

## Bazı Spalax Populasyonlarında Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz ve 6-Fosfoglukonat Dehidrogenaz Enzimlerinin Aktiviteleri Üzerine Bir Çalışma

H. Ramazan YILMAZ, Eşref YÜKSEL  
İnönü Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kampüs, Malatya-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 28.11.1996

**Özet:** Bu çalışma, Spalax genusunun türleşmesinin aydınlatılmasında katkıda bulunabilmek için planlanmıştır. Bu amaçla Fırat nehrinin iki tarafında kalan bölgedeki Spalax populasyonlarının karaciğerindeki Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz (G-6-PD) ve 6-Fosfoglukonat Dehidrogenaz (6-PGD) enzim aktiviteleri arasındaki fark araştırılmıştır.

Araştırma bölgesindeki Spalax genusuna ait hayvanlar 2 populasyona ayrılarak incelenmiştir. G-6-PD ve 6-PGD enzimlerinin spesifik aktiviteleri 0.01'lik hassasiyetle ölçülerek tablo halinde verilmiştir.

Bu veriler ışığında bu iki populasyonda görülen ortalama spesifik aktivite farklılıkları tartışılmıştır.

**Anahtar Sözcükler:** Spalax, Glukoz-6-fosfat ve 6-Fosfoglukonat Dehidrogenaz aktiviteleri, Türleşme.

### A Study on The Activities of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase and 6-Phosphogluconate Dehydrogenase Enzymes in Some Spalax Populations

**Abstract:** The purpose in planing this investigation was to contribute to the speciation problems in genus Spalax. For this, we examined the activities of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G-6-PD) and 6-Phosphogluconate Dehydrogenase (6-PGD) enzymes from the liver of Spalax samples taken from both sides of river Euphrates.

The samples belonging to genus Spalax were separated into two populationsin the research area. The spesific activities of G-6-PD and 6-PGD enzymes were measured at 0.01 level of significance. The results were given in a table.

The observed differences between the mean specific activities of te enzymes of the two populatons were discussed.

**Key Words:** Spalax, Glucose-6-Phosphate and 6-Phosphogluconate Dehydrogenase activity, Speciation.

### Giriş

Son yıllarda sitogenetik ve biyokimyasal veriler, taksonomik araştırmalarda ve türleşmenin izahında oldukça yaygın bir kullanım alanı bulmuştur. Bu tür çalışmalar taksonomik kriterlerin yetersiz kaldığı durumlarda, türleşmenin yönünün ve zamanının belirlenmesinde oldukça önemli veriler sağlamaktadır.

Spalax genusu hayvanları rodentlerin toprak altı ekolojik nişi kullanan ekstrem örneklerindedir (1). Bu hayvanların dikkati çeken anatomik ve davranış adaptasyonları, yaşama tarzlarının gereği, kazmaya müsait ayak şekilleri ile ilişkilidir. Toprak altı yaşama bağlı olarak gözlerinin gelişiminde büyük gerileme görülür. Hariçten gözleri bulunmamaktadır (2).

Spalax genusuna dahil üyeler üzerinde, özellikle 1970'li yılların sonundan itibaren, yoğun olarak çalışılmaya başlanmıştır. Bu hayvanların karmaşık taksonomik durumları nedeni ile sitogenetik çalışmalar oldukça rağbet görmüştür. Daha sonraları bu çalışmalar Spalax'ların taksonomik durumları yanında türleşmelerinin ve evrimlerinin de karmaşık olduğunu ortaya koymuştur. Bugün Spalax'ın yaklaşık 40 farklı karyotipik formu Kuzey Afrika, İsrail, Türkiye, Yugoslavya, Yunanistan, Romanya, Bulgaristan, Ukrayna ve Kafkasya'dan kaydedilmiştir.

G-6-PD, karbonhidrat metabolizmasının ikinci ana yolu olan pentozfosfat yolunun ilk enzimidir ve NADP<sup>+</sup> koenzim olarak kullanılarak D-Glukoz-6-fosfat'ın 6-

Fosfoglukonolakton'a yükseltgenmesini katalizler. Enzim ayrıca bu metabolik yolun hızını ayarlayan regülator enzim olması bakımından da değer taşır.

Koenzimi NADP+ olan 6-PGD, pentozfosfat yolunda 6-fosfoglukonat'ı dekarboksilasyona uğratarak, D-ribuloz-5-fosfat'ı meydana getirir (3).

Enzimlerin hem fizyolojik hem de klinik önemlerinin anlaşılması ile özellikle insan dahil değişik tür canlılar üzerinde, geniş kapsamlı çalışmalar yapılmıştır (4).

G-6-PD enzimine 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 (3).

Çalışma yöremizde Yüksel (5) tarafından Fırat nehrinin batısında (Malatya) ve doğusunda (Elazığ) yapılan çalışmada Elazığ populasyonu *Spalax ehrenbergi*, Malatya populasyonu *Spalax leucodon* olarak teşhis edilmiştir. Karyotip analizleri neticesinde *S.leucodon*'da  $2n = 60$  ve  $NF = 80$ , *S. ehrenbergi* de  $2n = 52$  ve  $NF = 76$  olduğu tesbit edilmiştir ( $NF =$  kromozom kol sayısı). İki türün kromozom morfolojisi bakımından da farklı olduğu da belirtilmektedir.

Yukarıda zikredilen karyotip ve  $NF$  değerlerinde görülen farklılıkların enzim varyasyonlarında da görülüp görülemeyeceğini, coğrafi engellerin *Spalax* populasyonları üzerinde ne derece etkili olduğunu test etmek ve *Spalax* genusunun türleşmesinin aydınlatılmasına katkıda bulunmak amacıyla *Spalax* genusunda özellikle Elazığ ve Malatya yöresi esas alınmak kaydıyla bu tür bir çalışmaya gidilmesi uygun görülmüştür.

## Materyal ve Yöntem

### Araştırma Alanının Tanımı ve *Spalax* Örneklerin Eldesi

Çalışmada kullanılan *Spalax* örnekleri Fırat nehrinin doğu (Elazığ) ve batı (Malatya) tarafından yakalanmıştır. Araştırmanın yürütüldüğü bölgenin rakımı yaklaşık 880-1150 m dır. Bu lokalitelerden 22 kör fare örneği toplanmıştır (Şekil 1.). Toplanan 22 *Spalax* örneğinden 8 (5 dişi, 3 erkek) tanesi Fırat nehrinin doğu (Elazığ) tarafından alınmıştır. Batı (Malatya) tarafında ise 14 örnek (8 dişi, 6 erkek) yakalanmıştır.

## Enzim Çalışmaları

Canlı olarak doğal habitatlarından yakalanan hayvanlar 2-3 gün laboratuvar şartlarına uyum sağlamaları için bekletildikten sonra eter ile bayıltılarak ağırlıkları ve boyları ölçüldü. Bundan 4-5 saat sonra boyunları kırılmak suretiyle aniden öldürülerek karın kısımları açıldı ve karaciğerleri süratle çıkarılıp 0.15 M KCL çözültesi içeren buz içindeki beherlere konuldu ve perfüzyon işlemi yapıldı. Perfüzyon işlemi, G-6-PD ve 6-PGD enzimlerinin aktivitelerinin ölçülmesi Gözükara (6)'ya göre yapıldı.

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 bu dalga boyunda herhangi bir absorpsiyon vermez.

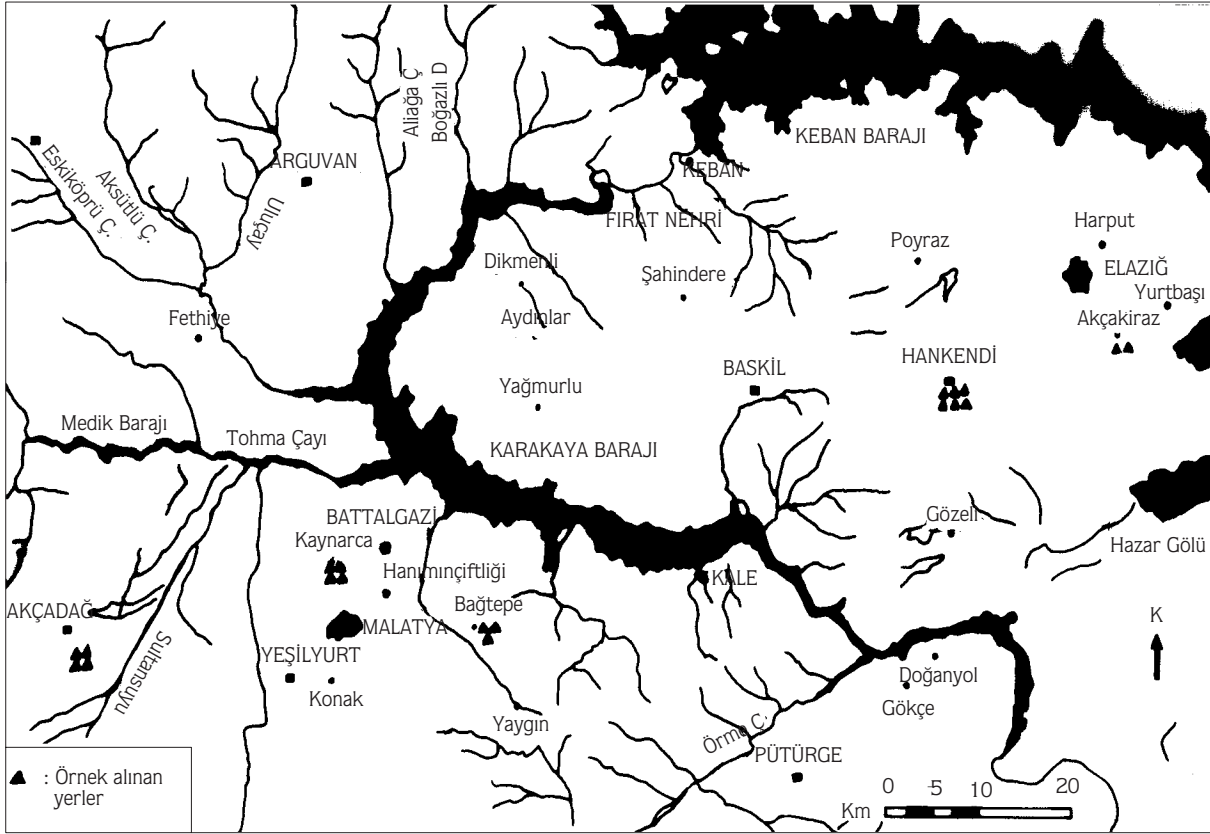
Denemeye alınan *Spalax* örneklerinin karaciğer süpernatantından ml'deki enzim ünite sayısı hesaplandı. Hesaplanan G-6-PD miktarları her örnekteki protein miktarına bölünerek her örnek için G-6-PD enziminin spesifik aktivitesi hesaplandı. Aynı işlem 6-PGD enzimi içinde yapıldı. 1mg proteinde bulunan enzim ünite sayısı spesifik aktivite olarak tanımlanmıştır.

Protein miktar tayini Lowry ve Ark. (7) göre yapıldı. Örneklerden elde edilen absorpsiyon değerlerine karşılık gelen protein miktarları Standart BSA eğrisinden okunarak 1 ml'deki protein miktarı hesaplandı.

## Bulgular

Araştırma alanının çeşitli bölgelerinden toplanan kör fare örnekleri *Spalax leucodon* Nordmann (1840) ve *Spalax ehrenbergi* Nehring (1898) olarak teşhis edildi. Elde edilen sonuçlara göre araştırma alanı iki populasyon bölgesine ayrılarak incelendi. Bu populasyonlardan birincisi Fırat nehrinin doğusundaki Elazığ'da yayılmış olan populasyondur. İkincisi ise Fırat nehrinin batısında yayılmış olan Malatya populasyonudur. Elazığ populasyonuna ait örnekler Akçakiraz ve Hankendi lokalitelerinden, Malatya Populasyonuna ait örnekler Akçadağ, Bağtepe, Kaynarca ve Orduzu lokalitelerinden yakalanmıştır.

Her bölgeden toplanan kör fare örnekleri üzerinde yapılan incelemelerde kendi aralarında morfolojik bir farklılığa rastlanmamıştır.



Şekil 1. Örneklerin alındığı yeri ve araştırma alanının ayrıntısını gösterir harita

Araştırmada coğrafi engellerin Spalax populasyonları üzerinde ne derece etkili olduğu ve karyotiplerindeki farklılıkların enzim varyasyonlarında da görülüp görülemeyeceğinin test edilmesi amaçlanmıştır. Araştırılan bu iki populasyondan Elazığ populasyonu, Malatya populasyonundan Fırat nehri nedeniyle ayrılmaktadır.

Araştırılan iki populasyonun G-6-PD ve 6-PGD enzim aktivitelerinin analiz sonuçları aşağıda verilmiştir. Her iki populasyon için spektrofotometrik enzim aktivite yöntemi kullanılmıştır.

1. Elazığ Populasyonu: Elazığa ait Akçakiraz ve Hankendi lokalitelerinden yakalanan örneklerin G-6-PD ve 6-PGD enzimlerinin spesifik aktivite bakımından yapılan varyans analizi neticesinde fark bulunmadığından bu örnekler beraber değerlendirilmiştir.

G-6-PD için ortalama spesifik aktivite  $0,6398 \pm 0,1276$  ünite/mg protein, 6-PGD için ortalama spesifik aktivite  $1,2231 \pm 0,2485$  ünite/mg protein olarak bulundu (Tablo 1).

Tablo 1. Elazığ ve Malatya Spalax populasyonlarının G-6-PD ve 6-PGD enzimlerinin spesifik aktivitelerinin karşılaştırılması.

	Birey sayısı	G-6-PD aktivitesi (ünite/mg protein)(a)	6-PGD aktivitesi (ünite/mg Protein)
Elazığ ( <i>S.ehrenbergi</i> )	8	$0,6398 \pm 0,1276$	$1,2231 \pm 0,2485$
Malatya ( <i>S.leucodon</i> )	14	$1,3780 \pm 0,8860$	$2,0548 \pm 0,3657$

a) İki toplum arasında G-6-PD aktivitesi  $P < 0,05$  önem seviyesinde fark var.

2. Malatya Populasyonu: Malatya'ya ait lokalitelerde yakalanan örnekler arasında da her iki enzimin spesifik aktiviteleri bakımından varyans analizi neticesinde fark bulunmadığından örnekler beraber değerlendirilmişlerdir.

G-6-PD için ortalama spesifik aktivite ve standart sapmalar  $1.3780 \pm 0.8860$  ünite/mg protein, 6-PGD için ise  $2.0548 \pm 0.3657$  ünite/mg protein olarak tespit edildi (Tablo 1).

## Tartışma ve Sonuç

Spalax türlerinin ve alttürlerinin türleşme problemi pek çok araştırmacı tarafından detaylı olarak incelenmesine rağmen mevcut veriler bu problemin aydınlatılmasında henüz yeterli bulunmamaktadır. Bu konuda Spalax'ın belirttiğimiz aşağıdaki özellikleri dikkate değerdir;

1) Spalax, yerleşik ve gen akımı sınırlı populasyonlara sahiptir (8,9).

2) Karyotipik formlar arasında zaman zaman hibrit zonlara rastlanmasına rağmen (10,11) tesadüfi seleksiyon işlemlerinde Spalax'ın hibrit zonları tüm tür sınırları ile karşılaştırıldığında çok dardır (9),

3) Genelde, yüksek organizasyonlu hayvanlarda etholojik izolasyon mekanizmalarının karmaşık bir genetik yapıya sahip olduğu düşünülmektedir ve bunların dar hibrit zonunda direkt olarak seleksiyondan ziyade tür sınırları boyunca adaptif değişmelerin bir neticesi olarak ortaya çıktığı düşünülebilir (9).

Spalax genusunun türleşmesinde etholojik izolasyonunun orijini allopatrik türleşmeyle desteklenmektedir. Ayrıca hibrit oluşumunda bazı özel durumlar gözönüne alınmalıdır:

1) Hibritler, hibrit zon dışında hem ekolojik hem de etholojik olarak düşük uyum değerine sahiptirler (9),

2) Etkili pre-zigotik izolasyondan yoksun olan parental tiplerin hibrid zon içine girmeleri sürekli melez oluşumundan sorumlu olabilir (9),

3) Mayotik dengesizlik nedeniyle potansiyel post-zigotik izolasyonunun kapsamı nisbeten küçük olabilir (9).

Elazığ ve Malatya populasyonları firat nehri nedeniyle birbirinden izole olmuş durumdadır. Canlıların türleşmesinde coğrafi engellerin etkili olduğu bilinmektedir. Ancak coğrafi izolasyonlar yalnız başına etkili olduğu söylenemez. Bunun yanında Kence ve arkadaşlarının (12) belirttiği gibi farklılaşma sürecinde olan populasyonların giderek yeni türler oluşturabilmesi için, coğrafi izolasyona ek olarak diğer bazı izolasyon mekanizmalarının da işleyerek populasyonlar arası gen alışverişlerini kısıtlaması gerekir. Eşeyssel davranışlara bağlı olan izoyaslonlar populasyonlar arası gen alışverişlerini kısıtlayarak tür oluşumunda rol oynayan en önemli izolasyon mekanizmalarından biridir.

Araştırma bölgemizi oluşturan alanda farklı Spalax türleri yaşamaktadır. Bunlar *S. leucodon* ve *S.ehrenbergi*'dir (5). Tablo 1'den de görüleceği gibi, Elazığ ve Malatya Spalax populasyonları farklı tür olmaları nedeniyle, beklendiği gibi G-6-PD enzimi spesifik aktivite bakımından farklıdır. Ancak 6-PGD enzimi bakımından önemli bir fark görülmemiştir.

Çalışmadan elde edilen verilere göre: G-6-PD enzim aktivitesinin ölçülmesi yolu ile, bu enzim aktivitesinin birbirine yakın ama farklı olan türlerin ayırımından sitogenetik karakterlerle birlikte bir kriter olarak kullanılabileceği düşünülebilir.

## Kaynaklar

1. Yüksel, E., Gülkaç, M.D., Adıyaman-Gaziantep ve Şanlıurfa Bölgeleri Spalax'ları (Rodentia: Spalacidae) üzerine Sitogenetik İnceleme. İnönü Üniv. Araş. Fonu, Proje No: 86/04, 1989.
2. Yüksel, E., Gülkaç, M.D., Spalax leucodon'un Bazı Alttür ve Kromozomal formlarının Evolusyonu ve Filogenetik İlişkileri. Doğa Tr. J. of Biology C. 14, 81, 59-68, 1990.
3. Gözükara, E.M., Biyokimya, Ofset Repromat Ltd. Şti. Ankara, s. 926, 1990.
4. Karagözler, A.A., Fare (Mus musculus) Karaciğeri Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Enzimi Aktivitesine Yüksek Karohidrat Diyetinin Etkisinin İncelenmesi. İnönü Üniv. Yay. (Yüksek Lisans Tezi), 1987.
5. Yüksel, E., Cytogenetic Study in Spalax (Rodentia: Spalacidae) From Turkey. Communications Serie C: Biologie Tome 2, pp. 1-12, 1985.
6. Gözükara, E.M., Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase From Rat Liver. Hacettepe Bulletin of Natural Sciences and Engineering, Vol. 3, pp. 1-15, 1974.
7. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Rondall, J.R., Protein Measurement With the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275, 1951.
8. Nevo, E., Adaptive Convergence and Divergence of Subterranean Mammals, Ann. Rev. Ecol. Syst., 10: 269-308, 1979.

9. Heth, G. and Nevo, E., Origin and Evolution of Ethological Isolation in Subterranean Mole Rats, *Evolution*, 35: 254-274, 1981.
10. Wahrman, J., Gotein, R. and Nevo, E., Geographic Variation of Chromosomal Forms in Spalax, a Subterranean Mammal of Restricted Mobility, *Comparative Mammalian Cytogenetics*, Springer Verlag, New York, 30-48, 1969.
11. Wahrman, J., Gotein, R. and Nevo, E., Mole Rat Spalax: Evolutionary significance of the Chromosome Variation. *Science*, 164: 82-84, 1969.
12. Kence, A., Bozcuk, A.N., Yazgan, Ş., Türkiye'de Yayılan Kara Sinek Toplulukları Arasında Eşeyssel İzolasyon ve Genetik Farklılaşma. *Doğa Bilim Der.Temel Bilim*, 5, 173-78, 1981.