

**DIHİDROPİRİMİDİN DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN
AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ İLE KOYUN
KARACİĞERİNDEN SAFLAŞTIRILMASI,
BAZI KİMYASAL MOLEKÜLLER ve METAL
İYONLARININ ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Yasemin CAMADAN

Doktora Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Bilim Dalı

Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

2014

Her hakkı saklıdır

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**DİHİDROPİRİMİDİN DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN AFİNİTE
KROMATOĞRAFİSİ İLE KOYUN KARACİĞERİNDEN
SAFLAŞTIRILMASI, BAZI KİMYASAL MOLEKÜLLER ve METAL
İYONLARININ ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Yasemin CAMADAN

**KİMYA ANABİLİM DALI
Biyokimya Bilim Dalı**

**ERZURUM
2014**

Her hakkı saklıdır



**T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



TEZ ONAY FORMU

**DİHİDROPİRİMİDİN DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ
İLE KOYUN KARACİĞERİNDEN SAFLAŞTIRILMASI, BAZI KİMYASAL MOLEKÜLLER
VE METAL İYONLARININ ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR danışmanlığında, Yasemin CAMADAN tarafından hazırlanan bu çalışma 24/07/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı –Biyokimya Bilim Dalı’nda Doktora tezi olarak **oybirliği/oy çokluğu (5./5.)** ile kabul edilmiştir

Başkan : Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREYİOĞLU

İmza :

Üye : Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

İmza:

Üye : Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

İmza :

Üye : Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

İmza :

Üye : Doç. Dr. Murat ÇANKAYA

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 28 / 08 / 2014 tarih ve 34 / 1084 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU
Enstitü Müdürü

Bu çalışma BAP projesi kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: 2012/145

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

ÖZET

Doktora Tezi

DİHİDROPİRİMİDİN DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ İLE KOYUN KARACİĞERİNDEN SAFLAŞTIRILMASI, BAZI KİMYASAL MOLEKÜLLER ve METAL İYONLARININ ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Yasemin CAMADAN

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Bilim Dalı

Danışmanı: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

Bu çalışmada dihidroprimidin dehidrogenaz (DPD) enzimi ilk defa koyun karaciğerinden %16,7 verimle 402,7 kat saflaştırıldı. Saflaştırma prosedüründe DEAE iyon değişim ve 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi kullanıldı. Enzimin saflığını kontrol etmek ve molekül kütlesini belirlemek için SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı ve tek bant gözlemlendi. Molekül kütlesi koyun karaciğer DPD enzimi için 111 kDa bulundu. Enzim üzerinde yapılan kinetik çalışmalar çerçevesinde optimum pH, optimum iyonik şiddet, optimum sıcaklık, stabil pH sırasıyla 8,0, 0,9 mM, 50°C, 7,5 olarak hesaplandı. Enzimin NADPH substratı için K_M değeri 22,97 μ M, V_{max} değeri 0,17 EÜ/ml ve urasil substratı için K_M değeri 17,46 μ M, V_{max} değeri 0,14 EÜ/ml olarak bulundu. Ayrıca essitalopram, fluoksetin, mirtazapin, haloperidal antidepresan ve propofol, 2,6-di-tert-bütilfenol, 2,6-dimetilfenol, lidokain anestezik moleküllerin enzim üzerine *in vitro* etkileri araştırıldı. Buna ilaveten enzim aktivitesi üzerine Ag^+ , Cu^{+2} , Ni^{+2} , Zn^{+2} , Co^{+2} , Fe^{+3} , Cr^{+2} , Cd^{+2} ve Pb^{+2} gibi metal iyonlarının *in vitro* etkileri incelendi. Bütün etken molekülleri ve metal iyonları için IC_{50} değerleri hesaplandı.

2014, 107 sayfa

Anahtar Kelimeler: Dihidroprimidin dehidrogenaz, saflaştırma, inhibisyon

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

PURIFICATION OF DIHYDROPYRIMIDINE DEHYDROGENASE ENZYME FROM SHEEP LIVER BY AFFINITY CHROMATOGRAPHY AND INVESTIGATION OF THE EFFECT OF SOME CHEMICAL MOLECULE AND METAL IONS

Yasemin CAMADAN

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

Supervisor: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

In this study, dihydropyrimidine dehydrogenase enzyme (DPD) was in first purified from sheep liver with a yield of 16.7% and 402.7 purification fold. DEAE ion exchange and 2',5'-ADP Sepharose 4B affinity chromatography were used for purification procedures. In order to check the purity of molecular mass of DPD, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis was performed and a single band was observed. Molecular mass the enzyme was 111 kDa for sheep liver DPD. Within the framework of kinetic studies on the enzymes; optimum pH, ionic strength, optimum temprature and stable pH were performed and calculated as 8.0, 0.9 mM, 50°C, 7,5 respectively. K_m and V_{max} values for the NADPH substrat for enzyme were found as 22,97 μ M, 0,17 EÜ/mL respectively. 17,46 μ M, 0,14 EÜ/mL for the uracil substrat of the enzyme. Also, *in vitro* effects of antidepressant molecules including of escitalopram, fluoxetine, mirtazapine, haloperidal antidepressant molecules and anesthetic molecules including of propofol, 2,6-di-tert-butylphenol, 2,6-dimethylphenol, lidocaine on the enzyme were investigated. In addition, *in vitro* effects of Ag^+ , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , Cr^{2+} , Cd^{2+} ve Pb^{2+} ions on the enzyme activity were determined. Also, IC_{50} values for each active molecule and metal ion were calculated.

2014, 107 pages

Keywords: Dihydropyrimidine dehydrogenase, purification, inhibition

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışma Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof.Dr. Hasan ÖZDEMİR yönetiminde Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Tezimin deneysel kısmından yazım safhasına kadar ilgi ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR’e en derin minnet ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarımın bütün safhalarında bölümün bütün imkânlarını benden esirgemeyen Kimya Bölüm Başkanlığına, Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREYİOĞLU’na, Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN’e, Eğitim Fakültesi öğretim üyelerinden Sayın Doç. Dr. Ahmet Mavi’ye, Bingöl Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ’ye

Çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen, Sayın Yrd. Doç. Dr. Ebru Akkemik’e, Sayın Ramazan KALIN’a, Sayın Zeynep KÖKSAL’a, ayrıca araştırma laboratuvarında çalışan bütün arkadaşlarıma ve Kimya Bölümünün bütün elemanlarına teşekkür ederim.

Tüm yaşamım boyunca her türlü maddi manevi yardım ve desteklerinin yanı sıra göstermiş oldukları sabır ve anlayıştan dolayı anneme ve ablalarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmayı 2012/145’nolu projeyle maddi yönden destekleyen Atatürk Üniversitesi, Bilimsel Araştırmaları Projeleri Koordinatörlüğü’ne teşekkürler ederim.

Yasemin CAMADAN

Temmuz, 2014

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Nükleotitler.....	6
1.2. Dihidropirimidin Dehidrogenaz	13
1.3. 5-Floraurasil	20
1.5. DPD'nin Bilinen İnhibitörleri	22
1.6. DPD Üzerine Çalışılacak Moleküller	24
1.6.1. Antidepresan moleküller	24
1.6.1.a. Essitalopram ve fluoksetin.....	26
1.6.1.b. Mirtazapin	26
1.6.1.c. Haloperidal	27
1.6.2. Anestezik moleküller.....	28
1.6.2.a. Genel anestezik ilaçlar.....	28
1.6.2.b. Lokal anestezik moleküller	29
1.6.3. Ağır metaller.....	30
2. KAYNAK ÖZETLERİ	36
2.1. Çalışmanın Amacı	45
3. MATERYAL ve METOTLAR.....	47
3.1. Materyal.....	47
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	47
3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar.....	47
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması	48
3.2. Yöntem	53
3.2.1. Protein tayini	53

3.2.1.a. Kalitatif protein tayini	53
3.2.1.b. Bradford yöntemiyle protein tayini	53
3.2.2. Koyun karaciğeri DPD enziminin aktivite ölçümü	54
3.2.3. Koyun karaciğeri DPD enziminin saflaştırma çalışmaları	55
3.2.3.a. Koyun karaciğer DPD enzimi için homojenat hazırlanması	55
3.2.3.b. Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz.....	56
3.2.3.c. 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonunun hazırlanması ve paketlenmesi..	57
3.2.3.d. Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu	57
3.2.3.e. Asetik asit çöktürmesi	58
3.2.3.f. DEAE-Selüloz anyon değişim kolonunun hazırlanması ve kolonun paketlenmesi.....	58
3.2.3.g. DEAE-Selüloz iyon değişim kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu	59
3.2.3.h. Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu	59
3.2.4. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının belirlenmesi	59
3.2.5. Koyun karaciğer DPD enziminin karakterizasyon çalışmaları	61
3.2.5.a. DPD enzimi için optimum pH çalışmaları	61
3.2.5.b. DPD enzimi için optimum iyonik şiddet çalışmaları	61
3.2.5.c. DPD enzimi için optimum sıcaklık çalışmaları	61
3.2.5.d. DPD enziminin stabil pH çalışmaları.....	62
3.2.5.e. DPD enzimi için K_m ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik çalışmalar	62
3.2.5.f. Çeşitli ilaçların etken maddelerinin ve metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi	62
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	63
4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik.....	63
4.2. Amonyum Sülfat Çöktürmesi.....	63
4.3. Koyun Karaciğerinden Saflaştırılan Dihidropirimidin Dehidrogenaz Enziminin Saflaştırılması Çalışmaları İle İlgili Sonuçlar	64
4.3.1. Koyun karaciğer dihidropirimidin dehidrogenaz enziminin saflaştırılma basamakları	64
4.3.1.a. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi sonuçları.....	65

4.3.2. İkinci yöntemle koyun karaciğer dihidropirimidin dehidrogenaz enziminin saflaştırılma basamakları.....	67
4.3.2.a. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının belirlenmesi.....	68
4.4. Koyun Karaciğerden Saflaştırılan DPD Enziminin Enziminin Karakterizasyon Çalışmaları ile İlgili Sonuçlar	69
4.4.1. Koyun Karaciğer DPD enzimi için optimum pH çalışma sonuçları	69
4.4.2. Koyun karaciğer DPD enziminin optimum iyonik çalışma sonuçları.....	70
4.4.3. Koyun karaciğer DPD enziminin optimum sıcaklık çalışma sonuçları	71
4.4.4. Koyun karaciğer DPD enzimi için stabil pH çalışma sonuçları	73
4.4.5. Koyun karaciğer DPD enziminin K_m ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik çalışma sonuçları.....	74
4.5. Koyun karaciğerden saflaştırılan DPD enziminin aktivitesi üzerine bazı antidepresan-anestezik moleküllerin ve metal iyonlarının etkilerinin belirlenmesine ait çalışma sonuçları	76
4.5.1. Koyun karaciğerden saflaştırılan DPD enziminin aktivitesi üzerine bazı antidepresan ve anestezik moleküllerin etkilerinin belirlenmesine ait çalışma sonuçları.....	76
4.5.2. Koyun karaciğer DPD enziminin aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkilerinin belirlenmesine ait çalışma sonuçları.....	84
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	95
KAYNAKLAR	103
ÖZGEÇMİŞ	108

SİMGELER DİZİNİ

CM	: Karboksimetil
DEAE	: Dietilaminoetil
UTP	: Üridin trifosfat
GTP	: Guanozin trifosfat
AMP	: Adenozin monofosfat
CTP	: Sitidin trifosfat
PRPP	: Fosforibozil pirofosfat
dADP	: Deoksiadenozin monofosfat
GTP	: Guanidin trifosfat
dGTP	: Deoksiguanozin trifosfat
dATP	: Deoksiadenozin trifosfat
dTTP	: Deoksitimidin trifosfat
UDP	: Uridin difosfat
CDP	: Sitidin difosfat
GDP	: Guanozin difosfat
ADP	: Adenozin difosfat
dUTP	: Deoksiüridin trifosfat
dCTP	: Deoksisitidin trifosfat
dTMP	: Deoksitimidilat
dUMP	: Deoksiüridin monofosfat
THF	: Tetrahidrafolat
DHF	: Dihidrofolat
5-FU	: 5-floraurasil
CPS II	: Karbamoil fosfat sentaz II
ADP	: Adenozin difosfat
FAD	: Flavin adenin dinükleotid
FMN	: Flavin mononükleotid
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat

TP	: Timidin fosforilaz
OPRT	: Oratat fosforibozil transferaz
UP	: üridinUridin fosforilaz
FdUMP	: 5-Floradeoksi
MTHF	: 5-10 metilen tetrahidrofolat
FUMP	: 5-Florauridin monafosfat
FUR	: 5-Florauridin
CMP	: Sitidin monofosfat
UMP	: Üridilat
CTP	: Sitidilat
FBAL	: α -flora- β -alanin
FUPA	: Flora- β -üreydopropionat
DHFU	: Dihidrofloraurasil
SDS	: Sodyum dodesilsülfat
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
PBMN	: Periferal mononükleer kan hücreler

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Afinite kromatografisinin genel prensibi.....	5
Şekil 1.2. Pirimidin halkasının oluşum şekli	7
Şekil 1.3. Pirimidin de nova sentez yolu şekli	9
Şekil 1.4. Pirimidin katabolizması	12
Şekil 1.5. Urasıl, timin ve 5-F-Urasıl metabolizmasının katabolik yolu	14
Şekil 1.6. DPD dimerinin genel görünüşü	15
Şekil 1.7. DPD'nin alt birimi	16
Şekil 1.8. Domain II ve III üç boyutlu şekilleri.	17
Şekil 1.9. FAD bağlı bölge	17
Şekil 1.10. DPD nin kinetik mekanizmasının şeması	19
Şekil 1.11. 5-FU'nun metabolik regülasyonu	22
Şekil 1.12. Essitalopram molekülünün yapısal formülü	26
Şekil 1.13. Fluoksetin molekülünün yapısal formülü	26
Şekil 1.14. Mirtazapin molekülünün yapısal formülü	27
Şekil 1.15. Haloperidal molekülünün yapısal formülü	27
Şekil 1.16. Propofol ve türevlerinin yapısal fomülü	29
Şekil 1.17. Lidokainin yapısal formülü.....	30
Şekil 4.1. Bradford yöntemiyle proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart grafik.....	63
Şekil 4.2. Koyun karaciğer DPD enziminin SDS-PAGE fotoğrafı.	66
Şekil 4.4. Koyun karaciğer DPD enziminin SDS-PAGE fotoğrafı.	68
Şekil 4.5. SDS-PAGE sonucu çizilen log MK-R _f grafiği	69
Şekil 4.6. Koyun karaciğerinden saflaştırılan dihidropirimidin dehidrogenaz enzimi için yapılan optimum pH çalışmasının sonucuna yönelik çizilen Aktivite-pH grafiği.....	70
Şekil 4.7. Değişik konsantrasyonlardaki K-fosfat (pH 8,0) tampon çözeltileri kullanılarak koyun karaciğerden saflaştırılan DPD enzimi için yapılan iyonik şiddet-aktivite grafiği	71

Şekil 4.8. Koyun karaciğerden saflaştırılan DPD enziminin optimum sıcaklığı için sıcaklık aktivite ölçüm sonuçları grafiği	72
Şekil 4.9. Değişik pH'lardaki KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak koyun karaciğer DPD enzimi için elde edilen stabil pH grafiği	73
Şekil 4.10. NADPH substratı için K_M ve $V_{\max}$ bulunmasına yönelik $1/V-1/[\text{NADPH}]$ çizilen Lineweaver-Burk grafiği	75
Şekil 4.11. Urasil için K_M ve $V_{\max}$ bulunmasına yönelik $1/V-1/[\text{Urasil}]$ çizilen Lineweaver-Burk grafiği	75
Şekil 4.12. Koyun karaciğer DPD enzim için essitalopram etken maddesi ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği.....	77
Şekil 4.13. Koyun karaciğer DPD enzim aktivitesi için mirtazapin etken maddesi ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği	78
Şekil 4.14. Koyun karaciğer DPD enzim için fluoksetin etken maddesi ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği.....	79
Şekil 4.15. Koyun karaciğer DPD enzim için haloperidol etken maddesi ile elde edilen Aktivite Konsantrasyon grafiği	80
Şekil 4.16. Koyun karaciğer DPD enzim için 2,6-di-tert-bütilfenol etken maddesi ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği	81
Şekil 4.17. Koyun karaciğer DPD enzim için 2,6-dimetilfenol etken maddesi ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği	82
Şekil 4.18. Koyun karaciğer DPD enzim için 2,6-diisopropilfenol (propofol) etken maddesi ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği.....	83
Şekil 4.19. Koyun karaciğer DPD enzim için lidokain etken maddesi ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği	84
Şekil 4.20. Koyun karaciğer DPD enzim için Ag^+ iyonu ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği	85
Şekil 4.21. Koyun karaciğer DPD enzim için Cu^{+2} nin iyonu ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği	86
Şekil 4.22. Koyun karaciğer DPD enzim için Ni^{+2} nin iyonu ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği	87
Şekil 4.23. Koyun karaciğer DPD enzim için Zn^{+2} iyonu ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği	88

Şekil 4.24. Koyun karaciğer DPD enzim için Co^{+2} iyonu ile elde edilen %Aktivite- Konsantrasyon grafiği	89
Şekil 4.25. Koyun karaciğer DPD enzim için Fe^{+3} iyonu ile elde edilen %Aktivite- Konsantrasyon grafiği	90
Şekil 4.26. Koyun karaciğer DPD enzim için Cd^{+2} iyonu ile elde edilen %Aktivite- Konsantrasyon grafiği	91
Şekil 4.27. Koyun karaciğer DPD enzim için Pb^{+2} iyonu ile elde edilen %Aktivite- Konsantrasyon grafiği	92
Şekil 4.28. Koyun karaciğer DPD enzim için Cr^{+2} iyonu ile elde edilen %Aktivite- Konsantrasyon grafiği	93

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Afinite kromatografisinin en çok uygulandığı biyolojik sistemler.....	6
Çizelge 1.2. DPD'nin bilinen inhibitörleri.....	23
Çizelge 3.1. Koyun karaciğeri DPD enziminin aktivite ölçüm kuvvet içeriği	54
Çizelge 4.1. Koyun karaciğerinden elde edilen DPD enzimi için amonyum sülfat çöktürmesi doygunluk aralığı belirleme sonuçları.....	64
Çizelge 4.2. Koyun karaciğer dihidropirimidin dehidrogenaz enziminin saflaştırma sonuçları.....	65
Çizelge 4.3. Koyun karaciğer dihidropirimidin dehidrogenaz enziminin saflaştırma sonuçları.....	67
Çizelge 4.4. 280 mM K-fosfat tamponu kullanılarak koyun karaciğern saflaştırılan saflaştırılan DPD enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	69
Çizelge 4.5. Koyun karaciğerinden saflaştırılan DPD enziminin optimum iyonik şiddet için K-fosfat (pH 8) tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	71
Çizelge 4.6. Koyun karaciğerinden saflaştırılan DPD enziminin optimum sıcaklığı için sıcaklık aktivite ölçüm sonuçları	72
Çizelge 4.7. Koyun karaciğerinden saflaştırılan DPD enziminin stabil pH'sı için 35 mM KH ₂ PO ₄ kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları (EÜ/ml). .	73
Çizelge 4.8. Koyun karaciğer DPD enzimi için K _M ve V _{max} değerlerinin bulunmasına yönelik NADPH substratı için K _M ve V _{max} değerlerinin bulunmasına yönelik Aktivite-NADPH derişim çizelgesi	74
Çizelge 4.9. Koyun karaciğerden saflaştırılan DPD enziminin urasil substratı için K _M ve V _{max} değerlerinin bulunmasına yönelik Aktivite-urasil derişim çizelgesi	75
Çizelge 4.10. Koyun karaciğerden saflaştırılan DPD enziminin urasil ve NADPH substratları için K _M , V _{max} çalışmaları sonuçları.....	76

Çizelge 4.11. Koyun karaciğerinden saflaştırılan DPD enzim aktivitesi üzerine essitalopram etken maddesi ile yapılan IC ₅₀ çalışmasında kullanılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü.....	77
Çizelge 4.12. Koyun karaciğerinden saflaştırılan DPD enzim aktivitesi üzerine mirtazapin etken maddesi ile yapılan IC ₅₀ çalışmasında kullanılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü.....	78
Çizelge 4.13. Koyun karaciğerinden saflaştırılan DPD enzim aktivitesi üzerine Fluoksetin etken maddesi ile yapılan IC ₅₀ çalışmasında kullanılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü.....	79
Çizelge 4.14. Koyun karaciğerinden saflaştırılan DPD enzim aktivitesi üzerine haloperidol etken maddesi ile yapılan IC ₅₀ çalışmasında kullanılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü.....	80
Çizelge 4.15. Koyun karaciğerinden saflaştırılan DPD enzim aktivitesi üzerine 2,6-di-tert-bütilfenol etken maddesi ile yapılan IC ₅₀ çalışmasında kullanılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü.....	81
Çizelge 4.16. Koyun karaciğerinden saflaştırılan DPD enzim aktivitesi üzerine 2,6- dimetilfenol etken maddesi ile yapılan IC ₅₀ çalışmasında kullanılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü.....	82
Çizelge 4.17. Koyun karaciğerinden saflaştırılan DPD enzim aktivitesi üzerine 2,6-diisopropilfenol (propofol) etken maddesi ile yapılan IC ₅₀ çalışmasında kullanılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü	83
Çizelge 4.18. Koyun karaciğerinden saflaştırılan DPD enzim aktivitesi üzerine lidokain etken maddesi ile yapılan IC ₅₀ çalışmasında kullanılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü.....	84
Çizelge 4.20. Koyun karaciğerinden saflaştırılan DPD enzim aktivitesi üzerine Ag ⁺ iyonu ile yapılan IC ₅₀ çalışmasında kullanılan %Aktivite- Konsantrasyon deney prosedürü	85
Çizelge 4.21. Koyun karaciğerinden saflaştırılan DPD enzim aktivitesi iyonu üzerine Cu ⁺² iyonunun etkisi için yapılan IC ₅₀ çalışmasında kullanılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü.....	86

Çizelge 4.22. Koyun karaciğerinden saflaştırılan DPD enzim aktivitesi üzerine Ni ⁺² iyonunun etkisi için yapılan IC ₅₀ çalışmasında kullanılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü.....	87
Çizelge 4.23. Koyun karaciğerinden saflaştırılan DPD enzim aktivitesi üzerine Zn ⁺² iyonunun etkisi için yapılan IC ₅₀ çalışmasında kullanılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü.....	88
Çizelge 4.24. Koyun karaciğerinden saflaştırılan DPD enzim aktivitesi üzerine Co ⁺² iyonunun etkisi için yapılan IC ₅₀ çalışmasında kullanılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü.....	89
Çizelge 4.25. Koyun karaciğerinden saflaştırılan DPD enzim aktivitesi üzerine Fe ⁺³ iyonunun etkisi için yapılan IC ₅₀ çalışmasında kullanılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü.....	90
Çizelge 4.26. Koyun karaciğerinden saflaştırılan DPD enzim aktivitesi üzerine Cd ⁺² iyonunun etkisi için yapılan IC ₅₀ çalışmasında kullanılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü.....	91
Çizelge 4.27. Koyun karaciğerinden saflaştırılan DPD enzim aktivitesi üzerine Pb ⁺² iyonunun etkisi için yapılan IC ₅₀ çalışmasında kullanılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü.....	92
Çizelge 4.28. Koyun karaciğerinden saflaştırılan DPD enzim aktivitesi üzerine Cr ⁺² iyonunun etkisi için yapılan IC ₅₀ çalışmasında kullanılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü.....	93
Çizelge 4.29. Koyun karaciğer DPD enzimi için ilaç etken maddelerinin IC ₅₀ değerleri.....	94
Çizelge 4.30. Koyun karaciğer DPD enzimi için aktif katyonların IC ₅₀ değerleri	94

1. GİRİŞ

Canlı yaşamının iki temel şartı vardır. Birincisi kendi kendini kopyalayabilmesi, diğeri ise kimyasal tepkileri seçici olarak ve etkili bir şekilde katalizleyebilmesidir. Enzimler katalitik RNA moleküllerinin bir grubu hariç olmak üzere protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir ve canlı organizmadaki kimyasal reaksiyonları hızlandırıp, hiçbir yan ürün olmadan %100'lük ürün verimi sağlarlar (Keha ve Küfrevioğlu 2000; Lehninger 2013).

Protein yapısında olan enzimlerin katalitik aktivitelerini göstermeleri için protein konformasyonunu korumaları gerekir. Birçok enzim katalitik aktivitesini gerçekleştirmek için kofaktör adı verilen küçük moleküllere ihtiyacı vardır. Katalitik olarak aktif olan enzime holoenzim, kofaktörü olmayan enzime ise apoenzim denir. Kofaktörler metaller ve koenzim adı verilen küçük organik moleküller olmak üzere ikiye ayrılır. Vitamin kökenli olan koenzimler enzimlere sıkı veya gevşek bağlanabilir. Koenzim enzime sıkı bağlıysa prostetik grup adını alır. Enzime gevşek bağlanan koenzimler, tıpkı substratlar gibi enzime bağlanır ve ayrılırlar bu yüzden onlara kosubstrat denir (Berg *et al.* 2014).

Enzimler katalizledikleri tepkimenin türüne bağlı olarak altı ana sınıfa ayrılır. (1. Sınıf) Oksiredüktazlar: Elektron aktarımını sağlar (hidrit iyonları veya H atomları). (2. Sınıf) Transferazlar: Grup aktarım tepkimelerini katalizler. (3. Sınıf) Hidrolazlar: Hidroliz tepkimelerini gerçekleştirirler (işlevsel grupların suya aktarımı). (4. Sınıf) Liyazlar: Grupların çift bağlara katılması veya grupların uzaklaşmasıyla çift bağların oluşumunu sağlar. (5. Sınıf) İzomerazlar: Molekül içi grupların aktarımı ile izomerik yapıların oluşumunu gerçekleştirir. (6. Sınıf) Ligazlar: ATP veya benzeri bileşiklerin katkılarıyla gerçekleşen kondensasyon tepkimelerinin yardımıyla C-C, C-S, C-O ve C-N bağlarının oluşumunu sağlar (Lehninger 2013).

Enzimatik reaksiyonların hızını azaltan veya enzimlerin kataliz görevlerini tamamen engelleyen maddelere inhibitör adı verilmektedir. Bu maddeler enzimlere bağlanırlar, substrat gibi hareket etmezler ve ürün oluşturmayan bu maddeler enzimin katalitik görevini yerine getirmesini engellerler. Bu olaya inhibisyon denir. Enzim inhibisyonu doğal veya deneysel olarak enzim aktivitesinin düzenlenme yollarından biridir. Birçok ilaç, spesifik enzimi inhibe ederek etki gösterir. Canlılarda koagülasyon, fibrinoliz, kompleman aktivasyonu, inflamasyon reaksiyonları gibi birçok süreç enzim inhibisyonu ile düzenlenir. Enzim inhibisyonu geri dönüşümsüz ve geri dönüşümlü olmak üzere ikiye ayrılır. Geri dönüşümlü inhibisyonda, inhibitör ortamdan uzaklaştırıldığında enzim aktivitesini yeniden kazanır, geri dönüşümsüz inhibisyonda ise enzim inhibitör tarafından geriye dönüşümsüz olarak inaktif hale getirilir (Gürdöl ve Ademoğlu 2013).

Proteinler kataliz, sinyal iletimi ve yapısal destek gibi neredeyse tüm biyolojik süreçlerde çok önemli görevlerde yer alırlar. Proteinlerin bu alanlardaki işlevleri çok geniş bir aralıkta fazla sayıda molekül ile etkileşimlerine olanak sağlayan kendine özgü üç boyutlu yapısından kaynaklanır. Biyokimyanın temel amacı amino asit diziliminin proteinin üç boyutlu yapısını ve bu sayede işlevini nasıl özgül hale getirdiğini belirlemektir. Ayrıca her bir proteinin substratlarına ve diğer moleküllere özgül olarak nasıl bağlandığını, katalizi nasıl gerçekleştirdiğini, enerjiyi ve bilgiyi nasıl dönüştürdüğünü öğrenmektir. Bu amaçla bir protein ile çalışmalar yapmak için öncelikle bu proteinin hücre içinde yer alan diğer bileşenlerinden ayrılması yani proteinin bulunduğu ortamdan saflaştırılması gerekmektedir. Çünkü proteinler, yapı ve işlevleri ile girişim yapabilecek maddelerin etkisinden uzak tutularak incelenebilir. Proteinler çözünürlük, boyut, yük ve özgül bağlanma afinitesi gibi karakteristik özellikler kullanarak saflaştırılabilir. Genellikle protein karışımlarından her biri farklı bir özelliğin kullanılması temeline dayanan bir seri ayırma işlevine tabi tutulur. Herhangi bir proteinin saflaştırma işleminin ilk basamağı hücreleri parçalayarak protein içeriklerinin ham özüt adı verilen bir çözeltiye aktarmaktır. Saflaştırmadaki her aşamada aktivite ölçülür ve özgül aktivite belirlenir. Çok sayıda saflaştırma tekniği mevcuttur (Lehninger 2013; Berg *et al.* 2014).

Nötral tuzlar düşük konsantrasyonlarda protein moleküllerinin çözünürlüğünü artırır. Bu etkiye salting-in denir. $MgCl_2$ ve $(NH_4)_2SO_4$ gibi iki değerlikli tuzlar, $NaCl$ ve KCl gibi tek değerlikli tuzlardan daha etkilidir. Nötral tuzların bu özelliği, onların iyon şiddetine bağlıdır. Bu iyonlar protein molekülünde yan grupların ayrışmasını modifiye eder. Yüksek tuz konsantrasyonlarında ise bu tuzların doğru miktarlarda eklenmesi sonucu istenilen proteinlerin çözünürlüğü azalır hatta çökerken diğerleri çözeltide kalır. Yüksek tuz konsantrasyonunda hidrasyon suyu protein molekülünden uzaklaştırılır ve çözünürlük azalır. Bu olaya salting out denir. Bu işlem için genellikle $(NH_4)_2SO_4$ tuzu kullanılır. Bu şekilde çöken proteinler santrifüjleme işlemiyle çözelti içinde kalan diğer proteinlerinden ayrılır. Tuz çöktürmesi diğer saflaştırma aşamalarında elde edilen ve aktif kısımları içeren seyreltik protein çözeltilerinin deriştirilmesi için uygundur (Keha ve Küfrevioğlu 2000; Lehninger 2013; Berg *et al.* 2014).

Diyaliz işlemi, gerekli gerekli olduğu durumlarda tuzun uzaklaştırılması için kullanılır. Diyaliz yönteminde proteinler tuz gibi küçük moleküllerden yarı geçirgen bir zar kullanılarak ayrılabilir. Protein karışımı diyaliz torbasının içine yerleştirilir, bu torba da küçük moleküllerin taşınacağı bir tampon çözeltiye içerisine konulur. Diyaliz torbasının gözenek çapından daha büyük boyutlara sahip moleküller diyaliz içerisinde kalır. Daha küçük moleküller ve zarın gözeneklerinden geçebilen iyonlar derişim gradientlerini difüzyon ile azaltarak diyaliz torbasının dışında tampon çözeltide birikirler. Bu teknik tuz ya da diğer küçük moleküllerin hücre kısımlarından uzaklaştırılması için yararlıdır fakat proteinleri etkin bir şekilde birbirinden ayıramaz (Berg *et al.* 2014).

Yüksek saflıkta protein elde etmek için bir saflaştırma aşaması genellikle yeterli değildir. Çünkü, ham özütteki diğer proteinler de ayrılmak istenen proteinle ayrılabilirler. Daha yüksek kalitede saflık için farklı molekül özelliklerine dayanan ve birbirini izleyen ayırma işlemlerinin uygulanması gerekir. Proteinlerin ayrılması için kullanılan en güçlü yöntemlerden biri kolon kromatografisidir. Kolon kromatografisinde proteinler kolonda tutulur, tamponlanmış bir çözelti bu kolondan geçer ve kolonun üstünü kaplayan protein çözeltisi hareketli fazın içinden süzülür. Her

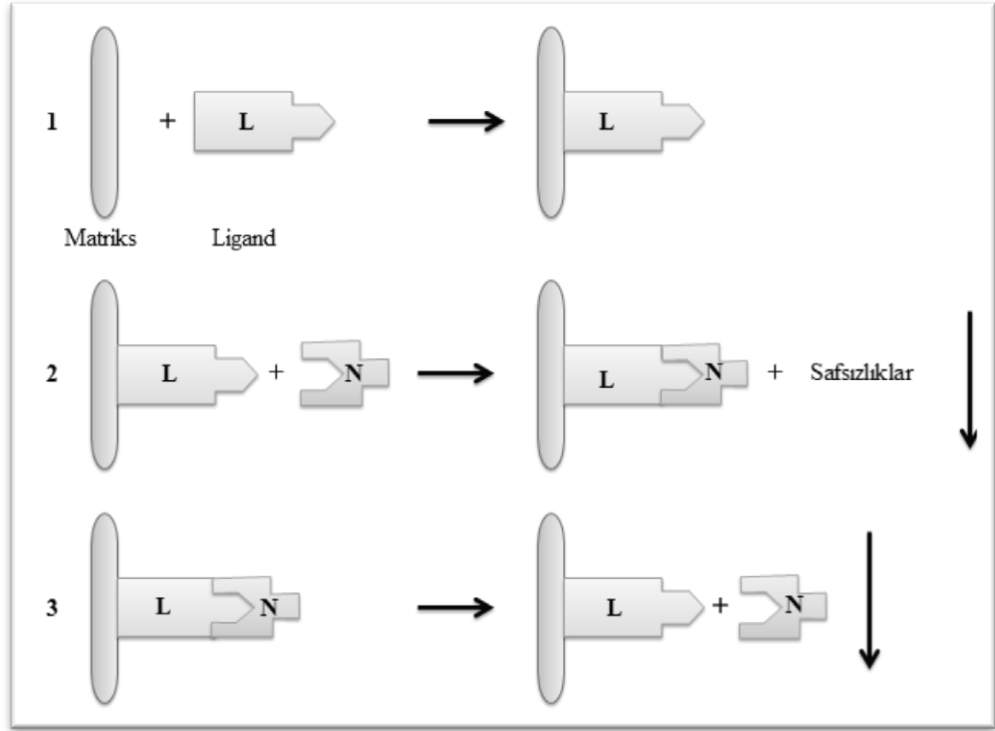
bir protein kendi özelliklerine bağlı olarak hızlı veya yavaş bir şekilde geçer (Lehninger 2013; Berg *et al.* 2014).

İyon-değişim kromatografisinde verilen bir pH'da proteinlerinin net elektrik yükünün işareti ve büyüklüğünden yararlanılır. Kolon matriksi kendisine bağlanmış yüklü grupları içeren sentetik bir polimerdir. Bağlanmış anyonik grupları içeren kolonlara katyon değiştiriciler, bağlanmış katyonik grupları içeren kolonlara da anyon değiştiriciler denir. Pozitif yüklü proteinler (katyonik proteinler) negatif yüklü karboksimetilselüloz (CM-selüloz) kullanılmasıyla, negatif yüklü proteinler (anyonik proteinler) anyon değişimi ile pozitif yüklü dietilaminoetilselüloz (DEAE-selüloz) kolonlar kullanılmasıyla ayrılırlar. Ayrıştırma, bir pH ya da tuz gradienti oluşturularak hareketli fazın pH ve/veya tuz derişiminin kademeli olarak değiştirilmesiyle gerçekleşir. Kolonun uzunluğu artıkça farklı net yüklere sahip iki proteinin ayrışması kolaylaşır fakat protein çözeltisinin kolondan akma hızı kolonun uzunluğuyla ters orantılıdır. Protein içeren çözelti kolondan çıktığı zaman fraksiyonlar toplanır. Herbir fraksiyon istenilen protein varlığı için testler yapılır ve istenilen proteini içeren tüm fraksiyonlar birleştirilebilir (Lehninger 2013; Berg *et al.* 2014).

Afinite kromatografisi bir adsorbsiyon kromatografisidir. Bu kromatografi tekniğinde saflaştırılması istenen molekül bir destek materyaline (matriks), kovalent olarak immobilize edilmiş bir komplementer bağlanma bileşimine (ligant) spesifik ve tersinir bağlanır. Diğer tekniklerle saflaştırılması birçok basamak isteyen, daha fazla zaman gerektiren birçok biyolojik materyal, afinite kromatografisi tekniği ile tek bir basamakta yüksek bir verimle saflaştırılabilir. Yüksek seçicilik ve birbirini etkileyen moleküllerin tabii spesifitesinden dolayı, afinite kromatografisi; kompleks biyolojik karışımlardan maddeleri saflaştırmak için, bazı maddelerin denatüre olmuş şekillerinden tabi şekillerini ayırmak için, büyük miktarlardaki kirleticiyi, küçük miktardaki biyolojik materyallerden ayırmak için kullanılabilir (Axen *et al.* 1967)

Afinite kromatografisinin genel prensibi:

Afinite koromatografisinin genel prensibi Şekil 1.1’de özetlenmiştir.



Şekil 1.1. Afinite kromatografisinin genel prensibi *

*((1)'de ligand matrikse kovalent bağlanır, (2)'de saflaştırılacak numune kolona adsorbe olup, safsızlıklar akar ve (3)'de numune elüe edilir)

Verimli bir ayırım yapabilmek için, biyospesifik ve matrikse kovalent bağlanabilecek bir liganda ihtiyaç vardır. İmobilize edilecek ligandın numune için spesifik bağlama afinitesi olmalıdır. Safsızlıklar kolondan uzaklaştıktan sonra, bağlı numunenin aktif bir şekilde seçimli desorpsiyonu için kullanılabilir bir yöntem bulunması gerekmektedir. Afinite kromatografisinin en sık kullanıldığı biyolojik sistemler Çizelge 1.1’de gösterilmiştir (Axen and Ernback 1971).

Çizelge 1.1. Afinite kromatografisinin en çok uygulandığı biyolojik sistemler

Saflaştırılacak Madde	Ligand
Enzim	Substrat, inhibitör, kofaktör
Antikor	Antijen, virüs, hücre
Lektin	Polisakkarit, glikoprotein, hücre, hücre yüzey reseptörü
Nükleik asit	Komplementer baz dizisi, histon, bağlayıcı protein
Hormon, Vitamin	Reseptör taşıyıcı protein
Hücre	Hücre yüzeyi spesifik proteini, lektin

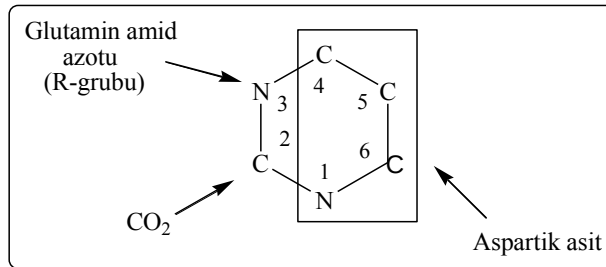
1.1. Nükleotitler

Nükleotitler birçok yaşamsal işlevlerde gerekli olan moleküllerdir. Nükleotitler öncelikle genomun eşlenmesi ve kalıtsal bilginin RNA'ya aktarılması gibi gereken nükleik asitlerin öncülleridir. Ayrıca bir adenin nükleotit olan ATP genel enerji kaynağı olarak kullanılırken, guanin ise GTP'de bazı özel reaksiyonlarda enerji kaynağı olarak işlev görür. UDP-glukoz gibi nükleotit türevleri, glikojen yapımı gibi biyolojik işlemlerde görev alırlar. Nükleotitler aynı zamanda sinyal iletim yollarının temel bileşenleridir. Halkasal AMP ve halkasal GMP gibi yapıya sahip nükleotitler hücreler arasında ve hücreler içinde sinyal taşıyan ikincil mesajcılardır. Sinal yollarında protein kinazlarca fosfat aktarımında fosforil vericisi olarak ATP görev yapar ve bazen sinyal molekülü olarakta salgılanabilir. NAD, FAD, S-adenozilmetiyonin ve koenzim A gibi kofaktörlerin yanısıra UDP-glukoz ve CDP-diaçilgliserol gibi aktifleştirilmiş biyosentetik ara ürünlerin bileşenleridir.

Nükleotidler de nova (yeni) yolları ve kurtarma yolları olmak üzere iki çeşit yolla sentezlenirler. Nükleotitlerin de nova sentezi metabolik öncüller riboz 5-fosfat, CO₂ ve NH₃ ile başlar. Kurtarma yollarında ise nükleotit yıkımından açığa çıkan serbest bazları ve nükleositleri geri kazanır. Pürin ve pirimidin biyosentezinin de novo yolları neredeyse bütün canlı organizmalar için aynıdır. Pürin halka yapısı riboza bağlı olarak

bir veya birkaç atomun yapıya bağlanmasıyla oluşur. Pirimidin halkası ise orotat olarak sentezlenir, riboz fosfata bağlanır ve sonra nükleik asit sentezinde kullanılan ortak pirimidin nükleotidlerine dönüştürülür. Serbest bazlar de novo sentez yollarının ara ürünleri olmasa da kurtarma sentez yollarının ara ürünleridir. Pirimidin ve pürin de novo yollarında bazı önemli öncüller paylaşılır. Fosforibozil pirofosfat (PRPP) ikisi içinde önemlidir. Her iki yolda da bir amino asit önemli bir öncüdür: pürinler için glisin ve pirimidinler içinde aspartat. Glutamin de novo sentez yolağında beş farklı basamakta en önemli amino asit kaynağıdır. Ayrıca pürin yollarındaki iki basamakta aspartat amino grubu kaynağı olarak kullanılır (Lehninger 2013; Berg *et al.* 2014).

Yaygın pirimidin nükleotidleri sitidin ve urasil içeren sitidin-5'-monofosfat (CMP; sitidilat) ve üridin 5'-monofosfat (UMP; üridilat)'tır. Pirimidinlerin de novo sentez yolunda önce halka sentezlenir sonra bir riboz fosfata takılarak pirimidin nükleotit oluşur. Pirimidin halkası bikarbonat, aspartat ve amonyaktan oluşur.

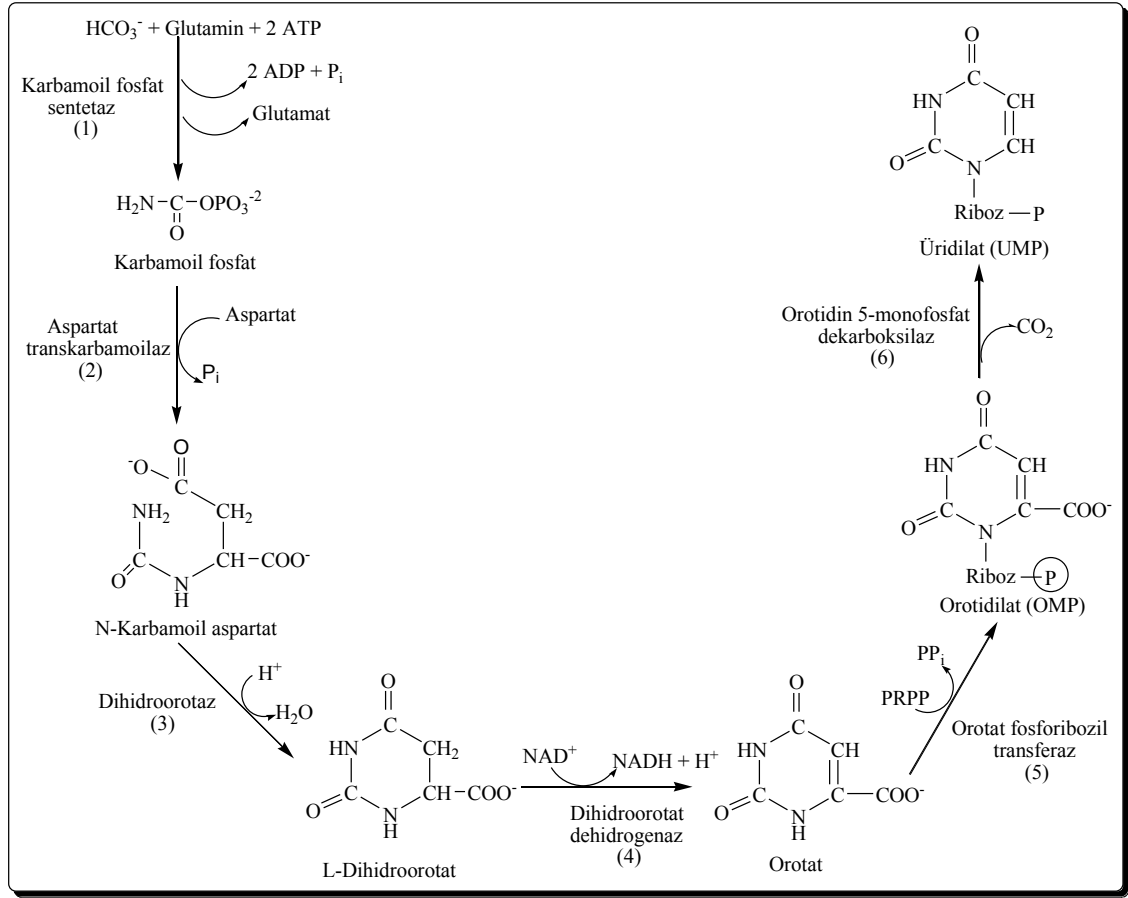


Şekil 1.2. Pirimidin halkasının oluşum şekli

Pirimidin biyosentezinde ilk basamak iki molekül ATP harcanmasını gerektiren çok basamaklı bir reaksiyonlarla bikarbonat ve amonyaktan karbamoil fosfat oluşur. Pirimidin sentezi için gerekli olan karbamoil fosfat sitoplazmada karbamoil fosfat sentaz II (CPS II) aracılığıyla yapılır. Karbamoil fosfat pirimidin sentezinin ilk basamağında N-karbamoilaspartat oluşturmak için aspartatla tepkimeye girer. Bu tepkime aspartat transkarbamoilaz tarafından katalizlenir. Dihidroorotaz enziminin katalizlediği bir tepkimeyle N-karbamoilaspartattan su ayrılır ve pirimidin halkası L-dihidroorotat oluşturmak üzere kapanır. Bu bileşik NAD⁺'nın son elektron alıcısı olduğu

bir tepkimeyle bir pirimidin türevi olan oratata oksitlenir ve orotik asit meydana gelir. Oratayı üreten enzim dihidrooratat dehidrogenaz mitokondri içinde yer almaktadır. Pirimidin biyosentezindeki diğer bütün reaksiyonlar sitozolikdir. Ökaryotlarda bu yolun ilk üç enzimi karbamoil fosfat sentetaz II, aspartat transkarbamoilaz ve dihidroorataz üç işlevli bir proteinin parçalarıdır. Bu protein kısaca CAD olarak bilinir ve her üç tepkime için aktif bölgelere sahip üç benzer polipeptit zincirini içerir.

Oratat oluşuktan sonra 5'-fosforibozal 1-pirofasfat (PRPP) şeklindeki ribozla birleşir. PRPP, pentoz fosfat yolunda oluşan riboz-5-fosfata ATP'den bir pirofosfat grubu takılan 5-fosforil-1-pirofosfat sentetazca oluşturulur. Oratat, PRPP ile tepkimeye girip bir pirofosfatın hidrolizi ile bir pirimidin nükleotiti olan oradilatı oluşturur. Bu tepkimeyi pirimidin fosforiboziltransferaz enzimi katalizler (burada reaksiyonu geri dönüşümsüz kılar). Oradilat dekarboksilazla RNA'nın başlıca pirimidin nükleotit öncülü olan üridilata (UMP) dönüştürülür. Bu tepkimeyi orodilat dekarboksilaz yürütür. UMP'nin fosforillenmesiyle UTP'ye dönüşür. UTP oluşuktan sonra sitidilat sentaz enzimiyle karbonil grubundan amin grubuyla değişmesiyle sitidin trifosfat (CTP) oluşur. (Lippincott 2007; Lehninger 2013; Berg *et al.* 2014).



Şekil 1.3. Pirimidin de nova sentez yolu şekli (Gürdöl ve Ademoğlu 2012)

DNA'nın yapıtaşı olan deoksiribonükleotitler kendilerine karşılık gelen ribonükleotidlerden D-ribozun 2'-karbon atomunun 2'-deoksi türevi oluşturmak üzere doğrudan indirgenmesiyle elde edilir. Örneğin adenosin difosfat (ADP), 2'-deoksiadenosin difosfata (dADP) ve GDP, dGTP'ye indirgenir. Bu reaksiyon ribonükleotit redüktaz tarafından katalizlenir. *E.coli*'de ve ökaryotların çoğunda enzim R1 ve R2 olarak belirlenmiş iki alt birime sahip bir dimerdir. Her R1 alt birimi iki tip düzenleyici bölgeye sahiptir. Bir tipi tüm enzim aktifliğini etkiler ve enzimi aktifleştiren ATP'ye veya enzimi inaktifleştiren dATP'ye bağlanır. İkinci tipi kendisine bağlanan etkileyici moleküle (ATP, dATP, dTTP veya dGTP) yanıt olarak substrat özgüllüğünü değiştirir. ATP veya dATP bağlandığında UDP ve CDP'nin indirgenmesi tercih edilir. dTTP veya dGTP'ye bağlandığında sırasıyla GDP veya ADP'nin indirgenmesi uyarır.

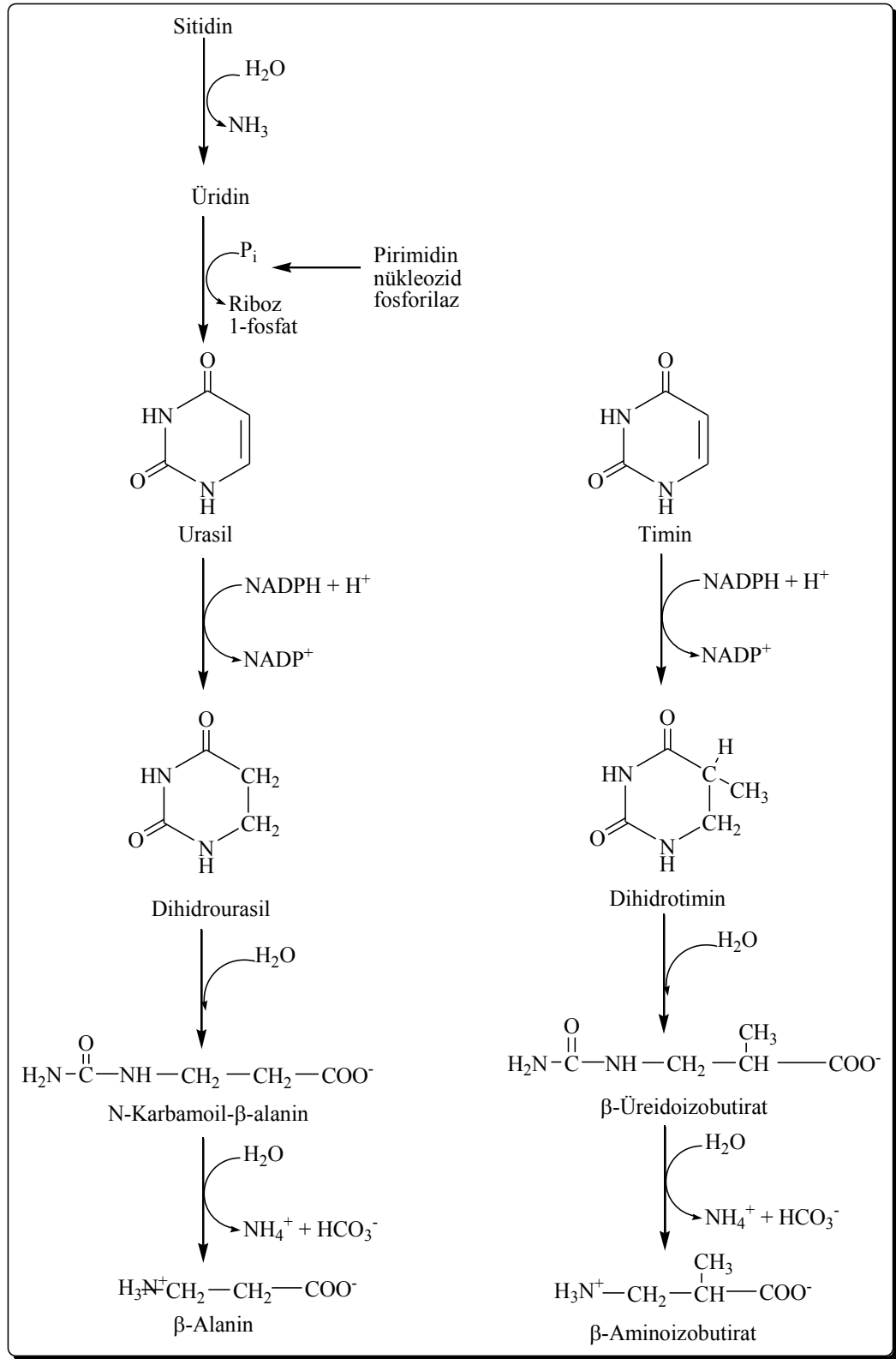
Pirimidin sentez yolağında sentezlenen urasil bir DNA bileşeni değildir. DNA'da urasilin metilenmiş benzeri olan timin bulunur. Bakterilerde dUMP'ye giden yol dUTP oluşumuyla, dCTP'nin deaminasyonu veya dUDP'nin fosforillenmesiyle başlar. Deoksiuridilatın (dUMP) timidilat sentaz tarafından metillenerek timidilata (dTMP) dönüştürülür. Bir nükleotidin metillenmesi onarım için hasarlı DNA'yı işaretleyerek DNA'da saklanan bilginin korunmasına yardım eder. Hidroksimetil (-CH₂OH) oksidasyon düzeyindeki tek karbon birimi N⁵,N¹⁰-metilen tetrahidrofolat'tan dUMP'ye aktarılır ve sonra bir metil grubuna indirgenir. İndirgenme tetrahidrofolatın (THF) dihidrofolata (DHF) yükseltgenmesiyle gerçekleşir.

Dihidrofolat, dihidrofolatat redüktaz tarafından tetrahidrofolata indirgenir. Bu yeniden üretim birçok süreç için temeldir. Timidilat sentazın inhibitörleri arasında başarılı anti-tümör ajan olarak yararlanılan 5-floraurasil gibi timin analogları yer almaktadır. 5-floraurasil metabolik olarak 5-FdUMP'ye dönüştürülür ki bu bileşik inaktif timidilat sentaza kalıcı olarak bağlanır; bu nedenle, bu ilaç intihar inhibitörü olarak adlandırılır. DHF, metotreksat gibi ilaçların varlığında inhibe edilen bir enzim olan dihidrofloat redüktaz tarafından THF'e indirgenir. Bu folat analogları, THF kaynağını azaltarak sadece pürin sentezini durdurmakla kalmaz, dUMP'nin dTMP'ye metilasyonuna engel olarak DNA'nın bu esansiyel bileşeninin hücrel konsantrasyonunu azaltırlar. Dolayısı ile DNA sentezi durdurulur ve hücre büyümesi yavaşlatılır. Nükleotid prekürsörlerini azaltarak DNA replikasyonunu yavaşlatıcı etkilerinden dolayı, yukarıda tanımlanan ilaçlar ve benzerleri kanser hücrelerinin büyüme hızını azaltmak için kullanılırlar (Lippincott 2007; Lehninger 2013).

Antikarsinojenik ilaçlar özellikle fetus, kemik iliği, deri, gastrointestinal yollar, saç folikülleri gibi hızla büyüyen hücreleride etkiler. Bu yüzden bu ilaçları kullanılan kişilerde anemi, pullu-kepekli deri, saç dökülmesi görülür (Gürdöl ve Ademoğlu 2013).

Pirimidinlerin pek çok türleri üre ve amonyağa yıkılır. Pirimidinler aynı zamanda β -alanin ve koenzim A'nın sentezinde öncül molekül olarak kullanılır. Sitozin, urasilin ve timinin ana yıkım yolu aşağıdaki şekilde (Şekil 1.4) gösterildiği gibidir. Sitozin şekilde

de görüldüğü gibi amino grubunu kaybederek urasile dönüşür. Daha sonra sırasıyla dihidrourasil ve β -üreidopropionik asit meydana gelir, son safhada β -alanin, NH_3 ve CO_2 ortaya çıkmaktadır. Timin, aşağıdaki reaksiyonlarda da gösterildiği gibi β -aminoizobütirata kadar yıkılır. Bu bileşik de bir amino asit gibi metabolize olur. Önce transaminasyonla amino grubu uzaklaştırılarak metilmalonat semialdehid meydana gelir. Metilmalonat semialdehid çeşitli reaksiyonlarla önce metil malonil CoA'ya ve oradan da süksinil CoA'ya çevrilir. Diğer pirimidin bazlarından da β -alanin üzerinden asetil CoA oluşur. Serbest haldeki pirimidin bazlarının yıkımında pürinlere göre en önemli fark halka yapısının parçalanmasıdır. Pürin halkasının aksine, pirimidin halkaları enerji, yani, ATP meydana getirebilecek tarzda metabolize olmaktadır (Keha ve Küfrevioğlu 2000; Gözükara 2011)



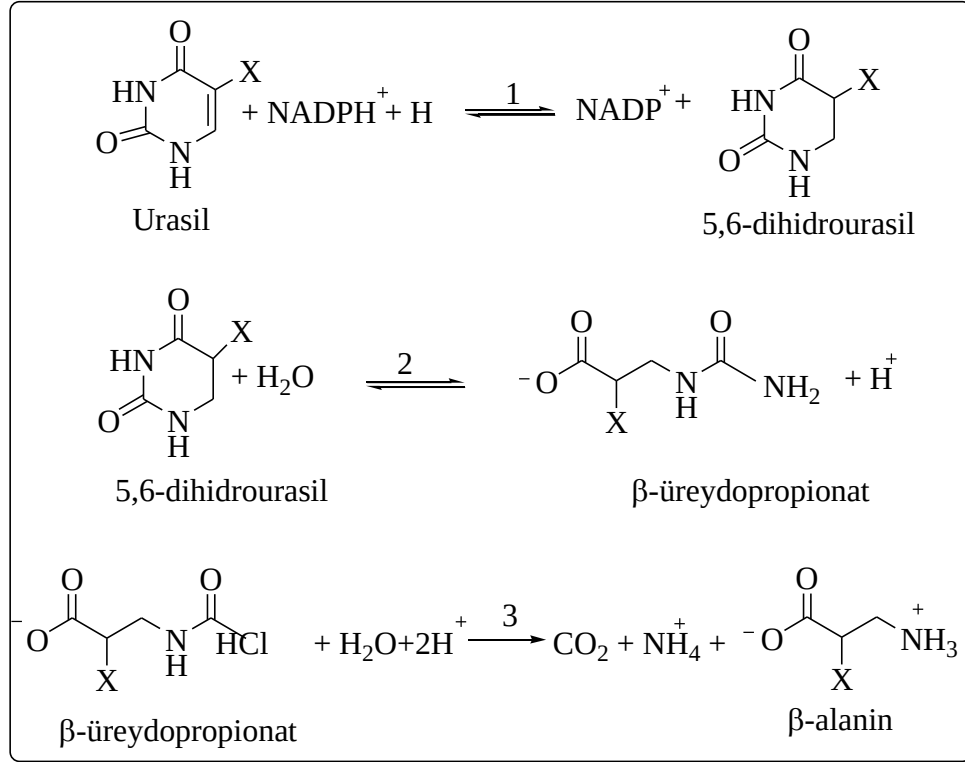
Şekil 1.4. Pirimidin katabolizması (Gürdöl ve Ademoğlu 2012)

1.2. Dihidropirimidin Dehidrogenaz

Dihidropirimidin dehidrogenaz (5,6-dihidrourasil: NADP⁺ 5-oksidoredüktaz E.C.1.3.1.2, DPD), pirimidin katabolizmasının ilk ve hız sınırlayıcı enzimidir. Aynı zamanda en yaygın antikanser ilaçlarından biri olan 5-Floraurasil'in %85'den daha fazlası bu enzim tarafından katabolize edilir (Podschunt *et al.* 1992, Lu *et al.* 1993, Dobritzsch *et al.* 2001). Bu sitozolik enzim çeşitli memeli dokularında bulunur, ana aktivitesini karaciğer hücrelerinde gösterir (Ho *et al.* 1986).

Dihidroprimidin dehidrogenaz enzimi (DPD) urasil, timin ve 5-floraurasil pirimidinlerinin sırasıyla β -alanin, β -aminoizobutrat ve α -flora- β -alanin'e parçalanmasını sağlayan 3 basamaklı metabolik yolun ilk enzimidir. DPD enzimi bu pirimidinleri bir NADPH bağlı reaksiyonla karşılık gelen dihidropirimidinlere 5,6-dihidrourasil, β -üreydopropionat ve 5,6-dihidrofloraurasile indirger (Schnackerz *et al.* 2004). Reaksiyon mekanizması Şekil 1.5'de gösterilmektedir.

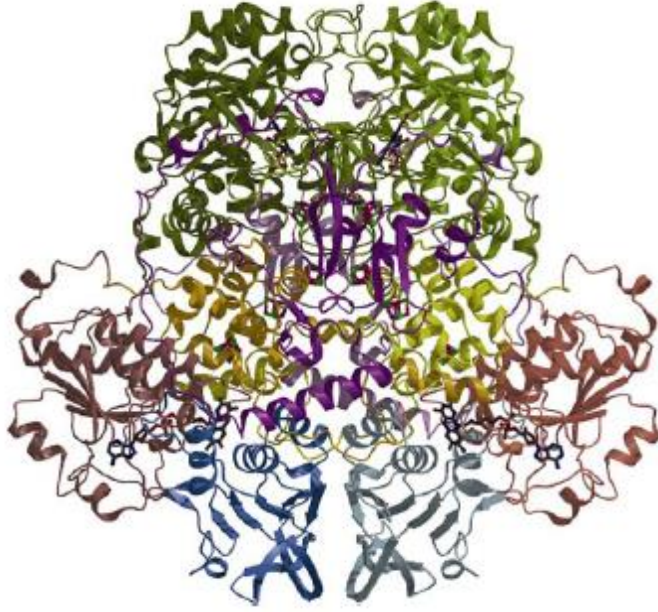
Dihidroprimidin halkası dihidroprimidin aminohidrolaz tarafından N3 ve C4 atomları arasından hidrolizlenerek N-karbamil- β -alanin veya N-karbamil- β -aminoizobutürat oluşur. Son olarak N-karbamil- β -alanin, beta-alanin sentaz tarafından amonyum, karbondioksit ve nörotransmitter olarak kabul edilen β -alanine hidroliz olur (Schnackerz *et al.* 2004). Memelilerin metabolik yolunda bir nörotransmitter olan karnazin ve anserin nöropeptidlerinin yapıtaşı olan β -alaninin başlıca sentez yoludur (Gonzalez and Salguero 1995; Lohkamp *et al.* 2010).



Şekil 1.5. Urasil, timin ve 5-F-Urasil metabolizmasının katabolik yolu

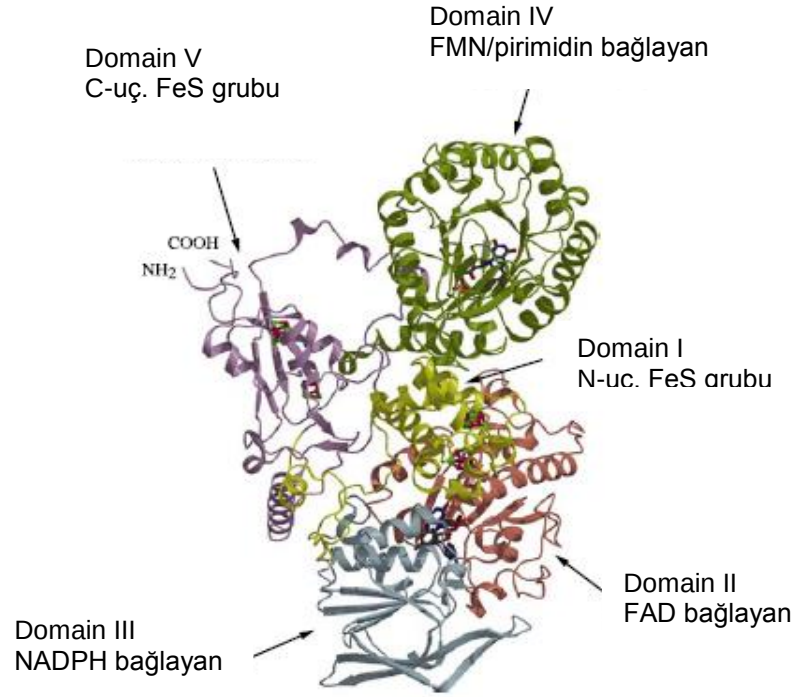
(Reaksiyon :1 dihidroprimidine dehidrogenaz (DPD), reaksiyon 2: dihidroprimidaz (DHP, E.C. 3.5.2.2) ve reaksiyon 3: β-alanin sentaz (β-AS ; β-ureidopropionaz, E.C. 3.5.1.6) (Schnackerz *et al.* 2004)

İnsan DPD enziminin sıgır ve domuz dibi diğer memeli DPD enzimleri arasındaki yüksek sekans benzerliğinden (>%90) dolayı benzer reaksiyon mekanizmasına ve üç boyutlu yapıya sahip olduğu düşünülür. X-ray yapısı en iyi karakterize edilmiş memeli enzimi rekombinat domuz DPD'dir. Enzim 2x111 kDa ağırlığında homodimerdir. Her altbirim 1025 aminoasitten oluşur, bir tane FAD, bir tane FMN ve dört tane [4Fe-4S] grubu taşır. Klasik olmayan iki bölge ping-pong kinetik mekanizması göre enzim sırasıyla elektron-verici kosubstrat NADPH ve elektron-kabul edici pirimidinler için ayrı bağlanma bölgeleri içerir. Doğal enzimin son modeli elektron yoğunluk haritasında görülmeyen C-terminalinde son 8-10 rezidüsü dışında her alt zinciri içeren tam zincirin 4 FAD, 4FMN ve 16 [4Fe-4S] grubunu içerir (Şekil 1.7). (Dobritsch *et al.* 2002; Schnackerz *et al.* 2004).



Şekil 1.6. DPD dimerinin genel görünüşü (Schnackerz *et al.* 2004)

DPD monomerinde bulunan 1025 amino asit residüleri farklı büyüklük ve katlanma biçiminde olan 5 domaini oluşturur (Şekil 1.6). İlk domain 110x90x60 Å ebatlarında uzamış bir çekirdek şekli oluşturan 28-847 rezidülerinden meydana gelirken 5. domain (2-26 ve 845-1020 rezidüleri) genişletilmiş ilmik bölgeleri ile bu bölgeden ayrılır (Schnackerz *et al.* 2004).

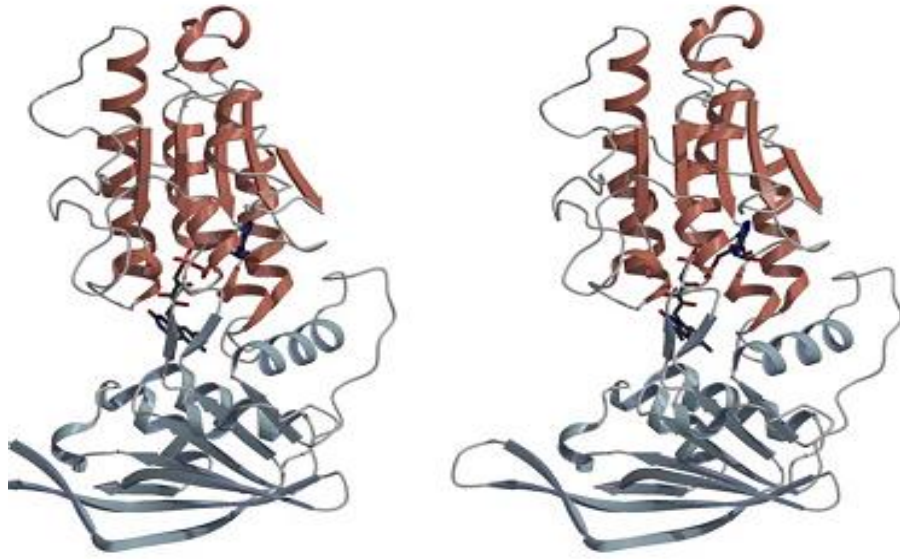


Şekil 1.7. DPD'nin alt birimi

Kofaktörler top-çubuk modelinde, demir ve kükürt grupları mor ve yeşil şeklinde gösterilmiştir (Schnackerz *et al.* 2004).

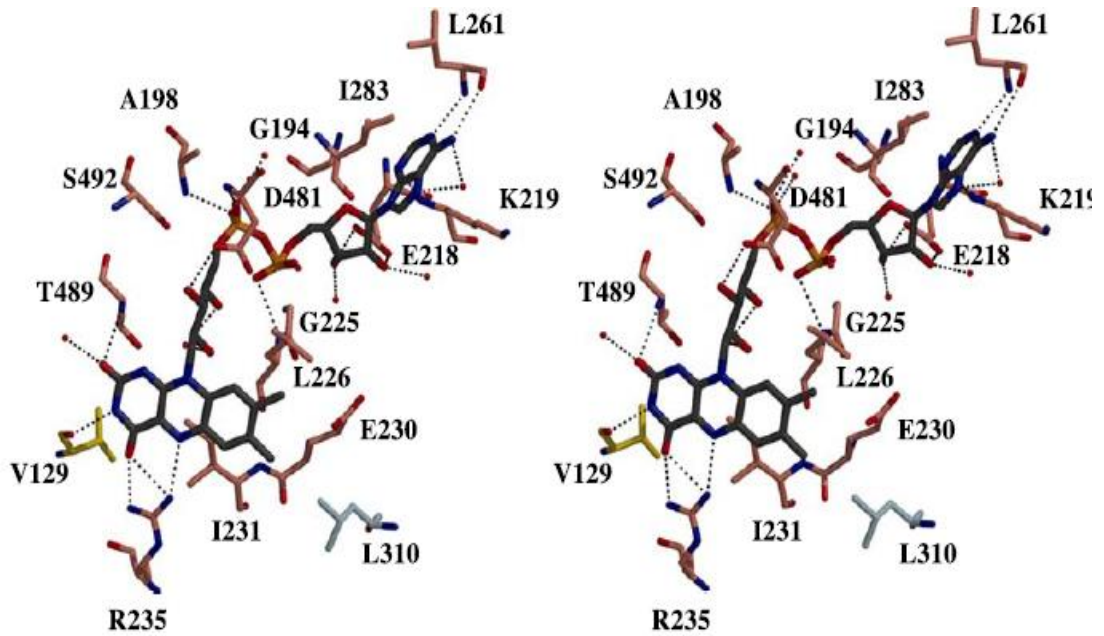
Domain I (rezidüler 27-173) 2 tane [4 Fe-4S] grubunu içerir ve sadece bir α -heliks yapısına sahiptir. Sistein tiyoller DPD'deki ilk FeS grubunu koordine eder. İkinci ($n\text{FeS}_2$) grubu şimdiye kadar diğer FeS proteinlerinde görülmeyen bir koordinasyon gösterir. 3 demir 3 sistein tiyolle etkileşime girerken Q156'nın yan zinciri 4. demirle koordinasyon yapar.

FAD bağlayıcı bölge içeren domain II ve NADPH bağlayıcı domain III'ün %20'si benzer amino asit sekansına sahiptirler. Domain II'nin β -4 zinciri ve α -4 heliksinin arasına gömülü olan domain III, ilave olarak 3 zincirli anti-paralel β tabakası içerir. FAD'ın adenozin kısmı domain II'in içine derince gömülmüştür. Kofaktör molekülün bu bölgesiyle direkt olarak etkileşir.



Şekil 1.8. Domain II ve III üç boyutlu şekilleri.

FAD bağlı domain II (rezidüleri 173-286, 442-524) kırmızı, NADPH bağlı domain III (rezidüleri 287-441) gri ile gösterilmiştir (Schnackerz *et al.* 2004).



Şekil 1.9. FAD bağlı bölge

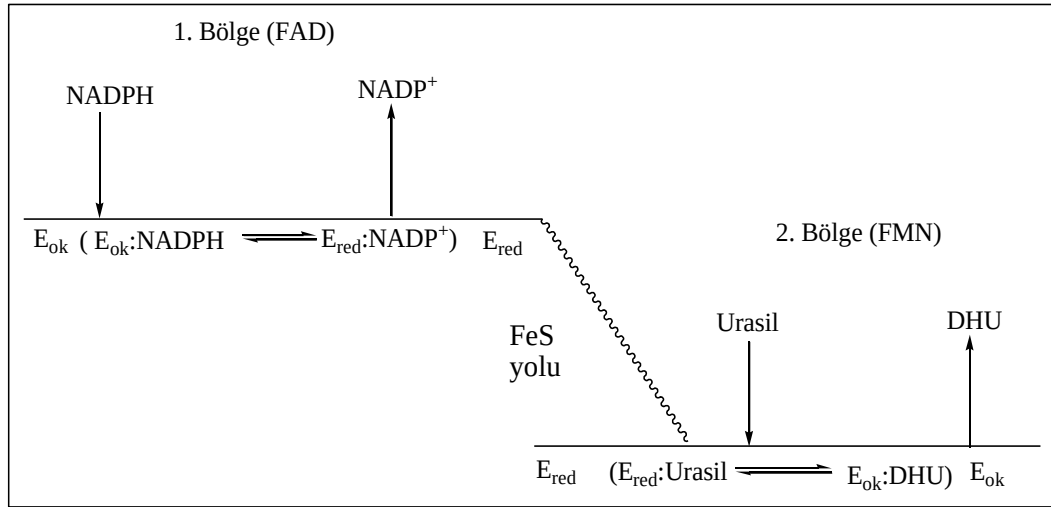
Bütün amino asitler H-bağı veya van der Waals etkileşimleri aracılığıyla kofaktör bağlanmaya (koyu gri atomlar) karışırlar. Domain I den kaynaklı amino asit rezidülerinin karbon atomları sarı ile , domain II ve III kaynaklı olanlar sırası ile somon rengi ve mavi ile gösterilmiştir. Kırmızı küreler FAD bağlanmaya katılan düzenli su moleküllerini gösterir. Hidrojen bağı etkileşimleri noktali çizgiler olarak gösterilir (Schnackerz *et al.* 2004).

DPD'nin domain IV bir TIM barrel içerir. TIM barrelin temeli üst uç başında 4-zincirli anti-paralel β -tabakası olan kısa bir sarmaldan önce gelen 2 antiparalel β -zincirinden oluşur. FMN, C-terminalinin sonunda barrel dizisini oluşturan zincirlere bağlıdır. Domain V, 1-26 ve 848-1025 rezidüleri ve sistein tiyoller tarafından koordine edilen (cFeS₁ ve cFeS₂), 2[4Fe-S] grublarını içerir (Schnackerz *et al.* 2004).

Bütün domainlerdeki rezidüler ara yüzün oluşumuna katılırlar. Domain III ve IV sınırlı ve yalnızca hidrofobik olmasına rağmen, domain I karşı alt biriminin beş domainleriyle ilişkili olduğu için dimerin oluşumunda merkezi bir rol oynar.

Pirimidin substratları ve inhibitörleri, DPD'nin ligandsız aktif bölgesinde bulunan bazı su moleküllerinin yerini alarak FMN izolaksin halka düzlemine neredeyse paralel bağlanır. Bütün DPD kompleks yapılarında 609, 668, 736 asparaginlerinin yan zincirleri ve T737 substrat veya inhibitör bağlanma bölgesi içerir. Bu bağlanma ortakları ligand bağlanması üzerinde önemli bir konformasyon veya pozisyon değişiklikleri yapmadan pirimidin halka azotları ve karbomil grupları ile hidrojen bağları yolu ile etkileşir. Sadece pirimidin bağlayıcı cepte meydana gelen değişiklikler, aktif bölge düğümü rezidülerinin yanı sıra komşu amino asitlere (L669 ve A683) uygulanır. Ligantsız enzim kompleksleri ve bütün kompleksler pH=4,7 elde edilir ve bu düğümü çözücü etkisiyle pirimidin bağlı bölgeden ayrılır (Schnackerz *et al.* 2004).

Urasilin yarışmalı bir inhibitörü olan 2,6-dihidrosipirimidin (2,6-DHP) varlığında, ilk hız şablonları bir ping-pong mekanizması olduğunu düşündüren paralel çizgiler takımından oluşmuştur (Podschun *et al.* 1990). Ürün inhibisyonu, ATP-riboz ve 2,6 DHP tarafından son inhibisyon 2 bölümlü ping-pong mekanizmasının bir göstergesidir. Kinetik mekanizması aşağıdaki şekilde gösterilmiştir.



Şekil 1.10. DPD nin kinetik mekanizmasının şeması

Mekanizmada NADPH 1. bölgeye bağlanır ve elektronlarını FeS grubu yolu ile 2. bölgedeki FMN'ye transfer eden FAD'ı indirger, FMN de urasılı 5,6-dihidrourasıla (DHU) indirger (Dobritsch *et al.* 2002).

Domuz karaciğer DPD'sinin urasil/timin parçalanma reaksiyon mekanizması kinetik parametrelerin pH bağımlı olduğunu düşündürür. NADPH, FAD-izalloksazin halkasına bakan nikotinamidin pro-S tarafı ile 1. bölgeye (site 1) bağlanır. Hidrür, NADPH'ın C-4'den (dördüncü C'tan) FAD'ın N-5'e tranfer olur, NADPH ve FADH ayrılır. [4Fe-4S] gruplarıyla 2. bölgede (site 2) elektron transferi NADP serbest bırakılana kadar gerçekleşmez. İki elektron transferi FeS kanalı yoluyla meydana gelir ve bir proton NADPH tarafından verilir 2. Bölgede indirgenmiş FMN oluşur. Elektronlar proteinin sonunda bulunan 2.bölgedeki FMN nin N1'e transfer olur ve indirgenmiş flavin K754 yoluyla N5'te protonasyonla stabilize olur. Üç asparagin rezidüsüne N609, N668 ve N736 hidrojen bağıyla bağlı urasil, hidrid transferini sağlamak için FMN'nin N5'nin yukarısına C6'yı yöneltmek için 2. bölgeye bağlanır ve sistein 671 (Cys-671) tiyol grubuna, C5'e proton eklemek için uygun pozisyonundadır (Dobritsch *et al.* 2002; Schnackerz *et al.* 2004).

Homodimerik enzimde ayrı bölgelerin (domainlerin) 3 boyutlu düzenlenmesi elektronların sırasıyla FAD'tan nFeS2 sonrada nFeS1 tranfer edilmesiyle iki elektron transfer zincirlerinin oluşumuna neden olur. nFes1 ve FMN arasındaki boşluk dimerdeki

diğer altbirimin 5. bölgesinin (domain 5) C- ucundaki gruplar tarafından kapatılır. Bu bölgedeki karşılıklı yer değiştirme dimeri domuz karaciğer DPD'sinin katalitik birimi yapar (Dobritzsch *et al.* 2002).

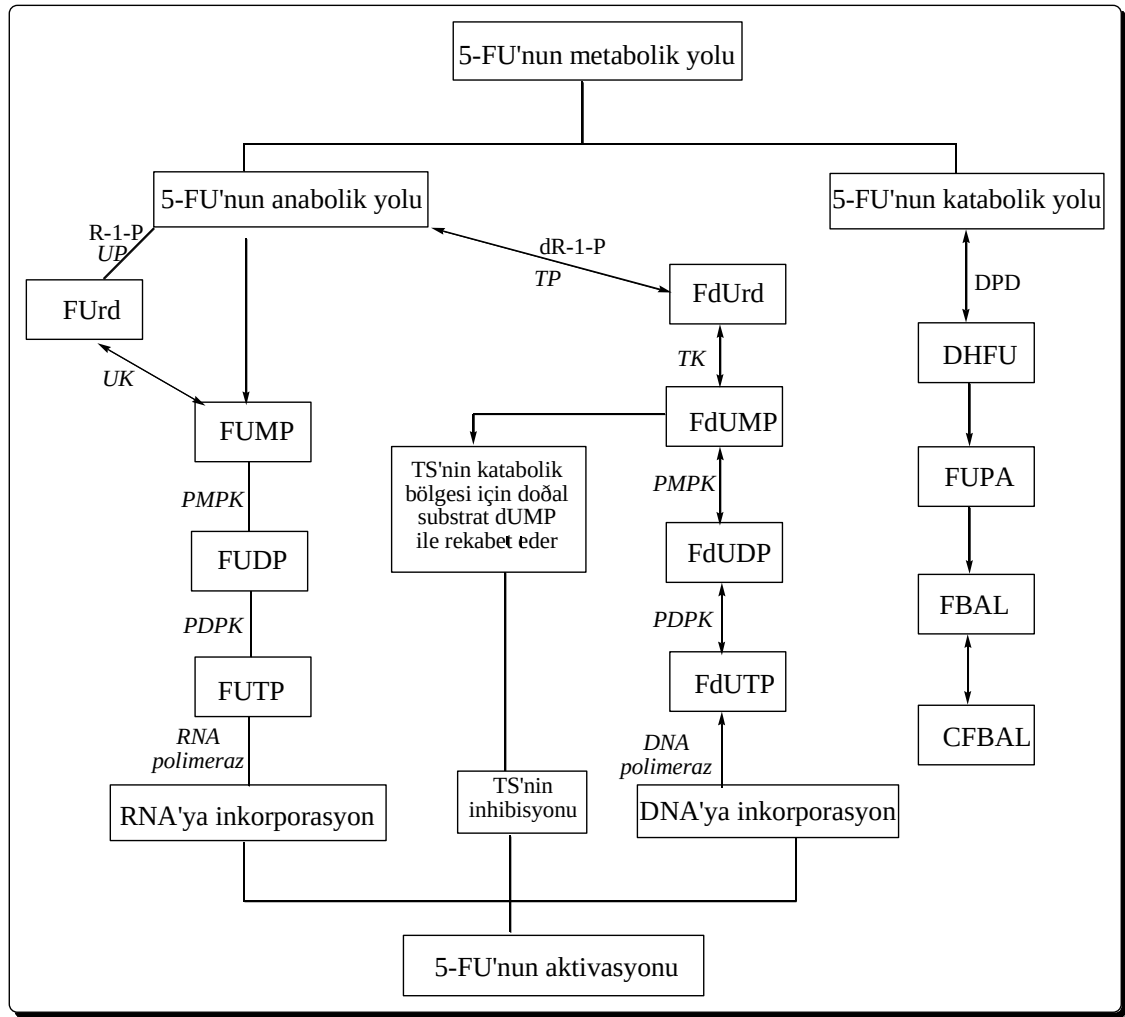
1.3. 5-Floraurasil

5-Floraurasil (5-FU) koleraktal, göğüs, baş/boyun kanserlerinin tedavisinde kullanılan ve kemoterapik ajan olarak 3. en yaygın ilaçtır. Bu anti-neoplastik bileşik timidilat sentazı engelleyerek DNA sentezini bloke eder. Bununla birlikte DPD enzimi 5-FU katabolizmasının ilk ve hız belirleyici enzimidir ve alınan dozun %80'ninden daha fazlası DPD tarafından hızlı ayrıştırılır (Lu *et al* 1993, Johnsyon *et al* 1999, Schnackerz *et al.* 2004). Bu metabolik yol boyunca 5-FU'nun parçalanması sinir sistemi üzerinde birçok yan etkisi olan florlanmış ürünlere neden olur. Katabolik pirimidin metabolik yolunun inhibisyonu 5-FU ve ilgili bileşiklerin etkisini artırarak klinik potansiyellerini artırır. Bu yüzden DPD kanser tedavisinin gelişimi için önemli bir hedef olarak ortaya çıkmıştır. 5-FU ilacının alınmasını takiben ölümü de içeren yüksek toksititeden etkilenen tam veya kısmi DPD yetersizliğine sahip kanser hastalarıyla ilgili farmakogenetik bozukluklar tanımlanmıştır (Schnackerz *et al.* 2004).

Bu hastaların bir kısmının bir kısmının DPD'yi kodlayan gen olan DPYD'nin mutant alleli için genotipik olarak heterozigot olduğu son zamanlarda gösterilmiştir. Tam DPD yetersizliğine sahip pediatrik hastaların DPYD geninin analizi hastalık yapıcı mutasyonların tanımlanmasına katkıda bulunmuştur. Çocuklardaki DPD eksikliği çoğunlukla nörolojik bozukluk takip eder. Bu hastalarda fibroplast ve mononükleer kan hücrelerinde hiçbir DPD aktivitesi gözlenmezken idrar, kan ve beyin omurilik sıvısında çok miktarda timin ve urasil birikimi gözlenmiştir. (Schnackerz *et al.* 2004). Ayrıca tam DPD eksikliği görülen hastalarda asemptomatik nöbetler, zeka ve büyüme geriliği ve dismorfik özellikler görülmüştür. Bu hastaların karaciğer dokularında hiç DPD aktivitesi bulunamazken idrar, kan ve beyin-omirilik sıvılarında aşırı miktarlarda dihidrourasil ve dihidrotimin birikimi belirlenmiştir (Kuilenburg *et al.* 2007).

5-FU kendi başına inaktiftir ve antitümör etkisi göstermek için fosforlanmalıdır. 5-FU'nun fosforlanması için 3 farklı metabolik yol vardır. Timidin fosforilaz (TP), oratat fosforibosil transferaz (OPRT), uridin fosforilaz (UP) bu metabolik yolların üç anahtar enzimidir. 5-FU, DPD tarafından detokslanır. TP, OPRT ve UP tarafından aktive edilir. TS, DPD, TP ve OPRT genlerinin tümör içi ekspresyon düzeyleri bazı kanserlerin 5-FU'a dayanan kemoterapiye klinik tepkileri tahmin edilebilir. 5-FU, timidin kinazla 5-flora-2-deoksiuridin-5-monofosfata dönüştürülen TP tarafından 5-flora deoksiuridin (FdUMP) fosforillenir. FdUMP, timidilat sentaz ve 5-10 metilen tetrahidrofolat (MTHF) ile üçlü bir kompleks oluşturarak TS'nin inhibisyonu ve DNA sentezlenme sürecinin bloke edilmesiyle sonuçlanan bir antikanser aktivitesi gösterir. 5-FU ayrıca OPRT tarafından 5-flauridin-monofosfata (FUMP) ve UP tarafından FUMP dönüştürülen 5-flauridine (FUR) fosforillenir. FUMP daha sonra floridin difosfata fosforillenir. Bu ya FdUMP dönüşen ya da normal RNA işleyişini ve fonksiyonu bozan (F-RNA) içinde yoğun olarak bulunan aktif floridin trifosfat metabolitine fosforlanır (Tateishi *et al.* 2008).

5-FU katabolik yolunun ilk basamağında kullanılan DPD enzimi, 5-FU'in flora-5,6-dihidrouasile (DHFU) dönüşümünü katalizler. DHFU de ilk önce flora- β -üreydopropionata (FUPA) sonrada α -flora- β -alanine (FBAL) parçalanır (Ezzeldin and Diasio 2004; Kuilenburg 2004; Lee *et al.* 2004).

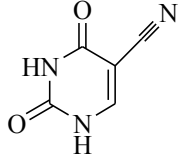
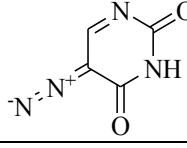
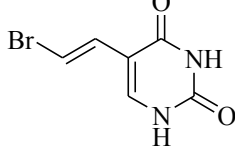
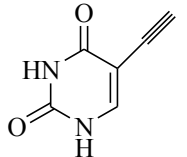
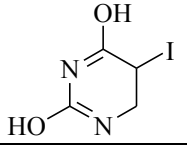
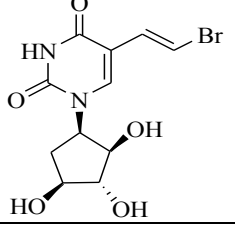
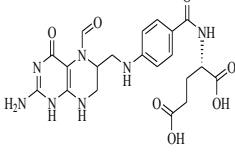
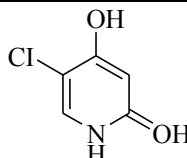


Şekil 1.11. 5-FU'nun metabolik regülasyonu (Lee *et al.* 2004).

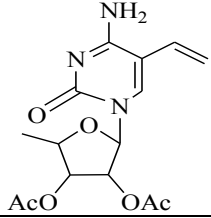
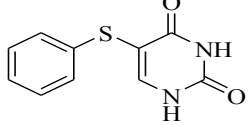
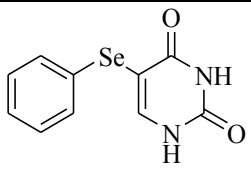
1.5. DPD'nin Bilinen İnhibitörleri

DPD enzimini çeşitli urasil türevleri ve bazı ilaçlar inhibe eder. Enzimi 5-siyanourasil (Dorsett *et al.* 1969), 5-iyodaurasil (Porter *et al.* 1991), 5-enilurasil (Porter *et al.* 1991), 5-bromovinilurasil (Porter *et al.* 1991), 5-(Fenilselenenil)urasil (Gaudgaon *et al.* 1993), 5-(Feniltio)urasil (Gaudgaon *et al.* 1993), alfa-interferon (Milano *et al.* 1994), folinik asit (Fischel *et al.* 1997), sorivudine (Diasio 1998), 5-kloro-2,4-dihidroksipirimidin (Takechi *et al.* 2002), , gimerical (Sakata *et al.* 2011) ve 2',3'-Di-O-asetil-deoksi-5-vinilsitidin (Hattori *et al.* 2003) inhibe ettiği görülmüştür. İnhibitörlerin özellikleri Çizelge 1.2'de gösterildi.

Çizelge 1.2. DPD'nin bilinen inhibitörleri

Adı	Yapısı	Özelliği
5-Siyanourasil		Geri dönüşümsüz inhibitördür. 5 pozisyonunda halojen gibi bir elektronegatif süstitüent taşıyan urasil analogları DPD'ye urasilden daha fazla ilgi duyarlar
5-Diazourasil		Geri dönüşümsüz inhibitör. 5-floraurasilin etkinliğini güçlendirmek ve bulunma değişkenliği kontrol etmek için yararlıdır.
5-Bromovinilurasil		Geri dönüşümsüz inhibitör. 5-bromovinilurasil in vivo koşullarda enzimi inhibe eder ve faredeki plazma urasil seviyesinin artmasına neden olur. 5-floraurasilin etkinliğini güçlendirmek ve bulunma değişkenliği kontrol etmek için yararlıdır.
5-Enilurasil		İn vivo ve in vitro koşullarda geri dönüşümsüz inhibitördür. 5-FU'in sitotoksit etkisini artırılması 5-enil urasil yoluyla DPD'nin inhibisyonu ile gerçeklerşir.
5-İyodaurasil		İnhibitör
Sorivudine		Bir antimetabolittir ve timinin sentetik bir analogudur. Su çiçeği ve zonaya neden olan enfeksiyonların tedavisinde kullanılır. Floroprimidinlerle ölümcül ilaç etkileşimlerine neden olur.
Folinik asit (leucovorin)		5-floraurasilin etkinliğini artırmak için kullanılır.
Gimerical (5-kloro-2,4-dihidroksipiridin)		Yarışmalı inhibitördür. Gimerical kısmen homolog rekombinasyonun (HR) ilk basamağını inhibe eder. Gimerical gibi DPYD inhibitörleri, DNA onarımın HR aracılığıyla kısmı baskılanmasıyla radyo terapinin etkinliğini artırabilir.

Çizelge 1.2 (devam)

2',3'-Di-O-asetil-deoksi-5-vinilsitidin		DPD inhibitörüdür. 5-FU'n ön ilacı olan kapesitabin ile oral yoldan tatbik edildiğinde tümör dokularında 5-FU'n miktarını önemli biçimde artırır.
5-(Feniltiyo) urasil		İnhibitör
5-(Fenil selenenil) urasil		İnhibitör
Alfa-interferon	Protein	İnhibitör

1.6. DPD Üzerine Çalışılacak Moleküller

Bu tez kapsamında DPD enzimi üzerine depresyon etkisi gösteren moleküller, antidepresan yapılar, anestezik etkili moleküller ile daha önce hiç etkisi araştırılmamış ağır metal iyonları üzerine çalışma planlandı.

1.6.1. Antidepresan moleküller

Depresyon, derin üzüntülü bir duygu durum içinde düşünce, konuşma ve hareketlerde yavaşlama, durgunluk, değersizlik, küçüklük, isteksizlik, karamsarlık duygu ve düşünceleri ile fizyolojik işlevlerde yavaşlama gibi belirtileri içeren bir durumdur. Depresyon, kanser hastalarında en yaygın ruh sağlığı sorunu olarak belirtilir. Tedavinin uzun sürmesi durumunda belirsizlik daha yoğun yaşanır, belirsizlik ümitsizliğe yol açar ve hasta bireyde sıklıkla depresyon görülür. Kemoterapinin yan etkilerinden ya da hastalığın kontrol edilemeyen semptomlarından dolayı kanser hastalarında depresyon görülme sıklığının yüksek olduğu saptanmıştır (Beser ve Öz 2003).

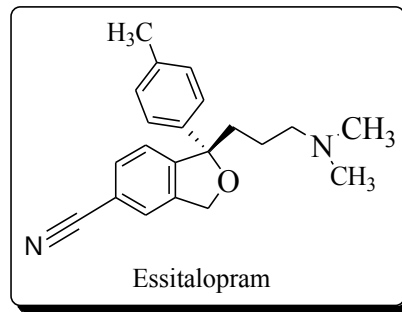
Antidepresanların hepsini kanser tedavisinde kullanmak mümkündür. Antidepresan seçimi hedef belirtiler, hastanın tıbbi durumu ve ilaç yan etkilerine göre yapılır. Trisiklik antidepresanlar kardiyak sorunu olmayan hastalarda, düşük bir dozda (10-25 mg) başlanıp, yararlanım elde edilene dek 1-2 günde bir 25 mg arttırılır. Amitriptilin, kanser hastalarında ağrı sağaltımında sık kullanılır. Depresyonda gerekenden daha düşük dozda ağrı giderici etki gösterirler. İkinci nesil antidepresanların trisikliklere benzer yan etkileri vardır ve daha az kardiyotoksik kabul edilirler. Seçici serotonin geri alım inhibitörleri (SSRI) (fluoksetin, fluvoksamin, sertralin, paroksetin, sitalopram) toksisite açısından daha güvenli kullanımları ve yan etkilerinin daha az oluşu ile son yıllarda kanserli hastalarda yoğun olarak kullanılmıştır. Benzodiazepinler anksiyolitik ve antidepresan olarak kullanılabilir. Karaciğer toksisitesi düşük olan oksazepam, lorazepam, alprazolam tercih edilmelidir. Alprazolamın anksiyete giderici olduğu kadar, etkin bir antidepresan olduğu da belirtilmektedir ve özellikle depresyon ve anksiyete belirtilerinin birlikte olduğu hastalarda yararlı olabilir (Ateşçi *et al.* 2001).

Depresyon tedavisinde kullanılan tüm antidepresan ilaçlar doğrudan veya dolaylı olarak noradrenalin ve/veya serotoninin beyindeki etkilerini artırır. Selektif serotonin geri alım inhibitörleri (SSRI) özellikle serotonin geri alımını inhibe eden ve noradrenalin taşıyıcısına göre serotonin taşıyıcısına 300 ile 3000 kat seçici olan bir antidepresan ilaç grubudur. SSRI'ların dopamin taşıyıcısını bloke edici etkileri çok azdır. SSRI'lar istenmeyen etkilerinin düşük olması ve yüksek dozlarında görece güvenli olmasından dolayı diğer antidepresanlar ilaçlara göre daha fazla tercih edilirler.

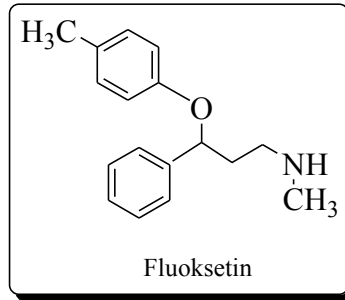
Bu tez kapsamında ilk defa koyun karaciğerin saflaştırılmış dihidropirimidin dehidrogenaz enziminin aktivitesi üzerine essitalopram, fluoksetin, mirtazapin, haloperidol antidepresan moleküllerin etkileri incelendi. Bu depresyon ilaçlarının DPD enzimi üzerine kinetik özellikleri ile ilgili detaylı bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır.

1.6.1.a. Essitalopram ve fluoksetin

SSRI inhibitörlerinden olan essitalopram ve fluoksetin obsesif kompulsif bozukluk, panik bozukluklar, jenerize anksiyete, premenstrual sendromda ve blumia nevroza gibi psikiyatrik bozukluklarda kullanılır. Metabolize edilmelerinde sitokrom P450 enzimlerini, glukuronid ile sülfat konjugasyonları kullanılır. Fluoksetin yarılanma ömrünün diğerlerine göre daha uzundur (50 saat) (Howland and Mycek 2009).



Şekil 1.12. Essitalopram molekülünün yapısal formülü

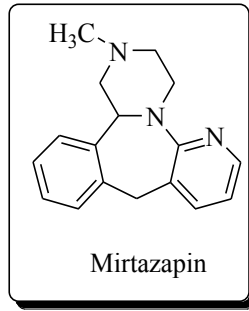


Şekil 1.13. Fluoksetin molekülünün yapısal formülü

1.6.1.b. Mirtazapin

Mirtazapin atipik bir antidepresan türüdür. Üçüncü kuşak bir antidepresandır. Atipik antidepresanlarda çoğunlukla antikolinerjik ve diğer yan etkiler daha az görünür. Ayrıca daha az ilaç etkileşim olasılıklarına sahiptir. Mirtazapin serotonin yapısal analogudur, çeşitli postsinaptik serotonin reseptör tiplerinde (5-HT_{2A}, 5-HT_{2C}, 5-HT₃ resaptörlerini

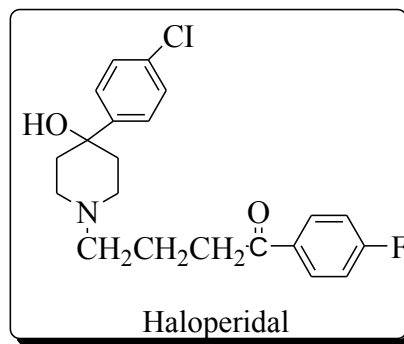
içeren) kuvvetli antagonistik etkileri vardır. Aynı zamanda kuvvetli bir histamin H_1 -reseptör antagonistidir ve rölatif olarak sedasyon yapar. Mirtazapin belirgin sedatiftir ve uyku bozukluğu olan hastalarda kullanılabilir (Süzer 2002; Brunton *et al.* 2008).



Şekil 1.14. Mirtazapin molekülünün yapısal formülü

1.6.1.c. Haloperidol

Haloperidol bir nöroleptik ilaçtır. Nöroleptik ilaçların etkileri dopamin ve/veya serotonin reseptörlerinin blokajı ile sağlanır. Aynı zamanda sakinleştirici etkiye sahiptir ve spontan fiziksel hareketleri azaltırlar (Howland and Mycek 2009).



Şekil 1.15. Haloperidol molekülünün yapısal formülü

1.6.2. Anestezik moleküller

Anestezi sözcük anlamıyla duyumsama yokluğu demektir. Anestezik maddeler genel ve lokal anestezik olmak üzere ikiye ayrılır.

1.6.2.a. Genel anestezik ilaçlar

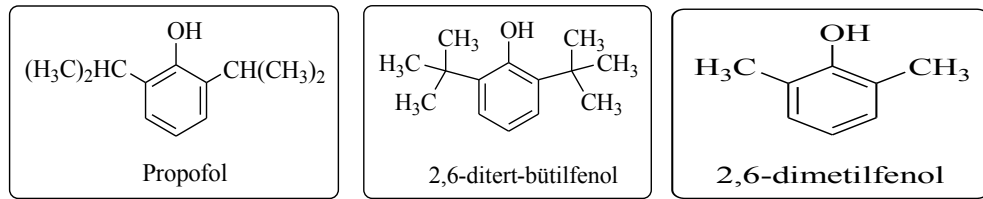
Genel anestezi, duyumsama fonksiyonunun veya farkındalığın bütün duyu şekillerini içine almak üzere tüm olarak ortadan kalkmasını ifade ve bilinç kaybı ile birliktedir. Bu durumda tüm dış uyarılara yanıt verme ve onları algılama süreci geçici olarak durmuştur. Genel anestezi olarak kullanılan ilaçlar (genel anestezikler) bu davranışsal durumu geri dönüşlü olarak meydana getirirler. Genel anestezi yapmak için insanda kullanılan ilaçların çoğu, uçucu sıvı veya gaz halinde bulunan maddelerdir ve bunlar inhalasyon yoluyla uygulandıklarından bunlara inhalasyon anestezikler adı verilir. Geri kalan anestezikler ise katı maddelerdir ve bunlarada katı genel anestezikler denir. Bu katı genel anestezikler ise intravenöz yoldan verildiklerinden aynı zamanda intravenöz anestezikler olarakta adlandırılırlar.

İntravenöz anestezikler kimyasal yapılarına göre altı gruba ayrılırlar; (i) Çok kısa etki süreli barbitüratlar, (ii) Ketamin, (iii) Kısa etki güçlü opioidler, (iv) Benzodiazepinler, (v) Propofol, (vi) Etomidat'lardır. İntravenöz anestezinin pekçok avantajı bulunmaktadır. Verilmesi kolaydır. İndikasyon kolaydır. Parlama tehlikesi yoktur. Uyanırken bulantı, kusma yoktur. Ayrıca solunum sistemi üzerinde tahriş edici etkisi yoktur. İntravenöz anestezide doz fazlalığı olduğu durumlarda solunum felci meydana gelebilir. Bu maddeler damar içerisine enjekte edildiğnden kısa sürede organizmanın yağ dokusu tarafından tutulurlar. Fazla lipofilik olduklarından beyin dokusuna çabuk girerler ve orda toplanırlar (Brunton *et al.* 2008; Kayaalp 2012).

Bu çalışmada genel anestezik ilaçlarda kullanılan propofol ve türevi olan iki molekül kullanıldı.

1. Propofol

Propofol'un orijinal ismi 2,6-diizopropil fenol'dur. Fiziksel niteliği bakımında bir sıvı yağdır ve %1'lik emülsiyon şeklinde kullanılır. Karaciğerde metabolize edilmek suretiyle elimine edilir. Eliminasyon yarılanma ömrü 5-10 saat arasındadır. Yavaş intravenöz injeksiyonla (2,5 mg/kg dozunda) verilerek anestezi indüksiyonu için kullanılır. Bu amaçla genellikle fentanil (6 µg/kg) veya benzeri bir opioid ilaçla birlikte enjekte edilir. Etkisi çabuk 40-50 saniye içinde başlar. Anesteziden ayrılma çabuk olur. Kalp debisini azaltması ve vazodilatör etkisi nedeniyle kalp basıncını fazla düşürür. Kalp artış hızında refleks artma olur (Brunton *et al.* 2008).



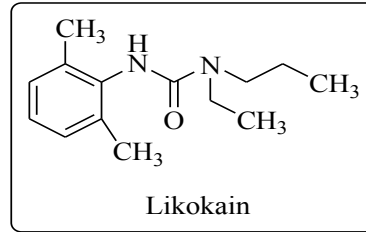
Şekil 1.16. Propofol ve türevlerinin yapısal fomülü

1.6.2.b. Lokal anestezik moleküller

Lokal anestezikler sinir hücrelerinde Na^+ kanallarının özelleşmiş reseptör kısımlarına geri dönüşümlü olarak bağlanırlar ve bu açıklıktan iyon hareketini engellerler. Sinir dokusuna lokal olarak uygun konsantrasyonlarda uygulandıklarında, lokal anestetik sinir sisteminin herhangi bir yerinde ve her tür sinir lifinde, sinir iletiminden sorumlu olan aksiyon potanselini geri dönüşümlü olarak inhibe eder. Böylece sinir gövdesiyle karşılaşan lokal anestezik sinirin inerve ettiği bölgede hem duyuşal hem de motor paraliye neden olur. Lokal anestezikler hidrofilik, hidrofobik kısım ve ara zincir olmak üzere üç kısımdan oluşur. Hidrofilik ve hidrofobik kısımlar aralarındaki ester ve amid bağlarıyla ayrılırlar. Hidrofilik kısım genellikle tersiyer amin, bazende sekonder amindir. Hidrofobik kısım ise aromattir. Ara zincir ise genellikle iki veya üç karbonlu bir alkol ya da karboksilli asid grubudur (Brunton *et al.* 2008; Kayaalp 2012).

1. Lidokain

Lidokain lokal bir anesteziktir. Lidokainin ksilidin amid türevidir. %2'lik konsantrasyonu ile uzun süre anestezi sağlanır. Kendisinin vazodilatör etkisi yok denecek kadar azdır. Lokal anestezikler içinde en sabit olanıdır. Lokal olarak mukozalara uygulandığında yüzeysel anestezi oluşturur. Amidler içerisinde en kısa etki sürelidir. Hem topikal hemde enjeksiyon anestezi (infiltrasyon, blok, spinal, epidural, kaudal anestezi) kullanılır. İntravenöz yoldan verildiğinde kalpteki aritmileri düzeltir. (Brunton *et al.* 2008).



Şekil 1.17. Lidokainin yapısal formülü

1.6.3. Ağır metaller

Yoğunluğu 6 g/mL den büyük olan metallere ağır metaller denir. Ancak bunların içinde az da olsa metal olmayan örneğin arsenik gibi elementler de ağır metaller arasında yer alır. Ağır metallerin başlıcaları Cu, Pb, Hg, Cd, Fe, Mn, Cr, Ni, Zn'dir. Periyodik sistemde yer alan elementlerin birçoğu canlı organizmada önemli fonksiyonlara sahip biyoelementlerdir. Bu biyoelementlere Ca, Mg, Fe, Zn, Mn, Cu, Co, I vb. birçok element örnek olarak verilebilir. Biyoelementler vücutta iyonlar, suda çözünmeyen anorganik bileşikler ve biyomoleküllerle kompleks oluşturmuş halde bulunurlar. Bir elementin biyoelement olarak ifade edilebilmesi için canlılık fonksiyonlarının sürdürülmesine katkısı, eksikliğinde ise bir bozukluğunun ortaya çıkması gerekmektedir. Bu durumda olan biyoelementler esansiyel biyoelement olarak adlandırılır. Esansiyel biyoelementler genelde 100 mg üstünde bulunur. Biyokimyasal reaksiyonlarda enzimlerin prostetik grubunda bulunan veya enzim aktivitesini

düzenleyen biyoelementler ise organizmda çok az miktarda olduğunda bunlara eser elementler denir (Burtis and Ashwood 2005; Gündüz 2008).

Demir, bakır ve çinko iyonları hücre büyümesini ve demir taşıma döngüsü etkilerler. Bu iyonların ribonükleotid redüktaz üzerinde etkilerine bakılmıştır. Çinko iyonu enzimi inhibe ederken, demir ve bakırın enzim üzerine uyarıcı etkisi olduğu görülmüştür. Karbotiyamitlerin ve tiyosemikarbazonların metal komplekslerinin ribonükleotid redüktazı inhibe ettiği ve antikanser aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Antikanser maddelerin hedef enzimi olan protein kinaz C(PKC) Ca^{+2} gibi ikinci mesajcılar ve fosfolipit hidroliz ürünleri tarafından aktive edilir. Bu ailenin dokuz farklı üyesi çeşitli sinyal iletimi, hücre büyümesi/farklılaşması ve hormon salınımı hücrel aktivitelere sahiptir. Tümör oluşumunu engellemek PKC'nin inhibisyonu önemlidir. Yapılan çalışmalar PKC'nin antrasiklin-Cu(II) tarafından inhibe edildiğini gösterir. Serin/fosfotazlar Zn^{+2} , Hg^{+2} , Cu^{+2} , Yb^{+2} ve Sc^{+2} bir dizi d-blok geçiş metali iyonları tarafından inhibe olur. Merkezi sinir sisteminin bazı hastalıklarında metal iyonlarının birikimi gözlemlendi ve bunların hastalık patogeneğinde nasıl bir rol oynadığı araştırıldı. Beyin korteksinde bulunduğu bilinen birçok lizozomal ve sitoplazmik proeinazların metal iyonlar tarafından inhibe edilip edilmediğine bakılmıştır. Cu^{+2} , Cd^{+2} , Pb^{+2} , Hg^{+2} ve Zn^{+2} 'nin milimolar konsantrasyonlarının bütün lizozomal proeinazları inhibe ettiği bulundu. Aynı zamanda sitoplazmik proeinazlarda çeşitli derecelerde metal iyonlarına bağlı olarak inhibe olduğu görülmüştür. Prolin endonükleaz ve lösil aminopeptidazın %50'den fazlası sırasıyla Zn^{+2} ve Cu^{+2} 'nin tarafından inhibe olduğu, Ayrıca alanil ve tripeptidilaminopeptidaz ve prolin endopeptidaz çeşitli derecelerde Co^{+2} ve Mn^{+2} tarafından inhibe olduğu belirlenmiştir (Louie and Meade 1999).

Bakır; birçok besinde bulunmasına rağmen en çok karaciğer, kabuklu deniz ürünleri, baklagiller, ceviz, fındık gibi kuru yemişler, daha az miktarda da yumrulu bitkiler ve yeşil sebzeler ve sütte bulunur. Günlük bakır miktarı çocuklarda 0,5-0,7 mg/gün olmasına rağmen yaş ilerledikçe bu oran artar ve yetişkinlerde 2-3 mg kadar çıkar. Bakır eser ağır metallere aittir. Biyolojik sistemlerde hem Cu^{+1} hem Cu^{+2} değerlikli olarak bulunur. Bu yüzden bakırlı metalloproteinler organizmada oksido-redüksiyon

reaksiyonlarına katılırlar. Bakır bileşeni olduğu sitokrom oksidaz, SOD, dopamin β -hidroksilaz, lizil oksidaz, tirozinaz gibi enzimler vasıtasıyla çeşitli metabolik olaylarda yer alır. Örneğin tirozinaz enzimi aracılığıyla melanin sentezine katıldığı için bakır eksikliği durumunda saç ve derinin doğal rengi oluşmaz. Bakır sinir sistemi fonksiyonları, kollajen ve elastinde çapraz bağ oluşumu için gereklidir. Ayrıca demir metabolizmasında önemli bir roledir. Bakır eksikliği demir emilimini bozar ve şiddetli bakır eksikliğine anemi eşlik eder. Erişkin insan vücudu 80-150 mg bakır içerir. Toprakta yoksunluğu tahıl bitkilerini büyük oranda etkiler. Ancak fazlası da çok zararlıdır. Çünkü böyle yerlerde otlayan kümes ve ağıl hayvanları bu fazlalıktan büyük oranda etkilenir. Koyun ve inek, öteki hayvanlardan daha fazla zarar görür. Bakır sülfat süs havuzlarında ve içme suyu rezervuarların da mantar üremesine mani olmak için kullanılır (Burtis and Ashwood 2005; Gündüz 2008).

Çinko; insanlar ve hayvanlar için büyüme ve sağlıklı olmak için gerekli olan ve demirden sonra en bol bulunan ikinci biyoelementtir. Biyolojik sistemlerde sadece 2+ değerlik aldığından dolayı diğer geçiş metallerinin katıldığı oksido-redüksiyon reaksiyonlarına katılmaz. Genellikle et, süt ve süt ürünleri gibi proteinlerden zengin besinlerde bol bulunur. Günlük çinko gereksinimi 15 mg kadardır. İnsan vücudunda prostat bezi, semen, karaciğer, sinidirim kanalı, saç, deri, retina, böbrek, kas ve kemiklerde olmak üzere 1,4-2,3 g kadar çinko bulunur. Çinko farklı türlerde yaklaşık 300 enzimin gerekli bir bileşenidir. Çinko atomları metalloprotein molekülünün bağlı kısmına sıkı bir şekilde bağlıdır ve sıklıkla aktif merkezle ilişkilidirler. Aynı zamanda birçok metalloenzimin yapısal kararlılığına ve konformasyonuna katkıda da bulunur. Çinko protein sentezinde önemli rol oynar ve gen ekspresyonunda önemli işleve sahiptir. Ayrıca bağ dokusu biyosentezi için temel role sahip olduğundan yara iyileşmesi için gereklidir. Ayrıca immün sisteminin bütünlüğü ve fonksiyonları için içinde gereklidir (Burtis and Ashwood 2005; Gündüz 2008).

Nikel; hayvansal besinler ve yağ içeriği düşük besinlerde az, çikolata, kabuklu kuru yemişler, fasulye ve tahıllarda bol miktarda nikel bulunur. İnsanlarda günlük gereksinimi 150 μ g'dan azdır. Hayvanlarda nikel eksikliği folat ve B₁₂ vitamini

metabolizmasında değişikliklere, demir kullanımında bozulmaya yol açar. İnsanlar için nikel tuzları daha diğer eser elementlerden daha az toksittir ve nikel toksitasyonu bir endüstriyel gaz olan nikel karbonile maruz kalma sonucu oluşur. Nikel karbonil karbon monoksitten 100 kat daha toksittir ve kansorejen özelliğindedir. Endüstride ise genellikle paslanmaz çeliklerin ve bakırla birlikte kupronikel alaşımların elde edilmesinde kullanılır. Aynı zamanda nikel, sıvı bitkisel yağlardan katı yemeklik yağların üretiminde olduğu gibi doymamış organik bileşiklere hidrojen katmada katalizör olarak kullanılmaktadır (Atkins and Jones 1999; Gürdöl ve Ademoğlu 2013).

Demir; yerkürede en çok, yer kabuğında en bol bulunan ikinci elementtir. Demir cevherleri esas olarak elik üretiminde kullanılır. Et, karaciğer, sakatat, yumurta sarısı, deniz ürünleri gibi hayvansal gıdalarda organik yapıda iyonlaşabilen demir halinde bulunurken ıspanak, fasulye, taneli bitkiler, hurma, ceviz ve pekmez gibi bazı bitkiserl besinlerde anorganik demir tuzları halinde bulunur. Demir organizmada oksijen taşınması, oksido-redüksiyon reaksiyonları gibi hayati öneme sahip birçok fonksiyon için gerekli olan bir elementtir. Vücutta bulunan demir miktarı 4-5 g'dır. Vücutta bulunan demirin büyük bir kısmı hemoglobin ve miyoglobinin yapısında hem grubuna bağlı olarak; kalan kısmı ise demirin taşınması ve depolanmasıyla görevli proteinler ve diğer demir içeren bileşiklerde bulunur. Hemoglobinin yapısında yer alan demir dokulara oksijen taşınmasında, miyoglobinin yapısında yer alan demir ise kaslara taşınan oksijenin depolanmasında görev alır. Sitokrom c oksidaz, sitokrom p450, katalaz ve peroksidazlar gibi hem proteinler ve demir-sülfür bileşikleri organizmadaki redoks reaksiyonlarında kullanılır. Süksinat dehidrojenaz, NADPH dehidrojenaz, yağ açıl KoA dehidrojenaz gibi flavinli enzimlerde hem yapısında olmayan demir bulunur (Atkins and Jones 1999; Gürdöl ve Ademoğlu 2013).

Kobalt; insanlar için esansiyel olan B₁₂ vitamininin (kobalamin) yapısında bulunur. İnsan vücudunda kobalaminin bol bulunduğu kemikler, karaciğer, böbrek ve kan hücreleri olmak üzere yaklaşık 1 mg kadar kobalt bulunur. İnsanlar besinlerle alınan kobaltı kullanarak bundan B₁₂ vitaminini sentezleyemez. Geviş getiren hayvanlar tarafından besinlerle alınan kobalt bu hayvanların mikroflorası tarafından B₁₂ vitamini

sentezinde kullanılır. Bu hayvanlardan kaynaklanan besinlerin tüketilmesiyle kobalt doğrudan kobalamin şeklinde alınır (Gürdöl ve Ademoğlu 2013).

Krom; en bol kepekli un, pekmez ve bira mayasında bulunur. İnsan vücudunda 6 mg kadar bulunur. Yaş ilerledikçe ihtiyaç duyulan krom miktarı azalır. Çok sayıda oksidasyon basamağı olmasına rağmen sadece Cr^{+3} ve Cr^{+6} değerlikte biyolojik sistemlerde bulunur. Krom glukoz ve lipid metabolizmasının kontrolünde yer alır. Düşük molekül ağırlıklı krom bileşiğinin insülin etkisini artırır. İnsülin direnci krom eksikliğinin sonucu oluşabilir ve insülin krom olmaksızın glukoz düzenleyicisi olarak etkisiz olduğu belirlenmiştir (Burtis and Ashwood 2005; Gürdöl ve Ademoğlu 2013).

Kadmiyum; çinko ve kurşun filizlerinin eritildiği maden çıkarma sırasında elde edilen yan üründür. Eklektro plaklamada, yeniden şarj edilebilen nikel bazlı bataryaların üretiminde ve organik bazlı boyalarda renk verici madde olarak kullanılır. Ayrıca tütün ürünlerinde de kadmiyum bulunur. Memeli hayvanların böbreklerinde birikmesi sonucu böbrek hastalıkları meydana gelir. Uzun süre kadmiyum aerosollerini teneffüs edilmesi sonucu akut karaciğer bozuklukları oluşur. Toprakta ve sedimentlerde öteki iki yüklü metallerle göre daha gevşek tutulduğundan çok hareketlidir. Bu nedenle topraktan bitkilere, bitkilerden de katlanarak insanlara geçer (Burtis and Ashwood 2005; Gündüz 2008).

Gümüş; doğal halde nadiren bulunur genellikle kurşun ve bakır arıtımının bir yan ürünü olarak elde edilir. Gümüş(I) hemen hemen her zaman bileşeklerinde +1 yükseltgenme basamaklıdır. Gümüşün büyük bir kısmı fotoğraf endüstrisinde geri kazanılır. Gümüş klinik olarak sülfadiazin ile tedavi edilen yanık hastalarında ve gümüş içeren nazal dekonjestanlar ile tedavi edilen hastalarda kullanılır. Bu durumlarda hastalarda cildin subepitelyal tabakası ve muköz membranlar dahil pek çok organda gümüş depozitleri argiriya adı verilen (cildin grileşmesi) hastalığı görülür. Argiriya büyüme geriliği, hematopoez, kalp büyümesi, karaciğer dejenerasyonu ve renal tüplerin harabiyeti ile karakterize edilir. Serum normal gümüş düzeyi 2 ng/mL'den azdır (Burtis and Ashwood 2005; Gündüz 2008).

Kurşun; maden filizlerinden elde edilir. Kurşunun kararlı yapısı (kimyasal inertlik) ve kolay şekil alması, yapı endüstride kullanılmasını sağlar. Kurşunun en önemli özelliği yüksek yoğunluğundan dolayı radyasyon kalkanı olarak kullanılmasıdır. Kurşun çevremizde çok sık bulunan hem akut hemde hemde kronik toksit bir ağır metaldir. Ağız yoluyla, inhalasyon veya deriden temas ile alımıyla toksitiye neden olur. Kurşun hem sentezi için gerekli porfobilinojen (PBG) sentazı Fe^{+2} üretmek için gerekli bir hem sentezleyici enzim olarak redüktazı engeller. Redüktazın inhibisyonu eritrositlerde protoporfirin birikimine yol açar. Böylece hem yetersizliğine bağlı anemi oluşur. Kurşun proteinlerdeki sistein sülfidril grupları ile kovalent bağlar oluşturan bir elektrofildir ve tüm doku proteinleri kendine bağlanmış olan metali içerirler Kurşun fazlalığı böbreklere zarar verebilir. Aynı zamanda kuvvetli bir nörotoksittir. Bu nedenle akut kurşun zehirlenmelerinde beyin kanamaları dahil çeşitli hastalıklar görülebilir. Akut olmayan kurşun konsantrasyonları insanda öğrenme güçlükleri meydana getirebilir (Burtis and Ashwood 2005; Gündüz 2008).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Pirimidinler nükleik asitlerin anahtar monomerleridir ve katabolik metabolizmalarının seçimli inhibisyonu, antitümör, antimikrobiyal ve antiparasitik ajanların dizaynında önemli bir yere sahiptir. Urasilin 5,6-dihidrourasil'a çevrilmesi dihidropirimidin dehidrogenaz tarafından katalizlenir, bu da 5,6-dihidrourasil ve karbamoil- β -alaninin yoluyla β -alanine dönüşen urasilin üç basamaklı katabolik yolunun ilk reaksiyonudur. Memeli dokularında β -alaninin sadece bu metabolik yolla sentez edilir. Merkezi sinir sisteminde major inhibitör nörotransmitter olan 4-aminobütirik asit (GABA) ile yapısal olarak ilişkilidir. İlave olarak β -alaninin nörotransmitter bir taşıma mekanizması özelliğine sahip bazı özel beyin hücreleri tarafından alınır. β -alaninin karnozin, anserin ve N^x -(β -alanin) lizin gibi kasta ve beyinde transmitter aktivitesi olan dipeptidleri içerir. Urasilin parçalanma metabolizmasında yer alan üç enzimim beyin sitozolinde yer aldığı açıkça gösterilmiştir (Podschun *et al.* 1989).

DPD enzimi fare (Shiotani and Weber 1981), domuz (Podschun *et al.* 1989), inek (Porter *et al.* 1991) ve insan (Lu *et al.* 1992) karaciğerinden saflaştırılmıştır. İnsan, sinamolguş maymunu, makak maymunu, köpek, rat ve fare karaciğer DPD enziminin aktiviteleri üzerindeki çalışmada DPD enzim aktivitesinin türler arasında farklı olduğu gözlenmiştir.

Büyükten küçüğü doğru sıralama yapıldığında sırasıyla fare, rat, insan, köpek, sinamolguş maymun, makak maymunu olduğu gözlenmiştir. Bu bilgiler yeni floroprimimidin antikanser ajanlarının ve DPD inhibitörlerinin prelinik gelişimi için insan DPD'sinin in vivo modelleri seçiminde dikkatli olunması gerektiğini önerir (Sludden *et al.* 1998). 50 yaşında gliomadan ölen erkek hastadan otopsiyle bronş, böbreküstü, onikiparmak bağırsağı, karaciğer, akciğer, dalak, böbrek, pankreas, prostat, tiroid bezi, kas, testis, beyincik, beyin zarı, boz madde ve akmadde dokuları alınmıştır. Bu dokular arasında en yüksek aktivite sırasıyla dalak, karaciğer sonra eşit miktarda onikiparmak bağırsağı ve testis, böbreküstü bezi, pankreas, akciğer ve prostatta bulunmuştur. Diğer dokularda ise oldukça düşük aktivite bulunmuştur (Kuilenburg *et*

al. 2006). Ayrıca periferik mononükleer kan hücrelerinde de yüksek enzim aktivitesi göstermiştir (Kubota 2003). DPD enzimi *Alcaligenes eutrophus* bakterisinde elde edilmiştir (Schmitt *et al.* 1996). Domuz DPD'nin cDNA'sı *Escherichia coli*'ye klonlanmış ve ekspres edilmesi sonucunda yüksek verimde rekombinat enzim elde edilmiştir (Rosenbaum *et al.* 1997).

Urasil ve timin pirimidinleri DNA ve RNA sentezinin önemli bileşikleridir. Dihidropirimidin dehidrogenaz (DPD; E.C. 1.3.1.2) tarafından 5,6 dihidro ürünlerine indirgenen birkaç enzimatik reaksiyonun substratlarıdır. Bir çok insan dokusunda DPD aktivitesi bulunmasına rağmen en yüksek aktivitesi karaciğer ve mononükleer hücrelerde gösterir. Urasil ve timinin sırasıyla β -alanin ve β -aminoizobutirik asite indirgenmesi için hız sınırlandırıcı enzimdir. DPD'de bozukluklar sinirsel gelişim için önemli sonuçları olabilir. Çünkü bu metabolik yol nörotransmitter (sinir ileticisi) olarak kabul edilen β -alaninin tek endojen kaynağıdır. Mononükleer hücre DPD aktivitesi klinik fenotip analizi için kullanılır. DPD eksikliği sinirsel sendrom, thymine uraciluria ile ilgilidir ve konvülsif (kasılan) rahatsızlıklar ve zeka geriliği ile tanımlanır. İdrar, plazma ve beyin omurilik sıvısındaki urasil ve timin yüksek konsantrasyonu ve çok düşük veya tespit edilemeyen fibroblast DPD aktivitesi konvülsif rahatsızlıkları ve zeka geriliği olan bebeklerde bulunmuştur. Pedigree (soyağacı) analizi DPD eksikliğinin kalıtsal otozomal resesif olduğunu gösterdi. DPD aynı zamanda pirimidin analogu olan 5-florourasilin (5-FU) parçalanmasını sağlayan ve antikanser etkisini düzenleyen anahtar bir enzimdir. 5-FU kolorektal kanserlerde tek başına kullanılırken, göğüs, baş/boyun ve diğer kanserlerin tedavisinde kullanılır. Düşük DPD aktivite nedeniyle 5-FU parçalanmasının bozunması, ilacın geleneksel dozlarda alımından sonra şiddetli, yaşamı tehdit eden veya ölümcül diyareye, nötropeniye ve/veya nörotoksitiye neden olur. DPD enzimini kodlayan DPYD geninde bazı mutasyonlar thymine uraciluria olan çocuklarda ve 5FU ilgili toksitesi olan yetişkinlerde belirlenmiştir. Bu mutasyonlar 14. exonun atlanmasıyla, 534, 543 ve 732 numaralı kodonlarda nokta mutasyonuyla ve 1897 nolu bazda sitozinin silinmesiyle sonuçlanan bir splice donor de G'nin A'ya transisyon içerir buda kodon 637'de, proteinin erken sonlanmasına neden olur (Ridge *et al.* 1998).

Pirimidinler nükleik asitlerin anahtar monomerleridir ve katabolik metabolizmalarının seçimli inhibisyonu antitümör, antimikrobiyal ve ajanları dizaynında önemli bir stratejiye sahiptir. Urasilin 5,6 dihidrourasil ve N-karbamoil yoluyla β -alanine dönüşümünü sağlayan metabolik üç basamak dizisinin ilk reaksiyonunu dihidropirimidin dehidrogenaz (EC 1.3.1.2) tarafından katalizlenir. Memeli dokularında β -alanin biyosentezine öncülük eden tek metabolik yoldur ve yapısal olarak merkezi sinir sisteminde önemli inhibitör nörotransmitter olan 4-aminobütirik asit (GABA) ile ilgilidir. Son zamanlarda β -alaninin kendisinin sinaptik transmiseyona dahil olduğu önerilmiştir. İlave olarak β -alanin özelleşmiş beyin hücreleri (yıldız şeklindeki neuroglia hücresi, astrosit) tarafından nörotransmitter taşıma mekanizması özelliğı ile alınır. β -alanin karnozin, anserin ve N-(β -alanin) lisin gibi kasta ve beyinde transmitter aktiviteye sahip dipeptidleri içerir. Urasilin bozunma metabolizmasının üç enzimi aynı zamanda beyin sitozolünde bulunduğu açıkça gösterilmiştir. DPD'nin doğal substratları timin ve urasildir, urasil timine göre reaksiyonu %129 daha fazla indirger. Aynı zamanda 5 pozisyonunda yer alan substrat analoglarının DPD enzimi tarafından parçalanır. Örneğın urasil türevleri olan 5-aminourasil ve 5 flaurasil, timine göre sırasıyla %146 ve %156 daha fazla reaksiyon hızı gösterir. Buda gösteriyor ki pirimidinin substratının 5 nolu karbonundaki elektron çekici elektron çekici substituent (H, NH₂, F) enzimatik indirgenme için önemlidir. DPD sitozin veya oratatı substrat olarak kullanmaz. Dehidrogenaz reaksiyon için 4. karbondaki serbest okso veya hidroksil grupları önemlidir. Eğer bu grup bir amino grubu (sitozin) ile yer değiştirirse, pirimidinin C-5 ve C-6 çift bağı arasında indirgenme meydana gelmez (Podschun *et al.* 1989).

Dihidrotimin dehidrogenaz (4,6-dihidrotimin oksireduktaz, EC 1.3.1.2) timinin dihidrotimine hidrolizini katalizler. Timin ve urasilin yıkım yollarındaki enzimin biyolojik önemi 5 pozisyonunda enzimin yerine geçen pirimidin analoglarının katabolik yolundaki aktivitesinin inhibisyonu ile görölmüştür. Enzim aktivitesi incelenen bütün fare hepatomlarında (karaciğer tümörü) tümör büyüme oranlarındaki artışa paralel olarak azaldığı belirlenmiştir. Aynı zamanda azalan aktivite fare kolon kanserinde de bildirildi. Bu sonuçlar bu enzim aktivitesinin hücre poliferasyonu ile bağlantısı

olduğunu düşündürmüştür. Enzim rat karaciğerinden saflaştırılması yapılmış ve enzimin bir flavoprotein olduğu bulunmuştur. Saflaştırma boyunca diğer NADPH -oksitleyici enzimlerin ortadan kaldırılması önemlidir. 5 mM 2-merkapttoetanol ilave edilmesi %80 den 90 kadar enzimin aktivitesini koruduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar 2-merkapttoetanol gibi tiyollerin enzimlerin stabilizasyonu için önemli olduğunu düşündürmüştür. 2-merkapttoetanolla stabilizasyon sülfidril grupların varlığının enzim için önemli olduğunu ve ya enzimin konformasyonunu sürdürmek (korumak) için gerekli olduğunu göstermiştir (Shiotani and Webers 1980).

5-florourasil (FU) ve onun öncü ilacı kapesitabin, kanserlerin tedavisinde kullanılan en yaygın ilaçlar arasındadır. Bu ajanlar ya tek ajan ya da karışım halinde baş-boyun, serviks (rahim boynu), göğüs ve sindirim sistemi (gastrointestinal) kanserlerinin tedavisinde uygulanırlar. Floropirimidinler ile tedavi miyelosüpresyon (kemik iliğinin çalışmasının engellenmesi), kardiyak toksisite, mukozit, el-ayak sendromu (HFS) (kemoterapinin tetiklediği akral eritem) ve ishal dahil olmak üzere çok sayıda olumsuz yan etkileri rapor edilmiştir. Son zamanlarda kapesitabin oral uygulamasının kolaylığından dolayı tercih edilmiştir. İlave olarak kapesitabin 5FU ile karşılaştırıldığında kapesitabinin ağız iltihabı, kellik, nötropeni (nötrofil lökositlerinin kanda azalması, radyasyon sonucu gelişen nötropeni), ishal, bulantı vakalarında daha az fakat HFS'li vakalardaki daha fazla olarak hastaların daha iyi tolere ettiği bildirilmiştir. Urasilin DPD tarafından parçalanmasıyla, yalnızca iki inhibitör nörotransmitter olan gilislin ve γ -aminoisobütirik asitin (GABA) bir yapısal homoloğu olan endojen β -alaninin sentezlenir. Tam DPD eksikliği olan pediatrik hastaların idrar, kan ve beyin omurilik sıvılarında timin ve urasilin yüksek seviyeleri bulunduğu ve bununda çeşitli seviyelerde nörolojik anormalliklere neden olabileceği rapor edilmiştir. DPD, 5FU gibi florlanmış pirimidinlerin katabolik yıkımında anahtar bir rol oynar. Kanser hastalarında alınan 5-FU ilacının >80'den fazlası florlanmış β -alanine katabolize olduğu rapor edilmiştir. Kalan 5-FU anabolik metabolik yolla birleşmesi öncelikle dTMP'nin de novo sentezi için gerekli bir enzim olan timidilat sentazın (TS) inhibisyonuna ve anti-tümör ve sito-toksik etkilere neden olur. 5FU, 5FdUMP'ye dönüşür ve TS ile stabil bir kompleks oluşturur. Bu komplekste daha fazla enzimatik aktiviteyi sınırlandırır, DNA

ve RNA sentezini ve stabilizezini azaltır. Son 20 yıldır 5FU tedavisine yanıt olarak DPD aktivite eksikliği ve ağır toksitite arasında nedensel bağlantı yoğun olarak çalışılmıştır. DPD’i kodlayan gen DPYD insan kromozom bölgesinde 1p22 de yer alır ve yaklaşık 950 kb’ı kapsayan 23 ekzon bölgesinden oluşur.

DPYD’de varyasyonların çoğunun enzimatik aktivite üzerinde işlevsel sonuçları olmamasına rağmen 30 üzerinde tek nükleotid poliformizmi (SNPs) ve delesyon mutasyonları tanımlanmıştır. İnsanların %40-50’den daha fazlasında tam ya da kısmi DPD eksikliğine neden olduğu bulunan IVS14 +1 G > A olan varyanta özel bir ilgi gösteriri. Son çalışmalarda epigenetik faktörlerin enzim aktivitesini etkileyebileceğini önerilmiştir. DPYD promotorunun anormal metilasyonunun kısmi DPD eksikliği fenotimine neden olduğu bulundu. 5-FU’nun yaygın kullanımından dolayı DPD eksikliği ve 5-FU’dan dolayı ağır toksitite önemli bir konudur. 1200 üzerinde hastanın meta-analizi 5-FU ile tedavi edilen hastaların %30’dan fazlasının ilaca bağlı toksitite deneyimi olduğunu ortaya koymuştur. Kısmi DPD eksikliğini gösteren DPD enzimatik aktivite düşüklüğünün sıklığını ilave çalışmalar farklı etnik alt popülasyonlar arasında önemli değişkenlik göstermesine rağmen genel popülasyonda ilk başlarda %3-5 arasında olduğu arasında olduğu tahmin edilmiştir. DPD aktivite belirlemek için pek çok tarama metodu geliştirildi. En yaygın test, yeni testlerin kalitesini karşılaştırmak için bir kriter (karşılaştırma testi) kullanır. 5FU ile radyoaktif işaretli hastaların periferel kan momonükleer hücrelerinin (PBMCs) ex vivo inkübasyonunun ve yüksek-basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile katabolit oluşum oranının sonucunu ölçülmesini içerir. DPD’nin karaciğerde aktivitesi yüksek olmasına rağmen PBMCs’nin DPD aktiviteleri arasında güçlü bir uyum olduğu belirlenmiştir ve PBMCs’lerin kullanımı daha kolay olduğu için daha sık kullanılmıştır. DPD mRNA’sının real-time kantitatif PCR’nın DPD aktivitesini ölçmek için alternatif bir yöntem olarak düşünülmüştür. Kantitatif PCR radyoaktif işaretlenmiş deneyden daha az karmaşık ve nispeten yüksek verimli olduğundan daha avantajlıdır. Az sayıda hasta üzerinde yapılan son bir raporda DPD enzim aktivitesini hesaplamak için 5FU’nın katabolik yolda son metaboliti olan flora-β-alanin (FBAL) plazma seviyesinin HPLC ile ölçülmesi önerilmiştir. FBAL’in indirgenme seviyesi önemli ölçüde radyoaktif test ile ölçülen indirgenmiş DPD

aktivitesi ile ilgilidir. Buna rağmen, bu analiz florapirimidin en az test uygulama dozajını gerektirir (Yen and McLeod 2007).

5-floraurasil (5-FU), ilk olarak Heidelberger tarafından 1957 yılında sentez edilmiştir, 45 yıldan daha fazla süredir çeşitli solid kanserlerin tedavisinde kullanılmaktadır. Japonya da, tegafur, doxifluridine (5-DFUR) gibi 5-FU türevleri ve 1:4 oranında karıştırılmış tegafur ve urasilden oluşan bileşik (UFT) 1970 yılından beri geliştirilmiş oral yolla kanserin tedavisinde kullanılmıştır. 1990 'lı yıllarda Birleşik Devletlerde ve Avrupada, UFT/leucovorin (LV), capecitabine, eniluracil/5-FU, 1M tegatur-0,4 M gimeracil-1M ostacil potassium (S-1) geliştirildi ve oral kanser tedavisinde florlanmış pirimidinler ile kullanımı dikkat çekmeye başlanmıştır. Bu ilaçlar arasında, UFT/LV, eniluracil/5-FU, ve S-1 dihidropirimidin dehidrogenazı inhibe eden floroprimidinler olarak (DIFs) olarak sınıflandırılır. Genel anlamıyla, bu ilaçlar DPD (EC 1.3.1.2)'yi inhibe etmek amacıyla geliştirilmiş florlanmış pirimidinlerdir. Dihidropirimidin dehidrogenaz enzimi karaciğer ve mononükleer hücrelerde yüksek aktivite gösterir. Aboagye ve arkadaşları tarafından 5-FU'nun %96'nın karaciğerde parçalandığı rapor edildi. Alınan 5-FU'nun kanda eliminasyon yarı ömrü yaklaşık 20 dakikadır. 5-FU özellikle karaciğerde parçalanmasına rağmen DPD aktivitesi ölçmek için örnek toplamak kolay değildir. Periferik mononükleer hücreler (PMNCs) karaciğerdeki DDP aktivitesi ile zayıf bir pozitif lineer korelasyon gösterdiği için belirteç olarak kullanılmıştır. PMNCs deki DPD aktivitesi (PMNC-DPD) 5-FU atılımı ters orantılıdır. PMNC-DPD aktivitesi intravenöz infüzyon sırasında kan 5-FU konsantrasyonlarının varyasyonları dahil olmak üzere sirkadiyen varyasyonlar gösterdiği bilinmektedir. 5-FU'nun parçalanma ürünü olan α -flora- β -alanin (F-BAL) ve metabolitlerinin toksisiteye neden olduğu deneysel olarak gösterilmiştir. Çünkü DIF (inhibitör floroprimidinler) preperatlar ve inhibitör olmayan DIF preperatlar arasındaki geliştirilmiş toksisite örnekleri açıkça farklıdır. DPD'nin inhibisyon ve ya kontrolünün parçalanma ürünleri ve toksisiteyi azalttığı olasılığı inkar edilemez. Bilindiği üzere timidilat sentaz (TS) 5-FU'nun hedef enzimidir ve 5-FU'nun duyarlılığını etkiler. Aynı zamanda DPD'nin de 5-FU'nun duyarlılığını belirlediği bildirilmiştir. Aboagye ve arkadaşları, 5-FU'nun %83'nün tümörü küçültmeye maruz bıraktığını kaydetti. Bu tümörlerde DPD, 5FU'a

göre kemoterapi etkisini belirlediği kliniksel olarak doğrulanmıştır. DPD, 5-FU'nun parçalanması için hız belirleyici enzimdir ve 5-FU'nun etkisini belirlemek için TS'den daha güçlü bir faktör olduğu düşünülmüştür. Bu sonuçlar aynı zamanda tümör ilerlemesinin yansıtılması olarak, DPD'nin prognostik faktör olarak kullanılma olasılığını akıllara getirtmiştir. Tümörlerdeki DPD aktivitesi veya ekspresyonu kanserin türüne bağlı olarak normal dokudan farklı olduğu gösterildi. 5-FU'nun etkinliği ve farmakokinetiği DPD tarafından belirlendiği için 5-FU'nun farmakokinetiğinin stabilizasyonu ve etkinliğinin artırılması DPD inhibisyonu vasıtasıyla çalışılmıştır. DPD inhibitör etkisi gösteren bu floropirimidinler son zamanlarda DIFs (inhibitör florapirimidinler) olarak sınıflandırılırlar. Bu ilaçların oral ilaç uygulamaları ile intravenöz uygulamaları arasında farmakokinetiklerinin karşılaştırılabilir olduğu ortaya çıkarıldı. Tümörlerde DPD'nin inhibisyonu 5-FU için yüksek DPD ekspresyonu ile dirençli tümörlerin üstesinden gelmek için etkili bir strateji olabilir (Tetsuro 2003).

Klinik uygulamalarda 50 yıldan daha fazla kullanılmasına rağmen 5-FU büyük ilgiden dolayı hala kemoterapide kullanılmaktadır. Kolektal, göğüs, özofajival (yemek borusu ile ilgili), baş ve boyun tümörleri gibi birçok solid kanser yardımcı (adjuvan), neoadjuvan veya palyatif (hafifletici) tedavi ortamında 5-FU bazlı terapiler ile tedavi edilmektedir. 5-FU tedavisine yanıt hastalar arasında oldukça değişkendir ve bunlardan %10-30 standart dozlarda hayatı tehdit eden şiddetli yan etkilere sahiptir. 5-FU'un katabolik yolağındaki alterasyonlar etkinliğini ve yan etkilerinin ortaya çıkma riskini etkilediği düşünülmektedir. Dihidropirimidin dehidrogenaz, 5-FU katabolizmasından sorumlu anahtar enzimdir ve 5-FU'ü 5-flora-5,6-dihidrourasile (5-FUH₂) dönüştürür. Azaltılmış DPD aktivitesi ile artan oranlarda 5-FU uygulanmasıyla 5-FU sitotoksit 5-flora-2-deoksiuridin monofosfat'a metabolize olur. 5-flora-2-deoksiuridin monofosfat'ta TS enzimi ve onun kofaktörü 5,10-metilentetrahidofolat ile kararlı üçlü bir kompleks oluşturur, bu komplekste sonradan TS enzimini inhibe eder. İnsan hücrelerinde TS aktivitesi timidin trifosfatın (dTTP) öncüsü olan timidilatın (dTMP) tek de novo kaynağıdır. TS'in inhibisyonu, DNA sentezlenmesini bozan, hücre döngüsünü durduran ve apoptozise neden olan intraselüler nükleotid havuzunda bir dengesizlikle sonuçlanır. Azalmış DPD aktivitesine sahip olan hastalar bu nedenle mukoz membranları ve kemik

iliği gibi vücut dokularında büyük hücre ölümlerinin hızlıca çoğalmasıyla gelişen şiddetli veya ölümcül 5-FU toksitesi riskini artırır. Plazmadaki belirlenmiş endojen oranı DPD aktivitesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir ve DPD aktivitesi için bir vekil marker olduğu düşünülmüştür. 5-FU'nun aynı metabolik yol boyunca urasil (U) gibi bozunduğu için, UH_2/U oranı aynı zamanda 5-FU bazlı kemoterapilerde ciddi yan etkilerin riskinin habercisi olabilir.

5-FU uygulanmasından önce UH_2/U oranlarını değerlendirilir. Bu marker tedaviyi başlatmadan önce şiddetli 5-FU toksitesi riskine sahip hastaları teşhis etme olanağı verebilir. 5-FU H_2 ve 5-FU plazma düzeylerinin gözlenmesi bireysel olarak 5-FU dozunun ayarlanması için tedavi boyunca ilacın etkinliği ve koruyuculuğunu artırmak amacıyla kullanılabilir (Büchel *et al.* 2013).

Kısmi ve tam DPD eksikliği, 5FU alımını takiben ölüme içeren şiddetli toksisite gelişen kanser hastalarına etkileyen farmakogenetik bir hastalıktır. İnsan DPD'sini etkileyen inhibitör ilaçlar 5FU etkinliğini artırır ve daha düşük dozajlarda ilaç alımına izin verir.

Mutasyonel çalışmalarda, işlevsel olarak önemli bölgelerde yer alan beş rezidünün domuz dihidropirimidin dehidrogenazın katalitik mekanizmasındaki rolünü araştırmak amaçlanır. Bu enzime pirimidin bağlanması için aktif bölge lopunun (halkasının) kapanmasıyla beraber katalitik olarak bir sistein kalıntısı (C671) önemlidir. Benzer enzim mutantlarının kinetik karakterizasyonu, aktif bölgenin kapanması için halkadaki H673 kalıntısının protondan arındırılması gerekliken sbstrat tanınması için S670 önemlidir. Redoks kofaktörlerinin bağlayan seçilmiş kalıntıları içeren çalışmalar Q156, glutamat için mutastona uğrarsa, ilk FeS grubunun sıra dışı koordinasyonundan dolayı indirgenemez ve aktivite gösteremez bundan dolayı R235 in FAD bağlanması için önemlidir (Lohkamp *et al.* 2010).

Farmakokineik çalışmalar anabolik yolda 5-FU'nun enzimatik aktivasyonu ve katabolik eliminasyonu arasında hassas bir denge olduğunu belirtir. 5-FU'nun metabolizmasının

katabolik yolu hem sistemli toksitede hemde 5-FU'la dayalı anti-tümör etkinliğinin tedavisinde önemlidir. Pediatrikte DPD eksikliği doğuştan thymine-uraciluria, nörolojik bozukluklar, büyüme geriliği ve dismorfizm gibi kalıtsal hastalıklarla beraber görülür. Aynı zamanda DPD aktivitesinin olmadığı veya düşük olduğu durumlarda mukozit, granülositopeni, nöropati ve hatta 5-FU ilacı alındıktan sonra ölüme içeren büyük toksitelerin geliştiği görüldü. Çok sayıdaki çalışmada ilaçla tedavi sırasında şiddetli toksite çeken hastaların yaklaşık %30-50 arasında DPD eksikliği olduğu görülmüştür. Genel popülasyonda kısmi veya tam DPD eksikliği %1-%5 den daha az olduğu düşünülür (Hsiao *et al.* 2007, Dolegowska *et al.* 2012). Periferik mononükleer kan hücrelerin (PBMN) DPD aktivitesi normal karaciğer DPD aktivitesi ile pozitif linier korelasyon gösterdiğinden dolayı günümüzde PBMN total vücut aktivitesi için surrogate (yerini tutucu) marker olarak kullanılır. 5-FU'nun parçalanmasında DPD aktivitesi ve 5-FU atılımı arasında ters ilişki DPD'nin rolünü belirtir. İnsan DPYD geni yaklaşık 150 kb boyutunda, 1p22 kromozomun üzerinde yer alan tek bir gen olarak bulunur. Büyüklüğü 69 dan 1404 kb arasında değişen 23 ekzon ve büyüklüğü 1 ile 20 kb arasında olan intronlardan oluşur. İnsan DPYD'nin cDNA'sı 110 kDa ağırlığında olan ve 1025 amino asit içeren bir proteini kodlar. Sığır, domuz ve insan DPYD genleri karşılaştırıldığında bu türler arasında çok benzer mekanizma ve üç boyutlu yapıyla genin evrim boyunca oldukça korunduğu gözlenmektedir. Günümüzde DPYD'nin gen kodlama bölgesinde 2 splice bölge mutasyonları, 2 anlamsız (nonsense) mutasyonları, 5 delesyon mutasyonları, 32 yanlış anlam (missense) mutasyonları ve 2 splice mutasyonlarını içeren 40'ten daha fazla mutasyon ve polimorfizm rapor edilmiştir. Mutasyonların çoğu DPD eksikliği olan hastalarda belirlenmiştir. DPD proteini etkileyen farklı mutasyonlar mekanizmaları vardır. DPYD'nin değişmez GT siplays donor bölgesinde G'nin A'ya değişimini, DPD pre-mRNA parçasının oluşumunda hatalı bir siplaysa neden olur. GT siplays bölgesinde bir G'nin A'ya mutasyonu DPD proteininde 14. Egzonda atlamaya neden olur ve DPD proteinde 581-635 amino asitlerini kodlayan 165 bp kaybolur ve kesikli bir protein oluşur. 61C>T ve 1156G>T anlamsız mutasyonları translasyonun erken sonlanmasına neden olan stop kodonu yaratır ve işlevsel olmayan bir proteine yol açar. Beş delesyon mutasyonları DPYD geninde çerçeve kayması mutasyonuna neden olur ve erken sonlanma meydana gelir. DPD

mutasyonlarının çoğunluğu olan missense mutasyonlar, DPD aktivitesi üzerinde farklı etkilere yol açan mutant DPD proteinlerine oluşturur (Hsiao *et al.* 2007).

2.1. Çalışmanın Amacı

Kanser hastaları kullanılan antikanser ilaçların yan etkilerinden dolayı oldukça zor bir tedavi süreci geçirmektedirler. Tedavinin sürecinin çok uzun olması ve şiddetli yan etkilerinden dolayı hastalar üzerinde hem bedenen hemde zihinsel birçok problem ortaya çıkmaktadır. Bu yüzden kanser hastalarında depresyon çok sıklıkla görülen bir hastalıktır ve hastanın yaşam kalitesini, kendine bakımını, tedaviye uyum ve zamanla kanserin şiddetini, gidişini ve yanıtını etkiler. Depresyonun seyrine göre pek çok antidepresan ilacı hastalara tedavi sırasında verilmektedir. Ayrıca daha önce yapılan çalışmalarda bazı enzimlerin metallerle çeşitli komplekslerle oluşturarak antikanser aktivitesine sahip olduğu görülmüştür.

5-FU gibi florlanmış pirimidin analoglarının yapısında olan ilaçların parçalanmasında yer alan önemli bir enzim olan DPD üzerine bu ilaçların ve metallerin etkisi önemlidir. Çünkü DPD enziminin kısmı ve tam eksikliği hastalar üzerinde çeşitli hatta bazı durumlarda ölüme bile varan toksitelere sebep olduğu gibi hastalığın seyri hakkında da bilgi vermektedir. Bu sayede hastalarda kullanılacak ilaç dozunun ayarlanmasında kolaylık sağlar.

Bu tez kapsamında 5-FU gibi florlanmış antikanser ilaçlarının parçalanmasında görev alan enzimlerden biri olan DPD enzimi koyun karaciğerinden saflaştırıldı. Enzimin saflık derecesi PAGE ile belirlendi ve saflaştırılan enzimin en etkili olduğu pH, sıcaklık, K_m ile V_{max} değerleri gibi kinetik özellikleri tespit edildi. Ayrıca elde edilen saf enzim aktivitesi üzerine essitalopram, mirtazapin, fluoksetin ve haloperidol etkin maddeleri içeren antidepresan moleküller, 2,6-di-tert-bütilfenol, 2,6-dimetilfenol, 2,6-diisopropilfenol ve lidokain anestetik moleküllerin etkisi incelendi. Daha önce benzer hiçbir çalışmaya rastlanmadığından dolayı Ag^+ , Cu^{+2} , Ni^{+2} , Zn^{+2} , Co^{+2} , Fe^{+3} , Cr^{+2} , Cd^{+2} ve Pb^{+2} metal iyonlarının etkisi araştırıldı. Bütün bu moleküllerin ve iyonların enzim

üzerine in vitro etkileri araştırıldı ve inhibisyon etkisi gösteren maddeler için IC_{50} değerleri tespit edildi.

Kanser tedavisi sırasında alınan depresyon ilaçlarının ve diğer ilaçların DPD enzimini etkileyip etkilemediği konusunda araştırma yapmak, insanlar için toksik olmayan dozların hesaplanmasını mümkün kılarak, insan sağlığına ve literatüre önemli katkılar sağlayacağı inancındayız.

3. MATERYAL ve METOTLAR

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Standart serum albumin, Amonyum sülfat, Sodyum asetat, N,N,N,N'-tetrametil etilendiamin (TEMED), Diyaliz torbası, Sodyum karbonat, , Formaldehit, Sodyum tiyosülfat, Sodyum klorür, Potasyum klorür, Glutalaldehit, N,N'-metilen bisakrilamid, Akrilamid, Coomassie brillant blue G-250, Coomassie brillant blue R-250, Brom timol mavisi, Gliserol, Trihidroksimetilaminometan (Tris), Etanol, Metanol Sigma Chemical Company'den; Sodyum sülfat, Sodyum dodesilsülfat (SDS), Gümüş nitrat, Hidroklorik asit, sukroz, aminoetil izotiyourenyum bromür, fenilmetilsülfonil florür (PMSF), 1,4-Dithioerythritol (DTT), β -nikotindiamid adnindinükleotit 2'fosfat (NADPH), Urasil, İzoproponal E. Merk AG'den; Potasyum dihidrojen fosfat, Sodyum hidroksit, Etilendiamintetraasetikasit (EDTA) Riedel de Haen'den; β -merkapttoetanol Fluka'dan; Glisin ICN Biomedicals. inc.'den sağlanmıştır.

3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

Çalışmalar esnasında aşağıdaki alet ve cihazlardan faydalanıldı.

Soğutmalı santrifüj	: Hermle Z 323 K(Germany)
Spektrofotometre	: Beckman Coulter Du 730 (UV-VIS)
pH metre	: Sehott pH-Meter CG840
Elektroforez tankı	: Bio Rad (dikey)
Peristaltik pompa	: İsmatec
Karıştırıcı (Shaker)	: IKA KS 130 basic
Karıştırıcı (Vorteks)	: Fisons whirli-mixer
Hassas terazi	: Denver Instrument

Otomatik pipet	: Eppendorf
Afinite kolonu	:Kapalı sistem oluřturucu (1x10), sigma (ABD)
Çalkalayıcı	: Midi Dual 14
Magnetik karıştırıcı	: Chiltan Hotplate Magmetic Stirrer HSBI
Saf su cihazı	: Barnstead Easy Pure UV/UF
Su banyosu	: Nüve
Kar makinesi	: Scotsman AF-20 (Authomatic ice machines)
Ultraturaks	: Heidolph SilientCrusher M
Güç kaynağı	: 1-Bio Rad Power Pac 3000
Buzdolapları	: Siemens
Derin dondurucu (-20°C'ye kadar)	: Sanyo Medical Freezer
Ultrasantrifüj	: Beackman Coulter (Optima LE-SOK Ultracentrifuge)

3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

Biyokimyasal çalışmalarda kullanılan çözeltilerin kullanılış yerleri ve hazırlanış şekilleri aşağıdaki gibidir. Çözelti hazırlamak amacıyla kullanılan su, saf sudur.

Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler

1. 280 mM KH_2PO_4 (pH=7,4) çözeltisi: 2,4385 g KH_2PO_4 alınarak 40 ml saf suda çözüldü, pH 7,4 yapıldıktan sonra (pH metre ile) toplam hacim saf su ile 50 ml'ye tamamlandı.
2. 20 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi: 0,203 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ alınarak bir miktar saf suda çözüldü, toplam hacim saf su ile 50 ml'ye tamamlandı.
3. 8 mM DDT çözeltisi: 0,0617 g DDT alınarak bir miktar saf suda çözüldü, son hacim saf su ile 50 ml'ye tamamlandı.
4. 600 μM NADPH çözeltisi: 0,0050 g NADPH alınarak bir miktar saf suda çözüldü, son hacim saf su ile 10 ml'ye saf suda tamamlandı.

5. 1500 μ M Urasil çözeltisi: 0,085 g urasil alınarak bir miktar saf suda çözüldü son hacmi saf su ile 50 ml'ye tamamlandı.

Homojenat hazırlanması için kullanılan tampon:

A tamponu (pH=7,4): 35 mM KH_2PO_4 , 2,5 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,25 M sukroz, 10 mM EDTA, 2 mM DTT, 0,1 mM PMSF, 1 mM aminoetil izotiyourenyum bromür, 5 mM 2-merkaptto etanol çözeltisi: 0,6096 g potasyum fosfat dibazik, 0,05082 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 8,55 sukroz, 0,2922 g EDTA, 0,03085 g DTT, 0,001741 g PMSF, 0,02810 g aminoetil izotiyourenyum bromür ve 35,75 μ L 2-merkapttoetanol alınarak 80 ml saf suda çözüldü, pH'sı ayarlandıktan sonra hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

DEAE-Selüloz anyon değişim kromatografisi kolonunda kullanılan çözelti

Jelin hazırlanmasında kullanılan çözelti 0,2 M Tris/HCl pH 7,2 tamponu: 24,228 g Tris alınır, 800 ml saf suda çözülür, pH metre kullanılarak 1 M HCl ile pH 7,2'ye ayarlanır. Son hacim saf su ile 1 L'ye tamamlanır.

Affinite kromatografisi kolonunda kullanılan çözeltiler

1. I. Rejenarasyon çözeltisi: 0,1 M Na-asetat/ 0,5 NaCl (pH=4,5): 4,1 g Na-asetat ve 14,61 g NaCl alınıp 450 ml suda çözüldü, pH=4,5'e ayarlanarak ve toplam hacim saf suyla 500 ml'ye tamamlandı.
2. II. Rejenarasyon çözeltisi: 0,1 M Tris/ 0,5 NaCl (pH=8): 6,05 g Tris ve 14,61 g NaCl alınıp 450 ml suda çözülecek, pH=4,5'e ayarlanarak ve toplam hacim saf suyla 500 ml'ye tamamlandı.

DEAE-Selüloz anyon değişim ve affinite kolonunun dengelenmesi, yıkanması ve diyaliz için kullanılan tampon

1. 0,5 mM DTT içeren A tamponu: (35 mM KH_2PO_4 , 2,5 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,25 M sukroz, 10 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 0,1 mM PMSF, 1 mM aminoetil izotiyourenyum bromür, 5 mM 2-merkapto etanol (pH 7,4)): 6,0963 g KH_2PO_4 , 0,5082 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 85,575 sukroz, 2,9224 g EDTA, 0,07712 g DTT, 0,01741 g PMSF, 0,2810 g aminoetil izotiyourenyum bromür ve 357,5 μL 2-merkaptoetanol alınarak 800 ml saf suda çözüldü, pH 7,4'e ayarlandıktan sonra hacmi saf su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

Affinite kolonundan elüsyon yapmak için kullanılan tampon

1. 0,5 mM DTT, 1 M KCl ve 0,2 mM NADPH içeren A tamponu (pH=7,4) : 0,6096 g KH_2PO_4 , 0,05082 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 8,55 sukroz, 0,2922 g EDTA, 0,007712 g DTT, 0,001741 g PMSF, 0,02810 g aminoetil izotiyourenyum bromür, 7,4551 g KCl, 0,01667 g NADPH ve 357,5 μL 2-merkaptoetanol alınarak 80 ml saf suda çözüldü, pH'sı ayarlandıktan sonra hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

Bradford yöntemiyle protein tayini için kullanılan çözelti:

1. Coomassie Brilliant Blue çözeltisi: 100 mg coomassie brilliant blue G-250 rektifi 50 ml %95'lik etanolde çözüldü. Bu çözeltiye %95'lik 100 ml fosforik asit ilave edilerek çözeltinin hacmi saf suyla 1000 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti karanlık ortamda muhafaza edildi.

Elektroforez için kullanılan çözeltiler

1. 1 M Tris-HCl tamponu (pH:8,8): 12,114 g Tris, 80 ml saf suda çözüldü. 1 N HCl ile pH:8,8'e ayarlandı, toplam hacim 100 ml'ye tamamlandı.

2. 1 M Tris-HCl tamponu (pH:6,8): 12,114 g Tris, 80 ml saf suda $\text{çöz} \ddot{u} \ddot{l} \ddot{d} \ddot{u}$. 1 N HCl ile pH:6,8'e ayarlandı, toplam hacim 100 ml'ye tamamlandı.
3. %30 Akrilamid-%0,8 Bisakrilamid çözeltisi : 15 g akrilamid, 0,4 g bisakrilamid ve 34,6 g saf su karıştırılarak $\text{çöz} \ddot{u} \ddot{l} \ddot{d} \ddot{u}$.
4. %10'luk SDS: 1 g SDS 9 g saf suda $\text{çöz} \ddot{u} \ddot{l} \ddot{e} \ddot{r} \ddot{e} \ddot{k}$ elde edildi.
5. %10'luk amonyum persülfat çözeltisi : 1 g amonyum persülfat tartılarak saf su ile 10 ml'ye tamamlandı.
6. Yürütme tamponu: 1,51 g Tris ve 7,51 g glisin, 450 ml saf suda $\text{çöz} \ddot{u} \ddot{l} \ddot{d} \ddot{u}$. Daha sonra bunun üzerine 5 ml %10'luk SDS ilave edilerek toplam hacim saf suyla 500 ml'ye tamamlandı.
7. %0,1'lük brom timol mavisı çözeltisi : 0,1 g indikatör 0,01 M 16 ml NaOH içerisinde $\text{çöz} \ddot{u} \ddot{m} \ddot{d} \ddot{u}$ ve toplam hacim saf suyla 100 ml'ye tamamlandı.
8. Numune tamponu: 1 M Tris-HCl (pH 8)'den 0,5 ml, %10'luk SDS'den 1 ml, %100'lük gliserinden 1 ml ve %0,1'lik bromtimol mavisinden 1 ml alınarak saf suyla 10 ml'ye tamamlandı. Bu tampona kullanılmadan önce 950 μl numune tamponundan 50 μl olacak şekilde β -merkaptoetanol ilave edildi.

Gümüş boyamada kullanılan $\text{çözelti} \ddot{r}$

1. Tespit çözeltisi : 60 ml saf su, 30 ml %96'lik etanol, 10 ml asetik asit'in karıştırılmasıyla elde edildi.
2. Redüksiyon Çözeltisi : 4,8 g sodyum asetat, 45 ml etanol ve 80 ml saf su karıştırıldı, pH 6'ya asetik asitle ayarlandıktan sonra 150 mg sodyum tiyosülfat, 3 ml glutalaldehit eklenip saf su ile 150 ml'ye tamamlandı.
3. Boyama çözeltisi : 100 mg gümüş nitrat, 100 ml saf su'da $\text{çöz} \ddot{u} \ddot{m} \ddot{d} \ddot{u}$ üzerine 30 μl formaldehit eklenmesiyle hazırlandı.
4. Yıkama Çözeltisi 1: 3,75 g sodyum karbonat, 270 ml saf su'da $\text{çöz} \ddot{u} \ddot{l} \ddot{d} \ddot{u}$ ve üzerine 120 μl formaldehit ilave edildi.
5. Yıkama çözeltisi 2: 1 ml gliserin ve 250 ml'lik %5'lik asetik asitten karıştırılarak hazırlandı.

Çalışmada kullanılan metal çözeltilerin stok konsantrasyonları

1. 0,1 M AgNO_3 çözeltisi: 0,1698 g AgNO_3 tartılıp 10 ml saf suda çözöldü.
2. 0,1 M $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi: 0,237 g $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ tartılıp 10 ml saf suda çözöldü.
3. 0,1 M ZnCl_2 çözeltisi: 0,1363 g ZnCl_2 tartılıp 10 ml saf suda çözöldü.
4. 0,1 M $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ çözeltisi: 0,3312 g $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 10 ml saf suda çözöldü.
5. 0,1 M $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$ çözeltisi: 0,400 g $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ tartılıp 10 ml saf suda çözöldü.
6. 0,1 M $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi: 0,2379 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ tartılıp 10 ml saf suda çözöldü.
7. 0,1 M $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi: 0,3085 g $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ tartılıp 10 ml saf suda çözöldü.
8. 0,1 M FeCl_3 çözeltisi: 0,1622 g FeCl_3 tartılıp 10 ml saf suda çözöldü.
9. 0,1 M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi: 0,2496 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ tartılıp 10 ml saf suda çözöldü.

İnhibisyon çalışmalarında kullanılan moleküllerin stok konsantrasyonları

1. 0,031 M essitalopram çözeltisi: 0,1 g essitalopram tartılıp 1 ml suda çözöldü.
2. 0,013 M fluoksetin çözeltisi: 0,02 g fluoksetin tartılıp, 5 ml suda çözöldü.
3. 0,056 M mirtazapin çözeltisi: 0,015 g mirtazapin tartılıp, 1 ml suda çözöldü
4. 0,005 M haloperidal çözeltisi: 0,002 g haloperidal tartılıp, 1 ml suda çözöldü.
5. 0,05 M 2,6-di-tert-bütilfenol çözeltisi: 0,0104 g 2,6-di-tert-bütilfenol alınıp 1ml DMSO'da çözöldü.
6. 0,084 M 2,6-dimetilfenol çözeltisi: 0,0103 g 2,6-dimetilfenol alınıp, 1ml DMSO'da çözöldü.
7. 0,2617 M 2,6-diizopropilfenol (propofol) çözeltisi: 5,23 M'lık stok 2,6-diisopropilfenol çözeltisinden 0,05 ml alınıp 1 ml DMSO'da çözöndü.
8. 0,01066 M lidokain çözeltisi: 0,02133 M'lık stok lidokain çözeltisinden 0.05 ml alınıp, 4,5 ml DMSO'da çözöldü.

3.2. Yöntem

3.2.1. Protein tayini

3.2.1.a. Kalitatif protein tayini

Kalitatif protein tayini, 280 nm’de proteinlerin yapısında bulunan triptofan, trozin ve fenilalanin amino asitlerinin maksimum absorbands göstermesi esasına dayanır (Segel 1968). Kromatografi işlemlerinden sonra eşit hacimlerde alınan bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Fraksiyonlar kuvarz küvetlere alınarak, absorbandsları spektrofotometrede köre karşı okundu.

3.2.1.b. Bradford yöntemiyle protein tayini

Hazırlanan homojenat amonyum sülfat çöktürmesi ile elde edilen enzim çözeltisi ve 2’, 5’ADP-Sepharose 4B afinite kromatografisi yöntemiyle kısmi saflaştırılmış enzim için kanitatif protein miktarı Bradford 1976 metoduna göre belirlendi. Bu yöntemde boya olarak kullanılan Coomassie Brilliant Blue G-250, negatif bir yüke sahiptir ve protein üzerindeki pozitif yüke bağlanır. Boyanın kırmızı ($\lambda_{\text{max}}=465$ nm) ve mavi ($\lambda_{\text{max}}=595$ nm) formu mevcuttur. Proteinin bağlanması, kırmızı formun mavi forma dönüşümünü sağlar. Bu yöntemin bozucu faktörlere karşı hassasiyeti oldukça azdır (1-100 μg arası). Reaksiyon yüksek oranda tekrarlanabilir ve hızlı cereyan eder, iki dakikada tamamlanır. Tayin işlemleri şu prosedüre göre gerçekleştirildi: 1 ml’inde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albumin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 μl konuldu. Saf su ile bütün tüplerin hacmi 0,1 ml’ye tamamlandı ve 5 ml Coomassie brilliant blue G-250 çözeltisi ilave edilerek vorteks ile karıştırıldı. 10 dakika inkübe edildikten sonra 595 nm’de 3 ml’lik küvetlerde köre karşı absorbands değerleri okundu. Kör olarak, 0,1 ml enzim numunesinin içinde bulunduğu tampondan ve 5 ml Coomassie brilliant blue G-250 çözeltisinden oluşan karışım kullanıldı. Elde edilen sonuçlardan absorbands değerlerine karşılık gelen μg protein değerleri standart grafik haline getirildi. Saflaştırmanın her aşamasında ortamdaki protein miktarını belirlemek için enzim

numuneleri 20 kat veya daha çok seyreltme yapılarak elde edilen seyreltilmiş çözeltisinden 3 ayrı tüpe sırasıyla 50, 100 ve 200 µl alınarak üzerlerine 5'er ml renklendirme reaktifi eklendi. Vorteks ile karıştırıldıktan sonra 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Sonra 595 nm'de absorbans değerleri okundu. Bu işlem 3 defa tekrarlanarak 3 ayrı ölçümün aritmetik ortalaması alınıp standart grafikten protein miktarları belirlendi.

3.2.2. Koyun karaciğeri DPD enziminin aktivite ölçümü



Enzim aktivitesi Shindler ve Bardsley yöntemiyle NADPH'ın NADP⁺ ya yükseltgenmesinden dolayı harcanan NADPH'ın 340 nm'de takip edilmesi (absorbansın azalması) esasına göre yapıldı. Enzim ünitesi 1 mikromol NADPH'ın azalmasına sebep olan enzim miktarı olarak tanımlandı. Aktivite ölçümünde 28 mM K-Fosfat, 2 mM MgCl₂, 0,8 mM DTT, 60 µM NADPH, 150 µM urasil ve enzim çözeltisi ilave edilerek toplam hacim 1 ml ye tamamlandı. Kontrol tüpünde enzim çözeltisi yerine tampon çözeltisi ilave edildi. Aktivite ölçüm kuvvet içeriği Çizelge 3.1'de gösterildi.

Çizelge 3.1. Koyun karaciğeri DPD enziminin aktivite ölçüm kuvvet içeriği

Stok Çözeltiler	Kontrol Küveti		Numune Küveti	
	Hacim (µl)	Konsantrasyon (mM)	Hacim (µl)	Konsantrasyon (mM)
Potasyum fosfat	140	28	100	28
Magnezyum klorür	100	2	100	2
DTT	100	0,8	100	0,8
NADPH	100	60	100	60
Enzim numunesi	-	-	40	-
Saf su	460	-	460	-
Urasil	100	150	100	150
Toplam	1000	-	1000	-

Aktivite ölçüm kuvvetleri Çizelge 3.1'de gösterildiği şekilde önce urasil katılmaksızın pipetlendi. Sonra urasil, küvete pipetlenerek spektrofotometreye yerleştirildi ve okuma

başlatıldı. Başlangıçta ve dakikada bir olmak üzere üç dakika boyunca absorbans değerleri kaydedildi.

Enzim ünitesi hesaplanırken aşağıdaki formül kullanılacak.

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

$E\ddot{U}/ml = 1\text{ ml'deki enzim ünitesi}$

ΔOD = Bir dakikadaki absorbans değişimi

6,22 = 1 mM NADPH'ın oluşturduğu absorbans değeri (ekstinksiyon katsayısı)

V_T = Ölçümün yapıldığı küvetteki son hacim

V_E = Ölçümün yapıldığı küvete ilave edilen enzim numunesinin hacmi

S_f = Seyreltme faktörü (seyreltilen örnek için kullanılır)

3.2.3. Koyun karaciğeri DPD enziminin saflaştırma çalışmaları

3.2.3.a. Koyun karaciğer DPD enzimi için homojenat hazırlanması

Taze sığır karaciğeri alınarak (15 gram) üzerindeki zar temizlenip bıçakla küçük parçalar halinde doğrandı. Daha sonra sıvı azotla parçalanıp ultraturaks yapıldıktan sonra yaklaşık 1,5 katı kadar A tamponuna (A tamponu: 35 mM potasyum fosfat, 2,5 mM $MgCl_2$, 0,25 M sukroz, 10 mM EDTA, 2 mM DTT, 1 mM aminoetilizotiyoürebrobür, 0,1 mM PMSF, 5 mM 2-merkaptetanol pH=7,4) alındı. 13.500 rpm de 1 saat, 100000xg'de 1 saat satrifüj edildi. Süpernatant (homojenat) alınarak aktivite bakıldı (protein tayini için 1,5 ml alındı) ve amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı.

3.2.3.b. Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz

Proteinler çok değerlikli elektrolitlerdir, bu yüzden iyonlara benzer şekilde hareket ederler. Yeteri kadar yüksek tuz konsantrasyonunda, bir protein bir çözeltiden kantitatif olarak çöktürebilir. Bu olayın esası, yüksek tuz konsantrasyonunda protein moleküllerini çevreleyen ve çözünür halde tutan su moleküllerinin tuzdaki iyonlar tarafından çekilmesi ve proteinlerin çökmesinin sağlamasıdır. Proteinlerin çökmesinde molekül ağırlığı ve iyonik şiddet etkilidir. Dolayısıyla değişik tuz konsantrasyonlarında, değişik proteinler çöker (Lehninger 1993; Keha ve Küfrevioğlu 2009). Elde ettiğimiz elüatlarda proteinlerin bu özelliklerinden faydalanılacaktır.

Amonyum sülfat çöktürmesi için uygun doygunluk noktasını bulmak amacıyla %0-20, 20-40, 40-60, 60-80 ve 80-90 aralıklarında çöktürme yapıldı. Çöktürme işlemleri sırasında kullanılan katı amonyum sülfat miktarları şu formülle tespit edildi.

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

V = Süpernatantın hacmi

S₁= 1'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu

S₂= 1'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğu

Amonyum sülfat çöktürmesi için, afinite kolonundan elde edilen elüatlar birleştirildikten sonra, katı (NH₄)₂SO₄ yavaş yavaş porsiyonlar halinde katıldı (0°C'de). Her porsiyon ilavesi sırasında daha önce katılan (NH₄)₂SO₄'ın çözünmüş olmasına dikkat edildi. Çöktürmeden sonra elde edilen çözelti 13.500 rpm de 5°C'de 15 dakika süreyle soğutmalı santrifüjde santrifüj edilerek oluşan çökelek, A tamponunun çözünebildiği en az miktarında çözüldü. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen enzim çözeltisi diyaliz torbasına yerleştirildikten sonra enzimin içinde bulunduğu A tamponu karşı 1-2 defa değiştirilmek suretiyle 24 saat süreyle diyaliz edildi. Diyaliz işlemi magnetik karıştırıcı üzerinde buzdolabı içinde (4°C'de) gerçekleştirildi.

Amonyum sülfat çöktürmesinden sonra enzimin saflaştırılması için iki yöntem denendi.

I. Yöntem;

3.2.3.c. 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonunun hazırlanması ve paketlenmesi

10 ml'lik yatak hacmi için 2 g kuru 2', 5'-ADP Sepharose 4B jeli tartılarak, 400 ml destile su ile katı maddelerin uzaklaştırılması için birkaç defa yıkandı. Yıkama esnasında jel şişirilmiş oldu. Şişirilmiş jelin havası su trompu kullanılarak vakum ile alındı ve daha sonra dengeleme tamponu 0,5 mM DTT içeren A tamponu (35 mM KH_2PO_4 , 2,5 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,25 M sukroz, 10 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 0,1 mM PMSF, 1 mM aminoetil izotiyourenyum bromür, 5 mM 2-merkapt etanol (pH 7,4)) jel süspanse edildi. Süspanse edilmiş jel, 1x10 cm'lik kapalı sistemden oluşan soğutmalı kolona paketleni. Jel çöktükten sonra peristaltik pompa yardımıyla A tampon ile yıkanarak kolon dengelendi. Kolonun dengelenmiş olduğu elüat ile tampon çözeltide 280 nm'de absorbanlarının ve pH'larının eşitlenmesinden anlaşıldı. Böylece afinite kolonu hazırlanmış oldu.

3.2.3.d. Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu

Amonyum sülfat ve diyaliz sonrası alınan numune 0,5 mM DTT içeren A tamponu (35 mM KH_2PO_4 , 2,5 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,25 M sukroz, 10 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 0,1 mM PMSF, 1 mM aminoetil izotiyourenyum bromür, 5 mM 2-merkapt etanol (pH 7,4)) ile dengelenmiş olan ve Bölüm 3.2.3.c. anlatıldığı gibi hazırlanan 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kolona tatbik edildi ve kolon aynı tampon çözeltisi ile yıkandı. Yıkandıktan sonra kolondan homojenat geçirildi ve homojenat altta toplandı. Daha sonra kolan rejenere edildi ve dengelendi. Homojenat tekrar kolondan geçirildi. Kolon yıkandıktan sonra enzimin elüsyonu 0,5 mM DTT, 0,2 mM NADPH ve 0,2 mM KCl içeren A tamponuyla yapıldı. Peristaltik pompa vasıtasıyla kolonun akış hızı 35 ml/saat'e ayarlandı ve elüatlar 1,5'er ml halinde tüplere alındı.

II. Yöntem;

3.2.3.e. Asetik asit çöktürmesi

Amonyum sülfat çöktürmesi sonrası diyaliz edilen süpernatanta pH 4,85 oluncaya kadar %5'lik asetik asit çözeltisi ilave edildi. Bu pH da 10 dakika karıştırıldı, 13.500 rpm'de 10 dakika santrüfij yapıldı. Süpernatant 0,5 M NaOH ile pH 7,3'e ayarlandı ve diyaliz yapıldı.

3.2.3.f. DEAE-Selüloz anyon değişim kolonunun hazırlanması ve kolonun paketlenmesi

DEAE-Selüloz anyon değişim kromatografisinde kullanılan kolan dolgu materyali hazır olarak satın alındığından dolayı şişirme işlemine gerek yoktur. Islak iyon değişim jeli 15-30 ml/g oranında ve konsantre 200 mM Fosfat-NaOH tamponu ile karıştırılarak 2-3 dk bekletildi. Daha sonra karışımın pH'sı asit veya baz ile 7,2'ye ayarlandı. Jelin bir süre dibe çökmesi beklendi. Daha sonra süpernatant dekante edildi. Dibe çöken jel tekrar tampon ile 15-30 ml/g oranında süspanse edildi. Uygun hacmi ölçülebilen bir cam silindire tatbik edilen karışımın dibe çökmesi beklendi. Süpernatant derhal dekante edildi. Kolon ısı ve güneş ışığı olmayan bir yere dikey olarak yerleştirildi. Karıştırılmış jel çözeltisi kolona döküldü yerçekimine karşı jelin yatak hacmi sabit kalana kadar bu şekilde dengeleme tamponu ile paketleni. Daha sonra saatte 45 ml akacak şekilde peristaltik pompa ile kolon akış hızını sabitlendi. Dengeleme tamponu ile kolonun dengelenmesi sağlandı.

Not: Dengeleme tamponu ile jelin hazırlandığı tampon aynı olmamalı fakat benzer olmalı.

3.2.3.g. DEAE-Selüloz iyon değişim kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu

DEAE- selüloz kolonu (3.0x50 cm) 0,5 mM DTT içeren A tamponu (35 mM KH_2PO_4 , 2,5 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,25 M sukroz, 10 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 0,1 mM PMSF, 1 mM aminoetil izotiyourenyum bromür, 5 mM 2-merkapt etanol (pH 7,4)) ile dengelendikten sonra homojenat kolana yüklendi. Akış hızı 15 ml/h olacak şekilde ayarlandı. Kolon, A tamponu ile 15 ml/h akış hızında yıkandı ve dengelendi. Kolon dengelendikten sonra 0,015 M - 0,40 M KCl ile gradiyentli elüsyon yapıldı.

3.2.3.h. Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu

Amonyum sülfat ve diyaliz sonrası alınan numuneye asetik asit çöktürmesi, DEAE iyon değişim kromatografisi yapıldıktan sonra Bölüm 3.2.3.d'de anlatıldığı gibi hazırlanan afinite kolonuna tatbik edildi. Afinite kolonu 0,5 mM DTT içeren A tamponu (35 mM KH_2PO_4 , 2,5 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,25 M sukroz, 10 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 0,1 mM PMSF, 1 mM aminoetil izotiyourenyum bromür, 5 mM 2-merkapt etanol (pH 7,4)) tamponu ile dengelendi ve kolon aynı tampon çözeltisi ile yıkandı. Kolon yıkandıktan sonra enzimin elüsyonu 0,5 mM DTT, 0,2 mM NADPH ve 0,2 mM KCl içeren A tamponuyla yapıldı. Peristaltik pompa vasıtasıyla kolonun akış hızı 35 ml/saat'e ayarlandı ve elüatlar 1,5'er ml halinde tüplere alındı.

3.2.4. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının belirlenmesi

Enzim saflaştırıldıktan sonra %3-10 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) Laemmli metoduna göre yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi (Laemmli 1970).

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

Yığıma jeli şöyle hazırlandı: 0,410 ml 1 M Tris-HCl (pH=6,8), 0,400 ml %30 Akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,030 ml %10'luk SDS, 0,030 ml %5'lik TEMED, 2,450 ml saf su ve 0,1 ml %10'luk PER karıştırıldı. PER çözeltisi taze hazırlandı ve en son ilave edilerek hemen jel hazırlandı.

Bunun için elektroforez plakaları önce su ile sonra alkol ile iyice yıkandı. Her iki kenarında aralık oluşturuvcu bir plaka ile düz bir plaka üst üste getirilerek kısıkaçlarla tutturuldu. Sabitleştirilen plakalar, içerisinde sızdırmayı önleyen sünger ihtiva eden jel hazırlama kabinine konuldu. Önce ayırma jeli hazırlandı ve enjektörle plakaların arasına üst kesimde 0,5 cm kalıncaya kadar dolduruldu. Belli bir süre jelin donması beklendi, ayırma jelinin katılaştığından emin olunduktan sonra yığıma jeli hazırlandı. Jelin üst kısmındaki boşluğa dolduruldu ve numune kuyucuklarının oluşması için tarak dikkatlice yerleştirildi. Yığıma jeli polimerize olduktan sonra tarak dikkatlice çıkartılarak numune kuyuları belirlendi. Jel plakalarla birlikte elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankına yürütme tamponu dolduruldu. Enzim örnekleri yaklaşık 10 µg protein olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim 50 µl olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu katıldı. Üç dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi. Elektroforez tankı kapatılarak alt tarafından (+) anot, üst taraftan ise (-) katot yerleştirildi. Önce 80 voltta 30 dakika yürütüldü ve örnek ayırma jeline kadar gelip yığıldıktan sonra akım 120 volta çıkartılarak numuneler jelin alt sınırına gelinceye kadar, yaklaşık 1,5 saat kadar yürütüldü. Numunelerin takip edilmesi, numune tamponuna katılan brom timol mavisi yardımıyla anlaşıldı. Yürütme işlemi bittikten sonra akım kesilerek plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı.

Gümüş boyama için jel shaker üzerinde 30 dakika tespit çözeltisinde, 30 dakika redüksiyon çözeltisinde bekletildi. Daha sonra 3 kez 5'er dakika süreyle saf su ile iyice yıkandı. 20 dakika taze hazırlanıp karanlıkta bekletilmiş gümüş nitrat çözeltisiyle çalkalayıcının üzerinde boyandı ve son olarak yıkama 1 çözeltisi ile bantlar belirginleşinceye kadar karıştırıldı. Siyahlaşan sıvı döküldü ve jel yıkama 2 çözeltisine alınarak jel yıkandı (Temel 2006).

3.2.5. Koyun karaciğer DPD enziminin karakterizasyon çalışmaları

Koyun karaciğerinden saflaştırılan dihidropirimidin dehidrogenaz enziminin kinetik özelliklerini araştırmak üzere NADPH substratı için optimum pH, optimum sıcaklık, optimum iyonik şiddet değerleri bulundu. Daha sonra NADPH ve urasil substratları için K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı.

3.2.5.a. DPD enzimi için optimum pH çalışmaları

Koyun karaciğer DPD enziminin optimum pH'sını belirlemek amacıyla pH'sı 6, 6.5, 7, 7.5, 8, K-fosfat, 8.5 Tris/HCl, 9.0, 9.5 ve 10 olan glisin/NaOH tamponları hazırlandı. Uygun substrat çözeltisi ile her bir tamponda ayrı ayrı enzim aktivitesi belirlendi. Sonuçlar grafikler halinde verildi.

3.2.5.b. DPD enzimi için optimum iyonik şiddet çalışmaları

Koyun karaciğer DPD enziminin optimum aktivite sağlayan iyonik şiddetinin belirlenmesi amacıyla optimum pH'a belirlendikten sonra optimum pH'da 1, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1 M K-Fosfat tamponları kullanılarak belirlendi.

3.2.5.c. DPD enzimi için optimum sıcaklık çalışmaları

Optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla ısıtmalı soğutmalı su banyosu kullanıldı. Aktivite ölçümü için gerekli olan tampon ve substratları ihtiva eden karışım küvet içerisinde ilgili sıcaklığa ayarlı su banyosunda bekletildi. 0°C ile 80°C arasında her 10°C de bir olmak üzere aktivite ölçümü yapıldı.

3.2.5.d. DPD enziminin stabil pH çalışmaları

Enzimin stabil olduğu pH'yı tesbit etmek için pH'ları 5, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 ve 8,0 olan 35 mM KH_2PO_4 tamponları kullanıldı. Belirtilen pH'lardaki tampon çözeltilerinin 1 ml'sine 1 ml enzim çözeltisi karıştırılarak $+4^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edildi. 4 gün boyunca 12 saat arayla yapılan aktivite ölçümünde enzimin stabil olduğu pH belirlendi. Sonuçlar grafik ve tablo halinde verildi.

3.2.5.e. DPD enzimi için K_m ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik çalışmalar

Koyun karaciğer dihidropirimidin dehidrogenaz enziminin NADPH substratı için K_M ve V_{max} değerlerini belirlemek amacıyla sabit urasil konsantrasyonunda NADPH'ın 5 farklı konsantrasyonlarıyla aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen değerlerle Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Bu grafikten yararlanarak NADPH için K_M ve V_{max} değerleri belirlendi. Aynı şekilde NADPH'ın sabit konsantrasyonunda urasil'nin 5 farklı konsantrasyonunda aktivite ölçümleri yapılarak Lineweaver-Burk grafiği oluşturuldu ve urasil için K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı. Aktivite ölçümleri optimal şartlarda gerçekleştirildi (Lineweaver and Burk 1934).

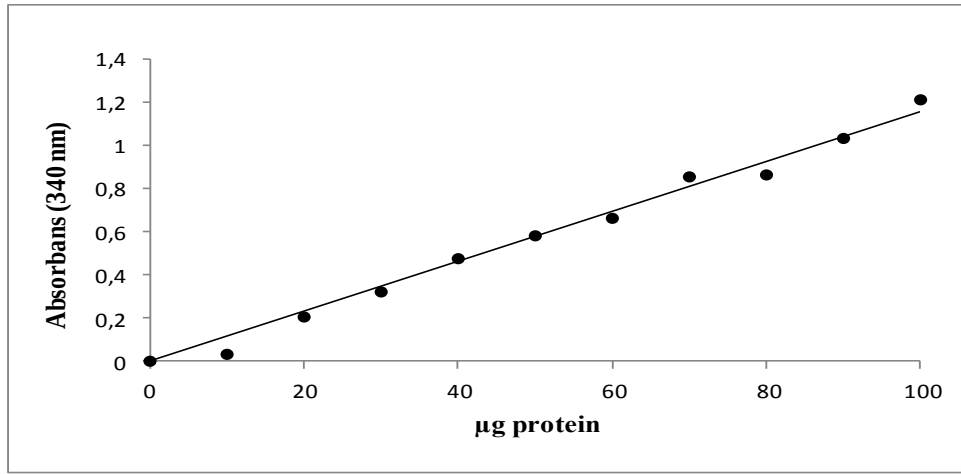
3.2.5.f. Çeşitli ilaçların etken maddelerinin ve metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi

Bu çalışmada bazı depresyon ilaçlarının etken maddelerinin, lokal anestezik ilaç olan lidokain ve genel bir anestezik olan propol ve türevlerinin enzim aktivitesi üzerine enzim inhibisyon etkileri araştırıldı. Ayrıca bazı metal iyonların enzim aktivitesi üzerine etkilerine bakıldı. Bu amaçla bu maddelerin IC_{50} değerleri tespit edildi. IC_{50} değerlerini tespit etmek amacıyla; oda sıcaklığında optimum pH da doygun olmayan sabit substrat (NADPH) konsantrasyonunda ortama farklı hacimlerde metal iyonları ve etken maddeler ilave edildi. Maddelerin ilave edilmediği enzim aktivitesi 100 kabul edilerek, %Aktivite-konsantrasyon grafikleri çizildi. Bu grafiklerden yararlanarak maddelerin IC_{50} değerleri hesaplandı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

Standart grafik Bölüm 3.2.1.b’de anlatıldığı gibi hazırlandı. Standart çözeltilerin μg proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 4.1’de gösterildi.



Şekil 4.1. Bradford yöntemiyle proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart grafik

Homojenat, amonyum sülfat, diyaliz ve afinite kromatografisi sonucu elde edilen enzim çözeltilerindeki kantitatif protein tayini Bradford yöntemi ile belirlendi. Elde ettiğimiz enzim çözeltilerindeki kantitatif protein tayini Bradford yöntemiyle yapıldıktan sonra Şekil 4.1’deki standart grafikten faydalanılarak protein miktarı hesaplandı.

4.2. Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Koyun karaciğerinden Bölüm 3.2.3.b’de anlatıldığı gibi hazırlanan homojenatta, amonyum sülfat çöktürmesi için uygun doygunluk noktasını bulmak amacıyla %0-20, 20-30, 30-40 ve 40-50 aralıklarında çöktürme yapıldı. Her çöktürme kademesindeki çökelekler A tamponunun çözebildiği en az miktarındaki çözüldü. Hem çökelekte hem

de süpernatantta aktiviteye bakıldı. Çöktürme kademelerindeki çökelek ve süpernatantların aktiviteleri Çizelge 4.1’de gösterildi. Koyun dihidropirimidin dehidrogenaz enzimi için %30-50 amonyum sülfat doygunluğundaki enzim aktivitesinin maksimum olduğu görüldü.

Çizelge 4.1. Koyun karaciğerinden elde edilen DPD enzimi için amonyum sülfat çöktürmesi doygunluk aralığı belirleme sonuçları

% doygunluk	%0-20	%20-30	%30-40	%40-50
Çökelek Aktivite (EÜ/ml)	-	0,0174	0,092	0,032
Süpernatant Aktivite (EÜ/ml)	0,021	0,020	0,012	0,0013

4.3. Koyun Karaciğerinden Saflaştırılan Dihidropirimidin Dehidrogenaz Enziminin Saflaştırılması Çalışmaları İle İlgili Sonuçlar

4.3.1. Koyun karaciğer dihidropirimidin dehidrogenaz enziminin saflaştırılma basamakları

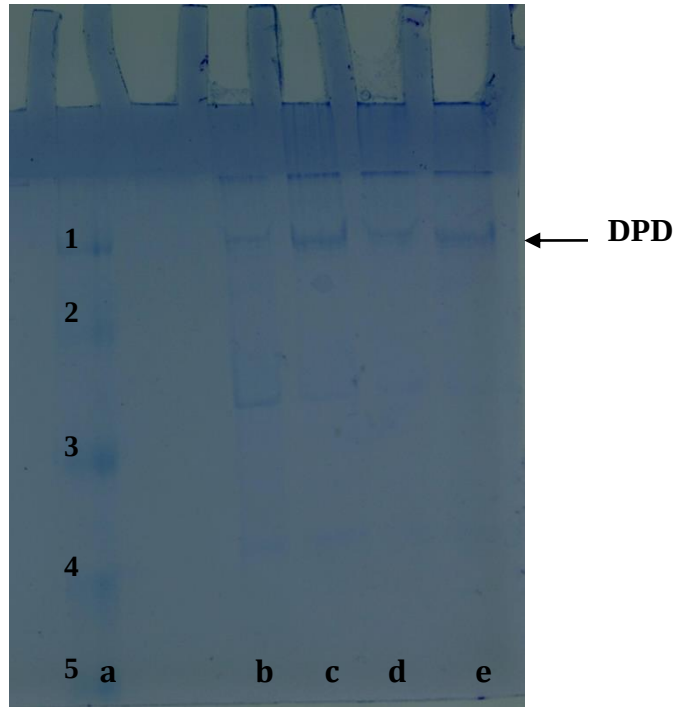
Amonyum sülfat sonrası hazırlanan homojenat hazırlanan homojenat 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonuna yüklendi. Yükleme yapıldıktan sonra kolan tekrar rejenere yapıldı, yıkandı ve dengelendi. Dengelendikten sonra alttan alınan homojenat tekrar kolondan geçirildi. Elüsyon için ise 0,2 mM NADPH, 0,5 mMDTT ve 0,2 mM KCl içeren A tamponu kullanıldı. Kolondan elde edilen elüatlara Bradford metoduyla kantitatif protein tayini ve aktivite tayini yapılarak spesifik aktiviteleri hesaplandı ve saflaştırma katsayısı belirlendi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2’de gösterildi.

Çizelge 4.2. Koyun karaciğer dihidropirimidin dehidrogenaz enziminin saflaştırma sonuçları

Saflaştırma Basamakları	Aktivite (EÜ/ml)	Protein (mg/ml)	Spesifik Aktivitesi (EÜ/mg)	% Verim	Saflaştırma Katsayısı
Homojenat	0,0174	147,56	0,000118	100	1
(NH₄)₂SO₄ çöktürmesi ve diyaliz	0,0763	147,56	0,00101	109,56	8,52
2',5'-ADP Sepharose 4B Afinité kromatografisi	0,0188	0,3422	0,0548	8,079	464,20

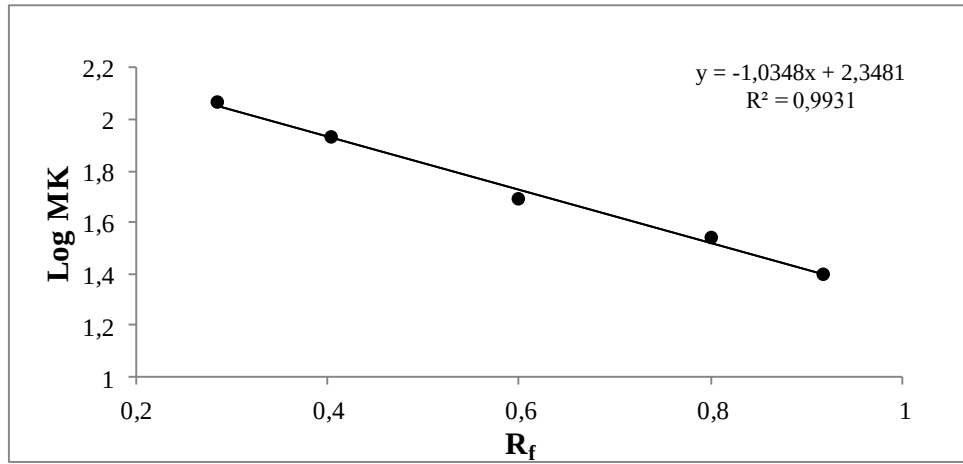
4.3.1.a. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi sonuçları

Koyun karaciğer dihidropirimidin dehidrogenaz enziminin 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite sonucu elde edilen elüatlardaki enzimin saflığını kontrol etmek için SDS-PAGE yöntemi kullanıldı. Bu amaçla Bölüm 3.2.4'te izah edilen elektroforez sistemi kurularak enzim numuneleri sırayla kuyulara uygulandı ve yürütüldü. Elde edilen bantları gösteren fotoğraf Şekil 4.2'de gösterildi Standart proteinlerin ve enzimin jelde yürüdükleri mesafeler ölçülerek R_f değerleri hesaplandı. $\log MK-R_f$ değerleri ile grafik çizildi (Şekil 4.3). Grafikten faydalanarak koyun karaciğer DPD mol kütlesi yaklaşık 128,82 kDa olarak hesaplandı.



Şekil 4.2. Koyun karaciğer DPD enziminin SDS-PAGE fotoğrafı.

Bant b, c, d,e; 2', 5'-ADP Sepharoz 4B afinite kolonuyla saflaştırılan koyun karaciğer DPD enzimi, Bant a; Standart proteinler: 1. (120 kDa), 2. (85 kDa), 3. (50 kDa), 4. (35 kDa), 5. (25 kDa)



Şekil 4.3. SDS-PAGE sonucu çizilen log MK-R_f grafiği

4.3.2. İkinci yöntemle koyun karaciğer dihidropirimidin dehidrogenaz enziminin saflaştırılma basamakları

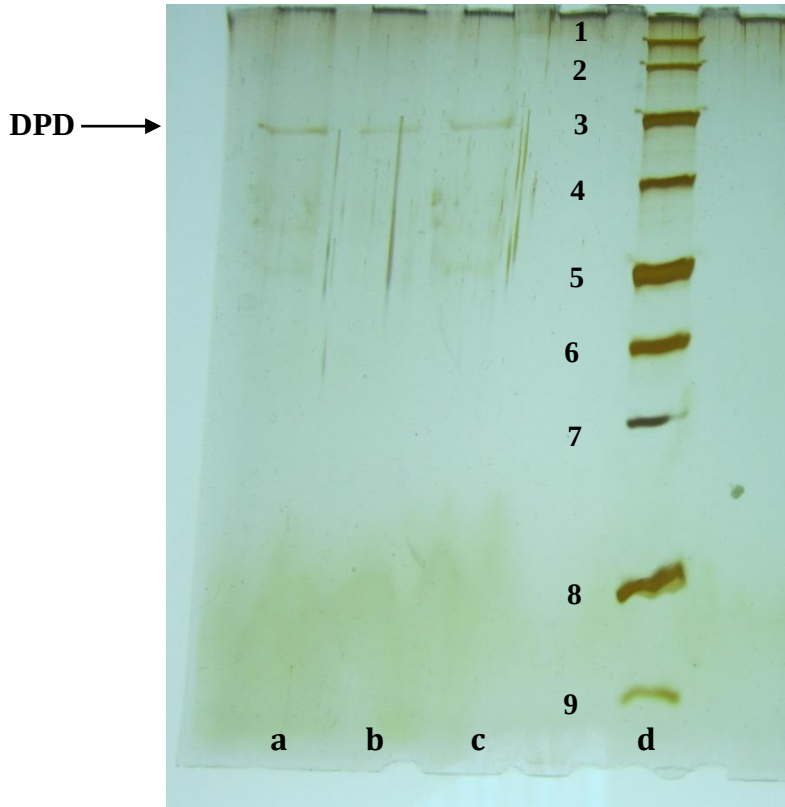
Amonyum sülfat çöktürmesi sonrası diyaliz edilen süpernatanta Bölüm 3.2.3.e’de anlatıldığı gibi pH=4,85 asetik asit çöktürmesi ve diyaliz yapıldı. Daha sonra hazırlanan homojenat DEAE-anyon değişim kolonuna yüklendi. 15 mM-400 mM KCl içeren A tamponu ile enzime gradientli elüsyon yapıldı. 15 mM-100 mM arasında KCl içeren A tamponu enzim elüe edildi. DEAE sonrası elde ettiğimiz fraksiyonlar 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonuna yüklendi. Elüsyon ise 0,2 mM NADPH, 0,5 mM DTT ve 0,2 mM KCl içeren A tamponuyla kullanıldı. Kolondan elde edilen elüatlara Bradford metoduyla kantitatif protein tayini ve aktivite tayini yapılarak spesifik aktiviteleri hesaplandı ve saflaştırma katsayısı belirlendi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2’de gösterildi.

Çizelge 4.3. Koyun karaciğer dihidropirimidin dehidrogenaz enziminin saflaştırma sonuçları

Saflaştırma Basamakları	Aktivite (EÜ/ml)	Protein (mg/ml)	Spesifik Aktivite (EÜ/mg)	%Verim	Saflaştırma Katsayısı
Homojenat	0,07235	42,00	$1,722 \cdot 10^{-3}$	100	1
Amomyum Sülfat Çöktürmesi	0,05493	29,65	$1,852 \cdot 10^{-3}$	75,9	1,1
DEAE-Selüloz İyon Değişim Kromotografisi	0,02814	0,07826	0,3595	38,9	208,8
2',5'-ADP-Sefaroz Affinite Kromotografisi	0,01206	0,01739	0,6935	16,7	402,7

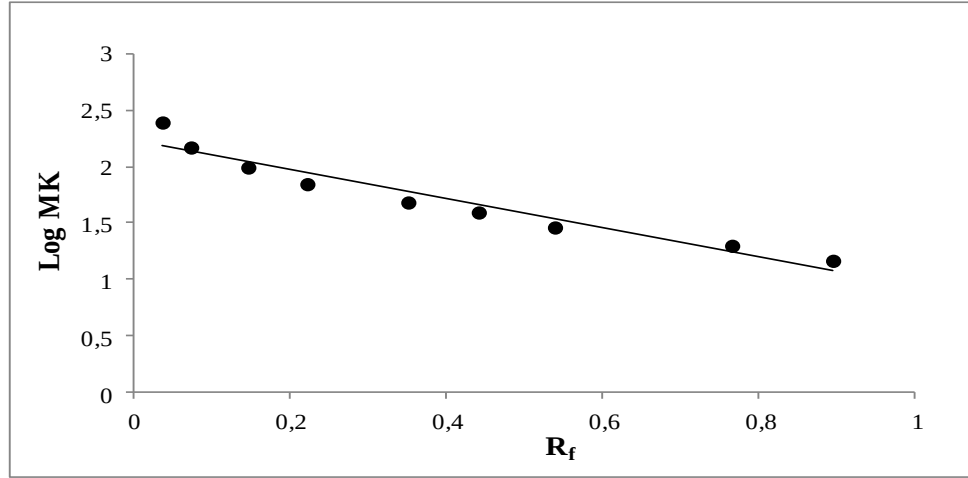
4.3.2.a. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının belirlenmesi

Koyun karaciğer dihidropirimidin dehidrogenaz enziminin 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite sonucu elde edilen elüatlardaki enzimin saflığını kontrol etmek için SDS-PAGE yöntemi kullanıldı. Bu amaçla Bölüm 3.2.4'te izah edilen elektroforez sistemi kurularak enzim numuneleri sırayla kuyulara uygulandı ve yürütüldü. Elde edilen bantları gösteren fotoğraf Şekil 4.4'de gösterildi. Standart proteinlerin ve enzimin jelde yürüdükleri mesafeler ölçülerek R_f değerleri hesaplandı. log MK- R_f değerleri ile grafik çizildi (Şekil 4.5). Grafikten faydalanarak koyun karaciğer DPD mol kütlesi yaklaşık 111 kDa olarak hesaplandı



Şekil 4.4. Koyun karaciğer DPD enziminin SDS-PAGE fotoğrafı.

Bant a, b, c; 2', 5'-ADP Sepharoz 4B afinite kolonuyla saflaştırılan koyun karaciğer DPD enzimi, Bant d; Standart proteinler: 1. (250 kDa), 2. (150 kDa), 3. (100 kDa), 4. (70 kDa), 5. (50 kDa), 6. (40 kDa), 7. (30 kDa), 8. (20 kDa), 9. (15 kDa)



Şekil 4.5. SDS-PAGE sonucu çizilen log MK-R_f grafiği

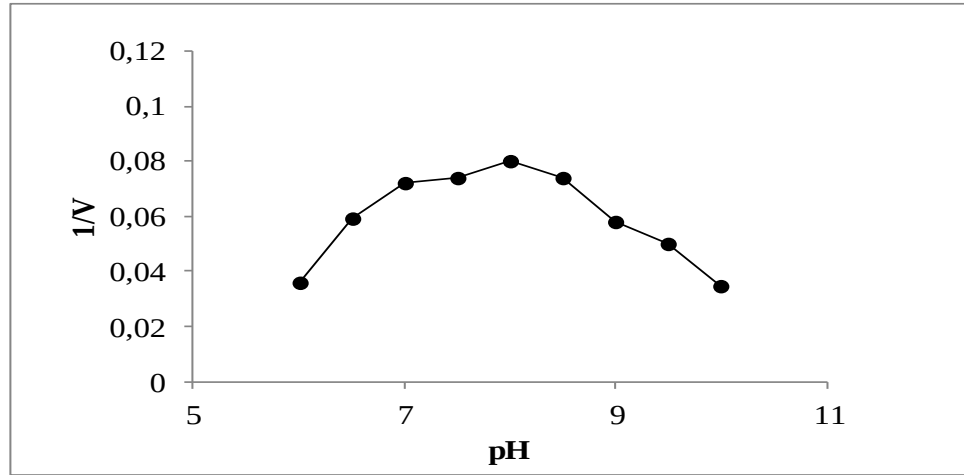
4.4. Koyun Karaciğerden Saflaştırılan DPD Enziminin Karakterizasyon Çalışmaları ile İlgili Sonuçlar

4.4.1. Koyun Karaciğer DPD enzimi için optimum pH çalışma sonuçları

Koyun karaciğer enziminin optimum pH'sı Bölüm 3.2.5.a'da anlatıldığı şekilde; pH'sı 5,0-8,0 aralığında 280 mM potasyum fosfat ve 8,5- 10 aralığında 280 mM Glisin-NaOH tampon çözeltileri kullanılarak enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak belirlendi (Şekil 4.6). Koyun karaciğer DPD enziminin optimum pH'sı 8 olarak belirlendi.

Çizelge 4.4. 280 mM K-fosfat tamponu kullanılarak koyun karaciğern saflaştırılan saflaştırılan DPD enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları

pH	Aktivite (EÜ/ml)
6	0,036
6,5	0,059
7	0,072
7,5	0,074
8	0,08
8,5	0,074
9	0,058
9,5	0,05
10	0,035



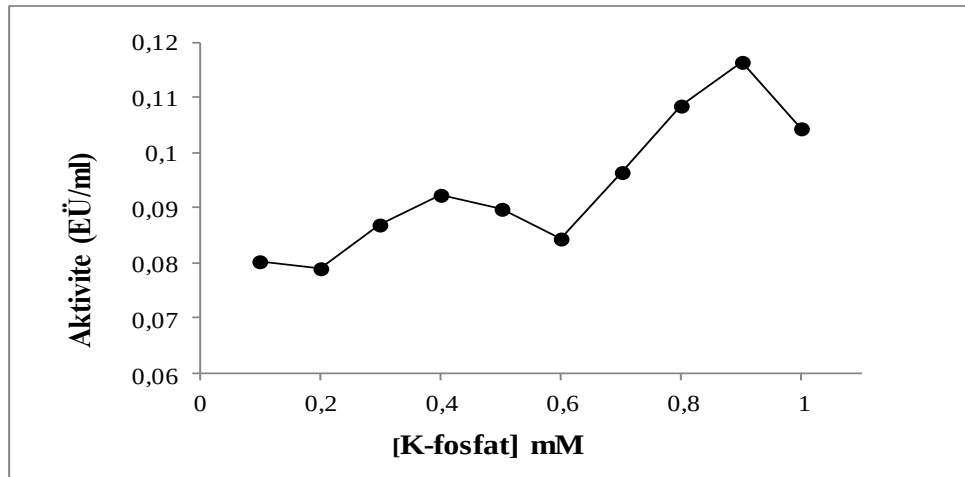
Şekil 4.6. Koyun karaciğerinden saflaştırılan dihidropirimidin dehidrogenaz enzimi için yapılan optimum pH çalışmasının sonucuna yönelik çizilen Aktivite-pH grafiği

4.4.2. Koyun karaciğer DPD enziminin optimum iyonik çalışma sonuçları

Koyun karaciğerden saflaştırılan DPD enzim aktivitesi için en uygun iyonik şiddetin belirlenmesi amacıyla önceki çalışmalarla uygunluğu belirlenen K-fosfat tamponunun optimum pH'daki değişik konsantrasyonlardaki çözeltileri Bölüm 3.2.5.b'de anlatıldığı gibi hazırlandı. Farklı K-fosfat konsantrasyonlarında aktivite ölçümleri yapılarak K-fosfat konsantrasyonu ile aktivite değerlerinden oluşan grafik çizildi. Yapılan çalışmalar sonucu koyun karaciğerinden saflaştırılan DPD enzimi için en uygun iyonik şiddetin 900 mM K-fosfat(pH 8,0) tamponu olarak tespit edildi.

Çizelge 4.5. Koyun karaciğerinden saflaştırılan DPD enziminin optimum iyonik şiddet için K-fosfat (pH 8) tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

[KH ₂ PO ₄] mM	Aktivite (EÜ/ml)
100	0,08038
200	0,08038
300	0,08708
400	0,09244
500	0,08976
600	0,0844
700	0,09645
800	0,1085
900	0,1165
1000	0,1045



Şekil 4.7. Değişik konsantrasyonlardaki K-fosfat (pH 8,0) tampon çözeltileri kullanılarak koyun karaciğerden saflaştırılan DPD enzimi için yapılan iyonik şiddet-aktivite grafiği

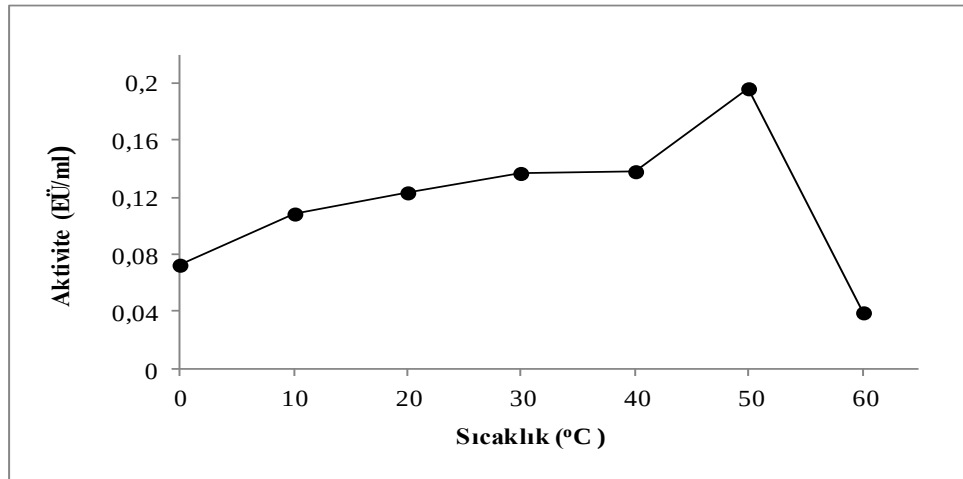
4.4.3. Koyun karaciğer DPD enziminin optimum sıcaklık çalışma sonuçları

Koyun karaciğerden saflaştırılan DPD enziminin optimum sıcaklığını belirlemek üzere optimum pH ve uygun iyonik şiddete sahip 500 mM K-fosfat (pH 8,0) tampon çözeltisi

kullanıldı. 0°C ile 80°C arasında her 10°C’de bir olmak üzere Bölüm 3.2.5.c’de anlatıldığı şekilde aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.6’da gösterildi. Bu çalışmalar sonucu optimum sıcaklık 50°C olarak tespit edildi.

Çizelge 4.6. Koyun karaciğerinden saflaştırılan DPD enziminin optimum sıcaklığı için sıcaklık aktivite ölçüm sonuçları

Sıcaklık (°C)	Aktivite (EÜ/ml)
0	0,07234
10	0,1085
20	0,1223
30	0,1366
40	0,1379
50	0,1956
60	0,03885



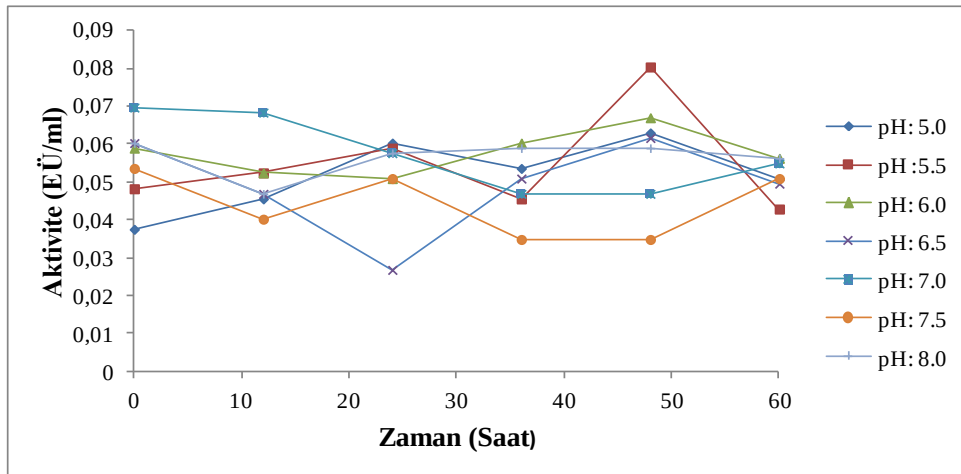
Şekil 4.8. Koyun karaciğerden saflaştırılan DPD enziminin optimum sıcaklığı için sıcaklık aktivite ölçüm sonuçları grafiği

4.4.4. Koyun karaciğer DPD enzimi için stabil pH çalışma sonuçları

Koyun karaciğer DPD enzimi için stabil pH'ları Bölüm 3.2.5.d'de anlatıldığı şekilde; pH'ları 5,0-8,0 aralığında 35 mM KH_2PO_4 tampon çözeltileri kullanılarak hazırlanan enzim stoklarının gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak belirlendi. DPD enzimi için stabil pH, 35 mM KH_2PO_4 tamponunda pH 6,0 olarak bulundu.

Çizelge 4.7. Koyun karaciğerinden saflaştırılan DPD enziminin stabil pH'sı için 35 mM KH_2PO_4 kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları (EÜ/ml).

Zaman (saat)	pH=5 Aktivite	pH=5,5 Aktivite	pH=6 Aktivite	pH=6,5 Aktivite	pH=7 Aktivite	pH=7,5 Aktivite	pH=8 Aktivite
0	0,03751	0,04823	0,05895	0,06029	0,06967	0,05359	0,06029
12	0,04555	0,05242	0,05242	0,04689	0,06833	0,04019	0,04689
24	0,06029	0,05895	0,05091	0,0268	0,05761	0,05091	0,05761
36	0,05359	0,04555	0,06029	0,05091	0,04689	0,03483	0,05895
48	0,06297	0,08039	0,06698	0,06163	0,04689	0,03483	0,05895
60	0,05091	0,04287	0,05627	0,04957	0,05493	0,05091	0,05627



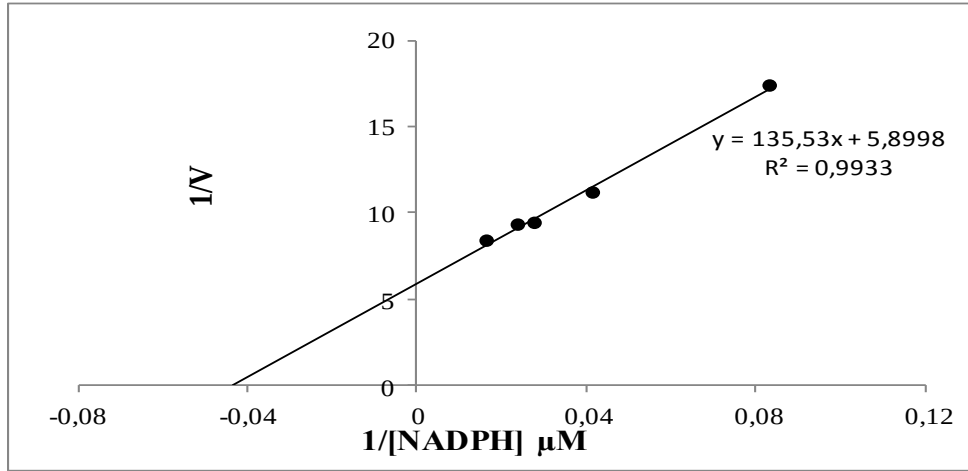
Şekil 4.9. Değişik pH'lardaki KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak koyun karaciğer DPD enzimi için elde edilen stabil pH grafiği

4.4.5. Koyun karaciğer DPD enziminin K_m ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik çalışma sonuçları

Koyun karaciğerden saflaştırılan DPD enziminin NADPH ve urasil substratları için K_M ve V_{max} değerlerini belirlemek için Bölüm 3.2.5.e’da anlatıldığı gibi urasil konsantrasyonunda NADPH’ın 5 farklı konsantrasyonlarıyla aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen değerlerle $1/V-1/[NADPH]$ Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Bu grafikten yararlanarak NADPH için K_M ve V_{max} değerleri belirlendi. Aynı şekilde NADPH’ın sabit konsantrasyonunda urasil’in 5 farklı konsantrasyonlarıyla aktivite ölçümleri yapılarak $1/V-1/[urasil]$ - Lineweaver-Burk grafiği oluşturuldu ve urasil için K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı. Bu çalışmalar sonucunda NADPH için K_m değeri 0,023 mM ve V_{max} değeri 0,17 EÜ/ml olarak; urasil için ise, K_m değeri 0,017 mM ve V_{max} değeri 0,17 EÜ/ml olarak tespit edildi.

Çizelge 4.8. Koyun karaciğer DPD enzimi için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik NADPH substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik Aktivite-NADPH derişim çizelgesi

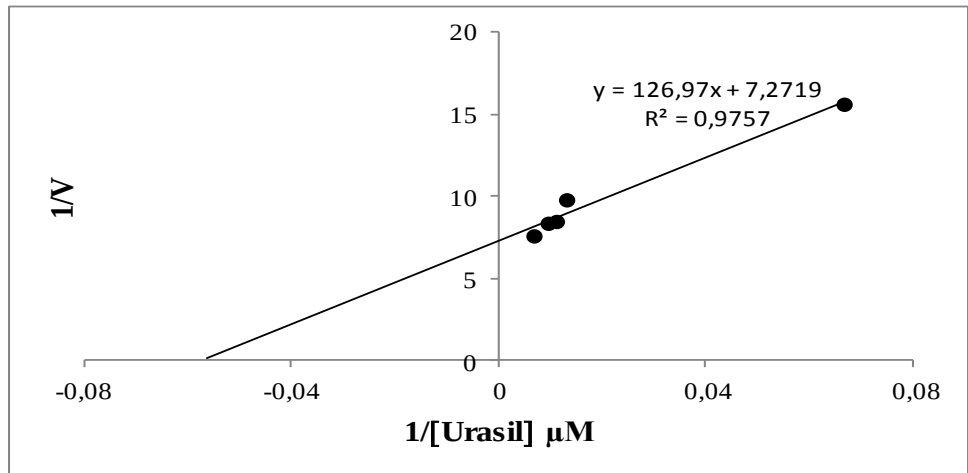
[NADPH] μM	Aktivite (EÜ/ml)
0,0833	17,358
0,0417	11,141
0,0278	9,452
0,0238	9,328
0,0167	8,418



Şekil 4.10. NADPH substratı için K_M ve V_{max} bulunmasına yönelik $1/V-1/[NADPH]$ çizilen Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.9. Koyun karaciğerden saflaştırılan DPD enziminin urasil substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik Aktivite-urasil derişim çizelgesi

[Urasil] μM	Aktivite (EÜ/ml)
0,0667	15,660
0,0133	9,823
0,0111	8,489
0,00952	8,389
0,00762	7,622



Şekil 4.11. Urasil için K_M ve V_{max} bulunmasına yönelik $1/V-1/[Urasil]$ çizilen Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.10. Koyun karaciğerden saflaştırılan DPD enziminin urasil ve NADPH substratları için K_M , V_{max} çalışmaları sonuçları

Substrat	K_M (μM)	V_{max} (EÜ/ml)
Urasil	17,46	0,14
NADPH	22,97	0,17

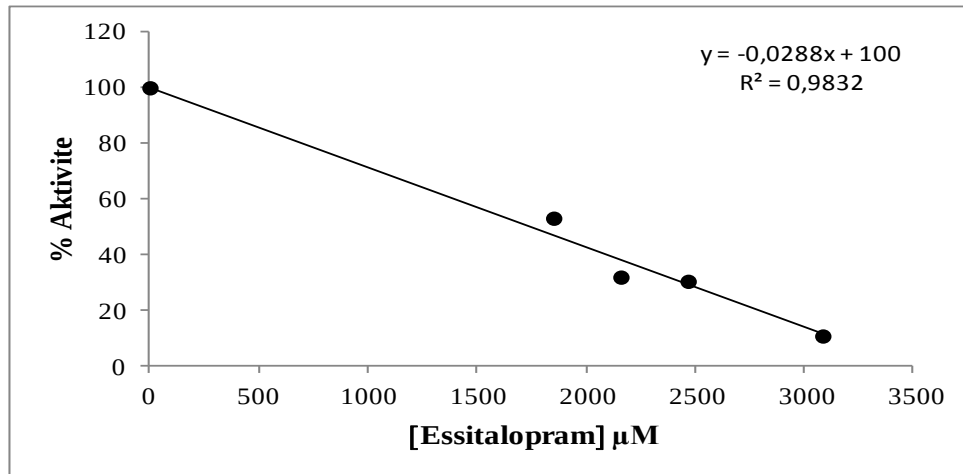
4.5. Koyun karaciğerden saflaştırılan DPD enziminin aktivitesi üzerine bazı antidepresan-anestezik moleküllerin ve metal iyonlarının etkilerinin belirlenmesine ait çalışma sonuçları

4.5.1. Koyun karaciğerden saflaştırılan DPD enziminin aktivitesi üzerine bazı antidepresan ve anestezik moleküllerin etkilerinin belirlenmesine ait çalışma sonuçları

Koyun karaciğer enzim aktivitesi üzerine essitalopram, fluoksetin, mirtazapin, haloperidal antidepresan moleküllerin ve propofol, 2,6-di-tert-bütilfenol, 2,6-dimetilfenol anestezik moleküllerin etkilerini incelemek amacıyla bu maddelerin stok çözeltileri hazırlandı ve koyun karaciğer DPD enzimi üzerine etkileri araştırıldı. Çalışmalar sonucu elde edilen inhibisyon etkileri Çizelge 4.11-4.18’de verildi. Konsantrasyona karşı %Aktivite grafikleri Şekil 4.12-4.19’da gösterildi.

Çizelge 4.11. Koyun karaciğerinden saflaştırılan DPD enzim aktivitesi üzerine essitalopram etken maddesi ile yapılan IC₅₀ çalışmasında kullanılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

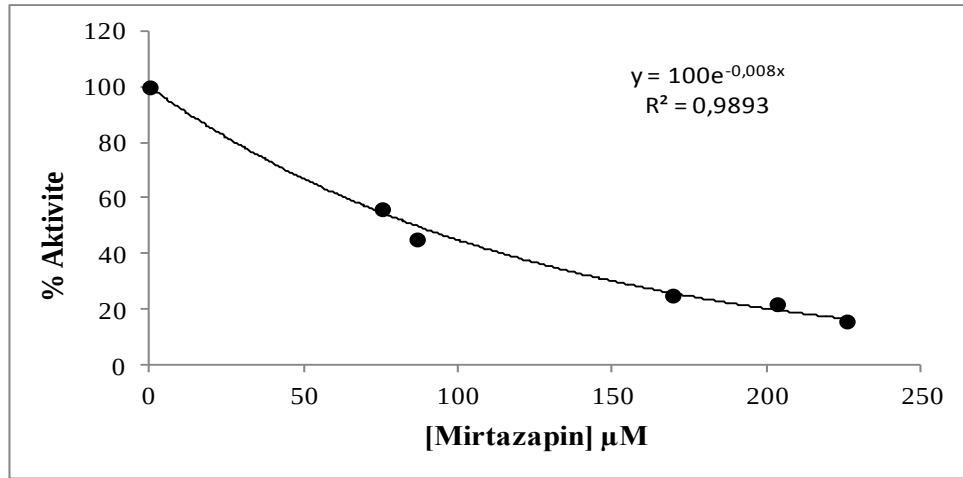
Kör tüpü								Numune tüpü									
	inhibitör	Fosfat Tamp.(ml)	MgCl ₂ (ml)	DTT (ml)	NAPH (ml)	Saf Su (ml)	İnhibitör (ml)	Urasil (ml)	Fosfat Tamp.(ml)	MgCl ₂ (ml)	DTT (ml)	NAPH (ml)	Saf Su (ml)	İnhibitör (ml)	Urasil (ml)	% Aktivite	[I] µM
[Essitalop ram] µM		0,14	0,10	0,10	0,10	0,46	-	0,1	0,10	0,10	0,10	0,10	0,46	-	0,10	100	0
		0,14	0,10	0,10	0,10	0,40	0,06	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,40	0,06	0,10	84,48	1850
		0,14	0,10	0,10	0,10	0,39	0,07	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,39	0,07	0,10	75,86	2158
		0,14	0,10	0,10	0,10	0,38	0,08	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,38	0,08	0,10	58,01	2466
		0,14	0,10	0,10	0,10	0,36	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,36	0,10	0,10	37,92	3083



Şekil 4.12. Koyun karaciğer DPD enzim için essitalopram etken maddesi ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği

Çizelge 4.12. Koyun karaciğerinden saflaştırılan DPD enzim aktivitesi üzerine mirtazapin etken maddesi ile yapılan IC₅₀ çalışmasında kullanılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

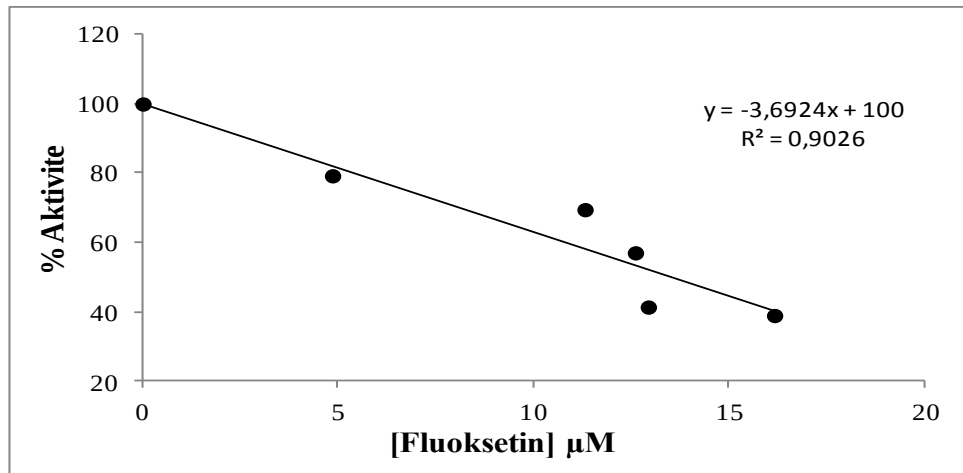
Kör tüpü								Numune tüpü									
inhibitör	Fosfat Tamp.(ml)	MgCl ₂ (ml)	DTT (ml)	NAPH (ml)	Saf Su (ml)	İnhibitör (ml)	Urasil (ml)	Fosfat Tamp.(ml)	MgCl ₂ (ml)	DTT (ml)	NAPH (ml)	Saf Su (ml)	İnhibitör (ml)	Urasil (ml)	% Aktivite	[I] µM	
[Mirtazapin] µM	0,14	0,10	0,10	0,10	0,46	-	0,1	0,10	0,10	0,10	0,10	0,46	-	0,10	100	0	
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,36	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,36	0,10	0,10	56,07	75,37	
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,345	0,115	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,345	0,115	0,10	45,16	86,68	
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,235	0,225	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,235	0,225	0,10	24,92	169,6	
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,190	0,270	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,190	0,270	0,10	21,82	203,5	
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,160	0,30	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,160	0,30	0,10	15,58	226,1	



Şekil 4.13. Koyun karaciğer DPD enzim aktivitesi için mirtazapin etken maddesi ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği

Çizelge 4.13. Koyun karaciğerinden saflaştırılan DPD enzim aktivitesi üzerine Fluoksetin etken maddesi ile yapılan IC₅₀ çalışmasında kullanılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

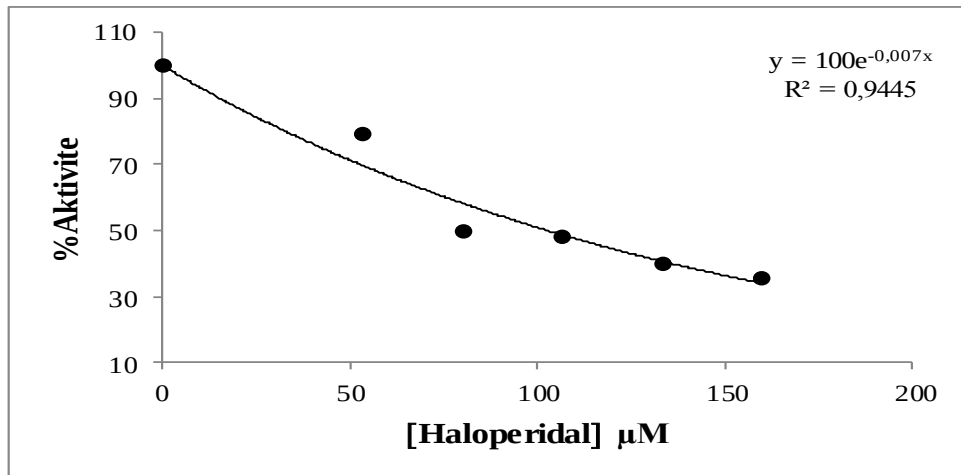
inhibitör	Kör tüpü							Numune tüpü							% Aktivite	[I] μ M
	Fosfat Tamp.(ml)	MgCl ₂ (ml)	DTT (ml)	NAPH (ml)	Saf Su (ml)	İnhibitör (ml)	Urasil (ml)	Fosfat Tamp.(ml)	MgCl ₂ (ml)	DTT (ml)	NAPH (ml)	Saf Su (ml)	İnhibitör (ml)	Urasil (ml)		
[Fluoksetin] μ M	0,14	0,10	0,10	0,10	0,46	-	0,1	0,10	0,10	0,10	0,10	0,46	-	0,10	100	0
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,385	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,385	0,10	0,10	79,81	4,85
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,285	0,115	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,285	0,115	0,10	69,55	11,31
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,265	0,225	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,265	0,225	0,10	52,11	12,6
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,26	0,270	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,26	0,270	0,10	41,48	12,93
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,21	0,30	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,21	0,30	0,10	39,04	16,16



Şekil 4.14. Koyun karaciğer DPD enzim için fluoksetin etken maddesi ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği

Çizelge 4.14. Koyun karaciğerinden saflaştırılan DPD enzim aktivitesi üzerine haloperidal etken maddesi ile yapılan IC₅₀ çalışmasında kullanılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

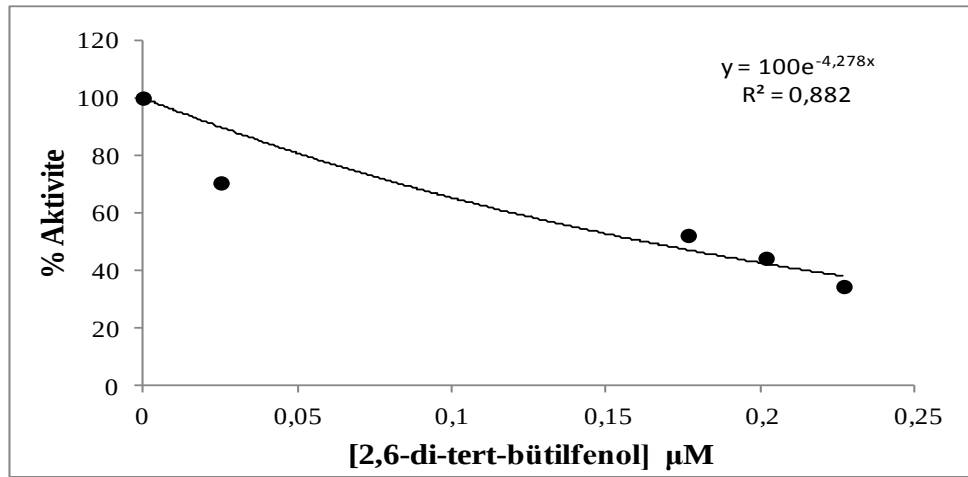
inhibitör	Kör tüpü							Numune tüpü							% Aktivite	[I] μ M
	Fosfat Tamp.(ml)	MgCl ₂ (ml)	DTT (ml)	NAPH (ml)	Saf Su (ml)	İnhibitör (ml)	Urasil (ml)	Fosfat Tamp.(ml)	MgCl ₂ (ml)	DTT (ml)	NAPH (ml)	Saf Su (ml)	İnhibitör (ml)	Urasil (ml)		
[Fluoksetin] μ M	0,14	0,10	0,10	0,10	0,46	-	0,1	0,10	0,10	0,10	0,10	0,46	-	0,10	100	0
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,385	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,385	0,10	0,10	79,81	4,85
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,285	0,115	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,285	0,115	0,10	69,55	11,31
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,265	0,225	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,265	0,225	0,10	52,11	12,6
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,26	0,270	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,26	0,270	0,10	41,48	12,93
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,21	0,30	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,21	0,30	0,10	39,04	16,16



Şekil 4.15. Koyun karaciğer DPD enzim için haloperidaletken maddesi ile elde edilen Aktivite Konsantrasyon grafiği

Çizelge 4.15. Koyun karaciğerinden saflaştırılan DPD enzim aktivitesi üzerine 2,6-di-tert-bütilfenol etken maddesi ile yapılan IC₅₀ çalışmasında kullanılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

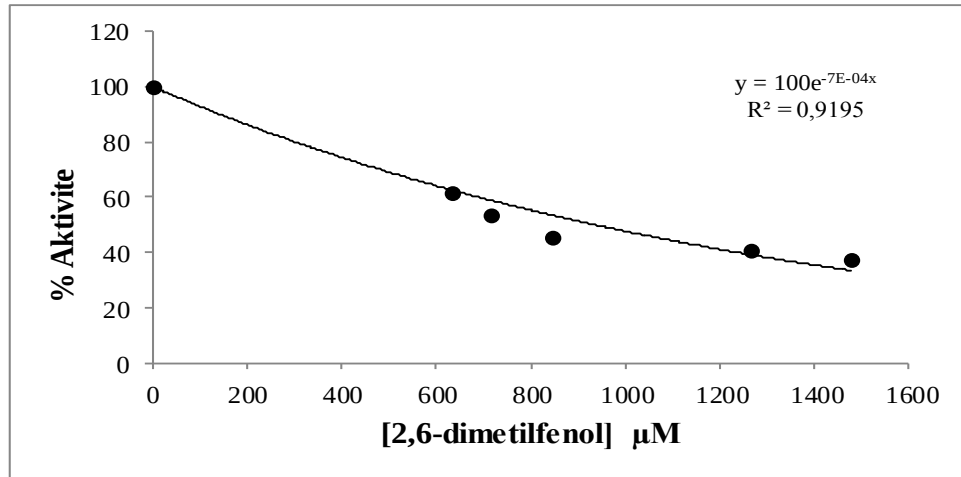
inhibitör	Kör tüpü							Numune tüpü							% Aktivite	[I] µM
	Fosfat Tamp.(ml)	MgCl ₂ (ml)	DTT (ml)	NAPH (ml)	Saf Su (ml)	inhibitör (ml)	Urasil (ml)	Fosfat Tamp.(ml)	MgCl ₂ (ml)	DTT (ml)	NAPH (ml)	Saf Su (ml)	inhibitör (ml)	Urasil (ml)		
[2,6-di-tert-bütilfenol] µM	0,14	0,10	0,10	0,10	0,46	-	0,1	0,10	0,10	0,10	0,10	0,46	-	0,10	100	0
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,445	0,005	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,445	0,005	0,10	84,48	1850
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,425	0,035	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,425	0,035	0,10	75,86	2158
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,420	0,040	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,420	0,040	0,10	58,01	2466
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,415	0,045	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,415	0,045	0,10	37,92	3083



Şekil 4.16. Koyun karaciğer DPD enzim için 2,6-di-tert-bütilfenol etken maddesi ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği

Çizelge 4.16. Koyun karaciğerinden saflaştırılan DPD enzim aktivitesi üzerine 2,6-dimetilfenol etken maddesi ile yapılan IC₅₀ çalışmasında kullanılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

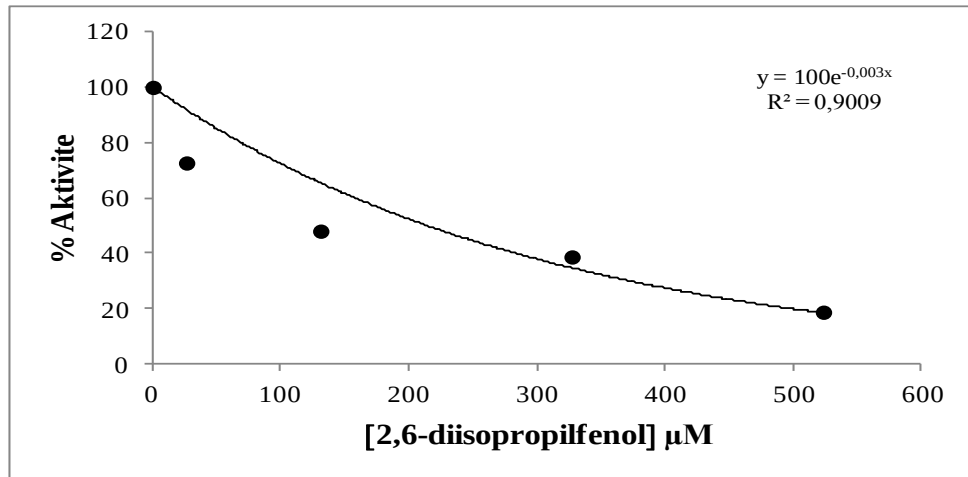
inhibitör	Kör tüpü							Numune tüpü							% Aktivite	[I] μ M
	Fosfat Tamp.(ml)	MgCl ₂ (ml)	DTT (ml)	NAPH (ml)	Saf Su (ml)	İnhibitör (ml)	Urasil (ml)	Fosfat Tamp.(ml)	MgCl ₂ (ml)	DTT (ml)	NAPH (ml)	Saf Su (ml)	İnhibitör (ml)	Urasil (ml)		
[2,6-dimetilfenol] μ M	0,14	0,10	0,10	0,10	0,46	-	0,1	0,10	0,10	0,10	0,10	0,46	-	0,10	100	0
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,385	0,075	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,385	0,075	0,10	79,69	53,21
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,375	0,085	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,375	0,085	0,10	50,00	79,81
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,36	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,36	0,10	0,10	48,44	106,4
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,31	0,15	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,31	0,15	0,10	40,00	133,0
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,285	0,175	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,285	0,175	0,10	35,93	159,6



Şekil 4.17. Koyun karaciğer DPD enzim için 2,6-dimetilfenol etken maddesi ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği

Çizelge 4.17. Koyun karaciğerinden saflaştırılan DPD enzim aktivitesi üzerine 2,6-diisopropilfenol (propofol) etken maddesi ile yapılan IC₅₀ çalışmasında kullanılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

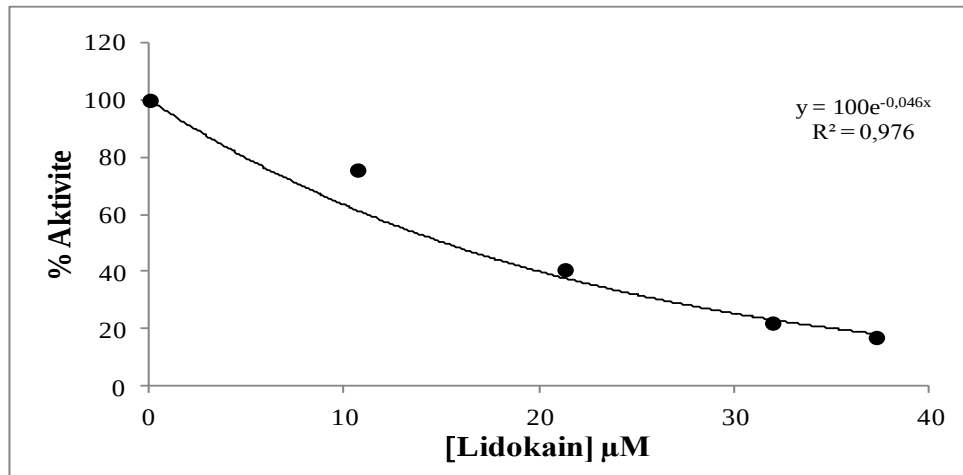
inhibitör	Kör tüpü							Numune tüpü							% Aktivite	[I] μ M
	Fosfat Tamp.(ml)	MgCl ₂ (ml)	DTT (ml)	NAPH (ml)	Saf Su (ml)	inhibitör (ml)	Urasil (ml)	Fosfat Tamp.(ml)	MgCl ₂ (ml)	DTT (ml)	NAPH (ml)	Saf Su (ml)	inhibitör (ml)	Urasil (ml)		
[2,6-diisopropilfenol] μ M	0,14	0,10	0,10	0,10	0,46	-	0,1	0,10	0,10	0,10	0,10	0,46	-	0,10	100	0
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,45	0,01	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,45	0,01	0,10	84,48	1850
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,41	0,05	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,41	0,05	0,10	75,86	2158
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,335	0,125	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,335	0,125	0,10	58,01	2466
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,260	0,20	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,260	0,20	0,10	37,92	3083



Şekil 4.18. Koyun karaciğer DPD enzim için 2,6-diisopropilfenol (propofol) etken maddesi ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği

Çizelge 4.18. Koyun karaciğerinden saflaştırılan DPD enzim aktivitesi üzerine lidokain etken maddesi ile yapılan IC₅₀ çalışmasında kullanılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

Kör tüpü								Numune tüpü									
[Lidokain] µM	inhibitör	Fosfat Tamp.(ml)	MgCl ₂ (ml)	DTT (ml)	NAPH (ml)	Saf Su (ml)	İnhibitör (ml)	Urasil (ml)	Fosfat Tamp.(ml)	MgCl ₂ (ml)	DTT (ml)	NAPH (ml)	Saf Su (ml)	İnhibitör (ml)	Urasil (ml)	% Aktivite	[I] µM
		0,14	0,10	0,10	0,10	0,46	-	0,1	0,10	0,10	0,10	0,10	0,46	-	0,10	100	0
		0,14	0,10	0,10	0,10	0,41	0,05	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,41	0,05	0,10	84,48	1850
		0,14	0,10	0,10	0,10	0,36	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,36	0,10	0,10	75,86	2158
		0,14	0,10	0,10	0,10	0,31	0,15	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,31	0,15	0,10	58,01	2466
		0,14	0,10	0,10	0,10	0,285	0,175	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,285	0,175	0,10	37,92	3083



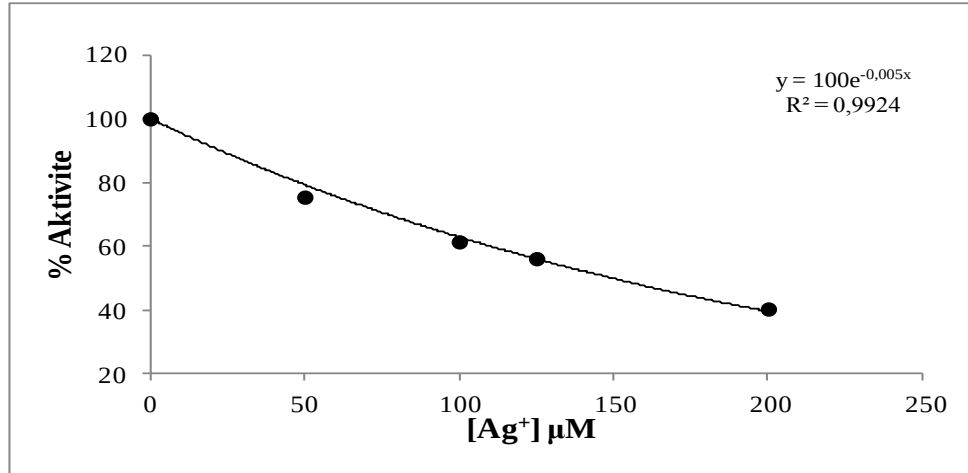
Şekil 4.19. Koyun karaciğer DPD enzim için lidokain etken maddesi ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği

4.5.2. Koyun karaciğer DPD enziminin aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkilerinin belirlenmesine ait çalışma sonuçları

Koyun karaciğerden saflaştırılan DPD enzimi aktivitesi üzerine Ag^+ , Cu^{+2} , Ni^{+2} , Zn^{+2} , Co^{+2} , Fe^{+3} , Cr^{+2} , Cd^{+2} ve Pb^{+2} metal iyonlarının etkisi araştırmak amacıyla bu maddelerin stok çözeltileri hazırlandı ve koyun karaciğer DPD enzimi üzerine etkilerine bakıldı. Çalışmalar sonucu elde edilen inhibisyon etkileri Çizelge 4.20-4.28’de verildi. Konsantrasyona karşı %Aktivite grafikleri Şekil 4.20-4.28’de gösterildi.

Çizelge 4.20. Koyun karaciğerinden saflaştırılan DPD enzim aktivitesi üzerine Ag^+ iyonu ile yapılan IC_{50} çalışmasında kullanılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

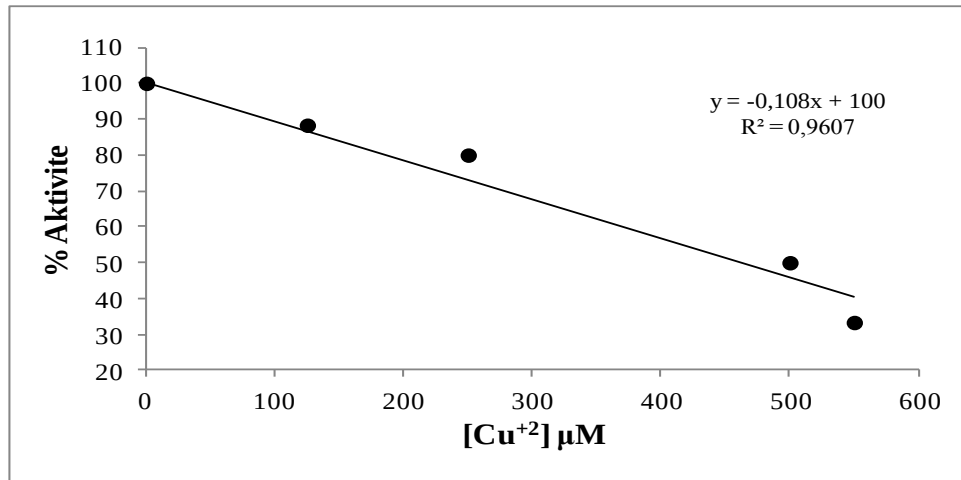
Kör tüpü								Numune tüpü									
[Ag ⁺] mM	inhibitör	Fosfat Tamp.(ml)	MgCl ₂ (ml)	DTT (ml)	NAPH (ml)	Saf Su (ml)	İnhibitör (ml)	Urasil (ml)	Fosfat Tamp.(ml)	MgCl ₂ (ml)	DTT (ml)	NAPH (ml)	Saf Su (ml)	İnhibitör (ml)	Urasil (ml)	% Aktivite	[I] µM
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,10	0,46	-	0,1	0,10	0,10	0,10	0,10	0,46	-	0,10	100	0
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,10	0,45	0,01	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,45	0,01	0,10	75,43	50
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,10	0,44	0,02	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,44	0,02	0,10	61,41	100
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,10	0,435	0,025	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,435	0,025	0,10	55,49	125
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,10	0,42	0,04	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,42	0,04	0,10	40,35	200



Şekil 4.20. Koyun karaciğer DPD enzim için Ag^+ iyonu ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği

Çizelge 4.21. Koyun karaciğerinden saflaştırılan DPD enzim aktivitesi iyonu üzerine Cu^{+2} iyonunun etkisi için yapılan IC_{50} çalışmasında kullanılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

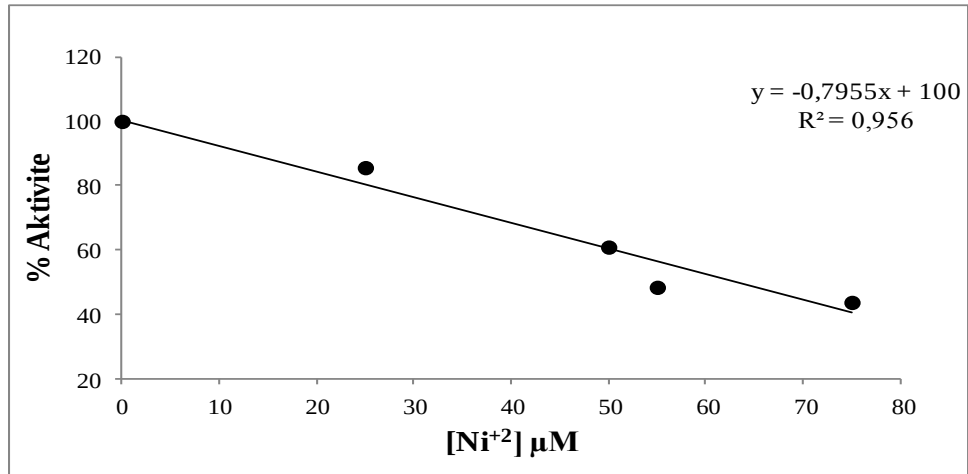
inhibitör	Kör tüpü							Numune tüpü							% Aktivite	[I] μM
	Fosfat Tamp.(ml)	MgCl_2 (ml)	DTT (ml)	NAPH (ml)	Saf Su (ml)	İnhibitör (ml)	Urasil (ml)	Fosfat Tamp.(ml)	MgCl_2 (ml)	DTT (ml)	NAPH (ml)	Saf Su (ml)	İnhibitör (ml)	Urasil (ml)		
[Cu^{+2}] mM	0,14	0,10	0,10	0,10	0,46	-	0,1	0,10	0,10	0,10	0,10	0,46	-	0,10	100	0
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,435	0,025	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,435	0,025	0,10	88,33	125
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,41	0,05	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,41	0,05	0,10	75	250
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,36	0,1	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,36	0,1	0,10	50	500
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,35	0,11	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,35	0,11	0,10	33,44	550



Şekil 4.21. Koyun karaciğer DPD enzim için Cu^{+2} 'nin iyonu ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği

Çizelge 4.22. Koyun karaciğerinden saflaştırılan DPD enzim aktivitesi üzerine Ni^{+2} iyonunun etkisi için yapılan IC_{50} çalışmasında kullanılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

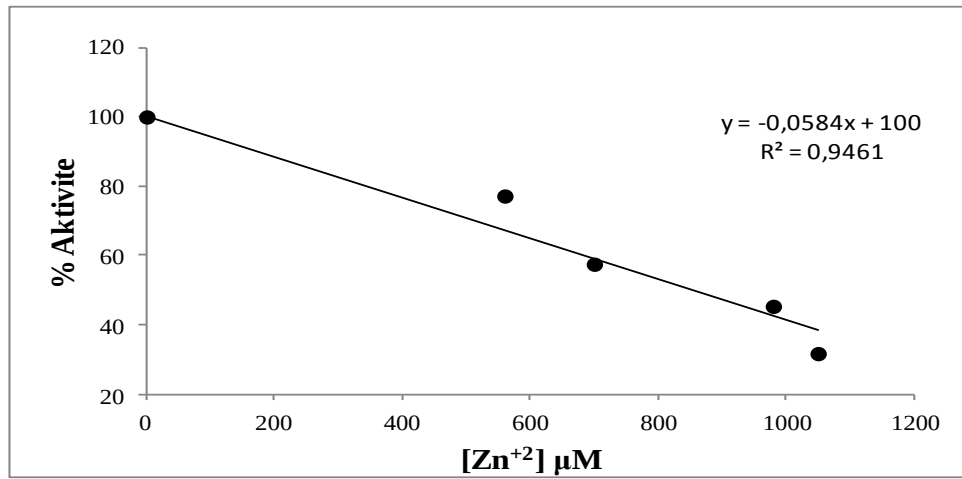
Kör tüpü									Numune tüpü								
inhibitör	Fosfat Tamp.(ml)	MgCl ₂ (ml)	DTT (ml)	NAPH (ml)	Saf Su (ml)	İnhibitör (ml)	Urasil (ml)	Fosfat Tamp.(ml)	MgCl ₂ (ml)	DTT (ml)	NAPH (ml)	Saf Su (ml)	İnhibitör (ml)	Urasil (ml)	% Aktivite	[I] μ M	
[Ni ⁺²] mM	0,14	0,10	0,10	0,10	0,46	-	0,1	0,10	0,10	0,10	0,10	0,46	-	0,10	100	0	
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,41	0,05	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,41	0,025	0,10	85,63	25	
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,36	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,36	0,05	0,10	60,94	50	
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,35	0,11	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,35	0,1	0,10	48,44	55	
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,31	0,15	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,31	0,11	0,10	43,55	75	



Şekil 4.22. Koyun karaciğer DPD enzim için Ni^{+2} 'nin iyonu ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği

Çizelge 4.23. Koyun karaciğerinden saflaştırılan DPD enzim aktivitesi üzerine Zn^{+2} iyonunun etkisi için yapılan IC_{50} çalışmasında kullanılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

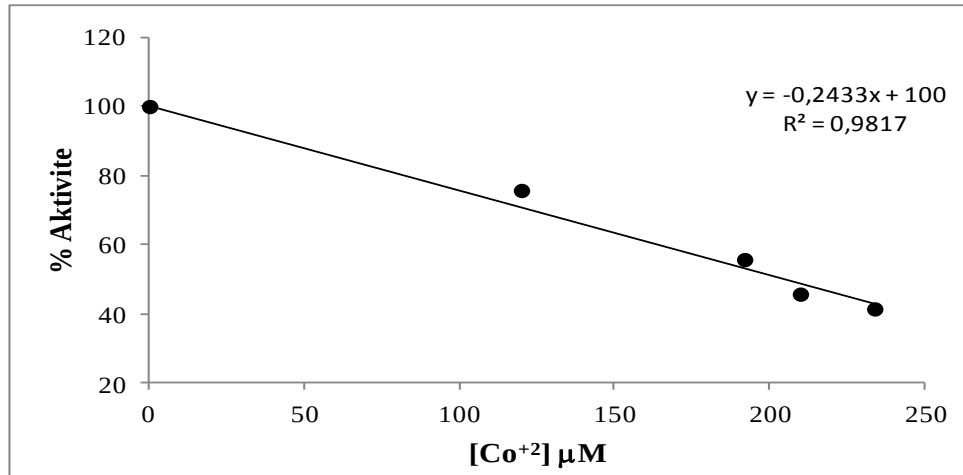
Kör tüpü								Numune tüpü									
inhibitör	Fosfat Tamp.(ml)	MgCl ₂ (ml)	DTT (ml)	NAPH (ml)	Saf Su (ml)	İnhibitör (ml)	Urasil (ml)	Fosfat Tamp.(ml)	MgCl ₂ (ml)	DTT (ml)	NAPH (ml)	Saf Su (ml)	İnhibitör (ml)	Urasil (ml)			
[Zn ⁺²] mM	0,14	0,10	0,10	0,10	0,46	-	0,1	0,10	0,10	0,10	0,10	0,46	-	0,10	100	0	
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,38	0,08	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,38	0,08	0,10	77,23	560	
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,36	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,36	0,10	0,10	57,58	700	
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,32	0,14	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,32	0,14	0,10	45,45	980	
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,31	0,15	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,31	0,15	0,10	31,83	1050	



Şekil 4.23. Koyun karaciğer DPD enzim için Zn^{+2} iyonu ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği

Çizelge 4.24. Koyun karaciğerinden saflaştırılan DPD enzim aktivitesi üzerine Co^{+2} iyonunun etkisi için yapılan IC_{50} çalışmasında kullanılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

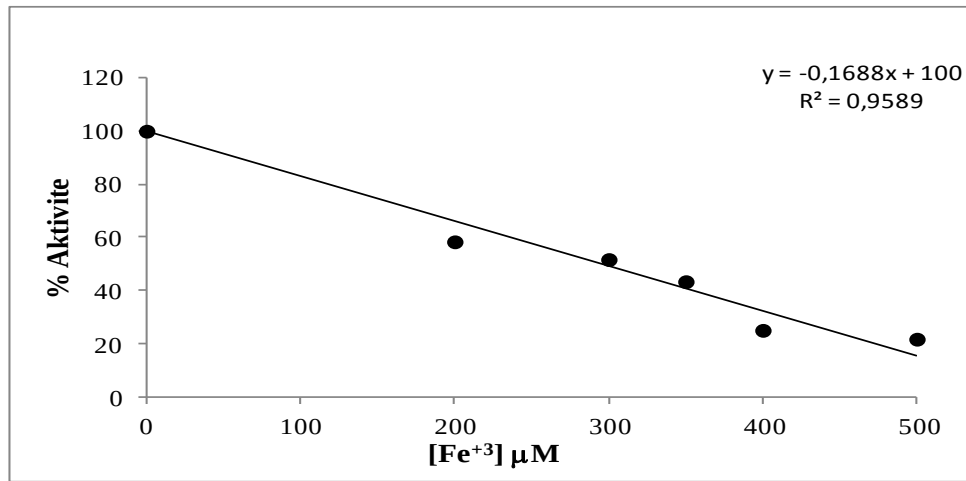
Kör tüpü								Numune tüpü								
inhibitör	Fosfat Tamp.(ml)	MgCl ₂ (ml)	DTT (ml)	NAPH (ml)	Saf Su (ml)	İnhibitör (ml)	Urasil (ml)	Fosfat Tamp.(ml)	MgCl ₂ (ml)	DTT (ml)	NAPH (ml)	Saf Su (ml)	İnhibitör (ml)	Urasil (ml)	% Aktivite	[I] µM
[Co ⁺²] mM	0,14	0,10	0,10	0,10	0,46	-	0,1	0,10	0,10	0,10	0,10	0,46	-	0,10	100	0
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,36	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,36	0,10	0,10	77,23	120
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,30	0,16	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,30	0,16	0,10	57,58	192
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,285	0,175	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,285	0,175	0,10	45,45	210
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,265	0,195	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,265	0,195	0,10	31,83	234



Şekil 4.24. Koyun karaciğer DPD enzim için Co^{+2} iyonu ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği

Çizelge 4.25. Koyun karaciğerinden saflaştırılan DPD enzim aktivitesi üzerine Fe^{+3} iyonunun etkisi için yapılan IC_{50} çalışmasında kullanılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

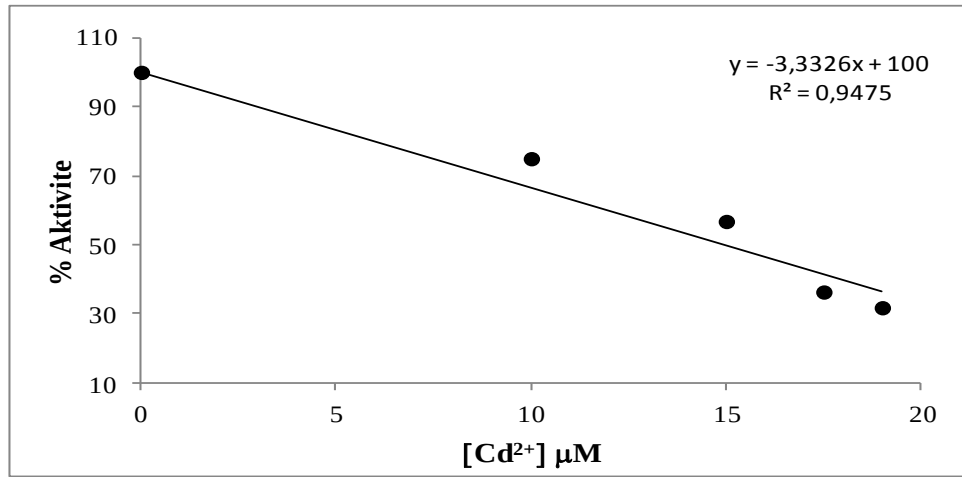
Kör tüpü								Numune tüpü									
inhibitör	Fosfat Tamp.(ml)	MgCl ₂ (ml)	DTT (ml)	NAPH (ml)	Saf Su (ml)	İnhibitör (ml)	Urasil (ml)	Fosfat Tamp.(ml)	MgCl ₂ (ml)	DTT (ml)	NAPH (ml)	Saf Su (ml)	İnhibitör (ml)	Urasil (ml)	% Aktivite	[I] µM	
[Fe ⁺³] mM	0,14	0,10	0,10	0,10	0,46	-	0,1	0,10	0,10	0,10	0,10	0,46	-	0,10	100	0	
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,44	0,02	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,44	0,20	0,10	58,34	200	
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,43	0,03	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,43	0,30	0,10	51,66	120	
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,425	0,035	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,425	0,35	0,10	43,33	192	
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,42	0,04	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,42	0,40	0,10	25,00	210	
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,41	0,05	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,41	0,50	0,10	21,67	234	



Şekil 4.25. Koyun karaciğer DPD enzim için Fe^{+3} iyonu ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği

Çizelge 4.26. Koyun karaciğerinden saflaştırılan DPD enzim aktivitesi üzerine Cd^{+2} iyonunun etkisi için yapılan IC_{50} çalışmasında kullanılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

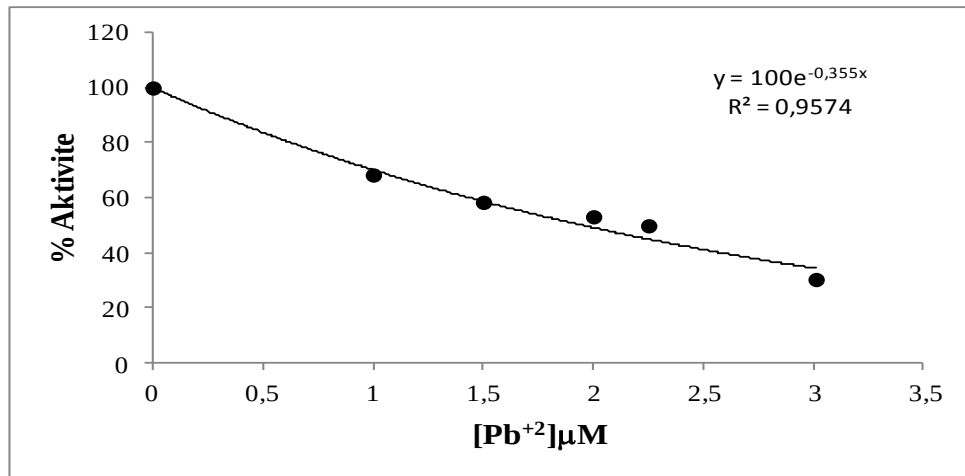
Kör tüpü								Numune tüpü									
[Cd ⁺²] mM	inhibitör	Fosfat Tamp.(ml)	MgCl ₂ (ml)	DTT (ml)	NAPH (ml)	Saf Su (ml)	İnhibitör (ml)	Urasil (ml)	Fosfat Tamp.(ml)	MgCl ₂ (ml)	DTT (ml)	NAPH (ml)	Saf Su (ml)	İnhibitör (ml)	Urasil (ml)	% Aktivite	[I] µM
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,10	0,46	-	0,1	0,10	0,10	0,10	0,10	0,46	-	0,10	100	0
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,10	0,36	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,36	0,10	0,10	51,66	10
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,10	0,31	0,15	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,31	0,15	0,10	43,33	15
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,10	0,285	0,175	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,285	0,175	0,10	25,00	17,5
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,10	0,270	0,19	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,27	0,19	0,10	21,67	19



Şekil 4.26. Koyun karaciğer DPD enzim için Cd^{+2} iyonu ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği

Çizelge 4.27. Koyun karaciğerinden saflaştırılan DPD enzim aktivitesi üzerine Pb^{+2} iyonunun etkisi için yapılan IC_{50} çalışmasında kullanılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

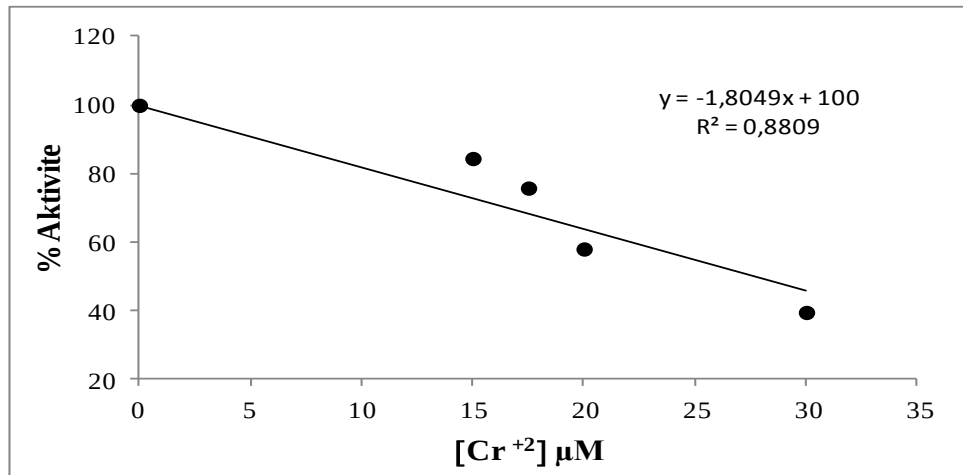
Kör tüpü								Numune tüpü									
inhibitör	Fosfat Tamp.(ml)	MgCl ₂ (ml)	DTT (ml)	NAPH (ml)	Saf Su (ml)	İnhibitör (ml)	Urasil (ml)	Fosfat Tamp.(ml)	MgCl ₂ (ml)	DTT (ml)	NAPH (ml)	Saf Su (ml)	İnhibitör (ml)	Urasil (ml)	% Aktivite	[I] µM	
[Pb ⁺²] mM	0,14	0,10	0,10	0,10	0,46	-	0,1	0,10	0,10	0,10	0,10	0,46	-	0,10	100	0	
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,36	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,36	0,10	0,10	58,34	1	
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,31	0,15	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,31	0,15	0,10	51,66	1,5	
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,26	0,20	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,26	0,20	0,10	43,33	2,0	
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,235	0,225	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,235	0,225	0,10	25,00	2,25	
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,16	0,30	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,16	0,30	0,10	21,67	3,0	



Şekil 4.27. Koyun karaciğer DPD enzim için Pb^{+2} iyonu ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği

Çizelge 4.28. Koyun karaciğerinden saflaştırılan DPD enzim aktivitesi üzerine Cr^{+2} iyonunun etkisi için yapılan IC_{50} çalışmasında kullanılan %Aktivite-Konsantrasyon deney prosedürü

Kör tüpü								Numune tüpü									
inhibitör	Fosfat Tamp.(ml)	MgCl ₂ (ml)	DTT (ml)	NAPH (ml)	Saf Su (ml)	İnhibitör (ml)	Urasil (ml)	Fosfat Tamp.(ml)	MgCl ₂ (ml)	DTT (ml)	NAPH (ml)	Saf Su (ml)	İnhibitör (ml)	Urasil (ml)	% Aktivite	[I] µM	
[Cr ⁺²] mM	0,14	0,10	0,10	0,10	0,46	-	0,1	0,10	0,10	0,10	0,10	0,46	-	0,10	100	0	
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,305	0,155	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,305	0,155	0,10	84,48	15,5	
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,285	0,175	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,285	0,175	0,10	75,86	17,5	
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,26	0,20	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,26	0,20	0,10	58,01	20,0	
	0,14	0,10	0,10	0,10	0,16	0,30	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,16	0,30	0,10	37,92	30,0	



Şekil 4.28. Koyun karaciğer DPD enzim için Cr^{+2} iyonu ile elde edilen %Aktivite-Konsantrasyon grafiği

Çizelge 4.29. Koyun karaciğer DPD enzimi için ilaç etken maddelerinin IC₅₀ değerleri

	Etken Madde	IC₅₀ (μM)
Antidepresan Moleküller	Essitalopram	1736,11
	Mirtazapin	86,65
	Fluoksetin	13,24
	Haloperidal	99,03
Anestezik Moleküller	2,6-di-tert-bütilfenol	0,16
	2,6-dimetilfenol	0,93
	2,6-diisopropilfenol	0,21
	Lidokain	15,07

Çizelge 4.30. Koyun karaciğer DPD enzimi için aktif katyonların IC₅₀ değerleri

Metal İyonları	IC₅₀ (μM)
Ag ⁺	138,64
Cu ⁺²	463,00
Ni ⁺²	63,00
Zn ⁺²	86,00
Co ⁺²	206,00
Fe ⁺³	296,00
Cr ⁺²	28,00
Cd ⁺²	15,00
Pb ⁺²	1,95

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Pirimidinler nükleik asitlerin anahtar monomerleridir ve katabolik metabolizmalarının seçimli inhibisyonu antitümör, antimikrobiyal ve antiparasitik ajanların dizaynında önemli bir yere sahiptir. (Podschun *et al.* 1989). Dihidropirimidin dehidrogenaz (DPD; EC 1.3.1.2) urasil ve timinin sırasıyla β -alanin ve β -aminoizobütirata parçalanmasını katalizleyen ilk ve hız belirleyici enzimdir ayrıca memelilerde β -alaninin sentezlendiği tek yoldur. Birçok dokuda DPD aktivitesi bulunur fakat en yüksek aktivitesini karaciğer ve periferel mono nükleer kan hücrelerinde gösterir. DPD aynı zamanda anti kanser ajan olan, göğüs, baş/boyun ve kolarektal kanserlerin tedavisinde kullanılan 5-floraurasilin (5-FU) %80'den fazlasının metabolizmasından sorumludur. 5-FU genelde iyi tolere edilir buna rağmen düşük veya saptanamayan DPD aktivitesine sahip hastalar şiddetli hatta pnisitopeni, mukozit ve nörolojik toksite gibi hayatı tehdit eden toksitite riskine sahiptirler. DPD eksikliği otozomal resesiftir. Tam DPD eksikliği timin ve urasilin idrar düzeylerinin artması ile karakterize edilen konjenital timin-urasil sendroma, gelişme geriliği ve konvülsif rahatsızlıklar ile sonuçlanır (Sludden *et al.* 1998).

DPD'nin immünohistokimyasal karakterizasyonunun araştırılması ve DPD'nin immünohistokimyasal ekspresyonu 5-FU için kolorektal kanserlerini hassaslıkla tahmin edilebileceğini göstermiştir (Takenoue *et al.* 2002). DPD enzimi eksikliği 5-floraurasil (5-FU) antikanser ilağını kullanan tedavilerinde kullanan hastalarda bazı yan etkilere neden bir farmakogenetik sendromdur. Bu populasyon çalışmasının amacı Tunus nüfusunda dihidropirimidin dehidrogenaz geninin (DPYD) kodlanan bölgesinde HPLC ile denatüre edilerek genotiplenmiştir. DPYD'nin kodlanmış bölgesinde 12 varyant belirlenmiştir (Fredj *et al.* 2007).

DPD aktivitesinin eksikliği, hastalarda 5-FU alınmasından sonra ölümde içeren bazı toksitelere neden olur. Bazı çalışmalar dihidropirimidin geninin (DPYD) moleküler defekleri DPD aktivitesinin yetersizliğine ve bununda farmokogenetik sendroma neden olduğunu göstermiştir. Günümüzde çeşitli mutasyonlarını içeren 40'ten daha fazla

varyant allelleri DPYD'nin gen kodlama alanda rapor edildi. DPD eksikliğine ve şiddetli toksisiteyle sonuçlanan 14. ekzonda sıçramaya neden olan IVS14+1G>A nın Avrupalılarda 5-FU toksitesi ile ilgili en yaygın mutasyondur. DPYD geni yüksek işlem hacimli teknolojiyle taranmasına rağmen DPD'nin regülasyon mekanizması nedeniyle aydınlatılamamıştır. Bu farmakogenetik sendromun fenotipi ve genotipi arasında açık bir bağlantı kurmak için DPD aktivitesinin ölçülmesi gerekir. 5-FU tedavisinden önce DPYD'nin genetik defeklerinin en azından IVS14+1>A ve/veya DPD aktivitesinin taranması hastaları özellikle belli popülasyondaki hastaları zararlı sondan koruyacağını akla getirir (Hsiao and Lin 2007).

İyon değişim kromatografisinde duran fazda bulunan ve yerlerinden kolayca ayrılabilen iyonlar çevrelerindeki (yürüyen sıvıdaki ve karışım içindeki) iyonlarla yer değiştirir. Bu yöntemle basit inorganik ve organik iyonlar birbirinden ayrılabilceği gibi enzimler, hormonlar ve nükleik asitler gibi biyolojik öneme sahip polielektrolitler de ayrılabilir. Afinite kromatografisi ise bir çeşit adsorpsiyon kromatografisidir. Bu kromatografi tekniğinde saflaştırılması istenen molekülün, matriks adı verilen bir kolon maddesine kovalent ve immobilize edilmiş bir komplementer bağlanma bileşiğine (ligand) spesifik ve tersinir bağlandığı bir tekniktir. Genelde kolon dolgu maddesi olarak Sephadex, Sepharose, Biogel gibi farklı jeller kullanılmaktadır. Diğer yöntemlerle çok basamaklı işlemler gerektiren birçok ayırımlar, bu yöntemle çok defa bir basamakla gerçekleşir (Küfrevioğlu ve Çiftçi 2008).

Bu çalışmada ilk defa koyun karaciğerinden DPD enzimi saflaştırıldı. Bu amaçla ilk olarak DEAE-anyon değişim kromatografisi ve afinite kromatografisi kullanıldı. Daha sonra saflaştırılan enzimlerin kinetik özellikleri ve SDS-PAGE metoduyla molekül kütlesi belirlendi. Çalışmalarımız esnasında elde edilen homojenata ilk önce $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürmesi yapıldı, sonra pH=4,85 asetik asit çöktürmesi yapıldı. İlk önce DEAE iyon değişim kromatografisi sonra 2', 5'-ADP Sepharoz 4B afinite kromatografisi ile elde edilen elüatlara kantitatif protein yapıldı. Elüatlardaki protein miktarları Bradford metoduna göre yapıldı. Bu yöntem negatif bir yüke sahip olan Coomassie Brilliant Blue G-250'nin protein üzerindeki pozitif yüke bağlanması sonucu oluşan renkli kompleksin

595 nm’de maksimum absorbands göstermesi esasına dayanır. Bu yöntemin diğer protein tayin metotlarından üstün tarafı, bozucu etkilere karşı daha az hassas olması ve reaksiyon yüksek oranda tekrarlanabilir olmasıdır. Proteine boyanın bağlanması çok hızlı gelişir ve protein boya kompleksi çözeltilerde uzun süre kalabilmektedir. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır (Bradford and Williams 1976).

Koyun karaciğeri homojenatı hazırlanırken hücreleri parçalamak için sıvı azot ve ultratüreks kullanıldı. Enzimini saflaştırmak için 2 yöntem denendi. 1. yöntemde; homojenata amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz yapıldıktan sonra elde edilen homojenat iki defa 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonuna yüklendi. Diğer yöntemde ise homojenata amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz yapıldıktan sonra homojenat DEAE-Selüloz kolonundan ve affinite kolonundan geçirildi. Elde edilen tüm elüatlarda aktivite tayini ve kantitatif protein tayini yapıldı. Yapılan çalışmaların sonunda enzimin 1. yöntemle enzimin saflaştırılamadığına karar verildi. Bunun üzerine 2. yöntemde bulunan sonuçlar neticesinde hesaplamalar yapılarak koyun karaciğer DPD enzimi için saflaştırma tablosu çizildi (Çizelge 4.2). Çizilen saflaştırma tablosuna göre enzimi %16,7 verimle 402,7 kat saflaştırıldı. Literatürde yapılan çalışmalarda domuzdan %28 verimle 3100 kat (Podschun *et al.* 1989), rattan %15 verimle 1406 kat (Shiotani ve Weber 1980), HPLC kullanılarak yapılan çalışmalarda insandan %20,3 verimle 7824 kat, domuzdan %16,7 verimle 2588 kat, rattan %42,7 verimle 3700 kat ve inekten %30,6 verimle 3669 kat saflaştırılmıştır (Lu *et al.* 1993).

Saflaştırılan koyun karaciğer DPD enziminin saflığının kontrolü için ve molekül ağırlıklarının tespiti için Bölüm 3.2.4’de anlatıldığı şekilde SDS-PAGE yapıldı ve elde edilen tek bantın molekül ağırlığı çizilen Rf-logMK grafiğinden bulundu (Şekil 3.3). Çizilen grafiğe göre koyun karaciğerinden saflaştırılan DPD enziminin mol kütlesi 111 kDa olarak bulundu. Literatürde yapılan saflaştırma çalışmaları neticesinde molekül kütlesi afinite kolonu kullanıldığında domuz için 107 kDa, 92 kDa ve 12 olacak şekilde üç bant (Podschun *et al.* 1989), rat için 110 kDa (Shiotani and Weber 1980) olarak bulunmuştur. Saflaştırılmada HPLC kromatografisi kullanıldığında ise SDS-PAGE ile enzimin molekül kütlesi insan ve domuzda benzer olarak 102 ve 90 kDa olmak üzere iki

bant, sıçanda 105 kDa, inekte 108 kDa olarak bulunmuştur (Lu *et al.* 1993). DPD enzimi için bulduğumuz molekül ağırlığı literatürle uyum içindedir.

Saflaştırma işlemleri yapıldıktan sonra enzim için karakterizasyon çalışmaları yapıldı. Bu amaçla koyun karaciğer DPD enzimi için optimum pH, optimum iyonik şiddet, optimum sıcaklık ve stabil pH değerleri belirlendi. Koyun karaciğerinden saflaştırılan DPD enziminin optimum pH değerlerini belirlemek amacıyla pH 5,0-8,0 aralığında 280 mM potasyum fosfat ve 8,5- 10 aralığında 280 mM Glisin-NaOH tampon çözeltileri kullanılarak enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak belirlendi. Koyun karaciğer DPD enziminin optimum pH değeri 0,28 M'lık KH_2PO_4 tamponunda 8,0 olarak tespit edildi. Literatürde yapılan çalışmalarda rattan elde edilen DPD enziminin optimum pH fosfat tamponunda 7,4 (Shiotani and Weber 1980), insandan elde edilen enzimin optimum pH'yı fosfat tamponunda 7,4 (Lu *et al.* 1992), sığırdan elde edilen enzimin optimum pH'sı 7,4 olarak tespit edilmiştir (Anonymous 2014).

Koyun karaciğer DPD enziminin optimum iyonik şiddetini belirlemek için optimum pH'a belirlendikten sonra optimum pH'da 1, 0,9 , 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1 fosfat tamponları kullanılarak aktivite ölçümleri yapıldı. Yapılan aktivite ölçümleri sonucunda enzim için iyonik şiddet 0,9 M bulundu (Şekil 3.5).

Koyun karaciğer enziminden saflaştırılan DPD enziminin optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla optimum pH ve optimum iyonik şiddette 10'ar °C artışla 0-80°C aralığında aktivite ölçümleri yapıldı. Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen bulgulara göre enzim için optimum sıcaklık 50°C olarak bulundu (Şekil 4.8). Lu ve arkadaşları insandan saflaştırılan karaciğer DPD enziminin optimum sıcaklığı 37°C olarak belirlemişlerdi (Lu *et al.* 1992).

Koyun karaciğer DPD enziminin stabil pH'sını belirlemek amacıyla pH'ları 5, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 ve 8,0 olan 35 mM KH_2PO_4 tamponları kullanıldı. Belirtilen pH'lardaki tampon çözeltilerinin 1 ml'sine 1 ml enzim çözeltisi karıştırılarak +4°C'de muhafaza

edildi. 4. gün boyunca 12 saat arayla yapılan aktivite ölçümünde enzimin stabil olduğu pH 6,0 olarak belirlendi (Şekil 4.9).

Koyun karaciğer DPD enziminin NADPH ve urasil substratlarına olan ilgisini belirlemek amacıyla substratlardan biri sabit tutularak diğ erinin 5 farklı konsantrasyonunda enzim aktivite değ erleri belirlendi. Elde edilen $1/V$ ve $1/[S]$ değ erleri yardımıyla Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek K_M ve V_{max} değ erleri hesaplandı. Koyun karaciğer DPD enziminin NADPH substratı için K_M ve V_{max} değ erleri sırasıyla 22,97 μM , 0,17 EÜ/ml, urasil substratı için K_M ve V_{max} değ erleri sırasıyla 17,46 μM 0,14 EÜ/ml olarak tespit edildi. Podschun ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada domuz ciğ erinden saflaştırılan DPD enziminin urasil ve NADPH substratları için K_M değ erleri sırasıyla 1,98 μM ve 11,36 μM olarak (Podschun *et al.* 1989), Shiotani ve Weber rattan saflaştırılan DPD enzimi için urasil ve NADPH substratları için K_M değ erleri sırasıyla 1,8 μM ve 11 μM olarak, V_{max} değ erleri sırasıyla 41,5 EÜ/ml ve 40,6 EÜ/ml olarak bulunmuştur (Shiotani and Weber 1980). Lu ve arkadaşları domuz, rat ve sığ ır karaciğ erinden saflaştırılan DPD enziminin urasil substratı için K_M değ erlerini sırasıyla 4,9 μM , 5,9 μM , 2,4 μM , 3,9 μM olarak, V_{max} değ erlerini sırasıyla 0,6 ($\mu mol/mim/mg$), 0,7 ($\mu mol/mim/mg$), 0,8 ($\mu mol/mim/mg$), 0,7 ($\mu mol/mim/mg$) olarak bulmuşlardır. NADPH substratı için domuz, rat ve sığ ır karaciğ erinden saflaştırılan DPD enziminin K_M değ erlerini sırasıyla 9,6 μM , 11,9 μM , 20,6 μM , 8,9 μM olarak, V_{max} değ erlerini sırasıyla 10,1 ($\mu mol/mim/mg$), 8,2 ($\mu mol/mim/mg$), 20,9 ($\mu mol/mim/mg$), 8,5 ($\mu mol/mim/mg$) olarak belirlemişlerdir (Lu *et al.* 1992). Koyun karaciğ er DPD enziminin NADPH substratı için bulunan K_M değ erlerinin urasil substratına göre literatürde bulunan değ erlere daha yakın olduğu görölmektedir. Aynı zamanda NADPH için bulunan V_{max} değ erleri urasil V_{max} değ erlerine göre literatürde bulunan değ erlerle daha çok örtüşmektedir. Fakat literatürdeki bulgulara uygun olarak urasilin K_M , NADPH'nın K_M değ erinden daha küçüktür. K_M değ erinin küçü k olması enzim substrat kompleksinin sağ lamlığ ının bir ölçüsüdür. K_M değ erinin yüksek olması enzimin substrata ilgisinin az olduğunu gösterir.

Günümüzde kullanımda olan tüm uçucu anesteziklerin propranolol, lidokain, fentanil ve petidin gibi çok çeşitli ilaçların metabolizmasını inhibe ettiği iyi bilinir. Anestezi uzmanları için klinik önemde olan etkileşimlere, simetidin ve lokal anestezikler ve benzodiazepinler arasındaki; plazma kolinesterazların ilaçlar tarafından inhibisyonu; monoamin oksidaz inhibitörleri ve sempatomimetikler veya petidin arasındaki etkileşimler verilebilir (Wood 1991). Lokal anestezikler (lidokain ve tetrakain) ve klorpromazinin fare beyninin sinaptozomal membranlarıyla ilgili üç enzimin aktiviteleri ($\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPaz}$, $\text{Mg}^{2+}\text{ATPaz}$ ve asetilkolinesteraz) araştırılmıştır. Her maddenin yaklaşık olarak aynı konsantrasyonları her ATPazı %50 inhibe ettiği tespit edilmiştir (Sidek *et al.* 1984).

En yeni antidepresanların her biri potansiyel ilaç etkileşimleriyle ilişkili olan sitokrom P450 enzimlerinin farklı bir grubunu inhibe eder. Sitokrom P450 1A2 fluvoksamin tarafından inhibe edilir ve teofilin, klozapin ve diğerleriyle olan ilaç etkileşimlerinde yer alır. Fluoksetin, norluoksetin, sertralin ve paroksetin sitokrom P460 2D6'nın in vitro inhibitörüdür (Nemeroff *et al.* 1996).

Koyun karaciğerinden saflaştırılan DPD enzimi üzerine essitalopram, mirtazapin, fluoksetin, haloperidal antidepresan moleküllerin ve 2,6-di-tert-bütilfenol, 2,6-dimetilfenol, 2,6-diisopropilfenol (propofol), lidokain anestezi moleküllerin etkisini belirlemek amacıyla reaksiyon ortamına bu maddelerin en az 4 veya 5 farklı konsantrasyonları ilave edilerek aktivite ölçümleri yapıldı. Bulunan bu değerlerle %Aktivite- konsantrasyon grafikleri çizildi (Şekil 4.12-4.19). Çizilen bu grafiklerden koyun karaciğer DPD enzimi için IC_{50} değerleri essitalopram için 1736,11 μM , mirtazapin için 86,65 μM , fluoksetin için 13,24 μM , haloperidal için 99,03 μM , 2,6-di-tert-bütilfenol için 0,16 μM , 2,6-dimetilfenol için 0,93 μM , 2,6-diisopropilfenol (propofol) için 0,21 μM ve lidokain için 15,07 μM olarak bulundu.

Bakır ve çinko gibi metal iyonlar fizyolojik önemli iyonlardır ve birçok önemli biyolojik fonksiyonda rol alır. Yapılan bir çalışmada ilk defa α -glukozidaz enziminin doğal inhibitörleri araştırılmış ve metal iyonlarının α -glukozidazı inhibe ettiği

bulunmuştur. Çalışmada bakır, vanadyum, nikel ve çinkonun enzimi tamamen, bor ve demirin ise orta derecede bir inhibisyon verdiği gözlenmiştir (Wang *et al.* 2004). Günümüzde organik asetilkolinesteraz inhibitörleri Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır. Bununla birlikte çinko ve demir porfirinlerin asetilkolinesterazı inhibe ettiği görülmüştür. Hemin biyosentetik metabolizmasının bozulmasına neden olduğu için alüminyum toksitesi anemiye neden olmaktadır. Ayrıca δ -aminolevulinik asit dehidrotaz, heksokinaz, gliserol kinaz ve ATPaz gibi birçok enzim alüminyum tarafından inhibe olmaktadır. Cu^{+2} , Cd^{+2} , Hg^{+2} , Zn^{+2} ve Pb^{+2} iyonları (düşük μM) heksokinazı inhibe ederken, çinko ve kadminyum iyonları ise DNA tamir enzimlerini inhibe eder (Louie and Meade 1999).

Koyun karaciğer DPD enzimi üzerine metal iyonlarının (ağır metallerin etkisini) incelemek amacıyla Ag^+ , Cu^{+2} , Ni^{+2} , Zn^{+2} , Co^{+2} , Fe^{+3} , Cr^{+2} , Cd^{+2} ve Pb^{+2} metallerinin en az 4 veya 5 farklı konsantrasyonları reaksiyon ortamına ilave edilerek aktivite ölçümleri yapıldı. Daha sonra bulunan bu değerlerle %Aktivite- konsantrasyon grafikleri çizildi (Şekil 4.20-4.28). Çizilen bu grafiklerden koyun karaciğer DPD enziminin IC_{50} değerleri Ag^+ için 138,64, Cu^{+2} için 463,00, Ni^{+2} için 63,00, Zn^{+2} için 86,00, Co^{+2} için 206,00, Fe^{+3} için 296,00, Cr^{+2} için 28,00, Cd^{+2} için 15,00 ve Pb^{+2} için 1,95 μM olarak hesaplandı.

5 pozisyonundaki bir halojen gibi elektonegatif süstitüent taşıyan urasil analogları dihidroprimidin dehidrogenaza urasilden daha fazla ilgi gösterirler. Ayrıca 5 pozisyonunda bir elektron verici gruba sahip olan timin, urasilden daha yavaş reaksiyona girmektedir. Hem rat hemde hamster DPD enziminde, 5-iyodaurasili timinden daha hızlı reaksiyona girdiği bulunmuştur. Bu durumu en iyi iyot grubu elektronegatif ve metil grubunun elektron verici olması açıklar. (Dorsett *et al.* 1969). Eniluracil, tümörler ve perifenal-kan mononükleer hücrelerde DPD'nin katalitik aktivitesini tamamen inhibe eder (Salemm *et al.* 2000). DPD düzeyi düşük tümörler 5-FU'ya nispeten duyarlı iken, yüksek DPD seviyelerine sahip tümörler 5-FU'ya nispeten dirençlidirler (Diasio 1998).

5-FU ilacının parçalanması sonucunda da vücutta toksiteye neden olan birçok florlanmış ürün meydana gelir. Bu ürünlerin parçalanıp vücuttan atılması için DPD enzimine ihtiyaç vardır. Kanseri hastalarda DPD enziminin inhibe edilmesi genellikle 5-FU ilacının etkinliğini artırdığından istenilen bir durumdur. Fakat çok fazla inhibe edilmesi ve aynı zamanda bazı hastalarda tam veya kısmi DPD eksikliği olabildiğinden çok şiddetli toksiteye neden olabilir. Ayrıca DPD eksikliği nörolojik bozukluklara da neden olur.

DPD enzim aktivitesi üzerine ilaç inhibisyonu ile ilgili çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Metal iyonlarının inhibisyonu ile ilgili hiçbir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu yüzden enzim üzerine bulduğumuz sonuçlar literatürde daha önce belirtilmemiştir. DPD enzimini inhibe ettiğinden dolayı bu tür etken maddeye sahip ilaçların ve metal iyonlarının kullanımlarının ve dozlarının ayarlamasının önemli olduğu sonucuna varılmıştır.

Sonuç Olarak;

1. Dihidropirimidin dehidrogenaz enziminin koyun karaciğerinden saflaştırılması ilk defa bu tez kapsamında gerçekleştirildi.
2. Bu çalışma sonunda ilk defa koyun karaciğerinden saflaştırılan DPD enziminin molekül ağırlığı, optimum pH, optimum iyonik şiddet, optimum sıcaklık, K_M ve V_{max} gibi kinetik özellikleri belirlendi.
3. Koyun karaciğer DPD enzimi üzerine bazı antidepresan ve anestetik moleküller, metal iyonlarının etkisi incelendi. Bu amaçla essitalopram, mirtazapin, fluoksetin, haloperidol antidepresan molekülleri ve 2,6-di-tert-bütilfenol, 2,6-dimetilfenol, 2,6-diisopropilfenol (propofol), lidokain anestetik molekülleri, Ag^+ , Cu^{+2} , Ni^{+2} , Zn^{+2} , Co^{+2} , Fe^{+3} , Cr^{+2} , Cd^{+2} ve Pb^{+2} metal iyonları ile çalışıldı. Bu amaçla moleküller ve metal iyonları için IC_{50} değerleri hesaplandı. Bu çalışmanın sonunda moleküllerin ve metal iyonlarının düşük miktarlarda enzimi inhibe ettiği görüldü.

KAYNAKLAR

- Akyol H., 2004. Kemoterapinin temel ilkeleri. XIII. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser
- Akyol H., 2004. Kemoterapinin Temel İlkeleri. XIII. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, Hemşire Programı.
- Anonymous, 2014. (brenda 2014).
- Ateşci F.G., Oğuzhanoglu N.K., Baltarlı B., Karadağ F., Özdel O., Karagöz N., 2003.
- Atkins P. And Jones L., 1999. Temel Kimya 2. Bilim Yayıncılık, 886 s, Ankara.
- Axen, R., Porath, J., Ernback, S., 1967. Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides. *Nature*, 214(5095), 1302-1304.
- Axen. R., Ernback. S., 1971. Chemical fixation of enzymes to cyanogen halide activated polysaccharide carriers. *European Journal of Biochemistry*, 18, 351-360.
- Berg J. M., Tymoczko J. L. and Stryer L., 2014. Biyokimya. Palme Yayınları No: 822, 1054 sayfa, Ankara
- Beser -Gördeles N., ve Öz F., 2003. Kemoterapi alan lenfomalı hastaların anksiyetede depresyon düzeyleri ve yaşam kalitesi. C.Ü. Hemşirelik Yüksek Okulu Dergisi, 7.
- Bradford. M.M., Williams W.L., 1976. New, rapid, sensitive method for protein determination. *Federation Proceedings*, 35, 274-274.
- Brunton L.L., Lazo J.S., Parker K.L., 2008. Tedaviniin Farmakolojik Temelleri- Goldman and Gilman. Nobel Tıp Kitabevleri, 2015, Ankara
- Burtis C. A., Ashwood E. R., 2005. Tietz Klinik Kimyada Temel İlkeler. Palme Yayıncılık, 1091 s, Ankara.
- Büchel B., Rhyn P., Schürch S., Bühr C., Amstutz U., Largiadè R.C., 2013. LC-MS/MS method for simultaneous analysis of uracil, 5,6-dihydrouracil, 5-fluorouracil and 5-fluoro-5,6-dihydrouracil in human plasma for therapeutic drug monitoring and toxicity prediction in cancer patients. *Biomedical Chromatography*, 27, 7-16.
- Change P.C., Harvey A.R. and Ferrier D.R., 2007. Lippincott's Illustrated Reviews Serisinden: Biyokimya. Nobel Tıp Kitabevleri, 536 sayfa, Ankara
- Diasio R.B., 1998. Soriivudine and 5-fluorouracil; a clinically significant drug-drug interaction due to inhibition of dihydropyrimidine dehydrogenase. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 46, 1-4.
- Dobritzsch D., Person K., Schneider G., Lindqvist Y., 2000. Crystallization and preliminary X-ray study of pig liver dihydropyrimidine dehydrogenase. *Acta Crystallographica Section D*, 57, 153-155.
- Dobritzsch D., Ricogna S., Schneider G., Schnackerz K.D., and Lindqvist Y., 2002. Crystal structure of the productive ternary complex of dihydropyrimidine dehydrogenase with nadph and 5-iodouracil. *The Journal of Biyological Chemistry*, 277, 13155-13166.
- Dolegowska B., Ostapowicz A., Stanczyk-Dunaj M., Blogowski W., 2012. Spectrophotometric Methods as a novel screening approach for analysis of dihydropyrimidine dehydrogenase activity before treatment with 5-fluorouracil chemotherapy. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 63, 411-421.

- Dorsett M.T., Morse P.A., Gentry G.A., 1969. Inhibition of rat dihydropyrimidine dehydrogenase by 5-cyanouracil *in vitro*. *Cancer Research*, 29, 79-82.
- Ezzeldin H. And Diasio R., 2004. Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency a pharmacogenetic syndrome associated with potentially life-threatening toxicity following 5-fluorouracil administration. *Clinical Colorectal Cancer*, 4, 181-189.
- Fischel J.L., Formento P., Etienne M.C., Spector T., Renee N., Milano G., 1997. Dual modulation of 5-fluorouracil cytotoxicity using folinic acid with a dihydropyrimidine dehydrogenase inhibitor. *Biochemical Pharmacology*, 53, 1703-1709.
- Fredj B.K., Gross E., Chouchen L., B'Chir F., Ahmed B.S., Neubauer S., Kiechle M., and Saguem S., 2007. Mutational spectrum of dihydropyrimidine dehydrogenase gene (DPYD) in the Tunisian population. *Comptes Rendus Biologies*, 330, 764-769.
- Gonzalez F.J. and Salguero P.D., 1995. Diagnostic analysis, clinical importance and molecular basis of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. Elsevier Science Ltd, 16, 325-327.
- Goudgaon N.M., Naguib F.N., Kouni M.H., Schinazi R.F., 1993. Phenylselenenyl-and phenylthio-substituted pyrimidines as inhibitors of dihydrouracil dehydrogenase and uridine phosphorylase. *Medicinal Chemistry*, 36, 4250-4254.
- Gözükara M.E., 2011. *Biyokimya. Nobel Tıp Kitabevleri*, 988 s, İstanbul.
- Gündüz T., 2008. *Çevre Kimyası. Gazi kitabevi*. 939 s, Ankara.
- Gürdöl F. ve Ademoğlu E., 2013. *Biyokimya. Nobel Tıp Yayınları*, 691 s, İstanbul.
- Hattori K., Kohchi Y., Oikawa N., Suda H., Ura M., Ishikawa T., Miwa M., Endoh M., Eda H., Tanimura H., Kawashima A., Horii I., Ishitsuka H., Shimma N., 2003. Design and synthesis of the tumor-activated prodrug of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) inhibitor, ro0094889 for combination therapy with capecitabine. *Bioorganic & Medical Chemistry Letters*, 13, 867-872.
- Ho D.H., Townsend L., Luna M.A., Bodeley G.P., 1986. Distribution and inhibition of dihydrouracil dehydrogenase activities in human tissues using 5-fluorouracil as a substrate. *Anticancer Research* 6, 781-784.
- Howland R. D., Mycek M.J., 2009. *Lippincott's Illustrated Reviews Serisinden: Farmakoloji. Nobel Tıp Kitabevi*, 550 s, Ankara.
- Hsiao H.H., Lin S.F., 2007. Pharmacogenetic Syndrome of Dihydropyrimidined Deficiency. *Current Pharmacogenomics*, 5, 31-38.
- Johnson S.J., Ridge S.A., Cassidy J., McLeod H.L., 1999. Regulation of dihydropyrimidine dehydrogenase in colorectal cancer. *Clinical Cancer Research*, 1999, 5, 2566-2570.
- Kanser Hastalarında Psikiyatrik Bozukluklar ve İlişkili Etmenler. *Türk Psikiyatri Dergisi* 14(2) 145-152
- Kayaalp S. O., 2012. *Tıbbi Farmakoloji. Pelikan Yayınevi*. 1555 s, Ankara
- Keha E. ve Küfrevioğlu Ö.İ., 2000. *Biyokimya. Aktif Yayınevi*, 636 s, Erzurum.
- Kubota T., 2003. 5-Fluorouracil and dihydropyrimidine dehydrogenase. *Internal Journal clinical Oncology*, 8, 127-131.
- Kuilenberg A.B.P, 2004. Dihydrouracil dehydrogenase and the efficacy and toxicity of 5-fluorouracil. *European Journal of Cancer*, 40, 939-950.
- Kuilenburg A.B.P., Meijer J., Dobritzsch D., meisma R., Duran M., Lohkamp B., Zoetekouw L., Abeling N.G.G.M., Tinteren H.L.G, Bosch A.M., 2007. Clinical

- biochemical and genetic finding in two sibs with a dihydropyrimidine deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism*, 91, 157-164.
- Lee A., Ezzeldin H., Fourie J., Diasio R., 2004. Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency: impact of pharmacogenetics on 5-fluorouracil therapy. *Clinical Advances in Hematology & Oncology*, 2, 527-533.
- Lohkamp, B., Voevodskaya, N., Lindqvist, Y. and Dobritzsch, D. 2010. Insights into the mechanism of dihydropyrimidine dehydrogenase from site-directed mutagenesis targeting the active site loop and redox cofactor coordination. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804, 2198-2206.
- Lohkamp, B., Voevodskaya, N., Lindqvist, Y., Dobritzsch, D., 2010. Insights into the mechanism of dihydropyrimidine dehydrogenase from site-directed mutagenesis targeting the active site loop and redox cofactor coordination. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804, 2198-2206.
- Louie Y. A., Meade J.T., 1999. Metal Complexes as enzyme inhibitors. *Chemical Reviews*, 99, 2711-2734.
- Lu Z., Zhang R., Diasio R.B., 1993. Dihydropyrimidine dehydrogenase activity in human peripheral blood mononuclear cells and liver: population characteristics, newly identified deficient patients, and clinical implication in 5-fluorouracil chemotherapy. *Cancer Research*, 53, 5433-5438.
- Lu Z.H., Zhang R., and Diasio R.B., 1992. Purification and characterization of dihydropyrimidine dehydrogenase from human liver. *Journal of Biological Chemistry*, 267, 17102-17109.
- Lu Z.H., Zhang R., and Diasio R.B., 1993. Comparison of dihydropyrimidine dehydrogenase from human, rat, pig and cow liver. *Biochemical Pharmacology*, 46(5), 945-952.
- Lu Z.H., Zhang R., Diasio R.B., 1993. Comparison of dihydropyrimidine dehydrogenase from human, rat, pig and cow liver. *Biochemical Pharmacology*, 46, 945-952.
- Milano G., Fischel J.L., Etienne M.C., Renee N., Formento P., Thyss A., Gaspard M.H., Thill L., Cupissol D., 1994. Inhibition of dihydropyrimidine dehydrogenase by alpha-interferon: experimental data on human tumor cell lines. *Cancer Chemotherapy Pharmacology*, 34, 147-52.
- Nelson D.L., and Cox M.M., 2013. *Biyokimyanın İlkeleri*. Palme Yayınları No: 764, 1158 s, Ankara.
- Nemeroff C.B., DeVane C.L., Pollock B.G., 1996. Newer antidepressants and the cytochrome p450 system. *American Journal of Psychiatry*, 153, 311-20.
- Podschun B., Jahnke K., Schnackerz K.D., Cook P.F., 1992. Acid base catalytic mechanism of the Dihydropyrimidine dehydrogenase from pH studies. *The Journal of Biological Chemistry*, 267, 3407-3413.
- Podschun B., Wahler G. And Schnackerz D.K., 1989. Purification and characterization of dihydropyrimidine from pig liver. *European Journal of Biochemistry*, 185, 219-224.
- Podschun B., Wahler G., Schnackerz K.D., 1989. Purification and characterization of dihydropyrimidine dehydrogenase from pig liver. *European Journal of Biochemistry*, 185, 219-24.

- Podschun, B., Cook, P.F., Schnackerz, D.K. 1990. Kinetic mechanism of dihydropyrimidine dehydrogenase from pig liver. *Journal of Biological Chemistry*, 265, 12966-12972.
- Porter D.J.T., Chesnut W.G., Merrill B.M., Spector T., 1991. Mechanism-based inactivation of dihydropyrimidine dehydrogenase by 5-ethynyluracil. *The Journal of Biological Chemistry*, 267, 5236-5242.
- Porter D.J.T., Chesnut W.G., Taylor L.C.E., Merrill B.M., Spector T., 1991. Inactivation of dihydropyrimidine dehydrogenase by 5-iodouracil. *The Journal of Biological Chemistry*, 266, 19988-19994.
- Ridge A. S., Sludden J., Brown O., Robertson L., Wei X., Sapone A., Fernandez-Salguero P.M, Gonzalez F.J, Vreken P., Van Kuilenburg A.B.P., Van Gennip A.H., McLeod H.L., 1998. Dihydropyrimidine dehydrogenase pharmacogenetics in Caucasian subjects. *Journal of Clinical Pharmacology*, 46, 151–156.
- Sakata K.I., Someya M., Matsumoto Y., Tauchi H., Kai M., Toyota M., Takagi M., Hareyama M., Fukushima M., 2011. Gimerical, an inhibitor of dihydropyrimidine dehydrogenase, inhibits the early step in homologous recombination. *Cancer Science*, 102, 1712-1716.
- Saleem A., Yap J., Osman S., Brady F., Suttle B., Lucas V.S., Jones T., Price P.M., Aboagye O.E., 2000. Modulation of fluorouracil tissue pharmacokinetics by eniluracil in-vivo imaging of drug action. *Lancet*, 355, 2125-31.
- Schmitt U., Jahnke K., Rosenbaum K., Cook F.K., Schnackerz D.K., 1996. Purification and characterization of dihydropyrimidine dehydrogenase from *alcaligenes eutrophus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 332, 175-182.
- Schnackerz, D.K., Dobritsch, D., Lingduvist Y., Cook, P.K. 2004. Dihydropyrimidine dehydrogenase a flavoprotein with four iron-sulfur clusters. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1701, 61-74.
- Shiotani T. and Weber G., 1981. Purification and properties of dihydrothymine dehydrogenase from rat liver. *The Journal of Biological Chemistry*, 256, 219–224.
- Sidek H.M., Nyquist-Battie C., Vanderkooi G., 1984. Inhibition of synaptosomal enzymes by local anesthetics. *Biochimica et Biophysica Acta*, 801, 26-31.
- Sludden S., Hardy C.S., VandenBranden R.M, Wrighton A.S., McLeod L.H., 1998. Liver dihydropyrimidine dehydrogenase activity in human, cynomolgus monkey, rhesus monkey, dog, rat and mouse. *Pharmacology*, 56, 276–280.
- Süzer Ö., 2002. Farmakolojini Temelleri. Nobel Tıp Kitabevleri, 572 s, İstanbul.
- Taiichi Shiotani T., Weber G., 1980. Purification and properties of dihydrothymine dehydrogenase from rat liver. *The Journal of Biological Chemistry*, 256, 219-234.
- Takechi T., Fujioka A., Matsushima E., Fukushima M., 2002. Enhancement of the antitumor activity of 5-fluorouracil (5-FU) by inhibiting dihydropyrimidine dehydrogenase activity (DPD) using 5-chloro-2,4-dihydroxypyridine (CDHP) in human tumor cells. *European Journal of Cancer*, 38, 1271-1277.
- Tateishi, Y., Tatemoto, Y., Ohno, S., Morishita, K., Ueta, E. and Yamamoto, T. 2008. Combined evaluation of dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidine phosphorylate mRNA levels in tumor predicts the histopathological effect of 5-fluorouracil-based chemoradiotherapy. *Cancer Letters*, 274, 187-193

- Van Kuilenburg A. B. P., Van Lenthe H., 2006. Activity of pyrimidine degradation enzymes in normal tissues, *Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids*, 25, 1211–1214.
- Wang Y., Ma L., Li Z., Du Z., Liu Z., Qin J., Wang X., Huang Z., Gao L., S.C. Chen S.C.A., 2004. Synergetic inhibition of metal ions and genistein on α -glucosidase. *FEBS Letters*, 576, 46–50.
- Wood M., 1991. Pharmacokinetic drug interactions in anaesthetic practice. *Clinical Pharmacokinetics*, 21, 285-307.
- Yen J.L, McLeod L.H., 2007. Should DPD analysis be required prior to prescribing fluoropyrimidines? *European Journal of Cancer*, 43, 1011-1016.

ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Rize’de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Rize’de tamamladı. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü’nden mezun oldu. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Kimya Anabilim Dalında yüksek lisans yaptı. 2009 yılında Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalında doktora eğitimine başladı. Artvin Çoruh Üniversitesinde öğretim görevlisi olarak çalışmaktadır.