

DÜZELTME ve YENİDEN BASIM

[Altıkat ve ark. Kalsiyum glukonat, potasyum klorür ve sodyum bikarbonat'ın insan eritrosit glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzimi üzerine *in vivo* etkileri. 19: 39-44, 2002.]

Kalsiyum glukonat, potasyum klorür ve sodyum bikarbonat'ın insan eritrosit glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzimi üzerine *in vitro* etkileri

***In vitro* effects of calcium gluconate, potassium chloride and sodium bicarbonate on human erythrocyte glucose 6-phosphate dehydrogenase**

Sayit Altıkat^{a*}, Mehmet Emin Büyükokuroğlu^b, Mehmet Çiftçi^c, Nuri Bakan^a, Ömer İrfan Küfrevioğlu^d

^aAtatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye

^bAtatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye

^cAtatürk Üniversitesi, Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi, Erzurum, Türkiye

^dAtatürk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye

MAKALE BİLGİLERİ

Makale geçmişi

Geliş tarihi : 12 / 03 / 2001

Kabul tarihi : 27 / 11 / 2001

*** Yazışma Adresi:**

Sayit Altıkat

Dumlupınar Üniversitesi,

Tıp Fakültesi,

Biyokimya Anabilim Dalı,

Kütahya, Türkiye

e-posta: saitaltikat@hotmail.com

Anahtar Kelimeler:

Eritrosit

Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz

In vitro

Kalsiyum glukonat

Potasyum klorür

Sodyum bikarbonat

Keywords:

Erythrocyte

Glucose 6-phosphate dehydrogenase

In vitro

Calcium gluconate

Potassium chloride

Sodium bicarbonate

ÖZET

Tedavide sıklıkla kullanılan bazı elektrolitlerin insan eritrosit glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzimi (G6PD) üzerine olan etkileri *in vitro* koşullarda araştırıldı. GPD enzimi afinite kromatografisi ile saflaştırıldı. Enzim aktivitesinin tayini Beutler metoduna göre spektrofotometrik olarak 340 nm'de yapıldı. Çalışmanın sonuçlarına göre enzim aktivitesini % 50 inhibe eden ilaç konsantrasyon (I_{50}) değerleri kalsiyum glukonat için 19.4 mM, sodyum bikarbonat için 160 mM oldu. Buna karşın potasyum klorürün herhangi bir etkisi görülmemiştir.

J. Exp. Clin. Med., 2013; 30: S137-S140

ABSTRACT

Effects of some electrolytes which are frequently used for treatment, on erythrocyte glucose 6-phosphate dehydrogenase enzyme (G6PD) activity were investigated in *in vitro* conditions. G6PD was purified by affinity chromatography. Enzyme activity was determined according to the Beutler method by using a spectrophotometer at 340 nm. According to the results of study, 50% inhibitor drug concentration values (I_{50}) were 19.4 mM for calcium gluconate and 160 mM for sodium bicarbonate in *in vitro* study. There was not observed any inhibitor effect of potassium chloride on glucose 6-phosphate dehydrogenase activity. The result of this study revealed that calcium gluconate and sodium bicarbonate but not potassium chloride have significant inhibitory effect on the activity of G6PD enzyme in *in vitro*.

J. Exp. Clin. Med., 2013; 30: S137-S140

1. Giriş

Hemolilik anemilerle birlikte seyreden eritrosit enzim defektleri ilk kez glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) eksikliğinin tanımlanması ile gündeme gelmiştir. Eritrositlerde yaklaşık olarak 15 enzim defekti tanımlanmış olup, dünyada en sık görülen, hemolilik anemiye neden olan ve klinik açıdan en önemlisi G6PD eksikliğidir. G6PD eksikliği aynı zamanda primakin duyarlılığı veya favizm şeklinde de isimlendirilmektedir. Dünyada yaklaşık olarak 400 milyon kişi bu hastalıktan etkilenmektedir (Litz ve ark., 1996). X'e bağlı olarak taşınan ve resesif karakterde olan bu hastalık erkeklerde ve homozigot kadınlarda tam olarak, heterozigot kadınlarda ise değişik şekillerde görülmektedir. Normal eritrositte, sürekli olarak glukozun % 90'ı aerobik yoldan yıkılırken % 10'ı heksoz monofosfat (HMP) yolu ile metabolize edilir ve NADPH elde edilmiş olur. Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) pentoz yolunun ilk basamağını katalizleyen anahtar bir enzimdir [EC.1.1.1.49] (Telefoncu ve Telefoncu, 1989). Eritrositlerde NADPH oluşumu için tek kaynak pentoz fosfat metabolik yolu olup, G6PD eksikliğinde NADPH üretimi önemli ölçüde azalır.

HMP metabolik yolu normalde inaktif olup, stres hallerinde veya oksitleyici ajan varlığında stimüle olur. Bu yoladaki eksiklerin ortaya çıkabilmesi için genellikle oksidan bir madde ile temas gerekir. Ortaya çıkan hemolizin şiddeti enzim eksikliğinin düzeyine göre değişmektedir. Bazı kişilerde enzim eksikliği hayat boyu süren bir anemiye neden olacak kadar ağırdır.

Oksidan madde ile temas edildikten 2-3 gün sonra hemoglobinemi, hemoglobüri ve hematokrit düşmesi ile karakterize intravasküler hemoliz meydana gelir (Berkow, 1992). Anemi, sarılık ve retikülositoz ortaya çıkar. Zencilerde eritrosit kitlesinin % 25'i etkilenirken, beyazlarda eksiklik daha ağır olup, derin hemoliz, hemoglobüri ve akut böbrek yetmezliği gelişebilir (Andrews ve Mooney, 1994). Sıklıkla en iyi tanı koydurucu bulgu, periferik kandaki hücrelerde dalak tarafından Heinz cisimciklerinin uzaklaştırılması nedeniyle oluşan bir yada daha fazla ısırık (1 μ m'lik) bulunmasıdır (Andrews ve Mooney, 1994). G6PD eksikliği esas olarak Afrika, Akdeniz bölgesi, Orta Doğu, Güneydoğu Asya, Kafkas halklarında ve onların soylarından gelenlerde görülmektedir (Kayaalp, 1998; Beutler, 1994). İspanyol Yahudileri, Yunanlılar, Çinliler, Filipinliler, İndonezyalılar ve Hintlilerde % 5-40 oranında bu enzim eksikliğinin görüldüğü belirlenmiştir (Fairbanks ve ark., 1994). Türkiyedeki olgular daha çok Çukurova ve Van'ın Başkale ilçesinde bulunmaktadır. Eti Türklerinde % 11.4, Çukurova bölgesinde % 8.2, Kıbrıslılar'da % 3.5 G6PD eksikliğine rastlanmıştır (Kayaalp, 1998).

Bir çok metabolik hastalıkların seyrinde elektrolit ve asit-baz denge bozuklukları gözlenebilmektedir. Bu patolojik durumların düzeltilmesinde oral veya parental elektrolit preparatları da kullanılmaktadır. Kalsiyum glukonat osteoporoz, raşitizm, osteomalazi, tetani ve diğer hipokalsemi ile seyreden hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Sodyum bikarbonat ise metabolik veya renal tubuler asidozda diyabetik ketoasidozda ve bikarbonat kaybının olduğu durumlarda kullanılmaktadır. Potasyum klorür çeşitli nedenlerle oluşan hipopotasemilerin düzeltilmesi amacıyla tercih edilmektedir. Sıklıkla kliniklerde kullanılan bu ilaçların G6PD üzerine etkilerinin bilinmesi önem taşımaktadır. Bu nedenle çalışmamızda bu üç ilacın G6PD enzim aktivitesi üzerine olan in vitro etkilerini inceledik.

2. Gereç ve yöntem

2', 5' ADP-sepharose 4B pPharmacia'dan, NADP+ ve G6P Sigmadan diğer kimyasallar ise Sigma ve Merck'ten temin edildi. Kalsiyum glukonat Adeka A.Ş.'den, potasyum klorür Haver A.Ş.'den ve sodyum bikarbonat Drogosan A.Ş.'den temin edildi.

İnsan eritrositlerinden G6PD enziminin saflaştırılması

Hemolizat taze insan kanından hazırlandı. EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri küçük ependorf tüplerine konuldu ve 15 dakika 2500 xg'de santrifüj edildi. Tüplerin üst kısmındaki plazma ve lökosit tabakaları damlalıklarla alındı. Daha sonra elde edilen eritrosit peleti 0.16 m KCL çözeltisi ile üç defa yıkandı. Her defasında 2500xg'de santrifüj edilerek süpernatant atıldı. Elde edilen eritrositlerden bir hacim alınıp beş hacim buzlu su eklenerek hemoliz edildi. Daha sonra hücre zarlarının uzaklaştırılması için 10000 xg'de 30 dakika santrifüj edildi. Böylece hemolizat hazırlanmış oldu. Elde edilen hemolizatta % 35-65 aralığında amonyum sülfat çöktürmesi yapıldıktan sonra ve 4°C'ta 50 mM K-asetat /50 mM K-fosfat (pH: 7) tamponuna karşı iki saat süreyle iki defa değiştirilerek diyaliz işlemi uygulandı. Elde edilen enzim çökeltilisinden 2;5 ADP-sepharose 4 b jeli kullanılarak afinite kromatografisi ile G6PD enzimi saflaştırıldı.

SDS poliakrilamid jel elektroforezi

Saflaştırılan enzimin saflığı SDS poliakrilamid jel elektroforeziyle kontrol edildi. Elektroforez sırasında yığıma jel için % 4, yürütme jel için % 10 akrilamid konsantrasyonu kullanıldı. Elektroforez Laemmli'nin tanımladığı metoda göre yapıldı (Laemmli, 1970).

İnhibitör çalışması

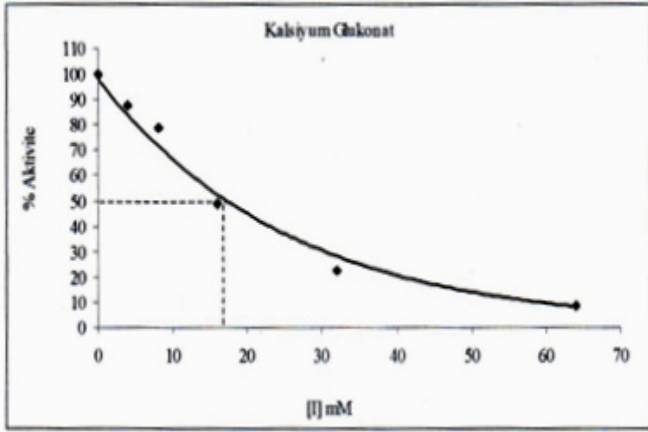
Bu çalışmada kalsiyum glukonat, potasyum klorür ve sodyum bikarbonat kullanıldı. Kalsiyum glukonat için 4, 8, 16, 32 ve 64 mM küvet konsantrasyonlarında, potasyum klorür için 40, 80, 160, 320 ve 400 mM küvet konsantrasyonlarında, sodyum bikarbonat için ise 40, 80, 160, 240, 320 mM küvet konsantrasyonlarında aktivite ölçümleri yapıldı. Her bir ilaç için 5 farklı konsantrasyonda [İlaç]-%Aktivite grafikleri çizildi. İlaçsız küvetin aktivitesi % 100 kabul edildi. % 50 inhibisyona neden olan ilaç konsantrasyonu (I_{50}) grafiklerden hesaplandı.

Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz aktivitesinin ölçümü

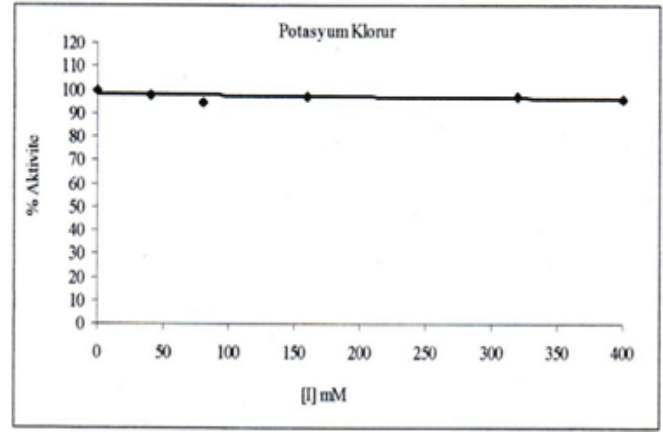
Enzim aktivitesinin ölçümü spektrofotometrede 37 °C'ta Beutler metoduna göre yapıldı. Bu metod NADP+'nın G6PD tarafından glukoz 6-fosfat varlığında indirgenmesi esasına dayanır. NADPH'nın oluşum oranı G6PD aktivitesine bağımlı olup 340 nm'deki absorpsiyon artışıyla ölçülmüştür.

3. Sonuçlar

G6PD enzime amonyum sülfat çöktürmesi ve 2'.5'-ATP Sepharose 4B afinite jeli ile ve % 51.6 verim ile 9300 kat saflaştırılmıştır. Regrasyon analizlerinden elde edilen I_{50} değerleri kalsiyum glukonat için 19.4 mM ve sodyum bikarbonat için 160 mM olmuştur. Potasyum klorür ise inhibisyon oluşturmadı. Kalsiyum glukonat, potasyum klorür ve sodyum bikarbonatın 5 farklı konsantrasyonu kullanılarak elde edilen %aktivite-[ilaç] grafikleri Şekil 1, 2 ve 3'te gösterilmiştir.



Şek. 1. Kalsiyum glukonatın 5 farklı konsantrasyonunu kullanarak elde edilen % aktivite-[I] grafiği.



Şek. 2. Potasyum klorürün 5 farklı konsantrasyonunu kullanarak elde edilen % aktivite-[I] grafiği.

4. Tartışma

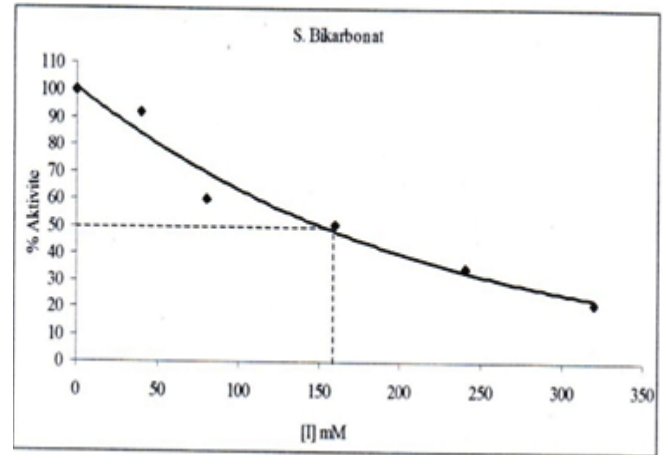
Elektrolit ve asid-baz denge bozuklukları, vücutta hemostazı sağlayan olayların birbiriyle yakından ilgili olmaları nedeniyle çoğunlukla karma bozukluklardır. Elektrofil ve asid-baz denge bozuklukları bazen fatal sonuçlanabilecek kadar ağır seyredebilir. Böyle durumlarda hasta kişilere acil müdahale zorunluluğu vardır.

Eritrosit yaşlanmasının muhtemel mekanizmalarından bir tanesinde ATP kaybı, kalsiyum birikimi ve oksijen radikallerinin birikimi ile ilişkili olduğu iddia edilmiştir (Tang, 1997). G6PD eksikliği olan kişilerin eritrositlerinin kalsiyuma bağlı vezikül oluşumuna duyarlılığının normal kişilerden daha fazla olduğu belirlenmiştir (Tsai ve ark., 1996). Diğer yandan G6PD eksikliği bulunan kişilerin eritrositlerinde kalsiyum konsantrasyonunun belirgin şekilde arttığı gösterilmiştir (Devi ve Anandaraj, 1995; Demonte ve ark., 1992). Çoğunlukla nörolojik belirtilerde ortaya çıkan hipokalseminin tedavisinde başlangıçta kalsiyum tuzları kullanılmaktadır (Berkow, 1992; Rang ve ark., 1999). Bu amaçla en sık kullanılan Ca-glukonat damar dışına çıktığı zaman oldukça tahriş edici bir madde olup, kas içi enjeksiyon lokal nekroza neden olabilmektedir. Çalışmamızın sonuçları Ca-glukonatın eritrosit G6PD enzimini *in vitro* olarak inhibe ettiğini ortaya koymuştur. Eritrosit yaşlanmasına bağlı olarak kalsiyum birikiminin olması ve yine G6PD eksikliği olan kişilerin eritrositlerinde kalsiyum miktarlarının normal kişilerden farklı olduğunun bulunması, G6PD eksikliği bulunan kişilerin oksidan maddeye maruz kaldıklarında önce yaşlı eritrositlerin parçalanmasının nedenini açıklayabilir. Yukarıda belirtilen çalışma sonuçları, eksikliği olan kişilerde dikkatle kullanılmasını gerektirir. Çünkü var olan eritrosit içi yüksek kalsiyum düzeyi daha da artarak hücrenin lizisine neden olacaktır.

Metabolik asidoz böbrek bozuklukları, zehirlenmeler, endokrin hastalıklar ve gastrointestinal sistemden alkali kaybına neden olan durumlarda ortaya çıkmaktadır. Böyle durumlarda esas tedavi primer nedenin düzeltilmesi olup

şiddetli asidoz durumlarında tedavi amacıyla intravenöz olarak NaHCO_3 verilmesi halen değerini korumaktadır (Berkow, 1992).

Yukarıda belirttiğimiz nedenlerden dolayı ortaya çıkan elektrolit veya asid-baz denge bozukluklarına ilaveten Ca-glukonat veya NaHCO_3 'ün verilmesine bağlı olarak hemoliz gelişimi hastanın durumunu daha da içinden çıkılmaz bir şekle sokabilir. Bu nedenle G6PD eksikliği olan kişilerde her iki ilacın dikkatle kullanılması gereklidir. G6PD eksikliği bulunan kişilerde bu iki ilacın kullanılması gerekiyor ise doz düzenlenmesinin çok dikkatli yapılması, tedavi süresince kan ve idrar tetikleriyle hastaların sürekli takibinin uygun olacağı düşünüyoruz. Potasyum klorürün G6PD enzimine etkisinin olmaması nedeniyle, hekimlerin G6PD eksikliği olanlarda kişilerde bu ilacı rahatlıkla kulana bileceklerini söyleye biliriz. Her üç ilaçla ilgili ayrıntılı *in vivo* çalışmalarının yapılması gerekli olup, bu çalışma sonuçlarının klinisyenlerin ufkunu aydınlatacağını umuyoruz.



Şek. 3. Sodyum bikarbonatın 5 farklı konsantrasyonunu kullanarak elde edilen % aktivite-[I] grafiği.

KAYNAKLAR

- Andrews, M.M., Mooney, K.H., 1994. Alterations in hematologic function in children. In: Mc Cance, K.L., Huenther, S.E. (eds), Pathophysiology. Mosby-Year Book Inc. Missouri, pp: 908-942.
- Berkow, R., (editör-in-Chief), 1992. The merck manuel. Çeviri ed: Keklikoğlu, M., Tuzcu, M., 1995. Tanı/ tedavi el kitabı, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd., İstanbul, pp: 1136-1174.
- Beutler, E., 1971. Red cell metabolism manuel of biochemical methods. Academic Press, London.

- Beutler, E., 1994. G6PD deficiency. *Blood*, 81, 3613-3636.
- Çiftçi, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., Gündoğdu, M., Özmen, İ., 2000. Effects of some antibiotics on enzyme activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. *Pharmacol. Res.* 41, 111-107.
- Delgado, C., Tejedor, C., Luque, J., 1990. Partial purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase from rat erythrocyte haemolysate by partitioning in aqueous two-phase system. *J. Chromatogr.* 498, 159-168.
- Demonte, G., Guida, L., Sdraffa, A., et al., 1992. Mechanisms of perturbation of erythrocyte calcium homeostasis in favism. *Ceol Calcium*, 13, 649-658.
- Devi, C.V., Anandaraj, M.P., 1995. Calcium activated neutral protease & calcium ATPase in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency hemizygotes. *Indian J. Med. Res.* 101, 39-41.
- Fairbanks, V.F., Klee, G.G., 1994. Biochemical aspects of hematology. In: Burtis CA, Ashwood ER (eds), *Tietz textbook of clinical chemistry*, WB Saunders Co., USA, pp: 1974-1979.
- Kayaalp, S.O., 1998. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji, Feryal Matbacılık, Ankara, pp. 153-154.
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680-683.
- Litz, C.E, Mc., Clure, J.S, Burning, R.D, 1996. Blood and bone marrow In: Damjanov I, Linder J (eds). *Anderson pathology*, Mosby-year Book Inc., Missouri, pp: 1063-1114.
- Morelli, A., Benatti, U., Gaetani, G.F., De Flora, A., 1978. Biochemical mechanisms of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75, 1979-1983.
- Ninfall, P., Orsenigo, T., Barociami, L., 1990. Rapid purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase from mammal's erythrocyte. *Perp. Biochem.* 20, 297-309.
- Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., 1999. *Pharmacology*. Churchill Livingstone, China. 199, 746-756.
- Shreve, D.S., Levy, H.R., 1977. On the molecular weight of human glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 78, 1369-1375.
- Sodeman, W.A., Jr, Sodeman, T.M, 1985. Sodeman's pathologic physiology mechanism of disease. Çev: kurul, *Fizyopatoloji cilt 2.*, Türkiye Klinikleri Yayınevi, Ankara, pp: 720-724.
- Tang, T.K., 1997. Free radical theory of erythrocyte aging. *J. Formos Med. Assoc.* 96, 779-783.
- Telefoncu, A., Telefoncu, F., 1989. Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesine primaquine'nin etkisi. *Tr. J. Medical. Sci.* 14, 57-63.
- Tsai, K.J., Shih, L.Y., Hung, S.W., et al., 1996. Enhanced vesiculation exacerbates complement-dependent hemolysis in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient red blood cells. *Life Sci.* 59, 867-876.
- Weksler, B.B., Moore, A., Tepler, J., 1990. Hematology In: Andreoli, T.E, Carpenter, C.C.J, Plum, F, Smith, L.H Jr (eds). *Cecil essentials of medicine*, WB Saunders Co., USA, pp: 342-403.