

İNSAN ERİTROSİT GLUKOZ 6-FOSFAT DEHİDROGENAZ ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE BAZI İLAÇLARIN İN VİTRO ETKİLERİ

EFFECTS OF SOME MEDICAL DRUGS ON ENZYME ACTIVITY OF GLUCOSE 6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE FROM HUMAN ERYTHROCYTES IN VITRO

Mehmet ÇİFTÇİ, Ö.İrfan KÜFREYOĞLU, İlhami KİKİ, Mehmet GÜNDOĞDU

Atatürk Üniversitesi Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (MÇ, İK) ve Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı (İK, MG), Erzurum

Özet

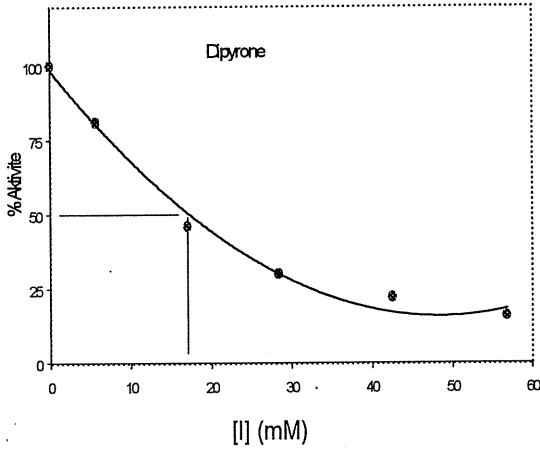
Bazı ilaçların glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzimi üzerinde etkileri incelenmediğinden bu çalışmada, dopamin hidroklorür, dipyrone, digoksin, heparin sodyum, lidokain HCl, hyosin-N-butil bromür, teofilin etilendiamin, cytosine arabinoside, siklofosfamid ve traneksamik asid ilaçlarının insan eritrositlerinden saflaştırılan glukoz 6-fosfat dehidrogenaz üzerinde in vitro etkileri araştırıldı. Bu amaçla önce eritrosit glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzimi, 2',5'-ADP Sepharose 4B jelinin kullanıldığı afinite kromatografisi vasıtasıyla % 28 verimle 13.654 kat saflaştırıldı. Saflaştırma esnasında sıcaklık +2 °C'de kontrol altında tutuldu. Enzim aktivitesi Beutler metoduna göre 340 nm'de spektrofotometrik olarak belirlendi. Bütün kinetik çalışmalarda bu metod kullanıldı. Bu ilaçlardan dopamin hidroklorür, dipyrone, digoksin, heparin sodyum'un söz konusu enzim üzerinde inhibisyon etkileri olduğu tesbit edildi. İnhibisyon etkisi gösteren bu ilaçlar için % aktivite-[I] grafikleri çizilerek I₅₀ değerleri bulundu. Bu ilaçların yaklaşık kan konsantrasyonları hesaplanarak, dipyrone'nun enzimi % 3 oranında; dopamin hidroklorür, digoksin, heparin sodyum'un %1 oranında inhibe ettikleri belirlendi. Diğer ilaçların enzimi inhibe etmedikleri görüldü. Buna göre dipyrone ilacının glukoz 6-fosfat dehidrogenaz eksikliği olan hastalarda kullanılmasının sakıncalı olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: *Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz, Eritrosit, İlaçlar*

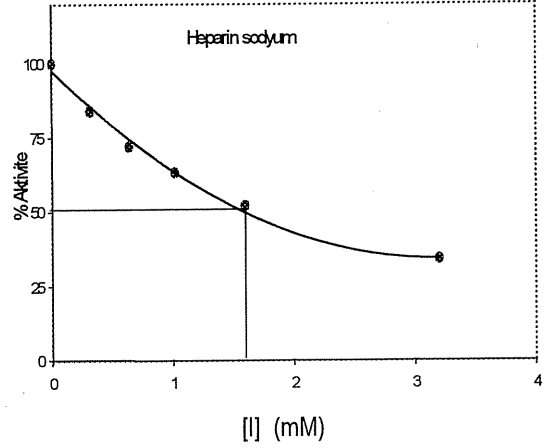
Summary

Since the effects of some drugs have not been analyzed on glucose 6-phosphate dehydrogenase, in the present study, the in vitro effects of dopamine hydrochloride, dipyrone, digoxin, heparin sodium, lidocain HCl, hyosin-N-butyl bromide, theophylline ethylenediamine, cytosine arabinoside, cyclophosphamide and tranexamic acid on glucose 6-phosphate dehydrogenase purified from human erythrocytes were investigated. For this purpose, at the beginning, erythrocyte glucose 6-phosphate dehydrogenase was purified 13.654 times in a yield of 28% by using 2',5'-ADP Sepharose 4B affinity gel. Temperature of +2°C was maintained under control during the purification process. Enzyme activity was determined with Beutler method by using spectrophotometer at 340 nm. This method was utilized for all kinetic studies. The drugs such as ; dopamine hydrochloride, dipyrone, digoxin, and heparin sodium indicated the inhibitory effects on the enzyme. I₅₀ values of the drugs exhibiting inhibitory effects were determined by plotting activity % vs [I]. By calculating approximate blood concentration of this drugs, it was observed that dipyrone inhibited the enzyme in the ratio of 3 % and dopamine hydrochloride, digoxin, heparin sodium inhibited in the ratio of 1%. The other drugs did not show any inhibition effects on the enzyme. Therefore, the dipyrone must not be taken by patients who has deficiency of glucose 6-phosphate dehydrogenase enzyme.

Key words: *Glucose 6-phosphate dehydrogenase, Erythrocyte, Drugs*



Şekil 1. İnsan G6PD Enzimi İçin Dipyron İlacı Kullanılarak 5 Farklı İnhibitör Konsantrasyonunda Elde Edilen % Aktivite-[I] Grafiği



Şekil 2. İnsan G6PD Enzimi İçin Heparin Sodyum İlacı Kullanılarak 5 Farklı İnhibitör Konsantrasyonunda Elde Edilen % Aktivite-[I] Grafiği

Giriş

Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (D-glukoz 6-fosfat: NADP⁺ oksidoredüktaz, E.C. 1.1.1.49, G6PD), pentoz fosfat metabolik yolunun ilk basamağını katalizlemektedir (1,2). Eritrositlerde NADPH oluşumu için tek kaynak, pentoz fosfat metabolik yoludur ve G6PD eksikliğinde NADPH önemli ölçüde azalır. NADPH'ın eritrositlerdeki en önemli rolü ise okside glutatyonun indirgenmesini sağlamaktır. Glutatyonun indirgenmiş formu, serbest tiyol grubu ihtiva eden bir tripeptiddir (α -glutamil sisteinil glisin). Serbest tiyol grubu, hemoglobin ve eritrosit proteinlerini indirgenmiş halde tutarak sülfhidril tamponu görevini görür; aynı zamanda hidrojen peroksit ve organik peroksitlerle reaksiyona girerek detoksifikasyon olaylarında rol alır (2-4). G6PD enzim eksikliği kalıtsaldır. Bugün dünyada 400 milyondan daha çok insan G6PD eksikliğinden etkilenmektedir (5). G6PD eksikliği olan insanlarda asetonilid, metilen mavisi, primaquin, fenilhidrazin, sülfapiridin gibi bazı ilaç ve kimyasal maddelerin enzim üzerindeki inhibisyonundan dolayı, NADPH üretimi azaldığından alyuvarların hemolizi artar ve çok ciddi problemler ortaya çıkabilir (6,7). Bu çalışmada, kalp-damar hastalıklarının tedavisinde kullanılan bazı ilaçlar ile bazı ağrı kesicilerin eritrosit G6PD enzimi üzerindeki inhibisyon etkileri in vitro olarak araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem

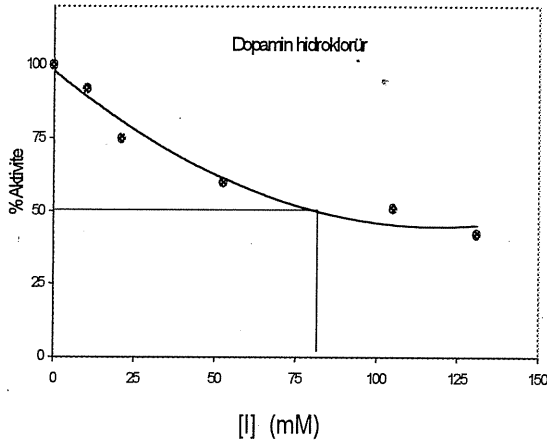
Hemolizatin hazırlanması: EDTA'lı torbalara alınan sağlam taze insan kanı (yaş:34, erkek), 10 ml'lik tüplere konuldu ve 15 dakika 2500 xg'de santrifüj edildi. Tüplerin üst kısmındaki plazma ve lökosit tabakaları damlalıklarla alındı. Daha sonra eritrositler, 0,16 M'lık KCl çözeltisiyle 3 defa yıkandı. Her defasında 2500 xg'de santrifüj edilerek, süpernatant atıldı. Elde edilen eritrositler, hacimlerinin 5 katı kadar buzlu su ile hemoliz edildi. Bundan sonra hücre zarlarının uzaklaştırılması için 10.000 xg 'de 4 °C sıcaklıkta 30 dakika santrifüj edildi. Böylece hemolizat elde edilmiş oldu (8-10). **Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz:** Hemolizatta değişik amonyum sülfat doyumluklarında çöktürme yapılarak, en uygun doyumluk konsantrasyonu olarak % 35-65 arası tesbit edildi. Bu aralıkta katı amonyum sülfatla çöktürülen enzim, 5000 xg'de 15 dakika santrifüj edilerek ayrıldı. Elde edilen çökelek, 50 mM fosfat tamponunda (pH=7,0) çözüldü. Enzim çözeltisi diyaliz torbalarına konarak 2'şer saat süreyle 2 defa değiştirilmek suretiyle, 50 mM K-asetat/ 50 mM K-fosfat (pH=7,0) tamponuna karşı diyaliz edildi. Bütün bu işlemler +4 °C'da yapıldı (8). **Afinite kolonuyla enzimin saflaştırılması:** Kuru haldeki 2',5'-ADP Sepharose 4B jeli, 0,1M K-asetat/ 0,1M K-fosfat (pH=6,0) tamponu

içinde süspansiyon edildi. Jel 1x10 cm boyutlarında soğutmalı ve kapalı sistem oluşturu bir kolona

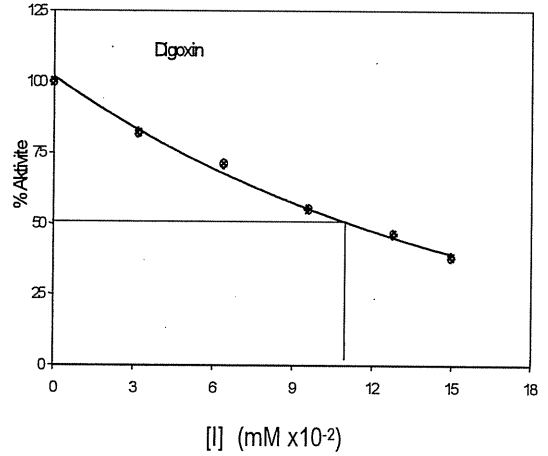
Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz işlemlerinden sonra elde edilen enzim çözeltisi bu kolona tatbik edildi. Yıkama sırasıyla, 25 ml 0,1M K-asetat/ 0,1M K-fosfat (pH=6,0), 25 ml 0,1M K-asetat/ 0,1M K-fosfat (pH=7,85) ve 25 ml 0,1M KCl/ 0,1M K-fosfat (pH=7,85) çözeltileriyle yapıldı. Dengeleme ve yıkama işlemleri sırasında kolon akış hızı 50 ml/saat'a ayarlandı. Yıkama işlemine, 280 nm'de absorbans fosfat dehidrogenaz enzimi aktivitesi ölçümü: Enzim aktivitesi spektrofotometrede 37°C'de Beutler metoduna göre yapıldı. Bu metod NADP⁺'nin indirgenmesinden dolayı oluşan NADPH'nin 340 nm'de absorbans vermesi esasına dayanır (8,12). *Inhibitör çalışmaları:* İlaç olarak dopamin hidroklorür, dipyrone, digoksin, heparin sodyum, lidokain HCl, hyosin-N-butil bromür, teofilin etilendiamin, cytosine arabinoside,

paketlenildi ve aynı tamponla dengelendi.

görülmeyinceye kadar devam edildi. Daha sonra kolona tutunmuş olan G6PD enzimi, 80 mM K-fosfat + 80 mM KCl +0,5 mM NADP⁺ + 10 mM EDTA (pH=7,85) çözeltisiyle elüe edildi. Elüsyon sırasında kolon akış hızı 20 ml/saat'e ayarlandı. Elüatlarda NADP⁺'nin de 280nm'de absorbans vermesinden dolayı, sadece enzim aktiviteleri belirlendi. Aktivite gösteren fraksiyonlar birleştirildi (8,11). *Glukoz 6-siklofosamid ve traneksamik asid* kullanıldı. Bu ilaçlar için, ön denemelerle mümkün olan en yüksek inhibitör konsantrasyonlarında aktivite ölçümü yapıldı. İnhibisyon etkisi gösteren ilaçlar için inhibitörsüz ortamda ve 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda aktivite tayini yapıldı. Daha sonra % aktivite-[I] grafikleri çizilerek, grafiklerden I₅₀ değerleri hesaplandı.



Şekil 3. İnsan G6PD Enzimi İçin Dopamin Hidroklorür İlacı Kullanılarak 5 Farklı İnhibitör Konsantrasyonunda Elde Edilen % Aktivite-[I] Grafiği



Şekil 4. İnsan G6PD Enzimi İçin Digoxin İlacı Kullanılarak 5 Farklı İnhibitör Konsantrasyonunda Elde Edilen % Aktivite-[I] Grafiği

Bulgular

Bu çalışmada ilaç olarak dopamin hidroklorür, dipyrone, digoksin, heparin sodyum, lidokain HCl, hyosin-N-butil bromür, teofilin etilendiamin, cytosine arabinoside, siklofosamid ve traneksamik asid kullanıldı. Bu ilaçlar için, ön denemelerle mümkün olan en yüksek inhibitör konsantrasyonlarında aktivite ölçümü yapılarak, dopamin hidroklorür, dipyrone, digoksin ve heparin sodyum ilaçları, G6PD enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösterirken; lidokain HCl,

hyosin-N-butil bromür, teofilin etilendiamin, cytosine arabinoside, siklofosamid ve traneksamik asid ilaçlarının herhangi bir inhibisyona sebep olmadıkları gözlemlendi. İnhibisyon etkisi gösteren ilaçlar için inhibitörsüz ortamda ve 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda aktivite tayini yapılarak çizilen % aktivite-[I] grafikleri Şekil 1-4'de gösterildi. Bu grafiklerden elde edilen I₅₀ değerleri Tablo 1'de verildi.

Tablo 1. Değişik İlaçlar İçin % Aktivite-[I] Grafiklerinden Elde Edilen I₅₀ Değerleri

ilaç adı (inhibitör)	I ₅₀
dipyron	17 mM
heparin sodyum	1.6 mM
dopamin hidroklorür	85 mM
digoxin	0.11 mM
lidokain HCl	inhibisyon göstermedi
hyosin-N-butil bromür	inhibisyon göstermedi
teofilin etilendiamin	inhibisyon göstermedi
cytosine arabinoside	inhibisyon göstermedi
siklofosamid	inhibisyon göstermedi
traneksamik asid	inhibisyon göstermedi

Tartışma

İnhibisyon çalışmalarında kullanılan ilaçlardan dopamin hidroklorür, dipyron, digoksin ve heparin sodyum; glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösterirken, lidokain HCl, hyosin-N-butil bromür, teofilin etilendiamin, cytosine arabinoside, siklofosamid ve traneksamik asid ilaçları herhangi bir inhibisyona neden olmadı.

Tablo 1'den görüldüğü gibi, dopamin hidroklorür, dipyron, digoksin, heparin sodyum ilaçları için elde edilen I₅₀ değerleri sırasıyla 85mM, 17mM, 0,11mM, 1,6 mM 'dır. Bu değerlere göre bu ilaçların inhibisyon etkilerinin büyükten küçüğe doğru sırası; digoksin (0,11mM), heparin sodyum (1,6 mM), dipyron (17mM) ve dopamin hidroklorür (85mM) şeklindedir. Söz konusu inhibisyon gösteren ilaçlar direkt olarak adale veya damar içi uygulandığından, bir dozun uygulanması sonrasında yaklaşık kan konsantrasyonları şöyledir; digoksin : 0.00128 mM, heparin sodyum: 0.0032 mM, dipyron: 0.568 mM ve dopamin hidroklorür: 0.262 mM. Buna göre söz konusu konsantrasyonlarda ilaçların sebep oldukları % inhibisyon, % aktivite-[I] grafiklerinden (Şekil 1-4) hesaplandığında, dipyron ilacının 1 dozu glukoz 6-fosfat dehidrogenaz üzerinde % 3 oranında inhibisyona sebep olurken, diğer 3 ilaç (digoksin, heparin sodyum ve dopamin hidroklorür) % 1 oranında inhibisyona yol açmaktada olduğu deneysel bulgularımızdan anlaşılmaktadır. Bu inhibisyon değerlerine göre glukoz 6-fosfat dehidrogenaz eksikliği olmayan sağlıklı kişilerde bu ilaçların kullanılması bu enzim açısından fazla sakıncalı görünmemektedir. Ancak dipyron grubu ağrı kesicilerin hemolize sebep olan ilaçlar arasında zikredilmemesine rağmen (6), glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzim eksikliği olan kişilerde, hem enzim yetersizliği hem de söz konusu

ilacın enzimi %3 oranında inhibe etmesi dolayısıyla tedavide kullanılmamasının daha uygun olacağı kanısındayız.

Kaynaklar

- Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM (eds). Principles of Biochemistry, Worth Publishers New York: Inc, 2nd Edition, 1993
- Keha EE, Küfrevioğlu Öİ (yazar). Biyokimya, Erzurum: Şafak Yayınevi, 1997
- Reuter R, Naumann M, Metz P, Kopperschlager G. Purification and characterization of glucose 6-phosphate dehydrogenase from Pseudomonas W6. Biomed Biochim Acta 1990; 7: 539-546
- Yüreğir TG, Aksoy K, Dikmen N, Ünlükurt İ. Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enziminin insan eritrositlerinden kısmi saflaştırılması ve enzimolojik özelliğinin incelenmesi. IX.Ulusal Biyoloji Kongresi, Genel Biyoloji, Nümerik Taksonomi ve Kantitatif Ekoloji Paneli Bildirileri 1988; 1:125-130
- Aksoy K. Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enziminin yapısı. Adana: Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları, 1997
- Beutler E. Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency and other enzyme abnormalities. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BF, Kipps TJ (eds). Williams Hematology, 5th ed., New York: Mc Graw-Hill. 1995:564-580
- Telefoncu A, Zihnioğlu F. Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz aktivitesine primaquine'in etkisi. Tr J Med Sci 1990; 14: 57-63
- Ninfali P, Orsenigo T, Barociani L, Rapa S. Rapid purification of glucose 6-phosphate dehydrogenase from mammal's erythrocytes. Preparative Biochemistry 1990; 20: 297-309
- Delgado C, Tejedor MC, Luque J. Partial purification of glucose 6-phosphate dehydrogenase and phosphofruktokinase from rat erythrocyte haemolysate by partitioning in aqueous two-phase systems. J Chrom 1990; 498: 159-168
- Shreve DS, Levy HR. On the molecular weight of human glucose 6-phosphate dehydrogenase. Biochem Biophys Res Com 1997; 78:1369-1375
- Morelli A, Benatti U, Gaetani GF, De Flora A. Biochemical mechanisms of glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency. Proc Natl Acad Sci 1978; 75: 1979-1983
- Beutler E (author). Red cell metabolism manual of biochemical methods. London: Academic Press, 1971

Yazışma Adresi:

Prof.Ö İrfan KÜFREVOĞLU
Atatürk Üniversitesi, Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi
25240-Erzurum