

T.C.  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

İNSAN ERİTROSİTLERİNDEN GLUKOZ-6-FOSFAT DEHİDROGENAZ  
ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI PESTİSİTLERİN ENZİM  
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DİLEK CİCİ

Balıkesir, Eylül-2007

T.C.  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

İNSAN ERİTROSİTLERİNDEN GLUKOZ-6-FOSFAT DEHİDROGENAZ  
ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI PESTİSİTLERİN ENZİM  
ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DİLEK CİCİ

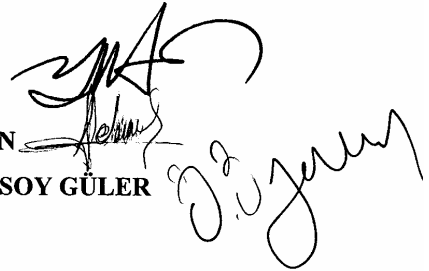
Tez Danışmanı: Doç. Dr. Yusuf TURAN

Sınav Tarihi: 10.09.2007

Jüri Üyeleri: Doç. Dr. Yusuf TURAN

Yrd. Doç. Dr. Selma SİNAN

Yrd. Doç. Dr. Özen ÖZENSOY GÜLER



Balıkesir, Eylül-2007

## ÖZET

### İNSAN ERİTROSİTLERİNDEN GLUKOZ-6-FOSFAT DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI PESTİSİTLERİN ENZİM ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Dilek CİCİ

Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı

(Yüksek Lisans Tezi /Tez Danışmanı: Doç. Dr. Yusuf TURAN)

Balıkesir, 2007

Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (D-glukoz-fosfat:NADP<sup>+</sup> oksidoredüktaz, EC 1.1.1.49; G6PD) insan eritrositlerinden saflaştırıldı. Saflaştırma işlemi, hemolizatin veya homojenatın hazırlanması, amonyum sülfat çöktürmesi ve 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi olarak üç basamaktan oluştu. Eritrosit G6PD enzimleri %14,68 verimle, spesifik aktiviteleri 120,13 U/mg olarak elde edildi. Tüm saflaştırma işlemleri sonunda insan eritrosit G6PD enzimi 2742,69 kat saflaştırıldı. SDS poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzimin saflığı belirlendi. Enzim aktiviteleri spektrofotometrik olarak 840nm'de Beutler metoduna göre ölçüldü.

Ayrıca insan eritrosit G6PD enziminin aktivitesi üzerine bazı pestisitlerin *in vitro* etkileri araştırıldı.

**ANAHTAR SÖZCÜKLER:** Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, Saflaştırma, Afinite kromatografisi, (RS)-5-etil-2-(4-izopropil-4-metil-5-okzo-2-imidazolin-2-yl) nikotinic asit, (2,4-Diklorofenoksiasetik asit dimetilamin), (N-(Fosfonometil)glisin), (Propil3-(dimetilamino)propilkarbomat hidroklorit)

## ABSTRACT

### PURIFICATION OF GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE FROM HUMAN ERYTHROCYTES AND INVESTIGATION OF EFFECTS OF SOME PESTICIDES

Dilek CİCİ

Balikesir University , Institute of Science, Department of Biology

(MSc. Thesis / Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Yusuf TURAN)

Balikesir, Turkey, 2007

In this study, glucose-6-phosphate dehydrogenase (D-glucose-6-phosphate:NADP<sup>+</sup> oxidoreductase, EC 1.1.1.49;G6PD) was purified from human erythrocytes. The purification consisted of three steps; preparation of haemolysate or homogenate, ammonium sulphate fractionation and 2',5'-ADP Sepharose 4B affinity chromatography. Erythrocytes G6PD enzyme was obtained with a yield of %14,68 having a specific activity of 120,13 U/mg proteins respectively. The overall purification was about 2742,69-fold for erythrocytes G6PD. The purification enzyme was determined respectively by SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Enzymatic activity was spectrophotometrically measured according to Beutler method at 340nm.

In addition, in vitro effects of pesticides on human red blood cell G6PD enzyme activity was investigated.

**KEY WORDS:** Glucose-6-phosphate dehydrogenase, purification, affinity chromatography, (2,4-Dichlorophenoxy acetic acid dimethylamin), N-(Phosphonomethyl) glycine, (RS)-5-ethyl-2-(4-isopropyl-4-methyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)nicotinic acid, (Propyl(3(dimethylamino)propyl) carbamate hydrochlorid)

## İÇİNDEKİLER

|   |             |
|---|-------------|
| <b>ÖZET, ANAHTAR SÖZCÜKLER</b>  | <b>ii</b>   |
| <b>ABSTRACT, KEY WORDS</b>  | <b>iii</b>  |
| <b>İÇİNDEKİLER</b>  | <b>iv</b>   |
| <b>SEMBOL LİSTESİ</b>   | <b>viii</b> |
| <b>ŞEKİL LİSTESİ</b>  | <b>ix</b>   |
| <b>ÇİZELGE LİSTESİ</b>  | <b>x</b>    |
| <br>  |             |
| <b>ÖNSÖZ</b>  | <b>xi</b>   |
| <br>  |             |
| <b>1.GİRİŞ</b>  | <b>1</b>    |
| <br>  |             |
| 1.2 Pestisitlerin İnsan ve Çevre Üzerine Etkileri                                     | 8           |
| <br>  |             |
| 1.2.1 Pestisitlere Karşı Dayanıklılık Oluşumu   | 10          |
| <br>  |             |
| 1.2.2 Pestisitlerin Hedef Olmayan Organizmalar Üzerine Etkisi                         | 10          |
| <br>  |             |
| 1.2.3 Pestisitlerin İnsanlar Üzerine Etkileri   | 11          |
| <br>  |             |
| 1.2.4 Pestisitlerin Çevre Üzerine Etkileri  | 12          |
| <br>  |             |
| 1.2.5 Gıdaların Kontaminasyonu  | 13          |
| <br>  |             |
| 1.3 Çalışmalarımızda Kullanılan Pestisitler Ve Kullanım Yerleri                       | 14          |
| <br>  |             |
| 1.3.1 (RS)-5-etil-2-(4-izopropil-4-metil-5-okzo-2-imidazolin-2-yl)<br>nikotinic asit) | 14          |

|   |           |
|---|-----------|
| 1.3.2 (N-(Fosfonometil)glisin)  | 15        |
| 1.3.3 (2,4-Diklorofenoksiasetik asit dimetilamin)   | 15        |
| 1.3.4 (Propil3-(dimetilamino)propilkarbomat hidroklorit)  | 16        |
| 1.4 G6PD Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Bileşiklerin Etkilerinin Belirlenmesi<br>Üzerine Yapılan Çalışmalar                                  | 17        |
| <b>2. MATERYAL VE YÖNTEM</b>  | <b>24</b> |
| 2.1 Materyal  | 24        |
| 2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler  | 24        |
| 2.1.2 Yararlanılan Alet ve Cihazlar   | 24        |
| 2.1.3 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması   | 25        |
| 2.2 Yöntemler   | 27        |
| 2.2.1 İnsan Eritrositlerinden G6PD Enzimin Saflaştırılması ve İnhibisyonu<br>Çalışmaları ile İlgili Yöntemler                               | 27        |
| 2.2.1.1 Kan Numunelerinin Temini ve Hemolizat Hazırlanması  | 27        |
| 2.2.1.2 Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Diyaliz  | 27        |
| 2.2.1.3 2,5, ADP-Sepharose 4B Afinite Kolonunun Hazırlanması, İnsan Eritrosit<br>Hemolizatının Afinite Kolonuna Tatbiki ve G6PD'ın Elüsyonu | 28        |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.2.1.4 Sodyum dodesilsülfat-Poliakrilamid jel elektroforezi(SDS-PAGE) ile Enzim Saflığının Kontrolü                      | 29        |
| 2.3 Protein tayini  | 31        |
| 2.3.1 Kalitatif Protein Tayini  | 31        |
| 2.3.2 Bradford Yöntemi ile Protein tayini   | 32        |
| 2.4 Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz Enziminin Aktivite Tayini  | 33        |
| <b>3. BULGULAR</b>  | <b>36</b> |
| 3.1 Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik   | 36        |
| 3.2 İnsan Eritrositlerinden Glukoz -6-Fosfat Dehidrogenaz Enzimin Saflaştırılma ve İnhibisyon Çalışma Sonuçları           | 37        |
| 3.2.1 Amonyum Sülfatla Çöktürme Basamakları ve Sonuçları  | 37        |
| 3.2.2 Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Enziminin 2',5' ADP-Sepharose 4B Afinitite Kromatografisi ile Saflaştırılma Kademeleri | 37        |
| 3.2.3 Sodyum Dodesilsülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforez(SDS-PAGE) Sonucu  | 39        |
| 3.2.4 Giriş Bölümünde Bahsedilen Zirai İlaçların Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz Enzimi Üzerine Etkilerinin Sonuçları        | 40        |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.2.4.1 (2,4-Diklorofenoksiasetik asit dimetilamin) Sonuçları                                     | 40        |
| 3.2.4.2 (N-(Fosfonometil)glisin) Sonuçları  | 41        |
| 3.2.4.3 (RS)-5-etil-2-(4-izopropil-4-metil-5-okzo-2-imidazolin-2-yl) nikotinik asit)<br>Sonuçları | 42        |
| 3.2.4.4 (Propil3-(dimetilamino)propilkarbomat hidroklorit) Sonuçları                              | 43        |
| <b>4. TARTIŞMA VE SONUÇ</b>   | <b>45</b> |
| <b>KAYNAKÇA</b>   | <b>51</b> |



## SEMBOL LİSTESİ

| SİMGE             | ADI  | BİRİMİ |
|-------------------|--|--------|
| G6PD              | 6-fosfoglukanat dehidrogenaz                               | -      |
| ADP               | Adenozin difosfat  | -      |
| AMP               | Adenozin monofosfat  | -      |
| ATP               | Adenozin trifosfat   | -      |
| DEAE              | Dietilaminoetil selüloz                                    | -      |
| DNA               | Deoksiribonükleik asit                                     | -      |
| E                 | Enzim  | -      |
| E.C.              | Enzim kod numarası   | -      |
| EDTA              | Etilendiamin tetra asetil asit                             | -      |
| EU                | Enzim Ünitesi  | E.U.   |
| FAD               | Flavinadenindinükleotid(yükseltgenmiş hal)                 | -      |
| G6P               | Glukoz-6-fosfat  | -      |
| G6PD              | Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz                               | -      |
| GSH               | İndirgenmiş glutatyon                                      | -      |
| GSSG              | Yükseltgenmiş glutatyon                                    | -      |
| I                 | İnhibitör  | -      |
| I <sub>50</sub>   | %50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonu        | Mol/l  |
| [I]               | İnhibitör konsantrasyonu                                   | Mol/l  |
| i.m.              | Adele içine  | -      |
| i.v.              | Damar içine  | -      |
| NAD <sup>+</sup>  | Nikotinamid adenin dinükleotid(yükseltgenmiş hal)          | -      |
| NADP <sup>+</sup> | Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat(Yükseltgenmiş hal)   | -      |
| NADPH             | Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat(indirgenmiş hal)     | -      |
| OD                | Optik dansite  | -      |
| P                 | Ürün   | -      |
| PAGE              | Poliakrilamid jel elektroforezi                            | -      |
| RNA               | Ribonükleik asit   | -      |
| S                 | Substrat   | -      |
| SDS               | Sodyum dodesilsülfat                                       | -      |
| TCA               | Triklor asetik asit  | -      |
| TEMED             | N,N,N <sup>1</sup> , N <sup>1</sup> - tetrametiletildiamin | -      |
| TRIS              | Trihidroksimetil amino metan                               | -      |

## ŞEKİL LİSTESİ

|   |    |
|---|----|
| Şekil 1.1 Pentoz Fosfat Metabolik Yolunun Oksidatif ve Nonoksidatif Reaksiyonları...  | 3  |
| Şekil 1.2 Eritrositlerdeki G6PD Metabolizması.....  | 6  |
| Şekil 1.3 (RS)-5-ethyl-2-(4_metyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)=nicotinic acid.....  | 14 |
| Şekil 1.4 N-(phosphonomethyl)glycine.....   | 15 |
| Şekil 1.5 (2,4- dichlorophenoxy)acetic acid).....   | 16 |
| Şekil 1.6 Propyl 3-(dimethylamino)propylcarbamate hydrochloride.....  | 16 |
| Şekil 3.1 Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik.....  | 36 |
| Şekil 3.2 Affinite kromatografisi ile saflaştırılan insan eritrosit G6PD enziminin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi fotoğrafı.....   | 39 |
| Şekil 3.3 İnsan Eritrosit G6PD enzimi için 4 farklı pestisid konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite-(2,4-Dichlorophenoxyacetic acid dimethylamin) grafiği.....                                   | 41 |
| Şekil 3.4 İnsan Eritrosit G6PD enzimi için 4 farklı pestisid konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite-( N-(Phosphonomethyl) glycine grafiği.....   | 42 |
| Şekil 3.5 İnsan Eritrosit G6PD enzimi için 4 farklı pestisid konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite-((RS)-5-ethyl-2-(4-isopropyl/-4-methyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl) nicotinic acid) grafiği..... | 43 |
| Şekil 3.6 İnsan Eritrosit G6PD enzimi için 4 farklı pestisid konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite-(Propyl( 3-(dimehylamino)propylcarbomethylhydroclorid) grafiği.....                          | 44 |

## ÇİZELGE LİSTESİ

|  |    |
|--|----|
| <b>Çizelge 2.1</b> İnsan Eritrosit G6PD Enzimi için spektrofotometrede numune küvet içeriği.....   | 33 |
| <b>Çizelge 2.2</b> İnsan Eritrosit G6PD Enzimi için spektrofotometrede kontrol küvet içeriği.....  | 34 |
| <b>Çizelge 3.1</b> İnsan eritrosit glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminin saflaştırma basamakları.....   | 38 |
| <b>Çizelge 3.2</b> İnsan G6PD enzimi (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid dimethylamin) çözeltisi miktarları ile insan G6PD enzimi üzerine kullanılan çözelti miktarları ve altta bunlara karşılık gelen pestisit konsantrasyonları.....                                  | 40 |
| <b>Çizelge 3.3</b> İnsan G6PD enzimi(N-(Phosphonomethyl) glycine) çözeltisi miktarları ile insan G6PD enzimi üzerine kullanılan çözelti miktarları ve altta bunlara karşılık gelen pestisit konsantrasyonları.....   | 41 |
| <b>Çizelge 3.4</b> İnsan G6PD enzimi((RS)-5-ethyl-2-(4-isopropyl/-4-methyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl) nicotinic acid) çözeltisi miktarları ile insan G6PD enzimi üzerine kullanılan çözelti miktarları ve altta bunlara karşılık gelen pestisit konsantrasyonları..... | 42 |
| <b>Çizelge 3.5</b> İnsan G6PD enzimi(Propyl (3(dimethylamino) propylcarbamatehydroclorid) çözeltisi miktarları ile insan G6PD enzimi üzerine kullanılan çözelti miktarları ve altta bunlara karşılık gelen pestisit konsantrasyonları.....                           | 43 |
| <b>Çizelge 3.6</b> Çalışmamızda kullanılan dört pestisid için $I_{C50}$ değerleri.....   | 44 |

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans çalışmalarım esnasında desteğini gördüğüm, insanlara yaklaşımını ve bilimsel yönlerini kendime örnek aldığım çok kıymetli danışman hocam sayın Doç. Dr. Yusuf TURAN'a öncelikle şükranlarımı arz ederim.

Çalışmalarında yardımlarını gördüğüm ve her konuda desteklerini esirgemeyen sayın Yrd. Doç. Dr. Selma SİNAN'a teşekkür gönül borcumdur.

Yüksek lisans tezimin deneysel aşamalarını gerçekleştirmiş olduğum Balıkesir Üniversitesi Temel Bilimler Araştırma ve Uygulama Merkezi (BÜTAM)'ne teşekkür ederim.

Ayrıca beni her şeyin başarılabilir olduğuna inandıran; yaşamı kolaylıkla göğüslemeyi ve yılmamayı öğreten ailemin her bir ferdine sonsuz sevgiler.

Son olarak yüksek lisans çalışmalarım esnasında benden maddi ve manevi desteğini esirgemeyen sevgili eşime sonsuz teşekkürlerimi belirtmek isterim.

Balıkesir, 2007

Dilek CİCİ

## 1. GİRİŞ

Enzimler, canlı organizmalarda kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürün oluşmasına fırsat vermeden spesifik olarak %100 'lük bir verim sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Proteinlerin en büyük ve en özelleşmiş grubunu oluşturur. Katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu hariç olmak üzere, bütün enzimler protein yapısındadır. Enzimlerin katalizleme güçleri, turnover sayısı ile ifade edilir. Turnover sayısı, birim zamanda 1 mol enzimin ürüne dönüştürdüğü substratın mol sayısıdır. Turnover sayısı en yüksek olan enzim,  $40.000.000 \text{ s}^{-1}$  ile katalazdır [1].

Bugün bir çok enzim tanımlanmış, büyük bir kısmı saf halde elde edilip kinetikleri incelenmiş ve kristallendirilmiştir. Ancak yapılan genetik çalışmalar daha tespit edilmemiş bir çok enzimin varlığını göstermektedir. Enzimlerin üzerinde etkili oldukları ve ürüne dönüştürdükleri bileşiklere substrat adı verilir. Bazı enzimler substrat adının sonuna -az son eki getirilerek adlandırılırken, bazıları da ilk bulucularının ortaya attıkları isimlerle tanınmaktadır. Fosfataz, üreaz, lipaz, tripsin ve pepsin gibi. Fakat bu isimlerin çoğu enzimlerin fonksiyonları hakkında eksik bilgi verdiği için Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB) tarafından sistematik bir sınıflandırma yapılmıştır. Ayrıca her bir enzim için 4 rakamlı enzim kod numarası (E.C.) öngörülmüştür [2].

Enzimlerin aktivitelerini pozitif yönde etkileyen bileşiklere aktivatör adı verilir. Genellikle enzim aktivatörleri küçük iyonlar veya fazla büyük olmayan moleküllerdir. Bunlar kofaktörlerin aksine kataliz olayına her zaman katılmazlar. Aktivatörleri iki grupta toplamak mümkündür. Birinci gruptakiler sadece substratla birleşerek aktivatör rolü oynayan bileşiklerdir. İkinci gruptakiler ise serbest enzimle birleşerek aktivatör rolü oynayan bileşiklerdir [3].

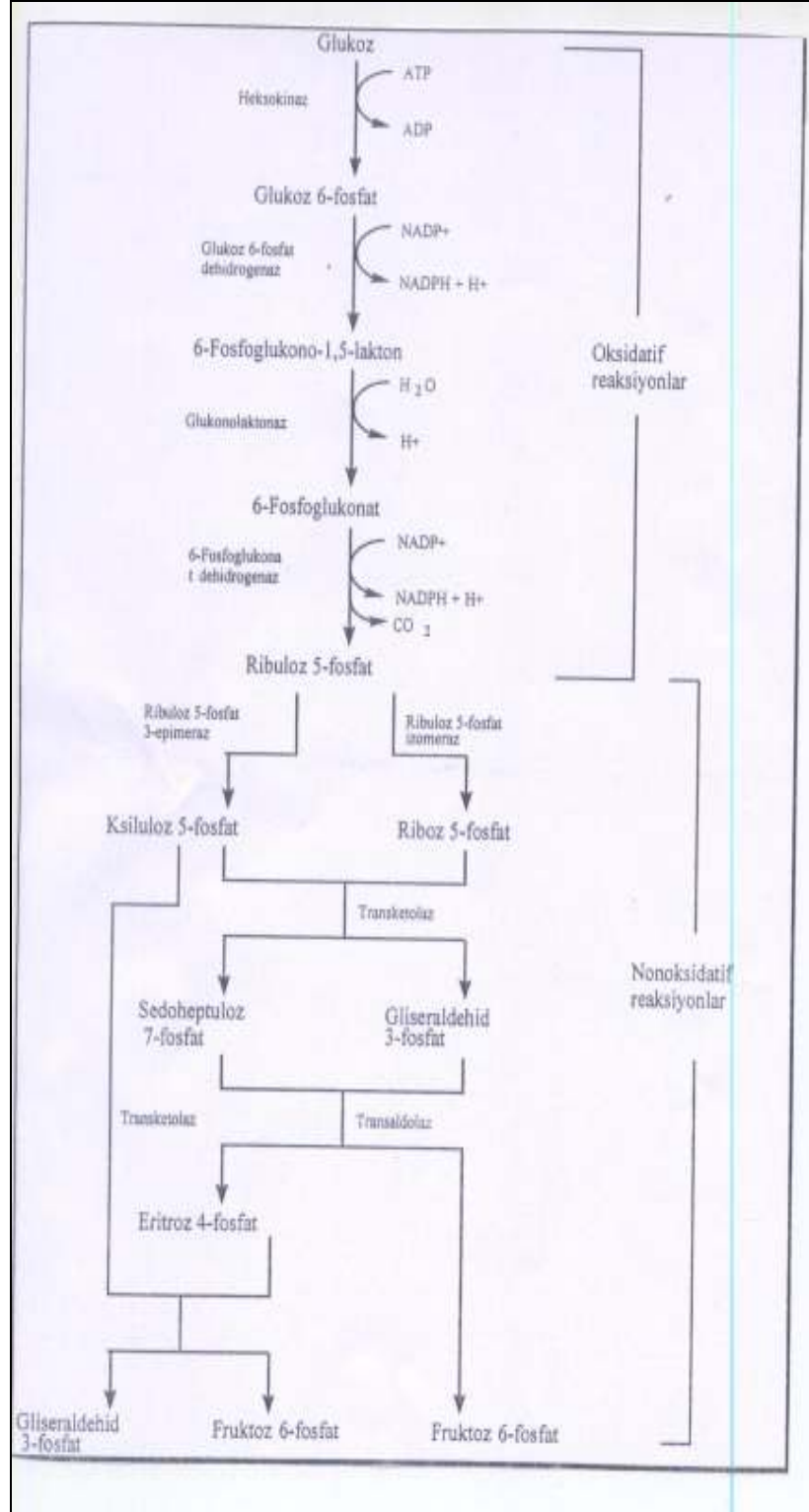
Enzimlerin, bazı bileşikler tarafından hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak aktivitelerinin azaltılması ve hatta yok edilmesi olayına inhibisyon adı verilir. Buna sebep olan bileşiklere de inhibitör denilir. İnhibitörler, genellikle küçük molekül ağırlığına sahip bileşik veya iyonlardır. Enzimatik aktivitenin inhibisyonu, biyolojik sistemlerde başlı başına bir kontrol mekanizması oluşturur. Bu yüzden enzim inhibisyonu büyük bir önem arz etmektedir. Birçok ilaç ve zehirli bileşik fonksiyonlarını bu yolla gerçekleştirirler. Enzim etki mekanizmalarının incelenmesinde de inhibisyon olayından faydalanılır [4].

**Pentoz fosfat metabolik yolu** bazen pentoz yan yolu, heksoz monofosfat yolu veya fosfoglukonat oksidatif yolu olarak da isimlendirilebilir. Bu reaksiyon serisinin aydınlatılmasında ilk adım, 1931 yılında Otto Warburg tarafından atılmış ve tamamı Fritz Lipmann, Frank Dickens, Bernard Horecker ve Efraim Racker isimli biyokimyacılar tarafından ortaya konulmuştur [4,5].

Pentoz fosfat metabolik yolu eritrosit ve beyin hücrelerin temel enerji kaynağı olan glukozun oksidasyonu için tek oksidatif yoldur [6]. Pentoz fosfat metabolik yolu, glikoliz yoluna bir alternatif yol olarak düşünülse de her iki yolun hücredeki fonksiyonları ve hücredeki ihtiyaç alanları farklıdır. Glikoliz, daha çok Krebs döngüsü ile birlikte hücre içi enerji gereksiniminin giderilmesinden sorumludur [10]. Bununla birlikte pentoz fosfat metabolik yolu, oksidatif ve nonoksidatif olmak üzere iki aşamada gerçekleşir ve bu yolun hedefi indirgeyici olaylar için gerekli NADPH'ı üretmek ve ATP, NAD<sup>+</sup>, FAD, DNA, RNA, gibi bileşikler için ön madde olan riboz-5-fosfat sentezlemektir. Bu olayın toplam reaksiyonu şöyledir:



Pentoz fosfat metabolik yolu aynı zamanda üç,dört,beş,altı ve yedi karbonlu şekerlerin oksidatif olmayan bir seri reaksiyonla birbirlerine dönüştürülmesini de katalizler. Bitkilerde pentoz fosfat yolunun bir bölümü, fotosentez olayı ile CO<sub>2</sub> 'den glukozun sentezlenmesinde de rol alır [4,11]. Pentoz fosfat metabolik yolunun oksidatif ve nonoksidatif reaksiyonları Şekil 1.1 de gösterilmiştir.



**Şekil 1.1** Pentoz Fosfat Metabolik Yolunun Oksidatif ve Nonoksidatif Reaksiyonları [38]

**Glukoz-6 fosfat dehidrogenaz** (D-Glukoz 6-fosfat: NADP<sup>+</sup> oksidoredüktaz, EC 1.1.1.49, G6PD), NADP<sup>+</sup>'nin indirgenmesiyle birlikte glukoz 6-fosfat'ın 6-fosfoglukuno-1,5-laktona'ya dönüşmesini katalizleyen düzenleyici bir enzimdir. Bu reaksiyon pentoz fosfat metabolik yolunun ilk ve hız sınırlayıcı basamağıdır [12]. Bu enzim NADP<sup>+</sup>'ye karşı son derece spesifiktir ve NAD<sup>+</sup> için K<sub>M</sub> değeri NADP<sup>+</sup> için olandan yaklaşık 1000 misli fazladır. Bu reaksiyonun ürünü C-1 karboksili ile C-5 hidroksil grubu arasında oluşan bir molekül içi estere sahip olan 6-fosfoglukuno-1,5-laktondur. Bundan sonraki basamak 6-fosfoglukuno-1,5-laktonun laktonaz enzimi katalizörlüğünde 6-fosfoglukonata hidrolizidir. Bu altı karbonlu şeker daha sonra oksidatif dekarboksilasyonla ribuloz-5-fosfata dönüşür. Bu reaksiyonda koenzimi yine NADP<sup>+</sup> olan 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enzimi görev alır. Riboz-5-fosfat sentezindeki son basamak Ribuloz-5-fosfatın izomerleşme reaksiyonudur.

NADPH, indirgeyici biyosentez olaylarında yaygın bir şekilde kullanılan ve pentoz fosfat yolunun önemli bir ürünüdür. Ayrıca, oksidatif hasara karşı hücrenin korunmasında temel teşkil etmektedir [11]. Üretilen NADPH' lar genel olarak;

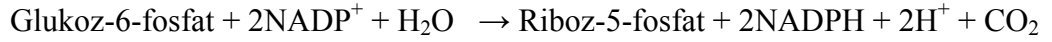
- Yağ asitlerinin sentezi,
- Steroidlerin sentezi,
- Bazı aminoasitlerin sentezi,
- İndirgenmiş glutatyon sentezi ve peroksitlerin ortadan kaldırılması,
- İlaç detoksifikasyonu,
- DNA sentezi için ribonükleotidlerin deoksiribonükleotidlere dönüşmesi gibi birçok indirgeyici biyosentez olaylarında kullanılırlar [11].

Yukarıda maddeler halinde belirttiğimiz reaksiyonlar sonucu bir glukoz molekülü başına iki NADPH ve riboz-5-fosfat meydana gelmektedir. Pentoz fosfat yoluna giren glukoz 6-fosfat, hücrenin NADPH, riboz-5-fosfat ve ATP ihtiyacına göre dört farklı şekilde reaksiyona girer [4,7,12].



1- Riboz-5-fosfata NADPH'dan daha fazla ihtiyaç varsa, glukoz 6-fosfatın çoğu glikolizle fruktoz-6- fosfat ve gliseraldehid-3- fosfata çevrilir. Daha sonra transketolaz ve transaldolaz enzimleriyle reaksiyonların dönüşümlü işlemesi sonucu bir molekül gliseraldehid-3- fosfat ve iki molekül fruktoz-6-fosfat, üç molekül riboz-5- fosfata dönüştürülür.

2- Riboz-5- fosfat ve NADPH ihtiyacını eşit olduğu durumda; pentoz fosfat yolunun oksidatif reaksiyonları devreye girmektedir. Bu reaksiyonların stokiyometrik denklemi şöyledir:

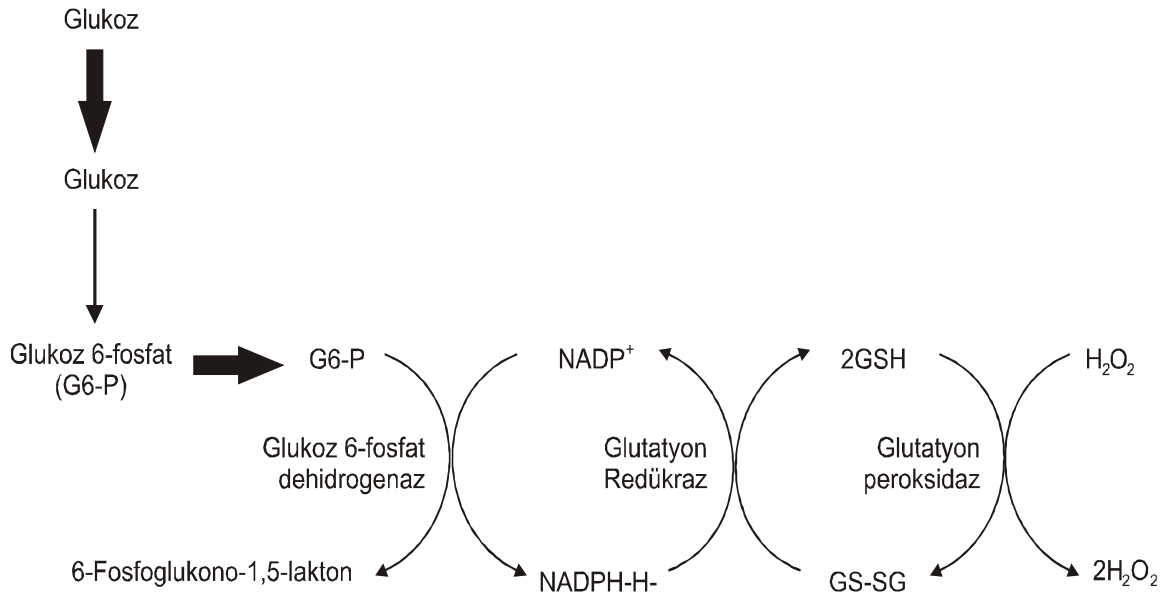


3- NADPH'a riboz-5-fosfattan daha fazla ihtiyaç olduğu durumda; glukoz-6-fosfat tamamen CO<sub>2</sub>'ye yükselgenir ve bu da üç grup reaksiyonla gerçekleştirilir. Birincisinde iki NADPH ve bir riboz-5-fosfat oksidatif olarak sentezlenir. Daha sonra riboz-5-fosfat, transketolaz ve transaldolaz enzimleriyle fruktoz-6-fosfat ve gliseraldehid-3-fosfata dönüştürülür. Son olarak da glukoneogenez reaksiyonlarıyla-3-fosfat ve fruktoz-6-fosfattan glukoz-6-fosfat tekrar sentezlenir.

4- Riboz-5-fosfattan daha fazla NADPH'a ve bununla birlikte ATP'ye ihtiyaç duyulduğu durumda; glukoz-6-fosfat piruvata dönüşür. Riboz-5-fosfattan türetilen fruktoz-6-fosfat ve gliseraldehit-3-fosfat glukoneogenez yerine glikoliz yoluyla piruvata kadar yükseltgenir. Bu arada NADPH ve ATP bereberce sentezlenmiş olur [4,7,12].

Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi birçok hücrede NADP<sup>+</sup> 'nin indirgenmesine eşlik ederek glukoz-6-fosfatın (G6P) 6-fosfoglukono-1,5-lakton'a dönüşümünü katalizleyen düzenleyici bir enzimdir. Dolayısıyla, bu enzim çoğu hücrede NADPH'ın tek kaynağı olan pentoz fosfat metabolik yolunun ilk ve kilit enzimidir [4,15-19].

İlk defa Warburg tarafından alyuvar ve bira mayasında belirlenen bu enzim, bir çok indirgeyici biyosentez olaylarının meydana gelmesinde, sülfhidril gruplarının sürekliliğinin sağlanmasında, serbest radikallerin ve peroksitlerin detoksifikasyonunda görev alan indirgenmiş glutatyonun oluşumunda indirgeyici rol oynayan NADPH, temel olarak pentoz fosfat metabolik yolunun ilk enzimi olan bu enzim tarafından katalizlenen glukoz 6-fosfat'ın 6-fosfoglukono-1,5-lakton'a dönüşümü sırasında elde edilmektedir(şekil1.2) [4,12,20,22-27].



**Şekil 1.2** Eritrositlerdeki G6PD Metabolizması[38]

Pentoz fosfat metabolik yolu ile ilgili radyoaktif <sup>14</sup>C ile işaretlenmiş glukoz ile yapılan denemeler, bu yolun kas dokularından çok adipoz dokuda aktif olduğunu göstermiştir. Bu sonuç pentoz fosfat metabolik yolunun başlıca rolünün, indirgeyici biyosentez olaylarında kullanılmak üzere, NADPH üretmek olduğu iddiasını desteklemektedir. Çünkü, yağ dokusu hücrelerinde asetil CoA'dan yağ asitlerinin biyosentezine de büyük miktarda NADPH kullanılmaktadır [4,14].

GSH/GSSG oranı alyuvarlarda yaklaşık 500 dür. İndirgenmiş glutatyon (GSH), ilaç ve detoksifikasyonu ve hidrojen peroksitlerin uzaklaştırılması reaksiyonlarında

önemli bir role sahiptir. Bu rol özellikle karaciğerde çok önemlidir. Çünkü detoksifikasyon olayı karaciğer mikrozomlarında bulunan sitokrom P-450 sistemi tarafından gerçekleştirilir. Bu sistemin işleyişinde oksijen molekülüne yeterli miktarda elektron aktarılmazsa süperoksit radikali( $O_2^-$ ) veya peroksit ( $H_2O_2$ ) oluşur. Hücrede bu zararlı iyonları zararsız hale getirecek sistem mevcuttur. Süperoksit dismutaz ve katalaz enzimleri, hücrede oksidatif strese sebep olan süperoksit radikali ve peroksit'in suya dönüşmesine sebep olarak hücre membranı proteinlerinin hasar görmesini önlerler. Bu enzimlerin fonksiyonu askorbik asit, indirgenmiş glutatyon (GSH) ve K vitamini tarafından güçlendirilir.

Normal eritrosit hücre yapısının devamı ve hemoglobindeki demir iyonunun +2 halinde korunması için GSH zorunludur. Düşük seviyede GSH ihtiva eden alyuvarların daha çok hemolize maruz kaldıkları tespit edilmesine rağmen sebepleri henüz ortaya konulmamıştır [4,12,17,22,25]. GSH seviyesindeki düşme, lens proteinlerinin çözünürlüğünün azalmasını teşvik edeceğinden lenste önemli bir role sahiptir [28,29].

Lens vücuda en fazla protein içeriğine sahip olan ve tek hücre tipinden meydana gelen bir dokudur [30]. Lensteki toplam protein miktarının yaklaşık % 90'ını kristalinler içermektedir [30,31].

Lenste metabolizmada kullanılabilir glukozun %14'ü pentoz fosfat metabolik yolu ile kullanılır [31]. Bu yol pek çok biyokimyasal reaksiyon için kritik bir öneme sahip olan NADPH'ın üretimi için olduğu kadar nükleik asitlerin sentezi için gerekli olan pentozları üretir [31]. NADPH'ın lensteki en önemli görevi okside glutatyonu (GSSG) indirgenmiş glutatyonla çevirerek lensin opaklaşmasını önlemektir.

Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi glukoz 6-fosfatın, 6-fosfoglukono  $\delta$ -laktone oksidasyonunu katalizler;



Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminin aktivitesinin tayini için yukarıdaki reaksiyonda görüldüğü gibi, reaksiyon sonunda oluşan NADPH göz önüne alınır. NADPH 340 nm'de absorbands verir. Dolayısıyla enzimin aktivitesi 25 °C'de NADP<sup>+</sup>'nin indirgenmesi sonucu oluşan, NADPH'ın 340 nm'de absorbsiyon vermesiyle spektrofotometrik metodla absorbsiyon artışı sonucu ölçülür. 1 mM NADP<sup>+</sup> indirgendiğinde (1 ml hacimde ve 1 cm ışık yolunda), spektrofotometrede 340 nm dalga boyunda okunduğunda 6,22 OD (optik dansite) verir. Yukarıdaki reaksiyonlarda görüldüğü gibi glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminin katalizlediği reaksiyonda 1 mol substrat (G6P) reaksiyona girdiğinde, 1 mol NADPH oluşur [32].

G6PD eksikliğinden dolayı heterozigotların eritrosit hücreleri sıtmanın sebebi bir parazit olan "*Plasmodium falciparum*" a karşı dirençlidirler. *Plasmodium falciparum* gelişmesi için NADPH gerekir. Heterozigotların eritrosit hücreleri kendi ihtiyaçlarını karşılayacak yeterli miktardaki NADPH'ı üretirler fakat sıtma parazitinin optimum gelişimi için yeterli değildir [33]. Pamakiun gibi sıtma tedavisinde kullanılan ilaçlar eritrosit hücrelerindeki NADPH'ın konsantrasyonunu daha da düşürürler. Pamakiun molekül kısmı yapısal olarak NADP<sup>+</sup>'nin nikotinamid halkasına analogdur. Bu ilaç, pamakuinin piridin grubuna kendiliğinden elektron transferiyle nonenzimatik olarak indirgenir. G6PD eksikliğinden dolayı düşük konsantrasyonda NADPH'a sahip olan kişilere pamakuin uygulandığında, NADPH konsantrasyonu indirgenmiş haldeki glutatyonu(GSH) üretemeyecek seviyeye düşecektir. Böylece eritrosit membran proteinleri ve membran lipidlerinin oksidasyonu akut hemolitik anemi olarak bilinen bir durumu ortaya çıkaran eritrosit hemolizini netice verir. Bu durum ölümle sonuçlanabilir [33].

## 1.2 Pestisitlerin İnsan ve Çevre Üzerine Etkileri

İnsanlar kolay veya parasız sahip oldukları nimetlerin değerini maalesef bilmemekte, bu nimetleri hem hor, hem de hiç bitmeyecek gibi bol kullanmaktadır. Bunun sonucu oluşan gıda, hava, su ve toprak kirliliği buna en güzel örnektir. Yoğun ve bilinçsiz bir şekilde kullanılan ve çevre kirliliğine neden olan etkenlerden biri olan

pestisitler, ekonomik bir şekilde üretilmeleri ve kullanım kolaylığı nedeniyle; ürünü hastalıkların, böceklerin, yabancı otların ve diğer zararlıların olumsuz etkilerinden koruyarak verim ve kaliteyi güvence altına almayı amaçlayan tarımsal savaşımında çok önemli bir yer tutmaktadır.

Pestisit deyimi, insektisit (böcek öldürücü), herbisit (yabani ot öldürücü), fungusit (küf öldürücü), rodentisit (kemirgen öldürücü) vb. şeklinde sınıflandırılan kimyasal maddelerin tümünü kapsamaktadır. Pestisitler, etkili maddelerinin kökenlerine göre de gruplara ayrılabilir:

1. İnorganik maddeler
2. Doğal organik maddeler
  - a) Bitkisel maddeler
  - b) Petrol yağları vb.
3. Sentetik organik maddeler
  - a) Klorlu hidrokarbonlar
  - b) Organik fosforlular
  - c) Diğer sentetik organik maddeler ( azotlu bileşikler, piretroidler)

Pestisitlerin kullanımı çok eski tarihlere dayanmaktadır. M.Ö. 1500'lere ait bir papirüs üzerinde bit, pire ve eşek arılarına karşı insektisitlerin hazırlanışına dair kayıtlar bulunmuştur. 19.yy'da zararlılara karşı inorganik pestisitler kullanılmış, 1940'lardan sonra pestisit üretiminde organik kimyadan faydalanılmış, DDT ve diğer iyi bilinen insektisit ve herbisitler keşfedilmiştir. Bugüne kadar 6000 kadar sentetik bileşik patent almasına karşın, bunlardan 600 kadarı ticari kullanım olanağı bulmuştur. Ülkemizde tarımı yapılan kültür bitkileri, sayıları 200'ü aşan hastalık ve zararlıların tehdidi altında olup yeterli savaşım yapılmadığı için toplam ürünün yaklaşık 1/3'i kayba uğramaktadır. Bu kayıpların önlenmesi bakımından pestisitlerin daha uzun yıllar büyük bir kullanım potansiyeline sahip olacağı kuşkusuzdur. Formülasyon olarak 30 000 ton civarında olan pestisit kullanımımızda en yoğun kullanılan gruplar sırasıyla herbisitler, insektisitler, fungusitler ve yağlardır.

Bununla beraber, yoğun ve bilinçsiz pestisit kullanımının sonucunda gıdalarda, toprak, su ve havada kullanılan pestisitlerin kendisi ya da dönüşüm ürünleri kalabilmektedir. Hedef olmayan diğer organizmalar ve insanlar üzerinde olumsuz etkileri görülmektedir. Pestisit kalıntılarının önemi ilk kez 1948 ve 1951 yıllarında insan vücudunda organik klorlu pestisitlerin kalıntılarının bulunmasıyla anlaşılmıştır. Pestisitlerin bazıları toksikolojik açıdan bir zarar oluşturmazken, bazılarının kanserojen, sinir sistemini etkileyici ve hatta mutasyon oluşturucu etkiler saptanmıştır. Pestisit kalıntılarının en önemli kaynağı gıdalardır. Bu nedenle 1960 yılında FAO ve WHO “Pestisit Kalıntıları Kodeks Komitesi”ni kurmuşlar ve bu komitenin çalışmaları sonucu konu ile ilgili tanımlamalar yapılmış, bilimsel araştırma verilerine dayanılarak gıdalarda bulunmasına izin verilen maksimum kalıntı değerleri saptanmıştır. Ülkemizde de tarımsal ürünlerde kullanılan pestisitlerin gıdalarda bulunması müsaade edilebilir maksimum miktarları ürün ve ilaç bazında belirlenmiştir. Bu bilgilere Tarım Bakanlığının Web sayfasından kolaylıkla ulaşmak mümkündür.

### **1.2.1 Pestisitlere Karşı Dayanıklılık Oluşumu**

Savaşlarda kullanılan pestisitlere karşı zararlı ve hastalıkların dayanıklılık kazandıkları bilinmektedir. Dayanıklılığın pratikteki anlamı hastalık ve zararlıların daha önce kendilerine karşı başarıyla uygulanan toksik maddelerden artık etkilenmedikleridir. 1970’de dayanıklı olarak saptanan tür sayısı 244 iken, 1980’de bu sayı 428’e yükselmiştir. Tarımsal ürün zararlılarında meydana gelen çeşitli tipteki dayanıklılıklar sonucunda pestisitlerin etkinliğindeki azalmayı aşmak için daha yüksek dozlarda uygulama gerekmekte, bu da hem maliyetin artmasına ve ürün veriminde azalmalara yol açmakta, hem de üründe ve çevrede kalıntı miktarının ve kirliliğin artmasına neden olmaktadır.

### **1.2.2 Pestisitlerin Hedef Olmayan Organizmalar Üzerine Etkisi**

Hemen bütün insektisitler spesifik olmadıkları için sadece hedef organizmaları öldürmez, omurgalı ve omurgasız diğer organizmaları da etkilerler. Zararlı etkilerin

şiddeti, insektisit ve formülasyonun tipine, uygulama şekline ve tarımsal arazinin tipine bağlı olarak değişmektedir. En genel yan etkiler şunlardır:

1. Arılar, kuşlar ve balıklar, mikroorganizmalar ve omurgasızlar gibi hedef olmayan organizmalarda ölümler,
2. Kuş, balık ve diğer organizmalarda üreme potansiyelinin azalması,
3. Hedef olmayan organizmalarda dayanıklılık oluşması sonucu insanlara hastalık taşıyan böcek ve parazitlerin kontrolden çıkması,
4. Ekosistemin yapısının ve türlerinin sayılarının değişmesi gibi uzun dönemli etkiler.

### **1.2.3 Pestisitlerin İnsanlar Üzerine Etkileri**

Pestisitlerin insanlarda belirli miktarlarda toksik olmaları nedeniyle savaşta çalışan herkesin bunların kullanımı sırasında meydana gelebilecek potansiyel zarardan sakınmaları gerekir. İnsanların pestisitlere maruz kalması mesleki zehirlenmeler veya kaza ile meydana gelebilmektedir. Her iki tür zehirlenmenin ana nedenleri:

1. Halkın bu konuda yetersiz eğitime sahip olması ve pestisitlerin toksisite potansiyellerinin bilinmemesi,
2. Uygun olmayan koşullarda depolama,
3. Kaza ile saçılma sonucu gıdaların kontamine olması,
4. Dikkatsiz yükleme ve taşıma,
5. Yıkanmamış pestisit kaplarının kullanımı,
6. Genel bakım ve atık değerlendirme işlemleri

Mesleki zehirlenmeler, üretim, formülasyon hazırlama, taşıma, yükleme ve uygulama sırasında deri ve solunum yoluyla maruz kalma (akut zehirlenme) olarak tanımlanabilir. Daha çok organik fosforlar ve karbamatlılar bu tip zehirlenmeye neden olurlar. Bunlar vücutta kolin esterase enzimini inhibe ederek asetil kolin birikimine yol açarlar. Kaza ile meydana gelen zehirlenmelerde pestisitlerin yaprak ve topraktaki kalıntıları veya onların toksik dönüşüm ürünleriyle temas sonucu hastalıklar meydana gelebilmektedir. Aşırı dozlarda alınmadıkça organik klorlu pestisitlerin

insanlara akut zehirlilikleri enderdir. Bu bileşikler daha çok kronik zehirlenmeler meydana getirmektedir. Sinir sistemini etkiler ve karaciğere zarar verirler. Son yıllarda ilaçların besin maddelerindeki kalıntılarının insanlar için kronik toksisitesi iki şekilde ele alınmaktadır:

1. Kabul edilebilir günlük alım (Acceptable Daily Intake-ADI): Bir kişinin bir günde alabileceği kabul edilebilir günlük ilaç miktarını mg/kg olarak ifade eden değerdir.

2. Maksimum kalıntı limitleri (Maximum Residue Limits-MRL): Gıda maddelerinde bulunmasına izin verilen en fazla ilaç miktarını (ppm) ifade eden değerdir.

“Codex Alimentarius”, USEPA (United States Environmental Protection Agency) gibi kuruluşların bu değerleri içeren listeleri mevcuttur. Bu miktarlar tarımsal ürünlerin dış pazarlaması bakımından da önemlidir. Zira tolerans miktarını aşan değerlerde pestisit kalıntısı tespit edilen tarımsal ürünler alıcı ülkeler tarafından geri çevrilmektedir.

Pestisitlerin kalıntı yoluyla kronik toksisiteleri yanında bazılarının insanlarda mutajenik, teratojenik ve kanserojen etkilerinin de olduğu son yıllarda yapılan çalışmalarla saptanmıştır.

#### **1.2.4 Pestisitlerin Çevre Üzerine Etkileri**

Tarımsal alanlara, orman veya bahçelere uygulanan pestisitler havaya, su ve toprağa, oradan da bu ortamlarda yaşayan diğer canlılara geçmekte ve dönüşüme uğramaktadır. Bir pestisitinin çevredeki hareketlerini onun kimyasal yapısı, fiziksel özellikleri, formülasyon tipi, uygulama şekli, iklim ve tarımsal koşullar gibi faktörler etkilemektedir.

Pestisitlerin püskürtülerek uygulanması sırasında bir kısmı evaporasyon ve dağılıma nedeniyle kaybolurken, diğer kısmı bitki üzerinde ve toprak yüzeyinde



kalmaktadır. Havaya karışan pestisit rüzgarlarla taşınabilir; yağmur, sis veya kar yağışıyla tekrar yeryüzüne dönebilir. Bu yolla hedef olmayan diğer organizma ve bitkilere ulaşan pestisit, bunlarda kalıntı ve toksisiteye neden olabilir.

Toprak ve bitki uygulamalarından sonra toprak yüzeyinde kalan pestisitler, yağmur suları ile yüzey akışı şeklinde veya toprak içerisinde aşağıya doğru yıkanmak suretiyle taban suyu ve diğer su kaynaklarına ulaşabilirler. Eğim, bitki örtüsü, formülasyon, toprak tipi ve yağış miktarına bağlı olarak taşınan pestisitler, bu sularda balık ve diğer omurgasız su organizmalarının ölmesine; bu organizmalardaki pestisit kalıntısının insanların gıda zincirine girmesi ve kontamine olmuş suların içilmesiyle kronik toksisitenin oluşmasına neden olurlar.

Toprağa geçen pestisitler güneş ışınlarının etkisiyle fotokimyasal degradasyona, bitki, toprak mikroorganizmaları ve diğer organizmaların etkisiyle biyolojik degradasyona uğramakta; toprak katı maddeleri (kil ve organik madde) tarafından adsorlanıp desorplanmakta veya kimyasal degradasyona uğramaktadırlar. Toprak içine geçmiş pestisitler kapiller su vasıtasıyla toprak yüzeyine taşınmakta ve buradan havaya karışabilmektedir. Toprağın yapısı, kil tipi ve miktarı, organik madde içeriği, demir ve alüminyum oksit içeriği, pH'sı ve toprakta var olan baskın mikroorganizma türleri tüm bu olayları etkileyen faktörlerdir. Toprakta pestisit tutulmasıyla hareketi ve biyolojik alımı engellenmekte ve çeşitli şekillerde degradasyonu ile ya toksik özelliğini kaybetmekte ya da daha toksik metabolitlerine dönüşebilmektedir. Pestisit kendisinin ya da toksik dönüşüm ürünlerinin hedef olmayan yerleri veya organizmaları kontamine etmesi istenmediğinden tüm bu olayların bilinmesi ve incelenmesi önem taşımaktadır.

### **1.2.5 Gıdaların Kontaminasyonu**

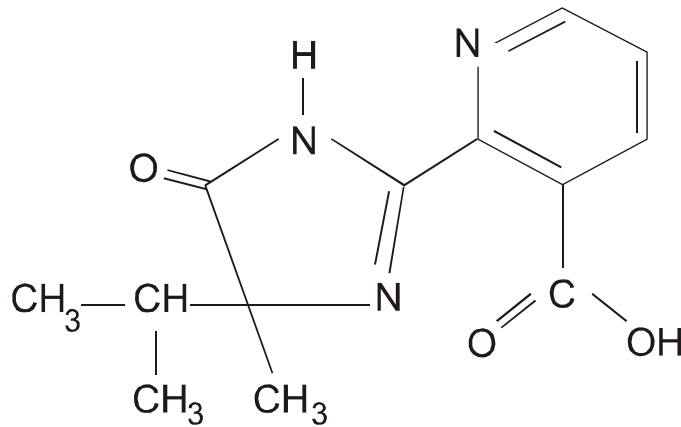
Bitkinin direkt yolla veya toprakta kalan pestisiti kendi bünyesine alması ve bu bitkilerin insan gıdası veya hayvan yemi olarak kullanılması sonucunda pestisitler insanların gıda zincirine girmektedirler.

Kimyasal savaşım, belirtilen riskler nedeniyle titizlikle yapılması gereken bir iştir. Bu riskleri minimuma indirmek için uygulama sırasında gerekli her türlü önlem alınmalıdır.

### 1.3 Çalışmalarımızda Kullanılan Pestisitler Ve Kullanım Yerleri

#### 1.3.1 (RS)-5-etil-2-(4\_metil-5-okzo-2-imidazolin-2-yl)=nikotinik asit

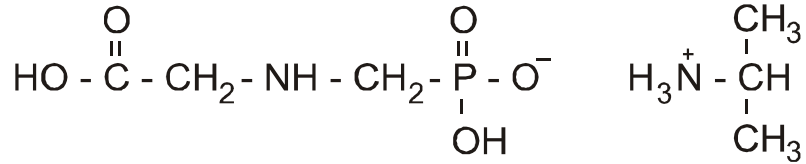
Genel adı Imazethapyr, kimyasal olarak ise (RS)-5-etil-2-(4\_metil-5-okzo-2-imidazolin-2-yl)=nikotinik asit diye adlandırılır. Maddenin fiziksel hali renksiz kristaldir. Etki şekli, yeşil aksam ve kökler tarafından alınan seçici sistematik herbisittir. Akut oral olarak etkir. Zehirlilik derecesi çok yüksek değildir. Arılarda ve balıklarda zehirlidir. Türk Gıda Kodeksinde yer alan maksimum rezidü limiti(MRL) nohut için 0.05 ppm'dir. Toprak herbisitleri ile karıştırılabilir. Dar yapraklı yabancı ot ilaçları ve Sulphonylurea'lı ilaçlarla karışmaz. Kullanım Yerleri; Nohutta ekim sonrası çıkış öncesinde,yabani hardal, horoz ibiği, köpek üzümü, fare kulağı, labada, kaz ayağı, kırmızı mercimekte ise ekim öncesidir. Arap baklası,çoban tarağı, tavşan kulağı, sarı ipek çiçeği, yumrulu çam çiçeği, uzun süpürge otu, mor malkomya, yabani hardal, çayır akça çiçeği, Suriye geyik otu, taşkesen otu, Trakya hardalı, lalemanti, pelemirde ekim sonrası çıkış öncesidir. Yabani hardal, yumrulu çam çiçeği, uzun süpürge otu, Trakya hardalı, çayır akça çiçeği, yoncada çıkış sonrasıdır [25].



Şekil 1.3 (RS)-5-etil-2-(4\_metil-5-okzo-2-imidazolin-2-yl)=nikotinik asit

### 1.3.2 N-(fosfonometil)glisin

Genel adı Glyphosate, kimyasal adı (IUPAC) ise N-(fosfonometil)glisin'dir. Maddenin fiziksel hali kokusuz beyaz tozudur. Etki şekli yapraklar tarafından alınan sistemik etkili seçici olmayan herbisittir. Akut oral olarak etkir. Zehirlilik derecesi çok fazla olmayıp arılar ve balıklarda etkilidir. Türk Gıda Kodeksinde yer alan maksimum rezidü limiti(MRL), sert çekirdekli meyveler, fındık, yumuşak çekirdekli meyveler, turunçgillerde 0.1 ppm'dir. Üzümde ise 0.02 ppm'dir. Kullanım Yerleri;Turunçgiller, bağ, fındık, meyve bahçeleri ve ekili olmayan alanlarda; yabancı yulaf, yabancı havuç, kısır brom, kuş yemi, mürdümük, ballıbaba, kanarya otu, tilki kuyruğu, yer fesleğeni, düğün çiçeği, turna gagası, yabancı fiğ, kuş otu, yabancı hardal, ebe gümeci, yabancı yonca, semiz otu, sütleğen, sirken, bambul otu, domuz pıtrağı, zincir pıtrağı, kırmızı köklü tilki kuyruğu, kirpi darı, darıcan,, horoz ibiği, yeşil horoz ibiği, topalak, köpek dişi ayrığı, tarla sarmaşığı, ısırgan otu, pelin otu, kaynaştır [25].

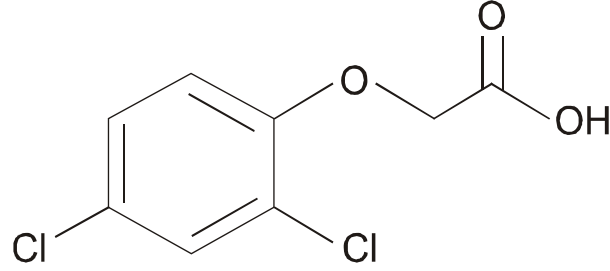


Şekil 1.4 N-(fosfonometil)glisin

### 1.3.3 (2,4-dikloropenoksi)asetik asit

Genel adı 2,4-D, kimyasal adı (IUPAC); (2,4-dikloropenoksi)asetik asit'tir. Maddenin fiziksel hali renksiz tozudur. Tuz formülasyonlar kökler, ester formülasyonlar yapraklar tarafından daha iyi alınır. Akut oral olarak etkir. Imazethapyr ve Glyphosate göre daha zehirlidir. Arılarda ve balıklarda zehirlidir. Gıda Kodeksinde yer alan maksimum rezidü limiti (MRL); Hububatta 0.2 ppm, meyveler,

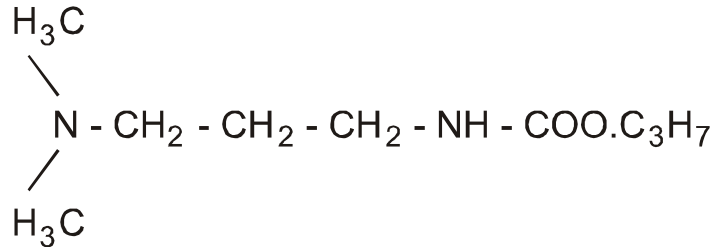
çeltik ve mısırdaki 0.05 ppm'dir. Kullanım Yerleri; Hububatta akhindiba, arap baklası, at kuyruğu, çoban çantası, çoban değneği, dön baba, düğün çiçeği, köy göçürendir [25].



Şekil 1.5 (2,4-dikloropenoksi)asetik asit

#### 1.3.4 Propil 3-(dimetilamino) propilkarbamat hidroklorid

Genel adı, propamokarb hidroklorid; kimyasal adı (IUPAC); Propil 3-(dimetilamino) propilkarbamat hidroklorid'dir. Maddenin fiziksel hali renksiz, aromatik, higroskopik kristaldir. Akut oral olarak etkir. Çok zehirlidir. Arılara ve balıklara zehirsiz olmakla beraber beraber sulara bulaştırılmaması gerekir. Türk Gıda Kodeksinde yer alan maksimum rezidü limiti(MRL); Tütün için 1,0 ppm, hıyar ve kabak için 0,2 ppm'dir. Kullanım Yerleri; Ayçiçeği ve Patatete Mildiyö, Kabakgillerde yalancı mildiyö ve tütündür [25].



Şekil 1.6 Propil 3-(dimetilamino) propilkarbamat hidroklorid

#### **1.4 G6PD Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Bileşiklerin Etkilerinin Belirlenmesi Üzerine Yapılan Çalışmalar**

Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi bakteri, protozoa, mantar, sıçan, sinek, balık ve memelilerin hemen hemen tüm dokuları olmak üzere geniş bir canlı topluluğunda bulunmuştur. Buna ek olarak tavşan karaciğer mikrozomunda ve kemik iliğinde de bu enzimin olduğu tespit edilmiştir [17,25,40-48].

G6PD'nin değişik canlı ve dokulardaki molekül büyüklüğü, birincil ve alt birim yapıları ortaya konmuş [11,48-54], muhtemel ikincil yapı amino asit dizilişinden tahmin edilmiş [48,50,54]; enzimin spesifik substrat ve koenzim bağlanma bölgeleri dolaylı olarak belirlenmiştir [49-51,54]. Değişik tür G6PD'larda aspartik asit + glutamik asit sayısının lizin + histidin + arginin sayısından fazla olması enzime düşük izoelektrik noktası kazandırmıştır [8]. Örneğin;C.Utilis, sıçan meme bezi ve sığır lensi G6PD'lerinin izoelektrik pH'ları sırasıyla 6,16, 5,8 ve 5,14 dir [11,55,56].

Birbirinin eşi alt birimlerden oluşan insan ve maya sitozolik G6PD enzimlerinin asetillenmiş amino uçlarına sahip olduğu, tavşan mikrozomal G6PD'sinin ise piroglutamat içerdiği bulunmuştur [53].

Enzim monomerinin molekül ağırlığı, mikroorganizmalarda 50-60 k Dal, memelilerde ise 58-67 k Dal olarak değerlendirilmiştir [8]. Örneğin, insan G6PD monomeri 514 amino asit içerir ve molekül ağırlığı 59 k Dal' dur [49]. Tavşan karaciğer mikrozomal enziminin molekül ağırlığının da 90 k Dal olduğu bulunmuştur [53]. Ayrıca fare karaciğerinde 121 k Dal, sıçan meme bezlerinde 120 k Dal, sıçan eritrositlerinde 131 k Dal, domuz karaciğerinde 133 k Dal, Sığır eritrositlerinde 114 kDal , insan karaciğerinde 118 k Dal ve sığır lensinde 64 k Dal olarak bulunmuştur [57].

G6PD'ler üzerinde yapılan çalışmalar, katalitik olarak aktif en küçük dördüncül yapının dimerik birim olduğu; monomerik yapıların ise katalitik bir aktiviteye sahip olmadıklarını göstermiştir [11,15,32,48,50,58]. Ayrıca bu enzim yüksek iyonik güç ( $>0.1$ ) ve alkali pH'da dimerik, düşük pH(pH 5.5-6.5) ile düşük iyonik güçte ise belirgin olarak tetramerik yapıdadır [11,15,59]. Tetramer-dimer dengesini sağlayan en önemli düzenleyici etkenin pH olduğu, *in vivo* olarak eritrosit içinde dimerik yapının baskın olduğu belirlenmiştir [15].

Ayrıca  $Mg^{+2}$  ve diğer +2 değerli katyonların da yapıyı tetramerik birime kaydırduğu [11,15,60]; pH'sı 6.0'dan daha düşük iyonik güçlerde enzimin daha yüksek oligomerik yapılar oluşturduğu belirlenmiştir [23,50,61]. G6PD enziminin katalizlediği tepkimelerde substrat görevi görmesi ve enzimi kararlı halde tutmasıyla  $NADP^+$ 'nin G6PD üzerinde iki fonksiyonunun olduğu ortaya çıkarılmıştır. Enzimin, kararlılığı için gerekli sıkıca bağlı "yapısal  $NADP^+$ " ve G6PD tepkimesinde indirgenme fonksiyonunu gören gevşekçe bağlı "katalitik  $NADP^+$ " ihtiva ettiği ileri sürülmüştür. "Yapısal  $NADP^+$ "'nin enzimin her alt birimine yarım veya bir molekül olarak bağlandığı ortaya atılmıştır [60].

Enzimin dördüncül yapısı, bir çok ligantların bağlanmasından sonra allosterik etkileşiminin varlığı ve metabolitler ile inhibisyonu nedeniyle G6PD enzimi "allosterik" bir enzim gibi davranmaktadır [15,23].

G6PD'nin katalizlediği tepkime, glukoz 6-fosfatın bir nolu karbonun dehidrogenasyonu ile başlar. Enzim sınırlı substrat spesifikliği gösteriyor ise de 2-deoksi glukoz 6-fosfat, 3-deoksi glukoz 6-fosfat, galaktoz 6-fosfat ve glukoz gibi substrat analoglarını da kullanabilmektedir. Bu kullanım tabii substrat ile karşılaştırıldığında düşük ilgi ve orandadır [15, 11].

Enzimin 2dG6P ile Gal6P için ilgisi normal substratına göre %4'den daha küçüktür[32,48]. Bikarbonat varlığında enzimin glukoz kullanımında belirgin bir artış gösterdiği ortaya konulmuştur [11,32].

Yapılan çalışmalarda memeli ve *S.calbergasis* kaynaklı G6PD enzimlerinin spesifik koenzimlerinin NADP<sup>+</sup> olduğu bulunmakla beraber; G6PD enzimlerinin kullandıkları koenzimlere göre 5 grupta toplandıkları belirlenmiştir [11].

1. Spesifik olarak NADP<sup>+</sup> kullananlar,
2. NADP<sup>+</sup>'yi tercih edenler,
3. Hem NADP<sup>+</sup> hem de NAD<sup>+</sup> kullananlar,
4. NAD<sup>+</sup> tercih edenler,
5. Spesifik olarak NAD<sup>+</sup> kullananlar.

Normal insan G6PD'sinin NADP<sup>+</sup> kullandığı, NAD<sup>+</sup> kullanımının çok düşük olduğu bulunmuştur [62]. G6PD'nin kendisine spesifik koenzim yanında desamino NADP<sup>+</sup>, 3-asetilpiridin adenin dinükleotid fosfat gibi NADP<sup>+</sup> analoglarını da kullanabildiği bulunmuştur [62,63].

NADPH ve ATP ile güçlü bir şekilde inhibe olan enzimin NADPH için K<sub>i</sub> sabiti 9µM olarak bulunmuştur [11,64,65].

Sıcaklık enzim aktivitesi üzerinde önemli bir role sahiptir. Sıcaklık reaksiyonunun hızını maksimum noktaya ulaşıncaya kadar artırır. Fakat bu artış ürünlerin meydana gelmesi için gerekli olan enerjiye sahip yeterli sayıda molekül oluşuncaya kadar devam eder. Daha sonra ısı artışı devam ederse, enzim denatürasyonuna bağlı olarak enzim aktivite kaybeder ve reaksiyonun hızı düşmeye başlar [17,19,26]. Bu sebeple aktive ölçümü esnasında çalışılan sıcaklık için kontrol faktörü kullanılarak sıcaklığın belli bir seviyede tutulması zorunludur [66]. Örneğin, sıçan lensi G6PD enzimi oda sıcaklığında stabildir. Fakat sıcaklık 37°C'ye çıkarıldığında enzim aktivitesini kaybetmektedir [67]. Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi, karaciğer, yağ dokusu, adrenal korteks, troit, eritrosit, testis ve laktasyondaki meme bezi gibi dokularda aktif olduğu halde, iskelet kasındaki aktivitesi düşüktür [8,11,15,48].

Pentoz fosfat metabolik yolunun yanı sıra diğer metabolik yolların da kontrolü açısından önemli bir role sahip olan glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminin kontrolü fizyolojik şartlarda meydana gelmektedir [11].

G6PD'nin steroidler tarafından inhibe edildiği [68], bu inhibisyonun yalnızca memeli G6PD'sinde etkin olduğu tesbit edilmiştir. Bu, NADP<sup>+</sup> ve G6P ile unkompetitif bir inhibisyonudur [11]. Çalışmalar, 17. ve 20. karbon atomunda karbonil grubu ihtiva eden steroidlerin düşük derişimleriyle bile enzim aktivitesini engelledikleri ortaya konulmuştur. G6PD'ye steroid bağlanmasının genellikle hidrofobik etkileşim ile gerçekleştiği; polar grupların varlığının ise bağlanmayı azalttığı sonucuna varılmıştır [11]. NADPH/NADP<sup>+</sup> oranının G6PD enzimi aktivitesinin düzenlenmesinde en önemli etken olması yanında NADPH'ın NADP<sup>+</sup>'ya karşı kompetitif bir inhibisyonu söz konusudur [11]. İnsan trombositlerinden saflaştırılan G6PD ile yapılan çalışmada, NADPH'ın NADP<sup>+</sup>'ye karşı kompetitif bir inhibisyona sahip olduğu gösterilmiştir[69]. NADPH inhibisyonunun dengelenmesinde de okside glutatyonun (GSSG) aktivatör olarak görev aldığı gösterilmiştir [11].

G6PD enziminin aktivitesi ATP tarafından da önemli ölçüde etkilenmektedir [11]. ATP'nin *L.mesenteroides*' den elde edilen G6PD enzimini inhibe ettiği ve bu inhibisyonun fizyolojik Mg<sup>+2</sup> konsantrasyonunda ortadan kalktığı bulunmuştur. ATP'nin G6PD üzerindeki inhibisyon etkisi G6P ile yarışmalı olarak gerçekleşmektedir. Bununla birlikte, AMP'nin sıçan karaciğerinde GSSG gibi G6PD inhibisyonunu bozduğu ifade edilmiştir. Söz konusu enzim aynı zamanda asetil-CoA ve koenzim-A(CoA) tarafından da inhibe edilmektedir ve bu inhibisyon ATP'nin meydana getirdiği inhibisyona nazaran daha belirgin olduğu bulunmuştur [11,70]

G6PD'nin üzerine çevresel faktörlerden ısı, ışık, ağır metal iyonlarının ve diğer modülatörlerin etkileri değişiktir [71]. Farklı dokular ve organizmalardaki G6PD aktivitesi üzerine ısı, ışık, ağır metal iyonları gibi çevresel faktörlerin değişik etkileri vardır. Örneğin, soğuğa maruz bırakılan genç kertenkelelerin beyin G6PD aktivitesi



kontrol grubuna nazaran yüksek iken, diğ er yaş grublarında yaş a ba ğ lı olarak bir azalma bulunmuştur [72]. Ayrıca, açlık süresiyle orantılı olarak G6PD aktivitesinde çok de ğ iş iklikler saptanmıştır. Sıç an karaciğ erinde söz konusu emzimin aktivitesi açlıkta %50 aktivite kaybına uğ rarken, aç bırakılıp yeniden beslenen sıç anların karaciğ erinde ya da gebelik ve laktasyon dönemindeki sıç anların meme bezinde, G6PD aktivitesinde 20-40 kat artış tespit edilmiştir [73]. Isı, beslenme biçimi, açlık gibi etkenler ile aktivitesinde böyle farklı de ğ iş iklik ve düzenlemeler olması G6PD enziminin “adaptif” bir enzim oldu ğ u inancını pekiştirmeye katkıda bulunmaktadır [48,74,75]. Diğ er yandan insan eritrosit G6PD aktivitesinde yaş a ba ğ lı olarak azalma oldu ğ u tespit edilmiştir [66,76].

G6PD enziminin optimum pH’sı çe ş itli türlerde belirlenmiştir ve türden türe 7,4 ile 9 arasında de ğ iş en farklılık gözlenmiştir [17]. Sığır adrenal korteksindeki enzimin optimum pH’sının 8-9 arasında de ğ iş mektedir [77]. Sıç an karaciğ erinden elde edilen sitoplazmik G6PD enziminin optimum pH’sı 7,5 olarak belirlenmiştir. Mitokondri G6PD enziminin ise 7,5 ve 9 olmak üzere iki tane optimum olarak verilmektedir [2,25,32,74]. Maydanozda optimum pH=8 olarak belirlenmiştir [78].

Glukoz-6- fosfat dehidrogenaz enzimi aktivitesi de ğ iş ikliğ ine dokusal farklılıkların etkisi yanında, enzimin biyokimyasal ve genetik yapısındaki de ğ iş iklikler de etki etmektedir [11,79,80]. Bu yapısal de ğ iş iklikler sonucu meydana gelen aktivite düşüklüğü ile birlikte ortaya çıkan tablo “**G6PD eksikliği**” adı altında incelenmektedir [25]. G6PD eksikliği lensi de içine alan pek çok dokuda gösterilmiştir [81-83]. G6PD eksikliği ilk olarak bazı insanlarda sıtmaya karşı primaquin’i kullandıklarında hemolitik aneminin gelişmesine karşı aşırı hassasiyetin sebebinin anlaşılması için yapılan araştırmalar sonucunda keşfedildi [84]. Eritrositlerde diğ er pek çok enzimin eksikliği bilinmesine rağmen, G6PD eksikliği sadece hematolojide de ğ il aynı zamanda insan biyolojisinde de önemli enzim defektlerinin en yaygın olanlardan biri olarak bilinmektedir [84-86].

13 ekzon ve 12 introndan oluşan G6PD geni insanda X kromozomunun Xq28 bölgesinde bulunur ve 100 kilobaz uzunluğundadır [87,88]. Bu enzimin 442 varyantı olduğu tespit edilmiş ve bununla ilgili olarak enzim eksikliğinin çok sık olarak rastlanan genetik hastalıklara sebep olduğu belirlenmiştir. Söz konusu enzimin eksikliği, pentoz fosfat metabolik yolunu etkileyen bir oksidatif stres durumunda hemolitik anemiye doğurur. Örneğin, Afrika'da G6PD eksikliği yüksek oranda görülmektedir [89].

Bu gün dünyada G6PD enzimi eksikliğinden 400 milyondan fazla insan etkilenmektedir. Bu enzimin bugüne kadar dünyada yaklaşık 400, Türkiye'de ise 20'ye yakın varyantı tespit edilmiştir. Türkiye'deki varyantların büyük bir kısmı Çukurova ile Antalya bölgesinde bulunmuştur [25].

Hemolitik anemi G6PD eksikliğinin en önemli göstergesidir. Hemoliz genelde ilaç alımı, enfeksiyon ve bakla yenmesine bağlı olarak artar [56]. G6PD eksikliği olan kişilerde katarakt riski artar, bu da indirgenmiş glutatyon seviyesinin düşük olması ile açıklanabilir [90,91]. G6PD eksikliğinin katarakt gelişimi için hazırlayıcı faktör olduğu öne sürülmektedir [92]. Eritrositlerdeki eksiklikle birlikte lensteki G6PD aktivitesinin azalmasının G6PD eksikliği olan insanlarda katarakta yol açabileceği ifade edilmiştir [83,93]. Kataraktlı 52 hastada yapılan çalışmada, kataraktın bu hastaların %52'sinde G6PD eksikliğinden kaynaklandığı belirlenmiştir [94]. G6PD'nin gözün opaklaşmasını önlemede ve hücrelerin gelişimi için vazgeçilmez olduğu bilinmektedir [95,96].

G6PD enzimi insan eritrositlerinden ilk olarak 1965 yılında Yoshida tarafından saflaştırılmıştır [61]. Enzim daha sonra sıçan meme bezlerinden, sığır eritrositlerinden ve birkaç insan dokusundan afinite kromatografisi vasıtasıyla saflaştırılmıştır [23,61]. Ayrıca at eritrositlerinden, domuz karaciğerinden, sığır göz lensi, köpek karaciğerinden, fare karaciğerinden, sıçan karaciğerinden, sıçan adrenali, insan karaciğerinden, insan plateletinden saflaştırılmıştır [97]. Bundan başka tavşan dokuları arasında G6PD enziminin tam bir haritasını çıkarmak amacıyla tavşanın farklı dokularından bu enzim saflaştırılmış ve bazı özellikleri test edilmiştir [44]. Bu amaçla tavşan kemik iliği,

dalak, akciğer, karaciğer, böbrek, yağ dokusu, beyin, kalp, kas, eritroblast, retikulosit ve eritrosit hücrelerinden G6PD saflaştırılmıştır [44].

Yine sıtmaya karşı kullanılan ilaçlardan birisi olan primaquinin G6PD üzerinde etkisine bakılmış ve bu enzimi inhibe ettiği belirlenmiştir [66]. Çiftçi ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada bazı antibiyotiklerin (seftrizoksim, ampicilin, sefuroksim, sefazolin, sefaperazon, streptomisin, gentamisin sülfat ve netilmisin) insan G6PD'sine etkileri araştırılmış ve bu ilaçların söz konusu enzimi inhibe ettikleri belirlenmiştir [98]. Ayrıca metamizol ve magnezyum sülfatın G6PD enzimini *in vitro* ve *in vivo* inhibe ettiği bulunmuştur [99]. Bununla birlikte maya G6PD enziminin dietilnitrozamin [100] tarafından inhibe edildiği ve fare eritrosit G6PD enzimlerinin [101] 2,4-diklorofenoksiasetik asit tarafından *in vivo* ve *in vitro* olarak inhibe edildiği belirlenmiştir.

## **2. MATERYAL VE YÖNTEM**

### **2.1 Materyal**

#### **2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler**

Çalışmamızda kullanılan N, N, N', N'-tetrametil etilen daimin (TEMED), diyaliz torbaları, NADP<sup>+</sup> (Na<sup>+</sup> tuzu), standart serum albümin, glukoz-6-fosfat (monosodyum tuzu) Sigma Chemical Comp'den; sodyum hidroksit, trihidroksimetilaminometan(Tris), amonyum sülfat, sodyum asetat, sodyum klorür, fosforik asit, glisin, sodyum azotür, hidroklorik asit, potasyum bifosfat, potasyum fosfat, sodyum fosfat, magnezyum klorür, gliserin, etanol, potasyum asetat, metanol, asetik asit, izopropanol E:Merck AG'den; akrilamid, N,N'-metilen bisakrilanid, Coomassie Brilliant Blue G-250, brom timol mavisi, sodyum dodesil sülfat(SDS), amonyum per sülfat, b- merkapto etanol, Sephadex G 200 Pharmacia'dan; 2',5'-ADP-Sepharose 4B Pharmacia'dan, çalışmada kullanılan antibiyotikler ve değişik ilaçlar ise piyasadan temin edildi.

#### **2.1.2 Yararlanılan Alet ve Cihazlar**

Çalışmalar esnasında aşağıdaki alet ve cihazlardan faydalanılmıştır.

Santrifüj: IEC Clinical Centrifuge USA.

Soğutmalı Santrifüj: Hettich Zentrifugen EBA 12R

Spektrofotometre: SHIMADZU UV-VIS 1208(Japan)

pH metre: Orion 920A

Elektroforez Tankı: Hoefler, HSI.

Peristaltik Pompa: Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala(İsveç)

Hassas terazi: Libror AEG-220/Shimadzu

Afinite kolonu: Kapalı sistem oluşturucu ve soğutmalı(1x10 cm) Sigma (ABD).

Kronometre: Hanhard, Elektronische digital-Stoppuhr (Germany)

Otomatik pipetler: Sigma-Brand

Mağnetik Karıştırıcı: Heildolph

### 2.1.3 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

Araştırma süresince kullanılan çözeltilerin kullanılış yerleri ve hazırlanış şekilleri aşağıdaki gibidir:

1. 1 M tris-HCl / 5mM EDTA (pH=8,0) (Eritrosit ve lens G6PD aktivitesi ölçümünde kullanılan tampon): 6,05 g (0,05 mol) Tris ve 0,0605g ( $2,5 \times 10^{-4}$  mol) EDTA alınarak bir miktar saf suda çözüldü. Çözeltinin pH'sı pH metre yardımıyla 1 M HCl ile titre edilerek 8,0'a ayarlandı. Çözelti daha sonra saf suyla 50 ml'ye tamamlandı.

2. 0,1 M MgCl<sub>2</sub> (Enzim aktivite ölçümünde kullanılan aktivatör çözeltisi): 0,475 g MgCl<sub>2</sub> ( $5 \times 10^{-3}$  mol) alınıp hacmi saf su ile 50 ml'ye tamamlandı.

3. 2 mM NADP<sup>+</sup> (Enzimin aktivite ölçümünde kullanılan çözelti): 0,0765 g NADP<sup>+</sup> ( $1 \times 10^{-4}$  mol) alınıp hacmi saf su ile 50 ml'ye tamamlandı.

4. 6 mM G6P (Enzimin aktivite ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi): 0,091 g glukoz-6-fosfat( $3 \times 10^{-4}$  mol) alınıp hacmi saf su ile 50 ml'ye tamamlandı.

5. 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH=7,0) (Amonyum sülfat çökeltisinin çözünmesi için kullanılan tampon): 0,68 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>( $5 \times 10^{-3}$  mol) alınıp 80 ml saf suda çözüldü. pH'sı NaOH ile 7,0'a ayarlandı. Daha sonra toplam hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

6. (50 mM Potasyum asetat/50 mM potasyum fosfat) (pH=6,0) (Eritrosit hemolizatından elde edilen çözünmüş amonyum sülfat çökeleğinin diyalizi için kullanılan tampon): 4,9 g potasyum asetat ( $5 \times 10^{-2}$  mol) ve 6,8 g potasyum fosfat

( $5 \times 10^{-2}$  mol) karışımının hacmi saf su ile 800 ml'ye getirilip pH=6,0'a ayarlandıktan sonra toplam hacim 1 lt'ye tamamlandı.

7. (0,1 M Potasyum asetat/ 0,1 M Potasyum fosfat) (pH=6,0) (Afinite kolonunun dengelenme ve yıkanması için kullanılan tampon): 9,8 g (0,1 mol) potasyum asetat ve 13,6 (0,1 mol) potasyum fosfat karıştırıldı ve 800 ml saf suda çözüldü. Daha sonra pH=6,0'a ayarlandı ve toplam hacim 1 lt olacak şekilde saf su ilave edildi.

8. (0,1 M Potasyum asetat/ 0,1 M Potasyum fosfat) (pH=7,85) (Numuneyi tatbikten sonra afinite kolonunun yıkanması için kullanılan tampon): 9,8 g (0,1 mol) potasyum asetat ve 13,6 g (0,1 mol) potasyum fosfat karıştırıldı ve 800 ml saf suda çözüldü. Daha sonra pH=7,85'e ayarlandı ve toplam hacim 1 lt olacak şekilde saf su ilave edildi.

9. (0,1 M Potasyum fosfat/ 0,1 M KCl) (pH=7,85) (Numuneyi tatbikten sonra afinite kolonunun yıkanması için kullanılan tampon): 13,6 (0,1 mol) potasyum fosfat ve 7,45 g (0,1 mol) KCl karıştırıldı ve 800 ml saf suda çözüldü. Daha sonra pH=7,85'e ayarlandı ve toplam hacim 1 lt olacak şekilde saf su ilave edildi.

10. (80 mM Potasyum fosfat + 80 mM KCl + 0,5 mM  $\text{NADP}^+$  + 10 mM EDTA ) (pH= 7,85 ) (Afinite jeline tutunmuş olan glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminin elüsyon tamponu): 5,44 g potasyum fosfat ( $4 \times 10^{-2}$  mol), 2,98 g KCl ( $4 \times 10^{-2}$  mol), 0,1913g  $\text{NADP}^+$  ( $2,5 \cdot 10^{-4}$  mol) ve 1,21 g EDTA ( $5 \times 10^{-3}$  mol) karıştırıldı. Daha sonra pH=7,85'e ayarlandı ve toplam hacim 500 ml olacak şekilde saf su ilave edildi.

11. (0,1 M Tris/ 0,5M NaCl) (pH= 8,5) (Afinite kolonunun rejenerasyonu için hazırlanan tampon): 6,05g Tris (0,05 mol ) ve 14,61g NaCl(0,25 mol) alınarak pH= 8,5 ayarlandı. Toplam hacim saf ile 500 ml'ye tamamlandı.

12. (0,1 M Sodyum asetat/ 0,5M NaCl ) (pH=4,5) (Afinite kolonunun rejenerasyonu için hazırlanan tampon): 4,1 g sodyum asetat (0,05 mol) ve 14,61 g NaCl (0,25 mol) alınarak pH=4,5'e ayarlandı. Toplam hacim saf su ile 500 ml'ye tamamlandı.

## **2.2 Yöntemler**

### **2.2.1 İnsan Eritrositlerinden G6PD Enzimin Saflaştırılması ve İnhibisyonu Çalışmaları ile İlgili Yöntemler**

#### **2.2.1.1 Kan Numunelerinin Temini ve Hemolizat Hazırlanması**

EDTA'lı kaplar içinde alınan taze insan kanı, +4 °C 'deki şartlarda laboratuvara getirilerek günlük olarak kullanıldı. Taze kandan eritrositleri ayırmak amacıyla, kan numunesi 15 dakika 2.500xg'de santrifüj edildi. Tüplerin üst kısmındaki plazma ve lökosit tabakaları bir damlalık vasıtasıyla alındı. Daha sonra eritrositler 0,16 M'lık KCl çözeltisi ile üç defa yıkandı. Her defasında 2.500 xg'de santrifüj edilerek süpernatant atıldı. Elde edilen eritrositler hacimlerinin beş katı buzlu su ile hemoliz edildi. Daha sonra hücre zarlarını uzaklaştırmak için +4 °C'de 10.000xg'de 20-30 dakika santrifüj yapıldı. Damlalık vasıtasıyla süpernatant atıldı [23]. Böylece hemolizat hazırlanmış oldu. Bütün bu işlemler +4 °C'de gerçekleştirildi.

#### **2.2.1.2 Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Diyaliz**

Proteinler çok değerlikli elektrolitlerdir. Bu yüzden iyonlara benzer şekilde hareket ederler. Yeteri kadar yüksek tuz konsantrasyonunda, bir protein bir çözeltiden kantitatif olarak çöktülebilir. Bu olayın esası, yüksek tuz konsantrasyonlarında, protein moleküllerini çevreleyen ve çözünür halde tutan su moleküllerinin tuzdaki iyonlar tarafından çekilmesi ve proteinlerin çökmesini sağlamasıdır. Proteinlerin çökmesinde molekül ağırlığı ve iyonik şiddet etkilidir. Dolayısıyla değişik tuz konsantrasyonlarında değişik proteinler çöker [4,12]. Deney, proteinlerin bu özelliklerinden faydalanılarak yapıldı. Kan numunesi için hazırlanan hemolizat için %30-70 aralıklarında amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Bütün bu işlemler +4°C'de

gerçekleştirildi. Amonyum sülfat çöktürmesi sırasında hemolizat ve homojeneta katı  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  yavaş yavaş katıldı(+4°C) ve her defasında daha önce katılan  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 'ın çözünmüş olmasına dikkat edildi. Bu işlem yaklaşık 1 sat kadar sürdü. Amonyum sülfatın kan hemolizati içerisindeki çözünme işlemi magnetik karıştırıcı ile yapıldı. Amonyum sülfatın hemolizat içerisindeki çözünme işlemi bittikten sonra numuneler 5.000xg'de 15 dakika santrifüj edildi. Daha sonra süpernatant behere alındı ve çökelek ise yeteri kadar 50 mM potasyum fosfat tamponunda (pH=7,0) çözülerek hem süpernatantta hem çökelekte ayrı ayrı enzim aktivitesine bakıldı.

Çöktürme işlemleri sırasında kullanılan katı amonyum sülfat miktarları aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$g(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = 1.77 \times V(S_2-S_1) / 3.54-S_2$$

V= Çözeltinin hacmi

S<sub>1</sub>=1'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu

S<sub>2</sub>=1'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğu

Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen karışım diyaliz torbasına yerleştirildi ve (50mM potasyum asetat/ 50 mM Potasyum fosfat) (pH=7,0) tamponuna karşı, 12 saat süreyle diyaliz edildi[44]. Diyaliz işlemi magnetik karıştırıcı üzerinde buz dolabı içinde +4°C'de gerçekleştirildi ve daha sonra protein ve aktivite tayini Bölüm 2.3.ve Bölüm 2.4 de izah edildiği şekilde yapıldı.

### **2.2.1.3 2,5, ADP-Sepharose 4B Afinite Kolonunun Hazırlanması, İnsan Eritrosit Hemolizatının Afinite Kolonuna Tatbiki ve G6PD'm Elüsyonu**

Afinite jeli hazırlamak için, 10 ml'lik yatak hacmini oluşturmak üzere 2 g kuru 2', 5' ADP-Sepharose 4B kolon materyali tartıldı ve 400 ml saf su içerisinde katkı maddelerinin uzaklaştırılması için birkaç defa yıkandı. Yıkama esnasında jel şişti. Bütün bu işlemler laboratuvar şartlarında gerçekleştirildi. Şişmiş jelin havası alındıktan



hemen sonra %25 dengeleme tamponu(0,1 M Potasyum asetat/ 0,1 M Potasyum fosfat pH=6,0) ve %75 jel olacak şekilde, jel süspanse edildi. Süspanse edilmiş jel(1x10)cm'lik kapalı sistem oluşturucu ve soğutmalı kolona paketlenildi. Daha sonra kolona paketlenmiş jel, peristaltik pompa kullanılarak dengeleme tamponuyla yıkandı. Dengeleme ve yıkama, akış hızı 50 ml/saat olarak uygulandı[23]. Kolonun dengelenmiş olduğu elüat ile üstten kolona uygulanan dengeleme tamponunun 280 nm'deki absorbanasının eşitlenmesinden anlaşıldı. Bu şekilde afinite jeli ve kolonu elde edilmiş oldu. Amonyum sülfat çöktürmesinden elde edilen 60 ml'lik derişikleştirilmiş numune, 0,1 M Potasyum asetat/0,1 M Potasyum fosfat(pH=6,0) tampon çözeltisiyle dengelenmiş olan afinite kolonuna tatbik edildi. Daha sonra kolon sırasıyla 25 ml 0,1 M Potasyum asetat/0,1 M potasyum fosfat (pH=6,0) 25 ml 0,1 M potasyum asetat/0,1 M potasyum fosfat (pH=7,85) ve 0,1 M KCl/ 0,1 M Potasyum fosfat (pH=7,85) çözeltiyle yıkandı. Akış hızı peristaltik pompa ile kontrol altında tutuldu. Bu şekilde enzimin büyük bir kısmı jele tutunmuş ve diğer safsızlıklar uzaklaştırılmış oldu. Daha sonra 80 mM potasyum fosfat + 80 mM KCl + 0,5 mM NADP<sup>+</sup> + 10 mM EDTA (pH=7,85) çözeltisi kolondan geçirilerek enzim elüe edildi. Elüsyonlar fraksiyon toplayıcısı ile 2'şer ml'lik tüplere alındı. Akış hızı peristaltik pompa ile 20 ml/saat'e ayarlandı. Bütün bu işlemler sırasında sıcaklık +4 °C'de sabit tutuldu [25, 74]. Her fraksiyonda enzim aktivitesine bakıldı ve aktivite gösteren fraksiyonlar birleştirildi. Ayrıca hemolizat, amonyum sülfat çöktürmesi ve enzim çözeltisinde spesifik aktiviteler ayrı ayrı belirlenerek yüzde saflaştırma hesaplandı [25]. Elde edilen enzim çözeltisi kinetik çalışmalarda kullanılmak üzere derin dondurucuda dondurularak saklandı.

#### **2.2.1.4 Sodyum dodesilsülfat-Poliakrilamid jel elektroforezi(SDS-PAGE) ile Enzim Saflığının Kontrolü**

İnsan eritrosit G6PD enzimi 2', 5', ADP-Sepharose 4B afinite kromatografisi ile saflaştırıldıktan sonra enzimin saflığı, %0,1 SDS ihtiva eden sırasıyla %4 ve %10 akrilamid konsantrasyonunda yığma ve yürütme jeli ile kesikli SDS-PAGE yapılarak kontrol edildi [73].

Bu işlemin başında elektroforez için kullanılan cam plakalar önce su, sonra alkol ile iyice yıkandı. Cam plakaları birleştiren mikalara(spacer) ince bir tabaka halinde vazelin sürüldü. İki cam plaka birbiri üstüne konuldu ve özel naylon kaplarına yerleştirilerek jel hazırlama cihazına konuldu. Daha sonra cam plakalar aralık oluşturucu mikaların bulunduğu kısımlardan kısıkaçlarla dikkatlice sıkıştırıldı. Ayırma jeli hazırlanarak plakalar arasına enjektörle döküldü. Ortamda hava olmamasına dikkat edildi. Jel yüzeyinin düzgün olması için % 0,1 'lik SDS ile ince bir tabaka oluşturuldu. Katılaşıncaya kadar (yaklaşık yarım saat) beklendi. Katılaştıktan sonra üstündeki %0,1'lik SDS alındı. Daha sonra plakaların üst kısmına tarak yerleştirildi ve yığma jel tarağın yanından üst yüzeye kadar ilave edildi. Tarağın üstüne nemli süzgeç kağıdı konularak bir gece bekletildi. Sonraki gün tarak dikkatlice çıkarılarak plakalar elektroforez tankına yerleştirildi. Oluşan boşluklar işaretlenerek jelin üstü önce saf su, sonra da yürütme tamponu ile yıkandı. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konuldu. Numuneler her birinde 20 µg protein olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim 100 µl olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu katıldı. 3 dakika kaynar su banyosuna inkübe edildi. Numuneler soğutulularak, elektroforeze çok ince bir enjektör yardımıyla uygulandı. Tank kapağı kapatılarak alt tarafından (+) kablo(anot), üstten (-) kablo(katot) yerleştirildi. Önce 80 voltta yarım saat bekletildi. Daha sonra akım 150 volta ayarlanarak 4-5 saat oda sıcaklığında tatbik edildi. Akım kesilerek, cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı. Bu yürütme tamponu tekrar kullanılmak üzere saklandı ve sabitleştirme çözeltisinde (%50 izopropanol + %10 TCA + %40 saf su) 15 dakika bekletildi. Daha sonra sabitleştirme çözeltisinden çıkarılan jel özel kabına konularak, renklendirme çözeltisi üstünü örtünceye kadar eklendi. 45 dakika kadar çalkayıcı üzerinde bırakıldı. Sonra renklendirme çözeltisinden çıkarılarak, yıkama çözeltisine alındı. Belirli aralıklarla değiştirilmek suretiyle jelin zemin rengi açılıp, protein bantları belirginleşinceye kadar 1-2 gün bu çözelti içinde çalkalandı.

Yıkama çözeltisi, aktif karbon üzerinden geçirilerek tekrar tekrar kullanıldı. Jel yıkama çözeltisinden çıkarıldıktan sonra fotoğrafı çekildi. Elektroforezde kullanılan renklendirme çözeltisi; % 0,1 Coomassie Brilliant Blue R-250, %50 metanol, %10

asetik asit, %40 saf su ile hazırlandı. Yıkama çözeltisi ise; %50 metanol, %10 asetik asit, %40 saf sudan ibarettir.

Ayırma jeli şöyle hazırlandı: 15 ml 1 M Tris-HCl (pH=8,8), 10,66 ml % 30'luk akrilamid-%0,8'lik bisakrilamid, 0,61 ml %1'lik SDS, 0,4 ml %5'lik TEMED (N,N,N',N'- tetrametil etilen diamin) ve 11,94 ml su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine en son olarak 0,8 ml %1,5'luk amonyum persülfat /  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  (PER) ilave edildi. Burada kullanılan PER kullanılmadan hemen önce taze olarak hazırlandı.

Yığıma jeli hazırlanması sırasında 1 M'lık Tris-HCl(pH=6,8)'den 1,24 ml, %30'luk akrilamid- %0,8'lik bisakrilamid'den 1 ml, % 10'luk SDS'den 0,1 ml, %5'lik TEMED'den 0,1 ml ve saf sudan 7,36 ml alınarak karıştırıldı. Son olarak yine günlük hazırlanmış %1,5'luk PER'den 0,2 ml ilave edildi.

## **2.3 Protein tayini**

### **2.3.1 Kalitatif Protein Tayini**

Kalitatif protein tayini, proteinlerin yapısında bulunan aromatik gruplara sahip tirozin ve triptofan amino asitlerinin 280 nm'de maksimum absorbanans göstermesi esasına dayanan Warburg Metodu olarak bilinen yolla gerçekleştirildi. Kromatografi işlemlerinden sonra eşit hacimde alınmış olan bütün tüplerde kalitatif protein tayini yapıldı. Kuvarz küvetler kullanılarak spektrofotometrede absorbanansları köre karşı okundu. Bununla birlikte 2',5', ADP-Sepharose 4B afinite kolonundan alınan fraksiyonlarda elüsyon işlemi sırasında  $\text{NADP}^+$  kullanıldığından ve  $\text{NADP}^+$  280 nm'de proteinlerin absorbanansını maskeleydiği için sonuç alınamadı. Sephadex G-200 ile yapılan jel filtrasyon kromatografisinde proteinlerin kalitatif tayini bu metodla belirlendi.

### 2.3.2 Bradford Yöntemi ile Protein tayini

Hazırlanan hemolizat, amonyum sülfat çöktürmesi ile elde edilen enzim çözeltisi ve 2',5' ADP-Sepharose 4B afinite kromatografisi yöntemiyle saf halde elde edilen enzim çözeltilerindeki kantitatif protein miktarı bu metod vasıtasıyla belirlendi. Bu yöntemde boya olarak kullanılan Coomassie brilliant blue G-250, negatif bir yüke sahiptir ve protein üzerindeki pozitif yüke bağlanır. Boyanın kırmızı ( $\lambda_{\max} = 465 \text{ nm}$ ) ve mavi ( $\lambda_{\max} = 595 \text{ nm}$ ) formu mevcuttur. Proteininin bağlanması, kırmızı formun mavi forma dönüşümünü sağlar. Bradford yönteminin diğer kantitatif protein tayin metodlarına göre avantajlı tarafları ise;

- Kısa sürede uygulanabilirliği,
- Fazla miktarda bozucu faktörün bulunmaması,
- Protein-boya kompleksinin çözeltilerde uzun süre kalabilmesi
- Her bir çalışma için başka bir standart eğrinin gerekmemesi,
- Bu yöntemin hassasiyetinin 1-100  $\mu\text{g}$  arasında olmasıdır [93].

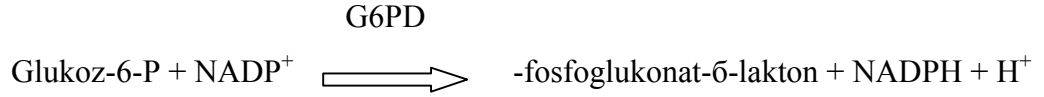
Tayin işlemleri şu prosedüre göre gerçekleştirildi: 1 ml'sinde 1 mg protein ihtiva edecek şekilde standart sığır albumin standart protein çözeltisi olarak hazırlandı. Bu çözeltilerden deney tüplerine 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100  $\mu\text{l}$  aktarıldı. Saf su ile tüm tüplerin hacmi 0,1 ml'ye tamamlandı. Daha sonra her bir tüpe 5 ml Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi ilave edildi. Vortex kullanılarak tüpler içerisindeki çözeltilerin karışması sağlandı ve protein-boya kompleksinin tam olarak sağlanabilmesi için 10 dakika inhibisyona bırakıldı. Bu işlemlerden sonra, 3 ml'lik küvetler kullanılarak spektrofotometreyle 595 nm'de köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak, 0,1 ml aynı tampon ve 5 ml renklendirme reaktifinden oluşan karışım kullanıldı. Absorbans değerlerine karşılık gelen  $\mu\text{g}$  protein değerleri standart grafik halinde verildi.

Numune çalışmaları için, 20 kat seyretilmiş eritrosit hemolizati, amonyum sülfat çöktürmesi numunesi ve saf enzim çözeltisinden üç ayrı tüpe sırasıyla 50, 50 ve 200'er  $\mu\text{l}$  alınarak üzerlerine 5'er ml renklendirme reaktifi ilave edildi. Vorteks ile karıştırılıp 10

dakikalık bir inkübasyondan sonra 595 nm’de absorbans değerleri okundu. Bu işlem 3 defa tekrarlanarak 3 ayrı ölçümün aritmetik ortalaması alınıp standart grafikten yararlanılarak protein miktarları belirlendi.

#### 2.4 Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz Enziminin Aktivite Tayini

Enzim aktivitesi spektrofotometrede 25°C’de Beutler metoduna göre yapıldı. Bu metod nikotiamidadenin dinükleotidfosfat’ın (NADP<sup>+</sup>) indirgenmesinden dolayı oluşan NADPH’ın 340 nm’de absorbans vermesi esasına dayanır. Absorbansı ölçülen NADPH, G6PD enziminin vücutta fizyolojik olarak katalizlediği aşağıdaki reaksiyonda meydana gelmektedir.



Tayin işlemleri için aşağıdaki prosedür uygulandı:

**Çizelge 2.1** İnsan Eritrosit G6PD Enzimi için spektrofotometrede numune küvet içeriği [38]

| Numune küveti                  |                     |                     |
|--------------------------------|---------------------|---------------------|
|                                | 3 ml’lik küvet için | 1 ml’lik küvet için |
| 1 M Tris-HCl+5mM EDTA (pH=8,0) | 250µl               | 100µl               |
| 0,1 M MgCl <sub>2</sub>        | 250µl               | 100µl               |
| 2 mM NADP <sup>+</sup>         | 250µl               | 100µl               |
| Enzim                          | 50µl                | 50µl                |
| Saf su                         | 1450µl              | 550µl               |
| 6mM Glukoz6-fosfat             | 250µl               | 100µl               |
| <b>Toplam</b>                  | <b>2500µl</b>       | <b>1000µl</b>       |

**Çizelge 2.2** İnsan Eritrosit G6PD Enzimi için spektrofotometrede kontrol küvet içeriği [38]

| <b>Kontrol küveti(kör)</b>    |                            |                            |
|-------------------------------|----------------------------|----------------------------|
|                               | <b>3 ml'lik küvet için</b> | <b>1 ml'lik küvet için</b> |
| 1MTris-HCl+5 mM EDTA (pH=8,0) | 250µl                      | 100µl                      |
| 0,1 M MgCl <sub>2</sub>       | 250µl                      | 100µl                      |
| 2 mM NADP <sup>+</sup>        | 250µl                      | 100µl                      |
| Enzim                         | 50µl                       | 50µl                       |
| Saf su                        | 1700µl                     | 650µl                      |
| <b>Toplam</b>                 | <b>2500µl</b>              | <b>1000µl</b>              |

Çizelgelerde belirtilen çözeltiler küvetlere konduktan sonra 25°C'de 10 dakika inkübe edilerek, numunedeki absorbans artışları 5 dakika süreyle 15 saniyede bir kaydedildi [32].

Daha sonra aşağıdaki formül kullanılarak ml başına enzim ünitesi hesaplandı;

$$A=(\Delta OD \backslash 6,22) \times (V_C \backslash V_E)$$

A= ml başına enzim ünitesi (EU) sayısı.

$\Delta OD$ = 340 nm'de optik dansitenin dakika başına değişimi.

$V_C$  = küvet hacmi

$V_E$  = küvetteki saf enzim çözeltisinin hacmi.

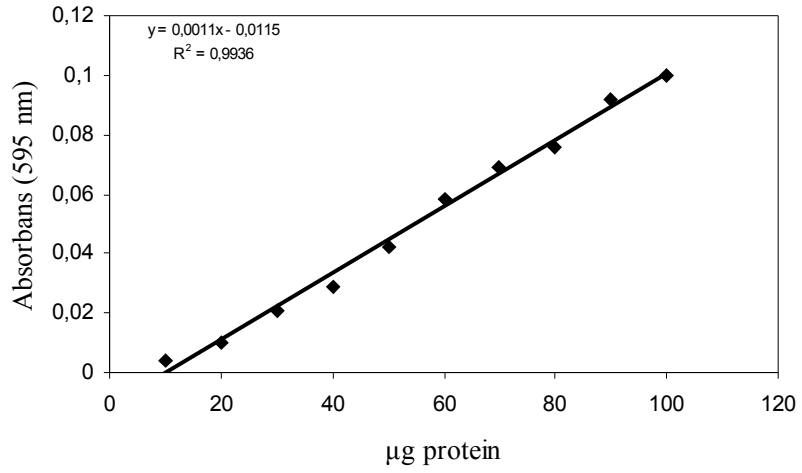
**6,22** = 1 mM NADP<sup>+</sup> nin indirgendiği farzedildiğinde kullanılan katsayı(milimolar ekstinksiyon katsayısı).

Eđer enzim seyreltilerek kullanılırsa yukarıdaki formülden çıkan A değeri seyreltme faktörü (f) ile çarpılır.

Saf enzimin ve amonyum sülfat çöktürmesi aktivite tayininde hemolizat veya homojenat yerine, saf enzim çözeltileri ve amonyum sülfat çöktürmesinden elde edilen çözelti kullanıldı. Diğer işlemler aynen uygulandı.

### 3. BULGULAR

#### 3.1 Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik



**Şekil 3.1** Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik [38]

Eritrosit hemolizati, lens homojenati, amonyum sülfat çöktürmesi ve saf enzim çözeltilerindeki kantitatif protein miktarı Bradford yöntemiyle tayin edildi. Standart grafik bölüm 2.3.2'de anlatıldığı gibi hazırlandı. Hemolizat, homojenat, amonyum sülfat çöktürmesi ve saf enzim çözeltilerindeki kantitatif protein miktarı bu standart grafikten faydalanılarak bulundu. Standart çözeltilerin ug proteine karşılık gelen absorbans değerleri şekil 3.1'de gösterildi.



## **3.2 İnsan Eritrositlerinden Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Enzimin Saflaştırılma ve İnhibisyon Çalışma Sonuçları**

### **3.2.1 Amonyum Sülfatla Çöktürme Basamakları ve Sonuçları**

Çalışmamızda, insan eritrositi G6PD'sinin %30-70 amonyum sülfat doygunluğunda çöktürme yapıldı. Bununla ilgili amonyum sülfat sonuçları Bölüm 2.2.1.b'de anlatıldığı gibi hesaplandı. Her bir çöktürme basamağında oluşan çökelek, 50 mM potasyum fosfat (pH=7,0) tamponunda çözüldü. Hem çökelekte hem de süpernatantta enzim aktivitesine bakıldı. Böylece enzimin çöktüğü amonyum sülfat doygunluk aralığı tespit edilmiş oldu.

### **3.2.2 Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Enziminin 2',5' ADP-Sepharose 4B Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılma Kademeleri**

%30-70 amonyum sülfat doygunluk aralığında çöktürülen insan eritrosit glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi 50 mM potasyum asetat / potasyum fosfat (pH=6,0) tamponuna karşı diyaliz edildikten sonra 2', 5', ADP-Sepharose 4B kolonuna tatbik edildi. Her bir elüatın 340 nm'de aktivite tayinleri yapıldı.

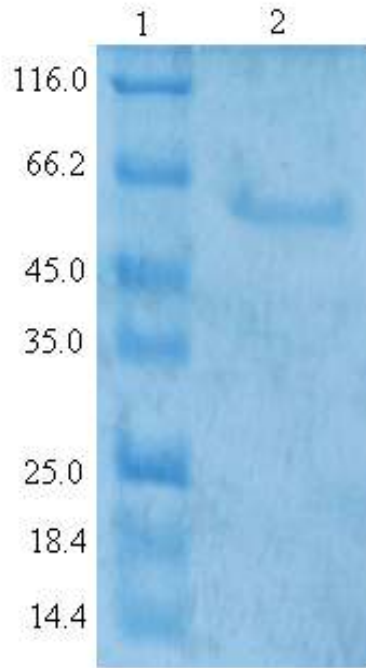
**Çizelge 3.1** İnsan eritrosit glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminin saflaştırma basamakları

| <b>Basamak</b>   | <b>Hacim (ml)</b> | <b>Aktivite (U/ml)</b> | <b>Toplam Aktivite (U)</b> | <b>Protein Miktarı (mg/ml)</b> | <b>Toplam Protein (mg)</b> | <b>Spesifik Aktivite (U/ml)</b> | <b>% Verim</b> | <b>Saflaştırma Derecesi</b> |
|--|-------------------|------------------------|----------------------------|--------------------------------|----------------------------|---------------------------------|----------------|-----------------------------|
| <b>Ham ekstrakt</b>                                    | 83                | 0.289                  | 23.98                      | 4.95                           | 410.85                     | 0.0584                          | 100            | 1                           |
| <b>Amonyum Sülfat Çöktürmesi</b>                       | 37                | 0.450                  | 16.65                      | 10.26                          | 379.62                     | 0.0438                          | 69.43          | 0.75                        |
| <b>2', 5', ADP Sepharose 4B Afinite Kromatografisi</b> | 1.5               | 2.35                   | 3.52                       | 0.0293                         | 0.0439                     | 120.13                          | 14.68          | 2742.69                     |

### 3.2.3 Sodyum Dodesilsülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforez(SDS-PAGE)

#### Sonucu

2', 5', ADP-Sepharose 4B afinite kromatografisinden saf olarak elde edilen G6PD enzimi ve standart proteinler, Bölüm 2.2.1.4'de anlatıldığı şekilde kesikli SDS-poliakrilamid jel elektroforezine tatbik edildi



**Şekil 3.2** Affinite kromatografisi ile saflaştırılan insan eritrosit G6PD enziminin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi fotoğrafı ( $\beta$ -galaktosidaz(116.0), bovin serum albumin(66.2), ovalbumin(45.0), laktat dehidrogenaz(35.0), restriksiyon endonükleaz(25.0),  $\beta$ -laktoglobulin(18.4), lysozyme(14.4))

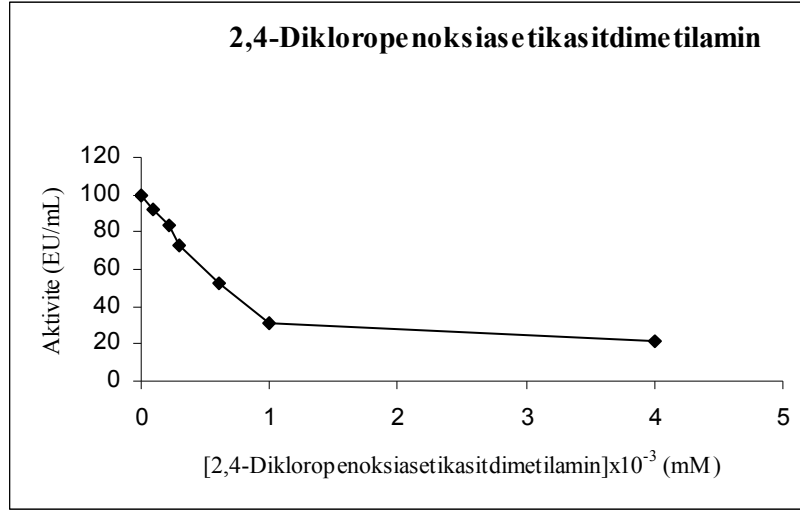
### 3.2.4 Giriş Bölümünde Bahsedilen Zirai İlaçların Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz Enzimi Üzerine Etkilerinin Sonuçları

İnsan eritrositlerinden saflaştırılan G6PD enzimi üzerine bazı pestisidlerin inhibisyon etkileri araştırıldı. Çizelgeleri ve aktivite-konsantrasyon grafikleri aşağıda verildi.

#### 3.2.4.1 (2,4-dikloropenoksi)asetik asit dimetilamin

**Çizelge 3.2** İnsan G6PD enzimi (2,4-dikloropenoksi)asetik asit dimetilamin çözeltisi miktarları ile insan G6PD enzimi üzerine kullanılan çözelti miktarları ve altta bunlara karşılık gelen pestisit konsantrasyonları

| Saf su | Tris-HCl<br>EDTA          | MgCl <sub>2</sub> | NADP <sup>+</sup> | ENZİM | Glukoz-6-<br>Fosfat(6mM) | Toplam | İlaç<br>Hacmi | İlaç           |
|--------|---------------------------|-------------------|-------------------|-------|--------------------------|--------|---------------|----------------|
| (µl)   | (5mM)<br>(pH=8,0)<br>(µl) | (0,1M)            | (2mM)             | Hacmi | (µl)                     | Hacim  | (µl)          | Konsantrasyonu |
|        |                           | (µl)              | (µl)              | (µl)  |                          | (µl)   |               | (mM)           |
| 550    | 100                       | 100               | 100               | 50    | 100                      | 100    | 0             |                |
| 480    | 100                       | 100               | 100               | 50    | 100                      | 100    | 70            | 0,001          |
| 400    | 100                       | 100               | 100               | 50    | 100                      | 100    | 150           | 0,001          |
| 340    | 100                       | 100               | 100               | 50    | 100                      | 100    | 210           | 0,001          |
| 230    | 100                       | 100               | 100               | 50    | 100                      | 100    | 320           | 0,001          |
| 180    | 100                       | 100               | 100               | 50    | 100                      | 100    | 370           | 0,001          |
| 130    | 100                       | 100               | 100               | 50    | 100                      | 100    | 420           | 0,001          |

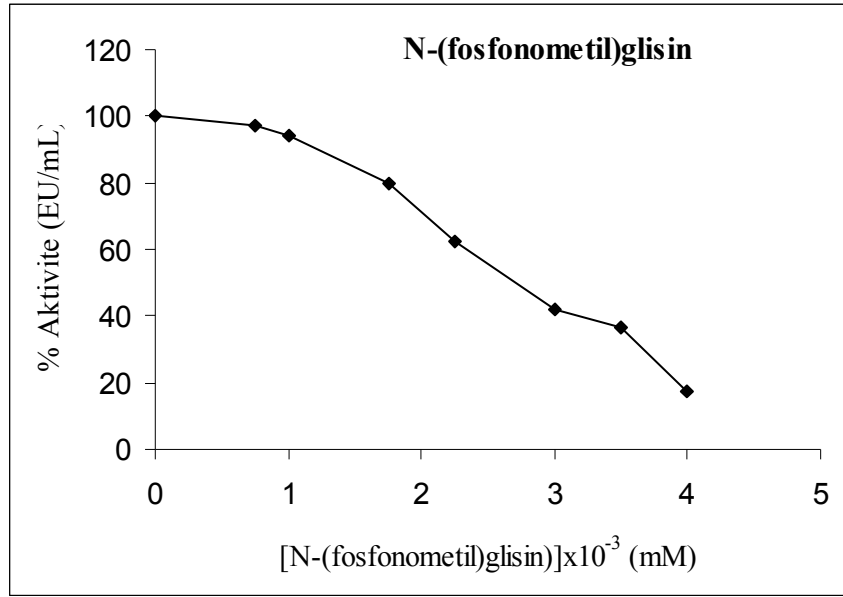


**Şekil 3.3** İnsan Eritrosit G6PD enzimi için 4 farklı pestisid konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite-(2,4-dikloropenoksi)asetik asit dimetilamin grafiği

### 3.2.4.2 N-(Fosfonometil)glisin Sonuçları

**Çizelge 3.3** İnsan G6PD enzimi N-(Fosfonometil)glisin çözeltisi miktarları ile insan G6PD enzimi üzerine kullanılan çözelti miktarları ve altta bunlara karşılık gelen pestisit konsantrasyonları

| Saf su | Tris-HCl<br>EDTA          | MgCl <sub>2</sub> | NADP <sup>+</sup> | ENZİM | Glukoz-6-<br>Fosfat(6mM) | Toplam | İlaç<br>Hacmi | İlaç           |
|--------|---------------------------|-------------------|-------------------|-------|--------------------------|--------|---------------|----------------|
| (µl)   | (5mM)<br>(pH=8,0)<br>(µl) | (0,1M)            | (2mM)             | Hacmi | (µl)                     | Hacim  | (µl)          | Konsantrasyonu |
|        |                           | (µl)              | (µl)              | (µl)  |                          | (µl)   |               | (mM)           |
| 550    | 100                       | 100               | 100               | 50    | 100                      | 100    | 0             |                |
| 500    | 100                       | 100               | 100               | 50    | 100                      | 100    | 50            | 0,001          |
| 460    | 100                       | 100               | 100               | 50    | 100                      | 100    | 90            | 0,001          |
| 380    | 100                       | 100               | 100               | 50    | 100                      | 100    | 170           | 0,001          |
| 290    | 100                       | 100               | 100               | 50    | 100                      | 100    | 260           | 0,001          |
| 200    | 100                       | 100               | 100               | 50    | 100                      | 100    | 350           | 0,001          |
| 150    | 100                       | 100               | 100               | 50    | 100                      | 100    | 400           | 0,001          |
| 90     | 100                       | 100               | 100               | 50    | 100                      | 100    | 460           | 0,001          |

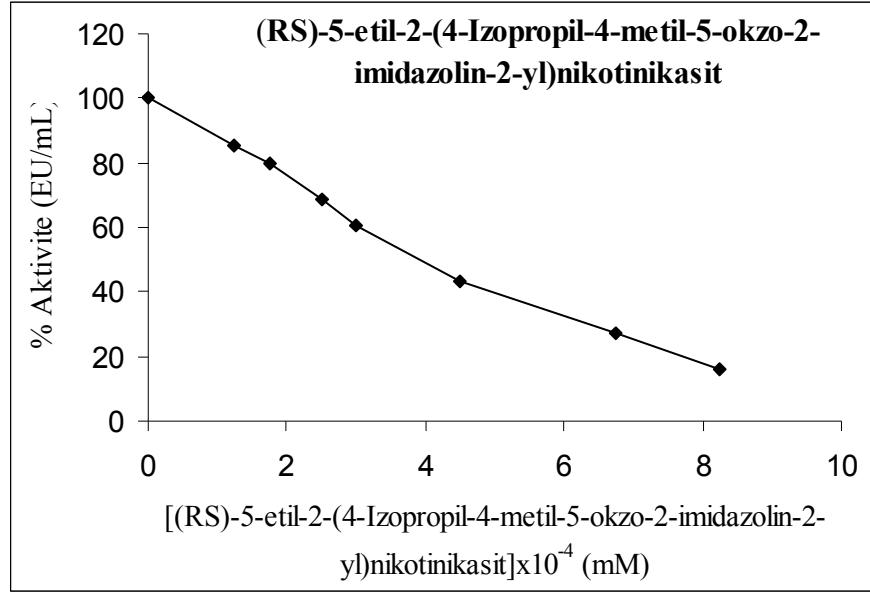


**Şekil 3.4** İnsan Eritrosit G6PD enzimi için 4 farklı pestisid konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite-( N-(Fosfonometil)glisin grafiği

### 3.2.4.3 (RS)-5-etil-2-(4-izopropil/-4-metil-5-okzo-2-imidazolin-2-yl) nikotinik asit Sonuçları

**Çizelge 3.4** İnsan G6PD enzimi (RS)-5-etil-2-(4-izopropil/-4-metil-5-okzo-2-imidazolin-2-yl) nikotinik asit çözeltisi miktarları ile insan G6PD enzimi üzerine kullanılan çözelti miktarları ve altta bunlara karşılık gelen pestisit konsantrasyonları

| Saf su | Tris-HCl EDTA       | MgCl <sub>2</sub> | NADP <sup>+</sup> | ENZİM | Glukoz-6-Fosfat(6mM) | Toplam | İlaç Hacmi | İlaç Konsantrasyonu |
|--------|---------------------|-------------------|-------------------|-------|----------------------|--------|------------|---------------------|
| (µl)   | (5mM) (pH=8,0) (µl) | (0,1M)            | (2mM)             | Hacmi | (µl)                 | Hacim  | (µl)       | (mM)                |
|        |                     | (µl)              | (µl)              | (µl)  |                      | (µl)   |            |                     |
| 550    | 100                 | 100               | 100               | 50    | 100                  | 100    | 0          |                     |
| 450    | 100                 | 100               | 100               | 50    | 100                  | 100    | 100        | 0,001               |
| 400    | 100                 | 100               | 100               | 50    | 100                  | 100    | 150        | 0,001               |
| 340    | 100                 | 100               | 100               | 50    | 100                  | 100    | 210        | 0,001               |
| 300    | 100                 | 100               | 100               | 50    | 100                  | 100    | 250        | 0,001               |
| 220    | 100                 | 100               | 100               | 50    | 100                  | 100    | 330        | 0,001               |
| 150    | 100                 | 100               | 100               | 50    | 100                  | 100    | 400        | 0,001               |
| 90     | 100                 | 100               | 100               | 50    | 100                  | 100    | 460        | 0,001               |

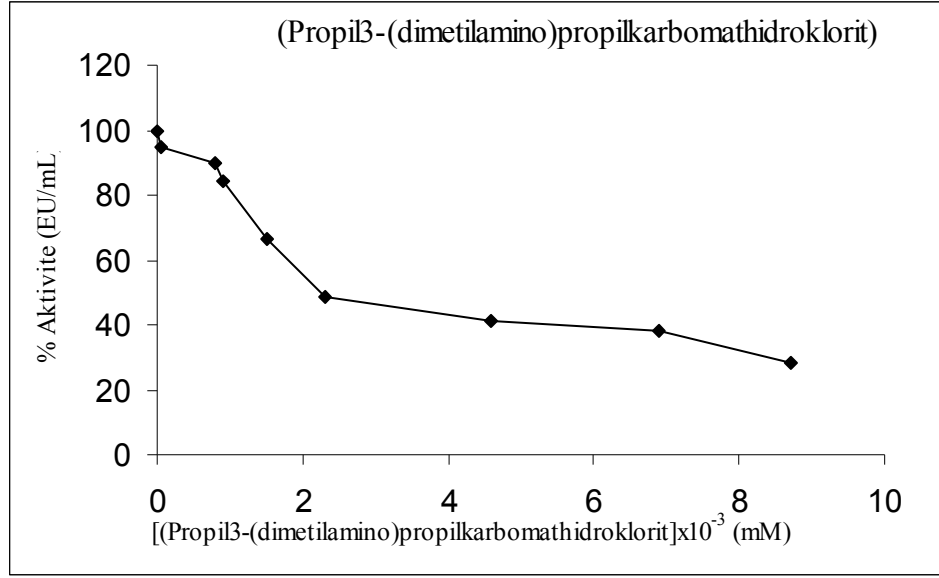


**Şekil 3.5** İnsan Eritrosit G6PD enzimi için 4 farklı pestisid konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite-(RS)-5-etil-2-(4-izopropil/-4-metil-5-okzo-2-imidazolin-2-yl) nikotidik asit grafiği

### 3.2.4.4 (Propil 3-(dimetilamino) propilkarbomat hidroklorit)

**Çizelge 3.5** İnsan G6PD enzimi (Propil 3-(dimetilamino) propilkarbomat hidroklorid) çözeltisi miktarları ile insan G6PD enzimi üzerine kullanılan çözelti miktarları ve altta bunlara karşılık gelen pestisit konsantrasyonları

| Saf su | Tris-HCl<br>EDTA          | MgCl <sub>2</sub> | NADP <sup>+</sup> | ENZİM | Glukoz-6-<br>Fosfat(6mM) | Toplam | İlaç<br>Hacmi | İlaç           |
|--------|---------------------------|-------------------|-------------------|-------|--------------------------|--------|---------------|----------------|
| (µl)   | (5mM)<br>(pH=8,0)<br>(µl) | (0,1M)            | (2mM)             | Hacmi | (µl)                     | Hacim  | (µl)          | Konsantrasyonu |
|        |                           | (µl)              | (µl)              | (µl)  |                          | (µl)   |               | (mM)           |
| 550    | 100                       | 100               | 100               | 50    | 100                      | 1000   | 0             |                |
| 490    | 100                       | 100               | 100               | 50    | 100                      | 1000   | 60            | 0,001          |
| 450    | 100                       | 100               | 100               | 50    | 100                      | 1000   | 100           | 0,001          |
| 400    | 100                       | 100               | 100               | 50    | 100                      | 1000   | 150           | 0,001          |
| 320    | 100                       | 100               | 100               | 50    | 100                      | 1000   | 230           | 0,001          |
| 240    | 100                       | 100               | 100               | 50    | 100                      | 1000   | 310           | 0,001          |
| 190    | 100                       | 100               | 100               | 50    | 100                      | 1000   | 360           | 0,001          |
| 150    | 100                       | 100               | 100               | 50    | 100                      | 1000   | 400           | 0,001          |



**Şekil 3.6.** İnsan Eritrosit G6PD enzimi için 4 farklı pestisid konsantrasyonunda elde edilen %Aktivite-(Propil 3-(dimetilamino) propilkarbomat hidroklorid grafiği

**Çizelge 3.6** Çalışmamızda kullanılan dört pestisid için IC<sub>50</sub> değerleri

| Pestisit ismi  | IC <sub>50</sub>                |
|--|---------------------------------|
| (Propil3-(dimetilamino) propilkarbomat hidroklorit)                          | <b>4,85x 10<sup>-3</sup> mM</b> |
| (RS)-5-etil-2-(4-izopropil-4-metil-5-okzo-2-imidazolin-2-yl) nikotinik asit) | <b>4,48x 10<sup>-4</sup> mM</b> |
| (N-(Fosfonometil) glisin)  | <b>2,77x 10<sup>-3</sup> mM</b> |
| (2,4-Diklorofenoksiasetik asit dimetilamin)                                  | <b>1,76x 10<sup>-3</sup> mM</b> |



#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (D-Glukoz 6-fosfat: NADP<sup>+</sup> oksidoredüktaz, EC 1.1.1.49, G6PD), pentoz fosfat yolunun ilk basamağını katalizleyen kilit enzimdir [61,99]. Hemen hemen bütün memeli dokularda, bitkilerde ve mikro organizmalarda bulunması, pentoz fosfat yolunun ilk enzim olması ve enzimin katalizlediği reaksiyonda NADP<sup>+</sup> ın indirgenmesiyle ürün olarak meydana gelen NADPH<sup>+</sup> ın birçok indirgeyici biyosentez ve çeşitli detoksifikasyon olaylarında önemli bir fonksiyonunun bulunması enzimin önemini ortaya koymaktadır. Bu sebeple hakkında çok fazla araştırma mevcuttur. Örneğin tavşan karaciğerinde, fare karaciğerinde, sıçan karaciğerinde, domuz karaciğerinde, insan karaciğerinde, insan eritrositlerinde ve sığır lensi gibi bir çok canlı dokusundan enzim saflaştırılıp karakterize edilmiştir [11,16,53,57,60,99]. Ayrıca bu enzim birçok bakteriden ve maydanoz, lahana gibi halk arasında önemli gıda maddeleri olarak tüketilen bitkilerden de saflaştırılıp karakterize edilmiştir [78].

G6PD eksikliği eritrosit hücreleri ve lensi de içine alan tüm dokularda bulunur [103]. Bu enzimin eksikliği genetik anormallik, yaş ve alınan diyetle bağlı olabilir [2]. Eritrosit hücrelerinde bir çok enzim eksikliği ile ilgili bilgiler bulunmasına rağmen [85,86,104,105]. G6PD eksikliği sadece hematolojik olarak değil, aynı zamanda canlının tüm biyolojisinde en yaygın olarak hala geçerliliğini korumaktadır [84]. G6PD eksikliği olan kişilerde kronik hemolizin sebep olduğu komplikasyonlar yüzünden yaşam süreci kısalmır. Bugün dünyada G6PD enzimi eksikliğinden, 400 milyondan daha fazla insan etkilenmektedir. Bu enzimin bugüne kadar dünyada yaklaşık 400, Türkiye’de ise 20’ye yakın varyantı tespit edilmiştir. Türkiye’deki varyantların büyük bir kısmı Çukurova ile Antalya bölgesinde bulunmuştur [25]. Orzalesi ve arkadaşlarının farklı yaş grubunda yaptıkları bir çalışmada eritrosit hücrelerindeki G6PD eksikliği ile katarakt arasında bir ilişki saptamışlardır, bu çalışmada 40-50 yaş grubunun %37’si, 51-60 yaş grubunun %67’si, 61-70 yaş grubunun %71’inde enzim eksikliğinden meydana gelen katarakta bağlı körlük tespit edilmiştir [76]. Değişik hastalıklar için kullanılan

bazı ilaçlar ve antibiyotikler enzimi inhibe etmektedirler. Özellikle ilaçların kanla temaları ve lense göre daha çabuk olduğundan enzim eksikliği olan hastalarda hemolitik anemiye sebep olurlar [84].

Görüldüğü gibi G6PD enzimi canlılar için hayati bir önem taşımaktadır ve inhibisyonu durumunda çok ciddi sağlık problemleri ortaya çıkmaktadır. Dolayısıyla yaptığımız bu çalışmanın önemli olduğu açıktır.

G6PD enzimi ilk olarak Warburg ve Christensen tarafından bulunduğundan sonra farklı kaynaklardan değişik yöntemler kullanılarak bir çok kez saflaştırılmıştır [58,79].

Bu çalışmada insan eritrosit G6PD enziminin afinite tomografisiyle saflaştırılması, ve bazı pestisitlerin bu enzim üzerine etkileri belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla taze insan kanı temin edildi.

Enzim saflaştırılması işlemi 2 basamakta gerçekleştirildi;

1-elde edilen hemolizat numuneleri için amonyum sülfat çöktürmesi

2-elde edilen numune için afinite kromatografisi.

Bütün saflaştırma işlemleri sırasında sıcaklık +4°C'de tutulması gerektiğinden işlemler soğuk ortam kullanılarak gerçekleştirildi. Böylece sıcaklığın sebep olacağı enzim aktivitesindeki kaybın önüne geçilmiş oldu.

Amonyum sülfat çöktürmesi uzun zamandan beri çeşitli bilim adamları tarafından kullanılan kısmi saflaştırma metotudur. Bu metod vasıtasıyla numune içindeki bir çok safsızlıklar giderilir ve proteinler daha derişik hale getirilir. Afinite kromatografisi işleminden önce amonyum sülfat çöktürmesi işleminin yapılması, kromatografi işleminden önce enzimin derişik hale getirilmesi açısından da büyük bir öneme sahiptir [23]. Bundan dolayı eritrosit hemolizati için %30-70 aralığında amonyum sülfat çöktürmesi yapılarak bir çok safsızlık uzaklaştırılmış oldu ve enzim derişikleştirildi. Ninfali ve Palma tarafından tavşan akciğeri ve dalağında yapılan bir çalışmada G6PD'nin akciğer için %20-65, dalak için %0-55 amonyum sülfat doygunluğunda çöktüğü belirlenmiştir [44]. İnsan eritrosit ve G6PD'sinin tespit edilen çökme aralığı ise (35-65)dir [99]. Ayrıca Corpas ve arkadaşları tarafından sıçan

karaciğeri ve böbrek-korteks sitozolünde G6PD enzimi %40-55 amonyum sülfat doyunluğunda çöktüğü bulunmuştur [106].

Amonyum sülfat çöktürmesi işleminden sonra elde edilen enzim çözeltisi diyaliz edildi. Böylece enzim çözeltisinden iyonlar uzaklaştırıldı ve kolona tatbik edilecek enzimin kolona tutunması kolaylaştırıldı [38].

Önceleri G6PD'nin saflaştırılması için CM-selüloz (karboksimetil), DEAE-selüloz(dietilaminotil) ile yapılan kolon kromatografisi yöntemleri kullanılmıştır [109]. Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda, yukarıdaki yöntemlere ilave olarak, jel filtrasyonkromatografisi, hidroksiapatit kolon kromatografisi, etanol çöktürmesi ile ultrasantrifügasyon metodları uygulanmıştır [55,77]. Afinite kromatografisi yöntemi için ligantların geliştirilmesiyle birlikte G6PD enzimi zaman almadan ve daha iyi bir yüzde verimle saflaştırılabilmıştır [110]. Afinite kromatografisi ile enzimin saflaştırılması işleminde çeşitli absorban materyaller kullanılmaktadır [38]; 8-(6-amino heksil) amino-2'-fosfoadenozin difosforiboz, 8-(6-amino heksil) amino-2', 5'-ADP , 8-(6-amino heksil) amino-NADP<sup>+</sup> ve N<sup>6</sup> - (6- amino heksil) amino2',5'-ADP materyalleri gibi. Affinite kromatografisi, çok basamaklı saflaştırma işlemleri sırasında enzim aktivitesinde oluşan önemli kayıpları elimine etmek ve enzimi yüksek verimle elde etmek için kullanılan en önemli saflaştırma metodudur. Son yıllarda, G6PD enzimi, 2',5' ADP-Sepharose 4B affinite kromatografisi ile yüksek bir verimle saflaştırılmıştır. Bu yöntem ilk defa Flora ve arkadaşları tarafından ortaya konmuştur [38, 44]. Burada ligant olarak kullanılan materyal G6PD'nin kuvvetli bir inhibitörü olan orto fosfattır.

Flora ve arkadaşları G6PD enzimini sırasıyla DEAE-Sephadex, P<sub>11</sub> ve 2', 5' ADP- Sepharose 4B affinite kromatografisi olmak üzere saflaştırma işlemini üç basamakta gerçekleştirmişlerdir [44]. Bu üç basamağın uygulama süresi uzun olduğundan sıcaklığa karşı çok hassas olan G6PD aktivitesinde önemli kayıplara yol açmaktadır. Bu sebeple çalışmamızda ilk iki basamak yerine amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı ve elde edilen derişik enzim çözeltisi, 2', 5' ADP- Sepharose 4B affinite kromatografisi kolonuna uygulandı. Böylece 7-8 saat gibi kısa bir sürede spesifik aktivitesi 120.13 (Eu/mg) olan insan eritrosit G6PD enzimini %14,68 verimle,

2742,69 kat saflaştırıldı. 114,7(Eu/mg) spesifik aktivitesine sahip insan eritrosit G6PD enzimi %28 verimle daha önce Çiftçi ve arkadaşları tarafından 13.654 kat; 20,862(Eu/mg) spesifik aktivitesine sahip tavuk eritrosit G6PD enzimi %54,68 verimle 9.150 kat [108]; 1,24(Eu/mg) spesifik aktivitesine sahip domuz karaciğer G6PD enzimi %40 verimle 1000 kat [16]; 2,64(Eu/mg) spesifik aktivitesine sahip sığır lensinden %13,7 verimle 19.700 kat [57]; 130(Eu/mg) spesifik aktivitesine sahip köpek karaciğerinden %18 verimle 2000 kat [27] saflaştırıldı. Görüldüğü gibi insan eritrosit G6PDsi için elde ettiğimiz spesifik aktivite değerleri domuz karaciğerininkinden yüksek, tavuk eritrosit ve köpek karaciğerininkinden düşüktür. Verim ise köpek karaciğerinden elde edilene yakındır.

Eritrosit hemolizati, amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen enzim çözeltisinde, 2', 5' ADP- Sepharose 4B affinite kromatografisinden elüe edilen saf enzim çözeltisinden protein miktarları Bradford yöntemiyle şekil3.1. verilen standart grafikten kantitatif olarak belirlendi. Bu yöntemde boya olarak kullanılan Coomassie brilliant blue G-250, negatif bir yüke sahiptir ve protein üzerindeki pozitif yüke bağlanır. Boyanın kırmızı ( $\lambda_{\max} = 465\text{nm}$ ) ve mavi( $\lambda_{\max} = 595\text{nm}$ ) formu mevcuttur. Proteinin bağlanması, kırmızı formun mavi forma dönüşümünü sağlar. Birçok protein hemen hemen aynı sonuç eğrilerini verdiği için, yöntem geniş bir kullanım aralığına sahiptir. Bu yöntem az zaman alması, daha az reaktif gerektirmesi ve hassasiyetinin diğer tayin metotlarına nazaran daha iyi olması (1-100 $\mu\text{g}$ ) sebebiyle avantajlıdır.

Afinite kolonundan elüe edilen saf enzim çözeltileri için kalitatif protein tayini yapılamadı. Bunun sebebi ise elüsyon çözeltilerinde  $\text{NADP}^+$  bulunduğu ve  $\text{NADP}^+$  nin 280nm'de protein absorbansını maskeleyiydi[23]. Bu sebeple alınan her bir elüsyon tüpü için 25 °C' spektrofotometre'de Beutler'a göre aktivite tayini yapıldı [32]. Ayrıca verimi %10 civarında artırdığından dolayı elüsyon tamponuna EDTA katıldı [23].

Aktivitelerin belirlenmesinde kullanılan yöntem, nikotinamidadenin dinükleotitfosfat( $\text{NADP}^+$ )ın G6P varlığında G6PD tarafından  $\text{NADPH}$ 'a indirgenmesi esasına dayanır.  $\text{NADPH}$ 'ın oluşum hızı G6PD aktivitesine bağlıdır ve spektrofotometrik olarak 340nm'de absorbanstaki artışın izlenmesi ile belirlenebilir [32].

Enzimlerin saflığını kontrol etmek için sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektrofez (SDS-PAGE) yapıldı. Jelde tek bandın gözlenmesi insan eritrositlerinden elde edilen G6PD enzimlerinin saf oldukları ispatlanmış oldu.

İnsan eritrositlerinden elde edilen G6PD enzimlerinin optimum pH değerleri 8,0 olarak belirlendi. Literatürde insan eritrositi, sıçan karaciğeri ve kobay lensinden saflaştırılan enzimlerin de optimum pH'ları 8,0 [112], sıçan karaciğeri sitoplazmik G6PD'nin optimum pH'sı 7,5 [110], köpek karaciğeri tarafından elde edilen enzim için optimum pH'sı 7,7 [27] sığır lensi G6PD'sinin optimum pH'sı 7,7 ve 9,6 olmak üzere iki pik olarak [57] tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuç insan eritrositi, sıçan karaciğeri ve kobay lensinden saflaştırılan enzimlerin optimum pH'ları ile benzerlik ve diğer kaynaklardan elde edilen optimum pH'lar dan farklılık göstermektedir.

Çalışma için seçilen pestisitler ziraat mühendisleriyle fikir alışverişinde bulunularak belirlendi. Mümkün olduğu kadar sık kullanılan pestisitler tercih edildi. Seçilen pestisitlerin insan G6PD'si üzerinde etkilerini araştırmış olan hiçbir literatüre rastlanmadı.

Genel olarak ilaç ve kimyasal maddelerin enzimler üzerindeki inhibisyon etkileri  $I_{50}$  (enzimin aktivitesine %50 inhibe eden pestisit) değeri olarak verilmektedir. Kinetik çalışmalar sırasında enzim aktivitesini inhibe eden kimyasal maddelerin  $I_{50}$  değerleri de belirtilmiştir.

İnsan eritrositleri G6PD enzimi üzerinde etkilerini araştırmak üzere üçü herbisit, bir tanesi fungusit olmak üzere dört madde belirlenmiştir. Pestisitlerin hepsinin insan eritrositleri G6PD enzimi üzerinde inhibisyon etkisi çalışıldı.

Bilindiği gibi  $I_{50}$  değeri küçük olan inhibitörün inhibisyon etkisi daha yüksektir. Bu sonuçlara göre kullanılan pestisitlerin insan eritrosit G6PD enzimi üzerine inhibisyon etkilerini büyükten küçüğe doğru sıralaması; (RS)-5-etil-2-(4-izopropil-4-metil-5-okso-2-imidazolin-2-yl) nikotinik asit), (2,4-Diklorofenoksiasetik asit dimetilamin), (N-(Fosfonometil)glisin), (Propil3-(dimetilamino)propilkarbomat hidroklorit) şeklindedir;

Literatürde G6PD enzimi ile ilgili çok çalışma bulunmasına rağmen insan eritrositi ile G6PD aktivitesi üzerinde pestisitlerin özelliklerinin araştırılması konusunda çalışmalara rastlanmamıştır. Örneğin Çiftçi ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, insan eritrositlerinden saflaştırılan G6PD enzimi üzerinde bazı antibiyotiklerin inhibisyon etkileri araştırılmıştır.

Buna göre bu tez kapsamında, hemen hemen tüm memeli dokularında yaygın bir şekilde bulunan ve birçok metabolik olayda hayati önem taşıyan NADPH ve riboz 5-fosfat gibi önemli bileşiklerin oluşmasına sebep olan ve pentoz fosfat metabolik yolunun ilk enzimi olan G6PD insan eritrositlerinden afinite kromatografisi ile saflaştırılmış dört adet kimyasal maddenin G6PD enzimi üzerinde etkileri araştırılmıştır. İnsan eritrosit G6PD enzimi üzerinde inhibisyon etkisi göstermiştir.

Sonuç olarak;

- Literatürde bilinen bir yöntemle, 2', 5', ADP-Sepharose 4B kullanılarak insan eritrositlerinden G6PD enzimi saflaştırılmıştır.
- Tarımda yaygın olarak kullanılan pestisitlerden (RS)-5-etil-2-(4-izopropil-4-metil-5-okzo-2-imidazolin-2-yl) nikotinik asit), (2,4-Diklorofenoksiasetik asit dimetilamin), (N-(Fosfonometil)glisin), (Propil3-(dimetilamino)propilkarbomat hidroklorit)'in saf G6PD enzimi üzerindeki in vitro inhibisyon etkisi belirlenmiştir.
- Söz konusu pestisitlerin enzim üzerindeki inhibisyonunun bir ölçüsü olan IC<sub>50</sub> değerleri tespit edilmiştir.
- (RS)-5-etil-2-(4-izopropil-4-metil-5-okzo-2-imidazolin-2-yl) nikotinik asit) pestisitinin diğerlerine oranla G6PD enzimi aktivitesi üzerinde en çok inhibisyon etkisi gösterdiği bulunmuştur.

## KAYNAKÇA

- [1] Fresht, A.,. Structure and Mechanism in protein science. W.H. Freeman and Company, New York, 1999, 166.
- [2] Yüreğir, G.T., Enzimler ve Enzim Kinetikleri. Temel Biyokimya., Kemal Matbaası, 1. Cilt, Adana,1981, 148-167.
- [3] Gözükara, E., Enzimler. Biyokimya. Ofset Repromat Ltd.Şti., Ankara, 1989, .572-576,
- [4] Keha E.E., ve Küfrevioğlu,Ö. İ., Biyokimya, Aktif Yayınevi, İstanbul, 2000, .344-345.
- [5] Agrios, G.N., Plant Pathology. Academic Pres, London, 1997, .212-213.
- [6] Thomas, J.H., and Gilham, B., Wills' Biochemical Basis of Medicine Wright, London, 1983, .297-302.
- [7] Mathews, K.C., and Van Holde, K.E., Biochemistry. The Benjamin/Cummings Publishing Company, , Redwood City, 1990, 493-501.
- [8] Mayes, P.A., "The pentose phosphate pathway, other pathway of hexose metabolism" *Libraire du Libon*, Beirut, (1991), 189-198.
- [9] Lukens J.N., "Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and related deficiencies involving pentose

phosphate pathway and glutathione metabolism”  
*Clinical Hematology Lea Febiger*, Philadelphia,  
(1993) ,1, 1006-1022.

- [10] Krebs, H.A., and Eggleston, L. V., “The regulation of pentose phosphate cycle in rat liver”, Weber G., “Advences in enzyme regulation”, *Pergamon Pres Ltd*, Oxford, Cilt.12, (1978), 421-433.
- [11] Levy, H.R., “Glucose-6-phosphate dehydrogenase”  
*Adv.Enzymol*, (1979), 48, 97-192.
- [12] Lehinger, A. L., *Principles of Biochemistry*. Worth Publishers, Inc., Second Edition, New York, 1993, 198-239.
- [13] Bonsignore, A., Fornaini, G., Leoncini, G., Fantoni, A., and Segni, P., “Characterization of leucocyte glucose 6-phosphate dehydrogenase in Sardinian Mutants”, *J. Clin. Invest*, (1966), 45, 12-16.
- [14] Wood, T., “Physiological Functions of pentose phosphate pathway”, *Cell Biochem. and Function*, 4, (1986), 241-247.
- [15] Bonsignore, A., and De Flora, A., “Regulatory properties of glucose 6- phosphate dehydrogenase”, *Curr. Top. Cell. Regul*, 6, (1972), 21-62.
- [16] Kanji, M.I., Toews, M.L., and Carper, W.R., “Glucose 6-phosphate dehydrogenase purification and partial characterization”, *The Journal of Biological Chemistry*, 251, (1976), 2255-2257.



- [17] Deutsch, J., *Methods of Enzymatic Analysis*, 1983, 190-196.
- [18] Kirkman, H.N., and Gaetani. G.F., "Regulation of glucose 6-phosphate dehydrogenase in human erythrocytes", *The Journal of Biological Chemistry*, 261, (1986), 4033-4038.
- [19] Telefoncu, A., ve Telefoncu. F., "Glucose 6-fosfat dehidrogenaz aktivitesine Primaguine'in etkisi" *Tr.J. of Medical Sciences*, 14, (1989), 57-63.
- [20] Ünlükurt, I., Aksoy, K., ve Yüreğir, G.T., "Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz(G6PD) enzimi ile eser elementler arasındaki ilişki", *Çukurova Ün. Tıp Fak. Dergisi*, 2, (1993), 141-145.
- [21] Shannon,W.N., Gover, S., Lam, M.S, Veronica., and Adams, M.J., Human glucose 6-phosphate dehydrogenase: the crystal structure reveals a structural NADP<sup>+</sup> moleculeand provides insights into enzyme deficiency. *Structure*, 8, 2000, 293-303.
- [22] Yüreğir,T.G., Aksoy, K., Dikmen, N., ve Ünlükurt, İ., Glukoz 6-fosfatdehidrogenaz enziminin insan eritrositlerinden kısmi saflaştırılması ve enzimolojik özelliğinin incelenmesi, IX.Ulusal Biyoloji Kongresi, Genel Biyoloji, Nümerik Taksonami ve Kantitatif Ekoloji Paneli bildirileri, 1, 125-130,1988.
- [23] Ninfali, P., Orsenigo, T., Barociani and Rapa, S., "Rapid purification of glucose 6-phosphate

- dehydrogenase from mammals erythrocytes”, *Preparative Biochemistry*, 20, (1990), 297-309.
- [24] Grossman, S., Budinsky, R., and Jollow, D., “Dapsone-induced hemolytic anemia: Role of glucose 6-phosphate dehydrogenase in the hemolytic response of rat erythrocytes of N-Hydroxydapsone”, *The journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 273, 870-877, (1995).
- [25] Aksoy, K., “Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enziminin yapısı” Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları, (1997).
- [26] Champe, P.C., Harvey, R.A., *Biyokimya*(From Lippincott’s Illustrated Reviews). Nobel Tıp Kitapevleri, 2.Edition, 1997, .111.
- [27] Özer, N., Aksoy, Y., and Öğüs, H., “Kinetic properties of human placental glucose 6-phosphate dehydrogenase”, *The Int.J.of Biochem.& cell Biol.* 33, (2001), 221-226.
- [28] Rathbun, W.B., Lens glutathione: “Metabolism and possible functions”, *Doc. Ophthalmol.* 8, (1976), 145-152.
- [29] Augusteyn, R.C., “On the possible role of glutathione in maintaining human lens protein sulphhydryls”, *Exp. Eye Res.*, 28, (1979), 665-671
- [30] Spector, A., Oxidation and cataract, nugen, J., (ed), Human cataract formation. The Pitman Pres, Bath,

1984, 48-64.

- [31] Jaffe, N.S., and Horwitz, J., Textbook of ophthalmology (Podos MS and Yanoff M edit), Times Mirror International Publishers Limited. 3, London ,1995, 7.1-7.9.
- [32] Beutler, E., “Red cell metabolism manual of biochemical methods”, *Academic Pres*, London, 1971, 19,68.
- [33] Rawn, J.D., Biochemistry. Burlington, neil Patterson Publishers, North Carolina, 1989, 407,
- [34] Özmen, İ., Çiftçi, M., Küfrevioğlu, İ., Çürük, M.A., Erzurum Bölgesinde Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Enzim Eksikliği Tespit Edilen Şahıslarda Mutasyon İçeren Ekzonların Belirlenmesi ve Bazı İlaçların Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi, 18. Ulusal Biyokimya Kongresi, Trabzon, 2004.
- [35] Yalın, E.A., Aksoy, K., Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Enziminde Mutasyon Ve Yapı Fonksiyon Analizleri, 18. Ulusal Biyokimya Kongresi, Trabzon, 2004.
- [36] Ünlükurt, İ., Aksoy, K., Yüreğir, G., Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz Enzim Aktivitesine Primakinin Etkisi, 18. Ulusal Biyokimya Kongresi, Trabzon, 2004.
- [37] Çömelekoğlu, Ö., Mazmancı, B., Arpacı, A., ‘ Pesticidlerin Kronik Etkisine Maruz Kalan Tarım

İşçilerinde Eritrosit Süperoksit Dismutaz ve Katalaz Aktiviteleri' *Turk J. Biol*, 24, (2000), 483.

- [38] Beydemir, Ş., Koyun Eritrositleri ve Göz Lensinden Glukoz -6-Fosfat Dehidrogenaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu, Bazı İlaç ve Kimyasal Maddelerinin İnhibisyon veya Aktivasyon Kinetiklerinin İncelenmesi, M. Sc. Thesis Doktora.,Erzurum, 2002.
- [39] Cacciapuoti, A.F., and Lessie, T.G., “Characterization of the fatty acid-sensitive glucose 6-phosphate dehydrogenase from *Pseudomonas Cepacia*”, *Journal of Bacteriology*, (1977), 555-563.
- [40] David, S, Shreve and Levy, H.Richard., “On the molecular weight of human glucose 6-phosphate dehydrogenase”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 78, (1977), 1369-1375.
- [41] Grigor, M.R., “Multiple molecular forms of rat mammary glucose 6-phosphate dehydrogenase: Proposed role in turnover of the enzyme”, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 229, (1984), 612-622.
- [42] Fickenscher, K., and Scheibe, R., “Purification and properties of the cytoplasmic glucose 6-phosphate dehydrogenase from pea leaves”, *Biophysics*, 247, (1986), 393-402.
- [43] Dikmen, N., ve Yüreğir, T.G., “Kordon Kanından izole edilen galaktoz 6-fosfat kullanımı ile ilginç iki glukoz 6-fosfat dehidrogenaz varyantı” *Çukurova*

*Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 14, (1989), 212-219.

- [44] Ninfali, P., and Palma. F., “Comparative study on glucose 6-phosphate dehydrogenase from rabbit tissues”, *The Journal of Experimental Zoology*, 254, (1990), 6-12.
- [45] Reuter, Naumann, M., Metz, P., and Kopperschlager, G., “Purification and characterization of glucose 6-phosphate dehydrogenase from *Pseudomonas W6*”, *Biomed. Biochim. Acta*, 7, (1990), 539-546.
- [46] Delgado, C.M., Cristina Tejedor and Jose Lague., “Partial purification of glucose 6-phosphate dehydrogenase and phosphofructokinase from rat erythrocyte haemolysate by partitioning in aqueous two-phase systems” *Journal of Chromatography*, 498, (1990), 159-168.
- [47] Walter, G., Niehaus., and T.Conn Mallett., “Purification and characterization of glucose 6-phosphate dehydrogenase from *Cryptococcus Neoformans*”, *Biophysics* , 313, (1994), 304-309.
- [48] Luzzato, L., and Baattistuzzi, G., “Glucose 6-phosphate dehydrogenase”, *Adv.Hum. Genet*, 14, (1985), 217-329.
- [49] Persico, M.G., Viglietto, G.,Martini, G., Toniolo, D., Paonessa, G., Moscatelli, C., Dono, R., Vulliamy, T., and Luzatto, L., “Isolation of human glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) cDNA clones,

primary structure of the protein and unusual 5' noncoding region", *Nucleic Acid Res.* 14, (1986), 2511-2522.

- [50] Yoshido, A., and Huang, I.Y., "Structure of Human Glucose 6-phosphate Dehydrogenase", *Academic Press Inc. Ltd*, London, (1986), 473-482
- [51] Vulliamy, T.J., D'Urso, M., Battistuzzi, G., Estrada, M., Foulkes, N.S., Martini, G., Calabro, V., Poggi, V., Giordano, R., Town, M., Luzatto, L., and Persico, G., "Diverse point mutations in the human glucose 6-phosphate dehydrogenase gene cause enzyme deficiency and mild or severe hemolytic anemia", *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, (1988), 5171-5175.
- [52] Iritani, N., Nishimoto, N., Katsurada, A., and Fulunda, H., "Regulation of hepatic lipogenic enzyme gene expression by diet quantity in rats fed a fat-free, high carbohydrate diet", *J. Nutr.* (1992), 122, 236.
- [53] Ozols, J., "Isolation and complete amino acid sequence of luminal endoplasmic reticulum glucose 6-phosphate dehydrogenase", *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, (1993), 5302-5306.
- [54] Jeffery, J., Persson, B., Wood, I., Bergman, T., Jeffery, R., and Jörnvall, H., "Glucose 6-phosphate dehydrogenase, Structure-function relationships and the *Pichia jadinii* enzyme structure" *Eur. J. Biochem.* 41, (1975), 212.
- [55] Nevadan, B.H., Hyde, C.M., and Levy, H.R.,

- “Mammary glucose 6-phosphate dehydrogenase”, *Arch. Biochem. Biophys*, 165, (1974), 398-406.
- [56] Ulusu, N.N., Kuş, M.S., Acan, N.L., and Tezcan, E.F., “Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz: Moleküler ve Kinetik özellikleri”, *Biyokimya Dergisi*, 22, (1997), 25-33.
- [57] Ulusu, N.N., Kuş, M.S., Acan, N.L., and Tezcan, E.F., “A rapid method for the purification of glucose 6-phosphate dehydrogenase from bovine lens.” *The Int. J. of Biochem. & Cell Biology*, 31, (1999), 787-796.
- [58] Bautista, J.M., Mason, P.J., and Luzatto, L., “Purification and properties of human glucose 6-phosphate dehydrogenase made in E.coli”, *Biochim. Biophys. Acta*, 1119, (1992), 74-80.
- [59] Olaniyi, A., Babalona, G., Beetlestone, V.G., and Luzatto, L., “Genetic variants of human erythrocyte glucose 6-phosphate dehydrogenase”, *V. Biol. Chem.* 251, (1976), 2993-3002.
- [60] Hirono, A., Kuhl, W., Gelbart, T., Forman, L., Fairbanks, V.F., and Beutler, E., “Identification of the binding domain for NADP<sup>+</sup> of human glucose 6-phosphate dehydrogenase by sequence analysis of mutants.” *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, (1989), 1005.
- [61] Grunwald, M., Hill, H.Z., “Characterization of the glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in rat liver mitochondria”, *Biochem J.* (1976), 159,683-687.
- [62] Yoshida, A., “Kinetics and molecular abnormalities of

- human G6PD,(in Glucose 6-phosphate dehydrogenase)", *Academic Press Inc. Ltd*, 41, London, (1978), 347-355.
- [63] Anonim, "Standardization of procedure for the study of glucose 6-phosphate dehydrogenase", *WHO Teach. Rep. Ser.1*, (1967), 366.
- [64] Beutler, E., "Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency, Hemolytic anemia in disorders of red cell metabolism", *Plenum Medical Book Company*, Newyork, (1978), 23-167.
- [65] Beutler, E., "The genetics of glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency", *Semin Hematol*, 27, (1990), 137.
- [66] Telefoncu, A., ve Telefoncu. F., "Glucose 6-fosfat dehidrogenaz aktivitesine Primaguine'in etkisi", *Tr.J.of Medical Sciences*, 14, (1989), 57-63.
- [67] Cheng, H.M., and Chylack, L.T., "Regulation and stabilization of lens glucose 6-phosphate dehydrogenase", *Exp. Eye.Res*, 24, 1977, 459-466.
- [68] Gordon, G., Mackow, M.C. and Levy, H.R., "On the mechanism of interaction of steroids with human glucose6-phosphate dehydrogenase", *Archives of Biochemistr and Biophysics*,318, (1995), 25-29.
- [69] Kosow, P.D., "Glucose 6-phosphate dehydrogenase of human blood platelets kinetics and regulatoryproperties", *Arch. Biochem. Biophysics*,



162, (1974), 186-193.

- [70] Olive, C., and Levy, H.R., "Glucose 6-phosphate dehydrogenase from *leuconostoc mesenteroides*", Wood. W.A., (ed), *Methods Enzymol, Academic Press Inc, Cilt XII, London, (1975), 196-201.*
- [71] Anderson, L.E., and Duggan, J.X., "Light Modulation of Glucose 6-phosphate dehydrogenase", *Plant Physiol.* 58, (1976), 135-139.
- [72] Mishara, P.N., and Patnaik, B.K., "Effect of cold stress and starvation on the cerebral glucose 6-phosphate dehydrogenase activity of male garden lizards of three different age groups", *Neurobiol Aging* 14, (1993), 217.
- [73] Chang H.L., Holten, D., and Karin, R., "Distribution of the multiple molecular forms of glucose 6-phosphate dehydrogenase in different physiological states", *Can. J. Biochem.* 57, (1979), 396.
- [74] Morelli, A., Benatti, U., Gaetani, G.F., and De Flora, A., "Biochemical mechanism of glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency", *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75, (1978), 4.
- [75] Laemmli, D.K., "Cleavage of structural proteins during assembly of the head of Bacteriophage T4", *Nature*, London, (1970), 227,680.
- [76] Orzalesi, N., Sorcinelli, R., and Guiso, G., "Increased incidence of cataracts in male subjects deficient in

glucose 6-phosphate dehydrogenase”, *Arch Ophthalmol*, 99, (1981), 69-70.

- [77] Kerns, K.W., Glucose 6-phosphate dehydrogenase from cow adrenal cortex, Wood, W.A. (ed), *Methods Enzymol. Academic Press, Inc. Cilt XLI*, London., 1975, 188-196
- [78] Çoban, A.K., Çiftçi, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., “Purification of glucose 6-phosphate dehydrogenase from parsley (*petroselinum hortense*) leaves and investigation of some kinetic properties”, *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, (2002).
- [79] Maeda, M., Constantoulakis, P., Chen, C.S., Stamatoyannopoulos, G., and Yoshida, A., “Molecular abnormalities of a human glucose 6-phosphate dehydrogenase variant associated with undetectable enzyme activity and immunologically crossreacting material”, *Am. J. Hum. Genet.* 51, (1992), 386-395.
- [80] Cappellini, M.D., Tavazzi, D., Martiner Di Monstemuros, F., Sampietro, M., Gaviraghi, A., Carandini, D., and Fiorelli, G., “Alternative splicing of human G6PD Messenger RNA in K562 cells but not in cultured erythroblast”, *Eur. J. Clin. Invest*, 23, (1993), 188-191.
- [81] Zinkham, W.H., “A deficiency of glucose 6-phosphate dehydrogenase activity in lens from individuals with primaquine-sensitive erythrocytes.”, *Bull Johns Hopkins Hosp.* 109, (1961), 206-10

- [82] Pannacciulli, I., Tizianello, A., and Salvidio, E., "L'attivit  della G6PD e 6PGD dei leucociti, delle piastrine, delle cellule midollari, spleniche, epatiche e di tessuto gastrico in soggetti con eritroenzimopenia familiare.", *Boll Soc Ital Biol Sper.* 42, (1966), 1552-7
- [83] Orzalesi, N., Sorcinelli, R., and Binaghi, F., "Glucose 6-phosphate dehydrogenase in cataracts of subjects suffering from favism", *Ophthalmol Res.* 8, (1976), 192-4.
- [84] Beutler, E., "G6PD deficiency", *Blood*, 84, (1994), 3613-3636.
- [85] Valentine, W.N., Tanaka, K.R., and Paglia, D.E., "Hemolytic anaemias and erythrocyte enzymopathies", *Ann. Intern. Med.* (1985), 103,245.
- [86] Zanella, A., Colombo, M.B., Rossi, F., Merati, G., and Sirchia, G., "Congenital non-spherocytic haemolytic anemias". *Haematologica*, (1989), 74,387.
- [87] Donald, D., Town, M., Mason, P., Vulliamy, T., and Luzzatto, L., "Deficiency in red blood cells", *Nature*, (1991), 350,115.
- [88] Beutler, E., *Hematology*, McGraw-Hill Book Company, New York., (1991), 591-612
- [89] Coulibaly, F.H., Koffi, G., Toure, H.A., Bouanga, J-C., Allangba, O., Tolo, A., Sawadogo, D., Sanogo, I., Konate, S., Prehu, C., Sangare, C., and Galacteros, F., "Molecular genetics of glucose 6-phosphate

- dehydrogenase deficiency in a population of newborns from Ivory Coast”, *Clinical Biochemistry*, 33, (2000), 411-413.
- [90] Dwivedi, R.S., and Pratap, V.B., “Alteration in glutathione metabolism during cataract progression”, *Ophthalmic Res.* 19, (1987), 41-44.
- [91] Jagues, P.F., Chylack, L.T., Gandy, R.B., and Hartz, S.C., “Antioxidant status in persons with and without senile cataract”, *Arch. Ophthalmol.* 106, (1988), 337-340.
- [92] Orzalesi, N., Fossarello, M., Sorcinelli, R., and Schlich, U., “The relationship between glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency and cataracts in Sardinia. An epidemiological and biochemical study”, *Doc Ophthalmol.* (1984), 57,187.
- [93] Bradford, M., M., A., “Rapid and Sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”, *Anal.Biochem.*72, (1976), 248.
- [94] Yüreğir, G., Varinli, İ., and Donma, O., “Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency both in red blood cells and lenses of the normal and cataractous native population of Çukurova, the Southern Part Turkey”, *Patr I. Ophthalmic Res.* 21, (1989), 155-7.
- [95] Kinoshita, J.H., “Selected topics in ophthalmic biochemistry”, *Arch. Ophthalmol.* 72, 1964, 554-572.

- [96] Ohrloff, C., Bous, F., and Hockwin, o., “Competition for glucose 6-phosphate by enzymes of bovine lenses”, *Doc. Ophthalmol.* 8, (1976), 177-183.
- [97] Bilgili, C., Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enziminin köpek karaciğerinden saflaştırılması ve bazı özelliklerinin tanımlanması. Doktora Tezi, Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1992.
- [98] Çiftçi, M.Küfrevioğlu, Ö.İ., Gündoğdu, M., Özmenİ., “Effects of some antibiotics on enzyme activity of glucose-6- phosphate dehydrogenase from human erythrocytes”. *Pharmacol Res.*, 41,(2001), 109-113.
- [99] Çiftçi, M., Bilici, D., and Küfrevioğlu, “Effects of melatonin on enzyme activity of glucose 6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes *in vitro* and from rat erythrocytes *in vivo*”. *Pharmacol Res.*, 44, (2003), 7-11.
- [100] Atalay, A., ve Aker, A., “Maya glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enziminin dietilnitrozamin tarafından inhibisyonu”, *Biyokimya Dergisi*, IX, (1984), 3,71.
- [101] Alıcıgüzel, Y., Yücel, G., Özben, T.,Aksu, T.A., Tosun, N., Gümüşlü, S., ve Yılmaz, R.N., “2,4-Diklorofenoksiasetik asitin in vitro eritrosit glukoz 6-fosfat dehidrogenaz ve redükte glutatyon üzerine etkisi”, *Biyokimya dergisi, kongre özel sayı*, XIV, (1989), 76.
- [102] Çiftçi, M., Özmen, İ., Büyükokuroğlu, M.E., Pençe,

- S., and Küfrevioğlu, "Effects of metamizol and magnesium sulfate on enzyme activity of glucose 6-phosphate dehydrogenase from human erythrocyte *in vitro* and rat erythrocyte *in vivo*" *Clinical Biochemistry*, (2004), 297-302.
- [103] Meloni, T., Carta, F., Forteleoni, G., Carta, A., Ena, F., Meloni, GF., "Glucose6-phosphate dehydrogenase deficiency and patients in Northern Sardinia", *American Journal of Ophthalmology*.110, (1990), 66-4.
- [104] Beutler, E.,. Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency and other enzyme abnormalities, in Beutler, E., Lichtman, M.A., Coller, B.S., Kipps, T.J., (eds). Williams hematology. McGraw-Hill, New York, 1995, 564
- [105] Valentine, W.N., and Paglia, D.E., "Erythroenzymopathies and hemolytic anemia: The many faces of inherited variant enzymes", *J.Lab.Clin.Med.* (1990), 115,12
- [106] Corpas, F.J., Garcia-Salguero, L., Peragon, J., and Lupianez, J.A., "Kinetic properties of hexose-monophosphate dehydrogenases. I. Isolation and partial purification of glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency in a population of newborns from Ivory Coast", *Clinical Biochemistry*,33, (1995), 411-413.
- [107] Kuby, S.A., and Noltmann, E.A., "Glucose 6-phosphate dehydrogenase (crystalline) from Brewers'

yeast”. *Methods Enzymol Academic Pres.* Orlando,(1966), 116-125

- [108] Yılmaz, H., Çiftçi, M., Beydemir, Ş., and Bakan, E., “Purification of glucose 6- phosphate dehydrogenase from chicken erythrocytes and investigation of some kinetic properties”, *Preparative Biopchemistry and Biotechnology*, (2002) .
- [109] Bradford, M.M., “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”, *Anal. Biochem.* (1976), 72,248.
- [110] Flora, A., Morelli, A., Benatti, U., and Giuliano, F., “An improved procedure for rapid isolation of glucose 6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes”, *Arch. Biochem. Biophys.* 169, (1975), 362-363.
- [111] Lee, C., “Glucose 6-phosphate dehydrogenase from mouse”, *Methods Enzymol Academic Pres. USA*, (1975), 252-257
- [112] Kuş, M.S., Normal senil kataraktlı ve diabetik kataraktlı insan lensi glukoz 6-fosfat dehidrogenazlarının kısmen saflaştırılması ve özelliklerinin karşılaştırılması. Ph. D. Tezi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 1979.