

## **Nikotinamid Adenin Dinükleotid İnhibisyonu\***

### **Inhibition of Nicotinamide Adenine Dinucleotide**

**Bilge UZALP\*\***

#### **GİRİŞ**

Nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP) ile indirgenmiş formlarının, proteinlerin deaminasyonunda (3), pentoz fosfat ve glikolitik yollardaki oksidatif olaylardaki rolleri çok önemlidir (1,12,15,18). Bu enzimlerin inhibisyonu ile vücuttaki birçok metabolik olaylar incelenmiş ve incelenmektedir (4,7,10,13).

NAD ve NADP ile redükte formlarının rol aldığı metabolik olaylar bu koenzimlere bağımlı oksido-redüktaz enzimlerin inhibisyonu ile bloke edilebilir. Bunun için NAD ve NADP nin asıl görev yapan bölümü nikotinamid yerine onun yerini alabilecek fakat hidrojen atomu taşımayacak bir yapı sokularak analogu oluşturulursa bu analog kompetitif inhibisyonla asıl kofaktörün yerini alarak bağımlı enzimlerin hidrojen alım verimini bloke edebilir (5,6).

Amacımız bugüne kadar 6- amino nikotinamid (6-AN) kullanılarak yapılan in vitro ve in vivo 6- amino nikotinamid adenin dinükleotid (6- ANAD) sentezlerini karşılaştırarak (4,7), bu türevin organizmada oluşturulmasıyla sağlanacak en verimli inhibisyon yönteminin ve kontrolünün saptanmasıdır.

Redaksiyona verildiği tarih: **19.3.1982**

\* "Nikotinamid Adenin Dinükleotid İnhibisyonunun Kolesterol Metabolizması İle İlişkisi" konulu doçentlik tezinin (1981) bir bölümüdür.

\*\* Tıp Bilimleri Birimi, Eczacılık Fakültesi, Ankara Üniversitesi.

## DENEL KISIM

## MATERYAL ve YÖNTEM

Deneyleerde; Toyo SF-200 A ve Toyo SF-160 K tipi kollektörler, Toyo Uvicon 540 M tipi kontrol ve optik ünite ve yazdırıcı, Hitachi 204-A tipi flüoresans spektrofotometresi, Aminco DW-2 uv/ vis spektrofotometre, Hitachi inkübatör ve santrifüj ile 4°C de soğuk odadan yararlanıldı.

Çalışmalarımızda in vitro deneyleerde DIETRICH ve çalışma arkadaşları ile BRUNNEMANN ve çalışma arkadaşlarının uyguladıkları yöntemler kullanıldı (7,4). Bu metodlardan hareket edilerek in vivo deneyleerde iki yöntemin birleştirilmesi yoluna gidildi.

İn vivo deneyleerde 180-250 gram ağırlığında beşerlik gruplar halinde erkek sıçanlar (Wistar rat) ve 15-20 gram ağırlığında onarlık gruplar halinde erkek fareler (ICR mice) kullanıldı. Deney hayvanları 23°C de 12 saat ışıklı, 12 saat karanlık tutulan, havalandırılmalı odada, pelet yem ve su ile serbest olarak beslendiler.

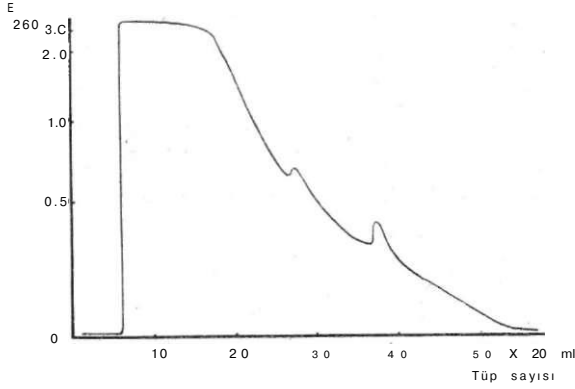
6- AN (Sigma) için süre ve doza bağımlılık testleri yapıldı. Farelerde 200 mg/ kg, sıçanlarda 15 mg/ kg tek doz intra peritoneal yolla uygulandı. 20 saat sonra deney hayvanlarının karaciğer, böbrek, kalp ve beyinleri izole edildi. Kuru buzda dondurularak tartıldı. Dokular 9 katı % 3 perklorik asitle homojenize edildi. Homojenat 5-10 dakika, 2500 rpm de soğukta santrifüj edildi (7), Sonra, soğuk odada 5N potasyum hidroksitle nötralize edilerek, doveks 1x10 (formiyat formu) (Biorad Laboratory) kolondan geçirildi (4).

Ayrılan nükleotidlerden 260 nm de UV absorbanlarına bakılarak seçilen örneklerin ince tabaka kromatografileri yapıldı. Bunun için Kieselger 60 adsorbantı (Merck) ve belirteç olarak UV lambasından yararlanıldı. Solvan sistemi olarak metil etil keton-amonyum hidroksit (1:1), izobütirik asit-amonyum hidroksit-su (66:1.7:33), 1 M amonyum asetat- % 95 etanol (3:7) ve n-propanol-amonyum hidroksit-su (60:30:10) solvan sistemleri denenerek bunlardan n-propanol-amonyum hidroksit-su (60:30:10) seçildi.

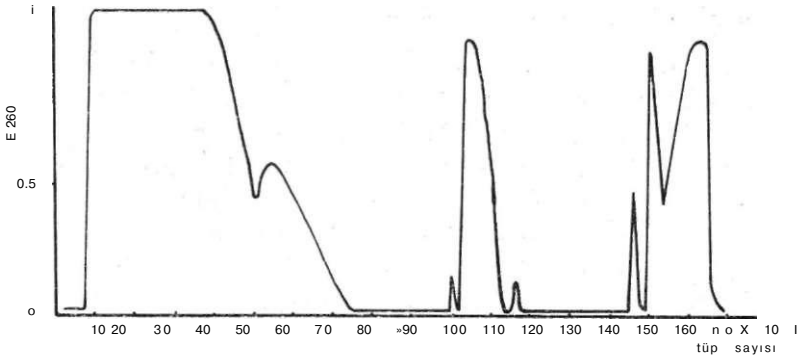
Kontrollerle uygun Rf değerine sahip lekelerin flüoresans aktiviteleri (8,9,11,14,17) ve alkol dehidrogenaz enzimi için substrat olup olmadıkları (2,16) saptandı.

## BULGULAR

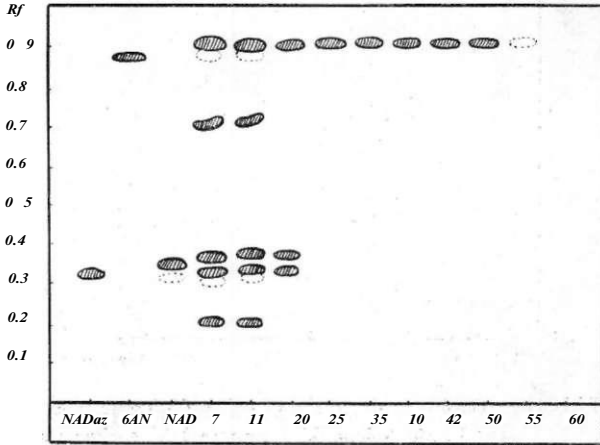
Deney sonuçları şekillerde özetlenmiştir. Şekil 1a, 2a, 3a, 4a, 5a doveks ve aktif kömür kolonlarla ayrılan *in vitro* ve *in vivo* deney sonuçlarının 260 nm de UV spektrumlarını göstermektedir. Şekil 1b, 2b,3b,4b ve 5b kolon kromatografisi ile ayrılıp, UV absorbansına bakılarak seçilmiş 20 ml. lik (Şek. 1b, 3b,4b, 5b) ve 10 ml. lik (Şek. 2b) örnek tüplerden alınan numuneler ve kontrollerin ince tabaka kromatogramlarını göstermektedir.



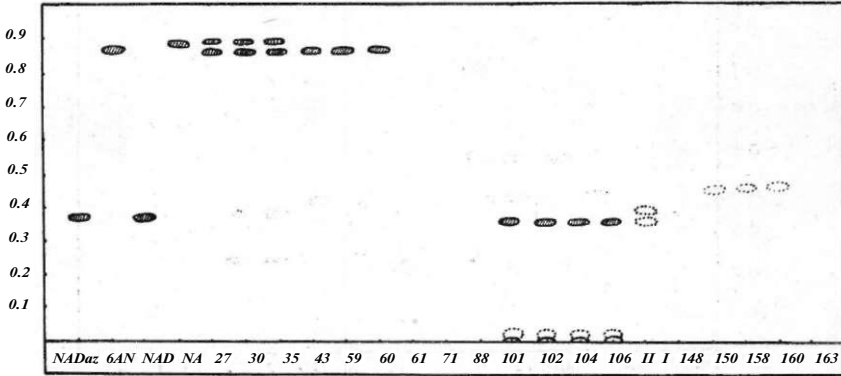
Şek. 1a) DİETRİCH ve çalışma grubunun uyguladıkları yöntemle, *in vitro* 6-ANAD senteziyle ilgili UV spektrumu.



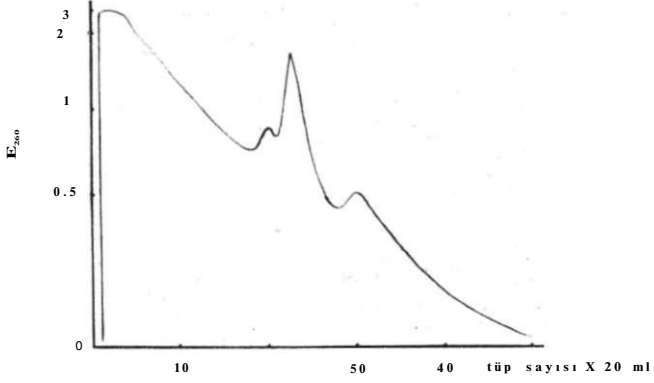
Şek. 1b) DİETRİCH ve çalışma grubunun uyguladıkları yöntemle, *in vitro* 6-ANAD senteziyle ilgili ince tabaka kromatogramı.



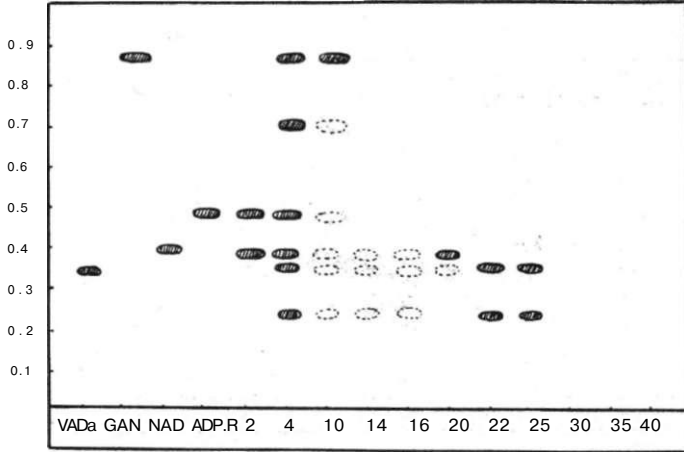
Şek. aa) BRUNNEMANN ve çalışma grubunun uyguladıkları yöntemle, in vitro 6-ANAD senteziyle ilgili UV spektrumu.



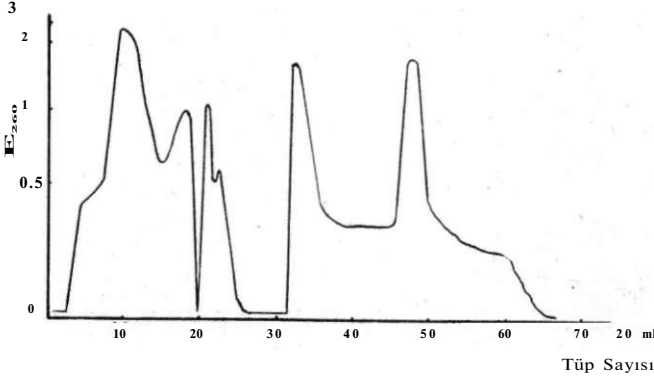
Şek. 2b) BRUNNEMANN ve çalışma grubunun uyguladıkları yöntemle, in vitro 6-ANAD senteziyle ilgili ince tabaka kromatogramı.



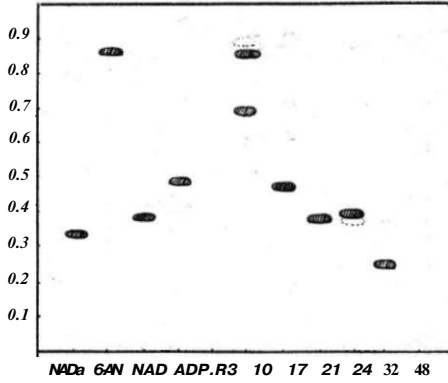
Şek. 3a) DIETRICH ve çalışma grubunun in vivo 6-ANAD sentezi yöntemi sonuçlarının aktif kömür kolondaki ayırımının UV spektrumu.



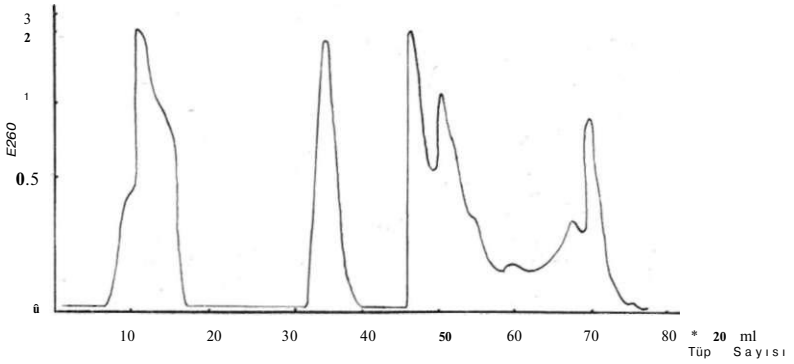
Şek. 3b) DIETRICH ve çalışma grubunun in vivo yöntemiyle 6-ANAD sentez ,sonuçlarıyla ilgili ince tabaka kromatogramı.



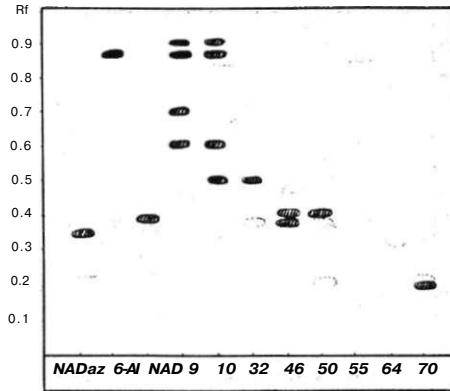
Şek. 4a) DIETRICH ve BRUNNEMANN ile çalışma gruplarının 6-ANAD sentezlerinin birleştirilmesiyle elde edilen yöntemle farelerde 6-ANAD sentezi sonuçlarının UVspektrumu.



Şek. 4b) DIETRICH ve BRUNNEMANN ile çalışma gruplarının 6-ANAD sentezlerinin birleştirilmesiyle elde edilen yöntemle farelerde 6-ANAD sentezi sonuçlarının ince tabaka kromatogramı.



Şek. 5a) DIETRICH ve BRUNNEMANN ile çalışma gruplarının 6-ANAD sentezlerinin birleştirilmesiyle elde edilen yöntemle sıçanlarda 6-ANAD sentezi sonuçlarının UV spektrumu



Şek. 5b) DIETRICH ve BRUNNEMANN ile çalışma gruplarının 6-ANAD sentezlerinin birleştirilmesiyle elde edilen yöntemle sıçanlarda 6-ANAD sentezi sonuçlarının ince tabaka kromatogramı.

## SONUÇ

İn vitro deneyler sonucunda DİETRİCH ve çalışma grubunun yöntemi ile karbon kolondan geçirilen nükleotidlerin birbirinden ayrılmasının daha uzun ve zor olmasına karşılık (Şek. 1a,b) BRUNNE-MANN ve çalışma grubunun yöntemi ile daha kısa sürede ve kolayca sağlanabildiği görüldü (Şek. 2a,b). Bu nedenle fare ve albino ratlarda yapılan in vivo deneylerde doveks kolonla ayırma gidildi ve 6-AN uygulanan deney havanlarında 260 nm de UV absorpsiyonu veren (Şek. 3a,4a,5a), ince tabaka kromatogramlarında lekelerin kuyruk teşkil etmediği ve iyi ayrıldığı görülen n-propanol-amonyum hidroksit-su (60:30:10) solvan sistemiyle kontrol NAD lekesine yakın leke veren (Şek. 3b,4b,5b), flüorometrik aktivite gösteren ve fakat alkol dehidrogenaz enzim aktivitesi kontrolünde etkisiz kalan örnek 6-ANAD olarak kabul edildi.

## ÖZET

İn vitro ve in vivo olarak nükleotidlerin ayrımında, bu arada 6-AN uygulanan hayvanlarda oluşan 6-ANAD ın ayrımında doveks 1x10 (formiyat formu) kolon kullanılması daha uygun bulunmuştur. İnce tabaka kromatogramları için n-propanol-amonyum hidroksit-su (60:30:10) solvan sistemi kullanılmıştır. Nükleotidlerin flüoresans gösterme özelliklerinden kontrol niteliğinde yararlanılmıştır. Kolon ve ince tabaka kromatografileri ile ayrımların sonucunda NAD'ye yakın Rf deki lekelerden 6-ANAD'ın ayrımı enzimatik olarak kontrol edilmiştir. Alkol dehidrogenaz enzimi için NAD substrat olmakla beraber 6-ANAD 1 / 1000 oranında substrat teşkil ettiğinden enzimatik kontrol güvenli bir yol oluşturmaktadır.

## SUMMARY

It was shown that the dowex column is more suitable than the active carbone column in the separations of the nucleotides and 6-ANAD which is synthetized in vivo by 6-AN pretreatment. n-propanol-ammonium hydroxide-water (60:30:10) solvent system was used for thin layer chromatography of nucleotides. The fluorescence activities of the nucleotides used for control. NAD and 6-ANAD were



distinguished from each other by cotrolling their activities on the alcohol dehydrogenase enzyme preparations.

#### KAYNAKLAR

- 1- Amnion, H.P.T., Steinke, j., *Diabetes*, **21**: 143 (1972).
- 2- Bergmeyer, H.U., *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. 4, 2. Edit., Verlag Chemie Weinheim Academic Press, Berlin (1974).
- 3- Bingöl, G., *Biyokimya*, 2. Bası, Mis Matbaası, Ankara (1981).
- 4- Brunnemann, A., Coper, H. und Neubert, D., *Nauyn Schmiedeberg's Arch. Exp. Path. u. Pharmak.*, **246**, 437 (1964).
- 5- Coper, H., Neubert, D., *Biochim. Biophys. Acta*, **82**, 167 (1964).
- 6- Davenport, H.W., *Physiology of Digestive Tract*, 3. Edit., Year Book Medical Publishers, Chicago (1971).
- 7- Dietrich, L.S., Frieland, I.M., Kaplan, L.A., *J. Biol. Chem.*, **233**: 4, 964 (1958).
- 8- Ewing, G.W., *Instrumental Methods of Chemical Analysis*, 4. Edit., Mc Graw-Hill Book Comp., New York, Toronto, Tokyo, Paris, London (1975).
- 9- Harvey, H., *Anal. Biochem.*, **29**, 58 (1969).
- 10- Howell, B.F., *Methods Enzymol.*, **66**, 55 (1980).
- 11- Konstantinova, M.A., *Fluorometric Analysis*, Israel Prog, for Scient Trans. Ltd., Jerusalem (1965).
- 12- Köhler, E., Barrach, H., Neuber, D., *Febs. Letters*, **6**: 3, 225 (1970).
- 13- Magasanik, B., Vischer, E., Doniger, R., Elson, D., Shargaff, E., *Biol. Chem.*, **186**, 37 (1950).
- 14- Nakayama, M., *Methods in Medical Chemistry*, Tokyo U.P., Tokyo (1978).
- 15- Numa, S., *Reviews of Physio., Biochem. and Exp. Pharm.*, **69**, 79 (1974).
- 16- Roodyn, D.B., *Automated Enzyme Assays*, North Holland Publishing Coop., Amsterdam (1970).
- 17- Udenfriend, E., *Fluorescence Assay in Biology and Medicine*, Academic Press, New York (1962).
- 18- Wilson, J.A., *Principles of Animal Physiology*, Mc Millan Comp. (New York, J972).