

FARE (MUS MUSCULUS) KARACİĞERİ GLUKOZ-6-FOSFAT  
DEHİDROGENAZ ENZİMİ AKTİVİTESİNE YÜKSEK KARBOHİDRAT  
DİYETİNİN ETKİSİNİN İNCELENMESİ

A.Alev Karagözler

İnönü Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin  
Kimya Anabilim Dalı İçin Öngördüğü  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır.

Eylül - 1987

MALATYA

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

İş bu çalışma, jürimiz tarafından KİMYA Anabilim Dalında  
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan PROF. DR. ENGİN M. GÖZÜKARA



Üye PROF. DR. A. NİHAT BOZCIK



Üye YRD. DOÇ. DR. KAYAHAN FIŞKIN



---

ONAY

Yukarıdaki imzaların, adıgeçen öğretim üyelerine ait  
olduğunu onaylarım.

/ 8 / 9 / 1987

Prof. Dr. Orhan ÖZER  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü



## ÖZET

Bu çalışmada fare (mus-musculus) karaciğeri G-6-PD enzim aktivitesinin yüksek karbohidrat diyetine bağlı olarak değişimi incelendi. Bu amaçla 1,5-2 aylık farelere %60 karbohidrat içeren yapay besin verilerek 24, 48, 120, 144 ve 168 inci saatlerde hayvanların karaciğerleri çıkarıldı ve ultrasantrifüjde 28.000 rpm'de elde edilen supernatandaki enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçüldü. Uygulanan besinin G-6-PD enzim aktivitesini yaklaşık 10 kat artırdığı saptandı.

Eldeki supernatan örneklerine slab jel elektroforez uygulandı. Laemmli'ye göre uygulanan slab jel elektroforez deneylerinde protein bantları elde edildi. Aktivite artışını bir kez daha görmek üzere Hedricks and Smith'in disk jel elektroforez yöntemi slab jel elektroforez düzeneğine uygulandı. Elektroforezden sonra yapılan boyamada protein bantları elde edildi. Gerekli kimyasal madde temin edilemediğinden aktivite tayini yapılamadı.

## SUMMARY

In this work, the change in activity of mouse liver G-6-PD enzyme with reference to high carbohydrate diet has been investigated. For this purpose, 1,5-2 months old mice were fed 60% carbohydrate containing diet and at 24, 48, 120, 144 and 168 th hours the livers of mice were removed; and the activity of enzyme was measured spectrophoto-metrically in supernatant fraction prepared by centrifuging liver homogenate at 28000 rpm.

The supernatant samples were then run on slab gel electrophoresis. In these experiments, which were conducted according to Laemmli, protein bands were detected. In order to observe once more the activity increase the method of disc gel electrophoresis of Hedricks and Smith was adapted to slab gel electrophoresis apparatus. After staining the gel, protein bands were clearly marked, but because of the lack of required chemicals affinity test for activity was not performed.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleşmesi için yoğun mesaisine rağmen ilgi ve desteğini esirgemeyen tez yöneticim Sayın Prof.Dr. Engin M. Gözükara'ya; deney hayvanları ve ultrasantrifüj aletinin teminindeki yardımlarından dolayı Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Fizyoloji ve Moleküler Biyoloji Anabilim dalları elemanlarına; teknik bilgisinden faydalandığım arkadaşım Arş.Grv. M.Haluk Türkdemir'e; tezimi titizlikle daktilo eden Emine Turgut'a ve yardımlarından dolayı eşim A.Ersin Karagözler'e teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET .....	iv
SUMMARY .....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	xi
 1. GİRİŞ .....	 1
1.1. G-6-PD Enziminin Fiziksel Özellikleri .....	2
1.2. G-6-PD Enziminin Katalitik Özellikleri .....	3
1.3. G-6-PD Enziminin Yapısal Özellikleri .....	4
1.3.1. Primer yapı .....	4
1.3.1.a. Amino asit bileşimi .....	4
1.3.1.b. Amino asit dışındaki bileşenler .....	4
1.3.1.c. N- ve C- terminal amino asitler .....	4
1.3.1.d. Altünite (monomer) ağırlıkları .....	6
1.3.2. Sekonder yapı .....	7
1.3.3. Tersiyer ve kuaterner yapı .....	7
1.4. G-6-PD Enziminin Katalitik Faaliyetinden Sorumlu Amino Asitler .....	 7
1.5. G-6-PD Enziminin Eksikliğinin Farkedilmesinin Tarihçesi .....	 8
1.6. G-6-PD Enziminin Hücre ve Doğadaki Dağılımı .	10
1.7. G-6-PD Molekülünün Varyantları .....	10
1.8.1. Methemoglobin indirgenmesi .....	16
1.8.2. Redukte glutation seviyesinin ayarlanması .	16
1.8.3. Oksidan bileşik ve ilaçların indirgenmesi .	17
1.8.4. Lipid sentezinin ayarlanması .....	17
1.9. G-6-PD Enziminin Klinik Önemi .....	17
1.10. G-6-PD Enziminin Eksikliğinin Laboratuvar Tespiti .....	 20
1.10.1. Heinz Body test .....	20

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ (Devam Ediyor)

	<u>Sayfa</u>
1.10.2. Spektrofotometrik test .....	21
1.10.3. Floresan spot test .....	22
1.11. G-6-PD Enziminin Aktivitesinin Düzenlenmesi .	22
2. DENEYSEL ÇALIŞMA .....	26
2.1. Deneylerde Kullanılan Maddeler .....	26
2.2. Deney Hayvanlarına Uygulanan İşlemler .....	26
2.3. Enzim Aktivite Tayini .....	27
2.3. Elektroforez Deneyleri .....	36
3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA .....	40
DEĞİNİLEN BELGELER DİZİNİ .....	44

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Olgun eritrositte glukoz metabolizmasının enzimatik yolları .....	14
2.1. Standart BSA ile hazırlanan çalışma grafiği ..	30
3.1. 168 saat süreyle %60 karbohidrat içeren diyetle beslenen farelerin karaciğer G-6-PD enzimi aktivitesinin zamanla değişimi .....	40
3.2. Örneklerle Laemmli'ye göre uygulanan slab jel elektroforez deneyi sonunda elde edilen jel fotoğrafı .....	41
3.3. Örneklerle Hedricks and Smith'e göre uygulanan slab jel elektroforez deneyi sonucu elde edilen jel fotoğrafı .....	42



## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Çeşitli kaynaklardan elde edilen G-6-PD enziminin amino asit kapsamları .....	5
2.1. Standart BSA çözeltileri ile 750 nm de elde edilen absorbens değerleri ve ortalaması .....	30
2.2. Örneklerle okunan absorbens değerleri ve ortalaması .....	31
2.3. Örneklerdeki protein miktarları .....	31
2.4. Aktivite tayin karışımlarının bileşimleri .....	33
2.5. Örneklerin ikili ve tekli aktivite tayin karışımları ile ölçülen absorbens .....	34
2.6. Örneklerdeki G-6-PD enzimlerinin miktarları ...	35
2.7. Örneklerdeki G-6-PD enzimlerinin spesifik aktiviteleri .....	36

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Bu çalışmada kullanılmış, fakat tez metni içinde açıklanmamış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
G-6-PD	Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz
G-6-P	Glukoz-6-fosfat
NADP <sup>+</sup>	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat redukte.
NAD <sup>+</sup>	Nikotinamid adenin dinukleotid
NADH	Nikotinamid adenin dinukleotid redukte
TPN	Triphosphopyridinnucleotid
C.utilis	Candida utilis
L.mesenteroides	Leuconostoc mesenteroides
N.crassa	Neurospora crassa
S.carlsbergensis	Saccharomyces carlsbergensis
S.cerevisiae	Saccharomyces cerevisiae
B.subtilis	Bacillus subtilis
TRIS	Trihidroksimetil amino metan
6-PG	6-fosfoglukonat
6-PGD	6-fosfoglukonat dehidrogenaz
GSH	Glutation (indirgenmiş)
GSSG	Glutation (yükseltgenmiş)
ACD	Dibasik asit sitrat
NBT	Nitro blue tetrazolium
PMS	Phenazin metasulfat
ADP	Adenosin difosfat
ATP	Adenosin trifosfat
TA	Transaldolaz
TK	Transektolaz
HMP	Heksozmonofosfat
BSA	Bovin serum albumin
TEMED	N, N, N', N'-Tetrametiletildiamin

## 1. GİRİŞ

Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (D-Glukoz 6P :  $\text{NADP}^+$  oksidoredüktaz, E.C.1.1.1.49) enziminin fizyolojik önemi saptanarak üzerinde çok geniş kapsamlı çalışmalar yapılmıştır.

Enzim, karbonhidrat metabolizmasının ikinci ana yolu olan pentozfosfat yolunun ilk enzimidir ve  $\text{NADP}^+$  koenzim olarak kullanılarak D-Glukoz-6-fosfat'ın D-Glukano-6-lakton-6-fosfat'a yükseltgenmesini katalizler. Enzim ayrıca bu metabolik yolun hızını ayarlayan regülasyon enzimi olması bakımından da değer taşır.

Enzimin hem fizyolojik hem de klinik öneminin anlaşılması ile insan dahil değişik seviyeden organizmalar üzerinde geniş kapsamlı çalışmalar yapılmıştır.

Özellikle zenciler ve Akdeniz ülkeleri insanları arasında yaygın olan G-6-PD enzimi eksikliği klinik önem taşıyan kalıtsal enzimatik bozuklukların en önemlisidir denebilir (Burka, et al., 1966; Beutler, 1967).

G-6-PD ilk defa Warburg and Christian (1931) tarafından önce at eritrositlerinde, daha sonra diğer memeli eritrositlerinde ve bira mayasında keşfedilmiş ve "Zwischenferment" (ara maya) olarak adlandırılmıştır. İlk defa 1936 da bira mayasından kısmen saflaştırılmış fakat yine aynı kaynaktan izole edilmesi 25 yıl kadar sonra başarılmıştır (Noltmann, et al., 1961). Bu arada enzimin pekçok hayvan, bitki ve mikroorganizmalardaki varlığı saptanmıştır (Levy, 1979).

G-6-PD enzime ilginin pekçok nedeni vardır. G-6-PD, hayvan dokularında, birçok bitki ve mikroorganizmada heksozmonofosfat yolunun ilk reaksiyonunu katalizler ki bu yol, NADPH ve pentozfosfatları üretir (Levy, 1979).

Heksozmonofosfat yolunun asıl amacı NADPH üretmek ise de yolun gidişi farklı dokularda ve değişken metabolik

şartlarda değişik olabilir. Bazı hayvan dokularında glukozun büyük kısmı heksozmonofosfat yolu ile metabolize edilir. Bu yüzden bu yolun aktivitesini kontrol eden faktörlerin araştırılması çok ilgi çekmiştir.

İnsan eritrositlerinde de G-6-PD'nin heksozmonofosfat yolunun hız belirleyici reaksiyonunu katalizlediği saptanmıştır (Yoshida, 1973). İnsan eritrositi G-6-PD'na ilgi 1951'li yıllarda, primaquin'e hassas hemolitik kansızlığın G-6-PD eksikliği ile ilgili olduğu (Garson, et al., 1956) ve insan G-6-PD'ı için yapısal genin X kromozomu üzerinde yerleştiği saptandıktan sonra daha da artmıştır (Childs, et al., 1958).

#### 1.1. G-6-PD Enziminin Fiziksel Özellikleri

Çeşitli kaynaklardan elde edilen G-6-PD'nin optimum pH değerleri 6,8 ile 9,5 arası gibi gayet geniş bir dağılım gösterir. Basit organizmalarda optimum pH değerinin biraz düşük, memeli hücrelerinde ise genellikle biraz daha yüksek olduğu gözlenir (Gözükara, 1978). İnsan alyuvarları G-6-PD'nin optimum pH'ı 8-9 arasında değişir (Anstoll and Trujillo, 1967).

Enzim, G-6-PD için  $2.9 \times 10^{-5} M$  ile  $1.3 \times 10^{-4} M$  arasında Michaelis-Menten sabiti,  $K_m$ , gösterirken koenzim  $NADP^+$  için bu değer  $4.4 \times 10^{-6} M$  ile  $1.05 \times 10^{-5} M$  arasında değiştiği görülmüştür (Gözükara, 1978).

Enzim, elde edildiği kaynağa bağlı olarak çok değişik spesifik aktivite değerleri gösterir. Örneğin; insan eritrositi G-6-PD'nin spesifik aktivitesi 750 Unite/mg protein iken, sığır adrenal bezi enzimi 340, sıçan karaciğeri enzimi 210, C.utilis enzimi 314, L.mesenteroides enzimi 314, Neurospora crassa enzimi 470, Saccharomyces carlsbergensis'den saflaştırılan enzim ise 670 spesifik aktivite gösterir (Gözükara, 1978).

## 1.2. G-6-PD Enziminin Katalitik Özellikleri

G-6-PD'in pekçok formu magnezyumu aktivatör olarak kullanılır. Eritrosit enzimi ise optimum aktivite için  $Mg^{++}$  iyonlarına gereksinim duyar. Diğer iki değerlikli katyonlardan  $Ca^{++}$ ,  $Mn^{++}$  ve  $Ba^{++}$  da aktivator olarak davranabilirse de bu katyonların yüksek konsantrasyonu enzimi inhibe eder (Glaser and Brown, 1955).

G-6-PD'in koenzimi  $NADP^+$  dir ve bu koenzimin uzaklaşması ile G-6-PD inaktif hale gelir. İnaktif hale gelmesinin nedeni koenzimin yokluğunda enzim molekülünün aktif dimer halinin kararsız olması ve aktif olmayan monomer haline dönüşmesidir (Kirkman and Hendrickson, 1962; Chung and Langdon, 1963).

$NADP^+$  nin G-6-PD molekülüne bağlanması sigmoid eğri gösterir. Yani bağlanan  $NADP^+$  molekülü G-6-PD'in  $NADP^+$  a karşı ilgisini artırarak ortamdaki diğer  $NADP^+$  molekül-lerinin bağlanmasını kolaylaştırır (Luzzato, 1967).

Alyuvarlardan elde edilen G-6-PD da  $NADP^+$  yı koenzim olarak kullanır.  $NADP^+$  yerine NAD olması halinde substratı ile verdiği reaksiyonun hızı %95 oranında düşer (Keller, 1971).

G-6-PD enzimi substratı olan G-6-P için oldukça özgül davranır, fakat bu özgüllük kesin değildir. Alyuvarlar G-6-PD enzimi Galaktoz-6-fosfat ve 2-deoksiglukoz-6-fosfat ile düşük aktive gösterir (Gözükara, 1975). Bu iki alternatif substratın fizyolojik önemi pek yok ise de 2-deoksiglukoz-6-fosfat ile olan reaksiyonun G-6-PD'in mutant tiplerini karakterize etme ve tanımda faydalı olacağı ispatlanmıştır (Keller, 1971).



### 1.3. G-6-PD Molekülünün Yapısal Özellikleri

#### 1.3.1. Primer yapı

##### 1.3.1. a. Amino asit bileşimi

Enzimin çeşitli varyantının bulunması nedeniyle amino asit bileşimi de çeşitlilik gösterir. Çizelge 1.1. de çeşitli kaynaklardan elde edilen G-6-PD enziminin amino asit kapsamları görülmektedir. Özellikle sistein ve methionin amino asitleri kapsamlarında göze çarpan farklılıklar vardır.

##### 1.3.1. b. Amino asit dışındaki bileşenler

Maya hücresi G-6-PD'ında  $Zn^{++}$  ve diğer metallerin varlığı saptanmıştır. Sığır adrenal G-6-PD enziminin kantitatif analizi  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  ve  $Cu^{2+}$  metallerinin varlığını göstermiştir. İnsan eritrositi G-6-PD'ının ise bir metaloenzim olmadığı farkedilmiştir. Ancak metallerin varlığı saptanamamış olabilir. Gerçekte metal iyonu içeriği hakkında kesin delil yoktur.

Bu metal iyonları dışında G-6-PD moleküllerinde rastlanan en önemli bileşen moleküle sıkıca bağlanmış  $NADP^+$  dir (Levy, 1979).

##### 1.3.1. c. N- ve C- terminal amino asitler

C.utilis'den elde edilen G-6-PD molekülünün C-terminallerinde glisin, N-terminallerinden birinde glisin dışında ise alanin olan iki altüniteden oluştuğu farkedilmiştir. S.cerevisiae'den elde edilen G-6-PD molekülünün N-terminal amino asiti tirozin olarak saptanmıştır. İnsan eritrositi G-6-PD enziminin N-terminal amino asitlerinin tirozin ve alanin olduğu sanıldıysa da daha sonra bu enzimin bloke N-terminal uç içerdiği ve N-terminal ucunda piroglutamik asit olduğu saptanmıştır. İnsan lökosit G-6-PD'ı ve sığır adrenal G-6-PD'ının N-terminal uçlarının da bloke olduğu tespit edilmiş

Çizelge 1.1.: Çeşitli kaynaklardan elde edilen G-6-PD enzimlerinin amino asit kapsamları.  
(1: *L.mesenteroides*, 2: *B.subtilis*, 3: *C.utilis* As-75, 4: *S.cerevisiae*, 5: *N.crassa*, 6: İnsan eritrositi)

Amino asit	1	2	3	4	5	6
Asx	144	130	134	96	101	98
Thr	48	52	44	30	43	39
Ser	44	54	67	44	59	48
Glx	104	108	106	80	100	111
Pro	30	54	49	35	45	46
Gly	70	60	83	50	60	65
Ala	116	76	67	39	52	60
Cys	0	4	14	4	32	14
Val	60	58	57	50	51	63
Met	18	20	15	12	34	24
Ile	52	68	47	36	56	50
Leu	72	86	81	60	76	84
Tyr	44	50	32	28	39	34
Phe	64	40	42	39	40	46
Lys	74	62	89	54	71	54
His	12	26	12	14	21	23
Arg	36	44	35	36	57	56
Trp	16	10	10	8	14	14

NOT: Hesaplar dimer başına yapılmıştır. Bu tablo *Advances in Enzymology*, Alton Meister (Ed) Vol. 48, 1979, Interscience (John Wiley & Sons) New York'dan alınmıştır.

fakat bu bloke amino asitlerin hangi amino asitler olduğu saptanamamıştır (Levy, 1979).

Terrence, et al, (1981) tarafından sıçan karaciğeri ve uterusu G-6-PD enzimi üzerinde karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Sıçan karaciğeri G-6-PD enziminin amino asit bileşimi diğ er memeli dokularından elde edilen enzimlerinkine benzer bulundu. Her iki kaynaktan elde edilen enzimlerin N-terminal ucunda piroglutamat olduğu saptandı. Bu sonuç, pekçok hayvansal kaynaktan elde edilen G-6-PD'ların bloke N-terminallere sahip oldukları hakkında diğ er araştırmacılar tarafından verilen raporlara (Yoshida, 1972; Singh and Squire, 1975; Kohn, et al., 1976; De Flora, et al., 1977) ve bu bloke amino terminalin piroglutamat olduğu na dair Yoshida (1972) tarafından verilen rapora uymaktadır.

İnsan eritrositi B ve A tipi G-6-PD moleküllerinde ve C.utilis G-6-PD'ında C-terminal amino asit glisindir. İnsan lökosit G-6-PD molekülü C-terminalinde ise lizin amino asiti olduğu saptanmıştır.

#### 1.3.1. d. Altünite (monomer) molekül ağırlığı

Monomer veya altünite terimi peptid bağlarını koparmadan enzimin disosiye olması sonucu elde edilen polipeptid zincirine verilen isimdir. Birkaç istisna dışında mikrobiyal G-6-PD enzimlerinin monomerlerinin molekül ağırlığı 50.000-60.000 arasında değışirken memeli G-6-PD'larının monomerlerinin molekül ağırlığı 58.000-67.000 arasında değışir (Levy, 1979).

Sıçan karaciğeri G-6-PD enziminin monomer molekül ağırlığı bazı araştırmacılar tarafından 28.000 bulunurken bazıları tarafından 64.000 olarak hesaplanmıştır. Bu farkın nedeninin tür farklılığı mı yoksa başka etkenler mi olduğu saptanamamıştır.



### 1.3.2. Sekonder yapı

G-6-PD enziminin sekonder yapısı hakkında çok az çalışma vardır. *S.cerevisiae* ve *C.utilis*'den elde edilen G-6-PD enziminin az miktarda heliks yapı gösterdiği farkedilmiştir. Sıçan karaciğeri G-6-PD enzimi ile yapılan çalışmalar ise bu enzimin oldukça fazla helikal yapı gösterdiğini rapor etmektedir (Levy, 1979).

### 1.3.3. Tersiyer ve kuaterner yapı

Bütün çalışmalar G-6-PD'in katalitik aktivite gösterebilmesi için en az dimer yapıda olması gerektiğini belirtir (Levy, 1979). Buna rağmen G-6-PD molekülleri tetramer veya oligamerler oluşturmak üzere biraraya gelebilirler.

İnsan eritrositi G-6-PD'inin dimer ve tetramer yapıları arasında dengede olduğu ve molekülün yüksek pH ve iyonik kuvvet durumunda dimer hali, alçak pH ve iyonik kuvvet durumunda ise tetramer hali tercih ettiği tespit edilmiştir. Fare meme bezi enzimi de aynı şekilde davranır (Levy, 1979).

Tetramer G-6-PD molekülleri aslında dimerlerin dimerleri şeklinde ortaya çıkarlar. İnsan eritrositi G-6-PD enzimi ile yapılan çalışmalar, altüniteleri birarada tutan kuvvetler hidrofobik kuvvetler iken, dimerleri birarada tutan kuvvetlerin iyonik bağlar olduğunu ortaya koymuştur. Fare meme bezi G-6-PD enzimi için de aynı sonuçlar bulunmuştur (Levy, 1979).

İnsan eritrositi G-6-PD'ı B varyantının elektronmikroskopik çalışmaları enzimin tetrahedral yapıda olduğunu göstermiştir.

### 1.4. G-6-PD Enziminin Katalitik Faaliyetinden Sorumlu Amino Asitler

Sıçan karaciğeri G-6-PD enziminin piridoksal-5'-fosfat ile muamele edildiğinde inhibisyona uğradığı Gözükkara,

(1974, 1975) tarafından gösterilmiştir.

Camardella, et al., (1981) tarafından insan eritrositi G-6-PD enziminin piridoksal-5'-fosfat ile muamelede %80 aktivite kaybına uğradığı bildirilmiştir.

Her iki araştırmacı da piridoksal-5'-fosfat ile aktivite kaybının reaktifin lizin amino asidine bağlanması sonucu oluştuğunu dolayısıyla G-6-P'in enzime bağlanma bölgesinin lizin amino asitinin  $\epsilon$ -amino grubu olduğunu tahmin etmişlerdir.

p-Kloromerküribenzoat (PCMB) varlığında G-6-PD enziminin oldukça fazla aktivite kaybına uğradığı Gözükkara, (1975) tarafından gösterilmiştir. Ortama  $\text{NADP}^+$  eklendiğinde PCMB'in inhibisyonunun giderilmesi -SH gruplarının  $\text{NADP}^+$  bağlanmasında önemli rol oynadığını ortaya çıkarmış ve sonuçta iki -SH grubunun sıçan karaciğeri G-6-PD enziminin aktivitesi için gerekli olduğu kanısına varılmıştır.

Yine Gözükkara, (1975) tarafından yapılan deneylerde tetranitrometanin (TNM) da enzimin inhibisyonuna neden olduğu saptanmıştır. Bu deneyin sonucu da  $\text{NADP}^+$ 'ın bağlanma bölgesinde trozin amino asiti varlığını ortaya koymuştur.

Aynı araştırmacı tarafından Rose Bengal kullanılarak enzimin katalitik aktivitesinde histidinin de rol oynadığı saptanmıştır.

Çeşitli araştırmalardan elde edilen bu sonuçlara bakılacak olursa G-6-PD enziminde katalitik aktiviteden sorumlu olan amino asitlerin sistein, trozin, histidin ve lizin olduğu kanısına varılmaktadır.

#### 1.5. G-6-PD Enziminin Eksikliğinin Farkedilmesinin Tarihçesi

İkinci Dünya savaşı sırasında Şikago Üniversitesi Ordu Tıp Araştırma Birimi sıtmaya karşı kullanılan ilaçlar üzerinde araştırmalar yaparken ilaçla indüklenmiş

hemolitik anemi ile karşılaştı ve G-6-PD enzimi eksikliği farkedildi (Alving, et al., 1948). Earle (1948) anti-malaryal bir ilaç olan pamaquinin Amerikalı zencilerin %5-10'nunda hemolize neden olurken, Asyalı tiplerde daha az hemolize neden olduğunu farketti.. Hochwald, et al., (1952)'ın primaquin adlı ilaç hakkındaki raporu dikkatleri yine bu ilaç ve hastalık üzerine çekti ve bu tip ilaçların neden olduğu kansızlık hastalıklarının hepsine birden "primaquin duyarlılığı" adı verilmesine yol açtı. Hochwald, (1952) aynı zamanda bu duyarlılığın zencilerde %10 oranında görüldüğünü ve hemolizin alınan ilaç dozuyla orantılı olduğunu belirtti.

Dern, et al., (1954) ilaca karşı duyarlılığın eritrositteki bir anormallikten kaynaklandığını rapor etti. Daha sonraki raporlarda sadece primaquin değil, diğer pekçok ilacın da hemolize yol açtığı belirtildi (Dern, 1957).

Garson, et al., (1956) primaquin veya benzeri ilaçları kullandığında hemolitik kansızlık gösteren hemen hemen tüm fertlerin alyuvarlarında G-6-PD enzimi eksikliği bulunduğunu farketti. Çok geçmeden bu eksikliğin genetik olarak aktarılan bir eksiklik olduğu rapor edildi (Browne, 1957; Childs, 1958). Daha sonra alyuvarlardaki G-6-PD enzimi eksikliğin insanlardaki en önemli enzim eksikliği olduğu ve G-6-PD eksikliğin primaquin duyarlılığı ile başabaş gittiği belirtildi (Schrier, et al., 1958; Tarlov, et al., 1962; Krevans, 1963; Burka, et al., 1966).

Yakın yıllarda bu tip hemolize çok sık rastlanmıştır. Ayrıca zenci ve Asya mutanti arasındaki fark da daha belirgin hale gelmiştir. Asyalı topluluklarda enzim eksikliği ve ilaç duyarlılığı daha çok görülür. Aksoy, vd., (1985) tarafından Batı Trakya Türklerinde %5 oranında G-6-PD eksikliği saptanmıştır.

### 1.6. G-6-PD Enziminin Hücre ve Doğadaki Dağılımı

G-6-PD hayvan dokularında sitoplazmik (çözünür) enzim olarak bulunur. Yeşil bitkilerde ise G-6-PD enziminin hem sitoplazmada hem de kloroplastlarda bulunduğu gösterilmiştir (Levy, 1979).

G-6-PD enzimi doğada, hayvan ve bitki dünyasında bol miktarda dağılmıştır. İnsan topluluklarında 50 den fazla mutant veya varyant G-6-PD tipi ortaya çıkarılmıştır (Keller, 1971). Mutant tipler arasındaki farklar optimum pH da, Michaelis-Menten sabitinde ve termokararlılıkta ortaya çıkmaktadır. Bununla beraber bu biyokimyasal varyantların pek azı klinik önem taşır (Keller, 1971).

### 1.7. G-6-PD Molekülünün Varyantları

Kısmen saflaştırılmış G-6-PD enziminin elektroforetik çalışmaları sonucunda normal insanlarda alyuvarlar enziminin üç elektroforetik tipi veya varyantı tespit edilmiştir ve bu üç tip enzimin genetik olarak belirlendiği saptanmıştır (Keller, 1971).

Asya'lılarda enzim bir tek bant halinde görülür ki buna B tipi denir ve normal fertlerdeki  $B^+$ , enzim eksikliğini gösteren tiplerde ise  $B^-$  olarak isimlendirilir.

Elektroforetik olarak daha hızlı bir G-6-PD olan fenotip  $A^+$  normal zencilerin %30-45'inde bulunmuş, daha yavaş bir formu ise fenotip B olarak zencilerin %80'inde saptanmıştır.

Asya'lı tiplerde şimdiye kadar gözlenen tek enzim tipi B fenotipidir.

G-6-PD enziminin bu farklı elektroforetik özellikleri molekülün aktif enzimatik kısmını içermeyen yapı farklılıklarından ileri gelmelidir. Çünkü  $A^+$  ve  $B^+$  tipi G-6-PD moleküllerinin enzim özellikleri birbirinin aynıdır.

Ancak, zenci erkeklerde enzim eksikliği gözlenirse de aktivitenin %10-20 si hâlâ mevcuttur (Ogino and Ichihara, 1952; Carson, et al., 1956). Asya'lılarda çok daha düşük enzim seviyeleri gözlenmiştir (Marks and Gross, 1959). Sonuçta, G-6-PD eksikliği olan zenciler Asya'lılarda rastlanandan daha az hemolize uğrarlar.

Zencilerdeki enzim eksikliği diğer dokularda da görülürse de (Marks, et al., 1959; Tarlov, et al., 1962) eritrosit ve okuler lens gibi çekirdeksiz hücrelerde daha çok görülür (Zinkham, 1960). Asya'lıların G-6-PD eksikliğinin zencilerdekinden farkı bütün dokularda var olmasıdır (Keller, 1971). Yine Asya'lılar zencilerden daha çok ilaç dozuna bağımlı kansızlık gösterirler. Ayrıca Asya'lılar, zencilerde hiç etki göstermeyen aminopirin, quinin ve quinidin gibi ilaçlara karşı da klinik hemoliz gösterecek kadar hassastırlar (Ogino and Ichihara, 1957; Tarlov, et al., 1962).

Bu değişiklik ve farklılaşmalara açıklık getirilmesi önceleri pek kolay olmamıştır. G-6-PD eksikliğinin genetik kontrolünden bir tek sex-linked genden daha kompleks olayların sorumlu olması gerektiği savunulmuştur. Pekçok bağımsız mutasyonun birbirine bağlı olarak çalıştığı, hatta kalıtsal eksikliğin derece ve şeklini etkileyen modifiye edici genlerin de buna dahil olduğu düşünüldü. Bu varsayımlar, yeterli saflaştırma için teknikler geliştirilerek klinik vakalardan ve farklı ırklara ait gruplardan kısmen saflaştırılmış enzimlerle yapılan çalışmaların artmasına neden oldu ve enzimin güvenilir fiziksel ve kimyasal karakterizasyonu mümkün oldu. Çok geçmeden, G-6-PD'in çeşitli formlarının sabit karakter taşıdığı ve normal G-6-PD molekülünden belirli şekilde ayrıldığı anlaşıldı. Daha sonra özellikle aileler üzerinde yapılan çalışmalar G-6-PD molekülünün bu varyantlarının genetik olarak kontrol edildiğini ve muhtemelen, X-kromozomu üzerinde G-6-PD'in kalıtımını

yöneten bir tek gendeki mutasyonları temsil ettiğini gösterdi. Artık, farklı mutantların kinetik ve kararlılık değişimleri karşılaştırılarak pekçok klinik ve biyokimyasal farklanmalar tek gen hipotezi ile açıklanabilmektedir. Alyuvarların (hatta bütün diğer dokuların) G-6-PD enzimini kontrol eden başka genetik mekanizmaların ve ilave modifiye edici genlerin varlığına gerek duyulmamaktadır.

G-6-PD'in varyantlarından pekçoğu enzim eksikliğinin klinik belirtileri ile şu veya bu şekilde ilgilidir. Primaquin duyarlılığı gösteren zencilerin hemen hepsinde A<sup>-</sup> tipi enzim bulunmuştur. A<sup>-</sup> varyantı pekçok özelliği açısından normal (A tipi) enzime çok benzer ancak daha düşük toplam aktivite gösterir. G-6-PD enzimi eksikliği olan zencilerin olgunlaşmamış çekirdekli alyuvarlarında A<sup>-</sup> tipi mutant form normal veya normale yakın miktarda bulunur, fakat sahip olduğu olağanüstü kararsızlık ve hızlı değer düşmesi çekirdeksiz alyuvarlarda enzim eksikliğine neden olur (Kirkman, 1968). Buna rağmen, A<sup>-</sup> tipi G-6-PD diğer vücut hücrelerinde normal seviyede ölçülebilir, çünkü bu hücreler sentez fonksiyonlarını devam ettirip G-6-PD'ı sürekli yenilerler. Böylece, A<sup>-</sup> tipi enzime sahip ve primaquine duyarlılık gösteren zencilerdeki enzim eksikliği kantitatif olmaktan çok kalitatif denebilir.

G-6-PD molekülünün A ve B tipinde olduğu gibi, pekçok varyantında bir tek amino asit substitusyonu görülür ki bu bir tek amino asit enzim molekülünü normalden daha kararsız kılar (Keller, 1971).

Böylece herhangi bir olaydaki G-6-PD anormalliği varyantlarının olması ile açıklanmış ve farklı enzim eksikliği, ilaç duyarlılığı ve dokulardaki farklı dağılım bu varyantlara bağlanmıştır.

### 1.8. G-6-PD Enziminin Metabolik ve Fizyolojik Rolü

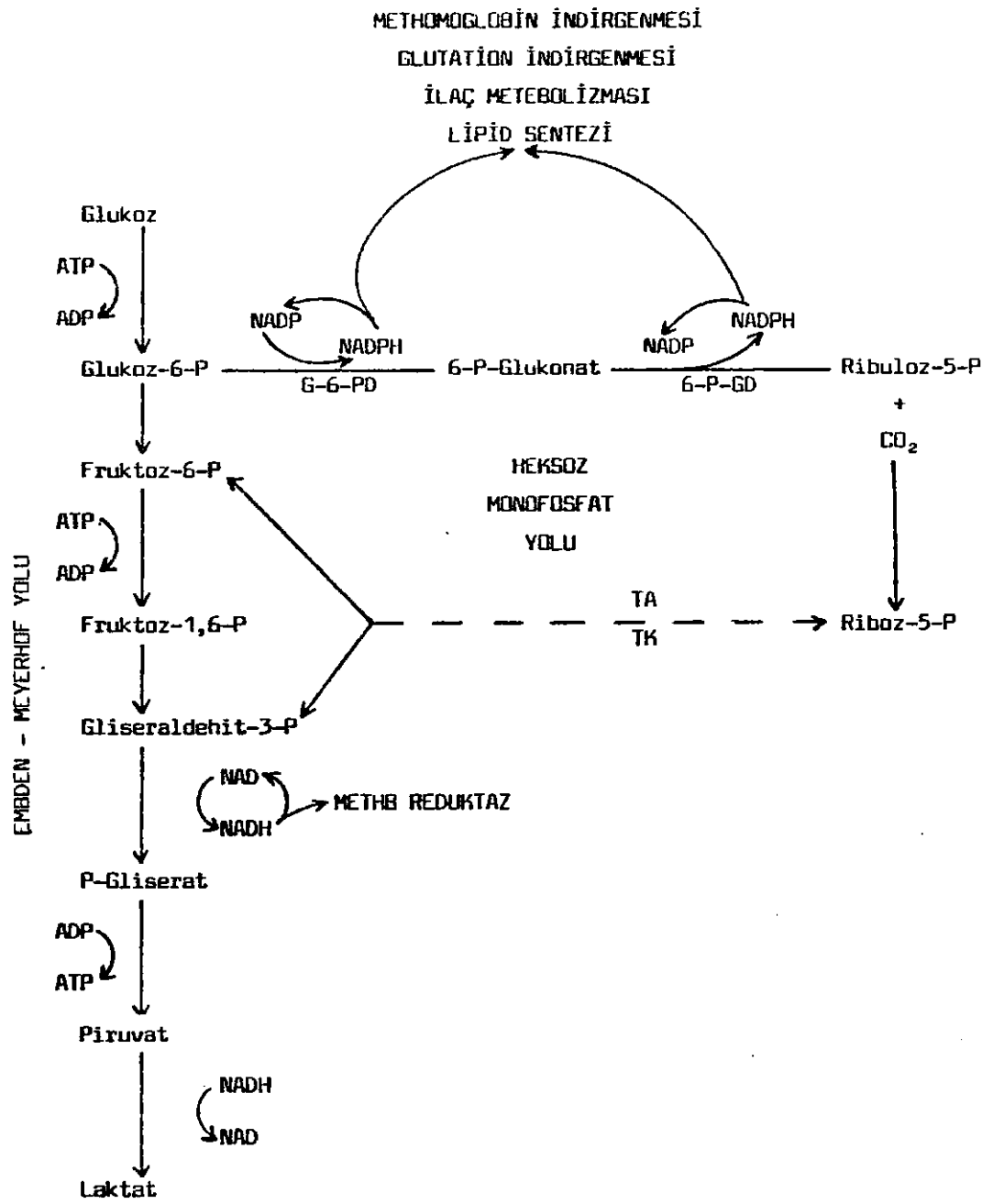
G-6-PD enzimi metabolik olarak özellikle eritrositler açısından çok önemlidir. Çekirdeksiz olmasına karşılık, olgun insan alyuvarları, kan içindeki dolaşım süresince metabolize olaylara aktif olarak karışan hücre olma özelliğini korur. Eritrosit pekçok metabolik yolda tek başına çalışır ve bu yollara karbonhidrat metabolizması da dahildir (Granick, 1949).

Alyuvarlar diğer vücut hücrelerinin yaptığı gibi glikojeni depolamaz. Onun yerine, enerji gerektiren metabolizması için çevresinde glukoz bulunmalıdır.

Ayrıca, olgun alyuvarlarda sitrik asit (Krebs) döngüsünün enzimleri ya iz düzeyde vardır ve bu yüzden Krebs döngüsüne bağlı sitokrom sistemi de eksiktir veya hiç yoktur. Bu nedenle bu döngüden gelecek enerjiye de güvenemez. Bütün bunların yerine, olgun alyuvarlar hücresi enerji üretimi için öncelikle anaerobik glikolitik yola (Embden-Meyerhof) güvenir (Şekil 1.1). Fizyolojik koşullar altında, olgun eritrositlerin kullandığı glukozun %90'ı bu şekilde metabolize edilir (Murphy, 1960).

Glikolitik yol daha az etkili enerji kaynağı olmasına rağmen bu metabolik yol eritrosite bağlı oksijenin korunmasını sağlar, çünkü bu hücre kendi metabolizması için çok az oksijene ihtiyaç duyar. Bağlı oksijenin böyle "metabolik izolasyonu" diğer vücut hücrelerinin kullanımı için oksijen taşıyan eritrositin etkinliğini artırır (Jandl, 1963).

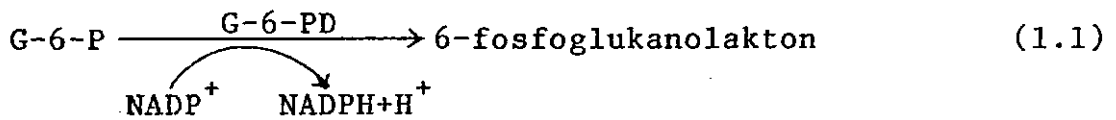
Alyuvarlarda glukoz için alternatif bir yol daha vardır. Bu, pentoz fosfat yolu olarak da bilinen heksozmonofosfat (HMP) yoludur. Reaksiyon gerçekte iki basamakta gerçekleşirse de bu alternatif yolda G-6-PD, G-6-P'ı 6-fosfoglukanota çeviren başlangıç enzim ödevini görür (Anstall and Trujillo, 1967; Marks, 1967).



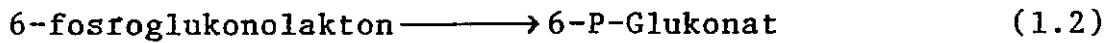
Şekil 1.1: Olgun eritrositte glukoz metabolizmasının enzimatik yolları.



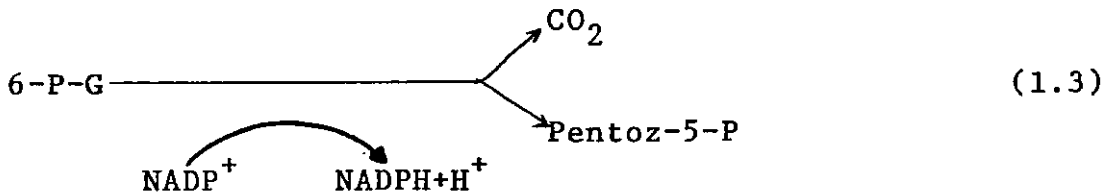
Bu basamakların birincisinde G-6-PD'nin etkisi ile karşı gelen laktona yükseltgenir. Gerekli kofaktör NADP'dır (Carson, et al., 1959; Kirkman, 1962). İki elektron direkt olarak NADP'a transfer olur ve aşağıdaki reaksiyonun ikinci bir ürünü olarak NADPH ortaya çıkar (Stern and Vennesland, 1960) :



İkinci basamakta lakton, tersinmez bir reaksiyonla enzimatik hidrolize uğrar ve 6-PG oluşur :



HMP yolunda 6-fosfoglukonik dehidrogenaz (6-P-GD) ile ayarlanan ikinci ara basamak da NADP ister ve yine direkt hidrojen transferi ile ikinci bir NADPH molekülü verir (Stern and Vennesland, 1960) :



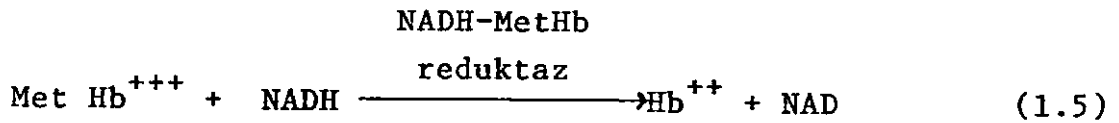
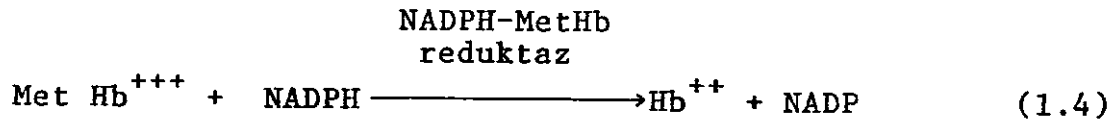
Bu reaksiyon olgun eritrosit içinde glukozun  $\text{CO}_2$ 'e yükseltgenmesi için tek yoldur.  $\text{CO}_2$ , rübuloz-5-fosfat bileşiğini oluşturmak için ayrıışan glukozun birinci karbonundan çıkar.

Olgun alyuvarlar için HMP yolunun en önemli fonksiyonu NADPH halinde indirgeme gücü üretilmesidir. Bu yol eritrosite NADPH temini için tek yoldur (Fertman and Fertman, 1955). NADPH hücre içinde indirgen reaksiyonlarda ve hücre bileşenlerini oksitlenmeye karşı korumak üzere kullanılır. Alyuvarlar, oksijen taşıma görevi nedeniyle yükseltgen etkilere daima açıktır (Jandal, 1953).

Bu etkileri önlemek için eritrositte hepsi NADPH'yi kofaktör olarak kullanan spesifik olaylar vardır. NADPH nin regule ettiği ve devamını sağladığı bu olaylar şöyle sıralanabilir:

#### 1.8.1. Methemoglobin indirgenmesi

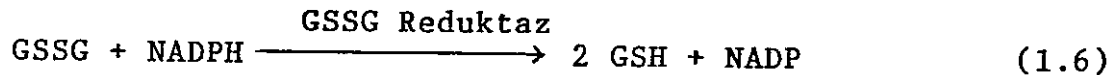
Normal alyuvarlarda hemoglobin, indirgenmiş fonksiyonel durumla (ferrohemoglobin), yükseltgenmiş ferric durum (methemoglobin) arasında gidip gelir. Methemoglobin oksijen bağlayamaz ve bu yüzden fonksiyonel değildir. Hemoglobinin oksitlenmesini önleyip fonksiyonel durumda tutmak için eritrosit, aşağıdaki reaksiyonlarla gösterilebilen iki enzim sistemine sahiptir:



Fizyolojik koşullarda ikinci sistem daha önemli sayılırsa da bazı şartlarda birinci sistem önemlidir. Bu sistem eritrositlerin doğal olmayan elektron taşıyıcılara (oksidanlara) maruz kalması durumunda (örneğin metilen mavisi) oldukça hızlanır, fakat NAD-methemoglobin reduktaz böyle bileşiklerle çok az uyarılır (Keller, 1971).

#### 1.8.2. Redukte glutation seviyesinin ayarlanması

Glutation alyuvarlar içinde kompleks fonksiyonları olan bir tripeptittir. Glutation, eritrosit içinde kofaktörü NADPH olan glutation reduktaz enzimi tarafından aşağıdaki reaksiyon gereğince indirgenmiş fonksiyonel GSH halinde tutulur.



Hücre içinde indirgenmiş glutathion (GSH) çevredeki oksidan maddelerin etkisini kendi üzerine çekerek hücrenin fonksiyonel proteinlerini oksitlenmekten korur. Bu arada kendisi oksitlenir ve iki glutathion molekülü disülfid bağı ile birbirine bağlanır (GS-SG). Bu molekülün fonksiyonunu yapabilmesi ancak indirgenmiş  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  ların kullanılması ve glutathion reduktaz (GSSG reduktaz) enzimi aracılığı ile glutathionun tekrar indirgenmesi ile mümkündür (Keller, 1971).

#### 1.8.3 Oksidan bileşik ve ilaçların indirgenmesi

NADPH, eritrositin içten veya dıştan gelebilecek oksitleyici etkilere karşı korunmasında önemli görev alır. Bu tip oksidan bileşikler elektron taşıma özelliğine sahip olduklarından hücre içindeki maddelerden elektron alıp hücreye zarar verebilirler. NADPH bu oksidan bileşiklerin etkisini giderir.

#### 1.8.4. Lipid sentezinin ayarlanması

Eritrositin lipid içeriğinin %90'ından fazlası hücre zarında yer alır. O halde hücrenin dayanıklılığı ve canlılığı büyük ölçüde hücre zarı lipidlerinin sentezine ve yenilenmesine bağlıdır. NADPH, koenzim olarak lipid sentezinin bazı basamaklarında gereklidir. HMP yolunun hayati önemi G-6-PD eksikliği olan alyuvarlarda hücre zarı lipid miktarındaki azalma ile saptanmıştır (Keller, 1971).

#### 1.9. G-6-PD Enziminin Klinik Önemi

G-6-PD enzimi ve HMP yolu hücrenin oksidasyona karşı savunmasında o kadar önemlidir ki, G-6-PD eksikliği hücrenin oksidasyondan zarar görmesine neden olur. G-6-PD eksikliği olan alyuvarların oksidasyona uğrama ihtimalinin daha fazla olduğu gösterilmiştir. Gözlenen bütün anormallikler NADPH eksikliğine sebep olan bu enzim

eksikliğine yorumlanmaktadır.

G-6-PD enzimi ve HMP yolunun diğer enzimleri alyuvarlardan başka pekçok dokuda değişen miktarlarda bulunur. Süt üreten göğüs, adrenal korteks ve adipose doku gibi lipogenesis için büyük potansiyeli olan dokularda enzim aktivitesi yüksektir. Bağırsak mukozası ve tiroid bezleri gibi dokularda orta derecede aktivite görülürken iskelet kasları çok az G-6-PD aktivitesi gösterir.

HMP yolunun metabolik fonksiyonları gözönüne alınırsa, G-6-PD enziminin olgun alyuvarlarda oldukça fazla miktarda bulunması gerekir. Bununla beraber eritrosit yaşlandıkça G-6-PD aktivitesi (ve büyük olasılıkla konsantrasyonu da) azalır (Marks, 1957; Marks, et al., 1958; Marks, 1958; Marks and Gross, 1959). Yaşlanmayla aktivitesi ve miktarı azalan başka enzimler de varsa da G-6-PD'in normal koşullarda eritrositin hayat sınırlandırıcı enzimi olacağı fikri benimsenmiştir (Brewer and Powell, 1963; Powel, et al., 1966).

Biyokimyasal olarak alyuvarlar hücresi ile gözün lensi arasında büyük benzerlik vardır (Allen and Jandl, 1961; Jandl, et al., 1960). Her iki doku da çekirdeksizdir ve her ikiside sulfidril bakımından zengin proteinin korunması ile ilgilenir. Her iki doku da bunu NADPH üreterek ve GSH'un hücre içindeki miktarını koruyarak sağlarlar.

Lenste, G-6-PD enziminin galaktoz ile inhibisyonu sonucu veya naftalin ve dinitrofenol gibi oksidan bileşiklerin lense girmesinin etkisiyle GSH seviyesi düşer, -SH grupları oksitlendiği için sonuçta lens proteinleri çöker ve katarakt oluşur (Lerman, 1960; Ogino and Ichihara, 1957; Marks, et al., 1959; Zinkham, 1960).

G-6-PD enzimi eksikliğinin en fazla klinik önemi olan ve en sık görülen belirtisi ilaçla indüklenmiş hemolitik anemidir. G-6-PD eksikliği olan kişilerde bu kansızlık sadece hemolitik ilaçların alınması ile değil, aynı

zamanda tedavi değeri olmayan bazı bileşiklerle karşı karşıya gelindiğinde de ortaya çıkar.

G-6-PD eksikliği olan ve ilaç duyarlılığı gösteren kişilerde bakteriyel enfeksiyon, viral enfeksiyon, diabetik acidosis gibi bazı hastalıkları geçirirken arka arkaya hemolitik süreçler görülebilir.

G-6-PD eksikliği olan kişilerde görülen bir başka belirti de favizmdir. Favizm, çiğ veya pişmiş bakla yiyen kişilerde görülen akut hemolitik anemidir. Çok duyarlı kişilerde bakla bitkisinin polenleri solunduğunda da bu etki görülebilir. Favizm, sadece G-6-PD eksikliği olan kişilerde görüldüğü gibi, ırk olarak da sadece Asya kökenli fertlerde görülmüştür (Greenberg and Wong, 1961; Zinkham, et al., 1958; Szeingberg, et al., 1958; Szeingberg, et al., 1959). Bununla beraber, G-6-PD eksikliği olan Asya'lıların hepsi favizm belirtisi göstermediği gibi favizmden şikayet eden kişiler, daha önceleri hiç hastalık belirtisi göstermeden defalarca bakla yemiş olabilirler.

Alyuvarlar G-6-PD eksikliğine bağlı olarak yeni doğmuş çocuklarda sarılık oldukça sık görülür. Bu olayın daha çok Asya'lı ve zenci çocuklarında görüldüğü saptanmıştır (Keller, 1971).

Tai-Fai Fok, et al., (1985) inceledikleri 1228 Çinli yeni doğmuş çocukta erkeklerin %4.4 'ünde, kızların ise %0.35'inde enzim eksikliği saptamışlardır.

G-6-PD eksikliği kan bankacılığında da problem yaratır. Normalkanın ACD çözeltisi içinde önemli bir G-6-PD aktivitesi kaybına uğramadan uzun süre korunabildiği kaydedilmiştir (Tarlov, 1962). Buna karşılık, G-6-PD eksikliği olan kişilerin kanlarının zaten az olan enzim aktivitesini giderek kaybettiği ve bu kanın hemolize uğrama ihtimalinin arttığı görülmüştür (Ogino and Ichihava, 1957). Erken yaşlanma ve kısa ömür özelliğine sahip enzimce eksik eritrositler bir başka kişiye verildiğinde de



aynı özellikleri göstereceğinden tedavide aksama görülebilir. Bu yüzden, G-6-PD eksikliği gösteren kanın mümkünse kan nakillerinde kullanılmaması önerilir (Keller, 1971).

G-6-PD'in alyuvarların glukoz metabolizması üzerindeki etkisi gözönüne alınacak olursa, kalıtsal enzim eksikliği tüm vücudu, özellikle de karbonhidrat metabolizmasını etkileyebilir. Primaquine duyarlı zencilerde kolesterol seviyesinin aynı yaştaki kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu anlaşılmıştır (Tarlov, et al., 1962). G-6-PD'in da G-6-P'in konsantrasyonu üzerinde kontrol görevi olduğundan enzimin kalıtsal eksikliğinin glukoz metabolizması üzerinde etkisi olacağı açıktır.

#### 1.10. G-6-PD Enzimi Eksikliğinin Laboratuvarda Tespiti

Yukarıda bahsedilen nedenlerden dolayı alyuvarların G-6-PD eksikliğini saptamak için laboratuvarda kolay uygulanabilir ve güvenilebilir bir yöntemin geliştirilmesinin oldukça önemli olduğu ortaya çıkar. Primaquine duyar eritrositlerin hematolojik testlerde hiçbir anormallik göstermemeleri bu konuda zorluk yaratır. G-6-PD eksikliğini saptamak için rafine ve spesifik laboratuvar teknikleri istenir ve geliştirilmiştir. Bunlar şöyle sıralanabilir:

##### 1.10.1 Heinz Body testi

G-6-PD eksikliğini saptamak için ilk geliştirilen laboratuvar testi Heinz Body testidir. Test, alyuvarların asetil fenil hidrazinle in vitro reaksiyona girmesi ile denature hemoglobin parçalanması şeklinde ortaya çıkar. Asetil fenil hidrazin (100 mg/100 ml) ile 37°C da inküasyon sonucu normal alyuvarlar da Heinz Body oluşturur fakat, G-6-PD eksikliği gösteren hücreler kimyasal maddenin yükseltgen etkisine daha çok maruz kaldıklarından daha fazla Heinz Body oluşması beklenir. Eğer eritrositlerin %40 dan fazlası 5 veya daha fazla Heinz Body gösterirse

test pozitif sayılır. Pratikte Heinz Body testi duyar-sızdır ve spesifik değildir.

Güvenirliğin az olması ve daha iyi testlerin geliştiril-mesi ile bu test fazla geliştirilmemiş ve fazla uygu-lanmamıştır.

### 1.10.2. Spektrofotometrik test

Bu yöntem eritrosit G-6-PD aktivitesinin ölçülmesi için kullanılan en hassas ve duyarlı yöntem olup enzim ölçüm-lerinde referans yöntem olarak kullanılmıştır. G-6-PD moleküllerinin konsantrasyonunu direkt olarak ölçmezse de enzimin en doğru ölçümünü verir. Enzimin substrat üzerin-deki aktivitesi G-6-PD'nin ve NADP'nin (kofaktör) fazlasını içeren bir sistemde NADPH'nin oluşum hızı ölçülerek tayin edilir. Ortamda substrat ve kofaktörün fazlası bulun-duğundan enzim konsantrasyonu reaksiyonda hız belirleyici faktör olarak davranır. NADPH'nin oluşumu deney karışı-mının ışık absorbansının artışı şeklinde spektrofotometrik olarak takip edilir. NADPH 340 nm de kuvvetli absorbans piki verir. Bu pik NADPH için spesifik olup reaksiyondaki diğer bileşenler tarafından verilmez. Substrat olarak G-6-P varsa da NADPH, kısmen 6-fosfoglukonatın riboz-5-fosfata dönüşmesinden de açığa çıkar. Çünkü hemolizat G-6-PD yanında 6-PGD'ı da içerir. Bununla beraber NADPH'nin büyük kısmı G-6-PD tarafından tutulduğundan 6-PGD'ın aktivitesi G-6-PD'daki eksikliği maskeleyemez.

Bu yöntem Glock and Mc Lean (1953) tarafından bulunmuş, Kornberg and Horecker (1958) tarafından geliştirilmiş ve pekçok araştırmacı tarafından kullanılmıştır.

### 1.10.3. Floresans G-6-PD spot test

Bu test, NADPH'nin NADP'dan farklı olarak ultraviyole ışık altında floresans özellik göstermesine dayanır. İncelenecek hücrelerin hemolizatlari G-6-P ve NADP ile birkaç dakika inkübe

edildikten sonra filtre kağıdına damlatılır. Kuruduktan sonra her nokta ultraviyole ışık altında incelenir.

G-6-PD açısından eksik olan nokta az floresans özellik gösterir veya hiç göstermez. Normal hücrelerin lekesi ise parlak floresans özellik gösterir.

Fok, et al., (1985) Çin'li yeni doğmuş çocuklardaki enzim tayinini bu yöntemle yapmış ve spektrofotometrik tayin ile bulguları desteklemişlerdir.

Ayrıca, glutationu kararlı kılma, methemoglobini indirgeme ve bazı organik boyalarla reaksiyon verme özelliklerinden yararlanılarak G-6-PD'ı analiz etmek için yöntemler geliştirilmiştir.

Ashmun, et al., (1984) boyama veya fixation kullanmadan scanning mikro-spektrofotometre kullanarak insan eritrositini tek tek inceleyebilmek için bir yöntem geliştirmişlerdir. Bir hücrede G-6-PD seviyesini kantitatif olarak inceleyebilmek için methemoglobin indirgenmesi yöntemini kullanmışlardır.

#### 1.11. G-6-PD Enziminin Aktivitesinin Düzenlenmesi

G-6-PD enziminin aktivitesi başlıca üç etkene bağlı olarak değişmektedir. Alınan besinlerin bileşimi ve miktarı, hormonal denge ve  $\text{NADP}^+ / \text{NADPH} + \text{H}^+$  oranı bu enzimin aktivitesinin düzenlenmesinde rol oynayan başlıca faktörlerdir.

Glock and Mc Lean (1955) sıçan karaciğeri G-6-PD aktivitesinin önce aç bırakılıp sonra thyroksin ile muamele edilen hayvanlarda dikkati çekecek şekilde değiştiğini göstermişlerdir.

48 saat aç bırakılıp sonra yüksek karbonhidrat diyeti uygulanan sıçanların karaciğer G-6-PD enzimi aktivitesinin arttığı Tepperman and Tepperman (1952, 1958), Rudock, et al., (1971a, 1971b); Gözükar, et al., (1972) tarafından gösterilmiştir. Enzim aktivitesindeki bu artışın



yeni enzim sentezine bağılı olduğu RNA inhibitörü Aktinomisin D ve protein inhibitörü puromisin kullanılarak gösterilmiştir.

Yüksek seviyede enzim içeren deney hayvanlarının yapay besin ortamına %55 glukoz, %15 linolenik asit karıştırıldığında enzim aktivitesinin süratle düştüğü saptanmıştır (Gözükara, 1974).

Memelilerin süt bezlerinde süt üretiminin başlaması ve durması ile de G-6-PD enzimi aktivitesinde önemli değişimler olduğu saptanmıştır (Baldwin and Yang, 1974).

Chang, et al., (1979) aç bırakılıp tekrar beslenme, hamilelik ve süt üretme dönemlerinde sıçan karaciğeri ve süt bezleri G-6-PD enzimi aktivitesindeki 20-40 katlık artışın enzimin multiple moleküler formları arasında yeni bir düzenlemeye sebep olmadan gerçekleştiğini göstermişlerdir.

Kastrouni, et al., (1984) sıçan karaciğeri G-6-PD enzimi aktivitesinin diyet ve insulinle değişimini incelemişlerdir. Önce aç bırakılıp sonra beslenmiş sıçanların karaciğer ve adipos dokusu enziminin glukoz ağırlıklı diyet koşullarında aktivite artışı gösterdiği ve diyet koşulları devam ettiği sürece bu yeni durumda kaldığı tespit edilmiştir. İnsulin verilmesinin ise enzim aktivitesinde daha da artışa neden olduğunu göstermişlerdir.

Bu araştırmacılar G-6-PD aktivitesindeki değişimden şu iki mekanizmayı sorumlu tutmuşlardır:

Birinci mekanizma transkripsiyon veya traslasyona bağılı değildir. Kolaylıkla etkilenebilir ve halen var olan fakat aktif olmayan enzimin aktivasyonunu sağlar.

"Aktivasyon" terimi burada genel bir anlamda kullanılır ve inaktif G-6-PD formlarının, protein sentezi olmaksızın, aktif enzim haline çevrilmesi veya değiştirilmesini tanımlar. Bu mekanizma çok çabuk hareket eder ve adipos dokusu metabolik değişmelere çok çabuk ayak uydurur.

İkinci mekanizma genetik seviyede işler ve daha geç izlenir. Metabolik ihtiyaca göre hücreye enzim miktarını artırma olasılığını vererek birinci mekanizmayı destekler. Sonuçlardan bu ikinci mekanizmayı ateşleyen sinyalin insulin tarafından yaratıldığı çıkarılır.

Rudock, et al., (1971a) 48 saat aç bırakılıp daha sonra %60 karbonhidrat diyet ile beslenen sıçanlarda toplam çözünür proteine oranla G-6-PD enzimi düzeyinde 20-30 katlık bir artış saptanmışlardır.

Sun and Holten, (1978) önce aç bırakılıp sonra yüksek karbonhidrat diyetle beslenen sıçanlardaki hepatik G-6-PD seviyesindeki artışın nedenini araştırmışlardır. G-6-PD mRNA sentezindeki 2-3 katlık artışın enzim aktivitesindeki 20-30 katlık artışı yeterince açıklamadığı ve özel diyet uygulanmamış normal sıçanlarda tercüme edilemeyen veya çok yavaş tercüme edilen oldukça önemli miktarda G-6-PD mRNA bulunduğunu ileri sürmüşlerdir.

Ayrıca diyetle doymamış yağ asitlerinin bulunmasının enzim seviyesinde bir düşmeye neden olduğu da saptanmıştır (Tepperman and Tepperman, 1965; Gözükar, et al., 1972).

cAMP'nin de bu enzimin sentez hızında azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (Garcia and Holten, 1975).

Epiandrosteron, pregnolon ve dehidroisoandrosteronun enzimin potent inhibitörleri olduğu saptanmıştır (Gözükar, 1974).

Böylece, bu enzimin induksiyonunun kompleksliliğinin araştırılması karbonhidrat, lipid ve amino asit metabolizmasında yer alan pekçok enzimin seviyesinin diyetle ayarlanması mekanizmasına açıklık getirebilir.

Sentezlenmiş ve hücre ortamında bulunan enzimin aktivitesinin düzenlenmesinde  $\text{NADP}^+ / \text{NADPH} + \text{H}^+$  oranının son derece önemli olduğu Pontremoli, et al., (1969); Holten, et al., (1976) tarafından ifade edilmiştir. Hücre içinde

$$\frac{\text{NAD}^+ / \text{NADH} + \text{H}^+}{\text{NADP}^+ / \text{NADPH} + \text{H}^+} = 100.000 \text{ olan oranın}$$

herhangi bir şekilde değişmesinin bu sisteme bağımlı enzimlerin aktivitesinde bir değişmeye neden olacağı saptanmıştır (Gözükara, 1978). Bu yolla sentezlenen  $\text{NADPH} + \text{H}^+$ 'ın biyosentetik yollarda kullanılması, G-6-PD enzimini aktive eden en önemli etkenlerden birisidir.

Bütün raporlara bakıldığında G-6-PD enzimi aktivitesinin alınan besin, hormonal denge ve  $\text{NADP}^+ / \text{NADPH} + \text{H}^+$  oranına bağlı olarak düzenlendiği anlaşılmaktadır.

Bu çalışmada da fare karaciğeri G-6-PD enzimi aktivitesine yüksek karbohidrat diyetinin etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Glukoz	%60
Kazein	%30
Seluloz	% 3
Tuz karışımı	% 2
Vitamin karışımı	% 5

### 2.3. Enzim Aktivite Tayini

Enzim aktivite tayini için sırasıyla şu işlemler yapıldı:

1. Yapay yüksek karbonhidratlı diyetle beslenen fareler 24, 48, 120, 144 ve 168. saatlerde üçerli gruplar halinde aniden öldürülerek karın kısımları açıldı ve karaciğerleri süratle çıkarılıp 0.15 M KCl çözeltisi içeren buz içindeki beherlere kondu. Aynı işlem 48. ve 120. saatlerde kontrol hayvanlarında da uygulandı.

İlerideki belirtmelerde kolaylık olması açısından örnekler şöyle numaralandırıldı:

1 No'lu örnek: Yüksek karbonhidratlı diyetle 24 saat beslendikten sonra öldürülen farelerin karaciğerinden alınan örnek.

2 No'lu örnek: Yüksek karbohidratlı diyetle 48 saat beslendikten sonra öldürülen farelerin karaciğerinden alınan örnek.

3 No'lu örnek: Yüksek karbohidratlı diyetle 120 saat beslendikten sonra öldürülen farelerin karaciğerinden alınan örnek.

4 No'lu örnek: Yüksek karbohidratlı diyetle 144 saat beslendikten sonra öldürülen farelerin karaciğerinden alınan örnek.

5 No'lu örnek: Yüksek karbohidratlı diyetle 168 saat beslendikten sonra öldürülen farelerin karaciğerinden alınan örnek.

6 No'lu örnek: Normal diyetle 48 saat beslendikten sonra öldürülen kontrol farelerin karaciğerinden alınan örnek.

## 2. DENEYSEL ÇALIŞMA

### 2.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Yapılan tüm deneylerde kullanılan, KCl, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaOH, Na, K.tartarat, CuSO<sub>4</sub>, TRIS, HCl, MgCl<sub>2</sub>, SDS, Gliserin, 2-merkaptotetanol, bromfenol mavisi, TEMED, NH<sub>4</sub>S<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, Isopropanol, Asetik asit, L-asparajin, imidazol, ribo-flavin, NaN<sub>3</sub>, Agarose, Merck, Darmstad Şirketinden; NADP<sup>+</sup>, G-6-P, 6-PG, Boenringer Marnheim GmbH şirketinden, Akrilamid, Bis-acrilamid, NBT, PMS, Comassie mavisi British Drug House şirketinden; Folin's phenol reagent, BSA, Glukoz, Kazein, Seluloz, Tuz karışımı, Vitamin karışımı H.Ü. Moleküler Biyoloji Bölümünden; TPN, Fluka AG, Buchs Sch, Switzerland şirketinden; Sakkaroz, Malatya Şeker Fabrikası Araştırma Laboratuvarından, Standart Pelet diyet Özkaşıkçı A.Ş. den elde edildi.

### 2.2. Deney Hayvanlarına Uygulanan İşlemler

Bu çalışmada deney hayvanı olarak 21 adet 1,5-2 aylık erkek fare (mus musculus) kullanıldı. Fareler Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Fizyoloji Anabilim dalından sağlandı.

Deneye alınan erkek farelerin hepsi önce musluk suyu ve pelet diyeti ile beslendi. Hayvanlar deney süresince %40 nemlilik, 20°C de, gündüz normal gün ışığında, gece karanlıkta ve gürültüsüz bir ortamda tutuldu.

Daha sonra deneye alınan fareler 48 saat aç bırakıldı. Bu süre içinde sadece su verildi. Bu süre sonunda farelerin 6 sı kontrol olarak ayrı bir kafese alındı. Deney hayvanlarına yüksek karbonhidrat diyeti, kontrol hayvanlarına ise normal diyet verildi.

Verilen yapay yüksek karbonhidrat diyetinin bileşimi şöyledir:

7 No'lu örnek: Normal diyetle 120 saat beslendikten sonra öldürülen kontrol farelerin karaciğerinden alınan örnek.

2. Karaciğerlerin fazla suyu kurutma kağıdı ile alındıktan sonra üçü birlikte tartıldı ve ağırlığının 4 katı 0.15 M KCl çözeltisi ile birlikte homojenizatör tüpüne kondu. Homojenizatör tüpü içi buz dolu başka bir plastik kabın içine yerleştirildi.

Mevcut enzimin yıkılmasını minimuma indirmek için işlemler mümkün olduğu kadar 0-4°C arasında yürütüldü.

3. Karaciğerler, Heidolph SN 111 homojenizatöründe ikinci hız pozisyonunda dört defa yavaş yavaş aşağı yukarı hareketle homojenize edildi.

4. Homojenize karaciğer dokusu ağzı kapaklı plastik tüplere kondu ve (rotor no'su 30 olan başlıkla) Beckman Model L-2 ultrasantrifüjünde +4°C de 28.000 rpm de 60 dakika döndürüldü. Ultrasantrifüjden alınan numunelerin supernatanları buz içindeki temiz tüplere alındı.

5. Numuneler uzun süre saklanacağı için stabilizatör olarak 1 g. ciğer başına 2 ml. olmak üzere  $10^{-14}$  M NADP<sup>+</sup> çözeltisi eklendi. Tüplerin ağzı sıkıca kapatılarak derin dondurucuda saklandı.

6. Supernatanın 1 mililitresindeki protein miktarını tayin için Lowry Protein tayin yöntemi uygulandı (Lowry, et al., 1951).

Bu yöntem için gerekli çözeltiler şöyle hazırlandı:

Çözelti A:

%2 lik Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 'ın 0.1N NaOH deki çözeltisi....	100	hacim
%2 lik Na, K tartarat çözeltisi	....	1 "
%1 lik CuSO <sub>4</sub> çözeltisi	....	1 "

Bu çözeltiler ayrı ayrı hazırlandı ve kullanılacak miktar deneyden hemen önce karıştırılarak çözelti A oluşturuldu.

Çözelti B:

Folin's Fenol ayıracı	.... 2 hacım
1 N NaOH çözeltisi	.... 1 "

BSA Çözeltisi:

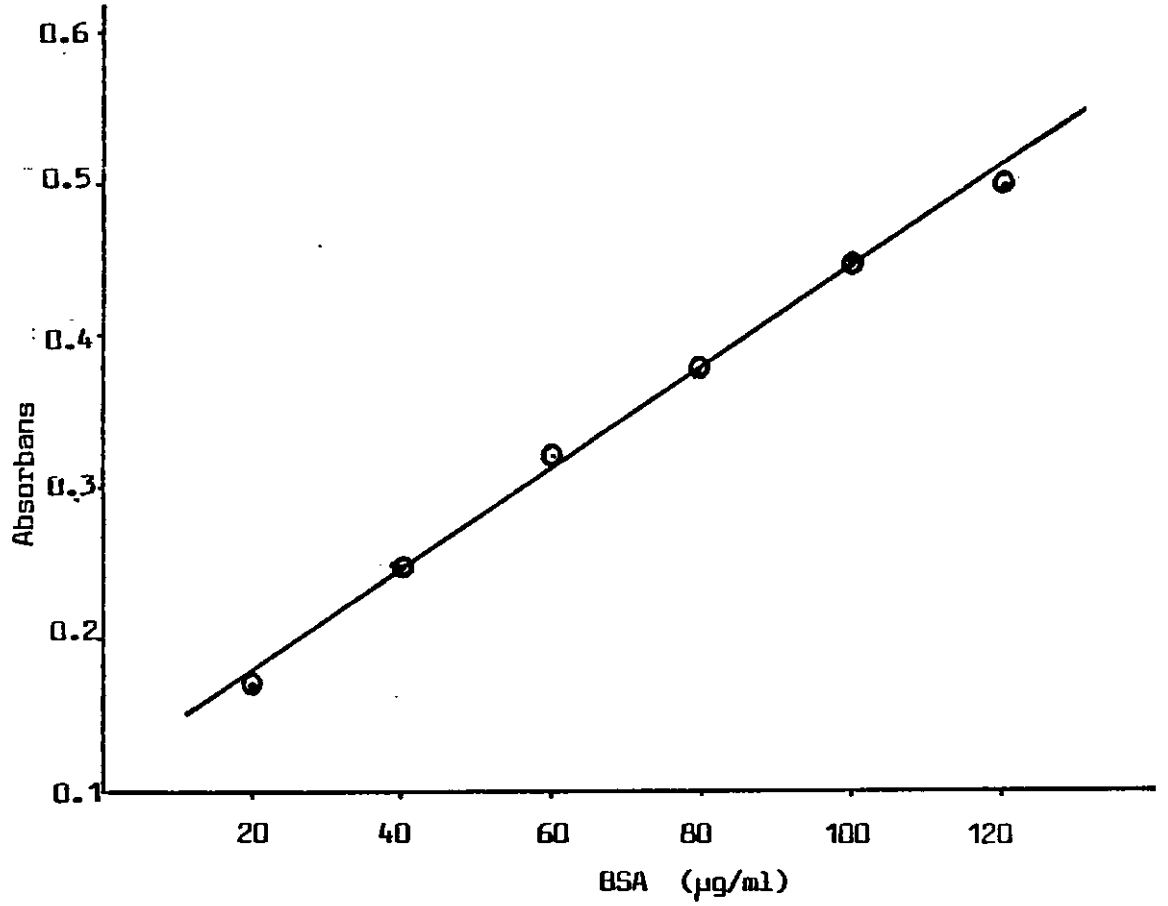
Standart protein çözeltisi olarak BSA (Bovin Serum Albumin) çözeltisi kullanıldı. 1 mg/ml konsantrasyondaki stok çözeltiden 20, 40, 60, 80, 100, 120, 150 µg/ml lik çözelti hazırlandı.

Lowry Protein tayin yöntemi aşağıdaki şekilde uygulandı:

- a) Her supernatan örneğinden 0,05 ml alınarak 10 ml ye seyreltildi (200 kat seyrelme).
- b) Seyreltilmiş örnekten iki test tüpüne 1 er ml otomatik pipetle dağıtıldı.
- c) Taze hazırlanmış çözelti A'dan 5 er ml eklendi ve 15 dakika beklendi.
- d) Taze hazırlanmış çözelti B'den 0,5 er ml eklendi ve tüpler çalkalanarak hızlı karışma sağlandı.
- e) Renk oluşumu için 30 dakika beklendi.
- f) Spektrofotometrede (Perkin-Elmer Junior III Colomen 6/8) 750 nm de absorbans değerleri kaydedildi.
- g) Standart BSA çözeltilerine de aynı işlem uygulanarak çalışma grafiği çizildi. Standart BSA çözeltisi ile elde edilen absorbans değerleri ve çalışma grafiği Çizelge 2.1 ve Şekil 2.1 de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1 : Standart BSA çözeltileri ile 750 nm de elde edilen absorbans değerleri ve ortalaması.

BSA ( $\mu\text{g/ml}$ )	$A_1$	$A_2$	Aort
20	0,168	0,167	0,168
40	0,248	0,247	0,248
60	0,318	0,322	0,320
80	0,374	0,382	0,378
100	0,442	0,447	0,445
120	0,494	0,458	0,496
150	0,574	0,582	0,578



Şekil 2.1 : Standart BSA ile hazırlanan çalışma grafiği.



h) Örneklerden elde edilen absorbands değerleri ve ortalaması Çizelge 2.2 de verildi. Bu absorbands değerlerine karşı gelen protein miktarları Şekil (1) den okunarak 1 ml deki protein miktarları Çizelge 2.3 de hesaplandı.

Çizelge 2.2 : Örneklerle okunan absorbands değerleri ve ortalaması.

Örnek	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	Aort
1	0,186	0,186	0,186
2	0,237	0,237	0,237
3	0,237	0,233	0,235
4	0,231	0,236	0,234
5	0,238	0,242	0,240
6	0,183	0,190	0,187
7	0,182	0,186	0,184

Çizelge 2.3 : Örneklerdeki protein miktarları.

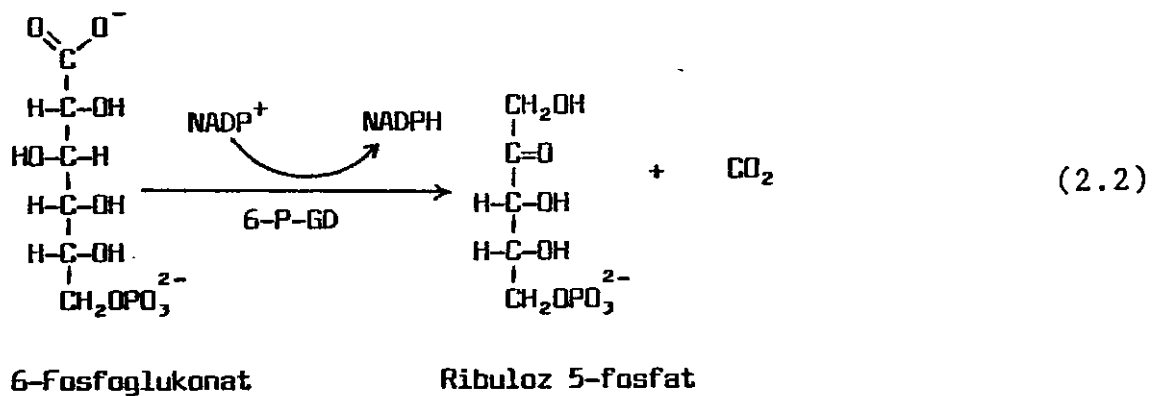
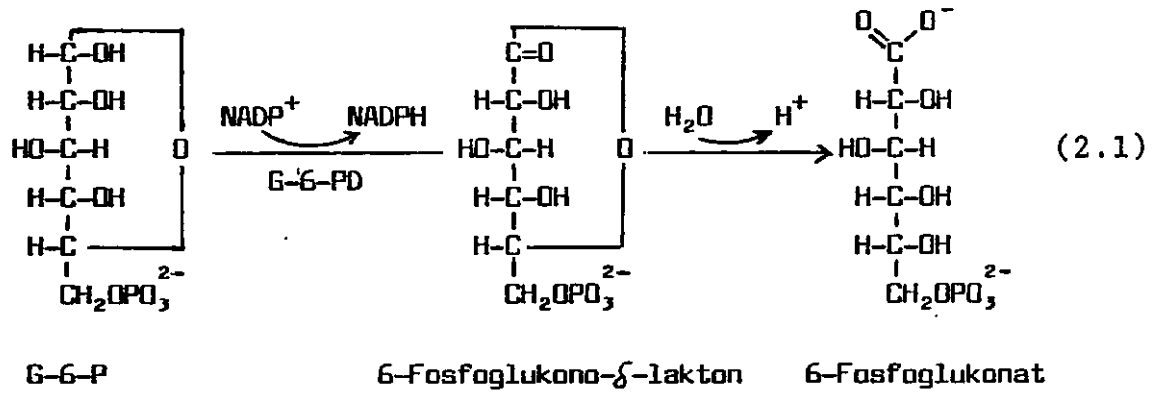
Örnek	Aort	Çalışma grafiğinden okunan protein mik: ( µg/ml)	1 ml örnekteki protein mik: ( mg/ml)
1	0,186	22,0	4,40
2	0,237	38,0	7,60
3	0,235	37,0	7,40
4	0,234	36,4	7,28
5	0,240	39,5	7, 9
6	0,187	22,5	4, 5
7	0,184	21,0	4, 2

## 7. Enzim aktivitesi tayini yapıldı.

Aktivite tayini için aşağıdaki çözeltiler hazırlandı:

- 0,25 M TRİS-HCl tamponu pH=8
- 0,175 M MgCl<sub>2</sub>
- 0,015 M NADP<sup>+</sup> Seyreltik KOH ile pH=5,5'a ayarlandı ve dondurucuda saklandı.
- 0,01 M G-6-P Dondurucuda saklandı
- 0,01 M 6-PG Dondurucuda saklandı

Elimizdeki supernatan örnekleri hem G-6-PD hem de 6-PGD enzimleri içerir. Eğer TRİS-HCl tamponu içinde  $\text{NADP}^+$ , G-6-P ve  $\text{Mg}^{++}$  iyonu var ise enzim denklem (2.1) gereğince G-6-P'ı 6-fosfoglukono- $\delta$ -laktona dönüştürür. Bu oldukça dayanıksız bir bileşiktir hemen moleküle 1 molekül su katılarak 6-fosfoglukonata (6-PG) dönüşür. 6-PG ikinci enzimin substratıdır. Ortam koşulları koenzim ( $\text{NADP}^+$ ) ve kofaktör bakımından uygun olduğundan ikinci enzim de denklem (2.2) gereğince aktivite gösterir ve sonuçta ikisinin aktivitesi birden ölçülmüş olur (Gözükara, 1974).



Bu iki enzimin aktivitelerini ayrı ayrı tayin etmek için iki ayrı enzim aktivite tayin karışımı hazırlandı (Çizelge 2.4). İkinci karışıma G-6-P ilave edilmedi.

Böylece birinci karışım ile hem G-6-PD hem de 6-PGD enzimlerinin aktivitesi ölçülürken ikinci karışım ile sadece 6-PGD enziminin aktivitesi ölçülmüş oldu.

Çizelge 2.4 : Aktivite tayin karışımlarının bileşimleri

Çözelti ve (kons.)	ATK (I) G-6-P ve 6-PGD için enzim aktivite tayin bileşimi		Son konsantrasyon (M)
	(ml)	ATK (II) 6-PGD için enzim aktivite tayin bileşimi (ml)	
TRİS-HCl pH=8 (0,25M)	24	24	0,12
MgCl <sub>2</sub> (0,175M)	3	3	0,0104
NADP <sup>+</sup> (0,015M)	3	3	0,0009
6-PG (0,01M)	3	3	0,0006
G-6-P (0,01M)	10	-	0,002
H <sub>2</sub> O	6,5	16,5	-
Toplam	49,5	49,5	

Enzim aktivite tayini için spektrofotometrik yöntem seçildi. Bu metod uygulama kolaylığı ve hassaslığı ile diğer metodlara tercih edilmiştir. Reaksiyon ürünü olan NADPH 340 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyon verirken NADP<sup>+</sup> bu dalga boyunda herhangi bir absorpsiyon vermez.

1 Ünite Enzim : 1 mol NADPH yapımını optimal şartlarda bir dakikada sağlayan enzim miktarı 1 ünite dir.

Spesifik Aktivite : 1 mg proteinde bulunan enzim ünite sayısı spesifik aktivite olarak tanımlanır (ünite/mg protein).

Denemeye alınan her grup hayvanın karaciğer supernatanından hem ikili hem tek aktivite tayini yapıldı. 2,97 ml aktivite tayin karışımları deney tüplerine otomatik pipet ile dağıtıldı. İkili ve tek aktivite tayin karışımlarını içeren deney tüpleri 30°C daki su banyosu içene yerleştirildi.

3 defa seyreltilmiş karaciğer supernatanından 0,03 ml alınıp 2,97 ml lik aktivite tayin karışımına karıştırılıp süratle spektrofotometreye (Perkin Elmer Junior III) yerleştirildi. 0. ve 5. dakikadaki absorbanslar okunarak aradaki farklar hesap edildi.

Çizelge 2.5 ikili ve tekli enzim aktivite tayin karışımı ile karıştırılan örneklerin 0. ve 5. dakikadaki absorbanslarını ( $A_1$  ve  $A_2$ ) ve farklarını ( $\Delta A$ ) vermektedir

Çizelge 2.5 : Örneklerin ikili ve tekli aktivite tayin karışımları ile ölçülen absorbans değerleri.

Örnek No	İkili enzim aktivite tayini			Tekli enzim aktivite tayini		
	$A_1$	$A_2$	$\Delta A$	$A_1$	$A_2$	$\Delta A$
1	0,016	0,108	0,092	0,021	0,066	0,045
2	0,030	0,249	0,219	0,021	0,068	0,047
3	0,030	0,236	0,206	0,024	0,062	0,038
4	0,036	0,249	0,213	0,023	0,065	0,042
5	0,035	0,285	0,250	0,020	0,067	0,047
6	0,021	0,060	0,039	0,016	0,045	0,029
7	0,025	0,062	0,037	0,016	0,038	0,022

5 dakikadaki absorbans farkları tespit edildikten sonra ml deki enzim unite sayısı şöyle hesaplandı:

$$A = c \cdot \epsilon$$

A= absorbans

c= konsantrasyon (mmol/ml)

$\epsilon$  = molar absorbans

$$c = \text{milimol/ml} = 1000 \mu\text{mol/ml}$$

$$\begin{aligned} \text{Ünite enzim/ml} &= \frac{\Delta A_{340}}{5} \times \frac{1}{6220} \times 1000 \times \text{seyrelme} \\ &= \frac{\Delta A_{340}}{5} \times \frac{1}{6220} \times 1000 \times 3 \times \frac{3}{0,03} \\ &= \Delta A_{340} \times 9,66 \end{aligned}$$

Birinci aktivite tayin karışımı ile hem G-6-PD ve hem de 6-PGD enzimlerinin miktarı, ikinci aktivite tayin karışımı ile ise sadece 6-PGD enziminin miktarı tayin edilir.

İkinci değerler birinciden çıkarılınca her numunedeki G-6-PD miktarı hesaplanmış olur. Çizelge 2.6 da ikili ve tekli aktivite tayin karışımı ile elde edilen sonuçlara göre hesaplanan G-6-PD + 6-PGD ve 6-PGD miktarları ve her örnek için hesaplanan G-6-PD miktarları görülmektedir.

Çizelge 2.6 :.Örneklerdeki G-6-PD enzimlerinin miktarları.

Örnek	G-6-PD+6-PGD (ünite enzim/ml)	6-PGD (ünite enzim/ml)	G-6-PD (ünite enzim/ml)
1	0,8887	0,4347	0,4540
2	2,1155	0,4540	1,6615
3	1,9900	0,3671	1,6229
4	2,0576	0,4057	1,6519
5	2,4150	0,4540	1,9610
6	0,3767	0,2801	0,0966
7	0,3574	0,2125	0,1449

Hesaplanan G-6-PD miktarları her örnekteki protein miktarına bölünerek her örnek için G-6-PD enziminin spesifik aktivitesi Çizelge 2.7 de hesaplandı.

Çizelge 2.7 : Örneklerde G-6-PD enzimlerinin spesifik aktiviteleri.

Örnek	Protein miktarı (mg/ml)	G-6-PD miktarı (ünite/ml)	Spesifik aktivite (ünite/mg protein)
1	0,4540	4,4	0,1032
2	1,6615	7,6	0,2186
3	1,6229	7,4	0,2193
4	1,6519	7,2	0,2269
5	1,9610	7,9	0,2482
6	0,0966	4,5	0,0214
7	0,1449	4,2	0,0345

### 2.3. Elektroforez Deneyleri

Spektrofotometrik bulguları desteklemek için eldeki örneklerle poliakrilamid slab jel elektroforez uygulandı.

Örnekler önce Laemmli'ye göre (Laemmli, 1970) slab jel elektroforeze tabi tutuldu. Bu uygulama için aşağıdaki çözeltiler hazırlandı:

#### 1. Üst tampon:

0,125 M TRİS ve %0,1 SDS içeren çözelti hazırlandı. HCl ile pH 6,8 e ayarlandıktan sonra 1 lt ye tamamlandı.

#### 2. Alt tampon:

0,375 M TRİS ve %0,1 SDS içeren çözelti hazırlandı. HCl ile pH 8,8 e ayarlandıktan sonra 1 lt ye tamamlandı.

#### 3. Örnek tamponu:

Aşağıdaki maddeleri belirtilen konsantrasyonlarda içeren çözelti hazırlandı. HCl ile pH 6,8 e ayarlandıktan sonra 100 ml ye tamamlandı.

Madde	Konsantrasyon
TRİS	0,0625 M
SDS	%2
Gliserin	%10
2-merkaptoetanol	%5
Brom fenol mavisi	%0,001

4. Akrilamid çözeltileri aşağıdaki bileşimlerde hazırlandı:

	%15 lik jel çözeltisi	%5 lik jel çözeltisi	Stack jel
Alt tampon	10 ml	10 ml	10 ml (üst tampon)
Akrilamid	3 g	1 g	0,54 g
Bis-akrilamid	81,2 mg	27 mg	60 mg
TEMED	10 µl	10 µl	20 µl
%5 amonyumpersulfat çöz.	50 µl	50 µl	200 µl
Sakkaroz	3 g	0,5 g	-
H <sub>2</sub> O	6 ml	9,2 ml	10 ml
Toplam	20 ml	20 ml	20 ml

5. Renklendirme çözeltisi (protein boyası):

%0,5 Comassie mavisı

%25 isopropanol

%10 asetik asit içeren 1 litre çözelti hazırlandı.

6. İlk renk giderici çözelti:

%10 isopropanol

%10 asetik asit içeren 1 litre çözelti hazırlandı.

7. İkinci renk giderici çözelti:

%10 asetik asit çözeltisi hazırlandı

Slab jel tabakası %15 den %5 e doğru azalan yoğunlukta hazırlandı. 4 saat bekledikten sonra üst kısmına stack jel dökülerek örneklerin konması için çukurlar açmak üzere tarak yerleştirildi ve jelin donması için 2 saat beklendi.

Jel donduktan sonra tarak çıkarıldı ve slab jel tabakasını içeren cam levhalar elektroforez ünitesine yerleştirildi.

Alt ve üst hücrelere alt ve üst tampon çözeltileri kondu.

25 µl supernatan örneği ile 25 µl örnek tamponu test tüplerinde su banyosu içinde 2 dakika kaynatıldı. Böylece

proteinler altünitelerine ayrıldı. Bir mikro şırınga kullanılarak örnekler akrilamid içindeki çukurlara yerleştirildi.

Elektroforez başlatıldı. 30 saat 40 mA akım uygulanarak bantların yürümesi sağlandı. Brom fenol mavisi jel tabakasının alt ucuna yaklaştığında elektroforeze son verildi. Daha sonra jel tabakası çıkarılarak protein boyasına kondu. Protein boyasında bir gece bekleyen jel daha sonra renk giderici çözeltilere atıldı. En sonunda %7 lik asetik asit çözeltisi içinde saklandı.

Aynı örneklerle Hedrics ve Smith'in (1968) disk jel elektroforez yöntemi slab jel elektroforez için değiştirilerek uygulandı. Bunun için şu çözeltiler hazırlandı:

1. Üst tampon:

5,13 g Asparajin

1 mg Brom fenol mavisi

0,67 ml 0,015 TPN içeren çözeltinin pH'ı TRİS ile 7,3 e ayarlandıktan sonra 1 litreye tamamlandı.

2. Alt tampon:

5,13 g Asparajin içeren çözeltinin pH'ı TRİS ile 7,3 e ayarlandı ve 1 litreye tamamlandı.

3. Çözelti A:

0,46 ml TEMED ve 5,815 TRİS içeren çözeltinin pH'ı HCl ile 7,9 a ayarlandı ve 100 ml ye tamamlandı.

4.Çözelti B:

0,46 ml TEMED ve 3,27 g imidazol içeren çözeltinin pH'ı 5,7 ye ayarlandı ve 100 ml ye tamamlandı.

5. Çözelti C: %12 Akrilamid çözeltisi

72 g Akrilamid ve 2,4 g Bis (N,N'-metilen bis-akrilamid) suda çözülüp 150 ml ye tamamlandı ve cam pamuğundan süzüldü.

6. Çözelti D:

10 g Akrilamid ve 2,5 g Bis (N,N'-metilen bis-akrilamid) suda çözülüp 100 ml ye tamamlandı.



### 7. Çözelti E

4 mg Riboflavin 100 ml suda çözüldü.

### 8. Katalizör

0,07 g Amonyum persulfat 50 ml suda çözüldü.

### 9. Aktivite boyası

7,5 ml 0,1 M G-6-P

0,5 ml 0,015 M TPN

12 mg NBT (Nitroblue tetrazolium)

10 ml 0,25 M TRİS (pH=8)

0,4 mg PMS (Fenazinmetasülfat)

yukarıdaki maddeler 50 ml suda çözülerek aktivite boyası hazırlandı.

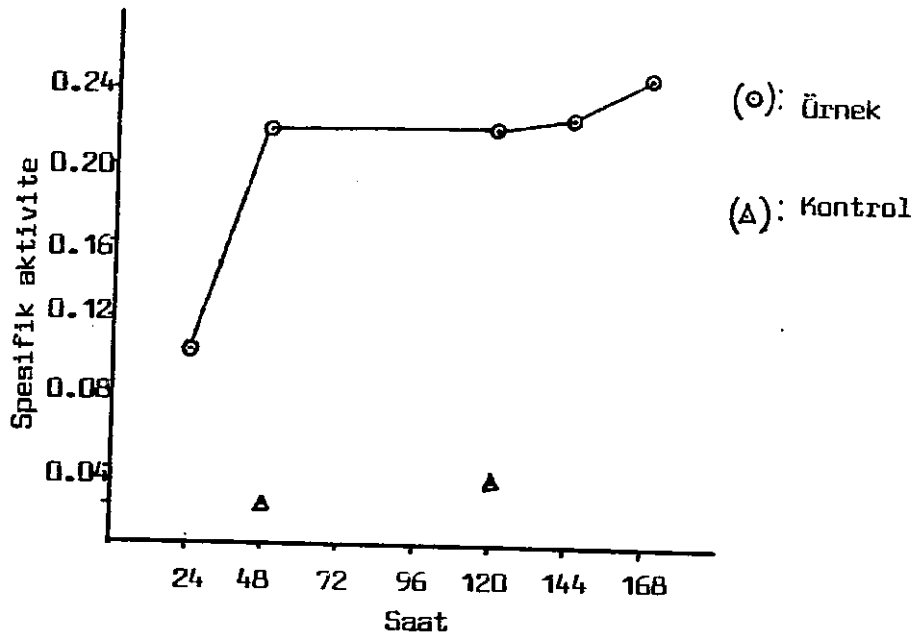
0,5 ml çözelti A, 1,0 ml çözelti C, 0,5 ml H<sub>2</sub>O ve 2,0 ml amonyum persülfat çözeltisi karıştırılarak poliakrilamid jel tabakasının alt kısmı hazırlandı. Donması için 1 saat beklendikten sonra üzerine 0,5 ml çözelti B, 1,0 ml çözelti D, 0,5 ml çözelti E, 2 ml H<sub>2</sub>O ve 0,5 ml amonyum persülfat karışımı dökülerek slab jel tabakası hazırlandı. Jel içine tarak ile çukurlar açıldı.

Slab jeli taşıyan cam levhalar elektroforez ünitesine yerleştirildi. Üst ve alt tamponlar doldurulduktan sonra 7,2 ve 5 no'lu supernatan örneklerinin 25 µl si 25 µl gliserin ile karıştırılarak 7, 2, 5, 7, 2, 5 sırasıyla çukurlara yerleştirildi.

Elektroforez başlatıldı ve 3,5 saat süreyle 88 mA akım uygulandı. Elektroforezin sona ermesinden sonra cam levhaların arasından çıkarılan poliakrilamid jel tabakası 6 örneği tam ortadan üçerli gruplara ayıracak şekilde ortadan bölündü. Jelin bir yarısı protein boyasına (Laemmli'ye göre) kondu, diğer yarısı ise aktivite boyasına yerleştirilerek 15 dakika karanlıkta bekletildi. Protein boyasına daldırılan kısım daha sonra renk giderici çözeltilere yerleştirildi ve sonuçta %7 lik asetik asit çözeltisi içinde saklandı.

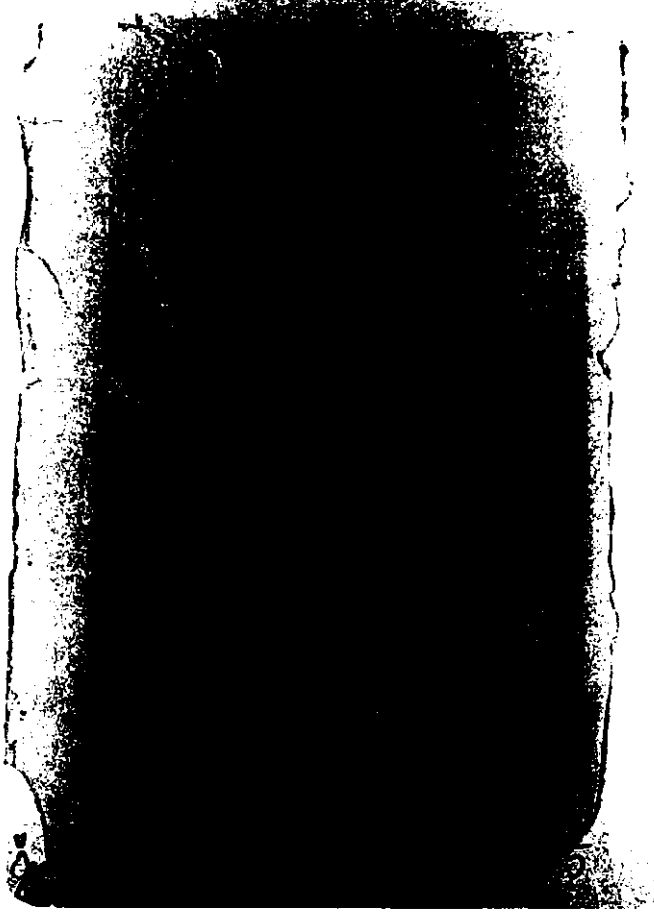
### 3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Spetrofotometrik enzim aktivite tayini yöntemi ile elde edilen sonuçlarla çizilen grafik Şekil 3.1 de görülmektedir. 168 saat süreyle %60 karbohidrat içeren yapay besinle beslenen farelerin karaciğer G-6-PD enzimi aktivitesinde kontrol hayvanlarınkine göre yaklaşık 10 katlık bir artış görülmektedir.



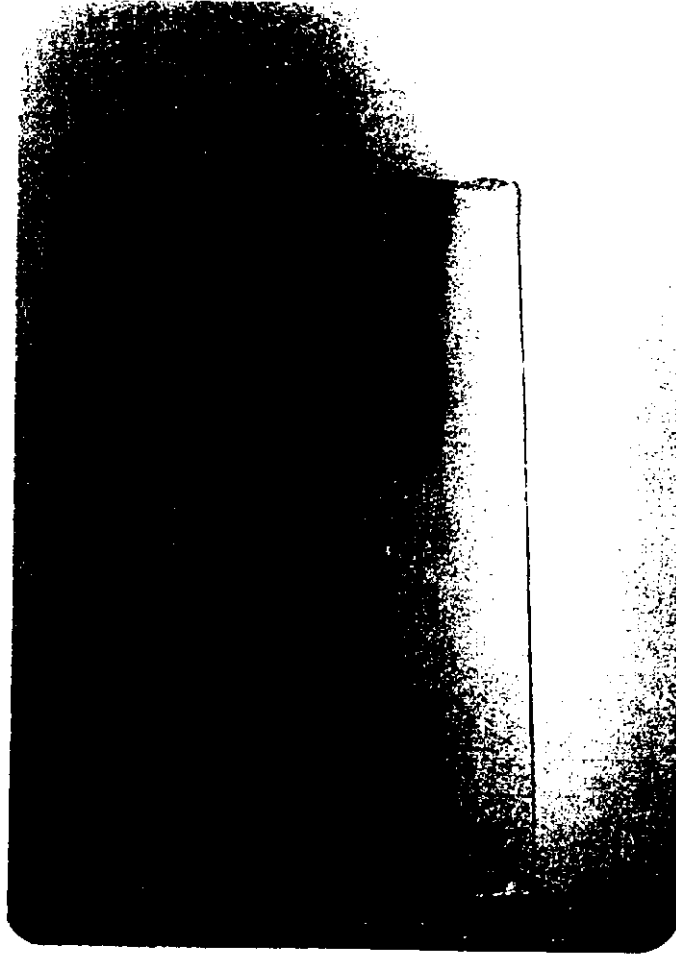
Şekil 3.1 : 168 saat süreyle %60 karbohidrat içeren diyetle beslenen farelerin karaciğer G-6-PD enzimi aktivitesinin zamanla değişimi.

Laemmli'ye göre uygulanan slab jel elektroforez deneyinin sonucu Şekil 3.2 de görülmektedir. Örnekler SDS'li ortamda ısıtılarak proteinlerin monomerlerine ayrılması sağlandığından oldukça fazla sayıda protein bandı gözlenmiştir.



Şekil 3.2: Örneklerle Laemmli'ye göre uygulanan slab jel elektroforez deneyi sonucu elde edilen jel fotoğrafı.

Örneklerin aktivitesini elektroforez deneyi ile de gözleyebilmek için Hedricks and Smith'in disk jel elektroforez yöntemi slab jel elektroforeze uygulandığında örneklerdeki proteinler SDS ile bir ön ısıtmaya tabi tutulmadığından Şekil 3.3 deki durum elde edilmiştir. Ancak, deney sonunda protein bantları elde edilmesine rağmen kimyasal madde eksikliği nedeni ile aktivite boyaması yapılamamıştır.



Şekil 3.3 : Örneklere Hedricks and Smith'e göre uygulanan slab jel elektroforez deneyi sonucu elde edilen jel fotoğrafı.

Spektrofotometrik enzim aktivite tayin yöntemi ile elde edilen sonuç G-6-PD enziminin indüklenebilir bir enzim olduğunu göstermektedir. Elde edilen sonuç Tepperman and Tepperman (1952, 1958), Rudack, et al., (1971a,1971b) ve Gözükkara, et al. (1972) tarafından elde edilen sonuçlarla paralellik göstermektedir.

G-6-PD enzimi pentozfosfat yolunun enzimatik kademesinde bulunan ve bu metabolik yolun işleyişini kontrol eden enzimdir. Bu çalışmada yüksek karbohidrat içeren yapay besin ile beslenen farelerin karaciğerinde bu enzim miktarının yaklaşık 10 kat arttığı tespit edilmiştir.

Deneylerden elde ettiğimiz bu sonuç indüklenabilir enzim hipotezine uygunluk göstermektedir. Metabolizmanın düzenli bir şekilde işlemesi hücre içi koşullarda enzim miktarına ve bu enzimlerin kullanacağı substrat miktarına sıkı sıkıya bağlıdır. Çalışmamızda kullandığımız yapay besindeki karbohidrat miktarını %60 a çıkardığımızda enzim aktivitesinin 10 kat artış göstermesi, hücre içi koşulların değişmesi ile enzim aktivitesinin değişeceğine iyi bir örnektir.

Karbohidrat oranı yüksek besin alındığında glukozdan meydana gelen G-6-P miktarı da yükselecektir. Enzimin substrat konsantrasyonunun yükselmesi enzim aktivitesinin artışına neden olmuştur. Bu artışın hem yeni mRNA sentezi hem de yeni enzim sentezinden ileri geldiği Kastrouni, et al., (1984); Sun and Holten, (1978) tarafından gösterilmiştir. Bu metabolik yolun düzenli bir şekilde çalışması hem enerji üretimi hem de NADPH üretimi bakımından önem taşır. NADPH'nin ortamda yeterli düzeyde olması yağ asidi sentezi, redukte glutathion sentezi, methemoglobin indirgenmesi ve diğer birçok biyosentez yolunun düzenli bir şekilde çalışmasını sağlar. Örneğin lipid sentezinde bir bozukluk, redukte glutathionun az oluşu veya diğer bazı metabolik yolların işleyişinin bozulması eritrositlerin hemolize uğramasına ve hücrenin ölmesine neden olmaktadır. Bu bakımdan pentozfosfat yolunun ilk enzimi olan G-6-PD enziminin aktivite değişimi metabolik bakımdan çok önem taşımaktadır. Bu nedenle bu çalışmada, besin alınımında bir değişiklik yaparak bu enzim aktivitesinin nasıl bir değişim gösterdiğinin incelenmesi amaçlanmıştır.

## DEĞİNİLEN BELGELER DİZİNİ

- Aksoy, M., Kutlar, A., Kutlar, F., Dinçol, G., Erdem, Ş., Baştēsbihçi, S., 1985, Batı-Trakya Türklerinde Hemoglobin Varyantlar  $\beta$ -Thalessemi, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz eksikliği ve haptoglobın tipleri: Doğa Bilim Dergisi, C.9.1, 45-49.
- Allen, D.W. and Jandl, J.H., 1961, Oxidative hemolysis and precipitation of hemoglobin: II. Role of thiols in oxidant drug action, J. Clin. Invest., 40, 454.
- Alving, A.S., Craige, B., Jr., Bullman, J.N., Whorton, C.M., Jones, R., Jr., and Eichelberger, L., 1948, Procedures used at Statesville Penitentiary for testing of potential antimalarial agents: J.Clin. Invest., 27 (May Suppl. symposium on malaria), 2.
- Anstall, H.B. and Trujillo, J.M., 1967, Glucose-6-phosphate dehydrogenase Its purification and Properties: Amer. J. Clin. Path., 47, 296.
- Ashmun, R.A., Holtquist, D.E. and Schultz, J.S., 1984, Quantitation of glucose-6-phosphate dehydrogenase in single cells by microspectrophotometry: The Cell: Sixth Ann Arbor Conference, 309-322.
- Beutler, E., Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency; 1967, Diagnosis, clinical and genetic implications: Amer. J. Clin. Path., 47, 303.
- Baldwin, R.L. and Yang, Y.T., 1974, In Lactation a Comprehensive Treatise: Vol. I. B.L. Larson and W.R. Smith, Eds., Academic Press. New York, 349-411.
- Brewer, G.J. and Powell, R.D., 1963, Hexokinase activity as a function of age of the human erythrocyte: Nature, 199, 704.
- Browne, E.A., 1957, The inheritance of an intrinsic abnormality of the red blood cell predisposing to drug-induced hemolytic anemia (Abst.): Bull. Johns Hopkins Hospital, 101, 115.
- Burka, E.R., Weaver, Z. III. and Marks, P.A., 1966, Clinical spectrum of hemolytic anemia associated with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: Ann. Intern. Med., 64, 817.

## DEĞİNİLEN BELGELER DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Camardella, L., Romano, M., Prisco, G. and Descalzi, F., 1981, Human erythrocytes glucose-6-phosphate dehydrogenase: Labelling of a reactive Lysyl residue by pyridoxal-5'-phosphate: Biochem. Biophys. research communication, Vol. 103. No. 4, 1384-1385.
- Carson, P.E., Flanagan, C.L., Ickes, C.E. and Alving, A.S., 1956, Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes: Science, 124, 484.
- Carson, P.E., Schrier, S.L. and Kellermeyer, R.W., 1959, Mechanism of inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase in human eritrocytes: Nature, 184, 1292.
- Chang, H.L., Holten, D. and Karin, R., 1979, Distrubution of the multiple molecular forms of glucose-6-phosphate dehydrogenase in different physiological states: Can. J. Biochem. 57, 396-401.
- Childs, B., Zinkham, W., Browne, E.A., Kimbro, E.L. and Torbet, J.V., 1958, A genetic study of a defect in glutathione metabolism of the erythrocyte: Bull. Johns Hopkins Hospital, 102, 21.
- Chung, A.E. and Langdon, R.G., 1963, Human erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase. II. Enzyme-coenzyme interrelationship: J. Biol. Chem., 238, 2317.
- De Flora, A., Morelli, A., Frascio, M., Corte, G., Corte, G., Curt, G., Galliano, M., Gozzer, C., Minchiott, C., Marenì, C. and Goelani, G., 1977, Biochim. Biophys. Acta 500, 109-123.
- Dern, R.J., Weinstein, J.M., LeRoy, G.V., Talmage, O.W. and Alwing, A.S., 1954, The hemolytic effect of primaquine. I. The localization of the drug-induced hemolytic defect in primaquine-sensitive individuals: J. Lab. Clin. Med., 43, 303.
- Dern, R.J., Beutler, E. and Alving, A.S., 1955, The hemolytic effect of primaquine: V. Primaquine-sensitivity as a manifestation of a multiple drug sensitivity: J. Lab. Clin. Med., 45, 30.

## DEĞİNİLEN BELGELER DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Earle, D.P., Jr., Bigelow, F.S., Subrod, L.G. and Rane, C.A., 1948, Studies on the chemotherapy of the human malaries: IX. Effect of pamaquine on the blood cells of man: J. Clin. Invest., 27 (May Supplement Symposium on malaria), 121.
- Fertman, M.H. and Fertman, M.B., 1955, Toxic anemias and Heinz bodies: Medicine, 34, 131.
- Fok, T-F., LAU, S-P. and FUNG, K-P., 1985, Cord blood G-6-PD activity by quantitative enzyme assay and fluorescent stop test in Chinese neonates: Aust. Paediatr. J., 21, 23-25.
- Garcia, D.R. and Holten, D., 1975, J. Biol. Chem 250, 3960-3965. Reported in Sun, J.D. and Holten, D., 1978, Levels of rat liver glucose-6-phosphate dehydrogenase messenger RNA, J. Biol. Chem., 253, 19, 6832-6836.
- Glaser, L. and Brown, D.H., 1955, Purification and properties of d-glucose-6-phosphate dehydrogenase: J. Biol. Chem., 216, 67.
- Glock, G.E. and Mc Lean, P., 1953, Further studies on properties and assay of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconic dehydrogenase of rat liver: Biochem. J., 55, 400.
- Glock, G.G. and Mc Lean, P., 1955, The determination of oxidized and reduced diphosphopyridine nucleotide and triphosphonucleotide in animal tissues: Biochem. J., 61, 390-397.
- Granick, S., 1949, The chemistry and functioning of the mammalian erythrocyte: Blood, 4, 404.
- Greenberg, M.S. and Wong, M., 1961, Studies on destruction of glutathione-unstable red blood cells. The influence of fava beans on primaquine upon such cells in vivo: J. Lab. Clin. Med., 57, 733.
- Gözükar, E.M., Florich, M. and Holten, D., 1972, The effect of unsaturated fatty acids on the rate of synthesis of rat liver glucose-6-phosphate dehydrogenase: Biochem. Biophys. Acta. 286, 155.



## DEĞİNİLEN BELGELER DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Gözükara, E.M., 1974, Erkek Albino Sıçan Karaciğeri (*Rattus Norvegicus* Benkenhout, Rodentia: Muridae) glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi üzerine araştırmalar: Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Doçentlik tezi.
- Gözükara, E.M., 1975, Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from Rat Liver (II): Hacettepe Bulletin of Natural Sciences and Engineering, 4, 1-11.
- Gözükara, E.M., 1978, Glukoz 6-P Dehidrogenaz enziminin özellikleri, metabolik ve klinik açıdan önemi: Biyokimya Dergisi, Yıl 2, Cilt 2, Sayı 3., 217-240.
- Hedrick, J.L. and Smith, A.S., 1968, Arch. Biochem. Biophys. 126, 155-164.
- Hockwald, R.S., Arnold, J., Clayman, C.B. and Alving, A.S., 1952, Status of primaquine: 4 toxicity of primaquine in Negroes: J.A.M.A., 149, 1568.
- Holten, D., Procsal, D. and Chang, H.L., 1976, Regulation of pentosephosphate pathway dehydrogenases by  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  ratios: Biochem. Biophys. Research Comm. 68, 436.
- Jandl, J.H., Engle, L.K. and Allen, D.W., 1960, Oxidative hemolysis and precipitation of hemoglobin: I. Heinz body anemias as an acceleration of red cell aging: J. Clin. Invest., 39, 1818, 1960.
- Jandl, J.H., 1963, The Heinz body hemolytic anemias (Editorial): Ann. Intern. Med., 58, 702.
- Kahn, A., Bertrand, O., Cottreau, D., Bioyin, P. and Dreyfus, J.C., 1976, Biochim. Biophys. Acta 445, 537-548. Reported in Terrence, M.D. Jr., Theodore, A.M., David, J.A. and Kenneth, L.B., Glucose-6-phosphate dehydrogenase. Partial characterization of the rat liver and uterine enzymes: Biochim. Biophys. Acta., 658, 356-368.
- Kastrouni, E., Pegiou, T., Gardiki, P. and Trakatellis, A., 1984, Activity changes of glucose-6-phosphate dehydrogenase in response to diet and insulin: Int. J. Biochem., 16, 1359-1366.

## DEĞİNİLEN BELGELER DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Keller, D.F., 1971, G-6-PD Deficiency, CRC Press, Cleveland, 67 p.
- Kirkman, H.N., 1962, Glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes: I. Further purification and characterization: J. Biol. Chem., 237, 2364.
- Kirkman, H.N. and Hendrickson, E.M., 1968, Glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes: II. Subactive States of the enzyme from normal persons: J. Biol. Chem., 237, 2371.
- Kirkman, H.N., 1968, Glucose-6-phosphate dehydrogenase variants and drug-induced hemolysis: Ann. N.Y. Acad. Sci., 151, 753.
- Kornberg, A. and Horecker, B.L., 1958, Glucose-6-phosphate dehydrogenase in Methods in Enzymology, Vol. 1, Academic Press, New York, 323.
- Krevans, J.R., 1963, Out of the wastebasket (Editorial), Ann. Intern. Med., 58, 701.
- Laemmli, U.K., 1970, Cleavage of structural Proteins during the assembly of head of bacteriophage T4: U.K. Nature, 227, 680.
- Lerman, S., 1960, Pathogenetic factors in experimental galactose cataract, Part I A.M.A. Arch. Ophthalmol., 63, 128.
- Levy, H.R., 1979, Glucose-6-phosphate dehydrogenase, Advances in Enzymology, Vol. 48, Alton Meister Ed., Interscience, John Wiley & Sons, New York, pp 97-194.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.S., Farr, A.L. and Randall, R.J., 1951, Protein measurement with the Folin phenol reagent: J. Biol. Chem., 193, 265-75.
- Luzzato, L., 1967, Regulation of the activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase by NADP<sup>+</sup> and NADPH: Biochim. Biophys. Acta, 146, 18-25.
- Marks, P.A., 1957, A relationship between erythrocyte aging in vivo and activities of glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconic dehydrogenase: J. Clin. Invest., 36, 913.

## DEĞİNİLEN BELGELER DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Marks, P.A., 1958, Red Cell glucose-6-phosphate dehydrogenase and nucleosid phosphorylase: *Science* 127, 1338.
- Marks, P.A. and Gross, R.T., 1959, Erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: evidence of differences between Negroes and Caucasians with respect to this genetically determined trait: *J. Clin. Invest.*, 38, 2253.
- Marks, P.A., Johnson, A.B. and Hirschberg, E., 1958, Effect of age on the enzyme activity in erythrocytes: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 44, 529.
- Marks, P.A., Gross, R.T. and Hurwitz, R.E., 1959, Gene action in the erythrocyte deficiency of glucose-6-phosphate dehydrogenase, tissue enzyme-levels: *Nature*, 183, 1266.
- Marks, P.A., 1967, Glucose-6-phosphate dehydrogenase in mature erythrocytes: *Amer. J. Clin. Path.*, 47, 287.
- Murphy, J.R., 1960, Erythrocyte metabolism: II. Glucose metabolism and pathways: *J. Lab. Clin. Med.*, 55, 286, 1960.
- Noltmann, E.A., Gubler, C.J. and Kuby, S.A., 1961, Glucose-6-phosphate dehydrogenase (Zwischenferment): I. Isolation of the crystalline enzyme from yeast: *J. Biol. Chem.*, 236, 1225-1230.
- Ogino, S. and Ichihara, J., 1957, Biochemical studies on cataract: V. Biochemical genesis of senile cataract: *Amer. J. Ophtal.*, 43, 754.
- Rudack, D., Elaine, M. and Holten, D., 1971a, Rat liver glucose-6-phosphate dehydrogenase regulation by carbohydrate diet and insulin: *J. Biol. Chem.*, 246, 1249.
- Rudack, D., Gözükar, E.M., Chisholm, E.M. and Holten, D., 1971b, The effect of dietary carbohydrate and fat on the synthesis of rat liver 6-phosphogluconate dehydrogenase: *Biochem. Biophys. Acta* 252, 305.
- Pontremoli, S. and Grazi, E., 1969, Hexose-monophosphate oxidation, Comprehensive Biochemistry, Ed. Florkin Statz, 17, 163.

## DEĞİNİLEN BELGELER DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Powell, R.D., Brever, G.J., De Gowin, R.L. and Carson, P.E., 1966, Effects of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency upon the host and upon host-drug-malaria parasite interactions: *Milit. Med.*, 131, 1039.
- Scherier, S.L., Kellermayer, R.W., Carson, P.E., Ickes, C.E. and Alving, A.S., 1958, The hemolytic effect of primaquine: IX. Enzymatic abnormalities in primaquine-sensitive erythrocytes: *J. Lab. Clin. Med.*, 52, 109.
- Singh, D. and Squire, P.G. 1975, *Int. J. Peptide Protein Res.* 7, 185-188. Reported in Terrence, M.D. Jr., Theodore, A.M., David, J.A. and Kenneth, L.B., 1981, Glucose-6-phosphate dehydrogenase. Partial characterization of the rat liver and uterine enzymes: *Biochim. Biophys. Acta.*, 658, 356-368.
- Stern, B.K. and Vennesland, B., 1960, The enzymatic transfer of hydrogen: IX. The reactions catalyzed by glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconic dehydrogenase: *J. Biol. Chem.*, 235, 205.
- Sun, J.D. and Holten, D., 1978, Levels of Rat Liver glucose-6-phosphate dehydrogenase messenger RNA: *J. Biol. Chem.* 253, 6832-6836.
- Szeinberg, A., Asher, Y. and Sheba, C., 1958, Studies on glutathione stability in erythrocytes of cases with past history of favism or sulfa-drug-induced hemolysis: *Blood*, 13, 348.
- Szeinberg, A., Sheba, C. and Adam, A., 1958, Enzymatic abnormality in erythrocytes of a population sensitive to vicia faba or hemolytic anaemia induced by drugs: *Nature*, 181, 1256.
- Szeinberg, A., Sheba, C., Hirshorn, N. and Bodonzi, E., 1959, Studies on erythrocytes in cases with past history of favism and drug-induced acute hemolytic anaemia: *Nature*, 184, 1325.
- Tarlov, A.R., Brewer, G., Carson, P.E. and Alving, A.S., 1962, Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: an inborn error of metabolism of medical and biological significance: *Arch. Intern. Med.*, 109, 209.

## DEĞİNİLEN BELGELER DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Tepperman, H.M. and Tepperman, J., 1952, The hexosemono-phosphate shant and adaptive hyperlipogenesis: Diabetes, 7, 478, 485.
- Tepperman, J. and Tepperman, H.M., 1958, Effects of Antecedent Food intake Pattern on Hepatic Lipogenesis: Am. J. Physiol. 193 (1), 55-64.
- Tepperman, H.M. and Tepperman, J., 1965, Effect of saturated fat diets on rat liver NADP-linked enzymes: Am. J. Physiol. 209, 773-779.
- Terrence, M.D.Jr., Theodore, A.M., David, J.A. and Kenneth, L.B., 1981, Glucose-6-phosphate dehydrogenase Partial characterization of the rat liver and uterine enzymes: Biochim. Biophys. Acta, 658, 356-368.
- Warburg, O. and Christian, W., 1931, Über Aktivierung der Robisonschen Hexose-Mono-Phosphorsaure in roten Blutzellen and die Geivinnung Aktivieren-der Fermentlosungen: Biochim. Z., 242, 206-227.
- Yoshida, A., 1972, Anal. Biochem. 49, 320-325. Reported in Glucose-6-phosphate dehydrogenase. Partial characterization of the rat liver and uterine enzymes. Biochim. Biophys. Acta, 658, 356-368.
- Yoshida, A., 1973, Science, 179, 532-537. Reported in Glucose-6-phosphate dehydrogenases, Levy, H.R., Advances in Enzymology, Alton Meister (Ed.) Vol. 48, 1979 Interscience (John Wiley & Sons), New York.
- Zinkham, W.H., Lenhard, R.E., Jr. and Childs, B.A., 1958, A deficiency of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in erythrocytes from patients with favism: Bull. Johns Hopkins Hosp., 102, 169.
- Zinkham, W.H., 1960, Enzyme studies on lenses of persons with primaquine-sensitive erythrocytes (Abst): Amer. J. Dis. Child., 100, 525.