

GLUKOZ 6-FOSFAT DEHİDROGENAZ ÜZERİNE BAZI SİTOTOKSİK KİMYASALLARIN ETKİSİ

İsmail ÖZMEN

Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Isparta
e-mail: ozmeni@fef.sdu.edu.tr

Alınış: 02 Şubat 2009, Kabul: 01 Nisan 2009

Özet: Bu çalışmanın amacı, glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) üzerine bazı sitotoksik kimyasalların *in vitro* etkilerini araştırmaktır. Başlangıçta, G6PD enzimi insan eritrositlerinden amonyum sülfat çöktürmesi ile kısmi olarak ve bunu takiben afinite kromatografisi ile saflaştırıldı. İnhibisyon etkisi gösteren ilaçların I_{50} değerleri %aktivite - ilaç konsantrasyonu grafiği ile belirlendi. Saflaştırılan enzim üzerinde araştırılan iki ilacın (2,4-dihidroksi-5-floropirimidin ve sodyum 2-sulfaniletansulfonat) enzimi inhibe ettiği belirlendi.

Anahtar kelimeler: Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz, afinite kromatografisi, saflaştırma, enzim inhibisyonu

EFFECT OF SOME CYTOTOXIC CHEMICALS ON GLUCOSE 6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE

Abstract: The objective of this study was to determinate *in vitro* effects of some cytotoxic chemicals (2,4-dihydroxide-5-fluoropyrimidine and sodium 2-sulfanylethanesulfonate) on glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD). Initially, G6PD was purified from human erythrocyte by using ammonium sulphate precipitation and affinity chromatography. I_{50} values of the drugs exhibiting inhibition effects were determined by means of [drug]-activity% graph. The drugs investigated on the purified enzyme inhibited the enzyme activity.

Key words: Glucose-6-phosphate dehydrogenase, affinity chromatography, purification, enzyme inhibition

GİRİŞ

Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (G6PD, EC 1.1.1.49), Pentoz Fosfat Yolunda (PFY) NADP'nin NADPH'a indirgendiği ilk reaksiyonu kataliz eder. PFY, eritrositlerde NADPH'ın tek kaynağıdır. NADPH, nükleik asitler, proteinler ve membran lipidleri gibi pek çok molekül üzerinde serbest radikallerin oluşturduğu oksidatif stresden hücreyi korumak amacıyla hayati bir öneme sahiptir (AMES vd. 1993, MCCORD 1993). G6PD eksikliği en yaygın metabolik hastalıklardan birisidir. Bu hastalarda, belirli ilaçlar, yiyecekler veya enfeksiyonda serbest radikallerin aşırı üretimi hayati tehdit eden hemolitik krize sebep olur (MEHTA vd. 2000, SCHLORFF vd. 1999).

Serbest radikallerin indirgenmesinde rol alan indirgenmiş glutatyon (GSH) kendisi yükseltgenir ve GSSG oluşur, bu yükseltgenmiş (okside) glutatyonun indirgenmesinde ve tekrar antioksidatif reaksiyonlarda rol alması için NADPH tarafından indirgenmesi gerekir. Peroksitlere karşı eritrositlerin korunması için NADPH'nin üretimi esastır (JENKİNS & GOLDFARB 1993).

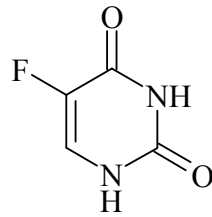
Reaktif oksijen türlerinin elimine edilmesi, okside glutatyonun ve NADP⁺'nin indirgenmesi reaksiyonlarında G6PD enziminin yanısıra; superoksid dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR) enzimleri de rol alırlar (HALLIWELL & GUTTERIDGE 1989, MATES vd. 1999). Eğer hücrede serbest radikallerin üretimi, bu enzimlerin elimine etme kabiliyetini aşarsa antioksidan savunma sistemi bozulur ve oksidatif stres ortaya çıkar. Pekçok ilaç ve kimyasal vücudun spesifik organlarında serbest radikallerin oranını artırabilir (MATES vd. 1999).

G6PD eksikliği genetik bir hastalıktır ve tarif edilebilen 400 varyantı vardır. Enzim eksikliği eritrositlerde hemolitik anemiye sebep olur (MEHTA vd. 2000). İlaç etkileşimli hemoliz araştırmacıların oldukça ilgisini çekmektedir. Çünkü pekçok ilaç terapilerde kullanılmaktadır ve ilaçların hemolitik anemiye sebep olduğuna dair pekçok çalışma mevcuttur (MELONI vd. 1991). Çinde yapılan bir araştırmada ebegömesi, tavşankulağı kökü gibi bir takım halk ilaçlarının enzim eksikliği bulunan şahısların eritrositlerinde olumsuz etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (KO vd. 2008). Bununla birlikte G6PD eksikliği olan kişilerin sıtma hastalığına karşı daha dirençli olduğu tespit edilmiştir (BEUTLER & DUPARC 2007). Bir çalışmada, Tip-I glikojen depolama hastalığının, G6PD eksikliği ile ortaya çıkan otozomal resesif bozukluk olduğu belirlenmiştir. (LEE vd. 2007). Bu çalışmada, G6PD üzerinde iki sitotoksik ilacın (2,4-dihidroksi-5-floropirimidin ve sodyum-2-merkaptotetan sulfonat) etkisi araştırılmıştır. Literatürlerde bu iki ilacın G6PD üzerine olumlu ya da olumsuz etkisini araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır.

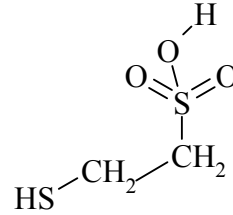
2,4-dihidroksi-5-floropirimidin sitotoksik ilaçlardandır ve antimetabolit olarak fonksiyon görür. Farklı kanser formlarının palyatif tedavisinde tek başına veya kolorektal ve meme kanserlerinin tedavisinde kombine olarak, ayrıca pankreas, karaciğerin malign tümörlerinde, karaciğer metastazında ve analkanserde, over kanserinde, servikal kanserde, mesane ve prostat kanserinde endikedir. Damar yoluyla ve bazı vücut boşluklarına uygulanabilmektedir. Yan etkileri, bulantı, kusma, ağızda yara (stomatit-mukozit) oluşumu, yemek borusunda yaralar ve mide ülserleridir. Düşük lökosit sayısı görülür, saç kaybı ve tırnaklarda renk değişimi oluşur. Cilt güneşe duyarlı hale gelir. Baş ağrısı, görme bozuklukları ve yürürken denge kaybı (serebellar ataksi) gibi yan etkiler nadir görülür. Göğüs ağrısı, ani ölüm ve düzensiz kalp atışları şeklinde bildirilen kalp hasarı vakaları mevcuttur. Ayrıca deride kabarma ve kızarmaya neden olur (TİK 2001).

Sodyum 2-sulfaniletansulfonat, kanser tedavisinde çok kullanılan alkilleyici ilaçlardan ifosfamide ile birlikte kullanılır. Ifosfamide DNA'yı zedeleyerek hücrenin replikasyonunu bozar. Pek çok sitotoksik ilaçlarla ortak olan yan etkilerinin yanı sıra, uzun süreli kullanımda gametogenez ciddi olarak etkilenir. Ayrıca, yoğun radyoterapi ile birleşince, akut lenfositler olmayan lösemi insidansında belirgin bir artış görülmesidir. Ifosfamid, sodyum 2-sulfaniletansulfonat beraber verilmediğinde %100

oranında hemorajik sistit gelişir. Sodyum 2-sulfaniletansulfonat idrar yollarında özgül olarak bu metabolit ile reaksiyona girerek toksik etkinin meydana gelmesini engeller. Ifosfamide kullanımıyla ürotelyal etki görülen hastalarda rutin olarak sodyum 2-sulfaniletansulfonat kullanılır (TİK 2001). Hastalarda santral sinir sistemi depresyonu (somnolans, konfüzyon, halüsinasyon, psikoz ve koma) gelişebilir ve bu durum özellikle tek seferde yüksek doz uygulanan kişilerde ölümcül olabilir. Kemik iliği depresyonu doza bağlıdır ve özellikle nötropeni görülür (VERSCHRAGAEGEN vd. 2002).



2,4-dihidroksi-5-floropirimidin



sodyum 2-sulfaniletansulfonat

Şekil 1. 2,4-dihidroksi-5-floropirimidin ve sodyum 2-sulfaniletansulfonat maddelerinin kimyasal yapısı

MATERYAL VE METOT

Materyaller

2',5' ADP-Sepharose 4B Pharmacia Firmasından alındı. Diğer bütün kimyasallar Sigma Chem. Co. ve Merck'ten analitik saflıkta alındı. İlaçlar çeşitli hastanelerden temin edildi.

Hemolizat Hazırlanması

Sağlıklı kişiden alınan taze kan 15 dakika 2500xg'de santrifüj edildi. Eritrositler 0.16 M'lık KCl çözeltisi ile yıkandı. Elde edilen eritrositler hemoliz edildi. Hücre zarlarını uzaklaştırmak için +4°C'de 10.000xg'de 20-30 dakika santrifüj edildi. (NINFALI vd. 1990, SHREVE & LEVY 1977). Bütün deneysel işlemler +4°C'de gerçekleştirildi.

Protein miktarlarının ve enzim aktivitelerinin ölçümü

Kantitatif protein miktarları Bradford metodu ile ölçüldü (BRADFORD 1976). Bu yöntemde boya olarak kullanılan Coomassie brilliant blue G-250, negatif bir yüke sahiptir ve protein üzerindeki pozitif yüke bağlanır. Boyanın kırmızı (λ_{\max} =465 nm) ve mavi (λ_{\max} =595 nm) formu mevcuttur. Proteinin bağlanması, kırmızı formun mavi forma dönüşümünü sağlar. Sodyum dodesil sülfat (SDS) ve Triton X-100 gibi deterjanlar reaksiyonu interfere ederler.

Standart grafik hazırlandıktan sonra alınan kanlardan enzim saflaştırma basamaklarında elde edilen enzim çözeltilerinden 80'er µl alınarak saf su ile 100 µl'ye tamamlandı ve üzerlerine 5'er ml renklendirme reaktifi ilave edildi. On dakikalık bir inkübasyondan sonra 595 nm'de absorbans değerleri okundu. Standart grafikten yararlanılarak protein miktarları belirlendi.

Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enziminin aktivite ölçümü

G6PD aktiviteleri Beutler tarafından tariff edildiği gibi 340 nm'de absorpsiyon değişikliği ölçülerek belirlendi (BEUTLER 1984).

Enziminin aktivitesinin tayini için reaksiyon sonunda oluşan NADPH göz önüne alınır. 1 mM NADP⁺ indirgendiğinde (1 ml hacimde ve 1 cm ışık yolunda), spektrofotometrede 340 nm dalga boyunda okunduğunda 6,22 OD (optik dansite) verir. (BEUTLER 1984).

Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz

Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz işlemleri Ninfali'ye göre yapıldı (NINFALI vd. 1990). Proteinler çok değerlikli elektrolitler olduğundan iyonlara benzer şekilde hareket ederler. Yüksek tuz konsantrasyonlarında, protein moleküllerini çevreleyen ve çözünür halde tutan su molekülleri, tuzdaki iyonlar tarafından çekilir ve proteinler çöker. Bu çökmeye molekül ağırlığı ve iyonik şiddet etkilidir. Dolayısıyla değişik tuz konsantrasyonlarında değişik proteinler çöker (LEHNINGER vd. 1993).

Hemolizat, katı (NH₄)₂SO₄ ile 35-65% arasında doygunluğa getirildikten sonra 5.000xg'de 15 dakika santrifüj edildi. Elde edilen çökeltiler yeteri kadar 50 mM fosfat tamponunda (pH=7) çözüldü. Enzimin içinde bulunduğu karışım (50 mM K-asetat/50 mM K-fosfat) (pH=7) tamponuna karşı 2 saat süreyle 2 defa değiştirilerek diyaliz edildi (NINFALI vd. 1990).

G6PD'nin saflaştırılması

10 ml'lik yatak hacmi için 2 g kuru 2', 5' ADP Sepharose 4B jeli tartıldı. 400 ml destile su ile birkaç defa yıkandı. Şişmiş jelin havası alındıktan sonra %25 dengeleme tamponu (0.1 M K-asetat/0.1 M K-fosfat pH=6) ve %75 jel olacak şekilde 1x10 cm'lik kapalı sistem oluşturucu ve soğutmalı -yine aynı tamponu içeren-kolona paketlenildi. Jel çöktükten sonra dengeleme tamponuyla (0,1 M K-asetat/0,1 M K-fosfat pH=6) yıkandı. Dengeleme ve yıkamada akış hızı 50 ml/saat olarak uygulandı (NINFALI vd. 1990).

Numune kolona yüklendikten sonra sırasıyla 25 ml 0,1 M K-asetat/0,1 M K-fosfat pH=6,25 ml 0,1 M K-asetat/0,1 M K-fosfat (pH=7,85) ve 25 ml 0,1 M KCl/0,1 M K-Fosfat (pH=7,85) çözeltileriyle yıkandı. Daha sonra 25 ml 80 mM K-fosfat + 80 mM KCl + 0,5 mM NADP⁺ + 10 mM EDTA (pH=7,85) çözeltisi kolona uygulandı enzim elüe edildi. Enzim aktivitesi her fraksiyonda belirlendi. Ayrıca hemolizat, amonyum sülfat çöktürmesi ve enzim çözeltisinde spesifik aktiviteler ayrı ayrı belirlenerek yüzde saflaştırma hesaplandı. Saflaştırılan enzim çözeltisi 50 mM K-asetat/50 mM K-fosfat (pH=6) çözeltisiyle diyaliz edildi. (MORELLI vd. 1978, NINFALI vd. 1990).

SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

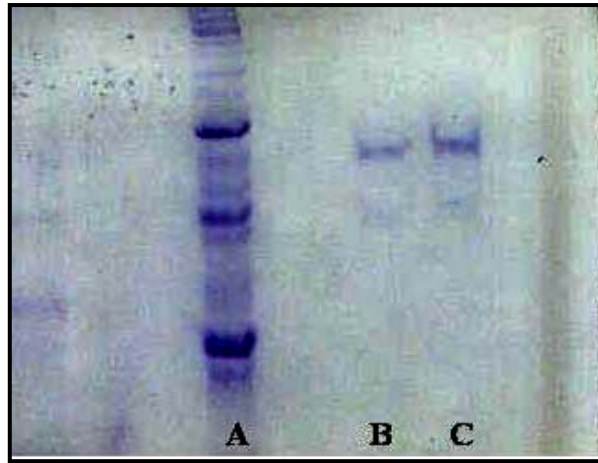
Enzimin saflaştırılmasından sonra %3-8 kesikli sodyum dodesilsülfat (SDS-PAGE) poliakrilamid jel elektroforezi Laemmler tarafından anlatıldığı gibi yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi (LAEMMLER 1970).

In vitro inhibitör Çalışmaları

Bu çalışmada, G6PD enzimi üzerine etkilerini belirlemek amacıyla 2,4-dihidroksi-5-floropirimidin ve sodyum 2-sulfaniletansulfonat kimyasalları seçildi. I_{50} değerlerini (I_{50} ; %50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonları) belirlemek için 0,6 mM substrat konsantrasyonunda ve beş farklı ilaç konsantrasyonlarında elde edilen enzim aktivite değerleri kullanıldı. Enzim aktiviteleri, 2,4-dihidroksi-5-floropirimidin için 0,038 M, 0,046 M, 0,053 M, 0,065 M ve 0,076M küvet konsantrasyonlarında, sodyum 2-sulfaniletansulfonat için 0,061 M, 0,12 M, 0,18 M, 0,24 M and 0,31 M küvet konsantrasyonlarında ölçüldü. Kontrol grubu olarak ilaçsız enzim aktivitesi ölçüldü ve grafikte aktivite %100 olarak alındı. İlaç konsantrasyonlarına karşı inhibisyon grafiği çizilerek I_{50} değerleri hesaplandı.

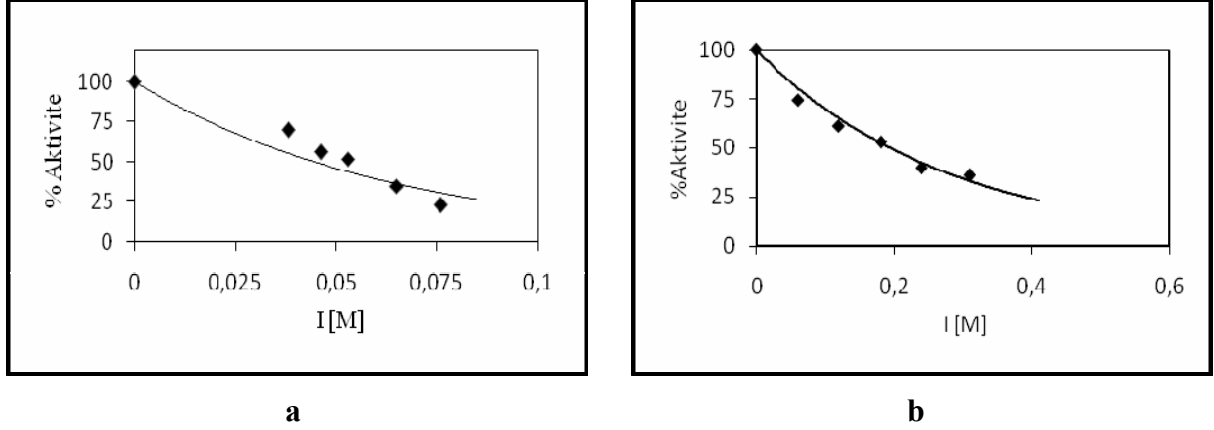
TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, *in vitro* şartlarda G6PD üzerine bazı sitotoksik ilaçların etkileri araştırıldı. Enzim insan eritrositlerinden amonyum sülfat çöktürmesi ve bunu takiben afinite kromatografisi metotları kullanılarak saflaştırıldı. Enzim %42,4 oranında 9.11 kat saflaştırıldı. Saflaştırılan enzim SDS-PAGE elektroforezine tabi tutularak enzim saflığı kontrol edildi (Şekil 2).



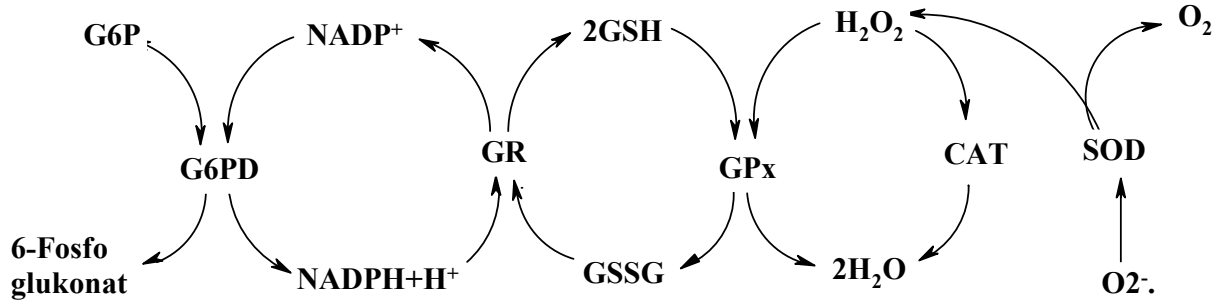
Şekil 2. İnsan eritrositlerinden saflaştırılan G6PD enziminin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi. A; standart proteinlerin karışımı (mol ağırlıkları; β -galaktozidaz, E. coli; 116.000, fosforilaz B, tavşan; 97.400, albumin, bovine; 66.000, ovalbumin, chicken; 45.000, karbinik anhidraz, bovine; 29.000), B ve C; İnsan eritrositlerinden saflaştırılan G6PD enziminin bantları

Enzim üzerine ilaçların etkileri araştırılırken etkili olan en düşük konsantrasyonda çalışıldı. Enzim için bu kimyasalların I_{50} değerleri araştırıldı. %50 inhibisyona sebep olan konsantrasyon 2,4-dihidroksi-5-floropirimidin için 0,043 M, sodyum 2-sulfaniletansulfonat için 0,18 M olarak grafikten ve elde edilen denklemden hesaplandı. Dolayısı ile çalışma sonunda bu ilaçların G6PD enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği belirlendi. Elde edilen değerler Şekil 3 gösterildi.



Şekil 3. 2,4-dihidroksi-5-floropirimidin (a) ve sodyum 2-sulfaniletansulfonat(b) için % aktivite-[I] regresyon analizi grafikleri

Bu çalışma sonunda 2,4-dihidroksi-5-floropirimidin ve sodyum 2-sulfaniletansulfonat etken maddelerinin bu enzimi inhibe ettiği belirlenmiştir. Bu enzimin yetersiz çalışması, hücrede NADPH'in eksik üretilmesi anlamına gelir. Bu durumda serbest radikallerin indirgenmesinde rol alan antioksidan enzimlerin verimli çalışabilmesi için yeterli NADPH hücrede bulunmuyor demektir (FRIDOVICH 1978). Bu durumu daha ayrıntılı belirtmek gerekirse; serbest radikaller çok aktif olarak reaksiyona girebilen bileşiklerdir. Özellikle hücre membranları ve DNA ile etkileşebilirler. Başlatılan zincirleme reaksiyon ile hücrenin hızlı bir şekilde zarar görmesine yol açarlar (HUSAIN & SOMANI 1997). Bu radikalleri elimine ederek H_2O_2 oluşmasını sağlayan başlıca enzim SOD enzimidir. Oluşan H_2O_2 , CAT ve GPx enzimleri tarafından suya dönüştürülerek tamamen zararsız hale getirilir. GPx, bu reaksiyonu kataliz ederken İndirgenmiş glutatyona (GSH) ihtiyaç duyar ve GSH reaksiyon sonunda yükseltgenmiş glutatyona (GSSG) dönüşür. GSSG, detoksifikasyon reaksiyonlarında rol almaz. Bu nedenle tekrar GSH' a dönüşmesi gerekir. Bu işlem, NADPH bağımlı olarak çalışan GR enzimi tarafından gerçekleştirilir. NADPH'ta bizim bu çalışmamızda araştırdığımız G6PD enzimi tarafından $NADP^{+}$ 'nin indirgenmesi sonucu oluşur (SOMANI 1996). G6PD'nin bloke olması durumunda NADPH üretilmeyeceği için zararlı serbest radikallerin ortadan kaldırılması mümkün olmayacak ve radikaller tarafından hücre membranlarının zarar görmesi sonucu hemoliz ortaya çıkacaktır (ÖZMEN vd. 2004) (Şekil 4).



Şekil 4. G6PD, GR, GP, CAT ve SOD tarafından kataliz edilen reaksiyonlar

Bu çalışmanın sonuçlarına göre; normal ve G6PD eksikliği olan kişilerin bu ilaçları doktor kontrolünde kullanmalıdır. Artmış serbest radikal miktarından dolayı enzim miktarı olumsuz etkileniyor olabilir. G6PD eksikliği, yeni doğanlarda hemoliz ve sarılığa sebep olur. Metabolizma bir ilaç olarak kullanılan bu kimyasalların hemolitik etkisine karşı direnç gösterirse hemoliz görülmeyebilir. Bazı durumlarda ise, bir kısım ilaçlar eritrositlerin ömrünü kısaltsa bile, hemolizin derecesi klinik anlamda belirti göstermeyebilir (FRANK 2005).

Çalışmadan bu kimyasalların antioksidan savunma sistemi üzerine yan etkilere sahip olduğu açıktır. G6PD enzim seviyesinin yapılan tahlillerden düşük olduğunu bilen hastalar doktor ilaç yazarken bu konuda doktoru bilgilendirmelidir. Yeterli enzim üretilmeyen kişilerde bu ilaçların kullanımı yüksek oranda kanın hemoliz olmasına ve başka arzu edilmeyen yan etkilere sebep olabilir.

KAYNAKLAR

- AMES BN, SHIGENAGA MK, HAGEN TM, 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90, 7915–22.
- BEUTLER E, DUPARC S, 2007. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and antimalarial drug development. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 77(4), 779-789.
- BEUTLER E, 1984. Red cell metabolism, A manual of Biochemical Methods, 3rd ed. Grune and Starton, Inc. Orlando, FL 32887, London, 248-251.
- BRADFORD MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*; 72, 248-51.
- CHUN HAY KO, KAREN LI, PAK CHEUNG NG, KWOK PUI FUNG, RAYMOND PUI-ON WONG, KIT MAN CHUI, GOLDIE JIA-SHI GU, EDMUND YUNG AND TAI FAI FOK, 2008. Pro-oxidative effects of Chinese herbal medicine on G6PD-deficient erythrocytes *in vitro*, *Toxicology in Vitro* 22, (5) 1222-1227.
- FRANK JE, 2005. Diagnosis and management of G6PD deficiency. *American Family Physician*. 72 (7), 1277-1282.
- FRIDOVICH I, 1978. The biology of oxygen radicals. *Science*, 201, 875-880.

- HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC, 1989. Free Radicals in Biology and Medicine, (2nd Ed.), Clarendon Press, Oxford.
- HUSAIN K, SOMANI SM, 1997. Interaction of exercise and ethanol on hepatic and plasma antioxidant system in rat. *Pathophysiology*, 4, 69–74.
- JENKINS RR, GOLDFARB A, 1993. Introduction: oxidant stress, aging and exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 25, 210–212.
- LAEMMLI DK, 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of bacteriophage T. *Nature* 227, 680-683.
- LEE KW, LEE JH, SHIN SW, KIM SJ, JOH JW, LEE DH, KIM JW, PARK HY, LEE SY, LEE HH, PARK JW, KIM SY, YOON HH, JUNG DH, CHOE YH, LEE SK, 2007. Hepatocyte transplantation for glycogen storage disease type Ib. *Cell Transplantation* 16 (6), 629-637.
- LEHNINGER AL, NELSON DL, COX MM, 1993. Principles of Biochemistry. New York Worth Publisher Inc., 126-132.
- MATES JM, PEREZ-GOMEZ C, NUNEZ DE CASTRO I, 1999. Antioxidant Enzymes and Human Diseases. *Clinical Biochemistry*. 32, 595-603.
- MCCORD JM, 1993. Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance. *Clinical Biochemistry* 26, 351–7.
- MEHTA A, MASON PJ, VULLIAMY TJ, 2000. Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase deficiency. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 13 (1), 21-38.
- MELONI T, FORTELEONI G, ENA F, MELONI GF, 1991. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and bacterial infections in northern Sardinia. *The Journal of Pediatrics*. 118, 909–11.
- MORELLI A, BENATTI U, GAETANI GF, DE FLORA A, 1978. Biochemical mechanisms of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 75 1979-83.
- NINFALI P, ORSENIGO T, BAROCIANI L, RAPA S, 1990. Rapid purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase from mammal's erythrocytes. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. 20, 297-309.
- OZMEN I, BAYIR A, CENGİZ M, SİRKEÇİOĞLU AN, ATAMANALP M, 2004. Effects Of Water Reuse System On Antioxidant Enzymes Of Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss* W., 1792), *Veterinarni Medicina- Czech*, 49, 10, 373-378.
- SCHLORFF EC, HUSAIN K, SOMANI SM, 1999. Dose- and time-dependent effects of ethanol on antioxidant system in rat testes. *Alcohol*. 18, 203-214.
- SHREVE DS, LEVY, HR, 1977. On the molecular weight of human glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Biochemical and Biophysical Research Communications Biochem Biophys Res Commun*. 1977 Oct 24, 78 (4), 1369-75.
- SOMANI SM, 1996. Exercise, drugs and tissue specific antioxidant system. In: Somani SM. Editor. *Pharmacology in Exercise and Sports*, CRC Press, Boca Raton, FL.; 57–95.
- TİK (Türkiye ilaç kılavuzu), 2001. Turgut yayıncılık, 372-380.
- URSO ML, CLARKSON PM, 2003. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*, 15, 189, 41-54.
- VERSCHRAGAEGEN C, HORPWITZ S, 2002. Cytotoxic drugs in gynecologic oncology. Cytotoxic Drug Therapy In Gynaecological Oncology: Principles and Practice, Chapter 18, Péter Bösze, (Ed). *CME Journal of Gynecol Oncology*, 6, 319-43.