



T.C.

SİVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GLUKOZ-6-FOSFAT DEHİDROGENAZ (G-6-FDH)
AKTİVİTESİ ÜZERİNE POLİAMİNLERİN (AGMATİN,
PUTRESİN, SPERMİDİN VE SPERMIN) İN VİTRO
ETKİLEŞİMLERİNİ İNCELEMEK**

MUHAMMED YUSUF ÇAVUŞ

Yüksek Lisans Tezi

Biyokimya Ana Bilim Dalı

SİVAS-2019

**T.C.
SIVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GLUKOZ-6-FOSFAT DEHİDROGENAZ (G-6-FDH)
AKTİVİTESİ ÜZERİNE POLİAMİNLERİN (AGMATİN,
PUTRESİN, SPERMİDİN VE SPERMİN) İNVİTRO
ETKİLEŞİMLERİNİ İNCELEMEK**

MUHAMMED YUSUF ÇAVUŞ

Yüksek Lisans Tezi

**Tıp Fakültesi
Biyokimya Ana Bilim Dalı**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. V. KENAN ÇELİK**

SİVAS-2019

“Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz (G-6-FDH) aktivitesi üzerine Poliaminlerin (Agmatin, Putresin, Spermidin ve Spermin) in vitro etkileşimlerini incelemek” adlı **Yüksek lisans** Tezi, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzuna uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Biyokimya** Ana Bilim Dalında **Yüksek lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan _____

Üye _____

Üye _____

Üye _____

Üye (Danışman) _____

ONAY

Bu tez çalışması,tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Zübeyda AKIN POLAT
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MÜDÜRÜ

Bu tez, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 18.02.2015 tarihli ve 4/4 sayılı kararı ile kabul edilen Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzuna göre hazırlanmıştır. (Proje No: T- 808).

TEŞEKKÜR

Tez alıŐma sırasında bana destek olan, hocalarıma özellikle bana değerli bilgi ve tecrübeleriyle çalıŐmalarımın her aşamasında yol gösterip ve destek veren danışman hocam sayın **Doç. Dr. V. Kenan elik'e**, çalıŐmamı destekleyen Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri BaŐkanlıęına (**CUBAP**)'a, çalıŐmalarım süresince bilgi ve emiğini gösteren Biyokimya Ana Bilim Dalı'nın tüm ęretim üyelerine, bana her zaman maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen değerli **aileme**, **YTP'e** ve tüm **arkadaŐlarıma** sonsuz teşekkür ederim

ÖZET

GLUKOZ-6-FOSFAT DEHİDROGENAZ (G-6-FDH) AKTİVİTESİ ÜZERİNE POLİAMİNLERİN (AGMATİN, PUTRESİN, SPERMİDİN VE SPERMIN) İNVİTRO ETKİLEŞİMLERİNİ İNCELEMEK

MUHAMMED YUSUF ÇAVUŞ

Yüksek Lisans Tezi

Biyokimya Ana Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. V. Kenan ÇELİK
2019, 60 sayfa

Bu çalışmada, majör Poliaminlerin (Agmatin, Putresin, Spermidin ve Spermin) normal plazmasında düzeyleri baz alınarak “düşük, normal ve yüksek” konsantrasyonlarının glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesi üzerine etkileri incelendi. Enzim aktivite ölçümleri spektrofotometrik olarak yapıldı. Ölçülen absorbanslar enzim aktivitesini gösteren birimlere dönüştürüldü, tablolar oluşturulup grafikler çizildi.

Poliaminlerin tümü glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesinde artış sağlamışlardır. Bu artışta öncelik sırası yüksek dozlarda “**agmatin** (%256)> **spermin** (%159)> **spermidin** (%158)> **putresin** (%130)” şeklinde, düşük dozlarda ise “**putresin** (%160)> **spermidin** (%158)> **agmatin** (%127)> **spermin** (%114)” şeklinde saptanmıştır. Enzim aktivitesinin artışında yüksek dozlarda agmatin, düşük dozlarda putresin etkili olmuştur.

Sonuç olarak, poliaminler tümü glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzim aktivitesini artıran birer pozitif modülatör oldukları saptanmıştır. Bu özellikleri göz önüne alındığında Glukoz-6-FDH enzim yetersizliği ya da eksikliği olan birçok hastalıkta poliaminler terapötik olarak kullanım potansiyeli taşımaktadırlar bu konuda yapılacak yeni ve kapsamlı çalışmalar birçok hastalığın sağaltımına katkı sağlayabilecek önemde olabilecektir.

Anahtar Kelimeler: Poliaminler, Agmatin, Putresin, Spermidin, Spermin, G6FDH.

ABSTRACT

INVESTIGATING OF POLYAMINES (AGMATINE – PUTRISCINE – SPERMIDINE – SPERMINE) IN VITRO INTERACTION ON GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE ACTIVITY

MUHAMMED YUSUF ÇAVUŞ

Master's. Thesis
Department of biochemistry

Supervisor: Dr. V. Kenan ÇELİK
2019, 60 pages

In this study, the effects of low, normal and high concentrations of the major polyamines (Agmatin, Putresin, Spermidin and Spermin) based on normal plasma levels on the glucose-6-phosphate dehydrogenase activity were investigated. Enzyme activity measurements were performed spectrophotometrically. Measured absorbances were converted into units showing enzyme activity, tables and graphics were drawn.

All polyamines increased the activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase. This increase was detected by priority, the highest doses of “agmatine (256%)> spermine (159%)> spermidine (158%)> putresine (130%)” and in low doses “putresin (16%)> spermidine (158%)> agmatin (%127)> spermin (%114)”. High doses of agmatine and low doses of putresin were effective to increase enzyme activity.

As a result, all of the polyamines are found to be positive modulators that increase the activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase enzyme. Based to these results, in many diseases with glucose-6-FDH deficiency or insufficiency, polyamines have the potential to be used therapeutically. New and comprehensive studies that will be done on this subject can be important to contribute to the treatment of many diseases.

Key Words: Polyamines, Agmatine, Putresine, Spermidine, Spermine, G6FDH

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
İÇ KAPAK	İ
ONAY	İİ
YÖNERGE	İİİ
TEŞEKKÜR	İV
ÖZET	V
ABSTRACT	VI
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	VII
TABLolar DİZİNİ	X
ÇİZELGELER DİZİNİ	XI
KISALTMALAR DİZİNİ	XII
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
1. Glukoz-6- Fosfat Dehidrogenaz (G-6-FDH)	3
1.1. Glukoz -6- Fosfat metabolizması	3
1.2. Pentoz Fosfat Yolağının önemi	5
1.3. Riboz ve deoksiriboz kullanım yolu.....	7
1.4. NADPH kullanan sentez mekanizmaları.....	7
1.5. G-6-FDH'ın Biyokimyasal özellikleri	9
1.6. G-6-FDH eksikliğine bağlı gelişen hastalıklar	12
2. POLİAMİNLER	13
2.1. Poliaminlerin Tarihçesi	13
2.2. Poliaminlerin özellikleri ve biyokimyasal önemi	14
2.3. Poliaminlerin Fonksiyonları ve biyolojik işlevleri	15
2.3.1. Poliaminlerin hücreler üzerindeki etkileri	15
2.3.2. DNA yapısı ve apoptoz üzerindeki etkisi	16
2.3.3. Poliaminler ve hücre çoğalması	16
2.3.4. Poliaminler ve gen ifadesi	17

2.3.5. Poliaminler ve iyon kanalları	17
2.3.6. Poliaminler ve hücre sinyalizasyonu	18
2.3.7. Poliaminler, bağışıklık hücreleri ve yara iyileşmesi	18
2.3.8. Poliaminler ve bağırsak	20
2.3.9. Poliaminlerin üreme sistemine etkileri	20
2.3.10. Poliaminler ve oksidatif stres	21
2.4. Poliaminlerin Metabolizması (Sentezi ve Yıkımı)	23
2.5. Poliaminlerin asetilasyonu	24
2.5.1. Asetilasyon reaksiyonları	24
2.6. Poliaminlerin taşınması	25
2.6.1. Taşıma sistemleri	26
2.7. Agmatin ve Tarihçesi	26
2.8. Putresin	28
2.9. Spermidin	28
2.10. Spermin	28
2.11. Kadaverin	28
2.12. Poliaminler ve hastalıklarla ilişkileri	29
2.12.1. Poliaminler ve kanser	29
2.12.2. Poliaminler ve parazit enfeksiyonu	30
2.12.3. Poliaminler ve gen tedavisi	30
2.12.4. Poliaminler ve diyabet	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM	31
3.1. Gereçler	31
3.1.1. Kullanılan gereçler	31
3.1.2. Sarf malzeme ve kimyasal maddeler	31
3.1.3. Çözeltilerin hazırlanması	31
3.2. Yöntem	32
3.2.1. Glukoz-6-FDH enzim aktivite ölçümü	32

4. BULGULAR	35
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	45
6. KAYNAKLAR	48
ÖZGEÇMİŞ	59
EKLER	60
EK 1. Ön Değerlendirme Formu	60
EK 2. Formu	60

TABLolar

Sayfa No

Tablo 1: G6FD Aktivitesini / lokalizasyonu Düzenleyen Sinyaller	11
Tablo 2: Poliaminlerin düşük-normal-yüksek konsantrasyonları	33
Tablo 3: G-6-PDH ve Agmatin çalışma tablosu	36
Tablo 4: G-6-PDH ve Putresin çalışma tablosu	38
Tablo 5: G-6-PDH ve Spermidin çalışma tablosu	40
Tablo 6: G-6-PDH ve Spermin çalışma tablosu.....	42

ÇİZELGELER

Sayfa No

Şekil 1. Glukoz -6- Fosfat metabolizması	3
Şekil 2A. Pentoz fosfat yolağın oksidatif yolu	4
Şekil 2B. Pentoz fosfat yolunun non-oksidatif yolu	5
Şekil 3. Pentoz Fosfat Yolunda NADH ve Riboz 5 üretimi	6
Şekil 4. Deoksinükleotid sentezinde NADPH'ın rolü	7
Şekil 5. Antioksidan enzim sistemlerinde NADPH'ın rolü	8
Şekil 6. İlaç metabolizmasında NADPH'ın rolü	9
Şekil 7. G6FDH enzimin katalizlediği reaksiyon ve NADPH üretimi	10
Şekil 8. G-6-FDH'ın eritrosit hücrelerindeki rolü.....	12
Şekil 9. Poliaminlerin Biyokimyasal yapısı	14
Şekil 10. Poliaminlerin katyonik yapıları.	15
Şekil 11. İltihaplanma yerinde NO ve poliaminlerin sentezi	19
Şekil 12. Poliaminlerin taşınması ve sentezi için moleküler yol	23
Şekil 13. Poliaminlerin sentezi ve dönüşümleri	25
Şekil 14. Agmatin sentez ve yıkım yolağı	27
Şekil 15. G-6-FDH volum aktivite -Agmatin invitro etkileşim grafiğı	36
Şekil 16. G-6-FDH spesifik aktivite -Agmatin invitro etkileşim grafiğı	36
Şekil 17. G-6-FDH volum aktivite -Putresin invitro etkileşim grafiğı	38
Şekil 18. G-6-FDH spesifik aktivite -Putresin invitro etkileşim grafiğı	38
Şekil 19. G-6-FDH volum aktivite -Spermidin invitro etkileşim grafiğı	40
Şekil 20. G-6-FDH spesifik aktivite -Spermidin invitro etkileşim grafiğı	40
Şekil 21. G-6-FDH volum aktivite -Spermin invitro etkileşim grafiğı	42
Şekil 22. G-6-FDH spesifik aktivite -Spermin invitro etkileşim grafiğı	42
Şekil 23. G-6-FDH volum aktivite -Poliaminler invitro etkileşim grafiğı	43
Şekil 24. G-6-FDH spesifik aktivite -Poliaminler invitro etkileşim grafiğı	43
Şekil 25. G-6-FDH volum aktivite -Poliaminler invitro etkileşim grafiğı	44
Şekil 26. G-6-FDH spesifik aktivite -Poliaminler invitro etkileşim grafiğı	44

KISALTMALAR/SİMGELER

ADC	Arginin dekarboksilaz
AGM	Agmatin
AGMAT	Agmatinaz
ALS	Amiyotropik lateral skleroz
ATP	Adenozin Trifosfat
AZI, AZI2 ve AZI3	Antizimler
CAD	Kadaverin
CAT-2B	Arginin taşıyıcı
DAO	Diamin-oksidad
DFMO	α -diflorometil ornitinin
DNA	Deoksiribo Nükleik asit
EGF	Epidermal büyüme faktörü (epidermal growth factor)
eIF-5A	Hücre büyümesi: Eukariyotik başlangıç faktörü
6FGD	6-fosfoglukonat dehidrogenaz
G6F	Glukoz-6-Fosfat
G6FDH	Glukoz-6- Fosfat Dehidrogenaz
GTPaz	Guanozin üç fosfataz
HMF	Hekzos mono fosfat
IEC-6	İnce bağırsak epitel hücreleri (small intestinal epithelial cells)
MAP kinaz	Mitojenle-Etkinleşen Protein Kinaz (Mitogen Activated Protein Kinase)
Mdm2	Nükleer Protein
NADP	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (Okside)
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (indirgenmiş)
NF-κB	Nükleer faktör-kappa beta
NMDA	N-metil D-aspartat
NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentaz

OAZ	Ornitin dekarboksilaz antizim
ODC	Ornitin dekarboksilaz
ORF1	Açık okuma formları proteini (open reading forms protein)
P53	Nükleer fosfoprotein
PAO	Poliamin oksidaz
PFY	Pentoz Fosfat Yolu
PUT	Putresin
RNA	Ribo Nükleik asit
SAM	S-adenozilmetiyonin
SAMdc	S-adenozilmetiyonin dekarboksilaz Activated Protein Kinase)
SLC22A2	Çözünen taşıyıcı aile 22 üye 2 (solute carrier family 22 member 2)
SOD	Süperoksit dismutaz
SPD	Spermidin
SPM	Spermin
SSAT	Spermidin / sperm N1-asetil-transferaz
TGF-β	Dönüştürücü büyüme faktörü (transforming growth factor)

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Metabolizma anabolik (sentez reaksiyonları) ve katabolik (yıkım reaksiyonları) süreçlerin tamamını oluşturur. Organizmanın gereksinimlerine göre bu süreçlerde rol alan enzimlerin miktarları ve hızları başlıca hormonlar tarafından düzenlenirler. Böylece canlı sistemlerde sağlıklı bir ortamın sürekliliği idame ettirilir. Karbonhidrat metabolizmasında yer alan ve katabolik süreçlerden biri olan hekzos mono fosfat (HMF) yolunun hız sınırlayıcı enzimi glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6FDG) enzimidir (1,2,3).

G6FDH (EC 1.1.1.49) enzimi tüm dokuların sitoplazmasında yer alır ve glukoz-6-fosfatı oksidatif ve oksidatif olmayan reaksiyonlar ile kataliz ederek başlıca riboz ve NADPH üretir. Ürettiği riboz ile RNA ve deoksiriboz ile de DNA yapımına katkı sağlar. Ürettiği NADPH lar ise ATP nin kullanılmadığı steroid sentezi, yağ asit sentezi gibi birçok reaksiyonda enerji kaynağı olarak kullanılır. Böylece hem nükleotid metabolizması hem de yağ metabolizmasının idame ettirilmesinde önemli bir rol oynar (4).

G6FDH'in hücre fizyolojisinde merkezi rolünü ortaya konması öneminin kavranmasına katkı sunacaktır. Önemli bir NADPH kaynağı olması, NADPH havuzunun idamesindeki rolü ve redoks homeostazındaki kritik önemine ek olarak, antioksidan yollar, nitrik oksit sentaz, NADPH oksidaz, sitokrom p450 sistemleri gibi birçok hücresel sisteme NADPH sağlayıcısı olmasından dolayı hücre ömrünün uzamasına da çok önemli katkılar sunmaktadır (4,5).

G6FDH enzim eksikliği ya da inhibisyonunda tüm hücreler etkilenmekte ve en çok etkilenen hücrelerin başında eritrositler (hemolitik anemi), kemik iliği, deri ve bağırsak mukozası hücreleri gibi hızla çoğalan hücreler gelmektedir (6).

Poliaminler (Agmatin, Putresin, Spermidin ve Spermin) tüm canlı hücrelerde bulunan bazik, organik alifatik katyonlardır. Poliaminler hücre büyümesi, farklılaşması, çoğalması, DNA, RNA ve protein sentezinde önemli bir rol oynarlar. Hücrelerin çoğalma hızı ile poliaminlerin derişimleri arasında önemli bir ilişki vardır (7). Poliaminler endojen olarak tüm dokularda sentezlenir ve diyetle de ekzojen olarak da alınır (8).

Poliaminler, iyon kanallarının düzenlenmesi, enzim aktiviteleri, translasyon ve transkripsiyon gibi birçok farklı biyolojik süreçte önemli bir rol oynar. Aynı zamanda, poliaminler antioksidan kapasiteleri ile strese bir cevap oluşturken immün sisteme de etki etmektedir (9,10). Hypusin ara ürünü oluşturarak protein biyosentezi için gerekli olan mRNA seviyelerini arttırır (11).

Bu çalışmanın amacı, glukoz-6-Fosfat dehidrogenaz enziminin aktivitesi üzerine majör poliaminlerin (Put, Spd, Spm ve Agm) normal plazma konsantrasyonları ile farklı konsantrasyonları kullanarak *in vitro* etkileşimlerini incelemektir. Çalışmada doz eğrileri incelenip enzim üzerindeki aktivasyon/inhibisyon etkilerinin ortaya çıkarılıp sonuçların ne gibi etkileri olacağını öngörmektir.

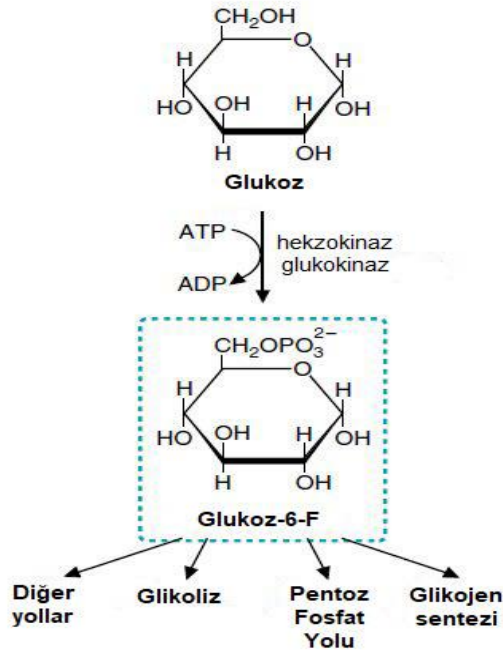


2.GENEL BİLGİLER

1. Glukoz-6- Fosfat Dehidrogenaz (G-6-FDH)

1. 1. Glukoz -6- Fosfat metabolizması

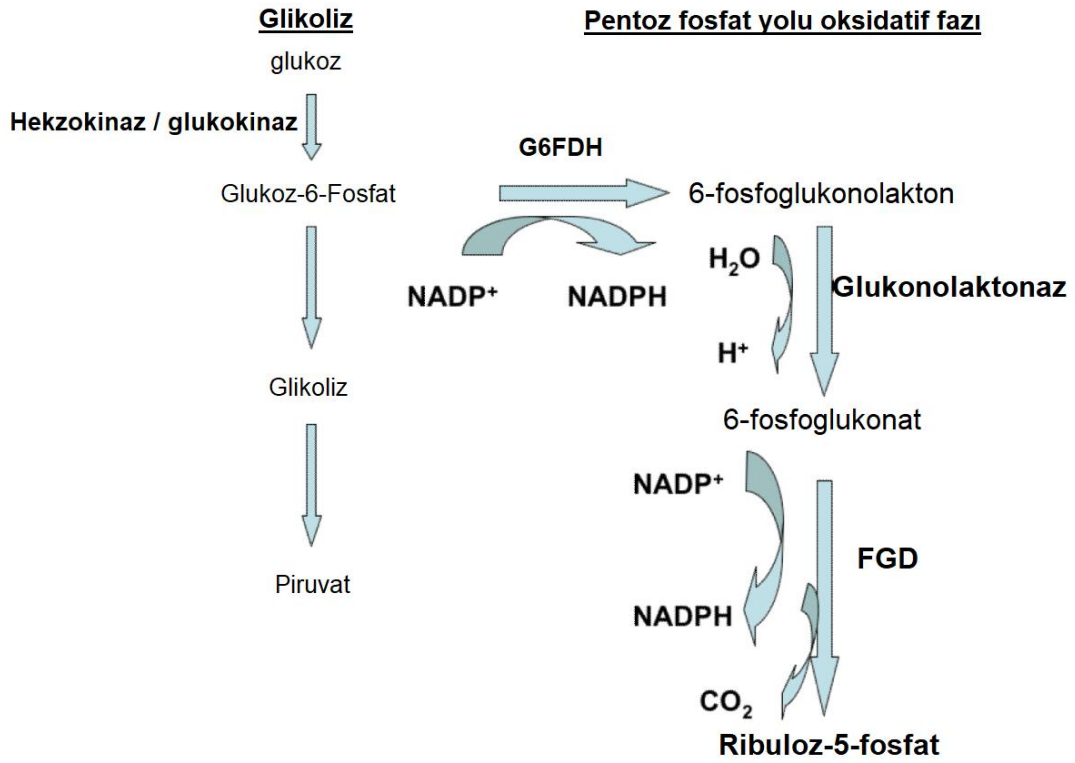
Glukoz tüm hücreler tarafından enerji elde etmek için kullanılan temel bir moleküldür. Glukoz hücre içine alındıktan sonra hemen hemen tüm dokularda bulunan heksokinaz tarafından, karaciğer ve pankreas dokularında ise glukokinaz tarafından fosforile edilerek glukoz-6-fosfata (G6F) dönüştürülür (şekil 1). Fosforilasyonun iki amacı vardır, ilki glukozun tekrar plazmaya kaçmasını önlemek, ikincisi ise kimyasal olarak işaretlenerek metabolize edilmesini sağlamaktır (12). Glukozun metabolizması organizmanın ihtiyacına göre farklılık göstermektedir. Şöyle ki; enerji gereksinimini karşılamak için glikoliz yolağının (anaerobik, aerobik) aktive olması, DNA ve RNA sentezi için gerekli deoksiriboz ve riboz üretimi ve oksidatif hasara karşı hücreleri korumada, anabolik reaksiyonlar için gereken NADPH'ın sağlanmasında pentoz fosfat yolağının aktive edilmesidir. Glikoprotein, glikolipid ve proteoglikan sentezi için gerekli amino ve asidik şeker türevlerinin sentezi yapılarak kompleks karbonhidrat sentez yollarının aktive olmasıdır (12,13,14).



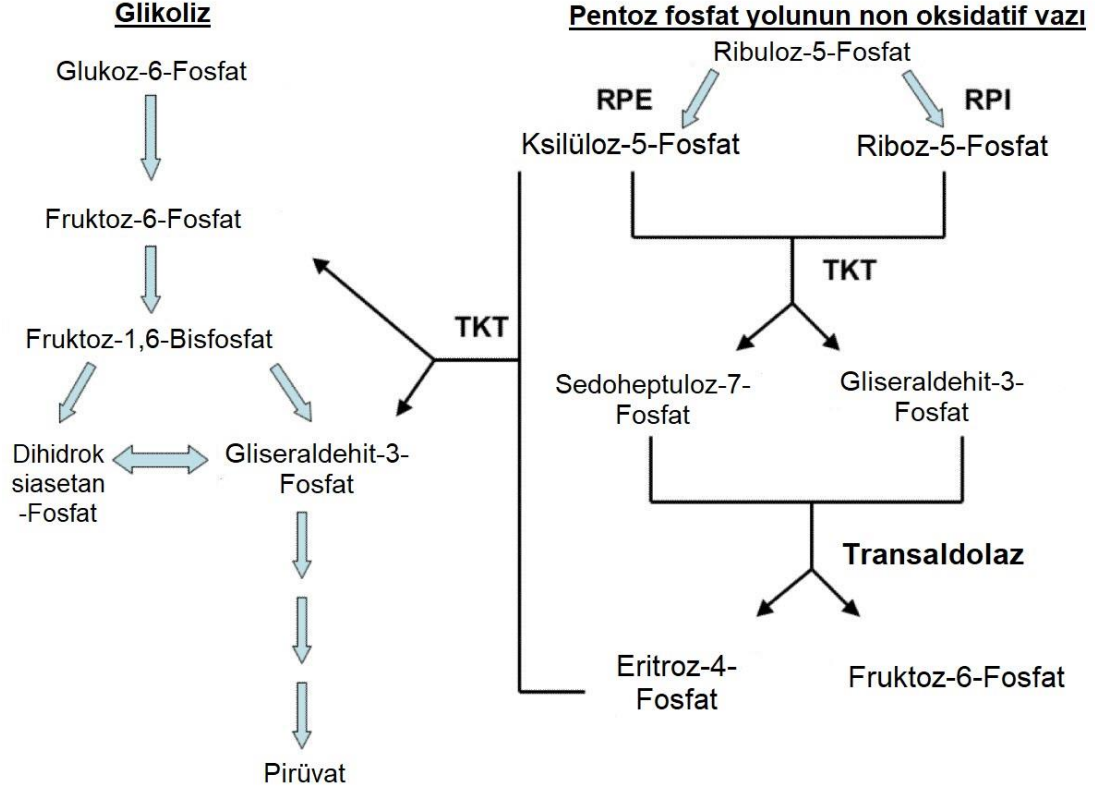
Şekil 1: Glukoz -6- Fosfat metabolizması (15).

Glukoz, hegzokinaz ve glukokinaz enzimleri aracılığı ile bir mol ATP kullanarak G6F'a dönüştürülür. G6F, genellikle glikoliz, pentoz fosfat yolu ve glikojen sentezi gibi yollarda kullanılacak önemli bir öncüdür. G6F metabolizmanın ihtiyacına göre de glikojenoliz (glikojen yıkımı) ve glukoneojenez (glukozun karbonhidrat olmayan kaynaklardan sentezi) gibi diğer karbonhidrat metabolizması yollarından da üretilebilir.

G6F, pentoz fosfat yolu esas olarak NADPH ve riboz-5-Fosfat oluşturan glikolizin ilk aşaması etrafında gerçekleşen doğal bir geçiş yoldur. Pentoz fosfat yolunun birinci aşamasında (Oksidatif faz), oksitlenen her bir glukoz 6-fosfat ile iki mol NADPH, 1mol CO₂ ve ribüloz-5-fosfat üretilir (şekil 2A). Pentoz fosfat yolunun ikinci aşamasında (non oksidatif faz), ribüloz-5-fosfat kullanılarak riboz-5-Fosfat, ksiluloz-5-fosfat ve ileri aşamalarında ise diğer karbonhidratlar üretilir (Şekil 2B). Tüm hücreler lipid sentezi, antioksidan sistemlerde, detoksifikasyon reaksiyonlarında ve benzeri birçok mekanizmada kullanmak üzere NADPH gibi indirgeyici bir ajana ve nükleotidlerin sentezi için de riboz-5-Fosfat molekülüne gereksinim duyarlar. Bu gereksinimleri karşılayacak pentoz fosfat yolu tüm hücrelerin sitoplazmasında, granüler endoplazmik retikulum ve peroksisomlarında mevcuttur (15,16,17).



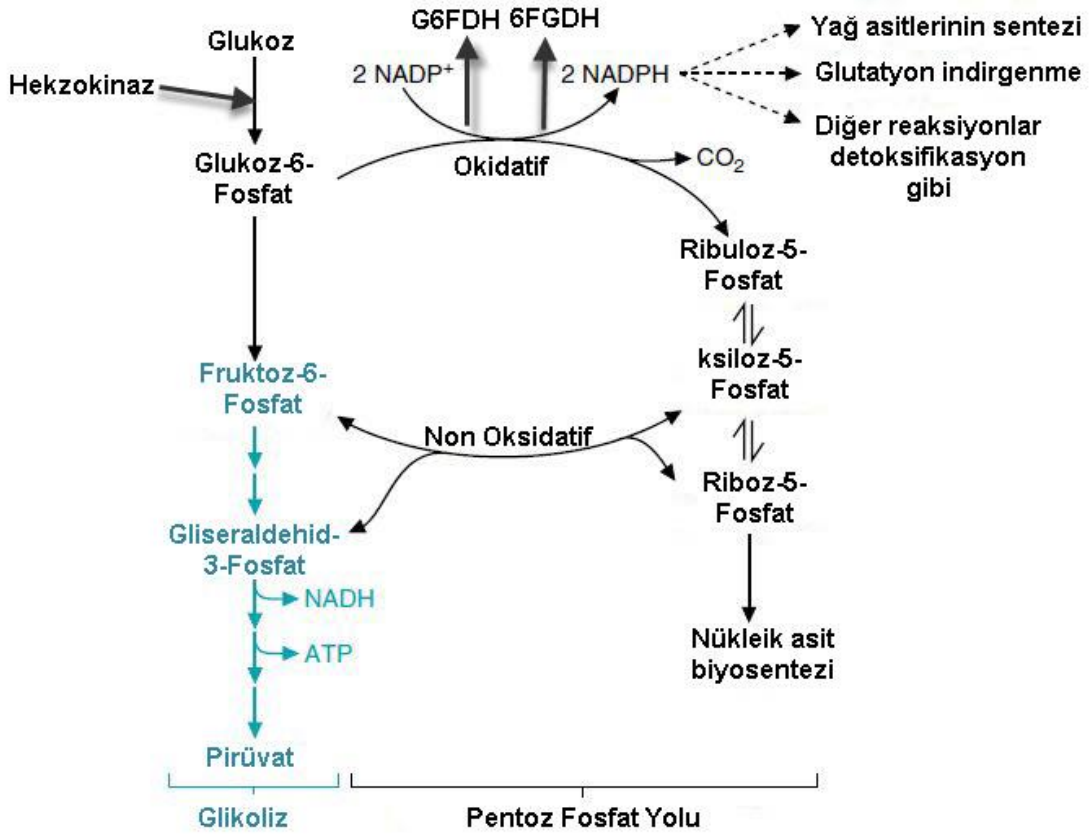
Şekil 2A: Pentoz fosfat yolağın oksidatif yolu. 6FGD: 6-fosfoglukonat dehidrogenaz (18).



Şekil 2B: Pentoz fosfat yolunun non-oksidatif yolu (18).

1.2. Pentoz fosfat yolağının önemi:

Pentoz fosfat yolunun oksidatif kısmında, başlıca glukoz-6-fosfat dehidrogenaz ve 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enzimleri aracılığı ile okside edilmiş glukoz -6- fosfatın her molekülü başına, bir molekül ribüloz-5-fosfat ve CO₂, iki molekül NADPH oluşumuna yol açan üç reaksiyondan oluşmaktadır (18).



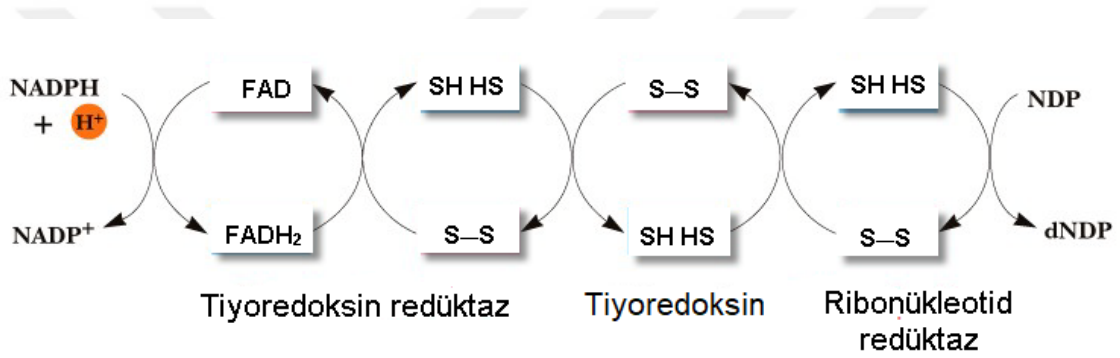
Şekil 3: Pentoz Fosfat Yolunda NADPH ve Riboz -5-fosfat üretimi. (15)

Pentoz fosfat yolunun oksidatif fazının başlıca fonksiyonu, nükleotitlerin, lipidlerin ve amino asitlerin biyosentezi için öncül molekülleri sağlamaktadır (19). Yolun bu kısmı, karaciğerde, meme bezinde ve adipoz dokusun da NADPH'a bağımlı yağ asitlerinin biyosentezinde önemlidir. Ayrıca bu yol, testislerde, yumurtalıklar, plasenta ve adrenal korteks de steroid hormonlarının NADPH'a bağımlı biyosentez reaksiyonları ve eritrositlerde membran stabilitesinin sağlanmasında redükte glutasyonun (GSH) idamesi için de NADPH sağlar (19,20). Kemik iliği, deri ve bağırsak mukozası hücreleri gibi hızlı bir bölünme oranına sahip hücrelerde, glukoz-6-fosfattan, riboz-5-fosfat üretilmesi pentoz-fosfat yolunun oksidatif olmayan fazı ile sağlanır. Yolağın son aşamasında üretilen riboz-5-fosfat nükleotitlerin ve nükleik asitlerin sentezi için gereklidir (19). Pentoz-fosfat yolunun bir diğer önemi hücreleri oksidatif hasara karşı korumada rol oynayan antioksidan enzimlerin ve moleküllerin yenilenmesi için (indirgen özelliklerinin kazanılmasında) gerekli olan NADPH'ın üretimini sağlamaktır. Eritrosit gibi birçok hücre ve redoks mekanizmalarında yer alan ve hücreleri oksidatif hasardan koruyan glutasyon redüktaz reaksiyonu gibi sistemler NADPH bağımlıdır. Bunların başında gelen en önemli mekanizmalardan

biriside ilaçların ve endojen ya da eksojen kaynaklı yabancı bileşiklerin detoksifiye edilmesinden sorumlu olan sitokrom P450 sistemleridir. (Şekil 3) (21,22,23).

1.3. Riboz ve deoksiriboz kullanım yolu

Pentoz fosfat yolu ile sentezlenen Riboz-5-Fosfat DNA ve RNA sentezi için gerekli bir öncül moleküldür. Ayrıca Riboz 5-fosfat, nükleotit ve nükleik asit sentezi için bir öncüdür. DNA'nın ve RNA'nın esas yapıtaşı nükleotittir. Nükleotitler heterosiklik bir azotlu baz, bir şeker ve fosfattan oluşur. DNA'daki şeker deoksiriboz iken RNA'daki ribozdur (15,16). Nükleotid difosfatlardan deoksinükleotid difosfat oluşumundan sorumlu yegane enzim "tiyoredoksin redüktaz" sistemidir ve NADPH bağımlıdır (Şekil4).



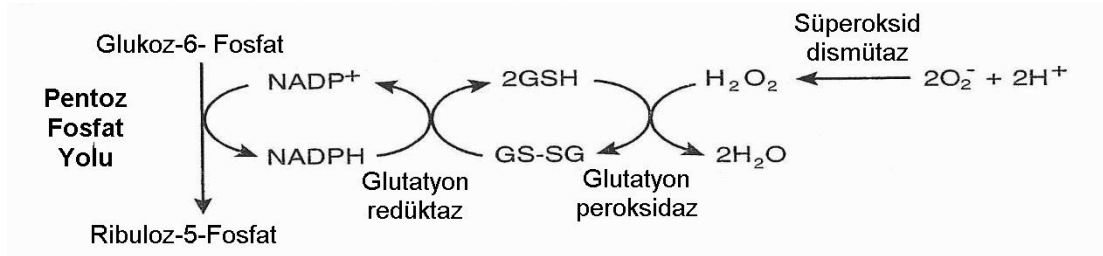
Şekil 4: Deoksinükleotid sentezinde NADPH'in rolü.

1.4. NADPH kullanan sentez mekanizmaları

NADPH memeli hücrelerinde başlıca dört enzim tarafından üretilir. Bunlardan ikisi pentoz fosfat yolunda yer alan G6FDH ve 6FGD enzimleridir. Diğerleri ise malik enzim ve izositratdehidrogenaz enzimidir. NADPH bağımlı enzimlerin başlıcaları antioksidan enzim sistemleri (glutasyon redüktaz, peroksidaz, katalaz gibi), Nitrik oksit sentaz, Dihydrofolat redüktaz, NADPH Oksidaz, sitokrom p450 oksidoreduktaz ve lipid sentezi enzimleridir (HMG CoA redüktaz ve diğerleri). G6FDH inhibe edildiğinde bu enzimlerin ihtiyacı olan NADPH, malik enzim ve izositrat dehidrogenaz enzimine bağımlı olmaktadır. Bu iki enzimde diğer enzimleri için gerekli olan NADPH ihtiyacını karşılayacak yeterli miktarda NADPH sentez edemezler, bu nedenle NADPH üretiminde G6FDH önemli bir enzim olmaktadır (20). Ek olarak kolesterol veya steroid hormonlarının biyosentezi için gerekli olan hücrel NADPH üretiminde G6FDH bağımlıdır (19).

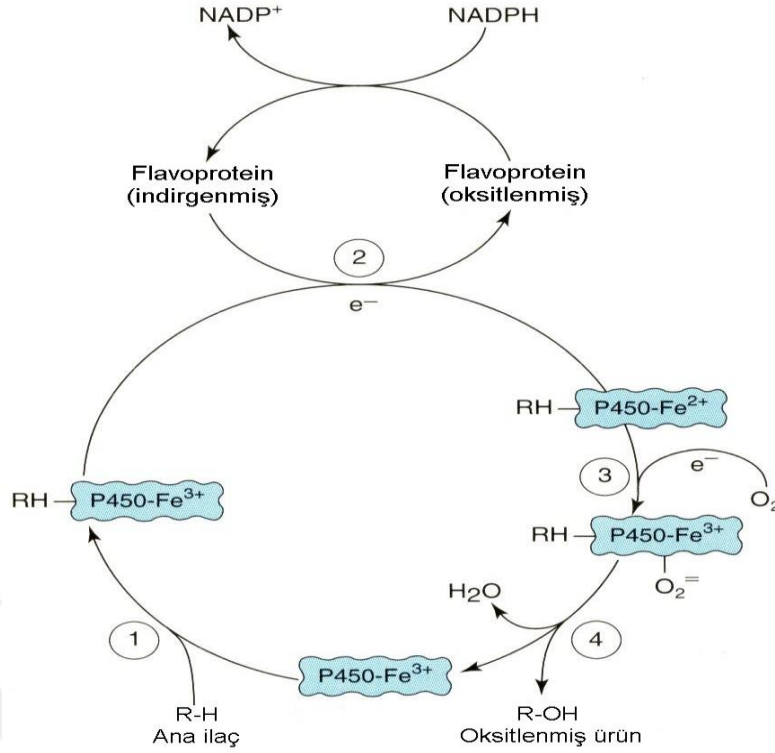
Dehidrojenazların (G6FDH ve 6FGDH) pentoz fosfat yolundan ürettiği NADPH, sitokrom p450 ile detoksifikasyon mekanizmaları için de önemli bir rol oynar. Son olarak, makrofajlar gibi spesifik bağışıklık hücrelerinde, "solunum patlaması" olarak bilinen savunma mekanizmasının işlev kazanması, oksidatif ve immün strese yanıt oluşturabilmesi için NADPH gereklidir. Solunum patlaması, NADPH oksidazın aktivitesinden kaynaklanır ve bu, bir elektronun NADPH'den oksijene süperoksit oluşturmak üzere transferini katalize eder. NADPH oksidaz, istilacı bir mikroorganizmayı çevreleyen fagolizozom zarına katılan sitozolik ve membranöz proteinlerden oluşur. Süperoksit fagolizozomun intramembranöz boşluğuna salınır, burada genellikle bakteri ve mantar patojenlerine karşı etkili olan H_2O_2 ve diğer ROS'a dönüştürülür. H_2O_2 , fagositik hücreden veya istilacı mikroorganizmadan gelebilen süperoksit dismutaz (SOD) tarafından oluşturulur (Şekil 5) (16,21,23).

Glutasyon redüktaz ve glutasyon peroksidaz gibi antioksidan enzimler aktivitelerinde gerekli olan redükte glutatyona (GSH) gereksinim duyarlar. Bunun içinde okside glutasyonu (GS-GS) indirgemek için NADPH gereklidir buda G6FDH aktivitesine bağlıdır. Bu enzimlerin düzgün çalışması ile süperoksit dismutaz (SOD) tarafından üretilen H_2O_2 'in suya yıkılmasında sağlanmaktadır (Şekil 5) (20,21).



Şekil 5: Antioksidan enzim sistemlerinde NADPH'in rolü.

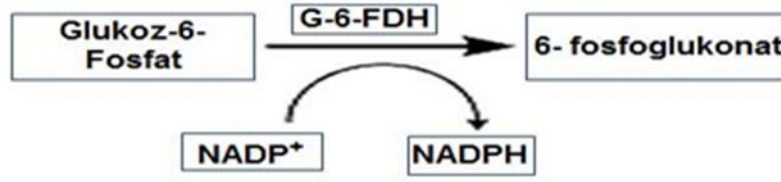
İlaç metabolize eden yapılar içinde en önemli rol Sitokrom P450 monooksijenazlara düşmektedir. Endoplazmik membrana lokalize olan enzim, NADPH'den aldığı elektronu ilk önce kendi üzerindeki demirin indirgenmesini sağlayarak oksijene olan ilgisini artmakta, daha sonraki aşamada ise ilacın hidrosillenmesini sağlayarak suda çözünür hale gelmesine aracı olmaktadır (Şekil 6).



Şekil 6: İlaç metabolizmasında NADPH'in rolü.

1. 5. G-6-FDH'in biyokimyasal özellikleri

G6FDH X genine bağlı Xq28 bölgesine lokalizedir ve enzimin aktivitesi için önemli olan lizin amino asitinin kodlandığı bölgedeki oktapeptid yapı ve dinükleotid bağlanma bölgesinin kodlandığı heptapeptid dizilimdeki bölgeler evrimsel süreçte çok iyi korunmuştur (24,25). G6FDH memeli hücrelerinde dimer ya da tetramer olarak eksprese edilmektedir. Protein yapısı 514 amino asitten oluşmaktadır, NADP ve G6F için bağlanma bölgesine ek olarak allosterik olarak düzenleyici bir bölgeye de sahiptir. NADP bağlandığında bu bölge yapının stabil olmasına ve enzimin aktif formda kalmasına yardımcı olur (25). G6FDH tüm hücrelerin sitoplazmasında yer alan sitozolik bir enzimdir ve glukoz-6-fosfatın, 6-fosfoglukonolaktone dönüşümünü kataliz eden pentoz fosfat yolunun (heksos mono fosfat yoluda denen) hız sınırlayıcı enzimidir. Oksidatif yolak olarak gerçekleşen bu reaksiyonda bir mol NADP⁺ kullanılarak bir mol NADPH üretilir (şekil 7).



Şekil 7: G6FDH enzimin katalizlediği reaksiyon ve ilk NADPH üretimi.

G6FDH enzimi koenzim sağlayıcısı olarak antioksidan sistemlerde homeostazi sağlamada, lipid sentezinde, detoksifikasyon mekanizmaları ve nükleotid sentezi, insülin direncinin geliştiği diyabette, hücre büyümesi ve hücre ölümü gibi birçok biyokimyasal olayda önemli rol oynamaktadır (26,27,28,29).

G6FDH, oksitleyiciler ve indirgeyicilerin belirlediği hücre içi redoks potansiyelinin, hücre büyümesinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Hücre içi ana indirgeyici, esas olarak G6FDH vasıtasıyla pentoz fosfat yolu ile üretilen NADPH'dir. Wang-Ni Tian ve arkadaşları G6FDH aktivitesinin NADPH sağlayarak hücre büyümesinde redoks regülasyonu için kritik bir rol oynadığını, G6FDH aktivitesinin inhibe ve aktive ederek, hücre büyümesinde rol oynayan büyüme faktörünün inhibe/aktive edildiğini göstererek kanıtlamışlardır. Ayrıca G6FDH inhibe edilen hücrelerde H_2O_2 'nin sitotoksik etkisinin arttığı ve NADPH / NADP oranında %30-40'lık bir azalmaya da neden olduğunu göstermişlerdir (26).

G6FDH lokasyonu ve aktivitesi birçok madde tarafından transkripsiyon, translasyon ve post-translasyon seviyelerinde oldukça sıkı bir şekilde düzenlenmektedir (Tablo 1). Enzim aktivitesinde ki başlıca düzenleyici faktör NADPH/NADP oranıdır. Bu oran azaldığında (NADP de artış) enzim aktive olarak daha çok NADPH üretilir. G6FDH'nin post-translasyon regülasyonunda başlıca rol fosforilasyon ile yapılır. Bazı faktörler ve p53 gibi proteinlerin direkt bağlanması ile de regüle edilmektedir (30,31,32).

Tablo 1: G6FD Aktivitesini / lokalizasyonu Düzenleyen Sinyaller.

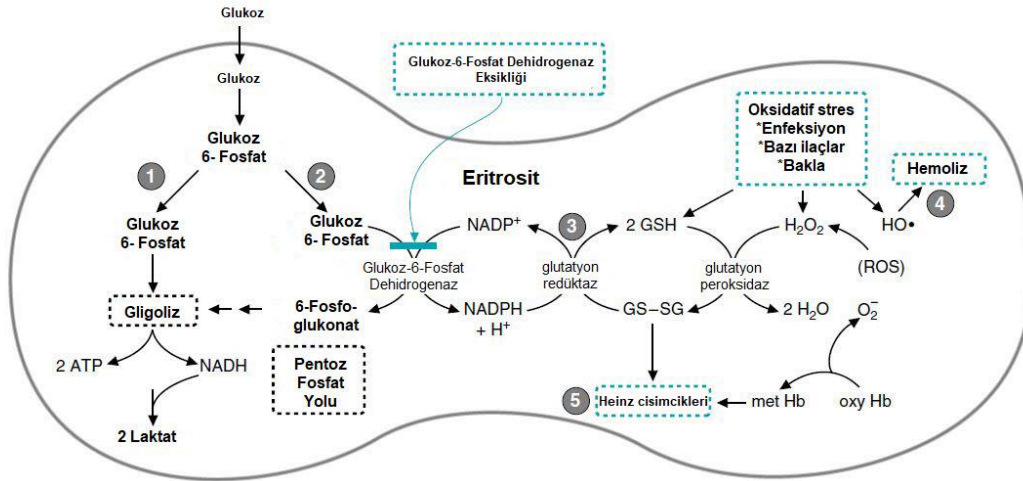
Pozitif regülatörler	Negatif regülatörler
PDGF	Aldosteron
EGF	cAMP
VEGF	cAMP bağımlı PKA
HGF	CREM
Ensülin	Araşidonik asit
D vitamini	P38 MAP kinazı
PI3-Kinaz	P53
Fosfolipaz C- γ	TNF α
Ras-GTPaz	AMP Kinaz
cGMP bağımlı PKG	
mTOR	
S6 kinaz	
src	
TIGAR	
Hsp27	
ATM	
SREBP	
Nrf2	

PDGF-trombosit kaynaklı büyüme faktörü; EGF-epidermal büyüme faktörü; VEGF-vasküler endotel hücre büyüme faktörü; HGFhepatocyte Büyüme faktörü; PI-3K-fosfatidilinositol-3-kinaz; PKG-protein kinazı G; mTOR-memeli rapamisininin hedefi; TIGAR- TP53-indüklenmiş glikoliz ve apoptoz düzenleyici; Hsp27-ısı şoku proteini 27; ATM-ataksi telanjiektazi mutasyon geçirmiştir; SREBP-sterol yanıt elemanı bağlayıcı protein; PKA-protein kinazı A; CREM-siklik AMP cevap elemanı modülatörü; Nrf2-nükleer faktör-E2 ile ilgili faktör; TNF α -tümör nekroz faktörü alfa; AMPK-5 'adenozin monofosfat ile aktifleştirilmiş protein kinazı.

1. 6. G-6-FDH eksikliğine bağlı gelişen hastalıklar

Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz eksikliği, dünya çapında 400 milyondan fazla insanı etkileyen, pentoz fosfat yolundaki en yaygın enzim eksikliğidir. Enzim eksikliği olan kişilerde tedavi amaçlı kullanılan birçok ilaç bu tür kişileri olumsuz olarak etkileyecektir (33). Eritrositlerin oksidatif hasara karşı ömrünün belirlenmesinde, pentoz-fosfat yolu oldukça önemlidir. Eritrositlerin oksidatif hasardan korunabilmesi için redükte glutatyon (GSH) düzeylerinin sürekli korunması NADPH üretimine bağlıdır. Bu da G6FDH aktivitesi ile idame ettirilir. Bu enzim inhibe veya eksik olduğunda eritrosit hücreleri oksidatif hasara karşı koyamaz, membran bütünlüğü bozulan hücrelerde hemolitik anemi kaçınılmaz olur. Okside glutatyon (GSSG) yeniden rejenere edilerek indirgenmiş forma (GSH) dönüştürülmez ise hemoglobinler birbirleri ile çapraz bağ yaparak heinz parçacıklarının oluşmasına ve hücreleri hemolize olmalarına yol açar (Şekil 5) (34).

Diğer taraftan G6FDH enzim aktivitesinde görülen azalmalara ya da mutasyonlara bağlı inhibisyonlarda, şiddetli enfeksiyon (22), kronik granümatöz (35), ve pek çok radikal birikmesine bağlı olarak gelişen DNA hasarı sonucu birçok kanser hastalığı gelişebileceği gibi immün yetmezliklerine de yol açmaktadır (23).



Şekil 8: G-6-FDH'nin eritrosit hücrelerindeki rolü (15).

G6FDH enzimi için yaklaşık 200 farklı mutasyon tipi bildirilmiştir, bu nedenle farklı klinik yansımalara da neden olur. G6FDH eksikliği/mutasyonu olan kişilerde bazı yiyeceklere (Soya fasülyesi, bakla gibi) ve ilaçların toksik etkilerine karşı hassasiyet gelişir. Buna bağlı olarak akut hemolitik anemi görülür (36).

2. POLİAMİNLER

2.1. Poliaminlerin tarihçesi:

Poliaminler ilk olarak 1674 yılında Antonie Van Leeuwenhoek tarafından insan semeninden kristalize madde olarak keşfedildi. Bu keşiften sonra kristalize maddenin yapısı ile ilgili ileri sürülen fikirler yapının kalsiyum fosfat ya da protein olabileceği yönündeydi (37,38,39). Yaklaşık 200 yıl sonra Ladenburg ve Abel'in organik kristalleri tanımlaması ile semenden elde edilen maddeye 'spermin' adı verilmiştir (40). Kristal yapının kimyasal yapısı ise yaklaşık 250 yıl sonra 1924 yılında Rosenheim ve arkadaşları tarafından açıklığa kavuşturulmuştur ve sperminin atom sayısını açıklayamasalar da laboratuvarında sentezlenmeye başlanmışlardır. Farklı dokulardan elde edilen sperminin kimyasal yapısı ve formülü semenden elde edilen ile kıyaslandığında Leeuwenhoek'in raporundaki bulgular doğrulanmıştır (41,38). Poliaminlerin gerçek kimyasal yapıları ise ilk keşiften yaklaşık 290 yıl sonra açıklığa kavuşturulmuştur (41)

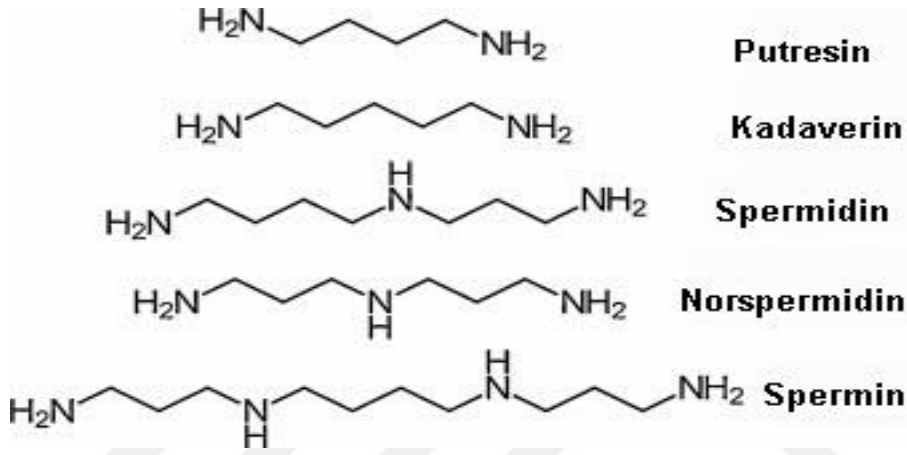
Poliaminlerin fonksiyonu yıllarca bilinmemekle birlikte hücresel yapıyı koruduklarına inanılmıştır (37,41). Memelilerdeki poliaminler, karbon sayısındaki ve amin gruplarındaki farklılıklardan ötürü yapı bakımından farklılık gösteren putresin, spermidin, spermin ve kadeverindir. Bununla birlikte, bazı bilim adamları kadeverinin klasik bir poliamin olmadığını, histamin, agmatin ve termin içeren bir oligoamin ailesinin bir üyesi olarak görmektedirler (42).

Poliaminlerin yapısı belirlendikten sonra yapılan araştırmalar, farklı hücre tipleri üzerinde *in vitro* çalışmalar kullanarak fizyolojik işlevlerini anlama yönünde gelişmiştir. Bununla birlikte, birincil hücre kültürlerinin aseptik koşullar altında tutulması zor olması nedeniyle bakteri kültürü poliaminlerin fonksiyonlarının değerlendirilmesi için uygun bir model haline geldi.

Poliaminlerin bakteri üremesi üzerindeki etkisi, kültür ortamındaki miktarlarına ve değerlendirilen bakteri türüne bağlı olarak, poliaminler, gramnegatif bakteri ve birkaç virüsün büyümesini inhibe ederken, bazı *Haemophilus*, *Neisseria* ve *Pasteurella* suşlarının büyümesini de indüklediği saptanmıştır (41,43). Poliaminlerin etkilerinin hücre büyümesi üzerine önemli olan bir keşif, poliaminlerin DNA'ya bağlanma kapasiteleri ve nükleotitlerin yükünü değiştirme kapasiteleridir (44).

2.2. Poliaminlerin özellikleri ve biyokimyasal önemi

Doğal poliaminler [Agmatin, Putresin: (1,4-diaminobutan), Spermidin: (N- (3-aminopropil)-1,4-butadiamin) ve Spermin: (N, N'-bis (3-aminopropil)-1,4-bütandiamin)] tüm canlı hücrelerde bulunan çeşitli uzunluklarda karbon zincirlerine ve farklı amino gruplarına sahip küçük, bazik, organik, alifatik ve düşük molekül ağırlıklı katyonlardır. Bu bileşiklerin bir veya daha fazlası her canlı hücrede bulunur (45,46). Poliaminler, iki veya daha fazla amino grubu (-NH₃⁺) içeren tüm ökaryotik ve prokaryotik hücrelerde bulunan polikatyonik moleküllerdir. (şekil: 9).

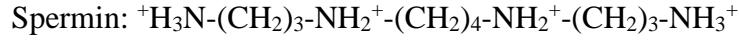
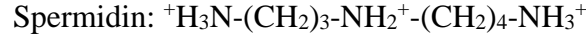
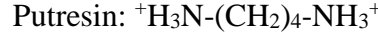


Şekil 9: Poliaminlerin Biyokimyasal yapısı. Spermin (tetraamin), spermidin(triamin), putresin (diamin) ve kadaverin (diamin) (47,48).

Poliaminlerin yapısındaki amino grupları poliaminlere çok önemli fonksiyon özellikleri kazandırmaktadırlar. Fizyolojik öneme sahip amin molekülleri olarak, birçok nörotransmitter ve hormonun (dopamin, epinefrin, norepinefrin, serotonin ve tiroid hormonları gibi) alifatik yapılarıyla ve amino gruplarına sahip olmalarıyla değerli olmaktadır. Biyojenik bir moleküldeki amino gruplarının sayısı, ona farklı biyokimyasal ve fizyolojik özellikler sağlamaktadır (48,49).

Poliaminlerin yapısındaki amin grupları fizyolojik koşullarda protonlanarak pozitif yüklü yapılara dönüşmektedir. Doğal olarak kazandıkları pozitif yükler, DNA, RNA, ATP ve fosfolipidler gibi negatif yüke sahip hücresel bileşikler ile etkileşime girmelerine olanak sağlamaktadır. Hücrelerin çoğalma hızı ile poliaminlerin derişimleri arasında önemli bir ilişki varlığı bulunmaktadır. Poliaminlerin hücresel anyonlar ile etkileşim yeteneği esas olarak her bir poliamin ilişkili pozitif yüklerin sayısına bağlıdır.

Anyonik etkileşimlerin üretilmesinde spermin en çok sayıda pozitif yüke sahip olduğu için en aktif ve putresinin en az sayıda pozitif yüke sahip olduğu için en az aktif olmaktadır (Şekil 10) (50).



Şekil 10: Poliaminlerin Katyonik yapıları (45).

2.3.Poliaminlerin Fonksiyonları ve biyolojik işlevleri:

Poliaminlerin biyolojik etkileri göz önüne alındığında hücre proliferasyonu ilk sırada yer almaktadır. Hücre çoğalmasının gereksinimlerinin başında ise DNA ve RNA sentezi gelmektedir. Poliaminler hücre büyümesi, farklılaşması, çoğalması, DNA, RNA ve protein sentezinde önemli bir rol oynadığını yapılan araştırmalarda ortaya konmuştur (51,52,53). Poliamin derişimlerinin farklılaşması hücre içinde ve organizmada birçok kimyasal olayların başlamasına ve farklılaşmasına neden olması kaçınılmazdır. Bu nedenle hem endojen hemde eksojen kaynaklardan gelen poliaminlerin hücre içi konsantrasyonları sıkı bir şekilde düzenlenmek zorundadır. Poliaminlerin hücre içi derişimlerinin ihtiyaca göre belirlenmesi bu nedenle oldukça önemlidir (44,47).

2.3.1. Poliaminlerin hücreler üzerindeki etkileri

Poliaminlerin polikasyon niteliği, DNA, RNA, ATP ve fosfolipidler gibi anyonik komplekslerine bağlamalarına izin verir. Spermidin ve spermin çoğunlukla hücre içi molekülleri ile ilişkilidir, ancak hücrede çoğu putresin serbest haldedir. Poliaminlerin en önemli hücresel etkilerinden biri, gen ekspresyonunda artış, mRNA içeriği, RNA'ların ribozomlara translokasyonu, ribozomal montaj, ATP ve magnezyum kullanımı gerektiren hücre çoğalmasının uyarılmasıdır. Bu durum poliaminlerin hücre çoğalmasını teşvik etmek için bu hücresel işlemlerin her birine katkıda bulunduğunu göstermektedir (49,54). Ek olarak, kanserde poliaminler metabolik süreçleri düzenler ve farklı tip tümörlerin gelişimini, metastazını ve kontrolünü değerlendirme de merkezidir. Bu tür işlemler arasında hücre bölünmesi ve çoğalması, gen ifadesi, DNA ve protein sentezi, apoptoz düzenlenmesi, oksidatif stres, anjiyogenez ve hücre-hücre iletişiminin düzenlemeleri yer alır (55,56,57).

Hücrel fonksiyonlar ve canlılık perspektifinden bakıldığında, tüm memelilerin organ sistemlerinde fizyolojik süreçleri sürdürmesi ve hayati önem taşımaları nedeniyle, poliaminlerin iki önemli etkisi olan oksidatif stres ve anjiyogenez en büyük ilgiyi çekmiştir. Embriyonik gelişim sırasında, mitoz, apoptoz ve neovaskülarizasyon arasındaki denge üreme performansını geliştirmek için kritik öneme sahiptir.

Bu nedenle, poliaminlerin, gebeliğin peri-implantasyon döneminde, mitoz, apoptoz ve neovaskülarizasyonun metabolik süreçleri üzerindeki etkilerinin uygun bir şekilde anlaşılması ve daha fazla araştırılması, memelilerde üreme performansını artırmak için hayati öneme sahiptir. (58).

2.3.2. DNA yapısı ve apoptoz üzerindeki etkisi

Poliaminler DNA'yı stabilize eder, kromatin kompleksleri, kromatin ve DNA yapısında gelişen modifikasyonların nedeninin poliamin yetersizliği olan hücrelerde gösterilmiştir (59). Tersine, yukarıda belirtildiği gibi, aşırı miktarda poliamin birikimi, apoptozu aktive eder. Etkili olduğu düşünülen mekanizmalardan biri, poliamin oksidaz (PAO) tarafından poliaminlerin katabolizması sırasında hidrojen peroksit birikiminin oluşturduğu oksidatif stres olduğu düşünülmektedir (60). Bu nedenle, bağırsak epitel hücre hattında (IEC-6), diflorometil ornitin (DFMO, bir ODC inhibitörü) poliamin sentezinde anahtar enzim olan ODC'nin baskılanması sonucu yeterli poliaminlerin üretilmemesi ile apoptozu yavaşlatılır. Aynı koşullarda, eksojen bir putresin temini veya S-adenozilmetiyonin dekarboksilaz (SAMdc)'nin inhibe edilmesiyle de hücre içi putresin birikiminin indüklenmesi apoptozu geri getirmektedir (61).

2.3.3. Poliaminler ve hücre çoğalması

Poliaminlerin hücre çoğalmasındaki önemi iyi bilinmektedir. Etkileri hücre büyümesi ve ölümü ile ilgili çeşitli genlerin düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan nükleer fosfoprotein p53'ün aktivitesi ile etkileşimlerini içerir (62). Difluoromethylornithine (DFMO) tarafından hem *in vivo* hem de *in vitro* olacak inhibe edilen poliamin sentez düzeyi yetersizliği sonucu p53 geninin ekspresyonunun artmasına neden olur. Bundan dolayı hücre büyümesinin inhibisyonunu sağlar. Paralel olarak, poliamin tükenmesi, p53 mRNA'nın stabilitesinde önemli bir artışa yol açar. Bu etki, p53'ün ana bir inhibitörü olan Mdm2 proteininin ekspresyonu

üzerindeki inhibe edici bir etki ile kuvvetlendirilir (Mdm2, p53 ile aktif olmayan bir kompleks oluşturup parçalanmaya yönelir) (63).

Poliaminler (bu olayda spermidin, spermin ve putresinden daha etkili); endotel hasarı sonrası vasküler düz kas hücre migrasyonu için önemli bir rol oynar (64). Ayrıca, hücre büyümesi sırasında poliaminlere gereksinim, kısmen ökaryotik başlangıç faktörü 5A (eIF-5A) modifikasyonu için bir substrat olarak spermidine ihtiyaçtan kaynaklanabilir. eIF-5A, iki aşamalı bir işlemde deoksihipusin sentetaz (butilaminin, spermidinden eIF 5A'da spesifik bir lizin kalıntısına transferini katalize eder) ve deoksihipusin hidroksilaz (bu, olgunlaşmış eIF-5A'yı oluşturmak için bu kalıntıyı hidroksile eder) ile spermin ile modifiye edilir (65).

2.3.4. Poliaminler ve gen ifadesi

Poliaminler (putresin, spermidin ve spermin) hücre çoğalmasındaki etkilerini nükleik asit ve protein sentezini düzenlenmesindeki rolü nedeni ile de fizyolojik öneme sahiptir. Bu etkilerinin de 30S ribozomal alt birimlerin *in vivo* mekanizmaları etkileyerek protein sentezini kalite ve kantitesini etkilemektedir (66). Böylece poliaminler gen transkripsiyonunu ve translasyonunu uyarır. Hücrelerde poliaminlerin-RNA kompleksi şeklinde var olabilecekleri ve RNA arasındaki etkileşimleri Mg^{2+} 'nin fizyolojik konsantrasyonlarında olabileceği saptanmıştır (67).

2.3.5. Poliaminler ve iyon kanalları

Endojen poliaminler, özellikle sperminin, çeşitli iyon kanallarının bloke edilmesinde ve modüle edilmesinde etkili olduğu tespit edilmiştir. Özellikle bazı potasyum kanalları (membran potansiyelinin korunmasında yer alan) ve glutamat reseptörü üzerinde bloke edici bir etkiye sahiptir (63). Bu kanallar hem uyarıcı hem de uyarıcı olmayan hücrelerde zar potansiyelini kontrol ederek nöronlarda ve kas hücrelerinde uyarılma eşliğinin de kontrol edilmesine aracılık eder. Ayrıca sperminin, merkezi sinir sisteminde Ca^{2+} geçişlerinin boyutunu artıran ya da gerilim boyutunu bloke edebilecek etkilerini N-metil D-aspartat (NMDA) reseptörlerinin alt tiplerinde glutamat antagonisti olarak etki yapar. Poliaminlerin başka birçok katyon kanalları ile de etkileşimleri bildirilmiştir (68).

2.3.6. Poliaminler ve hücre sinyalizasyonu

Poliaminler hücre içi sinyal yollarının etkilemelerinde başlıca rol polikatyonik özelliklerinden ileri gelmektedir. Bu özellikleri poliaminlere membranlara lokalize

fosfolipidler ile güçlü bir şekilde etkileşime girmesine izin vererek membran bağımlı enzimlerin aktivitelerinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynayabilmektedirler. Böylece hücre membran polaritesinin dengeleyici/düzenleyici etkileri sayesinde poliaminler aracılığı ile epidermal büyüme faktör (EGF) reseptörlerin aktivitelerinin modüle ederek hücre özelliklerini değiştirebilmektedirler (69,70).

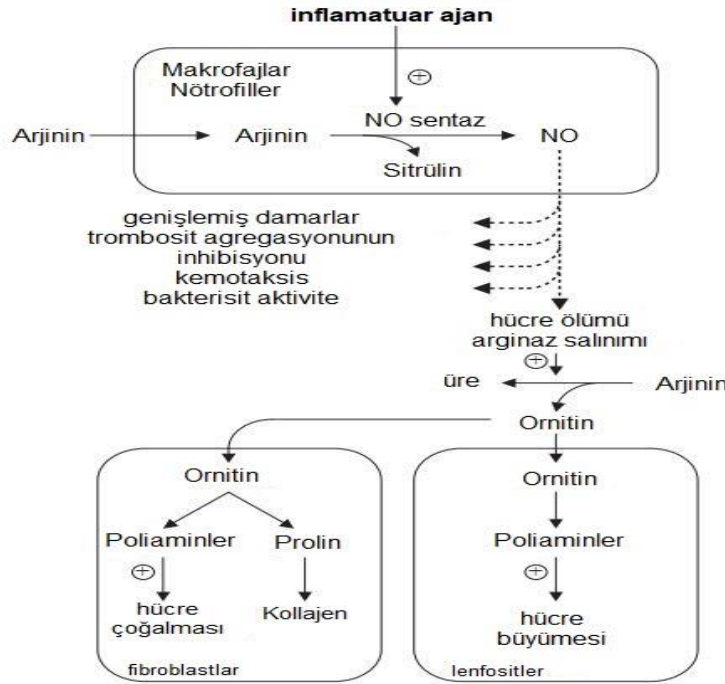
Proto-onkogenlerin (myc, jun, fos) ekspresyonunu uyaran çeşitli protein kinazların (tirozin kinaz, MAP kinaz) aktive edilmesinde (69), GTPaz aktivitelerini G proteinleri ile etkileşime giren poliaminler hücre içi sinyallerin oluşunda etkili olmaktadır. Ek olarak, poliaminler, NF-kB'nin (özellikle inflamasyon süreçlerinde yer alan transkripsiyon faktörü) DNA üzerinde spesifik etki oluşturacak nükleer faktörlere bağlanmayı çok yüksek konsantrasyonlarda spesifik yanıt elemanlarına bağlanmasını uyurabilir (71,72).

2.3.7. Poliaminler, bağışıklık hücreleri ve yara iyileşmesi

Poliaminler hem bağışıklık hücrelerinin farklılaşmasında hem de enflamatuar reaksiyonun düzenlenmesinde oldukça önemli rol oynamaktadır. Makrofajların aktif duruma geçip fagosite yapma kabiliyeti sergilemelerindeki en önemli mekanizmalardan biri indüklenebilir nitrik oksidaz sentaz'ın (iNOS) aktive edilmesidir. Makrofajların aktif durumunun (M1 ya da Fight (F1) sonlanması ve M2 ya da yara iyileştirme moduna geçişte İNOS'un inhibisyonunu gerektirir. Bu süreçler başlıca poliaminler tarafından yönetilmektedir. Yapılan çalışmalarda inflamasyon bölgelerinde iNOS ekspresyonlarının poliamin sentezindeki değişiklikler (azalma yönünde) ile başladığı ve fagositik hücrelerin bu bölgelerde biriktiğini göstermeleri poliaminler ile immün hücrelerin aktivasyonu arasında ki ilişkiyi net bir şekilde ortaya koymaktadır (73). İnflamasyon sonrası hasar görmüş bölgede hücrelerin onarılması ve ölü hücrelerin yerine yeni hücrelerin sentez edilmesi için arjinin metabolizmasının tamamen poliamin ve kollajen sentez yönüne kayması ve salınımlarının (spermin) artması ile hücre büyümesinin ve çoğalmasının hızla kolaylaştığı gösterilmiştir. Ayrıca iNOS aktivitesinin baskılanması ile immün durumun M2 fazına geçtiği tespit edilmiştir (74,75,76). Bir başka çalışmadaki önemli bir bulgu da prolaktinin T hücreler üzerindeki etkisi poliaminlerin metabolizmasının düzenlenmesin Spermidin / sperm N1-asetil-transferaz (SSAT) aktivitesinin arttırması ve Poliamin oksidaz (PAO) aktivitesininde azaltılması ile gerçekleştirmesidir (77).

Ayrıca poliaminlerin, pulmoner immünolojik ve intestinal immünoalerjik reaksiyonlar üzerine de baskılayıcı bir etkisi olduğu belirlenmiştir (78).

Poliaminlerin proto-onkogenlerin *cfos* ve *c-myc* ekspresyonu üzerindeki aktive edici etkisi immün durumun yara iyileştirme/M2 ya da F2 (fix) moduna doğru yöneldiğinin başka bir göstergesidir (64). Hücre proliferasyonundaki rollerinin yanı sıra, yaranın iyileşmesi için gerekli olan fibroblastların çoğalmasında poliaminler, transglutaminazlar için substratlar olarak işlev görür. Bu Ca^{2+} bağımlı enzimler, bir protein ve bir primer amin arasında bir izopeptid (α glutamil) lisin bağı oluşumuna izin verir ve ekspresyonu, TGF- β gibi mediatörler tarafından artırılır. Ayrıca TGF- β 'nin gen ifadesi için poliaminlerin gerekli olabileceği de bildirilmektedir (64). Bu transglutaminazların, yara iyileşme sırasında apoptoz, osteogenez, hücre sinyalleme ve hücre adezyonu gibi birçok hücre içi ve hücre dışı işleme dahil olduğu gösterilmiştir (şekil:11) (62,79, 80).



Şekil 11: İnflamasyon yerinde NO ve poliaminlerin sentezi: fagositler, lenfositler ve fibroblastlar arasındaki iş birliğinin önemi. (NO sentaz: nitrik oksit sentaz)

2.3.8. Poliaminler ve bağırsak

Poliaminlerin bağırsak fonksiyonunun korunmasında yapılan çalışmalarda önemli bulgular elde edilmiştir. Hasar meydana geldiğinde, bağırsak mukozası bir diğerinin yerine getirilmesi yoluyla iki ardışık mekanizma ile kendisini onarabildiği, böylece hasarlı hücrelerin elimine edilmesinden sonra çıplak yüzey, hücrelerin komşu veya alt

bölgelerden göç etmesi ve diğerlerinin değiştirilmesi yoluyla tekrar kaplanabildiği saptanmıştır (69,76).

Kriptik IEC-6 hücre kültür modelinde yapılan incelemede bağırsak hücrelerinin göç ve hücre hareketliliğinde gerekli olan aktin filament oluşumunun poliaminlerin mevcudiyetine bağlı olduğu saptanmıştır (64,73). Poliaminlerin sentezin de anahtar enzim olan ODC nin DFMO (bir ODC inhibitörü) ile inhibe edilmesi ile arjinin metabolizmasının prolin yönüne kaymasının hücre onarım işlemleri için bir zorunluluk olduğunun da bir başka kanıtı olmaktadır (82).

Poliaminlerin bağırsak metabolizması içindeki rollerinin araştırılması ile ilgili olarak bağırsak rezeksiyonu veya transplantasyon sonrası intestinal adaptasyon çalışmalarında, rezeksiyon sonrası kalın bağırsakta poliamin içeriklerinin önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir (83,84). Poliaminlerin bağırsak trofikitesi içindeki rolü, bağırsak rezeksiyonu veya transplantasyonu sonrası intestinal adaptasyon üzerine yapılan çalışmalarla da gösterilmektedir (83, 84). Ayrıca eksojen olarak uygulanan poliaminlerin (spermin) endojen olarak sentezlenen poliaminlerin yerini alabileceği de gösterilmiştir (85). TGF- β 32'nin ekspresyonunu uyararak veya transglutaminazları aktive ettiğinde gösterilmiştir (86). Deneysel hayvan modelinde 3 gün aç bırakılan sıçanların diyetine konulan ornitin tuzu (ornitin alfa-ketoglutarat) ile villularda hiperplazi gelişimine ve fırçamsı yüzeylerinde hidrolaz aktivitesindeki artışın poliamin sentezinde ki artışa bağlı olduğu gösterilmiştir (87). Duranton ve ark. Tarafından yapılan daha sonraki çalışmada ise ornitin alfa-ketoglutarat farelere uygulandığında iskemi hasarını önlemediği ancak poliamin sentezindeki artışa bağlı olarak mukozanın onarımı desteklendiği bildirilmiştir (88).

2.3.9. Poliaminlerin üreme sistemine etkileri

Poliaminlerin hem erkeklerin hem de kadınların üreme fizyolojisi üzerinde üreme başarısı için hayati olan süreçleri düzenleyecek etkileri vardır. Erkeklerde Sertoli ve Leydig hücreleri, spermatogenez sırasında spermatogonia'nın farklılaşmasını düzenleyen poliaminleri sentezler ve depolar. Spermin üretkenlik için hayati bir poliamin olarak kabul edilir, çünkü sperm üretemeyen fareler, spermin farklılaşmamasıyla sonuçlanan spermatogonia ve primer spermlerin mayotik sonlanması nedeniyle kısırır (89,90). Poliaminlerin testis içindeki önemi, spermin ve spermidinin, seminal plazmada diğer herhangi bir vücut dokusu veya sıvısından daha fazla olması hücre içi konsantrasyonlarına dayanmaktadır.

Bu bulgu, poliaminlerin sperm hareketliliği ve sperm yumurtaları dölleme kapasitesi için önemini ortaya koymaktadır. Ayrıca, sperm ve spermidin, sperm hücreleri tarafından glukoz kullanımını da artırmaktadır (91).

Kadınlarda poliaminler, puberte öncesi ve postpubertal aşamalar sırasında yumurtalık fonksiyonları için gerekli mekanizmaları düzenler. Granüloza ve luteinize edici hücrelerin ovulasyon süreçlerinde modülasyonu, dölleme koşuluna göre mayotik sürecin olgunlaşması için putresin miktarını ve üreme dokuları dahil plasentanın da kan akışını artırdığı gösterilmiştir (90, 91). Gebe koyunlarla yapılan araştırmalar, üreme dokularındaki poliamin konsantrasyonlarının, plasentolarda, interkotiledon plasenta ve endometriyal gebeliğin ilk yarısı sırasında daha fazla olduğu poliamin konsantrasyonlarının gestasyon aşamasına bağlı olarak değiştiğini ortaya koymuştur (91). Gebeliğin periimplantasyon ve implantasyon dönemlerinde, hücrelerin proliferasyonunda, migrasyonunda ve organogenez süreçlerinde moleküler sinyal mekanizmaların olumlu etkileri memelilerde embriyonik sağkalımı iyileştirir (92,93). Embriyonun erken kayıpları üreme sisteminde yetersiz miktarda sentezlenen poliaminler ile ilişkilendirilmektedir (89, 94).

2.3.10. Poliaminler ve oksidatif stres

Oksidatif stres, anaerobik hücrelerde oksijen kullanımına bağlı olarak oksitlenen ürünlerdeki artış ile ortaya çıkmaktadır. Başka bir deyişle antioksidan-oksidan dengenin oksidan yöne kaymasıdır (95). Oksijen kullanılan reaksiyonlarda tam elektron aktarımının olmadığı koşullarda serbest radikal bileşikleri oluşmaktadır. Serbest radikaller, endojen proteinlerin, fosfolipid membranların, karbonhidratların, nükleik asitlerin ve diğer hücrel bileşiklerin ile reaksiyona giren ve hücrel molekülleri yıkıma uğratan biyokimyasal olarak oldukça kararsız moleküllerdir. En yaygın serbest radikaller, hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit anyonu (O_2^-), nitro peroksit (NOO^-) ve hidroksil radikalleridir (OH^-). Serbest radikalleri bloke ederek, ortadan kaldırarak ya da daha kararlı yapılara dönüştüren moleküllere antioksidanlar denir. Bu moleküllerin yetersizliğinde mevcut radikallerden en toksik olanları (OH^- , NOO^- ve O_2^- gibi) zarar ve DNA hasarlarına neden olurlar, hasarın boyutu büyük olursa ve tamir edilemezse hücreler apoptoz yoluna girerler (96).

Poliaminler, hücrel metabolizma sırasında oluşan serbest radikalleri kontrol ettikleri için hücre koruyucu etkileri olan güçlü antioksidanlardır (97,98). Yukarıda belirtildiği gibi poliaminler, DNA gibi hücrel moleküllerle etkileşime girer.

DNA ve poliaminler arasındaki güçlü etkileşim, DNA nükleotidlerinin negatif yükü nedeniyle oluşur ve poliaminler DNA'nın yapısal ve fonksiyonel hasarını önler. Çünkü DNA'ya bağlanarak serbest radikalleri bloke ederler. Poliaminler ayrıca hücre zarlarında lipid peroksidasyonunu da inhibe eder. Lipid peroksidasyonu, doymamış fosfolipidlerin, hücre zarındaki lipitlerin işlevselliğini ve yapısını etkileyen doymuş fosfolipitlere dönüştürüldüğü bir işlemdir (97,98).

Membranın akışkanlığı ve geçirgenliği doymamış yağ asitlerinin sayısına bağlı olduğu için lipid peroksidasyonunun önlenmesi önemlidir (97,99). E. coli ile yapılan çalışmalar, putresinin, oksidatif strese karşı korunma için oksR, Kate ve katG gibi genlerin ekspresyonunu arttırarak kültür ortamında serbest radikallere maruz kalan suşların hayatta kalma oranını arttırdığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada, spesifik bir putresin inhibitörü (1,4-diamino-2-butanon) oksidatif stres koşulları altında oksR ekspresyonunu azaltmıştır. Bu nedenle, poliaminlerin DNA'ya bağlanma ve genlerin ekspresyonunu teşvik etme kabiliyetinin bakteri modellerinde oksidatif strese karşı koruyucu olduğunu düşülmüştür (100).

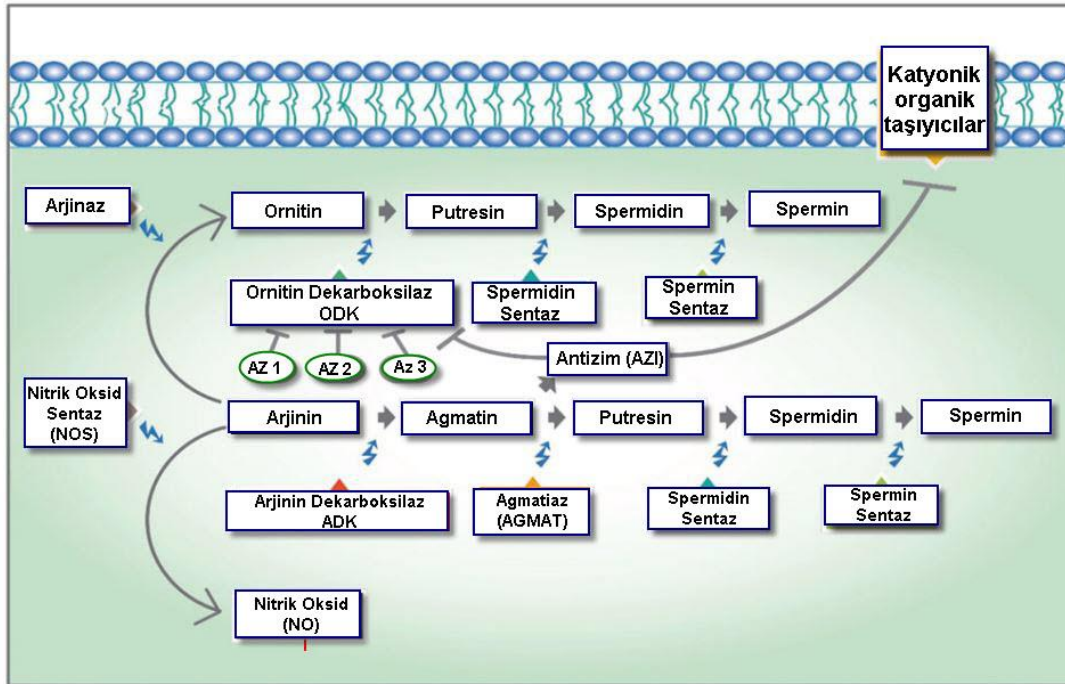
Poliaminlerin hücresele seviyede metabolizması ayrıca, ısı stresi ve çeşitli patolojiler gibi fizyolojik olmayan koşullar altında yüksek derecede toksisite oluşturur. Çin hamsteri yumurtalık hücreleri ile yapılan ve ısı stresine maruz kalan araştırmalar, poliaminlerin oksidasyon oranının arttığını ve hücrelerin canlılığını etkileyen serbest radikallerde önemli bir artışa bağlı yüksek derecede toksisitenin geliştiği gösterildi (101). Poliaminlerin serbest radikalleri kontrol etme potansiyeli araştırmalarında, sperminin, spermidine kıyasla kültüre edilmiş hücrelerde H₂O₂'i kontrol etme kabiliyetinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Genetiği değiştirilmiş fare fibroblastları hücreleri (spermin için gen içermeyen hücreler), *in vitro* kültürlenmiş ve 1- 2 mM H₂O₂'ye maruz bırakılan normal fibroblastlarla karşılaştırılmıştır. Sonuçlar, genetiği değiştirilmiş hücrelerin H₂O₂'ye normal hücrelere göre daha yüksek duyarlılığa sahip olduğunu göstermiştir. Ek olarak, 10 µM spermin eklendiğinde ve aynı dozdaki spermidin ile karşılaştırıldığında, sperminin, hücreleri H₂O₂'den korunmada çok daha büyük biyolojik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (102).

Poliaminlerin reaktif oksijenleri temizleme kapasiteleri doğrulansa da daha çok çalışmaya ihtiyaç var. Çünkü biyojenik aminlerin hücrelerdeki seviyeleri yüksek olduğunda, amin oksidazların aktivitesilerinin arttığı ve buna bağlı olarak yeni serbest radikallerin oluştuğu da bir gerçektir (103).

2.4. Poliaminlerin Metabolizması (Sentezi ve Yıkımı)

Poliaminler endojen olarak tüm dokularda sentezlenir. Diyet yolu ile besinlerden gelen ve bağırsak mikrobiyotasından salınıp emilen poliaminler ekzojen olarak da alınır (8). Poliamin homeostazının sağlanmasında sentez yolağında yer alan hız sınırlayıcı ve düzenleyici enzim ornitin dekarboksilaz (ODC) ve katabolizmada yer alan asetil transferazlar ve Poliamin Oksidaz (PAO) gibi enzimler önemli bir role sahiptir.

Poliaminlerin endojen sentezi arjinin amino asitini öncül olarak kullanarak iki yolla olur. İlki arjinaz aracılığı ile ornitin sentezlenir, ornitinden ise hız sınırlayıcı enzim olan ODC'nin katalizlediği reaksiyonla ilk majör poliamin olan Putresin (Put) sentezlenir, daha sonra spermidin sentaz aracılığı ile Spermidin (Spd), spermin sentaz aracılığı ile de Spermin (Spm) sentezlenir. İkinci yol ise Arjinin Dekarboksilaz (ADC) aracılığı ile diğer bir poliamin olan Agmatin (Agm), daha sonra agmatinaz enzimi ile putresin sentezlenir. Hücre içi konsantrasyonu artan Spd ve Spm spesifik asetil transferazlar aracılığı ile asetillenenek hücre dışına salınırlar. Diğer hücrelerde özel taşıyıcılar aracılığı ile plazmaya ya da ekstraselüler matrikse salınan poliaminleri hücre içine alırlar (Şekil 12) (57).



Şekil 12: Poliaminlerin taşınması ve sentezi için moleküler yol. Arjinin, ornitin dekarboksilaz (ODC1) ile ornitine hidrolize edilir. Arjinin ayrıca üç nitrik oksit sentaz formundan (NOS1, NOS2, NOS3) biriyle nitrik okside dönüştürülebilir. ODC1'in enzimatik aktivitesi ve düzeyi bollu ornitini putresine ve dolayısıyla spermidine ve spermine

dönüştürme kapasitesini ve düzeyini kontrol eden antizimlerle (AZI, AZI2 ve AZI3) düzenlenir (58).

2.5.Poliaminlerin asetilasyonu

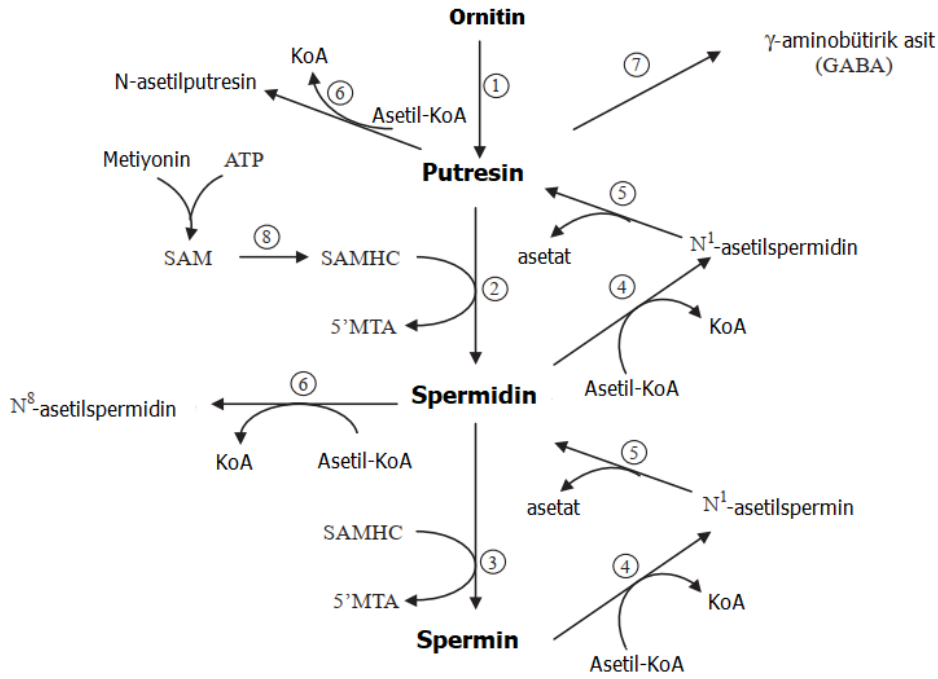
Poliaminler, çeşitli oksidazların ve asetil transferazların etkisi ile çok sayıda türevler halinde metabolize edilirler.

2.5.1. Asetilasyon reaksiyonları

Aminopropil-transferazlar tarafından katalize edilen reaksiyonlar geri dönüşlü olmamasına rağmen, spermin ve spermidin, sırasıyla spermidine ve putresine geri dönüştürülebilir (104). Bu reaksiyonlar, bir sitozolik asetil-CoA: spermidin / sperm N1-asetil-transferaz (SSAT) etkisiyle N-asetillenmiş ara maddeler, N1 asetilspermin ve N1-asetilspermidinin oluşumunu gerektirir. Özel olarak, yakın zamanda, insan SSAT geninin, amino asit mevcudiyeti ile (transkripsiyonel ve transkripsiyon adımlarında) düzenlendiği gösterilmiştir (105).

Daha sonra, peroksizomlarda bulunan bir FAD enzimi olan poliamin oksidaz (PAO), bir aldehit (3-asetamidopropanal) ve hidrojen peroksit salınımı ile bir poliamin verir (106). Radyoaktif-işaretli spermidin veya spermin *in vivo* olarak tek başına uygulandığında diğer iki poliaminin bu dönüşüm reaksiyonları ile çok hızlı bir şekilde putresine dönüştüğü saptanmıştır. Farklı substrat özelliklerine sahip izoenzimlerin varlığı da bildirilmiştir (104,107). Ek olarak, son ürün olarak salınan N8-asetil-spermidin ve Nasetil-putresin'i veren bir nükleer N8-asetil-transferaz daha saptanmıştır (108).

Asetilasyon reaksiyonları, hücreye taşıdıkları pozitif yük sayısını azaltarak poliaminlerin farklı polianyonlarla etkileşimlerinin azaltılmasına neden olmaktadır. Asetillenmiş poliaminlerin artan atılımı, poliaminlerin hücre içi konsantrasyonunun kontrol edildiği mekanizmalardan biridir (Şekil 13) (104, 108).



Şekil 13: Poliaminlerin sentezi ve dönüşümleri 1. ornitin dekarboksilaz (ODC); 2. spermidin sentetaz; 3. spermin sentetaz; 4. asetil-CoA: spermidin / spermin N1-asetil transferaz (SSAT); 5. poliamin-oksidadz (PAO); 6. N8-asetil-transferaz; 7. diamin-oksidadz (DAO); 8. S-adenozilmetiyonin dekarboksilaz (SAMdc). SAM: S-adenozilmetiyonin; SAMHC: S-adenozilmetil homosisteamin, 5MTA: 5-metiltiyoadenozin.

2.6. Poliaminlerin taşınması

Plazmaya salınan poliaminlerin hücrelerdeki fizyolojik etkisinin oluşturulmasında hücrelerin sahip oldukları taşıyıcı sistemlerine bağlıdır. Memelilerde hücre içi poliaminler düşük olduğunda hücrelerin plazmadaki poliaminleri hücreye dahil etme kabiliyetini artıran, farklı 22 organik katyon taşıyıcı aile ile 2 de (SLC22A2) gibi organik katyonik taşıyıcılar aracılığı ile yapılmaktadır Bununla birlikte, SLC22A2 gibi taşıyıcılar da hücrelerdeki poliaminlerin konsantrasyonları arttığında inhibe edilebilir ve bu işlem hücrelerin poliaminlerin homeostazının muhafaza etmesine katkı sunar (Şekil 12) (91,94, 109).

2.6.1. Taşıma sistemleri

Taşınım (hücre sel alım ve salınım), hücre içi poliamin içeriğinin düzenlendiği ana yollardan biridir. Bu nakil, hücre içi poliamin içeriğinin, örneğin ODC'nin inhibe edilmesiyle, protein sentezine bağlı bir işlemin azaltılmasıyla uyarılır. Bu durumda, eksojen poliaminlerin tedariki hücre içi poliamin konsantrasyonunda hızlı ve belirgin bir artışa neden olur ve sonuçta yeni bir taşıma inhibisyonuna neden olur (108).

Poliaminlerin taşınması bakterilerde iyi tanımlanmıştır, ancak memelilerde çok da net değildir. *Escherichia coli*'de üç sistem tarif edilmiştir: bir ATPase'e bağımlı iki taşıyıcı, biri putresine özgü, diğeri spermidine özgü ve hem hücre alımını hem de salımını sağlayan ve ayrıca birde putresine özgü üçüncü bir sistem (110).

Memelilerde, taşıyıcı (lar) için gerekli gen (ler) henüz tanımlanmamıştır. Akciğer alveollerinin epitel hücreleri vücutta en yoğun taşıma aktivitesini gösterir. Bu hücrelerde biri yüksek diğeri düşük afiniteli iki taşıma sistemi tanımlanmıştır. Bu taşıma ATP'ye bağımlıdır (65). Çin hamsteri yumurtalık hücrelerinde (gen transfeksiyonu veya deaktivasyon deneyleri için yaygın olarak kullanılır) ve kolonik karsinom hücrelerinde CaCo-2'de, farklı poliaminler için tek bir enerjiye bağımlı sistem tarif edilmiştir (61). Bununla birlikte, bir poliamin salgılama aktivitesinin korunmasının, onları yakalayamayan bazı hücre hatlarında, iki farklı nakil sisteminin varlığını ortaya koyan çalışmalarda vardır (108).

İnsan hücre hatlarında Satriano ve ark. dekarboksilasyon ile argininden türetilmiş bir poliamin olan agmatinin, aktif bir ATP bağımlı sistem tarafından hücrede taşındığını ve diğ er poliaminlerin taşınmasında yarışmacı bir inhibitörü olduğunu gösterdiler. Not olarak, agmatin, bu taşıyıcı yarışmacı etkisi ile putresin, spermidin ve sperminin hücre içeriğini boşaltma kabiliyetiyle doğrudan bağlantılı olabilecek antiproliferatif bir özellik gösterdiğini de belirttiler (111).

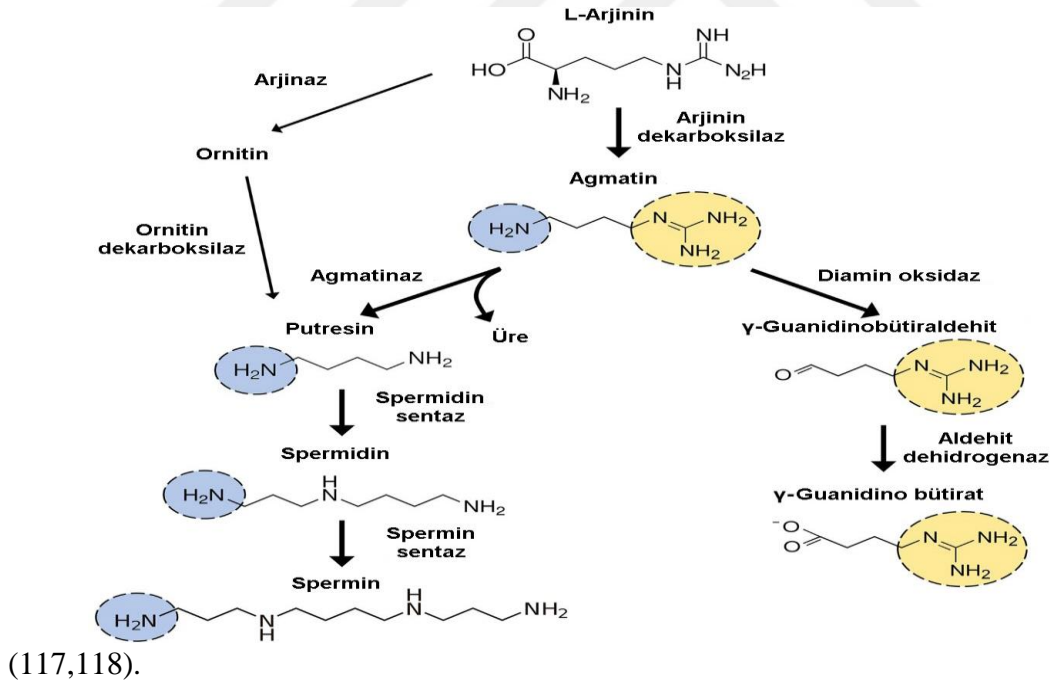
2.7. Agmatin ve Tarihçesi

Agmatin (Agm; $^+H_3N-(CH_2)_4-NH-CN H-NH_3^+$), arjinin dekarboksilaz (ADC) aracılığı ile L-arjininden sentezlenen bir poliamindir. Dekarboksile olmuş arjinin olarakta bilinir. Bu molekül bitkilerde, bakterilerde ve omurgasızlarda saptandı. 1990'lara kadar memelilerde tespit edilmedi. Başlangıçta bir nörotransmitter olduğu düşünülen agmatinin yapı analizi sonucunda bir poliamin olduğu anlaşıldı (112). Sonraki yıllar memelilerin beyinlerinden izole edilen molekülün spektroskopik analizler sonucu agmatin olduğu açıklandı (113, 114).

Agmatin arjinin dekarboksilaz enzimi aracılığı ile arjinin amino asitinin dekarboksile edilmesi ile sentezlenir. Daha sonra putresin oluşturmak üzere agmatinaz enzimi aracılığı ile 1 mol üre ayrışması ile putresin sentezini sağlar (Şekil 14).

Agmatin, insülin salınımına aracılık ederek sekretagog özellik gösterdiği ve glukoz metabolizmasını indirekt olarak modüle ettiği, yine adrenal bezin kromaffin hücrelerinden adrenalın ve noradrenalin salgılanmasını uyardığı saptanmıştır (112). Nöromodüler olarak, merkezi sinir sisteminde, agmatin luteinize edici hormon salgılayan hormon (LHRH) salınımını uyardığı ve morfinin etkisini doza bağımlı olarak artırdığı da saptanmıştır (114). İyonotropik etkileri ile adrenerjik reseptöre, imidazolin reseptörüne ve NMDA reseptörüne bağlandığı ve endotel hücrelerinde NOS'u aktive ettiği bilinmektedir (115). Buna zıt olarak ta iNOS aktivitesini de inhibe ettiğinde saptanmıştır (116).

Agmatin, kendi başına poliaminlerin homeostazında önemli bir role sahiptir. ODC'yi inhibe etme kabiliyeti ile başka bir fizyolojik önemi ortaya çıkmıştır. Bu özelliği ile agmatin ODC'yi inhibe ederek düz kas proliferasyonunu inhibe etmektedir



Şekil 14: Agmatin sentez ve yıkım yolağı

2.8. Putresin:

Putresin (put) ilk kez 1907 yılında bitkiden elli yıl sonrada beyinden izole edildi (112). Çürük kokusundan (putrifiying) dolayıda putresine olarak adlandırılmıştır. İki amino grubu olan kısa hidrokarbon zincirinde dört karbon atomu (C4) içeren bir diamindir ve bağlanma afinitesi poliaminler arasında en düşük olanıdır. Putresin hayvan dokusunun ayrışması sırasında amino asit lizin ve argininin dekarboksilasyonunun diamin ürünüdür (7,9). Memelilerde iki sentez yolağı vardır, birincisi hız sınırlayıcı enzim olan ODC tarafından katalizlenen reaksiyon ile putresin oluşmaktadır (Şekil 13). İkincisi ise agmatinin agmatinaz enzim aracılığı ile yıkımı sonucu putresin oluşmaktadır (Şekil 14).

2.9. Spermidin:

Spermidin, triamin olarak bilinen üç amino gruba sahip bir poliamindir. Spermidin, putresinden sentezlenen ve sperminin bir öncüsü olarak işlev gören her yerde bulunan bir polikatyondur. Putresine, spermidin ve sperminin hepsi bilinen ve bilinmeyen biyolojik süreçlere katılan poliaminlerdir. Ekzojen spermidin temini, maya (*Saccharomyces cerevisiae*), nematodlar (*Caenorhabditis elegans*) ve fles (*Drosophila melano-gaster*) dahil olmak üzere çeşitli model organizmaların ömrünü uzattığı ve bu maddenin farelerde yaşa bağlı oksidatif protein hasarını azalttığı belirtilmektedir. Evrensel bir yaşlanma karşıtı molekül olarak spermidin, kültüre edilmiş maya ve memeli hücrelerinde, ayrıca nematodlarda otofajiye neden olur. (7,9,119).

2.10. Spermin:

Spermin poliamini, spermidin ve dAdoMet' in kimyasal reaksiyonu spermin sentaz ile katleli ile sentezlenir. Bu enzim sadece ökaryot hücrelerde bulunur. Bu enzimin en yüksek aktivitesi diğer dokulara göre kıyaslandığında endokrin glandlarda ve beyinde yüksek aktiviteye sahiptir. Enzim kendi ürünleri spermin ve 5'-metiltiyoadenozin ile inhibe edilir. Kimyasal yapısında dört amino gruba sahiptir ve bir tetramin olarak sınıflandırılır (Şekil 13) (7).

2.11. Kadaverin:

Kadaverin, iki amino ve beş karbon atom (C5) grubu içeren hayvansal dokularda proteinlerin hidrolizi sırasında ortaya çıkan lizinin ve argininin bakteriyel dekarboksilasyonu ile oluşan kötü kokulu diaminlerden biridir.

Spermin, anyonik etkileşimlerin üretilmesinde en aktif ve putresinin en az sayıda pozitif yüke sahip olduğu için en az aktif olmaktadır. Hayvanların çoğunu iten çok kötü kokulu bir koku ile karakterize olan bu moleküller ayrıca çöpçü, parazit ve diğerleri için çekici bir etki yaratabilir. Son yapılan çalışmalar, CAD'in, aminle ilişkili reseptörler (TAAR'lar) olarak adlandırılan, koku alma epitelindeki kemosenör reseptörlerini aktive ettiğini göstermektedir. TAAR genleri, tüm omurgalı taksonlarında, türler arasında çeşitlilik göstermekte ve kanonik koku alma reseptörleri (OR'ler) ve feromon vomeronasal reseptörleri (VR'ler) için tamamlayıcı uçucu molekülleri saptamak için duyuşal bir alt sistemi oluşturmaktadır (120,121,122,123,124).

2.12. Poliaminler ve hastalıklarla ilişkileri

2.12.1. Poliaminler ve kanser

Hızla büyüyen hücreler ve tümör hücreleri, ODC ve SAMdc dekarboksilazın yüksek aktivitelerini gösterir. Poliaminler, hücre büyümesine dahil edildiğinden poliamin biyosentezinde yer alan enzimler potansiyel olarak antineoplastik tedaviler için birer hedeftirler (125,59,126,127,128,129). ODC'nin aşırı ekspresyonu genellikle tümörögenез ile ilişkili olmasına rağmen, ODC geni aşırı eksprese eden transjenik farelerde 20-50 kat daha yüksek ODC aktivitesi sergilemesine rağmen uzun yaşam süresi sergilemelerine rağmen spontan tümör insidansı bakımından hiçbir fark gözlenmedi (130). Meme kanserinde, tümörün poliamin içerikleri ve nüksü arasında pozitif bir ilişki vardır. Aynı şekilde, poliamin içeriğini prognostik faktörlerle ilişkilendirmek için birkaç girişimde bulunulmuştur ve çoğu durumda, yüksek poliamin içeriği ile daha zayıf sonuç arasında pozitif bir ilişki gösterilmiştir (131).

Poliamin içermeyen bir diyet ile antikanser etkili DFMO'nun daha efektif olduğu görülmüştür. Bu sonuç DFMO aracılı inhibe edilen poliaminlerin, kısmen diyet bileşenlerinden alınan poliaminlerle telafi edildiğini göstermektedir. Bu nedenle, poliaminlerin taşınmasını önleyen bileşikler, DFMO'nun antiproliferatif aktivitesini arttırmada etkili olabilecekleri öngörülmektedir (128). DFMO, kemoterapi ile kullanılabilir; ancak sonuçlar DFMO'nun ilaçların verimliliğini artırabileceğini veya

azaltabileceğini göstermektedir (132) Bu sebepten dolayı, poliamin alımını inhibe etmek için birkaç analog geliştirilmiştir. Poliaminlerin taşınmasının daha iyi karakterizasyonu ile yeni bir antikanser ilaçların tasarımına yardımcı olacaktır (129).

Birkaç sitotoksik bileşik geliştirilmiştir ve 2 grup poliamin analogu umut vericidir: oksa-poliaminler ve bisoksinaftalimitler. Oksa-spermin ve oksa-spermidin herhangi bir biyolojik aktivite göstermez. Bununla birlikte, onların sülfoaminoderivatifleri bir insan tümör hücresi paneline karşı sitotoksikite sergiler (133).

2.12.2. Poliaminler ve parazit enfeksiyonu

DFMO, memelilerde Trypanosoma brucei (TB) 'nin akut enfeksiyonunu tedavi ettiği gösterilen anti-parazitik bir ajan olarak başarılı olmuştur (131). DFMO'nun TB enfeksiyonuna karşı yüksek verimliliğinin birçok nedeni olabilir. Birincil neden, konakçı ve parazit ODC enzimi arasındaki kararlılıktaki önemli tutarsızlıktır. Parazit ODC oldukça kararlıdır ($t_{1/2} > 6$ saat), insan enzimi hızla dönüşür ($t_{1/2} < 1$ saat). Bu, yeni sentezlenmiş aktif ODC'nin, insan konakçıdaki etkisizleştirilmiş DFMO'nun yerini aldığını ancak enzimin devir oranının düşük olduğu parazitin yerini almadığını gösterir (134). Bu nedenle, DFMO, hücreyi oksidatif strese karşı koruyan tripanyonun (parazitte glutasyonun eşdeğeri) sentezini önler (131). Ayrıca, DFMO Chaga hastalığı, leishmaniasis veya sıtma gibi hastalıkların tedavisinde de etkilidir (131,134).

2.12.3. Poliaminler ve gen tedavisi

İlginç bir araştırma alanı, viral olmayan gen tedavisinde DNA transfeksiyonu için poliaminin kullanılmasıdır. Bu tekniğin ilgisi, viral vektörlerden daha düşük bir toksisite, düşük immünojeniklik, kontrol edilebilir sentezler ve farmasötik karakterizasyon için tanımlanmış moleküler yapıdır (135).

2.12.4. Poliaminler ve diyabet

Glikasyon diyabetik komplikasyonların oluşumunda önemli bir rol oynar. Bu nedenle, antiglisasyon ajanları üzerinde yoğun bir araştırma devam etmektedir. Son zamanlarda, bir in vitro çalışma, spermin ve spermidinin, fizyolojik konsantrasyonda önemli bir antiglikasyon etkisi gösterdiğini göstermiştir (136). Bu sonucu doğrulamak için ileri in vitro ve in vivo çalışmaların da ele alınması gerekmektedir.

3.GEREÇ VEYÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan Gereçler

Spektrofotometre (HITACHI 220)

PH metre cihazı (ADWA, AD 1200)

Vortex (ISO LAP, laborgerate GmbH)

Mikro pipet (set 1000 µl, 100µl ve 10 µl) (Gilson)

Kuvartz küvet

Manyetik karıştırıcı

Hassas terazi (Bl 120 S)

Ependrofler

3.1.2. Sarf malzeme ve kimyasal maddeler

D-Glucose 6-phosphate sodium salt

β-Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrate

Glucose-6-phosphate Dehydrogenase from baker's yeast

Agmatin

Putresin

Spermidin

Spermin

Tris-HCl

MgCl₂

3.1.3. Çözeltilerin hazırlanması:

Poliaminlerin (Put, Spd, Spm ve Agm) normal plazma konsantrasyonları baz alınarak düşük, normal ve yüksek konsantrasyonları hazırlandı (Tablo 2). Enzim aktivite ölçümü için gerekli olan 0.0033 M MgCl₂ içeren 0.055 M Tris·HCl tampon çözeltisi hazırlandı ve HCl çözeltisi ile pH 7.8 ayarlandı. Enzim aktivitesinde kullanılan 0.006 M NADP ve 0.1 M Glucose-6-phosphate çözeltileri ultra saf deiyonize su kullanılarak hazırlandı.

Tablo 2: Poliaminlerin düşük-normal-yüksek konsantrasyonları

Poliaminler			Normal plazma konsant.			
Agmatin	2 ng/ml	4ng/ml	8 ng/ml	12 ng/ml	16ng/ml	20 ng/ml
Putresin	5 ng/ml	8ng/ml	15 ng/ml	20 ng/ml	25ng/ml	30ng/ml
Spermidin	2ng/ml	4ng/ml	7 ng/ml	12 ng/ml	16ng/ml	20 ng/ml
Spermin	2ng/ml	4ng/ml	6 ng/ml	8 ng/ml	10ng/ml	12ng/ml

3.2. Yöntem

3.2.1. Glukoz-6-FDH enzim aktivite ölçümü:

Glukoz-6-PDH enzimin aktivitesinin ölçümünde temel prensip reaksiyonda yer alan NADP'nin indirgenmesi sonucu oluşan NADPH'ı **340 nm** dalga boyunda absorbanstaki artışın ölçülmesine dayanmaktadır.

Deney protokolünün hazırlanması ve 340 nm absorban ölçümü;

Liyofilize G6PDH enzim kaynağı, pH 7.8 olan 3,3 mM MgCl₂ içeren 55 mM Tris-HCl tamponunda 5,1 mg/ml stok olacak şekilde hazırlandı. Daha sonra stok çözeltiden 10 mikrolitre alınıp 1ml'ye seyreltildi ve deney protokolüne göre gerekli hacim (0.1 ml) kullanıldı. Deneyde kullanılacak diğer substratlarda önceden hazırlandı, ölçüm boyunca tüm deneyde kullanılacak enzim ve substratlar buz küveti içinde tutuldu. Spektrofotometre 340 nm dalga boyuna, sıcaklık 25°C ye ayarlandı ve aşağıdaki tabloya göre deney karışımı hazırlandı en son 0.1 ml enzim karışımı örnek küvetine ilave edilerek alt üst edilip kronometre çalıştırıldı, 5 dakika boyunca her bir dakikada absorbanlar okunup kaydedildi. Böylece ortamda hiç poliamin olmadan sadece saf enzim aktivitesi ölçüldü. Daha sonra hazırlanan poliaminlerin (agmatin, putresin, spermidin ve spermin) farklı derişimleri tek tek mevcut enzim protokolüne uygulandı tampon hacminde ki değişiklikler ile 3 ml deney ortam hacminin sabit kalması sağlandı ve absorban ölçümleri kaydedildi.

*Standart enzim aktivite ölçüm protokolü

	Kör	Örnek
0.055 M Tris·HCl buffer, pH 7.8 with 0.0033 M MgCl ₂	2.8 ml	2.7 ml
0.006 M NADP (or 0.06 M NAD)	0.1 ml	0.1 ml
0.1 M Glucose-6-phosphate	0.1 ml	0.1 ml
Glukoz-6-PDH	-	0.1 ml

*Poliaminlerin eklenmesi ile standart enzim aktivite ölçüm protokolü

	Kör	Örnek
0.055 M Tris·HCl buffer, pH 7.8 with 0.0033 M MgCl ₂	2.8 ml	2.6 ml
0.006 M NADP (or 0.06 M NAD)	0.1 ml	0.1 ml
0.1 M Glucose-6-phosphate	0.1 ml	0.1 ml
Poliamin (Agm, put, spd, spm)	0.1 ml	0.1ml
Glukoz-6-PDH	-	0.1 ml

Ölçülen absorbanslar kullanılarak aşağıdaki formüller ile enzim aktivitesi spesifik ve volüm aktivite olarak hesaplandı, tablo ve şekiller oluşturuldu.

Standart Ünite; Dakikada 1mikromol glukoz-6-fosfatı ürüne (6-fosfo-D-glukonat) dönüşümünü katalizleyen enzim aktivite miktarıdır (mikromol/ml dk).

Volüm aktivite; Bir mililitredeki enzim ünite aktivitesi (ünite / ml).

Spesifik aktivite; Miligram protein başına dakikada enzim ünite aktivitesi (ünite / mg protein, dk.).

Hesaplamalar:

$$Volum\ aktivite = \frac{V * \left(\frac{\Delta A}{\Delta t}\right)}{\epsilon * d * v\ enzim}$$

V: Total Hacim = 3 ml

$(\Delta A/\Delta t)$ = G-6-FDH aktivitenin absorbanslarının ortalaması 5 dakikada = 0,553

d: küvetin kalınlığı = 1 cm.

ϵ : Sabit bir değer = 6,22 $cm^{-1} mM^{-1}$

V_{enzim} : Deneyde kullanılan enzim miktarı = 0,1 ml.

$$Volum\ aktivitesi = \frac{3 * 0,553}{6,22 * 0,1}$$

G-6-FDH'in Volum Aktivitesi = 2,66 ünite/ ml.

$$Spesifik\ aktivite = \frac{VA\ (\text{ünite/ml})}{\epsilon * d * v\ enzim * C\ protein}$$

VA= Volum Aktivite.

ϵ : Sabit bir değer = 6,22 $cm^{-1} mM^{-1}$.

V_{enzim} : Deneyde kullanılan enzim miktarı = 0,1 ml.

$C_{protein}$: G-6-FDH 0,1 ml 0,0005 mg Protein.

$$Spesifik\ aktivite = \left(\frac{2,66}{0,0017}\right)/1000$$

G-6-FDH'in spesifik Aktivitesi = 1.56 ünite / mg protein, dk.

$$\% aktivite = \frac{Poliaminin\ volum\ aktivitesi * 100}{Enzimin\ volum\ aktivitesi}$$

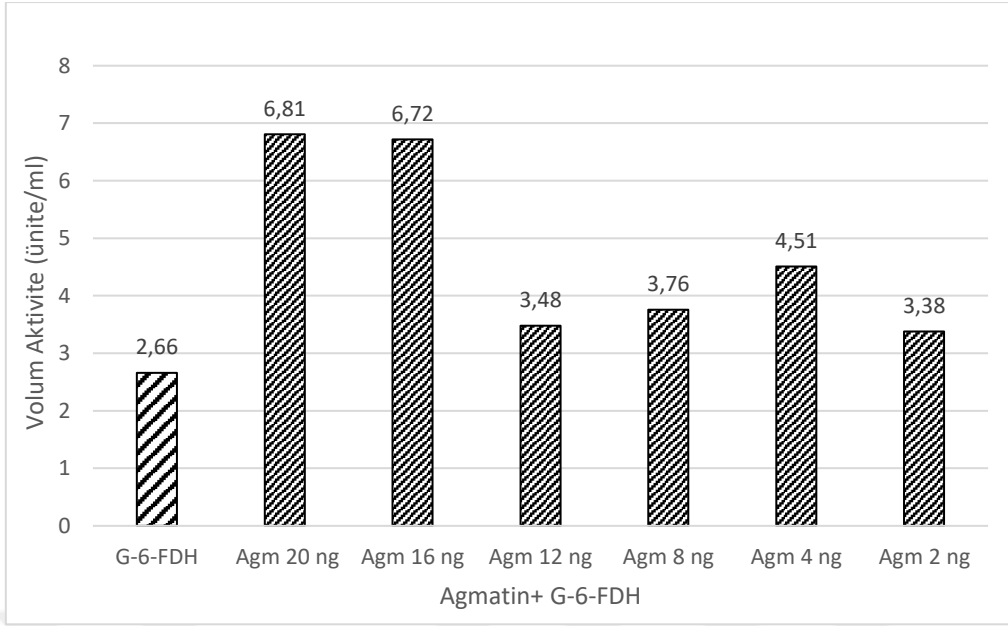
G-6-FDH % Spesifik aktivitesi = %100

4. BULGULAR

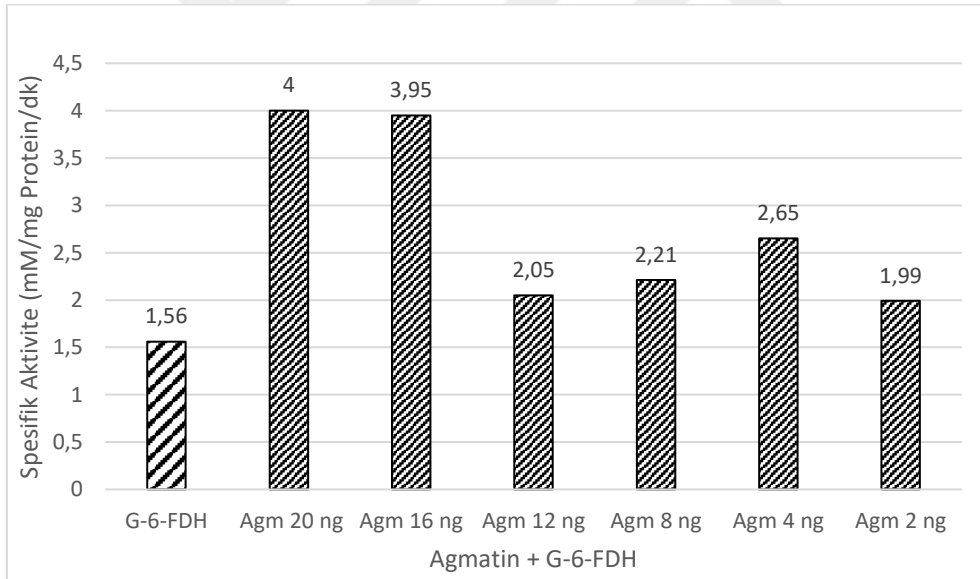
Agmatin ile G-6-FDH invitro çalışmalarda elde edilen sonuçlar:

Tablo 3: G-6-PDH ve Agmatin çalışma tablosu.

			Agm				
	G-6-FDH	Agm 20ng/ml	Agm 16ng/ml	Agm 12ng/ml	Agm 8ng/ml	Agm 4ng/ml	Agm 2ng/ml
Absorbans/1 dakika	0.38	0.99	0.97	0.38	0.54	0.52	0.37
Absorbans/2 dakika	0.50	1.38	1.33	0.53	0.64	0.78	0.52
Absorbans/3 dakika	0.58	1.52	1.49	0.73	0.76	0.99	0.72
Absorbans/4 dakika	0.63	1.57	1.56	0.91	0.91	1.14	0.86
Absorbans/5 dakika	0.68	1.60	1.61	1.05	1.05	1.24	1.03
Ortalama	0.55	1.41	1.39	0.72	0.78	0.93	0.70
Volum aktivite	2.66	6.81	6.72	3.48	3.76	4.52	3.38
Spesifik aktivite	1.56	4.00	3.95	2.05	2.21	2.65	1.99
% Spesifik Aktivite	100	256.21	252.79	131.10	141.62	169.85	127.37



Şekil 15: G-6-FDH volum aktivite -Agmatin invitro etkileşim grafiği

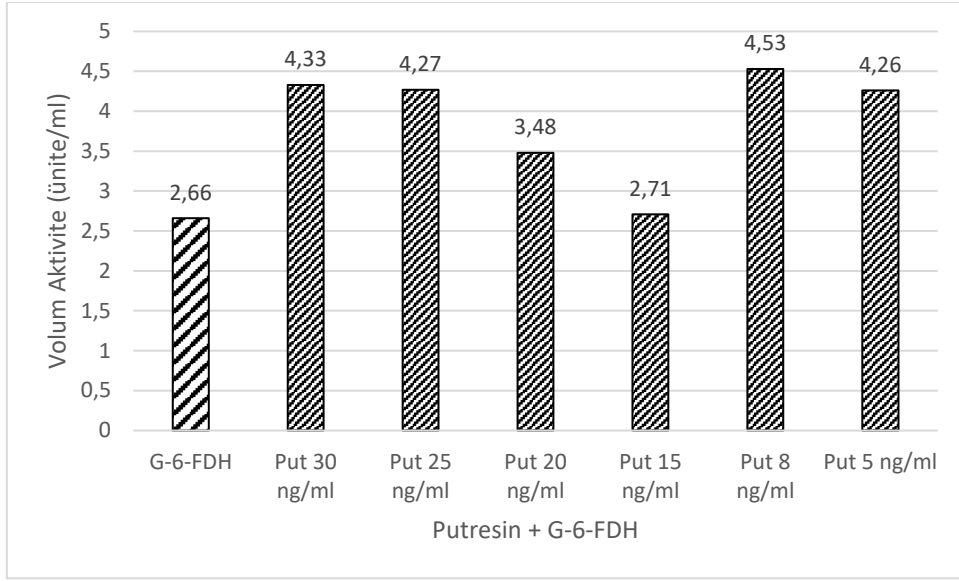


Şekil 16: G-6-FDH spesifik aktivite -Agmatin invitro etkileşim grafiği

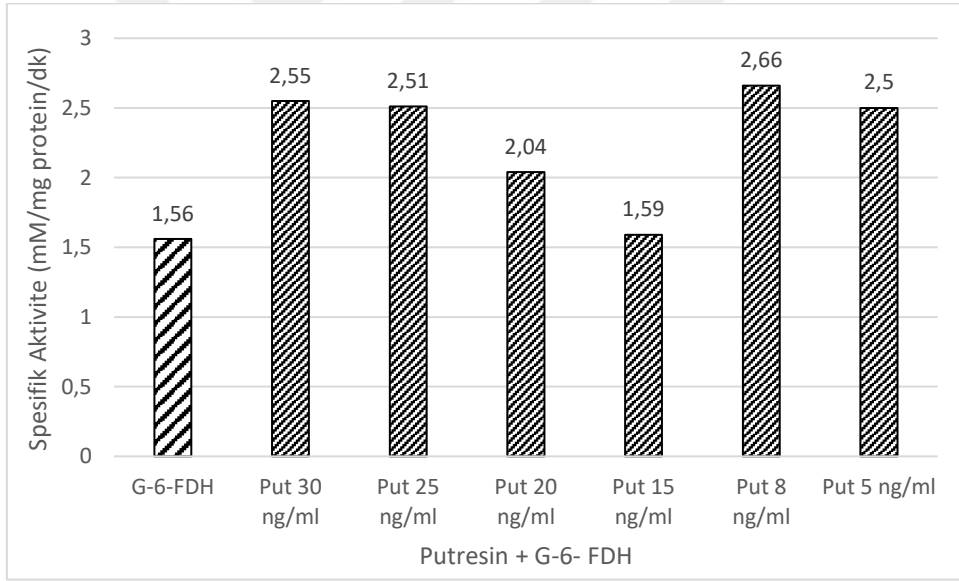
Putresin ile G-6-FDH invitro çalışmalarda elde edilen sonuçlar:

Tablo 4: G-6-PDH ve Putresin çalışma tablosu.

			Put				
	G-6-FDH	Put 30ng/ml	Put 25ng/ml	Put 20ng/ml	Put 15ng/ml	Put 8ng/ml	Put 5ng/ml
Absorbans/1 dakika	0.38	0.59	0.56	0.51	0.23	0.64	0.58
Absorbans/2 dakika	0.50	0.81	0.75	0.66	0.43	0.84	0.81
Absorbans/3 dakika	0.58	0.95	0.94	0.76	0.59	1.00	0.90
Absorbans/4 dakika	0.63	1.04	1.04	0.82	0.66	1.08	1.02
Absorbans/5 dakika	0.68	1.09	1.12	0.84	0.89	1.13	1.10
Ortalama	0.55	0.89	0.88	0.72	0.56	0.94	0.88
Volum aktivite	2.66	4.33	4.27	3.48	2.71	4.53	4.26
Spesifik aktivite	1.56	2.55	2.511	2.048	1.593	2.66	2.50
% Spesifik Aktivite	100	163	160.53	130.94	101.88	170.53	160.38



Şekil 17: G-6-FDH volum aktivite -Putresin invitro etkileşim grafiği

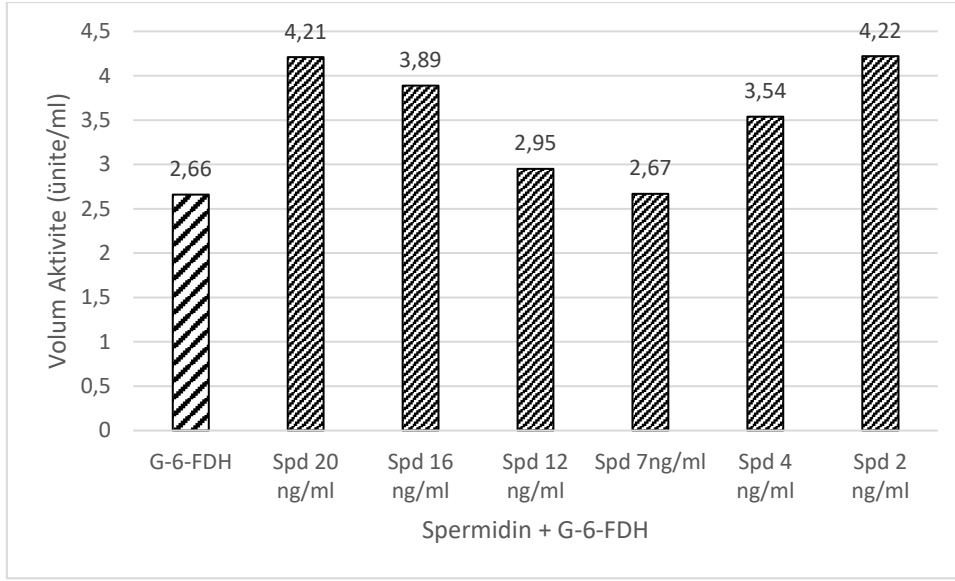


Şekil 18: G-6-FDH spesifik aktivite -Putresin invitro etkileşim grafiği

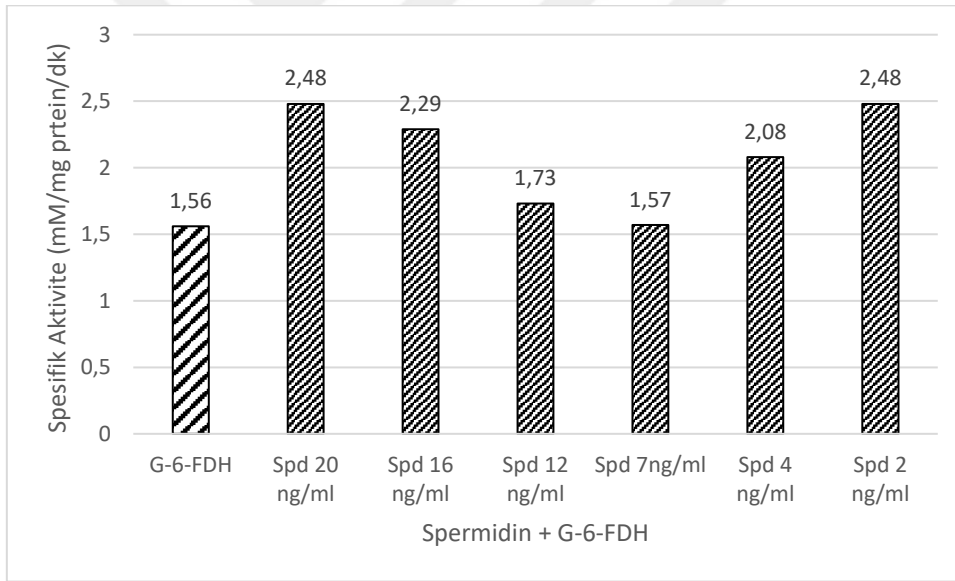
Spermidin ile G-6-FDH invitro çalışmalarda elde edilen sonuçlar:

Tablo 5: G-6-PDH ve Spermidin çalışma tablosu.

			Spd				
	G-6-FDH	Spd 20ng/ml	Spd 16ng/ml	Spd 12ng/ml	Spd 7ng/ml	Spd 4ng/ml	Spd 2ng/ml
Absorbans/1 dakika	0.38	0.585	0.43	0.39	0.29	0.39	0.43
Absorbans/2 dakika	0.50	0.86	0.76	0.52	0.47	0.53	0.72
Absorbans/3 dakika	0.58	0.92	0.85	0.64	0.57	0.68	0.93
Absorbans/4 dakika	0.63	0.98	0.97	0.72	0.68	0.93	1.07
Absorbans/5 dakika	0.68	1.02	1.02	0.78	0.75	1.13	1.22
Ortalama	0.55	0.87	0.80	0.61	0.55	0.73	0.87
Volum aktivite	2.66	4.21	3.89	2.95	2.67	3.54	4.22
Spesifik aktivite	1.56	2.48	2.29	1.73	1.57	2.08	2.48
% Spesifik Aktivite	100	158.58	146.5	111.17	100.6	133.27	158.84



Şekil 19: G-6-FDH volum aktivite -Spermidin invitro etkileşim grafiği

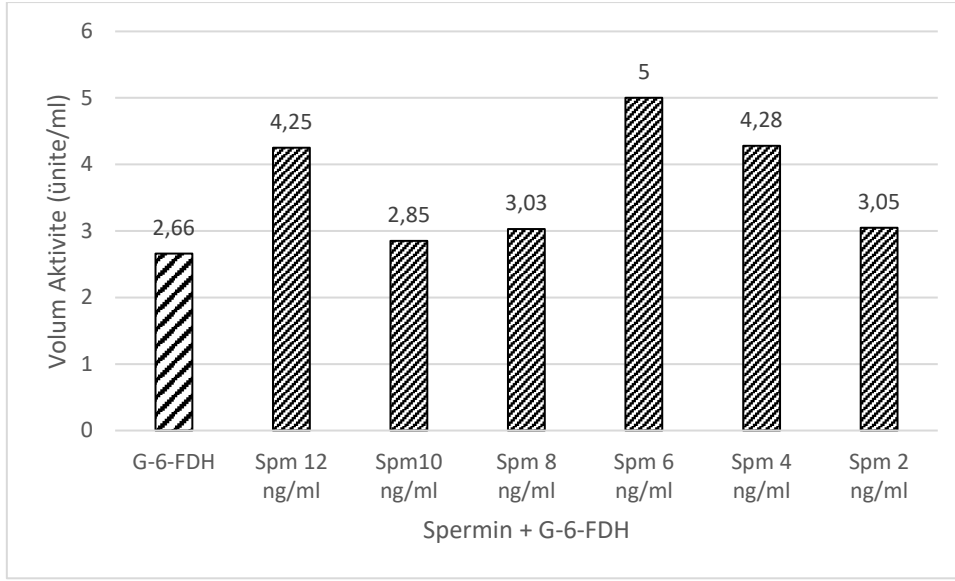


Şekil 20: G-6-FDH spesifik aktivite -Spermidin invitro etkileşim grafiği

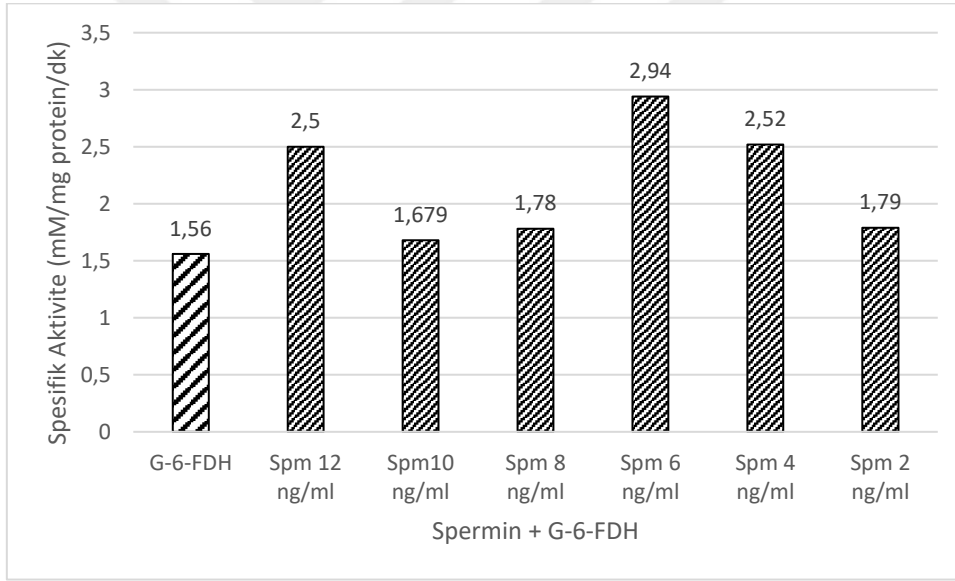
Spermin ile G-6-FDH invitro çalışmalarda elde edilen sonuçlar:

Tablo 6: G-6-PDH ve Spermin çalışma tablosu.

			Spm				
	G-6-FDH	Spm 12ng/ml	Spm 10ng/ml	Spm 8ng/ml	Spm 6ng/ml	Spm 4ng/ml	Spm 2ng/ml
Absorbans/1 dakika	0.78	0.53	0.49	0.41	0.598	0.513	0.342
Absorbans/2 dakika	0.51	0.72	0.63	0.55	0.932	0.772	0.482
Absorbans/3 dakika	0.78	0.97	0.82	0.68	1.12	0.97	0.55
Absorbans/4 dakika	0.63	1.03	0.92	0.74	1.23	1.06	0.79
Absorbans/5 dakika	0.78	1.08	0.100	0.76	1.29	1.12	0.99
Ortalama	0.53	0.88	0.59	0.62	1.03	0.88	0.63
Volum aktivite	2.66	4.25	2.85	3.03	5.00	4.28	3.05
Spesifik aktivite	1.54	2.50	1.679	1.78	2.94	2.52	1.79
% Spesifik Aktivite	100	159.97	107.43	114.18	188.12	161.17	114.93

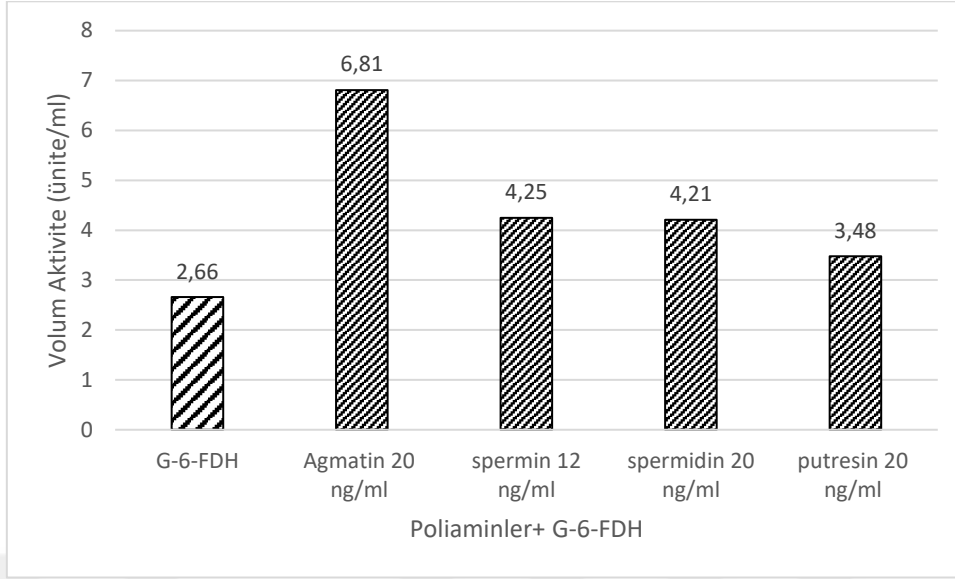


Şekil 21: G-6-FDH volum aktivite -Spermin invitro etkileşim grafiği

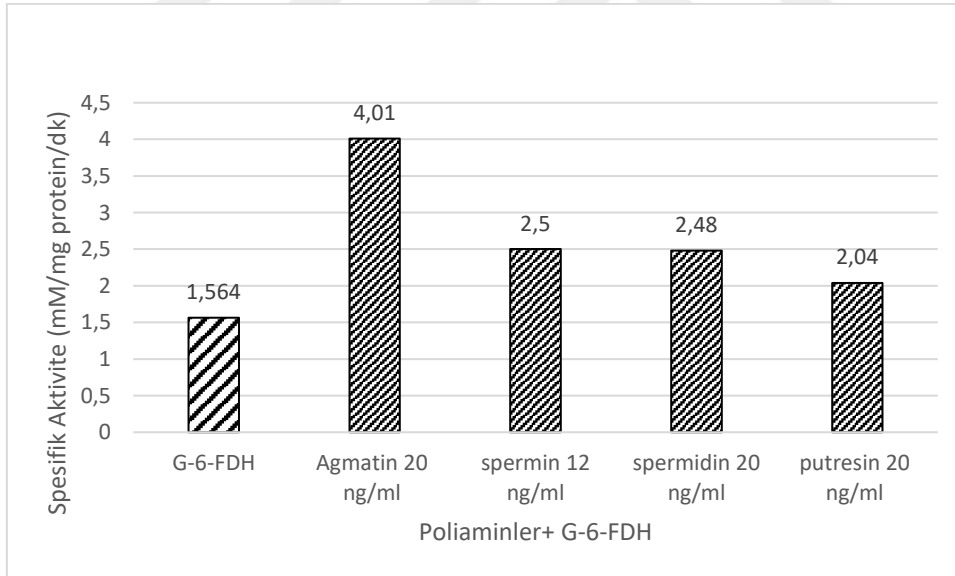


Şekil 22: G-6-FDH spesifik aktivite -Spermin invitro etkileşim grafiği

Tüm poliaminler yüksek dozlarda ile G-6-FDH

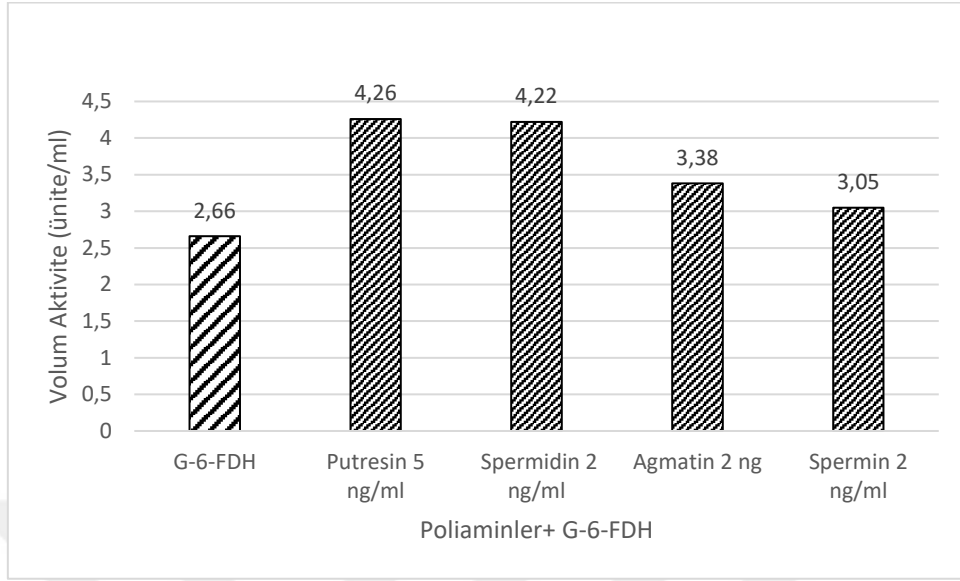


Şekil 23: G-6-FDH volum aktivite -Poliaminler (Agm, Put, Spm ve Spd) invitro etkileşim grafiği (yüksek dozlarda)

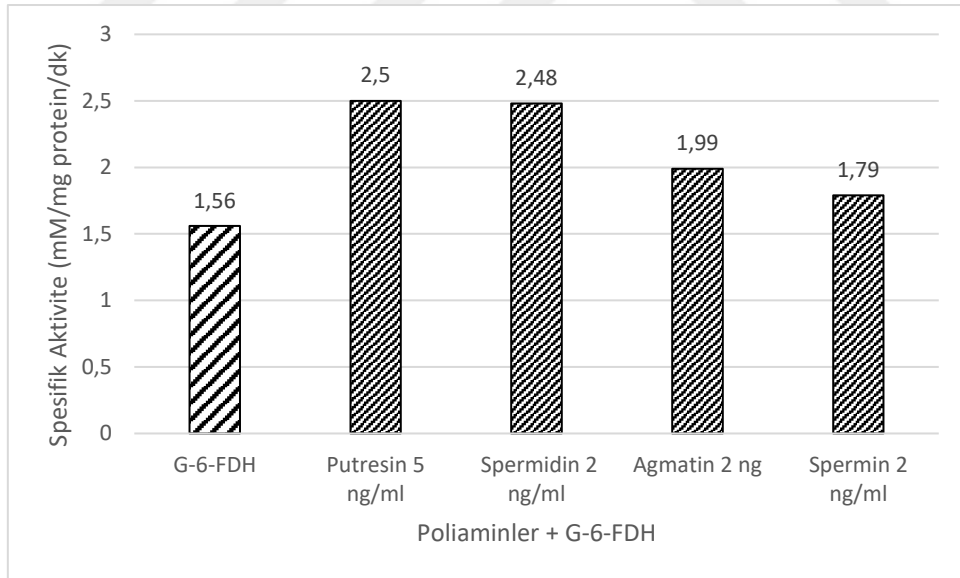


Şekil 24: G-6-FDH spesifik aktivite -Poliaminler (Agm, Put, Spm ve Spd) invitro etkileşim grafiği (yüksek dozlarda)

Tüm poliaminler en düşük dozlarda ile G-6-FDH



Şekil 25: G-6-FDH volum aktivite -Poliaminler (Agm, Put, Spm ve Spd) invitro etkileşim grafiği (düşük dozlarda)



Şekil 26: G-6-FDH spesifik aktivite -Poliaminler (Agm, Put, Spm ve Spd) invitro etkileşim grafiği (düşük dozlarda)

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, majör Poliaminlerin (Agmatin, Putresin, Spermidin ve Spermin) farklı derişimlerinin G6FDH aktivitesi üzerindeki etkileri incelendi. Hazırlanan farklı derişimler poliaminlerin normal plazma değerleri baz alınarak hazırlandı (137,138). Literatüre göre sağlıklı bireylerin plazmasında bulunan poliaminlerin normal değerleri, Agmatin için: **7,98 ng/ml**, Putresin için: **15,17 ng/ml**, Spermidin için: **7,01 ng/ml**, Spermin için: **6,00 ng/ml**. Poliaminlerin eksikliğini ya da fazlalığını normal plazma değerlerine göre kıyaslayabilmek için de, bu normal plazma değerlerin 2 katı altında ve üç katı üstüne olacak şekilde farklı konsantrasyon değerleri belirlenerek farklı derişimlerde çözeltileri hazırlandı (Tablo 2). Böylece normal olmayan (hastalık) koşullarda poliaminlerin hücre içi derişimlerinin artabileceği ya da azalabileceği buna bağlı olarak sağlık sorunlarını kıyaslayabilmek ve bu durumda poliaminlerin farklı derişimlerinin (her üç koşulda; düşük, normal ve yüksek konsantrasyonlar) G6FDH aktivitesini nasıl etkileyebileceği saptanacak ve olası hastalıklarla olumlu ya da olumsuz etkileri öngörülebilecektir. Bu şekilde çalışmanın amacına uygun konsept belirlenerek deney ortamı oluşturuldu.

Ölçümlerimiz sonucunda oluşturulan tablo ve grafiklere göre tüm poliaminler G6FDH aktivitesi üzerine pozitif bir etki göstererek enzimin aktivitesini artırmışlardır. Poliaminlerin en yüksek derişimlerinde (20 ng/ml; sadece spermin 12 ng/ml) enzim spesifik aktivitesinin artışına neden olan poliamin sıralaması ve yüzde etki düzeyleri sırasıyla “**agmatin %256> spermin %159> spermidin %158> putresin %130**” şeklindedir (Şekil 23). Poliaminlerin en düşük düzeylerine (2 ng/ml; sadece putresin 5 ng/ml) göre enzim spesifik aktivitesinde kıyaslandığında ise sıralama “**putresin %160> spermidin %158> agmatin %127> spermin %114**” şeklinde artışlar oluşmuştur (Şekil 25). İlginç olan sonuç yüksek dozlarda agmatin, düşük dozlarda ise putresin enzim aktivitesini en fazla artıran poliaminler olmuşlardır.

Agmatini doz etkileşim çalışmaları değerlendirildiğinde genel olarak tüm dozlarında enzim aktivitesinde artışa neden olmuştur. Düşük derişimlerine (2 ng/ml; 4 ng/ml) göre yüksek derişimleri (16 ng/ml ve 20 ng/ml) kıyaslandığında enzim aktivitesinde en fazla artış yüksek derişimlerde olmuştur. Bu iki yüksek dozlar arasında ise aktiviteler arasında çok fazla fark da oluşmamıştır (Tablo 3) (Şekil 15 ve 16). Enzim aktivitesindeki bu artış diğer poliaminler ile kıyaslandığında agmatin oldukça fazla bir fark yaratmıştır.

Putresin G6FDH enzim aktivitesini normal plazma düzeylerinin altındaki ve üstünde ki tüm derişimler de artırmıştır. Bu artışlar hemen hemen aynı düzeyde olsa da farklılık olarak ortaya çıkan bulguda en fazla enzim aktivitesini artıran etkili doz 8 ng/ml olarak saptandı. Bir diğer farklılık ise putresinin düşük dozunun enzim aktivitesindeki etkisi diğer poliaminlere kıyasla en yüksek olarak ortaya çıkmasıdır (Tablo 4) (Şekil 17 ve 18).

Spermidin normal plazma düzeyinin (7 ng/ml) enzim aktivitesini dikkate değer olmayacak şekilde artırmış olsa da hemen hemen değişmemiştir (saf enzimin spesifik aktivitesi 1,564 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein.dk, enzim+spd spesifik aktivite 1,574 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein.dk). Doz artış ya da azalışında enzim aktivitesi doz yönüne göre artmıştır. Enzim aktivitesinde en fazla artışa neden olan doz ise 2 ng/ml olmuştur. Diğer poliaminler ile kıyaslandığında her ne kadar putresin düşük doz da etkili olsa da spermidin de ikinci olarak putresini izlemektedir (Tablo 5) (Şekil 19 ve 20).

Spermin enzim üzerindeki en fazla artışı sağlayan dozunun normal plazma konsantrasyonu olarak belirlenen 6 ng/ml'lik dozudur. Bu dozda spermin enzim aktivitesini yaklaşık iki katına çıkarmıştır (%188). Diğer poliaminler ile kıyaslandığında spermin yüksek dozda agmatinden sonra enzim aktivitelerini en çok artıran sıradaki ikinci poliamindir (Tablo 6) (Şekil 21 ve 22).

G-6-FDH enzimin hücre içi konsantrasyonlarında ve aktivitelerindeki değişikliklerin birçok hastalığın prognozunda ya da patogeneğinde yer aldığı aşıkardır. Eksikliğinin yarattığı olumsuz etkilerinin başında NADPH a bağımlı sistemler ve biyosentez basamakları gelmektedir. NADPH bağımlı sistemlerin başında antioksidan enzim sistemler (glutasyon redüktaz, peroksidaz, katalaz gibi) gelmektedir. Bu enzimlerin tam performans çalışmaları ve hücreleri oksidatif hasarlardan koruyabilmeleri ve hücre yaşamını idame ettirebilmelerinin yegane kaynağı NADPH'tır. Bu da G-6-FDH enzim aktivitesine bağlıdır (6,19). İmmün hücrelerin aktif forma geçmesi için Nitrik oksit sentaz, NADPH Oksidaz gibi enzimlerin indüklenmesi için de NADPH'a gereksinim vardır. Yine yetersiz enzim aktiviteleri immün yetmezlik nedeni olmaktadır (21,22,23). Dihidrofolat redüktaz, sitokrom p450 oksidoreduktaz gibi sistemlerinde yetersiz NADPH durumlarında karaciğerde oksidatif ve immün strese yol açarak steostaz oluşumuna neden olmaktadır (21,22). Yine yetersiz G-6-FDH aktiveye bağılı olarak etkilen biyosentez yollarının başında lipogenezis ve bu yolda düzenleyici olan NADPH gereksinen enzimler olarak HMG CoA redüktaz etkilenecektir (20). Etkilenen mekanizmaların

bir diğeri de sitokrom p450 ile detoksifikasyon mekanizmalarıdır. Son olarak da yetersiz antioksidan kapasitesi ile artan radikal oksijen türleri doku hasarı ve inflamasyona neden olarak multibl skleroz, amiyotropik lateral skleroz (ALS) ve Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklara neden olmaktadır (139). G-6-PDH enzim eksikliği ya da yetersizliğinin olduğu durumda enerji dengesinde oluşan yetersizlik ile hemen hemen bütün hücreler olumsuz olarak etkilenmektedir. En çok etkilenen hücrelerin başında eritrositler (hemolitik anemi), riboza / deoksiriboza ihtiyaç duyan kemik iliği, deri ve bağırsak mukozası hücreleri gibi hızla çoğalan hücreler gelmektedir (6).

Çalışmamızda elde edilen veriler poliaminlerin (agm, put, spd ve spm) tamamının G-6-FDH enziminin pozitif bir modülatör olduğunu kanıtlamaktadır. Enzim eksikliğine bağlı hastalıklarda poliaminlerin plazma düzeylerinin de kontrol edilip varsa eksikliğinin giderilmesi ile ilgili yapılacak yeni çalışmalar birçok hastalığın prognozunu değiştirebilir. Enzim eksikliğine bağlı tüm hastalıklarda tedavi amaçlı poliamin özellikle agmatin uygulamaları etkili sonuçlara yol açabilir. Ama poliaminlerin proliferatör özellikleri de göz önünde bulundurulmalıdır. Aksi takdirde kanser gelişimine ve pek çok toksik olaya da neden olabilirler (54,55,94,106,129,140, 141,142,143).

Metabolik hastalıkların en önemlilerinden birisi de tip II diyabet hastalığıdır. Çelik ve arkadaşlarının yapmış oldukları diyabet tabanlı meme kanseri hastalarında diyabet grubundaki hastalarda poliamin sentezinde yer alan enzim düzeylerini düşük olarak saptamışlardır (144). Sentez enzimlerin düzeylerinin düşük olması halinde poliaminlerin plazma ve hücre içi konsantrasyonları düşük olacağı aşıkardır. Böyle bir durumda yapılacak yeni çalışmalarda G-6-FDH enzim düzeyleri ve poliamin takviyeleri diyabette önemli sağaltımlara da yol açabilir. Yine nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilendirilmiş poliaminlerin ve G-6-FDH enzim eksikliklerin her ikisi birden saptanması yeniden değerlendirilmesinde çok yararlı olacaktır (145,146).

Sonuç olarak:

Bu çalışmada, majör Poliaminlerin (Agmatin, Putresin, Spermidin ve Spermin) normal plazma konsantrasyonları baz alınarak hazırlanan farklı konsantrasyonlarının hepsi Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimini aktive etmişlerdir. Glukoz-6-FDH enzim yetersizliği ya da eksikliği olan birçok hastalıkta poliaminler terapötik olarak kullanım potansiyeli sergileyebilirler. Bu konuda yapılacak yeni ve kapsamlı çalışmalar önemli olacaktır.

6. KAYNAKLAR

- 1- Gupta, A. (2019). Metabolism of Carbohydrates. In *Comprehensive Biochemistry for Dentistry* (pp. 403-440). Springer, Singapore.
- 2- Horecker, B. L. (1965). Pathways of carbohydrate metabolism and their physiological significance. *Journal of Chemical Education*, 42(5), 244.
- 3- Yang, L., Wang, X., Chang, N., Nan, W., Wang, S., Ruan, M., ... & Bi, Y. (2019). Cytosolic glucose-6-phosphate dehydrogenase is involved in seed germination and root growth under salinity in Arabidopsis. *Frontiers in plant science*, 10.
- 4- Horecker, B. L. (2002). The pentose phosphate pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 277(50), 47965-47971.
- 5- C Stanton, Robert. (2012). Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase, NADPH, and Cell Survival. *IUBMB life*. 64. 362-9.
- 6- Konak, Ş., & Polat, M. (2015). Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz Enzim Eksikliği; Tanı ve Tedavi. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 3(2), 77-83.
- 7-Lenis, Y. Y., Elmetwally, M. A., Maldonado-Estrada, J. G., & Bazer, F. W. (2017). Physiological importance of polyamines. *Zygote*, 25(3), 244-255.
- 8- Kalac, P., & Krausová, P. (2005). A review of dietary polyamines: formation, implications for growth and health and occurrence in foods. *Food Chemistry*, 90(1-2), 219-230.
- 9-Moinard, C., Cynober, L., & de Bandt, J. P. (2005). Polyamines: metabolism and implications in human diseases. *Clinical Nutrition*, 24(2), 184-197.
- 10- Hussain T, Tan B, Ren W, Rahu N, Dad R, Kalhoro DH, et al. Polyamines: therapeutic perspectives in oxidative stress and inflammatory diseases. *Amino Acids*. 2017;49(9):1457–1468. Pmid:28733904.
- 11- Park MH, Joe YA, Kang KR, et al. The polyamine-derived amino acid hypusine: its posttranslational formation in eIF-5A and its role in cell proliferation. *Amino Acids* 10: 109-121, 1996
- 12- Chambe, P. C., Harvey, D. E., & Ferrier, D. E. (2007). Biyokimya lippincott's illustrated reviews 3. baskı. *İstanbul, Nobel Tıp Kitapevi*, 384-387.
- 13- Horecker, B. L. (1965). Pathways of carbohydrate metabolism and their physiological significance. *Journal of Chemical Education*, 42(5), 244.
- 14- Da Poian, A. T., & Castanho, M. A. R. B. (2015). Integrative Human Biochemistry.

- 15- Marks, D. B., & Smith, C. (2004). *Marks basic medical biochemistry: A clinical approach*. Lippincott Williams and Wilkins: Philadelphia, PA, USA.
- 16- Lieberman, M., & Marks, A. D. (2009). *Marks' basic medical biochemistry: a clinical approach*. Lippincott Williams & Wilkins.
- 17-Frederiks, W. M., & Vreeling-Sindelárová, H. (2001). Localization of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity on ribosomes of granular endoplasmic reticulum, in peroxisomes and peripheral cytoplasm of rat liver parenchymal cells. *The Histochemical Journal*, 33(6), 345-353.
- 18- Stanton, R. C. (2012). Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH, and cell Survival. *IUBMB life*, 64(5), 362-369.
- 19-Horecker, B. L. (2002). The pentose phosphate pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 277(50), 47965-47971
- 20- Champe, P. C., Harvey, R. A., & Ferrier, D. R. (2005). *Biochemistry*. Lippincott Williams & Wilkins.
- 21- Mejía, S. Á17., Gutman, L. A. B., Camarillo, C. O., Navarro, R. M., Becerra, M. C. S., Santana, L. D., ... & Flores, M. D. (2018). Nicotinamide prevents sweet beverage-induced hepatic steatosis in rats by regulating the G6PD, NADPH/NADP+ and GSH/GSSG ratios and reducing oxidative and inflammatory stress. *European journal of pharmacology*, 818, 499-507.
- 22- Clark, M. A. R. C. I. A., & Root, R. K. (1979). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and infection: a study of hospitalized patients in Iran. *The Yale journal of biology and medicine*, 52(2), 169.
- 23- Hill, H. R., Kumánovics, A., & Young, K. D. (2013). Disorders of Leukocyte Function. In *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics* (pp. 1-29).
- 24- Kletzien, R. F., Harris, P. K., & Foellmi, L. A. (1994). Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a "housekeeping" enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress. *The FASEB Journal*, 8(2), 174-181.
- 25- Au, S. W., Gover, S., Lam, V. M., & Adams, M. J. (2000). Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: the crystal structure reveals a structural NADP+ molecule and provides insights into enzyme deficiency. *Structure*, 8(3), 293-303.
- 26- Da Poian, A. T., & Castanho, M. A. R. B. (2015). *Integrative Human Biochemistry*.

- 27- Park, J., Rho, H. K., Kim, K. H., Choe, S. S., Lee, Y. S., & Kim, J. B. (2005). Overexpression of glucose-6-phosphate dehydrogenase is associated with lipid dysregulation and insulin resistance in obesity. *Molecular and Cellular Biology*, 25(12), 5146-5157.
- 28- Tian, W. N., Braunstein, L. D., Pang, J., Stuhlmeier, K. M., Xi, Q. C., Tian, X., & Stanton, R. C. (1998). Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity for cell growth. *Journal of Biological Chemistry*, 273(17), 10609-10617.
- 29- Tian, W. N., Braunstein, L. D., Apse, K., Pang, J., Rose, M., Tian, X., & Stanton, R. C. (1999). Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in cell death. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 276(5), C1121-C1131.
- 30- Cosentino, C., Grieco, D., & Costanzo, V. (2011). ATM activates the pentose phosphate pathway promoting anti-oxidant defence and DNA repair. *The EMBO journal*, 30(3), 546-555.
- 31- Jiang, P., Du, W., Wang, X., Mancuso, A., Gao, X., Wu, M., & Yang, X. (2011). P53 regulates biosynthesis through direct inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Nature cell biology*, 13(3), 310.
- 32- Stanton, R. C., Seifter, J. L., Boxer, D. C., Zimmerman, E., & Cantley, L. C. (1991). Rapid release of bound glucose-6-phosphate dehydrogenase by growth factors. Correlation with increased enzymatic activity. *Journal of Biological Chemistry*, 266(19), 12442-12448.
- 33- Çiftçi, M., KÜFREVİOĞLU, Ö. İ., İlhami, K. İ. K. İ., & GÜNDOĞDU, M. (1998). İnsan eritrosit glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine bazı ilaçların in vitro etkileri. *Atatürk Üniversitesi Tıp Dergisi*, 30(1-2), 57-60.
- 34- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biochemistry. 5th edition. New York: W H Freeman; 2002. Section 20.5, Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase Plays a Key Role in Protection Against Reactive Oxygen Species. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22389/>.
- 35- Heyworth, P. G., Cross, A. R., & Curnutte, J. T. (2003). Chronic granulomatous disease. *Current opinion in immunology*, 15(5), 578-584.
- 36- Morrison, J. C. (1985). Red blood cell disorders. In Principles of Medical Therapy in Pregnancy (pp. 1177-1177). Springer, Boston, MA.
- 37- Bachrach, U. (2010). The early history of polyamine research. *Plant Physiol. Biochem.* 48, 490–5.
- 38- Vauquelin, L.N. (1791). Experiences sur le sperme humain. *Ann. Chim.* 9, 64–80.

- 39-Boettcher, A. (1865). Farblose Krystalle eines eiweissartigen Körpers aus dem menschlichen Sperma dargestellt. *Virchows Arch. Pathol. Anat. Physiol. Klin. Med.* **32**, 525–35.
- 40- Ladenburg, A. & Abel, J. (1888). Ueber das Aethylenimin (Spermine). *Ber Deutsch Chem. Ges.* **21**, 758–66.
- 41-Dudley, H.W., Rosenheim, M.C. & Rosenheim, O. (1924). The chemical constitution of spermine. I. The isolation of spermine from animal tissues, and the preparation of its salts. *Biochem. J.* **18**, 1263–72.
- 42- Moinard, C., Cynober, L. & de Bandt, J.P. (2005). Polyamines: metabolism and implications in human diseases. *Clin. Nutr.* **24**, 184–97.
- 43- Herbst, E.J. & Esmond, E. S. (1948). Putrescine as a growth factor for *Hemophilus parainfluenzae*. *J. Biol. Chem.* **176**, 989–90.
- 44- Ames, B.N., Donald, T.D. & Sanford, M.R. (1958). Presence of polyamines in certain bacterial viruses. *Science* **127**, 814.).
- 45-Thomas T and Thomas T. Polyamines in cell growth and cell death: Molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell Mol Life Sci.* **58**: 244-258, 2001.
- 46- Büyükuslu, N. (2015). Anne sütünde poliaminler. *Journal of Current Pediatrics/Guncel Pediatri*, **13**(2). Polyamines in living organisms.
- 47- Coffino, P. (2001). Regulation of cellular polyamines by antizyme. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2**, 188–94.
- 48- Tiburcio, A.F., Altabella, T., Bitrián, M., Alcázar, R. (2014). The roles of polyamines during the lifespan of plants: from development to stress. *Planta* **240**, 1–18.
- 49- Igarashi, K. & Kashiwagi, K. (2015). Modulation of protein synthesis by polyamines. *IUBMB Life* **67**, 160–9.
- 50- Moinard, C., Cynober, L. & de Bandt, J.P. (2005). Polyamines: metabolism and implications in human diseases. *Clin. Nutr.* **24**, 184–97.
- 51- Pegg, A. E. (2016). Functions of polyamines in mammals. *Journal of Biological Chemistry*, **291**(29), 14904-14912.
- 52- Yatin, M. (2002). Polyamines in living organisms. *J Cell Mol Biol*, **1**, 57-67.
- 53- Iacomino, G., Picariello, G., and D’Agostino, L. (2012) DNA and nuclear aggregates of polyamines. *Biochim. Biophys. Acta* **1823**, 1745–1755
- 54-Igarashi, K. & Kashiwagi, K. (2000). Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **271**, 559–64.
- 55-Takigawa, M., Enomoto, M., Nishida, Y., Pan, H.O., Kinoshita, A. & Suzuki, F. (1990a). Tumor angiogenesis and polyamines: -difluoromethylornithine, an irreversible inhibitor of ornithine decarboxylase, inhibits B16 melanoma-induced

angiogenesis *in ovo* and the proliferation of vascular endothelial cells *in vitro*. *Cancer Res.* **50**,4131–8.

56- Moinard, C., Cynober, L. & de Bandt, J.P. (2005). Polyamines: metabolism and implications in human diseases. *Clin. Nutr.* **24**, 184–97.

57- Kalařc, P. (2013). Health effects and occurrence of dietary polyamines: a review for the period 2005–mid 2013. *Food Chem.* **161**, 27–39.

58-Lenis, Y. Y., Elmetwally, M. A., Maldonado-Estrada, J. G., & Bazer, F. W. (2017). Physiological importance of polyamines. *Zygote*, 25(3), 244-255.

59- Davidson NE, Hahm HA, McCloskey DE, Woster PM, Casero Jr RA. Clinical aspects of cell death in breast cancer: the polyamine pathway as a new target for treatment. *Endocr Relat Cancer* 1999;6(1):69–73.

60-Hoet PH, Nemery B. Polyamines in the lung: polyamine uptake and polyamine linked pathological or toxicological conditions. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;278(3): L417–33.

61-Ray RM, Viar MJ, Yuan Q, Johnson LR. Polyamine depletion delays apoptosis of rat intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 278(3):C480–9.

62-Bettuzzi S, Davalli P, Astancolle S, et al. Coordinate changes of polyamine metabolism regulatory proteins during the cell cycle of normal human dermal fibroblasts. *FEBS Lett* 1999; 446(1):18–22.

63-Li L, Rao JN, Guo X, Liu L, Santora R, Bass BL, et al. Polyamine depletion stabilizes p53 resulting in inhibition of normal intestinal epithelial cell proliferation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 281(3):C941–53.

64- Liang M, Ekblad E, Hellstrand P, Nilsson BO. Polyamine synthesis inhibition attenuates vascular smooth muscle cell migration. *J Vasc Res* 2004; 41(2):141–7.

65- Tome ME, Gerner EW. Hypusine modification in eukaryotic initiation factor 5A in rodent cells selected for resistance to growth inhibition by ornithine decarboxylase inhibiting drugs. *Biochem J* 1996;320(Part 1):55–60.

66- Echandi, G., & Algranati, I. D. (1975). Defective 30S ribosomal particles in a polyamine auxotroph of *Escherichia coli*. *Biochemical and biophysical research communications*, 67(3), 1185-1191.

67- Yoshida M, Kashiwagi K, Kawai G, Ishihama A, Igarashi K. Polyamine enhancement of the synthesis of adenylyl cyclase at the translational level and the consequential stimulation of the synthesis of the RNA polymerase sigma 28 subunit. *J Biol Chem* 2001;276(19):16289–95.

68- Williams K. Interactions of polyamines with ion channels. *Biochem J* 1997; 325:289–97.

69-Johnson LR, McCormack SA. Healing of gastrointestinal mucosa: involvement of polyamines. *News Physiol Sci* 1999; 14:12–7.

- 70- Moruzzi MS, Marverti G, Piccinini G, Frassinetti C, Monti MG. Effect of spermine on membrane associated and membrane-inserted forms of protein kinase C. *Mol Cell Biochem* 1993;124(1):1–9.
- 71-Yuan Q, Ray RM, Viar MJ, Johnson LR. Polyamine regulation of ornithine decarboxylase and its antizyme in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;280(1): G130–8.
- 72- Pfeffer LM, Yang CH, Murti A, et al. Polyamine depletion induces rapid NF kappa B activation in IEC-6 cells. *J Biol Chem* 2001;276(49):45909–13.
- 73- Shearer JD, Richards JR, Mills CD, Caldwell MD. Differential regulation of macrophage arginine metabolism: a proposed role in wound healing. *Am J Physiol* 1998;272(35): E181–90.
- 74- Satriano J, Ishizuka S, Archer DC, Blantz RC, Kelly CJ. Regulation of intracellular polyamine biosynthesis and transport by NO and cytokines TNF-alpha and IFN-gamma. *Am J Physiol* 1999;276(4 Part 1):C892–9.
- 75-Hammermann R, Dreissig MD, Mossner J, et al. Nuclear factor-kappaB mediates simultaneous induction of inducible nitric-oxide synthase and up-regulation of the cationic amino acid transporter CAT-2B in rat alveolar macrophages. *Mol Pharmacol* 2000;58(6):1294–302.
- 76- Satriano J, Schwartz D, Ishizuka S, et al. Suppression of inducible nitric oxide generation by agmatine aldehyde: beneficial effects in sepsis. *J Cell Physiol* 2001;188(3): 313–20.
- 77- Ferioli ME, Pirona L, Pinotti O. Prolactin and polyamine catabolism: specific effect on polyamine oxidase activity in rat thymus. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 165 (12): 51–6.
- 78- Hoet PH, Nemery B. Polyamines in the lung: polyamine uptake and polyamine-linked pathological or toxicological conditions. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;278(3): L417–33.
- 79- Haroon ZA, Hettasch JM, Lai TS, Dewhirst MW, Greenberg CS. Tissue transglutaminase is expressed, active, and directly involved in rat dermal wound healing and angiogenesis. *FASEB J* 1999;13(13):1787–95.
- 80- Medina MA. Glutamine and cancer. *J Nutr* 2001;131 (9 Suppl.):2539S–42S.
- 81- Grimble RF, Grimble GK. Immunonutrition: role of sulfur amino acids, related amino acids, and polyamines. *Nutrition* 1998;14: 605–10.
- 82- Babal P, Ruchko M, Campbell CC, et al. Regulation of ornithine decarboxylase activity and polyamine transport by agmatine in rat pulmonary artery endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;296(2):372–7.
- 83- De Oca J, Bettonica C, Cuadrado S, et al. Effect of oral supplementation of ornithine a-ketoglutarate on the intestinal barrier after orthoptic small bowel transplantation. *Transplantation* 1997; 63:636–9. 45.

- 84- Czernichow B, Nsi Emvo E, Galluser M, Gosse F, Raul F. Enteral supplementation with ornithine α -ketoglutarate improves the early adaptative response to resection. *Gut* 1997; 40:67–72.
- 85- Yuan Q, Viar MJ, Ray RM, Johnson LR. Putrescine does not support the migration and growth of IEC-6 cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;278(1): G49–56.
- 86- Tunici P, Sessa A, Rabbellotti E, Grant G, Bardocz S, Perin A. Polyamine oxidase and tissue transglutaminase activation in rat small intestine by polyamines. *Biochim Biophys Acta* 1999;1428(2–3):219–24.
- 87- Raul F, Gosse F, Galluser M, Hasselmann M, Seiler N. Functional and metabolic changes in intestine mucosa of rats after enteral administration of ornithine α -ketoglutarate salt. *J Parenter Enteral Nutr* 1995;19: 145–50.
- 88- Duranton B, Schleiffer R, Gosse F, Raul F. Preventive administration of ornithine α -ketoglutarate improves intestinal mucosal repair after transient ischemia in rats. *Crit Care Med* 1998; 26:120–5.
- 89- Wang, X., Ikeguchi, Y., McCloskey, D.E., Nelson, P. & Pegg, A.E. (2004). Spermine synthesis is required for normal viability, growth, and fertility in the mouse. *J. Biol. Chem.* **279**, 51370–5.
- 90- Lefèvre, P.L., Palin, M.F. & Murphy, B.D. (2011). Polyamines on the reproductive landscape. *Endocr. Rev.* **32**, 694–712.
- 91- Kwon, H, Wu, G., Bazer, F.W. & Spencer, T.E. (2003). Developmental changes in polyamine levels and synthesis in the ovine conceptus. *Biol. Reprod.* **69**, 1626–1634.
- 92- Wang, J.F., Su, R.B., Wu, N., Xu, B., Lu, X.Q., Liu, Y. & Li, J. (2005). Inhibitory effect of agmatine on proliferation of tumor cells by modulation of polyamine metabolism. *Acta Pharmacol. Sin.* **26**, 616–22.
- 93- Bazer, F.W., Wu, G., Johnson, G.A., Kim, J. & Song, G. (2011). Uterine histotroph and conceptus development: select nutrients and secreted phosphoprotein 1 affect mechanistic target of rapamycin cell signaling in ewes. *Biol. Reprod.* **85**, 1094–107.
- 94- Kim, J.Y., Burghardt, R.C., Wu, G., Johnson, G.A., Spencer, T.E. & Bazer, F.W. (2011). Select nutrients in the ovine uterine lumen. VIII. Arginine stimulates proliferation of ovine trophoblast cells through MTOR–RPS6K–RPS6 signaling cascade and synthesis of nitric oxide and polyamines. *Biol. Reprod.* **84**, 70–8.
- 95- Allen, R.G. & Tresini, M. (2000). Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic. Biol. Med.* **28**, 463–99.
- 96- Rhee, H.J., Kim, E.J. & Lee, J.K. (2007). Physiological polyamines: simple primordial stress molecules. *J. Cell. Mol. Med.* **11**, 685–703.

- 97- Tadolini, B., Cabrini, L., Landi, L., Varani, E. & Pasquali, P. (1984). Polyamine binding to phospholipid vesicles and inhibition of lipid peroxidation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **122**, 550–5.
- 98- Rider, J.E., Hacker, A., Mackintosh, C.A., Pegg, A.E., Woster, P.M. & Casero, J.R. (2007). Spermine and spermidine mediate protection against oxidative damage caused by hydrogen peroxide. *Amino Acids* **33**, 231–40.
- 99- Dumbroff, E.B., Legge, R.L. & Thompson, J.E. (1986). Radical scavenging properties of polyamines. *Phytochemistry* **25**, 367–71.
- 100- Tkachenko, A., Nesterova, L. & Pshenichnov, M. (2001). The role of the natural polyamine putrescine in defense against oxidative stress in *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* **176**, 155–7.
- 101- Harari, P.M., Fuller, D.J. & Eugene, W.G. (1989). Heat shock stimulates polyamine oxidation by two distinct mechanisms in mammalian cell cultures. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **16**, 451–7.
- 102- Rider, J.E., Hacker, A., Mackintosh, C.A., Pegg, A.E., Woster, P.M. & Casero, J.R. (2007). Spermine and spermidine mediate protection against oxidative damage caused by hydrogen peroxide. *Amino Acids* **33**, 231–40.
- 103- Grancara, S., Zonta, F., Ohkubo, S., Brunati, A.M., Agostinelli, E. & Toninello, A. (2015). Pathophysiological implications of mitochondrial oxidative stress mediated by mitochondriotropic agents and polyamines: the role of tyrosine phosphorylation. *Amino Acids* **47**, 869–83.
- 104- Jeevanandam M, Petersen SR. Clinical role of polyamine analysis: problem and promise. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2001;4(5):385–90.
- 105- Aubel C, Chabanon H, Carraro V, Wallace HM, Brachet P. Expression of spermidine/spermine N1-acetyltransferase in HeLa cells is regulated by amino acid sufficiency. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35(9):1388–98.
- 106- Hoet PH, Nemery B. Polyamines in the lung: polyamine uptake and polyamine-linked pathological or toxicological conditions. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;278(3): L417–33.
- 107- Seiler N. Catabolism of polyamines. *Amino Acids* 2004; 26(3):217–33.
- 108- Seiler N, Delcros JG, Moulinoux JP. Polyamine transport in mammalian cells. An update. *Int J Biochem Cell Biol* 1996;28(8):843–61.
- 109- Wang, X., Wei, Y., Dunlap, K.A., Lin, G., Satterfield, M.C., Burghardt, R.C., Wu, G. & Bazer, F.W. (2014). Arginine decarboxylase and agmatinase: an alternative pathway for de novo biosynthesis of polyamines for development of mammalian conceptuses. *Biol. Reprod.* **90**, 84
- 110- Seidel ER, Scemama JL. Gastrointestinal polyamines and regulation of mucosal growth and function. *J Nutr Biochem* 1997;8:104–11.

- 111- Satriano J, Isome M, Casero Jr RA, Thomson SC, Blantz RC. Polyamine transport system mediates agmatine transport in mammalian cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;281(1): C329–34.
- 112- Reis DJ, Regunathan S. Is agmatine a novel neurotransmitter in brain?. *Trends Pharmacol Sci* 2000;21(5):187–93.
- 113- Li G, Regunathan S, Barrow CJ, Eshraghi J, Cooper R, Reis DJ. Agmatine: an endogenous clonidine-displacing substance in the brain. *Science* 1994;263(5149):966–9.
- 114- Rui-Bin SU, Bo-Yi QIN. A biphasic opiod function modulator: agmatine. *Acta Pharmacol Sin* 2003; 24:631–6.
- 115- Raghavan SA, Dikshit M. Vascular regulation by the L-arginine metabolites, nitric oxide and agmatine. *Pharmacol Res* 2004;49(5):397–414.
- 116- Galea E, Regunathan S, Eliopoulos V, Feinstein DL, Reis DJ. Inhibition of mammalian nitric oxide synthase by agmatine, an endogenous polyamine formed by decarboxylation of arginine. *Biochem J* 1996; 316:247–9.
- 117- Grillo MA, Colombatto S. Metabolism and function in animal tissues of agmatine, a biogenic amine formed from arginine. *Amino Acids* 2004;26(1):3–8.
- 118- Dudkowska M, Lai J, Gardini G, et al. Agmatine modulates the in vivo biosynthesis and interconversion of polyamines and cell proliferation. *Biochim Biophys Acta* 2003;1619(2):159–66.
- 119- Cohen, S. S. (1998). A guide to the polyamines Oxford University Press. *New York*.
- 120- Madeo, F., Eisenberg, T., Büttner, S., Ruckenstuhl, C., & Kroemer, G. (2010). Spermidine: a novel autophagy inducer and longevity elixir. *Autophagy*, 6(1), 160–162.
- 121- Hawel, L., Tjandrawinata, R. R., Fukumoto, G. H., & Byus, C. V. (1994). Biosynthesis and selective export of 1, 5-diaminopentane (cadaverine) in mycoplasma-free cultured mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*, 269(10), 7412–7418.
- 122-Rolen, S. H., Sorensen, P. W., Mattson, D., & Caprio, J. (2003). Polyamines as olfactory stimuli in the goldfish *Carassius auratus*. *Journal of Experimental Biology*, 206(10), 1683–1696.
- 123- Prounis, G. S., & Shields, W. M. (2013). Necrophobic behavior in small mammals. *Behavioural processes*, 94, 41–44.
- 124- Oliveira, T. A., Koakoski, G., da Motta, A. C., Piato, A. L., Barreto, R. E., Volpato, G. L., & Barcellos, L. J. G. (2014). Death-associated odors induce stress in zebrafish. *Hormones and behavior*, 65(4), 340–344.
- 125- Gugliucci A. Polyamines as clinical laboratory tools. *Clin Chim Acta* 2004;344(1–2):23–35.

- 126- Chen Y, Hu J, Boorman D, Klein-Szanto A, O'Brien TG. Therapy of murine squamous cell carcinomas with 2- difluoromethylornithine. *J Carcinog* 2004;3(1):10.
- 127- Babbar N, Gerner EW. Polyamines as modifiers of genetic risk factors in human intestinal cancers. *Biochem Soc Trans* 2003;31(2):388–92.
- 128- Thomas T, Thomas TJ. Polyamine metabolism and cancer. *J Cell Mol Med* 2003;7(2):113–26.
- 129- Wallace HM, Fraser AV. Polyamine analogues as anticancer drugs. *Biochem Soc Trans* 2003;31(2):393–6.
- 130- Alhonen L, Halmekyto M, Kosma VM, Wahlfors J, Kauppinen R, Janne J. Life-long over-expression of ornithine decarboxylase (ODC) gene in transgenic mice does not lead to generally enhanced tumorigenesis or neuronal degeneration. *Int J Cancer* 1995;63(3):402–4.
- 131- Wallace HM, Fraser AV, Hughes A. A perspective of polyamine metabolism. *Biochem J* 2003;376(Part 1):1–14.
- 132- Pasanen T, Karppinen A, Alhonen L, Janne J, Wahlfors J. Polyamine biosynthesis inhibition enhances HSV-1 thymidine kinase/ganciclovir-mediated cytotoxicity in tumor cells. *Int J Cancer* 2003;104(3):380–8.
- 133- Kong Thoo LP, Dance AM, Bestwick C, Milne L. The biological activities of new polyamine derivatives as potential therapeutic agents. *Biochem Soc Trans* 2003;31(2):407–10.
- 134- Heby O, Roberts SC, Ullman B. Polyamine biosynthetic enzymes as drug targets in parasitic protozoa. *Biochem Soc Trans* 2003;31(2):415–9.
- 135- Blagbrough IS, Geall AJ, Neal AP. Polyamines and novel polyamine conjugates interact with DNA in ways that can be exploited in non-viral gene therapy. *Biochem Soc Trans* 2003;31(2):397–406.
- 136- Gugliucci A, Menini T. The polyamines spermine and spermidine protect proteins from structural and functional damage by AGE precursors: a new role for old molecules? *Life Sci* 2003;72(23):2603–16.
- 137- Uzbay, T., Goktalay, G., Kayir, H., Eker, S. S., Sarandol, A., Oral, S., ... & Kirli, S. (2013). Increased plasma agmatine levels in patients with schizophrenia. *Journal of psychiatric research*, 47(8), 1054-1060.
- 138- Liu, R., Bi, K., Jia, Y., Wang, Q., Yin, R., & Li, Q. (2012). Determination of polyamines in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled with Q-TOF mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 47(10), 1341-1346.
- 139- Tiwari, M. (2017). Glucose 6 phosphatase dehydrogenase (G6PD) and neurodegenerative disorders: Mapping diagnostic and therapeutic opportunities. *Genes & diseases*, 4(4), 196-203.

- 140-Kapancik, S., Celik, V. K., Kilickap, S., Kacan, T., & Kapancik, S. (2016). The relationship of agmatine deficiency with the lung cancer. *International Journal of Hematology and Oncology*, 27(4), 103-109.
- 141-Nowotarski, S. L., Woster, P. M., & Casero, R. A. (2013). Polyamines and cancer: implications for chemotherapy and chemoprevention. *Expert reviews in molecular medicine*, 15
- 142- Del Rio, B., Redruello, B., Linares, D. M., Ladero, V., Ruas-Madiedo, P., Fernandez, M., ... & Alvarez, M. A. (2019). The biogenic amines putrescine and cadaverine show in vitro cytotoxicity at concentrations that can be found in foods. *Scientific reports*, 9(1), 120.
- 143- Büyükuslu, N., & Eröz, S. E. (2015). Poliaminler ve kanser; Kanserli hastaların beslenmesinde poliaminlerin rolleri. *Clinical and Experimental Health Sciences*, 5(2), 123-128
- 144- Çelik, V. K., Kapancık, S., Kaçan, T., Kaçan, S. B., Kapancık, S., & Kılıçgün, H. (2017). Serum levels of polyamine synthesis enzymes increase in diabetic patients with breast cancer. *Endocrine connections*, 6(8), 574-579.
- 145-Çelik, V. K., Ersan, E. E., Kilicgun, H., Kapancik, S., & Ersan, S. (2016). Agmatine mediated hypertonic stress development in Schizophrenia: a Novel study. *Neuropsychiatry*, 6(5), 184-189.
- 146-Çelik, V. K., Çiğdem, B., Kapancik, S., Kiliçgün, H., & Bolayir, E. (2018). The Importance of Increased Serum Ornithine Levels in the Pathogenesis of Alzheimer and Parkinson's Diseases. *Asian Journal of Research and Reports in Neurology*, 1(1), 1-8. Retrieved from <http://www.journalajorrin.com/index.php/AJORRIN/article/view/25298>.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel bilgiler

Adı Soyadı	MHD YOUSSEF JAWISH
Doğum Yeri ve Tarihi	Şam-1989
Medeni Hali	Evli
Yabancı Dil	Arpça-Türkçe- İngilizce
İletişim Adresi	Diriliş MAH. 68-14 SOK korkmaz sitesi A blok. NO: 6. D: 8. Sivas merkez.
E-posta Adresi	y.jaa@hotmail.com

Eğitim ve Akademik Durumu

Lise	Şam Alsaade Lisesi, 2008
Lisans	Şam Üniversitesi, 2014
Yüksek Lisans	Sivas Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2016
Unvan	Yüksek lisans Öğrencisi

İş Tecrübesi

Şam hastanesinde	Kan alma ve tahlilleri yapma (staj).2014
Gençlik merkezinde	Biyoloji ve Türkçe Öğretmeni, 2015
Cumhuriyet Üniversitesi Hastanesi	Kan alma ve tahlilleri yapma (staj).2017

EKLER

EK 1. Ön Değerlendirme Formu

EK 2. Form

