

**T.C.  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**İNSAN ERİTROSİTLERİNDEN GLUKOZ 6-FOSFAT  
DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, BAZI  
KUMARİN ve PESTİSİTLERİN ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**DOKTORA TEZİ**

**Ersin HOPA**

**Balıkesir, Ağustos-2010**

T.C.  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

İNSAN ERİTROSİTLERİNDEN GLUKOZ 6-FOSFAT  
DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, BAZI  
KUMARİN ve PESTİSİTLERİN ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

Ersin HOPA

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Selma SİNAN

Sınav Tarihi: 02.08.2010

Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Oktay ARSLAN (BAÜ)

Doç. Dr. Kamil SEYREK (BAÜ)

Doç. Dr. Mustafa CEMEK (AKÜ)

Doç. Dr. Yusuf TURAN (BAÜ)

Doç. Dr. Selma SİNAN (Danışman-BAÜ)

Enstitü Yönetim Kurulunun ..... tarih ..... sayılı oturumunun .....  
nolu kararı ile ..... Mezun olmuştur.

Balıkesir, Ağustos 2010

**Bu alışma Balıkesir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi  
tarafından 2009/20 no'lu proje ile desteklenmiştir.**

## ÖZET

# İNSAN ERİTROSİTLERİNDEN GLUKOZ 6-FOSFAT DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, BAZI KUMARİN ve PESTİSİTLERİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ersin HOPA

Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı

(Doktora Tezi / Tez Danışmanı : Doç. Dr. Selma SİNAN)

Balıkesir, 2010

Bu çalışmada genel metabolizma için çok önemli yere sahip olan Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (D-glukoz-6-fosfat: NADP<sup>+</sup> oksidoredüktaz, EC 1.1.1.49; G6PD) enzimi insan eritrositlerinden saflaştırıldı ve karakterize edildi. Saflaştırma işlemi, amonyum sülfat çöktürmesi ve 2', 5' ADP-Sepharose 4B afinite kromatografisi olarak iki basamakta gerçekleştirildi. İnsan eritrosit G6PD enzimi %33,65 verimle 7068,100 kat saflaştırıldı. Sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel (SDS-PAGE) elektroforezi ile G6PD enziminin molekül ağırlığı yaklaşık 59000-60000 dalton arasında olduğu belirlendi. G6PD enziminin NADP<sup>+</sup> ve glukoz 6-fosfat (G6P) substratları için K<sub>m</sub> ve V<sub>max</sub> değerleri belirlendi. Enzim aktiviteleri spektrofotometrik olarak 340 nm'de Beutler metoduna göre ölçüldü.

Beslenme ve tedavi süreçlerinde insan vücudu ile etkileşim içerisinde bulunabilecek altısı yeni yedi kumarin türevi ve üçü herbisit ikisi insektisit beş pestisit enzim aktivitesi üzerine in vitro etkileri incelendi. Kumarin bileşiklerinin isimleri, 6,7-dihidroksi-3-(2-metilfenil)-2H-kromen-2-on (OPC), 6,7-dihidroksi-3-(3-metilfenil)-2H-kromen-2-on (MPC), 6,7-dihidroksi-3-(4-metilfenil)-2H-kromen-2-on (PPC), 6,7-dihidroksi-3-(2,5-dimetoksifenil)-2H-kromen-2-on (DPC), 6,7-dihidroksi-3-(3,4,5-trimetoksifenil)-2H-kromen-2-on (TPC), 7,8-dihidroksi-3-(4-metilfenil)-2H-kromen-2-on (FPC), Varfarin sodyum'dur. Varfarin sodyum hariç kumarin bileşiklerinin tamamı G6PD enzimi aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösterdi. Kumarin bileşiklerinde en etkili inhibitörün OPC olduğu belirlendi. Kumarin bileşiklerinin inhibisyon mekanizmaları yarışmalı, yarı yarışmalı, yarışmasız ve karışık tipte olarak tespit edildi. Çalışmada incelenen pestisitler glifosat, deltamethrin, 2,4-D, diazinon, imazethapyr'dir. Pestisitlerin tamamının enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir. İnhibisyon mekanizmalarının yarı yarışmalı ve yarışmalı tipte olduğu tespit edilmiştir.

**ANAHTAR SÖZCÜKLER:** Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz, kumarin, pestisit, eritrosit, inhibisyon

## ABSTRACT

# PURIFICATION OF GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE FROM HUMAN ERYTHROCYTES AND INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF SOME COUMARIN AND PESTICIDES ON THE ENZYME

Ersin HOPA

Balikesir University, Institute of Science, Department of Biology

(PhD. Thesis / Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Selma SINAN)

Balikesir, Turkey, 2010

In this study, Glucose 6-phosphate dehydrogenase (D-glukoz-6-fosfat: NADP<sup>+</sup> oksidoreductase, EC 1.1.1.49; G6PD) enzyme which is very important for general metabolism was purified from human erythrocytes and characterized. The purification process consists of two steps; ammonium sulfate fractionation and 2', 5' ADP-Sepharose 4B affinity chromatography. Human erythrocyte G6PD enzyme was purified 7068,100 fold in a yield of 33,65 %. Molecular weight of G6PD enzyme were determined approximately between 59000-60000 dalton by sodium dodesilsulfate polyacrylamide gel (SDS-PAGE) electrophoresis.  $K_m$  and  $V_{max}$  values for NADP<sup>+</sup> and glucose 6-phosphate (G6P) substrates of G6PD enzyme were determined. Enzymatic activity was spectrophotometrically measured according to Beutler method at 340 nm.

In vitro effects of six new coumarin derivatives of seven; three herbisite and two insectisites that may be in interaction with human body throughout nutrition and medical treatment, on enzyme activities were investigated. The name of coumarins are 6,7-dihydroxy-3-(2-methylphenyl)-2H-chromen-2-one (OPC), 6,7-dihydroxy-3-(3-methylphenyl)-2H-chromen-2-one (MPC), 6,7-dihydroxy-3-(4-methylphenyl)-2H-chromen-2-one (PPC), 6,7dihydroxy-3-(2,5-dimethoxyphenyl)-2H-chromen-2-one (DPC), 6,7-dihydroxy-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-2H-chromen-2-one (TPC), 7,8-dihydroxy-3-(4-methylphenyl)-2H-chromen-2-one (FPC), Varfarin sodium. Except of Varfarin sodium, all of them caused an inhibition effect on G6PD enzyme activity. It was found that OPC is the most effective inhibitor in coumarin compounds. Inhibiton mechanism of coumarin derivatives were determined as competitive, uncompetitive, noncompetitive and mixed types. Investigated pesticides in this study are glyphosate, deltamethrin, 2,4-D, diazinon, imazethapyr. All of them indicated the inhibitory effects on the enzyme activity. Inhibition mechanism of them were determined as uncompetitative and compatitative.

**KEYWORDS:** Glucose 6-phosphate dehidrogenase, coumarin, pesticide, erythrocyte, inhibition

## İÇİNDEKİLER

|  | Sayfa     |
|--|-----------|
| ÖZET, ANAHTAR SÖZCÜKLER  | ii        |
| ABSTRACT, KEY WORDS  | iii       |
| İÇİNDEKİLER  | iv        |
| ŞEKİL LİSTESİ  | vi        |
| ÇİZELGE LİSTESİ  | ix        |
| SEMBOL LİSTESİ   | xii       |
| ÖNSÖZ  | xiii      |
| <b>1. GİRİŞ</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1 Eritrositler   | 2         |
| 1.1.1 Eritrositlerin Yapısı ve Fonksiyonu  | 3         |
| 1.1.2 Eritrositlerde Enerji Sağlanması   | 4         |
| 1.1.3 Eritrositin Oksidasyondan Korunması  | 5         |
| 1.2 Pentoz Fosfat Metabolik Yolu   | 6         |
| 1.2.1 Hücre İçinde G6P'ın Kullanımının Kontrolü  | 10        |
| 1.3 G6PD Enzimi  | 11        |
| 1.3.1 G6PD Enziminin Önemi   | 11        |
| 1.3.2 G6PD Enziminin Genetik Yapısı  | 12        |
| 1.3.3 G6PD Enziminin Biyomoleküler Yapısı  | 12        |
| 1.3.4 G6PD Enziminin Spesifik Özellikleri  | 14        |
| 1.3.5 G6PD Enziminin Eksikliği   | 16        |
| 1.3.6 Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz Enziminin Saflaştırılması   | 20        |
| 1.4 G6PD Enzimi Üzerine Bazı Kumarin Türevleri ve Bazı Pestisitlerin<br><i>In vitro</i> Etkilerinin İncelenmesi                              | 26        |
| 1.4.1 Kumarin Türevleri  | 26        |
| 1.4.2 Pestisitler  | 30        |
| <b>2. MATERYAL VE METOTLAR</b>   | <b>36</b> |
| 2.1 MATERYALLER  | 36        |
| 2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler   | 36        |
| 2.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar  | 37        |
| 2.1.3 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması  | 38        |
| 2.2 METOTLAR   | 41        |
| 2.2.1 İnsan Eritrositlerinden G6PD Enzimin Saflaştırılması ve<br>İnhibisyonu Çalışmaları ile ilgili Metodlar                                 | 41        |
| 2.2.2 Protein tayini   | 48        |
| 2.2.3 Glukoz 6-fosfat Dehidrogenaz Enziminin Aktivite Tayini   | 49        |
| 2.2.4 NADP <sup>+</sup> ve G6P Substratları için K <sub>m</sub> ve V <sub>max</sub> Değerlerinin<br>Bulunmasına Yönelik Çalışmalar           | 51        |
| 2.2.5 Kumarin Türevlerinin ve Bazı Pestisitlerin İnsan Eritrositlerinden<br>2', 5' ADP-Sepharose 4B Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılan |           |

|   |            |
|---|------------|
| G6PD enzimi üzerine İn vitro Etkilerinin İncelenmesi  | 51         |
| 2.2.6 İnsan Eritrosit G6PD Enzimi için İnhibitör Etkisi Gösteren Kumarin Türevleri ve Bazı Pestisitlerin İnhibisyon Tiplerinin Bulunması          | 51         |
| <b>3. BULGULAR</b>  | <b>53</b>  |
| 3.1 İnsan Eritrosit Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz Enziminin 2', 5' ADP-Sepharose 4B Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması ve Karakterizasyonu | 53         |
| 3.1.1 Amonyum Sülfat Çöktürmesi   | 53         |
| 3.1.2 2', 5' ADP-Sepharose 4B Afinite Kromatografisi ile G6PD Enzimin Saflaştırılması   | 53         |
| 3.1.3 Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik   | 57         |
| 3.1.4 Eritrosit G6PD Enziminin Sodyum dodesilsülfat-Poliakrilamid jel (SDS-PAGE) Elektroforezi  | 58         |
| 3.1.5 Eritrosit G6PD Enziminin NADP <sup>+</sup> ve G6P Substratları için K <sub>m</sub> ve V <sub>max</sub> Değerlerinin Hesaplanması            | 59         |
| 3.2 Kumarin Türevleri ve Bazı Pestisitlerin G6PD Enzimi Üzerine Etkileri  | 61         |
| 3.2.1 Kumarin Türevlerinin G6PD enzimi Üzerine İn vitro Etkileri  | 62         |
| 3.2.2 Pestisitlerin G6PD Enzim Aktivitesi Üzerine İn vitro Etkileri   | 85         |
| <b>4. TARTIŞMA VE SONUÇ</b>   | <b>97</b>  |
| <b>EKLER</b>  | <b>113</b> |
| <b>KAYNAKLAR</b>  | <b>118</b> |

## **SEMBOL LİSTESİ**

|                   |   |
|-------------------|---|
| PFY               | Pentoz fosfat yolu  |
| HMP               | Heksoz monofosfat   |
| MetHB             | Methemoglobin   |
| 6PGD              | 6-fosfoglukonat dehidrogenaz                              |
| ADP               | Adenozin difosfat   |
| ATP               | Adenozin trifosfat  |
| DEAE              | Dietilaminoetil selüloz                                   |
| DNA               | Deoksiribonükleik asit                                    |
| kb                | Kilo baz  |
| E                 | Enzim   |
| EC                | Enzim kod numarası  |
| EDTA              | Etilendiamin tetra asetik asit                            |
| EU                | Enzim ünitesi   |
| FAD <sup>+</sup>  | Flavin Adenin dinükleotid (Yükseltgenmiş hal)             |
| G6P               | Glukoz 6-fosfat   |
| G6PD              | Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz                              |
| GSH               | İndirgenmiş glutatyon                                     |
| GSSG              | Yükseltgenmiş glutatyon                                   |
| I                 | İnhibitör   |
| NAD <sup>+</sup>  | Nikotinamid adenin dinükleotid (Yükseltgenmiş hal)        |
| NADP <sup>+</sup> | Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (Yükseltgenmiş hal) |
| NADH              | Nikotinamid adenin dinükleotid (İndirgenmiş hal)          |
| NADPH             | Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (İndirgenmiş hal)   |
| OD                | Optik dansite   |
| P                 | Ürün  |
| PAGE              | Poliakrilamid jel elektroforezi                           |
| RNA               | Ribonükleik asit  |
| S                 | Substrat  |
| SDS               | Sodyum dodesilsülfat                                      |
| TEMED             | N,N,N',N'-tetrametiletildiamin                            |
| Tris              | Trihidroksimetil aminometan                               |



## ŞEKİL LİSTESİ

| Şekil Numarası | Adı   | Sayfa |
|----------------|---|-------|
| Şekil 1.1      | Eritrosit hücre zarının sitoplazmik yüzündeki proteinlerin şematik gösterimi  | 3     |
| Şekil 1.2      | Hemoglobin molekülünün yapısı   | 4     |
| Şekil 1.3      | Pentoz Fosfat Metabolik Yolu  | 9     |
| Şekil 1.4      | G6PD enzimini kodlayan genin 12 intron 13 ekzon bölgesi   | 12    |
| Şekil 1.5      | Aktif G6PD dimerinin üç boyutlu modeli  | 13    |
| Şekil 1.6      | İnsan G6PD Enziminin Moleküler Özellikleri  | 14    |
| Şekil 1.7      | PFY ile glikolitik yolun bağlantısı ve hidrojen peroksidin glutasyon aracılığıyla indirgenmesi                            | 16    |
| Şekil 1.8      | G6PD Enzimi Eksikliğinin Dünya Üzerindeki Dağılımı  | 20    |
| Şekil 1.9      | C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> ' nin açık kimyasal yapısı   | 27    |
| Şekil 1.10     | (RS)-5-etil-2-(4-metil-5-okzo-2-imidazolin-2-yl)=nikotinik asit'in kimyasal yapısı  | 31    |
| Şekil 1.11     | N-(fosfonometil)glisin'in kimyasal yapısı   | 32    |
| Şekil 1.12     | (2,4-diklorofenoksi)asetik asitin kimyasal yapısı   | 33    |
| Şekil 1.13     | 0-0-dietil 0-2-izopropil-6-metillpirimidin-4-il fosforotiyolat'ın kimyasal yapısı   | 33    |
| Şekil 1.14     | (S)- $\alpha$ -siyano-3-fenoksibenzil (1R,3R)-3-(2,2-dibromovinil) = 2,2-dimetilsiklopropankarboksilat'ın kimyasal yapısı | 34    |
| Şekil 2.1      | a) EDTA'lı tüpteki insan kanı b) eritrositleri ayırmak için santrifüj yapılmış EDTA'lı tüp                                | 42    |
| Şekil 2.2      | a) Hipotonik ortamdaki eritrosit b) eritrositin su alması c) eritrositin hemolizi   | 42    |
| Şekil 2.3      | Amonyum sülfat çöktürmesinden sonra numuneye uygulanan diyaliz aşaması  | 44    |
| Şekil 2.4      | Afinite kromatografisi ile protein saflaştırma aşamaları  | 46    |
| Şekil 3.1      | 2', 5' ADP-Sepharose 4B Afinite Kolonundan G6PD enziminin elüsyon grafiği   | 55    |

|            |  |    |
|------------|--|----|
| Şekil 3.2  | Lowry yöntemiyle proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart grafik  | 57 |
| Şekil 3.3  | Afinite kromatografisi ile saflaştırılan G6PD enziminin SDS-polakrilamid jel elektroforezi. Molekül ağırlık standartları; ( $\beta$ -galaktosidaz (118,0kDa), sığır serum albumin (79,0 kDa), yumurta albumini (47,0 kDa), karbonik anhidraz (33,0 kDa), $\beta$ -laktoglobulin (25,0 kDa) ve Lizozim (19,5 kDa) | 58 |
| Şekil 3.4  | Sabit G6P değerinde farklı NADP <sup>+</sup> Konsantrasyonlarında $K_m$ ve $V_{max}$ Grafiği   | 59 |
| Şekil 3.5  | Sabit NADP <sup>+</sup> değerinde farklı G6P Konsantrasyonlarında $K_m$ ve $V_{max}$ Grafiği   | 59 |
| Şekil 3.6  | İnsan eritrosit G6PD enzimi için farklı DMSO konsantrasyonlarda elde edilen % Aktivite-[DMSO] Grafiği  | 63 |
| Şekil 3.7  | İnsan eritrosit G6PD enzimi için farklı OPC konsantrasyonlarda elde edilen % Aktivite-[OPC] Grafiği  | 64 |
| Şekil 3.8  | İnsan eritrosit G6PD enzimi için farklı MPC konsantrasyonlarda elde edilen % Aktivite-[MPC] Grafiği  | 65 |
| Şekil 3.9  | İnsan eritrosit G6PD enzimi için farklı DPC konsantrasyonlarda elde edilen % Aktivite-[DPC] Grafiği  | 66 |
| Şekil 3.10 | İnsan eritrosit G6PD enzimi için farklı FPC konsantrasyonlarda elde edilen % Aktivite-[FPC] Grafiği  | 67 |
| Şekil 3.11 | İnsan eritrosit G6PD enzimi için farklı PPC konsantrasyonlarda elde edilen % Aktivite-[PPC] Grafiği  | 68 |
| Şekil 3.12 | İnsan eritrosit G6PD enzimi için farklı TPC konsantrasyonlarda elde edilen % Aktivite-[TPC] Grafiği  | 69 |
| Şekil 3.13 | İnsan eritrosit G6PD enzimi için farklı Varfarin konsantrasyonlarda elde edilen % Aktivite-[Varfarin] Grafiği  | 70 |
| Şekil 3.14 | İnsan Eritrosit G6PD enzimi üzerine OPC nin etkisi   | 74 |
| Şekil 3.15 | İnsan Eritrosit G6PD enzimi üzerine MPC nin etkisi   | 76 |
| Şekil 3.16 | İnsan Eritrosit G6PD enzimi üzerine PPC nin etkisi   | 78 |
| Şekil 3.17 | İnsan Eritrosit G6PD enzimi üzerine FPC nin etkisi   | 80 |
| Şekil 3.18 | İnsan Eritrosit G6PD enzimi üzerine DPC nin etkisi   | 82 |
| Şekil 3.19 | İnsan Eritrosit G6PD enzimi üzerine TPC nin etkisi   | 84 |

|            |   |    |
|------------|---|----|
| Şekil 3.20 | İnsan eritrosit G6PD enzimi için farklı Glifosat konsantrasyonlarda elde edilen % Aktivite-[Glifosat] Grafiği         | 86 |
| Şekil 3.21 | İnsan eritrosit G6PD enzimi için farklı 2,4-D konsantrasyonlarda elde edilen % Aktivite-[2,4-D] Grafiği               | 87 |
| Şekil 3.22 | İnsan eritrosit G6PD enzimi için farklı İmazethapyr konsantrasyonlarda elde edilen % Aktivite-[İmazetapir] Grafiği    | 88 |
| Şekil 3.23 | İnsan eritrosit G6PD enzimi için farklı Diazinon konsantrasyonlarda elde edilen % Aktivite-[Diazinon] Grafiği         | 89 |
| Şekil 3.24 | İnsan eritrosit G6PD enzimi için farklı Deltamethrin konsantrasyonlarda elde edilen % Aktivite-[Deltamethrin] Grafiği | 90 |
| Şekil 3.25 | İnsan Eritrosit G6PD enzimi üzerine Glifosat nin etkisi   | 94 |
| Şekil 3.26 | İnsan Eritrosit G6PD enzimi üzerine 2,4-D'nin etkisi  | 96 |

## ÇİZELGE LİSTESİ

| Çizelge Numarası | Adı  | Sayfa |
|------------------|--|-------|
| Çizelge 1.1      | Kumarin türevlerinin kimyasal yapısı, adlandırılması ve kısaltmaları   | 29    |
| Çizelge 1.2      | G6PD enzimi üzerine in vitro çalışma yapılan pestisitlerin kimyasal yapısı, adlandırılması ve kullanılan kısaltmalar   | 35    |
| Çizelge 2.1      | Kontrol küvetinin hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler ve miktarları   | 49    |
| Çizelge 2.2      | Numune küvetinin hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler ve miktarları  | 50    |
| Çizelge 3.1      | İnsan Eritrosit G6PD Enziminin Saflaştırma Tablosu   | 56    |
| Çizelge 3.2      | G6PD enziminin $\text{NADP}^+$ ve G6P substratları için $K_m$ ve $V_{max}$ değerleri   | 60    |
| Çizelge 3.3      | Çalışılan Kimyasal Maddelerin Stok Konsantrasyonları   | 62    |
| Çizelge 3.4      | İnsan Eritrosit G6PD Enzimi Üzerine DMSO ile Yapılan Çalışmalarda Kullanılan Konsantrasyonlar, 340 nm' de Ölçülen 1 dakikalık Absorbans Farkları, Aktivite ve Buna Karşılık Gelen % Aktivite Sonuçları | 63    |
| Çizelge 3.5      | İnsan Eritrosit G6PD Enzimi Üzerine OPC ile Yapılan Çalışmalarda Kullanılan Konsantrasyonlar, 340 nm' de Ölçülen 1 dakikalık Absorbans Farkları, Aktivite ve Buna Karşılık Gelen % Aktivite Sonuçları  | 64    |
| Çizelge 3.6      | İnsan Eritrosit G6PD Enzimi Üzerine MPC ile Yapılan Çalışmalarda Kullanılan Konsantrasyonlar, 340 nm' de Ölçülen 1 dakikalık Absorbans Farkları, Aktivite ve Buna Karşılık Gelen % Aktivite Sonuçları  | 65    |
| Çizelge 3.7      | İnsan Eritrosit G6PD Enzimi Üzerine DPC ile Yapılan Çalışmalarda Kullanılan Konsantrasyonlar, 340 nm' de Ölçülen 1 dakikalık Absorbans Farkları, Aktivite ve Buna Karşılık Gelen % Aktivite Sonuçları  | 66    |

- Çizelge 3.8 İnsan Eritrosit G6PD Enzimi Üzerine FPC ile Yapılan Çalışmalarda Kullanılan Konsantrasyonlar, 340 nm' de Ölçülen 1 dakikalık Absorbans Farkları, Aktivite ve Buna Karşılık Gelen % Aktivite Sonuçları 67
- Çizelge 3.9 İnsan Eritrosit G6PD Enzimi Üzerine PPC ile Yapılan Çalışmalarda Kullanılan Konsantrasyonlar, 340 nm' de Ölçülen 1 dakikalık Absorbans Farkları, Aktivite ve Buna Karşılık Gelen % Aktivite Sonuçları 68
- Çizelge 3.10 İnsan Eritrosit G6PD Enzimi Üzerine TPC ile Yapılan Çalışmalarda Kullanılan Konsantrasyonlar, 340nm' de Ölçülen 1 dakikalık Absorbans Farkları, Aktivite ve Buna Karşılık Gelen % Aktivite Sonuçları 69
- Çizelge 3.11 İnsan Eritrosit G6PD Enzimi Üzerine Varfarin ile Yapılan Çalışmalarda Kullanılan Konsantrasyonlar, 340 nm' de Ölçülen 1 dakikalık Absorbans Farkları, Aktivite ve Buna Karşılık Gelen % Aktivite Sonuçlar 70
- Çizelge 3.12 İnsan Eritrosit G6PD enzimi üzerine 7 farklı kumarin türevinin farklı konsantrasyonlarda % aktivite değişimleri 71
- Çizelge 3.13 İnsan eritrosit G6PD enzimi üzerine OPC nin  $K_i$  değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları 73
- Çizelge 3.14 İnsan eritrosit G6PD enzimi üzerine MPC nin  $K_i$  değerlerinin anılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları 75
- Çizelge 3.15 İnsan eritrosit G6PD enzimi üzerine PPC nin  $K_i$  değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları 77
- Çizelge 3.16 İnsan eritrosit G6PD enzimi üzerine FPC nin  $K_i$  değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları 79
- Çizelge 3.17 İnsan eritrosit G6PD enzimi üzerine DPC nin  $K_i$  değerlerinin tesitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları 81
- Çizelge 3.18 İnsan eritrosit G6PD enzimi üzerine TPC nin  $K_i$  değerlerinin tesitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları 83
- Çizelge 3.19 İnsan eritrositlerinden saflaştırılan G6PD enzimi için 6 farklı kumarin türevinin  $IC_{50}$  değerleri, 2 farklı sabit inhibitör konsantrasyonlarında

|   |    |
|---|----|
| Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan $K_i$ değerleri ve inhibisyon tipleri  | 85 |
| Çizelge 3.20 İnsan Eritrosit G6PD Enzimi Üzerine Glifosat ile Yapılan Çalışmalarda Kullanılan Konsantrasyonlar, 340 nm' de Ölçülen 1 dakikalık Absorbans Farkları, Aktivite ve Buna Karşılık Gelen % Aktivite Sonuçları               | 86 |
| Çizelge 3.21 İnsan Eritrosit G6PD Enzimi Üzerine 2,4-D ile Yapılan Çalışmalarda Kullanılan Konsantrasyonlar, 340 nm' de Ölçülen 1 dakikalık Absorbans Farkları, Aktivite ve Buna Karşılık Gelen % Aktivite Sonuçları                  | 87 |
| Çizelge 3.22 İnsan Eritrosit G6PD Enzimi Üzerine İmazethapyr ile Yapılan Çalışmalarda Kullanılan Konsantrasyonlar, 340 nm 'de Ölçülen 1 dakikalık Absorbans Farkları, Aktivite ve Buna Karşılık Gelen % Aktivite Sonuçları            | 88 |
| Çizelge 3.23 İnsan Eritrosit G6PD Enzimi Üzerine Diazinon ile Yapılan Çalışmalarda Kullanılan Konsantrasyonlar, 340 nm' de Ölçülen 1 dakikalık Absorbans Farkları, Aktivite ve Buna Karşılık Gelen % Aktivite Sonuçları               | 89 |
| Çizelge 3.24 İnsan Eritrosit G6PD Enzimi Üzerine Deltamethrin ile Yapılan Çalışmalarda Kullanılan Konsantrasyonlar, 340 nm' de Ölçülen 1 dakikalık Absorbans Farkları, Aktivite ve Buna Karşılık Gelen % Aktivite Sonuçları           | 90 |
| Çizelge 3.25 İnsan Eritrosit G6PD enzimi üzerine 5 farklı pestisit farklı konsantrasyonlarda % Aktivite değişimi  | 91 |
| Çizelge 3.26 İnsan eritrosit G6PD enzimi üzerine Glifosat'ın $K_i$ değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları                                       | 93 |
| Çizelge 3.27 İnsan eritrosit G6PD enzimi üzerine 2,4-Dnin $K_i$ değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları  | 95 |
| Çizelge 3.28 İnsan eritrositlerinden saflaştırılan G6PD enzimi için 2 farklı pestisit $IC_{50}$ değerleri, 2 farklı sabit inhibitör konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan $K_i$ değerleri ve inhibisyon tipleri | 96 |

## **ÖNSÖZ**

Lisansüstü eğitimim boyunca birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum, bilgi ve tecrübeleriyle her zaman desteğini gördüğüm, bilimsel çalışma yöntem ve disiplinini öğreten, danışman hocam sayın Doç. Dr. Selma SİNAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Deneyisel çalışmalarım süresince her türlü katkı ve desteğini esirgemeyen değerli bilgilerinden faydalandığım sayın hocam Doç. Dr. Yusuf TURAN'a, doktora tez izleme sınavları esnasında değerli bilgi ve yorumları ile bizleri yönlendiren hocalarım sayın Prof. Dr. Oktay ARSLAN'a ve Doç. Dr. Kamil SEYREK'e en derin saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Sıkıntıda ve mutluluğumda; bana her zaman benimle olduğunu hissettiren; en büyük güvencem sevgili eşim Çiğdem HOPA'ya ve desteklerini benden esirgemeyen sevgili aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımı 2009/20 no'lu proje kapsamında destekleyen Balıkesir Üniversitesi Araştırma Projeleri Birimine teşekkür ederim.

**Balıkesir, 2010**

**Ersin HOPA**

## 1. GİRİŞ

Canlı kimyasının yüksek derecedeki kompleksliği, en üst seviyedeki düzeni bilim adamları tarafından ilgiyle araştırılmakta ve her geçen gün ilginç sonuçlar ortaya çıkmaktadır. Canlıların biyokimyasında milyonlarca reaksiyon gerçekleşmekte ve bu karmaşık olaylar maksimum ekonomi ilkesine uyularak düzenlenmektedir.

Enzimler canlıların yaşamını sürdürebilmesi için gerçekleşen biyokimyasal reaksiyonların düzenleyicisi rolündedirler. Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) enzimi de canlılarda çok önemli bir yeri olan pentoz fosfat metabolik yolunun (PFY) ilk ve tek kilit enzimi rolündedir.

G6PD enzimi insan, hayvan, bitki, mantar, mikroorganizma gibi birçok canlı metabolizmasında bulunmaktadır. İnsan eritrositlerinde bulunan G6PD enziminin görevini yapamaması PFY'nun aksamasına, eritrositlerin hemolize uğramasına neden olur. Bu durum canlının dönüşümsüz zarara uğramasına yol açabilir.

Son yıllarda insan nüfusunun artması, ilaç, kozmetik ve gıda gibi birçok sanayinin gelişmesine ve çeşitlenmesine neden olmaktadır. Özellikle metabolizmada önemli fizyolojik fonksiyonlara sahip enzimlerin aktivitelerinin bu bileşiklerden ne ölçüde etkilendiği son derece önemlidir. Çalışmamızda antikoagülen, anti-kanserojen, antibiyotik etkileri [1,2] ve biyolojik aktivite potansiyeli yüksek olduğu için ilaç sanayinde sık kullanılan kumarin türevlerinin G6PD enzim aktivitesi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Söz konusu kumarin türevleri önceleri bitkilerden doğal olarak sentezlenirken, son yıllarda laboratuvarlarda birçok türevi sentezlenmektedir. Araştırmamızda G6PD enzimine etkileri incelenmiş olan kumarin türevleri Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Organik Kimya laboratuvarlarında sentezlenen 6 yeni türevidir. Ayrıca etken maddesi kumarin türevi olan varfarin sodyum bileşiğinin G6PD enzimi üzerine aktivitesi üzerine etkisi de



araştırılmıştır. Varfarin, oral yoldan etkili protrombinopenik bir antikoagulandır. Trombo-embolik belirtilerle seyreden çeşitli hastalıklarda, kanın pıhtılaşmasında rolü olan maddelerin karaciğerdeki sentezini önleyerek etkisini gösterir. Çalışmamızda yüksek verim elde etmek amacıyla tarım sanayinde çok sık kullanılan beş farklı pestisit in insan eritrositlerinde bulunan G6PD enziminin aktivitesi üzerine etkileri incelenmiştir. Bu çalışma için aşağıda belirtilen uygulamalar gerçekleştirilmiştir.

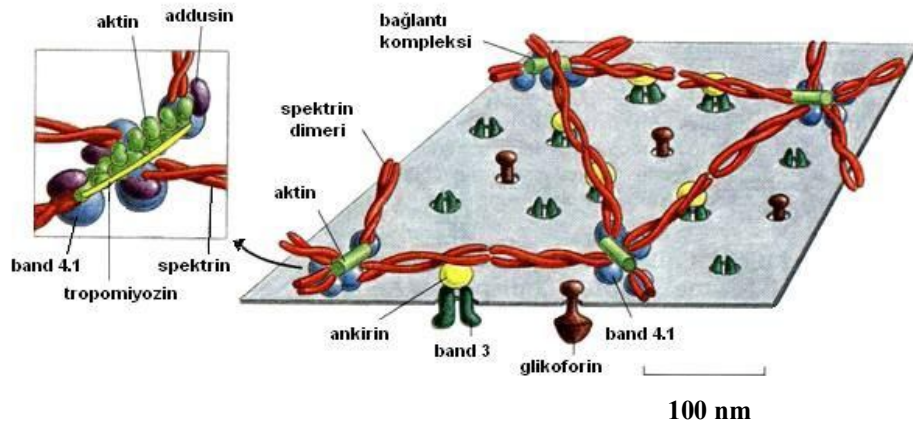
- İnsan eritrositinden 2', 5' ADP-Sepharose 4B Afinite Kromatografisi ile Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz enziminin saflaştırılması
- Sodyum Dodesilsülfat Poliakrilamid Jel (SDS-PAGE) elektroforezi ile saflığının kontrolü.
- Optimum şartlarda enzimin substrata ilgisinin biyokimyasal ifadesi olan  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerinin bulunması
- Altısı orijinal bir tanesi ilaç etken maddesi olarak kullanılmakta olan yedi kumarin türevinin ve üçü herbisit, ikisi insektisit olmak üzere toplam beş pestisit in saf enzim üzerindeki *in vitro* etkisi
- İnhibisyona neden olan kimyasal maddelerin inhibisyon mekanizmasının belirlenmesi

## 1.1 Eritrositler

Eritrositler, içerdikleri hemoglobin sayesinde dokular arasında oksijen ve karbondioksit taşıyıcısı olarak görev yapan kan hücreleridir. Bu hücreler kuarterner yapıda , özelleşmiş bir protein olan hemoglobini taşırlar ve görevini yapabilmesi için uygun ortamı sağlarlar [3]. Normal koşullarda ortalama yaşam süreleri 100-120 gündür [4].

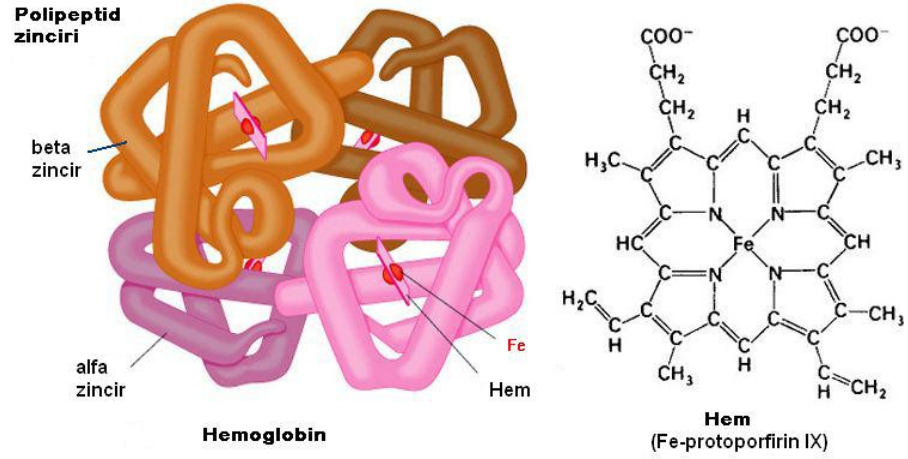
### 1.1.1 Eritrositlerin Yapısı ve Fonksiyonu

Bikonkav disk şekilli hücreler olan eritrositlerin çapları 6-9  $\mu\text{m}$ , kalınlıkları merkezi kısımlarında 1  $\mu\text{m}$ , en kalın oldukları perifer kısımlarında ise 2-2.5  $\mu\text{m}$ 'dir [3]. Olgunlaşmış insan eritrositleri çekirdek, mitokondri, ribozom, endoplazmik retikulum ve diğer iç zar sistemlerini bulundurmazlar. Bu nedenle nükleik asit, protein, fosfolipid veya karbohidrat sentezleyemezler. En önemli bileşenleri homojen dağılım gösteren, kuru ağırlığının %90'ını oluşturan hemoglobindir [5]. Eritrosit hücre zarı, Şekil 1.1' de görüldüğü gibi diğer hücre zarlarına benzer şekilde iki sıralı lipid matriks ve bunun içinde ya da sitoplazmik yüzünde yerleşmiş çeşitli proteinlerden oluşmaktadır. Zarın dış yüzeyi ise karbohidrat birimlerini içerir [6]. Spektrin, eritrosit membranının protein iskeletini oluşturur. Çift tabakalı lipid membranın sitoplazmik yüzünde yer alan bu protein hücrenin yapısal bütünlüğünün sürdürülmesini sağlar. Spektrin molekülleri birbirine kısa aktin filamentleri, plazma membranına ise ankirin köprüleri ile tutunmaktadır. Deformabilitesi yüksek membran protein iskeletinin yapısına katkıda bulunan diğer proteinler band 3 proteini ve band 4.1 proteinleridir (Şekil 1.1). Eritrosit membranı yapısında bulunan Na-K pompası "Adenozin trifosfat" (ATP az) aktivitesiyle elektrokimyasal gradiyente karşı hücre içine  $\text{K}^+$ , dışına  $\text{Na}^+$  iyonlarının aktarımını gerçekleştirmektedir. Bu işleviyle membran potansiyeli, hücre içi osmolarite ve dolaylı olarak da hücre hacmi üzerinde etkili olmaktadır [7].



**Şekil 1.1** Eritrosit hücre zarının sitoplazmik yüzündeki proteinlerin şematik gösterimi [7].

Eritrositlerin içindeki hemoglobin, dört tane Hem ( $\text{Fe}^{+2}$  protoporfirin IX) molekülünün her birinin demirleriyle bir globin molekülünün histidinlerine bağlanmalarından oluşmuş bileşiktir (Şekil 1.2) [8]. Sentezi polikromotofilik eritroblastlarda başlar. Hemoglobin yüksek konsantrasyonda oksijen bağlama yeteneğine sahiptir. Ferröz ( $\text{Fe}^{+2}$ ) şekildeki demir atomu geri dönüşümlü olarak oksijen bağlayabilmektedir [9].



Şekil 1.2 Hemoglobin molekülünün yapısı [8]

### 1.1.2 Eritrositlerde Enerji Sağlanması

Glukoz, eritrositlerin ihtiyaç duyduğu yakıt ham maddesidir. İnsülin bağımsız hücreler olan eritrositlere glukoz girişi hücre membranında yer alan glukoz taşıyıcı moleküller (Glu T-1 ve Glu T-3) aracılığı ile gerçekleşir. Bu taşıyıcılar düşük insülin salgılanmasında da hücreye glukoz girişine olanak sağlarlar [10]. Eritrosit içine alınan glukoz; glikoliz ve PFY ile metabolize edilir. Olgun eritrositlerde mitokondri ve diğer sitoplazmik organeller olmadığı için krebs siklusu ve oksidatif fosforilasyon gerçekleşemez. Bu hücreler 120 günlük ömürlerini sürdürebilmeleri için gerekli enerjiyi glukozun aerobik koşullarda bile laktik aside kadar yıkılmasını sağlayan glikoliz yoluyla sağlarlar. Normal şartlarda eritrositteki glukozun %90'ı glikoliz (Embden- Meyerhof yolu) ile kullanılır. PFY glukozun oksidasyonu için ikinci bir yoldur ve eritrosite alınan glukozun %10 kadarı bu yolda kullanılarak Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) ve riboz 5-fosfat elde edilir [11,12].

### 1.1.3 Eritrositin Oksidasyondan Korunması

Yağlar, proteinler, nükleik asitler ve karbohidratlar gibi tüm hücrenel bileşenler,reaktif oksijen metabolitlerine maruz kaldıklarında, fizyolojik ve yapısal hasara uğrayabilirler. Oluşan radikaller, hücre membranının önemli bileşenleri olan fosfolipidlerin oksidasyonuna yol açabilmekte, sonuç olarak membranın yapısı ve fonksiyonları bozulmaktadır. Proteinlerin oksidasyonu ise proteolize duyarlılığı artırmaktadır [13]. Bu ciddi tehlike karşısında canlıda hücrenel savunma sistemleri mevcuttur. Katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz gibi enzimler ile C vitamini, ürik asit, glutatyon, taurin, E vitamini ( $\alpha$ -tokoferol),  $\beta$ -karoten ve bilirubin savunma sisteminde görevliler olarak sayılan antioksidan bileşiklerdir [8].

Hemoglobinin hem kısmındaki iki değerlikli (ferröz) demir atomlarının üç değerlikli olan ferrik ( $Fe^{+3}$ ) hale yükseltgenmesiyle methemoglobin oluşur. Bu haliyle hemoglobin  $O_2$  ve  $CO_2$  taşıyamaz duruma gelir. Neticede fonksiyonel bir anemi ortaya çıkar. Bazı ilaçlar (lidokain, sülfonamidler, dapson, klorokin, primakin, fenasetin), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve serbest radikaller gibi ürünler methemoglobin oluşumuna neden olurlar [3]. Aslında sağlıklı insanlarda da methemoglobin oluşur. Ancak bu oran sadece toplam hemoglobinin % 1,5'u kadardır. Oluşan methemoglobinlerin belli bir kısmı bir dereceye kadar engellenebilir. Methemoglobin, başlıca NADPH' a bağımlı methemoglobin redüktaz olmak üzere , redükte glutatyon ve askorbik asit tarafından indirgenerek ferröz demirli hemoglobin haline dönüştürülür [3,14]. Oksidasyonun devam etmesi durumunda geri dönüşümsüz konformasyonel değişimlerle sülfhemoglobin ortaya çıkar. Hemoglobin denatüre olarak eritrosit içinde çöker. Sülfhemoglobin çökelekleri eritrosit hücre membranındaki sülfhidril grupları ile disülfid bağları yaparlar. Membrana bağlı görülen bu çökmüş bileşenler "Heinz cisimcikleri" olarak isimlendirilir [15].

Eritrositlerde peroksitlerin artışı hemoglobinin methemoglobine dönüşümüne, membran lipidlerinin ve hücre için yaşamsal önemi olan enzim yapısındaki proteinlerin oksidasyonuna neden olur. Eritrositlerde  $H_2O_2$ 'nin yıkımında katalaz

enzimi aktif rol üstlenir. Katalaz enzimi yapısında dört molekül NADPH taşımaktadır. NADPH yokluğunda bu enzim aktivite gösteremez. İndirgenmiş glutatyon molekülü NADPH ile yakından ilgilidir. GSH methemoglobinin indirgenmesi yanında katalaz enzimine de yardımcı olur. GSH bu işlevleri gerçekleştirirken yükseltgenmeyeceği için hızlı bir şekilde yenilenmesi yani indirgenmesi gereklidir. Bu indirgenme olayında NADPH'a ihtiyaç vardır. Sonuç olarak eritrosit hücre bütünlüğünün ve işlevlerinin sürdürülebilmesi için GSH'ye; sürekli tüketilen GSH'nin rejenerasyonu, methemoglobin redüktaz sisteminin ve katalaz enziminin işlevi için de NADPH'ye gereksinim vardır [14]. Eritrositte NADPH oluşumu için tek kaynak ise pentoz fosfat metabolik yoludur [16].

## **1.2 Pentoz Fosfat Metabolik Yolu**

Glukozun yıkıldığı glikoliz yolu, sitrik asit devri ve oksidatif fosforilasyonda amaç, glukozdan enerji üretmektir. Önemli bir metabolik yol olan PFY'nda ise glukozun kullanılmasının nedeni metabolik enerjinin, bir başka formu olan indirgeyici gücün üretilmesidir.

Pentoz fosfat metabolik yolu bazen pentoz yan yolu, heksoz monofosfat yolu veya fosfoglukonat oksidatif yolu olarak da isimlendirilebilir. Bu reaksiyonun aydınlatılmasında ilk adım, 1931 yılında Otto Warburg tarafından atılmış ve tamamı Fritz Lipmann, Frank Dickens, Bernard Horecker ve Efraim Racker isimli biyokimyacılar tarafından ortaya konulmuştur [17,18].

Tüm glukozun glikolitik yolla yıkıldığı iskelet kası ve beyin gibi dokularda PFY'nun aktivitesi düşüktür. Bununla birlikte aktif yağ asidi ve kolesterol sentezinin olduğu karaciğer, adrenal korteks ve süt üreten meme dokusunda glukoz oksidasyonunun önemli bir kısmı PFY ile gerçekleşmektedir [19,20].

PFY eritrosit ve beyin hücreleri gibi bazı hücrelerin temel enerji kaynağı olan glukozun oksidasyonu için tek oksidatif yoldur [21]. PFY glikoliz yoluna bir alternatif olarak düşünülse de her iki yolun hücredeki fonksiyonları ve hücredeki ihtiyaç alanları farklıdır. Bu yolun en önemli ürünleri NADPH ve riboz 5-fosfattır.

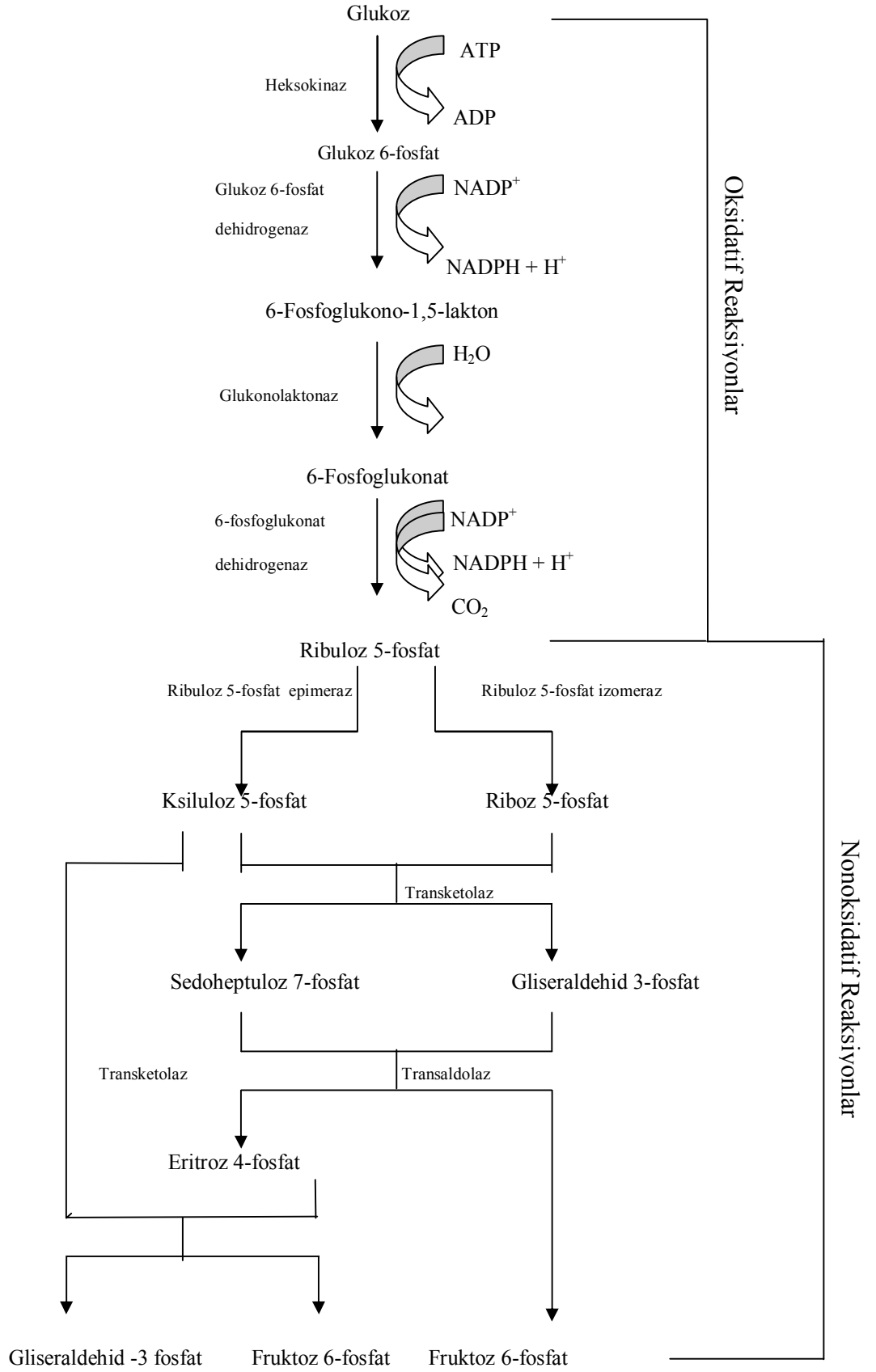
NADH ile aynı redoks potansiyeline sahip olan NADPH, farklı amaçlar için kullanılmaktadır. Mitokondride katabolik substraların hidrojenleri, NAD<sup>+</sup> ile elektron transport zincirine taşımaktadır. Buna karşılık NADP<sup>+</sup> tarafından taşınan hidrojenler sitoplazmada indirgen biyosentezlerde kullanılmaktadır [19,20]. PFY ile sentezlenen riboz 5-fosfat ise canlı metabolizması için çok önemli olan ATP, NAD<sup>+</sup>, FAD<sup>+</sup>, DNA, RNA gibi bileşiklerin sentezlenmesinde görev almaktadır.

PFY tepkimeleri ile sitoplazmada [NADPH] / [NADP<sup>+</sup>] oranı arttırılmaktadır. Yemek sonrasında karaciğer hücrelerindeki NADPH miktarı, NADP<sup>+</sup> ile karşılaştırıldığında 50-100 kat daha fazla bulunmaktadır. Bu durum NAD<sup>+</sup> ile karşılaştırıldığında belirgin bir fark ortaya çıkmaktadır. Aerobik koşullarda NAD<sup>+</sup>, NADH miktarından 100 kat daha fazladır. Bu nedenle hücre indirgen biyosentezler için NADH yerine NADPH kullanmayı tercih etmektedir [19,20].

PFY Şekil 1.3'te belirtildiği gibi oksidatif ve nonoksidatif olmak üzere iki aşamada gerçekleşir [22]. PFY'nun oksidatif bölümü G6PD enziminin glukoz-6-fosfatı (G6P) 6-Fosfoglukono-1,5-lakton'a dönüştürmesi ile başlamakta ve bir dizi tersinmez (geri dönüşümsüz) tepkime ile indirgen biyosentez tepkimelerinde kullanılan NADPH üretilmektedir. NADPH;

- Yağ asitlerinin biyosentezi ve zincir uzatma reaksiyonlarında,
- Steroidlerin biyosentezinde,
- Bazı aromatik aminoasitlerin biyosentezinde,
- Okside glutatyonun (GSSG) indirgenmesinde,
- DNA sentezi sırasında ribonükleotidlerin deoksiribonükleotidlere dönüştürülmesinde,
- Nörotransmitter sisteminde,
- Peroksitlerin, ilaçların ve ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda,
- Methemoglobinin hemoglobine dönüşümünde,
- Glukuronik asid yolunda,
- L-askorbik asid sentezinde,
- Hücre zarının bütünlüğünün korunmasında kullanılmaktadır [23-25].

Buna karşılık PFY'nun oksidatif olmayan bölümündeki tersinir (geri dönüşümlü) tepkimeler ile glikolitik ve glukoneogenik yollara bağlantı sağlanmakta ve riboz 5-fosfat üretilmektedir [19,20]. Pentoz fosfat metabolik yolu aynı zamanda üç, dört, beş, altı ve yedi karbonlu şekerlerin oksidatif olmayan bir seri reaksiyonla birbirlerine dönüştürülmesini de katalizler [18,26]. PFY'nun oksidatif ve nonoksidatif reaksiyonları Şekil 1.3'de gösterilmiştir.



Şekil 1.3 Pentoz fosfat Metabolik Yolu [27]



### 1.2.1 Hücre İçinde G6P'ın Kullanımının Kontrolü

Hücrenin NADPH veya riboz-5-fosfata olan ihtiyacına göre PFY farklı şekillerde çalışmaktadır [28].

**1) Hücrenin riboz-5-fosfat gereksiniminin daha fazla olması halinde** oksidatif yolun yanı sıra oksidatif olmayan yol tepkimelerinin ters yönde kullanılması ile riboz-5-fosfat sentez edilmektedir. Bu durum özellikle iskelet kası gibi glukoz-6-fosfataz aktivitesinin oldukça düşük olduğu fakat buna karşılık yeterli nükleotid konsantrasyonunun sağlanması gereken dokularda geçerlidir.

**2) Riboz-5-fosfat ve NADPH gereksinimlerinin dengede olduğu koşullarda** ise oksidatif yol ve oksidatif olmayan reaksiyonlarda her iki ürün meydana gelmektedir [19,20].

**3) Hücrenin NADPH gereksiniminin daha fazla olması halinde** oksidatif ve oksidatif olmayan yollarda birlikte oluşan fruktoz-6-fosfat ve gliseraldehit-3-fosfat, glukoneogenik tepkimeler ile tekrar glukoz-6-fosfata çevrilmektedir. Bu durumda döngüsel bir yol izleyen metabolik yollarda bir glukoz molekülünden CO<sub>2</sub> ve NADPH elde edilmektedir [19,20].

**4) Riboz 5-fosfattan daha fazla NADPH' a ve bununla birlikte ATP'ye ihtiyaç duyduğu** durumda; glukoz 6-fosfat pürivata dönüşür. Riboz 5-fosfattan türetilen fruktoz-6-fosfat ve gliseraldehit-3-fosfat glukoneogenez yerine glikoliz yoluyla pürivata kadar yükseltgenir. Bu arada NADPH ve ATP beraberce sentezlenmiş olur [28].

PFY ile üretilen NADPH'nin indirgenme olayındaki rolü nedeniyle yüksek oksijen parsiyel basıncı altındaki hücrelerde PFY aktif şekilde çalışmaktadır. Yukarıda bahsedilen PFY'nun ürüne bağlı ihtiyaca göre düzenlenmesinin yanında kısa süreli düzenlemelerde G6PD, yüksek [NADPH]/[NADP<sup>+</sup>] oranı ile inhibe

olmaktadır. NADPH kullanımındaki artış, PFY'nun oksidatif bölümünün aktivitesini arttırmaktadır [19,20,29].

### 1.3 G6PD Enzimi

#### 1.3.1 G6PD Enziminin Önemi

Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (D-Glukoz 6-fosfat: NADP<sup>+</sup> oksidoredüktaz, EC 1.1.1.49, G6PD), NADP<sup>+</sup>'nin indirgenmesiyle birlikte glukoz 6-fosfatın 6-fosfoglukono-1,5-lakton'a dönüşmesini katalizleyen düzenleyici bir enzimdir. Bu reaksiyon PFY'nun ilk ve hız sınırlayıcı basamağıdır [30].

Bu enzimin, NADP<sup>+</sup>-glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, Zwischenferment, D-glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (NADP<sup>+</sup>), NADP<sup>+</sup>-bağımlı glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, 6-fosfoglukoz dehidrogenaz, Entner-Doudoroff enzim ve glukoz-6-fosfat 1-dehidrogenaz gibi isimleri de bulunmaktadır [31].

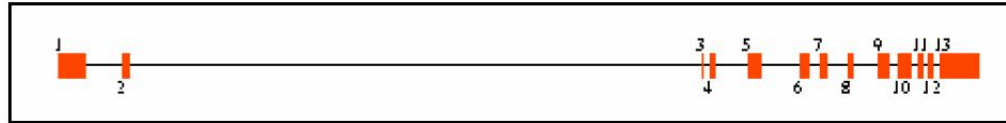
Enzim 1931 yılında Otto Warburg ve W.Chiristian tarafından at eritrositlerinde tanımlanmıştır. 1936 yılında kısmen saflaştırılmış ve çeşitli organizmalarda çalışmalar yapılmıştır. Lipman, Diskens, Horecker ve Racker tarafından PFY'da tanımlanmıştır.

G6PD bakteri, protozoa, mantar, sinek, sıçan, balık ve memeliler olmak üzere geniş bir canlı topluluğunda bulunmaktadır. Çoğunlukla sitoplazmada peroksizom, endoplazmik retikulum, lizozom, kloroplast ve mitokondri gibi çeşitli organellerde de tespit edilmiştir [32-35]. G6PD enzimi G6P'nin 6-fosfoglukono-1,5-laktona dönüştüğü reaksiyonu katalizler. G6PD ile katalizlenen reaksiyon termodinamik açıdan geri dönüşümlü olmasına rağmen, G6P'nin oksidasyonunun ürünü olan D-glukonolaktonun hızlı bir şekilde hidroliziyle geri dönüşümsüz hale gelmektedir. Bu hidroliz pH bağımlıdır, pH 6,4 ve 28°C'de laktonun yarı ömrü 24 dakika, pH 7,4'te ise yaklaşık 1,5 dakikadır [26]. G6PD aktivitesi beslenme, hormonlar ve özellikle

NADPH konsantrasyonuna bağlı olarak değişmektedir [36]. Beslenmenin ve hormonların enzim üzerinde uzun süreli etkisi kaba kontrol, NADP+/NADPH oranı ile kontrol ise kısa süreli ince kontroldür [22]. Ayrıca, “Epidermal Growth Factor” ve “Platelet Growth Factor” hormonları G6PD aktivitesini %25-27 oranında arttırmaktadır [37]. Aynı şekilde “Nerve Growth Factor”ün G6PD, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin sentezini uyararak hücreyi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye karşı koruduğu düşünölmektedir [38].

### 1.3.2 G6PD Enziminin Genetik Yapısı

G6PD geni 1986 yılında klonlanmıştır [39,40]. G6PD enzimini kodlayan gen 20114 bç (baz çifti) uzunluğunda, 13 ekzon ve 12 intron bölgesinden oluşmaktadır (şekil 1.4) ve X kromozomunun uzun kolu üzerinde q28 lokusuna yerleşmiştir. G6PD geni yaklaşık 20 kb (kilo baz) , genin kodladığı mRNA ise 2269 bç uzunluğundadır [41]. Enzimin monomeri 515 aa (amino asit) uzunluğundaki G6PD enzimini, genin 1545 bç uzunluğundaki şifrelenen 22 bölgesi kodlamaktadır. En kısa ekzon 38 bç'nden oluşan 3. ekzon, en uzununu 771 bç' den oluşan 13. ekzondur. 2. intron dışındaki bütün intronların uzunluğu 300 bç den kısadır. İkinci intron 11 kb, uzunluğundadır. 2625 bç uzunluğundaki G6PD mRNA'sından ekzon 1'in tamamı, ekzon 2'nin ilk 8 bç, ekzon 13'ün ilk 88 bç ve 3' ucundan 608 bç proteine dönüştürölmez [40,41,43-48].

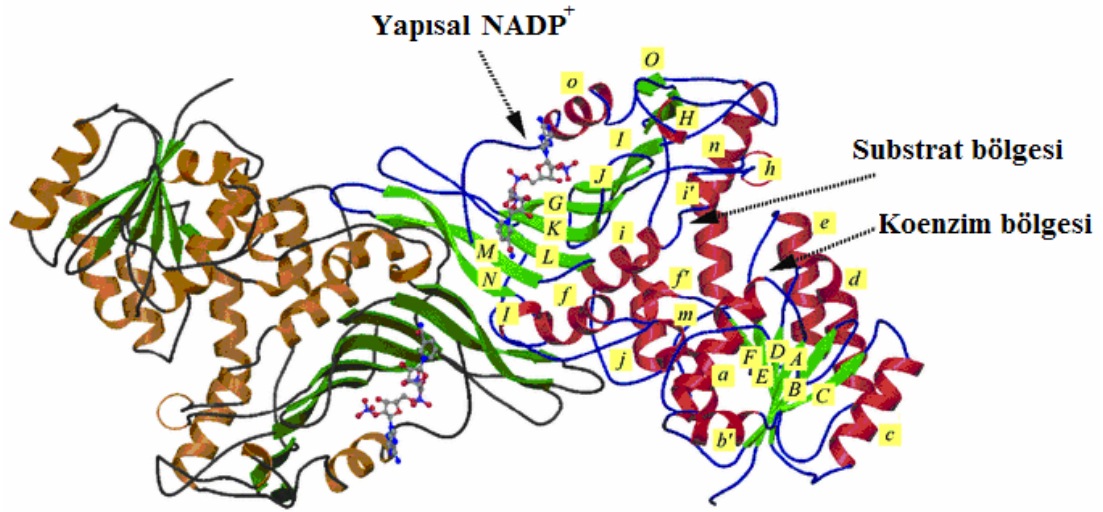


şekil 1.4 G6PD enzimini kodlayan genin 12 intron 13 ekzon bölgesi [48]

### 1.3.3 G6PD Enziminin Biyomolekölör Yapısı

G6PD bakteri, bitki, böcek, mantar, balık ve memelileri içeren geniş bir canlı topluluğunda bulunmaktadır. Bu yüzden geniş bir araştırma sahası meydana gelmiştir.

Tüm dokularda bulunan enzim, aynı tip monomerlerin biraraya gelmesi ile oluşan, dimerik, tetramerik ve heksamerik yapılar şeklinde bulunabilir. Enzim genellikle aktif olarak dimerik yapı gösterir (Şekil 1.5) ve her alt birim iki molekül  $\text{NADP}^+$  ile bağlanmış şekilde yaklaşık 59256 dalton molekül ağırlığına sahiptir. Enzimin dimerik ya da tetramerik formunu sıcaklık, enzim, NADPH konsantrasyonu gibi çeşitli faktörler etkilemektedir. Yüksek pH ve iyonik kuvvet dimer, düşük pH ve iyonik kuvvet ise tetramer oluşumuna neden olur [26]. Monomerlerin amino asit sıralarında türler arası benzerlik olmakla beraber primer, sekonder ve tersiyer yapıları arasında farklılıklar vardır. Primer yapısı bakteriden insana kadar %39'u korunmuş ve 64 amino asidi her türde aynıdır. Enzimin amino ve karboksil uçlarındaki amino asit dizileri için kesin bir bilgi bulunmamaktadır. Bazı çalışmalar, amino ucunda glisin varlığını, son çalışmalarda karboksil uca ise lösin amino asidinin bulunduğunu göstermektedir

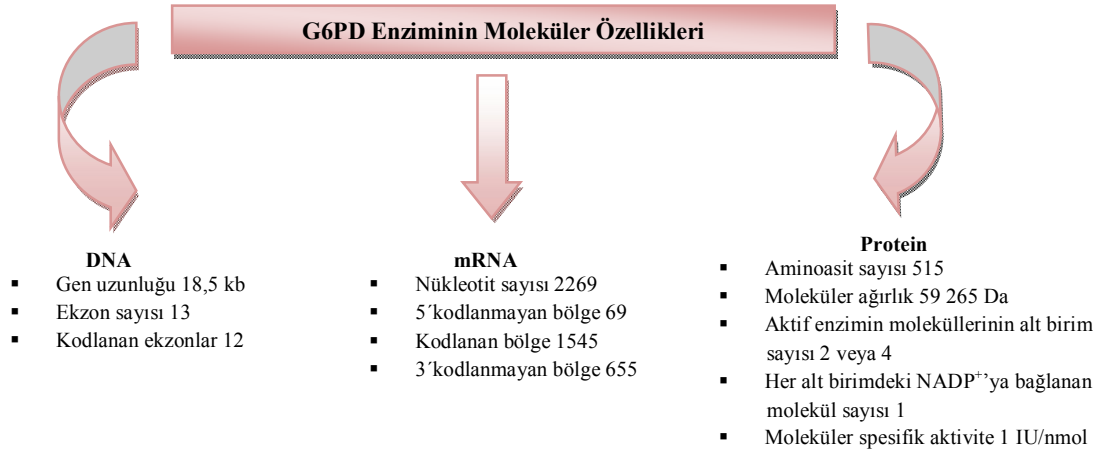


Şekil 1.5 Aktif G6PD dimerinin üç boyutlu modeli [49]

İnsan G6PD'sinin her alt biriminde "Yapısal  $\text{NADP}^+$ " adı verilen ve enzimin kararlılığı için gerekli olan  $\text{NADP}^+$  molekülü bulunmaktadır. Ayrıca enzimin katalitik aktivitesi için gerekli olan "Koenzim  $\text{NADP}^+$ " molekülü vardır. Bu  $\text{NADP}^+$  molekülünün, enzimdeki dinükleotid bağlanma bölgesinde bulunan 41. aminoasit olan Glisin 41 ve Aspartik asit 42 ile etkileşime girdiği tahmin edilmektedir. "Yapısal  $\text{NADP}^+$ " deki adenin molekülünün Tirozin 503 ve Arginin 487 arasında;

nikotinamid molekülünün ise Triptofan 509 ile Tirozin 401 arasında enzime bağlandığı düşünülmektedir. Bu “Yapısal NADP<sup>+</sup>” molekülündeki 2'-fosfat grubu Arginin 487, Arginin 357, Lizin 238 ve Lizin 366 ile hidrojen bağı oluştururken, bisfosfat grubu Arginin 370 ile etkileşim halindedir. Nikotinamid molekülündeki amid grubu ise Arginin 393 ve Aspartik asit 421 ile etkileşim içindedir. Bütün bu etkileşimler göz önünde bulundurulduğunda, “Yapısal NADP<sup>+</sup>” nin ortamdan ayrılması durumunda enzimdeki alt birimlerin hepsinde yapısal bütünlüğün bozulabileceği düşünülmektedir [50].

G6PD'nin moleküler özellikleri Şekil 1.6'da belirtilmektedir.



**Şekil 1.6** İnsan G6PD Enziminin Moleküler Özellikleri

### 1.3.4 G6PD Enziminin Spesifik Özellikleri

G6PD enziminin, substratı olan G6P'ı, açık-zincir (Fischer formülü) halinde mi yoksa piranoz halkası (Haworth formülü) şeklinde mi kullanıldığı araştırılmış ve bütün G6PD enzimlerinin substratını  $\beta$ -D-glukopiranoz-6-fosfat şeklinde kullandığı tespit edilmiştir. G6PD enziminin anomerik C atomu spesifitesi fizyolojik açıdan incelenmiş, G6P'ı kullanan çeşitli enzimlerin anomerik özgülüğünün birbirinden farklı olduğu belirtilmiştir [51].

G6PD enziminin katalizlediği reaksiyonda, anomerik C atomundaki hidrojenin doğrudan koenzim olan NADP<sup>+</sup> molekülündeki nikotinamid kalıntısına β-pozisyonundan taşındığı belirtilmiştir. Bu olay ilk defa Stern ve Vennesland tarafından NADP<sup>+</sup>-spesifik olan *S. carlbergensis*'te gösterilmiştir [52].

Çeşitli memeli dokularından elde edilen G6PD enzimleriyle yapılan çalışmalarda, hepsinin NADP<sup>+</sup> için spesifik olduğu bildirilmekte iken sıçan meme bezlerinden ve bazı memeli dokularından Levy (1961) tarafından saflaştırılan G6PD enzimlerinin, yüksek konsantrasyonlarda koenzim olarak NAD<sup>+</sup>'ı kullanabildiği tespit edilmiştir [53] ve G6PD enzimleri 5 ana sınıfta toplanmıştır:

**1. NADP<sup>+</sup>'ye Spesifik G6PD Enzimleri:** Bu enzimler NAD<sup>+</sup> ile reaksiyon vermezler [52,54-60].

**2. NADP<sup>+</sup>'yi Tercih Eden G6PD Enzimleri:** Bu enzimler yüksek konsantrasyonda NAD<sup>+</sup>'yi kullanabilirler, ancak fizyolojik koşullar altında NADP<sup>+</sup>'yi tercih ederler [61,62].

**3. Hem NADP<sup>+</sup>'yi Hem de NAD<sup>+</sup>'ı Kullanan G6PD Enzimleri:** Bu enzimler, fizyolojik koşullar altında koenzim olarak her iki molekülü de kullanırlar [63-65].

**4. NAD<sup>+</sup>'ı Tercih Eden G6PD Enzimleri:** Bu enzimler, hem NAD<sup>+</sup>'yi hem de NADP<sup>+</sup>'yi koenzim olarak kullanabilirler, fakat fizyolojik şartlarda sadece NAD<sup>+</sup> ile reaksiyon verirler [66,67].

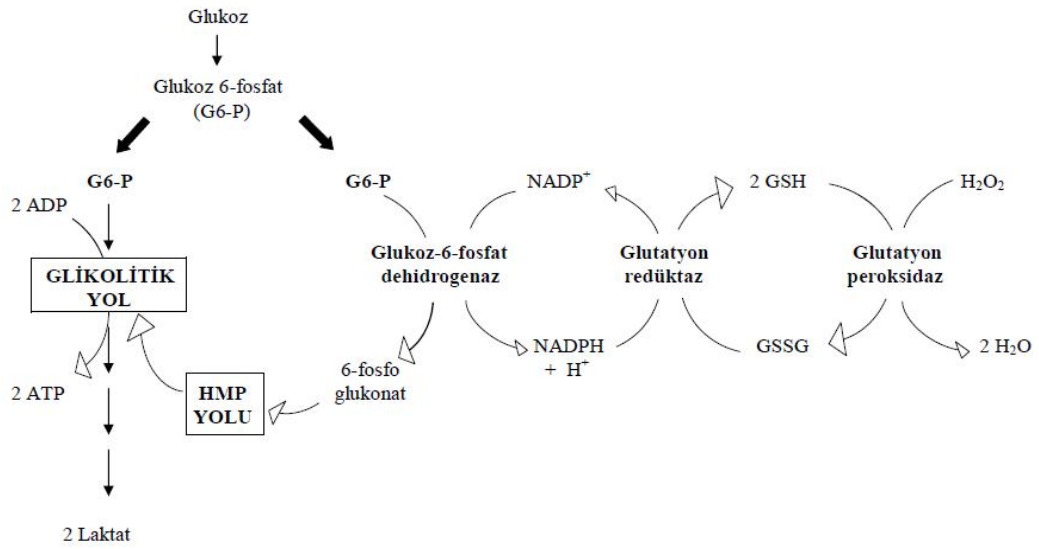
**5. NAD<sup>+</sup>'a Spesifik G6PD Enzimleri:** Bu enzimler sadece NAD<sup>+</sup> ile reaksiyona girerler [68].

G6PD enzimlerinin çoğunluğu bu grupların ilk üçüne dahildir, sadece az bir kısmının diğer iki gruba ait olduğu belirtilmektedir [26].

### 1.3.5 G6PD Enziminin Eksikliği

#### 1.3.5.1 G6PD Enziminin Eksikliğinin Metabolik Etkisi

Eritrositlerde NADPH oluşumu hayati bir önem taşımaktadır. NADPH, birçok indirgeyici biyosentez olaylarının meydana gelmesinde, sülfhidril gruplarının sürekliliğinin sağlanmasında, serbest radikallerin ve peroksitlerin detoksifikasyonunda görev alan indirgenmiş glutatyonun oluşumunda indirgeyici rol oynar [18].



**Şekil 1.7** PFY ile glikolitik yolun bağlantısı ve hidrojen peroksidin glutatyon aracılığıyla indirgenmesi [69]

G6PD enzimi eksikliği olduğunda NADPH üretimi önemli derecede azalır. G6PD nin çok önemli bir enzim olduğu bu olay ile çok iyi anlaşılmaktadır. NADPH 'ın eritrositlerdeki en önemli rolü glutatyonu indirgemek olduğunu belirtmiştik. G6PD eksikliği olanlarda hemoliz yapan maddelerin verilmesi durumunda onların kendisi veya metabolitleri hemolize karşı dayanıklılığı sağlayan indirgenmiş glutatyonu(GSH) oksitleyerek (GSSG-okside glutatyon) inaktive ederler (Şekil 1.7). Bunun sonucunda eritrositlerde hemoliz meydana gelir. Hemoliz oluşumundan hemen önce eritrosit GSH düzeyi azalır ve GSSG artar. GSSG hücreden dışarı çıkar ve hücre içi total GSH miktarı azalır. Eritrosit membran proteinlerindeki sülfidril

gruplarının oksidasyonu membran fonksiyonunu bozar ve dalakta, daha ağır durumlarda ise karaciğerde de eritrositlerin erken yıkımına neden olur [70].

G6PD eksiği olan bireyler kimyasal maddeye bağlı oksidatif hemolize duyarlıdır. Pro-oksidatif özelliği olan Çin bitkisel ilaçlarının G6PD eksikliği olan kan örnekleri üzerine bir çalışma yapılmıştır. Amaç Çin'de yaygın olarak kullanılan 18 tane bitkisel ilacın G6PD enzimi üzerine pro oksidatif etkilerinin incelenmesidir. Normal ve G6PD eksiği olan tüm kan örnekleri bitkisel ilaçların sulu ekstraktları ile inkübe edilmiştir. GSH ve methemoglobin (MetHB) seviyeleri biyokimyasal analizlerle tayin edilmiştir. *Rhizoma coptidis* kontrol grubuna karşı G6PD eksiği olan eritrositlerdeki GSH seviyesini belirgin bir seviyede azalttığı, MetHB seviyesini arttırdığı gözlenmiştir. Dolayısıyla G6PD eksiği olan bireyler bu pro-oksidatif bikilerin tüketimini sınırlandırmaları gerektiği açıklanmıştır [71].

G6PD eksikliği üzerine yapılan bir çalışmada; yaşları 0,5-6 arasında değişen 1183 çocuktan kan örnekleri alınmış ve 3 çocukta enzim aktivitesi ve hemoglobin oranına bakılarak G6PD eksikliği tespit edilmiştir. G6PD enziminin bazı kinetik özellikleri incelenmiş, bunun sonucunda G6PD eksikliği olan bireylerde optimum pH değerlerinin normal insanlardan daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Normal insanlarda pH= 8 iken G6PD eksikliği olan kişilerde pH' ın 8,5 ile 9 arasında olduğu anlaşılmıştır. Sıcaklığın enzim aktivitesine etkisi incelenmiş, 0-60 °C arasında G6PD aktivitelere bakılmıştır. G6PD eksikliği olan kişilerde 40-45 °C arasında maksimum aktivite gözlenmiştir. Dolayısıyla sağlıklı insanlara göre G6PD eksikliği olan kişilerde enzimin sıcaklığa daha kararlı olduğu görülmüştür. Bazı ilaçların inhibitör etkileri incelendiğinde sodyum ceftizoxime hariç diğer ilaçların inhibitör etkisine G6PD eksiği olan kişilerin direnç gösterdiği gözlenmiştir. Bu ilaçlar netilmicin, sodyum cefuroxime, streptomycin, metamizol'dır. Bazı G6PD eksikliği olan bireylerde streptomycin ve metamizolün enzimi aktive ettiği gözlenmiştir [72].



### 1.3.5.2 G6PD Enziminin Eksikliğinin Coğrafik Dağılımı

G6PD eksikliği ilk olarak primakin alanlarda belirlendiği için bu genetik defekt önceleri “primakin duyarlılığı” Şeklinde isimlendirilmiŐtir. Fava fasulyesi yenildiği zaman ortaya çıktığı için bu hastalığa bazen favizm adı da verilmektedir [73,74]. G6PD eksikliği esas olarak Afrika, Akdeniz bölgesi, Orta Doğu, Güneydoğu Asya, Kafkas halklarında ve onların soylarından gelenlerde görülmektedir.[73,75]. Bazı kaynaklarda ise İspanyol Yahudileri, Yunanlılar, Çinliler, Filipinliler, Endonezyalılar ve Hintliler’de %5-40 oranında bu enzimin eksikliğinin görüldüğü belirlenmiştir [76].

Türkiye’de enzimin eksikliği daha çok Çukurova ve Van’ın BaŐkale ilçesinde olmak üzere birçok farklı bölgede görülmektedir. Türkiye’nin batı bölgesinde G6PD enzim eksikliği üzerine yapılan bir çalışmada lökositoz ve trombositoz kanıtı bulunmayan klinik olarak sağlıklı 1421 birey incelenmiş ve G6PD aktivitesi ölçülmüŐtür. Bu çalıŐmanın amacı, G6PD eksikliği olan asemptomatik taŐıyıcıları (bunlar genellikle G6PD eksikliğinin farkında değillerdir) favizm hakkında bilgilendirmektir. Sağlıklı erkeklerde G6PD’nin normal değerleri  $8,94 \pm 8,65$  IU/g Hb iken sağlıklı bayanlarda  $9,16 \pm 3,78$  IU/g Hb olarak tespit edilmiştir. Bayanlarda Őiddetli ve orta Őiddetli G6PD eksikliğinin sıklığı sırasıyla %0,44 ve %6,07 iken erkeklerde ise %7,24’tür. Tüm görülme sıklıkları içinde G6PD eksikliği fenotipi %6,9 olarak tespit edilmiştir. Türkiye’nin batı bölgesinde G6PD eksikliği fenotipinin sıklığı oldukça yüksek olmasına rağmen, erkekler ve kadınlar arasında G6PD aktivitesi arasında belirgin istatistiksel bir fark görülmediği belirtilmiştir. Çalışmada, sıtmanın oldukça yaygın olduğu bilinen Türkiye’nin bu bölgesinde yaŐayan hastalara primakin gibi anti malarial ilaçlar reçete edilmeden önce G6PD eksikliğinin taranması gerekliliği vurgulanmıŐtır [77].

G6PD eksikliği üzerine yapılan bir başka çalışmada, üç boyutlu modelleme yöntemi ile G6PD’nin kristal yapısında Alman soyunun 6 G6PD varyantı analiz edilmiştir. Alman popülasyonundaki tüm mutasyonların ya G6P, ya  $NADP^+$  birimlerinden birine yakın, ya da iki monomerin ara yüzeyinde olduğu belirtilmiştir.  $G6PD_{Vancouver}$ ’ın üç mutant aminoasidinden ikisi  $NADP^+$ ’nın bağlama

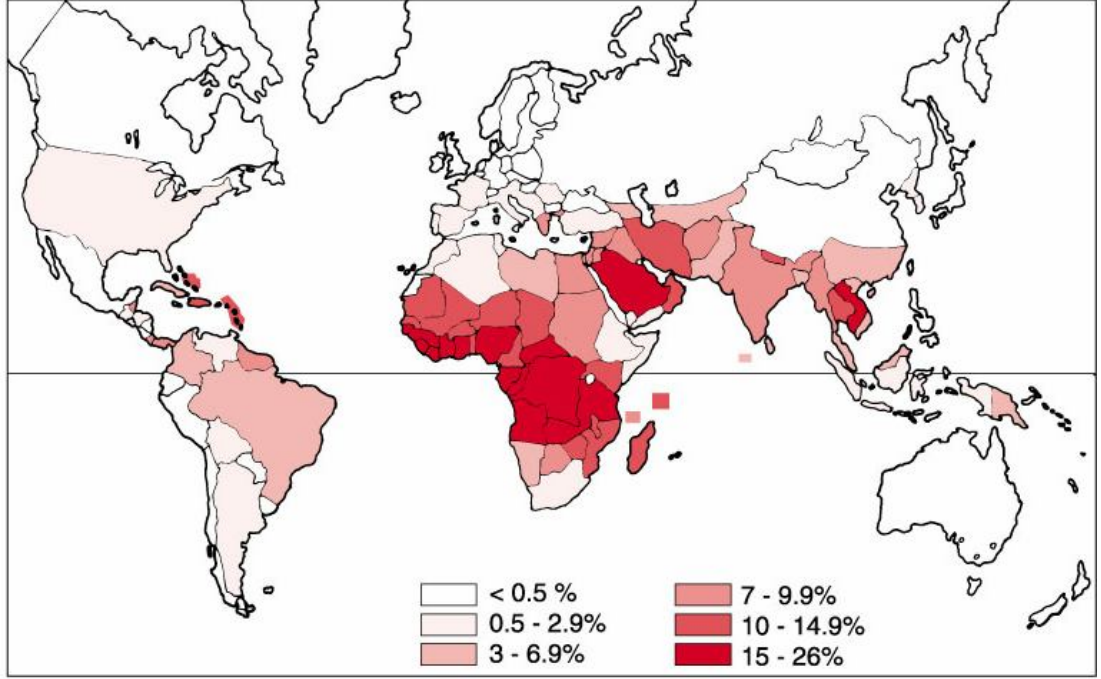
bölgesine yakın olduğu, G6PD<sub>Aachen</sub> mutasyonu da ikinci NADP<sup>+</sup> birimine yakın olduğu, G6PD<sub>Wayne</sub> mutasyonu G6P bağlama bölgesine yakın olduğu belirtilmiştir. Bu mutasyonların G6P ve NADP<sup>+</sup> birimlerinin bağlanmasını etkileyebildiği, G6PD<sub>Munich</sub>, G6PD<sub>Riverside</sub> ve G6PD<sub>Gastonia</sub> mutasyonlarının ise iki monomerin arayüzeyine yakın olduğu tespit edilmiştir. G6PD varyantları diğer popülasyonlardan gelen mutantlarla karşılaştırılabilirler ve doğal seleksiyondan kurtulan G6PD varyantlarının nedeni tartışılabilir. Bu çalışmada Alman orijinli altı G6PD varyantı içinde yapısal modifikasyonun üç boyutlu lokalizasyonu incelenmiştir. İlginç olan yağın akdeniz varyantlarının hiçbirinin henüz Almanya'da bulunmamasıdır. G6PD eksikliği avrupa boyunca dağılım göstermesine rağmen, G6PD eksikliğinden sorumlu Akdeniz mutantlarının niçin Alman popülasyonunda bulunmadığı düşünülmektedir [78].

Drousiotou ve arkadaşları, Kıbrıs'ta iki farklı yetişkin popülasyon grubunda farklı yöntem kullanarak G6PD eksikliğinin sıklığını tayin etmişlerdir. Semikantitatif prosedürle toplam 391 örnekten 196 erkek içerisinde 10 tanesinde enzimin eksikliği görülmüştür (%5,1). 195 dişiden sadece 2 tanesinde enzim eksikliği bulunmuştur. Bunlardan bir tanesinin homozigot olduğu tespit edilmiştir. Kantitatif yöntemde ise toplam 312 örnek içinden 172 erkekte 11 tanesinde bu enzimin eksikliği gözlenmiştir (%6,4). 140 dişiden 8 tanesinde enzimin kısmi eksikliği tespit edilmiştir. Ayrıca Kıbrıs'lı yetişkin erkeklerde G6PD eksikliği %6,4 olarak tespit edilmiş ve 5 mutasyonun olduğu genetik heterojenlik görülmüştür [79].

Yapılan bir çalışmada G6PD eksikliği ile NEC hastalığı (yeni doğan normal altı bebeklerde görülen barsaklardaki bir kısım dokuların hasar görmesi) arasında bir ilişki olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada hastanenin yeni doğan bakım ünitesinde birkaç bebekte G6PD enzim eksikliği görülmüştür. Aynı bebeklerin barsaklarındaki doku hasarında G6PD eksikliğinin risk faktörü oluşturduğu sonucuna varılmıştır [80].

Genetik bir rahatsızlık olan G6PD eksikliğinin ayrıca Eti Türklerinde %11,4, Çukurova bölgesinde %8,2, Kıbrıslılarda %3,5 oranında dağılım gösterdiği belirtilmektedir [81].

Dünya üzerindeki G6PD enzimi eksikliğinin coğrafik dağılımı Şekil 1.8’de belirtilmektedir.



Şekil 1.8 G6PD Enzimi Eksikliğinin Dünya Üzerindeki Dağılımı [82]

### 1.3.6 Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz Enziminin Saflaştırılması

PFY’nun ilk ve düzenleyici enzimi olan G6PD 1931 yılında Warburg ve Christian tarafından at eritrositlerinde keşfedilmiş ve “Zwischenferment” adı verilmiştir [83].

G6PD enzimi saf olarak ilk kez 1936 yılında *Brewers* mayasından Noltmann, Gubler ve Kuby tarafından kristal yapıda elde edilmiş [84,85], daha sonra diğer memeli eritrositlerinde keşfedilmiştir [86]. G6PD enzimi insan eritrositlerinden 1961’de Marks ve arkadaşları; 1962’de Kirkmann ve Hendrickson; 1963’te Chung ve Langdon; 1965’te Luzzatto ve Allen tarafından saflaştırılmıştır [87]. G6PD enzimi, insan eritrositlerinden 1966 yılında Yoshida tarafından homojen halde ve en

yüksek saflık derecesine sahip olarak (258 000 kat) saflaştırılmış ve spesifik aktivitesi 750 U/mg protein olarak bulunmuştur.[88].

Daha sonraki yıllarda, çeşitli bitki, hayvan ve mikroorganizmalardan bu enzimin izolasyonu ve kinetik parametreleri üzerine çalışmalar yapılmış, enzime ait moleküler, katalitik ve düzenleyici özelliklerine ait bilgiler elde edilmiştir.

G6PD enziminin izolasyonu üzerine yapılan bir çalışmada, pirinç kamışı hidrolizatı üzerinde büyütülen *Candida guilliermondii*'den G6PD enzimi elde edilmiştir. Bunun için öncelikle *Candida guilliermondii* hücrelerinin pirinç kamışı hidrolizatında kültürü yapılmıştır. Bunlar bilyeler kullanılarak vortex çalkalaması ile parçalanmış ve hücre süspansiyon konsantrasyonu ile işlem zamanının G6PD salımı üzerine etkisi incelenmiştir. Hücre parçalama, hücre içi enzimlerin mikroorganizmalardan elde edilmesinde kullanılan önemli bir yöntemdir [89,90]. Bu çalışma düşük maliyetli hemiselülozik hidrolizatlar kullanılarak *C. guilliermondii*'den önemli bir hücre içi enzim olan G6PD'nin elde edilmesi dolayısıyla ekonomik açıdan bakıldığında oldukça ilginç sonuçlar getirmiştir. Üstelik vortex ile çalkalamada bilyeler kullanılarak hücre parçalanmasında hızlı, basit ve çabuk çoğalmayı sağlayan bir metot uygulanmıştır [91].

Genellikle sitoplazmik bir enzim olan G6PD enziminin saflaştırılmasında önceleri CM-selüloz (karboksimetil), DEAE-selüloz (diethylaminoetil) ile yapılan kolon kromatografisi yöntemleri kullanılmıştır [92]. Daha sonraki yıllarda bu yöntemlere ilave olarak jel filtrasyon kromatografisi, hidroksiapatit kolon kromatografisi, etanol çöktürmesi ve ultrasantrifigasyon metodları uygulanmıştır [93-95].

Afinite kromatografisi yöntemi için özel ligandların geliştirilmesiyle G6PD enzimi daha kısa sürede ve iyi bir yüzde verimle saflaştırılabilmektedir [96]. Afinite kromatografisi çok basamaklı saflaştırma işlemleri sırasında enzim aktivitesinde oluşabilecek kayıpları ortadan kaldırmak ve yüksek bir verim elde etmek için çok sık kullanılan önemli bir saflaştırma metodudur. Son yıllarda G6PD enzimi saflaştırılması üzerine yapılan çalışmalarda bizimde çalışmamızda kullandığımız

2', 5' ADP-Sepharose 4B afinite kromatografisi kullanılmaktadır. Bu yöntem ilk olarak Flora ve arkadaşları tarafından bulunmuştur [97]. Bu yöntemde ligand olarak kullanılan metaryel G6PD'nin kuvvetli inhibitörü olan orto fosfattır.

G6PD enzimi protozoa [55], bakteri [58], mantar [98], sinek [99], sıçan [100], balık [101] ve memelilerin hemen hemen bütün dokuları olmak üzere geniş bir canlı topluluğunda bulunmuştur. Bunlara ek olarak tavşan karaciğer mikrozomunda ve kemik iliğinde de bu enzimin olduğu tespit edilmiştir [102]. G6PD enzimi çeşitli insan dokularından elde edilmiştir. İnsan eritrositlerinden [87, 88,100,103-108], insan beyni, trombositleri, böbrek ve karaciğerinden [49, 111] ve insan plasentasından [108,109] saflaştırılmış ve bu enzimin bazı kinetik özellikleri incelenmiştir. G6PD enzimi hayvan dokularından koyun eritrositleri ve göz lensinden [110], Van Gölü balığından (*Chalcalburnus tarischii*) [101], sığır eritrositlerinden, adrenal korteksinden, lensinden [63, 109, 108], tavşan beyin korteksinden, ince bağırsağından, eritrositleri ve retikülositlerinden [98,111], kaz eritrositlerinden [112], laktasyondaki sıçan meme bezlerinden [113,106,114], sıçan karaciğeri, böbreği, yumurtalıkları ve beyninden [115-121], fare böbreklerinden [122,123], tavuk karaciğerinden [124], domuz beyni, ince bağırsağı ve karaciğerinden [56, 105,125], köpek karaciğerinden [126], farklı metotlarla saflaştırılarak kinetik özellikleri incelenmiştir. Bitkilerden ise bezelye yapraklarından [127], patatesten [86,128], arpa ve arpa köklerinden [129,130,134], soya fasulyesi yumrularından [132], ıspanaktan [34,133], mısır yapraklarından [134], fındık (*Corylus avellana* L.) kotiledonlarından [135], maydanoz (*Petroselinum hortense*) yapraklarından [136], şeftaliden [137], tütün yapraklarından [138,139], arpa yapraklarından [140], soya fasulyesi yapraklarından [141], buğday germinden [142] farklı metodlarla saflaştırılarak çeşitli kinetik özellikleri incelenmiştir. G6PD enzimi mikroorganizmalardan da *Saccaromyces carlsbergensis*'den [85, 86], *Aspergillus aculeatus*'tan [55], *Trypanosoma brucei*'den [56], *Aspergillus niger* ve *Aspergillus nidulans*'tan [59], *Acetobacter hansenii*'den [60, 67], *Pseudomonas multivorans*'tan [68], *Candida utilis*'ten [88], *Hansenula mrakii*'den [143], *Neurospora crassa*'dan [144], *Pseudomonas fluorescens*'ten [145], *Pseudomonas aeruginosa*'dan [146], *Pseudomonas W6*'dan [66,147], *Escherichia coli*'den [148,149], *Drosophila melanogaster*'den [150], *Macracanthorhynchus hirudinaceus (Acanthocephala)*'dan

[151], *Cryptococcus neoformans*'tan [153], *Saccharomyces cerevisiae*'den [153,154], *Actinobacillus actinomycetemcomitans*'tan [155], *Methanoculleus thermophilicus*'tan [156], *Bacillus stearothermophilus*'dan [157], *Plasmodium berghei*'den [158], *Plasmodium falciparum*'dan [159], *Corynebacterium glutamicum*'dan [160], *Eimeira stiedai*'den [161], *Mycobacterium smegmatis*'ten [156,162], *Arthrobacter globiformis*'ten [163], *Leuconostoc mesenteroides*'ten [164,165] ve *Penicillium duponti* ve *Penicillium notatum*'dan [166] çeşitli metotlarla saflaştırılmıştır.

G6PD enzimi üzerine birçok bilginin elde edilmesi, birçok farklı organizmadan saflaştırılması, enzimin uzun süredir moleküler yapısı ile aktivitesi üzerine araştırmalar yapıldığını göstermektedir.

İbraheem ve arkadaşları; bir hastanın enfekte olmuş dilinde izole edilen *Aspergillus aculeatus* adlı mantardan G6PD enzimi saflaştırmışlardır. Enzimin spesifik aktivitesi 220 U/mg, moleküler kütlesi jel filtrasyon ile  $105000 \pm 5000$  dalton ve alt ünitesi SDS-PAGE ile  $52000 \pm 100$  dalton olarak bulunmuştur. Enzimin pH=7,5'da  $K_m$  değerleri  $\text{NADP}^+$  için 6  $\mu\text{M}$  ve G6P için 75  $\mu\text{M}$  olarak tespit edilmiştir. Enzimin üzerine sıcaklığın etkisi ile fosfofenolprüvat (PEP), adenozin trifosfat (ATP), fruktoz-6-fosfat (F6P), çinko(II) ve kobalt(II) iyonlarının inhibisyon etkisi incelenmiştir. Arrhenius denklemi kullanılarak enzimin aktivitesine sıcaklığın etkisi incelenmiş, doğrusal eğri elde edilmiş ve aktivasyon enerjisi 13kcal/mol olarak bulunmuştur. Enzimin sabit sıcaklık çalışmasında 55 °C de hızlı bir şekilde inaktive olduğu tespit edilmiştir. İnaktivasyonun dönüşümsüz ve doğrusal bir şekilde olduğu (hız sabiti  $0.22 \text{ dakika}^{-1}$ ) bulunmuştur. Ayrıca çinko(II) ve kobalt(II) iyonlarının enzimi inhibe ettikleri tespit edilmiştir [54].

G6PD enzimi üzerine yapılan bir çalışmada, insan eritrositlerinden G6PD enzimi DEAE- selüloz ve Fosfo-selüloz yöntemleriyle saflaştırılmış ve Cd(II), Al(III) ve Ni(II)'nin enzim üzerine inhibisyon etkileri incelenmiştir. Kısmen saflaştırılmış olan enzimin spesifik aktivitesi 1,4 U/mg protein olarak tespit edilmiştir. Cd(II) 1,5 mM konsantrasyona kadar artan bir biçimde enzim aktivitesini inhibe ettiği ve 1,5 mM'da enzimin aktivitesinin %60' ını kaybettiği görülmüştür.

İnhibitör G6P substratına göre yarı yarışmalı, NADP<sup>+</sup>'ye göre yarışmasız olarak tespit edilmiştir. Sülfidril bileşiklerinin (Glutasyon (1,2 mM), β-Merkaptoetanol (1,2mM), ditiyothreitol (1,25mM)) G6PD enzim aktivitesini Cd(II) inhibisyon etkisine karşı koruduğu tespit edilmiştir. Al(III)'ün inhibisyonunun NADP<sup>+</sup> ve G6P değişken substratlarına karşı sırasıyla karışık tipte ve yarışmalı olduğu bulunmuştur. Ni(II) nin inhibisyon tipi, substrat NADP<sup>+</sup> olduğunda yarışmalı, G6P olduğunda karışıktır. Bu çalışma sonucunda metal iyonlarının G6PD enzimini dönüşümsüz olarak inhibe ettiği tespit edilmiştir [167].

Özmen ve arkadaşları, bazı antibiyotiklerin G6PD enzimi üzerine etkilerini incelemişlerdir. İlk olarak *in vitro* çalışma için insan eritrositlerinden G6PD enzimini, amonyum sülfat çöktürmesi ve 2', 5' ADP-Sepharose 4B afinite kromatografisini kullanarak 9811 kez, %42 verimle saflaştırmışlardır. Saflığın kontrolü için sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) kullanılmış ve tek bir band elde edilerek enzimin insan eritrositlerinden saflaştırıldığı anlaşılmıştır. Bu çalışmada saf G6PD enzimi üzerine 4 farklı antibiyotiklerin etkileri araştırılmıştır. Bu antibiyotiklerin isimleri İsepamicin sülfat, meropenem, klorofenikol, tiamfenikol glisinet hidroklorid'dir. Enzimi inhibe eden ilaçların K<sub>i</sub> değerleri ve inhibisyon tipleri tespit edilmiştir. İsepamicin sülfat için IC<sub>50</sub>= 2.1 mM ve K<sub>i</sub>=1.7mM'dır. Tiamfenikol glisinet hidroklorid ise enzimi aktive etmiş, diğerlerinin enzim aktivitesi üzerine etkileri görülmemiştir. Bunlara ek olarak isepamisin sülfatın fare eritrositlerindeki antioksidan enzimler üzerine *in vivo* etkileri incelenmiştir [100].

Çiftçi ve arkadaşları; Van Gölü balıklarının karaciğerlerindeki G6PD enzimi üzerine bazı ilaçların etkilerini incelemişlerdir. 2', 5' ADP-Sepharose 4B afinite kromatografisini kullanarak Van gölü balıklarının karaciğerlerinden G6PD enzimini 899 kat ve %46.24 verimle saflaştırmışlardır. Saflaştırılan G6PD enzimi aktivitesi üzerine vankomisin, sülfanil amid, sülfanil asetamid, nidazol, ciprofloxacın, amoksilin ve potasyum permanganatın etkileri incelenmiştir. İlaçların hepsinin G6PD enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir. IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 1,88; 0,037; 0,032; 1,178; 2,26; 643,5; 0,0002 mM ve K<sub>i</sub> sabitleri de sırasıyla; 1,18±0,148, 0,119±0,021, 0,075±0,015, 1,15±0,21, 7,69±0,67, 1007±69

ve  $0,001\pm 0,00022$  mM olarak bulunmuş. Vankomizin ve nidazolün yarışmalı, diğerlerinin ise yarışmasız inhibitör oldukları tespit edilmiştir [101].

Yapılan bir çalışmada; mide asidinin artması sonucu kullanılan Omepirazol, anestezi özelliği olan morfin sülfat, remifentamil, ketamine ve gram pozitif bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlara karşı antibiyotik etki gösteren vankomisin içeren ilaçların insan eritrosit G6PD enzimi üzerine etkileri incelenmiştir. G6PD enzimini insan eritrositlerinden 2', 5' ADP-Sepharose 4B afinite kromatografisi ile saflaştırmıştır.  $IC_{50}$  değerleri sırasıyla 3,24; 43,58; 97,6; 64,16 ve 0,903 mM olarak bulunmuştur.  $K_i$  sabitleri sırasıyla omapirozol, morfin ve vankomisin için  $8,22\pm 0,55$ ,  $25,93\pm 6,82$  ve  $2,71\pm 0,677$  olduğu ve inhibisyon tiplerinin hepsinin yarışmasız olduğu tespit edilmiştir [168].

G6PD enzimi üzerine yapılan bir çalışmada deniz tutması, mide bulantısı ve hastalardaki istifrayı azaltmak veya önlemek için kullanılan anti-emetik özellikteki bazı ilaçların G6PD ve antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkileri incelenmiştir. Öncelikle G6PD enzimi insan eritrositlerinden 2', 5' ADP- Sepharose 4B afinite kromatografisi ile 1026 kat, %51,3 verimle saflaştırılmış ve 4 farklı anti-emetik özellik taşıyan ilacın etkisi incelenmiştir. Bu ilaçlar granisetron hidroklorid, ondansetron hidroklorid, metokloropramide hidroklorid, trimethobenzamide hidrokloriddir. Granisetron hidroklorid, ondansetron hidroklorid enzimi inhibe etmiştir.  $K_i$  değerleri sırasıyla 5,05 ve 0,034 mM,  $IC_{50}$  değerleri ise sırasıyla 3,9 ve 0,036 mM'dır. Diğer ilaçların enzime etkisi görülmemiştir [169].

Yapılan bir çalışmada, G6PD üzerine bazı sitotoksik kimyasalların *in vitro* etkileri araştırılmıştır. G6PD enzimi insan eritrositlerinden amonyum sülfat çöktürmesi ve ardından 2', 5' ADP-Sepharose 4B afinite kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzim aktivitesi üzerinde araştırılan iki ilacın (2,4-dihidroksi-5-floropirimidin ve sodyum 2-sulfaniletansulfonat) enzimi inhibe ettiği belirlenmiştir [170].



## 1.4 G6PD Enzimi Üzerine Bazı Kumarin Türevleri ve Bazı Pestisitlerin *In vitro* Etkilerinin İncelenmesi

G6PD enziminin organizma için önemli olan pentoz fosfat yolunun ilk basamağını katalizlemesi; enzimin yaşam sürecinde çok önemli bir role sahip olduğunu, bununla beraber besin, ilaç, kozmetik ve daha birçok alanda kullanılan çeşitli maddelerin bu enzimi inhibe veya aktive etkilerinin araştırılmasının gerekliliğini gözler önüne sermektedir.

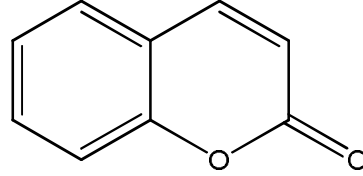
Bu çalışmada, insan eritrositlerinde bulunan G6PD enzimi 2', 5' ADP-Sepharose 4B Afinitite kolonu ile saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir.

Biyolojik aktivite potansiyeli yüksek birçok türeve sahip yeni kumarinin türevleri ve şu an ilaç sanayiinde kullanılan ve insanlar tarafından kolay ulaşılabilen etken maddesi varfarin sodyum kumarin türevi olan ilacı; tarımda sık kullanılan bazı pestisitlerin bu çalışmada insan eritrositlerindeki G6PD enziminin aktivitesi üzerindeki inhibisyon veya aktivasyon etkileri incelenmiştir.

### 1.4.1 Kumarin Türevleri

“Coumarin serbest halde ilk defa 1820 yılında Vogel tarafından tonka baklası (tonquin bean) adı verilen ve Güney Amerika'da yetişen fabaceae familyasından *dipteryx odorata* (*Coumarouna odorata*) isimli ağacın kurutulmuş hoş kokulu tohumlarından izole edilmiştir. Bileşik ilk defa bu bitkiden izole edildiğinden, bitkinin cins adına dayanılarak “coumarin” adı verilmiştir. Literatürde “coumarin” olarak anılan bu bileşik Türkçe kaynaklarda “Kumarin” olarak yer almaktadır. Kumarin ve kumarin türevlerine bitkilerde tek başlarına veya kombine halde yaygın olarak rastlanmaktadır. Bu tür bileşikler çeşitli biyolojik aktiviteleri nedeniyle son yıllarda önem kazanmış doğal bileşiklerdir [171]. Kumarin bileşiğinin kimyasal yapısı Strecker (1867) ve Fitting (1870) tarafından aydınlatılmıştır [172]. Bugün tonka baklası dışında, yaklaşık 600 cins bitkiden kumarin türevleri elde edilmiştir [173].

$C_9H_6O_2$  kapalı formüllüne sahip kumarin (2H-kromen-2-on), pek çok bitkide bulunan bir kimyasal bileşiktir. Kumarin benzopironların grubuna girer ve benzen ile  $\alpha$ -piron halkasının birleşmesinden meydana gelmiştir ve açık kimyasal yapısı Şekil 1.9’da belirtmektedir.



**Şekil 1.9**  $C_9H_6O_2$ ’ nin açık kimyasal yapısı

Kumarin hoş kokusu sebebiyle parfüm sanayiinde ve hoş gitmeyen kokuları maskeleyen amacıyla kullanılmaktadır [174]. Gıda sanayiinde yine hoş kokusu nedeniyle bir dönem kullanılmış olsa da, hayvanlar üzerinde yapılan araştırmalarda toksik özelliği bulunduğu için dolayısıyla, bu alanda kullanılmasından vazgeçilmiştir [174]. Kumarinlerin belki de en tanınmış kullanım alanları, kanama üzerindeki antikoagülan etkileridir. Bazı kumarin türevleri ticari olarak oral antikoagülan olarak satılmaktadır. Antikoagülan etkilerine [175,176] ilaveten, antibiyotik [177] ve antikanser [178] etkileri nedeniyle de kumarinler birçok biyoloji ve ilaç araştırmalarında kullanılmaktadır. Önemli bir biyoaktivite gücüne sahip olması nedeniyle, son yıllarda etkili farmakolojik değeri olan yeni tür kumarin türevleri sentezlenmektedir [179,180].

Çalışmamızda Üniversitemiz Organik kimya laboratuvarlarında sentezlenmiş orijinal altı kumarin türevinin G6PD enzimi üzerine inhibisyon veya aktivasyon etkileri incelenmiştir. Ayrıca etken maddesi varfarin sodyum olan bir ilacın G6PD enzimi aktivitesi üzerine in vitro etkileri incelenerek, karşılaştırma yapılmıştır. Daha önce belirttiğimiz gibi kumarin organik maddesinin bir çok türevi farklı alanlarda kullanılması, gelecekte bizim çalıştığımız yeni kumarin türevlerinin de kullanım alanlarının doğmasına neden olacağı kanaatindeyiz.

Varfarin sodyum’un yanında phenprocoumon, phenprocoumon, phenprocoumon, phenprocoumon, phenprocoumon, phenprocoumon ve acenoumarol kumarin türevleri içeren çeşitli ilaçlar

bulunmaktadır. Ancak çalışmamızda bu ilaçlar içerisinde en fazla kullanılan ve ulaşılması en kolay olan, antikoagulan etkiye sahip varfarin sodyum içeren ilacın G6PD enzimi üzerine in vitro etkileri incelenmiştir.

Çalışmamızda kullanılan ilacın yapısında varfarin sodyum bulunmaktadır. Varfarin, 4-hidroksikumarin yapısında, oral yoldan etkili protrombinopenik bir antikoagulandır. Trombo-embolik belirtilerle seyreden çeşitli hastalıklarda, kanın pıhtılaşma mekanizmasında rolü olan Faktör VII, IX, X ve II'nin karaciğerdeki sentezini önleyerek etkisini gösterir. Bu sentezi önleme derecesi uygulanan doza bağlıdır. Antikoagulan ilaçların trombus üzerinde doğrudan etkileri olmadığı gibi, iskemik doku harabiyetini de geri döndüremezler. Tromboz oluşuktan sonra, antikoagulan tedavisi pıhtılaşmanın yayılmasını önlemek için yapılır ve böylelikle sekonder bir trombo-embolik komplikasyon önlenmiş olur.

Varfarin ağız yolundan alındıktan sonra tamama yakını emilir ve 1-9 saatte maksimal plazma konsantrasyonlarına ulaşır. Varfarin yaklaşık %97'si plazma proteinlerine bağlanır. Varfarin, genellikle 36-72 saat içinde hipoprotrombinemi meydana getirir. Etkisi 4-5 gün devam eder. Böylelikle düz ve uzun süreli bir cevap eğrisi gösterir [181].

Altısı yeni, yedi kumarin türevinin kimyasal yapısı ve bulgular kısmında kullanacağımız kısaltma isimleri aşağıda Çizelge 1.1'de belirtilmiştir.

**Çizelge 1.1** Kumarin türevlerinin kimyasal yapısı, adlandırılması ve kısaltmaları

| <i>Kimyasal Maddenin Yapısı</i> | <i>Kimyasal Maddenin İsmi</i>                               | <i>Kullanılan Kısaltma</i> |
|---------------------------------|---|----------------------------|
|                                 | 6,7-dihidroksi-3-(2-metilfenil)-2H-kromen-2-on              | OPC                        |
|                                 | 6,7-dihidroksi-3-(3-metilfenil)-2H-kromen-2-on              | MPC                        |
|                                 | 6,7-dihidroksi-3-(4-metilfenil)-2H-kromen-2-on              | PPC                        |
|                                 | 7,8-dihidroksi-3-(4-metilfenil)-2H-kromen-2-on              | FPC                        |
|                                 | 6,7-dihidroksi-3-(2,5-dimetoksifenil)-2H-kromen-2-on        | DPC                        |
|                                 | 6,7-dihidroksi-3-(3,4,5-trimetoksifenil)-2H-kromen-2-on     | TPC                        |
|                                 | Sodyum 2-okso-3-[(RS)-3-okso-1-fenilbütil]-2H-kromen-4-olat | Varfarin                   |

## 1.4.2 Pestisitler

İnsan nüfusunun geometrik artışı ve bunun karşısında besin maddelerinin aritmetik artışı, insanların besin gereksiniminin artmasına neden olmuştur. Tarım alanlarının gittikçe yerleşim alanlarına dönüşmesi, sorunu daha da arttırmaktadır. Üreticiler hem ekonomik mücadelede geri kalmamak, hem de insanların besin gereksinimlerini daha kısa sürede karşılayabilmek için çeşitli yollarla sentezlenen hormon ve ilaçları kullanmaktadırlar. İlaçlara genel olarak pestisit denmektedir. Pestisitler, ekonomik şekilde üretilmeleri ve kolay kullanılabilirliği nedeniyle üretilmek istenen meyve ve sebzeleri böceklerin, yabancı otların ve daha birçok zararlı etkenlerin olumsuz etkilerinden korumak amacıyla oldukça fazla kullanılmaktadır.

Pestisitler tarım ürünü zararlılarının kontrolünde kullanılan tüm kimyasalları kapsamaktadır. Genellikle aktif etkene göre sınıflandırılan pestisitler, en genel anlamda insektisitler-böcek öldürücüler, akarisitler-akar öldürücüler, fungusitler-mantar öldürücüler, herbisitler-ot öldürücüler gruplarından oluşmaktadırlar. Türkiye’de kullanılan çeşitli pestisitlerin tüketim miktarlarını % olarak kıyaslamak gerekirse en fazla %47 ile insektisitlerin kullanıldığı, bunu %24 ile herbisitlerin izlediği ve %16’lık oranla da fungusitlerin yer aldığı gözlenmiştir [182].

Üreticilerin son yıllarda pestisitleri bilinçsizce ve aşırı kullanmaları tüketicilerin ciddi sağlık sorunlarıyla karşı karşıya kalmalarına neden olmaktadır. Pestisitlerin bazıları toksikolojik yönden bir zarar oluşturmazken, bazılarının kanserojen, sinir sistemini etkileyici ve hatta mutasyon oluşturucu etkileri olduğu saptanmıştır.

Yapılan bir çalışmada *in vitro* enzim analizleri için *Synechococcus sp.* PCC7942 hücrelerinden elde edilen süpernatantın DDT varlığında ve yokluğunda G6PD aktivitesi gözlemlenmiş ve bunun için farklı DDT konsantrasyonlarında enzim aktivitesinin zamana bağlı olarak nasıl değişiklik gösterdiği takip edilmiştir. Analizler sonucunda DDT’nin enzim aktivitesini etkilediği ve bu etkinin 50 mM

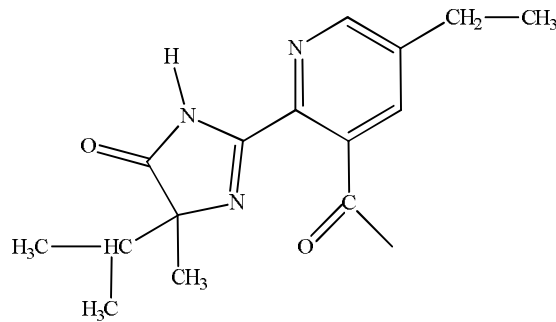
konsantrasyonda 30 dakika sonunda maksimuma ulaşarak %51,22'lik bir azalmaya neden olduğu belirlenmiştir [183].

Çalışmamızda üç herbisit, iki insektisit olmak üzere beş pestisit insan eritrositlerinden saflaştırılmış G6PD enzimi aktivitesi üzerine inhibisyon veya aktivasyon etkileri incelenmiştir.

#### 1.4.2.1 Herbisitler

##### 1.4.2.1.1 (RS)-5-etil-2-(4-metil-5-okso-2-imidazolin-2-il)=nikotinik asit

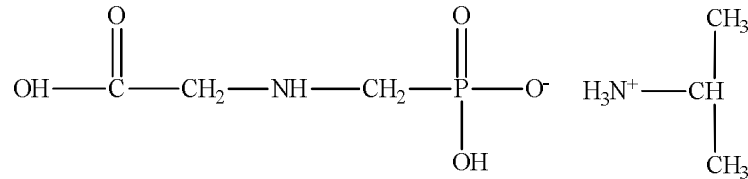
Genel adı Imazethapyr, kimyasal olarak ise (RS)-5-etil-2-(4-metil-5-okso-2-imidazolin-2-il)=nikotinik asit diye adlandırılır. Kimyasal yapısı Şekil 1.10'da görülmektedir. Maddenin fiziksel hali renksiz kristaldir. Etki şekli, yeşil aksam ve kökler tarafından alınan seçici sistematik herbisittir. Akut oral olarak etkir. Zehirlilik derecesi çok yüksek değildir. Arılarda ve balıklarda zehirlidir. Türk Gıda Kodeksinde yer alan maksimum rezidü limiti (MRL) nohut için 0,05 ppm'dir. Toprak herbisitleri ile karıştırılabilir. Dar yapraklı yabancı ot ilaçları ve Sulphonylurea'lı ilaçlarla karışmaz. Kullanım yerleri; nohutta ekim sonrası çıkış öncesinde, yabani hardal, horoz ibiği, köpek üzümü, fare kulağı, labada, kaz ayağı, kırmızı mercimekte ise ekim öncesidir. Arap baklası, çoban tarağı, tavşan kulağı, sarı ipek çiçeği, yumrulu çam çiçeği, uzun süpürge otu, mor malkomya, yabani hardal, çayır akça çiçeği, suriye geyik otu, taşkesen otu, trakya hardalı, lalemanti, pelemirde ekim sonrası çıkış öncesidir. Yabani hardal, yumrulu çam çiçeği, uzun süpürge otu, trakya hardalı, çayır akça çiçeği, yoncada çıkış sonrasıdır [184].



**Şekil 1.10** (RS)-5-etil-2-(4-metil-5-okso-2-imidazolin-2-il)=nikotinik asit'in kimyasal yapısı

#### 1.4.2.1.2 N-(fosfometil)glisin

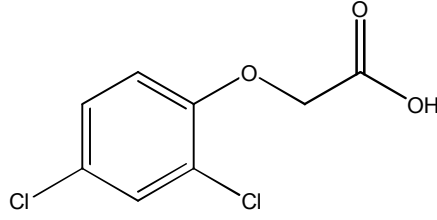
Genel adı Glifosat, kimyasal adı (IUPAC) ise N-(fosfometil)glisin'dir. Kimyasal yapısı Şekil 1.11'de görülmektedir. Maddenin fiziksel hali kokusuz beyaz tozdur. Etki şekli yapraklar tarafından alınan sistemik etkili seçici olmayan herbisittir. Akut oral olarak etkir. Zehirlilik derecesi çok fazla olmayıp arılar ve balıklarda etkilidir. Türk Gıda Kodeksinde yer alan maksimum rezidü limiti (MRL), sert çekirdekli meyveler, fındık, yumuşak çekirdekli meyveler, turunçgillerde 0.1 ppm'dir. Üzümde ise 0,02 ppm'dir. Kullanım yerleri; turunçgiller, bağ, fındık, meyve bahçeleri ve ekili olmayan alanlarda; yabancı yulaf, yabancı havuç, kısır brom, kuş yemi, mürdümük, ballıbaba, kanarya otu, tilki kuyruğu, yer fesleğeni, düğün çiçeği, turna gagası, yabancı fiğ, kuş otu, yabancı hardal, ebe gümesi, yabancı yonca, semiz otu, sütleğen, sirken, bambul otu, domuz pıtrağı, zincir pıtrağı, kırmızı köklü tilki kuyruğu, kirpi darı, darıcan, horoz ibiği, yeşil horoz ibiği, topalak, köpek dişi ayrığı, tarla sarmaşığı, ısırğan otu, pelin otu ve kaynaştır [184].



Şekil 1.11 N-(fosfometil)glisin'in kimyasal yapısı

#### 1.4.2.1.3 (2,4-diklorofenoksi)asetik asit

Genel adı 2,4-D, kimyasal adı (IUPAC); (2,4-diklorofenoksi)asetik asit'tir. Kimyasal yapısı Şekil 1.12'de görülmektedir. Maddenin fiziksel hali renksiz tozdur. Tuz formülasyonlar kökler, ester formülasyonlar yapraklar tarafından daha iyi alınır. Akut oral olarak etkiler. Imazethapyr ve Glifosata göre yüksek zehir etkisine sahiptir. Özellikle arılarda ve balıklarda zehirlidir. Gıda Kodeksinde yer alan maksimum rezidü limiti (MRL); hububatta 0,2 ppm, meyveler, çeltik ve mısırdada 0,05 ppm'dir. Kullanım Yerleri; hububatta akhindiba, arap baklası, at kuyruğu, çoban çantası, çoban değneği, dönüba, düğün çiçeği, köy göçürendir [184].

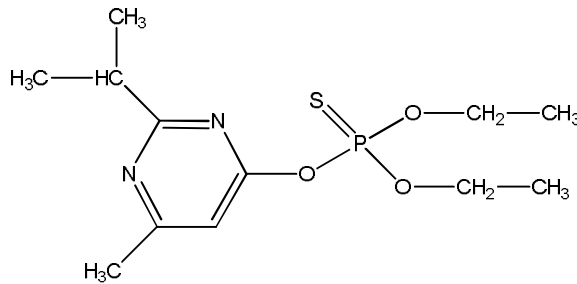


Şekil 1.12 (2,4-diklorofenoksi)asetik asitin kimyasal yapısı

### 1.4.2.2 İnspektisitler

#### 1.4.2.2.1 0-0-dietil 0-2-izopropil-6-metilpirimidin-4-il fosforotiyoat

Genel adı Diazinon olan, renksiz ve kokusuz bir kimyasal olup; tarımda koyu kahverengi/yeşil sıvı formda kullanılmaktadır. Kimyasal yapısı Şekil 1.13’de belirtilmektedir. Sudaki çözünürlüğü zayıftır [185]. Mide ve solunum sistemine etkilidir. Balıklara karşı zehirlidir, buna karşın arılara çok zehirlidir. Yapısı sıvı ve sarı renklidir. Meyve, sebze, hububat ve pamuk üzerine kullanılır. Etkili olduğu organizmalar; meyvelerde bulunan göz kurdu, yaprak biti, ağaç sarı kurdu, doğu meyve güvesi, armut kaplani, elma ağ kurdu, elma pamuklu biti, kiraz sineği, tomurcuk tırtılı, yaprak büken (Rezidü limiti 0,2-0,3 ppm); sebzelerde kavun kızıl böceği, lahana güvesi, soğan sineği (Rezidü limiti 0,2 ppm); pamuk ve hububatta kabuklu bit, yaprak biti (Rezidü limiti 0,1 ppm), ekin güvesidir (rezidü limiti 0,05ppm) [184].



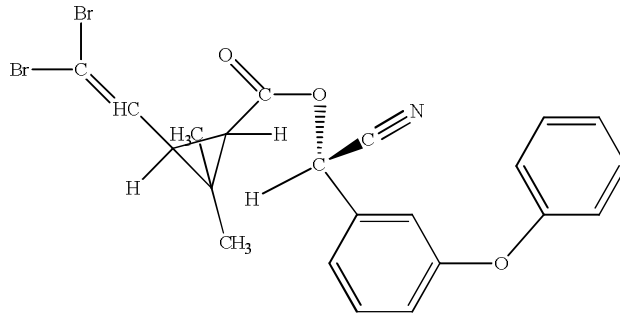
Şekil 1.13 0-0-dietil 0-2-izopropil-6-metilpirimidin-4-il fosforotiyoat’ın kimyasal yapısı



#### 1.4.2.2.2 (S)- $\alpha$ -siyano-3-fenoksibenzil (1R,2R)-3-(2,2- dibromovinil) - 2,2-dimetilsiklopropankarboksilat

Genel adı Deltamethrin olan maddenin fiziksel hali renksiz olup kristaldir. Kimyasal yapısı Şekil 1.14’de verilmektedir. Kontak ve mide etkili insektisittir. Hızlı etki gösterir. Arılara ve balıklara zehirlidir. Sinekler için öldürücü etkisi vardır [186]. Türk Gıda Kodeksinde yer alan maksimum rezidü limiti(MRL) Buğday, mercimek, mısır, meyveler, zeytin, soya, ayçiçeği, pamuk tohumu, biber, domates, havuç, hıyar için 0,5 ppm, marul, üzüm için 0,05 ppm, patates, şekerpancarı için 0,01 ppm Süt için 0,02 ppm olarak bildirilmiştir [184].

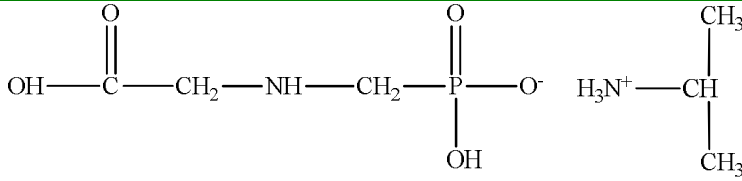
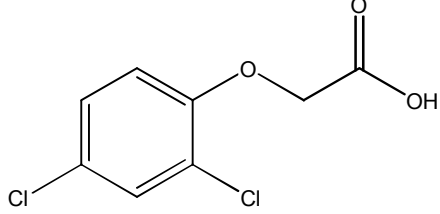
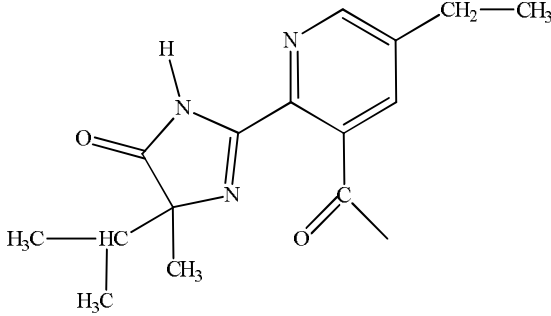
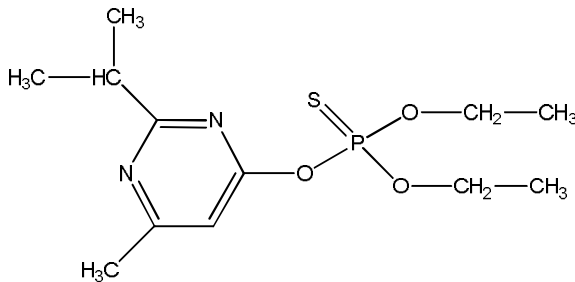
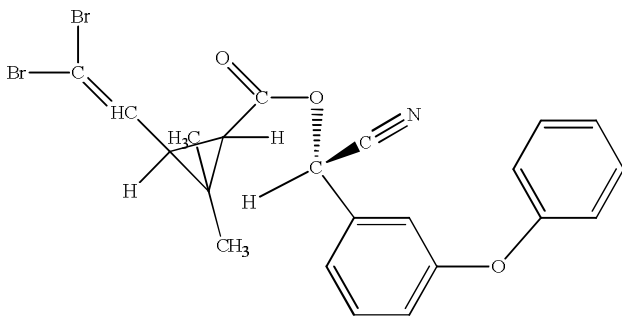
Zeytinde zeytin karakoşnili, zeytin sineği; buğdayda süne ve kımlı; pamukta çizgili yaprak kurdu için kullanılmaktadır. Ayrıca meyvede elma iç kurdu, elma ağ kurdu, testereli arılar, yaprak galeri güveleri, armut yaprak piresi; bağda dürmece, Salkım güvesi; sebze beyaz sinek, yeşil kurt, bozkurt, pis kokulu yeşil böcek, tohum böceği, yaprak bitleri, yaprak pireleri, patatesten patates böceği; mercimek, nohutta hortumlu böcek, mantolu böcek, yeşil kurt; mısırdaki koçan kurdu, hububatta Süne, Hortumlu böcek, ekin kambur böceği; zeytinde zeytin sineği, zeytin güvesi, zeytin kara koşnili; ayçiçeğinde çayır tırtılı; fındıkta kır tırtılı; şekerpancarında pancar piresi, bozkurt, kalkan böceği için de kullanılmaktadır.



**Şekil 1.14** (S)- $\alpha$ -siyano-3-fenoksibenzil (1R,3R)-3-(2,2- dibromovinil) = 2,2-dimetilsiklopropankarboksilat’ın kimyasal yapısı

Çizelge 1.2’de insan eritrositlerinden saflaştırılmış olan G6PD enzimi aktivitesi üzerine in vitro etkileri incelenmiş olan beş farklı pestisit kimyasal yapıları, isimleri ve kullanılan kısaltmaları verilmiştir.

**Çizelge 1.2** G6PD enzimi üzerine in vitro çalışma yapılan pestisitlerin kimyasal yapısı, adlandırılması ve kullanılan kısaltmalar

| <i>Kimyasal Maddenin Yapısı</i>   | <i>Kimyasal Maddenin İsmi</i>  | <i>Kullanılan Kısaltma</i> |
|---|--|----------------------------|
|   | N-(fosfonametil) glisin  | Glifosat                   |
|   | (2,4-diklorofenoksi) asetik asit   | 2,4-D                      |
|  | 5-etil-2-[( <i>RS</i> )-4-izopropil-4-metil-5-okso-2-imidazolin-2-il]nikotinik asit                                    | İmazethapyr                |
|  | <i>O,O</i> -dietil <i>O</i> -2-izopropil-6-metilprimidin-4-il fosforotiyoat  | Diazinon                   |
|  | ( <i>S</i> )- $\alpha$ -siyano-3-fenoksibenzil ( <i>1R,3R</i> )-3-(2,2-dibromovinil)-2,2dimetilsiklopropan karboksilat | Deltamethrin               |

## 2. MATERYAL VE METOTLAR

### 2.1 MATERYALLER

#### 2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneysel çalışmalarımızda kullanılan N, N, N', N'-tetrametil etilen daimin (TEMED), diyaliz torbaları, NADP<sup>+</sup> (Na<sup>+</sup> tuzu), standart serum albumin, glukoz-6-fosfat (monosodyum tuzu) Sigma Chemical Comp'den; sodyum hidroksit, trihidroksimetil- aminometan(Tris), amonyum sülfat, sodyum asetat, sodyum klorür, fosforik asit, glisin, sodyum azit, hidroklorik asit, potasyum bifosfat, potasyum fosfat, sodyum fosfat, magnezyum klorür, gliserin, etanol, potasyum asetat, metanol, asetik asit, izopropanol Merck AG'den; akrilamid, N,N'-metilen bisakrilamid, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, CuSO<sub>4</sub>, NaK-Tartarat, Folin fenol ayıracağı, sığır serum Albumini (BSA), brom timol mavisi, sodyum dodesil sülfat (SDS), amonyum per sülfat, b- merkaptto etanol, 2',5'-ADP-Sepharose 4B Pharmacia'dan, G6PD enzimi aktivitesi üzerine etkileri incelenecek olan kumarin türevleri (6,7-dihidroksi-3-(2-metilfenil)-2H-kromen-2-on, 6,7-dihidroksi-3-(3 metilfenil)-2H-kromen-2-on, 6,7-dihidroksi-3-(4-metilfenil)-2H-kromen-2-on, 7,8-dihidroksi-3-(4-metilfenil)-2H-kromen-2-on, 6,7dihidroksi-3(2,5dimetoksifenil)-2H-kromen-2-on, 6,7-dihidroksi-3-(3,4,5-trimetoksifenil)-2H-kromen-2-on) Balıkesir Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Organik Kimya Laboratuvarlarında sentezlenerek; Varfarin sodyum kumarin türevi içeren ilaç eczanelerden; pestisitler ( N-(fosfonametil) glisin, (2,4-diklorofenoksi) asetik asit, 5-etil-2-[(RS)-4-izoproil-4-metil-5-okso-2-imidazolin-2-il]nikotinik asit, O,O-dietil O-2-izopropil-6-metilprimidin-4-il fosforotiyoat, (S)- $\alpha$ -siyano-3-fenoksibenzil (1R,3R)-3-(2,2-dibromovinil)-2,2dimetilsiklopropankarboksilat) tarım ilacı satılan merkezlerden temin edilmiştir.

### 2.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar

Çalışmalar esnasında aşağıdaki alet ve cihazlardan faydalanılmıştır

---

|  |  |
|--|--|
| <i>Soğutmalı santrifüj</i>                     | Sigma 3K15   |
| <i>Soğutmalı Ultrasantrifüj</i>                | Hettich EBA 12R                                      |
| <i>Multi Santrifüj<br/>(Falkon santrifüjü)</i> | Thermo IEC   |
| <i>pH metre</i>                                | Hana pH 211 Microprocessor                           |
| <i>UV-Spektrofotometre<br/>(Plaka okuyucu)</i> | Biotek Power Wave XS                                 |
| <i>Manyetik karıştırıcı</i>                    | Torrey Pines Scientific                              |
| <i>Peristaltik pompa</i>                       | Atta SJ1211  |
| <i>Hassas Terazî</i>                           | Sartorius BL 210S                                    |
| <i>Otomatik pipetler</i>                       | Hi-Tech ve Finipipette                               |
| <i>Elektroforez Sistemi</i>                    | Hoefer, HSI  |
| <i>Kromatografi Kolonu</i>                     | Sigma (1 cm çap ve 10 cm uzunluk)                    |
| <i>Vorteks</i>                                 | Fisons Whirli Mixer                                  |
| <i>Buz makinesi</i>                            | Fiocchetti AF 10                                     |
| <i>Çalkalayıcı</i>                             | GFL  |
| <i>Jel Görüntüleme Sistemi</i>                 | Gel Doc-H Imaging System (UVP)                       |
| <i>HPLC</i>                                    | Agilent 1100 Series                                  |
| <i>Kronometre</i>                              | Hanhard, Electronisch Digital-<br>Stoppuhr (Germany) |

---

### 2.1.3 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

Çalışma süresince kullanılan çözeltilerin kullanılış yerleri ve hazırlanış şekilleri aşağıdaki belirtilmiştir:

1. **1 M tris-HCl / 5mM EDTA (pH=8,0) (Eritrosit ve lens G6PD aktivitesi ölçümünde kullanılan tampon):** 6,05 g (0,05 mol) Tris ve 0,0605 g ( $2,5 \times 10^{-4}$  mol) EDTA alınarak bir miktar saf suda çözüldü. Çözeltinin pH'sı pH metre yardımıyla 1 M HCl ile titre edilerek 8,0'a ayarlandı. Çözelti daha sonra saf suyla 50 mL'ye tamamlandı.

2. **0,1 M MgCl<sub>2</sub> (Enzim aktivite ölçümünde kullanılan aktivite çözeltisi):** 0,475 g MgCl<sub>2</sub> ( $5 \times 10^{-3}$  mol) alınıp hacmi saf su ile 50 mL'ye tamamlandı.

3. **2 mM NADP<sup>+</sup> (Enzimin aktivite çözümünde kullanılan koenzim):** 0,0765 g NADP<sup>+</sup> ( $1 \times 10^{-4}$  mol) alınıp hacmi saf su ile 50 mL'ye tamamlandı.

4. **6 mM G6P (Enzimin aktivite ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi):** 0,091 g glukoz-6-fosfat ( $3 \times 10^{-4}$  mol) alınıp hacmi saf su ile 50 mL'ye tamamlandı.

5. **50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH=7,0) (Amonyum sülfat çökeltisinin çözülmesi için kullanılan tampon):** 0,68 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ( $5 \times 10^{-3}$  mol) alınıp 80 mL saf suda çözüldü. pH'sı NaOH ile 7,0'a ayarlandı. Daha sonra toplam hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

6. **(50 mM Potasyum asetat/50 mM potasyum fosfat) (pH=6,0) (Eritrosit hemolizatından elde edilen çözünmüş amonyum sülfat çökeleğinin diyalizi için kullanılan tampon):** 4,9 g potasyum asetat ( $5 \times 10^{-2}$  mol) ve 6,8 g potasyum fosfat ( $5 \times 10^{-2}$  mol) karışımının hacmi saf su ile 800 mL'ye getirilip pH=6,0'a ayarlandıktan sonra toplam hacim 1 L'ye tamamlandı.

7. **(0,1 M Potasyum asetat/ 0,1 M Potasyum fosfat) (pH=6,0) (Afinitekolonunun dengelenme ve yıkanması için kullanılan tampon):** 9,8 g (0,1

mol) potasyum asetat ve 13,6 (0,1 mol) potasyum fosfat karıştırıldı ve 800 mL saf suda çözüldü. Daha sonra pH=6,0'a ayarlandı ve toplam hacim 1 L olacak şekilde saf su ilave edildi.

**8. (0,1 M Potasyum asetat/ 0,1 M Potasyum fosfat) (pH=7,85) (Numuneyi tatbikten sonra afinite kolonunun yıkanması için kullanılan tampon):** 9,8 g (0,1 mol) potasyum asetat ve 13,6 g (0,1 mol) potasyum fosfat karıştırıldı ve 800 ml saf suda çözüldü. Daha sonra pH=7,85'e ayarlandı ve toplam hacim 1 L olacak şekilde saf su ilave edildi.

**9. (0,1 M Potasyum fosfat/ 0,1 M KCl) (pH=7,85) (Numuneyi tatbikten sonra afinite kolonunun yıkanması için kullanılan tampon):** 13,6 g (0,1 mol) potasyum fosfat ve 7,45 g (0,1 mol) KCl karıştırıldı ve 800 mL saf suda çözüldü. Daha sonra pH=7,85'e ayarlandı ve toplam hacim 1 L olacak şekilde saf su ilave edildi.

**10. (80 mM Potasyum fosfat + 80 mM KCl + 0,5 mM NADP<sup>+</sup> + 10 mM EDTA ) (pH= 7,85 ) (Afinite jeline tutunmuş olan glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminin elüsyon tamponu):** 5,44 g potasyum fosfat ( $4 \times 10^{-2}$  mol), 2,98 g KCl ( $4 \times 10^{-2}$  mol), 0,1913 g NADP<sup>+</sup> ( $2,5 \cdot 10^{-4}$  mol) ve 1,21 g EDTA ( $5 \times 10^{-3}$  mol) karıştırıldı. Daha sonra pH=7,85'e ayarlandı ve toplam hacim 500 ml olacak şekilde saf su ilave edildi.

**11. (0,1 M Tris/ 0,5M NaCl) (pH= 8,5) (Afinite kolonunun rejenerasyonu için hazırlanan tampon):** 6,05g Tris (0,05 mol ) ve 14,61g NaCl (0,25 mol) alınarak pH= 8,5 ayarlandı. Toplam hacim saf ile 500 mL'ye tamamlandı.

**12. (0,1 M Sodyum asetat/ 0,5M NaCl ) (pH=4,5) (Afinite kolonunun rejenerasyonu için hazırlanan tampon):** 4,1 g sodyum asetat (0,05 mol) ve 14,61 g NaCl (0,25 mol) alınarak pH=4,5'e ayarlandı. Toplam hacim saf su ile 500 ml'ye tamamlandı.

**13. % 0,02 lik  $\text{NaN}_3$  çözeltisi (Afinite kolonunun bakterilerden korunması için kullanılan çözelti):** 20 mg  $\text{NaN}_3$  alınarak hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

**14. SDS Elektrofrezinde kullanılan ayırma ve yığma Jeli:** 15g Akril amid, 0,4 g Bis alınarak son hacim saf su ile 50mL'ye tamalanarak Akril amid/bis hazırlandı. Ayırma jeli için 16,65 mL, yığma jeli için 2,6 mL kullanıldı. Ayırma jeli için Tris-HCl'den 11,82 g alınarak pH=8,8 oluncaya kadar 0,1 M NaOH ilave edildi, son hacim saf su ile 50 mL'ye tamamlanarak 1,5 M Tris-HCl (pH=8,8) hazırlandı. 12,5 mL kullanıldı. Tris-HCl 3,94 g alınarak pH 6,8 oluncaya kadar 0,1 M NaOH ilave edildi, son hacim saf su ile 50 mL'ye tamamlanarak 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) hazırlandı. Yığma jeli için 5mL kullanıldı. SDS 1g alınarak son hacim saf su ile 10 mL'ye tamamlandı (%10'luk SDS). Ayırma jeli için 0,5  $\mu\text{L}$ , yığma jeli için 200  $\mu\text{L}$  kullanıldı. %10'luk amonyum persülfat için amonyum persülfattan 1g alınarak son hacim saf su ile 10 mL'ye tamamlandı. Ayırma jeli için 150  $\mu\text{L}$ , yığma jeli için 400  $\mu\text{L}$  kullanıldı.

**15. SDS elektrofrezinde kullanılan numune tamponu:** 0,5 mL 1 M Tris-HCl (pH=6,8), 1 mL %1 SDS ve 1 mL %100'lük gliserin ve 5 mL % 0,1'lik brom timol mavisinin karıştırılarak hacimlerinin saf su ile 10 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı. Bu tampon kullanılmadan önce 950  $\mu\text{L}$  numune tamponunda 50  $\mu\text{L}$  olacak şekilde  $\beta$ -merkaptotanol ilave edildi.

**16. SDS elektrofrezinde kullanılan yürütme tamponu:** 1,5 g Tris ve 7,2 g glisin 50 mL suda çözüldü. Daha sonra bunun üzerine 5 mL % 10'luk SDS ilave edilerek toplam hacim saf su ile 500 mL' ye tamamlandı.

**17. Boyama çözeltisi (SDS jelinin boyanması için kullanılan çözelti):** 100 mL çözelti için; 0,1 g Coomassie Brilliant Blue R-250, %50 metanol, %10 asetik asit, %40 saf su olacak şekilde hazırlandı.

**18. Yıkama çözeltisi (SDS jelinin boya açmada kullanılan çözelti ):** % 50 metanol, %10 asetik asit, %40 saf su olacak şekilde yeteri kadar hazırlandı.

### **19. Proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözeltiler:**

- Fenol ayıracı** : Folin-fenol ve distile sudan bire bir oranda alınarak hazırlandı
- Ayıraç A** : % 2'lik Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.1 M NaOH'da çözüldü.
- Ayıraç B** : %1 NaK tartarat distile suda çözüldü
- Ayıraç C** : % 0,5'lik CuSO<sub>4</sub> distile suda çözüldü.
- Ayıraç D** : 48 mL A ayıracından, 1mL B ayıracından, 1mL C ayıracından konulup hazırlandı.

#### **Sığır Serum**

- Albumini (BSA)** : 5 mg 5 ml suda çözülerek taze olarak hazırlandı.

## **2.2 METOTLAR**

### **2.2.1 İnsan Eritrositlerinden G6PD Enzimin Saflastırılması ve İnhibisyonu Çalışmaları ile ilgili Metodlar**

#### **2.2.1.1 Kan Numunelerinin Temini ve Hemolizat Hazırlanması**

Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) içeren tüplere alınan taze insan kanı, +4°C 'deki şartlarda laboratuvara getirilerek günlük olarak kullanıldı. Taze kandan eritrositleri ayırmak amacıyla, kan numunesi 10 dakika 5000 rpm'de santrifüj edildi. Serum ve eritrositler birbirinden ayrıldı ( Şekil 2.1).

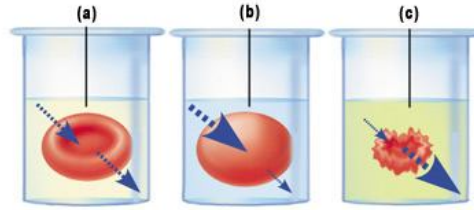




**b**      **a**

**Şekil 2.1 a)** EDTA'lı tüpteki insan kanı **b)** eritrositleri ayırmak için santrifüj yapılmış EDTA'lı tüp

Tüplerin üst kısmındaki plazma ve lökosit tabakaları bir damlalık vasıtasıyla alındı. Elde edilen eritrositler hacimlerinin beş katı buzlu saf su ile hemoliz edildi (Şekil 2.2).



**Şekil 2.2 a)** Hipotonik ortamdaki eritrosit **b)** eritrositin su alması **c)** eritrositin hemolizi

Daha sonra hücre zarlarını uzaklaştırmak için  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 15 000 rpm'de 30 dakika santrifüj yapıldı. Damlalık vasıtasıyla süpernatant alındı [97]. Böylece hemolizat hazırlanmış oldu. Bütün bu işlemler  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de gerçekleştirildi.

### 2.2.1.2 Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Diyaliz

Proteinler çok değerlikli elektrolitlerdir. Bu yüzden iyonlara benzer şekilde hareket ederler. Yeteri kadar yüksek tuz konsantrasyonunda, protein molekülleri bir çözeltiden kantitatif olarak çöktülebilir. Bu olay, yüksek tuz konsantrasyonlarında, protein moleküllerini çevreleyen ve çözünür halde tutan su moleküllerinin tuzdaki

iyonlar tarafından çekilmesi ve proteinlerin çökmesini sağlamasıdır. Proteinlerin çökmesinde molekül ağırlığı ve iyonik şiddet etkilidir. Dolayısıyla değişik tuz konsantrasyonlarında değişik proteinler çöker [18,187]. Amonyum sülfat çöktürmesi, proteinlerin bu özelliklerinden faydalanılarak yapıldı. Kan numunesi için hazırlanan hemolizat için önce % 30-0, daha sonra %30-70 aralıklarında amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Bütün bu işlemler +4 °C’de gerçekleştirildi. Amonyum sülfat çöktürmesi sırasında hemolizat ve homojeneta katı (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> yavaş yavaş katıldı (+4 °C) ve her defasında daha önce katılan (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>’ın çözünmüş olmasına dikkat edildi. Bu işlem yaklaşık bir buçuk saat sürdü. Amonyum sülfatın kan hemolizatı içerisindeki çözünme işlemi magnetik karıştırıcı ile yapıldı. Amonyum sülfatın hemolizat içerisindeki çözünme işlemi bittikten sonra numuneler 15000 rpm’de 30 dakika santrifüj edildi. Daha sonra süpernatant behere alındı ve çökelek ise yeteri kadar 50 mM potasyum fosfat tamponunda (pH=7,0) çözülererek çöktürme işlemleri sırasında kullanılan katı amonyum sülfat miktarları aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

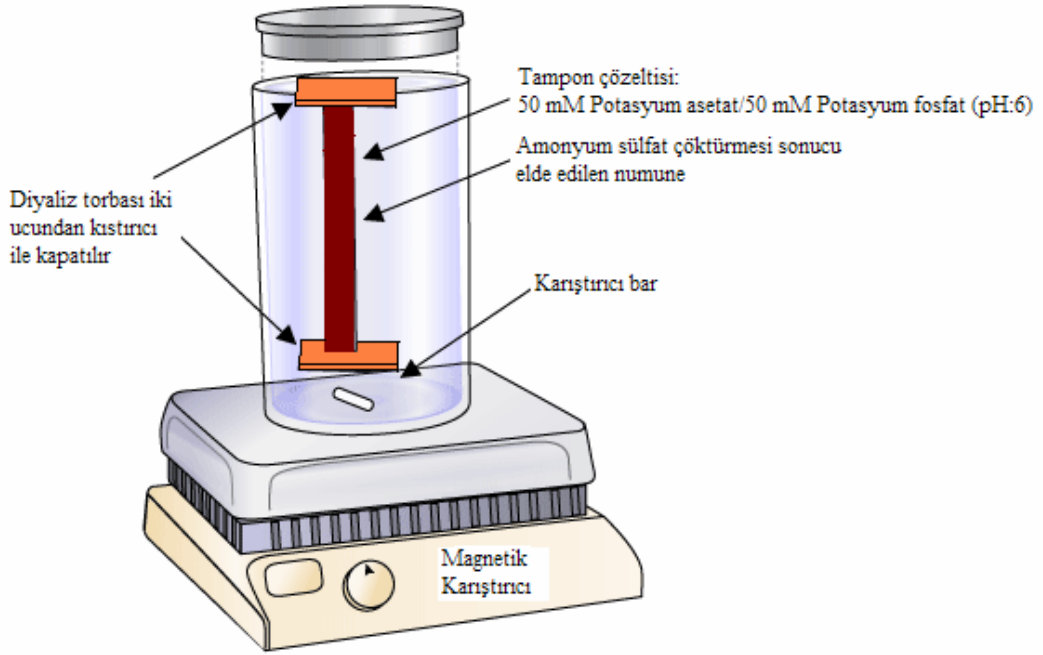
$$g(NH_4)_2SO_4 = \frac{1.77xVx(S_2 - S_1)}{3.54 - S_2}$$

V = Çözeltinin hacmi

S<sub>1</sub> = 1’in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu

S<sub>2</sub> = 1’in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğu

Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen numune diyaliz torbasına yerleştirildi ve (50mM potasyum asetat/ 50 mM Potasyum fosfat) (pH=7,0) tamponuna karşı, 12 saat süreyle diyaliz edildi [44]. Diyaliz işlemi magnetik karıştırıcı üzerinde +4 °C’de gerçekleştirildi. (Şekil 2.3)



**Şekil 2.3** Amonyum sülfat çöktürmesinden sonra numuneye uygulanan diyaliz aşaması

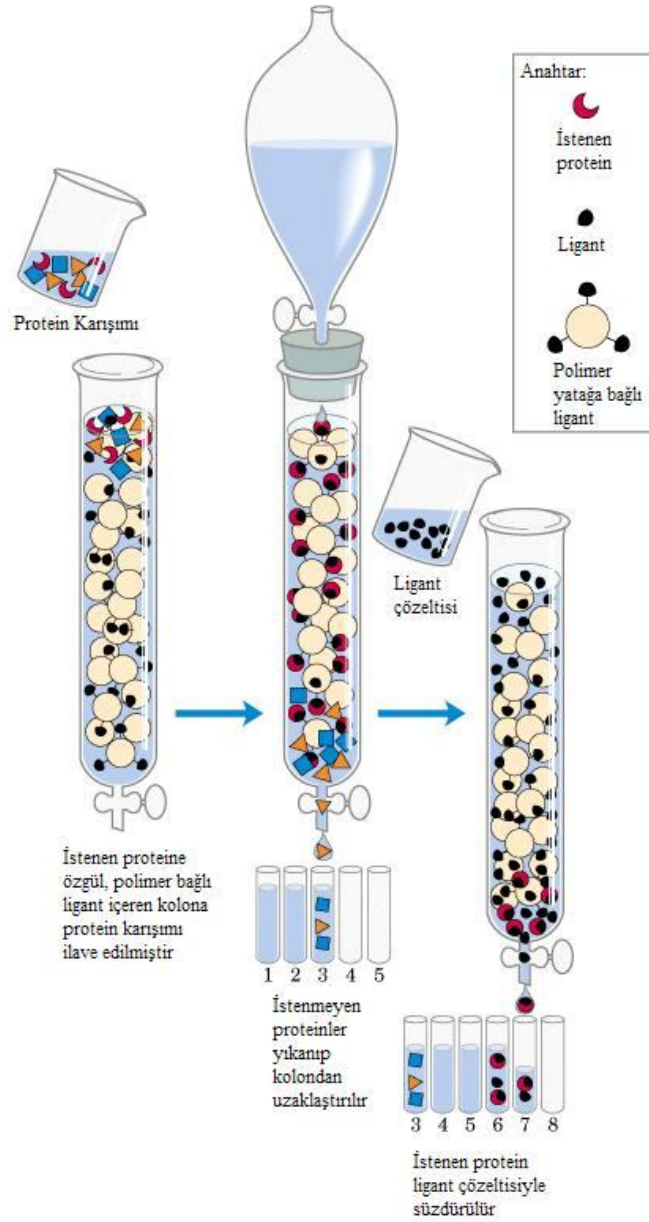
Diyaliz işlemi ile ortamdaki iyonlardan izole edilen numune afinite kolonuna tatbik edilmek için +4 °C’de muhafaza edildi.

### **2.2.1.32,5, ADP-Sepharose 4B Afinité Kolonunun Hazırlanması, İnsan Eritrosit Hemolizatının Afinité Kolonuna Tatbiki ve G6PD’nin Elüsyonu**

Afinité jeli hazırlamak için, 10 mL’lik yatak hacmini oluşturmak üzere 2 g kuru 2’, 5’ ADP-Sepharose 4B kolon materyali tartıldı ve 400 mL saf su içerisinde katkı maddelerinin uzaklaştırılması için birkaç defa yıkandı. Yıkama esnasında jel şişti. Bütün bu işlemler laboratuvar şartlarında gerçekleştirildi. Şişmiş jelin havası alındıktan hemen sonra %25 dengeleme tamponu (0,1 M Potasyum asetat/ 0,1 M Potasyum fosfat pH=6,0) ve %75 jel olacak şekilde, jel süspanse edildi. Süspanse edilmiş jel (1x10) cm’lik kapalı ceketli kolona paketleni.

Daha sonra kolona paketlenmiş jel, peristaltik pompa kullanılarak dengeleme tamponuyla yıkandı. Dengeleme ve yıkama, akış hızı 50 mL/saat olarak uygulandı [98]. Kolonun dengelenmiş olduğu elüat ile üstten kolona uygulanan dengeleme tamponununun 280 nm'deki absorbansının eşitlenmesinden anlaşıldı. Amonyum sülfat çöktürmesinden elde edilen derişiklendirilmiş numune, 0,1 M Potasyum asetat/0,1 M Potasyum fosfat (pH=6,0) tampon çözeltisiyle dengelenmiş olan afinite kolonuna tatbik edildi. Daha sonra kolon sırasıyla 25 mL 0,1 M Potasyum asetat/0,1 M potasyum fosfat (pH=6,0) 25 mL 0,1 M potasyum asetat/0,1 M potasyum fosfat (pH=7,85) ve 0,1 M KCl/ 0,1 M Potasyum fosfat (pH=7,85) çözeltiyle yıkandı. Akış hızı peristaltik pompa ile kontrol altında tutuldu. Bu şekilde enzimin büyük bir kısmı jele tutunmuş ve diğer safsızlıklar uzaklaştırılmış oldu. Daha sonra 80 mM potasyum fosfat + 80 mM KCl + 0,5 mM NADP<sup>+</sup> + 10 mM EDTA (pH=7,85) elüsyon çözeltisi ile kolona tutunmuş olan enzim elüe edildi. Şekil 2.4' te afinite kromatografisi ile saflaştırma basamakları gösterilmektedir.

Elüsyonlar fraksiyon toplayıcısı ile 1,5 mL'lik tüplere alındı. Akış hızı peristaltik pompa ile 20 ml/saat'e ayarlandı. Bütün bu işlemler sırasında sıcaklık +4 °C'de sabit tutuldu [97]. Her fraksiyonda enzim aktivitesine bakıldı, en yüksek aktivite gösteren tüpten 100µL ayrıldı ve aktivite gösteren fraksiyonlar birleştirildi. Hemolizat, amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen çözelti, en yüksek aktivite gösteren elüet ve aktivite gösteren tüplerin birleştirilmesi sonucu oluşan havuz çözeltinin aktiviteleri ayrı ayrı belirlendi [97]. Bu yöntemle büyük oranda saflaştırılmış olan G6PD enzimi in vitro ölçümlerde kullandı.



Şekil 2.4 Afinite kromatografisi ile protein saflaştırma aşamaları [187]

#### 2.2.1.4 Sodyum dodesilsülfat-Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile Enzim Saflığının Kontrolü

İnsan eritrosit G6PD enzimi 2', 5' ADP-Sepharose 4B afinite kromatografisi ile saflaştırıldıktan sonra enzimin saflığı, %0,1 SDS ihtiva eden sırasıyla %3 ve %10 akrilamid konsantrasyonunda yığıma ve yürütme jeli ile kesikli SDS-PAGE yapılarak kontrol edildi [188]. Bu işlemin başında elektroforez için kullanılan cam plakalar önce su, sonra alkol ile iyice yıkandı. Cam plakaları birleştiren mikalara (spacer)

ince bir tabaka halinde vazelin sürüldü. İki cam plaka birbiri üstüne konuldu ve özel naylon kaplarına yerleştirilerek jel hazırlama cihazına konuldu. Daha sonra cam plakalar aralık oluşturucu mikaların bulunduğu kısımlardan kıskaçlarla dikkatlice sıkıştırıldı. Ayırma jeli hazırlanarak plakalar arasına enjektörle döküldü. Ortamda hava olmamasına dikkat edildi. Jel yüzeyinin düzgün olması için % 0,1 'lik SDS ile ince bir tabaka oluşturuldu. Polimerleşinceye kadar (yaklaşık yarım saat) beklendi. Polimerleştikten sonra üstündeki %0,1'lik SDS alındı. Daha sonra plakaların üst kısmına tarak yerleştirildi ve yığma jel tarağın yanından üst yüzeye kadar ilave edildi. Tarağın üstüne nemli süzgeç kağıdı konularak bir gece bekletildi. Sonraki gün tarak dikkatlice çıkarılarak plakalar elektroforez tankına yerleştirildi. Oluşan boşluklar işaretlenerek jelin üstü önce saf su, sonra da yürütme tamponu ile yıkandı. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konuldu. Numuneler her birinde 10 µg protein olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim 100 µL olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu katıldı. 3 dakika kaynar su banyosuna inkübe edildi. Numuneler soğutulularak, elektroforeze çok ince bir enjektör yardımıyla uygulandı. Tank kapağı kapatılarak alt tarafından (+) kablo (anot), üstten (-) kablo (katot) yerleştirildi. Önce 80 voltta numuneler ayırma jeline gelinceye kadar yürütüldü. Daha sonra akım 150 volta ayarlanarak 4-5 saat oda sıcaklığında tatbik edildi. Akım kesilerek, cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı. Bu yürütme tamponu tekrar kullanılmak üzere saklandı. Daha sonra renklendirme çözeltisi üstünü örtünceye kadar eklendi. 45 dakika kadar çalkalayıcı üzerinde bırakıldı. Sonra renklendirme çözeltisinden çıkarılarak, renk açma çözeltisine alındı. Belirli aralıklarla değiştirilmek suretiyle jelin zemin rengi açılıp, protein bantları belirginleşinceye kadar 1-2 gün bu çözelti içinde çalkalandı.

Yıkama çözeltisi, aktif karbon üzerinden geçirilerek tekrar tekrar kullanıldı. Jel yıkama çözeltisinden çıkarıldıktan sonra fotoğrafı çekildi. Elektroforezde kullanılan renklendirme çözeltisi; % 0,1 Coomassie Brilliant Blue R-250, %50 metanol, %10 asetik asit, %40 saf su ile hazırlandı. Yıkama çözeltisi ise; %50 metanol, %10 asetik asit, %40 saf sudan ibarettir.

## 2.2.2 Protein tayini

### 2.2.2.1 Kalitatif Protein Tayini

Kalitatif protein tayini, proteinlerin yapısında bulunan aromatik gruplara sahip tirozin ve triptofan amino asitlerinin 280 nm'de maksimum absorbands göstermesi esasına dayanan Warburg Metodu olarak bilinen yolla gerçekleştirildi. Kromatografi işlemlerinden sonra eşit hacimde alınmış olan bütün tüplerde kalitatif protein tayini yapıldı. Kuvarz küvetler kullanılarak UV-Vis spektrofotometrede absorbsansları köre karşı okundu. Bununla birlikte 2', 5' ADP-Sepharose 4B afinite kolonundan alınan fraksiyonlarda elüsyon işlemi sırasında NADP<sup>+</sup> kullanıldığından ve NADP<sup>+</sup> 280 nm'de proteinlerin absorbandsını maskelediği için sonuç alınamadı.

### 2.2.2.2 Lowry Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini

Amonyum sülfat çöktürmesi sırasında elde edilen çözeltilerdeki protein miktar tayinleri bu yöntemle belirlendi. Bu yöntem alkali koşullar altında biüret reaksiyonu ve aromatik aminoasitlerin Cu<sup>+2</sup> katalizli oksidasyonundan sonra, ayrıca bulunan fosfomolibdik, fosfotungisdik asiti ile heteropolimolibden mavisine indirgenmeyi içeren Folin- Ciocalteu reaksiyonunun bir kombinasyonudur. Özetle deneyin prensibi alkali ortamda proteinlerin peptid bağlarının ve tirozin aminoasitinin yan grubunun bakır ile kompleks oluşturmasına dayanır [189]. Koyu mavi renk oluşumu karakteristiktir ve 600 nm dalga boyunda absorbands verir. Bu yöntem Bradford yöntemine göre daha duyarlıdır. Hassasiyet aralığı 5-100 µg/mL'dir. Ayrıca triptofan ve tirozin içeriği fazla olan proteinlerin miktar tayini için avantajlıdır. Çünkü ayrıca, bu aminoasitlere daha yüksek hassasiyet gösterir.

Protein tayini işleminde şu yol izlendi: 1 mL'sinde 1 mg protein içeren standart sığır albümin çözeltisinden tüplere 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 µL alındı. Her tüpe 2 mL D ayırıcından eklendi. 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Her tüpe 0,2 mL folin-fenol çözeltisinden eklenip vorteks ile zaman kaybetmeden karıştırıldı ve 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. 600 nm'de

köre karşı absorbands değerleri okundu. Okunan absorbands değerlerine karşılık gelen mg protein değerleri ile standart grafik hazırlandı (Şekil 3.2).

Saflaştırma basamaklarında kantitatif protein tayini yapılacak numuneler için de standart eğri hazırlanırken uygulanan metot uygulanmıştır. Ölçümlerin ortalama absorbandsına karşılık gelen protein miktarı standart grafik yardımıyla hesaplandı.

### 2.2.3 Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz Enziminin Aktivite Tayini

Enzim aktivitesi UV-Vis spektrofotometrede 25 °C’de Beutler metoduna göre yapıldı. Bu metot nikotiamid adenin dinükleotid fosfat’ın (NADP<sup>+</sup>) indirgenmesinden dolayı oluşan NADPH’ın 340 nm’de absorbands vermesi esasına dayanır.

G6PD enziminin aktivite ölçümünde kontrol ve numune küvetinin hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler ve miktarları sırasıyla Çizelge 2.1 ve 2.2’de verilmiştir.

**Çizelge 2.1** Kontrol küvetinin hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler ve miktarları

| Kimyasal maddeler           | 1 ml’lik küvet için kullanılan miktar (µL) |
|-----------------------------|--|
| 1M Tris-HCl+5mM EDTA pH=8,0 | 100  |
| 0,1 M MgCl <sub>2</sub>     | 100  |
| 2mM NADP <sup>+</sup>       | 100  |
| Enzim                       | 50   |
| Saf su                      | 650  |
| <b>Toplam</b>               | <b>1000</b>                                |



**Çizelge 2.2** Numune küvetinin hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler ve miktarları

| Kimyasal maddeler           | 1 ml'lik küvet için kullanılan miktar (µL) |
|-----------------------------|--|
| 1M Tris-HCl+5mM EDTA pH=8,0 | 100  |
| 0,1 M MgCl <sub>2</sub>     | 100  |
| 2mM NADP <sup>+</sup>       | 100  |
| 6mM G6P                     | 100  |
| Enzim                       | 50   |
| Saf su                      | 550  |
| <b>Toplam hacim</b>         | <b>1000</b>                                |

Belirtilen çözeltiler küvetlere yerleştirildikten sonra hızlı bir şekilde 25 °C'de, numunedeki 1 dakika içerisindeki absorpsiyon artışları kaydedildi. Daha sonra aşağıdaki formül kullanılarak mL başına enzim aktivitesi hesaplandı;

$$A = (\Delta OD \cdot 6,22) \times (V_C / V_E)$$

**A** = mL başına enzim ünitesi (EU) sayısı

**ΔOD** = 340 nm'de optik dansitenin dakika başına değişimi

**V<sub>C</sub>** = küvet hacmi

**V<sub>E</sub>** = küvetteki saf enzim çözeltisinin hacmi

**6,22** = 1 mM NADP<sup>+</sup>'nin indirgenmesi için kabul edildiğinde kullanılan katsayı (mM ekstinksiyon katsayısı)

Saflaştırma tablosu elde etmek için amonyum sülfat çöktürme işlemleri sonucu elde edilen numune ile hemolizat saf su ile seyreltilmesi için bir dakika içerisinde elde edilen 340 nm'deki absorpsiyon farkı ile seyreltme faktörü çarpıldı. Çıkan sonuç formülde aynen uygulanarak enzim üniteleri hesaplandı.

#### **2.2.4 NADP<sup>+</sup> ve G6P Substratları için K<sub>m</sub> ve V<sub>max</sub> Değerlerinin Bulunmasına Yönelik Çalışmalar**

NADP<sup>+</sup> için K<sub>m</sub> ve V<sub>max</sub> değerleri hesaplanırken sabit G6P konsantrasyonunda 5 farklı NADP<sup>+</sup> konsantrasyonu kullanılarak optimum şartlarda aktivite ölçümü yapıldı. Aynı şekilde G6P için K<sub>m</sub> ve V<sub>max</sub> değerleri, sabit NADP<sup>+</sup> konsantrasyonunda 5 farklı G6P konsantrasyonu kullanılarak optimum şartlarda aktivite ölçümü yapıldı. Daha sonra hem NADP<sup>+</sup> hem de G6P için Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Grafikten K<sub>m</sub> ve V<sub>max</sub> değerleri bulundu.

#### **2.2.5 Kumarin Türevlerinin ve Bazı Pestisitlerin İnsan Eritrositlerinden 2', 5' ADP-Sepharose 4B Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılan G6PD enzimi üzerine İn vitro Etkilerinin İncelenmesi**

Bu çalışmada Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Organik Kimya laboratuvarlarında sentezlenen yeni altı farklı kumarin türevi, antikoagulan özelliği olan etken maddesi olarak varfarin sodyum kumarin türevini içeren ilacın, üçü herbisit ikisi insektisit olarak tarım alanında çok fazla kullanılan beş farklı pestisit insan eritrositlerinden saflaştırılan G6PD enzimi aktivitesi üzerine etkileri araştırıldı. Kinetik ölçümler için Beutler metodu kullanıldı [190]. Enzimi inhibe eden maddeler için sabit substrat konsantrasyonunda farklı inhibitör konsantrasyonu kullanılarak IC<sub>50</sub> değerleri % Aktivite-[I] grafikleri çizilerek belirlendi.

#### **2.2.6 İnsan Eritrosit G6PD Enzimi için İnhibitör Etkisi Gösteren Kumarin Türevleri ve Bazı Pestisitlerin İnhibisyon Tiplerinin Bulunması**

Yeni sentezlenmiş olan 6,7-dihidroksi-3-(2-metilfenil)-2H-kromen-2-on, 6,7-dihidroksi-3-(3-metilfenil)-2H-kromen-2-on, 6,7-dihidroksi-3-(4-metilfenil)-2H-kromen-2-on, 7,8-dihidroksi-3-(4-metilfenil)-2H-kromen-2-on, 6,7-dihidroksi-3-(2,5-dimetoksifenil)-2H-kromen-2-on, 6,7-dihidroksi-3-(3,4,5-trimetoksifenil)-2H-kromen-2-on, Sodyum 2-okso-3-[(RS)-3-okso-1-fenilbütül]-2H-kromen-4-olat; herbisit olarak kullanılan N-(fosfonometil)glisin ve (2,4-diklorofenoksi)asetik asit etken maddelere sahip iki

farklı pestisitlerin inhibisyon tipleri ve  $K_i$  değerleri tespit edilmiştir.  $K_i$  değerleri tespit edilirken Bölüm 2.2.5'te belirtildiği gibi % Aktivite-[I] grafiği çizildikten sonra, enzimin aktivitesini %50'nin aşağısına ve %50'nin yukarisına denk gelen uygun iki inhibitör konsantrasyonu tespit edilmiştir. Bu sabit iki konsantrasyon ile farklı G6P konsantrasyonları seçilerek  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri hesaplanarak Lineweaver-Burk grafikleri çizilmiş,  $K_i$  değerleri hesaplanmıştır.

### **3. BULGULAR**

#### **3.1 İnsan Eritrosit Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz Enziminin 2', 5' ADP-Sepharose 4B Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması ve Karakterizasyonu**

##### **3.1.1 Amonyum Sülfat Çöktürmesi**

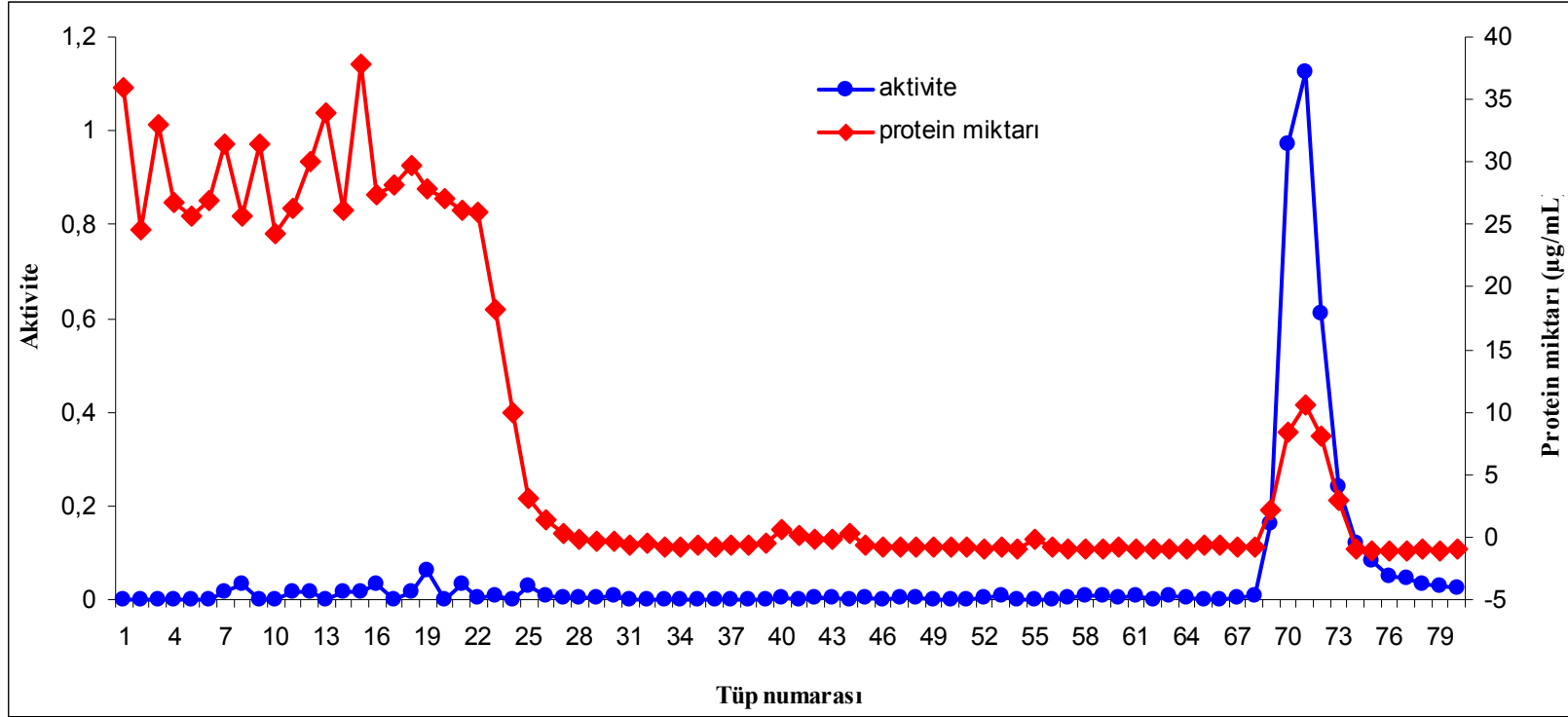
Bölüm 2.2.1.2'de belirtildiği gibi insan eritrosit G6PD enzimi için daha önce belirlenen % 30-70 amonyum sülfat çöktürme aralığı kullanılmıştır. Çöktürme sonunda 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH=7,0) tamponu kullanılarak çözülen çökeleğin toplam aktivitesi 5,04 U/ml, toplam protein miktarı 391,125 mg/ml olarak belirlenmiş, yüzde verimi 68,18 ve saflaştırma katsayısı 1,200 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 3.1). Çökeleğin çözülmesiyle elde edilen numune afinite kolona tatbik edilmiştir.

##### **3.1.2 2', 5' ADP-Sepharose 4B Afinite Kromatografisi ile G6PD Enzimin Saflaştırılması**

Bölüm 2.2.1.3'de belirtildiği gibi amonyum sülfat çöktürmesi sonunda elde edilen numune 50 mM Potasyum asetat/50 mM potasyum fosfat (pH=6,0) tamponuna karşı diyaliz edildikten sonra 2', 5' ADP-Sepharose 4B Afinite kolonuna tatbik edildi. Kolonun yıkanması için 25'er mL 0,1 M Potasyum asetat/ 0,1 M Potasyum fosfat (pH=6,0), 0,1 M Potasyum asetat/ 0,1 M Potasyum fosfat (pH=7,85), 0,1 M Potasyum fosfat/ 0,1 M KCl (pH=7,85) tamponları geçirildikten sonra 80 mM Potasyum fosfat + 80 mM KCl + 0,5 mM  $\text{NADP}^+$  + 10 mM EDTA (pH= 7,85 ) tamponu kolondan geçirilerek elüsyon işlemi gerçekleştirildi. Yıkama ve elüsyon işlemlerinde kolondan alınan numuneler 1,5 mL'lik tüplere yerleştirildi. Bölüm 2.2.3'de belirtildiği gibi her bir elüatın 340 nm'de aktivite tayini yapıldı.

Ayrıca yüksek aktivite gösteren tüpler birleştirilerek havuz oluşturuldu ve aktivite tayini yapıldı. Bölüm 2.2.2.2’de belirtildiği gibi önceden 500 µL ayrılmış olan hemolizat, amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen numune, en yüksek aktivite gösteren tüp ve sonradan oluşturulan elüat havuzunun kantitatif protein tayinleri yapıldı. Tüp numaralarına göre aktivite ve protein miktarları Şekil 3.1’de gösterilmektedir. Toplam 79 tüp ile kolondan önce safsızlıklar ardından G6PD enzimi elüe edildi. İlk aşama olarak kolona tatbik edilmiş diyaliz sonrası numunede enzim ile beraber safsızlıklar bulunmaktadır. Safsızlıkların kolondan uzaklaştırılması için ilk olarak 0,1 M Potasyum asetat/ 0,1 M Potasyum fosfat (pH=6,0) yıkama tamponu kolondan geçirildi ve 20 tüp bu yıkama işlemi sonucu alındı. Ardından 0,1 M Potasyum asetat/ 0,1 M Potasyum fosfat (pH=7,85) ve 0,1 M Potasyum fosfat/ 0,1 M KCl (pH=7,85) yıkama tamponları kolondan geçirilerek toplam 60 tüp alındı. 61.tüpten itibaren 80 mM Potasyum fosfat + 80 mM KCl + 0,5 mM NADP<sup>+</sup> + 10 mM EDTA (pH= 7,85 ) elüsyon tamponu kolondan geçirilerek 61.tüpten itibaren enzim kolondan elüe edimeye başlandı.

Çizelge 3.1’de görüldüğü gibi aktivitesi en yüksek olan tüpte G6PD enzimi insan eritrositlerinde %33,65 verimle, 7068,100 kat saflaştırılmıştır. Kinetik çalışmalar için aktivitesi yüksek 4 tüpün birleştirilmesi sonucu oluşturulan havuzda G6PD enzimi insan eritrositlerinde %81,41 verimle 4845,400 kat saflaştırılmıştır.



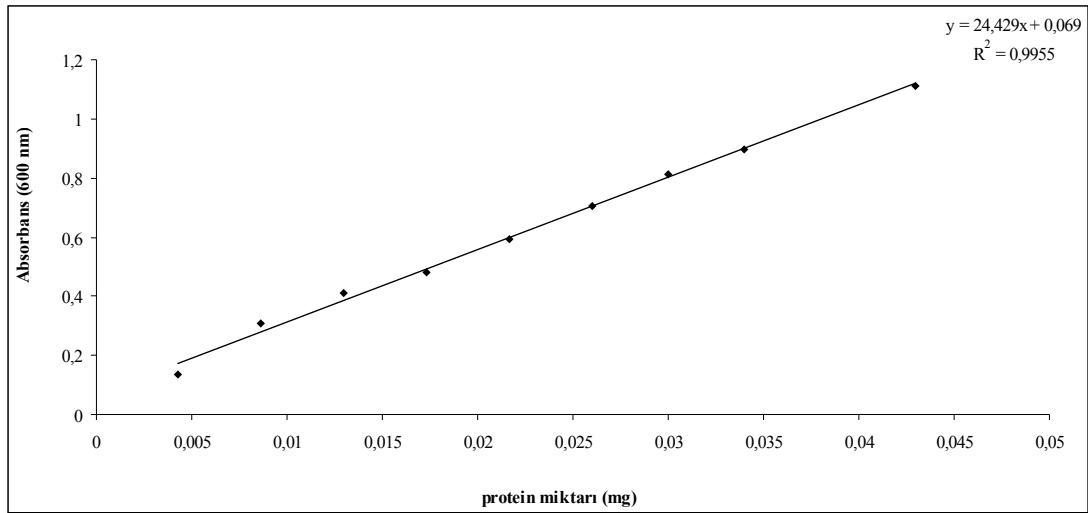
Şekil 3.1 2', 5' ADP-Sepharose 4B Afinite Kolonundan G6PD enziminin elüsyon grafiği

**Çizelge 3.1** İnsan Eritrosit G6PD Enziminin Saflaştırma Tablosu

|   | <b>Hacim<br/>(ml)</b> | <b>Aktivite<br/>(U/ml)</b> | <b>Toplam<br/>Aktivite (U/ml)</b> | <b>Protein<br/>Miktarı<br/>(mg/ml)</b> | <b>Toplam<br/>Protein<br/>(mg/ml)</b> | <b>Spesifik<br/>Aktivite<br/>(U/mg)</b> | <b>% Verim</b> | <b>Saflaştırma<br/>Derecesi</b> |
|---|-----------------------|----------------------------|-----------------------------------|--|---------------------------------------|---|----------------|---------------------------------|
| <b>Hemolizat</b>  | 77                    | 0,096                      | 7,392                             | 9,510                                  | 732,270                               | 0,0100                                  | 100            | 1                               |
| <b>Amonyum Sülfat<br/>Çöktürmesi</b>                      | 35                    | 0,144                      | 5,04                              | 11,175                                 | 391,125                               | 0,012                                   | 68,18          | 1,200                           |
| <b>2', 5' ADP-Sepharose 4B<br/>Afinite Kromatografisi</b> | 1,5                   | 1,659                      | 2,488                             | 0,0235                                 | 0,0352                                | 70,681                                  | 33,65          | 7068,100                        |
| <b>2', 5' ADP-Sepharose 4B<br/>Afinite Kromatografisi</b> | 6                     | 1,003                      | 6,018                             | 0,0207                                 | 0,1242                                | 48,454                                  | 81,41          | 4845,400                        |

### 3.1.3 Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

Saflaştırma basamaklarında kantitatif protein tayini için Lowry metodu kullanılmıştır. Lowry metodu kantitatif diğer protein tayinlerinden oldukça hassas olup hassasiyet aralığı 5-100 µg/ml'dir. Söz konusu yöntemle protein miktar tayininde sığır serum albümin proteini standart olarak kullanılmıştır. Standart çözeltilerdeki mg proteine karşılık gelen absorbans değerleri aşağıdaki grafikte gösterilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi regresyon katsayısı 0,9955 olarak belirlenmiştir. Söz konusu grafiğin doğru denkleminde ilgili absorbansa karşılık gelen mg protein miktarı tespit edilmiştir ve sonuçlar Şekil 3.2'de grafik halinde verilmiştir.

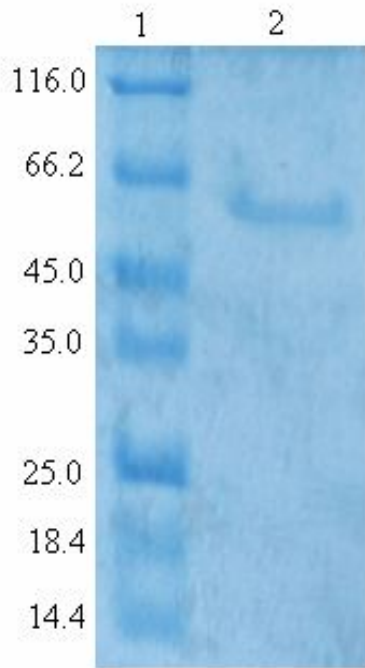


**Şekil 3.2** Lowry yöntemiyle proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart grafik



### 3.1.4 Eritrosit G6PD Enziminin Sodyum dodesilsülfat-Poliakrilamid jel (SDS-PAGE) Elektroforezi

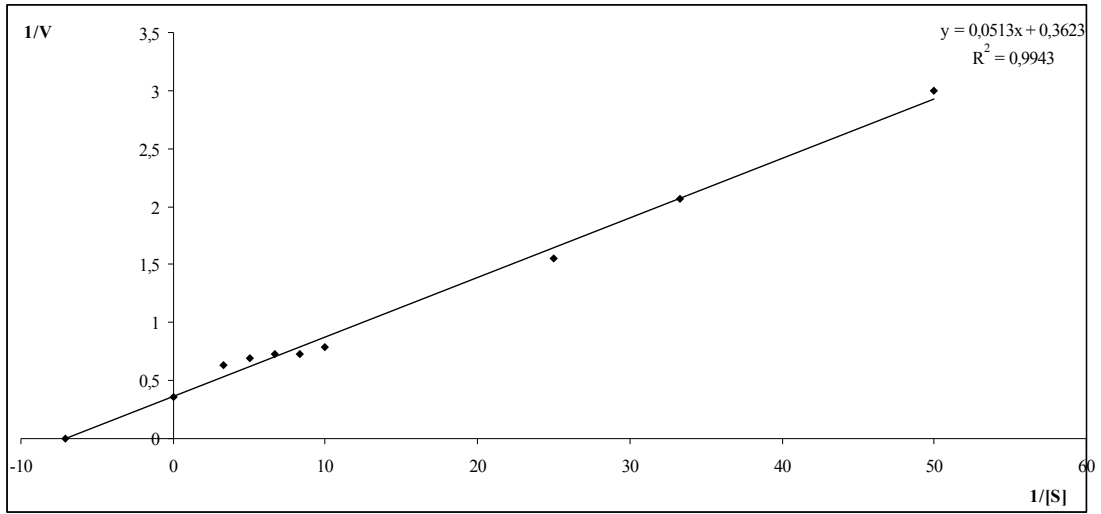
Afinite kolonundan saflaştırılan G6PD enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla bölüm 2.2.1.4’de anlatıldığı şekilde hazırlanan (SDS-PAGE) elektroforezine enzim numunesi tatbik edildi. Protein bantları içeren jellerin görüntüleri jel görüntüleme sistemi ile bilgisayara aktarıldı (Şekil 3.3).



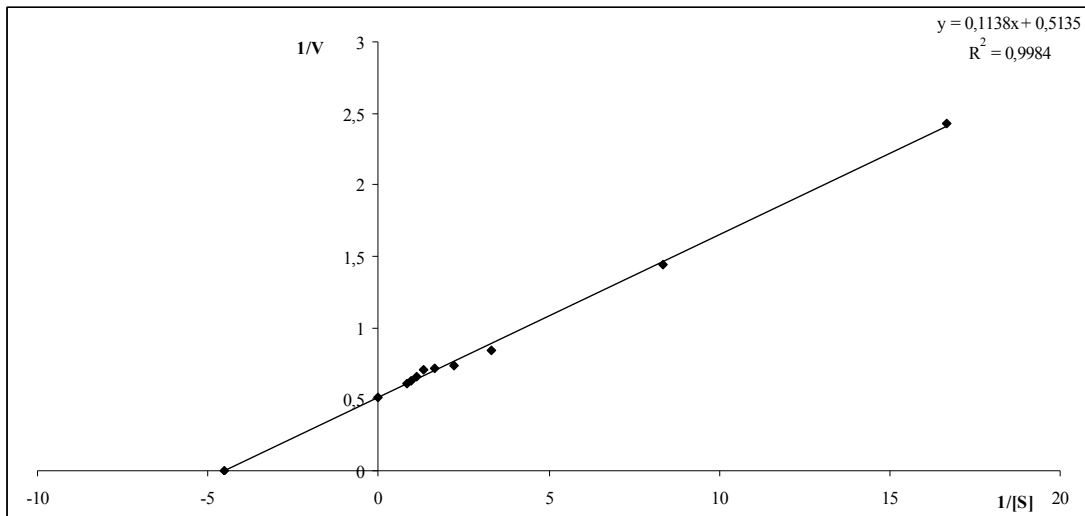
**Şekil 3.3** Afinite kromatografisi ile saflaştırılan G6PD enziminin SDS-polakrilamid jel elektroforezi. Molekül ağırlık standartları; ( $\beta$ -galaktosidaz (118,0kDa), sığır serum albumin (79,0 kDa), yumurta albumini (47,0 kDa), karbonik anhidraz (33,0 kDa),  $\beta$ -laktoglobulin (25,0 kDa) ve Lizozim (19,5 kDa)

### 3.1.5 Eritrosit G6PD Enziminin $\text{NADP}^+$ ve G6P Substarları için $K_m$ ve $V_{\max}$ Değerlerinin Hesaplanması

İnsan eritrosit G6PD enziminin  $\text{NADP}^+$  ve G6P substratları için  $K_m$  ve  $V_{\max}$  değerleri bölüm 2.2.4'te anlatıldığı şekilde tespit edildi. Şekil 3.4 ve Şekil 3.5'te görüldüğü gibi enzimin iki ayrı substratı için Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Elde edilen  $K_m$  ve  $V_{\max}$  değerleri Çizelge 3.2'de belirtilmektedir.



Şekil 3.4 Sabit G6P değerinde farklı  $\text{NADP}^+$  Konsantrasyonlarında  $K_m$  ve  $V_{\max}$  Grafiği



Şekil 3.5 Sabit  $\text{NADP}^+$  değerinde farklı G6P Konsantrasyonlarında  $K_m$  ve  $V_{\max}$  Grafiği

Çizelge 3.2’de görüldüğü gibi enzimin  $K_m$  değeri daha düşük olan  $NADP^+$ ’ye ilgisi, G6P’den daha yüksektir. Yine katalitik etkinlik olarak bilinen  $V_{max}/K_m$  oranı da  $NADP^+$ ’nin, G6P’ye göre yüksek olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda  $NADP^+$  substrat gibi değerlendirilmiştir. Çünkü koenzim kullanan enzimlerde koenzim substrat gibi davranmaktadır.

**Çizelge 3.2** G6PD enziminin  $NADP^+$  ve G6P substratları için  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri

| <b><i>Substrat</i></b>         | <b><i>K<sub>m</sub> (mM)</i></b> | <b><i>V<sub>max</sub> (EU/ml)</i></b> | <b><i>V<sub>max</sub> (EU/ml)/K<sub>m</sub>(mM)</i></b> |
|--------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|---|
| <b><i>NADP<sup>+</sup></i></b> | 0,141                            | 2,76                                  | 19,57   |
| <b><i>G6P</i></b>              | 0,221                            | 1,94                                  | 8,77  |

### 3.2 Kumarin Türevleri ve Bazı Pestisitlerin G6PD Enzimi Üzerine Etkileri

İnsan eritrosit G6PD enzimine in vitro etkilerini incelemek için Bölüm 2.2.5’de belirtildiği şekilde kumarin türevleri ve bazı pestisitlerin stok çözeltileri hazırlanarak Çizelge 3.3’de belirtilmiştir.

G6PD enzimi aktivitesini %50’ye indiren inhibitör konsantrasyonlarını tespit etmek için  $IC_{50}$  çalışması yapılmış olan 7 kumarin türevinin çalışmada kullanılan konsantrasyon değerleri, aktivite ve % aktivite değerleri Çizelge 3.5-3.11’de belirtilmiş, Şekil 3.7-3.13’de sonuçlar grafik şeklinde verilmiştir. G6PD enzimine inhibisyon etkisi gösteren kumarin türevlerinin inhibisyon tipi çalışması yapılmıştır. Çizelge 3.13-3.18’de G6PD enzimine inhibisyon etki gösteren kumarin türevlerinin kullanılan konsantrasyonları, substrat konsantrasyonları ve kullanılan çözeltilerin miktarları belirtilmiş,  $1/[S]$  ve  $1/V$  hesaplamaları yapılarak Lineweaver-Burk grafikleri Şekil 3.14-3.19’da gösterilmiştir.

G6PD enziminin aktivitesini %50’ye indiren inhibitör konsantrasyonlarını tespit etmek üzere  $IC_{50}$  çalışması yapılmış, 5 pestisitinin kullanılan konsantrasyon değerleri, aktivite ve % aktivite değerleri Çizelge 3.20-3.24’de belirtilmiştir. Şekil 3.20-3.24’de sonuçlar grafik şeklinde verilmektedir.  $IC_{50}$  değerleri tespit edilen pestisitlerin inhibisyon tipleri belirlenmiştir. Çizelge 3.26 ve Çizelge 3.27’de  $IC_{50}$  değerleri tespit edilen pestisitlerin inhibisyon tipi çalışmasında kullanılan konsantrasyonları, substrat konsantrasyonları ve kullanılan çözeltilerin miktarları belirtilmiş,  $1/[S]$  ve  $1/V$  hesaplanarak çizilen Lineweaver-Burk grafikleri Şekil 3.25 ve Şekil 3.26’da gösterilmiştir.

**Çizelge 3.3** Çalışılan Kimyasal Maddelerin Stok Konsantrasyonları

| <i>Kimyasal Madde</i> | <i>Stok Çözelti<br/>Konsantrasyonu (M)</i> |
|-----------------------|--|
| OPC                   | 0,0671                                     |
| MPC                   | 0,0365                                     |
| PPC                   | 0,0509                                     |
| DPC                   | 0,0291                                     |
| TPC                   | 0,0123                                     |
| FPC                   | 0,0446                                     |
| Varfarin              | 0,001                                      |
| Glifosat              | 0,104                                      |
| 2,4-D                 | 0,226                                      |
| İmazethapyr           | 0,00346                                    |
| Diazinon              | 0,00304                                    |
| Deltamethrin          | 0,0004948                                  |

### 3.2.1 Kumarin Türevlerinin G6PD enzimi Üzerine *In Vitro* Etkileri

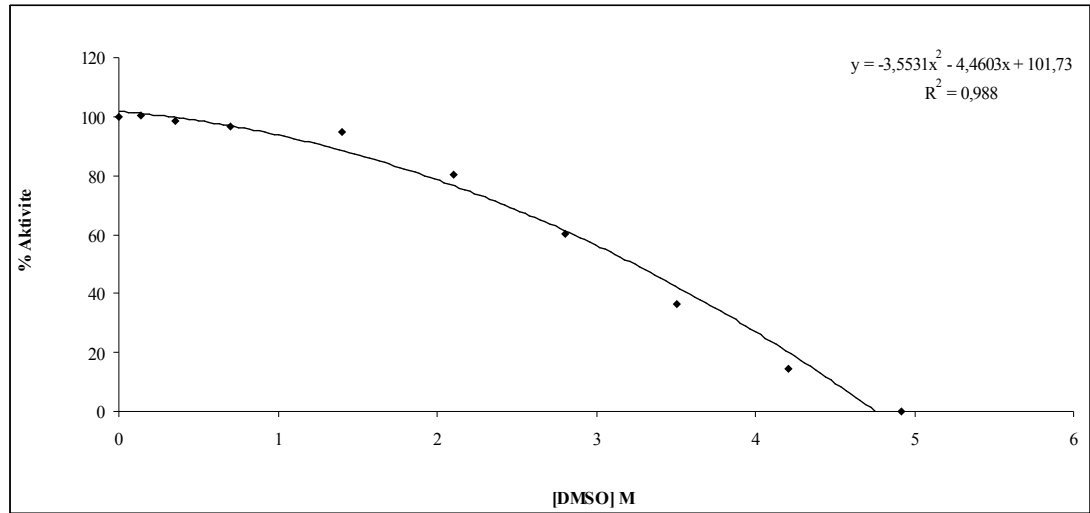
#### 3.2.1.1 IC<sub>50</sub> Çalışmaları

Kumarin türevleri dimetil sülfö oksit (DMSO) ile farklı konsantrasyonlarda çözülmüştür. DMSO'nun kuvvetli bir çözücü olduğu göz önünde bulundurularak önce DMSO'nun G6PD enzimini hangi konsantrasyonlarda ne kadar inhibe ettiği tespit edildi. Çizelge 3.4'de kullanılan DMSO miktarları, absorbans farkları, aktivite değerleri ve % Aktivite değerleri verilmektedir. Şekil 3.6 'da [DMSO]- % Aktivite grafiği görülmektedir. Bu elde edilen bilgilerden yola çıkılarak özellikle DMSO'nun G6PD enzimine etki etmediği veya göz ardı edilecek derecede az etki ettiği konsantrasyonları aralıkları kumarin türevlerinin IC<sub>50</sub> çalışmalarında kullanılmıştır. DMSO ve 7 kumarin türevinin IC<sub>50</sub> çalışmalarında tampon olarak 100'er µL Tris-HCl, MgCl<sub>2</sub>, NADP<sup>+</sup> ve G6P kullanılmıştır. Çizelge 3.12'de 7 kumarin türevinin farklı konsantrasyonlarda % Aktivite değişimleri toplu olarak görülmektedir.

**Çizelge 3.4** İnsan Eritrosit G6PD Enzimi Üzerine DMSO ile Yapılan Çalışmalarda Kullanılan Konsantrasyonlar, 340 nm’ de Ölçülen 1 dakikalık Absorbans Farkları, Aktivite ve Buna Karşılık Gelen % Aktivite Sonuçları

| Enzim( $\mu$ L) | [DMSO] (M) | Fark( $\Delta$ 0D) | Aktivite | %Aktivite |
|-----------------|------------|--------------------|----------|-----------|
| 50              | -          | 0,294              | 0,948    | 100,00    |
| 50              | 0,140      | 0,296              | 0,951    | 100,30    |
| 50              | 0,351      | 0,289              | 0,929    | 98,36     |
| 50              | 0,702      | 0,285              | 0,916    | 96,66     |
| 50              | 1,404      | 0,279              | 0,897    | 94,97     |
| 50              | 2,106      | 0,236              | 0,758    | 80,24     |
| 50              | 2,808      | 0,177              | 0,569    | 60,03     |
| 50              | 3,510      | 0,108              | 0,347    | 36,63     |
| 50              | 4,212      | 0,043              | 0,138    | 14,58     |
| 50              | 4,914      | 0,000              | 0,000    | 0         |

Çizelge 3.4’de belirtildiği gibi DMSO’nun 1,404 M konsantrasyonuna gelinceye kadar G6PD enziminin % Aktivite değerinde fazla değişiklik görülmemektedir. Kumarin türevlerinin özellikle, DMSO’nun 0 ile 1,404 M konsantrasyonuna denk gelen hacimlerinde çözülmesine dikkat edildi.



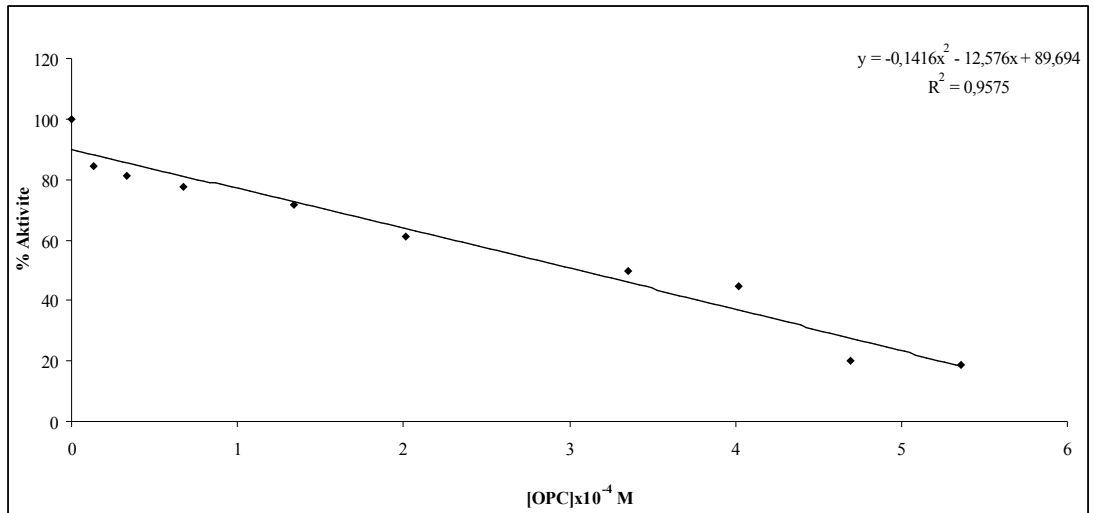
**Şekil 3.6** İnsan eritrosit G6PD enzimi için farklı DMSO konsantrasyonlarda elde edilen % Aktivite-[DMSO] Grafiği

Bölüm 2.2.5'te belirtildiği gibi kumarin türevlerinden OPC  $0,134 \times 10^{-4}$  M ile  $5,36 \times 10^{-4}$  M konsantrasyonları arasında G6PD enzimi üzerine etkileri incelenmiş, absorbans farkları, aktivite ve % aktivite sonuçları Çizelge 3.5'te belirtilmiştir.

**Çizelge 3.5** İnsan Eritrosit G6PD Enzimi Üzerine OPC ile Yapılan Çalışmalarda Kullanılan Konsantrasyonlar, 340 nm' de Ölçülen 1 dakikalık Absorbans Farkları, Aktivite ve Buna Karşılık Gelen % Aktivite Sonuçları

| Enzim( $\mu$ L) | [OPC] $\times 10^{-4}$ (M) | Fark( $\Delta$ 0D) | Aktivite | %Aktivite |
|-----------------|----------------------------|--------------------|----------|-----------|
| 50              | -                          | 0,155              | 0,498    | 100       |
| 50              | 0,134                      | 0,131              | 0,421    | 84,58     |
| 50              | 0,336                      | 0,126              | 0,405    | 81,35     |
| 50              | 0,671                      | 0,120              | 0,385    | 77,48     |
| 50              | 1,34                       | 0,111              | 0,357    | 71,67     |
| 50              | 2,01                       | 0,095              | 0,305    | 61,34     |
| 50              | 3,35                       | 0,077              | 0,247    | 49,71     |
| 50              | 4,02                       | 0,069              | 0,221    | 44,55     |
| 50              | 4,69                       | 0,031              | 0,099    | 20,01     |
| 50              | 5,36                       | 0,029              | 0,093    | 18,72     |

IC<sub>50</sub> değerini hesaplamak için aktivite ortamındaki OPC konsantrasyonuna karşılık % Aktivite grafiği çizilmiştir. Şekil 3.7'de gösterilen grafikten enzim aktivitesini %50 azaltan OPC konsantrasyonu IC<sub>50</sub>= $3,05 \times 10^{-4}$  M olarak tespit edilmiştir.



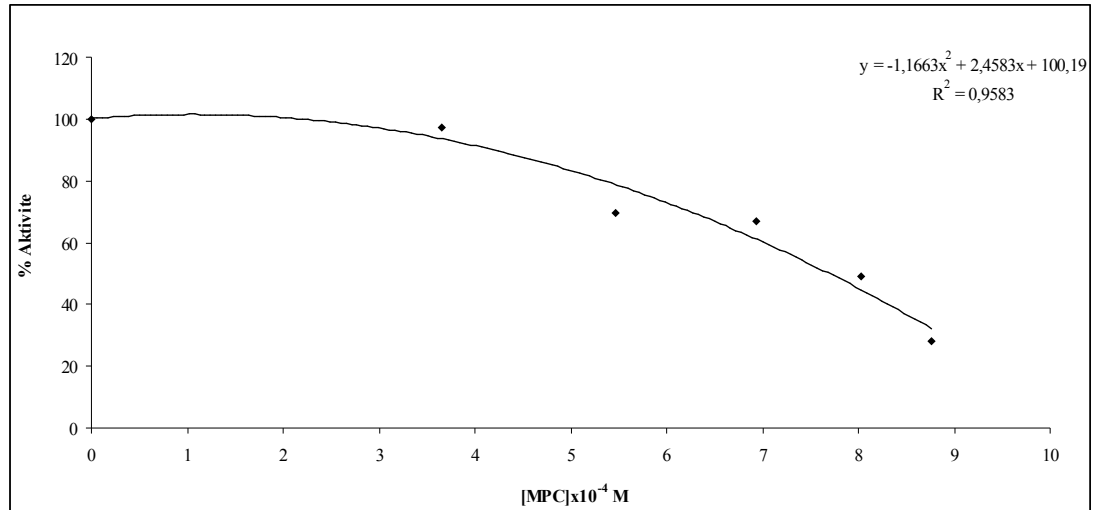
**Şekil 3.7** İnsan eritrosit G6PD enzimi için farklı OPC konsantrasyonlarda elde edilen % Aktivite-[OPC] Grafiği

Yeni 6 kumarin türevinden MPC'nin 5 farklı konsantrasyonunda G6PD enzimi üzerine  $IC_{50}$  çalışması Bölüm 2.2.5'de anlatıldığı şekilde uygulanmıştır. MPC'nin  $3,65 \times 10^{-4}$  M ile  $8,76 \times 10^{-4}$  M konsantrasyonları arasında G6PD enzimi üzerine etkileri incelenmiş, absorbans farkları, aktivite ve % aktivite sonuçları Çizelge 3.6'te belirtilmiştir

**Çizelge 3.6** İnsan Eritrosit G6PD Enzimi Üzerine MPC ile Yapılan Çalışmalarda Kullanılan Konsantrasyonlar, 340 nm'de Ölçülen 1 dakikalık Absorbans Farkları, Aktivite ve Buna Karşılık Gelen % Aktivite Sonuçları

| Enzim( $\mu$ L) | [MPC]. $\times 10^{-4}$ (M) | Fark ( $\Delta 0D$ ) | Aktivite | % Aktivite |
|-----------------|-----------------------------|----------------------|----------|------------|
| 50              | -                           | 0,443                | 1,39     | 100        |
| 50              | 3,65                        | 0,422                | 1,35     | 97,1       |
| 50              | 5,47                        | 0,303                | 0,97     | 69,78      |
| 50              | 6,93                        | 0,290                | 0,93     | 66,9       |
| 50              | 8,03                        | 0,212                | 0,68     | 48,92      |
| 50              | 8,76                        | 0,123                | 0,39     | 28,05      |

Şekil 3.8'de belirtildiği gibi MPC'nin farklı konsantrasyonlarına karşılık gelen % Aktivite sonuçları grafik şeklinde gösterilmektedir. MPC'nin enzimin aktivitesini yarıya indiren konsantrasyonu  $IC_{50}=7,69 \times 10^{-4}$  M olarak tespit edilmiştir



**Şekil 3.8** İnsan eritrosit G6PD enzimi için farklı MPC konsantrasyonlarında elde edilen % Aktivite-[MPC] Grafiği

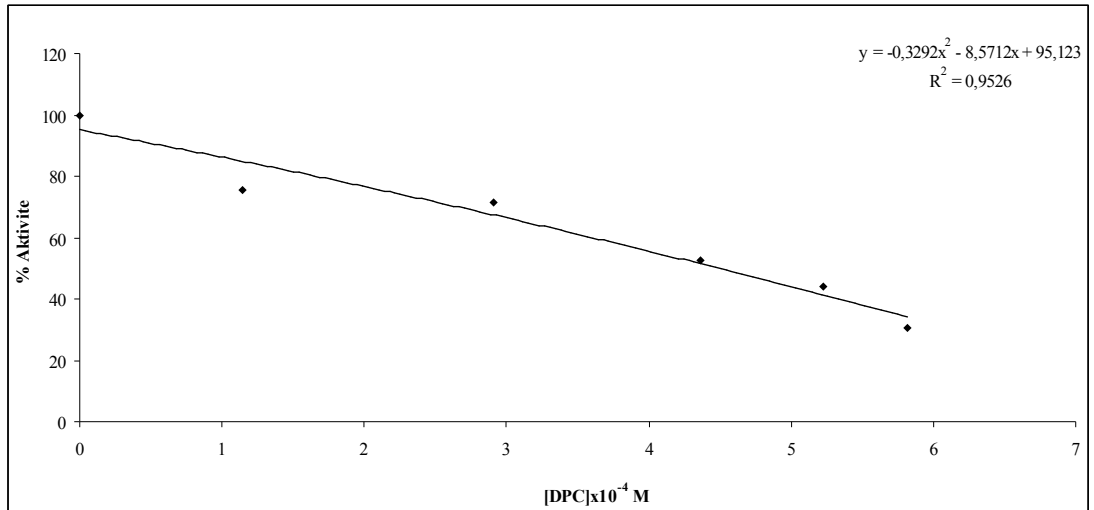


DPC'nin  $1.145 \times 10^{-4}$  M ile  $5,82 \times 10^{-4}$  M konsantrasyonları arasında G6PD enzimi üzerine  $IC_{50}$  çalışması yapılırken kullanılan 5 farklı inhibitör konsantrasyonu, absorbands farkları, aktivite ve % aktivite sonuçları Çizelge 3.7'de belirtilmiştir.

**Çizelge 3.7** İnsan Eritrosit G6PD Enzimi Üzerine DPC ile Yapılan Çalışmalarda Kullanılan Konsantrasyonlar, 340 nm' de Ölçülen 1 dakikalık Absorbans Farkları, Aktivite ve Buna Karşılık Gelen % Aktivite Sonuçları

| Enzim( $\mu$ L) | [DPC] $\times 10^{-4}$ (M) | Fark ( $\Delta 0D$ ) | Aktivite | %Aktivite |
|-----------------|----------------------------|----------------------|----------|-----------|
| 50              | -                          | 0,356                | 1,446    | 100       |
| 50              | 1,145                      | 0,269                | 0,864    | 75,57     |
| 50              | 2,91                       | 0,254                | 0,819    | 71,55     |
| 50              | 4,36                       | 0,186                | 0,600    | 52,48     |
| 50              | 5,23                       | 0,157                | 0,506    | 44        |
| 50              | 5,82                       | 0,127                | 0,409    | 30,67     |

Şekil 3.9'da verilen [DPC]-% Aktivite grafiğinden anlaşıldığı gibi enzimin aktivitesi %50'nin altına inmektedir. G6PD enziminin aktivitesini %50'ye indiren DPC konsantrasyonu  $IC_{50}=4,48 \times 10^{-4}$  M olarak tespit edilmiştir



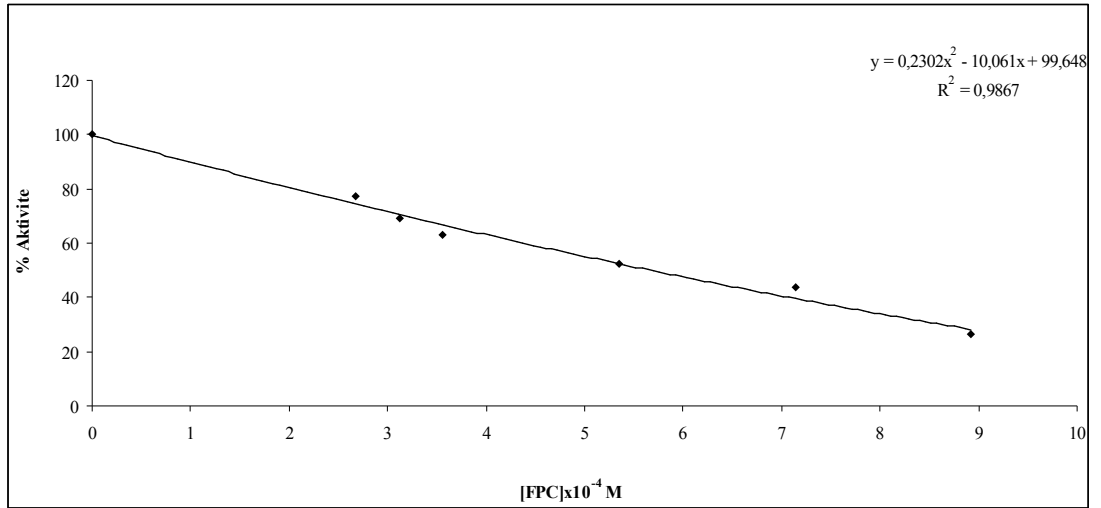
**Şekil 3.9** İnsan eritrosit G6PD enzimi için farklı DPC konsantrasyonlarında elde edilen % Aktivite-[DPC] Grafiği

Bölüm 2.2.5'te belirtildiği gibi kumarin türevlerinden FPC  $2.67 \times 10^{-4}$  M ile  $8,92 \times 10^{-4}$  M konsantrasyonları arasında G6PD enzimi üzerine etkileri incelenmiş, absorbans farkları, aktivite ve % aktivite sonuçları Çizelge 3.8'de belirtilmiştir

**Çizelge 3.8** İnsan Eritrosit G6PD Enzimi Üzerine FPC ile Yapılan Çalışmalarda Kullanılan Konsantrasyonlar, 340 nm' de Ölçülen 1 dakikalık Absorbans Farkları, Aktivite ve Buna Karşılık Gelen % Aktivite Sonuçları

| Enzim( $\mu$ L) | [FPC] $\times 10^{-4}$ (M) | Fark ( $\Delta 0D$ ) | Aktivite | %Aktivite |
|-----------------|----------------------------|----------------------|----------|-----------|
| 50              | -                          | 0,270                | 0,868    | 100       |
| 50              | 2,67                       | 0,209                | 0,672    | 77,4      |
| 50              | 3,12                       | 0,187                | 0,601    | 69,2      |
| 50              | 3,56                       | 0,170                | 0,546    | 62,9      |
| 50              | 5,35                       | 0,141                | 0,453    | 52,2      |
| 50              | 7,14                       | 0,118                | 0,379    | 43,2      |
| 50              | 8,92                       | 0,071                | 0,228    | 26,2      |

Çizelge 3.8'de belirtildiği gibi FPC  $7,14 \times 10^{-4}$  mM'dan itibaren G6PD enziminin aktivitesini % 50'nin altına indirmeye başlamıştır. Şekil 3.10'da bu sonuç görülmektedir. FPC'nin  $IC_{50}=5,67 \times 10^{-4}$  M olarak tespit edilmiştir



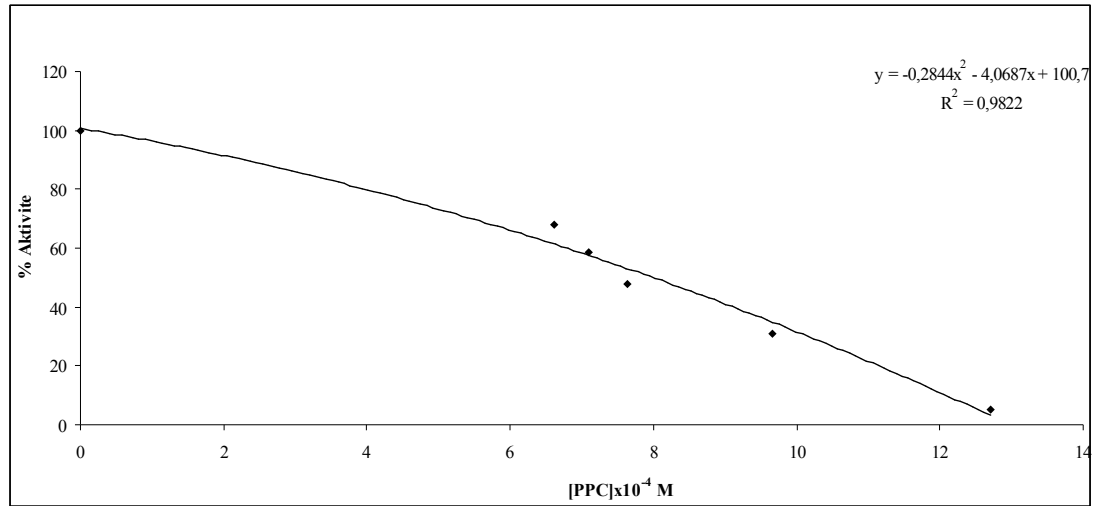
**Şekil 3.10** İnsan eritrosit G6PD enzimi için farklı FPC konsantrasyonlarda elde edilen % Aktivite-[FPC] Grafiği

PPC'nin enzim üzerine yapılan IC<sub>50</sub> çalışmasında 6,62x10<sup>-4</sup> M ile 12,7x10<sup>-4</sup> M arasındaki 5 farklı konsantrasyon, absorbans farkları, aktivite ve % aktivite sonuçları Çizelge 3.9'te belirtilmiştir.

**Çizelge 3.9** İnsan Eritrosit G6PD Enzimi Üzerine PPC ile Yapılan Çalışmalarda Kullanılan Konsantrasyonlar, 340 nm' de Ölçülen 1 dakikalık Absorbans Farkları, Aktivite ve Buna Karşılık Gelen % Aktivite Sonuçları

| Enzim(μL) | [PPC]x10 <sup>-4</sup> (M) | Fark (Δ0D) | Aktivite | %Aktivite |
|-----------|----------------------------|------------|----------|-----------|
| 50        | -                          | 0,312      | 1,003    | 100       |
| 50        | 6,62                       | 0,212      | 0,682    | 68,05     |
| 50        | 7,1                        | 0,183      | 0,588    | 58,62     |
| 50        | 7,63                       | 0,149      | 0,479    | 47,75     |
| 50        | 9,67                       | 0,096      | 0,311    | 31,02     |
| 50        | 12,7                       | 0,016      | 0,051    | 5,08      |

PPC'nin enzim üzerine gösterdiği inhibisyon etkisi [PPC]-% Aktivite grafiği şeklinde Şekil 3.11'de görülmektedir. Enzimin aktivitesini yarıya indiren PPC'nin konsantrasyonu IC<sub>50</sub>=7,90x10<sup>-4</sup> M olarak belirlenmiştir.



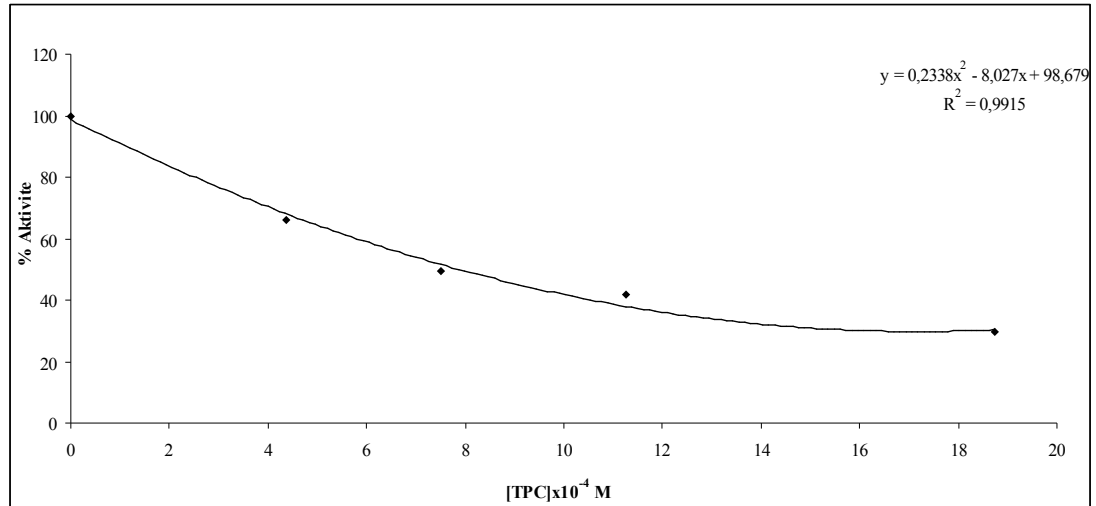
**Şekil 3.11** İnsan eritrosit G6PD enzimi için farklı PPC konsantrasyonlarında elde edilen % Aktivite-[PPC] Grafiği

Bölüm 2.2.5'te belirtildiği gibi TPC'nin enzim üzerine IC<sub>50</sub> çalışması 4,38x10<sup>-4</sup> M ile 18,75x10<sup>-4</sup> M konsantrasyonları arasında gerçekleştirilmiştir. Çalışmada elde edilen absorbans farkları, aktivite ve % aktivite sonuçları Çizelge 3.10'da belirtilmiştir.

**Çizelge 3.10** İnsan Eritrosit G6PD Enzimi Üzerine TPC ile Yapılan Çalışmalarda Kullanılan Konsantrasyonlar, 340 nm'de Ölçülen 1 dakikalık Absorbans Farkları, Aktivite ve Buna Karşılık Gelen % Aktivite Sonuçları

| Enzim(μL) | [TPC]x10 <sup>-4</sup> (M) | Fark (Δ0D) | Aktivite | %Aktivite |
|-----------|----------------------------|------------|----------|-----------|
| 50        | -                          | 0,223      | 0,717    | 100       |
| 50        | 4,38                       | 0,148      | 0,475    | 66,24     |
| 50        | 7,50                       | 0,110      | 0,353    | 49,23     |
| 50        | 11,25                      | 0,093      | 0,299    | 41,70     |
| 50        | 18,75                      | 0,066      | 0,212    | 29,50     |

G6PD enziminin aktivitesini, TPC'nin farklı konsantrasyonlarda % olarak hangi oranlarda düşürdüğü Şekil 3.12'de grafik şeklinde belirtilmektedir. TPC'nin enzim aktivitesini %50'ye indiren konsantrasyonu IC<sub>50</sub>=7,89x10<sup>-4</sup> M olarak tespit edilmiştir



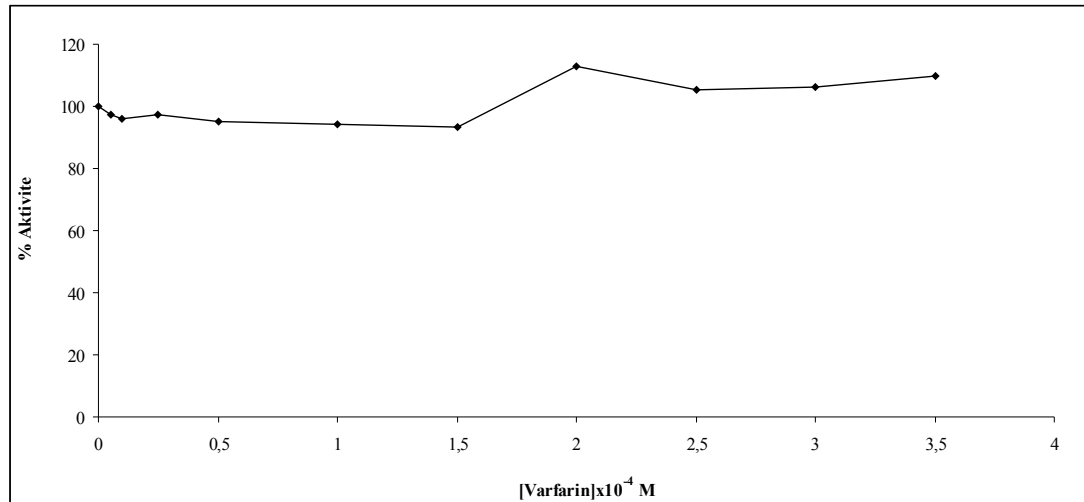
**Şekil 3.12** İnsan eritrosit G6PD enzimi için farklı TPC konsantrasyonlarında elde edilen % Aktivite-[TPC] Grafiği

Bölüm 2.2.5'te belirtildiği gibi varfarin sodyum kumarin türevi içeren ilacın  $0,05 \times 10^{-4}$  M ile  $3,50 \times 10^{-4}$  M konsantrasyonları arasında G6PD enzimi üzerine  $IC_{50}$  çalışması yapılmış ve çalışmada elde edilen absorbans farkları, aktivite ve % aktivite sonuçları Çizelge 3.11'de belirtilmiştir.

**Çizelge 3.11** İnsan Eritrosit G6PD Enzimi Üzerine Varfarin ile Yapılan Çalışmalarda Kullanılan Konsantrasyonlar, 340 nm'de Ölçülen 1 dakikalık Absorbans Farkları, Aktivite ve Buna Karşılık Gelen % Aktivite Sonuçlar

| Enzim ( $\mu$ L) | [Varfarin] $\times 10^{-4}$ (M) | Fark ( $\Delta OD$ ) | Aktivite | %Aktivite |
|------------------|---------------------------------|----------------------|----------|-----------|
| 50               | -                               | 0,245                | 0,790    | 100       |
| 50               | 0,05                            | 0,238                | 0,768    | 97,20     |
| 50               | 0,10                            | 0,235                | 0,758    | 95,94     |
| 50               | 0,25                            | 0,239                | 0,770    | 97,46     |
| 50               | 0,50                            | 0,233                | 0,750    | 94,93     |
| 50               | 1,00                            | 0,231                | 0,745    | 94,30     |
| 50               | 1,50                            | 0,229                | 0,739    | 93,34     |
| 50               | 2,00                            | 0,283                | 0,913    | 115,56    |
| 50               | 2,50                            | 0,258                | 0,832    | 105,31    |
| 50               | 3,00                            | 0,261                | 0,840    | 106,32    |
| 50               | 3,50                            | 0,269                | 0,868    | 109,87    |

Şekil 3.13'de verilen [Varfarin]-% Aktivite grafiğinde görüldüğü gibi ilacın 10 farklı konsantrasyon değerinde enzim aktivitesi üzerinde önemli bir aktivasyon veya inhibisyon etkisi tespit edilmemiştir.



**Şekil 3.13** İnsan eritrosit G6PD enzimi için farklı Varfarin konsantrasyonlarında elde edilen % Aktivite-[Varfarin] Grafiği

Çizelge 3.12 İnsan Eritrosit G6PD enzimi üzerine 7 farklı kumarin türevinin farklı konsantrasyonlarda % aktivite değişimleri

| Kimyasal madde | C(mM) | % Akt. | C(mM) | % Akt. | C(mM) | % Akt. | C(mM) | % Akt. | C(mM) | % Akt. | C(mM) | % Akt. | C(mM) | % Akt. | C(mM) | % Akt. | C(mM) | % Akt. | C(mM) | % Akt. |
|----------------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|
| OPC            | 0,134 | 84,5   | 0,336 | 81,3   | 0,671 | 77,4   | 1,34  | 71,6   | 2,01  | 61,3   | 3,35  | 49,7   | 4,02  | 44,5   | 4,69  | 20     | 5,36  | 18,7   | -     | -      |
| MPC            | 3,65  | 97     | 5,47  | 69,7   | 6,93  | 66,9   | 8,03  | 48,9   | 8,76  | 28     | -     | -      | -     | -      | -     | -      | -     | -      | -     | -      |
| PPC            | 6,62  | 68     | 7,1   | 58,6   | 7,63  | 47,7   | 9,67  | 31     | 12,7  | 5      | -     | -      | -     | -      | -     | -      | -     | -      | -     | -      |
| FPC            | 2,67  | 77,4   | 3,12  | 69,2   | 3,56  | 62,9   | 5,35  | 52,2   | 7,14  | 43,2   | 8,92  | 26,2   | -     | -      | -     | -      | -     | -      | -     | -      |
| DPC            | 1,14  | 75,5   | 2,91  | 71,5   | 4,36  | 52,4   | 5,23  | 44     | 5,82  | 30,6   | -     | -      | -     | -      | -     | -      | -     | -      | -     | -      |
| TPC            | 4,38  | 66,2   | 7,50  | 49,2   | 11,25 | 41,7   | 18,75 | 29,5   | -     | -      | -     | -      | -     | -      | -     | -      | -     | -      | -     | -      |
| Varfarin       | 0,05  | 97,2   | 0,1   | 95,9   | 0,25  | 97,4   | 0,50  | 94,9   | 1,00  | 94,3   | 1,50  | 93,3   | 2,00  | 115    | 2,5   | 105    | 3     | 106    | 3,5   | 109    |

### **3.2.1.2 G6PD Enzim Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon Etkisi Gösteren Kumarin Türevlerinin İnhibisyon Mekanizması**

Araştırmamızda insan eritrositlerinden saflaştırılan G6PD enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren OPC, MPC, DPC, PPC, FPC ve TPC kumarin türevlerinin söz konusu enzim üzerindeki inhibisyon mekanizması belirtilmiştir. Aynı zamanda inhibisyon etkisi gösteren bileşiğin enzim veya enzim-substrat kompleksinden ayrılma katsayısı olarak bilinen  $K_i$  değerleri hesaplanmıştır. Çalışmada önce inhibitörsüz farklı G6P konsantrasyonlarında enzimin % Aktivite değerleri ayrı ayrı hesaplandı, ardından enzimin aktivitesini % 50'nin altı ve üstünde kumarin türevlerinin belirli konsantrasyon değerleri alınarak bu değerler sabit olmak kaydıyla farklı G6P konsantrasyonlarında enzimin % aktivitesindeki değişimler, her kumarin türevi için ayrı ayrı tespit edildi. Sonuçların Lineweaver-Burk grafikleri çizildi.

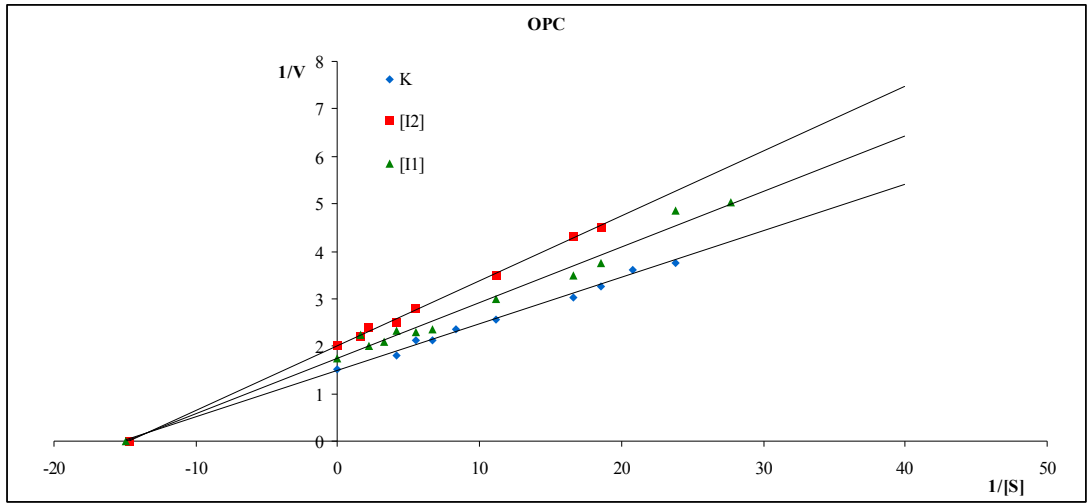
Çizelge 3.13, Çizelge 3.14, Çizelge 3.15, Çizelge 3.16, Çizelge 3.17, Çizelge 3.18'de çalışmada kullanılan tampon çözeltilerin hacimleri, enzim hacmi, saf su miktarı, kullanılan sabit kumarin türevlerinin ayrı ayrı konsantrasyonları ve farklı substrat konsantrasyonları belirtilmiştir. Şekil 3.14, Şekil 3.15, Şekil 3.16, Şekil 3.17, Şekil 3.18, Şekil 3.19' da, elde edilen sonuçların  $1/S- 1/V$  grafikleri hesaplanarak Lineweaver-Burk grafikleri verilmektedir.

**Çizelge 3.13** İnsan eritrosit G6PD enzimi üzerine OPC nin  $K_i$  değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

| Tris-HCl(1M)<br>EDTA(5mM)<br>( $\mu$ L) | MgCl<br>(0,1 M)<br>( $\mu$ L) | NADP <sup>+</sup><br>(2m M)<br>( $\mu$ L) | Enzim<br>Hacmi<br>( $\mu$ L) | Saf su<br>( $\mu$ L) | Sub<br>strat<br>çöz.<br>Hacmi<br>( $\mu$ L) | Küvet<br>teki<br>Substr<br>at<br>kons.<br>(mM) | Küvetteki<br>inhibitör<br>kons.<br>(mM) |
|---|-------------------------------|---|------------------------------|----------------------|---|--|---|
| 100                                     | 100                           | 100                                       | 50                           | 643                  | 7   | 0,042  | -                                       |
|   |                               |   |                              | 642                  | 8   | 0,048  | -                                       |
|   |                               |   |                              | 641                  | 9   | 0,054  | -                                       |
|   |                               |   |                              | 640                  | 10  | 0,06   | -                                       |
|   |                               |   |                              | 635                  | 15  | 0,09   | -                                       |
|   |                               |   |                              | 630                  | 20  | 0,12   | -                                       |
|   |                               |   |                              | 625                  | 25  | 0,15   | -                                       |
|   |                               |   |                              | 620                  | 30  | 0,18   | -                                       |
|   |                               |   |                              | 610                  | 40  | 0,24   | -                                       |
|   |                               |   |                              | 638,1                | 9   | 0,054  | 0,19                                    |
|   |                               |   |                              | 637,1                | 10  | 0,06   |   |
|   |                               |   |                              | 632,1                | 15  | 0,09   |   |
|   |                               |   |                              | 617,1                | 30  | 0,18   |   |
|   |                               |   |                              | 607,1                | 40  | 0,24   |   |
|   |                               |   |                              | 572,1                | 75  | 0,45   |   |
|   |                               |   |                              | 547,1                | 100   | 0,6  |   |
|   |                               |   |                              | 638,09               | 6   | 0,036  | 0,401                                   |
|   |                               |   |                              | 637,09               | 7   | 0,042  |   |
|   |                               |   |                              | 635,09               | 9   | 0,054  |   |
|   |                               |   |                              | 634,09               | 10  | 0,06   |   |
|   |                               |   |                              | 629,09               | 15  | 0,09   |   |
|   |                               |   |                              | 619,09               | 25  | 0,15   |   |
|   |                               |   |                              | 614,09               | 30  | 0,18   |   |
|   |                               |   |                              | 604,09               | 40  | 0,24   |   |
|   |                               |   |                              | 594,09               | 50  | 0,3  |   |
|   |                               |   |                              | 569,09               | 75  | 0,45   |   |
| 544,09                                  | 100                           | 0,6                                       |                              |                      |   |  |   |



Çizelge 3.13’de belirtildiği gibi G6PD substratı olan G6P’nin farklı konsantrasyonlarına karşı, OPC’nin 0.190 mM ile 0,401 mM olarak iki farklı konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkileri incelenmiştir. Şekil 3.14’de belirtildiği gibi inhibitör konsantrasyonu arttırıldığında  $K_m$  değerinde bir farklılık olmadığı,  $V_{max}$  değerinin ise azaldığı görülmektedir. OPC’nin  $K_m$  üzerinde bir değişime neden olmaması, OPC’nin enzim aktif bölgesine bağlanmadığını ve yarışmasız bir inhibitör olduğunu göstermektedir.

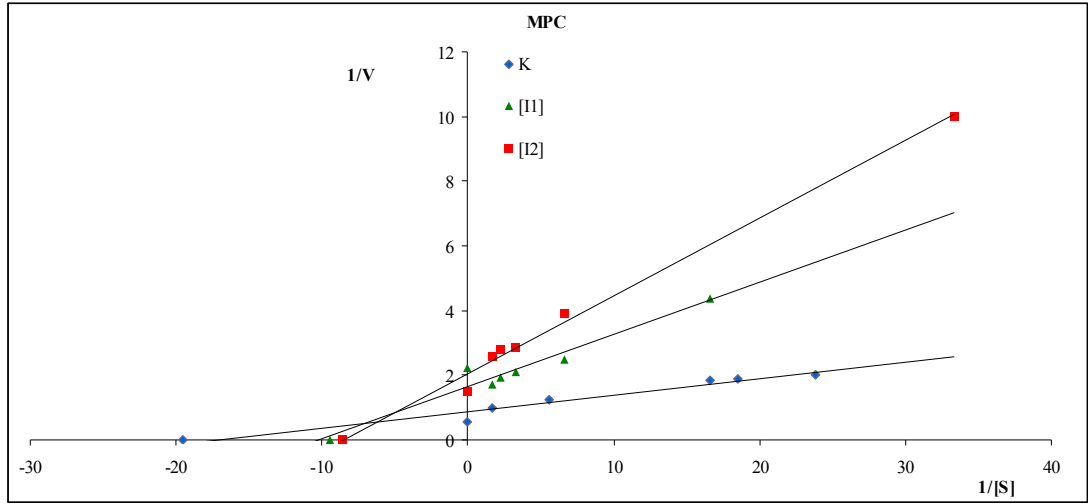


**Şekil 3.14** İnsan Eritrosit G6PD enzimi üzerine OPC nin etkisi  $[I_1]= 1,9 \times 10^{-4} M$ ,  $[I_2] = 4,01 \times 10^{-4} M$

**Çizelge 3.14** İnsan eritrosit G6PD enzimi üzerine MPC nin  $K_i$  değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

| Tris-HCl<br>(1M)<br>EDTA<br>(5mM)<br>( $\mu$ L) | MgCl<br>(0,1 M)<br>( $\mu$ L) | NADP <sup>+</sup><br>(2mM)<br>( $\mu$ L) | Enzim<br>Hacmi<br>( $\mu$ L) | Saf su<br>( $\mu$ L) | Substrat<br>çöz.<br>Hacmi<br>( $\mu$ L) | Küvetteki<br>Substrat<br>kons.<br>(mM) | Küvet<br>teki<br>inhibi<br>tör<br>kons.<br>(mM) |
|---|-------------------------------|--|------------------------------|----------------------|---|--|---|
| 100   | 100                           | 100                                      | 50                           | 643                  | 7                                       | 0,042                                  | -   |
|   |                               |  |                              | 641                  | 9                                       | 0,054                                  | -   |
|   |                               |  |                              | 640                  | 10                                      | 0,06                                   | -   |
|   |                               |  |                              | 620                  | 30                                      | 0,18                                   | -   |
|   |                               |  |                              | 550                  | 100                                     | 0,6                                    | -   |
|   |                               |  |                              | 621                  | 10                                      | 0,06                                   | 0,69  |
|   |                               |  |                              | 611                  | 20                                      | 0,12                                   |   |
|   |                               |  |                              | 581                  | 50                                      | 0,3                                    |   |
|   |                               |  |                              | 556                  | 75                                      | 0,45                                   |   |
|   |                               |  |                              | 531                  | 100                                     | 0,6                                    | 0,87  |
|   |                               |  |                              | 621                  | 5                                       | 0,03                                   |   |
|   |                               |  |                              | 601                  | 25                                      | 0,15                                   |   |
|   |                               |  |                              | 576                  | 50                                      | 0,3                                    |   |
|   |                               |  |                              | 551                  | 75                                      | 0,45                                   |   |
|   |                               |  |                              | 526                  | 100                                     | 0,6                                    |   |

Çizelge 3.14’de belirtildiği gibi G6PD substratı olan G6P’nin farklı konsantrasyonlarına karşı, MPC’nin 0,690 mM ile 0,870 mM olarak iki farklı konsantrasyonunun enzime olan etkileri incelenmiştir. Şekil 3.15’de belirtildiği gibi inhibitör konsantrasyonu arttırıldığında  $K_m$  artarken,  $V_{max}$  değerinde azalma görülmektedir. Bu sonuçtan MPC’nin G6PD enzimi üzerine karışık inhibisyon etki gösterdiği anlaşılmaktadır. Bu tip inhibisyon tipleri yarı yarışmalı inhibisyon tipine benzer. İnhibitör enzime serbest olarak bağlanabildiği gibi, enzim-substrat kompleksine de bağlanabilir. Ancak yarı yarışmalıdan en önemli farkı enzim-substrat konsantrasyonuna inhibitör bağlandığında enzim tam inaktif değil, kısmi aktivite gösterebilecek durumdadır.

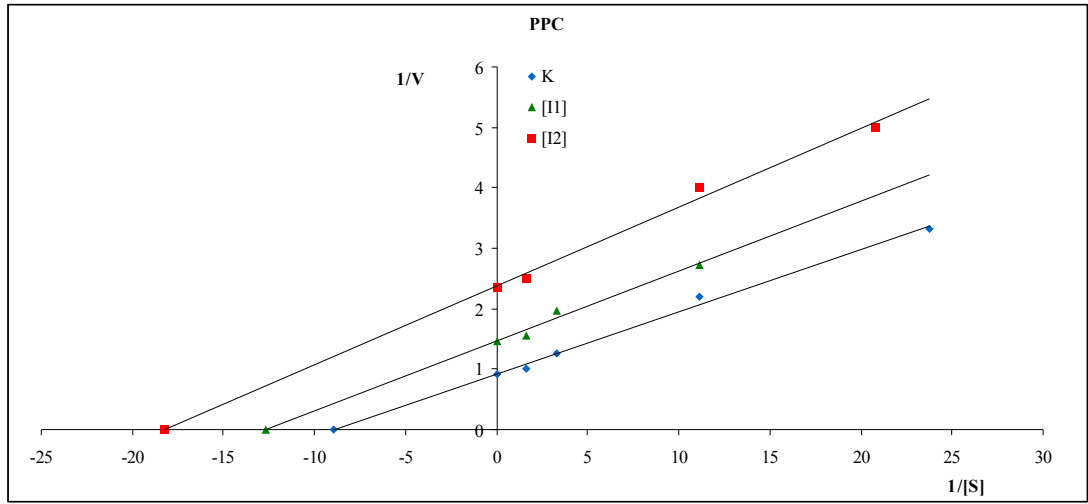


**Şekil 3.15** İnsan Eritrosit G6PD enzimi üzerine MPC nin etkisi  $[I_1]= 6,9 \times 10^{-4} M$ ,  $[I_2] = 8,7 \times 10^{-4} M$

**Çizelge 3.15** İnsan eritrosit G6PD enzimi üzerine PPC nin  $K_i$  değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

| Tris-HCl<br>(1M)<br>EDTA<br>(5mM)<br>( $\mu$ L) | MgCl<br>(0,1 M)<br>( $\mu$ L) | NADP <sup>+</sup><br>(2mM)<br>( $\mu$ L) | Enzim<br>Hacmi<br>( $\mu$ L) | Saf<br>su<br>( $\mu$ L) | Substrat<br>çöz.<br>Hacmi<br>( $\mu$ L) | Küvetteki<br>Substrat<br>kons.<br>(mM) | Küvet<br>teki<br>inhibitör<br>kons.<br>(mM) |
|---|-------------------------------|--|------------------------------|-------------------------|---|--|---|
| 100   | 100                           | 100                                      | 50                           | 640                     | 10                                      | 0,06                                   | -   |
|   |                               |  |                              | 635                     | 15                                      | 0,09                                   | -   |
|   |                               |  |                              | 600                     | 50                                      | 0,3                                    | -   |
|   |                               |  |                              | 550                     | 100                                     | 0,6                                    | -   |
|   |                               |  |                              | 634                     | 2                                       | 0,012                                  | 0,71  |
|   |                               |  |                              | 621                     | 15                                      | 0,09                                   |   |
|   |                               |  |                              | 586                     | 50                                      | 0,3                                    |   |
|   |                               |  |                              | 536                     | 100                                     | 0,6                                    |   |
|   |                               |  |                              | 633                     | 2                                       | 0,012                                  | 0,76  |
|   |                               |  |                              | 628                     | 8                                       | 0,048                                  |   |
|   |                               |  |                              | 621                     | 15                                      | 0,09                                   |   |
|   |                               |  |                              | 536                     | 100                                     | 0,6                                    |   |

Çizelge 3.15’de belirtildiği gibi G6PD substratı olan G6P’nin farklı konsantrasyonlarına karşı, PPC’nin 0.710 mM ile 0,760 mM olarak iki farklı konsantrasyonunun enzime olan etkileri incelenmiştir. Şekil 3.16’da belirtildiği gibi inhibitör konsantrasyonu arttırıldığında  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerinin ikisinin de azaldığı görülmektedir. Bu sonuçlarla PPC’nin G6PD enzimine karşı yarı yarışmalı inhibitör olduğu tespit edilmiştir. Yarı yarışmalı inhibitörler enzime ancak enzim-substrat kompleksi oluştuğunda bağlanabilirler. Buna göre inhibitör varlığında devamlı Enzim –substrat kompleksi uzaklaştığı için  $K_m$  azalırken ortamda sürekli enzim-substrat-inhibitör kompleksi olacağından  $V_{max}$  da düşer.

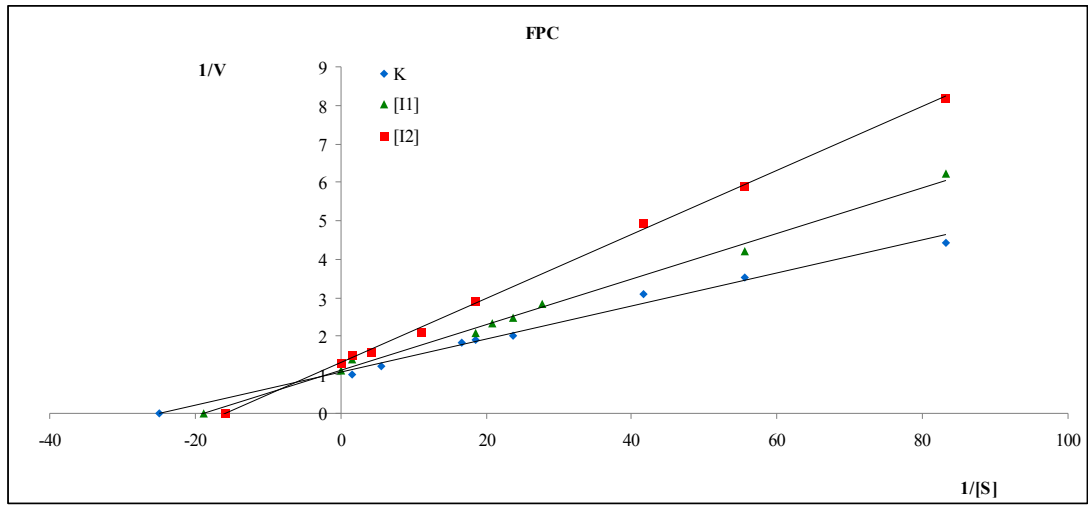


**Şekil 3.16** İnsan Eritrosit G6PD enzimi üzerine PPC nin etkisi  $[I_1] = 7,1 \times 10^{-4} M$ ,  $[I_2] = 7,6 \times 10^{-4} M$

**Çizelge 3.16** İnsan eritrosit G6PD enzimi üzerine FPC nin  $K_i$  değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen

| Tris-HCl<br>(1M)<br>EDTA<br>(5mM)<br>( $\mu$ L) | MgCl<br>(0,1 M)<br>( $\mu$ L) | NADP <sup>+</sup><br>(2mM)<br>( $\mu$ L) | Enzim<br>Hacmi<br>( $\mu$ L) | Saf su<br>( $\mu$ L) | Substrat<br>çöz.<br>Hacmi<br>( $\mu$ L) | Küvetteki<br>Substrat<br>kons.<br>(mM) | Küvet<br>teki<br>inhibitör<br>kons.<br>(mM) |
|---|-------------------------------|--|------------------------------|----------------------|---|--|---|
| 100   | 100                           | 100                                      | 50                           | 648                  | 2                                       | 0,012                                  | -   |
|   |                               |  |                              | 647                  | 3                                       | 0,018                                  | -   |
|   |                               |  |                              | 646                  | 4                                       | 0,024                                  | -   |
|   |                               |  |                              | 643                  | 7                                       | 0,042                                  | -   |
|   |                               |  |                              | 641                  | 9                                       | 0,054                                  | -   |
|   |                               |  |                              | 640                  | 10                                      | 0,06                                   | -   |
|   |                               |  |                              | 620                  | 30                                      | 0,18                                   | -   |
|   |                               |  |                              | 550                  | 100                                     | 0,6                                    | -   |
|   |                               |  |                              | 640,02               | 2                                       | 0,012                                  | 0,35  |
|   |                               |  |                              | 639,02               | 3                                       | 0,018                                  |   |
|   |                               |  |                              | 636,02               | 6                                       | 0,036                                  |   |
|   |                               |  |                              | 635,02               | 7                                       | 0,042                                  |   |
|   |                               |  |                              | 634,02               | 8                                       | 0,048                                  |   |
|   |                               |  |                              | 633,02               | 9                                       | 0,054                                  |   |
|   |                               |  |                              | 542,02               | 100                                     | 0,6                                    |   |
|   |                               |  |                              | 632,47               | 2                                       | 0,012                                  | 0,692                                       |
|   |                               |  |                              | 631,47               | 3                                       | 0,018                                  |   |
|   |                               |  |                              | 628,47               | 6                                       | 0,036                                  |   |
|   |                               |  |                              | 625,47               | 9                                       | 0,054                                  |   |
|   |                               |  |                              | 619,47               | 15                                      | 0,09                                   |   |
| 594,47  | 40                            | 0,24                                     |                              |                      |   |  |   |
| 534,47  | 100                           | 0,6                                      |                              |                      |   |  |   |

Çizelge 3.16’da belirtildiği gibi G6PD substratı olan G6P’nin farklı konsantrasyonlarına karşı, FPC’nin 0,350 mM ile 0,692 mM olarak iki farklı konsantrasyonunun enzime olan etkileri incelenmiştir. Şekil 3.17’de belirtildiği gibi inhibitör konsantrasyonu arttırıldığında  $K_m$  artarken,  $V_{max}$  değerinde azalma görülmektedir. Bu sonuçtan FPC’nin de MPC’de olduğu gibi G6PD enzimi üzerine karışık inhibisyon etkisi gösterdiği anlaşılmaktadır. İnhibitör enzime serbest olarak bağlanabildiği gibi, enzim-substrat kompleksine de bağlanabilir. Enzim-substrat kompleksine inhibitör bağlandığında yarı yarışmalıdan farklı olarak kısmi aktivite gösterebilir.



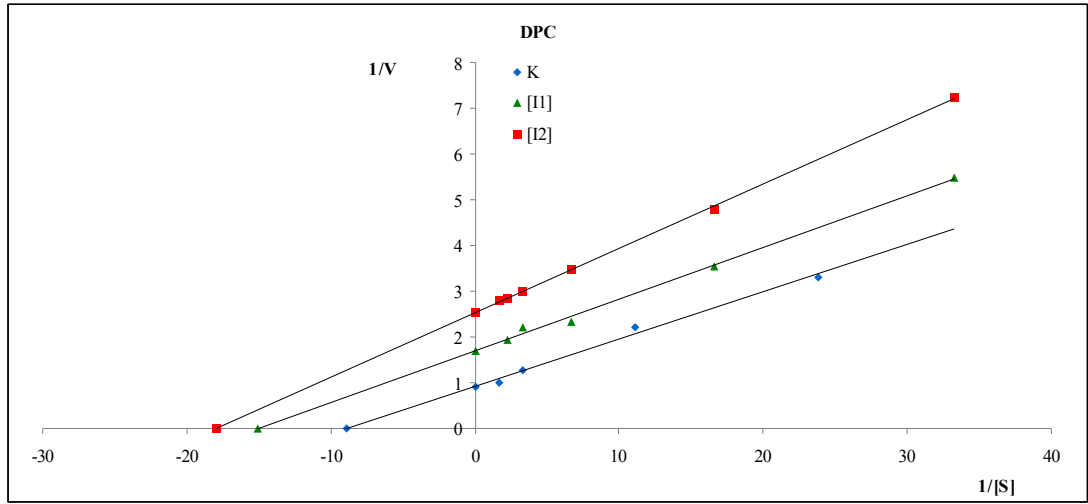
**Şekil 3.17** İnsan Eritrosit G6PD enzimi üzerine FPC nin etkisi  $[I_1] = 3,5 \times 10^{-4} M$ ,  $[I_2] = 6,92 \times 10^{-4} M$

**Çizelge 3.17** İnsan eritrosit G6PD enzimi üzerine DPC'nin  $K_i$  değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

| Tris-HCl (1M) EDTA (5mM) ( $\mu$ L) | MgCl (0,1 M) ( $\mu$ L) | NADP <sup>+</sup> (2mM) ( $\mu$ L) | Enzim Hacmi ( $\mu$ L) | Saf su ( $\mu$ L) | Substrat çöz. Hacmi ( $\mu$ L) | Küvetteki Substrat Kons. (mM) | Küvetteki İnhibitör Kons. (mM) |
|-------------------------------------|-------------------------|------------------------------------|------------------------|-------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| 100                                 | 100                     | 100                                | 50                     | 643               | 7                              | 0,042                         | -                              |
|                                     |                         |                                    |                        | 635               | 15                             | 0,09                          | -                              |
|                                     |                         |                                    |                        | 600               | 50                             | 0,3                           | -                              |
|                                     |                         |                                    |                        | 550               | 100                            | 0,6                           | -                              |
|                                     |                         |                                    |                        | 635               | 5                              | 0,03                          | 0,15                           |
|                                     |                         |                                    |                        | 630               | 10                             | 0,06                          |                                |
|                                     |                         |                                    |                        | 615               | 25                             | 0,15                          |                                |
|                                     |                         |                                    |                        | 590               | 50                             | 0,3                           |                                |
|                                     |                         |                                    |                        | 565               | 75                             | 0,45                          |                                |
|                                     |                         |                                    |                        | 540               | 100                            | 0,6                           |                                |
|                                     |                         |                                    |                        | 627               | 5                              | 0,03                          | 0,50                           |
|                                     |                         |                                    |                        | 622               | 10                             | 0,06                          |                                |
|                                     |                         |                                    |                        | 607               | 25                             | 0,15                          |                                |
|                                     |                         |                                    |                        | 582               | 50                             | 0,3                           |                                |
|                                     |                         |                                    |                        | 557               | 75                             | 0,45                          |                                |
|                                     |                         |                                    |                        | 532               | 100                            | 0,6                           |                                |



Çizelge 3.17’de belirtildiği gibi G6PD substratı olan G6P’nin farklı konsantrasyonlarına karşı, DPC’nin 0,150 mM ile 0,500 mM olarak iki farklı konsantrasyonunun enzime olan etkileri incelenmiştir. Şekil 3.18’de belirtildiği gibi inhibitör konsantrasyonu arttırıldığında  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerinin ikisinin de azaldığı görülmektedir. Bu sonuçlarla DPC’nin G6PD enzimine karşı yarı yarışmalı inhibitör olduğu tespit edilmiştir. Yarı yarışmalı inhibitör özelliği gösteren DPC G6PD enzimine ancak Enzim-Substrat kompleksi oluştuğunda bağlanabilir. DPC bileşiğinin enzime substrat bağlanması ile oluşan üç boyutlu yapısında meydana gelen değişimden sonra bağlanabildiğini Şekil 3.18’deki Lineweaver-Burk grafiğinden anlaşılmaktadır.

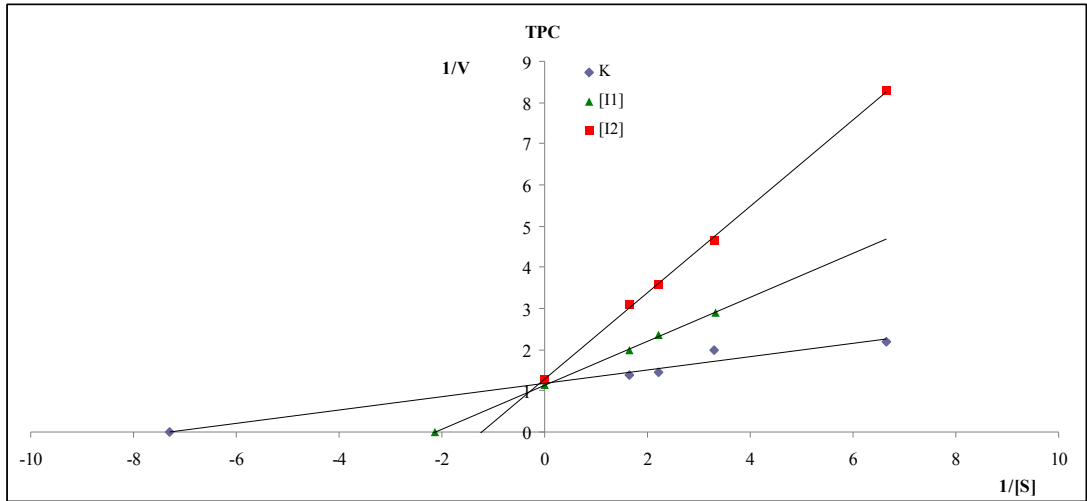


**Şekil 3.18** İnsan Eritrosit G6PD enzimi üzerine DPC nin etkisi  $[I_1]= 1,5 \times 10^{-4}$  M,  $[I_2] = 5,04 \times 10^{-4}$  M

**Çizelge 3.18** İnsan eritrosit G6PD enzimi üzerine TPC'nin  $K_i$  değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

| Tris-HCl (1M) EDTA (5mM) ( $\mu$ L) | MgCl (0,1 M) ( $\mu$ L) | NADP <sup>+</sup> (2mM) ( $\mu$ L) | Enzim Hacmi ( $\mu$ L) | Saf su ( $\mu$ L) | Substrat Çöz. Hacmi ( $\mu$ L) | Küvetteki Substrat Kons. (mM) | Küvetteki İnhibitör Kons. (mM) |
|-------------------------------------|-------------------------|------------------------------------|------------------------|-------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| 100                                 | 100                     | 100                                | 50                     | 625               | 25                             | 0,15                          | -                              |
|                                     |                         |                                    |                        | 600               | 50                             | 0,3                           | -                              |
|                                     |                         |                                    |                        | 575               | 75                             | 0,45                          | -                              |
|                                     |                         |                                    |                        | 550               | 100                            | 0,6                           | -                              |
|                                     |                         |                                    |                        | 617,13            | 10                             | 0,06                          | 0,06048                        |
|                                     |                         |                                    |                        | 577,13            | 50                             | 0,3                           |                                |
|                                     |                         |                                    |                        | 552,13            | 75                             | 0,45                          |                                |
|                                     |                         |                                    |                        | 527,13            | 100                            | 0,6                           |                                |
|                                     |                         |                                    |                        | 566,37            | 25                             | 0,15                          | 0,2019                         |
|                                     |                         |                                    |                        | 541,37            | 50                             | 0,3                           |                                |
|                                     |                         |                                    |                        | 516,37            | 75                             | 0,45                          |                                |
|                                     |                         |                                    |                        | 491,37            | 100                            | 0,6                           |                                |

Çizelge 3.18’de belirtildiği gibi G6PD substratı olan G6P’nin farklı konsantrasyonlarına karşı, TPC’nin 0,06048 mM ile 0,2019 mM olarak iki farklı konsantrasyonunun enzime olan etkileri incelenmiştir. Şekil 3.19’da görüldüğü gibi inhibitör konsantrasyonu arttıkça  $K_m$  artarken  $V_{max}$  değişmemektedir. Bu sonuç TPC’nin inhibisyon tipinin yarışmalı olduğunu göstermektedir. TPC’nin yarışmalı bir inhibitör olması G6PD enzimine substratın bağlandığı yerden yani enzimin aktif bölgesinden bağlandığını göstermektedir. TPC kumarin bileşiğinin aktif merkeze uygun ve bu bölgeye bağlanmada substrat ile yarış halinde olduğu inhibisyon mekanizmasından görülmektedir. Bu çeşit inhibisyonlarda substrat konsantrasyonunun artırılmasının söz konusu inhibitörün inhibisyon etkisini azalttığı bilinmektedir.



**Şekil 3.19** İnsan Eritrosit G6PD enzimi üzerine TPC nin etkisi  $[I_1] = 6,048 \times 10^{-5} M$ ,  $[I_2] = 2,019 \times 10^{-4} M$

Çizelge 3.19’da OPC, MPC, DPC, PPC, FPC, TPC’nin IC<sub>50</sub> değerleri, inhibisyon tipleri ve K<sub>i</sub> değerleri belirtilmektedir. Çizelgeden de anlaşıldığı gibi OPC kumarin türevinin IC<sub>50</sub> değeri en düşük olan bileşik olarak, G6PD enzim aktivitesi üzerinde en kuvvetli inhibitör etkisi gösterdiği tespit edilmiştir.

**Çizelge 3.19** İnsan eritrositlerinden saflaştırılan G6PD enzimi için 6 farklı kumarin türevinin IC<sub>50</sub> değerleri, 2 farklı sabit inhibitör konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan K<sub>i</sub> değerleri ve inhibisyon tipleri

| Kumarin Türevleri | IC <sub>50</sub> Değerleri (M) | İnhibisyon Tipi | K <sub>i</sub> Değerleri(M)                      |
|-------------------|--------------------------------|-----------------|--|
| OPC               | 3,05x10 <sup>-4</sup>          | Yarışmasız      | 13,7x10 <sup>-4</sup>                            |
| MPC               | 7,69x10 <sup>-4</sup>          | Karışık         | 7,34x10 <sup>-4</sup><br>2,69x10 <sup>-4</sup>   |
| PPC               | 7,90 x10 <sup>-4</sup>         | Yarı Yarışmalı  | 8,35x10 <sup>-4</sup>                            |
| FPC               | 5,67 x10 <sup>-4</sup>         | Karışık         | 4,996x10 <sup>-3</sup><br>8,129x10 <sup>-4</sup> |
| DPC               | 4,48 x10 <sup>-4</sup>         | Yarı Yarışmalı  | 4,19x10 <sup>-4</sup>                            |
| TPC               | 7,89 x10 <sup>-4</sup>         | Yarışmalı       | 3,18x10 <sup>-5</sup>                            |

### 3.2.2 Pestisitlerin G6PD Enzim Aktivitesi Üzerine İn Vitro Etkileri

#### 3.2.2.1 IC<sub>50</sub> Çalışmaları

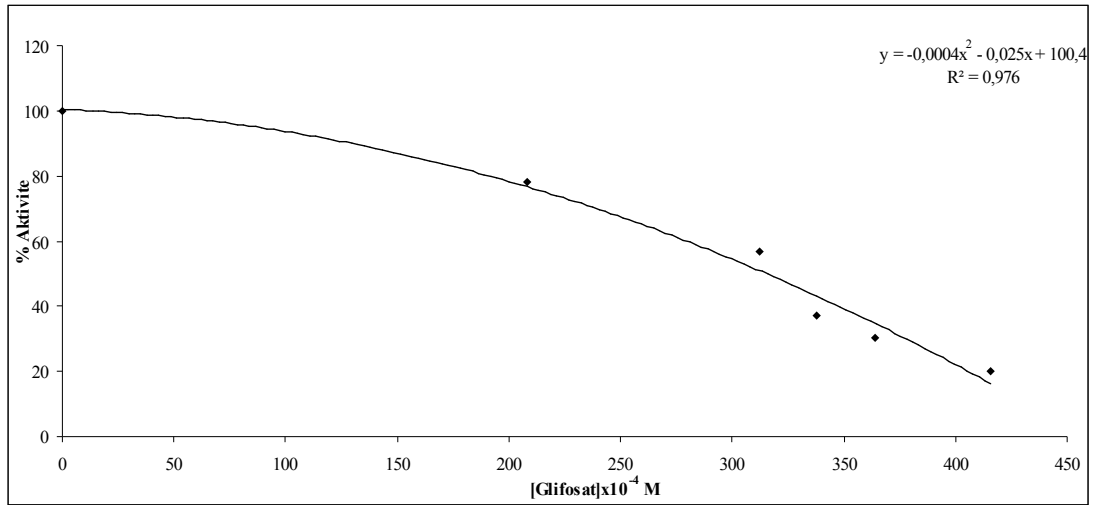
G6PD enzime in vitro etkileri incelenen pestisitlerden , Glifosat, 2,4-D ve İmazethapyr (herbisitler) saf su ile seyreltilmişlerdir. Diazinon ve Deltamethrin (insektisitler) ise DMSO ile çözülmüştür. Çizelge 3.25’de 5 pestisit farklı konsantrasyonlarında enzimin aktivitesinin % aktivite değişimi birlikte verilmektedir.

Bölüm 2.2.5’te açıklandığı gibi herbisitlerden Glifosat 208x10<sup>-4</sup> M ile 416x10<sup>-4</sup> M konsantrasyonları arasında G6PD enzimi üzerine etkileri incelenmiş, absorbans farkları, aktivite ve % aktivite sonuçları Çizelge 3.20’de belirtilmiştir. [I]- % Aktivite sonuçları Şekil 3.20’de grafik şeklinde verilmiştir.

**Çizelge 3.20** İnsan Eritrosit G6PD Enzimi Üzerine Glifosat ile Yapılan Çalışmalarda Kullanılan Konsantrasyonlar, 340 nm’ de Ölçülen 1 dakikalık Absorbans Farkları, Aktivite ve Buna Karşılık Gelen % Aktivite Sonuçları

| Enzim (µL) | [Glifosat]x10 <sup>-4</sup> (M) | Fark (ΔOD) | Aktivite | %Aktivite |
|------------|---------------------------------|------------|----------|-----------|
| 50         | -                               | 0,105      | 0,337    | 100       |
| 50         | 208                             | 0,082      | 0,263    | 78,04     |
| 50         | 312                             | 0,060      | 0,192    | 56,90     |
| 50         | 338                             | 0,040      | 0,128    | 37,09     |
| 50         | 364                             | 0,032      | 0,102    | 30,26     |
| 50         | 416                             | 0,021      | 0,067    | 20,00     |

Çizelge 3.20’de belirtildiği gibi Glifosat 338x10<sup>-4</sup> M’den itibaren G6PD enziminin aktivitesini % 50’nin altına indirdiği tespit edilmiştir. Şekil 3.20’de G6PD enziminin aktivitesini %50’ye indiren konsantrasyonu IC<sub>50</sub>=323,5x10<sup>-4</sup> M olarak tespit edilmiştir



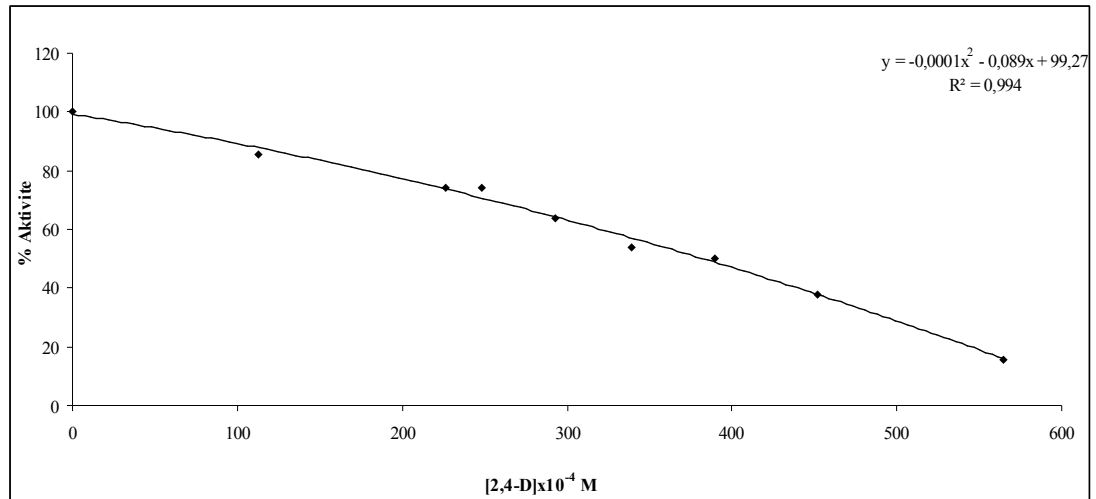
**Şekil 3.20** İnsan eritrosit G6PD enzimi için farklı Glifosat konsantrasyonlarda elde edilen % Aktivite-[Glifosat] Grafiği

2,4-D'nin enzim üzerine yapılan IC<sub>50</sub> çalışmasında 113x10<sup>-4</sup> M ile 565x10<sup>-4</sup> M arasındaki 8 farklı konsantrasyon, absorbans farkları, aktivite ve % aktivite sonuçları Çizelge 3.21'te belirtilmiştir.

**Çizelge 3.21** İnsan Eritrosit G6PD Enzimi Üzerine 2,4-D ile Yapılan Çalışmalarda Kullanılan Konsantrasyonlar, 340 nm' de Ölçülen 1 dakikalık Absorbans Farkları, Aktivite ve Buna Karşılık Gelen % Aktivite Sonuçları

| Enzim (µL) | [2,4-D]x10 <sup>-4</sup> (M) | Fark (Δ0D) | Aktivite | %Aktivite |
|------------|------------------------------|------------|----------|-----------|
| 50         | -                            | 0,152      | 0,488    | 100       |
| 50         | 113                          | 0,130      | 0,418    | 85,65     |
| 50         | 226                          | 0,113      | 0,363    | 74        |
| 50         | 248                          | 0,113      | 0,363    | 74        |
| 50         | 293                          | 0,098      | 0,315    | 64        |
| 50         | 339                          | 0,083      | 0,266    | 54        |
| 50         | 390                          | 0,076      | 0,244    | 50        |
| 50         | 452                          | 0,059      | 0,189    | 38        |
| 50         | 565                          | 0,024      | 0,077    | 15,8      |

Şekil 3.21'de belirtildiği gibi 2,4-D'in farklı konsantrasyonlarına karşılık gelen % Aktivite sonuçları grafik şeklinde gösterilmektedir. 2,4-D'in enzimin aktivitesini yarıya indiren konsantrasyonu IC<sub>50</sub>=384x10<sup>-4</sup> M olarak tespit edilmiştir



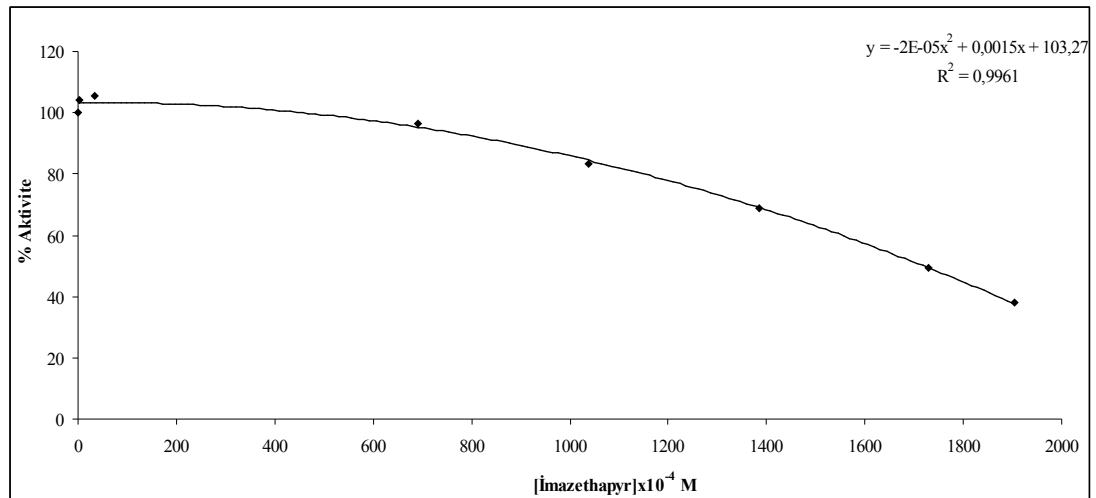
**Şekil 3.21** İnsan eritrosit G6PD enzimi için farklı 2,4-D konsantrasyonlarda elde edilen % Aktivite-[2,4-D] Grafiği

Herbisitlerden İmazethapyr'in 7 farklı konsantrasyonunda G6PD enzimi üzerine IC<sub>50</sub> çalışması Bölüm 2.2.5'de anlatıldığı şekilde uygulanmıştır. İmazethapyr'in 3,46x10<sup>-4</sup> M ile 1903x10<sup>-4</sup> M konsantrasyonları arasında G6PD enzimi üzerine etkileri incelenmiş, absorbans farkları, aktivite ve % aktivite sonuçları Çizelge 3.22'de belirtilmiştir

**Çizelge 3.22** İnsan Eritrosit G6PD Enzimi Üzerine İmazethapyr ile Yapılan Çalışmalarda Kullanılan Konsantrasyonlar, 340 nm 'de Ölçülen 1 dakikalık Absorbans Farkları, Aktivite ve Buna Karşılık Gelen % Aktivite Sonuçları

| Enzim(μL) | [İmazethapyr]x10 <sup>-4</sup> (M) | Fark (ΔOD) | Aktivite | %Aktivite |
|-----------|------------------------------------|------------|----------|-----------|
| 50        | -                                  | 0,366      | 1,179    | 100       |
| 50        | 3,46                               | 0,382      | 1,230    | 104,32    |
| 50        | 34,6                               | 0,386      | 1,243    | 105,42    |
| 50        | 692                                | 0,353      | 1,135    | 96,26     |
| 50        | 1038                               | 0,306      | 0,984    | 83,46     |
| 50        | 1384                               | 0,252      | 0,812    | 68,94     |
| 50        | 1730                               | 0,181      | 0,584    | 49,53     |
| 50        | 1903                               | 0,138      | 0,445    | 37,82     |

İmazethapyr'i saf su ile çeşitli oranlarda seyrelterek enzime etkisine bakıldığında sonuç elde edilemediğinden hiç seyreltmeden enzime etkisine bakıldı. Çizelge 3.22'de belirtildiği gibi çok yüksek konsantrasyonda G6PD enziminin aktivitesini %50'nin altına indirebildiği için I<sub>50</sub> değeri hesaplanmadı.



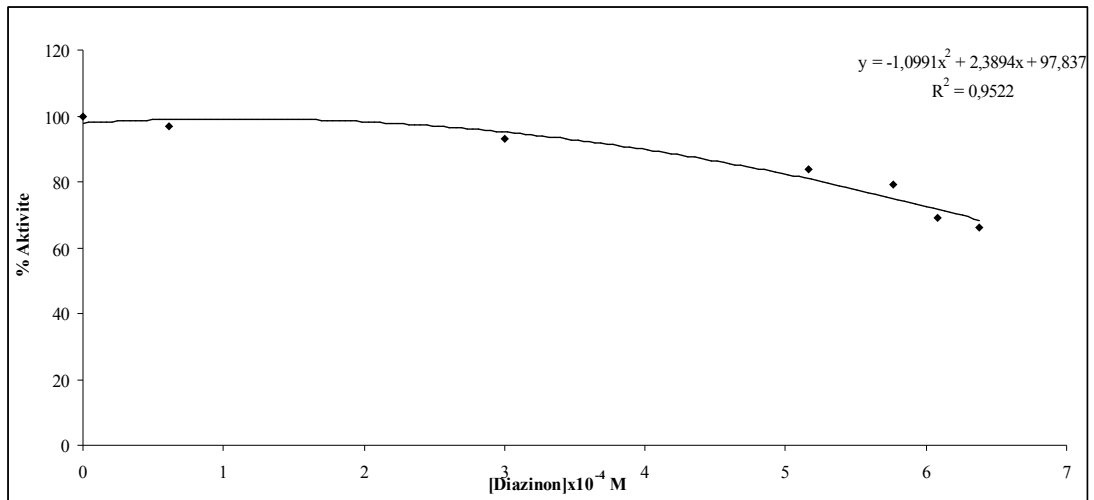
**Şekil 3.22** İnsan eritrosit G6PD enzimi için farklı İmazethapyr konsantrasyonlarında elde edilen % Aktivite-[İmazethapyr] Grafiği

İnsektisitlerden Diazinon  $0,608 \times 10^{-4}$  M ile  $6,380 \times 10^{-4}$  M konsantrasyonları arasında G6PD enzimi aktivitesi üzerine etkileri Bölüm 2.2.5'te belirtildiği gibi incelenmiş, absorbans farkları, aktivite ve % aktivite sonuçları Çizelge 3.23'te belirtilmiştir.

**Çizelge 3.23** İnsan Eritrosit G6PD Enzimi Üzerine Diazinon ile Yapılan Çalışmalarda Kullanılan Konsantrasyonlar, 340 nm' de Ölçülen 1 dakikalık Absorbans Farkları, Aktivite ve Buna Karşılık Gelen % Aktivite Sonuçları

| Enzim ( $\mu$ L) | [Diazinon] $\times 10^{-4}$ (M) | Fark ( $\Delta$ 0D) | Aktivite | %Aktivite |
|------------------|---------------------------------|---------------------|----------|-----------|
| 50               | -                               | 0,6532              | 2,100    | 100       |
| 50               | 0,608                           | 0,6322              | 2,032    | 96,78     |
| 50               | 3,040                           | 0,5569              | 1,950    | 93,03     |
| 50               | 5,160                           | 0,5518              | 1,774    | 84,47     |
| 50               | 5,770                           | 0,5159              | 1,658    | 78,98     |
| 50               | 6,080                           | 0,4511              | 1,450    | 69,06     |
| 50               | 6,380                           | 0,4326              | 1,391    | 66,23     |

Bölüm 1.3.6.2.2'de diazinonun Türk Gıda Kodeksinde yer alan maksimum rezidü limitleri (MRL) belirtilmektedir.  $IC_{50}$  çalışmasında kullanılan Diazinon miktarları MRL'den çok yüksek konsantrasyonda olması (Çizelge 3.23) ve belirli bir konsantrasyondan sonra çalışmada kullanılan 1mL'lik küvetlerde bulanıklığın gerçekleşmesi enzimin aktivitesinin %50'nin altına inmesini engellemiştir. Şekil 3.23'te sonuçlar grafik halinde verilmektedir.



**Şekil 3.23** İnsan eritrosit G6PD enzimi için farklı Diazinon konsantrasyonlarda elde edilen % Aktivite-[Diazinon] Grafiği

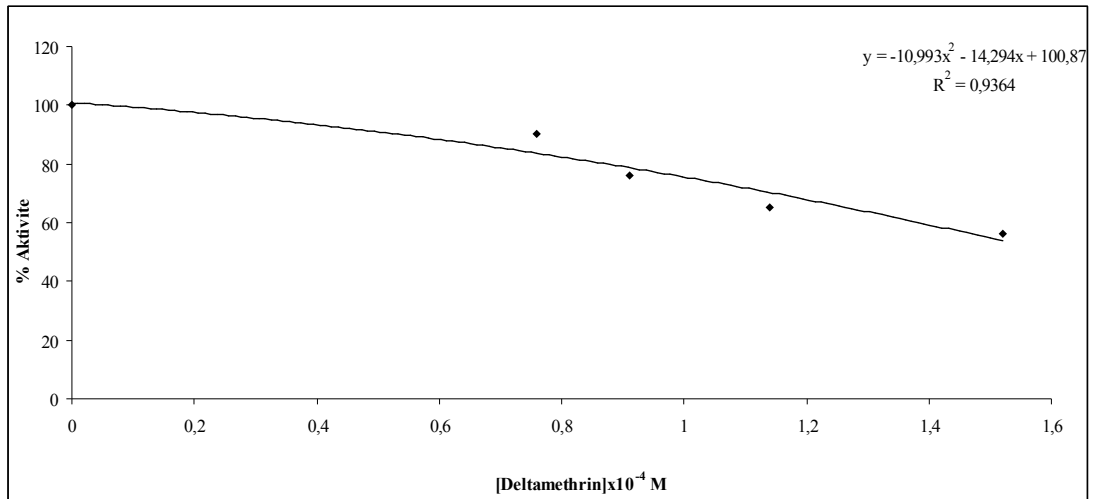


Bölüm 2.2.5'te açıklandığı gibi insektisitlerden Deltamethrin  $0,76 \times 10^{-4}$  M ile  $1,52 \times 10^{-4}$  M konsantrasyonları arasında G6PD enzimi üzerine etkileri incelenmiş, absorbans farkları, aktivite ve % aktivite sonuçları Çizelge 3.24'te belirtilmiştir. [I]-% Aktivite sonuçları Şekil 3.24'da grafik şeklinde verilmiştir.

**Çizelge 3.24** İnsan Eritrosit G6PD Enzimi Üzerine Deltamethrin ile Yapılan Çalışmalarda Kullanılan Konsantrasyonlar, 340 nm' de Ölçülen 1 dakikalık Absorbans Farkları, Aktivite ve Buna Karşılık Gelen % Aktivite Sonuçları

| Enzim ( $\mu$ L) | [Deltamethrin] $\times 10^{-4}$ (M) | Fark ( $\Delta OD$ ) | Aktivite | %Aktivite |
|------------------|-------------------------------------|----------------------|----------|-----------|
| 50               | -                                   | 0,653                | 2,100    | 100       |
| 50               | 0,76                                | 0,587                | 1,89     | 90,07     |
| 50               | 0,91                                | 0,494                | 1,59     | 76,13     |
| 50               | 1,14                                | 0,422                | 1,36     | 64,76     |
| 50               | 1,52                                | 0,363                | 1,17     | 56,03     |

Bölüm 1.3.6.2.2'de belirtilen Türk Gıda Kodeksinde yer alan maksimum rezidü limitleri (MRL) göz önünde bulundurulduğunda  $IC_{50}$  çalışmasında kullanılan Deltamethrin konsantrasyonlarının çok yüksek olduğu anlaşılmaktadır. Ayrıca Deltamethrin'in  $1,52 \times 10^{-4}$  M'dan daha derişik çözeltisi hazırlanarak 1 mL'lik kuvars küvet içine aktarıldığında çözeltide bulanıklık olması nedeniyle  $IC_{50}$  değeri bulunamamıştır (Şekil 3.24).



**Şekil 3.24** İnsan eritrosit G6PD enzimi için farklı Deltamethrin konsantrasyonlarında elde edilen % Aktivite-[Deltamethrin] Grafiği

**Çizelge 3.25** İnsan Eritrosit G6PD enzimi üzerine 5 farklı pestisit farklı konsantrasyonlarda % Aktivite değişimi

| <b>Kimyasal madde</b> | <b>C(mM)</b> | <b>% Akt.</b> | <b>C(mM)</b> | <b>% Akt.</b> | <b>C(mM)</b> | <b>% Akt.</b> | <b>C(mM)</b> | <b>% Akt.</b> | <b>C(mM)</b> | <b>% Akt.</b> | <b>C(mM)</b> | <b>% Akt.</b> | <b>C(mM)</b> | <b>% Akt.</b> | <b>C(mM)</b> | <b>% Akt.</b> | <b>C(mM)</b> | <b>% Akt.</b> | <b>C(mM)</b> | <b>% Akt.</b> |
|-----------------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|
| Glifosat              | 208          | 78            | 312          | 56,9          | 338          | 37            | 364          | 30,2          | 416          | 20            | -            | -             | -            | -             | -            | -             | -            | -             | -            | -             |
| 2,4-D                 | 113          | 85,6          | 226          | 74            | 248          | 74            | 293          | 64            | 339          | 54            | 390          | 50            | 452          | 38            | 565          | 15,8          | -            | -             | -            | -             |
| İmazethapyr           | 3,46         | 104           | 34,6         | 105           | 692          | 96            | 1038         | 83            | 1384         | 68            | 1730         | 49            | 1903         | 37            | -            | -             | -            | -             | -            | -             |
| Diazinon              | 0,60         | 96            | 3,04         | 93            | 5,60         | 84            | 5,77         | 78            | 6,08         | 69            | 6,38         | 66            | -            | -             | -            | -             | -            | -             | -            | -             |
| Deltamethrin          | 0,76         | 90            | 0,91         | 76            | 1,14         | 64            | 1,52         | 56            | -            | -             | -            | -             | -            | -             | -            | -             | -            | -             | -            | -             |

### 3.2.2.2 G6PD Enzim Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon Etkisi Gösteren Pestisitlerin İnhibisyon Mekanizmasının Belirlenmesi

Enzim aktivitesini % 50' nin aşağısına indiren Glifosat, 2,4-D'nin  $K_i$  değeri ve inhibisyon tipi hesaplandı. Çalışmada önce inhibitörsüz farklı G6P konsantrasyonlarında enzimin % Aktivite değerleri ayrı ayrı hesaplandı, ardından enzimin aktivitesini % 50'nin altı ve üstünde Glifosat ve 2,4-D'nin konsantrasyon değerleri alınarak bu değerler sabit olmak kaydıyla farklı G6P konsantrasyonlarında enzimin % aktivitesindeki değişimler, her pestisit için ayrı tespit edildi. Sonuçların Lineweaver-Burk grafikleri çizildi ve pestisitlerin inhibisyon tipleri belirlendi.

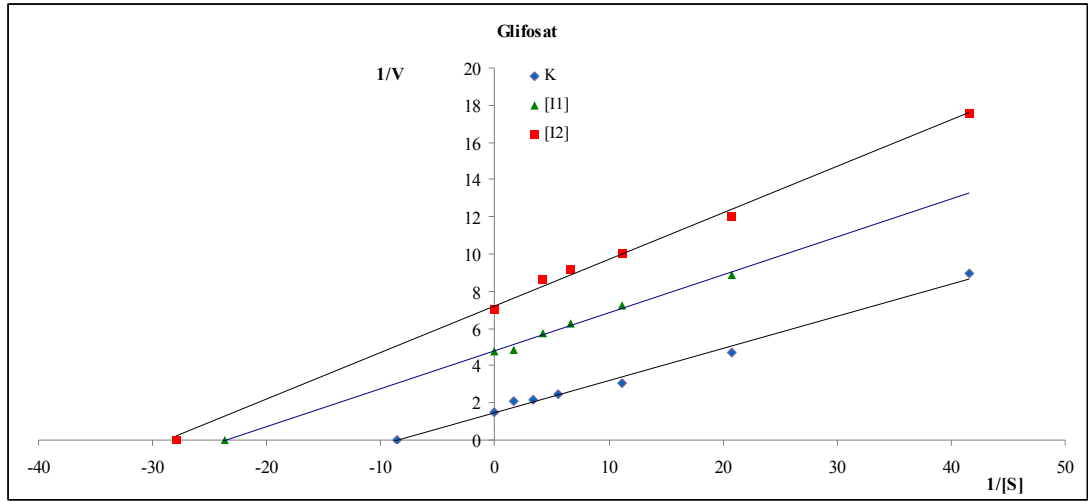
G6PD enzimi üzerine Deltamethrin ve Diazinon maddeleri  $IC_{50}$  çalışmalarında belirli konsantrasyonlardan sonra 1mL'lik kuvars küvette bulanıklığa yol açmıştır. Bu durumda sağlıklı absorbans değerleri elde edilemeyeceğinden, maddelerin enzime uygulanan konsantrasyon miktarları aktiviteyi % 50'nin altına indirmemiştir. Bu pestisitler için inhibisyon tipleri belirlenememiştir.

Çizelge 3.26 ve Çizelge 3.27'de Glifosat ve 2,4-D'nin inhibisyon tipini belirlemek için kullanılan tampon çözeltilerin hacimleri, enzim hacmi, saf su miktarı, kullanılan pestisitlerin iki farklı konsantrasyonları ve farklı substrat konsantrasyonları belirtilmiştir. Şekil 3.25 ve Şekil 3.26' da sonuçların  $1/S-1/V$ 'leri hesaplanarak Lineweaver-Burk grafikleri çizilmiştir.

**Çizelge 3.26** İnsan eritrosit G6PD enzimi üzerine Glifosat'ın  $K_i$  değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

| Tris-HCl<br>(1M)<br>EDTA<br>(5mM)<br>( $\mu$ l) | MgCl<br>(0,1<br>M)<br>( $\mu$ l) | NADP <sup>+</sup><br>(2mM)<br>( $\mu$ l) | Enzim<br>Hacmi<br>( $\mu$ l) | Saf<br>su<br>( $\mu$ l) | Substrat<br>çöz.<br>Hacmi<br>( $\mu$ l) | Küvetteki<br>Substrat<br>kons.<br>(mM) | Küvet<br>teki<br>inhibitör<br>kons.<br>(mM) |
|---|----------------------------------|--|------------------------------|-------------------------|---|--|---|
| 100   | 100                              | 100                                      | 50                           | 646                     | 4                                       | 0,024                                  | -   |
|   |                                  |  |                              | 642                     | 8                                       | 0,048                                  | -   |
|   |                                  |  |                              | 635                     | 15                                      | 0,09                                   | -   |
|   |                                  |  |                              | 625                     | 25                                      | 0,15                                   | -   |
|   |                                  |  |                              | 610                     | 40                                      | 0,24                                   | -   |
|   |                                  |  |                              | 550                     | 100                                     | 0,6                                    | -   |
|   |                                  |  |                              | 342                     | 8                                       | 0,048                                  | 31,2  |
|   |                                  |  |                              | 335                     | 15                                      | 0,09                                   |   |
|   |                                  |  |                              | 325                     | 25                                      | 0,15                                   |   |
|   |                                  |  |                              | 310                     | 40                                      | 0,24                                   |   |
|   |                                  |  |                              | 250                     | 100                                     | 0,6                                    |   |
|   |                                  |  |                              | 317                     | 8                                       | 0,048                                  | 50,1  |
|   |                                  |  |                              | 310                     | 15                                      | 0,09                                   |   |
|   |                                  |  |                              | 300                     | 25                                      | 0,15                                   |   |
|   |                                  |  |                              | 285                     | 40                                      | 0,24                                   |   |
|   |                                  |  |                              | 225                     | 100                                     | 0,6                                    |   |

Çizelge 3.26’da belirtildiği gibi G6PD’nin substratı olan G6P’nin farklı konsantrasyonlarına karşı, Glifosat’ın 31,2 mM ile 50,1 mM olarak iki farklı konsantrasyonunun enzime olan etkileri incelenmiştir. Şekil 3.25’te görüldüğü gibi inhibitör konsantrasyonu arttırıldığında  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerinin ikisinin de azaldığı görülmektedir. Bu sonuçlarla Glifosat’ın G6PD enzimine karşı yarı yarışmalı inhibitör olduğu tespit edilmiştir. Glifosat G6PD enzimine ancak enzim-substrat kompleksi oluştuğunda bağlanabilir. Böyle bir ortamda substrat miktarı arttırıldığında inhibisyon etkisi de artmaktadır.

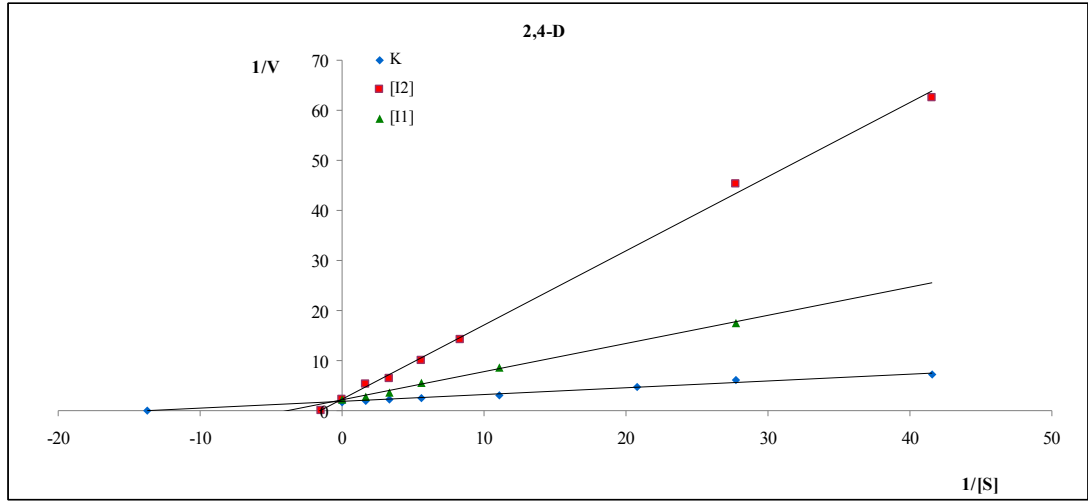


**Şekil 3.25** İnsan Eritrosit G6PD enzimi üzerine Glifosat nin etkisi  $[I_1]= 3,12 \times 10^{-2} M$ ,  $[I_2] = 5,01 \times 10^{-2} M$

**Çizelge 3.27** İnsan eritrosit G6PD enzimi üzerine 2,4-Dnin  $K_i$  değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

| Tris-HCl<br>(1M)<br>EDTA<br>(5mM)<br>( $\mu$ L) | MgCl<br>(0,1<br>M)<br>( $\mu$ L) | NADP <sup>+</sup><br>(2mM)<br>( $\mu$ L) | Enzim<br>Hacmi<br>( $\mu$ L) | Saf su<br>( $\mu$ L) | Substrat çöz.<br>Hacmi<br>( $\mu$ L) | Küvetteki<br>Substrat<br>kons.<br>(mM) | Küvetteki<br>inhibitör<br>kons.<br>(mM) |
|---|----------------------------------|--|------------------------------|----------------------|--------------------------------------|--|---|
| 100   | 100                              | 100                                      | 50                           | 646                  | 4                                    | 0,024                                  | -                                       |
|   |                                  |  |                              | 644                  | 6                                    | 0,036                                  | -                                       |
|   |                                  |  |                              | 642                  | 8                                    | 0,048                                  | -                                       |
|   |                                  |  |                              | 635                  | 15                                   | 0,09                                   | -                                       |
|   |                                  |  |                              | 620                  | 30                                   | 0,18                                   | -                                       |
|   |                                  |  |                              | 600                  | 50                                   | 0,3                                    | -                                       |
|   |                                  |  |                              | 550                  | 100                                  | 0,6                                    | -                                       |
|   |                                  |  |                              | 516                  | 4                                    | 0,024                                  | 29,3                                    |
|   |                                  |  |                              | 514                  | 6                                    | 0,036                                  |   |
|   |                                  |  |                              | 500                  | 20                                   | 0,12                                   |   |
|   |                                  |  |                              | 490                  | 30                                   | 0,18                                   |   |
|   |                                  |  |                              | 470                  | 50                                   | 0,3                                    |   |
|   |                                  |  |                              | 420                  | 100                                  | 0,6                                    |   |
|   |                                  |  |                              | 444                  | 6                                    | 0,036                                  | 45,2                                    |
|   |                                  |  |                              | 435                  | 15                                   | 0,09                                   |   |
|   |                                  |  |                              | 420                  | 30                                   | 0,18                                   |   |
|   |                                  |  |                              | 400                  | 50                                   | 0,3                                    |   |
|   |                                  |  |                              | 350                  | 100                                  | 0,6                                    |   |

Çizelge 3.27’de belirtildiği gibi G6PD’nin substratı olan G6P’nin farklı konsantrasyonlarına karşı, 2,4-D’ in 29,3 mM ile 45,2 mM olarak iki farklı konsantrasyonunun enzime olan etkileri incelenmiştir. Şekil 3.26’da belirtildiği gibi inhibitör konsantrasyonu arttırıldığında  $K_m$  artmakta,  $V_{max}$  ise değişmemektedir. 2,4-D G6PD enzimine karşı yarışmalı inhibisyon etkisi göstermektedir. 2,4-D’in molekül yapısını G6PD enziminin substratın bağlanma bölgesi olan aktif bölgeye uygundur . İnhibitör konsantrasyonu arttıkça enzim-substrat kompleksinin gerçekleşmesi zorlaşacağı için  $K_m$  değeri artarken; substrat miktarı arttırıldığında inhibisyon etkisi kaldırılacağından  $V_{max}$  değeri değişmez.



**Şekil 3.26** İnsan Eritrosit G6PD enzimi üzerine 2,4-Dnin etkisi  $[I_1]=2,93 \times 10^{-2}$  M,  $[I_2] = 4,52 \times 10^{-2}$  M

İnhibisyon tipi çalışmasında Lineweaver-Burk grafikleri çizilen 2,4-D’in yarışmalı, Glifosat’ın yarı yarışmalı olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 3.28’de 2,4-D ve Glifosat’ın  $IC_{50}$  değerleri, inhibisyon tipleri ve  $K_i$  değerleri belirtilmektedir

**Çizelge 3.28** İnsan eritrositlerinden saflaştırılan G6PD enzimi için 2 farklı pestisit in  $I_{50}$  değerleri, 2 farklı sabit inhibitör konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan  $K_i$  değerleri ve inhibisyon tipleri

| Pestisitler | $IC_{50}$ Değerleri    | İnhibisyon Tipi | $K_i$ Değerleri        |
|-------------|------------------------|-----------------|------------------------|
| Glifosat    | $323,5 \times 10^{-4}$ | Yarı Yarışmalı  | $1,345 \times 10^{-2}$ |
| 2,4-D       | $384 \times 10^{-4}$   | Yarışmalı       | $8,459 \times 10^{-3}$ |

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) (D-glukoz-6-fosfat;  $\text{NADP}^+$  oksidoredüktaz, E.C 1.1.1.49) pentoz fosfat metabolik yolunun (PFY) ilk ve kontrol enzimidir [191]. G6PD enzimi glukoz-6-fosfatın 6-fosfoglukonalaktona dönüşümünü  $\text{NADP}^+$  varlığında dönüşümsüz olarak kataliz etmektedir. Glukoz canlı metabolizmasında genellikle ATP üretmek amacıyla kullanılmaktadır. Örneğin glikoliz ve sitrik asit metabolik yollarında glukoz daha basit moleküllere dönüştürülürken asıl amaç olan ATP'nin üretildiği görülmektedir. Ancak canlının yaşamını sürdürebilmesi için ATP'nin yanında farklı birçok özelleşmiş moleküllere de ihtiyacı vardır. G6PD enziminin ilk reaksiyonunu katalizleyen PFY canlılık için gerekli özelleşmiş moleküllerden Nikotinamid adenin dinükleotid (NADPH) ve riboz 5-fosfat'ı sentezleyen yoldur. Bu metabolik yola giren glukozun katabolik sonu alışımlışın dışında ATP üretimi değil, birçok biyosentez reaksiyonlarında indirgeyici güç olan NADPH'ın ve DNA, RNA, ATP,  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{FAD}^+$  gibi önemli moleküllerin ön maddesi olan riboz 5-fosfatın sentezlenmesidir.

G6PD enzimi PFY'nda ilk reaksiyon olan Glukoz 6 fosfat'ı 6-fosfoglukonata katalizlerken  $\text{NADP}^+$ 'nin NADPH'a indirgenmesi çok önemli bir katabolik mekanizmadır. Çünkü NADPH'ın görevi sadece indirgeyici biyosentez değil, bunun yanında sülfhidril gruplarının sürekliliğinin sağlanmasında, serbest radikallerin ve peroksitlerin detoksifikasyonunda görev alan indirgenmiş glutatyonun oluşumunda da indirgeyici rol oynamaktadır.

PFY birçok farklı canlılarda, kas, yağ, kan gibi birçok farklı dokularda gerçekleşmektedir. Bu metabolik yolun kilit enzimi olan G6PD'de çok geniş bir canlı topluluğunda bulunmaktadır. G6PD enzimi protozoa [55], bakteri [58], mantar [98], sinek [99], sıçan [100], balık [101] ve memelilerin hemen hemen bütün dokuları olmak üzere geniş bir canlı topluluğunda bulunmuştur. Bunlara ek olarak tavşan karaciğer mikrozomunda ve kemik iliğinde de bu enzimin olduğu tespit



edilmiştir [102]. G6PD enzimi çeşitli insan dokularından elde edilmiştir. İnsan eritrositlerinden [87,100, 103-108], insan beyni, trombositleri, böbrek ve karaciğerinden [49, 111] ve insan plasentasından [108] saflaştırılmış ve bu enzimin bazı kinetik özellikleri incelenmiştir.

G6PD enziminin hayati bir öneme sahip olması, eksikliğinin de o denli önemli bir sorun olduğunu gözler önüne sermektedir. 1950'li yıllarda antimalaryal ilaç primakinin kullanılmasıyla hastalarda oluşan çeşitli semptomların araştırılması, G6PD enzimi eksikliğinin keşfine sebep olmuştur [192]. G6PD enziminin eksikliği genetik anormallik, yaş ve alınan diyetle ilgili olabilmektedir. G6PD eksikliği yaygın olarak görülen bir enzim hastalığı olduğu için klinik, populasyon dağılımı, biyokimyasal karakteri, moleküler biyolojisi üzerine sayısız çalışmalar yapılmıştır ve halen yapılmaktadır [193].

Çalışmamızda insan eritrositlerinden hayati önemi olan G6PD enzimi saflaştırıldı ve enzim aktivitesi üzerine çeşitli kumarin türevleri ve çeşitli pestisitlerin inhibisyon veya aktivasyon kinetikleri incelendi.

Daha önce belirtildiği gibi G6PD enzimi insan vücudunun farklı dokularında görev yapmaktadır. Bu çalışmada çeşitli pestisit ve kumarin türevlerinin özellikle insan kanındaki G6PD enziminin aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesinin önemli nedenleri bulunmaktadır. İnsan nüfusu zamanın ilerlemesiyle hızla artmaktadır. Nüfusun artışı gereksinimlerin de artmasına neden olmaktadır. Bu ihtiyaçların en önde gelenlerinden ikisinden bahsetmek gerekirse beslenme ve sağlık ile ilgili ihtiyaçlar akla gelmektedir. İnsanlar yeterli beslenmeden sağlıklı yaşayamazlar. Yeterli ve dengeli beslenme meyve ve sebzelerden gerektiği kadar faydalanabilmekle olur. Yerleşim alanlarının tarım alanlarının yerlerini işgal etmeye başlaması beslenme ihtiyacını tehlikeye sokmaktadır. Üreticiler bu sorunu çözmek için hormon, zirai ilaçlarla kullanarak kısa sürede daha fazla ürün elde etme yoluna başvurmuşlardır. Bu gelişme insan metabolizmasının özellikle çok çeşitli zirai ilaçlarla yani pestisitlerle etkileşim içerisinde olmasına neden olmuştur. İnsan kanına karışabilen bu çeşitli pestisitlerin hayati öneme sahip olan G6PD enzimine etkilerinin incelemeye değer bir konu olduğunu düşünmekteyiz.

Günümüzde artış gösteren çeşitli sağlık sorunları da aynı beslenme sorunu gibi çözülmeye çalışılmaktadır. Bu yüzden ilaç sanayi genellikle ham maddesi bitkiler olan çeşitli ilaçlar üretmektedir. Fakat ihtiyaçlara cevap verilebilmesi için bitkilerin yanında laboratuvarlarda sentezlenen birçok kimyasal madde de ilaç etken maddesi olarak kullanılmaktadır. Bu çeşitliliğin zenginleşmesi beraberinde maddelerin yan etki sorununu da getirmektedir. Çalışmamızda ilaç hammaddesi olarak şu an kullanılan kumarin maddesinin henüz ilaç yapımında kullanılmamış ancak kullanılması muhtemel olarak düşündüğümüz altı yeni kumarin türevinin insan eritrositinde bulunan G6PD enzimine etkileri incelenmiştir. Eritrosit G6PD'sinin çalışılmasının bir diğer nedeni ise PFY'nun ilk reaksiyonunu G6PD enzimi katalizlerken oluşan NADPH üretiminin eritrositler için hayati önem taşımasıdır. NADPH eritrositlerde GSH metabolizmasında rol oynamaktadır. Oksijen ve türevleri hemoglobini inaktif hemoglobine (methemoglobin) dönüştürmekte ve ayrıca moleküler oksijen, membran lipidlerinden aktivitesi yüksek peroksitler oluşmaktadır. Çok az miktarda glukozun kullanıldığı PFY'nda üretilen NADPH, eritrositin oksidatif hasara karşı korunmasında kullanılmaktadır [14, 16]

Çalışmamızda G6PD enziminin insan eritrositlerinden saflaştırma çalışması iki basamakta gerçekleştirildi. Birinci basamakta insan kanından elde edilen hemolizata amonyum sülfat çöktürmesi uygulandı. İkinci basamakta ise amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen numune afinite kolonuna tatbik edildi. Bu işlemleri gerçekleştirirken kan, hemolizat, amonyum sülfat çöktürme sonrası numune ve kolona tatbik edildiğinde kolonun bulunduğu ortam 4°C de tutulmasına özen gösterildi. Bu uygulamayı yaparak sıcaklığın sebep olacağı enzim aktivitesindeki kayıp engellenmiş oldu.

Saflaştırma çalışmasının ilk basamağı olarak uygulanan amonyum sülfat çöktürmesi uzun bir zamandır bilim adamları tarafından uygulanmaktadır. Bu işlem enzimin kısmi saflaştırılması için yapılır. Amonyum sülfat çöktürmesi yapılarak hemolizat içerisindeki safsızlıkların ortadan kalkması ve numunenin derişikleştirilmesi sağlanır. Çalışmamızda insan eritrosit hemolizatu için %30-%70 aralığında amonyum sülfat çöktürmesi yapılarak numune birçok safsızlıktan

uzaklaştırılmış oldu ve enzimin bulunduğu numune derişikleştirilmiş oldu. %30-%70 aralığını seçmemizin nedeni insan eritrositlerinden G6PD saflaştırılması üzerine yapılan farklı çalışmalarda %35-%65 ve %30-%70 çöktürme aralığının seçilmesidir. [72,104,106,168,170]. Farklı çalışmaların çoğunda %35-%65 amonyum sülfat çöktürme aralığının kullanılmasına karşın, bizim çalışmamızda %30-%70 değer aralığının uygulanmasının nedeni daha geniş bir alanı değerlendirebilmektir. Uygulamanın sonucunda %68,18 verimle, 1,277 kat kısmi olarak saflaştırma yapıldı. Yapılan farklı G6PD saflaştırma çalışmalarında uygulanan amonyum sülfat çöktürmeleri değer aralıkları mantarda % 15-% 65 [54], gökkuşuğu alabalığında %40-%65 [194] , kazda %40-%60 [116], tavşan akciğerinde %20-%65 [102] ve tavşan dalağında % 0-%55 [102], koyun eritrositlerinde %50-%60, koyun lensinde %0-%30'dur [110]. Literatürdeki bu değerlerin çalışmamızdaki amonyum sülfat çöktürme aralığından farklı olmasının nedeni farklı canlılardaki G6PD enziminin yapısal farklılıklarından kaynaklanmaktadır.

Amonyum sülfat çöktürme işlemi gerçekleştirildikten sonra elde edilen derişikleştirilmiş çözelti diyaliz edildi. 2' 5' ADP- Sepharose 4B afinite jelinin yapısında bulunan 5 karbonlu riboz şekerinin 2. ve 5. karbonuna bağlı olan fosfat moleküllerinde eksi yüklü oksijen atomları bulunmaktadır. Afinite jelindeki bu fosfatlar enzime yüksek ilgisi olan yapılardır. Amonyum sülfat çöktürme işleminden sonraki numuneye diyaliz işlemi uygulanmaz ise amonyum ( $\text{NH}_4^+$ ) molekülü eksi yüklü oksijen atomlarına bağlanır ve bu bölgeler kapalı olacağı için G6PD enziminin diğer safsızlıklardan ayrılabilmesi sağlıklı olarak gerçekleştirilemez.

Diyaliz edilen çözelti, Bölüm 2.2.1.3'te belirtildiği gibi hazırlanmış olan 2' 5' ADP Sepharose-4B Afinite kolonuna tatbik edildi. Afinite kromatografisi birçok saflaştırma metodlarına göre oldukça avantajlı bir yöntem olduğu için ve uzun zamandır G6PD enzimi saflaştırması üzerine yapılan çalışmalarda bu kromatografinin kullanılması bizimde bu yöntemi seçmemize neden olmuştur [96]. Afinite kromatografisi, saflaştırılacak olan proteinleri bağlanma özelliklerine göre ayırır. Kolonda tutulan protein özel bir ligand tarafından kolondan alınarak saflaştırma gerçekleşmiş olur [187].

Daha önceki yıllarda G6PD saflaştırmasına yönelik çalışmalarda CM-Selüloz, DEAE-selüloz ile yapılan kolon kromatografisi yöntemleri kullanılmıştır [92]. İlerleyen zamanlarda bu yöntemlere ek olarak jel filtrasyon kromatografisi, hidroksipatit kolon kromatografisi, etanol çöktürmesi ile ultrasantrifigasyon metodları uygulanmıştır [93-95]. Afinite kromatografisi yöntemi için özel ligandların geliştirilmesiyle G6PD enzimi daha kısa sürede daha iyi bir yüzde verimle saflaştırılmıştır [96]. Afinite kromatografisi ile G6PD enziminin saflaştırılması işleminde çeşitli absorban metaryelleri kullanılmaktadır. Bunlar; 8-(6-aminohekzil) amino-2'-fosfoadenozin difosforiboz, 8-(6-aminohekzil) amino-2',5'-ADP, 8-(6-aminohekzil) amino-NADP<sup>+</sup> N<sup>6</sup>-(6-aminohekzil) amino-2', 5'-ADP metaryelleri bunlara örnektir [195]. Son yıllarda G6PD enzimi, 2' 5' ADP Sepharose-4B afinite kromatografisi ile yüksek verimle saflaştırılmaktadır. Bu yöntem ilk kez Flora ve arkadaşları tarafından uygulanmıştır [97]. Bu yöntemde ligand olarak G6PD'nin kuvvetli inhibitörü olan orto fosfat görev yapmaktadır [110].

Flora ve arkadaşları G6PD enzimini saflaştırırken önce DEAE-Sephadex, P<sub>11</sub>, ardından 2' 5' ADP- Sepharose 4B afinite kromatografisini sırayla uygulamış ve enzimi saflaştırmıştır [97]. Üç basamak uygulandığı için zaman ekonomik olarak kullanılamamıştır. Ayrıca sıcaklığında enzime olan etkisi enzimin aktivitesinde kayıplara neden olmuştur. Bu çalışmada ilk iki basamağın yerine amonyum sülfat çöktürmesi uygulandı. Derişik halde olan çözelti 2' 5' ADP- Sepharose 4B afinite kolonuna tatbik edildi. Toplam bir buçuk günlük bir süre sonunda saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiş oldu. Çizelge 3.1'de görüldüğü gibi hemolizat, amonyum sülfat çöktürmesi sonucu oluşan derişikleştirilmiş çözelti ve afinite kromatografisi sonucu elde edilen çözeltinin spesifik aktiviteleri, % verimleri ve saflaştırma katsayıları tespit edilmiştir. Saflaştırma tablosunu hazırlarken özellikle Afinite kolondan elde edilen 1,5 mL'lik tüplerden en yüksek aktiviteye sahip olan ile, kinetik çalışmalarda kullanmak için aktivitesi yüksek görülen 4 tüpün karıştırılması sonucu oluşturulan enzim havuzunun spesifik aktiviteleri, % verimleri ve saflaştırma katsayıları Çizelge 3.1' de belirtilmiştir. Afinite kolonundan elde edilen en yüksek aktiviteye sahip olan 1,5mL'lik tüpteki enzim 70,681 EU/mg spesifik aktivite ile %33,65 verimle, 7068,100 kat saflaştırılmıştır. Kinetik çalışmalarda kullanılmak üzere hazırlanan 4 tüpten oluşan (6 mL) havuzdan G6PD enzimi 48,454 EU/mg spesifik aktivite ile

%81,41 verimle 4845,400 kat saflaştırılmıştır. Görüldüğü gibi hacim arttıkça aktivitesi düşük olan enzimlerinde havuza eklenmesi sonucu spesifik aktivite ve saflaştırma katsayısı düşmekte ancak % verim artmaktadır. Bunun nedeni de kolondan elüe edilmiş olan G6PD enzimlerinin hepsinin % verim hesabına dahil edilebilmiş olmasıdır.

Yapılan çalışmalarda insan eritositlerinden G6PD enzimi 114,7 EU/mg spesifik aktivite ile %28 verimle 13654 kat [106], 62,96 EU/mg spesifik aktivite ile %28,33 verimle 2248 kat [168], 61,44 EU/mg spesifik aktivite ile % 56 verimle 13356 kat [72], 22,9 EU/mg spesifik aktivite ile %43 verimle 9150 kat [104], % 42,4 verimle 9110 kat [170], saflaştırılmıştır. Çalışmamızda elde ettiğimiz %33 verimle 7068,100 kat saflaştırma sonucumuz Erat'ın sonuçlarına benzerlik göstermektedir. Ayrıca spesifik aktivite değerimiz olan %70,681 Özmen ve arkadaşlarının sonucuna yakın olduğu görülmüştür. Ancak saflaştırma katsayısı oldukça yüksek olduğu tespit edilen çalışmalarda verimin düşük olduğu görülmektedir. Çalışmamızda da saflaştırma katsayımızın düşük olduğu basamakta % verimin arttığı görülmektedir.

Farklı canlıların G6PD enzimlerinin spesifik aktivite, % verim ve saflaştırma katsayılarına bakılacak olursa; koyun eritrositinin spesifik aktivitesi 4,64 EU/mg, %37,1 verimle 1189,74 kat [110]; tavuk eritrositinden 20,862 EU/mg spesifik aktivite ile %54,68 verimle, 9150 kat [196]; Gökkuşuğu alabalığının eritrositinden 14,51 EU/ mg spesifik aktivite ile %70,40 verimle, 1271,19 kat [194]; domuz karaciğerinden 1,24 EU/mg spesifik aktivite ile %40 verimle, 1000 kat [197]; köpek karaciğerinden 130 EU/mg spesifik aktivite ile %18 verimle, 2000 kat [130] saflaştırılmıştır. Görüldüğü gibi insan eritrosit G6PD enzimini saflaştırarak elde edilen spesifik aktivite sonucu köpek karaciğeri hariç diğer elde edilen sonuçlardan daha yüksektir. Araştırmamızda elde edilen % verim değeri Gökkuşuğu alabalığından düşük, köpek karaciğerinden yüksek, diğerler sonuçlara benzerlik göstermektedir. Genellikle karaciğerden yapılan saflaştırma işlemlerinde elde edilen % verimin çalışmamızda elde ettiğimiz değerden düşük olmasının nedeni, dokudan enzimlerin izolasyonunun daha güç olmasındandır.

İnsan eritrosit hemolizatında, amonyum sülfat çöktürmesi uygulandıktan sonra elde edilen enzim çözeltisinde ve 2' 5' ADP-Sepharose 4B Afinite kromatografisinden elde edilen saf enzim çözeltisinde protein miktarları Lowry yöntemiyle Şekil 3.2'de verilen standart grafikten kantitatif olarak belirlendi. Bu yöntem alkali koşullar altında biüret reaksiyonu ve aromatik aminoasitlerin  $\text{Cu}^{+2}$  katalizli oksidasyonundan sonra, ayrıca bulunan fosfomolibdik, fosfotungisidik asiti ile heteropolimolibden mavisine indirgenmeyi içeren Folin- Ciocalteu reaksiyonunun bir kombinasyonudur [189]. Koyu mavi oluşu karakteristiktir ve 600 nm dalga boyunda absorbans verir. Yöntem Bradford yöntemine göre yaklaşık yüz kat duyarlıdır. G6PD enziminin saflaştırılmasına dayalı bir çok çalışmada [72, 104,168, 170] saflaştırma tablosu oluşturmak için gerçekleştirilen protein miktarı işlemi genellikle Bradford yöntemiyle yapılmıştır.

Afinite kolonunda elde edilen saf enzim çözeltisi için kalitatif protein tayini yapılamadı. Kalitatif protein tayini, proteinin yapısında bulunan aromatik gruplara sahip triozin ve triptofan amino asitlerinin 280 nm'de maksimum absorbans göstermesi esasına dayanmaktadır. G6PD enziminin elüsyonu için  $\text{NADP}^{+}$  'nin kullanılması 280 nm'de proteinlerin absorbansının maskelenmesine neden olduğu için afinite basamağında proteinlerin kalitatif tayini belirlenememiştir.

Diyaliz aşamasından sonra elde edilen çözelti Afinite kolonuna uygulandıktan sonra bölüm 3.1.2'de belirtildiği gibi yıkama işlemleri gerçekleştirildi. Yıkama işlemi başladığında kolondan gelen elüentler 1,5 mL'lik tüplere alınmaya başlandı ve enzim kolondan elüe edilinceye kadar bu çalışma devam etti. Alınan her bir tüp için  $25^{\circ}\text{C}$ 'de 340 nm'de spektrofotometrede Beutler metoduna göre aktivite tayini yapıldı [190]. Verimin %10 arttırılması için elüsyona EDTA katıldı [97].

Aktivite ölçümleri yapılan tüplerin ayrıca Lowry yöntemiyle kantitatif protein miktarları da belirlendi. Şekil 3.1'de toplam 79 tüpün 340 nm'de ki aktivite değerleri ve 600 nm'de protein miktarları belirtilmektedir. Görüldüğü gibi ilk 21 tüpte aktivite pek görülmezken protein miktarları en fazla bu tüplerde görülmektedir. 21.tüpten sonra protein miktarı hızlı bir şekilde düşüş göstermektedir. Bu da ilk yıkama işleminde safsızlığa neden olan proteinlerin kolondan temizlendiğini göstermektedir.

68.tüpten sonra hızlı bir şekilde protein miktarının ve aktivitenin yükseldiği görülmektedir. Bu sonuçta afinite kolonu tarafından yıkama işlemleri gerçekleşirken tutulan G6PD enziminin elüsyon tamponu tarafından kolondan elüe edildiğinin ispatıdır. 75. tüpten itibaren protein miktarı ve aktivitede yine düşüş görülmekte ve bu da artık kolonda G6PD enziminin bittiğini göstermektedir (Şekil 3.1).

Beutler metodu ile aktivite tayini, Lowry metodu ile kantitatif protein miktarı tayini G6PD enzimi için yapıldıktan sonra enzimin saflığını kontrol etmek için sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yapıldı. Bu uygulamanın sonucunda jelde tek band gözlemlendi. SDS-PAGE uygulamasında normal elektroforez yapılırken ilave olarak SDS katılmaktadır. SDS, çok yüksek eksi yüke sahip olduğu için ayrılması istenen proteinlerin etrafını bu yüklerle çevrelendiğinden ayrılma olayı moleküllerin yükleri ile değil, sadece molekül ağırlıklarına göre gerçekleşmektedir. Bu çalışmada bu yöntemi uygulayarak literatürde belirtilen G6PD molekül ağırlığı ile karşılaştırma yapıldı. Şekil 3.3’de görüldüğü gibi jeldeki tek bandın, molekül ağırlıkları bilinen standart proteinlerin jelde yerleştikleri bölgelere göre kıyaslama yapılarak molekül ağırlığı tahmin edildi. G6PD enzimine ait olan jeldeki tek bant molekül ağırlıkları 66200 ile 45000 dalton olan iki standart bant arasına karşılık geldiği görülmektedir. Enzimin bulunduğu bölge yaklaşık 59000 ile 60000 dalton arasında olduğu tespit edilmiştir. G6PD enzimi insan eritrositlerinde aktif olarak dimer yapıda bulunmaktadır ve literatürde 120000 dalton olarak belirtilmektedir [198]. SDS-PAGE elektroforez uygulaması ile dimer yapıdaki G6PD enziminin alt birimleri ayrılarak tek band oluşturmaktadır. Çalışma sonucu bulduğumuz molekül ağırlığı literatürdeki bilgilere uygunluk göstermektedir. Ayrıca insan eritrositlerindeki G6PD enziminin saflaştırılması üzerine yapılan bir çok çalışmada SDS-PAGE elektroforezi yöntemi uygulanmış ve elde edilen jel görüntülerinde G6PD enziminin altbiriminin molekül ağırlığının tek band şeklinde 59000-60000 dalton arasında olduğu belirtilmiştir [72,106,168,170].

G6PD enziminin saflaştırılmasının ardından kinetik özelliklerinin belirlenmesi için Lineweaver-Burk grafiğinden yararlanarak enzimin substrata ilgisini ifade eden  $K_m$  sabiti ve enzimin katalitik gücünü gösteren  $V_{max}$  değeri tespit edilmiştir.. G6PD enziminin doğal substratı D-glukoz-6-fosfattır. Ancak enzim 2-deoksiglukoz-6- fosfat, 2-deoksi-2-floroglukoz-6-fosfat, 2-deoksi-2-kloroglukoz-6-

fosfat, mannoz-6- fosfat, 3-deoksiglukoz-6-fosfat gibi substrat analoglarını da belirli oranlarda kullanabilmektedir. Bu enzimle ilgili olarak yapılan bütün çalışmalarda, D-glukoz-6- fosfat için en yüksek  $V_{max}$  ve en düşük  $K_m$  değeri bulunmuştur [26]. PFY'nun ilk reaksiyonunu katalizleyen G6PD enzimi G6P'ı 6-fosfoglukanolakton'a çevirirken  $NADP^{+}$ 'yi koenzim olarak kullanmaktadır. Koenzim kullanan enzimli reaksiyonlarda koenzim substrat olarak değerlendirilmektedir. Bundan dolayı çalışmada G6PD enziminin iki substratı için  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri tespit edilmiştir.

İnsan eritrosit G6PD enziminde  $NADP^{+}$  için  $K_m$  değeri 0,141 mM iken, G6P için  $K_m$  değeri 0,221 mM olarak tespit edilmiştir.  $NADP^{+}$  için  $K_m$  değeri ile G6P için  $K_m$  değeri karşılaştırıldığında, enzimin  $NADP^{+}$ 'ye karşı olan afinitesi G6P'ye göre daha yüksek olduğu görülmektedir. G6PD enzimi üzerine yapılan başka bir çalışmada insan eritrosit G6PD enziminin G6P için  $K_m$  değeri 0,5mM,  $NADP^{+}$  için ise 0,210 mM olarak tespit edilmiştir [72]. Bu çalışmada da enzimin  $NADP^{+}$ 'ye olan afinitesi G6P'den daha kuvvetli olarak görülmektedir. Yapılan başka bir çalışmada insan plasental G6PD enziminin  $NADP^{+}$  için  $K_m$  değerini  $20\pm 10\mu M$  ve G6P için  $K_m$  değeri ise  $40\pm 10\mu M$  olarak tespit edilmiştir [199]. Farklı canlılar üzerine yapılan çalışmalara bakıldığında koyun eritrosit G6PD enziminde  $NADP^{+}$  için  $K_m$  değeri  $1,23\times 10^{-5}$ , G6P için ise  $3,6\times 10^{-2}$  [110]; *Aspergillus aculeatus* adlı mantarın G6PD enziminde  $NADP^{+}$  için  $K_m$  değeri  $6\pm 1\mu M$  ve G6P için  $75\pm 6\mu M$  [54] olarak belirtilmektedir. Farklı çalışmalardan elde edilen sonuçlara bakıldığında çalışmamızda elde edilen G6P ve  $NADP^{+}$  için  $K_m$  değerleri insan eritrositlerindeki G6PD enzimi üzerine yapılan diğer çalışmaya uygunluk göstermektedir. Koyun eritrosit ve *Aspergillus aculeatus* mantarından saflaştırılmış G6PD enziminin  $NADP^{+}$  ve G6P için  $K_m$  değerleri ise çalışmamızda elde edilen değerlerden küçüktür. Farklı canlılarda bulunan G6PD enzimlerinin genetik ve biyomoleküler yapı bakımından benzer yanlarına olmasına rağmen birbirlerinden farklılık gösterirler. Bu farklılık substrata ilginin ölçüsü olan  $K_m$  değerinde de görülmektedir.

Araştırmamızda saflaştırılmış ve karakterize edilmiş olan insan eritrosit G6PD enziminin aktivitesi üzerine altısı yeni yedi kumarin türevi ve beş pestisit olmak üzere on iki kimyasal maddenin etkileri incelenmiştir.



Saflaştırılmış enzim aktivitesi üzerine in vitro etkileri incelenmiş olan yeni kumarin türevleri Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Organik Kimya Laboratuvarlarından temin edilmiş ve söz konusu bileşiklerin saflıkları erime noktası ve ince tabaka kromatografisi ile analiz edilmiştir. Yapıları IR, NMR spektrumları ile aydınlatılmıştır. Bunlara ek olarak bir kumarin türevi varfarin sodyumu, etken maddesi olarak içeren ilacın enzim aktivitesi üzerine etkisi belirlenmiştir.

Kumarin türevlerinin G6PD enzimi aktivitesini %50 oranında azaltan konsantrasyonları olan IC<sub>50</sub> değerleri belirlenmiştir. Yeni kumarin türevleri olan 6,7-dihidroksi-3-(2-metilfenil)-2*H*-kromen-2-on'nin (OPC) IC<sub>50</sub>=3,05x10<sup>-4</sup>, 6,7-dihidroksi-3-(3-metilfenil)-2*H*-kromen-2-on'nin (MPC) IC<sub>50</sub>=7,69x10<sup>-4</sup>, 6,7-dihidroksi-3-(4-metilfenil)-2*H*-kromen-2-on'un (PPC) IC<sub>50</sub>=7,90 x10<sup>-4</sup>, 7,8-dihidroksi-3-(4-metilfenil)-2*H*-kromen-2-on'un (FPC) IC<sub>50</sub>=5,67 x10<sup>-4</sup>, 6,7-dihidroksi-3-(2,5-dimetoksifenil)- 2*H*-kromen-2-on'un (DPC) IC<sub>50</sub>=4,48 x10<sup>-4</sup>, 6,7-dihidroksi-3-(3,4,5-trimetoksifenil)-2*H*-kromen-2-on'un(TPC) IC<sub>50</sub>=7,89 x10<sup>-4</sup> olarak tespit edilmiştir

Bu sonuçlarla yeni kumarin türevlerinin altısının da G6PD enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösterdikleri anlaşılmaktadır. Kumarin türevlerinin IC<sub>50</sub> değerleri küçükten büyüğe doğru sırasıyla OPC, DPC, FPC, MPC, TPC, PPC gelmektedir. OPC diğer kumarin türevlerine göre IC<sub>50</sub>'si en düşük olanıdır. Bu sonuç OPC'nin diğerlerine göre kuvvetli inhibitör olduğunu göstermektedir. PPC, MPC ve TPC'nin IC<sub>50</sub>'leri birbirine çok yakındır ve OPC ile beraber FPC ve DPC'den daha yüksektir. Bu sonuç PPC, MPC ve TPC'nin diğerlerine göre zayıf inhibitör olduklarını göstermektedir.

G6PD enziminin aktivitesi üzerine etkileri incelen 6 yeni kumarin türevinin de potansiyel inhibitör oldukları görülmektedir. Gelecekte ilaç hammaddesi olması muhtemel altı yeni kumarin türevinin kullanılma aşamasında dozlarının ayarlanmasında dikkat edilmesi gerektiği kanaatindeyiz. Özellikle kuvvetli inhibitör olarak belirlenen OPC'nin ilaç sanayinde kullanılırken miktar belirlenmesi sırasında titizlik gösterilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda etken maddesi varfarin sodyum kumarin türevi olan ilacın G6PD enzimi üzerine etkisi incelendiğinde enzim aktivitesi üzerine belirgin bir değişikliğin görülmediği tespit edilmiştir. Varfarin sodyum'un kimyasal yapısına bakıldığında enzim aktivitesine inhibisyon etkisi gösteren 6 yeni kumarin türevinin kimyasal yapısından çok farklı olduğu görülmektedir [200]. Bu sonuç varfarin sodyum bileşiğinin kimyasal yapısının enzimin aktif bölgesine veya substratın bağlanmadığı farklı bir bölgesine tutunması için uygun olmadığını göstermektedir.

Literatürde kumarin türevlerinin insan eritrosit G6PD enzimi aktivitesi üzerine  $IC_{50}$  çalışması görülmemektedir. Ancak insan metabolizmasında önemli görevleri olan farklı enzimlerin aktivitesi üzerine bazı kumarin türevlerinin etkisi incelenmiştir. Yapılan bir çalışmada insan karbonik anhidraz I (hCA-I) ve insan karbonik anhidraz II (hCA-II) enzimlerinin aktivitesi üzerine bizim çalışmamızda da incelenen 6,7-dihidroksi-3-(2-metilfenil)-2*H*-kromen-2-on (DPC), 6,7-dihidroksi-3-(3-metilfenil)-2*H*-kromen-2-on (OPC), 6,7-dihidroksi-3-(4-metilfenil)-2*H*-kromen-2-on (MPC), 6,7-dihidroksi-3-(2,5-dimetoksifenil)- 2*H*-kromen-2-on (PPC) adlı 4 kumarin türevinin  $IC_{50}$  değerleri tespit edilmiştir [201]. hCA-I'in esteraz aktivitesi üzerine OPC'nin diğer kumarin türevlerine göre kuvvetli inhibisyon etkisi gösterdiği  $IC_{50}$  değerlerinden anlaşılmaktadır. Bu sonuçların çalışmamızdaki OPC'nin G6PD enzimi için de en kuvvetli inhibisyon etkisi gösterdiği sonucunu desteklemektedir. hCA-I ve hCA-II enzimleri için 4 kumarin türevinin  $IC_{50}$  değerlerine genel olarak bakıldığında, bizim çalışmamızda G6PD enzimi için kullanılan aynı kumarin türevlerinin  $IC_{50}$  değerlerine göre düşük konsantrasyonda oldukları görülmektedir. Bu tespit ile kullanılan kumarin türevlerinin G6PD enzimi üzerinde hCA enzimine göre daha zayıf inhibisyon etkisi gösterdiği anlaşılmaktadır.

Ayrıca araştırmamızda insan G6PD enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren kumarin türevlerinin inhibisyon tipleri ve  $K_i$  değerleri belirlenmiştir. Bu işlemi gerçekleştirirken her inhibitörlü çalışma için iki farklı sabit inhibitör konsantrasyonlarında  $1/V$  ve  $1/S$  değerleri hesaplanarak Lineweaver-Burk grafikleri çizilmiştir (Şekil 3.14-Şekil 3.19).

Enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren kumarin türevlerinden OPC'nin yarışmasız, TPC'nin yarışmalı, PPC'nin ve DPC'nin yarı yarışmalı, MPC'nin ve FPC'nin karışık inhibitör oldukları tespit edilmiştir.

Kumarin türevlerinin kimyasal yapılarında ki farklılıklar inhibisyon tiplerinin de farklılaşmasına neden olmaktadır. OPC, MPC ve PPC kumarinlerin yapıları arasındaki fark fenil halkasındaki metil gruplarının farklı konumlarda olmasından kaynaklanmaktadır. Metil grubu OPC'de 2 konumunda, MPC'de 3, PPC de ise 4 konumunda yer almaktadır. Fenil halkasının 2 konumunda metil grubunun olması OPC'nin G6PD enzimine aktif bölgeden değil farklı bir bölgeden bağlanmasına neden olabileceğini düşünmekteyiz. Metil grubunun 2 yerine 3 konumunda bağlanması sadece kumarin türevinin yapısını değil enzime etki etme mekanizmasını da değiştirmekte, enzime hem aktif bölge hem de aktif olmayan farklı bir bölgeden bağlanabilme yeteneği kazandırdığı ve PPC'de ise metil grubu 4 konumunda yer alarak enzime ancak enzim-substrat kompleksi gerçekleştiğinde bağlanabilecek yapıya dönüştüğü düşünülmektedir. DPC ve TPC'nin kimyasal yapılarına bakıldığında fenil halkalarının farklı konumlarında farklı sayıda metoksi gruplarının bulunduğu görülmektedir. DPC'nin fenil halkasının 2 ve 5 konumunda metoksi grubunun bulunması enzime enzim-substrat kompleksi oluştuğunda bağlanabilmesini sağlarken, metoksi grubunun fenil halkasının 3,4 ve 5 konumunda bulunması enzimin sadece aktif bölgesinden bağlanabilmesine neden olduğu kanaatindeyiz. FPC yapısına bakıldığında PPC'de olduğu gibi 4 konumunda metil grubu bulunmaktadır. Ancak hidroksil gruplarından bir tanesinin farklı konumda yer aldığı görülmektedir. Bu yapısal değişiklik FPC'nin enzime hem substrat gibi bağlanabilmesine hem de aktif bölgeden bağlanabilmesine sebep olduğunu düşünmekteyiz.

G6PD enzimi aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren pek çok bileşiğin inhibisyon mekanizması aydınlatılmıştır. Yapılan bir çalışmada, insan eritrositlerinden G6PD enzimi saflaştırılmış ve Cd(II), Al(III) ve Ni(II)'nin enzim üzerine inhibisyon etkileri incelenmiştir. Al(III)'ün inhibisyon tipinin G6P substratı kullanıldığında yarışmalı olduğu, Ni(II) nin inhibisyon tipinin ise, karışık inhibisyon tipi gösterdiği belirtilmiştir. Sonuç olarak metal iyonlarının G6PD enzimini dönüşümlü olarak

inhibe ettiği bu çalışma sonucunda tespit edilmiştir [167]. Yapılan bir başka çalışmada İsepamicin sülfate, meropenem, klorofenikol, tiamfenikol glisinet hidroklorid adlı antibiyotik türlerinin G6PD enzimi üzerine etkileri incelenmiştir. Çalışma sonucunda İsepamicin sülfat'ın inhibisyon tipi yarışmalı ve  $K_i=1,7$  mM, Tiamfenikol glisinet hidroklorid ise enzimi aktive etmiştir. Diğer antibiyotikler ise enzime herhangi bir etki göstermemiştir. Bir başka çalışmada Omepirazol, morfin sülfat, remifentamil, ketamine, vankomisin ilaçlarının insan eritrosit G6PD enzimi üzerine etkileri incelenmiştir.  $K_i$  değerleri sırasıyla omapirozol, morfin ve vankomisin için  $8,22\pm0,55$  mM,  $25,93\pm6,82$  mM ve  $2,71\pm0,677$  mM olduğu ve inhibisyon tiplerinin hepsinin yarışmasız olduğu tespit edilmiştir [168]. Magnezyum sülfat ve metamizol'ün G6PD enzimi üzerine etkileri incelenen bir çalışmada iki maddenin de yarı yarışmalı olduğu tespit edilmiş ve  $K_i$  değerleri metamizol için  $6,35\times10^{-3}$ M, magnezyum sülfat için ise  $1,32\times10^{-2}$ M olduğu belirtilmiştir [202]. Veriler karşılaştırıldığında 6 yeni kumarin türevinin de  $K_i$  değerlerinin insan eritrosit G6PD enzimini inhibe eden isepamicin sülfat, omepirazol, morfin sülfat, remifentamil, ketamine, vankomisin, magnezyum sülfat ve metamizol'ün  $K_i$  değerlerinden daha düşük olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar 6 yeni kumarin türevinin G6PD enziminin katalitik aktivitesine gösterdiği inhibisyon etkisinin, diğer maddelere göre daha kuvvetli olduğunu göstermektedir.

İnsan eritrosit G6PD enzimi üzerine üçü herbisit ikisi insektisit olmak üzere beş farklı pestisit in vitro etkileri incelenmiştir. Çalışmamızda özellikle herbisit ve insektisit olarak farklı amaçla kullanılan pestisitler seçilmiştir.

Herbisit olan N-(fosfonametil) glisin (Glifosat), (2,4-diklorofenoksi) asetik asit (2,4-D), 5-etil-2-[(RS)-4-izopropil-4-metil-5-okso-2-imidazolin-2-il]nikotinik asit (İmazethapyr) adlı ilaçların G6PD enzim aktivitesi üzerinde % 50 inhibisyon etkisi gösterdiği konsantrasyonları belirlenmiştir. Çalışmada herbisitler belirli oranlarda saf su ile seyreltilmişlerdir. Üç herbisit in de G6PD enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösterdikleri belirlenmiştir. Glifosat'ın  $IC_{50}$  değeri  $323\times10^{-4}$  M, 2,4-D'in  $IC_{50}$  değeri  $384\times10^{-4}$  M olarak tespit edilmiştir. İmazethapyrin farklı konsantrasyonlarda G6PD enzimi üzerine etkileri incelenirken diğer herbisitlerin konsantrasyonlarına yakın miktarlar kullanılmış, ancak enzime herhangi bir etki

göstermediği belirlenmiştir. İlaç diğerlerinde uygulandığı gibi seyreltme işlemi gerçekleştirilmeden derişik halde enzime uygulandığında ancak inhibisyon etkisi göstermeye başlamıştır. IC<sub>50</sub> çalışmasında İmazethapyr'den 0,1730 M kullanıldığında enzimin % aktivitesinin yarıya indiği tespit edilmiştir. Ancak bu konsantrasyondaki enzim aktivitesinin sağlıklı olmadığını düşündüğümüzden IC<sub>50</sub> değeri hesaplanmamıştır.

IC<sub>50</sub> değerleri tespit edilen glifosat ve 2,4-D insan eritrosit G6PD enziminin aktivitesi üzerine gösterdikleri inhibisyon etki düzeylerinin birbirine yakın oldukları görülmektedir. Literatürde insan eritrosit G6PD'nin aktivitesi üzerine bu pestisitlerin IC<sub>50</sub> çalışmasına rastlanmasa da farklı canlıların G6PD enzim aktivitesi üzerine çeşitli pestisitlerin etkileri üzerine çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada sığır lenfosit hücreleri üzerine Glifosattan artan konsantrasyonlarda 6 saat muamele edilmiştir. Glifosat uygulanan hücrelerin G6PD enzim aktivite tayini yapılmış ve artan glifosat miktarına bağlı olarak aktivitede istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlenmiştir [203]. Bizim çalışmamızda glifosatın konsantrasyonu 20,8 mM'dan itibaren devamlı yükseltildiğinde G6PD enziminin aktivitesi düşüş göstermiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuç kaynağı farklı olmasına rağmen literatür ile uygunluk göstermektedir.

Çalışmamızda ayrıca IC<sub>50</sub> değerleri tespit edilen herbisitlerden glifosat ve 2,4-D'in inhibisyon mekanizmaları incelenmiştir. Glifosatın inhibisyon tipinin yarı yarışmalı olduğu ve K<sub>i</sub> değerinin 1,345x10<sup>-2</sup>, 2,4-D'in ise yarışmalı ve K<sub>i</sub> değerinin 8,459x10<sup>-2</sup> olduğu tespit edilmiştir. K<sub>i</sub> değeri enzim ile inhibitörün birbirinden ayrılma katsayısını gösterdiği için 2,4-D'in Glifosat'a göre zayıf inhibitör olduğu, yani enzime daha ilgili olduğu düşünülmektedir.

0,0-dietil 0-2-izopropil-6-metilprimidin-4-il fosforotiyoat (Diazinon), (S)- $\alpha$ -siyano-3-fenoksibenzil (1R,3R)-3-(2,2-dibromovinil)-2,2dimetilsiklopropan karboksilat(Deltamethrin) adlı insektisitlerin insan eritrosit G6PD enzimi aktivitesi üzerine etkileri incelenirken herbisitler gibi saf suda çözünmedikleri için kumarin türevlerini çözerken DMSO kullanıldı. Deltamethrin'in 1,52x10<sup>-4</sup> M'dan daha derişik çözeltisi hazırlanarak 1 mL'lik kuvars küvet içine aktarıldığında çözeltide

bulanıklık olması nedeniyle IC<sub>50</sub> değeri bulunamamıştır (Şekil 3.24). Diazinon'da  $6,380 \times 10^{-4}$  M'dan daha yüksek konsantrasyonu 1mL'lik küvete eklediğimizde çözeltide Deltamethrinde olduğu gibi bulanıklık meydana gelmiştir. İki insektisit de IC<sub>50</sub> değerleri tespit edilemedi, ancak G6PD enzime inhibisyon etkisi gösterdikleri belirlenmiştir.

Literatürde çalışmada kullanılan insektisitlerin insan eritrosit G6PD enziminin aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi ile ilgili bir araştırmaya rastlanmamıştır. Ancak farklı canlıların G6PD enziminin aktivitesi üzerine insektisitlerin etkisi ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada gökkuşuğu alabalığının kanından saflaştırmış G6PD enziminin aktivitesi üzerine Deltamethrin'in etkisi araştırılmıştır. IC<sub>50</sub> değeri 0,63 mM, inhibisyon tipi yarışmasız ve K<sub>i</sub> değeri  $1,84 \pm 0,33$  mM olarak tespit edilmiştir [194]. İnsan eritrosit G6PD enziminin aktivitesini Deltamethrin 0,152 mM konsantrasyon ile %56'ya indirmekte, gökkuşuğu balığının G6PD enziminin aktivitesi ise Deltamethrin 0,63 mM'la %50'ye indirilmektedir. Buradan Deltamethrinin insan eritrosit G6PD enzime daha kuvvetli inhibisyon etki gösterdiği görülmektedir. Bölüm 1.4.2.2.2'de belirtildiği gibi balıklarda Deltamethrin zehir etkisine sahiptir. Elde edilen bu sonuçlar insan G6PD aktivitesi için de Deltamethrin'in potansiyel bir inhibitör olduğunu göstermektedir.

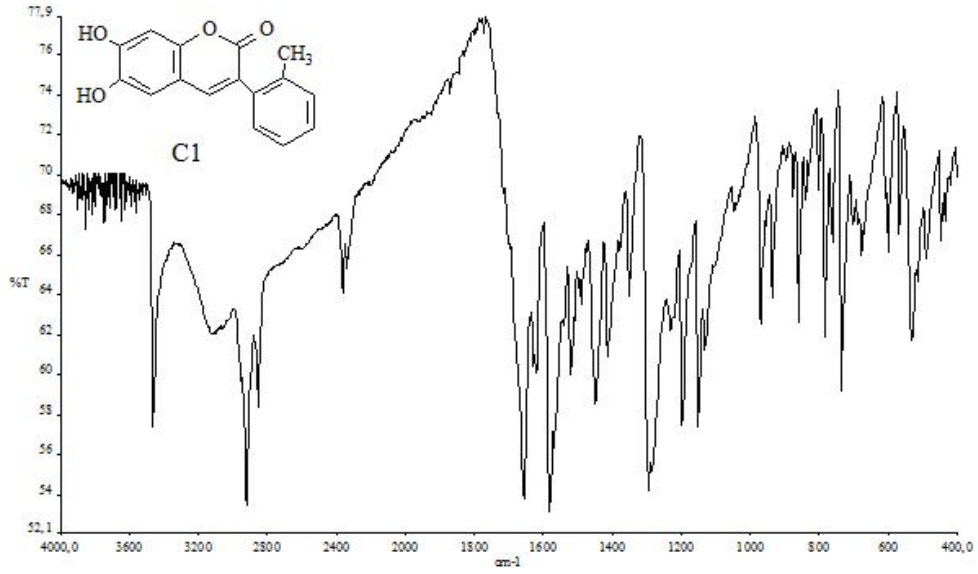
Bölüm 1.4.2.1 ve Bölüm 1.4.2.2'de belirtildiği gibi çalışmada kullanılan herbisitlerin ve insektisitlerin bitkilere uygulama işleminden sonra üzerinde bıraktıkları kalıntıların miktarı, belirli bir düzeyi aşmaması için Türk Gıda Kodeksi Maksimum Rezidü Limiti (MRL) olarak isimlendirilmiş bir sınırla belirlenmiştir. Çalışmamızda kullanılan herbisitlerin ve insektisitlerin bitkilerde bırakabilecekleri kalıntı limiti 0,02 ile 0,5 ppm arasında değişmektedir. Kalıntı limitleri, çalışmada G6PD enzimi aktivitesi üzerine etkileri incelenen herbisitlerin konsantrasyonlarından düşük görülmektedir. Ancak bitkilerin son ilaçlama tarihinden sonra ve hasat öncesi yapılan ilaçlamalar, ilaçlamalarda uygun tekniklerin kullanılmaması, bu işlemin deneyimli elemanlarla yapılmaması, üreticinin kalıntı düzeyi konusunda bilgisizliği gibi birçok faktör MRL'de belirtilen sınırların aşımına neden olabilmektedir.

Sonuç olarak yapılan çalışmalarda aşağıdaki bulgular elde edilmiştir.

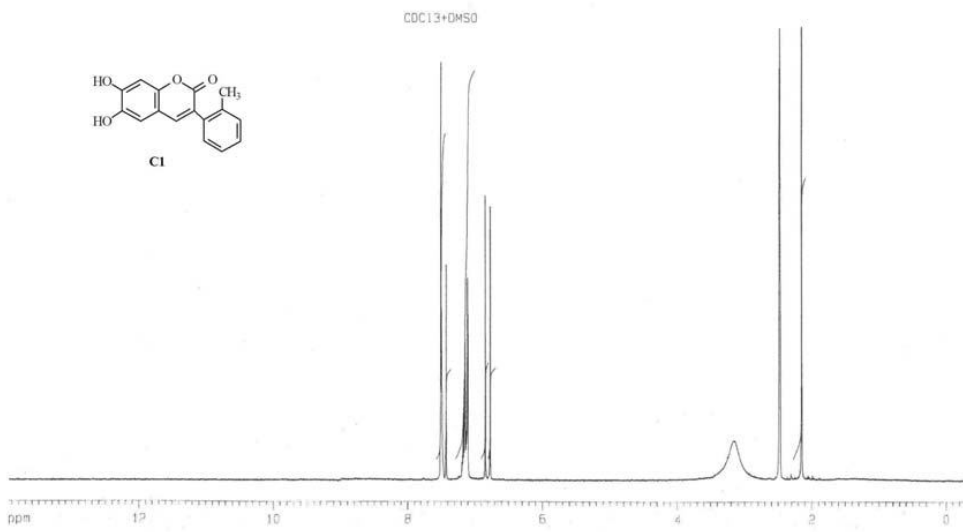
- ✓ İnsan eritrosit G6PD enzimi 2' 5' ADP-Sepharose 4B Afinite kromatografisi ile saflaştırılmıştır.
- ✓ Saflaştırılan insan eritrosit G6PD enzimi SDS-PAGE elektroforezinde yaklaşık 59-60 kDa molekül ağırlığında tek bant olarak elde edilmiştir.
- ✓ Altısı yeni, yedi kumarin türevinin ve üç herbisit, iki insektisit olmak üzere beş pestisitın insan eritrosit G6PD enziminin aktivitesi üzerine in vitro etkileri incelenmiştir.
- ✓ Altı yeni kumarin türevi olan OPC, MPC, PPC, DPC, TPC ve FPC'nin G6PD enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösterdikleri, Varfarin sodyum etken maddesi olan ilacın enzim aktivitesini etkilemediği belirlenmiştir. Enzime inhibisyon etkisi gösteren kumarin türevlerinin inhibisyon tipleri belirlenmiş; OPC'nin yarışmasız, TPC'nin yarışmalı, PPC ve DPC'nin yarı yarışmalı, MPC ve FPC'nin karışık tipte oldukları tespit edilmiştir.
- ✓ Pestisitler Glifosat, 2,4-D, İmazethapyr, Deltamethrin ve Diazinon'un G6PD enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir. İnhibisyon mekanizmaları incelenen pestisitlerden Glifosatın yarı yarışmalı, 2,4-D'nin yarışmalı tipte inhibitör oldukları tespit edilmiştir.

## EKLER

### EK.A 6,7-dihidroksi-3-(2-metilfenil)kumarinin IR ve NMR Spektrumları



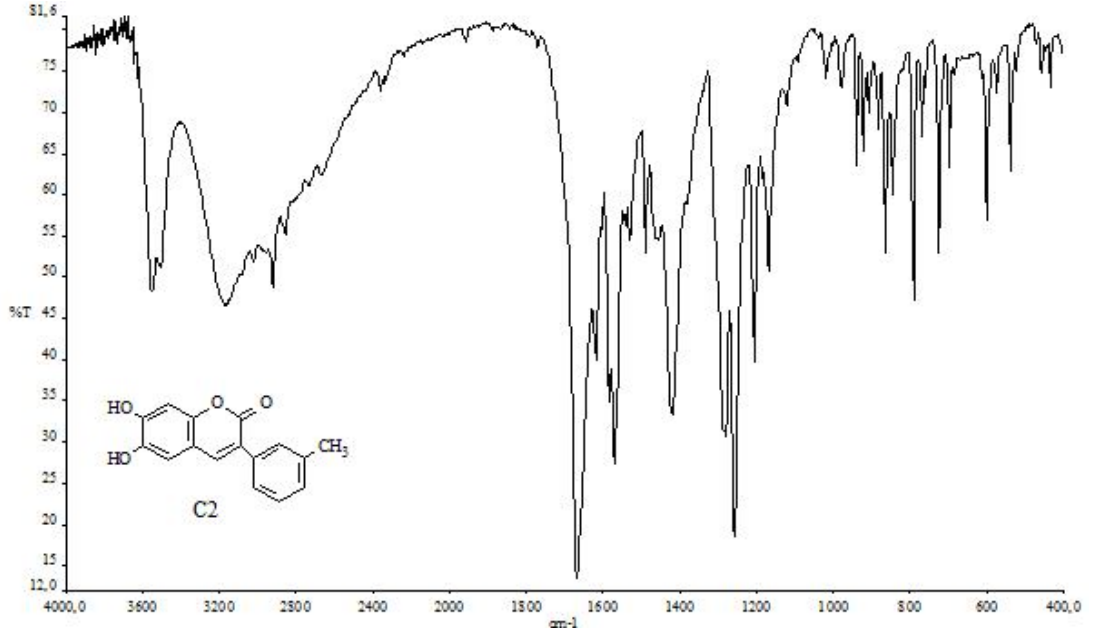
Şekil A.1 6,7-dihidroksi-3-(2-metilfenil)kumarinin FT-IR Spektrumu



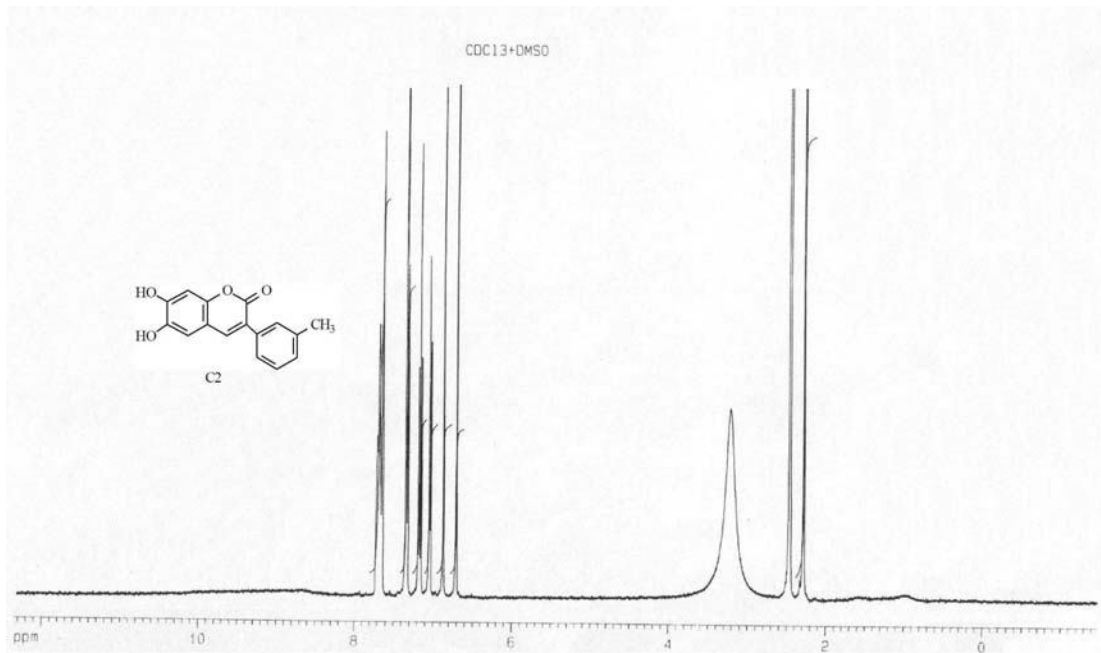
Şekil A.2 6,7-dihidroksi-3-(2-metilfenil)kumarin'in <sup>1</sup>H-NMR Spektrumu



**EK.B** 6,7-dihidroksi-3-(3-metilfenil)kumarinin IR ve NMR Spektrumları

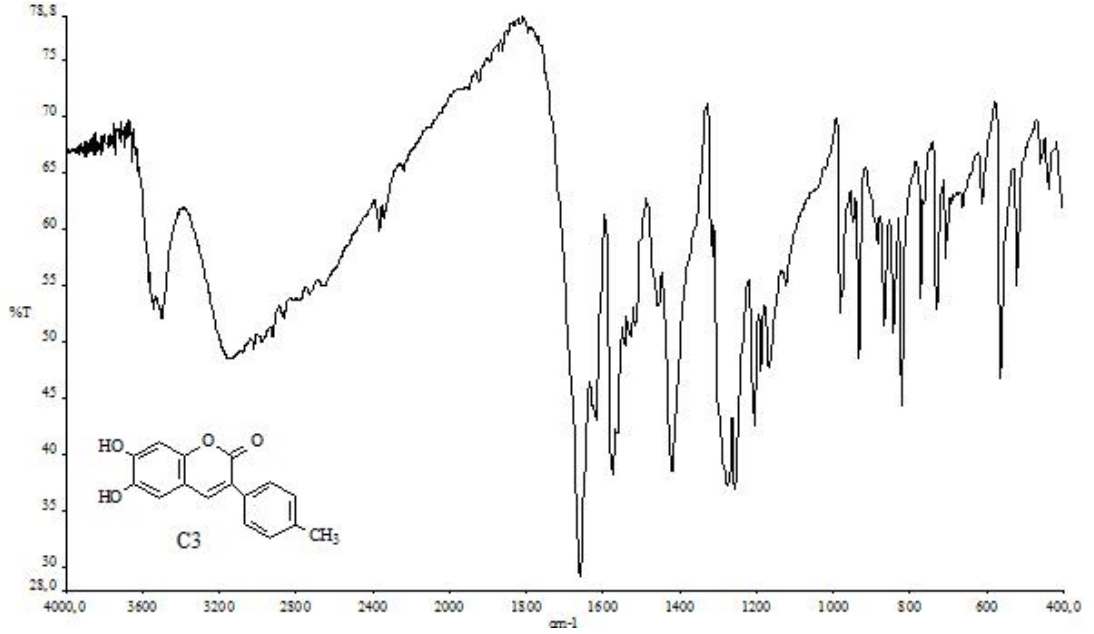


**Şekil B.1** 6,7-dihidroksi-3-(3-metilfenil)kumarinin FT-IR Spektrumu

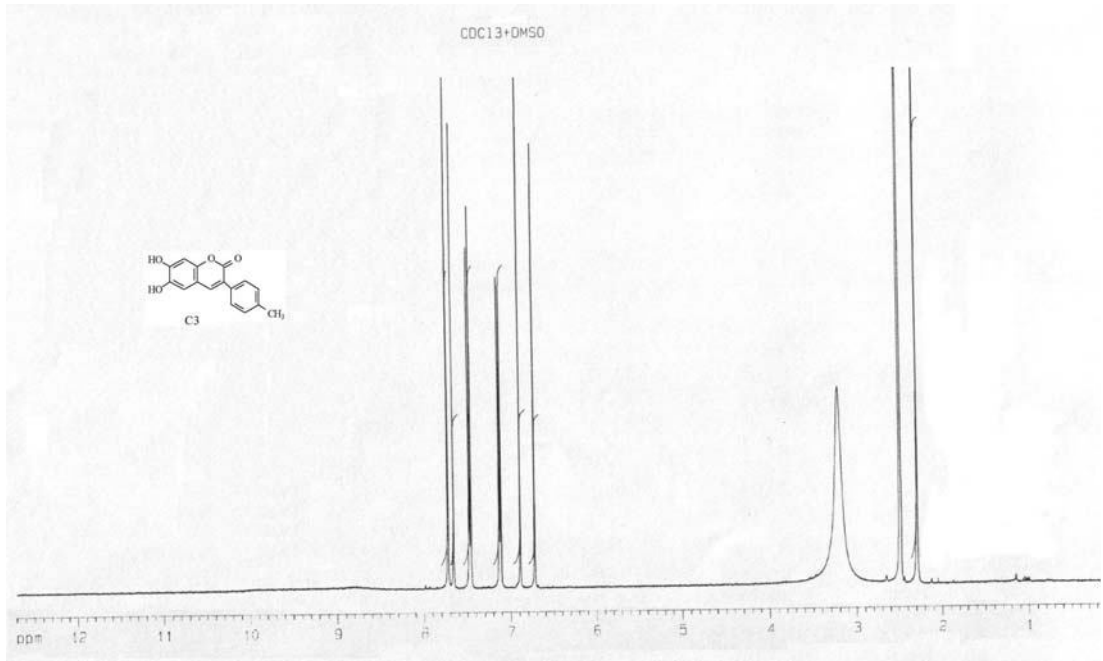


**Şekil B.2** 6,7-dihidroksi-3-(3-metilfenil)kumarinin <sup>1</sup>H-NMR Spektrumu

**EK C 6,7-dihidroksi-3-(4-metilfenil)kumarinin IR ve NMR Spektrumları**

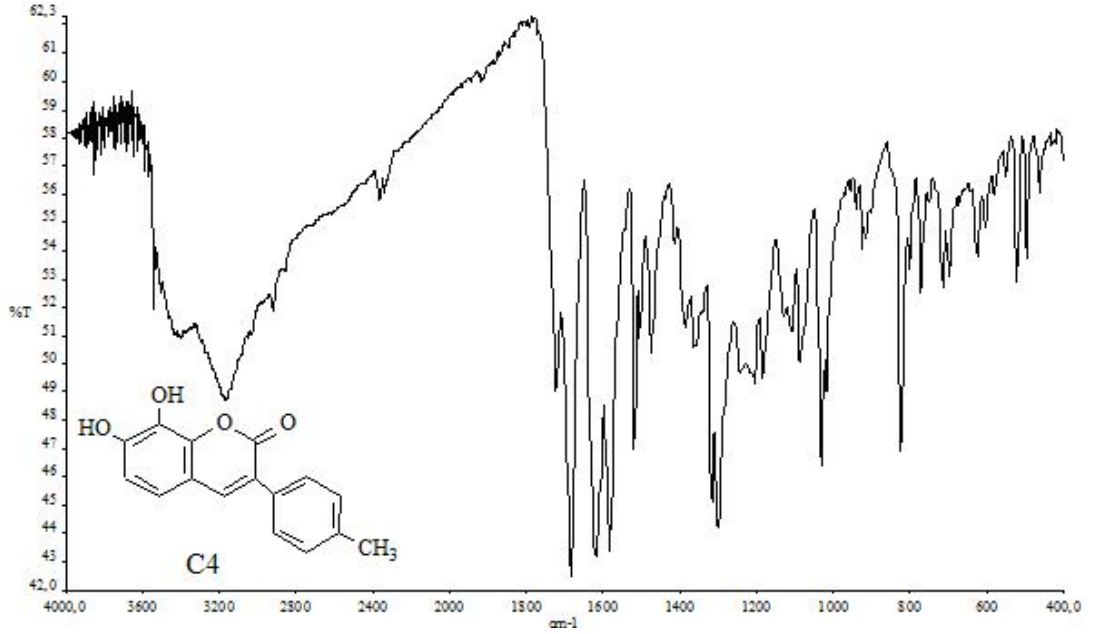


**Şekil C.1** 6,7-dihidroksi-3-(4-metilfenil)kumarinin FT-IR Spektrumu

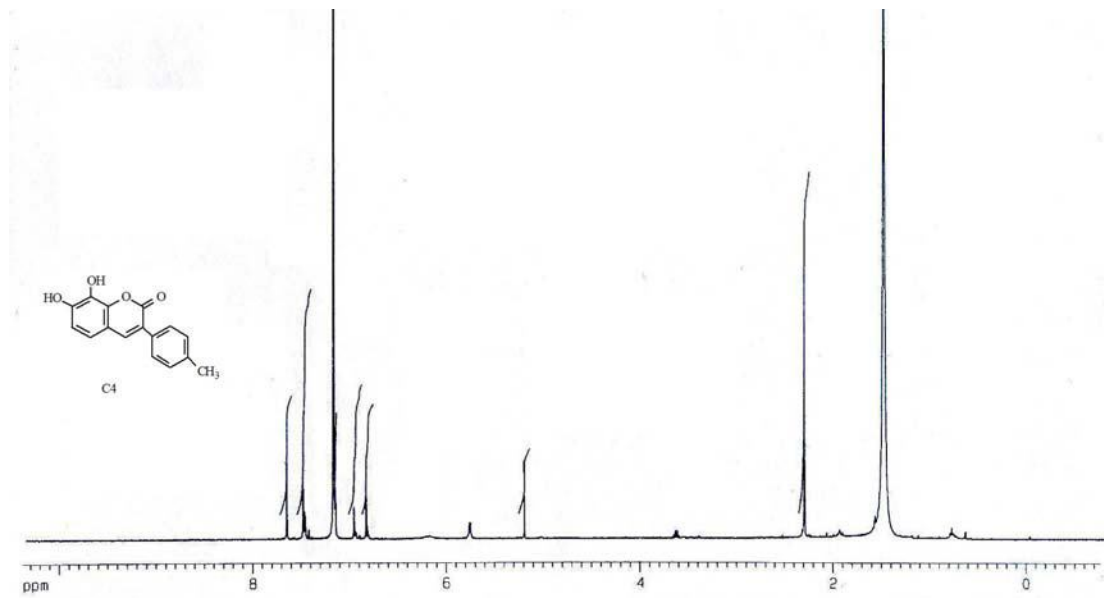


**Şekil C.2** 6,7-dihidroksi-3-(4-metilfenil)kumarinin <sup>1</sup>H-NMR Spektrumu

**EK D 7,8-dihidroksi-3-(4-metilfenil)kumarinin IR ve NMR Spektrumları**


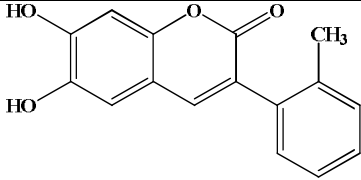

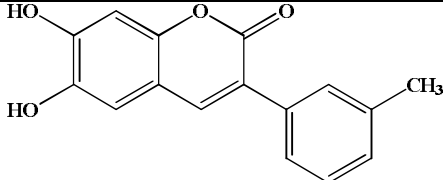

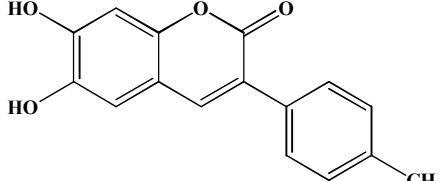

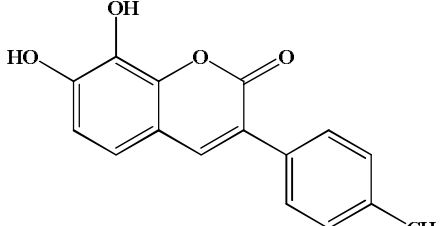

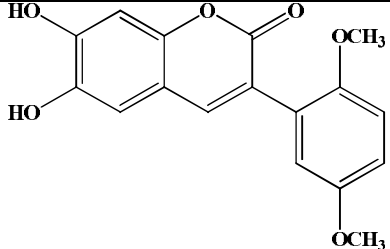

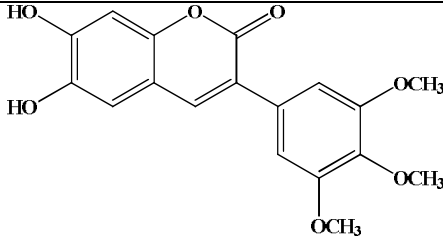


**Şekil D.1 7,8-dihidroksi-3-(4-metilfenil)kumarinin FT-IR Spektrumu**



**Şekil D.2 7,8-dihidroksi-3-(4-metilfenil)kumarinin <sup>1</sup>H-NMR Spektrumu**

**EK E** Kumarin Türevi Bileşiklerin İnce Tabaka Kromatogramları ve Erime Noktaları

| İnce Tabaka kromatogramı  | Molekül Yapısı  | Kısaltma | E.N (°C) |
|---|---|----------|----------|
|    |    | OPC      | 242      |
|    |    | MPC      | 211      |
|   |   | PPC      | 257-258  |
|  |  | FPC      | 227-228  |
|  |  | DPC      | 286-289  |
|  |  | TPC      | 253-255  |

## KAYNAKLAR

- [1] Guenther, E., "The Essential Oils", Vol.II, D.Von Nostrand Ltd., New York (1975)
- [2] Lewis, R.J. et al., *Embo.*, J15, (1996) 1412
- [3] Nelson D.A., Davey F.R., "Erythrocytic disorders. In: Henry JB (Ed.). Clinical diagnosis and management by laboratory methods" 18th ed. Philadelphia: WB Saunders Co; ch 26(1991);660-2.
- [4] Ağaoğlu, L., Anemiler. Neyzi, O., Ertuğrul, T., (Editörler). "Pediatri 2" de. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi;( 2002). s.1056-7.
- [5] Pasternak, C.A., (Çeviri: G. Ciliv, K. Emerk, A. Karan). "İnsan biyokimyasına giriş" Ankara: Çağ Matbaacılık; (1980):196-205.
- [6] Beutler, E., Shohet ,S.B., "The red cell membran" In: Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Lichtman MA (Eds.). Hematology. 4th ed. New York: Mc Graw-Hill Co; ch 36, (1991);368-77.
- [7] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., "Molecular biology of the cell" 4th ed. New York: Garland Publishing; 2002: p.601-5.
- [8]Mallery, C.H., "Chemical architecture of cells" 2007. <http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/chemistry/organic.htm>
- [9] Champe, P.C., Harvey, R.A., (Çeviri: A. Toklugil, M. Dirican, E. Ulukaya). "Biyokimya" İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 1997:25-38.
- [10] Dods, R.F., "Diabetes mellitus" In: Kaplan AL, Pesce AJ (Eds.). Clinical chemistry theory, analysis and correlation. 3rd ed. USA: Mosby-Year Book; 1996; ch 32,613-21.
- [11] Fairbanks, V.F., Klee, G.G., "Biochemical aspects of hematology" In: Burtis CA, Ashwood ER (Eds.). Tietz textbook of clinical chemistry. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders ch 46Co; (1999) 1642-55.
- [12] Murray, R.K., Mayes, P.A., Granner, D.K., Rodwell, W.W., (Çeviri: N. Dikmen, T. Özgünen). "Harper'ın Biyokimyası" İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 219-29, İstanbul, 2004.
- [13] Martinez-Cayuela, M., "Oxygen free radicals and human disease" *Biochimie* ;77(3) (1995)147-61.

- [14] Erbağcı, A.B., “Gaziantep İl Merkezinde Eritrosit G6PD Referans Sınırları ve G6PD Eksikliği Sıklığının Araştırılması” (Uzmanlık Tezi). Gaziantep: Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi; 1997.
- [15] Glader, B.E., Lukens, J.N., “Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and related disorders of hexose monophosphate shunt and glutathione metabolism” In: Lee, G.R., Foerster, J., Lukens, J., Paraskevas, F., Greer, J.P., Rodgers, G.M., (Eds.). “Wintrobe’s Clinical hematology”, vol.1, 10th ed. London: WB Saunders Co; ch 43(1999) 1176-90.
- [16] Büyükokuroğlu, M.E., Süleyman, H. , “Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz eksikliği” T Klin J Med Sci 21(5) (2001) 415-9.
- [17] Agrios, G.N.,. “Plant Pathology” Academic Press, (1997) p 212-213 ,London.
- [18] Keha, E.E., ve Küfrevioğlu, Ö.İ., “Biyokimya” Aktif Yayınevi, (2000)s:344-345,İstanbul.
- [19] Onar, T., “Karbohidratlar” In: Onat, T., Emerk, K., Sözmen, E. T.,(eds) “*İnsan Biyokimyası*”ı 975-8624-20-02 İstanbul Palme Yayıncılık (2002).
- [20] Tuncel, P., (2000) “Heksoz Monofosfat Yolu” In: Champe, P. C. , Harvey, R. A., (Eds). “*Lippincott’s Mustrated Reviews*” *Biyokimya İstanbul*
- [21] Thomas, J.H.,and Gilham, B.,. “Will’s Biochemical Basis of Medicine Wright” S, 297-302, London,1983.
- [22] Krebs, H.A., Eggleston, L.V., “The regulation of the pentose phosphate cycle in rat liver” In: Weber, G., (ed). *Adv enzyme regul.* Oxford: Pergamon Press Ltd,; 12(1978) 421-33
- [23] Colleen, S., Marks, A. D., Lieberman, M., “*Marks’ Temel Tıbbi Biyokimyası-Klinik Yaklaşım*”, Güneş Kitabevi, İstanbul, ISBN: 978-975-227-138-3 (2007)
- [24] Scott, M. D., Zuo, L., LubinN, B. H., Chiu, D. T., “NADPH, not glutathione, status modulates oxidant sensitivity in normal and glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient erythrocytes”, *Blood*, 77 (9) (1991)2059-2069.
- [25] Giuseppe, M., Ursini, M. V., “A new lease of life for an old enzyme”, *Bioessays*, 18(1996) 631-637.
- [26] Levy, H.R., “Glucose 6-phosphate dehydrogenase” *Adv. Enzymol*, 48(1979) 97-192.
- [27] Gözükar, E.M., “Biyokimya” 4.Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2001:923-38.

- [28] Mathews, K.C., and Van Holde, K.E., "Biochemistry". The Benjamin/Cummings Publishing Company, s,493-501,Redwood City,(1990).
- [29] Mayes A. P., Menteş G "Pentoz Fosfat Yolu ve Heksoz Metabolizmasının Diğer Yolları" In: Murray, K. R., Mayes, A. P., Granner, K. D., Rodwell, W. V.(eds) *Harper'in Biyokimyası 975-95 331-1-1 Barış Kitebevi*(1993).
- [30] Shannon, W.N., Gover, S., Lam, M.S., Veronica, and Adams, M.J., "Human glucose 6-phosphate dehydrogenase: the crystal structure reveals a structural NADP<sup>+</sup> molecule and provides insights into enzyme deficiency" *Structure*, 8 (2000), 293-303
- [31] <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme>
- [32] Antonenkov, V.D., "Dehydrogenases of the pentose phosphate pathway in rat liver peroxisomes" *Eur J Biochem* 183(1989) 75-82.
- [33] Bublitz, C., Steavenson, S., "The pentose phosphate pathway in the endoplasmic reticulum" *J Biol Chem* 263(1988) 12849-53.
- [34] Oeser, A., Tolbert, N.E., Schnarrenberger, C., "Two isoenzymes each of G6PD and 6PGD in spinach leaves" *Arc Biochem Biophys* 154(1973) 438-48
- [35] Zaheer, N., Tewari, K.K., Krishan, P.S., "Mitochondrial forms of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconic acid dehydrogenase in rat liver" *Arch Biophys*; 120(1967) 22-34
- [36] Ayala, A., Fabregat, I., Machado, A., "The role of NADPH in the regulation of glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenase in rat adipose tissue" *Mol Cell Biochem* 105(1991) 1-5.
- [37] Seifter, R.C., Boxer, J.L., Zimmerman, D.C., Cantley, L.C., Rapid release of bound glucose-6-phosphate dehydrogenase by growth factors. *J Biol Chem* 266: (1991) 12442-8.
- [38] Jackson, G.R., Werrbach-Perez, K., Pan, Z., Sampath, D., Perz-Polo, J.R., "Neurotrophin regulation of energy homeostasis in the central nervous system" *Dev Neurosci*, 16(1994) 285-90.
- [39] Persico, M.G., Viglietto, G., Martini, G. et al. "Isolation of human glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) cDNA clones: primary structure of the protein and unusual 50 non-coding region [published erratum appears in *Nucleic Acids Research* 1986 Oct. 10; 14(19): 7822]. *Nucleic Acids Research*" 14(1986) 2511±2522.
- [40] Martini, G., Toniolo, D., Vulliamy, T. et al. "Structural analysis of the X-linked gene encoding human glucose 6-phosphate dehydrogenase" *European Molecular Biology Organisation Journal* ; 5(1986) 1849±1855.
- [41] Cheney, C.A., Lee, A., "Sequence of human G6PD cloned in plasmids and a yeast artificial chromosome (yac)" *Genomics* ;10 (1991)79-86.

[42] Poggi, V., Town, M., Foulkes, N.S., Luzzatto, L., “Identification of a single base new human mutant glucose-6-phosphate dehydrogenase gene by polymerase-chain reaction amplification of the entire coding region from genomic DNA” *Biochem. J.*; 271(1990) 157-160.

[43] Takizawa, T., Huang, I.Y., Ikuta, T., Yoshida, A., “Human glucose-6 phosphate dehydrogenase: primary structure and cDNA cloning” *Proc Natl Acad Sci USA*; 83(12) (1986) 4157-4161.

[44] Chen, E.Y., Cheng, A., Lee, A. et al. “Sequence of human glucose-6-phosphate dehydrogenase cloned in plasmids and a yeast artificial chromosome” *Genomics.*; 10(3) (1991) 792-800.

[45] Hirono, A. and Beutler, E., “Alternative splicing of human glucose-6-phosphate dehydrogenase messenger RNA in different tissues” *J Clin Invest.* 83(1) (1989); 343-346.

[46] Hirono, A., Kuhl, W., Gelbart, T., Forman, L., Fairbanks, V.F., Beutler, E., “Identification of the binding domain for NADP<sup>+</sup> of human glucose-6-phosphate dehydrogenase by sequence analysis of mutants” *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 86(24) (1989) 10015-10017.

[47] “<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucore&id=31542>”  
Omic no; X03674. 30.08.2007.

[48] Doğan, H., “Doğu anadolu Bölgesinde Hemolitik Anemi Çocuklarda Glukoz 6-fosfat Dehidrogenaz Genindeki Mutasyonların Mikroarray Sistemi İle Tespiti”  
Doktora Tezi, 2007.

[49] Kotaka, M., Gover, S., Vandeputte-Rutten, L., AU, S. W., Lam, V. M., Adams, M. J., , “Structural studies of glucose-6-phosphate and NADP<sup>+</sup> binding to human glucose-6-phosphate dehydrogenase”, *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 61(2005), 495-504.

[50] Mason, P. J., Bautista, J. M., Gilsanz, Z., F., , “G6PD deficiency: The genotype-phenotype association”, *Blood Reviews*, 21(2007), 267-283.

[51] Salas, M., Vinuela, E., Sols, A., “Spontaneous and enzymatically catalyzed anomerization of glucose 6-phosphate and anomeric specificity of related enzymes”, *The Journal of Biological Chemistry*, 240(1965) 561-568.

[52] Stern, B. K., Vennesland, B., “The enzymatic transfer of hydrogen. IX. The reactions catalyzed by glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6- phosphogluconic dehydrogenase”, *The Journal of Biological Chemistry*, 235 (1) (1960),205-208.

[53] Levy, H. R., , “The pyridine nucleotide specificity of glucose-6-phosphate Dehydrogenase”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 6, 49(1961)53.54



- [54] Ibraheem, O., Adewale, I. O., Afolayan, A., "Purification and properties of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Aspergillus aculeatus*", *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 38 (5) (2005), 584-590.
- [55] Heise, N., Opperdoes, F. R., "Purification, localisation and characterisation of glucose-6-phosphate dehydrogenase of *Trypanoma brucei*", *Molecular and Biochemical Parasitology*, 99 (1999), 21-32.
- [56] Tappia, P. S., Jones, C. J. P., Connock, K. M. J., "Purification of guinea pig small intestinal peroxisomes and the subcellular localization of glucose-6-phosphate dehydrogenase", *Molecular and Cellular Biochemistry*, 179 (1998), 13-20.
- [57] Akar, M. A., Sumathy, K., Baquer, N. Z., "Regulation and properties of purified glucose-6-phosphate dehydrogenase from rat brain", *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 33(1996), 512-518.
- [58] Wennekes, L. M. J., Goosen, T., Van Den Broek, P. J. M., Van Den Broek, H. W. J., "Purification and characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Aspergillus niger* and *Aspergillus nidulans*", *Journal of General Microbiology*, 139 (1993), 2793-2800.
- [59] Levy, H. R., Cook, C., "Purification and properties of NADP-linked glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Acetobacter hansenii* (*Acetobacter xylinum*)", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 291 (1) (1991), 161-167.
- [60] Cho, S. W., Joshi, J. G., "Characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase isozymes from human and pig brain, *Neuroscience*", 38 (3) (1990), 819- 828.
- [61] Levy, H. R., "The interaction of mammary glucose-6-phosphate dehydrogenase with pyridine nucleotides and 3 $\beta$ -Hydroxyandrost-5-en-17-one", *The Journal of Biological Chemistry*, 238 (2) (1963), 775-784.
- [62] Ulusu, N. N., Kuş, M. S., Acan, N. L., Tezcan, E. F., "A rapid method for the purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase from bovine lens", *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 31(1999), 787-796.
- [63] Opheim, D., Bernlohr, R. W., "Purification and regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Bacillus licheniformis*", *Journal of Bacteriology*, 116 (3) (1973), 1150-1159.
- [64] Anderson, B. M., Anderson, C. D., "Purification and characterization of *Acetobacter vinelandii* glucose-6-phosphate dehydrogenase: Dual coenzyme specificity", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 321 (1) (1995), 94-100.
- [65] Reuter, R., Naumann, M., Metz, P., Kopperschlager, G., "Purification and characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Pseudomonas*'s W6", *Biomedica Biochimica Acta* 49 (7) (1990) 539-546.

- [66] Rangunathan, S., Levy, H. R., "Purification and characterization of the NAD-preferring glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Acetobacter hansenii* (*Acetobacter xylinum*)", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 310 (2) (1994), 360-366.
- [67] WYK, J. C. V., LESSIE, T. G., "Purification and characterization of the *Pseudomonas multivorans* glucose-6-phosphate dehydrogenase active with nicotinamide adenine dinucleotide", *Journal of Bacteriology*, 120 (3) (1974), 1033-1042.
- [68] Benziman, M., Maover, A., "Nicotinamide adenine dinucleotide and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-specific glucose 6-phosphate dehydrogenases of *Acetobacter xylinum* and their role in the regulation of the pentose cycle", *The Journal of Biological Chemistry*, 248 (5), (1973) 1603-1608.
- [69] Champe, P.C., Harvey, R.A., (Çeviri: A. Toklugil, M. Dirican, E. Ulukaya). "Biyokimya" İstanbul: *Nobel Tıp Kitabevi*; (1997) 25-38.
- [70] Sodeman, W.A., Jr, Sodeman, T.M., "Sodeman's Pathologic Physiology Mechanism of Disease", 1985. Çev: kurul, Fiziopatoloji cilt-2, Ankara: *Türkiye Klinikleri Yayınevi*, (1991)720-724.
- [71] Hay Ko, C., Li, K., Cheung Ng, P., Pui Fung, K., Pui-On Wong, R., Chui, K., Gu, G., Yung, E., Fok, T., "Pro-oxidative effect of Chinese herbal medicine on G6PD deficient erythrocytes in vitro" *Toxicology in Vitro* 22 (2008) 1222-1227.
- [72] Özmen, İ., Çiftçi, M., Küfrelioğlu, Ö.İ., Çürük, M.A., "Investigation of Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD) Kinetics for Normal and G6PD-Deficient Persons and the Effects of some Drugs" *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, (2004) Vol. 19 (1), pp. 45-50.
- [73] Kayaalp, S.O., "Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji". 9. Baskı. Ankara: *Hacettepe-Taş Kitapçılık* (2000) 155-156.
- <sup>1</sup>[74] Weksler, B.B., Moore, A., Tepler, J., "Hematology". In: Andreoli, T.E., Carpenter, C.C.J, Plum, F., Smith, L.H., Jr eds. "Cecil Essentials of Medicine". USA: *WB Saunders Co.*, (1990) 342-403.
- [75] Laurence, D.R., Bennett, P.N., Brown, M.J., "Clinical Pharmacology", *China: Churchill Livingstone* (1997) 77-120.
- [76] Cotran, R.S., Kumar, V., Collins, T.R., "Pathological Basis of Disease". USA: *W.B. Saunders Co.* (1999):601-643.
- [77] Turan, Y., "Prevalence of Erythrocyte Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase (G6PD) Deficiency in the Population of Western Turkey" *Archives of Medical Research* 37 (2006) 880-882.

- [78] Kiani, F., Schwarzl, S., Fischer, S., Efferth, T., “Three-Dimensional Modeling of Glucose-6-phosphate Dehydrogenase-Deficient Variants from German Ancestry” *Plos ONE* 2(7) (2007) e625,doi:10.1371/Journal.pone.0000625
- [79] Drousiotou, A., Touma E.H., et al, “Molecular characterization of G6PD deficiency in Cyprus”, *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 33 (2004) 25– 30.
- [80] Schutzman, D.L., Porat, R., “Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency”: Another Risk Factor for Necrotizing Enterocolitis” , *The Journal of Pediatrics*, 151 (2007) 435-437.
- [81] Tamer, I., Ünal, B., Aksoy, K., “Glukoz-6-fosfat dehidrogenazenzim eksikliği gözlenen olgularda eritrosit zarı  $\text{Na}^+$ -  $\text{K}^+$ / $\text{Mg}^{++}$  adenozin 5'-trifosfataz, eritrosit süperoksid dismutaz ve plazma malondialdehid düzeyleri”. *Ç.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi* 23 (1998) 114-118.
- [82] Redrawn from WHO Working Group “Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency”. *Bull WHO* 67 (1989) 601.
- [83] Warburg, O., Christian, W., “Aktivierung von kohlehydrat in roten blut zellen”, *Biochemische Zeitschrift.*,(1961) 238, 131.
- [84] Noltmann, E. A., Gubler, C. J., Kuby, S. A., “Glucose-6-phosphate dehydrogenase (*Zwischenferment*) I. Isolation of the crystalline enzyme from yeast”, *The Journal of Biological Chemistry* , 236 (5) (1961), 1125-1230.
- [85] Yue, R. H., Noltmann, E. A., Kuby, S. A., “Glucose-6-phosphate dehydrogenase (*Zwischenferment*) III. Studies on the subunit structure and on the molecular association phenomenon induced by triphosphopyridine nucleotide”, *The Journal of Biological Chemistry* , 244 (5), (1966) 1353-1364.
- [86] Hauschild, R., von Schaewen, A., “Differential regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase isoenzyme activities in potato”, *Plant Physiology*, 133 (2003), 47-62.
- [87] De Flora, A., Lorenzoni, I., Mangiarotti, M. A., Dina, D., Bosignore, A., “Electrophoretic behavior of human erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase during purification”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*,31(1968), 501-507.
- [88] Yoshida, A., “Glucose-6-phosphate dehydrogenase of human Erythrocytes”, *The Journal of Biological Chemistry* , 241 (21) (1966), 4966-4976.
- [89] Balasundaram, B., Pandit, A.B., “Selective release of invertase by hydrodynamic cavitation”. *Biochem Eng J* 8 (2001); 251-6
- [90] Lovitt, R.W., Jones, M., Collins, S.E., Coss, G.M., Yau, C.P., Attouch, C., “Disruption of baker’s yeast using a disrupter of simple and novel geometry”. *Process Biochem* 36: (2000); 415-21

- [91] Gurpilhares, D.B., Hasmann, F.A., Pessoa Jr, A., Roberto, I.C., “Optimization of glucose-6-phosphate dehydrogenase releasing from *Candida guilliermondii* by disruption with glass beads” *Enzyme and Microbial Technology* 39 (2006)591-595
- [92] Kuby, S.A., Noltmann, E.A., “Glucose 6-phosphate dehydrogenase (crystalline) from Brewers yeast. *Methods Enzymol.* Academic Press. (1966) s.116-125 Orlando
- [93] Nevadan, B.H., Hyde, C.M., Levy, H.R., “Mammary glucose 6-phosphate dehydrogenase” *Arch. Biochem. Biophys* 165 (1974), 398-406.
- [94] Kerns, K.W., “Glucose 6-phosphate dehydrogenase from cow adrenal cortex”, Wood, W.A. (ed), *Methods Enzymol.* Academic Press, Inc. Cilt XLI, (1975) s 188-196, London
- [95] Ujita, S., Kimura, K., “Glucose 6-phosphate dehydrogenase, vegetative and spore *Bacillus subtilis*. *Methods Enzymol.* Academic Press. (1975) S. 258261 USA.
- [96] Flora, A., Morelli, A., Benatti, U., Giuliano, F., “An improved procedure for rapid isolation of glucose 6-phosphate dhydrogenase from human erythrocytes” *Arch. Biocem . Biophys* 169.(1975) ,362-363.
- [97] Ninfali, P., Orsenigo, T., Barociani, and Papa, S., “Rapid purification of gucose 6-phosphate dehydrogenase from mammal’s erythrocytes”. *Preparative Biochemistry*, 20 (1990),297-309.
- [98] Reilly, K. E., Allred, J. B., “Glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Saccaromyces cerevisiae* is a glycoprotein”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 216(3) (1995), 993-998.
- [99] Chi-Yu, L., Langley, C. H., Burkhart, J., “Purification and molecular weight determination of glucose-6-phosphate dehydrogenase and malic enzyme from mouse and *Drosophila*”, *Analytical Biochemistry*, 86 (1978), 697- 706.
- [100] Özmen, İ., Küfrevioğlu, Ö. İ., Gül, M., “Effects of some antibiotics on activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes in vitro and effect of isepamicin sulfate on activities of antioxidant enzymes in rat erythrocytes”, *Drug and Chemical Toxicology*, 28(2005), 443-445.
- [101] Çiftçi, M., Türkoğlu, V., Çoban, T. A., “Effects of some drugs on hepatic glucose-6-phosphate dehydrognase activity in Lake Van fish (*Chalcalburnus tarischii* Palas, 1811)”, *Journal of Hazardous Materials*, 143(2007), 415-418.
- [102] Ninfali, P., Palma, F., “Comparative study of glucose-6-phosphate dehydrogenase from rabbit tissues”, *The Journal of Experimental Zoology*, 254 (1990), 6-12.
- [103] Pittalis, S., di Montemuros, F. M., Tavazzi, D., Fiorelli, G., “Rapid isolation of glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes by combined affinity

and anion-exchange chromatography for biochemical characterization of variants”, *Journal of Chromatography*, 573(1992), 29-34.

[104] Erat, M., “Purification of human erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase and glutathione reductase enzymes using 2',5'-ADP Sepharose 4B affinity column material in single chromatographic step”, *Protein Expression and Purification*, 34(2004), 257-260.

[105] .Büyükokuroğlu, M. E., Altıkat, S., Çiftçi, M., Banoğlu, Z. N., Göçer, F., “Klorpromazin ve Haloperidol’ün insan eritrosit glukoz-6- fosfat dehidrogenaz enzimi üzerine in vitro etkileri”, *Klinik Psikofarmakoloji Bülteni*, 11 (2),(2001) 101-105.

[106] Çiftçi, M., Küfrelioğlu, Ö. İ., Gündoğdu, M., Özmen, İ., “Effects of some antibiotics on enzyme activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes”, *Pharmacology Research*, 41 (1) (2000), 109- 113.

[107] Kahler, S. G., Kirkman, H. N., “Intracellular glucose-6-phosphate dehydrogenase does not monomerize in human erythrocytes”, *The Journal of Biological Chemistry* , 258 (2) (1983), 717-718.

[108] Yoshida, A., “Enzyme purification by selective elution with substrate analog from ion-exchange columns: Application to glucose-6-phosphate dehydrogenase, pseudocholesterase, lactate dehydrogenase, and alanine dehydrogenase”, *Analytical Biochemistry*, 37 (1970), 357-367.

[109] Aksoy, Y., “Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminin insan plasentasından saflaştırılması ve bazı özelliklerinin incelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, (1992) Ankara.

[110] Beydemir, Ş., “Koyun eritrositleri ve göz lensinden glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu, bazı ilaç ve kimyasal maddelerin inhibisyon veya aktivasyon kinetiklerinin incelenmesi”, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, (2002) Erzurum.

[111] .Oertel, G. W., Benes, P.,The effects of steroids on glucose-6-phosphate dehydrogenase, *Journal of Steroid Biochemistry*3, (1972), 493-496.

[112] Çiftçi, M., Beydemir, Ş., Yılmaz, H., Altıkat, S., “Purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase from Buffalo (*Bubalus bubalis*) erythrocytes and investigation of some kinetic properties”, *Protein Expression and Purification*,29(2003), 304-310.

[113] Cho, S. W., Joshi, J. G., “Characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase isozymes from human and pig brain”, *Neuroscience*, 38 (3), (1990) 819-828.

- [114] Criss, W. E., Mc Kerns, K. W., "Purification and partial characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase from cow adrenal cortex", *Biochemistry*, 7 (1), (1968) 125-134.
- [115] Capellaci, S., Aluigi, G., Tabellini, L., Ninfali, P., "One step purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase from brain areas by immunoaffinity chromatography", *Biotechnology Letters*, 23(2001), 353-357.
- [116] Beydemir, Ş., Yılmaz, H., Çiftçi, M., Bakan, E., Küfrevioğlu, Ö. İ., "Purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase from goose erythrocytes and kinetic properties", *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 27(2003), 1179-1185.
- [117] Levy, H. R., Raineri, R. R., Nevaldine, B. H., "On the structure and catalytic function of mammary glucose-6-phosphate dehydrogenase", *The Journal of Biological Chemistry*, 241 (10),(1966) 2181-2187.
- [118] Delgado, C., Tejedor, M. C., Luque, J., "Partial purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase and phosphofructokinase from rat erythrocyte haemolysate by partitioning in aqueous two-phase systems", *Journal of Chromatography*, 498 (1990), 159-168.
- [119] Dao, M. L., Watson, J. J., Delaney, R., Johnson, B. C., "Purification of a new high activity form of glucose-6-phosphate dehydrogenase from rat liver and the effect of enzyme inactivation on its immunochemical reactivity", *The Journal of Biological Chemistry*, 254 (19),(1979) 9441-9447.
- [120] Grunwald, M., Hill, Z. H., Characterization of the glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in rat liver mitochondria, *Biochemical Journal*, 159 (1976), 683-687.
- [121] Jeffery, J., Barros-Söderling, J., Murray, L., Wood, I., Hansen, R., Szepesi, B., Jörnvall, H., "Glucose-6-phosphate dehydrogenase: Characteristics revealed by the liver enzyme structure", *Journal of Biochemistry*, 186(1989), 551-556.
- [122] Crpas, F. J., Garcia-Salguero, L., Pergon, J., Lupianez, J. A., "Kinetic properties of hexose-monophosphate dehydrogenases. I. Isolation and partial purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase from rat liver and kidney cortex", *Life Science*, 56 (3)(1995) 179-189.
- [123] Ninfali, P., Guidi, L., Aluigi, G., Biagiotti, E., Del Grande, P., "High glucose-6-phosphate dehydrogenase activity contributes to the structural plasticity of periglomerular cells in the olfactory bulb of adult rats", *Brain Research*, 819 (1999), 150-154.
- [124] Parshad, R. K., Guraya, S. S., "Comparison of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in healthy and atretic follicles in rat ovary", *Indian Journal of Experimental Biology*, 29 (1991), 276-277.

- [125]. Velasco, P., Barcia, R., Ibargüen, I., Sieiro, A. M., Ramosmartines, J. I., “Purification, characterization and kinetic mechanism of glucose-6-phosphate dehydrogenase from mouse liver”, *International Journal of Biochemistry*, 26 (2) (1994), 195-200.
- [126] Ninfali, P., Malatesta, M., Biagiotti, E., Aluigi, G., Gazzanelli, G., Glucose-6-phosphate dehydrogenase in small intestine of rabbit: Biochemical properties and subcellular localization, *Acta Histochemistry*, 103(2001), 287-303.
- [127] Fickenser, K., Schiebe, R., “Purification and properties of the cytoplasmic glucose-6-phosphate dehydrogenase from pea leaves”, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 247(1986), 393-402.
- [128] Wendt; U. K., Wenderoth, I., Tegeller, A., von Schaewen, A., Molecular characterisation of a novel glucose-6-phosphate dehydrogenase from potato (*Solanum tuberosum* L.), *The Plant Journal*, 23 (2000), 723-733.
- [129] Esposito, S., Massaro, G., Vona, V., Di Martino, R. V., Carfagna, S., “Glutamate synthesis in barley roots: The role of the plastidic glucose-6-phosphate dehydrogenase”, *Planta* 216(2003), 639-647.
- [130] Özer, N., Bilgi, C., Ögüş, İ. H., Dog liver glucose-6-phosphate dehydrogenase: Purification and kinetic properties, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 34 (2002), 253-262.
- [131] Esposito, S., Guerriero, G., Vona, V., Di Martino Rigano, V., Carfagna, S., Rigano, C., “Glutamate synthase activities and protein changes in relation to nitrogen nutrition in barley: The dependence on different plastidic glucose-6P dehydrogenase isoforms”, *Journal of Experimental Botany*, 409 (2005), 55-64.
- [132] Hutchings, D., Rawsthorne, S., Emes, M. J., “Fatty acid synthesis and the oxidative pentose phosphate pathway in developing embryos of oilseed rape (*Brassica napus* L.)”, *Journal of Experimental Botany*, 56(2005), 577- 585.
- [133] Lenzian, K. J., “Modulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase by NADPH, NADP<sup>+</sup> and dithiothreitol at variable NADPH/NADP<sup>+</sup> ratios in an illuminated reconstituted spinach (*Spinacia oleracea* L.) chloroplast system”, *Planta*, 148 (1980), 1-6.
- [134] Valenti, V., Stanghellini, M. A., Pupillo, P., “Glucose-6-phosphate dehydrogenase isozymes of maize leaves”, *Plant Physiology* 75(1984), 521-526
- [135] Gossling, P. G., Ross, J. O., “Characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconic acid dehydrogenase from hazel cotyledons”, *Phytochemistry*, 18 (1979), 1441-1445.
- [136] Çoan, T. A. K., Çiftçi, M., Küfrevioğlu, Ö. İ., “Purification and investigation of some kinetic properties of glucose-6-phosphate dehydrogenase from parsley

(*Petroselinum hortense*) leaves”, *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 32 (2) (2002), 173-187.

[137] Wei-Fu, K., Jian-Ye, C., Zhi-Xia, H., Peng-Fei, W., Ji-Cheng, Z., Quihong, P., Wei-Dong, H., “Activity and subcellular localization of glucose-6-phosphate dehydrogenase in peach fruits”, *Journal of Plant Physiology*, 164(2007), 934-944.

[138] Knight, J. S., Emes, M. J., Debnam, P. M., “Isolation and characterisation of a full-length genomic clone encoding a plastidic glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Nicotiana tabacum*”, *Planta* 212 (2001), 499-507.

[139] Šindelar, L., Šidelarova, M., Burketova, L., “Changes in activity of glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenase isozymes upon potato virus Y infection in tobacco leaf tissues and protoplasts”, *Plant Physiology and Biochemistry*, 37 (3) (1999), 195-201.

[140] Semenišina, A., Popova, T., Schnarrenberger, C., Pinheiro De Carvalho, M. A. A., “Purification and some catalytic properties of glucose-6-phosphate dehydrogenase isoforms from barley leaves, *Photosynthetica*”, 39 (2) (2001), 299-304.

[141] Robinson, M. J., “Dark and daylight activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in the leaves of nitrogen-limited spinach and soybean plants”, *International Journal of Plant Science*, 161 (4) (2000), 651-657.

[142] Mirfakhrai, M., Auleb, L., “Partial purification and kinetic characterization of wheat germ glucose-6-phosphate dehydrogenase”, *Journal of Plant Physiology*, 135 (1989), 191-196.

[143] Miki, T., Tsujimoto, Y., Miyabe, S., Sugiyama, K., Izawa, S., Inoue, Y., Kimura, A., “Oxidative stress response in yeast: Purification and some properties of oxidative stress-inducible glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Hansenula mrakii*”, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 60 (6) (1996), 966-970.

[144] Scott, W. A., Tatum, E. L., “Purification and partial characterization of glucose 6-phosphate dehydrogenase from *Neurospora crassa*”, *The Journal of Biological Chemistry*, 246 (20) (1971) 6347-6352.

[145] Beriault, R., Chenier, D., Singh, R., Middaugh, J., Maillioux, R., Appanna, V., “Detection and purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase, malic enzyme, and NADP-dependent isocitrate dehydrogenase by blue native polyacrylamide gel electrophoresis”, *Electrophoresis*, 26(2005), 2892- 2897.

[146] Lessie, T., Neidhart, F. C., “Adenosine triphosphate-linked control of *Pseudomonas aeruginosa* glucose-6-phosphate dehydrogenase”, *Journal of Bacteriology*, 93 (4) (1967)1337-1345.



- [147] Miethe, D., Babel, W., "Glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Pseudomonas W6*, *Methods in Enzymology*", (1988) 346-350.
- [148] Xu, Y., Vitolo; M., De Albuquerque, C. N., Pessoa Jr., A., Purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase from Baker's yeast in aqueous two-phase systems with free triazine dyes as affinity ligands, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 108 (1-3) (2003), 853-865.
- [149] Bowman, J. E., Brubaker, R. R., Frischer, H., Carson, P. E., "Characterization of enterobacteria by strach-gel electrophoresis of glucose-6-phosphate dehydrogenase and phosphogluconate dehydrogenase", *Journal of Bacteriology*, ) 94 (3) (1967, 544-551.
- [150] Ganguly, R., Ganguly, N., Manning, J. E., "Isolation and characterization of the glucose-6-phosphate dehydrogenase gene of *Drosophila melanogaster*", *Gene*, 35 (1985), 91-101.
- [151] Stein, T. A., "Partial purification and properties of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Macracanthorhynchus hirudinaceus* (Acanthacephala)", *Comparative Biochemistry and Physiology*, (1971) 39 B, 541-549.
- [152] Niehaus, W. G., Mallett, T. C., "Purification and characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Cryptococcus neoformans*: identification as "Nothing Dehydrogenase", *Archives of Biochemistry and Biophysics*", 313(2)(1994), 304-309.
- [153] Farmer, E. E., Easterby, J. S., "The purification of yeast glucose-6-phosphate dehydrogenase by dye-ligand chromatography", *Analytical Biochemistry*, 141 (1984), 79-82.
- [154] Bakır, S., Atalay, A., "N-Nitrozodietilamin'in glukoz-6-fosfat dehidrogenaz ve piruvat kinaz enzimleriyle *in vitro* etkileşimleri", *Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*; 12 (1), (1990) 53-64.
- [155] Shah, H. N., Andrews, D. M. A., "Malate dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase, key markers for studying the genetic diversity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*", *FEMS Microbiology Letters*, 122 (1994), 69-74.
- [156] Klein, A. R., Berk, H., Purwantini, E., Daiels, L., "Thauer, R. K., *Si*-face stereospecificity at C5 of coenzyme F420 for F420-dependent glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Mycobacterium smegmatis* and F420-dependent alcohol dehydrogenase from *Methanoculleus thermophilicus*", *European Journal of Biochemistry*, (1996) 239, 93-97.
- [157] Okuno, H., Nangata, K., Nakajima, H., "Purification and properties of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*", *Journal of Applied Biochemistry*, 7 (1985), 192-201.

- [158] Buckwitz, D., Jacobasch, G., Kuckelkorn, U., Plonka, A., Gerth, C., "Glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Plasmodium berghei*: Kinetic and electrophoretic characterization, *Experimental Parasitology*, 70 (1990), 264-275.
- [159] Kurdi-Haidar, B., Luzzatto, L., "Expression and characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase of *Plasmodium falciparum*", *Molecular Biochemistry and Parasitology*, 41 (1990), 83-92.
- [160] Moritz, B., Striegel, K., de Graaf, A. A., Sahm, H., "Kinetic properties of the glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenases from *Corynebacterium glutamicum* and their application for predicting pentose phosphate pathway flux *in vivo*", *European Journal of Biochemistry*, 267(2000), 3442-3452.
- [161] Frandsen, J. C., "Partial purification and some properties of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Eimeria stiedai* (Lindemann, 1865) Kisskalt & Hartmann, 1907 (Protozoa: Coccidia)", *Comparative Biochemistry and Physiology*, 54 B (1976), 537-541.
- [162] Purwantini, E., Daniels, L., "Purification of a novel coenzyme F420-dependent glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Mycobacterium smegmatis*", *Journal of Bacteriology*, 178 (10) (1996), 2861-2866.
- [163] Sokolov, A. P., Troysenko, Y. A., "Glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase from *Arthrobacter globiformis*", *Methods in Enzymology*, 188 (1990), 339-342.
- [164] Levy, H. R., Christoff, M., Ingulli, J., Ho, E. M. N., "Glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*: Revised kinetic mechanism and kinetics of ATP inhibition", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 222 (2) (1983), 473-478.
- [165] Olive, C., Geroch, M. E., Levy, H. R., "Glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*", *The Journal of Biological Chemistry*, 246 (7) (1971), 2047-2057.
- [166] Malcolm, A. A., Shepherd, M. G., "Purification and properties of *Penicillium* glucose-6-phosphate dehydrogenase", *Biochemistry Journal*, 128 (1972), 817-831.
- [167] Haghghi, B., Ilghari, D., "Inhibition of Human Erythrocyte glucose 6-phosphate Dehydrogenase by Cadmium, Nickel and Aluminium", *Journal of sciences, Islamic Republic of Iran* 15(4) (2004): 315-320
- [168] Özdemir, H., Çiftçi, M., "In vitro effects of some drugs on human red blood cell glucose 6-phosphate dehydrogenase enzyme activity", *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 21(1) (2006):75-80.
- [169] Özmen, İ., Küfrevioğlu, Ö.İ., "Effects of antiemetic drugs on glucose 6-phosphate dehydrogenase and some antioxidant enzymes", *Pharmacological Research* 50(2004): 499-504.

- [170] Özmen, İ., “Effects of Some Chemicals on G6PD Enzyme Purified by Affinity Chromatography”, *Hacettepe J. Biol. & Chem.*, 37 (4) (2009): 327-330.
- [171] Sethna, S.M., Shah, N.M., *Chem.Rev.*, 36, (1945) 1-62
- [172] Coffey., S., “Rood’s Chemistry of Carbon Compounds”, Vol.IV(E), 2nd Ed., Elsevier, New York (1977)
- [173] Murray, R.D.H., Mendez, J., Brown, S.A., “The Natural Coumarins”, John Willey and Sons Ltd., New York (1982)
- [174] Guenther, E., “The Essential Oils”, Vol.II, D.Von Nostrand Ltd., New York (1975)
- [175] Shilling, W., Longland,R., Crampton, C., *Nature*, 221 (1969) 664
- [176] Chen, Y.L. et al., *Helv. Chim. Acta*, 79 (1996) 651
- [177] Lewis, R.J. et al., *Embo.*, J15, (1996) 1412
- [178] Manfredini et al., *J. Med. Chem.*, 37, (1994) 2401
- [179] Sethna, S., Phadke, R., *Org. React. (New York)*, 7, (1953) 1-58
- [180] a) Hoult, J.R.S., Payd, M., *Gen. Pharmacol.*, 27, (1996) 713 b) El-Sayed, A.M. et al., *Il Farmaco*, 54, (1999) 56 c) Belal, F., Al-Shaboury, S., Al-Tamrah, A.S., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 30, (2002) 1191
- [181] <http://www.eis.com.tr/Admin/Documents/UrunProspektus/coumadin.doc>
- [182] Tarım ve Köy işleri Bakanlığı Zirai Araştırma Merkezi(2005)
- [183] Çebi, M., “Synecococcus SP. PCC7942 Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enziminin ışığa bağlı düzenlenmesinde disülfid bağlarının rolünün araştırılması”19 Mayıs Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi (2003) Samsun.
- [184] <http://www.bahcesel.com/doc/Ruhsatli-Zirai-mucadele.../herbisitler>
- [185] Altınışık, U., “Sıçanlarda Subletal Doz İle Oluşturulan Akut Diazinon Toksikitesinde Pankreas Hasarının Zamana Göre Gelişimi”, Tıpta Uzmanlık Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı (2007), Isparta.
- [186] Stelzer, KJ., Gordon, MA., “Effects of Phyrethroids on Lymphocyte Mitogenic Responsiveness”, *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, 46(1) (1984), 137-150.
- [187] Lehninger, A.L.,”Principles of Biochemistry” Worth Publishers, Inc., 2<sup>th</sup> edition (1993) p.198-239,Newyork .

- [188] Laemmli, D.K., "Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, London 227 (1970) 680
- [189] Lowry, O.H., Rosbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., "Protein measurement with the folin phenol reagent". *J. Biol. Chem.* 193 (1951):265-275.
- [190] Beutler, E., "Red cell metabolism manual of biochemical methods. Academic Press, 68 s, London (1971)
- [191] Mehta, A., Mason, P.J., Vulliamy, T.J., "Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency" *Bailliers Best Pract Res Clin haematol* Mar 13 (2000); 21-38.
- [192] Fiorelli, G., Montemuros, F., Cappellini, M., "Chronic non-spherocytic haemolytic disorders associated with G6PD variants " *Bailliers clin Haematol* 13 (2000); 39-55
- [193] Ulusu, N.N., Sahilli, M., Canbolat, O., et al. "Pentose phosphate pathway, glutathione related enzymes and other antioxidant systems during oxidative stress in diabetic rodent brain and peripheral organs: preventive effects of stobadine and vitamin E" *Neurochemical Research* 6 (2003) 815-23.
- [194] Çiftçi, M., Ciltas, A., Erdoğan, O., "Purification and characterization of glucose 6-phosphate dehydrogenase from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) erythrocytes" *Vet. Med. – Czech*, 49, (9) 2004: 327–333
- [195] Lee, C., "Glucose 6-phosphate dehydrogenase from mouse" *Methods Enzymol.* Academic Press. (1975) 252-257, USA.
- [196] Yılmaz, H., Çiftçi, M., Beydemir, Ş., Bakan, E., "Purification of glucose 6 phosphatedehydrogenase from chicken erythrocytes and investigation of some kinetic properties". *Prevarative Biochemistry and Biotechnology*, (2002).
- [197] Kanji, M.I., Toews, M.L., Carper, W.R., "Glucose 6 phosphate dehydrogenase purification and partial characteri zation " *The Journal of Biological cChemistry*, 251 (1976) 2255-2257.
- [198] David, s., Shereve and Levy, H.Richard., "On the molecular weight of human glucose 6-phosphate dehydrogenase" *Biochemical and Biophysical research communications*, 78 (1977) 1369-1375.
- [199] Özer, N., Aksoy, Y., Öğüş, H., "Kinetic Properties of human placental glucose 6-phosphate dehydrogenase" *The Int. J. Of Biochem, Cell Biol.* 33 (2001) 221-226
- [200] Kutlu, H., "Farmasötik kimya IV", İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Kürsüsü, s.290, İstanbul, 1976.
- [201] Basaran, I., Sinan, S., Çakır, Ü., Bulut, M., Arslan, O., Özensoy, Ö., "In vitro inhibition of cytosolic carbonic anhydrases I and II by some new dihydroxycoumarin

compounds” *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, iFirst article, 2007; 1–5

[202] Çiftçi, M., Özmen, İ., Büyükokuroğlu, M.E., Pençe, S., Küfrevioğlu, Ö.İ., “effects of metamizol and magnesium sulfate on enzyme activity of glucose 6-phosphate dehydrogenase from human erythrocyte in vitro and rat erythrocyte in vivo” *Clinical Biochemistry* 34 (2001) 297-302.

[203] Lioi, M.B., Scarfi, M.R., Santoro, A., Barbieri, R., Zeni, O., Di Berardino, D., Ursini, M.V., “Genotoxicity and oxidative stress induced by pesticide exposure in bovine lymphocyte cultures in vitro” *Mutation Research* 403 (1998) 13–20