

Prof. Dr. Selva Önder 62870  
Prof. Dr. Selva Önder

Dr. Volkan Sözer

Doç. Dr. İhsan Sözer

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

# SİALİDAZ ENZİMİNİN GLUKOZ VARLIĞINDA AKTİVİTE DEĞİŞİMİNİN İNCELENMESİ

Kimyager Selva ÖNDER

F.B.E. Kimya Anabilim Dalı Organik Kimya Programında  
hazırlanan

TC. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
DOKÜMANİSYON MERKEZİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Volkan SÖZER**

İSTANBUL , 1997

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
İÇİNDEKİLER.....	i
ŞEKİL LİSTESİ.....	iii
TABLO LİSTESİ.....	iv
KISALTMALAR LİSTESİ.....	v
TEŞEKKÜR .....	vi
ÖZET .....	vii
SUMMARY .....	viii
1.GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI .....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	2
2.1.Sialidaz.....	2
2.1.1.Enzim Özellikleri .....	3
2.1.1.1.Substrat Spesifitesi .....	4
2.1.1.1.1.Konfigürasyonel Spesifiklik.....	4
2.1.1.1.2.Sialidaz Aktivitesi İçin Doğal Substratlarda Sterik Engelleme.....	4
2.1.1.1.3.Glikozidik Bağın Pozisyonu.....	4
2.1.1.1.4.Nöraminik Asidin Substitusyonu .....	4
2.1.1.1.5.Kinetik Özellikleri.....	5
2.1.1.1.6.İnhibitörleri .....	5
2.2.Sialik Asid Metabolizması .....	5
3.GLİKOZİLLENME VE FİZYOLOJİK ÖNEMİ .....	8
3.1.Nonenzimatik Glikozillenen Proteinler.....	8
3.1.1.NonEnzimatik Glikozillenmeye Etki Eden Faktörler.....	11
3.1.2.NonEnzimatik Glikozillenmenin Yol Açtığı Fizyolojik Değişimler.....	12
4.DESİALİLASYON VE FİZYOLOJİK ÖNEMİ .....	15
5.DENEYSEL BÖLÜM .....	18

5.1. Materyal ve Metod .....	18
5.1.1. Materyal .....	18
5.1.1.1. Analizde Kullanılan Maddeler .....	18
5.1.1.1.1. Sialidaz Aktivitesinin Belirlenmesinde Kullanılan Maddeler .....	18
5.1.1.2. Kullanılan Alet ve Cam Malzemeler .....	18
5.1.2. Yöntem .....	19
5.1.2.1. Farklı Glukoz Konsantrasyonlarında Sialidaz Aktivitesinin Belirlenmesi ...	19
5.1.2.1.1. Prensibi .....	19
5.1.2.1.2. Deneyin Yapılışı, Substrat ve Enzim Solüsyonlarının Hazırlanması .....	20
5.2. Bulguların İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi .....	21
6. BULGULAR .....	22
7. TARTIŞMA VE SONUÇLAR .....	31
KAYNAKLAR .....	34
ÖZGEÇMİŞ .....	41

## ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.2. Sialik asidin sentezi.....	7
Şekil 3.a. Şeker kalıntıları ile peptid zinciri arasındaki N-glikozidik bağı.....	8
Şekil 3.b. Şeker kalıntıları ile peptid zinciri arasındaki O-glikozidik bağı.....	8
Şekil 3.1.a. Proteinlerin nonenzimatik glikozillenme formülü.....	9
Şekil 3.1.b. Protein molekülleri arasında meydana gelen çapraz bağlanmanın şematik yapısı.. (Bileşiğin adı: (2-furoil)-4(5)-(2-furonil)-1H-imidazol).....	10

## TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Memelilerde sialidaz tipleri.....	2
Tablo 3.1. İn vivo ve in vitro olarak nonenzimatik glikozillenen proteinler .....	11
Tablo 3.1.1. İn vivo ve in vitro ortamlarda nonenzimatik glikozillenme üzerine etkili faktörler .....	11
Tablo 3.1.2. Nonenzimatik glikozillenmenin çeşitli protein fonksiyonları üzerine etkisi .....	13
Tablo 7.1. Sialidaz ünitelerinin 15 ve 20 dakikalar arasında oluşturdukları $\Delta A$ değerleri .....	22
Tablo 7.2. 0.05, 0.10, 0.15 ve 0.20 U/L konsantrasyonlarındaki sialidaz solüsyonlarının belirtilen glukoz konsantrasyonu ile inkübasyon sonucu oluşturdukları $\Delta A$ değerleri .....	25
Tablo 7.3.1. 0.05, 0.10, 0.15 ve 0.20 U/L konsantrasyonlarındaki sialidaz solüsyonlarının glukozsuz ve %200 mg glukozlu ortamlarda 24 saat 37°C'de inkübasyon öncesi ve sonrasındaki $\Delta A$ değerleri .....	27
Tablo 7.3.2. 0.05, 0.10, 0.15 ve 0.20 U/L konsantrasyonlarındaki sialidaz solüsyonlarının glukozsuz ve %400 mg glukozlu ortamlarda 24 saat 37°C'de inkübasyon öncesi ve sonrasındaki $\Delta A$ değerleri .....	28
Tablo 7.3.3. 0.05, 0.10, 0.15 ve 0.20 U/L konsantrasyonlarındaki sialidaz solüsyonlarının glukozsuz ve %800 mg glukozlu ortamlarda 24 saat 37°C'de inkübasyon öncesi ve sonrasındaki $\Delta A$ değerleri .....	29

## KISALTMALAR LİSTESİ

ALP::Alkali Fosfataz

AST: Aspartat Amino Transferaz

Apo: Apolipoprotein (apoprotein)

CMP:Sitidin Mono Fosfat

CMP-NANA:Sitidin Mono Fosfo N-Asetil Nöraminik Asid

CTP:Stidin Tri Fosfat

2,3-DPG:2,3-Di Fosfo Gliserat

EDTA:Etilen Diamin Tetra Asetat

LDL:Düşük Dansiteli Lipoprotein

NL: N-Asetil Nöramin (2-3) Laktikol

PPi:Pirofosfat

UDP:Üridin Di Fosfat

UTP:Üridin Tri Fosfat

## TEŞEKKÜR

*Bu çalışmama başlangıcından bitimine kadar her aşamasında bilgi ve önerileriyle büyük katkıda bulunan, benden bir an olsun bile desteğini esirgemeyen saygıdeğer hocam, Yrd. Doç. Dr. Volkan SÖZER'e, deneysel çalışmama bilgi ve önerileriyle katkıda bulunan Doç. Dr. Hüseyin SÖNMEZ'e ve biyolog Zeynep Banu GÜNGÖR'e teőekkürü bir borç bilirim.*

*Selva ÖNDER*

## ÖZET

Sialidaz karbohidratların indirgen olmayan ucundan bir terminal sialik asid kalıntısını uzaklaştıran hidrolitik bir enzimdir. Sialidaz enziminin yüksek glukoz konsantrasyonunda aktivitesindeki değişimi incelemek amacı ile yapılan bu çalışmada %200 ve %400 mg glukoz konsantrasyonunda glukozsuz ortama göre aktivite değişikliğine uğramazken, %800 mg glukoz ortamında ve 0.20 U/L sialidaz konsantrasyonunda glukozsuz ortama göre istatistiksel açıdan farklı olduğu görüldü.

24 saat inkübasyonlu ortamda yine %200 ve %400 mg glukoz konsantrasyonlarında anlamlı bir fark yokken, %800 mg glukoz konsantrasyonunda 0.15 ve 0.20 ünitelerde istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulundu.

## **SUMMARY**

Sialidase is a hydrolytic enzyme which removes the sialic acid unit from the terminal group of carbohydrates. In this study the effect of glucose on the sialidase activity was investigated. No significance difference was found in the sialidase activity 200% and 400% mg glucose concentration when compared with the sialidase activity in glucose-free medium. Significance difference was found at the 800% mg glucose concentration for the 0.20 U/L sialidase. For 24 hour incubation period no significant difference in the sialidase activity was found in the 200% and 400% mg glucose concentration, but significant difference was found in the 800% mg glucose concentration medium for the 0.15 U/L, 0.20 U/L sialidase concentration when compared with the sialidase activity in glucose-free medium.

## 1.GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI

Sialidaz (N-Asetil nöraminidaz), polisakkaridlerin ve oligosakkaridlerin indirgen olmayan ucundan terminal sialik asid kalıntısını uzaklaştıran hidrolitik bir ekzoenzimdir. İnfluenza virüsünden elde edilen sialidaz uzun yapılı bir molekül olup, 130.000 civarında bir molekül ağırlığına sahiptir. Sialidazın kompleks görüntüsü onun bir tip polipeptid zincirinden daha fazlasını içerdiğini kanıtlar.

Yüksek glukoz konsantrasyonu organizmada çeşitli değişikliklere sebep olmaktadır. Bunlardan bir tanesi proteinlerin glikozillenmesidir. Glikozillenme (Glikozilasyon) proteinlerin enzim aracılığı ya da enzim aracılığı olmaksızın (nonenzimatik) karbohidrat molekülleriyle bağlanmasıdır. Glikozillenen proteinlerin yapıları ve gösterdikleri etkiler değişmektedir. Ayrıca yine yapılan bazı araştırmalarda glikozillenme olayı meydana gelmeksizin yüksek glukoz konsantrasyonunun bazı enzimlerin aktivitelerindeki (örneğin:ALP ve AST) değişimlere yol açtığı da gözlenmiştir. Sialidazla ilgili olarak son bir kaç yıldır yapılan çalışmalarda deneysel diabet modeli oluşturan sıçanlarda, diabet ve nondiabetik hastalarda sialidaz enziminin aktivitesinde yükselme olduğu gösterilmiştir.

Biz bu tez çalışmamızda yukarıdaki bulguları dikkate alarak in vitro ortamda farklı glukoz konsantrasyonlarının sialidaz aktivitesi üzerinde bir değişim oluşturup oluşturmadığını incelemeyi amaçladık.

## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1.Sialidaz

Sialidaz (=N-Asetil nöraminidaz), polisakkaridlerin ve oligosakkaridlerin indirgen olmayan ucundan bir terminal sialik asid kalıntısını uzaklaştıran hidrolitik bir ekzoenzimdir (Gottschalk, Bhargava, 1971), (Miyagi, Tsuiki, 1985) ve sialik asidin ayrılmasından sonra çoğu durumda bir galaktoz kalıntısı açığa çıkar (Alon, Bayer, Wilchek, 1991). Enzim, mikrobial sistemlerde (virüsler ve bakterilerde) ve memeliler gibi yüksek organizmalarda bulunur (Schauer, 1982).

İlk olarak Warren ve Spearing, insan ve domuz plazmasında sialidazın varlığını göstermiştir. Sonraları, sialidazın memelilerin birçok doku ve organında bulunduğu, aktivitesinin viral ve bakteriyel sialidazlar ile karşılaştırıldığı zaman daha düşük olduğu bildirilmiştir. Ayrıca subselular lokalizasyon, substrat spesifikliğı, ısıya dayanıklılık, katyonlar tarafından inhibisyona hassasiyet ve kinetik özellikler gibi kriterler temel alınarak, memeli dokularında farklı tip sialidazların bulunduğu da gösterilmiştir (Tablo 2.1) (Gottschalk, Bhargava, 1971).

Tablo 2.1. Memelilerde sialidaz tipleri

İnsan	-Plazma doku -Beyin -İntestinal mukoza
İnek, öküz	-Plazma -Beyin -Platelet ve eritrosit
Sıçan	Karaciğer, böbrek, dalak, beyin, incebarsak, meme bezleri ve testis
Guinea domuzu	Beyin
Domuz	Böbrek, beyin
Fare	Beyin
Tavşan	Böbrek

Sıçan karaciğer ve böbreğinde sialidazın subsellular dağılımı incelenerek, enzimin en yoğun olarak lizozomlarda bulunduğu gösterilmiştir (Gottschalk, Bhargava, 1971) (Gonen, Baenziger, Schoufeld, Jacobsen, Farrar, 1981). Beyin dokusunda beş farklı tip sialidazın varlığı ortaya konmuştur. Bunlardan iki tanesi çözünebilir (Venerando, Tettamanti, Cestaro, Zambotti, 1975), üç tanesi ise membrana bağlı halde sinaptosomal membranlarda (Schengrund, Rosenberg, 1970), lizozom (Fiorilli, Venerando, Siniscalco, Monti, Bresciani, Caimi, Preti, Tettamanti, 1989), (Gottschalk, Bhargava, 1971) ve myelin (Yohe, Jacobson, Yu, 1983) membranlarında bulunan tiplerdir. Son yıllarda ise sıçan beyinde immunolojik olarak farklı iki sialidaz tipinin varlığı kanıtlanmıştır (Miyagi, Sagawa, Konno, Handa, Tsuiki, 1990).

Miyelin membranına bağlı sialidaz, nongangliozid substratları ve N-Asetil nöramin (2-3) laktikol (NL) ve fetuin gibi gangliozid substratları hidroliz eder (Yohe, Jacobson, Yu 1983). Bu sialidazın orijini bilinmemesine rağmen enzimin oligodendroglial perikaryada sentezlenmesi ve UDP-galaktoz: seramid galaktozil transferaz gibi miyelin ile ilgili diğer enzimlere benzer şekilde miyelin membranına transport edilmesi olasıdır (Saito, Sato-Bigbee, Yu, 1992).

Gebelik ve laktasyon esnasında dişi sıçanların organlarındaki sialidaz aktivitesinde değişiklikler saptanmıştır. Doğumdan 14-16 gün sonra karaciğer ve meme bezlerinde sialidaz aktivitesinde artış görülmüştür. Beyinde ise gebeliğin ikinci haftası ve laktasyonun ilk haftasında pik gözlenmiştir. Gelişme boyunca sıçan beyin sialidazında değişiklikler olduğu bildirilmiştir. Ancak memeli sialidazının indüktif bir enzim olduğu henüz kanıtlanmamıştır (Gottschalk, Bhargava, 1971).

### 2.1.1. Enzim Özellikleri

İnfluenza virüsünden elde edilen sialidaz uzun yapılı bir molekül olup, 130.000 civarında bir moleküler ağırlığa sahiptir. Sialidazın kompleks görüntüsü onun bir tip polipeptid zincirinden daha fazlasını içerdiğini kanıtlar. Enzimin başlıca özellikleri şunlardır (Gottschalk, Bhargava, 1971):

### 2.1.1.1. Substrat Spesifitesi

#### 2.1.1.1.1.Konfigürasyonel Spesifiklik

Sialidazlar  $\alpha$ -D konfigürasyonunda N-Açıl nöraminik asitler içeren glikozidleri (ketoasitleri) yarabilirler.

Sialidazdan etkilenmeyen ve doğal olarak bulunan ketosidik bağlı N- Asetil nöraminik asit içeren tek bileşik; sitidin 5'-mono fosfo-N-asetil nöraminik asit (CMP-NANA)'dır. Bu durumda N-Asetil nöraminik asidin anomeric karbon atomu  $\beta$  konfigürasyonundadır.

#### 2.1.1.1.2.Sialidaz Aktivitesi İçin Doğal Substratlarda Sterik Engellenme:

$\alpha$ -ketosidik olarak bağlı nöraminik asitlerin tümü sialidaza hassastır. Bununla birlikte nöraminik asidin bağlı olduğu şekerin komşu karbon atomu substitue edilirse, bu substitusyon sialidazın etkisi için sterik bir engel oluşturur.

#### 2.1.1.1.3. Glikozidik Bağın Pozisyonu

Nöraminik asidin şekeri ile yaptığı  $\alpha$ -ketosidik bağın 4 farklı pozisyonu bilinmektedir. (2→3), (2→4), (2→6) ve (2→8).

#### 2.1.1.1.4.Nöraminik Asidin Substitusyonu

Nöraminik asidin N-substituenti doğal ürünlerde asetil veya glikozil kalıntısı olabilir. Doğal olarak bulunan maddelerde nöraminik asit çoğunlukla 4,7 veya 8. karbon atomlarının serbest hidroksil grubunda bir asetil kalıntısı ile substitue olmuştur. Di-ve tri- o- asetillenmiş nöraminik asitler de bilinmektedir.

Nöraminik asit molekülünün negatif yüklü karboksil grubu nöraminidazların etkisi için gereklidir.

### 2.1.1.1.5.Kinetik Özellikleri

Çeşitli sialidazların pH optimumu substratın tabiatı ile değişir. İnsan plazmasındaki nöraminidazın pH optimumu 5,5 olup,  $\text{Ca}^{2+}$  ile uyarılır, etilen diamin tetra asetat (EDTA) ile inhibe olur.

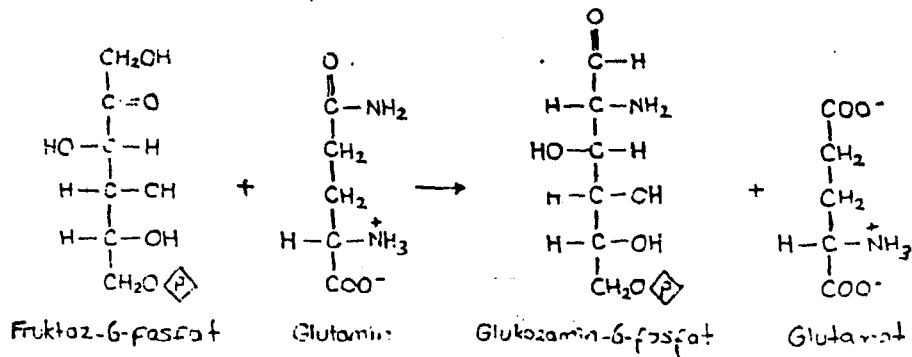
### 2.1.1.1.6.İnhibitörleri

Sialidaz aktivitesini inhibe eden başlıca maddeler; N-Asetilnöraminik asid, 2-Deoksi-2,3-dehidro-N-asetil nöraminik asid ve N-Substitue okzamik asidlerdir (Gottschalk, Bhargava, 1971).

### 2.2.Sialik Asid Metabolizması

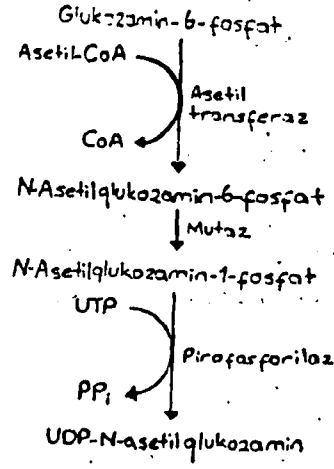
N-Asetil nöraminik asid (=sialik asid); N-Asetilmannozaminin 9 karbonlu türevidir. Bu şeker türevlerinin karboksilik asid grupları pH 7'de iyonizedir (Lehninger, Nelson, Cox, 1993).

Amino şekerler, kovalent bağlı oligosakkarid zincirleri içeren makromoleküller olan glukokonjugatların majör bileşenleridir. İlk oluşan amino şekerin prekürsörü fruktoz-6-fosfattır. Azot, glutamidin amid grubundan gelir.Bu reaksiyon glutamin:fruktoz-6-fosfat amido tranferaz tarafından katalizlenir ve irreversibldir.



Enzim, hem amid grubu transferini hem de C-2 indirgenmesine kenetli C-1'in oksidasyonu ile şekerin internal bir oksidoredüksiyonunu katalizler.

Glukozamin-6-fosfat sonra üç basamaklı bir reaksiyon dizisiyle UDP-N-asetil glukozamine çevrilir.



Sialik asid biyosentezi, UDP-N-asetil glukozaminin epimerizasyonu ile devam eder. Bu reaksiyon UDP-glukoz ve UDP-galaktozun birbirine çevrilmesine benzer. Ürün, UDP-N-asetilgalaktozamin N-Asetilmannozamin-6-fosfata çevrilir. N-Asetil mannozamin-6-fosfat aldol kondensasyonuna benzer bir şekilde fosfoenolpiruvat ile reaksiyona girer. Ürün; N-Asetil nöraminik asid 9-fosfat, N-Asetil nöraminik asid vermek üzere yarıdır. Oligosakkarid biyosentezi için sialik asidin metabolik aktivasyonu bir nükleozid monofosfat şekeri olan sitidin monofosfat-sialik asid (=CMP-sialik asid) oluşumunu içerir. CMP-sialik asid, sitozolde sentezlenen diğer nükleotid-bağlı şekerlerden farklı olarak nükleusta sentezlenir (Mathews, van Holde, 1990).

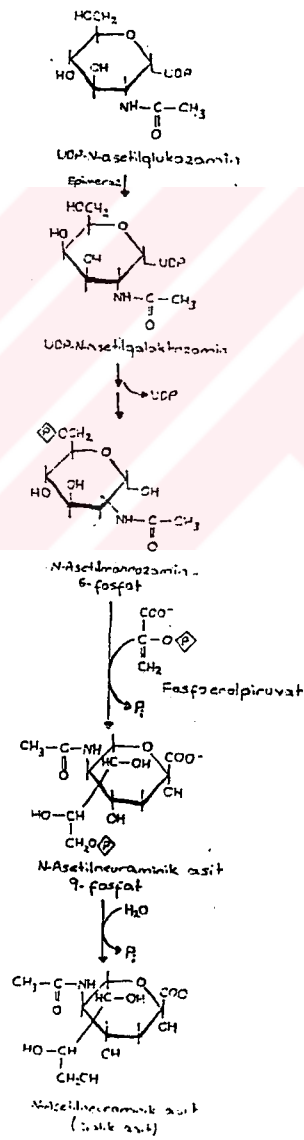


Glikoprotein sentezinde sialik asid kalıntılarının ilavesi trans Golgi'de olur. CMP-sialik asid translokaz, transGolgi membranında yer alan bir transfer proteindir. CMP-sialik asid bu kanaldan geçip, trans Golgiye girer ve sialik asid kalıntıları sialil transferaz vasıtasıyla moleküle ilave edilir (Rawn, 1989).

Sialik asidlerin N-glikolil (-C-CH<sub>2</sub>OH) veya diasetil türevleri de mevcuttur. (Smith, Hill, Lehman, Lefkowitz, Handler, White, 1983).

UDP-N-asetil glukozamin karaciğerde negatif feedback kontrol vasıtasıyla kendi sentezini regüle ediyor görünmektedir ve fruktoz 6-fosfatı glukozamin-6-fosfata çeviren amidotransferaz üzerine inhibitör etki gösterir. UDP-N-asetil galaktozamin ve CMP-sialik asidin sentez hızları da bu yolla kontrol edilir. Korneada CMP-sialik asid, UDP-N-asetil glukozamini N-Asetilmannozamine çeviren 2-Epimerazı inhibe eder (Smith, Hill, Lehman Lefkowitz, Handler, White, 1983).

Suda çözünen birçok glikoproteinin oligosakkarid zincirlerinin uçlarında bulunan sialik asid kalıntıları belirli bir proteinin kan dolaşımında sirküle olmaya devam edip etmeyeceğini veya karaciğer tarafından uzaklaştırılıp uzaklaştırılmayacağını tayin eden bir mesaj taşır. Hepatositlerin plazma membranı, sialik asidden yoksun glikoproteinler için asialoglikoprotein reseptörleri olarak bilinen spesifik bağlayıcı bölgelere sahiptir. Bu reseptörler vasıtasıyla bağlanan glikoproteinler hepatositler tarafından alınır ve lizozomlarda yıkılır (Libby, 1987). (Lehninger, Nelson, Cox, 1993).

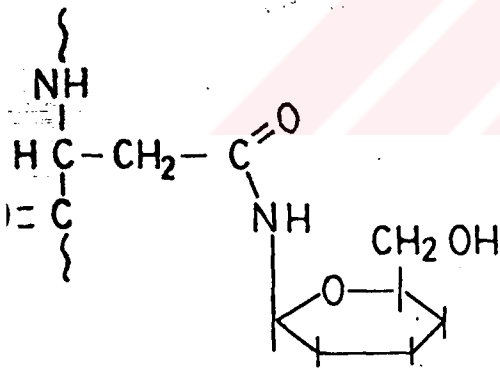


Şekil 2.2. Sialik asidin sentezi.

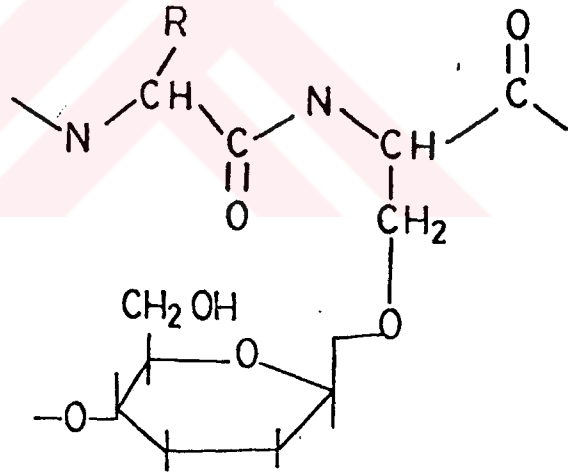
### 3.GLİKOZİLLENME VE FİZYOLOJİK ÖNEMİ

Glikozillenme (Glikozilasyon) proteinlerin enzim aracılığı ya da enzim aracılığı olmaksızın (nonenzimatik) karbohidrat molekülleri ile bağlanmasıdır.

Proteinlerin enzimatik glikozillenmesi, hücrede golgi kompleksi ve endoplazmik retikulum lümeninin majör metabolik aktivitelerinden biridir. Özel glikozil transferazların etkinliğinde yürüyen reaksiyonlar sonucu oluşan ürünler "glikoproteinler" olarak adlandırılır. Glikoproteinlerde şeker kalıntıları (glukoz, galaktoz, mannoz, fukoz, N-Asetil glukozamin, N-Asetilmannozamin, sialik asitler) asparagin amino asidine  $\beta$ -N-glikozid bağı ile bağlıdır (Şekil 3a). Buna karşılık şeker kalıntıları serin, treonin, hidroksilizin amino asidlerinin hidroksil gruplarına O-glikozidik bağı ile bağlıdır (Şekil 3b). Bu grup nispeten daha seyrekdir (Candan, 1988), (Rawn, 1989).



Şekil 3 a



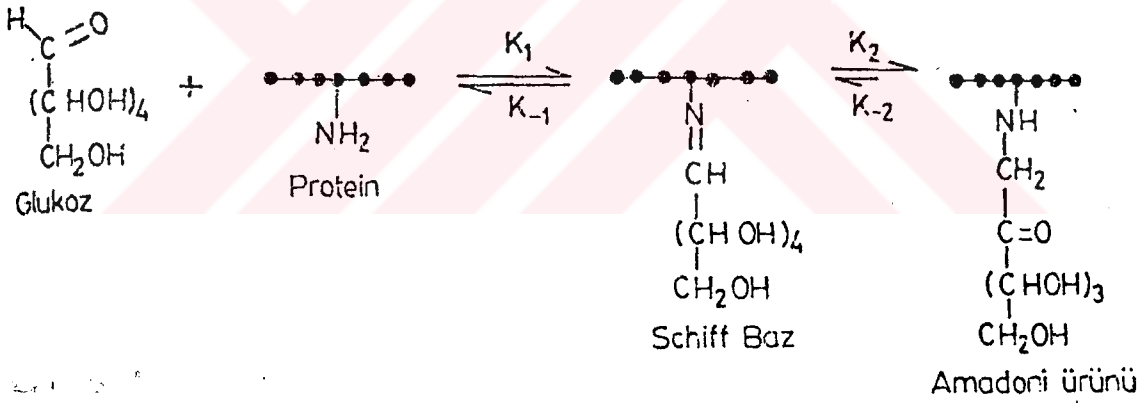
Şekil 3 b

#### 3.1.Nonenzimatik Glikozillenen Proteinler

Nonenzimatik glikozillenme reaksiyonunda proteinlerin N-terminal amino gruplarına ve lizin amino asidlerinin  $\Sigma$  amino grubuna şeker kalıntılarının fosforillenmiş şekilleri serbest karbonil grupları ile bağlanırlar. Enzim etkisi olmadan

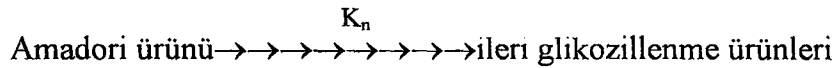
proteine bağlanan karbohidrat molekülü glukoz olduğu zaman bu durum non enzimatik glikozillenme olarak da adlandırılır. (Candan, 1988) (Kirschenbaum, 1984), (Means, Chang, 1982).

İn vivo ve in vitro olarak meydana gelebilen non enzimatik glikozillenme şekilleri şekil 3.1a'da formülendirilmiştir. Reaksiyonun ilk basamağı proteinin amino grubuna glukozun nükleofilik bir atak yaparak aldimin yapıları Schiff bazı oluşturması ile başlar. Meydana gelen Schiff bazının oluşum sabiti ( $K_1$ ), disosiasyon sabitine ( $K_{-1}$ ) eşittir. Birinciye göre daha yavaş seyreden ikinci basamakta; Amadori çevrimi olarak adlandırılan bir reaksiyon ile Amadori ürünü adı verilen ketoamin yapı oluşur. Bu ürünün geri dönüşüm hızı birinci ürüne göre daha yavaştır ( $K_2 > K_{-2}$ ). İn vivo olarak organizmada yarı ömrü gün yada haftalar ile ölçülebilen proteinlerin (Hemoglobin, Albumin) glikozillenmesi sonucu ketoamin ürünleri birikir. Bunlar erken glikozillenme ürünleridir. (Brownlee, Cerami, Vlassara, 1988), (Brownlee, Vlassara, Cerami, 1984), (Kennedy Ragnes, 1984).



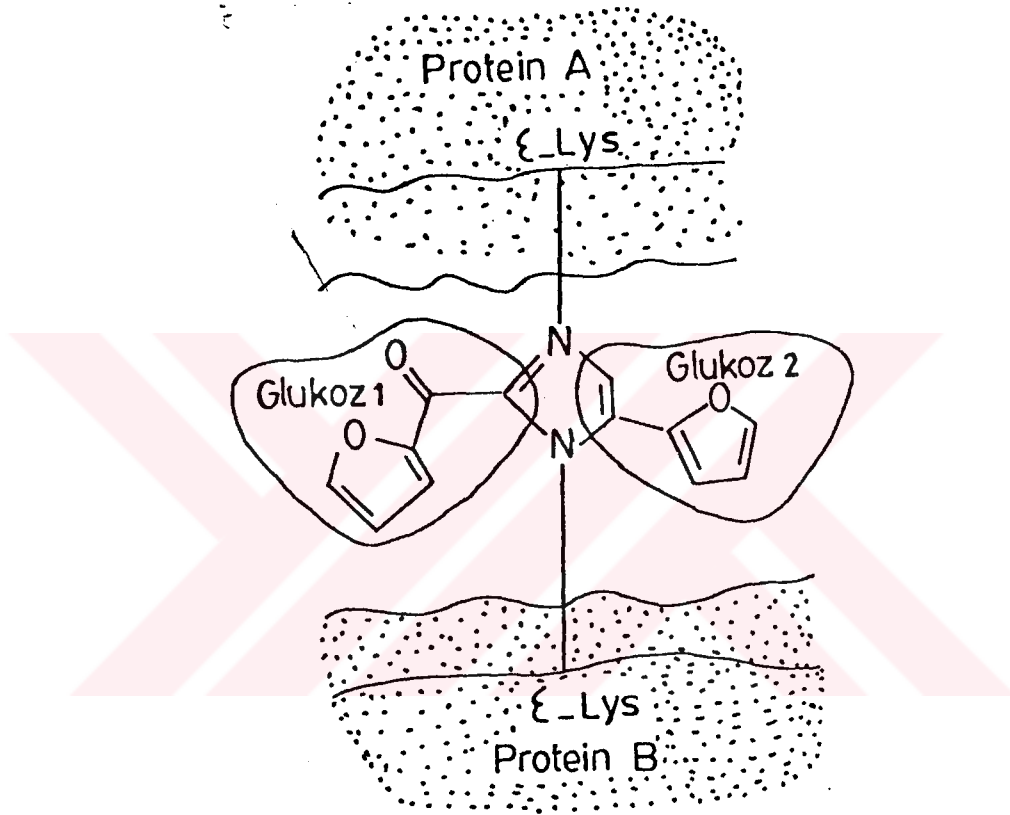
Şekil 3.1.a. Proteinlerin nonenzimatik glikozillenme formülü

Yarı ömrü kısa olan proteinlere zıt olarak kristalin, kollajen, elastin, myelin gibi dönüşüm hızı çok yavaş olan proteinler post Amadori nonenzimatik glikozillenme ürünleri olarak birikir. Bunlar ketoaminin daha ileri dehidrasyona uğraması ile oluşur.



Kahverenkli, fluoresans veren ileri glikozillenme ürünleri protein molekülleri arasında çapraz bağlanmalara yol açarlar ve melanoidler olarak da adlandırılırlar

(Banga, Balo, Horvath, 1959), (Brownlee, Cerami, Vlassera, 1988), (Brownlee, Vlassara, Cerami, 1984), (Kennedy, Ragnes, 1984). Çapraz bağlamanın iki adet glukoz molekülü ile iki adet lizinin  $\Sigma$  amino grubu arasındaki heterosiklik kondensasyon ile olduğu gösterilmiştir (Şekil 3.1.b). (Brownlee, Cerami, Vlassera, 1988), (Brownlee, Vlassara, Cerami, 1984)



Şekil 3.1.b. Protein molekülleri arasında meydana gelen çapraz bağlanmanın şematik yapısı (Bileşiğin adı: (2-furoil)-4(5)-(2-furanil)-1H-imidazol).

Fizyolojik koşullar altında bu ürünlerin yapım hızı çok yavaştır ve amadori ürünlerinden farklı olarak bir kere meydana geldikten sonra tekrar geri dönüşümleri yoktur. İleri glikozillenme ürünlerinin meydana gelme reaksiyonları “Maillard reaksiyonları” olarak da bilinir (Brownlee, Vlassara, Cerami, 1984) (Fırat, 1982).

İn vivo ve in vitro olarak nonenzimatik glikozillenmeye uğrayan proteinler Tablo 3.1’de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. İn vivo ve in vitro olarak nonenzimatik glikozillenmeye uğrayan proteinler

<u>In vivo</u>	<u>In vitro</u>
Hemoglobin	Antitrombin III
Eritrosit membran proteinleri	Fibrin
Fibrinojen	Endotelyal hücre membranı
Albumin	HDL
LDL	Katepsin B
Kollajen	$\beta$ -N-asetil-D
Myelin proteinleri	glukozaminidaz
Periferik sinir proteini	Pankreatik ribonükleaz A
Tubulin	Ferritin
Lens kristalleri	
Lens kapsül proteinleri	
Kemik proteinleri	
İnülin	

### 3.1.1. Nonenzimatik Glikozillenmeye Etki Eden Faktörler

Proteinlerin nonenzimatik glikozillenmesi üzerine in vivo ve in vitro ortamlarda etkili çeşitli faktörler vardır. Bunlar Tablo 3.1.1a'da gösterilmiştir.

Tablo 3.1.1. İn vivo ve in vitro ortamlarda nonenzimatik glikozillenme üzerine etkili faktörler

<u>In vitro</u>	<u>In vivo</u>
pH	Sabit
Isı	Sabit
Protein konsantrasyonu	Sabit
Amino grubu yakın çevresi	Sabit
Glukoz konsantrasyonu	Ortalama kan glukoz düzeyi
İnkübasyon süresi	Hiperglisemi süresi ve protein yarı ömrü

Herhangi bir protein için nonenzimatik glikozillenmenin miktarı birbirinden bağımsız olarak etki eden değişkenlerin etkilerinin toplamı ile değerlendirilir. Bu değişkenlerin ilk dört tanesi canlı sistemlerde sabittir. İn vitro olarak pH'nin önemli etkisi vardır. Deneysel olarak Amadori ürününün pH 7'nin altında iyi bir şekilde meydana gelmediği görülmüştür. PH 7 ile 9 arasında ise Amadori ürünü dengeye

erişerek artar. Bu gözlem sadece proteinler üzerindeki yüksüz amino asitlerin glukoz ile bu tip bir ekleme reaksiyonuna girebileceklerine dair kimyasal teori ile paralellik gösterir.

Isıyı arttırmak Amadori ürününün oluşum hızında diğer nonenzimatik kimyasal reaksiyonlardakine benzer şekilde nispi bir artışa yol açar. İn vivo olarak sabit olan diğer iki faktör protein konsantrasyonu ve amino grubunun çevresidir. Yüksek protein konsantrasyonunda glukoz ile potansiyel olarak reaksiyona girebilecek amino gruplarının sayısı artarken, her amino grubunu çevreleyen bölgelerdeki proteinlerin lokal çevresi bu amino gruplarının glukoz ile reaksiyona girmesi üzerine direkt etki yapar. Bu son faktörler belirli bir proteinde görülen ve tesadüf olmayan amino grubu glikozillenmesini açıklamakla kalmaz, aynı zamanda farklı proteinler arasında görülen nonenzimatik glikozillenme hassasiyetindeki değişiklikleri de açıklar (Brownlee, Vlassara, Cerami, 1984), (Garlich, Muzer, 1983), (Garlich, Muzer, Higgins, Bunn, 1983).

Glukoz konsantrasyonunu arttırmak, proteinler üzerinde birikmiş Amadori ürünlerinin aynı oranda artmasına sebep olur. İnkübasyon zamanının uzunluğu iki nedenle önemlidir. Birincisi; Amadori ürünlerinin dengeye erişilene kadar zaman geçtikçe birikmeye devam etmesidir. Bu birikim birçok kritik proteinin önemli fonksiyonel özelliklerini belirgin derecede bozmaya yetebilir. İkinci neden; Amadori ürünlerinin ; dengeye eriştikten sonraki sabit düzeyleri, dengenin ortalama kan glukoz düzeylerinde oluşabilmesi için gerekli zamanın ötesinde artmamasına rağmen, ileri glikozillenme ürünleri tekrar kullanılan proteinlerin tüm hayatı boyunca birikmeye devam eder. İleri glikozillenme ürünlerinin belirgin klinik sonuçları protein moleküllerinin arasında veya içinde yer alan artmış çapraz bağlanma ile ilişkili değişmiş fizyolojik olaylardan ve diğer glikozillenme ile ilişkili yapısal değişikliklerden kaynaklanır (Brownlee, Vlassara, Cerami, 1984).

### **3.1.2. Nonenzimatik Glikozillenmenin Yol Açtığı Fizyolojik Değişimler**

Nonenzimatik glikozillenme etkisi ile proteinlerde meydana gelen fizyolojik değişiklikler Tablo 3.1.2.'de özetlenmiştir.

Tablo 3.1.2. Nonenzimatik glikozillenmenin çeşitli protein fonksiyonları üzerine etkisi

Enzim aktivitesi
Regülatör moleküllerin bağlanması
Proteinlerin çapraz bağlanması
Proteazlara karşı duyarlılık
Makromoleküllerin hücre yüzey reseptörleri tarafından tanınması ve endositoz
Immunolojik etki

Tabloda görüldüğü gibi bu fizyolojik değişikliklerin ilki enzim proteinlerinin aktivitesinde meydana gelen değişimdir. Ancak in vivo olarak nonenzimatik glikozillenme enzim proteinlerinde önemsenecek düzeyde meydana gelmez. Çünkü bu proteinlerin çoğu genellikle kısa ömürlüdür. Bununla beraber reversibl glukoz-protein schiff baz bileşikleri oluşur ve in vivo olarak bu bileşiklerin konsantrasyonlarındaki artış enzimlerin katalitik özellikleri ile anlamlı olarak ilişkilidir. Bu inaktivasyon mekanizması aktif bölgede normal fonksiyonlar için gerekli lizin aminoasidlerinin  $\Sigma$  amino gruplarının glukoz ile bağlanması sonucu oluşur (Brownlee, Vlassara, Cerami, 1984) Örneğin ribonükleaz A; glukoz ile yirmi dört saat inkübe edilir ise enzim aktivitesini %50 oranında kaybettiği saptanmıştır (Eble, Thorpe, Bagnes, 1983). Benzer sonuçlar katepsin B ve papain için de alınmıştır (Coradello, Lubec, Pollah, Sternberg, 1982).

Organizmada bazı proteinlerin fonksiyonu çeşitli regülatör molekülleri ile düzenlenir. Regülatör moleküllerin bu proteinlere bağlanması üzerine nonenzimatik glikozillenmenin etkisi vardır. Regülatör moleküllerin bağlanması için gerekli terminal amino asidin  $\alpha$ -amino grubu ya da lizinin  $\Sigma$  amino grubunun nonenzimatik glikozillenmesi ile bu moleküllerin bağlanmasını inhibe eder. Regülatör moleküllerin bağlanmalarına iyi bir model 2,3-DPG'nin hemoglobine reversibl bağlanmasıdır. 2,3-DPG'de bağlanma için gerekli pozitif yüklü grupların nonenzimatik glikozillenmesi bu molekülün hemoglobine bağlanmasını azaltır (Peratz, 1979).

Nonenzimatik glikozillenmenin yol açtığı bir diğer fizyolojik değişim daha önce de kısaca bahsettiğimiz gibi, proteinlerde meydana gelen çapraz bağlardır.

Çapraz bağlanmaların yol açtığı agregatlaşma organizmada ilk olarak lens kristalleri olan kristallinler üzerinde incelenmiştir (Stevens, Rovzer, Monnier, Cerami, 1978). Oluşan bu agregatlaşmalar proteinlerin normal fizyolojik fonksiyonlarını olumsuz etkiler.

Non enzimatik glikozillenen proteinlerde proteazlara karşı duyarlılıkta azalma görülmüştür. Buna iyi bir örnek fibrindir. Diabetli hastalarda nonenzimatik olarak glikozillenen fibrinin plazmine karşı duyarlılığının azaldığı saptanmıştır (Brownlee, Vlassara, Cerami, 1983).

Nonenzimatik olarak glikozillenen makromoleküllerin hücre reseptörleri tarafından tanınması ve endositoza uğramaları da etkilenmektedir. Hücre yüzeyleri çeşitli molekülleri yüksek affinite de bağlayabilen reseptörler içerir. Bu reseptörlere çeşitli moleküllerin bağlanabilmesi organizmada homeostazın muhafazasında önemlidir. Çeşitli proteinlerin nonenzimatik glikozillenme yolu ile modifikasyonları tanınmalarını ve endositozlarını anlamlı olarak değiştirir (Silverstern, Steinman, Cohnz, 1977). Buna örnek olarak serum albumin ve LDL (düşük dansiteli lipoprotein) moleküllerini verebiliriz. Glikozillenen serum albuminin kapiler endotel hücreleri tarafından endositozu arttığı halde, yine glikozillenen LDL moleküllerinin fibroblastlar tarafından fagosite edilmeleri azalmıştır (Gonen, Baenziger, Schunfeld, Jacobson, Farror, 1981), (Williams, Devenny, Bitensky, 1981), (Witztum, Mahoney, Branks, 1982).

Yine nonenzimatik glikozillenmenin proteinler üzerinde yol açtığı bir başka modifikasyon, nonenzimatik glikozillenmeye uğrayan proteinlerin antijenik karakter kazanarak otoantikör oluşumuna yol açabilmeleridir (Brownlee, Vlassara, Cerami, 1984), (Witztum, Steinbrecher, Fisher, Kseaniemi, 1983).

Proteinlerin glikozillenme hızında karbohidrat türlerinin de etkisi olduğu ileri sürülmüştür. Yapılan araştırmalarda aldolazların, ketozlara göre proteinler ile daha hızlı reaksiyonlaştıkları gösterilmiştir. (Bunn, Higgins, 1981), (Kirschenbaum, 1984). Bu farkın karbonil grubunun aldehid yapısı içinde daha elektrofilik olması ile oluştuğu düşünülmüştür. (Bunn, Higgins, 1981). Buna karşılık Oimomi ve arkadaşları deneysel olarak albuminin fruktoz ile gkukoza oranla daha hızlı glikozillendiğini göstermişlerdir (Oimomi, Nakamichi, Ohan, Sakai, Igaki, Hata, Baba, 1989)

#### 4. DESIALİLASYON VE FİZYOLOJİK ÖNEMİ

Biyolojik sistemlerde bir glikoproteinden sialidaz etkisiyle sialik asid kalıntılarının uzaklaştırılması o glikoproteinin antijenik expression, reseptörler tarafından tanınma, fonksiyonunu yerine getirmedeki yapısal etkinlik ve dolaşımında kalma gibi çeşitli biyolojik proseslerini etkileyebilir (Miyagi, Tsuiki, 1985).

Hücre yüzeyinin tüm net negatif yükünün majör bileşenleri olarak sialik asidler; anyonik plazma proteinlerinin vasküler endotel hücre yüzeyi ile etkileşimini inhibe eden güçlü bir elektrostatik bariyere eşlik ederler. Glikoproteinler, proteoglikanlar ve gangliosidler gibi hücre yüzeyi glukokonjugatlarında terminal bir pozisyonu işgal eden sialik asidler hücre yüzeyinin negatif yükünün yaklaşık %50'sinden sorumludurlar (Danon, Skutelsky, 1976).

Yüzey glikoproteinleri gibi LDL reseptörleri de en az bir tane N-bağlı oligosakkaridin ve tüm O-bağlı oligosakkaridlerin terminal sialik asid kalıntıları taşıdığı hem O-hem de N-bağlı oligosakkaridler içerirler. Çeşitli hücre tiplerinin LDL reseptörleri bu benzer temel glikoprotein yapısına sahip görünmekle beraber, oligosakkarid dallanması ve buna bağlı oluşan sialilasyon çarpıcı olarak farklılık gösterebilir (Cummins, Kornfeld, Schneider, Hobgood, Tolleshaug, Brown, Goldstein, 1983).

Endotel hücrelerinden sialidaz etkisiyle sialik asidin uzaklaştırılması, LDL reseptörünün LDL'e artmış affinitesi ve LDL'in artmış endositozu ile sonuçlanır (Sprague, Moser, Edwards, Schwartz, 1988).

Son zamanlarda bir kaç çalışma LDL'in de sialik asidini kaybedebileceğini (desialilasyon) ve bu şekilde oluşan modifiye LDL formunun koroner aterosklerozla ilişkili olabileceğini ileri sürmüştür (Mukhin, Tertov, Kacharava, Orekhov, 1990), (Orekhov, Tertov, Pokrovsky, Adamova, Martsenyuk, Lyakishev, Smirnov, 1988), (Orekhov, Tertov, Mukhin, Mikhailenko, 1989), (Orekhov, Tertov, Mukin, 1991), (Tertov, Sobenin, Tonevitsky, Orekhov, Smirnov, 1990), (Tertov, Sobenin, Gevara, Morrisett, Orekhov, 1992). LDL'nin yapısında bulunan apolipoprotein B (apo B) molekülü N-glikozidik bağ ile bağlı iki tip polisakkarid zinciri (yüksek mannoz ve

sialillenmiş) içerir. Sialik asid, sialillenmiş polisakkarid zincirinin terminal ucunda yer alır. (Tertov, Sobenin, Tonevitsky, Orekhov, Smirnov, 1990). Desialillenmiş lipoproteinlerin normal lipoproteinlere oranla daha küçük molekül yapısına sahip olmaları nedeniyle daha fazla elektroforetik mobilite gösterdikleri bildirilmiştir (Tertov, Sobenin, Orekhov, 1992), (Tertov, Sobenin, Gabbasov, Popov, Jaakkola, Salakivi Nikkari, Smirnov, Orekhov, 1992). Normal LDL'e oranla desialillenmiş LDL'de ester kolesterol serbest kolesterol, trigliserid içeriği daha az; oysa digliserid, monogliserid ve serbest yağ asidi konsantrasyonları daha fazla bulunmuştur. Ayrıca desialillenmiş LDL'nin düşük fosfatidil kolin, sfingomiyelin ve fosfatidiletanol amin düzeyleri yüksek lizofosfatidilkolin içeriği ile karakterize olduğu gösterilmiştir. Normal LDL'e göre desialillenmiş LDL daha yüksek düzeylerde oksisiteroller fakat daha düşük miktarlarda A ve E vitaminleri içermektedir. Bakır iyonları varlığında desialillenmiş LDL sialillenmiş LDL'e göre daha etkili bir biçimde okside olur. Bu desiale LDL'de doğal olarak bulunan antioksidanların (A ve E vitaminleri) azalmış miktarları ile açıklanabilir (Sobenin, Tertov, Koschinsky, Bunting, Slavina, Dedov, Orekhov, 1993), (Tertov, Orekhov, Martsenyuk, Perova, Smirnov, 1989), (Tertov, Sobenin, Gabbasov, Popov, Yaroslavov, Jauhiainen, Ehnholm, Smirnov, Orekhov, 1992), (Tertov, Sobenin, Orekhov, 1992), (Tertov, Sobenin, Gabbasov, Popov, Jaakkola, Salakivi, Nikkari, Smirnov, Orekhov, 1992).

Koroner atherosklerozlu kişilerin dolaşımındaki sağlıklılara göre yüksek oranda saptanan desialilasyona uğramış LDL'nin normal LDL'e oranla selüler lipid birikimini daha fazla uyardığı gösterilmiştir (Tertov, Sobenin, Orekhov, 1992), (Tertov, Sobenin, Gabbasov, Popov, Jaakkola, Salakivi, Nikkari, Smirnov, Orekhov, 1992), (Sobenin, Tertov, Koschinsky, Bunting, Slavina, Dedov, Orekhov, 1993), (Tertov, Orekhov, Martsenyuk, Perova, Smirnov, 1989), (Tertov, Sobenin, Gabbasov, Popov, Yaroslavov, Jauhiainen, Ehnholm, Smirnov, Orekhov, 1992). Desialillenmiş LDL doğal LDL reseptörleri, modifiye (asetillenmiş) LDL için olan scavenger reseptör veya fagositoz vasıtasıyla hücreler tarafından alınabilir (Orekhov, Tertov, Mukhin, 1991). Desialillenmiş LDL'nin agregasyona eğilimli olduğu da ileri sürülmüştür (Tertov, Sobenin, Gabbasov, Popov, Orekhov, 1989).

Koroner atherosklerotik hastalardan anjiyo ile elde edilmiş LDL normal insan aort kültürlerine konduğunda buralarda kolesterol birikimine neden olur (Orekhov, Tertov, Pokrovsky, Adamova, Martsenyuk, Lyakishev, Smirnov, 1988), Tertov, Orekhov, Martsenyuk, Perova, Smirnov, 1989) Kolesterol birikimi DNA, total protein, kollajen , hiyaluronik asid ve glukozaminoglikanların artan sentezini gösterir. (Orekhov, Tertov, Kudryashov, Smirnov, 1990). Hastaların kan plazması ve LDL'sinin bu özelliği "atherojenez başlatıcısı veya hızlandırıcısı" olarak adlandırılır. Atheroma oluşturmeyen doğal LDL'den nöraminidazla sialik asid uzaklaştırılması hücre içinde lipid birikimine neden olur. Atheroma oluşturmeyen doğal LDL'den sialik asid uzaklaştırılması ise atheroma oluşturan lipoproteinleri modifiye eder. (Orekhov, Tertov, Mukhin, Mikhailenko, 1989), (Tertov, Sobenin, Gabbasov, Popov, Orekhov, 1989).

LDL'de meydana gelen desialillasyon kaynağı tam olarak açıklanmamakla beraber koroner atherosklerozlu kişilerde yapılan bir çalışmada sialidaz aktivitesini sağlıklılara göre yüksek bulmamız, LDL desialillasyonunda sialidazın da rolü olabileceğini düşündürmektedir (Süer, 1995). Ancak lipoprotein desialilasyonunda sialidaz aktivitesinin karaciğerde lipoprotein lipaz sentezi sırasında mı yoksa lipoproteinler dolaşıma verildikten sonra mı etkili olduğu açık değildir.

## **5.DENEYSEL BÖLÜM**

### **5.1.Materyal ve Metod**

#### **5.1.1.Materyal**

##### **5.1.1.1.Analizde Kullanılan Maddeler**

###### **5.1.1.1.1.Sialidaz Aktivitesinin Belirlenmesinde Kullanılan Maddeler**

Sialidaz aktivitesi Alon ve arkadaşları (Alon, Bayer, Wilchek, 1991) tarafından ileri sürülmüş olan yöntemine göre tayin edildi. Gerekli maddeler şunlardır:

Glukoz (Sigma)

Sialidaz (Sigma)

Fetuin (Sigma)

Galaktoz oksidaz (Sigma)

Peroksidaz (Sigma)

2-2'-Azino-bis (3-etilbenziazolin-6-sülfonik asid) (=ABTS) (Sigma)

1 mM  $\text{CaCl}_2$  ve 1 mM  $\text{MgCl}_2$  ilave edilmiş, pH'ı 7.2 olan PBS (=phosphate buffered saline)

0.154 M NaCl ve 9mM  $\text{CaCl}_2$  ilave edilmiş pH'ı, 5.5 olan 50 mM sodyum asetat tamponu

##### **5.1.1.2.Kullanılan Alet ve Cam Malzemeler**

-Pastör pipet

*Enzimatik reaksiyon için,*

-Elektrikli ısıtıcı

- Otomatik pipetler (Gilson)
- Spektrofotometre (Schimadzu)
- Su banyosu (Elektromag)
- Deney tüpleri, pipetler,erlen,beher,balon joje,cam kapsül v.b. cam malzemeler
- Tartım aleti (Schimadzu)
- 37 °C'lik etüv

## 5.1.2.Yöntem

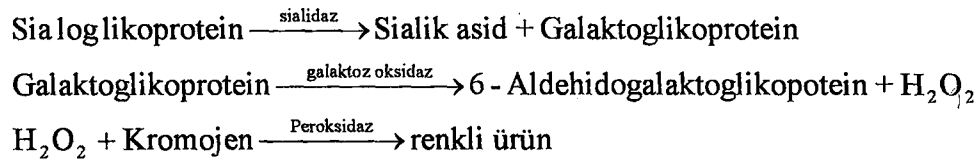
### 5.1.2.1.Farklı Glukoz Konsantrasyonlarında Sialidaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Farklı glukoz konsantrasyonlarının sialidaz aktivitesine etkisini incelemeye 3 ayrı glukoz konsantrasyonları kullanıldı. Bunlar : %200 mg, %400 mg, %800 mg.

Sialidaz aktivitesi Alon ve arkadaşları tarafından geliştirilen yöntemle belirlendi (Alon, Bayer, Wilchek, 1991).

#### 5.1.2.1.1. Prensibi

Sialidaz bir sialoglikoprotein olan fetülden sialik asidi uzaklaştırır. Geriye kalan galaktoglikoproteinden galaktoz oksidaz etkisiyle hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve 6-Aldehidogalaktoz glikoprotein oluşur.  $H_2O_2$  ve kromojen (ABTS), peroksidaz etkisiyle renkli bir ürün oluşturur. Ürünün renk şiddeti sialidaz aktivitesi ile orantılıdır.



### 5.1.2.1.2. Deneyin Yapılışı, Substrat Ve Enzim Solüsyonlarının Hazırlanması

Sialidaz solüsyonu: 0.154 M NaCl ve 9 mM CaCl<sub>2</sub> ilave edilmiş pH'ı 5.5 olan 50 mM'lik sodyum asetat tamponunun 1 mililitresinde 1 ünite sialidaz içerecek şekilde hazırlandı. Enzim aktivitesinin 1 ünitesi; 37°C ve pH 5.5'ta 1 dakikada  $\alpha_1$ -Asid glikoproteinden 1  $\mu$ mol sialik asidi hidroliz etmek için gerekli miktar olarak tanımlanır.

Galaktoz oksidaz solüsyonu: 1 mililitre PBS'de 150 ünite galaktoz oksidaz olacak şekilde hazırlandı.

Substrat solüsyonu: 1 mililitre PBS'de 1-1.5 mg fetuin, 0.15 mg ABTS ve 5 ünite peroksidaz içerecek şekilde hazırlandı.

1. İlk olarak glukozsuz ortamda farklı enzim konsantrasyonlarının aktivitelerinin belirlenerek bir grafik elde edilmesi amacıyla aşağıda belirtilen şekillerde sialidaz ünüteleri hazırlandı.

- a. 0.05 U/L
- b. 0.10 U/L
- c. 0.15 U/L
- d. 0.20 U/L

Bu ünütelerin hazırlanmasında daha önce ifade edilen stok sialidaz solüsyonundan faydalanıldı ve sulandırmalarda pH'ı 5.5 olan 50 mM'lik sodyum asetat tamponu kullanıldı.

Reaksiyon, 100  $\mu$ l numune ve 150  $\mu$ l galaktoz oksidaz solüsyonu içeren tübe 750  $\mu$ l substrat solüsyonu ilavesiyle başlatıldı. Reaksiyonun 15. ve 20. dakikalarında renkli ürünün absorbansı 405 nm'de okundu. Substrat solüsyonu ve distile su içeren bir solüsyon kör olarak kullanıldı.

2.Glukozlu ortamda sialidaz aktivitesini inceleyebilmek amacıyla %200, %400 ve %800 mg'lık glukoz konsantrasyonları olacak şekilde saf glukoz yukarıda ifade edilen enzim ünitelerine ilave edildi ve hemen enzim aktiviteleri tayin edildi.

3.Farklı glukoz konsantrasyonlarının belli bir inkübasyon döneminden sonra sialidaz aktivitesi üzerine etkilerini görebilmek amacı ile yukarıda ifade edilen glukoz konsantrasyonları ve enzim üniteleri 37°C'de etüvde 24 saat bekletildi ve bu süre sonunda enzim aktiviteleri tayin edildi.

Bütün enzim aktivite tayinleri 5 kere yapıldı ve ortalamaları alındı.

## **5. 2.Bulguların İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi**

“Varriance Analyse” metodu ile analiz edildi.



## 6.BULGULAR

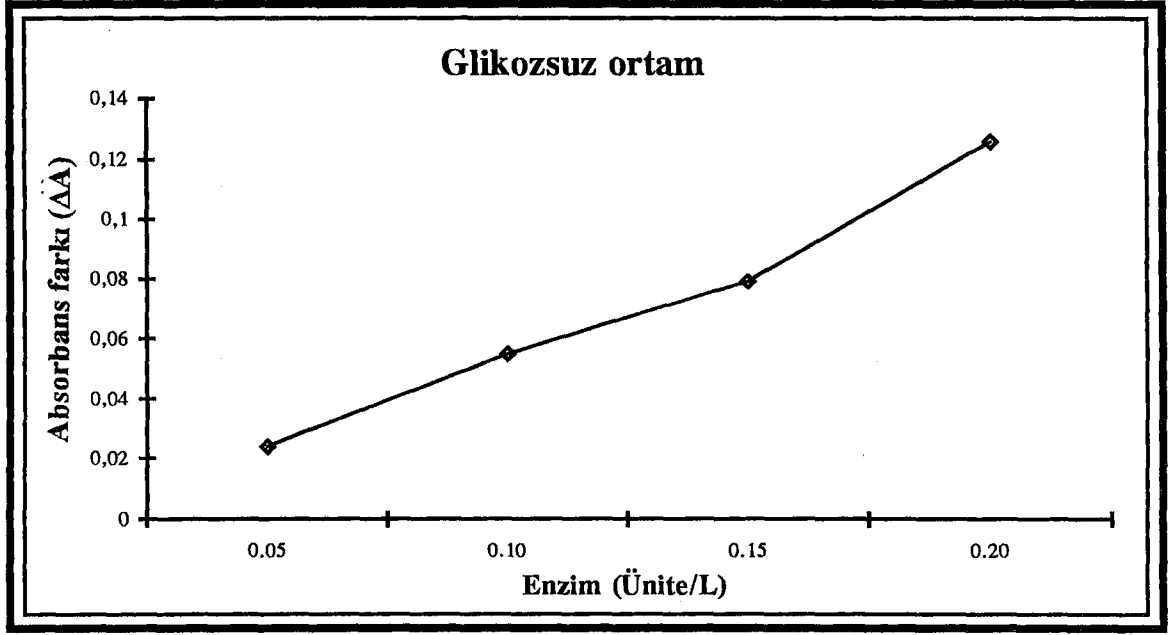
0.05 U/L, 0.10 U/L, 0.15 U/L, 0.20 U/L konsantrasyonlarındaki sialidaz solüsyonlarının glukozsuz, %200, %400 ve % 800 mg glukozlu ortamlarda aktiviteye bağlı olarak belli zaman aralıklarında oluşturduğu  $\Delta A$  değerleri tablo 7.1'de gösterilmiştir.

Tablo 7.1. Sialidaz ünitelerinin 15 ve 20 dakikalar arasında oluşturdukları  $\Delta A$  değerleri

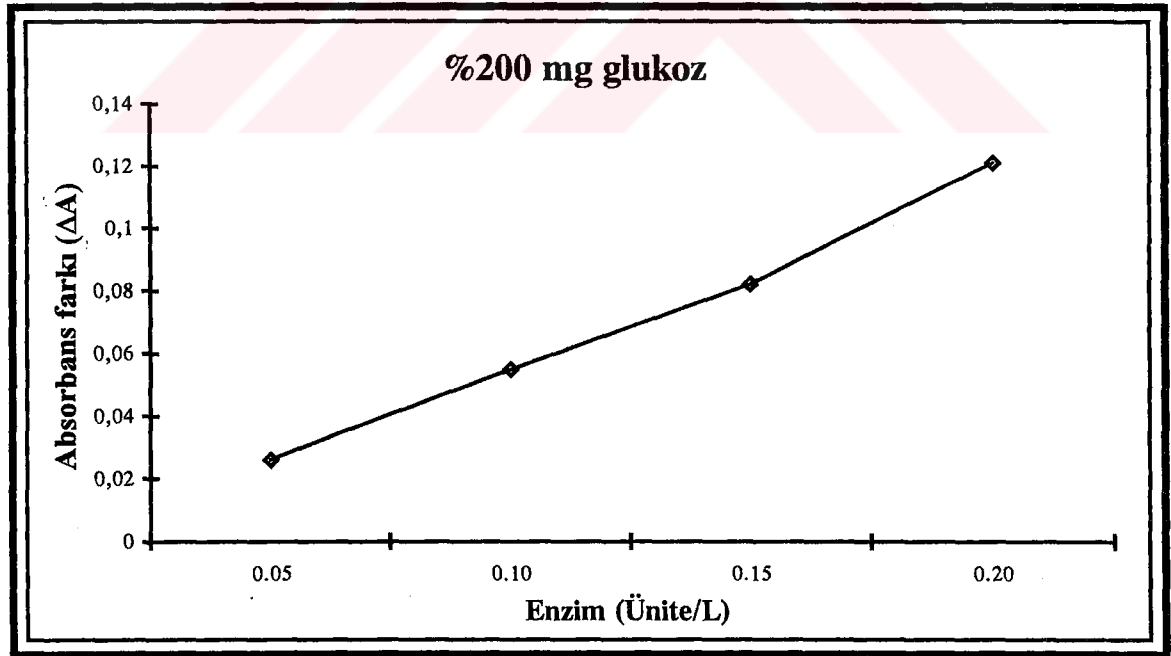
IU	Glukozsuz	%200 mg Glukoz	%400 mg Glukoz	%800 mg Glukoz
0.05	0.024±0.0032	0.026±0.044	0.027±0.0058	0.030±0.0035
0.10	0.055±0.041	0.055±0.0066	0.059±0.0030	0.063±0.0053
0.15	0.079±0.049	0.082±0.0067	0.081±0.0075	0.088±0.009
0.20	0.1257±0.0075	0.121±0.085	0.130±0.0010	0.143±0.012

Tabloda ifade edilen değerlerin grafikleri sırasıyla grafik 7.1.1, grafik 7.1.2., grafik 7.1.3, grafik 7.1.4.'te verilmiştir.

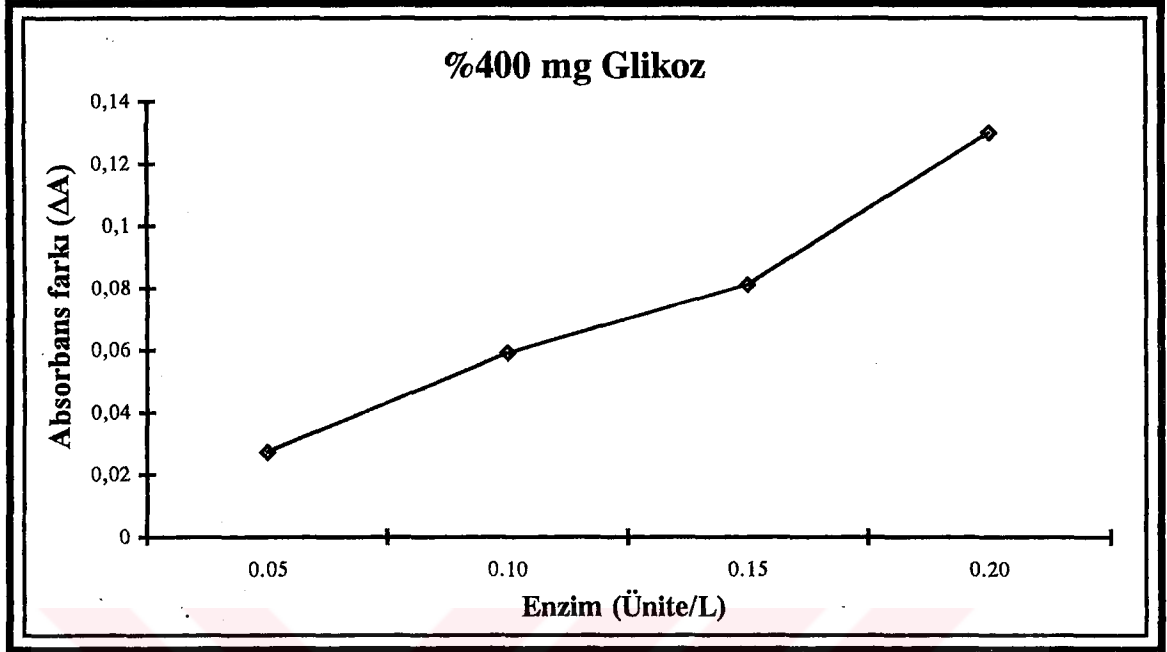
Çalışmamızda en uygun dalga boyunun 405 nm olduğu ve glukozun direkt olarak bu absorbansı etkilemediği görüldü.



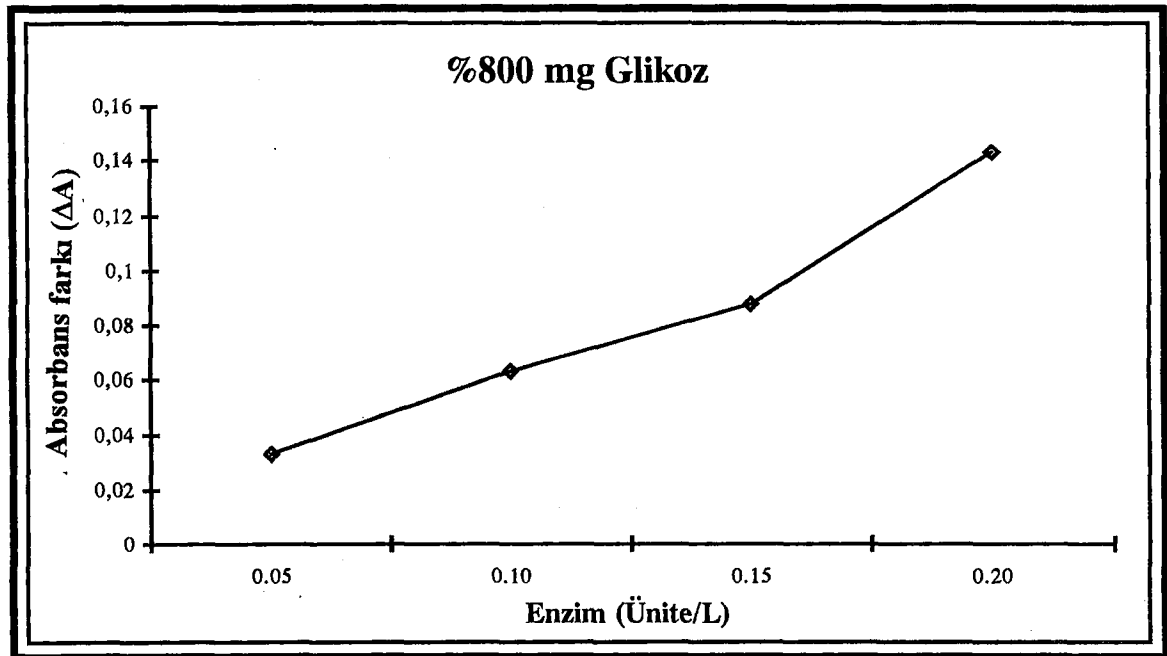
Grafik 7.1.1.



Grafik 7.1.2.



Grafik 7.1.3



Grafik 7.1.4.

Yukarıdaki ifade edilen bulgular istatistiksel açıdan değerlendirildiğinde;

%200 mg ve %400 mg glukoz konsantrasyonlu ortamda hiç bir ünitenin aktivitesinde glukozsuz ortamda elde edilen aktivitelere göre anlamlı bir fark elde edilmemiştir.

%800 mg glukoz konsantrasyonlarında ise 0.05, 0.10 ve 0.15 U/L konsantrasyonlarında glukozsuz ortama göre aktiviteleri arasında anlamlı bir fark yoktur.

0.20 U/L'de anlamlı bir fark görülmüştür.

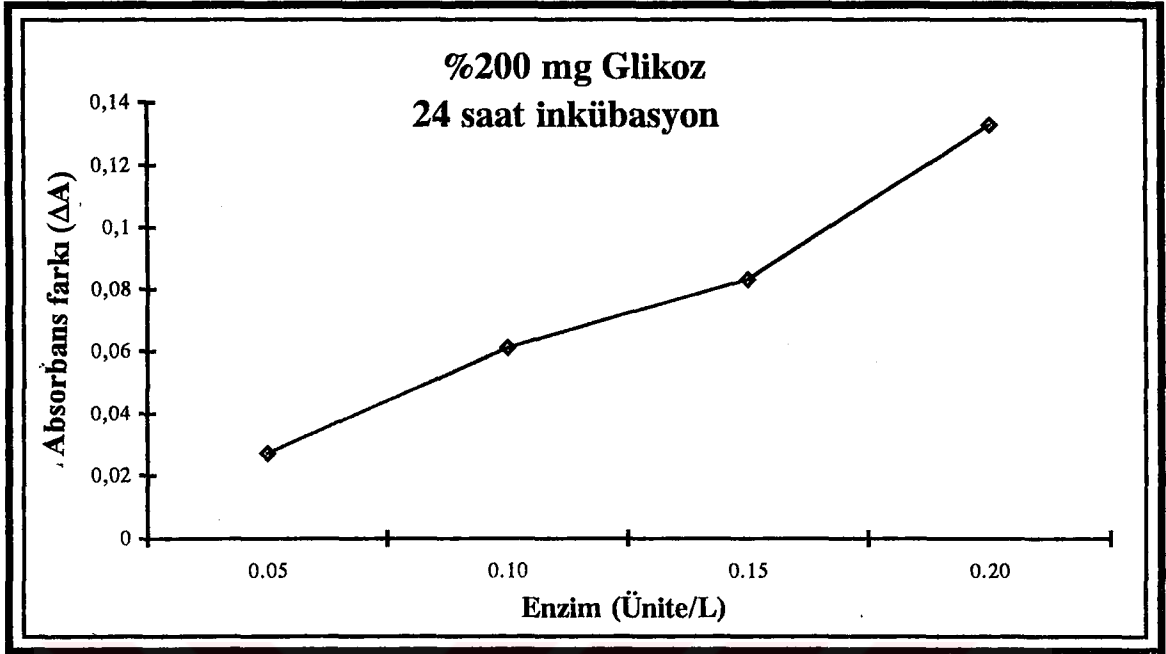
0.05, 0.10, 0.15 ve 0.20 U/L konsantrasyonlarındaki sialidaz solüsyonlarının %200, %400, %800 mg glukozlu ortamda 24 saat 37°C'de inkübasyona bırakılması ile elde edilen aktivite değerleri tablo 7.2.'de gösterilmiştir.

Tablo 7.2, 0.05, 0.10, 0.15 ve 0.20 U/L konsantrasyonlarındaki sialidaz solüsyonlarının belirtilen glukoz konsantrasyonu ile inkübasyon sonucu oluşturdukları  $\Delta A$  değerleri

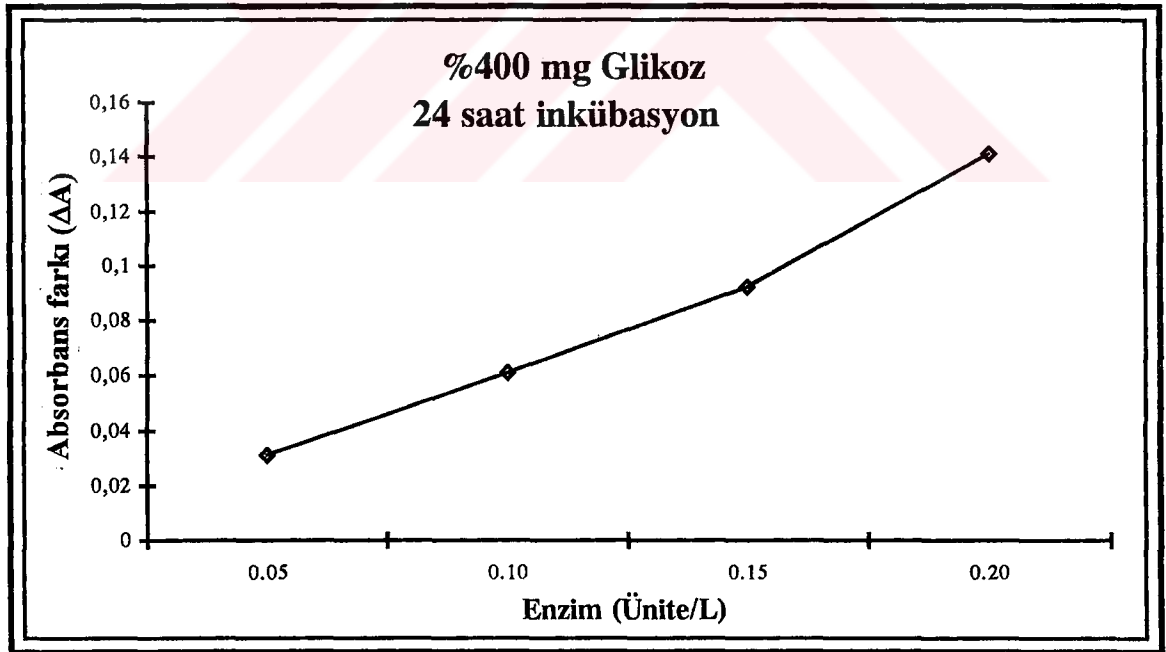
24 saat 37°C de inkübasyon

IU	Glukozsuz	%200 mg Glukoz	%400 mg Glukoz	%800 mg Glukoz
0.05	0.024±0.0032	0.027±0.0021	0.031±0.0035	0.034±0.0043
0.10	0.055±0.041	0.061±0.0044	0.061±0.0036	0.070±0.0053
0.15	0.079±0.049	0.083±0.004	0.092±0.0060	0.092±0.010
0.20	0.1257±0.0075	0.133±0.064	0.141±0.010	0.149±0.0010

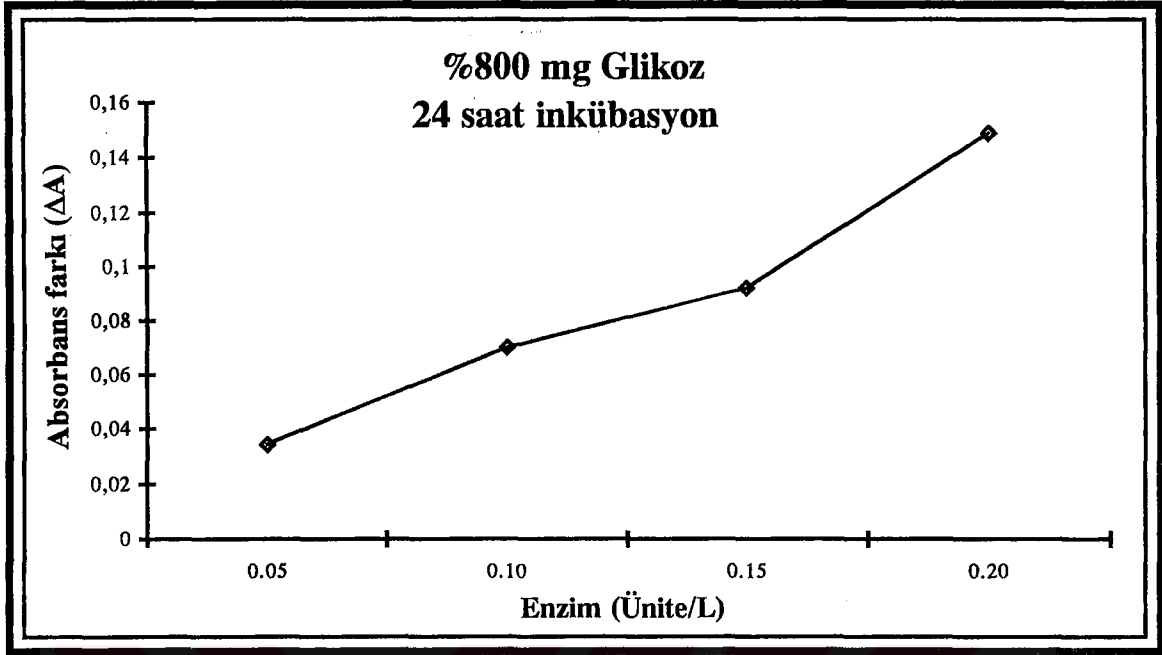
Tablo 7.2.'de ifade edilen değerlerin grafikleri sırasıyla grafik 7.2.1, grafik 7.2.2., grafik 7.2.3.'de verilmiştir.



Grafik 7.2.1.



Grafik 7.2.2.



Grafik 7.2.3.

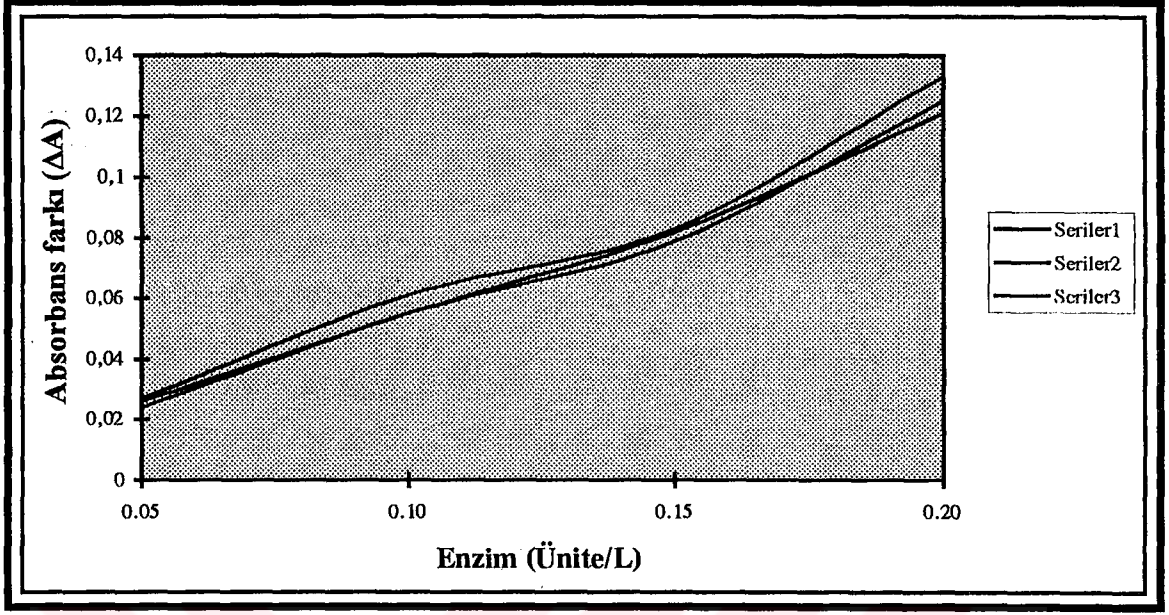
İnkübasyonlu ortamda elde edilen bulgular istatistiksel olarak değerlendirildiğinde;

%200 mg ve %400 mg glukoz konsantrasyonlu ortamda hiç bir ünitenin aktivitesinde glukozsuz ortamdakine göre anlamlı bir fark elde edilmemiştir.

%800 mg glukozlu ortamda 0.05 ve 0.10 ünitelerde glukozsuz ortama göre anlamlı bir fark bulunmazken, 0.15 ve 0.20 ünitelerde anlamlı bir fark elde edilmiştir.

Tablo 7.3.1. 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 U/L konsantrasyonlarındaki sialidaz solüsyonlarının glukozsuz ve %200 mg glukozlu ortamlarda 24 saat 37°C'de inkübasyon öncesi ve sonrasındaki ΔA değerleri

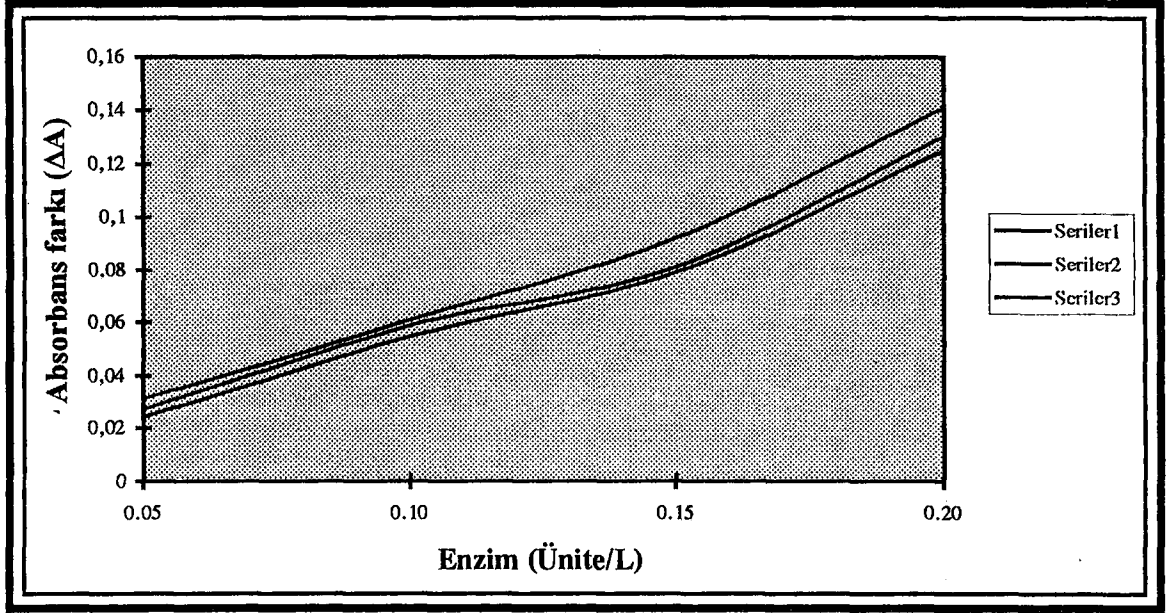
IU	Glukozsuz	%200 mg Glukoz	%200 mg Glukoz, 24 saat, 37°C'de inkübasyon
0.05	0.024	0.026	0.027
0.10	0.055	0.055	0.061
0.15	0.079	0.082	0.083
0.20	0.125	0.121	0.133



Grafik 7.3.1.

Tablo 7.3.2. 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 U/L konsantrasyonlarındaki sialidaz solüsyonlarının glukozsuz ve %400 mg glukozlu ortamlarda 24 saat 37°C'de inkübasyon öncesi ve sonrasındaki  $\Delta A$  değerleri

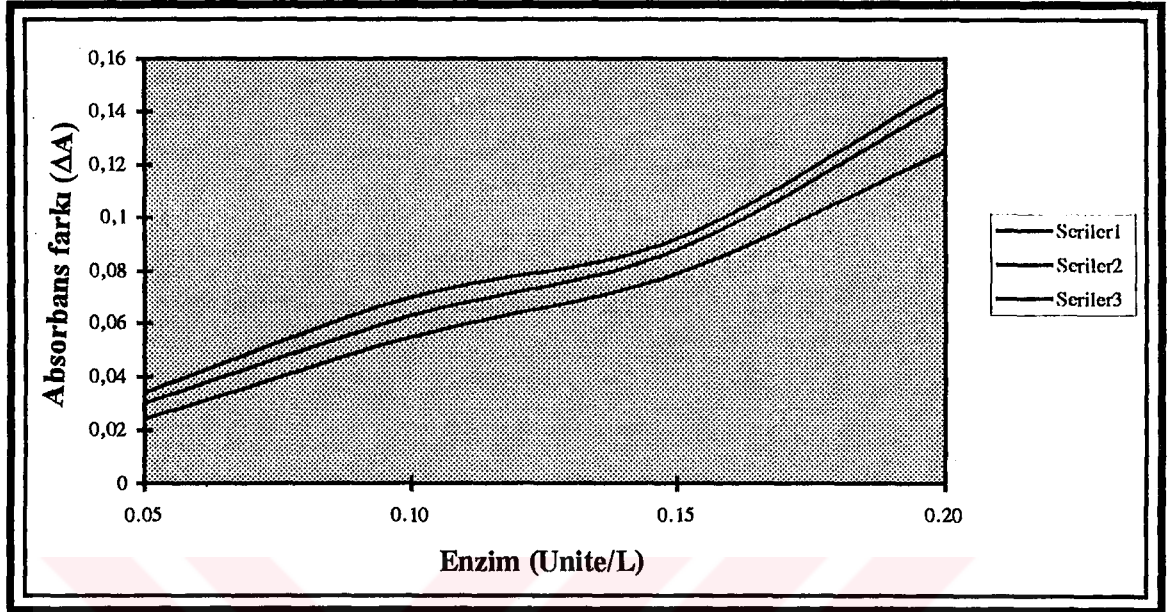
IU	Glukozsuz	%400 mg Glukoz	%400 mg Glukoz, 24 saat, 37°C'de inkübasyon
0.05	0.024	0.027	0.031
0.10	0.055	0.059	0.061
0.15	0.079	0.081	0.092
0.20	0.125	0.13	0.141



Grafik 7.3.2.

Tablo 7.3.3. 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 U/L konsantrasyonlarındaki sialidaz solüsyonlarının glukozsuz ve %800 mg glukozlu ortamlarda 24 saat 37°C'de inkübasyon öncesi ve sonrasındaki ΔA değerleri

IU	Glukozsuz	%800 mg Glukoz	%800 mg Glukoz, 24 saat, 37°C'de inkübasyon
0.05	0.024	0,03	0,034
0.10	0.055	0,063	0,07
0.15	0.079	0,088	0,092
0.20	0.125	0,143	0,149



Grafik 7.3.3.

## 7.TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Sialidaz (N-Asetil nöraminidaz), karbohidratların indirgen olmayan ucundan bir terminal sialik asid kalıntısını uzaklaştıran hidrolitik bir ekzoenzimdir. Organizmanın bir glikoproteininden sialik asid kalıntılarının uzaklaşması bu proteinin çeşitli fizyolojik fonksiyonlarında değişimlere yol açabilmektedir. Bu nedenle moleküllerden sialik asid kalıntılarının uzaklaştırılmasında rol oynayan sialidazın oldukça önemli fonksiyonlara sahip olduğu söylenebilir. Son zamanlarda biyolojik sistemlerde desialilasyon olaylarının önemli rol oynadığı patogenezlere biri de atherosklerozdur. LDL'de meydana gelen desialilasyonun atheroskleroz oluşumunda yer tutan etkenlerden biri olduğu bazı araştırmalarda ifade edilmiştir. Diğer yandan organizmadaki mevcut çok çeşitli enzimlerin aktiviteleri üzerine farklı etkenlerin etki ettiği bilinmektedir. Bu etkenler arasında nonenzimatik glikozillenmenin oldukça önemli bir yeri vardır. Proteinlerin N-terminal amino gruplarına ve lizin aminoasidlerinin  $\Sigma$  amino gruplarına şeker kalıntılarının fosforillenmiş şekillerinin serbest karbonil grupları ile bağlanması olan nonenzimatik glikozillenme bu proteinlerin fizyolojik fonksiyonlarında önemli değişimlere neden olmaktadır.

Organizmada bulunan enzimlerin içinde farklı türdeki birçok proteinin in vivo ve in vitro ortamlarda nonenzimatik glikozillendiği gösterilmiştir.

Nonenzimatik glikozillenme üzerine etki eden faktörlerin en önemlileri ortamın PH<sub>1</sub>, ortamın glukoz konsantrasyonu ve süre olarak gözükmektedir. Ortamın PH<sub>1</sub>'inin 7'nin altında olması nonenzimatik glikozillenmeyi artırıcı bir unsur olarak görülmektedir. Diğer yandan ortamın glukoz konsantrasyonunun artması, sürenin uzaması ile nonenzimatik glikozillenme arasında bir paralellik olduğu gösterilmiştir. İn vitro ortamda glukoz konsantrasyonunun sialidaz akitvitesi üzerine etkilerini inceleme amacıyla yapılan bu çalışmada elde edilen bulgular istatistiksel olarak

değerlendirildiğinde %200 mg ve %400 mg glukoz konsantrasyonlu ortamda hiç bir ünitenin aktivitesinde glukozsuz ortamda elde edilen aktivitelere göre anlamlı bir fark elde edilmemiştir. %800 mg glukoz konsantrasyonunda ise 0.20 U/L konsantrasyonunda anlamlı bir fark görülmüştür. 24 saat inkübasyonlu ortamda yine %200 mg ve %400 mg glukoz konsantrasyonlarında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark yokken, %800 mg glukoz konsantrasyonlarında 0.15 ve 0.20 ünitelerde anlamlı bir fark bulunmuştur. Bu sonuçlar kullanılan en yüksek glukoz konsantrasyonunda gerek hemen gerekse 24 saatlik bir inkübasyonun sonucunda sialidaz aktivitesinde bir değişim meydana gelebileceğini göstermektedir. Yüksek karbohidrat konsantrasyonlarında bazı enzimlerin aktivitelerini inceleyen çalışmalar yapılmıştır. Örneğin, yayınlanmış bir tez çalışmasında yüksek konsantrasyondaki glukozun elastazı aktive ettiğine dair bulgular elde edilmiştir (Sönmez, 1990). Yine Pollak ve arkadaşlarının yaptığı in vitro bir çalışmada (Pollak, Coradello, Leban, Mava, 1983), (Pollak, Schober, Lischka, 1984) yüksek glukoz konsantrasyonunda alkali fosfataz aktivitesinde bir artış olduğu gözlenmiştir. Ancak uzun süreli inkübasyonlarda (48 saat ve yukarısı) aktivitede bir azalma saptanmıştır. Benzer bir sonuç yine alkali fosfatazla yapılan bir tez çalışmasında da (Kal, 1989) elde edilmiştir. Buna karşılık AST aktivitesi üzerine glukoz konsantrasyonlarının etkisini inceleyen bir başka tez çalışmasında ise (Eminsoy (Karaduman), 1989) aktivitede bir azalma saptanmıştır. Yüksek glukoz konsantrasyonlarında sialidaz aktivitesi üzerine bir çalışmada elde edilen bulgular, deneysel diabet modelinde sıçanlarda elde edilen (Sönmez, Süer, Güngör, Kökoğlu, İsbir, 1997) plazma ve sialidaz, karaciğer sialidaz bulguları, diabetik ve nondiabetik kişilerde elde edilen plazma sialidaz düzeyleri yine diabetik kişilerde yapılmış çalışmalarda lökosit sialidaz düzeylerinde bir artış bulguları ile bir paralellik gösterilmektedir. Ortamın yüksek glukoz konsantrasyonunun bazı enzimlerin aktiviteleri üzerine yapmış olduğu bu pozitif yönde etkinin mekanizması

henüz açıklanmış değildir. Belli ortamlarda glukozun bu enzimlerin aktivatörü gibi bir fonksiyon gösterebileceği düşünüleceği gibi glukozun enzim üzerinde spesifik bazı bölgelere bağlanması enzimin katalitik bölgesinin daha fonksiyonel bir çalışmaya yol açmasına neden olabilir.



**KAYNAKLAR**

- Alon, R., Bayer, E.A., Wilchek, M., 1991. "A coupled enzyme assay for measurement of sialidase activity.", *J. Biochem. Biophys. Methods*, 22: 23-33
- Banga, T., Balo, J., Horvath, M., 1959. "Nephelometric determination of elastase activity and method for elastoproteolytic measurements." *Biochem. J.*,71: 544-551
- Brownlee, M., Vlassara, H., Cerami, A., 1983. "Nonenzymatic reduces the susceptibility of fibrin to defredation by plasmin", *Diabetes*, 32:630-634
- Brownlee, M., Vlassara, H., Cerami, A., 1984. "Nonenzymatic glycosylation on the pathogenesis of diabetic complications". *Ann.Intern. Med*, 101: 527-537
- Brownlee, M., Cerami, A., Vlassera, H., 1988. " Advanced glycosylation and product in tissue and the biochemical basis of diabetic complications". *N.Eng. J.Med.*, 318 (20): 1315-1321
- Bunn, H.F., Higgins, P.J., 1981. "Reactions of monosaccarides with proteins. Possible evolutionary significance" *Science*, 213: 222-224
- Candan, G., 1988. "Proteinlerin nonenzimatik glikozillenmeleri" Editör: Hatemi H., *Diabetes Mellitus*, 117-125
- Coradello, H., Lubec, G., Pollah, A., Sternberg, M., 1982." Enzyme activities of native non-enzymatically glycosylated tripsin, chymotripsin and papain." *Pediatr. Patol.*, 17: 457-464
- Cummings, R.D., Kornfeld, S., Schneider, W.J., Hobgood, K.R, Tolleshaug H., Brown M.S., Goldstein, J.L., 1983. "Biosynthesis of N-and O-linked oligosaccharides of the low density lipoprotein receptor." *J.Biol. Chem.*, 258-15261-73

- Danon, D., Skutelsky, E., 1976. "Endothelial surface change and its possible relationship to thrombogenesis" *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 275: 47-63
- Eble A.S., Thorpe S.R., Bagnes J.W.: 1983, "Nonenzymatic glycosylation and glucose dependent cross-linking of protein." *J.Biol. Chem.*, 258: 94106-94112
- Eminsoy (Karaduman), G., 1989. "Aspartat aminotransferaz aktivitesi üzerine glukozun etkisi."
- Firat, P.A., 1982. "Nonenzymatic browning-products.: physiologic effects and metabolic transit in relations to chemical structure a review". *Diabetes*, 31: 22-28
- Fiorilli, A., Venerando, B., Siniscalco, C. Monti, E., Bresciani R., Caimi, L., Pretii A., Tettamanti, G., 1989. "Occurence in brain lysosomes of a sialidase active on ganglioside." *J.Neurochem*, 53, 672-80
- Garlich, R.C., Muzer, J.S., 1983. "The principal site of nonenzymatic glycosylation of human serum albumin in vivo". *J.Biol. Chem.*, 258-6142-6146
- Garlich, R.C., Muzer, J.S., Higgins, P.J., Bunn, H.F., 1983. "Characterization of glycosylated hemoglobins: relevance to monitoring of diabetic control and analysis of other proteins." *J.Clin. Invest.*, 71: 1062-1072
- Gonen, B., Baenziger, J., Schoufeld, G., Jacobsen, D., Farrar, P., 1981. "Nonenzymatic glycosylation of low density lipoproteins in vitro effects on cell-interactive properties" *Diabetes.*, 30: 875-878
- Gottschalk, A, Bhargava, A.S., 1971."Neuraminidases. " In: *The Enzymes*, Paul D, Bayer, volume 5, 3<sup>rd</sup> ed. Academic Press, NewYork and London, 321: 42
- Kal, S., 1989. "Alkalifosfataz aktivitesi üzerine glukozun etkisi."
- Kennedy, L, Ragnes, W., 1984. "Nonenzymatic glycosylation and the chronic complications of diabetes." An overview. *Diabetologia*, 26: 93-98

- Kirschenbaum, D.M., 1984. "Glycosylation of proteins: Its implications in diabetic control and complications" *Ped. Clin. North. Am.*, 31 (3): 611-621
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M.: 1993. "The oligosaccharides of glycoproteins have biological functions." In: *Principles of Biochemistry*. 2<sup>nd</sup> ed. Worth Publishers, New York, USA, 316-8
- Libby, P., 1987. "The active roles of cells of the blood vessel wall in health and disease." *Mol. Aspects. Med.*, 9: 499-567
- Mathews, C.K, vanHolde, K.E., 1990. "Biosynthesis of aminosugars." In: *Biochemistry*. 2<sup>nd</sup> ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Redwood City. Canada, 557-8
- Means, G.E, Chang, M.K., 1982. "Nonenzymatic glycosylation of proteins. Glycosylation and function changes." *Diabetes*, 31: 1-4
- Miyagi, T., Tsuiki, S., 1985. "Purification and characterization of cytosolic sialidase from rat liver". *J.Biol. Chem.*, 260: 6710-6
- Miyagi, T., Sagawa, J., Konno, K., Handa, S., Tsuiki, S., 1990. "Biochemical and immunological studies on two distinct ganglioside-hydrolyzing sialidases from the particulate fraction of rat brain." *J.Biochem.*, 107: 787-93
- Mukhin, D.N., Tertov, U.V, Kacharava, A.G, Orekhov, A.N., 1990. "Desialylated low density lipoproteins atherogenic lipoproteins occurring in blood of patients with coronary atherosclerosis". *Biull. Eksp. Biol. Med.*, 110 (8): 138-40
- Oimomi, M., Nakamichi, T., Ohan, T., Sakai, M., Igaki, N., Hata, F., Baba, S., 1989. "Fructose related glycation." *Diabetes Research and Clinical practise*, 7: 137-139

- Orekhov, A.N, Tertov, V.V, Pokrovsky, S.N., Adamova, I.Y., Martsenyuk, O.N, Lyakishev, A.A., Smirnov, V.N.,1988. “ Blood serum atherogenicity associated with coronary atherosclerosis. Evidence for non-lipid factor providing atherogenicity of low-density lipoproteins an approach to its elimination.” *Circ. Res.*, 62:421-91
- Orekhov, A.N., Tertov, V.V., Mukhin, D.N., Mikhailenko, I.A., 1989. “Modification of low density lipoprotein by desialylation causes lipid accumulation in cultured cells. Discovery of desialylated lipoprotein with altered cellular metabolism in the blood of atherosclerotic patients”. *Biochem.Biophys. Res. Commun.*, 162: 206-11
- Orekhov, A.N, Tertov, V.V., Kudryashov, S.D, and Smirnov U.N., 1990. “Triggerlike stimulation of cholesterol accumulation and DNA and extracellular matrix synthesis induced by atherogenic serum or low density lipoprotein in cultured cells.” *Circ. Res.*, 66:311
- Orekhov, A.N., Tertov, V.V, Mukhin, D.N., 1991. “Desialylated low density lipoprotein- naturally occurring modified lipoprotein with atherogenic potency”. *Atherosclerosis*, 86: 153-161
- Peratz, M.F., 1979. “Regulation of oxygen affinity of hemoglobin.” *Annv. Rev.Biochem.*, 48: 327-386
- Pollak, A., Coradello, H., Leban, J, Mava, E., 1983. “Inhibition of alkaline phosphatase activity by glucose.” *Clin. Chim. Acta.*, 133:15-24
- Pollak, A, Schober, H, Lischka, A., 1984. “Influence of glucose fluctuations on alkaline phosphatase activity.” *Acta. diabettolat.*, 21: 123-131
- Rawn, J.D., 1989. “Biochemistry.” Neil Petterson Publishers, burlington, North Carolina, 878-887

- Saito, M., Sato-Bigbee, C., Yu, R.K., 1992. "Neuraminidase activities in oligodendroglial cells of the rat brain." *J. Neurochem.*, 58: 78-82
- Schauer, R., 1982. "Chemistry, metabolism and biological functions of sialic acids." *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 40: 131-239
- Schengrund, C.L., Rosenberg, A., 1970. "Intracellular location and properties of bovine sialidase." *J. Biol. Chem.*, 245:6196-200
- Silverstein, S.C., Steinman, R.M., Cohnz, A., 1977. "Endocytosis" *Annu. Rev. Biochem.*, 46: 669-722
- Smith, E.L., Hill R.L., Lehman, I.R., Lefkowitz, R.J., Handler, P., White, A., 1983. "Amino sugars." In: *Principles of Biochemistry. General Aspects.* 7<sup>th</sup> edition. Kosaido Printing Co.Ltd. Tokyo, Japan 3: 94-5
- Sobenin, I.A., Tertov, V.V., Koschinsky, T., Bunting, C.E., Slavina, E.S., Dedov I.I., Orekhov, A.N., 1993. "Modified low density lipoprotein from diabetic patients causes cholesterol accumulation in human intimal aortic cells." *Atherosclerosis*, 100 (1): 41-54
- Sönmez, H., 1990. "Çözünür elastin türevinin in vitro nonenzimatik glikozillenme özelliği".
- Sönmez, H., Süer, S., Güngör, Z., Kökoğlu E., Esbir, T., 1997. "Sialidase activities and sialic acid levels of the liver and serum from the streptozotocin induced diabetic rats." *Diabetes Research* (In press).
- Sprague, E.A., Moser, M., Edwards E.H., Schwartz, C.J., 1988." Stimulation of receptor-mediated low density lipoprotein endocytosis in neuraminidase-treated cultured bovine aortic endothelial cells". *J. Cell-Physiol.*, 137: 251-62

- Stevens, V.J., Rovzer, L.A, Monnier, V.M, Cerami, A., 1978. "Diabetic cataract formation: potential role of glycosylation of lens crystallins." *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 75: 2918-2922
- Süer, S.,1995. "Diabetic ve non-diabetik atheroskleroz patojenezinde lipoprotein desialilasyonu ve sialidaz aktivitesi".
- Tertov, V.V, Orekhov, A.N, Martsenyuk, O.N, Perova, N.V, Smirnov, V.N., 1989. "Low density lipoproteins isolated from the blood of patients with coronary heart disease induce the accumulation of lipids in human aortic cells." *Exp.Mol. Pathol.*, 50:337-47
- Tertov, V.V, Sobenin, I.A, Gabbasov, Z.A, Popov, E.G, Orekhov, A.N., 1989. "Lipoprotein aggregation as an essential condition of intracellular lipid accumulation caused by modified low density lipoproteins." *Biochem. Biophys. Res.Comm.*, 163: 489, 1989
- Tertov, V.V, Sobenin, I.A., Tonevitsky, A,G, Orekhov, A.N, Smirnov, V.N., 1990. "Isolation of atherogenic modified (desialylated) low density lipoprotein from blood of atherosclerotic patients: separation from native lipoprotein by affinity chromatography". *Biochem. Biophys. Res.Comm.*, 167 (3):1122-7
- Tertov, V.V,Sobenin, I.A, Gevara, K.H, Morrisett, D.D, Orekhov, A.N., 1992. "Carbohydrate composition of native and desialylated low density lipoproteins in the plasma of patients with coronary atherosclerosis." *Kardiologia*,32 (9-10): 57-61
- Tertov, V.V, Sobenin, I.A, Gabbasov, Z.A, Popov, E.G, Jaakkola, O, Salakivi, T, Nikkari, T, Smirnov V.N, Orekhov A.N.: 1992, "Multiple modified desialylated low density lipoproteins that cause intracellular lipid accumulation. Isolation, fractionation and characterization". *Lab. Invest.*, 67 (5): 665-75

- Tertov, V.V., Sobenin, I.A., Orekhov, A.N., 1992. "Characterization of desialylated low-density lipoproteins which cause intracellular lipid accumulation", *int. J. Tiss, Reac*, 14, 155-162
- Tertov, V.V., Sobenin, I.A., Gabbasov, Z.A., Popov, E.G., Yaroslavov, A.A., Jauhiainen, M., Ehnholm, C., Smirnov, V.N., Orekhov, A.N., 1992. "Three types of naturally occurring modified lipoproteins induce intracellular lipid accumulation in human aortic intimal cells the role of lipoprotein aggregation." *Eur.J.Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 30: 171-8
- Venerando, B., Tettamanti, G., Cestaro, B., Zambotti, V., 1975. "Studies on brain cytosol neuraminidas. Isolation and partial characterization of two forms of the enzyme from pig brain." *Biochim. Biophys. Acta.*, 403: 461-472
- Williams, S.K., Devenny, J.J., Bitensky, M.W., 1981. "Micropinocytic ingestion of glycosylated albumin by in isolated microvessels: Possible role in pathogenesis of diabetic microangiopathy." *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 78: 2393-2397
- Witztum, J.C., Mahoney, E.M., Branks, M.J., 1982. "Nonenzymatic glycosylation of low density lipoprotein alters biologic activity." *Diabetes*, 31: 283-291
- Witztum, J.L., Steinbrecher, U.P., Fisher, M., Kseaniemi, A., 1983. "Nonenzymatic glycosylation of homologous low density lipoprotein and albumin renders them immunogenic in the guinea pig." *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 80: 2757-2761
- Yohe, H.C., Jacobson, R.I., Yu, R.K., 1983. "Ganglioside-basic protein interaction: protection of gangliosides against neuraminidase action." *J.Neurosci.Res.* 9:401-12

## ÖZGEÇMİŞ

Doğum tarihi :21 Şubat 1968

Doğum yeri :İstanbul

Üniversite : 1985-1990 Yıldız Teknik Üniversitesi

Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü

Yüksek Lisans : 1994- Yıldız Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı

Organik Kimya Programı