

**BAZI FLOROFENİLTİYOÖRE BİLEŞİKLERİNİN
İNSAN ERİTROSİTLERİNDEN SAFLAŞTIRILAN
GLUKOZ 6-FOSFAT DEHİDROGENAZ VE 6-
FOSFOGLUKONAT DEHİDROGENAZ
ENZİMLERİNİN AKTİVİTELERİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Muhammed Lütfü YILDIZ

Kimya Ana Bilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU

İkinci Tez Danışmanı: Doç. Dr. Yeliz DEMİR

2021

(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANA BİLİM DALI

**BAZI FLOROFENİLTİYOÜRE BİLEŞİKLERİNİN İNSAN ERİTROSİTLERİNDEN
SAFLAŞTIRILAN GLUKOZ 6-FOSFAT DEHİDROGENAZ VE 6-
FOSFOGLUKONAT DEHİDROGENAZ ENZİMLERİNİN AKTİVİTELERİ
ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

(Evaluation of the Effects of some Fluorophenylthiourea Compounds on the Activities of
Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase and 6-Phosphogluconate Dehydrogenase Enzymes
Purified from Human Erythrocytes)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Muhammed Lütfü YILDIZ

Danışman: Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU
İkinci Tez Danışmanı: Doç. Dr. Yeliz DEMİR

Erzurum
Haziran, 2021

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Muhammed Lütfü YILDIZ tarafından hazırlanan “**Bazı Florofeniltiyoüre Bileşiklerinin İnsan Eritrositlerinden Saflaştırılan Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz ve 6- Fosfoglukonat Dehidrogenaz Enzimlerinin Aktiviteleri Üzerine Etkilerinin İncelenmesi**” başlıklı çalışması .. / .. / 20.. tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Kimya Ana Bilim Dalı, Biyokimya Bilim Dalında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı ıslak imzalıdır
Danışman:	Prof. Dr. Ömer İrfan KÜFREVİOĞLU <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı ıslak imzalıdır
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı ıslak imzalıdır
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. Veysel ÇOMAKLI <i>Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi</i>	Aslı ıslak imzalıdır
İkinci Tez Danışmanı	Doç. Dr. Yeliz DEMİR <i>Ardahan Üniversitesi</i>	Aslı ıslak imzalıdır
		Enstitü Yönetim Kurulunun/....../..... tarih ve sayılı kararı.

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN

Aslı ıslak imzalıdır

Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, Tablo, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksel Lisans Tezi olarak *Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVOĞLU* danışmanlığında sunulan “**Bazı florofeniltiyoüre bileşiklerinin insan eritrositlerinden saflaştırılan glukoz 6-fosfat dehidrogenaz ve 6- fosfoglukonat dehidrogenaz enzimlerinin aktiviteleri üzerine etkilerinin incelenmesi**” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	7	30
Kuramsal Temeller	11	30
Materyal ve Yöntem	25	35
Bulgular	8	20
Tartışma	1	20
Tezin Geneli	14	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Muhammed Lütfü YILDIZ	Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVOĞLU
3.3.2021	3.6.2021
İmza: Aslı ıslak imzalıdır	İmza: Aslı ıslak imzalıdır

* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak yapmış olduğum bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Ömer İrfan KÜFREVİOĞLU yönetiminde, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma laboratuvarında yapılmıştır. Tez yazımı ve deneysel çalışmalarım boyunca yardım ve ilgisini eksik tutmayan kıymetli hocam Prof. Dr. Ömer İrfan KÜFREVİOĞLU'na en derin minnet ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarım boyunca değerli yardımlarını gördüğüm Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR, Sayın Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN ve diğer bölüm elemanlarına ve çalışmamın her aşamasında yardımını esirgemeyen ikinci danışman hocam Doç. Dr. Yeliz DEMİR'e teşekkürü borç bilirim.

Ayrıca maddi ve manevi hiçbir desteğini esirgemeyen babam, annem, kardeşlerim ve eşime ayrıca teşekkür ederim.

Muhammed Lütfü YILDIZ

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI FLOROFENİLTİYOÜRE BİLEŞİKLERİNİN İNSAN ERİTROSİTLERİNDEN SAFLAŞTIRILAN GLUKOZ 6-FOSFAT DEHİDROGENAZ VE 6- FOSFOGLUKONAT DEHİDROGENAZ ENZİMLERİNİN AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Muhammed Lütfü YILDIZ

Danışman: Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREYİOĞLU

İkinci Tez Danışmanı: Doç. Dr. Yeliz DEMİR

Amaç: Bu çalışmada insan eritrositlerinden elde edilen 6-fosfoglukonat dehidrogenaz (6PGD) ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) enzimleri üzerine 2-florofeniltiyoüre, 3-florofenil tiyoüre, 4-florofeniltiyoüre, 2,5-diflorofeniltiyoüre, 2,6-diflorofeniltiyoüre bileşiklerinin etkilerini incelemeyi amaçlanmıştır.

Yöntem: Bu çalışmada 6-fosfoglukonat dehidrogenaz (6PGD) ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) enzimleri afinitite kromatografisi metoduyla saflaştırıldı. Saflaştırma sonrası enzimlerin aktivitesi spektrofotometrik yöntemle belirlendi.

Bulgular: Yapılan çalışmalar sonucunda, insan eritrositlerinden saflaştırılan G6PD ve 6PGD enzimlerini 2-florofeniltiyoüre, 3-florofeniltiyoüre, 4-florofeniltiyoüre, 2,5-diflorofeniltiyoüre, 2,6-diflorofeniltiyoüre bileşiklerinin tamamı yarışmalı olarak inhibe ettiği gözlemlenmiştir.

Sonuç: İnhibisyon çalışmalarının sonuçlarına göre, inhibisyon etkisi gözlemlenen bu bileşikler için % Aktivite-[I] grafikleri çizilerek IC_{50} değerleri bulundu. Ayrıca bu bileşikler için Lineweaver- Burk grafikleri kullanılarak K_i sabitleri ve inhibisyon tipleri belirlendi.

Anahtar Kelimeler: İnsan Eritrosit, Saflaştırma, Glukoz 6-fosfatdehidrogenaz, 6-Fosfoglukonat Dehidrogenaz, Tiyoüre, İnhibisyon

Haziran 2021, 65 sayfa

ABSTRACT

MASTER OF SCIENCE

EVALUATION OF THE EFFECTS OF SOME FLUOROPHENYLTHIOUREA COMPOUNDS ON THE ACTIVITIES OF GLUCOSE 6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE AND 6-PHOSPHOGLUCONATE DEHYDROGENASE ENZYMES PURIFIED FROM HUMAN ERYTHROCYTES

Muhammed Lütfü YILDIZ

Supervisor: Prof. Dr. Ö. Irfan KUFREVIOGLU

Co-supervisor: Assoc. Prof. Dr. Yeliz DEMİR

Purpose: In this study, 2-fluorophenyl thiourea, 3-fluorophenyl thiourea, 4-fluorophenyl thiourea, 2,5-difluorophenyl thiourea, 2, 6-difluorophenyl thiourea on 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) enzymes obtained from human erythrocytes. It is aimed to examine the effects of difluorophenyl thiourea compounds.

Method: In this study, 6PGD and G6PD enzymes were purified by affinity chromatography method. Enzymes activity after purification was determined by spectrophotometric method.

Findings: As a result of the studies, it was observed that all of the 2-fluorophenyl thiourea, 3-fluorophenyl thiourea, 4-fluorophenyl thiourea, 2,5-difluorophenyl thiourea, 2, 6-difluorophenyl thiourea compounds competitively inhibited the G6PD and 6PGD enzymes purified from human erythrocytes.

Results: According to the results of the inhibition studies, IC_{50} values were found by plotting % Activity-[I] graphs for these compounds whose inhibition effect was observed, and K_i constants and inhibition types were determined for these compounds by using Lineweaver-Burk graphs.

Keywords: Human Erythrocyte, Purification, Glucose 6-phosphatedehydrogenase, 6-Phosphogluconate Dehydrogenase, Thiourea, Inhibition

June 2021, 65 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ	xi
GİRİŞ.....	1
Teze Genel Bakış ve Literatür Özeti.....	1
KURAMSAL TEMELLER.....	5
Kanın Yapısı ve Genel Fonksiyonları	5
Enzimler	5
Enzimlerin yapısı ve fonksiyonları	6
Enzimlerin inhibisyonu	7
Enzimlerin isimlendirilmesi	8
Enzimlerin sınıflandırılması.....	8
Pentoz Fosfat Yolu.....	10
Glukoz 6- Fosfat Dehidrogenaz Enzimi (G6PD).....	14
6-Fosfoglukonat Dehidrogenaz Enzimi (6PGD).....	15
Tiyoüre Bileşikler.....	16
Tiyoüre Bileşiklerinin Açık Yapıları	16
MATERYAL VE YÖNTEMLER	17
Materyal	17
Yararlanılan Alet ve Cihazlar.....	17
Kullanılan kimyasal maddeler.....	17
Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması.....	17
Yöntemler.....	20
Protein tayini	20
Kan numunelerinin temini ve hemolizatın hazırlanması	21
Glukoz 6-fosfat Dehidrogenaz ve 6-fosfoglukonat Dehidrogenaz Enzimlerinin Saflaştırılması.....	21

Afinite Kolonunun Hazırlanması	23
Numunenin Afinite Kolonuna Tatbiki ve G6PD ile 6PGD Enzimlerinin Elüsyonu	23
Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid Jel Elektrophorezi (SDS-PAGE) ile Enzim Saflığının Kontrolü	24
Glukoz 6- fosfatdehidrogenaz ve 6- fosfoglukonat dehidrogenaz Enzimleri İçin IC ₅₀ ve K _i Değerlerinin Belirlenmesine Ait Kinetik Çalışmalar	25
ARAŞTIRMA BULGULARI	26
Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik.....	26
Kinetik Çalışmaların Sonuçları	28
SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	39
KAYNAKLAR.....	46
ÖZGEÇMİŞ.....	52

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Enzimlerin Sınıflandırıldıkları gruplara göre fonksiyonları	9
Tablo 2. İnsan eritrosit G6PD enziminin aktivite ölçüm küveti içeriği	22
Tablo 3. İnsan eritrosit 6PGD enziminin aktivite ölçüm küvet içeriği	23
Tablo 5. İnsan eritrosit G6PD enziminin 2',5' ADP Sepharose-4B afinite kolon materyali ile saflastırılma basamakları.	26
Tablo 6. İnsan eritrosit 6PGD enziminin 2',5' ADP Sepharose-4B afinite kolon materyali ile saflastırılma basamakları	27
Tablo 7. İnsan G6PD enzimi için Lineweaver-Burk ve % Aktivite-[I] grafiklerinden elde edilen IC_{50} değerleri, K_i sabitleri ve inhibisyon tipleri tablosu	38
Tablo 8. İnsan 6PGD enzimi için Lineweaver-Burk ve %Aktivite-[I] grafiklerinden elde edilen IC_{50} değerleri, K_i sabitleri ve inhibisyon tipleri tablosu	38
Tablo 9. G6PD ve 6PGD enzimleri üzerine tiyoüre bileşiklerin inhibisyon çalışmaları sonucunda elde edilen IC_{50} değeri, K_i sabiti ve inhibisyon tipi	43

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Bir reaksiyonun enzim olmadan ve enzim ile birlikteki ilerlemesi.....	6
Şekil 2. Enzim substrat ve aktif bölge gösterimi.....	7
Şekil 3. Pentoz fosfat yolu oksidatif reaksiyonları.....	12
Şekil 4. Çalışmada kullanılan florofeniltiyoüre bileşiklerinin açık yapıları	16
Şekil 5. Bradford yöntemiyle proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart grafik	26
Şekil 6. 2',5' ADP Sepharose-4B afinite kolon materyali ile G6PD ve 6PGD enzimlerinin saflaştırmasını gösteren SDS-PAGE fotoğrafı 1: G6PD enzimi: 2: 6PGD enzimi .	27
Şekil 7. Saflaştırılan insan eritrosit G6PD ve 6PGD enzimlerinin için log M_K-R_f grafiği	27
Şekil 8. İnsan G6PD enzimi için 5 farklı 2-florofeniltiyoüre konsantrasyonunda çizilen %Aktivite-[2-florofeniltiyoüre] grafiği	28
Şekil 9. İnsan G6PD enzimi için 5 farklı 3-florofeniltiyoüre konsantrasyonunda çizilen %Aktivite-[3-florofeniltiyoüre] grafiği	28
Şekil 10. İnsan G6PD enzimi için 5 farklı 4-florofeniltiyoüre konsantrasyonunda çizilen %Aktivite-[4-florofeniltiyoüre] grafiği	29
Şekil 11. İnsan G6PD enzimi için 5 farklı 2,5-diflorofeniltiyoüre konsantrasyonunda çizilen %Aktivite-[2,5-diflorofeniltiyoüre] grafiği	29
Şekil 12. İnsan G6PD enzimi için 5 farklı 2,6-diflorofeniltiyoüre konsantrasyonunda çizilen %Aktivite-[2,6-diflorofeniltiyoüre] grafiği	30
Şekil 13. İnsan 6PGD enzimi için 5 farklı 2-florofeniltiyoüre konsantrasyonunda çizilen %Aktivite-[2-florofeniltiyoüre] grafiği	30
Şekil 14. İnsan 6PGD enzimi için 5 farklı 3-florofeniltiyoüre konsantrasyonunda çizilen %Aktivite-[3-florofeniltiyoüre] grafiği	31
Şekil 15. İnsan 6PGD enzimi için 5 farklı 4-florofeniltiyoüre konsantrasyonunda çizilen %Aktivite-[4-florofeniltiyoüre] grafiği	31
Şekil 16. İnsan 6PGD enzimi için 5 farklı 2,5-diflorofeniltiyoüre konsantrasyonunda çizilen %Aktivite-[2,5-diflorofeniltiyoüre] grafiği	32
Şekil 17. İnsan 6PGD enzimi için 5 farklı 2,6-diflorofeniltiyoüre konsantrasyonlarında çizilen %Aktivite-[2,6-diflorofeniltiyoüre] grafiği	32
Şekil 18. İnsan G6PD enzimi aktivitesi üzerine 2-florofeniltiyoüre etkisinin Lineweaver-Burk grafiği	33
Şekil 19. İnsan G6PD enzimi aktivitesi üzerine 3-florofeniltiyoüre etkisinin Lineweaver-Burk grafiği	33

Şekil 20. İnsan G6PD enzimi aktivitesi üzerine 4-florofeniltiyoüre etkisinin Lineweaver-Burk grafiği	34
Şekil 21. İnsan G6PD enzimi aktivitesi üzerine 2,5-diflorofeniltiyoüre etkisinin Lineweaver-Burk grafiği	34
Şekil 22. İnsan G6PD enzimi aktivitesi üzerine 2,6-diflorofeniltiyoüre etkisinin Lineweaver-Burk grafiği	35
Şekil 23. İnsan 6PGD enzimi aktivitesi üzerine 2-florofeniltiyoüre etkisinin Lineweaver-Burk grafiği	35
Şekil 24. İnsan 6PGD enzimi aktivitesi üzerine 3-florofeniltiyoüre etkisinin Lineweaver-Burk grafiği	36
Şekil 25. İnsan 6PGD enzimi aktivitesi üzerine 4-florofeniltiyoüre etkisinin Lineweaver-Burk grafiği	36
Şekil 26. İnsan 6PGD enzimi aktivitesi üzerine 2,5-diflorofeniltiyoüre etkisinin Lineweaver-Burk grafiği	37
Şekil 27. İnsan 6PGD enzimi aktivitesi üzerine 2,6-diflorofeniltiyoüre etkisinin Lineweaver-Burk grafiği	37

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

6PGD	6-Fosfoglukonat dehidrogenaz
6PGA	6-Fosfoglukonat
ADP	Adenozin difosfat
ATP	Adenozin trifosfat
DNA	Deoksiribonükleik asit
EC	Enzim kodu
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
ES	Enzim substrat kompleksi
G6PD	Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz
G6P	Glukoz 6-fosfat
GSH	İndirgenmiş glutatyon
GSSG	Okside glutatyon
hCA II	İnsan karbonik anhidraz II
IC₅₀	Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
K_i	Enzim inhibitör kompleksinin ayrılma sabiti
NADP⁺	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (okside form)
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (redükte form)
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PER	Amonyum persülfat
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilendiamin
TRİS	Trihidroksimetil amino metan
V_{max}	Maksimum hız
K_m	Enzim aktif bölgesinin tamamının substratla dolduğu andaki hız

GİRİŞ

Teze Genel Bakış ve Literatür Özeti

Enzimler vücudumuzdaki reaksiyonları hızlandıran yapılardır, yapım, yıkım ve dönüşüm reaksiyonlarda önemli rol oynayan enzimler hızlı bir biçimde yan ürün oluşturmadan işlevlerini yerine getirmektedir. Pentoz fosfat yolunun en önemli enzimlerinden olan glukoz 6-fosfatdehidrogenaz (G6PD) ve 6- osfoglukonat dehidrogenaz (6PGD) enzimleri ise NADPH oluşumunda önemli rol oynamaktadır. Her iki enziminde inhibisyon durumunda anemi oluşmaktadır ve insanlar için dikkat gerektiren hastalık haline gelmektedir.

Yapmış olduğumuz çalışmamızda, bazı florofeniltiyoüre bileşiklerin insan eritrositlerinden saflaştırılan G6PD ve 6PGD enzimlerinin aktiviteleri üzerine etkilerini incelemiş bulunmaktayız. Bilindiği gibi tiyoüre bileşiklerin son zamanlarda kullanımı artmaktadır, çalışmamızda ise bazı florofeniltiyoüre bileşiklerinin insan eritrosit G6PD ve 6PGD enzimlerini inhisyon etkileri üzerine çalışma yapılmıştır.

G6PD (EC 1.1.1.49; G6PD) pentoz fosfat yolunun kontrol noktasındaki enzimidir (Nelson and Cox 2013, İbrahim vd 2015, Temel vd 2018). Glukoz 6- fosfat dehidrogenaz enzimi eksikliği insanlarda görünen en yaygın enzimopatilerden birisidir ve tahminlere göre dünya nüfusunun %8 civarında görülmektedir (Chu et al. 2018).

Kızılbay vd. (2020) yapmış olduğu bir araştırmada G6PD enzimi insan eritrositinden afinite kromatografisi yöntemiyle 21.981 kat saflaştırmış ve dobutamin hidroklorürün enzim aktivitesi üzerine etkileri incelenmiştir. Çalışmalar sonucunda dobutamin hidroklorür enzimi inhibe etmiş ve K_i sabiti $19,02 \pm 4.83\text{mM}$ olarak bulunmuştur (Kızılbay ve Karaman 2020).

Jain et al. (2020) yapmış olduğu araştırmada ise G6PD'nin GSH tükenmesini önleyici bir enzim olduğunu belirtmiş ve G6PD enzimi eksikliğinin obezite hastalarında daha yaygın olduğunu rapor etmiştir. G6PD eksikliği olan bireylerin oksidatif strese karşı savunmasız ve daha yüksek risk altında olduğunu belirtmiştir (Jain et al. 2020).

Aytekin vd. (2019) Nil Tilepya Balığı (*Oreochromis niloticus*)'nda karaciğer, solungaç, böbrek ve kas dokularında bulunan G6PD aktiviteleri üzerinde bakırın etkilerini incelemişlerdir. Balıklar 0,6, 3,0 ve 6.0 mg/L bakır çözeltisi derişimlerinin etkisine 14, 15 ve 30 gün sürelerle bırakılarak G6PD aktiviteleri kontrol edilmiş. G6PD aktivitelerini kontrol değerlerine göre karşılaştırdınca dikkate alınacak kadar önemli olduğunu belirlemişlerdir. Sonuç

olarak bakırın tüm derişimlerinin Tilapya balığının karaciğer ve böbrek dokularında G6PD enziminin aktivitesini azalttığını solungaç dokusunda ise aktivitenin arttığını belirlemişlerdir (Aytekin ve Kargın 2019).

Altay vd. (2015) tarafından yapılan çalışma ise G6PD ve insan karbonik anhidraz II (hCAII) enzimleri üzerine lipid düşürücü bir ilaç olan, Siprofibrat (2-[4-(2,2-dikloro siklopropil) fenoksil]-2-metil propiyonik asit) etkileri incelenmiştir. Çalışmalarının sonucunda, hCAII üzerine değişimler gözlemlenirken G6PD enzim aktivitesinde herhangi bir değişiklik gözlemlenmemiştir (Altay vd. 2015).

Temel vd. (2015) G6PD enzimi sıçan eritrositlerinden saflaştırmışlardır. Tiyosemikarbazon temelli aza-yilid (TSCAs) türevi olan sentez moleküllerinin G6PD enzimi aktivitesi üzerine *in vitro* inhibisyon ve aktivasyon etkileri incelenmiştir. Çalışma sonucunda ise TSCAs türevlerinden 3a-3d molekülleri G6PD enziminin aktivitesini 40,77 μ M ile 58,0 μ M aralığındaki IC₅₀ değerlerinde inhibisyon gösterdiği belirtilmiştir (Bayıdır ve Temel 2018).

Kırıcı vd. (2015) *Capoeta capoeta umbla* (C. c. umbla) isimindeki balık türünün böbrek dokusu üzerinde imidacloprid ve lambda-cyhalothrin pestisitlerinin G6PD enzimi aktivitesi üzerine *in vitro* çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada balık böbreğinden G6PD enzimini amonyum sülfat çöktürmesi ve 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi yöntemiyle saflaştırmışlardır. Çalışmalarının sonucunda ise % 22,7 verimle enzimi saflaştırarak imidacloprid ve lambda-cyhalothrin pestisitlerinin G6PD enzimini etkili bir şekilde inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir. Ayrıca lambda- cyhalothrin enziminin imidacloprid enzime oranla daha fazla inhibisyon etkisini gösterdiğini belirtmişlerdir (Kırıcı vd. 2015).

Maillart et al. (2020) G6PD eksikliği olan COVID- 19 hastalarının önemli bir oranda hemoliz vaka gösterdiklerini belirtmişlerdir. Çalışmalarında ise hidrosiklorokin kullanımının yaygın hale geldiğini ve etkili olduğuna dair güçlü bir kanıt olmadan tedavi türü olarak öne sürüldüğünü ayrıca hidrosiklorokin (HCQ) ilacının G6PD eksikliği olan hastalar da akut hemoliz gibi ciddi yan etkisinin olduğunu belirtmişlerdir (Maillart et al 2020). Ayrıca Takahashi et al. (2020) yapmış olduğu çalışmalarda G6PD eksikliği olan hastalarda hidrosiklorokin' in yan etki olarak hemolizi ilişkilendirdiklerini belirtmiştir (Takahashi et al. 2020).

Çiftçi vd. (2020) ise Japon bildiricim eritrositlerinden G6PD enzimini 2'5'-ADP Sepharose 4B afinite jeli ile %69' luk saflaştırma verimi elde etmiş olup 52,84 EU / mg spesifik aktivite ile saflaştırmışlardır. SDS-PAGE yöntemi kullanılarak kontrol edilmiş ve sonuç olarak jel üzerinde tek bir bant gözlemlemişlerdir. Karakterizasyon çalışmalarında ise optimum iyonik şiddeti 0,5 M Tris-HCl' de optimum sıcaklığı ise 60 °C olarak bulmuşlardır (Çiftçi vd. 2020).

Mele et al. (2018) pentoz fosfat yolunun reaktif oksijen artışı ve NADPH sentezinden kaynaklı kanserojen mikroorganizmaların metabolik büyümede ve metastazında önemli bir glikoliz metabolizması olduğunu belirtmiştir. Yapmış oldukları çalışmalarda ise polidatinin pentoz fosfat yolunun anahtar enzimi olan G6PD enzimini inhibe ettiğini belirtmiş ve inhibisyonun kanser hücrelerinin kemoterapiye olan duyarlılığını artıracak ve yeniden sağlayabileceğini bildirmiştir (Mele et al. 2018).

Akkoyun vd. (2018) 6PGD enzimi inhibisyonu üzerine sıçan eritrositlerinden 2',5'-ADP Sepharose4B afinite kromatografi ile saflaştırmışlardır. Çalışmalarında sonucunda Cd iyonun inhibe ettiğini astaksantin (AST) iyonunun ise Cd iyonunun enzim aktivitesini artırdığını bildirmişlerdir (Akkoyun vd. 2018).

Adem vd. (2016) 6PGD enzimini sıçan akciğerinden 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi kullanarak saflaştırmışlar ve SDS-PAGE kontrol edip tek bant elde gözlemlemişlerdir. 6PGD enzimi için molekül ağırlığını Sephadex G-150 jel filtrasyon kromatografisi yöntemiyle 107 kDa olduğunu bulmuşlardır. İnhibisyon çalışmalarında ise levofloksasin, furosemid, seftazidim, sefuroksim ve gentamisin antibiyotiklerinin inhibisyon etkilerini incelemiş ve 6PGD enziminin levofloksasin tarafından inhibe edildiğini bildirmişlerdir (Adem ve Çiftçi 2016).

Adem vd. (2016) başka bir çalışmada ise sıçan kalbinden G6PD ve 6PGD enzimlerini saflaştırarak, furosemid, digoksin ve dopamin' in inhibisyon etkilerini incelemişlerdir. Çalışmalarının sonucunda ise üç ilacın da inhibisyon etkisi gösterdiğini belirtirken, dopamin' in yarışmalı furosemid ve digoksin yarışmasız inhibisyon gösterdiğini tespit etmişlerdir (Adem ve Çiftçi 2016).

Feng Q et al. (2020) 6PGD enzimi üzerine Gene Ekspresyon Omnibus (GEO) profillerini incelemiş ve kanserli doku örneklerinde 6PGD enziminin ekspresyonunu tespit etmişlerdir. 6PGD enzimi üzerine Ebselen ile inhibisyon çalışmaları yapmış, sonuç olarak ise Ebselen'in 6PGD enzimini inhibe ederek kanser tümörlerinin büyümesini baskıladığını ve inhibitör olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir (Feng Q et al. 2020).

Özaslan vd. (2019) insan eritrositlerinden G6PD ve 6PGD enzimlerini saflaştırmış ve antidepressan ilaçlar olan aripiprazol, mirtazapin, risperidon, essitalopram ve haloperidol' ün enzimler üzerine inhibisyon etkilerini araştırmışlardır. Çalışmalarının sonucunda ilaçların her iki enzimi de inhibe ettiğini bildirmişlerdir (Özaslan vd. 2019).

Yang et al. (2018) 6PGD enziminin tümör metabolizma ve büyümesinde rolü olduğunu belirtmiş ve göğüs kanseri olan hastalarda incelemelerde bulunmuşlardır. Yapmış oldukları

alışmalar sonucunda ise t m rl  hücrelerde 6PGD enziminin aktivitesinin daha yüksek olduğunu gözlemlemiş ve enzimin inhibisyonunun kemoterapi duyarlılığını artırdığını belirtmişlerdir. Enzim inhibisyonu sağlanması halinde kemoterapik etkinliğin artırıldığını ve terapötik stratejiyi temsil edebileceğini  ne sürmüşlerdir (Yang et al. 2018).

Zhang et al. (2019) cisplatin ilacına dirençli akciğer ve yumurtalık kanser hücrelerinde 6PGD enzimi üzerine inceleme yapmışlarıdır. Bu hücrelerde 6PGD enziminin ekspresyonunun daha fazla olduğunu ve tümör büyümesinin daha yüksek oranda olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmanın sonucunda direnç gösteren kanser hücrelerinde 1-Hidroksi-8-metoksi-antrakinon vasıtasıyla 6PGD enziminin inhibe gösterdiğini ve cisplatine direncinin azaldığını tespit etmişlerdir. Tümörlü hücrelerde 6PGD enziminin inhibisyonu sağlanarak cisplatine direncinin aşılabileceğini ve hastalığın tedavi edilebileceğini bildirmişlerdir (Zhang et al. 2019).

Ma et al. (2018) en agresif tiroid kanseri türü olan anaplastik tiroid karsinomu (ATC)'na 6PGD inhibisyonunun etkisini incelemişlerdir. Çalışmanın sonucunda kanser hücreleri 6PGD inhibisyonuna maruz bırakıldığı zaman ATC hücrelerinin doksorubisine karşı duyarlı olduğunu ve yukarı regüle edildiğini bildirmişlerdir. ATC tedavisinde kemoterapiye alternatif olarak direncin üstesinden gelmek için terapötik bir strateji olduğunu bildirmişlerdir (Ma and Cheng 2018).

KURAMSAL TEMELLER

Kanın Yapısı ve Genel Fonksiyonları

Kan, vücudun iç ortamının normal bileşiminin korunması olan homeostazın sağlanmasına önemli katkı sağlayan organ sistemini oluşturur. Kan; özel hücreleri içermesinin yanında proteinler ve sudan oluşan sıvı bir doku olarak kabul edilebilir. Kanda en bol bulunan hücre, oksijeni dokulara taşıyan ve protonların hemoglobin ile bağlanması yoluyla kanın tamponlanmasına katkıda bulunan eritrosit diye adlandırılan kırmızı kan hücreleridir. Kırmızı kan hücreleri, farklılaşma sürecinde tüm iç organellerini kaybeder. Beyaz kan hücreleri olan lökositler, kanda bulunan ve enfeksiyona karşı savunmada görev yapan çekirdekli hücrelerdir. Sitoplazmik organelleri içeren ancak çekirdeği bulunmayan trombositler (platelet), kan damarının lümeni içinde normal *trombüs* (pıhtı) oluşumuna katkıda bulunarak kanamanın kontrolünde rol oynarlar (Marks' et al. 2006).

Eritrositler, ihtiva ettikleri hemoglobin ile dokular arasında karbondioksit ve oksijen taşıyan kan hücreleridir. Hemoglobin kuartern yapıda olup eritrositler tarafından taşınırlar ve uygun ortamı sağlarlar (Nelson and Cox 2013). Eritrositler normal koşullarda 100 ile 120 gün arasında yaşam sürelerine sahiptirler. Esas görevi taşıma ve bunun yanı sıra düzenleme, savunma ve koruma görevi olan kan, plazma olarak adlandırılan sıvı bölümle % 91-92 su ve bunun içindeki % 7'si plazma protein içeren kan hücreleri denilen şekilli elemanlardan oluşmaktadır (Nelson and Cox 2013). Taşıma görevi olarak, hormonlar, kan gazları, enzimleri ve besin maddelerini gerekli olan hücrelere iletirler. Metabolik aktivite sonrası oluşan artık maddeleri ise böbrek ve akciğer gibi organlara iletir. Osmotik basıncın dengelenmesi, vucüt ısı ve sıvıların pH dengesinin sağlanması gibi düzenleme görevleri de vardır. Ayrıca kanda mevcut lökositler aracılığıyla zararlı mikroorganizmaları etkisiz hale getiren savunma görevi de vardır (Bala 2010).

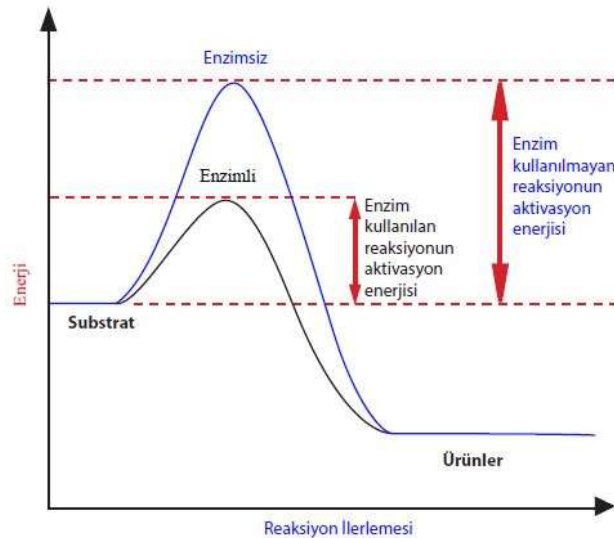
Enzimler

Canlı organizmalarda her canlının hayatını devam ettirmesi için dışarıdan aldığı besinleri yapısına göre biyolojik moleküllere seçici olarak dönüştürmesi gerekmektedir. Enzimler ise bu dönüşüm reaksiyonlarını hızlandırırlar ve yan ürün oluşturmaksızın %100'lük verim sağlarlar. Enzimler kimyasal reaksiyonların hızlarını artırıp, reaksiyonlardan hiçbir değişikliğe uğramadan çıkan maddelerdir. (Lerner and Lerner 2003). Katalitik aktivitesi olan

bir kısım RNA molekülleri hariç, bütün enzimler protein yapısındadırlar (Nelson and Cox 2013).

Enzimlerin yapısı ve fonksiyonları

Moleküller için özel bağlanma enerjilerine sahip proteinler olan enzimler olmasaydı reaksiyonların büyük kısmı mevcut halinden daha yüksek enerji düzeyi ve daha yüksek sıcaklığa gereksinim duyarlardı. Bununla birlikte zayıf enerjili bağ yapabilme özelliğine sahip olmaları, reaksiyon hızını artırmak için enzimlere büyük avantaj sağlamaktadır. Enzimler besin üretimi, gen klonlama gibi birçok alanda yaygın uygulama alanı bulmuşlardır (Lerner and Lerner 2003). Biyokimya tarihinde araştırmaların büyük çoğunluğu enzimler üzerinedir. Bunlardan kataliz olayı ile ilgili çalışmalardan ilki midedeki sindirim enzimlerinin etkileri üzerine 1760-1825 yılları arasında yapılmıştır. Bunun ardından İsveçli kimyager S.S.Berzelius 1835 yılında sabit bir enzim üzerine ilk çalışmayla, diastazın nişastayı canlı yapı içinde (*in vivo*) sülfürik asite göre daha da yüksek bir verimle hidrolizlemiştir (Keha ve Küfrevioğlu 2020). Şekil 1.'de bir reaksiyonun enzim olmadan ve enzim ile birlikteki ilerlemesi gösterilmiştir.



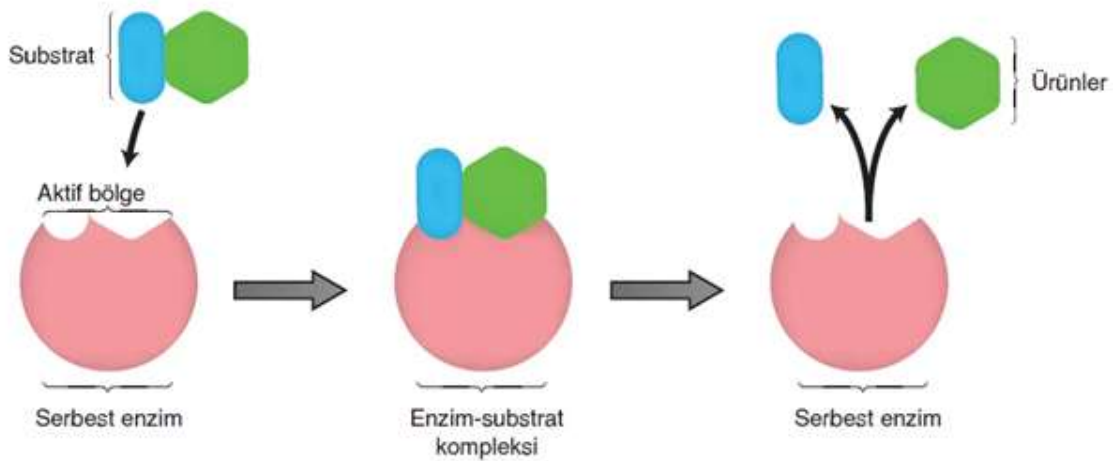
Şekil 1. Bir reaksiyonun enzim olmadan ve enzim ile birlikteki ilerlemesi (Stenesh, 1998)

Enzimlerin genel özellikleri aşağıdaki gibidir;

1. Enzimler genellikle protein yapısındadırlar.
2. Enzimler aynı türdeki reaksiyonları birçok kez gerçekleştirilebilir.
3. Bir enzim, bir çeşit reaksiyona ya da aynı tip benzer reaksiyonlara spesifiktir.
4. Enzimler katalizör görevi gördüğü tepkimelerin aktivasyon enerjilerini düşürür.
5. Oluşacak reaksiyonun dengeye ulaşmasını hızlandırırlar.
6. Enzimler canlı ve cansız ortamda görev yaparlar (Gözükara 1997).

Bugün 5000'den fazla enzim tanımlanmış olup, birçoğunun saf halinin kinetik çalışılması yapılmış ve 200 'den fazlası kristallendirilmiştir. (Keha ve Küfrevioğlu 2020). Buna rağmen yapılan bazı çalışmalarda ise birçok enzimin hala tespit edilemediğini göstermektedir. Enzimlerin küçük bir katalitik molekülü dışında tamamı proteindir ve enzimlerin katalitik aktiviteleri, doğal protein konformasyonlarının dayanıklılığına göredir. Enzim alt birimlerine ayrılır ya da denatüre olursa katalitik aktiviteleri büyük oranla kaybolur. Bazı enzimlerin aktiviteleri için amino asit kalıntıları dışında kalıntılara ihtiyaçları yoktur. Diğerleri ise inorganik iyon ya da koenzim denilen kompleks organik moleküllere ihtiyaç duyarlar (Koshland et al. Neet 1968).

Enzim proteinine çok sıkı bağlanmış olan koenzim ya da metal iyonuna prostetik grup adı verilmiştir. Metal iyonlarıyla ve koenzimiyle katalitik olarak aktif olan bir enzime ise holoenzim denilmektedir. Holoenzimlerin protein kısmına apoenzim ya da apoprotein adı verilmiştir. Koenzimlerin görevi işlevsel grupların geçici taşıyıcılığını yapmaktır ve genellikle diyet olarak alınan vitaminlerden türemektedirler (Nelson and Cox 2013). Enzime substratın bağlandığı ve reaksiyonun gerçekleştiği yere aktif bölge denilmektedir. Enzim- substrat kompleksi enzimin aktivitesi için önemli rol oynamaktadır (Nelson and Cox 2013). Şekil 2'de serbest enzim ve enzimin aktif bölgesine bağlanan ve aktivite susbtrat gösterilmiştir.



Şekil 2. Enzim substrat ve aktif bölge gösterimi (Blanco et al. 2017).

Enzimlerin inhibisyonu

Enzimlerin aktivitelerinin bazı bileşikler tarafından azaltılması ya da tamamen yok edilmesine inhibisyon denilmektedir. İnhibisyon etkisi olan bileşiklere ise inhibitör denilmektedir ve genellikle küçük molekül yapısında bulunmaktadır veya iyonik yapıdadırlar (Goldstein et al. 1965). Enzim inhibisyonu kontrol mekanizmasında rol aldığı için önem arz etmektedir. Birçok ilaç, zehirli bileşikler ve kimyasal maddeler bu yolla işlev göstermektedirler (Keha ve Küfrevioğlu 2020).

İnhibisyon, dönüşümlü ya da dönüşümsüz olarak iki şekilde gerçekleşebilir. Dönüşümlü inhibisyonunda inhibitör ve enzim denge reaksiyonu halinde etkileşimdedir. Bu inhibisyon, yarışmalı ve yarışmasız ya da yarı yarışmalı halinde olabilir. Yarışmalı inhibisyon, inhibitör ve substratın enzim üzerinde aynı bölgeye bağlanmaya çalışmasıyla gerçekleşir (Keha ve Küfrevioğlu 2020).

Yarışmasız inhibisyonunda substrat ve inhibitör enzimin farklı bölgelerine bağlandığı için substrat konsantrasyonu inhibisyon üzerine etki göstermez. Yarı yarışmalı inhibisyonunda ise inhibitör yalnızca enzim substrat kompleksine bağlanmaktadır. Dönüşümsüz inhibisyon çeşidinde ise inhibitör enzime kovalent bağ ile bağlanır yada ayrılması zor bir kompleks oluşturmaktadır (Keha ve Küfrevioğlu 2020).

Enzimlerin isimlendirilmesi

Enzimlerin isimlendirilirken, belirli kural çerçevesinde ve her enzimin kendine ait kod numarası kullanılmaktadır (Tipton et al. 2000). Enzyme Commission (E. C.) olarak adlandırılan bu numara, harflerinden sonra 4 rakamdan oluşmaktadır. Örneğin E.C. 2.7.1.1. kodlu numaraya baktığımızda 2 numarasının enzimin, transferaz enzimi, 7 numarasının fosfat grubunu transfer ettiğini, 1 numarasının fosfat transferini alkol grubuna ait olduğunu ve sondaki 1 rakamı da bu transferi sağlayan enzimler arasında ilk sırayı aldığını ifade etmektedir. Bahsettiğimiz enzim ise hekzokinaz adıyla bildiğimiz, ATP:D- heksoz 6- fosfotransferaz enzimidir. (Keha ve Küfrevioğlu 2020).

Enzimlerin sınıflandırılması

Enzimler altı ana grupta sınıflandırılmaktadırlar. Bunlar sırasıyla şöyledir:

- 1- Oksidoredüktazlar
- 2- Transferazlar
- 3- Hidrolazlar
- 4- Liyazlar
- 5- İzomerazlar
- 6- Ligazlar

Sınıflandırıldıkları gruplara göre fonksiyonları ise Tablo 1’ deki gibidir (Gajera at al. 2008)

Tablo 1. Enzimlerin Sınıflandırıldıkları gruplara göre fonksiyonları

Ana Sınıflandırma Numarası	Ana Sınıflandırma ve Alt Sınıflandırma İsimleri	Katalize Ettikleri Reaksiyon Tipleri
1	OKSİDOREDÜKTAZLAR Dehidrogenazlar, Oksidazlar Redüktazlar, Peroksidazlar Katalazlar, Hidrolazlar	İki substrat arasında elektron alışverişi olan reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir.
2	TRANSFERAZLAR Kinazlar, Açıltransferazlar Transaldolazlar, Metiltransferazlar	Verici ve alıcı substrat arasında oluşan reaksiyonda hidrojen dışındaki grupların transferini katalizler.
3	HİDROLAZLAR Esterazlar, Glioksidazlar Peptidazlar, Fosfatazlar Tiyolazlar, Fosfolipazlar Amidazlar	Ester, peptit, eter, glukozit, C- halojenür, anhidrit ya da P-N bağlarının hidrolizlenmesini H ₂ O molekülünün katılımıyla sağlayan enzimlerdir.
4	LİYAZLAR Dekarboksilazlar, Aldolazlar Hidratazlar, Dehidratazlar	Substratlarda grupların uzaklaştırılıp çift bağların oluşturulduğu reaksiyonları oksidasyon veya hidrolizden farklı bir mekanizma ile katalizleyen enzimlerdir.
5	İZOMERAZLAR Rasemazlar, Epimerazlar İzomerazlar, Mutazlar	Yapısal, geometrik veya optik izomer yapıların birbirine dönüşümünü sağlayarak tekrar düzenlenmesini sağlarlar.
6	LİGAZLAR Sentetazlar, Karboksilazlar	Yüksek enerjili fosfat bileşiklerinin(ATP, GTP gibi) fosfat bağının koparak ortaya çıkardığı enerji yardımıyla iki molekülün bağlandığı reaksiyonları katalizlerler.

Enzimlerin aktivitelerine etki eden faktörler şu şekilde sıralanabilir:

1. Substrat konsantrasyonu
2. Enzim konsantrasyonu
3. pH
4. İyonik şiddet
5. İnhibitör ve aktivatörlerin varlığı
6. Sıcaklık

Substrat ve enzim konsantrasyonu, sıcaklık, pH, inhibitör ve aktivatörlerin varlığı ile iyonik şiddet enzim aktivitesine etki eden faktörlerdendir. Enzimler, belirli sıcaklık ve pH

aralıklarında en iyi şekilde çalışır ve optimalin altındaki koşullar, bir enzimin bir substrata bağlanma yeteneğini kaybetmesine neden olabilir (Eed 2012).

Pentoz Fosfat Yolu

Pentoz fosfat yolu aynı zamanda heksoz monofosfat yolu olarak da bilinir. Organizmaya pentozlar ve nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) sağlayan metabolik bir yoldur. Bu yolda oluşan serbest enerji ATP' ye dönüştürülemez. Oluşan NADPH organizmada bir hidrojen vericisi görevindedir (Gürdöl 2015). Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat, kısaltılmış NADP⁺ veya daha eski gösterimde TPN (trifosfopiridin nükleotid), Calvin döngüsü ve indirgeyici ajan olarak NADPH gerektiren lipid ve nükleik asit sentezleri gibi anabolik reaksiyonlarda kullanılan bir kofaktördür. Tüm hücrel yaşam biçimleri tarafından kullanılır (Kawai et al. 2008).

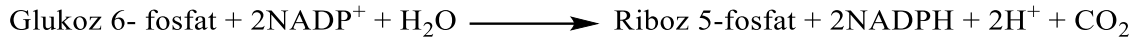
NADPH, NADP⁺ 'nın indirgenmiş şeklidir. NADP⁺, adenin parçasını taşıyan riboz halkasının 2 'pozisyonunda ek bir fosfat grubunun varlığıyla NAD⁺, dan farklıdır. Bu ekstra fosfat, NAD⁺ kinaz tarafından eklenir ve NADP⁺ fosfataz ile uzaklaştırılır. NADPH, NADP⁺ dan üretilir. Hayvanlarda ve diğer fotosentetik olmayan organizmalardaki ana NADPH kaynağı, ilk adımda glikoz-6-fosfat dehidrojenaz (G6PDH) ile pentoz fosfat yoludur. Pentoz fosfat yolu ayrıca, glikozdan NAD (P) H'nin bir başka önemli parçası olan pentoz üretir. Bazı bakteriler Entner-Doudoroff yolu için de G6PDH kullanır, ancak NADPH üretimi aynı kalır (Iwahashi et al. 1989). Yaşamın tüm alanlarında bulunan Ferredoksin-NADP⁺ redüktaz, bitkiler ve siyanobakteriler dâhil olmak üzere fotosentetik organizmalarda önemli bir NADPH kaynağıdır. Fotosentezin hafif reaksiyonlarının elektron zincirinin son basamağında ortaya çıkar. Karbondioksiti asimile etmek ve karbondioksiti glikoza dönüştürmeye yardımcı olmak için Calvin döngüsündeki biyosentetik reaksiyonlar için indirgeme gücü olarak kullanılır. Diğer fotosentetik olmayan yollarda da elektronları kabul etmede işlevleri vardır: nitratin bitki asimilasyonu için nitrojen döngüsünde ve yağların üretiminde amonyağa indirgenmesinde gereklidir (Keha ve Küfrevioğlu 2020).

NADPH' ın kullanım yerlerini şu şekilde sıralayabiliriz;

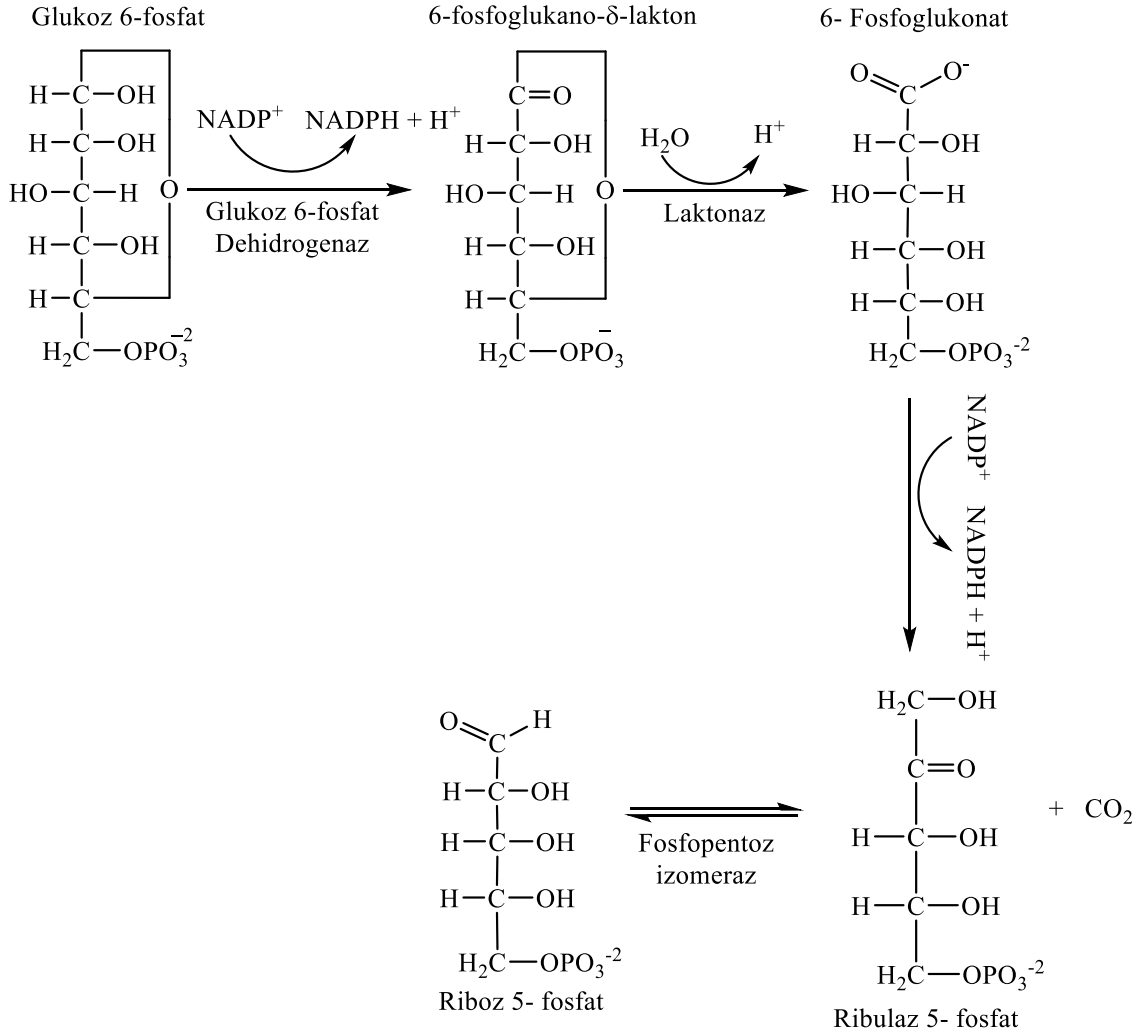
1. Yağ asidi, steroid ve kolesterol sentezi.
2. Ksenobiyotiklerin zehir etkisini yok etmeyi sağlayan karma fonksiyonlu oksidaz sisteminde.
3. Glutatyon (GSH)'un yenilenmesinde.
4. Deoksiriboz oluşumunda.
5. Amino asitlerin bazılarının metabolizmasında.
6. Glukuronik asit metabolizmasında.

Pentozlar ise DNA ve RNA yapısına katılmalarının yanı sıra, koenzim A, NAD⁺ ve FAD gibi önemli bileşiklerinde yapısında bulunabilirler (Gürdöl 2015). İnsan eritrositlerinde, pentoz fosfat yolunun işlevi, eritrositlerin varlığını sürdürmesi için önemlidir. Eritrositler, GSH, koenzimler ve ATP gibi gerekliliği önem arz eden bileşiklerin sentezi için enerji gereksinimi duyarlar ve bu enerjiyi glukozu metabolize ederek sağlarlar. Olgun eritrositler mitokondrilerini kaybettikleri için ATP' nin temini oksidatif fosforilasyon yoluyla sağlanamaz (Montgomery 1996). Hücrelerde indirgeyici gücün en hızlı kullanılabilir hali NADPH' dir. Pentoz fosfat yolu ile glukoz 6-fosfat, riboz 5-fosfata oksitlenirken NADPH' in üretimi gerçekleşir. Bu beş karbonlu şeker ile onun türevleri olan RNA, DNA, FAD, ATP, NAD⁺ ve CoA gibi hayati önemi olan biyomoleküllerin bileşenleridir (Çiftci 1998). Pentoz fosfat yolu aynı anda hücre sitozolünde, üç, dört, beş, altı ve yedi karbonlu şekerlerin, bir seri oksidatif olmayan birbirine dönüşüm reaksiyonlarını da katalizler (Keha ve Küfrevioğlu 2020).

Pentoz fosfat yolunun oksidatif reaksiyonlarının toplam reaksiyonunu aşağıdaki şekilde gösterebiliriz;

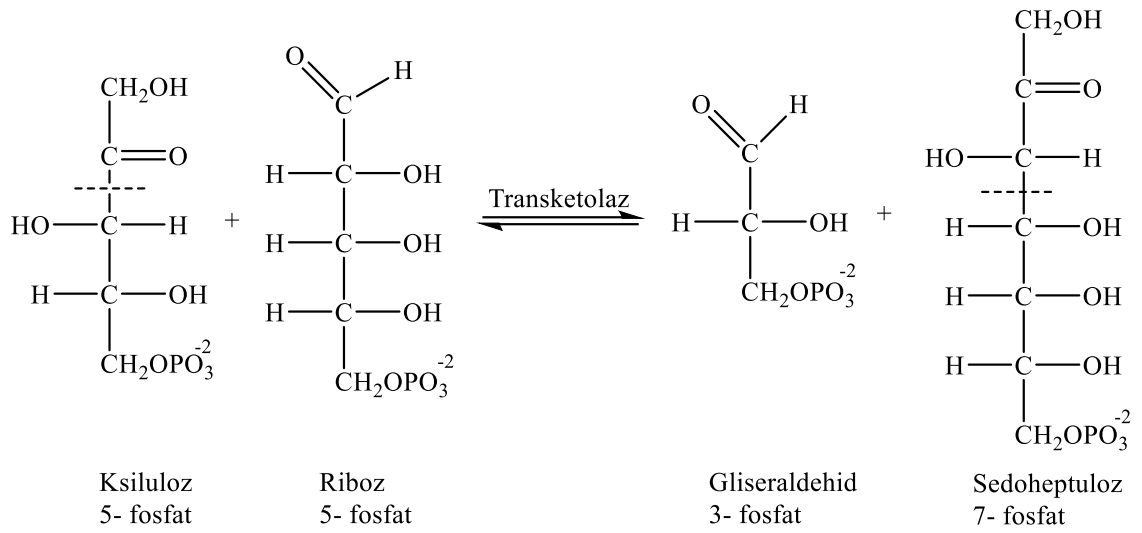


Pentoz fosfat yolunun, oksidatif reaksiyonları glukoz 6- fosfatın 1 no'lu karbonunun dehidrogenasyonu ile başlar ve bu reaksiyonu G6PD enzimi katalizler. G6PD enzimi inceleyecek olursak NADP⁺ ye aşırı spesifik olduğunu ve NAD⁺ için KM değerini NADP⁺ için olana göre 1000 kat daha fazla olduğunu görmekteyiz. Bu reaksiyon sonucunda ise C-1 karboksili ve C-5 hidroksil grubu arasında oluşan, bir molekül içi estere sahip olan 6-fosfoglukono-Δ-lakton oluşmaktadır. Daha sonra ise 6-fosfoglukono-Δ-lakton ürününün laktonaz enzimi ile katalizlenmesi ile 6-fosfoglukonata hidrolizlenir. Hidrolizlenme sonucunda oluşan altı karbonlu şeker daha sonra koenzimi NADP⁺ olan 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enzimi katalizörlüğünde oksidatif dekarboksilasyona uğrayarak ribuloz 5-fosfata dönüşür, bu reaksiyonları açık reaksiyonları ile Şekil 3'de verilmiştir (Keha ve Küfrevioğlu 2020).

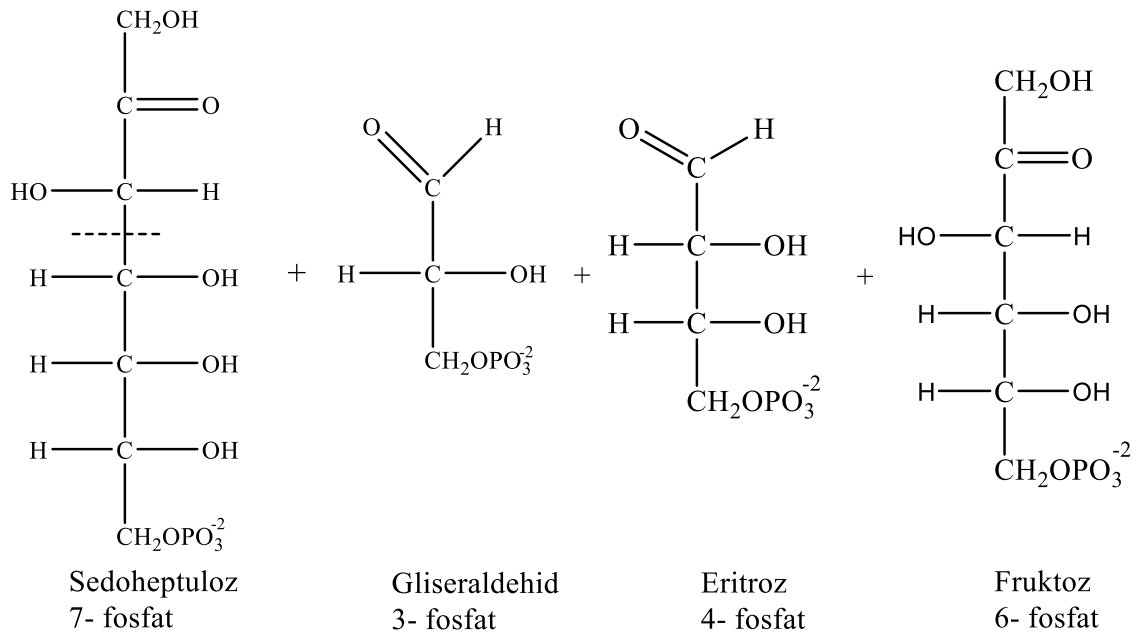


Şekil 3. Pentoz fosfat yolu oksidatif reaksiyonları (Keha ve Küfrevioğlu 2020).

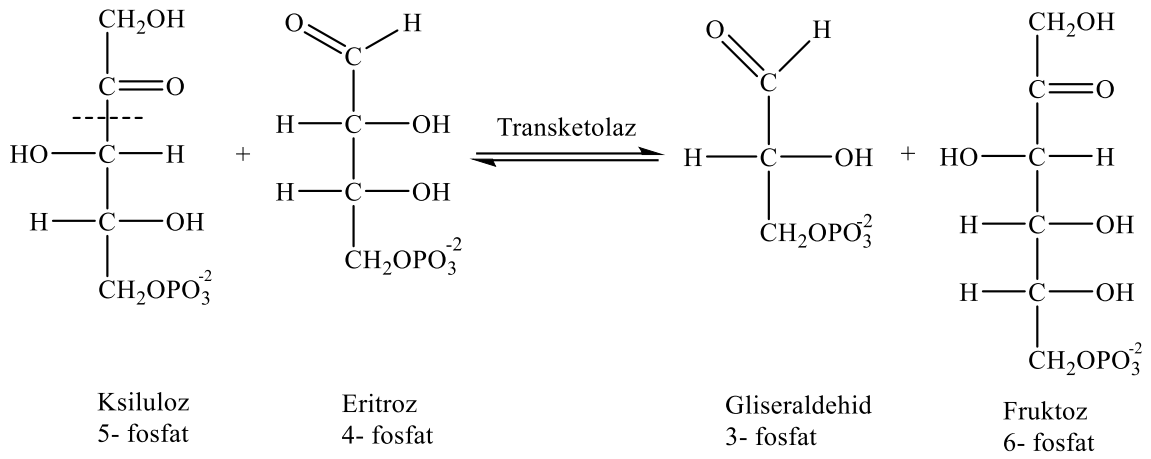
Pentoz fosfat yolunun ikinci dönem reaksiyonları olarak bilinen oksidatif olmayan reaksiyonlarına, organizmanın başvurmasındaki temel amaç glukoz israfına sebep olmadan yeterli miktarda NADPH teminini sağlamaktır. Başka bir deyişle ihtiyaç fazlası ribozları tekrar glukozla dönüştürmektir. Bu reaksiyonlar transketolaz ve transaldolaz enzimleri tarafından katalizlenen reaksiyonları kapsamaktadır (Gürdöl 2015). Transketolaz enzimi iki karbonlu, transaldolaz enzimi ise üç karbonu birimlerin transferini yapmaktadır (Keha ve Küfrevioğlu 2020). Pentoz fosfat yoluyla glikolizi birbirine bağlayan reaksiyonların ilkinde, iki pentozdan gliseraldehid 3-fosfat ve sedoheptuloz 7-fosfat meydana gelir.



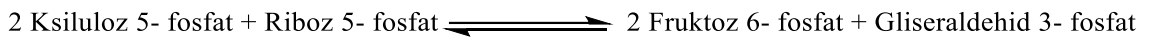
Burada iki karbonlu birimini veren ksiluloz 5- fosfat 3 no'lu C'da ribuloz 5 fosfatın epimeri olup, birbirine fosfopentoz epimeraz vasıtasıyla dönüştürülürler. Gliseraldehid 3- fosfat ve sedoheptuloz 7- fosfat daha sonra reaksiyona girerek bir fruktoz 6- fosfat ve birde eritroz 4- fosfat teşkil ederler:



Yukarıdaki reaksiyonda oluşan eritroz 4- fosfat, transketolaz enzimi katalizörlüğünde, ksiluloz- 5- fosfattan iki karbon birimi alarak gliseraldehid 3- fosfat ve fruktoz 6- fosfatı meydana getirir. Transketolaz enziminin koenzimi tiamin pirofosfat (TPP)'dir.



Bu reaksiyonların toplamı aşağıdaki gibidir.



Buradaki ksiluloz 5- fosfatın, fosfopentoz izomeraz ve epimeraz enzimlerinin sırasıyla görev yapmaları sonucu, riboz 5- fosfattan yapıldığını göz önüne aldığımız zaman yukarıdaki denklem;



şekline döner. Böylece pentoz fosfat yoluyla meydana getirilen fazla riboz 5- fosfat glikoliz ara ürünlerine dönüştürülmüş oluyor (Keha ve Küfrevioğlu 2020).

Glukoz 6- Fosfat Dehidrogenaz Enzimi (G6PD)

Eritrositler, yaşamlarını devam ettirmeleri için ihtiyaç duydukları enerjiyi Embden Meyerhof denilen anaerobik glikolizden sağlarlar. Bunun yanı sıra eritrositler, hücredeki proteinleri ve hemoglobini oksidan etkilerden de muhafaza etmektedirler. Glukoz 6- fosfat dehidrogenaz(G6PD) enzimi hücreleri bu oksidan hasarlardan koruma ile görev yapmaktadır ve eritrositlerde pentozmonofosfat yolunda bulunmaktadır ve pentoz fosfat yolunun ilk basamağındaki NADP⁺ yi NADPH + H⁺ ya indirgeyen önemli bir enzimidir. (Anonim 2021). G6PD eksikliği hemolitik anemiye yol açar bir bozukluktur, bu hastalığa sahip olan kişilerde oksidan nitelikli bileşiklerin bazılarını zehirsizleştirme özelliği bozulup sonuç olarakta hemolitik anemi gelişmektedir. İnsanlarda en yaygın olarak gören anemi türü olup dünyada 200 milyondan fazla insan ile ilgilidir. Özellikle Afrika'nın tropikal bölgeleri, Akdeniz bölgesinde ve Amerikalı zenci insanlar arasında yaygın olarak görülmektedir. X- kromozunda bulunan bu enzim geni incelendiğinde 400' den fazla mutasyon tespit edilmiştir. Bu mutasyonlardan herhangi birine sahip kişilerin genelinde belirti görülmemektedir yine de oksidan nitelikli ilaç(antibiyotik, primakin vb) kullanımı, baklagiller veya enfeksiyon anemiye tetikleyebilir. G6PD

eksikliğinde eritrositlerin etkilenmesinin sebebi eritrositlerin NADPH'ı sadece pentoz fosfat yolu vasıtasıyla üretebilmesidir. (Gürdöl 2015).

G6PD eksikliğinde anemi oluşmasının sebebi ise NADPH üretiminin azalmasıdır, çünkü NADPH eritrositler de antioksidan bileşik olan GSH yenilenmesini sağlayan glutatyon redüktaz enziminin kofaktörüdür. GSH glisin, sistein ve glutamik asitten oluşmaktadır ve bir tripeptiddir. Bu yapı proteinlerdeki sülfhidril gruplarının oksidasyona karşı korur ve enzim reaksiyonlarının bir kısmında sülfhidril gurplarını kosubstrat olarak kullanır. Her iki işlev içinde GSH oksitlenerek kondanse olur ve GSSG'ye dönüşür. Bu işlevlerin devam edebilmesi için GSH' ın tekrar indirgenmiş haline dönüşmesi gerekmektedir, bu dönüşümü ise glutatyon redüktaz enzimi NADPH' ı kofaktör olarak kullanarak sağlamaktadır (Gürdöl 2015).

Dünya sağlık örgütü G6PD enzimini eksikliğini klinik bulgular ve aktivite düzeyine göre beş sınıfa ayırmıştır;

- Sınıf I** : Enzimin aktivitesi normalden %10 civarında daha azdır ve kronik hemolitik anemi gözlemlenmiştir.
- Sınıf II** : Ağır enzim eksikliği olan ve genellikle aralıklı olarak hemolitik anemi saptanan sınıftır.
- Sınıf III** : Orta derecede (%10 - %60) enzim eksikliği mevcut olan hastalar olup, hemolitik anemi de mevcuttur.
- Sınıf IV** : Enzim eksikliği ve hemoliz yoktur.
- Sınıf V** : Bu sınıfta olan hastalarda ise enzim aktivitesi yüksek olup bu sınıf ayrıca kendi arasında dört varyanta ayrılmıştır.

G6PD enzimi eksikliğinde oluşan hastalıklarında tedavi olarak en yaygın kullanılan yöntem, ilaçlar ve oksidan streten kaçınma durumudur bu durumda ise hasta bakla tüketimi ve enfeksiyona karşı dikkatli hareket edilmesine yönlendirilmektedir. Çok nadir olarak Hb 7g/dL altında olduğunda ya da bu seviyede hemoglobüri devam ediyorsa transfüzyon önerilmektedir.

6-Fosfoglukonat Dehidrogenaz Enzimi (6PGD)

Pentoz fosfat yolunun ikinci oksidatif basamağını katalizleyen 6PGD enzimi hem eksikliği yaygın olarak görülmeyen hem de eksikliği durumunda ağır hemolitik vakaları az olan bir enzimdir (Walzem et al. 1991). İzomerazın inhibitörü olan 6PGD hücrede birikmesi halinde glikoliz yolunu inhibe etmektedir (Barrett 1997). 6PGD enzimi redüktif biyosentezlerde ve NADPH nükleotit sentezinde riboz 5-fosfat sağlaması açısından önemlidir (Tandoğan ve Ulusu

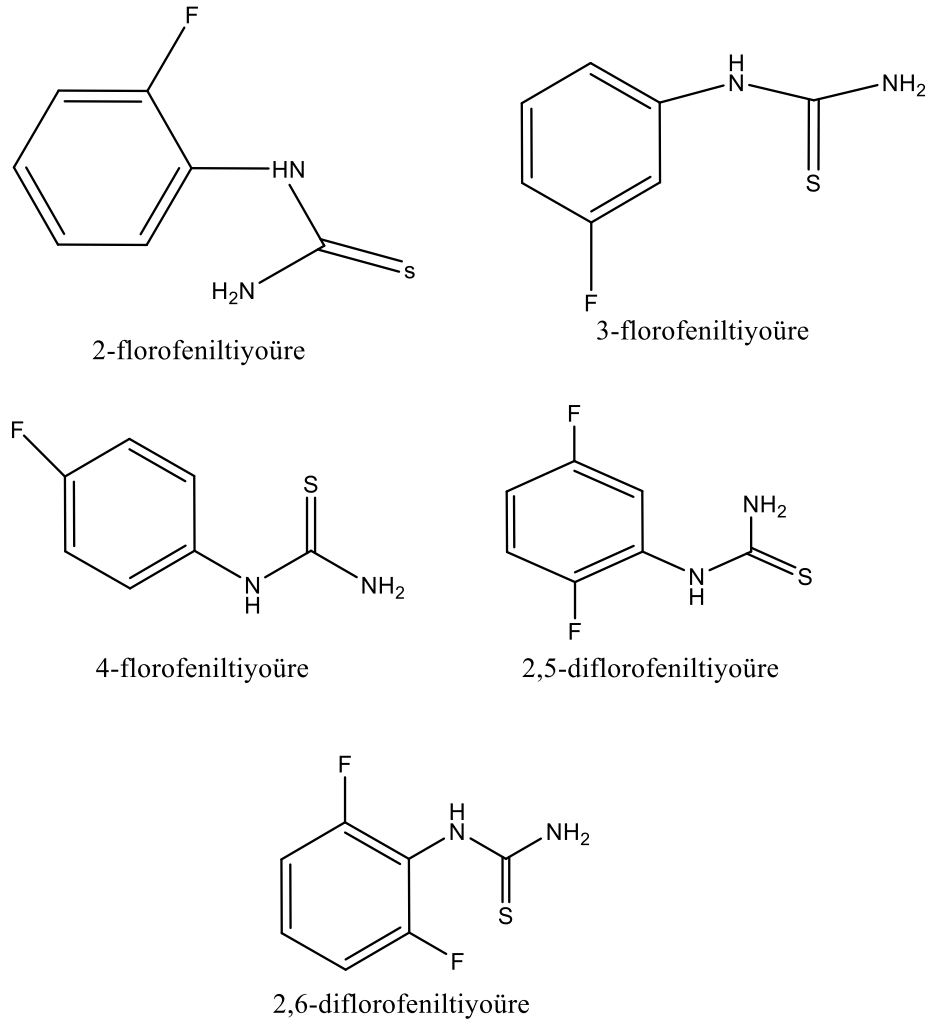
2003). Ayrıca eksik olması durumunda hemolitik anemi oluşturduğu bilinen 6PGD enzimi canlı organizmalar için hayati öneme sahiptir (Caprari et al. 2001).

Tiyoüre Bileşikler

Tiyoüre bileşikler yapılarında C, N ve S atomları bulundurmaktadır, genel formülleri ise CSN_2H_4 şeklindedir (Davidson MG at al. 2007). Üre yapısındaki oksijen, tiyoürelerde ise kükürt şeklindedir (Alkan 2010; Ünal 2012). Yapılarında S atomu ihtiva etmesi birçok kalitatif ve kantitatif analizlerde rahatça uygulama alanı bulmaktadır (Li J. 2004). Yapılarında aktif S ve N atomlarından ve molekülleri bulundurması yüksek hidrojen bağı yapma özelliği sağlamaktadır.(Zhoua at al. 2004) Üstün hidrojen bağı yapabilme kapasitesi birçok organik reaksiyonlarda katalizör olarak görev yapabilmesini sağlamaktadır (Weioun et al. 2004).

Tiyoüre Bileşiklerinin Açık Yapıları

Çalışmamızda enzim aktivitesine etkilerini incelediğimiz tiyoüre bileşiklerinin açık yapıları Şekil 4’de verilmiştir.



Şekil 4. Çalışmada kullanılan florofeniltiyoüre bileşiklerinin açık yapıları

MATERYAL VE YÖNTEMLER

Materyal

Yararlanılan Alet ve Cihazlar

Çalışma boyunca kullanılan aletlere ve cihazlara aşağıda verilmiştir:

Spektrofotometre	: Beckman Coulter DU 730
pH metre	: Thermo Orion Star A211
Elektroforez tankı	: Biorad
Soğutmalı santrifüj	: Hermle Z323 K
Peristaltik pompa	: Ismatec
Hassas terazi	: Denver
Otomatik pipetler	: Eppendorf
Magnetic karıştırıcı	: Ika C- Mag HS7
Çalkalayıcı	: Ika
Saf su cihazı	: Merck
Güç kaynağı	: 1-Bio Rad Power Pac 3000
Buzdolapları	: Siemens

Kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmalarımızda kullanılan, sodyum bikarbonat ve etilendiamintetraasetikasit (EDTA), N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin (TEMED), standart serum albümin, β -nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (okside form) (NADP^+), inhibitör olarak kullanılan kimyasallar, gümüş nitrat, sodyum karbonat, sodyum tiyosülfat, Sigma Chemical Comp. 'den; akrilamid, Coomassie brilliant blue G-250, β -merkapto etanol ve 2',5' ADP Sepharose 4B, N,N'-metilen bisakrilamid, brom timol mavisi, sodyum dodesil sülfat (SDS), Pharmacia'dan; etanol, metanol, asetik asit, trihidroksimetilaminometan (Tris), sodyum hidroksit, sodyum klorür, hidroklorik asit, glisin, fosforik asit, gliserin, potasyum fosfat, potasyum bisfosfat, sodyum asetat, potasyum asetat, sodyum asetat, izopropanol, potasyum klorür, E.Merck AG'den temin edildi.

Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

Araştırma esnasında kullanılan çözeltilerin hazırlanış şekilleri ve kullanılış yerleri aşağıdaki gibidir:

1. 5 mM EDTA/ 1M Tris-HCl (pH=8,0) (G6PD ve 6PGD enzim aktiviteleri için kullanılan tampon): 12,11 g (0,1 mol) Tris ve 0,15 g (0,0005mol) EDTA, 45

- mLdistile suda çözüldü. Çözelti pH'ı HCl çözeltisi ile 8,0'a ayarlanarak toplam hacmi distile su ile 50 mL'ye tamamlandı.
2. 0,1 M $MgCl_2$ (G6PD ve 6PGD enzim aktiviteleri ölçümünde kullanılan aktivatör çözeltisi): 0,48g $MgCl_2$ (0,005 mol) alınıp hacmi distile su kullanılarak 50 mL'ye tamamlandı.
 3. 2 mM $NADP^+$ (G6PD ve 6PGD enzim aktiviteleri ölçümünde kullanılan çözelti): 0,075 g $NADP^+$ (0,0001 mol) alındı ve hacmi distile suyla 50 mL'ye tamamlandı.
 4. 6 mM G-6P (G6PD enzimin aktivite ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi): 0,078 g G-6P (0,0003 mol) alınıp hacmi distile suyla 50 mL' ye tamamlandı.
 5. 0,16 M KCl (Kanın yıkanması için gereken çözelti): 1,192 g KCl (0,016 mol) alınıp distile suyla hacim 100 mL'ye tamamlandı.
 6. 0,1 M CH_3COOK /0,1 M KH_2PO_4 pH=6,0 (Afinite kolonunun yıkanması ve dengelenmesi için kullanılan ilk tampon): 9,8 g CH_3COOK (0,1 mol) ile 13,6 g KH_2PO_4 (0,1 mol) karışımı 975 mL distile su ile çözüldü. pH'sı 6,0'ya ayarlandıktan sonra distile su ile 1L'ye tamamlandı.
 7. 0,1 M KCl / 0,1 M KH_2PO_4 , pH=7,85 (Numuneyi tatbik ettikten sonra afinite kolonunun yıkanmasında kullanılan 2.tampon): 7,45 g (0,1 mol) KCl ve 13,6 g KH_2PO_4 (0,1 mol) karışımı hacmi distile su kullanılarak 975 mL'ye tamamlandı. pH'sı 7,85'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 1L'ye tamamlandı.
 8. 0,1 M KH_2PO_4 /0,1 M CH_3COOK , pH=7,85 (Numune tatbik ettikten sonra afinite kolonunun yıkanması için kullanılan 3.tampon): 9,8 g (CH_3COOK) (0,1 mol) ve 13,6 g KH_2PO_4 (0,1 mol) karışımı 975 mLdistile suda çözüldü. pH'sı 7,85'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 1L'ye tamamlandı.
 9. 80 mM KH_2PO_4 + 0,5 mM $NADP^+$ + 80 mM KCl + 10 mM EDTA (pH=7,85) (Afinite jeline tutunmuş olan G6PD elüsyon tamponu): 10,88 g K-fosfat KH_2PO_4 (0,08 mol), 5,96g KCl (0,08 mol), 0,38 g $NADP^+$ (0,05 mol) ve 2,42g EDTA (0,006mol) karıştırıldı. pH=7,85 'e ayarlanarak toplam hacmi suyla 1 L' ye tamamlandı.
 10. 10 mM EDTA + 5 mM $NADP^+$ + 80 mM KCl + 80 mM K- fosfat (pH= 7,85) (Afinite jeline tununmuş olan 6PGD elüsyon tamponu): 6,97 g K- fosfat, 0,88 g EDTA, 2,98 g KCL, 1,86 g $NADP^+$ karıştırıldı. pH= 7,85'e ayarlandıktan sonra toplam hacmi distile suyla 500 mL'ye tamamlandı.
 11. (0,1 M Tris + 0,5 M NaCl) (pH=8,5) (Afinite kolonunun rejenerasyonunda kullanılan tampon): 24,22 g Tris (0,2 mol) ve 29,22 g NaCl (0,5 mol) alınarak pH=8,5'e ayarlanarak toplam hacmi distile su ile 1 L' ye tamamlandı.

12. (0,1 M Na-asetat /0,5 M NaCl) (pH=4,5) (Afinite kolonunun rejenerasyonunda kullanılmak için hazırlanan tampon): 4,1 g Na-asetat (0,05 mol) ve 14,61 g NaCl (0,25 mol) alınarak distile suda çözüldü, pH=4,5'e ayarlandı ve toplam hacmi 1 L'ye tamamlandı.
13. 0,154 M NaCl (Eritrositlerin yıkanmasında kullanılan çözelti): 8,9 g NaCl (0,154 mol) alınarak hacmi distile suyla 1 L'ye tamamlandı.
14. 6 mM 6PGA (6PGD enzim aktivitesinde kullanılan çözelti): 0,091 g (0,3 mmol) 6PGA alınıp su ile çözüldü. Hacmi suyla 50 mL'ye tamamlandı.

Elektroforez işlemi için kullanılan çözeltiler

1. %0,8 Bisakrilamid - %30 Akrilamid çözeltisi: 0,4 g bisakrilamid, 15 g akrilamid, ve 4,6 mL suyla karıştırılarak çözüldü.
2. 1M Tris-HCl (pH=8,8): 12,11 g Tris (0,1mol) 90 mL distile suda çözülerek 1M HCl ile pH 6,8' e ayarlanıp 100 mL'ye tamamlandı.
3. %10'luk SDS: 1 g SDS alınarak distile su ile 10 mL'ye tamamlanarak çözüldü.
4. Yürütme tamponu: 7,5 g glisin (0,1 mol) ve 1,51 g Tris (12,5 mmol) tartılarak 490 mL distile suda çözülüp %10'luk SDS'den 5 mL eklendi ardından pH=8,3'e ayarlanarak toplam hacmi 500 mL'ye tamamlandı.
5. Numune tamponu: %10'luk SDS 1 mL, 1 M Tris-HCl (pH=6,8)'den 0,5 mL, %100'luk gliserin 1 mL ve %0,1'lik bromtimol mavisi 1 mL alındı. Distile suyla 10 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan tamponu kullanmadan önce ilk 950 µL numune tamponu, 50 µL β-merkaptoetanol ilave edildi.

Gümüş boyama işlemi için kullanılan çözeltiler

1. Tespit çözeltisi: 20 mL asetik asit, 60 mL %96' lık etanol 120 mL distile su karıştırılarak hazırlandı.
2. Redüksiyon çözeltisi: 80 mL ile 45mL etanol içersinde 4,8 g sodyum asetat çözüldü (pH: 6,0) 150 mg sodyum tiyosülfat ve 3 mL glutaraldehit karıştırılarak toplam hacim 150 mL'ye distile su ile tamamlandı.
3. Boyama çözeltisi: 100 mg gümüş nitrat, 100 mL distile suda çözülerek üzerine 30 µL formaldehit ilave edildi.
4. Yıkama çözeltisi: 3,75 g sodyum karbonat 270 mL distile suda çözüldü. Ardından 120 µL formal dehit ilave edildi.

Yöntemler

Protein tayini

Kalitatif protein tayini

Kalitatif protein tayini UV spektrofotometresi ile yapılan analiz ile belirlenmektedir. 280nm soğurma bandında protein yapısında bulunan fenilalanin, tirozin ve triptofan amino asitleri gözlenmektedir (Segel 1968; Akkemik 2009). İnsan eritrositlerinden elde edilen enzim örneklerinde kalitatif protein tayini bu metottan yararlanılarak yapıldı.

Bradford yöntemiyle protein tayini

Enzimlerin protein miktarı Bradford yöntemiyle belirlenmiştir (Bradford, 1976). Bununla birlikte enzimlerin saflaştırılmasında hemolizat ve afinite komatografisi yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde boya olarak Coomassie brilliant blue G- 250 kullanılmaktadır. Boyanın negatif yüklü olması sebebiyle, pozitif yüklü proteine bağlanabilmektedir. Proteinin bağlanmasıyla kırmızıdan ($\lambda_{max}=465$ nm) mavi ($\lambda_{max}=595$ nm) forma dönüşmektedir. Reaksiyon hızlı cereyan eder ve defalarca tekrarlanabilir. Renk stabilitesi iki saat sürebilir (Bradford 1976).

Bradford yönteminde protein tayininde kullanılması için standart grafik gerekmektedir. Bu yüzden 1 mL'sinde 1mg protein ihtiva eden standart sığır albümin çözeltisi tüplere sırasıyla 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 μ L konuldu. Tüplerin hacimleri saf su ile 0,1 mL'ye tamamlanıp 4900 μ L Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisi eklenerek vorteksleme işlemi yapıldı. 10 dakikalık inkübasyon süresi sonrasında 595 nm dalga boyunda köre karşı absorbans değerleri kaydedildi. Kör olarak ise 0,1 mL enzim numunesini ihtiva eden tampon ve 4900 μ L Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisi karışımı kullanıldı. Standart grafik, absorbans değerlerine karşı gelen μ g protein değerleri kullanılarak çizilmiştir. (Şekil 9)

İnsan eritrosit hemolizatından ve yukarıda bahsettiğimiz saflaştırma aşamalarından sonra elde edilen enzim numunelerinden, eppendorf tüplerine konulmak üzere alınarak üzerlerine 4900 μ L Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi eklendi. Ardından vortekslenerek 10 dakikalık inkübasyon süresinden sonra 595nm'de absorbans değerleri okundu ve not edildi. Her numune üçer defa deneme yapılarak aritmetik ortalama hesaplandı. Protein miktarları tespit edilen absorbans değerleri kullanılarak, standart grafikten ekstapolasyonla protein miktarları belirlendi.

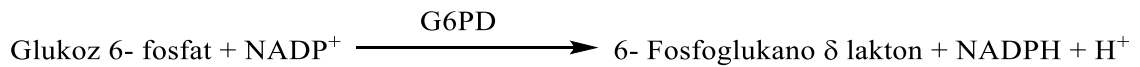
Kan numunelerinin temini ve hemolizatin hazırlanması

Yapılan çalışmalar için kullanılan insan kanı Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi Kan Merkezi'nin atık kanlarından temin edildi. Sağlıklı insandan alınan kan numunesi +4°C' de muhafaza edildi. Alınan kan örneğinden eritrositlerin ayrılması işlemi için santrifüj tüplerine konularak santrifüje yerleştirildi ve 15 dakika boyunca 2500 xg'de santrifüjleme yapıldı. Santrifüjleme sonrasında alınan tüplerin üst kısmında kalan lökosit ve plazma kısmı dikkatli bir şekilde damlalıkla alındı. Tüplerin altında kalan eritrosit peletleri alındı ve 0,154 M NaCl çözeltisiyle 3 defa yıkandı. Her bir yıkama aşamasında 15 dakika 2500 xg'de santrifüjleme yapıldı. Santrifüjleme sonrasında elde edilen eritrositlerin (15 mL) hacminin 5 katı(75 mL) kadar buzlu hemoliz çözeltisi ile hemoliz edildi. Hemolizat içerisinde bulunan eritrositler, hücre zarlarını uzaklaştırma amacıyla +4 °C'de 20.000xg'de 30 dakika boyunca santrifüjleme işlemi yapıldı. Santrifüjleme işlemi sonrasında, çalışmalarda kullanmak için tüplerin üst kısmında bulunan hemolizat damlalıkla dikkatlice alınıp geriye kalan çökelek kısmı ise atıldı. Bu işlemler sonrasında hemolizat elde edilmiş oldu (Ninfali et al. 1990) ve bu hemolizatta enzim aktivitesi daha önce tayin metodu bölümünde bahsedildiği şekilde hesaplandı ve glukoz 6-fosfat dehidrogenaz ve 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enzimlerinin saflaştırılması başlığında anlatıldığı şekilde hemolizatta protein tayini yapıldı.

Glukoz 6-fosfat Dehidrogenaz ve 6-fosfoglukonat Dehidrogenaz Enzimlerinin Saflaştırılması

G6PD enziminin aktivite ölçümü

G6PD enziminin aktivitesi tayininde kullanılan spektrofotometrik yöntem aşağıdaki reaksiyona dayanmaktadır:



G6PD, NADP⁺ 'ı indirgemektedir. NADPH' ın oluşumun miktarını G6PD aktivitesine bağlı olduğu bilinmektedir ve 340 nm' deki absorbans artışı ile ölçülebilmektedir.

Tablo 2. İnsan eritrosit G6PD enziminin aktivite ölçüm küveti içeriği

Stok Aktivite Çözeltileri	Kontrol Küveti		Numune Küveti	
	Hacim (µl)	Konsantrasyon	Hacim (µl)	Konsantrasyon
1M Tris- HCl, 5mM EDTA	100	0,1 M Tris, 0,5 mM EDTA	100	0,1 M Tris, 0,5 mM EDTA
0,1 M MgCl ₂	100	0,01 mM	100	0,01 mM
2mM NADP ⁺	100	0,20 mM	100	0,20 mM
6mM G-6P	100	-	100	-
Su	600	-	570	-
Enzim numunesi	-	-	30	-

Tablo 2’deki ölçüm örnekleri hazırlandıktan sonra numunenin absorbans artışları 3 dakikalık periyotlarla kaydedildi (Beutler 1971).

Enzim ünitesi aşağıdaki formülden yararlanılarak hesaplandı.

$$E\ddot{U}/ml = \frac{\Delta OD}{6,22} \times \frac{V_T}{V_E}$$

E $\ddot{U}$ /ml : Enzim ünitesi / ml

ΔOD : Absorbans değişimi / dk

6,22 : 1 mM NADPH’in oluşturduğu absorbans değeri (ekstinksiyon katsayısı)

V_T : Toplam küvet hacmi

V_E : Küvete ilave edilen enzim numunesinin hacmi

6PGD Enziminin Aktivite Ölçümü



Enzim aktivitesi 25°C’de Beutler metoduna göre UV spektrofotometrede ölçüm yapıldı. Yukarıdaki reaksiyonda da görüldüğü gibi 6PGD; 6-fosfoglukonat ihtivasında NADP⁺’ın indirgenmesinden dolayı NADPH’in 340 nm’de absorbans değeri vermesi esasına dayanmaktadır.

Tablo 3. İnsan eritrosit 6PGD enziminin aktivite ölçüm küvet içeriği

Stok Aktivite Çözeltileri	Kontrol Küveti		Numune Küveti	
	Hacim (µL)	Konsantrasyon	Hacim (µL)	Konsantrasyon
1M Tris- HCl, 5mM EDTA	100	0,1 M Tris, 0,5 mM EDTA	100	0,1 M Tris, 0,5 mM EDTA
0,1 M MgCl ₂	100	0,01 mM	100	0,01 mM
2mM NADP ⁺	100	0,20 mM	100	0,20 mM
Su	600	-	570	-
Enzim numunesi	-	-	30	-
10 Dakika İnkübasyon				
6 mM 6PGA	100	0,60 mM	100	0,60 mM

Aktivite ölçüm küvetleri hazırlanırken Tablo 3’de belirtildiği gibi önce enzim numunesi katılmadan pipetlemesi yapıldı, ardından başlangıçta ve her bir dakikalık periyotlarla üç dakika boyunca absorbans değerleri kaydedildi. Enzim ünitesi hesaplaması yapılırken ise glukoz 6-fosfat dehidrogenaz ve 6- fosfoglukonat dehidrogenaz enzimlerinin saflaştırılması başlığında anlatıldığı gibi formülden yararlanılarak hesaplandı.

Afinite Kolonunun Hazırlanması

Kuru 2',5'-ADP Sepharose 4B jelinden 10 mL’ lik yatak hacmi elde etmek için 2 gr tartıldı. 400mL distile su ile birkaç defa yıkanarak katı maddelerin uzaklaştırılması sağlandı. Yıkama ile jel şişirildi. Şişirilen jelin havası, su trombu ile vakuma alındı. Ardından dengeleme tamponu (0,1 M CH₃COOK / 0,1M KH₂PO₄ pH= 6,0) ilave edilmesiyle jel süspanse edildi. Ardından 1x10 cm’ lik kapalı sistemden oluşan soğutmalı kolona paketlemesi yapıldı. Jel çökmesi gerçekleştikten sonra peristaltik pompa kullanılarak dengeleme tamponu ile yıkama yapıldı. Dengelemede ve yıkama esnasında akış hızının 50mL/h olduğu absorbansının eşitlenmesinden anlaşıldı ve bu şekilde afinite kolonu hazırlanmış oldu.

Numunenin Afinite Kolonuna Tatbiki ve G6PD ile 6PGD Enzimlerinin Elüsyonu

Yukarıdaki başlıkta verildiği gibi hazırlanan afinite jeli insan eritrosit hemolizantından G6PD ve 6PGD enzimlerinin saflaştırılması için kullanıldı. Elde edilen 30 mL’ lik derişikleştirilmiş halde olan numune alınarak, 0,1M CH₃COOK / 0,1M KH₂PO₄ (pH= 6,0) tamponuna tatbik edildi. Ardından kolon sırasıyla 25 mL 0,1M CH₃COOK / 0,1M KH₂PO₄ (pH= 6,0), 25 mL 0,1M CH₃COOK / 0,1M KH₂PO₄ (pH= 7,85) ve 25 mL 0,1M KCl / 0,1M KH₂PO₄ (pH= 7,85) çözeltileriyle yıkandı. Dengelenme ve yıkama hızı ise 50mL/h olarak ayarlandı. Akış hızının kontrol altında tutulması peristaltik pompa ile sağlandı. Bu şekilde

enzimin büyük bir kısmının jele tutunması ve safsızlıkların uzaklaştırılması sağlanmış oldu. Ardından 80 mM KH_2PO_4 + 80mM KCl + 0,5mM NADP^+ + 10mM EDTA (pH=7,85) çözeltisi kolona tatbik edildi ve enzim elüe edildi. Elüsyonlar fraksiyon toplayıcısı ile peristaltik pompanın akış hızı 20mL/h olarak ayarlanarak 2 mL' lik tüplere alındı. Tüm bu işlemler esnasında sıcaklık ise $+4^\circ\text{C}$ olarak sabit tutuldu (Morelli et al. 1978; Ninfali et al. 1990). Elüatlarda 280 nm' de kalitatif protein tayini, NADP^+ absorbansı protein absorbansını maskeleye yaptığı için yapılmadı. Bunun yerine her fraksiyonda enzim aktivitesi belirlendi. Aktivite görülen fraksiyonlar bir araya alındı.

Daha sonra kolona 6PGD enziminin elüsyonunda kullanılan 80 mM KH_2PO_4 + 5 mM NADP^+ + 80 mM KCl + 10 mM EDTA (pH=7,85) elüsyon tamponu ilave edildi ve kolondan 6PGD enzimi elüe edildi. Aktivite ölçümü yapılarak aktivite gösteren tüpler birleştirildi. Daha sonraki inhibisyon çalışmaları için saklandı.

Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) ile Enzim Saflığının Kontrolü

Enzimin saflaştırılmasından sonra elde edilen enzimin saflığı % 3 ile % 8 kesikli SDS-PAGE Laemmli metodundan faydalanılarak belirlendi (Laemmli 1970).

Bu işlemler için elektrofrez plakaları ilk olarak su ardından da alkol ile yıkandı. İki kenarda aralık oluşturan plakayla bir düz plaka üst üste konularak kısıkaçlar yardımıyla sabitlendi. Sabitleşen plakalar, sızdırmayı engelleyen sünger içeren jel hazırlama kabinine yerleştirildi. İlk olarak ayırma jeli hazırlanıp enjektör kullanarak üst kesimde 2 cm kalacak şekilde plakaların arasına dolduruldu. Jelin donması için 120 dakika bekletildi, ardından ayırma jeli katılaştıktan sonra yığma jeli hazırlandı. Jelin üst kısmı boşluğa doldurulduktan sonra numune kuyucuklarının oluşturulması için tarak dikkatli bir şekilde yerleştirildi. Ardından yığma jelinin katılaşmasını bekleme esnasında kurumayı önlemek için sistemin üzerine ıslatılmış bir süzgeç kâğıdı yerleştirildi. Yığma jelinin katılaşmasından sonra tarak dikkatli bir şekilde çıkarıldı ve numune kuyuları belirlenmiş oldu. İlk olarak saf su ardından yürütme tamponuyla yıkama gerçekleştirildi ve jel plakalarıyla birlikte elektrofrez tankına yerleştirildi. Yürütme tamponu elektrofrez tankının alt ve üst kısımlarına dolduruldu. Enzim numuneleri toplam hacmi 50 μL olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponunu ilave edilerek hazırlandı. Denatürasyon için üç dakika boyunca kaynar su banyosunda bekletildi. Elektrofrez tankı kapatılıp alt tarafta anot (+), üst tarafta ise katot (-) yerleştirildi. Ardından 80 voltta 30 dakika yürütülme yapıldı ve örnek ayırma jeline kadar gelip yığıldı. Daha sonra akım 120 volt' a ayarlanarak numuneler jelin alt sınırına gelene kadar yürütüldü. Numunelerin takibi ise numune tamponuna katılan, brom timol mavisi ile yapıldı Yürütme işlemi sona erince akım kesilerek

plakalar arasındaki jel dikkatli bir şekilde çıkarılarak gümüş boyama işlemi için hazırlanan çözeltiler uygulanıp jelin boyama işlemi gerçekleştirildi. Son olarak yıkama çözeltisine alınan jelde, jelin kararması ve bantların belirginleşmesiyle birlikte fotoğrafı çekildi (Şekil...).

Ayrırma jeli %30 Akrilamid- %0,8 bisakrilamid, 4,4 mL %10'luk SDS, 0,2 mL 1M Tris-HCl (pH=8,8), 5 mL, 0,13 mL TEMED, 0,05 mL %10'luk PER ve 3,13 mL distile suyla karıştırılarak hazırlandı. Yığma jeli ise 0,4 mL 1M Tris-HCl (pH=6,8), 0,44 mL %30 Akrilamid %0,8 bisakrilamid, 0,03 mL %10'luk SDS, 0,03 mL TEMED, 0,05 mL %10'luk PER ve 2,45 mL distile su ile karıştırıldı.

Glukoz 6- fosfatdehidrogenaz ve 6- fosfoglukonat dehidrogenaz Enzimleri İçin IC₅₀ ve K_i Değerlerinin Belirlenmesine Ait Kinetik Çalışmalar

İnsan eritrosit G6PD ve 6PGD enzimlerinin aktiviteleri üzerine 2- florofeniltiyoüre, 3- florofeniltiyoüre, 4-florofeniltiyoüre, 2,5-diflorofeniltiyoüre, 2,6-diflorofeniltiyoüre bileşiklerinin etkileri incelendi. İnhibisyon etkisi yüksek olanların %Aktivite-[I] grafikleri çizildi, eğrinin denkleminde IC₅₀ değerleri hesaplandı. IC₅₀ değerleri hesaplanan bazı florofeniltiyoüre bileşiklerinin K_i değerlerini belirlemek amacıyla beş substrat konsantrasyonu ve üç inhibitör konsantrasyonları ile aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen değerlerle her bir inhibitör için Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Grafik denkleminde yarışmalı inhibisyon için eğime eşit olan

$$K_M I = K_M \times \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$$

ifadesinden, yarışmasız ve yarı yarışmalı inhibisyon için ise,

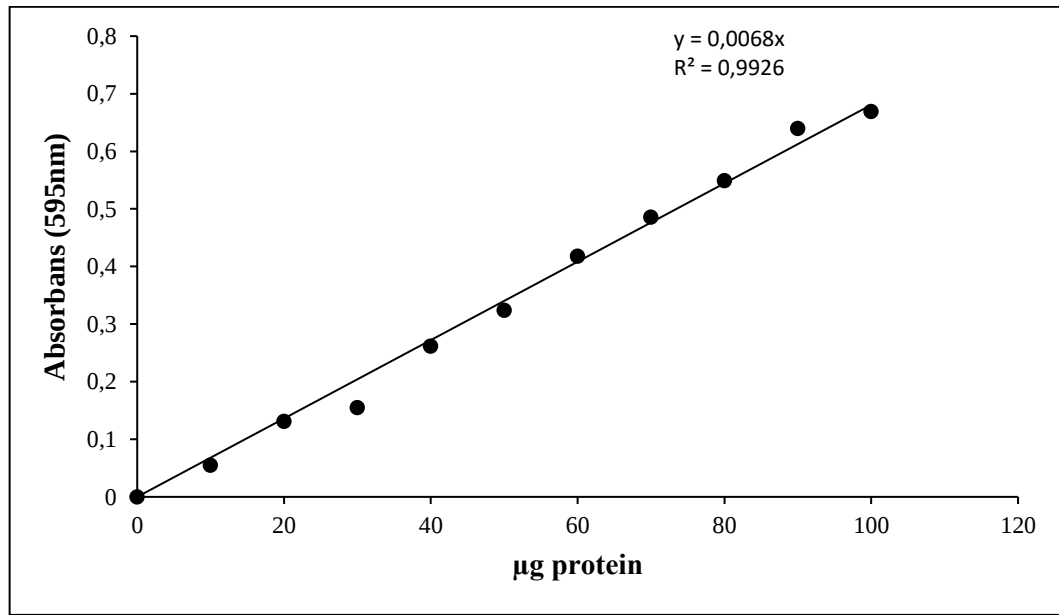
$$V_{max} = \frac{VI_{max}}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$$

formülünden yararlanılarak K_i değerleri belirlendi.

ARAŞTIRMA BULGULARI

Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

Elde edilen enzim çözeltilerinde protein miktarı, kantitatif protein tayin yöntemi olan Bradford metoduyla belirlendi. Standart grafik yukarıda bahsedildiği şekilde hazırlandı. Ham hemolizat, afinite kromatografisi sonucunda elde edilen enzimin çözeltilerindeki kantitatif protein tayini bu standart grafik yardımıyla bulundu ve standart çözeltilerin μg proteine karşılık gelen absorbans değeri Şekil 5’da gösterildi.



Şekil 5. Bradford yöntemiyle proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart grafik

Saflaştırma Sonuçları

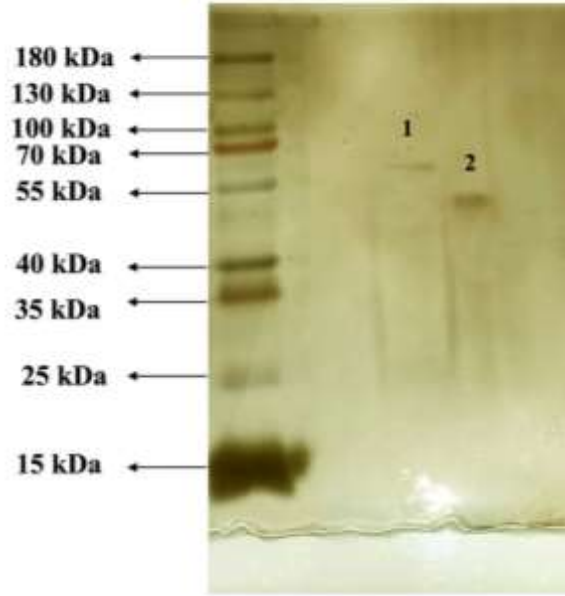
Çalışmalar esnasında elde edilen veriler, bu bölümde çizilgeler ve şekiller ile gösterilmektedir.

Tablo 4. İnsan eritrosit G6PD enziminin 2',5' ADP Sepharose-4B afinite kolon materyali ile saflaştırılma basamakları.

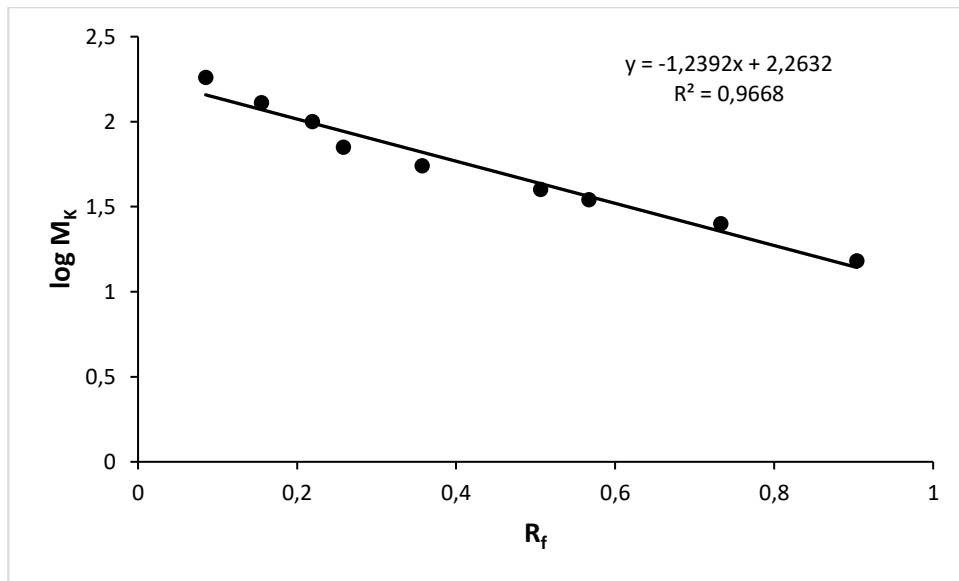
Saflaştırma Basamakları	Aktivite (EU/mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Toplam Hacim (mL)	Toplam Aktivite (EU)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (EU/mg)	Yüzde Verim (%)	Saflaştırma katsayısı
Hemolizat	0,22	32,44	30	6,60	973,20	0,007	100	1
2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi	0,72	0,042	4	2,88	0,168	17,14	43,64	2448,57

Tablo 5. İnsan eritrosit 6PGD enziminin 2',5' ADP Sepharose-4B afinite kolon materyali ile saflaştırılma basamakları

Saflaştırma Basamakları	Aktivite (EU/mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Toplam Hacim (mL)	Toplam Aktivite (EU)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (EU/mg)	Yüzde Verim (%)	Saflaştırma katsayısı
Hemolizat	0,14	32,44	30	4,20	973,20	0,004	100	1
2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi	0,54	0,044	3	1,62	0,132	12,27	38,57	3068,18



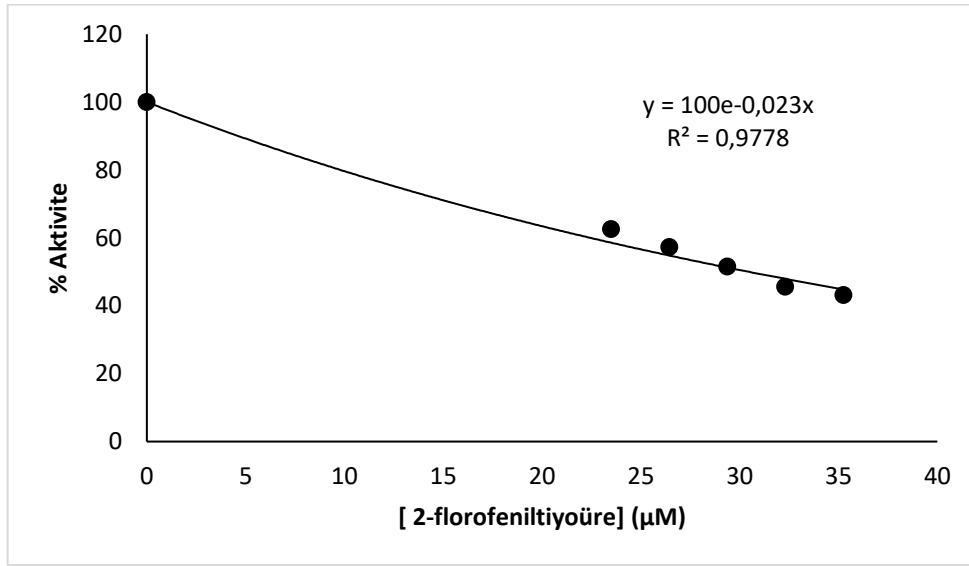
Şekil 6. 2',5' ADP Sepharose-4B afinite kolon materyali ile G6PD ve 6PGD enzimlerinin saflaştırmasını gösteren SDS-PAGE fotoğrafı 1: G6PD enzimi: 2: 6PGD enzimi



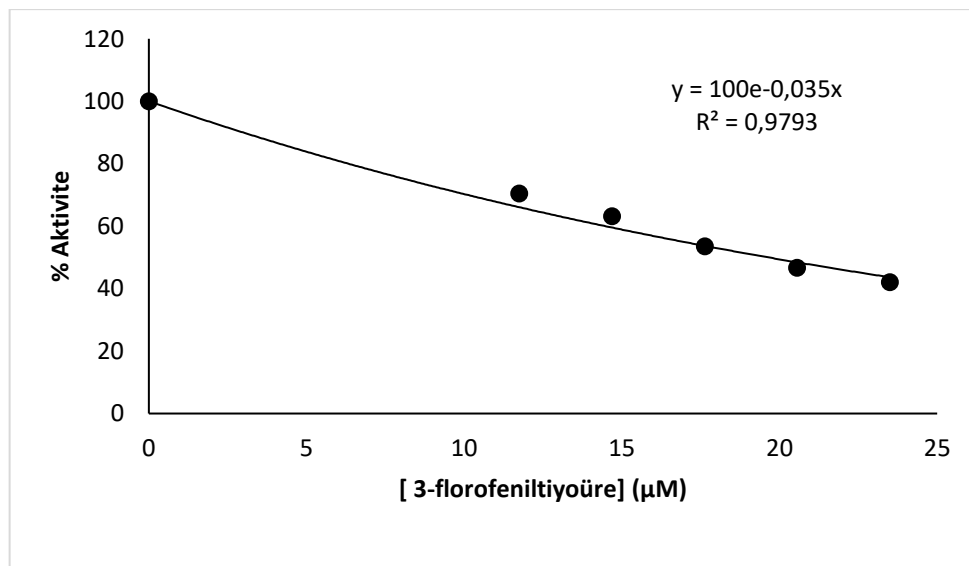
Şekil 7. Saflaştırılan insan eritrosit G6PD ve 6PGD enzimlerinin için log M_k - R_f grafiği

Kinetik Çalışmaların Sonuçları

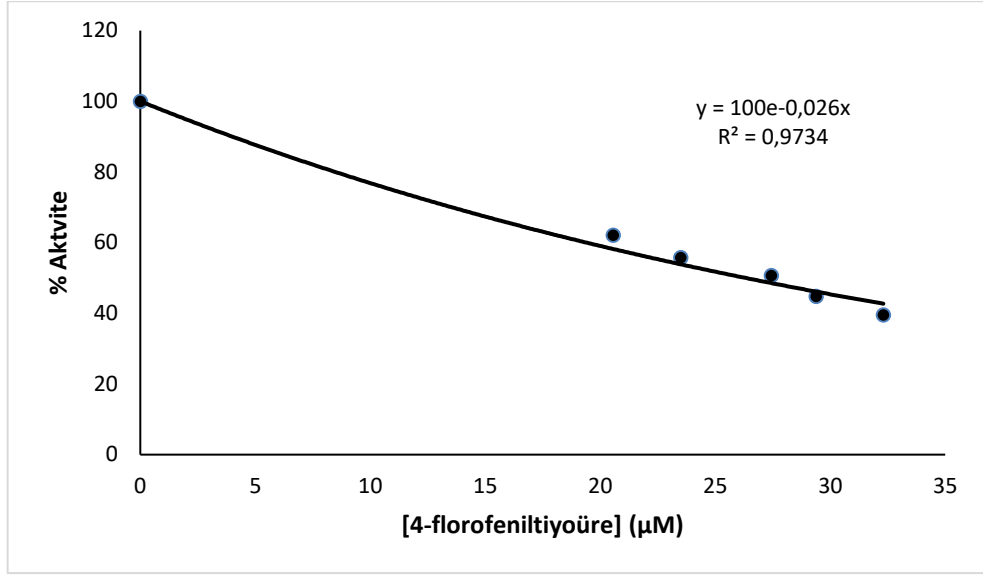
Her enzim için ayrı ayrı olarak üzerine çalışılan maddeler için en az 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda aktiviteler tespit edildi ve %Aktivite-[I] grafikleri çizildi (Sekil 12-21) ve bu grafikler ile IC₅₀ değerleri hesaplanarak Tablo 7 ve 8’de verildi. Ayrıca inhibisyon gösteren maddeler için 3 farklı inhibitör ve 5 sabit substrat konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafikleri çizildi (Sekil 22-31) ve bu grafiklerden her bir inhibitör için K_i sabiti bulundu. Bulunan K_i sabitleri Tablo 7 ve Tablo 8’de verildi.



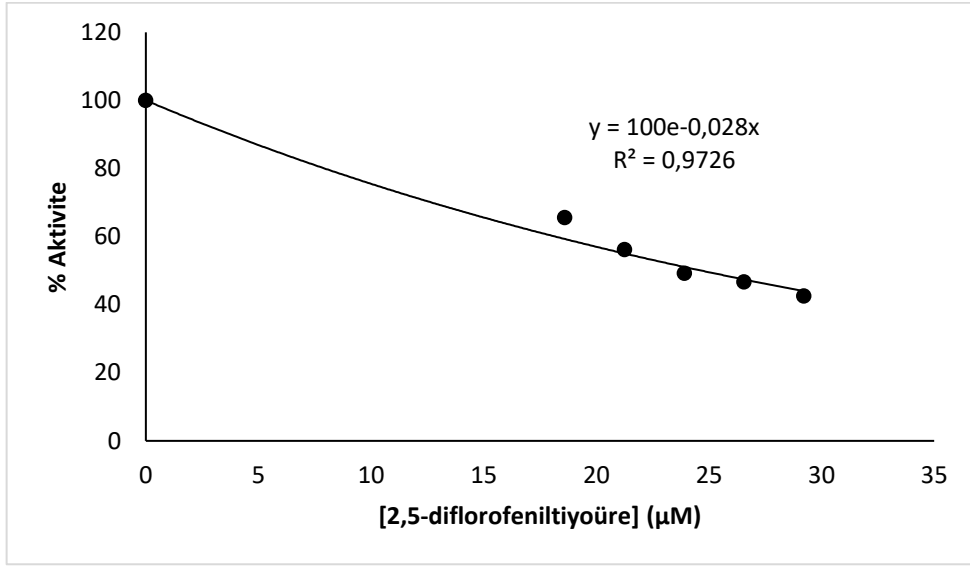
Şekil 8. İnsan G6PD enzimi için 5 farklı 2-florofeniltiyoüre konsantrasyonunda çizilen %Aktivite-[2-florofeniltiyoüre] grafiği



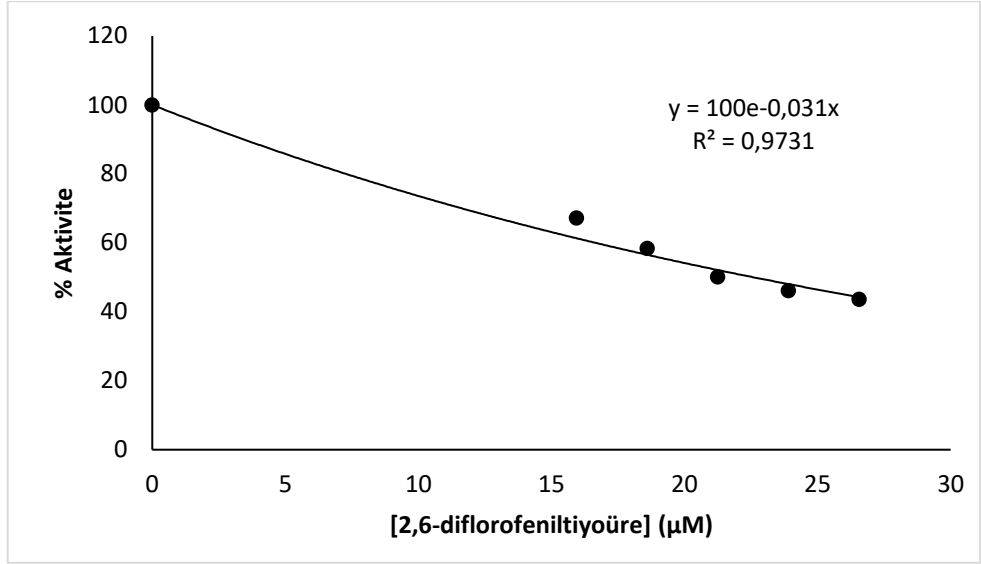
Şekil 9. İnsan G6PD enzimi için 5 farklı 3-florofeniltiyoüre konsantrasyonunda çizilen %Aktivite-[3-florofeniltiyoüre] grafiği



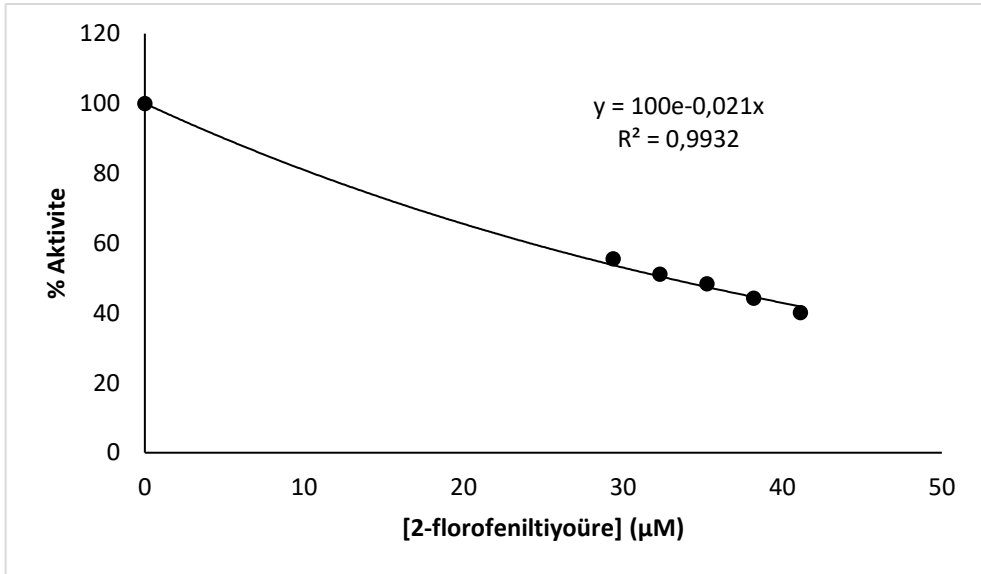
Şekil 10. İnsan G6PD enzimi için 5 farklı 4-florofeniltiöüre konsantrasyonunda çizilen %Aktivite-[4-florofeniltiöüre] grafiği



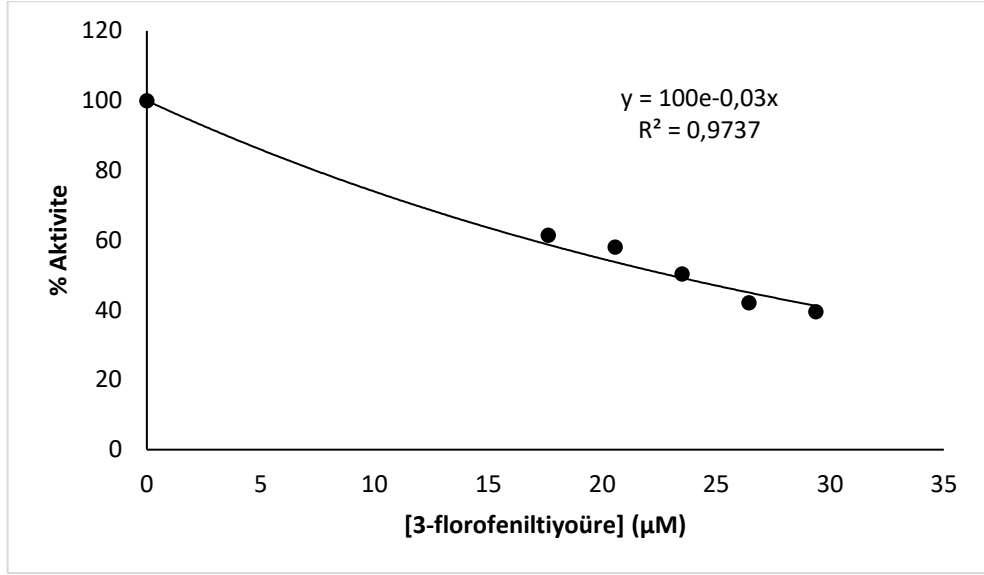
Şekil 11. İnsan G6PD enzimi için 5 farklı 2,5-diflorofeniltiöüre konsantrasyonunda çizilen %Aktivite-[2,5-diflorofeniltiöüre] grafiği



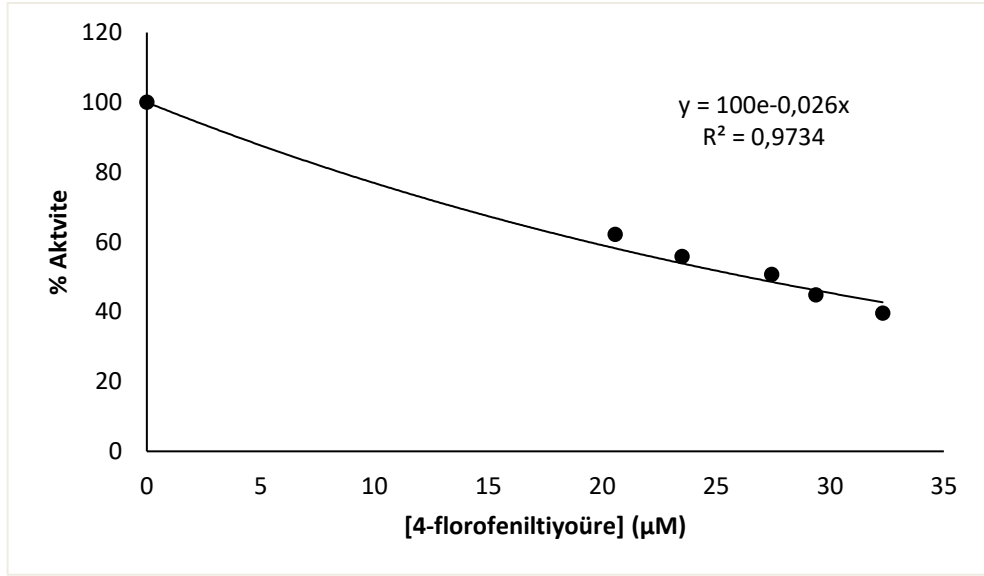
Şekil 12. İnsan G6PD enzimi için 5 farklı 2,6-diflorofeniltiyoüre konsantrasyonunda çizilen %Aktivite-[2,6-diflorofeniltiyoüre] grafiği



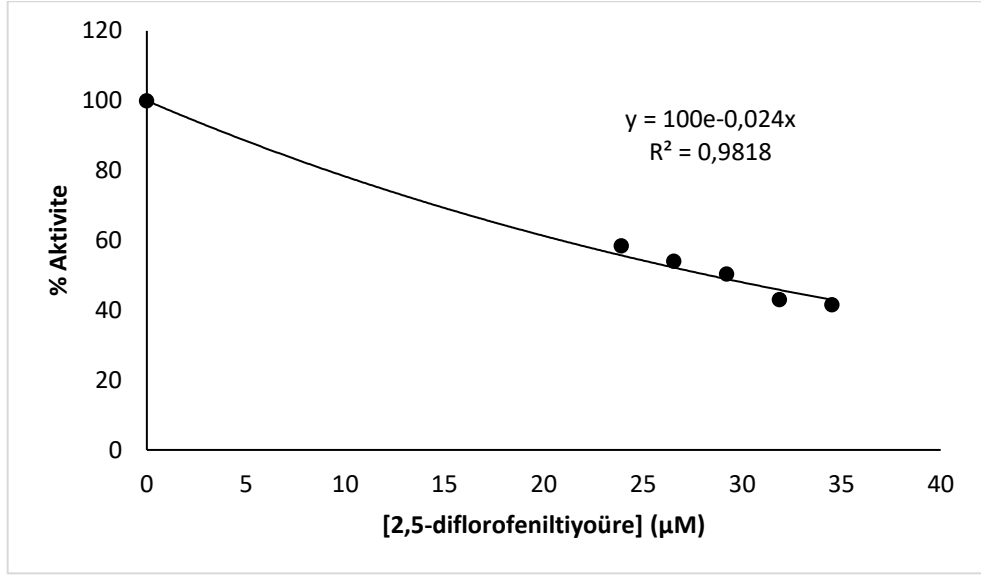
Şekil 13. İnsan 6PGD enzimi için 5 farklı 2-florofeniltiyoüre konsantrasyonunda çizilen %Aktivite-[2-florofeniltiyoüre] grafiği



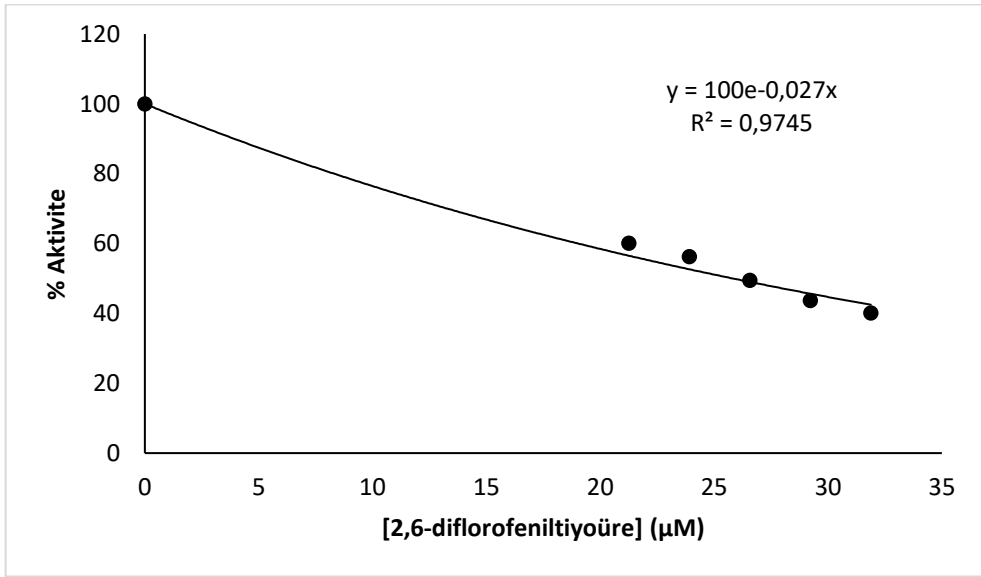
Şekil 14. İnsan 6PGD enzimi için 5 farklı 3-florofeniltiyoüre konsantrasyonunda çizilen %Aktivite-[3-florofeniltiyoüre] grafiği



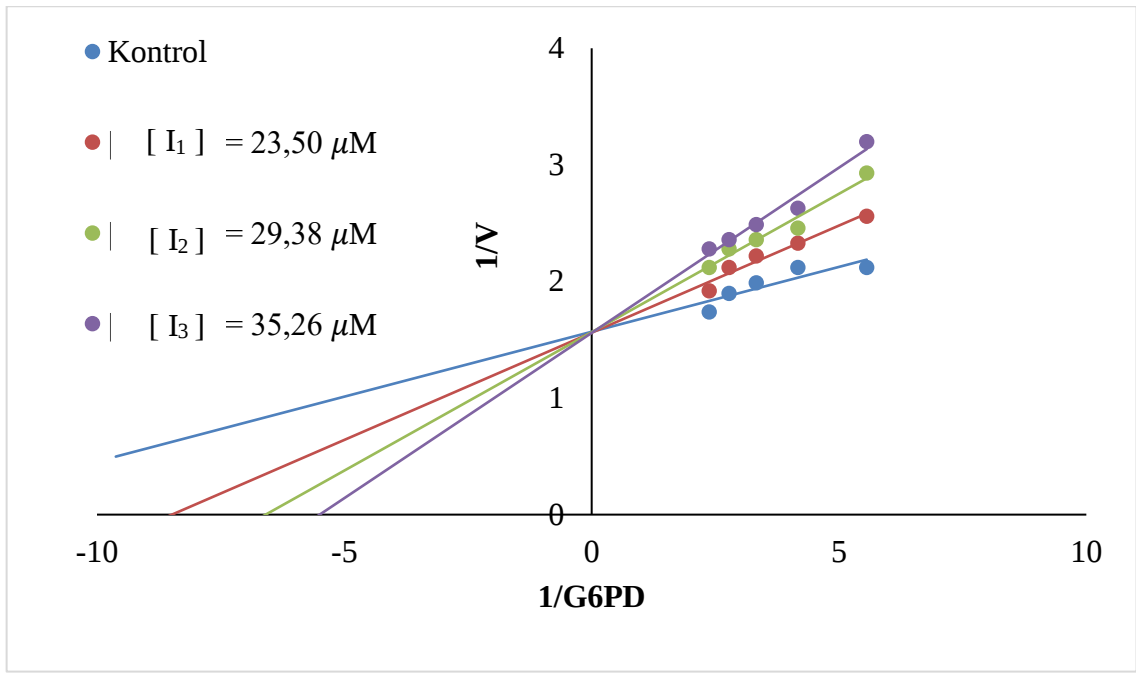
Şekil 15. İnsan 6PGD enzimi için 5 farklı 4-florofeniltiyoüre konsantrasyonunda çizilen %Aktivite-[4-florofeniltiyoüre] grafiği



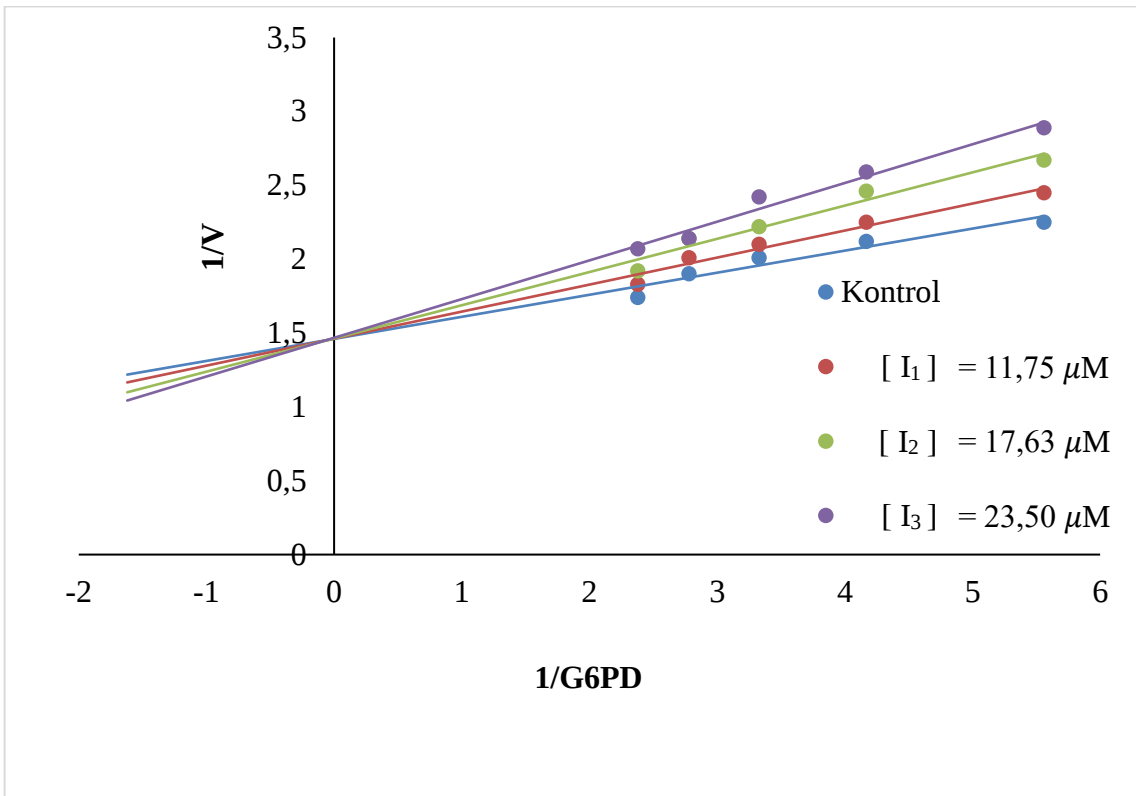
Şekil 16. İnsan 6PGD enzimi için 5 farklı 2,5-diflorofeniltiöüre konsantrasyonunda çizilen %Aktivite-[2,5-diflorofeniltiöüre] grafiği



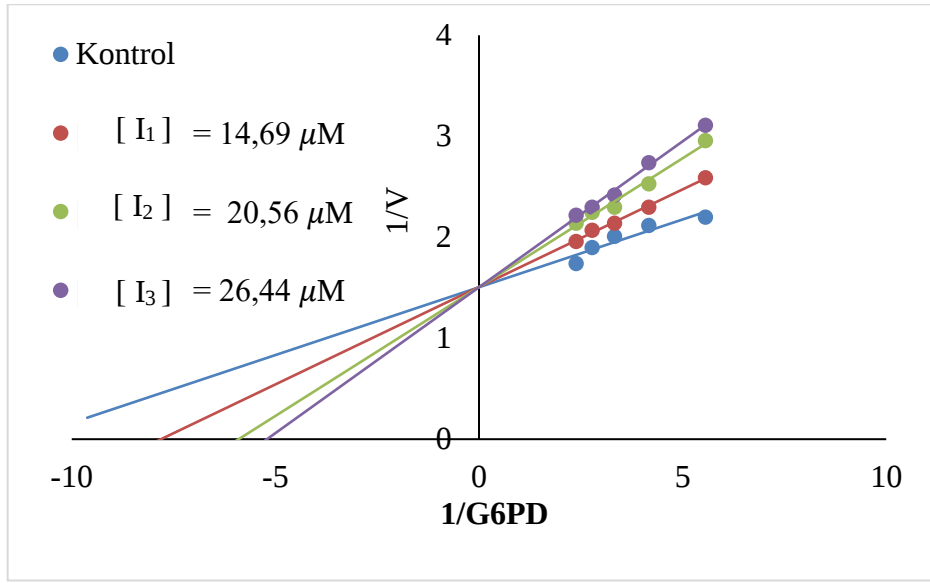
Şekil 17. İnsan 6PGD enzimi için 5 farklı 2,6-diflorofeniltiöüre konsantrasyonlarında çizilen %Aktivite-[2,6-diflorofeniltiöüre] grafiği



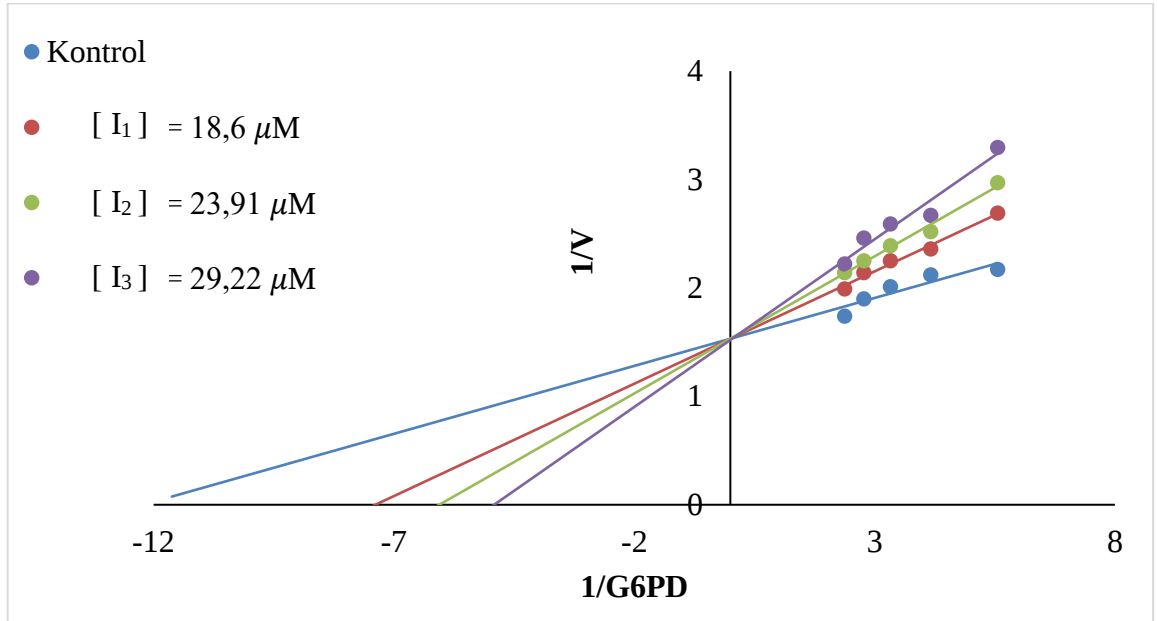
Şekil 18. İnsan G6PD enzimi aktivitesi üzerine 2-florofeniltiyöre etkisinin Lineweaver-Burk grafiği



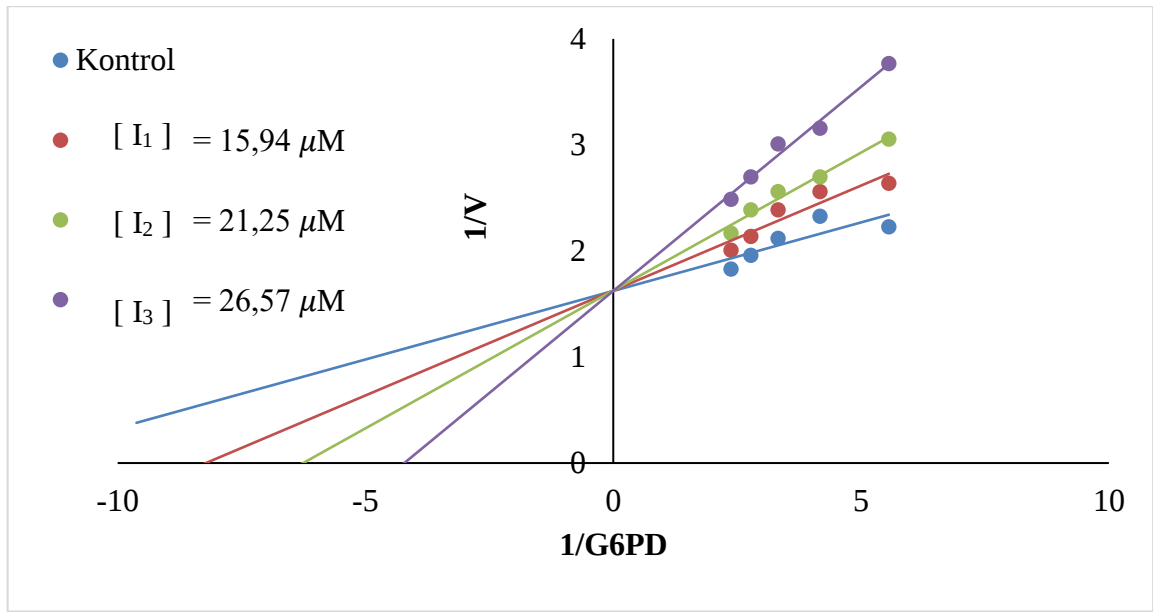
Şekil 19. İnsan G6PD enzimi aktivitesi üzerine 3-florofeniltiyöre etkisinin Lineweaver-Burk grafiği



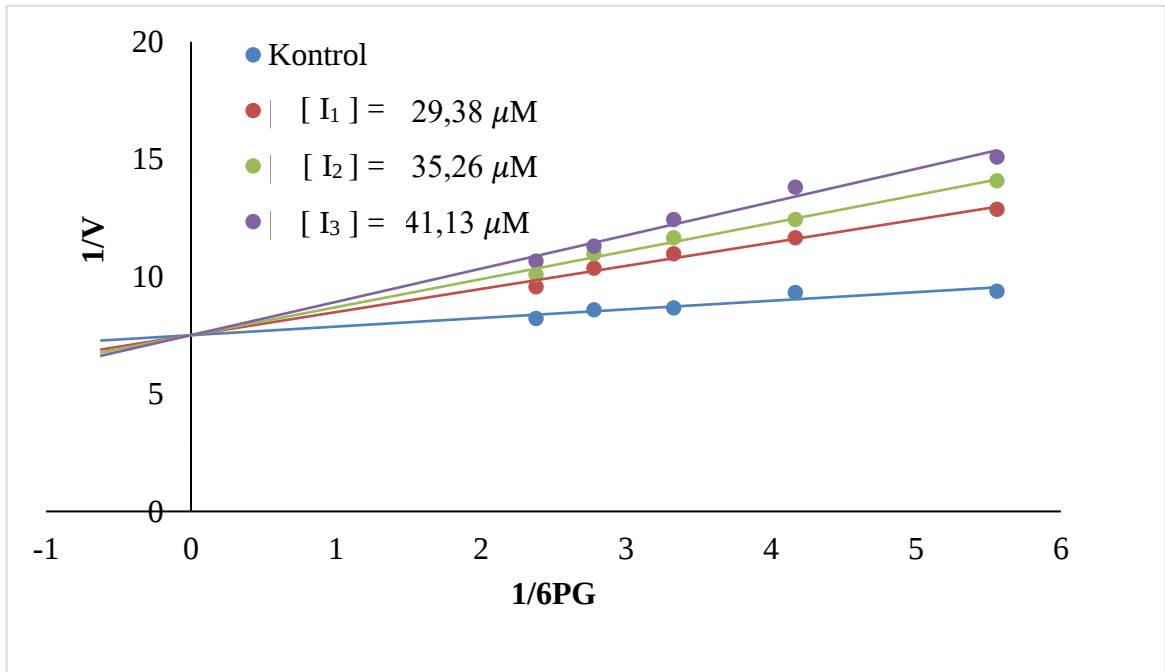
Şekil 20. İnsan G6PD enzimi aktivitesi üzerine 4-florofeniltiyoüre etkisinin Lineweaver-Burk grafiği



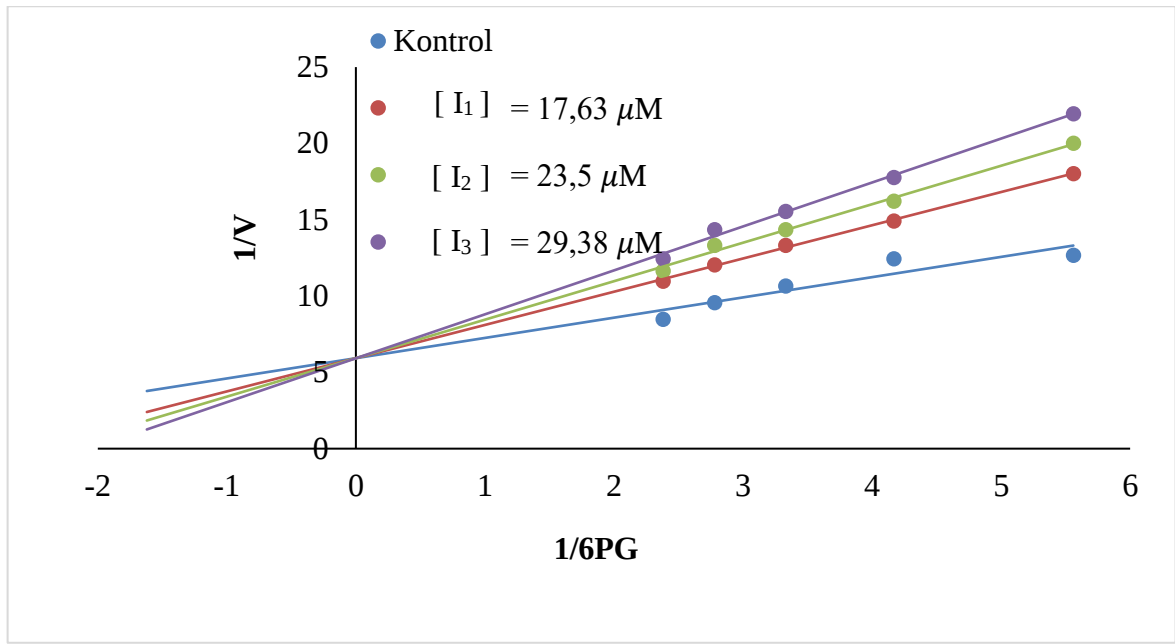
Şekil 21. İnsan G6PD enzimi aktivitesi üzerine 2,5-diflorofeniltiyoüre etkisinin Lineweaver-Burk grafiği



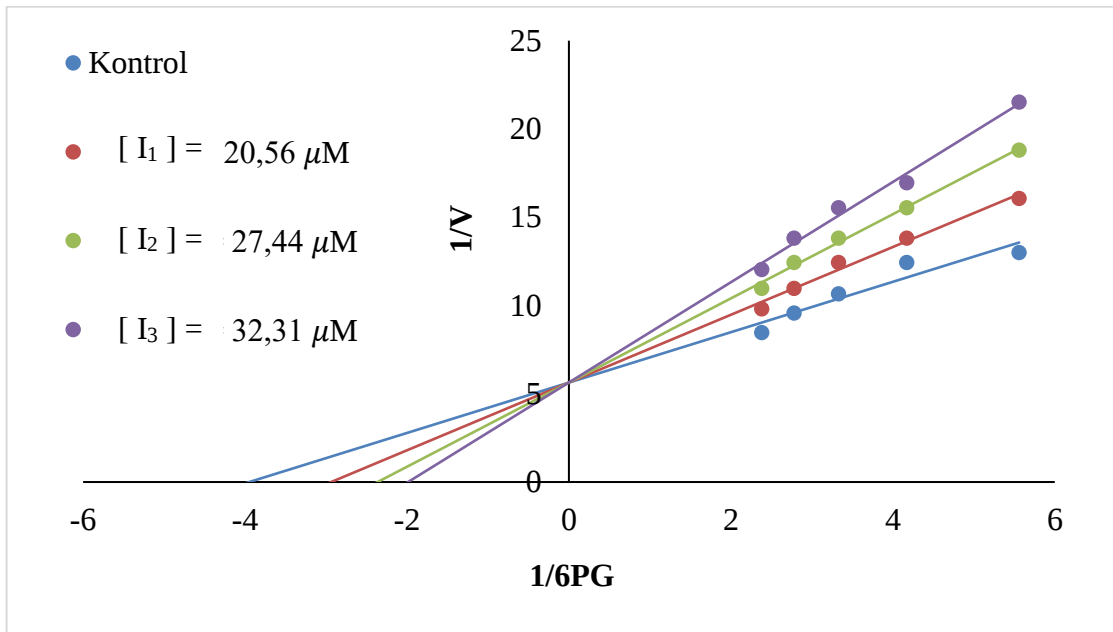
Şekil 22. İnsan G6PD enzimi aktivitesi üzerine 2,6-diflorofeniltiyöre etkisinin Lineweaver-Burk grafiği



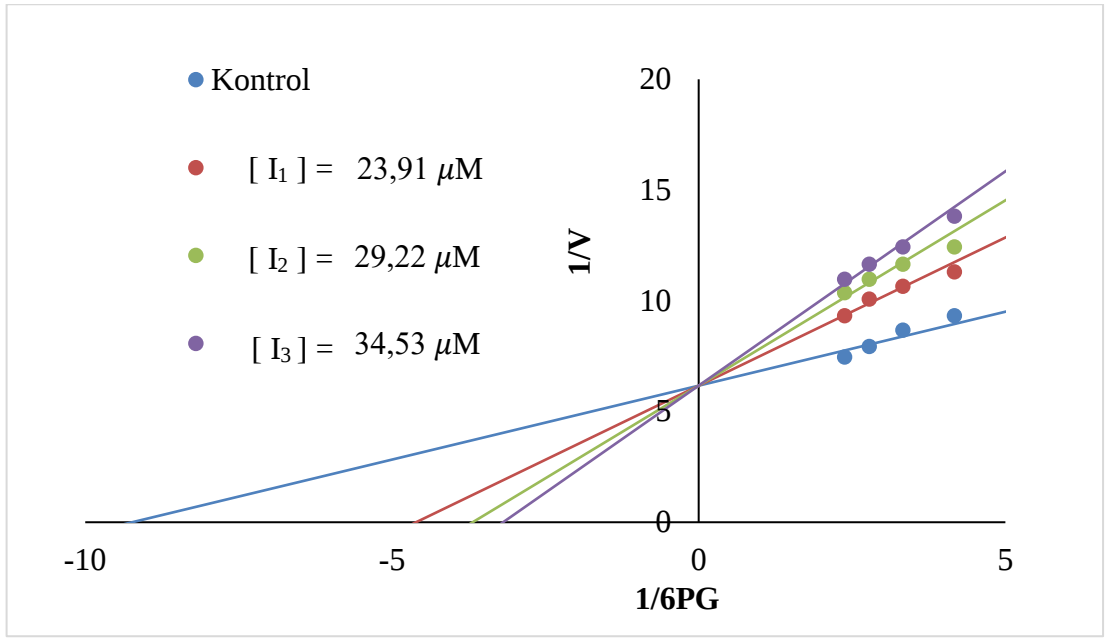
Şekil 23. İnsan 6PGD enzimi aktivitesi üzerine 2-florofeniltiyöre etkisinin Lineweaver-Burk grafiği



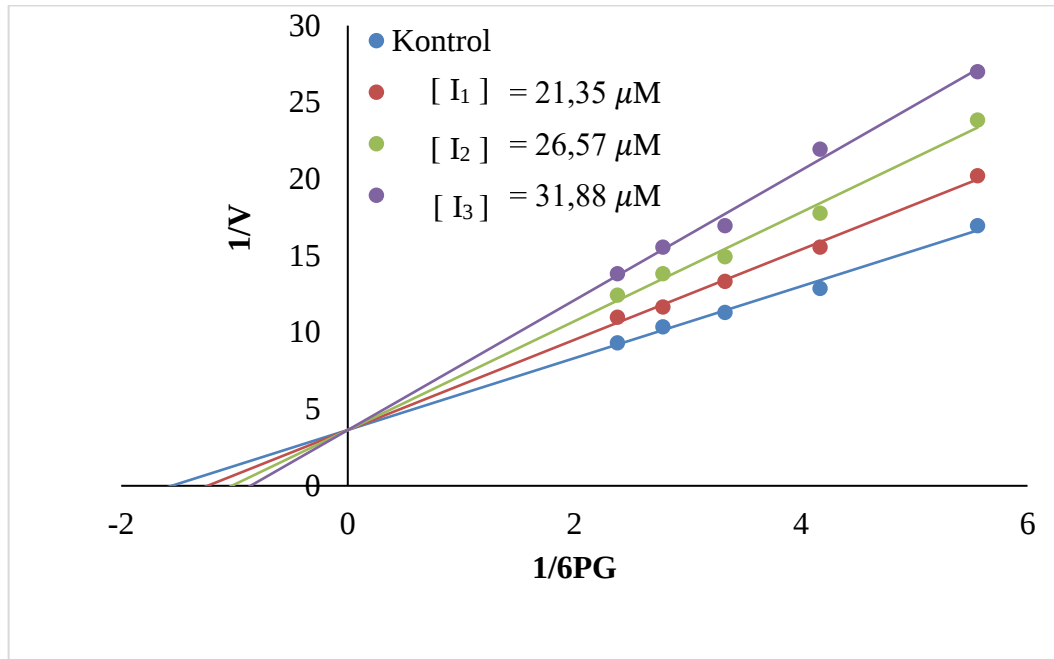
Şekil 24. İnsan 6PGD enzimi aktivitesi üzerine 3-florofeniltiyoüre etkisinin Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 25. İnsan 6PGD enzimi aktivitesi üzerine 4-florofeniltiyoüre etkisinin Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 26. İnsan 6PGD enzimi aktivitesi üzerine 2,5-diflorofeniltiyöre etkisinin Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 27. İnsan 6PGD enzimi aktivitesi üzerine 2,6-diflorofeniltiyöre etkisinin Lineweaver-Burk grafiği

Tablo 6. İnsan G6PD enzimi için Lineweaver-Burk ve % Aktivite-[I] grafiklerinden elde edilen IC₅₀ değerleri, K_i sabitleri ve inhibisyon tipleri tablosu

İnhibitör	IC ₅₀ Değeri (μM)	K _i Sabiti (μM)	İnhibisyon Tipi
2-florofeniltiyöre	30,13	27,98 ± 6,75	Yarışmalı
3-florofeniltiyöre	19,80	39,70 ± 11,26	Yarışmalı
4-florofeniltiyöre	21,00	26,53 ± 6,25	Yarışmalı
2,5-diflorofeniltiyöre	24,75	23,84 ± 4,32	Yarışmalı
2,6-diflorofeniltiyöre	22,35	21,60 ± 8,42	Yarışmalı

Tablo 7. İnsan 6PGD enzimi için Lineweaver-Burk ve %Aktivite-[I] grafiklerinden elde edilen IC₅₀ değerleri, K_i sabitleri ve inhibisyon tipleri tablosu

İnhibitör	IC ₅₀ Değeri (μM)	K _i Sabiti (μM)	İnhibisyon Tipi
2-florofeniltiyöre	33,00	15,82 ± 1,54	Yarışmalı
3-florofeniltiyöre	23,10	26,27 ± 1,23	Yarışmalı
4-florofeniltiyöre	26,65	24,42 ± 3,83	Yarışmalı
2,5-diflorofeniltiyöre	28,88	20,46 ± 2,95	Yarışmalı
2,6-diflorofeniltiyöre	25,67	29,97 ± 5,72	Yarışmalı

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

G6PD enzimi, nükleik asit sentezi, beş karbonlu şeker, detoksifikasyon ve çeşitli biyosentez tepkimeleri için gerekli NADPH'ı sağlar, ayrıca pentoz fosfat yolunun ilk basamağını katalizler ve kilit bir enzimdir. G6PD enzimi eksikliği durumunda birçok klinik durum görülmüştür ve enzim eksikliğinden dolayı günümüzde 400 milyon civarında insan olumsuz şekilde etkilenmektedir (Segel 1968; Stryer 1985; Telefoncu 1986; Nelson and Cox 2013; Keha ve Küfrevioğlu 2020).

Memeli dokuların hemen hemen hepsinde, mikroorganizmalarda ve bitkilerde bulunması, pentoz fosfat yolunun ilk enzimi olması ve G6PD enziminin katalizleme yaptığı reaksiyonda NADP^+ indirgenerek, NADPH^+ 'ın oluşması ve çeşitli detoksifikasyon ve birlikte birçok indirgeyici biyosentez olaylarında önemli bir fonksiyonunun olması enzimin önemini bizlere göstermektedir. Bu nedenle enzim hakkında fazlaca araştırma mevcuttur. Sıçan, tavşan, domuz ve insan karaciğerinde ayrıca insan eritrositinin yanı sıra sığır lensi gibi birçok canlı dokusu üzerinden saflaştırılıp karakterize edilmesi bu çalışmalar için birer örnektir (Levy 1979; Kanji et al. 1976; Ozols 1993; Ulusu vd. 1999; Hirono et al. 1989; Çiftçi vd. 2003)

Hücre içerisinde G6PD enziminin aktivitesi azalırsa, NADPH üretimi azalmaktadır. NADPH ise redükte GSH havuzunun devamının sürdürülmesi için önem arz etmektedir. Bunun sonucunda, peroksitlerin ve hücre içinde oluşan serbest radikallerin detoksifikasyonlarında azalma görülür. GSH, proteinlerin sülfhidril gruplarının redükte durumda kalmalarını da sağlamaktadır ve hemoglobin de buna dahildir. Bu sülfhidril gruplarının oksidasyonları ile denatüre proteinler oluşmaktadır ve bu proteinler heinz cisimcikleri denilen çözünmez kütleler oluşturarak eritrositlerin membranlarına tutunurlar. Membran ise proteinlerinin daha ileri oksidasyonu ile, eritrositler deforme edilemez hale gelirler. Bu şekilde eritrositler dolaşım esnasında dalak ve karaciğer makrofajları tarafından uzaklaştırılmaktadırlar. G6PD eksikliği olan kişilerde eritrositler, NADPH üreten tek yolun pentoz fosfat yolu olmasından dolayı diğer hücrelere göre daha fazla etkilenmektedirler. Çünkü diğer dokular, glutatyonu indirgenmiş halde tutabilmek için NADP^+ bağımlı malat dehidrogenaz gibi alternatif NADPH üretim kaynaklarına sahiptirler. Eritrosit ribozomu ve nükleusu bulunmadığından ötürü enzimi tekrar elde edememektedir. Bu sebeple, eritrositler düşük stabilizasyonlu enzim varyasyonlarına karşı özellikle savunmasızdırlar (Lippincott W and Lippincott 2007).

G6PD mutasyonlarından birisi mevcut olan kişiler genellikle klinik bulgular göstermemektedir. Fakat G6PD eksikliği olan hastaların bir kısmında, oksidan ilaçlarda tedavi edildiğinde, ağır bir enfeksiyon geçirdiklerinde veya bakla tüketiminde hemolitik anemi gözlenme ihtimali vardır (Lippincott W and Lippincott 2007).

G6PD eksikliğinin Akdeniz varyantı gibi bazı formlarında baklanın hemolitik etkenlerine aşırı duyarlılık vardır. Favizm olarak adlandırılan, bakla tüketimi sonucunda görülen bu hemolitik etki G6PD hastalarının tümünde görülmez fakat favizmi olan tüm hastaların G6PD eksikliği vardır. G6PD eksikliğinde hemolizin belirmesine neden olan en önemli faktör enfeksiyondur. Enfeksiyon sonucunda oluşan inflamatuvar, makrofajlarda serbest radikal oluşumu ile eritrositlerin içine difüze olarak harabiyet verirler. G6PD eksikliği ile dünyaya gelen bebeklerde ise doğumdan bir ila dört gün sonrasında yenidoğan sarılığı görülmektedir(Lippincott W and Lippincott 2007).

G6PD enziminin yaklaşık 400 varyasyonu bilinmektedir, Türkiye’de ise 20’ye yakın varyantının varlığı tespit edilmiştir(Aksoy 1997). Orzalesi ve arkadaşları ise katarakt ve G6PD enzimi arasında ilişki saptamışlardır. Yaptıkları çalışmada 40- 50 yaş aralığındaki grupta %37, 51- 60 yaş aralığında %67 ve 61- 70 yaş aralığındaki katarakt hastalarının %71’ inde G6PD enzimi eksikliğinden meydana gelen katarakta bağlı görme bozukluğunu belirtmişlerdir (Orzalesi et al. 1981).

Farklı hastalıklar için kullanılan bazı antibiyotik ve ilaçlarında G6PD enzimi inhibe ettiği bilinmektedir. İlaçların kanla temasları, lense göre daha çabuk olduğundan enzim eksikliği olan hastalarda hemolitik anemiye sebep olmaktadır(Beutler 1994). G6PD enzimi ilk olarak Warburg ve Christensen tarafından bulunmuştur ve sonrasında farklı kaynaklardan değişik metotlarla defalarca saflaştırılmıştır (Maeda et al. 1992)

Canlı organizmalarda indirekt veya direkt antioksidan etki gösteren birçok enzimden biriside 6PGD enzimidir(Reiter et al. 1997; Jakobasch et al. 1996). Enzim eksikliğinde GSH eksikliği meydana gelerek, hücrede oluşan peroksitlerin ve Fe^{+3} ün indirgenmemesine sebep olur, dolayısıyla oluşan radikaller hücre zarındaki yağlara zarar vererek parçalanmasına sebep olma ihtimali vardır(Sosyal ve Bakan 1984).

Yapılan araştırmalarda G6PD ve 6PGD enzimlerinin, Alzhemier hastalarının korteks tabakasında belirgin şekilde artış olduğu görülmüştür. Bu iki enzim pentoz fosfat yolunun oksidatif basamaklarını katalizlemektedir ve enzimlerin yüksek aktivite göstermesi ise oksidan aktivitesine cevap olarak oluşmaktadır (Palmer 1999). G6PD eksikliğinde meydana gelen hemolitik anemi, 6PGD eksikliğinde de görülmektedir (Caprari et al. 2001). Bu yüzden 6PGD enzimi de önem arz etmektedir. 6PGD enzimi de birçok kaynaktan saflaştırılıp, inhibitörleri,

reaksiyon mekanizması, amino asit dizilimi ve X- ray çalışmaları yapılmıştır; bunlara ek olarak enzimin gen yapısı aydınlatılarak enzimi şifreleyen gen de tespit edilmiştir (Adem 2006).

G6PD enzimi, glikolitik yok ve pentoz fosfat yoluna giren glukoz 6- fosfat'ın dengesinin korunması için önemli bir noktada bulunmaktadır (Del Mar et al. 1986). G6PD enzimi eksiliğinde 6-PG birikmesine ve fosfoglukoz izomeras ile glukoz metabolizmasının inhibisyonuna neden olmaktadır (Hanau et al. 1996). 6-PG birikmesi durumunda hücrede toksik etki meydana gelmektedir. Ayrıca G6PD enzimi eksikliğinde, eritrosit piruvat kinaz aktivitesinde artma ve retikulosit sayısında farklılaşma da meydana geldiği belirtilmiştir. 6- PG birikiminde glikoliz metabolizmasının olumsuz etkilendiği de dikkate alındığında G6PD enziminin önemi ortaya çıkmaktadır. Enzimin önemi kemoterapilerde hedef enzim olarak seçilmesi farklı çalışmalarda öne sürülmüştür (Barret 1997). Ayrıca G6PD varyasyonlarında olduğu gibi, 6PGD varyasyonlarında da eritrosit sıtmaya karşı direnç sağlamaktadır (Bayoumi et al. 1986). Yapmış olduğumuz çalışmada insan eritrositinden G6PD ve 6PGD enzimlerini, afinite kromatografisini kullanılarak saflaştırılmış ve bazı florofeniltiyoüre bileşiklerin bu iki enzim üzerindeki etkileri belirlenmeye çalışılmıştır.

G6PD enziminin saflaştırılması iki basamakta gerçekleşmiştir; bunlar, hemolizatin hazırlanması, afinite kromatografisidir. Yapmış olduğumuz çalışmamızda kullanılan 2',5'-ADP Sepharose-4B afinite jelinin, G6PD ve 6PGD gibi NADPH ve NADP⁺ ya spesifik olan enzimlerin tümüne ilgisi vardır. Bundan dolayı enzimlerin tümünü bağlayabilir. Burada afiniteyi orto fosfat sağlamaktadır; 2',5'-ADP ayrıca G6PD ve 6PGD enzimlerinin de kuvvetli inhibitörüdür (Çiftci 1998; Adem 2006; Akkemik 2009).

Yaptığımız çalışma sonucunda insan eritrosit G6PD enzimi %43,64 verim ile 2448,57 kat saflaştırıldı (Tablo 7) ve enzimin saflığı SDS- PAGE ile kontrol edildi (Şekil 10). Saflaştırma işlemleri yapılırken, aktivite kaybını önlemek için sıcaklık sabit tutulması gerekir, bu nedenle +4°C'de çalışıldı.

İnsan eritrositlerinden 6PGD enzimi saflaştırılması için ilk olarak hemolizat hazırlandı. 2',5'-ADP Sepharose-4B afinite kolonuna tatbik edilerek saf enzim elde edildi. Çalışma sonucunda insan eritrosit 6PGD enzimi %38,57' lük verimle 3068,18 kat saflaştırıldı (Tablo 8) ve enzimin sağlığının kontrolü SDS- PAGE ile kontrol edildi (Şekil 10).

Saflaştırılan enzim çözeltileri mg mertebesinde elde edildiği için bu çözeltilerdeki protein miktarı Bradford metoduyla belirlenir. Bu yöntem daha hassas olup daha az süre ve daha az reaktif gerektiren bir yöntemdir. Aynı zamanda her defasında standart çalışmayı gerektirmez. Enzimler üzerinde kimyasal maddeler ve ilaçların inhibisyon etkileri IC₅₀ değeri ve K_i sabitleri bulunarak belirlenir. K_i sabitini bulmak için Lineweaver-Burk grafikleri

kullanıldı. Sonuçların hassasiyetli olması için her inhibitörlü çalışmada 3 sabit inhibitör ve 5 farklı substrat konsantrasyonunda V-[S] değerleri bulunmuştur.

İnsan eritrositlerin saflaştırılan G6PD enzimi üzerine, 2-florofeniltiyöre, 3-florofeniltiyöre, 4-florofeniltiyöre, 2,5-diflorofeniltiyöre, 2,6-diflorofeniltiyöre maddelerinin etkileri incelendi. Bu maddelerin hepsi inhibisyon etkisi gösterdi. İnhibisyon etkileri büyükten küçüğe göre 2,6-diflorofeniltiyöre, 2,5-diflorofeniltiyöre, 4-florofeniltiyöre, 2-florofeniltiyöre, 3-florofeniltiyöre şeklinde sıralanmaktadır. Ayrıca IC_{50} değerleri de sırasıyla 22,35 μ M, 24,75 μ M, 21 μ M, 30,13 μ M, 19,8 μ M şeklindedir. Çalışılan bütün tiyöre maddeler inhibisyon etkisi gösterdiği için hepsinin ayrı ayrı Lineweaver-Burk grafikleri çizildi ve grafikler kullanılarak K_i sabitleri ve inhibisyon tipleri tespit edildi. K_i sabitleri ise 2,6-diflorofeniltiyöre ($K_i= 21,6 \pm 8,42 \mu$ M), 2,5-diflorofeniltiyöre ($K_i=23,84 \pm 4,32 \mu$ M), 4-florofeniltiyöre ($K_i= 26,53 \pm 6,25 \mu$ M), 2-florofeniltiyöre ($K_i= 27,98 \pm 6,75 \mu$ M), 3-florofeniltiyöre ($K_i= 39,7 \pm 11,26 \mu$ M) şeklindedir. K_i sabiti ve IC_{50} değeri küçük olan inhibitörün enzime ilgisi büyük, inhibisyon etkisinin de yüksek olduğu bilinmektedir. K_i sabiti ve IC_{50} değerinin aynı olmadığı durumlarda ise sıralama ölçütü olarak K_i sabiti referans alınır. Bu sonuçlar incelendiğinde en yüksek inhibisyonu 2,6-diflorofeniltiyöre gerçekleştirmiştir.

Elde ettiğimiz sonuçlara göre çizdiğimiz Lineweaver- Burk grafiğini bakarak inhibisyon tiplerini belirlediğimizde, insan eritrositinden saflaştırılan G6PD enzimi üzerine çalışma yaptığımız maddelerin tamamı yarışmalı inhibisyon gösterdiği ortaya çıkmıştır. (Tablo 7)

İnsan eritrositlerinden saflaştırılan 6PGD enzim aktivitesi üzerine 2- florofeniltiyöre, 3-florofeniltiyöre, 4-florofeniltiyöre, 2,5-diflorofeniltiyöre, 2,6-diflorofeniltiyöre maddelerinin etkileri incelendi. Yapılan çalışmalar sonucunda bütün maddelerin inhibisyon etkisi göstermiştir. Elde edilen değerler ile her bir madde için Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Grafik çiziminde en küçük kareler regresyon doğru denkleminde yararlanılmıştır. Lineweaver- Burk grafiğinden yararlanılarak K_i sabitleri ve inhibisyon tipleri tespit edildi. Yaptığımız çalışmada etkilerini incelediğimiz maddelerin inhibisyon etkileri ise büyükten küçüğe göre sırasıyla; 2-florofeniltiyöre > 2,5-diflorofeniltiyöre > 4-florofeniltiyöre > 3-florofeniltiyöre > 2,6-diflorofeniltiyöre şeklindedir. Ayrıca IC_{50} değerleri de sırasıyla 33 μ M, 28,88 μ M, 26,65 μ M, 23,1 μ M, 25,67 μ M şeklindedir. Çalışılan bütün tiyöre bileşikler inhibisyon etkisi gösterdiği için hepsinin ayrı ayrı Lineweaver-Burk grafikleri çizildi ve grafikler kullanılarak K_i sabitleri ve inhibisyon tipleri tespit edildi. K_i sabitleri ise sırasıyla 2-florofeniltiyöre ($K_i= 15,82 \pm 1,54 \mu$ M), 2,5-diflorofeniltiyöre ($K_i= 20,46 \pm 2,95 \mu$ M), 4-florofeniltiyöre ($K_i= 24,42 \pm 3,83 \mu$ M), 3-florofeniltiyöre ($K_i= 26,27 \pm 1,23 \mu$ M), 2,6-

diflorofeniltiyoüre ($K_i = 29,97 \pm 5,72 \mu\text{M}$) şeklindedir. Yaptığımız çalışma sonuçlarına bakıldığında en yüksek inhibisyon etkisini 2-florofeniltiyoüre göstermiştir.

Elde ettiğimiz sonuçlara göre çizdiğimiz Lineweaver- Burk grafiğini bakarak inhibisyon tiplerini belirlediğimizde, insan eritrositinden saflaştırılan 6PGD enzimi üzerine çalışma yaptığımız maddelerin tamamı yarışmalı inhibisyon gösterdiği ortaya çıkmıştır. G6PD ve 6PGD enzimleri üzerine yapmış olduğumuz inhibisyon çalışmalarının sonucunda elde edilen IC_{50} , K_i sabiti ve inhibisyon tipi Tablo 9’da verilmiştir.

Tablo 8. G6PD ve 6PGD enzimleri üzerine tiyoüre bileşiklerin inhibisyon çalışmaları sonucunda elde edilen IC_{50} değeri, K_i sabiti ve inhibisyon tipi

G6PD ENZİMİ			
İnhibitör	IC_{50} Değeri (μM)	K_i Sabiti (μM)	İnhibisyon Tipi
2-florofeniltiyoüre	30,13	$27,98 \pm 6,75$	Yarışmalı
3-florofeniltiyoüre	19,80	$39,70 \pm 11,26$	Yarışmalı
4-florofeniltiyoüre	21,00	$26,53 \pm 6,25$	Yarışmalı
2,5-diflorofeniltiyoüre	24,75	$23,84 \pm 4,32$	Yarışmalı
2,6-diflorofeniltiyoüre	22,35	$21,60 \pm 8,42$	Yarışmalı
6PGD ENZİMİ			
İnhibitör	IC_{50} Değeri (μM)	K_i Sabiti (μM)	İnhibisyon Tipi
2-florofeniltiyoüre	33,00	$15,82 \pm 1,54$	Yarışmalı
3-florofeniltiyoüre	23,10	$26,27 \pm 1,23$	Yarışmalı
4-florofeniltiyoüre	26,65	$24,42 \pm 3,83$	Yarışmalı
2,5-diflorofeniltiyoüre	28,88	$20,46 \pm 2,95$	Yarışmalı
2,6-diflorofeniltiyoüre	25,67	$29,97 \pm 5,72$	Yarışmalı

6PGD enzimi farklı kaynaklardan saflaştırılmış ve üzerine inhibisyon çalışmaları yapılmıştır. Adem ve Çiftçi’ nin yapmış oldukları çalışmada 6PGD enzim aktivitesi üzerine; metronidazol, ornidazol, klindamisin, larnoksikam, imipenem, vankomisin, amoksisilin’in *in vitro* inhibisyon etkileri incelenmiş ve sonuç olarak tamamının inhibisyon etkisinin olduğunu bildirmişlerdir. İnhibisyon etkisi olan ilaçların IC_{50} değerlerinin sırasıyla; IC_{50} değerlerinin sırasıyla; 0,17 mM, 0,23 mM, 0,43 mM, 21,79 mM, 46,39 mM, 117,43 mM, 287,35 mM olduğunu bildirmişleridir. Ayrıca K_i sabitlerinin ise $0,40 \pm 0,04$ mM, $0,57 \pm 0,06$ mM, $0,77 \pm 0,11$ mM, $42,40 \pm 2,89$ mM, $65,60 \pm 4,03$ mM, $130,22 \pm 9,21$ mM, $287,58 \pm 10,56$ mM belirtmişlerdir. İnhibisyon türlerinden ise klindamisin, vankomisin, amoksisilin yarışmalı inhibisyon diğer ilaçların ise yarışmasız inhibisyon gösterdiğini bildirmişlerdir (Adem ve Çiftçi 2007).

Yine insan eritrositlerinden saflaştırılan 6PGD enzimi üzerine yapılan farklı bir inhibisyon çalışmasında ise Akyüz ve arkadaşları sefepim, izepamisin, seftazidim, ampisilin, levoflaksasin, penisilin G, gentamisin sülfat, teokoplanin, ciprofloksasin, ofloksasin ve sefotaksim ilaçlarının enzim üzerinde *in vitro* olarak inhibisyon gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca çalışmalarında düşük IC₅₀ değeri ve K_i sabitine sahip olan sefemiin ile netilmisin sülfat'ın sıçan kanında *in vivo* etkilerini inceleyerek inhibisyon olduğunu belirtmişlerdir (Akyüz et al. 2004).

Maillard et al. (2009) ise yaptıkları çalışmada kalsiyum algılama reseptörlerinin böbrekteki renin enzim üzerine etkilerini incelemek için *in vitro* ve *in vivo* çalışma yapmış ve kalsiyum klorür'ün farklı konsantrasyonlarının uygulandığı sıçanlarda, furosemidin damardan enjeksiyonu ile PRA (plazma renin aktivitesi)'yı 8,7±3,2'den 18,6±2,3'e çıkarttığı belirtmiş (Maillard et al. 2009). Akkemik ise insan eritrositlerinden saflaştırdığı G6PD enzimi üzerine 25 ilacın inhibisyon etkisini incelemiş ve 11 ilacın inhibisyon gösterdiğini belirtmiştir ayrıca 6PGD enzimi üzerine de 23 ilacın inhibisyon etkisini incelemiş ve 8 ilacın inhibisyon etkisinin olduğunu belirtmiştir. Maillard'ın çalışmasının aksine furosemidin' in *in vitro* olarak inhibe ettiğini göstermiştir (Akkemik 2009).

Sonuç olarak; Yüksek lisans çalışması olarak aşağıda belirtilen bulgular elde edilmiştir.

- 1- İnsan eritrosit G6PD enzimi, hemolizatın hazırlanması 2',5' ADP Sepharose-4B afinite kromatografisi metodu kullanılarak 17,14 EÜ/mg protein spesifik aktivite, %43,64 verimle 2448,57 kat saflaştırıldı.
- 2- İnsan eritrosit 6PGD enzimi, hemolizatın hazırlanması 2',5' ADP Sepharose-4B afinite kromatografisi metodu kullanılarak 12,27 EÜ/mg protein spesifik aktivite, %38,57 verimle 3068,18 kat saflaştırıldı.
- 3- Enzimlerin saflık derecelerinin kontrolü SDS-PAGE yapılarak sağlandı.
- 4- G6PD enzimi üzerine 5 farklı florofeniltiyoüre bileşiklerinin etkileri incelendi ve hepsi inhibisyon etkisi gösterdiği için 5 bileşğinde IC₅₀ ve K_i sabitleri ve bu 5 bileşğinde Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek inhibisyon türleri belirlendi en yüksek inhibisyonu 2,6-diflorofeniltiyoüre göstermiştir ve bütün bileşikler yarışmalı inhibisyon sergilemiştir.
- 5- 6PGD enzimi üzerine 5 farklı florofeniltiyoüre bileşiklerinin etkileri incelendi ve hepsi inhibisyon etkisi gösterdiği için 5 bileşğinde IC₅₀ ve K_i sabitleri ve bu 5 bileşğinde Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek inhibisyon türleri belirlendi, en yüksek inhibisyonu 2-florofeniltiyoüre göstermiştir ve bütün bileşikler yarışmalı inhibisyon sergilemiştir.

Çalışmamızın sonuçlarına göre; Tiyoüre bileşikler farmakolojik etkileri bakımından oldukça önemli olup son zamanlarda ise medisinal kimya branşında çokça kullanılmakta olan yapılardır. Kükürt ile oksijen arasında olan elektronegatiflik farkı, tiyoüre ile üre arasında çeşitli farklılıklar ortaya koymaktadır (Alkan 2011; Ünal 2012). Ayrıca G6PD ve 6PGD enzimlerini inhibe etmesi durumunda NADPH üretimi azalacak ve bu durumda da eritrositler hemoliz olacaktır. Tiyoürelerin türevleri virüslere ve antitümör biyoaktivitelere karşı inhibitör etkileri vardır (Mansuroğlu 2009; Ünal 2012). Bu hususlar düşünülürse çalışmamızın önemi daha iyi anlaşılabacaktır.

KAYNAKLAR

- Adem, S., & Ciftci, M. (2007). Effects of some drugs on human erythrocyte 6-phosphogluconate dehydrogenase: an in vitro study. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 22(6), 751-754.
- Adem, S., & Ciftci, M. (2016). Purification and biochemical characterization of glucose 6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase and glutathione reductase from rat lung and inhibition effects of some antibiotics. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 31(6), 1342-1348.
- Adem, S., & Ciftci, M. (2016). Purification and Characterization of Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase, 6-Phosphogluconate Dehydrogenase, and Glutathione Reductase from Rat Heart and Inhibition Effects of Furosemide, Digoxin, and Dopamine on the Enzymes Activities. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 30(6), 295-301.
- Adem, S., İnsan Eritrositlerinden 6-fosfoglukonat dehidrogenaz Enzimini Saflastırılması, Bazı İlaç ve Kimyasalların Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi, (Y.Lisans tezi), Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum (2006).
- Akkemik E., Bazı İlaçların İnsan Eritrositlerinden Saflastırılan Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz ve 6-fosfoglukonat dehidrogenaz Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkilerinin İncelenmesi , (Y.Lisans tezi), Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum (2009).
- Aksoy, K. (1997). Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enziminin yapısı. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları.
- Akyüz, M., Bazı Antibiyotiklerin İnsan Eritrositlerinden Saflastırılan 6-fosfoglukonat dehidrogenaz Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi, (doktora tezi), Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum (2004).
- Akyüz, M., Erat, M., Çiftçi, M., Gümüştekin, K., & Bakan, N. (2004). Effects of some antibiotics on human erythrocyte 6-phosphogluconate dehydrogenase: an in vitro and in vivo study. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 19(4), 361-365.
- Alkan, C., Tek, Y., & Kahraman, D. (2011). Preparation and characterization of a series of thiourea derivatives as phase change materials for thermal energy storage. *Turkish Journal of Chemistry*, 35(5), 769-777.
- Anonim 2021 <https://www.thd.org.tr/thddata/userfiles/file/g6pd%5b1%5d.pdf>
- Ası, T., Tablolarla Biyokimya Cilt 2- s. 40-49, 1999.
- Aytekin, T., & Kargın, F. Oreochromis niloticus' da Bakırın Karaciğer, Solungaç, Böbrek ve Kas Dokularında G6PD Aktivitesine Etkisi. *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, 4(2), 60-63.
- Bala D. A., Deniz Aktaran Temel Biyokimya ve Fizyoloji Bilgisi (145-146).
- Barrett, M. P. (1997). The pentose phosphate pathway and parasitic protozoa. *Parasitology Today*, 13(1), 11-16.
- Bautista, J., Mason, P. J., & Luzzatto, L. (1992). Purification and properties of human glucose-6-phosphate dehydrogenase made in E. coli. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1119(1), 74-80.

- Bayoumi, R. A., Bashir, A. H., & Abdulhadi, N. H. (1986). Resistance to falciparum malaria among adults in central Sudan. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 35(1), 45-55.
- Bayramoğlu Akkoyun, M., Bengü, A. Ş., Temel, Y., Akkoyun, H. T., Ekin, S., & Ciftci, M. (2018). The effect of astaxanthin and cadmium on rat erythrocyte G6PD, 6PGD, GR, and TrxR enzymes activities in vivo and on rat erythrocyte 6PGD enzyme activity in vitro. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 32(8), e22170.
- Beutler, E. (1984). *Red cell metabolism: a manual of biochemical methods*.
- Beutler, E. (1994). G6PD deficiency.
- Blanco, G., & Blanco, A. (2017). *Medical biochemistry*. Academic Press.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Brenda, W. L., & K Lee, L. (2003). *World of microbiology and immunology*. Gale.
- Brewer, G. J., & Dern, R. J. (1964). A New Inherited Enzymatic Deficiency of Human Erythrocytes: 6-Phospho-gluconate Dehydrogenase Deficiency. *American journal of human genetics*, 16(4), 472.
- Caprari, P., Caforio, M. P., Cianciulli, P., Maffi, D., Pasquino, M. T., Tarzia, A., ... & Salvati, A. M. (2001). 6-Phosphogluconate dehydrogenase deficiency in an Italian family. *Annals of hematology*, 80(1), 41-44.
- Chu, C. S., Bancone, G., Nosten, F., White, N. J., & Luzzatto, L. (2018). Primaquine-induced haemolysis in females heterozygous for G6PD deficiency. *Malaria journal*, 17(1), 1-9.
- Çiftci, M., Bazı İlaçların İnsan Eritrositlerinde Bulunan Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz Enzimi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi, (Doktora Tezi), Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum (1998).
- ÇİFTÇİ, M., BİLİCİ, D., & İrfan Küfrevioğlu, Ö. (2001). Effects of melatonin on enzyme activities of glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes in vitro and from rat erythrocytes in vivo. *Pharmacological research*, 44(1), 7-11.
- Davidson, M. G., Johnson, A. L., Jones, M. D., Lunn, M. D., & Mahon, M. F. (2007). Titanium (IV) complexes of oximes—Novel binding modes. *Polyhedron*, 26(5), 975-980.
- Del Mar Medina-Puerta, M. A., & Garrido-Pertierra, A. (1986). Purification and properties of the enzyme 6-phosphogluconate dehydrogenase from *Dicentrarchus labrax* L. liver. *Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry*, 83(1), 215-220.
- Eed, J. (2012). Factors affecting enzyme activity. *Essai*, 10(1), 19.
- Gajera H.P., Patel B., Golakiya A., Fundamentals of Biochemistry International Book Distributing Co. (publishing division) khushnuma complex basement 7, meerabai marg (behind jawahar bhawan) lucknow 226001 u.p. (India) 2008.
- Goldstein, J. L., & Swain, T. (1965). The inhibition of enzymes by tannins. *Phytochemistry*, 4(1), 185-192.
- Gözükara M., Biyokimya cilt:1. Nobel Tıp Kitabevleri ISBN: 9789754207842 İstanbul, 1997.
- Güller, U., Önalın, Ş., Arabacı, M., Karataş, B., Yaşar, M., & Küfrevioğlu, Ö. İ. (2020). Effects of different LED light spectra on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): in vivo

- evaluation of the antioxidant status. *Fish Physiology and Biochemistry*, 46(6), 2169-2180.
- Gürdöl F., Figen Gürdöl Tıbbi Biyokimya Nobel Tıp Kitap Evleri ISBN: 978-605-159-7 İstanbul, 2015.
- Hanau, S., Rippa, M., Bertelli, M., Dallochio, F., & Barrett, M. P. (1996). 6-Phosphogluconate Dehydrogenase from *Trypanosoma Brucei*: Kinetic Analysis and Inhibition by Trypanocidal Drugs. *European Journal of Biochemistry*, 240(3), 592-599.
- Hirono, A., Kuhl, W., Gelbart, T., Forman, L., Fairbanks, V. F., & Beutler, E. (1989). Identification of the binding domain for NADP⁺ of human glucose-6-phosphate dehydrogenase by sequence analysis of mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(24), 10015-10017.
- Hunaiti, A. A., & Soud, M. (2000). Effect of lead concentration on the level of glutathione, glutathione S-transferase, reductase and peroxidase in human blood. *Science of the total environment*, 248(1), 45-50.
- Iwahashi, Y., Hitoshio, A., Tajima, N., & Nakamura, T. (1989). Characterization of NADH kinase from *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biochemistry*, 105(4), 588-593.
- Jacobasch, G., & Rapoport, S. M. (1996). Hemolytic anemias due to erythrocyte enzyme deficiencies. *Molecular aspects of medicine*, 17(2), 143-170.
- Jain, S. K., Parsanathan, R., Levine, S. N., Bocchini, J. A., Holick, M. F., & Vanchiere, J. A. (2020). The potential link between inherited G6PD deficiency, oxidative stress, and vitamin D deficiency and the racial inequities in mortality associated with COVID-19. *Free Radical Biology and Medicine*, 161, 84-91.
- Kanji, M.I., Toews, M.L., and Carper, W.R., (1976). Glucose 6-phosphate dehydrogenase purification and partial characterization. *The Journal of Biological Chemistry*, 251, 2255-2257.
- Kawai, S., & Murata, K. (2008). Structure and function of NAD kinase and NADP phosphatase: key enzymes that regulate the intracellular balance of NAD (H) and NADP (H). *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 72(4), 919-930.
- KIRICI, M., KIRICI, M., Mesut, I. Ş. I. K., & ATAMANALP, M. (2015). İmidacloprid ve Lambda-cyhalothrin'in *Capoeta capoeta umbla* Böbrek Dokusunda Glikoz 6-Fosfat Dehidrogenaz Enzimi Üzerine In Vitro Etkileri. *Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi*, 2(1), 8-14.
- Kizilbay, G., & Karaman, M. (2020). Possible inhibition mechanism of dobutamine hydrochloride as potent inhibitor for human glucose-6-phosphate dehydrogenase enzyme. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 1-9.
- Koshland Jr, D. E., & Neet, K. E. (1968). The catalytic and regulatory properties of enzymes. *Annual review of biochemistry*, 37(1), 359-411.
- Körber, F. (1992, January). Nomenclature of 6-phosphogluconate dehydrogenase: the reaction catalysed determines the systematic name. In *European journal of clinical chemistry and clinical biochemistry: journal of the Forum of European Clinical Chemistry Societies* (Vol. 30, No. 1, pp. 47-49).
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227(5259), 680-685.
- Levy, H. R., & Daouk, G. H. (1979). Simultaneous analysis of NAD-and NADP-linked activities of dual nucleotide-specific dehydrogenases. Application to *Leuconostoc*

- mesenteroides glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, 254(11), 4843-4847.
- Li, J. (2004). Reaction kinetics of gold dissolution in acid thiourea solutions (Doctoral dissertation, The University of Utah).
- Lippincott W. and Lippincott W., (2007). Pentoz Fosfat Yolu ve NADPH. Lippincott's Illustrated Reviews Serisinden: Biyokimya, ed: Champe P.C. Harvey R.A. Ferrier İ.R. Nobel tıp kitapçevleri, Bursa, 143-151.
- Ma, L., & Cheng, Q. (2018). Inhibiting 6-phosphogluconate dehydrogenase reverses doxorubicin resistance in anaplastic thyroid cancer via inhibiting NADPH-dependent metabolic reprogramming. *Biochemical and biophysical research communications*, 498(4), 912-917.
- Maeda, M., Constantoulakis, P., Chen, C. S., Stamatoyannopoulos, G., & Yoshida, A. (1992). Molecular abnormalities of a human glucose-6-phosphate dehydrogenase variant associated with undetectable enzyme activity and immunologically cross-reacting material. *American journal of human genetics*, 51(2), 386.
- Maillard, M. P., Tedjani, A., Perregaux, C., & Burnier, M. (2009). Calcium-sensing receptors modulate renin release in vivo and in vitro in the rat. *Journal of hypertension*, 27(10), 1980-1987.
- Mansuroğlu, D. S., Arslan, H., Vanderveer, D., Binzet, G., (2009), Synthesis and characterization of n-(2,2-diphenylacetyl)-n -substituted thiourea derivatives: the crystal structure of n-(2,2-diphenylacetyl)-n -(4-chlorophenyl)-thiourea, phosphorus, sulfur, and silicon, 184, 3221-3230.
- Marks' Basic Medical Biochemistry: a Clinical Approach, 2nd edition 807.
- Montgomery Rex, Conway Tomas W., Spector Arthur A., Chappell David., (1996), Biochemistry a case-oriented approach, sixth edition. Mosby-year book, Inc.
- Morelli, A., Benatti, U., Gaetani, G. F., & De Flora, A. (1978). Biochemical mechanisms of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75(4), 1979-1983.
- Nelson, D. L., Cox, M. M. 2013. Lehninger principles of biochemistry, sixth edition (w.h. Freeman publishers), New York.
- Ninfali, P., Orsenigo, I., Baronciani, L., & Rapa, S. (1990). Rapid purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase from mammal's erythrocytes. *Preparative biochemistry*, 20(3-4), 297-309.
- Okay M. Organik Kimya Dersler, 3. Baskı, Ankara: Ünneimat Basımevi, 1965.
- Orzalesi, N., Sorcinelli, R., and Guiso, G., (1981), Increased incidence of cataracts in male subjects deficient in glucose 6-phosphate dehydrogenase", *Arch Ophthalmol.*, 99, 69-70.
- Ozols, J., (1993), Isolation and complete amino acid sequence of lumenal endoplasmic reticulum glucose 6-phosphate dehydrogenase", *proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 5302-5306.
- Özaslan, M. S., Balcı, N., Demir, Y., Gürbüz, M., & Küfrevioğlu, Ö. İ. (2019). Inhibition effects of some antidepressant drugs on pentose phosphate pathway enzymes. *Environmental toxicology and pharmacology*, 72, 103244.
- Palmer A.M., The activity of the pentose phosphate pathway is increased in response to oxidative stress in alzhemier's disease, *j neural transm*, 106, 317-28, (1999).

- Paulo, A. C., and Gubitz, G. M., Textile processing with enzymes. Crc press, Cornwall, England. Isbn 1 85573 610 1, (2003).
- Reiter R., Tang L., Garcia J.J., (1997), Munoz-hoyos a., life sci. Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical, palhophysiology, 60: 2255-71.
- Segel Ih. Biochemical calculations. Newyork: inc. 1968; 403.
- Soysal T., Bakan E., (1984), Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz Enzimi, Kinetik Parametreleri ve Klinik Önemi. Doğa Bilim Dergisi 8 (1), 150-3.
- Stenesh, J. (1998). Introduction to Metabolism. In Biochemistry (pp. 203-219). Springer, Boston, MA.
- Stryer, L.,1985, Biochemie, Vieweg, Braunschweing,pp: 93.
- Sun, C. Y., Zhang, Q. Y., Zheng, G. J., & Feng, B. (2019). Phytochemicals: Current strategy to sensitize cancer cells to cisplatin. Biomedicine & Pharmacotherapy, 110, 518-527.
- Takahashi, T., Luzum, J. A., Nicol, M. R., & Jacobson, P. A. (2020). Pharmacogenomics of COVID-19 therapies. npj Genomic Medicine, 5(1), 1-7.
- Tandoğan B., ve Ulusu N.N., (2003) 6- fosfoglukonat dehidrogenaz: Moleküler ve Kinetik Özellikler. Türk Biyokimya Dergisi, 28, 268-273.
- Telefoncu A., ve Telefoncu F., (1989), Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz Aktivitesine Primaquine'in etkisi. Tr.j.of Medical Sciences, 14, 57-63.
- Temel, Y., Bayıdır, S., (2019), The Synthesis of Thiosemicarbazone-Based Aza-Ylides as Inhibitors of Rat Erythrocyte Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase Enzyme İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 9(3): 1503-1512.
- Tipton, K., & Boyce, S. (2000). History of the enzyme nomenclature system. Bioinformatics, 16(1), 34-40.
- Toews, M.L., Kanji, M., Carper, W., (1976), 6-phosphogluconate dehydrogenase, J Biol Chem., 251 (22), 7127-7131.
- Ulus, N.N., Kus, M.S., Acan, N.L., and Tezcan, E.F., (1999), A rapid metod for the purification of glucose 6-phosphate dehydrogenase from bovine lens." The int. J.of Biochem.&Cell Biology, 31, 787-796.
- Us Altay, D., Edip Keha, E., & Alver, A. (2015). In vitro effect of ciprofibrate on human carbonic anhydrase II and glucose 6 phosphate dehydrogenase enzyme activities/Siprofibratın insan karbonik anhidraz II ve glukoz 6 fosfat dehidrogenaz enzim aktivitelere in vitro etkisi. Turkish Journal of Biochemistry/Turk Biyokimya Dergisi, 40(2).
- Ünal A.A., (2012) Bazı Tiyoüre Ve Amit Türevlerinin Sentezi ve Çeşitli Anyonlarla Hidrojen Etkileşimlerinin İncelenmesi Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Ve Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi.
- Walzem Rl., Storebakken T., Hung Sso., Hansen Rj., (1991). Relationship between growth and selected liver enzyme activities of individual rainbow trout. Journal of nutrition, 121, 1090- 1098.
- Weiqun Z, Baolong L, Liming Z, Jiangang D, Yong Z, Lude L, Yang X. (2004), Structural and Spectral Studies on n-(4-chloro)benzoyl-n'-(4-tolyl)thiourea. Journal of molecular structure, 690:145-150.
- Xia, S., Liu, M., Wang, C., Xu, W., Lan, Q., Feng, S., ... & Lu, L. (2020). Inhibition of SARS-CoV-2 (previously 2019-nCoV) infection by a highly potent pan-coronavirus fusion

inhibitor targeting its spike protein that harbors a high capacity to mediate membrane fusion. Cell research, 30(4), 343-355.

Zhoua W, Lua J, Zhanga Z, Zhanga Y, Caoa Y, Lub L, Yang X. (2004), Structure and vibration spectra of n-4-chlorobenzoyl–n0-4-methoxylphenylthiourea. Vibrational spectroscopy;; 34 :199–204.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Muhammed Lütfü YILDIZ
Doğum tarihi:	01.06.1991
Doğum Yeri:	Erzurum
Uyruğu:	T.C.
Adres:	Atatürk Üniversitesi Araştırma Hast. Mikrobiyoloji A.B.D.
Tel:	0530 5278514
E-mail:	muhammedlutfuyildiz@gmail.com
Eğitim	
Lise:	Kırıkkale Mehmet Akif Ersoy Lisesi
Önlisans:	Atatürk Üniversitesi, Erzurum Meslek Yüksek Okulu Kimya Teknolojisi
Lisans:	Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü
Yüksek lisans:	Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Ens,Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Bilimdalı
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	İyi