

**KOYUN KARACİĞERİNDEN ALDOZ
REDÜKTAZ VE SORBİTOL DEHİDROGENAZ
ENZİMLERİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE
BAZI FENOLİK ASİTLERİN ENZİM AKTİVİTESİ
ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Hatice Esra ASLAN

Yüksek Lisans Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Bilim Dalı

Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR

2015

Her hakkı saklıdır

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KOYUN KARACİĞERİNDEN ALDOZ REDÜKTAZ VE SORBİTOL
DEHİDROGENAZ ENZİMLERİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI
FENOLİK ASİTLERİN ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Hatice Esra ASLAN

**KİMYA ANABİLİM DALI
Biyokimya Bilim Dalı**

**ERZURUM
2015**

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

KOYUN KARACİĞERİNDEN ALDOZ REDÜKTAZ VE SORBİTOL
DEHİDROGENAZ ENZİMLERİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI
FENOLİK ASİTLERİN ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ

Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR danışmanlığında, Hatice Esra ASLAN tarafından hazırlanan bu çalışma 22/05/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı - Biyokimya Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak ~~oybirliği/oy~~ **çokluğu** (.../...) ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU

İmza : 

Üye : Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR

İmza : 

Üye : Prof. Dr. Ali KILINÇ

İmza : 

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 28/05/2015 tarih ve 21/736 nolu kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Ertan YILDIRIM
Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KOYUN KARACİĞERİNDEN ALDOZ REDÜKTAZ VE SORBİTOL DEHİDROGENAZ ENZİMLERİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI FENOLİK ASİTLERİN ENZİMLERİN AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Hatice Esra ASLAN

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR

Aldoz redüktaz [E.C 1.1.1.21] ve sorbitol dehidrogenaz [EC 1.1.1.14] enzimleri koyun karaciğerinden saflaştırıldı. AR enzimi homojenat hazırlanması, amonyum sülfat çöktürmesi, DE-52 Selüloz iyon değişim, Sephadex G-100 jel filtrasyon ve 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi yöntemleri kullanılarak %2,11 verimle yaklaşık 161,9 kat saflaştırıldı. AR enzimi için optimum pH, optimum iyonik şiddet, optimum sıcaklık, aktivasyon enerjisi, aktivasyon entalpisi, Q10 ve stabil pH belirlendi. SDH enzimi ise koyun karaciğerinden homojenat hazırlanması, amonyum sülfat çöktürmesi, DE-52 Selüloz iyon değişim, CM-Selüloz C-52 iyon değişim ve Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi yöntemleri ile %0,53 verimle yaklaşık 9,07 kat saflaştırıldı. Enzimlerin saflığını kontrol etmek ve alt birim molekül kütlelerini tespit etmek amacıyla SDS-PAGE yapıldı ve enzimlerin alt birim molekül kütlesi koyun karaciğeri AR enzimi için 38,82 kDa ve SDH enzimi için 37,74 kDa olarak belirlendi. Ayrıca aldoz redüktaz enziminin substratı için K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı. Daha sonra koyun karaciğeri AR ve SDH enzimi aktivitesi üzerine bazı fenolik asitlerin etkileri araştırıldı. İnhibisyon etkisi gösteren fenolik asitler için Linewear-Burk grafikleri ile K_i sabitleri ve inhibisyon tipleri tespit edildi.

2015, 143 sayfa

Anahtar Kelimeler: Aldoz redüktaz, sorbitol dehidrogenaz, koyun karaciğeri, inhibisyon

ABSTRACT

Master Thesis

PURIFICATION OF ALDOSE REDUCTASE AND SORBITOL DEHYDROGENASE ENZYMES FROM SHEEP LIVER AND INVESTIGATION OF SOME PHENOLIC ACIDS EFFECTS ON ENZYMES ACTIVITY

Hatice Esra ASLAN

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

Supervisor: Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR

Aldose reductase [E.C 1.1.1.21] and sorbitol dehydrogenase [EC 1.1.1.14] were purified from sheep liver. AR was purified with a yield 2.11% and approximately 161.9 fold by preparation of homogenates, ammonium sulphate precipitation, DE-52 Cellulose ion-exchange, Sephadex G-100 gel filtration and 2',5'-ADP Sepharose 4B affinity chromatography techniques. Optimal pH, optimal ionic strength, optimal temperature, activation energy, activation enthalpy, Q_{10} and stable pH were determined for AR enzyme. SDH was purified with a yield 0.53% and approximately 9.07 purification fold by preparation of homogenates, ammonium sulphate precipitation, DE-52 cellulose ion-exchange, CM-Selüloz C-52 ion-exchange and Sephadex G-100 gel filtration chromatography techniques. To check the purity and determine subunit molecular weights of enzymes, SDS-PAGE was performed which showed a single band and MW of approximately 38.82 kDa for sheep liver AR and 37.74 kDa for sheep liver SDH. In addition, K_M and V_{max} values for substrate of AR enzyme were calculated. Then effects of phenolic acids on sheep liver AR and SDH enzymes activities were investigated. For phenolic acids that exhibit inhibitory effect K_i constants were calculated and inhibition types were determined by the help Lineweaver-Burk curves.

2015, 143 pages

Keywords: Aldose reductase, sorbitol dehydrogenase, sheep liver, inhibition

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmanın deneysel kısmı Prof. Dr. Sayın Şükrü BEYDEMİR yönetiminde, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Öncelikle çalışmalarım sırasında bilgi ve deneyimleriyle bana her zaman yol gösteren, hoşgörü ve sabırla her konuda beni destekleyerek her türlü yardım ve desteği sağlayan değerli danışman hocam Prof. Dr. Sayın Şükrü BEYDEMİR'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca Kimya Bölümü Biyokimya Bilim Dalı öğretim üyelerinden değerli hocalarım Prof. Dr. Sayın Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU'na, Prof. Dr. Sayın İlhami GÜLÇİN'e, Prof. Dr. Sayın Hasan ÖZDEMİR'e ve Yrd. Doç. Dr. Sayın Halis ŞAKİROĞLU'na teşekkür ederim.

Çalışmalarım esnasında bilgi ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli grup arkadaşlarım Arş. Gör. Dr. Sayın Zuhâl ALİM'a, Yrd. Doç. Dr. Sayın Namık KILINÇ'a, Sayın Mesut IŞIK'a ve Sayın Yeliz Demir'e teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmalarım boyunca benden maddi manevi desteklerini esirgemeyen başta babam Prof. Dr. Sayın Kadir ASLAN olmak üzere annem Gülizar ASLAN ve ablam Rabia ASLAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hatice Esra ASLAN

Mayıs, 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.....	6
1.2. Poliöl (Sorbitol) Yolu ve Metabolik Önemi.....	9
1.3. Aldoz Redüktaz Enzimi.....	14
1.4. Sorbitol Dehidrogenaz Enzimi.....	18
1.5. Fenolik Bileşikler.....	21
1.6. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Fenolik Bileşikler.....	22
1.6.1. 3,4-Dihidroksi benzoik asit.....	23
1.6.2. 3,5-Dihidroksi benzoik asit.....	23
1.6.3. 3-Hidroksi benzoik asit.....	24
1.6.4. 4-Hidroksi benzoik asit.....	24
1.6.5. Salisilik asit.....	25
1.6.6. p-Kumarik asit.....	25
1.6.7. Elagik asit.....	26
1.6.8. Gallik asit.....	26
1.6.9. Ferulik asit.....	27
1.6.10. Kafeik Asit.....	28
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	29
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	35
3.1. Materyal.....	35
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	35
3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar.....	37
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması.....	38

3.1.3.a. AR enziminin aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler	38
3.1.3.b. AR enzimi için homojenatın hazırlanmasında kullanılan çözeltiler	38
3.1.3.c. AR enziminin diyalizinde kullanılan çözelti	38
3.1.3.d. AR için hazırlanan DE-52 Selüloz iyon değişim kromatografisinde kullanılan çözeltiler	38
3.1.3.e. AR için hazırlanan Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisinde kullanılan çözeltiler	39
3.1.3.f. AR için hazırlanan afinite kolonunda kullanılan çözeltiler	39
3.1.3.g. AR enziminin kinetik çalışmalarında kullanılan çözeltiler ve hazırlanmaları.....	39
3.1.3.h. SDH enziminin aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler	40
3.1.3.ı. SDH enzimi için homojenatın hazırlanmasında kullanılan çözeltiler	40
3.1.3.i. SDH enziminin diyalizinde kullanılan çözelti	41
3.1.3.j. SDH için hazırlanan DE-52 Selüloz iyon değişim kromatografisinde kullanılan çözelti	41
3.1.3.k. SDH için hazırlanan CM-Selüloz C-52 iyon değişim kromatografisinde kullanılan çözelti	41
3.1.3.l. SDH için hazırlanan Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisinde kullanılan çözelti	42
3.1.3.m. Proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözeltiler	42
3.1.3.n. Elektroforez için kullanılan çözeltiler	42
3.1.3.o. Gümüş boyamada kullanılan çözelti	43
3.1.3.ö. AR enzimi inhibisyon çalışmalarında kullanılan fenolik asitlerin hazırlanması	43
3.1.3.p. SDH enzimi inhibisyon çalışmalarında kullanılan fenolik asitlerin hazırlanması	44
3.2. Yöntem	45
3.2.1. AR enziminin aktivite ölçümü	45
3.2.2. Protein tayini	46
3.2.2.a. Kalitatif protein tayini	46
3.2.2.b. Kantitatif protein tayini	46
3.2.3. Koyun karaciğeri AR enziminin saflaştırılması	47

3.2.3.a. Homojenatın hazırlanması	47
3.2.3.b. Amonyum sülfat çöktürmesi	47
3.2.3.c. Diyaliz	48
3.2.3.d. DE-52 Selüloz iyon değişim kromatografisi	48
3.2.3.e. Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi.....	50
3.2.3.f. 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonunun hazırlanması ve koyun karaciğeri AR enziminin saflaştırılması.....	50
3.2.4. Sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile AR enzim saflığının kontrolü.....	51
3.2.5. Sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile AR enziminin molekül kütlesi tayini	52
3.2.6. AR enzimi için karakterizasyon çalışmaları.....	53
3.2.6.a. AR enzimi için optimum pH belirlenmesine yönelik çalışmalar	53
3.2.6.b. AR enzimi için optimum iyonik şiddetin belirlenmesine yönelik çalışmalar	53
3.2.6.c. AR enzimi için optimum sıcaklığın belirlenmesine yönelik çalışmalar	53
3.2.6.d. Koyun karaciğeri aldoz redüktaz enziminin aktivasyon enerjisinin (Ea), aktivasyon entalpisinin (ΔH) ve Q10 değerinin hesaplanması ile ilgili çalışmalar.....	53
3.2.6.e. AR enzimi için stabil pH belirlenmesine yönelik çalışmalar	54
3.2.6.f. DL-Gliseraldehit substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar	54
3.2.7. Koyun karaciğeri AR enziminin aktivitesi üzerine bazı fenolik asitlerin etkilerinin belirlenmesi	55
3.2.7.a. İnhibisyon etkisi gösteren fenolik asitler için IC_{50} ve K_i değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar.....	55
3.2.8. Koyun karaciğeri SDH enziminin aktivitesinin ölçümü	56
3.2.9. Protein tayini	57
3.2.9.a. Kalitatif protein tayini	57
3.2.9.b. Kantitatif protein tayini	57
3.2.10. Koyun karaciğeri SDH enziminin saflaştırılması.....	58
3.2.10.a. Homojenat hazırlanması	58

3.2.10.b. Amonyum sülfat çöktürmesi	59
3.2.10.c. Diyaliz	60
3.2.10.d. DE-52 Selüloz iyon değişim kromatografisi	60
3.2.10.e. CM-Selüloz C-52 iyon değişim kromatografisi	61
3.2.10.f. Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi	63
3.2.11. Sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile SDH enzim saflığının kontrolü	63
3.2.12. Sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile SDH enziminin molekül kütlesi tayini	65
3.2.13. Koyun karaciğeri SDH enziminin aktivitesi üzerine bazı fenolik asitlerin etkilerinin belirlenmesi.....	65
3.2.13.a. İnhibisyon etkisi gösteren bazı fenolik asitler için IC ₅₀ ve K _i değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar.....	66
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	67
4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik.....	67
4.2. Koyun Karaciğerinden Aldoz Redüktaz Enziminin Saflaştırılması.....	67
4.2.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi.....	67
4.2.2. Diyaliz	68
4.2.3. 1.DE-52 Selüloz iyon değişim kromatografisi sonuçları	68
4.2.4. 2.DE-52 Selüloz iyon değişim kromatografisi sonuçları	69
4.2.5. Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi sonuçları.....	70
4.2.6. 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi sonuçları	70
4.2.7. Koyun karaciğerinden saflaştırılan aldoz redüktaz enziminin SDS-PAGE ile saflık kontrolü	71
4.2.8. Koyun karaciğeri aldoz redüktaz enziminin SDS-PAGE ile mol kütesinin belirlenmesine yönelik sonuçlar	72
4.3. Koyun Karaciğerinden Sorbitol Dehidrogenaz Enziminin Saflaştırılması	73
4.3.1. Amonyum sülfat çöktürmesi	73
4.3.2. Diyaliz	74
4.3.3. DE-52 Selüloz iyon değişim kromatografisi sonuçları	74
4.3.4. CM-Selüloz C-52 iyon değişim kromatografisi sonuçları	74
4.3.5. Jel Filtrasyon kromatografisi sonuçları	75

4.3.6. Koyun karaciğerinden saflaştırılan SDH enziminin SDS-PAGE ile saflık kontrolü	76
4.3.7. Koyun karaciğeri SDH enziminin SDS-PAGE ile mol kütesinin belirlenmesine yönelik sonuçlar	77
4.4. Koyun Karaciğeri Aldoz Redüktaz Enziminin Karakterizasyon Çalışmaları ile İlgili Sonuçlar	78
4.4.1. Koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzimi için optimum pH bulunmasına yönelik sonuçlar	78
4.4.2. Koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzimi için optimum iyonik şiddetin belirlenmesine yönelik sonuçlar	80
4.4.3. Koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzimi için optimum sıcaklık belirlenmesine yönelik çalışma sonuçları	82
4.4.4. Koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzimi için aktivasyon enerjisi (E_a), aktivasyon entalpisi (ΔH) ve Q_{10} değerlerinin belirlenmesi sonuçları	83
4.4.5. Koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzimi için stabil pH belirlenmesine yönelik çalışma sonuçları	84
4.4.6. Koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzimi için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışma sonuçları	84
4.5. Koyun Karaciğeri Aldoz Redüktaz Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Fenolik Bileşiklerin Etkilerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışma Sonuçları.....	85
4.6. Koyun Karaciğeri Sorbitol Dehidrogenaz Enzimi Aktivitesi Üzerine Bazı Fenolik Bileşiklerin Etkilerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışma Sonuçları.....	102
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	119
KAYNAKLAR	133
ÖZGEÇMİŞ	144

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ΔH	Aktivasyon entalpisi
3-DG	3-deoksiglukozon
ADA	American Diabetes Association
AGE	İleri glikasyon ürünleri
AKR	Aldo-keto redüktaz
Ala	Alanin
AR	Aldoz redüktaz
ATP	Adenozintrifosfat
Cys	Sistein
DM	Diabetes Mellitus
DNA	Deoksiribonükleik asit
E.C.	Enzim komisyon numarası
E_a	Aktivasyon enerjisi
EI	Enzim-inhibitör kompleksi
ESI	Enzim-substrat-inhibitör kompleksi
EÜ	Enzim ünitesi
F-3-P	Fruktoz-3-fosfat
G-6-P	Glukoz-6-fosfat
GR	Glutasyon redüktaz
GSH	İndirgenmiş glutasyon
GSSG	Yükseltgenmiş glutasyon
His	Histidin
I	İnhibitör
IC_{50}	Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
IFT	Bozulmuş açlık toleransı
IGT	Bozulmuş glukoz toleransı
IUMB	Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği
İGÜ	İleri glikasyon ürünleri
K_i	Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti

K_M	Enzimin aktif bölgesinin yarısının substratla dolduğu andaki substrat konsantrasyonu
Leu	Lösün
M_K	Molekül kütlesi
NAD^+	Nikotinamidadenindinükleotit (yükseltgenmiş form)
$NADH$	Nikotinamidadenindinükleotit (indirgenmiş form)
$NADP^+$	Nikotinamidadenindinükleotitfosfat(yükseltgenmiş form)
$NADPH$	Nikotinamidadenindinükleotitfosfat (indirgenmiş form)
NO	Nitrik oksit
Nox	$NADH$ -oksidaz
OGGT	Oral glukoz tolerans testi
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PER	Amonyum persülfat
Phe	Fenil alanin
PKC	Protein kinaz C
Q10	Her $10^\circ C$ 'lik ısı artışı için reaksiyon hızında meydana gelen artış
R	İdeal gaz sabiti
RAGE	İleri glikasyon ürünleri
R_f	Proteinin yürüme mesafesinin boyanın yürüme mesafesine oranı
RNA	Ribonükleik asit
ROS	Serbest oksijen radikalleri
rpm	Devir/dakika
SDH	Sorbitol dehidrogenaz
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TEMED	N,N,N,N' -Tetrametilendiamin
Trp	Triptofan
Tyr	Tirozin
V_{max}	Maksimum hız
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Poliöl (Sorbitol) Yolu	9
Şekil 1.2. Glikoliz ve poliöl yoluna giren glukozun akıbeti	11
Şekil 1.3. Hiperglisemi ile aktifleşen poliöl yolunun sebep olduğu diyabetik komplikasyonlar	12
Şekil 1.4. Poliöl yolu ve ROS ile ilişkisi	13
Şekil 1.5. İnsan aldoz redüktaz enziminin üç boyutlu yapısı.....	15
Şekil 1.6. Aldo z redüktaz enziminin aktif merkezi.....	16
Şekil 1.7. Sorbitol dehidrogenaz enziminin katalizlediği reaksiyon	18
Şekil 1.8. Koyun karaciğeri SDH enziminin üç boyutlu yapısı.....	19
Şekil 1.9. 3,4-Dihidroksi benzoik asit molekülünün yapısal formülü	23
Şekil 1.10. 3,5-Dihidroksi benzoik asit molekülünün yapısal formülü	23
Şekil 1.11. 3-Hidroksi benzoik asit molekülünün yapısal formülü	24
Şekil 1.12. 4-Hidroksi benzoik asit molekülünün yapısal formülü	24
Şekil 1.13. Salisilik asit molekülünün yapısal formülü	25
Şekil 1.14. p-Kumarik asit molekülünün yapısal formülü.....	26
Şekil 1.15. Elagik asit molekülünün yapısal formülü	26
Şekil 1.16. Gallik asit molekülünün yapısal formülü	27
Şekil 1.17. Ferulik asit molekülünün yapısal formülü.....	27
Şekil 1.18. Kafeik asit molekülünün yapısal formülü	28
Şekil 2.1. İnsandaki AR enzime ait genin kromozom üzerindeki lokalizasyonu	30
Şekil 2.2. Bazı AR inhibitörleri	34
Şekil 4.1. Bradford yöntemiyle proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart grafik.....	67
Şekil 4.2. Amonyum sülfat çöktürme aralığını gösteren grafik.....	68
Şekil 4.3. 1.DE-52 Selüloz iyon değişim kromatografisi sonuçlarını gösteren elüsyon grafiği	69
Şekil 4.4. 2. DE-52 Selüloz iyon değişim kromatografisi sonuçlarını gösteren elüsyon grafiği	69
Şekil 4.5. Jel filtrasyon kromatografisi sonuçlarını gösteren elüsyon grafiği.....	70

Şekil 4.6. 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi sonuçlarını gösteren elüsyon grafiği	70
Şekil 4.7. Koyun karaciğerinden saflaştırılan aldoz redüktaz enziminin SDS-PAGE ile saflık kontrolü	72
Şekil 4.8. SDS-PAGE ile çizilen R_f - $\log M_K$ grafiği.....	73
Şekil 4.9. Koyun karaciğeri SDH enziminin amonyum sülfat çöktürme aralığını gösteren grafik	73
Şekil 4.10. DE-52 Selüloz iyon değişim kromatografisi sonuçlarını gösteren elüsyon grafiği.....	74
Şekil 4.11. CM-Sephadex iyon değişim kromatografisi sonuçlarını gösteren elüsyon grafiği.....	75
Şekil 4.12. Jel filtrasyon kromatografisi sonuçlarını gösteren elüsyon grafiği.....	75
Şekil 4.13. Koyun karaciğerinden saflaştırılan SDH enziminin SDS-PAGE ile saflık kontrolü	77
Şekil 4.14. SDS-PAGE ile çizilen R_f - $\log M_K$ grafiği.....	78
Şekil 4.15. Koyun karaciğerinden saflaştırılan aldoz redüktaz enzimi için yapılan optimum pH çalışmasının sonucu çizilen Aktivite-pH grafiği.....	80
Şekil 4.16. Değişik konsantrasyonlardaki Na-fosfat (pH=5,5) tampon çözeltileri kullanılarak koyun karaciğerinden saflaştırılan aldoz redüktaz enziminin optimum iyonik şiddetini belirlemek için çizilen İyonik Şiddet-Aktivite grafiği.....	81
Şekil 4.17. Koyun karaciğerinden saflaştırılan aldoz redüktaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için çizilen Sıcaklık-Aktivite grafiği.....	82
Şekil 4.18. Koyun karaciğeri AR enziminin aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişim grafiği.....	83
Şekil 4.19. Değişik pH'lardaki NaH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzimi için çizilen stabil pH grafiği.....	84
Şekil 4.20. Koyun karaciğerinden saflaştırılan aldoz redüktaz enzimi için 5 farklı DL-gliseraldehit konsantrasyonunda çizilen Linewear-Burk grafiği	85
Şekil 4.21. 3,4-Dihidroksi benzoik asit'in koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	86

Şekil 4.22. 3,5-Dihidroksi benzoik asit'in koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	87
Şekil 4.23. 3-Hidroksi benzoik asit'in koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	88
Şekil 4.24. 4-Hidroksi benzoik asit'in koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	89
Şekil 4.25. Salisilik asit'in koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	90
Şekil 4.26. p-Kumarik asit'in koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	91
Şekil 4.27. Elagik asit'in koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	92
Şekil 4.28. Gallik asit'in koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	93
Şekil 4.29. Ferulik asit'in koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	94
Şekil 4.30. Kafeik asit'in koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	95
Şekil 4.31. Koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine 3,4-dihidroksi benzoik asit'in Linewear-Burk denklemi	96
Şekil 4.32. Koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine 3,5-dihidroksi benzoik asit'in Linewear-Burk denklemi	96
Şekil 4.33. Koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine 3-hidroksi benzoik asit'in Linewear-Burk denklemi	97
Şekil 4.34. Koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine 4-hidroksi benzoik asit'in Linewear-Burk denklemi	97
Şekil 4.35. Koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine salisilik asit'in Linewear-Burk denklemi.....	98
Şekil 4.36. Koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine p-kumarik asit'in Linewear-Burk denklemi.....	98
Şekil 4.37. Koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine elagik asit'in Linewear-Burk denklemi.....	99

Şekil 4.38. Koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine gallik asit'in Linewear-Burk denklemi.....	99
Şekil 4.39. Koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine ferulik asit'in Linewear-Burk denklemi.....	100
Şekil 4.40. Koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine kafeik asit'in Linewear-Burk denklemi.....	100
Şekil 4.41. 3,4-Dihidroksi benzoik asit'in koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	103
Şekil 4.42. 3,5-Dihidroksi benzoik asit'in koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	104
Şekil 4.43. 3-Hidroksi benzoik asit'in koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	105
Şekil 4.44. 4-Hidroksi benzoik asit'in koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	106
Şekil 4.45. Salisilik asit'in koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	107
Şekil 4.46. p-Kumarik asit'in koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	108
Şekil 4.47. Elagik asit'in koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	109
Şekil 4.48. Gallik asit'in koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	110
Şekil 4.49. Ferulik asit'in koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	111
Şekil 4.50. Kafeik asit'in koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine etkisi	112
Şekil 4.51. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine 3,4-dihidroksi benzoik asit'in Linewear-Burk denklemi.....	113
Şekil 4.52. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine 3,5-dihidroksi benzoik asit'in Linewear-Burk denklemi.....	113
Şekil 4.53. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine 3-hidroksi benzoik asit'in Linewear-Burk denklemi	114

Şekil 4.54. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine 4-hidroksi benzoik asit'in Linewear-Burk denklemi	114
Şekil 4.55. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine salisilik asit'in Linewear-Burk denklemi	115
Şekil 4.56. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine p-kumarik asit'in Linewear-Burk denklemi	115
Şekil 4.57. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine elagik asit'in Linewear-Burk denklemi.....	116
Şekil 4.58. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine gallik asit'in Linewear-Burk denklemi	116
Şekil 4.59. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine ferulik asit'in Linewear-Burk denklemi	117
Şekil 4.60. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine kafeik asit'in Linewear-Burk denklemi.....	117
Şekil 5.1. Diyabetin mikrovasküler komplikasyonları	120
Şekil 5.2. Diyabetin makrovasküler komplikasyonları.....	121

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Enzimlerin uluslararası sınıflandırılması	2
Çizelge 1.2. ADA 2003 kriterlerine göre diyabet tanısı ve bozulmuş glukoz toleransının derecelendirilmesi	7
Çizelge 1.3. İnsan dokusunda aldoz redüktaz miktarları	17
Çizelge 1.4. Çeşitli sıçan dokularında bulunan SDH miktarları	20
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve satın alındığı firmalar	35
Çizelge 3.2. Çalışmalar sırasında faydalanılan alet ve cihazlar	37
Çizelge 4.1. Koyun karaciğeri AR enziminin saflaştırma sonuçları	71
Çizelge 4.2. Koyun karaciğeri SDH enziminin saflaştırma sonuçları	76
Çizelge 4.3. 1M Na-Fosfat tamponu kullanılarak koyun karaciğerinden saflaştırılan aldoz redüktaz enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları	79
Çizelge 4.4. 1M Tris/HCl tamponu kullanılarak koyun karaciğerinden saflaştırılan aldoz redüktaz enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları	79
Çizelge 4.5. 1M Glisin/NaOH tamponu kullanılarak koyun karaciğerinden saflaştırılan aldoz redüktaz enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları	79
Çizelge 4.6. Koyun karaciğerinden saflaştırılan aldoz redüktaz enziminin optimum iyonik şiddet için Na-fosfat (pH=5,5) tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları	81
Çizelge 4.7. Koyun karaciğerinden saflaştırılan aldoz redüktaz enziminin optimum sıcaklık için Na-fosfat (pH=5,5) tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları	82
Çizelge 4.8. Koyun karaciğeri AR enzimi için aktivite ölçümünün logaritma değerleri	83
Çizelge 4.9. Koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine 3,4-dihidroksi benzoik asit'in etkisi	86

Çizelge 4.10. Koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine 3,5-dihidroksi benzoik asit'in etkisi	87
Çizelge 4.11. Koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine 3-hidroksi benzoik asit'in etkisi.....	88
Çizelge 4.12. Koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine 4-hidroksi benzoik asit'in etkisi.....	89
Çizelge 4.13. Koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine salisilik asit'in etkisi	90
Çizelge 4.14. Koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine p-kumarik asit'in etkisi	91
Çizelge 4.15. Koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine elagik asit'in etkisi	92
Çizelge 4.16. Koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine gallik asit'in etkisi	93
Çizelge 4.17. Koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine ferulik asit'in etkisi	94
Çizelge 4.18. Koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine kafeik asit'in etkisi	95
Çizelge 4.19. Koyun karaciğeri AR enzimi için bulunan IC ₅₀ değerleri K _i sabitleri ve inhibisyon türleri.....	101
Çizelge 4.20. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine 3,4-dihidroksi benzoik asit'in etkisi	103
Çizelge 4.21. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine 3,5-dihidroksi benzoik asit'in etkisi	104
Çizelge 4.22. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine 3-hidroksi benzoik asit'in etkisi	105
Çizelge 4.23. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine 4-hidroksi benzoik asit'in etkisi	106
Çizelge 4.24. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi salisilik asit'in etkisi	107
Çizelge 4.25. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi p-kumarik asit'in etkisi	108

Çizelge 4.26. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi elagik asit'in etkisi	109
Çizelge 4.27. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi gallik asit'in etkisi	110
Çizelge 4.28. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi ferulik asit'in etkisi	111
Çizelge 4.29. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi kafeik asit'in etkisi	112
Çizelge 4.30. Koyun karaciğeri SDH enzimi için bulunan IC_{50} değerleri K_i sabitleri ve inhibisyon türleri.....	118
Çizelge 5.1. Koyun karaciğeri AR enziminin saflaştırılması ile ilgili toplu sonuçlar	131
Çizelge 5.2. Koyun karaciğeri SDH enziminin saflaştırılması ile ilgili toplu sonuçlar	132

1. GİRİŞ

İnsanlık tarihinin başlangıcından bu yana hemen hemen tüm bilim insanları hayatı, canlılığı ve canlının hareketlerini açıklayabilmek için çalışma gelmişlerdir. Bu çalışmaların beraberinde canlı sisteme ait birçok bilinmezliğin çözümünü ortaya koymakla birlikte bize göre birçok karmaşıklığı da gün yüzüne çıkarmıştır. Fakat bu karmaşıklığın aslında kendi içerisinde bir düzenlilik olduğu da gözler önüne serilmiştir. Bütün bunlarla birlikte bilim insanları hayatın kaynağının ne olduğu konusunda net bir sonuç elde edememişlerdir. Fakat şu var ki canlılığın devamı için gerekli olan yapılar üzerinde çalışılmakta ve hala bu çalışmalar detaylandırılarak sürdürülmektedir. Bize göre çok karmaşık görülen enzimlerin üç boyutlu yapıları aslında bu ilginç moleküllerin en düzenli, en kararlı ve fonksiyonel halleridir.

Biyokimyasal reaksiyonların hemen hemen tamamı enzim denilen organik maddeler tarafından katalizlenmektedir. Bu maddeler kendileri bir değişikliğe uğramadan hücre içinde meydana gelen reaksiyonların hızını artırır. Enzimle katalize edilen reaksiyonlar enzimle katalize edilmeyen reaksiyonlara göre 10^3-10^7 kat daha hızlı cereyan ederler (Kalaycıoğlu *et al.* 2013; Nelson and Cox 2013).

Enzimler hücrelerde sentezlenen, protein yapısında olan ve biyolojik aktiviteye sahip makromoleküllerdir. Canlılar, pek çok çeşit enzim ihtiva ederler ve bu enzimler sayesinde düzenlemek suretiyle yaşamlarını devam ettirirler. Her enzim özel olarak bir reaksiyonu katalizlemektedir. Kimyasal katalizörlerin pek çoğunun çok çeşitli reaksiyonlarda katalizör olarak görev yaptıkları bilinmektedir. Buna karşılık enzimler genellikle spesifik bir reaksiyonu katalizlemektedirler (Gözükara 2011).

Enzimler, doğal ortamları dışında yeterli şartlar sağlanıldığında dış ortamlarda da aktivite gösterebilirler. Bundan dolayı pek çok alanda enzimlerden yararlanılabilmektedir. Bu nedenle enzimlerin yer aldıkları dokuların veya hücrelerin belirlenmesi, biyokimyasal reaksiyon işlevlerinin ortaya çıkarılması, etki

mekanizmalarının ve kinetik özelliklerinin tüm ayrıntıları ile incelenmesi büyük önem taşımaktadır (Kara 2009).

Enzim eksikliğinin kalıtsal olduğu genetik kusurlarda enzim aktivitesinin önemi daha çok anlaşılmaktadır. Bunun tersine bazı hastalıklarda spesifik bir enzimin aşırı aktivitesi hastalığın şiddetlenmesi yönünde canlıyı olumsuz etkileyebilmektedir. Bu nedenle enzimlerin inhibisyonu da önemli görülmektedir. Bu yönüyle enzim aktivitesi tayini hastalıkların tanısında ve teşhisinde önemli bir biyomarkır olabilmektedir. Bilindiği gibi ilaç molekülleri de etkilerini ya enzimleri inhibe ederek ya da aktive ederek göstermektedirler (Nelson and Cox 2013).

Enzimler katalizledikleri tepkimenin türüne göre sınıflandırılırlar. Tüm enzimlerin E.C. numaraları ve sistematik isimleri vardır (Nelson and Cox 2013)

Çizelge 1.1. Enzimlerin uluslararası sınıflandırılması (Nelson and Cox 2013)

SINIF ADI	KATALİZLENEN TEPKİMENİN TÜRÜ
Oksidoredüktazlar	Elektron aktarımı
Transferazlar	Grup aktarım tepkimeleri
Hidrolazlar	Hidroliz tepkimeleri
Liyazlar	Grupların uzaklaşması veya katılması ile çift bağ oluşumu
İzomerazlar	Molekül içi grup aktarımı ile izomerik yapı oluşumu
Ligazlar	Kondenzasyon tepkimeleriyle C-C, C-S, C-O ve C-N bağlarının oluşumu

Canlılık güçlü ve özgün katalizörler olan enzimlerin varlığıyla yakından ilgilidir. Çok iyi bilindiği gibi faaliyetlerini gerçekleştirirken canlıların beklemeye tahammülü yoktur. Örneğin insan, düşünürken aynı anda konuşabilir, görebilir, göz kapaklarını açıp kapatabilir, yürüyebilir ve ellerini oynatabilir. Bu demektir ki canlının tüm organ ve organelleri bir arada ve aynı zamanda çalışabilmektedir. Kısacası milyonlarca reaksiyon bir arada gerçekleşebilmektedir. Bu da ancak spesifik katalizörler sayesinde mümkündür. Birkaç katalitik RNA grubu dışında bilinen tüm enzimler protein yapısındadır. Birçok enzimin katalitik işlemlerini yerine getirebilmesi için protein yapısında olmayan koenzimler veya kofaktörler gereklidir (Nelson and Cox 2013).

Genel olarak enzimlerin özellikleri şu şekilde sıralanabilir;

- Etki ettiği maddenin sonuna ‘az’ eki getirilerek veya katalizlediği reaksiyonun çeşidine göre adlandırılırlar.
- Enzimler, hücre içinde sentezlenirler ve hücre içi ya da hücre dışında çalışırlar.
- Enzimler reaksiyonları başlatmaz, başlamış reaksiyonları hızlandırırlar.
- Enzimler etkilerini maddenin dış yüzeyinden başlatırlar ve maddelerin yüzeyi ne kadar geniş olursa etkinlikleri de o kadar hızlı olur.
- Enzimler takım halinde çalışabilirler. Birinin son ürünü kendisinden sonraki diğer enzimin substratı olabilir.
- Enzimler genellikle substrata spesifiktirler ve her enzim belirli bir reaksiyonu katalizler.
- Enzimli tepkimelerin büyük bir kısmı çift yönlüdür ve moleküllerin parçalanmasını veya birleşmesini sağlarlar.
- Denge noktası; yani, tepkimenin hangi yöne gideceği “termodinamik yasalarına” göre belirlenir.

Enzimlerin aktivitelerini etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Bunlar şu şekilde sıralanabilir;

- ✓ Enzim ve substrat konsantrasyonu
- ✓ Sıcaklık
- ✓ Ortamın pH'sı
- ✓ İnhibitör ve aktivatörler
- ✓ Zaman
- ✓ Reaksiyon ürünleri
- ✓ Çeşitli iyon konsantrasyonları
- ✓ Radyoaktivite
- ✓ Işık ve diğer fiziksel etmenler

Hücre içerisindeki fizikokimyasal şartlara göre enzimlerin aktivitelerinde bazı değişiklikler meydana gelebilmektedir. Bu durum ya enzim aktivasyonu ya da enzim inhibisyonu olarak gözlenmektedir (Nelson and Cox 2013).

Enzim aktivatörleri küçük iyonlar veya küçük yapılu moleküllerdir. Aktivatörler, sadece substratlarla birleşerek aktivatör rolü oynayan bileşikler ve serbest enzimlerle birleşerek aktivatör rolü oynayan bileşikler olmak üzere iki grupta toplanabilir (Gözükara 2011).

Enzim inhibitörleri, enzimin herhangi bir bölgesine bağlanarak enzimatik tepkimeleri yavaşlatan veya aksatan moleküllerdir. Enzim inhibitörlerinin çalışılması enzim mekanizmaları hakkında değerli bilgiler sağladığı gibi bazı metabolik yolların aydınlatılması için de yardımcı olmaktadır.

Enzim inhibisyonu dönüşümsüz inhibisyon ve dönüşümlü inhibisyon olmak üzere iki grupta incelenir (Nelson and Cox 2013).

Dönüşümsüz inhibisyonda inhibitör enzime dönüşümsüz olarak bağlanabilir veya enzim aktivitesi için gerekli olan fonksiyonel bir grup üzerinde bozucu etki yapabilir ya da kovalent olmayan kararlı bir yapı meydana getirebilir. Dönüşümsüz inhibitörler, tepkime mekanizmalarını incelemek ve aydınlatmak için bilim insanlarının çokça yararlandığı bir bağlanma çeşididir (Nelson and Cox 2013).

Dönüştürümlü inhibisyon üç grupta incelenmektedir;

- a) Yarışmalı (kompetitif) inhibisyon
- b) Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon
- c) Yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyon

Bir kısım inhibitörler substratın enzime bağlandığı enzimin aktif bölgesine bağlanmaktadır. Bu tür inhibisyon yarışmalı inhibisyonudur. Bu tip inhibitörlere ise substrat ile yarıştığı için yarışmalı inhibitör denilmektedir. Böylece enzimin aktif bölgesine substrat konsantrasyonundan daha büyük konsantrasyona sahip olan farklı bir molekül girmiş ve enzim inhibe edilmiş olur. Bu durumda enzimin bir kısmı EI kompleksi haline gelecek ve bu enzim molekülleri reaksiyona katılmayacaktır. Substrat konsantrasyonu arttırılmakla inhibisyon etkisi ortadan kaldırılabilir. Yani enzimin V_{max} değeri değişmezken, K_M değeri artar. (Gözükara 2011).

İnhibitör aktif merkezin dışında bir noktadan enzime bağlanarak inhibisyona sebep oluyorsa bu tip inhibitöre yarışmasız inhibitör, meydana gelen inhibisyona da yarışmasız inhibisyon denir. Yarışmasız inhibitörler genellikle enzimin üç boyutlu yapısında değişikliğe neden olarak inhibisyona sebep olmaktadır. Burada substrat ve inhibitör arasında yarışma söz konusu değildir. Substrat konsantrasyonu arttırılmakla inhibisyon kaldırılamaz. Enzimin V_{max} değeri azalırken, K_M değeri sabit kalır. Enzim moleküllerinden bir kısmı EI ve bir kısmı da ESI kompleksi halinde bulduklarından enzimin iki farklı inaktif kompleksi meydana gelir (Gözükara 2011).

Eğer bir inhibitör serbest bir enzime değil de ES kompleksine bağlanarak bir inhibisyona sebep oluyorsa bu tip inhibisyona da yarı yarışmalı inhibisyon denir. ESI kompleksi ortamda sürekli olarak var olacağından, yarı yarışmalı inhibitör varlığında V_{max} azalır. ESI kompleksinin oluşumuyla ES kompleksi ortamdan sürekli çekildiğinden, enzim ve substrattan ES kompleksinin oluşum dengesi daha fazla sağa kayar ve K_M değeri küçülür (Gözükara 2011).

1.1. Diabetes Mellitus

Diabetes Mellitus, insülin yapımındaki yetersizlik veya insülinin etkisini engelleyen faktörler nedeniyle ortaya çıkan, kan glukoz düzeyinin artması (hiperglisemi) ve keton cisimciklerinin yol açtığı asidoz (ketoasidoz) ile kendini gösteren metabolik bir bozukluktur. Hiperglisemi, endotel, kalp, böbrek, göz ve sinir gibi glukoz taşımını insüline bağlı olmayan dokularda glukoz düzeyini artırır. Bu durumun çeşitli komplikasyonlara ve bu dokularda hasara sebep olduğu bilinmektedir (Kawasaki *et al.* 1998; Oates 2002). Diyabetin oluşmasındaki temel neden, dolaşımdaki insülinin eksikliği veya periferik dokuların insüline yanıt verme yeteneğinin azalmasından kaynaklanmaktadır (insülin rezistansı).

Diyabetin gelişiminde çeşitli faktörler rol oynamaktadır. Bunların en önemlisi pankreatik β -hücrelerindeki hasar sonucu oluşan insülin yetmezliği ve bazı anomaliler sonucu periferik hücrelerde meydana gelen insülin direncidir. Diyabetik kişilerde karbohidrat, yağ ve protein metabolizmasındaki bozuklukların temeli, insülin hormonunun hedef dokulardaki yetersiz etkisine dayanmaktadır (Anonymous 2005 2010).

1997-2003 yıllarında “Amerikan Diyabet Birliği” (American Diabetes Association, ADA) ve 1999 yılında da “Dünya Sağlık Örgütü” (World Health Organization, WHO) tarafından diyabetin tanı kriterleri tekrardan düzenlenmiş ve tanı için aşırı susama, aşırı idrara çıkma, aşırı yeme, glukozüri, ketonüri ve açıklanamayan kilo kaybı gibi belirtilerin yanı sıra kan-glukoz değerinin de önemli olduğu vurgulanmıştır. Buna göre, tokluk kan glukoz düzeyinin 200 mg/dL ve üzerinde olması veya en az 8 saatlik açlıktan sonra plazma glukoz düzeyinin 126 mg/dL ve üzerinde bulunması, diyabet tanısı için yeterli görülmüştür (Anonymous 2004; Engelgau 2004; Clee and Attie 2007). Açlık kan glukoz düzeyi 100 mg/dL altında ise veya şeker yüklemesinden sonraki 2. saatte ölçülen kan glukoz düzeyi 140 mg/dL altında ise bu bireylerin normal kan glukoz düzeylerine sahip oldukları belirtilmiştir (Anonymous 2003).

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

Çizelge 1.2. ADA 2003 kriterlerine göre diyabet tanısı ve bozulmuş glukoz toleransının derecelendirilmesi (Anonymous 2003)

KATEGORİ	AÇLIK PLAZMA GLUKOZU	OGTT 2. SAAT GLUKOZU
Normal	< 100 mg/dL	< 140 mg/dL
IFT (Bozulmuş Açlık Toleransı)	*100–125 mg/dL	-----
IGT (Bozulmuş Glukoz Toleransı)	-----	140-199 mg/dL
Diabetes Mellitus	≥ 126 mg/dL	≥ 200 mg/dL
*Açlık plazma glukoz değeri IFT çıkarsa OGTT uygulanır.		

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından evrensel bir sağlık sorunu olarak kabul edilen diyabet, günümüzde sorgulanan ve tekrar gözden geçirilen iki tipte incelenir.

Tip I Diabetes Mellitus: Pankreas hücrelerinin zedelenmesi veya total kaybına bağlı olarak gelişen insülin eksikliği ile ortaya çıkan ve insüline bağımlı olarak sürüp giden diyabet tipidir. Tip I diyabet tanısı için, insülin bağımlı başlangıç şekli gereklidir (İnan 2014; Report of expert committee on diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care 2003).

Tip II Diabetes Mellitus: İnsülin yetersizliği ve/veya insüline bağımlı olan kas ve yağ dokusu gibi periferik dokularda, insüline yanıt verme yeteneğinin azalması (insülin direnci) ile meydana gelen bir diğer diyabet tipidir (Patricia *et al.* 2003; Alım 2010).

Normal şartlarda insülin, plazmadaki glukozun, okside olarak enerji üretiminde kullanmak veya glikojen şeklinde depolanmak üzere kas ve yağ dokusu gibi periferik dokulara taşınmasını sağlar. Aynı zamanda, insülin karaciğerdeki glikojenoliz (glikojen yıkımı) ve glukoneogenezi (glukoz yapımı) baskılayarak hepatik glukoz üretimini engeller (Donkin *et al.* 1997).

İnsülin direncinin gelişmesi durumunda, periferik dokularda direnç oluşarak kas ve yağ dokusundaki insülin aracılı glukoz kullanımı azalmakta, karaciğerdeki glukoz üretimi bozulmaktadır. İnsülin direncine karşı, plazma glukoz düzeyinin yükselmemesi için pankreas β -hücreleri normalden 1,5-2 kat daha fazla insülin üretmektedir. İnsülin direncinde, pankreasın daha fazla çalışarak normal glukoz düzeyini sağlaması, zamanla β -hücrelerinde fonksiyon kaybına neden olmakta ve buna bağlı olarak insülin sentezi azalarak Tip II diyabetin ortaya çıkmasına sebep olmaktadır (Ferrannini *et al.* 1987; Hollenbeck and Reaven 1987).

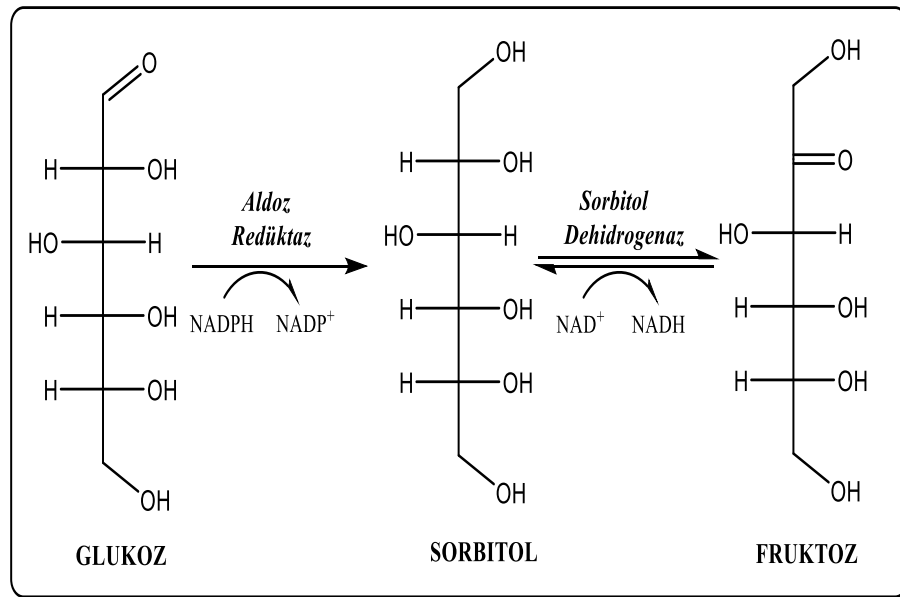
Diyabetik komplikasyonlar mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlar olmak üzere ikiye ayrılır. Mikrovasküler komplikasyonlar; retinopati, nefropati ve nöropati olarak, makrovasküler komplikasyonlar ise koroner kalp hastalığı, periferik damar hastalığı ve serebrovasküler hastalıklar olarak sınıflandırılmaktadır (Kurt *et al.* 2004).

Kan şekerinin yüksek olması durumunda bazı metabolik yolların aktivitesi artar ve bu metabolik yolların birbiriyle olan etkileşimleri değişerek, diyabetik komplikasyonlara sebep olur (UKPDS 1998; Temelkova-Kurktschiev *et al.* 2000). Bu metabolik yollar ise polioll yolu (Oates 2008; Zimmet and Alberti 2001), glukoz oksidasyonu (Lipinski 2001; Ostenson 2001; Jakus and Rietbrock 2004), protein kinaz C (PKC) aktivasyonu (Brownlee 2001), nonenzimatik glikasyon ve ileri glikasyon ürünleri (İGÜ) oluşumudur (Chappey *et al.* 1997; Yamagishi and Takeuchi 2004).

1.2. Poliöl (Sorbitol) Yolu ve Metabolik Önemi

Sorbitol yolu da denilen poliöl yolu, hiperglisemi durumunda önemli rol oynayan glikoliz metabolizmasının küçük bir yoludur. Bu metabolik yol hız-sınırlayıcı bir enzim olan aldöz redüktaz (AR) ve sorbitol dehidrogenaz (SDH) enzimlerinden oluşmaktadır (Gleissner *et al.* 2007).

Poliöl yolu diyabetik hiperglisemi durumunda meydana gelen ve hücrel toksisiteyi açıklayan en önemli mekanizmadır. Kan şekeri arttığında poliöl yolu aktifleşir ve hücrede sorbitol ve fruktoz birikimi meydana gelir.



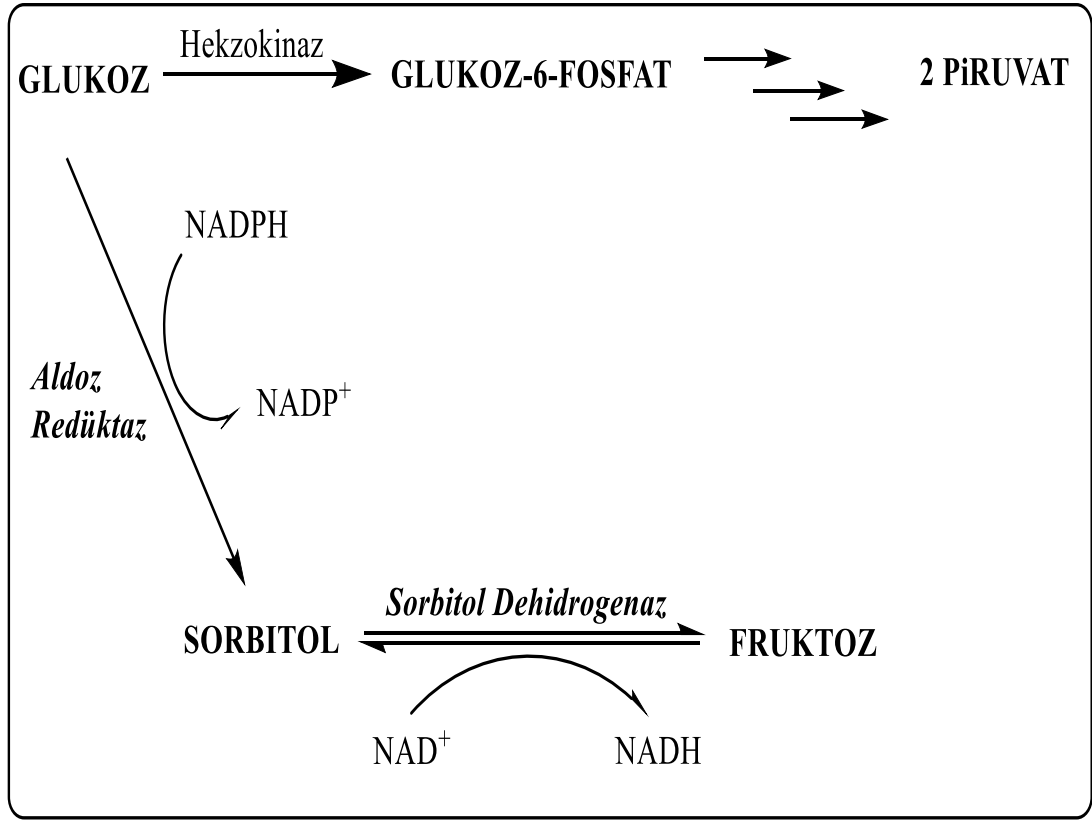
Şekil 1.1. Poliöl (Sorbitol) Yolu (Alım and Beydemir 2012)

Normal şartlarda, glikoliz yolunda glukoz molekülü, glukoz için yüksek afiniteye sahip olan heksokinaz enzimi tarafından fosforillenerek glukoz 6-fosfata (G-6-P) metabolize edilmektedir. Bu koşullarda aldöz redüktaz enziminin glukoz için afinitesi çok düşük olduğundan, fosforillenmemiş glukozun sadece yaklaşık %3'ü poliöl yoluna katılarak sorbitole ve oluşan sorbitol de sorbitol dehidrogenaz enzimi aracılığıyla fruktoza metabolize olmaktadır. Oluşan sorbitol böbreklerde osmotik regülasyonu, fruktoz ise

seminal vezikülerde sperm hücrelerinin enerji ihtiyacını karşılamaktadır (Yabe-Nishimura 1998).

Hücre içine glukoz girişi yönünden lens, retina, beyin, sinirler, eritrosit, böbrek, karaciğer, pankreas adacıkları, aort, kapiller damarlar ortak özelliğe sahiptirler. Bu dokularda glukoz hücrelere insülin den bağımsız olarak girebilmekte ve hücre içi glukoz konsantrasyonu doğrudan doğruya kan glukoz konsantrasyonuna bağılı olarak değişmektedir. Bu nedenle hiperglisemi durumunda hücre içi glukoz konsantrasyonu yükseldiğinden dolayı heksokinaz enzimi çok miktarda glukozu fosforilleyerek fosforillenmiş glukoz miktarını artırmaktadır. Heksokinaz enzimi ürünü tarafından inhibe olabilen bir enzimdir. Bu nedenle fosforillenmiş glukoz miktarının artması ile heksokinaz enzimi inhibe olur. Sonuçta glukozun fosforillenmesi duracak ve böylece fosforillenmemiş glukoz molekülleri glikoliz yoluna yönelemeyecektir. Glukoz düzeyinin normal olduğu durumda glukozu ilğisi düşük olan aldoz redüktaz enzimi hiperglisemi durumunda devreye girerek glukoz molekülünü ‘poliol’ yoluna yönlendirmektedir (Cameron and Cotter 1997).

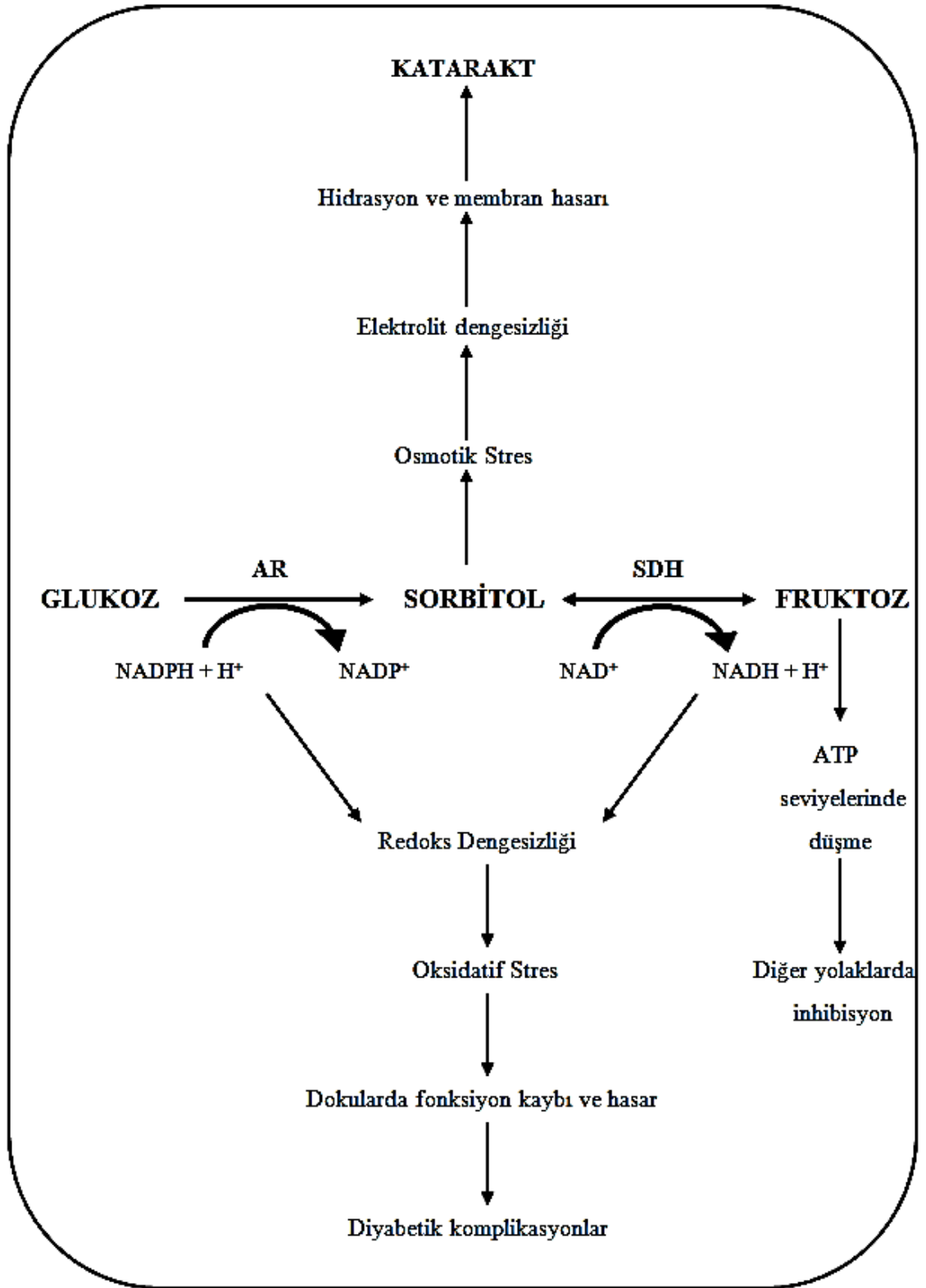
İnsülin den bağımsız olan dokularda glukoz konsantrasyonunun artmasıyla aktive olan poliol yolunun ilk enzimi aldoz redüktaz, NADPH’den aldığı elektronları glukozu aktararak, glukozun sorbitole indirgenmesini sağlamaktadır. Sorbitol ise, sorbitol dehidrogenaz aracılığı ile (NAD^+ kofaktörünün indirgenmesiyle) fruktoza okside olmaktadır. Bir alkol ürünü olan ve hidrofilik özellik taşıyan sorbitol, hücre zarından kolayca geçemediği için hücre içinde birikerek osmotik strese neden olmaktadır (Lorenzi 2007).



Şekil 1.2. Glikoliz ve poliöl yoluna giren glukozun akıbeti (González *et al.* 1984)

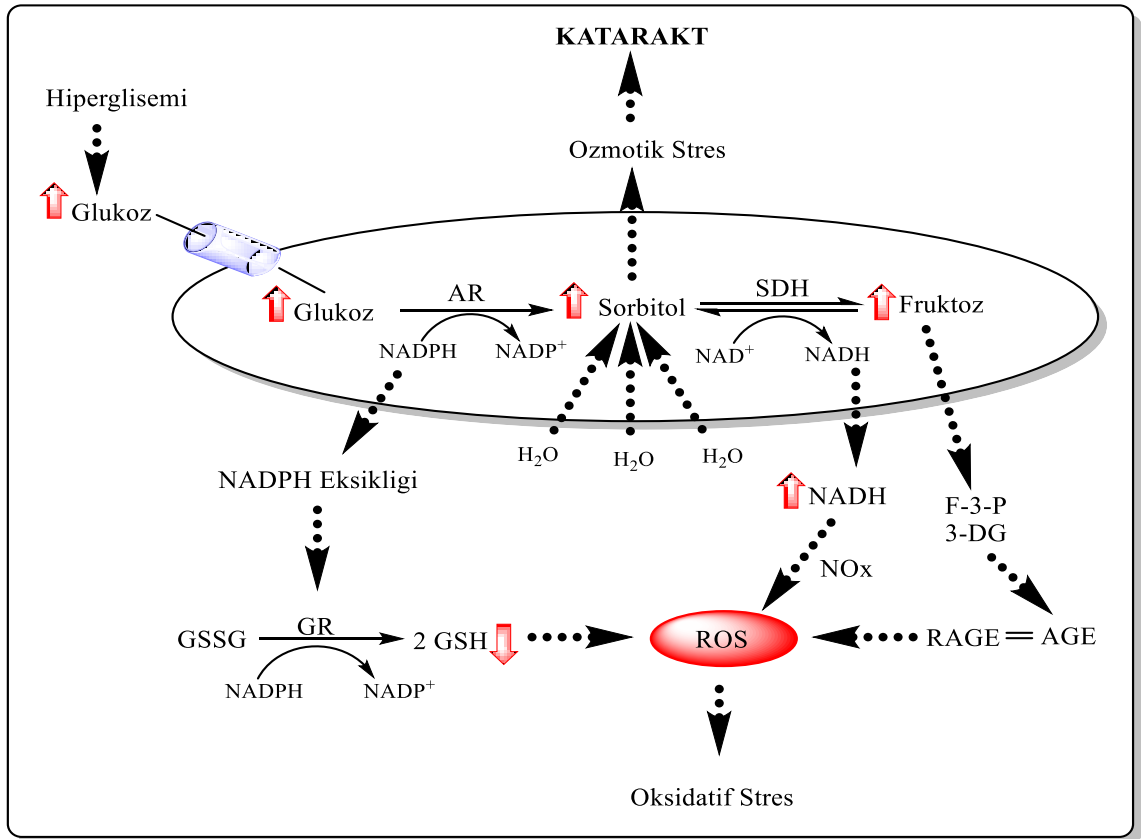
Diyabette görülen sürekli hiperglisemi durumunda aktifleşen poliöl yolu ile özellikle göz, böbrek, sinir, kalp ve kan damarları gibi çeşitli dokularda fonksiyon kayıpları görülmektedir (Anonymous 2004). Zamanla bu dokulara ait mikrovasküler komplikasyonlar (katarakt, diyabetik retinopati, nöropati ve nefropati) ve makrovasküler komplikasyonlar (kardiyovasküler, periferel arteriyel ve serebrovasküler hastalıklar) ortaya çıkmaktadır (King *et al.* 2005; Klip *et al.* 1994; Iwata *et al.* 2007).

Diyabetik sorbitol birikimi erken dönemde aldöz redüktaz inhibitörleri kullanılarak önlenmektedir. Hiperglisemiye engel olacak glukoz regülasyonu sağlanamazsa olay geri dönüşümsüz olduğundan dolayı nöropati, retinopati, nefropati oluşumu önlenemez duruma gelir (Yenigün ve Altuntaş 2001).



Şekil 1.3. Hiperglisemi ile aktifleşen polioll yolunun sebep olduğu diyabetik komplikasyonlar (Srivastava 2005)

Aldoz redüktaz, NADPH kofaktörünün de varlığında, serbest oksijen radikalleri (ROS) kaynaklı aldehitleri inaktif alkollere dönüştürmesinin yanında glukozu da sorbitole indirgeyen bir enzimdir. Aldoz redüktaz aktivitesinin yüksek olduğu hücrelerde NADPH'ın tükenmesi GSH seviyesinde artışa sebep olduğu için oksidatif stresin de artmasına sebep olmaktadır (Brownlee 2001).



Şekil 1.4. Poliöl yolu ve ROS ile ilişkisi (Alım and Beydemir 2012)

Hiperglisemiye bağlı doku hasarlarının oluşumundaki mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılmamış olsa da pek çok hipotez poliöl yoluna odaklanmıştır (Nishikawa *et al.* 2000; Oates 2002)

Poliöl yolunun ikinci ürünü olan fruktoz, fruktoz-3-fosfat ve sonra da 3-deoksiglukozon'a yıkılmaktadır. Her iki bileşik de, ileri glikolizasyonun son ürünlerinin oluşumunda görev almaktadırlar (Lorenzi 2007).

Glukozun, sorbitole indirgenmesi sırasında proton vericisi olarak görev alan NADPH'ın kullanılması sonucunda NADPH/NADP⁺ oranı azalmaktadır (Morrisey *et al.* 1999).

Antioksidan savunma sisteminde görevli olan glutatyonun (GSH) indirgenmesini sağlayan glutatyon redüktaz (GR) enzimi de NADPH bağımlı bir enzimdir. Bu sebeple, poliol yolunda NADPH'ın kullanılması, glutatyon redüktaz enzim aktivitesinin azalmasına ve hücrede oksidatif stresin birikmesine yol açmaktadır (Bravi *et al.* 1997; Yabe-Nishimura 1998).

NADPH'in bir diğer önemi ise, arjininden nitrik oksit sentaz enzimi (NOS) ile nitrik oksit oluşumunda indirgen ajan olarak görev almasıdır. Hücrenin NADPH havuzunun boşalması, NO sentezinin azalmasına, bu durumda damarlarda kan akışının azalmasına ve sinirlerde iletim hızının yavaşlamasına neden olduğu bilinmektedir (Yabe-Nishimura 1998; Chan *et al.* 2000; Gugliucci 2000).

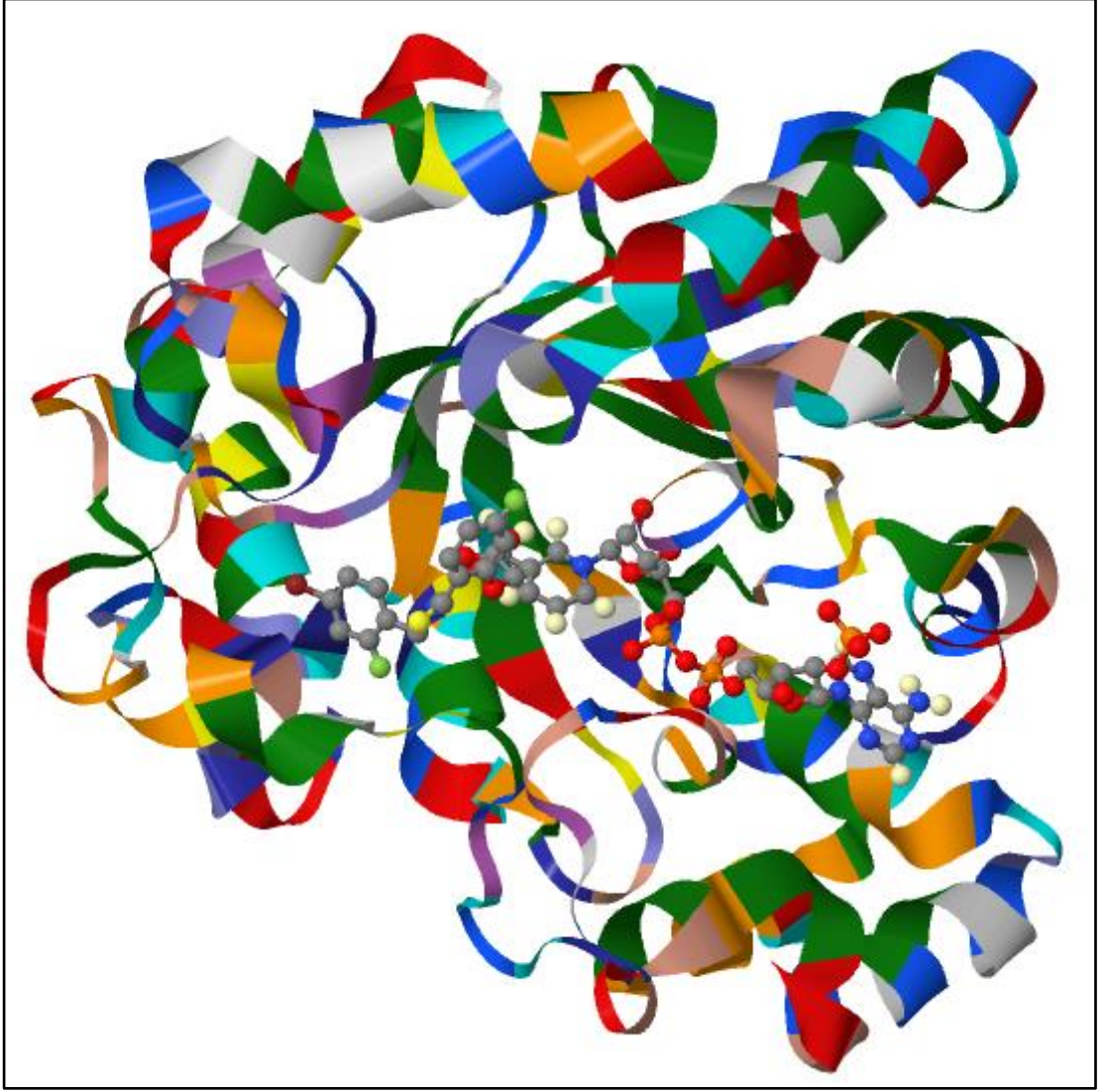
1.3. Aldoz Redüktaz Enzimi

Enzim komisyonu tarafından E.C. 1.1.1.21 kodu verilen aldoz redüktaz (AR) enzimi, aldo-keto redüktaz süper ailesinin bir üyesi (Jez *et al.* 1997), substrattaki aldehit grubunun redüksiyonundan sorumlu, NADPH kofaktörüne bağımlı, poliol yolunun ilk enzimidir (Hers 1956).

AR, yaklaşık 36 kDa ağırlığında, 315 aminoasit dizisinden oluşan ve hücre sitozolünde yer alan monomerik yapıda bir enzimdir (Kumar and Reddy 2007). Carper ve arkadaşları (1989) aldoz redüktaz enziminin primer yapısını ilk kez sıçan lensinde tayin etmişlerdir.

Yapılan birçok araştırma sonucunda aldoz redüktaz enziminin poliol yolunda D-glukozun D-sorbitole indirgenmesinden sorumlu olduğu (Kador 1988) ve bu reaksiyonun hiperglisemide, diyabetin komplikasyonları ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Sarges and Oates 1993).

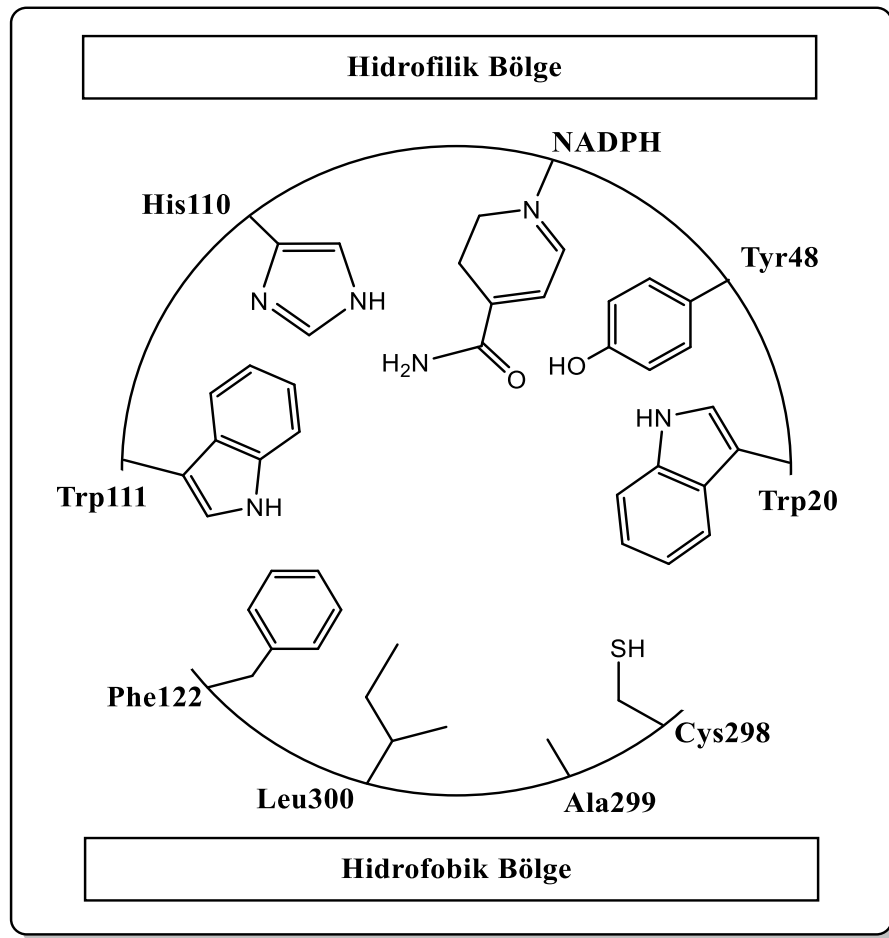
AR enzimi, polipeptidlerin β/α katlanması ile oluşmuş fiçi yapısındadır. Bu modelin merkezinde uç uca eklenmiş olan beta zincirlerinin etrafını, alfa helikslerin sarmasıyla β/α fiçi yapısı oluşmaktadır (Costantino *et al.* 1999).



Şekil 1.5. İnsan aldoz redüktaz enziminin üç boyutlu yapısı (Blakeley *et al.* 2008)

Enzimin β fiçi yapısının karboksi-terminal ucunda yer alan 60\AA genişliğinde ve 15\AA derinliğindeki aktif bölgesi, hidrofilik ve hidrofobik olmak üzere iki kısımdan meydana gelmektedir (Bohren *et al.* 1992; Kim *et al.* 2006).

Nükleotit yapısındaki kofaktörün nikotinamid halkası fiçimin iç kısmında, pirofosfat kısmı ise yapının kenarında yer almaktadır. Hidrofilik kısımda, NADPH'nin nikotinamid halkasının 4-pro-R hidrojeni ve 3 adet proton verici amino asitin (Tyr, His, Trp) yan grupları yer alırken, hidrofobik kısımda ise, inhibitör ve/veya substratın aromatik halka yan gruplarıyla etkileşime girebilen aminoasitlerin (Phe, Leu, Ala ve Cys) yan grupları bulunmaktadır (Kim *et al.* 2006).



Şekil 1.6. Aldoz redüktaz enziminin aktif merkezi (Kim *et al.* 2006)

Pek çok dokuda bulunmakta olan AR enzimi, böbrek, lens, beyin, karaciğer ve iskelet kasında yüksek konsantrasyonlarda bulunmuştur (Flynn *et al.* 1975; Wermuth *et al.* 1977). Enzim düzeylerinin, diyabetik komplikasyonların hedef dokularında daha yüksek

miktarda olması, bu komplikasyonların oluşumundan aldoz redüktazın sorumlu olduğunu işaret etmektedir (Tanimoto *et al.* 1998).

Çizelge 1.3. İnsan dokusunda bulunan 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

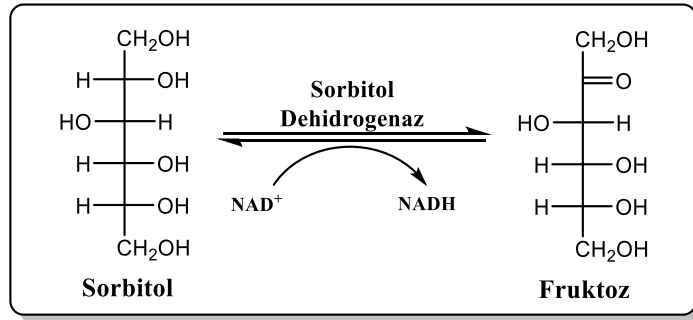
Antijen-antikor etkileşmesine dayanan bir analiz yöntemi kullanılarak, insanın çeşitli dokularından izole edilen sitozolik aldoz redüktaz enzim konsantrasyonlarına Çizelge 1.3'de yer verilmiştir. Buna göre, enzim konsantrasyonunun en fazla böbrek medullasında, siyatik sinirlerde ve lenste olduğu görülmektedir (Tanimoto *et al.* 1998).

Sıçan ve insan AR'ı, aminoasit dizilişleri bakımından yüksek benzerlik göstermektedir (Carper *et al.* 1987; Nishimura *et al.* 1990; Pailhoux *et al.* 1990; Fabre *et al.* 1994).

Biyokimyasal ve immünohistokimyasal incelemeler sonucunda da insan ve sıçan böbreğinde bulunan AR dağılımının benzer olduğunu anlaşılmıştır (Terubayashi *et al.* 1989).

1.4. Sorbitol Dehidrogenaz Enzimi

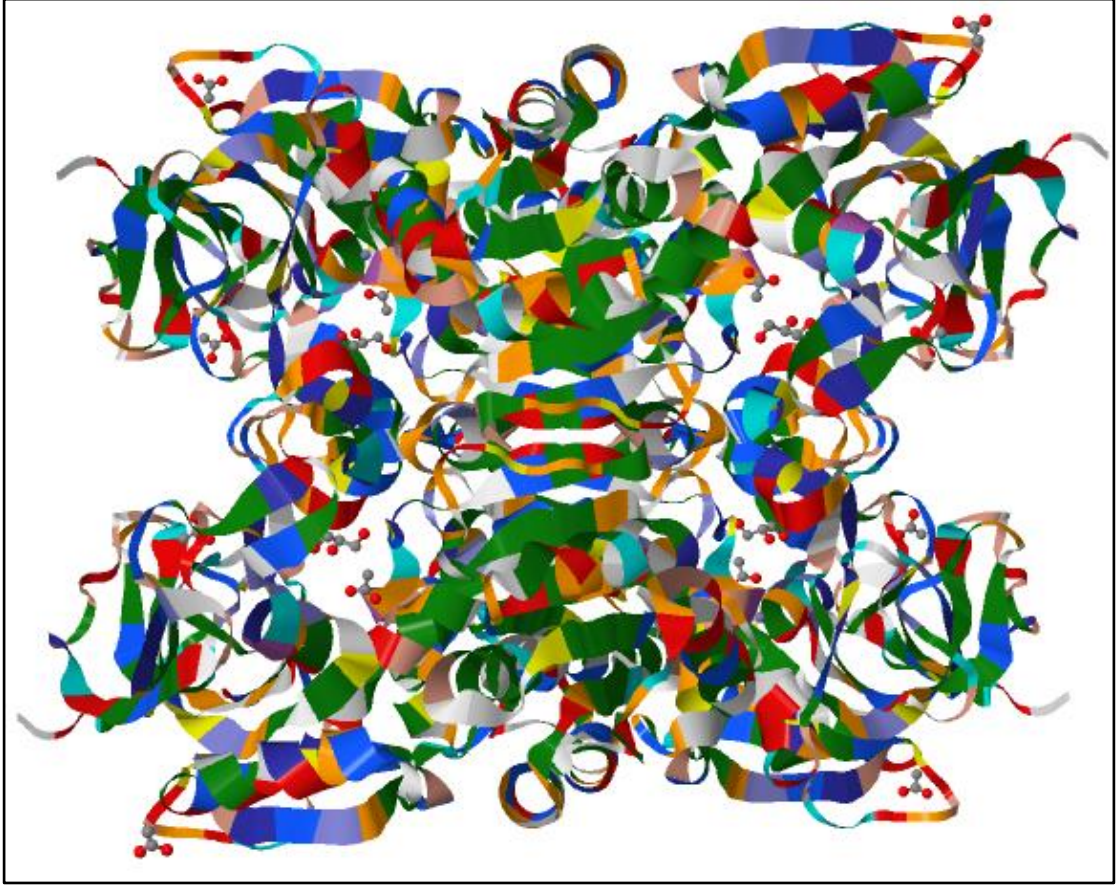
Sorbitol yolu olarak adlandırılan poliöl yolunun iki enziminden ikincisi olan sorbitol dehidrogenaz (L-İditol: NAD⁺ Oksidoredüktaz, EC 1.1.1.14) enzimi, koenzim olarak NAD⁺'i kullanan ve sorbitol ile fruktoz arasındaki dönüşümlü oksidasyon-redüksiyon reaksiyonunu katalizleyen bir enzimdir (Lindstad *et al.* 1994).



Şekil 1.7. Sorbitol dehidrogenaz enziminin katalizlediği reaksiyon

Sorbitol dehidrogenaz, dehidrogenaz/redüktaz protein ailesine dâhil olan bir metalo enzimdir (Jeffery *et al.* 1984; Jörnvall *et al.* 1984). Sorbitol dehidrogenazın her bir alt ünitesindeki aktif bölgesinde bir çinko atomu bulunur. Sorbitol dehidrogenaz tetramerik bir enzimdir. Ayrıca sorbitol dehidrogenaz enzimi, sorbitol, xylitol, o-mannitol ve L-İditol gibi poliollerin oksidasyonunu da katalizlemektedir (Luque *et al.* 1998).

Sorbitol dehidrogenaz enziminin kristalografik araştırmaları devam etmektedir. Çinko atomu koordinasyon geometrisi, substrat bağlanması için iki serbest koordinasyon ile ligantlar arasında 90°/180°'lik açıda oktahedral bir yapıdadır (Johansson *et al.* 2001). Enzimin dört tane alt birimi vardır ve bunların herbiri 355 rezidüden meydana gelmiştir (Jeffery *et al.* 1984; Karlsson *et al.* 1989).



Şekil 1.8. Koyun karaciğeri SDH enziminin üç boyutlu yapısı (Yennawar *et al.* 2011)

Sorbitol dehidrogenaz enziminin her bir alt birimi iki farklı bölgeye sahiptir. Bu bölgelerden biri NAD^+ 'nin bağlandığı koenzim bağlama bölgesi, diğeri ise çinko atomunun bulunduğu katalitik bölgedir (Johansson *et al.* 2001).

Sorbitol dehidrogenaz enzimi pek çok memeli dokusunda bulunmaktadır (Jeffery *et al.* 1984). Bu enzim özellikle karaciğer ve testis dokularında bol miktarda bulunur ve birkaç yıldır karaciğer ve testis hastalıklarında önemli bir tanı işaretçisi olarak da kullanılmaktadır (Asada and Galambos 1963; Hodgen and Sherins 1973).

Birçok dokuda bulunan sorbitol dehidrogenaz enzimi Brakley tarafından (1951) ilk kez sıçan karaciğerinden saflaştırılmıştır. Karaciğer dokusunda yüksek miktarda bulunduğu

için bu doku sorbitol dehidrogenaz enzimi için bir kaynak olarak görülmektedir (Hoshi *et al.* 1996).

Çizelge 1.4. Çeşitli sıçan dokularında bulunan SDH miktarları (Hoshi *et al.* 1996)

Doku	SDH Miktarı (Ünite / mg protein)
Karaciğer	13,9 ± 3,9
Böbrek	12,1 ± 1,4
Akciğer	5,0 ± 4,2
Mide	4,8 ± 1,5
Testis	3,1 ± 0,6
Beyin	3,5 ± 1,5
Dalak	0,7 ± 0,2
İskelet kası	0,6 ± 0,3

Sorbitol dehidrogenaz enzimi hiperglisemi durumunda aktif olan ve mikrovasküler ve makrovasküler gibi diyabetik komplikasyonların gelişiminde önemli rolü olan polioll yolunun ikinci enzimidir. Diyabetik komplikasyonların ortaya çıkmasında ve ilerlemesindeki rolünü açıklamak amacıyla bu enzim ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Obrosova *et al.* 1999; Nishikawa *et al.* 2000; Chu-Moyer *et al.* 2002; Amano *et al.* 2003).

SDH enzimi üzerinde yapılan çalışmalar, önemli bir sağlık sorunu olan ve dünyada ölüm nedenleri arasında ilk sıralarda yer alan diyabetin çeşitli komplikasyonlarının azaltılmasında ve tedavisinde kullanılabilen koruyucu ilaçların geliştirilmesi yönünden oldukça önem taşımaktadır.

1.5. Fenolik Bileşikler

Benzen halkası içeren organik maddeler genel olarak “fenolik bileşikler” olarak bilinmektedirler. ‘Fenol’ adıyla bilinen hidroksibenzen, bir başka deyişle bir adet hidroksil grubu taşıyan benzen, fenolik bileşiklerin en basit şeklidir. Diğer tüm fenolik bileşikler hidroksibenzenden türemişlerdir (Cemeroğlu ve Acar 1986; Hulme 1971).

Yaygın olarak kullanılan ismi polifenoller olan fenolik bileşikler bitkilerde fazla miktarda bulunan, meyve ve çiçeklere renklerini veren, bitkileri çeşitli çevresel stres faktörlerine karşı koruyan, benzen halkasına hidroksil grubu bağlı olan kimyasal bileşiklerdir (Cemeroğlu 2004; Ergün *et al.* 2002; Kahkonen *et al.* 1999). Bu bileşikler, lipidlerin ve diğer biyomoleküllerin (protein, karbohidrat, nükleik asitler) serbest radikaller tarafından okside olmalarını engellemek için aromatik halkalarındaki hidroksil gruplarında bulunan hidrojeni verebilmektedirler (Burda and Oleszek 2001).

Fenolik bileşikler doğal antioksidan maddelerdir ve bu bileşiklerin antioksidan etkisi, serbest radikalleri temizleme (Pekkarinan *et al.* 1999; Rice-Evans *et al.* 1995), metal iyonlarla bileşik oluşturma (metal şelatlama) ve singlet oksijen oluşumunu engelleme ile azaltma (Rice-Evans *et al.* 1995) gibi özelliklerinden ve genellikle fenol radikalının rezonans kararlılığından dolayı meydana gelmektedir (Fessenden and Fessenden 1990).

Fenolik maddelerin biyoyararlığı onların molekül büyüklüğü, çözünürlük vb. özellikleri tarafından belirlenen absorblanma ve metabolize olma yeteneklerine bağlıdır. Yapısal olarak fenolik bileşikler bir aromatik halkaya bağlı hidroksil grupları ile karakterize edilir ve basit fenolik maddelerden daha karmaşık yapıya polimerize bileşiklere kadar geniş bir yelpaze içinde yer alırlar. Fenolik asitler monosakkarit ve polisakkaritler ile konjuge olmuş, bir ya da daha fazla fenolik gruba bağlı veya ester ve metil esterlerin fonksiyonel türevleri halinde bulunabilirler (Balasundram *et al.* 2006).

Fenolik asitler, bitkilerin kokusundan, tatlarından, renklerinden sorumludurlar ve sadece küçük bir grubu doğada serbest olarak bulunmaktadır. Bu tür bileşiklerin gıdalarda

bulunması besinlerin kararlılığını, rengini, kokusunu, besin değerini ve kalitesini de belirgin şekilde etkilemektedir (Robbins 2003). Bundan dolayı fenolik asitler gıdalarda raf ömrünü uzatmak için koruyucu maddeler olarak kullanılabilirler. Ayrıca fenolik asit içeren pek çok bitkide bazı hastalıklarda tedavi edici olarak kullanılmaktadır (Bektaş 2005).

Fenolik bileşikler doğal antioksidanların en önemli gruplarını oluşturmaktadırlar (Gray 1978; Moure *et al.* 2001; Shahidi and Wanasundara 1992) Bu bileşikler meyve, sebze, baharat, tahıl ve içecekler gibi bitkisel gıdalarda yaygın olarak bulunmaktadır (Katiyar and Mukhtar 1997).

Son yıllarda bitkisel kökenli gıdalarda bulunan fenolik bileşiklerin yoğun bir şekilde incelenmesi, bunların insan sağlığı ile yakından ilişkisi olduğunun saptanmasından ve özellikle de kanser oluşumunu azalttığı yönündeki epidemiyolojik bilgilerden kaynaklanmaktadır.

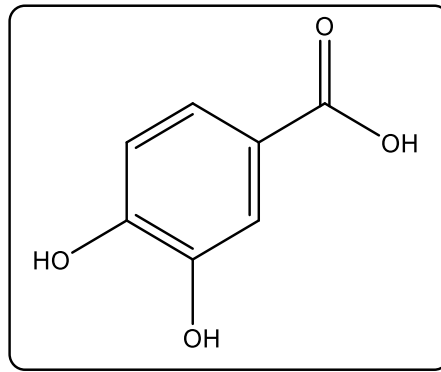
Fenolik asitler, özellikle kanser ve koroner kalp hastalıkları gibi ölümcül hastalıklara karşı koruyucu etkide bulunma potansiyelleri nedeniyle üzerinde oldukça yaygın çalışmalar yapılan önemli bileşiklerdir (Mattila *et al.* 2002). Bununla birlikte anti-allerjik, antiinflamatuar (iltihap oluşumunu önleyici), antimikrobiyal, antioksidan, antitrombotik (kan pıhtılaşmasını engelleyici) ve vasodilatory (damar genişletici) olmak üzere pek çok etkisi olduğu kanıtlanmış ve bu yararlı etkilerinin temel sebebinin ise antioksidan özellik göstermelerinden kaynaklandığı belirtilmiştir (Balasundram *et al.* 2006).

1.6. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Fenolik Bileşikler

Koyun karaciğeri aldoz redüktaz ve sorbitol dehidrogenaz enzimleri üzerine etkileri incelenen fenolik bileşiklerin özellikleri ve yapısal formülleri şöyledir:

1.6.1. 3,4-Dihidroksi benzoik asit

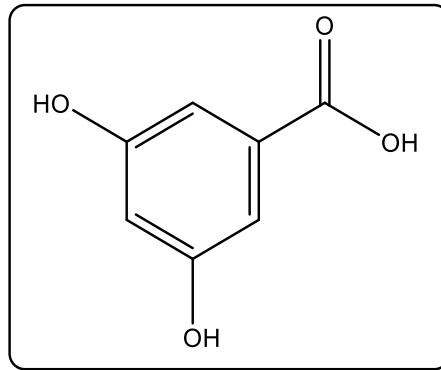
Molekül formülü $C_7H_6O_4$ ve molekül kütlesi 154,12 g/mol'dür. Protokateşik asit olarak da adlandırılmaktadır. Beyaz kristal pudra şeklinde bulunmaktadır. Erime noktası 200-202°C'dir. Sudaki çözünürlüğü çok azdır. Alkol ve eterdeki çözünürlüğü ise çok güçlüdür (Anonim 2007).



Şekil 1.9. 3,4-Dihidroksi benzoik asit molekülünün yapısal formülü

1.6.2. 3,5-Dihidroksi benzoik asit

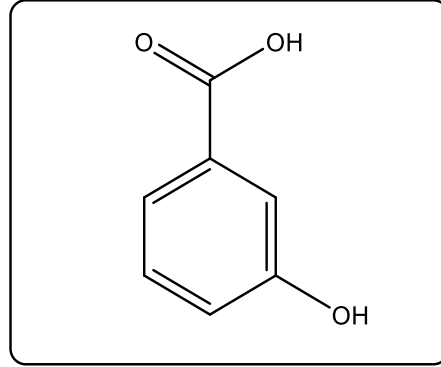
Molekül formülü $C_7H_6O_4$ ve molekül kütlesi 154,12 g/mol'dür. α -Resorsilik asit olarak da bilinir. Erime noktası 236-238°C'dir. Sudaki çözünürlüğü çok az iken etanolde çözünürlüğü yüksektir.



Şekil 1.10. 3,5-Dihidroksi benzoik asit molekülünün yapısal formülü

1.6.3. 3-Hidroksi benzoik asit

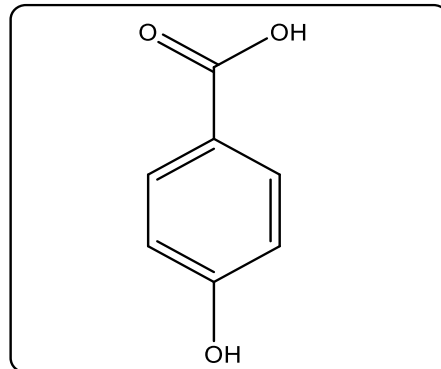
Molekül formülü $C_7O_6O_3$ ve molekül kütlesi 138,03 g/mol olan bir başka fenolik asit türevidir. Erime noktası 200–203°C'dir.



Şekil 1.11. 3-Hidroksi benzoik asit molekülünün yapısal formülü

1.6.4. 4-Hidroksi benzoik asit

Molekül formülü $C_7H_6O_3$ ve molekül kütlesi 138,12 g/mol olan fenolik asit türevidir. Erime noktası 214-217 °C'dir. p-Hidroksi benzoik asit olarak da adlandırılır. Beyaz kristaller şeklinde bulunur. Suda çözünürlüğü az olmasına rağmen alkoller, eter ve asetonda oldukça iyi çözünür (Anonim 2007).

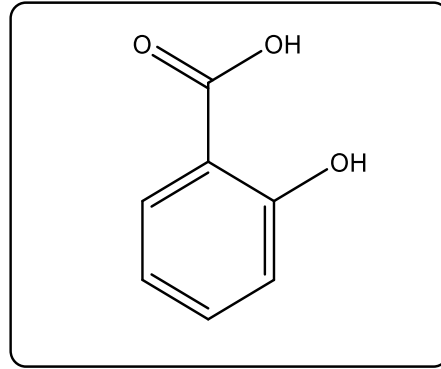


Şekil 1.12. 4-Hidroksi benzoik asit molekülünün yapısal formülü

1.6.5. Salisilik asit

Kimyasal adı 2-hidroksi benzoik asittir. Son yıllarda bitkilerde salisilik asidin biyolojisi ile ilgili yapılan çalışmaların sonucunda, salisilik asidin diğer birçok fenolik bileşik gibi, bitki büyümesinin düzenlenmesi, gelişimi ve diğer organizmalarla etkileşiminde temel rol oynadığı görüşü ortaya çıkmıştır (Harborne 1980).

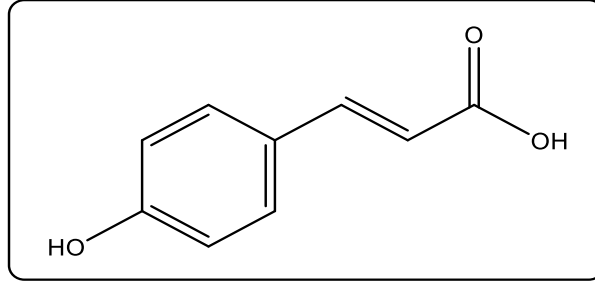
Bitkilerde salisilik asit, metabolik olarak aktif olan serbest formunun dışında, esterler ve glukozidler olarak bağlı formlarda da bulunabilir. Salisilik asit bitkilerde genellikle bir şeker bileşiği olan salisilik asit- β -glukozit (SAG) şeklinde, yani inaktif bir formda bulunmaktadır (Raskin 1995).



Şekil 1.13. Salisilik asit molekülünün yapısal formülü

1.6.6. p-Kumarik asit

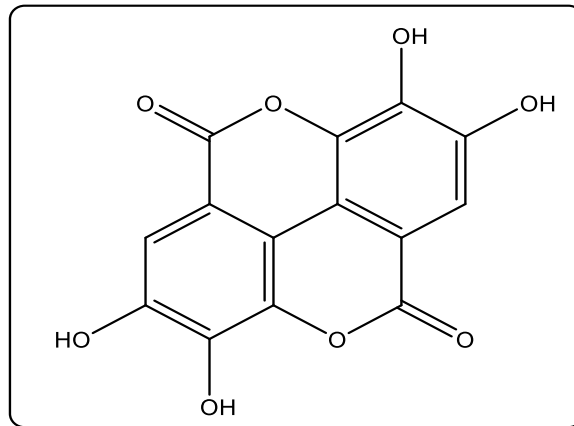
Kumarik asit, sinnamik asitten türemiş organik bileşiktir. Yapısındaki hidroksil grubunun bağlı olduğu yere göre orto, para ve meta olmak üzere üç izomeri bulunmaktadır. Molekül formülü $C_9H_8O_3$, molekül kütlesi 164,15 g/mol'dür. Erime noktası 210-213°C'dir (Anonim 2007). Strese karşı koruma sağladığı rapor edilmiştir. Tümör hücrelerini öldürme yeteneğinin yanında DNA'da oksidatif hasara neden olduğu bilinmektedir. Yüksek miktarlarda alındığı zaman toksik etki göstermektedir (Labieniec *et al.* 2003).



Şekil 1.14. p-Kumarik asit molekülünün yapısal formülü

1.6.7. Elagik asit

Elagik asit, kuvvetli bir antikanserojen/antimutagenik etkisi bulunan bir fenolik asit ve antibakteriyel-antiviral etkisinin de bulunduğu belirlenmiştir (Akiyama *et al.* 2001; Smerak *et al.* 2002). Bütün meyve ve sebzeler içerisinde en fazla kırmızı (*Rubus ideaus*) ve siyah (*Rubus occidentalis*) ahudududa bulunan elagik asit vücutta kansere neden olan kimyasalları inaktif hale getirip bir antikanserojen etki göstermektedir (Stoner and Mukhtar 1995).

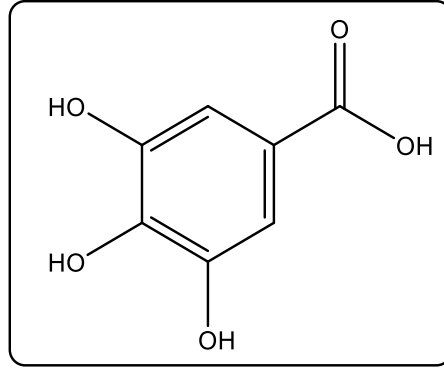


Şekil 1.15. Elagik asit molekülünün yapısal formülü

1.6.8. Gallik asit

Gallik asit (3,4,5-trihidroksibenzoik asit) bitkilerde doğal olarak üretilen bir polifenoldür (Stanely *et al.* 2009). Molekül formülü $C_7H_6O_5$ ve molekül kütlesi 170,12

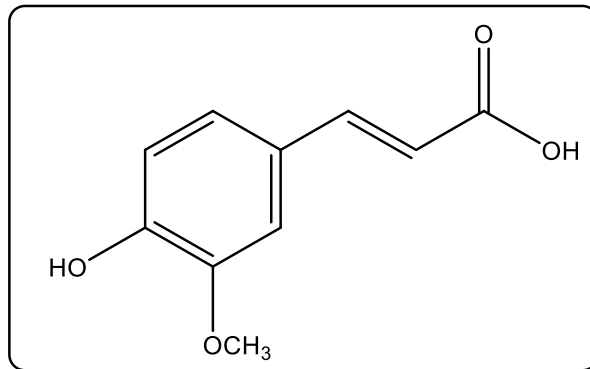
gr/mol'dür. Erime noktası 251°C'dir. Hastalıkların riskini azalttığı bilinmektedir (Hsu and Yen 2007). En önemli kaynağının çay olduğu bilinmektedir (Gupta *et al.* 2007). Ayrıca meşe ağaçlarından, kestane ve üzümde bulunmaktadır (Stanley *et al.* 2009).



Şekil 1.16. Gallik asit molekülünün yapısal formülü

1.6.9. Ferulik asit

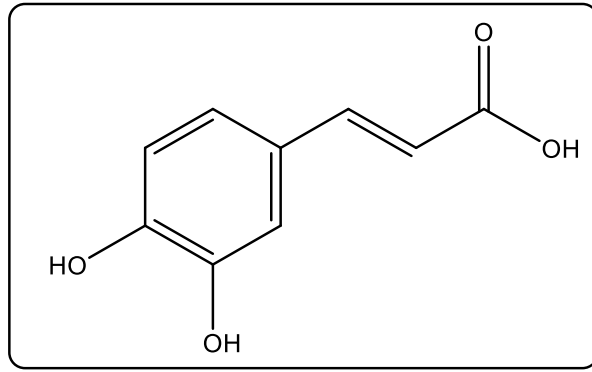
Ferulik asit (3-metoksi, 4-hidroksi sinnamik asit), sebze ve meyvelerde sıklıkla bulunan, fenilalanin ve tirozin metabolizmasından kaynaklanan, fenolik asit tüvidir (Graf 1992; Paganga 1999). Özellikle tohumlarda ve yapraklarda bulunur (Andersons *et al.* 1980). Mısırdaki, buğday, pirinç, yulaf, çavdar gibi tahılların kepeklerinde, kavrulmuş kahve, domates ve turunçgillerde bulunduğu bilinmektedir (Graf 1992).



Şekil 1.17. Ferulik asit molekülünün yapısal formülü

1.6.10. Kafeik Asit

Molekül formülü $C_9H_8O_4$, molekül kütlesi 180,16 g/mol'dür. 3,4-Dihidroksi sinnamik asit olarak da adlandırılır. Sarı kristalize halde bulunur. Erime noktası 223-225°C'dir. Sıcak suda ve alkolde çözünürlüğü oldukça iyidir (Anonim 2007). Doğal bir fenolik asit olduğu için pek çok bitkide bulunmaktadır. Elma, üzüm, erik, yulaf gibi çeşitli meyvelerde bulunmaktadır (Huang and Ferraro 1991).



Şekil 1.18. Kafeik asit molekülünün yapısal formülü

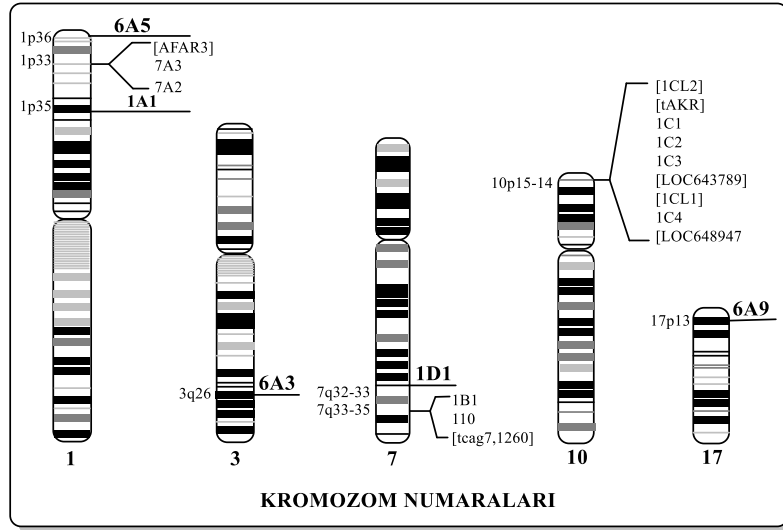
2. KAYNAK ÖZETLERİ

Diyabet; pankreasın yeterli insülin üretememesi ya da vücudun ürettiği insülini etkili bir şekilde kullanamaması veya her iki durumda da meydana gelen hasar sonucu oluşan, ömür boyu devam eden kronik ve insülin üreten hücrelerin azalması ile süregelen hiperglisemi ile karakterize edilen metabolik bir önemli bir sağlık problemidir (American Diabetes Association 2013)

2008 yılında Dünya Sağlık Örgütü'nün (World Health Organization (WHO)) yaptığı bir araştırmaya göre; dünya üzerinde yaklaşık 347 milyon diyabet hastası bulunmaktadır. Bu sayının 2030 yılına kadar ikiye katlanacağı ve diyabete bağlı ölümlerin dünya genelinde 7. sıraya yükseleceği tahmin edilmektedir (Danaei *et al.* 2011; Whiting *et al.* 2011; WHO 2011).

Aldoz redüktaz (AR) aldo-keto redüktaz (AKR) enzim ailesine ait bir enzimdir ve Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) tarafından belirlenen enzim kod numarası E.C.1.1.1.21'dir. Enzim sınıflandırılmasında ise oksidoredüktazlar ana sınıfına aittir. X-Ray kristalografi çözümü ile aldoz redüktazın üç boyutlu yapısı ortaya konulmuştur. İnhibitörler enzimin aktif bölgesi ile etkileşim içindedir. Çünkü AR enziminin aktif bölgesi esnek bir yapıya sahiptir. AR sitozolik bir enzimdir ve göz lensinde, retinada, böbrekte, adrenal bezde ve üreme organlarında dağılmış olarak bulunur (Srivastava 2005).

İnsanda bulunan AR enzimi, AKR1B1 geni tarafından, 7q35 kromozomu üzerinde lokalize, 315 aminoasitten meydana gelen ve 36 kDa molekül kütlesine sahip ve yapısında herhangi metal grubu içermeyen monomerik yapıda bir proteindir (Şekil 2.1) (Ramana and Srivastava 2009).



Şekil 2.1. İnsandaki AR enzimine ait genin kromozom üzerindeki lokalizasyonu (Barski *et al.* 2008)

Aldoz redüktaz enziminin özellikleri şu şekilde sıralanabilir (Srivastava 2005);

1. AR enzimi çeşitli alkollerin NADPH'a bağımlı olarak indirgenmesini katalizler.
2. Enzim polioliol yolunun ilk basamağını yani glukozun sorbitole dönüşümünü NADPH'a bağımlı olarak katalizlemektedir.
3. Normal koşullar altında glukozun çok az bir kısmı polioliol yoluna girer. Bunun sebebi glukozun AR'ı substratı olarak tercih etmemesidir.
4. AR enzimi steroidlerin, katekolaminlerin ve fosfolipitlerin katabolizmasından türeyen aldehitlerin indirgenmesini katalizlemede görev alır.
5. Mekanizmasının henüz anlaşılammış olması söz konusu olsa bile AR hücre büyümesiyle ilgili tüm sinyal anahtarlarında etki göstermekte ve bu etki spesifik şartlar altında artmaktadır.

Polioliol yolunun birinci enzimi olan aldoz redüktaz, NADPH varlığında glukozu sorbitole dönüştürmektedir. Polioliol yolunun diğer bir enzimi olan sorbitol dehidrogenaz ise dönüşümlü bir reaksiyonla sorbitolu fruktoza dönüştürmektedir. Hiperglisemik şartlarda heksokinaz enzimlerinde oluşan doygunluk sonucu hücre içindeki total glukozun 1/3'i

(%33) polioliol yolu ile metabolize olmaktadır (Kinoshita 1974; Kinoshita *et al.* 1983; Gonzales *et al.* 1984).

Hiperglisemi durumunda, glukozun aldoz redüktaz enzimi tarafından artan kullanımı, diyabetik hastalıkların gelişiminde önemli rol oynamaktadır (Chandra *et al.* 2002). Bu enzim, glukozu hücre zarından geçirgenliği düşük olan sorbitole çevirmekte ve böylece oluşan sorbitol hücre içinde birikerek insülininden bağımsız olan periferel sinir hücrelerine, retina ve böbrek dokusuna zarar vererek çeşitli diyabetik komplikasyonların oluşumuna sebep olmaktadır (Tanimoto *et al.* 1998; Nakano *et al.* 2003).

Aldoz redüktazın aktivitesinin artmasıyla, hücre içinde belirli koenzimlerin (NADPH ve NADH) miktarı değişmekte ve antioksidan savunma sistemine ait enzimlerin gen ifadesi engellenmektedir. Bu durum hücrelerde oksidatif strese yol açmaktadır (Larkins and Dunlop 1992; Hodgkinson *et al.* 2003). Ayrıca, hücrede biriken sorbitol osmotik strese neden olarak doku hasarına yol açabildiği gibi, miyoinositol miktarını da düşürerek fosfoinozotid sinyallerinin oluşumunu azaltmaktadır. Böylece sinir hücrelerinde iletim hızı yavaşlamakta ve çeşitli diyabetik mikrovasküler komplikasyonlara da yol açabilmektedir (Larkins and Dunlop 1992; Podwall and Gooch 2004).

Sorbitol Dehidrogenaz (L-İditol: NAD⁺ oksidoredüktaz, EC 1.1.1.14) sorbitol yolunun (polioliol yolu) iki enziminden ikincisidir. Bu enzim koenzim olarak NAD⁺ kullanarak sorbitol ve fruktoz arasındaki dönüşümlü oksidasyon-redüksiyon reaksiyonunu katalizleyen (Lindstad *et al.* 1994), memeli alkol dehidrogenazlarını da içine alan dehidrogenaz/redüktaz protein ailesine dâhil olan bir metalo enzimdir (Jeffery *et al.* 1984; Jörnvall *et al.* 1984). Ayrıca her bir alt ünitesindeki aktif bölgesinde bir çinko atomu bulunduran tetramerik bir enzimdir. (Luque *et al.* 1998).

Daha önce gerçekleştirilen bir çalışmada diyabetik komplikasyonların patogeneğinde önemli rolü olan sorbitol dehidrogenaz enziminin polioliol yolu için önemini araştırmak amacı ile diyabetik olan ve diyabetik olmayan sıçanlar üzerine araştırmalar yapılmıştır.

Hem enzim içeriğinin hem de enzim aktivitesinin böbrek ve karaciğerde çok olmasına karşı testiste enzim içeriğinin fazla olduğu ve aktivitesinin ise olmadığı tespit edilmiştir. SDH enziminin diyabetik karaciğer proteininde bol miktarda glikolize ve nonglikolize formları bulunmuştur. Ayrıca saflaştırılmış sorbitol dehidrogenaz enziminin glukoz ya da fruktozla inkübasyonu sonrasında aktivitesinin belirgin bir şekilde düştüğü gözlemlenmiştir. Sonuçta glikasyonun diyabetik koşullar altında karaciğer SDH aktivitesinin azalmasına neden olduğu görülmektedir (Hoshi *et al.* 1996).

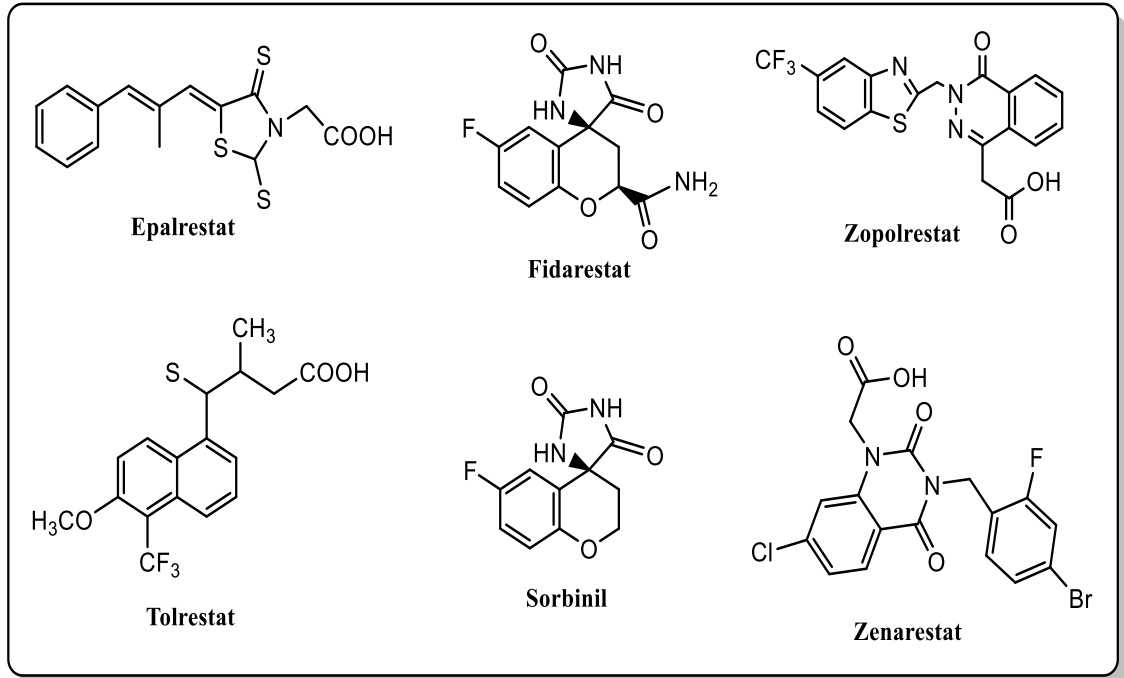
Başka bir çalışmada Perilla Biftek Otu (*Perilla frutescens*) bitkisinin köklerinden fenolik bileşiklerin izolasyonu ve tanımlanması yapılmış ayrıca aldoz redüktaz ve α -glukozidaz enzimlerinin aktiviteleri üzerine bu fenolik bileşiklerin inhibisyon etkileri incelenmiştir. *Perilla frutescens* bitkisinden 4 farklı fenolik bileşik (kafeik asit, rosmarinik asit, luteolin, apigenin) izole edilmiştir. Bu fenolik bileşikler için IC₅₀ ve K_i değerleri bulunmuştur. Bunlar arasında en yüksek inhibisyon etkisini luteolin göstermiştir. En güçlü aldoz redüktaz inhibitör aktivitesini ise rosmarinik asitin gösterdiği görülmektedir. Sonuç olarak *Perilla frutescens* köklerinden bazı bileşiklerin etkili bir kaynağı olarak yararlanılabileceği ortaya konulmuştur (Ha *et al.* 2012).

Aldoz redüktaz enzimi inhibitörleri yapısal olarak başlıca üç sınıfa ayrılmaktadırlar. Bunlar; karboksilik asit grubu taşıyanlar (epalrestat, tolrestat ve zopolrestat), siklik imid grubu taşıyanlar (fidarestat, sorbinil), sülfonil nitrometan türevleri taşıyanlardır (Rogniaux *et al.* 1999; Wang *et al.* 2007). İnhibitörlerin polar uçları ile aktif bölgeleri arasındaki etkileşimler enzim inhibitör kompleksinin kararlılığında önemli bir durum oluşturmaktadır.

Karboksilik asit ve siklik imid sınıfında yer alan AR inhibitörlerinin asidik gruplarının (karboksilat ve siklik imid) varlığı enzimin inhibisyonunda oldukça önemli bir husustur. Aldoz redüktaz enzimi inhibitörünün yapısında negatif yük bulduran karboksilik asit ve siklik imid grubu bulduranlar bileşikler, enzimin aktif bölgesinde bulunan Tyr48, His110 ve Trp111 aminoasitleri ile hidrojen bağı kurmaktadır (Rastelli *et al.* 2000).

Hiperglisemide, daha önce de belirtildiği üzere AR aktivitesi artmakta ve aktivitesi artan AR, osmotik denge, iyon taşınımı ve redoks dengesinin değişimine yol açarak, retinopati, nefropati, nöropati ve katarakt gibi diyabetik komplikasyonların oluşmasına sebep olmaktadır (Brownlee *et al.* 2006; Djoubissie *et al.* 2006; Rakowitz *et al.* 2006). Bu nedenle, AR inhibitörleri, diyabetik komplikasyonların ilerlemesinin, geciktirilmesinin veya başlamasının engellenmesi için tedavi edici ajan olarak oldukça geniş ölçüde araştırılmaktadır (El-Kabbani *et al.* 2004; Sun *et al.* 2004; Wang *et al.* 2009).

Ancak, son yirmi yıldan fazladır, AR inhibitörlerine ait bazı denemeler ve araştırmalar ya tasarımdaki yetersizlikten, ya da sentezlenen inhibitörün poliolsol yoluna olan yetersiz etkisinden dolayı tatmin edici olarak sonuçlanamamıştır (Obrosova *et al.* 2002). Görülen yan etkilerin oluşması, AR enzimi ile aynı süper aileden olan ve yapısal olarak birbirlerine çok benzeyen aldehit redüktazların da inhibe edilmesinden kaynaklandığı varsayılmaktadır. Bundan dolayı, sadece aldoz redüktaz enzimine bağlanabilen inhibitörler tasarlanmaya başlanmıştır (El-Kabbani *et al.* 2004). Buna karşılık, 1989 yılında piyasaya sürülen tolrestat, 1996 yılında düşük etkinliği ve karaciğer toksisitesi nedeniyle piyasadan toplatılmıştır. Aynı şekilde zopolrestat, ranirestat ve zenarestat bileşiklerinin de klinik denemeleri iptal edilmiştir. Şu anda Japonya'da, Ono tarafından 1992 yılında geliştirilen epalrestat ise kullanılmaktadır (Asano *et al.* 2002; Miyamoto 2002; Sturm *et al.* 2006).



Şekil 2.2. Bazı AR inhibitörleri (Donkor *et al.* 1999; Rogniaux *et al.* 1999; Wang *et al.* 2009).

Bir fenolik asit olan elagik asitin diyabetik ratların lens, eritrosit ve siyatik sinirlerinde sorbitol birikimini önlediği belirtilmiş (Ueda *et al.* 2004) ve diğer bir fenolik asit olan kafeik asitin de anti diyabetik etkisinin olduğu anlaşılmış ve glisemik kontrol için kullanılabileceği gözlenmiştir (Jung *et al.* 2006).

Yapılan çalışmalar sonucunda, kafeik asit ve elagik asitin kan glukoz seviyesini düşürüp polioliol yolunun çalışmasını düzenleyerek, diyabetik anomalilerin komplikasyonların gecikmesini veya azalmasını sağladığı söylenilebilir. Ancak, bu bileşiklerin diyabetten kaynaklanan böbrek hasarını önleyip önleyemediği konusu henüz aydınlatılamamıştır (Chao *et al.* 2010).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve satın alındığı firmalar

2,5-ADP Sepharose 4B	Pharmacia
3-Hidroksi Benzoik Asit	Sigma
3,4-Dihidroksi Benzoik Asit	Sigma
3,5-Dihidroksi Benzoik Asit	Sigma
4-Hidroksi Benzoik Asit	Sigma
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 Brilliant Blue G-250	Sigma
DE-52 Selüloz	E.Merc AG
Diyaliz Torbası	Sigma
DL-Gliseraldehit	Sigma
DMSO	Sigma
Elagik Asit	Sigma
Etanol	Sigma
Gallik Asit	Sigma
Gliserol	Sigma
Glisin	E.Merc AG
Glutaraldehit	Sigma

Çizelge 3.1. (devam)

Ferulik Asit	Sigma
HCl	E.Merc AG
İzopropanol	E.Merc AG
Kafeik Asit	Sigma
Metanol	E.Merc AG
N,N'-metilen bisakrilamid	Sigma
N,N,N,N'-tetrametil etilendiamin (TEMED)	Sigma
Potasyum Fosfat	E.Merc AG
p-Kumarik Asit	Sigma
Protein Marker	BioRad 0375
Salisilik Asit	Sigma
Sephadex G-100	E.Merc AG
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	E.Merc AG
Sodyum Fosfat	E.Merc AG
Sodyum Hidroksit	Sigma
Sodyum Klorür	E.Merc AG
Sorbitol	E.Merc AG
Trihidroksimetilaminometan (Tris)	Sigma
β -Merkapto 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

3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

Çizelge 3.2. Çalışmalar sırasında faydalanılan alet ve cihazlar

Soğutmalı Santrifüj	Hermle Z 323 K (Germany)
Spektrofotometre	Beckman Coulter
Spektrofotometre	Optizen Pop
pH metre	Mettler Toledo
Elektroforez Tankı	BIO RAD (Dikey)
Peristaltik Pompa	Ismatec
Karıştırıcı (Shaker)	GFL 3025
Karıştırıcı (Vorteks)	IKA Vortex 4 Basic
Hassas Terazı	Gec Avery
Afinite Kolonu	Kapalı Sistem Oluşturucu ve soğutmalı (1x10), Sigma (ABD)
Otomatik Pipet	Eppendorf
Çalkalayıcı	Midi Dual 14
Magnetik Karıştırıcı	IKA C-MAG HS7
Saf Su Cihazı	Barnstead Easy Pure UV/U
Su Banyosu	Nüve
Kar Makinesi	Scotsman AF-20
Güç Kaynağı	1-Bio Rad Power Pac 3000 2-Apparatus Corporation EC 135
Buzdolapları	Siemens Derin Dondurucu
(-20°C'ye kadar)	Sanyo Medical Freezer, Uğur
(-80°C'ye kadar)	Sanyo Ultra Low

3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

3.1.3.a. AR enziminin aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler

1. 1 M Na-fosfat tamponu (pH=5,5): 6 g NaH_2PO_4 tartılarak 40 ml saf suda çözüldü, pH=5,5'e ayarlandı ve toplam hacim saf su ile 50 ml'ye tamamlandı.
2. 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.

3.1.3.b. AR enzimi için homojenatın hazırlanmasında kullanılan çözeltiler

10 mM Na-fosfat tamponu (pH=7,4): 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.

3.1.3.c. AR enziminin diyalizinde kullanılan çözelti

5 mM β -merkaptolanol içeren 10 mM Na-fosfat tamponu (pH=7,4): 1,2 g NaH_2PO_4 tartılarak yaklaşık 900 ml saf suda çözüldü. İçerisine 36 μl β -merkaptolanol eklendi. pH= 7,4'e ayarlandıktan sonra toplam hacim saf su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

3.1.3.d. AR için hazırlanan DE-52 Selüloz iyon değişim kromatografisinde kullanılan çözeltiler

10 mM Na-fosfat tamponu (pH=7,4), (DE-52 Selüloz 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.

3.1.3.e. 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.

3.1.3.f. AR için hazırlanan afinite kolonunda kullanılan çözeltiler

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.

3.1.3.g. AR enziminin kinetik çalışmalarında kullanılan çözeltiler ve hazırlanmaları

1. Optimum pH çalışması için kullanılan tampon çözeltiler

a. NaH_2PO_4 (pH= 5,0–8,0)

11,998 g (0,1mol) Na-fosfat, 80 ml saf su içerisinde çözümlenerek 1 M NaOH ile istenilen pH'ya kadar titre edildi ve daha sonra saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

b. Tris-HCl (pH=7,0–9,0)

12,114 g (0,1 mol) tris, 80 ml saf su içerisinde çözümlenerek 1 M HCl ile istenilen pH'ya kadar titre edildi ve daha sonra son hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

c. Glisin-NaOH (pH= 9,0–10,5)

7,507 g (0,1mol) glisin 80 ml saf suda çözülerek 1M NaOH ile istenilen pH'a ayarlandı. Daha sonra toplam hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

2. Optimum sıcaklık çalışması için kullanılan tampon çözelti

1,1998 gr (0,01 M) sodyum fosfat, 80 ml saf su içerisinde çözülerek 1 M NaOH ile pH=5,5 olana kadar titre edildi ve daha sonra saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

3. Stabil pH çalışması için kullanılan tampon çözelti

1,1998 gr (0,01 M) sodyum fosfat, 80 ml saf su içerisinde çözülerek 1 M NaOH ile istenilen pH'a ayarlandı ve daha sonra saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

3.1.3.h. 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.

3.1.3.i. 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.

3.1.3.i. SDH enziminin diyalizinde kullanılan çözelti

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), (DE-52 Selüloz 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.

3.1.3.j. SDH için hazırlanan DE-52 Selüloz iyon değişim kromatografisinde kullanılan çözelti

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.

3.1.3.k. SDH için hazırlanan CM-Selüloz C-52 iyon değişim kromatografisinde kullanılan çözelti

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.

3.1.3.l. SDH için hazırlanan Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisinde kullanılan çözelti

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.

3.1.3.m. Proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözeltiler

1. 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 ml %95'lik etanolde çözüldü. Bu çözeltiliye %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.

3.1.3.n. 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-merkaptoetanol ilave edildi.

3.1.3.o. Gümüş boyamada kullanılan çözelti

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: 100 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

3.1.3.ö. AR enzimi inhibisyon çalışmalarında kullanılan fenolik asitlerin hazırlanması

1. 6,5 mM 3,4-dihidroksi benzoik asit çözeltisi: 1 mg 3,4-dihidroksi benzoik asit tartılıp, 1 ml DMSO'de çözülür.
2. 6,5 mM 3,5-dihidroksi benzoik asit çözeltisi: 1 mg 3,5-dihidroksi benzoik asit tartılıp, 1 ml DMSO'de çözülür.
3. 7,24 mM 3-hidroksi benzoik asit çözeltisi: 1 mg 3 hidroksi benzoik asit tartılıp, 1 ml DMSO'de çözülür.
4. 7,24 mM 4-hidroksi benzoik asit çözeltisi: 1 mg 4-hidroksi benzoik asit tartılıp, 1 ml DMSO'de çözülür.
5. 7,24 mM salisilik asit çözeltisi: 1 mg salisilik asit tartılıp, 1 ml DMSO'de çözülür.
6. 6,09 mM p-kumarik asit çözeltisi: 1 mg p-kumarik asit tartılıp, 1 ml DMSO'de çözülür.
7. 0,331 mM elagik asit çözeltisi: 1 mg elagik asit tartılıp, 1 ml DMSO'de çözülür. Daha sonra 10 kat seyreltildi.
8. 5,88 mM gallik asit çözeltisi: 1 mg gallik asit tartılıp, 1 ml DMSO'de çözülür.
9. 5,15 mM ferulik asit çözeltisi: 1 mg ferulik asit tartılıp, 1 ml DMSO'de çözülür.

10. 0,56 mM kafeik asit çözeltisi: 1 mg kafeik asit tartılıp, 1 ml DMSO'de çözülür. Daha sonra 10 kat seyreltildi.

3.1.3.p. SDH enzimi inhibisyon çalışmalarında kullanılan fenolik asitlerin hazırlanması

- 1.** 19,5 mM 3,4-dihidroksi benzoik asit çözeltisi: 3 mg 3,4-dihidroksi benzoik asit tartılıp, 1 ml DMSO'de çözülür.
- 2.** 19,5 mM 3,5-dihidroksi benzoik asit çözeltisi: 3 mg 3,5-dihidroksi benzoik asit tartılıp, 1 ml DMSO'de çözülür.
- 3.** 21,7 mM 3-hidroksi benzoik asit çözeltisi: 3 mg 3 hidroksi benzoik asit tartılıp, 1 ml DMSO'de çözülür.
- 4.** 21,7 mM 4-hidroksi benzoik asit çözeltisi: 3 mg 4-hidroksi benzoik asit tartılıp, 1 ml DMSO'de çözülür.
- 5.** 21,7 mM salisilik asit çözeltisi: 1 mg salisilik asit tartılıp, 1 ml DMSO'de çözülür.
- 6.** 0,061 mM p-kumarik asit çözeltisi: 1 mg p-kumarik asit tartılıp, 1 ml DMSO'de çözülür. Daha sonra 100 kat seyreltilir.
- 7.** 0,0331 mM elagik asit çözeltisi: 1 mg elagik asit tartılıp, 1 ml DMSO'de çözülür. Daha sonra 100 kat seyreltildi.
- 8.** 0,06 mM gallik asit çözeltisi: 1 mg gallik asit tartılıp, 1 ml DMSO'de çözülür. Daha sonra 100 kat seyreltildi.
- 9.** 0,052 mM ferulik asit çözeltisi: 1 mg ferulik asit tartılıp, 1 ml DMSO'de çözülür. Daha sonra 100 kat seyreltildi.
- 10.** 0,056 mM kafeik asit çözeltisi: 1 mg kafeik asit tartılıp, 1 ml DMSO'de çözülür. Daha sonra 100 kat seyreltildi.

3.2. Yöntem

3.2.1. AR enziminin aktivite ölçümü

Kullanılan çözeltiler:

1. 1 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 prosedürün modifiye edilmesiyle gerçekleştirildi. Reaksiyon ortamı, 250 µl Na-fosfat tamponu, 100 µl NADPH ve 500 µl saf su üzerine 50 µl izole edilen enzim eklenerek hazırlandı. Reaksiyon, yukarıda hazırlanan küvete 100 µl DL-gliseraldehit ilavesi ile başlatıldı. Spektrofotometre ile 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 EÜ/ml cinsinden hesaplandı.

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

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

ΔA =Test tüpündeki absorbans farkı

Δt =Zaman (dakika)

$\Delta A/\Delta t$ =Eğim

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

d =Işık Yolu (10 mm)

$V(L)$ =Total Hacim

$v(L)$ =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 absorbands göstermesi esasına dayanır (Segel 1968). Kromatografi işlemlerinden sonra eşit hacimlerde alınan bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Fraksiyonların absorbandsları kuvarz küvetler içinde, spektrofotometrede köre karşı okundu.

3.2.2.b. Kantitatif protein tayini

Hazırlanan homojenat, amonyum sülfat çöktürmesi ile elde edilen enzim çözeltisi ve saflaştırılan enzim için kantitatif protein miktarı Bradford metoduna göre 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 dönüşümü ile olur. Bu yöntemin bozucu faktörlere karşı hassasiyeti oldukça düşüktür (1-100 μg arası). Reaksiyon yüksek oranda tekrarlanabilir ve hızlı cereyan eder ve iki dakikada tamamlanır. Tayin işlemleri prosedürü şöyle 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 100 μl 'ye tamamlandı ve 4900 μl Coomessie Brilliant Blue G-250 çözeltisi ilave edilerek vorteks ile karıştırıldı. 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Sonra 595 nm'de 3 ml'lik cam küvetlerde köre karşı absorbands değerleri okundu. Kör olarak, 100 μl enzim numunesinin içinde bulunduğu tampon ile 4900 μl Coomessie Brilliant Blue G-250 çözeltisinden oluşan karışım kullanıldı. Elde edilen sonuçlardan absorbands değerlerine karşılık gelen μg protein değerleri standart grafik haline getirildi. Saflaştırmanın her aşamasında ortamdaki protein miktarını belirlemek için enzim numuneleri 10 kat veya daha çok seyreltme yapıldı. Elde edilen seyreltilmiş çözeltilerden her tüpe 100 μl alınarak üzerlerine 4,9'ar ml renklendirme reaktifi eklendi. Vorteks ile karıştırıldıktan sonra 10 dakika

inkübasyona bırakıldı ve sonra 595 nm’de absorbans değerleri okundu. Elde edilen değerler ile standart grafikten protein miktarları belirlendi (Bradford 1976).

3.2.3. Koyun karaciğeri AR enziminin saflaştırılması

3.2.3.a. Homojenatın hazırlanması

İzolasyon işleminde, -80°C’de saklanmış dokular kullanıldı. Bu dokular ağırlıklarının (gr) 3 katı kadar 5 mM β-merkaptöetanol 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 13500 rpm’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.

Koyun karaciğerinden elde edilen homojenat sırasıyla %0-20, %20-30, %30-40, %40-50, %50-60, %60-70, %70-80 ve %80-90 aralıklarında katı amonyum sülfat ile çöktürüldü. Çöktürme işlemlerinden sonra homojenat +4°C, 13500g’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 süpernatantta enzim aktivitesine bakıldı. Amonyum sülfatın homojenatta çözünme işlemi buz banyosunda manyetik karıştırıcı ile yapıldı. Katı amonyum sülfat miktarı aşağıdaki formülden hesaplandı.

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

V: Enzim çözeltisinin hacmi

S₁: 1'in kesri olarak çözeltideki amonyum sülfat doygunluğu

S₂: 1'in kesri olarak istenen amonyum sülfat doygunluğu

Yapılan işlemler sonucunda AR aktivitesinin tamamının %40-80 aralığında çöktüğü belirlendi. Daha sonra saflaştırma çalışmasında %40-80 amonyum sülfat çöktürmesi uygulandı. Elde edilen numune 13500 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atıldı ve 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 1 litre diyaliz tamponuna (5 mM β-merkaptotanol içeren, 10 mM Na-fosfat pH=7,4) karşı diyaliz edildi. Diyaliz işlemi +4°C'de gerçekleştirildi.

3.2.3.d. DE-52 Selüloz iyon değişim kromatografisi

1. DE-52 selüloz anyon değişim kolonunun hazırlanması

DE-52 selüloz anyon değişim kromatografisinde kullanılan kolon dolgu metaryeli hazır olarak satın alındığından dolayı şişirme işlemine gerek yoktur. Islak iyon değişim jeli 6ml/g oranında ve konsantre (0,2 M pH:7,2) Tris-HCl tamponu ile karıştırılarak 2-3 dk bekletildi. Daha sonra karışımın pH'sı asit veya baz ile 7,4'e ayarlandı. Jelin bir süre dibe çökmesi beklendi. Daha sonra süpernatant dekante edildi. Dibe çöken jel tekrar tampon ile 6 ml/g oranında süspanse edildi. Uygun hacmi ölçülebilen bir cam silindire

tatbik edilen karışımın dibе çökmesi beklendi. Bekleme süresi $t=n.h$ formülünden hesaplandı. Burada;

t = zaman (dk)

h = Jelin kolon içersindeki yüksekliği (cm)

n =1,3 ile 2,4 arasında değişen bir faktör

Dibe çöken jelin hacmi hesaplandı (Bu hacmin kolon tatbikinden sonra elde edilen yatak hacmine eşit olması beklenir). Süpernatant derhal dekante edildi. Daha sonra 200 mM Tris-HCl tamponu (pH=7,2) ile kolona tatbik edildi ve yatak hacminin 2-4 katı hacimde tampon ile kolon yıkandı.

2. 1.DE-52 selüloz anyon değişim kromatografisi

DE-52 selüloz kolonu (3.0x50 cm) 10 mM Na-fosfat, pH=7,4 ile dengelendikten sonra akış hızı 12 ml/saat olacak şekilde ayarlandı. Jel üzerindeki tampon seviyesi jel düzeyine indirilerek santrifüj sonrası elde edilen enzim çözeltisi pipet vasıtasıyla kolona tatbik edildi. Enzim homojenatı kolondan geçti ve tüplere 2'şer ml toplandı. Her bir tüpteki numunenin 340 nm'de aktivitesine bakıldı. Enzim aktivitesi görülen fraksiyonlar daha sonraki işlemlerde kullanıldı.

3. 2.DE-52 Selüloz iyon değişim kromatografisi

DE-52 Selüloz kolonu (3.0x50 cm) 10 mM Na-fosfat, pH=7,4 ile dengelendikten sonra akış hızı 12 ml/saat olacak şekilde ayarlandı. Jel üzerindeki tampon seviyesi jel düzeyine indirilerek 1.DE-52 Selüloz anyon değişim kolonundan alınan yüksek aktiviteli tüplerdeki birleştirilen numune pipet vasıtasıyla kolona tatbik edildi. Enzim homojenatı kolondan geçti ve tüplere 2'şer ml toplandı. Her bir tüpteki numunenin 340 nm'de aktivitesine bakıldı. Enzim aktivitesi görülen fraksiyonlar daha sonraki işlemlerde kullanıldı.

3.2.3.e. Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi

Kolon materyali olarak kullanılan Sephadex G-100, 5 g alınıp 200 ml suda oda sıcaklığında 1 gece bekletilerek şişirildi. Su trompu kullanarak şişirilmiş polimer materyalin içerisinde bulunan hava kabarcıkları alındı. Şişirilmiş ve havası uzaklaştırılmış jel pH=7,0 olan 200 mM Na- fosfat tamponuyla dolu kolona aktarıldı ve kolona paketlenildi. 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 0,2 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 koyun karaciğeri 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 kez 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, 1×10 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 absorbanslarının 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 -merkaptoetanol içeren 10 mM Na-fosfat tamponu (pH=7,4) ile yıkandı. Yıkama işlemine 280 nm'deki absorpsiyon değeri sıfır oluncaya kadar devam edildi. Daha sonra 0,25-2,5 mM NaCl gradientli Na-fosfat tampon çözeltisi ile elüsyon işlemi gerçekleştirildi ve AR enzimi elde edildi.

3.2.4. Sodyum dodesilsülfat-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). Öncelikle elektroforez plakaları önce su ve 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 pipetle plakaların arasına üst kesimde 0,5 cm kalıncaya kadar dolduruldu. Belli bir süre jelin donması beklendi, ayırma jelinin katılaştığından emin olunduktan sonra yığılma jeli hazırlanarak jelin üst kısmındaki boşluğa dolduruldu ve numune kuyucuklarının oluşması için tarak dikkatlice yerleştirildi. Yığılma jeli katılaştıktan sonra tarak dikkatlice çıkartılarak numune kuyuları belirlendi. Jel plakalarla birlikte elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu dolduruldu. Enzim numunesi; 100 μ l enzim örneği, 100 μ l numune tamponu, 100 μ l gliserol olacak şekilde hazırlandı. Örnekler 5 dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi. İnkübasyondan sonra enzim numunesinden kuyucuklara yükleme yapıldı. Elektroforez tankı kapatılarak alt tarafından (+) anot, üst taraftan ise (-) katot yerleştirildi ve önce 80 voltta 30 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 dikkatlice çıkarıldı ve tespit çözeltisine konuldu. Tespit çözeltisinde 30 dakika çalkalayıcıda yıkanan jel, çıkarılarak

redüksiyon çözeltisine konuldu ve 30 dakika çalkalayıcıda yıkandı. Jel daha sonra 3 kez 5'er dakika saf su ile çalkalayıcıda yıkandı. Boya çözeltisinde 20 dakika yıkanan jel saf sudan geçirilerek yıkama çözeltisine alındı. Yıkama çözeltisinde bantlar belirginleşene kadar elde çalkalanarak yıkandı. Protein bantları belirginleşen jel görüntüleme cihazına konularak 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. PER çözeltisi taze hazırlandı ve karıştırıldığında hemen döküldü.

Yığma 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.

3.2.5. Sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile AR enziminin molekül kütlesi tayini

Laemmli (1970), metoduna göre molekül kütlesi tayini şu şekilde yapıldı; standart protein olarak Thermo Scientific PageRuler Broad Range Unstained Protein Ladder 26630 kullanıldı. Elektroforez işleminden sonra standart proteinlerin R_f değerleri hesaplanarak $R_f - \log M_K$ standart grafiği çizildi. Daha sonra koyun karaciğerinden elde edilen AR enzimi için R_f değeri hesaplandı ve standart grafikte yerine konularak AR enziminin $\log M_K$ 'si belirlendi. Bu değer antilogaritması alınarak numunenin molekül kütlesi belirlendi.

Proteinlerin R_f değerleri şu formüle göre belirlendi;

$$R_f = \frac{X_e}{X_{boya}}$$

(X_e = Proteinin yürüme mesafesi, X_{boya} = Boyanın yürüme mesafesi)

3.2.6. AR enzimi için karakterizasyon çalışmaları

3.2.6.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 1 M Na-fosfat, tamponları hazırlandı ve her bir tamponda ayrı ayrı enzim aktivitesi belirlendi (Söyüt and Beydemir 2008).

3.2.6.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, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 mM Na-Fosfat tamponları kullanılarak belirlendi.

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

AR enziminin optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla ısıtmalı-soğutmali 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 70°C arasında 10°C aralıklarla aktivite ölçümü yapıldı (Demir *et al.* 2009).

3.2.6.d. Koyun karaciğeri aldoz redüktaz enziminin aktivasyon enerjisinin (E_a), aktivasyon entalpisinin (ΔH) ve Q10 değerinin hesaplanması ile ilgili çalışmalar

Koyun karaciğeri dokusundan saflaştırılan AR enziminin aktivitesinin optimum olduğu sıcaklıkların, E_a, ΔH ve Q10 değerlerinin belirlenmesi amacıyla dijital su banyosu kullanılarak 0°C ile 80°C arasında 10°C sıcaklık farkı oluşturularak, enzimin optimum pH'sında spektrofotometrik olarak AR aktivitesi deneyleri gerçekleştirildi. Daha sonra elde edilen aktivite değerlerinin logaritmaları (log k) alındı. Sıcaklık değerleri Kelvin'e çevrilerek grafikte $1/T \times 1000^{-1}$ olarak ifade edildi (Danişan *et al.* 2004). Daha sonra bu

grafikten faydalanılarak Arrhenius eğrisi elde edildi ve bu eğrinin eğimi kullanılarak aşağıdaki formüllerden aktivasyon enerjisi (E_a) ve aktivasyon entalpisi (ΔH) hesaplandı ($R=1,987 \times 10^{-3} \text{ kcal} \times \text{mol}^{-1} \times \text{K}^{-1}$);

$$Eğim = \frac{-E_a}{2,303 \times R} \quad \Delta H = E_a - (R \times T)$$

(Onganer *et al.* 1998; Segel 1975; Wilson 1971). Daha sonra bir enzim için, 10°C'lik sıcaklık değişiminin meydana getirdiği aktivite farklılığı olan Q10 değeri, aralarında 10°C fark olan iki aktivite değerinden yüksek olan aktivite değerinin düşük olan aktivite değerine bölünmesi ile hesaplandı (Keha ve Küfrevioğlu 2004).

3.2.6.e. 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 2ml'si 1ml enzim çözeltisi ile karıştırılarak +4°C'de muhafaza edildi. 6 gün boyunca 24 saat arayla yapılan aktivite ölçümünde enzimin stabil olduğu pH belirlendi (Söyüt *et al.* 2008).

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

DL-Gliseraldehit substratı için koyun karaciğeri 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.

3.2.7. Koyun karaciğeri AR enziminin aktivitesi üzerine bazı fenolik asitlerin etkilerinin belirlenmesi

Koyun karaciğeri AR enzim aktivitesi üzerine bazı fenolik asitlerin etkilerini belirlemek amacıyla kuvet ortamına değişik konsantrasyonlarda fenolik asit ilave edilerek aktivite değerleri okundu. Kullanılan fenolik asitin farklı konsantrasyonlarını oluşturmak için stok çözeltiler seyreltildi. Kullanılan stok çözelti hacmi gereken derişimi sağlamadığı zaman kuvete katılan tampon hacmi azaltılarak fenolik asit konsantrasyonu arttırıldı. Bu şekilde gereken konsantrasyon ayarlanmış oldu.

3.2.7.a. İnhibisyon etkisi gösteren fenolik asitler için IC₅₀ ve K_i değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar

İnhibisyon çalışmalarıyla ilgili farklı inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapılarak inhibisyon etkisi gösteren fenolik asitler belirlendi. Bu fenolik asitlerden inhibisyon etkisi yüksek olanların %Aktivite-[I] grafikleri çizildi, eğrinin denkleminde IC₅₀ değerleri hesaplandı. IC₅₀ değerleri hesaplanan fenolik asitlerin K_i değerlerini belirlemek amacıyla koyun karaciğeri AR enzim aktivitesini yarıya düşüren fenolik asit konsantrasyonu ile bu değerin altında ve üstünde iki sabit fenolik asit 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

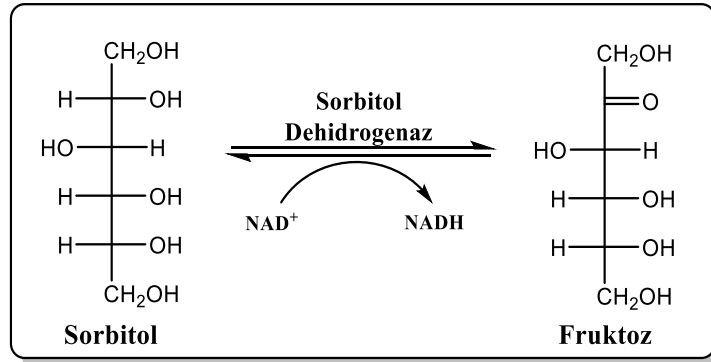
$$K_M I = K_M \times \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$$

formülünden, yarışmasız ve yarı yarışmalı inhibisyon için ise;

$$V_{max} = \frac{VI_{max}}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$$

formülünden yararlanılarak K_i değerleri belirlendi.

3.2.8. Koyun karaciğeri SDH enziminin aktivitesinin ölçümü



SDH enziminin aktivite ölçümü reaksiyonda belirtildiği gibi NAD^+ 'nin indirgenmesi sonucu oluşan absorbans artışı 340 nm'de 3 dakika süreyle ölçüldü. Bunun için 1 ml'lik kuvartz küvet içerisinde 50 mM Glisin/NaOH tamponu (pH=10,0), 10 mM sorbitol, 470 μ M NAD^+ ve enzim olacak şekilde hazırlandı (Lindstad *et al.* 1992). 340 nm'de köre karşı absorbans değerleri okundu. $NADH$ 'ın milimolar ekstinksiyon katsayısı aktivitenin hesaplanması için kullanıldı. Nikotinamid adenin dinükleotid (NAD^+), SDH tarafından sorbitol varlığında indirgenir. $NADH$ 'ın oluşum oranı SDH aktivitesine bağımlı olup 340 nm'deki absorbans artışı ile ölçülebilir. SDH aktivitesinin üniteleri dakika başına okside olan sorbitol'un mikromolünü 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 aşağıdaki gibidir;

$E\ddot{U}/ml$: 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

S_F : Seyreltme Faktörü

3.2.9. Protein tayini

3.2.9.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.

3.2.9.b. Kantitatif protein tayini

Koyun karaciğeri numunesinden hazırlanan homojenat, amonyum sülfat çöktürmesi, DE-52 Selüloz iyon değişim kromatografisi, CM-Selüloz C-52 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 dönüşümü ile olur. Bu yöntemin bozucu faktörlere karşı hassasiyeti oldukça düşüktür (1-100 μg arası). Reaksiyon yüksek oranda tekrarlanabilir ve hızlı cereyan eder ve iki dakikada tamamlanır. Renk stabilitesi 2 saatin 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 µl konuldu. Saf su ile bütün tüplerin hacmi 0,1 ml'ye tamamlandı ve 4,9 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 4,9 ml Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisinden oluşan karışım kullanıldı. Elde edilen sonuçlardan absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri standart grafik haline getirildi. Tüplere koyun karaciğerinden elde edilen homojenattan ve saflaştırma basamaklarından elde edilen enzim numunelerinden 0,1 er ml konularak üzerine 4,9'ar 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.

3.2.10. Koyun karaciğeri SDH enziminin saflaştırılması

3.2.10.a. Homojenat hazırlanması

Deneyde kullanılan koyun karaciğeri 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 KH₂PO₄ (pH=7,0) tampon çözeltisinin içinde homojenize edildi. Bu işlemden sonra süspansiyon 30 dakika 13000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası çökelek atıldı, süpernatant bir sonraki saflaştırma basamağında kullanıldı.

3.2.10.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.

Koyun karaciğerinden elde edilen SDH enzim homojenatı sırasıyla %0-20, %20-30, %30-40, %40-50, %50-60, %60-70, %70-80 ve %80-90 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 çözünmüş olmasına dikkat edildi. Amonyum sülfatın homojenatta çözünme işlemi buz banyosunda manyetik karıştırıcı ile yapıldı. Katı amonyum sülfat miktarı aşağıdaki formülden hesaplandı.

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

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 %30-70 aralığında çöktüğü belirlendi (Alım 2010). 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 edildi (böylece istenmeyen 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 çözünebileceği minimum fosfat tamponunda (5 mM KH_2PO_4 , pH=7,9) çözüldü. Amonyum sülfat çöktürmesi işlemleri sırasında ortamın sıcaklığı buz banyosuyla düşük tutulmaya çalışıldı.

3.2.10.c. Diyaliz

Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen numune diyaliz torbasına yerleştirilerek 2 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.

3.2.10.d. DE-52 Selüloz iyon değişim kromatografisi

1. DE-52 Selüloz anyon değişim kolonunun hazırlanması

DE-52 selüloz anyon değişim kromatografisinde kullanılan kolon dolgu metaryeli hazır olarak satın alındığından dolayı şişirme işlemine gerek yoktur. Islak iyon değişim jeli 6ml/g oranında ve konsantre (0,2 M pH:7,9) KH_2PO_4 tamponu ile karıştırılarak 2-3 dk bekletildi. Jelin bir süre dibe çökmesi beklendi. Daha sonra süpernatant dekante edildi. Dibe çöken jel tekrar tampon ile 6 ml/g oranında süspanse edildi. Uygun hacmi ölçülebilen bir cam silindire tatbik edilen karışımın dibe çökmesi beklendi. Bekleme süresi $t=n.h$ formülünden hesaplandı. Burada;

t = zaman (dk)

h = Jelin kolon içersindeki yüksekliği (cm)

n =1,3 ile 2,4 arasında değişen bir faktör

Dibe çöken jelin hacmi hesaplandı (Bu hacmin kolon tatbikinden sonra elde edilen yatak hacmine eşit olması beklenir). Süpernatant derhal dekante edildi. Daha sonra 200

mM Tris-HCl tamponu (pH=7,9) ile kolona tatbik edildi ve yatak hacminin 2-4 katı hacimde tampon ile kolon yıkandı.

2. DE-52 Selüloz anyon değişim kromatografisi

DE-52 selüloz kolonu (3.0x50 cm) 10 mM KH_2PO_4 , pH=7,9 ile dengelendikten sonra akış hızı 12 ml/saat olacak şekilde ayarlandı. Jel üzerindeki tampon seviyesi jel düzeyine indirilerek santrifüj sonrası elde edilen enzim çözeltisi pipet vasıtasıyla kolona tatbik edildi. SDH enzimi DE-52 Selüloz kolon materyaline tutunmadığından, kolonu dengeleme işleminde kullanılan 5 mM KH_2PO_4 tamponu (pH=7,9) kullanılarak elüsyon işlemi yapıldı. Elüatlar, kolon akış hızı 12 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 -merkaptotanol içeren, 5 mM KH_2PO_4 pH=6,2 olan tampona karşı diyaliz edildi. Böylece birleştirilen elüat çözeltisi CM-Selüloz C-52 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. Enzim homojenatı kolondan geçti ve tüplere 2'şer ml toplandı. Her bir tüpteki numunenin 340 nm'de aktivitesine bakıldı. Enzim aktivitesi görülen fraksiyonlar daha sonraki işlemlerde kullanıldı.

3.2.10.e. CM-Selüloz C-52 iyon değişim kromatografisi

1. CM-Selüloz C-52 iyon değişim kolonunun hazırlanması

Çalışmada kullanılan katyon değiştirici CM-Selüloz C-52 iyon değişim kromatografisinde kullanılan kolon dolgu materyeli hazır olarak satın alındığından dolayı şişirme işlemine gerek yoktur. Islak iyon değişim jeli 6ml/g oranında ve konsantre (0,2 M pH:6,2) KH_2PO_4 tamponu ile karıştırılarak 2-3 dk bekletildi. Jelin bir süre dibe çökmesi beklendi. Daha sonra süpernatant dekante edildi. Dibe çöken jel

tekrar tampon ile 6 ml/g oranında süspanse edildi. Uygun hacmi ölçülebilen bir cam silindire tatbik edilen karışımın dibeye çökmesi beklendi. Bekleme süresi $t=n.h$ formülünden hesaplandı. Burada;

t = zaman (dk)

h = Jelin kolon içersindeki yüksekliği (cm)

n =1,3 ile 2,4 arasında değişen bir faktör

Dibe çöken jelin hacmi hesaplandı (Bu hacmin kolon tatbikinden sonra elde edilen yatak hacmine eşit olması beklenir). Süpernatant derhal dekante edildi. Daha sonra 200 mM Tris-HCl tamponu (pH=7,9) ile kolona tatbik edildi ve yatak hacminin 2-4 katı hacimde tampon ile kolon yıkandı.

2. CM-Selüloz C-52 iyon değişim kromatografisi

CM-Selüloz C-52 kolonu (3.0x50 cm) 5 mM KH_2PO_4 tamponu (pH=6,2) ile dengelendikten sonra akış hızı 12 ml/saat olacak şekilde ayarlandı. Jel üzerindeki tampon seviyesi jel düzeyine indirilerek DE-52 selüloz iyon değişim kolonundan toplanan ve diyaliz edilen enzim çözeltisi pipet vasıtasıyla kolona tatbik edildi. Jel üzerindeki tampon seviyesi jel düzeyine indirilerek santrifüj sonrası elde edilen enzim çözeltisi pipet vasıtasıyla kolona tatbik edildi. SDH enzimi CM-Selüloz C-52 kolon materyaline tutundu ve 5mM KH_2PO_4 tamponu (pH=6,2) ile yıkama işlemi yapıldı. Yıkama işlemine üstten ilave edilen yıkama tamponunun pH ve 280 nm'deki absorbans değerleri eşit oluncaya kadar devam edildi. Yıkama tamamlandıktan sonra elüsyon için 0,25-2,5 mM NaCl gradientli Na-fosfat tampon çözeltisi ile elüsyon işlemi gerçekleştirildi. Elüatlar, kolon akış hızı 12 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 daha sonraki işlemlerde kullanıldı.

3.2.10.f. 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=6,2 olan 200 mM KH_2PO_4 tamponuyla dolu kolona aktarıldı ve paketlenildi. Kolonu dengelemek için 5 mM KH_2PO_4 pH=6,2 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 0,2 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.

3.2.11. Sodyum dodesilsülfat-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. 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. Yığma jeli katılaştıktan 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 numunesi; 100 µl enzim örneği, 100 µl numune tamponu, 100 µl gliserol olacak şekilde hazırlandı. Örnekler 5 dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi. İnkübasyondan sonra enzim numuneleri her bir kuyucuğa dikkatli bir şekilde yüklendi. Elektroforez tankı kapatılarak alt tarafından (+) anot, üst taraftan ise (-) katot yerleştirildi. Önce 80 voltta 30 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 tespit çözeltilisine konuldu. Tespit çözeltilisinde 30 dakika çalkalayıcıda yıkanan jel, çıkarılarak redüksiyon çözeltilisine konuldu ve 30 dakika çalkalayıcıda yıkandı. Daha sonra jel 3 kez 5'er dakika saf su ile çalkalayıcıda yıkandı. Boya çözeltilisinde 20 dakika yıkanan jel saf sudan geçirilerek yıkama çözeltilisine alındı. Yıkama çözeltilisinde bantlar belirginleşene kadar elde çalkalanarak yıkandı. Protein bantları belirginleşen jel görüntüleme cihazına konularak fotoğrafı çekildi.

Ayrırma 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. PER çözeltilisi taze hazırlandı ve karıştırıldığında hemen döküldü.

Yığma 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.

3.2.12. Sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile SDH enziminin molekül kütlesi tayini

Laemmli (1970), metoduna göre molekül kütlesi tayini şu şekilde yapıldı; standart protein olarak Thermo Scientific PageRuler Broad Range Unstained Protein Ladder 26630 kullanıldı. Elektroforez işleminden sonra standart proteinlerin R_f değerleri hesaplanarak $R_f - \log M_K$ standart grafiği çizildi. Daha sonra koyun karaciğerinden elde edilen SDH enzimi için R_f değeri hesaplandı ve standart grafikte yerine konularak SDH enziminin $\log M_K$ 'sı belirlendi. Bu değerın antilogaritması alınarak numunenin molekül kütlesi belirlendi.

Proteinlerin R_f değerleri şu formüle göre belirlendi;

$$R_f = \frac{X_e}{X_{boya}}$$

(X_e = Proteinin yürüme mesafesi, X_{boya} = Boyanın yürüme mesafesi)

3.2.13. Koyun karaciğeri SDH enziminin aktivitesi üzerine bazı fenolik asitlerin etkilerinin belirlenmesi

Koyun karaciğeri SDH enzim aktivitesi üzerine bazı fenolik asitlerin etkilerini belirlemek amacıyla küvet ortamına değişik konsantrasyonlarda fenolik asit ilave edilerek aktivite değerleri okundu. Kullanılan fenolik asitin farklı konsantrasyonlarını oluşturmak için stok çözeltiler seyreltildi. Kullanılan stok çözelti hacmi gereken derişimi sağlamadığı zaman küvete katılan tampon hacmi azaltılarak fenolik asit konsantrasyonu artırıldı. Bu şekilde gereken konsantrasyon ayarlanmış oldu.

3.2.13.a. İnhibisyon etkisi gösteren bazı fenolik asitler için IC₅₀ ve K_i değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar

İnhibisyon çalışmalarıyla ilgili farklı inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapılarak inhibisyon etkisi gösteren fenolik asitler belirlendi. Bu fenolik asitlerden inhibisyon etkisi yüksek olanların %Aktivite-[I] grafikleri çizildi, eğrinin denkleminde IC₅₀ değerleri hesaplandı. IC₅₀ değerleri hesaplanan bazı fenolik asitlerin K_i değerlerini belirlemek amacıyla koyun karaciğeri SDH enzim aktivitesini yarıya düşüren fenolik asit konsantrasyonu ile bu değerin altında ve üstünde iki sabit fenolik asit 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

$$K_M I = K_M \times \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$$

ifadesinden, yarışmasız ve yarı yarışmalı inhibisyon için ise,

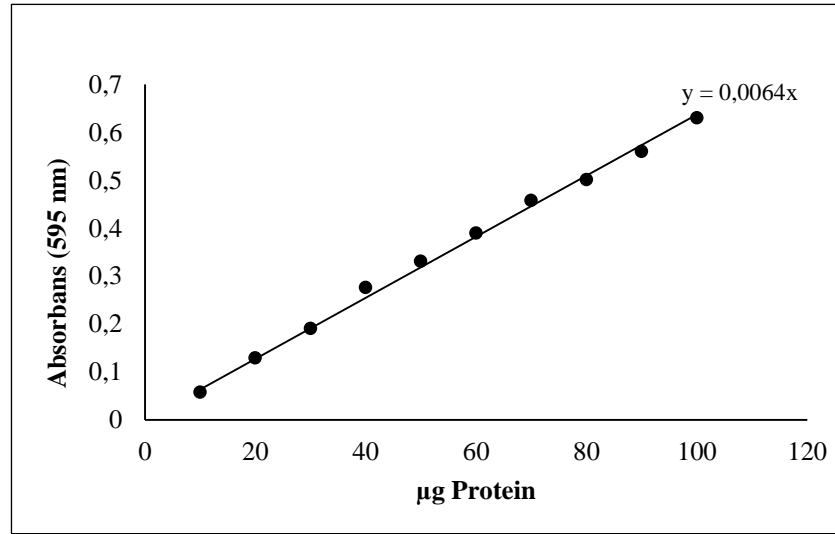
$$V_{max} = \frac{V_{I_{max}}}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$$

formülünden yararlanılarak K_i değerleri belirlendi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

Elde edilen enzim çözeltilerindeki kantitatif protein tayini Bradford yöntemiyle belirlendi. Standart grafik bölüm 3.2.2.b’de bahsedildiği gibi çizildi. Homojenat, DE-52 Selüloz iyon değişim kromatografisi, jel filtrasyon kromatografisi ve afinite kromatografisi sonucu elde edilen enzim çözeltilerindeki protein tayini bu standart grafikten faydalanılarak bulundu. Standart çözeltilerin μg proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 4.1’de gösterildi.



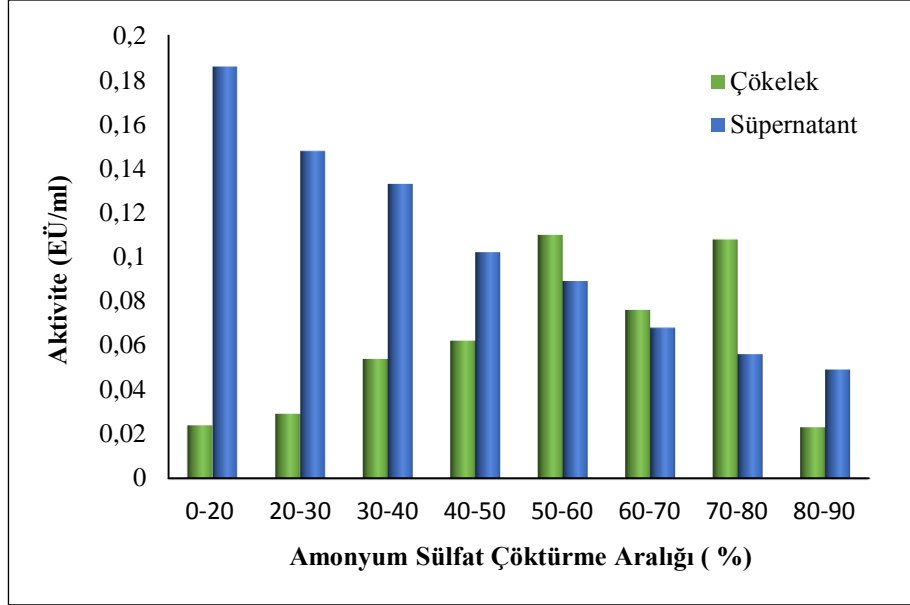
Şekil 4.1. Bradford yöntemiyle proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart grafik

4.2. Koyun Karaciğerinden Aldoz Redüktaz Enziminin Saflaştırılması

4.2.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Amonyum sülfat çöktürmesi bölüm 3.2.3.b’de anlatıldığı gibi yapıldı. Her santrifüj işleminden sonra hem süpernatantta hemde çökelekte aktivite bakılarak çöktürme aralığı

%40-80 olarak belirlendi. Amonyum sülfat çöktürme işlemi buz banyosunda magnetik karıştırıcı ile yapıldı.



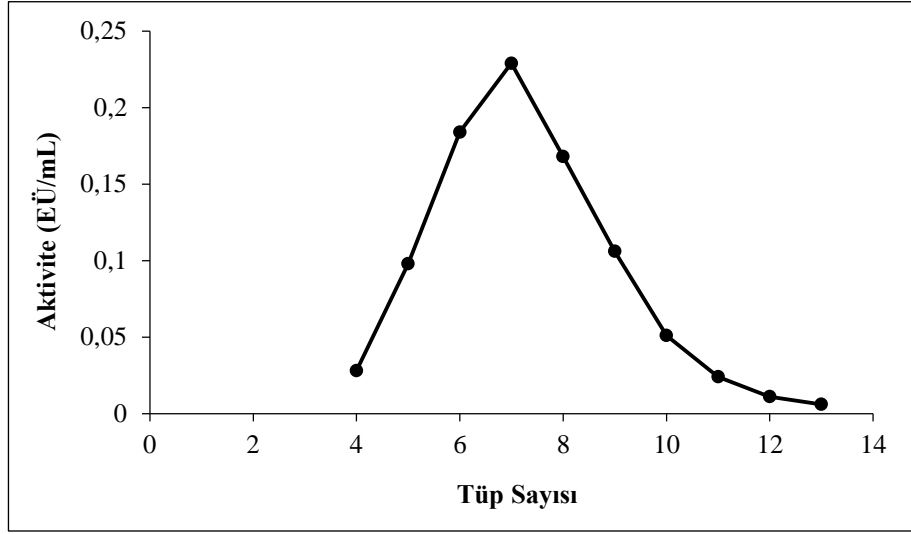
Şekil 4.2. Amonyum sülfat çöktürme aralığını gösteren grafik

4.2.2. Diyaliz

Diyaliz işlemi bölüm 3.2.3.c’de anlatıldığı gibi yapıldı. Kullanılan yöntemeye uygun diyaliz tamponu her defasında değiştirildi.

4.2.3. 1.DE-52 Selüloz iyon değişim kromatografisi sonuçları

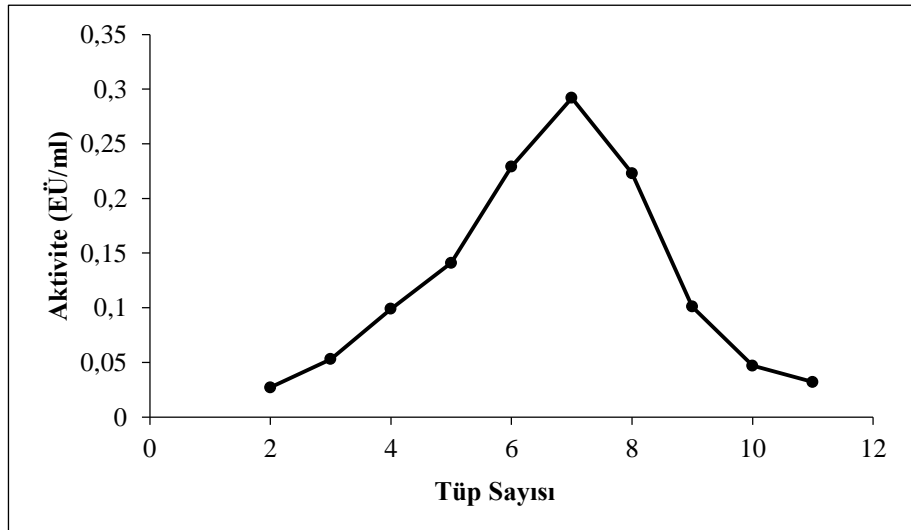
DE-52 Selüloz iyon değişim kromatografisi bölüm 3.2.3.d.2’de anlatıldığı gibi yapıldı.



Şekil 4.3. 1.DE-52 Selüloz iyon değişim kromatografisi sonuçlarını gösteren elüsyon grafiği

4.2.4. 2.DE-52 Selüloz iyon değişim kromatografisi sonuçları

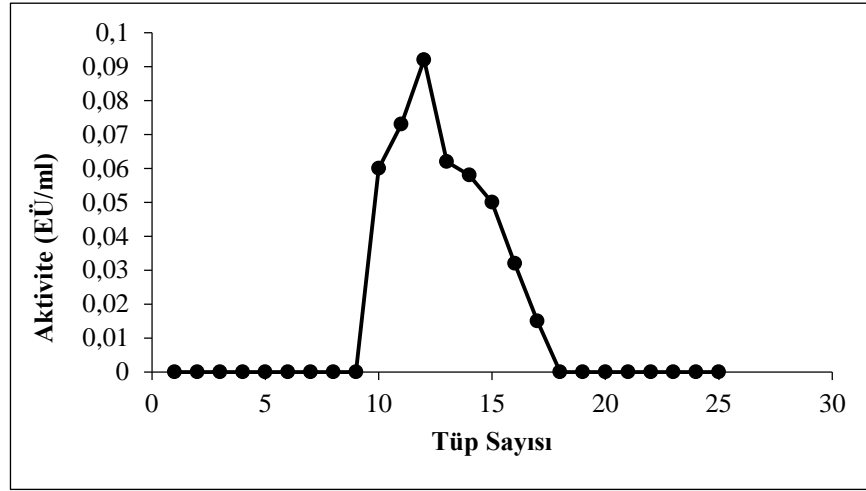
DE-52 Selüloz iyon değişim kromatografisi bölüm 3.2.3.d.3'de anlatıldığı gibi yapıldı.



Şekil 4.4. 2. DE-52 Selüloz iyon değişim kromatografisi sonuçlarını gösteren elüsyon grafiği

4.2.5. Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi sonuçları

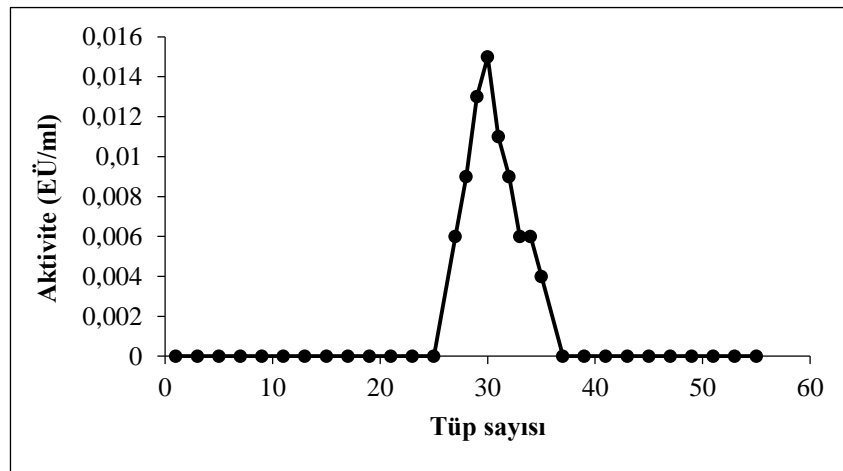
Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi bölüm 3.2.3.e’de anlatıldığı gibi yapıldı.



Şekil 4.5. Jel filtrasyon kromatografisi sonuçlarını gösteren elüsyon grafiği

4.2.6. 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi sonuçları

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



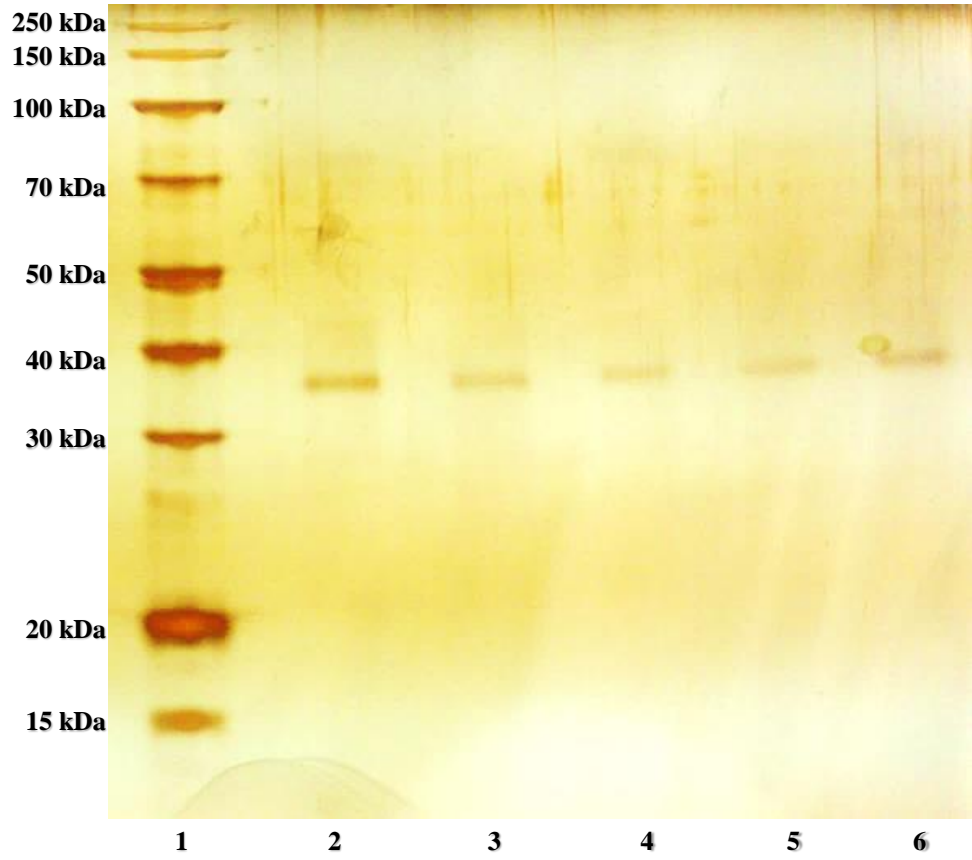
Şekil 4.6. 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi sonuçlarını gösteren elüsyon grafiği

Çizelge 4.1. Koyun karaciğeri AR 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	0,171	10	30	1,71	300	$5,7 \times 10^{-3}$	1	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ ve Diyaliz	0,206	8	27,18	1,65	217,44	$7,6 \times 10^{-3}$	1,33	96,37
1.DE-52 iyon değişim kromatografisi	0,227	6	7,83	1,362	46,97	0,029	5,02	79,65
2.DE-52 iyon değişim kromatografisi	0,291	2	8,9	0,438	17,8	0,025	4,39	25,61
Jel filtrasyon kromatografisi	0,069	5	0,654	0,345	3,27	0,106	18,6	20,02
Afinite kromatografisi	0,012	3	0,013	0,036	0,039	0,923	161,9	2,11

4.2.7. Koyun karaciğerinden saflaştırılan aldoz redüktaz enziminin SDS-PAGE ile saflık kontrolü

Koyun karaciğeri aldoz redüktaz enziminin 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi sonucu elde edilen elüatlardaki enzimin saflığını kontrol etmek için SDS-PAGE yöntemi kullanıldı. Bu amaçla bölüm 3.2.4'de anlatılan elektroforez sistemi kurularak enzim numuneleri sırayla kuyucuklara uygulandı ve yürütüldü. Elde edilen bantları gösteren fotoğraf Şekil 4.7'de gösterildi.

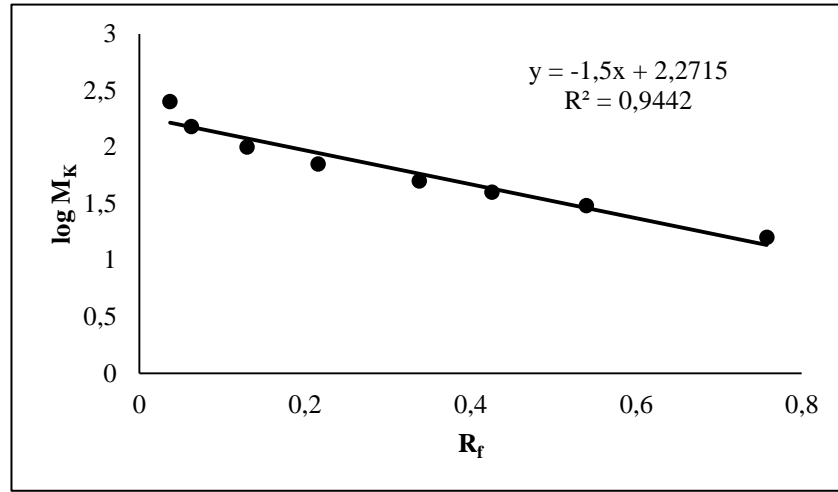


Şekil 4.7. Koyun karaciğerinden saflaştırılan aldoz redüktaz enziminin SDS-PAGE ile saflık kontrolü

*1.kuyu standart proteinler (*1. Kuyu standart proteinler (Thermo Scientific PageRuler Broad Range Unstained Protein Ladder 26630)), 2., 3., 4., 5. ve 6. kuyular koyun karaciğerinden saflaştırılan aldoz redüktaz enzimi.

4.2.8. Koyun karaciğeri aldoz redüktaz enziminin SDS-PAGE ile mol kütlesinin belirlenmesine yönelik sonuçlar

Koyun karaciğerinden elde edilen saf enzim SDS-PAGE’de yürütüldükten sonra fotoğrafı çekildi (Şekil 4.7). Standart proteinlerin ve enzimin jelde yürüdükleri mesafe ölçülerek R_f değerleri hesaplandı. R_f - $\log M_K$ değerleri ile grafik çizildi (Şekil 4.8). Grafikten faydalanılarak koyun karaciğeri aldoz redüktaz enziminin molekül kütlesi ise yaklaşık 38,82 kDa olarak hesaplandı.

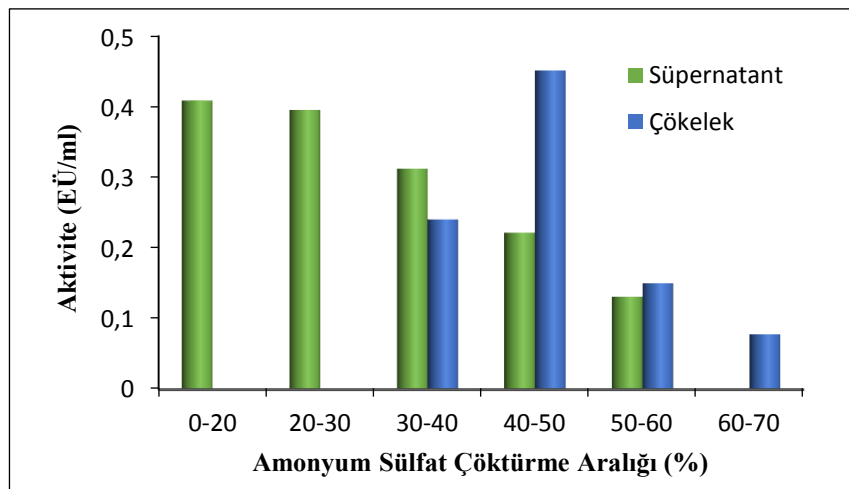


Şekil 4.8. SDS-PAGE ile çizilen R_f - log M_K grafiği

4.3. Koyun karaciğerinden Sorbitol Dehidrogenaz Enziminin Saflaştırılması

4.3.1. Amonyum sülfat çöktürmesi

Bölüm 3.2.10.b'de anlatıldığı gibi amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Her defasında çökelekte ve süpernatantta enzim aktivitesine bakılarak çöktürme aralığı %30-70 olarak belirlendi. İşlemler buz banyosunda yapıldı (Alım 2010).



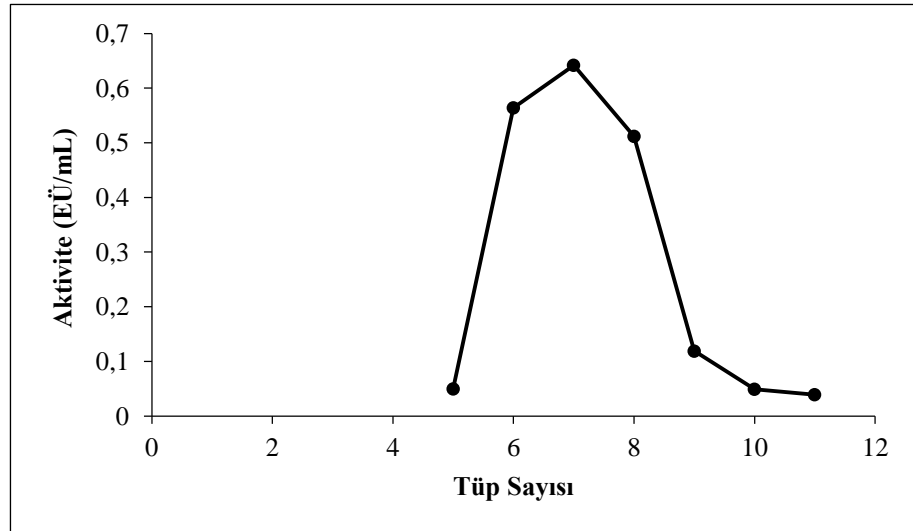
Şekil 4.9. Koyun karaciğeri SDH enziminin amonyum sülfat çöktürme aralığını gösteren grafik (Alım 2010)

4.3.2. Diyaliz

Bölüm 3.2.10.c'de anlatıldığı gibi diyaliz işlemi gerçekleştirildi. Diyaliz tamponu kullanılan yöntemle göre her defasında değiştirildi.

4.3.3. DE-52 Selüloz iyon değişim kromatografisi sonuçları

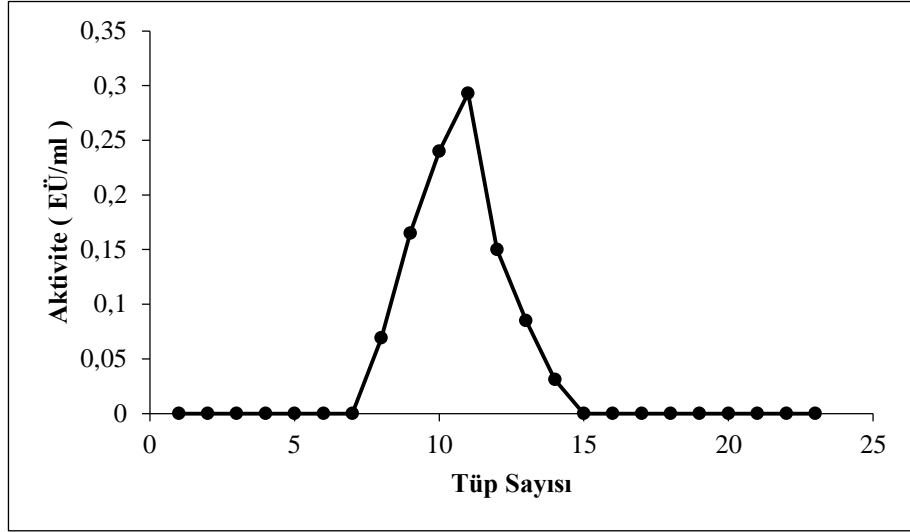
DE-52 Selüloz iyon değişim kromatografisi bölüm 3.2.10.d'de anlatıldığı gibi yapıldı.



Şekil 4.10. DE-52 Selüloz iyon değişim kromatografisi sonuçlarını gösteren elüsyon grafiği

4.3.4. CM-Selüloz C-52 iyon değişim kromatografisi sonuçları

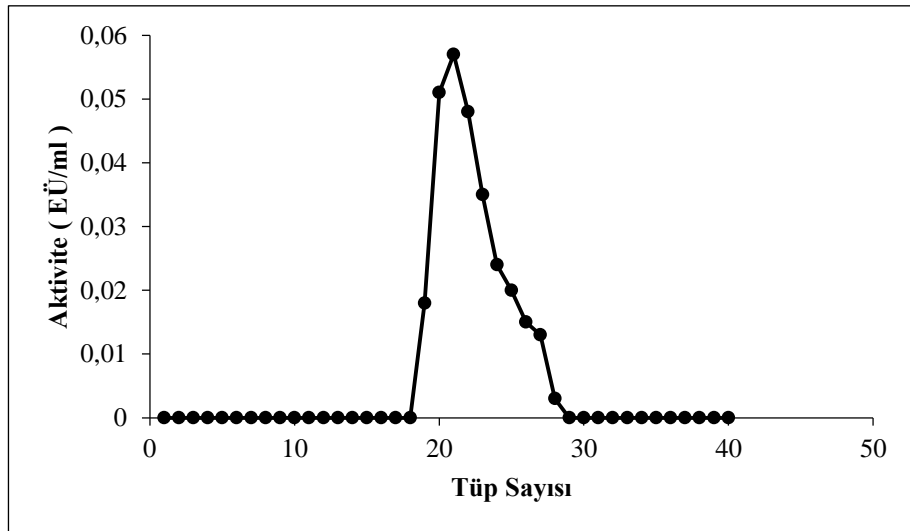
CM-Selüloz C-52 iyon değişim kromatografisi bölüm 3.2.10.e'de anlatıldığı gibi yapıldı.



Şekil 4.11. CM-Sephadex C-52 iyon değişim kromatografisi sonuçlarını gösteren elüsyon grafiği

4.3.5. Jel Filtrasyon kromatografisi sonuçları

Jel filtrasyon kromatografisi bölüm 3.2.10.f'de anlatıldığı gibi yapıldı.



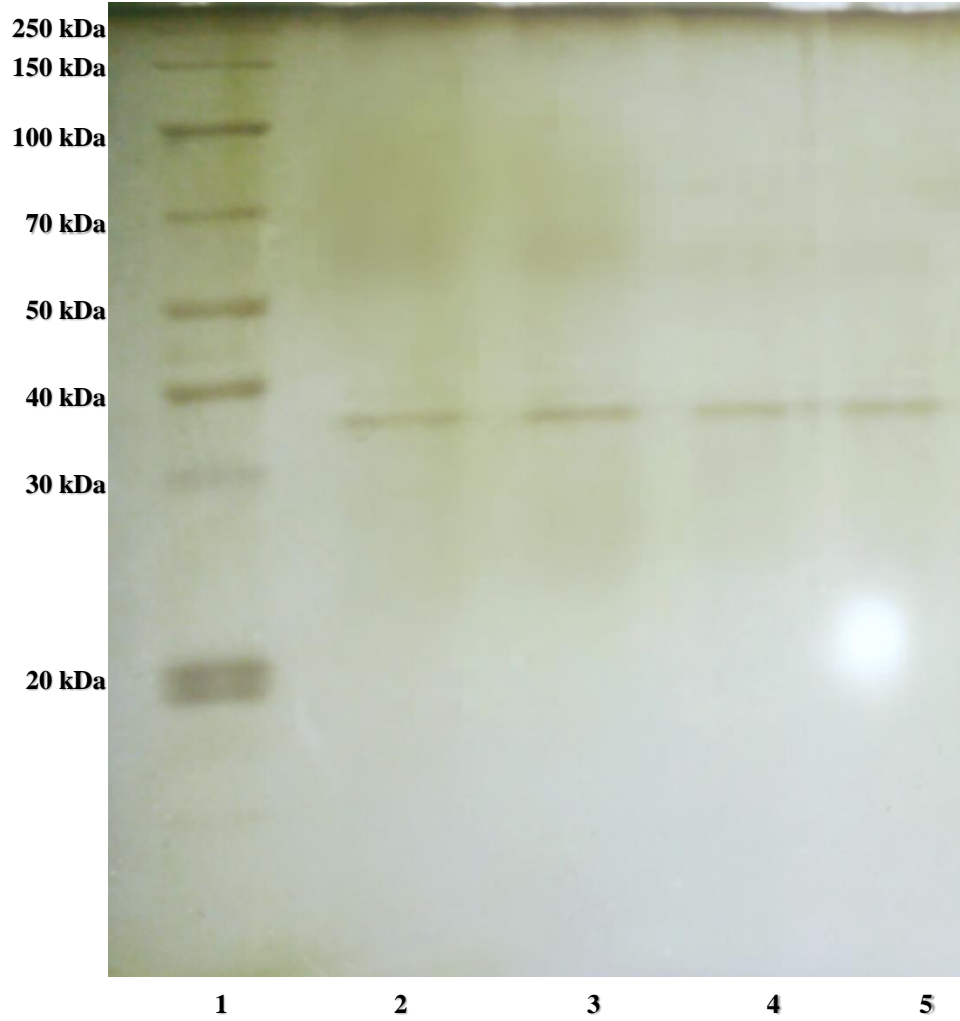
Şekil 4.12. Jel filtrasyon kromatografisi sonuçlarını gösteren elüsyon grafiği

Çizelge 4.2. Koyun karaciğeri 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	0,523	20	25,6	10,46	512	0,0204	1	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ ve Diyaliz	0,695	12	22,8	8,34	273,6	0,0304	1,49	79,73
DE-52 iyon değişim kromatografisi	0,639	10	6,5	6,39	65	0,098	4,80	61,09
CM iyon değişim kromatografisi	0,293	3	1,33	0,879	3,99	0,220	10,78	8,40
Jel filtrasyon kromatografisi	0,055	1	0,297	0,055	0,297	0,185	9,07	0,53

4.3.6. Koyun karaciğerinden saflaştırılan SDH enziminin SDS-PAGE ile saflık kontrolü

Koyun karaciğeri SDH enziminin jel filtrasyon kromatografisi sonucu elde edilen elüatlardaki enzimin saflığını kontrol etmek için SDS-PAGE yöntemi kullanıldı. Bu amaçla bölüm 3.2.11’de anlatılan elektroforez sistemi kurularak enzim numuneleri sırayla kuyucuklara uygulandı ve yürütüldü. Elde edilen bantları gösteren fotoğraf Şekil 4.13’de gösterildi.

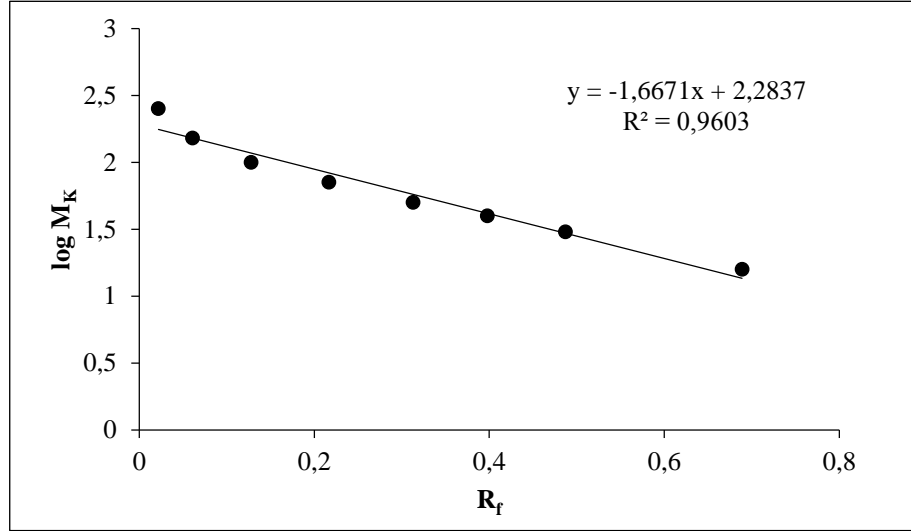


Şekil 4.13. Koyun karaciğerinden saflaştırılan SDH enziminin SDS-PAGE ile saflık kontrolü

*1.kuyu standart proteinler (*1. Kuyu standart proteinler (Thermo Scientific PageRuler Broad Range Unstained Protein Ladder 26630), 2., 3., 4. ve 5. kuyular koyun karaciğerinden saflaştırılan aldoz redüktaz enzimi

4.3.7. Koyun karaciğeri SDH enziminin SDS-PAGE ile mol kütesinin belirlenmesine yönelik sonuçlar

Koyun karaciğerinden elde edilen saf enzim SDS-PAGE’de yürütüldükten sonra fotoğrafı çekildi (Şekil 4.13). Standart proteinlerin ve enzimin jelde yürüdükleri mesafe ölçülerek R_f değerleri hesaplandı. $R_f - \log M_K$ değerleri ile grafik çizildi (Şekil 4.14). Grafikten faydalanılarak koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enziminin molekül kütesi ise yaklaşık 37,74 kDa olarak hesaplandı.



Şekil 4.14. SDS-PAGE ile çizilen R_f - log M_K grafiği

4.4. Koyun Karaciğeri Aldoz Redüktaz Enziminin Karakterizasyon Çalışmaları ile İlgili Sonuçlar

4.4.1. Koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzimi için optimum pH bulunmasına yönelik sonuçlar

Koyun karaciğerinden saflaştırılan aldoz redüktaz enzimi için optimum pH bölüm 3.2.6.a'da anlatıldığı gibi pH; 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 ve 8,0 olan 1M sodyum fosfat, pH; 7,0, 7,5, 8,0, 8,5 ve 9,0 olan 1 M Tris/HCl ve pH; 9,0, 9,5, 10,0 ve 10,5 olan 1 M glisin/NaOH tampon çözeltileri kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlendi (Şekil 4.15, Çizelge 4.3, Çizelge 4.4 ve Çizelge 4.5). Koyun karaciğerinden saflaştırılan aldoz redüktaz enzimi için sodyum fosfat tamponunda optimum pH=5,5 olarak belirlendi.

Çizelge 4.3. 1M Na-Fosfat tamponu kullanılarak koyun karaciğerinden saflaştırılan aldoz redüktaz enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları

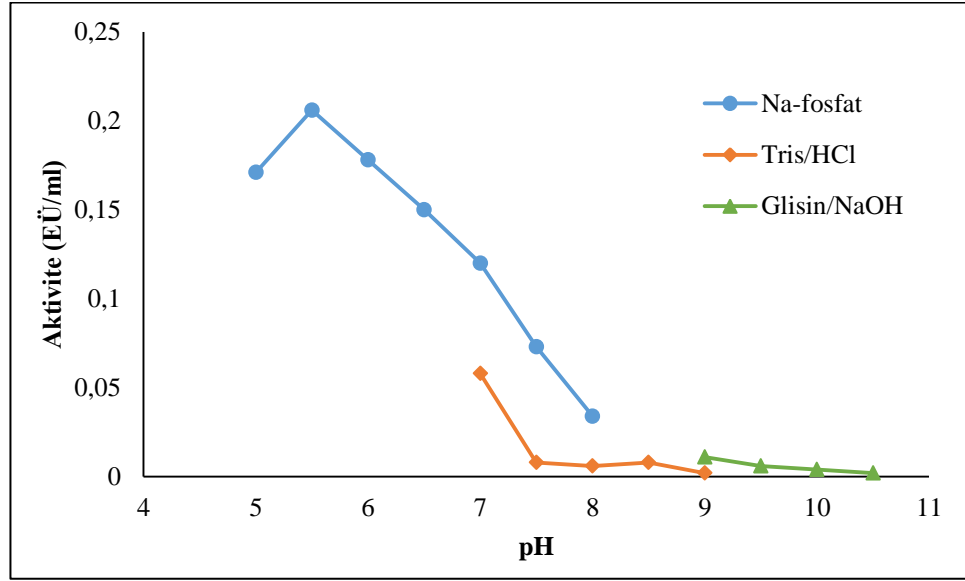
pH	Aktivite (EÜ/ml)
5,0	0,171
5,5	0,206
6,0	0,178
6,5	0,150
7,0	0,120
7,5	0,073
8,0	0,034

Çizelge 4.4. 1M Tris/HCl tamponu kullanılarak koyun karaciğerinden saflaştırılan aldoz redüktaz enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları

pH	Aktivite (EÜ/ml)
7,0	0,058
7,5	0,008
8,0	0,006
8,5	0,004
9,0	0,002

Çizelge 4.5. 1M Glisin/NaOH tamponu kullanılarak koyun karaciğerinden saflaştırılan aldoz redüktaz enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları

pH	Aktivite (EÜ/ml)
9,0	0,011
9,5	0,006
10,0	0,004
10,5	0,002



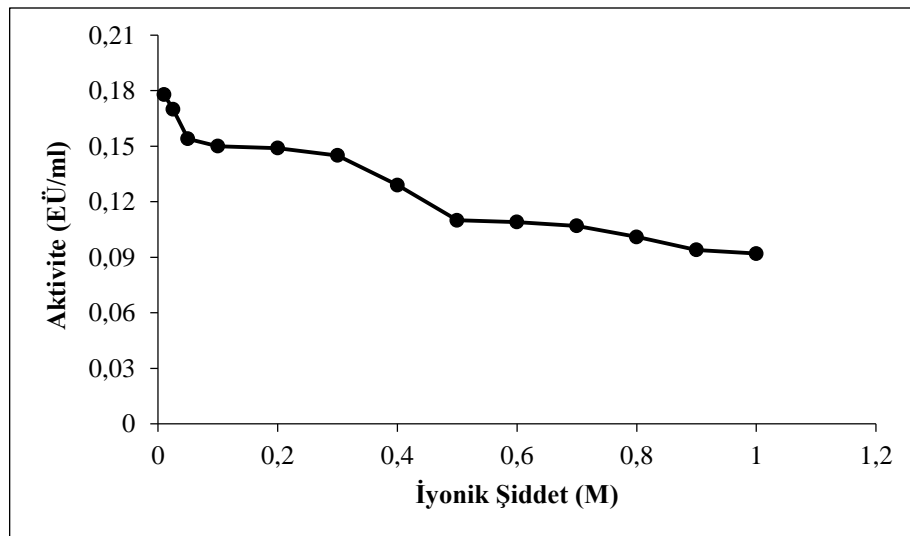
Şekil 4.15. Koyun karaciğerinden saflaştırılan aldoz redüktaz enzimi için yapılan optimum pH çalışmasının sonucu çizilen Aktivite-pH grafiği

4.4.2. Koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzimi için optimum iyonik şiddetin belirlenmesine yönelik sonuçlar

Koyun karaciğerinden saflaştırılan aldoz redüktaz enzim aktivitesi için en uygun iyonik şiddetin belirlenmesi amacıyla daha önce yapılan çalışmalarda en uygun tampon olan Na-fosfat tamponunun optimum pH'daki değişik konsantrasyonlardaki çözeltileri bölüm 3.2.6.b'de bahsedildiği gibi hazırlandı. Farklı Na-fosfat konsantrasyonlarında aktivite ölçümleri yapılarak Na-fosfat konsantrasyonu ile aktivite değerlerinden oluşan grafik çizildi. Yapılan ölçümler sonucunda koyun karaciğerinden saflaştırılan aldoz redüktaz enzimi için en uygun iyonik şiddetin 10 mM Na-fosfat (pH=5,5) tamponu olarak tespit edildi (Şekil 4.16 ve Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. Koyun karaciğerinden saflaştırılan aldoz redüktaz enziminin optimum iyonik şiddet için Na-fosfat (pH=5,5) tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

[Na-fosfat] (mM)	Aktivite (EÜ/ml)
10	0,178
25	0,170
50	0,154
100	0,150
200	0,149
300	0,145
400	0,129
500	0,110
600	0,109
700	0,107
800	0,101
900	0,094
1000	0,092



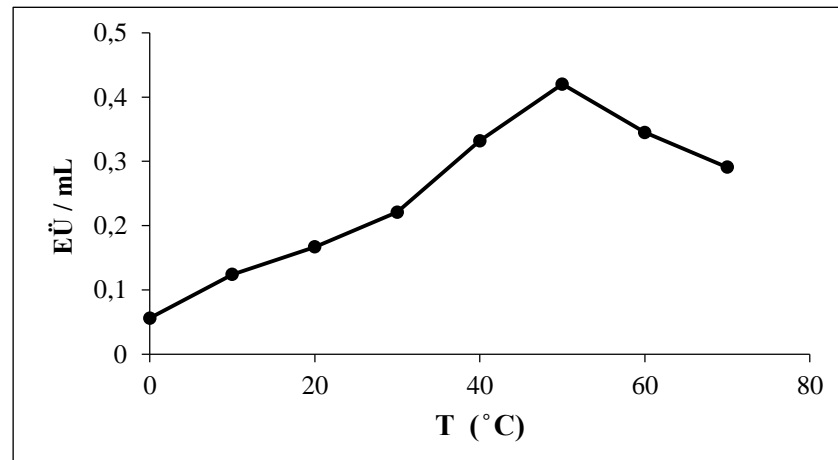
Şekil 4.16. Değişik konsantrasyonlardaki Na-fosfat (pH=5,5) tampon çözeltileri kullanılarak koyun karaciğerinden saflaştırılan aldoz redüktaz enziminin optimum iyonik şiddetini belirlemek için çizilen İyonik Şiddet-Aktivite grafiği

4.4.3. Koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzimi için optimum sıcaklık belirlenmesine yönelik çalışma sonuçları

Koyun karaciğerinden saflaştırılan aldoz redüktaz enzim aktivitesi için optimum sıcaklığı belirlemek üzere optimum pH ve iyonik şiddete sahip 10 mM Na-fosfat (pH=5,5) tampon çözeltisi kullanıldı. 0°C ile 70°C arasında her 10°C'de bir olmak üzere bölüm 3.2.6.c'de bahsedildiği gibi aktivite ölçümü yapıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.17 ve Çizelge 4.7'de gösterildi. Bu ölçümler sonucunda optimum sıcaklık 50°C olarak tespit edildi.

Çizelge 4.7. Koyun karaciğerinden saflaştırılan aldoz redüktaz enziminin optimum sıcaklık için Na-fosfat (pH=5,5) tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

Sıcaklık (°C)	Aktivite (EÜ/ml)
0	0,056
10	0,124
20	0,167
30	0,221
40	0,332
50	0,420
60	0,345
70	0,291



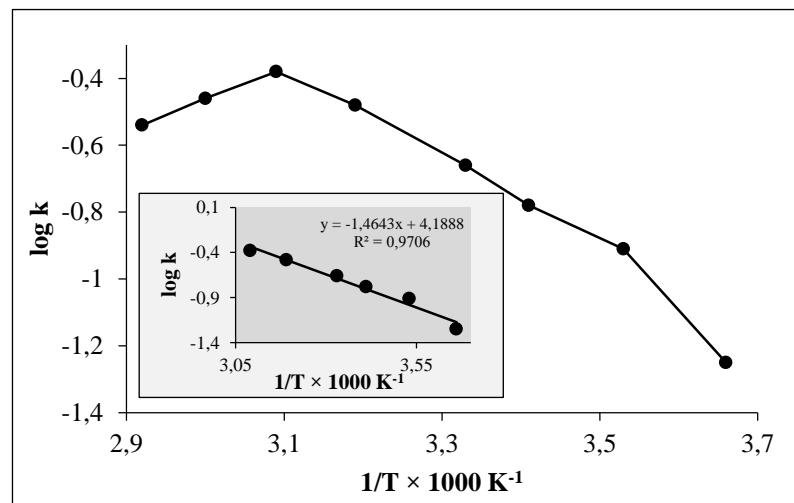
Şekil 4.17. Koyun karaciğerinden saflaştırılan aldoz redüktaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için çizilen Sıcaklık–Aktivite grafiği

4.4.4. Koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzimi için aktivasyon enerjisi (E_a), aktivasyon entalpisi (ΔH) ve Q10 değerlerinin belirlenmesi sonuçları

Koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzimi için optimum sıcaklık çalışmalarında elde edilen aktivite değerlerinin logaritmaları alınarak $\log k^{-1}/T$ grafikleri çizildi. Bu grafikten faydalanılarak Arrhenius eğrisi elde edildi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.8 ve Şekil 4.18'de gösterildi. Bu ölçümler sonucunda $E_a=2,16$ kcal/mol, $\Delta H=1,52$ kcal/mol ve $Q_{10}=1,33$ olarak belirlendi.

Çizelge 4.8. Koyun karaciğeri AR enzimi için aktivite ölçümünün logaritma değerleri

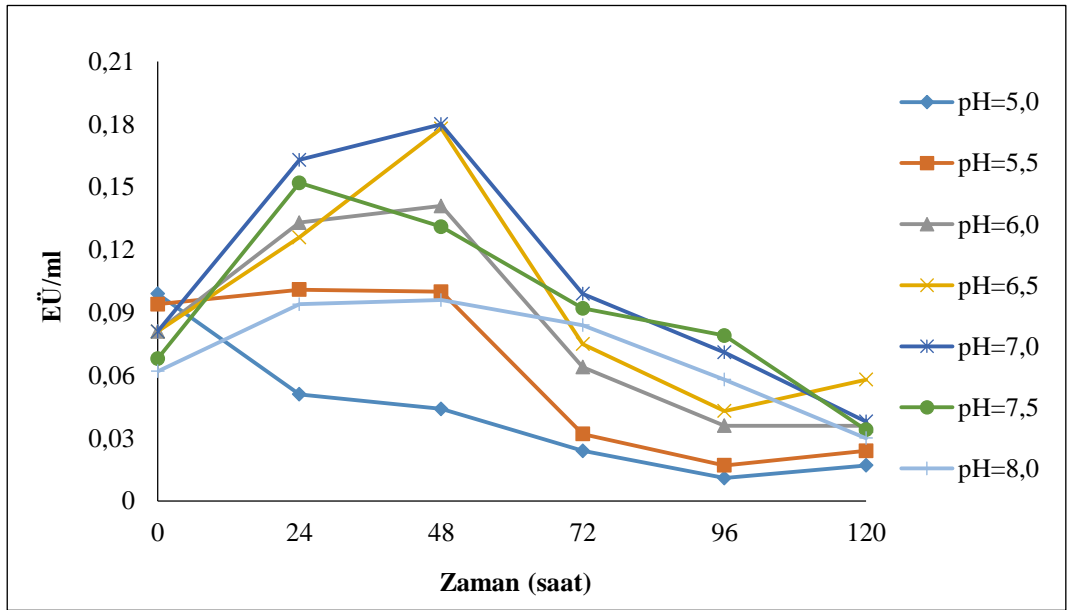
$1/T \times 1000 \text{ K}^{-1}$	$\log k$
2,92	-0,54
3,00	-0,46
3,09	-0,38
3,19	-0,48
3,30	-0,66
3,41	-0,78
3,53	-0,91
3,66	-1,25



Şekil 4.18. Koyun karaciğeri AR enziminin aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişim grafiği

4.4.5. Koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzimi için stabil pH belirlenmesine yönelik çalışma sonuçları

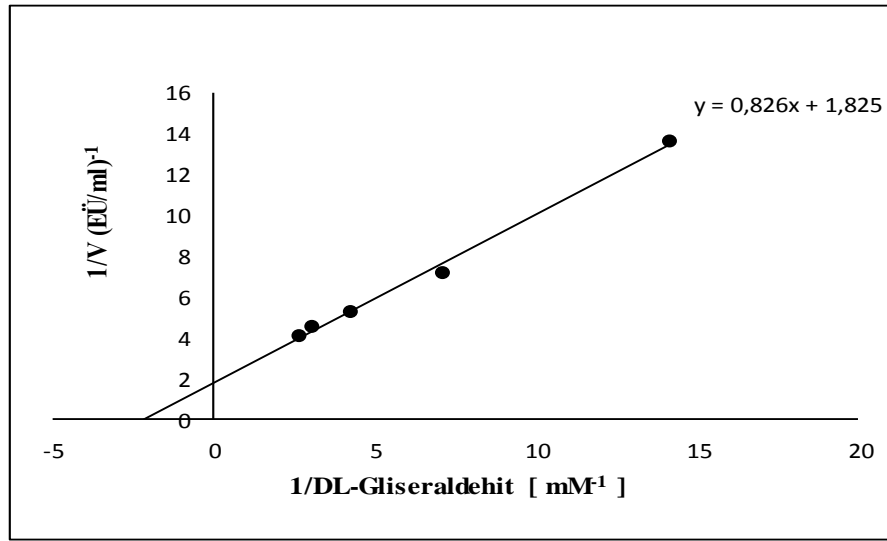
Koyun karaciğerinden saflaştırılan aldoz redüktaz enziminin stabil pH'sını belirlemek için bölüm 3.2.6.e'de bahsedildiği gibi stabil pH çalışması yapıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.18'de gösterildi. Bu çalışmalar sonucunda stabil pH=8,0 olarak belirlendi.



Şekil 4.19. Değişik pH'lardaki NaH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzimi için çizilen stabil pH grafiği

4.4.6. Koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzimi için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışma sonuçları

Koyun karaciğerinden saflaştırılan aldoz redüktaz enziminin K_M ve V_{max} değerlerini belirlemek üzere bölüm 3.2.6.f'de bahsedildiği gibi K_M - V_{max} çalışması yapıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.19'da gösterildi. Bu çalışmalar sonucu $K_M=0,45$ mM ve $V_{max}=0,55$ EÜ/ml olarak hesaplandı.



Şekil 4.20. Koyun karaciğerinden saflaştırılan aldoz redüktaz enzimi için 5 farklı DL-gliseraldehit konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

4.5. Koyun karaciğeri Aldoz Redüktaz Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Fenolik Bileşiklerin Etkilerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışma Sonuçları

Grafik denkleminde yarışmalı inhibisyon için şu formüllere göre hesaplanırken;

$$K_M I = K_M \times \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$$

yarışmasız ve yarı yarışmalı inhibisyon için ise;

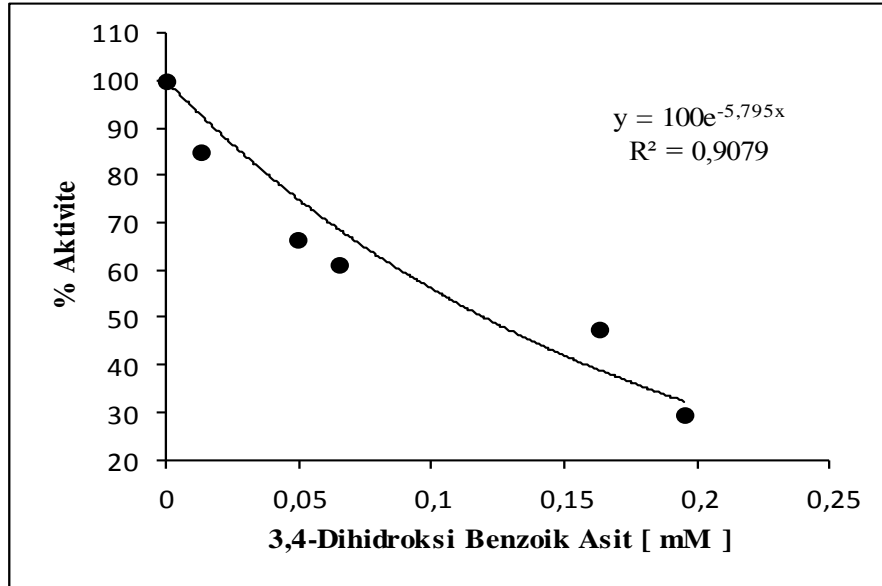
$$V_{max} I = \frac{V_{max}}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$$

formülü kullanılarak K_i değeri hesaplandı.

Ayrıca bu çalışmada koyun karaciğerinden saflaştırılan aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine bazı fenolik asitlerin inhibisyon etkisi *in vitro* şartlarda araştırılmıştır.

Çizelge 4.9. Koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine 3,4-dihidroksi benzoik asit'in etkisi

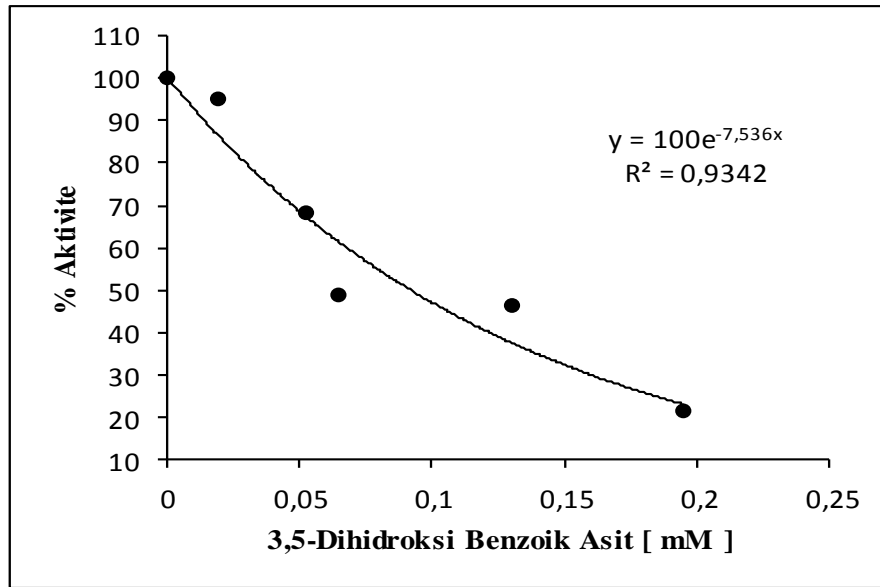
%Aktivite	[3,4-Dihidroksi Benzoik Asit] mM
100	0
84,92	0,013
66,48	0,049
61,17	0,065
47,77	0,163
29,33	0,195



Şekil 4.21. 3,4-Dihidroksi benzoik asit'in koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.10. Koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine 3,5-dihidroksi benzoik asit'in etkisi

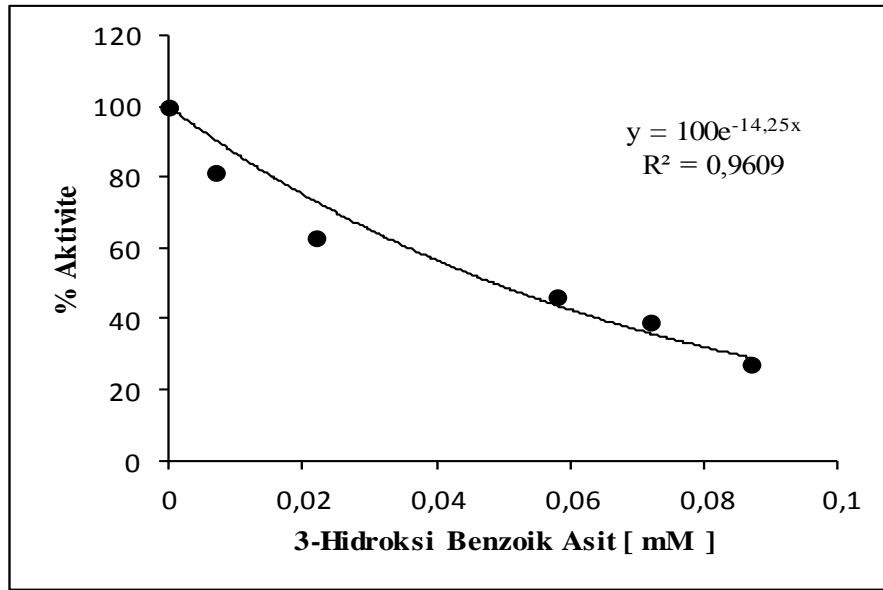
%Aktivite	[3,5-Dihidroksi Benzoik Asit] mM
100	0
95,37	0,019
68,21	0,052
49,07	0,065
46,29	0,130
21,29	0,195



Şekil 4.22. 3,5-Dihidroksi benzoik asit'in koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.11. Koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine 3-hidroksi benzoik asit'in etkisi

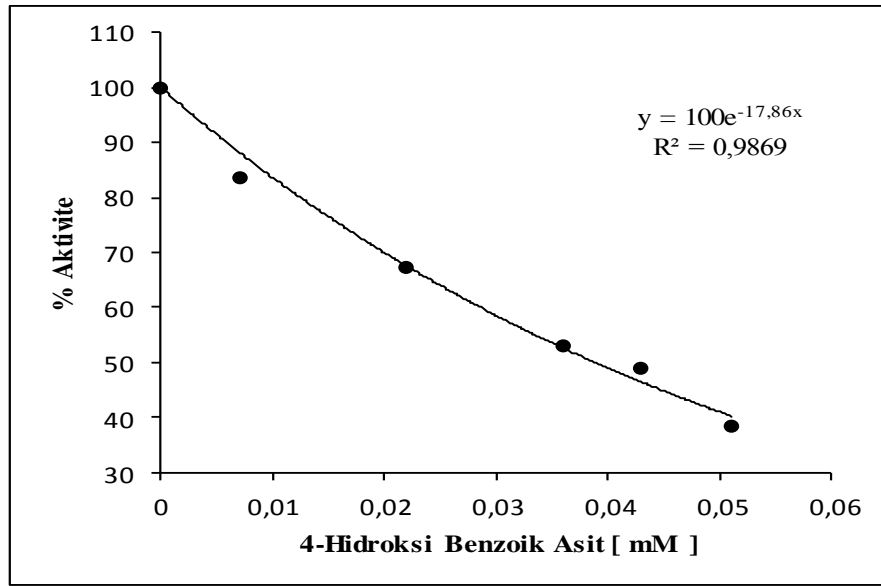
%Aktivite	[3-Hidroksi Benzoik Asit] mM
100	0
81,51	0,007
63,2	0,022
46,31	0,058
38,92	0,072
27,22	0,087



Şekil 4.23. 3-Hidroksi benzoik asit'in koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.12. Koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine 4-hidroksi benzoik asit'in etkisi

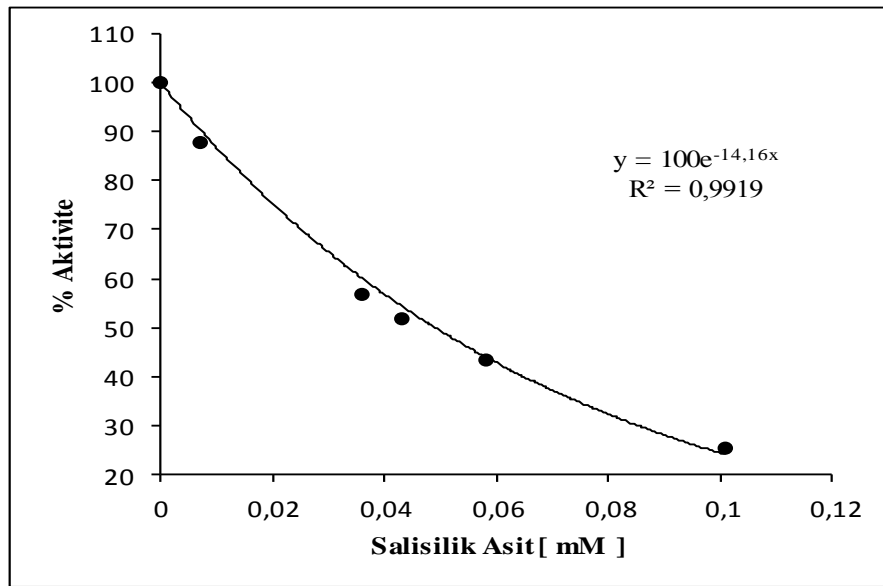
%Aktivite	[4-Hidroksi Benzoik Asit] mM
100	0
83,56	0,007
67,3	0,022
53,13	0,036
49,05	0,043
38,42	0,051



Şekil 4.24. 4-Hidroksi benzoik asit'in koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.13. Koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine salisilik asit'in etkisi

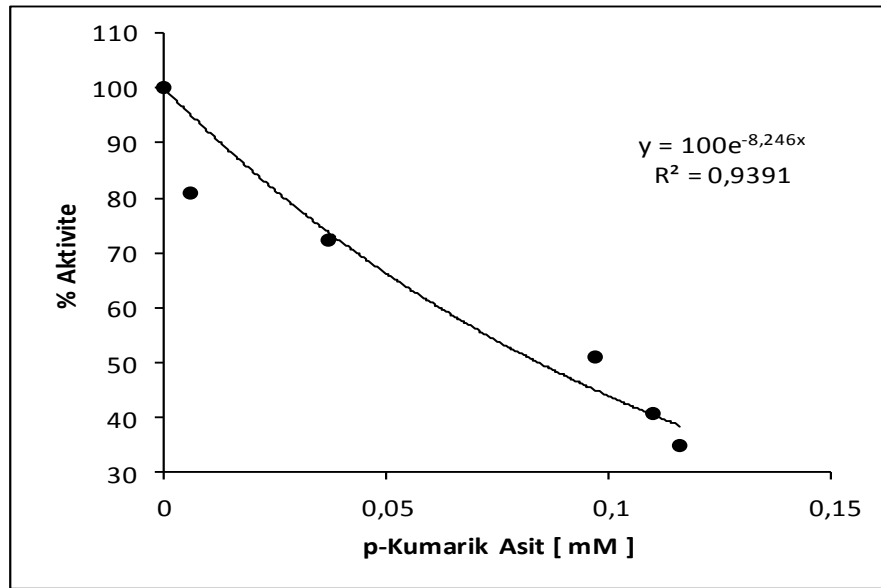
%Aktivite	[Salisilik Asit] mM
100	0
87,98	0,007
56,6	0,036
51,61	0,043
43,4	0,058
25,22	0,101



Şekil 4.25. Salisilik asit'in koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.14. Koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine p-kumarik asit'in etkisi

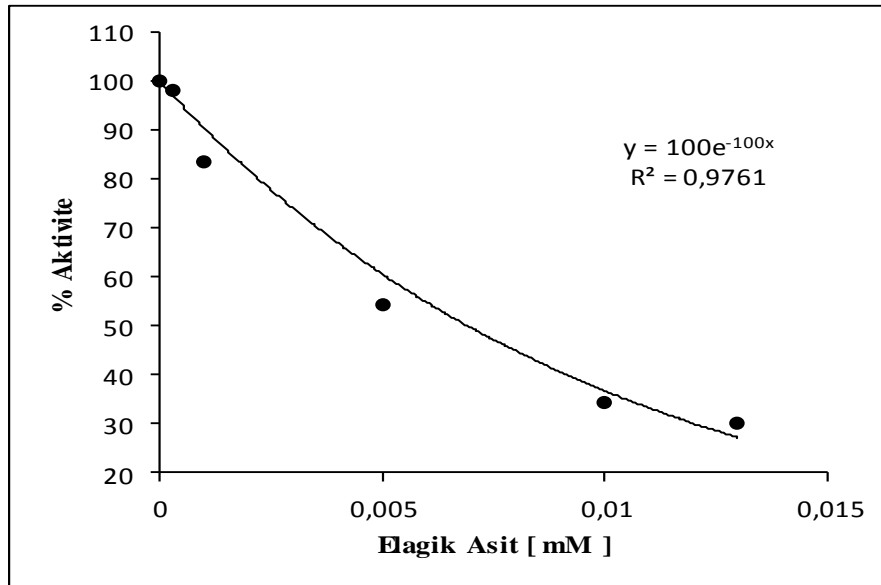
%Aktivite	[p-Kumarik Asit] mM
100	0
81,06	0,006
72,35	0,037
51,14	0,097
40,53	0,110
34,85	0,116



Şekil 4.26. p-Kumarik asit'in koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.15. Koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine elagik asit'in etkisi

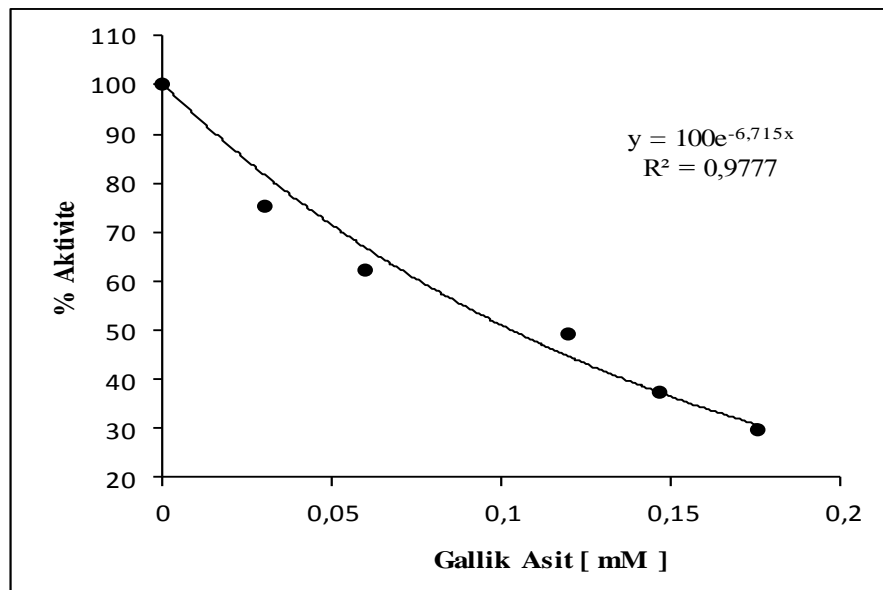
%Aktivite	[Elagik Asit] mM
100	0
98,9	0,0003
83,59	0,0010
54,27	0,0050
34,35	0,0100
30,15	0,0130



Şekil 4.27. Elagik asit'in koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.16. Koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine gallik asit'in etkisi

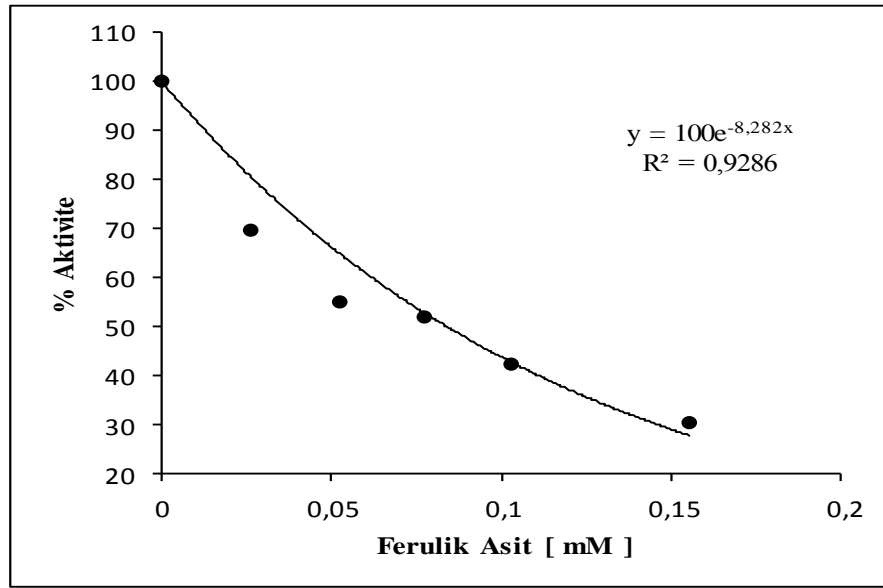
%Aktivite	[Gallik Asit] mM
100	0
75,15	0,030
62,12	0,060
49,09	0,120
37,58	0,147
29,7	0,176



Şekil 4.28. Gallik asit'in koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.17. Koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine ferulik asit'in etkisi

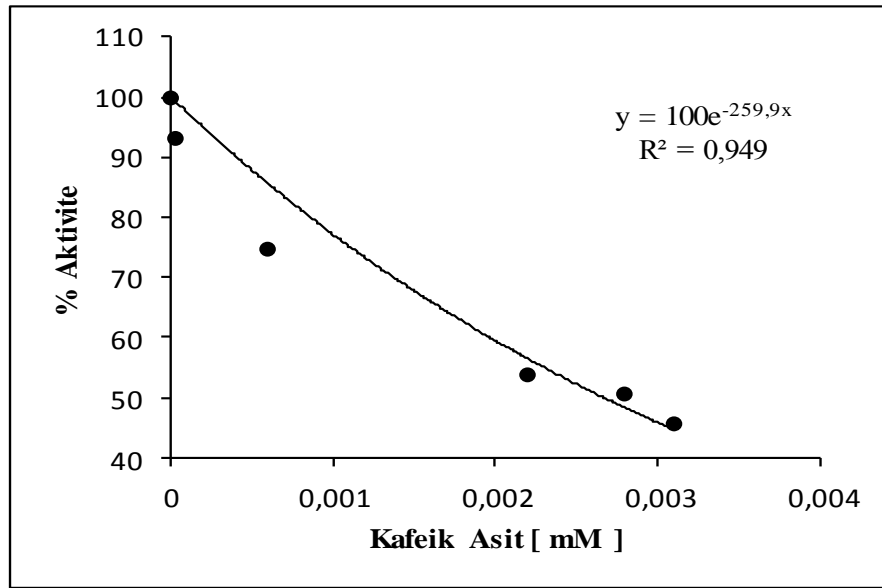
%Aktivite	[Ferulik Asit] mM
100	0
69,47	0,026
54,93	0,052
52	0,077
42,4	0,103
30,4	0,155



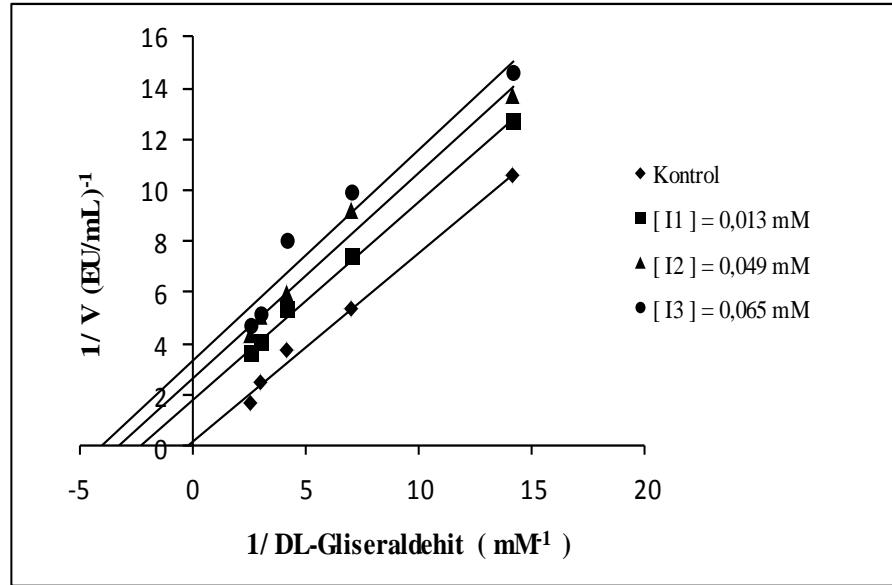
Şekil 4.29. Ferulik asit'in koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.18. Koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine kafeik asit'in etkisi

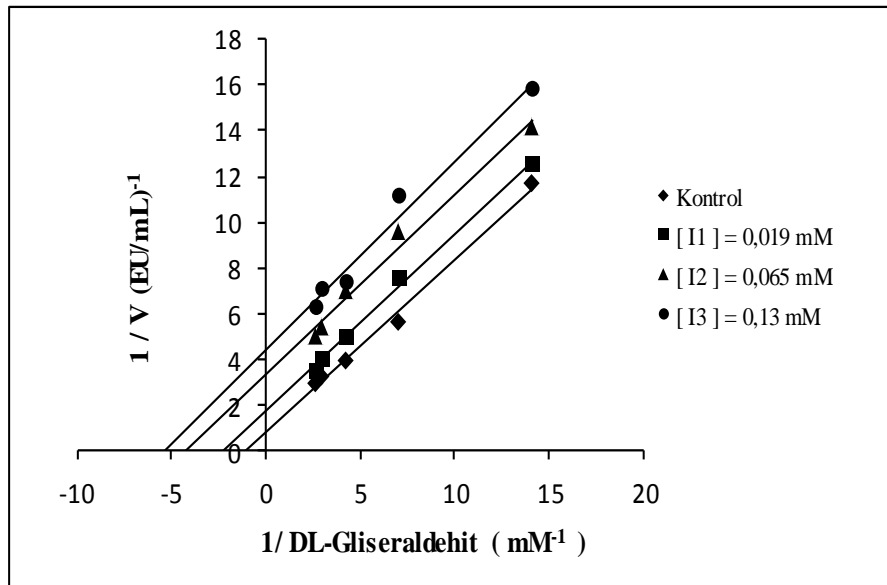
%Aktivite	[Kafeik Asit] mM
100	0
93,07	0,00003
74,59	0,00060
53,6	0,00220
50,67	0,00280
45,6	0,00310



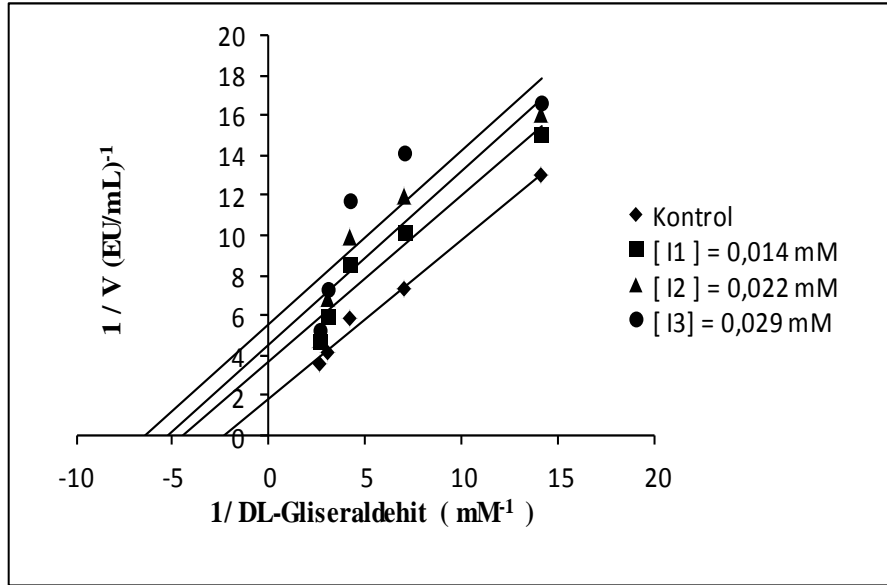
Şekil 4.30. Kafeik asit'in koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine etkisi



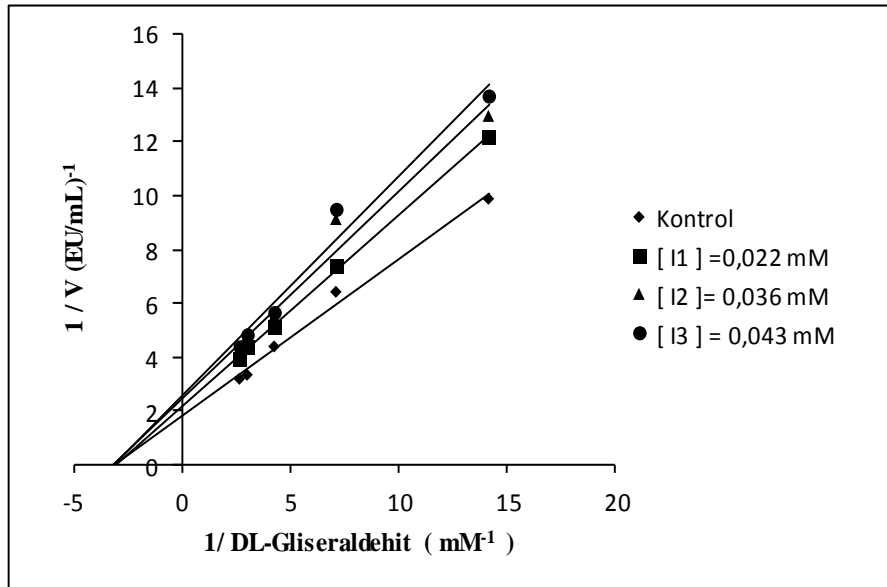
Şekil 4.31. Koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine 3,4-dihidroksi benzoik asit'in Linewear-Burk denklemi



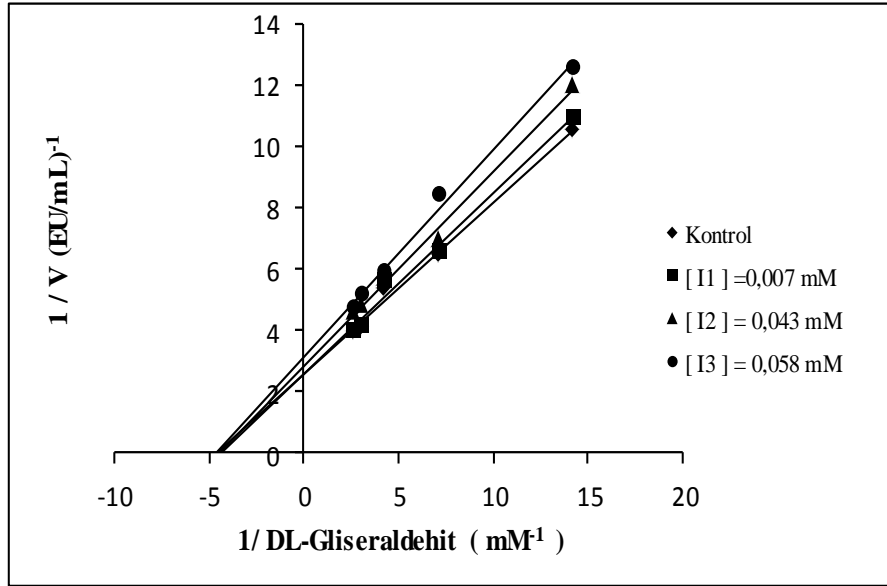
Şekil 4.32. Koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine 3,5-dihidroksi benzoik asit'in Linewear-Burk denklemi



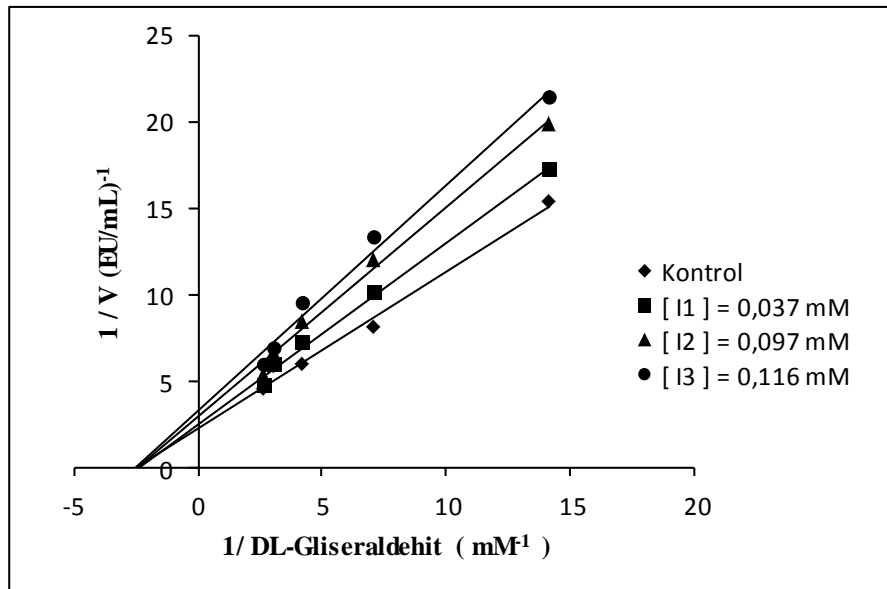
Şekil 4.33. Koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine 3-hidroksi benzoik asit'in Lineweaver-Burk denklemi



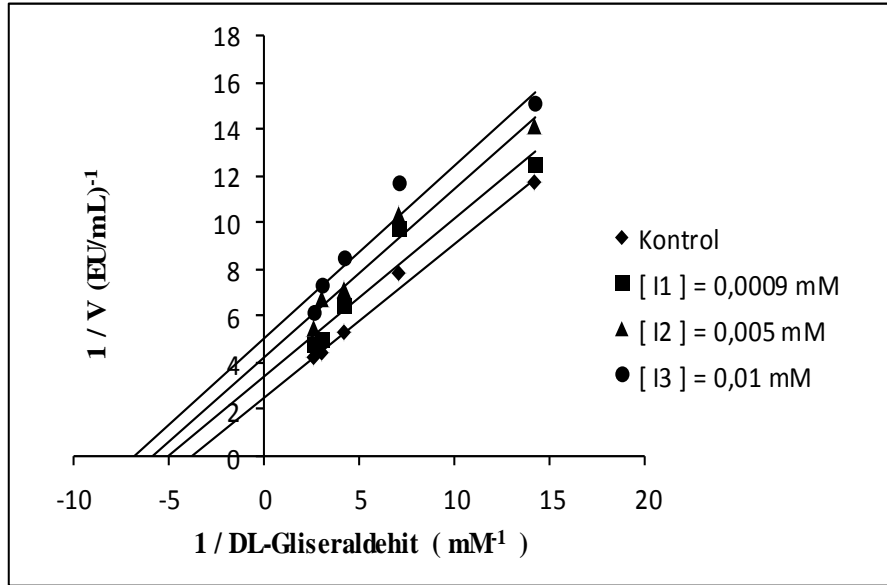
Şekil 4.34. Koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine 4-hidroksi benzoik asit'in Lineweaver-Burk denklemi



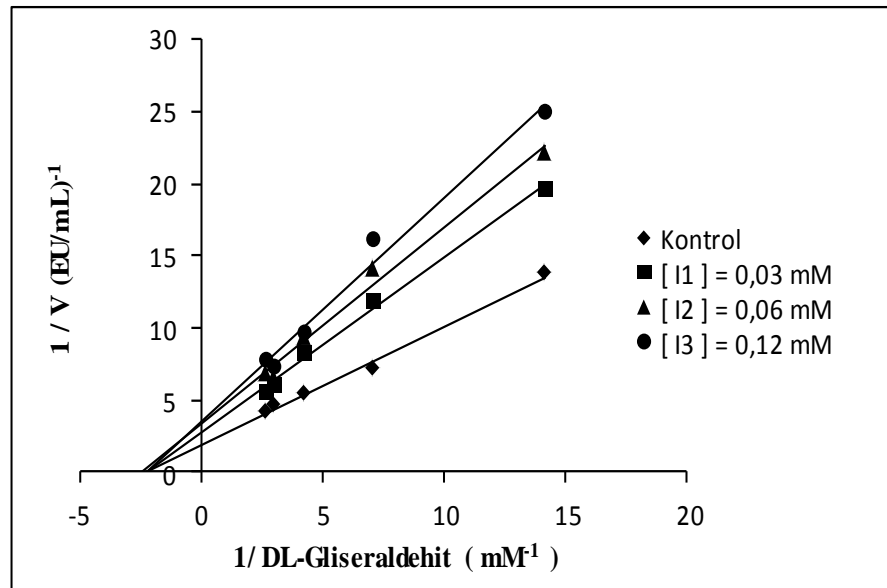
Şekil 4.35. Koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine salisilik asit'in Linewear-Burk denklemi



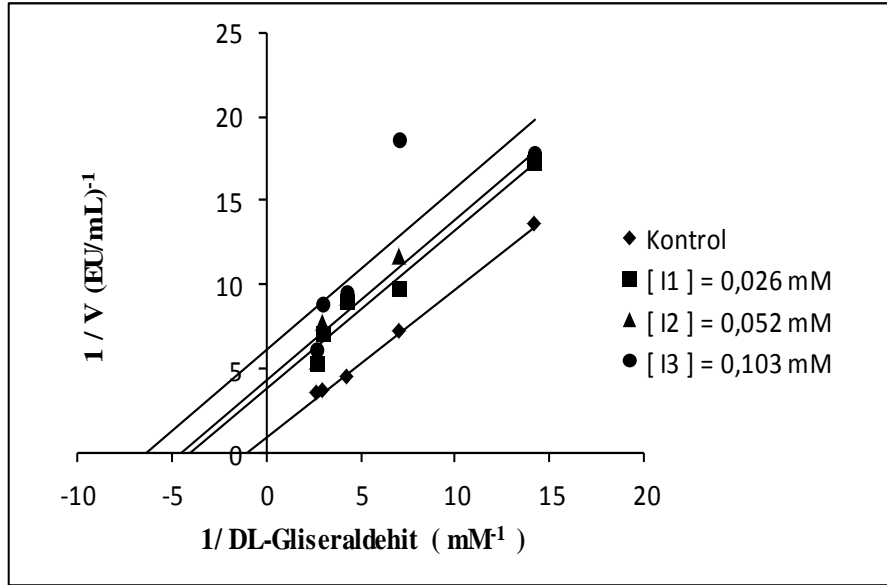
Şekil 4.36. Koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine p-kumarik asit'in Linewear-Burk denklemi



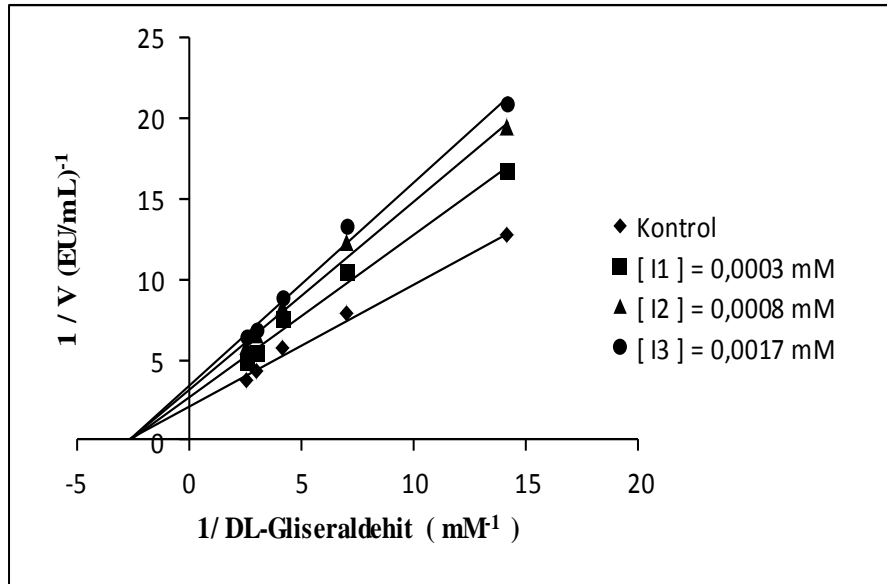
Şekil 4.37. Koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine elagik asit'in Lineweaver-Burk denklemi



Şekil 4.38. Koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine gallik asit'in Lineweaver-Burk denklemi



Şekil 4.39. Koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine ferulik asit'in Linewear-Burk denklemi



Şekil 4.40. Koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzim aktivitesi üzerine kafeik asit'in Linewear-Burk denklemi

Çizelge 4.19. Koyun karaciğeri AR enzimi için bulunan IC₅₀ değerleri K_i sabitleri ve inhibisyon türleri

Fenolik Asit Türü	IC ₅₀ (mM)	K _i (mM)	Ortalama K _i	İnhibisyon Türü
3,4-Dihidroksi benzoik Asit	0,12	0,001	0,0017	Yarı yarışmalı
		0,002		
		0,002		
3,5-Dihidroksi benzoik Asit	0,092	0,015	0,02	Yarı yarışmalı
		0,018		
		0,026		
3-Hidroksi benzoik Asit	0,049	0,014	0,014	Yarı yarışmalı
		0,015		
		0,014		
4-Hidroksi benzoik Asit	0,039	0,1	0,101	Yarışmasız
		0,098		
		0,105		
Salisilik asit	0,04	0,266	0,302	Yarışmasız
		0,376		
		0,275		
p-Kumarik asit	0,69	0,296	0,318	Yarışmasız
		0,34		
		0,319		
Elagik asit	0,007	0,002	0,007	Yarı yarışmalı
		0,008		
		0,01		
Gallik asit	0,103	0,062	0,091	Yarışmasız
		0,078		
		0,134		
Ferulik asit	0,084	0,009	0,014	Yarı yarışmalı
		0,014		
		0,018		
Kafeik asit	0,003	0,001	0,002	Yarışmasız
		0,001		
		0,003		

4.6. Koyun Karaciğeri Sorbitol Dehidrogenaz Enzimi Aktivitesi Üzerine Bazı Fenolik Bileşiklerin Etkilerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışma Sonuçları

Bu çalışmada koyun karaciğerinden saflaştırılan sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine bazı fenolik asitlerin inhibisyon etkisi *in vitro* şartlarda araştırılmıştır. İnhibisyon etkisi gösteren fenolik asitlerin K_i değerlerini belirlemek amacıyla koyun karaciğerinden saflaştırılan SDH enzim aktivitesini yarıya düşüren fenolik asit konsantrasyonu ile bu değerin altında ve üstünde iki sabit fenolik asit konsantrasyonlarında uygun beş substrat konsantrasyonu ile aktivite ölçümleri yapıldı. Çalışmalarda uygun 5 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 şu formüllere göre hesaplanırken;

$$K_{MI} = K_M \times \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$$

yarışmasız ve yarı yarışmalı inhibisyon için ise;

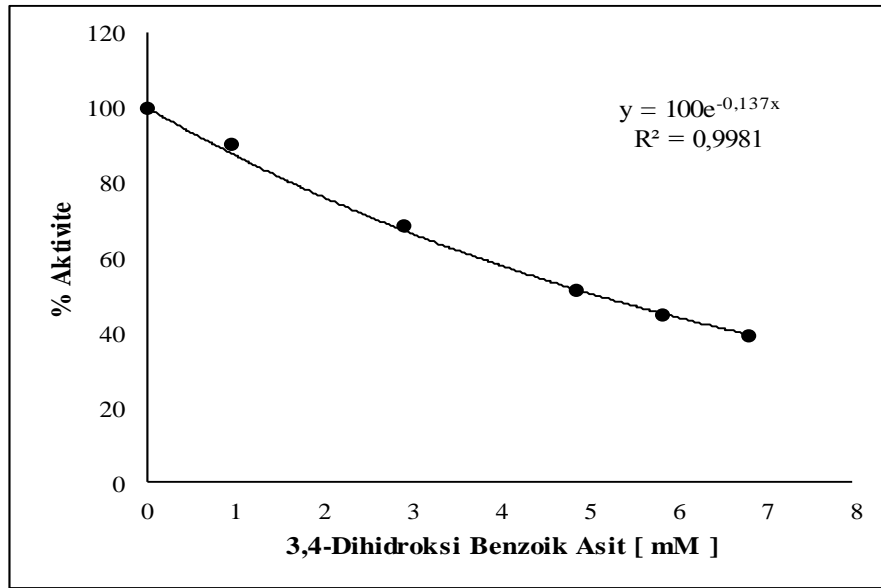
$$V_{maxI} = \frac{V_{max}}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$$

formülü kullanılarak K_i değeri hesaplandı.

Ayrıca bu çalışmada koyun karaciğerinden saflaştırılan sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine bazı fenolik asitlerin inhibisyon etkisi *in vitro* şartlarda araştırılmıştır.

Çizelge 4.20. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine 3,4-dihidroksi benzoik asit'in etkisi

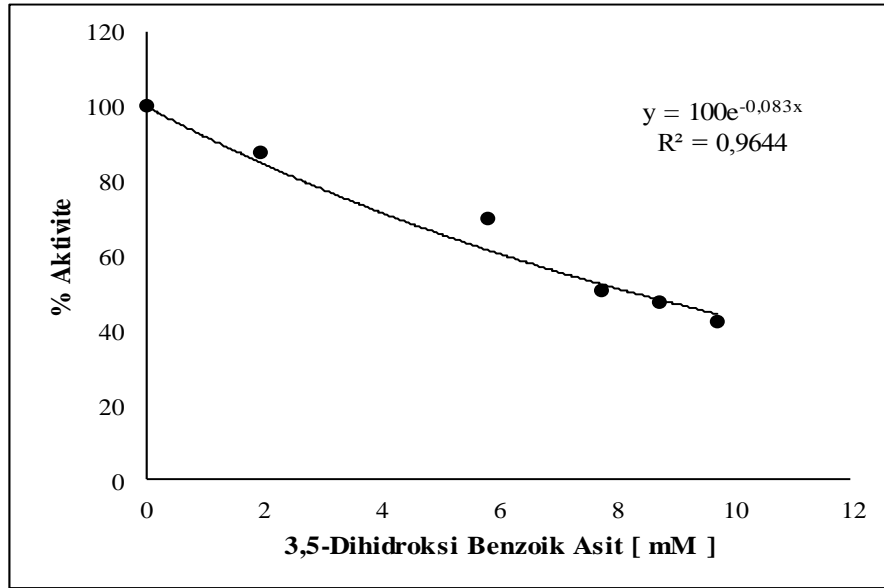
%Aktivite	[3,4-Dihidroksi Benzoik Asit] mM
100	0
90,01	0,97
68,59	2,92
51,25	4,87
44,55	5,84
39,19	6,81



Şekil 4.41. 3,4-Dihidroksi benzoik asit'in koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.21. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine 3,5-dihidroksi benzoik asit'in etkisi

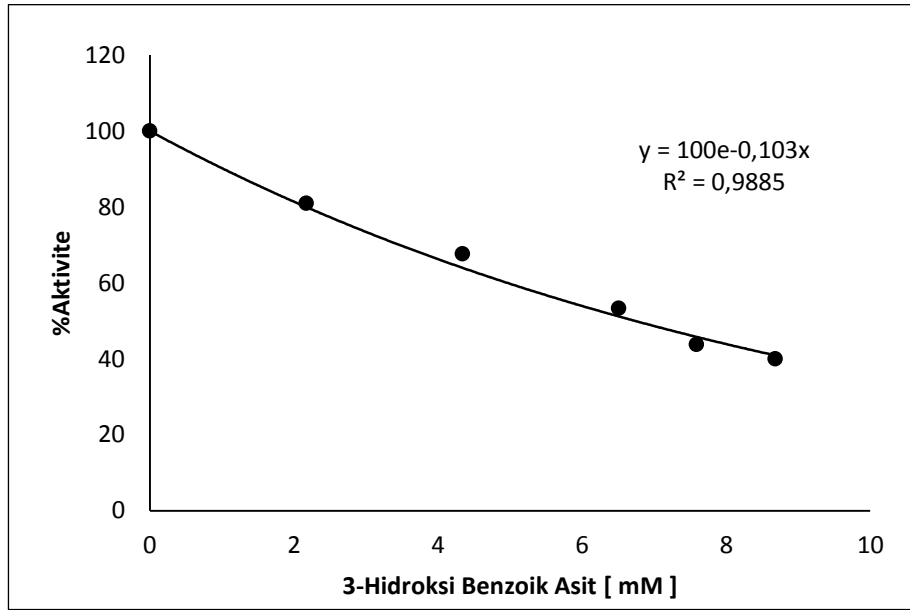
%Aktivite	[3,5-Dihidroksi Benzoik Asit] mM
100	0
87,89	1,95
70,12	5,84
50,40	7,78
47,38	8,76
42,47	9,73



Şekil 4.42. 3,5-Dihidroksi benzoik asit'in koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.22. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine 3-hidroksi benzoik asit'in etkisi

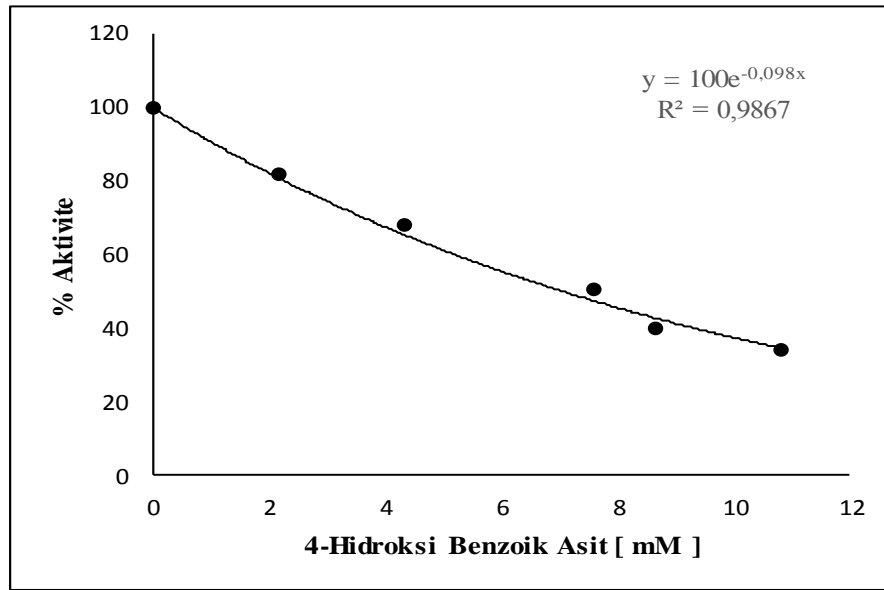
%Aktivite	[3-Hidroksi Benzoik Asit] mM
100	0
80,95	2,17
67,62	4,34
53,30	6,51
43,81	7,59
40	8,68



Şekil 4.43. 3-Hidroksi benzoik asit'in koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.23. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine 4-hidroksi benzoik asit'in etkisi

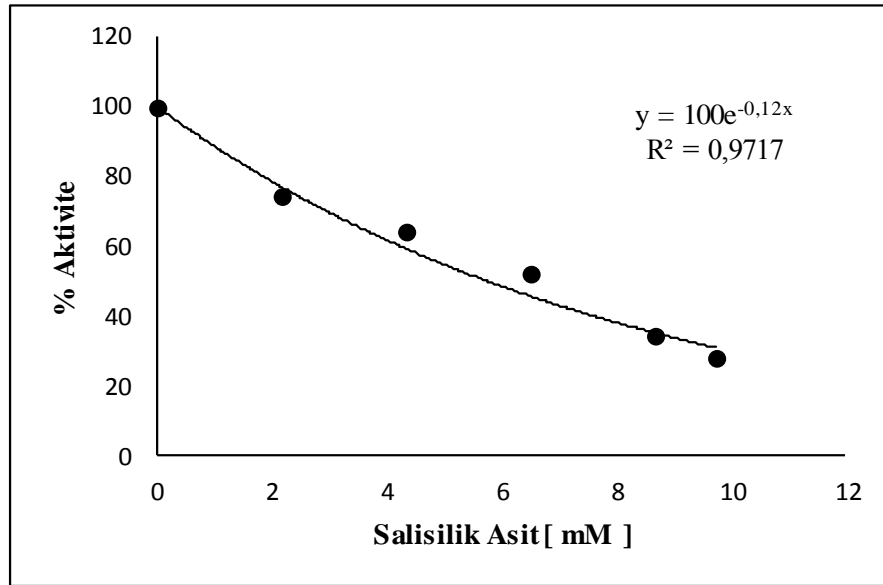
%Aktivite	[4-Hidroksi Benzoik Asit] mM
100	0
82,09	2,17
67,99	4,34
50,76	7,60
39,69	8,68
34,25	10,8



Şekil 4.44. 4-Hidroksi benzoik asit'in koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.24. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi salisilik asit'in etkisi

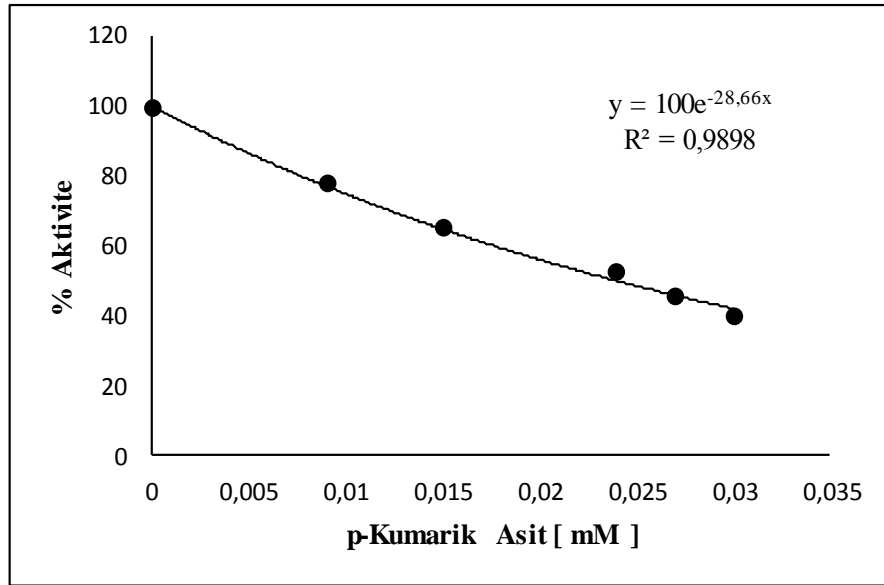
%Aktivite	[Salisilik Asit] mM
100	0
74,28	2,17
64,33	4,34
51,79	6,51
34,17	8,68
28,23	9,77



Şekil 4.45. Salisilik asit'in koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.25. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi p-kumarik asit'in etkisi

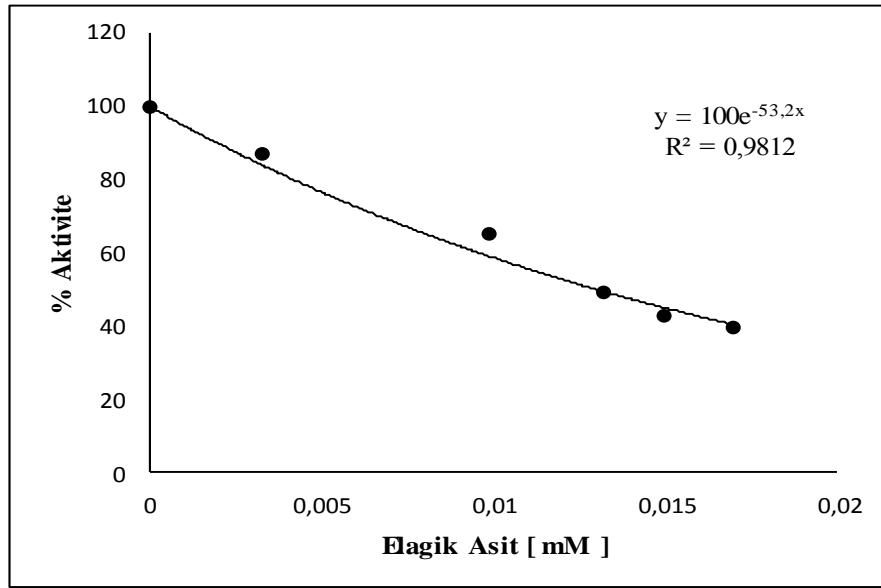
%Aktivite	[p-Kumarik Asit] mM
100	0
77,89	0,009
65,27	0,015
52,42	0,024
45,82	0,027
40,05	0,030



Şekil 4.46. p-Kumarik asit'in koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.26. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi elagik asit'in etkisi

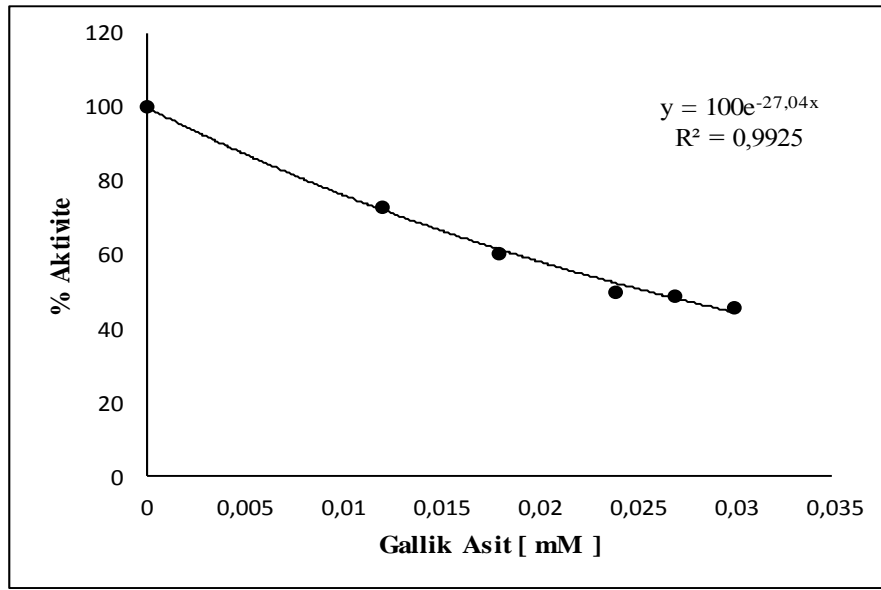
%Aktivite	[Elagik Asit] mM
100	0
87,29	0,0033
64,97	0,0099
49,5	0,0132
42,71	0,0150
39,83	0,0170



Şekil 4.47. Elagik asit'in koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.27. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi gallik asit'in etkisi

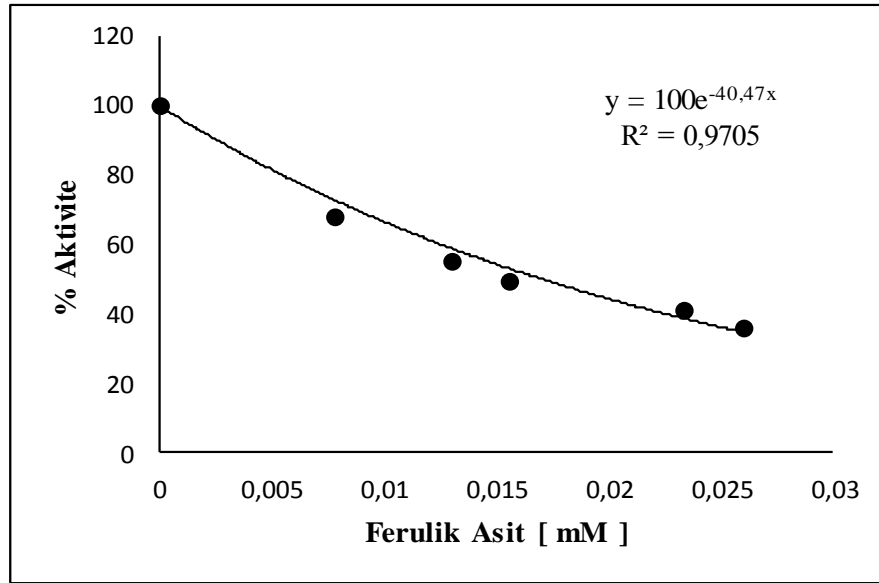
%Aktivite	[Gallik Asit] mM
100	0
72,83	0,012
60,43	0,018
50	0,024
48,91	0,027
45,74	0,030



Şekil 4.48. Gallik asit'in koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.28. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi ferulik asit'in etkisi

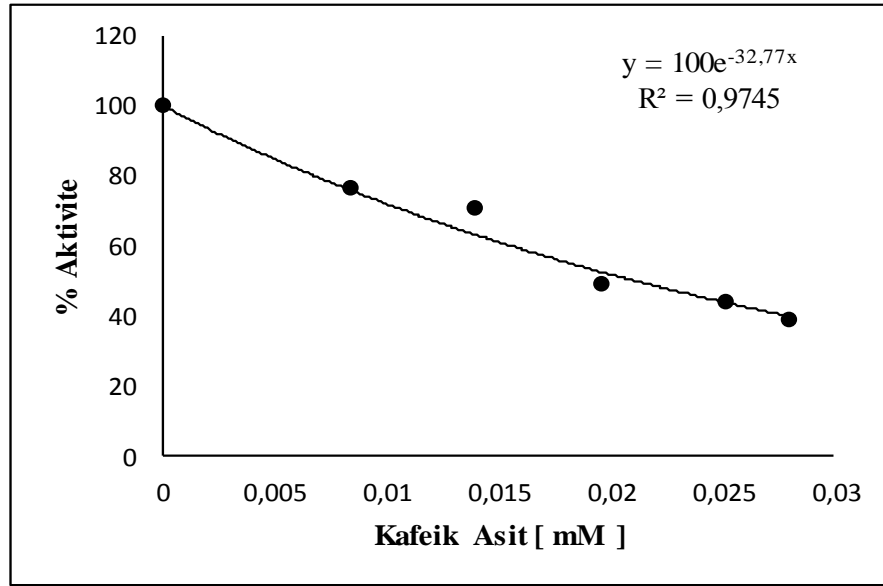
%Aktivite	[Ferulik Asit] mM
100	0
68,24	0,0078
55,29	0,0130
49,41	0,0156
41,18	0,0234
36,47	0,0260



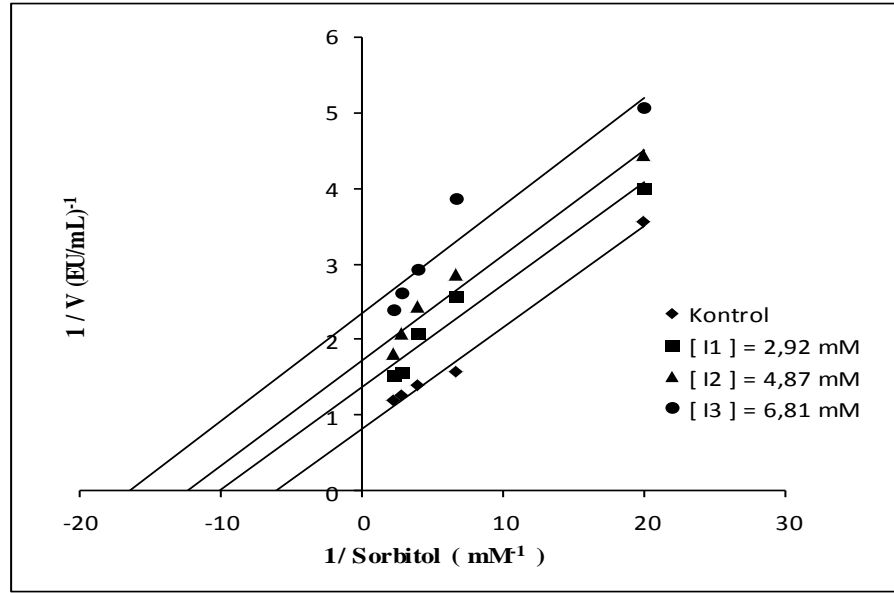
Şekil 4.49. Ferulik asit'in koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.29. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi kafeik asit'in etkisi

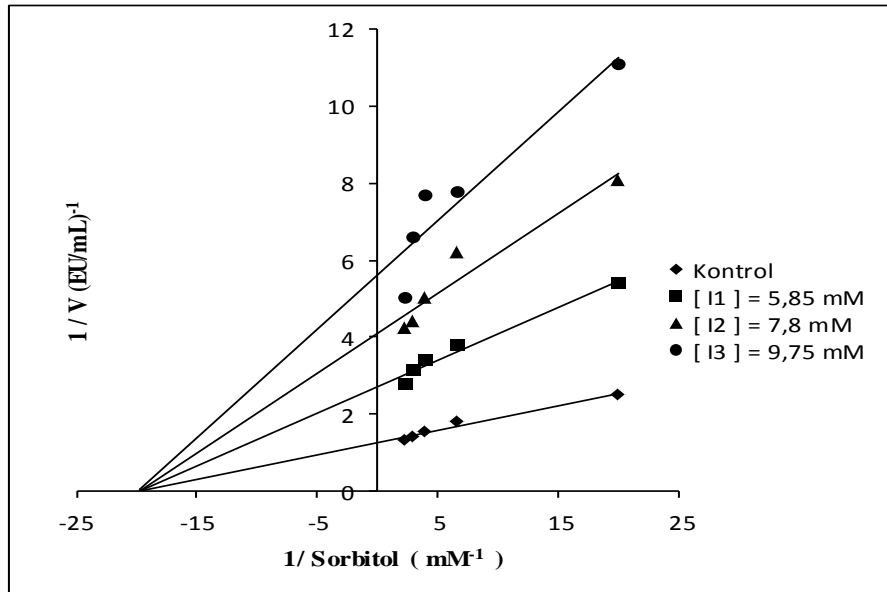
%Aktivite	[Kafeik Asit] mM
100	0
76,89	0,0084
70,65	0,0140
49,4	0,0196
44,04	0,0252
39,14	0,0280



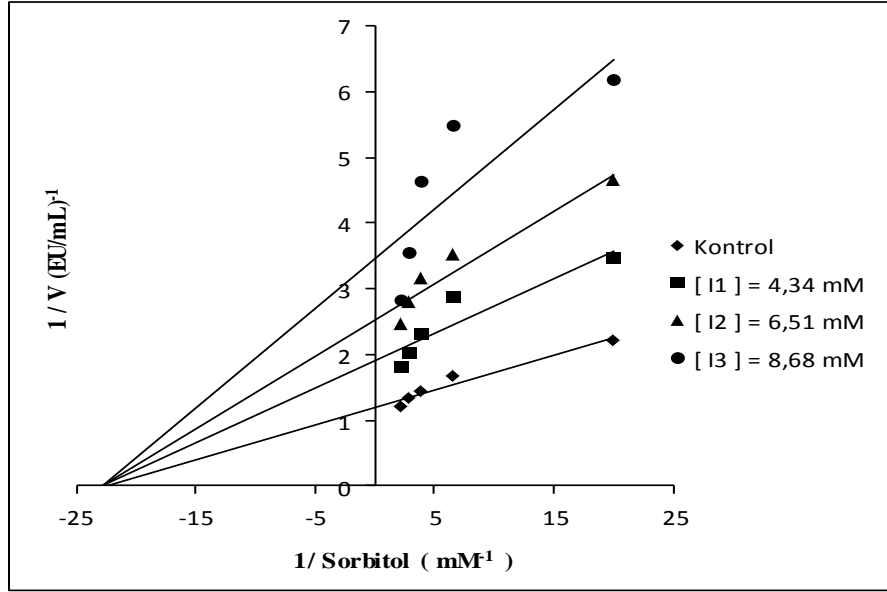
Şekil 4.50. Kafeik asit'in koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine etkisi



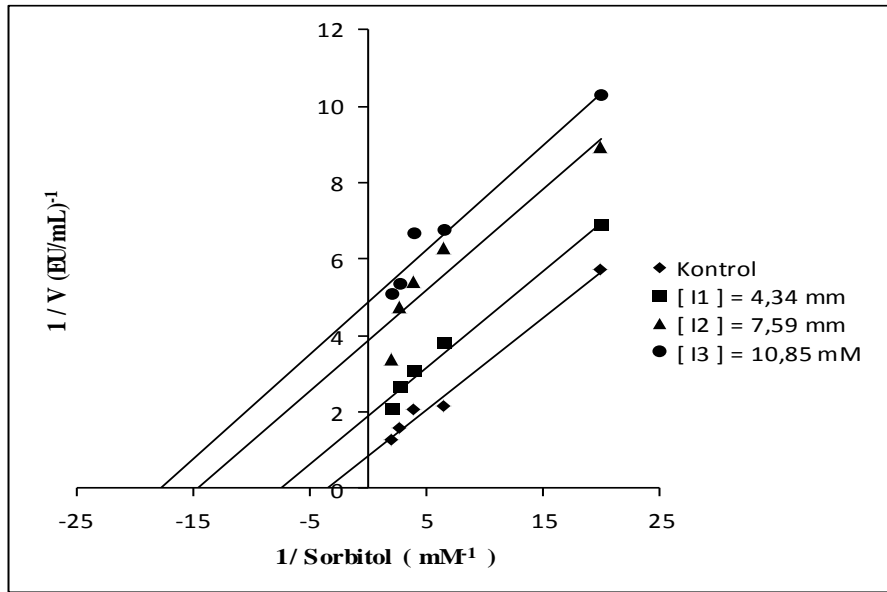
Şekil 4.51. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine 3,4-dihidroksi benzoik asit'in Linewear-Burk denklemi



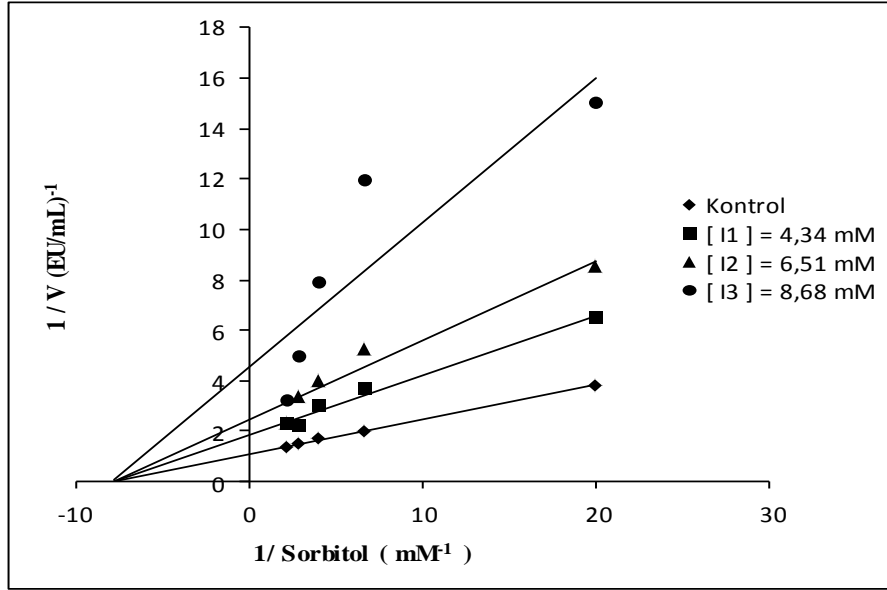
Şekil 4.52. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine 3,5-dihidroksi benzoik asit'in Linewear-Burk denklemi



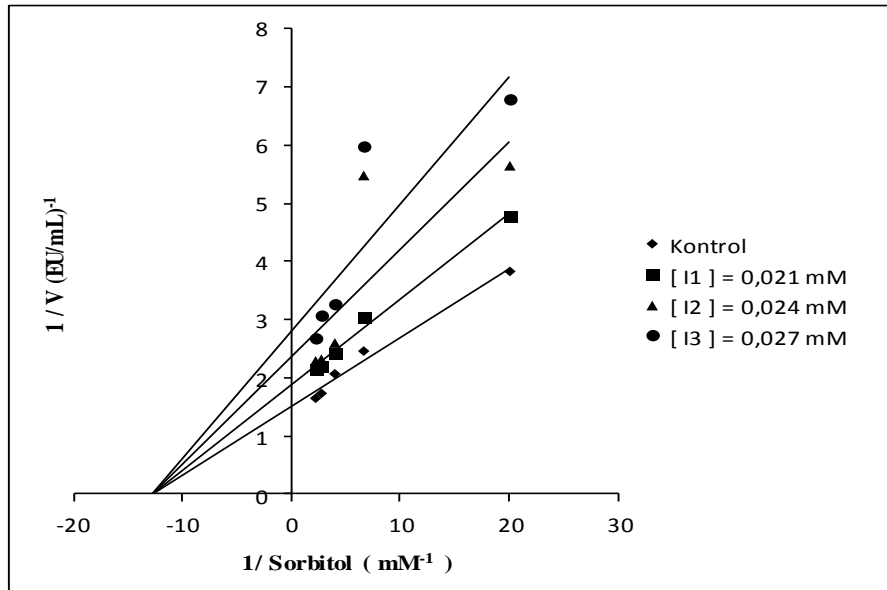
Şekil 4.53. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine 3-hidroksi benzoik asit'in Lineweaver-Burk denklemi



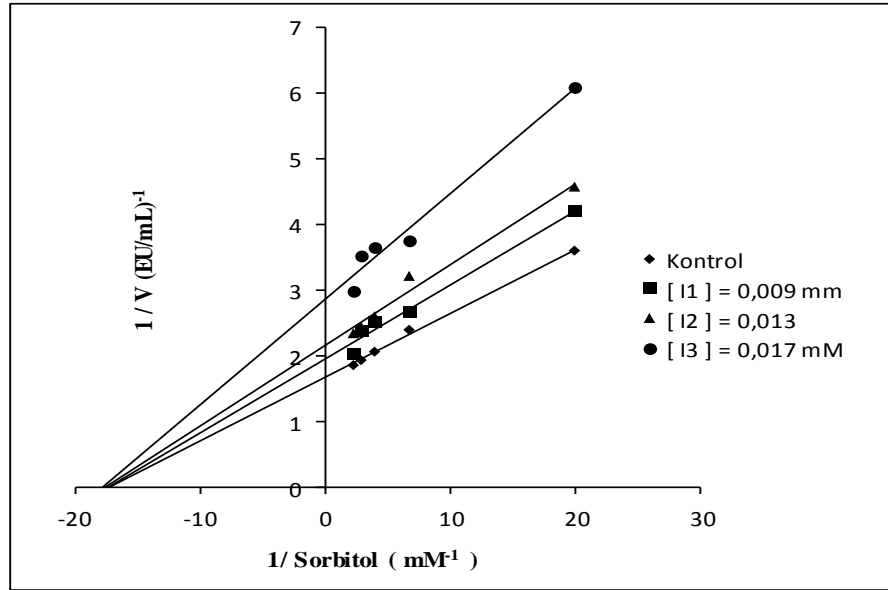
Şekil 4.54. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine 4-hidroksi benzoik asit'in Lineweaver-Burk denklemi



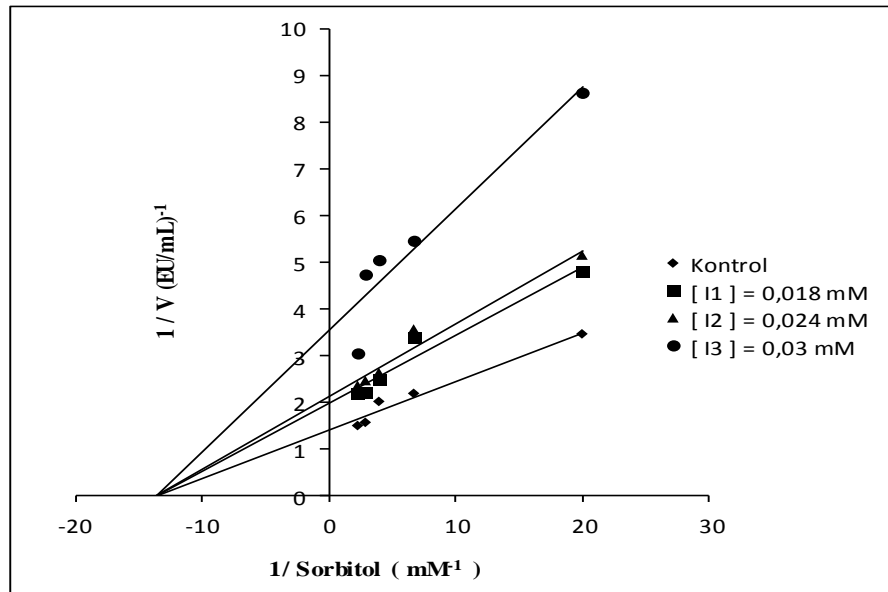
Şekil 4.55. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine salisilik asit'in Lineweaver-Burk denklemi



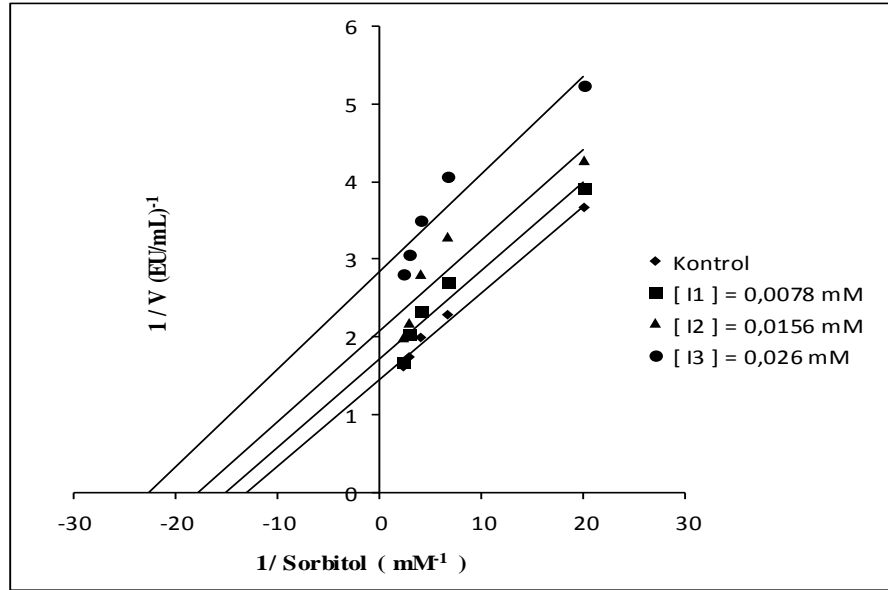
Şekil 4.56. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine p-kumarik asit'in Lineweaver-Burk denklemi



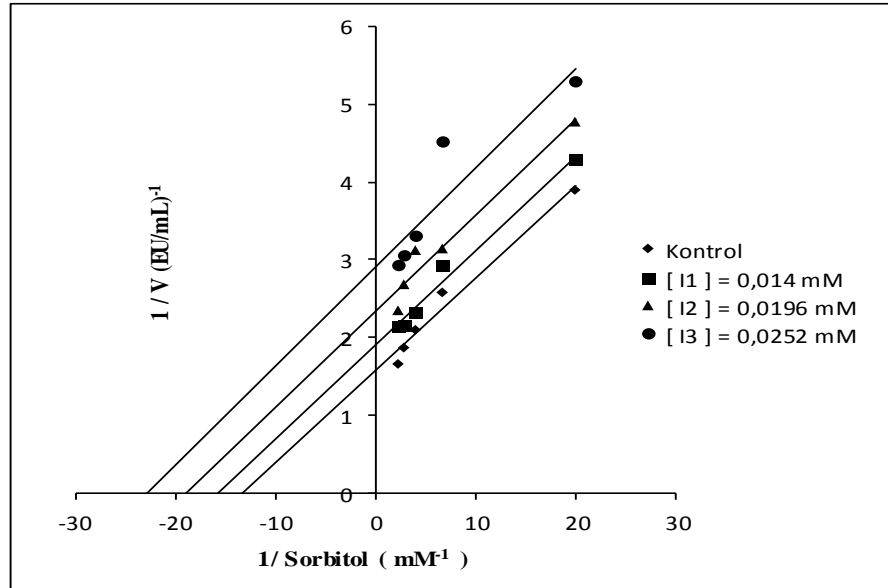
Şekil 4.57. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine elagik asit'in Lineweaver-Burk denklemi



Şekil 4.58. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine gallik asit'in Lineweaver-Burk denklemi



Şekil 4.59. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine ferulik asit'in Linewear-Burk denklemi



Şekil 4.60. Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine kafeik asit'in Linewear-Burk denklemi

Çizelge 4.30. Koyun karaciğeri SDH enzimi için bulunan IC₅₀ değerleri K_i sabitleri ve inhibisyon türleri

Fenolik Asit Türü	IC ₅₀ (mM)	K _i (mM)	Ortalama K _i (mM)	İnhibisyon Türü
3,4-Dihidroksi benzoik asit	5,06	4,54	4,3	Yarı yarışmalı
		4,56		
		3,80		
3,5-Dihidroksi benzoik asit	8,35	5,03	3,73	Yarışmasız
		3,34		
		2,83		
3-Hidroksi benzoik asit	6,73	7,42	5,97	Yarışmasız
		5,92		
		4,58		
4-Hidroksi benzoik asit	7,07	3,33	2,55	Yarı yarışmalı
		2,06		
		2,26		
Salisilik asit	5,78	5,75	4,52	Yarışmasız
		5,13		
		2,69		
p-Kumarik asit	0,024	0,0795	0,051	Yarışmasız
		0,043		
		0,031		
Elagik asit	0,013	0,057	0,045	Yarışmasız
		0,046		
		0,031		
Gallik asit	0,026	0,043	0,037	Yarışmasız
		0,047		
		0,02		
Ferulik asit	0,017	0,045	0,037	Yarı yarışmalı
		0,037		
		0,028		
Kafeik asit	0,021	0,067	0,045	Yarı yarışmalı
		0,04		
		0,029		

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

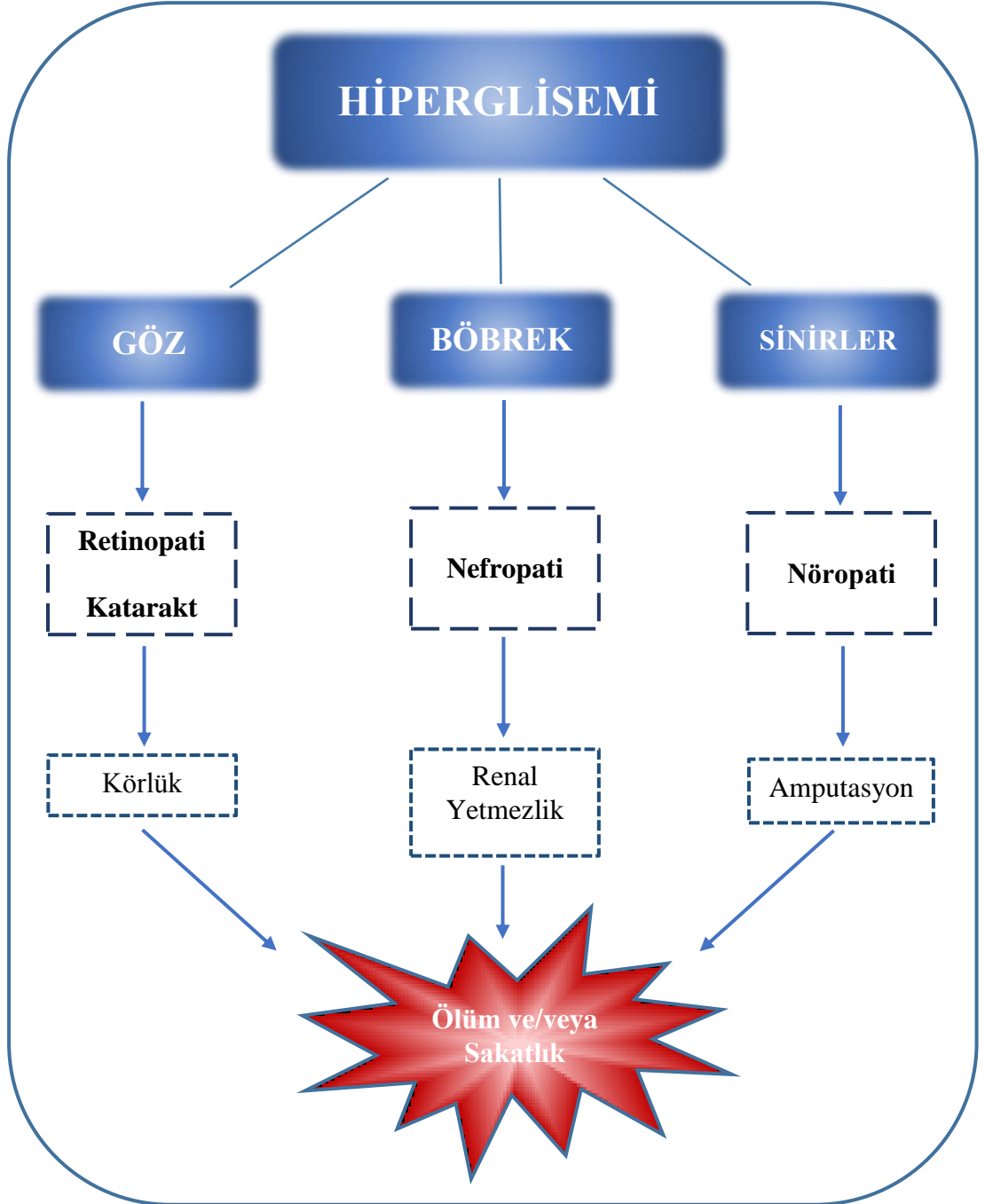
Diabetes Mellitus (DM) tüm dünyada sıklıkla rastlanılan, hiperglisemi ile karakterize, karbohidrat, lipid ve protein metabolizmalarının bozukluğu ile seyreden, kronik ve ilerleyici bir endokrin hastalıktır. Diyabet sadece bireyin kendini değil oluşturduğu akut ve kronik komplikasyonlarla toplumu da olumsuz yönde etkisi altına alan bir sağlık problemidir. Bu etkileme tıbbi olmanın yanında sosyal ve ekonomik açılardan da önem taşımaktadır (Başaran 2008).

Diyabetin en önemli nedenlerinden biri olarak insülinin mutlak veya göreceli eksikliği ya da periferik olarak etkisizliği gösterilmektedir. İnsülin, glukozun enerji olarak kullanılabilmesi için hücreye girmesini sağlamakta gerekli olan bir hormondur. Pankreastan salgılanan insülin sekresyonunun mutlak veya rölatif yetersizliği, insülinin etkisizliği veya insülin molekülündeki yapısal bozukluklar sonucunda oluşan bu hastalık, etiyolojisi, genetik ve klinik tablosu ile heterojen özellikte olan bir sendromdur (Akçay ve Akarsu 2000).

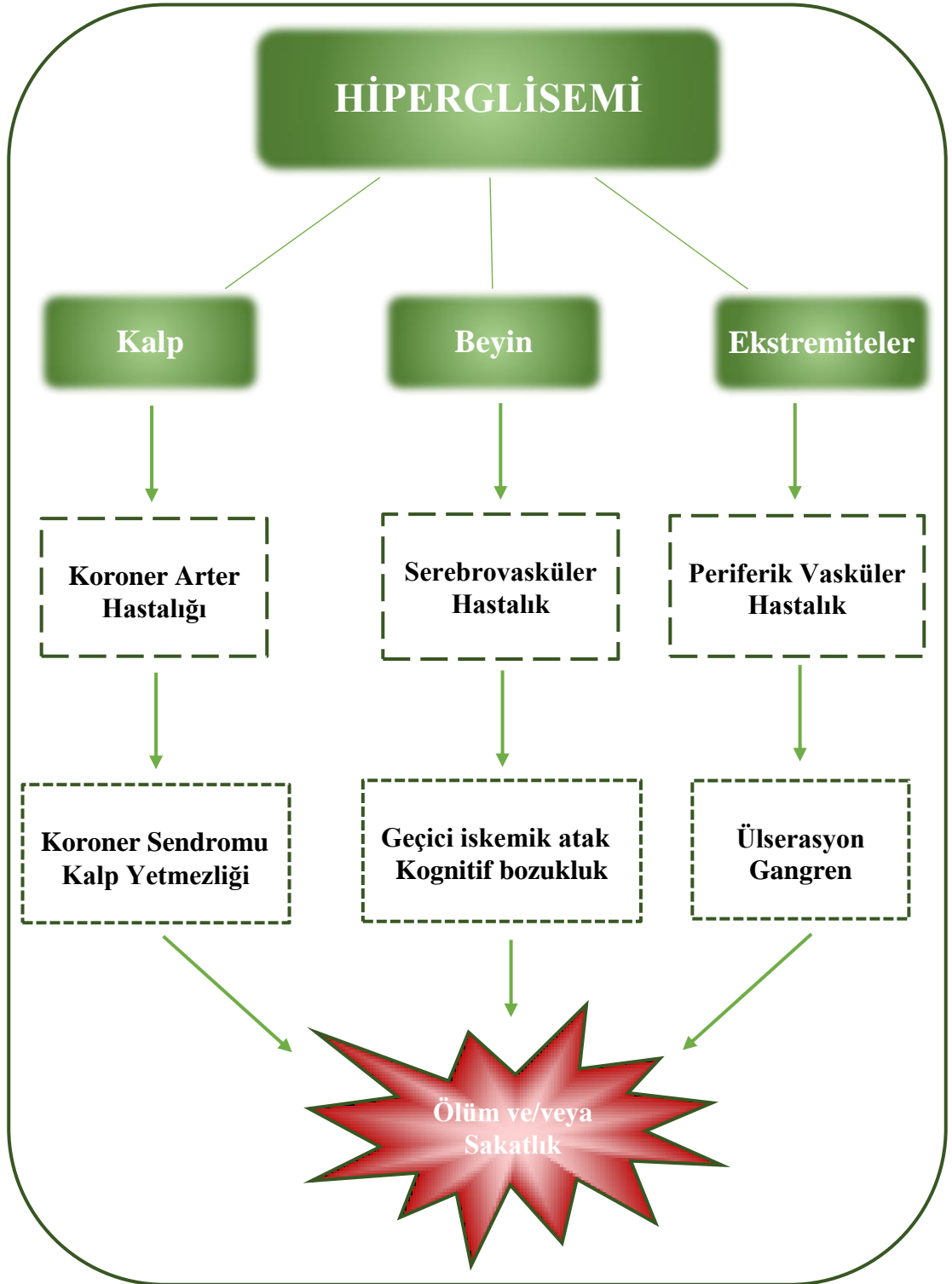
Dünyada 180 milyondan daha fazla insanı etkileyen diyabet, Türkiye’de ve tüm dünyada ölüm nedenleri arasında önemli bir sağlık sorunu olması sebebiyle ilk sıralarda yer almaktadır. Hiperglisemi durumunun uzun süreli seyri, ileri glikasyon ürünleri, protein kinaz C (PKC) yolu ve polioliol yolu gibi ikincil diyabetik komplikasyonların aktivasyonunun artmasında önemli rol oynamaktadır. Bu metabolik yolların aktivasyonu sonucu oluşan oksidatif stres endotel fonksiyon bozukluklarına yol açarak pek çok vasküler komplikasyon oluşumu ile sonuçlanabilmektedir (UKPDS Research Group 1998; Temelkova-Kurktschiev *et al.* 2000).

Hiperglisemi durumunda aktivitesi artan polioliol yolu ile diyabetik komplikasyonlar arasındaki ilişkiyi açıklamak için bu yolun enzimleri olan aldoz redüktaz ve sorbitol dehidrogenaz enzimleri üzerinde çok sayıda çalışmalar yapılmış ve bu enzimlerin gen

polimorfizmleri ile diyabetik komplikasyonlar arasındaki ilişki araştırılmıştır (Maekawa *et al.* 2001; Szaflık *et al.* 2008).



Şekil 5.1. Diyabetin mikrovasküler komplikasyonları



Şekil 5.2. Diyabetin makrovasküler komplikasyonları

Böbrek, karaciğer, lens, beyin, sinirler, eritrosit, retina, aort, pankreas adacıkları ve kapiller damarlar gibi hücrelere glukoz girişi için insülden bağımsız olan dokularda,

kontrol edilememiş diyabet gibi hiperglisemi durumlarında fazla miktarda glukoz bu hücrelerin içine girebilmektedir. Artmış glukoz konsantrasyonu ve yeterli NADPH bulunması durumunda, aldoz redüktaz fazla miktarda glukozun sorbitole dönüşmesine sebep olur. Sorbitol ise glukoz gibi hücre membrandan kolaylıkla geçemez ve hücre içine hapsolür. Sorbitol dehidrogenaz enziminin bulunmadığı veya az olduğu retina, böbrek ve sinir hücrelerinde bu artış oldukça fazladır. Sonuçta sorbitol bu hücrelerde birikip, osmotik basıncı artırarak hücre içerisine su girmesine ve hücrenin şişmesine sebep olur. Diyabetli bireylerde kan glukoz düzeyi sürekli olarak normal düzeyde tutulmadığı için katarakt oluşumu, nöropati, nefropati ve retinopati gibi mikrovasküler komplikasyonların temelinde bulunan damarsal sorunlar bu durumla yakından ilişkilidir (Champe and Harvey 1997).

Poliol yolu, glukozu sorbitole dönüştüren aldoz redüktaz ve sorbitolu fruktoza dönüştüren sorbitol dehidrogenaz enzimlerinden meydana gelen ve hiperglisemi durumunda aktifleşerek çeşitli diyabetik komplikasyonların ortaya çıkmasında rolü olan önemli bir metabolik yoldur (Kinoshita and Nishimura 1988; DCCT 1993).

Poliol yolu ve bu yolun hız sınırlayıcı enzimi olan aldoz redüktaz kronik komplikasyonların sebeplerini araştırmada önemli bir yer tutmaktadır. Hiperglisemik durumda poliol yolunun aktivitesinin artması ve glukozun %30'unun (Gonzalez *et al.* 1984; Yabe-Nishimura 1998) bu yol ile metabolize olması diyabette istenmeyen zararlı komplikasyonların ortaya çıkmasının en büyük sebeplerindendir. Bu nedenle, AR enziminin fizyolojik fonksiyonu üzerine olan araştırmalar ise günümüzde hala devam etmektedir. Bu durum, AR enzimin farklı dokularda çeşitli değişik fonksiyonel özellikler göstermesinden kaynaklanmaktadır. Örneğin; böbreklerde sorbitolün üretilmesinden ve osmoregülasyonun korunmasından sorumlu olan AR enzimi (Garcia-Perez and Burg 1991), testislerde spermlerin majör enerji kaynağı olan fruktozun üretilmesinden sorumludur (Kobayashi *et al.* 2002; Frenette *et al.* 2004).

Poliol yolunun ikinci enzimi olan sorbitol dehidrogenaz, NAD^+ varlığında sorbitolu fruktoza yükseltgeyen enzimdir. Yapılan çalışmalar diyabetin vasküler ve nörolojik

komplifikasyonlarında poliol yolunda görevli olan aldoz redüktaz ve sorbitol dehidrogenaz enzimlerinin sorumlu olduğunu göstermiştir. Yuying ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada miyokardial iskemi yaralanmasında SDH'ın temel bir role sahip olduğu ve sorbitol dehidrogenaz enziminin inhibisyonunun miyokardiyal iskemiye azalttığı da görülmüştür (Hwang *et al.* 2003).

Hiperglisemi durumunda aktive olan poliol yolunun canlı metabolizmasında oldukça önemli bir yeri vardır. Bu nedenle aldoz redüktaz ve sorbitol dehidrogenaz enzimleri üzerine yapılan çalışmalarda bu enzimlerin inhibe edilmesinin sebep oldukları diyabetik komplifikasyonların önlenmesi ve/veya geciktirilmesi açısından önemli olduğu görülmektedir. Bu durum yaptığımız çalışmanın önemini açıkça ortaya koymaktadır. Özellikle poliol yolunun hız sınırlayıcı enzimi olan aldoz redüktaz için inhibisyon çalışmaları çok daha önem teşkil etmektedir.

Bilindiği gibi enzimleri saflaştırmak oldukça zor bir işlemdir. Enzimler protein yapısındaki makromoleküller oldukları için şartların değişmesine karşı oldukça hassastırlar ve bu nedenle bir çözeltildeki enzimin varlığı, enzimin etki ettiği substrat molekülü veya reaksiyon sonucu oluşan ürün ya da enzimatik reaksiyona aracılık eden diğer parametreler üzerinden tespit edilmektedir.

Enzimlerin yapı ve fonksiyonlarının tanımlanabilmesi için, söz konusu enzimin saflaştırılması zorunlu bir aşamadır. Aldoz redüktaz ve sorbitol dehidrogenaz enzimlerinin saflaştırılması için pek çok çalışma yapılmış ve bu çalışmalar enzimlerin yapısal, katalitik ve kinetik özelliklerinin tanımlanmasına fırsat sağlamıştır. Bu yöndeki çalışmalar günümüzde aynı yoğunlukta devam etmektedir.

Jin *et al.* (2006) yaptıkları bir çalışmada; sıçan karaciğeri tümör hücreleri kullanılarak aldoz redüktaz enziminin 3-DG'un fonksiyonunu kısıtladığı ve hücrelerde kontrolsüz bölünmenin devam etmesine sebep olduğunu göstermişlerdir. Bu durum kanser hücrelerinin baskılanamaması sonucuyla ilişkilendirilebilir.

Aldoz redüktaz inhibitörleri ile yapılan birçok çalışmadan aldoz redüktaz inhibitörlerinin enzim aktivitesini önleyerek meydana gelebilecek çeşitli zararlı durumları önleyici rol oynadığı sonucuna varılabilir. Bilinen bazı önemli aldoz redüktaz inhibitörleri kullanılarak çok sayıda araştırmalar yapılmış ve enzimin inhibitörü olabilecek bileşiklerle de çalışmalar yapılmaktadır.

Aldoz redüktaz inhibitörlerinden; zenarestatin sinirlerde iletim hızını artırdığı (Setter *et al.* 2003), fidarestatin sinir hücrelerinde biriken sorbitol düzeyini azalttığı (Asano *et al.* 2002), ponalrestatin böbreklerde artan AR seviyesini düşürdüğü (Soulis-Liparota *et al.* 1995) ve genisteinin ise oksidatif stresi baskılayarak katarakt oluşumunu engellediği (Kim *et al.* 2008) yapılan çalışmalar sonucunda ortaya konulmuştur (Kılınç 2015).

Birçok kimyasal madde, canlı metabolizmasında düşük dozlarda da olsa enzim aktivitesini etkileyerek veya spesifik aktivitesinde inhibisyona yol açarak enzimleri etkilemektedir. Laboratuvarlarda birçok farklı enzimin ilaçlarla etkileşimi ile ilgili günümüze dek birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. Örneğin karbonik anhidraz (CA) glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (G6PD), 6-fosfoglukonat dehidrogenaz, glutatyon redüktaz (GR) gibi birçok enzim çeşitli kaynaklardan saflaştırılmış, üzerinde tıbbi uygulamalarda çok yaygın olarak kullanılan ilaçların inhibisyon ve aktivasyon etkileri incelenmiştir (Beydemir *et al.* 2002; Çiftçi *et al.* 2002; Ekinci *et al.* 2007).

Bu çalışma kapsamında koyun karaciğerinden aldoz redüktaz ve sorbitol dehidrogenaz enzimlerinin saflaştırılması ve enzim aktiviteleri üzerine çeşitli fenolik asitlerin *in vitro* etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Tez çalışmamız kapsamında, aldoz redüktaz enzimi koyun karaciğerinden saflaştırılmıştır. Saflaştırma işlemi homojenat hazırlanması, amonyum sülfat çöktürmesi (%40-80), DE-52 Selüloz iyon değişim kromatografisi, jel filtrasyon kromatografisi ve 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemler sonucunda AR enzimi koyun karaciğerinden 0,923 EÜ/mg spesifik aktivite, %2,11 verimle yaklaşık 161,9 kat saflaştırılmıştır. Enzim

aktivitesindeki düşüşü engellemek amacıyla tüm saflaştırma işlemleri buz banyosu kullanarak soğuk ortamda (+4°C'de) gerçekleştirilmiştir.

Amonyum sülfat ((NH₄)₂SO₄) çöktürmesi özellikle spesifik afinitesi bilinmeyen enzimler için sıklıkla kullanılan kısmi bir saflaştırma yöntemidir. Bu yöntemde numune içerisindeki birçok safsızlık uzaklaştırılır ve proteinler daha derişik halde elde edilirler. Bu nedenle kromatografik işlemler yapılmadan önce amonyum sülfat çöktürmesi yapılması enzimin derişikleştirilmesi yönünden büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla yaptığımız çalışmamızda koyun karaciğeri AR enzimi için %40-80 aralığında amonyum sülfat çöktürme işlemi yapılarak homojenattaki birçok safsızlık uzaklaştırılarak enzimin derişik hale getirilmesi amaçlandı. Amonyum sülfat çöktürmesi sonrası ise yine +4°C'de diyaliz işlemi gerçekleştirildi. Böylece düşük moleköl kütleli maddeler ve tuzlar enzim çözeltisinden uzaklaştırıldı.

Koyun karaciğeri aldoz redüktaz enziminin saflaştırılması işlemlerinde DE-52 Selüloz iyon değışim, Sephadex G-100 jel filtrasyon ve 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografî yöntemleri birarada kullanılmıştır. İyon değışim kromatografisi, proteinleri üzerlerinde taşıdıkları net yüklere göre ayıran kromatografik bir yöntemdir. Kolon pozitif (anyon değıştirici) veya negatif (katyon değıştirici) yüklü bağlayıcı gruplar içeren reçine ile paketlenir. Protein karışımı düşük iyonik şiddetli bir tampon ile kolon boyunca yürütölme işlemine tabii tutulur. Bu tamponun pH'sı hedef proteinin reçineye bağlanmasını sağlayacak değerde olmalıdır. Eğer tamponun pH'sı proteinin izoelektrik pH'sından daha düşük olursa proteinin yükü pozitif olur ve protein bir katyon değıştirici ile bağlanır. Bunun tam tersine tampon pH'sı proteinin izoelektrik pH'sından daha yüksek olursa proteinin yükü negatif olur ve bir anyon değıştirici ile bağlanarak kolonda tutulur. Bağlanmayan proteinler, kolondan ilk olarak akarlar. İyonik gücü ya da pH'sı farklı bir tampon kolondan geçirilerek bağı proteinlerin yükü değıştirilir ve kolondan akması sağlanır. İyon değışim kromatografisinde proteinin yüksek tuz konsantrasyonu içerikli tamponlarda olması istenmeyen bir durum olduğundan çalışmamızda kromatografik işlemler sırasında kullandığımız tampon çözelti oldukça düşük tuz konsantrasyon içerikli olarak kullanılmıştır (Alım 2010).

Yaptığımız çalışmamızda, aldoz redüktaz enzimi için DE-52 Selüloz kolonunda pH=7,4 olan tampon çözeltisi kullanıldı. Ancak pH=7,4'de AR enzimi DE-52 Selüloz iyon değişim kolonuna tutunmadı ve kolonun dengelenmesinde kullanılan tampon ile elüe oldu. Enzimin bağlanamama sebebi ise kullanılan pH değerinde kolona AR proteininden daha kuvvetli olarak bağlanan proteinlerin varlığı olabileceği tahmin edilmektedir. Kolona tutunan diğer proteinler sayesinde AR proteini kolona tutunan diğer proteinlerden ayrılmış oldu. DE-52 Selüloz iyon değişim kolonundan elüe edilen ve AR enzim aktivitesi görülen elüatlar Sephadex G-100 jel filtrasyon kolonuna yüklendi. Jel filtrasyon kolonunda molekül büyüklüğüne göre ayırım gerçekleştirildi. Jel filtrasyon kolonundan alınan elüatlarda görülen AR aktiviteli tüpler birleştirilerek 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonuna yüklendi. Enzim kolona tutundu ve artan tuz gradienti yöntemi uygulanarak enzim kolondan elüe edildi. Tutunan enzimlerin saflığını kontrol etmek amacıyla SDS-PAGE yöntemi kullanıldı. SDS-PAGE'de tek bant görülmesi ile koyun karaciğerinden aldoz redüktaz enziminin saf olarak elde edildiği anlaşıldı.

Koyun karaciğerinden elde ettiğimiz AR enziminin alt birim molekül kütlelerini tayin etmek amacıyla SDS-PAGE metodundan yararlanıldı. Şekil 4.7'da gösterildiği üzere koyun karaciğerinden elde edilen enzim numunesi ile birlikte standart protein numuneleride SDS-PAGE'de yürütüldü. Standart protein numunelerinin molekül kütleleri ve R_f değerleri kullanılarak $R_f - \log M_K$ standart grafiği çizildi ve Şekil 4.8'de verildi. SDS-PAGE jelinde koyun karaciğerinden elde edilen AR enzimi içinde R_f değeri hesaplanıp elde edilen standart grafikten koyun karaciğeri AR enziminin alt birim molekül kütlesi belirlendi. Yapılan hesaplamalar sonucunda AR enziminin alt birim molekül kütlesi 38,82 kDa olarak bulundu.

Her enzim için birim zamanda substratını en fazla değişikliğe uğrattığı belirli bir sıcaklık değeri bulunmaktadır. Bu sıcaklık değerine o enzimin optimum sıcaklığı denilmektedir. Koyun karaciğerinden saflaştırılan AR enzim aktivitesinin optimum sıcaklık değerlerinin belirlenmesi amacıyla dijital su banyosu kullanılarak 0°C ile 70°C arasında 10°C sıcaklık farkı oluşturularak gerçekleştirildi ve koyun karaciğeri aldoz

redüktaz enzimi için optimum sıcaklık 50°C olarak belirlendi. Enzimin optimum sıcaklık değerinden yararlanılarak $\Delta H=1,52$ kcal/mol, $E_a=2,16$ kcal/mol ve $Q_{10}=1,33$ olarak belirlendi. Ayrıca koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzimi için optimum pH çalışması farklı pH'larda tampon çözeltiler kullanılarak 10 mM Na-fosfat pH=5,5 tamponu kullanılarak belirlendi. Ayrıca koyun karaciğeri aldoz redüktaz enzimi için optimum iyonik şiddet 10 mM olarak belirlenirken, enzimin stabil pH'sı ise değişik pH'larda Na-fosfat, Tris/HCl ve Glisin/NaOH tamponları kullanılarak pH=5,5 (Na-fosfat) olarak belirlendi.

İlk kez sıçan karaciğerinden saflaştırılan sorbitol dehidrogenaz enzimi (Brakley 1951), bitki dokularında da bulunduğu için dolayı yapılan çalışmalarda bitki dokularından da saflaştırılmıştır (Negm and Loescher 1979; Doehlert 1987; Yamaguchi *et al.* 1994; Oura *et al.* 2000).

Ayrıca sorbitol dehidrogenaz enzimi birçok dokudan saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Sorbitol dehidrogenaz enzimini memeli dokularından saflaştırmak oldukça güç olmuştur. Bunun sebebi olarak sorbitol dehidrogenazın kararsız bir enzim olması ve stabilitesinin olmaması gösterilmiştir. Enzimin bu kararsız özelliği saflaştırma işleminin yapıldığı pek çok çalışmada da gözlemlenmiştir (Smith 1962; Rehg and Torack 1977; O'Brien *et al.* 1983; Karacaoğlan and Özer 2005).

Rehg ve Torack sıçan beyni kullanarak SDH enzimini, amonyum sülfat çöktürmesi, DE-52 Selüloz ve CM-Selüloz C-52 kromatografisi yöntemlerini kullanılarak %13,6 verimle yaklaşık 700 kat kısmen saflaştırılmıştır (Rehg and Torack 1977).

Çalışmamızda aldoz redüktaz enziminin saflaştırılması, karakterizasyon ve inhibisyon çalışmalarına ek olarak koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enziminin de farklı kromatografik teknikler denenerek saflaştırılması ve inhibisyon çalışmalarının yapılması amaçlanmıştır.

Yaptığımız çalışmamızda koyun karaciğeri SDH enzimi beş basamakta saflaştırılmıştır. Saflaştırma işlemi homojenat hazırlanması, amonyum sülfat çöktürmesi (%40-70) (Alım 2010), DE-52 Selüloz iyon değişim kromatografisi, CM-Selüloz C-52 iyon değişim kromatografisi ve Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kullanılan bu yöntemlerle SDH enzimi koyun karaciğerinden 0,185 EÜ/mg spesifik aktivite, %0,53 verimle yaklaşık 9,07 kat saflaştırılmıştır.

Koyun karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi için %40-70 aralığında amonyum sülfat çöktürme işlemi yapıldı ardından diyaliz işlemi gerçekleştirilerek istenmeyen düşük molekül kütleli moleküller ve tuz enzim çözeltisinden uzaklaştırılmıştır.

Çalışmamızda, sorbitol dehidrogenaz enzimi için DE-52 Selüloz kolonunda pH=7,9 olan tampon çözeltisi kullanıldı. Ancak pH=7,9'de SDH enzimi DE-52 Selüloz iyon değişim kolonuna tutunmadı ve kolonun dengelenmesinde kullanılan tampon ile elüe oldu. Enzimin bu pH değerinde kolona bağlanamama sebebi ise kullanılan pH değerinde kolona SDH proteininden daha kuvvetli olarak bağlanan proteinlerin varlığı olabileceği tahmin edilmektedir. Kolona tutunan diğer proteinler sayesinde SDH proteini kolona tutunan diğer proteinlerden ayrılmış oldu. DE-52 Selüloz iyon değişim kolonundan elüe edilen ve SDH enzim aktivitesi görülen elüatlar CM-Selüloz C-52 iyon değişim kolonuna yüklendi ve enzim bu kolona tutundu. Tutunan enzimler artan tuz gradienti uygulanarak kolondan elüe edildi ve tuzu uzaklaştırmak ve pH ayarlamak için diyaliz işlemi gerçekleştirildi. Diyaliz sonrasında enzim Sephadex G-100 jel filtrasyon kolonuna yüklendi. Jel filtrasyon kolonunda molekül büyüklüğüne göre ayırım gerçekleştirildi. Jel filtrasyon kolonundan alınan elüatların saflığını kontrol etmek amacıyla SDS-PAGE yapıldı. SDS-PAGE'de tek bant görülmesi ile enzimin saflığı ispatlanmış oldu. Ayrıca enzimin düşük verimle saflaştırılmasının altındaki sebep, enzimin kromatografi işlemleri sırasında hızlı bir şekilde aktivite kaybetmesidir.

Koyun karaciğerinden elde ettiğimiz SDH enziminin alt birim molekül kütlelerini tayin etmek amacıyla SDS-PAGE metodundan yararlanıldı. Şekil 4.13'de gösterildiği üzere

koyun karaciğerinden elde edilen enzim numunesi ile birlikte standart protein numuneleri de SDS-PAGE'de yürütüldü. Standart protein numunelerinin molekül kütleleri ve R_f değerleri kullanılarak $R_f - \log M_K$ standart grafiği çizildi ve Şekil 4.14'de verildi. SDS-PAGE jelinde koyun karaciğerinden elde edilen SDH enzimi içinde R_f değeri hesaplanıp elde edilen standart grafikten koyun karaciğeri SDH enziminin alt birim molekül kütlesi belirlendi. Yapılan hesaplamalar sonucunda SDH enziminin alt birim molekül kütlesi 37,74 kDa olarak bulundu.

IC_{50} değeri, enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu olarak tanımlanmaktadır. Aldoz redüktaz enzimi üzerine yaptığımız inhibisyon çalışmalarında herbir inhibitör için IC_{50} değerleri hesaplanarak belirlendi. Çalışmamızda en yüksek inhibisyonu IC_{50} değeri 3 μM olan kafeik asit göstermiştir. Bu bileşiği IC_{50} değerleri sırasıyla 7 μM ve 39 μM olan elagik asit ve 4-hidroksi benzoik asit bileşikleri izlemektedir. Aldoz redüktaz enzimi aktivitesi üzerine çalışılan inhibitörlerin büyüklükleri büyükten küçüğe doğru sıralaması şu şekildedir; kafeik asit > elagik asit > 4-hidroksi benzoik asit > salisilik asit > 3-hidroksi benzoik asit > ferulik asit > 3,5-dihidroksi benzoik asit > gallik asit > 3,4-dihidroksi benzoik asit > p-kumarik asit. Çalışılan bileşikler içerisinde kafeik asit bileşiğinin güçlü bir aldoz redüktaz inhibitörü olduğu sonucuna varılabilir.

AR enzimi aktivitesi üzerine çalışılan tüm inhibitörler SDH enzimi aktivitesi üzerine de çalışılmıştır. Çalışmamızda en yüksek inhibisyonu IC_{50} değeri 13 μM olan elagik asit göstermiştir. Bu bileşiği IC_{50} değerleri sırasıyla 17 μM ve 21 μM olan ferulik asit ve kafeik asit bileşikleri izlemektedir. Sorbitol dehidrogenaz enzimi aktivitesi üzerine çalışılan inhibitörlerin büyüklükleri büyükten küçüğe doğru sıralaması şu şekildedir; elagik asit > ferulik asit > kafeik asit > p-kumarik asit > gallik asit > 3,4-dihidroksi benzoik asit > salisilik asit > 3-hidroksi benzoik asit > 4-hidroksi benzoik asit > 3,5-dihidroksi benzoik asit. Çalışılan bileşikler içerisinde elagik asit bileşiğinin güçlü bir sorbitol dehidrogenaz inhibitörü olduğu sonucuna varılabilir.

Sonuç olarak bu tez kapsamında;

1. Koyun karaciğerinden aldoz redüktaz ve sorbitol dehidrogenaz enzimlerinin saflaştırılması gerçekleştirilmiştir.
2. Çalışma sonucunda koyun karaciğeri AR enzimi %2,11 verimle yaklaşık 161,9 kat ve SDH enzimi ise %0,53 verimle yaklaşık 9,07 kat saflaştırılabilmektedir. Enzimin saflığı SDS-PAGE ile kontrol edilerek tek bant gözlenmiştir.
3. Aldoz redüktaz enzimi için karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.
4. Koyun karaciğeri aldoz redüktaz ve sorbitol dehidrogenaz enzimleri üzerine bazı fenolik bileşiklerin inhibisyon etkileri incelenmiştir. Bu amaçla 3,4-dihidroksi benzoik asit, 3,5-dihidroksi benzoik asit, 3-hidroksi benzoik asit, 4-hidroksi benzoik asit, salisilik asit, p-kumarik asit, elagik asit, gallik asit, ferulik asit ve kafeik asit bileşikleri kullanılmıştır.
5. Aldoz redüktaz ve sorbitol dehidrogenaz enzimleri üzerinde inhibisyon etkisi gösteren 3,4-dihidroksi benzoik asit, 3,5 dihidroksi benzoik asit, 3-hidroksi benzoik asit, 4-hidroksi benzoik asit, salisilik asit, p-kumarik asit, elagik asit, gallik asit, ferulik asit ve kafeik asit bileşikleri için IC_{50} ve K_i değerleri hesaplanarak, inhibisyon tipleri belirlenmiştir.
6. Elde edilen bütün sonuçlar Çizelge 5.1 ve Çizelge 5.2'de aşağıdaki gibi özetlenmiştir.

Çizelge 5.1. Koyun karaciğeri AR enziminin saflaştırılması ile ilgili toplu sonuçlar

Aldoz Redüktaz Enziminin Saflaştırılması İle İlgili Sonuçlar			
Spesifik aktivite (EÜ/mg protein)	0,923		
Saflaştırma katsayısı	161,9		
Verim (%)	2,11		
Molekül Kütlesi Tayini (kDa)			
SDS-PAGE metodu ile (kDa)	38,82		
Karakterizasyon Çalışmaları			
Optimum pH	5,5		
Optimum iyonik şiddet (mM)	10		
Optimum sıcaklık (°C)	50		
Stabil pH	8,0		
E _a (kcal/mol)	2,16		
ΔH (kcal/mol)	1,52		
Q10	1,33		
K _M (mM)	0,45		
V _{max} (EÜ/ml)	0,55		
Kinetik Çalışmalar			
Fenolik Asitler	IC₅₀ (μM)	K_i (μM)	İnhibisyon Tipi
3,4-Dihidroksi benzoik asit	120	1,7	Yarı yarışmalı
3,5-Dihidroksi benzoik asit	92	20	Yarı yarışmalı
3-Hidroksi benzoik asit	49	14	Yarı yarışmalı
4-Hidroksi benzoik asit	39	101	Yarışmasız
Salisilik asit	40	302	Yarışmasız
p-Kumarik asit	690	318	Yarışmasız
Elagik asit	7	7	Yarı yarışmalı
Gallik asit	103	91	Yarışmasız
Ferulik asit	84	14	Yarı yarışmalı
Kafeik asit	3	2	Yarışmasız

Çizelge 5.2. Koyun karaciğeri SDH enziminin saflaştırılması ile ilgili toplu sonuçlar

Sorbitol Dehidrogenaz Enziminin Saflaştırılması İle İlgili Sonuçlar			
Spesifik aktivite (EÜ/mg protein)	0,185		
Saflaştırma katsayısı	9,07		
Verim (%)	0,53		
Molekül Kütlesi Tayini (kDa)			
SDS-PAGE metodu ile (kDa)	37,74		
Kinetik Çalışmalar			
Fenolik Asitler	IC₅₀	K_i	İnhibisyon Tipi
3,4-Dihidroksi benzoik asit	5,06 mM	4,3 mM	Yarı yarışmalı
3,5-Dihidroksi benzoik asit	8,35 mM	3,73 mM	Yarışmasız
3-Hidroksi benzoik asit	6,73 mM	5,97 mM	Yarışmasız
4-Hidroksi benzoik asit	7,07 mM	2,55 mM	Yarı yarışmalı
Salisilik asit	5,78 mM	4,52 mM	Yarışmasız
p-Kumarik asit	24 µM	51 µM	Yarışmasız
Elagik asit	13 µM	45 µM	Yarışmasız
Gallik asit	26 µM	37 µM	Yarışmasız
Ferulik asit	17 µM	37 µM	Yarı yarışmalı
Kafeik asit	21 µM	45 µM	Yarı yarışmalı

KAYNAKLAR

- Akçay, G., Akarsu, E., 2000. Endokrin ve Metabolizma Hastalıkları, Aktif Yayıncılık, Erzurum.
- Akiyama, H., Fujii, K., Yamasaki, O., Oono, T., Iwatsuki K., 2001. Antibacterial action of several tannins against staphylococcus aureus. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48, 487-491.
- Alım, Z. and Beydemir, Ş., 2012. Effects of some anti-neoplastic drugs on sheep liver sorbitol dehydrogenase. *Archives of Physiology and Biochemistry*. Early Online, 1-9.
- Alım, Z., 2010. Koyun karaciğerinden Sorbitol Dehidrogenaz Enziminin Saflaştırılması ve Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı İlaçların Etkilerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Amano, S., Yamagishi S., Koda Y., Tsuneoka M., Soejima M., Okamoto T., Inagaki Y., Yamada K., Kimura H., 2003. Polymorphisms of sorbitol dehydrogenase gene and susceptibility to diabetic retinopathy. *Med. Hypotheses*, 60, 550–551.
- American Diabetes Association., 2013. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 36, 67-74.
- Andersons, B., Gravitis, J., Erins, P., 1980. Study of macromolecular models of lignin obtained from ferulic acid, *Khim. Prir. Soedin.*, 2, 239–245
- Anonim, 2007. <http://en.wikipedia.org/wiki/Phenols>.
- 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. 2004. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 27(1); 5-10.
- Anonymous. 2005. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 28; S37-S42.
- Anonymous. 2010. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 33; S62-S69.
- Asada, M., Galambos J.T., 1963. Sorbitol dehydrogenase and hepatocellular injury: an experimental and clinical study. *Gastroenterology*, 44, 578-587.
- 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.
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S., 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* 99:191-203.
- Barski, O. A., Tipparaju, S. M. and Bhatnagar, A., 2008. The Aldo-Keto Reductase Superfamily and its Role in Drug Metabolism and Detoxification *Drug Metabolism Reviews*, 40, 553–624.
- Başaran, E., 2008. Tip 1 Diabetes Mellitus'lu hastalarda Diabetes Mellitus başlangıç yaşının komplikasyon gelişme süresine etkisi. Aile Hekimliği Uzmanlık Tezi, Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi.

- Bektaş, N., 2005. Bazı fenolik asitler ve kombinasyonlarının antioksidan aktivitelerinin değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Beydemir, Ş., Çiftçi M., Küfrevioğlu Ö. İ., 2002. Purification and characterization of glucose 6-phosphate dehydrogenase from sheep erythrocytes, and inhibitory effects of some antibiotics on enzyme activity. *J. Enz. Inhib. Med. Chem.*, 17, 271-277.
- Blakeley, M.P., Ruiz, F., Cachau, R., Hazemann, I., Meilleur, F., Mitschler, A., Ginell, S., Afonine, P., Ventura, O.N., Cousido-Siah, A., Haertlein, M., Joachimiak, A., Myles, D., Podjarny, A., 2008. Quantum model of catalysis based on a mobile proton revealed by subatomic x-ray and neutron diffraction studies of h-aldose reductase. *Proc.Natl.Acad.Sci*, 105, 1844-1848.
- Bohren, K. M., Grimshawg, C. E. and Gabbaya, K. H., 1992. Catalytic effectiveness of human aldose reductase critical role of c-terminal domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 20965-20970.
- 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. Biochem. J.*, 49, 257-271.
- Bravi, M. C., Pietrangeli, P., Laurenti, O., Basili, S., Cassone-Faldetta, M., Ferri, C. and De Mattia, G., 1997. Polyol pathway activation and glutathione redox status in non-insulin-dependent diabetic patients. *Metabolism*, 46 (10), 1194-1198.
- 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, 424-444.
- Brownlee, J.M., 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications, *Nature*, 414, 813-820.
- Burda, S., Oleszek, W., 2001. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49, 2774-2777.
- Cameron, N.E., Cotter M.A., 1997. Metabolic and vascular factors in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Diabetes*, 46,31-37.
- Carper, D.A., Wistow, G., Nishimura, C., Graham, C., Watanabe, K., Fujii, Y., Hayashi, H., Hayaishi, O., 1989. A superfamily of NADPH-dependent reductases in eukaryotes and prokaryotes. *Exp. Eye Res.* 49, 377-388.
- Cemeroğlu, B. ve Acar, J., 1986. Meyve ve sebze İşleme Teknolojisi. *Gıda Tek. Derneği No:6*, 513.
- Cemeroğlu, B., Yemenicioğlu, A., Ozkan, M., 2004. Meyve ve sebzelerin bileşimi, meyve sebze işleme teknolojisi 2. Baskı, Başkent Matbaacılık, Ankara.
- 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.
- Champe, P. C., Harvey, R. A., 1994. *Lippincott's Illustrated Reviews.*, J.B. Lippincott Company, New Jersey, USA.
- Champe, P.C., Harvey R.A., 1997. *Lippincott's Illustrated reviews serisinden: Biyokimya, Nobel tıp kitapçevleri*,130, 131 s, İstanbul

- Chan, N. N., Vallance, P. and Colhoun, H. M., 2000. Nitric oxide and vascular responses in type I diabetes. *Diabetologia*, 43, 137-147.
- Chandra, D., Jackson, E. B., Ramana, K. V. Kelley, R., Srivastava, S. K. and Bhatnagar, A., 2002. Nitric oxide prevents aldose reductase activation and sorbitol accumulation during diabetes. *Diabetes*, 51, 3095–3101.
- 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. *Mol. Nutr. Food. Res.*, 54(3), 388-395
- Chappey, O., Dosquet C., Wautier M.P., Wautier J.L., 1997. Advanced glycation end products, oxidant stress and vascular lesions. *Eur J Clin Invest.*, 27, 97-108.
- Chu-Moyer, M. Y., Ballinger W. E., Beebe D. A., Berger R., Coughter J. B., Day W. W., Li J., Mylari B. L., Oates P. J., Weekly R. M., 2002. Orally-effective, long-acting sorbitol dehydrogenase inhibitors: synthesis, structure-activity relationships, and *in vivo* evaluations of novel heterocycle-substituted piperazine-pyrimidines. *J. Med. Chem.* 45, 511-528
- Chung, K.T., Wong, T.Y., Wei, C.I., Huang, Y.W., Lin, Y., 1998. Tannins and human health: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 38, 421-64.
- Clee, M. S. and Attie, A. D., 2007. The genetic landscape of type 2 diabetes in mice. *Endocrine Reviews*, 28(1), 48–83.
- Çiftçi, M., Beydemir Ş., Yılmaz H., Bakan E. 2002. Effects of some drugs on rat erythrocyte 6-phosphogluconate dehydrogenase: an *in vitro* and *in vivo* study. *Polish J. Pharmacol.*, 54, 275-280.
- Danaei, G., Finucane, M. M., Lu, Y., Singh, G. M., Cowan, M. J., Paciorek, C. J., Lin, J. K., Farzadfar, F., Khang, Y. H., Stevens, G. A., Rao, M., Ali, M. K., Riley, L. M., Robinson, C. A., Ezzati, M., 2011. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. *Lancet*, 378, 31–40.
- Danişan, A., Ceyhan, D., Oğus, I. H. and Özer, N., 2004. Purification and Characterization of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from Rat Small Intestine. *Protein J*, 23, 317-324.
- DCCT (The Diabetes Control and Complications Trial Research Group), 1993. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *New Engl. J. Med.*, 329, 977-986.
- Del Corso, A., Costantino, L., Rastelli, G., Buono, F., Mura, U., 2000. Aldose reductase does catalyze the reduction of glyceraldehyde through a stoichiometric oxidation of NADPH. *Exp. Eye Res.*, 71:515-521.
- Demir, H., Beydemir, Ş., Çiftçi, M. 2009. Purification, Characterization and Kinetic Properties of Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase from *Polygonum cognatum* Meissn Leaves. *Asian Journal of Chemistry*, 21, 517-521.
- 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.

- Doehlert, D.C., 1987. Ketose reductase activity in developing maize endosperm. *Plant Physiol.*, 84, 830-834.
- Donkin, S. S., Bertics S. J., Armentano L. E., 1997. Chronic and transitional regulation of gluconeogenesis and glyconeogenesis by insulin and glucagon in neonatal calf hepatocytes. *J Anim Sci.* 75(11), 3082.
- 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. *Eur. J. Med. Chem.*, 34, 235-243.
- Ekinci, D., Beydemir Ş., Alım Z. 2007. Some drugs inhibit in vitro hydratase and esterase activities of human carbonic anhydrase-I and II. *Pharmacological Reports*, 59, 580-587.
- 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.
- Engelgau, M. M., 2004. Diabetes diagnostic criteria and impaired glycemic states: Evolving evidence base. *Clinical Diabetes*, 22(2); 69-70.
- Ergün, A., Tuncer, ŞD., Colpan, İ., Yalcın, S., Yıldız, G., Kucukersan MK., Kucukersan, S., Onol, AG., Muğlalı, OH., Şehu, A., 2002. *Yemler, Yem Hijyeni Ve Teknolojisi*. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Pozitif Matbaacılık, 465 s., Ankara,
- Fabre, S., Manin, M., Pailhoux, E., Veyssiere, G. And Jean, C., 1994. Identification of a functional androgen response element in the promoter of the gene for the androgen-regulated aldose reductase like protein specific to the mouse vas deferens, *J. Biol. Chem.* 269, 5857-5864.
- Ferrannini, E., Buzzigoli G., Bonadonna R., Giorikco M.A., Oleggini M., Graziadei L., Pedrinelli R., Brandi L., Bevilacqua S., 1987. Insulin resistance in essential hypertension. *N Engl J Med.*, 317(6), 350-7.
- Fessenden, R.J., Fessenden, J.S., 1990. *Organic Chemistry*, Brooks/Cole Publishing Company, Pacific Grove, California. 4th ede.
- 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 Dglyceraldehyde reduction. *J. Biol. Chem.*, 250, 2933 – 2940.
- Frenette, G., Lessard, C., Sullivan, R. 2004. Polyol pathway along the bovine epididymis. *Mol. Reprod. Dev.*, 69: 448-456.
- Garcia-Perez, A., Burg, M. B., 1991. Renal medullary organic osmolytes. *Physiol. Rev.*, 71, 1081-1115.
- 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.
- Gonzalez, R. G., Barnett, P., Aguayo, J., Cheng, H. M. and Chylack, L. T. J., 1984. Direct measurement of polyol pathway activity in the ocular lens. *Diabetes*, 33, 196–199.
- Gözükara, E.M., 2011. *Biyokimya*. Nobel Tıp Kitabevi, 373-408, İstanbul
- Graf, E., 1992. Antioxidant potential of ferulic acid, *Free Radic. Biol. Med.*, 13(4), 435–448

- Gray, J. I., 1978., Measurement of lipid oxidation. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 55, 539-46.
- Gugliucci, A., 2000. Glycation as the glucose link to diabetic complications. *Journal of the American Osteopathic Association (JAOA)*, 100 (10), 621-634.
- Gupta, N., Gupta, S., & Mahmood, A., 2007, Gallic acid inhibits brush border disaccharidases in mammalian intestine, *Nutrition Research*, 27, 230-235.
- Ha, T. J., Lee, J. H., Lee, M., Lee, B. W., Kwon, H. S., Park, C., Shim, K., Kim, H., Baek, I., Jang, D. S., 2012. *Food Chemistry*, 135, 1397–1403
- Harborne, J. B., 1980. Plant phenolics. In: *Secondary Plant Products*. E. A. Bell, B. V. Charlwood (ed.), Springer Verlag, 329-402 p. Berlin.
- Hers H.G., 1956. The mechanism of the transformation of glucose in fructose in the seminal vesicles. *Biochim Biophys Acta*, 22 (1), 202-203.
- Hodgen, G.D. and Sherins R.J., 1973. Enzymes as markers of testicular growth and development in the rat, *Endocrinology*, 93, 985-989.
- Hodgkinson, A. D., Bartlett, T., Oates, P. J., Millward, B. A. and Demaine, A. G., 2003. The response of antioxidant genes to hyperglycemia is abnormal in patients with type 1 diabetes and diabetic nephropathy. *Diabetes*, 52, 846–851.
- Hollenbeck, C., Reaven G.M., 1987. Variations in insulin stimulated glucose uptake in healthy individuals with normal glucose tolerance. *J Clin Endocrinol Metab.*, 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. *Biochem. J.*, 318, 119-123.
- Hsu, C.-L., & Yen, G. C., 2007, Effects of gallic acid on high fat diet-induced dyslipidaemia, hepatosteatosis and oxidative stress in rats, *British Journal of Nutrition*, 98, 727-735.
- Hulme, A. C., 1971. *The Biochemistry of fruits and their products*. A.R.C. Food Research Institute, Norwich, England Vol.2,172-205.
- Hwang Y.C., Bakr S., Ellery C.A., Oates P.J. and Ramasamy R., 2003. Sorbitol Dehydrogenase: a Novel Target for Adjunctive Protection of Ischemic Myocardium. *The FASEB Journal*, 17, 2331-2333.
- Hyndman, D. and Penning, T.M., 2009. Aldo-Keto Reductase (AKR) Superfamily homepage. Perelman School of Medicine. The Trustees of the University of Pennsylvania.
- 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.
- İnan, S. 2014. Diabetik Retinopati ve Etiyopatogenezi. *Kocatepe Tıp Dergisi*, 15(2), 207-17, Afyonkarahisar.
- Jakuš, V., Rietbrock N., 2004. Advanced Glycation End-Products and the Progress of Diabetic Vascular Complications. *Physiol. Res.*, 53, 131-142.
- Jeffery, J., Chesters J., Mills C., Sadler P.J., Jornvall H., 1984. Sorbitol dehydrogenase is a zinc enzyme. *EMBO J.*, 3, 357-360.
- Jez, J.M.; Bennet, M.J.; Schlegel, B.P; Lewis, M; Penning,T.M., 1997. Comparative anatomy of the aldo-keto reductase superfamily. *Biochem. J.*, 326, 625-636.
- 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. *Chem. Biol. Interact.*, 130, 351-358.
- Jörnvall, H., Von Bahr-Lindström H., Jeffery J., 1984. Extensive variations and basic features in the alcohol dehydrogenase-sorbitol dehydrogenase family. *Eur. J. Biochem.*, 140, 17-23.
- Jung, U. J., Lee, M. K., Park, Y.B., Jeon, S. M. *et al.*, Antihyperglycemic and antioxidant properties of caffeic acid in db/bd mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2006, 318, 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 polyol production: a reply. *Biochem. J.* 247, 495-496.
- Kahkonen, MP., Hopia, AI., Vuorela, HJ., Rauha, J.-P., Pihlaja, K., Kujala, TS., Heinonen M., 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3954-3962.
- Kalaycıoğlu, L., Serpek, B., Nizamlioğlu, M., Başpınar, N., Tiftik, A. M., 2013. *Biyokimya. Nobel Yayınevi*, 213-220, Ankara
- Kara, B., 2009. Aldoz redüktaz, α - Amilaz, Monoamin Oksidaz Ve Ksantin Oksidaz Enzimlerinin İnhibisyonu, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Karacaoğlan, V., Ozer I., 2005. Steady state kinetic properties of sorbitol dehydrogenase from chicken liver. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 140, 309-312.
- Karlsson, C., Maret W., Auld D.S., Höög J.O., Jörnvall H., 1989. Variability within mammalian sorbitol dehydrogenases. *Eur. J. Biochem.*, 186, 543-550.
- Katiyar, S.K., Mukhtar, H., 1997. Tea Antioxidants in cancer chemoprevention. *Journal of Cellular Biochemistry Supplement*, 27, 59-67.
- Kawasaki, Y., Fujii, J., Miyazawa, N., Hoshi, A., Okado, A., Tano, Y. and Taniguchi, N., 1998. Specific detections of the early process of the glycation reaction by fructose and glucose in diabetic rat lens. *FEBS Lett.*, 11, 116-120.
- Keha, .E. ve Kufrevioglu, O.I., 2004. *Biyokimya, Aktif yayınları*, 97-125, Erzurum.
- Kılınç, N., 2015. Sığır Böbreğinden Aldoz Redüktaz ve Sorbitol Dehidrogenaz Enzimlerinin Saflaştırılması, Karakterizasyonu, ve Bazı Antibiyotiklerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Kim, D., Hong, S. and Lee, D., 2006. Binding of fidarestat stereoisomers with aldose reductase. *International Journal of Molecular Sciences*, 519-536.
- Kim, Y. S., Kim, N. H., Jung, D. H., Jang, D. S., Lee, Y. M., Jonk, M.K. and Kim, J. S., 2008. Genistein inhibits aldose reductase activity and high glucose induced TGF- α 2 expression in human lens epithelial cells. *European Journal of Pharmacology*, 594, 18-25.
- King, K. D., Jones, J. D. and Warthen, J., 2005. Microvascular and macrovascular complications of diabetes mellitus. *American Journal of Pharmaceutical Education*, 69 (5), 1-10.
- Kinoshita J.H., Nishimura, C., 1988. The involvement of aldose reductase in diabetic complications. *Diabetes Metabo. Rev.*, 4, 323-337.

- Kinoshita, J. H., 1974. Mechanisms initiating cataract formation. Proctor Lecture. *Investigative Ophthalmology*, 13, 713-724.
- Kinoshita, J. H., Kador, P. F., Datiles, M. B., Fukui, H. N. and Hu, T. S., 1983. Corneal re-epithelialization in galactosemic rats. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 24, 563-569.
- Klip, A., Tsakiridis, T., Marette, A. and Ortiz, P. A., 1994. Regulation of expression of glucose transporters by glucose: A review of studies in vivo and in cell cultures. *Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB) Journal*, 8, 43-53.
- Kobayashi, T., Kaneko, T., Iuchi, Y., Matsuki, S., Takahashi, M., Sasagawa, I., Nakada, T., Fujii, J., 2002. Localization and physiological implication of aldose reductase and sorbitol dehydrogenase in reproductive tracts and spermatozoa of male rats. *J. Androl.*, 23, 674-683.
- Kumar P. A., Reddy G. B., 2007. Focus on molecules: aldose reductase *Exp. Eye Res.*, 85, 739-740.
- Kurt M., Atmaca A., Gürlek A., 2004. Diyabetik nefropati. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 35, 12-17.
- Labieniec M., Gabryelak T., Falcioni G., 2003, Antioxidant and prooxidant effects of tannins in digestive cells of the freshwater mussel *Unio tumidus*, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 539, 19-28.
- 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.
- Lindstad, R. I., McKinley-McKee, J. S., 1997. Reversible inhibition of sheep liver sorbitol dehydrogenase by nucleosides and nucleotides, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 435, 202-208.
- Lindstad, R.I., Hermansen L.F., McKinley-McKee J.S., 1994. Inhibition and activation studies on sheep liver sorbitol dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.*, 221, 847-854.
- 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*, 1-10.
- Luque, T., Hjelmqvist L., Marfany G., Danielsson O., El-Ahmad M., Persson B., Jörnvall H., Gonzales-Duarte R., 1998. Sorbitol Dehydrogenase of *Drosophila*. *The Journal Of Biological Chemistry*, 273, 34293-34301.
- Maekawa, K., Tanimato T., Okada S., Suzuki T., Yabe-Nishimura C., 2001. Expression of aldose reductase and sorbitol dehydrogenase genes in Schwann cells isolated from rat: Effects of high glucose and osmotic stress, *Mol. Brain Res.*, 87, 251-256.
- Mattila, P., Kumpulainen, J., 2002. Determination of free and total phenolic acids in plant-derived foods by HPLC with diode-array detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 3660-3667.
- Miyamoto, S., 2002. Molecular modeling and structure-based drug discovery studies of aldose reductase inhibitors. *Chem-Bio Informatics Journal*, 2(3), 74-85.

- Moure, A., Cruz, JM., Franco, D., Dominguez, M., Sineiro, J., Dominguez, H., Nunez, MJ., Parajo, JC., 2001. Natural antioxidants from residual source. *Food Chemistry*, 72, 145.
- Nakano, I., Tsugawa, T., Shinohara, R., Watanabe, F., Fujita, T., Nagata, M., Katoa, T., Himenoa, Y., Kobayashi, T., Fujiwara, K., Nagata, M., Itoha, M. And Nagasaka, A., 2003. Urinary sorbitol measurement and the effect of an aldose reductase inhibitor on its concentration in the diabetic state. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 17, 337-342.
- Negm, F.B., Loescher W.H., 1979. Detection and characterization of sorbitol dehydrogenase from apple callus tissue. *Plant Physiol.*, 64, 69-73.
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2013. *Biyokimyanın İlkeleri*. 183-204, Palme Yayıncılık, Ankara
- Nishikawa T., Edelstein D., Brownlee M., 2000. The missing link, a single unifying mechanism for diabetic complications. *Kidney Int.*, 58(77), 26-30.
- Nishimura, C., Matsuura, Y., Kokai, Y., Akera, T., Carper, D., Morjana, N., 1990. Cloning and expression of human aldose reductase. *J. Biol. Chem.* 265, 9788-9792.
- Noyan, A., 1993. Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji. *Meteksan A.Ş.*, S, 421-426, 1055-1066 Ankara.
- O'Brien, M.M., Schofield P.J., Edwards M.R., 1983. Polyol pathway enzymes of human brain. Partial purification and properties of sorbitol dehydrogenase. *Biochem. J.*, 211, 81-90
- Oates, P.J., 2002. Polyol pathway and diabetic peripheral neuropathy. *Int. Rev. Neurobiol.* 50, 325-392.
- Oates, P.J., 2008. Aldose reductase, still a compelling target for diabetic neuropathy. *Curr. Drug Targets*, 9, 14 p.
- Obrosova, I. G., Huysen, C. V., Fathallah, L., Cao, X., Greene, D. A. and Stevens, M. J. Obrosova, I.G., Fathallah L., Lang H.J., 1999. Interaction between osmotic and oxidative stress in diabetic precataractous lens. *Biochem. Pharmacol.*, 58, 1945-1954.
- Onganer, Y., Sakiroglu, H. and Kufrevioglu, O. I., 1998. Temperature effect on polyphenol oxidase and investigation of thermodynamic functions. *Chim. Acta Turcica*, 26, 41-46.
- 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.
- Paganga, G., 1999. The polyphenolic content of fruit and vegetables and their antioxidant activities. What does a serving constitute?. *Free Radic. Res.*, 30, 153-162
- Pailhoux, E. A., Martinez, A., Veyssiere, G. M. & Jean, C. G., 1990. Androgen-dependent protein from mouse vas deferens : cDNA cloning and protein homology with the aldo-keto reductase superfamily, *J. Biol. Chem.* 265, 19932-19936.
- 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.
- 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
- Ramana, K.V. and Srivastava, S.K., 2009. Aldose reductase: A novel therapeutic target for inflammatory pathologies. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. Vol.42, 17–20.
- Raskin, I., 1995. Salicylic Acid. In: *Plant Hormones, Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Davies (ed.), Kluwer Acad. Pub., London., 188-205 p.
- Rastelli, G., Antolini, L., Benvenuti, S. and Costantino, L., 2000. Structural bases for the inhibition of aldose reductase by phenolic compounds. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 8, 1151-1158.
- Rehg, J.E., Torack R.M., 1977. Partial purification and characterization of sorbitol dehydrogenase from rat brain. *J. Neurochem.*, 28, 655-660.
- Report of expert committee on diagnosis and classification of diabetes mellitus. 2003. *Diabetes Care*. 26 (suppl 1), 5-20.
- Rice-Avans, CA., Miller, NJ., Bolwell, PG., Bramley, PM., Pridham, JB., 1995. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenol flavonoids. *Free Radical Research*, 22, 375-383.
- Robbins R.J., 2003. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology, Food Composition Laboratory, Beltsville Human Nutrition Research Center, USA, 10, 2866-2887.
- 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.
- Sarges, R. and Oates, P., 1993. Aldose reductase inhibitors: recent developments. *Progress In Drug Research*, 40, 99–161.
- Segel, I.H., 1968. *Biochemical Calculations: Enzyme kinetics*. John Wiley and Sons, Inc, New York, 213.
- Segel, I.H., C. John Wiley and Sons 1975. *Enzyme Kinetics*. New York.
- 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.
- Shahidi F., Wanasundara, KJ., 1992. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 32, 67-103.
- Smerak, P., Sestakova, H., Polivkova, Z., Barta Z., Turkek, B., Bartova, J., Longova, M., Andel, M., 2002. Antimutagenic effects of ellagic acid and its effect on the immune response in mice. *Czech Journal of Food Science*, 20, 181-191.
- Smith, M.G., 1962. Crystallization of the L-iditol dehydrogenase of sheep liver. *Biochem. J.*, 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 inhibitor in the development of experimental diabetic nephropathy in the Sprague-Dawley rat. *Diabetologia*, 38, 387-394.

- Söyüt, H., Beydemir Ş., Hisar, O., 2008. Effects of some metals on carbonic anhydrase from brains of rainbow trout. *Biol. Trace Elem. Res.*, 123, 179-190.
- Söyüt, H., Beydemir, Ş., 2008. Purification and some kinetic properties of carbonic anhydrase from brains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver and metal inhibition. *Protein and Peptide Letters*, 15-55, (8), 528-535.
- Srivastava, S. K., Ramana, K. V., Bhatnagar, A., 2005. Role of aldose reductase and oxidative damage in diabetes and the consequent potential for therapeutic options, *Endocrinology Reviews*, 26, 380-392.
- Stanely, P., Prince, M., Priscilla, H., & Devika, P. T., 2009. Gallic acid prevents lysosomal damage in isoproterenol induced cardiotoxicity in Wistar rats, *European Journal of Pharmacology*, 139, 139-143.
- Stoner, GD., Mukhtar H., 1995. Polyphenols as cancer chemopreventive agent. *Journal of Biochemistry Supplement*, 22, 169-180.
- 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.
- Szaflik, J.P., Majsterek I., Kowaski M., Rusin P., Sobczuk A., Borucka A. I., Szaflik J., Blasiak J., 2008. Association between sorbitol dehydrogenase gene polymorphisms and type 2 diabetic retinopathy. *Experimental Eye Research*, 86, 647-652.
- 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.
- Tanimoto, T., Maekawaa, K., Okadaa, S. and Yabe-Nishimurab, 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.
- Terubayashi, H., Sato, S., Nishimura, C., Kador, P.F., Kinoshita., 1989. Localization of aldose and aldehyde reductase in the kidney, *J.H. Kidney Int.* 36,843.
- Turhan H., 2007. Tip II diabetes mellitus'lu hastalarda tedavi şekline ve hastalık süresine göre depresyon ve anksiyete, *Uzmanlık Tezi, Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul*
- Ueda H., Kawanishi K., Moriyasu M., 2004. Effects of ellagic acid and 2-(2,3,6-trihydroxy-4-carboxyphenyl) ellagic acid on sorbitol accumulation in vitro and in vivo. *Biol. Pharm. Bull.* 10, 1584-1587.
- UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study) 1998. 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.

- Vander Jagt, D. L., Kolb, N. S., Vander Jagt, T. J., Chino, J., Martinez, F. J., Hunsaker, L. A., 1995, Substrate specificity of human aldose reductase: identification of 4-hydroxynonenal as an endogenous substrate, *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1249, 117–126.
- 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., Munch, J. D. And Von Wartburg, J. P., 1977. Purification and properties of NADPH-dependent aldehyde reductase from human liver. *J. Biol. Chem.* 252, 3821–3828.
- Whiting, D.r., Guariguata, L., Weil, C., Shaw,J., 2011. IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 94, 311-321.
- Wilson, J. E., 1971. An expeditious method for determining the activation energies of World Health Organization (WHO)., 2011. Global status report on noncommunicable diseases 2010. Geneva, World Health Organization, 2011.
- Yabe-Nishimura, C., 1998. Aldose reductase in glucose toxicity: a potential target for the prevention of diabetic complications. *Pharmacol. Rev.* 50, 21-33.
- Yamagishi, S., Takeuchi M., 2004. Inhibition of protein kinase C might be harmful to diabetic retinopathy. *Med Hypotheses*, 63, 135-137.
- Yamaguchi, H., Kanayama Y., Yamaki S., 1994. Purification and properties of NAD⁺ - dependent sorbitol dehydrogenase from apple fruit. *Plant Cell Physiol.*, 35, 887-892.
- Yenigün, M., Altuntaş Y., 2001. Her Yönüyle Diabetes Mellitus. *Diabetik Mikroanjiopati ve Diabetik Makroanjiopati*, 315-375.
- Yennawar, H., Moller, M., Gillilan, R., Yennawar, N., 2011. X-ray crystal structure and small-angle X-ray scattering of sheep liver sorbitol dehydrogenase. *Acta Crystallogr. Sect.D* 67: 440-446.
- Zimmet, P., Alberti K.G.M.M., Shaw J., 2001. Shaw, Global and societal implications of the diabetes epidemic. *J. Nature*, 414, 782.

ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında Erzurum'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Kars'ta tamamladı. 2008 yılında kazandığı Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünden 2013 yılında mezun oldu. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2015 Mayıs ayında yüksek lisans eğitimini tamamladı.