TAVUK KARACİĞERİNDEN SORBİTOL DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI AĞIR METALLERİN ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Musa AKKUŞ

Yüksek Lisans Tezi
Kimya Anabilim Dalı
Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR
2012
Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TAVUK KARACİĞERİNDEN SORBİTOL DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI AĞIR METALLERİN ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Musa AKKUŞ

KİMYA ANABİLİM DALI

ERZURUM
2012

Her hakkı saklıdır

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TEZ ONAY FORMU

TAVUK KARACİĞERİNDEN SORBİTOL DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI AĞIR METALLERİN ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Prof.Dr.Şükrü BEYDEMİR danışmanlığında, Musa AKKUŞ tarafından hazırlanan bu çalışma 01/11/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak **oybirliği/~~oy çokluğu~~ (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan	: Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU	*İmza*	:
Üye	: Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN	*İmza*	:
Üye	: Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR	*İmza*	:

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU
Enstitü Müdürü

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

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TAVUK KARACİĞERİNDEN SORBİTOL DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI AĞIR METALLERİN ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Musa AKKUŞ

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR

Tavuk karaciğerinden sorbitol dehidrogenaz [L-İditol: NAD^+ oksidoredüktaz, EC 1.1.1.14] saflaştırıldı. Saflaştırma; homojenatın hazırlanması, amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-Sephadex iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi metotları ile gerçekleştirildi. Saflaştırma işlemi %3,65 verimle ve yaklaşık 267 kat olarak gerçekleştirildi. SDS-PAGE yöntemi ile tavuk karaciğeri SDH enziminin alt birim molekül kütlesi 41,4 kDa olarak hesaplanırken aktif formunun mol kütlesi ise jel filtrasyon kromatografisi yöntemi ile 169 kDa olarak hesaplandı. Ayrıca tavuk karaciğeri SDH enziminin optimum pH ve optimum sıcaklık değerleri sırası ile 9,0 ve 50°C olarak bulundu. Bu çalışmalarının yanısıra tavuk karaciğeri SDH enzim aktivitesi üzerine Pb^{+2}, Cd^{+2}, Ni^{+2}, Zn^{+2}, Ag^+ ve Hg^{+2} ağır metal iyonlarının inhibisyon etkileri araştırıldı. Pb^{+2}, Cd^{+2}, Ni^{+2}, Zn^{+2}, Ag^+ ve Hg^{+2} için IC_{50} değerleri ve Zn^{+2},Hg^{+2} ve Pb^{+2} için K_i sabitleri belirlendi.

2012, 94 sayfa

Anahtar Kelimeler: Sorbitol dehidrogenaz, tavuk karaciğeri, ağır metal, inhibisyon

ABSTRACT

Master Thesis

PURIFICATION OF SORBITOL DEHYDROGENASE FROM CHICKEN LIVER, AND INVESTIGATION EFFECTS OF SOME HEAVY METAL ON THE ENZYME ACTIVITY

Musa AKKUŞ

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

Supervisor: Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR

Sorbitol dehydrogenase [L-Iditol: NAD^+ oksidoreductase, EC 1.1.1.14] was purified from chicken liver. Purification was performed by methods of preparation of homogenates, ammonium sulphate precipitation, DEAE-Sephadex ion-exchange chromatography and gel filtration chromatography. The purification was performed with the yield of 3.65% and 267 fold. By the method of SDS-PAGE chicken liver SDH enzyme's subunit molecular weight was calculated as 41.4 kDa, SDH enzyme's active form molecular weight was calculated as 169 kDa via gel filtration chromatography. Besides, optimal pH and optimal tempreature of the enzyme was observed as 9.0 and 50°C respectively. In addition to these studies, the effects of inhibition of heavy metal ions (Pb^{2+},Cd^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+}, Ag^+ ve Hg^{2+}) on chicken liver SDH enzyme activity were investigated. For Pb^{2+}, Cd^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+}, Ag^+ and Hg^{2+} IC_{50} values were calculated and for Zn^{2+},Hg^{2+} and Pb^{2+} metals K_i constants were determined from Lineweaver-Burk graphs.

2012, 94 sayfa

Keywords: Sorbitol dehydrogenase, chicken liver,heavy metal,inhibition

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Yüksek lisans çalışmam süresince ilgi, sabır, anlayış ve desteğini esirgemeyen danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR'e sonsuz şükran ve minnettarlığımı sunarım.

Çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen biyokimya çalışma grubu hocalarım Sayın Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU'na, Sayın Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ'ye, Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR'e, Sayın Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN'e ve çalışmalarımda her an desteğini gördüğüm değerli arkadaşım Sayın Arş. Gör. Zuhal ALIM'a ve Sayın Arş. Gör. Turgay DEMİREL'e, yardımlarını esirgemeyen Namık KILINÇ'a, Mahinur ÇAM'a ve Ramazamn KALIN'a ve ayrıca diğer Biyokimya çalışma grubu arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmalarımın başarıya ulaşması için her türlü maddi ve manevi desteklerinden dolayı değerli aileme teşekkürlerimi sunarım.

Musa AKKUŞ
Ekim, 2012

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....i
ABSTRACT.....ii
TEŞEKKÜR.....iii
KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ.....vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....xi
1. GİRİŞ.....1
1.1. Sorbitol Dehidrogenaz Enzimi.....15
1.2. Diabetes Mellitus.....20
1.3. Ağırmetaller ve Çevresel Etkileri.....28
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....32
3. MATERYALve METOD.....38
3.1. Materyal.....38
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....38
3.1.2. Kullanılan alet ve cihazlar.....38
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması.....39
3.2. Metod.....45
3.2.1. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enziminin aktivitesinin ölçümü.....45
3.2.2. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enziminin saflaştırılması.....46
3.2.2.a. Tavuk karaciğer dokusunun temini ve homojenat hazırlanması.....46
3.2.2.b. Amonyum sülfat çöktürmesi.....46
3.2.2.c. Diyaliz.....47
3.2.2.d. Ultrasantrifüj.....48
3.2.2.e. DEAE-Sephadex iyon değişim kromatografisi.....48
3.2.2.f. Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi kolonunun hazırlanması tavuk karaciğeri SDH enziminin saflaştırılması ve tavuk karaciğeri SDH enziminin doğal halinin molekül kütlesinin tayini.....49
3.2.3. Optimum sıcaklık.....50
3.2.4.Optimum pH.....51

3.2.5. Bradford yöntemi ile kantitatif protein tayini 51
3.2.6. Kalitatif protein tayini 52
3.2.7. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzim saflığının kontrolü 52
3.2.8. Sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzimin molekül kütlesi tayini 54
3.2.9. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enziminin aktivitesi üzerine bazı ağır metallerin etkilerinin belirlenmesi 54
3.2.10. İnhibitör etkisi gösteren ilaçlar için IC_{50} ve K_i değerlerinin belirlenmesine ait çalışmalar 55
4. ARAŞTIRMA BULGULARI 61
4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik 61
4.2. Tavuk Karaciğeri Sorbitol Dehidrogenaz Enziminin Saflaştırma Sonuçları 62
4.2.1. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enziminin DEAE-Sephadex iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılması sonuçları 62
4.2.2. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enziminin jel filtrasyon (sephadex G-100)kromatografisi ile saflaştırma sonuçları. 62
4.2.3. Tavuk karaciğeri sdh enziminin aktif formunun molekül kütlesinin sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi ile belirlenmesine ait sonuçları 63
4.3. Tavuk Karaciğeri Sorbitol Dehidrogenaz Enziminin SDS-PAGE ile Saflık Kontrolü 65
4.4. Tavuk Karaciğeri Sorbitol Dehidrogenaz Enziminin Optimum pH Çalışmalarına Ait Bulgular 66
4.4. Tavuk Karaciğeri Sorbitol Dehidrogenaz Enziminin Optimum Sıcaklık Çalışmalarına Ait Bulgular 68
4.5. Tavuk Karaciğeri Sorbitol Dehidrogenaz Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Ağırmetallerin Etkilerine Ait Sonuçların Belirlenmesi 69
4.6. Tavuk Karaciğeri Sorbitol Dehidrogenaz Enzimi Üzerine İnhibitör Etkisi Gösteren Bazı ağırmetaller İçin K_i Değerlerinin Belirlenmesine Ait Çalışmaların Sonuçları 74
5. TARTIŞMA ve SONUÇ 77

KAYNAKLAR 87
ÖZGEÇMİŞ 95

KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ

ADH	alkol dehidrogenaz
AR	Aldoz redüktaz
BSA	Bovine serum albumin
DHAP	Dihidroksiaseton fosfat
DM	Diabetes melitus
DNA	Deoksiribonükleikasit
E	Enzim
EC	Enzim komisyon numarası
EGÜ	Erken glikasyon ürünleri
EI	Enzim-İnhibitör kompleksi
ES	Enzim-Substrat kompleksi
ESI	Enzim-Substrat-İnhibitör kompleksi
EÜ	Enzim ünitesi
GAPDH	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz
GR	Glutatyon redüktaz
GSH	İndirgenmiş glutatyon
GSSG	Yükseltgenmiş glutatyon
I	İnhibitör
İGÜ	İleri glikasyon ürünleri
IC_{50}	Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
K_i	Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti
NAD^+	Nikotinamidadenindinükleotit (yükseltgenmiş form)
NADH	Nikotinamidadenindinükleotit (indirgenmiş form)
$NADP^+$	Nikotinamidadenindinükleotitfosfat (yükseltgenmiş form)
NADPH	Nikotinamidadenindinükleotitfosfat (indirgenmiş form)
NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentaz
Nox	NADH-oksidaz
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi

PER	Amonyum peroksidisülfat
PKC	Protein kinaz C
RNA	Ribonükleik asit
mRNA	mesajcı RNA
ROS	Serbest oksijen radikalleri
rpm	Devir/dakika
S	Substrat
SDH	Sorbitol dehidrogenaz
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TEMED	N,N,N’,N’-Tetrametilendiamin
V_{max}	Maksimum hız

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Poliol yolu ve enzimleri 16
Şekil 1.2. SDH enziminin aktif bölgesindeki çinko atomunun koordinasyonu 18
Şekil 1.3. SDH enziminin kuarterner yapısı 18
Şekil 1.4. SDH enziminin bir alt biriminin yapısı 19
Şekil 1.5. Sorbitol (poliol) yolu 22
Şekil 1.6. İleri glikasyon ürünleri(İGÜ) oluşumu 26
Şekil 2.1. Sorbitol dehidrogenaz inhibitörü SDI 158'in kimyasal yapısı 35
Şekil 2.2. SDI 158 (CP- 166,572)'in insan SDH enziminin katalitik çinko atomuyla ve NADH ile etkileşimi 36
Şekil 4.1. Bradford yöntemiyle proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart grafik 61
Şekil 4.2. Tavuk karaciğeri SDH enziminin aktif formunun molekül kütlesinin tayini için kullanılan jel filtrasyon kromatografisi grafiği 64
Şekil 4.3. Tavuk karaciğeri SDH enziminin aktif formunun molekül kütlesi tayini için Sephadex G-100 kolon materyali kullanılarak yapılan jel filtrasyon kromatografisi sonucu elde edilen standart grafik 64
Şekil 4.4. Saflaştırma sonucu elde edilen SDS-PAGE fotoğrafı 65
Şekil 4.5. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yöntemiyle tavuk karaciğeri SDH enziminin molekül kütlesi tayininde kullanılan standart grafik 66
Şekil 4.6. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi için Optimum pH grafiği 67
Şekil 4.7. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enziminin optimum sıcaklık grafiği 68
Şekil 4.8. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz aktivitesi üzerine 5 farklı Pb^{+2} konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite-[Pb^{+2}] grafiği 71
Şekil 4.9. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz aktivitesi üzerine 5 farklı Cd^{+2} konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite-[Cd^{+2}] grafiği 72
Şekil 4.10. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz aktivitesi üzerine 5 farklı Ni^{+2} konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite-[Ni^{+2}] grafiği 72

Şekil 4.11. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz aktivitesi üzerine 5 farklı Ag^{+}konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite-[Ag^{+}] grafiği.....73
Şekil 4.12. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz aktivitesi üzerine 5 farklı Hg^{+2} konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite-[Hg^{+2}] grafiği.....73
Şekil 4.13. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz aktivitesi üzerine 5 farklı Zn^{+2} konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite-[Zn^{+2}] grafiği 74
Şekil 4.14. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz aktivitesi üzerine kurşun iyonunun etkisi 75
Şekil 4.15. Tavuk karaciğeri SDH enzimi üzerine çinkoiyonunun etkisi.....75
Şekil 4.16. Tavuk karaciğeri SDH enzimi üzerine civa iyonunun etkisi.....76
Şekil 5.1. Oksidatif stres ve sorbitol yolu arasındaki ilişki 78

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Enzim sınıfları ve katalizledikleri reaksiyon tipleri 4
Çizelge 1.2. Jel filtrasyon kromatografisinde kullanılan bazı jellerin proteinleri ayırma sınırları 12
Çizelge 3.1. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde Kurşun'un IC_{50} değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları 55
Çizelge 3.2. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerindeKadmiyum'un IC_{50} değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları. 56
Çizelge 3.3. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerindeNikel'inIC_{50} değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları 56
Çizelge 3.4. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerindeGümüş'ün IC_{50} değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları 57
Çizelge 3.5. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerindeCiva'nın IC_{50} değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları 57
Çizelge 3.6. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde Çinko'nun IC_{50} değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları 58
Çizelge 3.7. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde Kurşun'nun K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları 58
Çizelge 3.8. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde Çinko'nun K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları 59

Çizelge 3.9. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde Cıva'nın K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları 60
Çizelge 4.1. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enziminin saflaştırma basamakları 63
Çizelge 4.2. 0,2 M Tris/HCltamponunun farklı pH'larda tavuk karaciğeri sorbitoldehidrogenaz enzimi aktivitesine etkisi 66
Çizelge 4.3. 0,2 M Glisin/NaOH tamponunun farklı pH larda tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi aktivitesine etkisi 67
Çizelge 4.4. 0,2 M potasyum fosfat tamponunun farklı pH'larda tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi aktivitesine etkisi 67
Çizelge 4.5. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi için Optimum sıcaklık belirleme sonuçları 68
Çizelge 4.6. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi aktivitesi üzerine farklı konsantrasyonlarda kurşuniyonunun etkisi 69
Çizelge 4.7. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi aktivitesi üzerine farklı konsantrasyonlarda Kadmiyum iyonunun etkisi 69
Çizelge 4.8. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi aktivitesi üzerine farklı konsantrasyonlarda Nikel iyonununetkisi 70
Çizelge 4.9. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi aktivitesi üzerine farklı konsantrasyonlarda Gümüş iyonunun etkisi 70
Çizelge 4.10. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi aktivitesi üzerine farklı konsantrasyonlarda Civa iyonunun etkisi 70
Çizelge 4.11. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi aktivitesi üzerine farklı konsantrasyonlarda Çinko iyonunun etkisi 71
Çizelge 4.12. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine metal iyonları ile yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen IC_{50}değerleri 74
Çizelge 4.13. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi için bulunan K_i değerleri ve inhibisyon tipleri 76
Çizelge 5.1. Tavuk karaciğer dokusu SDH enzimi için yapılan çalışmaların toplu sonuçları 86

1. GİRİŞ

Canlı hücrelerde gerçekleşen yapım ve yıkım tepkimelerinin hepsine birden metabolizma denir. Kimyasal tepkimenin başlayabilmesi ve devam etmesi için tepkimeye girecek moleküllerin aktivasyon enerjisi denilen enerji engelini aşması gerekir.

Aktivasyon enerjisi, bir kimyasal tepkimenin başlayabilmesi için gerekli olan en düşük enerji miktarıdır. Aktivasyon enerjisi engelinin aşılması katalizör kullanılmasıyla sağlanır.

Kimyasal tepkimeye girecek moleküller hareket halindedir ve birbirleri ile çarpışmaktadır. Moleküllerin ısıtılması ile hareket enerjileri yükseltilir. Böylece moleküller birbirleri ile daha sık çarpışarak tepkimeye girmeleri kolaylaşır.

Ancak canlı sistemlerde kimyasal tepkimelerin çoğu hücrede meydana gelir. Hücrede kimyasal tepkimelerin olabilmesi için, enerji engeli biyolojik katalizör kullanılarak aşılabilir. Canlı sistemlerdeki bu biyolojik katalizörlere enzim denir (Anonim 2012a).

Enzimler canlı hücreler tarafından sentezlenen ve canlı organizmada kimyasal reaksiyonları hızlandıran, tepkime sonucunda hiçbir değişikliğe uğramadan çıkan ve aynı zamanda tam verim sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Katalitik RNA molekülleri dışındaki bütün enzimler protein yapısındadır.

Enzimlerin katalitik aktiviteleri, doğal protein konformasyonunun sağlamlılığına bağlıdır. Eğer enzim denatüre olursa veya alt birimlerine ayrılırsa katalitik aktivitesi kaybolur. Bu yüzden protein enzimlerinin birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapısı katalitik aktivite için esastır. Enzimlerin hızları turnover sayısı ile belirtilir. Turnover sayısı birim zamanda bir mol enzimin ürüne dönüştürdüğü substratın mol sayısı olarak

ifade edilmektedir. Turnover sayısı en yüksek olan enzim, 40.000.000 s^{-1} ile katalazdır (Fersht 1999).

Bir kısım enzimler katalitik aktivite göstermek için amnioasit kalıntıları dışında kimyasal bir guruba ihtiyaç duymazlar. Diğerleri kofaktör olarak adlandırılan Fe^{+2}, Mg^{+2}, Mn^{+2} gibi bir veya daha fazla inorganik iyona ya da koenzim olarak adlandırılan kompleks organik veya metaloorganik moleküllere gereksinim duyarlar. Bir diğer kısım enzimler ise aktivite gösterebilmeleri için hem koenzime hem de bir veya daha fazla metal iyonuna ihtiyaç duyarlar.

Protein yapısına çok sıkı hatta kovalent olarak bağlanan bir koenzim veya metal iyonu prostetik grup olarak adlandırılır. Metal iyonları ile veya koenzimiyle birlikte katalitik olarak aktif bir enzim, holoenzim olarak adlandırılırken bu gibi enzimlerin sadece protein kısmı apoenzim veya apoprotein olarak adlandırılmaktadır. Koenzimler, tiamin pirofosfat; aldehitler, koenzim A, açil grupları gibi özgül işlevsel gruplar için geçici taşıyıcı olarak görev yaparlar. Koenzimler çoğunlukla diyet ile düşük miktarlarda alınan organik besinler olan vitaminlerden temin edilirler (Nelson and Cox 2005).

Genel olarak enzimlerin özellikleri şu şekilde sıralanabilir;

1. Enzimler genellikle renksizdirler, suda çözünürler
2. Enzimlerin etki ettiği maddelere substrat denir. Reaksiyonsonunda meydana gelen maddeye ise ürün adı verilir.
3.Enzim substrat ilişkisi anahtar ile kilidin uyumuna benzer.
4. Enzim molekülünde aktif bölge denilen özel bir bölüm vardır. Enzim substratına geçici olarak aktif bölgeden bağlanır ve substrat-enzim bileşiği oluşur.
5. Daha sonra substrat ürüne veya ürünlere parçalanır.
6. Enzimler ise reaksiyondan değişmeden çıktıkları için tekrar tekrarkullanılabilirler.
7. Çok hızlı çalışırlar. Örneğin üre, enzim olmadan uzun zamanda parçalanırken, üreaz

enziminin varlığında saniyede 30 000 üre molekülü parçalanabilir.

8. Her hücrede tepkime çeşidi kadar enzim çeşidi vardır.

9. Enzimler takım halinde çalışırlar. Bir enzimin etki ettiği tepkimenin ürünü,başka bir enzimin substratını yapar. Örneğin, amilaz enzimi nişastayı maltozaparçalar. Oluşan maltoz maltaz enziminin substratıdır.

10. Enzimlerin bazıları tek substrata etki ederler yani spesifiktir. Örneğin, L-laktat dehidrogenaz enzimi laktik asidin yalnızca L-izomerine etki etmekte D-laktikasidi substrat olarak kullanmamaktadır.

11. Bazı enzimler ise çeşitli substratlara etki ederler yani daha az özgüldür. (Gıda teknolojisi M.E.B 2011)

Birçok enzim, substratlarının adına veya aktivitelerini tanımlayan bir kelime ya da sözcük grubuna "az" son eki ekleyerek adlandırılır. Üreaz, amilaz, arjinaz, proteaz ve lipaz, substratı tanımlayan; DNA polimeraz, laktat dehidrojenaz ve adenilat siklaz, tepkimeyi tanımlayan adlandırmalardır. Üreaz, ürenin hidrolizini katalize eden; DNA polimeraz ise DNA'nın sentezini katalize eden enzimdir. Pepsin, tripsin, amigdalin, pityalin, zimaz gibi, substratlarını veya aktivitelerini tanımlamayan, genel bir tanıma uymayan enzim isimleri de kullanılmıştır. Karışık isimlendirmelerin sonucu olarak bazen aynı enzim için iki veya daha fazla ad kullanılmıştır; bazen de iki farklı enzim için aynı ad kullanılmıştır. Böyle belirsiz anlamlılıklar ve yeni olarak keşfedilen enzimlerin sürekli artan sayısı nedeniyle, uluslar arası anlaşmalar vasıtasıyla, enzimlerin isimlendirilmesi ve sınıflandırılması için bir sistem benimsenmiştir. Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) tarafından önerilen ve benimsenen sistematik adlandırmada enzimler, altı büyük sınıfa ayrılırlar, her sınıfın da katalizlenen reaksiyon tipine dayanan alt sınıfları vardır.

Çizelge 1.1. Enzim sınıfları ve katalizledikleri reaksiyon tipleri

No	**Enzim gurubu**	**Katalizledikleri reaksiyon tipi**
1	Oksiredüktazlar	İki substrat arasındaki redoks tepkimesini katalizler.
2	Transferazlar	İki substrat arasındaki hidrojen dışındaki gurupların transferini gerçekleştiren tepkimeyi katalizlerler.
3	Hidrolazlar	Su katılması suretiyle bağların parçalandığı hidroliz reaksiyonlarını katalize eden enzimlerdir
4	Liyazlar	Oksidasyon veya hidrolizden farklı bir mekanizma ile substratlardan bazı grupların uzaklaştırıldığı ve çift bağların oluşturulduğu tepkimeleri katalizleyen enzimlerdir.
5	İzomerazlar	Molekül içindeki değişiklikleri katalizleyen enzimlerdir.
6	Ligazlar	Enerjice zengin bir bağın kopması ile ortaya çıkan enerji yardımıyla iki molekülün bağlanması reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.

Enzimler genelde ya aynı reaksiyonu ya da aynı tip benzer reaksiyonları katalizlerler. Substratlara karşı spesifiklikleri oldukça yüksektir, hatta bazı enzimlerin substrat özgüllükleri mutlaktır. Örneğin, proteolitik enzimler peptit bağlarının hidrolizini gerçekleştirirler. Bu enzimlerin substrat özgüllükleri birbirinden farklıdır. Tripsin sadece lisin veya arginin rezidülerinin karboksil grubu tarafındaki peptit bağlarını

parçalar. Kanın pıhtılaşmasında görev alan trombin ise karboksil bileşeni arginine ve amino grup bileşeni glisin aminoasitine ait peptit bağını parçalamaktadır. Buradan anlaşılacağı gibi trombinin substrat özgüllüğü yine bir proteolitik enzim olan tripsine göre daha fazladır.

Birçok enzimin stero spesifiklik özelliği de vardır. Bazı enzimler substrat molekülünün D-formunu ürüne çevirirken, bir kısmı da L-formunu ürüne dönüştüren tepkimeyi katalizlemektedir. Örneğin, glutamat dehidrogenaz enzimi L-glutamat ve laktat dehidrogenaz enzimi de L-laktat üzerinde etkilidirler (Keha ve Küfrevioğlu 2005). Bununla birlikte, aynı canlı türünde aynı reaksiyonu katalizleyen ancak farklı kimyasal ve fiziksel özellikleri olan enzimler de vardır. Bu tip enzimlere izoenzim denir. İzoenzimlerin substratlarına, kofaktörlerine ve inhibitörlerine karşı ilgileri farklıdır. İzoenzimlerin başlıca özellikleri arasında amino asit sayı ve sırasının farklı olması, izoelektrik noktalarının farklı olması, her bir izoenzimin farklı geninin olması ve elektroforetik hareketliliklerinin farklı olması sayılabilir. İzoenzimler farklı dokularda sınırlandırılmış olabildiği gibi, bir hücrenin farklı subsellüler fraksiyonlarında da yerleşebilirler (Devlin 2002).

Enzimlerin bir dokudan saflaştırılması işlemi oldukça zor bir işlemdir. Enzimler genellikle protein yapısında oldukları için şartların değişmesinden çok hızlı bir şekilde etkilenebilirler. Bu yüzden bir çözeltideki enzim varlığı, enzimin etki ettiği substrat molekülü veya reaksiyon sonucu oluşan ürün ya da enzimatik reaksiyona aracılık eden diğer parametreler üzerinden tespit edilmektedir

Enzimlerin aktivitesini etkileyen faktörler;

- Substart konsantrasyonu
- Sıcaklık
- pH

- Allosterik etkiler
- Hormonlar
- İyonik şiddet
- Enzim konsantrasyonu
- İnhibitör ve aktivitörlerin varlığı

şeklinde sıralanabilir.

Her enzim için aktivitelerin maksimum olduğu pH değerleri vardır. Bu değerlerin üzerinde ve altında aktivite düşer. Bu pH derecesine "Optimum pH" denir. Örneğin, proteini parçalayan pepsin, midede pH'nın 2,0 olduğu asidik ortamda maksimum çalışır; bunun aksine pankreastan salgılanan ve yine protein sindiriminde rol alan tripsin, ancak pH 8,5' da optimum olarak çalışabilir. Bir enzimin optimum pH'sı normal hücre içi ortamı pH'sı ile aynı değildir. Bu durum hücre içindeki enzim aktivitesinin kontrolünde pH-aktivite ilişkisinin önemini göstermektedir. Genelde bir kimyasal reaksiyonun hızı sıcaklıkla artış göstermektedir. Sıcaklık enzimli reaksiyonlarında hızlarının artışına sebep olan önemli bir faktördür, yani tepkime hızının yükselmesi, sıcaklıkla doğru orantılıdır. Bununla birlikte belli bir noktaya gelindiğinde enzim aktivitesinde bir düşüş gözlenir. Bu durum yüksek sıcaklıkta enzimin üç boyutlu yapısının etkilendiğini yani enzimin denatüre olduğunu göstermektedir. Bir enzim için $10^{o}C$'lik sıcaklık değişiminin meydana getirdiği aktivite farklılığı Q_{10} değeriyle ifade edilir (Keha ve Küfrevioğlu 2005).

Enzimlerin aktivitelerini pozitif yönde etkileyen bileşiklere aktivatör adı verilir. Aktivatörleri iki grupta toplamak mümkündür. Birinci gruptakiler sadece substratla birleşerek aktivatör rolü oynayan bileşikler. İkinci gruptakiler ise serbest enzimle birleşerek aktivatör rolü oynayan bileşiklerdir (Gözükara 1989).

Enzimlerin hem *invivo* hem de *invitro* aktivitelerinin, bazı bileşikler tarafından azaltılması ve hatta yok edilmesi olayına inhibisyon denir. Bu olaya sebep olan yani enzimle katalizlenen bir reaksiyonun hızını azaltan herhangi bir maddeye de inhibitör denilir. İnhibitörler genellikle küçük molekül kütlesine sahip bileşikler veya iyonlardır (Keha ve Küfrevioğlu 2007). Enzim aktivitesini inhibe eden madde veya faktörler aşağıdaki şekilde sıralanabilir:

•Substrat benzeri maddeler
•Toksinler
•İlaçlar
•Metal kompleksleri

Enzimatik aktivitenin inhibisyonu, biyolojik sistemlerde başlı başına bir kontrol mekanizması oluşturduğundan önemli bir olaydır. Enzimler hemen hemen bütün hücresel süreçleri katalizlediğinden, enzim inhibitörlerinin bilinen en önemli farmakolojik ajanlar arasında olması tesadüfî değildir. Birçok ilaç ve zehirli bileşikler etkilerini bu yolla gösterirler (Keha ve Küfrevioğlu 2007). Örneğin; aspirin (asetilsalisilat) bazı ağrı üreten süreçleri de içine alan pek çok süreçte yer alan prostaglandinlerin sentezindeki ilk basamağı katalizleyen enzimi inhibe eder.Enzim inhibitör çalışmaları ayrıca enzim mekanizmaları hakkında değerli bilgiler sağlamıştır ve bazı metabolik yolların tanımlanmasına yardımcı olmuştur (Lehninger 2005).

İnhibisyon çalışmaları ne gibi faydalar sağlamaktadır?

• Metabolik yollar hakkında bilgi
• İlaç ve toksinlerin, etkilerini nasıl gösterdiğinin açıklanması
• Enzim reaksiyon mekanizmalarının daha iyi aydınlatılması
• Enzim aktivitelerinin düzenlenmesiyle kontrol sisteminde etkili olmaları
• Substrat analogları kullanılarak önemli araştırmalar yapılması

Enzimatik inhibisyon iki grupta incelenir;

a) Dönüşümsüz inhibisyon
b) Dönüşümlü inhibisyon

Dönüşümsüz inhibisyon'da inhibitör enzime ya kovalent olarak bağlanır ya da zor ayrışabilen bir kompleks oluşturur. Dönüşümsüz inhibisyonda V_{max} (enzimatik reaksiyonda ulaşılabilecek maksimum hız) azalır, K_M ise (enzimin substrata olan ilgisini gösteren sabit) değişmeden kalır.

Dönüşümsüz inhibisyonun aksine dönüşümlü inhibisyonda enzim ile inhibitör etkileşmesi bir denge reaksiyonu şeklindedir.

Dönüşümlü inhibisyon üç grupta incelenir;

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

Geri dönüşümlü inhibisyon, dönüşümsüz inhibisyonun aksine bir denge reaksiyonu şeklindedir. En sık karşılaşılan dönüşümlü iki inhibisyon tipi yarışmalı ve yarışmasız inhibisyondur.

Dönüşümlü inhibisyonun en basit tipi yarışmalı (kompetitif) inhibisyondur. Yarışmalı inhibitör yapı itibariyle substrata benzer ve enzimin aktif bölgesine bağlanır. Böylece substratın enzime bağlanması önlenmiş olur. Fakat substrat konsantrasyonu artırılmakla inhibisyon etkisi ortadan kaldırılabilir. Yani enzimin V_{max} değeri değişmezken, K_M değeri artar.

Yine dönüşümlü bir tip olan yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyonda; inhibitör ve substrat enzim molekülüne aynı anda bağlanabilir. Bu durum bağlanmanın enzimin aynı bölgesine olmadığını gösterir. Yarışmasız bir inhibitör etkisini; bir enzimin turnover sayısını, yani katalitik aktivitesini düşürerek gösterir. Burada substrat ve inhibitör arasında yarışma söz konusu değildir. Substrat konsantrasyonu artırılmakla inhibisyon kaldırılamaz. Enzimin V_{max} değeri azalırken, K_M değeri sabit kalır. Substrat ve inhibitör farklı bölgelere bağlanabildiğinden, enzimin iki farklı inaktif kompleksi meydana gelir.

Bir başka dönüşümlü inhibisyon tipi, yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyondur. Bu inhibisyon çeşitinde; inhibitör serbest enzime bağlanamaz, sadece ES kompleksine bağlanır. Bunun için tek substratlı sistemlerde, yarı yarışmalı inhibisyona seyrek rastlanır. Birden fazla substratlı enzimlerde bu inhibisyon tipine daha sık rastlanır.

ESI kompleksi ortamda sürekli olarak var olacağından, yarı yarışmalı inhibitör varlığında V_{max} azalır. ESI kompleksinin oluşumu vasıtasıyla; ES kompleksi ortamdan sürekli çekildiğinden, enzim ve substrattan ES kompleksinin oluşum dengesi daha fazla sağa kayar ve K_M değeri küçülür (Segel 1975; Telefoncu 1986).

Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyonun özel bir türü olan lineer karışık tip inhibisyon, dönüşümlü inhibisyon sınıfına girer. Bu tür inhibisyonda; E, S ve I'nın bağlanma denge sabitleri farklılaşmaktadır.

Bazı inhibitörler enzimin spesifik gruplarıyla kovalent bağlar oluşturarak etki gösterirler. Örneğin kurşun, proteindeki sisteinin sülfidril yan zinciriyle kovalent bağlar oluşturur. Ağır metallerin bağlanması yarışmalı olmayan inhibisyon gösterir (Lippincott 2007).

Birçok multienzim sistemi, net reaksiyon hızlarını kendileri düzenleme kapasitesine sahiptir. Bu sistemlerin çoğunda, seri reaksiyonların son ürünü belirli bir

konsantrasyona ulaştığında; sistemin ilk enzimini veya dallanma noktasındaki enzimini inhibe eder. Bu enzimlere allsoterik enzimler adı verilir. Bu olaya da feed-back (geri besleme) inhibisyonu denir. Birden fazla polipeptid zinciri ihtiva eden allosterik enzimlerde; inhibitörlerin enzime bağlanmasıyla, değişik alt birimlerin bağlanma merkezleri arasındaki etkileşmelerle allosterik inhibisyon meydana gelir. Allosterik enzimleri etkileyen bileşiklere modülatör adı verilir (Stryer 1988).

İnhibisyon çeşidinin ve ilgili K_i sabitinin belirlenmesi için en çok başvurulan yöntem Lineweaver-Burk eğrileridir. Bu yöntemde 1/V ye karşı 1/[S] grafiği en az üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda çizilerek K_i sabiti hesaplanır. K_i sabitlerinin bulunmasının ikinci yöntemi Dixon grafikleri yoludur. Bu yöntemde en az iki sabit substrat konsantrasyonunda 1/V-[I] grafiği çizilerek K_i sabitleri bulunur (Telefoncu 1986).

Çeşitli organizmalar kendilerine has proteinlere sahip oldukları gibi, her hücre tipi de birçok değişik protein ihtiva etmektedir. Bunun yanında proteinler, biyolojik aktivitelerini ancak belirli pH ve sıcaklık sınırlarında gösterebilirler. Bu sebeplerden dolayı bir proteinin saf halde bir hücre veya dokudan izolasyonu güç bir iştir. Bu güçlüklere rağmen şimdiye kadar birçok protein saf olarak elde edilmiştir. Binin üzerinde enzim kısmen saflaştırılmış ve iki yüzden fazlası saf kristal halde elde edilmiştir. Ayrıca hiçbir enzimatik aktivite göstermeyen yüzlerce protein çeşitli kaynaklardan yüksek saflık derecesinde izole edilmiştir. Proteinler üç boyutlu yapıları, sıcaklık, pH, yüzey gerilimi gibi birçok faktörden hızlı bir şekilde etkilenerek kısa sürede enzim aktivitelerini kaybedebilmektedirler. Bu nedenle enzim saflaştırılması deneyleri oldukça dikkat gerektiren çalışmalardır.

Saflaştırma işlemleri genelde enzimlerin;

1. Molekül büyüklüğü,
2. Çözünürlükleri farklılıkları,
3. Elektriksel yük,
4. Adsorbsiyon davranışlarındaki farklılıkları esasına göre gerçekleştirilmektedir (Keha ve Küfrevioğlu 2005).

Proteinler genelde büyüklük olarak birbirinden farklıdır. Bu da bir proteini diğerinden ayırmayı kolaylaştırır ve bu esasa dayalı proteinleri ayırma metotları diyaliz, ultrafiltrasyon, yoğunluk gradienti santrifügasyonu ve jel filtrasyon kromatografisidir.

Bu durum, bir proteini diğer proteinlerden ve küçük moleküllerden ayırmayı mümkün kılar. Jel filtrasyon kromatografisinde kolon materyali olarak Sepharose, Biogel gibi polimerler yanında yaygın olarak kullanılan ve bir karbonhidrat türevi olan Sephadex polimeridir. Sephadex yapısında fazla miktarda hidroksil grubu ihtiva etmesi dolayısıyla suya ve elektrolit çözeltilerine ilgisi fazladır. Bu teknikte küçük molekül kütleli proteinler ve diğer safsızlıklar Sephadex'in porlarına takılırlar. Büyük molekül kütleli proteinler ise Sephadex'in porlarına takılmadan geçerler ve molekül kütlelerinin büyüklük sırasına göre kolondan elüe edilirler. Bu da proteinlerin ayırımları için oldukça avantajlı bir durumdur.

Jellerin özelliklerini belirlemede kullanılan temel terim "su kazanım değeri" dir. Bir gram kuru jelin emebildiği su miktarına o jelin su kazanım değeri denir. Bu değer 10 ile çarpılarak jelin ticari adının sonuna yazılır. Örneğin Sephadex G-15 jelinin su kazanım değeri 1,5' tur (1 g madde 1,5 g su emebilir). Bir jelin su kazanım değeri arttıkça gözenek büyüklüğü de artar

Çizelge 1.2. Jel filtrasyon kromatografisinde kullanılan bazı jellerin proteinleri ayırma sınırları

Dolgu maddesi	**Ayırma sınırı(molekül kütlesi)**
Sephadex G-10	0-700
Sephadex G-15	0-1.500
Sephadex G-25	1000-5000
Sephadex G-50	1500-30.000
Sephadex G-75	3000-80.000
Sephadex G-100	4000-150.000
Sephadex G-150	5000-300.000
Sephadex G-200	5000-600.000

Bazı proteinler ve virüsler gibi daha büyük moleküllerin agardan elde edilen ve nötral bir polisakkarit olan agaroz jeli kullanılır. Jel filtrasyonda karışımları ayırmada molekül büyüklükleri işlem için ayırt edici faktördür Moleküller büyüdükçe ayrılma molekül büyüklüğünden ziyade molekül kütlesine göre olur. Örneğin; G-100 ve G-200 tipi jellerde elüe etme hacmi yaklaşık olarak molekül kütlesinin logaritması ile doğru orantılıdır. Bunlardan yararlanılarak büyük moleküllü bileşiklerin mesela proteinlerin molekül kütleleri tayin edilebilir (Küfrevioğlu ve Çiftçi 2008).

Çözünürlük farlılığı da proteinleri saflaştırmada kullanılan diğer bir metottur. Proteinlerin çözünürlüğü başlıca pH, iyonik şiddet, çözücünün dielektrik özelliği ve sıcaklığa bağlıdır. Bu esaslara dayalı proteinleri ayırma metotları:

- İzoelektrik çökelme
- Nötral tuzlarla çöktürme
- Çözücülerle fraksiyonlama
- Sıcaklıkla çöktürmedir.

pH proteinlerin çoğunun çözünürlüğünü etkileyen bir parametredir. Değişik proteinlerin iyonlaşabilir R grupları taşıyan aminoasitlerinin sayısı farklı olduğundan, izoelektrik pH'ları da farklıdır ve bundan dolayı çoğu kez izoelektrik çökelme ile ayırt edilebilirler. Proteinler için izoelektrik çökelme ortamdaki iyon içeriğine göre değişir; çünkü proteinler belirli anyon ve katyonları bağlayabilirler. Eğer bir protein çözeltisi, H^+ ve OH^- dışındaki küçük iyonları uzaklaştırmak için saf suya karşı diyaliz edilirse, izoelektrik pH, izoiyonik pH' da gerçekleşir ve bu da proteine göre sabittir.

Nötral tuzlar düşük konsantrasyonlarda protein moleküllerinin çözünürlüğünü artırırlar. Bu olaya salting-in denir. $MgCl_2$ ve $(NH_4)_2SO_4$ gibi iki değerlikli tuzlar, NaCl, NH_4Cl ve KCl gibi tek değerliklilerden daha etkilidir. Nötral tuzların bu özelliği, onların iyon şiddetlerine bağlıdır. Bu iyonlar protein molekülünde yan grupların ayrışmasını modifiye ederler. Yeteri kadar yüksek tuz konsantrasyonunda bir protein bir çözeltiden hemen hemen kantitatif olarak çökeltilebilir; yani yüksek tuz konsantrasyonunda proteinlerin çözünürlüğü azalır ve hatta çökerler. Bu olaya salting-out adı verilir.

Suda çözünebilen nötral organik çözücülerin, özellikle etanol ve asetonun ilavesi, çoğu globuler proteinlerin sudaki çözünürlüğünü çökelme derecesine kadar azaltabilir. Bu etkinin kantitatif araştırmaları, sabit pH ve sabit iyonik şiddette çözünürlüğün ortamın dielektrik sabitinin bir fonksiyonu olduğunu göstermiştir. Etanol sudan daha küçük bir dielektrik sabitine sahip olduğundan sulu protein çözeltisine etanolun ilavesiyle zıt yüklerin çekimi artar ve proteinler kümelenerek çökerler.

Globuler proteinlerin çözünürlüğüne etki eden bir başka faktör de sıcaklıktır. Genelde çözünürlükleri 0-40^{0}C üzerinde azalır ve birçoğu denatüre olur. Bu nedenle proteinlerin ayrılması işlemleri daha çok düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilir.

Proteinlerin elektriksel yüklerine göre ayrılması, polipeptid zincirlerindeki iyonlaşabilir yan grupların sayısı ve cinsi ile belirlenen asit baz özelliklerine dayanmaktadır.

Proteinler, aminoasit bileşiminde ve dizilişinde farklılık gösterdiklerinden, her protein özel bir asit baz davranışına sahiptir. Elektriksel yük farkına dayanan ayırma metotlarından biri olan iyon değişim kromatografisinde duran fazda bulunan ve yerlerinden kolaylıkla ayrılabilen iyonlar çevrelerindeki iyonlar ile yer değiştirir. Bu değişim sonucunda duran fazın fiziki görünümünde değişme olmaz. İyon değişim kromatografisi ile basit inorganik ve organik iyonlar birbirlerinden ayrılabileceği gibi enzimler, hormonlar ve nükleik asitler gibi biyolojik önemi olan polielektrolitler de ayrılabilir.

İyon değişim kromatografisinde kullanılan materyaller, çoğunlukla selülozun sentetik olarak hazırlanmış türevleridir. Dietilaminoetil selüloz (DEAE-Selüloz), pH 7,0'da pozitif yüklü grupları ihtiva eder ve bu yüzden bir anyon değiştiricidir.

Proteinlerin DEAE-Selüloz kolonları üzerinde ayrılmasında ve her bir komponentin sırasıyla elüsyonunda, azalan pH'lı tamponların bir serisi veya artan iyonik şiddetli tuz çözeltilerinin bir serisi kullanılır. Bunların kolondan geçirilmesi sırasında anyonik proteinlerin bağlanması azaltılır. Çünkü pH'nın düşmesiyle birlikte, iyon değiştiriciye tutunan proteinlerin negatif yüklü bölgeleri nötral hale gelir. Yine iyonik şiddetin artmasıyla pozitif iyonlar proteinin negatif yüklü bölgelerine bağlanırlar; negatif iyonlar ise, proteinlerle iyon değiştiriciye bağlanma hususunda yarışa girerler. Böylece proteinler bu bölgeye daha yavaş bir kuvvetle bağlanırlar ve hatta koparlar. Elüatlar küçük fraksiyonlarda toplanarak gerekli analizler yapılır. Bu metodun önemli bir tarafı da, iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisini kombine edebilmesidir. Örneğin, DEAE-Sephadex kullanılarak proteinleri yüklerine ve molekül büyüklüklerine göre ayırmak mümkündür.

İyon değişim kromatografisi yöntemiyle proteinlerin saflaştırılması sırasında kolonun hazırlanması, dengelenmesi, numune tatbiki ve elüsyon işlemleri jel filtrasyon kromatografisindekine çok benzer. En önemli fark elüsyon işlemindedir. Genelde iki

farklı elüsyon uygulanır: basamaklı elüsyonda, kolondan proteinlerin elüsyonu sırasında değişik pH'lı ve değişik iyonik şiddetli çözeltiler sırasıyla geçirilir. Bu yöntem çok zaman alıcıdır. Gradientli elüsyonda ise bir gradient mikser kullanılır. Elüsyon tamponunda bir pH gradienti oluşturulur. Her protein izoelektrik pH'sına geldiğinde yüksüzleşir ve duran faza tutunamayarak elüe edilir. Benzer durum iyonik şiddet gradienti olarak da uygulanabilir (Küfrevioğlu ve Çiftçi 2008).

Biyokimya alanında günümüze kadar en çok araştırma yapılan konu enzimlerdir. Günümüzde birçok enzim saflaştırılmış, karakterize edilmiş ve 200'den fazla enzim dekristallendirilmiştir. Enzimler sağlıktan endüstriyel konulara kadar uygulama alanı bulmuştur.

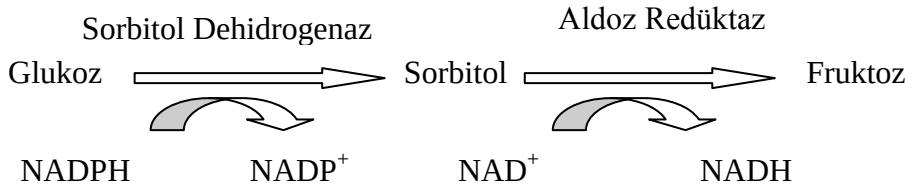
Kataliz olayı ile ilgili ilk denemeler 1760-1825 yılları arasında midedeki enzimatik sindirim üzerine yapılmıştır. Belirli bir enzim üzerindeki ilk çalışma 1860 yılında Pasteur tarafından yapılmış ve fermantasyon olayının enzimlerce yürütüldüğünü ispat etmiştir. Bu yüzden enzimler için "Ferment'' terimi kullanılmıştır. Buchner kardeşler 1897'li yıllarda maya hücrelerinde alkolik fermantasyonu katalize eden enzimleri elde etmeyi başarmışlardır. Bu buluş enzimlerin aktivite göstermeleri için hücre içinde bulunmalarının şart olmadığını ortaya koymuştur. Yapılan genetik çalışmalar ve hücre içindeki kimyasal reaksiyonların çeşitliliği daha birçok enzimin keşfedilmediğini göstermektedir. Bütün canlı hücrelerde meydana gelen reaksiyonlar enzimlerle ilgilidir. Enzimler canlı hücrelerde sentezlenir ve hücre canlılığını yitirdikten sonra uzun süre etkili kalırlar.

1.1. Sorbitol Dehidrogenaz Enzimi

Poliol dehidrogenazlar genelde şeker alkollerini şekerlere dönüştürürler. Bu enzimler katalitik şeker alkollerini dönüştürmede çok kullanışlıdırlar. Ancak daha çok karakterize

poliol dehidrogenazların olumsuz kinetik özelliklerinden dolayı kullanımları sınırlıdır. Sorbitol dehidrogenaz enzimi de bir poliol dehidrogenaz ailesi üyesidir.

Sorbitol dehidrogenaz (L-İditol: NAD^+ Oksidoredüktaz, EC 1.1.1.14) sorbitol yolu olarak adlandırılan poliol yolunun iki enziminden biri olup sorbitol ve fruktoz arasındaki dönüşümlü oksidasyon-redüksiyon reaksiyonunu katalizler.Ve koenzim olarak NAD^+'i kullanır (Lindstad *et al.* 1994).



Şekil 1.1. Poliol yolu ve enzimleri

SDH memeli alkol dehidrogenazlarını da içine alan orta zincirli dehidrogenaz/redüktaz protein familyasına dahil olan bir çinko enzimidir (Jörnval *et al.*1984; Jeffery *etal* 1984).

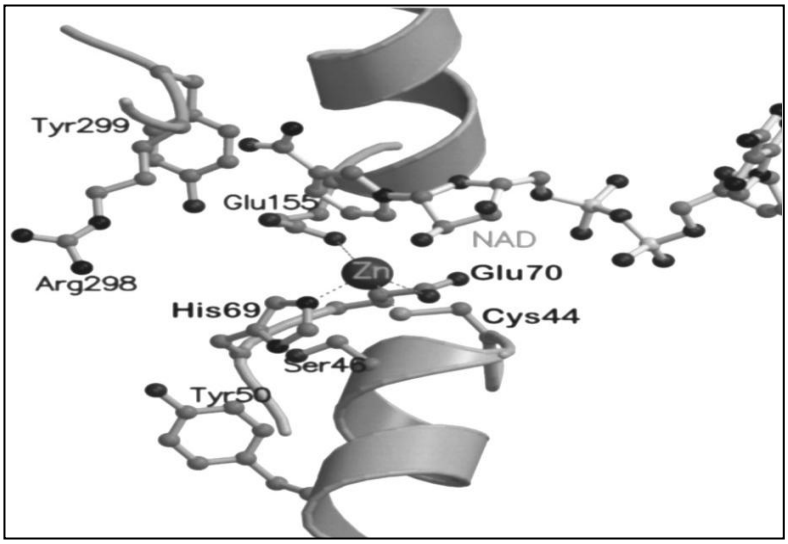
Açık yapı ve mekanistik olarak benzer olmalarına rağmen SDH ve ADH farklı çinko içerikleri ile beraber birçok ayırt edici özellikleri vardır. SDH tetramerik olmasına karşın, memeli ADH dimeriktir. SDH her bir alt biriminde katalitik bölgede bulunan bir çinko atomu içerirken, ADH her bir alt biriminde iki tane çinko atomu bulundurmaktadır. Bütün bunlarla birlikte SDH ile ADH'ların substarları da farklıdır. SDH sorbitol, Xlitol D-mannitol ve L-iditol gibi poliollerde aktivite gösterirken primer alkollerde etkin değildir (Luque *et al.*1998).

Polioller $C_nH_2(H_2O)_n$,ya da alditoller; aldozlardan ya da ketonlardan, karbonil gurubu nun indirgenmesi ile oluşmuş polifonksiyonel alkollerdir. Polioller karbon sayılarına

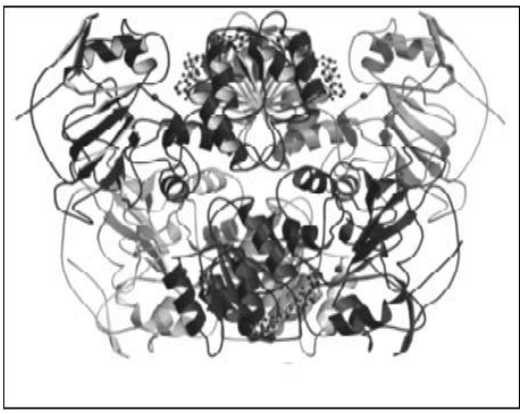
göre tetritol, pentitol, hegzitol gibi adlandırılırlar bu şekilde adlandırılmaları onların fizikokimyasal özellikleri ve karbon sayılarına göre olabilir. Birçok poliol yaygın olarak geniş bitki ve hayvan filumlarından ve daha yüksek hayvanlardan bakterilere kadar özellikle mantar algler ve bitkilerde bol miktarda bulunurlar (Touster *et al.*1962; Brimacombe *et al.* 1972). Buna rağmen doğada n>6 olan uzun zincirli polioller sentezlenmektedir. Birçok poliol ve türevleri yaygın uygulamalar sayesinde keşfedilmiştir. Örneğin sorbitol ve xylitol diş sağlığı ve diyabet kontrolünden dolayı yaygın olarak şeker yerine kullanılan poliollerdir. Çeşitli poliol esterleri patlayıcı madde ve ilaç olarak kullanılırlar (Lindstad *et al.* 1998).

Sorbitol dehidrogenaz enziminin memeli dokusunda aktif olduğu ilk kez 1942 yılında saptanmıştır (Breusch 1942**).** Bu çalışmadan sonra SDH değişik memeli dokularında saflaştırılmış ve karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.

İnsan SDH enzimi homotetramer olup her bir alt birimi katalitik olarak aktiftir. Katalitik bölgede His69, Cys44, Glu70 ve bir su molekülü ile koordine olan bir çinko atomu bulunmaktadır **(**Pauly *et al.* 2003).Aktif bölgedeki bu çinko atomunun fonksiyonu, sorbitol ve fruktoz arasındaki dönüşümlü oksidasyon-redüksiyon reaksiyonunun katalizi Süresince sorbitol hidroksilinin veya fruktoz karbonilinin oksijenini bağlamaktır (Jeffery *et al.* 1984; Eklund *et al.* 1985; Karlsson *et al.* 1989, 1995).SDH enziminin izoenzimlerinin varlığı bu güne kadar belirlenemiştir. Enzimle ilgili kristalografik araştırmalar devam etmektedir.Çinko atomu koordinasyonun geometrisi, substrat bağlanması için iki serbest koordinasyon ile birlikte liganlar arasında $90^o/180^o$ lik açının olduğu oktahedral bir yapıdır. (Johansson *et al.* 2001). Enzimin dört alt biriminden herbiri 355 rezidüden oluşur (Jeffery *et al.* 1984; Karlsson *et al.* 1989).

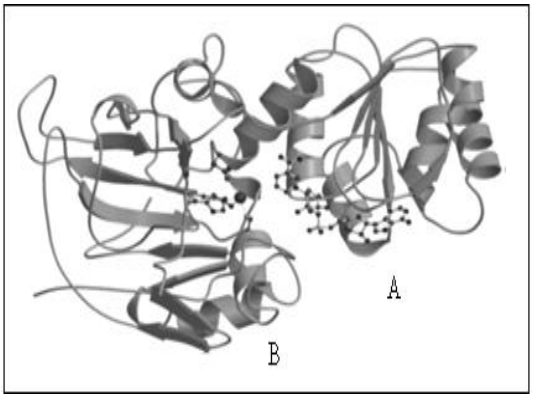


Şekil 1.2. SDH enziminin aktif bölgesindeki çinko atomunun koordinasyonu (Johansson *et al.* 2001)



Şekil 1.3. SDH enziminin kuarterner yapısı (Johansson *et al.*2001)

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



Şekil 1.4. SDH enziminin bir alt biriminin yapısı (A: koenzim bağlama bölgesi, B: katalitik bölge) (Johansson *et al.*2001)

Sorbitol dehidrogenaz memeli dokularının çoğusunda bulunmakla beraber (Jeffery and Jörnvall 1984).Özellikle karaciğer ve testis dokularında bol miktarda bulunmaktadır. Karaciğer hasarı ve diyabetik komplikasyonların tespitinde önemlilik arzetmektedir (Asada and Galambos 1963; Hodgen and Sherins 1973).

Hepatosit staplazmasında bulunan Sorbitol dehidrogenaz enzimi karaciğer için kısmen spesifiktir. (Anderson 1992; Turgut 1997). Normal durumda serumda bulunmayan sorbitol dehidrogenaz enzimi karaciğer harabiyeti halinde seruma geçerek yüksek aktivite göstermektedir. Bu nedenle serum SDH enzim aktivitesinde meydana gelen değişiklikler, karaciğer hastalıklarının klinik teşhisinde faydalı olmaktadır (Dixon *et al.* 1987).

Sorbitol dehidrogenaz enzimi kan glikoz seviyesinin artması durumunda aktivite gösterip kalp böbrek ve göz hastalıklarının gelişiminde önemli rol oynayan sorbitol (poliol) yolunun iki enziminden biridir. Bu bağlamda SDH enziminin diyabetteki rolünü açıklamak için birçok araştırma yapılmaktadır. (Obrosova *et al.* 1999; Nishikawa *et al.* 2000; Amano *et al.* 2003; Chu-Moyer *et al.* 2002).

1.2. Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus (DM) insulinin tamamen veya kısmı eksikliğine bağlı olarak gelişen ve yüksek kan şekeri (hiperglisemi) ile karakterize bir hastalıktır. İnsülin eksikliğinin yanı sıra insüline karşı gelişen direnç, diabetes mellitus gelişiminde rol oynamakta ve karbonhidrat, lipit ve protein metabolizmasını da etkilemektedir **(**Abou-Seif *et al.*2004; Hasselbaink *et al.*2003). İki çeşit diyabet hastalığı olup bunlar tip1(insüline bağımlı) ve tip2(insüline bağlı olmayan) diye adlandırılmaktadır.

Tip1 diabetes mellitus (DM) çocukluk yaş grubunda sık görülen, T-hücrelerinin aracılık ettiği insülin üretiminde görev alan pankreasın beta hücrelerinin süregelen otoimmün veya otoimmün dışı nedenlerle harabiyeti sonucu gelişen insülopeni ve hiperglisemi ile karakterize kronik metabolik bir hastalıktır (Alemzadeh *et al.*2004; Fiallo-Scharer *et al.*2004). Duyarlı bireylerde T ve B hücrelerinin aracılık ettiği immün sistemin anormal aktivasyonu sonucu gelişen bir insülitis tablosudur (Atkinson *et al.*2001, Haller *et al.*2005). Tip 1 diyabetin etiyolojisinde genetik, çevresel ve otoimmün faktörler rol oynar. Genetik yatkınlık, virüsler, fiziksel uyarıcılar ve stres gibi dış etkenler hastalığı tetikleyerek insülin salgılayan pankreasın beta adacık hücrelerine otoimmün saldırı başlatmaktadır. Bu harabiyetin patolojik görünümüne ‘insülitis’ denir. Tip 1 diyabetin, 5-10 yıllık bir sürecin sonucunda ortaya çıktığı bilinmektedir (Haller *et al.* 2005).

Eğer insülin hormonu var, ama miktarı azsa veya dokularda insüline karşı direnç varsa, bu diyabete de"Tip 2 diyabet (insüline bağımlı olmayan diyabet)" denir. Genellikle 35 yaşından sonra görülür. Tip1 diyabetli hastalar yaşam boyu insülin kullanmak zorundadırlar. Tip 2 DM diyabetli hastalar ise diyet, egzersiz ve ağızdan alınan ilaçlarla tedavi edilebilir. Gerekirse hastalığın ilerleyen dönemlerinde insülin kullanabilirler (Anonim 2012b).

Dünyada yaklaşık 151 milyon diabetes mellitus (DM) hastası vardır. Bunların yaklaşık %97'si Tip 2 DM'dir (Amos *et al.* 2010).

Tip2 DM'li hastaların tanı konulmasından ortalama sekiz yıl önce diyabetik olduğu düşünülmektedir (Haris *et al.* 1992). Tanı aldıktan kısa bir süre sonra ise birçoğunda mikroalbuminüri ve aşikâr nefropati tespit edilir.

DM'nin komplikasyonları mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlar olarak ikiye ayrılır. Mikrovasküler komplikasyonları; retinopati, nefropati ve nöropatidir. Makrovasküler komplikasyonları ise koroner kalp hastalığı, periferik damar hastalığı ve serebrovasküler hastalıklardır (Kurt vd 2004).

Kontrol altına alınmamış ve yüksek seyreden kan şekeri uzun vadede çeşitli komplikasyonların ortaya çıkmasına yol açmaktadır. Şişmanlık (obesite) sıkça tip-2 ile birlikte olup kalp-damar hastalıkları, böbrek yetmezliği ile sonuçlanan nefropati, sinir sistemi hastalığı nöropati, körlüğe kadar götüren retinopati ve ayak ülserleri gibi uzun vade komplikasyonları sonucu felç, kangren veya koroner hastalıkların meydana gelmesi riskini artırmaktadır (Sacks *et al.*1994).

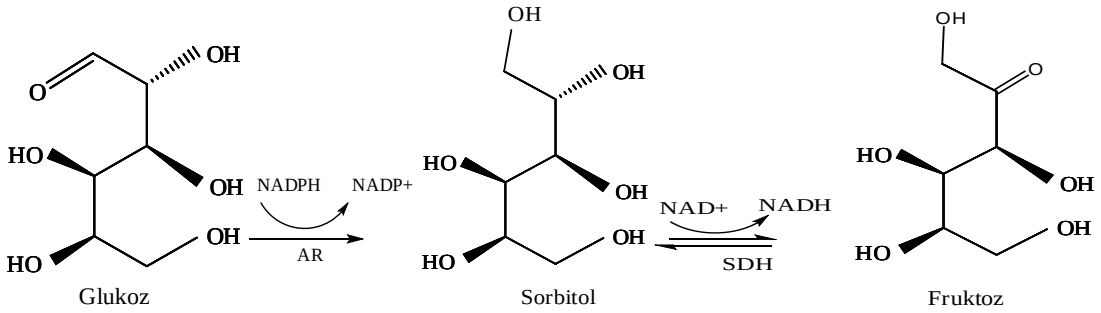
Kan şekerinin yüksek olması bazı metabolik yolların aktivitesini artırarak ve bu metabolik yolların birbiriyle olan etkileşimlerini değiştirerek bu diyabetik komplikasyonlara neden olmaktadır (UKPDS Research Group 1998; Temelkova-Kurktschiev *et al.* 2000).

Bu metabolik yollar; poliol yolu (Zimmet and Alberti 2001; Oates 2008), 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).

Poliol yolu, glikozun sorbitole indirgendiği ve sorbitolun da fruktoza dönüştüğü iki adımlı metabolik bir yoldur.

Bu metabolik yol aldoz redüktaz ve sorbitol dehidrogenaz enzimlerini içermektedir. Lens, retina, eritrosit, böbrek, plasenta, periferik sinirlerin schwann hücreleri, vesica seminalis ve yumurtalık hücrelerinde bulunan aldoz redüktaz, glukozu redükleyerek sorbitol oluşturur. Oluşan sorbitol, karaciğer, yumurtalık, sperm, vesica seminalis hücrelerinde bulunan sorbitol dehidrogenaz enzimi vasıtasıyla fruktoza oksitlenir. Vesica seminalislerde glukozun fruktoza dönüşümünü sağlayan bu yol enerji kaynağı olarak fruktozu tercih eden sperm hücreleri içindir. Karaciğerde ise sorbitolü fruktoza oksitleyen bu yol besinsel sorbitolün glikoliz veya glukoneogenez yollarına girebilen bir maddeye (fruktoza) çevrilmesini sağlar (Champe and Harvey 1997).

Poliol yolu diyabetik hiperglisemi de meydana gelen hücresel toksisiteyi açıklayan en önemli mekanizmadır. Kan şekeri artığında poliol yolu aktifleşir ve hücrede sorbitol ve fruktoz birikimi meydana gelir.



Şekil 1.5. Sorbitol (poliol) yolu(Alım ve Beydemir 2012)

Sorbitol yolu lens, beyin, sinirler, eritrosit, böbrek, karaciğer, pankreas adacıkları, aorta ve kapiller damarlarda etkindir. Bu dokular hücreye glukoz girişi yönünden ortaktır. Bu dokularda hücreye glukozun girişi insülinden bağımsız olduğu için hücre içi glukoz oranları doğrudan doğruya kan glukozunun artışından etkilenir. Kan glukoz oranları

normal olduğu sürece AR enzimi aktif olamaz ancak hiperglisemi de hücre içi glukoz oranları artığında Aldoz redüktaz aktif olabilmekte ve poliol yolu işlerlik kazanmaktadır. Sorbitol yolu etkinliğinin fizyolojik öneminin henüz bilinmediği bu dokular, diyabetes mellitusun uzun sürede gelişen retinopati, katarakt, nöropati, nefropati ve ateroskleroz gibi komplikasyonlarının geliştiği¸ dokulardır (Yenigün ve Altuntaş 2001).

AR çeşitli karbonil grupları indirgeyen $NAD(P)^+$ bağımlı birenzim olup sorbitol yolunun hız kısıtlayıcı enzimidir. Substratlarından olan glukoza ilgisi az olduğundan, hücre içi glukoz seviyesi fizyolojik düzeylerde kaldığı sürece AR etkin olamamaktadır. Hiperglisemi durumunda hücre içi glukoz miktarı fizyolojik seviyelerin üzerine çıkınca AR aktif hale geçmektedir. Hiperglisemide AR enzim aktivitesi artarken SDH enzim aktivitesi azalır. Bu durumda dokularda sorbitolün fruktoza dönüşümü yavaşlar. Sorbitol metabolik olarak kullanılmadığı ve difüzyonu çok yavaş olduğu için hücre membranı dışına kolayca çıkamaz dokularda birikir ve osmotik etki göstererek hücre içine daha fazla miktarda suyun çekilmesine böylece hücre ödemine neden olur. Sorbitolün kendisi bir doku toksini gibi hareket eder. Bu nedenle retinopati, nöropati, nefropati ve kalp hastalığına yol açmaktadır (Karasu vd 1990; Bukan vd 2004).

Hipergliseminin hücrelerde sebep olduğu poliol birikimi her hücrede farklıdır. En büyük etki sinir vazo nervorumlarında ve böbrek bazal membranlarında görülür(Yenigün ve Altuntaş 2001).Kan glukoz oranının artması hücre seviyesindeki Na-K pompasının çalışmasını ve Na-K ATP az enziminin etkisini azaltır.

Diyabette hem periferik sinir hücresine giren hem de bu hücrede sentezlenen miyoinozitol miktarında azalma olur. Miyoinozitolun hücreye girişi Na^+' bağımlı ve glukoz ile yarışmalı olması ve diyabette Na-K ATPaz aktivitesinde azalma ve kan glukoz konsantrasyonunda artma olmasından hücreye giren miyoinozitol miktarı azalır. Bu azalma hücre içindeki insülin etki azlığı ile paraleldir. Azalan miyoinositol glukozun

sorbitole dönüşme sürecini etkilemezken, sorbitolun fruktoza dönüşmesini yavaşlatır. Ve hücre içinde sorbitol miktarını artışına neden olur. Sorbitol güçlü su çekici özelliği ile su alarak hücre içinde ki su dejenerasyonuna sebep olur nikotin amid adenin dinükleotit(NADH) yolu sorbitolu, sorbitol dehidrogenaz enzimi ile fruktoza dönüştürmeye çalışan bir mekanizma olmasına rağmen bu yol hipergliseminin sebep olduğu miyoinozitol eksikliği nedeniile yavaşlar ve endotel nöron hücresinde sorbitol birikimi devam eder (Yenigün ve Altuntaş 2001).Ayrıca miyoinozitol eksikliğinin kendisi de Na-K ATPaz aktivitesinde azalmaya yol açar. Sinir Na-K ATPaz'ın membran fosfoinositidleri; muhtemelen protein kinaz C aracılığıyla kontrol edildiği düşünülmektedir. Azalmış sinir miyoinositol konsantrasyonları anormal fosfoinositidler ile sonuçlanır. Bu da azalmış Na-K ATPaz aktivitesine yol açar, miyoinositol transportu bu enzim üzerinden olduğundan, azalmış miyoinositol geri alımı zorlaşır. Ve azalmış Na-K ATPaz aktivitesi, artmış intraaksonal Na birikimine neden olur. Bu durum sinir impuls yayılımını, sodyuma bağlı aminoasit geri alınımını ve diğer fenomenleri etkiler. Sodyumun paranodal bölgede birikimi aksonal şişmeye neden olur. Esas olarak miyelin lamel terminallerinin aksondan ayrılmasına ve daha ileri yapısal değişikliklere yol açar (Yenigün ve Altuntaş 2001).

Nefropati ile oluşan böbrek yetmezliği diyabetin komplikasyonlar sonucunda ortaya çıkan bir durumdur.(Kimmelstiel and Wilson 1936). Diyabet sıklığı ile artış gösteren nefropati diyabetik komplikasyonlar sonucu meydana gelen ölümlerin onda birini oluşturur. (Humphrey *et al.* 1989; Forsblomet *et al.* 1998). Diyabetik nefropatinin patogenezinde poliol yolu aktivasyonu önemli rol oynar.

Yapılan çalışmalarda, miyokardiyumda oluşan iskemi sırasında, poliol yolunun miyokardiyal glukoz metabolizmasına etkileri incelenmiş, kardiyak AR aktivitesinin iskemi sırasında arttığı gösterilmiştir (Ramasamy *et al.* 1999; Hwang *et al.* 2002). Buna bağlı olarak miyokardiyumdaki $NADH/NAD^+$ oranı artmakta, glikoliz ve ATP üretimi deazalmaktadır. Bu durum iskemik hasarın sebebidir.(Williamson *et al.* 1993). Bilindiği

gibi iskemi, kanın yeterli oranda organlara verilememesidir. Bu durum oksijen yetmezliğini ortaya çıkarmaktadır. AR enzimin ininhibe edilmesi kalbi korumaktadır. Bu enzim iskemik hasarda önemli rol oynamaktadır.

Sorbitol dehidrogenaz enziminin (SDH) aktifleşmesi ile oluşan NADH, NADH-oksidaz (Nox) enziminin etkisi ile serbest oksijen radikalleri (ROS) oluşturur. (Tesfamariam 1994; Morre *et al.* 2000). ROS, gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz enzim (GAPDH) inhibisyonuna neden olarak daha fazla glukozun poliol yoluna yönelmesine ve AR aktivitesinin artmasına neden olmaktadır (Stevens *et al.* 2000). Aldoz redüktaz enzim aktivite göstermek için NADPH e ihitiyaç duyduğundan, hücre içi NADPH tüketimi artar. Glutatyon redüktaz enzimi (GR), NADPH bağımlı olarak, yükseltgenmiş glutatyonun (GSSG) indirgenmiş glutatyona (GSH) redüksiyonunu sağlayan enzimdir. AR' nin NADPH için K_m değeri, glutatyon redüktaz enziminin NADPH için K_m değerinden 10 kat daha düşüktür. Poliol yolağında artan AR aktivitesiyle NADPH'ın fazlaca tüketilmesi, GSH'nun üretiminin azalmasına neden olur (Yeh and Ashton 1990). Hücre içi majör antioksidan olan GSH'nun azalması hücrenin antioksidan kapasitesini sınırlar yani hücrenin oksitleyici etkenlere karşı korunma gücünü azaltır ve bu durum oksidatif strese neden olur (Lee and Chung 1999; Maritim *et al.* 2003).

Hiperglisemi durumunda sorbitol yolu aktivitesinin artması ile oluşan hücre içi NADPH tüketimi, NO sentezini etkilemekle beraber GSH üretimini de azaltır. Nitrik oksit sentaz enzimi (NOS), NADPH kullanarak arjininden nitrik oksit oluşumunu katalizlemektedir. AR ın artması ile beraber NADPH miktarı azalır. Ve buna bağlı olarak endotelyal NO sentezi azalır (Tesfamariam 1994). Nihayetinde oksidatif stersin artması ile NO azalması ateroskleroza sebebiyet verir (Kurowska 2002).

Poliol yolunun en önemli enzimi olan ve bu yolun aktivitesini sınırlayan aldoz redüktaz enzimi glikozu sorbitole dönüştürürken, diğer bir enzim olan sorbitol dehidrogenaz, sorbitolü fruktoza çevirir. Sorbitol hücre zarını geçemediğinden hücre içinde birikir.

Sorbitol birikimi, ozmotik etkilerle piridin nükleotidlerinin redoks durumunu değiştirerek (NADH/NAD^+ oranında ve protein kinaz C'de artış) hücre içi miyoinositol seviyelerini azaltır. Bu durum doku hasarına nedenolur. Glukoz, proteinlerin amino gruplarına nonenzimatik olarak bağlanarak "schiff-base" ürünleri oluşturur 'schiff-base' ürünlerinden sonra daha stabil olan amadori ürünleri oluşur (Dinçervd 2002).Saatler içerisinde bu ürünler kan glukoz konsantrasyonuna uygun olarak belirgin bir seviyeye ulaşır. Sonrasında daha stabil erken glikasyon ürünleri (EGÜ) oluşur. Hiperglisemiye uzun süreli maruz kalma kollajen, intraselüler proteinler ve nükleikasitler gibi stabil makromoleküllerde kümülâtif ve giderek artan tarzda irreversibl değişiklere neden olur. Erken glikasyon ürünleri (EGÜ) ileri glikasyon ürünleri (İGÜ)'ni oluşturmak üzere birleşirler (Kurt vd 2004).

Glikoz +Protein⟺schiff-base⇔Amadori ürünleri

↓

Erken glikasyon ürünleri(EGÜ)

↓

İleri glikasyon ürünleri(İGÜ)

Şekil 1.6. İleri glikasyon ürünleri (İGÜ) oluşumu

Hiperglisemi durumunda poliol yolunun aktive olması sonucu, sorbitolün fruktoza oksidasyonu ile sitozolik NADH/NAD^+ oranı yükselmektedir. NADH bu artış glisealdehit-3-fosfat-dehidrogenaz (GAPDH) enzimini inhibe eder ve Trioz-fosfat konsantrasyonunu artırır (Baynes and Thorpe 1999; Dunlop 2000; Garcia *et al.* 2001). Hücre içi konsantrasyonu artan gliseraldehit-3-fosfat, trioz-fosfat izomeraz enzimi ile dihidroksiaseton-fosfata (DHAP) dönüşür. DHAP'ın gliserol-3-fosfata redüksiyonu NADH bağımlıdır. NADH/NAD^+artması, DHAP'ın indirgenmesi ile protein kinaz C (PKC)'nin aktivatörü olan diaçilgliserol (DAG) oluşumuna neden olur. Ve bu da poliol

yolunun aktivatörü olan PKC yolunun aktivitesinin artmasına neden olur (Williamson *et al.* 1993; Garcia *et al.* 2001). PKC aktivasyonu diyabetin sebebiyet verdiği komplikasyonların ortaya çıkarır (Xia *et al.* 1994).

Diyabetik sorbitol birikimi erken dönemde aldoz redüktaz inhibitörleri kullanılarak önlenilebilir. Hiperglisemiye engel olacak glukoz regülasyonu sağlanamazsa olay geri dönüşümsüz olduğundan nöropati, retinopati, nefropati gelişmesi önlenemez (Yenigün ve Altuntaş 2001).

Aldoz redüktaz NADPH kullandığından, sorbitol yolunun etkinleşmesi ile hücrenin NADPH tüketimi artar. Hücrenin oksitleyici etkenlere karşı korunmasında görevi olan İndirgenmiş glutatyonun oluşumunu sağlayan glutatyon redüktaz da NADPH'ı kullandığından, hiperglisemide mevcut NADPH'ın aldoz redüktaz ile glutatyon redüktaz rekabet ederler. Dolayısıyla, hiperglisemide etkinliği artan sorbitol yolunun artan NADPH tüketimi, hücrenin oksitleyici etkenlere karşı korunma gücünü azaltır. Diyabetin kronik komplikasyonlarının patogenezinde sorbitol yolunun önemini bu yolla açıklayan araştırmacılar, hücrede sorbitol birikiminin değil, NADPH tüketimine neden olan sorbitol oluşumunun önemli olduğunu savunmaktadırlar (Yenigün ve Altuntaş 2001). Dolayısı ile AR' ın inhibe olması sorbitol birikimini engelleyeceğinden diyabetik komplikasyonların ortaya çıkması bu yolla engellenebilir.

Özetle, hiperglisemi sonucu oluşan sorbitol birikimi:

- İntraaksonal proteinlerin transport ve sentez hızında azalmaya
- Sinir Na^+-K^+ ATPaz aktivitesinde azalmaya
- Serbest oksijen radikal oluşumunun artışına
- Glikolipitlerin ve aminoasitlerin miyelin oluşturma hızında azalmaya
- Anormal inositol lipid metabolizmasına
- Aşırı glikojen birikimine ve periferik sinir glikolizasyonunun artmasınaneden olur.

Bu tez çalışmasında tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine Pb^{+2}, Cd^{+2}, Ni^{+2}, Zn^{+2}, Ag^{+} ve Hg^{+2} iyonların inhibisyon etkileri incelenmiş. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesinin optimum olduğu pH ve optimum sıcaklık değerleri ölçülmüştür**.**

1.3. Ağırmetaller ve Çevresel Etkileri

İnsanlar çok eski zamanlardan bu yana metalleri işleyip kullanmaktadırlar. Ve bu faaliyetler sonucunda doğal çevirimleri dışında değişik formlarda doğaya yayılmaya başlamışlardır. Sanayileşme ile birlikte ağır metal içeren kömürlerin yakılmaya başlanması, endüstri bölgelerindeki ağır metal kirliliğini aşırı boyutlara ulaştırmış ve ağır metal kirliliğinden kaynaklanan ilk tanımlanan zehirlenmeler Japonya'da ortaya çıkmıştır **(**Kahvecioğlu vd 2003).

Ağır metal tanımı fiziksel özellik açısından yoğunluğu 5 g/cm^3'ten daha yüksek olan metaller için kullanılır. Bu gruba Kurşun, kadmiyum, krom, demir, kobalt, bakır, nikel, cıva ve çinko olmak üzere 60 tan fazla metal dâhildir ***(***Kahvecioğlu vd 2003*)*.

Ağır metaller biyolojik proseslere katılma derecelerine göre yaşamsal ve yaşamsal olmayan olarak sınıflandırılırlar. Yaşamsal olarak tanımlananların organizma yapısında belirli bir konsantrasyonda bulunmaları gereklidir ve bu metaller biyolojik reaksiyonlara katıldıklarından dolayı düzenli olarak besinler yoluyla alınmaları zorunludur. Örneğin bakır hayvanlarda ve insanlarda kırmızı kan hücrelerinin ve birçokoksidasyon ve redüksiyon prosesinin vazgeçilmez parçasıdır **(**Bigersson. *et al.* 1988).

Buna karşın yaşamsal olmayan ağır metaller çok düşük konsantrasyonda dahi fizyolojik yapıyı etkileyerek sağlık problemlerine yol açabilmektedirler. Bu gruba en iyi örnek kükürtlü enzimlere bağlanan cıvadır **(**John *et al.* 1996).

Bu genel gösterimin aksine ağır metaller canlı bünyelerde sadece konsantrasyonlarına bağlı olarak etki göstermezler, etki canlı türüne ve metal iyonunun yapısına bağlıdır (çözünürlük değeri, kimyasal yapısı, redoks ve kompleks oluşturma yeteneği, vücuda alınış şekline, çevrede bulunma sıklığına, lokal pH değeri v.b.).

Kurşun (Pb): Kurşun insan faaliyetleri ile ekolojik sisteme en önemli zararı veren ilk metal olma özelliği taşımaktadır. Kurşun atmosfere metal veya bileşik olarak yayıldığından ve her durumda toksik özellik taşıdığından (çalışma ortamında izin verilen sınır 0,1mg/m^3) çevresel kirlilik oluşturan en önemli ağır metaldir**.** Özellikle endüstriyel ve şehir merkezlerine yakın yerlerde yetişen yiyecekler; tahıllar, baklagiller, bahçe meyveleri ve birçok et ürünü bünyesinde normal seviyelerin üzerinde kurşun bulundurur **(**Kahvecioğlu vd 2003).

Kadmiyum (Cd): Kadmiyum ve çinko yerkürede bir arada ve benzer yapılarda bulunurlar. Bu iki metal insan vücudunda da benzer yapısal ve fonksiyonel özellikler göstermektedirler. Kadmiyum, önemli enzim ve organ fonksiyonlarında çinkonun yerini alabilmektedir. Ve bu fonksiyonların gerekli şekilde gerçekleşmesini engellemektedir. Zn ve Cd ‘nin vücut içindeki oranları Cd zehirlenmesi Zn yetersizliğiyle arttığından çok önemlidir **(**Kahvecioğlu vd 2003).

Kadmiyum diğer ağır metallerle içinde suda çözünme özelliği en yüksek olan elementtir. Suda çözünebilir özelliğinden dolayı Cd^{+2} halinde bitki ve deniz canlıları tarafından biyolojik sistemlere alınır ve akümüle olma özelliğine sahiptir. Vücudumuzda 40 mg’ a kadar kadmiyum bulunabilmektedir ve günlük olarak da 40 µg’a kadar kadmiyum vücuttan atılabilir. Bu seviyeler, kadmiyumun çoğunu topraktan yani yiyecekler yoluyla alması nedeniyle bölgelere göre değişiklik gösterebilmektedir**.** Kadmiyum ve bileşikleri genellikle böbrekler ve karaciğerde birikirler ve ilerleyen yaşlarla böbreklerdeki birikim yüksek tansiyona da sebep olabilmektedir (Kartal vd 2004).

Civa (Hg): Civa birçok sanayi dalında kullanıldığı için, çevresel kontaminasyon ile balık ve deniz hayvanlarından, yapısında civa bulunan tarım ilaçlarının sık kullanımı sonucu, tarım ürünlerinin yapısından beslenme döngüsüne girerek etkisini göstermektedir. Yapılan çalışmalar balık, et ve bazı süt ürünlerinde yüksek düzeyde civa bulunabildiğini göstermiştir (Vural 1993; Concon *et al.*1988).Civanın bir canlıdan başka bir canlıya aktarılmasının incelendiği bir çalışmada, 8 ppm civa püskürtülen tohumlarla beslenen civcivlerin kaslarında yaklaşık 2 kat civa birikimi saptanırken, civa ile kontamine olmuş civcivlerle beslenen kır sansarlarında 6 kat civa birikimi saptanmıştır (Vural 1993). Civa zehirlenmesi sonucu böbrek hasarı oluşmakla birlikte titreme, dişetleri iltihabı, psikolojik değişiklikler ile gebelerde düşük ya da bebekte doğumsal anomaliler gözlenebilmektedir.

Nikel(Ni): Nikel'in bilinen biyolojik fonksiyonu olmamakla birlikte orta seviyede zehirleyici özelliği vardır. Doğal yayınımı yanında insan aktivitelerine bağlı olarak doğada bulunmaktadır. Nikelin organik formu, inorganik formundan daha zehirleyicidir. Deriyi tahriş etmesinin yanında kalp-damar sistemine çok zararlı ve kanserojen bir metaldir. Zararlı etkilerine Günlük nikel alınımının yaklaşık yarısı ekmek, içecek ve tahılların tüketilmesiyle olmaktadır. Besinlerin günlük 150 µg'dan az nikel içermesi tavsiye edilmektedir (Kartal vd 2004).

Çinko (Zn): Çinko metali ve birçok bileşiği diğer ağır metallerle karşılaştırıldığında düşük zehirlilik etkisi gösterirler. Çinko tuzlarının toksikliği çinkodan daha fazla, yapısında bulunduğu bileşiğin anyonik kısmının toksikliğine bağlıdır Diğer taraftan, çinko insanlar ve tüm bitki formları ile hayvan yaşamları için önemli ve yaşamsal elementlerden biridir (günlük doz 10 - 20 mg). Alkol dehidrojenaz, karbonik anhidraz ve karboksipeptidaz gibi 70'den fazla metalo-enzim fonksiyonu için koenzim bileşeni olarak gereklidir (Habashi 1997).

Gümüş (Ag): Gümüş; metalik gümüş, gümüş nitrat ve gümüş sülfadiazin formlarında uzun yıllardır yanıkların, yaraların ve çok sayıda bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır (Rai *et al.* 2009). Gümüş'ün, su dezenfeksiyonunda, yanıkların ve kronik ülserlerin tedavisinde kullanımının milattan önce 1000'li yıllara kadar uzandığı bilinmektedir. Literatürde, 1800'lü yıllarda gümüşün göz damlası olarak kullanıldığı, daha sonra penisilinin bulunmasıyla beraber kullanımın azaldığı ancak 1960'lı yıllarda %0,5'lik gümüş nitrat çözeltisinin yanık tedavisinde tekrar yaygın olarak kullanılmaya başlanıldığından bahsedilmektedir. Bu yıllarda gümüşün *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli* gibi bakterilere karşı etkinliği kanıtlanmıştır. Metalik haldeki gümüş aslında inert haldedir ancak ciltle temas ettiğinde, cilt üzerindeki nem ve yaranın sıvısı onu iyonize hale getirmektedir. İyonize gümüş son derece reaktiftir. Doku proteinlerine bağlanarak bakteriyel hücre duvarında ve daha sonra da nükleer zarda yapısal değişiklere neden olarak mikroorganizmanın ölümüne yol açmaktadır (Rai *et al.* 2009).

1997 yılında yapılan bir çalışmada tiol (-SH) grupları içeren aminoasitler ile içermeyen aminoasitlere gümüş iyonlarının etkisi incelenmiştir. Çalışmada tiol grubu içeren aminoasitlerde gümüş iyonlarının tiol gruplarına bağlandıkları net bir şekilde açıklanmıştır (Liau *et al.* 1997)

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Sorbitol dehidrogenaz (SDH) memeli dokularının çoğusunda bulunur. Her bir alt birimi 38 kDa olan homotetramerik bir çinko enzimidir (Iwata and Carper,1995).Aktif bölgedeki bu çinko enziminin fonksiyonu, dönüşümlü reaksiyon süresince sorbitol hidroksilini veya fruktoz karbonilini bağlamaktır (Jörnvall *et al.* 1984; Eklund *et al.* 1985).

Sorbitol dehidrogenaz, koyun (Smith M.G.1962) ve insan dokuları gibi pek çok dokulardan saflaştırılmıştır (O'Brien *et al.* 1982; Maret and Auld 1988; Baretto and Bcutler 1975; Jedziniak *et al.* 1981).

Sorbitol, gıda tatlandırcısı olarak kullanılan ve glukoz redüksiyonu sonucu üretilen bir alkol şekeridir. Glukoz metabolizmasında sorbitol (poliol) yolu önemlilik arzetmektedir ancak oksidatif stersi artırdığı ve diyabet patogenezinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Chung *et al.* 2003; Jay *et al.* 2006).

Sorbitol yolu için iki enzim gereklidir. Bu enzimler sorbitol dehidrogenaz ve aldoz reduktaz'dır. Aldoz redüktaz glukoz ve galaktozun sorbitole dönüşümünü katalizlerken, sorbitol dehidrogenaz sorbitolun fruktoza dönüşümünü sağlar. Glukoz normal miktarlarda iken aldoz redüktaz enzimi aktif değildir. Hiperglisemi hallerinde ise aldoz reduktaz enzimi uyarılır; glukoz, aldoz redüktaz enzimi yoluyla sorbitole dönüşür sorbitol de sorbitol dehidrogenaz enzimi vasıtasıyla fruktoza dönüştürülür. Oluşan fruktoz enerji kaynağı olarak kullanılır. Hiperglisemi gibi normal olmayan şartlarda, total glukozun neredeyse üçte biri poliol yolunda metabolize edilir. (Chung *et al.* 2003; Gonzalez *et al.* 1984; Jay *et al.* 2006) ve üretim fazlası olan sorbitol ve fruktoz gibi poliol ürünleri ortaya çıkar (Balendiran and Rajkumar 2005).

Sperm hücreleri üzerine yapılan bir çalışmada; sperm hücrelerinin seminal kesede, enerji kaynağı olarak sorbitol yolunda, glukozun fruktoza dönüştürdüğünü kanıtlanmıştır (Hers 1956; Kador *et al.* 1986; Bhatnagar and Srivastava 1992). Fare testisinde yüksek miktarda AR mRNA'sı tespit edilmiş olup, fazla miktarda AR enziminin testis metabolizmasında önemli rolü olduğu düşünülmektedir (Gui *et al.* 1995). Poliol yolağının varlığı daha sonra diyabetik sıçan lensinde de gösterilmiştir (Van Heyningen 1959).

Bir çalışmada diyabetik komplikasyonların patogenezinde önemli rol oynayan SDH ın poliol yolu için önemini araştırmak amacı ile diyabetik olan ve diyabetik olmayan sıçanlar üzerine araştırmalar yapılmıştır Hem enzim içeriği hem de enzim aktivitesi böbrek ve karaciğerde çok olmasına rağmen testiste enzim içeriğinin fazla olmasına karşın, aktivitesinin olmadığını saptanmıştır. SDH diyabetik karaciğer proteininde bol miktarda hem glikolize hem de nonglikolize formları bulunmuştur.Dahası, saflaştırılmış enzimin glukoz ya da fruktozla inkübasyonu sonrasında aktivitesinin belirgin bir şekilde düştüğünü gözlemlenmiştir bu sonuçlar glikasyonun diyabetik koşullar altında karaciğer SDH aktivitesinin azalmasına neden olduğunu göstermektedir(Hoshi *et al.*1996).

Başka bir çalışmada shcwan hücrelerindeki poliol aktivitesini araştırmak için hiperglisemik ve hiperglisemik olmayan şartlarda kültürlü hücrelerde aldoz redüktaz (AR) ve sorbitol dehidrogenaz (SDH) mRNA miktarları yarışmalı RT-PCR tekniğini kullanılarak çalışma yapılmıştır. Schwan hücrelerindeki AR ve SDH mRNA'sının yüksek (30mM) glukoz içeriğine karşın değişmediğini belirlemişlerdir. RT-PCR sistemi tekniği ile belirlenen AR mRNA sı AR aktivitesi ile ilişkili olduğu kadar kültür Schwan hücrelerindeki hiperglisemik şartlarda biriken sorbitol miktarı ile ilişkili olduğunu belirlenmiştir, bu çalışmada geliştirilen RT-PCR sisteminin diyabetik komplikasyonların gözlendiği organlarda, sorbitol yolunun aktivitesinin artmasıyla meydana gelen metabolik bozukluklarda aldoz redüktaz ve sorbitol dehidrogenaz

enzimlerinin rolünü belirlemede faydalı olabileceğini belirlenmiştir (Maekawa *et al.* 2001).

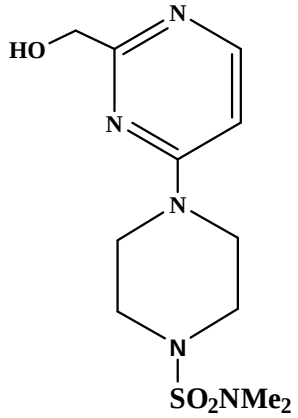
Tilton ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, inhibe olan SDH enziminin sorbitol birikimini artırmasına karşın yan etkileri olmadan bozulmuş sinir iletimi ve sinirlerde, aortta, gözle ilgili dokulardaki vasküler fonksiyon bozukluklarını içeren komplikasyonları azatlığı gözlemlenmiştir. Bu sonuç, bu dokulardaki patogenezlerin glukozun sorbitole indirgenmesinden ziyade SDH tarafından katalizlenen sorbitolün fruktoza dönüşmesi ile daha yakından ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu nedenle yüksek $NADH/NAD^+$ oranı çeşitli diyabetik dokulardaki patogenezlerin en önemli belirleyicisi olarak görülür (Tilton *et al.* 1995).

Schwan hücreleri üzerine yapılan bir çalışmada osmotik stres boyunca sorbitol birikimini gözlemlemek için, sorbitol dehidrogenaz inhibitörleri varlığında ve izoosmotik şartlar altında çalışmışlardır. Sorbitol dehidrogenaz inhibisyonunun hiperglisemik şartlar altında sorbitol birikimini artırdığını, izo osmotik şartlarda ise sorbitol birikiminin $+4^0C$ sıcaklıkta veya ortamda guinidin varlığında meydana geldiğini görmüşlerdir. Sorbitol birikiminin izoosmotik şartların sağlanması ve SDH'ın aktif olabilmesi ile önlenebileceği sonucuna ulaşmışlardır (Mizisin *et al.* 1997).

Sığır beyni SDH enzimi üzerinde yapılan çalışmalarda spesifik bir aldoz redüktaz enzim inhibitörü olduğu düşünülen (Kador *et al.* 1985) quercetin'in sığır beyni SDH enzimini önemli ölçüde inhibe ettiği (Wiesinger and Hamprecht 1989) ve benzer inhibisyonun insan beyni SDH enziminde de gözlendiği belirtilmiştir (O'Brien *et al.* 1983). Bu çalışmalar sonucunda araştırmacılar, AR inhibitörlerinin *invivo* şartlarda ilk olarak SDH enzimi üzerinde denenmesinin iyi sonuçlar doğurabileceğini belirtmişlerdir (Wiesinger and Hamprecht 1989).

İnvivo şartlarında aktif olan sadece bir sınıf (piperazin pirimidinler) sorbitol dehidrogenaz enzim inhibitörleri varlığına ulaşılmıştır (Geisen *et al.* 1992). Bunun dışında ditiyotreitol ve diğer metal şelatlayıcı tiyolları içeren ikinci bir sınıfın, SDH enziminin katalitik çinko atomuyla etkileşerek *invitro* şartlar altında güçlü inhibitör etkisi gösterdiği belirlenmiştir (Lindstad and McKinley-McKee 1996).

Geisen ve arkadaşları yaptıkları bir çalışma sonucunda 2-hidroksimetil- 4- 4(4-N,N, dimetilaminsülfonil-1- piperazin) pirimidin'in SDH'ın ilk inhibitörü olduğunu kanıtlanmışlardır (Geisen *et al.* 1994) .

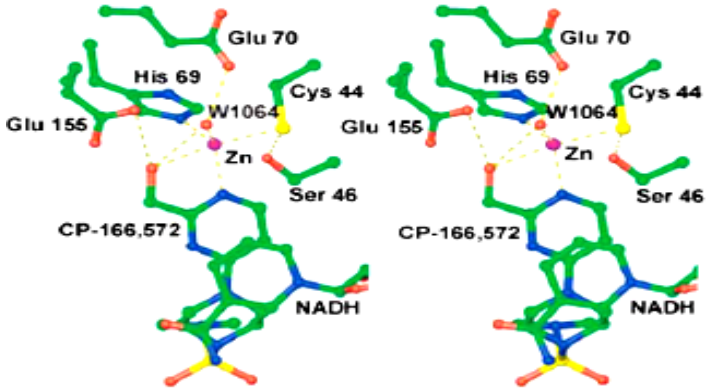


Şekil 2.1. Sorbitol dehidrogenaz inhibitörü SDI 158'in kimyasal yapısı

SDH inhibitörü 2-hidroksimetil-4-4(4-N,N, dimetilaminsülfonil-1-piperazin) pirimidin (SDI 158)'in, AR enzimini zayıf bir şekilde inhibe ettiği buna rağmen hekzokinaz, glutatyon redüktaz, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, laktat dehidrogenaz ve alkol dehidrogenazı içeren diğer birçok enzim aktivitesi üzerinde hiçbir etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir (Geisen *et al.* 1994; Tilton *et al.* 1995). Bundan dolayı SDI 158, spesifik bir SDH inhibitörüdür.

Yapılan diğer bir çalışmalarda SDI 158'in (CP-166,572), enzimin çinko atomuyla ve NADH'ın nikotinamid halkasıyla eşzamanlı etkileştiği belirtilmiştir. Ayrıca bu

çalışmalarda SDI 158'in NAD^+, sorbitol ve NADH ile yarı yarışmalı inhibisyon tipi sergilediği gözlenmiştir (Pauly *et al.* 2003).



Şekil 2.2. SDI 158 (CP- 166,572)'in insan SDH enziminin katalitik çinko atomuyla ve NADH ile etkileşimi (Pauly *et al.* 2003).

Sorbitol, poliol yolunun ilk ürünü olup osmotik olarak aktiftir fakat hücre zarından kolayca geçemediği için birikir (Lewis *et al.* 2001) ve ozmotik strese neden olur. Ozmotik stres, sorbitol birikimi ile hücrenin su içeriğinin artması sonucu meydana gelir.Bu durum redoks dengesinde bozulmaya sebep olur. Bu bozulma proteinlerin çözünürlüklerini değiştirerek membran direncine zarar verir (Tornlinson 1989). Lensde oluşan ozmotik stres sonucu membran yapısı bozulmaktadır (Kinoshita 1974; Brownlec *et al.* 1984). Bozulan membran yapısı katarakt ile sonuçlanır (Kinoshita 1965; Varma *et al.* 1977; Lee and Chung 1999).

Yapılan bir diğer çalışmada, sorbitol dehidrogenaz ve aldoz redüktaz inhibisyonun diyabetik ve galaktosemik farelerde şeker katarakt oluşumuna etkileri karşılaştırılmıştır bu amaçla hem sorbitol dehidrogenaz'ın inhibitörlerin varlığında ve yokluğunda hem de aldoz redüktaz inhibitörlerinin varlığında ve yokluğunda diyabetik ve galaktosemik farelerde şeker katarakt oluşumunu gözlemlemişlerdir. Yapılan bu çalışma sonucunda sorbitol dehidrogenaz inhibitörlerinin diabetik farelerde katarakt oluşumunu artırdığı ancak galaktosemik farelerde katarakt oluşumunu etkilemediği gözlenmiştir. Ayrıca

aldoz redüktaz inhibitörlerinin hem diabetik hem de galaktosemik farelerde katarakt oluşumunu azaltığı gözlemlenmiştir. Bu çalışmalar ile hücre içi sorbitol birikimin katrakta sebebiyet verdiği, aldoz redüktaz enziminin inhibe olmasının ise katarakt oluşumu önleyebileceği sonucuna ulaşılmıştır (Kador *et al.* 1998).

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Deneysel çalışmalarımızda kullandığımız standart serum albümin, N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin (TEMED), diyaliz torbaları Sigma Chemical Comp.'den; sodyum hidroksit, amonyum sülfat, sodyum klorür,potasyum fosfat, hidroklorik asit, glisin, sodyum azotür, gliserin, potasyum fosfat, etanol, metanol, asetik asit, izopropanol, akrilamid, N,N'-metilen bisakrilamid, coomassie brillant blue G-250,R-250, brom timol mavisi, sodyum dodesil sülfat (SDS), DEAE-Sephadex, CM-Sephadex C-50, Sephadex G-100, β-NAD^+, sorbitol, β-merkapto etanol ve diğer kimyasal maddeler E. Merk AG'den; temin edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan alet ve cihazlar

Çalışmalar sırasında aşağıdaki alet ve cihazlardan faydalanılmıştır.

Masa santrifüjü	: MSE Mistral 2000
Soğutmalı santrifüj	: HeraEÜs Sepatech (Suprafuge 22)
Ultrasantrifüj	: Beackman Coulter (Optima LE-SOK Ultracentrifuge)
Soğutmalı santrifüj	: Hermle Z 323 K(Germany)
Spektrofotometre	: CHEBİOS s.r.l. (Optimum-one/UV-VIS)
pH metre	: Schott pH-Meter CG840
Elektroforez tankı	: BIO RAD (dikey)
Peristaltik pompa	: İsmatec

Karıştırıcı(Shaker) : GFL 3025
Karıştırıcı(Vorteks) : Fisons whirlimixer
Hassas terazi : Gec avery (UK)
Otomatik pipet : Eppendorf
Çalkalayıcı : Midi Dual 14
Manyetik karıştırıcı : Chilten Hotplate Magmetic Stirrer HSBI
Saf su cihazı : Barnstead Easy Pure UV/UF
Su banyosu : Clifton
Kar makinesi : Scotsman AF-20 (Authomatic ice machines)
Güç kaynağı : 1-Bio Rad Power Pac 3000
Buzdolapları : Arçelik
Derin dondurucu (-20ºC'ye kadar) : Sanyo Medical Freezer
Derin dondurucu (-85ºC'ye kadar) : Sanyo Ultra Low

3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler:

1. 200 mM Glisin/NaOH tampon çözeltisi (pH=9,9): 1,5 g Glisin 90 ml saf suda çözüldü. 1 M NaOH ile pH=9,9'a getirildikden sonra toplam hacim saf su ile 100 ml ye tamamlandı.
2. 4,7 mM β-NAD^+ çözeltisi (Koenzim çözeltisi): 0,0156 g β-NAD^+ alındı 5 ml saf su içinde çözüldü
3. 100 mM sorbitol çözeltisi (Substrat çözeltisi): 0,182 g sorbitol alındı 10 ml saf su içinde içinde çözüldü.

Homojenat hazırlanırken kullanılan çözeltiler:

4. % 0.9 luk NaCl çözeltisi: 0,9 gr NaCl alınıp hacmi saf su ile 100 ml ye tamamlandı.

5. 50 mM Tris/HCl (2µl β-Merkaptoetanol) , pH=7,6: 0,6 g Tris yaklaşık 90 ml saf suda çözüldü 1M HCl ile pH=7,6'ye getirildikden sonra son hacim saf su ile 100 ml ye tamamlandı.

Amonyum sülfat çökeltisinin çözünmesi ve diyaliz için kullanılan tampon çözeltiler:

1. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu oluşan çökeleği çözmek için
50 mM Tris/HCI(2mM β-Merkaptoetanol) , pH=7,6: 0,6 g Tris yaklaşık 90 ml saf suda çözüldü.1M HCI ile pH=7,6'ye getirildikden sonra son hacim saf su ile 100 ml ye tamamlandı.
2. (Diyaliz için) 50 mM Tris/HCl (2mM β-Merkaptoetanol) , pH=7,6: 6.055 g Tris yaklaşık 900 ml saf suda çözüldü. İçine 144µl β-Merkaptoetanol katıldıktan sonra 1M HCl ile pH=7,6'ye getirilip son olarak çözelti hacmi 1000ml ye tamamlandı.

DEAE-Sephadex iyon değişim kromatografisi ve diyaliz için kullanılan tampon çözeltiler:

1. 50 mM Tris/HCltampon çözeltisi (pH=7,9): 6,055g Tris yaklaşık 900 ml saf suda çözüldü. 1M HCl ile pH=7,9'a getirilip daha sonra son hacim saf su ile 1000 ml' ye tamamlandı.
2. Diyalizde kullanılan pH:7,6 olan tampon çözeltisi: 6,055 g Tris yaklaşık 900 ml saf suda çözüldü. 1M HCl ile pH=7,6 ya getirildikden sonra içerisine144 µl β-merkaptoetanol katıldı. Son hacim saf su ile 1000 ml' ye tamamlandı.

Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi için kullanılan çözeltiler:

1. 50 mM Tris/HCltampon çözeltisi(pH=7,5), (Kolonun dengelenmesinde ve elüsyon

işleminde kullanılan çözelti);6,055 g Tris yaklaşık 900 ml saf suda çözüldü.1M HCl ile pH=7,5 e getirildikden sonra son hacim saf su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

2. Standart protein çözeltilerinin hazırlanışı:

a. Albumin; 20 mg albumin 1900 µl dengeleme tamponu içinde çözüldü ve içerisine 100 µl gliserol ilave edildi.

b. Alkol dehidrogenaz; 10 mg alkol dehidrogenaz 1900 µl dengeleme tamponu içinde çözüldü ve içerisine 100 µl gliserol ilave edildi.

c. β-Amilaz; 8 mg β-amilaz 1900 µl dengeleme tamponu içinde çözüldü ve içerisine 100 µl gliserol ilave edildi.

Optimum pH belirlemek için kullanılan tamponlar:

1. pH: 5,0 olan 200 mM KH_2PO_4 tamponunu hazırlamak için:3,48g KH_2PO_4 alındı 90 ml saf suda çözüldükten sonra 1M NaOH ile pH:5,0 olacak şekilde ayralandı daha sonra saf su ile hacim 100 ml'ye tamamlandı.

2. pH: 5,5 olan 200 mM KH_2PO_4 tamponunu hazırlamak için:3,48g KH_2PO_4 alındı 90 ml saf suda çözüldükten sonra 1M NaOH ile pH:5,5 olacak şekilde ayralandı Daha sonra saf su ile hacim 100 ml'ye tamamlandı.

3. pH:6,0 olan 200 mM KH_2PO_4tamponunu hazırlamak için:3,48g KH_2PO_4 alındı 90 ml saf suda çözüldükten sonra 1M NAOH ile pH:6,0 olacak şekilde ayralandı daha sonra saf su ile hacim 100 ml'ye tamamlandı.

4. pH: 6,5 olan 200 mM KH_2PO_4 tamponunu hazırlamak için: 3,48g KH_2PO_4 alındı 90 ml saf suda çözüldükten sonra 1M NaOH ile pH:6,5 olacak şekilde ayralandı. Daha sonra saf su ile hacim 100 ml'ye tamamlandı.

5. pH: 7,0 olan 200 mM KH_2PO_4tamponunu hazırlamak için: 3,48g KH_2PO_4 alındı 90 ml saf suda çözüldükten sonra 1M NaOH ile pH:7,0 olacak şekilde ayarlandı daha sonra saf su ile hacim 100 ml'ye tamamlandı.

6. pH: 7,5 olan 200 mM KH_2PO_4 tamponunu hazırlamak için: 3,48g KH_2PO_4 alındı 90 ml saf suda çözüldükten sonra 1M NaOH ile pH:7,5 olacak şekilde ayralandı. Daha

sonra saf su ile hacim 100 ml'ye tamamlandı.

7. pH: 8,0 olan 200 mM KH_2PO_4tamponunu hazırlamak için:3.48g KH_2PO_4 alındı 90 ml saf suda çözüldükten sonra 1M NaOH ile pH:8,0 olacak şekilde ayralandı. Daha sonra saf su ile hacim 100 ml'ye tamamlandı.

8. pH: 7,5 olan 200 mM Tris/HCltamponunu hazırlamak için: 2,42g Trisalındı 90 ml saf suda çözüldükten sonra 1M HCl ile pH: 7,5 olacak şekilde ayarlandı. Daha sonra saf su ile hacim 100 ml'ye tamamlandı.

9. pH: 8,0 olan 200 mM Tris/HCltamponunu hazırlamak için: 2,42g Trisalındı 90 ml saf suda çözüldükten sonra 1M HCl ile pH:8,0 olacak şekilde ayarlandı. Daha sonra saf su ile hacim 100 ml'ye tamamlandı.

10. pH: 8,5 olan 200 mM Tris/HCltamponunu hazırlamak için: 2,42g Trisalındı. 90 ml saf suda çözüldükten sonra 1M HCl ile pH:8,5 olacak şekilde ayarlandı daha sonra saf su ile hacim 100 ml'ye tamamlandı.

11. pH:9,0 olan 200 mM Tris/HCltamponunu hazırlamak için: 2,42g Trisalındı 90 ml saf suda çözüldükten sonra 1M HCl ile pH:9,0 olacak şekilde ayarlandı. Daha sonra saf su ile hacim 100 ml'ye tamamlandı.

12. pH: 9,0 olan 200 mM Glisin/NaOH tamponunu hazırlamak için: 1,5g Glisinalındı 90 ml saf suda çözüldükten sonra 1M NaOH ile pH:9,0 olacak şekilde ayarlandı. Daha sonra saf su ile hacim 100 ml'ye tamamlandı.

13. pH:9,5 olan 200 mM Glisin/NAOH tamponunu hazırlamak için: 1,5g Glisinalındı 90 ml saf suda çözüldükten sonra 1M NaOH ile pH:9,5 olacak şekilde ayarlandı . Daha sonra saf su ile hacim 100 ml'ye tamamlandı.

14. pH:10,0 olan 200 mM Glisin/NaOH tamponunu hazırlamak için: 1,5g Glisinalındı 90 ml saf suda çözüldükten sonra 1M NaOH ile pH:10,0 olacak şekilde ayarlandı. Daha sonra saf su ile hacim 100 ml'ye tamamlandı.

15. pH: 10,5 olan 200 mM Glisin/NaOH tamponunu hazırlamak için: 1,5g Glisinalındı 90 ml saf suda çözüldükten sonra 1M NaOH ile pH:10,5 olacak şekilde ayarlandı. Daha sonra saf su ile hacim 100 ml'ye tamamlandı.

Elektroforez için kullanılan çözeltiler:

1. 1M Tris-HCl (pH=8,8): 12,11 g Tris (0,1 mol) tartılarak 80 ml suda çözüldü, pH ayarı 1M HCl ile yapıldıktan sora 100 ml'ye tamamlandı.

2. 1 M Tris-HCl (pH=6,8):12,11 g Tris (0,1 mol) tartılarak 80 ml suda çözüldü, pH ayarı 1M HCl yapıldıktan sonra 100 ml'ye tamamlandı.

3. %30 Akrilamid-%0,8 Bisakrilamid çözeltisi: 15 g akrilamid, 0,4 g bisakrilamid ve 34,6 g su karıştırılarak çözüldü.

4. %10'luk amonyum persülfat çözeltisi: 1 g amonyum persülfat tartılarak su ile 10 ml'ye tamamlandı.

5. %10'luk SDS: 1 g SDS, 9 g 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 suda çözüldü; %10'luk SDS'den 5 ml ilave edildi, pH=8,3'e ayarlandı ve toplam hacim 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 suyla 10 ml'ye tamamlandı. Bu tampona kullanılmadan önce 950 µl numune tamponundan 50 µl olacak şekilde β-merkapto etanol ilave edildi.

8. Sabitleştirme çözeltisi (jelde yürütülen proteinlerin sabitleştirilmesi için kullanılan çözelti): %50 izopropanol, %10 TCA ve %40 su olacak şekilde karıştırılarak hazırlandı.

9. Jel boyama çözeltisi: 50 ml metanol, 10 ml asetik asit ve 40 ml su içerisinde 0,1 g coomassie brillant blue R-250 reaktifinin çözülmesiyle hazırlandı.

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

11. Coomassie brillant blue G-250 reaktifi (proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti): 100 mg coomassie brillant blue G-250, 50 ml %95'lik etanolde çözüldü. Bu çözeltiye %95'lik 100 ml fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin hacmi suyla 1L'ye tamamlandı.

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

Proteinlerin Kantitatif Tayininde Kullanılan Çözeltiler:

1. 100 mg coomassie brillant blue G-250, 50 ml % 95'lik etanolde çözüldü. Bu çözeltiye % 95'lik 100 ml fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin hacmi saf su ile 1 litreye tamamlandı.
2. Standart serum albumin çözeltisi (1 mg/ml; protein tayini için kullanılan çözelti): 1 mg standart serum albuminin 1 ml saf suda çözülmesiyle hazırlandı.

Çalışmalarımızda kullanılan ağır metallerin stok çözeltileri:

1. 1mM $AgNO_3$ hazırlamak için: 0,0845 $AgNO_3$ alınıp 5ml saf su da çözüldü. Daha sonra bu çözeltiden 10µl alınıp 1000 kat seyreltildi.
2. 2 mM $Hg(NO_3)_{2\times}H_2O$ hazırlamak için: 0,00343 $Hg(NO_3)_{2\times}H_2O$ alınıp 5ml saf suda çözüldü daha sonra bu çözeltiden 10µl alınıp 1mM a seyreltildi.
3. 100 mM $NiSO_4$ hazırlanmak için: 0,077g $NiSO_4$ alınıp 5ml saf suda çözüldü.
4. 100 Mm $Zn(NO_3)_2 \times 6H_2O$ hazırlamak için: 0,148g $Zn(NO_3)_2 \times 6H_2O$ alınıp 5ml saf suda çözüldü.
5. 100 mM $Cd(NO_3)_2 \times 4H_2O$ hazırlamak için: 0,154g $Cd(NO_3)_2 \times 4H_2O$ alınıp 5 ml saf su da çözüldü.
6. 1mM $Pb(NO_3)_2$ hazırlamak için: 0,0202 g $Pb(NO_3)_2$ alınıp 5ml saf su da çözüldü. Daha sonra bu çözeltiden 100µl alınıp 10ml ye tamamlandı.

3.2. Metod

3.2.1. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enziminin aktivitesinin ölçümü

Fruktozun sorbitole dönüşümlü olan reaksiyonunda NAD^+'nin indirgenmesi ile oluşan absorbans artışı 340 nm'de üç dakikalık süreyle ölçüldü birer dakika arayla sonuçlar kaydedildi. Bunun için 1 ml'lik kuvartz küvet içerisinde 50 mM Glisin/NaOH tamponu (pH=9,9), 10 mM sorbitol, 470 µM NAD^+ ve enzim olacak şekilde hazırlandı (Lindstad *et al.* 1992). 340 nm'de saf sudan oluşan köre karşı absorbans değerleri okundu.Aktivite hesaplamak için NADH'ın milimolar ekstinksiyon katsayısı kullanıldı. sorbitol dehidrogenaz (SDH) nikotinamid adenin dinükleotid (NAD^+)'i, ortamda sorbitol olduğunda indirger. NADH'ın oluşmum miktarı SDH aktivitesine bağlı olup 340 nm'deki absorbans artışı ile ölçülebilir. Sorbitol dehidrogenaz aktivitesinin üniteleri dakika başına okside olan sorbitol'un mikro molünü verir.

Enzim ünitesi hesaplamak için aşağıdaki denklem kullanıldı.

$$\frac{\text{EÜ}}{\text{ml}} = \frac{\Delta\text{OD}}{6{,}22} \times \frac{V_T}{V_E} \times S_F$$

EÜ/ml : 1 ml'deki enzim ünitesi

ΔOD : Bir dakikadaki absorbans değişimi

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

V_T : Ölçümün yapıldığı toplam küvet hacmi

V_E : Ölçümün yapıldığı küvete ilave edilen enzim numunesinin hacmi

3.2.2. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enziminin saflaştırılması

3.2.2.a. Tavuk karaciğer dokusunun temini ve homojenat hazırlanması

Deneyde kullanıdğımız tavuk karaciğeri taze olarak temin edildi. Dokudan kan ve diğer kirlilikleri uzaklaştırmak için % 0,09 luk NaCl çözeltisi ile yıkandı. Homojenatı hazırlamak izotonik NaCl ile yıkanan doku, küçük parçalara ayrıldı. Sonrasında havana konulan doku üzerine sıvı azot ilave edilip çok küçük parçalara ayrılana kadar havanda dövüldü. Sonra 2ml/g olacak şekilde üzerine 50mM Tris/HCl (2mM β-merkaptoetanol) (pH:7,6) tamponu ile homojenize edildi. Elde edilen homojenat süzgeç kâğıdı kullanılarak süzme işlemine tabi tutuldu. Bu işlemden sonra süspansiyon 20 dakika 13000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası çökelek atıldı, süpernatant bir sonraki saflaştırma basamağında kullanıldı.

3.2.2.b. Amonyum sülfat çöktürmesi

Yeteri kadar yüksek tuz konsantrasyonunda, bir protein bir çözeltiden hemen hemen kantitatif olarak çökeltilebilir; yani yüksek tuz konsantrasyonunda proteinlerin çözünürlüğü azalır ve hatta çökerler. Bu olaya salting-out adı verilir. Salting-out'un fizikokimyasal prensibi oldukça komplekstir; yüksek tuz konsantrasyonunda hidratasyon suyu protein molekülünden uzaklaştırılır ve böylece çözünürlük azalır (Keha ve Küfrevioğlu 2007).

Her bir protein farklı iyonik şiddette çökelme gösterdiğinden, bu yolla proteinler birbirlerinden ayrılabilirler. Salting-out sırasında proteinler denatüre olmazlar ve uygun bir ortamda tekrar çözelti fazına alınabilirler. Bu maksatla çoğunlukla suda iyi çözünüp, çok yüksek iyonik şiddet gösterebilen amonyum sülfat kullanılır (10 g suda yaklaşık 71,5 g $(NH_4)_2SO_4$ çözünebilir (Keha ve Küfrevioğlu 2007). Çözündüğünde pH'yı değiştirmeyen tuzlara nötral tuz denir. Örneğin NaCl, suda çözündüğünde Na^+ hidroliz

olmaz ve ortamın pH‘sını da değiştirmediğinden nötral bir tuzdur. $(NH_4)_2SO_4$ ise normalde asidik bir tuzdur. Fakat amonyum sülfat, suda çok iyi çözünmesi ve ortamın pH ‘sını da fazla değiştirmemesi nedeniyle nötral tuz sınıfına alınmıştır.

Tavuk karaciğerinden elde edilen SDH enzim homojenatı literatür taraması sonucu elde edilen bilgiler ışığında %0-35 ve %35-60 aralıklarında katı amonyum sülfat kullanarak çöktürmesi yapıldı (Karacaoğlan ve Özer 2005). Yine aynı literatürde sorbitol dehidrogenaz enziminin %35-60 aralığında çöktüğünü bildiğimizden, birinci aralıkta 20 dk 13000 rpm de santrifüj yapıldıktan sonra çökelek atılıp süpernatant ile tekrar amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı.Tekrar 20dk 13000 rpm de santrifüj edildi. Daha sonra ikinci aralıkta süpernatant atılıp çökelek az miktarda pH: 7,6 olan Tris/HCl (2mM β-merkaptoetanol) ile çözüldü. Bütün bu işlemler soğuk ortamda gerçekleştirildi.Ayrıca amonyum sülfat çöktürmesi boyunca her defasında bir önceki amonyum sülfatın çözünmesine dikkat edildi. Amonyum sülfatın homojenatta çözünme işlemi buz banyosunda manyetik karıştırıcı ile yapıldı. Katı amonyum sülfat miktarı aşağıdaki formülden hesaplandı.

$$g(NH_4)SO_4 = \frac{1.77 \times V \times (S_2 - S_1)}{3,54 - S_2}$$

V Enzim çözeltisinin hacmi

S_1 1’in kesri olarak çözeltideki amonyum sülfat doygunluğu

S_2 1’in kesri olarak istenen amonyum sülfat doygunluğu

3.2.2.c. Diyaliz

Çökelek, az miktarda pH: 7,6 Tris/HCl (2mM β-merkaptoetanol) ile çözüldükten sonra 2 saat boyunca aynı tampona karşı diyaliz edildi. Diyaliz işlemi sonrasında homojenat diğer işlemlerde kullanılmak üzere diyaliz torbasından çıkarıldı.

3.2.2.d. Ultrasantrifüj

Diyaliz işemine tabi tutuluan numune bu basamaktan sonra,içerisindeki çözünmeden kalan safsızlıkları uzaklaştırmak için, 100000 g de 1 saat süreyle santrifüj edildi. Çökelek kısmı atıldı. Süpernatant kısmı alınarak bir sonraki saflaştırma basamağında kullanıldı.

3.2.2.e. DEAE-Sephadex iyon değişim kromatografisi

Çalışmamız için anyon değiştirici olarak kullanılan DEAE-Sephadex iyon değişim reçinesinin önce şişirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla 100-120 ml yatak hacmi elde edebilmek için 5 g jel 100 ml destile suya konularak 80-90^{0}C'de 5 saat süre ile bekletilerek şişirildi. Şişirilmiş jel 0,5 N 100 ml soğuk HCl içinde 1 saat bekletildikten sonra 100 ml 0,5 N NaOH ile nötralize edildi. Jel materyalinden çözünmüş gaz vakum yardımıyla uzaklaştırılıp kolona doldurulduktan sonra 50mM Tris/HCltamponu (pH=7,9) ile dengelendi. Kolonun akış hızı peristaltik pompa yardımıyla 15-20 ml/saat'e ayarlandı. Jel üzerindeki tampon seviyesi jel düzeyine indirilerek ultrasantrifüj sonrası elde edilen enzim çözeltisi pipet vasıtasıyla kolona tatbik edildi. Sorbitol dehidrogenaz enzimi DEAE-Sephadex kolon materyaline tutunmadığından, kolonu dengeleme işleminde kullanılan 50mM Tris/HCItamponu (pH=7,9) kullanılarak elüsyon işlemi yapıldı. Elüatlar, kolon akış hızı 15 ml/saat'e ayarlanarak yaklaşık 3 ml'lik hacimler halinde tüplere alındı. Her bir elüatın 340 nm'de aktivitesine bakıldı, aktivite gösteren tüpler birleştirildi. Birleştirilen elüat çözeltileri, diyaliz torbasına yerleştirilerek iki saat süreyle 2mM β-merkaptoetanol içeren, 50Mm Tris/HCItamponu (pH=7,9) karşı diyaliz edildi.

3.2.2.f. Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi kolonunun hazırlanması tavuk karaciğeri SDH enziminin saflaştırılması ve tavuk karaciğeri SDH enziminin doğal halinin molekül kütlesinin tayini

Kolon materyalı olarak kullanılan sephadex G-100 den 5 g alınıp 200 ml su da 90 ^{o}C de 4 saat bekletilerek şişirildi. Şişirilmiş polimer materyalin içerisinde bulunan hava kabarcıkları su trombu kullanılarak vakumla alındı. Şişirilmiş ve havası uzaklaştırılmış jel pH'sı 7,5 olan 50 mM Tris/HCl tamponuyla dolu kolona aktarıldı ve paketlendi. Kolonu dengelemek için yine aynı tampon 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 0,125 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 altan elüatlar alınmaya başlandı ve alınan elüatlarda 340 nm absorbans değerlerine bakılıp absorbans değeleri sıfır olana kadar elüatlar alındı ve kaydedildi.

Molekül kütlesi tayininde kullanılacak olan standart grafiği elde edebilmek için kolondan önce standart proteinler geçirildi. Standart olarak, blue dekstran; 2.000.000 Da, β-amilaz; 200.000 Da, alkol dehidrogenaz; 150.000 Da, albumin; 66.000 Da standart proteinler ayrı ayrı kolona uygulandı. Sonra Tavuk karaciğerinden elde edilen enzim numunesi jel filtrasyon kolonuna uygulandı (Keha ve Küfrevioğlu 2005).

Elüsyon hacmi için dengelenen kolonun, jel üzerindeki tampon çözeltisi jel seviyesine indirildi. Kolona her bir protein çözeltisinden 2 ml tatbik edildi. Kolona uygulanan

protein çözeltisi jel tarafından tamamen emildikten sonra kolonun üstü elüsyon tamponuyla (50 mMTris/HCl pH=7,5)doldurularak, elüatlar 1'er ml olacak şekilde tüplere toplandı. Elüsyon tamponu kör olarak kullanıldı ve toplanan elüatların 280 nm'de absorbansları ölçülerek kaydedildi. Elüsyon işlemine 280 nm'deki absorbans değerleri 0,05 oluncaya kadar devam edildi. 280 nm'de absorbans gösteren tüplerde aktivite ölçümleri yapıldı. 280 nm'de kalitatif ölçüm için alınan absorbans değerleri tüp sayısına karşı grafiğe geçirildi. Daha sonra enzimin molekül kütlesini belirlemek için her bir protein için ayrı ayrı K_{av} değerleri ve Log MK değerleri hesaplandı. Log MK-K_{av} grafiği çizildi. Daha sonra tavukkaraciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi için K_{av} değeri belirlenerek grafik vasıtasıyla enzimin doğal halinin molekül kütlesi belirlendi.

Aşağıdaki formül kullanılarak K_{av} değeri hesaplandı ve Log MK-K_{av} grafiği çizildi.

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

V_o= Void hacim V_e= Elüsyon hacmi, V_t= Kolon yatak hacmi

3.2.3. Optimum sıcaklık

Bilindiği üzere enzimlerin aktiviteleri sıcaklıkla değişmektedir. Bazı sıcaklıklarda düşük aktivite gösteren enzimler sıcaklığın belli bir değeri geçmesi ile enzimlerin üç boyutlu yapıları bozularak denatüre olabilirler. Belirli sıcaklıklarda maksimum aktivite gösteren enzimler için bu sıcaklık değeri o enzim için optimum sıcaklıktır. Bu çalışmada, optimum sıcaklık ölçülürken su banyosu istenilen sıcaklık değerlerine ayarlandı. 10'ar ^{o}C'lik sıcaklık artışlarında aktivite değerleri ölçüldü ve enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeri hesaplandı.

3.2.4. Optimum pH

Çoğu enzimin aktivitesinin optimum olduğu bir pH değeri vardır.Bu değerin öncesinde ve sonrasında aktivite genelde düşüktür. Bu çalışmada da tavuk karaciğeri SDH enzim aktivitesinin hangi pH da optimum olduğunu belirlemek için;

pH:5,0 ile 8,0 arasında 0,5'er birimlik artışla potasyum fosfat tamponu,
pH:7,5 ile 9,0 arasında 0,5'er birimlik artışla Tris-HCl tamponu,
pH: 9,0 ile 10,5 arasında 0,5'er birimlik artışla Glisin/NaOH tamponu hazırlandı.
Hazırlanan tamponlar aktivite ölçümünde kullanılan tamponun yerine kullanıldı. Ve yapılan ölçümler sonucunda enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH değeri hesaplandı.

3.2.5. Bradford yöntemi ile kantitatif protein tayini

Tavuk karaciğeri numunesinden hazırlanan homojenat, amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-Sephadex iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltilerindeki kantitatif protein miktarı bu yöntemle belirlendi. Kullanılan Coomassie brillant blue G-250 negatif bir yüke sahiptir ve protein üzerindeki pozitif yüke bağlanır. Boyanın kırmızı (λ_{max}=465 nm) ve mavi (λ_{max}=595 nm) formu mevcuttur. Proteinin bağlanması, kırmızı formun mavi forma dönüşümünü sağlar. Bu yöntemin bozucu faktörlere girişimi oldukça azdır ve hassasiyeti 1-100 µg arasındadır. Reaksiyon büyük oranda tekrarlanabilir ve hızlıdır renk stabilitesi 2 saat devam eder. (Bradford 1976).

Bu metodla yapılan tayin için bir standart grafik çizilir.Bunun için 1 mg/ml olacak şekilde standart sığır albumin çözeltisinden tüplere 10, 20,30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µl konuldu. Bütün tüplerin hacmi 0.1ml ye tamamlandı ve 5 ml Coomassie brillant blue G-250 çözeltisi eklenip vorteksle karıştırıldı. 10 dakika inkübe edildikten sonra

595 nm'de 3 ml'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak 0,1 ml enzim numunesinin içinde bulunduğu tampondan ve 5 ml coomassie brillant blue G-250 çözeltisinden oluşan karışım kullanıldı. Elde edilen sonuçlardan absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri standart grafik haline getirildi.

Tüplere tavuk karaciğerinden elde edilen homojenattan ve yukarıda bahsedilen saflaştırma basamaklarından elde edilen enzim numunelerinden 0,1 er ml konularak üzerine 5'er ml coomassie brillant 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 değerin aritmetik ortalamasından gerçek değer tespit edildi. Elde edilen bu değerlere göre standart grafikten yararlanılarak protein miktarları belirlendi. Bu metodla saflaştırılan enzim çözeltilerinde ve homojenatta protein tayini yapıldı.

3.2.6. Kalitatif protein tayini

Kalitatif protein tayini, proteinlerin yapısında bulunan aromatik gruplara sahip tirozin ve triptofan amino grup asitlerinin 280 nm'de maksimum absorbans göstermesi esasına dayanan Warburg metodu olarak bilinen yolla gerçekleştirildi (Segel 1968). Sephadex G-150 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.

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

Laemmli metoduna göre saflaştırılan enzim %3-8 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) göre yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi (Laemmli 1970). Jelde çıkabilecek herhangi bir safsızlığa karşın

elektroforez plakaları saf su ve alkolle yıkandı. Sabitleştirilen plakalar, içerisinde sızdırmayı önleyen sünger ihtiva eden jel hazırlama kabinine konuldu. Önce ayırma jeli hazırlandı ve enjektörle plakaların arasına üst kesimde 0,5 cm kalıncaya kadar dolduruldu. İki saat jelin donması beklendi. Ayırma jelinin katılaştığından emin olunduktan sonra yığma jeli hazırlandı. Jelin üst kısmındaki boşluğa dolduruldu ve numune kuyucuklarının oluşması için tarak dikkatlice yerleştirildi. 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 örnekleri yaklaşık 20 µg protein olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim 50 µl olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu katıldı. Üç dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi. Elektroforez tankı kapatılarak alt tarafından (+) anot, üst taraftan ise (-) katot yerleştirildi. Önce 40 voltta 20 dakika yürütüldü ve örnek ayırma jeline kadar gelip yığıldı. Sonra akım 80 volt'a çıkartılarak numunelerin jelin alt sınırına gelmesine kadar yürütüldü. Numunelerin takip edilmesi, numune tamponuna katılan brom timol mavisi yardımıyla anlaşıldı. Yürütme işlemi bittikten sonra akım kesilerek plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı ve sabitleştirme çözeltisine konuldu. Sabitleştirme çözeltisinde 20 dakika bekletilen jel, çıkarılarak boyama çözeltisine konuldu ve çalkalayıcı üzerinde 2 saat bekletildi. Jel boyandıktan sonra çıkarılarak yıkama çözeltisine konuldu. Rengi açılıp, protein bantları belirginleşinceye kadar çalkalayıcı üzerinde yıkanan jel çıkarılarak fotoğrafı çekildi.

Ayırma jeli hazırlarken: 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.

Yığma jeli hazırlarken: 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.

3.2.8. Sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzimin molekül kütlesi tayini

Molekül kütlesi tayininde standart protein olarak; domuz myosin (200 kDa), E.colimy β-galaktosidaz (116 kDa), fosforilaz (97,4 kDa), sığır serum albumini (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), sığır eritrosit karbonik anhidrazı (29 kDa) kullanıldı. Elektroforez işleminden sonra standart proteinlerin R_f değerleri hesaplanarak log MK-R_f standart grafiği çizildi. Daha sonra tavuk karaciğerinden elde edilen SDH enzimi için R_f değeri hesaplandı ve standart grafikte yerine konularak SDH enziminin log MK'sı belirlendi. Bu değerin antilogaritması alınarak numunenin molekül kütlesi belirlendi.

Proteinlerin R_f değerleri;

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

Formülü kullanılarak belirlendi.X_e= Proteinin yürüme mesafesi, X_{boya}= Boyanın yürüme mesafesi

3.2.9. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enziminin aktivitesi üzerine bazı ağır metallerin etkilerinin belirlenmesi

Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine bazı ağır metallerin etkilerini belirlemek amacıyla küvet ortamına değişik konsantrasyonlarda ağırmetal çözeltisi ilave edilerek aktivite değerleri okundu. Kullanılan ağırmetalin farklı konsantrasyonlarını oluşturmak için stok çözeltiler seyreltildi.

3.2.10. İnhibitör etkisi gösteren ilaçlar için IC_{50} ve K_i değerlerinin belirlenmesine ait çalışmalar

İnhibitör çalışmalarıyla ilgili farklı inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapılarak inhibitör etkisi gösteren ağır metaller belirlendi. Bu metallerden inhibisyon etkisi yüksek olanların %Aktivite-[I] olarak grafikleri çizildi, eğrinin denkleminden IC_{50} değerleri hesaplandı.

IC_{50} değerleri hesaplanan bazı ağır metallerin K_i değerlerini belirlemek amacıyla, tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesini yarıya düşüren metal çözeltisi konsantrasyonunaltında ve üstünde iki değer belirlendi. Bu sabit metal konsantrasyonlarında uygun beş substrat konsantrasyonu ile aktivite ölçümleri yapıldı. Çalışmalarda uygun beş farklı substrat konsantrasyonu stok çözelti kullanılarak ön deneme ile belirlendi. Elde edilen değerler ile her bir inhibitör için Lineweaver-Burk grafikleri çizildi.

Çizelge 3.1. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde Kurşun'un IC_{50} değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Saf su (µl)	**Tampon Glisin/NaOH pH=9,9 (µl)**	**Sorbitol (µl)**	**NAD^+ (µl)**	**İnhibitör Hacmi (µl)**	**Küvetteki Tampon Konsantrasyonu (mM)**	**Enzim (µl)**	**Küvetteki Sorbitol Konsantrasyonu (mM)**	**Küvetteki NAD^+ Konsantrasyonu (µM)**	**Küvetteki İnhibitör Konsantrasyonu (mM)**	**Toplam Hacim (ml)**
530	250	100	100	0	50	20	10	470	0	1
525	250	100	100	5	50	20	10	470	0,005	1
520	250	100	100	10	50	20	10	470	0,01	1
515	250	100	100	15	50	20	10	470	0,015	1
510	250	100	100	20	50	20	10	470	0,02	1
500	250	100	100	30	50	20	10	470	0,03	1

Çizelge 3.2. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerindeKadmiyum'un IC_{50} değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları.

af su (µl)	Tampon Glisin/NaOH pH=9,9 (µl)	Sorbitol (µl)	NAD+ (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki Tampon Konsantrasyonu (mM)	Enzim (µl)	Küvetteki Sorbitol Konsantrasyonu (mM)	Küvetteki NAD+ Konsantrasyonu (µM)	Küvetteki İnhibitör Konsantrasyonu (mM)	ToplamHacim (ml)
530	250	100	100	0	50	20	10	470	0	1
525	250	100	100	5	50	20	10	470	0,0005	1
510	250	100	100	20	50	20	10	470	0,002	1
460	250	100	100	70	50	20	10	470	0,007	1
430	250	100	100	100	50	20	10	470	0,01	1
405	250	100	100	125	50	20	10	470	0,0125	1

Çizelge 3.3. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerindeNikel'inIC_{50} değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Saf su(µl)	Tampon Glisin/NaOH pH=9,9(µl)	Sorbitol(µl)	NAD^+(µl)	İnhibitörHacmi(µl)	Küvetteki Tampon Konsantrasyon(mM)	Enzim(µl)	Küvetteki Sorbitol Konsantrasyonu (mM)	Küvetteki NAD^+ Konsantrasyonu (µM)	Küvetteki İnhibitör Konsantrasyonu (mM)	Toplam Hacim (ml)
530	250	100	100	0	50	20	10	470	0	1
480	250	100	100	50	50	20	10	470	5	1
330	250	100	100	200	50	20	10	470	20	1
175	250	100	100	355	50	20	10	470	35,5	1
165	250	100	100	365	50	20	10	470	36,5	1
30	250	100	100	500	50	20	10	470	50	1

Çizelge 3.4. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerindeGümüş'ün IC_{50} değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Saf su(µl)	Tampon Glisin/NaOH pH=9,9(µl)	Sorbitol(µl)	NAD^+(µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki Tampon Konsantrasyonu (mM)	Enzim (µl)	Küvetteki Sorbitol Konsantrasyonu (mM)	Küvetteki NAD^+ Konsantrasyonu (mM)	Küvetteki İnhibitör Konsantrasyonu (mM)	Toplam Hacim (ml)
530	250	100	100	0	50	20	10	470	0	1
520	250	100	100	10	50	20	10	470	0,01	1
515	250	100	100	15	50	20	10	470	0,015	1
510	250	100	100	20	50	20	10	470	0,02	1
500	250	100	100	30	50	20	10	470	0,03	1
480	250	100	100	50	50	20	10	470	0,05	1

Çizelge 3.5. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerindeCiva'nın IC_{50} değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Saf su (µl)	Tampon Glisin/NaOH pH=9,9 (µl)	Sorbitol (µl)	NAD^+ (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki tampon Konsantrasyonu (mM)	Enzim (µl)	Küvetteki Sorbitol Konsantrasyonu (mM)	Küvetteki NAD^+ Konsantrasyonu (µM)	Küvetteki İnhibitör Konsantrasyonu (mM)	Toplam Hacim (ml)
530	250	100	100	0	50	20	10	470	0	1
525	250	100	100	5	50	20	10	470	0,005	1
520	250	100	100	10	50	20	10	470	0,01	1
515	250	100	100	15	50	20	10	470	0,015	1
510	250	100	100	20	50	20	10	470	0,02	1
500	250	100	100	30	50	20	10	470	0,03	1

Çizelge 3.6. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde Çinko'nun IC_{50} değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Saf su(µl)	Tampon Glisin/NaOH pH=9,9(µl)	Sorbitol(µl)	NAD^+ (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki tampon Konsantrasyonu (mM)	Enzim(µl)	Küvetteki Sorbitol Konsantrasyonu (mM)	Küvetteki NAD^+ Konsantrasyonu(µM)	Küvetteki İnhibitör Konsantrasyonu	ToplamHacim (ml)
530	250	100	100	0	50	20	10	470	0	1
510	250	100	100	20	50	20	10	470	2	1
480	250	100	100	50	50	20	10	470	5	1
470	250	100	100	60	50	20	10	470	6	1
450	250	100	100	80	50	20	10	470	8	1
430	250	100	100	100	50	20	10	470	10	1

Çizelge 3.7. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde Kurşun'nun K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Saf su (µl)	Tampon Glisin/NaOH pH=9,9(µl)	Sorbitol (µl)	NAD^+ (µl)	Enzim (µl)	İnhibitör hacmi (µl)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Küvetteki sorbitol konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
625	250	5	100	20	-	-	0,5	1
615	250	15	100	20	-	-	1,5	1
605	250	25	100	20	-	-	2,5	1
595	250	35	100	20	-	-	3,5	1
585	250	45	100	20	-	-	4,5	1
620	250	5	100	20	5	0.005	0,5	1
610	250	15	100	20	5	0,005	1,5	1
600	250	25	100	20	5	0,005	2,5	1
590	250	35	100	20	5	0,005	3,5	1
580	250	45	100	20	5	0,005	4,5	1
615	250	5	100	20	10	0,01	0,5	1
605	250	15	100	20	10	0,01	1,5	1

Çizelge 3.7 (Devam)

595	250	25	100	20	10	0,01	2,5	1
585	250	35	100	20	10	0,01	3,5	1
575	250	45	100	20	10	0,01	4,5	1
610	250	5	100	20	15	0,015	0,5	1
600	250	15	100	20	15	0,015	1,5	1
590	250	25	100	20	15	0,015	2,5	1
580	250	35	100	20	15	0,015	3,5	1
570	250	45	100	20	15	0,015	4,5	1

Çizelge 3.8. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde Çinko'nun K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Saf su (µl)	**Tampon Glisin/NaOH pH=9,9 (µl)**	**Sorbitol (µl)**	**NAD^+ (µl)**	**Enzim (µl)**	**İnhibitör hacmi (µl)**	**Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)**	**Küvetteki sorbitol konsantrasyonu (mM)**	**Toplam hacim (ml)**
625	250	5	100	20	-	-	0,5	1
615	250	15	100	20	-	-	1,5	1
605	250	25	100	20	-	-	2,5	1
595	250	35	100	20	-	-	3,5	1
585	250	45	100	20	-	-	4,5	1
605	250	5	100	20	20	2	0,5	1
595	250	15	100	20	20	2	1,5	1
585	250	25	100	20	20	2	2,5	1
575	250	35	100	20	20	2	3,5	1
565	250	45	100	20	20	2	4,5	1
565	250	5	100	20	60	6	0,5	1
555	250	15	100	20	60	6	1,5	1
545	250	25	100	20	60	6	2,5	1
535	250	35	100	20	60	6	3,5	1
525	250	45	100	20	60	6	4,5	1
525	250	5	100	20	100	10	0,5	1
515	250	15	100	20	100	10	1,5	1
505	250	25	100	20	100	10	2,5	1
495	250	35	100	20	100	10	3,5	1
485	250	45	100	20	100	10	4,5	1

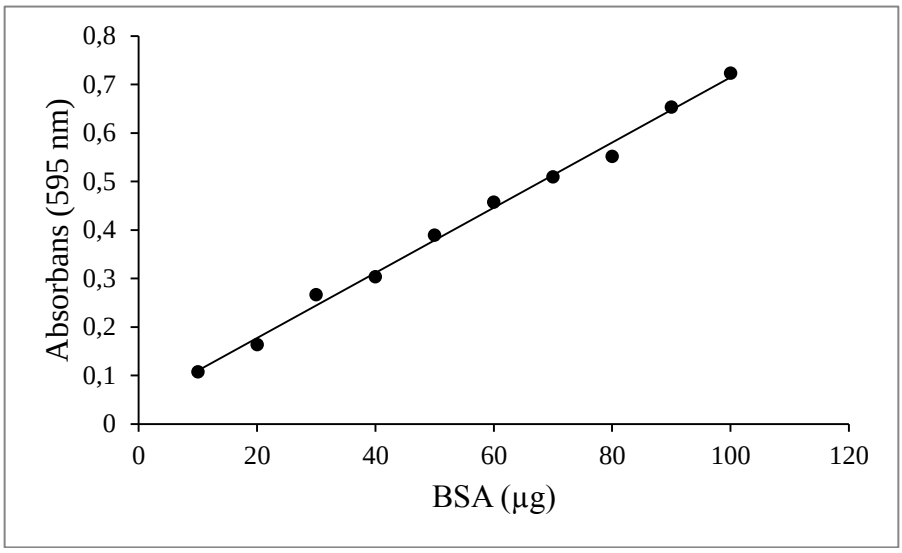
Çizelge 3.9. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde Cıva'nın K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Saf su (µl)	**Tampon Glisin/NaOH pH=9,9(µl)**	**Sorbitol (µl)**	**NAD^+ (µl)**	**Enzim (µl)**	**İnhibitör hacmi (µl)**	**Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)**	**Küvetteki sorbitol konsantrasyonu (mM)**	**Toplam hacim (ml)**
625	250	5	100	20	-	-	0,5	1
615	250	15	100	20	-	-	1,5	1
605	250	25	100	20	-	-	2,5	1
595	250	35	100	20	-	-	3,5	1
585	250	45	100	20	-	-	4,5	1
620	250	5	100	20	5	0,5	0,5	1
610	250	15	100	20	5	0,5	1,5	1
600	250	25	100	20	5	0,5	2,5	1
590	250	35	100	20	5	0,5	3,5	1
580	250	45	100	20	5	0,5	4,5	1
610	250	5	100	20	15	1,5	0,5	1
600	250	15	100	20	15	1,5	1,5	1
590	250	25	100	20	15	1,5	2,5	1
580	250	35	100	20	15	1,5	3,5	1
570	250	45	100	20	15	1,5	4,5	1
595	250	5	100	20	30	3	0,5	1
585	250	15	100	20	30	3	1,5	1
575	250	25	100	20	30	3	2,5	1
565	250	35	100	20	30	3	3,5	1
555	250	45	100	20	30	3	4,5	1

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

Deneysel çalışmalar sonucu elde ettiğimiz enzim çözeltisindeki kantitatif protein miktarı Bradford yöntemi ile belirlendi. Standart grafik hazırlandı. Ham homojenat, amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-Sephadex ve iyon değişim kromatografisi sonucu elde edilen enzim çözeltilerindeki kantitatif protein tayini bu standart grafikten faydalanılarak bulundu. Standart çözeltilerin µg proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 4.1'de gösterildi.



Şekil 4.1. Bradford yöntemiyle proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart grafik

4.2. Tavuk Karaciğeri Sorbitol Dehidrogenaz Enziminin Saflaştırma Sonuçları

4.2.1. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enziminin DEAE-Sephadex iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılması sonuçları

Enzim amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz işeminden sonra, anyon değiştirici DEAE-Sephadex iyon değişim reçinesi ile elüe edildi. Elüat çözeltileri ve kolona tatbik edilen numune için Bradford metoduyla kantitatif protein tayini ve aktivite tayinleri yapılarak spesifik aktiviteler hesaplandı, saflaştırma oranları belirlendi, bu oranlar Çizelge.4.1. de verildi.

4.2.2. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enziminin jel filtrasyon (sephadex G-100)kromatografisi ile saflaştırma sonuçları.

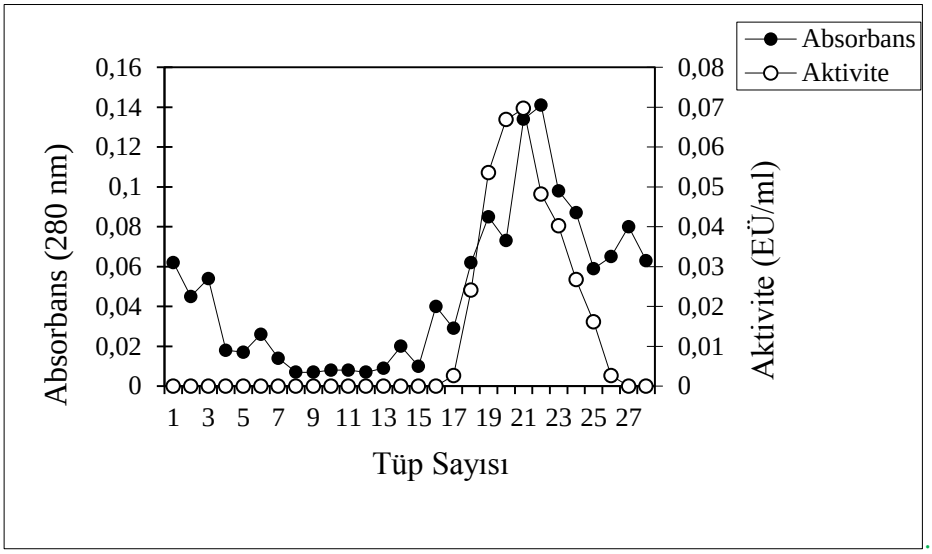
Amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz sonrası ve DEAE Sephadex iyon değişim kromotografisisonrası enzim jel filtrasyon kolonuna tatbik edildi. Elüat çözeltileri ve kolona tatbik edilen numune için Bradford metoduyla kantitatif protein tayini ve aktivite tayinleri yapılarak spesifik aktiviteler hesaplandı, saflaştırma oranları belirlendi, bu oranlar Çizelge 4.1’de verildi.

Çizelge 4.1. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enziminin saflaştırma basamakları

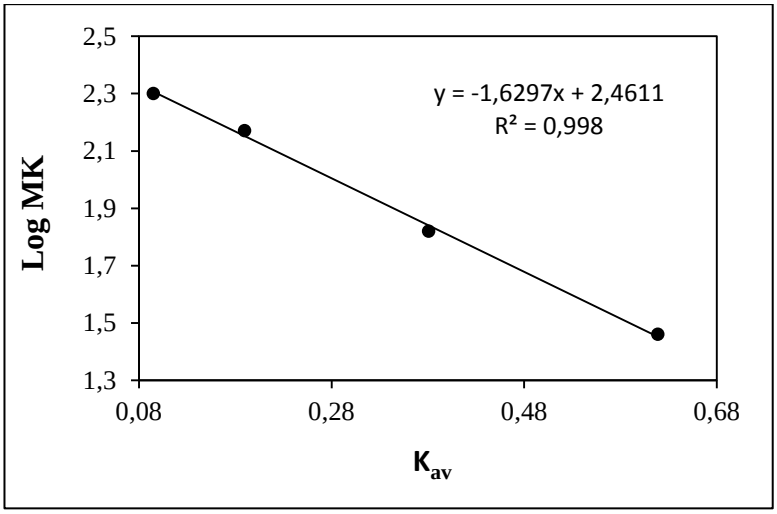
Saflaştırma basamakları	Aktivite (EÜ/ml)	Toplam hacim(ml)	Protein (mgprotein/ml)	Toplam protein(mg)	Toplam aktivite(EÜ)	Spesifik aktivite (EÜ/mg protein)	Saflaştırma katsayısı	Verim %
Homojenat	0,468	29	39,5	1145,5	13,572	0,0118	1	100
$(NH_4)_2SO_4$ çöktürmesi ve diyaliz	0,571	8,5	29,6	251,6	4,85	0,0193	1,64	35,7
DEAE-Sephadex A-50	0,300	14	0,372	5,208	4,2	0,806	68,3	30,98
Jel Filtrasyon (Sephadex G-100)	0,198	2,5	0,063	0,157	0,495	3,152	266,95	3,65

4.2.3. Tavuk karaciğeri sdh enziminin aktif formunun molekül kütlesinin sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi ile belirlenmesine ait sonuçları

Tavuk karaciğeri SDH enziminin aktif formunun molekül kütlesi jel filtrasyon kromatografisi yöntemi ile belirlendi. Bu işlem esnasında; kolonun void hacmini belirlemek için kolondan önceBlue dextran (2000 kDa) proteini geçirildi. Daha sonra β-amilaz (200 kDa), alkol dehidrogenaz (150 kDa), albumin (66 kDa) ve karbonik anhidraz (29 kDa) standart proteinleri sırasıyla kolona uygulandı. Her proteinin elüsyon hacmi 280 nm'de köre karşı absorbans okunarak belirlendi (Şekil 4.2.)Daha sonra log MK-K_{av} grafiği çizilerek, SDH enziminin aktif formunun molekül kütlesi tespit edildi (Şekil 4.3).



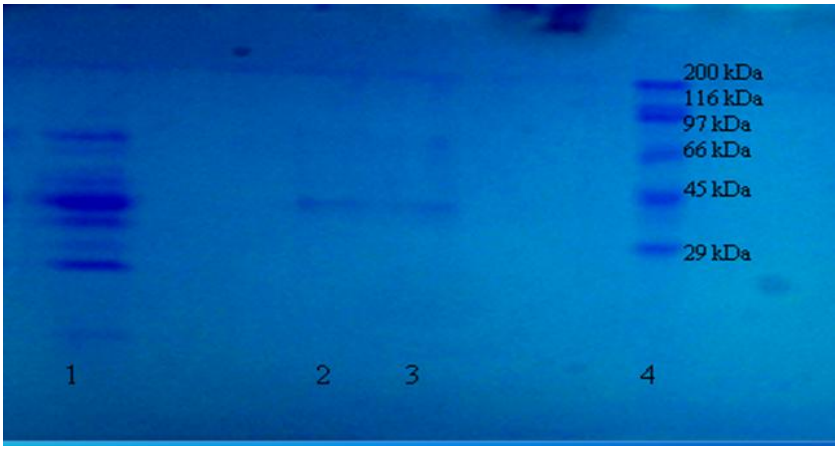
Şekil 4.2. Tavuk karaciğeri SDH enziminin aktif formunun molekül kütlesinin tayini için kullanılan jel filtrasyon kromatografisi grafiği



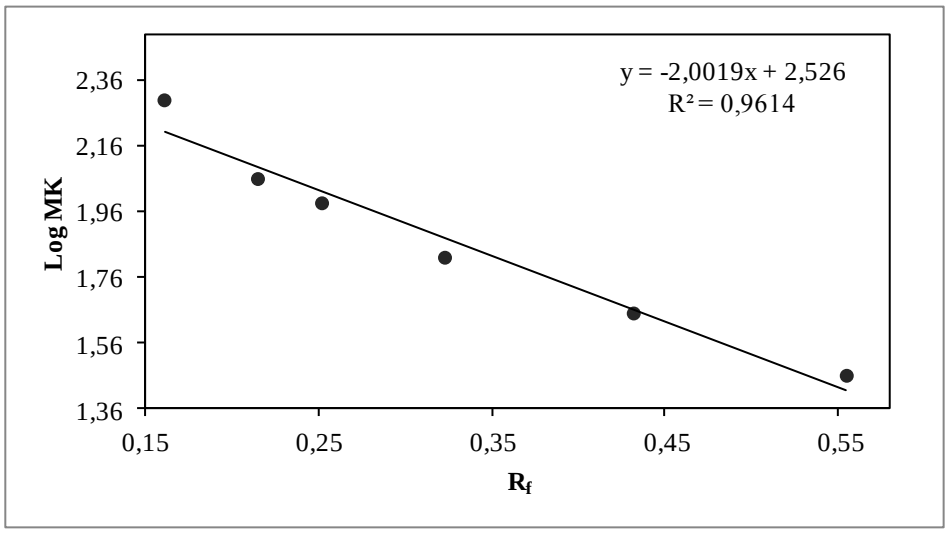
Şekil 4.3. Tavuk karaciğeri SDH enziminin aktif formunun molekül kütlesi tayini için Sephadex G-100 kolon materyali kullanılarak yapılan jel filtrasyon kromatografisi sonucu elde edilen standart grafik (SDH için Kav=0,1428)

4.3. Tavuk Karaciğeri Sorbitol Dehidrogenaz Enziminin SDS-PAGE ile Saflık Kontrolü

Tavuk karaciğerinden elde edilen sorbitol dehidrogenaz enzimi numunelerinin, homojenat, amonyum sülfat çökeleği, DEAE-Sephadex iyon değişimve jelfiltrasyon kromatografisinden elde edilen elüatlardaki enzimlerin saflığını kontrol etmek için kesikli SDS-PAGE yöntemi kullanıldı. Bu amaçla elektroforez sistemi kurularak enzim numuneleri sırayla kuyulara uygulandı ve yürütüldü. Elde edilen bantları gösteren fotoğraf aşağıdaki şekildegösterildi. Tavukkaraciğerinden saflaştırılan sorbitol dehidrogenaz enziminin molekül kütlesi log MK-R_f grafiği çizilerek bu grafikten hesaplandı.



Şekil 4.4. Saflaştırma sonucu elde edilen SDS-PAGE fotoğrafı
(4.standart proteinler: domuz myosin (200 kDa), E.colimy β-galaktosidaz (116 kDa), fosforilaz (97,4 kDa), sığır serum albumini (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), sığır eritrosit karbonik anhidrazı (29 kDa) 1.DEAE-sephadex,2 ve 3.sephadex G-100)



Şekil 4.5. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yöntemiyle tavuk karaciğeri SDH enziminin molekül kütlesi tayininde kullanılan standart grafik
(SDH için R_f=0,454)

4.4. Tavuk Karaciğeri Sorbitol Dehidrogenaz Enziminin Optimum pH Çalışmalarına Ait Bulgular

Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi için optimum pH çalışması bölüm 3,2,4'de anlatıldığı şekilde, pH5,0-8,0 aralığında 0,2 M potasyum fosfat, pH 7,5-9,0 0,2 M Tris/HCl tamponu ve pH 9,0-10,5 0,2 M Glisin/NaOH tampon çözeltileri kullanılarak gerçekleştirildi. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi için optimum pH, 0,2 M Glisin/NaOH pH=9,0 tamponu olarak belirlendi.

Çizelge 4.2. 0,2 M Tris/HCltamponunun farklı pH'larda tavuk karaciğeri sorbitoldehidrogenaz enzimi aktivitesine etkisi

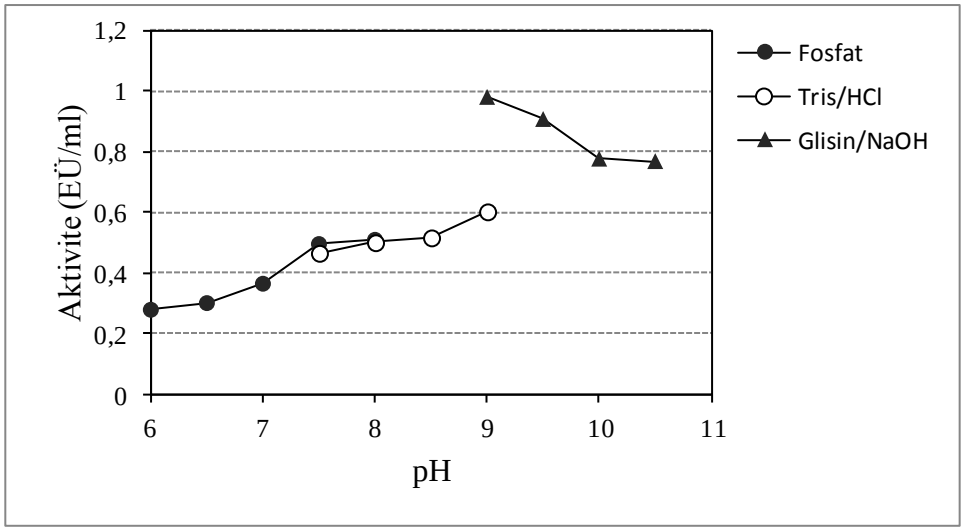
pH	Aktivite(EÜ/ml)
7,5	0.466
8,0	0.495
8,5	0.509
9,0	0.603

Çizelge 4.3. 0,2 M Glisin/NaOH tamponunun farklı pH larda tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi aktivitesine etkisi

pH	**Aktivite(Eü/ml)**
9,0	0.981
9,5	0.908
10,0	0.780
10,5	0.771

Çizelge 4.4. 0,2 M potasyum fosfat tamponunun farklı pH'larda tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi aktivitesine etkisi

pH	**Aktivite (EÜ/ml)**
5,0	0.385
5,5	0.458
6,0	0.281
6,5	0.297
7,0	0.362
7,5	0.490
8,0	0.506



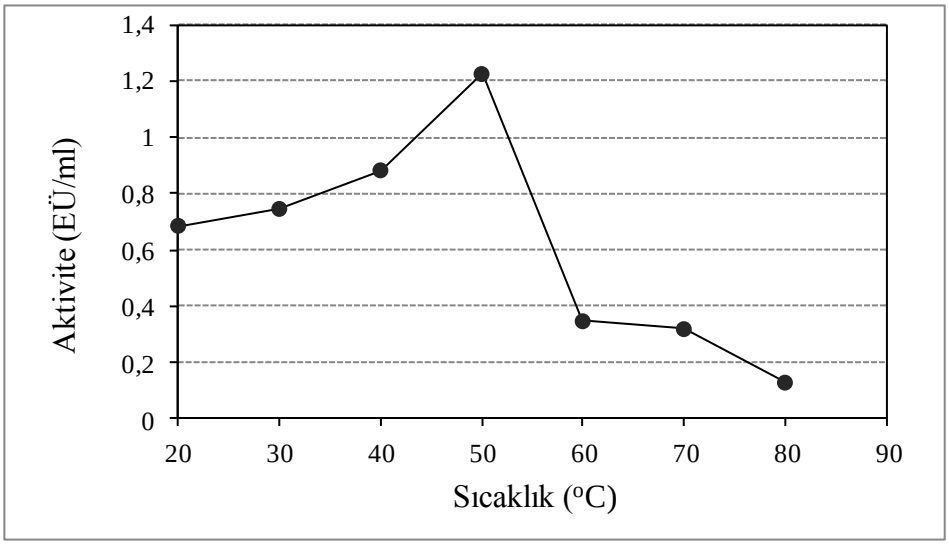
Şekil 4.6. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi için Optimum pH grafiği

4.4. Tavuk Karaciğeri Sorbitol Dehidrogenaz Enziminin Optimum Sıcaklık Çalışmalarına Ait Bulgular

Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla dijital su banyosu kullanılarak 20°C ile 80°C arasında 10°C sıcaklık farkı oluşturularak, enzimin optimum pH'sında spektrofotometrik ölçümler gerçekleştirildi. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi için optimum sıcaklık 50°C olak belirlendi(Şekil 4.7, Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi için Optimum sıcaklık belirleme sonuçları

Sıcaklık ^{o}C	**Aktivite(EÜ/ml)**
30	0,745
40	0,882
50	1,224
60	0,346
70	0,318
80	0,128



Şekil 4.7. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enziminin optimum sıcaklık grafiği

4.5. Tavuk Karaciğeri Sorbitol Dehidrogenaz Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Ağırmetallerin Etkilerine Ait Sonuçların Belirlenmesi

Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine ağır metallerin etkilerini incelemek amacı ile farklı konsantarsyonlarda farklı metal çözeltileri hazırlandı ve enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkileri incelendi. Enzim aktivitesini yarıya düşüren metal konsantrasyonlarını belirlemek için metallerin farklı konsantrasyonlarına karşı % aktivite grafikleri çizilerek IC_{50} değerleri belirlendi (Çizelge 4.6-4.11, Şekil 4.8-4.13).

Çizelge 4.6. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi aktivitesi üzerine farklı konsantrasyonlarda kurşuniyonunun etkisi

%Aktivite(Eü/ml)	**İnhibitör (mM)**
100	0,0
80,5	0,005
70,87	0,01
51,5	0,015
35,5	0,02
12,8	0,03

Çizelge 4.7. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi aktivitesi üzerine farklı konsantrasyonlarda Kadmiyum iyonunun etkisi

%Aktivite(Eü/ml)	**İnhibitör (mM)**
100	0,0
86,45	0,0005
72,9	0,002
53,6	0,007
34,84	0,01
19,03	0,0125

Çizelge 4.8. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi aktivitesi üzerine farklı konsantrasyonlarda Nikel iyonununetkisi

%Aktivite(Eü/ml)	**İnhibitör (mM)**
100	0,0
79,7	5,0
66,14	20,0
50,88	35,5
30,4	36,5
20,3	50,0

Çizelge 4.9. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi aktivitesi üzerine farklı konsantrasyonlarda Gümüş iyonunun etkisi

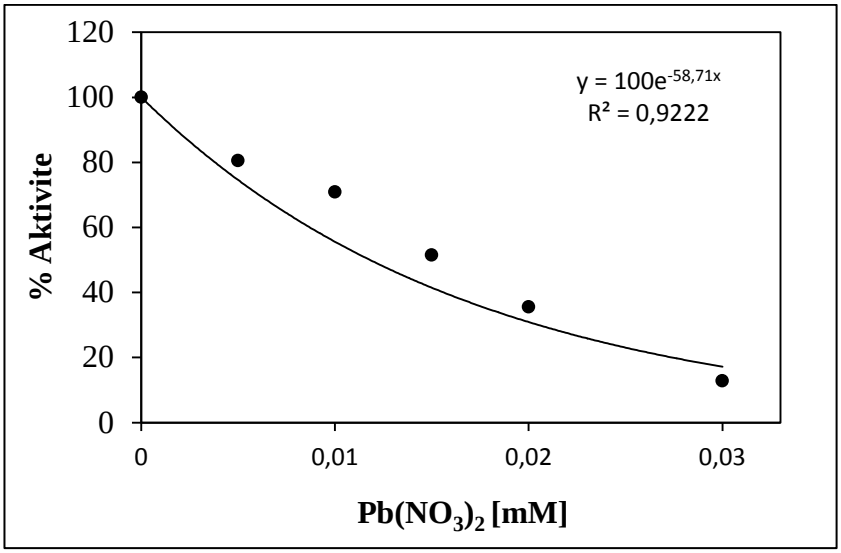
%Aktivite(Eü/ml)	**İnhibitör (mM)**
100	0,0
89,2	0,01
58,12	0,015
47,21	0,02
40,37	0,03
11,48	0,05

Çizelge 4.10. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi aktivitesi üzerine farklı konsantrasyonlarda Civa iyonunun etkisi

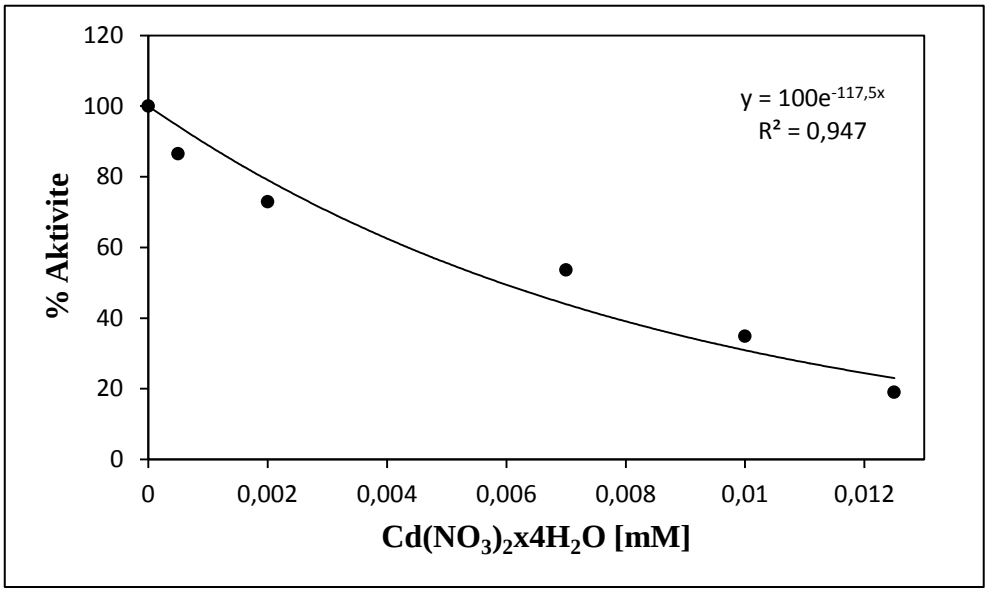
%Aktivite(Eü/ml)	**İnhibitör (mM)**
100	0,0
79,9	0,005
59,6	0,01
41,9	0,015
33,87	0,02
22,1	0,03

Çizelge 4.11. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi aktivitesi üzerine farklı konsantrasyonlarda Çinko iyonunun etkisi

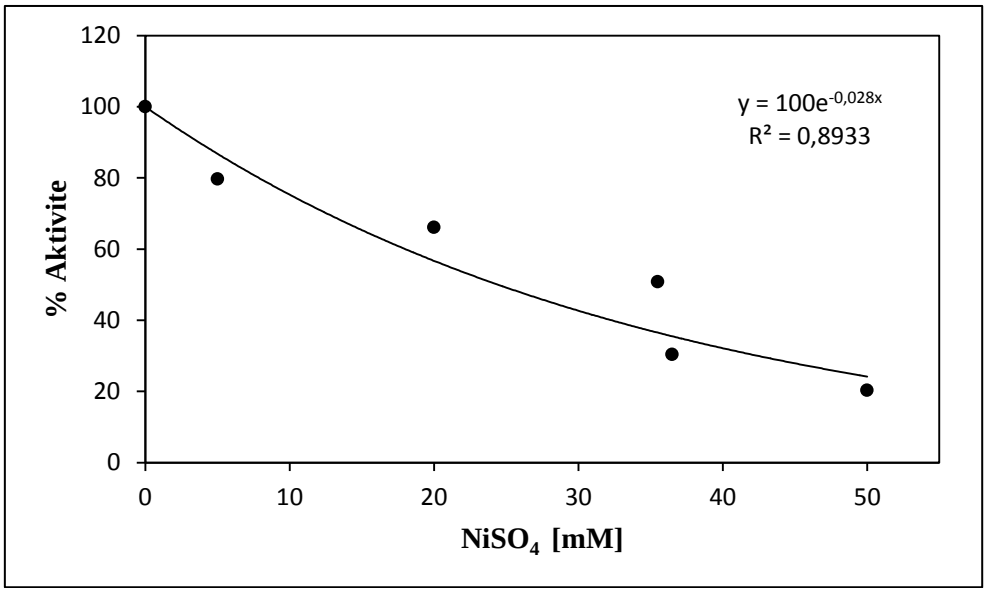
%Aktivite(Eü/ml)	**İnhibitör (mM)**
100	0,0
69,5	2,0
64,43	5,0
49,5	6,0
46,4	8,0
39,2	10,0



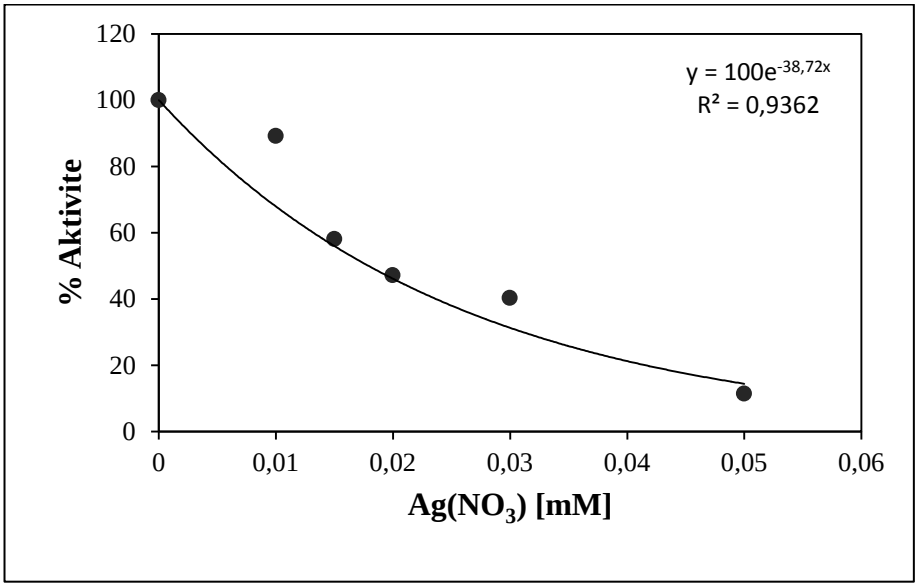
Şekil 4.8. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz aktivitesi üzerine 5 farklı Pb^{+2} konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite-[Pb^{+2}] grafiği



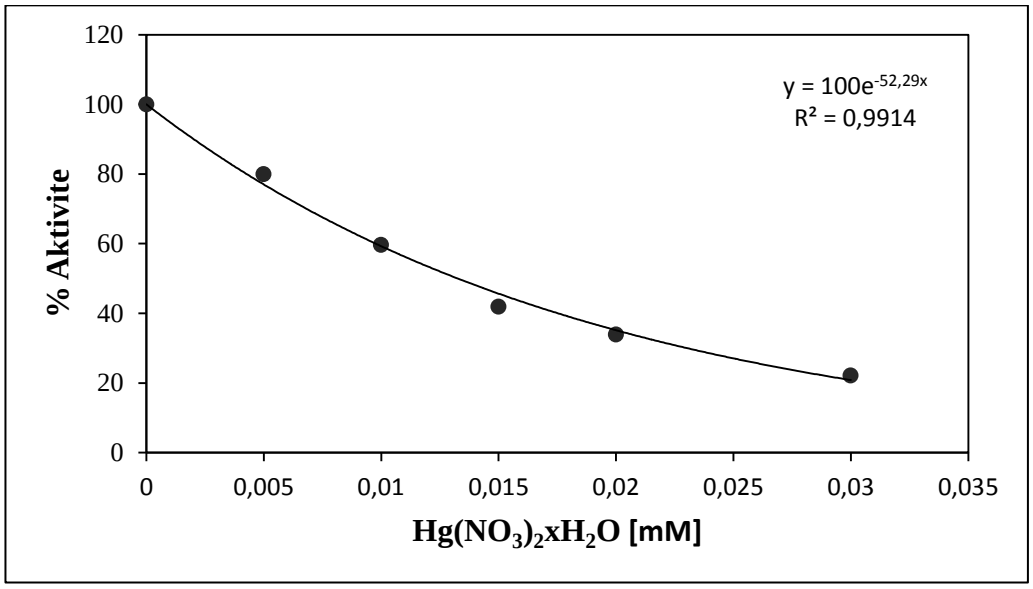
Şekil 4.9. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz aktivitesi üzerine 5 farklı Cd^{+2} konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite-[Cd^{+2}] grafiği



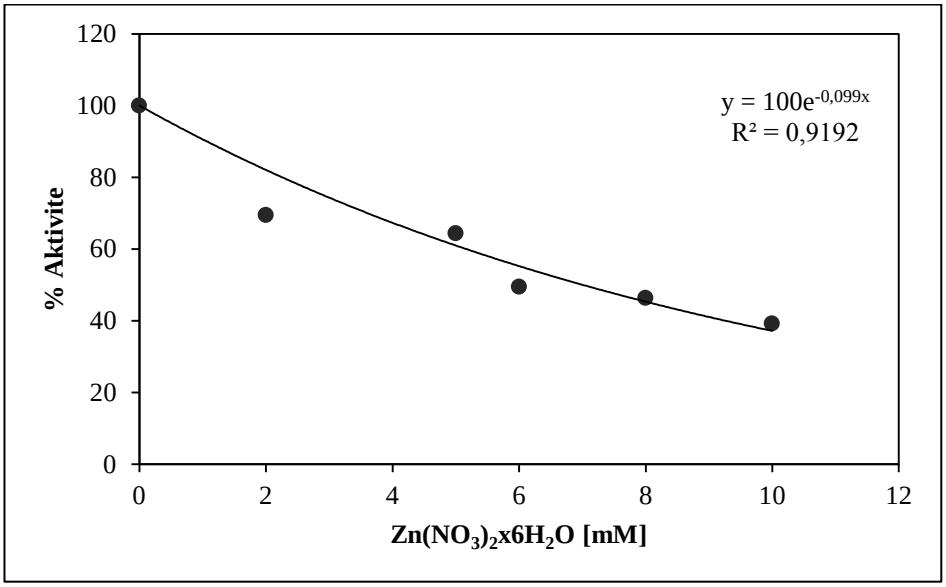
Şekil 4.10. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz aktivitesi üzerine 5 farklı Ni^{+2} konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite-[Ni^{+2}] grafiği



Şekil 4.11. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz aktivitesi üzerine 5 farklı Ag^{+}konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite-[Ag^{+}] grafiği



Şekil 4.12. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz aktivitesi üzerine 5 farklı Hg^{+2} konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite-[Hg^{+2}] grafiği



Şekil 4.13. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz aktivitesi üzerine 5 farklı Zn^{+2} konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite-[Zn^{+2}] grafiği

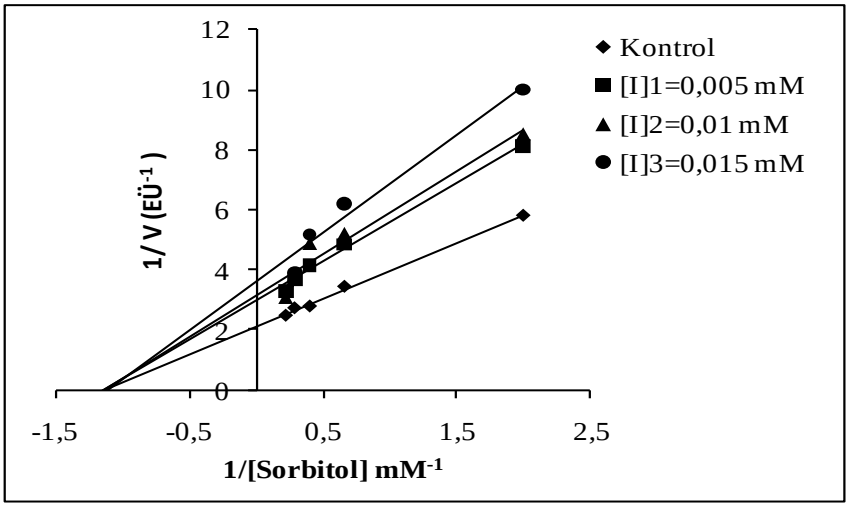
Çizelge 4.12. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine metal iyonları ile yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen IC_{50}değerleri

Ağırmetaller	**IC_{50} (mM)**
$Cd(NO_3)_2x4H_2O$	0,006
$Pb(NO_3)_2$	0,012
$Hg(NO_3)_2xH_2O$	0,013
$Ag(NO_3)$	0,018
$Zn(NO_3)_2x6H_2O$	7,07
$NiSO_4$	35

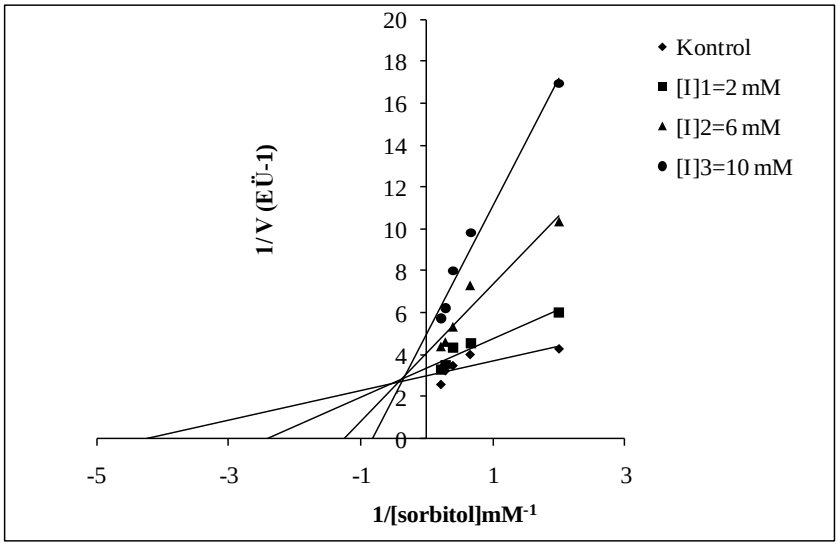
4.6. Tavuk Karaciğeri Sorbitol Dehidrogenaz Enzimi Üzerine İnhibitör Etkisi Gösteren Bazı ağırmetaller İçin K_i Değerlerinin Belirlenmesine Ait Çalışmaların Sonuçları

Tavuk karaciğeri SDH enzimi aktivitesi üzerine önemli oranda inhibisyon etkisi gösteren $Pb(NO_3)_2$, $Hg(NO_3)_2xH_2O$, $Zn(NO_3)_2x6H_2O$ metallerinin K_i değerlerini

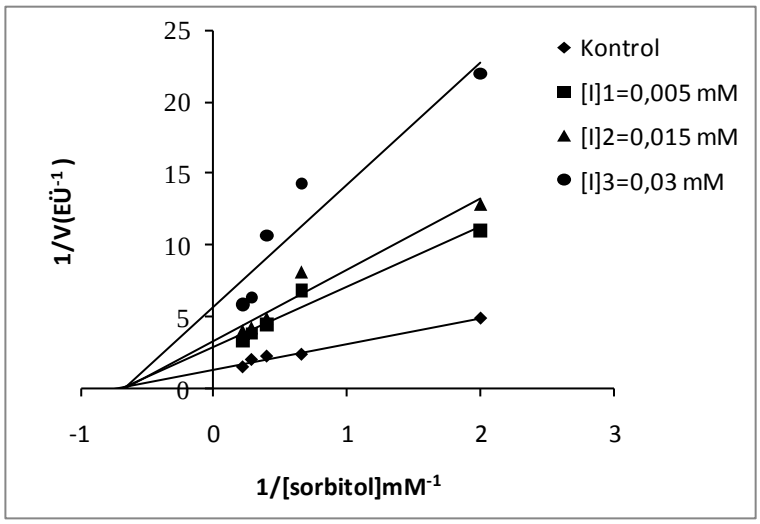
belirlemek için sabit 3 uygun metal iyonu konsantrasyonu ve 5 farklı substrat konsantrasyonunda aktivite değerleri ölçüldü. Elde edilen bu değerlerden lineweaver-burk grafikleri çizildi ve K_i değerleri hesaplandı.



Şekil 4.14. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz aktivitesi üzerine kurşun iyonunun etkisi



Şekil 4.15. Tavuk karaciğeri SDH enzimi üzerine çinkoiyonunun etkisi



Şekil 4.16. Tavuk karaciğeri SDH enzimi üzerine civa iyonunun etkisi

Çizelge 4.13. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi için bulunan K_i değerleri ve inhibisyon tipleri

	IC_{50} (mM)	**[I] (mM)**	**K_i (mM)**	**Ortalama K_i (mM)**		**İnhibisyon tipi**	
$Pb(NO_3)_2$	0,006	0,005	0,0124	0,18033±0,04879		Yarışmasız	
		0,01	0.0209				
		0,015	0,0208				
$Hg(NO_3)_2xH_2O$	0,013	0,005	0,0038	0,07033±0,00287		Yarışmasız	
		0,015	0,0093				
		0,03	0,008				
	IC_{50} (mM)	**[I] (mM)**	**K_i (mM)**	**Ortalama K_i**	**K_i' (mM)**	**Ortalama K_i'**	**İnhibisyon tipi**
$Zn(NO_3)_2x6H_2O$	7,07	2	2,079	2,112±0,037	16,66	16,013±1,043	Karışık tip
		6	2,152		16,57		
		10	2,105		14,81		

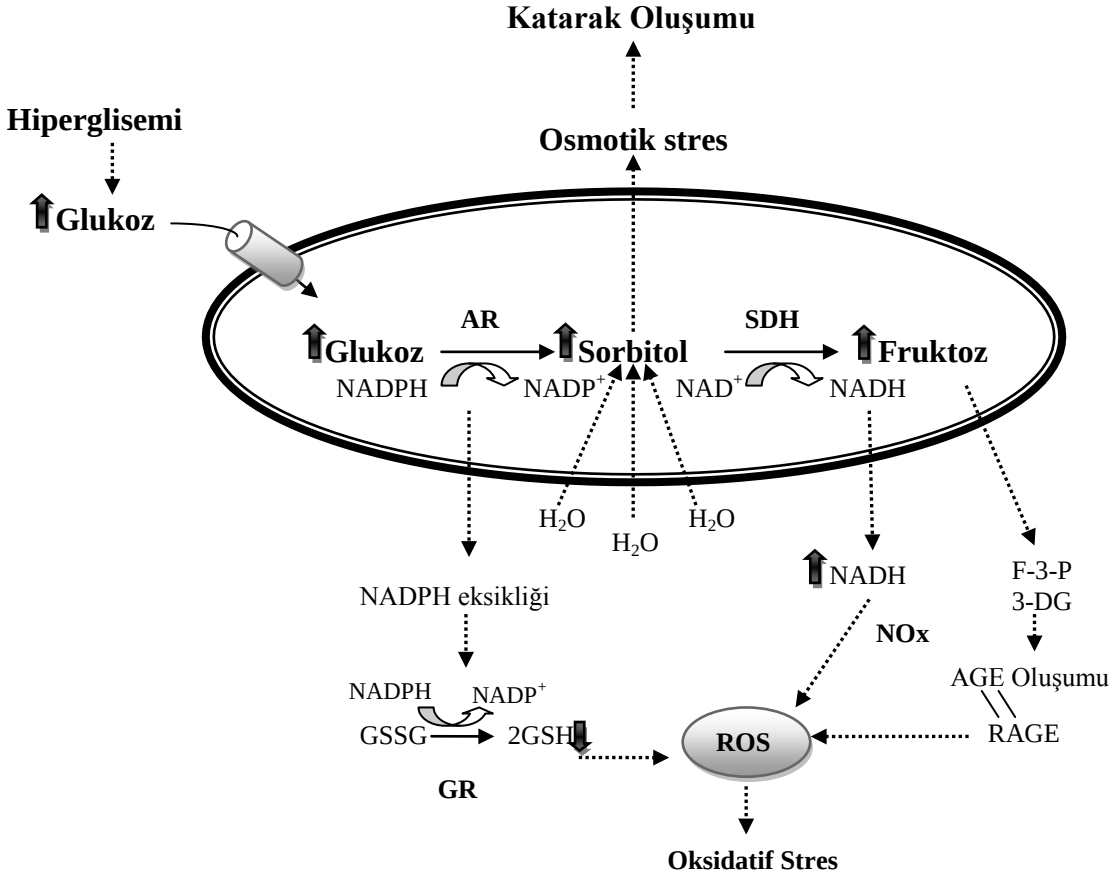
5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Poliol yolu, glukozu sorbitole dönüştüren aldoz redüktaz ve sorbitolü fruktoza dönüştüren sorbitol dehidrogenaz enzimlerini içeren ve hiperglisemi durumunda aktifleşerek retinopati, nöropati, nefropati, ateroskleroz gibi diabetik komplikasyonların gelişiminde rol oynayan önemli bir metabolik yoldur (Kinoshita and Nishimura 1988; The Diabetes Control and Complication Trials Group 1993).

Sorbitol yolu lens, beyin, sinirler, eritrosit, böbrek, karaciğer, pankreas adacıkları, aorta ve kapiller damarlarda etkindir. Bu dokular hücreye glukoz girişi yönünden ortak özelliğe sahiptirler; glukoz bu dokulardaki hücrelere insülinden bağımsız olarak girebilmekte, hücre içi glukoz konsantrasyonu doğrudan doğruya kan glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak değişmektedir.

Diyabet, günümüzde çok sık görülen bir metabolik hastalıktır. Dünyada 180 milyondan fazla insanı etkileyen diyabet, Türkiye'de ve dünyada ölüm nedenleri arasında üçüncü sırayı alan önemli bir sağlık sorunudur. Hiperglisemi poliol yolu gibi bazı metabolik yolların aktivitesini artırır. Bu metabolik yolların aktivasyonu sonucu oluşan oksidatif stres endotel fonksiyon bozukluklarına yol açmakta ve bunun sonucunda pek çok vasküler komplikasyon oluşmaktadır. (UKPDS Research Group 1998; Temelkova-Kurktschiev *et al.* 2000). Lens, retina, beyin, sinirler, eritrosit, böbrek, karaciğer, pankreas adacıkları, aort, kapiller damarlarda hücrelere glukoz girişi için insüline gerek olmadığından, kontrol edilmemiş diabet gibi hiperglisemi durumlarında büyük miktarlarda glukoz bu hücrelerin içine girebilir. Artmış glukoz konsantrasyonu ve yeterli NADPH varlığında, aldoz redüktaz fazla miktarda sorbitol sentezlenmesine neden olur. Sorbitol glukoz gibi membranları kolayca geçemez ve hücre içinde hapsolur. Sorbitol dehidrogenaz enziminin yok olduğu veya az olduğu retina, böbrek ve sinir hücrelerinde bu artış çoktur. Sonuçta sorbitol bu hücrelerde birikir, su çekerek hücre şişmesine neden olur. Diabette görülen katarakt oluşumu, nöropati, nefropati ve

retinopatiye yol açan damarsal sorunlar bu duruma bağlanabilir (Champe and Harvey 1997).



Şekil 5.1. Oksidatif stres ve sorbitol yolu arasındaki ilişki (Alım ve Beydemir 2012)

Hiperglisemi durumunda aktivitesi artan poliol yolu ile kornea, böbrek, kalp gibi çeşitli dokularda ortaya çıkan diabetik komplikasyonlar arasındaki ilişkiyi açıklamak için araştırmacılar, bu yolun enzimleri olan aldoz redüktaz ve sorbitol dehidrogenaz enzimleri üzerinde çok sayıda çalışma yapmışlar ve bazı araştırmacılar bu enzimlerin gen polimorfizmleri ile diabetik komplikasyonlar arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır (Maekawa *et al.* 2001; Szaflik *et al.* 2008).

Bilindiği üzere enzimlerin saflaştırılması işlemi pek de kolay olmayan bir süreçtir. Protein yapısındaki makromoleküller olarak bilinen enzimler şartların varyasyonlarına göre oldukça hassastırlar. Dolayısıyla enzimlerin aktviteleri üzerine pek çok parametre etkin olabilmektedir. Bunlar genel olarak: pH, sıcaklık, enzim ve substrat konsantrasyonları, iyonik şiddet, allosterik etkiler, hormonlar aktivatör ve inhibitörlerin varlığı şeklinde sıralanabilir.

Sorbitol dehidrogenaz enzimi birçok dokudan saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Sorbitol dehidrogenaz enzimini memeli dokularından saflaştırmak oldukça güç olmuştur. Bunun sebebi sorbitol dehidrogenazın kararsız bir enzim olması ve stabilitesinin olmamasıdır. Enzimin bu özelliği saflaştırma işleminin yapıldığı pek çok çalışmada gözlemlenmiştir (Smith 1962; Rehg and Torack 1977; O'Brien *et al.* 1982; Karacaoğlan and Özer 2005).

Enzimlerin, bazı bileşikler tarafından hem *invivo* hem de *invitro* olarak aktivitelerinin azaltılması ve hatta yok edilmesi olayına inhibisyon adı verilir. Buna sebep olan bileşiklere de inhibitör denilir. İnhibitörler, genellikle küçük molekül kütlesine sahip bileşik veya iyonlardır.

Enzimatik aktivitenin inhibisyonu, biyolojik sistemlerde başlı başına bir kontrol mekanizması oluşturur. Bu yüzden enzim inhibisyonu büyük bir önem arzetmektedir. Birçok ilaç ve zehirli bileşik fonksiyonlarını bu yolla gerçekleştirirler. Enzim etki mekanizmalarının incelenmesi çalışmalarında da inhibisyon olayından faydalanılır (Keha ve Küfrevioğlu 2005).

Ağır metaller yer kabuğunda doğal olarak bulunurlar. Bozulmaz ve yok edilemezler. Küçük bir miktara kadar vücudumuza gıdalar, içme suyu ve hava yolu ile girerler. İz elementler gibi bazı ağır metaller (örneğin bakır, selenyum, çinko) insan vücudunun

metabolizmasını sürdürmek için gereklidirler. Bununla birlikte yüksek konsantrasyonlarda toksik olabilirler **(**Anonim 2012c**)**.

Ağır metaller biyobirikime neden oldukları için tehlikelidirler. Biyobirikim; zamanla biyolojik bir organizmada bir kimyasal konsantrasyonunun, kimyasalın doğadaki konsantrasyonuyla karşılaştırıldığında artması demektir. Bileşikler herhangi bir zamanda canlı bünyesinde birikebilirler ve onların vücuda alınmalarıve depolanması, metabolize edilmelerinden veya atılmalarından daha hızlıdır.

Metallerin toksisitesi birkaç mekanizma ile ortaya çıkabilir;

• Enzimler gibi biyomoleküllerde gerekli fonksiyonel grupları bloke ederek
• Biyomoleküllerdeki gerekli metal iyonlarıyla yer değiştirerek
• Biyomoleküllerin, özellikle enzimlerin ve polinükleotidlerin, aktif konformasyonlarını modifiye ederek
• Biyomembranların bütünlüğünü bozarak

Çevremizde çeşitli şekillerde bulunan ağır metallerin kolay kolay bozulmaması ve yok edilememesi bu çalışmanın önemini ortaya koymaktadır. Çünkü havaya, toprağa, nehirlere ve denizlere karışan atıklar içerisinde bulunan veya bulunabilecek ağır metaller insanların en fazla tükettikleri et ürünleri gibi birçok besin maddesi vasıtasıyla vücudumuza girmekte ve atılamayarak biyobirikime sebep olmaktadır. Bunun sonuçları ise günümüzde tartışılmaz boyuttadır. Bu yüzden günümüzde özellikle ağır metallerin enzim aktiviteleri üzerine etkilerinin incelendiği çalışmalar oldukça önemlidir (Söyüt ve Beydemir 2008).

Çalışma öncesi ve çalışma esnasında yapılan literatür taramaları sonucunda açıkça görülmüştür ki; tavuk karaciğer dokusundan sorbitol dehidrogenaz enzimi 2005 yıında Karacaoğlan ve Özer tarafından saflaştırılmaya çalışılmıştır. Fakat enzimin stabil

olmaması ve aktivite kayıplarından dolayı saflaştırma işleminden vazgeçilmiştir (Karacaoğlan ve Özer 2005). Çalışmamızda tavuk karaciğeri dokusu kullanılarak SDH enziminin saflaştırılması Çizelge 4.1 ve Şekil 4.4'te görüldüğü şekilde başarılmıştır.

Yaptığımız çalışmada, tavuk karaciğeri SDH enzimi sadece üç basamakta saflaştırılmıştır. Saflaştırma işlemi amonyum sülfat çöktürmesi (35-60%) (Karacaoğlan ve Özer), DEAE Sephadex anyon değişim kromatografisi ve Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi yöntemleri ile gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemler kullanılarak SDH enzimi tavuk karaciğerinden 3,152 EÜ/mg spesifik aktivite, %3,65 verimle yaklaşık 267 kat saflaştırılmıştır. Bütün saflaştırma işlemleri sırasında sıcaklık +4°C'de tutulması gerektiğinden işlemler soğuk ortamda gerçekleştirilmiştir. Böylece sıcağın sebep olacağı enzim aktivitesindeki kaybın önüne geçilmiştir.

Amonyum sülfat çöktürmesi özellikle spesifik afinitesi bilinmeyen enzimler için uzun zamandan beri bilim adamları tarafından kullanılan kısmi saflaştırma yöntemidir. Bu yöntem yardımıyla numune içerisindeki birçok safsızlık uzaklaştırılmış olur ve proteinler daha derişik halde elde edilirler. Bu nedenle kromatografik işlemler öncesi amonyum sülfat çöktürmesi uygulanması enzimin derişikleştirilmesi açısından büyük öneme sahiptir (Ninfali *et al.* 1990). Bundan dolayı çalışmamızda tavuk karaciğeri SDH enzimi için %35-60 aralığında amonyum sülfat çöktürme işlemi yapıldı (Karacaoğlan ve Özer). Böylece homojenattaki birçok safsızlık uzaklaştırılarak enzimin derişik hale getirilmesi sağlandı. Amonyum sülfat çöktürmesi sonrası diyaliz işlemi gerçekleştirildi. Böylece düşük molekül kütleli maddeler ve tuzlar enzim çözeltisinden uzaklaştırıldı.

Tavuk karaciğerinden sorbitol dehidrogenaz enziminin saflaştırılması işlemlerinde DEAE Sephadex ve Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi yöntemleri birlikte kullanılmıştır. İyon değişim kromatografisi, proteinleri üzerlerinde taşıdıkları net yüklere göre ayıran kromatografi yöntemidir. Kolon pozitif (anyon değiştirici) veya negatif (katyon değiştirici) yüklü bağlayıcı gruplar içeren reçineyle doldurulur. Protein

karışımı düşük iyonik şiddetli bir tamponla kolon boyunca taşınır. Bu tamponun pH'sı hedef proteinin reçineye bağlanmasını teşvik edecek değere sahip olmalıdır. Eğer tampon pH'sı proteinin izoelektrik pH'sından daha küçük tutulursa proteinin yükü pozitif olur ve bir katyon değiştirici ile bağlanır. Bunun tersine tampon pH'sı proteinin izoelektrik pH'sından daha küçük tutulursa proteinin yükü negatif olur ve bir anyon değiştirici ile bağlanarak kolonda tutulur. Bağlanmayan proteinler, kolondan ilk olarak çıkarlar. İyonik gücü ya da pH'sı farklı bir tampon kolondan geçirilerek bağlı proteinlerin yükü değiştirilir ve kolondan ayrılması sağlanır. İyon değişim kromatografisinde proteinin yüksek tuz konsantrasyonu içerikli tamponlarda olması arzu edilmez. Bu nedenle çalışmamızda kromatografik işlemler sırasında oldukça düşük tuz konsantrasyon içerikli tampon çözeltiler kullanıldı (Alım 2010).

Çalışmamızda, SDH enziminin litaratürde belirtilen izoelektrik pH'sı (pI=7,3) (Lindstad and McKinley-Mckee 1996) ve stabil pH aralığı (pH 5,0-9,0) (Reiersen *et al.* 1992) göz önünde bulundurularak DEAE Sephadex kolonunda pH=7,9'da çalışıldı. pH 7,9'da SDH enzimi DEAE Sephadex kolonuna bağlanmadı ve kolonu dengelemekte kullanılan tampon çözelti ile elüe edildi. SDH enziminin pH=7,9'da DEAE Sephadex kolonuna bağlanmamasına sebep olarak, ortamda pH=7,9'da DEAE Sephadex kolonuna SDH proteininden daha kuvvetle bağlanan proteinlerin varlığı görüldü. Böylece sorbitol dehidrogenaz enzimi kolona bağlanan diğer proteinlerden ayrılmış oldu. İyon değişim kolonundan elde edilen ve SDH enzim aktivitesinin olduğu elüatlar Sephadex G 100 jel filtrasyon kolonuna yüklendi ve molekül büyüklüğü farklılığı esasına dayanılarak diğer proteinlerden ayrıldı. Enzim saflığı SDS-PAGE kullanılarak kontrol edildi. Jelde tek bandın gözlenmesi ile tavuk karaciğerinden elde edilen SDH enziminin saf olduğu ispatlandı (Şekil 4.4.) Enzimin düşük verimle saflaştırılmasının sebebi kolon kromatografisi çalışmalarımız sırasında enzimin çok hızlı bir şekilde aktivite kaybetmesidir.

Çalışmamızda tavuk karaciğerinden elde edilen SDH enziminin alt birim molekül kütlesinin belirlenmesinde SDS-PAGE metodu kullanıldı. Şekil 4.4'de verildiği gibi tavuk karaciğerinden elde edilen enzim numunesi ile birlikte standart protein numuneleri SDS-PAGE'de aynı zamanda yürütüldü. Log MK-R_f standart grafiği çizildi ve Şekil 4.5'de verildi. Daha sonra tavuk karaciğer dokusundan elde edilen enzim numunesinin R_f değeri hesaplanarak standart grafikten tavuk karaciğeri SDH enziminin alt birim molekül kütlesi hesaplandı. Tavuk karaciğeri SDH enziminin aktif formunun molekül kütlesinin belirlenmesi amacıyla da Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi yapıldı. Kolondan standart proteinler birer birer geçirildikten sonra log MK-K_{av} standart grafiği çizildi ve Şekil 4.3'da verildi. Daha sonra tavuk karaciğerinden elde edilen enzim numunesi kolondan geçirilerek K_{av} değeri belirlendi ve standart grafikten SDH enziminin aktif formunun molekül kütlesi belirlendi. Litaratürde çeşitli dokulardan izole edilen SDH enziminin homotetramerik bir enzim olduğu rapor edilmiştir (Lindstad and Mckinley-Mckee 1996; Alım ve Beydemir 2012). Çalışmamızda SDH enziminin alt birim molekül kütlesini 41,4 kDa, aktif formunun molekül kütlesini ise 169 kDa olarak belirledik (Şekil 4.3.). Bu sonuçlardan görüldüğü gibi çalışmamızda tavuk karaciğer SDH enzimi için hesapladığımız alt birim ve tabii molekül kütleleri ile litaratürde SDH enzimi için verilen mol kütleleri uygunluk göstermektedir.

Her enzim için birim zamanda substratını en fazla değişikliğe uğrattığı belirli bir sıcaklık vardır. Bu sıcaklığa o enzimin optimum sıcaklığı denir. Tavuk karaciğerinden saflaştırılan SDH enzim aktivitesinin optimum olduğu sıcaklık değerlerinin belirlenmesi amacıyla dijital su banyosu kullanılarak 20°C ile 80°C arasında 10°C sıcaklık farkı oluşturularak gerçekleştirildi ve tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi için optimum sıcaklık 50°C olarak belirlendi. Ayrıca tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi için optimum pH çalışması farklı pH'larda tampon çözeltiler kullanılarak 0,2 M Glisin/NaOH pH=9,0 tamponu olarak belirlendi.

Uzun zamandır yapılmakta olan çalışmalar; SDH'ıninhibe olması hiperglisemi durumunda aktif hale gelenpoliol mekanizması ile ilgili redols bozukluklarını düzelterek diyabetin sebebiyet verdiği komplikasyonların ortaya çıkmasını geçiktirmede yararlı olabileceğini göstermektedir (Kador *et al.* 1998). Bu sebeple birçok araştırmacı güçlü ve etkili SDH inhibitörleri geliştirmek için çalışmaktadır (Lindstad and McKinley-McKee 1997).

Sorbitol dehidrogenaz enziminin inhibitörlerine bu denli ilgi gösterilmesinin çok nedenleri vardır. Bunlar:

- Diyabetik komplikasyonların azaltılmasında ve hatta yok edilmesinde etkili olabilecek koruyucu ilaç tasarımları için faydalı olabilir.
- SDH-NAD^+ kompleksine bağlanan substrat benzeri inhibitörler enzimin aktif bölgesi ile bu bölgeye bağlanan substrat molekülü arasındaki etkileşimi tanımlamayı amaçlayan yapısal çalışmalarda faydalı olabilir.
- Son olarak güçlü ve çok özel SDH inhibitörleri bu enzimin fizyolojik rolünün belirlenmesinde faydalı olabilir (Lindstad and Mckinley-Mckee 1996).

Yapılan literatür taramasında tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerine metal iyonlarının inhibisyon etkisine dair çalışmalara rastlanılmamıştır. Bu sebeple çalışmamızda tavuk karaciğerinden elde edilen sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine bazı metallerin inhibisyon etkileri *in vitro* şartlarda incelendi.

Kimyasal maddelerin enzim aktiviteleri üzerine inhibisyon etkileri genel olarak IC_{50} kavramı ile ifade edilmektedir (enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu) IC_{50} düşük olan inhibitörün etkisi daha yüksektir bu bağlamda yaptığımız çalışmada sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren metallerin inhibisyon etkileri sırası ile;
$Cd(NO_3)_2x4H_2O > Pb(NO_3)_2 > Hg(NO_3)_2xH_2O > Ag(NO_3) > Zn(NO_3)_2x6H_2O > NiSO_4$

şeklindedir. Ayrıca $Pb(NO_3)_2$, $Hg(NO_3)_2xH_2O$, $Zn(NO_3)_2x6H_2O$ için K_i değerleri ve inhibisyon tipleri Lineweaver-Burk grafiklerinden belirlendi.

Sonuç olarak bu tez kapsamında;

1. Tavuk karaciğerinden sorbitol dehidrogenaz enzimi saflaştırılmıştır.

2. Çalışma neticesinde sorbitol dehidrogenaz enzimi %3,65 verimle ve yaklaşık 267 kat saflaştırılmıştır. Enzimin saflığıSDS-PAGE ile kontrol edilmiştir.

3. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enziminin optimum sıcaklık ve optimum pH değerleri hesaplanmıştır.

4. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi aktivitesi üzerinekadmiyum, kurşun, cıva, gümüş, çinko ve nikel iyonlarının inhibisyon etkileri incelenmiştir ve IC_{50} değerleri hesaplanmıştır.

5. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösterenkadmiyum, kurşun, cıva, gümüş, çinko ve nikel iyonlarının IC_{50} değerleri, civa çinko ve kurşun iyonlarının K_i değerleri ve inhibisyon tipleri Lineweaver-Burk grafiklerinden belirlenmiştir.

6. Tavuk karaciğeri sorbitol dehidrogenaz ile ilgili yaptığımız tüm çalışmalar Çizelge 5.1'de verilmiştir.

Çizelge 5.1. Tavuk karaciğer dokusu SDH enzimi için yapılan çalışmaların toplu sonuçları

SDH enziminin saflaştırılması ile ilgili sonuçlar			
Spesifik Aktivite EÜ/ml	3,152		
Saflaştırma Katsayısı	266,95		
Verim	%3,65		
Molekül kütlesi tayini (kDa)			
SDS-PAGE metodu ile	41,4		
Jel filtrasyon kromatografisi ile	169		
Optimum pH	9,0		
Optimum sıcaklık(^{o}C)	50		
Kinetik çalışmalar			
Ağırmetaller	**IC_{50} (mM)**		
$Cd(NO_3)_2x4H_2O$	0,006		
$Pb(NO_3)_2$	0,012		
$Hg(NO_3)_2xH_2O$	0,013		
$Ag(NO)_3$	0,018		
$Zn(NO_3)_2x6H_2O$	7,07		
$Ni(SO_4)$	35		
Ağırmetaller	**Ortalama K_i (mM)**		**İnhibisyon Tipi**
$Hg(NO_3)_2xH_2O$	0,07033±0,00287		Yarışmasız
$Pb(NO_3)_2$	0,18033±0,04879		Yarışmasız
$Zn(NO_3)_2x6H_2O$	**Ortalama K_i (mM)**	**Ortalama K_i' (mM)**	Karışık Tip
	2,112±0,037	16,013±1,043	

KAYNAKLAR

Abou-Seif MA, Youssef AA. Evaluation of some biochemical chenges in diabetic patients. Clin Chim Acta 2004; 346: 161-170.

Albering, J.H., van Leuson, S.M., Moonen, E.J.C.Attogewerff, J.A., Kleinjans, J.C.S., 1999. Human health risk assessment: A case study involving heavy metal soil contamination after the flooding of river meuse during the winter of 1993-1994. Environmental Health Perfectives, 107(1): 1-13.

Alemzadeh R, Wyatt D.T. Diabetes Mellitus. In: Behrman R.E, Klieg-man R.M, Jenson H.B (eds).Nelson Textbook of Pediatrics. 17 edition. Pennsylvania: Elsevier Saunders;2004.p.1947-72.

Alım Z., Beydemir Ş. ,Effects of some anti-neoplastic drugs on sheep liver sorbitol Dehydrogenase Archives of Physiology and Biochemistry, 2012; Early Online: 1-9 .

Amos AF, McVarty DJ, Zimmot P. The rising global burden of diabetes and its complications: Estimates and projections to the year 2010. Diabetic Med 1997; 14:755.

Anonim 2012a. :http//www.diyadinnet.com/yararlibilgiler-1386&Bilgi=enzim nedir. (24.09.2012).

Anderson, N.V., 1992. Veterinary Gastroenterology. Second Edition. Lea Febiger, Pensilvania.

Anonim 2012b: http://www.turkendokrin.org./files/pdf/diabetnedir.pdf**.** (13.09.2012)

Anonim 2012c: http://www.lenntech.com/heavy-metals.html. (03.09.2012).

Asada, M., Galambos J.T., 1963. Sorbitol dehydrogenase and hepatocellular injury: an experimental and clinical study. Gastroenterology,44, 578-587Atkinson MA., Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. Lancet 2001; 358:221-9.

Balendiran GK, Rajkumar B. Fibrates inhibit aldose reductase activity in the forward and reverse reactions. Biochem Pharmacol 2005;70:1653–1663.[PubMed:16226225]

Baretto. O.C.O and BcutlerE.(1975) j. Lab.Clin.Med.85, 645-649

Baynes, J.W., Thorpe S.R., 1999. Role of oxidative stress in diabetic complications. A new perspective on an old paradigm. Diabetes, 48, 1-9.

Bhatnagar, A., Srivastava S.K., 1992. Aldose reductase: congenial and injurious profiles of an enigmatic enzyme. Biochem. Med. Metab. Biol., 48, 91–121.

Bigersson B., Sterner O., Zimerson E., Chemie und Gesundheit “Eine verst♪2ndliche Einführung in die Toxikologie”, VCHVerlagsgeselschaft, 1988, ISBN 3-527-26455-8.

Blasco, J. and Puppo, J., 1999. Effect of heavy metals (Cu, Cd and Pb)on aspartate and alanine aminotransferase in Ruditapes philippinarium(Mollusca: Bivalvia).Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocronology, 122, 253-263.

Bukan, N., Sancak B., Bilgihan A., Kosova F., Buğdaycı G., Altan N., 2004. The effects of the sulfonylurea glyburide on glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase activities in the heart tissue of streptozotocin-induced diabetic rat. Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 26(7), 519-22.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method fort he quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analitical Biochemistry, 72, 248.

Brimacombe, J. S. and Webber, J. M. (1972) in The carbohydrates, Vol. IA (Pigman, W. and Horton, D., eds.), pp. 479±518, Academic Press, New York

Brownlec M., Viassara H., Ccrami A., 1984. Non-enzymatic glycosyhition and the pathogenesis of diabetic complications. Ann Intern Med., 101, 527-37.

Brownlee, M., 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. Nature. Vol, 414, 813-820.

Champe, P.C., Harvey R.A., 1997. Lippincott's Illustrated reviews serisinden: Biyokimya, Nobel tıp kitapevleri,130, 131 s, İstanbul

Chappey, O., Dosquet C., Wautier M.P., Wautier J.L., 1997. Advanced glycation end products, oxidant stres and vascular lesions. Eur J Clin Invest., 27, 97-108.

Chu-Moyer, M.Y., Ballinger W.E., Beebe D.A., Berger R., Couther J.B., Day W.W., Li J., Mylari B.L., Oates P.J., Weekly R.M., 2002. Orally-effective, lon-acting sorbitol dehydrogenase inhibitors:syntesis, structure-activity relationships, and *in vivo* evaluations of novel heterocycle-substituted piperozine-pyrimidines. J. Med. Chem., 45, 511-528.

Chung SSM, Ho ECM, Lam KSL, Chung SK. Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress. J Am Soc Nephrol 2003;14:S233–S236. [PubMed: 12874437]

Concon, J.M., 1988. Food Toxicology. Part B: Contaminants and Additives. Marcel Dekker, Inc., New York.

Çelik, İ., Çamaş, H.,Arslan, O. and Küfrevio ğlu, Ö.İ., 1996. The efects of some pepticides on human and bovine erythrocyte carbonicanhydrase enzyme activities in vitro. J. Environ. Sci. Health, 31, 2651-2652.

Devlin, T.M., 2002. Biochemistry with Clinical Correlations, Kanada.

Dinçer Y, Akçay T, Alademir Z, İlkova H (2002) Effect of oxidative stress on glutathione pathway in red blood cells from patients with insulin dependent diabetes mellitus. Metabolism 51(10), 1360-1362.

Dixon, D.G., Hodson P.V., Kaiser K.L.E., 1987. Serum sorbitol dehydrogenase activity as an indicator of chemically induced liver damage in rainbow trout. Environ. Toxicol. Chem., 6, 685-696.

Dökmeci İ, Dökmeci AH, 2005. Toksikoloji Zehirlendirmede Tanı ve Tedavi, 4.Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, 2005.

Dunlop, M., 2000. Aldose reductase and the role of poliol pathway in diabetic nephropathy. Kidney Int., 58(77), 3-12.

Ekinci D, Beydemir Ş., Küfrevioğlu Ö. İ, In Vitro Inhibitory Effects of Some Heavy Metals on Human Erytrocyte Carbonic Anhydrases, Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry 2007; 22, 745–750.

Eklund, H., Horjales E., Jornvall H., Branden C.I., Jeffery J., 1985. Moleculer aspects of functional differences between alcohol and sorbitol dehydrogenases. Biochemistry, 24, 8005-8012.

Fiallo-Scharer R, Eisenbarth G.S. Patophysiology of ‹nsulin-Depen-dent Diabetes. In:Pescovitz O.H, Eugster E.A(eds. PediatricEn-docrinology. 1 edition. Philadelphia (USA): Lippincott Williams and Wilkins; 2004. p.411-26.

Forsblom, C.M., Groop P.H., Ekstrand A., Totterman K.J., Sane T., Saloranta C., 1998. Predictors of progression from normoalbuminuria to microalbuminuria in NIDDM. Diabetes Care,21,1932-8.

Fresht, A., 1999. Structure and mechanism in protein science. W.H. Freeman and Company, 166 p, New York.

Garcia, S.F., Virag L., Jagtap P., Szabo E., Mabley J.G., Liaudet L., Marton A., Hoyt D.G., Murthy K.G., Salzman A.L., Southan G.J., Szabo C., 2001. Diabetic endothelial dysfunction: the role of poly (ADP-ribose) polymerase activation. Nature Med., 7, 108-113.

Geissen, K., Utz R., Grotsch H., Lang H.J., Nimmesgern H., 1994. Sorbitol accumulating pyrimidine derivatives. Arzneimittelforschung, 44, 1032-1043.

Geissen, K., Utz R., Nimmesgern H., Lang, H.J., 1992. Substituirte Prymidin-Derivate, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung als Reagenzien. In European Patent Application No. 0 470 616 A2.

Gıda teknolojisi M.E.B.Ankara 2011.

Gilbert, H.F., 1992. Basic Concepts in Biochemistry. Mc Graw-Hill Inc, 81 p, Germany.

Gonzales, R.G., Barnett P., Aguayo J., Cheng H.M., Chylack L.T.J., 1984. Direct measurement of poliol pathway activity in the ocular lens. Diabetes, 33,196.

Gözükara, E., 1989. Enzimler. Biyokimya. Ofset Repromat Ltd.Şti, 572-576 s, Ankara.

Gui T., Tanimoto T, Kokaiy, Nishimura C., 1995. Presence of a closely related subgroup in the aldo-ketoreductase family of the mouse. Eur. J. Biochem., 227, 448-453.

Habashi F., “Handbook of Extractive Metallurgy”, Vol. 2, WILEY-VCH, Germany, 1997.

Haller, M.J., Atkinson M.A., Schatz D., 2005. Type 1 diabetes mellitus: etiology, presentation and management. Pediatr Clin North Am., 52, 1553-78.

Haris Mİ., Klein R, Welborn TA, Knuiman MW. Onset of NIDDM occurs at least 4-7 years before clinicaldiagnosis. Diabetes Care 1992; 15:815-9

Hasselbaink DM, Glatz JFC, Luiken JJFP, Roemen THM, Vusse GJV. Ketone bodies disturb fatty acid handling in isolated cardiomyocytes derived from control and diabetic rats. Biochem J 2003; 371: 753-760.

Hers, H.G., 1956. The mechanism of the transformation of glucose in fructose in the seminal vesicles. Biochim Biophys Acta, 22(1), 202-3.

Hodgen, G.D. and Sherins R.J., 1973. Enzymes as markers of testicular growth and development in the rat, Endocrinology, 93, 985-989.

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.

Humphrey, L.L., Ballard D.J., Frohnert P.P., Chu C.P., O´fallon W.M., Palumbo P.J., 1989. Chronic renal failure in non-insulin-dependent diabetes mellitus. A population-based study in Rochester, Minnesota. Ann Intern Med., 111, 788-796.

Hwang, Y C., Sato S., Tsai J Y., Yan S., Bakr S., Zhan H., Oates P J., Ramasamy R., 2002. Aldose reductase activation is a key companent of myocardial response to ischemia. Faseb J., 16, 243-245.

Iwata T, Carper D.in: Weiner H,Holmes RS, Wermuth B, editors Enzimolog and Molecular Biology ofCarbonyl Metabolism Vol.5.Newyork: Plenum Press,1995:373-381.

Jay D, Hitomi H, Griendling KK. Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications.Free Rad Biol Med 2006;40.183–192. [PubMed: 16.413.400]

Jedziniak, J.A., Chylack L.T., Jr., Cheng H.M., Gillis M.K., Kalustian A.A., Tung W.H., 1981. The sorbitol pathway in the human lens: Aldose reductase and poliol dehydrogenase. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 20, 314-326.

Jeffery, J., Chesters J., Mills C., Sadler P.J., Jörnvall H.,1984. Sorbitol dehydrogenase is a zinc enzyme. EMBO J., 3, 357-360.

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.

John H. Duffus, Howard G.J. Worth, “Fundamental toxicology for chemists”, Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry Information Services, c1996

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.

Kador, P.F., Inoue J., Secchi E.F., Lizak M.J., Rodriguez l., Mori K., Greentree W., blessing K., Lackner P.A., Sato S., 1998. Effect of sorbitol dehydrogenase inhibition on sugar cataract formation in galactose-fed and diabetic rats. Exp. Eye Res., 67, 203-208.

Kador, P.F., Kinoshita J.H., Brittain D.R., Mirrlees D.J., Sennitt C.M, Stribling D.,1986. Purified rat lens aldose reductase. Poliol production *in vitro* and its inhibition by aldose reductase inhibitors. Biochem J.240(1), 233-7.

Kahvecioğlu Ö.,Kartal G., Güven A.,Timur Servet., 2003 Metallerin çevresel etkileri 1. İTÜ Metalurji ve Malzeme Bölümü Metalurji dergisi., 136, 47-53.

Karacaoğlan, V., Özer I., 2005. Steady state kinetic properties of sorbitol dehydrogenase from chicken liver. Comparative Biochemistry and Physiology, 140, 309-312.

Karasu, Ç., Öztürk Y., Altan N., Yıldızoğlu N., İkizler C., Altan V.M., 1990. Thyroid Hormones Mediated Effect Of Insulin On Alloxan Diabetic Rat Atria. General Pharmacology, 21(5), 735-740.

Karlsson, C., Jornvall H., Höög J.O., 1995. Zinc binding of alcohol and sorbitol dehydrogenase. Enzymology and Molecular biology of Carbonyl Metabolism, vol. 5. Plenum Press, New York, 397-406.

Karlsson, C., Maret W., Auld D.S., Höög J.O., Jörnvall H., 1989. Variability within mammalian sorbitol dehydrogenases. Eur. J. Biochem.186, 543-550.

Kartal G., Aybars GÜVEN, Özgenur KAHVECİOĞLU, Servet TİMUR 2004 Metallerin çevresel etkileri II. İTÜ Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü. Metalurji dergisi.,137,46-51.

Keha, E.E., ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 2005. Biyokimya. Aktif Yayınevi, 91-95, 118 s, İstanbul.

Keha, E.E., ve Küfrevioğlu, Ö.Đ., 2007. Biyokimya. Aktif Yayınevi, 118 s, istanbul.

Küfrevioğlu, Ö.İ. ve Çiftci M, 2008. Kromatografiye giriş ders notları, Erzurum

Kimmelstiel, P., Wilson C., 1936. Intercapillary lesions in glomeruli of kidney. American Journal of Pathology, 12, 83–97.

Kinoshita J.H., Nishimura, C., 1988. The involvement of aldose reductase in diabetic complications. Diabetes Metabo. Reu.,4, 323-337.

Kinoshita, J.H., 1965. Cataracts in galactosemia. Invest. Ophthalmol,4, 786-790.

Kinoshita, J.H., 1974. Mechanisms initiating cataract formation. Proctor Lecture. Invest Ophtalmol,13, 713-724.

Klaassen CD, 2009ç (Çeviri: Kalkan Ş, Soner BC), Ağır Metaller ve Ağır Metal Antagonistleri(Konu:65), Brunton LL, Lazo JS, Parker KL(Editors), (Çeviri Editörü: Süzer Ö), Tedavinin Farmakolijik Temeli, Nobel Tıp Kitapevleri, 2009.

Kurowska, E.M., 2002. Nitric oxide therapies in vascular diseases. Curr Pharm Des.,8, 155 66.

Kurt M.,Atmaca A., Gürlek A. Diyabetik nefropati .,Hacettepe Tıp Dergisi 2004; 35:12-17

Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of Bacteriophage T4. Nature, 227,680.

Lal S., Szwergold B.S., Taylor A.H, Randall W.C., Kappler F., Brown T.R., 1995.Production of fructose and fructose-3-phosphate in maturing rat lenses. Invest OphthalmolVis Sci., 36, 969-973.

Lee, A.Y., Chung S.S, 1999. Contributions of poliol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. Faseb J., 13, 23-30.

Lehninger AL. Principles üof biochemistry. Newyork: Worth, Publishers Inc,2000

Lehninger Principles of Biochemistry, 2005. Worth Publishers Inc., 1152 p, New York.

Lewis E.J., Hunsicker L.G., Clarke W.R., Berl T., Pohl M.A., Lewis J.B., Ritz E., Atkins R.C., Rohde R., Raz I., Collaborative Study Group., 2001. Renoprotective effect of the angiotensin-receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. N. Engl. J. Med., 345, 851-6.

Liau, S.Y., Read, D.C., Pugh, W.J., Furr, J.R., Russell, A.D., 1997, Interaction of Silver Nitrate with Readily Identifiable Groups: Relationship to the Antibacterial Action of Silver Ions, Letters in Applied Microbiology, vol:25, p. 279-283.

Linstad, R.I., Hermansen L.F., McKinley-McKee J.S., 1992. The kinetic mechanism of sheep liver sorbitol dehydrogenase. Eur. J. Biochem., 210,641-647.

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.

Lindstad, R.I., McKinley-McKee J.S., 1996. Reversible inhibition of sheep liver sorbitol dehydrogenase by thiol compounds. Eur. J. Biochem., 241, 142-148.

Lindstad, R.I., Koll P., Mckinley-Mckee J.S., 1998. Substrate specificity of sheep liver sorbitol dehydrogenase. Biochem. J., 330, 479-487.

Lipinski, B., 2001. Pathophysiology of oxidative stress in diabetes mellitus. Journal of Diabetes and Its Complications, 15, 203-210.

Lippincott's Illustrated Reviews:Biochemistry, 2007. Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti., 536 s, istanbul.

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 stres, Mol. Brain Res., 87, 251-256.

Maret, W., Auld D.S., 1988. Purification and characterization of human liver sorbitol dehydrogenase. Biochemistry, 27, 1622-1628.

Maritim, A.C., Sanders, R.A., Watkins, III J.B., 2003. Diabetes, oxidative stress and antioxidants, Review.Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, 17(1), 4-38.

Mizisin,A.P.,Lİ.l.,Calcutt N. A.,1997 sorbitol accumulation and transmembran efflux in osmotically stressed JSI schannoma cells.Neouscience Letters,229,53-56.

Morre DM., Lenaz G., Morre D.J., 2000. Surface oxidase and oxidative stress propagation inaging, J. Exp. Biol., 203, 1513-1521.

Nelson, D.L. and Cox M.M., 2005. Lehninger Biyokimyanın İlkeleri. (Çeviren: N.KILIÇ), Palme Yayıncılık, Ankara, 243-293.

Nishikawa T., Edelstein D., Brownlee M., 2000. The missing link, a single unifying mechanism for diabetic complications. Kidney Int., 58(77), 26-30.

Noris, D.O., Camp, J.M., Maldonado, T.A. and Woodling, J.D., 2000. Some aspects of hepatic function in feral Brown trout, Salmo trutta, living in metal contaminated water. Comparative Biochemistry and Physiology PartC: Pharmacology, Tocicology and Endocrinology, 127, 71-78.

Oates, P.J., 2008. Aldose reductase, still a compelling target for diabetic neuropathy. Curr. Drug Targets, 9, 14.

O'Brien, M.M., Schofield P.J., Edwards M.R., 1983. Poliol pathway enzymes of human brain. Partial purification and properties of sorbitol dehydrogenase. Biochem. J., 211, 81-90.

Obrosova, I.G., Fathallah L., Lang H.J., 1999. Interaction between osmotic and oxidative stres in diabetic precataractous lens. Biochem. Pharmacol., 58, 1945-1954.

Ostenson, C.G., 2001. The pathophysiology of type 2 diabetes mellitus, an overview. Acta Physiologica Scandinavica, 171, 241-247.

Pauly, T.A., Ekstrom J.L., Beebe D.A., Chrunyk B., Cunningham D., Griffor M., Kamath A., Lee S.E., Madura R., McGuire D., Subashi T., Wasilko D., Watts P., Mylari B.L., Oates P.J., Adams P.D., Rath V.L., 2003. X-ray crystallographic and kinetic studies of human sorbitol dehydrogenase. Structure, 11, 1071-1085.

Rai, M.,Yadav, A.,Gade, A.,2009,Silver Nanoparticles as a New Generation of Antimicrobials, Biotechnology Advances, 27, p. 76-83.

Ramasamy, R., Liu P.J, Oates S.S., 1999. Attenuation of ischemia induced increases in sodium and calcium by the aldose reductase inhibitor Zopolrestat. Cardiovasc. Res., 42, 130-139.

Sacks DB. Carbohydrates. In: Burtis CA, Ashwood ER, Editors. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 2nd ed. Philadelphia. Saunders 1994; 928-1001

Sarkar B.2002. Heavy Metals in the Enviroment, Marcel Dekker, Inc. New York.

Segel, I.H., 1975. Enzyme Kinetics. Wiley-Interscience, New York, 564-567.

Smith, M.G., 1962. Crystallization of the L-iditol dehydrogenase of sheep liver. Biochem. J., 83, 135-144.

Sienko, R.A.1983. Temel Kimya (Chemistry:Principles and Properties), (Çevirenler: Gündüz N., Gündüz T., Tüzün C., Pulat E., Üneri S., Zeren A., Özgüner S.), Savaş Yayınları,Fen Bilimleri Dizisi.

Söyüt, H., Beydemir, Ş., 2008. Purification and some kinetic properies of carbonic anhydrase from rainbow trout (*oncorhynchus mykiss)* liver and metal inhibition, Protein and Peptide Letters, 15-55, (8), 528-535.

Stevens, M.J., Obrosova I., Cao X., Van Husyen C., Grene D.A., 2000. Effects of DL-α-lipoic acid on peripheral nerve conduction, blood flow, energy metabolism, and oxidative stress in experimental diabetic neuropathy. Diabetes, 49, 1006.

Stryer, L., 1988. Biochemistry. W.H. Freeman and Company Thirdedition, 233-260 p, New York.

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.

Temelkova-Kurktschiev, T.S., Koehler C., Henkel E., Leonhardt W.,Fuecker K., Hanefeld M., 2000. Postchallenge plasma glucose and glycemic spikesare more strongly associated with atherosclerosis than fasting glucose or HbA1c levels. Diabetes Care, 12, 1830-1834.

Telefoncu, A., 1986. Temel ve Uygulamalı Enzimoloji, Ege Üniversitesi, Fen EdebiyatFakültesi yayını (Der) 59, İzmir.

Tesfamariam, B., 1994. Free radical in diabetic endothelial cell dysfunction. Free Radic Biol Med., 16, 383-391.

The Diabetes Control and Comlications 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.

Touster, O. and Shaw, D. R. D. (1962) Physiol. Rev. *42*, 181±225

Tornlinson, D.R., 1989. Poliols and myointositol in diabetic neuropathy of mice and men. Mayo Clin Proc., 64, 1030.

Turgut, K. Ok M., 1997. Veteriner Gastroenteroloji-Semptomdan Teşhisi. Bahçıvanlar Basım San. A.Ş., Konya

Ugochukwa NH, Figgers CL. Modultaion of the flux patterns in carbohydrate metabolism in the livers of streptozoticin-induced diabetic rats by dietary caloric restriction. Pharmacol R2006;54:172–180. [PubMed: 16740392].

UKPDS Research Group. 1998. Intensive blood glucose control with sulphonylureas or insulin, compared with conventional treatment and risk of complications in patients withType 2 diabetes (UKPDS). Lancet, 352, 837-853.

Van Heyningen., 1959. Metabolism of xylose by the lens, 2. Rat lens *in vivo* and *in vitro*. Biochem. J., 73, 197-207.

Varma, S.D., Mizuno A., Kinoshita J.H., 1977. Diabetic cataracts and flavonoids. Science, 195(4274), 205-6.

Vural, H., 1993. Ağır metal iyonlarının gıdalarda oluşturduğu kirlilikler. Çevre Dergisi 8: 3-8.

Wiesinger, H., Hamprecht B., 1987. Purification and properties of sorbitol dehydrogenase from bovine brain. J. Neurochem., 48, 147.

Williamson, J.R., Chang K., Frangos M., Hasan K.S., Ido Y., Kawamura T., Nyengaard J.R., Van Den E.M., Kilo C., Tilton R.G., 1993. Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. Diabetes, 42, 801.

Xia, P., Inoguchi T., Kern T.S., Engerman R.L., Oates P.J., King G.L., 1994. Characterization of the mechanism for the chronic activation of diacylglycerolprotein kinase C pathway in diabetes and hypergalactosemia. Diabetes, 43(9), 1122-29.

Yamagishi, S., Takeuchi M., 2004. Inhibition of protein kinase C might be harmful to diabetic retinopathy. Med Hypotheses, 63, 135-137.

Yeh, L.A., Ashton M.A., 1990. The increase in lipid peroxidation in diabetic rat lens can be reserved by oral sorbinil. Metabolism, 39, 619-622.

Yenigün, M., Altuntaş Y., 2001. Her Yönüyle Diabetes Mellitus. Diabetik Mikroanjiopati ve Diabetik Makroanjiopati, Sayfa 315-375.

Yüreğir, G.T., 1981. Enzimler ve Enzim kinetikleri. Temel Biyokimya 1.Cilt., Kemal Matbaası, 148-167 s, Adana

Zimmet, P., Alberti K.G.M.M., Shaw J., 2001. Shaw, Global and societal implications of the diabetes epidemic. J. Nature, 414, 782.

ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Iğdır'ın Yüzbaşılar Köyü'nde doğdu. İlköğrenimini Yüzbaşılar Köyü'nde orta ve lise öğrenimini Iğdır'da tamamladı. 2004 yılında başlamış olduğu Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi Kimya Bölümü lisans öğrenimini 2008 yılında tamamladı. 2008'de aynı bölümde başlamış olduğu yüksek lisans öğrenimini 2012 yılında tamamladı.