

MUHTELİF YAŞ GRUPLARINDAKİ SAĞLAM ŞAHISLARDA ERİTROSİT GLUKOZ-6-FOSFAT DEHİDROGENAZ ENZİMİ KİNETİĞİ ÜZERİNE BİR ÇALIŞMA (x)

Dr. Tevfik Aslan AKSU (xx)

ÖZET

10 kordon kanı, 10 yeni doğan ve 10 yetişkinde, spektrofotometrik olarak Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz enzimi aktivitesi ölçüldü. Üç değişik substrat konsantrasyonu kullanılarak enzime ait Km ve Vm değerleri tesbit edildi. Enzim aktivitesi kordon kanında 3.93 ± 1.53 Ünite/gm Hb, yeni doğanda 4.31 ± 0.93 Ünite/gm Hb, yetişkinde 4.76 ± 1.16 Ünite/gm Hb olarak tesbit edildi. Eritrosit hemolizasyonu ile yapılan ölçümlerde enzime ait kaba Km değeri 31-38 mikrom. bulundu. Mevcut bilgilerin ışığında sonuçların tartışması yapıldı.

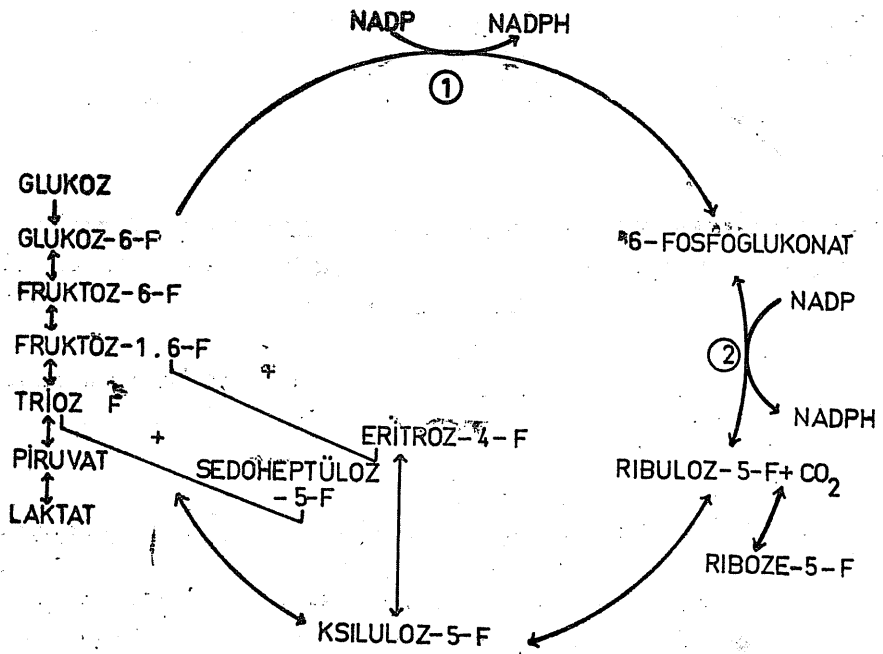
1. Giriş :

Glukoz -6- Fosfat Dehidrogenaz (G6PD) enzimi eritrosit metabolizmasında çok önemli bir yer işgal eder. Bu enzim bilindiği gibi pentoz fosfat yolunun (Şekil 1.) ilk enzimidir ve Glukoz-6- Fosfat (G6P)'ı 6 fosfoglukonat'a çevirir ve bu sırada bir molekül NADP, NADPH haline dönüşür. Pentoz fosfat yolunda 2. kademe 6-Fosfoglukonat Dehidrogenaz enzimi tarafından katalize edilen safhadır ki burada da 6-fosfoglukonat ribuloz-5-fosfat'a dönüşür, yine bir molekül NADPH ve ayrıca bir molekül CO₂ teşekkül eder.

Eritrosit içinde normal şartlarda glukozun % 3-11 i pentoz fosfat yolunda metabolize edilir. Bu metabolik yolun eritrosite neler temin ettiği Şekil 2. de gösterilmiştir. Bunların en başında NADPH sentezi gelir. NADPH eritrosit hayatı için çok lüzumlu bir maddedir. Bu madde eritrosit içinde enerji temini için kullanılmaz, ancak eritrosit bütünlüğünü sağlayan bir çok reaksiyonda kofaktör rolünü oynar. Bu reaksiyonlar; glutasyon ve metemoglobin redüksiyonu ve bazı enzimlerin stabilize edilmesidir.

Pentoz fosfat yolunun anahtar enzimi olan G6PD aktivitesinin hayatın

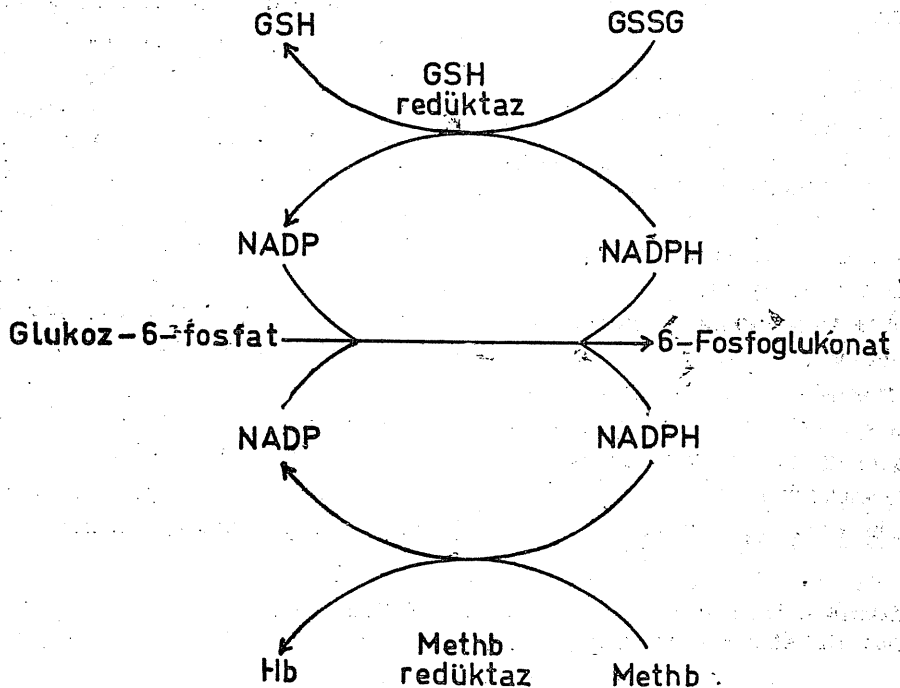
(x) Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Bölümü Çalışmalarından.
(xx) Doç. Dr. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Bölümü Öğretim Üyesi.



① GLUKOZ-6-FOSFAT DEHİDROGENAZ

② FOSFOGLUKONİK DEHİDROGENAZ

Şekil ; 1 Pentoz fosfat metabolik yolu.



Şekil ; 2 NADPH'nin kofaktör olarak katıldığı reaksiyonlar.

muhtelif periyodlarında farklı olduğuna dair raporlar vardır. Gross ve Hurwitz(1) Zinkham(2), Fois ve arkadaşları(3) ve Witt (4) G6PD aktivitesini yeni doğanda erişkine göre yüksek bulmuşlardır. Sadece Tada ve Watanebe(5) enzim aktivitesini prematürelere, normal yeni doğanlara göre düşük olarak tesbit etmişler, fakat normal doğanla, süt çocukları arasında bir fark bulamamışlardır.

Biz de bu çalışmayı, hem G6PD aktivitesini ölçme metodunu kurmak ve hem de kordon kanı, yeni doğan ve yetişkinleri bu enzimin çeşitli kinetik parametreleri yönünden kıyaslamak gayeleri ile düzenlemiş bulunuyoruz.

2. Materyal ve Metod :

Materyal : Çalışmamızda kullanılan kan nümuneleri, Fakültemiz Doğumünde dünyaya gelen bebeklerin göbek kordonlarından, Yeni Doğan Servisindeki 0-7 günlük bebeklerden elde edildi. Yetişkinlere ait kan örnekleri ise, laboratuvar personelimizden ve orta öğrenim yapan öğrencilerden

aldı. Nümuneler, fiziksel ve laboratuvar bulguları yönünden tamamen normal ve özellikle hemolitik bir hikâyesi veya tezahürü olmayan şahıslar arasından seçildi. Kan nümuneleri ACD solüsyonu üzerine alındı ve ilk üç saat içinde analiz edildi.

Metod : G6PD enzimi aktivitesi eritrosit hemolizatında tayin edildi. Ölçüm Unger ve Wiener(6) metodu ile yapıldı.

A) Kullanılan reaktifler :

1. 0.25 M Tris tamponu, pH 7.4
2. 0.154 M KCl (izotonik)
3. 0.12 M MgCl₂
4. 0.0125 M NADP
5. 0.0625 M Glukoz-6-Fosfat (G6P).

B) Deneyin yapılışı : Kan nümunesi izotonik KCl solüsyonu ile 3 defa yıkandı. Son santrifügasyonu takiben eritrositler distile su ilâvesi ile takriben 100 defa sulandırılarak hemolize edildi ve analize geçildi. Enzim aktivitesinin, Km ve Vm değerlerinin-tesbiti amacı ile 3 değişik substrat konsantrasyonunda ölçülebilmesi için aşağıdaki deney şeması düzenlendi :

		Kör	I nolu Substrat	II nolu Substrat	III nolu Substrat
Tris	(ml)	0.50	0.50	0.50	0.50
MgCl ₂	«	0.20	0.20	0.20	0.20
Su	«	1.50	1.38	1.35	1.30
NADP	«	—	0.10	0.10	0.10
G6P	«	—	0.02(x)	0.05(x)	0.10
Hemolizat	«	0.30	0.30	0.30	0.30
Toplam	«	2.50	2.50	2.50	2.50

(x) Tris tamponu ile 1/10 defa sulandırılmış 0.00625 M lık G6P solüsyonu

Hazırlanan deney şemasına göre son G6P molariteleri; I nolu substratta 5×10^{-6} M, II nolu substratta 12.5×10^{-6} M, II nolu substratta 250×10^{-6} M idi.

Spektrofotometrik ölçüm Beckman DU-2 spektrofotometresinde ve 340 milimikron dalga boyunda yapıldı. Hemolizatta mevcut Hb, siyanmethe-moglobin metodu ile tayin edildi ve enzim aktivitesi, hemolizatin ihtiva ettiği 1 gm Hb başına düşen enzim ünitesi olarak ifade edildi (Ünite/gm Hb).

Bilindiği gibi bir dakikada 1 mikromol NADP indirgeyen ve 1 mikromol NADPH teşekkülüne sebep olan enzim aktivitesi bir ünite olarak kabul edilir. Çalışmamızda ölçüm 340 milimikron dalga boyunda yapıldığına göre, 1 mikromol NADPH teşekkül ettiği zaman optik dansitede (OD) artış 1 ml hacim ve 10 mm lik ışık yolunda 0.00622 olur. Bu ön bilgiden hareket ederek enzim aktivitesi şu şekilde formüle edilebilir. Deneyimizde kuvetteki son hacim 2.5 ml olduğuna göre 1 mikromol NADPH teşekkül etmesi halinde OD de artış $0.00622/2.5 = 0.00249$ bulunur veya OD deki 0.001 artış, $0.001//0.00249 = 0.402$ mikromol NADPH oluşumuna tekabül eder. Deney sırasında bir dakikada tesbit edilen OD artışı A ile ifade edilir ve 0.3 ml hemolizatta mevcut olan Hb C ile gösterilirse

Enzim Aktivitesi (Ünite/gm Hb) = $A \times 0.402 / C$ olur.

Çalışmamızda enzimatik reaksiyonlar değişik sıcaklıklarda yapıldı. Ancak her deney sırasında temperatür dikkatle tesbit edildi ve bu konuda

elde mevcut faktörlerle(6) çarpılmak suretiyle sonuçlarımız 25°C için standardize edildi.

3. Bulgular :

Bulgularımızı 2 kısımda takdim edeceğiz :

1) Enzim satürasyonu ile ilgili çalışmalar ve sonuçları.

2) Muhtelif yaş periyotlarında tesbit edilen G6PD aktiviteleri ve kinetik parametreler.

1) Her ne kadar G6PD enziminin satüre olduğu konsantrasyonlar daha önceden tesbit edilmişse de, biz memleket şartlarımızda müsrif olmamak gayesiyle bu konuda bir ön çalışma yapmayı ve deneysel olarak maksimal hızı veren en düşük substrat konsantrasyonunu bulmayı uygun gördük. Nitekim çeşitli deney sonuçları gösterdi ki: $250 \times 10^{-6}\text{M}$ ve 1×10^{-3} M substrat konsantrasyonları- hızları yönünden farklı değildiler. Hatta bazı ölçmelerde, muhtemelen substrat inhibisyonuna bağlı olarak enzimatik aktivitede düşme bile tesbit edildi. Enzim doyurulması ile ilgili bulgular Tablo I. de gösterilmiştir.

2) G6PD ile ilgili çalışmalar 3 yaş grubunda yapıldı. Her grupta 10 değişik kan örneği analiz edildi. Grup A da kordon kanları, Grup B de 0-7 günlük yeni doğan bebekler, Grup C de de yetişkin şahıslar vardı.

Üç değişik substrat konsantrasyonunda ölçülen enzim aktiviteleri Tablo II. de topluca takdim edildi. II nolu substrat dışında diğer konsantrasyonlarda A, B, C, grupları arasında enzimatik aktivite yönünden bir fark

Tablo I. G6PD Enziminin Satürasyonuna Ait Bulgular

Vaka	Deneyde kullanılan G6P (ml)	Substrat konsantrasyonu	Enzim aktivitesi(Ünite/gm Hb)
B.D.	0.1	250x10-6M	3.336
B.D.	0.4	1x10-3M	3.336
B.Ş.	0.1	250x10-6M	3.348
B.Ş.	0.4	1x10-3M	2.916
E.K.	0.1	250x10-6	5.099
E.K.	0.4	1.10-3M	4.940
H.C.	0.1	250x10-6M	5.294
H.C.	0.150	375x10-6M	5.450
H.C.	0.2	5x10-4M	5.551
H.C.	0.4	1x10-3M	5.526

Tablo II. Üç değişik G6P Konsantrasyonunda Tesbit Edilen Enzim Aktiviteleri

Yaş Grupları	I nolu substrat (5x10-6M)	II nolu substrat (12.5x10-6M)	III nolu substrat (250x10-6M)(satüre enzim)
Grup A(n=10)	0.71±0.20	1.29±0.31	3.93±1.53
Grup B(n=10)	0.86±0.31	1.47±0.33	4.31±0.93
Grup C(n=10)	0.84±0.18	1.46±0.40	4.76±1.16

görülmedi. Ancak III nolu substratta A ve C grupları arasındaki fark önemli bulundu ($p < 0.05$).

G6PD enzimine ait Km ve Vm değerleri, deney sonuçlarına göre Lineweaver-Burk e doğrusu çizilerek hesap edildi. Tablo III. de üç yaş grubuna ait Km ve Vm değerleri görülmektedir.

4. Tartışma :

Çalışma bulgularını takdimlerindeki sınıflandırmaya uygun olarak tartışacağız.

Bu çalışmamızla bölümümüzde ilk defa G6PD enzimi aktivitesinin ölçül-

mesine dair metodu uygulamış ve ölçümle ilgili temel prensipleri tesbit etmiş bulunuyoruz. Kanaatımızca bu çalışmada kullanılan Unger ve Wiener metodu sadece bir ultraviole spektrofotometresinin mevcudiyetinde rahatlıkla uygulanabilir. Dikkatli olarak çalışıldığı zaman gayet düşük substrat konsantrasyonlarında dahi elde edilen v hızları, muntazam bir Lineweaver-Burke doğrusunun çizilebilmesine imkân vermişlerdir. Enzimin $250 \times 10^{-6}M$ lık bir substrat konsantrasyonu ile doyurulabildiğinin tesbiti, uygulama sırasında daha yüksek konsantrasyonlar

Tablo III. Muhtelif Yaş Gruplarındaki Normal Şahıslarda G6PD Enzimine ait Km ve Vm değerleri.

Yaş Grupları	Km	Vm
Grup A(kordon kanı)	31x10-6M	4.26±1.59
Grup B (yeni doğan)	29x10-6M	4.62±0.93
Grup C (yetişkin)	38x10-6M	5.23±1.36

kullanmayı önlemek yönünden yararlı bir sonuçtur.

Şekil 1. in incelenmesinden anlaşılacağı üzere pentoz fosfat yolunda NADPH sentezi ile sonuçlanan 2 reaksiyon vardır. Bunlardan ilki bizim ilgilendiğimiz G6PD enzimi tarafından yöneltir ve 6-fosfoglukonat ve NADPH teşekkülü ile sonuçlanır. İkinci reaksiyon ise hemen birinciyi izler ve 6-fosfoglukonik dehidrogenaz tarafından katalize edilmek suretiyle, ribüloz-5-fosfat, NADPH ve CO₂ teşekkülüne sebep olur. Hâlbuki eritrosit hemolizatlarında G6PD daima 6-Fosfoglukonik Dehidrogenazla kontaminedir. Yani oluşan NADPH bir değil iki enzimatik reaksiyon ürünüdür. Ancak problem pratik uygulama açısından ele alındığında şu şekilde bir hâl çaresi söz konusu olabilir. Eritrosit hemolizatında glutasyon redüktaz, methemoglobin redüktaz gibi NADPH okside eden sistemler vardır. İşte bu sistemler NADPH nin bir kısmını harcarlar ve çok doğru olmamakla beraber oluşumu gösterilen NADPH nin sadece G6PD reaksiyonu sonucu meydana gelmiş gibi mütealâsına imkân verir(7). O halde G6PD aktivitesinin saf olarak tayin edilmesi isteniyorsa daha değişik bir metod uygulaması gerekmektedir. Bu gaye için Dünya Sağlık Teşkilâtının

366 nolu raporuna (8) ve (9) nolu kaynağa başvurulabilir.

G6PD enziminin kinetik özellikleri hakkında çalışma yaparken bazı temel prensipler üzerinden hareket edilmesi Dünya Sağlık Teşkilâtı tarafından tavsiye edilmiştir((8). Bunlar; deney sıcaklığında üniformitenin temini, kinetik çalışmaların pürifiye edilmiş enzim preparatları ile yapılması ve enzim aktivitesinin nümunenin özelliğine göre gram Hb başına veya 10¹⁰ eritrosit başına düşen miktarlar olarak ifade edilmesidir. Aktivitenin 1 veya 100 ml kan başına düşen ünite olarak bildirilmesi bugün için en seyrek kullanılan bir usüldür. Eritrosit sayımı da büyük hatalara maruz kalabileceğine göre, bazı mahsurlarına rağmen aktiviteyi bildirmekte en uygun yolun gram Hb başına düşen ünite olabileceği kanısında birleşilmiştir (8, 9). Buna rağmen son bildiriş tarzının da hatalı yönleri belirtilmelidir. Zira enzimatik aktivite hemoglobinin konsantrasyonundan ziyade eritrosit sayısı ile orantılıdır. Bu itibarla enzim aktivitesi gram Hb başına hesaplandığında meselâ hipokrom anemilerde düşük, hipokrom anemilerde yüksek bulunabilir (9).

G6PD aktivitesi çalışmamızda kordon kanı, yeni doğan ve yetişkin kanlarında farklılık göstermemiştir. Ancak

aktivite bildirilmesinde en tavsiye edilen yolu seçmemize rağmen bu yol kordon-yeni doğan kanları ile erişkin kanlarını mukayese etmekte sıhhatli bir kıstas olmayabilir. Zira gerek kordon kanı ve gerekse yeni doğan eritrositleri, erişkin eritrositlerine göre hem daha büyük ve hem de daha fazla Hb ihtiva ederler(10). Bu itibarla gram Hb başına bildiriş aktivitenin kordon ve yeni doğan kanlarında relatif olarak düşük bulunmasına yol açabilir. Bu yargıya dayanarak kanaatımızı, G6PD aktivitesinin kordon ve yeni doğan kanlarında, yetişkinlere nazaran daha yüksek olduğu şeklinde ifade edebiliriz.

Hernekadar Dünya Sağlık Teşkilâtı İlmî Komitesi Km ölçülmesinin pürifiye

enzimle yapılmasını tavsiye ediyorsa da biz bu ölçümü şimdilik teknik imkânsızlığımız nedeniyle hemolizat kullanarak yaptık. Normal G6PD (Gd(+),B) enziminin glukoz-6-fosfat için Km değeri muhtelif kaynaklara göre (8, 11, 12) 39-78 mikroM arasında bildirilmiştir. Bizim tesbit ettiğimiz 31 - 38 mikroM lık seviye muhtemelen pürifiye enzimle çalışılmaması sonucudur. Ancak bulgularımızın enteresan sayılabilecek bir yönü Km değerlerinin kordon ve yeni doğan kanlarında aynı, buna karşılık yetişkin kanında nisbeten yüksek oluşudur. Bu farklılık ayrıca yüksek Km- düşük enzim substrat ilişkisi nedeniyle hayatın başlangıcında daha aktif bir G6PD bulunduğu fikrini destekler mahiyettedir.

SUMMARY

A STUDY OVER THE ENZYME KINETICS OF ERYTHROCYTE GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE IN VARIOUS AGE GROUPS

Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase activity has been measured spectro-photometrically in 10 cord bloods, 10 newborns and 10 adults. In addition, Km value for Glucose-6-phosphate was determined in three groups by using different substrate concentrations. Enzyme activities were

3.93±1.53 (Units/gm Hb), 4.31±0.93 and 4.76±1.53 in cord bloods, newborns and adults respectively. Rough Km value for glucose-6-phosphate ranged 31-38 micro M. Results were discussed in the light of current medical literature.

KAYNAKLAR

1. Gross, R.T. and Hurwitz, R.E.: The pentose phosphate pathway in human erythrocytes; relationship between the age of the subject and enzyme activity, Pediatrics, 22:453, 1958.
2. Zinkham, W.H.: An in-vitro abnormality of glutathione metabolism in erythrocytes from normal newborns, mechanism and clinical significance. Pediatrics, 23:18, 1959.

3. Fois, A. et al: Comportamento della gluco sio-6-fosfato deidrogenase e del glutathione ridotto negli eritrociti dei neonate a-termine e dei prematuri. *Haematologica* 46:178, 1961.
4. Witt, I et al: Vergleichende biochemische untersuchungen an erythrocyten aus neugeborenen und erwachsenen blut. *Klin. Wschr.* 45: 262, 1967.
5. Tada, K.P. and Watanabe, Y.: Anemia of premature infant: The glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in erythrocytes of cord blood from premature and fullterm infants. *Tohoku J. Exp. Med.*, 76:307, 1962.
6. Grandwohl's Clinical laboratory methods and diagnosis, 7th ed., Mosby St. Louis, Mo., 1970, p. 455.
7. Bergmeyer, H. U.: *Methods of Enzymatic Analysis*, 2nd ed., Verlag Chemie , 1965, p. 744.
8. World Health Organization Technical Report Series, 1967, 366.
9. Lowe, M.L. et al: Microfluorometry of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in red cells. *Clin Chem*; 18: 440, 1972.
10. Oski, F.A. and Naiman, J.L.: Hematologic problems in the newborn. 2 nd. ed., W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1972., p.14.
11. Witt, I. and Yoshioka, S.: Biochemical charecterization of a G6PD variant with favism : G6PD Zahringen. *Klin. Wschr.* 50:205, 1972.
12. Yoshida, A.: Human G6PD : Purification and characterization of Necro type variant (A+) and comparison with normal enzyme (B+). *Biochem. Genet.*, 1:81, 1967.