

PAPER DETAILS

TITLE: Ketoprofenin 6-Fosfoglukonat Dehidrogenaz Aktivitesi Üzerine In Vitro ve In Vivo Etkisinin Arastirilmesi

AUTHORS: Fatma GÜR,Sükrü BEYDEMİR,Kenan GÜMÜSTEKİN,Nuri BAKAN

PAGES: 0-0

ORIGINAL PDF URL: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/34031>



Ketoprofenin 6-Fosfoglukonat Dehidrogenaz Aktivitesi Üzerine *In Vitro* ve *In Vivo* Etkisinin Araştırılması*

Fatma GÜR^{1✉}, Şükrü BEYDEMİR², Kenan GÜMÜŞTEKİN³, Nuri BAKAN⁴

1. Atatürk Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Erzurum, TÜRKİYE.
2. Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Anabilim Dalı, Erzurum, TÜRKİYE.
3. Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Bolu, TÜRKİYE.
4. Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Erzurum, TÜRKİYE.

Özet: Bu çalışmada 6-fosfoglukonat dehidrogenaz (E.C.1.1.1.44;6PGD) enzimi insan eritrositlerinden saflaştırıldı. Saflaştırma işlemi hemolizatin hazırlanması, amonyum sülfat çöktürmesi ve 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi yöntemi ile gerçekleştirildi. Enzimin saflık derecesi SDS-PAGE elektroforez yöntemi ile belirlendi. Enzim üzerine ketoprofenin *in vitro* ve *in vivo* etkisi araştırıldı. Tüm saflaştırma işlemleri sonunda insan eritrosit 6PGD enzimi 742 kat saflaştırıldı. Eritrosit 6PGD enzimi %50 verimle, spesifik aktivite 0.46 U/mg olarak elde edildi. Enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak 340 nm'de Beutler metoduna göre ölçüldü. Çalışmada kullanılan ketoprofen ilacının *in vitro* şartlarda enzim aktivitesini inhibe ettiği gözlemlendi. *In vitro* inhibe eden bu ilaca ait IC_{50} değeri düşük olarak belirlendi. Daha sonra ketoprofenin *in vivo* inhibisyon etkisini belirlemek amacıyla Yeni Zelanda albino türü tavşanlar ile çalışmalar yapıldı. İlacın 6PGD enzim aktivitesi üzerine *in vivo* etkisi incelendiğinde I. saatte ($P<0.01$) ve III. saatte ($P<0.01$) ketoprofen ilacının enzim aktivitesini istatistiksel olarak önemli derecede inhibe ettiği gözlemlendi.

Anahtar kelimeler: 6 fosfoglukonat dehidrogenaz, Eritrosit, ilaç, inhibisyon.

In Vitro and *In Vivo* Effect of Ketoprofen on 6-Phosphogluconate Dehydrogenase Enzyme Activity

Abstract: In this study, 6-phosphogluconate dehydrogenase (E.C.1.1.1.44; 6PGD) was purified in human erythrocytes. This process was carried out by the preparation of hemolysate, precipitation by $(NH_4)_2SO_4$ and 2',5'-ADP Sepharose 4B affinity chromatography. The degree of purity of the enzyme was determined with SDS-PAGE electrophoresis. The effect of ketoprofen on the enzyme was investigated *in vitro* and *in vivo*. Human erythrocyte 6PGD was purified in 742-fold at the end of all purification processes. The recovery of 6PGD was 50%, and its specific activity was 0.46U/mg in erythrocytes. Enzyme activity was spectrophotometrically measured using the Beutler method at 340 nm. Ketoprofen inhibited the enzyme activity in *in vitro* conditions. IC_{50} value of the drug inhibition *in vitro* was determined. For the drug having low IC_{50} value (drug concentrations which produce 50% inhibition) (ketoprofen), *in vivo* studies were performed in New Zealand albino rabbits. In the evaluation of the *in vivo* effect of drug on 6PGD activity, it was observed that ketoprofen given at the first ($P<0.01$) and third hour ($P<0.01$), significantly inhibited the 6PGD activity.

Key words: 6-phosphogluconate dehydrogenase, Drug, Erythrocyte, Inhibition.

✉ Fatma GÜR

Atatürk Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Erzurum, TÜRKİYE
e-posta: fatma.gur@atauni.edu.tr

*Bu çalışma, Fatma Gür'ün "İnsan Eritrosit 6-fosfoglukonat Dehidrogenaz Enziminin Saflaştırılması, Bazı İlaçların Enzim Aktivitesi Üzerine *In Vitro* ve Tavşanlarda *In Vivo* Etkisinin İncelenmesi" başlıklı doktora tezinin bir kısmından özetlenmiştir.

GİRİŞ

Tedavide ağrı kontrol yöntemlerinin başında analjezik grubu ilaçlar gelmektedir. Analjezikler toplumda antibiyotiklerle birlikte en sık kullanılan ilaçların başında gelmektedir. Yaygın kullanılan analjeziklerden olan ketoprofen, akut ve kronik ağrı sendromlarında ağrının kontrolünü sağlama amacıyla tercih edilmektedir (Williams ve Upton, 1998).

Ketoprofen; antienflamatuvar, analjezik, antipiretik etkili bir ilaçtır. Gastrointestinal sistemde bozukluk gibi yan etkisinin yanı sıra santral sinir sistemini (SSS) deprese eder, aynı zamanda laterji ve unutkanlık yapabilmektedir (Beutler, 1971).

Canlı sistemlerde enzim aktiviteleri bazı kimyasallar, oksidatif stres, genetik hastalıklar, çevresel şartlar gibi çeşitli durumlarda belirli varyasyonlar gösterir. Enzim aktivite değişiklikleri ile ilgili bir çok literatür mevcuttur. Bunların birçoğunun insan ve hayvan doku enzim aktivitelerini azalttığı veya yükselttiği gösterilmiştir (Beydemir ve ark., 2000). Bunlara ilaveten 6PGD enzim aktivitesi üzerine bazı anti-kanser ilaçlarının *in vitro* ve *in vivo* etkileri laboratuvarımızda çalışılarak söz konusu ilaçların inhibisyon etkisi gösterilmiştir (Özabacıgil ve ark., 2008).

6PGD pentoz fosfat metabolik yolunun ikinci oksidatif basamağını katalizleyen önemli bir enzimdir. 6PGD eksikliği yaygın olarak görülen bir hastalık olmamakla birlikte enzim eksikliğinde görülen ağır hemolitik vakalar seyrekte olsa rapor edilmiştir (Walzem ve ark., 1991). 6 fosfoglukonat, fosfoglukoz izomerazın bir inhibitörüdür ve hücrede birikimi, glikoliz yolunu inhibe eder (Barrett, 1997).

6PGD redüktif biyosentezlere NADPH, nükleotit sentezine riboz 5-fosfat sağlaması bakımından birçok organizma için son derece önemlidir (Tandoğan ve Ulu, 2003). 6PGD eksikliğinde hemolitik anemi oluşur (Caprari ve ark., 2001). Bütün bunlardan dolayı 6PGD canlı organizmalar için hayati öneme sahiptir.

Bu çalışmada *in vitro* ve *in vivo* olarak ketoprofenin insan eritrosit enzimi 6PGD üzerine *in*

vitro, tavşan eritrosit 6PGD enzimi üzerine de *in vivo* etkisi araştırıldı. Ketoprofen için K_i değerleri ve inhibisyon tipi Lineweaver-Burk grafikleri ile belirlendi.

MATERYAL ve METOT

Kimyasal ve reaktifler; ketoprofen Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi-Erzurum'dan temin edildi. 2',5'-ADP Sepharose 4B Pharmacia'dan satın alındı. NADP⁺, 6-fosfoglukonat, protein ölçüm reaktifleri Sigma'dan temin edildi. Diğer kimyasallar Sigma ve Merck firmalarından temin edildi. *In vivo* çalışmalarda kullanılan Yeni Zelanda albino tipi tavşanlar Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarından temin edildi.

Hemolizat Hazırlanması ve Hemoglobin Tayini

Sağlıklı bireylerden alınan taze kan örnekleri EDTA'lı tüplere konuldu. 15 dakika 2500xg'de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra tüplerin üst kısmındaki plazma ve lökosit tabakaları dikkatli bir şekilde ayrılıp atıldı. Altta kalan eritrositler 0.15 M'lık KCl ile 3 defa yıkandı. Her defasında 2500xg'de santrifüj edilerek süpernatant kısımları uzaklaştırıldı. Altta kalan eritrositler hacimlerinin beş misli 0°C'deki distile su ile hemoliz edildi. Bundan sonra hücre zarlarını uzaklaştırmak için +4°C'de 10.000xg'de yarım saat süreyle santrifüj edildi. Hücre zarları atılıp üstteki süpernatant kısmı hemolizat eldesi olarak dikkatli bir şekilde alındı. Böylece hemolizat hazırlanmış oldu. Hemolizatta hemoglobin (Hb) tayini siyanomethemoglobin metoduna göre ölçüldü (Beutler, 1971; Shreve ve Levy, 1977; Ninfali ve ark., 1990; Özabacıgil, 2005). Tüm çalışmalar +4°C'de gerçekleştirildi.

Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Diyaliz

Proteinler çok değerlikli elektrolitler olduklarından iyonlara benzer şekilde hareket ederler. Yüksek tuz konsantrasyonlarında, protein

moleküllerini çevreleyen ve çözünür halde tutan su molekülleri, tuzdaki iyonlar tarafından çekilir ve proteinler çöker. Bu çökmede molekül ağırlığı ve iyonik şiddet etkilidir. Dolayısıyla değişik tuz konsantrasyonlarında değişik proteinler çökmektedir. Amonyum sülfat çöktürmesi deneyleri proteinlerin bu özelliklerinden faydalanılarak yapıldı (Lehninger, 1993; Keha ve Küfrevioğlu, 2004; Özabacıgil, 2005). Önceden elde edilen hemolizatta enzimin % 35-65 aralığındaki amonyum sülfat çöktürmesi sonucu oluşan çökeltide olduğu daha önceki çalışmamızda gösterildiğinden yine bu aralıkta katı amonyum sülfatla çöktürme işlemi yapıldı. Amonyum sülfat çöktürmesi sırasında hemolizata katı $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ yavaş yavaş katıldı ($+4^\circ\text{C}$ 'de). Her defasında daha önce katılan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 'ın çözünmüş olmasına dikkat edildi. Bu işlem bir saat kadar sürdü. Amonyum sülfatın hemolizatta çözünme işlemi magnetik karıştırıcı ile yapıldı. Çözünme işlemi tamamlandıktan sonra hemolizat 5.000 xg'de 15 dakika santrifüj edildi. Elde edilen çökeltiler yeteri kadar 50 mM fosfat tamponunda (pH=7) çözüldü. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen karışım diyaliz torbasına yerleştirildi. Enzimin içinde bulunduğu karışım, 50 mM KCH_3COO /50 mM K_3PO_4 (pH=7) tamponuna karşı 2 saat boyunca 2 defa tampon yenilenip değiştirilerek diyaliz edildi (Ninfali ve ark., 1990; Özabacıgil, 2005). Diyaliz işlemi $+4^\circ\text{C}$ 'de buzdolabı içinde manyetik karıştırıcı üzerinde yapıldı. Diyaliz işleminden sonra hazırlanan diyalizatta aktivite ve protein tayini yapıldı (Segel, 1968; Beutler, 1971; Özabacıgil, 2005).

Enzim Aktivite Ölçümü

6PGD enzim aktivitesinin ölçüm prensibi reaksiyon ürünü olan NADPH'nin 340 nm'de absorpsiyon artışının ölçülmesi ile rutin olarak ifade edilmektedir (Beutler, 1971; Özabacıgil, 2005).

2',5'-ADP Sepharose 4B Afinit Kolonunun Hazırlanması

Afinite kolonu Beydemir ve ark.'nın çalışmalarına

göre hazırlandı (Beydemir ve ark., 2004; Özabacıgil, 2005). Amonyum sülfat çöktürmesinden elde edilen diyalize numune 2',5'-ADP Sepharose 4B afinit kolonuna tatbik edildi. Daha sonra kolona yıkama tamponu tatbik edildi. pH=7.85'deki EDTA'lı elüsyon tamponu ile kolondan elüatlar alındı. Aktivite gösteren fraksiyonlar birleştirildi. Tüm bu çalışmalar $+4^\circ\text{C}$ 'de yapıldı.

Protein Ölçümü

Saflaştırma basamakları boyunca protein miktarları spektrofotometrik olarak Bradford metoduna göre belirlendi. Bu yöntem, proteine Coomassie Blue G-250'nin bağlanması esasına dayanmaktadır (Bradford, 1976; Özabacıgil, 2005).

SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Enzimin saflığının kontrolü Laemmli tarafından geliştirilen %3-8 kesikli sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi yöntemine göre yapıldı (Laemmli, 1970; Özabacıgil, 2005).

In Vitro İlaç Çalışmaları

İnsan eritrosit 6 fosfoglukonat dehidrogenaz enzimi üzerine ketoprofenin etkisini göstermek için saf enzim içeren tüpte kontrol olarak % Aktivite hesaplandı. Daha sonra 6 farklı konsantrasyonda hazırlanan ilaç çözeltileri saf enzim içeren tüpe ilave edildi. Bu ilaçların % Aktivite-[I] grafiği çizildi. Grafikteki eğrinin denkleminde IC_{50} değeri hesaplandı.

In Vivo İlaç Çalışmaları

Bu çalışmada ağırlıkları 1200-1500 gr arasında değişen 20 adet Yeni Zelanda albino türü tavşan kullanıldı. Kontrol ve ilaç için oluşturulan gruplarda 10 tane denek kullanıldı. Hayvanlara uygulanması gereken tedavi ilaç dozları belirlendi. Hayvanlara uygulanması gereken teröpatik ilaç dozları mg/kg olacak şekilde hesaplandı. Bu amaçla ketoprofen 2-5 mg/kg (Mulcahy ve ark., 2003) olacak şekilde

hayvanlara i.p. olarak uygulandı. 1.,3. ve 5.'inci saatlerde alınan kan örneklerinde (Akyuz ve ark., 2004) 6PGD aktivitesi spektrofotometrik olarak tespit edildi (Beutler, 1971). Hemolizatta hemoglobin tayini siyanomethemoglobin yöntemiyle bakıldı (Beutler, 1971; Shreve, 1977; Ninfali, 1990). *In vivo* çalışma sonuçları EU/gHb olarak hesaplandı.

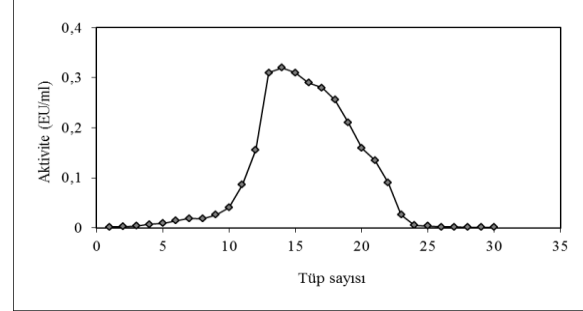
İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz için paired t testi kullanıldı. Sonuçlar $\pm$ SD olarak verildi ve $P < 0.05$ anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

İnsan eritrosit 6-Fosfoglukonat dehidrogenaz enzimi saflaştırma çalışmasında ilk olarak *in vitro* incelemelerde kullanılmak üzere hemolizat hazırlandı. Hemolizatta 6PGD aktivitesi tayini yapıldı. Enzimi saf elde edebilmek için %35-65 amonyum sülfat çöktürmesi ve 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite jel kromatografisi teknikleri kullanıldı. Enzim 742 kat

saflaştırıldı. Spesifik aktivite 0,46 U/mg olarak bulundu ve enzim % 50 saflaştırıldı. Sonuçlar Şekil 1'de gösterildi.



Şekil 1. İnsan eritrosit 6PGD enziminin 2',5'- ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırılması grafiği.

Figure 1. Purification graph of human erythrocytes 6PGD by method of 2', 5'-ADP Sepharose 4B affinity chromatography.

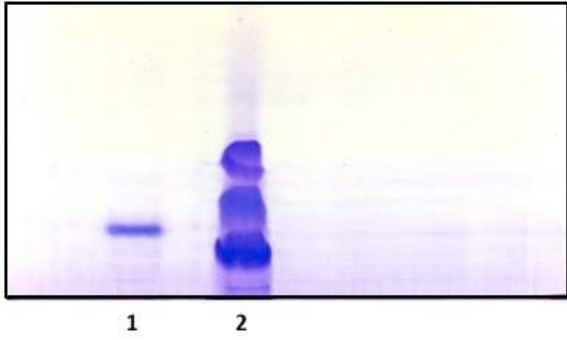
İnsan eritrosit 6PGD enziminin saflaştırılması çalışmalarında uygulanan her bir yöntem sonucunda elde edilen örneklerle ait protein ve aktivite değerleri hesaplanarak oluşturulan saflaştırma tablosu Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. İnsan eritrosit 6PGD enziminin saflaştırılması basamakları.

Table.1. Purification schemes of the enzyme of 6PGD from human erythrocytes.

Saflaştırma Basamakları	Aktivite (EU/mL)	Total Hacim (mL)	Protein (mg/mL)	Total protein (mg)	Total aktivite (EU)	Spesifik aktivite EU/mg	Verim (%)	Saflaştırma Katsayısı
Hemolizat	0.0035	25	5.63	140.75	0.0875	0.00062	100	1
Amonyum sülfat çöktürmesi (35-65)%	0.0048	15	0.220	3.3	0.072	0.022	82	35.5
2',5'- ADP Sepharose 4B kromatografi	0.0088	5	0.019	0.095	0.044	0.46	50	742

SDS-PAGE metodu ile saflaştırılan saf enzim Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2. Afinite kromatografisi ile insan kanından saflaştırılan 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enziminin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi fotoğrafı [(1) İnsan 6PGD Enzimi, (2) Standart Proteinler: karbonik anhidraz (Bovine, 29.000), Ovalbumin (Tavuk, 45.000) ve Albumin (Bovine, 66.000).

Figure 2. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of 6PGD purified by affinity gel. [(1) Human 6PGD Enzyme, (2) Standard proteins; bovine carbonic anhydrase (29.000), chicken ovalbumin (45.000) and bovine albumin (66.000).

Ketoprofenin inhibitör etkisi *in vitro* olarak ölçüldü. Daha sonra % aktiviteye bağlı ilaç konsantrasyon grafiğinden IC_{50} değeri elde edildi (Tablo 2). Bu değer ketoprofen için 3.68 mM olarak bulundu.

Bunlara ilaveten ketoprofen için Lineweaver-Burk grafiği çizilerek K_i değeri hesaplanarak Tablo 2’de gösterilmiştir.

Tablo 2. İnsan eritrosit 6PGD enzimi için bulunan IC_{50} , K_i değerleri ve inhibisyon tipi.

Table 2. The IC_{50} , K_i values and inhibition types for ketoprofen of human erythrocyte 6PGD.

Inhibitör	I_{50} (mM)	[I](mM)	K_i (mM)	Ortalama K_i (mM)	Inhibisyon Tipi
		1.9	3.14		
Ketoprofen	3.68	3.9	1.95	2.48	Yarışmasız
		6.86	2.35		

K_i değeri ketoprofen için 2.48 mM olarak hesaplandı. Ketoprofenin *in vivo* etkisi Tablo 3’te gösterildi.

Kontrol için enzim aktivitesi 1.15 ± 0.13 U/gHb olmasına rağmen, ilaç verilen grupta 1., 3. ve 5.

saatlerde sırasıyla 0.61 ± 0.20 U/gHb, 0.56 ± 0.23 U/gHb, 1.35 ± 0.21 U/gHb olarak elde edildi.

Tablo 3. Tavşan eritrosit 6PGD enzimi üzerine ketoprofen ilacının *in vivo* etkisi (n=6).

Table 3. *In vivo* effects of ketoprofen on human red blood cell 6-phosphogluconate dehydrogenase activity (n=6).

Uygulama süresi	$X \pm SD$ (n=6)	P
Kontrol	1.15 ± 0.13	-
1	0.61 ± 0.20	<0.01
3	0.56 ± 0.23	<0.01
5	1.35 ± 0.21	>0.05

TARTIŞMA ve SONUÇ

Bir çok kimyasalın düşük dozlarının bile özellikle spesifik enzimlerin inhibisyonuna sebep olarak normal enzim aktivitesini değiştirdiği ve canlı metabolizmaya etki ettiği bilinmektedir (Beydemir ve ark., 2000). Daha önce yapılan çalışmalarda insan eritrositleri dâhil farklı doku ve kan numunelerinde farklı enzimler üzerine bazı ilaç ve kimyasalların *in vivo* ve *in vitro* etkileri araştırılmıştır. Mesela “Akyüz ve ark., (2004) insan eritrosit 6PGDH enzimi üzerine bazı antibiyotiklerin inhibe edici etkisini göstermiştir”. Başka bir çalışmada C vitaminin 6PGD aktivitesini artırdığı gösterilmiştir (Puskas ve ark., 2000). Bunlara ilaveten daha önceki bir çalışmamızda kanser tedavisinde kullanılan sisplatin ve 5-Fluorouracil ajanlarının 6PGD aktivitesini düşürdüğünü göstermiştik (Ozabacigil ve ark., 2008). Tedavide kullanılan vanadatla yapılan bir çalışmada ilacın kuzu karaciğeri enzimini inaktive ettiği tespit edilmiştir (Bergamini ve ark., 1995). Sıçan eritrositlerinde yapılan enzim çalışmalarında amikasin, ampicilin ve netilmisin sülfatın enzimi inhibe ettiğini ve metamizol’ün enzim aktivitesi üzerine etkisinin olmadığı tespit edilmiştir (Akyüz ve ark., 2004).

Birçok kimyasal ve tedavide kullanılan ilaçların 6PGD enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi incelenmesine rağmen çalışmada kullandığımız

analjezik ilaçla ilgili herhangi bir literatür bilgisi bulunmamaktadır. 6PGD enzimi heksozmonofosfat metabolik yolunun 3. önemli enzimidir. 6-fosfoglukonatın ribuloz 5 fosfat ve CO₂'e oksidatif dekarboksilasyonunu kataliz etmektedir. Bu reaksiyon esnasında NADP⁺ NADPH'a indirgenir. İndirgenen bu NADPH redükte glutatyon üreterek hücreleri oksidatif hasara karşı koruması bakımından oldukça önemlidir. NADPH eksikliğinde canlı sistemlerde redükte glutatyon azalarak hücrenin ölümüne sebep olmaktadır. NADPH ayrıca yağ asitleri, steroid ve bazı aminoasitler gibi birçok biyomoleküllerin sentezinde görev alan bir koenzimdir.

Çalışmamızda 6PGD enzimi insan eritrositlerinden 2',5'-ADP Sepharose 4B Afinite kromatografisi yöntemi ile % 50 verimle 742 kat saflaştırıldı. Daha sonra ketoprofenin enzim üzerine *in vitro* kinetik etkisi incelendi. 6PGD enzimi için bu ilacın IC₅₀ ve K_i parametreleri hesaplandı. İlacın enzim üzerine inhibisyon etkisine göre inhibisyon tipi belirlendi. Elde edilen tüm bu çalışma sonuçlarından ilaç moleküllerinin enzimin aktif bölgesine bağlandığı düşünüldü. Tavşanlarla yapılan *in vivo* çalışmalarda ketoprofenin enzim aktivitesini önemli miktarda inhibe ettiği görüldü. Yapılan tüm bu çalışmalar sonucu *in vivo* ve *in vitro* çalışma sonuçlarının birbirini doğruladığını görmüş olduk.

Bu sonuçlara göre diyebiliriz ki hastalara söz konusu ilaçlar uygulanmadan önce kişilerin 6PGD eksikliğinin olup olmadığı araştırılması gerekmektedir. Özellikle 6PGD eksikliği olan birçok hasta için bu ilaçların kontrolsüz kullanımı tehlikeli olabilir. Ayrıca enzimi inhibe eden söz konusu bu ilaçların insan vücudundaki diğer enzimler üzerinde de etkisi olabileceği düşünüldüğünde ketoprofenin tedavi-doz aralığının yeniden gözden geçirilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

Akyüz M., Erat M., Çiftçi M., Gümüştekin K., Bakan N., 2004. Effects of some antibiotics on human erythrocyte 6-Phospho Gluconate

Dehydrogenase: An in vitro and in Vivo study. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 19, 361–365.

Barrett MP., 1997. The pentose phosphate pathway and parasitic protozoa. Parasitology Today 13, 11-16.

Bergamini CM., Signorini M., Hanau S., Rippa M., De Laureto PP., Cremonini MA., 1995. Inactivation and cleavage of liver 6-P-gluconate dehydrogenase during irradiation in the presence of vanadate. Archives of Biochemistry and Biophysics, 321, 1-5.

Beutler E., 1971. Redcell metabolism. Manual of biochemical methods. 12, 68-70, Academic press, London.

Beydemir Ş., Çiftçi M., Özmen İ., Büyükokuroğlu ME., Özdemir H., Küfrevioğlu Öİ., 2000. Effects of some medical drugs on enzyme activities of carbonic anhydrase from human erythrocytes in vitro and from rat erythrocytes in vivo. Pharmacological Research, 42, 187-191.

Beydemir Ş., Gülçin İ., Küfrevioğlu Oİ., Çiftçi M., 2003. Glucose 6-phosphate dehydrogenase: In vitro and in vivo effects of dantrolene sodium. Polish Journal of Pharmacology, 55, 787-792.

Beydemir Ş., Çiftçi M., Yılmaz H., Küfrevioğlu Oİ., 2004. 6-Phosphogluconate Dehydrogenase: Purification, Characterization and Kinetic Properties from Rat Erythrocytes. Turkish Journal of Veterinary&Animal Sciences, 28, 707-714.

Bradford MM., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 7, 248-254.

Caprari P., Caforio MP., Cianciulli P., Maffi D., Pasquino MT., Tarzia A., Amadori S., Salvati AM., 2001. 6-Phosphogluconate dehydrogenase deficiency in an Italian family. Annals of Hematology, 80, 41-44.

Keha E., Küfrevioğlu Öİ., 2004. Biyokimya, Aktif Yayınevi, Erzurum.

Laemmli DK., 1970. Cleavage of structural proteins

- during in assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lehninger AL., 1993. *Principles of Biochemistry*. 2nd ed., Worth Publishers, New York.
- Mulcahy DM., Tuomi P., Larsen RS., 2003. Differential mortality of male spectacled eiders (*Somateria fischeri*) and king eiders (*Somateria spectabilis*) subsequent to anesthesia with propofol, bupivacaine, and ketoprofen. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 17, 117-123.
- Ninfali P., Orsenigo T., Barociani SR., 1990. Rapid purification of glucose 6-phosphogluconate dehydrogenase from mammal's erythrocytes. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 20, 297-309.
- Özabacıgil F., 2005. İnsan eritrosit 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enziminin saflaştırılması, bazı ilaçların enzim aktivitesi üzerine in vitro ve tavşanlarda in vivo etkisinin incelenmesi. Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, Türkiye.
- Ozabacıgil F., Beydemir Ş., Çiftçi M., Gümüştekin K., Bakan N., 2008. Cisplatin and 5-fluorouracil inhibits 6-phosphogluconate dehydrogenase activity in human erythrocytes in vitro and in vivo. *Asian Journal of Chemistry*, 20, 3189-3196.
- Puskas F., Gergely P., Banki K., Perl A., 2000. Stimulation of the pentose phosphate pathway and glutathione levels by dehydroascorbate, the oxidized form of vitamin C. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 14, 1352-1361.
- Segel IH., 1976. *Biochemical calculations*. John Wiley and Sons, Inc., 403, New York.
- Shreve DS., Levy HR., 1977. On the molecular weight of human glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 78, 1369-1375.
- Tandoğan B., Ulusu N., 2003. Review. 6-Fosfoglukonat dehidrogenaz: Moleküler ve kinetik özellikler. *Türk Biyokimya Dergisi*, 28, 268-273.
- Walzem RL., Storebakken T., Hung SSO., Hansen RJ., 1991. Relationship between growth and selected liver enzyme activities of individual rainbow trout. *Journal of Nutrition*, 121, 1090-1098.
- Williams RL., Upton RA., 1998. The clinical pharmacology of ketoprofen. *Journal of Clinical Pharmacology*, 28, 13-22.