

**KOYUN BEYNİNDEN SORBİTOL DEHİDROGENAZ
ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZASYONU ve BAZI İLAÇLARIN
ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Bedia ÖZALTIN

Doktora Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Bilim Dalı

Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVLİOĞLU

2014

Her hakkı saklıdır

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**KOYUN BEYNİNDEN SORBİTOL DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU ve BAZI
İLAÇLARIN ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Bedia ÖZALTIN

**KİMYA ANABİLİM DALI
Biyokimya Bilim Dalı**

**ERZURUM
2014**

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**KOYUN BEYNİNDEN SORBİTOL DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU ve BAZI İLAÇLARIN ENZİM
AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Prof. Dr. İrfan KÜFREYİOĞLU danışmanlığında, Bedia ÖZALTIN tarafından hazırlanan bu çalışma 30/05/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak oybirliği/oy çokluğu (.../...) ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREYİOĞLU

İmza

Üye : Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR

İmza

Üye : Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

İmza

Üye : Doç Dr. Abdülkadir ÇOBAN

İmza

Üye : Yrd. Doç. Dr. Halis ŞAKİROĞLU

İmza

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 05.06.2014 tarih ve 23/722 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU
Enstitü Müdürü

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

ÖZET

Doktora Tezi

KOYUN BEYNİNDEN SORBITOL DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE BAZI İLAÇLARIN ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Bedia ÖZALTIN

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU

Koyun beyninden sorbitol dehidrogenaz [L-iditol: NAD⁺ oksidoredüktaz, EC 1.1.1.14] enzimi saflaştırıldı. Saflaştırma; homojenatın hazırlanması, amonyum sülfat çöktürmesi, CM-Selüloz C-52 iyon değişim kromatografisi metotları ile gerçekleştirildi. Saflaştırma işlemi %0,66 verimle ve 450 kat olarak gerçekleştirildi. SDS-PAGE yöntemi ile koyun beyni SDH enziminin alt birim molekül kütlesi 38,2 kDa olarak hesaplanırken aktif formunun mol kütlesi ise jel filtrasyon kromatografisi yöntemi ile 159 kDa olarak hesaplandı. Ayrıca koyun beyni SDH enziminin optimum pH ve optimum sıcaklık değerleri sırası ile 10,0 ve 40°C olarak bulundu. Koyun beyni SDH enziminin stabil olduğu pH aralığı 5,5-8,5 olarak bulundu. Koyun beyni SDH enzimi çinko ihtiva ettiği için atomik absorpsiyon yöntemi ile çinko tayini yapıldı. Bu çalışmaların yanı sıra koyun beyni SDH enzim aktivitesi üzerine ampisilin, oksitetrasiklin dihidrat, enrofloksasin, kanamisin, gentamisin sülfat, tilozin ve sefalekssin etken maddelerinin inhibisyon etkileri araştırıldı. Bu etken maddeler için IC₅₀ değerleri ve ampisilin, enrofloksasin, oksitetrasiklin dihidrat ve kanamisin etken maddeleri için K_i sabitleri belirlendi.

2014, 111 sayfa

Anahtar Kelimeler: Sorbitol dehidrogenaz, koyun beyni, etken madde, inhibisyon

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

PURIFICATION, CHARACTERIZATION OF SORBITOL DEHYDROGENASE FROM SHEEP BRAIN, AND INVESTIGATION EFFECTS OF SOME ACTIVE SUBSTANCES ON THE ENZYME ACTIVITY

Bedia ÖZALTIN

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

Supervisor: Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVLİOĞLU

Sorbitol dehydrogenase [L-iditol: NAD⁺ oksidoreductase, EC 1.1.1.14] enzyme was purified from sheep brain. Purification was performed by methods of preparation of homogenates, ammonium sulphate precipitation, CM-Sellulose ion-exchange chromatography. The purification was performed with the yield of 0,66% and 450 fold. By the method of SDS-PAGE sheep brain SDH enzyme's subunit molecular weight was calculated as 38,2 kDa, SDH enzyme's active form molecular weight was calculated as 159 kDa via gel filtration chromatography. Besides, optimal pH and optimal temperature of the enzyme was observed as 10,0 and 40°C respectively. It was found that sheep brain SDH activity is stable between 5,5 and 8,5 pH. Because SDH enzyme has zinc atom, zinc analyze was done by atomic absorption method. In addition to these studies, the effects of inhibition of ampicillin, oxytetracycline dihydrate, enrofloxacin, kanamycin, gentamicin sulfate, tylosin and cephalexin on sheep brain SDH enzyme activity were investigated. For these active substaces IC₅₀ values were calculated and for ampicillin, enrofloxacin, oxytetracycline dihydrate and kanamycin K_i constants were determined from Lineweaver Burk graphs.

2014, 111 pages

Keywords: Sorbitol dehydrogenase, sheep brain, active substance, inhibition

TEŞEKKÜR

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

Doktora tez çalışmam süresince ilgi, sabır, anlayış ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU'na sonsuz şükran ve minnettarlığımı sunarım.

Çalışmalarım esnasında desteğini esirgemeyen biyokimya çalışma grubu hocalarım Sayın Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR'e, Sayın Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ'ye, Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR'e, Sayın Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN'e ve çalışmalarım da her an desteğini gördüğüm değerli arkadaşım Sayın Arş. Gör. Zuhale ALİM'a ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Ebru AKKEMİK'e, yardımlarını esirgemeyen Sayın Namık KILINÇ'a, Sayın Musa AKKUŞ'a ve ayrıca diğer Biyokimya çalışma grubu arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Doktora eğitimim süresince burs katkısından dolayı TÜBİTAK-BİDEB'e teşekkür ederim.

Ayrıca her zaman maddi ve manevi desteğini gördüğüm eşime ve aileme teşekkür ederim.

Bedia ÖZALTIN

Mayıs, 2014

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Sorbitol Dehidrogenaz Enzimi	16
1.2. Diabetes Mellitus.....	21
1.3. Deneysel Çalışmada Kullanılan İlaçların Etken Maddeleri	28
2. KAYNAK ÖZETLERİ	34
3. MATERYAL ve METOD.....	40
3.1. Materyal.....	40
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler	40
3.1.2. Kullanılan alet ve cihazlar	40
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması	41
3.2. Metod.....	44
3.2.1. Koyun beyni sorbitol dehidrogenaz enziminin aktivitesinin ölçümü.....	44
3.2.2. Koyun beyni sorbitol dehidrogenaz enziminin saflaştırılması	45
3.2.2.a. Koyun beyni dokusunun temini ve homojenat hazırlanması.....	45
3.2.2.b. Amonyum sülfat çöktürmesi	45
3.2.2.c. Diyaliz	47
3.2.2.d. Ultrasantrifüj	47
3.2.2.e. DEAE-Sephadex iyon değişim kromatografisi	47
3.2.2.f. CM-Selüloz C-52 iyon değişim kromatografisi.....	47
3.2.3. Bradford yöntemi ile kantitatif protein tayini.....	48
3.2.4. Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi kolonunun hazırlanması ve koyun beyninden elde edilen SDH enziminin doğal halinin molekül kütlesinin tayini.....	49

3.2.5. Kalitatif protein tayini	51
3.2.6. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzim saflığının kontrolü	51
3.2.7. Sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzimin molekül kütlesi tayini	52
3.2.8. Koyun Beyni Sorbitol dehidrogenaz enziminin aktivitesi üzerine bazı ilaç etkilerinin belirlenmesi	53
3.2.9. İnhibitör etkisi gösteren ilaçlar için IC ₅₀ ve K _i değerlerinin belirlenmesine ait çalışmalar	53
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	60
4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik.....	60
4.2. Koyun Beyni Sorbitol Dehidrogenaz Enziminin Saflaştırılması Sonuçları	60
4.2.1. Amonyum sülfat çöktürmesi sonuçları.....	60
4.2.2. Koyun beyni sorbitol dehidrogenaz enziminin CM-Selüloz C-52 iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılması sonuçları	62
4.3. Koyun Beyni Sorbitol Dehidrogenaz Enziminin SDS-PAGE ile Saflık Kontrolü	62
4.4. Koyun Beyni Sorbitol Dehidrogenaz Enziminin Optimum pH Çalışmalarına Ait Sonuçlar.....	64
4.5. Koyun Beyni Sorbitol Dehidrogenaz Enziminin Optimum İyonik Şiddetin Bulunmasına Dair Sonuçlar	66
4.6. Koyun Beyni Sorbitol Dehidrogenaz Enziminin Optimum Sıcaklık Çalışmalarına Ait Sonuçlar	68
4.7. Koyun Beyni Sorbitol Dehidrogenaz Enziminin Stabil Olduğu pH'nın Bulunmasına Dair Çalışma Sonuçları	70
4.8. Koyun Beyni Sorbitol Dehidrogenaz Enziminde Çinko Belirlenmesi.....	72
4.9. Koyun Beyni Sorbitol Dehidrogenaz Enziminin Aktif Formunun Molekül Kütlesinin Sephadex G-100 Jel Filtrasyon Kromatografisi ile Belirlenmesine Ait Sonuçlar.....	73
4.10. Koyun Beyni Sorbitol Dehidrogenaz Enzimi Üzerine Bazı İlaçların Etken Maddelerinin Etkilerinin Belirlenmesine Ait Çalışma Sonuçları	74

4.11. Koyun Beyni Sorbitol Dehidrogenaz Enzimi Üzerine İnhibitör Etkisi	
Gösteren Bazı İlaçlar İçin K_i Değerlerinin Belirlenmesine Ait Çalışmaların	
Sonuçları	80
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	84
KAYNAKLAR	103
ÖZGEÇMİŞ	112

KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ

ADH	Alkol dehidrogenaz
AR	Aldoz redüktaz
BSA	Bovine serum albümin
°C	Santigrat derece
DCCT	The Diabetes Control and Complication Trials Group
DHAP	Dihidroksiaseton fosfat
DM	Diabetes melitus
DNA	Deoksiribonükleik asit
E	Enzim
EC	Enzim komisyon numarası
EGÜ	Erken glikasyon ürünleri
EI	Enzim-İnhibitör kompleksi
ES	Enzim-Substrat kompleksi
ESI	Enzim-Substrat-İnhibitör kompleksi
EÜ	Enzim ünitesi
GAPDH	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz
GR	Glutasyon redüktaz
GSH	İndirgenmiş glutasyon
GSSG	Yükseltgenmiş glutasyon
I	İnhibitör
IDF	International Diabetes Federation
İGÜ	İleri glikasyon ürünleri
IC ₅₀	Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
K _i	Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti
MEB	Milli Eğitim Bakanlığı
NAD ⁺	Nikotinamid Adenin Dinükleotit (yükseltgenmiş form)
NADH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit (indirgenmiş form)
NADP ⁺	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat (yükseltgenmiş form)
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat (indirgenmiş form)

NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentaz
Nox	NADH-oksidaz
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PER	Amonyum peroksidisülfat
PKC	Protein kinaz C
RNA	Ribonükleik asit
mRNA	Mesajcı RNA
ROS	Serbest oksijen radikalleri
rpm	Devir/dakika
S	Substrat
SDH	Sorbitol dehidrogenaz
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametilendiamin
UKPDS	United Kingdom Prospective Diabetes Study
V _{max}	Maksimum hız

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Poliöl yolu ve enzimleri.....	17
Şekil 1.2. SDH enziminin aktif bölgesindeki çinko iyonunun koordinasyonu.....	19
Şekil 1.3. SDH enziminin kuarterner yapısı	19
Şekil 1.4. SDH enziminin bir alt biriminin yapısı	20
Şekil 1.5. Sorbitol (poliöl) yolu	23
Şekil 1.6. İleri glikasyon ürünleri (İGÜ) oluşumu	27
Şekil 1.7. Ampisilin etken maddesinin yapısal formülü	29
Şekil 1.8. Tylosin etken maddesinin yapısal formülü.....	29
Şekil 1.9. Sefalekssin etken maddesinin yapısal formülü	30
Şekil 1.10. Oksitetrasiklin dihidrat etken maddesinin yapısal formülü	31
Şekil 1.11. Enrofloksasin etken maddesinin yapısal formülü.....	32
Şekil 1.12. Gentamisin sülfat etken maddesinin yapısal formülü.....	33
Şekil 1.13. Kanamisin etken maddesinin yapısal formülü.....	33
Şekil 2.1. Sorbitol dehidrogenaz inhibitörü SDI 158'in kimyasal yapısı	37
Şekil 2.2. SDI 158 (CP-166,572)'in insan SDH enziminin katalitik çinko iyonu ve NADH ile etkileşimi	38
Şekil 4.1. Bradford yöntemiyle proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart grafik.....	60
Şekil 4.2. Koyun beyni sorbitol dehidrogenaz enzimi için amonyum sülfat doğunluk aralığı tespitine yönelik aktivite-çöktürme aralığı grafiğı.....	61
Şekil 4.3. Koyun beyni sorbitol dehidrogenaz enziminin saflığının SDS-PAGE'de elde edilen sonucu	63
Şekil 4.4. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yöntemiyle koyun beyni SDH enziminin molekül kütlesi tayininde kullanılan standart grafik	63
Şekil 4.5. Koyun beyni SDH enziminin aktivitesi üzerinde pH'nın etkisi	66
Şekil 4.6. Koyun beyni SDH enziminin aktivitesi üzerinde iyonik şiddetin etkisi	68
Şekil 4.7. Koyun beyni SDH enziminin aktivitesi üzerinde sıcaklığın etkisi.....	69
Şekil 4.8. Koyun beyni SDH enziminin aktivitesinin belirli pH değerlerinde (pH 5,0-8,0) zamanla değişimi	71

Şekil 4.9. Koyun beyni SDH enziminin aktivitesinin belirli pH değerlerinde (pH 8,5-10,5) zamanla değişimi	72
Şekil 4.10. Jel filtrasyon kromatografisi sonucu elde edilen enzim çözeltilerinde atomik absorpsiyon spektrofotometresi yöntemi ile çinko tayini yapılmasının sonucu	72
Şekil 4.11. Koyun beyni SDH enziminin aktif formunun molekül kütlesinin tayini için kullanılan jel filtrasyon kromatografisi grafiği.....	73
Şekil 4.12. Koyun beyni SDH enziminin aktif formunun molekül kütlesi tayini için Sephadex G-100 kolon materyali kullanılarak yapılan jel filtrasyon kromatografisi sonucu elde edilen standart grafik.....	74
Şekil 4.13. Koyun beyni SDH enzimi üzerine ampisilin etken maddesinin etkisi	77
Şekil 4.14. Koyun beyni SDH enzimi üzerine oksitetrasiklin dihidrat etken maddesinin etkisi	77
Şekil 4.15. Koyun beyni SDH enzimi üzerine tylosin etken maddesinin etkisi	78
Şekil 4.16. Koyun beyni SDH enzimi üzerine kanamisin etken maddesinin etkisi.....	78
Şekil 4.17. Koyun beyni SDH enzimi üzerine enrofloksasin etken maddesinin etkisi...	79
Şekil 4.18. Koyun beyni SDH enzimi üzerine gentamisin sülfat etken maddesinin etkisi	79
Şekil 4.19. Koyun beyni SDH enzimi üzerine sefalekssin etken maddesinin etkisi	80
Şekil 4.20. Koyun beyni SDH enzimi üzerine ampisilin etken maddesinin etkisi	81
Şekil 4.21. Koyun beyni SDH enzimi üzerine oksitetrasiklin dihidrat etken maddesinin etkisi	81
Şekil 4.22. Koyun beyni SDH enzimi üzerine kanamisin etken maddesinin etkisi.....	82
Şekil 4.23. Koyun beyni SDH enzimi üzerine enrofloksasin etken maddesinin etkisi...	82
Şekil 5.1. Mikrovasküler komplikasyonların biyolojisi.....	84
Şekil 5.2. Büyük damarlarda metabolik hasar	85
Şekil 5.3. Diyabetes mellitusta artan oksidatif stres için mekanizma.....	85
Şekil 5.4. Hiperglisemi ve endotelial fonksiyon bozukluğu	86
Şekil 5.5. Poliöl yolunun diyabetik komplikasyonlarla ilişkisi	87
Şekil 5.6. Sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesiyle iskemik rahatsızlık arasındaki ilişki	88
Şekil 5.7. Oksidatif stres ve sorbitol yolu arasındaki ilişki	89

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Enzim sınıfları ve katalizledikleri reaksiyon tipleri	4
Çizelge 1.2. Jel filtrasyon kromatografisinde kullanılan bazı jellerin proteinleri ayırma sınırları	13
Çizelge 3.1. Koyun beyni sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde ampisilin etken maddesinin IC ₅₀ değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları	54
Çizelge 3.2. Koyun beyni sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde oksitetrasiklin dihidrat etken maddesinin IC ₅₀ değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları	55
Çizelge 3.3. Koyun beyni sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde tylosin etken maddesinin IC ₅₀ değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları	56
Çizelge 3.4. Koyun beyni sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde kanamisin etken maddesinin IC ₅₀ değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları	57
Çizelge 3.5. Koyun beyni sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde enrofloksasin etken maddesinin IC ₅₀ değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları	58
Çizelge 3.6. Koyun beyni sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde gentamisin sülfat etken maddesinin IC ₅₀ değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları	59
Çizelge 4.1. Koyun beyni SDH enzimi için amonyum sülfat doygunluk aralığı tespitine yönelik aktivite-çöktürme aralığı çizelgesi	61
Çizelge 4.2. Koyun beyni sorbitol dehidrogenaz enziminin saflaştırılması basamakları	62
Çizelge 4.3. pH 5,5-8,0 aralığında koyun beyni SDH enziminin aktivitesini gösteren çizelge	64

Çizelge 4.4. pH 7,5-9,0 aralığında koyun beyni SDH enziminin aktivitesini gösteren çizelge.....	65
Çizelge 4.5. pH 8,5-10,5 aralığında koyun beyni SDH enziminin aktivitesini gösteren çizelge.....	65
Çizelge 4.6. Koyun beyni SDH enziminin aktivitesinin farklı iyonik şiddetlerdeki değişimini gösteren çizelge.....	67
Çizelge 4.7. Koyun beyni SDH enziminin aktivitesinin sıcaklıkla değişimini gösteren çizelge.....	69
Çizelge 4.8. Koyun beyni SDH enziminin aktivitesinin belirli pH değerlerinde (pH 5,0-8,0) zamanla değişimi	70
Çizelge 4.9. Koyun beyni SDH enziminin aktivitesinin belirli pH değerlerinde (pH 8,5-10,5) zamanla değişimi	71
Çizelge 4.10. Ampisilin etken maddesinin koyun beyni SDH aktivitesi üzerine etkisi .	74
Çizelge 4.11. Oksitetrasiklin dihidrat etken maddesinin koyun beyni SDH aktivitesi üzerine etkisi.....	75
Çizelge 4.12. Tylosin etken maddesinin koyun beyni SDH aktivitesi üzerine etkisi	75
Çizelge 4.13. Kanamisin etken maddesinin koyun beyni SDH aktivitesi üzerine etkisi	75
Çizelge 4.14. Enrofloksasin etken maddesinin koyun beyni SDH aktivitesi üzerine etkisi	76
Çizelge 4.15. Gentamasin etken maddesinin koyun beyni SDH aktivitesi üzerine etkisi	76
Çizelge 4.16. Sefalekssin etken maddesinin koyun beyni SDH aktivitesi üzerine etkisi	76
Çizelge 4.17. Koyun beyni sorbitol dehidrogenaz enzimi için bulunan IC ₅₀ değerleri ..	80
Çizelge 4.18. Koyun beyni sorbitol dehidrogenaz enzimi için bulunan K _i , K _i ' değerleri ve inhibisyon tipleri.....	83
Çizelge 5.1. Koyun beyni SDH enzim aktivitesini inhibe eden ilaçların etken maddelerinin IC ₅₀ (mM) değerleriyle tıbbi uygulamada kullanılan konsantrasyonlarının karşılaştırılması	100
Çizelge 5.2. SDH enziminin saflaştırılması ile ilgili sonuçlar.....	102

1. GİRİŞ

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

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

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

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

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

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

ifade edilmektedir. Turnover sayısı en yüksek olan enzim, $40\,000\,000\text{ s}^{-1}$ ile katalazdır (Fersht 1999).

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

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

Genel olarak enzimlerin özellikleri şu şekilde sıralanabilir;

1. Enzimler genellikle renksizdirler, suda çözünürler
2. Enzimlerin etki ettiği maddelere substrat denir. Reaksiyonsonunda meydana gelen maddeye ise ürün adı verilir.
3. Enzim substrat ilişkisi anahtar ile kilidin uyumuna benzer.
4. Enzim molekülünde aktif bölge denilen özel bir bölüm vardır. Enzim substratına geçici olarak aktif bölgeden bağlanır ve substrat-enzim bileşiği oluşur.
5. Daha sonra substrat ürüne veya ürünlere parçalanır.
6. Enzimler reaksiyondan değişmeden çıktıkları için tekrar tekrar kullanılabilirler.
7. Çok hızlı çalışırlar. Örneğin üre, enzim olmadan uzun zamanda parçalanırken, üreaz enziminin varlığında saniyede 30 000 üre molekülü parçalanabilir.
8. Her hücrede tepkime çeşidi kadar enzim çeşidi vardır.

9. Enzimler takım halinde çalışırlar. Bir enzimin etki ettiği tepkimenin ürünü, başka bir enzimin substratını oluşturur. Örneğin, amilaz enzimi nişastayı maltoza parçalar. Oluşan maltoz, maltaz enziminin substratıdır.
10. Enzimlerin bazıları tek substrata etki ederler yani spesifiktir. Örneğin, L-laktat dehidrogenaz enzimi laktik asidin yalnızca L-izomerine etki etmekte D-laktikasidi substrat olarak kullanmamaktadır.
11. Bazı enzimler ise çeşitli substratlara etki ederler yani daha az özgüldür (MEB 2011).

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

Çizelge 1.1. Enzim sınıfları ve katalizledikleri reaksiyon tipleri

	Enzim gurubu	Katalizledikleri reaksiyon tipi
1	Oksiredüktazlar	İki substrat arasındaki redoks tepkimesini katalizler.
2	Transferazlar	İki substrat arasındaki hidrojen dışındaki grupların transferini gerçekleştiren tepkimeyi katalizlerler.
3	Hidrolazlar	Su katılması suretiyle bağların parçalandığı hidroliz reaksiyonlarını katalize eden enzimlerdir
4	Liyazlar	Oksidasyon veya hidrolizden farklı bir mekanizma ile substratlardan bazı grupların uzaklaştırıldığı ve çift bağların oluşturulduğu tepkimeleri katalizleyen enzimlerdir.
5	İzomerazlar	Molekül içindeki değişiklikleri katalizleyen enzimlerdir.
6	Ligazlar	Enerjice zengin bir bağın kopması ile ortaya çıkan enerji yardımıyla iki molekülün bağlanması reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.

Enzimler genelde ya aynı reaksiyonu ya da aynı tip benzer reaksiyonları katalizlerler. Substratlara karşı spesifiklikleri oldukça yüksektir, hatta bazı enzimlerin substrat özgülükleri mutlaklır. Örneğin, proteolitik enzimler peptit bağlarının hidrolizini gerçekleştirirler. Bu enzimlerin substrat özgülükleri birbirinden farklıdır. Tripsin sadece lizin veya arginin rezidülerinin karboksil grubu tarafındaki peptit bağlarını parçalar. Kanın pıhtılaşmasında görev alan trombin ise karboksil bileşeni arginine ve amino grup bileşeni glisin aminoasitine ait peptit bağı parçalamaktadır. Buradan

anlaşılabacağı gibi trombinin substrat özgüllüğü yine bir proteolitik enzim olan tripsine göre daha fazladır (Keha ve Küfrevioğlu 2010).

Birçok enzimin stereospesifiklik özelliği de vardır. Bazı enzimler substrat molekülünün D-formunu ürüne çevirirken, bir kısmı da L-formunu ürüne dönüştüren tepkimeyi katalizlemektedir. Örneğin, glutamat dehidrogenaz enzimi L-glutamat ve laktat dehidrogenaz enzimi de L-laktat üzerinde etkilidirler (Keha ve Küfrevioğlu 2010). Bununla birlikte, aynı canlı türünde aynı reaksiyonu katalizleyen ancak farklı kimyasal ve fiziksel özellikleri olan enzimler de vardır. Bu tip enzimlere izoenzim denir. İzoenzimlerin substratlarına, kofaktörlerine ve inhibitörlerine karşı ilgileri farklıdır. İzoenzimlerin başlıca özellikleri arasında aminoasit sayı ve sırasının farklı olması, izoelektrik noktalarının farklı olması, her bir izoenzimin farklı geninin olması ve elektroforetik hareketliliklerinin farklı olması sayılabilir. İzoenzimler farklı dokularda sınırlandırılmış olabildiği gibi, bir hücrenin farklı subsellüler fraksiyonlarında da yerleşebilirler (Devlin 2002).

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

Enzimlerin aktivitesini etkileyen faktörler;

- Substrat konsantrasyonu
- Sıcaklık
- pH
- Allosterik etkiler
- Hormonlar
- İyonik şiddet
- Enzim konsantrasyonu

- İnhibitör ve aktivatörlerin varlığı şeklinde sıralanabilir.

Her enzim için aktivitelerin maksimum olduğu pH değerleri vardır. Bu değerlerin üzerinde ve altında aktivite düşer. Bu pH derecesine "Optimum pH" denir. Örneğin, proteini parçalayan pepsin, midede pH'nın 2,0 olduğu asidik ortamda maksimum çalışır; bunun aksine pankreastan salgılanan ve yine protein sindiriminde rol alan tripsin, ancak pH 8,5'te optimum olarak çalışabilir. Bir enzimin optimum pH'sı normal hücre içi ortamın pH'sı ile aynı değildir. Bu durum hücre içindeki enzim aktivitesinin kontrolünde pH-aktivite ilişkisinin önemini göstermektedir. Genelde bir kimyasal reaksiyonun hızı sıcaklıkla artış göstermektedir. Sıcaklık enzimli reaksiyonlarında hızlarının artışına sebep olan önemli bir faktördür, yani tepkime hızının yükselmesi, sıcaklıkla doğru orantılıdır. Bununla birlikte belli bir noktaya gelindiğinde enzim aktivitesinde bir düşüş gözlenir. Bu durum yüksek sıcaklıkta enzimin üç boyutlu yapısının etkilendiğini yani enzimin denatüre olduğunu göstermektedir. Bir enzim için 10°C'lik sıcaklık değişiminin meydana getirdiği aktivite farklılığı Q_{10} değeriyle ifade edilir (Keha ve Küfrevioğlu 2010).

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

Enzimlerin hem *in vivo* hem de *in vitro* aktivitelerinin, bazı bileşikler tarafından azaltılması ve hatta yok edilmesi olayına inhibisyon denir. Bu olaya sebep olan yani enzimle katalizlenen bir reaksiyonun hızını azaltan herhangi bir maddeye de inhibitör denilir. İnhibitörler genellikle küçük molekül kütlesine sahip bileşikler veya iyonlardır (Keha ve Küfrevioğlu 2010). Enzim aktivitesini inhibe eden madde veya faktörler aşağıdaki şekilde sıralanabilir:

- Substrat benzeri maddeler
- Toksinler

- İlaçlar
- Metal kompleksleri.

Enzimatik aktivitenin inhibisyonu, biyolojik sistemlerde başlı başına bir kontrol mekanizması oluşturduğundan önemli bir olaydır. Enzimler hemen hemen bütün hücresel süreçleri katalizlediğinden, enzim inhibitörlerinin bilinen en önemli farmakolojik ajanlar arasında olması tesadüfî değildir. Birçok ilaç ve zehirli bileşikler etkilerini bu yolla gösterirler (Keha ve Küfrevioğlu 2010). Örneğin; aspirin (asetilsalisilat) bazı ağrı üreten süreçleri de içine alan pek çok süreçte yer alan prostaglandinlerin sentezindeki ilk basamağı katalizleyen enzimi inhibe eder. Enzim inhibitör çalışmaları ayrıca enzim mekanizmaları hakkında değerli bilgiler sağlamıştır ve bazı metabolik yolların tanımlanmasına yardımcı olmuştur (Lehninger 2005).

İnhibisyon çalışmaları ne gibi faydalar sağlamaktadır?

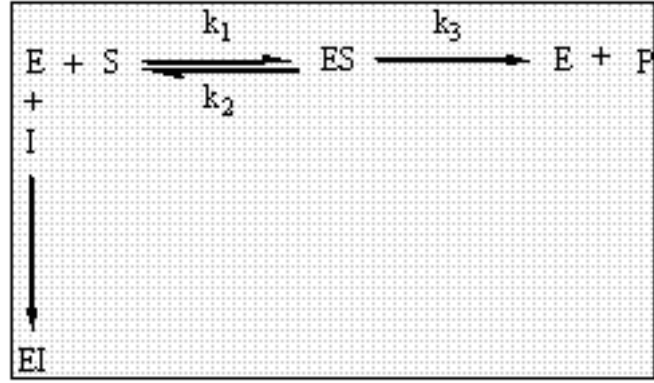
- Metabolik yollar hakkında bilgi
- İlaç ve toksinlerin, etkilerini nasıl gösterdiğinin açıklanması
- Enzim reaksiyon mekanizmalarının daha iyi aydınlatılması
- Enzim aktivitelerinin düzenlenmesiyle kontrol sisteminde etkili olmaları
- Substrat analogları kullanılarak önemli araştırmalar yapılması

Enzimatik inhibisyon iki grupta incelenir;

a) Dönüşümsüz inhibisyon

b) Dönüşümlü inhibisyon

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



şeklinde yazılabilir (Segel 1975; Keha ve Küfrevioğlu 2010).

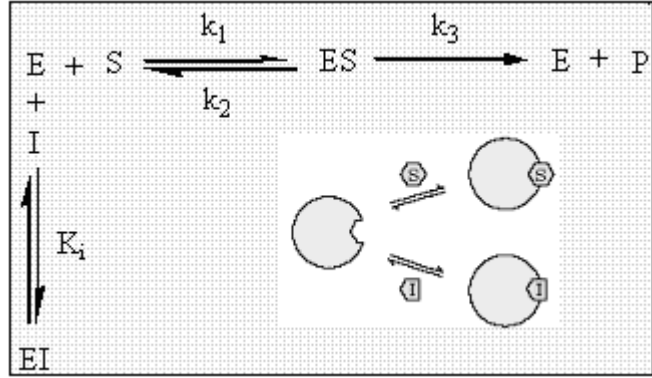
Dönüşümsüz inhibisyonun aksine dönüşümlü inhibisyonda enzim ile inhibitör etkileşmesi bir denge reaksiyonu şeklindedir.

Dönüşümlü inhibisyon üç grupta incelenir:

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

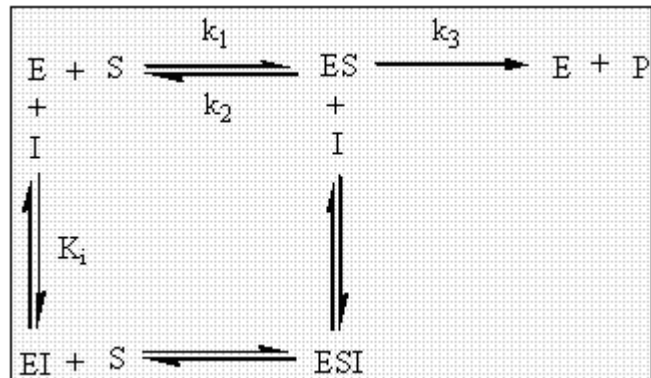
Geri dönüşümlü inhibisyon, dönüşümsüz inhibisyonun aksine bir denge reaksiyonu şeklindedir. En sık karşılaşılan dönüşümlü iki inhibisyon tipi yarışmalı ve yarışmasız inhibisyondur.

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



şeklinde yazılabilir (Segel 1975; Telefoncu 1986; Keha ve Küfrevioğlu 2010).

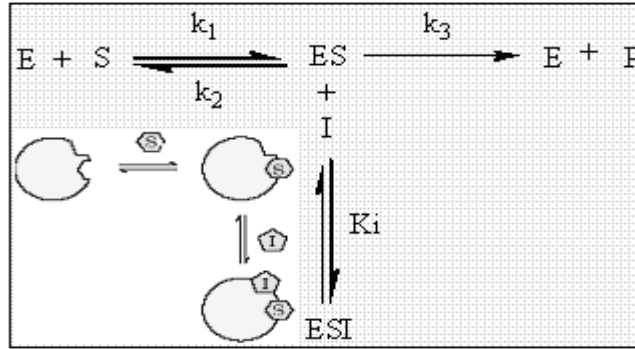
Yine dönüşümlü bir tip olan yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyonda; inhibitör ve substrat enzim molekülüne aynı anda bağlanabilir. Bu durum bağlanmanın enzimin aynı bölgesine olmadığını gösterir. Yarışmasız bir inhibitör etkisini; bir enzimin turnover sayısını, yani katalitik aktivitesini düşürerek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



şeklinde yazılabilir (Telefoncu 1986; Keha ve Küfrevioğlu 2010).

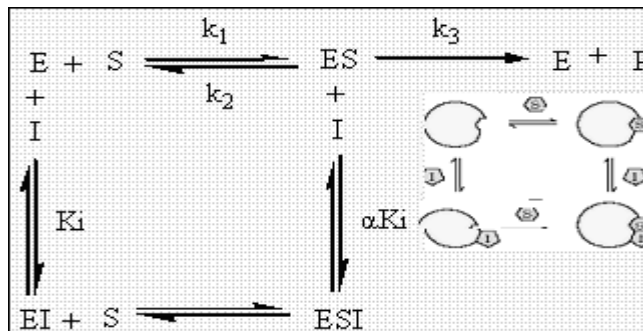
Bir başka dönüşümlü inhibisyon tipi, yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyonudur. Bu inhibisyon çeşitinde; inhibitör serbest enzime bağlanamaz, sadece ES kompleksine bağlanır. Bunun için tek substratlı sistemlerde, yarı yarışmalı inhibisyona seyrek rastlanır. Birden fazla substratlı enzimlerde bu inhibisyon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

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



şeklinde yazılır.

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



şeklinde yazılabilmektedir.

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

Birçok multienzim sistemi, net reaksiyon hızlarını kendileri düzenleme kapasitesine sahiptir. Bu sistemlerin çoğunda, seri reaksiyonların son ürünü belirli bir konsantrasyona ulaştığında; sistemin ilk enzimini veya dallanma noktasındaki enzimini inhibe eder. Bu enzimlere alloterik enzimler adı verilir. Bu olaya da feed-back (geri besleme) inhibisyonu denir. Birden fazla polipeptid zinciri ihtiva eden allosterik enzimlerde; inhibitörlerin enzime bağlanmasıyla, değişik alt birimlerin bağlanma merkezleri arasındaki etkileşmelerle allosterik inhibisyon meydana gelir. Allosterik enzimleri etkileyen bileşiklere modülatör adı verilir (Stryer 1988).

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

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

sıcaklık, pH, yüzey gerilimi gibi birçok faktörden hızlı bir şekilde etkilenerek kısa sürede enzim aktivitelerini kaybedebilmektedirler. Bu nedenle enzim saflaştırılması deneyleri oldukça dikkat gerektiren çalışmalardır.

Saflaştırma işlemleri genelde enzimlerin;

1. Molekül büyüklüğü,
2. Çözünürlükleri farklılıkları,
3. Elektriksel yük,
4. Adsorbsiyon davranışlarındaki farklılıkları esasına göre gerçekleştirilmektedir (Keha ve Küfrevioğlu 2010).

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

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

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

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

Dolgu maddesi	Ayırma sınırı (molekül kütlesi, Dalton)
Sephadex G-10	0-700
Sephadex G-15	0-1 500
Sephadex G-25	1 000-5 000
Sephadex G-50	1 500-30 000
Sephadex G-75	3 000-80 000
Sephadex G-100	4 000-150 000
Sephadex G-150	5 000-300 000
Sephadex G-200	5 000-600 000

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

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

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

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

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

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

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

Proteinlerin elektriksel yüklerine göre ayrılması, polipeptid zincirlerindeki iyonlaşabilir yan grupların sayısı ve cinsi ile belirlenen asit baz özelliklerine dayanmaktadır. Proteinler, aminoasit bileşiminde ve dizilişinde farklılık gösterdiklerinden, her protein özel bir asit baz davranışına sahiptir. Elektriksel yük farkına dayanan ayırma

metotlarından biri olan iyon değişim kromatografisinde duran fazda bulunan ve yerlerinden kolaylıkla ayrılabilen iyonlar çevrelerindeki iyonlar ile yer değiştirir. Bu değişim sonucunda duran fazın fiziki görünümünde değişme olmaz. İyon değişim kromatografisi ile basit inorganik ve organik iyonlar birbirlerinden ayrılabilceği gibi enzimler, hormonlar ve nükleik asitler gibi biyolojik önemi olan polielektrolitler de ayrılabilir.

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

Proteinlerin DEAE-Selüloz kolonları üzerinde ayrılmasında ve her bir komponentin sırasıyla elüsyonunda, azalan pH'lı tamponların bir serisi veya artan iyonik şiddetli tuz çözeltilerinin bir serisi kullanılır. Bunların kolondan geçirilmesi sırasında anyonik proteinlerin bağlanması azaltılır. Çünkü pH'nın düşmesiyle birlikte, iyon değiştiriciye tutunan proteinlerin negatif yüklü bölgeleri nötral hale gelir. Yine iyonik şiddetin artmasıyla pozitif iyonlar proteinin negatif yüklü bölgelerine bağlanırlar; negatif iyonlar ise, proteinlerle iyon değiştiriciye bağlanma hususunda yarışa girerler. Böylece proteinler bu bölgeye daha yavaş bir kuvvetle bağlanırlar ve hatta koparlar.

Proteinlerin CM-selüloz kolonları üzerinde ayrılmasında ve her bir komponentin sırasıyla elüsyonunda ise artan pH'lı tamponların bir serisi veya azalan iyonik şiddetli tuz çözeltilerinin bir serisi kullanılır. Bu sayede katyonik proteinlerin kolona bağlanması azaltılır.

Elüatlar küçük fraksiyonlarda toplanarak gerekli analizler yapılır. Bu metodun önemli bir tarafı da, iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisini kombine edebilmesidir. Örneğin, DEAE-Sephadex kullanılarak proteinleri yüklerine ve molekül büyüklüklerine göre ayırmak mümkündür.

İyon değişim kromatografisi yöntemiyle proteinlerin saflaştırılması sırasında kolonun hazırlanması, dengelenmesi, numune tatbiki ve elüsyon işlemleri jel filtrasyon kromatografisindeki çok benzer. En önemli fark elüsyon işlemindedir. Genelde iki farklı elüsyon uygulanır. Basamaklı elüsyonda, kolondan proteinlerin elüsyonu sırasında değişik pH'lı ve değişik iyonik şiddetli çözeltiler sırasıyla geçirilir. Bu yöntem çok zaman alıcıdır. Gradientli elüsyonda ise bir gradient mikser kullanılır. Elüsyon tamponunda bir pH gradienti oluşturulur. Her protein izoelektrik pH'sına geldiğinde yüksüzleşir ve duran faza tutunamayarak elüe edilir. Benzer durum iyonik şiddet gradienti olarak da uygulanabilir (Küfrevioğlu ve Çiftçi 2008).

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

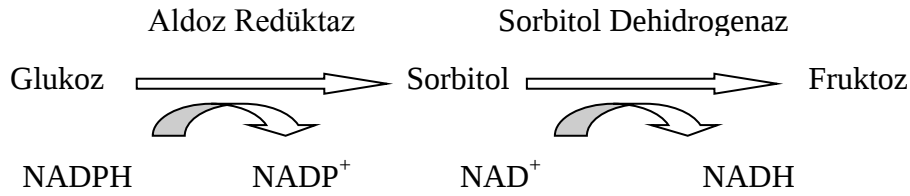
Kataliz olayı ile ilgili ilk denemeler 1760-1825 yılları arasında midedeki enzimatik sindirim üzerine yapılmıştır. Belirli bir enzim üzerindeki ilk çalışma 1860 yılında Pasteur tarafından yapılmış ve fermantasyon olayının enzimlerce yürütüldüğünü ispat etmiştir. Bu yüzden enzimler için "Ferment" terimi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

1.1. Sorbitol Dehidrogenaz Enzimi

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

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

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



Şekil 1.1. Poliol yolu ve enzimleri

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

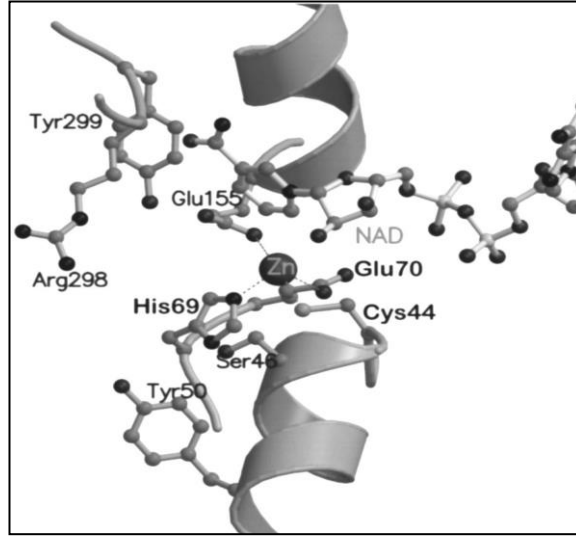
Açık yapı ve mekanistik olarak benzer olmalarına rağmen SDH ve ADH farklı Çinko içerikleri ile beraber birçok ayırt edici özellikleri vardır. SDH tetramerik olmasına karşın, memeli ADH dimeriktir. SDH her bir alt biriminde katalitik bölgede bulunan bir çinko atomu içerirken, ADH her bir alt biriminde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

Polioller $\text{C}_n\text{H}_2(\text{H}_2\text{O})_n$, ya da alditoller; aldozlardan ya da ketonlardan, karbonil gurubunun indirgenmesi ile oluşmuş polifonksiyonel alkollerdir. Polioller karbon sayılarına göre tetritol, pentitol, hegzitol gibi adlandırılırlar bu şekilde adlandırılmaları onların fizikokimyasal özellikleri ve karbon sayılarına göre olabilir. Birçok poliol yaygın olarak geniş bitki ve hayvan filumlarından ve daha yüksek hayvanlardan bakterilere kadar özellikle mantar algler ve bitkilerde bol miktarda bulunurlar (Touster

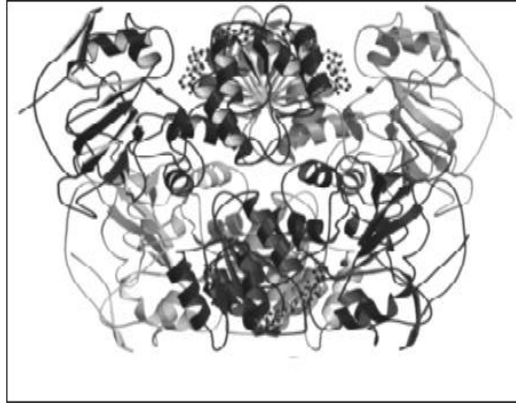
et al. 1962; Brimacombe *et al.* 1972). Buna rağmen doğada $n > 6$ olan uzun zincirli polioller sentezlenmektedir. Birçok polioller ve türevleri yaygın uygulamalar sayesinde keşfedilmiştir. Örneğin sorbitol ve xylitol diş sağlığı ve diyabet kontrolünden dolayı yaygın olarak şeker yerine kullanılan poliollerdir. Çeşitli polioller esterleri patlayıcı madde ve ilaç olarak kullanılırlar (Lindstad *et al.* 1998).

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

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

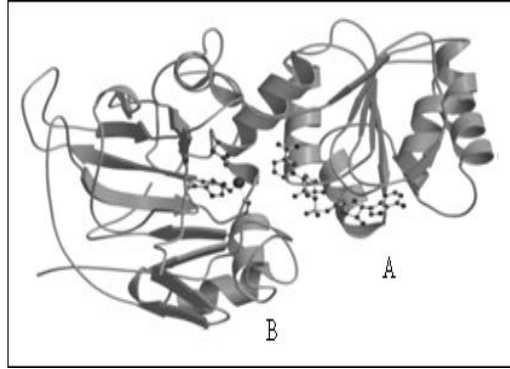


Şekil 1.2. SDH enziminin aktif bölgesindeki çinko iyonunun koordinasyonu (Johansson *et al.* 2001)



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

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



Şekil 1.4. SDH enziminin bir alt biriminin yapısı

*(A: koenzim bağlama bölgesi, B: katalitik bölge) (Johansson *et al.*2001)

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

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

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

1.2. Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus (DM) insulinin tamamen veya kısmi eksikliğine bağlı olarak gelişen ve yüksek kan şekeri (hiperglisemi) ile karakterize bir hastalıktır. İnsülin eksikliğinin yanı sıra insüline karşı gelişen direnç, diabetes mellitus gelişiminde rol oynamakta ve karbohidrat, lipit ve protein metabolizmasını da etkilemektedir (Abou-Seif *et al.* 2004; Hasselbaink *et al.* 2003). İki çeşit diyabet hastalığı olup bunlar tip 1 (insüline bağımlı) ve tip 2 (insüline bağımlı olmayan) diye adlandırılmaktadır.

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

Eğer insülin hormonu var, ama miktarı azsa veya dokularda insüline karşı direnç varsa, bu diyabete de “Tip 2 diyabet (insüline bağımlı olmayan diyabet)” denir. Genellikle 35 yaşından sonra görülür. Tip 1 diyabetli hastalar yaşam boyu insülin kullanmak zorundadırlar. Tip 2 DM diyabetli hastalar ise diyet, egzersiz ve ağızdan alınan ilaçlarla tedavi edilebilir. Gerekirse hastalığın ilerleyen dönemlerinde insülin kullanabilirler (Anonim 2012b).

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

Tip 2 DM'li hastaların tanı konulmasından ortalama sekiz yıl önce diyabetik olduğu düşünülmektedir (Haris *et al.* 1992). Tanı aldıktan kısa bir süre sonra ise birçoğunda mikroalbuminüri ve aşikâr nefropati tespit edilir.

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

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

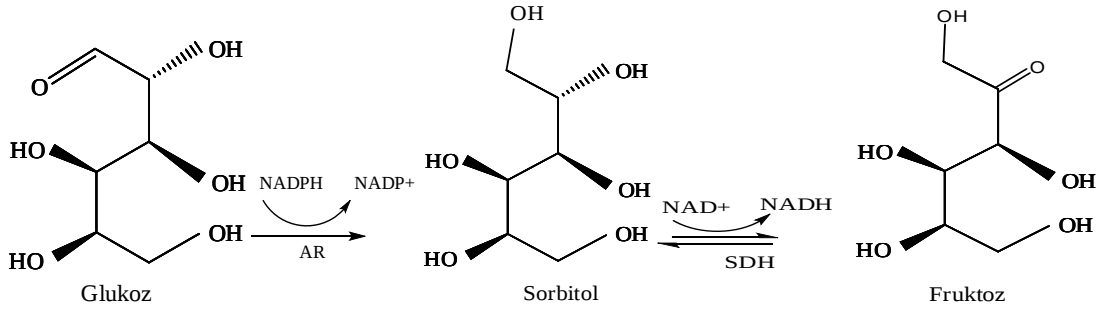
Kan şekerinin yüksek olması bazı metabolik yolların aktivitesini artırarak ve bu metabolik yolların birbiriyle olan etkileşimlerini değiştirerek bu diyabetik komplikasyonlara neden olmaktadır (UKPDS 1998; Temelkova-Kurktschiev *et al.* 2000).

Bu metabolik yollar; poliol yolu (Zimmet and Alberti 2001; Oates 2008), glukoz oksidasyonu (Lipinski 2001; Ostenson 2001; Jakus and Rietbrock 2004), protein kinaz C (PKC) aktivasyonu (Brownlee 2001), nonenzimatik glikasyon ve ileri glikasyon ürünleri (İGÜ) oluşumudur (Chappey *et al.* 1997; Yamagishi and Takeuchi 2004).

Poliol yolu, glukozun sorbitole indirgendiği ve sorbitolun da fruktoza dönüştüğü iki adımlı metabolik bir yoldur. Bu metabolik yol aldoz redüktaz ve sorbitol dehidrogenaz enzimlerini içermektedir. Lens, retina, eritrosit, böbrek, plasenta, periferik sinirlerin schwann hücreleri, vesica seminalis ve yumurtalık hücrelerinde bulunan aldoz redüktaz, glukozu redükleyerek sorbitol oluşturur. Oluşan sorbitol, karaciğer, yumurtalık, sperm,

vesica seminalis hücrelerinde bulunan sorbitol dehidrogenaz enzimi vasıtasıyla fruktoza oksitlenir. Vesica seminalislerde glukozun fruktoza dönüşümünü sağlayan bu yol enerji kaynağı olarak fruktozu tercih eden sperm hücreleri içindir. Karaciğerde ise sorbitolü fruktoza oksitleyen bu yol besinsel sorbitolün glikoliz veya glukoneogenez yollarına girebilen bir maddeye (fruktoza) çevrilmesini sağlar (Champe and Harvey 1997).

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



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

Sorbitol yolu lens, beyin, sinirler, eritrosit, böbrek, karaciğer, pankreas adacıkları, aorta ve kapiller damarlarda etkindir. Bu dokular hücreye glukoz girişi yönünden ortaktır. Bu dokularda hücreye glukozun girişi insülininden bağımsız olduğu için hücre içi glukoz oranları doğrudan doğruya kan glukozunun artışından etkilenir. Kan glukoz oranları normal olduğu sürece AR enzimi aktif olamaz ancak hiperglisemi de hücre içi glukoz oranları artığında aldoz redüktaz aktif olabilmekte ve poliol yolu işlerlik kazanmaktadır. Sorbitol yolu etkinliğinin fizyolojik öneminin henüz bilinmediği bu dokular, diyabetes mellitusun uzun sürede gelişen retinopati, katarakt, nöropati, nefropati ve ateroskleroz gibi komplikasyonlarının geliştiği dokulardır (Yenigün ve Altuntaş 2001).

AR çeşitli karbonil grupları indirgeyen NAD(P)^+ bağımlı birenzim olup sorbitol yolunun hız kısıtlayıcı enzimidir. Substratlarından olan glukozla ilgisi az olduğundan, hücre içi glukoz seviyesi fizyolojik düzeylerde kaldığı sürece AR etkin olamamaktadır.

Hiperglisemi durumunda hücre içi glukoz miktarı fizyolojik seviyelerin üzerine çıkınca AR aktif hale geçmektedir. Hiperglisemide AR enzim aktivitesi artarken SDH enzim aktivitesi azalır. Bu durumda dokularda sorbitolün fruktoza dönüşümü yavaşlar. Sorbitol metabolik olarak kullanılmadığı ve difüzyonu çok yavaş olduğu için hücre membranı dışına kolayca çıkamaz dokularda birikir ve osmotik etki göstererek hücre içine daha fazla miktarda suyun çekilmesine böylece hücre ödemine neden olur. Sorbitolün kendisi bir doku toksini gibi hareket eder. Bu nedenle retinopati, nöropati, nefropati ve kalp hastalığına yol açmaktadır (Karasu vd 1990; Bukan vd 2004).

Hipergliseminin hücrelerde sebep olduğu poliols birikimi her hücrede farklıdır. En büyük etki sinir vazo nervorumlarında ve böbrek bazal membranlarında görülür (Yenigün ve Altuntaş 2001). Kan glukoz oranının artması hücre seviyesindeki $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ pompasının çalışmasını ve $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPaz enziminin etkisini azaltır.

Diyabette hem periferik sinir hücresine giren hem de bu hücrede sentezlenen miyoinositol miktarında azalma olur. Miyoinositolun hücreye girişi Na^+ 'a bağımlı ve glukoz ile yarışmalı olması ve diyabette $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPaz aktivitesinde azalma ve kan glukoz konsantrasyonunda artma olmasından hücreye giren miyoinositol miktarı azalır. Bu azalma hücre içindeki insülin etki azlığı ile paraleldir. Azalan miyoinositol glukozun sorbitole dönüşme sürecini etkilemezken, sorbitolün fruktoza dönüşmesini yavaşlatır ve hücre içinde sorbitol miktarını artışına neden olur. Sorbitol güçlü su çekici özelliği ile su alarak hücre içindeki su dejenerasyonuna sebep olur Nikotinamid Adenin Dinükleotit (NADH) yolu sorbitolu, sorbitol dehidrogenaz enzimi ile fruktoza dönüştürmeye çalışan bir mekanizma olmasına rağmen, bu yol hipergliseminin sebep olduğu miyoinositol eksikliği nedeni ile yavaşlar ve endotel nöron hücresinde sorbitol birikimi devam eder (Yenigün ve Altuntaş 2001). Ayrıca miyoinositol eksikliğin kendisi de $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPaz aktivitesinde azalmaya yol açar. Sinir $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPaz'ın membran fosfoinositidleri; muhtemelen protein kinaz C aracılığıyla kontrol edildiği düşünülmektedir. Azalmış sinir miyoinositol konsantrasyonları anormal fosfoinositidlerle sonuçlanır. Bu da azalmış $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPaz aktivitesine yol açar, miyoinositol transportu bu enzim üzerinden olduğundan, azalmış miyoinositol geri alımı zorlaşır ve

azalmış $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPaz aktivitesi, artmış intraaksonal Na^+ birikimine neden olur. Bu durum sinir impuls yayılımını, sodyuma bağlı aminoasit geri alınımını ve diğer fenomenleri etkiler. Sodyumun paranodal bölgede birikimi aksonal şişmeye neden olur. Esas olarak miyelin lamel terminallerinin aksondan ayrılmasına ve daha ileri yapısal değişikliklere yol açar (Yenigün ve Altuntaş 2001).

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

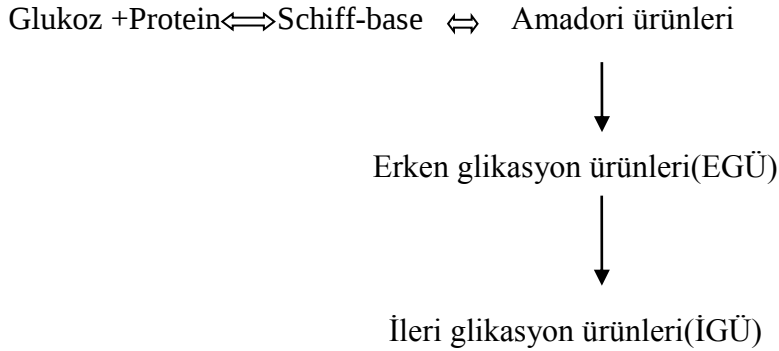
Yapılan çalışmalarda, miyokardiyumda oluşan iskemi sırasında, poliol yolunun miyokardiyal glukoz metabolizmasına etkileri incelenmiş, kardiyak AR aktivitesinin iskemi sırasında arttığı gösterilmiştir (Ramasamy *et al.* 1999; Hwang *et al.* 2002). Buna bağlı olarak miyokardiyumdaki NADH/NAD^+ oranı artmakta, glikoliz ve ATP üretimi de azalmaktadır. Bu durum iskemik hasarın sebebidir (Williamson *et al.* 1993). Bilindiği gibi iskemi, kanın yeterli oranda organlara verilememesidir. Bu durum oksijen yetmezliğini ortaya çıkarmaktadır. AR enzimin inihibe edilmesi kalbi korumaktadır. Bu enzim iskemik hasarda önemli rol oynamaktadır.

Sorbitol dehidrogenaz enziminin (SDH) aktifleşmesi ile oluşan NADH , NADH -oksidaz (Nox) enziminin etkisi ile serbest oksijen radikalleri (ROS) oluşturur (Teshamariam 1994; Morre *et al.* 2000). ROS, gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz enzim (GAPDH) inhibisyonuna neden olarak daha fazla glukozun poliol yoluna yönelmesine ve AR aktivitesinin artmasına neden olmaktadır (Stevens *et al.* 2000). Aldoz redüktaz enzim aktivite göstermek için NADPH 'ye ihtiyaç duyduğundan, hücre içi NADPH tüketimi artar. Glutasyon redüktaz enzimi (GR), NADPH bağımlı olarak, yükseltgenmiş glutatyonun (GSSG) indirgenmiş glutatyon (GSH) redüksiyonunu sağlayan enzimdir. AR'nin NADPH için K_m değeri, glutasyon redüktaz enziminin NADPH için K_m değerinden 10 kat daha düşüktür. Poliol yolağında artan AR aktivitesiyle NADPH 'nin

fazlaca tüketilmesi, GSH'nin üretiminin azalmasına neden olur (Yeh and Ashton 1990). Hücre içi majör antioksidan olan GSH'nin azalması hücrenin antioksidan kapasitesini sınırlar yani hücrenin oksitleyici etkenlere karşı korunma gücünü azaltır ve bu durum oksidatif strese neden olur (Lee and Chung 1999; Maritim *et al.* 2003).

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

Poliol yolunun en önemli enzimi olan ve bu yolun aktivitesini sınırlayan aldoz redüktaz enzimi glukozu sorbitole dönüştürürken, diğer bir enzim olan sorbitol dehidrogenaz, sorbitolu fruktoza çevirir. Sorbitol hücre zarını geçemediğinden hücre içinde birikir. Sorbitol birikimi, ozmotik etkilerle piridin nükleotidlerinin redoks durumunu değiştirerek (NADH/NAD⁺ oranında ve protein kinaz C'de artış) hücre içi miyoinositol seviyelerini azaltır. Bu durum doku hasarına neden olur. Glukoz, proteinlerin amino gruplarına nonenzimatik olarak bağlanarak "schiff-base" ürünleri oluşturur. "Schiff-base" ürünlerinden sonra daha stabil olan amadori ürünleri oluşur (Dinçer vd 2002). Saatler içerisinde bu ürünler kan glukoz konsantrasyonuna uygun olarak belirgin bir seviyeye ulaşır. Sonrasında daha stabil erken glikasyon ürünleri (EGÜ) oluşur. Hiperglisemiye uzun süreli maruz kalma kollajen, intraselüler proteinler ve nükleik asitler gibi stabil makromoleküllerde kümülâtif ve giderek artan tarzda geri dönüşümsüz değişiklere neden olur. Erken glikasyon ürünleri (EGÜ) ileri glikasyon ürünleri (İGÜ)'ni oluşturmak üzere birleşirler (Kurt vd 2004).



Şekil 1.6. İleri glikasyon ürünleri (İGÜ) oluşumu

Hiperglisemi durumunda poliol yolunun aktive olması sonucu, sorbitolün fruktoza oksidasyonu ile sitozolik NADH/NAD⁺ oranı yükselmektedir. NADH bu artış gliseraldehit-3-fosfat-dehidrogenaz (GAPDH) enzimini inhibe eder ve trioz-fosfat konsantrasyonunu artırır (Baynes and Thorpe 1999; Dunlop 2000; Garcia *et al.* 2001). Hücre içi konsantrasyonu artan gliseraldehit-3-fosfat, trioz-fosfat izomeraz enzimi ile dihidroksiaseton-fosfata (DHAP) dönüşür. DHAP'ın gliserol-3-fosfata redüksiyonu NADH bağımlıdır. NADH/NAD⁺ artması, DHAP'nin indirgenmesi ile protein kinaz C (PKC)'nin aktivatörü olan diaçilgliserol (DAG) oluşumuna neden olur ve bu da poliol yolunun aktivatörü olan PKC yolunun aktivitesinin artmasına neden olur (Williamson *et al.* 1993; Garcia *et al.* 2001). PKC aktivasyonu diyabetin sebebiyet verdiği komplikasyonların ortaya çıkarır (Xia *et al.* 1994).

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

Aldoz redüktaz NADPH kullandığından, sorbitol yolunun etkinleşmesi ile hücrenin NADPH tüketimi artar. Hücrenin oksitleyici etkenlere karşı korunmasında görevi olan indirgenmiş glutatyonun oluşumunu sağlayan glutatyon redüktaz da NADPH'yi kullandığından, hiperglisemide mevcut NADPH'nin aldoz redüktaz ile glutatyon redüktaz rekabet ederler. Dolayısıyla, hiperglisemide etkinliği artan sorbitol yolunun

artan NADPH tüketimi, hücrenin oksitleyici etkenlere karşı korunma gücünü azaltır. Diyabetin kronik komplikasyonlarının patogeneğinde sorbitol yolunun önemini bu yolla açıklayan araştırmacılar, hücrede sorbitol birikiminin değil, NADPH tüketimine neden olan sorbitol oluşumunun önemli olduğunu savunmaktadırlar (Yenigün ve Altuntaş 2001). Dolayısı ile AR' nin inhibe olması sorbitol birikimini engelleyeceğinden diyabetik komplikasyonların ortaya çıkması bu yolla engellenebilir.

Özetle, hiperglisemi sonucu oluşan sorbitol birikimi:

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

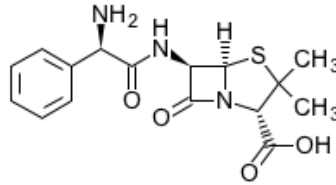
1.3. Deneysel Çalışmada Kullanılan İlaçların Etkin Maddeleri

Koyun beyne sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde çalışma yapılırken kullanılan ilaçların etkin maddelerinin bazı özellikleri;

Ampisilin: Penisilin grubu bir antibiyotiktir. Ampisilin vücut içerisindeki bakterilerle savaşıır. (D(-)-(-aminino benzilpenisilin) etkin bir semi-sentik penisilin türevidir. Gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı geniş bir etki spektrumu vardır. Bakteri hücre duvarının mukopeptid biyosentezini inhibe ederek etkir. Penisilazlar tarafından yıkıldığında penisilaz üreten bakterilere karşı etkisi yoktur. Bakterilerin ampisiline duyarlılığı şöyledir:

Duyarlı bakteriler: Beta hemolitik Streptococcus sp'leri de içeren çoğu gram pozitif bakteriler, bazı anaeroblar, bazı gram negatif aeroblardır. Ampisilin Oral Çözelti Tozu

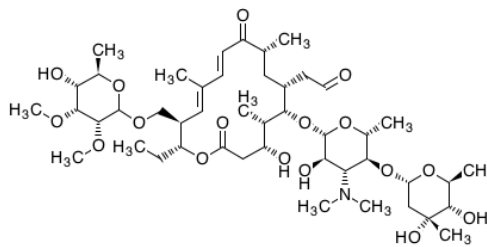
rumitasyona başlamamış buzağı, kuzu ile oğlaklarda, etçi tavuklarda ve taylarda ampisiline duyarlı bakteriler tarafından meydana getirilen sindirim, solunum sistemi, ürogenital sistemi enfeksiyonlarında, sepsislerde, yumuşak doku enfeksiyonlarında, viral enfeksiyonlarla seyreden ve bakteriler tarafından meydana getirilen sekonder enfeksiyonların tedavisinde kullanılır (Kandur 2007).



Şekil 1.7. Ampisilin etken maddesinin yapısal formülü

Tylosin: Makrolid grubu bir antibakteriyeldir. *Strep. fradie* kültürlerinden elde edilen bakteriyostatik etkili bir antibakteriyeldir. Tylosin kas içi uygulama sonrası hızla emilir. Uygulama yerinden emilen tylosin tüm vücuda dağılır, süte önemli miktarlarda geçer. Tylosin hücre içindeki 50S ribozomal alt birimlere bağlanıp, peptitlerin translokasyonunu ve protein sentezini engelleyerek duyarlı mikroorganizmalara karşı bakterisidal ve mikoplazmisidal etki gösterir. Tylosine başlıca gram pozitif bakteriler duyarlıdır.

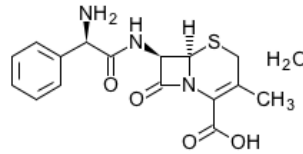
Tylosine duyarlı bakterilerden kaynaklanan sığır, koyun ve keçilerde zatürre, metritis, piyoderma, erken dönemdeki mastitis ve agalaksia, pododermatit, difteri, dizanteri, arthrit, enteritis, keçi ciğer ağrısı başta olmak üzere, solunum sistemi, sindirim sistemi ve yumuşak doku enfeksiyonlarının; hindilerde CRD başta olmak üzere solunum, sindirim sistemi ve yumuşak doku enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılır (Kandur 2007).



Sefalekssin: Sefalosporinlerin ana çekirdeği sefem türevi olan 7-aminosefolosporanikasit (7-ASA) oluşturur. Sefalekssin penisilinler gibi bakteri hücre duvarının peptidoglikan takasının sentezinin son basamağını (transpeptidaz reaksiyonunu) inhibe etmek ve otolitik enzimleri aktive etmek suretiyle bakterisid etki oluşturur.

Sefalekssin başta gram pozitif olmak üzere hem gram pozitif hem de negatif bakterilere karşı etkilidir. Sefalekssin kas içi uygulamayı takiben tüm vucuda dağılır. Kas içi uygulamayı takiben 30 dakika içinde doruk plazma seviyesine ulaşır. Atılımı büyük oranda glomeruler filtrasyon ile böbrekler aracılığıyla olmaktadır.

Sefalekssin etken maddesi sefaleksine duyarlı bakterilerin yol açtığı enfeksiyonların tedavisinde kullanılır. Duyarlı bakterilerden kaynaklanan solunum sistemi ve üriner sistem enfeksiyonlarının tedavisinde akut mastitis septisemi deri ve yumuşak doku enfeksiyonların ayak çürüğü kemik ve eklem hastalıklarının tedavisinde kullanılır (Kandur 2007).

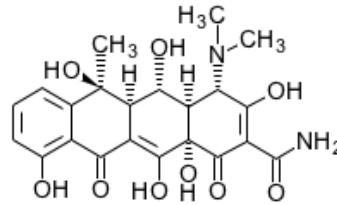


Şekil 1.9. Sefalekssin etken maddesinin yapısal formülü

Oksitetrasiklin dihidrat: Oksitetrasiklin dihidrat etken maddesi bir antibakteriyeldir. Oksitetrasiklinler bakterilerin 30 S ribozomlarına bağlanarak onların protein sentezini duruduraran bakteriyostatik etkili antibakteriyellerdir. Gram pozitif aerob bakteriler, gram negatif bakteriler, gram negatif anaerob bakterilere karşı iyi derece etkilidirler.

İlaç uygulama sonrası kandaki tedavi edici oksitetrasiklin konsantrasyonu en az 4 gün sürer. Oksitetrasiklin hedef hayvanlarda enfeksiyona yol açan bakteriler için MIC değerleri 0,062-2,0 µg/ml arasındadır. Oksitetrasiklinler tüm vücutta çok iyi bir dağılım gösterir. Akciğer, uterus ve ayak dokusunda yerleşen duyarlı mikroorganizmalara etkilidir (Kandur 2007).

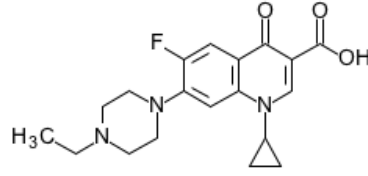
Oksitetrasiklinler ya değişmemiş olarak ya da mikrobiyolojik olarak inaktif formda idrar ve dışkı ile atılırlar. Sığır ve koyunlarda oksitetrasikline duyarlı mikroorganizmalarca oluşturulan solunum, sindirim, ürogenital sistem enfeksiyonlarında, sepsisemilerde, viral enfeksiyonlarla beraber seyreden ve duyarlı bakteriler tarafından meydana getirilen sekonder enfeksiyonların tedavisinde endikedir. Bu kapsamda sığır, koyun ve keçilerde başlıca zatürre, ayak çürüğü, sepsisemi, enterisitlerde ayrıca mastitis ve metritislerde lokal tedaviye destek olarak kullanılır (Kandur 2007).



Şekil 1.10. Oksitetrasiklin dihidrat etken maddesinin yapısal formülü

Enrofloksasin: Yüksek bakterisit etkiye sahiptir. Çok geniş bir endikasyon alanı bulunup, gram negatif, gram pozitif bakteriler ve mikoplazmaları etkiler. Enrofloksasin bakteri DNA'sının üremesinde önemli bir role sahip DNA- giraz enzimini (topoizomeraz II) inhibe ederek bakterinin ölümüne yol açar. İlacın parenteral yola verilmesini takiben uygulandığı yerden hızla emilip, ortalama 1 saat içerisinde en yüksek plazma seviyesine erişir. Akciğerlerde ilaç konsantrasyonu plazma değerinin 4 katına kadar çıkar. Bakterisit etkili plazma ve doku yoğunluğu 24 saat sürer. Enrofloksasin immun sistem üzerine baskı yapmadığı için tedavi sırasında hayvanın direncinde kırılma olmaz. Enrofloksasin'in biyolojik yarı ömrü 2 ila 6 saat arasındadır. Enrofloksasin değişime uğramadan büyük oranda böbreklerden idrar yoluyla ve az bir kısmı da safra/gaita yoluyla atılır. İdrarda esas olarak değişmemiş halde, az miktarda da metabolitleri, siprofloksasin ve glukuronid halinde, safra da ise metabolize olmamış halde bulunur.

Sığır ve koyunlarda gram negatif, gram pozitif bakterilerle Mycoplasma'ların oluşturduğu hastalıkların tedavisinde kullanılır (Kandur 2007).



Şekil 1.11. Enrofloksasin etken maddesinin yapısal formülü

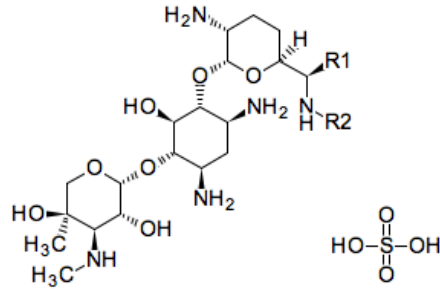
Gentamisin sülfat: Bir aktinomiset olan *Micromonospora purpurea*'dan elde edilen, duyarlı bakterilerin normal protein sentezini inhibe ederek etkisini gösteren bakterisid etkili bir aminoglikozit antibiyotiktir. Gentamisin sülfat *E.coli*, indol pozitif ve negatif *Proteus* türleri, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* grubu türleri, *Citrobacter* türleri ve penisilin ve metisiline dirençli *Staphylococcus* türleri de dâhil geniş etki spektrumuna sahiptir. Ayrıca *Shigella* ve *Salmonella* türlerine karşı da *in vitro* olarak etkilidir.

Gentamisin sülfat diğer aminoglikozit antibiyotiklere dirençli bakterilere karşı da etkili olabilmektedir. Gentamisin sülfata karşı bakteriyel direnç genellikle güç gelişmektedir.

Gentamisin sülfat hücre duvarı sentezini etkileyen antibiyotikler ile kombine kullanıldığı zaman D grubu streptokok suşları üzerinde sinerjik bir etki göstermektedir. Bundan dolayı penisilin G ile kombine edildiğinde *Streptococcus faecalis*, *S.faecium* ve *S. durans* suşları üzerinde sinerjik bakterisid bir etki gösterir. Ayrıca ampisilin veya karbenisilin ile kombine edildiği zaman da bakterisid etkisi artar. *Pseudomonas aeruginosa*'nın birçok suşuna karşı gentamisin ve karbenisilin kombinasyonu etkilidir. Sefalosporinlerle kombine edildiğinde de birçok gram negatif mikroorganizmaya karşı sinerjik etki gösterir.

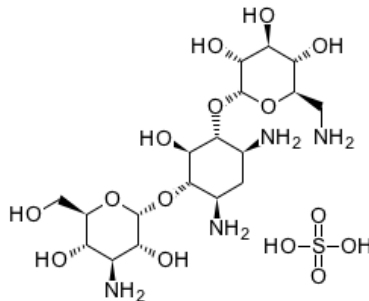
Sözü edilen duyarlı bakterilerin neden olduğu ağır enfeksiyonlarda, diğer antibiyotiklere dirençli ve özellikle gram negatif bakterilerin neden olduğu septisemi, bakteriyemi; idrar yolları enfeksiyonları; alt ve üst solunum yolu enfeksiyonları; deri, kemik ve yumuşak doku enfeksiyonları; enfekte yanık; gastrointestinal sistem enfeksiyonları; menenjit; kulak enfeksiyonları; yeni doğmuşların sepsislerinde ve *Pseudomonas*

aeruginosa'nın oluşturduğu hayatı tehdit eden enfeksiyonlarda karbenisilin ile birlikte kullanılır (Kandur 2007).



Şekil 1.12. Gentamisin sülfat etken maddesinin yapısal formülü

Kanamisin: *Streptomyces kanamyceticus*'dan üretilen aminoglikozit grubu bir antibiyotiktir. Kanamisin, protein sentezini inhibe etmek suretiyle bakterisid etki gösterir. Ortamın pH'sından çok az etkilenir ve plazma proteinlerine bağlanmaz. Kanamisin başlıca gram negatif ve aside dayanıklı bakteriler üzerinde birincil derecede etkilidir. Kanamisin, penisilin ve tetrasiklin grubu antibiyotiklerin etkisini güçlendirmektedir. Bu nedenle bu gibi ilaçlarla kombine kullanılması mümkündür. Sığır, at, koyun, köpek, kedilerde duyarlı bakterilerin neden olduğu solunum sistemi, üriner sistem enfeksiyonları, yumuşak doku ve deri enfeksiyonları ile duyarlı bakterilerin karıştığı sekonder enfeksiyonların tedavisinde, septisemilerde kullanılır (Kandur 2007).



Şekil 1.13. Kanamisin etken maddesinin yapısal formülü

2. KAYNAK ÖZETLERİ

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

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

Sorbitol, gıda tatlandırıcısı olarak kullanılan ve glukoz redüksiyonu sonucu üretilen bir alkol şekeridir. Glukoz metabolizmasında sorbitol (poliol) yolu önemlilik arz etmektedir ancak oksidatif stresi arttırdığı ve diyabet patogeneğinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Chung *et al.* 2003; Jay *et al.* 2006).

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

Sperm hücreleri üzerine yapılan bir çalışmada; sperm hücrelerinin seminal kesede, enerji kaynağı olarak sorbitol yolunda, glukozun fruktoza dönüştürdüğünü

kanıtlanmıştır (Hers 1956; Kador *et al.* 1986; Bhatnagar and Srivastava 1992). Fare testisinde yüksek miktarda AR mRNA'sı tespit edilmiş olup, fazla miktarda AR enziminin testis metabolizmasında önemli rolü olduğu düşünülmektedir (Gui *et al.* 1995). Poliöl yolağının varlığı daha sonra diyabetik sıçan lensinde de gösterilmiştir (Van Heyningen 1959).

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

Başka bir çalışmada shcwan hücrelerindeki poliöl aktivitesini araştırmak için hiperglisemik ve hiperglisemik olmayan şartlarda kültürlü hücrelerde aldoz redüktaz (AR) ve sorbitol dehidrogenaz (SDH) mRNA miktarları yarışmalı RT-PCR tekniğini kullanarak çalışma yapılmıştır. Schwan hücrelerindeki AR ve SDH mRNA'sının yüksek (30 mM) glukoz içeriğine karşın değişmediğini belirlemişlerdir. RT-PCR sistemi tekniğı ile belirlenen AR mRNA'sı AR aktivitesi ile ilişkili olduğu kadar kültür Schwan hücrelerindeki hiperglisemik şartlarda biriken sorbitol miktarı ile ilişkili olduğu belirlenmiştir, bu çalışmada geliştirilen RT-PCR sisteminin diyabetik komplikasyonların gözlemlendiğı organlarda, sorbitol yolunun aktivitesinin artmasıyla meydana gelen metabolik bozukluklarda aldoz redüktaz ve sorbitol dehidrogenaz enzimlerinin rolünü belirlemede faydalı olabileceğini belirlenmiştir (Maekawa *et al.* 2001).

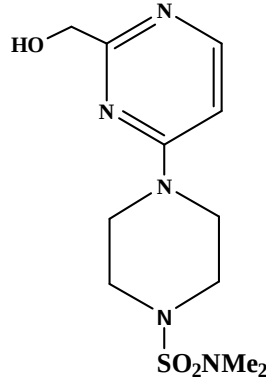
Tilton ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, inhibe olan SDH enziminin sorbitol birikimini artırmasına karşın yan etkileri olmadan bozulmuş sinir iletimi ve sinirlerde, aortta, gözle ilgili dokulardaki vasküler fonksiyon bozukluklarını içeren komplikasyonları azalttığı gözlemlenmiştir. Bu sonuç, bu dokulardaki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

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

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

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

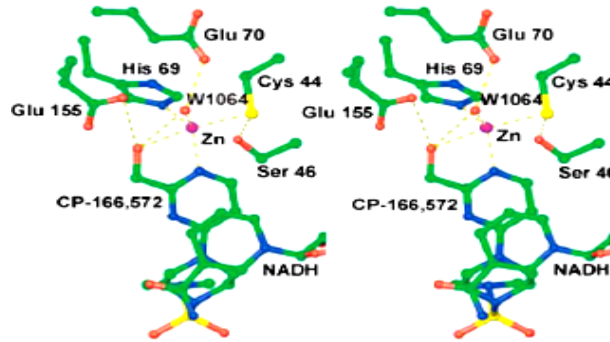
Geisen ve arkadaşları yaptıkları bir çalışma sonucunda 2-hidroksimetil- 4- 4(4-N,N, dimetilaminsülfonil-1- piperazin) pirimidin'in SDH'nin ilk inhibitörü olduğunu kanıtlamışlardır (Geisen *et al.* 1994) .



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

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

Yapılan diğer bir çalışmalarda SDI 158'in (CP-166,572), enzimin çinko iyonu ve NADH'in nikotinamid halkasıyla eş zamanlı etkileştiği belirtilmiştir. Ayrıca bu çalışmalarda SDI 158'in NAD⁺, sorbitol ve NADH ile yarı yarışmalı inhibisyon tipi sergilediği gözlenmiştir (Pauly *et al.* 2003).



Şekil 2.2. SDI 158 (CP-166,572)'in insan SDH enziminin katalitik çinko iyonu ve NADH ile etkileşimi

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

Yapılan bir diğer çalışmada, sorbitol dehidrogenaz ve aldoz redüktaz inhibisyonun diyabetik ve galaktosemik farelerde şeker katarakt oluşumuna etkileri karşılaştırılmıştır. Bu amaçla hem sorbitol dehidrogenazın inhibitörlerin varlığında ve yokluğunda hem de aldoz redüktaz inhibitörlerinin varlığında ve yokluğunda diyabetik ve galaktosemik farelerde şeker katarakt oluşumunu gözlemlemişlerdir. Yapılan bu çalışma sonucunda sorbitol dehidrogenaz inhibitörlerinin diyabetik farelerde katarakt oluşumunu artırdığı ancak galaktosemik farelerde katarakt oluşumunu etkilemediği gözlenmiştir. Ayrıca aldoz redüktaz inhibitörlerinin hem diyabetik hem de galaktosemik farelerde katarakt oluşumunu azalttığı gözlemlenmiştir. Bu çalışmalar ile hücre içi sorbitol birikimin katarakta sebebiyet verdiği, aldoz redüktaz enziminin inhibe olmasının ise katarakt oluşumunu önleyebileceği sonucuna ulaşılmıştır (Kador *et al.* 1998).

Obrosava ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada diyabetik olan ve diyabetik olmayan

sıçanlarda SDH inhibitörleri kullanılarak lenslerinde meydana gelen oksidatif stresin sorbitol birikimi sonucu oluştuğunu görmüşlerdir. SDH inhibitörü olarak SDI-157 kullanılarak diyabetik sıçanların lenslerindeki antioksidan GSH enziminin ve askorbat seviyesinin diyabetik olmayan sıçanlara göre azaldığı görülmüştür (Obrosava *et al.* 1999).

Bir çalışmada sıçan kalbindeki sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesinin iskemi süresince arttığı gözlenmiştir. SDH inhibitörleri kullanılarak aktivitenin azaltılması sağlanmış ve bu sayede iskeminin azaldığı görülmüştür. Bu da miyokardiyal iskemi rahatsızlığında SDH enziminin önemli bir role sahip olduğunu göstermiştir (Yuying *et al.* 2003).

Diyabetik retinopati Batı dünyasında körlüğün önde gelen bir nedenidir (King *et al.* 1998). Bu tip 2 diyabetin uzun süreli komplikasyonlarından en ciddi olanlarından birisidir. Hipergliseminin yanısıra genetik faktörler de muhtemelen diyabetik retinopatiye sebep olmaktadır. Bunun araştırılması amacıyla bir çalışmada hiperglisemi durumunda aktif olan poliol yolunun enzimlerinden biri olan SDH enziminin polimorfizmleri G-888C ve C-1214G arasında bir bağlantı kurmak amacıyla denemeler yapılmıştır. Sorbitol dehidrogenaz enziminin C-1214G ve G-888C polimorfizmlerinin diyabetik retinopatinin başlamasında bir işaretçi olarak kullanılabileceklerini ancak hastalığın ilerlemesinde bir rolünün olmadığı görülmüştür (Szaflik *et al.* 2008).

Bir çalışmada ise sorbitol dehidrogenaz enziminin yoksun sıçanlarda diyabetle ilişkilendirilmiş motor sinir iletim hızındaki azalma ve poliol birikim seviyesi arasında yakın bir ilişkinin olup olmadığı test edilmiştir. Ancak sıçanların siyatik sinirlerindeki sorbitol ve fruktoz seviyesi diyabetle ilişkilendirilen motor sinir iletim hızındaki eksiklikle bağdaştırılamamış ve SDH enzimi tarafından artan sorbitol mekanizmasının motor sinir iletim hızındaki eksikliğe katkı sağlamadığı görülmüştür. Sıçanların siyatik sinirlerinde fazla sorbitol biriktirmedikleri muhtemel bir sonuç olarak görülmüştür (Donald *et al.* 1998).

3. MATERYALve METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Deneysel çalışmalarımızda kullandığımız standart serum albumin, N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin (TEMED), diyaliz torbaları Sigma Chemical Comp.'den; sodyum hidroksit, amonyum sülfat, sodyum klorür, potasyum fosfat, hidroklorik asit, glisin, sodyum azotür, gliserin, potasyum fosfat, etanol, metanol, asetik asit, izopropanol, akrilamid, N,N'-metilen bisakrilamid, coomassie brillant blue G-250, R-250, brom timol mavisi, sodyum dodesil sülfat (SDS), DEAE-Sephadex, CM-Seluloz C-52, Sephadex G-100, β -NAD⁺, sorbitol, β -merkapt etanol ve diğer kimyasal maddeler E. Merk AG'den temin edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan alet ve cihazlar

Çalışmalar sırasında aşağıdaki alet ve cihazlardan faydalanılmıştır.

Masa santrifüjü	: MSE Mistral 2000
Soğutmalı santrifüj	: Heraeus Sepatech (Suprafuge 22)
Ultrasantrifüj	: Beackman Coulter (Optima LE-SOK Ultracentrifuge)
Soğutmalı santrifüj	: Hermle Z 323 K (Germany)
Spektrofotometre	: CHEBİOS s.r.l. (Optimum-one/UV-VIS)
pH metre	: Schott pH-Meter CG840
Elektroforez tankı	: BIO RAD (dikey)
Peristaltik pompa	: Ismatec
Karıştırıcı(Shaker)	: GFL 3025
Karıştırıcı(Vorteks)	: Fisons whirlimixer

Hassas terazi	: Gec avery (UK)
Otomatik pipet	: Eppendorf
Çalkalayıcı	: Midi Dual 14
Manyetik karıştırıcı	: Chiltern Hotplate Magnetic Stirrer HSBI
Saf su cihazı	: Barnstead Easy Pure UV/UF
Su banyosu	: Clifton
Kar makinesi	: Scotsman AF-20 (Automatic ice machines)
Güç kaynağı	: 1-Bio Rad Power Pac 3000
Buzdolapları	: Arçelik
Derin dondurucu (-20°C'ye kadar)	: Sanyo Medical Freezer
Derin dondurucu (-85°C'ye kadar)	: Sanyo Ultra Low

3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler:

1. 200 mM Glisin/NaOH tampon çözeltisi (pH 9,9): 1,5 g glisin 90 ml saf suda çözüldü. 1 M NaOH ile pH 9,0'a getirildikten sonra toplam hacim saf su ile 100 ml ye tamamlandı.
2. 4,7 mM β -NAD⁺ çözeltisi (Koenzim çözeltisi): 0,0156 g β -NAD⁺ alındı 5 ml saf su içinde çözüldü.
3. 100 mM sorbitol çözeltisi (Substrat çözeltisi): 0,1820 g sorbitol alındı 10 ml saf su içinde çözüldü.

Homojenat hazırlanırken kullanılan çözeltiler:

1. %0,9 luk NaCl Çözeltisi: 0,9 gr NaCl alınıp hacmi saf su ile 100 ml ye tamamlandı.
2. 5 mM KH₂PO₄, pH 7,0: 0,068 g KH₂PO₄ yaklaşık 90 ml saf suda çözüldü. 1 M NaOH ile pH 7,0'ye getirildikten sonra son hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

Amonyum sülfat çöktürmesinin çözünmesi ve diyaliz için kullanılan tampon çözeltiler:

1. (Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu oluşan çökeleği çözmek için) 5 mM KH_2PO_4 tamponu pH 7,9: 0,068 g KH_2PO_4 yaklaşık 90 ml saf suda çözöldü 1 M NaOH ile pH 7,9'a getirildikten sonra son hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.
2. (Diyaliz için) 5 mM KH_2PO_4 tamponu (1 mM β -merkaptöetanol içeren), (pH 7,9): 0,68 g KH_2PO_4 yaklaşık 900 ml saf suda çözöldü. 1 M NaOH ile pH 7,9'a getirildikten sonra içërisine 72 μl β -merkaptöetanol katıldı. Son hacim saf su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

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

1. 5 mM KH_2PO_4 tamponu (pH 7,9): 0,68 g KH_2PO_4 yaklaşık 900 ml saf suda çözöldü. 1 M NaOH ile pH 7,9'a getirildikten sonra son hacim saf su ile 1000 ml'ye tamamlandı.
2. 5 mM KH_2PO_4 Tamponu (pH 6,2), (Diyalizde kullanılan tampon): 0,68 g KH_2PO_4 yaklaşık 900 ml saf suda çözöldü. 1 M NaOH ile pH 6,2'ye getirildikten sonra içërisine 72 μl β -merkaptöetanol katıldı. Son hacim saf su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

CM-Selöloz C-52 iyon değişim kromatografisi için kullanılan tampon çözeltiler:

5 mM KH_2PO_4 Tamponu (pH 6,2); 0,68 g KH_2PO_4 yaklaşık 900 ml saf suda çözöldü. 1 M NaOH ile pH 6,2'ye getirildikten sonra son hacim saf su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi için kullanılan çözeltiler:

1. 50 mM KH_2PO_4 Tamponu (pH 7,0), (Kolonun dengelenmesinde ve elüsyon işleminde kullanılan çözelti); 6,8 g KH_2PO_4 yaklaşık 900 ml saf suda çözöldü. 1 M NaOH ile pH 7,0'a getirildikten sonra son hacim saf su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

2. Standart protein çözeltilerinin hazırlanışı:

Elektroforez için kullanılan çözeltiler:

1. 1 M Tris-HCl (pH 8,8): 12,11 g Tris (0,1 mol) tartılarak 80 ml suda çözüldü, pH ayarı 1 M HCl ile yapıldıktan sonra 100 ml'ye tamamlandı.
2. 1 M Tris-HCl (pH 6,8): 12,11 g Tris (0,1 mol) tartılarak 80 ml suda çözüldü, pH ayarı 1 M HCl yapıldıktan sonra 100 ml'ye tamamlandı.
3. %30 Akrilamid-%0,8 Bisakrilamid çözeltisi: 15 g akrilamid, 0,4 g bisakrilamid ve 34,6 g su karıştırılarak çözüldü.
4. %10'luk amonyum persülfat çözeltisi: 1 g amonyum persülfat tartılarak su ile 10 ml'ye tamamlanarak taze hazırlandı.
5. %10'luk SDS: 1 g SDS, 9 g suda çözülerek elde edildi.
6. Yürütme tamponu: 1,51 g Tris (12,5 mmol) ve 7,51 g glisin (0,1 mol) tartılarak 450 ml suda çözüldü; %10'luk SDS'den 5 ml ilave edildi, pH 8,3'e ayarlandı ve toplam hacim 500 ml'ye tamamlandı.
7. Numune tamponu: 1 M Tris-HCl (pH 8)'den 0,5 ml, %10'luk SDS'den 1 ml, %100'lük gliserinden 1 ml ve %0,1'lik bromtimol mavisinden 1 ml alınarak suyla 10 ml'ye tamamlandı. Bu tampona kullanılmadan önce 950 µl numune tamponundan 50 µl olacak şekilde β-merkapto etanol ilave edildi.
8. Sabitleştirme çözeltisi (jelde yürütülen proteinlerin sabitleştirilmesi için kullanılan çözelti): %50 izopropanol, %10 TCA ve %40 su olacak şekilde karıştırılarak hazırlandı.
9. Jel boyama çözeltisi: 50 ml metanol, 10 ml asetik asit ve 40 ml su içerisinde 0,1 g coomassie brilliant blue R-250 reaktifinin çözülmesiyle hazırlandı.
10. Jel yıkama çözeltisi: 50 ml metanol, 10 ml asetik asit ve 40 ml su karıştırılarak elde edildi.
11. Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi (proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti): 100 mg coomassie brilliant blue G-250, 50 ml %95'lik etanolde çözüldü. Bu çözeltiye %95'lik 100 ml fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin hacmi suyla 1 L'ye tamamlandı.

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

Proteinlerin Kantitatif Tayininde Kullanılan Çözeltiler:

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

3.2. Metod

3.2.1. Koyun beyni sorbitol dehidrogenaz enziminin aktivitesinin ölçümü

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

Enzim ünitesi hesaplamak için aşğıdaki denklem kullanıldı.

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

EÜ/ml	: 1 ml'deki enzim ünitesi
Δ OD	: Bir dakikadaki absorbans değişimi
6,22	: β -NADH 'ın 340 nm'deki milimolar ekstinksiyon katsayısı
V_T	: Ölçümün yapıldığı toplam küvet hacmi
V_E	: Ölçümün yapıldığı küvete ilave edilen enzim numunesinin hacmi

3.2.2. Koyun beyini sorbitol dehidrogenaz enziminin saflaştırılması

3.2.2.a. Koyun beyini dokusunun temini ve homojenat hazırlanması

Deneyde kullanmak amacıyla taze olarak temin edilen koyun beyini dokusundan kan ve diğer kirlilikleri elimine etmek için %0,9'luk NaCl çözeltisi ile üç defa yıkandı. Doku homojenatını hazırlamak için, ilk olarak doku küçük parçalara ayrıldı. Daha sonra sıvı azot içinde parçalanarak, 3 g/ml olacak şekilde 5 mM KH_2PO_4 (pH 7,0) tampon çözeltisinin içinde homojenize edildi. Elde edilen homojenat süzgeç kağıdı kullanılarak süzme işlemine tabi tutuldu. Bu işlemten sonra süspansiyon Heraeus Sepatech (Suprafuge 22) cihazı ile 13 000 rpm'de 60 dakika boyunca 2 defa santrifüj edildi. Santrifüj sonrası çökelek atıldı, süpernatant bir sonraki saflaştırma basamağında kullanıldı.

3.2.2.b. Amonyum sülfat çöktürmesi

Proteinler çok değerlikli elektrolitler oldukları için iyonlara benzer şekilde hareket ederler. Yüksek tuz konsantrasyonlarında, protein moleküllerini çevreleyen ve çözünür halde tutan su molekülleri, amonyum sülfat tuzundaki iyonlar tarafından çekilir ve proteinler çöker (salting-out). Gerçekleştirilen amonyum sülfat çöktürmesi deneyleri proteinlerin bu özellikleri esasına dayanmaktadır.

Koyun beyinden elde edilen SDH enzim homojenatı sırasıyla %0-20, %20-30, %30-40, %40-50, %50-60, %60-70, %70-80, %80-90 aralıklarında katı amonyum sülfat ile çöktürüldü. Çöktürme işlemleri sırasında Heraeus Sepatech (Suprafuge 22) cihazı ile

13000 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüj yapıldı. Her defasında çökelekte ve süpernatantda enzim aktivitesine bakıldı. Bütün bu işlemler +4°C' de gerçekleştirildi. Amonyum sülfat çöktürmesi sırasında homojenata katı amonyum sülfat yavaş yavaş katıldı ve her defasında daha önce katılan amonyum sülfatın çözünmüş olmasına dikkat edildi. Amonyum sülfatın homojenatta çözünme işlemi buz banyosunda manyetik karıştırıcı ile yapıldı. Katı amonyum sülfat miktarı aşağıdaki formülden hesaplandı.

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

V : Enzim çözeltisinin hacmi

S₁ : 1'in kesri olarak çözeltideki amonyum sülfat doygunluğu

S₂ : 1'in kesri olarak istenen amonyum sülfat doygunluğu

Bu işlemler sonucunda SDH aktivitesinin tamamının %30-85 aralığında çöktüğü belirlendi. Daha sonra saflaştırma çalışmasında ilk basamak olarak %30-85 amonyum sülfat kesitlemesi uygulandı.

Önce %30 doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Numune santrifüj tüplerine konularak 13 000 rpm'de 15 dakika santrifüj yapıldı (böylece yabancı proteinlerin çökmesi sağlandı). Daha sonra %85 doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesi gerçekleştirildi. Elde edilen numune 13 000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atılarak çökelek en düşük derişimli fosfat tamponunda (5 mM KH₂PO₄, pH 7,9) çözüldü. Amonyum sülfat çöktürmesi işlemleri sırasında ortam +4°C'de sabit tutulmaya çalışıldı.

3.2.2.c. Diyaliz

Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen numune diyaliz torbasına yerleştirilerek iki saat süreyle diyaliz tamponuna (1 mM β -merkaptöetanol içeren, 5 mM KH_2PO_4 pH 7,9) karşı 2 defa diyaliz edildi. Diyaliz işlemi, soğuk ortamda gerçekleştirildi.

3.2.2.d. Ultrasantrifüj

Diyaliz işleminden sonra numune içerisindeki çözünmeden kalan safsızlıkları uzaklaştırmak için numune, 100 000 x g'de 1 saat süreyle santrifüj edildi. Çökelek kısmı atıldı. Süpernatant kısmı alınarak bir sonraki saflaştırma basamağında kullanıldı.

3.2.2.e. DEAE-Sephadex iyon değişim kromatografisi

Çalışmada anyon değiştirici olarak kullanılan DEAE-Sephadex iyon değişim reçinesinin önce şişirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla 100-120 ml yatak hacmi elde edebilmek için 3 g jel 100 ml destile suya konularak 80-90°C'de 5 saat süre ile bekletilerek şişirildi. Şişirilmiş jel 0,5 N 100 ml soğuk HCl içinde 1 saat bekletildikten sonra 100 ml 0,5 N NaOH ile nötralize edildi. Jel materyalinden çözünmüş gaz vakum yardımıyla uzaklaştırılıp 3 cm²x30 cm ebadındaki kolona doldurulduktan sonra 5 mM KH_2PO_4 tamponu (pH 7,9) ile dengelendi. Kolonun akış hızı peristaltik pompa yardımıyla 15-20 ml/saat'e ayarlandı. Jel üzerindeki tampon seviyesi jel düzeyine indirilerek ultrasantrifüj sonrası elde edilen enzim çözeltisi pipet vasıtasıyla kolona tatbik edildi. Sorbitol dehidrogenaz enzimi DEAE-Sephadex kolon materyaline tutunmadığından bu basamak kullanılmadı.

3.2.2.f. CM-Selüloz C-52 iyon değişim kromatografisi

Çalışmada kullanılan katyon değiştirici CM-Selüloz C-52 iyon değişim reçinesinin öncelikle şişirilmesi gerekir. Bu amaçla 100-120 ml yatak hacmi elde edebilmek için 3

g jel 100 ml destile suya konularak 80-90°C'de 5 saat süre ile bekletilerek şişirildi. Şişirilmiş jel 0,5 N 100 ml soğuk HCl içinde 1 saat bekletildikten sonra 100 ml 0,5 N NaOH ile nötralize edildi. Jel materyalinden çözünmüş gaz vakum yardımıyla uzaklaştırılıp 3 cm²x30 cm ebadındaki kolona doldurulduktan sonra 5 mM KH₂PO₄ tamponu (pH 6,2) ile dengelendi. Kolonun akış hızı peristaltik pompa yardımıyla 15-20 ml/saat'e ayarlandı. Diyaliz edilen enzim çözeltisi pipet vasıtasıyla kolona tatbik edildi. Daha sonra 5 mM KH₂PO₄ tamponu (pH 6,2) ile yıkama işlemi yapıldı. Yıkama işlemine üstten ilave edilen yıkama tamponunun pH ve 280 nm'deki absorbans değerleri eşit oluncaya kadar devam edildi.

Yıkama tamamlandıktan sonra elüsyon için gradient mikserin kolona bağlı olan ve bir mekanik karıştırıcı ile karıştırılan haznesine 250 ml 1,5 M NaCl ve bu hazneye açılan diğer hazneye ise 250 ml 5 mM KH₂PO₄ tamponu (pH 6,2) dolduruldu ve artan iyonik şiddetle lineer gradient elüsyonu başladı. Elüatlar, kolon akış hızı 15 ml/saat'e ayarlanarak yaklaşık 2 ml'lik hacimler halinde tüplere alındı. Her bir elüatın 340 nm'de aktivitesine bakıldı. Aktivite gösteren tüpler birleştirildi.

Birleştirilen elüat çözeltileri ve kolona tatbik edilen numune için Bradford metoduyla kantitatif protein tayini ve aktivite tayinleri yapılarak spesifik aktiviteler hesaplandı ve saflaştırma oranları belirlendi.

3.2.3. Bradford yöntemi ile kantitatif protein tayini

Koyun beyini numunesinden hazırlanan homojenat, amonyum sülfat çöktürmesi, CM-Selüloz C-52 iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltilerindeki kantitatif protein miktarı bu yöntemle belirlendi. Bu yöntemde boya olarak kullanılan Coomassie brilliant blue G-250 negatif bir yüke sahiptir ve protein üzerindeki pozitif yüke bağlanır. Boyanın kırmızı ($\lambda_{\max}$ =465 nm) ve mavi ($\lambda_{\max}$ =595 nm) formu mevcuttur. Proteinin bağlanması, kırmızı formun mavi forma dönüşümünü sağlar. Bu yöntemin bozucu faktörlere girişimi oldukça azdır ve hassasiyeti 1-100 µg arasındadır. Reaksiyon yüksek oranda tekrarlanabilir ve hızlı cerayan eder, iki dakikada tamamlanır. Renk stabilitesi iki saat'in üzerinde devam edebilir (Bradford 1976).

Bu yöntem ile protein tayini yapabilmek için standart bir grafiğe ihtiyaç vardır. Bu amaçla 1 ml'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albumin çözeltisinden tüplere 10, 20,30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µl konuldu. Saf su ile bütün tüplerin hacmi 0,1 ml'ye tamamlandı ve 5 ml Coomassie brilliant blue G-250 çözeltisi ilave edilip vorteks ile karıştırıldı. 10 dakika inkübe edildikten sonra 595 nm'de 3 ml'lik küvetlerde köre karşı absorbands değerleri okundu. Kör olarak 0,1 ml enzim numunesinin içinde bulunduğu tampondan ve 5 ml Coomassie brilliant blue G-250 çözeltisinden oluşan karışım kullanıldı. Elde edilen sonuçlardan absorbands değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri standart grafik haline getirildi.

Tüplere koyun beyninden elde edilen homojenattan ve adı geçen saflaştırma basamaklarından elde edilen enzim numunelerinden 0,1'er ml konularak üzerine 5'er ml Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi ilave edildi. Vorteks ile karıştırıldıktan sonra 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Sonra 595 nm'de absorbands değerleri okundu. Her bir numuneden üçer adet deneme yapılarak bu üç değer aritmetik ortalamasından gerçek değer tespit edildi. Elde edilen bu değerlere göre standart grafikten yararlanılarak protein miktarları belirlendi. Bu metodla saflaştırılan enzim çözeltilerinde ve homojenatta protein tayini yapıldı.

3.2.4. Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi kolonunun hazırlanması ve koyun beyninden elde edilen SDH enziminin doğal halinin molekül kütlesinin tayini

Koyun beyni sorbitol dehidrogenaz enziminin doğal halinin molekül kütlesi Andrews ve arkadaşlarının metodu ile belirlendi (Whitaker 1963; Andrews 1964; Marshall 1970).

Jel filtrasyon kromatografisi ile molekül kütlelerinin tayini için önceden 36 ml yatak hacmi elde etmek için 3 g Sephadex G-100, 150 ml saf su içine alındı. 90°C'de su banyosunda bekletilerek polimer materyal (Sephadex G-100) şişirildi. Şişirilmiş materyalin içindeki hava, su trompu kullanılarak vakumla uzaklaştırıldı. Şişirilmiş ve havası uzaklaştırılmış polimer materyali 50 mM'lık ve pH'sı 7,0 olan KH₂PO₄

tamponuyla dolu kolona, içinde hava kabarcığı kalmayacak şekilde paketlenerek 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 ve bu değer aynı oluncaya kadar dengeleme işlemine devam edildi. Kolonun akış hızı 10-15 ml/saat olarak ayarlandı.

Molekül kütlesi tayininde kullanılacak olan standart grafiği elde edebilmek için kolondan önce standart proteinler geçirildi. Standart olarak, önce blue dekstran ve molekül kütlesi belli olan sitokrom c (12 kDa), karbonik anhidraz (29 kDa), albumin (66 kDa), alkol dehidrogenaz (150 kDa), β -amilaz (200 kDa) şeklinde standart proteinler ayrı ayrı kolona uygulandı. Daha sonra koyun beyninden elde edilen enzim numunesi jel filtrasyon kolonuna uygulandı (Keha ve Küfrevioğlu 2010).

Elüsyon hacmi için dengelenen kolonun, jel üzerindeki tampon çözeltisi jel seviyesine indirildi. Kolona her bir protein çözeltisinden 2 ml tatbik edildi. Kolona uygulanan protein çözeltisi jel tarafından tamamen emildikten sonra kolonun üstü elüsyon tamponuyla (50 mM KH_2PO_4 pH:7,0) doldurularak, elüatlar 1’er ml olacak şekilde tüplere toplandı. Elüsyon tamponu kör olarak kullanıldı ve toplanan elüatların 280 nm’de absorbansları ölçülerek kaydedildi. Elüsyon işlemine 280 nm’deki absorbans değerleri 0 oluncaya kadar devam edildi. 280nm’de absorbans gösteren tüplerde aktivite ölçümleri yapıldı. 280 nm’de kalitatif ölçüm için alınan absorbans değerleri tüp sayısına karşı grafiğe geçirildi. Daha sonra enzimin molekül kütlesini belirlemek için her bir protein için ayrı ayrı Kav değerleri ve log MK değerleri hesaplandı. log MK-Kav grafiği bilgisayarda Excel programı yardımıyla çizildi. Son olarak koyun beyni sorbitol dehidrogenaz enzimi için Kav değeri belirlenerek grafik vasıtasıyla enzimin doğal halinin molekül kütlesi belirlendi.

Aşağıdaki formül kullanılarak Kav değeri hesaplandı ve log MK-Kav grafiği çizildi.

$$Kav = \frac{Ve - Vo}{Vt - Vo}$$

Vo= Void hacim, Ve= Elüsyon hacmi, Vt= Kolon yatak hacmi

3.2.5. Kalitatif protein tayini

Kalitatif protein tayini, proteinlerin yapısında bulunan aromatik gruplara sahip tirozin ve triptofan amino asitlerinin 280 nm’de maksimum absorbans göstermesi esasına dayanan Warburg metodu olarak bilinen yolla gerçekleştirildi (Segel 1968). Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi işleminden sonra eşit hacimde alınmış olan bütün tüplerde kalitatif protein tayini yapıldı. Kuvarz küvetler kullanılarak spektrofotometrede absorbansları 280 nm’de köre karşı okundu.

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

Enzim saflaştırıldıktan sonra %3-8 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) Laemmli metoduna göre yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi (Laemmli 1970).

Bunun için elektroforez plakaları önce su ile sonra alkol ile iyice yıkandı. Her iki kenarında aralık oluşturuca bir plaka ile düz bir plaka üst üste getirilerek kısıkaçlarla tutturuldu. Sabitleştirilen plakalar, içerisinde sızdırmayı önleyen sünger ihtiva eden jel hazırlama kabinine konuldu. Önce ayırma jeli hazırlandı ve enjektörle plakaların arasına üst kesimde 0,5 cm kalıncaya kadar dolduruldu. İki saat jelin donması beklendi, ayırma jelinin katılaştığından emin olunduktan sonra yığma jeli hazırlandı. Jelin üst kısmındaki boşluğa dolduruldu ve numune kuyucuklarının oluşması için tarak dikkatlice yerleştirildi. Yığma jelinin katılaşması beklenirken ıslatılmış süzgeç kağıdı sistemin üzerine kapatıldı ve kuruması önleildi. Yığma jeli katılaştıktan sonra tarak dikkatlice çıkartılarak numune kuyuları belirlendi. Önce saf su, sonra da yürütme tamponuyla yıkandı ve jel plakalarla birlikte elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu dolduruldu. Enzim örnekleri yaklaşık 20 µg protein olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim 50 µl olacak şekilde 1/1 oranında numune

tamponu katıldı. Üç dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi. Elektroforez tankı kapatılarak alt tarafından (+) anot, üst taraftan ise (-) katot yerleştirildi. Önce 40 voltta 20 dakika yürütüldü ve örnek ayırma jeline kadar gelip yığıldı. Sonra akım 80 volt'a çıkartılarak numunelerin jelin alt sınırına gelmesine kadar yürütüldü. Numunelerin takip edilmesi, numune tamponuna katılan brom timol mavisi yardımıyla anlaşıldı. Yürütme işlemi bittikten sonra akım kesilerek plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı ve sabitleştirme çözeltisine konuldu. Sabitleştirme çözeltisinde 20 dakika bekletilen jel, çıkarılarak boyama çözeltisine konuldu ve çalkalayıcı üzerinde 2 saat bekletildi. Jel boyandıktan sonra çıkarılarak yıkama çözeltisine konuldu. Rengi açılıp, protein bantları belirginleşinceye kadar çalkalayıcı üzerinde yıkanan jel çıkarılarak fotoğrafı çekildi.

Ayırma jeli şöyle hazırlandı: 3,75 ml 1 M Tris-HCl (pH 8,8), 3,3 ml %30 Akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,15 ml %10'luk SDS, 0,1 ml %5'lik TEMED, 0,2 ml %1,5'lik PER ve 2,35 ml saf su karıştırıldı.

Yığılma jeli şöyle hazırlandı: 0,31 ml 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,3325 ml %30 Akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,025 ml %10'luk SDS, 0,025 ml %5'lik TEMED, 0,05 ml %1,5'lik PER ve 1,84 ml saf su karıştırıldı. PER çözeltisi taze hazırlandı ve karıştırıldığında hemen per döküldü.

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

Laemmli (1970), metoduna göre molekül kütlesi tayini şu şekilde yapıldı; standart protein olarak β -galaktosidaz (116 kDa), fosforilaz (97,4 kDa), sığır serum albumini (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), sığır eritrosit karbonik anhidrazı (29 kDa), kullanıldı. Elektroforez işleminden sonra standart proteinlerin R_f değerleri hesaplanarak log MK- R_f standart grafiği çizildi. Daha sonra koyun beyininden elde edilen SDH enzimi için R_f değeri hesaplandı ve standart grafikte yerine konularak SDH enziminin log MK'sı belirlendi. Bu değer antilogaritması alınarak numunenin molekül kütlesi belirlendi.

Proteinlerin R_f değerleri;

$$R_f = X_e / X_{\text{boya}}$$

formülü kullanılarak belirlendi.

X_e : Proteinin yürüme mesafesi, X_{boya} : Boyanın yürüme mesafesi

3.2.8. Koyun Beyni Sorbitol dehidrogenaz enziminin aktivitesi üzerine bazı ilaç etkilerinin belirlenmesi

Koyun beyni sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine bazı ilaçların etkilerini belirlemek amacıyla küvet ortamına değişik konsantrasyonlarda ilaç ilave edilerek aktivite değerleri okundu. Kullanılan ilacın farklı konsantrasyonlarını oluşturmak için stok çözeltiler seyreltildi. Kullanılan stok çözelti hacmi gereken derişimi sağlamadığı zaman küvete katılan tampon hacmi azaltılarak ilaç konsantrasyonu arttırıldı. Bu şekilde gereken konsantrasyon ayarlanmış oldu.

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

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

IC_{50} değerleri hesaplanan bazı ilaçların K_i değerlerini belirlemek amacıyla koyun beyni sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesini yarıya düşüren ilaç konsantrasyonu ile bu değerin altında ve üstünde iki sabit ilaç konsantrasyonlarında uygun beş substrat konsantrasyonu ile aktivite ölçümleri yapıldı. Çalışmalarda uygun beş farklı substrat

konsantrasyonu stok çözelti kullanılarak ön deneme ile belirlendi. Elde edilen değerlerle her bir inhibitör için Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Grafik denkleminde yarışmalı inhibisyon için eğime eşit olan $K_M(1+[I]/K_i)/V_{max}$ ifadesinden, yarışmasız inhibisyon için $V_{max}^I = V_{max}/(1+[I]/K_i)$ formülünden yararlanılarak K_i değerleri belirlendi.

Çizelge 3.1. Koyun beyni sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde ampisilin etken maddesinin IC_{50} değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitor konsantrasyonları

Tampon Glisin/NaOH pH 9,9 (μl)	Su (μl)	Sorbitol (μl)	NAD ⁺ (μl)	Enzim (μl)	İnhibitör Hacmi (μl)	Küvetteki inhibitor konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
250	530	100	100	20	0	0	1
250	480	100	100	20	50	0,045	1
250	430	100	100	20	100	0,090	1
250	380	100	100	20	250	0,224	1
250	280	100	100	20	350	0,314	1
250	130	100	100	20	400	0,360	1

Çizelge 3.2. Koyun beyni sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde oksitetrasiklin dihidrat etken maddesinin IC₅₀ değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Tampon Glisin/NaOH pH 9,9	Su (µl)	Sorbitol (µl)	NAD ⁺ (µl)	Enzim (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
250	530	100	100	20	0	0	1
250	525	100	100	20	5	0,00201	1
250	520	100	100	20	10	0,00403	1
250	515	100	100	20	15	0,00604	1
250	513	100	100	20	17	0,00685	1
250	510	100	100	20	20	0,00806	1

Çizelge 3.3. Koyun beyni sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde tylosin etken maddesinin IC₅₀ değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Tampon Glisin/NaOH pH 9,9	Su (µl)	Sorbitol (µl)	NAD ⁺ (µl)	Enzim (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
250	530	100	100	20	0	0	1
250	510	100	100	20	20	0,0040	1
250	420	100	100	20	110	0,0240	1
250	390	100	100	20	140	0,0305	1
250	380	100	100	20	150	0,0320	1
250	330	100	100	20	200	0,0436	1

Çizelge 3.4. Koyun beyni sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde kanamisin etken maddesinin IC₅₀ değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

/Tampon Glisin/NaOH pH 9,9	Su (µl)	Sorbitol (µl)	NAD⁺ (µl)	Enzim (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki inhibitör konsantrasyon (mM)	Toplam hacim (ml)
250	530	100	100	20	0	0	1
250	520	100	100	20	10	0,00086	1
250	505	100	100	20	25	0,00215	1
250	455	100	100	20	75	0,00644	1
250	430	100	100	20	100	0,00858	1
250	380	100	100	20	150	0,01290	1

Çizelge 3.5. Koyun beyni sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde enrofloksasin etken maddesinin IC₅₀ değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Tampon Glisin/NaOH pH 9,9	Su (µl)	Sorbitol (µl)	NAD ⁺ (µl)	Enzim (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
250	530	100	100	20	0	0	1
250	520	100	100	20	10	0,00014	1
250	517	100	100	20	13	0,00018	1
250	515	100	100	20	15	0,00021	1
250	512	100	100	20	18	0,00025	1
250	505	100	100	20	25	0,00035	1

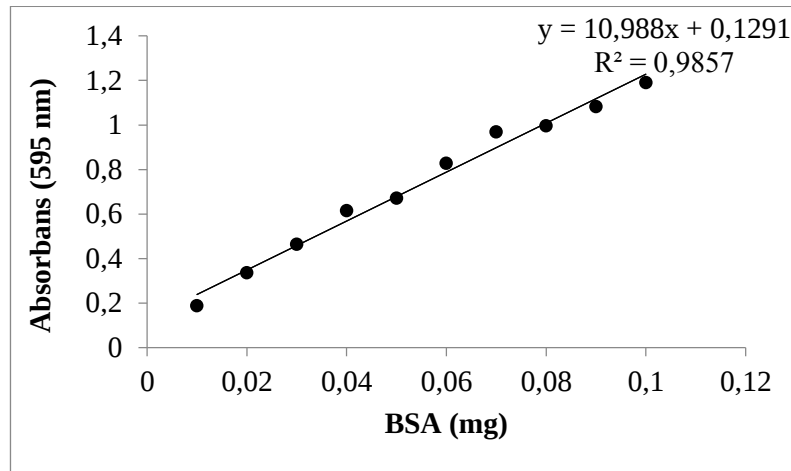
Çizelge 3.6. Koyun beyni sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde gentamisin sülfat etken maddesinin IC50 değerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Tampon Glisin/NaOH pH 9,9	Su (µl)	Sorbitol (µl)	NAD ⁺ (µl)	Enzim (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
250	530	100	100	20	0	0	1
250	505	100	100	20	25	0,00035	1
250	430	100	100	20	100	0,00140	1
250	330	100	100	20	200	0,00280	1
250	230	100	100	20	300	0,00420	1
250	30	100	100	20	500	0,00700	1

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

Deneysel çalışmalar sonucu elde ettiğimiz enzim çözeltisindeki kantitatif protein miktarı Bradford yöntemi ile belirlendi. Standart grafik hazırlandı. Ham homojenat, amonyum sülfat çöktürmesi, CM-Selüloz C-52 iyon değişim kromatografisi sonucu elde edilen enzim çözeltilerindeki kantitatif protein tayini bu standart grafikten faydalanılarak bulundu. Standart çözeltilerin μg proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 4.1’de gösterildi.



Şekil 4.1. Bradford yöntemiyle proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart grafik

4.2. Koyun Beyni Sorbitol Dehidrogenaz Enziminin Saflaştırılması Sonuçları

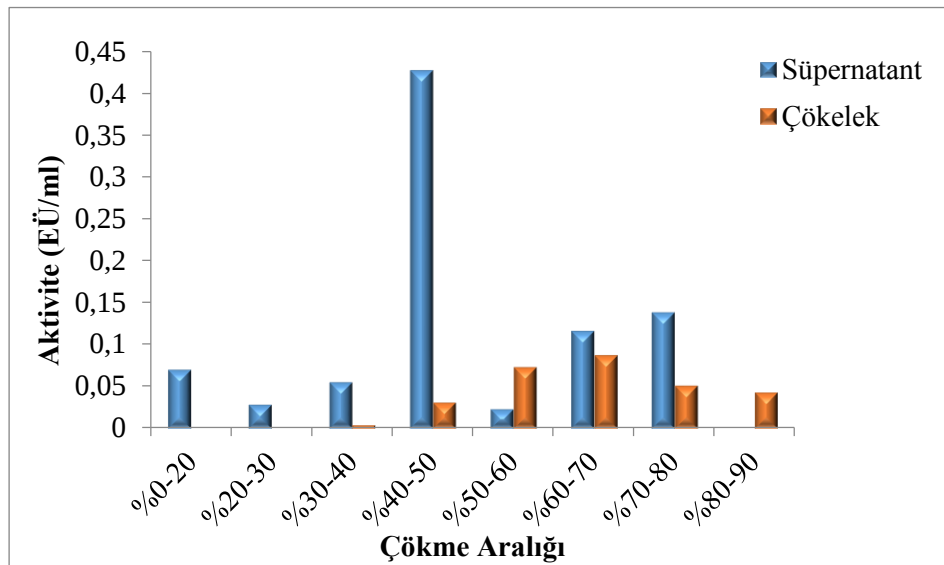
4.2.1. Amonyum sülfat çöktürmesi sonuçları

Koyun beyin dokusundan elde edilen homojenat art arda %0 ile %90 arasındaki amonyum sülfat çöktürmesi işlemine (her seferinde doygunluk %10 artırılarak) tabi tutuldu. Sorbitol dehidrogenaz aktivitesi içeren proteinlerin %30 amonyum sülfat

doygunluğundan itibaren çökmeye başladığı ve %80 doygunluğunda aktivitenin tamamının çöktüğü görüldü. Bundan sonraki saflaştırma çalışmalarında, saflaştırma işleminde ilk basamak olarak %30-%85 amonyum sülfat çöktürme işlemi yapılmasına karar verildi ve bu kesit her saflaştırma öncesinde uygulandı. Elde edilen çökelek 13 000 rpm’de 15 dakika santrifüjlenerek ve 5 mM KH_2PO_4 pH 7,9 tamponunda tekrar çözülerek bir sonraki işleme hazır hale getirildi.

Çizelge 4.1. Koyun beyni SDH enzimi için amonyum sülfat doygunluk aralığı tespitine yönelik aktivite-çöktürme aralığı çizelgesi

Amonyum sülfat aralığı (%)	0-20	20-30	30-40	40-50	50-60	60-70	70-80	80-90
Süpernatant Aktivite (EÜ/ml)	0,071	0,029	0,056	0,043	0,024	0,012	0,014	0,000
Çökelti Aktivite (EÜ/ml)	0,000	0,000	0,004	0,031	0,073	0,087	0,051	0,043



Şekil 4.2. Koyun beyni sorbitol dehidrogenaz enzimi için amonyum sülfat doygunluk aralığı tespitine yönelik aktivite-çöktürme aralığı grafiği

4.2.2. Koyun beyni sorbitol dehidrogenaz enziminin CM-Selüloz C-52 iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılması sonuçları

Amonyut sülfat çöktürmesi ve diyaliz sonrası enzim, katyon değiştirici CM-Selüloz iyon değişim reçinesi ile elüe edildi. Elüat çözeltileri ve kolona tatbik edilen numune için Bradford metoduyla kantitatif protein tayini ve aktivite tayinleri yapılarak spesifik aktiviteler hesaplandı, saflaştırma oranları belirlendi ve bu oranlar Çizelge 4.2’de verildi.

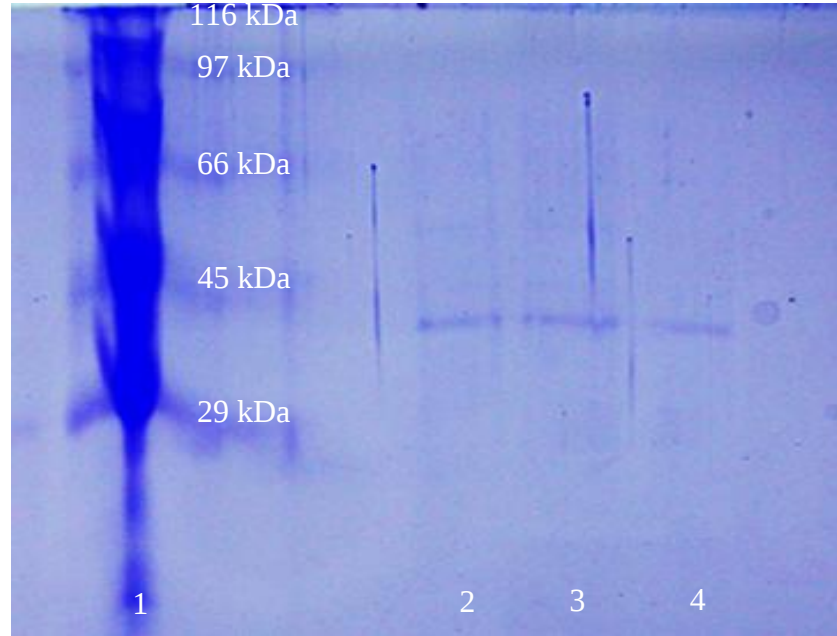
Çizelge 4.2. Koyun beyni sorbitol dehidrogenaz enziminin saflaştırılması basamakları

Saflaştırma basamağı	Aktivite (EÜ/ml)	Toplam hacim (ml)	Protein (mg/ml)	Toplam protein (mg)	Toplam aktivite (EÜ)	Spesifik aktivite (EÜ/mg)	Verim (%)	Saflaştırma katsayısı
Homojenat	$1,468 \times 10^{-1}$	26,5	3,850	102,025	3,890	$3,812 \times 10^{-2}$	100	1,00
(NH₄)₂SO₄ çöktürmesi ve diyaliz	$4,608 \times 10^{-2}$	3,5	1,946	6,811	0,161	$2,363 \times 10^{-3}$	4,14	6,10
CM-Selüloz iyon değişim kromatografisi	$8,574 \times 10^{-3}$	3,0	$4,5 \times 10^{-4}$	0,0015	0,026	17,13	0,66	450

4.3. Koyun Beyni Sorbitol Dehidrogenaz Enziminin SDS-PAGE ile Saflık Kontrolü

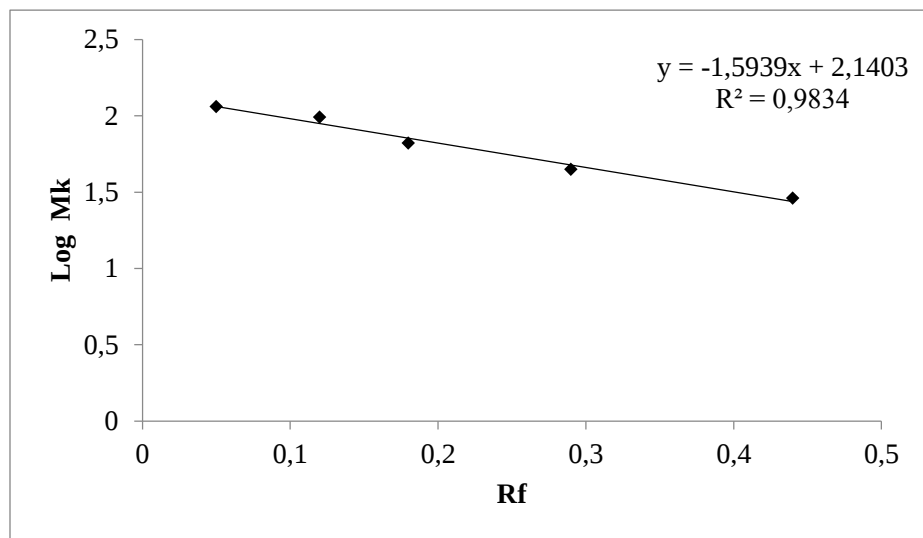
Koyun beyin dokusundan elde edilen sorbitol dehidrogenaz enzimi numunelerinin, homojenat, amonyum sülfat çökeleği, CM-Selüloz C-52 iyon değişim kromatografisinden elde edilen elüatlardaki enzimlerin saflığını kontrol etmek için kesikli SDS-PAGE yöntemi kullanıldı. Bu amaçla elektroforez sistemi kurularak enzim numuneleri sırayla kuyulara uygulandı ve yürütüldü. Elde edilen bantları gösteren fotoğraf Şekil 4.3’te gösterildi. Koyun beyninden saflaştırılan sorbitol dehidrogenaz

enziminin molekül kütlesi log MK-R_f grafiği çizilerek bu grafikten hesaplandı (Şekil 4.4).



Şekil 4.3. Koyun beyini sorbitol dehidrogenaz enziminin saflığının SDS-PAGE’de elde edilen sonucu

*1: standart proteinler, 2,3,4,: CM Selüloz C-52 iyon değişim kromatografisi sonucu elde edilen saf SDH enzimi



Şekil 4.4. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yöntemiyle koyun beyini SDH enziminin molekül kütlesi tayininde kullanılan standart grafik (SDH için R_f=0,34)

4.4. Koyun Beyni Sorbitol Dehidrogenaz Enziminin Optimum pH Çalışmalarına Ait Sonuçlar

Optimum pH çalışması; pH 5,5-8,0 aralığında potasyum fosfat tamponu, pH 7,5-9,0 aralığında Tris-HCl tamponu ve pH 8,5-10,5 aralığında ise glisin/NaOH tampon kullanıldı. Bu tampon çözelti aralıklarında sorbitol dehidrogenaz aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçüldü. Koyun beyini sorbitol dehidrogenaz enzimi için optimum pH 10,0 olarak belirlendi ve sonuçlar Çizelge 4.3-4.5 ve Şekil 4.5'te %Aktivite-pH grafiği ile gösterildi.

Çizelge 4.3. pH 5,5-8,0 aralığında koyun beyini SDH enziminin aktivitesini gösteren çizelge

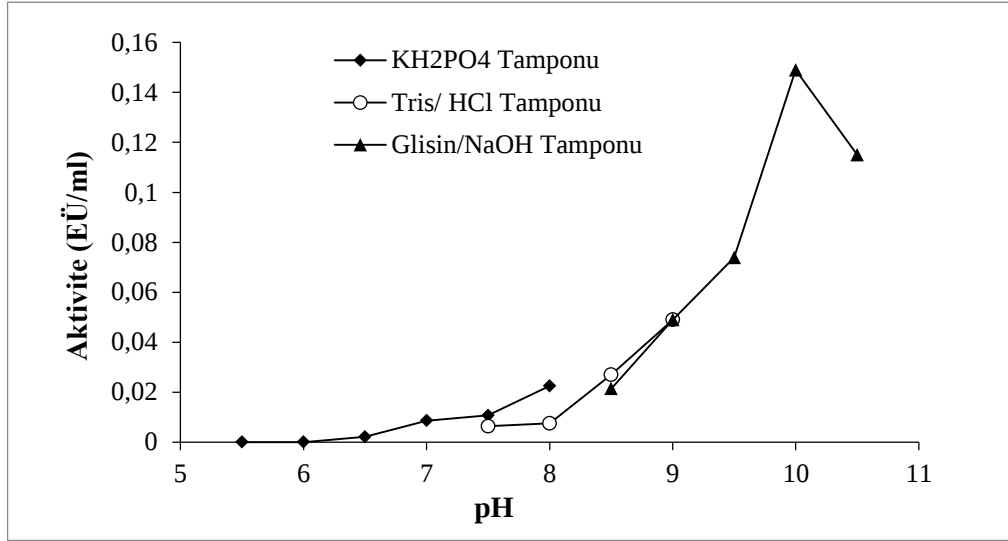
pH	Aktivite (EÜ/ml)
5,5	0
6,0	0
6,5	0,0021
7,0	0,0086
7,5	0,0107
8,0	0,0225

Çizelge 4.4. pH 7,5-9,0 aralığında koyun beyini SDH enziminin aktivitesini gösteren çizelge

pH	Aktivite (EÜ/ml)
7,5	0,0064
8,0	0,0075
8,5	0,0027
9,0	0,0490

Çizelge 4.5. pH 8,5-10,5 aralığında koyun beyini SDH enziminin aktivitesini gösteren çizelge

pH	Aktivite (EÜ/ml)
8,5	0,0214
9,0	0,0490
9,5	0,0739
10,0	0,1490
10,5	0,1150



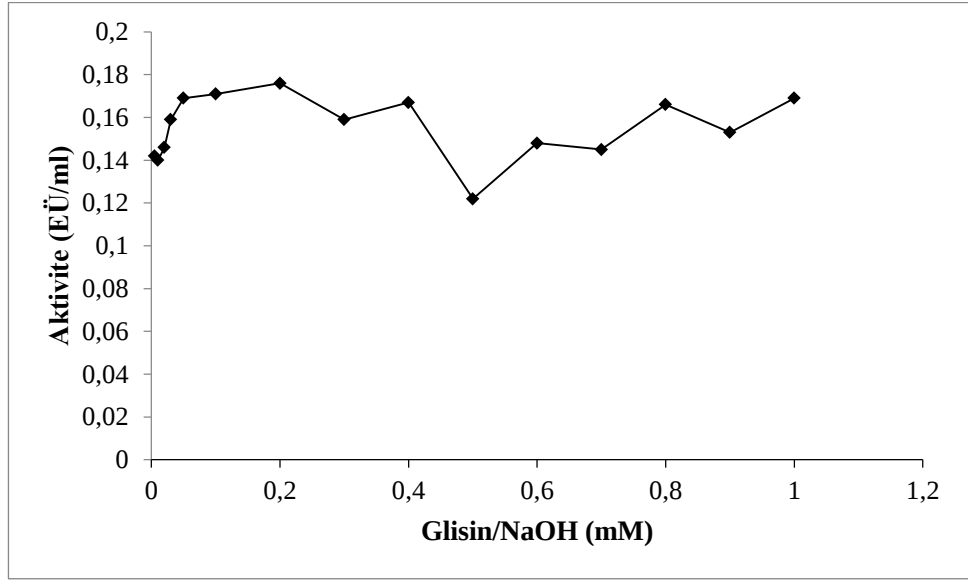
Şekil 4.5. Koyun beyni SDH enziminin aktivitesi üzerinde pH'nın etkisi

4.5. Koyun Beyni Sorbitol Dehidrogenaz Enziminin Optimum İyonik Şiddetin Bulunmasına Dair Sonuçlar

Enzimin aktivitesinin optimum olduğu pH'yı belirledikten sonra bu pH'daki çözeltinin 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM, 500 mM, 600 mM, 700 mM, 800 mM, 900 mM, 1000 mM'lık farklı konsantrasyonları hazırlandı ve bu konsantrasyonlardaki enzimin aktivitesi ölçülerek koyun beyni sorbitol dehidrogenaz enziminin optimum iyonik şiddeti 0,2 M olarak belirlendi. Sonuçlar Çizelge 4.6 ve Şekil 4.6'da grafik halinde verildi.

Çizelge 4.6. Koyun beyni SDH enziminin aktivitesinin farklı iyonik şiddetlerdeki değişimini gösteren çizelge

İyonik şiddet	Aktivite (EÜ/ml)
0,005 M	0,142
0,01 M	0,140
0,02 M	0,146
0,03 M	0,159
0,05 M	0,169
0,1 M	0,171
0,2 M	0,176
0,3 M	0,159
0,4 M	0,167
0,5 M	0,122
0,6 M	0,148
0,7 M	0,145
0,8 M	0,166
0,9 M	0,153
1,0 M	0,169



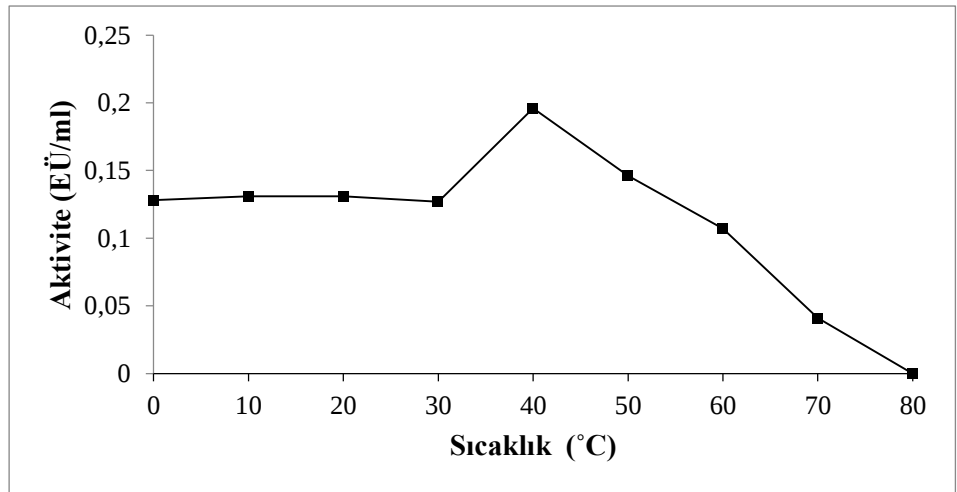
Şekil 4.6. Koyun beyni SDH enziminin aktivitesi üzerinde iyonik şiddetin etkisi

4.6. Koyun Beyni Sorbitol Dehidrogenaz Enziminin Optimum Sıcaklık Çalışmalarına Ait Sonuçlar

Sıcaklığın koyun beyni sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerindeki etkisinin araştırılması amacıyla enzimin optimum pH'sında ve 0-90°C aralığındaki sıcaklıklarda çalışıldı. İstenilen sıcaklıklar, oda sıcaklığının altında buz banyosunda, oda sıcaklığının üstünde ise ısıtıcı ve sirkülatörlü su banyosu kullanılarak ayarlandı. Mümkün olduğu kadar hızlı bir şekilde enzim çözeltisi aktararak, sorbitol substratı kullanılarak üç dakika boyunca aktivite ölçümleri yapıldı. Koyun beyni sorbitol dehidrogenaz enzimi için optimum sıcaklık 40°C olarak belirlendi ve sonuçlar Çizelge 4.7 ile Şekil 4.7'de grafik halinde verildi.

Çizelge 4.7. Koyun beyni SDH enziminin aktivitesinin sıcaklıkla değişimini gösteren çizelge

Sıcaklık (°C)	Aktivite (EÜ/ml)
0	0,128
10	0,131
20	0,131
30	0,127
40	0,196
50	0,146
60	0,107
70	0,041
80	0,000



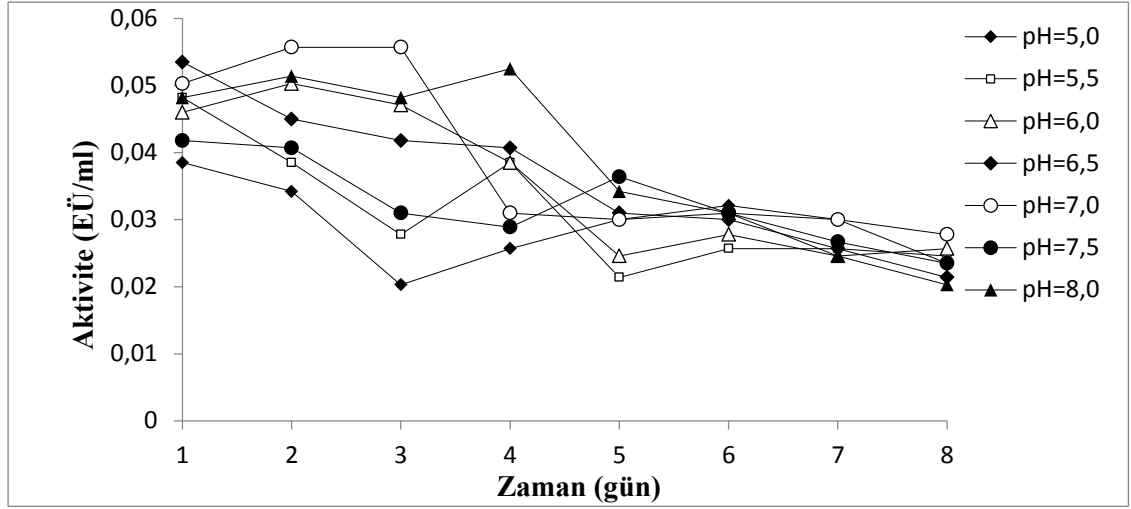
Şekil 4.7. Koyun beyni SDH enziminin aktivitesi üzerinde sıcaklığın etkisi

4.7. Koyun Beyni Sorbitol Dehidrogenaz Enziminin Stabil Olduğu pH'nın Bulunmasına Dair Çalışma Sonuçları

Enzimin stabil olduğu pH'yı tespit etmek için pH 5,0-8,0 aralığında fosfat tamponu ve pH 8,5-10,5 aralığında ise Glisin/NaOH tamponu kullanıldı. Belirtilen pH'lardaki tampon çözeltilerinin 1000 μ l'sine, 500 μ l enzim çözeltisi ilave edilerek 4°C'de muhafaza edildi. Başlangıçta aktiviteler ölçüldükten sonra 24 saat boyunca 1 hafta boyunca aktivite ölçümü yapıldı ve enzimin stabil olduğu pH aralığı 5,5-8,5 olarak belirlendi. Sonuçlar Çizelge 4.8-4.9 ve inkübasyon süresine karşılık aktivite değerleri Şekil 4.8-4.9'da grafikler halinde gösterildi.

Çizelge 4.8. Koyun beyne SDH enziminin aktivitesinin belirli pH değerlerinde (pH 5,0-8,0) zamanla değişimi

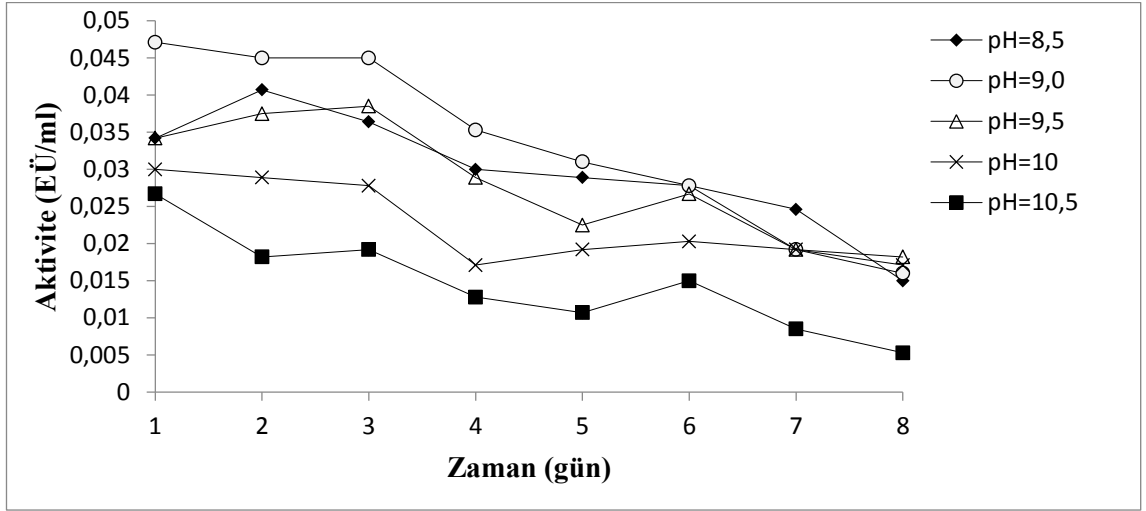
1.gün	2.gün	3.gün	4.gün	5.gün	6.gün	7.gün	8.gün	pH
0,0385	0,0342	0,0203	0,0257	0,0300	0,0321	0,0300	0,0235	5,0
0,0482	0,0385	0,0278	0,0385	0,0214	0,0257	0,0257	0,0246	5,5
0,0460	0,0503	0,0471	0,0385	0,0246	0,0278	0,0246	0,0257	6,0
0,0535	0,0450	0,0418	0,0407	0,0310	0,0300	0,0257	0,0214	6,5
0,0503	0,0557	0,0557	0,0310	0,0300	0,0310	0,0300	0,0278	7,0
0,0418	0,0407	0,0310	0,0289	0,0364	0,0310	0,0267	0,0235	7,5
0,0482	0,0514	0,0482	0,0525	0,0342	0,0310	0,0246	0,0203	8,0



Şekil 4.8. Koyun beyni SDH enziminin aktivitesinin belirli pH değerlerinde (pH 5,0-8,0) zamanla değişimi

Çizelge 4.9. Koyun beyni SDH enziminin aktivitesinin belirli pH değerlerinde (pH 8,5-10,5) zamanla değişimi

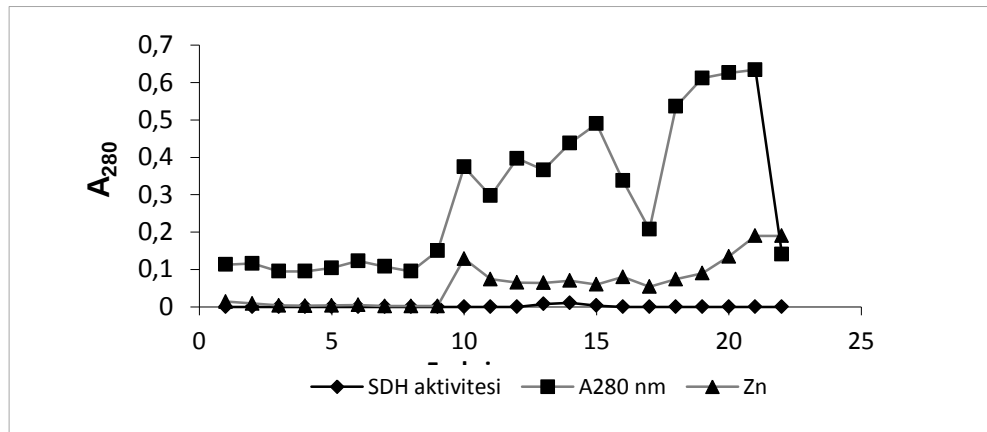
1.gün	2.gün	3.gün	4.gün	5.gün	6.gün	7.gün	8.gün	pH
0,0342	0,0407	0,0364	0,0300	0,0289	0,0278	0,0246	0,0150	pH 8,5
0,0471	0,0450	0,045	0,0353	0,0310	0,0278	0,0192	0,0160	pH 9,0
0,0342	0,0375	0,0385	0,0289	0,0225	0,0267	0,0192	0,0182	pH 9,5
0,0300	0,0289	0,0278	0,0171	0,0192	0,0203	0,0192	0,0171	pH 10,0
0,0267	0,0182	0,0192	0,0128	0,0107	0,015	0,0085	0,0053	pH 10,5



Şekil 4.9. Koyun beyini SDH enziminin aktivitesinin belirli pH değerlerinde (pH 8,5-10,5) zamanla değişimi

4.8. Koyun Beyni Sorbitol Dehidrogenaz Enziminde Çinko Belirlenmesi

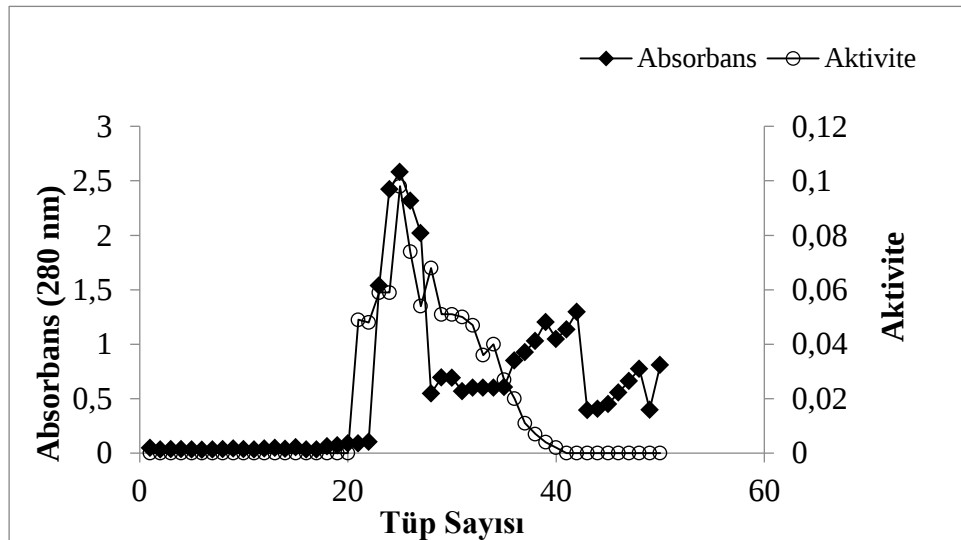
Koyun beyin dokusundan elde edilen sorbitol dehidrogenaz enzimi yapısında çinko ihtiva ettiği için jel filtrasyon kromatografisi sonucu elde edilen enzim çözeltilerinde atomik absorpsiyon spektrofotometresi yöntemi ile çinko tayini yapıldı. Sonuçlar Şekil 4.10'da verilmiştir.



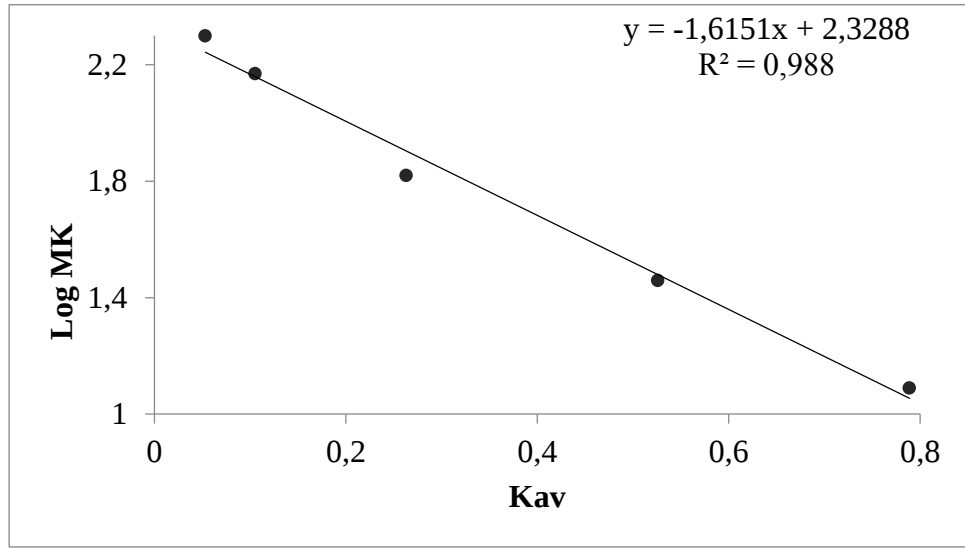
Şekil 4.10. Jel filtrasyon kromatografisi sonucu elde edilen enzim çözeltilerinde atomik absorpsiyon spektrofotometresi yöntemi ile çinko tayini yapılmasının sonucu

4.9. Koyun Beyni Sorbitol Dehidrogenaz Enziminin Aktif Formunun Molekül Kütlesinin Sephadex G-100 Jel Filtrasyon Kromatografisi ile Belirlenmesine Ait Sonuçlar

Koyun beyin dokusundan saflaştırılan SDH enziminin molekül kütlesi Bölüm 3.2.4’de anlatıldığı şekilde kolon materyali olarak Sephadex G-100 jeli ile jel filtrasyon kromatografisi yapıldı ve sonuçlar Şekil 4.11-4.12’de verildi. Bu işlem esnasında; Blue dextran (2000 kDa) kolona uygulandı. Daha sonra β -amilaz (200 kDa), alkol dehidrogenaz (150 kDa), albumin (66 kDa), karbonik anhidraz (29 kDa), sitokrom C (12 kDa) standart proteinleri sırasıyla kolona uygulandı. Daha sonra log MK-Kav grafiği çizilerek, SDH enziminin aktif formunun molekül kütlesi tespit edildi (Şekil 4.11) .



Şekil 4.11. Koyun beyni SDH enziminin aktif formunun molekül kütlesinin tayini için kullanılan jel filtrasyon kromatografisi grafiği



Şekil 4.12. Koyun beyni SDH enziminin aktif formunun molekül kütlesi tayini için Sephadex G-100 kolon materyali kullanılarak yapılan jel filtrasyon kromatografisi sonucu elde edilen standart grafik (SDH için Kav=0,0789)

4.10. Koyun Beyni Sorbitol Dehidrogenaz Enzimi Üzerine Bazı İlaçların Etken Maddelerinin Etkilerinin Belirlenmesine Ait Çalışma Sonuçları

Koyun beyni sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine bazı ilaçların etkilerini belirlemek amacıyla bu bileşiklerin stok çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerden değişik konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanarak koyun beyni sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine etkileri araştırıldı. Çalışmalar sonucu elde edilen inhibisyon etkileri Çizelge 4.10-4.16'da verildi. Ayrıca konsantrasyona karşı %Aktivite olarak oluşturulan grafikler Şekil 4.13-4.19'da; bu grafiklerden elde edilen IC₅₀ değerleri Çizelge 4.17'de verildi.

Çizelge 4.10. Ampisilin etken maddesinin koyun beyni SDH aktivitesi üzerine etkisi

Konsantrasyon (µM)	%Aktivite
0,000	100,0
0,045	85,6
0,090	72,5
0,224	48,20
0,314	38,20
0,360	26,50

Çizelge 4.11. Oksitetrasiklin dihidrat etken maddesinin koyun beyini SDH aktivitesi üzerine etkisi

Konsantrasyon (µM)	%Aktivite
0,00000	100,00
0,00201	85,00
0,00403	68,72
0,00604	49,17
0,00685	44,58
0,00806	32,25

Çizelge 4.12. Tylosin etken maddesinin koyun beyini SDH aktivitesi üzerine etkisi

Konsantrasyon (µM)	%Aktivite
0,0000	100,00
0,0040	95,52
0,0240	81,34
0,0305	47,76
0,0320	33,58
0,0436	21,64

Çizelge 4.13. Kanamisin etken maddesinin koyun beyini SDH aktivitesi üzerine etkisi

Konsantrasyon (µM)	%Aktivite
0,00000	100,00
0,00086	86,95
0,00215	60,86
0,00644	46,73
0,00858	33,69
0,01290	12,10

Çizelge 4.14. Enrofloksasin etken maddesinin koyun beyni SDH aktivitesi üzerine etkisi

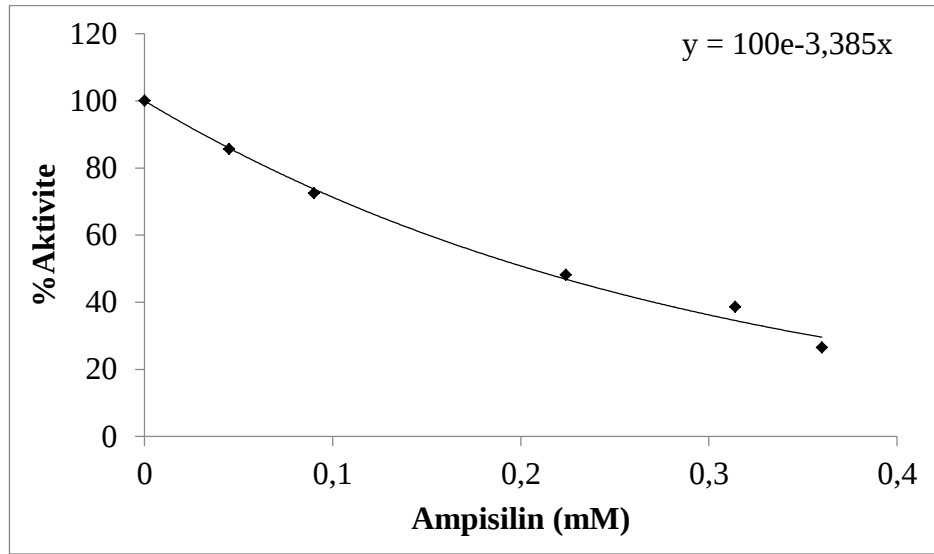
Konsantrasyon (μM)	%Aktivite
0,00000	100,00
0,00014	80,80
0,00018	50,42
0,00021	47,05
0,00025	35,71
0,00035	15,70

Çizelge 4.15. Gentamasin etken maddesinin koyun beyni SDH aktivitesi üzerine etkisi

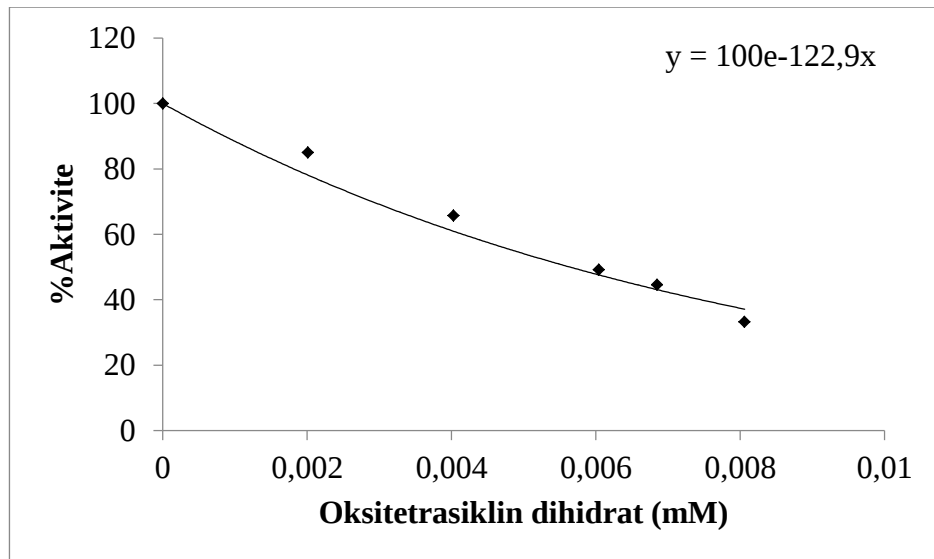
Konsantrasyon (μM)	%Aktivite
0,00000	100,00
0,00035	85,46
0,00140	72,67
0,00280	52,20
0,00420	44,10
0,00700	33,38

Çizelge 4.16. Sefalekssin etken maddesinin koyun beyni SDH aktivitesi üzerine etkisi

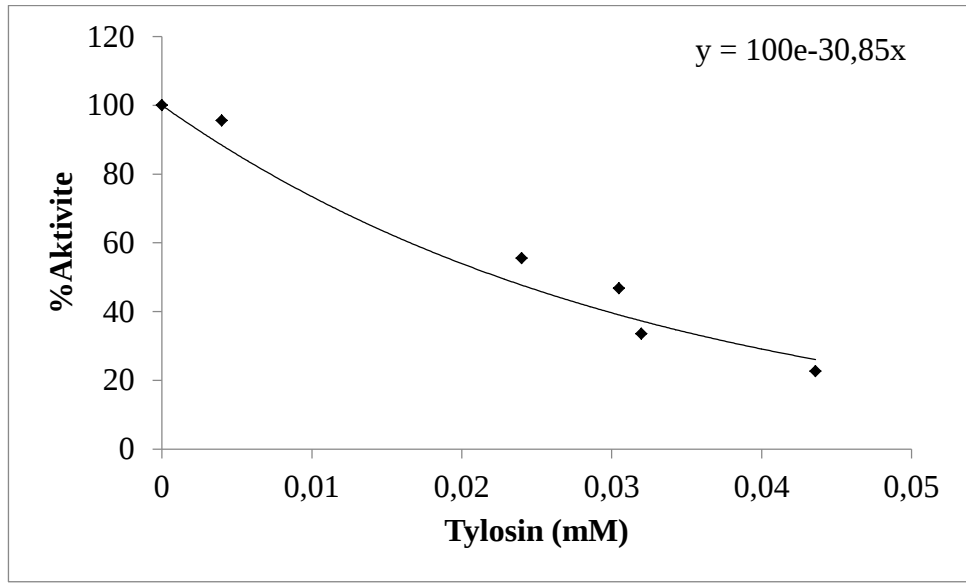
Konsantrasyon (μM)	%Aktivite
0,0000	100,00
0,0041	89,71
0,0100	85,98
0,0205	85,04
0,0410	87,38
0,0615	83,64
0,1020	71,02
0,2050	68,69



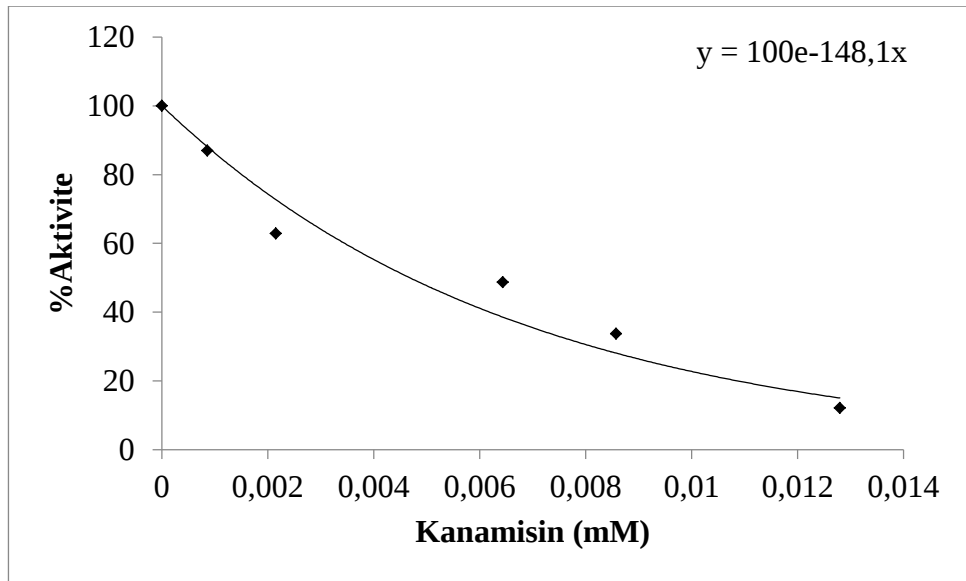
Şekil 4.13. Koyun beyni SDH enzimi üzerine ampisilin etken maddesinin etkisi



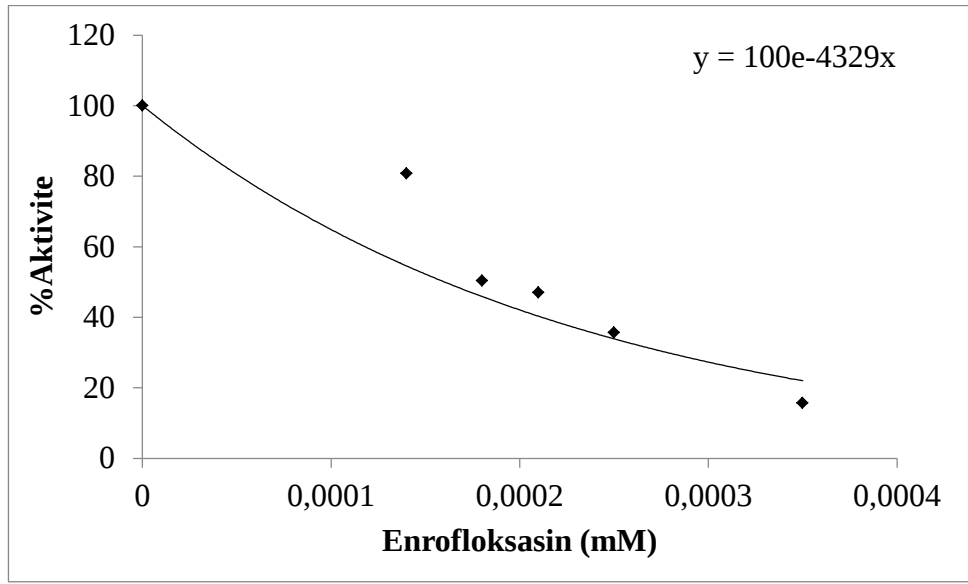
Şekil 4.14. Koyun beyni SDH enzimi üzerine oksitetrasiklin dihidrat etken maddesinin etkisi



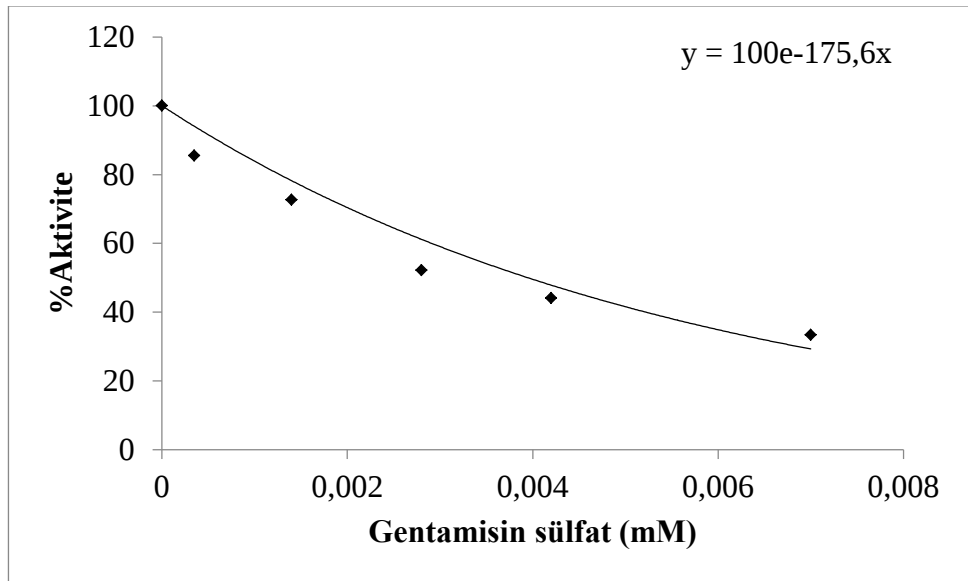
Şekil 4.15. Koyun beyni SDH enzimi üzerine tylosin etken maddesinin etkisi



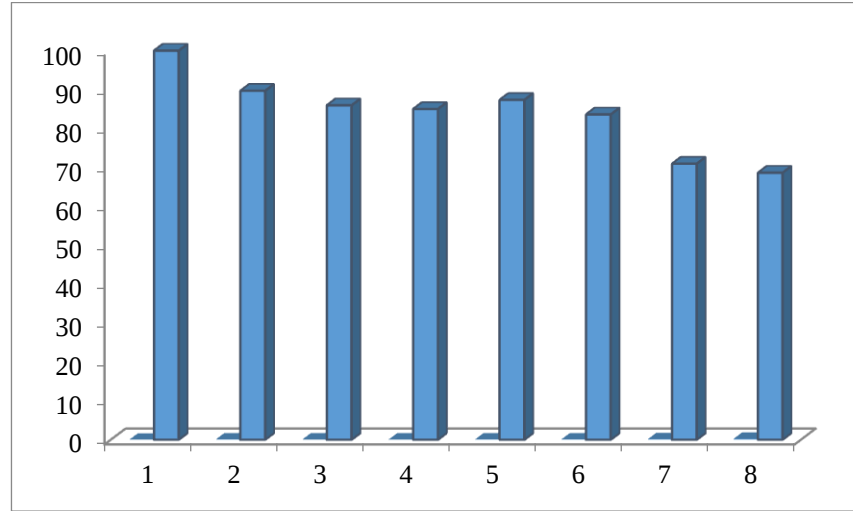
Şekil 4.16. Koyun beyni SDH enzimi üzerine kanamisin etken maddesinin etkisi



Şekil 4.17. Koyun beyni SDH enzimi üzerine enrofloksasin etken maddesinin etkisi



Şekil 4.18. Koyun beyni SDH enzimi üzerine gentamisin sülfat etken maddesinin etkisi



Şekil 4.19. Koyun beyni SDH enzimi üzerine sefalekssin etken maddesinin etkisi

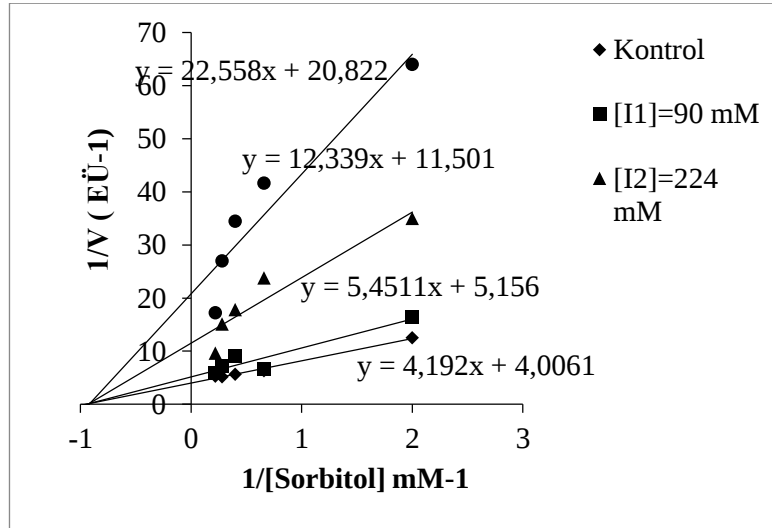
Çizelge 4.17. Koyun beyni sorbitol dehidrogenaz enzimi için bulunan IC_{50} değerleri

İlaçlar	IC_{50} (mM)
Enrofloksasin	0,00016
Gentamisin sülfat	0,00390
Kanomisin	0,00470
Oksitetrasiklin dihidrat	0,00560
Tylosin	0,02260
Ampisilin	0,20700

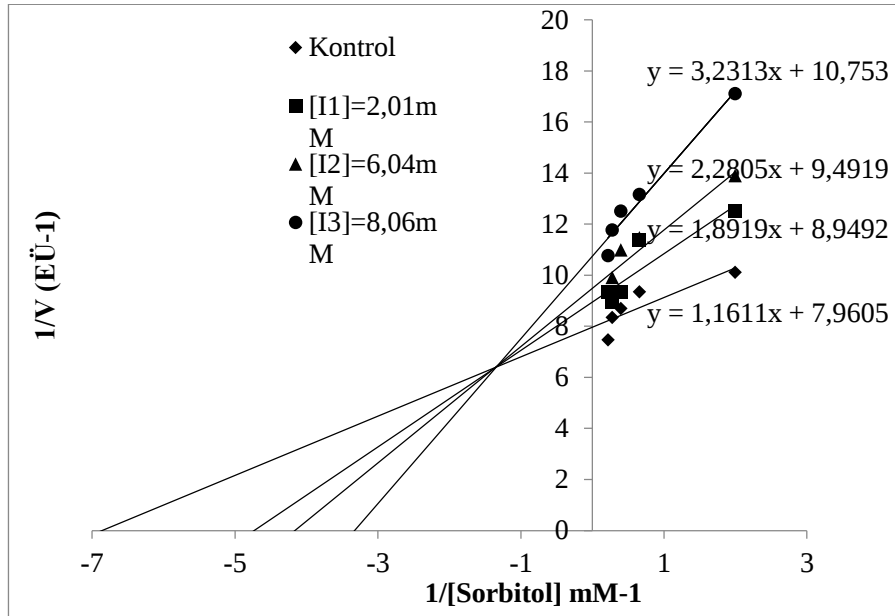
4.11. Koyun Beyni Sorbitol Dehidrogenaz Enzimi Üzerine İnhibitör Etkisi Gösteren Bazı İlaçlar İçin K_i Değerlerinin Belirlenmesine Ait Çalışmaların Sonuçları

Koyun beyni SDH enzimi aktivitesi üzerine güçlü inhibisyon etkisi gösteren ve elimizde mevcut olan ampisilin, oksitetrasiklin dihidrat, kanamisin, enrofloksasin etken maddeleri için K_i değerlerini belirlemek amacıyla sabit 3 uygun ilaç konsantrasyonu ve 5 substrat konsantrasyonu belirlenerek aktivite değerleri ölçüldü. Bu değerlerden Lineweaver-Burk grafikleri çizildi, y ekseninde kesişen doğruların oluşturduğu grafiği veren inhibitör yarışmalı, x ekseninde kesişen doğruların oluşturduğu

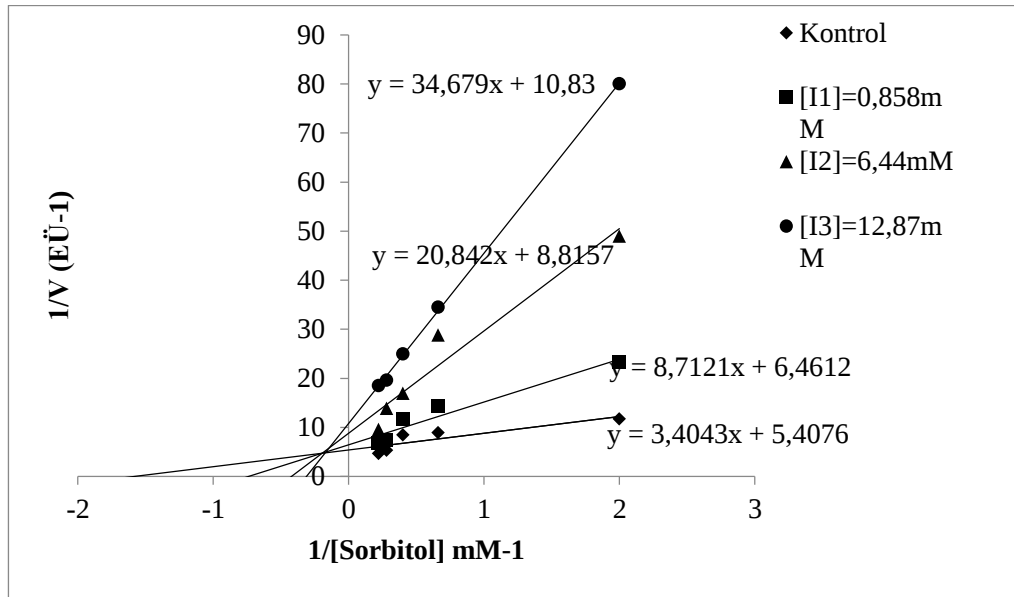
grafiği veren inhibitör ise yarışmasız olduğu için, elde edilen grafiklerdeki her bir doğrunun denkleminde K_i değerleri hesaplandı. Sonuçlar Şekil 4.20-4.23 arasında ve Çizelge 4.18’de verildi.



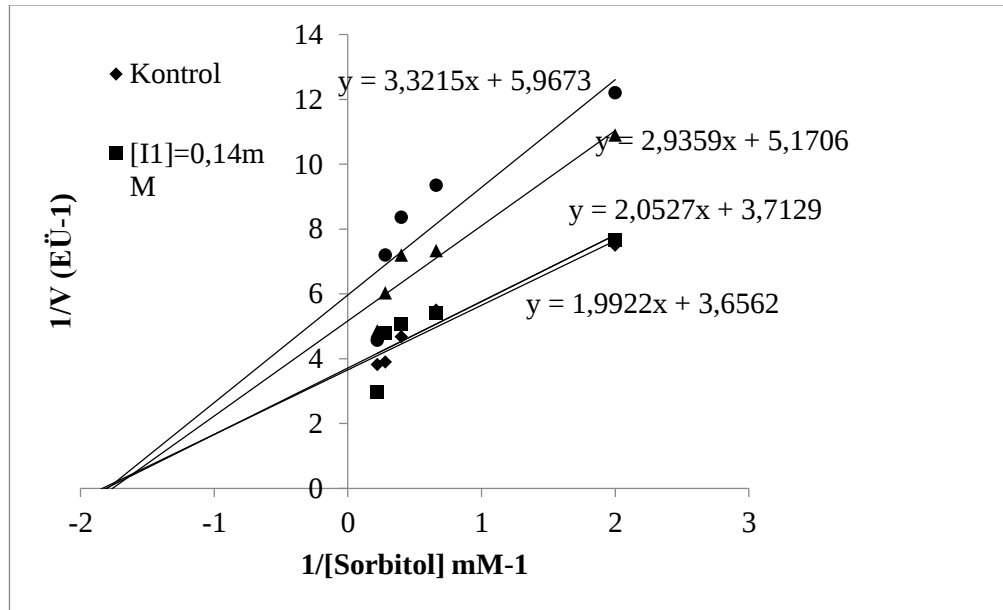
Şekil 4.20. Koyun beyini SDH enzimi üzerine ampisilin etken maddesinin etkisi



Şekil 4.21. Koyun beyini SDH enzimi üzerine oksitetrasiklin dihidrat etken maddesinin etkisi



Şekil 4.22. Koyun beyni SDH enzimi üzerine kanamisin etken maddesinin etkisi



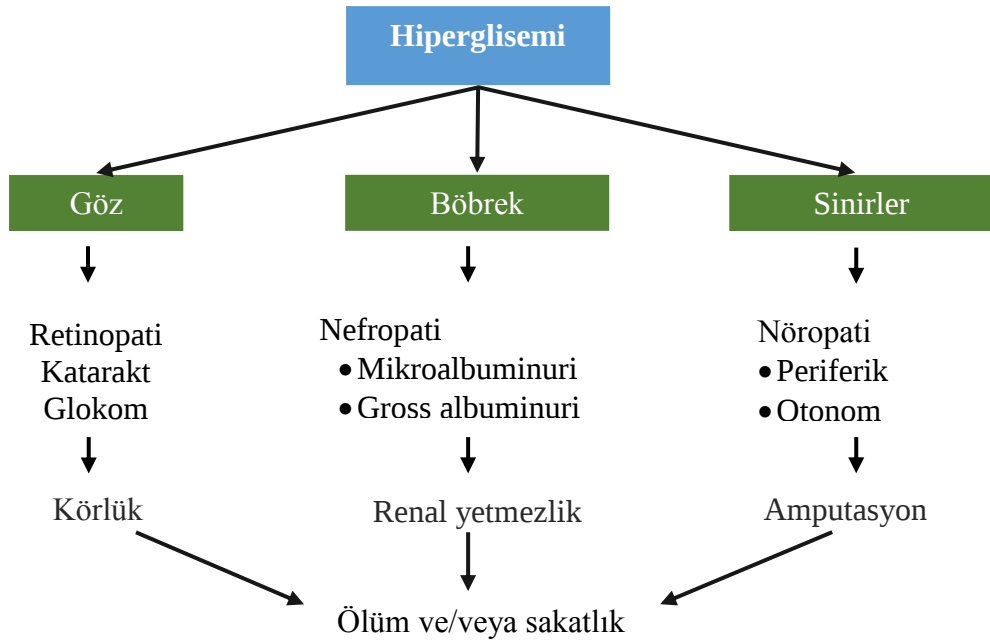
Şekil 4.23. Koyun beyni SDH enzimi üzerine enrofloksasin etken maddesinin etkisi

Çizelge 4.18. Koyun beyni sorbitol dehidrogenaz enzimi için bulunan K_i , K_i' değerleri ve inhibisyon tipleri

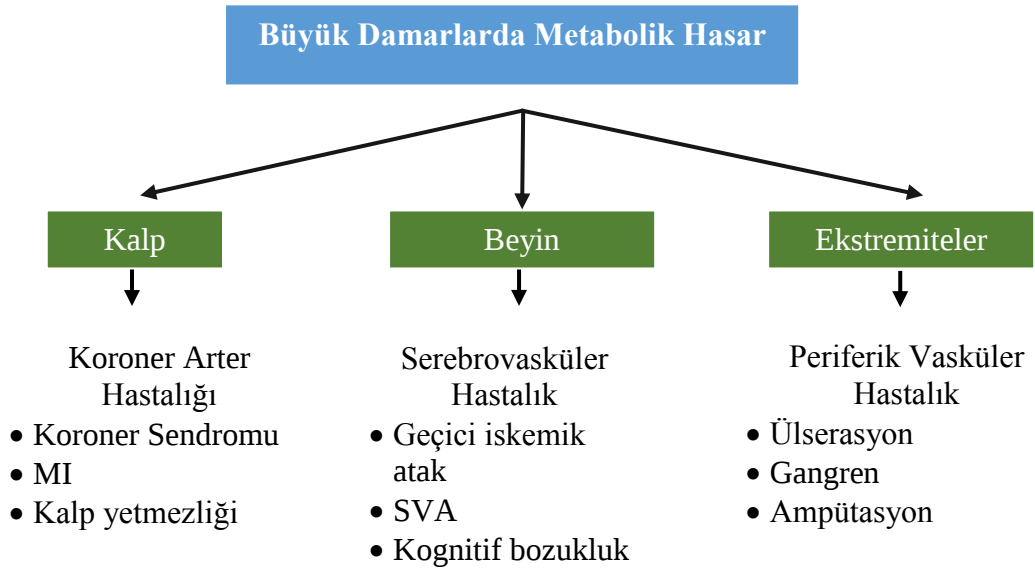
Etken Madde	IC ₅₀ (mM)	[I] (mM)	K _i (mM)	Ortalama Ki (mM)	Ki' (mM)	Ortalama Ki' (mM)	İnhibisyon Tipi
Oksitetrasiklin dihidrat	0,0056	0,066	3,150	4,612	15,952	22,838	Karışık
		0,110	6,233		31,789		
		0,154	4,455		20,773		
Kanamisin	0,0047	0,858	9,945	5,669	4,445	9,099	Karışık
		6,440	1,250		10,109		
		12,87	1,392		12,742		
Etken Madde	IC ₅₀ (mM)	[I] (mM)	K _i (mM)	Ortalama Ki (mM)	İnhibisyon Tipi		
Ampisilin	0,20700	90	310,340	170,8897	Yarışmasız		
		224	118,205				
		360	84,124				
Enrofloksasin	0,00016	0,140	1	0,6833	Yarışmasız		
		0,210	0,498				
		0,350	0,552				

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Günümüzde, diabetes mellitus (diyabet) ve onunla aynı risk faktörlerini paylaşan bulaşıcı olmayan, kronik hastalıklar önemli bir sağlık sorunu oluşturmaktadır. Her yıl dünyada 8 ile 14 milyon insan diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar, kanser ve kronik solunum yolu hastalıkları gibi diğer kronik karmaşık hastalıklar nedeniyle kaybedilmektedir. Yaşam tarzındaki hızlı değişim ile birlikte gelişmiş ve gelişmekte olan toplumların tümünde özellikle tip 2 diyabet prevelansı hızla yükselmektedir. 2013 sonu itibarı ile tüm dünyadaki diyabet nüfusu 382 milyon iken bu sayının 2035 yılında 592 milyona ulaşması beklenmektedir. 2013'te dünya üzerinde 5,1 milyon kişi diyabetten dolayı hayatını kaybetti ve bu sayı her 6 saniyede 1 kişinin hayatını kaybetmesi demektir (IDF 2013). Diyabette vasküler komplikasyonların gelişiminde majör risk faktörü hiperglisemidir.

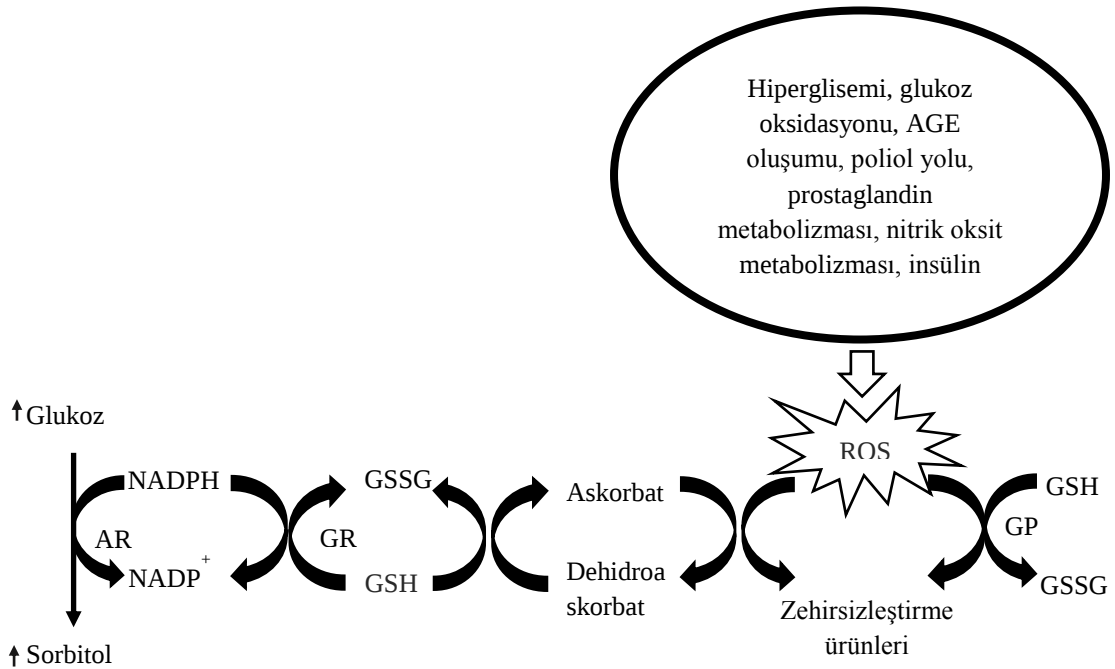


Şekil 5.1. Mikrovasküler komplikasyonların biyolojisi



Şekil 5.2. Büyük damarlarda metabolik hasar

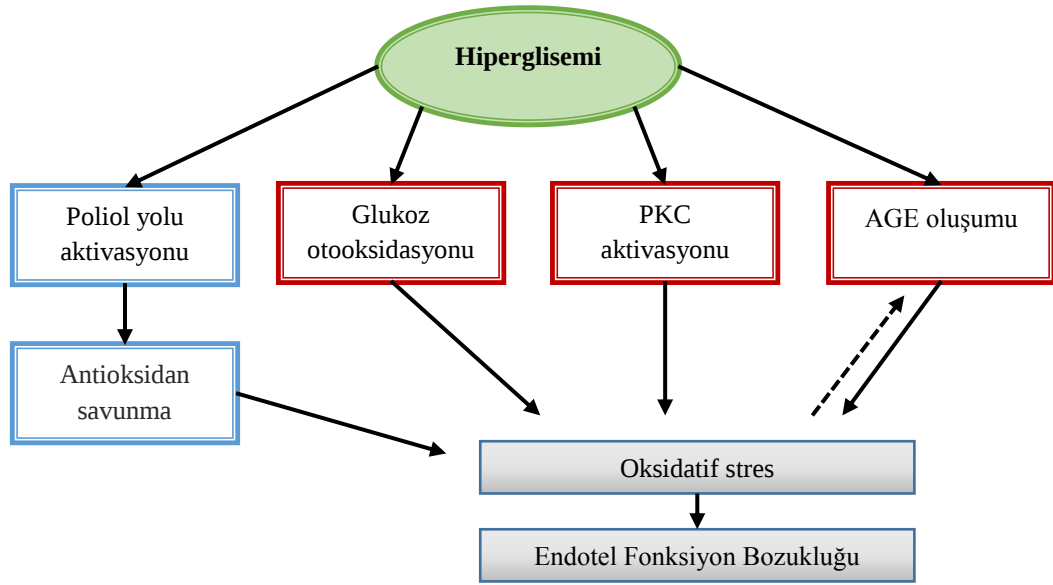
Hiperglisemi sorbitolün üretimi ve aldoz redüktazın indüksiyonu ile sonuçlanan poliol yolunu artırır. Oksidatif stres glutatyon ve nitrik oksit metabolizmasının bozulması ve NADPH'nin tüketilmesi gibi birçok farklı yollarla ortaya çıkabilir.



Şekil 5.3. Diyabetes mellitusta artan oksidatif stres için mekanizma.

*ROS; reaktif oksijen türleri, GSH; indirgenmiş glutatyon, GSSG; yükseltgenmiş glutatyon, GRD; glutatyon redüktaz, GPX; glutatyon peroksidaz, AR; aldoz redüktaz (Laaksonen and Sen 2000)

Hiperglisemi bazı metabolik yolların aktivitesini artırır. Bu metabolik yolların aktivitesinin artması sonucu oksidatif stres oluşmaktadır. Oksidatif stres oksidan oluşumu ve antioksidan savunma arasındaki dengenin oksidanlar yönünde bozulması durumudur. Oksidatif stres endotel fonksiyon bozukluklarına yol açmakta ve bunun sonucunda pek çok vasküler problemler ortaya çıkmaktadır (UKPDS 1998; Temelkova and Kurktschiev *et al.* 2000).

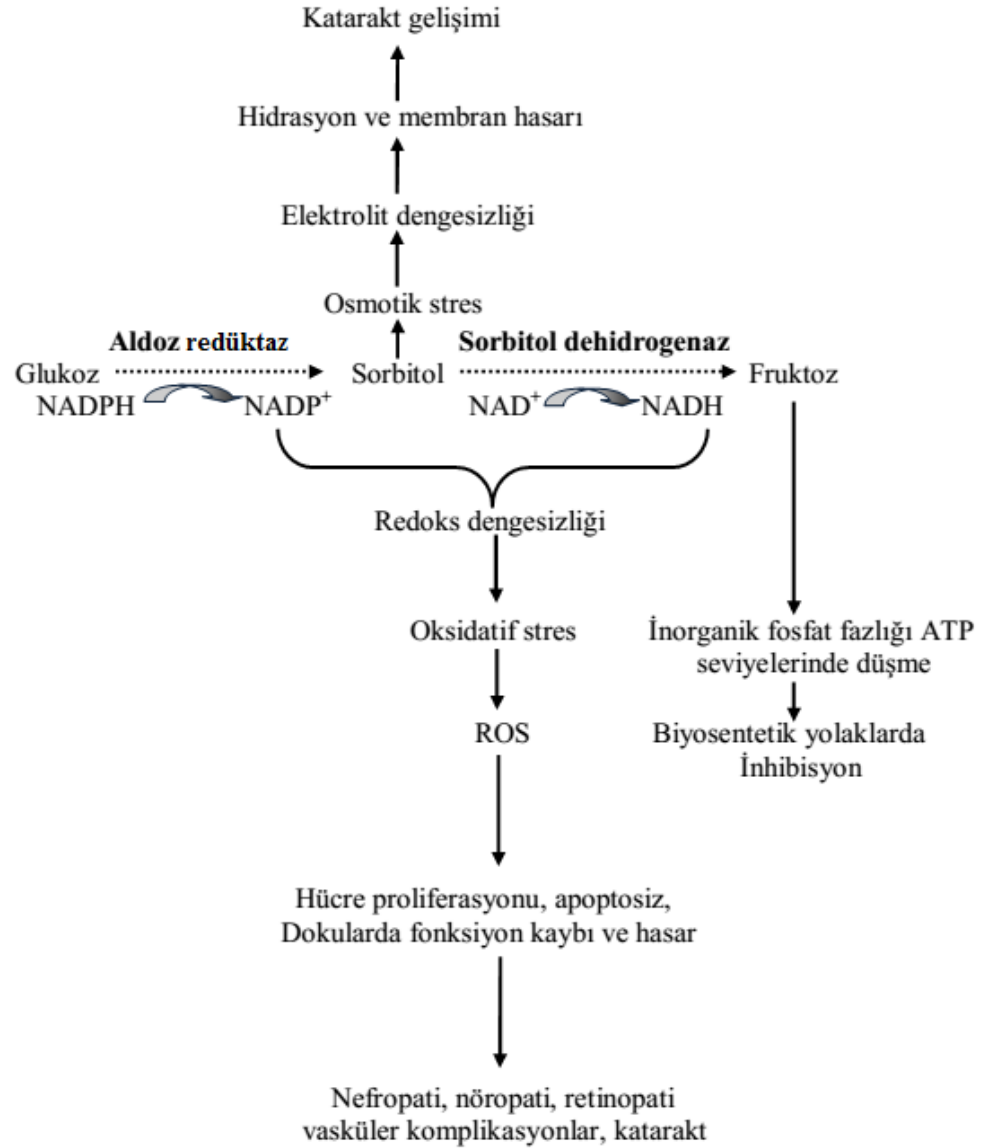


Şekil 5.4. Hiperglisemi ve endotelial fonksiyon bozukluğu (UKPDS 1998; Temelkova-Kurktschiev *et al.* 2000)

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

Poliol yolu, glukozu sorbitole dönüştüren aldoz redüktaz ve sorbitolü fruktoza dönüştüren sorbitol dehidrogenaz enzimlerini içeren ve hiperglisemi durumunda aktifleşerek retinopati, nöropati, nefropati, ateroskleroz gibi diabetik komplikasyonların

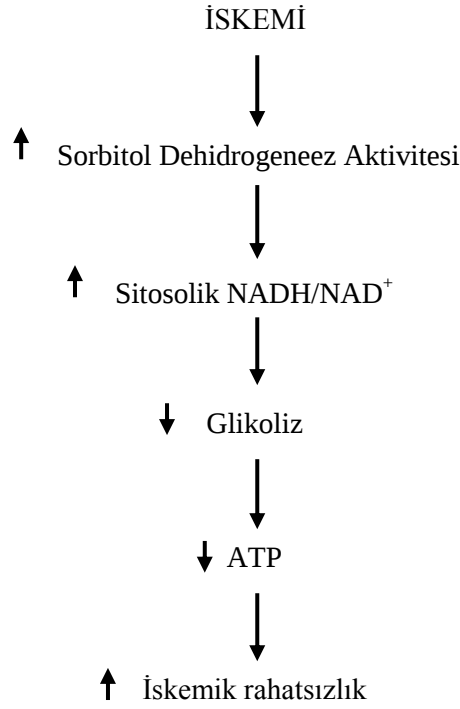
gelişiminde rol oynayan önemli bir metabolik yoldur (Kinoshita and Nishimura 1988; DCCT 1993).



Şekil 5.5. Poliöl yolunun diyabetik komplikasyonlarla ilişkisi (Srivastava *et al.* 2005)

Sorbitol dehidrogenaz NAD^+ varlığında sorbitolü fruktoza yükseltgeyen poliöl yolunun ikinci enzimidir. Son çalışmalar diyabetin vasküler ve nörolojik komplikasyonlarında poliöl yolunun enzimleri olan aldoz redüktaz ve sorbitol dehidrogenaz enzimlerinin aracılık ettiğini göstermiştir. Yuying ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada miyokardial iskemi yaralanmasında SDH'nin temel bir role sahip olduğunu göstermiştir.

Yine bu çalışmada sorbitol dehidrogenaz enziminin inhibisyonunun miyokardiyal iskemiye azalttığı görülmüştür. Bu çalışmada SDH'nin inhibisyonu düşük sitozolik NADH/NAD⁺ oranı ile ilişkilendirilmiştir (Hwang *et al.* 2003).

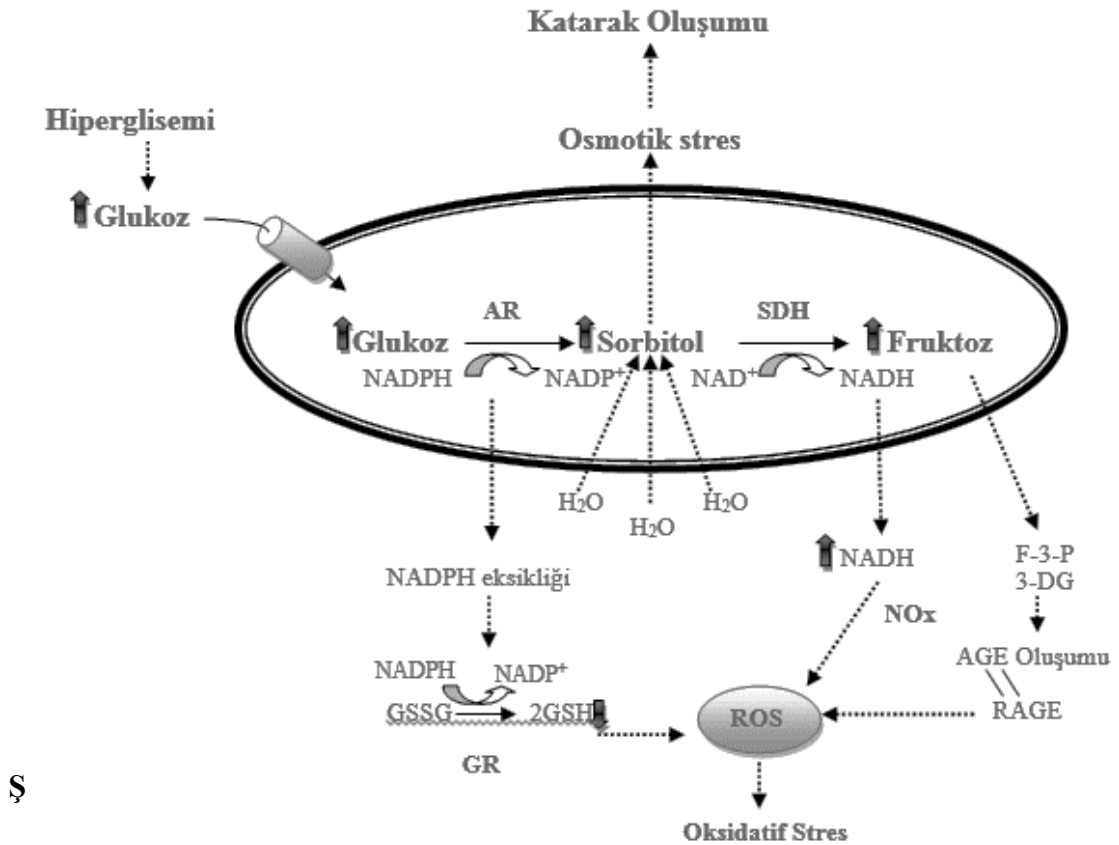


Şekil 5.6. Sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesiyle iskemik rahatsızlık arasındaki ilişki

Sorbitol dehidrogenaz enzimi (SDH), hiperglisemi durumunda aktif olan poliol yolunun ikinci enzimidir ve NAD⁺'yi koenzim olarak kullanarak sorbitolün fruktoza dönüşümünü katalizler (Mylari *et al.* 2003).

Sorbitol dehidrogenaz enzimi beyin, lens, eritrosit, karaciğer gibi bütün memeli dokularında bulunur (Jedziniak *et al.* 1981; O'Brien *et al.* 1983) ve özellikle karaciğer hastalıkları için önemli bir tanı işaretçisidir. Normalde serum SDH düzeyi tespit edilemeyecek düzeylerde dir. SDH düzeyinin yükselmesi karaciğerde parankimal hücre hasarı olduğunu gösterir. Akut enfeksiyöz hepatitler, toksik hepatitler, hipoksik karaciğer hasarı, siroz, primer ve sekonder karaciğer malignitelerinde serum SDH düzeyi artar (Anonim 2013a). Lens, retina, beyin, sinirler, eritrosit, böbrek, karaciğer, pankreas adacıkları, aort, kapiler damarlarda hücrelere glukoz girişi için

insüline gerek olmadığından, kontrol edilmemiş diyabet gibi hiperglisemi durumlarında büyük miktarlarda glukoz bu hücrelerin içine girebilir. Artmış glukoz konsantrasyonu ve yeterli NADPH varlığında, aldoz redüktaz fazla miktarda sorbitol sentezlenmesine neden olur. Sorbitol glukoz gibi membranları kolayca geçemez ve hücre içinde hapsolür. Sorbitol dehidrogenaz enziminin yok olduğu veya az olduğu retina, böbrek ve sinir hücrelerinde bu artış çoktur. Sonuçta sorbitol bu hücrelerde birikir, su çekerek hücre şişmesine neden olur. Diyabette görülen katarakt oluşumu, nöropati, nefropati ve retinopatiye yol açan damarsal sorunlar bu duruma bağlanabilir (Champe and Harvey 1997).



Görüldüğü gibi poliol yolu canlılar için hayati önem taşımaktadır. Bu nedenle bu yolun enzimlerinden biri olan sorbitol dehidrogenaz enzimi üzerinde yapılan çalışmalar, enzimin metabolizmadaki ve diyabetik komplikasyonlarındaki rolünü belirlemek ayrıca diyabetik komplikasyonların azaltılmasında etkili olabilecek koruyucu ilaçların

geliştirilmesi bakımından oldukça önemlidir. Dolayısıyla yaptığımız bu çalışmanın önemi gayet açıktır.

Hiperglisemi durumunda aktivitesi artan poliol yolu ile kornea, böbrek, kalp gibi çeşitli dokularda ortaya çıkan diyabetik komplikasyonlar arasındaki ilişkiyi açıklamak için araştırmacılar, bu yolun enzimleri olan aldoz redüktaz ve sorbitol dehidrogenaz enzimleri üzerinde çok sayıda çalışma yapmışlar ve bazı araştırmacılar tip 2 diyabetin mikrovasküler komplikasyonlarında önemli bir role sahip oldukları için bu enzimlerin gen polimorfizmleri ile diyabetik komplikasyonlar arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır (Maekawa *et al.* 2001; Szaflık *et al.* 2008).

Bu çalışmaların yanı sıra SDH enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu çalışmaları da yapılmıştır. Sorbitol dehidrogenaz enzimi ilk kez sıçan karaciğerinden saflaştırılmıştır (Brakley 1951). Sorbitol dehidrogenaz enzimi memeli dokularında bol miktarda bulunduğu için daha sonraki yıllarda farklı memeli dokularından da saflaştırılmış ve karakterizasyonu yapılmıştır (Williams Ashman *et al.* 1957; Smith 1962; Rehg and Torack 1977; Bailey *et al.* 1981; O'Brien *et al.* 1983; Wiesinger and Hamprecht 1987; Maret and Auld 1988; Marini *et al.* 1997).

SDH enzimi aynı zamanda fotosentez ürünlerinin sukroza translokasyonu için bitkilerde de bulunur. Bu yüzden SDH enzimi bazı bitki dokularından da saflaştırılmıştır (Negm and Loescher 1979; Doehlert 1987; Yamauchi *et al.* 1994; Oura *et al.* 2000).

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

Sorbitol dehidrogenaz enzimi birçok dokudan saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Sorbitol dehidrogenaz enzimini memeli dokularından saflaştırmak oldukça güç olmuştur. Bunun sebebi sorbitol dehidrogenazın kararsız bir enzim olması ve stabilitesinin olmamasıdır. Enzimin bu özelliği saflaştırma işleminin yapıldığı pek çok çalışmada gözlemlenmiştir (Smith 1962; Rehg and Torack 1977; O'Brien *et al.* 1983; Karacaoğlu and Özer 2005).

Sorbitol dehidrogenaz enziminin saflaştırılmasında bugüne kadar çok değişik kromatografik yöntemler kullanılmıştır. Örneğin sığır lensinden sorbitol dehidrogenaz enzimi, DE-52, amonyum sülfat çöktürmesi, Affi Blue, 2.DE-52, S-200, Bio Sil Sec 250 yöntemleri kullanılarak altı basamaklı bir prosesle %16 verimle, 3×10^4 kat saflaştırılabilmektedir ve sığır lensi SDH enziminin her bir alt biriminin molekül kütlesi 39 kDa, enzimin aktif formunun molekül kütlesi ise 156 kDa olarak bulunmuştur (Marini *et al.* 1997).

Sıçan beyninden sorbitol dehidrogenaz enzimi, amonyum sülfat çöktürmesi ve DEAE-Selüloz, CM-Selüloz kromatografisi yöntemleri kullanılarak %13,6 verimle 700 kat kısmen saflaştırılmıştır (Rehg and Torack 1977).

O'Brien ve arkadaşları insan beyninden sorbitol dehidrogenaz enzimini, protamin sülfat çöktürmesi, amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-Selüloz, CM-Selüloz, Matrex Red A gel, ultrafiltrasyon teknikleri ile toplam 6 basamakta %5,5 verimle 690 kat kısmen saflaştırabilmişlerdir. Bu çalışmada insan beyni sorbitol dehidrogenaz enziminin özellikle sulu solüsyonda (1 ml'de 1 mg'dan daha az protein olduğunda) stabilitesinin olmadığı bu nedenle saflaştırma işlemlerinin mümkün olduğunca hızlı tamamlanması gerektiği belirtilmiştir (O'Brien *et al.* 1983).

Sığır beyninden sorbitol dehidrogenaz enzimi, amonyum sülfat çöktürmesi ve DE-52, CM-52, Blue sepharose CL-6B, Green Sepharose 4B, Sephadex G-200 kromatografisi yöntemleri kullanılarak altı basamakta %6 verimle 3008 kat saflaştırılmıştır. Sığır beyni SDH enziminin molekül kütlesi SDS-PAGE'de 39 kDa olarak belirlenirken, jel

filtrasyon kromatografisi ile enzimin doğal halinin molekül kütlesi 155 kDa olarak bulunmuştur (Wiesinger and Hamprecht 1989).

Darmanin ve arkadaşları insan SDH enzimini kodlayan gen bölgesini karaciğer cDNA kütüphanesinden izole edip prokaryotik ekspresyon vektörüne takmışlar ve *Escherichia coli* BL21'e transfer etmişlerdir. Daha sonra elde ettikleri bakteriden insan sorbitol dehidrogenaz enzimini, amonyum sülfat çöktürmesi, anyon değişim kromatografisi (Q-99Sepharose kolon) ve boya afinitesi (Green-18 kolon) yöntemlerini kullanarak 23 kat saflaştırabilmişlerdir. Saflaştırılan homotetramerik SDH enziminin bir alt ünitesinin molekül kütlesi SDS-PAGE ile 37 kDa olarak tespit edilmiştir (Darmanin *et al.* 2003).

Karacaoğlu ve Özer (2005), tavuk karaciğerinden sorbitol dehidrogenaz enzimini saflaştırırken amonyum sülfat çöktürmesi ve Polybuffer Exchanger 94 kromatografisi yöntemini kullanmış ancak kromatografik işlemler sırasında enzim aktivitesinde önemli bir kayıp gözlemlendiğinden saflaştırma işlemlerinden vazgeçmiştir.

Bu çalışmada koyun beyni SDH enziminin farklı kromatografik metotlar denenerek saflaştırılması ve bazı ilaçların bu enzim üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yaptığımız çalışmada, koyun beyni SDH enzimi sadece iki basamakta saflaştırılmıştır. Saflaştırma işlemi amonyum sülfat çöktürmesi (%30-85), CM-Selüloz C-52 katyon değişim kromatografisi yöntemleri ile gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemler kullanılarak SDH enzimi koyun beyninden 17,13 EÜ/mg spesifik aktivite, %0,66 verimle 450 kat saflaştırılmıştır. Bütün saflaştırma işlemleri soğuk ortamda gerçekleştirilmesi gerektiğinden işlemler esnasında sıcaklık +4°C'de tutulmuştur. Böylece sıcaklık sebebiyle meydana gelebilecek enzim aktivitesindeki kayıp önlenmiştir. Çalışmamızda SDH enziminin saflaştırılması, yukarıda belirtilen çalışmalarla kıyaslandığında daha az basamakta ve daha kısa sürede gerçekleştirilmiştir.

Amonyum sülfat çöktürmesi özellikle spesifik afinitesi bilinmeyen enzimler için uzun zamandan beri bilim adamları tarafından kullanılan kısmi saflaştırma yöntemidir. Bu

yöntem yardımıyla numune içerisindeki birçok safsızlık uzaklaştırılmış olur ve proteinler daha derişik halde elde edilirler. Bu nedenle kromatografik işlemler öncesi amonyum sülfat çöktürmesi uygulanması enzimin derişikleştirilmesi açısından büyük öneme sahiptir (Ninfali *et al.* 1990). Bundan dolayı çalışmamızda koyun beyni SDH enzimi için %30-85 aralığında amonyum sülfat çöktürme işlemi yapıldı. Böylece homojenattaki birçok safsızlık uzaklaştırılarak enzimin derişik hale getirilmesi sağlandı. Amonyum sülfat çöktürmesi sonrası diyaliz işlemi gerçekleştirildi. Böylece düşük molekül kütleli maddeler ve tuzlar enzim çözeltisinden uzaklaştırıldı.

Ultrasantrifüj, bir solüsyon içindeki protein, nükleik asit gibi makromoleküllerin ayrılmasında hatta plazmit, DNA, mitokondrial DNA veya kromozomal DNA'nın ayrılmasında kullanılan yüksek devirli santrifüjdür. Çalışmamızda ultrasantrifüj, diyaliz işlemi sonrasında enzim çözeltisi içindeki çözünmeden kalan safsızlıkları uzaklaştırmak amacıyla kullanıldı ve böylece enzim çözeltisi berraklaştırılarak kromatografik işlemler için hazır hale getirildi. Yapılan bu işlem saflaştırma işleminin ileriki safhalarında kullanılan matriksin tıkanmasını önlemek ve matriksten maksimum performans sağlamak açısından oldukça önemlidir.

İyon değişim kromatografisi, proteinleri üzerlerinde taşıdıkları net yüklere göre ayıran kromatografi yöntemidir. Kolon pozitif (anyon değiştirici) veya negatif (katyon değiştirici) yüklü bağlayıcı gruplar içeren reçineyle doldurulur. Protein karışımı düşük iyonik şiddetli bir tamponla kolon boyunca taşınır. Bu tamponun pH'sı hedef proteinin reçineye bağlanmasını teşvik edecek değere sahip olmalıdır. Eğer tampon pH'sı proteinin izoelektrik pH'sından daha küçük tutulursa proteinin yükü pozitif olur ve bir kation değiştirici ile bağlanır. Bunun tersine tampon pH'sı proteinin izoelektrik pH'sından daha küçük tutulursa proteinin yükü negatif olur ve bir anyon değiştirici ile bağlanarak kolonda tutulur. Bağlanmayan proteinler, kolondan ilk olarak çıkarlar. İyonik gücü ya da pH'sı farklı bir tampon kolondan geçirilerek bağlı proteinlerin yükü değiştirilir ve kolondan ayrılması sağlanır. İyon değişim kromatografisinde proteinin yüksek tuz konsantrasyonu içerikli tamponlarda olması arzu edilmez. Bu nedenle

çalışmamızda kromatografik işlemler sırasında oldukça düşük tuz yoğunlaşma içerikli tampon çözeltiler kullanıldı.

Çalışmamızda, SDH enziminin literatürde belirtilen izoelektrik pH'sı (pH 7,3) (Lindstad and McKinley-Mckee 1996) ve stabil pH aralığı (pH 5,0-9,0) (Reiersen *et al.* 1994) göz önünde bulundurularak CM-Selüloz C-52 kolonunda pH 6,2'de çalışıldı. pH 6,2'de SDH enzimi CM Selüloz C-52 kolonuna bağlandı ve enzim artan tuz gradienti kullanılarak kolondan elüe edildi. Bu basamakta sorbitol dehidrogenaz enzimi %0,66 verimle yaklaşık 450 kat saflaştırıldı. Enzim saflığı SDS-PAGE kullanılarak kontrol edildi. Jelde tek bandın gözlenmesi ile koyun beyninden elde edilen SDH enziminin saf olduğu ispatlandı (Şekil 4.3). Enzimin düşük verimle saflaştırılmasının sebebi kolon kromatografisi çalışmalarımız sırasında enzimin çok hızlı bir şekilde aktivite kaybetmesidir. Bu sonuç sistein rezidülerine sahip olan SDH enziminin oksidasyona karşı hassas olması ve enzimin kuarterner yapısının hassas olması ile açıklanabilir.

Koyun beyin dokusundan elde edilen homojenat, amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen enzim çözeltisi ve her kromatografik işlem sonrası elde edilen enzim numunelerindeki protein miktarları Bradford yöntemiyle Şekil 4.1'de verilen standart grafikten niceleyici olarak belirlendi. Birçok protein hemen hemen aynı sonuç eğrilerini verdiğiinden, yöntem geniş bir kullanım alanına sahiptir. Bu yöntem, az zaman alması, daha az reaktif gerektirmesi ve hassasiyetinin diğer protein tayin metotlarına nazaran daha iyi olması (1-100 µg) sebebiyle avantajlı bir yöntemdir (Bradford 1976).

Çalışmamızda koyun beyninden elde edilen SDH enziminin alt birim molekül kütlesinin belirlenmesinde SDS-PAGE metodu kullanıldı. Şekil 4.3'de verildiği gibi koyun beyninden elde edilen enzim numunesi ile birlikte standart protein numuneleri SDS-PAGE'de aynı zamanda yürütüldü. Log MK-R_f standart grafiği çizildi ve Şekil 4.4'de verildi. Daha sonra koyun beyin dokusundan elde edilen enzim numunesinin R_f değeri hesaplanarak standart grafikten koyun beyni SDH enziminin alt birim molekül kütlesi hesaplandı. SDH enziminin aktif formunun molekül kütlesinin belirlenmesi amacıyla da Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi yapıldı. Kolondan standart proteinler

birer birer geçirildikten sonra log MK-Kav standart grafiği çizildi ve Şekil 4.11’de verildi. Daha sonra koyun beyninden elde edilen enzim numunesi kolondan geçirilerek Kav değeri belirlendi ve standart grafikten SDH enziminin aktif formunun molekül kütlesi belirlendi. Litaratürde çeşitli dokulardan izole edilen SDH enziminin homotetramerik bir enzim olduğu rapor edilmiştir (Lindstad and Mckinley-Mckee 1996; Alım ve Beydemir 2012). Çalışmamızda SDH enziminin alt birim molekül kütlesini 38,2 kDa, aktif formunun molekül kütlesini ise 159,0 kDa olarak belirledik (Şekil 4.12). Bu sonuçlardan görüldüğü gibi çalışmamızda koyun beyni SDH enzimi için hesapladığımız alt birim ve tabii molekül kütleleri ile litaratürde SDH enzimi için verilen mol kütleleri uygunluk göstermektedir. Buradan da anlaşılaçağı gibi koyun beyni SDH enzimi tetramerik bir yapıya sahiptir ve bu sonuçlarımızın da literatürlerdeki bulgular ile uyumlu olduğunu gösterir.

Her enzim için birim zamanda substratını en fazla değışikliğe uğrattığı belirli bir sıcaklık vardır. Bu sıcaklığa o enzimin optimum sıcaklığı denir. Koyun beyninden saflaştırılan SDH enzim aktivitesinin optimum olduğu sıcaklık değerlerinin belirlenmesi amacıyla dijital su banyosu kullanılarak 0°C ile 80°C arasında 10°C sıcaklık farkı oluşturularak gerçekleştirildi ve koyun beyni sorbitol dehidrogenaz enzimi için optimum sıcaklık 40°C olarak belirlendi. Ayrıca koyun beyni sorbitol dehidrogenaz enzimi için optimum pH çalışması farklı pH'larda tampon çözeltiler kullanılarak 0,2 M Glisin/NaOH pH 9,9 tamponu olarak belirlendi.

Enzimlerin, bazı bileşikler tarafından hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak aktivitelerinin azaltılması ve hatta yok edilmesi olayına inhibisyon adı verilir. Buna sebep olan bileşiklere de inhibitör denilir. İnhibitörler, genellikle küçük molekül kütlesine sahip bileşik veya iyonlardır. Enzimatik aktivitenin inhibisyonu, biyolojik sistemlerde başlı başına bir kontrol mekanizması oluşturur (Keha ve Küfrevioglu 2010). Örneğin nükleotit sentezinin inhibitörleri (örn, antikanser ajanlar) ve çinko ihtiva eden anjiyotensin dönüştürücü enzimin inhibitörleri (örn, tiyol kaptopril) kan basıncının azaltılması ve hipertansiyonun tedavisinde kullanılmaktadır (Ondenti and Cushman 1982). Bu yüzden enzim inhibisyonu büyük bir önem arz etmektedir. Birçok ilaç ve

zehirli bileşik fonksiyonlarını bu yolla gerçekleştirirler. Enzim etki mekanizmalarının incelenmesi çalışmalarında da inhibisyon olayından faydalanılır (Keha ve Küfrevioğlu 2010).

Birçok kimyasal madde, canlı metabolizmasında düşük dozlarda da olsa enzim aktivitesini etkileyerek veya spesifik aktivitesinde inhibisyona yol açarak enzimleri etkilerler. Laboratuvarlarda birçok farklı enzimin ilaçlarla etkileşimi ile ilgili günümüze dek pek çok çalışma yapılmıştır. Örneğin karbonik anhidraz, glukoz 6-fosfat dehidrogenaz, 6-fosfoglukonat dehidrogenaz, glutatyon redüktaz gibi birçok enzim çeşitli kaynaklardan saflaştırılmış, üzerinde tıbbi uygulamalarda çok yaygın kullanılan ilaçların inhibisyon ve aktivasyon etkileri incelenmiştir (Beydemir *et al.* 2002; Çiftçi *et al.* 2002; Ekinçi *et al.* 2007).

Diyabet hastalarında diyabetle ilişkili olarak motor sinir iletim eksikliği, bozulmuş duyuşsal algı ve acı gibi fonksiyonel anomaliler oluşur. Hiperglisemi süresince poliol yolundaki artış periferik sinirlerde ve bu yolu içeren dokularda doku bozulmasının en büyük sebebi olarak düşünülmektedir (Tomlinson 1993). Hiperglisemi süresince polioller hücre zarından kolayca difüze olamadıkları için dokularda birikir. Poliol yolundaki aşırı hareketlilik sinir bozukluğuna sebep olmaktadır. Sorbitol birikimi ile motor sinir iletim hızında bir eksiklik oluşur ve bunun için birçok mekanizma ileri sürülmüştür. Bu mekanizmalar sorbitol içeren hücrelerde osmotik stresin doğrudan başlamasına neden olur (Gabbay 1975; Greene 1984). Aynı zamanda poliol yolunun aşırı hareketi sonucu kofaktörlerin tükenmesi ile sinir fonksiyonunun bozulması muhtemeldir. Böylece aşırı AR aktivitesi ile aynı zamanda meydana gelen NADPH'nin indirgenmesi oksidatif strese karşı koruyucu diğer hücresel enzimlerin fonksiyonlarını tehlikeye atabilir (Cameron *et al.* 1996). Dönüşümlü olarak aşırı SDH aktivitesi ile NADH'nin NAD⁺'ya oranı değiştirilmesi ile oksidatif stresin ortadan kaldırılması için SDH inhibitörleri kullanılması önerilmiştir. Ancak istenilen sonuçlar çelişkili olmuştur (Donald *et al.* 1998).

Sorbitol dehidrogenaz enziminin diyabetik lenste inhibisyonunun en önemli metabolik sonuçlarından birisi sorbitol birikimi ile lens içerisinde osmotik stresin artmasıdır (Geisen 1994; Kador 1998). Sorbitol birikimi önemli bir antioksidan olan GSH tüketimi ile paralellik gösterir (Srivastava *et al.* 1998). Sorbitol dehidrogenazın inhibisyonu ile osmotik strese cevap olarak lens GSH seviyesinde ani bir azalma olmuştur (Geisen 1994). GSH'a benzer şekilde sorbitol dehidrogenazın inhibisyonu ile diyabetik lens askorbat seviyesinde de bir azalma görülmüştür (Maitra *et al.* 1995; Packer *et al.* 1995).

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

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

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

SDH inhibitörlerinin önemi ve yapılan literatür araştırmaları sonucunda koyun beyni SDH enzimi üzerinde, enzimin tıbbi ilaçlarla etkileşimi üzerine gerçekleştirilmiş çalışma olmaması göz önünde bulundurularak çalışmamızda koyun beyni SDH enzimi üzerinde tıbbi uygulamada yaygın olarak kullanılan ilaçların *in vitro* şartlarda inhibisyon etkileri incelenmiştir.

Çalışmada seçilen ilaçların etken maddelerinin koyun beyni SDH enzimi üzerinde etkilerinin araştırıldığı hiçbir literatürde rastlanmamıştır.

Genel olarak ilaç ve kimyasal maddelerin enzimler üzerindeki inhibisyon etkileri IC_{50} (enzimin aktivitesini %50 inhibe eden ilaç konsantrasyonu) değeri olarak verilmektedir. Kinetik çalışmalarımız sırasında enzim aktivitesini inhibe eden ilaçların etken maddelerinin IC_{50} değerleri de belirtilmiştir. Bilindiği gibi IC_{50} değeri küçük olan inhibitörün inhibisyon etkisi daha yüksektir. Bu bağlamda yaptığımız çalışmada sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren etken maddelerin inhibisyon etkileri sırası ile enrofloksasin > gentamisin sülfat > kanamisin > oksitetrasiklin dihidrat > tylosin > ampisilin şeklindedir. Bu sonuçlara göre en yüksek inhibisyon etkisine sahip etken madde enrofloksasindir (IC_{50} :0,00016 mM).

Enrofloksasin etken maddesi kuzu, koyun sığır gibi hayvanlarda gram pozitif ve gram negatif bakterilerin oluşturduğu hastalıkların tedavisinde kullanılan bir antibakteriyeldir. Koyun beyni SDH enzimini inhibe eden (IC_{50} :0,0039) bir diğer etken madde gentamisin sülfattır. Gentamisin sülfat etken maddesi sepsisemi, idrar yolları enfeksiyonları, alt ve üst solunum yolu enfeksiyonlarında tedavi amaçla kullanılmaktadır. Enrofloksasin ve gentamisin sülfat etken maddesine nazaran daha az inhibisyon etkisi gösteren bir diğer etken madde ise kanamisin etken maddesidir (IC_{50} :0,0047). Kanamisin etken maddesi sığır, at, koyun, köpek, kedilerde duyarlı bakterilerin neden olduğu solunum sistemi, üriner sistem enfeksiyonları, yumuşak doku ve deri enfeksiyonları ile duyarlı bakterilerin karıştığı sekonder enfeksiyonların tedavisinde kullanılan bir antibakteriyeldir.

Enrofloksasin, gentamisin sülfat ve kanamisin etken maddelerinden daha zayıf inhibisyon etkisi gösterdiği görülen oksitetrasiklin dihidrat (IC_{50} :0,0056 mM), tylosin (IC_{50} :0,0226 mM), ampisilin (IC_{50} :0,2070 mM) koyun ve sığırlarda bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılan antibakteriyel ilaçlardır.

Ayrıca enrofloksasin, kanamisin, oksitetrasiklindihidrat ve ampisilin etken maddeleri için Ki değerleri ve inhibisyon tipleri Lineweaver-Burk grafiklerinden belirlendi.

Yapılan bir çalışmada koyun karaciğeri SDH enzim aktivitesi üzerinde dakarbazin ($IC_{50}:0,025$), meme, over ve akciğer kanseri, akut lenfoblastik çocuk lösemisinde kullanılan metotreksat ($IC_{50}:0,081$ mM), ovaryum, baş, beyin, akciğer, testis kanserleri tedavisinde kullanılan epirubisin HCl ($IC_{50}:0,291$ mM) ilaçlarının güçlü inhibisyon etkisi gösterdikleri görülmüştür. Yine bu çalışmada kullanılan diğer antineoplastik etkiye sahip olan kalsiyum folinat ($IC_{50}: 1,62$ mM), gemitabin ($IC_{50}: 4,86$ mM) ve okzaliptatin ($IC_{50}: 6,54$ mM) ilaçlarının koyun karaciğeri SDH enzim aktivitesi üzerinde dakarbazin, metotreksat ve epirubisin HCl'den daha zayıf inhibisyon etkisi gösterdikleri saptanmıştır (Alım 2010).

Bu sonuçlara bakılarak koyun beyini SDH enziminin aktivitesi üzerinde çalışılan enrofloksasin, gentamisin sülfat, kanamisin, oksitetrasiklin dihidrat, tylosin etken maddelerinin koyun karaciğeri SDH enzimi aktivitesi üzerinde yüksek inhibisyon etkisi gösteren dakarbazin, metotraksat, epirubisin HCl, kalsiyum folinat, gemitabin ve okzaliptatin'den daha kuvvetli inhibisyon etkisi göstermiştir.

Ampisilin etken maddesi ise dakarbazin, metotreksattan daha düşük inhibisyon etkisi gösterirken diğer ilaçlardan daha kuvvetli bir inhibisyon etkisi göstermiştir.

Yapılan bir başka çalışmada ise ağır metallerin tavuk karaciğeri SDH enzim aktivitesi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu çalışmada ise inhibisyon gösteren metallerin inhibisyon etkileri $Cd(NO_3)_2 \times 4H_2O$ ($IC_{50}:0,006$ mM), $Pb(NO_3)_2$ ($IC_{50}:0,012$ mM), $Hg(NO_3)_2 \times H_2O$ ($IC_{50}:0,013$), $AgNO_3$ ($IC_{50}:0,018$), $Zn(NO_3)_2 \times 6H_2O$ ($IC_{50}:7,07$), NiS ($IC_{50}:35$) olarak bulunmuştur (Akkuş 2012).

Tavuk karaciğeri SDH enzim aktivitesi üzerinde ağır metallerin etkisine bakıldığında ise yüksek inhibisyon etkisi gösteren $Cd(NO_3)_2 \times 4H_2O$, $Pb(NO_3)_2$, $Hg(NO_3)_2 \times H_2O$, $AgNO_3$ metallerinin koyun beyini SDH enziminin aktivitesi üzerinde çalışılan enrofloksasin,

gentamisin sülfat, kanamisin, oksitetrasiklin dihidrat, etken maddelerinden daha zayıf inhibisyon etkisi gösterdiği görülür.

Tylosin ve ampisilin etken maddesi ise $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \times \text{H}_2\text{O}$, AgNO_3 metallereinden daha düşük inhibisyon etkisi gösterirken $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, NiS metallereinden daha yüksek bir inhibisyon etkisi göstermiştir.

Çalışmamızda kullandığımız ilaçlar için belirlediğimiz IC_{50} değerleri ile bu ilaçların tıbbi uygulamada kullanılan konsantrasyonları karşılaştırıldığında, bu ilaçların tıbbi uygulamada kullanılan konsantrasyonlardan çok daha düşük konsantrasyonlarda SDH enzimi üzerinde inhibitör etkisi gösterebilme özelliğine sahip oldukları gözlenmiştir (Çizelge 5.1). Elde edilen bulguların, özellikle bu ilaçları kullanan hastalar için önemli sonuçlar doğurabileceği düşünülmektedir.

Çizelge 5.1. Koyun beyni SDH enzim aktivitesini inhibe eden ilaçların etken maddelerinin IC_{50} (mM) değerleriyle tıbbi uygulamada kullanılan konsantrasyonlarının karşılaştırılması

İlaç etken maddeleri	IC_{50} (mM)	Tıbbi uygulamada kullanılan ilaç konsantrasyonları (mM)
Enrofloksasin	0,00016	0,0556
Gentamisin Sülfat	0,0039	0,0028
Kanamisin	0,0047	0,0858
Oksitetrasiklindihidrat	0,0056	0,0806
Tylosin	0,0226	0,0436
Ampisilin	0,2070	0,1794

Yukarıda da sayılan birçok literatürde diyabetik komplikasyonların oluşumunda ve ilerlemesinde SDH enziminin rolünü belirlemek ayrıca diyabetik komplikasyonlara karşı koruyucu ilaç geliştirmek için daha kapsamlı inhibisyon çalışmaları yapılarak spesifik ve güçlü SDH inhibitörlerinin belirlenmesi gerektiği ifade edilmektedir. Bu bilgiler göz önüne alındığında bu tez kapsamında yapılan çalışmaların önemi daha iyi anlaşılmaktadır.

Sonuç olarak bu tez kapsamında;

1. Koyun beyninden sorbitol dehidrogenaz enziminin saflaştırılması gerçekleştirilmiştir.
2. Çalışma sonucunda koyun beyni SDH enzimi %0,66 verimle yaklaşık 450 kat saflaştırılabilmektedir. Enzimin saflığı elektroforezle kontrol edilerek tek bant gözlenmiştir.
3. Koyun beyni SDH enzim aktivitesi üzerine bazı ilaçların inhibisyon etkileri incelenmiştir. Ampisilin, oksitetrasiklin dihidrat, tylosin, kanamisin, enrofloksasin, gentamisin sülfat ve sefalekssin etken maddelerini ihtiva eden ilaçların enzim üzerine inhibisyon etkileri incelenmiştir. Yaptığımız çalışmada sorbitol dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren etken maddelerin inhibisyon etkileri sırası ile enrofloksasin > gentamisinsülfat > kanamisin > oksitetrasiklindihidrat > tylosin > ampisilin şeklindedir. Bu sonuçlara göre en yüksek inhibisyon etkisine sahip etken madde enrofloksasindir (IC_{50} : 0,00016 mM).
4. SDH enzimi üzerinde inhibisyon etkisi ampisilin, oksitetrasiklin dihidrat, tylosin, kanamisin, enrofloksasin, gentamisin sülfat ve sefalekssin etken maddeleri için IC_{50} ve ampisilin, oksitetrasiklin dihidrat, kanamisin ve enrofloksasin etken maddeleri için K_i değerleri hesaplanmış ve inhibisyon tipleri belirlenmiştir.
5. Elde edilen bütün sonuçlar aşağıdaki çizelgede özetlenmiştir (Çizelge 5.2).

Çizelge 5.2. SDH enziminin saflaştırılması ile ilgili sonuçlar

SDH enziminin saflaştırılması ile ilgili sonuçlar			
Spesifik Aktivite EÜ/ml	17,13		
Saflaştırma Katsayısı	450,00		
Verim	%0,66		
Molekül kütlesi tayini (kDa)			
SDS-PAGE metodu ile	38,20		
Jel filtrasyon	159,00		
Optimum pH	10,00		
Optimum sıcaklık (°C)	40,00		
Kinetik çalışmalar			
İlaç etken maddeleri	IC ₅₀ (mM)		
Enrofloksasin	0,00016		
Gentamisinsülfat	0,00390		
Kanamisin	0,00470		
Oksitetrasiklindihidrat	0,00560		
Tylosin	0,02260		
Ampisilin	0,20700		
İlaçların etken maddeleri	Ortalama K _i (mM)		İnhibisyon Tipi
Ampisilin	170,8897		Yarışmasız
Enrofloksasin	0,6833		Yarışmasız
	Ortalama K _i	Ortalama K _i '	
Oksitetrasiklin dihidrat	4,6120	22,838	Karışık
Kanamisin	5,6685	9,0986	Karışık

KAYNAKLAR

- Abou-Seif M.A., Youssef A.A., 2004. Evaluation of some biochemical changes in diabetic patients. *Clin Chim Acta*, 346, 161-170.
- Akkuş, M., 2012. Tavuk Karaciğerinden Sorbitol Dehidrogenaz Enziminin Saflaştırılması ve Bazı Ağır Metallerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Alemzadeh R., Wyatt D.T., 2004. Diabetes Mellitus. In: Behrman R.E, Klieg-man R.M, Jenson H.B (eds). *Nelson Textbook of Pediatrics*. Elsevier Saunders, 17, 1947-1972, Pennsylvania.
- Alım Z., Beydemir Ş., 2012. Effects of some anti-neoplastic drugs on sheep liver sorbitol Dehydrogenase *Archives of Physiology and Biochemistry*. Early Online. 1-9.
- Alım, Z., 2010. Koyun Karaciğerinden Sorbitol Dehidrogenaz Enziminin Saflaştırılması ve Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı İlaçların Etkilerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Amano, S., Yamagishi S., Koda Y., Tsuneoka M., Soejima M., Okamoto T., Inagaki Y., Yamada K., Kimura H., 2003. Polymorphisms of sorbitol dehydrogenase gene and susceptibility to diabetic retinopathy. *Med. Hypotheses*, 60, 550–551.
- Amos A.F., McVarty D.J., Zimmot P., 1997. The rising global burden of diabetes and its complications: Estimates and projections to the year 2010. *Diabetic Med*, 14-755.
- Anderson, N.V., 1992. *Veterinary Gastroenterology*. Second Edition. Lea Febiger, Pensilvania.
- Andrews, P., 1965. The gel filtration behavior of proteins related to their molecular weights over a wide range. *Biochem. J.*, 96, 595-606.
- Anonim 2012a, <http://www.diyadinnet.com/yararlibilgiler-1386&Bilgi=enzim> nedir. (24.09.2012).
- Anonim 2012b, www.turkendokrin.org/files/pdf/DiyabetNedir.pdf. (03.09.2012)
- Anonim 2013a, <http://www.spitall.com/hastalik-belirtileri/sorbitol-dehidrogenaz-sdhiditol-dehidrogenaz-tahlili>. (05.02.2013)
- Asada, M., Galambos J.T., 1963. Sorbitol dehydrogenase and hepatocellular injury: an experimental and clinical study. *Gastroenterology*, 44, 578-587
- Atkinson MA., Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet* 2001; 358, 221-229.
- Bailey, J.P., Renz, C., McGuinness E.T., 1981. Sorbitol dehydrogenase from horse liver: purification, characterization and comparative properties. *Comp. Biochem. Physiol.*, 69, 909-914.
- Balendiran G.K., Rajkumar B., 2005. Fibrates inhibit aldose reductase activity in the forward and reverse reactions. *Biochem Pharmacol*, 70, 1653–1663.
- Baretto. O.C.O and Bcutler E., 1975. *J. Lab. Clin. Med.* 85, 645-649.
- Baynes, J.W., Thorpe S.R., 1999. Role of oxidative stress in diabetic complications. A new perspective on an old paradigm. *Diabetes*, 48, 1-9.

- Beydemir, Ş., Çiftçi M., Küfrevioğlu Ö.İ., 2002. Purification and characterization of glucose 6-phosphate dehydrogenase from sheep erythrocytes, and inhibitory effects of some antibiotics on enzyme activity. *J. Enz. Inhib. Med. Chem.*, 17, 271-277.
- Bhatnagar, A., Srivastava S.K., 1992. Aldose reductase: congenial and injurious profiles of an enigmatic enzyme. *Biochem. Med. Metab. Biol.*, 48, 91-121.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248 p.
- Brakley, R.L., 1951. The metabolism and antiketogenic effects of sorbitol. Sorbitol dehydrogenase. *Biochem. J.*, 49, 257-271.
- Brimacombe, J.S. and Webber, J.M., 1972. In *The Carbohydrates*, Vol.IA Pigman, W. and Horton, D. Academic Press, 479-518, New York.
- Brownlee M., Vlassara H., Cerami A., 1984. Non-enzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. *Ann Intern Med.*, 101, 527-537.
- Bukan, N., Sancak B., Bilgihan A., Kosova F., Buğdaycı G., Altan N., 2004. The effects of the sulfonylurea glyburide on glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase activities in the heart tissue of streptozotocin-induced diabetic rat. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 26(7), 519-522.
- Cameron, N.E., Cotter, M.A., Dines, K.C., Hohman, T.C., 1996. Reversal of Defective Peripheral Nerve Conduction Velocity, Nutritive Blood Flow and Oxygenation by a Novel Aldose Reductase Inhibitor, WAY-12 1509, in Streptozotocin-Diabetic Rats. *J Diabetic Complications*, 10, 43-53.
- Champe, P.C., Harvey R.A., 1997. Lippincott's Illustrated reviews seriesinden: *Biyokimya*, Nobel Tıp Kitapevleri, 130-131, İstanbul.
- Chappey, O., Dosquet C., Wautier M.P., Wautier J.L., 1997. Advanced glycation end products, oxidant stress and vascular lesions. *Eur J Clin Invest.*, 27, 97-108.
- Chu-Moyer, M.Y., Ballinger W.E., Beebe D.A., Berger R., Couthier J.B., Day W.W., Li J., Mylari B.L., Oates P.J., Weekly R.M., 2002. Orally-effective, long-acting sorbitol dehydrogenase inhibitors: synthesis, structure-activity relationships, and *in vivo* evaluations of novel heterocycle-substituted piperazine-pyrimidines. *J. Med. Chem.*, 45, 511-528.
- Chung S.S.M., Ho E.C.M., Lam K.S.L., Chung S.K., 2003. Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress. *J Am Soc Nephrol*, 14, 233-236.
- Çiftçi, M., Beydemir Ş., Yılmaz H., Bakan E., 2002. Effects of some drugs on rat erythrocyte 6-phosphogluconate dehydrogenase: an *in vitro* and *in vivo* study. *Polish J. Pharmacol.*, 54, 275-280.
- Darmanin, C., Iwata T., Carper D.A., Sparrow L.G., Chung R.P.T., El -Kabbani O., 2003. Expression, purification and preliminary crystallographic analysis of human sorbitol dehydrogenase. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, 59, 558-560.
- DCCT (The Diabetes Control and Complications Trial Research Group), 1993. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *New Engl. J. Med.*, 329, 977-986.
- Devlin, T.M., 2002. *Biochemistry with Clinical Correlations*, Kanada.

- Dinçer Y., Akçay T., Alademir Z., İlkova H., 2002. Effect of oxidative stress on glutathione pathway in red blood cells from patients with insulin dependent diabetes mellitus. *Metabolism*, 51(10), 1360-1362.
- Dixon, D.G., Hodson P.V., Kaiser K.L.E., 1987. Serum sorbitol dehydrogenase activity as an indicator of chemically induced liver damage in rainbow trout. *Environ. Toxicol. Chem.*, 6, 685-696.
- Doehlert, D.C., 1987. Ketose reductase activity in developing maize endosperm. *Plant Physiol.*, 84, 830-834.
- Donald, T.F.N., Fuk, K.L., Zhen, T.S., Nigel, A.C., Liu, W.L., Stephen, S.M.C. and Sookja, K.C., 1998. Effects of Sorbitol Dehydrogenase Deficiency on Nerve Conduction in Experimental Diabetic Mice. *Diabetes*, 47, 961-966.
- Dunlop, M., 2000. Aldose reductase and the role of polyol pathway in diabetic nephropathy. *Kidney Int.*, 58(77), 3-12.
- Ekinci, D., Beydemir Ş., Alım Z., 2007. Some drugs inhibit in vitro hydratase and esterase activities of human carbonic anhydrase-I and II. *Pharmacological Reports*, 59, 580-587.
- Eklund, H., Horjales E., Jornvall H., Branden C.I., Jeffery J., 1985. Molecular aspects of functional differences between alcohol and sorbitol dehydrogenases. *Biochemistry*, 24, 8005-8012.
- Fiallo-Scharer R., Eisenbarth G.S., 2004. Pathophysiology of Insulin Dependent Diabetes. Pescovitz O.H., Eugster E.A.. *Pediatric Endocrinology*, 1, 411-426, USA.
- Forsblom, C.M., Groop P.H., Ekstrand A., Totterman K.J., Sane T., Saloranta C., 1998. Predictors of progression from normoalbuminuria to microalbuminuria in NIDDM. *Diabetes Care*, 21, 1932-1938.
- Fresht, A., 1999. Structure and mechanism in protein science. W.H. Freeman and Company, 166 p, New York.
- Gabbay, K.H., 1975. Hyperglycemia, polyol metabolism, and complications of diabetes mellitus. *Annu Rev Med.*, 26, 521-536.
- Garcia, S.F., Virag L., Jagtap P., Szabo E., Mabley J.G., Liaudet L., Marton A., Hoyt D.G., Murthy K.G., Salzman A.L., Southan G.J., Szabo C., 2001. Diabetic endothelial dysfunction: the role of poly (ADP-ribose) polymerase activation. *Nature Med.*, 7, 108-113.
- Geissen, K., Utz R., Grotzsch H., Lang H.J., Nimmesgern H., 1994. Sorbitol accumulating pyrimidine derivatives. *Arzneimittelforschung*, 44, 1032-1043.
- Geissen, K., Utz R., Grotzsch H., Lang H.J., Nimmesgern H., 1994. Sorbitol accumulating pyrimidine derivatives. *Arzneimittelforschung*, 44, 1032-1043.
- Geissen, K., Utz R., Nimmesgern H., Lang, H.J., 1992. Substituierte Pyrimidin-Derivate, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung als Reagenzien. In European Patent Application No. 0 470 616 A2.
- Gonzalez, R.G., Barnett P., Aguayo J., Cheng H.M., Chylack L.T.J., 1984. Direct measurement of polyol pathway activity in the ocular lens. *Diabetes*, 33, 196 p.
- Gözükara, E., 1989. Enzimler. *Biyokimya*. Ofset Repromat Ltd.Şti, 572-576 s, Ankara.
- Greene, D.A., Lattimer, S.A., Sima A.A., 1987. Sorbitol, phosphoinositides, and sodiumpotassium-ATPase in the pathogenesis of diabetic complications. *N Engl J Med.*, 5, 316(10), 599-606.

- Gui T., Tanimoto T, Kokaiy, Nishimura C., 1995. Presence of a closely related subgroup in the aldo-ketoreductase family of the mouse. *Eur. J. Biochem.*, 227, 448-453.
- Haller, M.J., Atkinson M.A., Schatz D., 2005. Type 1 diabetes mellitus: etiology, presentation and management. *Pediatr Clin North Am.*, 52, 1553-1578.
- Haris M.İ., Klein R., Welborn T.A., Knuiman M.W., 1992. Onset of NIDDM occurs at least 4-7 years before clinical diagnosis. *Diabetes Care*, 15, 815-819.
- Hasselbaink D.M., Glatz J.F.C., Luiken J.J.F.P., Roemen T.H.M., Vusse G.J.V., 2003. Ketone bodies disturb fatty acid handling in isolated cardiomyocytes derived from control and diabetic rats. *Biochem J*, 371, 753-760.
- Hers, H.G., 1956. The mechanism of the transformation of glucose in fructose in the seminal vesicles. *Biochim Biophys Acta*, 22(1), 202-203.
- Hodgen, G.D. and Sherins R.J., 1973. Enzymes as markers of testicular growth and development in the rat, *Endocrinology*, 93, 985-989.
- Hoshi, A., Takahashi M., Fujii J., Myint T., Kaneto H., Suzuki K., Yamasaki Y., Kamada T., Taniguchi N., 1996. Glycation and inactivation of sorbitol dehydrogenase in normal and diabetic rats. *Biochem. J.*, 318, 119-123.
- Humphrey, L.L., Ballard D.J., Frohnert P.P., Chu C.P., O'fallon W.M., Palumbo P.J., 1989. Chronic renal failure in non-insulin-dependent diabetes mellitus. A population-based study in Rochester, Minnesota. *Ann Intern Med.*, 111, 788-796.
- Hwang Y.C., Bakr S., Ellery C.A., Oates P.J. and Ramasamy R., 2003. Sorbitol Dehydrogenase: a Novel Target for Adjunctive Protection of Ischemic Myocardium. *The FASEB Journal*, 17, 2331-2333.
- Hwang, Y C., Sato S., Tsai J Y., Yan S., Bakr S., Zhan H., Oates P J., Ramasamy R., 2002. Aldose reductase activation is a key component of myocardial response to ischemia. *Faseb J.*, 16, 243-245.
- IDF (International Diabetes Federation), 2013. *IDF Diabetes Atlas*, 6th Edition, Brussels.
- Iwata T., Carper D., 1995. *Enzimolog and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism* Weiner H., Holmes R.S., Wermuth B. Plenum Press, 5, 373-381, Newyork.
- Jakuš, V., Rietbrock N., 2004. Advanced Glycation End-Products and the Progress of Diabetic Vascular Complications. *Physiol. Res.*, 53, 131-142.
- Jay D, Hitomi H, Griendling KK. Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications. *Free Rad Biol Med* 2006;40:183–192.
- Jedziniak, J.A., Chylack L.T., Jr., Cheng H.M., Gillis M.K., Kalustian A.A., Tung W.H., 1981. The sorbitol pathway in the human lens: Aldose reductase and poliol dehydrogenase. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 20, 314-326.
- Jeffery, J., Chesters J., Mills C., Sadler P.J., Jörnvall H., 1984. Sorbitol dehydrogenase is a zinc enzyme. *EMBO J.*, 3, 357-360.
- Johansson, K., El-Ahmad M., Kaiser C., Jörnvall H., Eklund H., Hoog j.O., 2001. Crystal structure of sorbitol dehydrogenase. *Chem. Biol. Interact.*, 130, 351-358.
- Jörnvall, H., Von Bahr-Lindström H., Jeffery J., 1984. Extensive variations and basic features in the alcohol dehydrogenase-sorbitol dehydrogenase family. *Eur. J. Biochem.*, 140, 17-23.
- Kador, P.F., Inoue J., Secchi E.F., Lizak M.J., Rodriguez I., Mori K., Greentree W., blessing K., Lackner P.A., Sato S., 1998. Effect of sorbitol dehydrogenase

- inhibition on sugar cataract formation in galactose-fed and diabetic rats. *Exp. Eye Res.*, 67, 203-208.
- Kador, P.F., Kinoshita J.H., Brittain D.R., Mirrlees D.J., Sennitt C.M, Stribling D.,1986. Purified rat lens aldose reductase. Poliol production *in vitro* and its inhibition by aldose reductase inhibitors. *Biochem J.*, 240(1), 233-237.
- Kandur., R., 2007. TÜRKVADEMECUM Veteriner İlaç Rehberi. Cansız Hayal Yayıncılık, 1706 s.
- Karacaoğlu, V., Özer I., 2005. Steady state kinetic properties of sorbitol dehydrogenase from chicken liver. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 140, 309-312.
- Karasu, Ç., Öztürk Y., Altan N., Yıldızoğlu N., İkizler C., Altan V.M., 1990. Thyroid Hormones Mediated Effect Of Insulin On Alloxan Diabetic Rat Atria. *General Pharmacology*, 21(5), 735-740.
- Karlsson, C., Jornvall H., Höög J.O., 1995. Zinc binding of alcohol and sorbitol dehydrogenase. *Enzymology and Molecular biology of Carbonyl Metabolism*, vol. 5. Plenum Press, New York, 397-406.
- Karlsson, C., Maret W., Auld D.S., Höög J.O., Jörnvall H., 1989. Variability within mammalian sorbitol dehydrogenases. *Eur. J. Biochem*, 186, 543-550.
- Keha, E.E., ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 2010. *Biyokimya. Aktif Yayınevi*, 118, İstanbul.
- Kimmelstiel, P., Wilson C., 1936. Intercapillary lesions in glomeruli of kidney. *American Journal of Pathology*, 12, 83-97.
- Kinoshita J.H., Nishimura, C., 1988. The involvement of aldose reductase in diabetic complications. *Diabetes Metabo. Reu.*,4, 323-337.
- Kinoshita, J.H., 1965. Cataracts in galactosemia. *Invest. Ophthalmol*,4, 786-790.
- Kinoshita, J.H., 1974. Mechanisms initiating cataract formation. *Proctor Lecture. Invest Ophthalmol*,13, 713-724.
- Kurowska, E.M., 2002. Nitric oxide therapies in vascular diseases. *Curr Pharm Des.*,8, 155-166.
- Kurt M., Atmaca A., Gürlek A., 2004. Diyabetik nefropati. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 35, 12-17.
- Küfrevioğlu, Ö.İ. ve Çiftci M, 2008. Kromatografiye giriş ders notları, Erzurum.
- Laaksonen, D.E., and Sen, C.K. 2000 Exercise and Oxidative Stress in Diabetes Mellitus In: *Handbook of Oxidans and Antioxidans in Exercise*, Amsterdam: Elsevier, 1105-1136.
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680 p.
- Lee, A.Y., Chung S.S, 1999. Contributions of poliol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *Faseb J.*, 13, 23-30.
- Lehninger Principles of Biochemistry, 2005. Worth Publishers Inc., 1152 p, New York.
- Lewis E.J., Hunsicker L.G., Clarke W.R., Berl T., Pohl M.A., Lewis J.B., Ritz E., Atkins R.C., Rohde R., Raz I., Collaborative Study Group., 2001. Renoprotective effect of the angiotensin-receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.*, 345, 851-856.
- Lindstad, R.I., McKinley-McKee J.S., 1997. Reversible inhibition of sheep liver sorbitol dehydrogenase by the antidiabetogenic drug 2-hydroxymethyl-4-(4-

- N,N-dimethylaminosulfonyl-1-piperazino) pyrimidine. FEBS Letters, 408, 57-61.
- Lindstad, R.I., Hermansen L.F., McKinley-Mckee J.S., 1994. Inhibition and activation studies on sheep liver sorbitol dehydrogenase. Eur. J. Biochem., 221, 847-854.
- Lindstad, R.I., Koll P., Mckinley-Mckee J.S., 1998. Substrate specificity of sheep liver sorbitol dehydrogenase. Biochem. J., 330, 479-487.
- Lindstad, R.I., McKinley-McKee J.S., 1996. Reversible inhibition of sheep liver sorbitol dehydrogenase by thiol compounds. Eur. J. Biochem., 241, 142-148.
- Linstad, R.I., Hermansen L.F., McKinley-McKee J.S., 1992. The kinetic mechanism of sheep liver sorbitol dehydrogenase. Eur. J. Biochem., 210, 641-647.
- Lipinski, B., 2001. Pathophysiology of oxidative stress in diabetes mellitus. Journal of Diabetes and Its Complications, 15, 203-210.
- Lippincott's Illustrated Reviews:Biochemistry, 2007. Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti., 536 s, İstanbul.
- Luque, T., Hjelmqvist L., Marfany G., Danielsson O., El-Ahmad M., Persson B., Jörnvall H., Gonzales-Duarte R., 1998. Sorbitol Dehydrogenase of Drosophila. The Journal Of Biological Chemistry, 273, 34293-34301.
- Maekawa, K., Tanimato T., Okada S., Suzuki T., Yabe-Nishimura C., 2001. Expression of aldose reductase and sorbitol dehydrogenase genes in Schwann cells isolated from rat: Effects of high glucose and osmotic stres, Mol. Brain Res., 87, 251-256.
- Maitra, I., Serbinova, E., Tritschler, H. and Packer, L., 1995. α -Lipoic Acid Prevents Buthionine Sulfoximine-induced Cataract Formation in Newborn Rats. Free Radic Biol Med, 18, 823-829.
- Maret, W., Auld D.S., 1988. Purification and characterization of human liver sorbitol dehydrogenase. Biochemistry, 27, 1622-1628.
- Marini, I., Bucchioni L., Borella P., Del Corsa A., Mura U., 1997. Sorbitol dehydrogenase from bovine lens: purification and properties. Arch. Biochem. Biophys, 340, 383-391.
- Maritim, A.C., Sanders, R.A., Watkins, III J.B., 2003. Diabetes, oxidative stress and antioxidants, Review.Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, 17(1), 4-38.
- Marshall, J.J., 1970. Chromotog., 53, 379 p.
- MEB., 2011. Enzimlerin Özellikleri 541GI0010. Gıda Teknolojisi. 6-7 s, Ankara.
- Mizisin,A.P.,Lİ.L.,Calcutt N. A.,1997 sorbitol accumulation and transmembran efflux in osmotically stressed JSI schannoma cells.Neouscience Letters,229, 53-56.
- Morre DM., Lenaz G., Morre D.J., 2000. Surface oxidase and oxidative stress propagation inaging, J. Exp. Biol., 203, 1513-1521.
- Mylari, B.L., Withbroe G.J., Beebe D.A., Brackett N.S., Conn E.L., Coutcher J.B., Oates P.J., Zembrowski W.J., 2003. Design and synthesis of a novel family of triazine-based inhibitors of sorbitol dehydrogenase with oral activity: 1-{4-[3R, 5S-Dimethyl-4-(4-methyl-[1,3,5] triazin-2-yl)-piperazin-1-yl]-[1,3,5] triazin-2-yl}-(R) Ethano l. Bioorganic and Medical Chemistry, 11, 4179-4188.
- Negm, F.B., Loescher W.H., 1979. Detection and characterization of sorbitol dehydrogenase from apple callus tissue. Plant Physiol., 64, 69-73.
- Nelson, D.L. and Cox M.M., 2005. Lehninger Biyokimyanın İlkeleri. Palme Yayıncılık, Ankara, 243-293.

- Nishikawa T., Edelstein D., Brownlee M., 2000. The missing link, a single unifying mechanism for diabetic complications. *Kidney Int.*, 58(77), 26-30.
- O'Brien, M.M., Schofield P.J., Edwards M.R., 1983. Poliol pathway enzymes of human brain. Partial purification and properties of sorbitol dehydrogenase. *Biochem. J.*, 211, 81-90.
- Oates, P.J., 2008. Aldose reductase, still a compelling target for diabetic neuropathy. *Curr. Drug Targets*, 9, 14 p.
- Obrosova, I.G., Fathallah L., Lang H.J., 1999. Interaction between osmotic and oxidative stress in diabetic precataractous lens. *Biochem. Pharmacol.*, 58, 1945-1954.
- Ondenti, M.A., Cushman D.W., 1982. Enzymes of the reninangiotensin system and their inhibitors. *Annu Rev. Biochem.*, 51, 283-308.
- Ostenson, C.G., 2001. The pathophysiology of type 2 diabetes mellitus, an overview. *Acta Physiologica Scandinavica*, 171, 241-247.
- Oura, Y., Yamada K., Shiratake K., Yamaki S., 2000. Purification and characterization of a NAD⁺-dependent sorbitol dehydrogenase from Japanese pear fruit. *Phytochemistry*, 54, 567-572.
- Packer, L., Witt, E.H. and Tritschler, H.J., 1995. Alpha-Lipoic Acid as a biological antioxidant. *Free Radic Biol Med*, 19, 227-250.
- Pauly, T.A., Ekstrom J.L., Beebe D.A., Chrnyk B., Cunningham D., Griffor M., Kamath A., Lee S.E., Madura R., McGuire D., Subashi T., Wasilko D., Watts P., Mylari B.L., Oates P.J., Adams P.D., Rath V.L., 2003. X-ray crystallographic and kinetic studies of human sorbitol dehydrogenase. *Structure*, 11, 1071-1085.
- Ramasamy, R., Liu P.J, Oates S.S., 1999. Attenuation of ischemia induced increases in sodium and calcium by the aldose reductase inhibitor Zopolrestat. *Cardiovasc. Res.*, 42, 130-139.
- Rehg, J.E., Torack R.M., 1977. Partial purification and characterization of sorbitol dehydrogenase from rat brain. *J. Neurochem.*, 28, 655-660.
- Reiersen, H., Lindstad R.I., McKinley-McKee J.S., 1994. The inactivation of sheep liver sorbitol dehydrogenase by pyrophosphate and some analogous metal chelators. *Arch. Biochem. Biophys.*, 311, 450-456.
- Sacks D.B., 1994. Carbohydrates. Burtis C.A., Ashwood E.R. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, 2, 928-1001, Philadelphia.
- Segel, I.H., 1975. *Enzyme Kinetics*. Wiley-Interscience, New York, 564-567.
- Smith, M.G., 1962. Crystallization of the L-iditol dehydrogenase of sheep liver. *Biochem. J.*, 83, 135-144.
- Srivastava, S.K., Ramana K.V., Bhatnagar A., 2005. Role of Aldose Reductase and Oxidative Damage in Diabetes and the Consequent Potential for Therapeutic Options. *Endocrine Reviews*, 26(3), 380-392.
- Srivastava, S., Chandra, A., Wang, L.F., Seifert, W.E. Jr., DaGue, B.B., Ansari, N.H., Srivastava, S.K. and Bhatnagar, A., 1998. Metabolism of The Lipid Peroxidation Product, 4-Hydroxy-Trans-2-Nonenal, in Isolated Perfused Rat Heart. *J Biol Chem*, 273, 10893-10900.
- Stevens, M.J., Obrosova I., Cao X., Van Husyen C., Grene D.A., 2000. Effects of DL- α -lipoic acid on peripheral nerve conduction, blood flow, energy metabolism, and oxidative stress in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes*, 49, 1006 p.

- Stryer, L., 1988. Biochemistry. W.H. Freeman and Company Third edition, 233-260 p, New York.
- Szaflik, J.P., Majsterek I., Kowaski M., Rusin P., Sobczuk A., Borucka A.I., Szaflik J., Blasiak J., 2008. Association between sorbitol dehydrogenase gene polymorphisms and type 2 diabetic retinopathy. *Experimental Eye Research*, 86, 647-652.
- Telefoncu, A., 1986. Temel ve Uygulamalı Enzimoloji, Ege Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Yayını (Der) 59, İzmir.
- Temelkova-Kurktschiev, T.S., Koehler C., Henkel E., Leonhardt W., Fuecker K., Hanefeld M., 2000. Postchallenge plasma glucose and glycemic spikes are more strongly associated with atherosclerosis than fasting glucose or HbA1c levels. *Diabetes Care*, 12, 1830-1834.
- Tesfamariam, B., 1994. Free radical in diabetic endothelial cell dysfunction. *Free Radic Biol Med.*, 16, 383-391.
- Tilton, R.G., Chang K., Nyengaard J.R., van den Enden M., Ido Y., Williamson J.R., 1995. Inhibition of sorbitol dehydrogenase. Effects on vascular and neural dysfunction in streptozocin induced diabetic rats. *Diabetes*, 44, 234-242.
- Tomlinson, D.R., Stevens E.J., Diemel L.T., 1994. Aldose reductase inhibitors and their potential for the treatment of diabetic complications. *Trends Pharmacol Sci.*, 15(8), 293-297.
- Tomlinson, D.R., 1989. Polyols and myoinositol in diabetic neuropathy of mice and men. *Mayo Clin Proc.*, 64, 1030 p.
- Touster, O. and Shaw, D. R. D., 1962. *Physiol.* 42, 181-225.
- Turgut, K. Ok M., 1997. Veteriner Gastroenteroloji-Semptomdan Teşhisi. Bahçivanlar Basım San. A.Ş., Konya
- UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study), 1998. Intensive blood glucose control with sulphonylureas or insulin, compared with conventional treatment and risk of complications in patients with Type 2 diabetes (UKPDS). *Lancet*, 352, 837-853.
- Van Heyningen., 1959. Metabolism of xylose by the lens, 2. Rat lens *in vivo* and *in vitro*. *Biochem. J.*, 73, 197-207.
- Varma, S.D., Mizuno A., Kinoshita J.H., 1977. Diabetic cataracts and flavonoids. *Science*, 195(4274), 205-206.
- Whitaker, J.R., 1963. *Anal. Chem.*, 35, 1950 p.
- Wiesinger, H., Hamprecht B., 1987. Purification and properties of sorbitol dehydrogenase from bovine brain. *J. Neurochem.*, 48, 147 p.
- Wild S., Roglic G., Green A., 2004. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*, 27, 1047-1053.
- Williamson, J.R., Chang K., Frangos M., Hasan K.S., Ido Y., Kawamura T., Nyengaard J.R., Van Den E.M., Kilo C., Tilton R.G., 1993. Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes*, 42, 801 p.
- Xia, P., Inoguchi T., Kern T.S., Engerman R.L., Oates P.J., King G.L., 1994. Characterization of the mechanism for the chronic activation of diacylglycerolprotein kinase C pathway in diabetes and hypergalactosemia. *Diabetes*, 43(9), 1122-1129.
- Yamagishi, S., Takeuchi M., 2004. Inhibition of protein kinase C might be harmful to diabetic retinopathy. *Med Hypotheses*, 63, 135-137.

- Yamaguchi, H., Kanayama Y., Yamaki S., 1994. Purification and properties of NAD⁺ - dependent sorbitol dehydrogenase from apple fruit. *Plant Cell Physiol.*, 35, 887-892.
- Yeh, L.A., Ashton M.A., 1990. The increase in lipid peroxidation in diabetic rat lens can be reserved by oral sorbinil. *Metabolism*, 39, 619-622.
- Yenigün, M., Altuntaş Y., 2001. Her Yönüyle Diabetes Mellitus. *Diabetik Mikroanjiopati ve Diabetik Makroanjiopati*, 315-375.
- Zimmet, P., Alberti K.G.M.M., Shaw J., 2001. Shaw, Global and societal implications of the diabetes epidemic. *J. Nature*, 414, 782 p.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Antalya’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Antalya’da tamamladı. 2003 yılında Erzurum Atatürk Üniversitesi, Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi Kimya Öğretmenliği bölümünü kazandı ve 2008 yılında mezun oldu. Yine aynı yıl Erzurum Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi, Kimya Bilim Dalı, Biyokimya Anabilim Dalında doktora programına başladı. 2014 yılı Mayıs ayında tamamladı.