

Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Enzim Aktivitesi Üzerine Bir Çalışma

A Study on Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Enzyme Activity

Elmas ÖĞÜŞ¹, Mehmet Sezai KUŞ²

¹Sağlık Bilimleri Üniversitesi Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Biyokimya Bölümü, ANKARA

²Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, ANKARA

ÖZ

Amaç: Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) eksikliği, dünyada en çok rastlanan eritrosit enzim eksikliğidir. Ülkemizde özellikle Akdeniz bölgesinde görülen hemolitik anemilerin en sık nedenidir. Enzim eksikliği olan hastaların çoğunda klinik belirti yoktur. Ancak alyuvarlarda oksidatif hasara yol açan ilaçlar, enfeksiyonlar, bakla yenmesi, yenidoğan dönemi gibi nedenlerle hemolitik tablo gelişir. Çalışmamızda G6PD enzim aktivitesi ve kinetik özelliklerini araştırmak amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: G6PD enzim aktivitesi floresan spot testi ile kalitatif olarak ve kantitatif olarak ölçülen G6PD eksikliği olan bir kan örneği ve bir kontrol kan örneğinde kısmi enzim saflaştırması yapılarak kinetik özellikleri karşılaştırıldı.

Bulgular: Enzim eksikliği bulunan kan örneğinde kalitatif olarak floresans gözlenmedi. G6PD eksikliği olan örnekte kantitatif olarak ölçülen enzim aktivitesi kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ($p < 0.05$). Kısmen saflaştırılan hasta G6PD enziminin G6P ve NADP için K_m ve V_m değerleri normal enzime göre daha düşük bulundu. Hasta enziminin diğer kinetik özellikleri; normal enzime oranla alkalen pH'da daha yüksek aktivite, substrat benzerlerini daha yüksek oranda kullanabilme ve daha düşük termostabilite idi.

Sonuç: Halk sağlığı ve koruyucu hekimlik açısından G6PD enzimi eksikliği hastanın tanısı ve izlenmesinde önem taşır.

Anahtar kelimeler: Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, enzim eksikliği, kinetik özellikler.

ABSTRACT

Aim: Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency is the most common erythrocyte enzyme deficiency in the world. It is the most common cause of hemolytic anemia in our country especially in the Mediterranean region. Most patients with enzyme deficiency have no clinical symptoms. However, hemolytic state develops in the red blood cells due to drugs, infections, favism, newborn period which cause oxidative damage. In our study, we aimed to investigate G6PD enzyme activity and kinetic properties.

Material and Method: G6PD enzyme activity was measured qualitatively with a fluorescence spot test and quantitatively in a G6PD deficient blood sample and in a control blood sample, and partial enzyme purification was performed to compare kinetic characteristics.

Results: No fluorescence was observed qualitatively in the blood sample with enzyme deficiency. Enzyme activity measured quantitatively in the sample with G6PD deficiency was statistically significantly lower than the control ($p < 0.05$). The kinetics of the partially purified deficient enzyme were found to have lower K_m values (G6P and NADP) than in the normal enzyme. The other kinetic characteristics of enzyme of deficient G6PD activity in comparison with normal enzyme were; a higher optimum pH, more activity with the substrate analogs and a lower thermostability.

Conclusion: G6PD enzyme deficiency is important in the diagnosis and monitoring of the patient in terms of public health and preventive medicine.

Keywords: Glucose-6-phosphate dehydrogenase, enzyme deficiency, kinetic properties.

Gönderme tarihi / Received: 24.01.2018 **Kabul tarihi / Accepted:** 12.04.2018

İletişim: Elmas Öğüş, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Ankara Eğitim ve Araştırma Hast. Tıbbi Biyokimya Bölümü, Ulucanlar, Ankara

Tel: 0 (532) 684 4824 **E-posta:** oguselmas@gmail.com

1. GİRİŞ

Klinik yönden önem taşıyan glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) enzimi eksikliği insandaki enzim anomalilerinin en yaygını olup önemli bir halk sağlığı problemini oluşturur. Alyuvarlarda yapılan çalışmalarda dünyada 400 milyon kişi ile en sık rastlanan enzim eksikliğidir (1-4).

G6PD, pentoz fosfat yolunun ilk ve hız kısıtlayıcı enzimidir. Pentoz fosfat metabolik yolunun temel amacı organizmaya indirgeyici güç olarak nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) sağlamak ve riboz fosfatları sentezlemektir. NADPH proteinleri ve diğer molekülleri oksidatif hasardan korumakta önemli rol oynamaktadır. Eritrositler oksidatif strese uğradığında glutatyon peroksidaz enzimi ile redükte glutatyon (GSH), okside glutatyon (GSSG) haline geçerek hücreyi oksidatif etkenlerden korur. Pentoz fosfat yolundan elde edilen NADPH'lar serbest radikal hasarına karşı gereklidir ve GSSG glutatyon redüktaz (GR) enziminin katalizi ile tekrar GSH haline çevrilir, böylece hemoglobin, lipoproteinler ve hücre zarında yer alan -SH grubu taşıyan enzimler oksidasyondan korunur. G6PD eksikliğinde NADPH sentezi ve GSH düzeyi azalır, hemoglobin ve proteinlerdeki -SH grupları oksitlenir, proteinler denatüre olarak Heinz cisimcikleri oluşur ve alyuvarlar hemolize uğrar. (1,2).

G6PD enzimi eksikliği Güneydoğu Asya, Hindistan, Afrika ve Akdeniz halkında özellikle yaygındır (6,7). Türkiye genelinde enzim eksikliği %0.5, Çukurova bölgesinde ise %8.2'dir.

Hiperbilirubinemili yenidoğanlarda ise sıklık %10,5-22,1 arasındadır (5-9).

Enzim eksikliği olan hastaların çoğunda klinik belirti yoktur. Ancak alyuvarlarda oksidatif hasara yol açan ilaçlar, enfeksiyonlar, bakla yenmesi, yenidoğan dönemi gibi nedenlerle hemolitik tablo gelişir. Sıtma ilaçları gibi birçok ilaçla oluşan hemolitik tablo, ilaç uygulamasından sonra 1-3 gün içinde başlar. Klinik belirtiler orta derece anemi, sarılık, koyu renkli idrar, karın ağrısı, hafif dalak büyümesinden hızla ilerleyen anemiye kadar değişen bir tablo sergileyebilir. Enfeksiyonlarda ateşin başlamasından birkaç gün içinde orta dereceli anemi gelişir. Bazı G6PD varyantlarında bakla yenmesinden sonraki 1-2 gün içinde ilaçların neden olduğuna benzer ve "Favizm" denilen hemolitik kriz tablosu gelişir. Yenidoğan döneminde G6PD eksikliği olan bebeklerde yenidoğan sarılığına yatkınlık fazladır. Hemoliz sonucu kanda bilirubin düzeyi çok yükselir ve tedavi edilmezse kernikterus gelişebilir. G6PD eksikliğinin oldukça nadir gözlenen formu ekzon 10'da mutasyonu sonucu olan hereditör nonsferositik hemolitik anemi, sınıf I G6PD eksikliği olanlarda görülür ve bu hastalarda oksidatif stres olmayan durumlarda da hayat boyu devam eden kronik hemolitik anemi söz konusudur.

G6PD geni, X kromozomunun q28 bölgesinde bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda bu gen bölgesinde 140'dan fazla mutasyon tanımlanmıştır. G6PD eksikliği X'e bağlı resesif geçiş gösterir. Böylece ciddi eksiklik erkeklerde daha fazla görülür (4,10,11).

Başlangıçta G6PD eksikliği biyokimyasal olarak enzim aktivitesi ölçülmesi ve elektroforetik hareketliliğine göre sınıflandırılmıştır. Günümüzde fizikokimyasal ve kinetik özelliklerine göre 400'den fazla varyant bulunmaktadır (5,6). Beyaz ırkta en sık görülen varyant, 563. nükleotidde tek baz yer değişimi ile enzimin katalitik etkisinin azaldığı ve ağır hemolizin görüldüğü G6PD Akdeniz varyantıdır (10-11). Akdeniz halkının diyetinde bakla tanecikleri fazla bulunduğu için Akdeniz varyantında hemolitik krize yatkınlık sıktır.

Bu çalışmada G6PD enzim eksikliğine kalitatif ve kantitatif olarak basit testlerle bakılması ve G6PD enzim eksikliği olan kan örneği ve kontrol kan örneğinin kısmen saflaştırılarak kinetik çalışmalar ile değerlendirilmesi amaçlandı.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda kalitatif floresan spot testi ile G6PD enzim aktivitesi eksikliği tespit edilen bir kan örneği ve normal enzim aktivitesine sahip olan bir kontrol kan örneğinde alyuvar G6PD enzim aktivitesi kantitatif olarak ölçüldü. Her iki kan örneğinde ayrıca G6PD enzimi kısmen saflaştırıldı.

Kalitatif floresan spot testi yönteminde; 7.5 mM NADP+, 6 mM G6P, 0.1 M Tris-HCl (pH=8.0), %1 saponin ve 33 mM GSSG içeren 100 µl çalışma reaktifine 10µl heparinize kan örneği eklenerek karıştırıldı, oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi ve karışım Whatmann No.1 filtre kağıdına damlatılıp kurutuldu, uzun dalga UV lambası altında gözlemlendi. Floresans varlığı tepkime sonucu NADPH'nin oluştuğu ve G6PD

enzim aktivitesinin normal olduğu, floresans yokluğu ise NADPH'nin oluşmadığı ve G6PD enzim aktivitesinin eksik olduğu şeklinde değerlendirildi (12).

Kantitatif G6PD enzim aktivitesi tayini ise modifiye Zinkham yöntemine göre yapıldı (13). Aktivite ölçümünde, son derişimleri 0.1 M Tris- HCl (pH=8.0), 10 mM MgCl₂, 0.2 mM NADP⁺ ve 0.6 mM G6P olacak şekilde hazırlanan tepkime ortamınının 1 ml'si 50 µL hemolizat içermekteydi. Tepkime 25oC'de 20 dakika boyunca 340 nm dalga boyunda absorbanstaki artış izlendi. Enzim aktivitesi sonuçları IU/g Hb olarak hesaplandı.

Hemoglobin tayini siyanmethemoglobin yöntemi ile yapıldı (14). Bu yöntem, hemoglobindeki ferröz demirin (Fe²⁺) ferrisiyanür eklenecek ferrik demir (Fe³⁺) içeren methemoglonine çevrilmesi ve daha sonra potasyum siyanür (KCN) eklenerek dayanıklı siyanmethemoglobine dönüştürülmesi esasına dayanmaktadır. Bu oluşum 540 nm'de maksimum absorban verir. Kullanılan kan örneklerindeki G6PD enzimi, WHO'nun 1967 yılında yayınladığı G6PD standardizasyon çalışmalarını içeren kitapçığında yer alan yöntemle kısmen saflaştırıldı (13). Bu saflaştırmada DEAE Selüloz kolon kromatografisi, amonyum sülfat kesitlemesi ve diyaliz basamakları yer aldı. Enzimin kinetik özelliklerine göre varyant tiplendirmesindeki kriterler esas alındı. G6PD eksikliği bulunan bir kan örneği ve bir kontrol kan örneğinde kısmi enzim saflaştırması yapılarak kinetik özellikleri karşılaştırılmasında; G6P için Km değerlerini bulmak için son NADP⁺ derişimi 0.2 mM olarak

sabit tutulup son G6P derişimi 10-160 μM arasında değiştirildi. NADP+ için K_m değerlerini bulmak için son G6P derişimi 0.6 mM olarak sabit tutulup son NADP+ derişimi 1-30 μM arasında değiştirilerek aktiviter hesaplandı. 0.1 M Tris-HCl tamponunda pH: 6 ile pH: 11 aralığında 0.1 M Tris-HCl tamponu ve 0.1 M fosfat tamponunda enzimlerin kataliz hızlarına pH'nın etkisi incelendi. Her iki enzim 45°C'de su banyosunda değişik sürelerle inkube edilerek 0, 20, 40 ve 60. dakikalarda aktivite tayini yapılarak ısıya dayanıklılıkları incelendi. Her iki enzimin 2-deoksi-G6P, Gal-6-P ve deamino-NADP+ gibi substrat benzerleri ile aktiviteri ölçülerek kullanma yüzdeleri hesaplandı. Poliakrilamid slab jel elektroforezine konsantre edilmiş eksiklik gösteren ve normal enzim örnekleri uygulandı ve aktivite boyaması yapılarak elde edilen bandlar değerlendirildi (15,16).

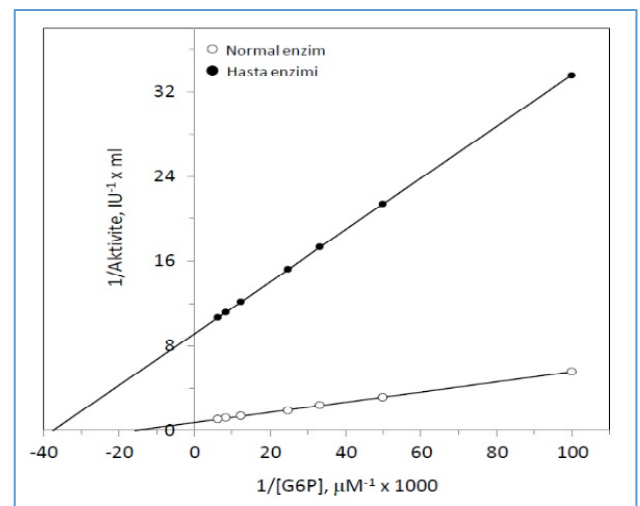
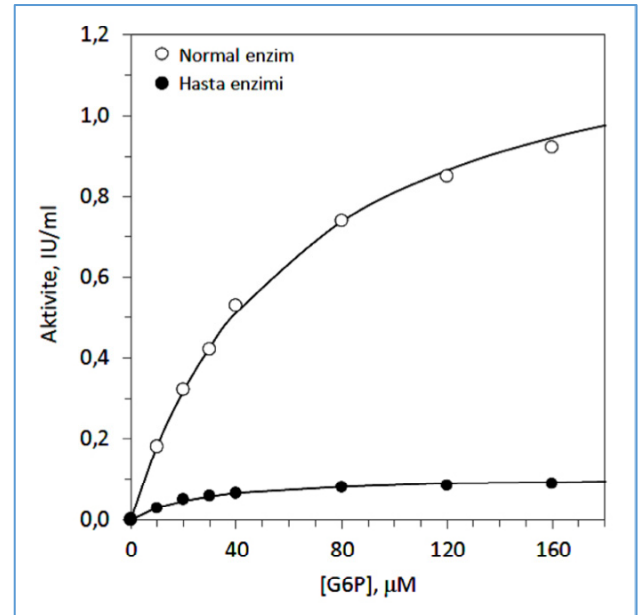
3. BULGULAR

Kalitatif floresan spot testinde floresans vermeyen örneğin kantitatif olarak ölçülen G6PD aktivitesi de uyumlu olarak düşük bulundu. Kontrol kan örneği ve G6PD enzim eksikliği olan kan örneğindeki enzim aktiviteri, sırasıyla 8.80 IU/g Hb ve 0.39 IU/g Hb olarak bulundu ($p < 0.05$).

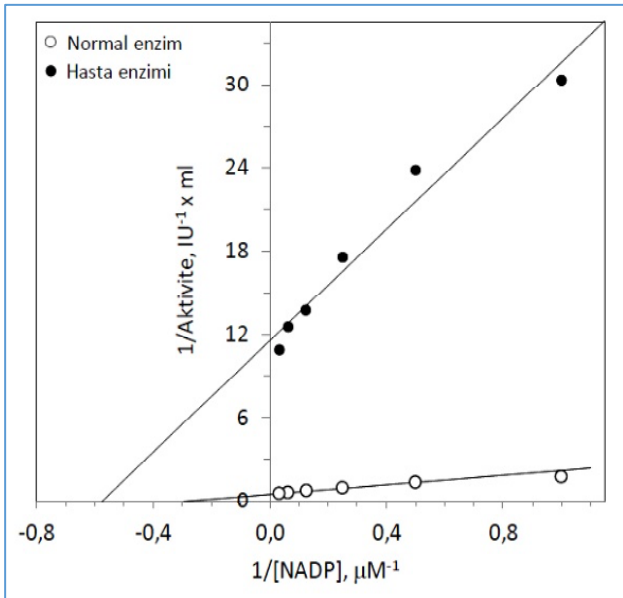
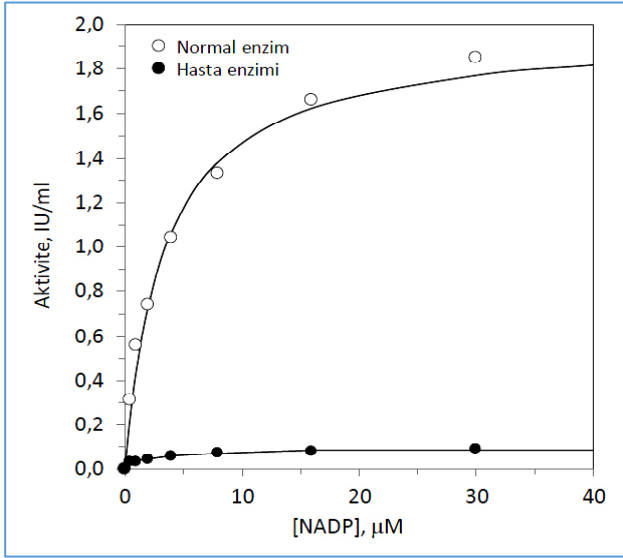
Kısmen saflaştırılan G6PD eksikliği gösteren enzimin kinetik özellikleri normal enzime göre değerlendirildi. Lineweaver-Burk grafiğinden yararlanılarak, G6P için K_m ve V_m değerleri hasta enzimi için sırasıyla 28.0 μM ve 0.11 IU/ml ve normal enzim için ise 57.8 μM ve 1.32 IU/ml olarak bulundu (Şekil 1).

NADP+ için yine aynı grafik yöntemiyle bulunan K_m ve V_m değerleri hasta enzimi için sırasıyla 1.7 μM ve 0.09 IU/ml, normal enzim için ise 4.1 μM ve 1.97 IU/ml olarak bulundu (Şekil 2).

G6PD eksikliği gösteren enzimin aktivitesi 0.1 M Tris-HCl tamponunda pH: 9.5'da ve 0.1 M fosfat tamponunda pH: 7.0'de normal enzimden daha yüksek aktivite verdięi



Şekil 1. G6P için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri



Şekil 2. NADP+ için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri

saptandı. Termostabilite deneyinde 45°C'de inkubasyonda hasta enziminin aktivitesinin tamamen kaybolduğu gözlemlendi.

Hasta enziminin, 2-deoksi-G6P, Gal-6-P ve deamino-NADP+ gibi substrat benzerlerini normal enzime göre daha yüksek bir yüzde ile substrat olarak kullanabildiği saptandı (Tablo 1).

Tablo 1. Substrat olarak kullanım

Substrat benzerleri	2-deoksi-G6P (%)	Gal-6-P (%)	Deamino-NADP+ (%)
Normal enzim	4.1	1.3	54
G6PD eksikliği olan hasta enzimi	43.3	26.7	266.2

4. TARTIŞMA

Dünya Sağlık Örgütü, ülkemizin G6PD eksikliği olan kuşakta yer aldığını belirtmiştir. Enzim eksikliği özellikle Akdeniz bölgesinde görülen hemolitik anemilerin en sık nedenidir. Türkiye genelinde enzim eksikliğinin sıklığı % 1-11'dir. Yapılan çalışmalarda Akdeniz bölgesinde sıklık %8.2-10.4 arasındadır (5-9). Kısmen saflaştırılan G6PD eksikliği gösteren enzimin kinetik özellikleri WHO'nun G6PD enziminin varyant tiplendirme kriterleri esas alınarak deneysel olarak çalışılmıştır. Gelişen moleküler tanı yöntemleri sonucu DNA düzeyindeki çalışmalar çok hızlı gelişmeler göstermiş ve daha çok geni daha kısa zamanda analiz edecek otomatik cihazlar üretilmeye başlanmıştır (17). Çalışmamızda G6PD eksikliği olan ve kısmen saflaştırılan enzimin kinetik analiz sonuçları ülkemizde sıklığın yüksek olduğu Akdeniz bölgesinde daha önce tanımlanmış olan Akdeniz, Tarsus gibi varyantların kinetik özellikleriyle benzerlik taşımaktadır. Günümüzde yeni ve ileri teknikler ile mutasyon analizleri ve varyant tiplendirmesi kolayca yapılabilmektedir (5).

G6PD eksikliğinde esas tedavi oksidatif strese neden olan ilaçlar, bakla ve enfeksiyon gibi durumlardan korunmadır. Hemoliz genellikle

kısa süreli ve geçicidir ve tedavi gerektirmez. Nadiren kan transfüzyonu gerektirecek ağır anemi gelişir. Luzzatto tarafından düzenlenen kılavuzda, Hb 7 g/dL'nin altında olduğunda ve Hb 7-9 g/dL ve hemoglobinüri varlığında transfüzyon önerilmektedir (18). Yenidoğanlarda ise hemoliz ve hiperbilirubineminin derecesine göre fototerapi veya kan değişimi yapılması esastır (19). Nonsferositik tipte hafif ve orta derecede anemisi olan kronik hastalar demir yüklenmesi açısından izlenmelidir. Çalışmalar da G6PD enzim eksikliği olan hastalarda vitamin E ve selenyumun antioksidan etkileri nedeniyle kullanılabildiği (19), L-sisteinin, hem antioksidan kapasiteyi hem de glutatyon üretimini artırabildiği (20) ve α -lipoik asid'in ise kan redoks durumunda değişikliklere ve antioksidan kapasitenin artmasına yol açabildiği gösterilmiştir (21).

Çalışmamızda kalitatif olarak enzim eksikliği saptanan olgunun kalitatif floresans spot testi ile kantitatif enzim aktivitesi düzeyi sonuçları uyum içindedir ve kontrol örneğinden istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p < 0.05$).

KAYNAKLAR

1. Beutler E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. N Engl J Med 1991;324:169-174.
2. Beutler E. Red cell metabolism: a manual of biochemical methods. 3rd ed. New York: Grune and Stratton, 1984.
3. Şevkinaz Konak, Mümin Polat. Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz Enzim Eksikliği; Tanı ve Tedavi MAKÜ Sag. Bil. Enst. Derg. 2015, 3(2): 77-83.
4. İlgen Şaşmaz. Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzim eksikliği Türk Ped Arş 2009; 44 Özel Sayı: 35-8.
5. Tetik E, Aral YZ, Türkmen MK, Bozkurt G. Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzim eksikliği olan çocuklarda G6PD S218F Akdeniz mutasyonu sıklığı. ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi 2014;15:1-8.
6. Acıpayam C, Orhaner BB, Karal Y. Screening of Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in cord blood Journal of Clinical and Analytical Medicine 2014, DOI: 10.4328/JCAM.2390.
7. Beutler E, Westwood B, Prchal JT, Vaca G, Bartsocas CS, Baronciani L. New glucose-6-phosphate dehydrogenase mutations from various ethnic groups. Blood. 1992;1;80: 255-6.
8. Say S, Özand P, Berkel İ. Erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Turkey. Acta Paediat Scand 1965; 54: 319-24.
9. Kus S. G6PD Çorum. A new variant of glucose 6 phosphate dehydrogenase. J Islamic Acad Sci 1989;2:31-3.
10. Luzatto L. Glucose-6-phosphate dehydrogenase: Genetic haematological aspects. Cell Bio Fun 1987; 5: 101-7.
11. Beutler E. The genetics of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Semin Hematol 1990; 27: 137-64.
12. Beutler E. Hematology. Ed: Williams JW, Beutler E, Erslev JA, Lichtman AM. Third Ed., Mc Graw-Hill Inc., New York, 1983.
13. WHO Scientific Group. Standardization of procedure for the study of G6PD. WHO Techn Rep Ser 1967;366:9-51.
14. Burtis CA, Ashwood ER. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, Second Edition, W.B. Saunders Company, Philadelphia; 1994. p. 2020-2021.
15. Davis BJ. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. Ann NY Acad Sci 1964;121:404-27.
16. Vuopio P, Harkonen M, Johnsson R, Nuutinen M. Red cell glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Finland. Annals Clin Res 1973;5:168-73.
17. Yıldız ŞM, Arıyürek SY, Aksoy K. Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Genindeki Akdeniz Mutasyonunun Mikroarray Tekniğiyle

- Saptanması Turk J Biochem.,2010; 35 (1) ; 63–66.
18. Luzzatto L, Poggi V. Glucose-6-phosphate deficiency. In: Orkin SH, Nathan D, Ginsburg D, Look AT, Fisher DE, Lux SE (eds). Hematology of Infancy and Childhood. 7th edition. Philadelphia: WB Saunders Company, 2009: 883-907.
 19. Hafez M, Amar ES, Zedan M, et al. Improved erythrocyte survival with combined vitamin E and selenium therapy in children with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and mild chronic hemolysis. J Pediatr 1986;108:558-561.
 20. Schulpis KH, Reclos GJ, Parthimos T, Parthimos N, Gavriilidis A, Tsakiris S. Lcysteine supplementation protects the erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase activity from reduction induced by forced training. Clin Biochem 2006;39:1002-1006.
 21. Georgakouli K, Deli CK, Zalavras A, et al. α -lipoic acid supplementation up-regulates antioxidant capacity in adults with G6PD deficiency. Food Chem Toxicol 2013;61:69-73.
 22. Minucci A, Giardina B, Zuppi C, Capoluongo E. Glucose-6- phosphate Dehydrogenase laboratory assay: how, when, and why? IUBMB Life 2009; 61: 27-34.
 23. Reclos GJ, Hatzidakis CJ, Kruithof RA. G-6-PD Diagnosis: Modification of the standard method eliminates the need for an additional hemoglobin determination. Pharmakeftiki 1999;12: 25-31.
 24. Reclos GJ, Hatzidakis CJ, Schulpis KH. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency neonatal screening: preliminary evidence that a high percentage of partially deficient female neonates are missed during routine screening. Journal of Medical Screening. 2000;7: 46-51.