T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

BAZI ANTİBİYOTİKLERİN İNSAN ERİTROSİTLERİNDEN SAFLAŞTIRILAN 6-FOSFOGLUKONAT DEHİDROGENAZ ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Mehmet AKYÜZ

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Nuri BAKAN

Doktora Tezi
Erzurum – 2004

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI

BAZI ANTİBİYOTİKLERİN İNSAN ERİTROSİTLERİNDEN SAFLAŞTIRILAN 6-FOSFOGLUKONAT DEHİDROGENAZ ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

MEHMET AKYÜZ

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 01. 09. 2004

Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 27. 09. 2004

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Nuri BAKAN

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Ebubekir BAKAN

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Nuri BAKAN

Jüri Üyesi : Prof. Dr. E. Edip KEHA

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Ahmet KIZILTUNÇ

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Zuhal UMUDUM

Enstitü Müdürü : Doç. Dr. Adnan TEZEL

Eylül 2004

ERZURUM

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR V

ÖZET VI

SUMMARY VII

KISALTMALAR VIII

1. GİRİŞ VE AMAÇ 1

2. GENEL BİLGİLER 3

2.1. Eritrositler 3

2.2. Eritrosit Metabolizması 4

2.3. Enzimler 7

2.4. Enzim İnhibisyonu 10

2.5. Pentoz Fosfat Yolu 14

2.5.1. Pentoz Fosfat Yolunun Tepkimeleri 15

2.5.2. Pentoz Fosfat Yolu Enzimlerinin Genetik Eksikliklerine Bağlı Bozukluklar 18

2.5.3. Pentoz Fosfat Yolunun Metabolik Önemi 19

2.6. 6PGD Enziminin Genel Özellikleri 21

2.6.1. 6PGD Enziminin Aminoasit Bileşimi 24

2.6.2. 6PGD Enziminin Optimum pH'sı 25

2.6.3. 6PGD Enziminin İzoelektrik Noktası 25

2.6.4. 6PGD Enziminin Mekanizması 25

2.6.5. 6PGD Enziminin Kristalizasyonu 28

2.6.6. 6PGD Enziminin Gen Yapısı 28

2.6.7. 6PGD Enziminin İzoenzimleri 31

2.6.8. 6PGD Enziminin Molekül Kütlesi Alt Birim Molekül Kütlesi ve Alt Birim Sayısı 31
2.6.9. 6PGD Enziminin Saflaştırılması 33
2.6.10. 6PGD Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler 35
2.6.10.1. Sıcaklık 35
2.6.10.2. Beslenme 37
2.6.10.3. Çevresel Faktörler 37
2.6.10.4. Metal İyonları 37
2.6.10.5. Yaş 38
2.6.11. 6PGD Aktivitesinin Önemi ve Dokulardaki Değerleri 40
2.6.12. 6PGD Enzimini İnhibe Eden Bileşikler ve Moleküller 42
2.6.13. 6PGD Aktivitesi Üzerine İyonların Etkisi 46
2.6.14. 6PGD Enziminin Kinetik Çalışmaları 47
2.6.15. 6PGD Aktivitesini Etkileyen Bazı İlaç ve Kimyasal Maddeler 48
2.7. Araştırmada Kullanılan İlaç ve Kimyasal Maddelerin Genel Özellikleri 49
3. MATERYAL ve YÖNTEMLER 66
3.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler 66
3.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar 66
3.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması 68
3.4.Yöntemler 73
3.4.1. İnsan Kanından 6PGD Enziminin Saflaştırılması 73
3.4.1.a. Kan Numunelerinin Alınması ve Hemolizat Hazırlanması 73
3.4.1.b. Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Diyaliz 74
3.4.1.c. Afinite Jelinin Hazırlanması 75

3.4.1.d. Numunenin Afinite Kolonuna Uygulanması ve 6PGD Enziminin Elüsyonu 76

3.4.1.e. Jel Filtrasyon Kolonunun Hazırlanması ve 6PGD Enziminin Saflaştırılması 77

3.4.2. Protein Tayini 79

3.4.2.a. Kalitatif Protein Tayini 79

3.4.2.b. Bradford Yöntemiyle ProteinTayini 79

3.4.3. İnsan 6PGD Enzim Aktivitesinin Ölçümü 80

3.4.4. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) İle Enzim Saflığının Kontrolü 82

3.4.5. İnsan 6PGD Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı İlaç Etkilerinin Belirlenmesi 84

3.4.6. İnhibitör Etkisi Gösteren İlaçlar İçin I_{50} ve K_i Değerlerinin Belirlenmesine Ait Çalışmalar 94

3.4.7. 6PGD Enzimi Aktivitesi Üzerine Sefepim ve Netilmisin İlaçlarının İn vivo Etkilerinin Araştırılmasına Yönelik Çalışmalar 97

3.4.7.1. İlaçların Deney Hayvanlarına Verilmesi ve Kan Numunelerinin Alınması 97

3.4.7.2. Hemoglobin Miktarının Belirlenmesi 97

3.4.7.3. İstatistiksel Analizler 99

4. BULGULAR 101

4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik 101

4.2. İnsan Eritrosit 6PGD Enziminin Afinite Kromotografisi İle Saflaştırılma Sonuçları 102

4.3. İnsan Eritrosit 6PGD Enziminin Jel Filtrasyon Kromotografisi İle Saflaştırılma Sonuçları 103

4.4. 6PGD Enzimi Numunelerinin SDS- Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile Saflık Derecesinin Kontrolü 105

4.5. İnsan 6PGD Enzimi Üzerinde Çalışılan İlaçların Etkilerinin Belirlenmesine Ait Çalışma Sonuçları 106

4.6. İnsan 6PGD Enzimi Üzerinde İnhibitör Etkisi Gösteren Bazı İlaçlar İçin K_i Değerlerinin Belirlenmesine Ait Çalışmaların Sonuçları 117

4.7. Hemoglobin Sonuçları 119

4.8. Bazı İlaçların Sıçan Eritrosit 6PGD Enzim Aktivitesi Üzerine İn vivo Etkilerinin Araştırılmasına Ait Çalışma Sonuçları 120

5. TARTIŞMA 122

6. KAYNAKLAR 137

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışma Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dal'ı öğretim üyesi Prof. Dr. Nuri BAKAN yönetiminde Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarları ile Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Bütün çalışmalarım süresince yardımlarını esirgemeyen, her zaman yanımda olan ve bana yol gösteren çok değerli hocam sayın Prof. Dr. Nuri BAKAN'a en derin minnet ve şükranlarımı sunarım.

Doktora eğitimim süresince bilgi, deneyim ve önerilerinden yararlandığım ve ayrıca çok yakın ilgi ve desteklerini gördüğüm Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı hocam sayın Prof. Dr. Ebubekir BAKAN'a ve Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi hocam sayın Prof. Dr. Y. Nuri ŞAHİN'e teşekkürü bir borç bilirim.

Deneysel çalışmalarım boyunca bana laboratuvarlarını açan Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi Müdürü Sayın Doç. Dr. Fikrettin ŞAHİN'e ve Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Şenol DANE'ye, kimyasal madde ve deneysel malzemeleri temin eden ayrıca çalışmanın uygulanması ve değerlendirilmesinde özverisini esirgemeyen Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdür Yardımcısı sayın Doç. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ'ye ve deneysel desteklerini sağlayan sayın Araş. Gör. Dr. Mustafa ERAT'a, ilaçları temin eden Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi sayın Yrd. Doç. Dr. Kenan GÜMÜŞTEKİN'e, maddi ve manevi desteğini esirgemeyen sayın Uz. Dr. Seyithan TAYSİ'ye teşekkür ederim.

Doktora eğitimim süresince emeği geçen değerli hocalarımdan sayın Prof. Dr. Fatih AKÇAY'a, Prof. Dr. Leyla YILDIZ'a, Prof. Dr. Sevinç KUŞKAY'a, Doç. Dr. Ahmet KIZILTUNÇ'a, Doç. Dr. M.Sait KELEŞ'e, Doç. Dr. Zuhal UMUDUM'a ve Doç. Dr. Hülya AKSOY'a şükranlarımı sunarım.

Ayrıca çalışmalarım boyunca bana sabırla her türlü desteğini veren eşime teşekkür ederim.

Mehmet AKYÜZ

Erzurum-2004

ÖZET

BAZI ANTİBİYOTİKLERİN İNSAN ERİTROSİTLERİNDEN SAFLAŞTIRILAN 6-FOSFOGLUKONAT DEHİDROGENAZ ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Bu çalışmada insan eritrosit 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enzimi üzerine bazı antibiyotiklerin *in vitro* ve *in vivo* etkileri araştırıldı. Bu amaçla insan eritrosit 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enzimi amonyum sülfat çöktürmesi, 2',5' ADP-Sepharose 4B Afinite ve Jel filtrasyon kromotografik yöntemleriyle saflaştırıldı. Saflaştırma % 50 verimle 725 kat gerçekleştirildi. Enzim aktivitesi Beutler metoduna göre ölçüldü. Netilmisin sülfat, sefepim, amikasin, isepamisin, kloramfenikol, seftazidim, teikoplanin, ampisilin, ofloksasin, levofloksasin, sefotaksim, penisilin g, gentamisin sülfat, siprofloksasin gibi bazı ilaçlar *in vitro* şartlarda enzim aktivitesini inhibe ederken, seftriakson, streptomisin sülfat ve meropenem ilaçlarının enzim aktivitesi üzerine herhangi bir etkisi gözlenmedi. Bu ilaçlar içerisinden sadece sefazolin sodyum *in vitro* şartlarda enzimi aktive etti. İnhibisyon etkisi gösteren ilaçların I_{50} değerleri belirlendi. Düşük I_{50} değerlerine sahip olan ilaçlar için (%50 inhibisyon oluşturan ilaç konsantrasyonu, netilmisin sülfat ve sefepim) in vivo çalışmalar sıçanlarda yapıldı (Spraque-Dawley). Netilmisin sülfat 15-mg/kg'lık bir dozda uygulandıktan 1., 2. ve 3. saatlerden sonra enzim aktivitesini önemli derecede inhibe etti ($p<0.01$). Sefepim 200-mg/kg'lık bir dozda uygulandıktan 1. ve 2. saatten sonra enzim aktivitesini önemli derecede inhibe etti ($p<0.01$)

Bu sonuçlardan netilmisin sülfat ve sefepim antibiyotikleri enzim aktivitesini hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak inhibe etti.

SUMMARY

DETERMINATION OF THE EFFECT OF SOME ANTIBIOTICS ON HUMAN ERYTHROCYTE 6-PHOSPHOGLUCONATE DEHYDROGENASE ENZYME ACTIVITY

The *in vitro* and *in vivo* effects of some antibiotics on human erythrocytes 6-phospogluconate dehydrogenase were investigated in this study. Human erythrocyte 6-phosphogluconate dehydrogenase was purified with ammonium sulfate precipitation, 2',5' ADP-Sepharose 4B Affinity and Gel filtration chromatography. Purification of enzyme was obtained with a yield % 50 and 725 fold. The enzyme activity was determined by Beutler's method. Some antibiotics such as netilmicin sulfate, cefepime, amikacin, ısepamycin, kloramphenicol, ceftazidim, teicoplanin, ampicillin, ofloxacine, levofloxacine, cefotaxime, penicillin g, gentamicin sulphate, ciprofloxacine, inhibited the enzyme activity in *in vitro* conditions, decefin, streptomycin and meronem, have not any effects. Of these drugs, only cefozin activated the enzyme activity in *in vitro* conditions. The I_{50} values of the inhibiting antibiotics were determined. For the drugs having low I_{50} values (drug concentrations which produce 50% inhibition, netilmicin sulfate and cefepime), *in vivo* studies were performed in rats (Spraque-Dawley). Netilmicin sulfate at 15-mg/kg inhibited the enzyme activity significantly ($p<0.01$) 1 h, 2 h, and 3 h after dosing. Cefepime at 200-mg/kg also inhibited the enzyme very significantly ($p<0.01$) 1 h and 2 h after dosing.

As a result, netilmicin sulfate and cefepime antibiotics inhibited rat erythrocyte 6-phospogluconate dehydrogenase both *in vivo* and *in vitro*.

KISALTMALAR

6PGD	: 6-Fosfoglukonat dehidrogenaz
6PG	: 6-Fosfoglukonat
CoA	: Koenzim A
NAD^+	: Nikotinamid dinükleotid (Yükseltgenmiş hal)
FAD	: Flavin adenin dinükleotid (Yükseltgenmiş hal)
RNA	: Ribonükleik asit
DNA	: Deoksiribonükleikasit
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (indirgenmiş hal)
GSH	: İndirgenmiş glutatyon
G6PD	: Glukoz 6- fosfat dehidrogenaz
RES	: Retiküloendotelyal sistem
SH	: Sülfhidril
BPG	: 2,3 bifosfogliserat
LDH	: Laktat dehidrogenaz
MetHb	: Methemoglobin
O^-_2	: Süperoksid anyonu
SOD	: Süperoksid dismutaz
H_2O_2	: Hidrojen Peroksit
GSH	: İndirgenmiş glutatyon
GSSG	: Yükseltgenmiş glutatyon
DIPF	: Diizopropil florofosfat
Vmax	: Enzimin aktif bölgesinin substrat ile tamamen doldurulduğu andaki hız

K_M	: Maksimum hızın yarısına erişildiği substrat konsantrasyonu
I	: İnhibitör
EI	: Enzim inhibitör kompleksi
ESI	: Enzim-substrat-inhibitör kompleksi
S	: Substrat
E	: Enzim
P	: Ürün
EDTA	: Etilen daimin tetra asetik asit
$NADP^+$	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (Yükseltgenmiş hal)
GR	: Glutatyon redüktaz
HMP	: Heksoz monofosfat yolu
EM	: Embden meyerhof yolu
PEG	: Polietilen glikol
2d6PG	: 2-deoksi-6-fosfoglukonat
d6PGD	: deoksi-6-fosfoglukonat
A^0	: Angstrom
mRNA	: Messenger ribonükleik asit
Pgd	: Fosfoglukonat dehidrogenaz
DEAE	: Dietilaminoetil
CM	: Karboksi metil
Phi	: Fosfonat
ADP	: Adenozin di fosfat
ATP	: Adenozin tri fosfat
Gra-3P	: Gliseraldehit 3-fosfat

E 4-P : Eritroz 4-fosfat

6AN : 6-aminonikotinamid

T_3 : Tiriiyodotironin

6PGA : 6 Fosfoglukonik asit

MES : 2(N-morfolino) etan sülfonik asit

FITC : Floreskeyn 5-izotiyosiyanat

DMSO : Dimetil sülfoksit

TEMED : N,N,N,N-tetrametiletilendiamin

PAGE : Poliakrilamid Jel Elektroforezi

OD : Optik dansite

I_{50} : Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu

K_i : İnhibitör kompleksinin ayrışma sabiti

Hb : Hemoglobin

R5P : Riboz-5-fosfat

SDS : Sodyum Dodesil Sülfat

TCA : Triklor asetik asit

PER : Amonyum per sülfat

i.v. : Damar içine

i.m. : Adele içine

BOS : Beyin omurilik sıvısı

Tris : Trihidroksimetilaminometan

1. GİRİŞ ve AMAÇ

6-Fosfoglukonat dehidrogenaz (E.C.1.1.1.44; 6PGD) pentoz fosfat yolunun üçüncü reaksiyonunu katalizleyerek $NADP^+$ varlığında 6-fosfoglukonat (6PG) bileşiğini D-ribuloz 5-fosfata dönüştüren kilit enzimdir. Reaksiyon ürünlerinden D-ribuloz 5-fosfat ATP, CoA, NAD^+, FAD, RNA ve DNA gibi hayati öneme sahip biyomoleküllerin bileşeni olan riboz 5-fosfata izomerize olur. Reaksiyon sırasında oluşan NADPH ise yağ asitleri, steroidler ve bazı aminoasitlerin sentezinde kullanılan önemli bir koenzimdir. Ayrıca antioksidan savunmada önemli bir role sahip olan indirgenmiş glutatyon konsantrasyonunun korunmasında glutatyon redüktaz enziminin katalizlediği reaksiyona indirgeyici ajan olarak katılmaktadır. NADPH eksikliğinde canlı sistemlerdeki indirgenmiş glutatyon konsantrasyonu düşer ve hücre ölür. Bu nedenle 6PGD antioksidan enzim olarak bilinir[1,2]. Vitamin C' nin 6PGD enzimini stimule ettiği bildirilmektedir[3]. Çoğu ilaçların bir çok vücut enzimini in vivo olarak aktive veya inhibe ederek metabolik yolları etkilediği bilinmektedir[4-6].

İlaçların 6PGD enzimini inhibe etmesi durumunda NADPH ve GSH seviyesi düşecek, bu durum daha yaşlı eritrositlerde hücre hasarına neden olacak ve bir çok sağlık problemini oluşturacaktır[1,6].

Pentoz fosfat yolunda NADPH üretiminde rol oynayan glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) enzimi üzerinde çok sayıda çalışma yapılmıştır. Ancak G6PD ile aynı seviyede önemli derecede NADPH oluşumuna neden olan 6-fosfoglukonat dehidrogenaz (6PGD) enzimi, insan dokularında yeterince çalışılmamış, ilaçların bu dokularda bulunan enzim aktivitesi üzerindeki etkileri de araştırılmamıştır. Yapılan literatür taramasında çalışmada kullanılan ilaçların bu enzim üzerindeki etkileriyle ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu amaçla 6PGD enzimi insan eritrositlerinden saflaştırılarak yaygın olarak kullanılan bazı antibiyotiklerin enzim üzerindeki in vitro etkilerinin araştırılması düşünülmüştür. Ayrıca in vitro çalışmalar sonucu yüksek inhibisyon etkisine sahip bazı antibiyotiklerin sıçan eritrosit enzimi üzerindeki in vivo etkilerinin araştırılması, K_i değerleri ile inhibisyon tiplerinin tespit edilmesi de hedeflenmiştir. Böylece in vitro olarak etkili olan ilaçların in vivo olarak da etkili olup olmadıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Eritrositler

Kan koyuca bir sıvı olup, bu sıvının koyuluğu (vizkosite) içinde bulundurduğu hücrelerden ve maddelerden ileri gelir. Kanın rengi oksijen ya da karbondioksit taşıyıp taşımamasına göre değişir. Oksijen taşıması halinde renk parlak kırmızı, karbondioksit taşıması halinde ise renk koyu kırmızıdır. Erişkin erkeklerde ortalama 5 litre, kadınlarda ise 4,5 litre kan bulunur. Kanın insan organizmasında taşıma, düzenleme, savunma ve koruma görevleri vardır[7].

Kanın % 42-45'ini eritrosit, lökosit ve trombosit gibi şekilli elemanlar oluşturur. Eritrositler ilk kez 1665 yılında Malphigi tarafından tanımlanmıştır. Daha sonra 1673 yılında Leeuwenhock kanın kırmızı renginin eritrositlere bağlı olduğunu tespit etmiştir. 1765 yılında ise eritrositlerin şeklinin disk biçiminde olduğu belirlenmiştir. Eritrositlerde hemoglobinin varlığını Funke, demirin varlığını ise Menghini bulmuştur[8]. Eritrositlerin en önemli görevi yapılarında bulunan hemoglobin ile dokulara oksijen taşımaktır. Kan hücrelerinin önemli bir bölümünü oluşturan lökositlerin ise mikroorganizmaların vücuda yayılmalarını önlemek ve dokuların tamir edilmesine katkıda bulunmak gibi fonksiyonları bulunmaktadır. Kapillerin endotel bütünlüğünün sağlanması ve kanın damarlardan dışarı sızmasının önlenmesi ise trombositlerin fonksiyonları arasında yer almaktadır[9].

Eritrosit hücrelerinin oluşumu "stem cell'' olarak adlandırılan temel hücreye dayanmaktadır. Bu hücre bir çok değişim aşamalarından geçtikten sonra retikülositleri oluşturur[10]. Retikülositler nükleus dışında bütün memeli hücre organellerini ihtiva ederler. Glikoliz, pentoz fosfat yolu, trikarboksilik asit siklüsü, oksidatif fosforilasyon,

hemoglobin, kolesterol, fosfolifid, triaçil gliserol ve pürin nükleotid sentezi enzimlerini bulundururlar[11].

Kemik iliğinden kan sirkülasyonuna salındıktan sonra üç gün içinde retikülositler organellerini kaybederek (mitokondri, golgi cisimciği ve RNA'nın hücreden uzaklaşmasıyla) olgun eritrositlere dönüşürler[10,11]. Çekirdeksiz ve bikonkav disk şeklinde olan insan eritrositinin çapı 6.0-9.0 mikron, eritrosit membranının kalınlığı ise 6 nm dir[9]. Eritrosit hücreleri dıştan bir membran ile sarılı olup iç kısmında bulunan ağ şeklindeki stroma ile hemoglobin örtülür. Bu hücrelerin % 50-60'ı protein, % 10-12'i lipit ve geri kalan kısmıda sudur[10]. Eritrosit membranı su, üre, kreatinin, H^+, OH^- ve HCO_3^- gibi bazı metabolitler için geçirgen olup[10,11], Na^+, K^+, Ca^{+2} gibi bazı iyonlar ve inorganik fosfat aktif transport ile taşınmaktadır[10]. Eritrositlerin fosfat içeriği plazmanın 50-100 misli kadar yüksektir. Bunun çoğunluğunu heksoz-P, trioz-P ve ATP şeklinde organik fosfatlar oluşturur[11].

Eritrositlerin ortalama 120 günlük ömürleri vardır. Bu süre sonunda retikuloendoteryal sistem (RES) hücreleri tarafından dolaşımdan alınarak yıkılırlar[10].

2.2. Eritrosit Metabolizması

Eritrositler ileri derecede özelleşmiş hücrelerdir. Eritrosit sitoplazmasının yaklaşık % 34 kadarı hemoglobin çözeltisi şeklindedir[9]. Eritrositler sadece glukoz kullanırlar ve mevcut pürinlerden nükleotid sentezleyebilirler[11]. Eritrositlerde çekirdek, mitokondri, lizozom, endoplazmik retikulum ve golgi sistemi gibi subselüler organeller bulunmamaktadır. Bu nedenle eritrositlerde nükleik asit ve protein sentezi yapılamamaktadır[9]. Bununla beraber eritrositler fonksiyonlarını yerine getirebilmeleri için şekillerini, iç yapılarını ve membran aktivitelerini koruyacak enerjiye ihtiyaç duyarlar. Bu enerji eritrositlerin tek yakıtı olan glukozun anaerobik glikoliz ve pentoz

fosfat yolu olmak üzere iki metabolik yol ile gerçekleştirilmektedir. Eritrositlerdeki glukozun % 90'ı anaerobik glikoz ile harcanır. Glukozun aerobik glikolitik yolu ise pentoz fosfat yoludur. Bütün bu reaksiyonlar sonucu oluşan NADH, NADPH, ATP hücre ve membranın yapısal bütünlüğünü korumada, hücre içi ve membranlardaki sülfhidril (-SH) gruplarını oksidasyona karşı korumada, glutatyon redüktaz enziminin katalizlediği reaksiyonda okside glutatyonu indirgenmiş şekline çevirerek glutatyonun diğer reaksiyonlarına bağlanmasında, pentoz fosfat yolu için $NADP^+$'yi rejenere etmede, hücre içi yüksek K^+ ve düşük Na^+ seviyelerini korumada ve hemoglobin demirinin indirgenmesinde kullanılır[8].

Glikoliz ve pentoz fosfat yolu enzimlerinin eksikliği, eritrositlerin kendi bütünlüklerini ortadan kaldırmaktadır. Böyle durumlarda katyon gradienti düzenlenememekte, bikonkav membranın esnekliği kaybolmakta, enzimlerin ve hemoglobinin -SH gruplarının indirgenmiş şekilde tutulmaları sağlanamamaktadır. Oksidasyon, eritrosit membranı ile hemoglobin yapısındaki hem ve globin kısımlarında değişikliklere yol açmaktadır. Bütün bu olaylar sonrasında, eritrosit membranında karmaşık disülfid bağları oluşmakta, denatüre hemoglobinin disülfid bağları ile bağlanması sonunda K^+ iyonu sızıntısı artmakta, membran esnekliği kaybolmakta, globin heinz cisimciği şeklinde çökmekte ve methemoglobin oluşmaktadır. Destekleme ve koruma fonksiyonlarının zamana bağlı olarak azalması sonucunda hücre ölmektedir[9].

Eritrosit membranından glukozun transportunu sağlayan protein molekül kütlesi 55.000 dalton olan, glikoprotein yapısında bulunan ve bir saniyede yaklaşık olarak 500 glukoz molekülünün geçişini sağlayan bir proteindir. Glukozun eritrosit içine geçişi kolaylaştırılmış difüzyonun tipik bir örneğidir. Birim zamanda taşınan madde miktarı taşınmayı kolaylaştırıcı proteinin kapasitesine ve madde konsantrasyon farkına

bağlıdır. Glikolitik yolda oluşan redükte nikotinamid adenin dinükleotid (NADH), Laktat dehidrogenaz (LDH) reaksiyonunda tekrar okside olarak glikolizin devamını sağlayacak NAD^+'ye dönüşür. Ancak diğer hücrelerden farklı olarak eritrosit NADH'ı methemoglobin Fe^{+3}'ünü Fe^{+2}'ye dönüştürmekte ve methemoglobin redüktaz reaksiyonunda da kullanılarak NAD^+'ye okside olmaktadır[11-13]. Böylece NAD^+ rejenerasyonu gerçekleştiğinden dolayı kalıtsal eritrosit LDH enzimi yokluğunun patolojik bir duruma yol açmadığı belirtilmektedir[10,13].

Hemoglobinden oksijen ayrıldığında hemoglobin yapısındaki demir iki değerliklidir. Bazı durumlarda süperoksid anyon tepkimesi ile hemoglobin üç değerlikli demirin yapısında yer aldığı methemoglobine dönüşmektedir. Total hemoglobin miktarının % 3 kadarı her gün otooksidasyon ile methemoglobine çevrilmektedir. Methemoglobin oluşumu nitrit, nitrat, anilin ve diğer oksidan kimyasal maddeler ile artmaktadır. Sigara dumanı gibi toksik maddelerin solunması veya sindirim sistemi yolu ile alınması daha fazla methemoglobin alınmasına neden olmaktadır. Oluşan methemoglobin bir flavoprotein olan methemoglobin redüktaz tarafından deoksihemoglobine indirgenmektedir[9].

$$HbFe^{+2} + O_2 \rightarrow HbFe^{+2}\ {}^{-}O_2 \rightarrow MetHbFe^{+3} + O_2^{-}$$

Hemoglobinin yapısındaki proteinin fonksiyonel grupları ile hem grubu oksijen tarafından oksidlenmektedir. Eritrositlerde yüksek konsantrasyonlarda bulunan Cl^- iyonunun katalizlediği bir işlem olan deoksihemoglobine oksijen bağlanması sırasında oksijen elektron alarak güçlü bir oksidan olan süperoksid anyonunu (O_2^-) oluşturmaktadır. Her gün eritrositlerde oluşan 10^7 süperoksid anyonu yaklaşık % 3 kadar methemoglobinin hemoglobine çevrilmesine yol açmaktadır[9].

Süperoksid anyonu proteinlerin -SH grupları ve hücre membranının doymamış yağ asitleri için son derece toksiktir. Bu nedenle süperoksid, sitozolik süperoksid dismutaz (SOD) enzimi ile hidrojen perokside (H_2O_2) çevrilmektedir[9].

$$2O_2^- + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

Güçlü bir toksik bileşik olan H_2O_2 molekülünün hızla parçalanması gerekmektedir. Bu parçalanma işleminde katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleri kullanılmaktadır. H_2O_2 ve lipid peroksidler tarafından indirgenen glutatyon (GSH) glutatyon peroksidaz ile okside glutatyona (GSSG) çevrilmektedir[9].

BPG eritrositlerde oksijen taşınmasında düzenleyici bir role sahiptir. Eritrositlerdeki glikoliz ve oksijen taşınması birbirine BPG ile bağlantılıdır. Bu yüzden glikoliz yolundaki bir arıza oksijen transportunu etkileyecektir[14].

BPG, hemoglobin fonksiyonunda büyük önem taşımaktadır. Hemoglobinin oksijene ilgisini azaltan BPG allosterik bir etkileyicidir. Eritrosit içinde hemoglobinle aynı konsantrasyonda (4.5 mM) bulunmaktadır. BPG bulunmadığı zaman miyoglobine benzer fonksiyon gören hemoglobin düşük oksijen konsantrasyonunda oksijen bağlamakta, fakat dokularda oksijeni bırakamamaktadır. BPG, dokularda oksijenin bırakılmasını ve deoksihemoglobinin ek tuz bağları ile yapısının korunmasını sağlamaktadır. BPG, eritrositlerdeki glikoliz metabolizma yolunda bir ara ürün olarak BPG' tan meydana gelen ileri derecede polar bir moleküldür. BPG, 1,3-bisfosfogliserattan meydana gelirken Adenozin di fosfat (ADP), Adenozin tri fosfata (ATP)'ye dönüşür ve enerji meydana gelir[9].

2.3. Enzimler

Enzimler, canlı organizmalardaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürünün oluşmasına fırsat vermeden % 100 'lük bir ürün verimi sağlayan biyolojik

katalizörlerdir[1]. Termodinamik yönden oluşabilen bir tepkimenin hızını katalizörler, tepkimenin denge sabitini değiştirmeden 10^{11} kat veya daha fazla artırmaktadır[15]. Katalitik aktivite gösteren küçük bir RNA grubu dışında, bütün enzimler protein yapısındadır. Proteinlerin en büyük ve çok özelleşmiş grubunu teşkil ederler[1].

Bazı enzimler katalizleme fonksiyonlarını yalnız protein yapılarıyla gerçekleştirirken, bir çoğuda protein yapısında olmayan ve kofaktör olarak adlandırılan moleküllere gereksinim duyarlar. Kofaktör bir metal iyonu (Mg^{+2} ,Fe^{+2}, Zn^{+2}) veya koenzim olarak adlandırılan kompleks bir organik molekül (NAD^+, FAD^+, Koenzim A) olabilmektedir. Fakat enzimin aktivite gösterebilmesi için bazen her ikisinede gereksinim duyulmaktadır. Koenzimlerin çoğu vitaminlerden ve özelliklede B grubu vitaminlerinden türemiş olup bir çok durumda tekrar tekrar kullanılırlar ve proteinlerin denatürasyonuna sebep olan şartlardan etkilenmezler[9].

Kofaktörle birleşik durumda bulunan ve katalitik olarak aktivite gösteren enzime holoenzim denilmektedir. Holoenzimin protein kısmı ise apoenzim olarak adlandırılmaktadır[9].

Bazı enzimlerde metal iyonu veya koenzim, protein kısmına gevşek ve geçici olarak bağlanırken, diğerlerinde sıkı ve sürekli olarak bağlanmaktadır[9]. Protein yapısına sıkıca bağlı olan koenzimlere ise prostetik grup adı verilmektedir[14].

Bir enzimin kinetik özellikleri hakkında en faydalı bilgiler Michaelis-Menten eşitliğinde yer alan enzimin substrata ilgisini ifade eden K_M sabiti ve enzimin katalitik aktivitesini gösteren V_{max} değerlerinden elde edilir. Bir çözelti içerisindeki enzim aktivitesi ''Enzim Ünitesi'' cinsinden verilir. Her enzimi kapsayacak bir ünite tarifi olmamasına rağmen, 25^0C'de ve optimal şartlarda 1 μmol (10^{-6} mol) substratı bir dakikada ürüne dönüştüren enzim miktarına ''1 enzim ünitesi'' denilmesi genelde kabul

edilmiştir. Ancak uluslar arası ölçü sistemine göre zaman birimi saniye, madde miktarı birimi mol olduğundan bu sistemde enzim aktivite birimi kataldır. 1 katal enzim belirli şartlar altında saniyede bir mol madde dönüşümüne sebep olur. Bazı enzimler için özel ünite tanımları da vardır.''Spesifik aktivite''(özgül aktivite) terimide 1 mg protein başına enzim ünitesi (EÜ/mg protein) olarak tarif edilir. Bu enzim saflığının bir ölçüsüdür ve enzim izolasyonu esnasındaki basamaklarda maksimum ve sabit bir değere ulaşır. Böylece enzimin saf halde elde edildiği anlaşılır[14,15].

Biyokimya tarihinde araştırmaların büyük çoğunluğunu enzimler üzerindeki çalışmalar oluşturmuştur[14]. İlk enzim çalışmaları, sindirime ilişkin enzimlerin araştırılmaya başlandığı 1760-1825 yılları arasındadır. İlk kez 1825 yılında Berzelius, nişastanın sindiriminde etkili olan bitkisel enzimler üzerinde çalışmış, 1860 yıllarında Pasteur fermentasyon enzimleri üzerinde araştırmalar yapmıştır. Fermentasyon ile ilişkisinden dolayı başlangıçta verilmiş olan ferment genel adı, Künhe tarafından 1878 yılında Yunanca'da ''mayada'' anlamına gelen enzim ile değiştirilmiştir. 1897 yılında ilk kez maya hücrelerinden fermentasyon enzimlerini elde eden Buchner, hiçbir canlı hücrenin olmadığı ortamda maya hücresi özütünün şekerleri mayaladığını göstermiştir. Soya fasulyesi özütünden saf ve kristalize üreaz elde edilmesi 1926 yılında Sumner, saf ve kristalize pepsin, tripsin ve kimotripsin elde edilmesi ise 1930 yılında Northop tarafından gerçekleştirilmiştir. Saf enzimlerin elde edildiği bu önemli gelişmeler sonunda enzimlerin yapısı ve özelliklerine ilişkin ayrıntılı bilgiler elde edilmiştir[15].

Günümüzde endüstride yaygın olarak bir çok üretimde kullanılmakta olan enzimler, bilimsel araştırma konularının çoğunluğunu oluşturmaktadır[15]. Enzimlerden tıp alanında giderek artan bir şekilde yararlanılmaktadır. Enzimlerin niteliksel ve niceliksel tayinleri yapılarak pek çok kalıtsal bozukluğun tanısı konulabilmekte ve

hastalığın geleceği ile ilgili bilgiler elde edilebilmektedir. Bu nedenle enzimlerin sağlıkta, hastalıkta, tanıda ve tedavide son derece önemli görevleri ve katkıları bulunmaktadır[9]. Biyolojik sıvı (kan plazması, serum, idrar) ve dokulardaki (karaciğer, kas vb. biyopsi materyali gibi) enzim aktivitesinin ölçümü, tanı konması ve yönlendirilmesinde laboratuvar analizlerinin büyük önemini ortaya koymaktadır[15].

Bugün yaklaşık olarak 2000 kadar enzim tanımlanmış olup bir çoğu saflaştırılmış ve karakterize edilmiş ve 200'den fazlası da kristallendirilmiştir. Ancak genetik çalışmalar tespit edilememiş daha bir çok enzimin var olduğunu göstermektedir[14].

2.4. Enzim İnhibisyonu

Bazı bileşikler tarafından enzimlerin hem in vivo, hem de in vitro aktivitelerinin azaltılması veya tümüyle yok edilmesi olayına inhibisyon adı verilir. İnhibisyona neden olan bileşiklere de inhibitör denir. İnhibitörler ise genellikle küçük molekül ağırlığına sahip olan iyonlar veya bileşiklerdir[14,15].

Biyolojik sistemlerde, enzim inhibisyonu başlı başına bir kontrol mekanizmasını oluşturduğundan dolayı önemlidir. Bir çok ilaç ve zehirli bileşiklerde fonksiyonlarını bu yolla gerçekleştirirler. Aynı zamanda inhibisyon olayından enzimlerin etki mekanizmasının incelenmesinde de yararlanılır[14].

Enzimatik inhibisyonu dönüşümlü ve dönüşümsüz olmak üzere ikiye ayrılır. Dönüşümsüz inhibisyonda inhibitör enzime ya kovalent olarak bağlanır ya da zor ayrışabilen bir kompleks oluşturur. Sinir uyarılarının nakledilmesinde önemli bir rol oynayan asetilkolin esteraz enziminin sinir gazı zehirleri tarafından inhibisyonu buna örnek verilebilir. Bu gazlardan diizopropilflorofosfat (DIPF) enzimin aktif bölgesinde yer alan serin amino asidiyle reaksiyona girerek inaktif diizopropilflorofosfo enzimini

oluşturur. Dönüşümsüz inhibisyonda V_{max} azalır, K_M ise değişmeden kalır. V_{max} enzimatik reaksiyonda ulaşabilecek maksimum hız, K_M ise enzimin substrata ilgisini gösteren sabittir[14].

Dönüşümsüz inhibisyonun aksine dönüşümlü inhibisyonda enzimle inhibitör etkileşmesi bir denge reaksiyonu şeklindedir. Dönüşümlü inhibiyonun en basit tipi yarışmalı (kompetetif) olanıdır[14]. Yarışmalı inhibisyonda inhibitör yapı olarak substrata benzer ve substrat ile inhibitör enzimin aktif bölgesine bağlanmakta yarışırlar[15]. İnhibitör enzimin aktif bölgesine bağlanır ve substratın enzime bağlanması önlenmiş olur. Fakat substrat konsantrasyonunu artırmakla inhibisyon etkisi ortadan kaldırılabilir. Yani enzimin V_{max} değeri değişmez. Çünkü hem enzim- substrat, hem de enzim inhibitör komplekslerinin ayrışmaları bir denge reaksiyonu olduğundan, substrat konsantrasyonun arttırılması dengeyi ES kompleksi lehine kaydırır[14].

$$ES \rightleftharpoons E+S$$

dengesine benzer şekilde I inhibitörü gösterdiğinde;

$$EI \rightleftharpoons E+I$$

denge denklemini yazabiliriz.

Son reaksiyon denge sabiti ise

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

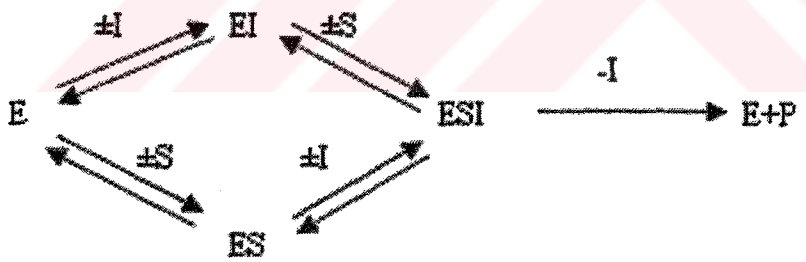
şeklinde ifade edilir[14].

Yarışmalı inhibitör kataliz hızını, ES kompleksi oranını düşürerek azaltır. Bir başka ifade ile enzimin K_M değeri artar. Bu tip inhibisyona molanatın süksinat dehidrogenaz enzimi üzerindeki etkisi klasik bir örnek olarak verilmektedir[15]. Bu enzim, süksinattan iki hidrojen atomunun çıkarılmasını katalizler. Malonat, süksinata göre bir

eksik metilen grubu ihtiva ettiğinden, iki karboksil grubu vasıtasıyla enzime yapışır, fakat hidrojen verebilecek iki karbon atomu olmadığından değişmeden kalır[14].

Yine dönüşümlü bir tip olan yarışmasız (nonkompetetif) inhibisyonda, inhibitör ve substrat enzim moleküllerine aynı anda bağlanabilir. Bu durum bağlanmanın enzimin farklı bölgesinde gerçekleştiğini gösterir. Yarışmasız inhibitör etkisini enzimin katalitik aktivitesini düşürerek gösterir. Burada substrat ve inhibitör arasında aktif bölge için yarışma söz konusu değildir. Substrat konsantrasyonunu artırmakla inhibisyon etkisi ortadan kaldırılamaz[14].

Enzimin V_{max} değeri azalırken, K_M değeri sabit kalır. Substrat ve inhibitör farklı bölgelere bağlanabildiğinden enzimin iki çeşit inaktif kompleksi meydana gelir. EI ve ESI . ESI'den, I dönüşümlü olarak ayrışabildiğinden yine ürün meydana gelebilir, fakat katalizlemede yavaşlama olur. Bu tip inhibisyonda aşağıdaki reaksiyonlar olabilir.



Yarışmasız inhibisyona örnek olarak enzimlerin aktivitelerinde gerekli olan sisteinlerin –SH gruplarına bazı ağır metal iyonlarının merkaptan oluşturacak şekilde dönüşümlü olarak bağlanmalarını verebiliriz.

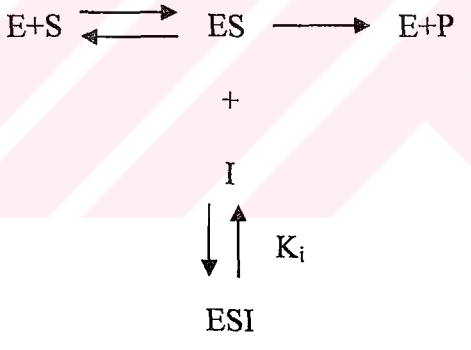
Burada meydana gelen denge reaksiyonunu gümüş iyonu için şöyle gösterebiliriz.

$$E\text{-}SH + Ag^{+} \rightleftharpoons E\text{-}S\text{-}Ag + H^{+}$$

Burada –SH grubu aktif bölgede bulunabildiği gibi enzimin üç boyutlu yapısının oluşumunda etkili olan bir bölgesinde de yer alabilir. Katalizlemede metal iyonlarına

ihtiyacı olan enzimlerin aktiviteleri, bazı bileşiklerin metal iyonlarına dönüşümlü bağlanması sonucu yarışmasız olarak inhibe edilebilirler. Mesela siyanür, Fe^{+2} ve Fe^{+3} ihtiva eden enzimleri, etilen diamin tetra asetat (EDTA) ise Mg^{+2}'li enzimleri bu iyonlara bağlanarak inhibe ederler[14].

Bir başka dönüşümlü inhibisyon tipi yarışmalı olmayan (unkompetetif) inhibisyondur. Bu inhibisyon çeşidinde ise inhibitör serbest enzime değil, sadece ES kompleksine bağlanabilir[14] . Böyle bir tip inhibisyonun reaksiyon şeması aşağıda verilmiştir.



Buna göre inhibitör sabiti;

$$K_i = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

şeklinde ifade edilir.

Bu bağıntı unkompetitif inhibitör varlığında, substrat konsantrasyonunun yükseltilmesi ile inhibisyonun artabileceğini göstermektedir. Buna göre inhibitör varlığında ortamdan sürekli ES kompleksi uzaklaştığı için K_M azalır. Aynı zamanda ortamdan ESI kompleksi sürekli var olacağından V_{max} da düşer. Unkompetetif

inhibisyon bir substratlı reaksiyonlarda nadir görülür, buna karşılık iki substratlı reaksiyonlarda yaygındır[14].

İnhibitörleri çok defa yarışmalı ve yarışmasız olmak üzere kesin sınırlarla birbirinden ayırmak mümkün değildir. Gerçekte inhibisyon genellikle karışıktır[14].

Birden fazla polipeptid zincirinden meydana gelen allosterik enzim adı verilen enzimlerde, allosterik inhibisyon adı verilen bir başka çeşit inhibisyon olayı gözlenir. Bu inhibisyon çeşidinde, inhibitörler enzimin aktif merkezinden başka bir yere bağlanır ve üç boyutlu yapıyı değiştirerek enzim aktivitesini etkilerler[14].

Enzimler, hem katalizledikleri reaksiyon tiplerine, hemde ürüne dönüştürdükleri substratlara karşı son derece spesifiktirler. Genellikle tek bir kimyasal reaksiyonu veya aynı tip benzer reaksiyonları katalizlerler. Substratlara karşı spesifikleri ise oldukça yüksek ve hatta bazen mutlaktır[14].

2.5. Pentoz Fosfat Yolu

Pentoz fosfat yolu bazen pentoz yan yolu, heksoz mono fosfat yolu veya fosfoglukonat oksidatif yolu olarakda adlandırılır. Bu reaksiyon serisinin aydınlatılmasında ilk adım 1931 yılında Otto Warburg tarafından atılmış ve tamamı Fritz Lipmann, Frank Dinckens, Bernard Horecker ve Efrahim Rocker isimli biyokimyacılar tarafından ortaya konulmuştur[14].

İndirgen biyosentez tepkimelerinde kullanılan indirgenme eşdeğerleri (NADPH) ile nükleotid ve nükleik asit sentezinde kullanılan riboz-5 fosfat, pentoz fosfat yolundan sağlanmaktadır. Glutatyonun indirgenmesinde kullanılmak üzere eritrositler pentoz fosfat yolunda önemli miktarda NADPH üretmektedir. Önemli olmamasına rağmen diyette bulunan ve nükleik asitlerin sindirimi sırasında ortaya çıkarak emilen pentoz

şekerlerin karbon iskeletleri, pentoz fosfat yolunda glikolitik ve glukoneogenetik ara ürünlere çevrilmektedir[15].

Pentoz fosfat yolu aynı zamanda üç, dört, beş, altı ve yedi karbonlu şekerlerin oksidatif olmayan bir seri reaksiyonlarla birbirine dönüştürülmesini de gerçekleştirir. Bu reaksiyonların tamamı sitozolde cereyan eder[14].

2.5.1. Pentoz Fosfat Yolunun Tepkimeleri

Oksidatif ve oksidatif olmayan olarak iki bölüme ayrılan pentoz fosfat yolunun ilk bölümünde NADPH üretilmekte, diğer bölümde ise şeker fosfatları biribirine çevrilmektedir. Oksidatif tepkimeler ile glukoz, ribuloz-5 fosfata çevrilmekte ve NADPH elde edilmektedir. Oksidatif bölümün ilk tepkimesini $NADP^+$-spesifik glukoz-6 fosfat dehidrogenaz katalizlemektedir. Bu enzim allosterik olarak kontrol edildiği için tüm pentoz fosfat yolunun kontrolu bu aşamada gerçekleştirilmektedir[15]. Enzim $NADP^+$'ye karşı son derece spesifiktir ve NAD^+ için K_M değeri $NADP^+$ için olandan yaklaşık 1000 misli fazladır[14]. Oksidatif tepkimelerin ikincisini katalizleyen glukonolaktonaz 6-fosfoglukonolaktondan, 6-fosfoglukonat oluşmasını sağlamaktadır. $NADP^+$-spesifik bir enzim olan 6-fosfoglukonat dehidrogenazın katalizlediği tepkime ile ribuloz-5 fosfat ve CO_2 elde edilir. Oksidatif bölümde glukoz 6-fosfattan $2NADPH+H^+$ sağlanır (şekil 2). Pentoz fosfat yolunun oksidatif tepkimelerinin yer aldığı bölümün toplam denklemi aşağıdaki şekildedir[15].

$$\text{Glukoz6-fosfat} + 2NADP^+ + 2H_2O \rightarrow \text{Ribüloz 5-fosfat} + 2NADPH+H^+ + CO_2$$

Pentoz fosfat yolunun oksidatif olmayan bölümünde ise, biyosentez tepkimelerinde kullanılmak üzere beş karbonlu şekerler ve glikoliz ile glukoneogenez için şeker fosfatlar elde edilmektedir. Şeker molekülleri arasında gerçekleştirilen düzenlemeler ile pentozlar kullanılarak trioz, tetroz, heksoz ve heptoz elde edilmektedir.

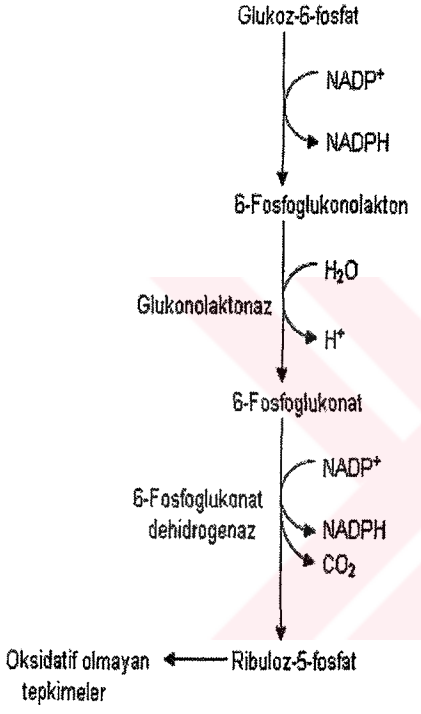
Oksidatif olmayan bölümde ikisi spesifik olmak üzere dört enzim görev yapmaktadır. Ribuloz 5-fosfattan iki farklı enzim kullanılarak iki değişik ürün oluşturulmaktadır. Spesifik enzimlerden 3-epimeraz (fosfopentoz epimeraz) ribuloz 5-fosfatı ksilüloz 5-fosfata, ketoizomeraz (fosfopentoz izomeraz) ise ribüloz 5- fosfatı, riboz 5-fosfata çevirmektedir. Denge halinde bulunan ribüloz 5-fosfat, riboz 5-fosfat ve ksilüloz 5-fosfat, transketolaz ve transaldolazın katalizlediği tepkimeler ile metabolize olmaktadır. Transketolaz ve transaldolaz, şeker fosfatları arasında iki ve üç karbonlu birimlerin değiştirilmesini sağlamaktadırlar. Her iki enzim için substratlardan birisi aldoz, diğeri ise ketozdur[15].

Koenzimi tiamin pirofosfat olan ketolaz, iki karbonlu keton birimini uygun alıcıya taşımaktadır. Ksilüloz 5-fosfattan iki karbonlu birimin ksilüloz 5-fosfata aktarılması ile sedoheptüloz 7-fosfat ve gliseraldehit 3-fosfat elde edilmektedir. Sedoheptüloz 7-fosfat yapısından üç karbonlu birimi gliseraldehit 3-fosfata aktaran transaldolaz, fruktoz 6-fosfat ve eritroz 4-fosfat oluşturmaktadır. Fruktoz 6-fosfat, glikolize katılmakta veya glukoz 6-fosfata çevrilerek pentoz fosfat yoluna girmektedir. Ksilüloz 5-fosfattan iki karbonlu birimin eritroz 4-fosfata transketolaz kullanılarak aktarılması ile fruktoz 6-fosfat ve gliseraldehit 3-fosfat oluşmaktadır[15].

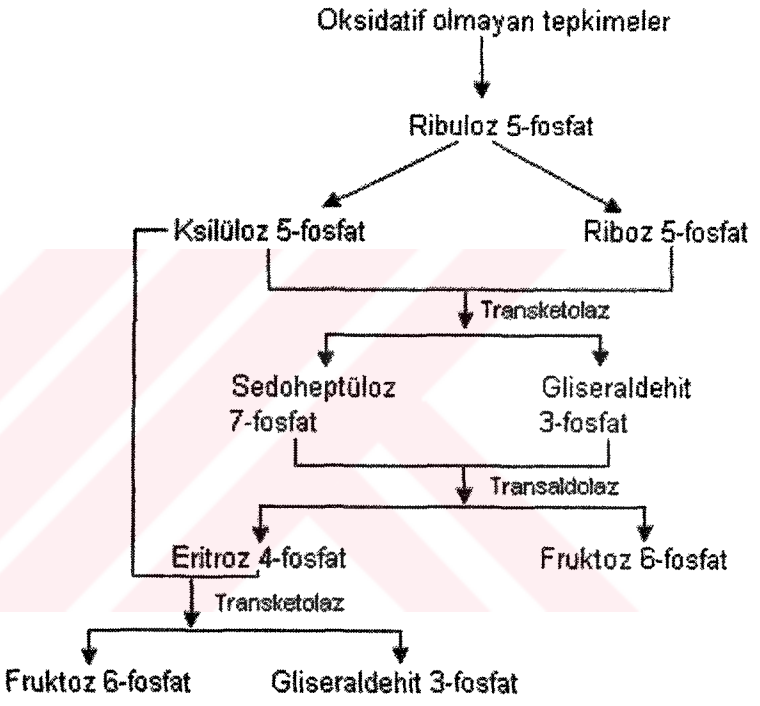
Pentoz fosfat yolunun oksidatif olmayan tepkimelerin (Şekil 3) yer aldığı bölümün toplam denklemi aşağıdaki şekildedir[15].

Ribüloz 5-fosfat + 2 Ksilüloz 5-fosfat→2 Fruktoz 6-fosfat + Gliseraldehit 3-fosfat

Pentoz fosfat yolunun oksidatif ve oksidatif olmayan bölümlerinin reaksiyonları aşağıdaki şekillerde gösterilmiştir[15].



Şekil 2: Pentoz fosfat yolunun oksidatif tepkimeleri



Şekil 3: Pentoz fosfat yolunun oksidatif olmayan tepkimeleri

2.5.2. Pentoz Fosfat Yolu Enzimlerinin Genetik Eksikliklerine Bağlı Bozukluklar

Eritrositlerde glukoz 6-fosfat dehidrogenazın kalıtsal eksikliği veya değişik genetik varyantlarının bulunması, ileri derecede anemiye yol açmaktadır. Ayrıca sıtma tedavisinde kullanılan bazı ilaçlar (primaquine) ile sülfat grubu antibiyotikler, glukoz 6-fosfat dehidrogenaz eksikliğine yol açarak hemolitik anemiye neden olmaktadır. Eritrositlerde NADPH üretiminin gerçekleştiği pentoz fosfat yolunda G6P'ın 6-fosfoglukonata çevrildiği tepkimeyi katalizleyen glukoz 6-fosfat dehidrogenaz büyük önem taşımaktadır. Bu enzimin eksik olduğu eritrositlerde NADPH üretimi yetersiz olduğu için glutatyon indirgenmiş halde tutulamamaktadır. Eritrosit membran bütünlüğü için gerekli olan indirgenmiş glutatyon sağlanamadığından hemoliz meydana gelmektedir. Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz eksikliği kalıtsal veya çevresel nedenlere bağlı olabilmekte veya ilaçlar eksikliğin ortaya çıkmasına neden olmaktadır.

Pentoz fosfat yolu ile ilişkili bir diğer bozukluk Wernicke-Korsakoff sendromudur. Bellek kaybı ve kısmi paralizi ile birlikte görülen bir mental bozukluk olan bu hastalık tiamin eksikliğine bağlı olarak gelişmektedir. Semptomlar genellikle vitamin eksikliğinin bulunduğu kronik alkoliklerde de görülmektedir. Wernicke-Korsakoff sendromunun temelinde transketolaz aktivitesindeki değişiklikler bulunmaktadır. Tiamin pirofosfata affinitesinin yaklaşık 10 kat azalması transketolazın aktivitesini değiştirmekte fakat pirüvat dehidrogenaz ve alfa ketoglutarat aktivitelerini etkilememektedir[15].

2.5.3. Pentoz Fosfat Yolunun Metabolik Önemi

Yağ asitleri ve steroid sentezinin aktif olduğu dokularda (adipoz doku, karaciğer, adrenal korteks ve süt veren meme bezi) büyük miktarlarda NADPH tüketildiği için pentoz fosfat yolu aktiftir[15]. Nitekim Pentoz fosfat yolu ile ilgili radyoaktif ^{14}C ile işaretlenmiş glukoz ile yapılan denemeler bu yolun kas dokularından çok adipoz dokuda aktif olduğunu göstermiştir. Bu sonuç pentoz fosfat yolunun başlıca rolünün indirgeyici biyosentez olaylarında kullanılmak üzere NADPH üretmek olduğu iddiasını desteklemektedir. Çünkü yağ dokusu hücrelerinde asetil-CoA'dan yağ asitlerinin biyosentezinde büyük miktarda NADPH kullanılmaktadır[14].

Pentoz fosfat yolu alyuvarlar ve beyin doku hücreleri gibi bazı hücrelerin temel enerji kaynağı olan glukozun oksidasyonu için başvurulan glikolize alternatif bir oksidatif yoldur[16-19]. Bu yol ile hücredeki glukozun %10'u kullanılmaktadır[20,21].

Heksoz monofosfat yolu da denen bu yolun temel görevi, NADPH'ın üretilmesidir. Üretilen NADPH'lar genel olarak;

1- Yağ asitlerinin sentezi

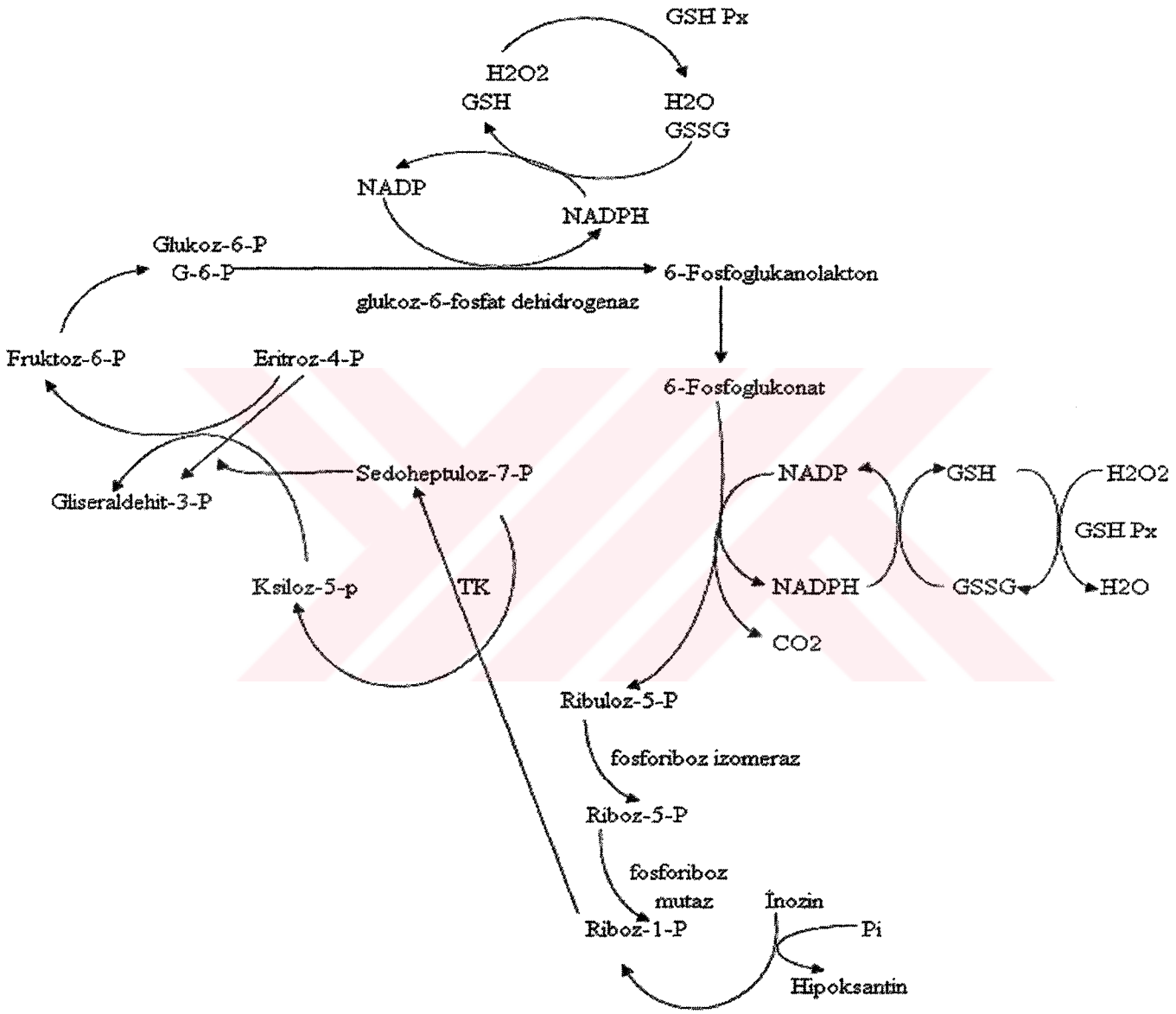
2- Steroidlerin sentezi

3- Bazı aminoasitlerin sentezi

4- İndirgenmiş glutatyon sentezi

5-DNA sentezi için ribinükleotidlerin (ribonükleotid redüktaz ile) deoksiribo nükleotidlere dönüşmesi gibi bir çok indirgenme biyosentezinde kullanılırlar[22,23].

Pentoz fosfat yolu ile okside ve redükte glutatyonun oluşumu ve buna bağlı olarak hidrojen peroksidin kullanımı arasındaki ilişki şekil 1 de gösterilmiştir[15].



Şekil 1: Heksoz monofosfat yolunda sentez edilen NADPH moleküllerinin kullanımı

Eritrosit bütünlüğünün korunmasında pentoz fosfat yolu önem taşımaktadır. Kofaktör olarak selenyum taşıyan glutatyon peroksidaz, GSH kullanarak H_2O_2' i suya çevirmektedir.

$$2GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + H_2O$$

Bu tepkime eritrositlerin hidrojen peroksidin zararlı etkilerinden korunmasında önem taşımaktadır[15]. NADPH bir tripeptid olan glutatyonun indirgenmesinde kullanılır. Kofaktör olarak NADPH taşıyan glutatyon redüktaz, GSSG' nu indirgemektedir.

$$GSSG + NADPH + H \rightarrow 2GSH + NADP^+$$

Normal eritrosit hücre yapısının devamı ve hemoglobinin Fe^{+2} halinde korunması için GSH zorunludur. Düşük seviyede GSH ihtiva eden alyuvarların daha çok hemolize maruz kaldıkları tespit edilmesine rağmen sebepleri henüz ortaya konulamamıştır[1,14,15,24,25]

2.6. 6PGD Enziminin Genel Özellikleri

6PGD enzimi pentoz fosfat yolunun kilit enzimlerinden biridir[26]. Enzim $NADP^+$, yi NADPH' a indirger. Bu ise aminoasitler, lipidler, nükleotidler, hücre duvarı ve diğer hücre komponentlerinin oluşması[27], hücresel redoks potansiyelinin sürdürülmesi ve hücreyi oksidatif strese karşı koruması için gereklidir[28]. NADPH ayrıca yağ asitlerinin oksidasyonunda yer alır, oksijen radikallerini oluşturmak için makrofajların ve polimorfonükleer lökositlerin aktive edilmesinde NADPH oksidaz'ın bir substratı olarak rol oynar ve GR tarafından oluşturulan okside glutatyonun indirgenmesi için gereklidir[29].

6PGD, bir çok mikroorganizmada glukoz ve glukonat katabolik enzimi olarak önemli rol oynar[30]. Enzim G6P'ın, glikolitik yola ve pentoz fosfat yoluna giren glukoz 6-fosfat arasındaki dengenin muhafaza edilmesinde önemli görülmektedir[31].

6-Fosfoglukonat dehidrogenaz eksikliğinde hemolitik anemi görülür. Enzim eksikliği olan hastalarda retikülosit sayısında farklılık, sarılık ve episodik hemolitik olaylar tespit edilmiştir. Bununla beraber eritrosit pirüvat kinaz aktivitesinde artma ve

GSH seviyesinde ise azalma gözlenir. Bu durum eritrositlerin yaşam süresini kısaltır. Enzim eksikliği bir İtalyan ailede tespit edilmiş ve aktivitesinde % 35 oranında azalma olduğu belirlenmiştir[32]. 6PGD düzeyindeki artış prognostik parametre olarak kabul edildiğinden enzim bir çalışmada diagnostik ayıraç olarak seçilmiştir[33].

Koenzim spesifikliğine göre, 6PGD enzimi üç şekilde sınıflandırılmaktadır[34].

1- Spesifik olarak NAD^+ kullananlar

2- Spesifik olarak $NADP^+$ kullananlar

3- Spesifik olmayan tip

Enzimin her türü $NADP^+$'ye bağımlıdır[35]. $NADP^+$' nin enzime afinitesinin 6PG' dan daha yüksek olduğu tespit edilmiştir[36]. Enzimin NAD^+ veya $NADP^+$'ye bağımlılığı kaynağına göre değişmektedir. Lacto bacillus enziminin NAD^+'ye spesifik olduğu, buna rağmen $NADP^+$'yi tercih ettiği, L.Casei enziminin ise $NADP^+$'yi tercih ettiği, fakat NAD^+ ile de bazen aktivite gösterdiği bildirilmektedir[37].

Schizosaccharomyces pompe ve Haemophilus Influenzae enzimleri[38] sadece $NADP^+$ ile aktifken, P.Fluorescens enzimi hem NAD^+ ve hem de $NADP^+$ ile aktiftir[2,39]. Fakat memelilerde ve mayalarda bulunan enzim özellikle $NADP^+$'e bağımlıdır[40]. 6PGD'ın aktif hale gelebilmesi için Mg^{+2} iyonlarına ihtiyaç vardır[41].

A.actinomycetem comitansdaki 6PGD'ın bakteriyel enzimlerden çok ökaryotik enzimlere benzediği bildirilmiştir[30].

P.Fluorescens enzimi tetramer olarak aktiftir ve dört polipeptid zincirinden oluşmuştur[39].

Memelilerde 6PGD aktivitesi yağ dokusunda ve karaciğerde yüksektir, fakat iskelet kası ve beyinde düşüktür[26].

Hücresel fraksiyon çalışmaları enzimin tamamına yakının stoplazmanın çözünebilir kısmında yer aldığını göstermektedir[42]. Bu nedenle 6PGD'ın dağılım profili hemen hemen eşi olmayan tek bir sitozolik dağılım gösterir[43]. Enzim daha yüksek bitkilerin yeşil yapraklarının kloroplast ve sitozollerinde ve fotosentetik olmayan dokularında bulunmaktadır[44]. Ayrıca enzim yüksek bitkilerde sitozolik ve plastidik izoformlarda da oluşmaktadır[45]. İzoenzimlerden biri kloroplastlarda, diğeri ise sitozolde bulunur. Her iki izoenzim benzer özellikler gösterir (hemen hemen aynı optimum pH, mol kütlesi K_M ,V_{max} değerleri gibi)[46].

Yapılan bir çalışmada enzimin glikozomlarda tespit edilemediği belirtilmektedir[43]. Enzim insan beyninde 0.5 U/gr.yaş doku ağırlığı seviyesinde bulunmaktadır[47]. Sıçan beyninde ilk fraksiyonlarda proteinin subselüler dağılım profili çıkarıldığında % 10.3±1'nin çekirdekcikte (yıkanmamış), % 13.3±0.8'nin mikrozomda % 50.8±4.2'nin saf mitokondride ve % 23.8±1'in ise supernatantda olduğu tespit edilmiştir[48]. 6PGD'ın, beyin sinaptozomlarında lokalize olması, glukozun HMP siklusu yardımıyla olduğu kadar EM yolu yardımıylada in vivo olarak yetişkin sıçan beyninde sinir uçlarında mobilize olduğunu ifade etmektedir[48].

Erkek wistar sıçanların kanlarında % 10 PEG kullanılarak pH 7 de çöktürülen enzimin supernatantda daha yüksek oranda bulunduğu tespit edilmiştir[49].

İnsan ve koyun 6PGD enzimleri % 94.2 oranında benzerlik göstermektedir. İnsan 6PGD'ı % 36 alfa heliks, % 9 beta tabakasından oluşmaktadır. Koyun 6PGD' ı ise % 34 alfa heliks, % 4 beta tabakasından oluşmaktadır[50].

6PGD enziminin biribirinden bağımsız iki eşit koenzim bağlanma bölgesi vardır. Bir alt birimden ayrılan NADPH, diğer alt birime bağlanır. Bu durum, her iki alt birimde konformasyonel bir değişiklik yapar[51]. İki alt birim tamamen bağımsızdır[46]. Her

alt birimde iki reaktif tiyol grubu vardır[52] ve bunlar katalitik aktivite için gereklidir[47]. 6-PG veya NADPH tarafından bu grupların korunduğu bildirilmektedir[52]. Aktivite kaybı ve tiyol gruplarının yavaş reaksiyonu büyük denatürasyona yol açarak protein yapısında değişiklikler meydana getirmektedir[52]. 6PG ve $NADP^+$ enzimin serbest formuna bağlanma kabiliyetindedir. NADPH yarışmalı bir inhibitör olduğı için, $NADP^+$ ve NADPH enzimin aynı formuna bağlanmaktadır. Substratların enzime rastgele bağlandığı ispat edilmiştir[47].

İnsan eritrosit 6PGD enzimi okside koenzim ile bir tam bölge (full-site), indirgen koenzim ile bir yarım bölge (half-site) tepkimesi gösterir. İndirgen ve okside koenzim için farklı bağlanma stokiyometreleri, enzim aktivitesinin regülasyonu üzerinde önemli etkiler yapabilir. NADPH, 6PGD için kuvvetli bir inhibitör olarak rol oynadığından dolayı enzim aktivitesi NADP/NADPH oranı ile regüle edilir[53].

2.6.1. 6PGD Enziminin Aminoasit Bileşimi

Enzimin 400 aminoasitten oluştuğu tespit edilmiştir[54]. D.Melanogaster[26] enziminin 481, kuzu karaciğeri[55] enziminin ise 482 aminoasitten oluştuğu belirlenmiştir. Ayrıca enzimin yapısında lizin, histidin, arginin, treonin, aspartik asit, serin, glutamik asit, prolin, glisin, alanin, valin, metiyonin, lösin, izolösin, tirozin, fenilalanin ve triptofan aminoasitlerinin olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda her mol enzim başına sadece 4 sülfhidril grubu içerir ve hiçbir disülfit bağını da içermez[39,52].

Ayrıca X-Ray kristalografik çalışmaları aktif yer bölgesinde bir proton alıcısı ve vericisi olarak rol oynama yeteneğinde olan bir çok aminoasit rezidülerinin varlığınıda göstermiştir. Tirozin 196 gibi, glutamat 195 ve glutamat 222 substrat bağlanma yeri olarak düşünülen bir cepte bulunmaktadır. Aspartat 188 aynı zamanda cebe yakındır. Bununla beraber histidin rezidüsünün de aktivite için gerekli olduğu laboratuvar

çalışmalarıyla ispatlanmıştır[35]. T.brucei[28] enzimi diğer enzimlerde bulunmayan iç içe iki grup aminoaside sahiptir (50- phe-Ala-Gly-52 ve 332-Asp-Ser-Val-Cys-335).

2.6.2. 6PGD Enziminin Optimum pH'sı

Enzim aktivitesi ile pH arasındaki ilişki incelenmiş ve pH 7.6-9.6 aralıkları çalışılmıştır. pH 7.6; 8.0; 8.4; 8.8; 9.2' de aktivitenin arttığı, fakat 9.3 de bir azalmanın tesbit edildiği ve bu azalmanın maksimum değerin % 20'i kadar olduğu bildirilmiş ve kan numunelerinin toplandığı gün hemen çalışılması önerilmiştir[56]

Enzimin doğal halinin optimum pH'ı P.fluorescens[39]'de 8.2, domuz karaciğerinde[42] 8.5, insan beyninde[47] 8.6, sıçan böbrek korteksinde[57] 8.0, Cyanobacterial[58]'de 8.0, D.melanogasterde[59] 7.8, sıçan eritrositlerinde[60] ise 7.0 olarak hesaplanmıştır.

Enzimin izoenzimi ile ilgili yapılan çalışmalarda optimum pH'ı soya fasulyesinde[61] 6PGD-1 için 8.6, 6PGD-2 için 8.9, sıçan karaciğerinde[62] her iki izoform (A ve B) için 8.5, Aspergillus cryzaede[63] ise izoenzim I için 7.5 olarak belirlenmiştir.

2.6.3. 6PGD Enziminin İzoelektrik Noktası

6PGD enziminin izoelektrik noktaları Trypanosoma brucei'de 7.98, salmonella typhimurium'da 5.01, Synechecoccus sp.'de 4.91 ve Escherichia[28] coli'da 4.94, insan kalbinde[50] 6.85, genç ve yaşlı sıçanlarda[64] ise 6.8 olarak tespit edilmiştir.

2.6.4. 6PGD Enziminin Mekanizması

Enzim ardışık/düzensiz (sekuensel, random-order) bir mekanizma izler[53]. Bu mekanizmada enzime önce bağlanan S_1 veya S_2 diğer substratın bağlanmasını kolaylaştırmakta ve üçlü ara bir kompleks (ES_1S_2) oluşmaktadır. Bu üçlü ara kompleksten oluşan bir diğer üçlü kompleks (EP_1P_2) yapısından ürünler (P_1 ve P_2)

sırayla ayrılmaktadır[15]. Koyun ve domuz karaciğer enzimi ile candida utilis enziminin ardışık/düzensiz bir mekanizma takip ettiği bildirilmiştir[53].

Ayrıca enzim bi-ter random kinetik mekanizmasınada sahiptir[65,66]. Fakat bu mekanizmada enzim aktivite için iki değerli metal iyonlarına ihtiyaç duymaz. Enzim E:NAD(P)H alkol, keton, E:NAD(P) dead end ürün komplekslerine sahiptir ve karbondioksit için bir bağlanma bölgesi yoktur. Karbondioksit direkt olarak bir enzim: enol ara bileşiği ile reaksiyona girer[65] (6PGD için 3-keto-6-fosfoglukonat). Enzimin reaksiyon şeması şekil 4'de verilmiştir.

Bunun yanısıra enzimin sıralı bir kinetik mekanizma gösterdiği belirtilmektedir[65]. Domuz karaciğerinde enzim mekanizması incelendiğinde, ilk olarak reaksiyon karışımına $NADP^+$'nin, sonrada 6PG'ın ilave edildiği ve ürünlerden CO_2, ribüloz 5-fosfat ve NADPH'ın sırayla ayrıldığı bir sıralı mekanizma ile uyum içinde olduğu belirtilmektedir[42]. Haemophilus Influenzae enziminin de bir sıralı reaksiyonu katalizlediği belirtilmiştir[38].

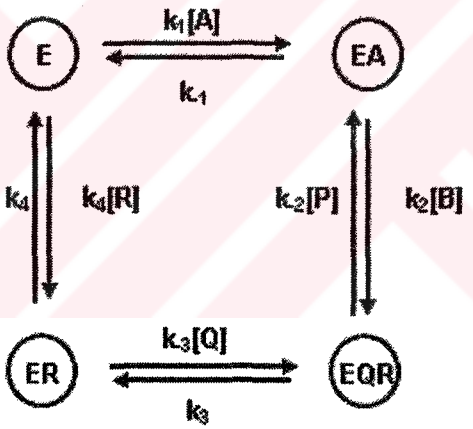
Candida utilisde, enzimin kinetik mekanizması asit-baz katalizi yönünden araştırılmış, çünkü asit baz katalizlerinde reaksiyon için metal iyonlarına ya da kofaktörlere ihtiyaç duyulmadığı belirtilmiştir[67].

Ayrıca insan granulosit 6PGD enziminde her iki substratın ($NADP^+$ ve 6-PG) tesbit edilmesi bir non-order mekanizmayıda baştan sona kadar takip ettiğini göstermiştir[68].

6PGD'ın mekanizması alternatif bir substrat olan 2-deoksi 6-fosfoglukonat (2d6PG) ile koyun karaciğeri, insan eritrositleri ve Trypanosoma brucei' de araştırılmış ve her üç enziminde 2d6PG'ı okside ettiği ve bir ara bileşik olan 3-keto-2-deoksi 6-fosfoglukonat (3kd6PG) ise, eritrosit ve trypanosoma enzimleri tarafından dekarboksile

edildiği tespit edilmiş ve enzim aktivitesinin NADPH ve 6PG tarafından regüle edildiği belirtilmiştir[69].

6PG ve d6PG'ın aynı zamanda keto arabileşiklerinin enzimatik dekarboksilasyonunu aktive ettiği bulunmuştur. 0.07 mM dan daha yüksek konsantrasyonlarda 6PG 'ın aynı protein bölgesi için, 3-keto-2-deoksi 6PG (3Kd6PG) ile yarışmasına bağlı olarak daha düşük bir aktivite etki gösterdiği, şayet NADPH dekarboksilasyonu aktive ederse bunun aynı zamanda 6PG ve $NADP^{+}$ nin diğer alt birime bağlanmasına müsaade etmeyeceği, bu nedenle iki alt birimden birinin katalitik olarak aktif olduğu bildirilmiştir[70].



Şekil 4: 6PGD enziminin reaksiyon şeması. A: İlk substrat, B: ikinci substrat, P: ilk ürün, Q: İkinci ürün, R: Üçüncü ürün, E: Enzim

2.6.5. 6PGD Enzimin Kristalizasyonu

Enzim kristal halde elde edilmiştir. İlk X-Ray analizleri enzim kristallerinin eşkenar dörtgen şeklinde olduğunu göstermiştir. Enzimin birim hücre boyutları a=7.27 nm, b=14.90 nm, c=10.38 nm olarak tespit edilmiştir. Birim hücrede muhtemelen dört dimerik molekül vardır[52].

Trypanosoma brucei enziminde kristallerin üçgen şeklinde olduğu tespit edilmiş, birim hücre boyutları a=b=135.1A^0, c=116.7A^0 olarak hesaplanmıştır. Kristallerin çok düzenli, ayrıca radyasyona karşı da dayanıklı olduğu belirtilmiştir[71].

Lactococcus lactis enzimi kristal halde elde edilmiş ve kristaller eşkenar dörtgen olarak karekterize edilmiştir. Kristallerin birim hücre boyutları a=70.4 ,b=105.7 ve c=474.6 A^0 olarak ölçülmüştür[72].

Sığır 6PGD enzimi de kristal halde elde edilmiş ve üç boyutlu yapısı incelenmiştir. Enzimin bir dimer olduğu, dimerin her alt biriminin a β-α-β bölgelerine sahip olduğu ve bu bölgelerin $NADP^+$'ye bağlandığı belirlenmiştir. Enzim kristallerinde koenzim 29.9A^2, heliks 21.1A^2 ve kuyruk 25.9A^2 olmak üzere üç alan belirlenmiştir. α-heliksde bir alanda 160 rezidü, diğer alanda ise 139 rezidü yer alır. Orijinal aminoasidin C-terminal sırası triptofan 468'e benzemektedir. N-terminal alanı (1-176) a β-α-β kıvrımlarına sahiptir. Koenzim, tabaka kıvrımlarının C-ucuna bağlanır. Rossmann kıvrımlarına göre, a β-α-β anti paralel üniteleri 129-176 rezidüden oluşmaktadır. İkinci alan (177-434) tamamen bir alfa sarmalıdır[73].

2.6.6. 6PGD Enziminin Gen Yapısı

Enzim aktivitesi farklı genetik ve çevresel faktörler tarafından belirlenen fenotipik bir özelliktir. Yapısal ve düzenleyici genlerdeki farklı alleler, enzim moleküllerinin miktar ve stabilitesini etkiler[74].

Farklı kaynaklarda yapılan çalışmalarda 6PGD enzimini şifreleyen genin yapısı aydınlatılmış[75-78], nükleotid sırası belirlenmiş[78,79] ve gen klonlanmıştır[80]. Bu enzimin geni kromozom 1 üzerinde yer alır[81]. Domateste üç bağımsız genin enzim aktivitesinden sorumlu olduğu tespit edilmiştir. Bunlardan 6Pgdh-1'in kromozom 4, 6Pgdh-2'nin kromozom 12, 6Pgdh-3'ün ise kromozom 5 üzerinde yer aldığı bildirilmektedir[82]. Domuz enziminin 6. kromozomun 9. kolunun ortasında yer aldığı tespit edilmiştir[83].

T.brucei gnd geninin GGa trinükleotid motifine sahip olduğu ve ATG başlangıç kodonuna karşı 7bp'de yer aldığı tespit edilmiştir. Bu motifin önemli olduğu belirlenmiş ve komplemantasyonun trypanosome genlerini klonlamak için başarılı bir şekilde kullanılabileceği belirtilmiştir[28]. Domuz ve Laminaria digitata (phaeophyceae) enzimlerinin cDNA karakterizasyonu yapılmıştır[45,83]. Buna göre Laminaria digitatada enzimin spesifik primerleri 6PGD-F:GAAATCGCGACATCGCC ve 6PGD-R:CTGTTCTCAGTCAAAGTA olarak belirlenmiştir[45].

Sprague-Dawley türü sıçanlarda 6PGD sentezindeki kinetik değişmeler incelenmiş ve mRNA miktarı tespit edilmiştir. 6PGD enziminin mRNA'nın yarılanma ömrü 2 saat olarak belirlenmiştir. İnsülinin, enzimin mRNA seviyesini düzenlemede güçlü bir işaret olduğu bildirilmiş ve bu indüksiyonun siklik nükleotidlerle doğrudan ilgili olmadığı belirtilmiştir[54].

Mex^{1} mutasyonunun kadınlarda ve erkeklerde $NADP^{+}$ bağımlı enzimin seviyesini farklı şekilde değiştirdiği ve aktivitenin kadınlarda daha düşük çıktığı tespit edilmiştir[84].

6PGD enzimi alkolik karaciğer sirozunda genetik marker olarak ifade edilmiş ve sirozlu hastalarda gen frekansları belirlenmiştir. 157 sirozlu hastada enzimin A aleli

frekansı 0.978, B aleli frekansı 0.022, kontrol grubunda ise 1.086 kişide A aleli frekansı 0.978, b aleli frekansı 0.022 olarak tespit edilmiştir[85]. Türk populasyonunda eritrosit 6PGD enziminin A aleli frekansı 0.9796, C aleli frekansı ise 0.0203 olarak belirlenmiştir[81].

İtalya'nın farklı bölgelerinde yaşayan 1210 kişinin genetik farklılığa sahip olup olmadığını belirlemek için, eritrosit enziminin gen frekansı tespit edilmiştir. 6PGD enziminin, PGD A geninin bazı bölgelerde en yüksek, bazı bölgelerde ise en düşük frekansa sahip olduğu tespit edilmiştir[86].

Rus toplumunda 5 eritrosit gen markeri'nın gen coğrafi analizleri çalışılmış ve PGD*C'nin 6PGD enziminin bir aleli olduğu gösterilmiş, detaylı bir şekilde araştırılmıştır[87].

Ayrıca enzimin PGD Ricmond ve PGD Freiberg olarak tanımlanan ve pek nadir bulunan alelleri vardır. Bunun yanı sıra önemli enzim eksiklikleriyle ilişkili olan fakat bilinmeyen, PGD O ve PGD W alelleri de bulunmaktadır[81].

6PGD enziminin Brevicoryne brassicae'da AA, BB, CC, AB, AC, BC olmak üzere 6 tane genotipi tespit edilmiş ve enzim sisteminin polimorfik olduğu belirlenmiştir[88].

Enzimin genelde A, A-C ve C olmak üzere üç fenotipi bildirilmesine rağmen, domuz kanında A, AB ve B fenotipleri tesbit edilmiştir[81,89].

Sıçanlarda enzimin 6-fosfoglukonat dehidrogenaz^{s} (Pgd^{s}) ve 6-fosfoglukonat dehidrogenaz^{c} (Pgd^{c}) alelleri, tavşanda ise 6-fosfoglukonat dehidrogenaz^{f} (Pgd^{f}) aleli bulunmaktadır. Pgd^{s} ve $pgd^{c'}$ nin benzer katalitik aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir. 6PGD hepsinde olmasada bir çok hücre tipinde bulunan housekeeping

enzim olduğu için, pgd^c nin çalışılan doku tipi ne olursa olsun bir genetik marker olarak kullanılabileceği ifade edilmektedir [90].

2.6.7. 6PGD'ın İzoenzimleri

Sıçan adipoz dokusunda 6PGD izoenzimlerinin intraselüler dağılımı belirlenmiştir[91].

Soya fasulyesi yumrularının bitki fraksiyonlarında $NADP^+$ ve 6PG'a spesifik olan, benzer kinetik özelliklere sahip iki izoenzim (6PGD-1 ve 6PGD-2) tespit edilmiştir. Her iki izoenzimin çok kararsız olduğu ve 20 mM T-HCI'de, pH 8.5'de ve + 4^0C, 2 saatte tüm aktivitesini kaybettiği belirtilmiştir. Ayrıca 2-merkaptoetanolün 6PGD'ın ve izoenzimlerinin aktivitesinin stabilize edilmesinde etkili olduğu vurgulanmıştır[61].

Aynı zamanda enzimin L.esculentumda[82] dört (6PGD-A-D), Giardia[92]'da üç, sıçan karaciğeri[62], Aspergillus cryzae[63] ve ıspanak yapraklarında[93] iki izoenziminin bulunduğu belirlenmiştir.

2.6.8. 6PGD Enziminin Molekül Kütlesi, Alt Birim Molekül Kütlesi ve Alt Birim Sayısı

6PGD enzimi, önceleri mikroorganizmalar dahil bir çok kaynaktan saflaştırılmış, bir çoğunun 100.000 kda dolaylarında bir mol kütlesine sahip olduğu[2] ve kaynakları ne olursa olsun benzer, iki eşit alt birimden oluşmuş (40-60 kda) bir dimer olduğu belirlenmiştir[2,51,55,58].

Enzimin mol kütlesi Lactobacillus Casei'de 100 kda bulunmuştur[37]. Corynebacterium glutamicum enziminin mol kütlesi 120 kda, alt biriminin mol kütlesi ise 52.5 kda olarak tespit edilmiş ve enzimin homodimerik yapıda olduğu belirtilmiştir[2].

Pseudomonas oleovorans enziminin mol kütlesi 110.000 olarak bulunmuş ve enzimin iki alt birime sahip olduğu tespit edilmiştir[94].

Sıçan beyninde enzimin mol kütlesi 90.000 olarak bulunmuştur[47]. Sıçan eritrositlerinde ise enzimin mol kütlesi 111.000, alt birim mol kütlesi ise 59.566 olarak bulunmuştur[60].

İnsanda[50] enzimin alt biriminin mol kütlesi 53.000 da, cryptococcus neoformansda[95] 50.000, koyun karaciğerinde[96] 51.000, sıçan beyninde[97] 48.800 olarak tespit edilmiştir. H.İnfluenzae enziminin mol kütlesi 70.000 olarak bulunmuş ve enzimin bir dimer olduğu belirtilmiştir[63,98]. Candida boidinii'de[99] enzimin mol kütlesi 110.000, alt birimlerinin mol kütlesi ise 58.000 olarak tespit edilmiştir.

Ancak enzimin tetramer yapıda olduğuda bilinmektedir. Nitekim yapılan çalışmalarda pseudomanas fluorescens enziminin tetramer yapıda olduğu belirlenmiş, mol kütlesi 126.000, alt birim mol kütlesi ise 31.000 olarak hesaplanmıştır[39].

Yine maydanoz yapraklarında bulunan enzimin tetramer yapıda olduğu belirtilmiş mol kütlesi 97.5 kda, alt birim mol kütlesi ise 24.1 kda olarak hesaplanmıştır[36]. Schizosaccharomyces enzimi de tetramer yapıdadır ve bir alt biriminin mol kütlesi 38 kda olarak belirlenmiştir[100].

Ayrıca enzimin mol kütlesi, altbirim mol kütlesi ve alt birim sayısı sırayla; Dicentrarchus labrax l. karaciğerinde[31] 104.000; 52.000; 2, insan eritrositlerinde[39] 104.00; 52.000; 2, domuz karaciğerinde[42] 83.000; 42.000; 2, koyun karaciğerinde[52] 94.000; 47.000; 2, sıçan karaciğerinde[62] 107.000; 54.000; 2, tavşan meme bezinde[101] 104.000; 52.000; 2, Streptococcus faecalisde[102] 108.000; 54.000; 2 olarak tespit edilmiştir.

2.6.9. 6PGD Enziminin Saflaştırılması

1972 ve 1973 yıllarında sıçan ve koyun karaciğer enziminin kinetik parametreleri araştırılmıştır[65]. Ancak insan eritrositlerinde yüksek konsantrasyonlarda bulunan enzim ilk kez 1974 yılında saflaştırılmıştır[53]. Daha sonra 1985 yılında insan enzimi kullanılarak inhibisyon çalışmaları yapılmıştır. 1986 yılında koyun karaciğer enzimi üzerinde NADPH'ın etkisi, 1988 yılında ise Haemophilus İnfluenza enzimi üzerinde ATP-ribozun etkisi araştırılmıştır[65].

Ancak 6PGD' ın saflaştırılmasında karşılaşılan problemlerden biri enzimin kararsız olmasıdır. Mantar ve hayvansal kaynaklı enzimlerin, bakteriyel kaynaklılardan çok daha kararsız olduğu kabul edilmektedir[37].

Bunun yanı sıra saflaştırma esnasında esas zorluk enzimin stabilizasyonudur. Bu ise tampona 2-merkaptoetanol ilave edilerek başarılmıştır[44].

Enzim L.bacillus Caseiden Menezes ve ark.[37] tarafından DE-52 kolonuyla % 60 verimle 4 kat saflaştırılmıştır.

Haemophilue İnfluenza enzimi Yoon ve ark.[38] tarafından tuz çöktürmesi, hidrofobik ve afinite kromotografileri kullanılarak beş basamakta % 16 verimle, 308 kat saflaştırılmış ve kinetiği incelenmiştir.

Enzim insan eritrositlerinden % 36-38 verimle, 28U/mg protein spesifik aktiviteyle Dallocchio ve ark.[53] tarafından saflaştırılmıştır.

Corpas ve ark.[57] enzimi sıçan karaciğeri ve böbrek korteksinden Yüksek hızda santrifügasyon, % 60-75 Amonyum sülfat çöktürmesi ve Sephadex G-25 kolon kromotografisi yöntemleriyle kısmi olarak saflaştırmışlardır.

Cottreau ve ark.[68] enzimi kronik granulositik lösemili bir hastadan saflaştırmış ve % 30 verimle 100 kat saflaştırma elde etmişlerdir.

Enzim Chooback ve ark.[96] tarafından koyun karaciğerinden % 61 verimle , 22.4 kat saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir.

Kroviarski ve ark.[103] insan eritrositlerinden hemolizat hazırladıktan sonra 2',5'-ADP Sepharose Afinite kromotografisi, bunu takiben Sephadex iyon değişim kromotografisi ve son olarakda Sepharose 6B salting out kromotografilerini kullanarak enzimi saflaştırmış ve bu sistemle haftada 10 mg saf enzim elde etmişlerdir.

Enzim Cryptococcus neoformansdan Walter ve ark.[104] tarafından İyon Exchange, Dye Ligand ve 2', 5'-ADP Sepharose kromotografik teknikleri kullanılarak saflaştırılmıştır.

Çiftçi ve ark.[105] enzimi sıçan eritrositlerinden kısmi olarak saflaştırmış ve 79 kat saflaştırma elde etmişlerdir.

Somers ve ark.[106] ise enzimi koyun karaciğerinden tuz gradienti kullanarak, afinite kromotografisiyle yüksek derecede saflıkta ve yüksek bir verimle saflaştırmışlardır.

İnsan 6PGD'ı Kroviarski ve ark.[107] tarafından Procion Blue HE-GN ve Phenyl-Sepharose olmak üzere iki kromotografik basamakta saflaştırılmıştır.

Enzim insan eritrositlerinden, Mutteuzzi ve ark.[108] tarafından Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve 2',5'-ADP Sepharose Afinite kromotografisi kullanılarak saflaştırılmıştır.

Enzim Pearse ve Rosemeyer[109] tarafından insan eritrositlerinden saflaştırılmış, aktivitesi üzerine bazı iyonların ve NADPH'ın etkisi araştırılmıştır.

Hanau ve ark.[110] enzimi kuzu karaciğerinden Ham extrakt, Fosfoselüloz ve ADP-Sepharose yöntemlerini kullanarak saflaştırmış ve % 80 verim elde etmişlerdir.

6PGD enziminin izoenzimleri ise DEAE-Selüloz, CM-Selüloz ve SP-Sephadex kromotografik yöntemleri ile sıçan eritrositlerinden[62], Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve İyon Değişim Kromotografisi yöntemiyle Aspergillus Cryzae'den[63], Affinite Jel Blue ile domatesten[82], Agarose Jel Thin Layer yöntemi ile eritrositlerden[111] saflaştırılmıştır.

Ayrıca enzim corynebacterium'dan[2], ıspanak yapraklarından[44], T.brucei'den[80] Pseudomonas oleovorans'dan[94], candida boidinii'den[99], domuz[42] ve koyun[52] karaciğerinden , bacillus stearothermophilus'tan[112], sıçan beyin[97] ve karaciğerinden[107], insan eritrosit[113] ve beyninden[47], kuzu karaciğerinden[114] değişik metodlarla saflaştırılmış, kristalize edilmiş ve kinetik özellikleri incelenmiştir.

2.6.10. 6PGD Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler

2.6.10.1. Sıcaklık

Enzim aktivitesine etki eden değişik faktörler vardır. Enzim aktivitesinin en çok etkilendiği parametrelerden biri sıcaklıktır. Sıcaklık 6PGD enzimi üzerinde son derece etkilidir[31,47]. Bu nedenle enzim aktiviteleri ölçümü sırasında sıcaklığın kontrol altında tutulması zorunludur. Çalışılan sıcaklık için kontrol faktörü kullanılmalıdır[115]. Enzimin 20^0C ve 30^0C'de 30 dakika inkübasyondan sonra aktivitesinde fazla değişikliklerin olmadığı, fakat 50^0C'de 20 dakika inkübasyondan sonra aktivitesinin tamamen azaldığı tespit edilmiştir[31].

Substrat yokluğunda 50^0C'de 25 dakika inkübasyondan sonra enzimin yaklaşık olarak aktivitesinin % 85'ini kaybettiği[47] bildirilmiş ve maksimum aktivitenin 40 ^{0}C'de elde edildiği belirtilmiştir[58].

Enzim pH 7.5' de 10 dakika farklı sıcaklıklarda inkübe edildiği zaman 50 ^{0}C'nin altında stabil olduğu, enzim aktivitesinin 0.3 mM $NADP^+$' nin ilave edilmesiyle 30 ile 50 ^{0}C arasında % 35 den fazla arttığı ve enzimin 1M ürede stabil olduğu, 4M ürede yarı

denatürasyona uğradığı ve daha yüksek konsantrasyonlarda ise inaktive edildiği tespit edilmiştir[58]. Enzimin tamponda % 50 gliserol ile en az 6 ay stabil olduğu belirlenmiştir[44].

Tiyol gruplarının katalitik aktivite için gerekli olduğu ve bu grupların enzim üzerinde bulunduğu yapılan sonuçlardan anlaşılmaktadır[47].

Subselüler fraksiyonlamadan sonra sukroz ortamındaki sıçan beyin homojenatı 6PGD enziminin 3 gün, –40 ^{0}C'de bekletilmesi sonucunda spesifik aktivitesinde önemli bir kayıp meydana gelmediği[48] ve 6PGD enziminin oda sıcaklığında buz içerisinde en az beş saat bekletildiğinde aktivitesinin stabil olduğu belirtilmektedir[116].

Genç ve yaşlı sıçanlarda enzimin ısı stabilitesinin 4 ^{0}C, 25 ^{0}C ve 37 ^{0}C' de yapıldığı, genç ve yaşlı karaciğer homojenatları için aktivite eğrilerinin farklı olmadığı tespit edilmiş[64], d.melanogaster enziminin aktivite için optimum sıcaklığının 37 ^{0}C olarak bulunduğu bildirilmiş[59] ve sıçan eritrosit enziminin en yüksek aktiviteyi 45 ^{0}C'de gösterdiği belirlenmiştir[60].

Trypanosoma brucei enziminin 30 ^{0}C'den daha yüksek sıcaklıklarda hızlıca bozulduğu bildirilmektedir[80].

Maydanoz yapraklarında sıcaklığın enzim aktivitesi üzerindeki etkisi araştırılmış enzim aktivitesinin 20 ^{0}C'de arttığı belirtilmiş ve optimum sıcaklığın 50 ^{0}C olarak ölçüldüğü belirlenmiştir[36].

Sıcaklığın 6PGD enziminin izoenzimleri üzerindeki etkiside araştırılmıştır. L.esculentum izoenzimlerinden D'nin yüksek sıcaklıklarda A izoenziminden daha stabil, B izoenziminin ise her üç enzimden daha labil olduğu belirlenmiştir[82].

Genel olarak termofilik enzimlerin substrat ve koenzimleri için mezofilik enzimlerden daha düşük afiniteye sahip oldukları gösterilmiştir[58].

2.6.10.2. Beslenme

Enzim aktivitesinin etkilendiği parametrelerden biriside beslenmedir. NADPH oluşturan enzim sistemleri (6-PGD) beslenme, hormonal ve metabolik duruma bağlı olarak çok değişmektedir[117].

Nitekim beslenen sıçanların karaciğerlerinde yüksek oranda 6PGD aktivitesi bulunmuştur[118]. Selenyum bakımından zayıf beslenen sıçanlarda 6PGD aktivitesinin arttığı belirtilmiştir[119]. Sıçan karaciğerinde lipogenes fazla miktarda NADPH tüketebilir ve 6PGD' ın lipogenes sıçanlar, yüksek karbonhidrat yağ serbest diyeti ile beslenirken stimule edildiğinden azalmaya başladığı ve poliansature yağ asitlerinin diyette bulunması durumunda enzim indüksiyonunun azaldığı bildirilmektedir[54].

2.6.10.3. Çevresel Faktörler

Enzim aktivitesi çevresel faktörlerden de etkilenir. Flounder (Platichthys fleus L.) örnekleri az ve çok kontamine olmuş alanlarda ve açık denizde toplanmış ve enzim aktivitesi ölçülmüştür. Tümörsüz, fakat kontamine olmuş karaciğerlerdeki 6PGD'ın ilk hızları sağlıklı olanlara oranla önemli derecede düşük bulunmuştur. 6PGD aktivitesinin extrafokal karaciğer dokusunda, kötü huylu tümörlerin dejeneratif bölgelerinde ve tümörsüz kontamine olmuş karaciğerlerde sağlıklı olanlarınkiyle karşılaştırıldığında azaldığı tespit edilmiştir[33]. Işığın enzimi inhibe, karanlığın ise aktive ettiği bildirilmiştir[46].

2.6.10.4. Metal İyonları

Enzimin Co^{+2}, Ca^{+2}, Mn^{+2} ve Mg^{+2} gibi iki değerli metal iyonları tarafından aktive edildiği bildirilmektedir[58,100,120].

Ancak manganezin karaciğerdeki enzimi uyardığı ve enzime afinitesinin magnezyumdan daha kuvvetli olduğu belirlenmiştir. İntraperiton olarak 1-14 gün boyunca fazla miktarda Mn uygulanan sıçanların karaciğerindeki enzimin, ilave olunan Mn tarafından büyük oranda uyarıldığı, fakat tiroidlerdeki enzimin mangan'a karşı hemen hemen duyarsız olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca selüler Mn'in karaciğerde enzimin maksimum stimulasyon seviyesine oldukça güç ulaştığı ve bu dokuda cinsiyet farkına göre etkili olduğu belirlenmiştir[120].

2.6.10.5. Yaş

Enzim aktivitesinin etkilendiği faktörlerden biride yaşdır. Hepatik NADPH oluşturan enzim sentezi, memelilerde yaşlanmadan etkilenir[117]. Yaş ile aktivitenin önemli derecede değiştiği ve yaşla birlikte azaldığı belirlenmiştir[64,121,122]. Nitekim sıçan karaciğer hücrelerinde[64] ve insan eritrositlerinde[123] 6PGD enzim aktivitesinin yaşlanma ile azaldığı bilinmektedir. Ancak günümüze değin yapılmış olan çalışmalar aktivite azalım mekanizmasını yeterince aydınlatamamıştır. Genç ve yaşlı sıçanlarda enzim aktivitelerinde gözlenen farklılıkların fosforilasyon, açilasyon veya deaminasyon gibi kovalent değişmelerin bir sonucu olmadığı belirtilmektedir. Yaşlı enzimlerde yer alan değişmenin muhtemelen oksidasyon ile, 1 histidin rezidüsündeki değişmeden kaynaklandığı ifade edilmektedir. Yaşlanma süresince lizin rezüdüsünde bir modifikasyon bulunduğu ve bununda enzimatik aktivitedeki kayıpla ilgili olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle, yaşlanma süresince okside olan, inaktivasyondan ve enzim kaybından sorumlu olan en önemli aminoasit rezidülerinin histidin ve /veya lizin olduğu ileri sürülmüştür[64].

Aynı zamanda genç ve yaşlı enzimlerin peptid haritaları farklı olup, yaşlı enzimler genç olanlara oranla daha az sayıda peptidlere sahiptir[64].

Genç ve yaşlı sıçan karaciğerleri üzerinde yapılan bir çalışmada yaşlı sıçanların enzim aktivitesinde genç sıçanlara göre % 40 oranında bir azalma olduğu yani yaşlanmayla birlikte % 40 oranında bir aktivite kaybının bulunduğu bildirilmektedir. Bu da yaşlı karaciğer ekstraktının 6PGD enziminin daha az aktif bir formunu veya tam aktif ve inaktif 6PGD enzim moleküllerinin bir karışımını ihtiva ettiğini göstermektedir. Yaşlı sıçanlarda bulunan enzimin, genç sıçanlardakinden yaklaşık % 26 oranında daha az aktif olduğu tespit edilmiştir[64].

Araştırmada her iki grubun sisteinil rezidüleri arasında önemli bir fark bulunmadığı, 3 arginin rezidüsünün modifikasyonunun her iki enzimde % 100' lük bir aktivite kaybına neden olduğu, metionin rezidülerinin genç ve yaşlı enzimler arasında her hangi bir farklılık göstermediği, genç ve yaşlı 6PGD enzimlerinde tüm aktivite kaybının her molekül için 2.7 histidin rezidüsünün modifikasyonu ile ilgili olduğu ve ayrıca lizin rezidüleri sayısında kayda değer farklılık olduğu tespit edilmiştir[64].

Farklı vücut ağırlığına sahip gök kuşağı alabalıklarında (0.6, 35.70, 175, 450 gr.) vücut ağırlığına bağlı olarak spesifik aktivitede, maksimum oranda ve katalitik etkinlikte devamlı ve önemli azalmalar gözlenmiştir. Yavru balıklara nazaran yetişkinlerde spesifik aktivitede % 92 gibi önemli derecede bir azalma tespit edilmiştir[117].

6PGD aktivitesi 1 haftalık, 2 haftalık, 4 haftalık ve 4 aylık tavukların kalıtsal olarak gelişmemiş (kalıtsal distrofik) yüzeysel göğüs kaslarında ölçülmüştür. Enzim aktivitesinin, 4 aylık olanlarda çok düşük, 1 haftalık olanlarda ise çok daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla gelişmemiş tavuklarda enzim aktivitesinin önemli derecede yüksek olduğu belirtilmiştir[121].

2.6.11. 6PGD Aktivitesinin Önemi ve Dokulardaki Değerleri

Pentoz fosfat yolu enzimlerinin aktivitelerinin normal iskelet kasında daha düşük olduğu bilinmektedir. Diğer yandan pentoz fosfat yolunun kasların gelişmesi veya iyileşmesinde önemli olduğu düşünülmektedir. Çünkü bu yol RNA sentezi için riboz sağlamaktadır. 6PGD NADPH' ın intraselüler seviyesini regüle eden en önemli enzimlerden biridir. Aktivitesinin, intraselüler NADPH' ın nisbeten sabit bir seviyede sürdürülmesi için artması beklenir. Bu nedenle aktivitesiyle yakından ilgilenilmektedir[121]. 6PGD ve G6PD enzim aktivitelerinin ölçülmesi, farklı olan türlerin ayırımında sitogenetik karekteristikle birlikte bir kriter olarak kullanılabileceği ve ayrıca aynı türün bireyleri arasında yaşlı veya genç olduğuna karar vermede bir gösterge olabileceği düşünülebilir[124].

6PGD aktivitesi ıspanak yapraklarında[44] 60 U/mg, sıçan karaciğeri ve böbrek korteksi sitozolünde[57] sırayla 424.2 mU/mg ve 120.7 mU/mg, insan eritrositlerinde[108] 28 IU/mg olarak tespit edilmiştir.

6PGD aktivitesi insanlarda tam kanda ölçülmüş olup enzimin eksik olmadığı erkeklerde, α- talasemili bireylerde 7.2±0.9 U/gHb, β-talasemili bireylerde 9.4±1.5 U/gHb, talasemik olmayan bireylerde ise 6.6±0.8 U/gHb olarak tespit edilmiştir[125]. Aktivitenin candida utilis[126]'de 34 IU, RW 231 türü E.Coli bakterisinde[127] yaklaşık % 80 saf olan fraksiyonda 31.500 U/mg olarak belirlendiği bildirilmiştir.

P.Fluorescens enziminin aktivitesi NAD^+ kullanıldığında yaklaşık 0.055 U/mg protein, $NADP^+$ kullanıldığında ise 0.041 U/mg protein olarak tespit edilmiştir[39]. T.Brucei prosiklik formlarının subselüler fraksiyonlarında enzim aktivitesinin hücre extraktında 2300 mU, küçük granülde 48 mU, sitozolde 2300 mU olarak hesaplandığı, büyük granülde ise tespit edilemediği belirlenmiştir[43].

Sprague- dawley türü 21 erkek sıçan üzerinde yapılan bir çalışmada sıçanlar üç eşit gruba ayrılmış, vücut ağırlığına göre üç farklı diyetle beslenmiş ve 57 günlük peryot sonunda enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Enzim aktivitesi 1.grupta 39±1, 2.grupta 28±16, 3.grup ise 28±16 mU/mg protein olarak hesaplanmıştır. İkinci ve üçüncü gruba oranla 1. grupta enzim aktivitesinin önemli derecede arttığı tespit edilmiştir[119].

Mısır, şeftali ve tütün köklerinde, ıspanak, şeftali ve tütün yapraklarında hem sitozolik ve hem de plastidik formlarda enzim aktivitesi ölçülmüş, her iki formda da farklı oranlarda bulunduğu tespit edilmiştir[128].

Tavuklarda, ontogenez süresince 6PGD aktivitesindeki değişmeler karaciğer, kalp, akciğer ve beyin dokularında incelenmiştir. Araştırmada embriyo (12, 14, 16, 18 günlük) ve civcivler (4, 6, 90 günlük) kullanılmış olup, stoplazmik 6PGD aktivitesi ölçülmüş ve gelişmenin her safhasında sabit olduğu bildirilmiştir[129].

Sekiz aylık beş adet Yeni Zelanda erkek tavşanlarının ince barsaklarında 6PGD aktivitesi ölçülmüştür. Enzim aktivitesinin muskularis eksternada, brunner bezlerinde , enterositlerde ve kript hücrelerinde yüksek, dil epitelyumunda ise düşük olduğu tespit edilmiştir[130,131].

6PGD aktivitesi, tavşan iskelet kasında ölçülmüştür. Aktivitenin her bir kas dokusundaki bağ dokuda birbirine oldukça yakın olduğu ve atrofik kaslarda bağ dokusundaki kadar arttığı bildirilmiştir[132].

Candida boidinii no.2201 metanol kullanan veya metanolden yaralanan bir maya cinsidir. Karbon kaynağı olarak glukoz ve metanol karşılaştırıldığında enzim aktivitesinin glukoz kaynaklıda 2 kat daha yüksek çıktığı tespit edilmiştir[133].

Ayrıca 6PGD enziminin aktivitesi yetişkin teleost doku ekstratlarında[31] (beyin, karaciğer ve böbrekte), flounder (Platichthys fleus L.) örneklerinde[33], cicer

arietinum'da[134], NAD^+ ve $NADP^+$ bağımlı bir çok laktik asit bakteri türünde[135], Türkiyenin farklı yörelerindeki kör farelerde[124], sıçan beyninde[48,122], kuzu karaciğerinde[70], sıçan karaciğerinde[136], tavşan meme bezinde[101], cryptococcus neoformansda[95], aureobasidum pullulans[137] türlerinde, leishmania'da[138], rhizobia[139]' da, phyophthora palmivora[140]'da, c.boidinii[133] türlerinde ve d.melanogaster[74] populasyonunda ölçülmüştür.

2.6.12. 6PGD Enzimini İnhibe Eden Bileşikler ve Moleküller

İnsan ve hayvan dokularındaki enzimin aktivitesi ve kinetik parametreleri üzerine bazı arabileşikler, nükleositler, metal iyonları, iyonik güç, NADPH ve pH'ın etkileri araştırılmıştır[61,68,109,141,142]. Hem 6PG, hemde $NADP^+$ enzimi inhibisyona, ısı inaktivasyonuna ve fotooksidasyona karşı korumaktadır[47,58,68]. İnhibisyonun 2-merkapto etanol tarafından önlendiği bildirilmiştir[58].

Yapılan çalışmalarda bazı metal iyonlarının enzimatik fonksiyonun potansiyel inhibitörleri olduğu belirlenmiştir[143]. Zn^{+2}'nin phormidium sp'de[58], cryptococcus neoformansda[95] ve balıklarda[143], bakır ve kadmiyumun ise (Cu^{+2} ve Cd^{+2}) phormidium sp'de[58] enzimi inhibe ettiği tespit edilmiştir.

Sıçanların karaciğer ve böbreklerindeki enzim aktivitesi üzerine kadmiyumun etkisi araştırılmış ve kadmiyum uygulandıktan sonra 9. saatte enzim aktivitesinde bir azalma, kadmiyum intoksikasyonundan sonraki 72 saatte içinde ise enzim aktivitesinde bir artma gözlendiği belirlenmiştir[144].

Enzimin bir fosfat eşdeğeri olan Phi (fosfonat) tarafından inhibe edildiği ve Phi için I_{50} değerinin 116.1 ± 7.3 mM olarak hesaplandığı bildirilmektedir[140]. Corynebacterium enziminin NADPH, ATP, D-Gliseraldehit 3-P, eritroz4-P, Fru1,6P,

fosfoenolpiruvat, 2,5-fosforilriboz-1-pirofosfat (Prib-PP) ve Gra3P tarafından inhibe edildiği tespit edilmiştir[66].

Fosfoenolpiruvatın, 6PG'a karşı levrek karaciğer enziminin nonkompetetif bir inhibitörü, $NADP^+$'ye karşı ise kompetetif bir inhibitörü olduğu belirlenmiş ve 6 PG' a karşı K_i değerlerinin 0,54 mM, $NADP^+$'ye karşı ise 0,15 mM olarak hesaplandığı bildirilmiştir[145].

Pseudomonas oleovorans ve Corynebacterium 6PGD'nın riboz 5-fosfat ve fruktoz-1,6-difosfat tarafından inhibe edildiği bildirilmiştir[66,94].

Candida Utilis enzimine 6-fosfogalaktonat ve ksiloz 5-fosfat moleküllerinin etki etmediği fakat 6-sulfoglukonat, 5-fosforibonat, 6-fosfoallonat, 5-fosfoarabonat ve 5-fosforibonat moleküllerinin ise enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir[67].

Streptomyces griseus' da Fosfo-Adenozin difosfo-ribozun, $NADP^+$ bağımlı enzimin kompetetif bir inhibitörü olarak rol oynadığı belirlenmiştir[146].

Haemophilus Influenzae enziminin 3-aminopridin adenin dinükleotid fosfat tarafından kuvvetli bir şekilde inhibe edildiği bildirilmektedir[38].

Yapılan araştırmalarda enzimin sülfhidril ayıraçları (PCMB, NEM, DTNB ve Hg) tarafındanda inhibe edildiği bildirilmiştir[58,68].

NADPH/NADP oranının enzimlerin regüle edilmesinde önemli olduğu belirtilmektedir[61]. İn vitro olarak fizyolojik $NADPH/NADP^+$ oranı tamamen sıçan karaciğerinde 6PGD'ı inhibe eder[118]. Bu nükleotidlerin sıçan karaciğer stoplazmasında 100:1 oranında bulunması pentoz fosfat yolunun oksidatif fazının in vivo olarak işleyemeyeceğini gösterir[84]. NADPH'ın farklı dokulardaki enzim aktivitesini inhibe ettiği tespit edilmiştir[37,47,58,61,65,68,84].

NADPH'ın $NADP^+$'ye karşı kuvvetli kompetetif bir inhibitör ve 6-PG'a karşı ise non kompetetif bir inhibitör olduğu belirlenmiştir[61,68].

NADPH'ın dicentrarchus labrax l[31]. ve sıçan karaciğer[57] enzimleri, sıçan böbrek korteksi[57] enzimi üzerinde kompetetif inhibisyon etkisi gösterdiğinde K_i değerlerinin sırayla 1.6 µM, 21 µM, 41 µM, non-kompetetif inhibisyon etkisi gösterdiğinde ise dicentrarchus labrax l[31]. karaciğer ve sıçan eritrosit[60] enzimleri için sırayla 40 µM, 0.052 mM olarak hesaplandığı belirlenmiştir.

Ribüloz 5-fosfatın[37] (Ru5P) 2 mM'lık bir konsantrasyonda enzimi hiperbolik bir şekilde % 70, asetil-CoA[66,] nın ise 2 mM'lık bir konsantrasyonda % 50 oranında inhibe ettiği bildirilmektedir.

Enzimin oda sıcaklığında 2 dakikada, kuvvetli bir şekilde 1M üre veya 0.2 M guanidin hidroklorür ile % 40 inaktive olduğu tespit edilmiştir[37].

ATP'nin 6PG'a karşı kompetetif[66], $NADP^+$'ye karşı ise unkompetetif[68] inhibisyon etkisi gösterdiği, fakat intraselüler ATP'nin % 80-90'ı Mg^{+2} ile komplekslendiğinden dolayı ATP inhibisyonunun in vivo şartlarda daha zayıf olduğu tespit edilmiş[66] ve sıçan eritrositlerinde ATP için K_i değeri 2.50 ± 0.866 mM olarak hesaplanmıştır[60]. AMP ve ADP'nin enzimi daha düşük oranda inhibe ettiği tespit edilmiştir[66].

Substrat olarak 6PG kullanıldığında Gra3P, Fru $1,6P_2$ ve E4-P bileşiklerinin enzimi çok kuvvetli bir şekilde inhibe ettiği ve K_i değerlerinin sırasıyla 1.45 mM, 3.6 mM ve 0.735 mM olarak hesaplandığı belirtilmiştir[66].

6PGD enzimi levrek karaciğerinde araştırılmıştır. Fosfoenolpiruvatın, 6 PG'a karşı enzimin nonkompetetif bir inhibitörü, $NADP^+$' ye karşı ise enzimin bir kompetetif

inhibitörü olduğu ve 6 PG' a karşı K_i değerlerinin 0.54 mM, $NADP^+$' ye karşı ise 0.15 mM olarak hesaplandığı bildirilmiştir[145].

6PGD aktivitesi üzerine farklı konsantrasyonlarda DEPC, 2,3-bütandion ve pridoksal fosfat bileşiklerinin etkisi incelenmiştir. Yapılan çalışmada DEPC'nin 10 µmol konsantrasyonda enzime etki etmediği, fakat 20µmol, 100µl ve 400µl konsantrasyonlarda enzimi inhibe ettiği, 2,3-bütandion'ın 8.0 µmol, 20 µmol ve 50 µmol konsantrasyonlarda enzimi inhibe ettiği, pridoksal fosfat'ın ise 1.0 µmol ve 3.0 µmol konsantrasyonlarda enzime etki etmediği belirlenmiştir[37].

Ayrıca L.Casei enzim aktivitesi üzerine foto inaktivasyon etkisi araştırılmış ve ışık, rose bengal (% 0.014 ve % 0.024) ve ışık+rose bengal karışımlarının enzimi sırayla %83.0, %74.3, %58,5 ve %22.4 oranında inaktive ettiği bildirilmektedir[37].

6-Amino nikotinamid'in (6AN) enzimin kompetetif bir inhibitörü olduğu ve 40 µM konsantrasyonda enzimi inhibe ettiği tespit edilmiştir. 6-Amino nikotinamid niasin'in bir analogudur, NAD(P) sentezinde niasin ile yarışır ve 6-ANADP (6-amino-NADP)' ye metabolize olur. 6ANAD(P) ise özellikle 6PGD enziminin kuvvetli bir inhibitörüdür. Bu ise glikolizin, poli (ADP-riboz) sentezinin ve nükleotid sentezinin inhibisyonu ile sitotoksisiteye yol açar[147,148].

İnhibisyon çalışmalarından sitrat ve pirofosfatın tavşan meme bezindeki enzimin kompetetif inhibitörleri olduğu tespit edilmiştir[101].

Aspergillus cryzaede[63] GSSG 'nin izoenzim I'i inhibe, izoenzim II yi ise aktive ettiği tespit edilmiştir.

İnsan beyin 6PGD enzimi ile yapılan çalışmalarda doymamış 6PG konsantrasyonunda (40 µM) inhibisyon sabitinin 1.31±0.48 µM, doymuş 6PG konsantrasyonunda ise (500 µM) 8.13±0.89 µM olarak hesaplandığı belirlenmiş ve bu

değerlerin önemli derecede farklılığından dolayı substratın rastgele bağlandığı ispat edilmiştir[47].

İnsülinin sıçanlarda 6PGD'ın indüksiyonunu direkt olarak regüle etmekte eşsiz olduğu tespit edilmiştir. Sprague-dawley türü sıçanlarda (hepatositlerde) optimal insulin konsantrasyonu varlığında (10^{-7}M), tiriiyodotironin (T_3)'in hafifçe enzim induksiyonunu stimule ettiği, somatostatin ve sekretinin ise enzim indüksiyonu üzerine etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Yine aynı şartlarda, 8-Br–cGMP'nin enzim indüksiyonunu önemli derecede etkilemediği, dibutiril cAMP'nin ise enzim indüksiyonunu değiştirmediği tespit edilmiştir[149].

2.6.13. 6PGD Aktivitesi Üzerine İyonların Etkisi

İnsan beyin 6-Fosfoglukonat dehidrogenaz enziminin aktivitesi bir çok tuz bileşikleri tarafından etkilenir. Etkinin büyüklüğü bu tuzlar arasında değişmez. Bu durum bir iyonik gücün katyondan bağımsız olduğunu göstermektedir. İki değerli katyon miktarı bu tuzların enzim üzerindeki etkisini belirtir. Dolayısıyla tek değerli katyonların aksine iki değerli katyonlar, enzim üzerine spesifik etkiye sahiptir. Daha düşük miktarda katyon varlığında aktivite kaybının daha fazla olduğu söylenir. Enzim aktivitesi lityum klorür, sodyum klorür ve potasyum klorür (0.1 iyonik güçte) 'ün ilave edilmesiyle arttığı, daha yüksek iyonik güçte ise aktivitede bir düşüş gözlendiği tespit edilmiştir. İyonik güç 0.05 olduğu zaman aktivitenin maksimum olduğu belirlenmiştir. İnsan eritrosit 6PGD enzimi aktivitesinin iyonik güce bağlı olduğu belirtilmektedir. İyonik güç 0.5 olduğu zaman magnezyum klorürün ilave edilmesi, enzim aktivitesini % 30, kalsiyum klorürün % 55, stransiyum klorürün ise % 110 azattığı bildirilmektedir. Bu nedenle tuzlar yardımıyla iyonik güç 0.05 olduğu zaman aktivitenin maksimum olduğu belirlenmiştir[47].

Fosfat, molibdat, arsenat iyonlarının sıçan karaciğeri enziminin her iki molekül formunu da (A ve B) inhibe ettiği tespit edilmiştir[62].

Kuluçkadan sonra 3 haftalık civcivlere 150 ve 300 ppm gümüş klorür verilerek karaciğer enzim aktivitesi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. 300 ppm gümüş klorür uygulanan civcivlerde aktivitenin daha düşük olduğu tespit edilmiştir[150].

2.6.14. 6PGD Enziminin Kinetik Çalışmaları

Cyanobacterial 6PGD enziminin, $NADP^+$ ve 6PG'a karşı tipik hiperbolik bir kinetik gösterdiği bildirilmektedir[61]. Pseudomonas oleovorans enzimi için 6PG'ın K_M değeri 152 μM, $NADP^+$'nin K_M değeri ise 55 μM olarak bulunmuştur[94]. Sıçan eritrosit enziminde $NADP^+$ ve 6PG için K_M değeri sırayla 0.059 mM, 0.194 mM, V_{max} değerleri ise 0.063EU/ml, 0.054EU/ml olarak hesaplanmıştır[60]. Ispanak yapraklarında Cp 6PGD'ın biyokimyasal özellikleri belirlenmiş olup, enzimin hem substrat, hemde kofaktör bakımından klasik Michaelis Menten kinetiğini gösterdiği belirlenmiştir. 6PG ve $NADP^+$ için K_M değerleri sırayla 40μM ve 6 μM olarak bulunmuştur[44]. Genç sıçanlarda $NADP^+$ ve 6PG için K_M değerlerinin sırayla 8.710^{-5} M, 1.710^{-4} M, yaşlı sıçanlarda ise sırayla 9.510^{-5} M ve 1.710^{-4} M olarak bulunduğu bildirilmiştir[64].

Sıçan karaciğeri enziminde 6PG ve $NADP^+$ için K_M değerleri sırayla 157 μM ve 258 μM, böbrek korteksinde ise 49 μM ve 56 μM olarak bulunduğu bildirilmektedir[57].

Cryptococcus neoformans'da 6PG için K_M değerinin 13 μM, $NADP^+$ için ise 0,86 μM olarak bulunduğu bildirilmiştir[95]. L.Casei 6PGD enziminde 6PG için K_M değerinin 7.710^{-4}M ve $NADP^+$ için ise 1.710^{-4}M olarak hesaplandığı bildirilmiştir[37].

Eritrosit 6PGD enziminde $NADP^+$ ve 6PGA (6PG) için Michaelis sabitleri sırayla 27 μmol/L ve 65 μmol/L olarak bulunmuştur[56]. Sıçan eritrosit enzimiyle ilgili yapılan bir çalışmada $NADP^+$ için K_M değerinin 6PGA'dan daha düşük olduğu ve

6PGA ile karşılaştırıldığında enzimin $NADP^+$' ye daha yüksek afinite gösterdiği bildirilmiştir[60].

Candida Utilisteki 6PGD enzimi 2-deoksi 6-fosfoglukonat substrat olarak kullanılarak karekterize edilmiştir. Enzim 2-deoksi 6-fosfoglukonatın oksidatif dekarboksilasyonunu katalizler. 2-deoksi 6-fosfoglukonat dehidrogenasyonun 6PG' dan 75 kat daha düşük olduğu belirlenmiştir[126].

2.6.15. 6PGD Aktivitesini Etkileyen Bazı İlaç ve Kimyasal Maddeler

Penicillamine'nin gelişmemiş tavukların beyaz ve kırmızı kaslarındaki 6PGD aktivitesi üzerindeki etkisi araştırılmıştır[151]. Maleimide'nin 6PGD enzimini enaz 12 dakikada inaktive ettiği bildirilmektedir[56]. Citrinin (CTN), sıçan karaciğer hücrelerindeki enzim aktivitesi üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir[152]. Suramin ilacı ve analogu olan trypan blue'nın T.brucei ve koyun karaciğer enzimini 6PG'a karşı yarışmalı, $NADP^+$'ye karşı ise yarışmasız olarak inhibe ettiği bildirilmektedir[153]. Enzimin metamizol tarafından invitro olarak aktive edildiği bildirilmiştir[105]. Clofibrat ilacının wistar türü erkek sıçanların kahverengi yağ dokusundaki enzim aktivitesini önemli derecede inhibe ettiği, fakat karaciğer ve beyaz yağ dokularındaki enzim aktivitesi üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir[154].

O-phthalaldehyde'nin koyun karaciğeri, T.brucei ve L.lactis 6PGD enzimini inaktive ettiği bildirilmektedir[155].

2 (N-morpholino) etan sulfonik asit (MES)'in bir çok fungal kaynaklı (cryptococcus neoformans, candida utilis, schizophyllum commune, rhodotorula sp., pleurotus sp., saccharomyces cerevesiae, aspergillus parasiticus) enzim aktivitesini inhibe ettiği bildirilmiştir[104]. Fluorescein 5-isothiocyanate (FITC)'ın, kuzu karaciğer

$NADP^+$-bağımlı 6PGD enziminin aktif bölgesine bağlanarak, 30 dakikada enzimi % 90'dan daha fazla inaktive ettiği, fakat $NADP^+$ veya 6PG varlığında inaktivasyonun daha yavaş olduğu bildirilmektedir[110]. Vanadat'ın kuzu karaciğer 6PGD enzimini inaktive ettiği, inaktivasyonun hızlı ve irreversibl olduğu ve tetramerik vanadat için spesifik olduğu tespit edilmiştir[55].

Mell hücrelerinin dimetilsülfoksid (DMSO) indüksiyonu etkisinde kalan 3-S pulse UV ışığına sublethal dozda bırakıldığı ve kısa 3-S pulse UV ışığının mutagenik effektör olarak kullanıldığı belirtilmektedir. UV irradyasyonunun uygulama zamanına bağlı olarak farklı etkilerin sadece hücrelerin S fazında gözlendiği belirlenmiştir. Farklı irradyasyon zamanında her bir aktivitede maksimum inhibisyon pikinin belirlendiği gözlenmiştir. DMSO uygulandığında 18-28 saatler arasında 6PGD aktivitesinde inhibisyon gözlendiği tespit edilmiştir[156].

2.7. Araştırmada Kullanılan İlaç ve Kimyasal Maddelerin Genel Özellikleri

1. Penisilin G (Kristapen): Penisilin G'nin ilaç olarak kullanılan yalın şekli potasyum veya sodyum tuzudur. Bunlar kristal şeklinde olduklarından kristalize penisilin G adını alırlar. Suda fazla çözündüklerinden suda solusyon halinde kullanılırlar. Bu nedenle aköz kristalize penisilin G diye de adlandırılırlar. Penisilin G aynı zamanda benzil penisilin diye de adlandırılır. Penisilin G, penisilinlerin en eskisidir. 1940'ların başından beri kullanılmaktadır. Belirli bazı bakterilerin yaptığı infeksiyonlarda başlangıçtaki etkinliğini ve değerlerini hala korumaktadır. Streptococcus pneumoniae, Grup A streptokoklar (strep.pyogenes), neisseria meningitidis, gram-pozitif basiller (clostridium perfringens ve tetani, corynebacterium diphteriae, bacillus antracis), treponema pallidum (sifiliz etkeni) ve leptospira gibi bakteri türlerinin yaptıkları enfeksiyonlarda en tercih edilen antibiyotiklerden birisidir.

Neisseria gonorhoae penisilin G'ye genellikle duyarlıdır. Ancak bu bakterinin beta-laktamaz salgılayan rezistan suşları da vardır. Staph.aureus suşlarının % 90'dan fazlası penisilin G'ye rezistandır. Bunun başta gelen nedeni söz konusu türlerin beta-laktamaz (penisilinaz) salgılamasıdır, fakat Nocardia asteroides resiztandır. Gram-negatif basiller (az sayıda ve önemsiz istisnalar dışında) penisilin G'ye duyarsızdırlar.

Penisilin G'nin kullanılışıyla ilgili iki önemli sakıncası, bazı bakterilerin salgıladığı beta-laktamazlara ve aside dayanıklı olmamasıdır. Midenin asidik içeriği içinde çok çabuk parçalanır. pH'sı 1.0-2.0 olan ortamda 20 dakikada %50 oranında yıkıldığı gözlemlenmiştir. Oral dozunun ancak 1/3'ten daha azı absorbe edilir. Bu nedenle ağız yolundan kullanılması tavsiye edilmez. Sudaki solüsyonu şeklinde sadece i.m veya tercihen i.v kullanılır. Penisilin G müstahzarlarında viyal (flakon) içinde steril kuru toz halinde bulunur ve bu durumda uzun süre bozulmadan kalır. Sulandırıldıktan sonra çabuk parçalanır ve tamponlanmamışsa oda sıcaklığında 24 saatten sonra inaktivasyon belirginleşir. Ayrıca daha kısa bir sürede bile, alerjen niteliği olan parçalanma veya dönüşme ürünleri meydana gelir. Bu nedenle penisilin G'nin injekte edileceği zaman sulandırılması ve bekletilmeden injekte edilmesi tavsiye edilir. İntravenöz yoldan tercihen injeksiyon şeklinde veya bir saati geçmeyen bir süre boyunca infüzyon şeklinde verilmesi tavsiye edilir.

Penisilin G'nin 1 milyon ünitesi 0.6 g'dır. Sodyum penisilin G, bir milyon ünite başına 1.7 mEq (39 mg) sodyum, potasyum penisilin G ise aynı miktar başına 1.7 mEq (66 mg) potasyum içerir. Sodyum yüklenmesine neden olmayan potasyum tuzu rutin olarak kullanılır. Ancak böbrek yetmezliği olgularında potasyum retansiyonu tehlikesi nedeniyle sodyum penisilin G tercih edilir.

İntramüsküler injeksiyondan sonra, doruk plazma konsantrasyonuna 15-30 dakikada erişilir. Uygulanan dozun büyüklüğüne göre plazmadan 3-6 saat içinde kaybolur. Yarılanma ömrü normal olarak 30 dakika kadardır. Böbrek yetmezliği olgularında artma gösterir, anürili hastalarda 100 saattir. Plazma proteinlerine yaklaşık % 60 oranında bağlanır. Büyük kısmı böbreklerden itrah edilerek (%90'ı tübüler salgılanma ve %10 'u glomerüler filtrasyon suretiyle) elimine edilir. Kalan kısmı karaciğerden safra içine atılır. Böbrekte tübüler salgılanma suretiyle olan itrahta hız maksimumu, erişkinde yaklaşık 3 milyon Ü/saat'tir. İdrarda penisilin G'nin büyük kısmı değişmemiş şekilde bulunur.

Penisilin G, i.m veya i.v olarak genellikle günde 25.000-50.000 Ü/kg verilir. Bu miktar 4-6 doza bölünmüş olarak uygun aralıklarla uygulanır. Beyin ve BOS'a girişinin kısıtlı olması nedeniyle menengokokal menenjitte toplam günlük erişkin dozu 24 milyon Ü'dir. İnfeksiyon etkeninin duyarlılığının nisbeten az olması nedeniyle, enterokokal endokarditte bir aminoglikozid ile birlikte ve günde toplam 20 milyonÜ dozunda kullanılır[157].

2. Ampisilin (Alfasilin): Hem oral yoldan hem de hem de parenteral uygulanabilen bir penisilin türevidir. Grup A streptokoklara, pnömokoklara, Neisseria'lara ve Clostridium'lara karşı in vitro etki gücü penisilin G'ye göre biraz daha düşüktür. Fakat enterokoklara, viridans grubu streptokoklara ve Listeria monocytogenes'e karşı ondan biraz daha fazla etkilidir. Haemophilus influenzae, E.coli, Salmonella, Shigella, Proteus mirabilis gibi gram–negatif basillerin suşlarının çoğuna karşı bakterisid etkinlik gösterir. Ancak, sayılan gram-negatif basillerde giderek artan bir oranda meydana gelen rezistans nedeniyle ampisilinin terapötik üstünlüğü azalmaktadır. Avrupa ülkelerinde izole edilen E.coli suşlarının tümü üzerinden yaklaşık

%40'nın ampisilin'e rezistan olduğu bulunmuştur. Klebsiella ve Enterobacter suşlarının çoğu, P.mirabilis dışındaki Proteus türleri, Pseudomonas aeruginosa, Bacteroides türleri ve beta-laktamaz salgılayan Staph.aureus suşları ampisiline rezistandırlar.

Ampisilin mide-barsak kanalından kısmen (ortalama % 40) absorbe edilir; absorpsiyonu besinler tarafından kısmen azaltılır. Oral uygulandığında maksimum plazma konsantrasyonuna yaklaşık 2 saattir. Halbuki i.m injeksiyonla verildiğinde doruk konsantrasyona 1 saatte erişir. Ciddi infeksiyonlarda yüksek dozda ve parenteral (genellikle i.v) verilmesi gerekir. Plazma proteinlerine çok az (ortalama % 20) bağlanır. Absorbe edilen dozun yaklaşık yarısı böbreklerden atılır. İdrardaki konsantrasyonu yüksektir. Kalan kısmının büyük bölümü karaciğerde safra içine itrah edilir ve az bir kısmı metabolize edilir. Tıkanıklık olmadığı takdirde safradaki konsantrasyonu plazmadakinin 300 katına çıkabilir. Tübüler salgılanmasını inhibe eden probenesid adlı ilaç ampisilin'in böbrekten itrahını bloke eder, kandaki konsantrasyonu yükseltir ve uzatır. Bundan dolayı ampisilin gonore tedavisinde kullanılır. Ampisilin'in yarılanma ömrü 80 dakika kadardır.

Ampisilin, kronik bronşitlerin akut nükslerinde (özellikle H.influenzae'nin eradikasyonu için), ayrıca bu bakterinin diğer duyarlı bakterilerle birlikte çocuklarda ve bebeklerde etken olduğu akut otitis media'da, E.coli ve duyarlı diğer bakterilere (P.mirabilis ve enterococcus'lar gibi) bağlı üriner infeksiyonlarda, H.influenzae menenjitinde ve Shigella dizanterisinde kullanılır. Bakteriyel menenjit olgularında, bakteri türü belli degilse, başlangıçta ampisilin verilmesi tercih edilir. Ancak, son zamanlarda H.influenzae suşlarında (yaklaşık %15) ampisiline rezistans belirdiği için tek başına veya daha iyisi ampisilinle birlikte, kloramfenikol tavsiye edilmektedir. İn vitro duyarlılık testi yapılabiliyorsa, onun sonucuna göre iki antibiyotikten biri ile tedavi

sürdürülür. Bakteriyel menenjitin diğer etkenleri olan pnömokoklara ve menengokoklara karşı ampisilin'in klinik etkinliği penisilin G'ninkine yaklaşık olarak eşit derecede bulunmuştur. Ancak, bakteri türü belirlenebilmiş ve adı geçen iki türden biri bulunmuş ise o takdirde penisilin G tercih edilir. Ampisilin'in menenjit tedavisinde yüksek dozda (günde 400 mg/kg) ve i.v. kullanılması tavsiye edilmektedir. Bu durumda toksisitesi ve tedavinin maliyeti penisilin G'ye göre yüksektir. Enterokokal endokardit olgularında bir aminoglikozid antibiyotikle kombine olarak yüksek dozda i.v. kullanılır.

Yukarıda sayılan bakterilere bağlı idrar yolu infeksiyonlarında bakteremi varsa, ampisilin'in gene yüksek dozda (genellikle günde 6-12g) ve i.v. kullanılması tavsiye edilir. Bu indikasyonda ampisilin uygulanması, bebeklerde ve gebelerde özel toksik etkisi olan tetrasiklinlere tercih edilebilir.

Tifoda, ampisilin en tercih edilen ilaç kloromfenikolun, seftriakson, fluorokinolonlar, amoksisilin ve ko-trimoksazoldan sonra gelen alternatifidir. Tifo dışındaki salmonella infeksiyonlarında, rezastans oluşabilmesi ve portörlük süresini uzatabilmesi nedeniyle tavsiye edilmez.

Ampisilin'in tavsiye edilen dozu genelde infeksiyonun ciddiliğine göre 50-400 mg/kg'dır ve dörde bölünerek 6 saatte bir verilir. Bu aralıkta doz yükseltildiği takdirde ampisilin ağızdan değil, parenteral (tercihen i.v.) kullanılmalıdır.

Ampisilin'in sık görülen özel bir yan tesiri infeksiyöz mononükleozlu hastalarda ve kronik lenfatik lösemi, böbrek yetmezliği ve hiperürisemi olgularında ve allopurinol adlı ürisemiyi düşürücü ilaç alanlarda sık olarak ciltte mokulopapüler döküntü oluşturmasıdır[157].

3. Sefazolin Sodyum (Cefozin): Plazma proteinlerine en fazla bağlanan sefalosporin olması ve böbreklerden esas itibariyle glomerüler filtrasyonla atılması

nedeniyle parenteral kullanılan birinci kuşak ilaçlar arasında eliminasyon yarılanma ömrü en uzun olanıdır (yaklaşık bir buçuk saat). Bu nedenle cerrahideki profilaktik uygulamalarda diğer sefalosporinlere tercih edilir.

Sefazolin, aynı dozda parenteral verilen diğer sefalosporinlere göre daha yüksek plazma konsantrasyonu sağlar. Ancak plazmada mevcut miktarın 4/5'ü proteine bağlı durumda olduğundan plazma konsantrasyonlarının karşılaştırılması serbest (etkin) plazma konsantrasyonları üzerinden yapıldığında sefazolin'in bu açıdan belirgin bir üstünlüğünün olmadığı görülür. Karaciğerden safra içine de itrah edilir. Safradaki düzeyi plazmadakinin yaklaşık 7 katı kadardır. Vücutta dezasetilasyona uğramaz . Erişkinlerde sekiz saatte bir 250-500 mg dozunda i.m veya i.v kullanılır. Pediatrik günlük dozu 25-50 mg/kg kadardır. Kas içinde injeksiyonu; sefalotin'e göre daha az ağrılıdır. Damar içine injeksiyonu sefalotin'e göre düşük oranda flebit yapar[157].

4. Sefotaksim Sodyum (Claforan): Tıpta ilk kullanılan üçüncü kuşak sefalosporindir. Antibakteriyel spektrumu sefoperazoninki kadar geniş değildir. Aerobik gram-negatif basillerin çoğuna (özellikle E.coli ve Serratia'ya) ve Staph.aureus'a karşı çok etkilidir. Gram-negatif enterik basillere, H.influenzae, N.menengitidis ve Strep.pneumoniae'ye bağlı menenjite karşı etkilidir. Pseudomonas, enterokoklar ve B.fragilis'e karşı etkinliği yetersizdir. Plazma proteinlerine %40 oranında bağlanır. BOS içine yeterli derecede nüfuz eder. Karaciğerde % 30-50'ye varan bir oranda metabolize edilir. Kalan kısmı ve metabolitleri büyük ölçüde böbrekten itrah edilir. Yarılanma ömrü 1 saat kadardır. Erişkinlerde i.m. injeksiyon veya i.v. injeksiyon ya da infüzyonla 8 saatte bir 1-2 g dozunda kullanılır. Ağır infeksiyonlarda 4-6 saatte bir verilmesi gerekir. Pediatrik dozu günde 100-150mg/kg'dır. Duruma göre daha yüksek dozda kullanılabilir. Böbrek yetmezliği bulunan hastalarda kreatinin

klirensi 20 ml/dak veya daha yüksekse dozunun ayarlanması gerekmez. Gram-negatif basillerin yaptığı menenjitte, non-nötropenik fakat başka bakımdan riskli (diyabetli ve alkolik gibi) hastaların ağır pnömonilerinde ve neonatal gonorede tercihen kullanılır[157].

5. Seftriakson (Desefin): Gram-negatif bakteri spektrumunun niteliği bakımından sefotaksim ve seftizoksim'e benzer. H.influenzae, N.gonorrheae, menengokoklar ve pnömokoklara çok etkilidir. Pseudomonas, B.fragilis, enterokoklar ve stafilokoklara karşı etkinliği düşüktür. Plazma proteinlerine %95 bağlanır. BOS'a sefotaksim ve seftizoksim kadar iyi sokulur. Kısmen karaciğerde metabolize edilmek veya safraya itrah edilmek ve kısmende böbreklerden glomerüler filtrasyonla atılmak suretiyle yavaş elimine edilir. Eliminasyon yarılanma ömrü en uzun olan sefalosporindir (8 saat). Böbrek yetmezliği olgularında doz ayarlanması gerekir. Erişkinlerde 24 saatte bir 2 g i.v. dozunda uygulanır. Çocuk dozu günde 50 mg/kg'dir; menenjitte iki katına çıkarılır. Bakteriyel menenjitte, alt solunum yolu infeksiyonlarında, gonorenin çeşitli şekillerinde ve doz intervalinin uzunluğu nedeniyle duyarlı bakterilere bağlı infeksiyonu olan ambulatuvar hastalarda tercihen kullanılır; tifoya karşı alternatif ilaçtır. Kolon cerrahisinde 2g'lık tek dozda profilaksi için kullanılabilir. Diğerlerine göre sık diyare yapan bir sefalosporindir. Bunda barsak mikroflorasını bozmasının katkısı vardır. Nisbeten sık bir şekilde safra kesesinde çökelti (psödolitiazis,"safra çamuru") yapar, bu bazen semptomatik olabilir (safra koliği , bulantı ve kusma gibi) ve tedavi bittikten sonra iki ay içinde çökelti kaybolur[157].

6. Sefepim HCl (Maxipime): Beta-laktamaz enzim türlerine en dayanıklı ve onları pek indüklemeyen dördüncü kuşak sefalosporindir. Antibakteriyel spektrumu sefotaksiminkine benzer. Ancak Ps.aeruginosa'ya karşı daha etkili (seftazidime yaklaşık eşit) dir. Streptokoklar ve metisiline-duyarlı Staph.aureus'a karşı seftazidimden daha

etkilidir. Tamamiyle böbrekten itrah edilir. İntravenöz injeksiyon veya infüzyonla 12 saatte bir 0.5-1 g verilir. Ağır infeksiyonlarda aynı ara ile 2 g uygulanır[157].

7. Meropenem (Meronem): Tienamisin'in dimetilkarbamoil türevidir. Renal dihidropeptidaza dayanıklı olduğu için imipenemden farklı olarak tek başına parenteral kullanılır. İmipeneminkine göre etki süresi daha uzundur. Antibakteriyel spektrumu imipeneminkine benzer. Ona rezistan bazı Pseudomonas aeruginosa suşlarına karşı etkilidir. Öte yandan gram-pozitif kokuslara karşı ondan daha az etkilidir. Erişkin dozu i.m veya i.v injeksiyon ya da infüzyonla 0.5-1 g'dır. İmipeneme göre daha az yan tesir yapar[157].

8. Kloramfenikol (Kemisetin Süksinat): Dikloroasetik asit grubu içeren bir nitrobenzen türevidir. Kloramfenikol, geniş spektrumlu oluşu ve vücutta dağılımının iyi olması nedeniyle diğer antibiyotiklerin çoğuna göre üstünlüğü olan bir ilaçtır. Ancak çok seyrek de olsa ölümle sonuçlanan irreversibl aplastik anemiye neden olur. Aplastik aneminin bazen ilacın tek bir dozundan sonra, hatta göze lokal uygulanmasından sonra oluşabildiği bildirilmiştir. Bazen aplastik anemi yerine agranülositoz meydana gelebilir. Aplastik anemiyi takiben lösemi gelişebildiği bildirilmiştir[157]. İlaç yüksek dozda ve özellikle uzun süre alındığında kemik iliği üzerinde reversibl toksik etki yapar. Bu toksik etki sonucu anemi ile birlikte lökopeni ve trombositopeni de oluşabilir[157]. Bu nedenle yaşamı tehdit eden infeksiyonlarda kullanılması gereken, fakat hafif ve gelip geçici infeksiyonlarda kullanılması tavsiye edilmeyen bir antibiyotikdir. Kloramfenikol in vitro olarak geniş bir grup gram negatif ve gram pozitif bakteriler üzerinde bakteriyostatik etki gösterir. Etkisini bakteri ribozomlarının 50 S alt birimlerine bağlanmak suretiyle peptidil transferaz enzim blokajı yaparak ve böylece bakterilerin protein sentezini inhibe ederek gösterir. Memeli hücrelerinin mitokondriyel

ribozomları bakteri ribozomları gibi 70S türü oldukları için kloramfenikol, özellikle eritropoietik hücrelerde, mitokondriyel protein sentezini yüksek dozda bozar. Vücuda alındıktan sonra en yüksek konsantrasyonlarda beyin ve beyin omirilik sıvısında bulunur. Gözün ak öz ve vitröz hümörüne ve seröz boşlukları ıslatan sıvılara ve gebelerde fötusa kolayca geçer. Karaciğerde % 90 oranında metabolize edilerek inaktive edilir. Bu, glükuronat metabolitine dönüştürülmek suretiyle olur. Eliminasyon yarılanma ömrü 3 saat kadardır.

Kloramfenikol seyrek olarak ciltte döküntü, ürtiker, anjiyo ödem şeklinde alerjik belirtilere neden olabilir. Prematüre ve yeni doğanlarda kloramfenikol verildiğinde, bunlarda biyotransformasyon, konjügasyon ve itrah ile görevli mekanizmaların henüz yetersiz olmasından ötürü hızla yüksek kan konsantrasyonlarına erişilir. Sonuçta akut dolaşım ve solunum depresyonu, hipotermi, kaslarda gevşeme, karında distansiyon, metabolik asidoz ve ciltte gri renk ile kendinin gösteren ''gri sendrom'' denilen durum meydana gelir. [157].

Tifolu hastada kloramfenikolun yüksek dozlarıyla tedaviye başlanıldığında vücutta hızlı yokedilen tifo basillerinden açığa çıkan endotoksinlere bağlı dolaşım kollapsı meydana gelebilir. Bu gibi endotoksin şoklarına karşı sistemik glukortikoid uygulanabilir[157].

İlaç nörotoksik etkiye sebep olur. Başağrısı, ruhsal depresyon, delirium veya konfüzyona neden olabilir. Nadir olarak periferik nörit ve optik nöropati yapar. Aynı zamanda kloramfenikolün deney hayvanlarında primer immün reaksiyonu inhibe ettiği gösterilmiştir[157].

Organizmalara bağlı enfeksiyonlarda kan konsantrasyonlarını arttırmak için büyüklerde 100 mg/kg, çocuklarda 50 mg/kg dozunda kullanılır. Bu doz 6 veya 8 saatte

bir verilecek şekilde dörde veya üçe bölünerek uygulanır. Prematürelerde 25 mg/kg 4 eşit doza bölünerek uygulanır.

9. Gentamisin (Gentamisin Sülfat): Micromonospora purpurea'dan elde edilir. Gerçekte yapıca birbirine çok benzeyen üç gentamisin türünün (gentamisinin C_1, C_{1a} ve C_2) karışımından ibarettir. Kitlesine göre, streptomisin, kanamisin ve amikasinden güçlüdür. Aminoglikozid ilaçlar içinde amikasinden sonra, spektrumu en geniş ve antibakteriyel etki gücü en yüksek olanıdır. Bakterisid etki yapar. Özellikle Enterobacteriaceae grubu (E. coli, Klebsiella, Aerobacter vb.) bakteriler ile Pseudomonas aeruginosa gibi gram-negatif basiller , penisiline ve metisiniline dayanıklı Staph. aureus suşları üzerinde etkilidir. Antipsödomonal penisilinlerle kombine edildiğinde, Proteus türleri ve Pseudomonas üzerinde, sinerjizma nedeniyle daha güçlü etkinlik gösterir. Sayılan bakterilerin hepsi in vitro koşullarda gentamisin'in 6 µg/ml'den daha düşük konsantrasyonları ile inhibe edilirler. Bu konsantrasyon serumda, bir kezlik mutad doz olan i.m. 1.5 mg/kg gentamisin ile elde edilir. Hemolitik streptokoklar ve pnömokoklar üzerindeki etkinliği yetersizdir. Plazma proteinlerine hemen hemen hiç bağlanmaz.

Kanda yaklaşık % 10 oranında alyuvarlara bağlanır. Bu nedenle anemik hastalarda kandaki serbest gentamisin konsantrasyonu biraz daha yüksek olur. Vücutta biyotransformasyona uğramadan böbreklerden itrah edilir ve idrarda serumdakinden 10-100 kez daha yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Duyarlı bakterilerde rezistans gelişmesi, streptomisine karşı olduğundan daha yavaş ve daha küçük derecededir. Diğer aminoglikozidlere (amikasin hariç) rezistan olan bakteri suşlarına gentamisin etkili olabilir. Ancak bunun tersi, çoğu kez doğru değildir yani gentamisine rezistan bakteriler, amikasin hariç diğer aminoglikozidler tarafından pek etkilenmezler.

Gentamisin mutad olarak 1-2 mg/kg dozunda 8 saatte bir (günde 3 kez) i.m. veya i.v. injeksiyon suretiyle kullanılır. İdrar yolu infeksiyonlarında daha ufak dozlarda (0.3-1 mg/kg) etkili olabilir. Lokal uygulamaya özgü % 0.3'lük oftalmik solüsyonu veya merhemi ve % 0.1'lik cilt merhemi veya kremi vardır. Toksisitesinin fazlalığı ve terapötik indeksinin düşük olması nedeniyle böbrek yetmezliği olan hastalarda dozunun ayarlanması ve mümkünse serumdaki düzeyinin izlenmesi gerekir[157].

10. Streptomisin (Streptomisin Sülfat): İlk bulunan aminoglikozid türevidir. Streptomyces griseus'tan elde edilir. Gram-negatif enterik basillere karşı etkinliği daha sonra bulunan aminoglikozidlere göre düşüktür.

Tüberküloz tedavisinde kullanılır. Ancak ripampin, pirazinamid ve etambutol gibi oral yoldan alınan yeni ilaçların çıkmasıyla bu kullanılış yerinde önemini kısmen kaybetmiştir. Tüberküloz menenjit olgularında intratekal olarak kullanılır. Diğer kemoterapötiklerle (genellikle tetrasiklinlerle) birlikte bruselloz, veba ve tularemi gibi infeksiyonlarda kullanılır. E.coli'ye bağlı idrar yolu infeksiyonlarında kullanılabilir. Bu indikasyonda idrarın pH 'ının 8'in üstüne çıkarılması etkinliğini artırır. Bu amaçla 3 saatte bir 500 mg sodyum bikarbonat veya aynı miktar sodyum sitrat ağızdan verilir. Antipsödomonal etkisi zayıftır ve antipsödomonal bir aminoglikozid sayılmaz.

Tüberküloz dışında kalan infeksiyonlarda günde 15-25 mg/kg dozunda i.m. kullanılır. Bu doz ikiye bölünerek 12 saatte bir uygulanır. İlk 7-10 günlük uygulamadan sonra günlük doz 1 g'a düşürülür. Çocuklarda ve bebeklerde günlük doz 20-40 mg/kg'dır[157].

Ototoksik etkisi (özellikle denge üzerinde) belirgindir. Nefrotoksik etkisi diğer aminoglikozidlere oranla daha zayıftır[157] .

11. Netilmisin (Netromisin): Sisomisin'den türetilen yarı-sentetik yeni bir aminoglikozid antibiyotiktir. Kimyaca N-etilsilsisomisin'dir. Amikasin gibi, bakterilerin salgıladığı inaktive edici enzimlerin çoğuna karşı dayanıklıdır ve sadece asetilazlar tarafından inaktive edilir. Bu nedenle, gentamisin'e ve tobramisin'e rezistan Enterobacteriacea grubu bakterilere karşı etkilidir. Pseudomonas, Providencia ve Serratia türlerine karşı etki gücü, gentamisininkine oranla biraz daha düşüktür.

Farmakokinetik özellikleri yönünden gentamisin ve tobramisine benzer. Deney hayvanlarında gentamisine ve tobramisine göre daha az toksik ve bu arada daha az nefrotoksik bulunmuştur. İnsanlarda fazla sayıda hasta üzerinde yapılan incelemeler ototoksisitesinin daha düşük olduğunu doğrulamış, fakat nefrotoksik etki yönünden netilmisin ile diğer iki aminoglikozid arasında kesin bir fark bulunmamıştır. Böbrek yetmezliği olgularında kanda penisilinlerle inaktive edilmez. Dozlamı gentamisin için belirtildiği şekildedir[157].

12. Siprofloksasin (Ciflosin): Siprofloksasin bir çok gram-negatif ve gram-pozitif mikroorganizmalara karşı etkili, geniş spektrumlu ve bakterisid etkiye sahip olan sentetik bir 4-quinolon türevidir. Sistemik infeksiyonlara karşı halen en fazla denenmiş olan fluorokinolondur. Aynı zamanda gravimetrik etki gücü en yüksek (MİK ve MBK değerleri en küçük) olan türevdir. Siprofloksasin mikst enfeksiyonlarda veya amino glikozidler, penisilinler ve sefalosporinler gibi diğer antibiyotiklere dirençli mikroorganizmaların yol açtığı enfeksiyonlarda da etkilidir. Ağızdan tablet şeklinde ve i.v. yoldan 50 veya 100 mg'lık infüzyon solüsyonu şeklinde kullanılır. İdrar yolu infeksiyonlarında ağızdan günde iki kez 250-500 mg verilir. Diğer infeksiyonlarda (üst ve alt solunum yolu infeksiyonları, gastrointestinal kanal infeksiyonları, cilt ve yumuşak doku infeksiyonları ve osteomyelit gibi) günde iki kez 250-750 mg uygulanır. Strep.

pneumoniae'ye karşı etkinliği düşük olduğundan ona bağlı infeksiyonlarda ağızdan iki kez 750 mg verilebilir. İntravenöz infüzyonla idrar yolu infeksiyonlarında günde iki kez 100 mg ve komplikasyonsuz gonore olgularında tek doz halinde ağızdan 250 mg veya i.v. infüzyonla 100 mg verilmesi yeterli olabilir. Siprofloksasin pseudomonas'a karşı aktif oluşu ve dokulara nüfuz gücünün yüksek oluşundan dolayı ayrı bir önem arz etmektedir. Serum yarı ömrü yaklaşık 4 saattir. Eliminasyonun % 90'ı ilk 24 saatte gerçekleşir[157].

13. Ofloksasin (Tarivid): Ofloksasin siprofloksasin gibi fluorokinolon gurubu bir antibiyotiktir. Kemik ve eklem enfeksiyonları hariç alt ve üst solunum yolu enfeksiyonları, cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları, idrar yolu enfeksiyonları, gastrointestinal kanal enfeksiyonları ve seksüel temasla geçen enfeksiyonlarda ağızdan günde iki kez 100-200 mg verilir. Ağır enfeksiyonlarda ise bir kezlik doz 300-400 mg'a kadar arttırılabilir[157].

14. Teikoplanin (Targocid): Yapı ve antibakteriyel etki mekanizması bakımından vankomisine benzeyen bir glikopeptid karışımı antibiyotiktir. Actinoplanezs teichomyceticus adlı aktinomiset türünden elde edilir. Hem aerobik hemde anaerobik gram-pozitif bakterilere karşı etkilidir. Gram-negatif bakterileri etkilemez. Duyarlı bakterilerin hücre duvarı sentezini bozarak bakterisid etki yapar. Böbreklerden büyük kısmı değişmeden atılır. Eliminasyon yarı ömrü uzun olduğundan günde bir kez injeksiyonu ile kandaki etkin konsantrasyonu 24 saat boyunca bir çok gram-pozitif bakteri türünün MİK (1 µg/ml) düzeyinin üstünde seyreder. Stafilokokların, enterokokların ve streptokokların sıklıkla rol oynadığı akut ve kronik osteomyelitlerin, septik artritlerin, cilt ve yumuşak doku enfeksiyonlarının, postoperatif yara enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılır. Karma enfeksiyonlarda aminoglikozidler, penisilinler, sefalosporinler, fluorokinolonlar ve rifampin ile kombine kullanılabilir.

Uygun dozu i.v. veya i.m. olarak günde bir kez 3-6 mg /kg' dir. Mide-barsak kanalından absorbe edilemediği için ağızdan kullanılmaz[157].

15. Amikasin Sülfat (Amiketem): Aminoglikozidler arasında yarı-sentetik olarak yapılan ilk türevdir. Doğal bir ilaç olan kanamisin A'dan açilleme suretiyle elde edilir. Yapısı ile ilgili bu özelliği nedeniyle; gentamisin, kanamisin ve tobramisin gibi doğal aminoglikozidleri inaktive eden bakteriyel enzimlere dayanıklıdır ve bundan dolayı en geniş spektrumlu aminoglikoziddir. Bu üstünlüğünü koruyabilmesi için hastanelerde kullanılması ve ancak gentamisin tarafından etkilenmeyen rezistan bakterilerin yaptığı infeksiyonlar için rezerv antibiyotik olarak sakınılması tavsiye edilir.

Farmakolojik ve farmakokinetik özellikleri yönünden kanamisin ile amikasin arasında yakın bir benzerlik vardır. Kanamisin gibi amikasin de iç kulakta özellikle işitme fonksiyonunu bozar. Gentamisin derecesinde nefrotoksik ve ototoksik etki gösterir. Gentamisin ve tobramisinden farklı olarak, amikasin böbrek yetmezliği olgularında kanda penisilinlerle birleşmek suretiyle inaktive edilmez[157].

Günde 15 mg/kg dozunda i.m. veya i.v. verilir. Bu doz üçe veya ikiye bölünerek 8 veya 12 saatte bir uygulanır[157].

16. İsepamisin Sülfat (İsepacine): 100 mg/ml-500 mg/2 ml'lik ambalajları bulunmaktadır. Antibakteriyel etkilidir. Gram pozitif ve gram negatif mikroorganizmaların neden olduğu alt solunum yolu enfeksiyonları, karın içi enfeksiyonları, peritonit, kolesistit, kolanjit, üriner sistem enfeksiyonları, deri ve deri dokusu enfeksiyonları, septisemi ve nötropenik enfeksiyonlar gibi bir çok enfeksiyonun tedavisinde kullanılır[157].

Şiddetli enfeksiyonlarda önerilen doz 14 gün süreyle i.v. yoldan günde bir kez 15 mg/kg'dir. Yükleme dozu gerekmez. Daha az şiddetli enfeksiyonlar için i.v. veya

i.m. yoldan 14 güne kadar günde bir kez 8 mg/kg dir. Maksimum günlük doz 1.5 g dir. Pseudomonas enfeksiyonlarında başka bir antibiyotikle birlikte kullanılması gerekebilir. Gününde doğmuş 16 günlük veya daha daha küçük bebeklerde önerilen doz i.v. enfüzyonla 30 dakikada veya i.m yolla günde bir kez 7.5 mg/kg dir. 16 günden büyük bebeklerde ve çocuklarda günde bir kez 15 mg/kg veya 2x75 mg/kg dir. Renal fonksiyonu normal olan yaşlı hastalarda doz ayarı gerekmez. Renal fonksiyon yetmezliği olanlarda doz ayarlanmalıdır[157].

Myastenia graviste kontrendikedir. Oluşabilecek ototoksisite ve nefrotoksisite bakımından hastalar tedavi dönemlerinde kontrol altında tutulmalıdır. Nefrotoksisite ve ototoksisite riski renal yetmezliği olan hastalarda, yüksek dozlar ile veya uzun süre tedavi gören hastalar ile yaşlı hastalarda daha fazladır. Parkinson veya infantil botulizm gibi nöromüsküler rahatsızlığı olanlarda adale zayıflığını arttırabilir. Gebelerde kullanılmamalıdır. İsepamisin az miktarda anne sütüne geçer. Asiklovir, amikasin, amfoterisin B.basitrasin, sefaloridin, sisplatin, kolitsin, gentamisin, kanamisin, neomisin, netilmisin, paramomisin, polimiksin B, sisomisin, streptomisin, tobramisin, vankomisin ve vikomisin gibi diğer potansiyel nörotoksik ve/veya nefrotoksik ilaçlarla sistemik veya topikal olarak birlikte ve/veya ardı ardına kullanılmasından kaçınılmalıdır. İsepasin solüsyon içeren ampülün etakrinik asit veya furosemid gibi diüretikler ile birlikte kullanılmasından kaçınılmalıdır. Çünkü bu ilaçlarda ototoksisiteye neden olabilir. Bunun yanında i.v. olarak kullanıldıklarında diüretikler antibiyotiğin serum ve dokudaki konsantrasyonunu değiştirmek suretiyle aminoglikozid toksisitesini arttırabilirler. Flebit, anormal böbrek fonksiyonu, poliüri, eritematöz döküntü, yüzde kızarıklık, ürtiker, gastrointestinal kanama, mide ağrısı, ateş, terlemede artış, baş ağrısı, vertigo, lökopeni, agranilositoz, bilirubinemi ve anaflaktik şok gibi yan etkiler görülebilir[157].

17. Levofloksasin (Cravit): Antibakteriyel etkilidir. Tablet akut sinüzit, kronik bronşitin akut alevlenmesi, toplumdan kazanılmış pnömoni, piyelonefrit dahil komplikasyonlu üriner sistem enfeksiyonları, deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarının tedavisinde endikedir[157].

Tablet; Akut sinüzitte günde tek doz 500 mg, 10-14 gün boyunca kullanılır. Kronik bronşitin akut alevlenmesinde günde tek doz 250-500 mg, 7-10 gün boyunca kullanılır. Toplumdan kazanılmış pnömonide günde tek doz ve ya iki kez 500 mg 7-14 gün boyunca kullanılır. Pyelonefrit dahil komplikasyonlu üriner sistem enfeksiyonlarında günde tek doz 250 mg 7-10 gün boyunca kullanılır. Deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarında günde tek doz 250 mg veya tek doz iki kez 500 mg 7-14 gün boyunca kullanılır. Enfüzyon çözeltisi toplumdan kazanılmış pnömonide günde tek doz veya 2 kez 500 mg' dir. Pyelonefrit dahil komplikasyonlu üriner sistem enfeksiyonlarında günde tek doz 250 mg' dir. Deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarında günde 2 kez 500 mg kullanılır[157].

Epilepsisi olan hastalarda, pediatrik yaş grubunda veya ergenlik dönemindeki çocuklarda gebelikte ve süt veren annelerde kontrendikedir. Şiddetli pnömokokal pnömonide levofloksasin en uygun tedavi olmayabilir. P.aeruginosa'nın etken olduğu nozokomiyal enfeksiyonlarda başka antibiyotiklerle kombinasyon gerekebilir. Psödomembranöz kolitten kuşku duyulduğunda levofloksasin tedavisi hemen kesilmeli ve gecikmeden uygun tedaviye başlanmalıdır. Tendinit yönünden predispozisyon bulunan hastalarda, konvülziyona eğilimi olan hastalarda, G6PD aktivitesi eksikliği bulunan hastalarda dikkatle kullanılmalıdır. Şiddetli güneş ışığı veya yapay UV ışınlarına maruz kalmaktan kaçınılmalıdır. Demir tuzları, magnezyum veya aliminyum içeren antasidler, sukralfat, levofloksasin emilimini azaltır. Alerjik reaksiyonlar, pruritus, döküntü, ürtiker, bronkospazm, Stevens Johnson Sendromu, toksik epidermal

nekroliz ve eksüdatif eritema multiforme, bulantı, diyare, iştahsızlık, kusma, karın ağrısı ve baş ağrısı gibi yan etkiler görülebilir. Enfüzyon çözeltisi;100 ml.lik 1 enfüzyo flakonluk ambalajlarda bulunmaktadır. Eşdeğeri Cravit 500 mg/7 film tablet ve 500 mg/1 flakon'dir[157].

18. Seftazidim Pentahidrat (Fortum): Üçüncü kuşak sefalosporindir. Gerek gram-pozitif, gerekse gram-negatif bakterilerin ürettikleri plazmid- veya kromozom-aracılı beta-laktamazların çoğuna karşı çok dayanıklı bir sefalosporindir. Bu özelliği nedeniyle diğer sefalosporinlere, ampisiline veya aminoglikozidlere rezistan olan gram-negatif enterik bakterilerin yaptığı infeksiyonlarda etkilidir. Antipsödomonal etki gücü en yüksek olan sefalosporinlerden biridir[158].

0.5 g i.m./i.v.,1g im/iv,2g iv ambalajlarında bulunur. Antibakteriyel etkilidir. Duyarlı mikroorganizmaların neden olduğu safra yolu, kemik, santral sinir sistemi, ürogenital sistem, intraabdominal, septisemi, deri ve yumuşak doku ve solunum sistemi enfeksiyonlarında endikedir[158].

Günlük doz erişkinler için 2-3x0.5-2 g ve çocuklar için 2-3x30-100 mg/kg'dir. Enjeksiyonlar i.m veya i.v olarak gerçekleştirilebilir[158].

Penisilinlere ve sefalosporinlere duyarlı olan hastalarda kontrendikedir. Süper enfeksiyona karşı dikkatli olunmalıdır. Aminoglikozidler, polimiksin-B, kolitsin ve furosemidle birlikte kullanıldığında nefrotoksisite artmaktadır. Coombs testinin yanlış pozitif sonuç vermesine ve SGPT ile SGOT değerlerinin yükselmesine neden olabilir. Alerjik reaksiyonlar gastrointestinal şikayetler, baş ağrısı ve ateş gibi yan etkiler görülebilir[158].

3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmalarımızda kullanılan standart serum albumin, N,N,N',N'-tetrametil etilen diamin (TEMED), diyaliz torbaları, $NADP^+$ (Na tuzu), 6-Fosfoglukonat (monosodyum tuzu), etilendiamintetraasetikasit (EDTA) Sigma chemical Comp.'den, triklor asetik asit, sodyum hidroksit, trihidroksimetilaminometan (Tris), amonyum sülfat, sodyum klorür, sodyum asetat, hidroklorik asit, glisin, fosforik asit, sodyum klorür, sodyum azotür, gliserin, sodyum fosfat, potasyum fosfat, potasyum bi fosfat, potasyum asetat, potasyum klorür, metanol, asetik asit, sodyum asetat, izopropanol E.Merck AG'den, Akrilamid, N,N'-metilen bisakrilamid, coomassie blue G-250, brom timol mavisi, sodyum dodesil sülfat (SDS), agar, amonyum per sülfat, β-merkaptoetanol, Sephadex G-200, 2,'5'ADP-Sepharose 4 B Pharmacia'dan, çalışmada kullanılan ilaçlar ise piyasadan temin edildi.

3.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar

Çalışmalar esnasında aşağıdaki alet ve cihazlardan faydalanılmıştır.

Santrifüj : MSE Mistral 2000

Santrifüj : IEC Clinical Centrifuge USA

Soğutmalı Santrifüj : Heraeus Sepatech

Soğutmalı santrifüj : Hermle 2383 K (Germany)

Spektrofotometre : Shimadzu UV-VIS 1208 (Japan)

Spektrofotometre : Beckman DU 530 UV-VIS (Life science)

pH metre : Scott Labstar (USA)

Elektroforez tankı : BIO RAD (dikey)

Fraksiyon toplayıcısı : Fration Collector, Fractomat Y-3

Peristaltik pompa : Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala (İsveç)

Karıştırıcı (shaker) : GFL 3025

Karıştırıcı (Vortex) : Genie K-55

Hassas terazi : Gec Avery (USA)

Afinite kolonu : Kapalı sistem oluşturucu ve soğutmalı (1x10), sigma (ABD)

Kronometre : Hanhard, Electronische Digital-Stoppurh

Otomotik pipetler : Fischer

Çalkalayıcı : GFL

Magnetik karıştırıcı : Chiltren Hotplate Magnetic Stirrer HSBI

Saf su cihazı : Barnstead EASY Pure UV/UF

Su banyosu : Clifton

Kar makinesı : Angelantoni Industrie

Liyofilizatör : Sinijders

Güç kaynağı : 1-Bio Rad Power Pac 3000

: 2-Apparatus Corporation EC 135

Buz dolapları : Philco ve Arçelik

Derin dondurucu (-20C'ye kadar): White-Westinghouse (USA)

Derin dondurucu (-85C'ye kadar) : Sanyo Ultra Low

Bilgisayarlı Görüntüleme Sistemi: Bio Rad Gel Doc 2000

3.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

Araştırma süresince çözeltileri hazırlamak amacıyla saf su ve deiyonize su kullanıldı. Çözeltilerin kullanılış yerleri ve hazırlanış şekilleri aşağıdaki gibidir.

1. 1M Tris-HCI/ 5mM EDTA (pH=8) (Enzim aktivitesi ölçümünde kullanılan tampon): 6.05 g (0.05 mol) Tris ve 0.0605 g EDTA ($2.5x10^{-4}$ mol) alınarak bir miktar destile suda çözüldü. pH'ı HCI ile 8'e ayarlandı. Daha sonra toplam hacim destile su ile 50 ml'ye tamamlandı.

2. 0.1 M $MgCl_2$ (Enzim aktivite ölçümünde kullanılan aktivatör çözeltisi): 0.475 g ($5x10^{-3}$ mol) alınıp bir miktar suda çözüldü. Hacmi destile su ile 50 ml'ye tamamlandı.

3. 2 mM $NADP^+$ (Enzimin aktivite ölçümünde kullanılan çözelti): 0.0765 g $NADP^+$ ($1x10^{-4}$ mol) alınıp bir miktar suda çözüldü. Hacmi destile su ile 50 ml'ye tamamlandı.

4. 6 mM 6PG (Enzimin aktivite ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi): 0.091 g 6PG ($3x10^{-4}$ mol) alınıp bir miktar suda çözüldü. Hacmi destile su ile 50 ml.'ye tamamlandı.

5. 0.16 M KCI (Kanın yıkanması için kullanılan çözelti): 1.192 g KCI (0.016 mol) alınıp çözüldü. Hacmi destile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

6. 50 m M KH_2PO_4 (pH=7) (Amonyum sülfat çökeltisinin çözünmesi için kullanılan tampon): 0.68 g KH_2PO_4 ($5x10^{-3}$ mol) alınıp 80 ml distile suda çözündü. pH'ı NaOH ile 7'ye ayarlandı. Daha sonra toplam hacim destile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

7. 50 m M K-asetat/50 mM K-fosfat (pH=6) (Çözünmüş amonyum sülfat çökeleğinin diyalizi için kullanılan tampon): 4.9 g K-asetat ($5x10^{-2}$ mol), 6.8 g K-fosfat ($5x10^{-2}$ mol) karışımının hacmi distile su ile 800 ml'ye çıkarılıp pH'sı 6'ya ayarlandıktan sonra toplam hacim destile su ile 1 lt'ye tamamlandı.

8. 0.1M K-asetat/ 0.1M K-fosfat (pH=6) (Afinite kolonunun dengelenme ve yıkanması için kullanılan tampon): 9.8 g K-asetat (0.1 mol) ve 13.6 g K-fosfat (0.1 mol) karışımı

800 ml destile suda çözüldü. pH=6'ya ayarlandıktan sonra toplam hacim destile su ile 1 lt'ye tamamlandı.

9. 0.1 M K-asetat/ 0.1 M K-fosfat (pH=7.85) (Numuneyi tatbik ettikten sonra afinite kolonunun yıkanması için kullanılan tampon): 9.8 g K-asetat (0.1 mol) ve 13.6 g K-fosfat (0.1 mol) karışımı 800 ml destile suda çözüldü. pH=7.85'e ayarlandıktan sonra toplam hacim destile su ile 1 lt'ye tamamlandı.

10. 0.1 M K-fosfat/ 0.1 M KCI (pH=7.85) (Numuneyi tatbik ettikten sonra afinite kolonunun yıkanması için kullanılan tampon): 13.6 g K-fosfat (0.1 mol) ve 7.45 g (0.1 mol) KCI karıştırılarak hacim destile su ile 800 ml'ye tamamlandı. pH=7.85'e ayarlandıktan sonra toplam hacim destile su ile 1 lt'ye tamamlandı.

11. 8 0 mM K-fosfat + 80 mM KCI + 5 mM $NADP^+$ + 10 mM EDTA (pH=7.85) (Afinite jeline tutunmuş olan 6-fosfoglukonat dehidrogenazın elüsyon tamponu): 5.44 g K-fosfat ($4x10^{-2}$mol), 2.98 g KCI ($4x10^{-2}$ mol), 1.913 g $NADP^+$ ($2x5.10^{-3}$ mol) ve 1.21 g EDTA ($5x10^{-3}$ mol) karıştırıldı. Bir miktar suda çözüldü. pH=7.85'e ayarlandıktan sonra toplam hacim destile su ile 500 ml'e tamamlandı.

12. % 0.02' lik NaN_3 çözeltisi (Kromotografi kolon materyallerinin bakterilerden korunması için kullanılan çözelti): 20 mg NaN_3 alınarak çözüldü ve hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

13. 0.1M Na-asetat/ 0.5 M NaCI (pH=4.5) (Afinite kolonunun rejenerasyonu için kullanılan tampon): 4.1 g Na-asetat (0.05 mol) ve 14.61 g NaCI (0.25 mol) alınıp suda çözüldü, pH=4.5'e ayarlandı. Daha sonra toplam hacim destile su ile 500 ml'ye tamamlandı.

14. 0.1 M Tris+ 0.5 M NaCI (pH=8.5) (Afinite kolonunun rejenerasyonu için hazırlanan çözelti): 6.05 g Tris (0.05 mol) ve 14.61 g NaCI (0.25 mol) alınarak bir miktar suda

çözüldü pH=8.5'e ayarlandı. Daha sonra toplam hacim destile su ile 500 ml'ye tamamlandı.

15. 0.1 M / 0.1M K-fosfat (pH=6.5) (Jel filtrasyon kolonunda kullanılan tampon): 9.8 g K-asetat (0.1 mol) 13.6 k-fosfat (0.1) mol karışımı 800 ml destile suda çözüldü. pH=6.5'e ayarlandıktan sonra toplam hacim destile su ile 1 lt'ye tamamlandı.

16. 1M Tris-HCI (pH=8.8): 12.11 g Tris (0.1 mol) tartılarak 80 ml suda çözüldü. pH=8.8'e ayarlandıktan sonra toplam hacim destile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

17. 1M Tris-HCI (pH=6.8): 12.11 g Tris (0.1 mol) tartılarak 80 ml suda çözüldü, pH=6.8'e ayarlandıktan sonra toplam hacim destile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

18. % 30 Akrilamid-% 0.8 bisakrilamid çözeltisi: 15 g Akrilamid, 0.4 g bisakrilamid ve 34.6 g su karıştırılarak çözüldü.

19. % 10'luk amonyum persülfat çözeltisi: 1 g Amonyum persülfat çözülerek su ile 10 ml'ye tamamlandı.

20. % 10 SDS çözeltisi: 1 g SDS, 9 g suda çözülerek elde edildi.

21. Yürütme Tamponu: 1.51 g Tris (12.5 mmol) ve 7.51 g glisin (0.1 mol) tartılarak 450 ml suda çözüldü. % 10'luk SDS'den 5 ml ilave edildi. pH=8.3'e ayarlandı ve toplam hacim 500 ml'ye tamamlandı.

22. Numune tamponu: 1 M Tris-HCI (pH=8)'den 0.5 ml , % 10'luk SDS'den 1 ml, % 100'lük gliserinden 1 ml ve % 0.1'lik bromtimol mavisinden 1ml alınarak saf su ile 10 ml'ye tamamlandı. Bu tampona kullanılmadan önce 950 µl numune tamponunda 50µl olacak şekilde β-merkaptoetanol ilave edildi.

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

24. Boyama Çözeltisi (Jelin boyanması için kullanılan çözelti): 0.1 g Coomassie blue R-250 alınarak, 50 ml metanol, 10ml asetik asit ve 40 ml su içerisinde çözülerek hazırlandı.

25. Yıkama çözeltisi (Jelin yıkanması için kullanılan çözelti): 50 ml metanol, 10 ml asetik asit ve 40 ml su karıştırılarak elde edildi.

26. Antikaogulant çözelti: 26.3 g Na-sitrat (dihidrat) (115.35 mmol), 3 g sitrik asit (15.62 mmol), 31.9 glukoz (monohidrat) (177 mmol), 2.2 g $NaH_2PO_4H_2O$ (15.94 mmol) ve 0.35 g Adenin (2.6 mmol) tartılarak suda çözüldü ve 1 lt'ye tamamlandı.

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

28. % 0.04'lük brom timol mavisi çözeltisi: 0.1 g indikatör, 0.01 M 16 ml NaOH içerisinde çözündü ve toplam hacim saf su ile 250 ml'e tamamlandı.

29. Drabkin çözeltisi: 0.198 g $K_3Fe(CN)_6$, 0.052 g KCN, 1.0 g $NaHCO_3$ tartılarak bir miktar suda çözündü ve hacmi destile su ile 1 lt'ye tamamlandı.

İlaç ve Kimyasal Maddelerin Stok Çözeltileri

1. Ampisilin: 1 g ampisilin'in 9 ml steril suda çözülmesiyle elde edildi (318 mM).

2. Penisilin G: 625 mg penisiline eşdeğer penisilin G potasyumun 2 ml steril suda çözülmesiyle elde edildi (838.9 mM).

3. Sefotaksim sodyum: 1000 mg sefotaksime eşdeğer sefotaksim sodyum 4 ml steril suda çözüldü (523.65 mM).

4. Sefepim: 1000 mg sefepime eşdeğer sefepim hidroklorür 10 ml steril suda çözüldü (208 mM).

5. Tiamfenikol: 750 mg tiamfenikol'ün 5 ml steril suda çözülmesiyle elde edildi (421 mM).

6. Sefazolin sodyum: 1000 mg sefazolin'e eşdeğer sefazolin sodyum 10 ml steril suda çözüldü (220 mM).

7. Gentamisin sülfat: 80 mg gentamisine eşdeğer gentamisin sülfat 2 ml steril suda çözüldü (83 mM).

8. Streptomisin sülfat: 1000 mg streptomisin'e eşdeğer streptomisin sülfat 9 ml steril suda çözüldü (76 mM).

9. Netilmisin sülfat: 50 mg netilmisin'e eşdeğer netilmisin sülfat 2 ml steril suda çözüldü (34.56 mM).

10. Teikoplanin: 200 mg teikoplanin 3 ml steril suda çözüldü (361 mM).

11. Siprofloksasin: 100 mg siprofloksasin'e eşdeğer 127 mg siprofloksasin laktat 50 ml steril suda çözüldü (6 mM).

12. Ofloksasin: 200 mg ofloksasin'e eşdeğer ofloksasin hidroklorür 100 ml steril suda çözüldü (5.5 mM).

13. Meropenem: 1000 g meropenem 50 ml steril suda çözüldü (52 mM).

14. Amikasin sülfat : 500 mg amikasin sülfat 2 ml çözücüsünde çözüldü (426.9 mM).

15. İsepamisin sülfat: 500 mg isepamisin sülfat 2 ml çözücüsünde çözüldü (438 mM).

16. Kloramfenikol : 1 g kloramfenikol 6 ml çözücüsünde çözüldü (515 mM).

17. Seftazidim: 1 g seftazidim 10 ml çözücüsünde çözüldü (155 mM).

18. Seftriakson: 1g seftriakson 10 ml çözücüsünde çözüldü (151 mM).

3.4. Yöntemler

3.4.1.İnsan Kanından 6-Fosfoglukonat Dehidrogenaz Enziminin Saflaştırılması

3.4.1.a. Kan Numunelerinin Alınması ve Hemolizat Hazırlanması

Deneyler için sağlıklı insan kanı, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi kan merkezinden taze olarak temin edildi. Antikoagulant çözelti içeren kan torbalarına alınan kanlar, buz içerisine yerleştirilerek laboratuvara getirildi ve hemen çalışıldı.

Eritrositleri ayırmak için alınan taze kanlar 10 ml'lik 4 adet santrifüj tüpüne konuldu ve 15 dakika 2500xg'de santifuj edildi. Santrifüj cihazından çıkarılan tüplerin üst kısmında kalan plazma ve lökosit tabakaları damlalıkla dikkatli bir şekilde alındı. Daha sonra tüplerin altında kalan eritrosit peleti 0.16 M KCI çözeltisi ile üç defa yıkandı. Her defasında 2500xg'de 15 dakika santrifüj edilerek süpernatant bir damlalık vasıtasıyla atıldı. Elde edilen eritrositler hacimlerinin beş katı kadar buzlu su ile hemoliz edildi.

Bundan sonra hemolizat içerisinde bulunan eritrosit hücre zarlarını uzaklaştırmak için + 4 ^{0}C 'de 10.000g'de 30 dakika santrifüj yapıldı. Sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere üst kısımdaki hemolizat bir damlalıkla dikkatli bir şekilde alındıktan sonra çökelen kısım atıldı. Böylece hemolizat hazırlanmış oldu[4,159,160]. Elde edilen bu hemolizatta enzim aktivitesi, aktivite tayin metodu bölümünde anlatıldığı şekilde hesaplandı. Ayrıca bölüm 3.4.2.a'da anlatıldığı gibi hemolizatta protein tayini yapıldı.

3.4.1.b. Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Diyaliz

Çok değerlikli elektrolitler olan proteinler iyonlara benzer şekilde hareket ederler. Protein moleküllerini çevreleyen ve çözünür halde tutan su molekülleri yüksek tuz konsantrasyonlarında, tuzdaki iyonlar tarafından çekilir ve proteinler çöker (salting out). İyonik şiddet ve molekül ağırlığı bu çökmede etkilidir. Dolayısıyla değişik tuz konsantrasyonlarında değişik proteinler çöker[1,14]. Amonyum sülfat çöktürmesi deneyleri proteinlerin bu özelliklerinden faydalanılarak yapıldı.

Bu yöntemde kan numunesi için hazırlanan hemolizatta sırasıyla % 0-20, % 20-30, %30-35, % 35-40, %40-50, %50-60, %60-65, %65-70 aralıklarında amonyum sülfat çöktürmeleri yapıldı. Her defasında çökeltide ve supernatantta bölüm 3.4.3'de belirtildiği şekilde aktivitelere bakıldı. Aradığımız enzimin % 35-65 arası amonyum sülfat çökeltisinde olduğu tespit edildi. Bütün bu işlemler +4°C' de gerçekleştirildi. Çöktürme işlemleri sırasında kullanılan katı amonyum sülfat, hemolizata yavaş yavaş katılarak manyetik karıştırıcı üzerinde bar ile iyice çözünmesi sağlandı. Her defasında daha önce katılan $(NH_4)_2SO_4$'ın çözünmüş olmasına dikkat edildi. Bu işlem buz dolu kap içerisinde (+4°C'de) ve bir saatte gerçekleştirildi.

Çöktürme işlemlerinde kullanılan katı amonyum sülfat miktarları aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$g\ (NH_4)_2SO_4 = \frac{1.77 x V x (S_2 - S_1)}{3.54 - S_2}$$

V=Hemolizat hacmi

S_1=1' in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu

S_2=1' in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğu

Çözünme işlemi tamamlandıktan sonra hemolizat santrifüj tüplerine konularak 5000xg' de 15 dakika santrifüj edildi. Elde edilen çökeltiler yeteri kadar 50 mM fosfat tamponunda (pH=7) çözüldü.

Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen karışım diyaliz torbasına konularak 50mM K-asetat/ 50mM K-fosfat (pH=7) tamponuna karşı 2 saat süreyle, 2 defa değiştirilerek diyaliz edildi[159]. Diyaliz işlemi magnetik karıştırıcı üzerinde buz dolabı içinde +4°C'de gerçekleştirildi. Diyaliz işlemi bittikten sonra aktivite tayin metodunda anlatıldığı şekilde aktivitelere bakıldı. Ayrıca bölüm 3.4.2.a'da izah edildiği gibi protein tayini yapıldı.

3.4.1.c. Afinite Jelinin Hazırlanması

10 ml lik yatak hacmi için 2 g kuru 2', 5' ADP Sepharose 4B jeli tartıldı ve 400ml destile su ile katkı maddelerin uzaklaştırılması için birkaç defa yıkandı. Yıkama esnasında jel şişti. Şişmiş jelin havası su trombu kullanılarak, vakum ile alındıktan sonra 0.1M K-asetat/ 0.1M K-fosfat (pH=6) dengeleme tamponu kolona konularak jel süspanse edildi. Süspanse edilmiş jel (1x10) cm'lik kapalı sistemden oluşturucu soğutmalı kolona paketlendi. Jel çöktükten sonra peristaltik pompa kullanılarak yıkama ve dengeleme tamponuyla yıkandı. Kolonun yıkanması ve dengelenmesi işlemlerinde 0.1M K-asetat/ 0.1M K-fosfat (pH=6) tamponu kullanıldı. Kolonun dengelenmiş olduğu hem elüat ile tamponun 280 nm' deki absorbanslarının ve hem de pH'larının eşitlenmesinden anlaşıldı. Yıkamada ve dengelemede peristaltik pompanın akış hızı 50 ml/saat olarak ayarlandı[159,161]. Böylece afinite kolonu hazırlanmış oldu.

3.4.1.d. Numunenin Afinite Kolonuna Uygulanması ve 6PGD Enziminin Elüsyonu

Amonyum sülfat çöktürmesinden elde edilen numune uygun tamponda çözülüp diyaliz edildikten sonra 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonuna uygulandı. Enzim çözeltisinin tümü kolondan geçtikten sonra kan kırmızı rengini tamamen kaybedinceye kadar dengeleme tamponu geçirmeye devam edilerek kolonun yıkanması sağlandı. Sonra kolon sırasıyla 25 ml 0.1 M K-asetat/ 0.1M K-fosfat (pH=6) ve 25 ml 0.1M K-asetat/ 0.1M K-fosfat (pH=7.85) çözeltileriyle yıkandı. Yıkama işlemi spektrofotometrede takip edildi. En son absorbans farkı 0.05 oluncaya kadar ikinci çözeltiyle yıkamaya devam edildi. Dengeleme ve yıkama işlemi yapılırken peristaltik pompanın hızı 50 ml/saat'e ayarlandı. Böylece enzimin büyük bir kısmı jele tutunmuş ve diğer safsızlıklar ise uzaklaştırılmış oldu. Kolon yıkandıktan sonra 80 mM K-fosfat + 80 mM KCI + 5 mM $NADP^+$ + 10 mM EDTA (pH=7.85) çözeltisi kolona uygulanarak enzim elüe edildi. Elüsyonlar fraksiyon toplayıcısı ile 2' şer ml'lik tüplere alındı. Peristaltik pompanın akış hızı 20 ml/saat'e ayarlandı.Tüm işlemler esnasında sıcaklık +4°C' de kontrol altında tutuldu[159,161]. $NADP^+$ absorbansı protein absorbansını maskelediğinden elüatlarda 280 nm'de kalitatif protein tayini yapılamadı. Bu nedenle enzim aktivitesi her fraksiyonda belirlendi ve aktivite gösteren fraksiyonlar birleştirildi (şekil 6). Ayrıca hemolizat, amonyum sülfat çöktürmesi ve enzim çözeltisinde spesifik aktiviteler ayrı ayrı belirlenerek yüzde saflaştırma hesaplandı. Saflaştırılmış olan enzim çözeltisi 500 ml 50 mM K-asetat / 50 mM K-fosfat (pH=7) çözeltisiyle çözelti iki defa değiştirilerek iki saat kadar diyaliz edildi[159,161]. Elde edilen enzim çözeltisi kinetik çalışmalarda kullanılmak üzere derin dondurucuda saklandı.

Bu çalışma sonucu elde edilen enzim örneklerinin saf olup olmadıklarını kontrol etmek amacıyla SDS-PAGE elektroforezi yapıldı. Ancak SDS-PAGE elektroforezi sonucunda birden fazla elektroforez bandı elde edildi. Bu nedenle enzimin saflaştırılmasında kullanılan Afinite kolonunun yeterli olmadığı sonucuna varılarak, ikinci bir kromatografik yöntem olan Jel Filtrasyon Kromotografisi uygulandı.

3.4.1.e. Jel Filtrasyon Kolonunun Hazırlanması ve 6PGD Enziminin Saflaştırılması

Jel filtrasyon kromatografisi yöntemiyle enzim saflaştırılmasının esası molekül büyüklüğüne dayanmaktadır. 20 ml'lik yatak hacmi için 5g Sephadex G-200 tartılarak 200 ml destile su içerisine alındı. 90^0C' de 4 saat bekletilerek şişirildi. Şişirilmiş polimer materyalin (Sephadex G-200) içerisinde bulunan hava kabarcıkları su trombu kullanılarak vakumla alındı. Şişirilmiş ve havası alınmış jel % 10'luk gliserinli pH'ı 6.5 olan 0.1M fosfat tamponuyla dolu kolona içinde hava kabarcığı olmayacak şekilde aktarıldı. Aynı tamponla dengeleme işlemi yapıldı. Kolonun dengelendiğini tespit etmek için üstten ilave edilen tamponla alttan alınan tamponun pH ve 280 nm'de absorbans değerleri aralıklarla ölçüldü. Bu değerler aynı oluncaya kadar dengeleme işlemine devam edilerek kolonun dengelenmesi sağlandı. Kolonun akış hızı 15-20 ml/saate ayarlandı.

Dengelenmiş olan kolona numunelerin uygulanması için kolonun üzerindeki kapalı sistem açıldı. Jelin üzerinde birikmiş olan tampon çözeltisinin emilmesi ve jel seviyesine inmesi için beklendi. Tampon tam jelin üzerine indiği anda afinite kolonundan elüe edilip diyaliz yapılan ve 0.25 ml gliserol ile karıştırılan 5 ml enzim numunesi, jelin üzerine tatbik edildi. Tatbik edilen numunenin emilmesi için beklendi ve üzerine pipetle dikkatli bir şekilde birkaç ml elüsyon tamponu ilave edilerek tekrar

jele emdirildi. Daha sonra kolonun üstü elüsyon tamponuyla doldurularak, daha yüksek seviyede bulunan erlen içindeki elüsyon tamponu ile kolon arasında bağlantı kuruldu. Numune tatbikinden itibaren kolondan elüatlar fraksiyon toplayıcısı yardımıyla 2'er ml olacak şekilde tüplere alındı.

Elüsyon tamponu kör olarak kullanılarak 280 nm'de toplanan elüatların absorbansları ölçüldü. 280 nm'deki absorbans sıfır oluncaya kadar elüsyon almaya devam edildi. Ayrıca 280 nm'de absorbans gösteren tüplerde aktivite ölçümleride yapıldı. 280 nm'de kalitatif ölçüm için alınan absorbans değerleri ve 340 nm'de alınan aktivite değerlerinin tüp sayısına karşı grafikleri çizildi (şekil 7). Bu tüplerde protein ve aktivite değerleri belirlenerek saflaştırma kat sayısı ve verimi hesaplandı. Daha sonra aktivite gösteren tüpler diyaliz yapıldı ve yüksek aktivite gösteren iki tüp birleştirildi. Birleştirilen tüpler elektroforez yapmak için derişikleştirme işlemine tabi tutuldu. Bu amaçla da liyofilizatör cihazı kullanıldı.

Enzim numunesini liyofilize etmek için numune -85 ^{0}C 'de bekletilerek iyice donduruldu. Liyafilizatör cihazı çalıştırılarak basınç ve sıcaklık ayarları sağlandı. Tamamen dondurulmuş olan enzim numunesi hemen çıkarılarak hazır hale getirilmiş olan liyofilizatöre takıldı ve liyofilizasyon işlemi başlatıldı. Enzim numunesinin yaklaşık % 80 oranında suyu uzaklaştırılıncaya kadar liyofilizasyon işlemine devam edildi. Elde edilen derişik insan 6PGD enzim numunesi, saflığını belirlemek amacıyla SDS-PAGE'de yürütüldü ve saf elektroforez bandı elde edildi (şekil8). İlaç ve kimyasal maddelerin etkilerinin araştırılmasında kullanılan enzim numunesi liyofilize edilmeden kullanıldı.

3.4.2. Protein Tayini

3.4.2.a. Kalitatif protein tayini

Kromotografi işlemlerinde kalitatif protein tayini fraksiyon toplayıcısı yardımıyla eşit hacimde alınan tüm fraksiyonlarda yapıldı. Kalitatif protein tayini 280 nm'de proteinlerin yapısında bulunan triptofan, tirozin ve fenilalanin aminoasitlerinin maksimum absorbans göstermesi esasına dayanmaktadır[162]. Fraksiyonlar kuvartz küvetlere alınarak absorbansları spektrofotometrede köre karşı okundu.

Fakat 280 nm'de enzim çözeltisindeki $NADP^+$, proteinlerin absorbansını maskelediği için sonuç alınamadı.

3.4.2.b. Bradford Yöntemiyle Protein Tayini:

Hemolizat, amonyum sülfat çöktürmesi, afinite kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltilerindeki protein miktarları bu yöntemle belirlendi. Bu yöntemde boya olarak kullanılan Coomassie brillant blue G-250 negatif bir yüke sahiptir ve protein üzerindeki pozitif yüke bağlanır. Boyanın kırmızı (λmax=465nm) ve mavi (λmax=595nm) olmak üzere iki formu mevcuttur. Proteinin bağlanması kırmızı formun mavi forma dönüşmesini sağlar. Oluşan kompleks 595 nm'de maksimum absorbans gösterir. Boyanın proteine bağlanması çok hızlı gelişir ve iki dakikada tamamlanır. Renk stabilitesi 2 saatin üzerinde devam edebilir. Bu yöntemin hassasiyet 1-100µgr. arasındadır[163]. Ancak bu yöntem ile protein tayinin yapılabilmesi için standart bir grafiğe ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle 1ml'sinde 1mg protein ihtiva eden standart sığır albümin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µl alındı. Saf su ile bütün tüplerin hacmi 0.1ml'ye tamamlandı ve 5 ml renklendirme reaktifi ilave edilip vorteks ile karıştırıldı. 10 dakika inkübe edildikten sonra 595 nm'de 3 ml'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak

0.1ml enzim numunesinin içinde bulunduğu tampon ve 5 ml renklendirme reaktifinden oluşan karışım kullanıldı. Elde edilen sonuçlardan absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri standart grafik haline getirildi (şekil 5).

Eritrosit hemolizatlarından ve belirtilen saflaştırma basamaklarından elde edilen enzim numunelerinden 0.1'er ml tüplere konularak üzerine 5'er ml coomassie brillant blue G-250 reaktifi ilave edildi. Vorteks ile karıştırıldıktan sonra 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Sonrada 595 nm' de absorbans değerleri okundu. Numuneler paralel çalışıldı ve aritmetik ortalamaları alınarak gerçek değer tespit edildi. Elde edilen bu değerlere göre standart grafikten yararlanılarak protein miktarları hesaplandı.

3.4.3. İnsan 6PGD Enzim Aktivitesinin Ölçümü

6-fosfoglukonat dehidrogenaz enzim aktivesinin belirlenmesi aşağıdaki esasa dayanmaktadır.

$$\text{6-fosfoglukonat} + NADP^{+} \xrightarrow[\text{dehidrogenaz}]{\text{6-fosfoglukonat}} \text{Riboz-5-fosfat} + NADPH$$

Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat 6-fosfoglukonat dehidrogenaz tarafından 6- fosfoglukonat varlığında riboz-5-fosfata indirgenir.

Yukarıdaki reaksiyonda görüldüğü gibi 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enziminin aktivitesini tayin etmek için reaksiyon sonucunda oluşan NADPH göz önüne alınır. Bilindiği gibi NADPH 340 nm'de absorbans verir. Dolayısıyla enzim aktivitesi 37^{0}C'de $NADP^{+}$'nin indirgenmesi sonucu oluşan NADPH'ın spekrofotometrik olarak 340 nm'deki absorbans artışı ile ölçülebilir. NADPH'ın oluşum oranı, 6-fosfoglukonat dehidrogenaz aktivitesine bağımlıdır[4].

6PGD aktivitesi ölçümü aşağıdaki tabloya göre yapıldı. Tabloda belirtilen çözeltiler küvetlere konduktan sonra 37 °C'de 10 dakika inkübe edildi. Sonra küvet spektrofotometreye yerleştirildi ve kontrole karşı aktivite değerleri okundu. Başlangıçta ve dakikada bir olmak üzere beş dakika boyunca 340 nm'deki absorbans değerleri kaydedildi.

Tablo1. İnsan eritrosit 6PGD enziminin aktivite ölçüm küvet içeriği

	Kontrol küveti	Numune küveti
Stok aktivite çözeltileri	Hacim (µl)	Hacim (µl)
1 M Tris-HCI, 5 mM EDTA (pH:8)	100	100
0.1 M Mg_2CI	100	100
2 mM $NADP^+$	100	100
Saf Su	650	550
Enzim örneği	50	50
10 dakika inkübasyon		
6-PG	-	100

Enzim ünitesi hesaplanırken aşağıdaki formül kullanıldı.

$$EU \ / \ ml \ = \frac{\Delta \ OD \ / \ dk}{6,22} \times \frac{V_T}{V_E} \times S_F$$

Formülde yer alan simgeler aşağıda açıklanmıştır.

EU/ml : 1 ml. deki enzim ünitesi

ΔOD : Bir dakikadaki absorbans değişimi

6,22 : 1mM NADPH'ın 340 nm'de oluşturduğu absorbans değeri (ekstinksiyon katsayısı)

V_T : Ölçümün yapıldığı toplam küvet hacmi

V_E : Ölçümün yapıldığı küvete konulan enzim numunesinin hacmi

S_F : Seyretme faktörü (seyreltilen örnekler için kullanılır)

Hemolizatda ve amonyum sülfat çökeleğinde aktivite ölçümü yapılırken genellikle 1/10 oranında seyreltildi. Afinite ya da jel filtrasyon kromatograftisi sonucu elde edilen elüsyonlarda yapılırken seyreltilmeden kullanıldı.

3.4.4. Sodyum Dodesil Sülfat – Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile Enzim Saflığının Kontrolü

Enzim saflaştırıldıktan sonra Laemmli metoduna göre %3-8 kesikli sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi[164].

Bunun için elektroforez plakaları önce su ile sonra da alkol ile iyice yıkandı. Her iki kenarında aralık oluşturucu bir plaka ile düz bir plaka üst üste getirilerek kıskaçlarla tutturuldu. Sabitleştirilen plakalar, içerisinde sızdırmayı önleyen sünger ihtiva eden jel hazırlama kabinine konuldu. Önce ayırma jeli hazırlandı ve bir enjektörle plakaların arasına üst kesimde 0.5 cm kalıncaya kadar dolduruldu. Hava olmamasına dikkat edildi. Bu jelin donması beklenirken üzerine ince bir n-bütanol tabası dökülerek jelin üstünün pürüzsüz olması sağlandı. Ayırma jelinin tamamen katılaşması için 2 saat beklendi. Bu süre sonunda alkol tabakası döküldü ve jelin üst kısmı saf su ile iyice yıkandı.

Daha sonra yığma jeli hazırlandı ve üst yüzeye kadar ilave edildi. Sonrada numune kuyucuklarının oluşması için üzerine tarak dikkatlice yerleştirildi. Yığma jelinin katılaşması beklenirken, ıslatılmış süzgeç kağıdı sistemin üzerine kapatıldı ve kuruması önlendi. Yığma jeli katılaştıktan sonra tarak dikkatli bir şekilde çıkartılarak numune kuyuları belirlendi. Jelin üstü önce saf su, sonra da yürütme tamponu ile yıkandı ve jel plakalarla birlikte elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroferoz tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konuldu. Enzim numuneleri her birinde 10 µgr protein olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim 50 µl olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu konuldu. Üç dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi. Sonra numuneler soğutularak çok ince bir enjektör ile jeldeki kuyulara enjekte edildi. Elektroforez tankı kapatılarak, alt taraftan (+) anot, üst taraftan ise (-) katot yerleştirildi. Önce 40 voltta 20 dakika yürütüldü ve örnekler ayırma jeline kadar gelip yığıldı. Sonrada akım 80 volta çıkartılarak numunelerin jelin alt sınırına gelmesine kadar yürütüldü. Numunelerin takip edilmesi, numune tamponuna katılan brom timol mavisi yardımıyla anlaşıldı. Yürütme işlemi bittikten sonra, akım kesilerek plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkartıldı ve sabitleştirme çözeltisine konuldu. Sabitleştirme çözeltisinde 20 dakika bekletilen jel, çıkarılarak boyama çözeltisine konuldu ve çalkalayıcı üzerinde 2 saat bekletildi. Jel boyandıktan sonra çıkarılarak yıkama çözeltisine konuldu. Rengi açılıp, protein bantları belirginleşinceye kadar, çalkalayıcı üzerindeki yıkama çözeltisinde yıkanan jel çıkarılarak fotoğrafı çekildi.

Yıkama çözeltisi, aktif karbon üzerinden geçirilerek sabitleştirme ve boyama çözeltileri ise herhangi bir işleme tabi tutulmadan defalarca kullanıldı.

Ayırma jeli şöyle hazırlandı: 3.75 ml 1M Tris HCI (pH=8.8), 3.3 ml % 30 Akrilamid - % 0.8 bisakrilamid, 0.15 ml % 10 'luk SDS, 0.1 ml % 5'lik TEMED, 0.2ml % 1.5 ml'lik PER ve 2.35 ml saf su karıştırıldı.

Yığma jeli şöyle hazırlandı: 0.31ml , 1M Tris-HCI (pH=6.8), 0.3325 ml % 30'luk Akrilamid-% 0.8 bisakrilamid, 0.025 % 10'luk SDS, 0.025 ml % 5'lik TEMED, 0.05 ml %1.5'lik PER ve 1.84 ml saf su karıştırıldı. PER çözeltisi kullanılmadan önce taze olarak hazırlandı.

3.4.5. İnsan 6PGD Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı İlaç Etkilerinin Belirlenmesi

İnsan 6PGD enzim aktivitesi üzerine bazı ilaçların ve kimyasalların etkilerini belirlemek amacıyla küvet ortamına değişik konsantrasyonlarda ilaç veya kimyasal katılarak aktivite değerleri okundu. İlaçların inhibisyon etkisi gösterip göstermedikleri mümkün olan en yüksek inhibitör konsantrasyonunda bir ön deneyle araştırıldı. Kullanılan ilaç veya kimyasalın farklı konsantrasyonlarını oluşturmak için stok çözeltiler seyreltildi. Kullanılan stok çözelti hacmi gereken derişimi sağlamadığı zaman küvete katılan su hacmi azaltılarak stok çözelti hacmi yükseltildi. Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltilerin miktarları ve buna göre küvetteki inhibitör konsantrasyonları, çalışmada kullanılan bütün ilaçlar için ayrı ayrı olmak üzere aşağıdaki tablolarda gösterilmiştir.

Tablo 2. İnsan eritrosit 6PGD enzimi için netilmisin ilacı ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları.

Safsu (µl)	Tris-HCl (1M) EDTA (5mM) (pH=8) (µl)	$MgCl_2$ (0.1M) (µl)	$NADP^+$ (2mM) (µl)	Enzim Hacmi (µl)	6PG (6mM) (µl)	Toplam Hacim (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)
550	100	100	100	50	100	1000	-	-
500	100	100	100	50	100	1000	50	3.47
475	100	100	100	50	100	1000	75	5.205
450	100	100	100	50	100	1000	100	6.94
350	100	100	100	50	100	1000	200	13.88
250	100	100	100	50	100	1000	300	20.2

Tablo 3. İnsan eritrosit 6PGD enzimi için amikasin ilacı ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Safsu (µl)	Tris-HCl (1M) EDTA (5mM) (pH=8) (µl)	$MgCl_2$ (0.1M) (µl)	$NADP^+$ (2mM) (µl)	Enzim Hacmi (µl)	6PG (6mM) (µl)	Toplam Hacim (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)
550	100	100	100	50	100	1000	-	-
540	100	100	100	50	100	1000	10	4.26
530	100	100	100	50	100	1000	20	5.68
525	100	100	100	50	100	1000	25	7.1
520	100	100	100	50	100	1000	30	10.65
510	100	100	100	50	100	1000	40	14.2

Tablo 4. İnsan eritrosit 6PGD enzimi için isepamisin ilacı ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Safsu (µl)	Tris-HCI (1M) EDTA (5mM) (pH=8) (µl)	$MgCl_2$ (0.1M) (µl)	$NADP^+$ (2mM) (µl)	Enzim Hacmi (µl)	6PG (6mM) (µl)	Toplam Hacim (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)
550	100	100	100	50	100	1000	-	-
500	100	100	100	50	100	1000	50	21.9
450	100	100	100	50	100	1000	100	43.8
350	100	100	100	50	100	1000	200	87.6
225	100	100	100	50	100	1000	325	142.35
150	100	100	100	50	100	1000	400	175.2

Tablo 5. İnsan eritrosit 6PGD enzimi için kloramfenikol ilacı ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Safsu (µl)	Tris-HCI (1M) EDTA (5mM) (pH=8) (µl)	$MgCl_2$ (0.1M) (µl)	$NADP^+$ (2mM) (µl)	Enzim Hacmi (µl)	6PG (6mM) (µl)	Toplam Hacim (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)
550	100	100	100	50	100	1000	-	-
530	100	100	100	50	100	1000	20	10.3
510	100	100	100	50	100	1000	40	20.6
470	100	100	100	50	100	1000	80	41.2
430	100	100	100	50	100	1000	120	61.8
400	100	100	100	50	100	1000	150	77.25

Tablo 6. İnsan eritrosit 6PGD enzimi için seftazidim ilacı ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Safsu (µl)	Tris-HCI (1M) EDTA (5mM) (pH=8) (µl)	$MgCl_2$ (0.1M) (µl)	$NADP^+$ (2mM) (µl)	Enzim Hacmi (µl)	6PG (6mM) (µl)	Toplam Hacim (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)
550	100	100	100	50	100	1000	-	-
530	100	100	100	50	100	1000	20	1.55
520	100	100	100	50	100	1000	30	3.1
510	100	100	100	50	100	1000	40	4.65
500	100	100	100	50	100	1000	50	6.2
480	100	100	100	50	100	1000	70	7.75

Tablo 7. İnsan eritrosit 6PGD enzimi için teikoplanin ilacı ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Safsu (µl)	Tris-HCI (1M) EDTA (5mM) (pH=8) (µl)	$MgCl_2$ (0.1M) (µl)	$NADP^+$ (2mM) (µl)	Enzim Hacmi (µl)	6PG (6mM) (µl)	Toplam Hacim (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)
550	100	100	100	50	100	1000	-	-
520	100	100	100	50	100	1000	30	7.2
500	100	100	100	50	100	1000	50	12
450	100	100	100	50	100	1000	100	24
350	100	100	100	50	100	1000	200	48
250	100	100	100	50	100	1000	300	72
150	100	100	100	50	100	1000	400	96

Tablo 8. İnsan eritrosit 6PGD enzimi için ampisilin ilacı ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Safsu (µl)	Tris-HCI (1M) EDTA (5mM) (pH=8) (µl)	$MgCl_2$ (0.1M) (µl)	$NADP^+$ (2mM) (µl)	Enzim Hacmi (µl)	6PG (6mM) (µl)	Toplam Hacim (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)
550	100	100	100	50	100	1000	-	-
450	100	100	100	50	100	1000	100	31.8
350	100	100	100	50	100	1000	200	63.6
250	100	100	100	50	100	1000	300	95.4
150	100	100	100	50	100	1000	400	127.2
50	100	100	100	50	100	1000	500	159

Tablo 9. İnsan eritrosit 6PGD enzimi için ofloksasin ilacı ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Safsu (µl)	Tris-HCI (1M) EDTA (5mM) (pH=8) (µl)	$MgCl_2$ (0.1M) (µl)	$NADP^+$ (2mM) (µl)	Enzim Hacmi (µl)	6PG (6mM) (µl)	Toplam Hacim (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)
550	100	100	100	50	100	1000	-	-
530	100	100	100	50	100	1000	20	0.11
520	100	100	100	50	100	1000	30	0.165
510	100	100	100	50	100	1000	40	0.22
500	100	100	100	50	100	1000	50	0.275
490	100	100	100	50	100	1000	60	0.33
475	1000	100	100	50	100	1000	75	0.412

Tablo 10. İnsan eritrosit 6PGD enzimi için sefotaksim ilacı ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Safsu (µl)	Tris-HCl (1M) EDTA (5mM) (pH=8) (µl)	$MgCl_2$ (0.1M) (µl)	$NADP^+$ (2mM) (µl)	Enzim Hacmi (µl)	6PG (6mM) (µl)	Toplam Hacim (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)
550	100	100	100	50	100	1000	-	-
520	100	100	100	50	100	1000	30	1.5
500	100	100	100	50	100	1000	50	2.5
450	100	100	100	50	100	1000	100	5
350	100	100	100	50	100	1000	200	10
300	100	100	100	50	100	1000	250	12.5

Tablo 11. İnsan eritrosit 6PGD enzimi için seftriakson ilacı ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Safsu (µl)	Tris-HCl (1M) EDTA (5mM) (pH=8) (µl)	$MgCl_2$ (0.1M) (µl)	$NADP^+$ (2mM) (µl)	Enzim Hacmi (µl)	6PG (6mM) (µl)	Toplam Hacim (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)
550	100	100	100	50	100	1000	-	-
525	100	100	100	50	100	1000	25	3.77
510	100	100	100	50	100	1000	40	6.04
500	100	100	100	50	100	1000	50	7.55
475	100	100	100	50	100	1000	75	11.33
460	100	100	100	50	100	1000	90	13.6
450	1000	100	100	50	100	1000	100	15.1

Tablo 12. İnsan eritrosit 6PGD enzimi için levofloksasin ilacı ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Safsu (µl)	Tris-HCI (1M) EDTA (5mM) (pH=8) (µl)	$MgCl_2$ (0.1M) (µl)	$NADP^+$ (2mM) (µl)	Enzim Hacmi (µl)	6PG (6mM) (µl)	Toplam Hacim (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)
550	100	100	100	50	100	1000	-	-
500	100	100	100	50	100	1000	50	0.7
475	100	100	100	50	100	1000	75	1.05
450	100	100	100	50	100	1000	100	1.4
350	100	100	100	50	100	1000	200	2.1
250	100	100	100	50	100	1000	300	2.8

Tablo 13. İnsan eritrosit 6PGD enzimi için sefepim ilacı ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Safsu (µl)	Tris-HCI (1M) EDTA (5mM) (pH=8) (µl)	$MgCl_2$ (0.1M) (µl)	$NADP^+$ (2mM) (µl)	Enzim Hacmi (µl)	6PG (6mM) (µl)	Toplam Hacim (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)
550	100	100	100	50	100	1000	-	-
520	100	100	100	50	100	1000	30	1.04
500	100	100	100	50	100	1000	50	1.73
450	100	100	100	50	100	1000	100	3.46
350	100	100	100	50	100	1000	200	6.93
250	100	100	100	50	100	1000	300	10.39

Tablo 14. İnsan eritrosit 6PGD enzimi için penisilin G ilacı ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Safsu (µl)	Tris-HCI (1M) EDTA (5mM) (pH=8) (µl)	$MgCl_2$ (0.1M) (µl)	$NADP^+$ (2mM) (µl)	Enzim Hacmi (µl)	6PG (6mM) (µl)	Toplam Hacim (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)
550	100	100	100	50	100	1000	-	-
500	100	100	100	50	100	1000	50	41.94
450	100	100	100	50	100	1000	100	83.89
400	100	100	100	50	100	1000	150	125.8
350	100	100	100	50	100	1000	200	167.78
50	100	100	100	50	100	1000	500	419.45

Tablo 15. İnsan eritrosit 6PGD enzimi için streptomisin ilacı ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Safsu (µl)	Tris-HCI (1M) EDTA (5mM) (pH=8) (µl)	$MgCl_2$ (0.1M) (µl)	$NADP^+$ (2mM) (µl)	Enzim Hacmi (µl)	6PG (6mM) (µl)	Toplam Hacim (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)
550	100	100	100	50	100	1000	-	-
500	100	100	100	50	100	1000	50	3.8
475	100	100	100	50	100	1000	75	5.7
450	100	100	100	50	100	1000	100	7.6
350	100	100	100	50	100	1000	200	15.2
250	100	100	100	50	100	1000	300	22.8

Tablo 16. İnsan eritrosit 6PGD enzimi için gentamisin sülfat ilacı ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Safsu (µl)	Tris-HCI (1M) EDTA (5mM) (pH=8) (µl)	$MgCl_2$ (0.1M) (µl)	$NADP^+$ (2mM) (µl)	Enzim Hacmi (µl)	6PG (6mM) (µl)	Toplam Hacim (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)
550	100	100	100	50	100	1000	-	-
500	100	100	100	50	100	1000	50	4.15
450	100	100	100	50	100	1000	100	8.3
400	100	100	100	50	100	1000	150	12.45
350	100	100	100	50	100	1000	200	16.3
250	100	100	100	50	100	1000	300	24.9
150	100	100	100	50	100	1000	400	33.2

Tablo 17. İnsan eritrosit 6PGD enzimi için siprofloksasin ilacı ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Safsu (µl)	Tris-HCI (1M) EDTA (5mM) (pH=8) (µl)	$MgCl_2$ (0.1M) (µl)	$NADP^+$ (2mM) (µl)	Enzim Hacmi (µl)	6PG (6mM) (µl)	Toplam Hacim (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)
550	100	100	100	50	100	1000	-	-
530	100	100	100	50	100	1000	20	0.12
510	100	100	100	50	100	1000	40	0.24
500	100	100	100	50	100	1000	50	0.3
470	100	100	100	50	100	1000	80	0.48
450	100	100	100	50	100	1000	100	0.6
350	100	100	100	50	100	1000	200	1.2

Tablo 18. İnsan eritrosit 6PGD enzimi için sefazolin sodyum ilacı ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Safsu (µl)	Tris-HCI (1M) EDTA (5mM) (pH=8) (µl)	$MgCl_2$ (0.1M) (µl)	$NADP^+$ (2mM) (µl)	Enzim Hacmi (µl)	6PG (6mM) (µl)	Toplam Hacim (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)
550	100	100	100	50	100	1000	-	-
540	100	100	100	50	100	1000	10	2.2
530	100	100	100	50	100	1000	20	4.4
525	100	100	100	50	100	1000	25	5.5
520	100	100	100	50	100	1000	30	6.6
500	100	100	100	50	100	1000	50	11

Tablo 19. İnsan eritrosit 6PGD enzimi için meropenem ilacı ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Safsu (µl)	Tris-HCI (1M) EDTA (5mM) (pH=8) (µl)	$MgCl_2$ (0.1M) (µl)	$NADP^+$ (2mM) (µl)	Enzim Hacmi (µl)	6PG (6mM) (µl)	Toplam Hacim (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)
550	100	100	100	50	100	1000	-	-
500	100	100	100	50	100	1000	50	2.6
450	100	100	100	50	100	1000	100	5.2
350	100	100	100	50	100	1000	200	10.4
250	100	100	100	50	100	1000	300	15.6
150	100	100	100	50	100	1000	400	20.8
50	100	100	100	50	100	1000	500	26

3.4.6. İnhibitör Etkisi Gösteren ilaçlar İçin I_{50} ve K_i Değerlerinin Belirlenmesine Ait Çalışmalar

İnhibitör çalışmaları ile ilgili bölümde 3.4.5'de anlatıldığı gibi farklı inhibitör konsantrasyonlarında aktivite ölçümü yapılarak inhibitör etkisi gösteren ilaçlar belirlendi. Bu ilaçların % Aktivite-[I] grafikleri çizilerek eğrinin denkleminden I_{50} değerleri hesaplandı (Şekil 9-22).

Bu ilaçlardan sefepim ve netilmisin'in K_i değerlerini belirlemek amacıyla insan eritrositlerinden saflaştırılan 6PGD enzim aktivitesini yarıya düşüren ilaç konsantrasyonu ile bu değerin altında ve üstündeki iki sabit ilaç konsantrasyonlarında uygun 5 substrat konsantrasyonu ile aktivite ölçümleri yapıldı. Çalışmalarda uygun 5 farklı substrat konsantrasyonları substrat stok çözeltileri kullanılarak ön deneme ile belirlendi. Elde edilen değerle her bir inhibitör için Lineweaver Burk grafikleri çizildi. Grafiğin denkleminden yarışmalı inhibisyon için eğime eşit olan K_M/V_{max} $(1+[I]/K_i)$ ifadesinden, yarışmasız inhibisyon için ise $Vmax=V^I_{max}$ $(1+[I]/K_i)$ formülünden yararlanılarak K_i değerleri belirlendi. Sonuçlar tablo 25'de verildi.

İnsan eritrositlerinden saflaştırılan 6PGD enzimi üzerinde çalışılan ilaçların (Sefepim ve netilmisin) K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları aşağıdaki tablolarda verilmiştir.

Tablo 20. İnsan eritrositlerinden saflaştırılan 6PGD enzimi üzerinde sefepim ilacının K_i değerlerinin tesbitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

TrisHCl (1M) EDTA (5mM) (µl)	$MgCl_2$ (0.1M) (µl)	$NADP^+$ (2mM) (µl)	Enzim (µl)	Saf Su (µl)	Substrat Çözeltisi Hacmi (µl)	Küv. Subst. Konst. (mM)	İnhibitör Çözeltisi Hacmi (µl)	Küv. İnh. Konst. (M)	Toplam Hacim (µl)
100	100	100	50	630	20	0.12	-	-	1000
100	100	100	50	610	40	0.24	-	-	1000
100	100	100	50	590	60	0.36	-	-	1000
100	100	100	50	570	80	0.48	-	-	1000
100	100	100	50	550	100	0.6	-	-	1000
100	100	100	50	580	20	0.12	50	1.04	1000
100	100	100	50	560	40	0.24	50	1.04	1000
100	100	100	50	540	60	0.36	50	1.04	1000
100	100	100	50	520	80	0.48	50	1.04	1000
100	100	100	50	500	100	0.6	50	1.04	1000
100	100	100	50	530	20	0.12	100	2.08	1000
100	100	100	50	510	40	0.24	100	2.08	1000
100	100	100	50	490	60	0.36	100	2.08	1000
100	100	100	50	470	80	0.48	100	2.08	1000
100	100	100	50	450	100	0.6	100	2.08	1000
100	100	100	50	480	20	0.12	150	3.12	1000
100	100	100	50	460	40	0.24	150	3.12	1000
100	100	100	50	440	60	0.36	150	3.12	1000
100	100	100	50	420	80	0.48	150	3.12	1000
100	100	100	50	400	100	0.6	150	3.12	1000

Tablo 21. İnsan eritrositlerinden saflaştırılan 6PGD enzimi üzerinde netilmisin ilacının K_i değerlerinin tesbitinde kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

TrisHCl (1M) EDTA (5mM) (µl)	$MgCl_2$ (0.1M) (µl)	$NADP^+$ (2mM) (µl)	Enzim (µl)	Saf Su (µl)	Substrat Çözeltisi Hacmi (µl)	Küv. Subst. Konst. (mM)	İnhibitör Çözeltisi Hacmi (µl)	Küv. İnh. Konst. (M)	Toplam Hacim (µl)
100	100	100	50	640	10	0.06	-	-	1000
100	100	100	50	630	20	0.12	-	-	1000
100	100	100	50	610	40	0.24	-	-	1000
100	100	100	50	590	60	0.36	-	-	1000
100	100	100	50	570	80	0.48	-	-	1000
100	100	100	50	630	10	0.06	10	0.694	1000
100	100	100	50	620	20	0.12	10	0.694	1000
100	100	100	50	600	40	0.24	10	0.694	1000
100	100	100	50	580	60	0.36	10	0.694	1000
100	100	100	50	560	80	0.48	10	0.694	1000
100	100	100	50	610	10	0.06	30	2.082	1000
100	100	100	50	600	20	0.12	30	2.082	1000
100	100	100	50	580	40	0.24	30	2.082	1000
100	100	100	50	560	60	0.36	30	2.082	1000
100	100	100	50	540	80	0.48	30	2.082	1000
100	100	100	50	565	10	0.06	75	5.205	1000
100	100	100	50	555	20	0.12	75	5.205	1000
100	100	100	50	535	40	0.24	75	5.205	1000
100	100	100	50	515	60	0.36	75	5.205	1000
100	100	100	50	495	80	0.48	75	5.205	1000

3.4.7. 6-Fosfoglukonat Dehidrogenaz Enzimi Aktivitesi Üzerine Sefepim ve Netilmisin İlaçlarının in vivo Etkilerinin Araştırılmasına Yönelik Çalışmalar

3.4.7.1. İlaçların deney hayvanlarına uygulanması ve kan numunelerinin hazırlanması

Bu araştırma için Sprague-Dawley türü sıçanlar temin edilerek steril şartlarda yetişkin hale getirilmeleri sağlandı. Ağırlıkları 180-200 gram olan 12 adet sıçan 6'arlı iki gruba ayrıldı ve aynı ortama konuldu. Sıçanlar özel kobay yemi ile beslendi. Yetişkin hale gelen gruplardan kontrol çalışması için 0.5 ml kan alındı ve EDTA'lı tüplere konuldu. Kan alımından sonra bir gruba 15mg/kg netilmisin sülfat, diğer gruba ise 200 mg/kg sefepim ilaçları intramusküler olarak uygulanarak eritrosit 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enzimi üzerindeki etkileri araştırıldı. Her bir gruba sırayla ilaç verildikten 1.saat, 2. saat ve 3. saat sonunda her sıçandan 0.1 ml. kan alınarak numaralanmış tüplere konuldu.

Elde edilen kanlar 2500xg'de santrifüj edilerek tüplerin üst kısmındaki plazma ve lökosit tabakaları uzaklaştırıldı. Sonra 0.16 M KCI çözeltisi ile üç kez yıkandı ve 1/5 oranında soğuk saf su ile hemoliz edildi. Bu çalışmalardaki aktivite değerleri saflaştırma yapılmaksızın hemolizatın 1/10 oranında seyreltilmesiyle elde edilen numunelerde gerçekleştirildi. Aynı numunelerde hemoglobin miktarlarıda bulunarak in vivo çalışma sonuçları EU/gHb olarak hesaplandı.

3.4.7.2. Hemoglobin Miktarının Belirlenmesi

Kan numunelerindeki hemoglobin değerleri siyanmethemoglobin yöntemine göre belirlendi. Bu yöntemde hemoglobin molekülündeki +2 değerlikli demir, ferrosiyanür ile +3 değere yükseltgenerek potasyum siyanür ile kararlı

siyanomethemoglobine dönüşür. Oluşan siyanomethemoglobin bileşiğinin 540 nm'de verdiği transmittans ölçülerek hemoglobin (Hb) miktarı belirlenir.

Bu amaçla kör ve numune için iki tüp hazırlandı. Kör ve numune oda sıcaklığında 15 dakika bekletildikten sonra spektrofotometrede 540 nm dalda boyunda transmittansı okunarak standart eğriden Hb miktarı belirlendi[4,159,160].

Tablo 22. Hemoglobin tayininde kullanılan küvet içeriği

	Drabkin çözeltisi (ml)	Hemolizat µl	Su µl
Kör	5	-	20
Numune	5	20	-

Bu yöntem ile hemoglobin tayininde standart bir grafiğe ihtiyaç vardır. Bunun için 100 ml destile suda 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 ve 10 mg siyanmethemoglobin olacak şekilde standart çözeltiler hazırlandı. Bu standart hemoglobin çözeltilerinden 10'ar ml tüplere konuldu ve 540 nm'de % T okundu. Elde edilen standart grafik şekil 29'da verilmiştir.

3.4.7.3. İstatistiksel Analizler

Sonuçlar ''İstatistiki olarak kantitatif bulguların incelenmesi'' (Statistical Graphics Grapdrations) metodu ile belirlendi[165]. Bu amaçla bütün parametrelerin ortalama değerleri (X) ve standart sapmaları (SD) bulundu.

Aritmetik Ortalama:

Aritmetik ortalama hesaplamada

$$\overline{X} = \frac{\sum X_1}{N}$$

formülü kullanıldı

Standart Sapma:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum X_1^2 - \frac{\left(\sum X_1^{\,2}\right)}{N}}{N-1}}$$

formülü kullanılarak standart sapmalar hesaplandı.

"t" Testi

Yapılan analizlerde ortalamalar arasındaki farkın önemli olup olmadığını anlamak için yapıldı. Ortalama farklarına ait standart sapmanın hesaplanması için aşağıdaki formüller kullanıldı.

$$S^2_{\overline{X}_1} = \frac{(N_1 - 1)S_1^2 + (N_2 - 1)S_2^2}{N_1 + N_2}$$

yukarıdaki formüllerde hesaplanan değerler aşağıdaki formülde yerine konularak "t" değeri hesaplandı.

$$t = \frac{\overline{X_1} - \overline{X_2}}{S_{\overline{X_1} - \overline{X_2}}}$$

P değeri

Probablite "t" hesabından serbestlik derecesine göre bulunan değerdir.

P> 0.05 ise fark önemsiz,

P<0.05 ise fark önemli,

P<0.01 ise fark çok önemli,

P<0.001 ise fark mutlak önemlidir.

Yukarıdaki formüllerde:

Σ: Toplama işareti

N: Analiz sayısı

t: Kritik oran

x: Her bir gözlemin ortalaması

D: Standart sapma

$S_{\overline{X_1} - \overline{X_2}}$: Ortalamalar arasındaki farkın hatası

n: Serbestlik derecesi

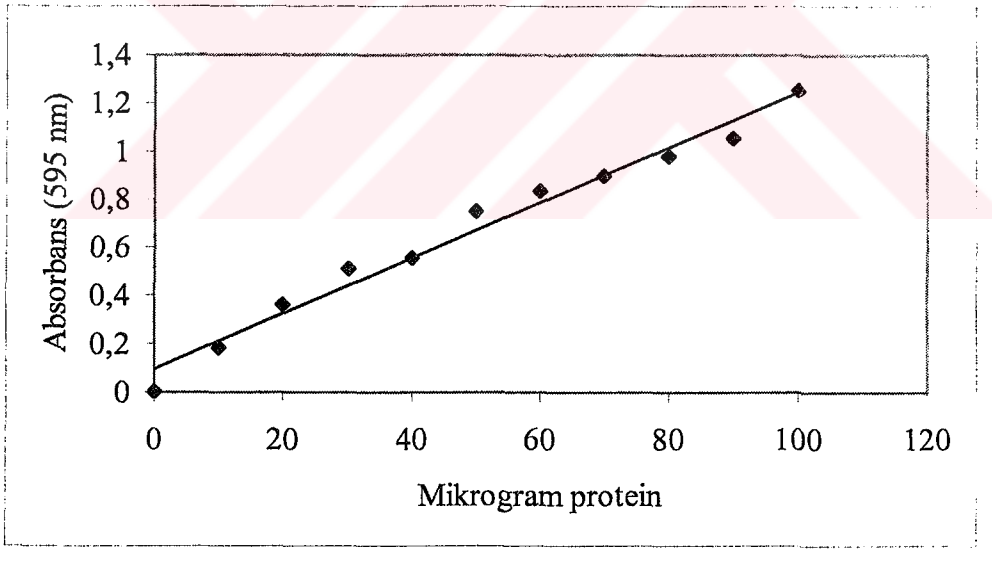
p: Probablite "t" hesabından serbestlik derecesine göre bulunan değer

$S_{\overline{X}}^2$: Her iki gözlemin varyansını ifade etmektedir.

4. BULGULAR

4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

Elde edilen enzim çözeltilerindeki kantitatif protein tayini Bradford yöntemiyle belirlendi. Standart grafik bölüm 3.4.2.b'de anlatıldığı gibi hazırlandı. Ham extrakt, amonyum sülfat çöktürmesi, afinite kromotografisi ve jel filtrasyon kromatografisi sonucu elde edilen enzim çözeltilerindeki kantitatif protein tayini bu standart grafikten yararlanılarak bulundu. Standart çözeltilerin μg proteine karşılık gelen absorbans değerleri şekil 5'de gösterildi.

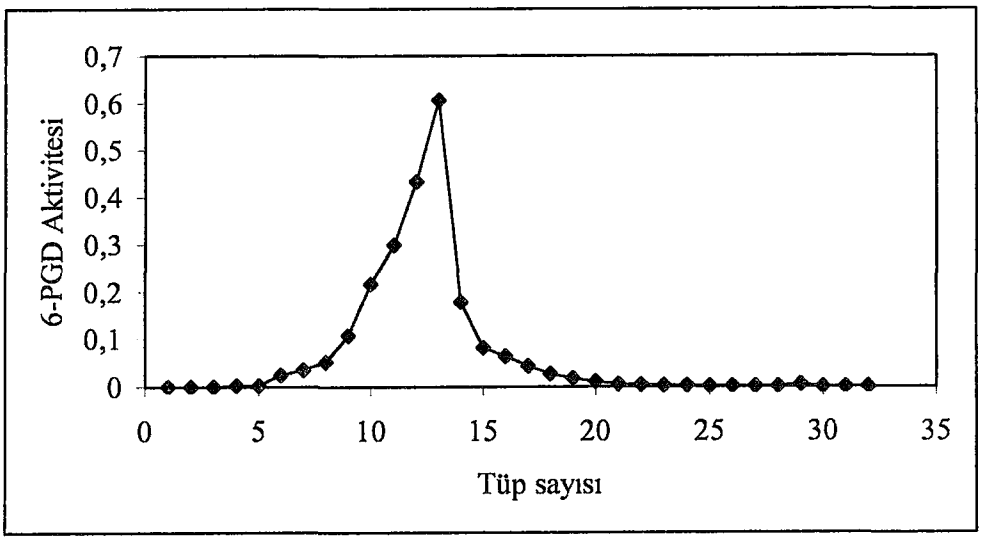


Şekil 5: Bradford yöntemiyle proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart grafik

4.2. İnsan Eritrosit 6-Fosfoglukonat Dehidrogenaz Enziminin Afinite Kromotografisi ile Saflaştırılma Sonuçları

Çalışmalarda enzim kullanıldığından dolayı fazla miktarda enzim saflaştırmak gerekiyordu. Gerek çalışılacak ilaçların tespiti için ön çalışma yaparken, gerekse normal çalışmalar için 6PGD enzimi çok defalar saflaştırıldı. Tüm saflaştırmalar aynı olduğundan sadece bir çalışmanın sonuçları verilecektir.

Enzim saflaştırılması işleminde önce hemolizat hazırlandı. Daha sonra hemolizatta % 35-65 amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Çökelti tamponda çözündükten sonra diyaliz yapıldı ve afinite kolonuna tatbik edildi. Jelin kolona paketlenmesi, tamponla dengelenmesi ve yıkama işlemlerinden sonra elüsyon tamponuyla enzim kolondan elüe edildi. Elüatlar 2'şer ml'lik fraksiyonlar halinde toplanarak aktivite tayini yapıldı. 280 nm'de kalitatif protein tayini bu dalga boyunda $NADP^{+}$'nin proteinleri maskelemesinden dolayı yapılamadı. Aktivite gösteren fraksiyonlar bir araya getirildi. Sonuçlar şekil 6'da gösterildi.

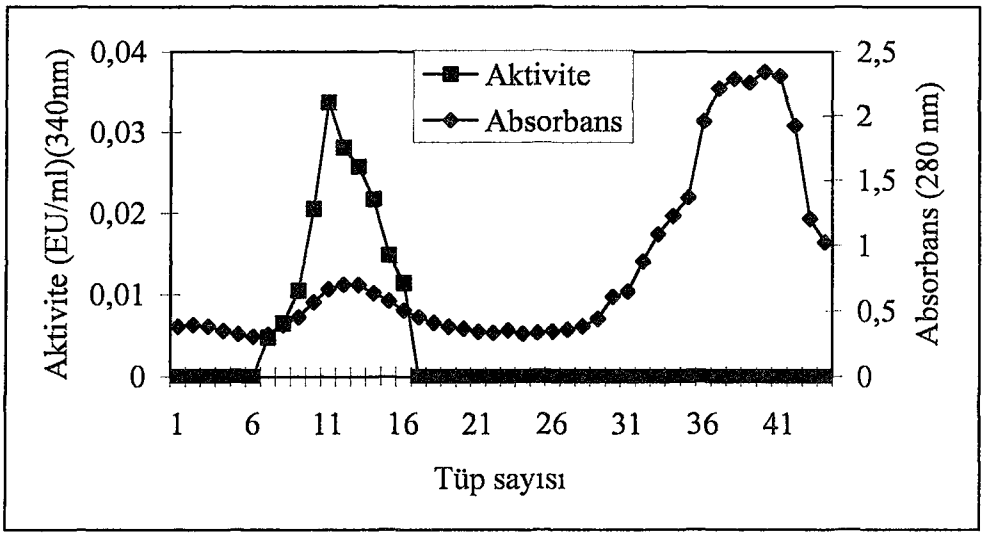


Şekil 6: Afinite kolonundan 6PGD enziminin 80 mM K-fosfat+ 80 mM KCI+5 mM $NADP^{+}$ +10 mM EDTA (pH=7.85) tamponu ile elüsyonu. Kolon 1x10cm, jel yüksekliği 5 cm, elüsyon hızı 20ml/saat ve fraksiyon hacmi 2 ml.

4.3. İnsan Eritrosit 6PGD Enziminin Jel Filtrasyon Kromotografisi İle Saflaştırılması Sonuçları

İnsan eritrositlerinden hemolizat hazırlandıktan sonra amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve afinite kromotografisi işlemleri yapıldı. Elde edilen enzim numunesi SDS-PAGE'de yürütülerek saf olup olmadığı kontrol edildi. Elektroforezde birden fazla bant gözlenmesi sonucu Jel Filtrasyon kromotografisi yapılmasına karar verildi. Afinite kolonundan elüe edilen enzim numunesi bölüm 3.4.1.3'de anlatıldığı gibi hazırlanıp dengelenen Sephadex G-200 kolonuna uygulandı. Elde edilen elüsyonlarla ilgili absorbans ve aktivite değerlerini gösteren grafik şekil 7'de gösterildi.

İnsan eritrosit 6PGD enziminin saflaştırılması çalışmalarında uygulanan her bir yöntem sonucunda elde edilen örneklerde protein ve aktivite değerleri hesaplanarak saflaştırma tablosu oluşturuldu (Tablo 23)



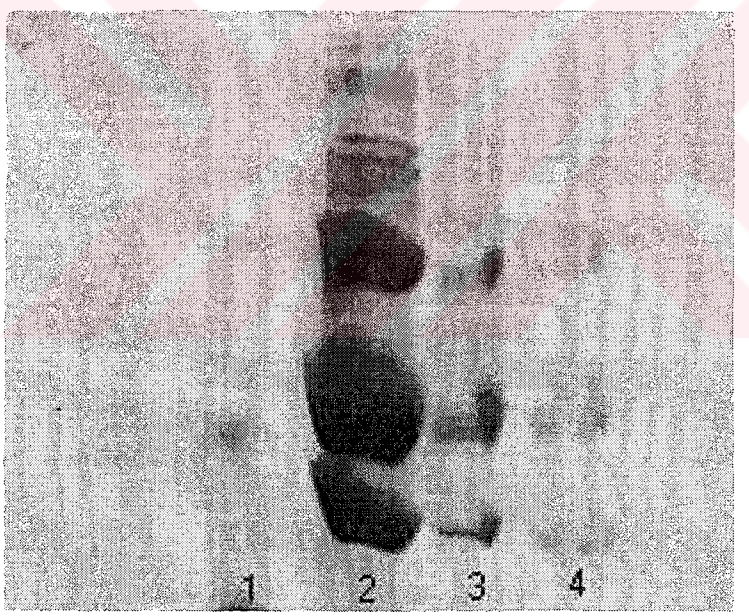
Şekil 7: İnsan eritrosit 6PGD enziminin jel filtrasyon kromotografisi yöntemi ile saflaştırılmasında kullanılan elüsyon grafiği

Tablo 23. İnsan eritrosit 6PGD enziminin saflaştırılması basamakları

Saflaştırma Basamakları	Total Hacim (ml)	Aktivite (EÜ/ml)	Total Aktivite (EÜ)	Protein Miktarı (mg/ml)	Total Protein Miktarı (mg)	Spesifik Aktivite (EÜ/mg)	% Verim	Saflaştırma Katsayısı
Hemolizat	50	0,1028	5,14	39,51	1975,5	0,0026	100	1
Amonyum Sülfat Çöktürmesi (%35-65) ve Diyaliz	20	0,228	4,56	46,89	937,8	0,0048	88,71	1,846
Afinite Kromatografisi	15	0,2685	4,0275	0,224	3,36	1,198	78,35	460,76
Jel Filtrasyon Kromatografisi	14	0,166	2,548	0,088	2,38	1,886	49,57	725,38

4.4. 6PGD Enzimi Numunelerinin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile Saflık Derecesinin Kontrolü

Jel filtrasyon kolonundan saflaştırılan enzimin saflığını kontrol etmek amacıyla SDS elektroforezi yapıldı. Bunun için bölüm 3.4.4'de anlatıldığı şekilde SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezine enzim numunesi ve standart numuneler tatbik edildi ve yürütüldü. Sonuçta belirginleşen protein bantlarının fotoğrafı çekilerek şekil 8'de gösterildi. Şekil'de görülen 1.kuyudaki enzim numunesi 20 cm boyundaki Sephadex G-200 jelinden elde edildi.



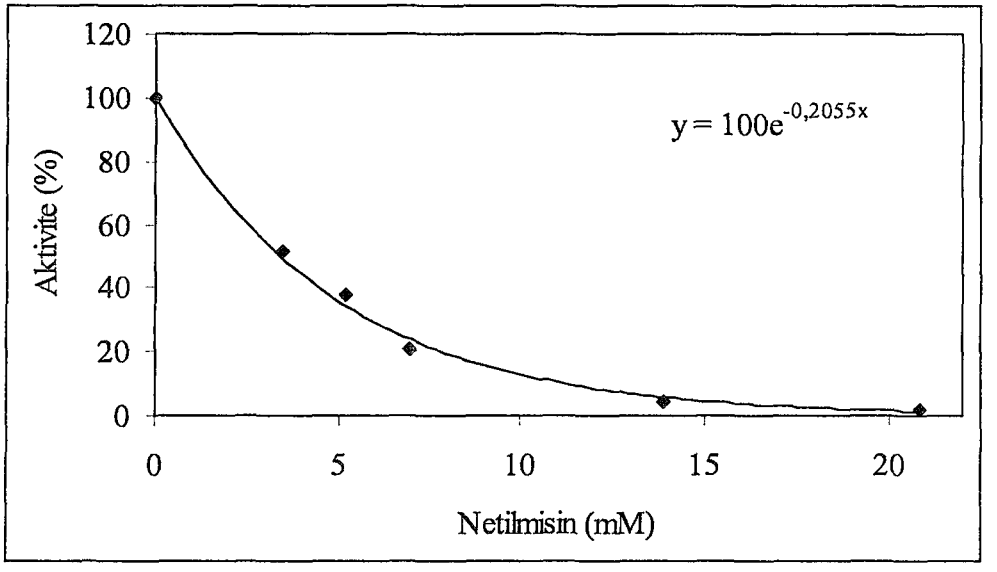
Şekil 8: İnsan eritrosit 6-PGD enziminin SDS-PAGE elektroforezi. **1:** Saf insan 6-PGD enzimi 52.000 Da. **2, 3 ve 4:** Standart proteinler (Karbonik anhidraz (bovin): 29.000 Da, Ovalbumin (tavuk): 45.000 Da, Albumin (bovin): 66.000 Da, Fosforilaz b (tavşan): 97.400 Da, β-galaktozidaz (E.coli): 116.000 Da ve Miyozin (tavşan):205.000 Da.

4.5. İnsan Eritrosit 6PGD Enzimi Üzerinde Çalışılan İlaçların Etkilerinin Belirlenmesine Ait Çalışma Sonuçları

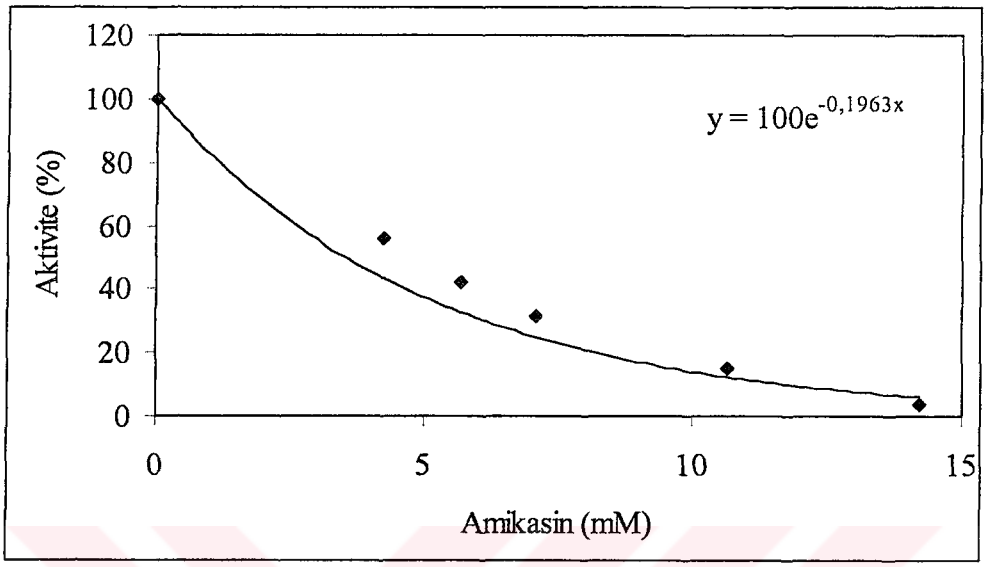
İnsan ertrosit 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine bazı ilaç ve kimyasal maddelerin etkisini belirlemek amacıyla bu bileşiklerin stok çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerden değişik konsantrasyonlu seyreltmeler yapılarak insan eritrositlerinden saflaştırılan 6-fosfoglukonat dehidrogenaz aktivitesi üzerindeki etkileri araştırıldı. Bu ilaçlardan çoğu enzimi inhibe etti. İlaçların I_{50} değerlerinin bulunması için 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapıldı. Daha sonra

$$EU \ / ml = \frac{\Delta OD \ / dk}{6,22} \times \frac{V_T}{V_E} \times S_F$$

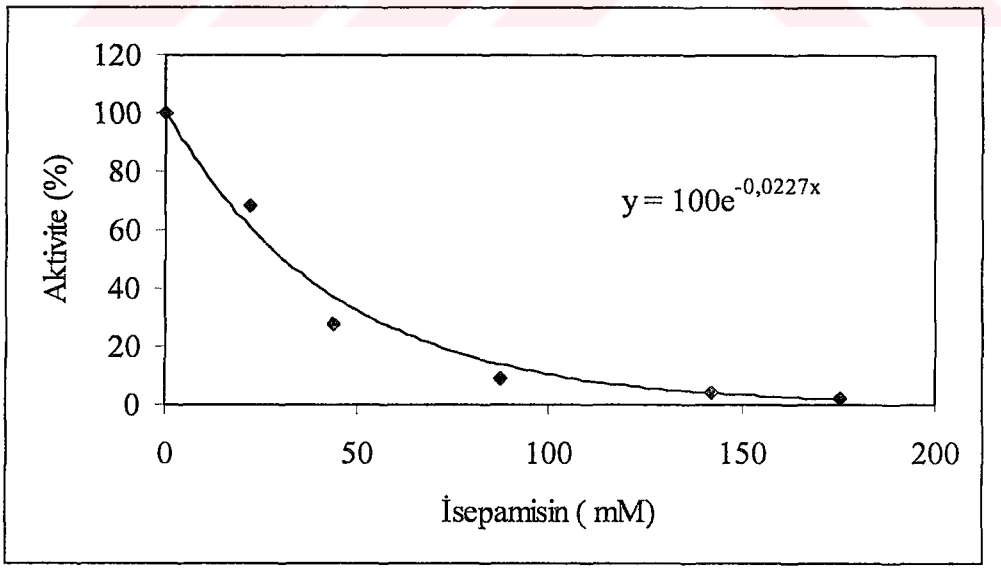
formülünden her bir inhibitör konsantrasyonu için enzim ünitesi (EU) hesaplandı. % Aktivite- Konsantrasyon grafikleri çizildi (şekil 9-26). Bu grafiklerden bulunan I_{50} değerleri ise tablo 24 'de gösterildi.



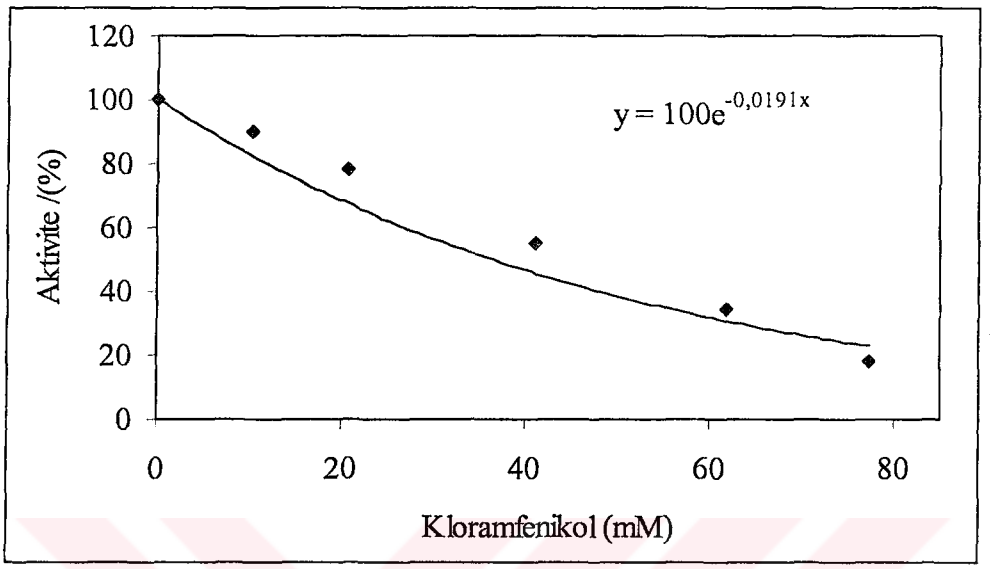
Şekil 9: İnsan eritrosit 6PGD enzimi için netilmisin kullanılarak 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[I] grafiği



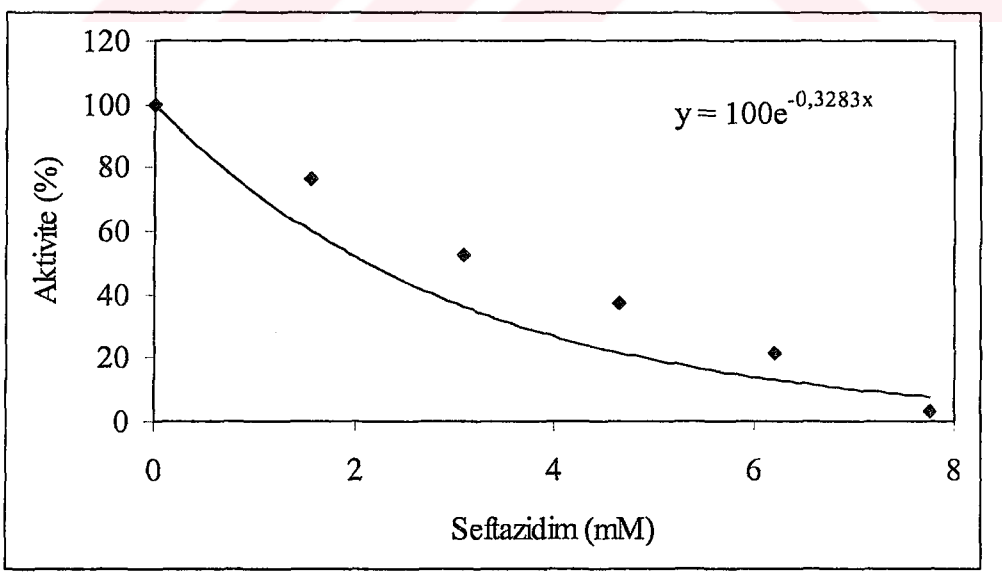
Şekil 10: İnsan eritrosit 6PGD enzimi için amikasin kullanılarak 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[I] grafiği.



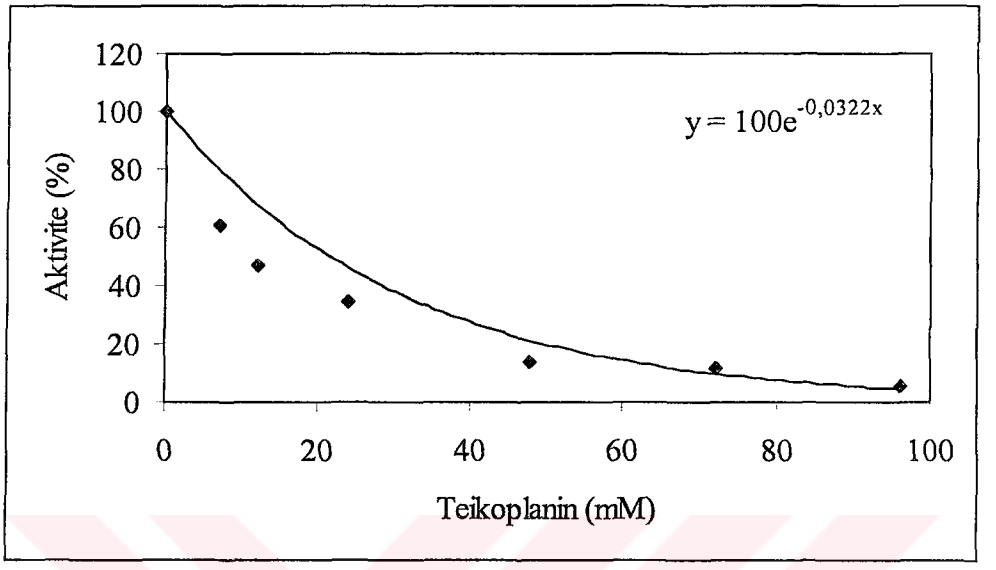
Şekil 11: İnsan eritrosit 6PGD enzimi için isepamisin kullanılarak 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[I] grafiği.



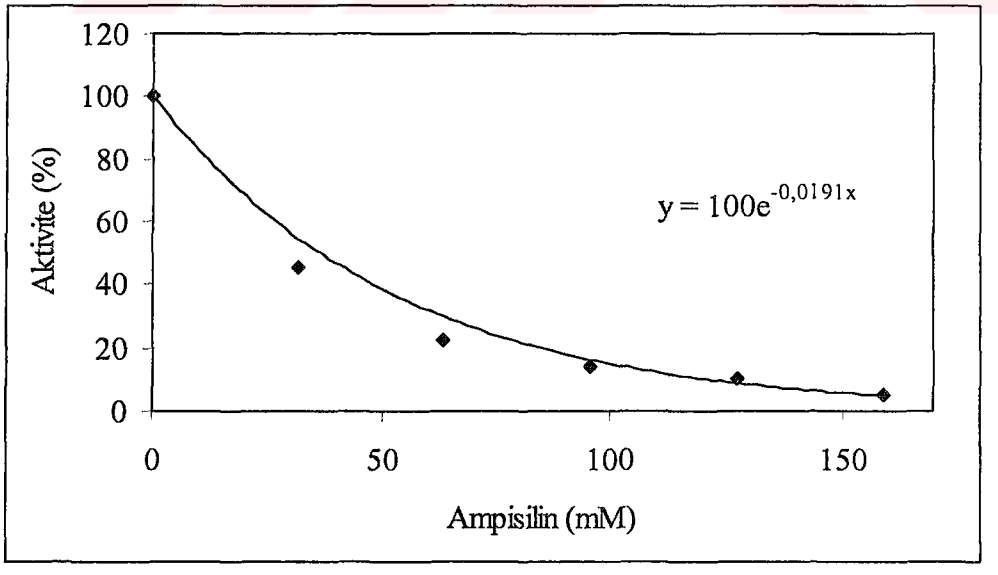
Şekil 12: İnsan eritrosit 6PGD enzimi için kloramfenikol kullanılarak 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[I] grafiği.



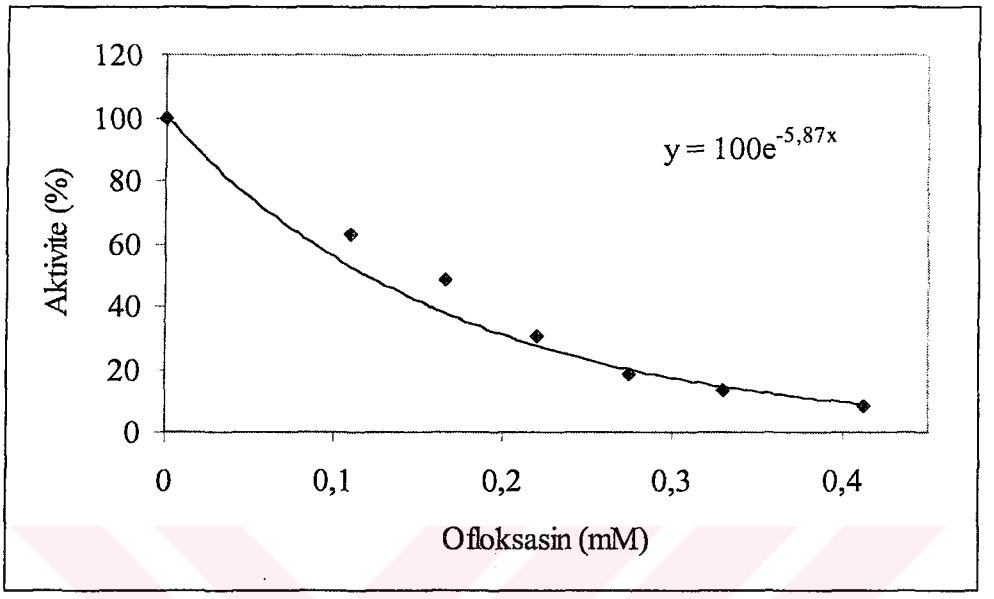
Şekil 13: İnsan eritrosit 6PGD enzimi için seftazidim kullanılarak 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[I] grafiği.



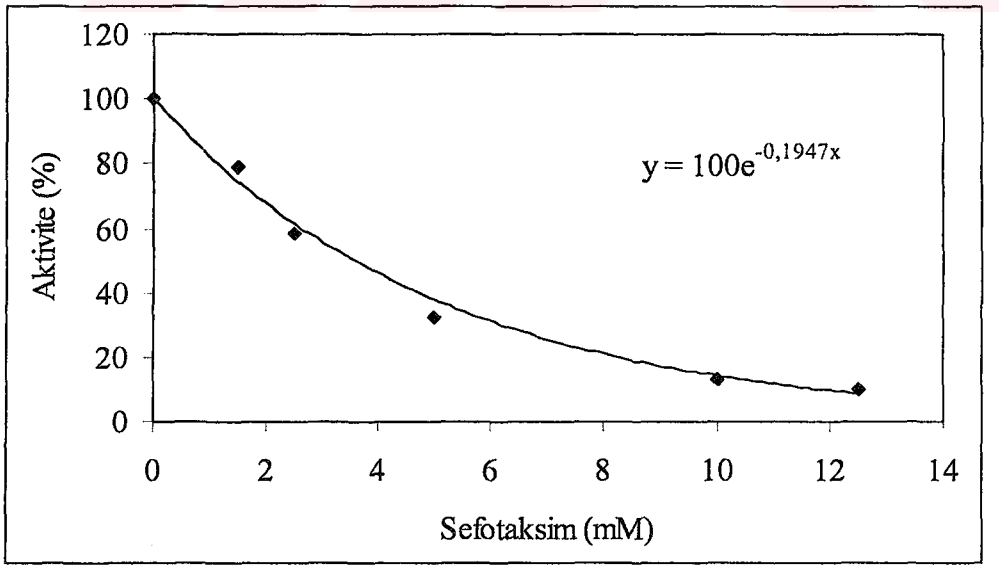
Şekil 14: İnsan eritrosit 6PGD enzimi için teikoplanin kullanılarak 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[I] grafiği.



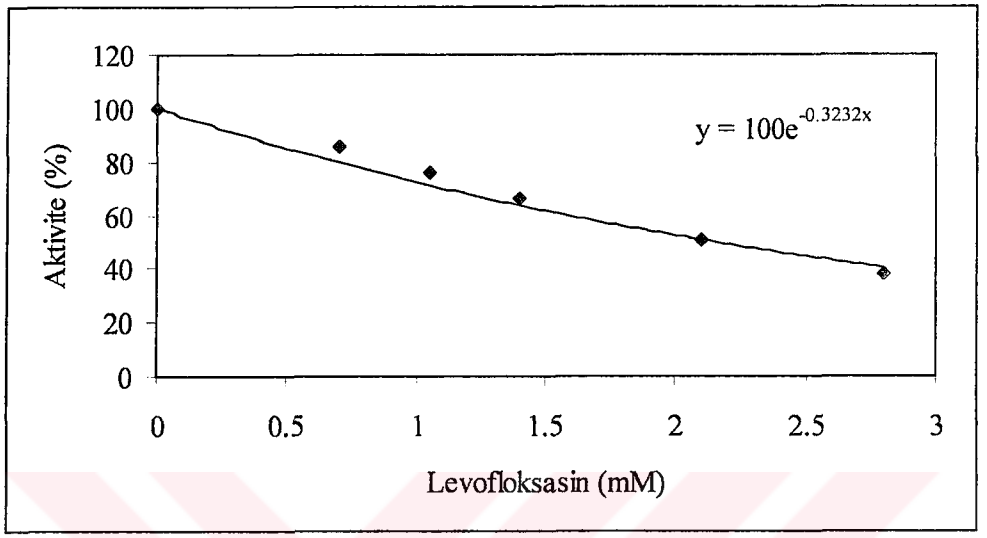
Şekil 15: İnsan eritrosit 6PGD enzimi için ampisilin kullanılarak 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[I] grafiği.



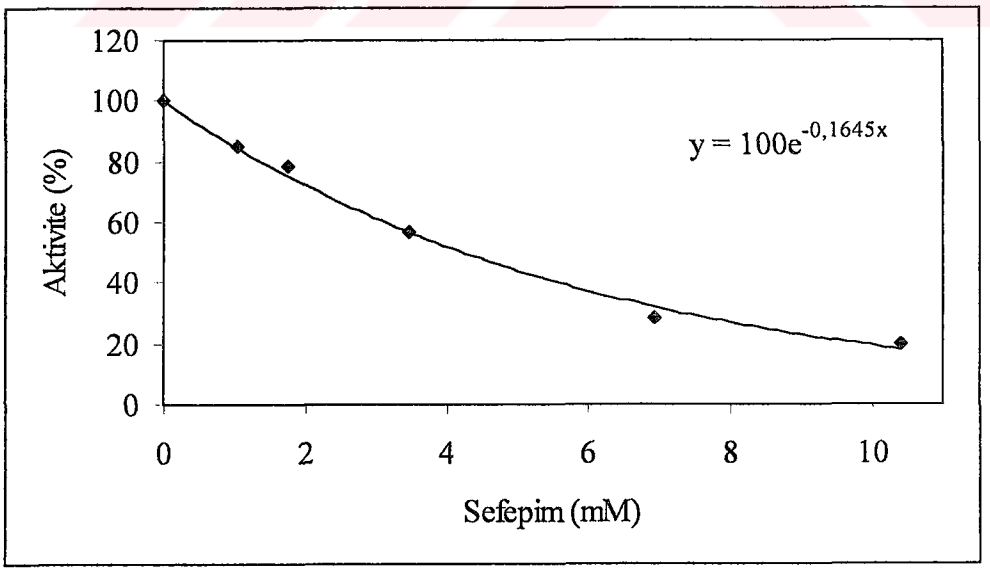
Şekil 16: İnsan eritrosit 6PGD enzimi için ofloksasin kullanılarak 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[I] grafiği.



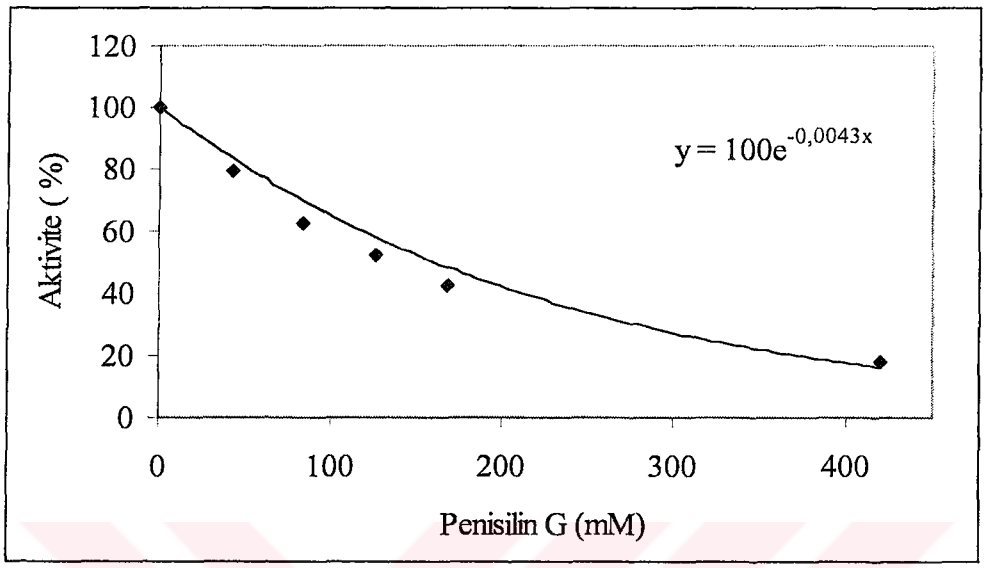
Şekil 17: İnsan eritrosit 6PGD enzimi için sefotaksim kullanılarak 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite[I] grafiği.



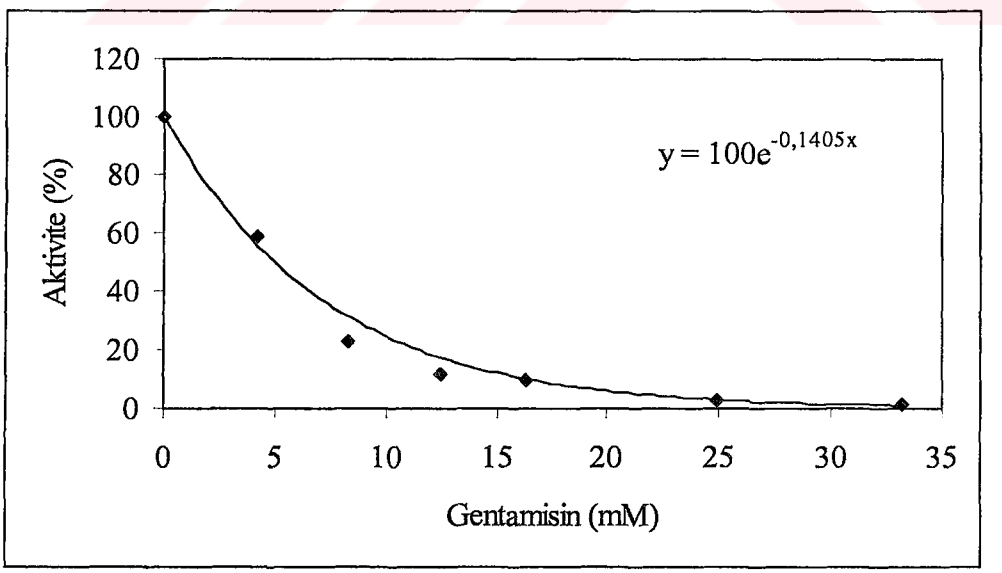
Şekil 18: İnsan eritrosit 6PGD enzimi için levofloksasin kullanılarak 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[I] grafiği.



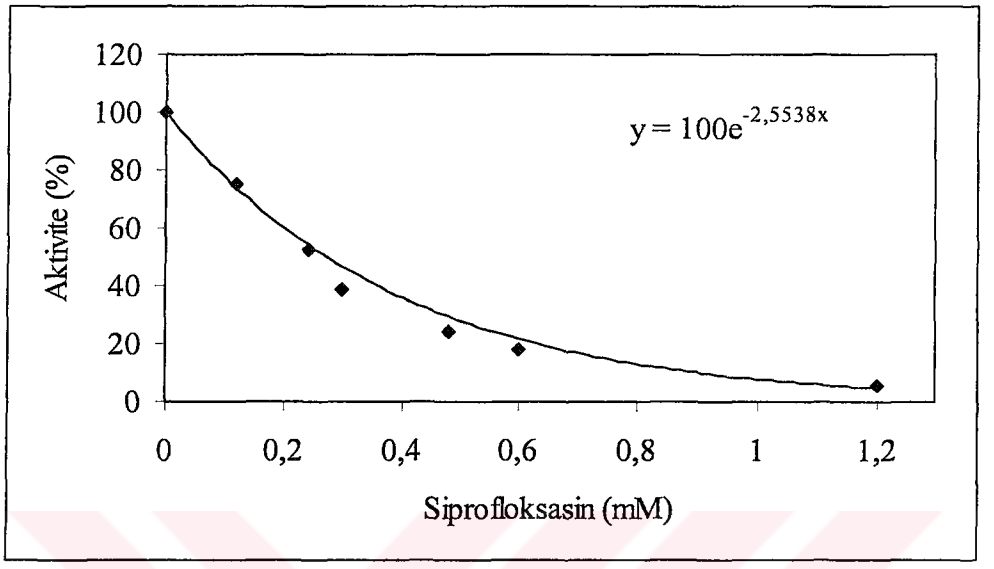
Şekil 19: İnsan eritrosit 6PGD enzimi için sefepim kullanılarak 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[I] grafiği.



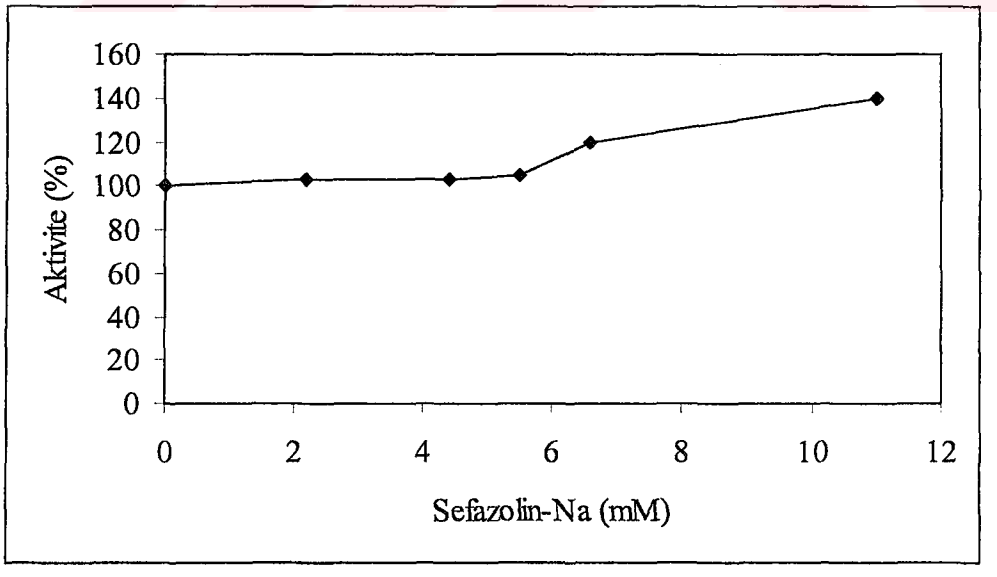
Şekil 20: İnsan eritrosit 6PGD enzimi için penisilin G kullanılarak 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[I] grafiği.



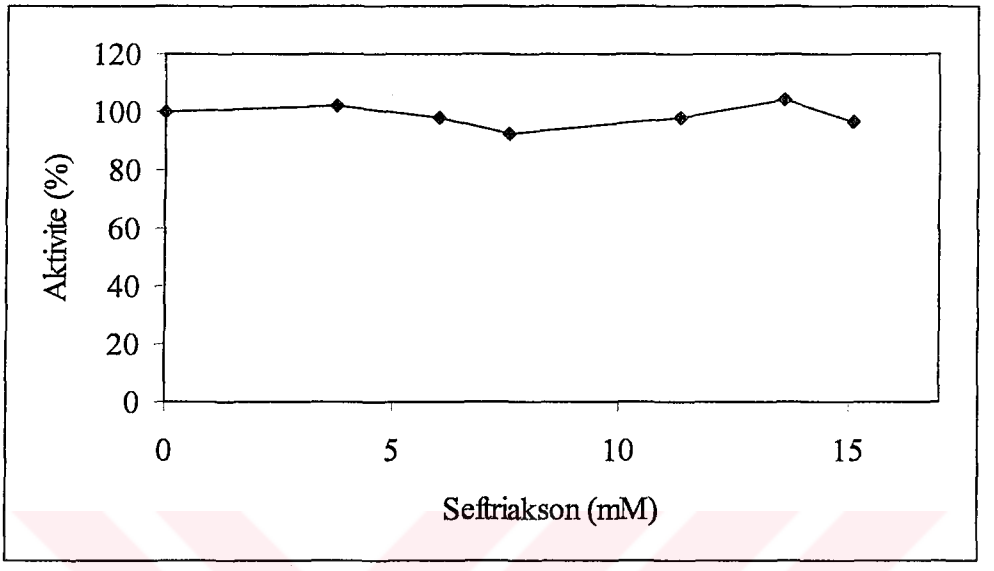
Şekil 21: İnsan eritrosit 6PGD enzimi için gentamisin kullanılarak 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[I] grafiği.



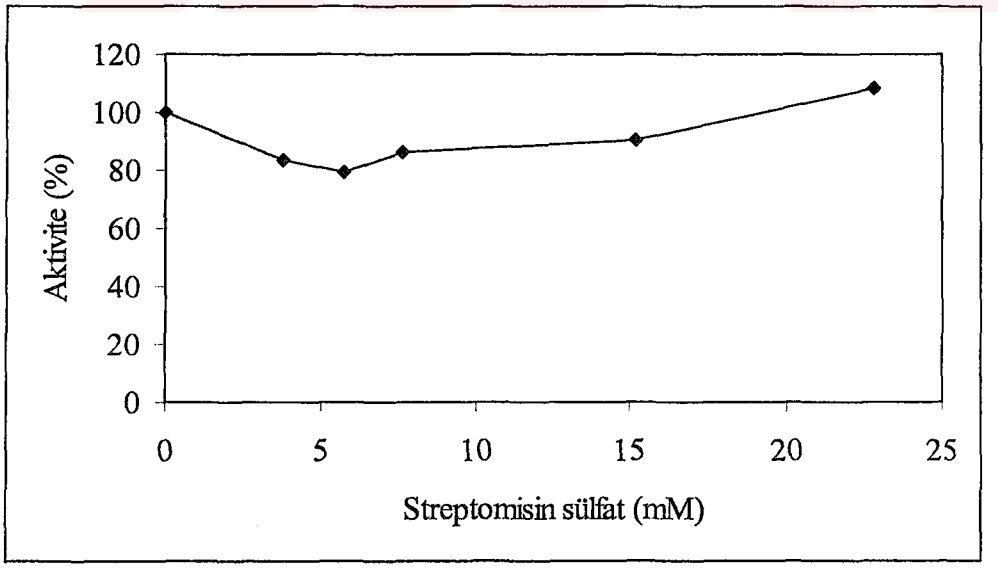
Şekil 22: İnsan eritrosit 6PGD enzimi için siprofloksasin kullanılarak 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[I] grafiği.



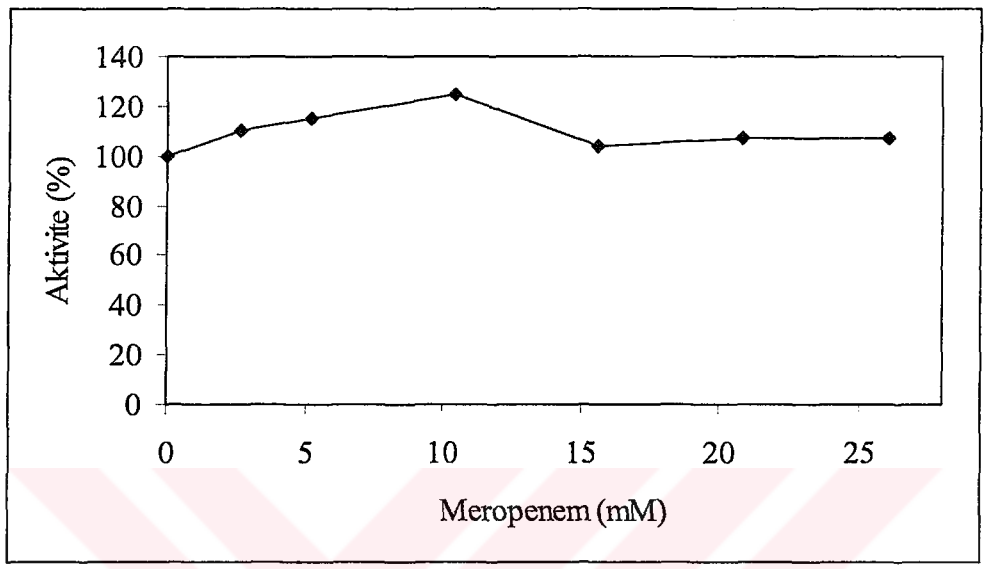
Şekil 23: İnsan eritrosit 6PGD enzimi için sefazolin sodyumun 5 farklı konsantras yonuna karşı elde edilen % Aktivite grafiği.



Şekil 24: İnsan eritrosit 6PGD enzimi için seftriaksonun 5 farklı konsantrasyonuna karşı elde edilen % Aktivite grafiği



Şekil 25: İnsan eritrosit 6PGD enzimi için streptomisin sülfatın 5 farklı konsantras yonuna karşı elde edilen % Aktivite grafiği.



Şekil 26: İnsan eritrosit 6PGD enzimi için meropenemin 5 farklı konsantrasyonuna karşı elde edilen % Aktivite grafiği.

Tablo 24. İnsan eritrosit 6PGD enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren ilaçlar için % Aktivite –[I] grafiklerinden elde edilen I_{50} Değerleri

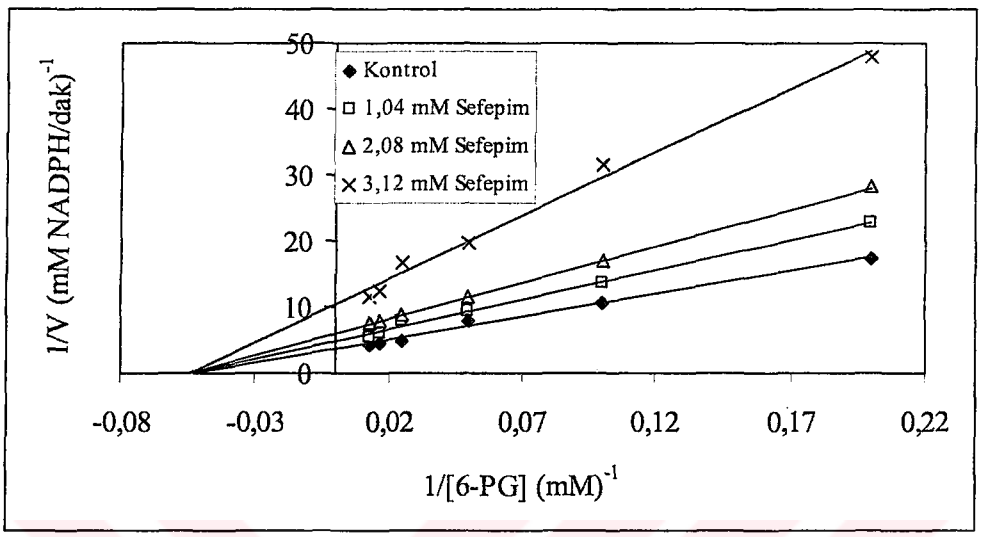
İlaç adı	**I_{50} değeri**
Netilmisin	3,372
Sefepim	4,213
Amikasin	3,530
İsepamisin	30,528
Kloramfenikol	36,283
Seftazidim	2,110
Teikoplanin	21,521
Ampisilin	36,282
Ofloksasin	0,118
Levofloksasin	2,142
Sefotaksim	3,559
Penisilin G	161,162
Gentamisin sülfat	4,932
Siprofloksasin	0,271
Sefazolin sodyum	Aktive
Meropenem	Etkisiz
Seftriakson	Etkisiz
Streptomisin sülfat	Etkisiz

4.6. İnsan Eritrosit 6PGD Enzimi Üzerine İnhibitör Etkisi Gösteren Bazı İlaçlar İçin K_i Değerlerinin Belirlenmesine Ait Çalışmaların Sonuçları

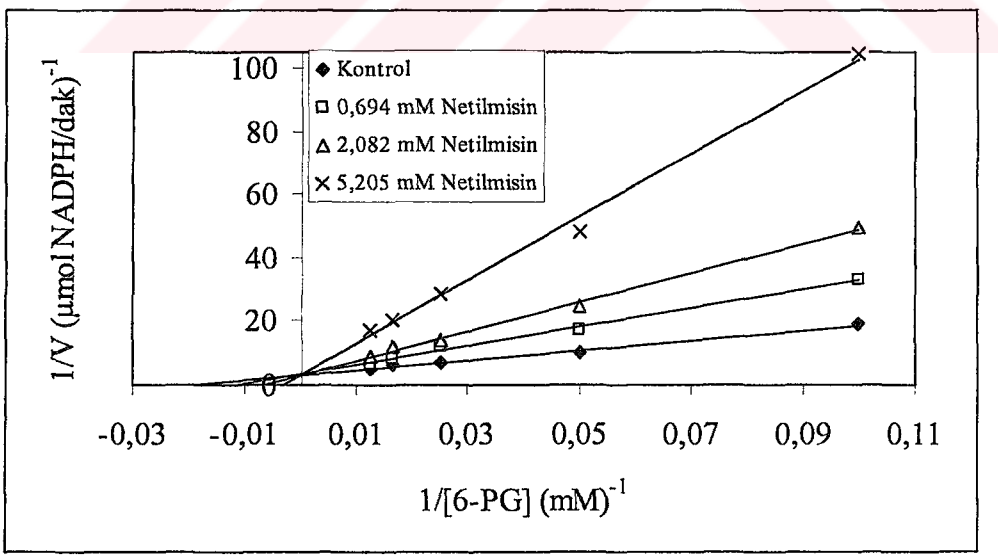
İnsan eritrositlerinden saflaştırılan 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren sefepim ve netilmisin ilaçları için K_i değerlerinin belirlemek amacıyla bölüm 3.4.6'da anlatıldığı gibi sabit üç uygun ilaç konsantrasyonu belirlenerek, değişen substrat konsantrasyonları ile aktivite değerleri belirlendi. Bu değerlerden Lineweaver-burk grafikleri çizildi. Y ekseni üzerinde kesişen doğruların oluşturduğu grafiği veren inhibitör yarışmalı, X ekseni üzerinde kesişen doğruların oluşturduğu grafiği veren inhibitör ise yarışmasız olduğu için elde edilen grafiklerdeki her bir doğrunun denkleminden bölüm 3.4.6'da anlatıldığı gibi K_i değerleri hesaplandı. Sonuçlar tablo 25 ile şekil 27-28'de verildi.

Tablo 25. İnsan eritrosit 6PGD enzimi için bulunan K_i ve I_{50} değerleri

İnhibitör	I_{50} (mM)	[I] (mM)	K_i (mM)	Ortalama K_i (mM)	İnhibisyon tipi
Netilmisin	3.372	0.694 2.082 5.205	0.775 1.075 0.968	0.939 ± 0.152	Yarışmalı
Sefepim	4.213	1.04 2.08 3.12	3.104 2.988 1.646	2.579 ± 0.810	Yarışmasız



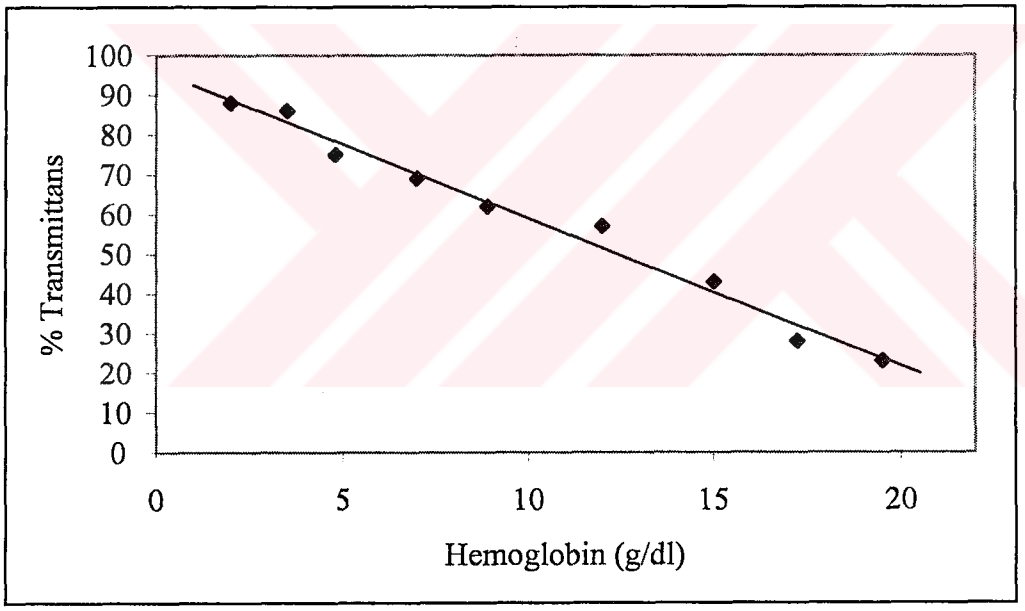
Şekil 27: 6PGD aktivitesi üzerine sefepim ilacının etkisi $[I_1]$=1.04 mM, $[I_2]$=2.08 mM, $[I_3]$=3.12 mM



Şekil 28: 6PGD aktivitesi üzerine netilmisin ilacının etkisi. $[I_1]$=0.694 mM, $[I_2]$=2.082 mM, $[I_3]$=5.205 mM

4.7. Hemoglobin Sonuçları

İn vivo çalışmalar için elde edilen sıçan kanlarında hemoglobin tayini syanomethemoglobin yöntemine göre yapıldı. Bunun için bölüm 3.4.7.2'de anlatıldığı gibi standart bir grafik hazırlandı. 540 nm'de %T okunarak karşılık gelen g/dl hemoglobin miktarları standart grafikten yararlanılarak bulundu. Daha sonra sonuçlar gram hemoglobin başına enzim ünitesi olarak hesaplandı. Standart çözeltide % T'ye karşılık gelen değerler standart grafik olarak şekil 29'da verildi.



Şekil 29: Sıçan eritrosit hemolizatında hemoglobin tayini için kullanılan standart grafik

4.8. Bazı İlaçların Sıçan Eritrosit 6PGD Enzim Aktivitesi Üzerine İn vivo Etkilerinin Araştırılmasına Ait Çalışma Sonuçları

Çalıştığımız ilaçlardan iki tanesi (Netilmisin sülfat ve sefepim) seçilerek sıçan eritrosit enzimi üzerindeki in vivo etkileri araştırıldı. Bu iki ilacı tercih etmemizin sebebi klinikte çok kullanılması, aktivite ölçümlerinde problem oluşturmaması ve I_{50} değerlerinin küçük olmasıdır. Bilindiği gibi I_{50} değerleri küçük olan inhibitörlerin inhibisyon etkileri yüksektir. Netilmisin ve sefepim ilaçları, sıçanlara uygulandıktan sonra belirli zaman peryotlarında kanları alınıp eritrosit 6PGD enzim aktiviteleri ölçüldü.

Kontrolle karşılaştırıldığında tablo 26'da görüldüğü gibi netilmisin ilacı uygulandıktan sonra birinci, ikinci ve üçüncü saatte sıçan eritrosit 6PGD enzimi üzerinde, istatistiksel olarak çok önemli bir inhibisyon etkisi oluşturmuştur. ($p<0.01$).

Yine kontrolle karşılaştırıldığında tablo 27'de görüldüğü gibi sefepim ilacı uygulandıktan sonra birinci ve ikinci saatte sıçan eritrosit 6PGD enzimini istatistiksel olarak çok önemli ($p<0.01$) derecede inhibe etmiştir. Üçüncü saatdeki inhibisyon etkisi ise önemli değildir ($p>0.05$).

Tablo 26. Sıçan eritrosit 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enzimi üzerine netilmisin antibiyotiğinin *in vivo* etkisi

Uygulama süresi	Aktivite (EÜ/gHb) X + SD (n = 6)	*t*	*p*
Kontrol	3.627 ± 0.419		
1	1.195 ± 0.115	13.489	< 0.01
2	0.354 ± 0.056	19.924	< 0.01
3	1.821 ± 0.123	8.804	< 0.01

Tablo 27. Sıçan eritrosit 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enzimi üzerine sefepim antibiyotiğinin *in vivo* etkisi

Uygulama süresi	Aktivite (EÜ/gHb) X + SD (n = 6)	*t*	*p*
Kontrol	3.893 ± 0.260		
1	1.197 ± 0.365	13.306	< 0.01
2	0.362 ± 0.077	10.903	< 0.01
3	3.628 ± 0.350	1.140	> 0.05

5. TARTIŞMA

Canlı organizmalarda direkt veya indirekt antioksidan etki gösteren önemli enzimler bulunmaktadır. Pentoz fosfat yolunun üçüncü basamağında bulunan 6PGD bu enzimlerden birisidir[36,166]. Enzim eritrositlerde yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır[53]. Oksidatif pentoz fosfat yolu enzimlerinin sinir rejenerasyonu için önemli olduğu ve merkezi sinir sisteminin normal fonksiyonu için gerekli olduğu belirtilmektedir[47].

Enzimin hücre metabolizmasında üç önemli rolü vardır. Bunlardan birincisi lipogenezis için biyosentetik reaksiyonlarda rol oynaması, ikincisi nükleik asit ve koenzimler için bir öncül molekül olan riboz 5-fosfat sentezlemesi, üçüncüsü ise indirgen biyosentezler için NADPH moleküllerini üretmesidir[135]. Bir koenzim olan NADPH, stoplazmada cereyan eden biyosentezlerin (kolesterol, steroidler, yağ asidleri, indirgen glutatyon, methemoglobinden hemoglobin, bazı aminoasitlerin sentezi gibi) gerçekleştirilmesinde görev görür. Aşırı enerjiye gereksinim olduğunda NADPH, NAD^+'yi indirgeyerek elde edilen NADH'dan ATP sentez edebilmesini de sağlar. Redükte glutatyon çeşitli hücre elemanlarına göre daha kolay okside olabilmektedir. Bu özelliğinden dolayı bir çok bileşiği oksidan ajanlara karşı koruyarak onların redükte halde yani fonksiyon görür halde kalmasını sağlar[167]. İndirgenmiş glutatyon aynı zamanda hidrojen peroksit ve diğer peroksitlerin giderilmesi, proteinlerin sülfhidril gruplarının korunması ve değişik yollarla hücre yapısına giren ilaç ve kimyasallardan oluşabilen atılımı mümkün olmayan ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu gibi reaksiyonlarda da rol oynamaktadır[168,169]. Bu nedenle 6PGD bir antioksidan enzim olarak bilinmekte ve bu özelliklerinden dolayı canlılar için çok önem arzetmektedir[36,166].

Enzim, glikolitik yola ve pentoz fosfat yoluna giren glukoz 6-fosfat arasındaki dengenin korunmasında önemlidir[31]. Enzim eksikliğinde retikulosit sayısında değişme, eritrosit piruvat kinaz aktivitesinde artma ve GSH seviyesinde azalma tespit edilmiştir. Bu durum ise insan kırmızı kan hücrelerinin yaşında ve indirgen sistemlerin aktivasyonunda bir azalmaya yol açmaktadır. Yine enzim eksikliğinde sarılıklı episodik hemolitik olaylar tespit edilmiştir[32].

Hanau ve ark[153]. yaptıkları bir çalışmada 6PG'ın bir çok ökaryotik hücre tipi için toksik olduğunu ve birikmesinin fosfoglukoz izomeraz enziminin inhibisyonuna sebep olduğunu belirtmektedirler.

Bu öneminden dolayı 6PGD enzimi ile ilgili çok sayıda araştırma yapılmıştır. Enzim koyun karaciğerinden[52], insan beyninden[47] ve eritrositlerinden[53], levrek[145] ve domuz[42] karaciğerinden, tavşan meme bezinden[101] saflaştırılmış, karakterize edilmiş ve biyokimyasal özellikleri belirlenmiştir. Enzimin aminoasit bileşimi belirlenmiş olup 400 aminoasitten oluştuğu tespit edilmiştir[54]. Enzim kristal halde elde edilmiş ve X-ray analizleri enzim kristallerinin üçgen ve düz eşkenar dörtgen olduğunu göstermiştir[52,71]. Enzim mekanizmasıyla ilgili yapılan çalışmalar enzimin ardışık/düzensiz (sekuensel, random order) ve sıralı bi-ter bir mekanizmayı takip ettiğini göstermiştir[53,66]. Aynı zamanda 6PGD'ın gen yapısı aydınlatılmış ve enzimi şifreleyen gen tespit edilmiştir[75,77].

Değişik kaynaklardan elde edilen 6PGD enzimi ile ilgili yapılan kinetik çalışmalar sonucunda NADPH[118], asetil CoA[66], o-phthalaldehyde[155], fluorescein 5-izotiyosiyanat[110], 3-aminopiridin adenin dinükleotid fosfat[38], malaimid[56] bileşiklerinin enzim inhibisyonuna neden olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada 6PGD enzimi

saflaştırılarak, bazı ilaçların ve kimyasal maddelerin enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon ya da aktivasyon etkileri araştırıldı.

Çalışmada kullanılan insan kanı Atatürk Üniversitesi Araştırma Hastanesi kan merkezinde sağlıklı şahıslardan alınarak antikoagulantlı torbalara konuldu. Enzim aktivitesi kaybını minimuma indirmek için alınan kanlar buzlu ortamda laboratuvara getirildi. 2500xg'de santrifüj edilerek eritrositler çöktürüldü ve üst kısımda kalan plazma ile lökosit tabakası uzaklaştırıldı. Daha sonra 0.16 M KCI çözeltisi ile temiz bir eritrosit pelleti elde etmek amacıyla üç defa yıkandı. Her defasında 2500xg'de santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı.

Elde edilen eritrosit hücrelerini hemoliz etmek için, eritrosit pelletinin beş katı kadar soğuk saf su katılarak bir süre bar ile hafif bir şekilde karıştırılarak hemoliz edildi. Saflaştırma işlemlerinde kullanılan kromotografi kolonlarının tıkanmaması için hemolizat içerisinde bulunan eritrosit membranlarının uzaklaştırılması gerekir. Bu amaçla elde edilen hemolizat 30 dakika soğutmalı bir santrifüjde ve 20.000xg'de santrifüj edildi. Bu işlem bittikten sonra süpernatant dikkatli bir şekilde alınarak hemolizat olarak kullanıldı.

Saflaştırma işlemlerinde ilk önce Amonyum sülfat çöktürmesi yapılmaktadır. Bu yöntem proteinlerin farklı iyonik şiddette çökmeleri esasına dayanmaktadır[14]. Bu yöntemle kısmi saflaştırma yapılarak numune içerisindeki bir çok safsızlıklar elimine edilir ve proteinler daha derişik halde elde edilir. Afinite kromotografisi işleminden önce Amonyum sülfat çöktürmesi işleminin yapılması afinite kolonuna tatbik edilecek çözeltideki enzim konsantrasyonun yüksek olması bakımından önemlidir[159,169]. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu %35-65 çöktürme aralığında bulunan 6PGD

enziminin daha sonraki saflaştırma basamaklarında aynı doygunluğu kullanıldı. Sıçan eritrosit 6PGD enzimi için % 50-70 ve % 60-80 aralıkları çalışılmıştır [60,105].

Bir çok çalışmada 6PGD enzimi 2',5'-ADP Sepharose 4B kolon materyali kullanılarak saflaştırılmıştır. Çünkü Afinite kromotografisi spesifik bir kromotografi tekniğidir ve çok kere bir basamakta çok kompleks bir karışımdan bazı proteinleri izole edebilir[14]. Bu nedenle biz de amonyum sülfat çöktürmesi yaptıktan sonra elde edilen enzim çözeltisini afinite kolonuna uyguladık. Bu amaçla 2 g kuru jel tartılarak saf suda şişirildi ve üç defa suyu değiştirilerek temizlendi. Vakumla hava kabarcıkları uzaklaştırıldıktan sonra 1x10 cm soğutmalı kolona paketlendi. Hızı 20 ml/saat olan peristaltik pompaya bağlanarak örnek kolondan geçirildi ve yıkama çözeltileriyle yıkandı. Sonra 5mM $NADP^+$ elüsyon çözeltisiyle enzim kolondan elüe edildi.

Elde edilen elüatların saf enzim ihtiva edip etmediğini kontrol etmek amacıyla Laemmli'ye göre % 3-8 kesikli Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi. Elüatların daha saf enzim içerdiği elektroforetik olarak belirlendi. Ancak elektroforezde birden fazla bant gözlendi ve gözlenen bantların mol kütleleride birbirinden farklı olduğu için molekül büyüklüğüne göre ayırım sağlayan Sephadex G-200 kolonundan enzim numunelerinin geçirilmesine karar verildi. 1.6x40 cm boyundaki kolon 20 ml/saat akış hızına ayarlı pompaya bağlanarak enzim örneği yürütüldü. Elde edilen enzim örneğini derişikleştirmek için liyofilize işlemi yapıldı ve elektroforetik olarak saf enzim elde edildi.

Sıcaklık 6PGD enziminde aktivite kaybına sebep olur[31,47]. Bu nedenle sıcaklığın kontrol altında tutulması gerekiyordu. Biz tüm işlemlerimizi soğuk odada 2-4 derecede

gerçekleştirdik. Protein tayini kalitatif ve kantitatif olmak üzere iki şekilde yapılmaktadır. Kalitatif tayin, protein yapısında bulunan aromatik halkaya sahip bazı aminoasitlerin (fenilalanin, tirozin ve triptofan) 280 nm dalga boyunda UV ışınlarını absorblaması esasına dayanmaktadır[162]. Kromotografi işlemlerinde elde edilen elüatlarda kalitatif protein tayini yapılamadı. Bunun nedeni elüsyon çözeltilerinde $NADP^+$ bulunması ve $NADP^{+'}$ nin 280 nm'de protein absorbansını maskelemesidir[159]. Bu nedenle her bir elüsyon tüpünde spektrofotometrede Beutlere göre aktivite tayini yapıldı[4]. Ancak bazı araştırmacılar farklı sıcaklıklarda enzim aktivitelerini ölçmüşlerdir[66,105,125]. Çalışmamızda ilaçların insan eritrosit 6PGD enzim aktivitesi üzerine olan etkileri denendiğinden insan vücut ısısı olan 37 derecedeki enzim aktivitelerine bakıldı. Bu bakımdan ortam sıcaklığının 37 dereceye ulaşıp dengelenmesini sağlamak amacıyla substratsız küvetler 10 dakika kadar su banyosunda inkübe edildi. Ayrıca verimi % 10 oranında artırdığından dolayı elüsyon çözeltisine EDTA katıldı. Saflaştırılan enzim çözeltilerinde kantitatif protein miktarları ise Brodfard yöntemiyle tesbit edildi. Bu yöntem fosforik asitli ortamda proteinlerin coomassie brillant-blue G-250 reaktifi ile kompleks oluşturması esasına dayanır. Oluşan kompleks 595 nm'de maksimum absorbans gösterir. Bu yöntemin diğer protein tayin yöntemlerinden üstün tarafı, çok kısa sürede uygulanması, son derece hassas olması , bozucu faktörlerin pek olmaması, protein-boya kompleksinin çözeltilerde uzun süre kalmasıdır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 μg arasındadır. Sarfiyatı az olup her defasında standart çalışmayı gerektirmeyen bir yöntemdir[163]. Buna karşılık Biüret yöntemi daha az hassas olup, Lowry yönteminde ise her tayin öncesinde standart çalışılmak gerekmekte ve çok uzun zaman almaktadır[170,171].

Eritrosit 6PGD enzimi Afinite ve Jel filtrasyon kromotografileri ile saflaştırıldıktan sonra Laemmli'ye[164] göre %3-8 kesikli Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi. Şekil 8'de görüldüğü gibi 2, 3 ve 4 nolu kuyulara standart proteinler , 1 nolu kuyuya ise insan eritrositlerinden saflaştırılmış 6PGD enzimi tatbik edildi. 1 nolu kuyuda görülen tek bant, enzimin tamamen saf olduğunu göstermektedir.

Saflaştırma yöntemleri olarak Del Mar ve ark.[31] dicentrarchus labrax l.(levrek) karaciğerinden Sephacryl S-200, 2',5'-ADP Sepharose 4 B ve DEAE Sephacel yöntemlerini kullanmışlardır. Sonuç olarak % 26 verimle 347.0 kat saflaştırma gerçekleştirmişlerdir. Silverberg ve Dalziel[52] koyun karaciğerinden asit muamelesinden sonraki extrakt, amonyum sülfat çöktürmesi-1, Sephadex G-100, DEAE-Sephadex, amonyum sülfat çöktürmesi-2 ve CM-Sephadex yöntemlerini kullanmışlardır. Bu çalışma sonucunda % 29 verimle 415 kat saflaştırma yapılabilmiştir. Weisz ve ark.[47] insan beyninden ham ekstrakt hazırladıktan sonra amonyum sülfat çöktürmesi (% 50-70), DEAE-Selüloz, Sepharyl S-200, Red matrix Jel kolon kromotografileri ve ultrafiltrasyon yöntemlerini kullanarak % 6 verimle 530 kat saflaştırma gerçekleştirmişlerdir. Sawa ve ark[58]. Phormidium sp.'den Extraksiyon, DEAE-Selüloz, Blue Sepharose, DEAE-Toyopearl, Hidroksiapatit ve Sephadex G-150 kolon kromotografi tekniklerini kullanarak % 4.4 verimle 830 kat saflaştırma yapabilmiştir. Hanau ve ark.[153] Tripanosoma bruceiden yüksek hızda süpernatant, DEAE-Selüloz ve 2',5'-ADP Agarose yöntemlerini kullanarak % 59 verimle 246 kat saflaştırma gerçekleştirmişlerdir. Krepinsky ve ark.[44] ıspanak yapraklarından (Kloroplast 6PGD) saf ekstrakt hazırladıktan sonra PIE ile çöktürme, DEAE-FraktoJel, Superdex G-200 ve ADP Agarose yöntemlerini kullanarak % 7 verimle 1000 kat saflaştırma yapabilmiştir.

Topham ve Dalziel[35] koyun karaciğerinden asit muamelesinden sonraki ham ekstrat alınarak ve amonyum sülfat çöktürmesi, Sephadex G-100, Afinite kromotografisi, CM-Sephadex yöntemlerini kullanarak % 29 verimle 626 kat saflaştırma gerçekleştirmiştir. Skolov ve ark.[94] pseudomonas oleovorans'dan Amonyum sülfat çöktürmesi, Sephacryl S-200 Jel filtrasyon kromotografisi, DEAE Biojel A ve Fosfoselüloz kromotografik yöntemlerini kullanarak % 78.4 verimle 400 kat saflaştırma gerçekleştirmişlerdir. Quadri ve Dean[112] bacillus stearothermophilus'dan değişik immobilize edilmiş-triazine Afinite Dye yöntemini kullanarak % 62 verimle 260 kat saflaştırma elde etmişlerdir. Sinicropi ve Kauffman[97] sıçan beyninden tuz çöktürmesi, anyon değişim ve immunoafinite yöntemlerini kullanarak 1700 kat saflaştırma gerçekleştirmişlerdir. Moritz ve ark.[66] corynebacterium glutamicum'dan saf ekstrakt hazırladıktan sonra DEAE-İyon değişim kromotografisi, Procion Red Dye Afinite kromotografisi, 2'5 2-ADP Ligand Afinite kromotografik tekniklerini kullanarak % 15 verimle 646 kat saflaştırma gerçekleştirmiştir. Betts ve Mayer[101] tavşan meme bezinden NADP-Sepharose afinite kromotografisi yöntemini kullanarak % 4 verimle 150 kat saflaştırma yapabilmiştir.

İnsan eritrositlerinden yapmış olduğumuz bu çalışmada, hemolizat hazırladıktan sonra Amonyum sülfat çöktürmesi, 2',5'-ADP Sepharose 4 B Afinite Kromotografisi ve Sephadex G-200 Jel Filtrasyon Kromotografisini kullanarak 1.886 EÜ/mg protein spesifik aktiviteyle, % 49.57 verimle, 725 kat saflaştırma gerçekleştirdik (Tablo 23). Bu sonuçlar çalışmada kullanılan metodun doğru olarak seçildiğini ve yeterince iyi bir metod olduğunu göstermektedir. Çünkü sadece iki kromotografik metod kullanılarak yüksek saflaştırma katsayısı elde edilmiştir.

Elde ettiğimiz saflaştırma katsayısı levrek karaciğeri[31], koyun karaciğeri[35,52], insan beyni[47], trypanosoma brucei[153], pseudomonas oleovorans[94], bacillus stearothermophilus[112], corynebacterium glutamicum[66] ve tavşan meme bezinden[101] elde edilen değerden yüksek, Phormidium sp.[58], ıspanak yaprakları[44], sıçan beyninden[97] elde edilen değerden ise düşük bulunmuştur.

Teröpatik veya başka amaçlarla kullanılan bir çok ilacın organizma üzerinde yan etkisi olduğu bilinmektedir[105,172-174]. Bu etkiler bazen dramatik sonuçlar oluşturabilmektedir[172]. Bu duruma, 1926 yılında sıtma tedavisinde kullanılan ve hastalarda ciddi yan etkiye neden olan primaquin ilacı örnek olarak verilebilir. İlaç kullanıldıktan birkaç gün sonra hastalarda idrar siyaha dönüşmüş, sarılık oluşmuş, hemoglobin düzeylerinde ani düşüşler olmuş ve alyuvarların büyük ölçüde tahribatı sonucu çoğu vakalar ölümle sonuçlanmıştır. Çünkü ilaç G6PD enzimi üzerinde inhibisyon etkisi göstermiştir[14]. Aynı şekilde asetazolamid ilacı da karbonik anhidraz enzimini inhibe ederek ciddi idrar artışına neden olduğu belirtilmektedir.[175]

Bu çalışmada kullanılan antibiyotikler dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla beraber nefrotoksisite, ototoksisite, nörotoksisite, ateş yükselmesi, kemik iliği hastalığı, alerji, deri döküntüsü ve hemolitik anemi gibi bir çok yan etkileri vardır[157]. Ampisilin insan eritrosit G6PD'nı[172], koyun karaciğeri G6PD'nı[173], sıçan 6PGD'nı[105] ve insan CA'nı[174], netilmisin sülfat insan eritrosit G6PD'nı[172], sıçan 6PGD'nı[105] , amikasin ise koyun eritrosit G6PD'nı[173] ve sıçan 6PGD'nı[105] inhibe eder. Buna ilaveten ampisilin, netilmisin ve amikasin'in in vivo olarak sıçan 6PGD ve G6PD'nı inhibe ettiği bildirilmiştir[105,172]. Yaptığımız literatür taramasında, diğer ilaçların 6PGD aktivitesi üzerindeki etkileriyle ilgili herhangi bir çalışmaya rastlamadık.

Bu çalışmada insan eritrositlerinden saflaştırılan 6PGD enzim aktivitesi üzerine, yaygın olarak kullanılan toplam 18 adet ilacın inhibisyon veya aktivasyon etkileri araştırıldı. İlaçlar seçilirken bir çok doktorla fikir alış verişinde bulunuldu ve en çok kullanılan ilaçlar tercih edildi. Çalışmada kullanılan ilaçlar araştırılırken elli ilaç tarandı ve suda çözünen en uygun ilaçlar tespit edildi.

Bu amaçla penisilin G, ampisilin, sefazolin, sefepim, sefotaksim, seftriakson, seftazidim, teikoplanin, meropenem, kloramfenikol, streptomisin, gentamisin, netilmisin, amikasin, isepamisin, ofloksasin, siprofloksasin, levoflosasin ilaçlarının enzim aktivitesi üzerindeki etkileri araştırıldı.

Bu ilaçlardan penisilin G, ampisilin, sefazolin, seftazidim, seftriakson, sefepim ve sefotaksim sodyum, hücre duvarı sentezi inhibitörleri olan beta–laktam antibiyotiklerindendir. Penisilin G ve ampisilin penisilin grubundan, sefazolin sodyum sefalosporinlerin birinci kuşağından, seftazidim, seftriakson ve sefotaksim sodyum üçüncü kuşağından, sefepim ise dördüncü kuşak bir sefalosporindir. Meropenem beta laktam antibiyotiklerinden olan karbapenemlerdendir. Teikoplanin hücre duvarı sentezini inhibe eden vankomisin benzeri bir antibiyotiktir. Kloramfenikol amfenikoller grubundan olup dikloroasetikasit grubu içeren bir nitrobenzen türevidir. Tetrasiklinler gibi geniş spektrumlu bir antibiyotiktir.

Gentamisin sülfat, streptomisin, isepamisin, amikasin ve netilmisin protein sentezi inhibitörü olarak bilinen aminoglikozidler grubundandır.

Ofloksasin, siprofloksasin ve levofloksasin ise florokinolonlar grubu olarak bilinen idrar yolu antiseptikleridir.

Şekil 9-22 amikasin, isepamisin, kloramfenikol, seftazidim, teikoplanin, ampisilin, ofloksasin, levofloksasin, sefotaksim, penisilin G, gentamisin sülfat, siprofloksasin ilaçlarının 6PGD enzimini in vitro olarak inhibe ettiğini göstermektedir. Netilmisin sülfat ve sefepim ilaçlarının ise enzimi hem in vitro ve hemde in vivo olarak inhibe ettiği şekil 9 ve 19 ile Tablo 26 ve 27'de görülmektedir. Bu ilaçlar içerisinde sefazolin sodyum enzimi aktive etti (Şekil 23). Seftriakson, meropenem ve streptomisin ise enzim üzerine herhangi bir etki göstermedi.

Genelde ilaç ve diğer kimyasal maddelerin enzimler üzerinde olan inhibisyon etkileri I_{50} değeri ve K_i sabiti olarak verilmektedir. Bu nedenle kinetik çalışmalar sırasında bu ilaçların I_{50} değerleri belirlendi. I_{50} (enzim aktivitesini % 50 inhibe eden ilaç konsantrasyonu) değerleri grafiklerin regresyon analizinden bulundu. I_{50} değerleri sırayla netilmisin için 3.372 mM, sefepim için 4.213 mM, amikasin için 3.530 mM, isepamisin için 30.528 mM, kloramfenikol için 36.283 mM, seftazidim için 2.110 mM, teikoplanin için 21.521 mM, ampisilin için 36.282mM, ofloksasin için 0.118 mM, levofloksasin için 2.142 mM, sefotaksim için 3.559 mM, penisilin G için 161.162 mM, gentamisin sülfat için 4.932 mM, siprofloksasin için 0.271 mM olarak hesaplandı. Bilindiği gibi I_{50} değeri küçük olan inhibitörün inhibisyon etkisi daha yüksektir. Bu sonuçlara göre çalışılan ilaçların eritrosit 6PGD enzimi üzerindeki inhibisyon etkilerinin büyükten küçüğe doğru sıralanışı; Ofloksasin, siprofloksasin, seftazidim, levofloksasin, netilmisin, amikasin, sefotaksim, sefepim, gentamisin, teikoplanin, isepamisin, ampisilin, kloramfenikol ve penisilin G şeklindedir.

Bunun yanısıra beta laktam antibiyotiklerinden olan sefalosporinlerin insan eritrosit 6PGD enzimi üzerindeki inhibisyon etkilerinin büyükten küçüğe doğru sıralanışı seftazidim, sefotaksim ve sefepim şeklindedir. Bu sıralamaya göre üçüncü

kuşak bir sefalosporin olan seftazidim en yüksek inhibisyon etkisine sahiptir. Sonuçlardan anlaşıldığı gibi üçüncü ve dördüncü kuşak sefalosporinler enzim üzerinde kuvvetli inhibisyon etkisine sahiptir.

Penisilin grubu antibiyotiklerinin enzim üzerindeki inhibisyon etkileri dikkate alındığında ampisilin'in penisilin G'ye göre daha güçlü inhibisyon etkisine sahip olduğu görülmektedir.

Aminoglikozid grubu antibiyotiklerinin insan eritrosit 6PGD enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkilerinin büyükten küçüğe doğru sıralanışı netilmisin, amikasin, gentamisin, isepamisin şeklindedir. Bu sıralamaya göre netilmisin ilacının 6PGD enzimi için kuvvetli bir inhibitör olduğu görülmektedir.

İdrar yolu antiseptikleri olarak bilinen florokinolon grubu antibiyotiklerinin 6PGD enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkilerinin büyükten küçüğe doğru sıralanışı ofloksasin, siprofloksasin, levofloksasin şeklindedir. Bu sıralamaya göre ofloksasin insan eritrosit 6PGD enzim aktivitesi üzerinde çok kuvvetli inhibisyon etkisi yapmıştır. Ayrıca bütün antibiyotikler içerisinde en yüksek inhibisyon etkisine sahip tek ilaçtır.

İn vitro çalışmalardan 6PGD enziminin netilmisin sülfat, sefepim, amikasin, seftazidim, ofloksasin, levofloksasin, sefotaksim, gentamisin sülfat ve siprofloksasin ilaçları tarafından kuvvetli bir şekilde inhibe edildiği anlaşılmaktadır. Bu ilaçlar içinden klinikte çok kullanılan, aktivite ölçümünde problem oluşturmayan ve in vitro şartlarda yüksek inhibisyon etkisi gösteren netilmisin (K_i=0.939 mM) ve sefepim (K_i=2.58 mM) ilaçları ise aynı zamanda in vivo olarak çalışıldı (Tablo26-27).

K_i sabitlerinin bulunmasında Lineveawer-Burk grafikleri kullanıldı. Bu yötem enzim kinetiği çalışan araştırmacılar tarafından kullanılmaktadır[162,176]. İnhibitörlerin K_i sabitlerinin bulunması için önce inhibitörsüz ortamda V-[S] değerlerinin bulunması gerekiyordu. Bu amaçla 6PGD enziminin substrat konsntrasyonuna bağlı olarak aktiviteleri bulundu. Daha sonra netilmisin ve sefepim ilaçları için üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda aktiviteler substrat konsantrasyonuna bağlı olarak hesaplandı. Daha sonra 1/V ve 1/[S] değerleride hesaplanarak Lineveawer-Burk grafikleri çizildi. Grafiklerde elde edilen doğruların denklemlerinden K_i sabitleri hesaplandı. Hesaplamalarda yarışmalı inhibisyon için elde edilen grafiğin denkleminden eğime eşit olan K_M / Vmax $(1+[I]/K_i)$ ifadesinden, yarışmasız inhibisyonda ise eğime eşit olan $Vmax=Vmax^I(1+[I]/K_i)$ ifadesinden faydalanıldı.

Bilindiği gibi K_i sabiti küçük olan inhibitörün enzime ilgisi büyük, inhibisyon etkiside yüksektir. Çalışmada kullanılan netilmisin ilacı için grafiklerden elde edilen ortalama K_i değeri 0.939±0.152 mM, sefepim için ise 2.579±0.810 mM olarak hesaplandı. Elde edilen K_i sabitlerine göre çalışılan bu ilaçların 6PGD enzimi üzerindeki inhibisyon etkilerinin büyükten küçüğe doğru sıralanışı; netilmisin, sefepim şeklindedir. K_i sabitlerine göre elde edilen bu sıralamanın I_{50} değerine göre elde edilen sıralamayla aynı olması, ilaçların enzim üzerindeki etkilerine göre sıralanışının doğru olduğunu desteklemektedir. Bu bakımdan K_i sabitlerinin hesaplanması önemlidir.

Çizilen Lineveawer-Burk grafikleri yardımıyla K_i sabitleri bulunarak inhibitörlerin inhibisyon tipide belirlendi. Buna göre çalışmada kullanılan ilaçlardan netilmisin insan 6PGD enzimini yarışmalı, sefepim ise yarışmasız olarak inhibe etti. Bu sonuca göre netilmisin ilacı yarışmalı inhibitör olup enzimin substratıyla aktif bölgeye

yarış halindedir. Sefepim ilacı ise yarışmasız inhibitör olup aktif bölge haricinde enzime bağlanarak inhibisyon etkisi gösterir.

İnsan 6PGD enzimini in vitro olarak inhibe eden 14 ilacın aynı etkiye sahip olup olmadıklarını araştırmak için klinikte daha çok kullanılan netilmisin ve sefepim ilaçlarının inhibisyon etkileri in vivo olarak da sıçanlarda çalışıldı. Bu amaçla Sprague-Dawley türü 12 adet sıçan temin edildi eşit sayıda iki gruba ayrıldı. Sonra numaralanarak kafeslere konuldu. İlaç uygulamasına başlamadan önce her sıçandan kan alındı. Bu değerler kontrol olarak kaydedildi. Daha sonra literatürdeki değerlere uygun konsantrasyonlarda bir gruba netilmisin diğer gruba ise sefepim ilaçları intramusküler olarak uygulandı. İlaç uygulandıktan sonra her bir denekten 1., 2. ve 3. saatlerde kan alındı. Alınan bütün kanlar antikougulant içeren tüplere konuldu ve santrifüj edilerek üst kısımdaki plazma ile lökosit tabakası atıldı. Sonrada 0.16M KCI çözeltisiyle üç kez yıkandı. Elde edilen eritrositlerden hemolizat hazırlanarak aktivite değerleri ölçüldü (Tablo 26-27).

Bu çalışmalar sonucunda elde edilen aktivite değerlerinin in vitro çalışmalarla paralel olduğu görüldü. Netilmisin verilen kontrol grubunda aktivite 3.627±0.419 EÜ/gHb, çalışma grubunda ise 1. saat sonunda 1.195±0.115 EÜ/gHb ($p< 0.01$), 2. saat sonunda 0.354±0.056 EÜ/gHb ($p<0.01$), 3. saat sonunda ise 1.821±0.123 EÜ/gHb ($p<0.01$) olarak bulundu. Bu değerlere göre çalışma grubunda 1. ,2. ve 3. saatlerde ciddi bir inhibisyon varlığı gözlendi.

Sefepim verilen kontrol grubunda aktivite 3.893±0.260 EÜ/gHb iken, çalışma grubunda 1. saat sonunda 1.197±0.365 EÜ/gHb ($p<0.01$), 2. saat sonunda 0.362±0.077 EÜ/gHb ($p<0.01$) ve 3. saat sonunda ise 3.628±0.350 EÜ/gHb ($p>0.05$) olarak bulundu.

Bu değerlere göre 1. ve 2. saatlerde ciddi inhibisyonun devam ettiği fakat 3. saatdeki inhibisyon etkisinin önemli olmadığı gözlendi.

Bu hesaplamalar göz önüne alındığında in vivo çalışmalar, netilmisin sülfat ilacının enzimi 2. saatte yaklaşık olarak % 91 ($p<0.01$) ve 3. saatte ise yaklaşık olarak % 50 ($p<0.01$) oranında inhibe ettiğini göstermektedir. Sefepim ilacı ise 2.saatte enzimi % 91 oranında ($p<0.01$) inhibe ederken, 3. saatte gözlenen inhibisyon etkisinin istatistiksel olarak önemli olmadığı görülmektedir (Tablo 26-27). Hem in vitro hem de in vitro sonuçlar birbirini desteklemektedir. Netilmisin sülfat ve sefepim ilaçlarının yarılanma ömrü 2-3 saat[157] olduğundan dolayı , enzim aktivitesi ilaç eliminasyonuna bağlı olarak 3. saatten sonra artmaya başlamıştır. Sefepim ilacı için de benzer bulgular elde edildi.

Netilmisin sülfat (15 mg/kg) ve sefepim (200 mg/kg) ilaçları için kullanılan dozlar literatürdekilerle uyum göstermektedir. Çünkü netilmisin sülfat ve sefepim için sırayla 37.5-200 mg/kg ve 20-2000 mg/kg'lık dozlar rapor edilmiştir[177-183].

Bu antibiyotiklerin kullanılması hemolitik etkiler gibi önemli sonuçlara neden olabilir. Buna ilaveten bu ilaçlar hasta sağlığını kötüleştirebilir ve ölümcül sonuçlara götürebilir. Netilmisin sülfat ve sefepim ilaçlarının hastalara verilmesi gerektiğinde, hemolitik ve diğer yan etkilerini azaltmak için dozajları çok iyi bir şekilde ayarlanmalıdır. Çünkü in vivo çalışmalar her iki ilacın kandaki konsantrasyonu yüksek olduğu sürelerde, inhibisyon etkilerinin çok olduğunu göstermektedir. Kandaki ilaç konsantrasyonu düştüğü zaman inhibisyon etkileride azalmakta ve hatta yok olmaktadır.

Bu nedenle hastalara ilaç tedavisi uygulanırken söz konusu ilaçların inhibe edici etkileri göz önünde bulundurularak daha düşük dozları tercih edilmeli ve hastalar

hekimlere danışmadan ilaç kullanmamalıdır. Yapmış olduğumuz çalışma bu açıdan son derece önemlidir.

Sonuç olarak pentoz fosfat yolunda önemli bir rol oynayan 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enzimi insan eritrositlerinden iki kromotografik basamak kullanılarak 725 kat saflaştırıldı. Çok sayıda antibiyotiğin saf enzim üzerindeki etkilerine bakıldı ve bunlardan çoğunun inhibisyon etkisine sahip olduğu belirlendi. İnhibitör etkisi gösteren ilaçlardan I_{50} değerleri küçük olan, kuvvetli inhibisyon etkisi gösteren, aktivite ölçümünde sorun oluşturmayan ve klinikte en çok tercih edilen iki ilaç seçilerek sıçanlara uygulandı. Belirli saatlerde alınan kanlarda yapılan aktivite ölçümleri sonucu her iki ilacın da kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı inhibisyon etkilerine sahip oldukları tespit edildi. İlaçların yüksek kan konsantrasyonunda inhibisyon etkileri arttığından olumsuz etkilerinden kaçınmak için düşük dozlarda uygulanması gerektiği sonucuna varıldı.

6. KAYNAKLAR

1. Leninger AL, Nelson DL, Cox MM. Principles of Biochemistry. 2nd edn.,Worth Publishers Inc., Newyork, 2000; 558-560.

2. Bianchi D, Bertrand O, Haupt K, Coello N. Effect of gluconic acid as a secondary carbon source on non-growing L-lysine producers cells of corynebacterium glutamicum. Purification and properties of 6-phosphogluconate dehydrogenase. Enzyme Microb Technol. 2001; 28: 754-759.

3. Puskas F, Gergeley Jr P, Banki K, Perl A. Stimilation of the pentose phosphate pathway and glutation levels by the dehydroascorbate, the oxidizedform of vitamin C. Faseb J. 2000; 14: 1352-1361.

4. Beutler E: Red cell metabolism. Manual of biochemical methods. Academic pres, London 1971; 12: 68-70.

5. Edward E, Morse Md. Toxic effects of drugs on erythrocytes. Ann Clin Lab Sci 1988; 18: 13-18

6. Jakobasch G, Rapoport SM. Hemolytic anemias due to erythrocyte enzyme deficiencies. Mol Asp Med. 1996; 17: 143-170.

7. Özden M. Anatomi ve fizyoloji ders kitabı. Ankara. Kadıoğlu Matbaası 1990: 87-92

8. Özer A. Pratik Hematoloji: Klinik, laboratuvar ve tedavi. Bornova-İzmir, Bilgehan Basımevi. 1985.

9. Onat T. Eritrosit Biyokimyası. In Emerk K, Onat T ed. Temel Biyokimya İzmir, Saray medikal yayıncılık, 1996: 865-879

10. Shohet SB, Beutler E. Glutathione metabolizm of erythrocyte. Williams Hematology. The Erythrocyte. Part four. 1986.

11. Thomas M, Devlin Ph, D. Textbook of Biochemistry with Clinical Correlasyon 2. baskı 1986.

12. Bhagawan N,Y. Biochemistry 2, baskı J.B. Crppincot Co 1978.

13. Doğru Y. Tip II diabetli hastalarda eritrosit G6PDH aktivitesi tayini. Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi Erzurum 1991.

14. Keha E, Küfrevioğlu Öİ. Biyokimya, Aktif yayınevi, Erzurum 2000

15. Kutay F, Onat T. İnsan Biyokimyası. In Onat T, Emerk K, Sözmen EY eds. Ankara Palme Yayıncılık 2002:198, 243-245.

16. Lukens JN. Clinical Hematology. Philadelphia: Lea Febiger. 1993; 1: 1006-1022.

17. Mathews KC, Van Holde KE. Biochemistry. Redwood City: The Benjamin/ Cummings Publishing Company, 1990: 493-501.

18. Mayes PA. The pentose phosphate pathway, other pathway of hexose metabolism. Beirut: Libraire du Libon, 1991: 189-198.

19. Thomas JH, Gillham B. Wills'Biochemical Basis of Medicine Wright. London: 1983; 297-302.

20. Beutler E. Glucose 6-phosphate dehydrogenase, The metabolic Basis of the Inherited Disases. Newyork: McGrow-Hill Book Company, 1983: 1629-1659.

21. Lu P, Comphell MK. Biochemistry. philadelphia: Saunders College Publishing, 1991; 293: 334.

22. Bonsignore A, De Flora A. Regulatory properties of glucose 6-phosphate dehydrogenase. Curr Top Cell Regul. 1972; 6: 21-62.

23. Bonsignore A, Fornani G,Leoncini G, Fantoni A, Segni P. Characterization of leucocyte glucose 6-phosphate dehydrogenase in Sardinian Mutants. J Clin Invest 1966; 45: 12-16.

24. Aksoy K. Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enziminin yapısı. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları. 1997; 15: 186-191.

25. Yüreğir TG, Aksoy K, Dikmen N, Ünlükurt İ. Glukoz-6 fosfat dehidrogenaz enziminin insan eritrositlerinden kısmi saflaştırılması ve enzimolojik özelliklerinin incelenmesi. IX. Biyoloji kongresi. Genel Biyoloji, Nümerik Taksonami ve Kantitatif Ekoloji Paneli Bildirileri. 1988; 1: 125-130.

26. Scott MJ, Lucchesi JC. Structure and expression of the drosophila melanogaster gene encoding 6-phosphogluconate dehydrogenase. Gene 1991; 109: 177-183.

27. Suryadi H, Yoshida N, Yamada-Onodera K, Katsuragi T, Yoshiki T. Characterization of a flavinogenic mutant of methanol yeast candida boidinii and its extracellular secretion of riboflavin. J of Biosci and Bioengin. 2000; 90 (1): 52-56 .

28. Barret MP, Le Page RWF. A 6-phosphogluconate dehydrogenase gene from trypanosoma brucei. Mol and Biochem Parasitol. 1993; 57: 89-100.

29. Biagiotti E, Bosch KS, Ninfali P, Frederiks WM, Van Noorden CJF. Posttranslational regulation of glucose 6-phosphate dehydrogenase activity in tongue epithelium. J Histochem Cytochem. 2000; 48 (7): 971-977.

30. Yoshida Y, Nakano Y, Yamashita Y, Koga T. The gnd gene encoding a novel 6-PGDH and its adjacent region of actinobacillus actinomycetemcomitants chrosomal DNA. Biochem Biophys Res Commun. 1997; 230: 220-225.

31.Del Mar M, Puerta M, Pertierra AG. Purification and properties of the enzyme 6-Phosphogluconate dehydrogenase from dicentrarchus labrax l.liver. Comp Biochem Physiol. 1986; 83 B (1): 215-220.

32. Caprari P, Caforio MP, Cianciulli P, Maffi D, Pasquino MT, Tarzia A, Amadori S, Salvati A M. 6 -Phosphogluconate d ehydrogenase deficiency i n an Italian family. A nn Hematol. 2001; 80: 41-44.

33. Köhler A, Cornelis JF, Noorden V. Initial velocities in situ of G6PDH and PGDH and expression of proliferating cell nuclear antigen (pCNA):sensitive diagnostic markers of e nvironmentally induced hepatocelular c arcinogenesis in a m arina flatfish (platichthys flesus l.). Aquatic Toxicology 1998; 40: 233-252.

34. Ohara H, Uchida K, Yahata M, Kondo K. NAD^+-spesific 6-phosphogluconate dehydrogenase in lactic acid bacteria. Biosci Biotech Biochem. 1996; 60 (4): 692-693.

35. Topham CM, Dalziel K. The chemical mechanism of sheep liver 6-phosphogluconate dehydrogenase. Biochem J. 1986; 234: 671-677.

36. Demir H, Çiftçi M, Küfrevioğlu Öİ. Purification of 6-phosphogluconate dehydrogenase from parsley (petroselinum hortense) leaves and investigation of some kinetic properties. Prep Biochem Biotechn. 2003; 33 (1): 39-52.

37. Menezes L, Kelkar SM, Kaklij GS. Glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase from lactobacillus casei : Responses with different modulators. Ind J of Biochem Biophys. 1989; 26: 329-333.

38.Yoon H, Anderson CD, Anderson BM. Kinetic studies of haemophilus influenzae 6-phosphogluconate dehydrogenase . Biochim Biophys Acta. 1989; 994 (1): 75-80.

39. Stournaras C, Maurer P, Kurz G. 6-Phospho-D-gluconate dehydrogenase from pseudomanas fluorescens. Properties and subunit structure. Eur J Biochem. 1983; 130: 391-396.

40. Wood WA. Carbonhydrate metabolism. Methods in enzymology. 1982; 89: 291.

41. Marbach A. Combined Phenotyping of glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD; EC.1.1.1.44). Forens Sci İnt. 1986; 32: 87-92.

42. Toews ML, Kanji MI, Carper WR. 6- phosphogluconate dehydrogenase. Purification and kinetics. J Biol Chem. 1976; 251 (22): 7127-31.

43. Heise N, Opperdoes FR. Purification, localisation of glucose 6-phosphate dehydrogenase of trypanosoma brucei. Mol Biochem Parasit. 1999; 99: 21-32.

44. Krepinsky K, Plaumann M, Martin W, Schnarrenberger C. Purification and cloning of chloroplast 6-PGDH from spinach. Eur J Biochem. 2001; 268: 2678-2686.

45. Moulin P, Crepineau F, Kloareg B, Boyen C. Isolation and characterization of six cDNA s involved in laminaria digitata (phaeophyceae). J Phycol. 1999; 35: 1237-1245.

46. Sindelar L, Sindelarova M, Burketova L. Chances in activity of glucose 6-phosphate dehydrogenase 6-phosphogluconate dehydrogenase isosymes upon potato virus y infection in tobacco leaf tissues and protoplasts. Plant Physiol Biochem. 1999; 37 (3): 195-201.

47. Weisz KS, Schofield PJ, Edwards MR. Human brain 6-phosphogluconate dehydrogenase : Purification and kinetic properties. J of Neurochem. 1985; 44 (2): 510-517.

48. Gaitonde MK, Murray E. Subcellular distribution profile of glucose 6-phosphate dehydrogenase, 6-phophogluconate dehydrogenase, transketolase and phosphoglucose isomerase in rat brain. Neurochem Int. 1991; 19 (1/2): 151-157.

49. Tejedor MC, Delgado C, Rubio A, Lukue J. Selective prepicitation of phosphofructokinase, glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase from rat erythrocyte hemolysates by polyethylene glycole. Bioscience Reports.1986; 6 (4).

50. Wing Tsui SK, Wa Chan JY, Yee Waye MM, Pui Fung K, Yu Lee C. Identification of a cDNA encoding 6-phosphogluconate dehydrogenase from a human heart cDNA library. Biochem Genet. 1996; 34 Nos: 9/10 .

51. Hanau S, Dallocchio F, Rippa M. NADPH activates a decarboxylation reaction catalysed by lamb liver 6-phophogluconate dehydrogenase. Biochim Biophys Acta. 1992; 1122: 273-277.

52. Silverberg M, Dalziel K. Crystalline 6-phosphogluconate dehydrogenase from sheep liver. Eur J Biochem. 1973; 38: 229-238.

53. Dallocchio F, Matteuzzl M, Bellini T. Half-site reactivity in 6-phosphogluconate dehydrogenase from human erythrocytes. Biochem J. 1985; 227: 305-310.

54. Hutchison JS, Winberry L, Nakayama R, Holten D. Kinetics for changes in enzyme synthesis and mRNA content and hormones required for induction of 6-phosphogluconate dehydrogenase.in hepatocytes. Biochim et Biophysic Acta 1984; 781: 30-38.

55. Bergamini CM, Signorini M, Hanau S, Rippa M. Inactivation and cleavage of liver 6-phosphogluconate dehydrogenase during irradiation in the presence of vanadate. Archiv Biochem and Biophys. 1995; 321(1): 1-5.

56. Barenghi L, Ceriotti F, Ripamonti M, Luzzana M, Bonini P. Erythrotic 6-phosphogluconate dehydrogenase mesured by a differential pH technique. Clin Chem. 1987; 33/4 579-582.

57. Corpas FJ, Garca-Salguero L, Barroso JB, Aranda F, Lupitez JA. Kinetic properties of hexose-monophosphate dehydrogenases. II. Isolation and partial purification of 6-phosphogluconate dehydrogenase from rat liver and kidney cortex. Moll Cell Biochem. 1995; 144 (2): 97-104.

58. Sawa Y, Suzuki K, Ochiai H. Purification and Characterization of 6-phosphogluconate dehydrogenase from phormidium sp. Agric Biol Chem. 1985; 49 (9): 2543-2549.

59. Williams JH, Krochko D, Geer BW. 6- phosphogluconate dehydrogenase from drosophila melanogaster. I. Purification and properties of the A isozymes. Biochem Genet. 1980; 18 (1-2): 87-101.

60. Beydemir Ş, Çiftçi M, Yılmaz H. 2003: XVII. Ulusal Kimya Kongresi. İstanbul.

61. Hong ZQ, Copeland L.Isoenzymes of 6-phosphogluconate dehydrogenase from the host fraction of soybean nodules. J Plant Physiol. 1992; 139: 313-319.

62. Maglysh SS, Gorbach ZV, Ostrovskii IUM. Purification and some properties of molecular forms of 6-phosphogluconate dehydrogenase from rat liver. Biokhimiia (Biokhimiia (Moscow, Russia) 1982; 47 (12): 2035-41.

63. Cebribn JA, Muito T, Porez A. 6-phosphogluconate dehydrogenase of aspergillus cryzae (ahlburg). II.Seperation and study of izoenzymes. Rev Esp Fisiol. 1981; 37 (4): 421-28.

64. Gordillo E, Ayala A, Bautista J, Machado A. Implication of lysine residues in the loss of enzymatic activity in rat liver 6-phosphogluconate dehydrogenase found in aging. The J Biol Chem. 1989; 264 (29): 17024-17028.

65. Berdis AJ, Cook PF. Overall Kinetic mechanism of 6-phosphogluconate dehydrogenase from candida utilis. Biochemistry 1993; 32: 2036-2040.

66. Moritz B, Striegel K, De Graaf, AA. Sahm H. Kinetic properties of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-PGDH from corynebacterium glutamicum and their application for predicting pentose phosphate pathway flux in vivo. Eur J Biochem. 2000; 267: 3442-3452.

67. Berdis AJ, Cook PF. Chemical mechanism of 6-phosphogluconate dehydrogenase from candida utilis from pH studies. Biochemistry 1993; 32: 2041-2046.

68. Cottreau D, Boivin P, Kahn A, Milani A, Marie J. Human granulocyte 6-phosphogluconate dehydrogenase. Purification by elective elution with NADP immunological and kinetic properties. Biochimie (Biochimie) 1975; 57 (3): 325-35.

69. Rippa M, Giovannini PP, Barret MP, Dallocchio F, Hanau S. 6-phosphogluconate dehydrogenase: The mechanism of action investigated by comparison of the enzyme from different species. Biochim Biophys Acta 1998; 1429 (1): 83-92.

70. Lettrs BJ. Is there an alternating site co-operativity between the two subunits of lamb liver 6-phosphogluconate dehydrogenase. Biochem J. 1993; 291: 325-326.

71. Phillips C, Barret MP, Gover S, Le Page RWF, Adams MJ. Preliminary crystallographic study of 6-phosphogluconate dehydrogenase from trypanosoma brucei. J Mol Biol. 1993; 233: 317-321.

72. Tetaud E, Hall DR, Gourley DG, Leonard GA, Arkison S, Barrett MP, Hunter WN Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of 6-phosphogluconate dehydrogenase from lactococcus lactis. Acta Crystallogr D Biol crystallogr 1998; 54 (Ft) 6 pt 2: 1422-1224.

73. Adams MJ, Gover S, Leaback R, Phillips C, Somers DO'N. The Structure of 6-phosphogluconate dehydrogenase refined at 2.5 A resolution. Acta Crystallogr. Sect B. 1991; 47: 817-820.

74. Pecsenye K. Detection of individual variation in enzyme activity in natural populations of drosophila melanogaster. Hereditas 1998; 128: 145-151.

75. Broedel SE JR, Wolf RE JR. Genetic tagging, cloning and DNA sequence of the synechocaccus sp. Strain PCC 7942 gene (gnd) encoding 6-phosphogluconate dehydrogenase. J Bacteriol. 1990; 172 (7): 4023-4031.

76. Nelson K, Selander RK.Intergeneric transfer and recombination of the 6-phosphogluconate dehydrogenase gene (gnd) in enteric bacteria. Proc Natl Acad Sci. USA. 1994; 91 (21): 10227-31.

77. Thampapillai G, Lan R, Reeves PR. Molecular evolution in the gnd locus of salmonella enterica. Mol Biol Evol. 1994; 11 (6): 813-28.

78. Scott MJ, Lucchesi JC. Structure and expression of the drosophila melanogaster gene encoding 6-phosphogluconate dehydrogenase. Gene 1991; 109: 177-183.

79. Bisercic M, Feutrier JY, Reeves PR. Nucleotide sequences of the gnd genes from nine natural isolates of escherichia coli:evidence of intergenic recombination as a contributing factor in the evolution of the polymorphic gnd locus. J of bacteriolog. 1991; 3894-3900.

80. Barret MP, Phillips C, Adams MJ, Le Page RW. Overexpression in escherichia coli and purification of the 6-phosphogluconate dehydrogenase of trypanosoma brucei. Protein Exper Purif. 1994; 5 (1): 44-49.

81. Ergüven A. The red cell enzyme and blood group polymorphisms in Turkey. Middle East Technical University Master of Science in Biology. A master's thesis. Ankara 1993.

82. Tanksley SD, Kuehn GD. Genetics, subcellular localization and molecular characterization of 6-phosphogluconate dehydrogenase isozymes in tomato. Biochem Genet 1985; 23: Nos 5/6.

83. Harbitz İ, Chowdhary B, Chowdhary R, Kran S, Frengen E, Gustavsson I, Davies W. Isolation, characterization and chromosomal astignment of a partial cDNA for porcine 6-phosphogluconate dehydrogenase. Hereditas 1990; 112: 83-88.

84. Gromnicki AR, Bentley MM. The isolation and characterization of a mutant allele a new x-linked locus, mex, affecting NADP-dependant enzymes in drosophila melanogaster. Biochem Genet. 1991; 29 (3/4): 145-162.

85. Lareu MV, Alvarez-Prechous, Pardinas C, Concheiro L, Carracedo A. Genetic markers in alcoholic liver cirrhosis. Hum Hered. 1992; 42 (4): 235-241.

86. Mamolini E, Beratta M, Cappellozza G, Moncinelli P, Scapoli C, Barale R, Barrai I. Genetic Structures in the population of Venetto. Hum Hered. 1992; 42 (6): 347-359.

87. Balanovskaia EV, Balanovskii OP, Spitsyn VA, Bychkovskaia LS, Makarov SV, Pai GV, Subbota DS. Russkii genofond. Genografiia eritrotsitarn ykh gennykh markerov (ACP1,PGM1, ESD, GLO1,6-PGD). Translated Title: The russian gene pool. genogeography of erythrocyte genetic markers (ACP1, PGM1, ESD, GLO1, 6PGD) Genetika 2001; 37 (8): 1138-1151.

88. Cole RA, Lynn J. Spatial and temporal population structure of brevicoryne brassicae. Ent Experimen Applicata 1996; 78: 121-127.

89. Ganghe B, Juneja RK. Prealiction of the halothane (hal) genotypes of pigs by deducing hal, phi, Po2, Pgd haplotypes of parents and offspiring; results from a large-scale practice in swedish breeds. An Blood Group Biochem Genet .1985; 16: 265-283.

90. Preston SL, Arthur F, Morris MC. An electrophoretic variant of 6-PGD in rat and its application in detecting somatic cell hybrids. Biochem Genet. 1983; 21: Nos ½.

91. Beitner R, Naor Z. Intracellular distrubition of isoenzymes of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6- phosphogluconate dehydrogenase in rat adipose tissue. Biochim Biophys Acta. 1972; 268 (3): 761-765.

92. Bertram MA, Meyer EA, Lile JD, Morse SA. A comparasion of isozymes of five axenic giardia isolates. J Parasitol. 1983; 69 (5): 793-801.

93. Schnarrenberger C, Oeser A, Tolbert NE. Two izoenzymes of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase from spinach leaves. Arch Biochem Biophys. 1973; 154 (1): 438-448.

94. Skolov AP, Luchin SV, Trotsenko IuA. Purification and properties of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase from pseudomonas oleovorans. Biokhimiia (Biokhimiia (Moscow, Russia) 1980; 45 (8): 1371-1378.

95. Niehaus WG, Richardson SB, Wolz RL. Slow-binding inhibition of 6-phosphogluconate dehydrogenase by zinc ion. Arch Biochem Biophys. 1996; 333 (2): 333-337.

96. Chooback L, Price NE, Karsten WE, Nelson J, Sundstrom P, Cook PF. Cloning, expression, purification and characterization of the 6-phosphogluconate dehydrogenase from sheep liver. Protein Exper Purif. 1998; 13 (2): 251-258.

97. Sinicropi DV, Kauffman FC. Retragrade alteration of 6-phosphogluconate dehydrogenase in aaxotomized superior cervical ganglia of the rat. J Biol Chem. 1979; 254 (8): 3011-3017.

98. Yoon H, Anderson CD, Anderson BM. Kinetic studies of haemophilus influenzae 6- phosphogluconate dehydrogenase . Biochim Biophys Acta. 1989; 994 (1): 75-80.

99. Kato N, Sahm H, Schntte H, Wagner F. Purification and properties of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6- phosphogluconate dehydrogenase from a methanol-utilizing yeast, candida boidinii. Biochim Biophys Acta. 1979; 566 (1): 1-11.

100. Tsai CS, Chen Q. Purification and kinetic characterization of 6-phosphogluconate dehydrogenase from schiozaccharomyces pompe. Biochem Cell Biol. 1998; 76 (4): 637-644.

101. Betts SA, Mayer RJ. Purification and properties of 6-phosphogluconate dehydrogenase from rabbit mammary gland. Biochem J. 1975; 151 (2): 263-270.

102. Bridges RB, Palumbo MP, Wittenberger CL. Purification and properties of NADP-spesific 6-phosphogluconate dehydrogenase from streptococcus faecalis. J Biol Chem. 1975; 250 (15): 6093-100.

103. Kroviarski Y, Cochet S, Boivin P, Bertrand O. Automated purification of human erythrocytic 6-phosphogluconate dehydrogenase. J Chromatogr. 1982; 243 (1): 111-121.

104. Walter G, Niehaus G, Flynn T. A potent spesific inhibitor of cryptococcus neoformans and of certain other fungal enzymes. Mycopathologia 1993; 123: 155-158.

105. Çiftçi M, Beydemir Ş, Yılmaz H, Bakan E. Effects of some drugs on rat erythrocyte 6-phosphogluconate dehydrogenase: an in vitro and in vivo study. Pol J Pharmacol. 2002; 54: 275-280.

106. Somers DO, Hajdu J, Adams MJ. A two-step purification procedure for sheep liver 6- phosphogluconate dehydrogenase. Protein Exper Purif. 1991; 2 (5-6): 385-389.

107. Kroviarski Y, Cochet S, Vadon C, Truskolaski A, Boivin P, Bertrand O. Purification of human 6-phosphogluconate dehydrogenase from human haemolysate with chromatography on an immobilized cye as the essential step and use of

automation. Simultaneous purification of lactate dehydrogenase. J Chromatogr.1988; 449 (2): 413-422.

108. Matteuzzi M, Bellini T, Dallocchio F. Purification and properties of 6-phosphogluconate dehydrogenase from human erythrocytes. Boll Soc Ital Biol Sper. 1981; 57 (20): 2018-21.

109. Pearse BM, Rosemeyer MA. Human 6-phosphogluconate dehydrogenase. Purification of the erythrocyte enzyme and the influence of ions and NADPH or its activity. Eur J Biochem. 1974; 42 (1): 213-23.

110. Hanau S, Dallocchio F, Rippa M. Identification of the lizin residüe involved in the inactivation of lamb liver 6-phosphogluconate dehydrogenase by fluorescein 5'-isothiocyanate. Biochem Int. 1991; 25 (4): 613-620.

111. Martin W, Voss C. The determination of the red cell izoenzymes 6-phosphogluconate dehydrogenase (EC 1.1.1.44) and acid phosphatase (313.2) by means of agarose jel thinlayer. Blut (Blut) 1978; 36 (1): 35-39.

112. Quadri F, Dean PD. The use of various immobilized-triazine afinity dyes for purification of 6- phosphogluconate dehydrogenase from bacillus stearothermophilus. Biochem J. 1980; 191 (1): 53-62.

113. Morelli A. Rapid purification of human erythrocyte 6-phosphogluconate dehydrogenase by means of affinity chromotography. Ital j Biochem. 1979; 28 (4): 280-284.

114. Corne A. Purification by dye-ligand chromotography of an NADP-dependent enzyme, 6- phosphogluconate dehydrogenase from lamb's liver. Anal Biochem. 1982; 121 (2): 227-229.

115. Telefoncu A, Telefoncu F. Glucose 6-fosfat dehidrogenaz aktivitesine primaquine etkisi. Tr J of Med Sci. 1989; 14: 57-63.

116. Nang Wang I, Dykhuizen DE. Variation of enzyme activities of a branched pathway involved in the utilization of gluconate in Escherichia coli. Evolution 2001; 55 (5): 897-908.

117. Barroso JB, Peragon J, Salguero LG, De la Higuera M, Lupianez JA. Kinetic behaviour and protein expression of hepatic NADPH-production systems during development of rainbrow trout(oncorhynchusmykiss). Aquaculture 1999; 179: 375-385.

118. Velasko P, Sieiro AM, İbarguren İ, Ramos-Martinez Jİ, Barcia R. The modulation of oksidative phase of the pentose phosphate pathway in Mouse liver. Int J Biochem Cell Biol. 1995; 27 (10): 1015-1019.

119. Cases J, Puing M, Caporiccio B, Baroux B, Baccou JC, Besancon P, Rouanet JM. Glutathione-related enzymic activities in rats reseiving high cholosterol or Standard diets supplemented with two forms of selenium. Food Chemistry 1999; 65: 207-2011.

120. Umazume K, Nishida M, Sakurai H, Yoshimura Y, Kawada J. Variations in manganese effect on 6-phosphogluconate dehydrogenases from the thyroid and liver of the Mouse and an evidence for non-interchangeability of manganese and magnesium. Biochem Int. 1990; 21(1): 85-95.

121. Mizuno Y. Glucose 6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activities in early stages of devolopment in dystrophic chicens. J of Neurol Sci. 1985; 68: 47-60.

122. Benzi G, Marzatico F, Pastoris O, Villa RF. Relationship between aging, drug treatment and the cerebral enzymatic antioxidant system. Exp Gerontol. 1989; 24 (2): 137-148.

123. Implication of lysine residues in the loss of 6- phosphogluconate dehydrogenase activity in aging human erythrocytes. Mech Agei and Develop. 1991; 59: 291-297.

124. Ramazan HC. Bazı spalax populasyonlarında glukoz 6-fosfat dehidrogenaz ve 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enzimlerinin varyasyonları üzerine bir çalışma. İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi Malatya 1993.

125. Mosca A, Paleari R, Rosti E, Luzzana M, Barella S, Sollaino C, Galanello R. Simultaneous Automated determination of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase activities in whole blood. Eur J Clin Chem Clin Biochem. 1996; 34: 431-438.

126. Rippa M, Signorini M, Dallocchio F. A multiple role coenzyme in the mechanism of action of 6-phosphogluconate dehydrogenase. The oxidative decarboxylation of 2 deoxy-6-phosphogluconate. The J Biol Chem. 1973; 248 (14): 4920-4925.

127. Rowley DL, Richard E, Wolf JR. Molecular characterization of the Escherichia coli K-12 zwf gene.Encoding glucose 6-phosphate dehydrogenase. J Bacteriol. 1991; 968-977.

128. Debnam PM, Emes MJ. Subcelular distrubition of enzymes of oxidative pentose phosphate pathway in root and leaf tissues. J Exper Botan. 1999; 50 (340): 1653-1661 .

129. Rinaudo MT, Curto M, Bruno R. Changes in the activities of $NADP^+$-linked dehydrogenases during ontogenesis in the chicken. Brith Poult Sci. 1984; 25: 221-226.

130. Ninfali P, Malatesta M, Biagiotti E, Aluigi G, Gazzanelli G. Glucose 6-phosphate dehydrogenase in small intestina of rabbit: Biochemical properties and subcellular localization. Acta Histochem. 2001; 103: 287-303.

131. Ninfali P, Aluigi G, Capellacci S, Biagiotti E. Heterogeneous disrubition of glucose 6-phosphate dehydrogenase in lingual epithelium. Acta Histochem. 2000; 102: 339-352.

132. Garcia-Batuel L, Garcia-Batuel VM. Connective tissue metabolism in normal and atrophic skeletal muscle. J Neurol Sci.1980; 47 (1): 69-77.

133. Suryadi H, Yoshida N, Yamada-Onodera K, Katsuragi T, Tani Yoshiki. Characterization of a flavinogenic mutant of methanol yeast candida boidinii and its extracellular secretion of riboflavin. J Biosci Bioengin. 2000; 90 (1): 52-56.

134. Kaur K, Singh R. Sugar metabolism and partitioning in cytosol and bacteroid fractions of chickpea nodules (cicer arietinum). Plant Physiol Biochem. 1999; 37 (9): 685-692.

135. Ohara H, Uchida K, Yahata M, Kondo K. NAD^+-spesific 6-phosphogluconate dehydrogenase in lactic acid bacteria. Biosci Biotech Biochem. 1996; 60 (4): 692-693.

136. Chesnokova LS, Malitskaia ED, Voinova NE. A comperative study of the interaction b etween glutathione r eductase a nd 6-phosphogluconate d ehydrogenase o f rat liver with certain affinity sorbents. Ukr Biokhim Zh. 1994; 66 (4): 58-65.

137. Yurlova NA, Kudryashova OA, Sof AV. Effect of the nitrogen source on biosynthesis of exopolysaccharides and activity of carbon metabolism enzymes in aureobasidium pullulans. Microbiology 1997; 66 (4): 391-396.

138. Kreutzer RD, Souraty N, Semko ME. Biochemical identities and differences among leishmania species and subspecies. Am J Trop Med Hyg 1987; 36 (1): 22-32.

139. Batzli JM, Grave WR, Vanberkum P. Isolation and characterization of rhizobia effective with maackia-amurensis. J Am Soc Hortic Sci. 1992; 117 (4): 612-616.

140. Stehmann C, Grant BR. Inhibition of enzymes of the glycolytic pathway and hexose monophosphate bypass by phosphonate. Pes Biochem Physiol. 2000; 67: 13-24.

141. Dyson JE, D'Orazio RE, Hanson WLT. Sheep 6-phosphogluconate dehydrogenase. Isolation procedure and effect of pH, ionic strength, and metal ions on the kinetic parameters. Archiv of Biochem Biophys. 1973; 154 (2): 623-635.

142. Dyson JE, D'Orazio RE, Hanson WLT. Sheep 6-phosphogluconate dehydrogenase. Inhibition by nucleoside phosphates and by other metabolic intermediates. J Biol Chem. 1973; 248 (15): 5428-5415.

143. Roark S, Brown K. Effects of metal contamination from mine tailings on allozyme distrubitions of populations of Great plains fishs. Environ Toxicol Chem. 1996;15 (6): 921-927.

144. Sarkar S, Yadov P, Trivedi R, Bensal AK, Bhatnagar D. Cadmium-induced lipid peroxidation and the statu of the antioxidant system in rat tissues. J Trace Elem Med Biol. 1995; 9 (3): 144-149.

145. Medina Puerta MM, Gallego-Iniesta M, Garrido-Pertierra A. Kinetic analysis of 6-phosphogluconate dehydrogenase from bass liver: Effects of temperature and pH on its catalytic function. Arch Biochem Biophys. 1988; 262 (1): 130-141.

146. Grefe U, Bormann EJ, Truckenbrodt G. Control by phospho-adenosine diphospho-ribose of $NADP^+$-dependent isocitrate dehydrogenase in streptomyces griseus. Z Allg Mikrobiol. 1980; 20 (10): 607-611.

147. Street JC, Alfieri AA, Koutcher JA. Quantitation of metabolic and radiobiological effects of 6-aminonicotinamide in RIF-1 tumor cells in vitro. Cancer Research. 1997; 57: 3956-3962.

148. Street JC, Mahmood U, Ballon D, Alfieri AA, Koutcher JA. ^{13}C and ^{31}P NMR investigation of effect of 6-Aminonicotinamide on metabolism of RIF-1 tumor cells in vitro. The J Biol Chem. 1996; 271: 4113-4119.

149. Hutchison JS, Winberry L, Nakayama R, Holten D. Kinetics for changes in enzyme synthesis and mRNA content and hormones required for induction of 6-phosphogluconate dehydrogenase in hepatocytes. Biochim Biophys Acta. 1984; 781: 30-38.

150. Donaldson WE, Thaxton JP. Mercuric cloride effects on the activities of some hepatic enzymes in chicks. Poult Sci. 1975; 54 (5): 1613-1616.

151. Park JH, Hill EJ, Chou TH, LeQuire V, Roelofs R. Park CR. Mechanism of action of penicillamine in the treatment of avian muscular dystrophy. Ann N Y Acad Sci. 1979; 317: 356-369.

152. Ribeiro SM, Chagas GM, Compello AP, Klopsel ML. Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria V. Effect on the homeostasis of the reactif oxygen spesis . Cell Biochem Funct. 1997; 15 (3) 203-209.

153. Hanau S, Rippa M, Berteli M, Dallocchio F, Barret MP. 6-phophogluconate dehydrogenase from trypanosoma brucei kinetic analysis and inhibition by trypanodical drugs. Eur J Biochem. 1996; 240: 592-599.

154. Kochan Z, Bukato G, Swierczynski J. İnhibition of lipogenesis in rat brown adipose tissue by clofibrate. Biochem Pharm. 1993; 46 (8): 1501-1506.

155. Giovannini PP, Rippa M, Dallocchio F, Tetaud M, Barret MP, Hanau S. The cross-linking by o-phthalaldehyde of two aminoacid residues at the active site of 6-PGDH. Biochem Mol Biol İnt. 1997; Sep. 43 (1): 153-160 .

156. Foresti M, Gaido L, Geraci G Selective gene mutation in mell cells. Mutation Research. 1992; 265: 195-202.

157. Kayaalp SÖ. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. Ankara. Hacettepe taş yayıncılık 1998; 1- 2.

158. Ommaty R. Modern ilaç rehberi feryal matbaası Ankara 2003.

159. Ninfali P, Orsenigo T, B arociani SR. Rapid purification of g lucose 6-phosphate dehydrogenase from mammal's erythrocytes. Prep Biochem. 1990; 20: 297-309.

160. Shreve DS, Levy HR. On the molecular weight of human glucose-6-phosphate dehydrogenase. Biochem Biophys Res Comm. 1977; 78: 1369-1375.

161. Morelli A, Benatti U, Gaetani GF, De Flora A..Biochemical mechanisms of glucose 6 phophate dehydrogenase deficiency. Proc Natl Acad Sci. USA 1978: 75; 1979-1983.

162. Segel IH. Biochemical calculations. Newyork: Inc. 1968; 403.

163. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantites of protein utilizing the principle of protein –dye binding Anal Biochem. 1976; 72: 248.

164. Laemmli DK. Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of Bacteriophage T_4. Nature 1970; 227: 680.

165. Snecador GW, Cochran WG. Statical methods. 4 th edition Iowa 1971: 170-172.

166. Reiter R, Tang L, Garcia JJ, Munoz-Hoyos A. Life Sci. Pharmalogical actions of melatonin in oxygen radical. Pathophysiology. 1997; 60: 2255-2271.

167. Soysal T, Bakan E. Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzimi, kinetik parametreleri ve klinik önemi. Doğa Bilim Dergisi 1984; 8(1): 150-153.

168. Knapen MFCM, Zusterzeel PLM, Peters W HM, Steegers E AP. Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction. Eur J of obstetrics and gynecology and Reproductive Biology 1999; 82: 171-174.

169. Erat M. İnsan ve sığır eritrosit glutatyon redüktaz enziminin saflaştırılması, karekterizasyonu, bazı ilaç ve kimyasal maddelerin inhibisyon veya aktivasyon etkilerinin araştırılması. Atatürk Üniviversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı Doktora Tezi Erzurum. 2002.

170. Jaenicke L. 1984 Proteinbestimmung, Einführung in the praxis des Biochemikers, Kölhn 27.

171. Rendina G. 1971. Quantitive determination of protein by the Biüret reaction Experimental methods in modern biochemistry, W.B. Saunders Company, London 75.

172. Çiftçi M, Küfrevioğlu Ö.İ, Gündoğdu M , Özmen İ. Effects of some antibiotics on enzyme activity of glucose 6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. Pharm Res. 2000; 41(1): 109-113.

173. Beydemir Ş, Çiftçi M, Küfrevioğlu Ö.İ. Purification and characterization of glucose 6-phosphate dehydrogenase from sheep erythrocytes, and inhibitory effects of some antibiotics on enzyme activity. J Enzy Inhib Med Chem. 2002; 17 (4): 271-277.

174. Beydemir Ş, Çiftçi M., Küfrevioğlu Ö.İ., Büyükokuroğlu, M.E. Effects of gentamicin sulfate on enzyme activities of carbonic anhydrase from human erythrocytes in vitro and from rat erythrocytes in vivo. Biol Pharma Bull. 2002: 25 (8); 966-969.

175. Warnock, D.G. Diuretic agent. In: Basic and Clinical Pharmacology, 4th edn., Ed. Katzung B.G. Appletion and Lange, USA.1989: 183-197.

176. Telefoncu A. Temel ve uygulamalı enzimoloji. İzmir Ege Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Yayınları (der) 1986;59.

177. Carlier E, Pujol R. Supra-normal sensitivity to ototoxic antibiotic of the developing rat cochlea. Arch Otorhinolaryngol. 1980; 226 (3): 129-133.

178. Jozepovitz C, Levine R, Farruggellat, Kaloyanides GJ. Comparative effects of aminoglycosides on renal cortical and urinary phospholipids in the rat. Proc Soc Exp Biol Med. 1986;182 (1):1-5.

179. Mouedden EL, Laurent G, Mingeot-Leclerceq, MP Taper HS, Cumps J, Tulkens PM. Apoptosis in renal proximal tubules of rats treated with low doses of aminoglycosides. Antimicrob Agents Chemother. 2000: 44; 665-675.

180. Slighter RG, Montenaro MJ, Fabian RJ, Bhandari JC, Donikian MR, Drobeck HP. Comparative nephrotoxicity of hydroxygentamicin and other aminoglycosides in rats. Fundam Appl Toxicol. 1984 Aug; 4(4):558-567.

181. Toubeau G, Laurent G, Carlier MB, Abid S, Maldague P, Heuson-Stiennon JA, Tulkens PM. Tissue repair in rat kidney cortex after short treatment with aminoglycosides at low doses: Acomperative biochemical and morphometric study. Lab Investig. 1986; 54 (4): 385-393.

182. Kai S, Kohmura H, Ishikawa K, Kawano S, Sakai A, Kuroyanagi K, Kadota T, Takahashi N. Reproductive and developmental toxicity studies on cefepime dihydrochloride administered subcutaneously to rats during the premating, gestation and lactation periods. Jpn J Antibiot. 1992; 45 (6): 642-660.

183. Forgue ST, Shyu W.C, Gleason CR, Pittman KA, Barbhaiya, RH. Pharmacokinetics of the novel cephalosporin cefepime (BMY-28142) in rats and monkeys. Antimicrob Agents Chemother. 1987;31(5):799-804.