

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

KOYUN ERİTROSİTLERİ VE GÖZ LENSİNDEN GLUKOZ-6-FOSFAT
DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZASYONU, BAZI İLAÇ VE KİMYASAL MADDELERİN
İNHİBİSYON VEYA AKTİVASYON KİNETİKLERİNİN
İNCELENMESİ

121460

121460

Şükrü BEYDEMİR


YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DEKÜMANTASYON MERKEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

ERZURUM
2002


Her hakkı saklıdır

Prof.Dr. Ö.İrfan KÜFREVOĞLU danışmanlığında Şükrü BEYDEMİR tarafından hazırlanan bu çalışma 17/05/2002 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı'nda Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

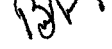
Başkan: Prof. Dr. Ö.İrfan KÜFREVOĞLU

İmza : 

Üye : Doç. Dr. Oktay ARSLAN

İmza : 

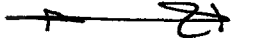
Üye : Doç. Dr. Barbaros NALBANTOĞLU

İmza : 

Üye : Yrd. Doç .Dr. Mehmet ÇİFTÇİ

İmza : 

Üye : Yrd. Doç .Dr. Yaşar DEMİR

İmza : 

Yukarıdaki sonucu onaylarım

(İmza)

Doç.Dr. Ümit DEMİR

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

KOYUN ERİTROSİTLERİ VE GÖZ LENSİNDEN GLUKOZ-6-FOSFAT DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU, BAZI İLAÇ VE KİMYASAL MADDELERİN İNHİBİSYON VEYA AKTİVASYON KİNETİKLERİNİN İNCELENMESİ

Şükrü BEYDEMİR

Atatürk Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU

Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (D-glukoz-6-fosfat: NADP⁺ oksidoredüktaz, EC 1.1.1.49; G6PD) koyun eritrositleri ve lensinden saflaştırıldı. Saflaştırma işlemi, hemolizatin veya homojenatın hazırlanması, amonyum sülfat çöktürmesi ve 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi olarak üç basamaktan oluştu. Eritrosit ve lens G6PD enzimleri sırasıyla % 37,1 ve % 66,8 verimle, spesifik aktiviteleri 4,64 ve 7,8 U/mg olarak elde edildi. Bu iki enzim için optimal pH, stabil pH, NADP⁺ ve G6P substratları için K_M ve V_{max} değerleri belirlendi.

Tüm saflaştırma işlemleri sonunda koyun eritrosit G6PD enzimi 1189,74 kat ve lens G6PD enzimi 10.400 kat saflaştırıldı. Jel filtrasyon kromatografisi yapılarak yaklaşık olarak koyun eritrosit G6PD'nin MA'sı 119.662 dalton ve lens G6PD'nin MA'sı 56.099 dalton olarak belirlendi. SDS poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile koyun eritrosit ve lens G6PD'nin alt birim MA'ları sırasıyla 66.880 dalton ve 54.957 dalton olarak belirlendi. Enzim aktiviteleri spektrofotometrik olarak 340 nm'de Beutler metoduna göre ölçüldü.

Ayrıca, koyun eritrosit ve lens G6PD enzimlerinin aktiviteleri üzerine bazı ilaçların *in vitro* etkileri araştırıldı

2002, 135 sayfa

Anahtar kelimeler: Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, ilaç, koyun, eritrosit, lens

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE FROM SHEEP ERYTHROCYTES AND EYE LENS, AND INVESTIGATION OF INHIBITION OR ACTIVATION KINETICS OF SOME DRUGS AND CHEMICAL MATERIALS ON THESE ENZYMES

Şükrü BEYDEMİR

Atatürk University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (D-glucose-6-phosphate: NADP⁺ oxidoreductase, EC 1.1.1.49; G6PD) was purified from sheep erythrocytes and lens. The purification consisted of three steps, preparation of haemolysate or homogenate, ammonium sulphate fractionation and 2', 5'-ADP Sepharose 4B affinity chromatography. Erythrocytes and lens G6PD enzymes were obtained with a yield of 37.1 % and 66.8 % having a specific activity of 4.64, and 7.8 U/mg proteins respectively. Optimal pH, stable pH, K_M and V_{max} values for NADP⁺ and glucose-6-phosphate (G6-P) substrates were also determined for the two enzymes.

The overall purification was about 1189.74-fold for erythrocytes G6PD and 10,400-fold for lens G6PD. Molecular weight of sheep erythrocytes and lens G6PD were determined approximately as 119,662 dal and 56,099 dal, respectively by gel-filtration chromatography. Subunit molecular weight of sheep erythrocytes and lens G6PD were determined approximately as 66,880 dal and 54,957 dal, respectively by SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Enzymatic activity was spectrophotometrically measured according to Beutler method at 340 nm.

In addition, *in vitro* effects of some medical drugs on sheep red blood cell and lens G6PD enzymes activity were investigated.

2002 135 pages

Key words: Glucose 6-phosphate dehydrogenase, drug, sheep, erythrocyte, lens

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu alışma, Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakóltesi Kimya Bölümü Biyokimya Ana Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU yönetiminde Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakóltesi Araştırma Laboratuvarı ve Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Tezimin deneysel kısmından yazım safhasına kadar ilgi ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU'na en derin minnet ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarım boyunca değerli katkılarından dolayı Atatürk Üniversitesi Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdür Yardımcısı Sayın Yrd. Doç. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ'ye, Tıp Fakóltesi Araştırma Hastanesi Göz Hastalıkları Ana Bilim Dalı Öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Destan Nil KULAÇOĐLU'na şükranlarımı sunarım. Ayrıca çalışmalarım sırasında her türlü yardımı esirgemeyen Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakóltesi Kimya Bölümü Başkanı Sayın Prof. Dr. Hasan SEÇEN, Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürü Sayın Doç. Dr. Fikrettin şAHİN, Fen Edebiyat Fakóltesi Kimya Bölümü elemanlarına ve Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi elemanlarına teőkükürü bir borç bilirim.

şükrü BEYDEMİR

Mayıs 2002

EC. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	xvi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	25
3. MATERYAL ve YÖNTEM	33
3.1. Materyal	33
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	33
3.1.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar	33
3.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması	34
3.2. Yöntemler	40
3.2.1. Koyun Eritrositlerinden ve Göz Lensinden G6PD Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu Çalışmaları İle İlgili Yöntemler.....	40
3.2.1.a. Kan Numunelerinin Temini ve Hemolizat Hazırlanması	40
3.2.1.b. Lens Numunelerinin Temini ve Homojenat Hazırlanması	40
3.2.1.c. Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Diyaliz.....	41
3.2.1.d. 2', 5' ADP-Sepharose 4B Afinite Kolonun Hazırlanması, Koyun Eritrosit Hemolizatının Afinite Kolonuna Tatbiki ve G6PD'ın Elüsyonu	42
3.2.1.e. Koyun Göz Lensi Homojenatının 2', 5' ADP-Sepharose 4B Afinite Kolonuna Tatbiki ve G6PD'ın Elüsyonu	43
3.2.1.f. Sodyum Dodesilsülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) İle Enzim Saflığının Kontrolü	44
3.2.1.e. Sodyum Dodesilsülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) İle Enzimin Molekül Ağırlığı Tayini	45
3.2.1.h. Koyun Eritrosit ve Göz Lensi G6PD Enzimlerinin Molekül Ağırlıklarının Jel Filtrasyon Kromatografisi Vasıtasıyla Bulunması	46

3.3. Protein Tayini	47
3.3.1. Kalitatif Protein Tayini	47
3.3.2. Bradford Yöntemi ile Protein Tayini	48
3.4. Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz Enziminin Aktivite Tayini	49
3.5. Koyun Eritrositleri ve Göz Lensinden Saflaştırılan G6PD Enzimleri ile İlgili Yapılan Kinetik Çalışmalar	51
3.5.1. Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Enzimi İçin Yapılan Optimum pH Çalışması..	51
3.5.2. Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz Enziminin Stabil Olduğu pH'nın Bulunmasına Yönelik Çalışmalar	51
3.5.3. NADP ⁺ ve Glukoz-6-fosfat Substratları İçin K _M ve V _{max} Değerlerinin Bulunmasına Yönelik Çalışmalar	52
3.5.4. ATP, ADP, NADH ve NADPH ve Çeşitli İlaçların Koyun Eritrosit ve Göz Lensi Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz Enzimi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi	52
3.5.5. Koyun Eritrosit Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz Enzimi İçin İnhibitör Etkisi Gösteren Çeşitli İlaçların K _i Sabitlerinin Bulunması.....	52
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	54
4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik.....	54
4.2. Koyun Eritrosit ve Göz Lensinden Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Enziminin Saflaştırılma, Karakterizasyon ve Kinetik Çalışma Sonuçları	55
4.2.1. Amonyum Sülfatla Çöktürme Basamakları ve Sonuçları	55
4.2.2. Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Enziminin 2', 5' ADP-Sepharose 4B Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılma Kademeleri	58
4.2.3. Sodyum Dodesilsülfat-Poliakrilamid Jel Elektropherez (SDS-PAGE) Sonucu	61
4.2.4. Koyun Eritrositlerinden ve Göz Lensinden Saflaştırılan G6PD Enziminin Molekül Ağırlığının Sephadex G-200 Jel Filtrasyon Kromatografisi İle Belirlenmesi	62
4.2.5. Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Enzimi İçin Optimum pH'nın Belirlenmesi	64
4.2.6. Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Enziminin Stabil Olduğu pH'nın Belirlenmesi ..	68
4.2.7. NADP ⁺ ve Glukoz-6-fosfat Substratları İçin K _M ve V _{max} Değerlerinin Belirlenmesi	72

4.2.8. ATP, ADP, NADH ve NADPH ve Çeşitli İlaçların Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz Enzimi Üzerine Etkilerinin Sonuçları	75
4.2.9. G6PD Enzimini İnhibe Eden İlaçlar İçin K_i Sabitleri Bulunmasına Yönelik Yapılan Çalışmaların Sonuçları.....	108
5. TARTIŞMA.....	114
KAYNAKLAR.....	128



SİMGELER DİZİNİ

6PGD	6-fosfoglukonat dehidrogenaz
ADP	Adenozin difosfat
AMP	Adenozin monofosfat
ATP	Adenozin trifosfat
DEAE	Dietilaminoetil selüloz
DNA	Deoksiribonükleik asit
E	Enzim
EC	Enzim kod numarası
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
EI	Enzim inhibitör kompleksi
ESI	Enzim-substrat-inhibitör kompleksi
EU	Enzim ünitesi
FAD	Flavin adenin dinükleotid (yükseltgenmiş hal)
G6P	Glukoz 6-fosfat
G6PD	Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz
GSH	İndirgenmiş glutatyon
GSSG	Yükseltgenmiş glutatyon
I	İnhibitör
i.m	Adele içine
i.v.	Damar içine
NAD ⁺	Nikotinamid adenin dinükleotid (yükseltgenmiş hal)
NADP ⁺	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (yükseltgenmiş hal)
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (indirgenmiş hal)
OD	Optik dansite
P	Ürün
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
RNA	Ribonükleik asit
S	Substrat
SDS	Sodyum dodesilsülfat
TCA	Triklor asetik asit
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamin
Tris	Trihidroksimetil amino metan

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Pentoz fosfat metabolik yolunun oksidatif ve nonoksidatif reaksiyonları.....	8
Şekil 1.2. Eritrositlerdeki G6PD Metabolizması.....	11
Şekil 4.1. Bradford yöntemiyle proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart grafik	54
Şekil 4.2. Koyun eritrosit G6PD enzimi için amonyum sülfat doygunluk aralığı tespitine yönelik Çöktürme Aralığı-Aktivite grafiği	56
Şekil 4.3. Koyun lens G6PD enzimi için amonyum sülfat doygunluk aralığı tespitine yönelik Çöktürme Aralığı-Aktivite grafiği	57
Şekil 4.4. Koyun eritrosit glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminin 2', 5' ADP-Sepharose 4B afinite kromatografisi ile saflaştırılması grafiği....	59
Şekil 4.5. Koyun lens glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminin 2', 5' ADP-Sepharose 4B afinite kromatografisi ile saflaştırılması grafiği	59
Şekil 4.6. Afinite kromatografisiyle saflaştırılan koyun eritrosit ve göz lensi glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi fotoğrafı	61
Şekil 4.7. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yöntemiyle proteinlerin molekül ağırlığı tayininde kullanılan standart grafik	62
Şekil 4.8. Koyun eritrosit G6PD enziminin molekül ağırlığı tayini için kullanılan standart jel filtrasyon kromatografisi grafiği	63
Şekil 4.9. Koyun lens G6PD enziminin molekül ağırlığı tayini için kullanılan standart jel filtrasyon kromatografisi grafiği	63
Şekil 4.10. Koyun eritrosit ve lens G6PD'ın molekül ağırlığı tayini için Sephadex G-200 kolon materyali kullanılarak yapılan jel filtrasyon kromatografisi sonucu elde edilen standart grafik	64
Şekil 4.11. 1 M Tris-HCl tampon çözeltisi kullanılarak koyun eritrosit glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları	66
Şekil 4.12. 1 M Potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak koyun eritrosit glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite	

ölçüm sonuçları	66
Şekil 4.13. 1 M Tris-HCl tampon çözeltisi kullanılarak koyun lensi glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları	67
Şekil 4.14. 1 M Potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak koyun lensi glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları	67
Şekil 4.15. Değişik pH'lardaki 1 M Tris-HCl tampon çözeltisi kullanılarak koyun eritrosit glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi için yapılan stabil pH grafiği	70
Şekil 4.16. Değişik pH'lardaki 1 M potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak koyun eritrosit glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi için yapılan stabil pH grafiği	70
Şekil 4.17. Değişik pH'lardaki 1 M Tris-HCl tampon çözeltisi kullanılarak koyun lensi glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi için yapılan stabil pH grafiği	71
Şekil 4.18. Değişik pH'lardaki 1 M potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak koyun lensi glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi için yapılan stabil pH grafiği	71
Şekil 4.19. Koyun eritrosit G6PD enzimi için sabit glukoz-6-fosfat (G6-P) konsantrasyonunda 5 farklı NADP ⁺ konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiği	72
Şekil 4.20. Koyun eritrosit G6PD enzimi için sabit NADP ⁺ konsantrasyonunda 5 farklı glukoz-6-fosfat (G6-P) konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiği	73
Şekil 4.21. Koyun lens G6PD enzimi için sabit glukoz-6-fosfat (G6-P) konsantrasyonunda 5 farklı NADP ⁺ konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiği	73
Şekil 4.22. Koyun lens G6PD enzimi için sabit NADP ⁺ konsantrasyonunda 5 farklı glukoz-6-fosfat (G6-P) konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiği	74
Şekil 4.23. Koyun eritrosit G6PD enzimi için 5 farklı ATP konsantrasyonunda	

elde edilen % aktivite-[ATP] grafiği	85
Şekil 4.24. Koyun eritrosit G6PD enzimi için 5 farklı ADP konsantrasyonunda elde edilen % aktivite-[ADP] grafiği	85
Şekil 4.25. Koyun eritrosit G6PD enzimi için 5 farklı NADH konsantrasyonunda elde edilen % aktivite-[NADH] grafiği	86
Şekil 4.26. Koyun eritrosit G6PD enzimi için 5 farklı NADPH konsantrasyonunda elde edilen % aktivite-[NADPH] grafiği	86
Şekil 4.27. Koyun eritrosit G6PD enzimi için 5 farklı ilaç konsantrasyonunda elde edilen % aktivite-[Gentamisin sülfat] grafiği	87
Şekil 4.28. Koyun eritrosit G6PD enzimi için 5 farklı ilaç konsantrasyonunda elde edilen % aktivite-[Sefazolin sodyum] grafiği	87
Şekil 4.29. Koyun eritrosit G6PD enzimi için 5 farklı ilaç konsantrasyonunda elde edilen % aktivite-[Penisilin G potasyum] grafiği	88
Şekil 4.30. Koyun eritrosit G6PD enzimi için 5 farklı ilaç konsantrasyonunda elde edilen % aktivite-[Sefotaksim sodyum] grafiği	88
Şekil 4.31. Koyun eritrosit G6PD enzimi için 5 farklı ilaç konsantrasyonunda elde edilen % aktivite-[Ampisilin] grafiği	89
Şekil 4.32. Koyun eritrosit G6PD enzimi için 5 farklı ilaç konsantrasyonunda elde edilen % aktivite-[Amikasin] grafiği	89
Şekil 4.33. Koyun eritrosit G6PD enzimi için 5 farklı ilaç konsantrasyonunda elde edilen % aktivite-[Sefepim hidroklorür] grafiği	90
Şekil 4.34. Koyun lens G6PD enzimi için 5 farklı ATP konsantrasyonunda elde edilen % aktivite-[ATP] grafiği	100
Şekil 4.35. Koyun lens G6PD enzimi için 5 farklı ADP konsantrasyonunda elde edilen % aktivite-[ADP] grafiği	101
Şekil 4.36. Koyun lens G6PD enzimi için 5 farklı NADH konsantrasyonunda elde edilen % aktivite-[NADH] grafiği	101
Şekil 4.37. Koyun lens G6PD enzimi için 5 farklı ilaç konsantrasyonunda elde edilen % aktivite-[İndomethacin] grafiği	102
Şekil 4.38. Koyun lens G6PD enzimi için 5 farklı ilaç konsantrasyonunda elde edilen % aktivite-[Deksametazon 21-fosfat disodyum] grafiği	102
Şekil 4.39. Koyun lens G6PD enzimi için 5 farklı ilaç konsantrasyonunda	

elde edilen % aktivite-[Lomefloxacin] grafiği	103
Şekil 4.40. Koyun lens G6PD enzimi için 5 farklı ilaç konsantrasyonunda elde edilen % aktivite-[Siklopentolat hidroklorür] grafiği	103
Şekil 4.41. Koyun lens G6PD enzimi için 5 farklı ilaç konsantrasyonunda elde edilen % aktivite-[Timolol maleat] grafiği	104
Şekil 4.42. Koyun lens G6PD enzimi için 5 farklı ilaç konsantrasyonunda elde edilen % aktivite-[Dorzolamid hidroklorür] grafiği	104
Şekil 4.43. Koyun lens G6PD enzimi için 5 farklı ilaç konsantrasyonunda elde edilen % aktivite-[Adrenalin] grafiği	105
Şekil 4.44. Koyun lens G6PD enzimi için 5 farklı ilaç konsantrasyonunda elde edilen % aktivite-[Seftriakson disodyum] grafiği	105
Şekil 4.45. Koyun lens G6PD enzimi için 5 farklı ilaç konsantrasyonunda elde edilen % aktivite-[Sefazolin sodyum] grafiği	106
Şekil 4.46. Koyun lens G6PD enzimi için 5 farklı ilaç konsantrasyonunda elde edilen % aktivite-[Vankomisin hidroklorür] grafiği	106
Şekil 4.47. Koyun lens G6PD enzimi için 5 farklı ilaç konsantrasyonunda elde edilen % aktivite-[Gentamisin sülfat] grafiği	107
Şekil 4.48. Koyun eritrosit G6PD enzimi üzerine Gentamisin sülfat ilacının etkisi	111
Şekil 4.49. Koyun eritrosit G6PD enzimi üzerine Penisilin G potasyum ilacının etkisi	112
Şekil 4.50. Koyun eritrosit G6PD enzimi üzerine Amikasin ilacının etkisi	112

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Koyun eritrosit G6PD enzimi için amonyum sülfat doygunluk aralığı tespitine yönelik çizelge	56
Çizelge 4.2. Koyun göz lensi G6PD enzimi için amonyum sülfat doygunluk aralığı tespitine yönelik çizelge	57
Çizelge 4.3. Koyun eritrosit glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminin saflaştırılma basamakları	60
Çizelge 4.4. Koyun lens glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminin saflaştırılma basamakları	60
Çizelge 4.5. 1 M Tris-HCl tampon çözeltisi kullanılarak koyun eritrosit glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları	64
Çizelge 4.6. 1 M Potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak koyun eritrosit glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	65
Çizelge 4.7. 1 M Tris-HCl tampon çözeltisi kullanılarak koyun göz lensi glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları	65
Çizelge 4.8. 1 M Potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak koyun göz lensi glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları	65
Çizelge 4.9. Koyun eritrosit G6PD enziminin stabil pH'sı için 1 M Tris-HCl tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları	68
Çizelge 4.10. Koyun eritrosit G6PD enziminin stabil pH'sı için 1 M potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları	68
Çizelge 4.11. Koyun lens G6PD enziminin stabil pH'sı için 1 M Tris-HCl tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları	69
Çizelge 4.12. Koyun lens G6PD enziminin stabil pH'sı için 1 M potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları	69

Çizelge 4.13. Eritrosit G6PD'sinin NADP ⁺ ve G6P substratları için K _M ve V _{max} değerleri	74
Çizelge 4.14. Lens G6PD'sinin NADP ⁺ ve G6P substratları için K _M ve V _{max} değerleri.....	74
Çizelge 4.15. Eritrosit glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi üzerine inhibisyon veya aktivasyon etkisi gösteren kimyasal madde ve ilaçların stok çözelti konsantrasyonları	75
Çizelge 4.16. Lens glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi üzerine inhibisyon veya aktivasyon etkisi gösteren kimyasal madde ve ilaçların stok çözelti konsantrasyonları	76
Çizelge 4.17. Koyun eritrosit G6PD enzimi üzerine ATP ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen ATP konsantrasyonları	77
Çizelge 4.18. Koyun eritrosit G6PD enzimi üzerine ADP ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen ADP konsantrasyonları	77
Çizelge 4.19. Koyun eritrosit G6PD enzimi üzerine NADH ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen NADH konsantrasyonları	78
Çizelge 4.20. Koyun eritrosit G6PD enzimi üzerine NADPH ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen NADPH konsantrasyonları	78
Çizelge 4.21. Koyun eritrosit G6PD enzimi üzerine Gentamisin sülfat ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen gentamisin sülfat konsantrasyonları	79
Çizelge 4.22. Koyun eritrosit G6PD enzimi üzerine Sefazolin sodyum ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen Sefazolin sodyum konsantrasyonları	80
Çizelge 4.23. Koyun eritrosit G6PD enzimi üzerine Penisilin G potasyum ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen Penisilin G potasyum konsantrasyonları	80
Çizelge 4.24. Koyun eritrosit G6PD enzimi üzerine Sefotaksim sodyum ile	

yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen Sefotaksim sodyum konsantrasyonları	81
Çizelge 4.25. Koyun eritrosit G6PD enzimi üzerine Ampisilin ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen Ampisilin konsantrasyonları	81
Çizelge 4.26. Koyun eritrosit G6PD enzimi üzerine Amikasin ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen Amikasin konsantrasyonları	82
Çizelge 4.27. Koyun eritrosit G6PD enzimi üzerine Sefepim hidroklorür ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen Sefepim hidroklorür konsantrasyonları	82
Çizelge 4.28. Koyun Eritrosit glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi üzerine kimyasal madde ve ilaçların inhibisyon veya aktivasyon etkisi ile ilgili çalışmaların sonuçları	83
Çizelge 4.28. (devam) Koyun Eritrosit glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi üzerine kimyasal madde ve ilaçların inhibisyon veya aktivasyon etkisi ile ilgili çalışmaların sonuçları	84
Çizelge 4.29. Koyun lens G6PD enzimi üzerine ATP ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen ATP konsantrasyonları	91
Çizelge 4.30. Koyun lens G6PD enzimi üzerine ADP ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen ADP konsantrasyonları	91
Çizelge 4.31. Koyun lens G6PD enzimi üzerine NADH ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen NADH konsantrasyonları	92
Çizelge 4.32. Koyun lens G6PD enzimi üzerine İndomethacin ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen İndomethacin konsantrasyonları	92
Çizelge 4.33. Koyun lens G6PD enzimi üzerine Deksametazon 21-fosfat disodyum ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen Deksametazon 21-fosfat disodyum konsantrasyonları	

Çizelge 4.34. Koyun lens G6PD enzimi üzerine Lomefloxacin ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen Lomefloxacin konsantrasyonları	93
Çizelge 4.35. Koyun lens G6PD enzimi üzerine Siklopetolat hidroklorür ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen Siklopetolat hidroklorür konsantrasyonları	94
Çizelge 4.36. Koyun lens G6PD enzimi üzerine Dorzolamid hidroklorür ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen Dorzolamid hidroklorür konsantrasyonları	94
Çizelge 4.37. Koyun lens G6PD enzimi üzerine Timolol maleat ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen Timolol maleat konsantrasyonları	95
Çizelge 4.38. Koyun lens G6PD enzimi üzerine Adrenalin ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen Adrenalin konsantrasyonları	95
Çizelge 4.39. Koyun lens G6PD enzimi üzerine Seftriakson disodyum ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen Seftriakson disodyum konsantrasyonları	96
Çizelge 4.40. Koyun lens G6PD enzimi üzerine Sefazolin sodyum ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen Sefazolin sodyum konsantrasyonları	96
Çizelge 4.41. Koyun lens G6PD enzimi üzerine Vankomisin hidroklorür ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen Vankomisin hidroklorür konsantrasyonları	97
Çizelge 4.42. Koyun lens G6PD enzimi üzerine Gentamisin sülfat ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen Gentamisin sülfat konsantrasyonları	97
Çizelge 4.43. Lens glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi üzerine kimyasal madde ve ilaçların inhibisyon veya aktivasyon etkisi ile ilgili çalışmaların sonuçları	98
Çizelge 4.43. (devam) Lens glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi üzerine kimyasal madde ve ilaçların inhibisyon veya aktivasyon etkisi ile ilgili	

çalışmaların sonuçları	99
Çizelge 4.44. Koyun eritrosit G6PD enzimi üzerine gentamisin sülfat'ın K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları	108
Çizelge 4.45. Koyun eritrosit G6PD enzimi üzerine Penisilin G potasyum'un K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları	109
Çizelge 4.46. Koyun eritrosit G6PD enzimi üzerine Amikasin'in K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları	110
Çizelge 4.47. Koyun eritrositlerinden saflaştırılan G6PD enzimi için 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan K_i değerleri ve inhibisyon tipleri	113
Çizelge 5.1. Koyun eritrosit G6PD enzimi için yapılan çalışmaların toplu sonuçları...	125
Çizelge 5.2. Koyun lens G6PD enzimi için yapılan çalışmaların toplu sonuçları.....	126

1.GİRİŞ

Enzimler, canlı organizmalarda kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürün oluşmasına fırsat vermeden spesifik olarak % 100'lük bir verim sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Proteinlerin en büyük ve en özelleşmiş grubunu teşkil ederler. Katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu hariç olmak üzere, bütün enzimler protein yapısındadır. Enzimlerin katalizleme güçleri, turnover sayısı ile ifade edilir. Turnover sayısı, birim zamanda 1 mol enzimin ürüne dönüştürdüğü substratın mol sayısıdır. Turnover sayısı en yüksek olan enzim, $40.000.000 \text{ s}^{-1}$ ile katalazdır (Fersht 1999).

Bugün bir çok enzim tanımlanmış, büyük bir kısmı saf halde elde edilip kinetikleri incelenmiş ve kristalendirilmiştir. Ancak yapılan genetik çalışmalar daha tespit edilmemiş bir çok enzimin varlığını göstermektedir.

Enzimlerin üzerinde etkili oldukları ve ürüne dönüştürdükleri bileşiklere substrat adı verilir. Bazı enzimler substrat adının sonuna -az son eki getirilerek adlandırılırken, bazıları da ilk bulucularının ortaya attıkları isimlerle tanınmaktadırlar. Fosfataz, üreaz, lipaz tripsin ve pepsin gibi. Fakat bu isimlerin çoğu enzimlerin fonksiyonları hakkında eksik bilgi verdiğinden uluslararası biyokimya birliği (IUB) tarafından sistematik bir sınıflandırma yapılmıştır. Ayrıca her bir enzim için 4 rakamlı enzim kod numarası (E. C.) öngörülmüştür (Yüreğir 1981).

Enzimlerin aktivitelerini pozitif yönde etkileyen bileşiklere aktivatör adı verilir. Genellikle enzim aktivatörleri küçük iyonlar veya fazla büyük olmayan moleküllerdir. Bunlar kofaktörlerin aksine kataliz olayına her zaman katılmazlar. 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).

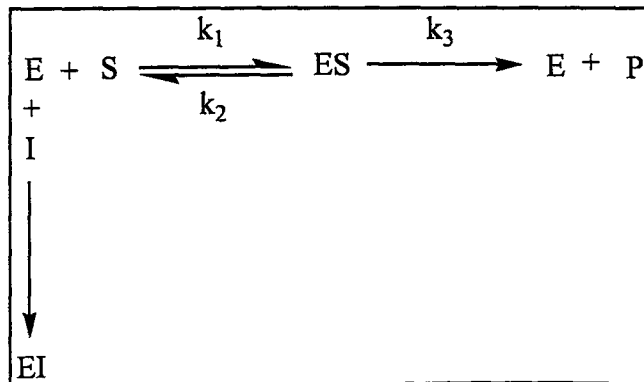
Enzimlerin, bazı bileşikler tarafından hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak aktivitelerinin azaltılması ve hatta yok edilmesi olayına inhibisyon adı verilir. Buna sebep olan bileşiklere de inhibitör denilir. İnhibitörler, genellikle küçük molekül ağırlığına sahip bileşik veya iyonlardır.

Enzimatik aktivitenin inhibisyonu, biyolojik sistemlerde başlı başına bir kontrol mekanizması oluşturur. Bu yüzden enzim inhibisyonu büyük bir önem arz etmektedir. Bir çok ilaç ve zehirli bileşik fonksiyonlarını bu yolla gerçekleştirirler. Enzim etki mekanizmalarının incelenmesinde de inhibisyon olayından faydalanılır (Keha ve Küfrevioğlu 2000).

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. Sinir uyarılarının iletilmesinde önemli bir rol oynayan asetil kolin estera z enziminin, sinir gazı zehirleri tarafından inhibisyonu buna güzel bir örnektir. Bu gazlardan diizopropilflorofosfat, enzimin aktif bölgesinde yer alan serin amino asidiyle reaksiyona girerek, inaktif diizopropilfosfo-enzim oluşturur. Dönüşümsüz inhibisyonda V_{max} (enzimatik reaksiyonda ulaşılacak maksimum hız) azalır, K_M ise (enzimin substrata ilgisini gösteren sabit) değişmeden kalır. Reaksiyon şeması;



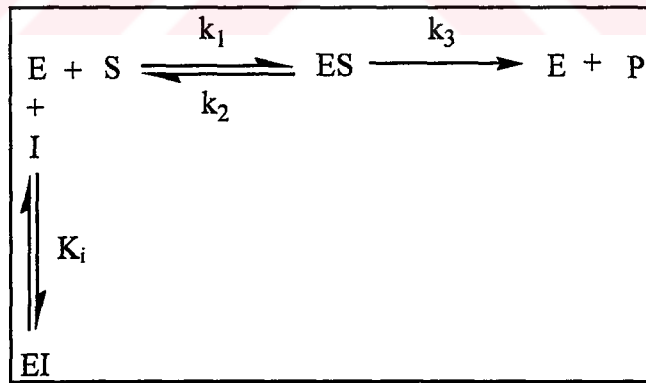
şeklinde yazılabilir (Segel 1975, Keha ve Küfrevioğlu 2000).

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

Dönüşümlü inhibisyon üç grupta incelenir;

- i) Yarışmalı (kompetitiv) inhibisyon
- ii) Yarışmasız (nonkompetitiv) inhibisyon
- iii) Yarı yarışmalı (unkompetitiv) inhibisyon

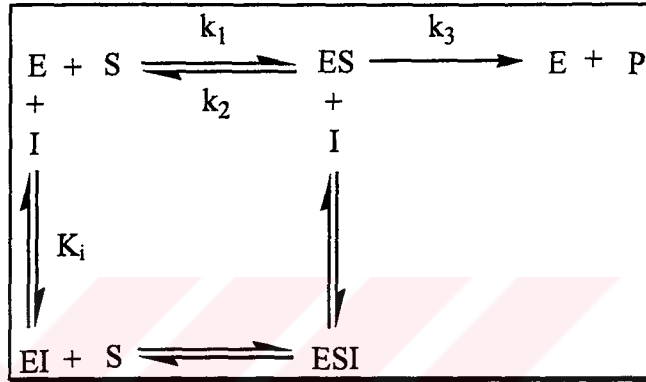
Dönüşümlü inhibisyonun en basit tipi yarışmalı (kompetitiv) inhibisyondur. Yarışmalı inhibitör yapı itibariyle substrata benzer ve enzimin aktif bölgesine bağlanır. Böylece substratın enzime bağlanması önlenmiş olur. Fakat substrat konsantrasyonu artırılmakla inhibisyon etkisi ortadan kaldırılabilir.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



şeklinde yazılabilir (Segel 1975, Telefoncu 1986, Keha ve Küfrevioğlu 2000).

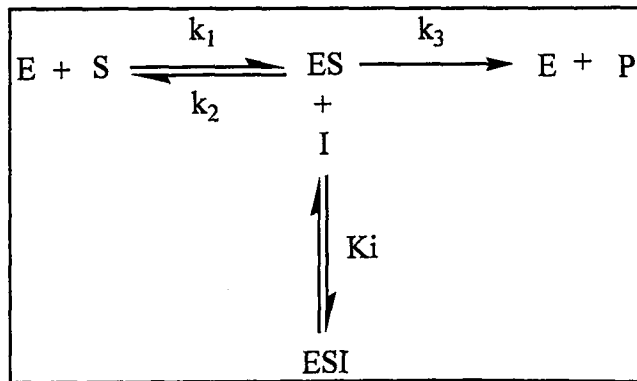
Yine dönüşümlü bir tip olan yarışmasız (nonkompetitiv) inhibisyonda; inhibitör ve substrat enzim molekülüne aynı anda bağlanabilir. Bu durum bağlanmanın enzimin aynı bölgesine olmadığını gösterir. Yarışmasız bir inhibitör etkisini; bir enzimin turnover

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: EI ve ESI. Yarışmasız inhibitör varlığında reaksiyon şeması;



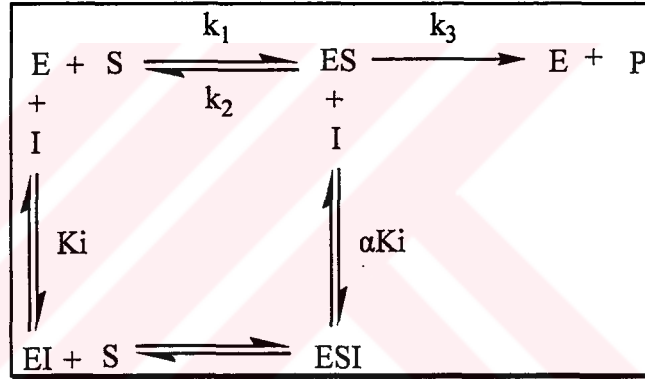
şeklinde yazılabilir (Telefoncu 1986, Keha ve Küfrevioğlu 2000).

Bir başka dönüşümlü inhibisyon tipi, yarı yarışmalı (unkompetitiv) inhibisyonudur. Bu inhibisyon çeşidinde; 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. Reaksiyon şeması;



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

Yarı yarışmalı (nonkompetitif) inhibisyonun özel bir türü olan lineer karışık tür inhibisyon, dönüşümlü inhibisyon sınıfına girer. Bu tür inhibisyonda; E, S ve I'nın bağlanma denge sabitleri farklılaşmaktadır (Segel 1975, Gilbert 1992).



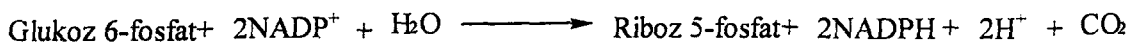
Birçok multienzim sistemi, net reaksiyon hızlarını kendileri düzenleme kapasitesine sahiptir. Bu sistemlerin çoğunda, seri reaksiyonların son ürünü belirli bir konsantrasyona ulaştığında; sistemin ilk enzimini veya dallanma noktasındaki enzimi inhibe eder. Bu enzimlere allosterik enzimler adı verilir. Bu olaya da feed-back 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. Homotropik allosterik enzimlerde; substrat, bizzat pozitif modülatör olarak etki yapar. Heterotropik allosterik enzimlerde ise; enzim, substratlardan başka bileşikler tarafından etkilenmektedir. Bazı allosterik enzimler homotropik-heterotropik karakterde olup, modülatörlerden birisi o enzimin substratı,

diğerleri başka bileşiklerdir. Allosterik enzimlerin kinetiği, Michaelis-Menten kinetiğinden farklılık gösterir (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 çizilir. Kesim noktalarından değerlendirmeler yapılır. K_i sabitlerinin bulunmasının ikinci yöntemi Dixon grafikleri yoludur. Bu yöntemde en az iki sabit substrat konsantrasyonunda $1/V-[I]$ grafiği çizilerek kesim noktalarından K_i sabitleri hesaplanır (Telefoncu 1986).

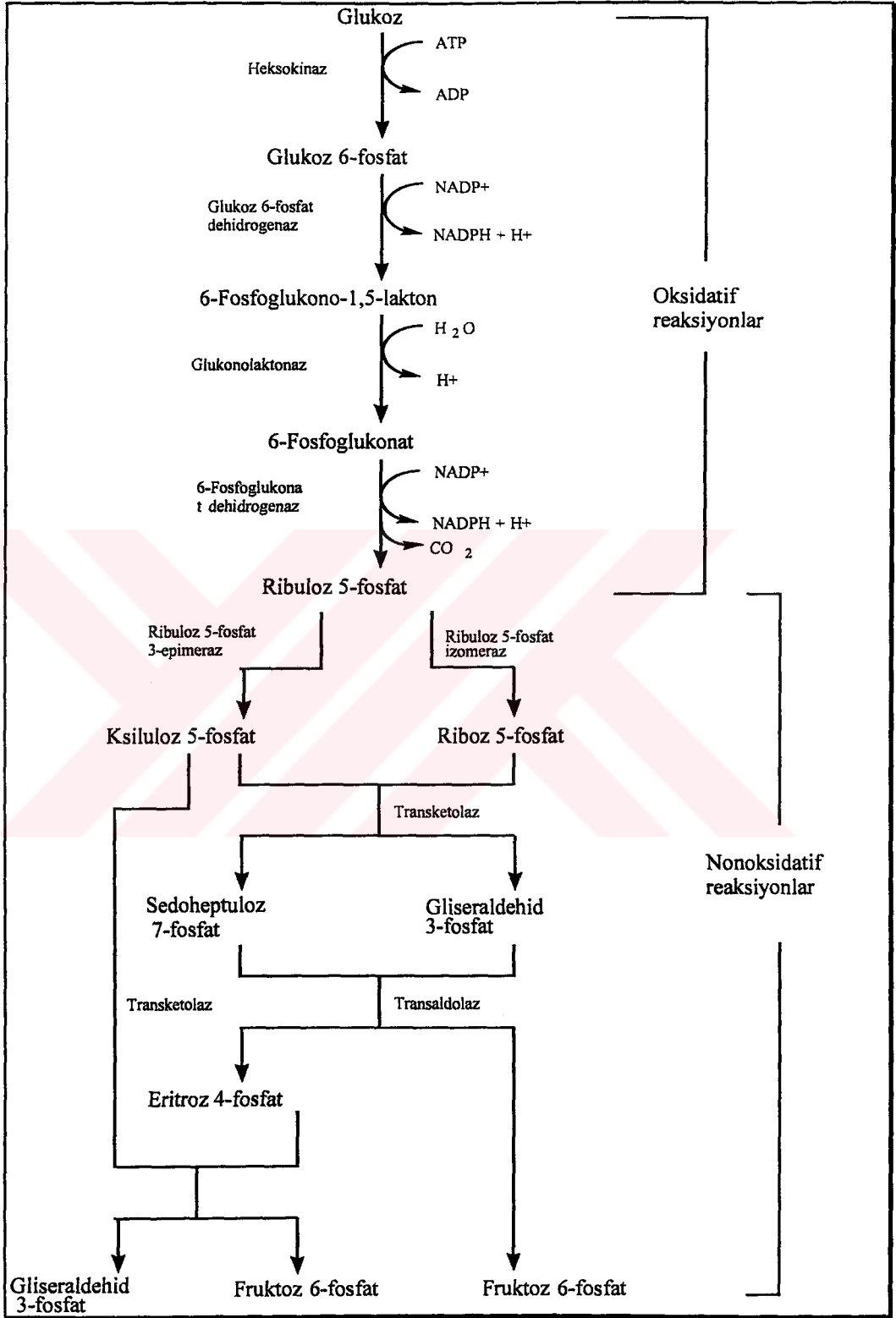
Pentoz fosfat metabolik yolu bazen pentoz yan yolu, heksoz monofosfat yolu veya fosfoglukonat oksidatif yolu olarak da isimlendirilebilir. Bu reaksiyon serisinin aydınlatılmasında ilk adım, 1931 yılında Otto Warburg tarafından atılmış ve tamamı Fritz Lipmann, Frank Dickens, Bernard Horecker ve Efraim Racker isimli biyokimyacılar tarafından ortaya konulmuştur (Agrios 1997, Keha ve Küfrevioğlu 2000).

Pentoz fosfat metabolik yolu eritrosit ve beyin hücreleri gibi bazı hücrelerin temel enerji kaynağı olan glukozun oksidasyonu için tek oksidatif yoldur (Thomas and Gilham 1983, Mathews and Van Holde 1990, Mayes 1991, Lukens 1993). Pentoz fosfat metabolik yolu, glikoliz yoluna bir alternatif yol olarak düşünülse de her iki yolun hücredeki fonksiyonları ve hücredeki ihtiyaç alanları farklıdır. Glikoliz, daha çok Krebs döngüsü ile birlikte hücre içi enerji gereksiniminin giderilmesinden sorumludur (Krebs and Eggleston 1978). Bununla birlikte pentoz fosfat metabolik yolu, oksidatif ve nonoksidatif olmak üzere iki aşamada gerçekleşir ve bu yolun hedefi indirgeyici olaylar için gerekli NADPH'ı üretmek ve ATP, NAD^+ , FAD, DNA, RNA gibi bileşikler için ön madde olan riboz-5-fosfat sentezlemektir. Bu olayın toplam reaksiyonu şöyledir:



Pentoz fosfat metabolik yolu aynı zamanda üç, dört, beş, altı ve yedi karbonlu şekerlerin oksidatif olmayan bir seri reaksiyonla birbirlerine dönüştürülmesini de katalizler. Bitkilerde pentoz fosfat yolunun bir bölümü, fotosentez olayı ile CO₂'den glukozun sentezlenmesinde de rol alır (Levy 1979, Keha ve Küfrevioğlu 2000). Pentoz fosfat metabolik yolunun oksidatif ve nonoksidatif reaksiyonları şekil 1.1'de gösterilmiştir.





Şekil 1.1. Pentoz fosfat metabolik yolunun oksidatif ve nonoksidatif reaksiyonlar (Rawan 1989).

Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (D-Glukoz 6-fosfat: NADP⁺ oksidoredüktaz, EC 1.1.1.49, G6PD), NADP⁺'nin indirgenmesiyle birlikte glukoz 6-fosfat'ın 6-fosfoglukuno-1,5-laktona'a dönüşmesini katalizleyen düzenleyici bir enzimdir. Bu reaksiyon pentoz fosfat metabolik yolunun ilk ve hız sınırlayıcı basamağıdır (Shannon et al 2000). Bu enzim NADP⁺'ye karşı son derece spesifiktir ve NAD⁺ için K_M değeri NADP⁺ için olandan yaklaşık 1000 misli fazladır. Bu reaksiyonun ürünü C-1 karboksili ile C-5 hidroksil grubu arasında oluşan bir molekül içi estere sahip olan 6-fosfoglukuno-1,5-laktondur. Bundan sonraki basamak 6-fosfoglukuno-1,5-laktonun laktonaz enzimi katalizörlüğünde 6-fosfoglukonata hidrolizidir. Bu altı karbonlu şeker daha sonra oksidatif dekarboksilasyonla ribuloz-5-fosfata dönüşür. Bu reaksiyonda koenzimi yine NADP⁺ olan 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enzimi görev alır. Riboz-5-fosfat sentezindeki son basamak Ribuloz-5-fosfatın izomerleşme reaksiyonudur.

NADPH, indirgeyici biyosentez olaylarında yaygın bir şekilde kullanılan ve pentoz fosfat yolunun önemli bir ürünüdür. Ayrıca, oksidatif hasara karşı hücrenin korunmasında temel teşkil etmektedir (Levy 1979). Üretilen NADPH'lar genel olarak;

- Yağ asitlerinin sentezi,
- Steroidlerin sentezi,
- Bazı aminoasitlerin sentezi,
- İndirgenmiş glutatyon sentezi ve peroksitlerin ortadan kaldırılması,
- İlaç detoksifikasyonu,
- DNA sentezi için ribonükleotidlerin deoksiribonükleotidlere dönüşmesi gibi birçok indirgeyici biyosentez olaylarında kullanılırlar (Bonsignore et al 1966, Wood 1986, Bonsignore and De Flora 1972).

Yukarda maddeler halinde belirttiğimiz reaksiyonlar sonucu bir glukoz molekülü başına iki NADPH ve bir riboz-5-fosfat meydana gelmektedir. Pentoz fosfat yoluna giren glukoz 6-fosfat, hücrenin NADPH, riboz-5-fosfat ve ATP ihtiyacına göre dört farklı

şekilde reaksiyona girer (Mathews and Van Holde 1990, Lehninger 1993, Keha ve Küfrevioğlu 2000).

1-Riboz-5-fosfata, NADPH'dan daha fazla ihtiyaç varsa, glukoz 6-fosfatın çoğu glikolizle fruktoz-6-fosfat ve gliseraldehid-3-fosfata çevrilir. Daha sonra transketolaz ve transaldolaz enzimleriyle reaksiyonların dönüşümlü işlemesi sonucu bir molekül gliseraldehid-3-fosfat ve iki molekül fruktoz-6-fosfat, üç molekül riboz-5-fosfata dönüştürülür.

2- Riboz-5-fosfat ve NADPH ihtiyacının eşit olduğu durumda; pentoz fosfat yolunun oksidatif reaksiyonları devreye girmektedir. Bu reaksiyonların stokiyometrik denklemi şöyledir.

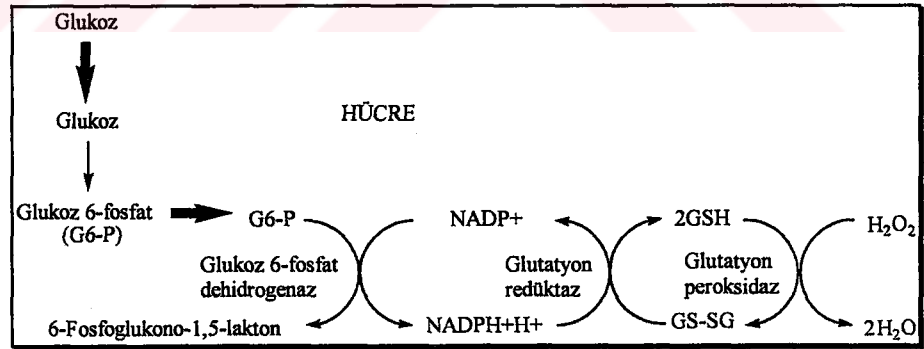


3- NADPH'a riboz-5-fosfattan daha fazla ihtiyaç olduğu durumda; glukoz-6-fosfat tamamen CO₂'ye yükseltgenir ve bu da üç grup reaksiyonla gerçekleştirilir. Birincisinde iki NADPH ve bir riboz-5-fosfat oksidatif olarak sentezlenir. Daha sonra riboz-5-fosfat, transketolaz ve transaldolaz enzimleriyle fruktoz-6-fosfat ve gliseraldehid-3-fosfata dönüştürülür. Son olarak da glukoneogenez reaksiyonlarıyla gliseraldehid-3-fosfat ve fruktoz-6-fosfattan glukoz-6-fosfat tekrar sentezlenir.

4- Riboz-5-fosfattan daha fazla NADPH'a ve bununla birlikte ATP'ye ihtiyaç duyulduğu durumda; glukoz-6-fosfat piruvata dönüşür. Riboz-5-fosfattan türetilen fruktoz-6-fosfat ve gliseraldehid-3-fosfat glukoneogenez yerine glikoliz yoluyla piruvata kadar yükseltgenir. Bu arada NADPH ve ATP beraberce sentezlenmiş olur (Mathews and Van Holde 1990, Lehninger 1993, Keha ve Küfrevioğlu 2000).

Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi bir çok hücrede NADP^{+} 'nin indirgenmesine eşlik ederek glukoz 6-fosfatın (G6P) 6-fosfoglukono-1,5-lakton'a dönüşümünü katalizleyen düzenleyici bir enzimdir. Dolayısıyla, bu enzim çoğu hücrede NADPH'ın tek kaynağı olan pentoz fosfat metabolik yolunun ilk ve kilit enzimidir (Kanji et al 1976, Deutsch 1983, Kirkman and Gaetani 1986, Telefoncu ve Telefoncu 1989, Lehninger 1993, Ünlükurt vd 1993, Keha ve Küfrevioğlu 2000, Shannon et al 2000,).

İlk defa Warburg tarafından alyuvar ve bira mayasında belirlenen bu enzim, bir çok indirgeyici biyosentez olaylarının meydana gelmesinde, sülfhidril gruplarının sürekliliğinin sağlanmasında, serbest radikallerin ve peroksitlerin detoksifikasyonunda görev alan indirgenmiş glutatyonun oluşumunda indirgeyici rol oynayan NADPH, temel olarak pentoz fosfat metabolik yolunun ilk enzimi olan bu enzim tarafından katalizlenen glukoz 6-fosfat'ın 6-fosfoglukono-1,5-lakton'a dönüşümü sırasında elde edilmektedir (şekil 1.2) (Yüreğir vd 1988, Ninfali et al 1990, Lehninger 1993, Lukens 1993, Ünlükurt vd 1993, Grossman et al 1995, Aksoy 1997, Champe and Harvey 1997, Keha ve Küfrevioğlu 2000, Özer et al 2001).



Şekil 1.2. Eritrositlerdeki G6PD metabolizması

Pentoz fosfat metabolik yolu ile ilgili radyoaktif ^{14}C ile işaretlenmiş glukoz ile yapılan denemeler, bu yolun kas dokularından çok adipoz dokuda aktif olduğunu göstermiştir. Bu sonuç pentoz fosfat metabolik yolunun başlıca rolünün, indirgeyici biyosentez olaylarında kullanılmak üzere, NADPH üretmek olduğu iddiasını desteklemektedir.

Çünkü, yağ dokusu hücrelerinde asetil CoA dan yağ asitlerinin biyosentezine de büyük miktarda NADPH kullanılmaktadır (Wood 1986, Keha ve Küfrevioğlu 2000).

GSH/GSSG oranı alyuvarlarda yaklaşık 500 dür. İndirgenmiş glutatyon (GSH), ilaç detoksifikasyonu ve hidrojen peroksitlerin uzaklaştırılması reaksiyonlarında önemli bir role sahiptir. Bu rol özellikle karaciğerde çok önemlidir. Çünkü, detoksifikasyon olayı karaciğer mikrozomlarında bulunan sitokrom P-450 sistemi tarafından gerçekleştirilir. Bu sistemin işleyişinde oksijen molekülüne yeterli miktarda elektron aktarılamazsa süperoksit radikali (O_2^-) veya peroksit (H_2O_2) meydana gelir. Hücrede bu zararlı iyonları zararsız hale getirecek sistem mevcuttur. Süperoksit dismutaz ve katalaz enzimleri, hücrede oksidatif strese sebep olan süperoksit radikali ve peroksit'in suya dönüşmesine sebep olarak hücre membranı proteinlerinin hasar görmesini önlerler. Bu enzimlerin fonksiyonu askorbik asit, indirgenmiş glutatyon (GSH) ve K vitamini tarafından güçlendirilir.

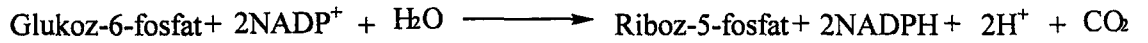
Normal eritrosit hücre yapısının devamı ve hemoglobindeki demir iyonunun +2 halinde korunması için GSH zorunludur. Düşük seviyede GSH ihtiva eden alyuvarların daha çok hemolize maruz kaldıkları tespit edilmesine rağmen sebepleri henüz ortaya konulmamıştır (Deutsch 1983, Yüreğir vd 1988, Lehninger 1993, Aksoy 1997, Keha ve Küfrevioğlu 2000). GSH seviyesindeki düşme, lens proteinlerinin çözünürlüğünün azalmasını teşvik edeceğinden lenste önemli bir role sahiptir (Rathbun 1976, Augusteyn 1979).

Lens vücutta en fazla protein içeriğine sahip olan ve tek hücre tipinden meydana gelen bir dokudur (Spector 1984). Lensteki toplam protein miktarının yaklaşık %90'nını kristalinler içermektedir (Spector 1984, Jaffe and Horwitz 1995).

Lenste metabolizmada kullanılabilir glukozun %14'ü pentoz fosfat metabolik yolu ile kullanılır (Jaffe and Horwitz 1995). Bu yol pek çok biyokimyasal reaksiyon için kritik bir öneme sahip olan NADPH'ın üretimi için olduğu kadar nükleik asitlerin sentezi için

gerekli olan pentozları üretir (Jaffe and Horwitz 1995). NADPH'ın lensteki en önemli görevi okside glutasyonu (GSSG) indirgenmiş glutatyona çevirerek lensin opaklaşmasını önlemektir.

Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi glukoz 6-fosfatın, 6-fosfoglukono δ-laktona oksidasyonunu katalizler;



Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminin aktivitesinin tayini için yukarıdaki reaksiyonda görüldüğü gibi, reaksiyon sonunda oluşan NADPH göz önüne alınır. NADPH 340 nm'de absorpsiyon verir. Dolayısıyla enzimin aktivitesi 25°C'de NADP⁺'nin indirgenmesi sonucu oluşan, NADPH'ın 340 nm'de absorpsiyon vermesiyle spektrofotometrik metodla absorpsiyon artışı sonucu ölçülür. 1 mM NADP⁺ indirgendiğinde (1 ml hacimde ve 1 cm ışık yolunda), spektrofometrede 340 nm dalga boyunda okunduğunda 6,22 OD (optik dansite) verir. Yukarıdaki reaksiyonlarda görüldüğü gibi glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminin katalizlediği reaksiyonda 1 mol substrat (G6P) reaksiyona girdiğinde, 1 mol NADPH oluşur (Beutler 1971).

G6PD eksikliğinden dolayı heterozigotların eritrosit hücreleri sıtmaya sebep olan bir parazit olan "*Plasmodium falciparum*"a karşı dirençlidirler. *Plasmodium falciparum* gelişmesi için NADPH gerekir. Heterozigotların eritrosit hücreleri kendi ihtiyaçlarını karşılayacak yeterli miktardaki NADPH'ı üretirler fakat sıtma parazitinin optimum gelişimi için yeterli değildir (Rawn 1989). Pamakuin gibi sıtma tedavisinde kullanılan ilaçlar eritrosit hücrelerindeki NADPH'ın konsantrasyonunu daha da düşürür. Pamakuin molekül kısmı yapısal olarak NADP⁺'nin nikotiamid halkasına analogdur. Bu ilaç, pamakuinin piridin grubuna kendiliğinden elektron transferiyle nonenzimatik olarak indirgenir. G6PD eksikliğinden dolayı düşük konsantrasyonda NADPH'a sahip olan kişilere pamakuin uygulandığında, NADPH konsantrasyonu indirgenmiş haldeki glutasyonu (GSH) üretemeyecek seviyeye düşecektir. Böylece eritrosit membran

proteini ve membran lipidlerinin oksidasyonu akut hemolitik anemi olarak bilinen bir durumu ortaya çıkaran eritrosit hemolizini netice verir. Bu durum ölümlerle sonuçlanabilir (Rawn 1989).

Bu tez kapsamında koyun eritrosit ve göz lensi G6PD enzimi üzerindeki etkileri araştırılan ilaçlar ve özellikleri aşağıda anlatılmıştır.

Sodyum ampisilin: Hem ağızdan hem de parenteral uygulanabilen bir penisilin türüdür. *Haemophilus influénzae*, *E.coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus mirabilis* gibi gram-negatif basillerin suşlarının çoğuna karşı bakterisit etkinlik gösterir. Ancak, sayılan gram-negatif basillerden son yıllarda meydana gelen rezistans artması nedeniyle ampisilinin terapötik üstünlüğü azalmaktadır. Avrupa ülkelerinde izole edilen *E.coli* suşlarının tümü üzerinden yaklaşık %40'ının ampisiline rezistans olduğu tespit edilmiştir.

Ampisilin mide-barsak kanalından kısmen (ortalama %40) absorbe edilir; absorpsiyonu besinler tarafından önemli ölçüde azaltılmaz. Oral uygulandığında doruk plazma konsantrasyonuna yaklaşık 2 saatte erişilir.

Ciddi enfeksiyonlarda yüksek dozda ve parenteral (genellikle i.v.) verilmesi gerekir. Ampisilinin menenjit tedavisinde yüksek dozda ve i.v. kullanılması tavsiye edilmektedir. Plazma proteinlerine çok az (ortalama %20) bağlanır. Absorbe edilen dozun yaklaşık yarısı böbreklerden (glomerüler filtrasyon ve tübüler salgılama suretiyle) atılır; idrardaki konsantrasyonu yüksektir. Kalan kısmının büyük bir bölümü karaciğerden safra içine itrah edilir ve az bir kısmı metabolize edilir. Tıkanıklık olmadığı takdirde safradaki konsantrasyonu plazmadakinin 300 katına çıkabilir. Tübüler salgılanmasını inhibe eden probenesid adlı ilaç ampisilin'in böbrekten itrahını bloke eder, kandaki konsantrasyonunu yükseltir ve atılımını geciktirir. Ampisilinin yarılanma ömrü 0,5-1 saattir (Kayaalp 1998).

Sefazolin sodyum: Antibakteriyel etkilidir. Bakterisid etkilerini hücre duvarı sentezini inhibe ederek gösterir. Plazma proteinlerine en fazla bağlanan sefalosporin olması ve böbreklerden esas itibariyle glomerüler filtrasyonla atılması nedeniyle, parenteral kullanılan birinci kuşak sefalosporinler arasında eliminasyon yarılanma ömrü en uzun olanıdır. Alt solunum yolu enfeksiyonları, arpacık, üst solunum yolu, üriner sistem enfeksiyonları, cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları, safra yolları enfeksiyonları, kemik, eklem ve yumuşak doku enfeksiyonlarında endikedir.

Penisilinler ile sefalosporinler arasında kısmi çapraz duyarlılık olduğuna dair klinik ve laboratuvar bulguları mevcuttur. Her iki ilaçla da anafilaktik şok dahil ciddi aşırı duyarlılık reaksiyonları bildirilmiştir (Kayaalp 1998).

Deksametazon: Kimyaca 9 α -flouro-16 α -metilprednizolon'dur. Oral veya paranteral olarak kullanılır. Plazmadaki yarılanma ömrü 3 saat kadardır. Plazma proteinlerine en az bağlanan bir glukokortikoiddir. Glukokortikoidler, insüline zıt yönde etki yaparlar. Karaciğerde glukoneogenezi artırır. Bu olay, muhtemel olarak glukoneogenezde rol oynayan piruvat karboksilaz, fruktoz 1-6 bisfosftaz ve glukoz 6-fosfatazı ve ayrıca amino asitleri piruvata dönüştüren transaminazları indüklemelerine; hücrelerde protein sentezini inhibe etmelerine; proteolizi artırmaları sonucu, glukogenik aminoasitleri artırmalarına bağlıdır. Glukokortikoidler yağ dokusu hücrelerine, fibroblastlara ve timositlere glukoz girişini azaltırlar. Glukoneogenezin artması ve glukoz girişinin azalması gliseminin yükselmesine neden olur. Glukokortikoid türü ilaçların yan tesirleri çok fazla ve önemlidir (Kayaalp 1998).

Gentamisin sülfat: Micromonospora purpurea'dan elde edilir. Gerçekte yapıca birbirine çok benzeyen üç gentamisin türünün karışımından ibrettir. Kitesine göre, streptomisin, kanamisin ve amikasinden güçlüdür. Aminoglikozid ilaçlar içinde spektrumu en geniş ve antibakteriyel etki gücü en yüksek olanlardan biridir. Bakterisid etki yapar. Özellikle Enterobacteriaceae grubu (E.coli, Klebsiella, Aerobacter vb.) bakteriler ile *Pseudomonas aeruginosa* gibi gram-negatif basiller ve penisiline ve metisiline dayanıklı Staph, aureus suşları üzerinde etkilidir. Antipsödomonal

penisilinlerle kombine edildiğinde, *Proteus* türleri ve *pseudomonas* üzerinde, sinerjizma nedeniyle daha güçlü etkinlik gösterir. Sayılan bakterilerin hepsi *in vitro* koşullarda gentamisin 6 µg/ml'den daha düşük konsantrasyonları ile inhibe edilirler. Bu konsantrasyon serumda, bir kezlik mutad doz olan i.m. 1,5 mg/kg gentamisin ile elde edilir. Plazma proteinlerine hemen hemen hiç bağlanmaz.

Kanda yaklaşık %10 oranında alyuvarlara bağlanır; bu nedenle anemik hastalarda kandaki serbest gentamisin konsantrasyonu biraz daha yüksek olur. Vücutta biyotransformasyona uğramadan böbreklerden itrah edilir ve idrarda serumdakinden 10-100 kez daha yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Gentamisinin en önemli indikasyonu, aerobik gram-negatif basillere (özellikle *Pseudomonas* ve *Proteus*'lara) bağlı sistemik enfeksiyonlardır (Kayaalp 1998).

Amikasin sülfat: Aminoglikozidler arasında yarı-sentetik olarak yapılan ilk türevidir. Doğal bir ilaç olan kanamisin A'dan açılma suretiyle elde edilir. Yapısı ile ilgili bu özelliği nedeniyle; gentamisin, kanamisin ve tobramisin gibi doğal aminoglikozidleri inaktive eden bakteriyel enzimlere dayanıklıdır ve bundan dolayı en geniş spektrumlu aminoglikoziddir.

Farmakolojik ve farmakokinetik özellikleri yönünden kanamisin ile amikasin arasında yakın bir benzerlik vardır. Kanamisin gibi amikasin de iç kulakta özellikle işitme fonksiyonunu bozar. Gentamisin derecesinde nefrotoksik ve ototoksik etki gösterir. Gentamisin ve tobramisinden farklı olarak, amikasin böbrek yetmezliği olgularında kanda penisilinlerle birleşmek suretiyle inaktive edilmez (Kayaalp 1998).

Vankomisin: *Streptomces orientalis*'den elde edilir. Yapıca diğer antibiyotiklerden hiç birine benzemez. Suda fazla çözünen stabil bir bileşiktir. Penisilinler gibi, bakteri hücre duvarının sentezini bozar. Ancak etki mekanizması onlarınkinden farklıdır. Vakomisin bakteride açil-D-alanil-D-alanin'e bağlanarak peptidoglikan zincirinin biyosentezini bloke eder.

Antibakteriyel spektrumunu dardır. Esas olarak gram-pozitif kokusları ve Clostridium'ları etkiler. Penisilinler gibi, bölünmekte olan duyarlı bakteriler üzerinde bakterisid etki yapar. Staph. Aureus ve Staph. Epidermis bu ilaca en fazla duyarlı olan kokus türleridir. Metisiline-rezistan ve mültipl-rezistan (hem metisiline- ve hem de gentamisine-rezistan) stafilokok suşları üzerinde güçlü bakterisid etkinlik gösterir. Streptokoklardan grup A beta-hemolitik streptokoklar ve Strep. pneumoniae de çok duyarlıdır. Strep. viridans suşlarının vankomisin'e duyarlılığı değişkendir. Grup D streptokoklardan enterokoklar bu ilacın bakterisid etkisine rezistandırlar; fakat vankomisin tarafından çoğalmaları inhibe edilir. Aynı gruptan non-enterokokal streptokoklar (Strep. bovis gibi) üzerinde suşa göre değişen bir derece bakterisid etkinlik gösterir. Clostridium tetani ve difficile gib gram-pozitif anaerob basiller ve Corynebacterium türleri üzerinde de güçlü bakterisid etki yapar. Gram-negatif basillere ve bakteriler dışındaki mikroorganizmalara etkisizdir.

Mide-barsak kanalından absorbe edilmez; sistemik infeksiyonların tedavisi için sadece paranteral (i.v.) kullanılır. Ağızdan sadece, C. difficile veya stafilokoklara bağlı enterokolitlerde barsakta lokal etki oluşturmak için kullanılır. Plazma proteinlerine çok düşük oranda (yaklaşık %10) bağlanır. Seröz boşluklara ve menenjit varsa, BOS (beyin omurilik sıvısı) içine iyi nüfuz eder. Böbreklerden itrah edilmek suretiyle elimine edilir. Eliminasyon yarılanma ömrü, böbrek fonksiyonu normal kimselerde 6 saat kadardır.

İntravenöz verilışı yavaş injeksiyon veya infüzyon şeklinde yapılır. Aminoglikozidlerle kombine kullanıldığında, dozu yarıya düşürülür. Sistemik ve lokal verildiğinde yan tesirlerini azaltmak için intravenöz solüsyonuna hidrokortizon ilave edilebilir.

Vankomisin, toksisitesi fazla olan bir antibiyotiktir. En ciddi yan tesiri nörotoksik etkisine bağlı işitme kaybıdır; bazen vestibüler siniri de bozabilir. İşitme kaybı yüksek dozla veya uzun süren tedavi sırasında meydana gelir ve irreversibl olabilir. Nefrotoksik etkisi hafiftir ve böbrek bozukluğu seyrek görülür. İnjesiyon yapılan vende tromboflebit oluşturabilir. Nadiren anafilaktik şok benzeri bir durum oluşturabilir (Kayaalp 1998).

Seftriakson: Üçüncü kuşak sefalosporinlerdendir. Gram-negatif bakteri spektrumunun niteliği bakımından sefotaksim ve seftizoksım'e benzer, *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae*, menengokoklar ve pnömokoklara çok etkilidir. *Pseudomonas*, *B. fragilis* enterokoklar ve stafilokoklara karşı etkinliği düşüktür. Plazma proteinlerine %95 bağlanır. BOS'a sefotaksim ve seftrizoksım kadar iyi sokulur. Kısmen karaciğerde metabolize edilmek veya safraya itrah edilmek ve kısmen de böbreklerden glomerüler filtrasyonla atılmak suretiyle yavaş elimine edilir. Eliminasyon yarılanma ömrü en uzun olan sefalosporindir (8 saat). Bakteriyel menenjitte, alt solunum yolu infeksiyonlarında, gonorenin çeşitli şekillerinde ve doz intervalinin uygunluğu nedeniyle duyarlı bakterilere bağlı infeksiyonu olan ambulatuvar hastalarda tercihen kullanılır; tiyofa karşı alternatif ilaçtır. Diğerlerine göre sık diyare yapan bir sefalosporindir; bunda barsak mikroflorasını bozmasının katkısı vardır. Nisbeten sık bir şekilde safra kesesinde çökelti (psödotitiazis, "safra çamuru") yapar, bu bazen semptomatik olabilir (safra koliği, bulantı ve kusma gibi); tedavi bittikten sonra iki ay içinde çökelti kaybolur (Kayaalp 1998).

Dorzolamid: Glokom tedavisinde yan tesirleri pahasına, sadece sistemik olarak kullanılır. Asetazolamid, solüsyon halinde göze damlatıldığında göz içine penetrasyonu yetersizdir. Bu indikasyonda kullanılmak üzere, gravimetrik etki gücü daha yüksek olan ve göze lokal uygulandığında processus ciliaris'e yeterince sokulabilen dorzolamid geliştirilmiştir. Sistemik yan tesirleri önemsiz derecededir. Bu ilaç %2'lik solüsyon halinde günde 3 kez göze damlatılır. Tek başına veya beta-blokör solüsyonlarıyla yeterli sonuç alınamayan glokom ve göz hipertansiyonu olgularında birlikte kullanılır (Kayaalp 1998).

Timolol maleat: Timolol maleat göz damlası olarak kullanılan bir ilaçtır. Bu ilacın % 0,25-0,5'lik solüsyonunun göze damlatılması normal deneklerde ve kronik açık-açılı glokom olgularında göz-içi basıncını düşürür; aynı etki ağız yolundan timolol verildiğinde de oluşur. Karteolol, betaksolol ve levobunolol'nun oftalmik solüsyonu da bu indikasyonda lokal kullanılır. Diğer beta-blokör ilaçların sistemik uygulanması ile de benzer sonuçlar alınmıştır. Dar-açılı glokomda belirgin bir etki göstermezler. Timolol selektif-olamayan tipte bir beta-blokördür.

Timolol solüsyonunun lokal uygulanması, açık açılı glokomun standart tedavisi sayılmaktadır. Bu ilaç aynı indikasyonda lokal kullanılan pilokarpin'e (%1-4'lük solüsyon) göre biraz daha fazla, adrenalin'e (%0,5-2'lik solüsyon) göre ise belirgin derecede fazla etkili bulunmuştur. Göze lokal uygulandığında göz-içi basıncındaki azalma 20 dakikada başlar ve 12-24 saat kadar sürer. Timolol solüsyonu günde iki kez damlatılmak suretiyle uygulanır. Sayılan beta-blokör-olmayan ilaçlara göre diğer bir üstünlüğü, pupilla çapında veya akomodasyonda belirgin değişiklik oluşturmamasıdır. Uygulanan miktarların %80'e kadar varabilen bir kısmı absorbe edilebilir.

Timolol ve diğer beta-blokörlerin göz-içi basıncını düşürmeleri, processus ciliaris epitel hücrelerinde aköz hümör yapımını azaltmaları ile ilgilidir. Aköz hümörün drenajını etkilemezler. Söz konusu etkisi beta-reseptörlerin blokajı ile ilgisi de kesin değildir. İlginç olarak adrenalin ve beta-mimetik (agonist) bir ilaç olan salbumatol da göz-içi basıncını düşürür; fakat bu etki iridokorneal açıdaki beta-reseptörler aracılığı ile drenajın artırılmasına bağlı olabilir.

Timolol maleat; lokal pilokarpin veya lokal adrenalin veya sistemik asetazolamid tedavisi ile kombine uygulanırsa bu ilaçların göz-içi basıncı üzerindeki düşürücü etkisini artırır. Timolol uygulanmasına başlandığında, ilk 1-2 hafta içinde etkisinde hafif bir azalma olur; bundan sonra 1-2 yıl boyunca uygulandığında bile etkinlikte bir azalma olmaz.

Timolol uygulanması seyrek olarak gözde yanma, fotofobi, görme bulanıklığı, kaş ağrısı ve kızarma gibi lokal belirtilere neden olur. Yan tesir sıklığı pilokarpin veya adrenaline göre daha düşüktür. Keratokonjonktivitis sikka yaptığı için terkedilen praktolol'un aksine, timolol göz yaşı salgılanmasında azalma yapmaz. Gözden absorbe edilerek kardiyovasküler nitelikte sistemik etki oluşturabilir. En çok görülen sistemik etkisi bradikardidir; kan basıncında hafif düşme yapabilir. Bronşiyal astma, konjestif kalp yetmezliği ve kalp bloku olan hastalarda sistemik etkileri sorun oluşturabilir (Kayaalp 1998).

Siklopentolat: Bu tür ilaçlar, sentetik olarak yapılan tersiyer amin türevleridir. Atropin ve skopolamin gibi, amino alkollerin organik asitlerle yaptığı esterlerdir. Bunlardan homatropin, yapısı bakımından atropin'e en fazla benzeyen türevidir; tropin'in mandelik asitle yaptığı esterdir. Bazıları kuvaterner amin haline sokulmuştur; bunlardan sonraki gruba girerler.

Tersiyer amin yapısında olmaları nedeniyle göze damlatıldıklarında göz içine çabuk nüfuz ederler. SSS (santral sinir sistemi)'ne girebilirler. Parasempatolitik etkinlikleri atropininkine göre zayıftır.

Bu ilaçlardan siklopentolat ve homatropin gibileri sadece oftalmik solüsyon şeklinde lokal kullanılır. Atropin'e göre üstünlükleri, midriyatik ve sikloplejik etkilerinin çabuk başlaması ve kısa sürmesidir. Gözü tahriş etmezler. Göze damlatıldıklarında genellikle yarım saat sonra etkileri maksimuma erişir ve en fazla 24 saat sürer. Tropikamid bunlar içinde en kısa etkili olanıdır; yaptığı midriyazis 20 dakika içinde maksimuma erişir ve 6-12 saat kadar sürer. %0,5'lik solüsyonu siklopleji yapmaksızın sadece midriyazis oluşturur. Bu ilaçların hepsinin etkinliği atropin'inkinden zayıf olduğu için, göze pilokarbin veya fizostigmin solüsyonu damlatmak suretiyle etkileri kolayca ortadan kaldırılabılır (Kayaalp 1998).

İndometasin: Analjezik, antipiretik ve antiinflamatuvar etkisi olan bir ilaçtır. Ağızdan alınan 50 mg indometasin, 600 mg aspirin ile aşağı yukarı eşit derecede analjezi yapar. Eşit-analjezik dozu, aspirininkinden daha güçlü antiinflamatuvar ve antipiretik etki gösterir. Yan tesirlerinin fazlalığı nedeniyle ankilozan spondilit, osteoartrit ve romatoid artrit gibi romatizmal hastalıklarda, akut gut artritinde, bursit, tendinit ve travmatik sinovit gibi durumlarda kullanılması tavsiye edilir. İlacın vazokonstriktör etkisi de vardır. Henüz açıklanamayan nedenlerle kalça, diz ve omuz eklemleri gibi büyük eklemlerin primer osteoartritinde diğer durumlarda olduğundan belirgin derecede daha güçlü terapötik etkinlik gösterir. Romatoid artritte yüksek dozda kullanılması gerekir, etkinlik ve yan tesir indensi bakımından aspirine göre bir üstünlüğü yoktur. Ankilozan spondilitte aspirinden daha fazla terapötik etkinlik gösterir; bu durumdaki etkinliği

fenilbutazonunkine eşittir. Akut gut artritinin tedavisinde ve kolşisine dayanıklılık göstermeyen hastalarda günde iki kez 25 mg gibi düşük bir dozda nöbetlerin profilaksisinde kullanılır. Akut infeksiyöz diyarelerde kısmi düzelme yapabilir; ancak bu amaçla kullanılmaz.

Deneyisel incelemelerde çeşitli endojen maddelerin yaptığı kapiler permeabilite artmasını önleyebildiği gösterilmiştir. Söz konusu etkiler hiç olmazsa kısmen prostaglandin sentezini inhibe etmesine bağlıdır. Ayrıca sitotoksik nitelikteki aktif oksijen radikallerini bağlayarak inaktive eder. *In vitro* olarak fosfodiesterazı güçlü bir şekilde inhibe eder ve intraselüler cAMP'nin konsantrasyonunu yükseltir. cAMP'nin polimorf çekirdekli lökositlerde ve makrofajlarda lizozom membranını stabilize ettiği ve trombositlerde fosfolipidlerin araşidonik aside dönüşmesini inhibe ettiği bir varsayım olarak ileri sürülmüştür. Bu nedenle, indometasin'in hücrelerde cAMP düzeyini yükseltmesi antiinflamatuvar etkisinin oluşmasına katkıda bulunabilir.

Ağız yoluyla alındığında gastrointestinal kanaldan çabuk ve tam absorbe edilir. Plazmada yarılanma ömrü iki saat kadardır; fakat bu değerden beklenene göre daha uzun etkinlik gösterir. Bunun nedeni kısmen, dokularda toplanması ve plazmadan kaybolan ilacın yerine dokudan plazmaya indometasin salıverilmesidir (Kayaalp 1998).

Sefepim: Beta-laktamaz enzim türlerine en dayanıklı ve onları pek indüklemeyen dördüncü kuşak sefalosporindir. Antibakteriyel spektrumu sefotaksiminkine benzer; ancak *Ps aeruginosa*'ya karşı daha etkili (seftazidime yaklaşık eşit)'dir. Streptokoklar ve metisiline duyarlı *Staph. Aureus*'a karşı seftazidimden daha etkilidir. Tamamıyla böbrekten itrah edilir. İntravenöz injeksiyon veya infüzyonla verilir (Kayaalp 1998).

Sefotaksim: Tıpta ilk kullanılan üçüncü kuşak sefalosporindir. Antibakteriyel spektrumu sefoperazonunki kadar geniş değildir. Aerobik gram-negatif basillerin çoğuna (özellikle *E.coli* ve *Serratia*'ya) ve *Staph. Aureus*'a karşı çok etkilidir. Gram-negatif enterik basillere, *H. influenzae*, *N. meningitidis* ve *Strep. pneumoniae*'ye bağlı

menenjitte karşı etkilidir. Pseudomonas, enterokoklar ve B. fragilis'e karşı etkinliği yetersizdir. Plazma proteinlerine % 40 oranında bağlanır; BOS içine yeterli derecede nüfuz eder. Karaciğerde % 30-50'ye varan bir oranda metabolize edilir. Kalan kısmı ve metabolitleri büyük ölçüde böbrekten itrah edilir. Yarılanma ömrü 1 saat kadardır. İ.m. injeksiyon veya i.v. injeksiyon ya da infüzyonla kullanılır (Kayaalp 1998).

Penisilin G: Penisilinler güçlü bakterisit etkileri yanında toksisiteleri nispeten düşük olan ve sık kullanılan doğal veya yarı-sentetik antibiyotiklerdir. İlk bulunan ve kısa aralıklarla yeni türevlerinin tıbbi kullanıma sunulması nedeniyle en hızla gelişme göstermiş olan antibiyotik grubunu oluştururlar. Başta Penicillium notatum ve chysogenum olmak üzere çeşitli Penicillium (yeşil renkli küf mantarları) türlerinden ekstraksiyon ve saflaştırma suretiyle elde edilirler. Kültür ortamına, özel substratlar (prekürsörler) katarak doğal olarak üretilen bu penisilinlerden sadece iki tanesi, penisilin G (benzilpenisilin) ve penisilin V (fenoksimetilpenisilin) klinikte kullanılmaya elverişli olarak değerlerini korumuşlardır; diğerleri klinik kullanıma girmemişlerdir.

Penisilin G'nin ilaç olarak kullanılan yalın şekli onun potasyum veya sodyum tuzudur; bunlar kristal şeklinde olduklarından kristalize penisilin G adını alırlar. Suda fazla çözündüklerinden suda solüsyon halinde kullanılırlar; bu nedenle aköz kristalize penisilin G olarakta adlandırılırlar. Yine penisilin G, benzilpenisilin şeklinde de adlandırılır.

Penisilin G penisilinlerin en eskisidir. 1940'ların başından beri kullanılmaktadır. Belirli bazı bakterilerin yaptığı infeksiyonlarda başlangıçtaki etkinliğini ve değerini hala korumaktadır. Aşağıdaki bakteri türlerinin yaptığı infeksiyonlarda en tercih edilen antibiyotiktir veya antibiyotiklerden biridir.

- Streptococcus pneumoniae
- Grup A streptokoklar (Strep. pyogenes)
- Neisseria meningitidis

- Gram-pozitif basiller (*Clostridium perfringens* ve tetani, *Corynebacterium diphtheriae*, *Bacillus anthracis*)
- *Treponema pallidum* (sifiliz etkeni) ve *Leptospira*

Grup B streptokoklar, Grup A türüne göre yaklaşık 4 kez daha az duyarlıdırlar. *Strep. Pneumoniae*'nin rezistans suşlarının (MİK $\geq 1\mu\text{g/ml}$) sayısı az da olsa giderek yükselmektedir. *Strep. viridans* genellikle çok duyarlıdır; ancak hasta yakın geçmişte penisilin tedavisi görmüşse duyarlık azalabilir. *Streptokokus faecalis* (enterokoklar)'ın penisilin G'ye duyarlığı yukarıda sayılan türlerinkinden azdır bu bakterinin yaptığı ciddi infeksiyonlarda (özellikle endokardit'te), gentamisin gibi bir aminoglikozid antibiyotikle birlikte kullanılması gerekir.

Neisseria gonorrhoeae penisilin G'ye genellikle duyarlıdır. Ancak bu bakterinin beta-laktamaz salgılayan rezistan suşları da vardır. *Staph. aureus* suşlarının % 90'dan fazlası (hastane içinde yerleşmiş yani nozokomiyal olanlar daha fazla olmak üzere) penisilin G'ye rezistandır; bunun başta gelen nedeni söz konusu türlerin beta-laktamaz (penisilinaz) salgılamasıdır. Aktinomiçetlerden *Actinomyces israelii* duyarlıdır, fakat *Nocardia asteroides* rezistandır. Gram-negatif basiller (az sayıda ve önemsiz istisnalar dışında) penisilin G'ye duyarsızdır.

Penisilin G'nin 1 milyon ünitesi 0,6 g'dır. Sodyum penisilin G, 1 milyon ünite başına 1,7 mEq (39 mg) sodyum, potasyum penisilin G ise aynı miktar başına 1,7 mEq (66 mg) potasyum içerir. Sodyum yüklenmesine neden olmayan potasyum tuzu rutin olarak kullanılır. Ancak böbrek yetmezliği olgularında potasyum retansiyonu tehlikesi nedeniyle, sodyum penisilin G yeğlenir (Kayaalp 1998).

Adrenalin: Vücutta adrenal medullada sentezlenir ve oradan salgılanarak hormon görevi yapar. Kimyaca, R-1-(3, 4-dihidroksifenil)-2-metilaminoetanoldür. İlaç olarak sentez suretiyle üretilir ve suda çözünen hidroklorür veya asid tartarat tuzu kullanılır. Işıktan bozunduğu için ampülleri ve diğer solüsyonları ışıktan muhafaza edilmelidir.

Bozunduğu zaman önce adrenokroma dönüşür ve pembe renk alır; daha sonra polimerize olarak kahverengi olur. Sadece renksiz solüsyonları kullanılmalıdır. Katekolaminler içinde en çok kullanılan ve çok çeşitli etkileri olan bir ilaçtır. Deri altına enjekte edilen adrenalin solüsyonu, yaptığı vazokonstriksiyon nedeniyle nisbeten yavaş absorbe edilir; etkisi 5 dakikada başlar. İntramüsküler injeksiyonu daha çabuk etki oluşturur.

Göze lokal uygulandığında nisbeten sık bir şekilde reaktif konjonktiva hiperemisi, alerjik konjonktivit ve temas dermatiti yapabilir. Bazen paradoksik olarak göz içi basıncını yükseltir (Kayaalp 1998).

Lomefloksasin: Sistemik infeksiyonlara karşı kullanılan bir fluorokinolondur. Aynı zamanda gravimetrik etki gücü en yüksektir. Ağızdan tablet şeklinde ve i.v. yoldan infüzyon solüsyonu şeklinde kullanılır. Türkiye’de her iki şekilde pazarlanmıştır. İdrar yolu infeksiyonlarında, ve alt solunum yolu infeksiyonlarında uygulanır. Strep. pneumoniae’ye karşı etkinliği düşüktür. Ancak pnömokokal ve streptokokal infeksiyonlarda penisilinler ve sefalosporinler fluorokinolonlara tercih edilirler. Yarılanma ömrü 6-8 saattir (Kayaalp 1998).

Bu çalışmada koyun eritrositleri ve göz lensinden glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminin afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırılması, karakterizasyonu ve enzimin bazı kinetik özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bunun yanı sıra, koyun hastalıklarında kullanılan bazı antibiyotiklerin ve insan göz hastalıklarında sıklıkla damla halinde kullanılan ilaçların G6PD enzimi üzerinde inhibisyon ve aktivasyon kinetiklerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi bakteri, protozoa, mantar, sinek, sıçan, balık ve memelilerin hemen hemen tüm dokuları olmak üzere geniş bir canlı topluluğunda bulunmuştur. Buna ek olarak tavşan karaciğer mikrozomunda ve kemik ilginde de bu enzimin olduğu tespit edilmiştir (Cacciapuoti and Lessie 1977, David et al 1977, Deutsch 1983, Grigor 1984, Fickenscher and Scheibe 1986, Dikmen ve Yüreğir 1989, Ninfali and Palma 1990, Reuter et al 1990, Delgado et al 1990, Walter et al 1994, Aksoy 1997,).

G6PD'nin değişik canlı ve dokulardaki molekül büyüklüğü, birincil ve alt birim yapıları ortaya konmuş (Levy 1979, Luzzatto and Baattistuzzi 1985, Persico et al 1986, Yoshido and Huang 1986, Vulliamy et al 1988, Iritani et al 1992, Ozols 1993, Jeffery et al 1993) ve muhtemel ikincil yapı amino asit dizilişinden tahmin edilmiş (Luzzatto and Baattistuzzi 1985, Yoshido and Huang 1986, Jeffery et al 1993); enzimin spesifik substrat ve koenzim bağlanma bölgeleri dolaylı olarak belirlenmiştir (Persico et al 1986, Yoshido and Huang 1986, Vulliamy et al 1988, Jeffery et al 1993). Değişik tür G6PD'larda aspartik asit + glutamik asit sayısının lizin + histidin + arginin sayısından fazla olması enzime düşük izoelektrik noktası kazandırmıştır (Levy 1979). Örneğin; C. Utilis, sıçan meme bezi ve sığır lensi G6PD'lerinin izoelektrik pH'ları sırasıyla 6,16, 5,8 ve 5,14 dir (Nevadan et al 1974, Levy 1979, Uluş vd 1997).

Birbirinin eşi alt birimlerden oluşan insan ve maya sitozolik G6PD enzimlerinin asetillenmiş amino uçlarına sahip olduğu, tavşan mikrozomal G6PD'sinin ise piroglutamat içerdiği bulunmuştur (Ozols 1993).

Enzim monomerinin molekül ağırlığı, mikroorganizmalarda 50-60 k Dal, memelilerde ise 58-67 k Dal olarak değerlendirilmiştir (Levy 1979). Örneğin, insan G6PD monomeri 514 amino asit içerir ve molekül ağırlığı 59 k Dal' dur (Persico et al 1986). Tavşan karaciğer mikrozomal enziminin molekül ağırlığının da 90 k Dal olduğu bulunmuştur

(Ozols 1993). Ayrıca fare karaciğerinde 121 k Dal, sıçan meme bezlerinde 120 k Dal, sıçan eritrositlerinde 131 k Dal, domuz karaciğerinde 133 k Dal, sığır eritrositlerinde 114 k Dal, insan karaciğerinde 118 k Dal ve sığır lensinde 64 k Dal olarak bulunmuştur (Ulus et al 1999).

G6PD'ler üzerinde yapılan çalışmalar, katalitik olarak aktif en küçük dördüncül yapının dimerik birim olduğu; monomerik yapıların ise katalitik bir aktiviteye sahip olmadıklarını göstermiştir (Bonsignore and De Flora 1972, Beutler 1978, Levy 1979, Luzzatto and Baattistuzzi 1985, Yoshido and Huang 1986, Bautista et al 1992). Ayrıca bu enzim yüksek iyonik güç (>0.1) ve alkali pH'da dimerik, düşük pH (pH 5.5-6.5) ile düşük iyonik güçte ise belirgin olarak tetramerik yapıdadır (Bonsignore and De Flora 1972, Olaniyi et al 1976, Levy 1979). Tetramer-dimer dengesini sağlayan en önemli düzenleyici etkenin pH olduğu, *in vivo* olarak eritrosit içinde dimerik yapının baskın olduğu belirlenmiştir (Bonsignore and De Flora 1972). Ayrıca Mg^{+2} ve diğer +2 değerli katyonların da yapıyı tetramerik birime kaydıracağı (Bonsignore and De Flora 1972, Levy 1979, Hirono et al 1989); pH'sı 6.0'dan daha düşük iyonik güçlerde enzimin daha yüksek oligomerik yapılar oluşturduğu belirlenmiştir (David et al 1977, Yoshido and Huang 1986, Ninfali et al 1990, Aksoy 1997). G6PD enziminin katalizlediği tepkimelerde substrat görevi görmesi ve enzimi kararlı halde tutmasıyla $NADP^{+}$ 'nin G6PD üzerinde iki fonksiyonunun olduğu ortaya çıkarılmıştır. Enzimin, kararlılığı için gerekli sıkıca bağlı "yapısal $NADP^{+}$ " ve G6PD tepkimesinde indirgenme fonksiyonunu gören gevşekçe bağlı "katalitik $NADP^{+}$ " ihtiva ettiği ileri sürülmüştür. "Yapısal $NADP^{+}$ "nın enzimin her alt birimine yarım veya bir molekül olarak bağlandığı ortaya atılmıştır (Hirono et al 1989).

Enzimin dördüncül yapısı, bir çok ligantların bağlanmasından sonra allosterik etkileşiminin varlığı ve metabolitler ile inhibisyonu nedeniyle G6PD enzimi "allosterik" bir enzim gibi davranmaktadır (Bonsignore and De Flora 1972, Ninfali et al 1990).

G6PD'nin katalizlediği tepkime, glukoz 6-fosfatın bir nolu karbonun dehidrogenasyonu ile başlar. Enzim sınırlı substrat spesifikliğı gösteriyor ise de 2-

deoksi glukoz 6-fosfat, 3-deoksi glukoz 6-fosfat, galaktoz 6-fosfat ve glukoz gibi substrat analoglarını da kullanabilmektedir. Bu kullanım tabii substrat ile karşılaştırıldığında düşük ilgi ve orandadır (Bonsignore and De Flora 1972, Levy 1979). Enzimin 2dG6P ile Gal6P için ilgisi normal substratına göre %4'den daha küçüktür (Luzzatto and Baattistuzzi 1985, Beutler 1990). Bikarbonat varlığında enzimin glukoz kullanımında belirgin bir artış gösterdiği ortaya konulmuştur (Beutler 1978, Levy 1979).

Yapılan çalışmalarda memeli ve *S.calbergasis* kaynaklı G6PD enzimlerinin spesifik koenzimlerinin NADP⁺ olduğu bulunmakla beraber; G6PD enzimlerinin kullanıldıkları koenzimlere göre 5 grupta toplandıkları belirlenmiştir (Levy 1979).

1. Spesifik olarak NADP⁺ kullananlar,
2. NADP⁺'yi tercih edenler,
3. Hem NADP⁺ hem de NAD⁺ kullananlar,
4. NAD⁺ tercih edenler,
5. Spesifik olarak NAD⁺ kullananlar.

Normal insan G6PD'sinin NADP⁺ kullandığı, NAD⁺ kullanımının çok düşük olduğu bulunmuştur (Yoshida 1978). G6PD'nin kendisine spesifik koenzim yanında desamino NADP⁺, 3-asetilpiridin adenin dinükleotid fosfat gibi NADP⁺ analoglarını da kullanabildiği bulunmuştur (Anonim 1967, Yoshida 1978).

NADPH ve ATP ile güçlü bir şekilde inhibe olan normal enzimin NADPH için K_i sabiti 9 µM olarak bulunmuştur (Beutler 1978, Levy 1979, Beutler 1990).

Sıcaklık enzim aktivitesi üzerinde önemli bir role sahiptir. Sıcaklık reaksiyonun hızını maksimum noktaya ulaşıncaya kadar artırır. Fakat bu artış ürünlerin meydana gelmesi için gerekli olan enerjiye sahip yeterli sayıda molekül oluşuncaya kadar devam eder. Daha sonra ısı artışı devam ederse, enzim denatürasyonuna bağlı olarak enzim aktivite kaybeder ve reaksiyonun hızı düşmeye başlar (Deutsch 1983, Telefoncu ve Telefoncu

1989, Champe and Harvey 1997). Bu sebeple aktivite ölçümü esnasında çalışılan sıcaklık için kontrol faktörü kullanılarak sıcaklığın belirli bir seviyede tutulması zorunludur (Telefoncu ve Telefoncu 1989). Örneğin, sıçan lensi G6PD enzimi oda sıcaklığında stabildir. Fakat sıcaklık 37°C'ye çıkarıldığında enzim aktivitesini kaybetmektedir (Cheng and Chylack 1977). Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi, karaciğer, yağ dokusu, adrenal korteks, tiroit, eritrosit, testis ve laktasyondaki meme bezi gibi dokularda aktif olduğu halde, iskelet kasında aktivitesi düşüktür (Bonsignore and De Flora 1972, Levy 1979, Luzzatto and Baattistuzzi 1985, Mayes 1991).

Pentoz fosfat metabolik yolunun yanı sıra diğer metabolik yolların da kontrolü açısından önemli bir role sahip olan glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminin kontrolü fizyolojik şartlarda meydana gelmektedir (Levy 1979).

G6PD'nin steroidler tarafından inhibe edildiği (Gordon et al 1995), bu inhibisyonun yalnızca memeli G6PD'sinde etkin olduğu tesbit edilmiştir. Bu, NADP⁺ ve G6P ile unkompetitif bir inhibisyonudur (Levy 1979). Çalışmalar, 17. ve 20. karbon atomunda karbonil grubu ihtiva eden steroidlerin düşük derişimleriyle bile enzim aktivitesini engelledikleri ortaya konulmuştur. G6PD'ye steroid bağlanmasının genellikle hidrofobik etkileşim ile gerçekleştiği; polar grupların varlığının ise bağlanmayı azalttığı sonucuna varılmıştır (Levy 1979). NADPH/NADP⁺ oranının G6PD enzimi aktivitesinin düzenlenmesinde en önemli etken olması yanında NADPH'ın NADP⁺'ya karşı kompetitif bir inhibisyonu söz konusudur (Levy 1979). İnsan trombositlerinden saflaştırılan G6PD ile yapılan çalışmada, NADPH'ın NADP⁺'ye karşı kompetitif bir inhibisyona sahip olduğu gösterilmiştir (Kosow 1974). NADPH inhibisyonunun dengelenmesinde de okside glutatyonun (GSSG) aktivatör olarak görev aldığı gösterilmiştir (Levy 1979).

G6PD enziminin aktivitesi ATP tarafindanda önemli ölçüde etkilenmektedir (Levy 1979). ATP'nin *L.mesenteroides*'den elde edilen G6PD enzimini inhibe ettiği ve bu inhibisyonun fizyolojik Mg⁺² konsantrasyonunda ortadan kalktığı bulunmuştur.

ATP'nin G6PD üzerindeki inhibisyon etkisi G6P ile yarışmalı olarak gerçekleşmektedir. Bununla birlikte, AMP'nin sıçan karaciğerinde GSSG gibi G6PD inhibisyonunu bozduğu ifade edilmiştir. Söz konusu enzim aynı zamanda asetil-CoA ve koenzim-A (CoA) tarafındanda inhibe edilmektedir ve bu inhibisyon ATP'nin meydana getirdiği inhibisyona nazaran daha belirgin olduğu bulunmuştur (Levy 1979, Olive and Levy 1975).

G6PD'nin üzerine çevresel faktörlerden ısı, ışık, ağır metal iyonlarının ve diğer modülatörlerin etkileri değişiktir (Anderson and Duggan 1976).

Farklı dokular ve organizmalardaki G6PD aktivitesi üzerine ısı, ışık, ağır metal iyonları gibi çevresel faktörlerin değişik etkileri vardır. Örneğin, soğuğa maruz bırakılan genç kertenkelelerin beyin G6PD aktivitesi kontrol grubuna nazaran yüksek iken, diğer yaş gruplarında yaşa bağlı olarak bir azalma bulunmuştur (Mishara and Patnaik 1993). Ayrıca, açlık süresiyle orantılı olarak G6PD aktivitesinde çok değişiklikler saptanmıştır. Sıçan karaciğerinde söz konusu enzimin aktivitesi açlıkta %50 aktivite kaybına uğrarken, aç bırakılıp yeniden beslenen sıçanların karaciğerinde ya da gebelik ve laktasyon dönemindeki sıçanların meme bezinde, G6PD aktivitesinde 20-40 kat bir artış tespit edilmiştir (Chang et al 1979). Isı, beslenme biçimi, açlık gibi etkenler ile aktivitesinde böyle farklı değişiklik ve düzenlemeler olması G6PD enziminin "adaptif" bir enzim olduğu inancını pekiştirmeye katkıda bulunmaktadır (Morelli et al 1978, Luzzatto and Baattistuzzi 1985, Mishara and Patnaik 1993). Diğer yandan insan eritrosit G6PD aktivitesinde yaşa bağlı olarak azalma olduğu tespit edilmiştir (Orzalesi et al. 1981, Telefoncu ve Telefoncu 1989).

G6PD enziminin optimum pH'sı çeşitli türlerde belirlenmiştir ve türden türe 7,4 ile 9 arasında değişen bir farklılık gözlenmiştir (Deutsch 1983). Sığır adrenal korteksindeki enzimin optimum pH'sının 8-9 arasında değişmektedir (Kerns 1975). Sıçan karaciğerinden elde edilen sitoplazmik G6PD enziminin optimum pH'sı 7,5 olarak belirlenmiştir. Mitokondri G6PD enziminin ise 7,5 ve 9 olmak üzere iki tane optimum

olarak verilmektedir (Beutler 1971, Morelli et al 1978, Yüregir et al 1994, Aksoy 1997). Maydanozda optimum pH= 8 olarak belirlenmiştir (Çoban 2002).

Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi aktivitesi değişikliğine dokusal farklılıkların etkisi yanında, enzimin biyokimyasal ve genetik yapısındaki değişiklikler de etki etmektedir (Levy 1979, Maeda et al 1992, Cappellini et al 1993). Bu yapısal değişiklikler sonucu meydana gelen aktivite düşüklüğü ile birlikte ortaya çıkan tablo “G6PD eksikliği” adı altında incelenmektedir (Aksoy 1997). G6PD eksikliği lensi de içine alan pek çok dokuda gösterilmiştir (Zinkham 1961, Pannacciulli et al 1966, Orzalesi et al 1976). G6PD eksikliği ilk olarak bazı insanlarda sıtmaya karşı primaquin’i kullandıklarında hemolitik aneminin gelişmesine karşı aşırı hassasiyetin sebebinin anlaşılması için yapılan araştırmalar sonucunda keşfedildi (Beutler 1994). Eritrositlerde diğer pek çok enzimin eksikliği bilinmesine rağmen, G6PD eksikliği sadece hematolojide değil aynı zamanda insan biyolojisinde de önemli enzim defektlerinin en yaygın olanlardan biri olarak bilinmektedir (Valentine et al 1985, Zenella et al 1989, Beutler 1994).

13 ekzon ve 12 introndan oluşan G6PD geni insanda X kromozomunun Xq28 bölgesinde bulunur ve 100 kilobaz uzunluğundadır (Donald et al 1991, Beutler 1991). Bu enzimin 442 varyantı olduğu tespit edilmiş ve bununla ilgili olarak enzim eksikliğinin çok sık olarak rastlanan genetik hastalıklara sebep olduğu belirlenmiştir. Söz konusu enzimin eksikliği, pentoz fosfat metabolik yolunu etkileyen bir oksidatif stres durumunda hemolitik anemiye doğurur. Örneğin, Afrika’da G6PD eksikliği yüksek oranda görülmektedir (Coulbaly et al 2000).

Bu gün dünyada G6PD enzimi eksikliğinden 400 milyondan fazla insan etkilenmektedir. Bu enzimin bu güne kadar dünyada yaklaşık 400, Türkiye’de ise 20’ye yakın varyantı tespit edilmiştir. Türkiyedeki varyantların büyük bir kısmı Çukurova ile Antalya bölgesinde bulunmuştur (Aksoy 1997).

Hemolitik anemi G6PD eksikliğinin en önemli göstergesidir. Hemoliz genelde ilaç alımı, enfeksiyon ve bakla yenmesine bağlı olarak artar (Ulus vd 1997). G6PD eksikliği olan kişilerde katarakt riski artar, bu da indirgenmiş glutatyon seviyesinin düşük olması ile açıklanabilir (Dwivedi et al 1987, Jaques et al 1988). G6PD eksikliğinin katarakt gelişimi için hazırlayıcı faktör olduğu öne sürülmektedir (Orzalesi et al 1984). Eritrositlerdeki eksiklik ile birlikte lensteki G6PD aktivitesinin azalmasının G6PD eksikliği olan insanlarda katarakta yol açabileceği ifade edilmiştir (Zinkham 1961, Orzalesi et al 1976). Kataraktlı 52 hastada yapılan bir çalışmada, kataraktın bu hastaların %52'sinde G6PD eksikliğinden kaynaklandığı belirlenmiştir (Yüreğir et al 1989). G6PD'nin gözün opaklaşmasını önlemede ve hücrelerin gelişimi için vazgeçilmez olduğu bilinmektedir (Kinoshita 1964, Ohrloff et al 1976).

G6PD enzimi insan eritrositlerinden ilk olarak 1965 yılında Yoshida tarafından saflaştırılmıştır (David et al 1977). Enzim daha sonra sıçan meme bezlerinden, sığır eritrositlerinden ve birkaç insan dokusundan afinite kromatografisi vasıtasıyla saflaştırılmıştır (David et al 1977, Ninfali et al 1990). Ayrıca at eritrositlerinden, domuz karaciğerinden, sığır göz lensi, köpek karaciğerinden, fare karaciğerinden, sıçan karaciğerinden, sıçan adrenali, insan karaciğerinden, insan plateletinden saflaştırılmıştır (Bilgili 1992). Bundan başka tavşan dokuları arasında G6PD enziminin tam bir haritasını çıkarmak amacıyla tavşanın farklı dokularından bu enzim saflaştırılmış ve bazı özellikleri test edilmiştir (Ninfali and Palma 1990). Bu amaçla tavşan kemik iliği, dalak, akciğer, karaciğer, böbrek, yağ dokusu, beyin, kalp, kas, eritroblast, retikulosit ve eritrosit hücrelerinden G6PD saflaştırılmıştır (Ninfali and Palma 1990).

Yine sıtmaya karşı kullanılan ilaçlardan birisi olan primaquinin G6PD üzerinde etkisine bakılmış ve bu enzimi inhibe ettiği belirlenmiştir (Telefoncu ve Telefoncu 1989).

Çiftçi ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada bazı antibiyotiklerin (seftrizoksim, ampisilin, sefuroksim, sefazolin, sefaperazon, streptomisin, gentamisin sülfat ve netilmisin) insan G6PD'sine etkileri araştırılmış ve bu ilaçların söz konusu enzimi inhibe ettikleri belirlenmiştir (Çiftçi et al 2000). Ayrıca metamizol ve magnezyum

sülfatın G6PD enzimini *in vitro* ve *in vivo* inhibe ettiği bulunmuştur (Çiftçi et al 2001). Bununla birlikte maya G6PD enziminin dietilnitrozamin (Atalay ve Aker 1984). tarafından inhibe edildiği ve fare eritrosit G6PD enzimlerinin (Alıcıgüzel vd 1989), 2,4-diklorofenoksiasetik asit tarafından *in vivo* ve *in vitro* olarak inhibe edildiği belirlenmiştir.



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmamızda kullanılan N, N, N', N'-tetrametil etilen diamin (TEMED), diyaliz torbaları, NADP⁺ (Na⁺ tuzu), standart serum albümin, glukoz-6-fosfat (monosodyum tuzu) Sigma Chemical Comp.'den; sodyum hidroksit, trihidroksimetil-aminometan (Tris), amonyum sülfat, sodyum asetat, sodyum klorür, fosforik asit, glisin, sodyum azottür, hidroklorik asit, potasyum bifosfat, potasyum fosfat, sodyum fosfat, magnezyum klorür, gliserin, etanol, potasyum asetat, metanol, asetik asit, izopropanol E. Merck AG'den; akrilamid, N,N'-metilen bisakrilamid, Coomassie Brilliant Blue G-250, brom timol mavisi, sodyum dodesil sülfat (SDS), amonyum per sülfat, β-merkaptto etanol, Sephadex G 200 Pharmacia'dan; 2',5'-ADP-Sepharose 4B Pharmacia'dan, çalışmada kullanılan antibiyotikler ve değişik ilaçlar ise piyasadan temin edildi.

3.1.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar

Çalışmalar esnasında aşağıdaki alet ve cihazlardan faydalanılmıştır.

Santrifüj: IEC Clinical Centrifuge USA.

Soğutmalı Santrifüj: Heraeus Sepatech

Spektrofotometre: SHIMADZU UV-VIS 1208 (Japan)

pH metre: Lab Star.

Elektroforez tankı: Hofer, HSI.

Peristaltik Pompa: Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala (İsveç)

Karıştırıcı: Vortex-Genie, Model K-55: GE, Sci. Ind. Inc. Spring field, Mass. 01103 (ABD).

Hassas terazi: Mettler Ha51 Gallenkamp

Afinite kolonu: Kapalı sistem oluşturucu ve soğutmalı (1x10 cm) Sigma (ABD).

Kronometre: Hanhard, Elektronische Digital-Stoppuhr (Germany)

Otomatik pipetler: Socorex

Çalkalayıcı: GFL

Mağnetik karıştırıcı: IKA Combimag RCO.

3.1.3 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

Araştırma süresince kullanılan çözeltilerin kullanılış yerleri ve hazırlanış şekilleri aşağıdaki gibidir:

1. 1 M Tris-HCl/ 5mM EDTA (pH= 8,0) (Eritrosit ve lens G6PD aktivitesi ölçümünde kullanılan tampon): 6,05 g (0,05 mol) Tris ve 0,0605 g ($2,5 \times 10^{-4}$ mol) EDTA alınarak bir miktar saf suda çözüldü. Çözeltinin pH'sı pH metre yardımıyla 1 M HCl ile titre edilerek 8,0'a ayarlandı. Çözelti daha sonra saf suyla 50 ml'ye tamamlandı.

2. 0,1 M $MgCl_2$ (Enzim aktivite ölçümünde kullanılan aktivatör çözeltisi): 0,475 g $MgCl_2$ (5×10^{-3} mol) alınıp hacmi saf su ile 50 ml'ye tamamlandı.

3. 2 mM $NADP^+$ (Enzimin aktivite ölçümünde kullanılan çözelti): 0,0765 g $NADP^+$ (1×10^{-4} mol) alınıp hacmi saf su ile 50 ml'ye tamamlandı.

4. 6 mM G6P (Enzimin aktivite ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi): 0,091 g glukoz-6-fosfat (3×10^{-4} mol) alınıp hacmi saf su ile 50 ml' ye tamamlandı.

5. 0,16 M KCl (Kanın yıkanması için kullanılan çözelti): 1,192 g KCl (0,016 mol) alınıp hacmi saf su ile 50 ml' ye tamamlandı.

6. 1 mM 2-ME içeren 10 mM Tris-HCl (pH= 7,6) (Lenslerin yıkanması ve homojenizasyonu için kullanılan tampon): 1×10^{-4} mol 2-merkaptoetanol ve 0,121g Tris (1×10^{-3} mol) alınıp bir miktar saf suda çözüldü. pH'sı HCl ile 7,6'ya ayarlandı. Daha sonra toplam hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

7. 50 mM KH_2PO_4 (pH= 7,0) (Amonyum sülfat çökeltisinin çözünmesi için kullanılan tampon): 0,68 g KH_2PO_4 (5×10^{-3} mol) alınıp 80 ml saf suda çözüldü. pH'sı NaOH ile 7,0'a ayarlandı. Daha sonra toplam hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

8. (50 mM Potasyum asetat/ 50mM potasyum fosfat) (pH= 6,0) (Eritrosit hemolizatından elde edilen çözünmüş amonyum sülfat çökeleğinin diyalizi için kullanılan tampon): 4,9 g potasyum asetat (5×10^{-2} mol) ve 6,8 g potasyum fosfat (5×10^{-2} mol) karışımının hacmi saf su ile 800 ml'ye getirilip pH=6,0'a ayarlandıktan sonra toplam hacim 1lt'ye tamamlandı.

9. 100 mM Potasyum fosfat (pH= 7,0) (Lens homojenatından elde edilen çözünmüş amonyum sülfat çökeleğinin diyalizi için kullanılan tampon): 6,8 g potasyum fosfat alınarak bir miktar saf suda çözüldü. pH'sı 7,0'a ayarlandıktan sonra saf su ile 500 ml'ye tamamlandı.

10. (0,1 M Potasyum asetat/ 0,1 M potasyum fosfat) (pH= 6,0) (Afinite kolonunun dengelenme ve yıkanması için kullanılan tampon): 9,8 g (0,1 mol) potasyum asetat ve 13,6 g (0,1 mol) potasyum fosfat karıştırıldı ve 800 ml saf suda çözüldü. Daha sonra pH= 6,0'a ayarlandı ve toplam hacim 1 lt olacak şekilde saf su ilave edildi.

11. (0,1 M Potasyum asetat/ 0,1 M potasyum fosfat) (pH= 7,85) (Numuneyi tatbikten sonra afinite kolonunun yıkanması için kullanılan tampon): 9,8 g (0,1 mol) potasyum asetat ve 13,6 g (0,1 mol) potasyum fosfat karıştırıldı ve 800 ml saf suda çözüldü. Daha sonra pH= 7,85'e ayarlandı ve toplam hacim 1 lt olacak şekilde saf su ilave edildi.

12. (0,1 M Potasyum fosfat/ 0,1 M KCl) (pH= 7,85) (Numuneyi tatbikten sonra afinite kolonunun yıkanması için kullanılan tampon): 13,6 g (0,1 mol) potasyum fosfat ve 7,45 g (0,1 mol) KCl karıştırıldı ve 800 ml saf suda çözüldü. Daha sonra pH= 7,85'e ayarlandı ve toplam hacim 1 lt olacak şekilde saf su ilave edildi.

13. (80 mM Potasyum fosfat + 80 mM KCl + 0,5 mM NADP⁺ + 10 mM EDTA) (pH= 7,85) (Afinite jeline tutunmuş olan glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminin elüsyon tamponu): 5,44 g potasyum fosfat (4×10^{-2} mol), 2,98 g KCl (4×10^{-2} mol), 0,1913 g NADP⁺ ($2,5 \cdot 10^{-4}$ mol) ve 1,21 g EDTA (5×10^{-3} mol) karıştırıldı. Daha sonra pH= 7,85'e ayarlandı ve toplam hacim 500 ml olacak şekilde saf su ilave edildi.

14. (0,1 M Tris/ 0,5M NaCl) (pH= 8,5) (Afinite kolonunun rejenerasyonu için hazırlanan tampon): 6,05 g Tris (0,05 mol) ve 14,61 g NaCl (0,25 mol) alınarak pH= 8,5'e ayarlandı. Toplam hacim saf su ile 500 ml'ye tamamlandı.

15. (0,1 M Sodyum asetat/ 0,5M NaCl) (pH= 4,5) (Afinite kolonunun rejenerasyonu için hazırlanan tampon): 4,1 g sodyum asetat (0,05 mol) ve 14,61 g NaCl (0,25 mol) alınarak pH= 4,5'e ayarlandı. Toplam hacim saf su ile 500 ml'ye tamamlandı.

16. % 0,02 lik NaN₃ çözeltisi (Afinite kolonunun bakterilerden korunması için kullanılan çözelti): 20 mg NaN₃ alınarak hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

17. 1 litre 0,1 M potasyum fosfat, % 10 gliserin (pH= 6,0) (Jel filtrasyon kolonunun dengelenme ve yıkanması için kullanılan tampon): 13,6 g potasyum fosfat bir miktar saf suda çözülerek pH= 6,0'a getirildikten sonra saf su ile 900 ml ye tamamlandı. Daha sonra 100 ml gliserin ilave edilerek 1 lt'ye tamamlandı.

18. 1 M Tris-HCl (pH= 7,2-8,9 aralığında) (Optimum pH ve stabil pH çalışması için kullanılan tampon çözeltiler): 12,11 g (0,1 mol) Tris 80 ml saf su içerisinde çözülerek 1

M HCl ile istenen pH'ya kadar titre edildi ve daha sonra saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

19. 1 M Potasyum fosfat pH= 4,9-8,0 aralığında (Optimum pH ve stabil pH çalışması için kullanılan tampon çözeltiler): 13,6 g (0,1 mol) potasyum fosfat 80 ml saf su içerisinde çözülerek istenen pH'ya kadar getirildi ve daha sonra saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

20. SDS elektroforezinde kullanılan numune tamponu: 0,5 ml 1 M Tris-HCl (pH= 6,8), 1ml % 1 SDS ve 1 ml % 100'lük gliserin ve 1 ml % 0,1'lik brom timol mavisinin karıştırılarak hacimlerinin saf su ile 10 ml'ye tamamlanması ile hazırlandı. Bu tampona kullanılmadan önce 950 µl numune tamponunda 50 µl olacak şekilde β-merkapto etanol ilave edildi.

21. SDS elektroforezinde kullanılan yürütme tamponu: 1,5 g Tris ve 7,2 g glisin 50 ml suda çözüldü. Daha sonra bunun üzerine 5 ml % 10'luk SDS ilave edilerek toplam hacim saf su ile 500 ml'ye tamamlandı.

22. Coomassie Brilliant Blue G-250 renk reaktifi (proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti): 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 ml % 95'lik etanolde çözüldü. Bu çözeltiye % 95'lik 100 ml fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin hacmi saf su ile 1 lt'ye tamamlandı.

23. Boyama çözeltisi (jelin boyanması için kullanılan çözelti): 100 ml çözelti için; 0,1 g Coomassie Brilliant Blue R-250, % 50 metanol, % 10 asetik asit, % 40 saf su olacak şekilde yeteri kadar hazırlandı.

24. Yıkama çözeltisi (jelin yıkanması için kullanılan çözelti): % 50 metanol, % 10 asetik asit, % 40 saf su olacak şekilde yeteri kadar hazırlandı.

25. Sabitleştirme çözeltisi (jeldeki proteinlerin sabitleştirilmesi için kullanılan çözelti): % 50 izopropanol, % 10 TCA, % 40 saf su olacak şekilde yeteri kadar hazırlandı.

26. % 0,04'lük brom timol mavisi çözeltisi: 0,1 g indikatörün 16 ml 0,01 N NaOH içinde çözüldükten sonra hacminin saf su ile 250 ml'ye tamamlanmasıyla hazırlandı.

27. Standart serum albumin çözeltisi (1 mg/ml; protein tayini için kullanılan çözelti): 25 mg standart serum albuminin 25 ml saf suda çözülmesiyle hazırlandı.

28. Koyun eritrosit G6PD enzimi için kullanılan ilaçların ana çözeltileri.

İlaç Adı	İlaç Miktarı (mg)	Çözücü Miktarı
Gentamisin sülfat	80	2 ml steril suyunda çözüldü
Sefazolin sodyum	1000	4 ml steril suyunda çözüldü
Penisilin G potasyum	600	2 ml steril suyunda çözüldü
Sefotaksim sodyum	524	2 ml steril suyunda çözüldü
Ampisilin	500	2 ml steril suyunda çözüldü
Amikasin sülfat	500	2 ml steril suyunda çözüldü
Sefepim hidroklorür	1000	10 ml steril suyunda çözüldü

29. Koyun lensi G6PD enzimi için kullanılan ilaçların ana çözeltileri.

İlaç Adı	İlaç Miktarı (mg)	Çözücü Miktarı
İndomethacin	5,0	5 ml steril suyunda çözüldü
Deksametazon 21-fosfat	8,0	2 ml steril suyunda çözüldü
Lomefloksasin	3,0	1 ml steril suyunda çözüldü
Siklopentolat hidroklorür	18,6	5 ml steril suyunda çözüldü
Dorzolamid hidroklorür	100,0	5 ml steril suyunda çözüldü
Timolol maleat	34,0	5 ml steril suyunda çözüldü
Adrenalin [(-) Epinefrin]	8,0	1 ml steril suyunda çözüldü
Seftriakson disodyum	1000	3,5 ml steril suyunda çözüldü
Sefazolin sodyum	1000	4 ml steril suyunda çözüldü
Vankomisin hidroklorür	500,0	10 ml steril suyunda çözüldü
Gentamisin sülfat	80,0	2 ml steril suyunda çözüldü
Siprofloksasin laktat	254,0	100 ml steril suyunda çözüldü

3.2. Yöntemler

3.2.1 Koyun Eritrositlerinden ve Göz Lensinden G6PD Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu Çalışmaları İle İlgili Yöntemler

3.2.1.a. Kan Numunelerinin Temini ve Hemolizat Hazırlanması

Erzurum Et ve Balık Kurumu Kombinasından EDTA'lı kaplar içinde alınan taze koyun kanı, +4 °C'deki şartlarda laboratuara getirilerek günlük olarak kullanıldı.

Taze kandan eritrositleri ayırmak amacıyla, kan numunesi 10 ml'lik 6 tüpe konuldu ve 15 dakika 2.500xg'de santrifüj edildi. Tüplerin üst kısmındaki plazma ve lökosit tabakaları bir damlalık vasıtasıyla alındı. Daha sonra eritrositler 0,16 M'lık KCl çözeltisi ile üç defa yıkandı. Her defasında 2.500xg'de santrifüj edilerek süpernatant atıldı. Elde edilen eritrositler hacimlerinin beş katı buzlu su ile hemoliz edildi. Daha sonra hücre zarlarını uzaklaştırmak için +4 °C'de 10.000xg'de 20-30 dakika santrifüj yapıldı. Damlalık vasıtasıyla süpernatant atıldı (Ninfali et.al. 1990). Böylece hemolizat hazırlanmış oldu. Bütün bu işlemler +4 °C'de gerçekleştirildi.

3.2.1.b. Lens Numunelerinin Temini ve Homojenat Hazırlanması

Erzurum Et ve Balık Kurumu Kombinasından alınan taze koyun gözleri, +4 °C'deki şartlarda laboratuvara getirilerek günlük olarak kullanıldı. Gözlerden önce kornea, daha sonra da iris tabakası ayrılarak lensler alındı. Elde edilen lens dokusu, 1 mM 2-ME (2-merkaptotanol) içeren 10 mM Tris-HCl (pH= 7,6) tamponu ile birkaç kez yıkanarak çok küçük parçalara ayrıldı. Daha sonra sıvı azot kullanılarak dokunun parçalanması sağlandı. Sonuçta 3 ml/g olacak şekilde 1 mM 2-ME içeren 10 mM Tris-HCl (pH= 7,6) tamponu ile homojenize edildi. Elde edilen çözelti 4 °C'de 39.100xg'de 60 dakika

santrifüj edildi. Süpernatant damlalıklarla dikkatli bir şekilde alındıktan sonra +4 °C'de bekletildi (Pittalis et.al. 1992).

3.2.1.c. Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Diyaliz

Proteinler çok değerlikli elektrolitlerdir, bu yüzden iyonlara benzer şekilde hareket ederler. Yeteri kadar yüksek tuz konsantrasyonunda, bir protein bir çözülden kantitatif olarak çöktülebilir. Bu olayın esası, yüksek tuz konsantrasyonlarında, protein moleküllerini çevreleyen ve çözünür halde tutan su moleküllerinin tuzdaki iyonlar tarafından çekilmesi ve proteinlerin çökmesini sağlamasıdır. Proteinlerin çökmesinde molekül ağırlığı ve iyonik şiddet etkilidir. Dolayısıyla değişik tuz konsantrasyonlarında değişik proteinler çöker (Keha ve Küfrelioğlu 2000, Lehninger 1993). Deney, proteinlerin bu özelliklerinden faydalanılarak yapıldı. Kan numunesi için hazırlanan hemolizat ve lens homojenatı için ayrı ayrı % 0-20, % 20-30, % 30-40, % 40-50, % 50-60, % 60-70, % 70-80, % 80-90 aralıklarında amonyum sülfat çöktürmeleri yapıldı. Yapılan amonyum sülfat çöktürmesinin her aralığında çöktürme ve süpernatantta Bölüm 3.4'de anlatıldığı şekilde aktivite ölçümü yapılarak enzimin aktif olduğu aralık belirlendi. Bundan sonraki çalışmalar belirlenen aralıkta yürütüldü. Bütün bu işlemler +4 °C'de gerçekleştirildi. Amonyum sülfat çöktürmesi sırasında hemolizat ve homojenata katı $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ yavaş yavaş katıldı (+4 °C) ve her defasında daha önce katılan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 'ın çözünmüş olmasına dikkat edildi. Bu işlem yaklaşık 1 saat kadar sürdü. Amonyum sülfatın kan hemolizatı ve lens homojenatında çözünme işlemi magnetik karıştırıcı ile yapıldı. Amonyum sülfatın hemolizat ve homojenat içerisindeki çözünme işlemi bittikten sonra numuneler 5.000xg'de 15 dakika santrifüj edildi. Daha sonra süpernatantlar ayrı behere alındı ve çökelekler ise yeteri kadar 50 mM potasyum fosfat tamponunda (pH= 7,0) çözülerek hem süpernatantta hem de çökelekte ayrı ayrı enzim aktivitesine bakıldı.

Çöktürme işlemleri sırasında kullanılan katı amonyum sülfat miktarları aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$g(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = \frac{1.77 \times V(S_2 - S_1)}{3.54 - S_2}$$

V = Çözeltinin hacmi

S₁ = 1'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu

S₂ = 1'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğu

Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen karışım diyaliz torbasına yerleştirildi ve (50 mM potasyum asetat/50 mM potasyum fosfat) (pH= 7,0) tamponuna karşı 2 defa değiştirilerek, 2 saat süreyle diyaliz edildi (Ninfali et.al. 1990). Diyaliz işlemi mağnetik karıştırıcı üzerinde buz dolabı içinde +4 °C'de gerçekleştirildi ve daha sonra protein ve aktivite tayini Bölüm 3.3 ve Bölüm 3.4 de izah edildiği şekilde yapıldı.

3.2.1.d. 2', 5' ADP-Sepharose 4B Afinite Kolonunun Hazırlanması, Koyun Eritrosit Hemolizatının Afinite Kolonuna Tatbiki ve G6PD'ın Elüsyonu

Afinite jeli hazırlamak için, 10 ml'lik yatak hacmini oluşturmak üzere 2 g kuru 2', 5' ADP-Sepharose 4B kolon materyali tartıldı ve 400 ml saf su içerisinde katkı maddelerinin uzaklaştırılması için birkaç defa yıkandı. Yıkama esnasında jel şişti. Bütün bu işlemler laboratuvar şartlarında gerçekleştirildi. Şişmiş jelin havası alındıktan hemen sonra % 25 dengeleme tamponu (0,1 M potasyum asetat/ 0,1 M potasyum fosfat pH= 6,0) ve % 75 jel olacak şekilde, jel süspanse edildi. Süspanse edilmiş jel (1x10) cm'lik kapalı sistem oluşturucu ve soğutmalı kolona paketlenildi. Daha sonra kolona paketlenmiş jel, peristaltik pompa kullanılarak dengeleme tamponuyla yıkandı. Dengeleme ve yıkama, akış hızı 50 ml/saat olarak uygulandı (Ninfali et.al. 1990). Kolonun dengelenmiş olduğu elüat ile üstten kolona uygulanan dengeleme tamponununun 280 nm'deki absorbansınınun eşitlenmesinden anlaşıldı. Bu şekilde afinite jeli ve kolonu elde edilmiş oldu. Amonyum sülfat çöktürmesinden elde edilen 60 ml'lik derişikleştirilmiş numune, 0,1 M potasyum asetat/ 0,1 M potasyum fosfat (pH= 6,0) tampon çözeltisiyle dengelenmiş olan afinite kolonuna tatbik edildi. Daha sonra kolon

sırasıyla 25 ml 0,1 M potasyum asetat/ 0,1 M potasyum fosfat (pH= 6,0), 25 ml 0,1 M potasyum asetat/ 0,1 M potasyum fosfat (pH= 7,85) ve 0,1 M KCl/ 0,1 M potasyum fosfat (pH= 7,85) çözeltileriyle yıkandı. Akış hızı peristaltik pompa ile kontrol altında tutuldu. Bu şekilde enzimin büyük bir kısmı jele tutunmuş ve diğer safsızlıklar uzaklaştırılmış oldu. Daha sonra 80 mM potasyum fosfat + 80 mM KCl + 0,5 mM NADP⁺ + 10 mM EDTA (pH= 7,85) çözeltisi kolondan geçirilerek enzim elüe edildi. Elüsyonlar fraksiyon toplayıcısı ile 2'şer ml'lik tüplere alındı. Akış hızı peristaltik pompa ile 20 ml/saat'a ayarlandı. Bütün bu işlemler esnasında sıcaklık +4 °C'de sabit tutuldu (Ninfali et.al. 1990, Morelli et.al. 1978). Her fraksiyonda enzim aktivitesine bakıldı ve aktivite gösteren fraksiyonlar birleştirildi. Ayrıca hemolizat, amonyum sülfat çöktürmesi ve enzim çözeltisinde spesifik aktiviteler ayrı ayrı belirlenerek yüzde saflaştırma hesaplandı (çizelge 4.3) (Ninfali et.al. 1990). Elde edilen enzim çözeltisi kinetik çalışmalarda kullanılmak üzere derin dondurucuda dondurularak saklandı.

3.2.1.e. Koyun Göz Lensi Homojenatının 2', 5' ADP-Sepharose 4B Afinitite Kolonuna Tatbiki ve G6PD'ın Elüsyonu

Afinitite jeli; Bölüm 3.2.1.d'de anlatıldığı şekilde hazırlandı. Amonyum sülfat çöktürmesinden elde edilen 3 ml'lik derişikleştirilmiş numune 0,1 M potasyum asetat/ 0,1 M potasyum-fosfat (pH= 6,0) tampon çözeltisiyle dengelenmiş olan afinitite kolonuna tatbik edildi. Diğer işlemler Bölüm 3.2.1.d'deki gibi yapıldı. Her fraksiyonda enzim aktivitesine bakıldı ve aktivite gösteren fraksiyonlar birleştirildi. Ayrıca homojenat, amonyum sülfat çöktürmesi ve enzim çözeltisinde spesifik aktiviteler ayrı ayrı belirlenerek yüzde saflaştırma hesaplandı (çizelge 4.4) (Ninfali et.al. 1990). Elde edilen enzim çözeltisi kinetik çalışmalarda kullanılmak üzere derin dondurucuda dondurularak saklandı.

3.2.1.f. Sodyum Dodesilsülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) İle Enzim Saflığının Kontrolü

Koyun eritrosit ve göz lensi G6PD enzimi 2', 5' ADP-Sepharose 4B afinite kromatografisi ile saflaştırıldıktan sonra enzimin saflığı, % 0,1 SDS ihtiva eden sırasıyla % 4 ve % 10 akrilamid konsantrasyonunda yığıma ve yürütme jeli ile kesikli SDS-PAGE yapılarak kontrol edildi (Laemmli 1970).

Bu işlemin başında elektrofrez için kullanılan cam plakalar önce su, sonra alkol ile iyice yıkandı. Cam plakaları birleştiren mikalara (spacer) ince bir tabaka halinde vazelin sürüldü. İki cam plaka birbiri üstüne konuldu ve özel naylon kaplarına yerleştirilerek jel hazırlama cihazına konuldu. Daha sonra cam plakalar aralık oluşturucu mikaların bulunduğu kısımlardan kışkaçlarla dikkatlice sıkıştırıldı. Ayırma jeli hazırlanarak plakalar arasına enjektörle döküldü. Ortamda hava olmamasına dikkat edildi. Jel yüzeyinin düzgün olması için % 0,1'luk SDS ile ince bir tabaka oluşturuldu. Katılaşmaya kadar (yaklaşık yarım saat) beklendi. Katılaştıktan sonra üstündeki % 0,1'luk SDS alındı. Daha sonra plakaların üst kısmına tarak yerleştirildi ve yığıma jel tarağın yanından üst yüzeye kadar ilave edildi. Tarağın üstüne nemli süzgeç kağıdı konularak bir gece bekletildi. Sonraki gün tarak dikkatlice çıkarılarak plakalar elektrofrez tankına yerleştirildi. Oluşan boşluklar işaretlenerek jelin üstü önce saf su, sonra da yürütme tamponu ile yıkandı. Elektrofrez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konuldu. Numuneler her birinde 20 µg protein olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim 100 µl olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu katıldı. 3 dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi. Numuneler soğutulularak, elektrofrez çok ince bir enjektör yardımıyla uygulandı. Tank kapağı kapatılarak alt tarafından (+) kablo (anot), üstten (-) kablo (katot) yerleştirildi. Önce 80 voltta yarım saat bekletildi. Daha sonra akım 150 volta ayarlanarak 4-5 saat oda sıcaklığında tatbik edildi. Akım kesilerek, cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı. Bu yürütme tamponu tekrar kullanılmak üzere saklandı ve sabitleştirme çözeltisinde (% 50 izopropanol + % 10 TCA + % 40 saf su) 15 dakika bekletildi. Daha sonra sabitleştirme çözeltisinden çıkarılan jel özel kabına konularak, renklendirme çözeltisi üstünü örtünceye kadar eklendi. 45 dakika kadar

çalkalayıcı üzerinde bırakıldı. Sonra renklendirme çözeltisinden çıkarılarak, yıkama çözeltisine alındı. Belirli aralıklarla değiştirilmek suretiyle jelin zemin rengi açılıp, protein bantları belirginleşinceye kadar 1-2 gün bu çözelti içinde çalkalandı.

Yıkama çözeltisi, aktif karbon üzerinden geçirilerek tekrar tekrar kullanıldı. Jel yıkama çözeltisinden çıkarıldıktan sonra fotoğrafı çekildi. Elektroforezde kullanılan renklendirme çözeltisi; % 0,1 Coomassie Brilliant Blue R-250, % 50 metanol, % 10 asetik asit, % 40 saf su ile hazırlandı. Yıkama çözeltisi ise; % 50 metanol, % 10 asetik asit, % 40 saf sudan ibarettir.

Ayırma jeli şöyle hazırlandı: 15 ml 1 M Tris-HCl (pH= 8,8), 10,66 ml % 30'luk akrilamid -% 0,8'lik bisakrilamid, 0,61 ml % 1'lik SDS, 0,4 ml % 5'lik TEMED (N,N,N',N'-tetrametil etilen diamin) ve 11,94 ml su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine en son olarak 0,8 ml % 1,5'luk amonyum persülfat (NH₄)₂S₂O₈ (PER) ilave edildi. Burada kullanılan PER kullanılmadan hemen önce taze olarak hazırlandı.

Yığıma jeli hazırlanması sırasında 1 M'lık Tris-HCl (pH= 6,8)'den 1,24 ml, % 30'luk akrilamid- % 0,8'lik bisakrilamid'den 1 ml, % 10'luk SDS'den 0,1 ml, % 5'lik TEMED'den 0,1 ml ve saf sudan 7,36 ml alınarak karıştırıldı. Son olarak yine günlük hazırlanmış % 1,5' luk PER'den 0,2 ml ilave edildi.

3.2.1.g. Sodyum Dodesilsülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) İle Enzimin Molekül Ağırlığı Tayini

Koyun eritrosit ve göz lensi G6PD enzimi 2', 5' ADP-Sepharose 4B afinite kromatografisi ile saflaştırıldıktan sonra enzimin molekül ağırlığı SDS-PAGE ile şu şekilde tayin edildi; standart protein olarak; kreatin fosfokinaz 81 k Dal, bovin serum albumin 66 k Dal, ovalbumin 45 k Dal, karbonik anhidraz 29 k Dal ve sitokrom c 12,4 k Dal kullanıldı. Elektroforez işleminden sonra fotoğraftan standart proteinlerin R_f

değerleri ($R_f = X_e / X_{boya}$, X_{boya} = boyanın yürüme mesafesi, X_e = proteinin yürüme mesafesi) formülü ile belirlendi. Ayrıca her bir proteinin MA'sının logaritması alındı ve log MA-Rf standart grafiği çizildi. Daha sonra koyun eritrosit ve göz lensi enzim numunelerinin R_f değeri bulunarak standart grafikte yerine konulduğunda numunelerin ayrı ayrı log MA'ları bulundu ve antilogaritmaları alınarak hem koyun eritrosit G6PD hem de lens G6PD enzimlerinin molekül ağırlıkları tespit edildi.

3.2.1.h. Koyun Eritrosit ve Göz Lensi G6PD Enzimlerinin Molekül Ağırlıklarının Jel Filtrasyon Kromatografisi Vasıtasıyla Bulunması

Koyun eritrosit ve göz lensi G6PD enzimlerinin molekül ağırlıkları Andrews ve arkadaşlarının metodu ile belirlendi (Andrews 1964, Whitaker 1963, Marshall 1970). 212 ml yatak hacmi elde etmek için 7 g Sephadex G-200, 150 ml saf su içine alındı. 90 °C'de su banyosunda bekletilerek polimer materyal (Sephadex G-200) şişirildi. Şişirilmiş materyalin içindeki hava, su trompu kullanılarak vakumla uzaklaştırıldı. Şişirilmiş ve havası uzaklaştırılmış polimer materyali % 10'luk gliserinli pH'sı 6,0 olan 0,1 M potasyum fosfat tamponuyla dolu kolona, içinde hava kabarcığı olmayacak şekilde aktarıldı. Aynı tamponla dengeleme işlemi yapıldı. Kolonun dengelendiğini tespit için, üstten ilave edilen tamponla alttan alınan tamponun pH ve 280 nm'de absorbans değerleri aralıklarla ölçüldü, bu değer aynı oluncaya kadar dengeleme işlemine devam edildi ve kolonun akış hızı 15-20 ml/saat olarak ayarlandı.

Koyun eritrosit ve lens G6PD enziminin molekül ağırlığı tespit etmek üzere jel filtrasyon kolonundan önce standart proteinler geçirildi. Bu işlem şu şekilde gerçekleştirildi; İlk olarak kolondan Blue dextran (2000 k Dal) geçirilerek void hacim hesaplandı. Daha sonra sırasıyla β -amilaz (200 k Dal), alkol dehidrogenaz (150 k Dal), bovin serum albumin (66 k Dal), sitokrom c (12,4 k Dal) standart proteinleri ayrı ayrı kolona uygulandı. Son olarak her bir numune jel filtrasyon kolonuna tatbik edildi.

Elüsyon işlemi için dengelenen kolonun, jel üzerindeki tampon çözeltisi jel seviyesine indirildi. Kolona her bir protein çözeltisinden 2 ml tatbik edildi. Kolona tatbik edilen protein çözeltisi jel tarafından tamamen emildikten sonra üzerine birkaç ml elüsyon tamponu % 10'luk gliserinli 0,1 M potasyum fosfat (pH= 6,0) ilave edilerek tekrar jele emdirildi. Daha sonra kolonun üstü elüsyon tamponuyla doldurularak, elüatlar 1,67'şer 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 sıfır oluncaya kadar devam edildi. 280 nm'de absorbans gösteren tüplerde aktivite ölçümleri yapıldı. 280 nm'de kalitatif ölçüm için alınan absorbans değerleri ve 340 nm'de alınan aktivite değerleri tüp sayısına karşı grafiğe geçirildi ve daha sonra bu enzimin mol ağırlığını belirlemek için her bir protein için ayrı ayrı ($K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$, V_o = void hacim, V_e = elüsyon hacmi, V_t = kolon yatak hacmi) formülü kullanılarak K_{av} değerleri ve molekül ağırlığının logaritması hesaplandı. Log MA- K_{av} grafiği bilgisayar yardımıyla çizildi. Koyun eritrosit ve lens G6PD enzimlerinin K_{av} değerleri tespit edilerek grafik denklemleri vasıtasıyla molekül ağırlıkları bulundu.

3.3. Protein Tayini

3.3.1. Kalitatif Protein Tayini

Kalitatif protein tayini, proteinlerin yapısında bulunan aromatik gruplara sahip tirozin ve triptofan amino asitlerinin 280 nm'de maksimum absorbans göstermesi esasına dayanan Warburg metodu olarak bilinen yolla gerçekleştirildi (Segel 1968). Kromatografi işlemlerinden sonra eşit hacimde alınmış olan bütün tüplerde kalitatif protein tayini yapıldı. Kuvarz küvetler kullanılarak spektrofotometrede absorbansları köre karşı okundu. Bununla birlikte 2', 5' ADP-Sepharose 4B afinite kolonundan alınan fraksiyonlarda elüsyon işlemi sırasında $NADP^+$ kullanıldığından ve $NADP^+$ 280 nm'de proteinlerin absorbansını maskeleyiği için sonuç alınamadı. Sephadex G-200 ile yapılan jel filtrasyon kromatografisinde proteinlerin kalitatif tayini bu metodla belirlendi.

3.3.2. Bradford Yöntemi ile Protein Tayini

Hazırlanan hemolizat, amonyum sülfat çöktürmesi ile elde edilen enzim çözeltisi ve 2', 5' ADP-Sepharose 4B afinite kromatografisi yöntemiyle saf halde elde edilen enzim çözeltilerindeki kantitatif protein miktarı bu metod vasıtasıyla belirlendi. Bu yöntemde boya olarak kullanılan Coomassie brilliant blue G-250, negatif bir yüke sahiptir ve protein üzerindeki pozitif yüke bağlanır. Boyanın kırmızı ($\lambda_{\max}= 465$ nm) ve mavi ($\lambda_{\max}= 595$ nm) formu mevcuttur. Proteinin bağlanması, kırmızı formun mavi forma dönüşümünü sağlar. Bradford yönteminin diğer kantitatif protein tayin metodlarına göre avantajlı tarafları ise;

- Kısa sürede uygulanabilirliği,
- Fazla miktarda bozucu faktörün bulunmaması,
- Protein-boya kompleksinin çözeltilerde uzun süre kalabilmesi,
- Her bir çalışma için başka bir standart eğrinin gerekmemesi,
- Bu yöntemin hassasiyetinin 1-100 μg arasında olmasıdır (Bradford 1976).

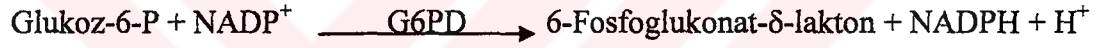
Tayin işlemleri şu prosedüre göre gerçekleştirildi: 1 ml'sinde 1 mg protein ihtiva edecek şekilde standart sığır albumin standart protein çözeltisi olarak hazırlandı. Bu çözeltiden deney tüplerine 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 μl aktarıldı. Saf su ile tüm tüplerin hacmi 0,1 ml'ye tamamlandı. Daha sonra her bir tüpe 5 ml Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi ilave edildi. Vortex kullanılarak tüpler içerisindeki çözeltilerin karışması sağlandı ve protein-boya kompleksinin tam olarak sağlanabilmesi için 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Bu işlemlerden sonra, 3 ml'lik küvetler kullanılarak spektrofotometreyle 595 nm'de köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak, 0,1 ml aynı tampon ve 5 ml renklendirme reaktifinden oluşan karışım kullanıldı. Absorbans değerlerine karşılık gelen μg protein değerleri standart grafik halinde verildi (şekil 4.1).

Numune çalışmaları için, 20 kat seyreltilmiş eritrosit hemolizatu ve lens homojenatu, her iki materyalin amonyum sülfat çöktürmesi numunesi ve saf enzim çözeltilerinden üç ayrı tüpe sırasıyla 50, 50 ve 200'er μl alınarak üzerlerine 5'er ml renklendirme reaktifi ilave edildi. Vorteks ile karıştırılıp 10 dakikalık bir inkübasyondan sonra 595 nm'de

absorbans değerleri okundu. Bu işlem 3 defa tekrarlanarak 3 ayrı ölçümün aritmetik ortalaması alınıp standart grafikten yararlanılarak protein miktarları belirlendi.

3.4. Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz Enziminin Aktivite Tayini

Enzim aktivitesi spektrofotometrede 25 °C'de Beutler metoduna göre yapıldı. Bu metod nikotiamidadenin dinükleotidfosfat'ın (NADP⁺) indirgenmesinden dolayı oluşan NADPH'in 340 nm'de absorbans vermesi esasına dayanır. Absorbansı ölçülen NADPH, G6PD enziminin vücutta fizyolojik olarak katalizlediği aşağıdaki reaksiyonda meydana gelmektedir.



Tayin işlemleri için aşağıdaki prosedür uygulandı:

Kontrol Küveti (Kör)		
	3ml'lik küvet için	1ml'lik küvet için
1 M Tris-HCl + 5 mM EDTA (pH= 8,0)	250 µl	100 µl
0,1 M MgCl ₂	250 µl	100 µl
2 mM NADP ⁺	250 µl	100 µl
Enzim	50 µl	50 µl
saf su	1700 µl	650 µl
Toplam	2500 µl	1000 µl

Numune Küveti		
	3ml'lik küvet için	1ml'lik küvet için
1 M Tris-HCl + 5 mM EDTA (pH= 8,0)	250 µl	100 µl
0,1 M MgCl ₂	250 µl	100 µl
2 mM NADP ⁺	250 µl	100 µl
Enzim	50 µl	50 µl
saf su	1450 µl	550 µl
6 mM Glukoz 6-fosfat	250 µl	100 µl
Toplam	2500 µl	1000 µl

Çizelgelerde belirtilen çözeltiler küvetlere konduktan sonra 25 °C'de 10 dakika inkübe edilerek, numunedeki absorban artışları 5 dakika süreyle 15 saniyede bir kaydedildi (Beutler 1971).

Daha sonra aşağıdaki formül kullanılarak ml başına enzim ünitesi hesaplandı.

$$A = \frac{\Delta OD}{6,22} \times \frac{V_C}{V_E}$$

şeklinde olur.

A = ml başına enzim ünitesi (EU) sayısı.

ΔOD = 340 nm'de optik dansitenin dakika başına değişimi.

V_C = küvet hacmi.

V_E = küvetteki saf enzim çözeltisinin hacmi.

6,22 = 1 mM NADP⁺'nin indirgendiği farzedildiğinde kullanılan katsayı (milimolar ekstinksiyon katsayısı).

Eğer enzim seyreltilerek kullanılırsa yukarıdaki formülden çıkan A değeri seyreltme faktörü (f) ile çarpılır.

Saf enzimin ve amonyum sülfat çöktürmesi aktivite tayininde hemolizat veya homojenat yerine, saf enzim çözeltileri ve amonyum sülfat çöktürmesinden elde edilen çözelti kullanıldı. Diğer işlemler aynen uygulandı.

3.5. Koyun Eritrositleri ve G6PD Enzimleri ile İlgili Yapılan Kinetik Çalışmalar

3.5.1. Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz Enzimi İçin Yapılan Optimum pH Çalışması

Optimum pH çalışması; pH'sı 7,2, 7,5, 8,0, 8,5, 9 aralığında 1 M Tris-HCl ve pH'sı 4,9, 6,0, 7,0, 7,5, 8,0 aralığında 1 M potasyum fosfat tampon çözeltilerinde eritrosit ve lens G6PD enzimlerinin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak ölçüldü. Sonuçlar çizelgelerde ve % Aktivite-pH grafikleri halinde gösterildi (çizelge 4.5-4.8) (şekil 4.11-4.14).

3.5.2. Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz Enziminin Stabil Olduğu pH'nın Bulunmasına Yönelik Çalışmalar

Enzimlerin stabil olduğu pH'yı tespit etmek için pH'ları 7,5, 8,0, 8,5 ve 8,9 olan Tris-HCl tamponu ve pH'ları 4,9, 6,0, 7,0 ve 8,0 olan potasyum fosfat tamponu kullanıldı. Belirtilen pH'lardaki tampon çözeltilerinin 2 ml'si ile 1 ml enzim çözeltisi karıştırılarak 4 °C'de muhafaza edildi. 8 saat arayla yapılan aktivite ölçümünde enzimin stabil olduğu pH belirlendi. İnkübasyon süresine karşılık aktivite değerleri grafikler halinde gösterildi.

3.5.3. NADP⁺ ve Glukoz-6-fosfat Substratları İçin K_M ve V_{max} Değerlerinin Bulunmasına Yönelik Çalışmalar

NADP⁺ için K_M ve V_{max} değerleri, sabit glukoz-6-fosfat (G6P) konsantrasyonunda 5 farklı NADP⁺ konsantrasyonu kullanılarak optimum şartlarda aktivite ölçümü yapıldı. Aynı şekilde G6P için K_M ve V_{max} değerleri, sabit NADP⁺ konsantrasyonunda 5 farklı G6P konsantrasyonu kullanılarak optimum şartlarda aktivite ölçümü yapıldı. Daha sonra hem NADP⁺ hem G6P için Lineweaver-Burk grafiği hazırlandı ve bu grafikten K_M ve V_{max} değerleri bulundu.

3.5.4. ATP, ADP, NADH, NADPH ve Çeşitli İlaçların Koyun Eritrosit ve Göz Lensi Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz Enzimi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

Metabolizmanın işleyişinde önemli yer tutan ATP, ADP, NADH, NADPH moleküllerinin ve çeşitli hastalıkların tedavisinde tıpta sıklıkla kullanılan bazı ilaçların koyun eritrositlerinden saflaştırılan G6PD enzimi üzerine ve ayrıca göz hastalıklarının tedavisinde sıklıkla kullanılan bazı ilaç ve göz damlalarının lensden saflaştırılan G6PD enzimi üzerine etkileri araştırıldı. Bu çalışmada, kinetik ölçümler için Beutler metodu kullanıldı (Beutler 1971). Enzimi inhibe eden kimyasal maddeler ve ilaçlar için sabit substrat konsantrasyonunda beş farklı inhibitör konsantrasyonu kullanılarak I₅₀ değerleri (enzimin aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu) % aktivite-[I] grafikleri çizilerek belirlendi.

3.5.5. Koyun Eritrosit Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz Enzimi İçin İnhibitör Etkisi Gösteren Çeşitli İlaçların K_i Sabitlerinin Bulunması

İnhibitör çalışmaları için, Bölüm 4.2.9'da anlatıldığı gibi ön denemeyle koyun eritrosit glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimini inhibe eden gentamisin sülfat, penisilin G

potasyum ve amikasin ilaçları kullanıldı. Eritrosit için yapılan tüm çalışmalarda kullanılan inhibitörlerin stok konsantrasyonları çizelge 4.15'de verilmiştir.

Çalışmalarda en uygun beş farklı substrat konsantrasyonu substrat stok çözeltileri kullanılarak ön çalışmayla belirlendi. Yine aynı şekilde her bir substrat konsantrasyonu için en uygun üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonu inhibitör stok çözeltileri kullanılarak ön çalışmayla tespit edildi.

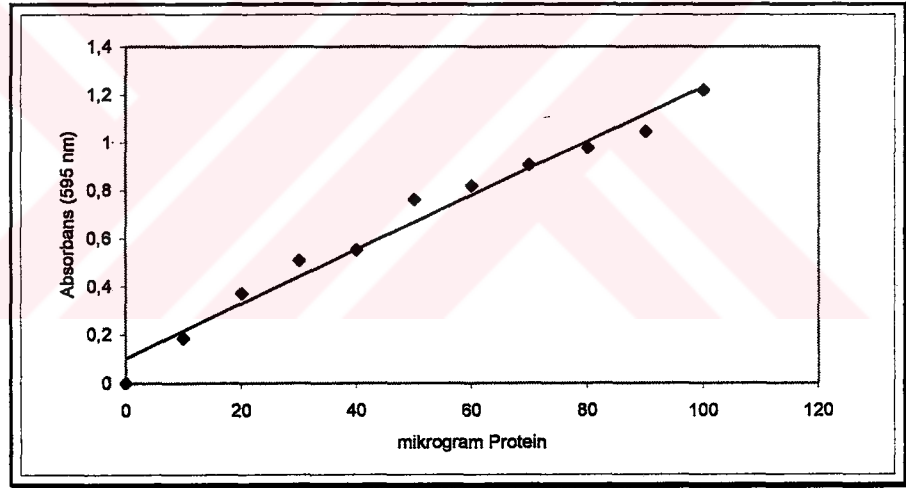
Spektrofotometrenin hassasiyet sınırları içinde absorbans değerinin ölçüldüğü konsantrasyonlar diğer deneylerde de kullanıldı. İnhibitör çalışmaları için kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları çizelge (4.44-4.46)'da verilmiştir.

Daha sonra koyun eritrositlerinden saflaştırılan glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi için üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda $V-[S]$ değerleri belirlenerek her bir inhibitör için ayrı ayrı Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek K_i değerleri tayin edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

Eritrosit hemolizati, lens homojenati, amonyum sülfat çöktürmesi ve saf enzim çözeltilerindeki kantitatif protein miktarı Bradford yöntemiyle tayin edildi. Standart grafik Bölüm 3.3.2'de anlatıldığı gibi hazırlandı. Hemolizat, homojenat, amonyum sülfat çöktürmesi ve saf enzim çözeltilerindeki kantitatif protein miktarı bu standart grafikten faydalanılarak bulundu. Standart çözeltilerin μg proteine karşılık gelen absorpsiyon değerleri şekil 4.1'de gösterildi.



Şekil 4.1. Bradford yöntemiyle proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart grafik

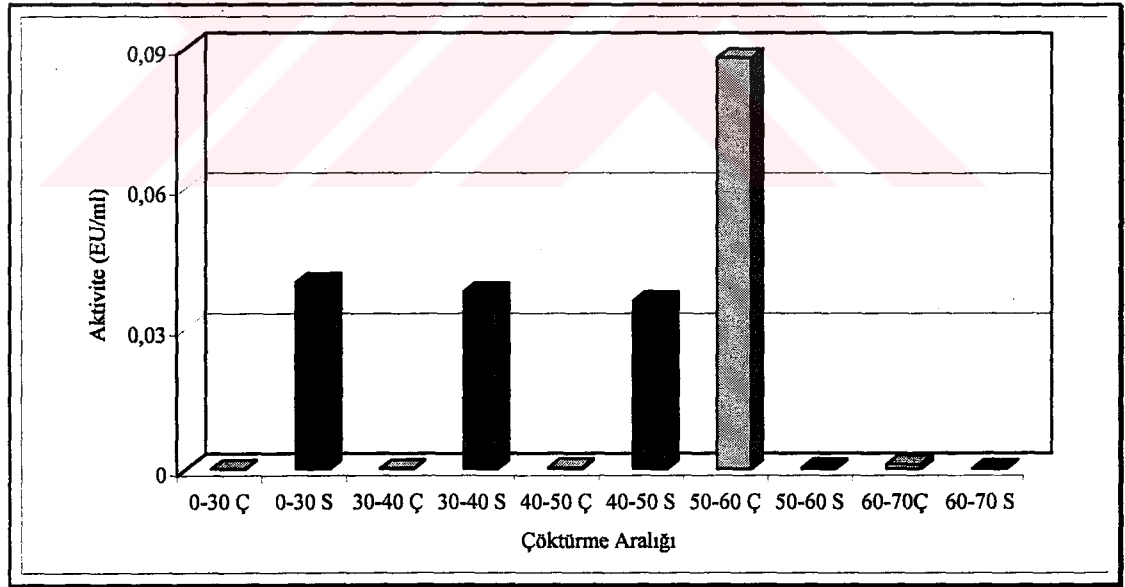
4.2. Koyun Eritrosit ve Göz Lensinden Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Enziminin Saflaştırılma, Karakterizasyon ve Kinetik Çalışma Sonuçları

4.2.1. Amonyum Sülfatla Çöktürme Basamakları ve Sonuçları

Çalışmamızda, koyun eritrositi ve göz lensi G6PD'sinin hangi amonyum sülfat doygunluğunda tamamen çöktüğünü belirlemek amacıyla % 0-20, % 20-30, % 30-40, % 40-50, % 50-60, %60-70 doygunluk aralıklarında çöktürme yapıldı. Söz konusu enzimin koyun eritrositinde % 50-60 ve göz lensinde % 0-30 amonyum sülfat doygunluğunda çöktüğü belirlendi. Bununla ilgili amonyum sülfat sonuçları Bölüm 3.2.1.c'de anlatıldığı gibi hesaplandı. Her bir çöktürme basamağında oluşan çökelek, 50 mM potasyum fosfat (pH= 7,0) tamponunda çözüldü. Hem çökelekte hem de süpernatantta enzim aktivitesine bakıldı. Böylece enzimin çöktüğü amonyum sülfat doygunluk aralığı tespit edilmiş oldu (çizelge 4.1 ve çizelge 4.2) (şekil 4.2 ve şekil 4.2).

Çizelge 4.1. Koyun eritrosit G6PD enzimi için amonyum sülfat doyunluk aralığı tespitine yönelik çizelge

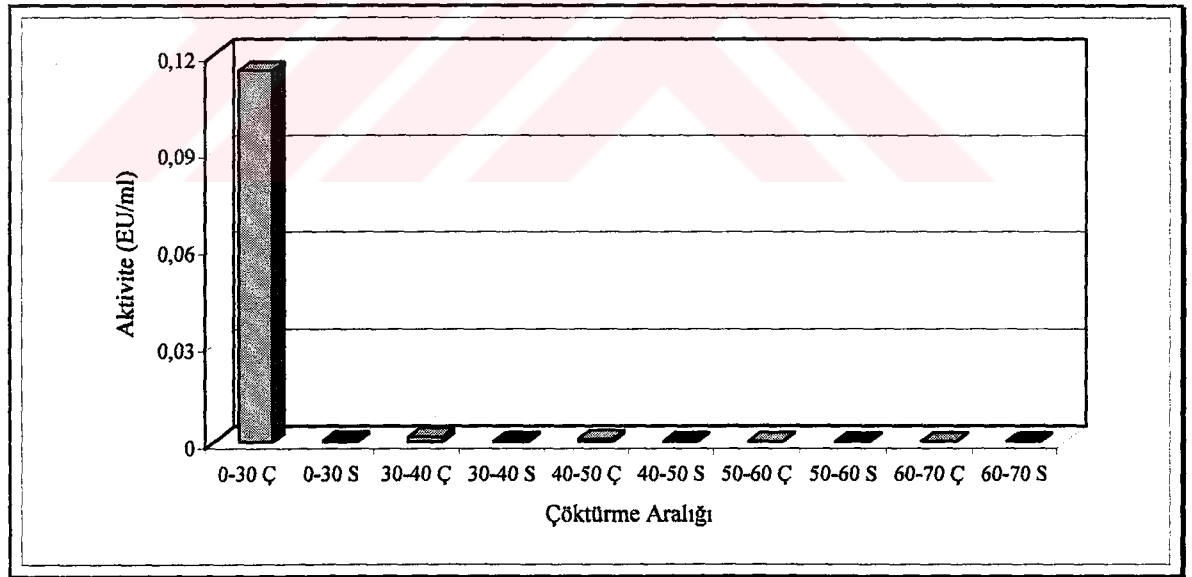
% Doygunluk	% 0-30	% 30-40	% 40-50	% 50-60	% 60-70
Aktivite (EU/ml)(çökelek)	0	0,0001	0,0003	0,088	0,0009
Çökelek hacmi (ml)	10	30	45	60	32
Çökelek toplam aktivite	0	0,003	0,0135	5,28	0,028
Aktivite (EU/ml) (süpernatant)	0,04	0,038	0,036	0,0002	0,000015
Süpernatant hacmi (ml)	176	174	171	171	173
Süpernatanttaki toplam aktivite	7,04	6,612	6,156	0,0342	0,0026



Şekil 4.2. Koyun eritrosit G6PD enzimi için amonyum sülfat doyunluk aralığı tespitine yönelik Aktivite-Çöktürme Aralığı grafiği

Çizelge 4.2. Koyun göz lensi G6PD enzimi için amonyum sülfat doygunluk aralığı tespitine yönelik çizelge

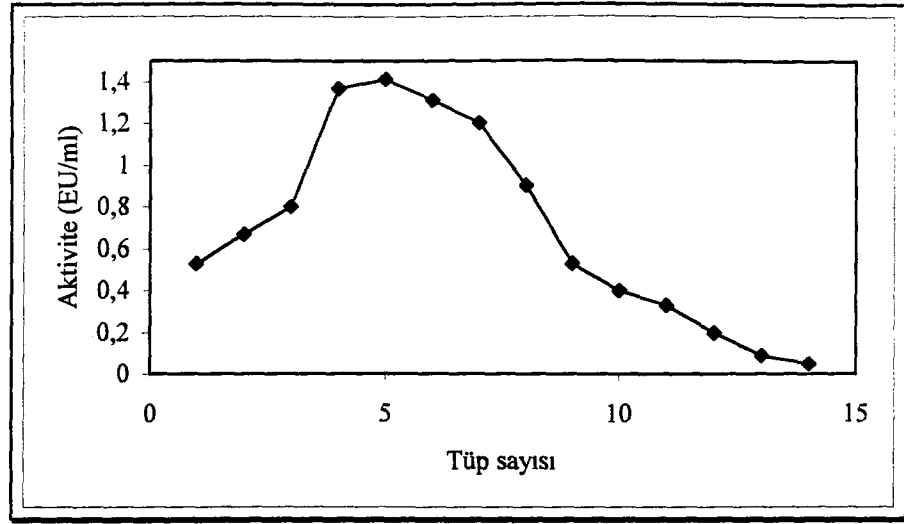
% Doygunluk	% 0-30	% 30-40	% 40-50	% 50-60	% 60-70
Aktivite (EU/ml)(çökelek)	0,115	0,0015	0,0008	0,00005	0
Çökelek hacmi (ml)	5	4	5	5	4
Çökelek toplam aktivite	0,575	0,006	0,004	0,00025	0
Aktivite (EU/ml) (süpernatant)	0,00032	0,0002	0,00005	0	0
Süpernatant hacmi (ml)	15	16	16	15	14
Süpernatanttaki toplam aktivite	0,0048	0,0032	0,0008	0	0



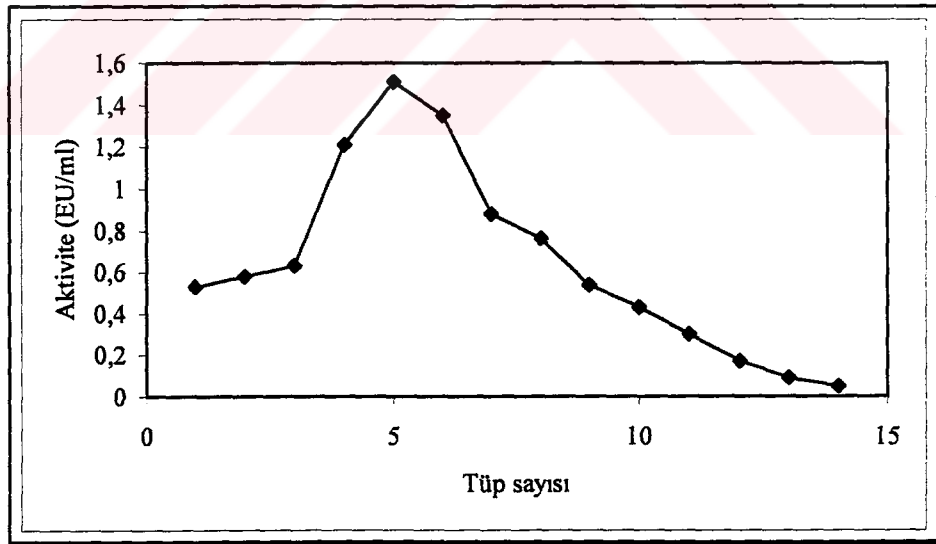
Şekil 4.3. Koyun lens G6PD enzimi için amonyum sülfat doygunluk aralığı tespitine yönelik Aktivite-Çöktürme Aralığı grafiği

4.2.2. Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Enziminin 2', 5' ADP-Sepharose 4B Afinitte Kromatografisi ile Saflaştırılma Kademeleri

% 50-60 amonyum sülfat doygunluk aralığında çöktürülen koyun eritrosit glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi 50 mM potasyum asetat/ 50mM potasyum fosfat (pH= 6,0) tamponuna karşı ve % 0-30 amonyum sülfat doygunluk aralığında çöktürülen lens G6PD'si 100 mM potasyum fosfat (pH= 7,0) tamponuna karşı diyaliz edildikten sonra 2', 5' ADP-Sepharose 4B kolonuna tatbik edildi. Her bir elatın 340 nm'de aktivite tayinleri yapıldı. Aktivite gösteren tüpler birleştirilerek Aktivite-Tp sayısı grafiği çizildi (şekil 4.4 ve şekil 4.5). Koyun eritrosit ve lens glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi 2', 5' ADP-Sepharose 4B afinite kromatografisi ile saflaştırılması sırasında elde edilen, yüzde verim ve saflaştırma katsayıları sırasıyla izelge 4.3 ve izelge 4.4'de verilmiştir.



Şekil 4.4. Koyun eritrosit glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminin 2', 5' ADP-Sepharose 4B afinite kromatografisi ile saflaştırılması grafiği



Şekil 4.5. Koyun lens glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminin 2', 5' ADP-Sepharose 4B afinite kromatografisi ile saflaştırılması grafiği

Çizelge 4.3. Koyun eritrosit glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminin saflaştırılma basamakları

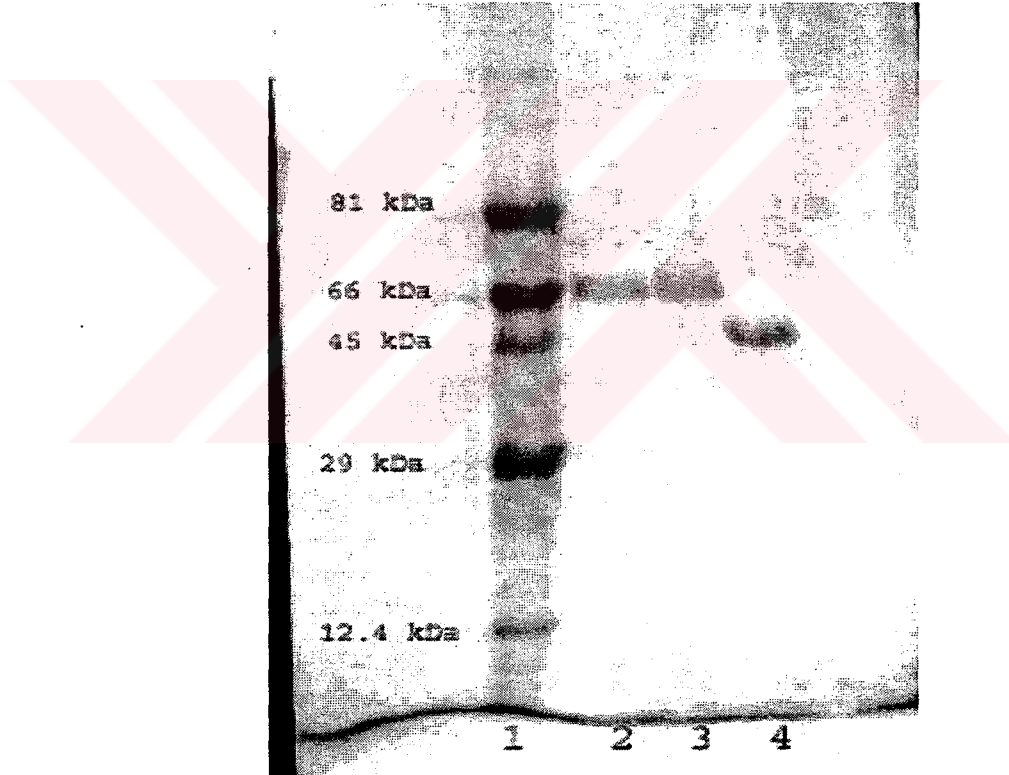
Saflaştırma basamakları	Aktivite (EU/ml)	Toplam hacim (ml)	Protein miktarı (mg)	Toplam protein (mg)	Toplam aktivite (EU/ml)	Spesifik aktivite (EU/mg)	Yüzde verim	Saflaştırma katsayısı
Hemolizat	0,064	176	16,2	2837,12	11,264	0,0039	100	1
Amonyum sülfat çöktürmesi (% 50-60)	0,088	60	5,91	354,6	5,28	0,014	46,87	3,58
2'5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi	0,209	20	0,045	0,90	4,18	4,64	37,1	1189,74

Çizelge 4.4. Koyun lens glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminin saflaştırılma basamakları

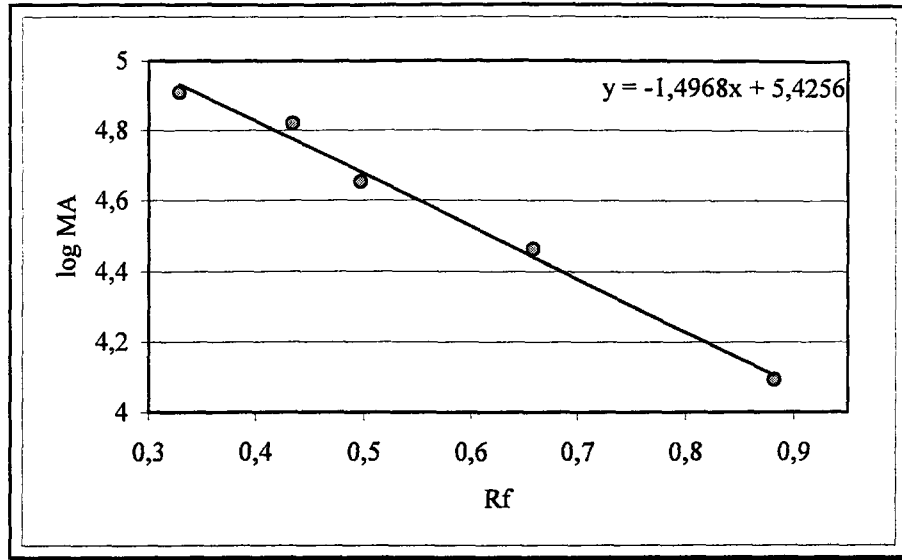
Saflaştırma basamakları	Aktivite (EU/ml)	Toplam hacim (ml)	Protein miktarı (mg)	Toplam protein (mg)	Toplam aktivite (EU/ml)	Spesifik aktivite (EU/mg)	Yüzde verim	Saflaştırma katsayısı
Homojenat	0,0117	57	15,6	577,2	0,6669	0,00075	100	1
Amonyum sülfat çöktürmesi (% 0-30)	0,118	5	7,16	21,48	0,590	0,0164	88,46	21,86
2'5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi	0,193	3	0,0248	0,0744	0,579	7,8	86,82	10.400

4.2.3. Sodyum Dodesilsülfat-Poliakrilamid Jel Elektroferez (SDS-PAGE) Sonucu

2', 5' ADP-Sepharose 4B afinite kromatografisinden saf olarak elde edilen G6PD enzimi ve standart proteinler, Bölüm 3.2.1.f.'de anlatıldığı şekilde hazırlanan kesikli SDS-poliakrilamid jel elektroferezine tatbik edildi. Daha sonra elde edilen alt birim bantlarının fotoğrafı çekildi. Koyun eritrosit G6PD enzimi alt biriminin molekül ağırlığı log MA-R_f grafiği çizilerek 66.880 dalton ve koyun lens G6PD enziminin molekül ağırlığı aynı grafikten 54.957 dalton olduğu tespit edildi (şekil 4.6, 4.7).



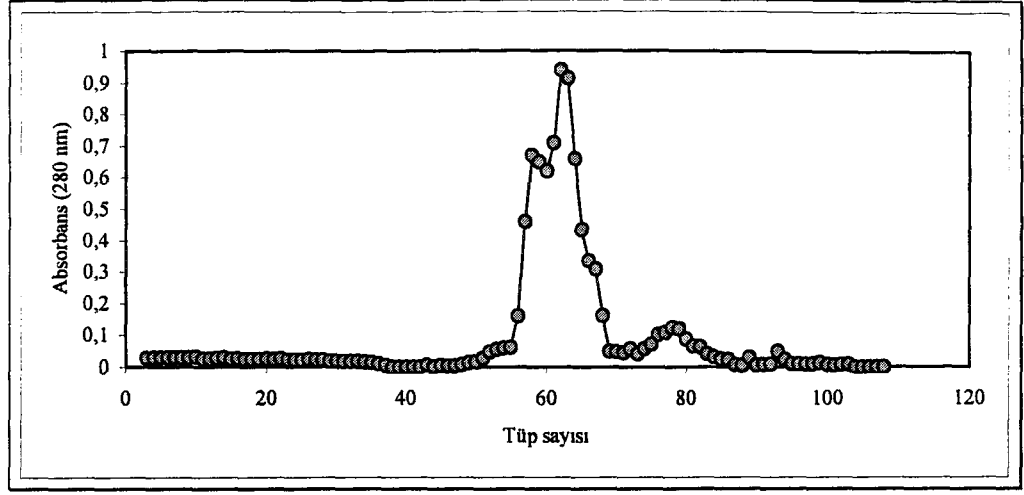
Şekil 4.6. Afinite kromatografisiyle saflaştırılan koyun eritrosit ve göz lensi glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminin SDS-poliakrilamid jel elektroferezi fotoğrafı ((1) standart proteinler (kreatin fosfokinaz 81 k Dal, bovin serum albumin 66 k Dal, ovalbumin 45 k Dal, karbonik anhidraz 29 k Dal ve sitokrom c 12,4 k Dal), (2) ve (3) Koyun eritrosit G6PD ve (4) Koyun göz lensi G6PD)



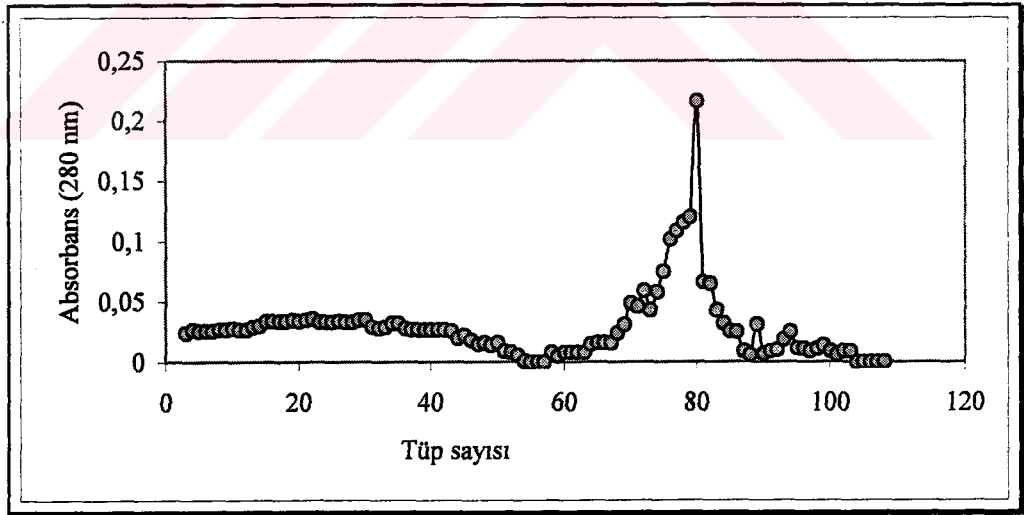
Şekil 4.7. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yöntemiyle alt birimlerin molekül ağırlığı tayininde kullanılan standart grafik

4.2.4. Koyun Eritrositlerinden ve Göz Lensinden Saflaştırılan G6PD Enziminin Molekül Ağırlığının Sephadex G-200 Jel Filtrasyon Kromatografisi İle Belirlenmesi

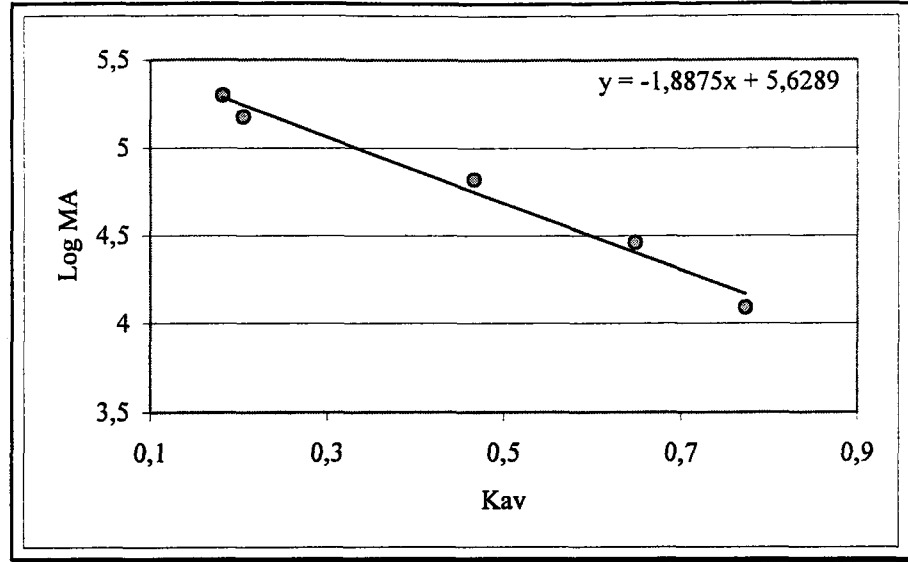
Koyun eritrosit ve lens G6PD enziminin molekül ağırlığı Bölüm 3.2.1.h.'de anlatıldığı şekilde kolon materyali olarak Sephadex G-200 jeli ile jel filtrasyon kromatografisi yapıldı ve sonuçlar şekil 4.8 ve şekil 4.9'de verildi. Bu işlem esnasında; Blue dextran (2000 k Dal) kolona uygulandı. Daha sonra β -amilaz (200 k Dal), alkol dehidrogenaz (150 k Dal), bovin serum albumin (66 k Dal), sitokrom c (12,4 k Dal) standart proteinleri sırasıyla kolona uygulandı. Daha sonra eritrosit G6PD enziminin molekül ağırlığının log MA- K_{av} grafiği çizilerek 119.662 dalton ve lens G6PD enziminin molekül ağırlığının 56.099 dalton olduğu tespit edildi (şekil 4.10).



Şekil 4.8. Koyun eritrosit G6PD enziminin molekül ağırlığı tayini için kullanılan standart jel filtrasyon kromatografisi grafiği



Şekil 4.9. Koyun lens G6PD enziminin molekül ağırlığı tayini için kullanılan standart jel filtrasyon kromatografisi grafiği



Şekil 4.10. Koyun eritrosit ve lens G6PD'nin molekül ağırlığı tayini için Sephadex G-200 kolon materyali kullanılarak yapılan jel filtrasyon kromatografisi sonucu elde edilen standart grafik

4.2.5. Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Enzimi İçin Optimum pH'ın Belirlenmesi

Koyun eritrosit ve lens G6PD enzimlerinin optimum pH'ları Bölüm 3.5.1'de anlatıldığı şekilde; pH'sı 7,2-9 aralığında 1 M Tris-HCl ve pH'sı 4,9-8,0 aralığında 1 M potasyum fosfat tampon çözeltileri kullanılarak enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak belirlendi. (çizelge 4.5-4.8, şekil 4.11-4.14). Koyun eritrosit ve lens G6PD'ı için optimum pH'lar 1 M Tris-HCl pH= 8,0 tamponu olarak belirlendi.

Çizelge 4.5. 1 M Tris-HCl tampon çözeltisi kullanılarak koyun eritrosit glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları

1M Tris-HCl	
pH	Aktivite (EU/ml)
7,2	0,0182
7,5	0,0267
8,0	0,0353
8,5	0,0267
9,0	0,0192

Çizelge 4.6. 1 M potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak koyun eritrosit glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları

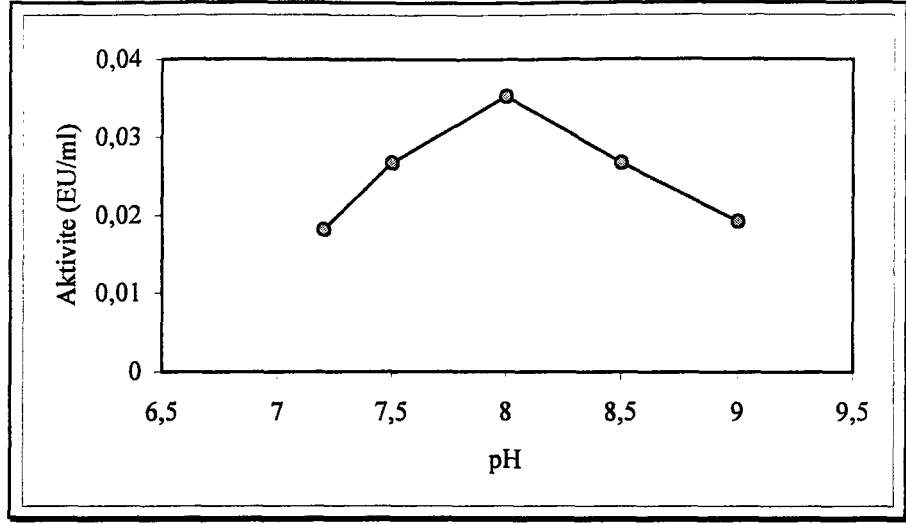
1M Potasyum fosfat	
pH	Aktivite (EU/ml)
4,9	0,0155
6,0	0,0193
7,0	0,0220
7,5	0,0257
8,0	0,0241

Çizelge 4.7. 1 M Tris-HCl tampon çözeltisi kullanılarak koyun göz lensi glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları

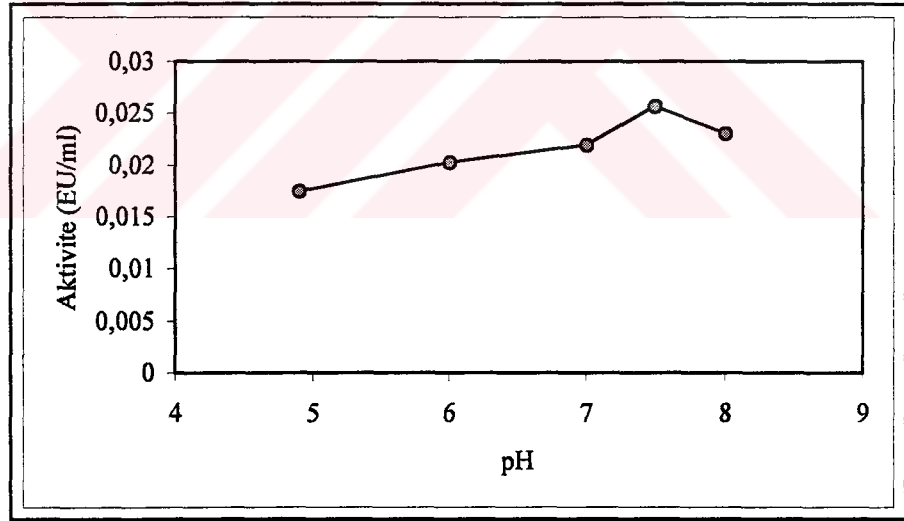
1M Tris-HCl	
pH	Aktivite (EU/ml)
7,2	0,037
8,0	0,069
8,5	0,048
9,0	0,041

Çizelge 4.8. 1 M potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak koyun göz lensi glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları

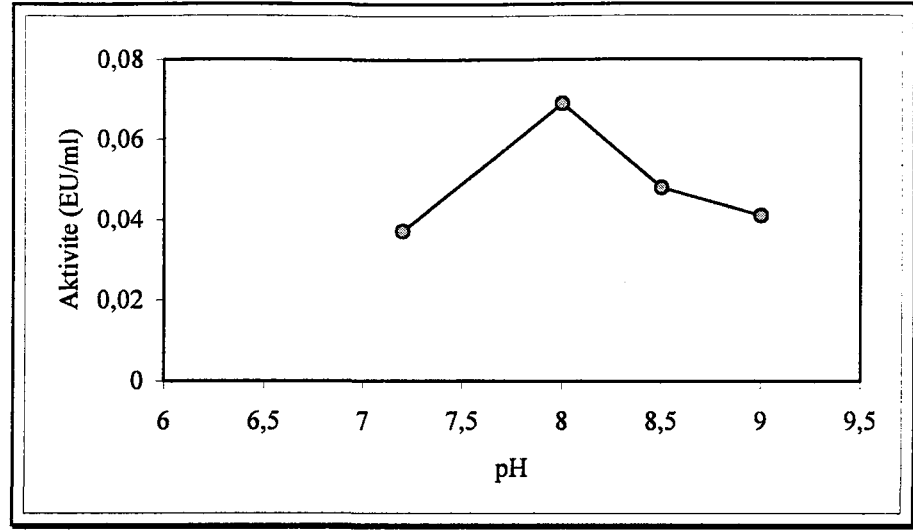
1M Potasyum fosfat	
pH	Aktivite (EU/ml)
4,9	0,023
6,0	0,036
7,0	0,044
7,5	0,052
8,0	0,048



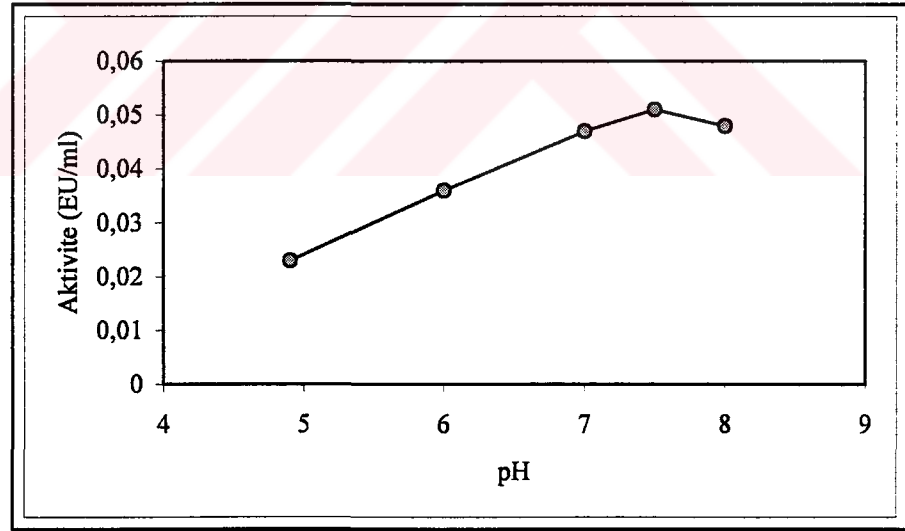
Şekil 4.11. 1 M Tris-HCl tampon çözeltisi kullanılarak koyun eritrosit glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları



Şekil 4.12. 1 M Potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak koyun eritrosit glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları



Şekil 4.13. 1 M Tris-HCl tampon çözeltisi kullanılarak koyun lensi glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları



Şekil 4.14. 1 M Potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak koyun lensi glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları

4.2.6. Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz Enziminin Stabil Olduğu pH'ın Belirlenmesi

Koyun eritrosit ve lens G6PD enzimlerinin stabil pH'ları Bölüm 3.5.2'de anlatıldığı şekilde; pH'ları 7,5, 8,0, 8,5 ve 8,9 olan Tris-HCl tamponu ve pH'ları 4,9, 6,0, 7,0 ve 8,0 olan potasyum fosfat tamponu kullanılarak enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak belirlendi. (çizelge 4.9-4.12, şekil 4.15-4.18). Koyun eritrosit ve lens G6PD'ı için stabil pH her ikisi için de 1 M Tris-HCl tamponunda pH= 8,5 olarak belirlendi.

Çizelge 4.9. Koyun eritrosit G6PD enziminin stabil pH'sı için 1 M Tris-HCl tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

Zaman	(pH= 7,5) Aktivite (EU/ml)	(pH= 8,0) Aktivite (EU/ml)	(pH= 8,5) Aktivite (EU/ml)	(pH= 8,9) Aktivite (EU/ml)
0. saat	0,0016	0,0021	0,0033	0,0024
8. saat	0,0018	0,0025	0,0038	0,0027
16. saat	0,0012	0,0013	0,0032	0,0017
24. saat	0,0009	0,0019	0,0035	0,0013

Çizelge 4.10. Koyun eritrosit G6PD enziminin stabil pH'sı için 1 M potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

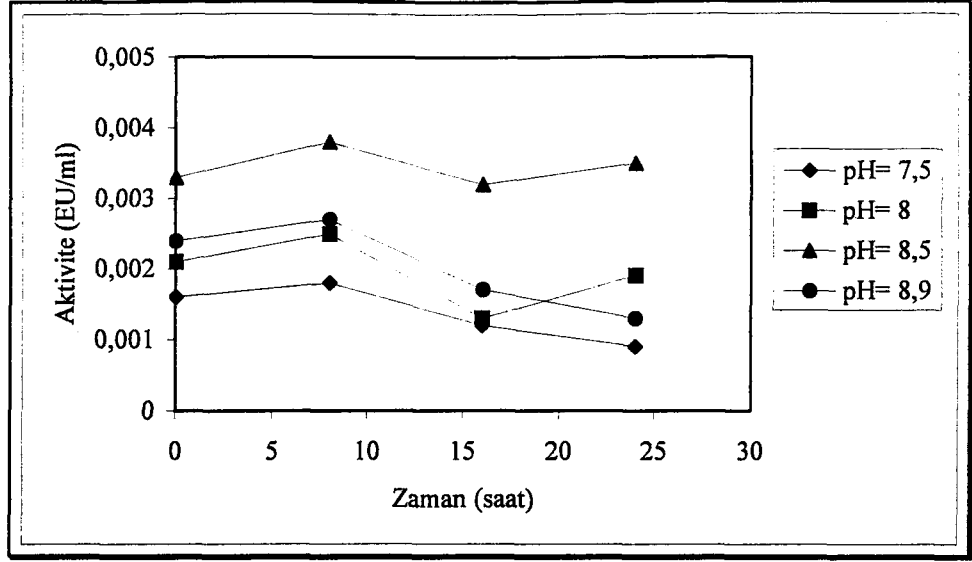
Zaman	(pH= 4,9) Aktivite (EU/ml)	(pH= 6,0) Aktivite (EU/ml)	(pH= 7,0) Aktivite (EU/ml)	(pH= 8,0) Aktivite (EU/ml)
0. saat	0,0020	0,0021	0,0023	0,0023
8. saat	0,0005	0,001	0,0013	0,0019
16. saat	0,0001	0,0007	0,0009	0,0013
24. saat	0	0,0002	0,0001	0,0006

Çizelge 4.11. Koyun lens G6PD enziminin stabil pH'sı için 1 M Tris-HCl tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

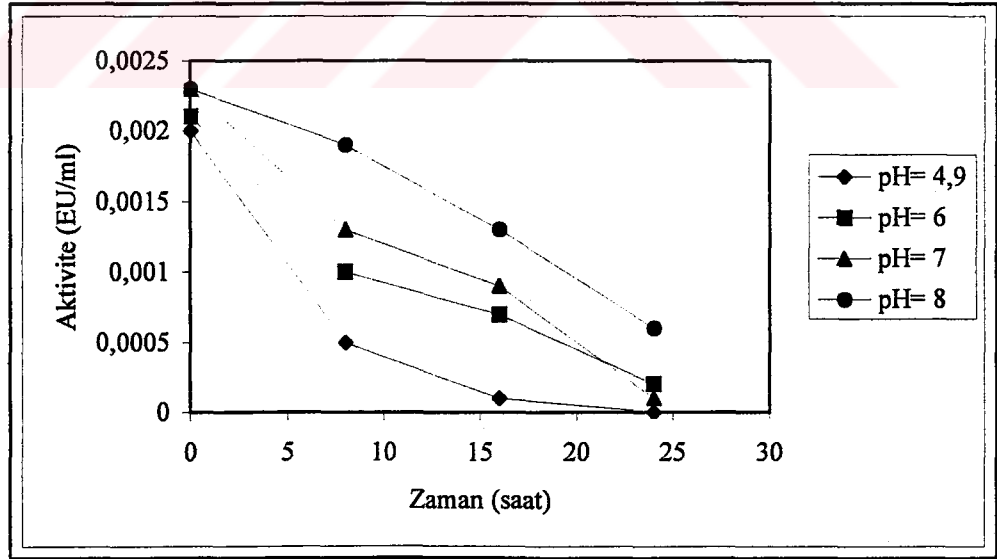
Zaman	(pH= 7,5) Aktivite (EU/ml)	(pH= 8,0) Aktivite (EU/ml)	(pH= 8,5) Aktivite (EU/ml)	(pH= 8,9) Aktivite (EU/ml)
0. saat	0,0104	0,0110	0,012	0,0110
8. saat	0,00144	0,00464	0,00754	0,00448
16. saat	0,00096	0,00512	0,00824	0,00304
24. saat	0	0,00208	0,00788	0,00288

Çizelge 4.12. Koyun lens G6PD enziminin stabil pH'sı için 1 M potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

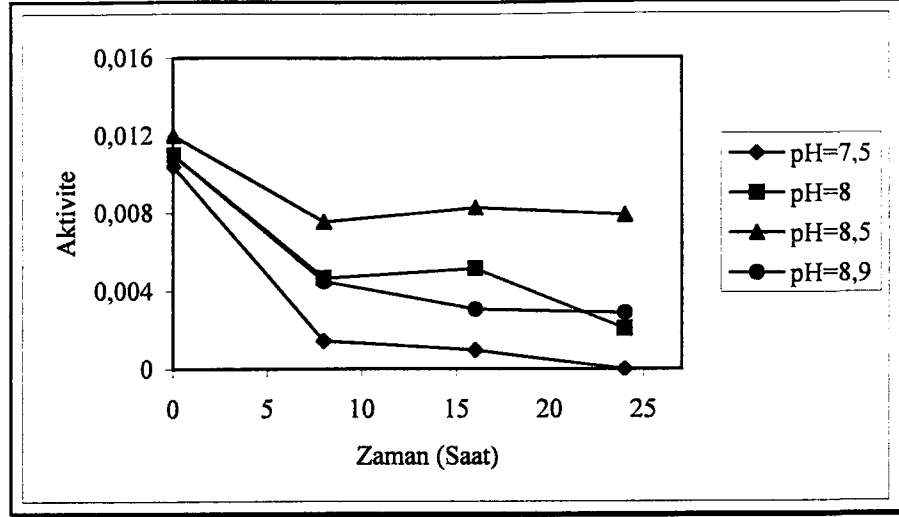
Zaman	(pH= 4,9) Aktivite (EU/ml)	(pH= 6,0) Aktivite (EU/ml)	(pH= 7,0) Aktivite (EU/ml)	(pH= 8,0) Aktivite (EU/ml)
0. saat	0,0017	0,0013	0,0060	0,0048
8. saat	0,0008	0,0009	0,00512	0,00496
16. saat	0,00128	0,00128	0,00448	0,0040
24. saat	0,00048	0	0,0008	0,0013



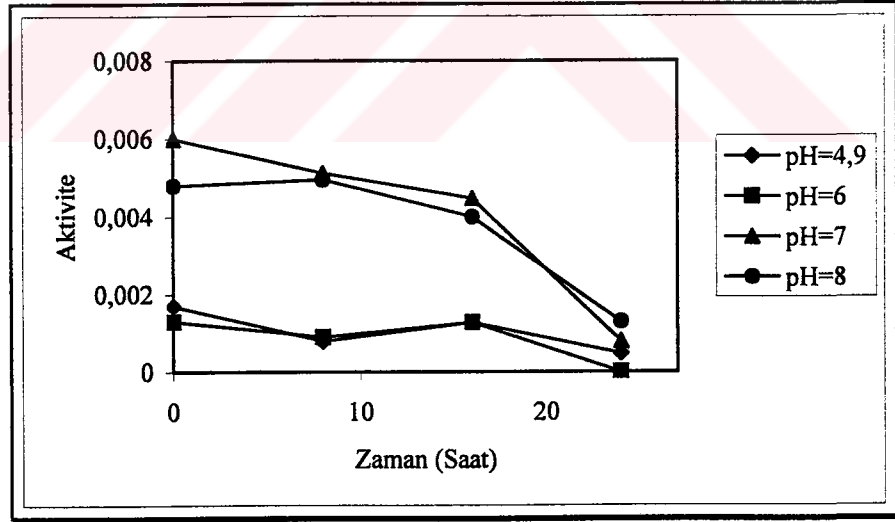
Şekil 4.15. Değişik pH'lardaki 1 M Tris-HCl tampon çözeltisi kullanılarak koyun eritrosit glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi için yapılan stabil pH grafiği



Şekil 4.16. Değişik pH'lardaki 1 M potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak koyun eritrosit glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi için yapılan stabil pH grafiği



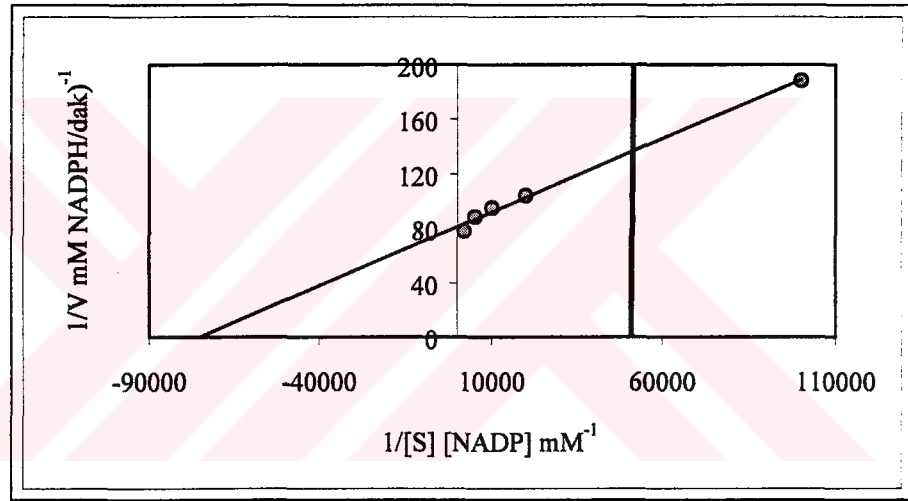
Şekil 4.17. Değişik pH'lardaki 1 M Tris-HCl tampon çözeltisi kullanılarak koyun lensi glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi için yapılan stabil pH grafiği



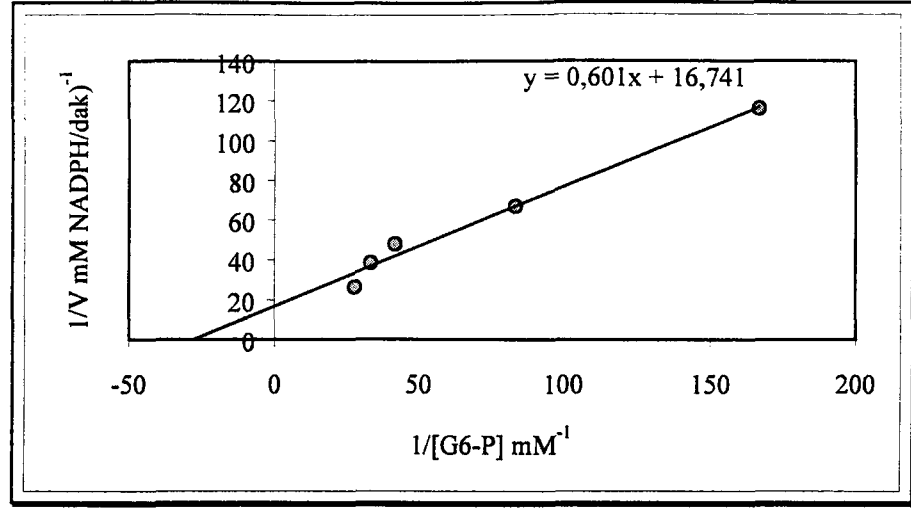
Şekil 4.18. Değişik pH'lardaki 1 M potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak koyun lensi glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi için yapılan stabil pH grafiği

4.2.7. NADP^+ ve Glukoz-6-fosfat Substratları İçin K_M ve V_{\max} Değerlerinin Belirlenmesi

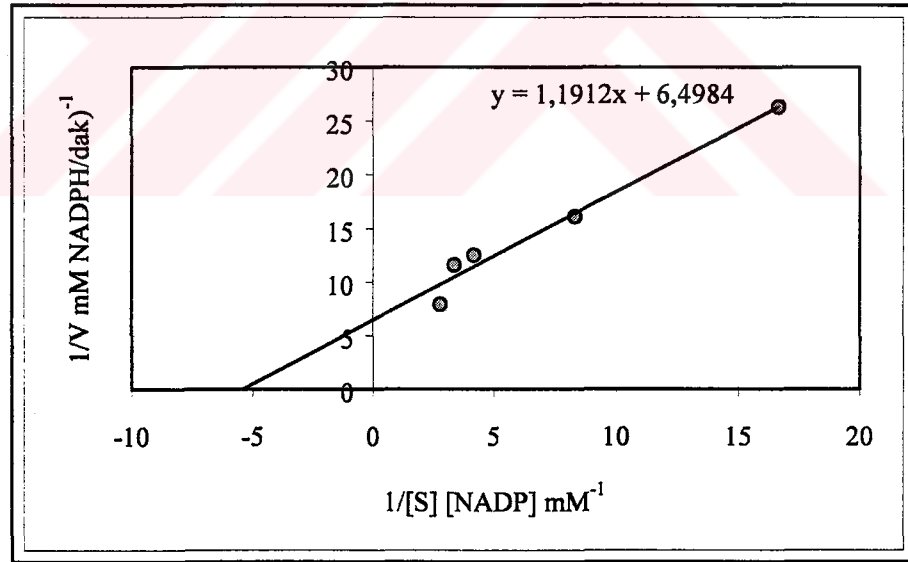
Koyun eritrosit ve lens glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimleri için ayrı ayrı NADP^+ ve G6P substratları ile K_M ve V_{\max} çalışması, Bölüm 3.5.3'de anlatıldığı şekilde yapıldı. Daha sonra koyun eritrosit ve lensi ile ilgili hem NADP^+ , hem G6P için ayrı ayrı Lineweaver-Burk grafikleri hazırlandı ve bu grafiklerden K_M ve V_{\max} değerleri bulundu. Bu değerler çizelge 4.13 ve çizelge 4.14'de verildi (şekil 4.19-4.22).



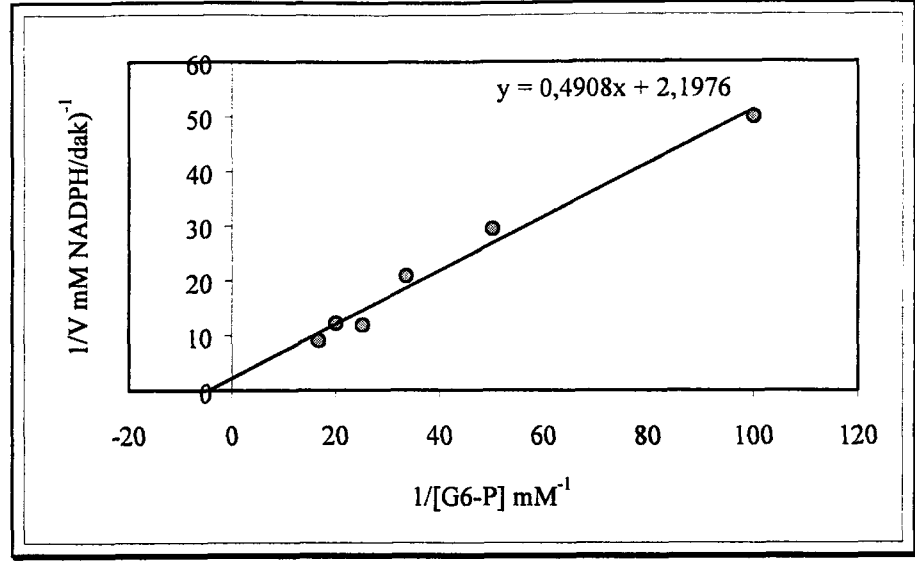
Şekil 4.19. Koyun eritrosit G6PD enzimi için sabit glukoz-6-fosfat (G6-P) konsantrasyonunda 5 farklı NADP^+ konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.20. Koyun eritrosit G6PD enzimi için sabit NADP⁺ konsantrasyonunda 5 farklı glukoz-6-fosfat (G6-P) konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.21. Koyun lens G6PD enzimi için sabit glukoz-6-fosfat (G6-P) konsantrasyonunda 5 farklı NADP⁺ konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.22. Koyun lens G6PD enzimi için sabit NADP^+ konsantrasyonunda 6 farklı glukoz-6-fosfat (G6-P) konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.13. Eritrosit G6PD'sinin NADP^+ ve G6P substratları için K_M ve V_{\max} değerleri

Substrat	K_M (mM)	V_{\max} (EU/ml)
NADP^+	$1,23 \times 10^{-5}$	$1,23 \times 10^{-2}$
G6P	$3,6 \times 10^{-2}$	$5,9 \times 10^{-2}$

Çizelge 4.14. Lens G6PD'sinin NADP^+ ve G6P substratları için K_M ve V_{\max} değerleri

Substrat	K_M (mM)	V_{\max} (EU/ml)
NADP^+	$2,23 \times 10^{-1}$	$4,55 \times 10^{-1}$
G6P	$1,83 \times 10^{-1}$	$1,54 \times 10^{-1}$

4.2.8. ATP, ADP, NADH NADPH ve Çeşitli İlaçların Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz Enzimi Üzerine Etkilerinin Sonuçları

Koyun eritrosit ve lens glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimleri için Bölüm 3.5.4'de anlatıldığı şekilde, bazı önemli kimyasal maddeler ve tedavide sıklıkla kullanılan ilaçların stok çözeltileri hazırlanarak çizelge 4.15 ve çizelge 4.16'da verildi. Koyun eritrosit ve lens G6PD enzimi üzerine inhibisyon veya aktivasyon etkisi gösteren kimyasal madde ve ilaçlar ile ilgili konsantrasyonlar ve % aktivite değerleri eritrosit ve lens için sırasıyla çizelge 4.28 ile çizelge 4.43'de verildi. Ayrıca eritrosit ve lens G6PD enzimi üzerine inhibisyon veya aktivasyon etkisinin belirlenmesinde kullanılan kimyasal madde ve ilaçlar için çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen kimyasal madde ve ilaç konsantrasyonları eritrosit ve lens için sırasıyla çizelge 4.17-4.27 ve çizelge 4.29-4.42'de verildi. Daha sonra G6PD enzimi üzerinde inhibisyon veya aktivasyon etkileri araştırıldı. Eritrosit G6PD enzimi için elde edilen sonuçlar şekil 4.23-4.33, lens G6PD enzimi için elde edilen sonuçlar şekil 4.34-4.47'de verilmiştir.

Çizelge 4.15. Koyun eritrosit glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi üzerine inhibisyon veya aktivasyon etkisi gösteren kimyasal madde ve ilaçların stok çözelti konsantrasyonları

Kimyasal Madde Türü	Stok Çözelti Konsantrasyonu(mM)
ATP	3,51
ADP	1,615
NADH	1,0
NADPH	5,0
Gentamisin sülfat	84,0
Sefazolin sodyum	550,0
Penisilin G potasyum	806,4
Sefotaksim sodyum	575,2
Ampisilin	715,4
Amikasin	427,0
Sefepim hidroklorür	208,0

Çizelge 4.16. Koyun lens glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi üzerine inhibisyon veya aktivasyon etkisi gösteren kimyasal madde ve ilaçların stok çözelti konsantrasyonları

Kimyasal Madde Türü	Stok Çözelti Konsantrasyonu(mM)
ATP	3,51
ADP	1,615
NADH	1,0
İndomethacin	2,79
Deksametazon 21-fosfat disodyum	7,74
Lomefloxacin	7,73
Siklopentolat hidroklorür	609,0
Dorzolamid hidroklorür	55,4
Timolol maleat	15,7
Adrenalin [(-) Epinefrin]	43,6
Seftriakson disodyum	2,4
Sefazolin sodyum	524,0
Vankomisin hidroklorür	33,6
Gentamisin sülfat	84,0

Çizelge 4.17. Koyun eritrosit G6PD enzimi üzerine ATP ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözeltiler miktarları ve bunlara karşılık gelen ATP konsantrasyonları

Saf su (µl)	Tris-HCl (1M) EDTA (5mM) (pH= 8,0) (µl)	MgCl ₂ (0,1M) (µl)	NADP ⁺ (2mM) (µl)	Enzim Hacmi (µl)	Glukoz 6-fosfat (6 mM) (µl)	Toplam Hacim (µl)	ATP Hacmi (µl)	Küvette ki ATP Konsantrasyonu (mM)
570	100	100	100	30	100	1000	0	-
520	100	100	100	30	100	1000	50	0,175
470	100	100	100	30	100	1000	100	0,35
370	100	100	100	30	100	1000	200	0,7
270	100	100	100	30	100	1000	300	1,05
170	100	100	100	30	100	1000	400	1,4
70	100	100	100	30	100	1000	500	1,75

Çizelge 4.18. Koyun eritrosit G6PD enzimi üzerine ADP ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözeltiler miktarları ve bunlara karşılık gelen ADP konsantrasyonları

Saf su (µl)	Tris-HCl (1M) EDTA (5mM) (pH= 8,0) (µl)	MgCl ₂ (0,1M) (µl)	NADP ⁺ (2mM) (µl)	Enzim Hacmi (µl)	Glukoz 6-fosfat (6 mM) (µl)	Toplam Hacim (µl)	ADP Hacmi (µl)	Küvetteki ADP Konsantrasyonu (mM)
570	100	100	100	30	100	1000	0	-
470	100	100	100	30	100	1000	100	0,161
370	100	100	100	30	100	1000	200	0,322
270	100	100	100	30	100	1000	300	0,483
70	100	100	100	30	100	1000	500	0,805
0	100	100	100	30	100	1000	570	0,920

Çizelge 4.19. Koyun eritrosit G6PD enzimi üzerine NADH ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen NADH konsantrasyonları

Saf su (µl)	Tris-HCl (1M) EDTA (5mM) (pH=8) (µl)	MgCl ₂ (0,1M) (µl)	NADP ⁺ (2mM) (µl)	Enzim Hacmi (µl)	Glukoz 6-fosfat (6 mM) (µl)	Toplam Hacim (µl)	NADH Hacmi (µl)	Küvetteki NADH Konsantrasyonu (mM)
570	100	100	100	30	100	1000	0	-
520	100	100	100	30	100	1000	50	0,05
470	100	100	100	30	100	1000	100	0,1
440	100	100	100	30	100	1000	130	0,13
150	100	100	100	30	100	1000	420	0,15
370	100	100	100	30	100	1000	200	0,2

Çizelge 4.20. Koyun eritrosit G6PD enzimi üzerine NADPH ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen NADPH konsantrasyonları

Saf su (µl)	Tris-HCl (1M) EDTA (5mM) (pH= 8,0) (µl)	MgCl ₂ (0,1M) (µl)	NADP ⁺ (2mM) (µl)	Enzim Hacmi (µl)	Glukoz 6-fosfat (6 mM) (µl)	Toplam Hacim (µl)	NADPH Hacmi (µl)	Küvetteki NADPH Konsantrasyonu (mM)
570	100	100	100	30	100	1000	0	-
520	100	100	100	30	100	1000	50	0,25
470	100	100	100	30	100	1000	100	0,5
370	100	100	100	30	100	1000	200	1
170	100	100	100	30	100	1000	400	2
0	100	100	100	30	100	1000	570	2,85

Çizelge 4.21. Koyun eritrosit G6PD enzimi üzerine Gentamisin sülfat ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen gentamisin sülfat konsantrasyonları

Saf su (µl)	Tris-HCl (1M) EDTA (5mM) (pH= 8,0) (µl)	MgCl ₂ (0,1M) (µl)	NADP ⁺ (2mM) (µl)	Enzim Hacmi (µl)	Glukoz 6-fosfat (6 mM) (µl)	Toplam Hacim (µl)	İlaç Hacmi (µl)	Küvetteki İlaç Konsantrasyonu (mM)
1450	250	250	250	50	250	2500	0	-
1440	250	250	250	50	250	2500	10	0,336
1350	250	250	250	50	250	2500	100	3,36
1250	250	250	250	50	250	2500	200	5
1150	250	250	250	50	250	2500	300	7,75
1050	250	250	250	50	250	2500	400	13,44
950	250	250	250	50	250	2500	500	16,8

Çizelge 4.22. Koyun eritrosit G6PD enzimi üzerine Sefazolin sodyum ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen Sefazolin sodyum konsantrasyonları

Saf su (µl)	Tris-HCl (1M) EDTA (5mM) (pH= 8,0) (µl)	MgCl ₂ (0,1M) (µl)	NADP ⁺ (2mM) (µl)	Enzim Hacmi (µl)	Glukoz 6-fosfat (6 mM) (µl)	Toplam Hacim (µl)	İlaç Hacmi (µl)	Küvetteki İlaç Konsantrasyonu (mM)
1450	250	250	250	50	250	2500	0	-
1440	250	250	250	50	250	2500	10	2,20
1400	250	250	250	50	250	2500	50	11
1350	250	250	250	50	250	2500	100	22
1250	250	250	250	50	250	2500	200	44
1150	250	250	250	50	250	2500	300	66
1050	250	250	250	50	250	2500	400	88

Çizelge 4.23. Koyun eritrosit G6PD enzimi üzerine Penisilin G potasyum ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen Penisilin G potasyum konsantrasyonları

Saf su (µl)	Tris-HCl (1M) EDTA (5mM) (pH= 8,0) (µl)	MgCl ₂ (0,1M) (µl)	NADP ⁺ (2mM) (µl)	Enzim Hacmi (µl)	Glukoz 6-fosfat (6 mM) (µl)	Toplam Hacim (µl)	İlaç Hacmi (µl)	Küvetteki İlaç Konsantrasyonu (mM)
1450	250	250	250	50	250	2500	0	-
1440	250	250	250	50	250	2500	10	3,22
1420	250	250	250	50	250	2500	30	9,66
1400	250	250	250	50	250	2500	50	16,1
1380	250	250	250	50	250	2500	70	22,54
1350	250	250	250	50	250	2500	100	32,2

Çizelge 4.24. Koyun eritrosit G6PD enzimi üzerine Sefotaksim sodyum ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen Sefotaksim sodyum konsantrasyonları

Saf su (µl)	Tris-HCl (1M) EDTA (5mM) (pH= 8,0) (µl)	MgCl ₂ (0,1M) (µl)	NADP ⁺ (2mM) (µl)	Enzim Hacmi (µl)	Glukoz 6-fosfat (6 mM) (µl)	Toplam Hacim (µl)	İlaç Hacmi (µl)	Küvetteki İlaç Konsantrasyonu (mM)
1450	250	250	250	50	250	2500	0	-
1440	250	250	250	50	250	2500	10	2,3
1420	250	250	250	50	250	2500	30	6,9
1400	250	250	250	50	250	2500	50	11,5
1375	250	250	250	50	250	2500	75	17,25
1350	250	250	250	50	250	2500	100	23

Çizelge 4.25. Koyun eritrosit G6PD enzimi üzerine Ampisilin ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen Ampisilin konsantrasyonları

Saf su (µl)	Tris-HCl (1M) EDTA (5mM) (pH= 8,0) (µl)	MgCl ₂ (0,1M) (µl)	NADP ⁺ (2mM) (µl)	Enzim Hacmi (µl)	Glukoz 6-fosfat (6 mM) (µl)	Toplam Hacim (µl)	İlaç Hacmi (µl)	Küvetteki İlaç Konsantrasyonu (mM)
1450	250	250	250	50	250	2500	0	-
1440	250	250	250	50	250	2500	10	2,86
1350	250	250	250	50	250	2500	100	28,6
1050	250	250	250	50	250	2500	400	114,4
950	250	250	250	50	250	2500	550	157,4
750	250	250	250	50	250	2500	700	200,2

Çizelge 4.26. Koyun eritrosit G6PD enzimi üzerine Amikasin ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen Amikasin konsantrasyonları

Saf su (µl)	Tris-HCl (1M) EDTA (5mM) (pH= 8,0) (µl)	MgCl ₂ (0,1M) (µl)	NADP ⁺ (2mM) (µl)	Enzim Hacmi (µl)	Glukoz 6-fosfat (6 mM) (µl)	Toplam Hacim (µl)	İlaç Hacmi (µl)	Küvetteki İlaç Konsantrasyonu (mM)
1450	250	250	250	50	250	2500	0	-
1440	250	250	250	50	250	2500	10	1,7
1400	250	250	250	50	250	2500	50	8,5
1250	250	250	250	50	250	2500	200	34
1050	250	250	250	50	250	2500	400	68
850	250	250	250	50	250	2500	600	102
750	250	250	250	50	250	2500	700	119

Çizelge 4.27. Koyun eritrosit G6PD enzimi üzerine Sefepim hidroklorür ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen Sefepim hidroklorür konsantrasyonları

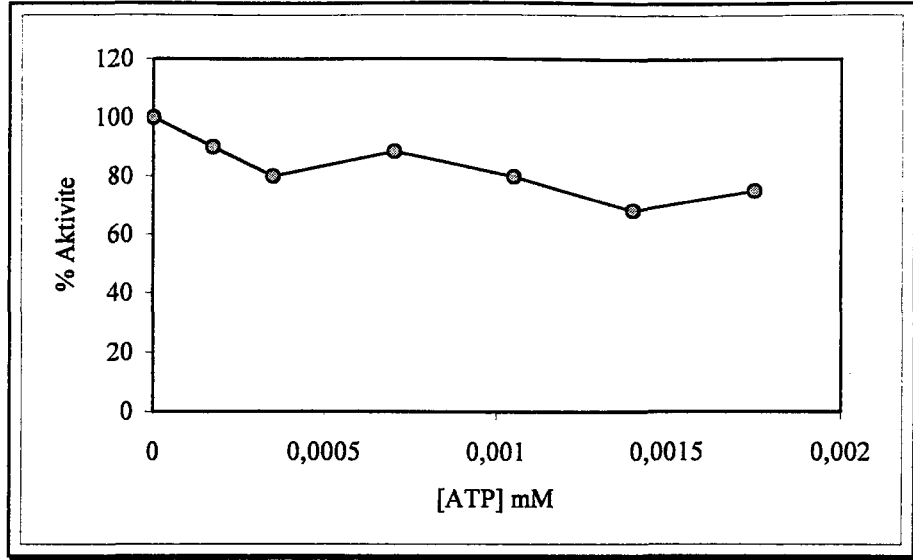
Saf su (µl)	Tris-HCl (1M) EDTA (5mM) (pH= 8,0) (µl)	MgCl ₂ (0,1M) (µl)	NADP ⁺ (2mM) (µl)	Enzim Hacmi (µl)	Glukoz 6-fosfat (6 mM) (µl)	Toplam Hacim (µl)	İlaç Hacmi (µl)	Küvetteki İlaç Konsantrasyonu (mM)
1450	250	250	250	50	250	2500	0	-
1440	250	250	250	50	250	2500	10	0,83
1400	250	250	250	50	250	2500	50	4,16
1350	250	250	250	50	250	2500	100	8,32
1250	250	250	250	50	250	2500	200	16,6
1150	250	250	250	50	250	2500	300	24,9

Çizelge 4.28. Koyun eritrosit glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi üzerine kimyasal madde ve ilaçların inhibisyon veya aktivasyon etkisi ile ilgili çalışmaların sonuçları

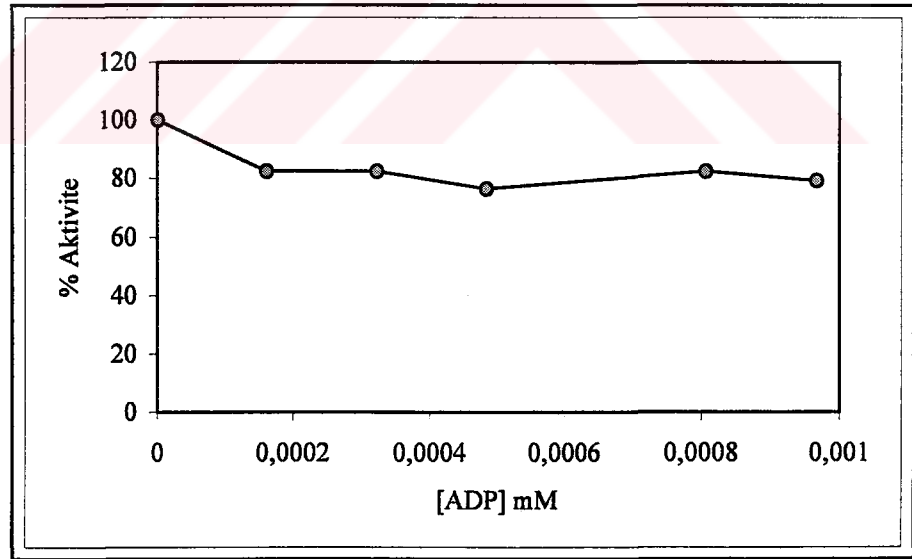
Kimyasal Türü	C(mM)	% Akt	C(mM)	% Akt	C(mM)	% Akt	C(mM)	% Akt	C(mM)	% Akt	C(mM)	% Akt
ATP	0,175	90,0	0,350	79,9	0,702	88,3	1,05	79,9	1,40	63,8	1,75	74,9
ADP	0,161	82,5	0,322	82,5	0,483	76,5	0,805	82,5	0,920	79,5	---	---
NADH	0,05	83,6	0,1	76,8	0,13	70,3	0,15	63,5	0,20	46,3	---	---
NADPH	0,25	98,2	0,50	93,3	1,0	86,6	2,0	79,9	0,285	74,9	---	---
Gentamisin sülfat	$3,35 \times 10^{-1}$	97,22	3,42	80,55	5	72,78	7,75	57,44	12,5	41,83	16,7	30,55
Sefazolin sodyum	2,2	103,27	11,0	98,36	22,0	86,87	44,0	111,48	66,0	126,22	88,0	134,42
Penisilin G potasyum	3,22	57,5	9,66	41,24	16,1	21,24	22,54	14,99	32,2	2,5	---	---
Sefotaksim sodyum	2,3	97,75	6,9	102,25	11,5	105,62	17,25	122,47	23,0	113,48	---	---

Çizelge 4.28. (devam) Koyun eritrosit glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi üzerine kimyasal madde ve ilaçların inhibisyon veya aktivasyon etkisi ile ilgili çalışmaların sonuçları

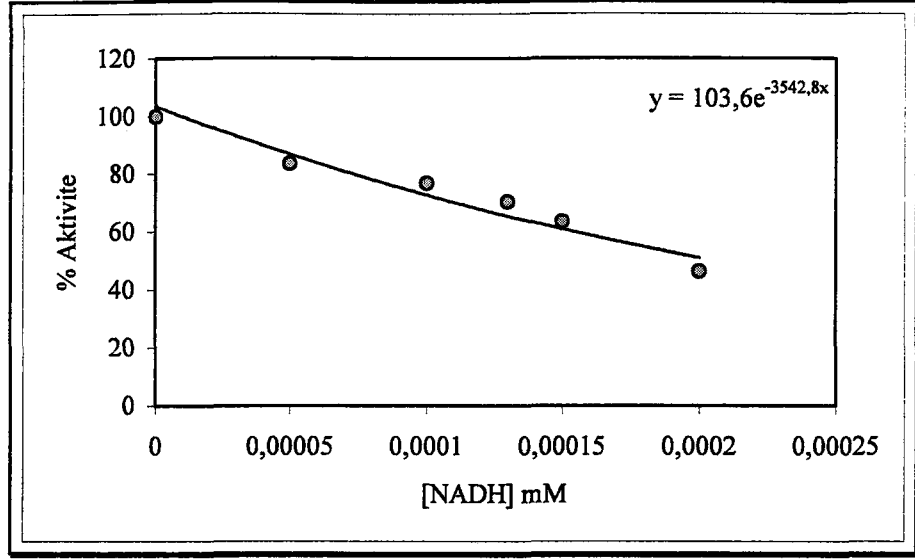
Kimyasal Türü	C(mM)	% Akt	C(mM)	% Akt	C(mM)	% Akt	C(mM)	% Akt	C(mM)	% Akt	C(mM)	% Akt
Ampisilin	2,86	105,19	28,6	100,0	114,4	83,11	157,4	84,42	200,2	61,04	---	---
Amikasin	1,7	92,76	8,5	88,16	34,0	76,97	68,0	42,76	102,0	24,99	119	9,21
Sefepim hidroklorür	0,83	100,0	4,15	104,5	8,3	105,62	16,6	108,98	24,9	116,86	---	---



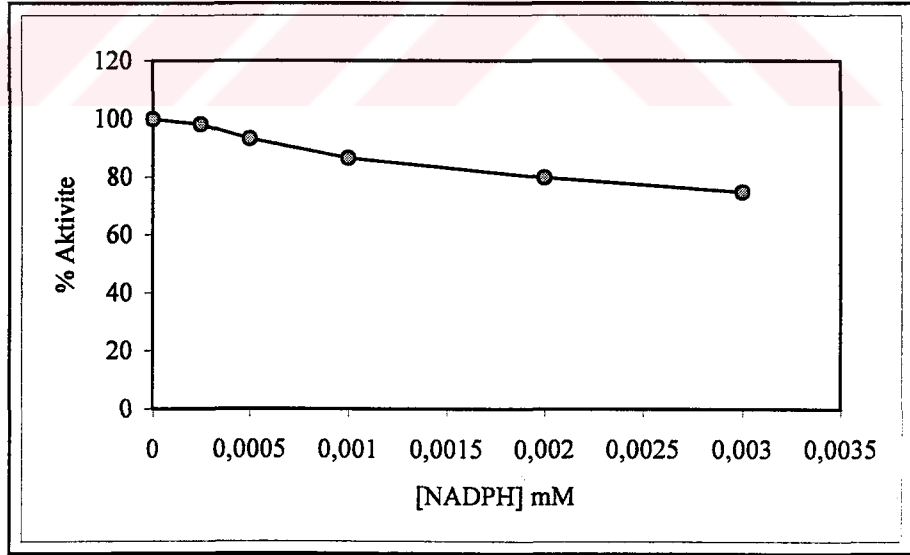
Şekil 4.23. Koyun eritrosit G6PD enzimi için 6 farklı ATP konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[ATP] grafiği



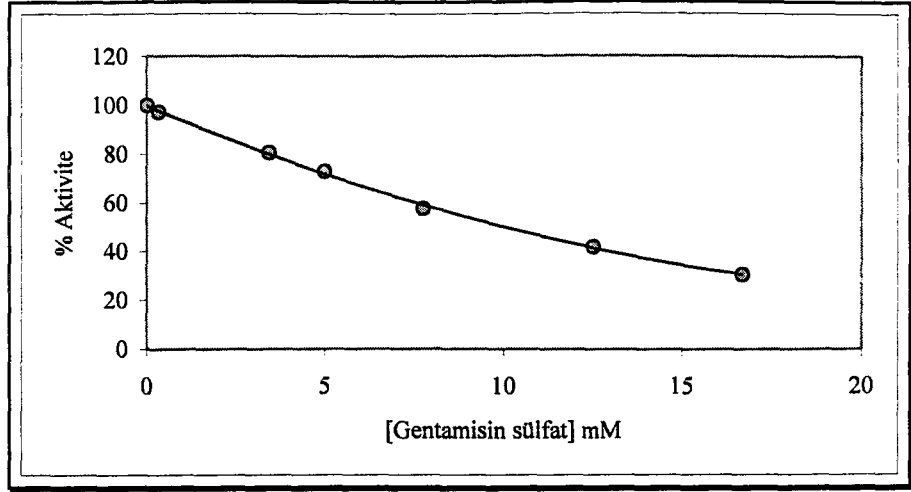
Şekil 4.24. Koyun eritrosit G6PD enzimi için 5 farklı ADP konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[ADP] grafiği



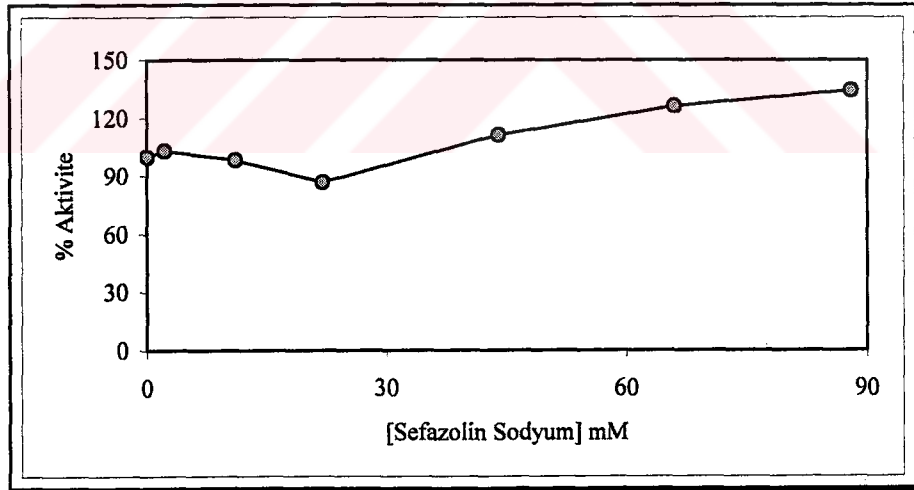
Şekil 4.25. Koyun eritrosit G6PD enzimi için 5 farklı NADH konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[NADH] grafiği



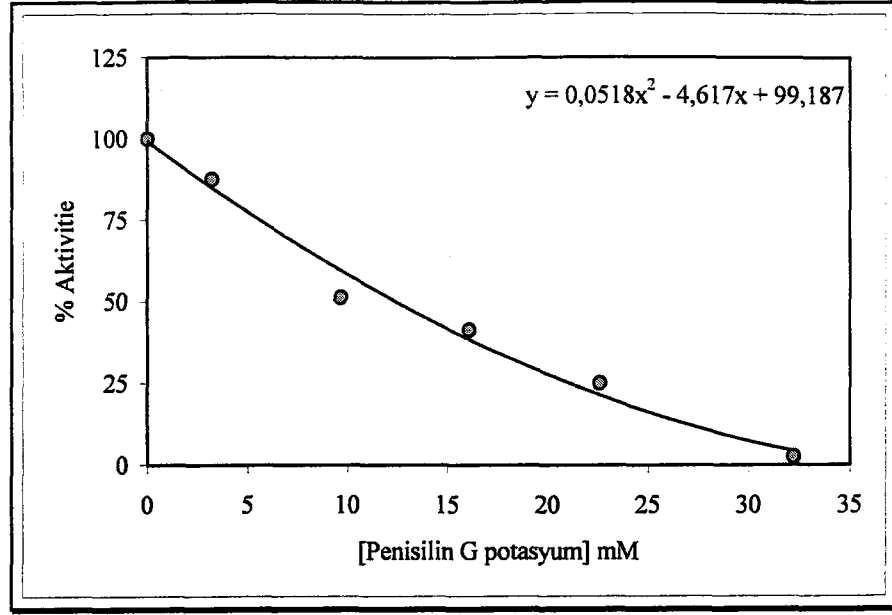
Şekil 4.26. Koyun eritrosit G6PD enzimi için 5 farklı NADPH konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[NADPH] grafiği



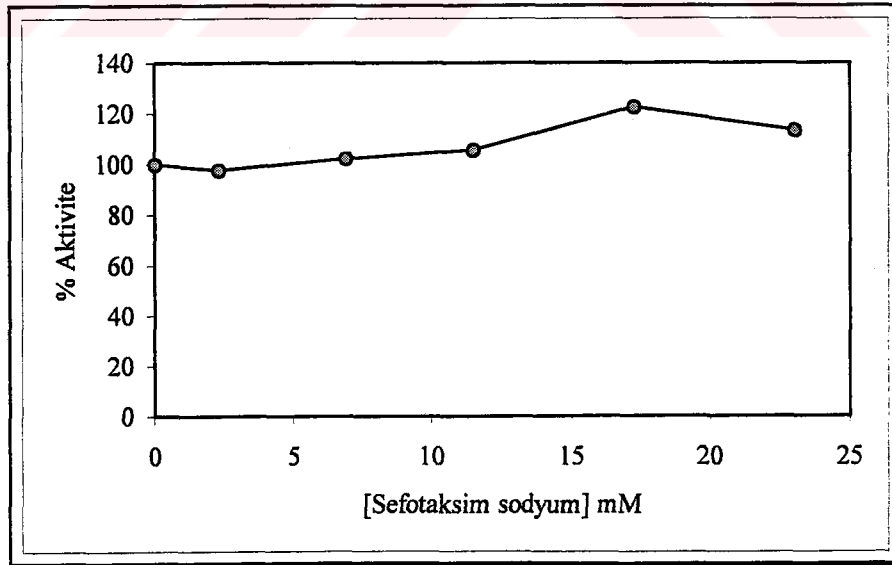
Şekil 4.27. Koyun eritrosit G6PD enzimi için 6 farklı ilaç konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Gentamisin sülfat] grafiği



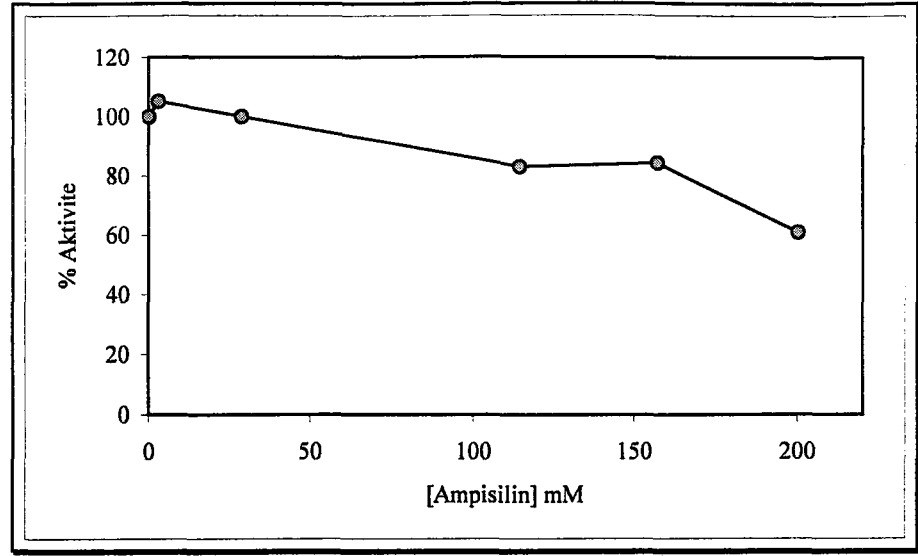
Şekil 4.28. Koyun eritrosit G6PD enzimi için 6 farklı ilaç konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Sefazolin sodyum] grafiği



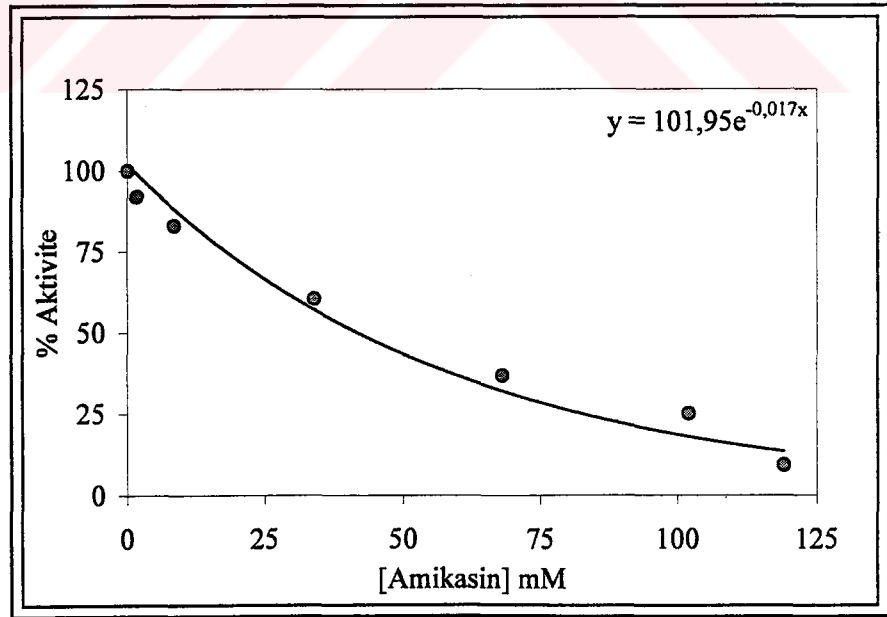
Şekil 4.29. Koyun eritrosit G6PD enzimi için 5 farklı ilaç konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Penisilin G potasyum] grafiği



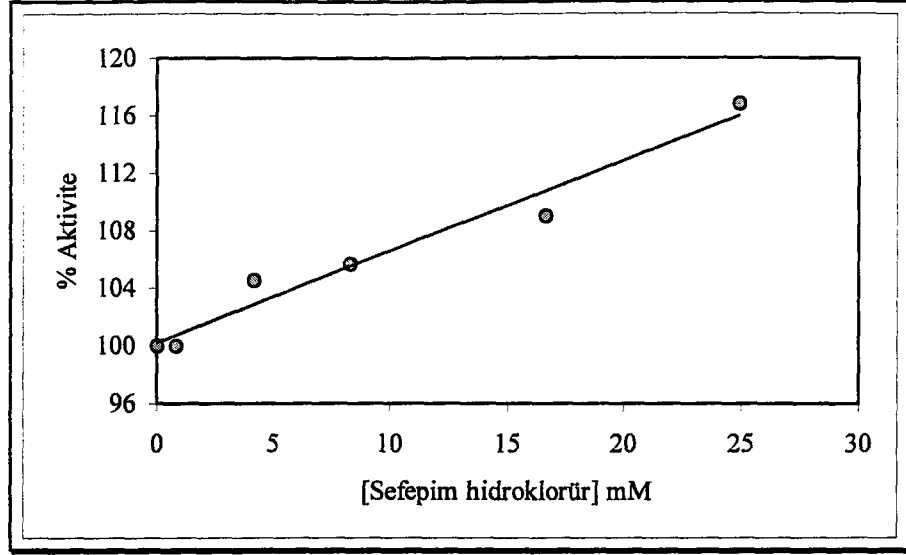
Şekil 4.30. Koyun eritrosit G6PD enzimi için 5 farklı ilaç konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Sefotaksim sodyum] grafiği



Şekil 4.31. Koyun eritrosit G6PD enzimi için 5 farklı ilaç konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Ampisilin] grafiği



Şekil 4.32. Koyun eritrosit G6PD enzimi için 6 farklı ilaç konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Amikasin] grafiği



Şekil 4.33. Koyun eritrosit G6PD enzimi için 5 farklı ilaç konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Sefepim hidroklorür] grafiği

Çizelge 4.29. Koyun lens G6PD enzimi üzerine ATP ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen ATP konsantrasyonları

Saf su (µl)	Tris-HCl (1M) EDTA (5mM) (pH= 8,0) (µl)	MgCl ₂ (0,1M) (µl)	NADP ⁺ (2mM) (µl)	Enzim Hacmi (µl)	Glukoz 6-fosfat (6 mM) (µl)	Toplam Hacim (µl)	ATP Hacmi (µl)	Küvetteki ATP Konsantrasyonu (mM)
580	100	100	100	20	100	1000	0	-
530	100	100	100	20	100	1000	50	0,175
480	100	100	100	20	100	1000	100	0,351
380	100	100	100	20	100	1000	200	0,702
280	100	100	100	20	100	1000	300	1,05
180	100	100	100	20	100	1000	400	1,4
80	100	100	100	20	100	1000	500	1,75

Çizelge 4.30. Koyun lens G6PD enzimi üzerine ADP ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen ADP konsantrasyonları

Saf su (µl)	Tris-HCl (1M) EDTA (5mM) (pH= 8,0) (µl)	MgCl ₂ (0,1M) (µl)	NADP ⁺ (2mM) (µl)	Enzim Hacmi (µl)	Glukoz 6-fosfat (6 mM) (µl)	Toplam Hacim (µl)	ADP Hacmi (µl)	Küvetteki ADP Konsantrasyonu (mM)
580	100	100	100	20	100	1000	0	-
480	100	100	100	20	100	1000	100	0,161
380	100	100	100	20	100	1000	200	0,323
280	100	100	100	20	100	1000	300	0,484
180	100	100	100	20	100	1000	400	0,646
80	100	100	100	20	100	1000	500	0,807

Çizelge 4.31. Koyun lens G6PD enzimi üzerine NADH ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen NADH konsantrasyonları

Saf su (µl)	Tris-HCl (1M) EDTA (5mM) (pH= 8,0) (µl)	MgCl ₂ (0,1M) (µl)	NADP ⁺ (2mM) (µl)	Enzim Hacmi (µl)	Glukoz 6-fosfat (6 mM) (µl)	Toplam Hacim (µl)	NADH Hacmi (µl)	Küvetteki NADH Konsantrasyonu (mM)
580	100	100	100	20	100	1000	0	-
530	100	100	100	20	100	1000	50	0,05
430	100	100	100	20	100	1000	150	0,15
380	100	100	100	20	100	1000	200	0,2
330	100	100	100	20	100	1000	250	0,25

Çizelge 4.32. Koyun lens G6PD enzimi üzerine İndomethacin ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen İndomethacin konsantrasyonları

Saf su (µl)	Tris-HCl (1M) EDTA (5mM) (pH= 8,0) (µl)	MgCl ₂ (0,1M) (µl)	NADP ⁺ (2mM) (µl)	Enzim Hacmi (µl)	Glukoz 6-fosfat (6 mM) (µl)	Toplam Hacim (µl)	İlaç Hacmi (µl)	Küvetteki İlaç Konsantrasyonu (mM)
580	100	100	100	20	100	1000	0	-
545	100	100	100	20	100	1000	35	0,0973
530	100	100	100	20	100	1000	50	0,139
515	100	100	100	20	100	1000	65	0,18
510	100	100	100	20	100	1000	70	0,194
505	100	100	100	20	100	1000	75	0,2

Çizelge 4.33. Koyun lens G6PD enzimi üzerine Deksetazon 21-fosfat disodyum ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen Deksetazon 21-fosfat disodyum konsantrasyonları

Saf su (µl)	Tris-HCl (1M) EDTA (5mM) (pH= 8,0) (µl)	MgCl ₂ (0,1M) (µl)	NADP ⁺ (2mM) (µl)	Enzim Hacmi (µl)	Glukoz 6-fosfat (6 mM) (µl)	Toplam Hacim (µl)	İlaç Hacmi (µl)	Küvetteki İlaç Konsantrasyonu (mM)
580	100	100	100	20	100	1000	0	-
530	100	100	100	20	100	1000	50	0,385
480	100	100	100	20	100	1000	100	0,77
380	100	100	100	20	100	1000	200	1,54
180	100	100	100	20	100	1000	400	3,08
10	100	100	100	20	100	1000	570	4,38

Çizelge 4.34. Koyun lens G6PD enzimi üzerine Lomefloxacin ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen Lomefloxacin konsantrasyonları

Saf su (µl)	Tris-HCl (1M) EDTA (5mM) (pH= 8,0) (µl)	MgCl ₂ (0,1M) (µl)	NADP ⁺ (2mM) (µl)	Enzim Hacmi (µl)	Glukoz 6-fosfat (6 mM) (µl)	Toplam Hacim (µl)	İlaç Hacmi (µl)	Küvetteki İlaç Konsantrasyonu (mM)
580	100	100	100	20	100	1000	0	-
530	100	100	100	20	100	1000	50	3,85
480	100	100	100	20	100	1000	100	0,77
380	100	100	100	20	100	1000	200	1,54
80	100	100	100	20	100	1000	500	3,85

Çizelge 4.35. Koyun lens G6PD enzimi üzerine Siklopentolat hidroklorür ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen Siklopentolat hidroklorür konsantrasyonları

Saf su (µl)	Tris-HCl (1M) EDTA (5mM) (pH= 8,0) (µl)	MgCl ₂ (0,1M) (µl)	NADP ⁺ (2mM) (µl)	Enzim Hacmi (µl)	Glukoz 6-fosfat (6 mM) (µl)	Toplam Hacim (µl)	İlaç Hacmi (µl)	Küvetteki İlaç Konsantrasyonu (mM)
580	100	100	100	20	100	1000	0	-
530	100	100	100	20	100	1000	50	30
480	100	100	100	20	100	1000	100	60
380	100	100	100	20	100	1000	200	120
180	100	100	100	20	100	1000	400	240
80	100	100	100	20	100	1000	500	300

Çizelge 4.36. Koyun lens G6PD enzimi üzerine Dorzolamid hidroklorür ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen Dorzolamid hidroklorür konsantrasyonları

Saf su (µl)	Tris-HCl (1M) EDTA (5mM) (pH= 8,0) (µl)	MgCl ₂ (0,1M) (µl)	NADP ⁺ (2mM) (µl)	Enzim Hacmi (µl)	Glukoz 6-fosfat (6 mM) (µl)	Toplam Hacim (µl)	İlaç Hacmi (µl)	Küvetteki İlaç Konsantrasyonu (mM)
580	100	100	100	20	100	1000	0	-
510	100	100	100	20	100	1000	100	5,54
480	100	100	100	20	100	1000	200	11,08
380	100	100	100	20	100	1000	300	16,62
280	100	100	100	20	100	1000	400	22,16
180	100	100	100	20	100	1000	500	27,70

Çizelge 4.37. Koyun lens G6PD enzimi üzerine Timolol maleat ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen Timolol maleat konsantrasyonları

Saf su (µl)	Tris-HCl (1M) EDTA (5mM) (pH= 8,0) (µl)	MgCl ₂ (0,1M) (µl)	NADP ⁺ (2mM) (µl)	Enzim Hacmi (µl)	Glukoz 6-fosfat (6 mM) (µl)	Toplam Hacim (µl)	İlaç Hacmi (µl)	Küvetteki İlaç Konsantrasyonu (mM)
580	100	100	100	20	100	1000	0	-
560	100	100	100	20	100	1000	20	0,314
530	100	100	100	20	100	1000	50	0,785
480	100	100	100	20	100	1000	100	1,57
430	100	100	100	20	100	1000	150	2,35
410	100	100	100	20	100	1000	170	2,67

Çizelge 4.38. Koyun lens G6PD enzimi üzerine Adrenalin ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen Adrenalin konsantrasyonları

Saf su (µl)	Tris-HCl (1M) EDTA (5mM) (pH= 8,0) (µl)	MgCl ₂ (0,1M) (µl)	NADP ⁺ (2mM) (µl)	Enzim Hacmi (µl)	Glukoz 6-fosfat (6 mM) (µl)	Toplam Hacim (µl)	İlaç Hacmi (µl)	Küvetteki İlaç Konsantrasyonu (mM)
580	100	100	100	20	100	1000	0	-
560	100	100	100	20	100	1000	20	0,872
530	100	100	100	20	100	1000	50	2,18
480	100	100	100	20	100	1000	100	4,36
430	100	100	100	20	100	1000	150	6,54
280	100	100	100	20	100	1000	300	13,08

Çizelge 4.39. Koyun lens G6PD enzimi üzerine Seftriakson disodyum ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen Seftriakson disodyum konsantrasyonları

Saf su (µl)	Tris-HCl (1M) EDTA (5mM) (pH= 8,0) (µl)	MgCl ₂ (0,1M) (µl)	NADP ⁺ (2mM) (µl)	Enzim Hacmi (µl)	Glukoz 6-fosfat (6 mM) (µl)	Toplam Hacim (µl)	İlaç Hacmi (µl)	Küvette ki İlaç Konsant rasyonu (mM)
580	100	100	100	20	100	1000	0	-
530	100	100	100	20	100	1000	50	0,12
480	100	100	100	20	100	1000	100	0,24
380	100	100	100	20	100	1000	200	0,48
280	100	100	100	20	100	1000	300	0,72
10	100	100	100	20	100	1000	570	1,37

Çizelge 4.40. Koyun lens G6PD enzimi üzerine Sefazolin sodyum ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen Sefazolin sodyum konsantrasyonları

Saf su (µl)	Tris-HCl (1M) EDTA (5mM) (pH= 8,0) (µl)	MgCl ₂ (0,1M) (µl)	NADP ⁺ (2mM) (µl)	Enzim Hacmi (µl)	Glukoz 6-fosfat (6 mM) (µl)	Toplam Hacim (µl)	İlaç Hacmi (µl)	Küvette ki İlaç Konsant rasyonu (mM)
580	100	100	100	20	100	1000	0	-
560	100	100	100	20	100	1000	20	10
530	100	100	100	20	100	1000	50	25
510	100	100	100	20	100	1000	70	35
480	100	100	100	20	100	1000	100	50
430	100	100	100	20	100	1000	150	75

Çizelge 4.41. Koyun lens G6PD enzimi üzerine Vankomisin hidroklorür ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen Vankomisin hidroklorür konsantrasyonları

Saf su (µl)	Tris-HCl (1M) EDTA (5mM) (pH= 8,0) (µl)	MgCl ₂ (0,1M) (µl)	NADP ⁺ (2mM) (µl)	Enzim Hacmi (µl)	Glukoz 6-fosfat (6 mM) (µl)	Toplam Hacim (µl)	İlaç Hacmi (µl)	Küvette ki İlaç Konsant rasyonu (mM)
580	100	100	100	20	100	1000	0	-
530	100	100	100	20	100	1000	50	1,68
480	100	100	100	20	100	1000	100	3,36
380	100	100	100	20	100	1000	200	6,73
280	100	100	100	20	100	1000	300	10
10	100	100	100	20	100	1000	570	16,8

Çizelge 4.42. Koyun lens G6PD enzimi üzerine Gentamisin sülfat ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen Gentamisin sülfat konsantrasyonları

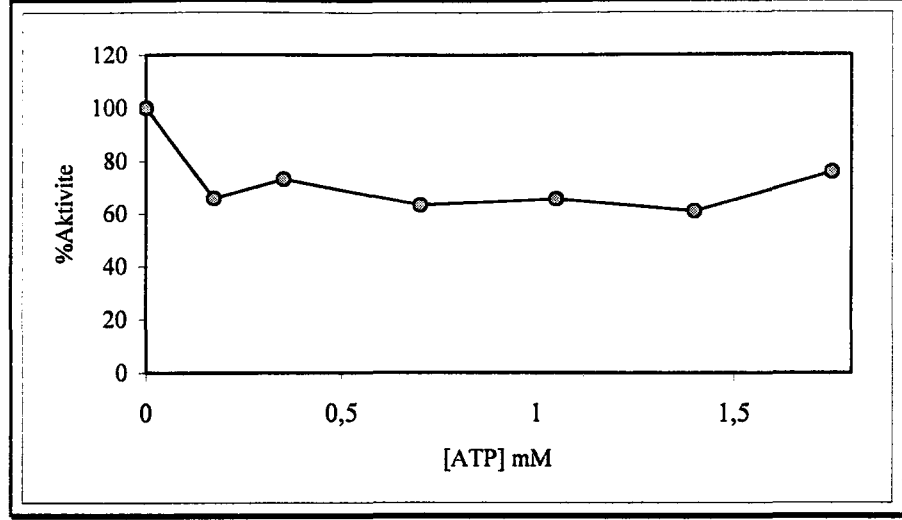
Saf su (µl)	Tris-HCl (1M) EDTA (5mM) (pH= 8,0) (µl)	MgCl ₂ (0,1M) (µl)	NADP ⁺ (2mM) (µl)	Enzim Hacmi (µl)	Glukoz 6-fosfat (6 mM) (µl)	Toplam Hacim (µl)	İlaç Hacmi (µl)	Küvette ki İlaç Konsant rasyonu (mM)
580	100	100	100	20	100	1000	0	-
530	100	100	100	20	100	1000	50	4,19
480	100	100	100	20	100	1000	100	8,28
430	100	100	100	20	100	1000	150	12,5
355	100	100	100	20	100	1000	225	18,8
280	100	100	100	20	100	1000	300	25,14
180	100	100	100	20	100	1000	400	33,5

Çizelge 4.43. Koyun lens glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi üzerine kimyasal madde ve ilaçların inhibisyon veya aktivasyon etkisi ile ilgili çalışmaların sonuçları

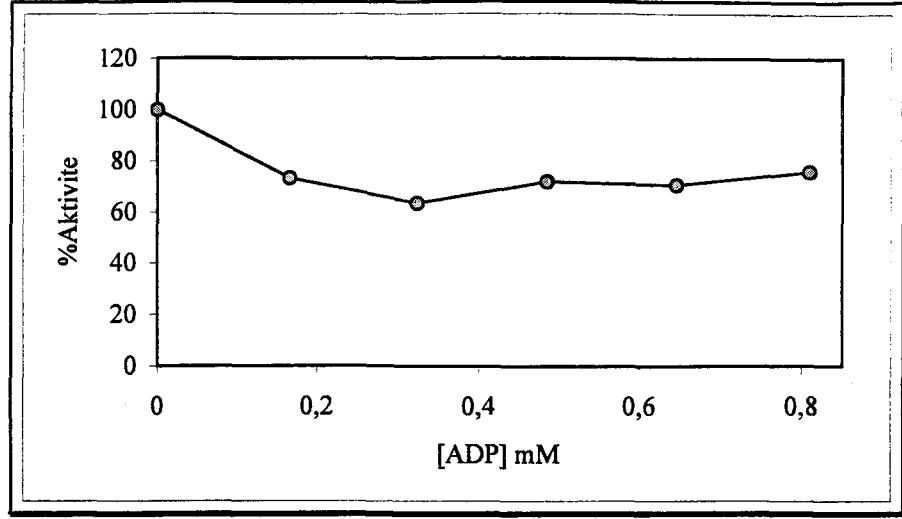
Kimyasal Türü	C(mM)	% Akt	C(mM)	% Akt	C(mM)	% Akt	C(mM)	% Akt	C(mM)	% Akt	C(mM)	% Akt
ATP	0,175	65,85	0,351	73,17	0,702	63,41	1,05	65,68	1,4	60,97	1,75	75,92
ADP	0,165	73,17	0,323	63,41	0,484	72,04	0,646	70,73	0,81	75,61	---	---
NADH	0,05	110	0,15	95	0,2	70	0,25	0	---	---	---	---
İndomethasin	0,097	100	0,14	83,33	0,18	66,66	0,19	56,66	0,2	40	---	---
Deksametazon	0,385	94,11	0,77	75,29	1,54	63,47	3,08	55,52	4,38	45,5	---	---
Lomefloxacin	0,385	119,35	0,77	119,35	1,54	129	3,85	106	---	---	---	---
Siklopentolat hidroklorür	30	107	60	109,8	120	107	240	107	300	114,2	---	---
Dorzolamid hidroklorür	5,54	104	11,08	102	16,64	97	22,16	85	27,7	85	---	---
Timolol maleat	0,314	102,8	0,785	151,4	1,57	211,42	2,35	260	2,67	291,42	---	---
Adrenalin	0,872	125,8	2,18	200,66	4,36	229,16	6,54	237,5	13,08	262,5	---	---

Çizelge 4.43. (devam) Koyun lens glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi üzerine kimyasal madde ve ilaçların inhibisyon veya aktivasyon etkisi ile ilgili çalışmaların sonuçları

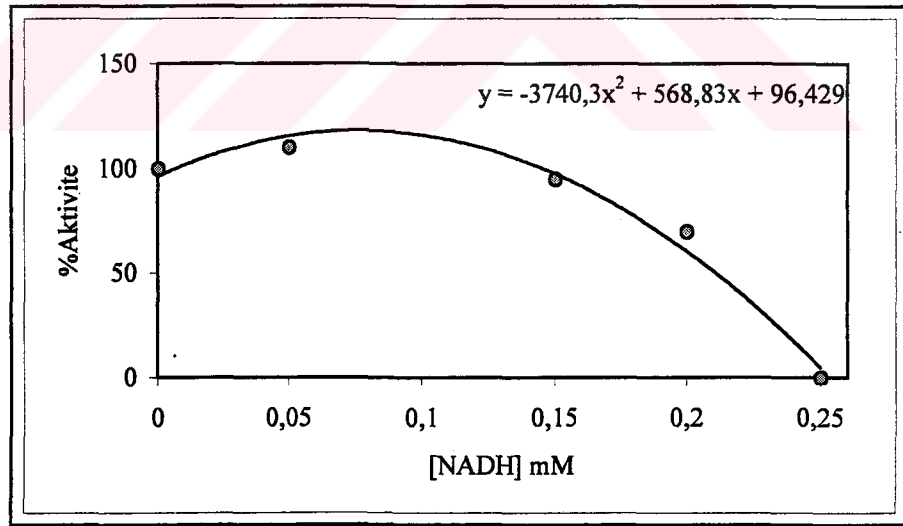
Kimyasal Türü	C(mM)	% Akt	C(mM)	% Akt	C(mM)	% Akt	C(mM)	% Akt	C(mM)	% Akt	C(mM)	% Akt
Seftriakson disodyum	0,12	116,66	0,24	120,83	0,48	104,16	0,72	104,16	1,37	104,16	---	---
Sefazolin sodyum	10	126	25	200	35	230	50	330	75	409	---	---
Vankomisin hidroklorür	1,68	88	3,36	72,7	6,73	57,14	10	50,7	16,8	41,14	---	---
Gentamisin sülfat	4,19	85,7	8,28	71,4	12,5	53,5	18,8	39,3	25,14	32,1	33,5	7,1



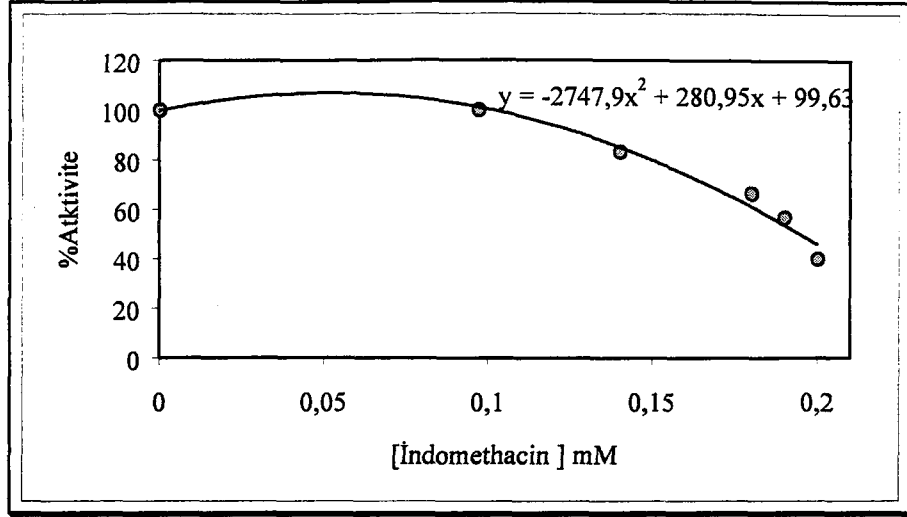
Şekil 4.34. Koyun lens G6PD enzimi için 6 farklı ATP konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[ATP] grafiği



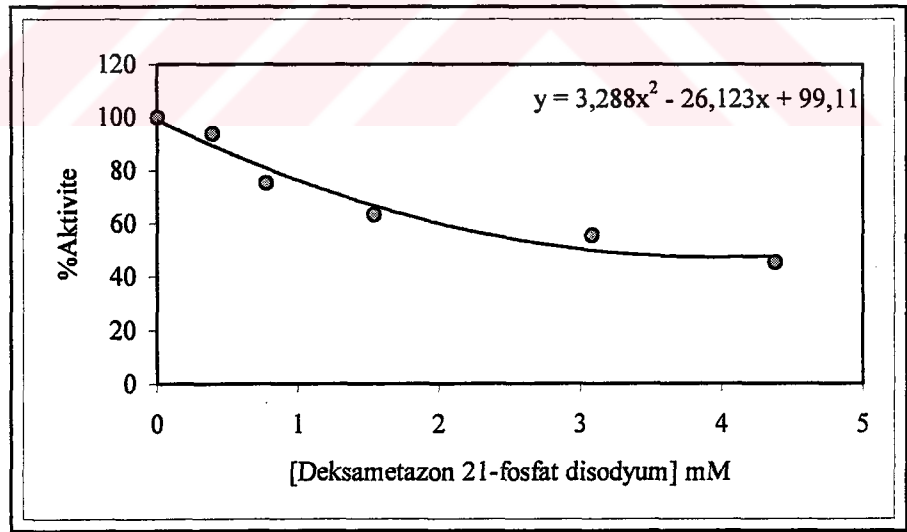
Şekil 4.35. Koyun lens G6PD enzimi için 5 farklı ADP konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[ADP] grafiği



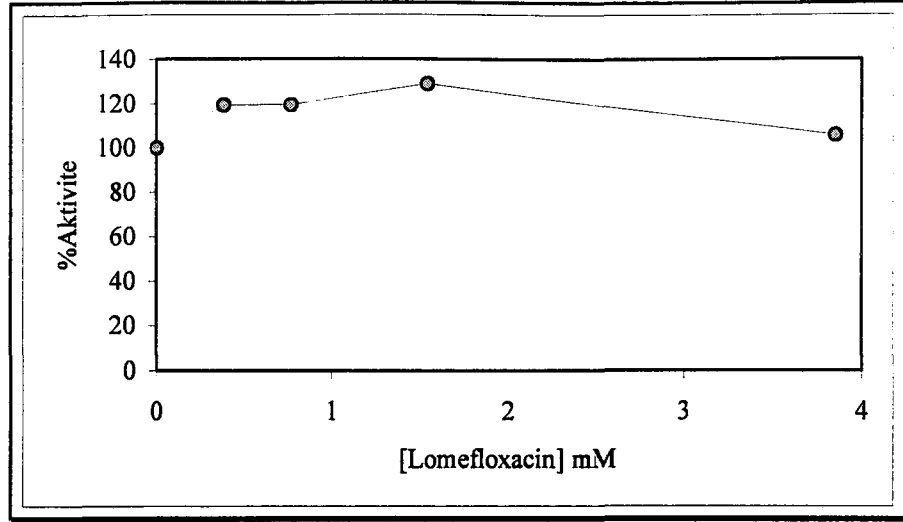
Şekil 4.36. Koyun lens G6PD enzimi için 5 farklı NADH konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[NADH] grafiği



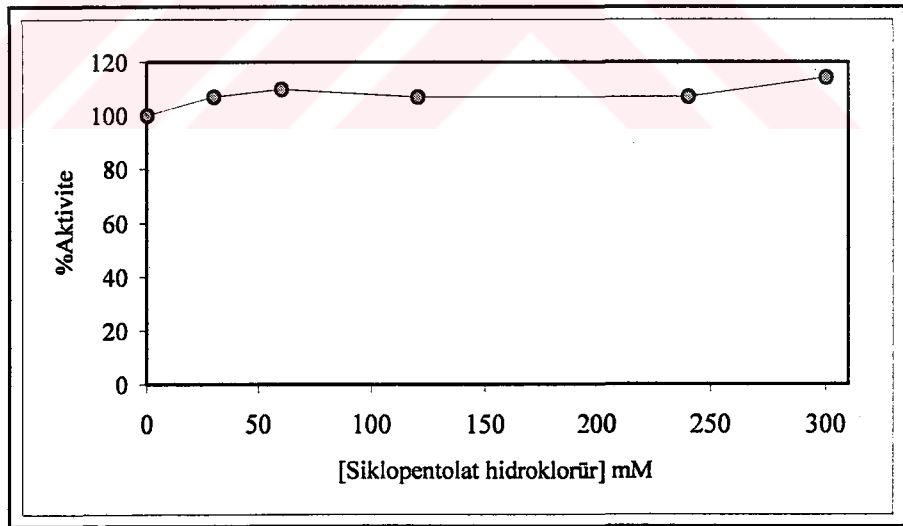
Şekil 4.37. Koyun lens G6PD enzimi için 5 farklı ilaç konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Indomethacin] grafiği



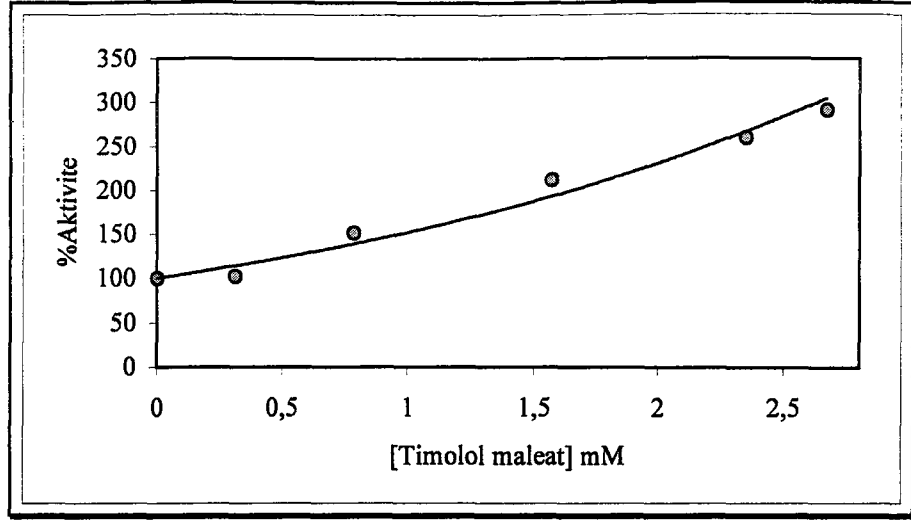
Şekil 4.38. Koyun lens G6PD enzimi için 5 farklı ilaç konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Deksametazon 21-fosfat disodyum] grafiği



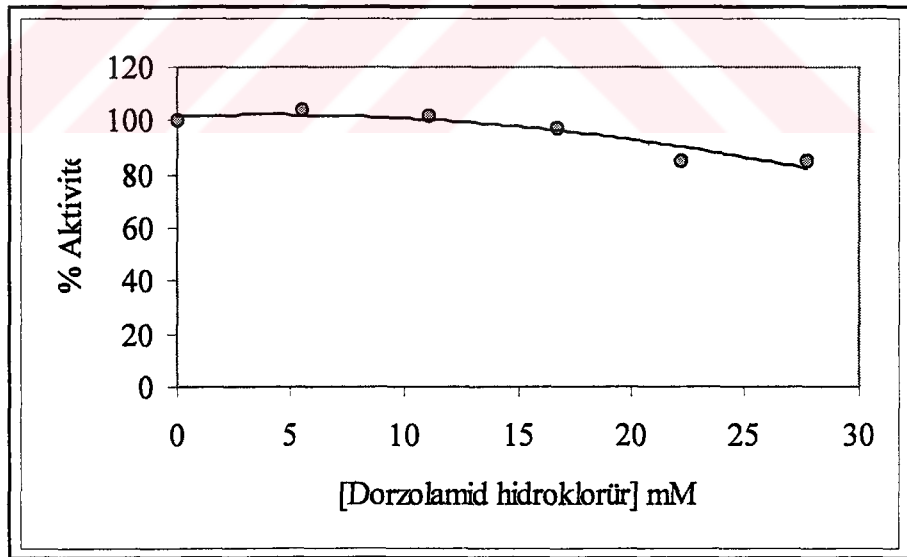
Şekil 4.39. Koyun lens G6PD enzimi için 5 farklı ilaç konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Lomefloxacin] grafiği



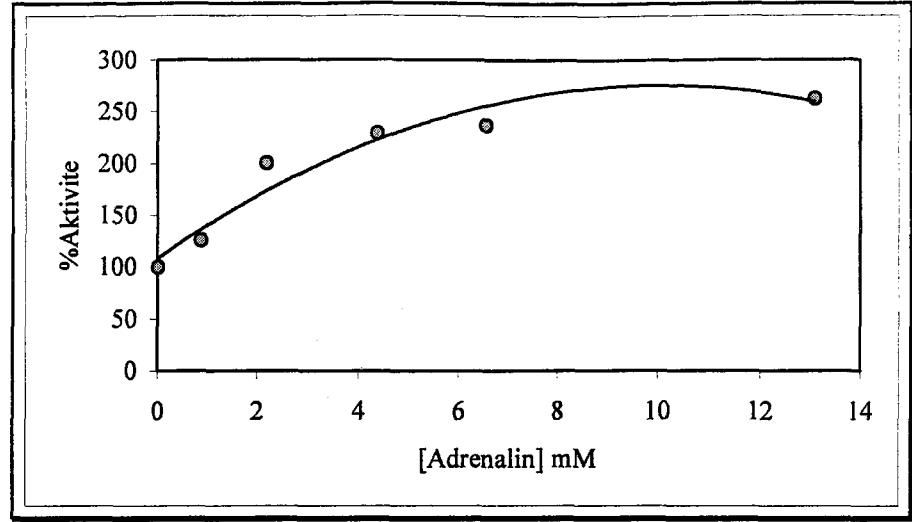
Şekil 4.40. Koyun lens G6PD enzimi için 5 farklı ilaç konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Siklopentolat hidroklorür] grafiği



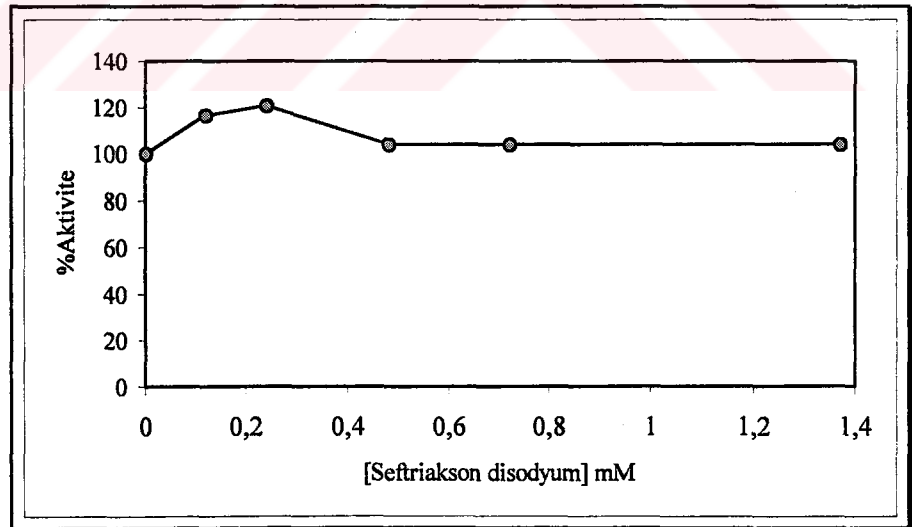
Şekil 4.41. Koyun lens G6PD enzimi için 5 farklı ilaç konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Timolol maleat] grafiği



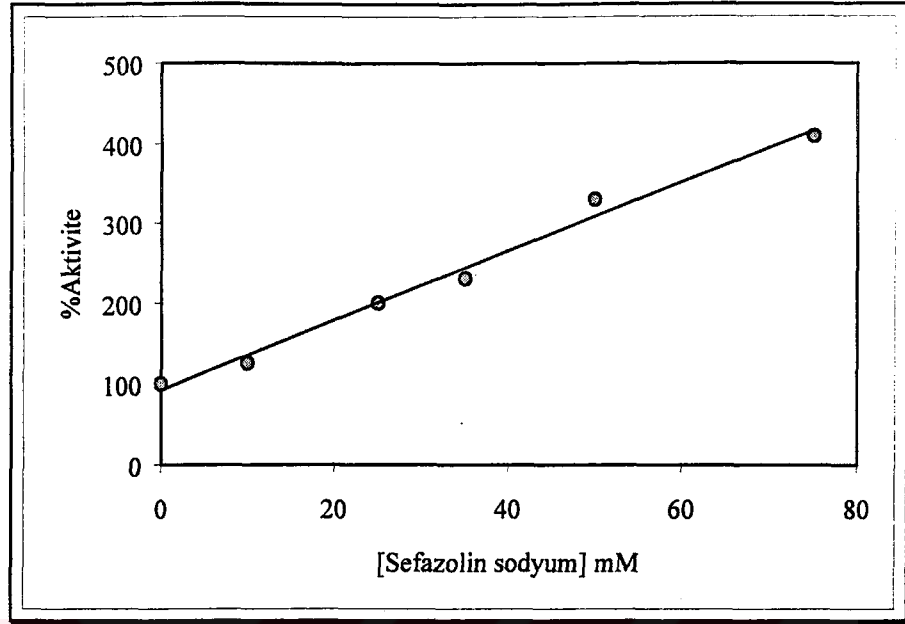
Şekil 4.42. Koyun lens G6PD enzimi için 5 farklı ilaç konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Dorzolamid hidroklorür] grafiği



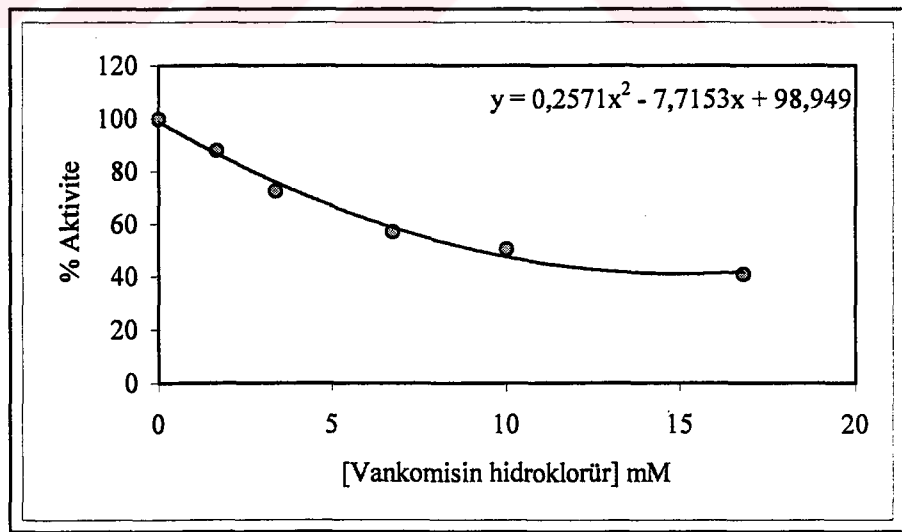
Şekil 4.43. Koyun lens G6PD enzimi için 5 farklı ilaç konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Adrenalin] grafiği



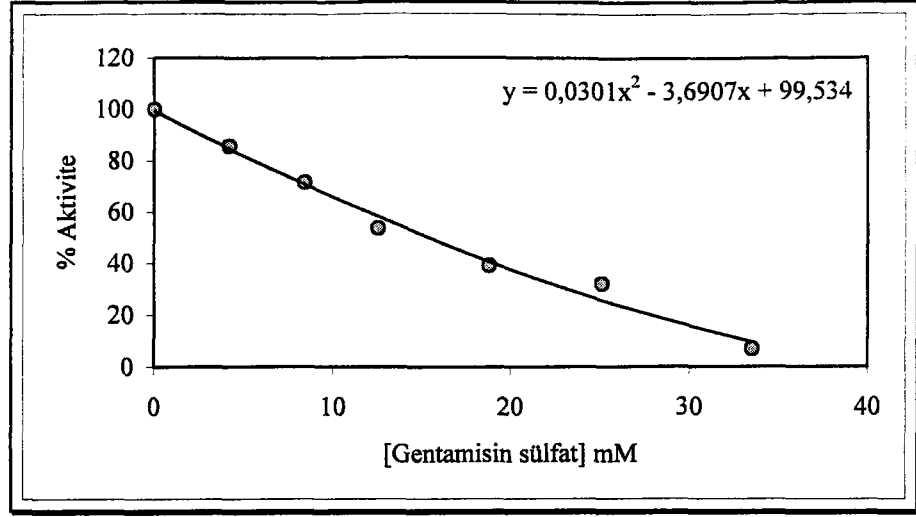
Şekil 4.44. Koyun lens G6PD enzimi için 5 farklı ilaç konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Seftriakson disodyum] grafiği



Şekil 4.45. Koyun lens G6PD enzimi için 5 farklı ilaç konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Sefazolin sodyum] grafiği



Şekil 4.46. Koyun lens G6PD enzimi için 5 farklı ilaç konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Vankomisin hidroklorür] grafiği



Şekil 4.47. Koyun lens G6PD enzimi için 6 farklı ilaç konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Gentamisin sülfat] grafiği

4.2.9. G6PD Enzimini İnhibe Eden İlaçlar İçin K_i Sabitleri Bulunmasına Yönelik Yapılan Çalışmaların Sonuçları

Değişik ilaçların K_i sabitlerinin bulunması için, önce inhibitörsüz ortamda V - $[S]$ değerlerinin bulunması gerekiyordu. Bu amaçla G6PD enziminin substrat konsantrasyonuna bağlı olarak aktiviteleri bulundu. Daha sonra gentamisin sülfat penisilin G potasyum ve amikasin ilaçları için 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda aktiviteler substrat konsantrasyonuna bağlı olarak hesaplandı. $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri hesaplanarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi.

Çizelge 4.44. Koyun eritrosit G6PD enzimi üzerine gentamisin sülfat'ın K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tris-HCl (1M) EDTA (5mM) (μ l)	MgCl ₂ (0,1M) (μ l)	NADP ⁺ (2mM) (μ l)	Enzim Hacmi (μ l)	Saf su (μ l)	Substrat çözeltisi nin hacmi (μ l)	Küvetteki substrat kons (mM)	Küvetteki inhibitör kons (mM)	Toplam Hacim (ml)
250	250	250	50	1690	10	0,024	---	2,5
250	250	250	50	1680	20	0,048	---	2,5
250	250	250	50	1670	30	0,072	---	2,5
250	250	250	50	1650	50	0,120	---	2,5
250	250	250	50	1620	80	0,192	---	2,5
250	250	250	50	1590	10	0,024	3,36	2,5
250	250	250	50	1580	20	0,048	3,36	2,5
250	250	250	50	1570	30	0,072	3,36	2,5
250	250	250	50	1550	50	0,120	3,36	2,5
250	250	250	50	1520	80	0,192	3,36	2,5
250	250	250	50	1390	10	0,024	10,08	2,5
250	250	250	50	1380	20	0,048	10,08	2,5
250	250	250	50	1370	30	0,072	10,08	2,5
250	250	250	50	1350	50	0,120	10,08	2,5
250	250	250	50	1320	80	0,192	10,08	2,5
250	250	250	50	1190	10	0,024	16,80	2,5
250	250	250	50	1180	20	0,048	16,80	2,5
250	250	250	50	1170	30	0,072	16,80	2,5
250	250	250	50	1150	50	0,120	16,80	2,5
250	250	250	50	1120	80	0,192	16,80	2,5

Çizelge 4.45. Koyun eritrosit G6PD enzimi üzerine Penisilin G potasyum'un K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tris-HCl (1M) EDTA (5mM) (μ l)	MgCl ₂ (0,1M) (μ l)	NADP ⁺ (2mM) (μ l)	Enzim Hacmi (μ l)	Saf su (μ l)	Substrat çözeltisi nin hacmi (μ l)	Küvetteki substrat kons (mM)	Küvetteki inhibitör kons (mM)	Toplam Hacim (ml)
250	250	250	50	1690	10	0,024	---	2,5
250	250	250	50	1680	20	0,048	---	2,5
250	250	250	50	1670	30	0,072	---	2,5
250	250	250	50	1650	50	0,120	---	2,5
250	250	250	50	1620	80	0,192	---	2,5
250	250	250	50	1675	10	0,024	4,83	2,5
250	250	250	50	1665	20	0,048	4,83	2,5
250	250	250	50	1655	30	0,072	4,83	2,5
250	250	250	50	1635	50	0,120	4,83	2,5
250	250	250	50	1605	80	0,192	4,83	2,5
250	250	250	50	1655	10	0,024	11,30	2,5
250	250	250	50	1645	20	0,048	11,30	2,5
250	250	250	50	1635	30	0,072	11,30	2,5
250	250	250	50	1615	50	0,120	11,30	2,5
250	250	250	50	1585	80	0,192	11,30	2,5
250	250	250	50	1620	10	0,024	22,58	2,5
250	250	250	50	1610	20	0,048	22,58	2,5
250	250	250	50	1600	30	0,072	22,58	2,5
250	250	250	50	1580	50	0,120	22,58	2,5
250	250	250	50	1550	80	0,192	22,58	2,5

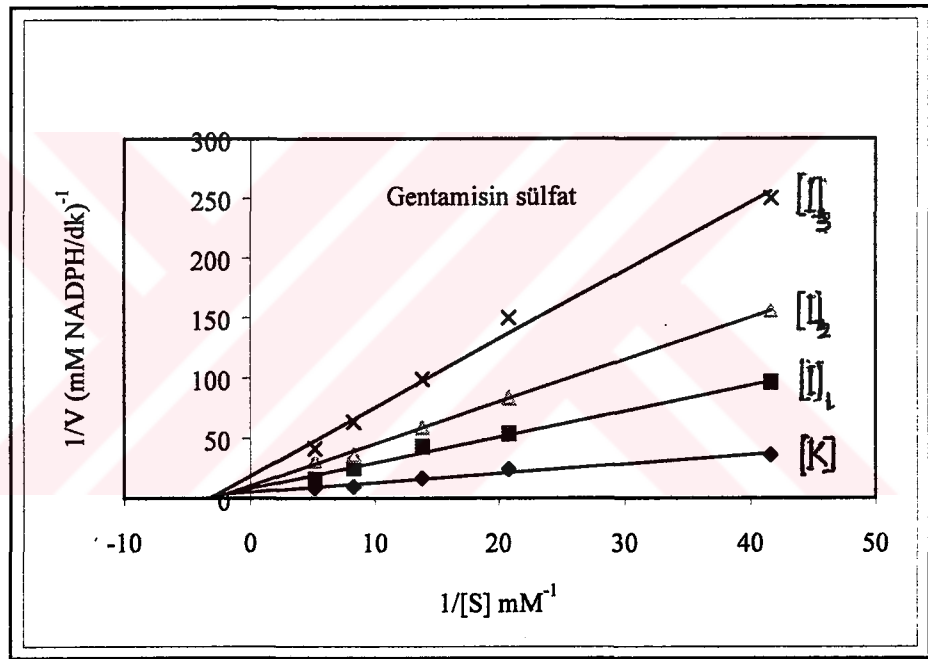
Çizelge 4.46. Koyun eritrosit G6PD enzimi üzerine Amikasin'in K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tris-HCl (1M) EDTA (5mM) (μ l)	MgCl ₂ (0,1M) (μ l)	NADP ⁺ (2mM) (μ l)	Enzim Hacmi (μ l)	Saf su (μ l)	Substrat çözeltisi nin hacmi (μ l)	Küvetteki substrat kons (mM)	Küvetteki inhibitör kons (mM)	Toplam Hacim (ml)
100	100	100	17	663	20	0,12	---	2,5
100	100	100	17	653	30	0,18	---	2,5
100	100	100	17	633	50	0,30	---	2,5
100	100	100	17	623	60	0,36	---	2,5
100	100	100	17	600	83	0,50	---	2,5
100	100	100	17	613	20	0,12	8,54	2,5
100	100	100	17	603	30	0,18	8,54	2,5
100	100	100	17	583	50	0,30	8,54	2,5
100	100	100	17	573	60	0,36	8,54	2,5
100	100	100	17	550	83	0,50	8,54	2,5
100	100	100	17	538	20	0,12	21,20	2,5
100	100	100	17	528	30	0,18	21,20	2,5
100	100	100	17	508	50	0,30	21,20	2,5
100	100	100	17	498	60	0,36	21,20	2,5
100	100	100	17	475	83	0,50	21,20	2,5
100	100	100	17	463	20	0,12	34,16	2,5
100	100	100	17	453	30	0,18	34,16	2,5
100	100	100	17	433	50	0,30	34,16	2,5
100	100	100	17	423	60	0,36	34,16	2,5
100	100	100	17	400	83	0,50	34,16	2,5

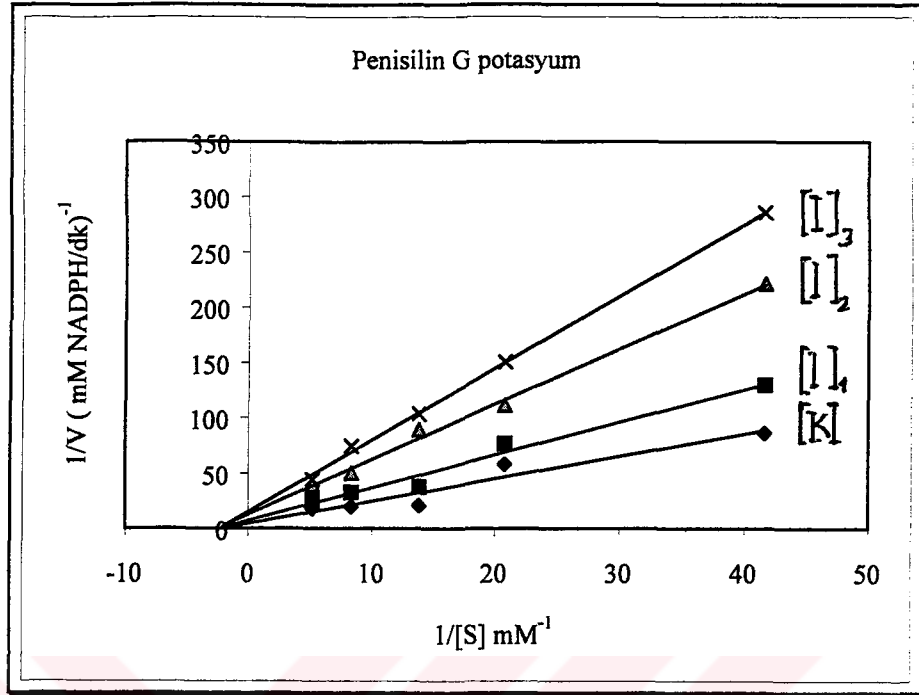
İnhibitör olarak kullanılan ilaçların inhibisyon tipleri nonkompetitiv olduğundan;

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

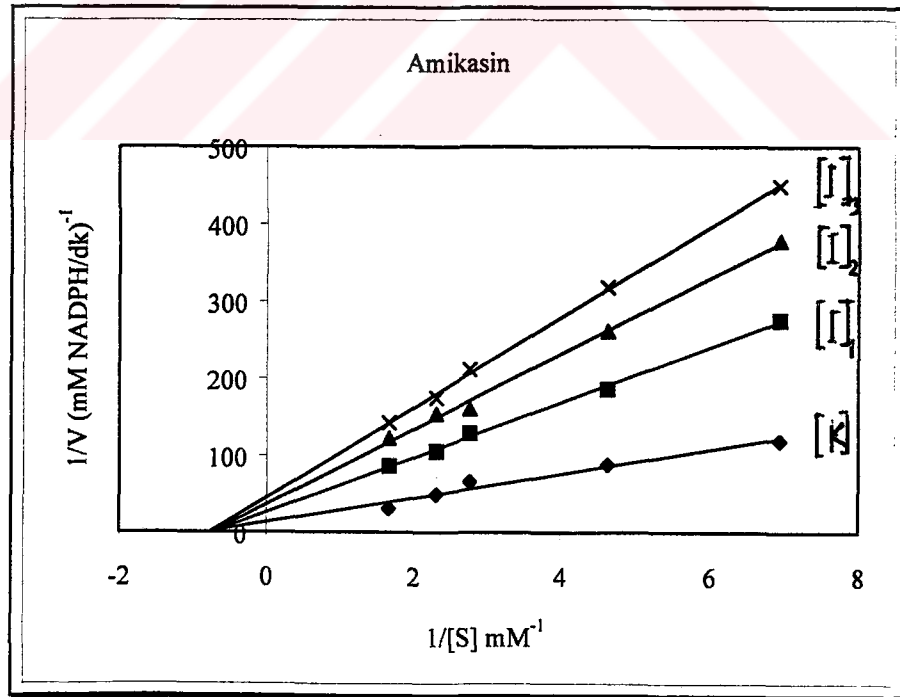
formülü kullanıldı. Elde edilen K_i değerleri çizelge 4.47’de verilmiştir.



Şekil 4.48. Koyun eritrosit G6PD enzimi üzerine Gentamisin sülfat ilacının etkisi $[I_1]= 3,35 \times 10^{-3} \text{ M}$, $[I_2]= 10,08 \times 10^{-3} \text{ M}$, $[I_3]= 16,8 \times 10^{-3} \text{ M}$



Şekil 4.49. Koyun eritrosit G6PD enzimi üzerine Penisilin G potasyum ilacının etkisi $[I_1]= 4,83 \times 10^{-3}$ M, $[I_2]= 11,3 \times 10^{-3}$ M, $[I_3]= 22,57 \times 10^{-3}$ M



Şekil 4.50. Koyun eritrosit G6PD enzimi üzerine Amikasin ilacının etkisi $[I_1]= 8,54 \times 10^{-3}$ M, $[I_2]= 21,2 \times 10^{-3}$ M, $[I_3]= 34,16 \times 10^{-3}$ M

Çizelge 4.47. Koyun eritrositlerinden saflaştırılan G6PD enzimi için 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan K_i değerleri ve inhibisyon tipleri

İnhibitör Cinsi	[I] M	K_i M	Ortalama K_i Değerleri	İnhibisyon Tipi
Gentamisin sülfat	$3,35 \times 10^{-3}$	$1,64 \times 10^{-4}$	$3,08 \times 10^{-4}$ M	Yarışmasız
	$10,08 \times 10^{-3}$	$4,01 \times 10^{-4}$		
	$16,80 \times 10^{-3}$	$3,60 \times 10^{-4}$		
Penisilin G potasyum	$4,83 \times 10^{-3}$	$7,28 \times 10^{-3}$	$7,48 \times 10^{-3}$ M	Yarışmasız
	$11,30 \times 10^{-3}$	$5,89 \times 10^{-3}$		
	$22,57 \times 10^{-3}$	$9,29 \times 10^{-3}$		
Amikasin	$8,54 \times 10^{-3}$	$9,26 \times 10^{-3}$	$12,25 \times 10^{-3}$ M	Yarışmasız
	$21,20 \times 10^{-3}$	$12,80 \times 10^{-3}$		
	$34,16 \times 10^{-3}$	$14,70 \times 10^{-3}$		

5. TARTIŞMA

Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (D-Glukoz 6-fosfat: NADP⁺ oksidoredüktaz, EC 1.1.1.49, G6PD), pentoz fosfat metabolik yolunun ilk basamağını katalizleyen kilit enzimdir (Grunwald and Hill 1976, Çiftçi et al 2001). Hemen hemen tüm memeli dokularında, bitkilerde ve mikroorganizmalarda bulunması, pentoz fosfat yolunun ilk enzimi olması ve enzimin katalizlediği reaksiyonda NADP⁺'nin indirgenmesiyle ürün olarak meydana gelen NADPH'ın birçok indirgeyici biyosentez ve çeşitli detoksifikasyon olaylarında önemli bir fonksiyonunun bulunması enzimin önemini ortaya koymaktadır. Bu sebeple hakkında çok sayıda araştırma mevcuttur. Örneğin tavşan karaciğerinde, fare karaciğerinde, sıçan karaciğerinde, domuz karaciğerinde, insan karaciğerinde, insan eritrositlerinde ve sığır lensi gibi bir çok canlı dokusundan enzim saflaştırılıp karakterize edilmiştir (Hizi and Yagil 1974, Grunwald and Hill 1976, Kanji et al 1976, Shreve and Levy 1977, Ozols 1993, Uluşu et al 1999, Çiftçi et al 2001). Ayrıca bu enzim birçok bakteriden, maydanoz ve lahana gibi halk arasında önemli gıda maddeleri olarak tüketilen bitkilerden de saflaştırılıp karakterize edilmiştir (Çoban et al 2002).

G6PD eksikliği eritrosit hücreleri ve lensi de içine alan tüm dokularda bulunur (Meloni et al 1990). Bu enzimin eksikliği genetik anormallik, yaş ve alınan diete bağlı olabilir (Yüreğir vd 1994, Jaffe and Horwitz 1995). Eritrosit hücrelerinde bir çok enzim eksikliği ile ilgili bilgiler bulunmasına rağmen (Valentine et al 1985, Zanella et al 1989, Valentine and Paglia 1990, Beutler 1995) G6PD eksikliği sadece hematolojik olarak değil, aynı zamanda canlının tüm biyolojisinde en yaygın olarak hala geçerliliğini korumaktadır (Beutler 1994). G6PD eksikliği olan kişilerde kronik hemolizin sebep olduğu komplikasyonlar yüzünden yaşam süresi kısalmır. Bu gün dünyada G6PD enzimi eksikliğinden 400 milyondan daha fazla insan etkilenmektedir. Bu enzimin bu güne kadar dünyada yaklaşık 400, Türkiye'de ise 20'ye yakın varyantı tespit edilmiştir. Türkiyedeki varyantların büyük bir kısmı Çukurova ile Antalya bölgesinde bulunmuştur (Aksoy 1997). G6PD eksikliği lenste de önemli sonuçlar doğurmaktadır. Katarakt ameliyatları artık ışınla gerçekleştirildiğinden direkt olarak insandan göz lensini temin etmek mümkün olmadığından denemeler hayvan lenslerinde gerçekleştirildi. Eritrosit hücreleri ve lens hücreleri arasındaki sitolojik ve metabolik bir

benzerlik, vardır bu nedenle eritrosit hücrelerinde enzim eksikliği olan insanlarda katarakt oluştuğu tespit edilmiştir (Orzalesi et al 1981). Lens hücrelerinde G6PD eksikliği nükleik asit sentezi için gerekli olan ribozların üretiminin azalması ve lens proteinlerinin yenilenmesinin azalmasına yol açar (Glässer 1976). Bu sebeplerden dolayı gözde katarakt riski artar. Orzalesi ve arkadaşlarının farklı yaş gruplarında yaptıkları bir çalışmada, eritrosit hücrelerindeki G6PD eksikliği ile katarakt arasında bir ilişki saptamışlardır, bu çalışmada 40-50 yaş grubunun % 37'si, 51-60 yaş grubunun % 67'si, 61-70 yaş grubunun % 71'inde enzim eksikliğinden dolayı meydana gelen katarakta bağlı körlük tespit edilmiştir (Orzalesi et al 1981). Değişik hastalıklar için kullanılan bazı ilaçlar ve antibiyotikler enzimi inhibe etmektedirler. Özellikle ilaçların kanla temasları lense göre daha çabuk olduğundan enzim eksikliği olan hastalarda hemolitik anemiye sebep olurlar (Beutler 1994).

Görüldüğü gibi G6PD enzimi canlılar için hayati bir önem taşımaktadır ve inhibisyonu durumunda çok ciddi sağlık problemleri ortaya çıkmaktadır. Dolayısıyla yaptığımız bu çalışmanın önemli olduğu açıktır.

G6PD enzimi ilk olarak Warburg ve Christensen tarafından bulunduğundan sonra farklı kaynaklardan değişik yöntemler kullanılarak bir çok kez saflaştırılmıştır (Levy 1979, Bautista et al 1992).

Bu çalışmada koyun eritrosit ve göz lensi G6PD enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılması, karakterizasyonu enzimin bazı kinetik özelliklerinin belirlenmesi ve bazı kimyasal madde ve ilaçların bu enzimler üzerine etkileri belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla öncelikle Erzurum Et ve Balık Kurumu Kombinasından taze koyun kanı ve koyun gözleri temin edildi.

Enzimin saflaştırılması işlemi iki basamakta gerçekleştirildi; i) her iki kaynaktan elde edilen hemolizat ve homojenat numuneleri için ayrı ayrı amonyum sülfat çöktürmesi, ii) her iki kaynaktan elde edilen numuneler için ayrı ayrı afinite kromatografisi. Bütün saflaştırma işlemleri sırasında sıcaklık +4 °C'de tutulması gerektiğinden işlemler soğuk

oda kullanılarak gerçekleştirildi. Böylece sıcaklığın sebep olacağı enzim aktivitesindeki kaybın önüne geçilmiş oldu.

Amonyum sülfat çöktürmesi uzun zamandan beri çeşitli bilim adamları tarafından kullanılan kısmi saflaştırma metodudur. Bu metod vasıtasıyla numune içerisindeki bir çok safsızlıklar elimine edilir ve proteinler daha derişik halde elde edilir. Afinite kromatografisi işleminden önce amonyum sülfat çöktürmesi işleminin yapılması, kromatografi işleminden önce enzimin derişikleştirilmesi açısından da büyük bir öneme sahiptir (Ninfali et al 1990). Bundan dolayı eritrosit hemolizati için % 50-60 ve lens homojenati için % 0-30 aralığında amonyum sülfat çöktürmesi yapılarak bir çok safsızlık uzaklaştırılmış oldu ve enzim derişikleştirildi. şekil 4.2 ve şekil 4.3'de gösterildiği gibi enzim aktivitesi hem eritrosit hemolizati hem de lens homojenati belirtilen doygunluk aralıklarında en yüksektir. Bu şekilde enzim derişik halde elde edilmiş oldu. Ninfali ve Palma tarafından tavşan akciğeri ve dalağında yapılan bir çalışmada G6PD'nin akciğer için % 20-65, dalak için %0-55 amonyum sülfat doygunluğunda çöktüğü belirlenmiştir (Ninfali and Palma 1990). İnsan eritrosit G6PD için tespit edilen çökme aralığı ise (% 35-65) dir (Çiftçi et al 2001). Ayrıca Corpas ve arkadaşları tarafından sıçan karaciğeri ve böbrek-korteks sitozolünde G6PD enzimi % 40-55 amonyum sülfat doygunluğunda çöktüğü bulunmuştur. (Corpas et al 1995). Bu çalışmada, eritrosit hemolizati ve lens homojenati için bulduğumuz çökme aralıkları bütün bu değerlerden farklı bir aralıktır.

Amonyum sülfat çöktürmesi işleminden sonra elde edilen enzim çözeltisi diyaliz edildi. Böylece enzim çözeltisinden iyonlar uzaklaştırıldı ve kolona tatbik edilecek enzimin kolona tutunması kolaylaştırıldı.

Önceleri G6PD'nin saflaştırılması için CM-selüloz (karboksimetil), DEAE-selüloz (diethylaminoetil) ile yapılan kolon kromatografisi yöntemleri kullanılmıştır (Kuby and Noltmann 1966). Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda, yukarıdaki yöntemlere ilave olarak, jel filtrasyon kromatografisi, hidroksiapatit kolon kromatografisi, etanol çöktürmesi ile ultrasantrifügasyon metodları uygulanmıştır (Nevadan et al 1974, Julian and Reithel 1975, Kerns 1975, Ujita and Kimura 1975). Afinite kromatografisi yöntemi

için ligantların geliştirilmesiyle birlikte G6PD enzimi zaman almadan ve daha iyi bir yüzde verimle saflaştırılabilmektedir (Flora et al 1975). Afinite kromatografisi ile bu enzimin saflaştırılması işleminde çeşitli adsorban materyaller kullanılmaktadır; 8-(6-aminohekzil) amino-2'-fosfoadenozin difosforiboz, 8-(6-aminohekzil) amino-2', 5'-ADP, 8-(6-aminohekzil) amino-NADP⁺, ve N⁶-(6-aminohekzil) amino-2', 5'-ADP materyalleri gibi (Lee 1975). Afinite kromatografisi, çok basamaklı saflaştırma işlemleri esnasında enzim aktivitesinde meydana gelen önemli kayıpları elimine etmek ve enzimi yüksek bir verimle elde etmek için kullanılan en önemli saflaştırma metodudur. Son yıllarda, G6PD enzimi, 2', 5' ADP-Sepharose 4B afinite kromatografisi ile yüksek bir verimle saflaştırılmıştır. Bu yöntem ilk defa Flora ve arkadaşları tarafından ortaya konulmuştur (Ninfali et al 1990). Burada ligant olarak kullanılan materyal G6PD'nin kuvvetli bir inhibitörü olan orto fosfattır.

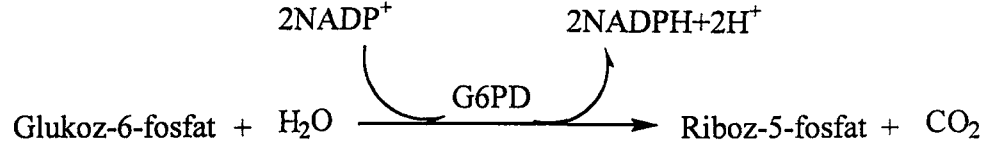
Flora ve arkadaşları G6PD enzimini sırasıyla DEAE-Sephadex, P₁₁ ve 2', 5' ADP-Sepharose 4B afinite kromatografisi olmak üzere; saflaştırma işlemini üç basamakta gerçekleştirmişlerdir (Ninfali et al 1990). Bu üç basamağın uygulama süresi uzun olduğundan dolayı sıcaklığa karşı çok hassas bir enzim olan G6PD aktivitesinde önemli kayıplara yol açmaktadır. Bu sebepten dolayı çalışmamızda ilk iki basamak yerine amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı ve elde edilen derişik enzim çözeltisi 2', 5' ADP-Sepharose 4B afinite kolonuna uygulandı. Böylece çizelge 4.3 ve çizelge 4.4'de gösterildiği 7-8 saat gibi daha kısa bir sürede spesifik aktivitesi 4,64 (EU/mg) olan koyun eritrosit G6PD enzimini % 37,1 verimle, 1189,74 kat; ve spesifik aktivitesi 7,8 (EU/mg) olan koyun göz lensi G6PD enzimini % 66,8 verimle, 10.400 kat saflaştırıldı. 114,7 (EU/mg) spesifik aktivitesine sahip insan eritrosit G6PD enzimi % 28 verimle 13.654 kat (Çiftçi et al 2000); 20,862 (EU/mg) spesifik aktivitesine sahip tavuk eritrosit G6PD enzimi % 54.68 verimle 9,150 kat (Yılmaz et al 2002); 1,24 (EU/mg) spesifik aktivitesine sahip domuz karaciğer G6PD enzimi % 40 verimle 1000 kat (Kanji et al 1976); 2,64 (EU/mg) spesifik aktivitesine sahip sığır lensinden % 13,7 verimle 19.700 kat (Ulus et al 1999); 130 (EU/mg) spesifik aktivitesine sahip köpek karaciğerinden % 18 verimle 2000 kat (Özer et al 2001). Görüldüğü gibi hem koyun eritrosit hem de lens G6PD'si için elde ettiğimiz spesifik aktivite değerleri domuz karaciğer ve sığır lensi G6PD enzimlerinin spesifik aktivite değerlerinden yüksek ancak insan eritrosit, tavuk

eritrosit ve köpek karaciğer G6PD enzimlerinin spesifik aktivite değerlerinden daha düşüktür. Koyun eritrosit için % verim, insan eritrositlerinden, sığır lensinden ve köpek karaciğerinden elde edilenden daha yüksektir. Tavuk eritrositleri ve domuz karaciğeri için elde edilen % verim ile yakındır. Lensten elde ettiğimiz % verimin bunların hepsinden daha yüksek olduğu görülmektedir. Eritrosit için elde edilen saflaştırma katsayısı insan eritrosit, tavuk eritrosit, sığır lensi G6PD enzimleri için bulunan saflaştırma katsayısı ile karşılaştırıldığında daha küçüktür. Bununla birlikte domuz karaciğer ve köpek karaciğer G6PD enzimleri için elde edilen değere yakındır.

Eritrosit hemolizati ve lens homojenatında, amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen enzim çözeltisinde ve 2', 5' ADP-Sepharose 4B afinite kromatografisinden elüe edilen saf enzim çözeltisinde protein miktarları Bradford yöntemiyle şekil 4.1'de verilen standart grafikten kantitatif olarak belirlendi. Bu yöntemde boya olarak kullanılan Coomassie brilliant blue G-250, negatif bir yüke sahiptir ve protein üzerindeki pozitif yüke bağlanır. Boyanın kırmızı ($\lambda_{\max}= 465 \text{ nm}$) ve mavi ($\lambda_{\max}= 595 \text{ nm}$) formu mevcuttur. Proteinin bağlanması, kırmızı formun mavi forma dönüşümünü sağlar. Birçok protein hemen hemen aynı sonuç eğrilerini verdiği için, yöntem geniş bir kullanım alanına sahiptir. Bu yöntem, az zaman alması, daha az reaktif gerektirmesi ve hassasiyetinin diğer protein tayin metotlarına nazaran daha iyi olması (1-100 μg) sebebiyle avantajlı bir yöntemdir (Bradford 1976).

Afinite kolonundan elüe edilen saf enzim çözeltileri için kalitatif protein tayini yapılamadı. Bunun sebebi ise elüsyon çözeltilerinde NADP^+ bulunduğu ve NADP^+ 'nin 280 nm'de protein absorbansını maskeleyesiydi (Ninfali et al 1990). Bu sebeple alınan her bir elüsyon tüpü için 25 °C'de spektrofotometre'de Beutler'a göre aktivite tayini yapıldı (Beutler 1971). Ayrıca verimi % 10 civarında artırdığından dolayı elüsyon tamponuna EDTA katıldı (Ninfali et al 1990).

Aktivitelerin belirlenmesinde kullanılan yöntem aşağıdaki tepkimeden görüldüğü gibi



Nikotinamidadenin dinükleotidfosfat (NADP⁺)'nin G6P varlığında G6PD tarafından NADPH'a indirgenmesi esasına dayanır. NADPH'ın oluşum hızı G6PD aktivitesine bağlıdır ve spektrofotometrik olarak 340 nm'de absorbanstaki artışın izlenmesi ile belirlenebilir (Beutler 1971).

Enzimlerin saflığını kontrol etmek için sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) yapıldı. Jelde tek bandın gözlenmesi ile koyun eritrositlerinden ve lensinden elde edilen G6PD enzimlerinin saf oldukları ispatlanmış oldu (şekil 4.6).

Koyun eritrositlerinden ve lensinden elde edilen G6PD enzimlerinin optimum pH değerleri 8,0 olarak belirlendi. Literatürde insan eritrositi, sıçan karaciğeri ve kobay lensinden saflaştırılan enzimlerin de optimum pH'ları 8,0 (Kuş 1979), sıçan karaciğer sitoplazmik G6PD'nin optimum pH'sı 7,5, (Zaheer et al 1967) köpek karaciğerinden elde edilen enzimin optimum pH'sı 7,7 (Özer et al 2001), sığır lensi G6PD'sinin optimum pH'sı 7,7 ve 9,6 olmak üzere iki pik olarak (Uluslu et al 1999) tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuç insan eritrositi, sıçan karaciğeri ve kobay lensinden saflaştırılan enzimlerin optimum pH'ları ile benzerlik ve diğer kaynaklardan elde edilen optimum pH'lar dan farklılık göstermektedir.

Koyun eritrosit ve lens G6PD enzimlerinin stabil pH değerleri 1M Tris-HCl tampon çözeltisinde pH= 8,5 olarak tespit edildi (şekil 4.15-4.18). Literatürde, tavuk eritrositlerinden elde edilen G6PD enziminin stabil pH'sının 1M Tris-HCl tampon çözeltisinde pH= 8.0 (Yılmaz et al 2002) olarak tespit etmişlerdir. Literatürde bu enzim için başka stabil pH çalışmasına rastlanmamakla birlikte tavuk eritrositlerinden elde edilen enziminin stabil pH'sı ile bizim elde ettiğimiz koyun eritrosit ve lens G6PD enzimlerinin stabil pH değeri farklılık göstermektedir.

Koyun eritrositlerinden ve lensinden saf olarak elde edilen G6PD enziminin alt birimlerinin molekül ağırlığının saptanmasında SDS-PAGE metodu kullanıldı. şekil 4.6'da verildiği gibi eritrosit ve lens numuneleri ile birlikte standart protein numuneleri SDS-PAGE'de aynı zamanda yürütüldü. log MA-R_f standart grafiği çizildi ve şekil 4.7 verildi. Daha sonra koyun eritrosit ve göz lensi enzim numunelerinin R_f değerleri yardımıyla standart grafikten koyun eritrosit G6PD enziminin alt birim molekül ağırlığı 66.880 Da ve koyun lens G6PD enziminin alt birim molekül ağırlığı 54.957 Da olarak hesaplandı. Koyun eritrositleri ve lensinden elde edilen G6PD enzimlerinin aktif formlarının molekül ağırlıklarının hesaplanması amacıyla Sephadex G-200 jel filtrasyon kromatografisi yapıldı. Kolondan standart proteinler geçirildikten sonra log MA-K_{av} grafiği çizildi ve şekil 4.10'da verildi. Daha sonra koyun eritrosit ve göz lensi enzim numunelerinin K_{av} değerleri yardımıyla standart grafikten enzimlerin molekül ağırlıkları belirlendi. Bu metotla aktif enzimin molekül ağırlığı, koyun eritrosit G6PD'si için 119,662 Da ve lens G6PD enzimi için ise 56.099 Da olarak bulundu. Eritrosit için jel filtrasyon kromatografisi metodu ile bulunan aktif enzimin molekül ağırlığı SDS-PAGE metodu ile bulunan alt birimin MA'sının hemen hemen iki katı olması koyun eritrositinde bulunan enzimin dimer yapıda olduğunu göstermektedir.

Literatürde insan eritrosit G6PD'sinin alt birim MA'sı 59.000 Da ve aktif enzimin MA'sı 120.000 Da (David et al 1977), sıçan karaciğeri G6PD'sinin alt birim MA'sı 64.000 Da ve aktif enzimin MA'sı 130.000 Da (David et al 1977), domuz karaciğeri G6PD'sinin alt birim MA'sı 67.000 Da ve aktif enzimin MA'sı 133.000 Da (Kanji et al 1975) olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre enzimin aktif formu dimerdir ve koyun eritrositleri için çalışmamızda hem SDS-PAGE hem de jel filtrasyon kromatografisi yöntemleriyle bulduğumuz sonuçları desteklemektedir. Koyun lensinden elde edilen G6PD enziminin ise hem SDS-PAGE yönteminde alt biriminin MA'sı hem de jel filtrasyon kromatografisi metodu ile bulunan aktif enzimin molekül ağırlığı birbirine eşit olması bu enzimin koyun göz lensinde monomer yapıda bulunduğunu göstermektedir. Literatürde enzimin aktif şeklinin dimer olduğu savunulmakla birlikte bazı dokularda monomer yapıda bulunmakta ve bu şekilde aktivite göstermektedir.

Örneğin, sığır lensi G6PD enziminin SDS-PAGE ile belirlenen alt birim MA'sı 69.200 ve jel filtrasyon kromatografisi ile yapılan aktif enzimin molekül ağırlığı 62.000 olarak belirlenmiştir, dolayısıyla enzim bir monomerdir (Ulus et al 1999). Bu sonuç çalışmamızda koyun göz lensi G6PD enzimi için hem SDS-PAGE hem de jel filtrasyon kromatografisi yöntemleriyle bulduğumuz sonuçları desteklemektedir.

G6PD enziminin doğal substratı G6P'dir. G6P diğer kullanılan substratlardan daha düşük K_M ve daha yüksek V_{max} 'a sahiptir. Enzimlerin doğal substratı ya da koenzimi yerine aynı deney şartlarında analogları kullanıldığında genellikle enzim aktivitesinin düştüğü gözlenmiştir (Ulus vd 1997).

Çalışmada G6P ve $NADP^+$ için K_M ve V_{max} değerleri Lineveawer-Burk grafikleri yardımıyla bulundu (şekil 4.19-4.22). Eritrosit G6PD enziminde $NADP^+$ için K_M değeri $1,23 \times 10^{-5}$ mM iken; G6P için K_M değeri $3,6 \times 10^{-2}$ olarak hesaplandı (çizelge. 4.13). $NADP^+$ için K_M değeri, G6P için bulunan K_M değeri ile karşılaştırıldığında, enzimin $NADP^+$ 'ye karşı olan afinitesi G6P'ye göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Lens G6PD enziminin $NADP^+$ için K_M değeri $2,23 \times 10^{-1}$ mM iken; G6P için K_M değeri $1,83 \times 10^{-1}$ olarak bulunmuştur (çizelge. 4.14). Bu sonuçlara göre lenste enzimin $NADP^+$ 'ye karşı olan afinitesi G6P'ye yakındır. Özer ve arkadaşları insan plasental G6PD enziminin $NADP^+$ için K_M değerini 20 ± 10 μ M ve G6P için K_M değerini 40 ± 10 μ M olarak tespit etmişlerdir (Özer et al 2001). *Trypanosoma brucei*'den saflaştırılan G6PD enziminin $NADP^+$ 'ye karşı K_M değeri 5,3 μ M ve G6P'ye karşı K_M değeri 138 μ M (Heise and Opperdoes 1999), sıçan yağ dokusunda G6PD enziminin $NADP^+$ 'ye karşı K_M değeri 1,7 mM ve G6P'ye karşı K_M değeri 0,035 mM (Levy 1979), sığır lensi $NADP^+$ 'ye karşı K_M değeri $0,008 \pm 0,002$ mM ve G6P'ye karşı K_M değeri $0,035 \pm 0,013$ (Ulus et al 1999) olarak literatürde verilmiştir. Koyun eritrosit G6PD enzimine karşı $NADP^+$ ve G6P için bulduğumuz K_M değerleri, insan plasental G6PD'si ve *Trypanosoma brucei* G6PD'si için bulunan K_M değerleri ile benzemektedir. Bununla birlikte lens G6PD enziminin $NADP^+$ ve G6P için bulunan K_M değerlerini ise sıçan yağ dokusunda ve sığır lensinden elde edilen K_M değerleri desteklemektedir.

Çalışma için seçilen ilaçlar veteriner hekimler ve Araştırma Hastanesinden göz doktorları ile fikir alışverişinde bulunularak belirlendi. Mümkün olduğu kadar sık kullanılan ilaçlar tercih edildi. Seçilen ilaçların koyun G6PD'si üzerinde etkilerini araştırmış olan hiçbir literatüre rastlanmadı.

Genel olarak ilaç ve kimyasal maddelerin enzimler üzerindeki inhibisyon etkileri I_{50} (enzimin aktivitesini %50 inhibe eden ilaç konsantrasyonu) değeri olarak verilmektedir. Kinetik çalışmalar sırasında enzim aktivitesini inhibe eden ilaç ve kimyasal maddelerin I_{50} değerleri de belirtilmiştir.

Koyun eritrositleri G6PD enzimi üzerinde etkilerini araştırmak üzere 7'si ilaç, 4 tanesi kimyasal madde olmak üzere toplam 11 madde belirlenmiştir. Bu ilaçlardan gentamisin sülfat ($I_{50}= 10,01$ mM), penisilin G potasyum ($I_{50}= 12,83$ mM), amikasin sülfat ($I_{50}= 41,88$ mM) ilaçları ve kimyasal madde olarak NADH ($I_{50}= 2,05 \times 10^{-4}$ mM) koyun eritrositleri G6PD enzimi üzerinde inhibisyon etkisi; ATP, ADP, NADPH kimyasal maddeleri ve ampisilin ilacı kısmi inhibisyon, sefazolin sodyum, sefepim hidroklorür aktivasyon etkisi ve sefotaksim sodyum ilacı da hiçbir etki göstermemiştir. Literatürde insan eritrosit G6PD enzimi aktivitesi üzerinde gentamisin sülfat ($I_{50}= 12$ mM) ilacının etkileri araştırılmış ve bu enzimi inhibe ettiği bulunmuştur (Çiftçi et al 2000). Görüldüğü gibi çalışmamızda gentamisin sülfat ilacı için bulduğumuz I_{50} değeri ile literatürdeki bu değer çok yakındır. Kullandığımız diğer ilaçlar ile ilgili literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanmadı.

Bilindiği gibi I_{50} değeri küçük olan inhibitörün inhibisyon etkisi daha yüksektir. Bu sonuçlara göre kullanılan ilaçların koyun eritrosit G6PD enzimi üzerine inhibisyon etkilerini büyükten küçüğe doğru sıralaması; NADH, gentamisin sülfat, penisilin G potasyum, amikasin şeklindedir.

Koyun lens G6PD enzimi için de 11 ilaç ve 3 kimyasal madde olmak üzere toplam 14 madde belirlenmiştir. Kullanılan ilaçlardan indomethacin ($I_{50}= 0,19$ mM), deksametazon 21-fosfat disodyum ($I_{50}= 3,0$ mM), vankomisin hidroklorür ($I_{50}= 8,0$ mM), gentamisin sülfat ($I_{50}= 15.3$ mM) ve NADH ($I_{50}= 0,21$ mM) koyun lens G6PD

enzimi üzerinde inhibisyon etkisi; ATP ve ADP kısmi inhibisyon, timolol maleat, adrenalin [(-) epinefrin], sefazolin sodyum aktivasyon etkisi; dorzolamid hidrokortür, lomefloxacin, siklopentolat hidroklorür ve seftriakson disodyum ilaçları hiçbir etki göstermemişlerdir. Çalışmamızda kullandığımız ilaçların G6PD enzimi üzerinde etkisi ile ilgili literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Sadece gentamisin sülfat ilacı ile ilgili olarak insan eritrosit G6PD enzimi için I_{50} değeri bulunmuş ($I_{50}= 12 \text{ mM}$) ve bu değer lens G6PD'si için bulduğumuz değere yakın bir değerdir.

Bu sonuçlara göre kullanılan ilaçların koyun lensi G6PD enzimi üzerine inhibisyon etkilerini büyükten küçüğe doğru sıralaması; indomethacin, NADH, deksametazon 21-fosfat disodyum, vankomisin hidroklorür, gentamisin sülfat şeklindedir.

Koyun eritrosit G6PD enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren gentamisin sülfat, penisilin G potasyum, amikasin ilaçları için K_i sabitlerinin belirlenmesi işleminde Lineweaver-Burk grafikleri kullanıldı (Segel 1975, Telefoncu 1986). Sonuçların hassas bulunabilmesi için her inhibitörlü çalışma için 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri elde edilmiştir (şekil 4.48-4-50). Grafik çiziminde Microsoft-Excel programından faydalanılmıştır.

K_i sabiti küçük olan inhibitörün enzime ilgisi büyük olduğundan dolayı enzimin katalitik aktivitesi üzerine inhibisyon etkisinin büyük olacağı bilinmektedir. Koyun eritrosit G6PD enzimi için çizelge 4.47'de verilen K_i değerlerine göre küçükten büyüğe doğru ilaçların sıralanışı; gentamisin sülfat, penisilin G potasyum, amikasin şeklindedir. Bu sonuçlara göre en yüksek inhibisyon etkisine gentamisin sülfat daha sonra da sırasıyla penisilin G potasyum ve amikasin sahiptir. Görüldüğü gibi enzim için bu ilaçlar potansiyel inhibitör olarak görünmektedir. K_i değerlerine göre yapılan bu sıralama I_{50} değerleri ile ilgili yapılan sıralama ile aynıdır. Gentamisin sülfat ilacı için üç sabit inhibitör konsantrasyonunda hesaplanan K_i sabitlerinin ortalaması $0,308 \pm 0.12 \text{ mM}$, penisilin G potasyum için $0,748 \pm 0.17 \text{ mM}$ ve amikasin için $12,253 \pm 2.76 \text{ mM}$ olarak bulundu. Çizilen Lineweaver-Burk grafikleri yardımıyla K_i sabitleri hesaplanarak inhibitörlerin inhibisyon tipleri belirlendi. Buna göre gentamisin sülfat, penisilin G potasyum, amikasin ilaçları enzimi yarışmasız olarak inhibe ettikleri bulundu. Bu

inhibitörler enzimin aktif bölgesi dışında bir bölgeye bağlanarak inhibisyon etkisi gösterirler.

Literatürde G6PD enzimi ile ilgili çok çalışma bulunmasına rağmen koyun eritrosit ve göz lensi ile G6PD aktivitesi üzerinde ilaçların kinetik özelliklerinin araştırılması konusunda çalışmalara rastlanmamıştır. Örneğin, Çiftçi ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, insan eritrositlerinden saflaştırılan G6PD enzimi üzerinde bazı antibiyotiklerin inhibisyon etkileri araştırılmış ve K_i değerleri bulunmuştur. Buna göre gentamisin sülfat insan eritrosit G6PD enzimi için K_i değeri 4.66 mM (yarışmalı) olarak bulunmuştur. (Çiftçi et al 2000). Bu değer bizim bulduğumuz değere yakındır.



Sonuç olarak tez kapsamında yapılan çalışmaların toplu değerleri çizelge 5.1 ve çizelge 5.2'de özetlenmiştir.

Çizelge 5.1. Koyun eritrosit G6PD enzimi için yapılan çalışmaların toplu sonuçları

Optimum pH	8,0 (1 M Tris-HCl)
Stabil pH	8,5 (1 M Tris-HCl)
K_M (NADP ⁺ için) (mM)	$1,23 \times 10^{-5}$
V_{max} (NADP ⁺ için) (EU/ml)	$1,23 \times 10^{-2}$
K_M (G6P için) (mM)	$3,6 \times 10^{-2}$
V_{max} (G6P için) (EU/ml)	$5,9 \times 10^{-2}$
Molekül Ağırlığı Tayini (dalton)	
SDS-PAGE metodu ile	66.880
Jel filtrasyon kromatografisi ile	119.662
İlaç ve Kimyasal Maddeler	
Etki Tarzları	
ATP	Az inhibisyon
ADP	Az inhibisyon
NADPH	Az inhibisyon
Ampisilin	Az inhibisyon
NADH	İnhibisyon, $I_{50} = 2,05 \times 10^{-4}$ mM
Gentamisin sülfat	İnhibisyon, $I_{50} = 10.01$ mM
Penisilin G potasyum	İnhibisyon, $I_{50} = 12.83$ mM
Amikasin sülfat	İnhibisyon, $I_{50} = 41.88$ mM
Sefazolin sodyum	Aktivasyon
Sefepim hidroklorür	Aktivasyon
Sefotaksim sodyum	Etkisiz

Çizelge 5.2. Koyun lens G6PD enzimi için yapılan çalışmaların toplu sonuçları

Optimum pH	8,0 (1 M Tris-HCl)
Stabil pH	8,5 (1 M Tris-HCl)
K_M (NADP ⁺ için) (mM)	$2,23 \times 10^{-1}$
V_{max} (NADP ⁺ için) (EU/ml)	$4,55 \times 10^{-1}$
K_M (G6P için) (mM)	$1,83 \times 10^{-1}$
V_{max} (G6P için) (EU/ml)	$1,54 \times 10^{-1}$
Molekül Ağırlığı Tayini (dalton)	
SDS-PAGE metodu ile	54.957
Jel filtrasyon kromatografisi ile	56.099
İlaç ve Kimyasal Maddeler	
Etki Tarzları	
ATP	Az inhibisyon
ADP	Az inhibisyon
NADH	İnhibisyon, $I_{50} = 0,21$ mM
İndometasin	İnhibisyon, $I_{50} = 0,19$ mM
Deksametazon 21-fosfat disodyum	İnhibisyon, $I_{50} = 3.05$ mM
Vankomisin hidroklorür	İnhibisyon, $I_{50} = 8.0$ mM
Gentamisin sülfat	İnhibisyon, $I_{50} = 15.34$ mM
Timolol maleat	Aktivasyon
Adrenalin [(-) Epinefrin]	Aktivasyon
Sefazolin sodyum	Aktivasyon
Dorzolamid hidroklorür	Etkisiz
Lomefloxacin	Etkisiz
Siklopentolat hidroklorür	Etkisiz
Seftriakson disodyum	Etkisiz

Buna göre bu tez kapsamında, hemen hemen tüm memeli dokularında yaygın bir şekilde bulunan ve bir çok metabolik olayda hayati önem taşıyan NADPH ve riboz 5-fosfat gibi önemli bileşiklerin oluşmasına sebep olan ve pentoz fosfat metabolik yolunun ilk enzimi olan G6PD hem koyun eritrositlerinden hem de göz lensinden afinite kromatografisi ile saflaştırılmış, enzimin karakteristik özellikleri belirlenmiştir. Ayrıca eritrosit ve lenste 25 adet ilaç ve kimyasal maddenin G6PD enzimi üzerinde etkileri araştırılmıştır. Bu ilaç ve kimyasal maddelerden gentamisin sülfat, penisilin G potasyum, amikasin sülfat ve NADH koyun eritrosit G6PD enzimi üzerinde inhibisyon, indomethacin, deksametazon 21-fosfat disodyum, vankomisin hidroklorür, gentamisin sülfat ve NADH koyun lensi G6PD enzimi üzerinde inhibisyon etkisi göstermiştir. Bu tip lens çalışmalarının sağlıklı insan lensi alınamayacağı için insanda yapılması güçtür. Fakat bu ilaçların koyun hastalıklarında da ortak olarak kullanılması insan lens metabolizmasına da ışık tutacaktır.

KAYNAKLAR

- Agrios, G.N., 1997. Plant Pathology. Academic Press, p 212- 213 London.
- Aksoy, K., 1997. Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enziminin yapısı. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları.
- Alicıgüzel, Y., Yücel, G., Özben, T., Aksu, T.A., Tosun, N., Gümşlü, S., ve Yılmaz, R.N., 1989. 2,4-Diklorofenoksiasetik asitin in vitro eritrosit glukoz 6-fosfat dehidrogenaz ve redükte glutatyon üzerine etkisi, Biyokimya dergisi, kongre özel sayı, XIV, 76.
- Anderson, L.E., and Duggan, J.X., 1976. Light Modulation of Glucose 6 phosphate dehydrogenase. Plant Physiol. 58, 135-139.
- Andrews, P., 1964. Biochem. J 91, 222.
- Anonim., 1967. Standardization of procedure for the study of glucose 6-phosphate dehydrogenase. WHO Teach. Rep. Ser. 1,366.
- Atalay, A., ve Aker, A., 1984. Maya glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enziminin dietilnitrozamin tarafından inhibisyonu. Biyokimya dergisi, IX, 3, 71.
- Augusteyn, R.C., 1979. On the possible role of glutathione in maintaining human lens protein sulphhydryls. Exp. Eye Res. 28, 665-671.
- Bautista, J.M., Fuentes, J.M., Dies, A., Merine, G.C., and Soller, G., 1992. Unfolding and trypsin inactivation studies reveal a conformation drift of glucose 6-phosphate dehydrogenase upon binding of NADP⁺. Biochim. Biophys. Acta, 1112, 99-112.
- Bautista, J.M., Mason, P. J., and Luzatto, L., 1992. Purification and properties of human glucose 6-phosphate dehydrogenase made in E. coli. Biochim. Biophys. Acta, 1119, 74-80.
- Beutler, E., 1971. Red cell metabolism manual of biochemical methods. Academic Press, 19, 68 s, London.
- Beutler, E., 1978. Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency, Hemolytic anemia in disorders of red cell metabolism. Plenum Medical Book Company, s. 23-167 New York.
- Beutler, E., 1990. The genetics of glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency. Semin Hematol, 27, 137.
- Beutler, E., 1991. Hematology, McGraw-Hill Book Company, s. 591-612 New York.
- Beutler, E., 1994. G6PD deficiency. Blood, 84, 3613-3636.
- Beutler, E., 1995. Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency and other enzyme abnormalities, in Beutler, E., Lichtman, M.A., Coller, B.S., Kipps, T.J.,(eds). Williams hematology. McGraw-Hill, s. 564 New York.
- Bilgili, C., 1992. Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enziminin köpek karaciğerinden saflaştırılması ve bazı özelliklerinin tanımlanması. Doktora Tezi, Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Bonsignore, A., and De Flora, A., 1972. Regulatory properties of glucose 6-phosphate dehydrogenase. Curr. Top. Cell. Regul, 6, 21-62.
- Bonsignore, A., Fornaini, G., Leoncini, G., Fantoni, A., and Segni, P., 1966. Characterization of leucocyte glucose 6-phosphate dehydrogenase in Sardinian Mutants. J. Clin. Invest, 45, 12-16.

- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72, 248.
- Cacciapuoti, A.F., and Lessie, T.G., 1977. Characterization of the fatty acid-sensitive glucose 6-phosphate dehydrogenase from *Pseudomonas Cepacia*. *Journal of Bacteriology*, 555-563.
- Cappellini, M.D., Tavazzi, D., Martiner Di Monstemuros, F., Sampietro, M., Gaviraghi, A., Carandini, D., and Fiorelli, G., 1993. Alternative splicing of human G6PD messenger RNA in K562 cells but not in cultured erythroblast. *Eur. J. Clin. Invest.* 23, 188-191.
- Champe, P.C., Harvey, R.A., 1997. *Biyokimya (From Lippincott's Illustrated Reviews). Nobel Tıp Kitapevleri*, 2.Edition, 111-7.
- Chang, H.L., Holten, D., and Karin, R., 1979. Distribution of the multiple molecular forms of glucose 6-phosphate dehydrogenase in different physiological states. *Can. J. Biochem.* 57, 396.
- Cheng, H.M., and Chylack, L.T., 1977. Regulation and stabilization of lens glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Exp. Eye. Res.* 24, 459-466.
- Corpas, F.J., Garcia-Salguero, L., Peragón, J., and Lupiáñez, J.A., 1995. Kinetic properties of hexose-monophosphate dehydrogenases. I. Isolation and partial purification of glucose 6-phosphate dehydrogenase from rat liver and kidney cortex. *Life Sciences.* 56, 179-189.
- Coulibaly, FH., Koffi, G., Touré, H.A., Bouanga, J-C., Allangba, O., Tolo, A., Sawadogo, D., Sanogo, I., Konaté, S., Préhu, C., Sangaré, C., and Galacteros, F., 2000. Molecular genetics of glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency in a population of newborns from Ivory Coast. *Clinical Biochemistry*, 33, 411-413.
- Çiftçi, M., Bilici, D., and Küfrevioğlu, Ö.İ., 2001. Effects of melatonin on enzyme activity of glucose 6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes *in vitro* and from rat erythrocytes *in vivo*. *Pharmacol Res.* 44, 7-11.
- Çiftçi, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., Gündoğdu, M., Özmen, İ., 2000. Effects of some antibiotics on enzyme activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. *Pharmacol Res.* 41, 109-113.
- Çiftçi, M., Özmen, İ., Büyükkuroğlu, M.E., Pençe, S., and Küfrevioğlu, Ö.İ., 2001. Effects of metamizol and magnesium sulfate on enzyme activity of glucose 6-phosphate dehydrogenase from human erythrocyte *in vitro* and rat erythrocyte *in vivo*. *Clinical Biochemistry.* 34, 297-302.
- Çoban, A.K., Çiftçi, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2002. Purification of glucose 6-phosphate dehydrogenase from parsley (*petroselinum hortense*) leaves and investigation of some kinetic properties. *Preparative Bipochemistry and Biotechnology. Baskıda*

- David S, Shreve and Levy, H.Richard., 1977. On the molecular weight of human glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 78, 1369-1375.
- Delgado, C.M., Cristina Tejedor and Jose Luque., 1990. Partial purification of glucose 6-phosphate dehydrogenase and phosphofructokinase from rat erythrocyte haemolysate by partitioning in aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography*, 498, 159-168.
- Deutsch, J., 1983. *Methods of Enzymatic Analysis*, 3, 190-196.
- Dikmen, N., ve Yüreğir, T.G., 1989. Kordon Kanından izole edilen galaktoz 6-fosfat kullanımı ile ilginç iki glukoz 6-fosfat dehidrogenaz varyantı. *Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 14, 212-219.
- Donald, D., Town, M., Mason, P., Vulliamy, T., and Luzzatto, L., 1991. Deficiency in red blood cells. *Nature*, 350, 115.
- Dwivedi, R.S., and Pratap, V.B., 1987. Alteration in glutathione metabolism during cataract progression. *Ophthalmic Res.* 19, 41-44.
- Fickenscher, K., and Scheibe, R., 1986. Purification and properties of the cytoplasmic glucose 6-phosphate dehydrogenase from pea leaves. *Biophysics*, 247, 393-402.
- Flora, A., Morelli, A., Benatti, U., and Giuliano, F., 1975. An improved procedure for rapid isolation of glucose 6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 169, 362-363.
- Fresht, A., 1999. *Structure and Mechanism in protein science*. W.H. Freeman and Company, s. 166 New York.
- Gilbert, H.F., 1992. *Basic Concepts in Biochemistry*, Mc Graw-Hill Inc, p.81, Germany.
- Glässer, D., 1976. cited by Ohrloff C, Bous F, Hockwin O. Competition of glucose 6-phosphate dehydrogenase enzyme of bovine lenses. *Doc Ophthalmol.* 8, 177-83.
- Glock, G.E., and McLean, P., 1954. Levels of enzymes of the direct oxidative pathway of carbohydrate metabolism in mammalian tissues and tumors. *Biochem. J.* 56, 171-5.
- Gordon, G., Mackow, M.C. and Levy, H.R., 1995. On the mechanism of interaction of steroids with human glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 318, 25-29.
- Gözükara, E., 1989. *Enzimler. Biyokimya. Ofset Repromat Ltd.Şti.*, s 572-576, Ankara.
- Grigor, M.R., 1984. Multiple molecular forms of rat mammary glucose 6-phosphate dehydrogenase: Proposed role in turnover of the enzyme. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 229, 612-622.
- Grossman, S., Budinsky, R., and Jollow, D., 1995. Dapsone-induced hemolytic anemia: Role of glucose 6-phosphate dehydrogenase in the hemolytic response of rat erythrocytes of N-Hydroxydapsone. *The journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 273, 870-877.
- Grunwald, M., Hill, H.Z., 1976. Characterization of the glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in rat liver mitochondria, *Biochem J.* 159, 683-687.
- Heise, N., and Opperdoes, F.R., 1999. Purification, localisation and characterization of glucose 6-phosphate dehydrogenase of *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 99, 21-32.

- Hirono, A., Kuhl, W., Gelbart, T., Forman, L., Fairbanks, V.F., and Beutler, E., 1989. Identification of the binding domain for NADP⁺ of human glucose 6-phosphate dehydrogenase by sequence analysis of mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 1005.
- Hizi, A., and Yagil, G., 1974. On the mechanism of glucose 6-phosphate dehydrogenase regulation in mouse liver. *Euro J Biochem.* 45, 201-209.
- Iritani, N., Nishimoto, N., Katsurada, A., and Fulunda, H., 1992. Regulation of hepatic lipogenic enzyme gene expression by diet quantity in rats fed a fat-free, high carbohydrate diet. *J. Nutr.* 122, 236.
- Jaffe, N.S., and Horwitz, J., 1995. Textbook of ophthalmology (Podos MS and Yanoff M edit), Times Mirror International Publishers Limited. 3, 7.1-7.9, London.
- Jaques, P.F., Chylack, L.T., Gandy, R.B., and Hartz, S.C., 1988. Antioxidant status in persons with and without senile cataract. *Arch. Ophthalmol.* 106, 337-340.
- Jeffery, J., Persson, B., Wood, I., Bergman, T., Jeffery, R., and Jörnvall, H., 1993. Glucose 6-phosphate dehydrogenase, Structure-function relationships and the pichia jadinii enzyme structure. *Eur. J. Biochem.* 41, 212.
- Julian, G.R., and Reithel, F.J., 1975. Glucose 6-phosphate dehydrogenase from bovine mammary gland. *Methods Enzymol.* Academic Press. s. 183-188 London.
- Kanji, M.I., Toews, M.L., and Carper, W.R., 1976. Glucose 6-phosphate dehydrogenase purification and partial characterization. *The Journal of Biological Chemistry*, 251, 2255-2257.
- Kayaalp, O., 1998. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. 8. baskı, I. ve II. cilt.
- Keha, E.E., ve Küfrevioğlu, Ö. İ., 2000. *Biyokimya*. Aktif Yayınevi, s:344-345, İstanbul.
- Kerns, K.W., 1975. Glucose 6-phosphate dehydrogenase from cow adrenal cortex, Wood, W.A. (ed), *Methods Enzymol.* Academic Press, Inc. Cilt XLI, s 188-196, London.
- Kinoshita, J.H., 1964. selected topics in ophthalmic biochemistry. *Arch. Ophthalmol.* 72, 554-572.
- Kirkman, H.N., and Gaetani. G.F., 1986. Regulation of glucose 6-phosphate dehydrogenase in human erythrocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 261, 4033-4038.
- Kosow, P.D., 1974. Glucose 6-phosphate dehydrogenase of human blood platelets kinetics and regulatory properties. *Arch. Biochem. Biophysics*, 162, 186-193.
- Krebs, H.A., and Eggleston, L.V., 1978. The regulation of pentose phosphate cycle in rat liver, Weber G., *Advances in enzyme regulation*. Pergamon Press Ltd, Cilt. 12 p. 421-433, Oxford.
- Kuby, S.A., and Noltmann, E.A., 1966. Glucose 6-phosphate dehydrogenase (crystalline) from Brewers' yeast. *Methods Enzymol.* Academic Press. s. 116-125 Orlando.
- Kuş, M.S., 1979. Normal senil kataraktlı ve diabetik kataraktlı insan lensi glukoz 6-fosfat dehidrogenazlarının kısmen saflaştırılması ve özelliklerinin karşılaştırılması. Ph. D. Tezi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of Bacteriophage T4, *Nature*, London 227, 680.

- Lee, C., 1975. Glucose 6-phosphate dehydrogenase from mouse. *Methods Enzymol.* Academic Press. s. 252-257 USA.
- Lehninger, A.L., 1993. *Principles of Biochemistry.* Worth Publishers, Inc., 2th Edition p 198-239, New York.
- Levy, H.R., 1979. Glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Adv.Enzymol*, 48, 97-192.
- Levy, H.R., Glucose-6-phosphate dehydrogenases, in: A.Meister (Ed.), *Advan. Enzymol*, 48, New York, John Wiley and Sons, 1979 pp. 97.
- Lukens, J.N., 1993. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and related deficiencies involving the pentose phosphate pathway and glutathione metabolism. *Clinical Hematology*, Lea Febiger, Philadelphia, 1, 1006-1022.
- Luzzatto, L., and Baattistuzzi, G., 1985. Glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Adv.Hum. Genet.* 14, 217-329.
- Maeda, M., Constantoulakis, P., Chen, C.S., Stamatoyannopoulos, G., and Yoshida, A., 1992. Molecular abnormalities of a human glucose 6-phosphate dehydrogenase variant associated with undetectable enzyme activity and immunologically crossreacting material. *Am. J. Hum. Genet.* 51, 386-395.
- Marshall, J.J., 1970. *J. Chromatog* 53, 379.
- Mathews, K.C., and Van Holde, K.E., 1990. *Biochemistry.* The Benjamin/Cummings Publishing Company, s, 493-501, Redwood City.
- Mayes, P.A., 1991. The pentose phosphate pathway, other pathway of hexose metabolism. *Libraire du Libon*, s, 189-198 Beirut.
- Meloni, T., Carta, F., Forteleoni, G., Carta, A., Ena, F., Meloni, GF., 1990. Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency and patients in Northern Sardinia. *American Journal of Ophthalmology.* 110, 661-4.
- Mishara, P.N., and Patnaik, B.K., 1993. Effect of cold stress and starvation on the cerebral glucose 6-phosphate dehydrogenase activity of male garden lizards of three different age groups. *Neurobiol Aging*, 14, 217.
- Morelli, A., Benatti, U., Gaetani, G.F., and De Flora, A., 1978. Biochemical mechanisms of glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75, 4.
- Nevadan, B.H., Hyde, C.M., and Levy, H.R., 1974. Mammary glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 165, 398-406.
- Ninfali, P., Orsenigo, T., Barociani and Rapa, S., 1990. Rapid purification of glucose 6-phosphate dehydrogenase from mammal's erythrocytes. *Preparative Biochemistry*, 20, 297-309.
- Ninfali. P., and Palma. F., 1990. Comparative study on glucose 6-phosphate dehydrogenase from rabbit tissues. *The Journal of Experimental Zoology*, 254, 6-12.
- Ohrloff, C., Bous, F., and Hockwin, O., 1976. Competition for glucose 6-phosphate by enzymes of bovine lenses. *Doc. Ophthalmol.* 8, 177-183.
- Olaniyi, A., Babalona, G., Beetlestone, V.G., and Luzzatto, L., 1976. Genetic variants of human erythrocyte glucose 6-phosphate dehydrogenase. *V. Biol. Chem.* 251, 2993-3002.
- Olive, C., and Levy, H.R., 1975. Glucose 6-phosphate dehydrogenase from *leuconostoc mesenteroides*, Wood. W.A.,(ed), *Methods Enzymol.* Academic Press Inc, Cilt XII, s.196-201 London.

- Orzalesi, N., Fossarello, M., Sorcinelli, R., and Schlich, U., 1984. The relationship between glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency and cataracts in Sardinia. An epidemiological and biochemical study. *Doc Ophthalmol.* 57, 187.
- Orzalesi, N., Sorcinelli, R., and Binaghi, F., 1976. Glucose 6-phosphate dehydrogenase in cataracts of subjects suffering from favism. *Ophthalmol Res.* 8, 192-4.
- Orzalesi, N., Sorcinelli, R., and Guiso, G., 1981. Increased incidence of cataracts in male subjects deficient in glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Arch Ophthalmol.* 99, 69-70.
- Ozols, J., 1993. Isolation and complete amino acid sequence of luminal endoplasmic reticulum glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 5302-5306.
- Özer, N., Aksoy, Y., and Ögüs, H., 2001. Kinetic properties of human placental glucose 6-phosphate dehydrogenase. *The Int. J. of Biochem. & Cell Biol.* 33, 221-226.
- Özer, N., Bilgi, Y., and Ögüs, I.H., 2001. Dog liver glucose 6-phosphate dehydrogenase: Purification and kinetic properties. *The Int. J. of Biochem. & Cell Biol.* 1199, 1-10.
- Pannacciulli, I., Tizianello, A., and Salvidio, E., 1966. L'attività della G6PD e 6PGD dei leucociti, delle piastrine, delle cellule midollari, spleniche, epatiche e di tessuto gastrico in soggetti con eritroenzimopenia familiare. *Boll Soc Ital Biol Sper.* 42, 1552-7.
- Persico, M.G., Viglietto, G., Martini, G., Toniolo, D., Paonessa, G., Moscatelli, C., Dono, R., Vulliamy, T., and Luzzatto, L., 1986. Isolation of human glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) cDNA clones, primary structure of the protein and unusual 5' noncoding region. *Nucleic Acid Res.* 14, 2511-2522.
- Pittalis, S., Montemuros, F.M., Tavazzi, D., and Forelli, G., 1992. Rapid isolation of glucose 6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes by combined affinity and anion-exchange chromatography for biochemical characterization of variants. *J Chromatogr.* 573, 29-34.
- Rathbun, W.B., 1976. Lens glutathione: Metabolism and possible functions. *Doc. Ophthalmol.* 8, 145-152.
- Rawn, J.D., 1989. *Biochemistry*. Burlington, Neil Patterson Publishers, p. 407, North Carolina.
- Reuter, R., Naumann, M., Metz, P., and Kopperschlager, G., 1990. Purification and characterization of glucose 6-phosphate dehydrogenase from *Pseudomonas* W6. *Biomed. Biochim. Acta*, 7, 539-546.
- Schnarrenberger, C., Oeser, A., Tolbert, N.E., 1973. Two isoenzymes each of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in spinach leaves. *Arch. Biochem. Biophys.* 154, 438-448.
- Segel, I. H., 1968. *Biochemical Calculations*. Inc., New York, 403.
- Segel, I. H., C. John Wiley and Sons, 1975. *Enzyme Kinetics*. New York.
- Shannon, W.N., Gover, S., Lam, M.S, Veronica., and Adams, M.J., 2000. Human glucose 6-phosphate dehydrogenase: the crystal structure reveals a structural NADP⁺ molecule and provides insights into enzyme deficiency. *Structure*, 8, 293-303.
- Shreve, D.S., and Levy H.R., 1977. On the molecular weight of human glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Biophys. Biochem. Res. Comm.* 78, 1369-1375.

- Spector, A., 1984. Oxidation and cataract, Nugent, J., Whelan, J., (ed), Human cataract formation. The Pitman Press, Bath, 48-64 s.
- Stryer, L., 1988. Biochemistry. W.H. Freeman and Company, 3th Edition p 233-260, New York.
- Telefoncu, A., 1986. Temel ve Uygulamalı Enzimoloji, Ege Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi yayını (Der) s 59, İzmir
- Telefoncu, A., ve Telefoncu. F., 1989. Glucose 6-fosfat dehidrogenaz aktivitesine Primaquine'in etkisi. Tr.J. of Medical Sciences, 14, 57- 63.
- Thomas, J.H., and Gillham, B., 1983. Wills' Biochemical Basis of Medicine Wright. s, 297-302, London.
- Ujita, S., and Kimura, K., 1975. Glucose 6-phosphate dehydrogenase, vegetative and spore Bacillus subtilis. Methods Enzymol. Academic Press. s. 258-261 USA.
- Ulus, N.N., Kuş, M.S., Acan, N.L., and Tezcan, E.F., 1999. A rapid method for the purification of glucose 6-phosphate dehydrogenase from bovine lens. The Int. J. of Biochem. & Cell Biology, 31, 787-796.
- Ulus, N.N., Kuş, M.S., ve Tezcan, E.F., 1997. Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz: Moleküler ve kinetik özellikleri. Biyokimya Dergisi, 22, 25-33.
- Ünlükurt, I., Aksoy, K., ve Yüreğir, G.T., 1993. Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) enzimi ile eser elementler arasındaki ilişki. Çukurova Ün. Tıp Fak. Dergisi, 2, 141-145.
- Valentine, W.N., and Paglia, D.E., 1990. Erythroenzymopathies and hemolytic anemia: The many faces of inherited variant enzymes. J. Lab. Clin. Med. 115, 12
- Valentine, W.N., Tanaka, K.R., and Paglia, D.E., 1985. Hemolytic anaemias and erythrocyte enzymopathies. Ann. Intern. Med. 103, 245.
- Vulliamy, T.J., D'Urso, M., Battistuzzi, G., Estrada, M., Foulkes, N.S., Martini, G., Calabro, V., Poggi, V., Giordano, R., Town, M, Luzzatto, L., and Persico, G., 1988. Diverse point mutations in the human glucose 6-phosphate dehydrogenase gene cause enzyme deficiency and mild or severe hemolytic anemia. Proc. Natl. Acad. Sci. 85, 5171-5175.
- Walter, G., Niehaus, and T.Conn Mallett., 1994. Purification and characterization of glucose 6-phosphate dehydrogenase from Cryptococcus Neoformans. Biophysics, 313, 304-309.
- Whitaker, JR., 1963. Anal. Chem 35, 1950.
- Wood, T., 1986. Physiological Functions of pentose phosphate pathway. Cell Biochem. and Function, 4, 241-247.
- Yılmaz, H., Çiftçi, M., Beydemir, Ş., and Bakan, E., 2002. Purification of glucose 6-phosphate dehydrogenase from chicken erythrocytes and investigation of some kinetic properties. Preparative Biochemistry and Biotechnology Baskıda.

- Yoshida, A., 1978. Kinetics and molecular abnormalities of human G6PD,(in Glucose 6-phosphate dehydrogenase). Academic Press Inc. Ltd, 41, 347-355 London.
- Yoshido, A., and Huang, I.Y., 1986. Structure of Human Glucose 6-phosphate Dehydrogenase. Academic Pres Inc. Ltd, s. 473-482 London.
- Yüregir, G.T., Aksoy, K., Arpacı, A., Ünlükurt, İ., and Tuli A., 1994. Studies on red cell glucose 6-phosphate dehydrogenase. Evaluation of reference values. Ann Clin. Biochem. 31, 50-55.
- Yüregir, G., Varinli, İ., and Donma, O., 1989. Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency both in red blood cells and lenses of the normal and cataractous native population of Çukurova, the Southern Part of Turkey. Patr I. Ophthalmic Res. 21, 155-7.
- Yüregir, G.T., 1981. Enzimler ve Enzim kinetikleri. Temel Biyokimya., Kemal Matbaası, 1. Cilt, s 148-167, Adana.
- Yüregir, T.G., Aksoy, K., Dikmen, N., ve Ünlükurt, İ., 1988. Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enziminin insan eritrositlerinden kısmi saflaştırılması ve enzimolojik özelliğinin incelenmesi. IX.Ulusal Biyoloji Kongresi, Genel Biyoloji, Nümerik Taksonami ve Kantitatif Ekoloji Paneli bildirileri, 1, 125-130.
- Zaheer, N., Tewari, K.K., and Krishman, P.S., 1967. Mitochondrials of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconic acid dehydrogenase in rat liver. Arch. Biochem. Biophys. 120, 22-34.
- Zanella, A., Colombo, M.B., Rossi, F., Merati, G., and Sirchia, G., 1989. Congenital non-spherocytic haemolytic anaemias. Haematologica, 74, 387.
- Zinkham, W.H., 1961. A deficiency of glucose 6-phosphate dehydrogenase activity in lens from individuals with primaquine-sensitive erythrocytes. Bull Johns Hopkins Hosp. 109, 206-10.

ÖZGEÇMİŞ

1972 yılında Eskişehir'in Merkez ilçesine bağlı Uludere köyünde doğdu. İlk ve orta öğrenimini Hatay'ın Dört Yol ilçesine bağlı Payas nahiyesinde tamamladı. 1991 yılında girdiği Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünü 1995 yılında başarıyla tamamladı. 1995 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimine başladı ve 1998 yılında tamamladı. Eylül 1998-Mayıs 2002 tarihleri arasında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalında Doktora öğrenimini tamamladı.

Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde 1996 yılından beri Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.

Evli ve bir çocuk babasıdır.