

Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzim eksikliði gözlenen olgularda eritrosit zarý $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Mg}^{++}$ adenozin 5'-trifosfataz, eritrosit süperoksit dismutaz ve plazma malondialdehit düzeyleri

Dr.Lülüfer TAMER, Dr.Birsel ÜNAL, Dr.Kýymet AKSOY

Ç.Ü. Týp Fakóltesi Biyokimya A.B.D. Balcalý/ADANA

ÖZET: Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) enzimi, pentoz fosfat yolunun ilk ve düzenleyici anahtar enzimi olup reaksiyon neticesinde oluþan NADPH, sülfidril gruplarýnýn korunmasýnda, serbest radikallerin ve peroksitlerin detoksifikasyonunda rol alýr. G6PD enzim eksikliði Çukurova Bölgesinde %8.2 olarak bulunmuþtur. Serbest radikaller, membran lipidlerinin ve de proteinlerin irreversible zararýndan direkt sorumludur. Bu amaçla G6PD enzim eksikliðinde gözlenen hemoliz olayýnýn fizyopatolojisine açýklýk getirmek amacıyla G6PD enzim eksikliði saptanan 8 olgunun eritrosit membran enzimlerinden olan $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Mg}^{++}$ adenozin 5'-trifosfataz ($\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Mg}^{++}$ ATPaz), ile süperoksit dismutaz (SOD) ve hasarýn göstergesi olarak da plazma malondialdehit (MDA) düzeyleri çalýþýlmýþtır. $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Mg}^{++}$ ATPaz enzim aktivitesi kontrol grubunda 299 ± 18 nmol Pi/mg protein/saat iken G6PD enzim eksikliði olan grupta 217 ± 14 nmol Pi/mg protein/saat olarak saptanmýþtır ($p < 0.001$). SOD enzim aktivitesi kontrol ve G6PD enzim eksikliði olan grupta sýrasýyla 1275 ± 237 , 646 ± 227 U/gr Hb olarak bulunmuþtur ($P < 0.001$). MDA düzeyleri ise kontrol grubunda 1.7 ± 1.5 nmol/ml iken, G6PD enzim eksikliði olan grupta 4.4 ± 0.5 nmol/ml olarak bulunmuþtur ($p < 0.001$). G6PD enzim eksikliði gözlenen olgularda hasarýn göstergesi olan MDA düzeyleri artarken, $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Mg}^{++}$ ATPaz ve SOD enzim düzeyleri kontrol grubuna oranla istatistiksel açýdan anlamlý derecede düþük bulunmuþtur.

Anahtar Kelimeler : G6PD, MDA, SOD, $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Mg}^{++}$ ATP'az

GÝRÝþ

Enzim eksiklikleri içinde en yüksek insidansý gösterdiði bilinen Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz (G6PD; D-Glukoz-6-Fosfat: NADP^+ Oksidoredüktaz, ECI.1.1.49) enziminin, yeryüzünde 400 milyondan fazla insaný etkilediði rapor edilmiþtir.^{4,7,24} G6PD enzim eksikliði Türkiye genelinde %0.6.²⁴ Eti Türklerinde %11.4,^{4,24} Çukurova Bölgesinde ise %8.2 olarak rapor edilmiþtir.²⁷ Enzim X kromozomu üzerinde bulunan gen tarafýndan þifrelendiði için X'e baðlý geçiþ göstermektedir.⁸

Eritrositlerde, glukozun %10'u Heksoz Mono Fosfat (HMP) yoluna girmektedir. Enzim, Glukoz-6-Fosfatýn, 6-fosfoglukanolaktone dönüþümünü kataliz

ederken Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat (NADP)'ýn redükte hale geçmesini saðlamaktadır. Oluþan redükte NADP'ler de bir çok biyokimyasal olayýn düzenlenmesinde ve hücreye redükte glutatyon (GSH) temininde kullanýlmaktadır. G6PD enzim eksikliði durumunda, redükte glutatyon üretimi azalacaðýndan, hücre kendisini oksidatif hasara karþý koruyamayacak ve hemolitik anemi tablosu geliþecektir.⁵

Herhangi bir travmaya maruz kalan dokular, immunolojik olan veya olmayan bir etkene karþý, fagositik hücrelerle korunmaya çalýþýrlar. Fagositik hücrelerin en fazla çalýþanlarý, nötrofiller, doku makrofajlarý ve monositlerdir.¹³ Nötrofillerin ve

Bu çalýþma, TÜBÝTAK (TAG-0764) ve Ç.Ü.Araþtırma Fonu (TF 97-43) tarafýndan desteklenmiþtir.

makrofajların aktivasyonu, respiratuar bir patlamayla sonuçlanır. Bu da HMP yolu üzerinde glukoz metabolizmasını ve oksijen tüketimini 2-20 kat artırır. Oksijen tüketimindeki artışla birlikte nötrofillerin ve makrofajların süperoksit anyonu (O_2^-), ile hidrojen peroksit (H_2O_2) salgıladıkları gösterilmiştir.²³

Serbest radikaller membran lipid ve proteinlerinin irreversible şekilde hasara uğramasından sorumludur. Serbest radikallerin protein metabolizmasına etkisi genellikle sülfhidril grupları üzerinedir. Serbest radikallerin etkisinde kalan sülfhidril grupları -S-S- şeklinde döner. Reaktif oksijen türleri, kolayca membran lipidlerini etkileyerek doymamış aldehydlerin oluşmasına neden olmaktadır. Bunlar serbest radikallerden daha dayanıklı olup, direkt hücredeki biyomoleküllerin yapısını bozarak proteinlerin ve diğer moleküllerin modifikasyonuna ve lipid peroksidasyonuna neden olmaktadır. Dolayısıyla doymamış aldehydler eritrositlerin hemolizine ve protein sentezinin inhibisyonuna neden olmaktadır.^{10,17}

Serbest radikallerin bu zararlı etkilerine karşı hücrede bir çok antioksidan savunma sistemi bulunmaktadır. Savunma sisteminde görev alan SOD enzimi ise 2 molekül süperoksit anyonunu hidrojen peroksit dönüştürmektedir.⁹

Bu amaçla G6PD enzim eksikliğinde gözlenen hemoliz olayının fizyopatolojisine açıklık getirmek amacıyla, G6PD enzim eksikliği gözlenen olguların (Yaş ortalaması: 23±9; G6PD enzim düzeyi: 0-4 U/gr Hb) eritrosit membran enzimlerinden olan Na^+ - K^+ / Mg^{++} Adenozin 5'-trifosfataz (Na^+ - K^+ / Mg^{++} ATPaz) ile süperoksit dismutaz (SOD) enzim düzeyleri ve oluşan hasarın göstergesi olarak da plazma malondialdehit (MDA) düzeyleri saptanmaya çalışılmıştır.

MATERYAL ve METOD

Na^+ - K^+ / Mg^{++} ATPaz ENZİM AKTİVİTESİNİN ÖLÇÜMÜ: Eritrosit zarının hazırlanmasında Beutler'in yöntemi kullanılmıştır. Eritrositler izotonik ortamda yıkanarak osmotik şok yoluyla hemoliz edildikten sonra yüksek hızda

santrifüj edilerek hemoglobin ortamdan uzaklaştırılmıştır.⁶

Yüküasyon ortamı Reading ve arkadaşlarının önerdikleri yöntemle göre hazırlanmıştır.^{21,22} Yükseküasyon ortamına eklenen ATP'den açığa çıkan inorganik fosfat ölçümü Ames tarafından önerilen yöntemle göre çalışılmıştır. Yöntem, ATP'den ayrılan inorganik fosfatın fosfomolibdat ile kompleks oluşturmaya prensibine dayanmaktadır.²

PROTEİN ÖLÇÜMÜ: Lowry ve arkadaşlarının geliştirdikleri yöntemle göre ölçülmüştür.¹⁶

PLAZMA MALONDİYALDEHİT ÖLÇÜMÜ: Malondialdehit ölçümü lipid peroksidasyonu sonucu oluşan malondialdehitin (MDA) tiobarbitürik asit (TBA) ile oluşturdukları pembe rengin 532 nm'deki absorbans piddetinin ölçülmesi prensibine dayanmaktadır.¹¹

ERİTROSİT G6PD VE SOD ENZİM AKTİVİTESİNİN ÖLÇÜMÜ: Eritrosit içi SOD enzim aktivitesi Randox kit yöntemine göre çalışılmış ve enzim aktivitesi U/gr Hb olarak verilmiştir. Bu yöntemin prensibi Ksantin oksidaz kullanmak sureti ile ksantinden süperoksit radikalleri oluşturularak bu radikallerin 2-(4 iyodofenil)-3-(4 nitrofenol)-5 fenil tetrazolium klorid (INT) ile kırmızı bir formazon boyası oluşturması esasına dayanmaktadır. Daha sonra SOD aktivitesi bu reaksiyonun inhibisyon derecesi ile ölçülmektedir (Randox laboratories, Ardmore, U.K.). Eritrosit G6PD enzim aktivitesi ise Beutler yöntemine göre spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.⁴

İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER: Gruplara ait ortalama±standart sapma ($X \pm SD$) değerleri ve gruplar arasındaki farkın önem kontrolü student-t testiyle çalışılmıştır.²⁵

BULGULAR

Tablo-1 'de gözlemlendiği gibi kontrol grubunda Na^+ - K^+ / Mg^{++} ATPaz enzim aktivitesi 299 ± 18 nmol Pi/mg protein/saat iken G6PD enzim eksikliği gözlenen grupta 217 ± 14 nmol Pi/mg protein/saat olarak saptanmıştır ($p < 0.001$). SOD enzim aktivitesi kontrol ve G6PD enzim eksikliği gözlenen grupta sırası ile 1275 ± 237 , 646 ± 227 U/gr Hb olarak

bulunmuştur ($p<0.001$). MDA düzeyleri ise kontrol grubunda 1.7 ± 1.5 nmol/ml iken, G6PD enzim eksikliği gözlenen grupta 4.4 ± 0.5 nmol/ml olarak saptanmıştır ($p<0.001$).

Tablo 1 :Kontrol ve G6PD Enzim Eksikliği Gözlenen Gruplara ait $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Mg}^{++}$, SOD ve MDA düzeyleri.

	$\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Mg}^{++}$ ATP az nmol Pi/mg protein/saat	SOD U/gr Hb	MDA nmol/ml
G6PD Eksikliği n=8	217±14	646±227	4.4±0.5
Kontrol n=10	299±18	1275±237	1.7±1.5
p	$p<0.001$	$p<0.001$	$p<0.001$

Tablodaki değerler Ortalama±standart sapma ($\bar{X}\pm\text{SD}$) olarak verilmiştir.

n: Denek Sayısı. p: Gruplar arasındaki farkın önem kontrolü.

TARTIPMA

G6PD enzimi tüm dokularda bulunmasına rağmen, eksikliğin en fazla eritrositlerde gözlemlendiği ve bu eksikliğin dünyada en yaygın enzim eksikliği olduğu bildirilmiştir.^{7,14,15}

G6PD enzim aktivitesini, alınan besinlerin kalite ve kantitesi, hormonlar ve NADPH düzeyi etkilemektedir. Enzimin kataliz ettiği reaksiyon neticesinde oluşan redükte NADP'ler sülfhidril gruplarının korunmasında, serbest radikallerin ve peroksidlerin detoksifikasyonunda, yağ asidi sentezi gibi bir çok biyosentetik reaksiyonda kullanılmaktadır.¹⁸

Okside glutatyonun hücre içi redüksiyonunu kataliz eden Glutatyon Redüktaz enziminin koenzimi olan NADPH 'lar, G6PD enzimi eksik olgularda yeterince üretilmeyeceği için eritrositler oksidatif strese karşı korunamayarak 120 günden önce yıkılacaktır.^{3,5} Enzim eksikliği olan olgularda O_2 tüketiminin ve serbest radikal üretiminin arttığı bilinmektedir. Artan serbest radikal üretiminin, metHb oluşumuna sebep olacağı ve antioksidan mekanizmanın, oluşan metHb 'ni dolaylı olarak temizleyemeyeceği rapor edilmiştir. Hemoglobinin oksidasyonu ile oluşan süperoksit anyonları enzim eksikliği nedeniyle yeteri kadar üretilmeyen NADPH eksikliğine bağlı olarak uzaklatılamayacak ve yetersiz GSH nedeniyle, glutatyon peroksidaz işlevini tam göremeyecektir.^{3,5,7,12}

Bu çalışmadaki bulgulara göre G6PD enzim eksikliği gözlenen olgularda plazma MDA düzeyi %61 artarken, eritrosit SOD enzim aktivitesi %49 oranında azalmaktadır.

Fizyolojik koşullarda, serbest radikal üretiminin bir çok zararlı etkisine karşı bir çok antioksidan sistemde koruyucu olarak görev almaktadır. Lipid peroksidasyonu sonucu ortaya çıkan hücre hasarının derecesi hücre içindeki bu antioksidan savunma sistemlerinin yetersizliği oranında büyük olacaktır. Bu savunma sistemlerini serbest radikal tutucuları ve bazı enzimler oluşturmaktadır. Savunma işlevinde öncelikle enzimatik sistemler rol almaktadır.^{19,20}

Topçu ve arkadaşları yaptıkları çalışmada G6PD enzim eksikliği gözlenen olgularda eritrosit zarı $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Mg}^{++}$ ATPaz ve $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ ATPaz enzim düzeyinde normale göre farklılık gözlemlenmiştir.²⁶ Akoğlu ve arkadaşları da G6PD enzim eksikliği gözlenen olgularda $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Mg}^{++}$ ATPaz enzim aktivitesinde farklılık gözlemlenmiştir.¹

Fakat bu çalışmada $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Mg}^{++}$ enzim düzeyi G6PD enzim eksikliği olan olgularda normale göre %27 azalmış olarak bulunmuştur. Çünkü serbest radikaller direkt veya indirekt yolla lipid peroksidasyonuna neden olmakta ve bu da zar yapısını bozmaktadır. $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Mg}^{++}$ ATPaz enzim sistemi zar lipid çift tabakasına lokalize olmuştur. Oluşan harabiyet $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Mg}^{++}$ ATPaz enzim sisteminde etkilemektedir. Ayrıca bu çalışmada lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA düzeyinde G6PD enzimi eksik olan olgularda %61 oranında artma ve serbest radikallerin ortadan kaldırılmasında görev alan SOD enzim düzeyinde ise %49 oranında azalma gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak G6PD enzim eksikliğinde gözlenen hemolizin kaynağı olarak $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Mg}^{++}$ ATPaz enzim aktivitesinin azalması ve bunun sonucu olarak Na^+ ve K^+ iyonlarının hücre içi ve dışı derişimlerinin değişmesine bağlı olabileceği düşünülmektedir. Zar lipid çift tabakasında lokalize olan fosfolipidlerin $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Mg}^{++}$ ATPaz enzim aktivitesi için gerekli olduğu, ancak lipid peroksidasyon ürünlerinin zar yapısını

bozmasýndan dolayı $\text{Na}^+ \text{-K}^+/\text{Mg}^{++}$ ATPaz enzim sisteminin inhibe olduđu düþünülmüþtür.

SUMMARY

Erythrocyte Membrane $\text{Na}^+ \text{-K}^+/\text{Mg}^{++}$ Adenosine 5'-Triphosphatase, Erythrocyte Superoxide Dismutase and Plasma Malondialdehyde Levels in Case of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Enzyme Deficiency.

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) enzyme is the key enzyme of pentose phosphate pathway. The product of this reaction is NADPH which takes part in many biosynthetic reactions, detoxification of free radicals and protection of sulfhydryl groups. The frequency of G6PD deficiency is found to be 8.2% in the Çukurova region. Free radicals are responsible for irreversible depletion of lipids and proteins of membrane. For this reason, $\text{Na}^+ \text{-K}^+/\text{Mg}^{++}$ Adenosine 5'-Triphosphatase, ($\text{Na}^+ \text{-K}^+/\text{Mg}^{++}$ ATPase), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) levels were studied in case of G6PD enzyme deficiency. $\text{Na}^+ \text{-K}^+/\text{Mg}^{++}$ ATPase activity in control and G6PD deficiency were found to be 299 ± 18 , 217 ± 14 nmol Pi/mg protein/hour, respectively ($p < 0.001$). SOD activity levels in the same groups were estimated as 1275 ± 237 , 646 ± 227 U/gr Hb, respectively ($p < 0.001$). Also, MDA levels in controls and G6PD enzyme deficiency groups were found to be 1.7 ± 1.5 , 4.4 ± 0.5 nmol/ml respectively ($p < 0.001$). According to these results, MDA levels were significantly increased in G6PD deficient group as compared to the control group.

Key Words : G6PD, MDA, SOD, $\text{Na}^+ \text{-K}^+/\text{Mg}^{++}$ ATPase

KAYNAKLAR

- Akoðlu T, Özdoðu R, Erdoðan H, Özer FL : Erythrocytemembrane ATPase activity of G6PD-deficient individuals and the effect of primaquine metabolic on membrane ATPase systems. Trop Med Hys. 1984; 87: 219-224.
- Ames BN : Assay of inorganic phosphate methods in enzymology. New York. Academic Press. 1966.
- Arese P, De Flora A : Pathophysiology of hemolysis in Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Semin Hematol. 27: 1-40. 1990.
- Beutler E : Red cell metabolism. A manual of biochemistry Grune and Stratton, New York. 1975.
- Beutler E : Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Hemolytic anemia in disorders of red cell metabolism, in Hematology. Plenum, New York, 1978.
- Beutler E, Kuhl W, Sachs P. : Sodium-potassium ATP 'ase activity in influenced by ethnic origin and not by obesity. N Eng J Med. 1983; 309:756.
- Beutler E. : Glucose-6-Phosphate dehydrogenase deficiency. Eng J Med. 1991; 324: 169-173.
- Deleon PA, Wolf SF, Persico G. : Localization of glucose-6-phosphate dehydrogenase in mouse and man by in situ hybridization; evidence for a single locus and transposition of homologous X-linked genes. Cytogenet Cell Genet. 1985; 35: 87-92.
- Gutteridge JMC : Lipid peroxidation and antioxidant as biomarkers of tissue damage. Clin Chem. 1995; 12: 1819-1828.
- Hallwell B, Gutteridge J : The important of free radicals and catalytic metal ions in human disease. Mol Aspect Med. 1985; 8: 89-91.
- Hiroshi O, Nabuko O, Yagi K : Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem. 1979; 95: 351-358.
- Janney SK, Joist SH, Fitch CD : Excess release of ferriheme in G6PD deficiency erythrocytes possible cause of hemolysis and resistance to malaria. Blood. 1986; 67: 331-333.
- Joseph C, Peter A: Role of oxygen-derived free radicals and metabolism in leukocyte-dependent inflammatory reactions. Am Assoc Pathol. 1982; 107: 263-303.
- Kletzien R, Harris P, Foellm L : Glucose-6-phosphate dehydrogenase : "housekeeping enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones nutrient and oxident stress. FASEB J. 1984; 8: 174-181.
- Levy R : Glucose-6-phosphate dehydrogenase. Adv. Enzymol. 1979; 48: 97-192.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL et al. : Protein measurement with folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951; 193:261.
- Lynch L, Fridovich I : Effect of superoxide on the erythrocyte membranes. J Biol Chem. 1978: 253: 1138-1845.
- Murray R, Granner D, Maye P, Rodwell V: Harper 's Biochemistry. Appleton Lange. East Norwalk. 1993.
- Niki E : Antioxidant compounds. Free Radic. 190; 9:9.
- Oberley LW : Free radicals and diabetes. Free Radic Biol Med. 1988; 5: 113-124.

21. Reading HW, Ýsbir T: Action of lithium on ATP 'ase in transmitter release from rat iris. Biochem Pharmacol. 1979; 28: 3441.
22. Reading HW, Ýsbir T: The role of cation-activated ATP 'ase in transmitter release from rat iris. J Exper Phsiol. 1980; 65:105.
23. Reslinski J, Hoey J, Simith W, et al.: Cellular response to oxidative stress at sulfhidryl group receptor sites on the erythrocyte membrane. J Biol Chem. 1988; 263: 12360- 12366.
24. Say S, Özand P, Berkel i: Erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Turkey. Acta Paediat Scand.1965; 54: 320-325.
25. Sounder BD, Trapp RG: Basic and clinical bioistatistics Prentice-Itali International Inc. London. 1994.
26. Topçu Z: Bakla ekstrelerinin eritrosit glutatyon düzeyleri ve ATPaz enzim sistemlerine etkisi. Master tezi. Adana, 1985.
27. Yüređir G.T. Ýsbir T: Çukurova 'da HbS ve G6PD enzim eksikliđi ve aralarýndaki ilipki. Dođa Tıp Ecz. 1984; 8:232-244.

Yazýþma Adresi:

Dr.Lülüfer TAMER
Ç.Ü. Tıp Fakültesi
Biyokimya A.B.D.
Balcalý/ADANA