

283806

T. C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ FAKÜLTESİ

**NORMAL, SENİL KATARAKTLI VE DİABETİK KATARAKTLI
İNSAN LENSİ GLUKOZ -6- FOSFAT DEHİDROGENAZLARININ
KİSMEN SAFLAŞTIRILMASI VE ÖZELLİKLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

Biyokimya Programı
DOKTORA TEZİ

MEHMET SEZAI KUŞ

ANKARA — 1979

44

T. C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ FAKÜLTESİ

**NORMAL, SENİL KATARAKTLI VE DİABETİK KATARAKTLI
İNSAN LENSİ GLUKOZ -6- FOSFAT DEHİDROGENAZLARININ
KISMEN SAFLAŞTIRILMASI VE ÖZELLİKLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

Biyokimya Programı
DOKTORA TEZİ

MEHMET SEZAI KUŞ

REHBER ÖĞRETİM ÜYESİ : Doç. Dr. KONÇUY Mergen

ANKARA — 1979

T E Ő E K K Ő R

**Bu çalışmada kullanılan lenslerin sağlanma-
sında yardımını gördüğümüz Ankara Üniversitesi Tıp
Fakóltesi Göz Klinięi doktorlarından Sayın Özden
Özdemir'e teőekkürü bir borç biliriz.**

İ Ç İ N D E K İ L E R

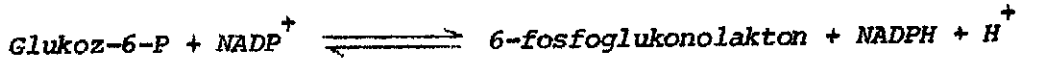
	<u>Sayfa</u>
GİRİŞ _____	1
ARAÇ, GEREÇ ve YÖNTEMLER _____	7
Araçlar _____	7
Gereçler _____	7
Lenslerin Sağlanması _____	8
Tamponlar _____	8
11.000 g. Süpernatantlarının Hazırlanması _____	9
Aktivite Tayinleri _____	9
a) G6PD Aktivitesi Tayini _____	9
b) 6PGD Aktivitesi Tayini _____	10
c) Glukoz ve Glukojen Tayinleri _____	10
Protein Tayinleri _____	11
İyon Değişirici Kolon Kromatografisi _____	11
BULGULAR _____	12
TARTIŞMA _____	30
ÖZET _____	37
KISALTMALAR _____	38
KAYNAKLAR _____	39

G İ R İ Ő

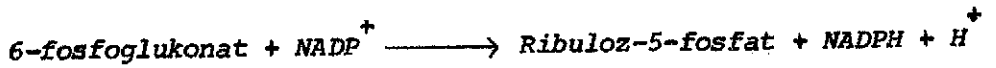
Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (D-glukoz-6-fosfat : NADP^+ oksido-redüktaz, E.C., 1.1.1., 49) karbonhidrat metabolizmasının ana yollarından biri olan pentoz fosfat, diğer adı ile hekzos monofosfat metabolik yolunun ilk ve düzenleyici enzimidir.

Nükleik asitlerin sentezi için gerekli ribozlar ile, yağ asiti, kolesterol, steroid hormon sentezleri ve glutatyonun indirgenmesi için gerekli NADPH 'lar pentoz fosfat metabolik yolundan sağlanır.

Glukoz-6-P dehidrogenaz (G6PD);



tepkimesini katalizler. Bu tepkime metabolik yolun hız kısıtlayıcı basamağıdır. Burada oluşan 6-fosfoglukonolakton, glukonolakton hidrolaz enzimi aracılığı ile 6-fosfoglukonata (6PG) parçalanır. 6-fosfoglukonat ise 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enzimi (6PGD) ile;



tepkimesini verir ve bir mol daha NADPH oluşur.

Bu çalışmada G6PD aktivitesi tepkime sonucu oluşan NADPH miktarının ölçülmesiyle tayin edilir. Diğer taraftan 6PGD tepkimesi sonucunda da NADPH oluşmaktadır. Bu da neticenin yanlış değerlendirilmesine yol açabilir. Bu nedenle ilk dikkat edilecek nokta 6PGD'in ortamdan uzaklaştırılmasıdır.

G6PD enzimine bitkiler ve hayvanlar aleminde çok yaygın olarak rastlanmaktadır. Enzim ilk defa 1931 yılında Warburg ve Christian tarafından gösterilmiş ve "Zwischenferment" olarak adlandırılmıştır (1).

Sonraki yıllarda enzimin hem fizyolojik hem de klinik öneminin anlaşılması üzerine insan dahil değişik seviyeden organizmalar üzerinde geniş kapsamlı çalışmalar yapılmış ve ilginç bulgular elde edilmiştir.

Bazı kalıtsal anemilerde insan alyuvar G6PD'sinin değişiklik gösterdiği dikkati çekmiş ve 1948 de Turchetti favizmde ilacın yol açtığı hemolizin bir alyuvar anomalisinden ötürü ortaya çıktığını belirtmiş (2), 1956 da ise ilaca duyarlı hemolitik anemi hastalığının nedeni olarak alyuvar G6PD aktivitesinin normale nazaran % 85-95 azaldığı gösterilmiştir (3).

Protein tekniklerindeki gelişmelerden sonra Yoshida normal insan alyuvarlarından G6PD'zı 258 000 defa saflaştırmayı başarmış ve özgül aktivitesini 750 Ünite/mg protein olarak bulmuştur. Enzimin yapısal ve kinetik özelliklerini incelemiş ve en aktif durumdaki enzimin hekzamer yapıya sahip olduğunu ileri sürmüştür (4).

Bazı araştırmacılara göre enzim pH = 7.0-9.0 arasında en aktif dimer yapıdadır. pH = 6.0 da yine aktif olup tetramer yapıdadır. Fakat

monomerlerine ayrıldığında inaktiftir (5-7).

Bu bulgular sonucu alyuvarda enzimin dimer yapısının fonksiyonel olarak aktif olduğunu ve çoğunlukla bu yapıda bulunduğunu açıklamışlardır (6,8).

1966 da akyuvar G6PD'zı kısmen saflaştırılıp kinetik özellikleri incelendiğinde alyuvar enzimi ile belirgin farkları olduğu görülmüş (9), buradan akyuvar ve alyuvar enzimlerinin farklı genetik denetim altında olduğu kanısına varılmıştır.

Daha sonra *Candida utilis* (10), *Neurospora crassa* (11), *E.coli* (12,13) gibi basit organizmaların yanısıra adrenal korteks (14-16), karaciğer (17,18), meme bezi (19,20) ve lens (21,22) gibi memeli dokularından çeşitli oranlarda saflaştırılan enzimin kinetik özellikleri incelenmiştir. Memeli dokularında, özellikle sıçan karaciğerinde G6PD enziminin miktarı ve özgül aktivitesi hormonal ve dietsel şartlara bağlı olarak değişmektedir (23-26).

G6PD aktivitesi sıçan, tavşan, koyun ve kobay gibi memelilerin lenslerinde de incelenmiş ve en yüksek aktivite kobayda bulunmuştur (27,28).

İnsan lensinde glukoliz, krebs döngüsü, pentoz fosfat ve sorbitol metabolik yollarının varlığı gösterilmiş en az aktif olarak krebs döngüsü bulunmuştur (29-32).

Lenste glukoz ve glukojen miktarları ile sorbitol ve glukolitik yol ara ürünleri tayin edilmiştir (32). Pirie ve Heyningen diabetik kataraktlı lenslerde glukoz miktarını normalden çok bulmuştur (33).

Şeker taşınmasının lenste basit diffüzyon veya kolaylaştırılmış

diffüzyon ile olduğu ortaya konmuştur (31,32,34). İnsülinin aktif olarak varlığı veya yetersizliği lensteki glukoz taşınmasını önemli derecede değiştirmemekte, böylece glukoz metabolizmasını etkilememektedir (34-37).

Lens yüksek miktarda redükte glutatyon ihtiva etmektedir. Ayrıca glutatyonun benzerleri olan oftalmik ve noroftalmik asit oranında yüksek bulunmuştur. Glutatyon birçok oksidasyon-redüksiyon tepkimelerine iştirak eder ve proteinlerin -SH guruplarının indirgenmiş halde kalmasını sağlar (38).

Her tip kataraktta glutatyon (GSH) ve amino asit miktarları ölçülmüş ve normalden düşük bulunmuştur (21,32,38-41).

Kataraktta lens proteinlerinin sülfidril gurupları fazlasıyla oksitlenmiş bulunmuş buna bağlı olarak disülfid bağlarının arttığı ve düşük molekül ağırlığındaki çözünmez proteinlerin birikerek kümeleştiği, inklüzyon cisimcikleri oluşturduğu ortaya çıkarılmıştır (32,39,42-44).

Senil kataraktta dehidrogenaz enzimlerinin özellikle G6PD'nin aktivitesi düşmekte, hatta kataraktın son devrelerinde kaybolmaktadır (21,22,29). Bu bulguların aksine izositrat dehidrogenaz, ($Na^+ - K^+$) ATPaz ve heksokinaz aktiviteleri kataraktta artmaktadır (29,32).

Katarakt oluşumunda iyonik kuvvetlerinde etkin olduğu ileri sürülmektedir (21,32). Yüksek galaktozlu dietle geliştirilen kataraktta Na^+ iyon konsantrasyonu normale nazaran 3-4 misli yüksek bulunmuştur (40).

Yaş ilerledikçe enzimin substratları ile ilişkilerinin değiştiği ve aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir (21,23,29,45,46).

Diabetik kataraktın biyokimyasal oluşum mekanizmasını aydınlatmak üzere yapılan çalışmalar ortaya ilginç bulgular çıkarmıştır. Şeker kataraktlarına yol açan ana faktör hiperglisemidir. Galaktoz veya glukoz miktarının lenste artması ile sorbitol metabolik yolu hızlanır. Şekerlerin fazlası, heksokinaz enzimi glukozu doyduğunda bu metabolik yola girerek aldoz redüktaz enzimi aracılığı ile kendi polialkollerini oluştururlar. Galaktozun polialkolü olan dulcitol sorbitol dehidrogenaz enzimi için iyi bir substrat değildir, bu nedenle metabolize olamaz ve lenste birikir. Glukozun polialkolü olan sorbitol ise kısmen sorbitol dehidrogenaz enzimi aracılığı ile fruktoza dönüşür. Fakat bu enzim aktivitesi düşük olduğu için sorbitol de fazla oranda metabolize olamaz. Ayrıca şeker alkoller lens membranından geçemezler, böylece lensde birikirler. Ozmolarite artar ve lens su çekerek şişer. Membranlar seçici geçirgen özelliklerini kaybederler, buna bağlı olarak doku harabiyeti artar ve katarakt gelişir (30,31,37,47,48).

Sorbitol metabolik yolunun ilk enzimi aldoz redüktaz çok aktiftir (49,50). Sorbitol dehidrogenazdan 50 defa daha aktif olduğu gösterilmiştir (49). Şeker kataraktında aldoz redüktaz inhibitörleri kullanılarak katarakt geciktirilebilmektedir (49). Bu bulgular göstermektedir ki aldoz redüktaz şeker kataraktının oluşmasında anahtar bir rol oynamaktadır (37,49,50).

Glukozun heksokinaz enzimi için K_m değerinin, glukozun aldoz redüktaz enzimi için K_m değerine nazaran daha düşük olduğu gösterilmiştir (49,51).

Diabetik kataraktlı insan lenslerinde şimdiye dek kinetik bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Bu bulgulara dayanarak, bu çalışmada G6PD enzimi normal, senil kataraktlı ve diabetik kataraktlı insan lenslerinden kısmen saflaştırıldı ve kinetik özellikleri incelenerek birbirleriyle karşılaştırıldı.

Enzimin substratı ile olan ilişkisini açıklayabilmek için lens yaş dokusundaki glukoz ve glukojen miktarları ölçüldü.

ARAÇ , GEREÇ ve YÖNTEMLER

Araçlar :

Deneylerde krio-unit (Keeler), cam-teflon homojenizatör (Janke Kunkel K.G.), santrifüj (Sorvall Superspeed SS-3 Automatic), spektrofotometre (Zeiss PM QII), pH-metre (Schott Mainz CG 810), fraksiyon toplayıcısı (LKB 7000 ULTRORAC) kullanıldı.

Gereçler :

Deneylerde kullanılan Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat ($NADP^+$), glukoz-6-fosfat (G6P), 6-fosfoglukonat (6PG), 2-deoksi D-glukoz-6-fosfat, glukoz oksidaz, peroksidaz ve DEAE-selüloz "Sigma Chemical Company" firmasından, sığır serum albumini "Armour Pharmaceutical Company" firmasından sağlandı. Diğer kimyasal bileşikler ise "Merck" ve "BDH Chemical Ltd" firmalarından alınmış olup yeterli analitik saflıkta idi.

Y ö n t e m l e r :

Lenslerin Sağlanması :

Normal, senil kataraktlı ve diabetik kataraktlı insan lensleri Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Kliniğinden sağlandı.

Kataraktlı lensler, normalde şeffaf olan lensin, beyaz renkte yoğun bir görüntü kazanmasıyla katarakt teşhisi konarak operasyon sonucu alınan lenslerdir.

Normal lensler ise trauma veya herhangi bir sebeple lensi ön kamara çıkış hastalardan, enükleasyon ve keratoplasti operasyonları yapılan donör gözlerinden alınan ve mikroskop altında şeffaf olarak gözlenen lenslerdir.

Gerek normal lensler, gerekse kataraktlı lensler operasyon sırasında, içinde CO₂ karı taşıyan krio-unit ile alınmış olup en kısa zamanda -20°C de saklanmaları nedeniyle enzim çalışmaları için uygundur.

Tamponlar :

1.9 x 10⁻¹ M Tris-HCl pH = 8.0 tamponu G6PD ve 6PGD aktivitelerinin ölçümünde kullanıldı. Bu tampon 1.5 x 10⁻² M MgCl₂ içermektedir.

G6PD'ların saflaştırılmasında kullanılan bütün tamponlara son derişimleri 10⁻³ M olacak şekilde EDTA pH = 7.0 ve 2 x 10⁻⁶ M olacak şekilde NADP katılmıştır (bu derişimlerde NADP ve EDTA içeren tamponlardan "N-E" içeren diye söz edilecektir).

pH 'nın G6PD enzimlerinin kataliz hızına etkisi aşağıdaki farklı

molaritedeki iki tampon sistemi kullanılarak incelendi.

I =	pH = 5.0	1.9×10^{-1} M Asetat tamponu
	pH = 6.0 - 7.0	1.9×10^{-1} M Fosfat tamponu
	pH = 8.0	1.9×10^{-1} M Tris-HCl tamponu
	pH = 9.0 - 10.0	1.9×10^{-1} M Glisin-NaOH tamponu

II =	pH = 5.0	5×10^{-2} M Asetat tamponu
	pH = 6.0	5×10^{-2} M Fosfat tamponu
	pH = 7.0-8.0-9.0	5×10^{-2} M Sodyum barbital tamponu
	pH = 10.0	5×10^{-2} M Glisin-NaOH tamponu

Bu tamponların hepsi 1.5×10^{-2} M $MgCl_2$ içermektedir.

11.000 g. Süpernatantların Hazırlanması :

100-200 mg ağırlığındaki normal, senil kataraktlı ve diabetik kataraktlı lensler, lens yaş dokusunun 100 mg'ı başına 2 ml "N-E" içeren 10^{-2} M pH = 6.5 KPO_4 tamponu içinde $+4^\circ C$ de 5 dakika homojenize edildi. Homojenatlar 20 dakika $+4^\circ C$ de 11.000 g. de santrifüj edildi. Süpernatantlar alınarak yine $+4^\circ C$ de "N-E" içeren 10^{-2} M pH = 6.5 KPO_4 tamponuna karşı dializ edildi, dializ suyu üç kez değiştirildi. Dializ edilmiş 11.000 g. süpernatantları G6PD'ların saflaştırılmasında kullanıldı.

Aktivite Tayinleri :

a) G6PD Aktivitesi Tayini :

G6PD aktivitesi G6P 'tan, 6PG oluşunken elektronları alarak indir-

genen NADP'nin 340 nm dalga boyundaki absorbans değişimi ölçülerek tayin edildi. Tepkime ortamı 3 ml içinde son derişimleri 6.33×10^{-2} M pH = 8.0 Tris-HCl tamponu, 5×10^{-4} M $MgCl_2$, 6.6×10^{-4} M G6P ve 1.33×10^{-4} M NADP içermektedir. Tepkime, ortama uygun miktarda enzim katılarak başlatıldı ve spektrofotometrede $25^\circ C$ de, 340 nm de 10 dakika absorbans değişimi takip edildi (52).

Enzim miktarı dakikada 0.005-0.010 O.D. verecek şekilde ayarlandı. NADPH oluşumuna bağlı olarak 340 nm dalga boyunda gözlenen absorbans artışı ilk 10 dakikada doğrusal ve katılan enzim miktarı ile orantılıdır.

Enzim aktivitesi milletlerarası enzim ünitesi olarak ifade edildi. Bir milletlerarası enzim ünitesi (I.Ü.) $25^\circ C$ de, 1 dakikada 1 mikromol NADPH oluşturan enzim miktarıdır (53).

Özgül aktivite, mg. protein başına milletlerarası enzim ünitesi olarak ifade edildi.

b) 6PGD Aktivitesi :

6PGD aktivitesi G6PD enzim aktivitesi tayini şartlarında, G6P yerine substrat olarak son derişimi 6.6×10^{-4} M olacak şekilde 6PG katılarak, spektrofotometre ile $25^\circ C$ de, 340 nm dalga boyunda 10 dakika absorbans değişimi izlenerek ölçüldü.

c) Glukoz ve Glukojen Tayinleri :

Yaş ağırlığı saptanan lensler süratle $+4^\circ C$ de 5×10^{-3} M pH = 6.5 KPO_4 tamponu içinde 5 dakika homojenize edildikten sonra bu homojenatin 0.5 ml'si glukoz tayini için eşit miktarda $ZnSO_4$ ve $Ba(OH)_2$ ile çöktü-

rüldü. Bu nötral süpernatanın 0.5 ml'si ile glukoz oksidaz yöntemiyle glukoz tayinleri yapıldı (54).

Metodun esası : Glukoz, glukoz oksidaz enzimi aracılığı ile glukonik asite dönüşürken H_2O_2 meydana gelir. İndirgen bir madde olan O-dianizidin'in H_2O_2 ile tepkimeye girmesiyle oluşan renkli bileşik spektrofotometrede 402 nm dalga boyunda okunur.

Geri kalan homojenat % 30 luk NaOH ile 30 dakika kaynatıldı ve distile suya karşı $+4^{\circ}C$ de dializ edildi. Dializ suyu iki kere değiştirildi. Dializat hacminin 10 misli kadar absolü alkol ve 1 ml % 4 lük Na_2SO_4 ile soğukta bir gece çökmeye bırakıldı. 10 dakika 2500 rpm de santrifüj ile çökelek tamamen alkolden ayrıldı. Sonra çökelek 0.5 ml distile suda çözüldü ve 0.5 ml 6 N HCl ile hidroliz edildi. Hidrolizat 6 N KOH ile nötralize edildikten sonra yine glukoz oksidaz yöntemi ile tayin yapıldı. Glukojen miktarı da μg glukoz olarak ifade edildi.

Protein Tayinleri :

Protein miktarları Warburg Christian (55) ve O.H.Lowry (56) yöntemleri ile ölçüldü. Standart olarak siğır serum albumini kullanıldı.

İyon Değiştirici Kolon Kromatografisi :

DEAE-Selüloz Peterson ve Sober (57) yöntemine göre hazırlandı ve yine aynı yöntemeye uygun olarak kolon kromatografisi yapıldı.

B U L G U L A R

1) 11.000 g. Süpernatantlarının Aktiviteleri :

$pH = 6.5$ 10^{-2} M KPO_4 tamponu içinde homojenize edilen normal, senil kataraktlı ve diabetik kataraktlı insan lenslerinin 11.000 g. süpernatantlarında G6PD aktiviteleri ölçüldü. G6PD aktiviteleri, lens sayısı, lenslerin yaş ortalaması Tablo I de görülmektedir.

Üç gurup lens 11.000 g. süpernatantlarında mg. protein başına düşen enzim aktiviteleri ve 1 ml'deki protein miktarları farklı bulundu.

2) Enzim Dayanıklılığı :

Her üç gurup lensin 11.000 g. süpernatantları 10^{-2} M KPO_4 $pH = 6.5$ tamponu içinde $-20^{\circ}C$ de 24 saat bekletilmekle G6PD aktivitesinin % 10 unu kaybetmektedir. Eğer, 11.000 g. süpernatantlarına tampona ilaveten 2×10^{-6} M NADP ve 10^{-3} M EDTA $pH = 7.0$ katılırsa $-20^{\circ}C$ de 2-3 ay süre ile G6PD aktivitelerinde bir kayıp gözlenmemiştir. Bu nedenle bundan sonraki işlemlerde kullanılan bütün tamponlara son derişimleri 10^{-3} M olacak şekilde EDTA $pH = 7.0$ ve 2×10^{-6} M olacak şekilde NADP katıldı.

3) Safılaştırma :

Normal, senil kataraktlı ve diabetik kataraktlı insan lenslerinin 11.000 g. süpernatantları G6PD aktivitesinden başka 6PGD aktivitesi de gösterirler. Bu sebeple 6PGD enzimini uzaklaştırıp yalnız G6PD enzim aktivitesini tayin edebilmek için G6PD'lar kısmen safılaştırıldı.

11.000 g. süpernatantları +4°C de "N-E" içeren $6.5 \cdot 10^{-2}$ M KPO_4 tamponuna karşı dializ edildikten sonra ayrı ayrı DEAE-selüloz kolonuna tatbik edildi.

DEAE-Selüloz Kolon Kromatografisi :

Yöntemler kısmında belirtildiği şekilde hazırlanan normal, senil kataraktlı ve diabetik kataraktlı lenslerin dializ edilmiş 11.000 g. süpernatantları, önceden "N-E" içeren 10^{-2} M KPO_4 pH = 6.5 tamponu ile dengelenen 2.5 cm X 60 cm boyutlarındaki DEAE-selüloz kolonuna uygulandı. Kolon 10^{-2} M - $8 \cdot 10^{-1}$ M KPO_4 pH = 6.5 gradienine bağlandı. 5 ml lik örnekler tüplerde toplandı. Bilinen yöntemlerle tüplerde G6PD aktiviteleri ve protein miktarları ölçüldü, aktivite bulunan tüpler bir araya getirildi. Kinetik çalışmalar kısmen safılaştırılmış bu örneklerle yapıldı.

Şekil 1; A, B, C ; DEAE-selüloz kolon kromatografisi ile, sırasıyla normal, senil kataraktlı, diabetik kataraktlı insan lenslerinden G6PD safılaştırmasını göstermektedir.

Normal, senil kataraktlı ve diabetik kataraktlı insan lenslerinden G6PD safılaştırılması Tablo II de görülmektedir.

4) Kısmen Saflaştırılmış Normal, Senil Kataraktlı ve Diabetik

Kataraktlı Lens G6PD'lerinin Kinetik Özellikleri :

a) Üç gurubun G6P ve NADP K_m 'leri ;

G6P K_m değerlerini bulmak için son NADP derişimi 13.3×10^{-5} M da sabit tutulup son G6P derişimi 33.3×10^{-5} M ile 4.1×10^{-5} M arasında değiştirildi.

NADP K_m değerlerini bulmak için son G6P derişimi 66.6×10^{-5} M da sabit tutulup son NADP derişimi 6.6×10^{-5} M ile 0.8×10^{-5} M arasında değiştirildi.

Hız hesaplamalarında ilk 10 dakikadaki absorbands değişimleri esas alındı. pH = 8.0 ve 25°C de Mg^{++} derişimi 1.5×10^{-2} M iken,

Normal enzimin ;

G6P için K_m değeri 58.82×10^{-6} M

NADP için K_m değeri 14.49×10^{-6} M olarak bulundu.

Senil kataraktlı enzimin;

G6P için K_m değeri 111.11×10^{-6} M

NADP için K_m değeri 12.34×10^{-6} M olarak bulundu.

Diabetik kataraktlı enzimin ;

G6P için K_m değeri 238.09×10^{-6} M

NADP için K_m değeri 19.60×10^{-6} M olarak bulundu.

Şekil 2 a ve b normal, senil kataraktlı ve diabetik kataraktlı insan lensi G6PD enzimlerinin kataliz hızının artan G6P derişimleri için Michaelis-Menthen eğrisini ve buradan hesaplanan Lineweaver-Burk grafiğini göstermektedir.

Şekil 3 a ve b ise normal, senil kataraktlı ve diabetik kataraktlı insan lensi G6PD enzimlerinin kataliz hızının artan NADP derişimleri için Michaelis-Menthen eğrisini ve buradan hesaplanan Lineweaver - Burk grafiğini göstermektedir.

b) pH'nın Normal, Senil kataraktlı ve Diabetik kataraktlı İnsan lensi G6PD'larının Kataliz Hızına Etkisi :

Üç guruba ait kısmen saflaştırılan enzimlerin kataliz hızına pH'nın etkisi yöntemler kısmında belirtilen tamponlar kullanılarak incelendi. Bütün ölçmeler 1.5×10^{-2} M $MgCl_2$ varlığında ve $25^{\circ}C$ de yapıldı.

Her üç enzimin kataliz hızının en yüksek olduğu pH = 8.0 olarak bulundu. pH = 5.0 iken en çok normal lens enzimi inaktifti. Şekil 4, normal, senil kataraktlı ve diabetik kataraktlı insan lensi G6PD'larının kataliz hızına pH'nın etkisini göstermektedir.

c) Değişen Mg^{++} Derişiminin Normal, Senil kataraktlı ve Diabetik kataraktlı İnsan Lensi G6PD'larının Kataliz Hızına Etkisi :

Mg^{++} G6PD aktivitesi için gereklidir. Her üç gurup enzimin katalizlediği tepkimenin hızı Mg^{++} derişimi 1.5×10^{-2} M iken en fazladır. 0.5×10^{-2} M'in altında ve 2.5×10^{-2} M'in üstünde düşer. Şekil 5 üç gurup lens enziminin aktivitesi üzerine Mg^{++} derişimlerinin etkisini göstermektedir.

d) Normal, Senil kataraktlı ve Diabetik kataraktlı İnsan Lensi G6PD'larının Isıya Dayanıklılığı :

Her üç enzim $25^{\circ}C$ de değişik zaman süresince aktivite gösterdi. $25^{\circ}C$ de normal enzim ilk bir saat lineer olmak üzere 4 saat, senil kataraktlı enzim yaklaşık olarak ilk iki saat lineer olmak üzere 6 saat,

diabetik kataraktlı enzim ise ilk bir saat lineer olmak üzere 3 saat aktivite gösterdi.

Normal, senil kataraktlı ve diabetik kataraktlı enzimler 50°C de su banyosunda değişik zaman aralıkları ile inkübe edildi ve aktiviteleri ölçüldü. 0, 10, 30, 60 ve 120.ci dakikada aktiviteleri ölçülerek ısıya dayanıklılıkları incelendi. Şekil 6 da her üç enzimin 50°C de çeşitli zaman aralıklarında inkübasyonları sonucu aktivite kayıpları görülmektedir.

e) Normal, Senil kataraktlı ve Diabetik kataraktlı İnsan Lensi G6PD'larının 2-deoksi D-Glukoz-6-Fosfata ilgileri :

Her üç enzimde bir G6P benzeri olan 2-deoksi-D-Glukoz-6-fosfat ile aktivite göstermedi. 2-deoksi-D-glukoz-6-fosfat % 100 inhibitör etkisi gösterdi.

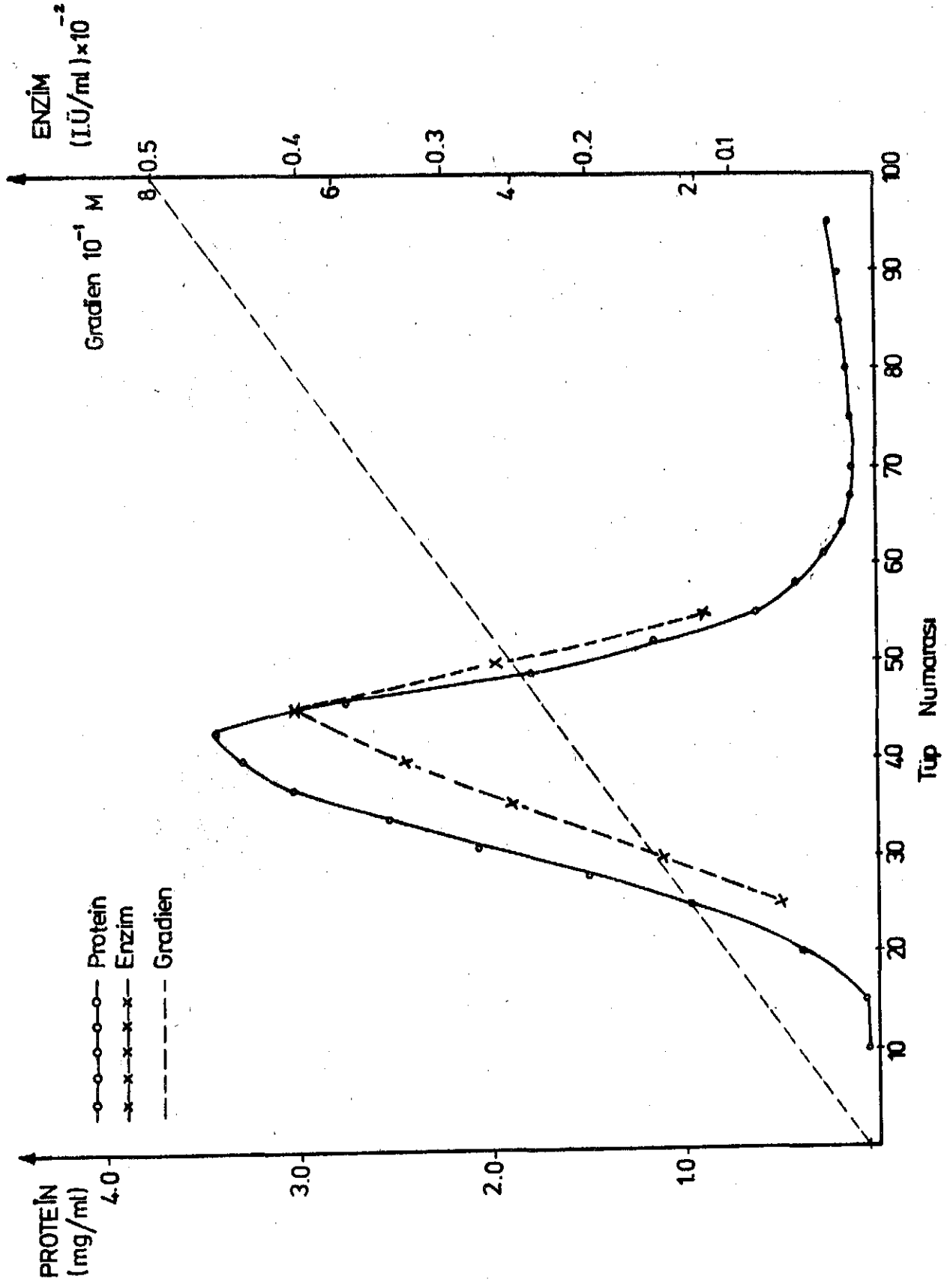
5) Normal, Senil Kataraktlı ve Diabetik Kataraktlı Lens Homojenatlarında Glukoz ve Glukojen Miktarları :

Yöntemler kısmında anlatıldığı gibi her üç gurup lens homojenatında 5 'er lens kullanılarak glukoz ve glukojen miktarları tayin edildi. Senil ve diabetik kataraktlı lenslerde glukoz miktarı normal lenslere oranla fazla bulundu (Tablo III).

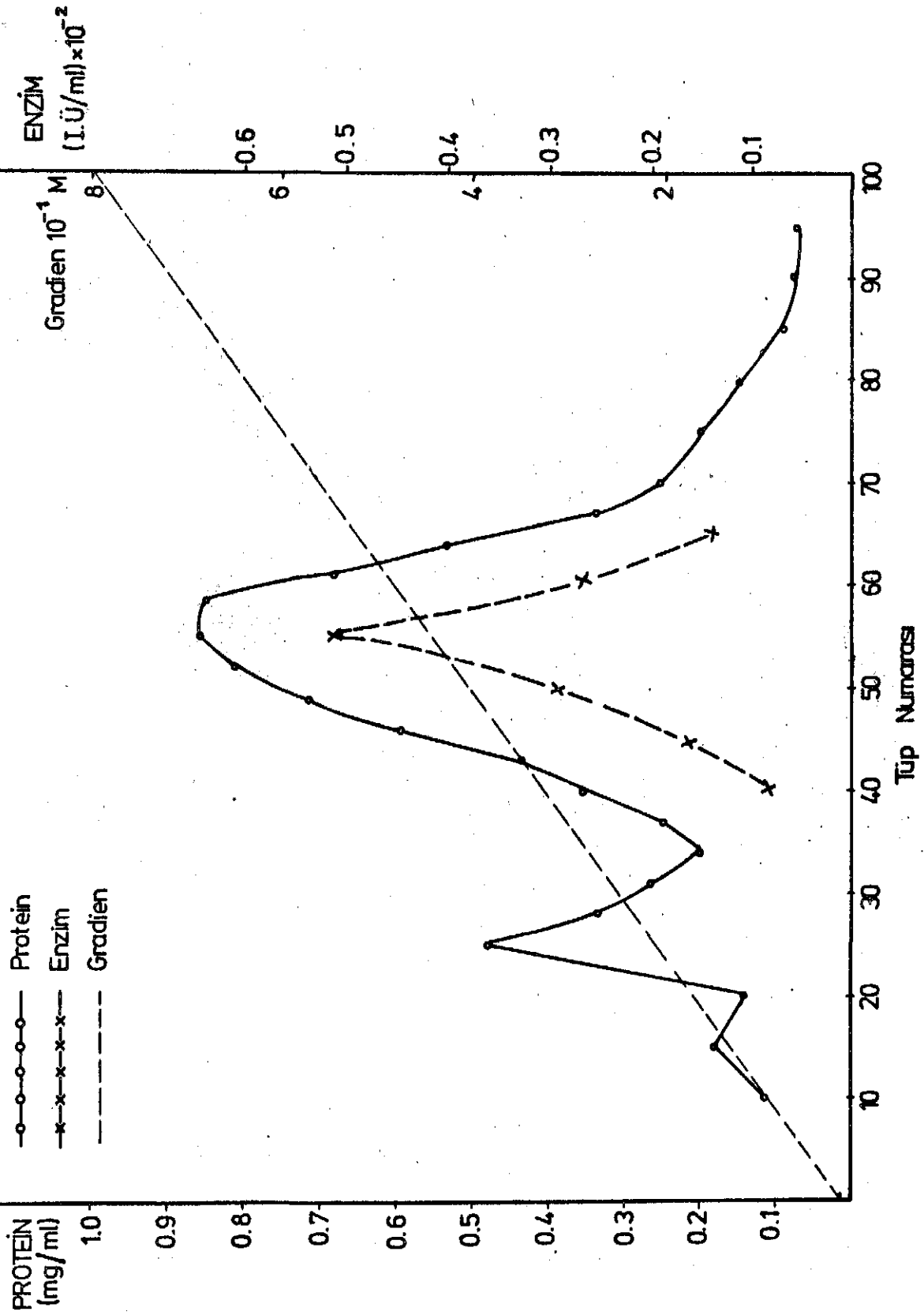
	AKTİVİTE (I.Ü./ml)×10 ⁻³	PROTEİN (mg/ml)	ÖZGÜL AKTİVİTE MIÜ/mg protein×10 ³	LENS SAYISI	LENSLERİN YAŞ ORTALAMASI
Normal enzim	29.90	24.2	1.23	13	63
Senil kataraktlı enzim	12.54	19.5	0.64	15	59
Diabetik kataraktlı enzim	37.62	16.7	2.25	12	64

Tablo I : Normal, senil kataraktlı ve diabetik kataraktlı insan lenslerinin

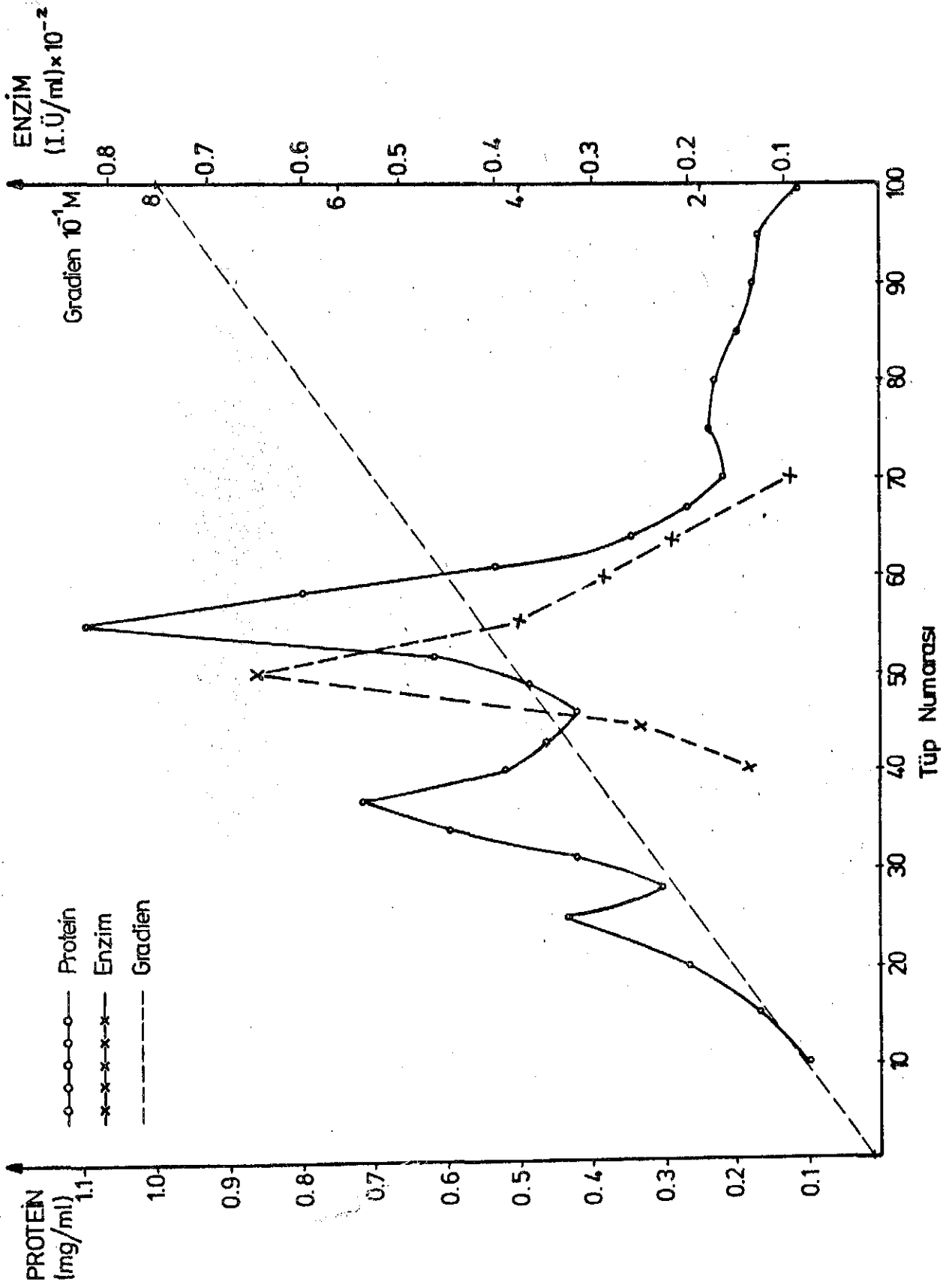
11.000 g. süpernatantlarında G6PD aktiviteleri.



Şekil 1,A : Normal insan lensi G6PD'inin DEAE-selüloz kolonundan elüsyonu.
 Kolon boyutları (2.5 cm X 60 cm), akış hızı 30 ml/saat, elüsyon
 tamponu "N-E" içeren KPO₄ tamponu pH = 6.5 10⁻² M - 8x10⁻¹ M



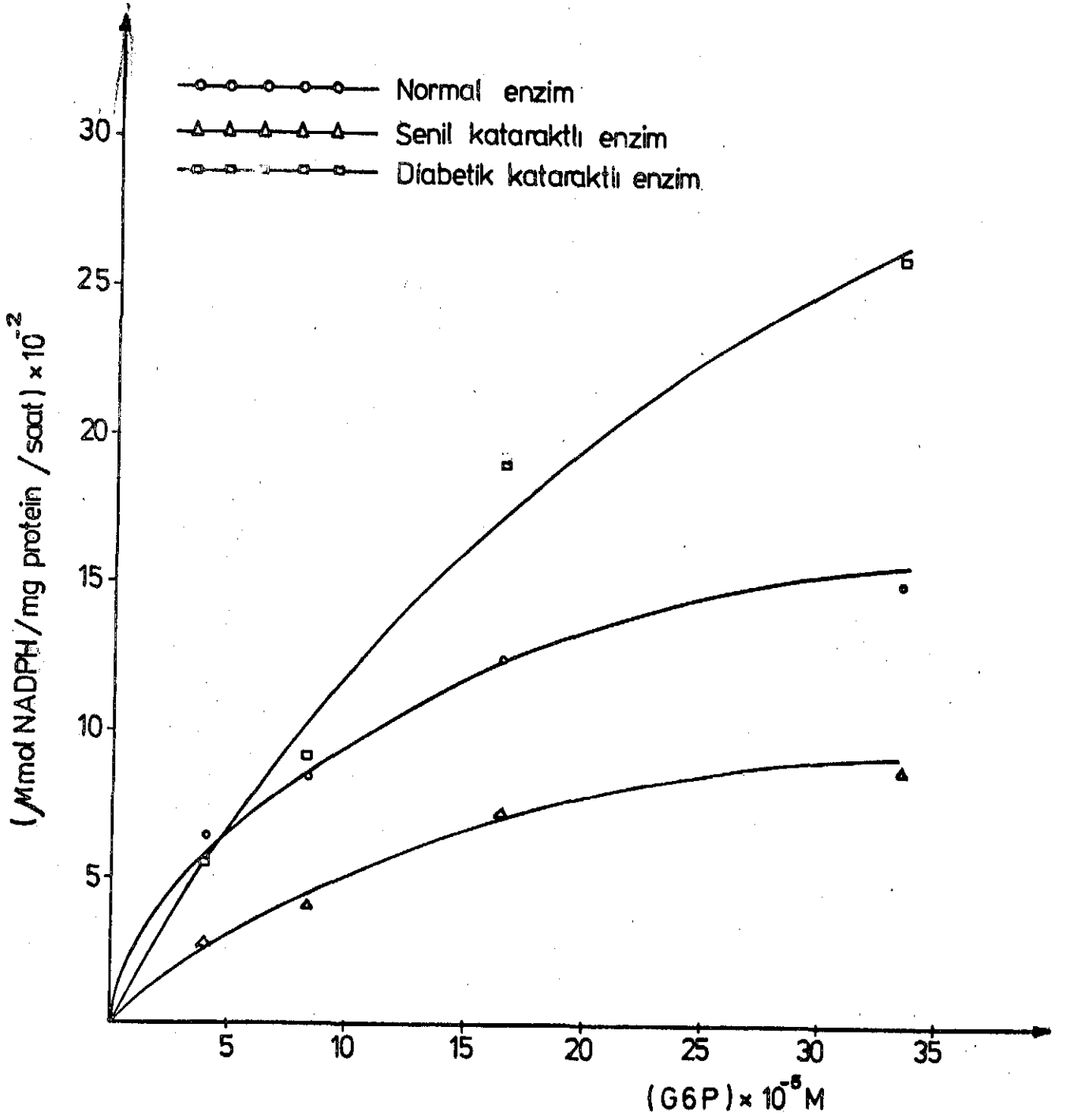
Sekil 1, B : Senil kataraktlı insan lensi G6PD'nin DEAE-selüloz kolonundan elüsyonu. Kolon boyutları (2.5 cm X 60 cm), akış hızı 30 ml/saat, elüsyon tamponu "N-E" içeren KPO_4 tamponu pH = 6.5 10^{-2} M - 8×10^{-1} M



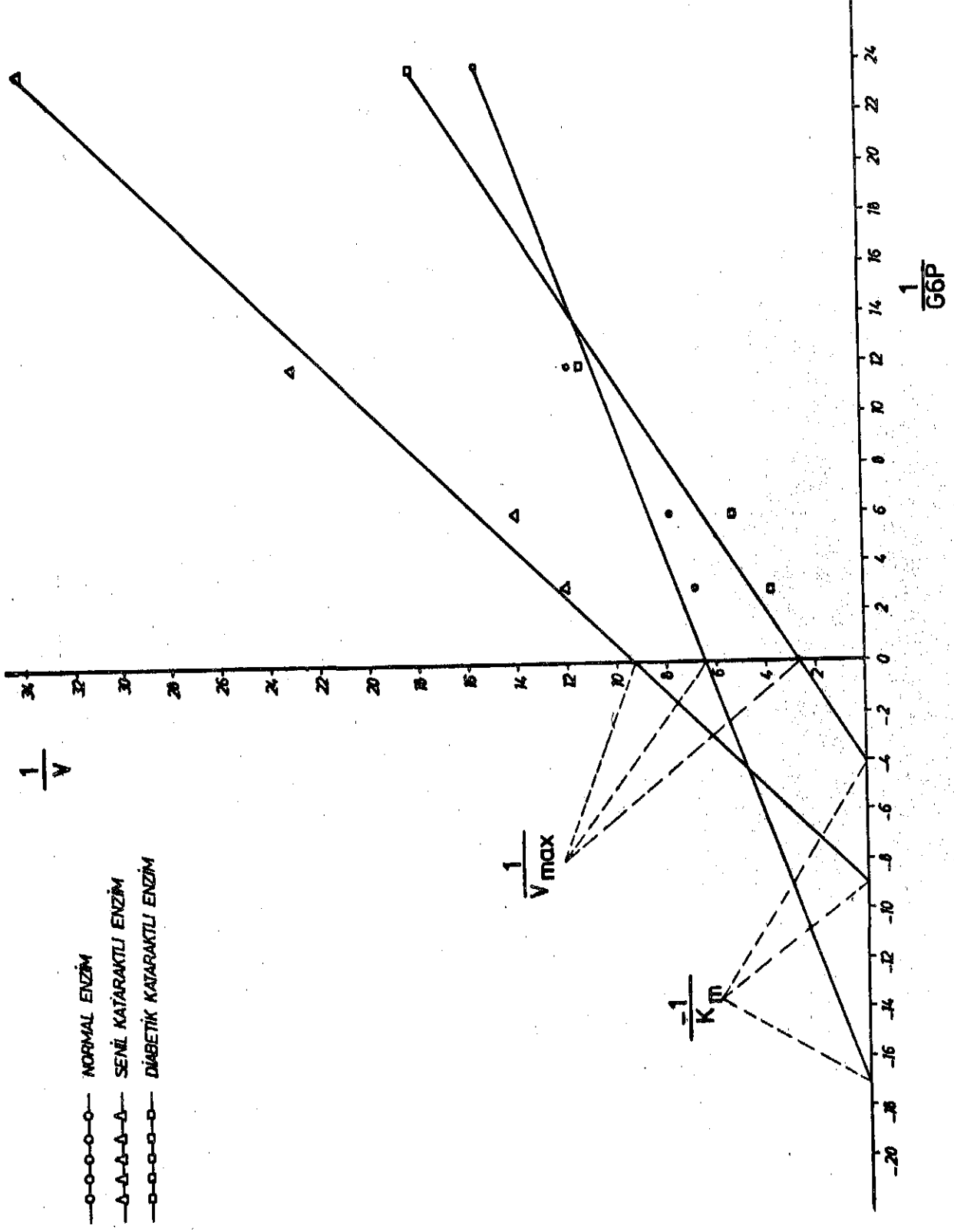
Sekil 1,C : Diabetik kataraktlı insan lensi G6PD'inin DEAE-selüloz kolonundan elüsyonu. Kolon boyutları (2.5 cm X 60 cm), akış hızı 30 ml/saat, elüsyon tamponu "N-E" içeren KPO₄ tamponu pH = 6.5 10⁻² M - 8x10⁻¹ M

	HACİM (ml)	PROTEİN (mg/ml)	AKTİVİTE (I.U./ml) × 10 ³	TOPLAM PROTEİN (mg)	TOPLAM AKTİVİTE (I.U.) × 10 ³	ÖZGÜL AKTİVİTE (I.U./mg protein) × 10 ³	6PGD G6PD	SAFLAŞMA	VERİM %
Normal enzim	11.000g. süpernatanı	24.2	29.90	726.0	897.00	1.23	15/10		
	DEAE-Selüloz sonrası	1.20	3.37	162.0	454.95	2.80	0	2.27	507
Senil kataraktlı enzim	11.000g. süpernatanı	19.5	12.54	526.5	338.58	0.64	1/10		
	DEAE-Selüloz sonrası	0.86	2.60	86.0	260.00	3.02	0	4.71	76.7
Diabetik kataraktlı enzim	11.000g. süpernatanı	16.7	37.62	477.5	940.50	2.25	1/10		
	DEAE-Selüloz sonrası	0.62	3.66	81.8	483.12	5.90	0	2.62	51.3

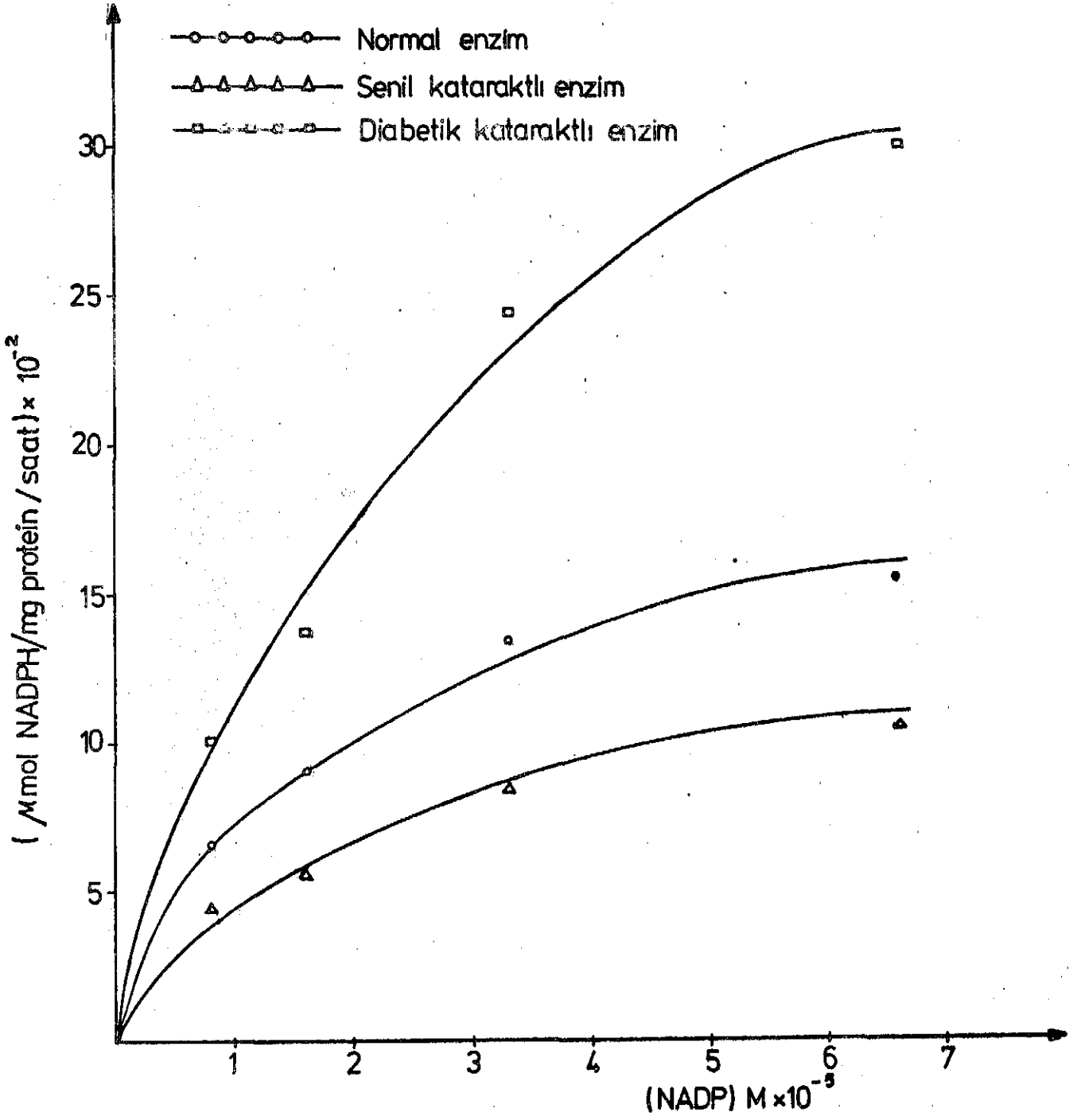
Tablo II : Normal, senil kataraktlı ve diabetik kataraktlı insan lenslerinden G6PD saflaştırılması.



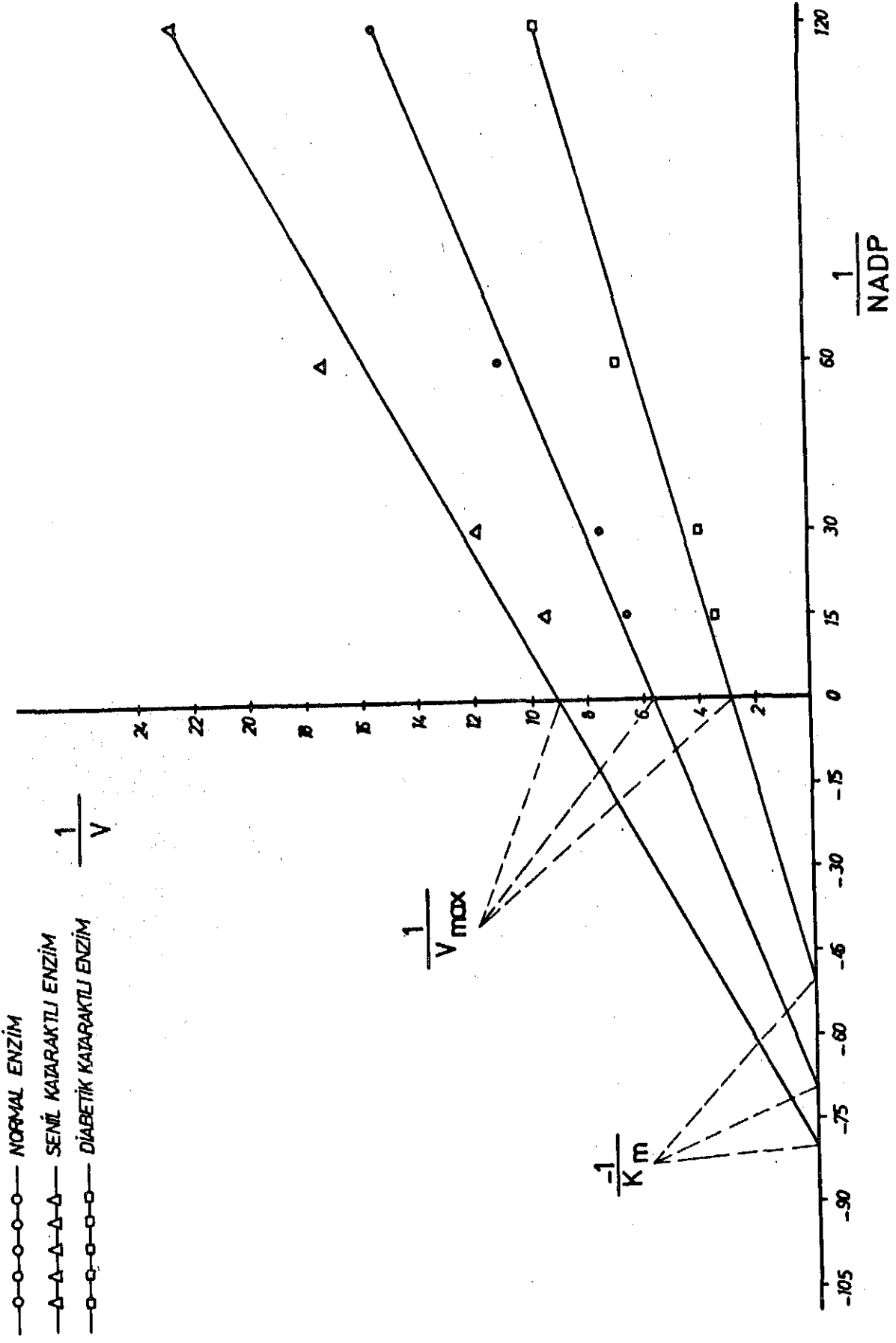
Şekil 2 a) : G6PD'in (G6P) değişken iken Michaelis-Menten eğrisi; (Mg^{++}) : 1.5×10^{-2} , (NADP) son derişimi : 13.3×10^{-5} M pH = 8.0 ve 25°C



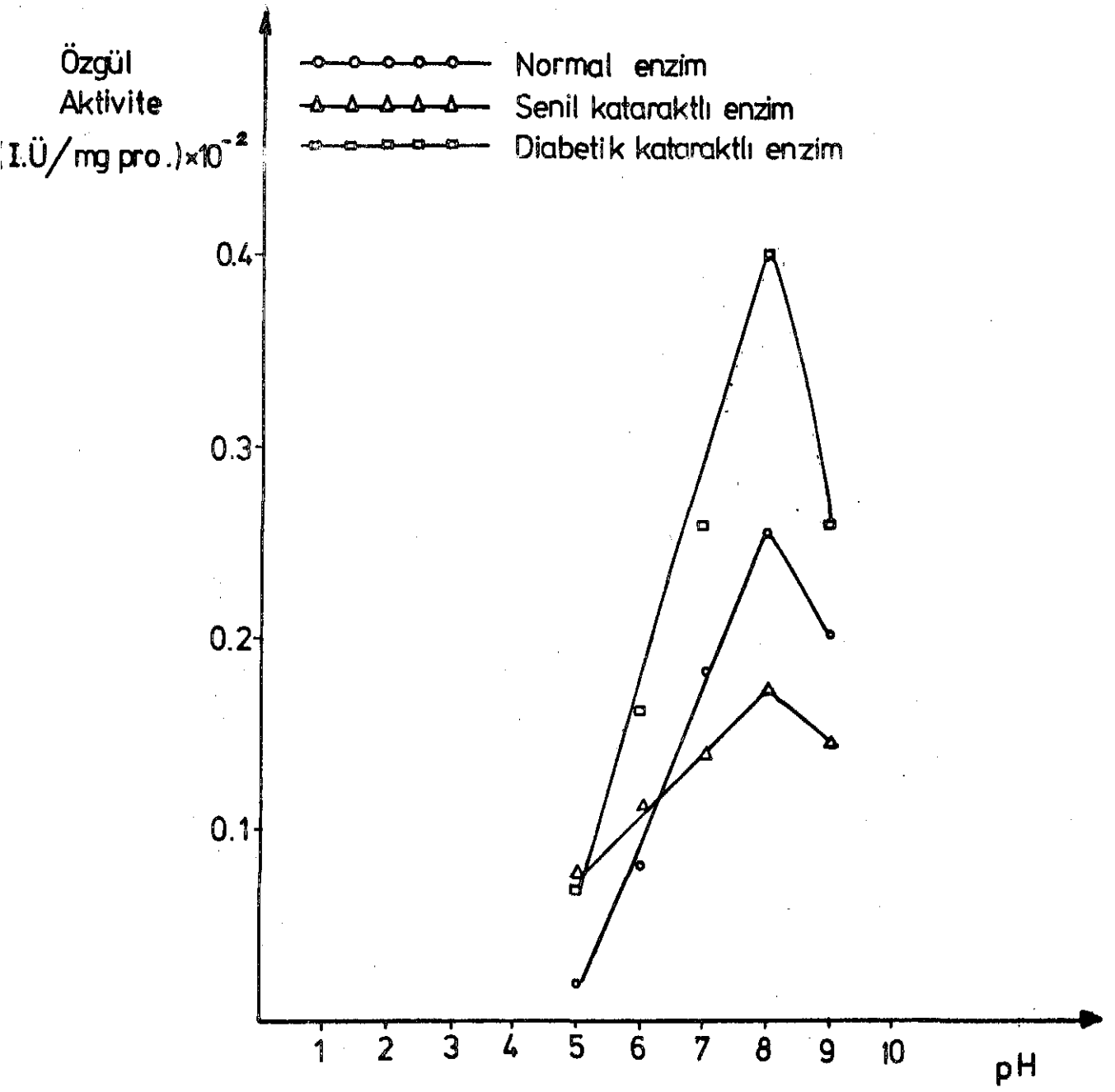
Şekil 2 b) : G6PD'nin (G6P) değışken iken Lineweaver-Burk grafiği;
 (Mg^{++}) : 1.5×10^{-2} , (NADP) son derişimi : 13.3×10^{-5} M



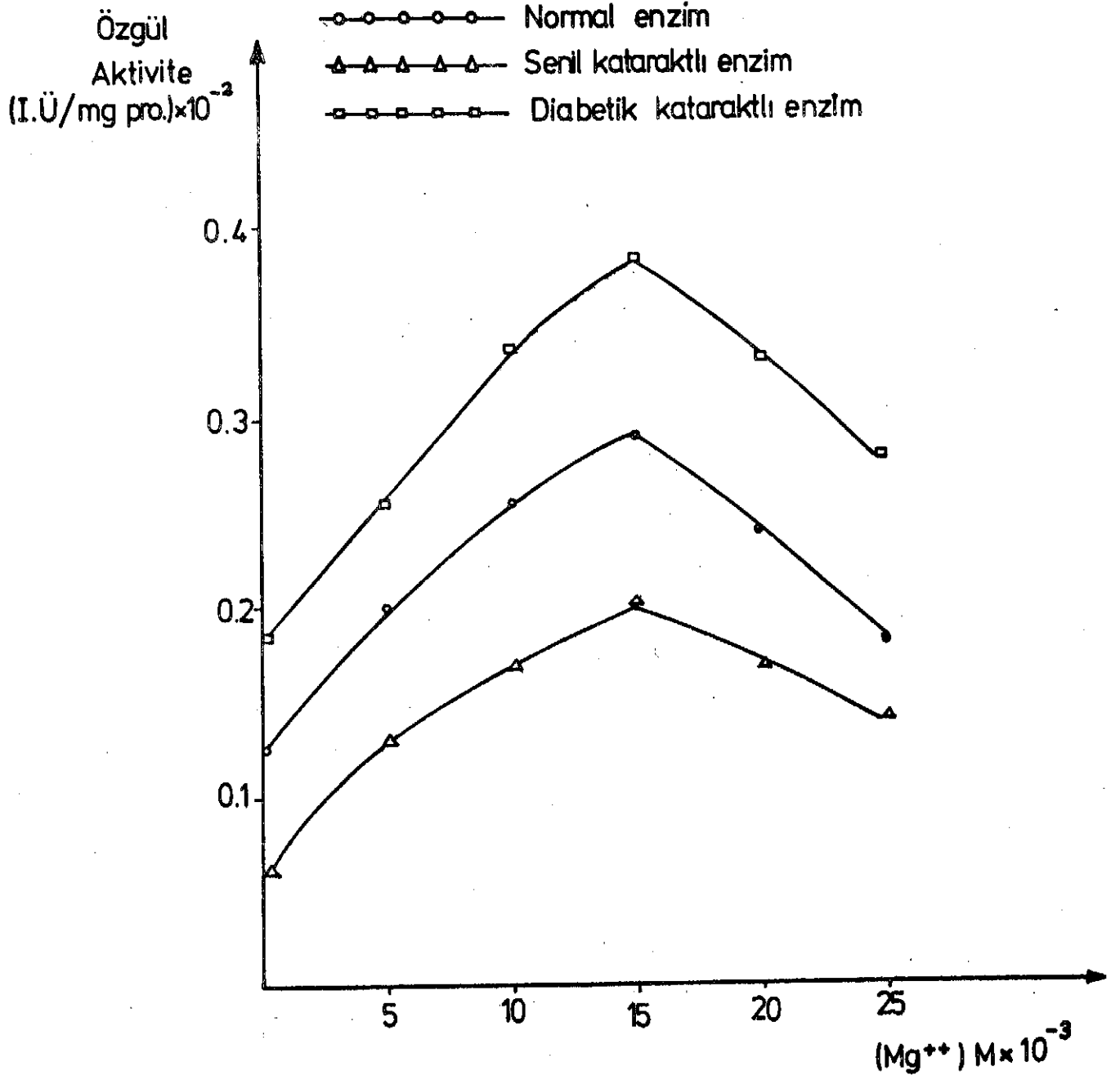
Şekil 3 a) : G6PD'ın (NADP) değişken iken Michaelis-Menten eğrisi;
 $(\text{Mg}^{++}) : 1.5 \times 10^{-2} \text{ M}$, (G6P) son derişimi : $66.6 \times 10^{-5} \text{ M}$,
 $\text{pH} = 8.0$ ve 25°C .



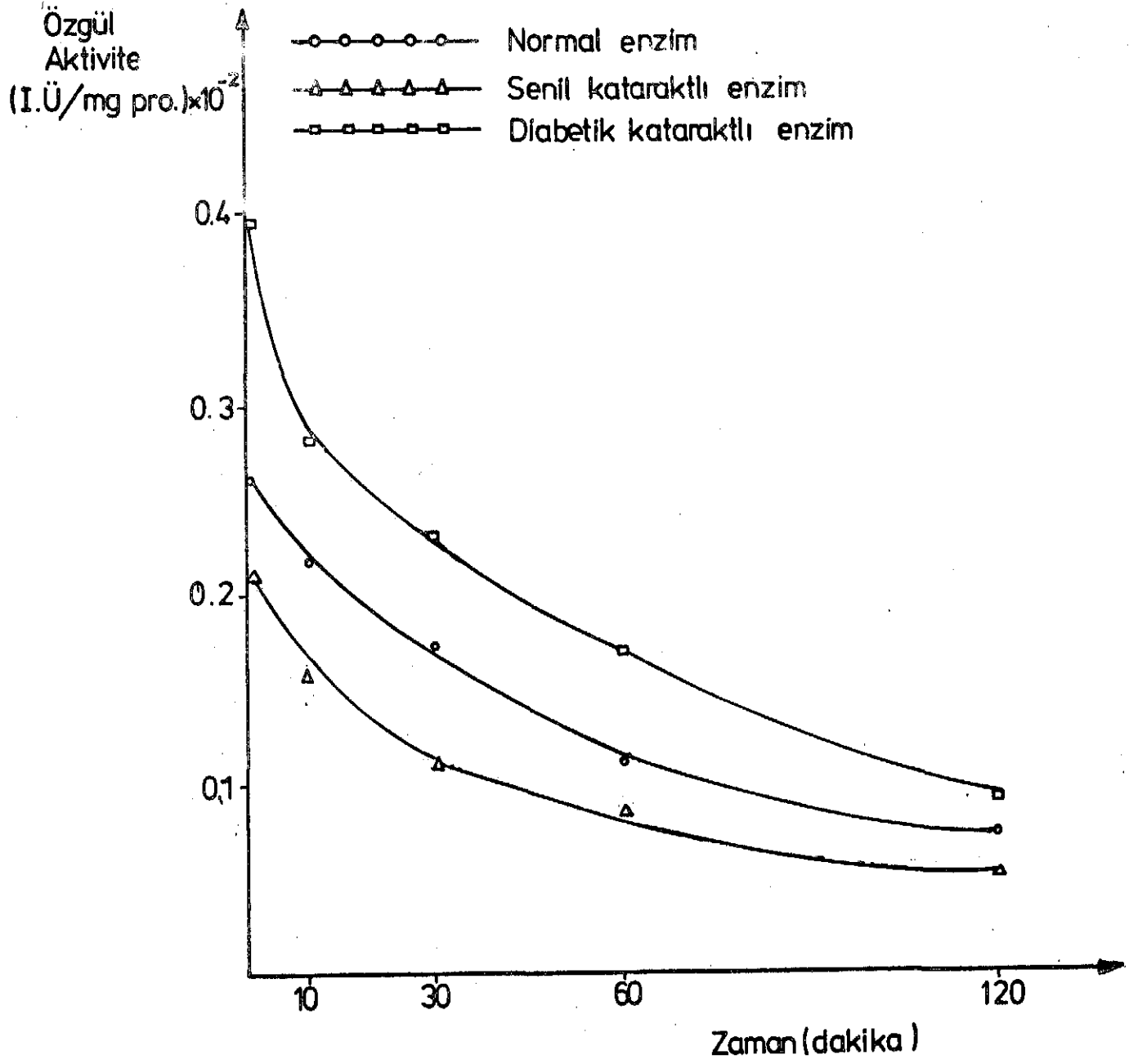
Şekil 3 b) : G6PD'ın (NADP) değişken iken Lineweaver-Burk grafiği;
 (Mg^{++}): 1.5×10^{-2} M, (G6P) son derişimi : 66.6×10^{-5} M,
 pH = 8.0 ve $25^\circ C$.



Şekil 4 : Normal, senil kataraktlı ve diabetik kataraktlı insan lensi G6PD'lerinin kataliz hızına pH'nın etkisi.
 (Mg^{++}) : 1.5×10^{-2} M ve $25^{\circ}C$.



Şekil 5 : Değişen Mg⁺⁺ derişimlerinin normal, senil kataraktlı ve diabetik kataraktlı insan lense G6PD'lerinin aktivitesine etkisi. pH = 8.0, 25°C.



Şekil 6 : Normal, senil kataraktlı ve diabetik kataraktlı insan lensi G6PD enzimlerinin 50°C de 0, 10, 30, 60 ve 120 dakika inkübasyonları sonucu aktivite kayıpları.

	GLUKOZ <i>µg glukoz/100 mg lens yaş ağırlığı</i>	GLUKOJEN <i>µg glukoz/100 mg lens yaş ağırlığı</i>
Normal lens	4	63
Senil kataraktlı lens	35	55
Diabetik kataraktlı lens	33	45

Tablo III : Normal, senil kataraktlı ve diabetik kataraktlı lens homojenatlarında glukoz ve glukojen miktarları (100 mg lens yaş ağırlığı başına µg glukoz).

T A R T I Ş M A

Normal, senil kataraktlı ve diabetik kataraktlı insan lensi 11.000 g. süpernatantlarında G6PD'ların özgül aktiviteleri ve ml'deki protein miktarları farklı bulundu. Tablo I. Diabetik kataraktlı enzimin özgül aktivitesi 2.25×10^{-3} olup grup içerisinde en yüksek değerdedir. Buna karşın senil kataraktlı enzimin özgül aktivitesi 0.64×10^{-3} olup en düşük değere sahiptir. Normal enzimin özgül aktivitesi ise 1.23×10^{-3} olup iki değer arasında. Bu bulgular daha önceki çalışmalarını destekler niteliktedir. Senil kataraktta ve özellikle kataraktın son devrelerinde G6PD enziminin aktivitesi çok azalmakta ve hatta bazen kaybolmaktadır (21,22,29).

G6PD enzim aktivitesine etki eden bir çok faktör vardır. Yaş, diyet, hormon, $NADP / NADPH-H^+$ oranı gibi. Yaş ilerledikçe enzim aktivitesinde düşme olduğu gösterilmiştir (21,23,29,45,46). Bu nedenle bu çalışmadaki üç grup lensin aynı yaş civarında olması sağlandı.

Diyetin enzim aktivasyonunda rolünü açıklayan deneyler özellikle sıçan karaciğerinde yapılmış. Aç bırakılmış sıçanlara yüksek proteinli ve yüksek karbonhidratlı diyet verildiğinde enzim aktivitesinde

bir artış gözlenmiştir (23-25,58). Bu enzim aktivitesindeki artışın yeni RNA sentezine bağlı olabileceği görüşü önem kazanmıştır (24,25).

Yine sıçan karaciğerinde glukagon ve cAMP'nin G6PD sentezini inhibe ettiği, insülinin ise aktive ettiği gösterilmiştir (23).

$NADP^+ / NADPH + H^+$ oranının enzim aktivitesinin düzenlenmesinde çok önemli olduğu Hong-Ming ve Chylack (22), Holten ve arkadaşları (59), Veech ve arkadaşları (60) tarafından ifade edilmiştir.

Diabetik kataraktlı enzimin özgül aktivitesinin normal enzime nazaran yüksek oluşu ilginçtir. Öncelikle akla gelen diabete bağlı olarak lens metabolizmasında enzim aktivitesini etkileyecek bir değişikliğin ortaya çıkmasıdır. Bu muhtemelen glukoz aracılığı ile olabilir. Bu çalışmada glukoz miktarı her iki tip kataraktta normal lenstekine nazaran 8-9 misli yüksek bulunmuştur. Glukoz miktarının diabetik kataraktta çok bulunduğu daha önce de gösterilmiştir (33). Ortamda glukozun fazla oluşu G6P'tın oluşumunu hızlandırır. Çünkü heksokinaz enziminin glukozla ilgisi çok fazladır. Hatta senil kataraktta bile heksokinaz aktivitesi normalden yüksek bulunmuştur (29,32). Böylece pentoz fosfat metabolik yolunun ilk enzimi G6PD özellikle diabetik kataraktta bir ölçüde uyarılmış olur. Ayrıca her iki tip kataraktta protein miktarları azalmıştır. Bu çalışmada da her iki tip kataraktta özellikle diabetik kataraktta ml'deki protein normal lenstekine nazaran daha düşük bulunmuştur. Normal lenste 24.2 mg/ml iken, diabetik kataraktlı lenste 16.7 mg/ml dir. Kataraktta glutasyon miktarının da düştüğü bilinmektedir. Glutasyonun en önemli görevlerinden biri -SH gurubu ihtiva eden proteinleri oksidasyonlardan korumaktır. Bu arada kendisi oksitlenir. Okside glutasyonun redüklenebilmesi için ortamda yeterli oranda NADPH'ya ihtiyaç var-

dır. NADPH'ların oluşması içinde özellikle G6PD enziminin aktivasyonu gerekir. Muhtemelen bu nedenlerden ötürü diabetik katarakta G6PD aktivitesi artmıştır.

Bu çalışmada kullanılan diabetik kataraktlı lenslerden biri diabet tedavisi görmüş bir hastaya aitti. Bu lensin G6PD özgül aktivitesi normal değerde bulunmuştur. Bu, insülinin diabetteki katarakt oluşumunu önleyebileceğini, en azından geciktirebileceğini düşündürmektedir.

Farelerde kalıtsal olarak ($Na^+ - K^+$) ATPaz eksikliği nedeniyle oluşan katarakta, kataraktlı lensler alınıp yerine yeni doğmuş fare lensleri yerleştirildikten sonra bu lenslerde kataraktın gelişmediği görülmüştür. Bu bulgu kataraktın sistemik bir hastalık sonucu olmadığını, lenste lokalize olmuş gene bağımlı bir mekanizmayla ortaya çıkabileceğini göstermektedir (61).

Enzim saflaştırılmasında çok yaygın olarak kullanılan amonyum sülfat çöktürmesi verimi çok düşürdüğü için kullanılmadı (27). Zaten G6PD saflaştırılmasında daha önceleri de anyon değiştirici reçinelerden yararlanılmıştır (21,22,62). Bu çalışmada normal, senil kataraktlı ve diabetik kataraktlı G6PD'ların kısmen saflaştırılması için DEAE-selüloz kolon kromatografisi yöntemi kullanıldı. Normal enzim % 50.7 verimle 2.27 kez, senil kataraktlı enzim % 76.7 verimle 4.71 kez, diabetik kataraktlı enzim ise % 51.3 verimle 2.62 kez saflaştırıldı. Tablo II. Bu saflaştırmanın ana gayesi G6PD enziminin ortamdan uzaklaştırılmasıdır. Çünkü G6PD tepkimesinde olduğu gibi bu tepkime sonucunda da NADPH oluşmaktadır. Bu nedenle kısmen saflaştırılmış enzimlerde 6PGD aktiviteleri araştırıldı, her üç enzimde 6PGD aktivitesi göstermedi.

Kısmen saflaştırılmış normal, senil kataraktlı ve diabetik kataraktlı lens G6PD'lerinin her iki substratı için (G6P ve NADP) K_m değerleri pH = 8.0 ve 1.5×10^{-2} M $MgCl_2$ varlığında ;

Normal enzimin; G6P için K_m değeri : 58.82×10^{-6} M, NADP için K_m değeri : 14.49×10^{-6} M olarak bulundu. Senil kataraktlı enzimin ; G6P için K_m değeri : 111.11×10^{-6} M, NADP için K_m değeri : 12.34×10^{-6} M olarak bulundu. Diabetik kataraktlı enzimin; G6P için K_m değeri ise : 238.09×10^{-6} M, NADP için K_m değeri : 19.60×10^{-6} M olarak bulundu. Şekil 2 a ve b. Şekil 3 a ve b.

Bu bulgulardan anlaşıldığına göre normal enzim ile senil ve diabetik kataraktlı enzimlerin NADP'ye karşı ilgileri önemli bir farklılık göstermemekte. Bununla beraber normal enzimin G6P'ta ilgisi senil ve diabetik kataraktlı enzimden daha fazladır. Aynı zamanda diabetik kataraktlı enzimin G6P'ta ilgisi senil kataraktlı enzimin G6P'ta ilgisinden daha az bulunmuştur.

Charlton ve Heyningen (21)'in çalışmalarında yaş ortalaması 69 olan normal insan lensi G6PD'sinin G6P için K_m değeri : 59×10^{-6} M, NADP için K_m değeri : 9×10^{-6} M olarak bulunmuş. Hong-Ming ve Chylack (22)'in çalışmalarında ise senil kataraktlı insan lensi G6PD'sinin G6P için K_m değeri : 48.8×10^{-6} M, NADP için K_m değeri : 3.95×10^{-6} M olarak bulunmuştur. Normal enzimin her iki substratı için bulunan K_m değerleri Charlton ve Heyningen'in K_m değerlerine tam olarak uymaktadır. Senil kataraktlı enzimin her iki substratı için bulunan K_m değerleri ise Hong-Ming ve Chylack'ın K_m değerlerinden daha büyüktür.

Tablo IV de değişik memeli dokuları ve mikroorganizmalardan saflaştırılan G6PD'ların her iki substratı için K_m değerleri görülmektedir (4,9-12,21,27,62-64).

G6PD	G6P için $K_m (10^{-6} M)$	NADP için $K_m (10^{-6} M)$
İnsan alyuvarları	50 - 78	2.9 - 4.4
İnsan akyuvarları	16	8.1
Sığır adrenal korteksi	42	5.6
Sıçan yağ dokusu	35	1.7
Sıçan kası	34	2.1
Sıçan karaciğeri	48	1.1
Maya	35	2.8
Asetobakter ksilinum	2500	40
Candida utilis	230	67
Neurospora crassa	29	13
E. coli	70	15
Koyun lensi	32	12
Kobay lensi	32	12.5

Tablo IV : Çeşitli türlerden saflaştırılan G6PD'ların K_m değerleri.

Yöntemlerde belirtilen tamponlarla pH'nın normal, senil kataraktlı ve diabetik kataraktlı enzim kataliz hızına etkisi incelendiğinde kataliz hızının pH = 8.0 de en yüksek olduğu bulundu. Şekil 4. Bu değer insan alyuvarları (4), sıçan karaciğeri (62), koyun lensi (21), koyun lensi (27) gibi birçok dokulardan elde edilen G6PD için bulunan pH değerlerinin aynıdır.

pH'nın enzim kataliz hızına etkisi her üç enzimle pH = 10.0 da 1.9×10^{-1} M Glisin - NaOH tamponu kullanılarak incelendiğinde pH = 8.0 de gözleendiği gibi ikinci bir aktivasyon gösterdi. Bu pH = 10.0 daki aktivasyonun kullanılan tamponun derişimine bağılı iyonik bir etkiden ötürü ortaya çıktığı kanısına varılarak ikinci tampon sisteminin derişimleri 5×10^{-2} M olacak şekilde hazırlandı. Bu derişimdeki Glisin - NaOH tamponu ile pH = 10.0 da her üç gurup G6PD enziminde ikinci bir aktivasyon gözlenmedi.

pH = 8.5 - 9.0 arasında koyun lensi G6PD'nin pH = 8.0 den başka ikinci bir aktivasyon gösterdiği Charlton ve Heyningen (21) tarafından gözlenmiştir. Ancak bunun nedenini izah edememişlerdir.

Normal, senil kataraktlı ve diabetik kataraktlı enzimlerin kataliz hızı Mg^{++} derişimi 1.5×10^{-2} iken en yüksektir. Bu değer altında ve üstünde düşmektedir. Mg^{++} dan başka Ca^{++} tarafından enzimin aktive edildiği gösterilmiştir (22). Yüksek Mg^{++} ve Ca^{++} miktarları enzimi inhibe etmektedir (21).

Normal, senil kataraktlı ve diabetik kataraktlı enzimlerin $25^{\circ}C$ de zamana bağılı olarak gösterdikleri aktivite farklıdır. Normal enzim 4 saat, senil kataraktlı enzim 6 saat, diabetik kataraktlı enzim ise 3 saat aktivite gösterdi.

Enzimlerin 50°C de değişik zaman aralıkları ile inkübasyonu sonucu aktiviteleri ölçüldü. 0, 10, 30, 60 ve 120.ci dakikada aktiviteleri ölçülerek ısıya dayanıklılıkları incelendi. Özellikle diabetik kataraktlı enzim 10 dakika 50°C de inkübe edildiğinde aktivitesinde diğer enzimlere nazaran büyük bir düşüş gösterdi. Bu bulgu diabetik kataraktlı enzimin, diğer iki enzime nazaran çok daha az dayanıklı olduğunu göstermektedir.

Her üç enzimde bir G6P benzeri olan 2-deoksi-D-glukoz-6-fosfat ile aktivite göstermedi. Yani 2-deoksi-D-glukoz-6-fosfat her üç enzim içinde inhibitördür.

Normal, senil kataraktlı ve diabetik kataraktlı lens homojenatlarında glukoz ve glukojen miktarları 100 mg lens yaş ağırlığı başına µg glukoz olarak tayin edildi. Senil ve diabetik kataraktlı lenslerde glukoz miktarı, normal lenslere oranla 8-9 misli fazla bulundu. Glukojen miktarları ile bir ilgi kurulamadı.

G6P'in senil kataraktlı ve diabetik kataraktlı G6PD'lar için bulunan K_m değerleri, G6P'in normal enzim için bulunan K_m değerinden büyüktür. G6P'a normal enzime nazaran, senil kataraktlı ve diabetik kataraktlı enzimlerin daha az olan ilgileri şüphesizki kataraktın yol açtığı bir durumdur. Özellikle şeker kataraktında glukoz miktarının normalden çok olduğu gösterilmiş (33), ayrıca bu çalışmanın bulguları olarakta hem senil hem de diabetik kataraktta glukoz miktarı normal lenslerden yüksek bulunmuştur. Glukoz miktarının çok oluşu, lenste özellikle kataraktta heksokinaz aktivitesinin de yüksekliğinden dolayı G6P'ın fazla miktarda oluşumuna yol açabilir. Belki de bu nedenle kataraktlı enzimlerin G6P'a ilgileri normalden azdır. Kuvvetle muhtemeldir ki katarakt oluştuğu zaman enzimin substratları ile olan ilişkisi değişmektedir.

Ö Z E T

Normal, senil kataraktlı ve diabetik kataraktlı insan lensi G6PD'larının 11.000 g. süpernatantları DEAE-selüloz kolon kromatografisine tatbik edilerek 6PGD'lar uzaklaştırılmak suretiyle kısmen saflaştırıldı ve kinetik çalışmalar bu enzimlerle yapıldı. Enzimlerin özellikleri birbirleriyle karşılaştırıldı.

Enzimlerin her iki substratı olan G6P ve NADP'ye ait K_m değerleri, kataliz hızına pH'nın, Mg^{++} 'un etkileri incelendi. $25^{\circ}C$ de ve $50^{\circ}C$ de enzimlerin aktiviteleri ve ısıya dayanıklılıkları araştırıldı. Enzimlerin bir G6P benzeri olan 2-deoksi-D-glukoz-6-fosfat ile aktivitesine bakıldı.

Normal, senil kataraktlı ve diabetik kataraktlı lens homojenatlarında glukoz ve glukojen miktarları tayin edildi.

K I S A L T M A L A R

- G6PD : Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz.
6PGD : 6-fosfoglukonat dehidrogenaz.
6PG : 6-fosfoglukonat.
NADP : Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat.
NADPH : İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat.
G6P : Glukoz-6-fosfat.
DEAE : Dietil aminoetil.
EDTA : Etilen diamin tetraasetik asit.
M : Molar
O.D. : Optik dansite.
µg : Mikrogram.

K A Y N A K L A R

1. Warburg, O., and Christian, W. : *Biochem. Z.*, 242, 206 (1931).
2. Turchetti, A. : *Riforma. Med.*, 62, 325 (1948).
3. Carson, P.E., Flanagan, C.L., Ickes, C.E., and Alving, A.S. :
Science, 124, 484 (1956)
4. Yoshida, A. : *J. Biol. Chem.*, 241, 4966 (1966).
5. Bonsignore, A., Lorenzoni, I., Cancedda, R., and De Flora, A. :
Biochem. Biophys. Res. Commun., 39(1), 142 (1970).
6. Bonsignore, A., Cancedda, R., Nicolini, A., Damiani, E., and De Flora,
A. : *Arch. Biochem. Biophys.*, 147, 493 (1971).
7. Wrigley, N.G., Heather, J.V., and Bonsignore, A., De Flora, A. :
J. Mol. Biol., 68, 483 (1972).
8. Yoshida, A., and Hoagland, D.V. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*,
40(5), 1167 (1970).
9. Bonsignore, A., Fornaini, G., Leoncini, G., Fantoni and Segni, P. :
J. Clin. Invest., 45, 12 (1966).

10. Engel, H.J., Domschke, W., Alberti, M., and Domagk, G.F. : *Biochim. Biophys. Acta.*, 191, 509 (1969).
11. Scott, W.A., and Tatum, E.L. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 66, 515 (1970).
12. Cavalieri, R.L., and Sable, H.Z. : *J. Biol. Chem.*, 248, 2815 (1973).
13. Sanwall, B.D. : *J. Biol. Chem.*, 245, 1626 (1970).
14. Criss, W.E., and Mc Kerns, K.W. : *Biochemistry.*, 7(1), 125 (1968).
15. Schaechet, M., and Squire, P.G. : *Biochim. Biophys. Acta.*, 227, 491 (1971).
16. Criss, W.E., and Mc Kerns, K.W. : *Arch. Biochem. Biophys.*, 135, 118 (1969).
17. Matsuda, T., and Yugary, Y. : *J. Biochemistry.*, 61, 535 (1967).
18. Holten, D. : *Biochim. Biophys. Acta.*, 268, 4 (1972).
19. Nevaldine, H., Barbara, H.H., Costance and Levy Richard, H. : *Arch. Biochem. Biophys.*, 165, 398 (1974).
20. Raineri, R., and Levy Richard, H. : *Biochemistry.*, 9(11), 2233 (1970).
21. Charlton, M. Josephine and Heyningen Ruth Van. : *Exp. Eye. Res.*, 11, 147 (1971).
22. Hong-Ming Cheng and Chylack L.T. Jr. : *Exp. Eye. Res.*, 24, 459 (1977).

23. Rose, K.J. Wang and Laura Livingston M. : *Exp. Gerontol.*, 12(3/4), 117 (1977).
24. Szepesi, B., and Moser, P. : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 136, 200 (1971).
25. Szepesi, B., and Freedland A. Richard : *J. Nutr.*, 99, 449 (1969).
26. Mohammed I. Kanji, Myron L. Toews, and Carper W. Robert : *J. Biol. Chem.*, 251(8), 2255 (1976).
27. Yarımağan, S., Mergen, K. : *Biyokimya Dergisi*, Yıl 1, Sayı 1, Sayfa 53 (1976).
28. Bullard, B., and Pirie, A. : *Exp. Eye. Res.*, 3, 118 (1964).
29. Friedburg, D. : *Exp. Eye. Res.*, 19, 117 (1973).
30. Heyningen Ruth Van : *Exp. Eye. Res.*, 1, 396 (1962).
31. Chylack, Leo T. Jr. : *Exp. Eye. Res.*, 11, 280 (1971).
32. Barber, G.W. : *Arch. Ophthalmol.*, 91, 141 (1974).
33. Diabetes and Cataract. *Brit. Med. J.*, 5493, 934 (1966).
34. Elbrink, J., and Bihler, I. : *Biochim. Biophys. Acta.*, 282, 337 (1972).
35. Levari, Ruth., Kornblueth, W., and Wertheimer, E. : *J. Endocrinol.*, 22, 361 (1961).
36. Kenneth, M. Giles, Harris, E. John. : *Am. J. Ophthalmol.*, 48, 508 (1959).

37. Kenneth H. Gabbay and Kinoshita, J.H. : *Israel J. Med. Sci.*, 8, 1557 (1972).
38. Reddy, V.N. : *Exp. Eye. Res.*, 11, 310 (1971).
39. Truscott, R.J.W., and Augusteyn, R.C. : *Biochim. Biophys. Acta.*, 492(1), 43 (1977).
40. Reddy, V.N., Schwass, D., Chakrapani, B., and Lim, C.P. : *Exp. Eye. Res.*, 23, 483 (1976).
41. Zygulska-Mach H. : *Pol. Med. J.*, 5, 667 (1966).
42. Truscott, R.J.W., and Augusteyn, R.C. : *Exp. Eye. Res.*, 25(2), 139 (1977).
43. Alao, J.F. : *Experientia*, 33(2), 862 (1977).
44. Stevens Victor., Rouzer Carol. A., Monnier Vincent M. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 75(6), 2918 (1978).
45. Otto Hockwin and Rainer Gassner : *Exp. Eye. Res.*, 7, 269 (1968).
46. Cutler, R. : *Exp. Gerontol.*, 10, 37 (1975).
47. Patterson, J.W., Margaretta, E. Patterson., Everett, V.K., and Reddy, D.V.N. : *Invest. Ophthal.*, 4, 98 (1965).
48. Kinoshita, J.H. : *Acta. Soc. Ophthal. Jap.*, 80(11), 1362 (1976).
49. Collins, J.G., and Corder, N. Clinton : *Invest. Ophthalmol. Visual. Sci.*, 16(3), 242 (1977).

50. Varma, S.D., Mizuno, A., Kinoshita, J.H. : *Science*, 195 (4274), 205 (1977).
51. Marjorie, F. Lou and Kinoshita, J.H. : *Biochim. Biophys. Acta.*, 141, 547 (1967).
52. Zinkham, W.H., and Lenhard, R.E. : *J. Pediat.*, 55, 319 (1959).
53. Zinkham, W.H. : *Bull. John Hopk. Hosp.*, 102, 169 (1958).
54. Free, H. Alfred "Advances in Clinical Chemistry". Ed. Sobotka, H. and Stewart, C.P., Acad. Press. Inc., Newyork and London, Vol 6, 67 (1963).
55. Warburg, O., and Christian, W. : *Biochem. J.*, 310, 384 (1942).
56. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. : *J. Biochem.*, 193, 265 (1951).
57. Peterson, E.A., Sober, H.A., "Methods in Enzymology". Ed. Colowick, S.P., Kaplan, N.O., Acad. Press., Inc., Newyork, Vol 5, 3 (1962)
58. Gözükkara Engin., Frolich, M., and Holten, D. : *Biochimica. et Biophysica Acta.*, 286, 155 (1972).

50. Varma, S.D., Mizuno, A., Kinoshita, J.H. : *Science*, 195 (4274), 205 (1977).
51. Marjorie, F. Lou and Kinoshita, J.H. : *Biochim. Biophys. Acta.*, 141, 547 (1967).
52. Zinkham, W.H., and Lenhard, R.E. : *J. Pediat.*, 55, 319 (1959).
53. Zinkham, W.H. : *Bull. John Hopk. Hosp.*, 102, 169 (1958).
54. Free, H. Alfred "Advances in Clinical Chemistry". Ed. Sobotka, H. and Stewart, C.P., Acad. Press. Inc., Newyork and London, Vol 6, 67 (1963).
55. Warburg, O., and Christian, W. : *Biochem. J.*, 310, 384 (1942).
56. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. : *J. Biochem.*, 193, 265 (1951).
57. Peterson, E.A., Sober, H.A., "Methods in Enzymology". Ed. Colowick, S.P., Kaplan, N.O., Acad. Press., Inc., Newyork, Vol 5, 3 (1962)
58. Gözükkara Engin., Frolich, M., and Holten, D. : *Biochimica. et Biophysica Acta.*, 286, 155 (1972).
59. Holten, D., Procsal, D., and Chang, H.L. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 68, 436 (1976).
60. Veech, R.L., Eggleston, L.V., Krebs, H.A. : *Biochem. J.*, 115, 609 (1969).
61. Yamamoto, Y., Iwata, S. : *Jap. J. Ophthalmol.*, 16, 300 (1972).

62. Geisler, R.W., Alyn Mc Clure and Hansen, R.J. : *Biochemica et Biophysica Acta.*, 327, 1 (1973).
63. Benziman Moshe and Mazover A. : *The J. Biochemistry.*, 248(5), 1603 (1973).
64. Marks, P.A., and Banks, J. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 46, 447 (1960).