

T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ETANOL VERİLEN RATLARDA QUERCETİN'İN ERİTROSİT
GLUKOZ-6-FOSFAT DEHİDROGENAZ (G6PD)
ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Bio. Ayhan VURMAZ

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç.Dr. Mustafa SERTESER**

Tez No: 2005-022

2005 - AFYONKARAHİSAR

KABUL VE ONAY

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Biyokimya Anabilim Dalı

Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından

Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 24 / 06 / 2005



Prof. Dr. Ömer ÇOLAK

ÜYE



Doç. Dr. Tülay KÖKEN

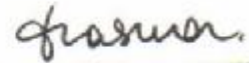
ÜYE



Doç. Dr. Mustafa SERTESER

ÜYE

Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Ayhan VURMAZ'ın "Etanol Verilen Ratlarda Quercetin'in Eritrosit Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz (G6PD) Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi" başlıklı tezi 29 / 06 / 2005 günü saat 13⁰⁰ 'da lisansüstü eğitim ve öğretim sınav yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.



Doç. Dr. Yüksel ARIKAN

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Yüksek lisansa başladığım günden bu yana derslerimde ve tez konusunun belirlenmesinde, çalışmaların planlanması ve yürütülmesi esnasında çok değerli yardım ve destekleriyle hep yanımda gördüğüm değerli tez hocam Sayın Doç. Dr. Mustafa SERTESER'e, eğitimim süresince, yardım ve desteklerini esirgemeyen kıymetli hocalarım Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Doç. Dr. Tülay KÖKEN ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Ahmet KAHRAMAN'a, istatistiksel analizlerin yapılmasında yardımlarını esirgemeyen kıymetli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Reha DEMİREL'e saygı ve sevgilerimi sunarım.

Yüksek lisans boyunca, ratların alınması, tezin deney aşaması ile biyokimyasal analizin çalışılması esnasında yardımlarıyla yanımda olan sevgili arkadaşlarım Bio. Fatih GÜRSOY ile Bio. Hamdullah ÇAKAR'a, yazım metninin hazırlanması sırasında emeği geçen değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Dr. Fatih ATEŞ ve Arş. Gör. Dr. Sema AKGÜN'e, rahat bir çalışma ortamı sağlayan Afyon Kocatepe Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi Başkanı Sayın Doç. Dr. Zehra AKINCI'ya ve özellikle Rektörlük Ahmet Necdet Sezer Uygulama ve Araştırma Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı'nın değerli çalışanlarına teşekkürler ederim.

Destek ve yardımlarıyla bugüne kadar hep yanımda olan değerli aileme sevgi ve saygılarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	II
Önsöz	III
İçindekiler	IV
Simgeler ve Kısaltmalar	VII
Şekiller	IX
Tablolar	X
ÖZET	1
SUMMARY	3
1. GİRİŞ	5
1. 1.Eritrositler	5
1.1.1.Eritrosit Zar Yapısı	6
1.1.1.Hemoglobin	8
1. 2. Pentoz Fosfat Yolu (PFY)	9
1. 2. 1. Eritrositler İçin PFY'nun Önemi	11
1. 2. 2. PFY Tepkimeleri	14
1. 3. G6PD Eksikliği	16
1. 3. 1. G6PD'nin Metabolik Rolü	17
1. 3. 2. Hemolizin Mekanizması	18
1. 3. 3. Malarya ve G6PD Eksikliği	19
1. 3. 3. 1. Coğrafik Yerleşimi	20
1. 3. 3. 2. Nüfus Çalışmaları	21
1. 3. 3. 3. İnvivo ve İnvitro Çalışmalar	22
1. 3. 3. 4. Korunmanın Mekanizması	22
1. 3. 4. Genetik ve Yapısal Fonksiyonla İlişkisi	23
1. 3. 5. Biyokimyasal ve Moleküler Tanısı	27
1. 3. 6. Klinik Belirtileri	28
1. 3. 6. 1. Kronik ve Non-sferositik Anemi	28
1. 3. 6. 2. Yenidoğan Sarılığı	29
1. 3. 6. 3. Favizm	30
1. 3. 6. 4. İnfeksiyonların Başlattığı Hemolizler	32

1. 3. 6. 5. İlaçların Başlattığı Hemolitik Anemi	32
1. 3. 6. 6. Hemolizi Başlatan Diğer Durumlar	32
1. 3. 7. Eritrosit Dışı Dokularda G6PD Eksikliğinin Etkileri	32
1. 3. 8. Hemolizin Tedavisi ve Önlenmesi	33
1. 3. 9. G6PD'nin DiyetSEL Regülasyonu	33
1. 3. 9. 1. G6PD ve HücreSEL Büyüme	34
1. 3. 10. G6PD'nin DiyetSEL ve Hormonal Regülasyonu	35
1. 3. 10. 1. DiyetSEL Durum	35
1. 3. 10. 1. 1. Açlık ve Tokluk Durumu	35
1. 3. 10. 1. 2. Diyet Karbohidratların Tipi ve Miktarı	35
1. 3. 10. 1. 3. Diyet Yağın Tipi ve Miktarı	36
1. 3. 10. 2. Hormonal Durum	37
1. 3. 10. 2. 1. Beslenme Durumuna Cevap Olarak Hormonların Rolü	37
1. 3. 11. G6PD Üretiminin Düzenlenme Mekanizmaları	38
1. 3. 12. G6PD'nin Kalıtımı	39
1. 3. 13. G6PD Varyantları	40
1. 4. Flavonoidler	46
1. 4. 1. Antioksidatif Flavonoid Quercetin	49
1. 4. 1. 1. Bağırsaklardan Emilimi	49
1. 4. 2. Flavonoidler ve Quercetin'in Çalışma Mekanizması	50
1. 4. 2. 1. Antioksidan Etkileri	50
1. 4. 2. 2. Direkt Radikal Çöpçüsü	51
1. 4. 2. 3. Quercetin-NO İlişkisi	51
1. 4. 2. 4. Quercetin-Ksantin Oksidaz İlişkisi	52
1. 4. 2. 5. Lökosit İmmobilizasyonu	52
1. 4. 2. 6. Diğer Enzim Sistemleri İle İlişkisi	52
1. 4. 3. Flavonoidlerin Alımı, Emilimi, Konjugasyonu ve Toksisitesi	53
1. 4. 3. 1. Alımı	53
1. 4. 3. 2. Emilim	53
1. 4. 3. 3. Konjugasyon	54
1. 4. 3. 4. Toksisite	54
1. 4. 4. Klinik Etkileri	54

1. 5. Alkol ve Metabolizması	55
1. 5. 1. Alkol Metabolizması Reaksiyonları	60
1. 5. 2. Hidroksil (OH [·]) Radikalinin Rolü	62
1. 5. 3. CYP2E1'in Hidroksietil Radikali Oluşumundaki Rolü	63
2. MATERYAL VE METOD	65
2. 1. Hayvanlar	65
2. 2. Biyokimyasal Analiz	66
2. 2. 1. Kimyasallar	66
2. 2. 2. Hemolizat Hazırlanışı	67
2. 2. 3. Hemolizat Hemoglobin Tayini	67
2. 2. 4. Hemolizat G6PD Aktivitesi Ölçümü	69
2. 2. 5. Tam Kan Redükte Glutasyon Düzeylerinin Ölçülmesi	70
2. 2. 6. İstatistiksel Analiz	71
3. BULGULAR	72
3. 1. G6PD Düzeyleri	72
3. 2. Tam Kan GSH Düzeyleri	73
4. TARTIŞMA	75
5. SONUÇ	89
KAYNAKLAR	91

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ADP	: Adenozin difosfat
ATP	: Adenozin trifosfat
A	: Adenin
ACE II	: Angiotensin converting enzim II
ADH	: Alkol dehidrogenaz
BPG	: Bifosfogliserat
C	: Sitozin
Ca	: Kalsiyum
CAT	: Katalaz
CA	: Karsinom
cAMP	: Siklik AMP
CNSHA	: Kronik non-siferositik hemolitik anemi
Cys	: Sistein
CoA	: Koenzim A
CYP2E1	: Alkol ile uyarılan sitokrom P ₄₅₀
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EtOH	: Etil alkol, etanol
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
FAD	: Flavin adenin dinükleotid
G	: Guanin
GSH	: Redükte glutatyon
GSSG	: Okside glutatyon
GPx	: Glutatyon peroksidaz
GR	: Glutatyon redüktaz
G6PD	: Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz
G6P	: Glukoz-6-fosfat
GİS	: Gastrointestinal sistem
Hb	: Hemoglobin
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HIV	: İnsan immün yetmezlik virüsü

i.g.	: İntragastrik
i. p.	: İntraperitoneal
LDL	: Düşük dansiteli lipoprotein
MDA	: Malondialdehid
MEOS	: Mikrozomal etanol okside edici sistem
Mg	: Magnezyum
mRNA	: Haberci RNA
NAD ⁺	: Nikotinamid adenin dinükleotid (yükseltgenmiş)
NADH	: Nikotinamid adenin dinükleotid (indirgenmiş)
NADP ⁺	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (yükseltgenmiş)
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (indirgenmiş)
NO	: Nitrik oksit
PFY	: Pentoz fosfat yolu
PK A	: Proteinkinaz A
PK C	: Proteinkinaz C
RNA	: Ribonükleik asid
RES	: Retikuloendotelial sistem
SOD	: Süperoksit dismutaz
SH	: Sülfidril
Sp 1	: Stimülatör protein 1
T	: Timin
T ₃	: Triiyodo tironin
TC	: Tirozin kinaz
TCA	: Trikarboksilik asid
Q3G	: Quercetin 3-O-β-glikozid
Q4'G	: Quercetin 4'-O-β-glikozid
Q3,4'G	: Quercetin 3,4'-O-β-glikozid
Q3GA	: Quercetin 3-O-β-D-glukronid
VLDL	: Çok düşük dansiteli lipoprotein
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. 1. 1. Eritrosit zar yapısı	7
Şekil 1. 1. 2. Hemoglobinin yapısı	9
Şekil 1. 2. 2. Pentoz fosfat yolu	16
Şekil 1. 3. 1. G6PD tarafından NADPH oluşumu	18
Şekil 1. 3. 3. Malaryaya karşı eritrositteki defans sistemi	20
Şekil 1. 3. 3. 1. G6PD, malarya ve favizmin insidansı	21
Şekil 1. 3. 3. 4. P. falciparum G6PD tarafından üretilen NADPH'ı kullanır	23
Şekil 1. 3. 4. a. Exonlara göre varyantlar	25
Şekil 1. 3. 4. b. Aktif G6PD dimerinin üç boyutlu modeli	26
Şekil 1. 3. 6. 3.a. G6PD eksikliği ile favizm ilişkisi	31
Şekil 1. 3. 6. 3.b. Favizme bağlı olarak oluşan hemolizin periferde görünümü	31
Şekil 1. 4. a. Benzen halka yapısının birleşimi	46
Şekil 1. 4. b. Flavonoidlerin kimyasal yapısı	46
Şekil 1. 4. c. Heterosiklik C halka yapısı	47
Şekil 1. 4. d. Kalkonlar	48
Şekil 1. 4. e. Luteolinin yapısı	48
Şekil 1. 4. f. Myricetin yapısı	48
Şekil 1. 4. g. Flavonon yapısı	48
Şekil 1. 4. h. Antosiyanin yapısı	48
Şekil 1. 4. i. İzoflavonoid yapısı	48
Şekil 1. 4. j. Neoflavonoid yapısı	48
Şekil 1. 4. 1. 1. Quercetin kimyasal yapısı	49
Şekil 1. 5. Alkol metabolizması	57
Şekil 1. 5. 2. Alkol alımı ROS oluşumunu indükler	63
Şekil 2. 2. 3. Hemoglobin kalibrasyon grafiği	68
Şekil 3. 1. Eritrosit G6PD enzim aktiviteleri	73
Şekil 3. 2. GSH değerleri	74

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. 3. 13. a. Kronik non-sferositik anemi ile G6PD ilişkisi	41
Tablo 1. 3. 13. b. Kronik non-sferositik anemi ile G6PD ilişkisi	42
Tablo 1. 3. 13. c. Kronik non-sferositik anemi ile G6PD ilişkisi	43
Tablo 1. 3. 13. d. Kronik non-sferositik anemi ile G6PD ilişkisi	44
Tablo 1. 3. 13. e. Kronik non-sferositik anemi ile G6PD ilişkisi	45
Tablo 3. 1. Grupların G6PD enzim aktivite ortalama değerleri	72
Tablo 3. 2. Grupların GSH ortalama değerleri	73

ÖZET

Etanol Verilen Ratlarda Quercetin'in Eritrosit Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz (G6PD) Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Alkolün vücut üzerindeki toksik etkileri bilinmektedir. Biz çalışmamızda alkolün eritrosit Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) enzim aktivitesi üzerine olan etkilerini ve bu etkilerin ortadan kaldırılmasında antioksidan flavonoid ailesinin bir üyesi olan quercetini kullanarak, eritrosit G6PD enzim aktivitesi üzerindeki koruyucu etkisini ortaya koymaya çalıştık. Bilindiği gibi alkol metabolizması sırasında reaktif oksijen ürünleri (ROS)'un oluşumu indüklenmekte ve bu zararlı ajanlar nükleusu ve mitokondrisi olmayan eritrositlere zarar vermektedir. Pentoz fosfat yolunun oksidatif basamağının kilit enzimi olan G6PD tarafından üretilen NADPH'lar zararlı ajanların detoksifikasyonu sırasında oluşan okside glutatyonun tekrar kullanılabilmesi için indirgenmesi sırasında kullanılmaktadır. Yeterli miktarda NADPH sağlanamadığı takdirde ise okside glutatyon indirgenememekte ve buna bağlı olarak hücre membran bütünlüğü korunamadığı için hemoliz oluşmaktadır. Quercetin ise membran bütünlüğünün korunması ile ilgili rolü, ROS'un oluşturduğu lipit peroksidasyonunu engellemeleridir. Bu amaçla 25 adet, 3-3,5 aylık 280-320 g Sprague-Dawley erkek rat kullanıldı. Ratlar dört gruba ayrıldı: **1. Kontrol grubu (K) (n=6):** Bu gruba 30 gün süre ile intra gastrik (i.g.) yolla 2 ml/gün serum fizyolojik (SF) verilmiştir. **2. Quercetin Grubu (Q) (n=7):** 30 gün süre ile 3 günde 1 kez 100 mg/kg quercetin ve 1 ml SF verildi. Quercetin, % 3 g olarak SF ile süspanse edilerek hazırlanmıştır. **3. Alkol Grubu (EtOH) (n=7):** 30 gün süre ile i.g. olarak, 12 saat açlıktan sonra etanol (EtOH) verilmiştir. Distile su ile hazırlanan %80 EtOH (v/v) 1 ml/gün ve SF 1 ml/gün olarak verilmiştir. EtOH verildikten bir saat sonra ise yem ve su verilmiştir. **4. Quercetin + Alkol Grubu (Q+EtOH) (n=5):** 30 gün boyunca i. g. Olarak 3 günde 1 kez 100 mg/kg quercetin verildikten 2 saat sonra % 80 (v/v) EtOH'den 1 ml/gün verilmiştir. EtOH verildikten bir saat sonra yem ve su

verilmiştir. Lityum+heparinli tüplere alınan kan numunelerinden eritrositlerde G6PD enzim aktivitesi Modified-Zinkham metoduna göre ölçülmüştür. Çalışma sonucunda quercetin grubunda G6PD enzim aktivitesi alkol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($6,38 \pm 0,4$ IU/gHb ve $3,82 \pm 0,67$ IU/gHb, $p<0,001$). Alkol grubunda G6PD enzim aktivitesi kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($3,82 \pm 0,67$ IU/gHb ve $6,03 \pm 0,4$ IU/gHb, $p<0,001$). Kontrol ile quercetin +alkol grubu arasında G6PD enzim aktivitelerinde anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=0,384$), Quercetin ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark yoktur ($p=0,704$). Alkol grubu ile quercetin + alkol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmüştür ($3,82 \pm 0,67$ IU/gHb ve $5,46 \pm 0,78$ IU/gHb, $p<0,001$).

Bu sonuçlar, alkolün eritrosit G6PD enzim aktivitesini azaltan etkisinin olduğunu ve quercetin bu etkiyi engellemede başarılı olduğunu göstermiştir.

Anahtar Sözcükler: Eritrosit, etanol, G6PD, oksidatif stres, quercetin

SUMMARY

The Effect Of Quercetin On Erythrocyte Glucose-6-phosphate Dehydrogenase (G6PD) Enzyme Activity In Ethanol Treated Rats

The toxic effects of ethanol on human body are well known. In this study, we aimed to evaluate the effects of ethanol on erythrocyte (G-6-P-D) enzyme activity and the effects of quercetin, a number of antioxidant flavonoids on erythrocyte G-6-P-D activity in the recovery of the effects of ethanol. It's well known that, during ethanol metabolism, the formation of reactive oxygen species (ROS) is induced and these agents damage the erythrocytes which are lack as nucleus and mitochondria.

G-6-P-D catalyzes the key step in penthose phosphate pathway, during which NADPH molecules are produced. NADPH is used to reduce the oxidized glutathione formed during detoxification reactions. In case of NADPH depletion, hemolysis occurs as a result of loss of membrane integrity by inhibiting the ROS-induced lipid peroxidation.

In this study, 25 male Sprague-Dawley rats weighing 280-320 g (3-3,5 months) were assigned into one of the four groups. The rats were on Standard diet and drink water ad libitum. 12 h of light and dark cycles were performed and the environmental temperature was kept between 25-28 °C. **The control group** (n = 6) received saline i. g (2 ml/day). **The quercetin group** (n = 7) received quercetin once upon days 100 mg/ kg via i.g. and saline (1 ml/day) coute for 30 days. **The Alcohol Group** (n = 7) received ethanol (%80 v/v, 1 ml/ day) via i. g. and saline (1 ml/day) Coute for 30 days. **The Alcohol + Quercetin Group** (n = 5) received 1 ml of Ethanol (%80 v/v) 2 hours after quercetin treatment once upon days 100 mg/ kg for 30 days.

The blood was drawn on Lithium heparine containing tubes. After erythrocyte package was prepared, erythrocyte G-6-P-D activity was measured according to modified Zinkham Method. G-6-P-D activity was found to be higher in the Quercetin

Group than those in the Alcohol Group ($6,38 \pm 0,4$ IU/gHb vs $3,82 \pm 0,67$ IU/gHb, $p < 0,001$). In the Alcohol Group, the erythrocyte G-6-P-D activity was found to be significantly decreased than those in the Control Group ($3,82 \pm 0,67$ IU/gHb vs $6,03 \pm 0,4$ IU/gHb, $p < 0,001$). No statistically significant differences were found between the Control Group and the Alcohol + Quercetin Group. Moreover, statistically significant differences were observed in erythrocyte G-6-P-D activity between the Alcohol Group and the Alcohol + Quercetin Group ($3,82 \pm 0,67$ IU/gHb vs $5,46 \pm 0,78$ IU/gHb, $p < 0,001$).

As a conclusion, our results demonstrate that ethanol decrease, erythrocyte G6PD activity and quercetin was found to be beneficial in the prevention of toxic effect raised by ethanol.

Key Words : Erythrocyte, ethanol, G6PD, oxidative stress, quercetin

1. GİRİŞ

1.1.Eritrositler

Eritrositler, organizmanın ihtiyacı olan oksijenin (O_2) sağlanması, karbondioksitin (CO_2) uzaklaştırılması, kan pH'sının ayarlanması gibi, oldukça önemli görevleri olan hücrelerdir. Yaklaşık 120 günlük yaşam süreleri boyunca, değişen çevre koşullarıyla karşılaşır. Çekirdek, mitokondri, ribozom gibi organellerinin olmayışından dolayı nükleik asit, protein ve lipid sentezi yapamazlar. İyon dengesinin sürdürülmesi, hemoglobin yapısının korunması, hücre zarının esnekliği ve bütünlüğünün devamlılığının sağlanabilmesi için eritrositlerin fazla miktarda metabolik enerjiye ihtiyaçları vardır. Taşıdıkları yüksek miktardaki O_2 nedeniyle oksidatif hasara uğraması en olası hücrelerdir. Ayrıca membranları poliansütüre yağ asitlerinden zengindir. Reaktif oksijen ürünleri (ROS) eritrositler için oldukça zararlıdır. Başlıca hedefleri hemoglobin ve hücre zarı olan bu oksidan ajanlar hemoglobinin β zincirlerini, zar proteinlerini ve bunların taşıdıkları $-SH$ (sülfidril) gruplarını oksitleyerek oksidatif hasara yol açarlar. Hemoglobindeki oksidatif hasarın sonuçlarından birincisi; hem gruplarının oksidasyonu ile methemoglobin oluşumudur. İkinci etkisi ise globinin sistein (Cys) yan zincirlerindeki $-SH$ gruplarının oksidasyonu ile disülfid köprülerinin oluşumudur. Oksidatif hasarın bir diğer etkisi hücre zarındadır. Zar lipidlerinin peroksidasyonu sonucunda proteinlerin oksitlenmesi sitoskelette değişikliklerin meydana gelmesine bunun sonucunda da zar bütünlüğü bozularak eritrositler parçalanır ve bireylerde akut hemolitik anemi ortaya çıkar. Eritrositlerin bu zararlı etkilerden korunması gerekir (1,2,3,4).

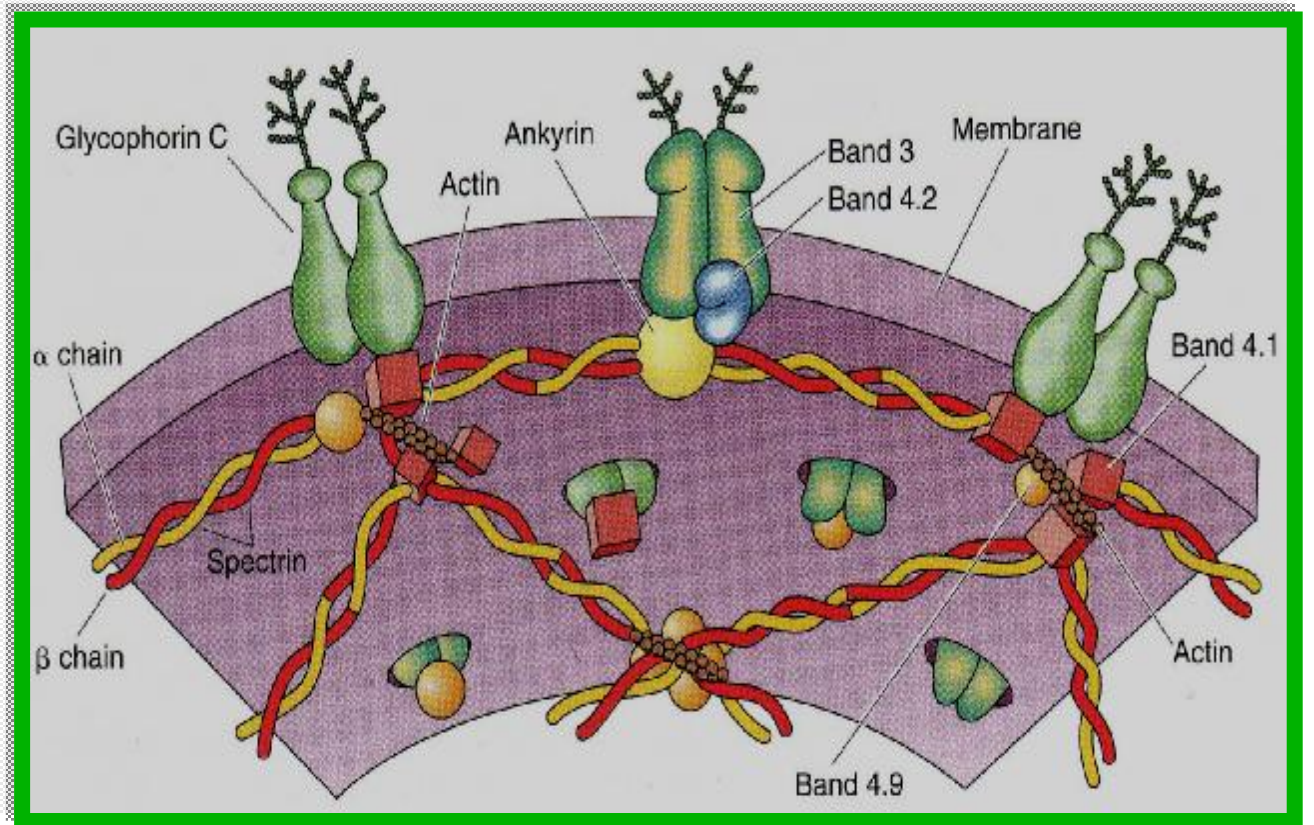
1. 1. 1. Eritrosit Zar Yapısı

Çekirdeksiz ve bikonkav disk şeklinde olan insan eritrositinin çapı 6,0-9,0 µm, kalınlığı merkezde 1,0 µm, kenarlarda 2,0-2,5 µm kadardır. Eritrosit membranının kalınlığı 6,0 nm olup yapısında %52 protein, %40 lipit, %8 karbohidrat bulunmaktadır. Lipid kısmının %60'ı fosfolipid, %25'i kolesterol ve kolesterol esterleri, %11'i glikosfingolipid ve %4'ü de gliseridler ve serbest yağ asitlerinden oluşmaktadır. Fosfolipidler ve yağ asitleri asimetrik dağılmaktadır. Bütün membranlarda olduğu gibi kolin içeren fosfolipitler (fosfatidilkolin ve sfingomyelin) membranın dış yüzünde, yüklü amino grubu içeren fosfolipitler (fosfatidiletanolamin ve fosfatidilserin) ise sitoplazmik yüzünde yer almaktadır. Eritrositlerde organeller bulunmadığı için lipit sentezi yapılamamaktadır. Kaybolan membran lipit içeriği plazma lipoproteinlerinden sağlanmakta ve fosfatidilkolin ile kolesterol öncelikli değiştirilmektedir. Transfer hızı lipoproteinlerdeki kolesterol ve fosfatidilkolin içeriğine bağlıdır. Membran yapısındaki bileşenlerin oranı hücre biçimini etkilemektedir. Kolesterol ve fosfatidilkolin kombinasyonu, saf fosfolipide göre daha viskoz bir yapı sağlamaktadır. Kolesterol/fosfolipid oranının artması, hücre membranının sertleşmesine, parçalanmasına ve dalakta yok edilmesine neden olmaktadır. Oranın azalması halinde ise hücre küresel şekil almakta ve parçalanmaktadır. Bu tür değişimlerin fiziksel bozukluklar yanında fizyolojik etkileride olmaktadır. Mikrovaskülerdeki sıyrılma (shear) kuvveti artarak, alan-hacim oranı ve O₂ taşınması etkilenmektedir (2).

Eritrosit membranının sağlamlığı ve esnekliğini sağlayan etkenler arasında membran integral proteinleri ile hücre iskeletini oluşturan periferel proteinler arasındaki bağlanma önem taşımaktadır. Yapısında spektrin, aktin, protein 4.1 ve tropomiyozinin bulunduğu hücre iskeleti plazma membranının stoplazmik yüzünde yer almaktadır. Membrana integral membran proteinlerinden glikoforin C ise band 4.1 proteini (hücre iskeleti proteini) aracılığı ile bağlıdır. Bütün olarak incelendiği zaman tipik bağlanmalar sonucundaki kafes görünümündeki yapı eritrositlerin deformasyondan sonra orijinal durumlarına dönmesini sağlamaktadır. İki heterodimerden oluşan bir tetramer olan spektrin, 12 aktin monomeri ile birleşerek hegzagonal kafes oluşturmaktadır. İki proteinin bağlanmalarını protein 4.1 gerçekleştirmektedir. Bu kafes şeklindeki kauçuğa benzer yapı, eritrositin

deformasyon sonrasında membranın tekrar eski şekline dönmesini sağlamaktadır. Hücre iskeleti proteinlerinin membrana bağlanmasında iki protein görev almaktadır: Ankrin spektrini integral membran proteini olan band 3 dimerine, protein 4.1 ise integral proteini glikoforin C yapısına bağlamaktadır. Dimer veya tetramer formunda bulunan band 3 proteininde iki farklı bölge bulunmaktadır. İntrastoplazmik bölge ankrin aracılığı ile spektrine bağlanmakta ve membran ilişkili bölge ise anyon değişimi fonksiyonuna aracılık etmektedir (şekil 1.1.1) (2).

Membran şekli ve mekanik özellikleri için önem taşıyan glikoforin C proteininin yanı sıra glikoforin A, B ve D yaygın olarak bulunan eritrosit membran proteinleridir. Membranda band 3 ve glikoforin A miktarının yarısı kadar bulunan ve bir transmembran protein (55 kDa) olan band 4.5 proteini glukoz transporteri olarak görev yapmaktadır (2).



Şeki 1.1.1. Eritrosit zar yapısı

1. 1. 2. Hemoglobin

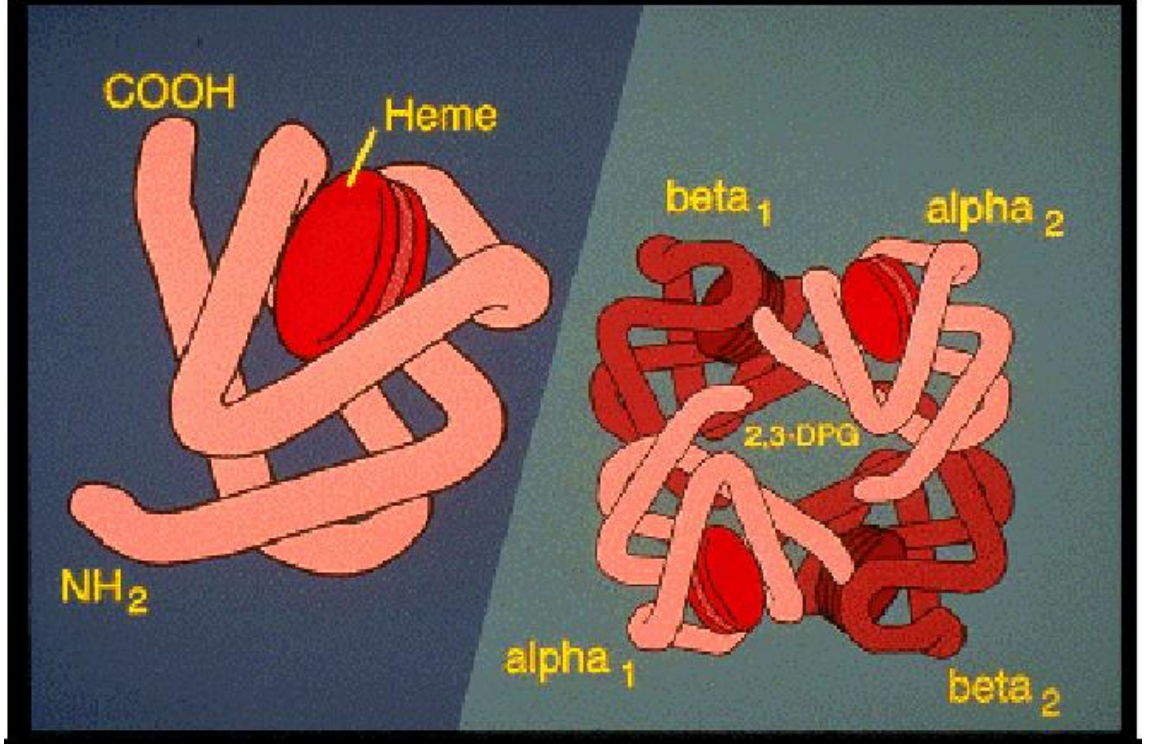
Evrimin önemli bir basamağı olan anaerobik yaşamdan aerobik yaşama geçişte canlılar, oksijeni kullanarak daha fazla enerji elde edebilme olanağına sahip olmuşlardır. Glukozun aerobik yıkılımından elde edilen enerji, anaerobik enerjiden elde edilen enerjiden 18 kat daha fazladır. Eritrositlerin yapısında bulunan ve yüksek konsantrasyonda oksijen bağlama yeteneği bulunan hemoglobin, oksijen taşınmasında kullanılmaktadır (5,6).

Bir protein olan hemoglobin oksijeni akciğerlerden dokulara, karbondioksit ve protonları ise dokulardan akciğerlere taşımaktadır. Akciğerlere giren havanın oksijenini bağlayan hemoglobin, birkaç saniye içinde vücudun en uzak dokularına kadar ulaştırmaktadır. Hemoglobin molekülünün O₂ bağlayan prostetik bölgesinde bir protoporfirin yer almaktadır. Molekülün protein kısmına bağlanan prostetik grup olan ferroprotoporfirin (hem), bu moleküllerin kırmızı renkli olmasını sağlamaktadır. Hem, grubu dört pirok halkasından meydana gelen protoporfirin halka sistemi ile bir demir atomundan oluşmaktadır. Meten köprüleri ile birbirine bağlanan dört pirok halkasından meydana gelen tetrapirok yan zincir olarak dört metil, iki vinil ve iki propiyonat eklenmiştir. Ferro şeklindeki demir atomu (Fe⁺⁺) geri dönüşümlü olarak oksijen bağlayabilmektedir (5,6).

Hemoglobin molekülünde, hem grubu taşıyan dört polipeptid zincir bulunmaktadır. Tetramerik yapıda olan polipeptidler aynı iki zincirin oluşturduğu birimler şeklinde hemoglobin yapısında yer almaktadır (şekil 1.1.2) (5,6).

- I. İki α , iki β zinciri bulunuyor ise buna Hb A denir ve en çok bulunan tiptir (%97).
- II. İki α , iki λ zinciri bulunuyor ise buna Hb A₂ denir erişkinde %2,6 oranında bulunur.
- III. İki α , iki δ zinciri bulunuyor ise Hb F denir erişkinde %0,2 oranında bulunur.

Hemoglobinin hem kısmında bulunan ferro demirin (Fe⁺⁺) ferrik (Fe⁺⁺⁺) şekline oksidasyonu ile methemoglobin meydana gelir ve okside hemoglobin oksijen taşıyamaz. Bazı ilaçlar ve reaktif oksijen ürünleri methemoglobin oluşumuna yol açarlar (5,6).



Şekil 1. 1. 2. Hemoglobinin yapısı

1. 2. Pentoz Fosfat Yolu (PFY)

Metabolik enerji elde edilmesinin yanı sıra karbohidratlardan nükleotidlerin, glikolipitlerin, glikoproteinlerin ve diğer özel ürünlerin sentezinde yararlanılmaktadır. Karbohidrat metabolizmasında az kullanılan bu yollar, özel biyosentetik amaçlar için kullanılmaktadır (7-9).

Pentoz fosfat metabolik yolu NADPH ve riboz-5-fosfat sağlamaktadır. Sitoplazmik bir metabolik yol olan pentoz fosfat metabolik yolunun 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⁺ elektron transport zincirine taşımaktadır. Buna karşılık NADP⁺ taşınan hidrojenler sitoplazmada indirgen biyosentezlerde kullanılmaktadır (7-9).

PFY'nun oksidatif bölümü glukoz-6-fosfat dehidrojenaz (G6PD) tepkimesi ile başlamakta ve bir dizi tersinmez (geri dönüşümsüz) tepkime ile indirgen

biyosentez tepkimelerinde kullanılan indirgenme eşdeğerleri NADPH üretilmektedir. Buna karşılıklı PFY'nun oksidatif olmayan bölümündeki tersinir (geri dönüşümlü) tepkimeler ile glikolitik ve glukoneogenik yollara bağlantı sağlanmakta ve nükleotid nükleik asit sentezinde kullanılan riboz-5-fosfat sağlanmaktadır (7-9).

PFY tepkimeleri ile sitoplazmada $[NADPH] / [NADP^+]$ oranı arttırılmaktadır. Yemek sonrasında karaciğer hücrelerindeki NADPH miktarı, $NADP^+$ ile karşılaştırıldığında 50-100 kat daha fazla bulunmaktadır. Bu durum NAD^+ ile karşılaştırıldığında belirgin bir fark ortaya çıkmaktadır. Aerobik koşullarda NAD^+ , NADH miktarından 100 kat daha fazladır. Bu nedenle hücre indirgen biyosentezler için NADH yerine NADPH kullanmayı tercih etmektedir (7-9).

Hücresinin NADPH veya riboz-5-fosfata olan göreceli gereksinimlerine göre PFY farklı şekillerde çalışmaktadır. Hücresinin 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. Riboz-5-fosfat ve NADPH gereksinimlerinin dengede olduğu koşullarda ise oksidatif yol ve pentoz fosfat izomeraz tepkimesinde her iki ürün meydana gelmektedir (7-9).

Hücresinin 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_2 ve NADPH elde edilmektedir (7-9).

Tüm glukozun glikolitik yolla yıkıldığı iskelet kası ve beyin gibi dokularda pentoz fosfat yolunun aktivitesi düşüktür. Bununla birlikte aktif yağ asidi ve kolesterol sentezinin olduğu karaciğer, adrenal korteks ve süt üreten meme dokusunda glukoz oksidasyonunun önemli bir kısmı pentoz fosfat yoluyla gerçekleşmektedir (7-9).

Vücudun antioksidan savunma sistemleri açısından NADPH büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle yüksek oksijen parsiyel basıncı altındaki hücrelerde pentoz

fosfat yolu aktif şekilde çalışmaktadır. Korneadaki glukozun %60 kadarı PFY'nda tüketilmektedir (7-9).

Beslenme sonrasında glukoz-6-fosfat dehidrogenaz ve fosfolukonat dehidrogenazın artması büyük olasılıkla insülin tarafından düzenlenmektedir. Kısa süreli düzenlemelerde glukoz-6-fosfat dehidrogenaz , yüksek $[NADPH]/[NADP^+]$ oranı ile inhibe olmaktadır. NADPH kullanımındaki artış, pentoz fosfat yolunun oksidatif bölümünün aktivitesini arttırmaktadır (7,8,9).

1. 2. 1. Eritrositler İçin PFY'nun Önemi

Eritrositler kemik iliğinde kök hücrelerden olgunlaşmaları esnasında nükleus, ribozom ve mitokondri gibi organellerini kaybederler ve dolaşıma salıverilirler. Mitokondrileri olmadığı için eritrositlerde enerji üretimi çok sınırlıdır. Oksidatif fosforilasyon ve Krebs döngüsü aktivitesi olmadığı için enerji gereksinimini glikolitik yoldan sağlamaktadır. Oksidatif stress etkisinde olmayan eritrositte glukozun %90 kadarı Embden-Mayerhof yolu (anaerobik glikoliz) ile pirüvat ve laktata parçalanmaktadır. Enerjisi tamamen glukozla bağlı hücrelerden olan eritrositlerde glukoz laktik aside metabolize olmakta ve net 2 ATP enerji kazanılmaktadır. Eritrositlerin iyonik dengesinin sağlanması için Na^+-K^+ ATPaz sisteminde, membran yapısının deformasyon yeteneğinin sürdürülmesinde ve eritrositlerin bikonkav şeklinin korunmasında ATP şeklinde enerjiye gereksinim bulunmaktadır (1-3,7,10).

Heksoz monofosfat yolu (pentoz fosfat yolu) ile (NADPH) ve pentoz fosfatlar sağlanmaktadır. NADPH üretimi eritrositler için hayati önem taşımaktadır. NADPH eritrositlerde GSH metabolizmasında rol oynamaktadır. Oksijen ve türevleri hemoglobini inaktif hemoglobine (methemoglobin) dönüştürmekte ve ayrıca moleküler oksijen, membran lipitlerinden aktivitesi yüksek peroksitler oluşmaktadır. Çok az miktarda glukozun kullanıldığı PFY'nda üretilen NADPH, eritrositin oksidatif hasara karşı korunmasında kullanılmaktadır (1-3,7,10).

Eritrositlerde hemoglobinin oksijene afinitesini Rapoport-Luebering döngüsü düzenlemektedir. Glikolitik yolda 1 mol ATP üretilen fosfogliserat kinaz tepkimesinin atlandığı bir yolda bisfosfogliseratmutaz tarafından katalizlenen tepkime ile eritrosite özgü olan 2,3 BPG elde edilmektedir (Rapoport-Luebering).

Eritrositlerde 2,3-BPG üretimi, glikolitik yolda 1 ATP eksik elde edilmesine yol açmaktadır. Allosterik etkileyici olarak etki gösteren 2,3-BPG, hemoglobinin oksijene afinitesini düzenlemektedir. Eritrositlerde Na^+ - K^+ ATPaz sistemi ile üç sodyumun hücre dışına çıkarılmasında ve iki potasyum ile bir klorürün hücre içine girmesinde 1 ATP harcanmakta ve elektriksel nötralitenen sürdürülmesi sağlanmaktadır. Embden-Mayerhof yolu ile sıkı ilişkide bulunan diğer metabolik yollar (Rapoport-Luebering döngüsü) NAD ile NADH ve ADP miktarının oransal düzenlenmesinde etkili olmaktadır (1-3,7,10).

Normalde peroksitler, bir tripeptid olan GSH'ın (γ -Glutamil Sisteinil Glisin) redüksiyonu ile inaktive olurlar. Bir çok hücrede bol miktarda bulunan GSH'da serbest bir tiyol grubu bulunur ve bu grup oksidatif strese karşı esas koruyucu rolü oynar. GSH'ın kolay okside olma özelliğinden dolayı, redükte sülfidril grupları -SH taşıyan bazı enzimlerin, hücre zarının ve hemoglobinin otooksidasyondan korunarak, yapısal ve fonksiyonel bütünlüğü sağlanır (1-4,7,10).

GSH molekülüne sistein, serbest -SH grubunu vermiştir. Bir protein iki tiyol grubu okside olacak olursa, bu protein GSH tarafından kolayca enzimatik olmayan reaksiyonla redükte edilebilir. Bir başka deyişle glutatyon, -SH grubunu okside olan proteine vererek, proteinlerdeki sistein -SH gruplarının redükte durumda tutulmasını yardım eder (1-4,7,10).

Hücre zarında birçok enzim bulunur. Bunlar hidrojenperoksit (H_2O_2) gibi ajanlarla okside olurlarsa GSH, -SH grubunu proteine vererek oksidatif stresi önler. GSH aynı zamanda peroksitlerin redüksiyonunu sağlar. Lipit peroksidasyonunu selenyum içeren glutatyon peroksidaz (GPx), eritrositte oluşan peroksit gruplarını zararsız hidroksil gruplarına çevirir. Bu tepkimede GSH indirgenmektedir. Tripeptid yapısındaki GSH'ın methemoglobin ve peroksitlerin indirgenmesi sırasında disülfitle bağlı okside glutatyona (GSSG) yükseltgenmektedir. Tekrar kullanılabilmesi için GSSG, NADPH bağlı GPx ile indirgenmekte ve GSH oluşturulmaktadır. PFY'nun birinci basamağında G6PD aracılığı ile NADPH üretilir ve bu GSSG, GSH dönüşümünü katalize eden glutatyon redüktaz tarafından gerekli hidrojen NADPH molekülünden alarak GSSG'ye transfer eder. G6PD enziminin, G6P'i 6-fosfoglukonalaktona dönüştürmesi sırasında G6P'nin 1. karbonundaki hidrojen NADP'ye aktarılarak NADPH oluşturulur. NADPH, GSH'ın sağlanması için

glutasyon redüktazın koenzimi olarak çalışır. G6PD yetmezliğinde, hücrenin redüktif kaynağı olan NADPH üretiminde bozukluk olduğu için hücrede oksidatif stres gelişir.

Bir çok G6PD yetmezlikli eritrositte, enzim tamamen inaktif değildir, ancak yaklaşık 10 kat daha düşük aktiviteye sahiptir. G6PD yetmezlikli bireyler oksidan madde almadıkları sürece klinik belirti vermezler. Bu hastalarda GSSG'nin GSH'a dönüşümü yetersiz NADPH düzeyleri nedeniyle gerçekleşmemektedir. Bunun bir sonucu olarakta methemoglobin (hemoglobindeki demir Fe^{++} durumundadır, methemoglobinde ise Fe^{+++} durumundadır) oluşmaktadır ve methemoglobin oksijen taşıyamaz. Normal koşullarda hücrede oluşan methemoglobinin (günde yaklaşık %3 kadar) çoğu, NAD-bağımlı methemoglobin redüktazın katalizlediği tepkime ile hemoglobine indirgenmektedir. Az miktarda methemoglobin ise glutasyon tarafından $NADP^+$ -bağımlı glutasyon peroksidazın katalizlediği tepkimeyle indirgenmektedir. Okside hemoglobin (methemoglobin) birikmesi sonucu eritrosit yapısında değişiklikler oluşur. Ayrıca, globulinin sistein yan zincirlerindeki sülfidril gruplarının oksidasyonu ile disülfid köprüleri oluşur. Böylece globinin tetramer yapısı bozulur ve polipeptid-zincirleri çözülerek (denatüre) çöker. Heinz cisimciği denilen bu denatüre olmuş globin kütlesi, hücre zarı sülfidril grupları ile disülfid köprüleri oluşturarak membrana yapışmaktadır. Bu gibi hücre içi kitlelerin (inklüzyonların) dalaktan geçerken fagositoz yolu ile alınması zarda kayba, hatta eritrositin tamamen parçalanmasına neden olur (1-3,7,10).

Dolayısıyla, pentoz fosfat yolunda NADPH'ın sürekli olarak üretilmesi ile GSH dönüşümünün sürdürülmesi eritrositlerin yaşam sürecinde kritik bir öneme sahiptir. Bu reaksiyonlar zincirinde G6PD'nin önemi ve gerekliliği, eritrositlerin oksidatif hasarlardan korunmasında gerekli olan NADPH'ın üretildiği ilk basamağı katalizleyen enzim olmasından kaynaklanmaktadır (1,2,3,7,10).

1. 2. 2. PFY Tepkimeleri

Eritrositler ve beyin hücreleri gibi bazı hücrelerin esas enerji kaynağı olan glukozun oksidasyonu için seçenek oksidatif yoldur. Heksoz monofosfat yolu veya fosfoglukonat yolu olarak bilinen bu yolda nükleik asit sentezi için gerekli olan ve ATP, CoA, NAD, FAD, RNA ve DNA gibi biyomoleküllerin yapıtaşı olarak kullanılan riboz-5-fosfat ile, indirgen biyosentez tepkimelerinde kullanılan hidrojen sağlayıcı kaynak olan nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) üretilir (7-9,11,12,16,18,22-24).

PFY'nun tepkimeleri oksidatif ve olmayan olmak üzere 2 basamağa ayrılır.

Oksidatif Basamak: Bu basamakta redüktan madde NADPH'nın üretimi sağlanır. PFY'nun ilk üç reaksiyonunun ikisinde oksidatif basamak gerçekleşir ve bu basamaklarda $1 \text{ NADP}^+ \rightarrow \text{NADPH}$ 'a indirgenir. PFY'nun ilk reaksiyonu glukoz-6-fosfatın, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) enzimi ile 6-fosfoglukonalaktona dehidrogenasyonudur. 6-fosfoglukonolaktondan, 6-fosfoglukonat oluşumunu glukonolaktonaz katalizlemektedir. 6-fosfoglukonat NADP^+ -spesifik bir enzim olan 6-fosfoglukonat dehidrogenazın katalizlediği dehidrogenasyon ve dekarboksilasyon ile ribüloz-5-fosfat ve CO_2 elde edilir. Bu sırada ikinci bir $\text{NADPH} + \text{H}^+$ molekülü meydana gelir (7-9,11,12,16,18,22-24).



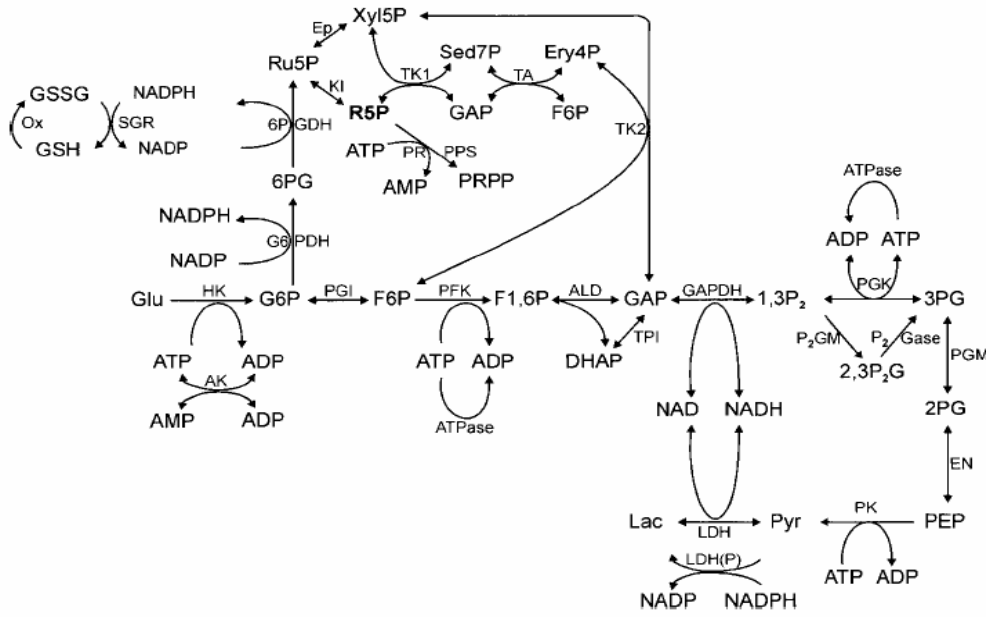
Üretilen NADPH'lar genel olarak, yükseltgenmiş glutatyonun indirgenmesinde, katalaz enziminin kararlılığının sağlanması gibi çeşitli biyosentetik yollarda kullanılır. Kimyasal enerjinin bir taşıyıcısı olarak, bazı öncül maddelerden steroidlerin ve yağ asitlerinin biyosentezinde kullanılır. Yağ asitlerinin biyosentezi sırasında meydana gelen ara ürünler karbonil gruplarının ve çifte bağlarının indirgenmesi için, NADPH gereklidir. İskelet kası gibi yağ asiti sentezinin düşük düzeyde gerçekleştiği diğer dokularda bu yol daha az kullanılır (7-9).

Oksidatif Olmayan Basamak: Bu bölümde biyosentetik tepkimelerde kullanılmak üzere beş karbonlu şekerler ve glikoliz ile glukoneogenez için şeker fosfatlar elde edilmektedir. Şeker molekülleri arasında gerçekleştirilen düzenlemeler ile pentozlar kullanılarak trioz, tetroz, heksoz, heptoz elde edilmektedir (7-9).

Oksidatif olmayan bölümde ikisi spesifik olmak üzere dört enzim görev yapmaktadır. Ribüloz-5-fosfattan iki farklı enzim kullanılarak iki değişik ürün oluşturulmaktadır. Spesifik enzimlerden 3-epimeraz (fosfopentoz epimeraz) ribüloz-5-fosfatı ksilüloz-5-fosfata, ketoizomeraz (fosfopentoz izomeraz) ise ribüloz-5-fosfatı, riboz-5-fosfata çevirmektedir. Denge halinde bulunan ribüloz-5-fosfat, riboz-5-fosfat ve ksilüloz-5-fosfat, transketolaz ve transaldolazın katalizlediği tepkimeler ile metabolize olmaktadır. Transketolaz ve transaldolaz, şeker fosfatları arasında iki ve üç karbonlu birimlerin değiştirilmesini sağlamaktadır. Her iki enzim için substratlardan birisialdoz, diğeri ise ketozdur (7-9).

Koenzimi tiamin pirofosfat olan transketolazın katalizlediği oksidatif olmayan bir reaksiyon ile ksilüloz-5-fosfattan iki karbonlu üniteyi riboz-5-fosfata taşıyarak, yedi karbonlu sedoheptüloz-7-fosfat oluşturulmaktadır. Ksilüloz-5-fosfattan geri kalan üç karbonlu kısım ise gliseraldehit-3-fosfatı meydana getirmektedir. Daha sonra transaldolaz enzimi sedoheptüloz-7-fosfatın üç karbonlu kısmını gliseraldehit-3-fosfat ile birleştirerek fruktoz-6-fosfat ve eritroz-4-fosfatı oluşturmaktadır. Bir sonraki aşamada transaldolazın tekrar aktivasyonu ile eritroz-4-fosfat ve ksilüloz-5-fosfattan, fruktoz-6-fosfat ve gliseraldehit-3-fosfat sentez edilmektedir. Reaksiyonun iki kez tekrar edilmesi ile oluşan gliseraldehit-3-fosfattan, fruktoz-1-6-bisfosfat elde edilir. Döngünün bu şekilde tamamlanması ile 6 tane pentoz fosfattan 5 adet heksoz fosfat oluşmaktadır. PFY'nun oksidatif olmayan bölümündeki bütün bu reaksiyonlar tamamen geri dönebildiğinden, bu yol ile aynı zamanda heksoz fosfatların pentoz fosfatlara dönüşümü gerçekleşmektedir (şekil 1. 2. 2) (7-9).

PFY'na giren G6P'ların hangi yola gidecekleri, bu yolun gerçekleştiği hücrenin metabolik ihtiyaçlarına bağlıdır. Öncelikli ihtiyaç nükleotid sentezi ise temel ürün riboz-5-fosfattır ve oksidatif olmayan basamağın birçok reaksiyonu gerçekleşmez. Öncelikli ihtiyaç eğer NADPH ise, oksidatif olmayan basamak ile kolayca G6P'a dönüşerek tekrar oksidatif faza girecek bileşikler oluşturulur (7,8,9).



Şekil 1. 2. 2. Eritrosit enerji metabolizması ve redoks modeli. Xyl5P: ksilüloz-5-fosfat, Sed7P: sedüloz 7-fosfat, Ery4P: eritroz 4-fosfat, R5P: riboz 5-fosfat, Ru5P: ribuloz 5-fosfat, PEP: fosfoenolpirüvat, 3PG: 3-fosfoglisarat, 2PG: 2-fosfoglisarat, 1,3P₂G: 1,3-bisfosfoglisarat, 2,3P₂G: 2,3-bisfosfoglisarat ve 6PG: 6-fosfoglukonat (18).

1. 3. G6PD Eksikliği

G6PD (EC 1.1.1.49) enzimi PFY'nun ilk ve hız kısıtlayıcı enzimidir. G6PD ilk kez 1931 yılında Otto Warburg ve W. Christian tarafından at eritrositlerinde tanımlanmış ve "Zwischenferment" olarak isimlendirilmiştir. 1936 yılında kısmen saflaştırılmış ve çeşitli organizmalarda çalışmalar yapılmıştır. Daha sonra Lipman, Dickens, Horecker ve Racker tarafından PFY'nda tanımlanmıştır. Enzimin birincil yapısı bakteriden insana kadar birçok türde, yaklaşık olarak %39 oranında korunmuştur ve 64 amino asit her türde aynıdır. Enzim eksikliği; eritrositler, karaciğer ve lökositler gibi çeşitli dokularda görülebilmektedir. Karaciğerde enzim eksikliği daha çok yeni doğan sarılığına yol açmaktadır. Eritrositlerde enzim eksikliği çeşitli seviyelerde hemolitik tablolara yol açmaktadır. G6PD eksikliği dünya çapında 400 milyondan fazla insanı etkileyen çok yaygın genetik geçiş gösteren bir hastalıktır. Epidemiyolojik ve invitro çalışmalar G6PD enzim eksikliğinin Plasmodium falciparum enfeksiyona karşı korunmada bir avantaj olduğunu göstermiştir (7,-9,11,15,19-22).

G6PD eksikliği 1950'li yılların ortasında ilk keşfedildiğinde niçin bazı insanların antimalarial ilaç olan primaquinenin etkisine hassas olduğu merak edilmiştir. Daha sonra etkilenenlerin çoğunun asemptomatik olduğu görülmüştür. Bununla beraber eksikliği olan bireyler bazı ilaçların alımında, bazı enfeksiyonlar esnasında ve favizm de yenidoğan sarılığı ve ciddi akut hemolitik anemi için risk altındadırlar (8,11,12,13,14).

G6PD eksikliğinin prevalansını değerlendirmede enzimin çok heterojen olduğu tespit edilmiştir, 387 varyantı tespit edilmiştir. İnsan G6PD geninin klonlanması ve sıralanması tanımlanan varyasyonun moleküler temelini mümkün kılar. Genetik varyasyon sayısının biyokimyasal analiz ile belirlenen sayıdan daha az olduğu görülmüştür ve bu fark artmaktadır. Çünkü dünyanın farklı bölümlerinde karşılaştırıldığında varyasyonlara farklı isimler verilmiştir. Yine de, G6PD eksikliğinin kronik nonsferositik hemolitik anemi (CNSHA) ile bağlantılı olan ciddi formu nadirdir. Bu durum sporadiktir ve tek olduğu düşünülür, buna rağmen şu an bunların tekrarlayan mutasyonlardan kaynaklandığı bilinmektedir (7,-9,11,15,19-22).

1. 3. 1. G6PD'nin Metabolik Rolü

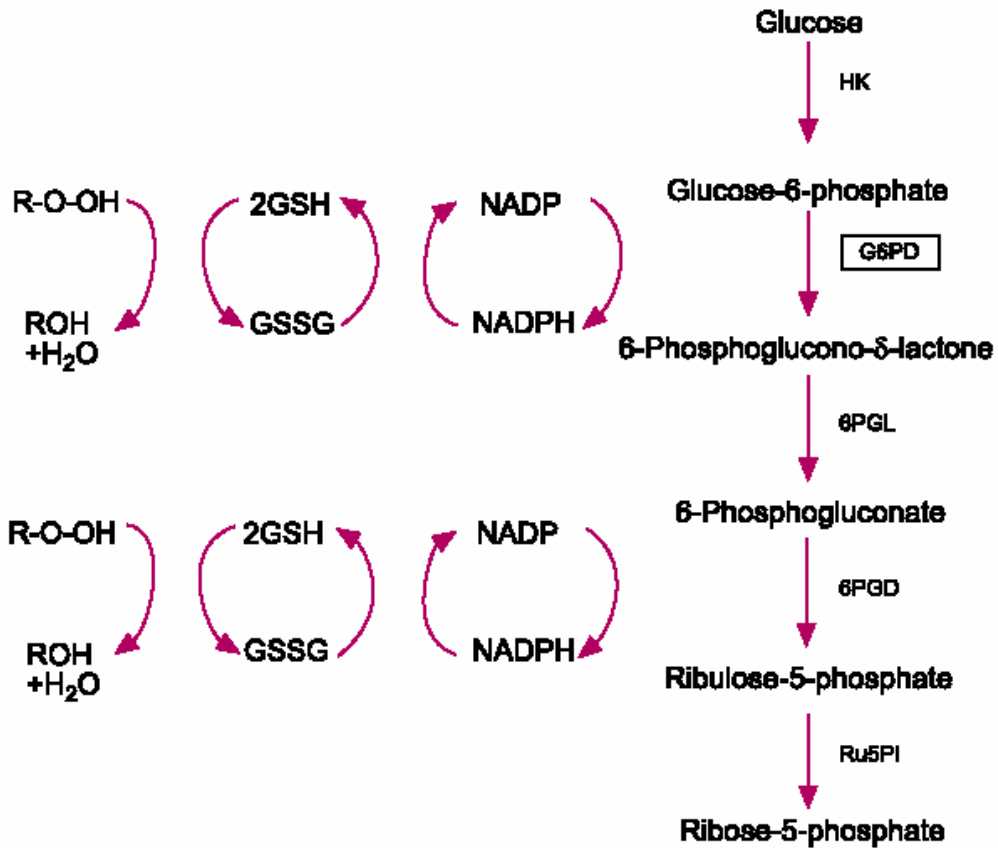
G6PD pentoz fosfat yolunun ilk reaksiyonunu katalize eder. Bu yol glukozu pentoz şekerlere çevirir, biyosentetik reaksiyonlar için gereklidir. Penyoz fosfat yolu aynı zamanda NADP'yi NADPH'a indirger(Şekil 1. 3. 1.) (2,7-9,11-31).

Pentoz fosfat yolunun G6PD aracılığı ile katalize olunan bu ilk basamakta, Glukoz 6-fosfat (G6P) 6-fosfoglukonolaktone dönüşür, 6-fosfoglukonolaktone 6-fosfoglukonata ve ribüloz 5-fosfata dönüşür (11,15).

Bu reaksiyon:



Riboz şekerler ATP, CoA, NAD, FAD, RNA ve DNA gibi önemli moleküllerin biyosentezi için gereklidir. Yine de riboz 5-fosfat pentoz fosfat yolunda şekillenir, glikolitik ara ürünlere tamamen çevrilebilir (11,15).



Şekil 1. 3. 1. G6PD tarafından PFY'nun oksidatif bölümünde toksik peroksidazların (R-O-OH) detoksifikasyonu sırasında oluşan GSSG GSH'ya indirgenir (11).

1. 3. 2. Hemolizin Mekanizması

G6PD eksikliğinde eritrositler NADP^+ 'yi NADPH 'a normal oranda indirgeyemezler ve bu oksidatif hasara karşı artmış hassasiyetle sonuçlanır. NADPH 'ın major rolü glutasyonu redükte formda tutmaktır. GSH / GSSG oranı 500/1'den fazladır. Redükte glutasyon hidrojen peroksit (H_2O_2) ve organik peroksitlerin detoksifikasyonunda, hemoglobindeki sistein rezidülerinin devamlılığında ve diğer eritrosit proteinlerinin redükte durumda kalmasında rol alır. H_2O_2 , glutasyon yolundaki gibi NADPH

bağımlı olarak katalaz (CAT) ile temizlenir. Okside ajanların varlığında, normal eritrositteki PFY sitümüle olur, NADPH ve GSH seviyeleri değişmez. G6PD eksikliğinde her ne kadar PFY maksimal hıza yakın çalışsa da glukoz akışı artmaz, GSH ve NADPH seviyeleri düşer. Oksidatif hasarın hemolize yol açması artmış sensitiviteye bağlıdır. GSH'ın ve diğer proteine bağlı -SH gruplarının geri dönüşümsüz oksidasyonunda önemli rol oynar. Bunun sonucundaki etkiler elektrolit inbalansı, membran cross-bağlantısı ve eritrosit fagositozudur. Favizm'de eritrositlerde kalsiyum seviyeleri yükselir ve bazı durumlarda eritrosit Ca-ATPaz degradasyonuna neden olur (11,15,19,22-34).

Pasif permeabilitenin artması ve Ca pompasının etkisinin azalmasının her ikisinin kombinasyonu, eritrosit Ca homeostazisinin bozulma nedenini açıklayabilir. G6PD eksikliğinde eritrositler, Ca bağımlı vezikülasyona daha hassas hale gelir ve bu kompleman bağımlı hemoliz ile koreledir (11,15,19,22).

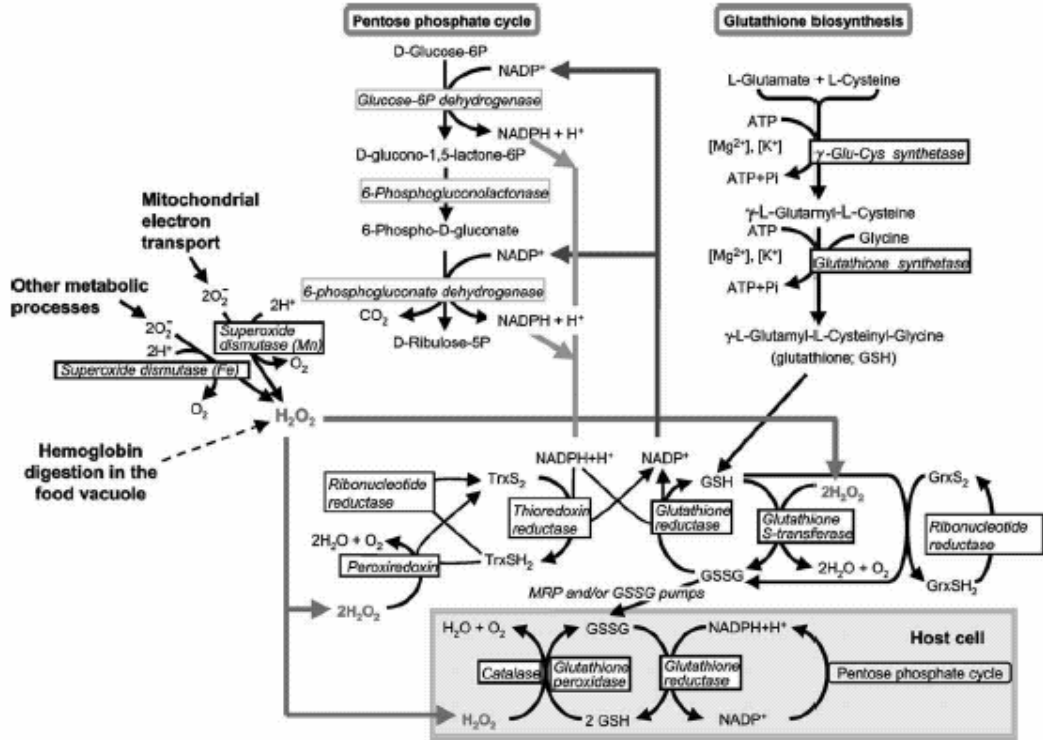
Favizm de eritrosit proteinlerinde anormallikler, artmış Ca seviyeleri, yüksek molekül ağırlıklı agregatların oluşması ve band-3 proteinin azalmasına neden olur. Bunun sebebi osmatik kayıp veya bölmelerdeki membran değişikliğini takiben mikrosirkülasyonda birikmesine bağlıdır. Eritrositlerin etkili yüzeyinin azalması sonucunda retiküloendotelial sistemde (RES) toplanma hatta osmatik parçalanmaya neden olabilir (11,16,19,22).

Oksidanların yol açtığı membran hasarı eritrositler tarafından dolaşımdan kaldırılmaları için bir sinyale yol açar. Bu hücrelerin makrofajlar tarafından tanınması membran karbohidratlarındaki değişiklikler sonucu olmaktadır. G6PD eksikliği olan hücreler glikoprotein değişimi geçirdiği gözlenmiştir. Buda akut olmayan hemolizde dolaşımdan kaldırılmalarına neden olur. Hemoglobinin glikolizasyonunda önemli bir artış G6PD eksikliği olan hücrelerde meydana gelmektedir(11,16,19,22).

1. 3. 3. Malarya ve G6PD Eksikliği

Malarya hipotezinde, G6PD eksikliği insidansı artmaktadır. Çünkü G6PD eksikliği allelleri Plasmodium falciparum enfeksiyonunun sebep olduğu ciddi malaryaya karşı önemli derecede direnç geliştirebilmektedir (şekil 1.3.3). Son zamanlarda sıcak ülkelerden tamamen ortadan kalkmasına rağmen tropik bölgelerde malarya artmakta

ve başta çocuklar olmak üzere her yaşta milyonlarca insanı öldürmektedir. Mortalite oranının yüksekliği allellerin karşı karşıya gelmesi ile malaryaya karşı önemli orandaki direnç gelişimi seçici bir avantaj sağlamaktadır. Malarya direnci nedeniyle G6PD eksikliği olanları değişik derecede tercih etmektedir (11,16,17).

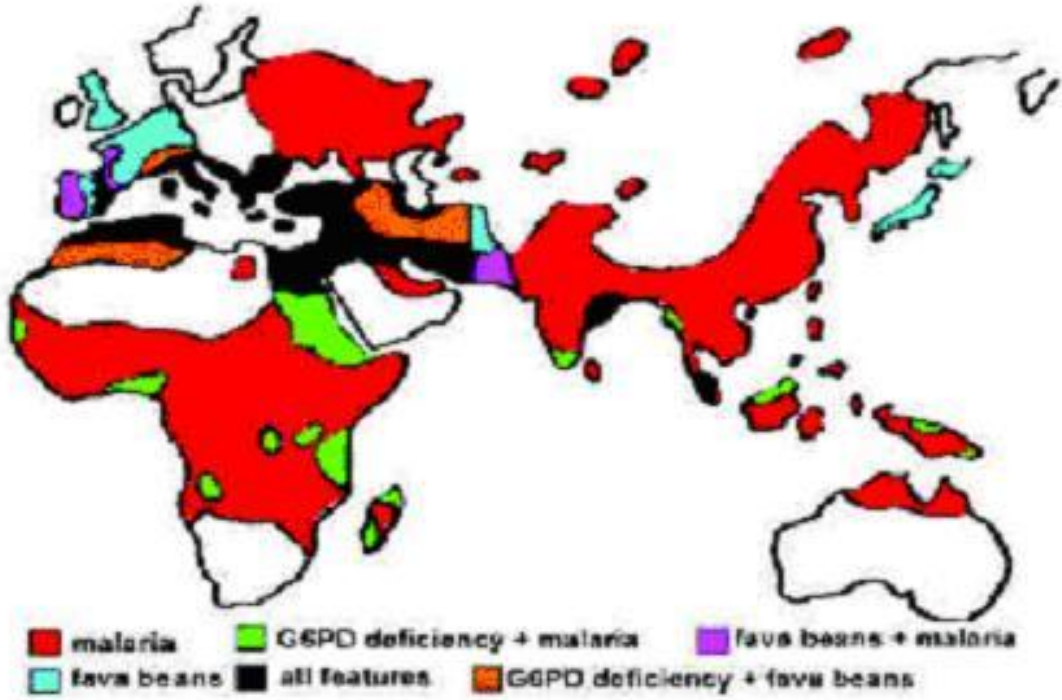


Şekil 1. 3. 3. Plasmodium falciparum infeksiyonuna karşı eritrositte oluşan defans sistemi (18).

1. 3. 3. 1. Coğrafik Yerleşimi

Dünyada malarya dağılımının G6PD eksikliğinin genetik dağılımı ile bir benzerlik gösterdiği fark edilmiştir. Tropikal kuşak çevresi boyunca dağılmıştır, bunlardan iki bölge hariç tutulmaktadır. G6PD eksikliği yüksek sıklıkta Avrupa ve Kuzey Amerika'da görülmektedir ve malarya buralarda görülmez. Gerçekte malarya Güney Avrupa'da sadece bu yüzyıl da ortadan kaldırılmıştır ve G6PD eksikliğinin görüldüğü Kuzey Amerika malarious bölgesinden gelenleri belli sınırlar içinde tutmaktadır. Daha fazla çalışma malarya ve G6PD eksikliği arasında bağlantının bulunduğunu destekler (şekil 1.3.3.1). Örneğin Sardina'da G6PD eksikliği Akdeniz

bölgesinde sıklığındaki farklılık malarya dağılımının tarihi geçmişi, yükseklik değişikliği farklılık göstermektedir (11).



Şekil 1. 3. 3. 1. G6PD, favizm ve malaryanın dünyada görülme sıklığı.

1. 3. 3. 2. Nüfus Çalışmaları

Malarya için ortaya atılan iddiaların asıl delili aynı toplumdaki bireylerin genotipi ile malarya enfeksiyonu sıklığı arasındaki ilişki yoğun nüfus kitlesinin incelenmesinden gelmektedir. Bazı çalışmalarda genotipik olarak G6PD eksikliğinin koruyucu etkisinin gösterilmesine rağmen, çok sayıdaki çalışmada heterozigot dişilerde koruculuğun olduğu kanısına varılmıştır. Daha sonraki çalışmalar batı ve doğu Afrika da daha açık sonuçlar taşımaktadır. Bu otoriteler çocuklarda genotip olarak sıklığını, ciddi malarya veya nadir komplikasyon durumları ile ilişkilerini kontrol eşlemesi yaparak karşılaştırmışlardır. Hem dişi heterozigotlarda hem de erkek hemizigotlarda ciddi *P.falciparum* malaryanın risklerini G6PD geninin %46-58 oranında azlattığını bulmuşlardır. Bu koruyuculuk düzeyi (HbS) orak hücreli anemide verilenden daha düşüktür. Fakat bazı HLA çeşitleri ve talesemilerle benzer ilişkiye sahiptir. Eğer erkek hemizigot dişi heterozigotlar gibi iyi korunmuş olsaydı niçin

yüzyıllardır malaryaya karşı savunmasız toplumda yetmezlikli genler sabit oranda kalsın? Cevabı aşağıda tartışıldığı gibi G6PD eksikliği ile ilişkili klinik problemler olmalı ki bunlar enfeksiyonun başlattığı hemolitik anemi, favizm, yenidoğan sarılığı, sağlıklı erkek hemizigotlarda da bir azalışa yol açmakta yeterli olmalıdır (11,16,17,25,26).

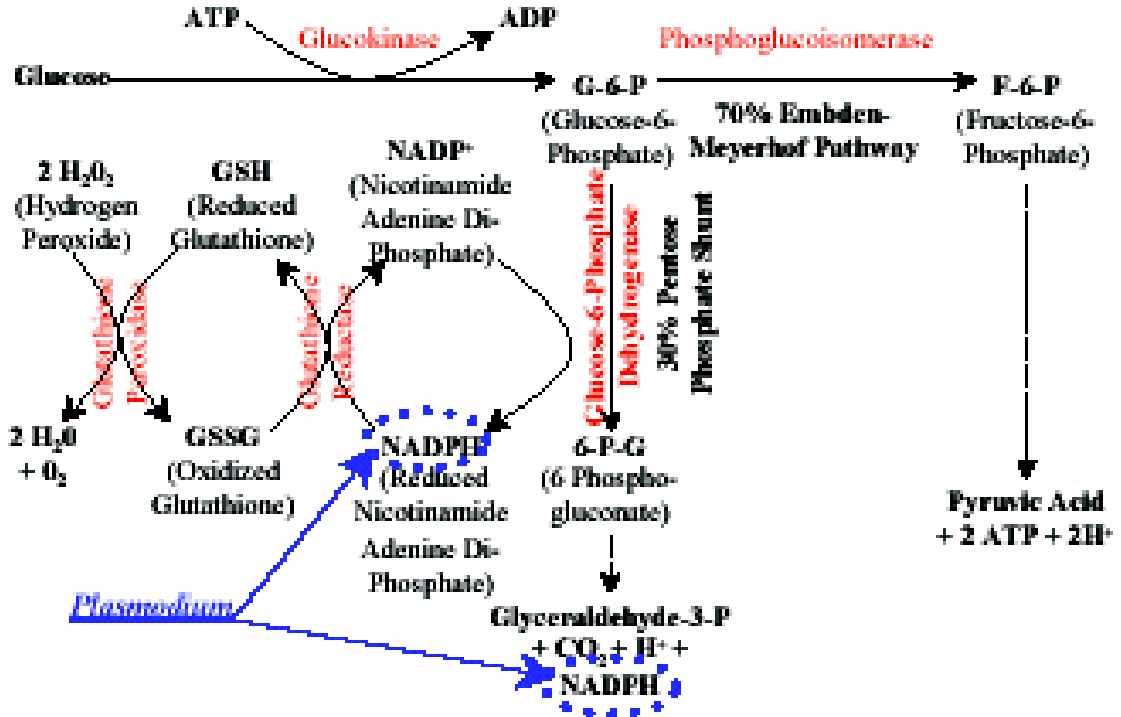
1. 3. 3. 3. İnvivo ve İnvitro Çalışmalar

Farklı tipte malarya hipotezini destekleyen deliller farklı genotipte insan eritrositlerinde laboratuvarlarda parazitin üretilmesi sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu canlı hücre kültürleri oksidan strese duyarlı olabilen ve malarya paraziti ile birleşmesi sağlanarak düşük oksijen seviyelerini tolere edebilecektir. Karşılaştırmalı çalışmaların farkı G6PD-Afrika ve G6PD-Akdeniz tipi kırmızı hücrelerde parazitin gelişimi, yetmezlikli hücrelerde daha yavaş olduğu gösterilmiştir (11).

1. 3. 3. 4. Korunmanın Mekanizması

Coğrafik ve epidemiyolojik çalışmalar, invivo ve invitro çalışmalar hemen hemen çok kuvvetli malarya hipotezini destekler. Enfekte olmayan hücrelerle karşılaştırıldığında *P.falciparum* enfeksiyonlu eritrositlerde PFY'nda aktivitede büyük artış vardır. Bu yoldaki artışa hem konak hücre hem de parazit katkıda bulunur. NADPH/NADP⁺ oranında azalma ve oksidatif stresin artması sebebi ile NADPH seviyesi yüksek görülmektedir ve G6PD eksikliği olan kırmızı hücreler NADPH'ın yüksek seviyesini sürdüremediği için özellikle oksidatif stres altında niçin parazitlerin yetmezliği olan konakta daha iyi gelişemediğini izah eder (şekil. 3. 3. 4.). İlave olarak hasarlanmış eritrositler immün sistem tarafından daha hızlı ortadan kaldırılıyor olmalıdır ve aktif makrofajlar tarafından parazitlerin öldürülmeleri de mümkündür (11,16).

G6PD and Malaria



Şekil 1. 3. 3. 4. Plasmodium falciparum G6PD tarafından üretilen NADPH'ı kullanır.

1. 3. 4. Genetik ve Yapısal Fonksiyonla İlişkisi

G6PD eksikliği X'e bağımlı özellik gösteren genetik bağımlı Protan-Deutan renksiz fenotipe sahip bir hastalıktır. G6PD geninin lokalize olduğu X kromozomunda Xq28 uzun kolda telomerik band vardır.

G6PD geni 1986 yılında klonlandı, 13 exon ve 12 intron ihtiva ettiği bulunmuştur. Yaklaşık 18 kb uzunluğunda ve 515 amino asit ihtiva eder. G6PD bakteri sinek, balık ve memelileri içeren geniş bir canlı topluluğunda bulunmaktadır. Tüm dokularda bulunan enzim, aynı tip monomerlerin biraraya gelmesi ile oluşan, dimerik, tetramerik ve hegzamerik yapılar şeklinde bulunabilir. G6PD'nin dimer tetramer ve hegzamer formda olmasının pH, ortamdaki Mg⁺² iyonu derişimi, protein derişimi ve iyonik kuvvet etkilemektedir. Enzim; 515 aminoasitten oluşan aktif enzim, iki molekül NADP⁺ ile bağlanmış herbiri yaklaşık 59,256 dalton

moleküler ağırlığına sahip iki monomer içeren bir dimerdir. Monomerlerin amino asit sıralarında türler arası benzerlik olmakla beraber primer, sekonder ve tersiyer yapıları arasında farklılıklar vardır. Enzimin amino ve karboksil uçlarındaki amino asit dizileri için kesin bir bilgi bulunmamaktadır. Bazı çalışmalar, amino uçta glisin varlığını göstermekte son çalışmalarda karboksil uçta lösin amino asidin bulunduğunu göstermektedir. G6PD enziminin katalitik aktivite gösterebilmesi için gerekli minimum kuaterner yapı dimerik alt birimler şeklindedir. Hücre içinde çoğunlukla dimer-tetramer karışımı halinde bulunur. En aktif formun hekzamer yapıda bulunduğu bildirilmiştir. Enzim NAD^+ 'yi koenzim olarak kullanabilir. Ancak bu durumda, normalin %4-10'u kadar aktivite gösterebilir. Enzim NADP^+ ve G6P'a farklı eğilimler gösterir. NADP^+ 'ye olan eğilimi çok daha fazladır. Fizyolojik şartlarda enzimin başlıca inhibitörleri, NADPH ve ATP molekülüdür (11,18,19,22,23,24).

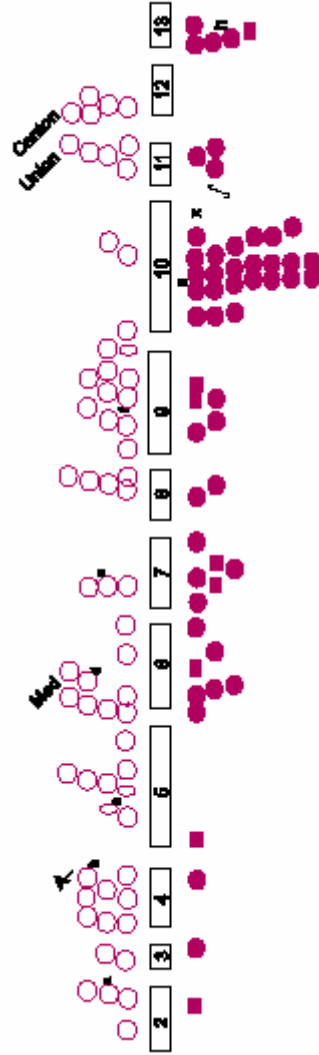
G6PD enziminin NADP^+ bağlayan yeri moleküler ve yapısal düzeyde henüz aydınlatılmamıştır. Ancak G6PD mutantlarının analizinden, 386 ve 387 nolu amino asitlerin, Arjinin ve Lizin'nin, NADP^+ bağlayan bölgede yer alabileceği tahmin edilmektedir. G6PD enziminin 205. amino asit Lizin'e bağlanmada, G6P'a kıyasla daha yüksek eğilime sahip olan pridoksal fosfat, G6P varlığında bu bölgeye bağlanarak enzim aktivitesinde %80 oranında kayba neden olmuştur. Buradan, G6P bağlayan bölgenin merkezinde 205. amino asidin, Lizin'nin bulunduğu bildirilmektedir (11,21-23).

Organizmada bu kadar önemli rol oynayan G6PD enzimi, karaciğer, yağ dokusu, adrenal korteks, tiroid, eritrosit, testis ve laktasyondaki meme bezi gibi dokularda aktif olmasına rağmen iskelet kasında düşük aktiviteye sahiptir (7).

G6PD enzim aktivitesinin kontrolü, enzimin kendi özelliklerinin ve eritrosit proteinlerinin aracılığı ile sağlanır. Redükleyici maddelere olan ihtiyacın artması ile, G6P'ın NADP^+ ile doyunluğu, dolayısıyla aktivitesi artar. Ancak, hücrede oksidatif stresin oluşması $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ oranını değiştirir ve hücrede sırasıyla;

- NADP^+ konsantrasyonu artar.
- NADPH 'ın inhibitör etkisi kalkar.
- Enzimin V_{\max} değeri aniden yükselir.
- PFY'na metabolik akım çok hızlanır.

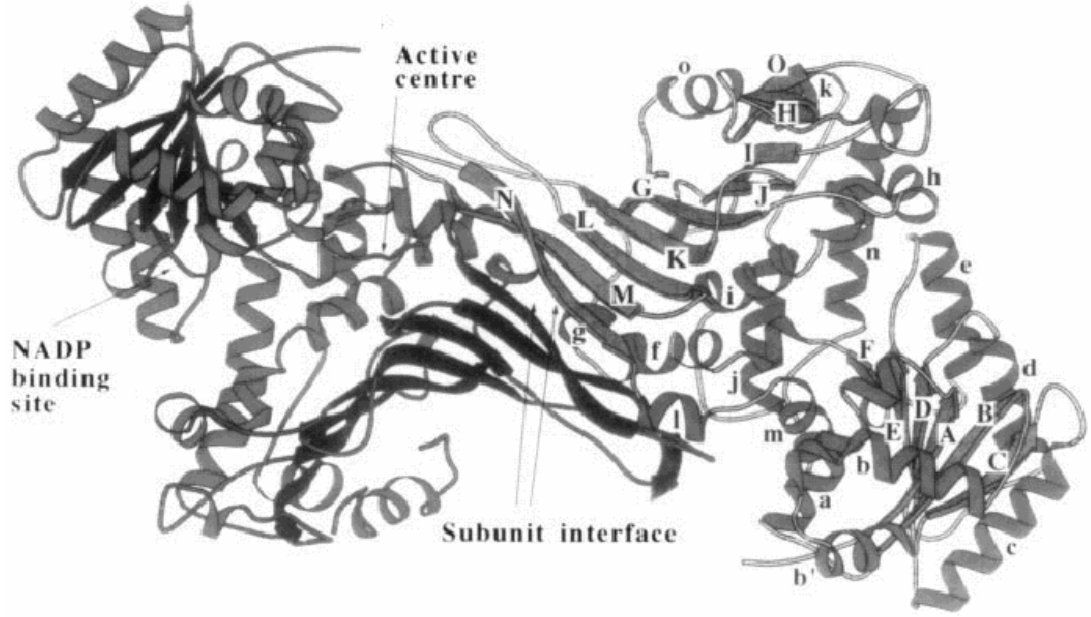
- G6P konsantrasyonu azalır.
- Hekzokinaz uyarılarak daha fazla glukoz, G6P'a dönüşür (7,11).



Şekil 1. 3. 4. a. Aminoasit bölgesinin değişimi G6PD eksikliğine neden olur. Numaralı kutucuklarda exonlar gösterildi. Açık halkalar sınıf 2 ve 3 varyantlarıdır, dolu halkalar sınıf 1 varyanttır, açık elipsoitler sınıf 4 varyantlarıdır. Dolu kutucuklar delesyonları gösterir, X anlamsız mutasyon ve J bağlı mutasyondur.

Mutasyonların gen bölgesine doğru yayılmasına rağmen bu mutasyonlar azdır. Sadece bu bölgede elektroforetik hareket düzensizliğinde önemli farklılıklar vardır ve özellikle NADP^+ 'nin düşük konsantrasyonlarında unstabildir. Bu yüzden önerilen çalışma NADP^+ 'nin bağlandığı bölgede olmalıdır. G6PD enziminin üç

boyutlu çalışmalarında insan enziminin temel yapısı, deşifre edilmiştir. NADP⁺'nin bağlanmasını sağlayan klasik β - α katlanmalarına sahip olduğu yerde ve exon2/exon3 sınırında parmak izini taşıyan GXXGXXA dizileri olduğu tespit edilmiştir (11). Tetramerik insan G6PD enziminin yapısı doğal tipler kullanılarak tespit edilmiştir ki bunlar 25-N terminal amino asidi bulunmadığı benzerleridir. Amino asit şifresi çözülmüş 10 ayrı exonda G6PD dimerinin aktif formda bulunmaktadır ki bu NADP⁺'nin stabil olması için gereklidir (11,18,19,21-23).



Şekil 1. 3. 4. b. Aktif G6PD dimerinin üç boyutlu modeli.

G6PD'e NADP molekülünün sıkıca bağlı bulunup bulunmadığı ek olarak katalitik NADP⁺'nin koenzim bağlı cep kalıntısına bağlı olup olmadığı sonucunun açıklığa kavuşturulması gerekmektedir. Suni olarak yapılan negatif yüklü 421. Asp rezidüsü bulunduran dimer merkezinde iç yüzde NADP⁺'nin etkisinin kararlı hale geldiği konsantrasyona bağlı olarak azaldığı gösterilmiştir. Dört farklı organizmanın G6PD sıra dizilerinin genel veri bankaları oluşturulmuştur. Amino asitlerin nasıl muhafaza edildiğine bakıldığında ilginçtir ki insanda G6PD eksikliğinde bu amino asit dizisi düzeltilerek değiştirilmektedir. Bu inceleme göstermektedir ki bu mutant tamamen farklı veya yetersiz oluşturulduğunda muhafaza edilen amino asitlerde değişiklik daha ölümcül veya etkisizdir. Diğer yandan yeni oluşan yüksek veya orta

derece gen oluşturulduğunda amino asitler korunmakta ve benzerlik %50-99 olmaktadır. Yer değişikliğinin olduğu yer düzensizlik için yeteri kadar önemli olmalıdır. Fakat yeteri kadar önemli olmasa da ölümcül olabilir. İncelendiğinde farklı noktalarda mutasyonların başarılı olması klinik önem derecesi ve korunmanın derecesi ile ilişkilidir. Klinik olara daha ciddi mutasyonlarda belirgin varoluşları haricinde özellikle Class I değişiklikler arasında amino asitlerin korunması daha önemli olmaktadır (19,23).

1. 3. 5. Biyokimyasal ve Moleküler Tanısı

Gelişmiş, basit tanı testleri G6PD enzim yetmezliğinin dünyada yaygın dağılımının incelenmesini izin vermektedir. Boyama ile renk değişikliği testi (Motulsky) büyük ölçüde Beutler'in florasana renk testinin yerini almıştır. Bu yetmezliği olan erkek hastaların tanımlanmasında ucuz ve anlaşılabilir bir methodur. Fakat her biri çok anemik veya yüksek retikülosit sayısına sahip olduğunda eksikliği hatalı yüksek veya hatalı normal sonuç vermektedir. Çok az yetmezlik farklılığı dahi hatalı olmaktadır. G6PD hakkındaki raporlarda bu durumlarda ve spot test sonucundaki bozukluğun doğrulanması gerekmektedir. Yenidoğanda tanıda karşılaşılan zorluklar, genç hücre sayısının çok olması ve transfüzyon yapılmasıdır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nün önerdiği tam olarak biyokimyasal tanımlamada yeni bir farklılık tarif edildiğinde önemlidir. Laboratuvarlar arasındaki farklılık dikkate alınmalıdır ve esas sebeplerden biride G6PD miktarındaki değişikliğin tahmini olmasıdır (11,18,19,23,24).

Heterozigot dişilerin tanısında kullanılan kontrol testleri güvensizdir. Çok sayıda heterozigot ve sınır G6PD aktivitesine sahip dişi olmasına rağmen hatta bir enzim çalışması daima kesin cevap vermeyebilir. Bu durumda bir dişinin durumu hakkında emin olmak için moleküler analiz yapılmalıdır. Basit bir enzim çalışması G6PD exon seviyesini yükselten polimerize zincir reaksiyonu çoğu durum hakkında cevap verebilir. Enzim aktivitesinde seviye, heterozigot dişilerin G6PD eksikliğinin klinik öneminde öncülük eder. Aktivite düşüşü hemizigot erkek bireylerde benzer bir risk oluşturacaktır (11,18,19,23,24).

Bu G6PD eksikliğinin (Class I) ciddi formdaki heterozigot dişilerde kullanışlı değildir. Enzim aktivitesindeki düşüş normal bir değişikliktir. Bu progenitör

hücrelerden oluşan kırmızı hücreler hakkındaki gerçeği izah edebilir. Alleldeki bozukluk intravasküler hayat döngüsünün kısalığını izah eder. Normal hücrelerde G6PD enzim fazlalığının önemi iki heterozigot Class I vakada hücre döngüsü arasında bulunmuştur. G6PD eksikliği çekirdekli kan hücrelerinin ömrünü ve çoğalmasını olumsuz etkilediği önerilmiştir. G6PD eksikliğinin moleküler esasının tariflenmesi kronik hemolizi bulunan bireyleri etkilediğinden direk ilgilendirmektedir. Bu şartlar karışık olduğundan ve sonradan olan ciddi mutasyonlar tariflenmiştir ki bunlar, genotip-fenotip görünüşünden ortaya çıkmaya başlar (11,18,19,23,24).

1. 3. 6. Klinik Belirtileri

G6PD eksikliği olan bireylerin çoğunda başlangıcı asemptomatik ve semptomların gelişiminde sadece oksidan stres sorumludur. G6PD eksikliği hayatı çoğu zaman etkilemez. Son zamanlarda standardize edilmiş spesifik deneysel çalışmalarda 10 yıl üzerindeki periyotta mortalite oranları 1756 erkekte, Sardina'da düşük bulunmuştur. Fakat iskemik kalp hastalığı, serebrovasküler hastalık ve karaciğer sirozunda mortalitede önemli artma olmuştur. G6PD eksikliği olan erkekler eksikliği olmayan kontrol grubu ile karşılaştırıldı. G6PD eksikliği olanlar arasındaki kanser riskinde azalmaya ilişkin daha önceki kayıtların doğruluğuna yönelik bir çalışma başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Tüm dokulardan salgılanan enzimin kontrol edilmesine rağmen eksikliğin klinik belirtileri ani bir şekilde ortaya çıkar. En yaygın klinik bulguları sarılık ve akut hemolitik anemi (bazı ilaçlarla) enfeksiyonla veya bakla yenmesi sonucu (favizm) ortaya çıkar (11,22).

1. 3. 6. 1. Kronik ve Non-sferositik Anemi

Nadir kalıtsal mutasyona maruz kalan kişiler (Class I G6PD varyantları) presipitan faktörlerin olmadığında aşırı hemolitik anemi meydana gelmesi geride kalan enzim aktivitesini daha da düşürmektedir. Farklılıklar tariflendiği, tanımlandığı gibi (akrabalarda hemen hemen aynıdır) dünyanın birçok yerinde endemik bölgelerde G6PD eksikliği tiplerinin yaygınlığının olup olmadığına aldırılmaz. Hemolizin ciddiyeti büyük farklılık gösterir. Çok sayıda hasta sık sık kan değişimi, yenidoğan

sarılık hikayesi verirler. Enfeksiyonların gelişimi ve ilaçların indüklediği hemoliz, safra kesesi taşı başlıca özelliği olabilir, splenomegali genellikle vardır. G6PD aktivitesi düşük dokularda ve nadir örneği granülosit yetmezliği, granülosit fonksiyon bozukluğu ile ilişkilidir ve hemoliz enfeksiyona duyarlılık arttığı için aniden ortaya çıkar (11,19,22,23).

1. 3. 6. 2. Yenidoğan Sarılığı

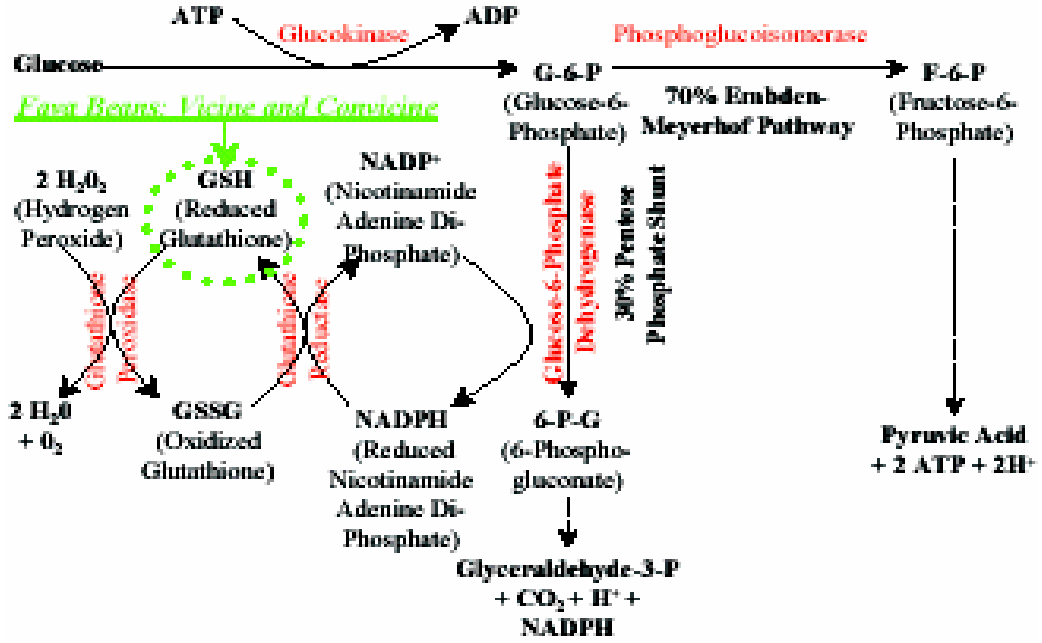
G6PD eksikliği neonatal hemoliz ve sarılığa sebep olan en yaygın enzim bozukluğudur. Batı Akdeniz kıyısı ve Afrikanın daha doğusu çok sayıda nüfus verisi elde mevcuttur. G6PD eksikliğinin meydana getirdiği yenidoğan sarılıklı tüm erkeklerin 1/3'den fazlası aydınlatılabilir, yine aynı oranda yenidoğan sarılık gelişimi (G6PD eksikliği sonucu) ortaya çıkartılabilir. Önceki gözlemlerde yenidoğan sarılık sıklık oranı Afrika soylarında Afrika'dan Amerika'ya gelenlerde önemli oranda düşüktü. Yenidoğan sarılığın ortaya çıkışında genetik faktörlerin etkili olduğu kadar çevresel faktörlerde etkilidir (11,28-31).

G6PD-A eksikliği olan tüm bireylerde her nasılsa yenidoğan sarılık riski artmaktadır ve tüm risk gruplarında kernikterus rapor edilmektedir. Halk sağlığı programları ile dünyanın bir kısmında kernikterus riskinde önemli azalma vardır. Fakat diğerlerinde bu azalma yoktur. Yenidoğan sarılık sıklığını yapan çevresel ve kültürel faktörlere oksidan ilaçlar, yenidoğan enfeksiyon sıklığı, hipoglisemi, asidoza maruz kalmasında buna dahildir. Yaygın hemoliz ve sıklık artışına neden olan yenidoğan eritrosit hemolizin ortaya çıkması uzun süre olmaktadır. Son zamanlarda deliller göstermektedir ki hemolizden özellikle bilirubin konjugasyonunun azalması ve atılması yenidoğan sarılığın patogenezinde esas rol oynadığı yolundadır. Hemolitik işlemi ek olarak ABO (kan grubu) uyumsuzluğu gibi hemolize yol açan küçük etkiler ve hiperbilirubinemidir. Bu gözlem ve çalışmalar ilk defa Sardina'da doğrulanmıştır. Kırmızı hücrelerdeki G6PD aktivitesi ile ilişkili değildir. Hiperbilirubinemi karaciğerde G6PD eksikliğinin neden olduğu karaciğer fonksiyon bozukluğu çok yaygındır (11.28,29).

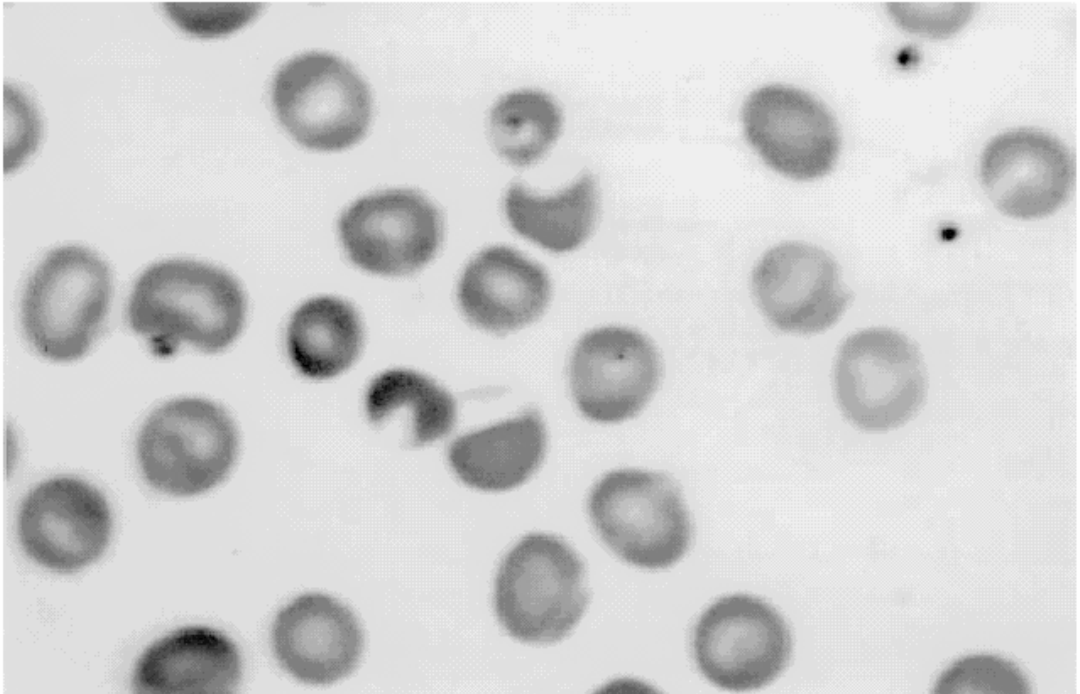
1. 3. 6. 3. Favizm

Bakla türü yiyeceklerin yenmesi sonucunda aniden hemolitik anemi meydana gelir. Baklada (*Vicia faba*) oksidan özellikte visin, konvisin, askorbik asit ve L-DOPA bulunmaktadır. Baklanın G6PD yetmezlikli bireylerde meydana getirdiği hemolitik etki esas olarak içeriğindeki toksik glikozidler olan visin ve konvisinden kaynaklanmakta ve favizm olarak isimlendirilen akut hemolitik anemiye yol açmaktadır. Visin ve konvisinin hidrolizi ile divisin ve izouramil açığa çıkmaktadır (şekil 1. 3. 6. 3.b). Ayrıca bakla tohumlarında bulunan β -glikozidaz, baklanın olgunlaştığı evrede çok yüksek miktarlara ulaşmakta ve hemolitik krizin daha ağır seyretmesine neden olmaktadır. Divisin süperoksit radikali (O_2^-)'nin oluşmasına yol açarak GSH'ı oksitlemektedir (şekil 1. 3. 6. 3.a.). Ayrıca baklada bulunan askorbik asit okside ve redükte divisin ile isouramil arasındaki redoks döngüsünü hızlandırarak hemolizi şiddetlendirici etki göstermektedir. Gözlemciler aile uzantısı olan duyarlı kişileri farketmiştir. Karakteristik ortaya çıkışı aniden akut hemolitik anemi şeklindedir. Bakla türü yiyeceklerin yenmesinden 24-48 saat sonra, solukluk, sarılık ve hemoglobinüri şeklinde ortaya çıkar. Akut renal yetmezlik yetişkinlerde gelişebilirken çocuklarda daha nadirdir. En yüksek oran 2-6 yaş çocuklar veya heterozigot etkilenmiş dişilerdir. Favizm donmuş, kurutulmuş, taze bakla türü yiyeceklerin alınmasından sonra gelişir. Hasat zamanının atması ve bakla ile beslenen annenin sütü ile beslenen bebeklerin annesini emmesi ile hemoliz başlar. Halbuki favizm eskiden sadece G6PD (özellikle Akdeniz tip G6PD)'nin polimorfik tipinin yetmezliği daha ciddi yetmezlik yaptığına inanılırdı. Tipik atakları Afrika kaynaklı kişilerde belgelenmiştir. Her nasılsa bakla türü yiyeceklere duyarlı G6PD eksikliği olanların hiçbirinde gözlenmemiştir ve hatta devamında ortaya çıkışında çarpıcı farklılıklar gösterirler. Bu farkların nedeni açık değildir. Baklanın yapısal olarak metabolizma edilmesi ve emilim farklılığı ile ilişkili olabilir. G6PD eksikliğinde eritrositlerde hemoliz başlatan heksoz monofosfat yolunun aktivitesinin artmasıdır (11,22,25,26,32,33,34).

G6PD and Fava Beans



Şekil 1. 3. 6. 3. a. G6PD eksikliği ile favizm ilişkisi.



Şekil 1. 3. 6. 3. b. Fava beans yenmesinin neden olduğu G6PD eksikliğine bağlı olarak oluşan akut hemolitik aneminin periferel kandaki görünümü (11).

1. 3. 6. 4. İnfeksiyonların Başlattığı Hemolizler

G6PD eksikliği olanlarda hemolizin en yaygın sebebi muhtemelen infeksiyondur. Çok sayıda bakteri, viral ve riketsiyal infeksiyon başlatıcı olarak özellikle infeksiyöz hepatit, pnömoni, tiroid ateş rapor edilmiştir. GİS ve üst solunum yollarının viral infeksiyonları G6PD eksikli çocuklarda bakteriyel infeksiyonlardan daha ciddi hemoliz yaptığı rapor edilmiştir (11,22).

1. 3. 6. 5. İlaçların Başlattığı Hemolitik Anemi

G6PD eksikliği ilk tariflenen araştırma sonucunda primaquinenin hemolitik etkisidir. Bunu takip eden zamanda G6PD eksikliği olan bireylerde son zamanlarda bulunmuş olan ilaçlar sorumlu tutulmuştur.

Ciddi hemoliz riski, genellikle tedavi süresi ve dozu ile ilişkilidir. Bu yüzden aşırı asetaminophen dozunda N-asetilsistein tedavisinin uygulanması ciddi hemoliz ile sonuçlanabilir. Klinik hemoliz ve sarılık tipik olarak tedavinin başlamasından sonra 2-3 günde meydana gelir. Hemoliz genellikle damar içindedir ve hemoglobüri ortaya çıkar. Retikülosit artışı bu duruma cevap olarak meydana gelir ve hemoglobin seviyesi 8-10 gün içinde tekrar artmaya başlar (11,22).

1. 3. 6. 6. Hemolizi Başlatan Diğer Durumlar

Diyabetik ketoasidoz G6PD eksikliği olanlarda hemolizi başlatabilir. Bu durum tam olarak kabul görmüş değildir. Şüphesiz diyabetik bireylerde kan glukoz seviyesinin normale getirilmesinde hemolizin olduğu rapor edilmiştir. Myokard enfarktüsü nadiren hemolitik anemiye başlatabilir. Kas harabiyeti orak hücreli anemi taşıyıcısı ve G6PD eksikliği olan bireylerin her birinde hemolizi başlattığı rapor edilmiştir (11,22).

1. 3. 7. Eritrosit Dışı Dokularda G6PD Eksikliğinin Etkileri

Hepatik G6PD eksikliği yenidoğan hiperbilirubinemisinin önemli bir sebebi olabilir. Nötrofil fonksiyon bozukluğu Class I'li dişilerde rapor edilmiştir. G6PD eksikliği olanlarda nötrofil fonksiyonu çalışmaları nitrik oksit, süperoksit, ve hidrojen üretiminde bozukluk olduğunu göstermektedir. Bu değişiklikler klinik olarak önemli

değildir. G6PD eksikliği olan bireylerde trombosit fonksiyonları bozulabilir ama bu klinik olarak anlamlı bir sonuç değildir (11).

1. 3. 8. Hemolizin Tedavisi ve Önlenmesi

En önemli fikirlerden bir tanesi hemolize sebep olan etkenlerden kaçınmadır. Yenidoğan döneminde sağlık eğitimi ile klinik komplikasyonların sıklığı önemli bir şekilde azaltılabilir. Sardina'nın kuzeyinde olduğu gibi, burada favizmin görülmesinde azalma görülmüştür ve Singapur'da hemen hemen kernikterus yenidoğanda görülmemektedir. Hepatit A'ya karşı aşılama enfeksiyonların sebep olduğu hemoliz ile ilişkili ölüm oranlarını azaltacağı öne sürülmüştür. Class I'li bireyler ve kronik hemolizlilerde belli durumlarda çeşitli değişken derecede anemi vardır. Ciddi derecede anemi eritrosit transfüzyonu gerektirebilir ve transfüzyonun tekrarlanma gerekliliği bir splenektomi endikasyonu olabilir ve bu bazı bireylerde faydalı olabilir. Folik asit 5 mg kronik hemolizli hastalara uzun süre verilmeli ve akut hemolitik durumlarda takip eden 2-3 hafta verilmelidir (11,22).

Vitamin E ve selenyumla uzun dönem tedavi serbest radikallerin sebep olduğu oksidan hasarın artışının azaltılmasında teorik olarak faydası olabilir. Klinik çalışmalar herhangi bir faydası olduğunu göstermemiştir. Yenidoğan sarılığı, G6PD eksikliğine bağlı ise erken tedavisi ve takibi gereklidir. Bilirubin seviyesi ile ilgili tedavi yöntemi hakkında bazı anlaşmazlıklar vardır. Genel kabul gören sarılık diğer sebeplerden (ör: anne sütü sarılığı) olsun veya olmasın erken tedavi edilmelidir. Hepatik bilirubin metabolizma bozukluğunun eşlik ettiği G6PD eksikliğinde meydana gelen bilirubin konsantrasyonunun 150 mmol/l'yi aştığı durumda fototerapi ile erken müdahale etmek gerekir. Son zamanlarda yapılan bir çalışma bilirubin konsantrasyonu 300 mmol/l'yi aştığı durumlarda transfüzyon kullanılabileceğini göstermiştir (11,22).

1. 3. 9. G6PD'nin Diyetsetel Regülasyonu

G6PD geni X kromozomu üzerinde uzun kolun 28. band bölgesinde lokalize (Xq28) ve yaklaşık 18kb uzunluğundadır. G6PD'nin promotör geni TATA benzeri seri, TTAAAT ve birçok stimülatör protein1 (Sp1) elementleri içerir, fakat CAAT

elementi içermez. S1 nükleaz ve fare G6PD mRNA'sının geniş analizi karaciğer ve yağ dokusunda kullanılan transkripsiyonel başlangıç bölgesini gösterir.Üç DnaI hipersensitivite Hss-1(-1000bp) ve Hss-2(-400bp) tüm dokularda bulunur. Fakat intron2 (+1500bp)'deki Hss-3, karaciğere spesifiktir. Translasyon başlangıç bölümü exon-2 de lokalizedir ve ratlarda, farelerde ve insanlarda bulunur. Exonların ve intronların sayısı ve exonların serisi ve boyutu yüksek ökaryotlarda korunur. İnsan, fare ve ratlar arasındaki G6PD cDNA serisinin benzerliği %87'dir. Fare ve ratlar arasındaki cDNA serisinin benzerliği yaklaşık %97 kadardır. 3üssü-çevrilemeyen bölgede (3'-UTR) daha fazla farklılık vardır. En sonda bulunan exon (exon 13), 800 nükleotiden uzun bulunmuştur ve translasyon durdurucu kodu içerir. 3'-UTR 600 nükleotit uzunluğundadır ve tek poli(A) bölümünü içerir. İkinci introndaki genin yapısı 11 kb'dir ve genelde genin yarısı kadardır. Bu büyük boyutlu intron fareler, ratlar ve insanlarda korunur (15).

G6PD aktivitesi ve mRNA miktarı dokular arası farklılık gösterir ve büyüme hızında indirgeyici biyosentetik reaksiyonlarda dokuya spesifik farklılıklar gösterir. Üstelik G6PD üretimi sadece birkaç dokuda hormonal ve diyetel faktörlerle düzenlenir. G6PD üretimi karaciğer ve yağ dokusunda düzenlenir, aktivitesi yağ asit biyosentez hızıyla ilişkilidir. G6PD'nin bu üretimi aynı zamanda diyet karbohidratları tarafından süt veren meme bezlerinde indüklenir. G6PD üretiminin diyetel regülasyonu majör olarak karaciğerde gerçekleşir (15).

1. 3. 9. 1. G6PD ve Hücresel Büyüme

G6PD aktivitesindeki değişiklikler hücre büyüme hızındaki değişikliklerle paraleldir. Bu nükleotid biyosentezi için gerekli olan riboz 5-fosfatın PFY'ndan sağlanması için başlangıçta gereklidir ve hücrenin redoks durumunu düzenlenmesi için G6PD rol oynar. Oksidatif strese olduğu gibi G6PD aktivitesinin regülasyonu ile benzer şekilde hem hücre büyümesinde hem de G6PD aktivitesinde birçok hücre türünde rastlantısal değişiklikler gözlenmiştir. G6PD aktivitesi çoğalan nodüllerde ve tümörlerde artmıştır. Serum Epidermal Growth Faktör (EGF) ve platelet büyüme faktörü gibi büyümeyi uyaran faktörler fibroblast ta ve epitelial hücre hatlarında G6PD aktivitesini ve DNA sentezini arttırır. EGF gibi hepatosit büyüme faktörünün uyarılması G6PD aktivitesinde ve DNA sentezinde paralel değişikliklerle sonuçlanır.

Aynı hücrelerin içinde, EGF'nin inkübasyonu ile birlikte malik enzim üretimi azalır. G6PD'nin beslenme düzenlenmesi allosterik veya fosforilasyon ile meydana geldiği düşünülmese de rağmen growth faktörler tarafından G6PD regülasyonu, G6PD enziminin intraselüler membranlardan salınımını ve aktivasyonunu içerir. Bu mekanizmanın detayları kompleks bir yapı oluşturduğu gösterilmiştir (15).

1. 3. 10. G6PD'nin Diyetel ve Hormonal Regülasyonu

Diyetel ve hormonal faktörler tarafından G6PD aktivitesinin düzenlenmesinin amacı yağ asidi sentez etme kapasitesi olan hücreleri sağlamaktır. Böylece G6PD'nin regülasyonu sadece yağ dokusu ve karaciğer gibi yüksek lipojenik kapasitesi olan dokularda gözlenir. Bununla birlikte humoral faktörlerin belirlenmesi kültür hücreleri ve intact hayvanları kullanarak geliştirilen modelleri ihtiyaç gösterir. Özellikle kültür hücreleri önemlidir. Çünkü canlı hücre hatlarında besinler ve hormonlar tarafından G6PD üretiminin düzenlenmesi yok olmuştur. Bunun için tek tabakalı kültürlerdeki primer hepatositler bu analiz için primer aracı sağlamaktadır (15).

1. 3. 10. 1. Diyetel Durum

1. 3. 10. 1. 1. Açlık ve Tokluk Durumu

Uzun süren açlık durumu rat karaciğer G6PD aktivitesini düşürür. Serbest yağlarla beslenmeden sonra yüksek karbohidratlı diyet G6PD aktivitesini normal beslenme durumundan daha fazla arttırır. Bu olay çok hızlı bir şekilde gerçekleşir. Bu hızlı gelişimin moleküler temeli çok iyi anlaşılammıştır. Fakat insülin, glukokortikoidler ve yüksek karbohidrat, düşük yağlı diyet ihtiyaç gösteriyor gibi görünür. Açlık ve tokluk durumu metabolik regülasyon çalışması için yararlı bir modeldir. Çünkü diyetteki farklılıklar belirlidir ve enzim aktivitesinde büyük değişikliklerle sonuçlanır (15).

1. 3. 10. 1. 2. Diyet Karbohidratların Tipi ve Miktarı

Yüksek karbohidrat tüketimi, yağdan fakir herhangi bir diyet G6PD aktivitesinde büyük yükselmelere neden olur. G6PD aktivitesindeki en büyük değişiklik ratlar

glukoz veya fruktoz içeren diyetle beslendiğinde gözlenir. Glukoz ve fruktoz hepatik G6PD aktivitesini hormonlardan bağımsız olarak yükseltir. Bu nedenle diyabetik ratlarda glukoz yerine fruktoz ile beslenme ile hepatik G6PD aktivitesi arttırılabilir. Ayrıca glukoz konsantrasyonu artınca, primer hepatosit kültüründe G6PD aktivitesi hormonların yokluğunda sıfırdan yirmibeşe yükseltir. Halen bu etkiler araştırmacılar tarafından tam olarak gözlenememiştir. Karbohidrat stimülasyonunu etkileyen faktörün glukoz veya fruktoz metabolizmasında orta derecede olduğu düşünülmektedir. G6PD üretiminde glukozun etkisi indirekt olabilir ve hücrelerin büyüme hızında ve redoks durumundaki değişiklikleri yansıtır (15).

1. 3. 10. 1. 3. Diyet Yağın Tipi ve Miktarı

Karbohidratların uyarıcı etkisine bağlı olarak poliansature yağ asitleri G6PD aktivitesini hem intakt hayvanlarda hem de kültürdeki primer hepatositlerde inhibe eder. Poliansature yağ tarafından G6PD inhibisyonu; yüksek karbohidratla beslenme, serbest yağ asitlerinden fakir poliansature yağ ile ve aç kalan ratların poliansature yağlarla birlikte desteklenen yüksek karohidratlı diyet ile beslemesi ile meydana gelir. Birçok kanıt G6PD aktivitesinin inhibisyonunu özellikle diyetin poliansature yağ içeriğine bağlı olduğunu gösterir. Palmitat ve stearat gibi sature yağ asitlerinin, oleat gibi monoansature yağ asitlerinin diyetle eklenmesi G6PD aktivitesini inhibe etmez. Bununla birlikte G6PD aktivitesinin inhibisyonu karbohidrat alımındaki azalmanın sadece bir sonucu olmadığını gösterir. Çünkü diyetle yeterli miktarda poliansature yağ asidi eklenimi esansiyel yağ asitlerinde ileride G6PD aktivitesini inhibe ettiği için G6PD aktivitesinin inhibisyonu hayvanlardaki esansiyel yağ asidi eksikliğinin bir sonucu değildir. Poliansature yağın inhibisyonu hayvanlardaki diyetle protein kalori oranının değişikliğin sonucu değildir. Ratlarda % 20 çiçek yağından elde edilen enerji G6PD aktivitesini %20 sığır yağından elde edilen enerjiden daha iyi inhibe eder. G6PD enzim aktivitesindeki düşüş araşidonat (20:4 n-6) ve eicosapentonat (20:5 n-3) ile inkübe edilen primer rat hepatositlerinde gözlendi. Primer rat hepatositlerindeki G6PD gen üretiminin inhibisyonu poliansature yağ asitleri ve sature olmayan veya monoansature yağ asitleri tarafından etkilenir. Poliansature yağın inhibitör etkisi karaciğerdeki G6PD regülasyonu için tektir. Yağ

dokusundaki G6PD regülasyonu diyetteki poliansütüre yağın varlığından etkilenmez (15).

1. 3. 10. 2. Hormonal Durum

1. 3. 10. 2. 1. Beslenme Durumuna Cevap Olarak Hormonların Rolü

G6PD regülasyonunda açlık ve tokluk durumlarında insülin ve glukagon rol oynar. Streptozotosinle tedavi edilen ratlarda pankreatit β hücreleri yok olur, insülin üretimini durdurur ve toklukta G6PD aktivitesinin indüklenmesini engeller. Diyabetik ratlarda karaciğer ve yağ dokusundaki G6PD aktivitesi aç kalan hayvanlardaki aktivite ile benzerdir ve insülinle tedavi G6PD aktivitesini normal seviyelere getirir. İnsülin tokluk durumunun en önemli göstergesidir. Glukagon veya cAMP G6PD aktivitesinde ters etkiye sahiptir. Glukagon enjekte edilen ratlar tokluk boyunca hepatic G6PD aktivitesinin indüksiyonunu sağlar ve bu enzim sentez hızının azaltılması ile olur. Açlık boyunca glukagon seviyelerinin yükselmesi nedeniyle bu hormon açlık durumunun primer göstergesidir.

Troid ve adrenal bezlerdeki hormonlarda G6PD aktivitesini düzenler. Troidektomi G6PD üretimini azaltır ve troid hormonu (T_3) ile tedavi G6PD üretimini artırır ki bu G6PD mRNA'daki artışı içermez. Bununla birlikte G6PD aktivitesindeki artış normal tiroid durumundan hipertroidiye geçiş boyunca enzim sentezindeki artış ve mRNA fazlalığı ile birliktedir. Yüksek sükröz diyeti hipertroidiye bağlı olarak G6PD aktivitesinde ve mRNA'daki artışla paraleldir. Adrenalektomi tok ratlarda G6PD aktivitesinde büyük bir artışa neden olur. Bu toklukla indüklenme glukortikoid dağılımını artırır. Aktivite üzerindeki bu etkiler enzim sentez hızındaki değişikliklerin bir sonucudur. Böylece, serbest yağ asidi, yüksek karbohidratlı diyet G6PD aktivitesini belki de artırırken çok az tiroid ve adrenale ihtiyaç gösterir (15).

Hormonal faktörler tarafından G6PD regülasyonu primer rat hepatosit kültüründe gözlenir. G6PD aktivitesinin ve mRNA seviyesinin indüksiyonu karbohidrat ve insüline cevap olarak hepatosit kültürlerinde tok intakt hayvanlardaki cevabı uyarır. İnsülin primer rat hepatosit kültürlerindeki G6PD aktivitesini indükler. İnsülinle indüklenen G6PD aktivitesindeki artış enzim protein sentezi ve G6PD

mRNA'sındaki fazlalığın hızındaki değişikliklerle paralellik gösterir. Böylece insülin tarafından bloklanan sinyal üretimi inhibitörlerin aynı zamanda G6PD üretimindeki stimülatör etkiyide bloklar. Çünkü insülin aynı zamanda hepatositlerdeki glukoz metabolizmasını arttırır, bu noktada insülin aktivitesinin G6PD üretiminde direkt veya indirekt rolü olduğu ve bunun glukoz metabolizmasını arttırdığını söylemek zordur. Glukokortikoidler rat hepatositlerindeki G6PD aktivitesini pozitif regülatörü olduğu rapor edilmiştir. Glukokortikoidler ve insülin her ikisi de G6PD mRNA birikimini ekleme tarzında stimüle eder. Fakat bu regülasyonun moleküler mekanizması tanımlanamamıştır. Glukokortikoidler linoleat ile G6PD üretiminin inhibisyonunu bloke eder (15).

Glukokortikoid ve yağ asit hareketi arasındaki ilişki glukokortikoidler tarafından yağ asidi metabolizmasının inhibisyonunu gösterir. Bu aktif metabolik üretimini bloklayarak G6PD üretimini inhibe etmesine ihtiyaç gösterir. Bununla birlikte T₃ ve glukagon her ikisi de intact hayvanlardaki G6PD aktivite değişiklikleri, kültür hepatositlerindeki G6PD aktivitesinde etkisi yoktur. Böylece intact hayvanlarda T₃ ve glukagonun etkisi indirekt olabilir (15).

1. 3. 11. G6PD Üretimini Düzenleme Mekanizmaları

Herhangi bir enzimin aktivitesi birçok adımda düzenlenebilir. Değişiklikler enzimin katalitik etkinliği ve/veya hücrede bulunan enzim miktarının değişikliği ile meydana gelir. Genel olarak kabul edilen görüş G6PD aktivitesi diyetsel değişikliklere cevap olarak allosterik veya kovalent değişikliklerle oluşmaz. Daha önceki raporlar G6PD enziminin irreversibil (geri dönüşümsüz) inaktivasyonu ile uyumluydu. Palmitoil CoA invitro, kovalent olarak bağlandığı ve G6PD aktivitesini inaktive ettiği ve antikorlar seviyelerinin düşük olarak ölçüldüğü gözlenmiştir. Ayrıca G6PD aktivitesi intraselüler membranlardan salınan bağlı enzimlerin mekanizması ile growth faktörler ve oksidan stres ile stimüle edilir. Diyetsel durum tarafından G6PD'nin regülasyonu sentezindeki değişiklikler ile çoğunlukla hesaplanabilir. Böylece kısa süreli düzenleme mekanizmaları bu tipin metabolik kontrolü ile ilişkili olduğu düşünölmüştür. G6PD'nin katalitik etkinliğindeki herhangi bir değişiklik selüler G6PD aktivitesinin temporal regülasyonunu sağlayabilir (15).

G6PD enzim aktivitesindeki artış G6PD proteindeki artış ile paralellik gösterir. Keza diyet lipidlerinin kullanımı G6PD protein miktarını azaltır. Karaciğer ve yağ dokusundaki diyetel ve hormonal durumlar gözden geçirildiğinde G6PD aktivitesindeki değişiklikler enzim sentez hızındaki değişikliklerle hesaplanabilir. Aynı şekilde, G6PD protein sentezinin hızı yağ tüketim diyeti boyunca %96 azalır. G6PD enzim aktivitesinin %91'nin rastlantısal olarak inhibisyonu ile bu olay gerçekleşir. Degradasyon hızındaki değişiklikler hormonal ve diyetel değişikliklere bağlı olup olmadığı tartışmalıdır. Yüksek yağ diyeti tüketimi rat karaciğerinde enzimin yarıömrünü 16 saatten 6 saate düşüğü rapor edilmiştir. Halen diyetteki yağın enzim kaybolma hızına etkisi olmadığı rapor edilmiştir. Enzim sentez hızındaki değişiklikler diyetel farklılıklar boyunca enzim aktivitesindeki değişiklikleri hesaplayabilir. Enzim turnover hızındaki değişiklikler G6PD aktivite miktarını değiştiren hücrenin hızını arttırabilir (15).

1. 3. 12. G6PD'nin Kalıtımı

G6PD enzim yetmezliğinin kalıtımı X'e bağlı kalıtım gösterir. Sağlıklı geni X şeklinde kusurlu geni de X⁻ şeklinde gösterirsek;

- Erkekler hemizigot yetmezlikli (X⁻Y) olur.
- Dişiler homozigot yetmezlikli (X⁻X⁻) veya heterozigot yetmezlikli (XX) olabilir.

Lyon hipotezi:

Bu hipoteze göre embriyonel gelişimin erken safhalarında dişilerde X kromozomlarından birinin inaktivasyonu ile iki X kromozomundan biri aktif konuma gelir. Bu haliyle diş gen aktivasyonu bakımından erkekle aynı düzeye sahiptir. Bu teoriye göre:

- Embriyonel gelişimin erken safhalarında dişilerin her hücresinde iki X kromozomundan sadece biri aktif, diğeri ise inaktiftir.
- İki X kromozomundan hangisinin aktif kalacağı gelişimin erken safhalarında rasgele belirlenir. Ayrıca sözü edilen X kromozomu anneden veya babadan olabilir.

- Çoğalan her hücrede aynı X kromozomu inaktif yapısını korur ve yavru hücrelere bu haliyle aktarılır.

Bu nedenle, G6PD geni bakımından kadınların iki ve erkeklerin bir kopya taşımalarına karşın, G6PD enzim düzeylerinin her iki cinste de aynı bulunmasının sebebi budur. Babası normal enzim aktivitesi gösteren, hemizigot G6PD yetmezlikli bir erkek çocuğa sahip heterozigot yetmezlikli dişiler, normal enzim aktivitesi gösterebilirler. Böyle bireylere zorunlu heterozigot adı verilir. G6PD yetmezliğinden kaynaklanan sağlık sorunları daha çok hemizigot erkeklerde ve homozigot dişilerde ortaya çıkar (22,25,26).

1. 3. 13. G6PD Varyantları

G6PD yetmezliği dünyada 400 milyondan fazla insanı etkileyen çok yaygın genetik geçiş gösteren bir hastalıktır. Enzim aktivitesi ve elektroforetik mobilitesine göre 4 genel varyant bulunmaktadır. G6PD genotip olarak 'Gd' ile sembolize edilir.

Gd B: Normal enzim aktivitesine ve elektroforetik mobiliteye sahiptir.

Gd B⁻: Akdeniz varyantı olarak ta bilinmektedir(Gd^{Akdeniz563T}). Elektroforetik mobilitesi Gd B'ye benzer şekilde normal mobilite gösterir. Enzim aktivitesi % 10'nun altındadır

-Gd A⁺: Afrika varyantı olarak bilinmektedir. Afrika da yaşayan erkeklerin %20'sinde görülür. Enzim aktivitesi normal, elektroforetik mobilitesi hızlıdır (17,21,23-26).

-Gd A⁻: Elektroforetik mobilitesi hızlı, enzim aktivitesi %5-15 arası gözlenir ve zenci ırkta %11 sıklıkta sıklıkta karşılaşılır(16,20-25).

Gd A⁺ ve Gd A⁻'nin enzim aktivitesi ve elektroforetik göç dışında kalan diğer kinetik özellikleri Gd B⁺ ile büyük benzerlik gösterir. Gd A⁺ ve Gd A⁻ varyantlarının Afrika'ya özgü olduğu bilinmekle beraber, İtalya, İspanya gibi Güney Avrupa, Güney Doğu Asya, Orta Doğu ve Güney Amerikalı beyazlarda da görülmektedir (19,21-24).

Table 1. Molecular characterization and biochemical properties of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) variants associated with chronic non-spherocytic haemolytic anaemia.

Name	Population ^a	Exon	Nucleotide substitution	Amino acid substitution	Mobility	Activity (% of N)	K_m G6P (μ M)	K_m NADP (μ M)	2-dG6P (%)	dNADP (%)	Heat stability ^b	pH optimum	K_N NADPH (μ M)	Reference
Honira	Solomon Islands	2	99 A → G	33 Ile → Met										13
Sunderland	English	11	1360 C → T	454 Arg → Cys	Slow									14
Kozukata	Japanese	2	105–107 del	35 or 36 Ile del	Slow									15
Swanes	Welsh	3	159 G → C	53 Trp → Cys	Normal	0.9				15				16
Vancouver	Canadian	4	224 T → C	75 Leu → Pro	Normal	0.1								17
		5	317 C → G	106 Ser → Cys										
		6	544 C → T	182 Arg → Trp										
Valladolid	Spanish	6	592 C → T	198 Arg → Cys	Fast	9.6	41	9	8.3	52	Normal	Normal		18, 19
Barcelona	Spanish	5	406 C → T	136 Arg → Cys	Fast	1.4	40	6	5	60	Normal	Normal		16
Plymouth	English	6	488 G → A	163 Gly → Asp	Fast	<0.1	48							20
Vollendam	Dutch	6	514 C → T	172 Pro → Ser	Fast									21
Shimshu	Japanese	6	527 A → G	176 Asp → Gly	–									
	English				Slow	0.3	–	High	Low	Low	–	–		
					Slow				10	41.7	–	–		
Chikugo	Japanese	6	535 A → T	179 Ser → Cys										15
Tsukui	Japanese	6	561–563 del	188 or 189 er del	Slow	1.5	100	4	<4	13	++	Normal	12.6	22, 23
Santiago	Chilean	6	593 G → C	198 Arg → Pro	Slow	5	50	43	<4	–	++	–	–	24, 25
Minnesota	USA-white	6	637 G → T	213 Val → Leu	Slow	9	88	4	<4	46	++	Normal	22	26, 27
Marion	USA-white	6			Normal	3	51	7	<4	37	++	Normal	10	
Gastonia	German/Dutch				Slow	4	66	7	<4	41	++	Normal	18	
Le Jeune														
Haribou	Greek	7	648 T → G	216 Phe → Leu	Normal									28
North Dallas	USA	7	683–685 del	229 Asn del										15
Ashikawa	Japanese	7	695 G → A	232 Cys → Tyr	Slow	3.8	29.8	18.2	7.1	109	+	Bimodal	2.1	12, 29
Durham	USA	7	713 A → G	238 Lys → Arg	Slow	25.3	31	7.4	7.1	67	++	Normal	10	30
Stonybrook	USA	7	724–729	242–243 Gly and Thr del	Slow	5								31
			GGCACT del											
Wayne	German	7	769 C → G	257 Arg → Gly	Fast	6	78.1	11.5	5.1	30.9	++	8.1	20.3 (Normal)	27, 32
Cleveland	USA-white	8	820 G → A	274 Glu → Lys	–	<0.1	–	–	14.8	45.3	–	–	–	16
Corum	Turkish	8			Slow	<0.1	–	–	9.5	167	–	–	–	16
Wexham	English	9	833 C → T	278 Ser → Phe	Normal	1	25.9	6.6	7.8	67	++	Bimodal	–	31, 33
West Virginia	USA-white	9	910 G → T	303 Val → Phe										15
Omiya	Japanese	9	921 G → C	307 Glu → His										34
Nara	Japanese	9	953–976 del	319–326 del										
	Portuguese													
Manhattan	USA	9	962 G → A	321 Gly → Glu										15
Iwatsuki	Japanese	10	1081 G → A	361 Ab → Thr										15

Table 1 continues over the page

Tablo 1. 3. 13. a. Kronik non-sferositik hemolitik anemi ile ilişkili G6PD varyantlarının biyokimyasal özellikleri ve moleküler karakterizasyonu.

Table 1. Continued.

Name	Population ^a	Exon	Nucleotide substitution	Amino acid substitution	Mobility	Activity (% of N)	K _m G6P (μM)	K _m NADP (μM)	2-dG6P (%)	dNADP (%)	Heat stability ^b	pH optimum	K _m NADPH (μM)	Reference
Serres	Greek	10	1082 C → T	361 Ala → Val										11
Loma Linda	USA-Mexican	10	1089 C → A	363 Asn → Lys	Slow	0.8	69.6	7.9	<4	60.4	++	Normal	9.5	26
Calvo Mackenna	Italian	10	1138 A → G	380 Ile → Val		<20								35
Riley	North European	10	1139 T → C	380 Ile → Thr										35
Olemeuc	Czech	10	1141 T → C	381 Phe → Leu										31
Tomah	Portuguese	10	1153 T → C	385 Cys → Arg	Slow	1.1	42	7.8	<4	40	++	8.5	15.4	36, 37
	Spanish	5												
Lynwood	USA	10	1154 G → T	385 Cys → Phe	Slow	0	76	18	3.3	39	++	Bimodal	-	15
Madrid	Spanish	10	1155 C → G	385 Cys → Trp										18
Girona														
Barcelona G50														
Iowa	USA-white	10	1156 A → G	386 Lys → Glu	Slow/Normal	12.5	65	4.4	4.1	47.4	++	Normal	15.8	25, 36, 38, 39
Walter Reed	English/Dutch				Slow	5	40	5.4	<4	44.7	++	Normal	12.8	
Iowa City	USA-white				Normal	1.3	48	6.9	<4	46	+	Normal	11.6	
Springfield	USA-white				Normal	11	33	4	<4	41	++	Normal	4	
Guadaluajara	Mexican	10	1159 C → T	387 Arg → Cys	Fast/Normal	14.2	36.4	5.3	4.5	68.8	Normal	Normal	22	24, 40, 41
	Irish				Normal	1.5	-	-	15	23	-	-	-	
	Japanese (2)					3.5								
	USA													
	Danish													
	Indian													
	Spanish													
Mt Sinai														
	Italian	10	1159 C → T	387 Arg → Cys										
	Genova	5	376 A → G	126 Asn → Asp										
	Worcester	10	1160 G → A	387 Arg → His										
Beverly Hills	Italian				Slow	<0.1	41	15	<4	61	++	Bimodal	-	42
Genova	Italian				Slow	1.7	180	2.8	11	13.7	++	Bimodal	-	12, 36, 43-46
Worcester	USA-white				Slow	<0.1	11.2	61	<4	21	++	<8	-	
Iwate	Japanese				Slow	2	37	40	<4	51	++	Normal	3	
Niigata	Scottish				Slow	1.8	47	7.3	32	37	++	Acidic	2.3	
Yamaguchi	Slovak				Slow	3.5	37	15	4.1	94	++	Normal	7.6	
Hartford	USA													15
Pratts	Czech	10	1162 A → G	388 Asn → Asp										31
Wisconsin	USA	10	1166 A → G	389 Glu → Gly										35
Nashville	USA	10	1177 C → G	393 Arg → Gly										26, 47
Anaheim	USA-white	10	1178 G → A	393 Arg → His	Slow/Normal	3	87-120	16-3.8	5	37	++	Normal	-	
Pertici	European				Fast/Normal	16	112	12	<4	37	++	Normal	-	
Calgary	Italian				Slow	<1	146	12 (N)	4.3	33.1	++	7	3.7	
	Canadian													
	Portuguese													
	Israeli													
	Finnish/Swedish													
Alhambra	USA-white	10	1180 G → C	394 Val → Leu	Slow	14.5	55	2.6	<4	-	+	>8	3.3	24, 48

Table 1. 3. 13. b. Kronik non-sferositik hemolitik anemi ile ilişkili G6PD varyantlarının biyokimyasal özellikleri ve moleküler karakterizasyonu.

Table 2. Clinical and haematological data of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) variants associated with chronic non-spherocytic haemolytic anaemia. For references, see Table 1 above.

Molecular variant	Origin	Age at diagnosis	NNJ	Exchange transfusion	Other transfusion	Splenomegaly	Splenectomy	G6PD activity (% of N)	Hb steady (g/dl)	Hb crisis (g/dl)	Reticulocytes (%)	Total bilirubin (μ mol/l)	Unconjugated bilirubin (μ mol/l)
Swazee	Wales	29 years	Yes	-	-	-	No	0.9	11.9	-	13.9	-	-
Valladolid	Spain	70 years	Yes	No	No	-	No	10	13.8-14.2	10.3	3.6-6.0	22-113	-
	Spain	25 years	Yes	-	Yes (multiple)	Yes	No	1.4	8.2	7.2	20-29	26-37	20-32
Plymouth	England	45 years	-	-	(multiple)	-	No	<0.1	13-14	12.5	5	-	-
Shimizu	England	54 years	-	-	-	-	No	0.3	12-14	-	9-17	-	-
Tsukui	Japan	20 years	Yes	-	-	-	No	1.5	13.8	13.2	3.5-6.6	44.5	-
Harilaou	Greece	Birth	Yes	No	Yes (multiple)	-	No	-	-	-	-	-	-
Ashikawa	Japan	6 years	Yes	-	Yes (multiple)	Yes	No	3.8	-	4.9	13.1	42.7	29
Durham	Greece	5 years	Yes	No	Yes (1)	-	No	25.3	10.1	-	12	43-359	-
Wayne	Germany	14 years	Yes	-	Yes (1)	Yes	Yes	6	14.1	5.5	0.3-7.9	68.4	26
	Germany	10 years	Yes	-	Yes (1)	Yes	Yes	10	12.5	4.7	1-4	35.9	-
Cleveland	Turkey	10 years	-	-	-	-	No	<0.1	10-12	4	2-18	-	-
Wexham	England	-	Yes	-	-	-	No	<0.1	12	5.6	16	-	-
West Virginia	USA-white	Birth	Yes	-	No	-	No	6.9	9.7-10.5	-	13.2-16.8	239-286	173-214
Nara	Portugal	6 months	Yes	Yes	Yes (1)	2 cm	No	0	10-11.8	4.0	14.9	11	1.7
	Japan	8 months	Yes	Yes	Yes (21)	7.5 cm	No	0	8	5.5	'marked'	-	-
Serres	Greece	3 months	Yes	No	Yes (8)	2-5 cm	Yes	-	12	-	5.2	120	115
Calvo Mackenna	Italy	Birth	Yes	Yes	Yes (3)	-	No	-	12	-	15-37	-	-
Riley	Europe	2 weeks	-	-	Yes (3)	-	No	<20	8-9	3.6	15-37	-	-
Tomah	Portugal	14 years	Yes	Yes	Yes (6)	1 cm	No	11.5	11.8-12.3	4.4	11.5	37	1
	Spain	-	-	-	-	-	No	5	12.4	-	8.4	78	65
Madrid	Spain	Birth	Yes	No	Yes (1)	Yes	No	0	11.8	9.7	7.5-7.8	26-103	-
Iowa	Europe	9 years	Yes	No	Yes (1)	No	No	12.5	9.6-12.5	3.8	4.8-12.9	-	-
	Holland/UK	2 months	Yes	-	-	-	No	5	-	-	6.4	48-239	-
	England	15 years	-	-	Yes	4 cm	Yes	0	10-12	5.2	6-40	102	-

Table 1. 3. 13. d. Kronik non-sferositik hemolitik anemi ile ilişkili G6PD varyantlarının klinik ve hemotolojik verisi.

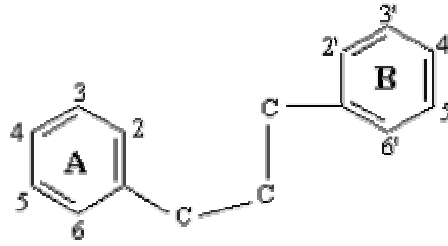
Gadabjara	Mexico	3 years	Yes	No	Yes (6)	1.5 cm	No	14	6-11	4.0	4-42	-	-
	Ireland	6 years	Yes	Yes	Yes (3)	Yes	Yes	1.5	12-14	9.3	15-25	40-96	-
	Japan	14 months	Yes	-	Yes (2)	Mild	No	3.5	8.5-9.5	5.8	28.2	-	-
	Denmark	Birth	Yes	No	Yes (few)	Slight	No	-	10.8	8.4	3.8-23	17-50	-
	India	4 years	Yes	No	Yes	2 cm	No	-	8.0	-	20	56	39
	USA	Birth	Yes	No	Yes (3)	1-2 cm	No	2	9.7	4.9	15	35-40	25-30
Mt Sinai	Spain	14 days	Yes	Yes	-	-	No	0.2	-	5.3	21	58	-
Beverly Hills	Scotland	Birth	Yes	Yes	Yes (4)	4 cm	No	-	9.4	-	11	70	-
	Italy	4 years	-	-	Yes (14)	Moderate	No	1.7	9-11	8.5	51	-	-
	USA-white	-	Yes	-	Yes (>15)	Yes	No	0	12.1	-	8.8	58	24
	Japan	1 year	Yes	-	Yes (1)	-	Yes	2.3	10-12	7.0	4-46	-	15-75
Wisconsin	USA	7 years	Yes	-	-	-	No	-	-	-	-	-	-
Nashville	Portugal	3 years	Yes	Yes	Yes (2)	Yes	No	19	11-12	5.6	7-26	41	6
	Israael	5 years	Yes	-	Yes (2)	-	No	15	8-11.5	4.2	-	-	-
	Italy	13 years	Yes	-	Yes (2)	-	No	1.0	9.5	-	10	49	37
	Italy	>13 years	-	-	Yes (>1)	-	No	0.7	12.7	-	12	56	39
Barri	Italy	Birth	Yes	No	-	Yes	No	<1	10.9	-	1-18	-	-
Puerto Limon	Costa Rica	4 years	-	-	-	No	No	<0.1	10.3-15.2	-	8.8-24	58	-
	Costa Rica	60 years	-	-	No	No	No	-	7.2-14.6	-	12.2-22	-	-
Clinic	France	31 years	-	-	No	No	No	0	13	-	12-20	-	22
	Spain	31 years	Yes	-	No	Slight	Yes	2.6	14.1 > 12.8	4.5 > 2.8	2.6	33 > 48	24 > 10
Japan	Israael	3 years	Yes	No	Yes	3 cm	No	-	9-10.5	6.5	12-27	43	43
Tokyo	Japan	15 years	Yes	-	-	No	No	3	12.8	8.5	6.2-13.3	46	24
	Japan	31 years	-	-	-	No	No	-	12.7	6.7	5.6-18.5	26-39	27
	Italy	4 years	Yes	-	Yes (1)	-	No	3.3	11.4-14.6	8.5	5-12.4	58-87	48-183
	Scotland	11 years	-	-	-	-	No	0.9	8.9	-	15	-	-
Sumaré	Brazil	22 years	Yes	-	-	2 cm	No	13	13	-	14	-	87
Kobe	Italy	12 years	Yes	-	-	-	No	0.4	11	5.2	5-24	-	-
	Japan	2 years	Yes	No	Yes (multiple)	1.5 cm	No	21.7	-	8.8	40	138	104

NNJ = neonatal jaundice; - = unknown.

Tablo 1. 3. 13. e. Kronik non-sferositik hemolitik anemi ile ilişkili G6PD varyantlarının klinik ve hemetolojik verisi.

1. 4. Flavonoidler

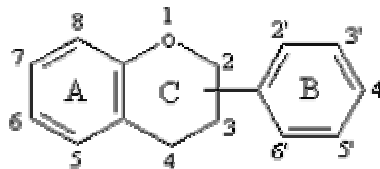
Flavonoidler 15 C atomu içeren polifenolik bileşiklerdir. İki benzen halkası lineer 3 C zinciri ile birleşir (34-37).



Şekil 1. 4. a. Benzen halka yapısının birleşimi

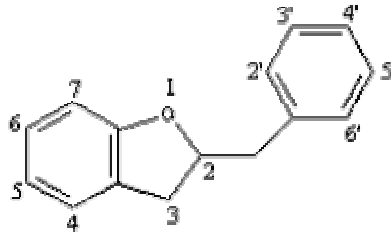
Üstteki iskelet C₆-C₃-C₆ sistemini içerir. Flavonoidler yüksek organizasyonlu bitkilerdeki en karakteristik sınıfı içerir. Flavonoidlerin çoğu angiosperm ailesinde çiçek pigmentleri gibi kolaylıkla tanınabilir. Halen bu olay sadece çiçeklerle sınırlı kalmayıp bitkilerin bütün parçalarını içerir.

Flavonoidlerin kimyasal yapısı kroman ile birlikte 2,3 veya 4 pozisyonundaki 2 aromatik halka taşıyan C₁₅ iskeletine dayanır (34-37).



Şekil 1. 4. b. Flavonoidlerin kimyasal yapısı

Bazı durumlarda 6 üyeli heterosiklik C halkası izomerik açık formda bulunur veya 5 üyeli bir halka ile yer değiştirir (34-37).



Şekil 1. 4. c. Heterosiklik C halka yapısı

Üç C'lu zincirin santral C atomunu içeren oksijen köprüsü sınırlı sayıda türde meydana gelir. İçi FURAN tip heterosikliklerle sonuçlanır (34-37).

Flavonoidlerin birçok altgrubu yerine konan C halkasının çeşitlerine bağlı olarak sınıflandırılır. Heterosiklik halkanın hem oksidasyon durumu hem de B halkasının pozisyonu sınıflamada önemlidir (34-37).

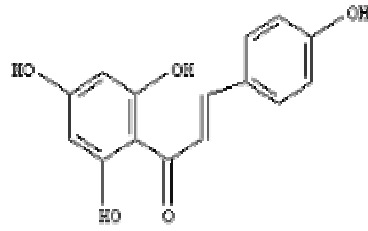
Altı altgrup örnekleri şunlardır:

- 1 Kalkonlar
- 2 Flavon (genellikle herbaceous aileleri; örneğin; Labiatae, Umbelliferae, Compositae).
Apigenin (Apium graveolens, Petroselinum crispum),
Luteolin (Equisetum arvense).
- 3 Flavonol (genellikle ağaç angiospermlerdedir).
Quercitol (Ruta graveolens, Fagopyrum esculentum, Sambucus nigra)
Kaempferol (Sambucus nigra, Cassia sena, Equisetum arvense, Lamium album, Polygonum bistorta)
Myricetin
- 4 Flavanon
- 5 Antosiyaninler

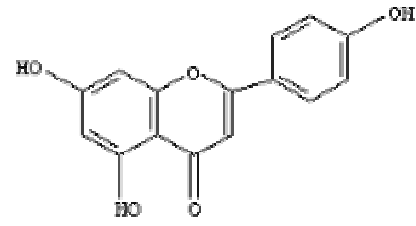
6- İzoflavonoidler

Bunların çoğu (flavononlar, flavonlar, flavonoller ve ansiyaninler) heterosiklik halkanın 2. pozisyonunda yer alır. İzoflavonoidlerde B halkanın pozisyon 3 de tutar. Kroman türevlerinin 4. pozisyonundaki B halkası ile birlikte (4-fenil kroman= NEOFLAVONOİDLER) (şekil 1. 4. j)'deki gibidir.

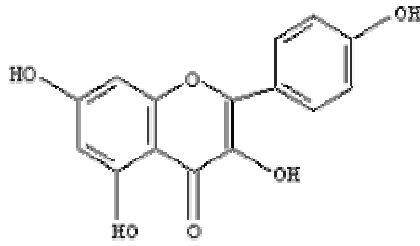
İzoflavonoidler ve neoflavonoidler anormal flavonoid olarak kabul edilir (34-35).



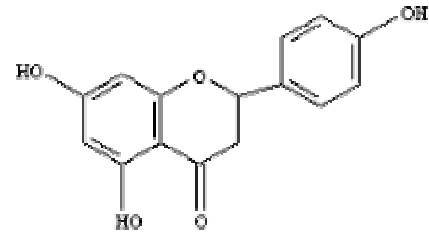
Şekil 1. 4. d. Kalkonlar



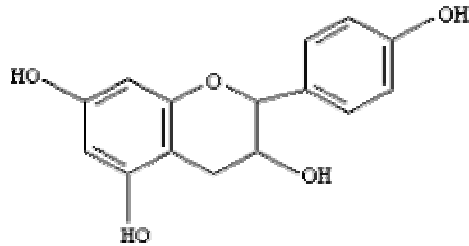
Şekil 1. 4. e. Luteolinin yapısı



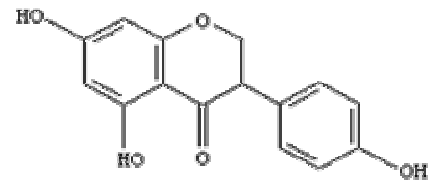
Şekil 1. 4. f. Myricetin yapısı



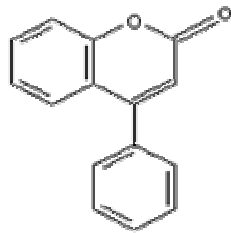
Şekil 1. 4. g. Flavonon yapısı



Şekil 1. 4. h. Antosiyanin yapısı



Şekil 1. 4. i. İzoflavonoid yapısı

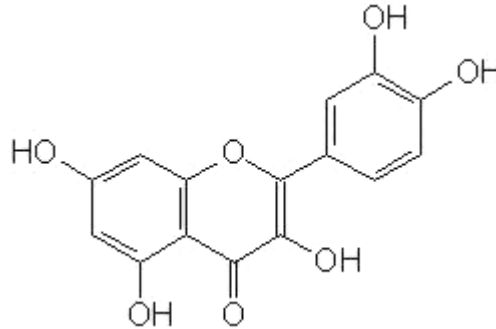


Şekil 1. 4. j. Neoflavonoid yapısı

1. 4. 1. Antioksidatif Flavonoid Quercetin

1. 4. 1. 1. Bağırsaklardan Emilimi

Flavonoidler bitki ailesinde genişçe yayılmış olup flavonol, flavanol, flavanon, flavon, antisiyanidin ve izoflavon olarak kategorize edilmiştir. Quercetin (3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon) meyvelerde ve sebzelerde bulunan tipik bir flavonol tip flavonoiddir (şekil1.4.1.1.). Flavonoidler onların glikozidlerinde olduğu gibi sıklıkla bulunur ki bu veya birçok şeker grupları fenolik gruplara glikozidik bağ ile bağlanmıştır. Genellikle, quercetin glikozidleri 3-pozisyonunda şeker grubu içerirler, örneğin, izoquerceitrin (quercetin 3-O-β-glikozid;Q3G), genellikle bitkilerin çeşitli gruplarında dağılır. Soğanda, halen 4'-pozisyonundaki fenolik grup şeker grubu ile bağlanır ve böylece major glikozidleri quercetin 4'-O-β—glikozid (Q4'G) ve quercetin 3,4'-O-β-glikozid (Q3,4'G). Diyet kaynaklarında toplam flavonoid alımı günlük birkaç yüz mg olarak tahmin edilir (36-37).



Şekil 1. 4. 1. 1. Quercetin'in kimyasal yapısı

Birçok invitro çalışmada quercetin'in farklı biyolojik etkileri açıklanmıştır. Bunlar; apoptozis indüksiyonu, antimitogenez, protein kinaz C (PKC) inhibisyonu, hücre siklus modülasyonu, angiogenez inhibisyonu, angiotensin converting enzim II (ACEII) inhibisyonunu içerir. Quercetin alımı insan sağlığı için yararlı olduğu ve antioksidan aktivitesinin kısmi olarak birçok biyolojik etkiler gibi olabileceği öne sürülmüştür. Flavonoidlerin fenolik hidroksil grupları (elektron donörleri olarak hareket ederler) serbest radikal toplayıcı aktivite için gerekli bileşimlerdir. Özellikle katekol yapı (o-dihidroksil yapı) bu komşu pozisyonundaki 2 hidroksil gruplarına sahiptir. Elektron verme kabiliyeti olan diğer pozisyonlardan daha üstündür ve

böylece quercetin ve diğer flavonoidlerin içerdiği katekol yapı güçlü bir radikal toplama aktivitesi gösterir. Flavonoidlerin antioksidan aktivitesi onların şelasyon özelliği ile açıklanabilir, çünkü demir iyonu gibi geçiş metal iyonları ROS üretiminde Fenton-tip reaksiyonu ile çok önemli bir rol oynar. Buna ek olarak bu katekol grubunun flavonoidlerin şelasyon özelliği direkt olarak katkıda bulunduğu anlaşılmıştır. Aslında birçok çalışmada quercetin lipit peroksidasyonunu serbest radikal toplama ve/veya transisyon metal iyonlarının şelasyonu ile etkili olarak inhibe ettiği gösterilmiştir (36-37).

Quercetin aglikonun ve glikozidlerinin biyoyararlanımlığı ve *invivo* olarak onların antiokdant aktivitelerinin tespit etmek için alternatif faktörüdür. Son yıllarda yapılan çalışmalar quercetin ve diğer flavonoidlerin karaciğer ve dolaşıma geçmeden bağırsak epitel hücrelerinde emilimi boyunca metabolik dönüşüme neden olabileceğini göstermişlerdir. Böylece eritrositlerdeki quercetin glikozidlerinin emilim ve metabolizma bilgisi onların fizyolojik fonksiyonunun önemini vurgular (36-38).

1. 4. 2. Flavonoidler ve Quercetin'in Çalışma Mekanizması

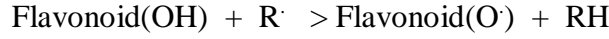
1. 4. 2. 1. Antioksidan Etkileri

Flavonoidlerin tüm gruplarının en iyi tanımlanan özelliği antioksidan kapasiteleridir. Flavonlar ve kateşinler vücudu ROS'a karşı koruyan en güçlü flavonoidler olarak görülürler. Vücut hücreleri ve dokuları serbest radikallerin ve ROS'un neden olduğu hasara sürekli maruz kalırlar. Serbest radikallerin hücresel fonksiyonları nasıl etkilediği tam bilinmemekle beraber en önemli sebeplerden biri hücre membran hasarı ile sonuçlanan lipit peroksidasyonudur. Bu hücresel hasar hücrenin dengesinde bozulmaya osmotik basınç değişikliğine, hücre şişmesine ve sonuçta hücrenin ölmesine neden olurlar. Serbest radikaller genel inflamatuvar cevap ve doku hasarına neden olan inflamatuvar mediatörleri artırır. Yaşayan organizmalar ROS'dan korunmak için çeşitli mekanizmalar geliştirmişlerdir. Vücudun antioksidan savunma mekanizmasını içeren SOD, CAT, GPx, gibi enzimler, GSH, Vit C ve α -tokoferol gibi nonenzimatik antioksidanlar mevcuttur. ROS'un hasar esnasında artmış üretimi endojen çöpçü bileşikler ile aditif etkiye sahiptir. Flavonoidler üç farklı yolla serbest

radikal üreticisini engelleyebilir, endojen antioksidanların fonksiyonunu arttırabilir (36-47).

1. 4. 2. 2. Direkt Radikal Çöpçüsü

Flavonoidler serbest radikallerin neden olduğu hasarı çeşitli yollarla önlerler. Birinci yol: Direkt serbest radikal çöpçüsü olarak flavonoidler ROS bileşikleri ile reaksiyona girerek stabilize ederler. Flavonoidlerdeki hidroksil grubunun yüksek reaktivitesinden dolayı radikaller aşağıdaki denkleme göre inaktive ederler.



Bazı flavonoidler direkt süperoksit çöpçüsüdür. Diğer flavonoidler peroksinitrit olarak adlandırılan reaktif oksijenden kaynaklanan radikallerin çöpçüsüdür. Epikateşin ve rutin güçlü birer radikal çöpçüsüdür. Rutinin çöpçü yeteneği ksantin oksidaz aktivitesini inhibe etmesinden dolayıdır. Flavonoidler invitro LDL oksidasyonunu inhibe edebilir (36-47).

1. 4. 2. 3. Quercetin-NO İlişkisi

Quercetin içeren çeşitli flavonoidler iskemi reperfüzyon hasarını indükleyebilen nitrik-oksit sentaz (iNOS) aktivitesini interfere ederek azaltırlar. NO endotelial hücre ve makrofajları da içeren çeşitli hücrelerde üretilir. NO salınımı kan damarlarındaki dilatasyonun devamı için gereklidir. Yüksek konsantrasyonda NO üretimi oksidatif hasar sonucu makrofajlardaki indüklenebilen NO sentazın etkisi ile olur. Aktive makrofajlarda eş zamanlı olarak hem NO hem de süperoksit anyonu artar. NO serbest radikallerle reaksiyona girer ve oldukça hasar verici peroksinitrit oluşur. Peroksinitrit LDL'yi direk okside eder ve hücre membranında irreversible hasar oluşur. Flavonoidler antioksidan olarak kullanıldığında serbest radikaller temizlenir ve bundan dolayı NO ile reaksiyona giremezler ve daha az hasar oluşur. İlginç olarak NO kendi başına radikal olarak davranır ve NO moleküllerinin flavonoidler tarafından direk olarak temizlendiği rapor edilmiştir. Silibin NO'de doz bağımlı inhibe eden bir flavonoiddir (45).

1. 4. 2. 4. Quercetin-Ksantin Oksidaz İlişkisi

Ksantin oksidaz yolu oksidatif yolda özellikle iskemi reperfüzyon hasarında önemlidir. Hem ksantin dehidrogenaz hem ksantin oksidaz ksantini ürik aside çevirir. Ksantin dehidrogenaz enzimin fizyolojik durumlardaki formudur fakat ksantin oksidaz iskemi durumundaki formudur. Ksantin oksidaz ROS'un kaynağıdır. Reperfüzyon fazında ksantin oksidaz moleküler oksijenle reaksiyon verir ve süperoksit radikali oluşur. Quercetin ve silibin ksantin oksidaz aktivitesini inhibe eder ve oksidatif hasarı azaltır (45).

1. 4. 2. 5. Lökosit İmmobilizasyonu

Lökositlerin immobilizasyonu ve endotelial duvara adhezyonu oksijen türevi serbest radikallerin oluşumundaki bir majör mekanizmadır. Normal şartlar altında lökositler endotel duvar boyunca serbestçe hareket ederler. İskemide inflamasyon esnasında çeşitli mediatörler ve kompleman faktörleri lökositlerin endotel duvarına adhezyonuna ve dolayısı ile immobilizasyonuna neden olur ve nötrofil degranülasyonunu stimüle eder. Sonuç olarak oksidan ve inflamatuvar mediatörler salınır ve doku hasarı meydana gelir. Pürifiye flavonoidlerin oral alımının reperfüzyon esnasındaki lökosit immobilizasyonunu azalttığı rapor edilmiştir. Lökosit immobilizasyonun flavonoidler tarafından azaltılması total serum komplemanlarının azalması ve inflamasyon benzeri durumlara karşı koruyucu mekanizmaları ile ilişkili olabilir. Bazı flavonoidler süperoksit üretimini etkilemeden nötrofil degradasyonunu inhibe edebilir. Bazı flavonoidlerin inhibitör etkisi (mast hücre degradasyonundaki inhibitör etkileri gibi) plazma membranındaki reseptör bağımlı Ca^{+2} kanallarını düzenlenmesi ile olur (45).

1. 4. 2. 6. Diğer Enzim Sistemleri İle İlişkisi

Flavonoidlerin antioksidan kapasiteleri üzerine yapılan araştırmalarla karşılaştırıldığında, flavonoidlerin diğer faydalı etkilerini araştıran çalışmalar azdır. Flavonoidlerin major etkileri (antiallerjik etkileri gibi) radikal çöpçü etkileri sonucudur. Diğer bir mekanizma flavonoidlerin çeşitli enzim sistemlerinde

interaksiyonuna dayanır. Bundan dolayı bazı etkileri radikal çöpçü etki ve enzim fonksiyonundaki interaksiyonunun kombinasyonu sonucu oluşur. Diğer oksijen ürünleri demir için de mevcut olduğunda lipid peroksidasyonu ile sonuçlanır. Demir şelatörü olarak bilinen spesifik flavonoidler serbest radikal oluşmasının etiyolojik faktörlerini ortadan kaldırır. Quercetin demir şelatörü ve demir stabilizatörü olarak bilinir. Bazı flavonoidler kompleman aktivasyonunu ve endoteldeki inflamatuvar hücrelerin adhezyonunu azaltır ve bu inflamatuvar cevapta azalma ile sonuçlanır. Flavonoidlerin bir başka etkisi peroksidasyon salınımında redüksiyonudur. Bu redüksiyon nötrofiller yolu ile ve α 1-antitripsin aktivasyonu interferansı yoluyla ROS'un oluşumunu inhibe eder. Nötrofiller için de proteolitik enzimlerin progresif inaktivasyonu tanımlanmıştır. Flavonoidlerin enzim sistemleri üzerine diğer bir ilginç etkisi araşidonik asit metabolizmasını inhibe etmesidir. Bu sonuç flavonoidlere antiinflamatuvar ve antitrombojenik özellik kazandırır. Araşidonik asit salınımı genel inflamatuvar cevabı başlatır. Nötrofiller araşidonik asitten kemotaktik bileşikler üreten lipooksijenazı içerirler (36-37,45,47).

1. 4. 3. Flavonoidlerin Alımı, Emilimi, Konjugasyonu ve Toksisitesi

1. 4. 3. 1. Alımı

Hollanda da günlük ortalama flavonoid alımının 23 mg/gün olduğu tahmin edilmektedir. Vit E, β -karoten ve Vit C alımı flavonoid alımından 3 kat fazladır. Flavonoid alımı ülkeler arasında büyük farklılık gösterir. En düşük alım yaklaşık 2,6 mg/gün ile Finlandiya'da iken en yüksek alım 68,2 mg/gün ile Japonya'dır. Quercetin flavonoid alımını tahmin etmede çok önemlidir. Flavonoid alımındaki cohort çalışmalarındaki majör problem flavonoidlerin biyolojik örneklerde ölçülerek sınırlı tutulmasıdır ve daha önemlisi çok az meyve ve sebze doğru ve tam tahmin için kullanılmaktadır (36-37,45,47).

1. 4. 3. 2. Emilim

Bazı çalışmalar diyetsel flavonoidlerin önemli miktarda emildiğini göstermiştir. Doğal flavonlar aglikon formdan ziyade glikolize formda daha fazla bulunurlar. Flavonoidlerin formu emilim derecesini etkiler (36-37,45,47).

1. 4. 3. 3. Konjugasyon

Flavonoidlerin (catechinler) konjugasyon yolu intestinal hücrelerde glukronidler ve konjugasyonu ile başlar. Daha sonra albümüne bağlanarak karaciğere taşınırlar. Karaciğerde flavonoidlerin konjugasyonu sülfat grubu, metil grubu veya her ikisinin eklenmesi ile güçlenir. Bu grupların eklenmesi dolaşımdaki eliminasyon zamanını azaltır. Flavonoid iskeletinde konjugasyon için çeşitli lokalizasyonlar vardır. Konjugasyonun tipi ve onun flavonoid iskeletindeki lokalizasyonu enzim inhibitör kapasiteyi, antioksidan aktiviteyi belirliyor olabilir. Son çalışmalar düzenli olarak flavonoid alınımını çeşitli konjugatların oluşumundaki baskınlık ve beklide yüksek aktivite ile sonuçlanacağını destekler (45).

Flavonoidlerin konsantrasyonları ve onların biyolojik aktif konjugatları kardiovasküler hastalık mortalitesinin oranını önlemek için arasıra alım yeterli değildir. Bununla beraber konjugat flavonoidlerin yarı ömrü uzun olduğu için (23-28 saat) düzenli alım birikime sebep olabilir (45).

1. 4. 3. 4. Toksikite

Quercetin'in toksik veya mutajenik özellikleri mevcuttur. Yakın zamanda flavonoidlerin mutajenik etkileri ile yapılan çalışmalar, *in vivo* antimutajenik özelliklerini göstermiştir (36,45).

1. 4. 4. Klinik Etkiler

Antioksidan özelliklerinden dolayı flavonoidlerin vasküler sistemde önemli etkileri mevcuttur. Oksijen radikalleri okside LDL oluşumuna neden olur ve bu endotelial duvarda hasara neden olarak aterosklerotik değişiklikleri başlatır. Flavonoid alınımının koroner ater hastalığına karşı koruyucu (antiaterojen) etkisini içeren çalışmalar azdır (36-47).

Siklooksijenaz ve lipooksijenaz inflamatuvar mediatörler olarak rol oynar. Bunlar genel inflamatuvar cevabı başlatan araşidonik asitin salınımına neden olurlar. Lipooksijenazı içeren nötrofiller araşidonik asitten kemotaktik bileşiklerin

oluşumuna neden olurlar, aynı zamanda sitokin salınımını sağlarlar. Quercetin hem siklooksijenazı hem de lipooksijenazı inhibe eder (antiinflamatuvar etki). Bu nedenle inflamatuvar metabolitlerin oluşumunu azaltır. Flavonoidlerin bir diğer inflamatuvar etkisi eikasonoid biyosentezini inhibe etmesidir (36-37,45).

ROS DNA'ya zarar verebilir ve mutasyona neden olabilirler. Eğer değişiklikler onkogen veya tümör subresör gen gibi kritik genlerde ortaya çıkarsa başlangıç veya progresyonla sonuçlanır. ROS direkt hücre iletimini ve büyümesini etkilerler. Reaktif oksijen ürünlerinin sebep olduğu hücresel hasar mitozu indükleyebilir ve hasarlı DNA da mutasyona neden olabilirler (36-37,45).

Klinik çalışmalar flavonoid alımı ile daha sonraki akciğer CA gelişimi arasında ters ilişki bulmuşlardır. Bu etki özellikle quercetinde gözlenmiştir. Quercetin ve apigenin melanoma büyümesini inhibe etmekte ve farelerde potansiyel metastetik ve invazif etkisi vardır (antitümör etki) (36-37,45).

Platelet agregasyonu hem ateroskler hem de akut platelet trombüs oluşumuna katkıda bulunur. Buna müteakip daralan arterlerde embolizasyon oluşur. Aktive plateletlerin vasküler endotele yapışması endotelial prostasiklin ve NO oluşumunu inhibe eden lipit peroksitlerin ve serbest oksijen radikallerinin oluşumuna sebep olur. Quercetin, kaempferol ve myricetin gibi bazı flavonoidlerin köpekler ve maymunlarda platelet agregasyonunu etkili inhibitörleri olduğu (antitrombojenik etki) gösterilmiştir (36-37,45).

1. 5. Alkol ve Metabolizması

Diyet açısından herhangi bir kalori değerinin olmadığına inanılan alkolün (etanol, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$) vücutta CO_2 ve suya oksitlenmesi ile karbohidratlardan elde edilen enerjiden daha fazla (4 kcal/g), yağlardan elde edilen enerjiden (9 kcal/g) daha az 7 kcal/g enerji sağlanmaktadır. Günde 100-120 g alkol tüketen bir kişi bazal metabolik enerjisinin yaklaşık yarısını sadece bu kaynaktan elde edebilmektedir. Kalori dışında bir yararı olmadığı için alkoliklerde vitamin ve mineral eksiklikleri görülmektedir (53).

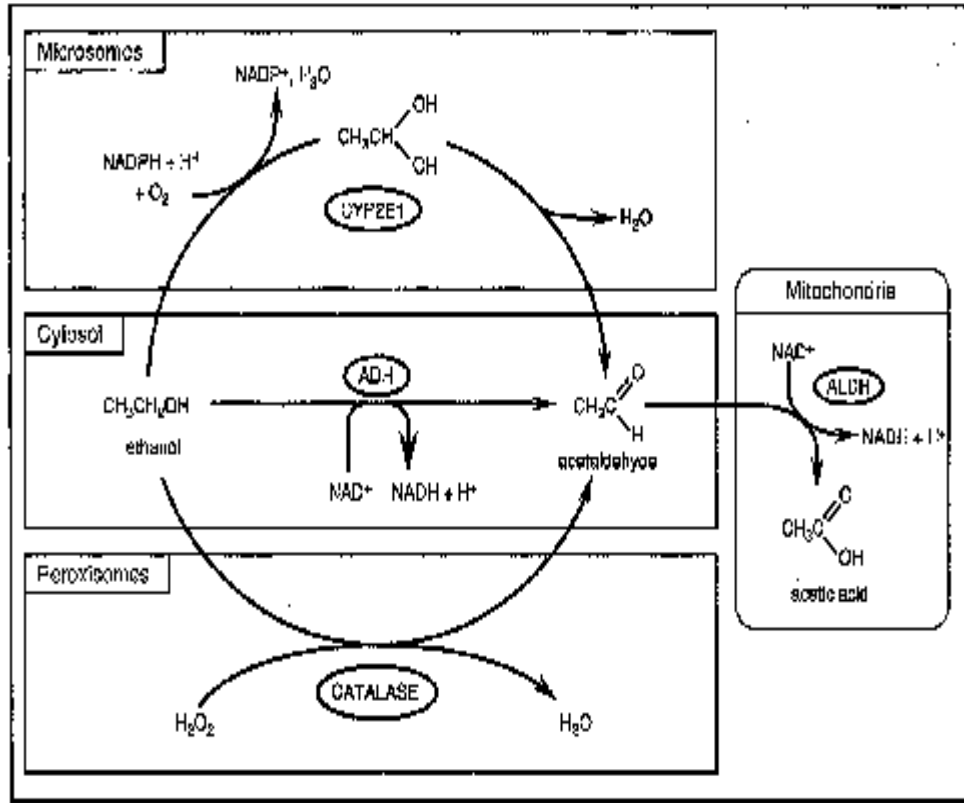
Sitozolik alkol dehidrogenaz (ADH) tarafından alkolden elde edilen asetaldehit, mitokondrial ve sitozolik asetaldehit dehidrogenazlar tarafından asetata oksitlenmektedir. Alkol aynı zamanda karaciğer düz endoplazmik retikulum içinde lokalize olan sitokrom P_{450} ailesinin bir üyesi olan mikrozomal etanol okside edici

sistem (MEOS) tarafından da asetaldehide oksitlenmektedir (şekil 1. 5.). Etanol için K_m değeri alkol dehidrogenazdan çok daha yüksek olduğu için ($K_{m \text{ MEOS}} \gg \gg K_{m \text{ ADH}}$) MEOS sentezi sitokrom P₄₅₀ ailesinin diğer üyelerinin substratları ve etanol tarafından uyarılmaktadır. Bu nedenle MEOS, kronik olarak yüksek dozlarda alkol tüketen bireylerdeki etanol oksidasyonunun yaklaşık %30 kadarını karşılamaktadır. Büyük bir kısmı karaciğerden kana diffüze olan asetat, TCA döngüsünde oksitlenmek üzere kas ve diğer dokular tarafından alınmaktadır. Diyet kalorisinin %15 kadarından daha az kısmının etanolden sağlanması halinde alınan etanol, ATP üretiminde etkin şekilde kullanılmaktadır. Oksidatif fosforilasyon ile NADH, ATP üretiminde kullanılmaktadır. Asetaldehitin bir kısmı kana geçerek diğer dokulara taşınmaktadır. Bir kısmı TCA siklüsünde oksitlenen asetatın önemli bir kısmı kas dokuları tarafından alınarak asetil CoA oluşturulmaktadır. TCA döngüsünde asetil CoA oksitlenerek CO₂ elde edilmektedir. Çok yüksek etanol düzeyleri dışında etanolün kalori içeriği, yüksek enerjili fosfat bağlarına (ATP) dönüştürülmektedir (48,53).

Çok yüksek dozlarda etanol alındığında etanolün bir kısmı endoplazmik retikulumdaki etanol okside edici sistem (MEOS) tarafından asetaldehide oksitlenmektedir. Yakıt ve NADPH elektronlarını alan O₂, suya indirgenmektedir. Bu tepkimede NADPH yapısındaki indirgenme potansiyeli şeklindeki enerji kullanılmaktadır. Uzun yıllar alkol kullanan kişilerin MEOS sistemi çok aktif şekilde çalışmakta ve bu kişilerin karaciğerinde ve kan dolaşımında bulunan asetaldehit, dokularda hasar oluşturmaktadır (48-55).

Alkol metabolizması, ADH aktivitesi ve NAD⁺ sağlanabilirliği ile sınırlandırılmaktadır. Alkol dehidrogenazın etanol için K_m değeri 1mM (46 mg/L) olduğu için enzim, bir veya iki kadeh alkolden sonra zorunlu olarak doymuş hale gelmekte ve alkol metabolizması sıfırıncı dereceden kinetik göstermektedir. İnsanların pek çoğu yaklaşık olarak saatte 10 g alkolü metabolize edebilmekte ve kan alkol düzeyi her saat yaklaşık 0,15 g azalmaktadır (53).

Alkol metabolize eden enzimlerin genetik varyantlarının bulunması alkol toleransında bireysel farklılıkların görülmesine neden olmaktadır. Farklı optimum pH ve V_{max} değerlerine sahip üç ADH genetik varyantı tanımlanmıştır. En ilginç polimorfizmde asetaldehidi asetata



Şekil 1. 5. Alkol metabolizması.

oksitleyen mitokondrial aldehit dehidrogenaz enzimi etkilenmektedir. Normalde hız sınırlayıcı olamayan bu enzimin asetaldehit için K_m değeri düşük olduğundan ($10 \mu\text{M}$) ara ürün birikimi olmamaktadır. Sarhoş bir kişinin kan alkol düzeyi $20\text{-}50 \text{ mM}$ ve asetik asit düzeyi $1\text{-}2 \text{ mM}$ arasında bulunmakta fakat asetaldehit $20 \mu\text{M}$ değerinden düşük saptanmaktadır. Atipik aldehit dehidrogenaz görülen pek çok Doğu Asya’da polipeptidin 487. pozisyonunda glutamik asit yerine lizin bulunmaktadır. Negatif dominant bir mutasyon olan bu genetik varyantta mutant enzim, normal enzim ile inaktif oligomerler oluşturduğu için heterozigotlarda bile enzim aktivitesi sıfıra yakındır. Bu bireylerde asetaldehit, K_m değeri 1 mM civarında olan sitozolik aldehit dehidrogenaz tarafından oksitlendiği için sadece bir-iki kadeh alkol alındığında toksik asetaldehit birikmektedir. Bunun sonucunda vasodilatasyon, yüz kızarıklığı ve taşikardinin görüldüğü doğuya özgü kızarıklık yanıtı görülmektedir. Bu enzimin eksik olduğu bireylerde alkolizm çok nadir ortaya çıkmaktadır. Mitokondrial aldehit dehidrogenazın farmakolojik olarak inhibe

edilmesini sağlayan disulfiram (antabuse), alkoliklerin tedavisinde kullanılmaktadır (53).

Alkollü içeceğe karışması halinde ölümcül olabileceği için bu bileşimin kullanılması sıkı tıbbi kontrolü gerektirmektedir (53).

Alkol aynı zamanda endoplazmik retikulumdaki sitokrom P₄₅₀ sistemi ile metabolize edilmektedir. Çok fazla miktarlarda kronik etanol tüketen kişilerde etanolün kalori içeriği etkin olarak ATP üretiminde kullanılmamaktadır. Bu etkinliğin azalmasına katkıda bulunan birkaç faktör bulunmaktadır. Yüksek dozlarda etanol alındığında etanolün %10-30 kadarı karaciğerdeki MEOS tarafından asetaldehide oksitlenmektedir. NADH şeklindeki indirgen eşdeğerler yerine bu sistem, NADPH şeklindeki indirgen eşdeğerleri tüketmektedir. Asetatin oksidasyonu ile yine de ATP üretilmektedir (48,53).

Yüksek miktarlarda etanol alındığında etanol kalorilerinin az etkin kullanımına mitokondrial hasar ve yakıt oksidasyonundan metabolitlerin yeniden döngüye katılması katkıda bulunmaktadır. Kronik alkoliklerin dokularından elde edilen mitokondrielerde normal ATP sentez için gerekli olan transmembran proton gradientinin korunamadığı görülmüştür. Bu nedenle etanol enerjisinin büyük bir kısmı ısıya dönüşmektedir. Etanol oksidasyonu, yağ asidi ve glukoz oksidasyonunun normal metabolik yolları ile girişim yapmaktadır. Oksidatif süreci tamamlamak için ara ürünlerin bu metabolik yollar arasındaki döngüsü, etanol varlığında glukoz ve yağ asitlerinin oksidasyonunu daha az etkili hale getirmektedir (48-50,53).

Sitokrom P₄₅₀ sistemini uyararak alkol, kendi metabolizmasının yanı sıra barbitüratların ve bazı ilaçların da metabolizmasını arttırmaktadır. Bu ilaçlara karşı iyi yanıt oluşturamadıkları için ölçülü içicilerde cerrahi işlemlerde anestezinin indüksiyonu ile problemler görülebilmektedir. Öte yandan alkollü bir kişide alkol metabolizması ilacın metabolizması ile yarışmaktadır. Akut etanol kullanımı MEOS üzerinde inhibisyon, kronik kullanım ise indüksiyon etkisi göstermektedir. Akut kullanımda etanol ADH yolunu tercih ettiği ve MEOS sistemi çalışmadığı için inhibisyon görülmektedir. İlaçların atılımında kullanılan diğer enzim sistemlerindeki artış MEOS indüksiyonu ile birlikte olduğu için alkol ile birlikte sedatif ve barbitüratlar alındığında enzime bağlanmak için birbirleri ile yarışmaktadırlar. Kompetitif enzim inhibisyonu ilaç klirensinin azalmasına ve çok yüksek kan

barbitürat düzeylerinin görülmesine yol açmaktadır. İlaç daha uzun süre kanda kaldığı için ölüme neden olabilmektedir (53).

Karaciğer metabolizması alkolden çok ciddi boyutlarda etkilenmektedir. Karbohidrat ve yağ asidi oksidasyonundan farklı olarak karaciğerde alkol metabolizmasının negatif kontrol mekanizması bulunmadığı için alkolün oksidasyonu, diğer besinlerin oksidasyonundan önce tercih edilmektedir. Geriye doğru beslenme ile inhibisyonun olmaması, alkol metabolizmasının tepkimelerinin enerji üreten yol olmaktan çok detoksifikasyon sistemi olarak geliştiğini düşündürmektedir. Normal olarak kolonda bakteriyel fermentasyon ile az miktarda alkol oluşmaktadır (53).

Alınan etanolden asetil CoA, NADH ve ATP üretildiği için glukoz ve yağ asitleri normal yollarında okside olamamaktadır. Ortamda alkolden sağlanan fazla miktarda NADH bulunduğunda metabolizma, yeni NADH oluşumuna yol açacak oksidasyon yollar yerine NADH tüketebileceği yolları tercih etmektedir. Bu nedenle çeşitli noktalarda kontrol gerçekleştirilmektedir (53).

Alkol alındığında üretilen asetil CoA, NADH ve ATP, glukoz metabolizmasını fosfofruktokinaz ve pirüvat dehidrogenaz aşamalarında inhibe etmektedirler. NAD^+ azalması ve malonil CoA düzeyinin artması yağ asidi oksidasyonunu azaltmaktadır. Yüksek ATP ve NADH düzeyleri ile NAD^+ azalması TCA döngüsünü inhibe etmektedir. Etanolün asetik aside oksidasyonu ile üretilen iki NADH solunum zincirinde okside edilerek hücrelerin enerji gereksinimi fazlasıyla karşılandığı için alkoliklerin karaciğerinde TCA döngüsü yavaşlamıştır. Yağ asidi oksidasyonunun azalması ve artmış yağ asitlerinin esterleşmesi sonucu trigliserit sentezi, VLDL salgılanması ve plazma trigliserit düzeyi artmaktadır. Özellikle yüksek insülin/glukagon oranı asetil CoA karboksilaz aktivitesini uyardığında yağ asidi sentezi de hızlanmaktadır (53).

Yüksek ATP ve NADH düzeylerine rağmen alkol, pirüvat ve oksaloasetatin glukoneogeneizde kullanılmasını inhibe etmektedir. Tersinir laktat dehidrogenaz ve malat dehidrogenaz tepkimeleri ile laktat/pirüvat ve malat/oksalasetat oranlarını yüksek $NADH/NAD^+$ oranı artırmakta ve kan laktat düzeyi artarken pirüvat ve oksaloasetat tüketilmektedir. Ağır fiziksel aktivite sonrası veya aç karnına alkol alan kişide karaciğer glikojen depoları tükendiğinden beklenenden daha önce hipoglisemi

gelişmektedir (53).

Kronik alkolizmde oluşan doku hasarının çoğu, yüksek dozlarda alkol alındıktan sonra karaciğerde biriken ve kana salgılanan asetaldehiden kaynaklanmaktadır.. Oldukça reaktif olan asetaldehit amino gruplarına, nükleotidlere ve fosfolipitlere kovalent olarak bağlanmaktadır (asetaldehit). Etkilenen proteinler arasında hemoglobin, kalmodülin, ribonükleaz ve tubulin bulunmaktadır. Kalp ve diğer dokulardaki proteinlerde karaciğerdeki proteinler kadar etkilenmektedir (53).

Asetaldehit, hepatik lipoprotein partiküllerinin oluşması için gerekli olan protein sentezinin ve proteinlerin tubuline bağımlı salgılanmasının azalmasına neden olmaktadır. Salgı mekanizmalarının bozulması sonucu, karaciğerde triaçilgliseroller ve proteinler birikmektedir. Yağ asidi oksidasyonunun inhibisyonu ile yüksek miktarlarda oluşan çok düşük dansiteli lipoprotein (VLDL) kanda artmasına rağmen belirgin miktarlarda protein ve triaçilgliserolün karaciğerde biriktiği görülmektedir. Proteinlerin birikimi ile hepatositlere giren su, karaciğerin şişmesine ve hepatik yapı parçalanmasına yol açmakta ve portal hipertansiyon gelişmektedir. Asetaldehid takısının oluşması sonrasında lipit peroksidasyonu artmakta ve serbest radikal hasarı kalıcı hale gelmektedir. Doğrudan glutatyona bağlanan asetaldehid, H₂O₂ ile hasar oluşturulmasına karşı glutatyonun koruyucu etkisini azaltmakta ve hidroksil radikali oluşumunu artırmaktadır. MEOS uyarılması da serbest radikal oluşumunu hızlandırmaktadır (48-52,53).

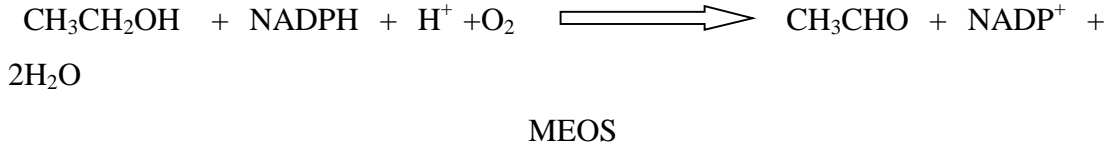
1. 5. 1. Alkol Metabolizması Reaksiyonları

Etanol sadece mayalar tarafından üretilmez. Aynı zamanda memelilerde de eser miktarda bulunabilir. Bağırsaklardaki bakteriyel fermentasyon memelilerdeki üretimin sadece bir yoludur. Ancak etanol aslında eksojen bir bileşiktir ve gastrointestinal yoldan kolayca emilirler. Emilen etanolün %2-10'u direk böbrek ve akciğerlerden elemine edilir. Geriye kelen kısım ise vücutta oksidize edilir. Bu oksidasyon işleminin başlıca merkezi karaciğerdir. ADH enzimi karaciğer dışında midede de bulunduğu bilinmektedir. Midede de etanolün bir kısmı metabolize edilir ve bu da karaciğerin daha az hasar görmesine yardımcı olur (53).

Alkol dehidrogenazlar (ADH) sitoplazmada bulunur ve alkol metabolizmasındaki en etkin enzimlerdir. Alkol dehidrogenazın birkaç izoenzimi bulunur ve alkolün asetaldehide dönüşümünü katalize eder (49-55).



MEOS düz endoplazmik retikulumda bulunur ve sitokrom P₄₅₀ enzim ailesi tarafından okside edilirler. Alkol ile uyarılan sitokrom P₄₅₀'ye sitokrom P₄₅₀ 2E1 veya CYP2E1 olarak adlandırılır. CYP2E1 için K_m değeri alkol dehidrogenazdan çok daha yüksektir (K_m MEOS >>K_m ADH). Alkol dehidrogenaz enzimi bir iki kadeh alkol alımından sonra doygunluğa ulaşır. Fakat yüksek dozda alkol alındığında MEOS devreye girer ve bu sırada düz endoplazmik retikulum sayısında hızlı bir artış gözlenir.



Katalaz (CAT) enzimi peroksizomlarda lokalizedir ve alkol metabolizmasında major bir rolü olmadığına inanılmaktadır. Peroksizomlarda yerleşik olan CAT enzimi invitro olarak H₂O₂ oluşturan sistem varlığında etanolü okside etme yeteneği vardır. CAT aktivitesini iki farklı kombinasyon örneğiyle açıklarsak;

a) NADPH oksidaz ve CAT kombinasyonu



+



b) Ksantin oksidaz ve CAT kombinasyonu



+



Etanol oksidasyon işleminin aktivasyonunun sürekliliği üç mikrozomal komponent olan sitokrom P₄₅₀, NADPH-sitokrom P₄₅₀ redüktaz ve fosfolipitlerle sağlanır (48,53).

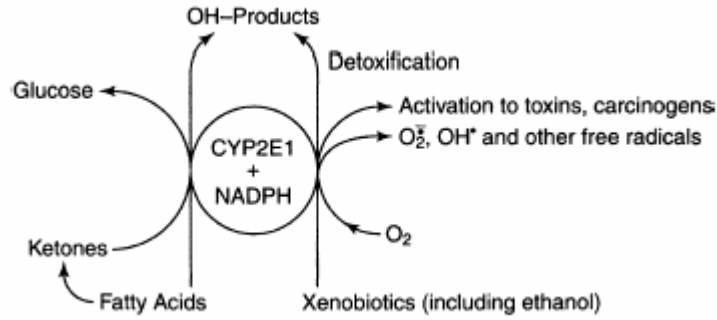
1. 5. 2.Hidroksil (OH[·]) Radikalinin Rolü

Etanolün CYP2E1 yoluyla ipik monooksijenaz mekanizması ile oksidasyonuna ek olarak, etanol karaciğer mikrozomlarında asetaldehide dönüşürken H₂O₂ demir katalizörlüğünde degradasyonundan kaynaklanan [·]OH radikali oluşur. Bu nonenzimatik yol hidroksietil radikalinin oluşmasından kısmen sorumlu olabilir, ara basamak etanol ve onun ürünü asetaldehid arasındadır. Bu etanolün [·]OH yakalayıcısı olduğunu düşündürür. Diğer delil; bazı radikallerin üretiminin okside ürünlerin sitokrom P₄₅₀'ye bağlanabilme yeteneğine ve alkolün α karbonundaki protonu yeterli reaktive etmesine bağlı olmasıdır. Benzer bir mekanizma 2-keto-4-thiomethylbutyric asit gibi mikrozomal etanol oksidasyonunu inhibe eden demir şelatörlerinin olması ile uyumludur. Mikrozomal etanol oksidasyonu invivo şartlar altında nonhem demir ve endojen demir şelatörlerinin mevcudiyetinin gerektirir. Bununla birlikte normal şartlar altında bu [·]OH bağımlı mekanizma mikrozomal etanol oksidasyonu üzerinde minör katkısı vardır. Hidroksil radikalinin kronik etanol alımından sonra NADPH'ın artması ve NADPH bağımlı süperoksit ve hidroksil radikali üretiminin artmasına rağmen etanol oksidize sistemin yeniden oluşumundaki aktiviteye katıldığı

süperoksidi içermediği bulunmuştur (48-55).

En az iki mekanizma etanolün mikrozomal mekanizmasında rol alır. Daha az görüleni endojen H_2O_2 'den oluşan fenton tipi reaksiyondan üretilen hidroksil radikalının üretimini içerir, ve majör olan diğer yol sitokrom P_{450} bağımlı monooksijenasyon ve hidroksil radikalinden bağımsızdır. Etanol metabolizmasında CYP2E1 hidroksietil radikalının oluşumunda rol alır. Alkol bağımlılığı serbest radikaller kronik etanol alımında CYP2E1 inhibitörlerine karşı antikor oluşumu ve CYP2E1'in indüksiyonunu izleyerek oluşurlar (48-55).

Bütün dokular ROS'u nötralize etme kapasitesine sahiptir. Bu mekanizma süperoksidin ve H_2O_2 'yi suya çeviren SOD ve CAT'ı içerir. GSH ve GSSG çiftini içeren glutatyon antioksidan sistem olarak çalışır (48,50,53,55).



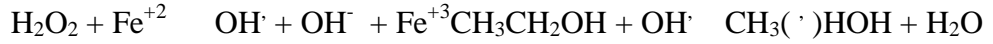
Şekil 1. 5. 2. Alkol alımı ROS oluşumunu indükler.

1. 5. 3. CYP2E1'in Hidroksietil Serbest Radikal Oluşumundaki Rolü

Karaciğer mikrozomlarında hidroksietil radikalının oluşumu NADPH ve fonksiyonel olarak aktif monooksijenaz enzimleri gerektirir. Sitokrom P450 gereksinimi NADPH varlığında sadece eğer Sit.P450 redüktaz ve Sit.P450'nin her ikisinin mevcudiyetinde monooksijenaz sisteminin oluşumunda hidroksietil radikallerinin üretiminde esansiyeldir. İlginç olarak insan karaciğer mikrozomlarında NADH hidroksietil radikalının oluşumunu destekler (52).

Etanolla indüklenen Sit.P450E1 izoenziminin etanolden serbest radikal oluşumuna diğer alifatik alkoller kadar neden olma olasılığı; etanol veya aseton ile beslenen ratlardan hazırlanan karaciğer mikrozomlarında etanol 1-proponol ve

1-bütanol de, fenobarbital veya methylcholantrene ile muamele edilen hayvanlara göre serbest radikal oluşumunun 2-3 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir. Sürekli olarak CYP2E1 veya CYP2E1 inhibitörlerine karşı oluşan p-nitrophenol ve diethyldithiocarbamate gibi antikolar, hidroksietil radikallerinin spin trap'i %60 azaltır. Bundan dolayı çalışmalar monooksijenaz sisteminin çeşitli SitP450 enzimi ve SitP450 redüktaz içerdiğini CYP2E1'in alkol kaynaklı radikal oluşumunda CYB1'den 22 kat daha fazla aktif olduğunu göstermiştir. İntragastrik beslenme ile etanol alan ratların kullanımında invitro spin-tapping tekniği ile veya invivo hidroksietil radikallerinin mikrozomal proteinlere kovalent bağlandığı immünojenik ölçümde hidroksietik radikal formasyonunun kronik etanol alımında 7 kat arttığı gözlenmiştir. Hidroksietil radikallerinin non-enzimatik olarak hidroksil radikalleri ile etanolün nteraksiyonu tarafından üretilebilir (fenton reaksiyonu ile) (52).



Kompleks sitokrom P450 bağımlı monooksijenaz enzim sistem aktivitesinin mikrozomal preparasyonlarında hidroksietil radikal formasyonu için gerekli olmasına rağmen birçok kanıt demir interaksiyonu ve ROS metabolitlerini içerdiğini gösterebilir. Hidroksietil radikalleri etanol ile lipid peroksidasyonunu stimüle ettiğine dair direk bir delil yoktur. Kimyasal olarak hidroksietil serbest radikali GSH, askorbik asit ve α -tokoferol ile reaktif olur. Etanolden oluşan radikaller kronik alkol alımından sonra karaciğer antioksidanlarında azalmaya katkıda bulunur. İntragastrik etanol ile beslenen ratlarda mikrozomal proteinlere kovalent bağlı hidroksietil radikallerinin miktarı karaciğer MDA içeriği ile pozitif yönde korelasyon gösterir. Benzer olarak alkolik karaciğer hastalığı olan hastalarda hidroksietil radikallerine karşı oluşan IgG titresi ile MDA proteinine karşı oluşan antikor titresi arasında pozitif bir korelasyon vardır. Bundan dolayı hidroksietil radikallerin alkolle indüklenen oksidatif hasarın sebebi olması mümkündür (52).

Bu bilgiler ışığında çalışmamızda etanol verilen ratlarda quercetin eritrosit G6PD enzim aktivitesi üzerinde koruyucu etkisini araştırmayı amaçladık.

2. MATERYAL VE METOD

2. 1. Hayvanlar

Bu çalışmada 38 adet, 3-3,5 aylık 280-320 g Sprague-Dawley erkek rat kullanıldı. 25 rat ile çalışma tamamlandı. Ratlar standart bir diyetle beslendiler ve içme suları ile ilgili herhangi bir sınırlandırılma yapılmadı. Tüm deney gruplarında çevresel şartlar kontrol altında tutuldu (12saat/12saat ışık/karanlık siklüsü, 25-28 °C ortam ısısı).

Ratlar aşağıdaki gibi 4 gruba ayrıldı;

1. Kontrol grubu (K) (n=6): Bu gruba 30 gün süre ile intra gastrik (i.g.) yolla 2 ml/gün serum fizyolojik (SF) verildi. Ratların günlük doğal yaşamları korunmuş olup, yem ve su konusunda herhangi bir kısıtlamaya gidilmemiştir.

2. Quercetin Grubu (Q) (n=7): 30 gün süre ile 3 günde 1 kez 100 mg/kg quercetin ve 1 ml SF verildi. Quercetin, % 3 g olarak SF ile süspanse edilerek hazırlandı. Yine bu grup için de herhangi bir yem ve su kısıtlaması yapılmamıştır.

3. Alkol Grubu (EtOH) (n=7): 30 gün süre ile i.g. olarak, 12 saat açlıktan sonra etanol (EtOH) verildi. Distile su ile hazırlanan %80 EtOH (v/v) 1 ml/gün ve SF 1 ml/gün olarak verildi. EtOH verildikten bir saat sonra ise yem ve su verildi.

4. Quercetin + EtOH Grubu (Q+EtOH) (n=5): 30 gün boyunca i. g. Olarak 3 günde 1 kez 100 mg/kg quercetin verildikten 2 saat sonra % 80 (v/v) EtOH'den 1 ml/gün verildi. EtOH verildikten bir saat sonra yem ve su verildi.

Tüm ratlara son yüklemenden 24 saat sonra Alfamin intraperitoneal (i.p) olarak uygulandı. Operasyon öncesi ratlar yaklaşık 12 saat aç bırakıldılar. Ratlar sırtüstü yatırılarak operasyon masasına dört ekstremitelerinden tespit edildiler. Batın açılıp heparinli enjektörle yaklaşık 5 ml kan intrakardiyak yöntemle alınarak heparinli tüplere konulduktan sonra ratlar dekapite edildi.

2. 2. Biyokimyasal Analiz

2. 2. 1. Kimyasallar:

Stabilize Edici Solüsyon:

- EDTA 2,7 mM (pH:7,0)
- 2-Mercaptoethanol 0,7 mM
- NaOH 25 mM

1000 ml için gerekli EDTA (Merk) hesaplanır ve tartılır. 1000 ml'lik balon jode, 500 ml Distile Su karıştırılır. EDTA çözülünceye kadar damla damla 25 mM NaOH eklenerek karıştırılır. pH: 7,0'a ayarlandıktan sonra miktarı hesaplanan 2-Mercaptoethanol ilave edilir. Volüm 1000 ml'ye Distile Su ile tamamlanır.

Drabkin Reaktifi:

- Sodyum Bikarbonat (NaHCO₃) 1 g
- Potasyum Ferrisiyanür (K₃Fe(CN)₆) 0,2 g
- Potasyum Siyanür (KCN) 0,05 g
- Distile Su 1000 g

G6PD Reaktifi :

- NADP⁺ (2 mM) : (β -Nicotinamide Adenine Dinucleotid Phosphate Monosodium Salt (Sigma N-505)) gerekli volüm distile su içerisinde hesaplanarak çözülür (NADP⁺ için MA:765,4 g).
- G-6-P (6 mM) : D-Glukoz-6-Phosphate (Disodium Salt (Sigma G-7250)) gerekli volümdeki distile su içerisinde hesaplanarak çözülür (G-6-P için MA :340,1 g).
- MgCl₂ (0,1 M) : 2033,1 mg MgCl₂·6H₂O (Merk) tartılarak 100 ml distile su içerisinde çözülür (MgCl₂ için MA: 203,30 g).

Tris-HCl Tamponu (1mM) :

pH 8,0 12,11 g Tris (hydrometyl-aminomethan) tartılır. 100 ml'lik kap içerisine konur, 25 ml distile su ve 65 ml 1 N HCl eklenerek çözülünceye kadar karıştırılır. pH 8,0 olduktan sonra hacim 100 ml'ye distile su ile

tamamlanır.

Raksiyon Karışımı :

Reaktifler:	Miktarlar (µl)
• Distile Su	550
• NADP ⁺ (2mM)	100
• Tris-HCl (1M) pH :8,0	100
• MgCl ₂ (0,1 M)	100

Toplam 850 µl'lik reaksiyon karışımı elde ederiz.

2. 2. 2. Hemolizat Hazırlanışı :

Heparinize kan 4 °C'de 3000 rpm de 5 dakika santrifüj edilir. Plazma ve beyaz küre tabakası aspire edilir. Daha sonra üç kez izotonik NaCl ile muamele edilip santrifüj edilir. Her santrifüj sonrası süpernatant aspire edilerek atılır. Hazırlanan eritrosit paketinden 50 µl alınıp bir başka tüpe aktarılır. Üzerine 950 µl stabilize edici solüsyon eklenir. Böylece 1/20 oranında dilüe edilmiş hemolizat hazırlanmış olur.

2. 2. 3. Hemolizat Hemoglobin Tayini :

Prensip :

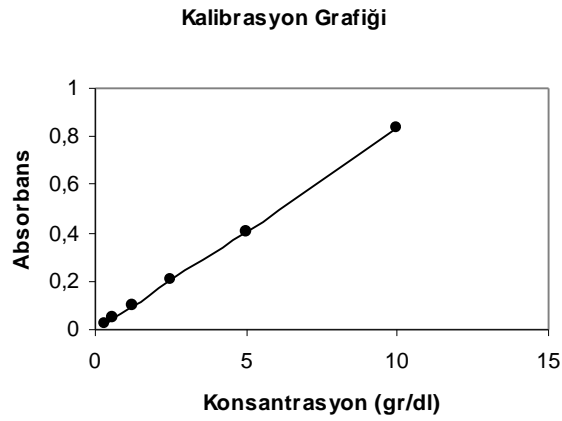
Drapkin çözeltisinde bulunan ferrisiyanür Hb'deki +2 değerlikli demiri (ferro=Fe⁺²) +3 değerlikli demir (Ferrik=Fe⁺³)'e çevirerek methemoglobine dönüştürür. Sonra potasyum siyanür ile birleşerek stabil bir molekül olan siyanmethemoglobin meydana gelir (57).

Prosedür :

Hemolizat hemoglobinin ölçümü aşağıdaki gibi yapılmıştır :

	<u>Kör</u>	<u>Numune</u>
Hemolizat	-	50 µl
Drapkin Çözeltilisi	2,5 ml	2,5 ml

Tüpler altüst edilir.daha sonra 10 dakika oda ısısında bekletilir. Numune köre karşı 546 nm’de okunur. Okunan absorbans kalibrasyon grafiğinden % Hb değeri olarak tespit edilir.



Şekil 2. 2. 3. Hemoglobin kalibrasyon grafiği

2. 2. 4. Hemolizat G6PD Aktivitesi Ölçümü :

Prensip :

G6PD enzim aktivitesi Modified Zinkham Metod'a göre ölçülmüştür (58). G6PD enzimi pentoz fosfat yolunun ilk ve hız kısıtlayıcı enzimi olup Glukoz-6-fosfat (G6P)'tan 6-fosfoglukonat (6-PG) oluşumunu katalize eder. Bu reaksiyon sırasında NADP^+ NADPH 'a dönüşür ve oluşan NADPH miktarı ile G6PD enzim aktivitesi doğru orantılıdır.



Prosedür :

Hemolizat G6PD tayini aşağıdaki gibi yapılmıştır.

Reaksiyon karışımı ve G6P reaktifleri dolaptan çıkartılıp 30 °C'ye getirildi.

	<u>Kör</u>	<u>Numune</u>
Reaksiyon Karışımı	850 µl	850 µl
Hemolizat	-	50 µl
Numuneye G6P ilave etmeden önce 30 °C'de 5 dk beklenerek enzim için optimal şart sağlanmış olur		
G6P	100 µl	100 µl

Oluşan tepkime 340 nm'de sıfırıncı dakikadan başlanarak onuncu dakikaya kadar her dakikadaki absorbans değerleri kaydedilir.

$$\text{Enzim Miktar Tayini : IU/gr Hb : } \frac{\Delta\text{OD} \times 10^5}{6,22 \times \% \text{ g Hb} \times \text{Hemolizat Miktarı}}$$

6,22 = 1 mmol NADPH'ın 1 cm'lik ışık yolunda verdiği OD değeridir.

2. 2. 5. Tam Kan Redükte Glutasyon Düzeylerinin Ölçülmesi

Redükte glutasyon (GSH) düzeyleri spektrofotometrik olarak Beutler yöntemi ile belirlendi (59).

Prensip:

Tam kan GSH'ın SH grupları bir disülfid kromojeni olan 5,5'-dithiobis 2-nitrobenzoikasit (DTNB)'i indirgemesi ile sarı renkli bir bileşik oluşur. Bu bileşiğin 412 nm dalga boyunda ölçülen absorbansı GSH konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Reaktifler:

- | | |
|--------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| • KCl tamponu | 0,15 M |
| • Çöktürücü solüsyon
(Proteinsizleştirme çözeltisi) | 1,67 g/dl metafosforik asit,
0,2 g/dl EDTA ve 30 g/dl NaCl |
| • Na ₂ HPO ₄ çözeltisi | 0,3 M |
| • DTNB | 2 mM |
| • Sodyum sitrat | %1 |

Prosedür:

Kan GSH'ı için 0,2 ml tam kan 1,8 ml buz soğukluğunda distile su ile karıştırılarak hemoliz edildi (Hemolizat). Hazırlanan hemolizat numuneleri üzerine 3 ml çöktürücü solüsyondan (1,67 g/dl metafosforik asit, 0,2 g/dl EDTA ve 30 g/dl NaCl içeren) eklenerek karıştırıldı. 5 dakika oda ısısında bekledikten ve renk kıvamına geldikten sonra Whatman 1 kağıdından süzülerek filtrat elde edildi. 0,4 ml filtrat üzerine 2 ml 0,3 M Na₂HPO₄ çözeltisi ve 0,5 ml 40 mg/dl DTNB (%1'lik sitrat içerisinde çözülen) ile muamele edilerek oluşan rengin absorbansı Shimadzu UV-1601 spektrofotometresinde 412 nm dalga boyunda reaktif körüne karşı okundu. Tam kan GSH düzeyleri mg/g Hb olarak ifade edildi.

2. 2. 6. İstatiksel Analiz

İstatiksel analizler SPSS paket programı kullanılarak yapıldı. Sonuçlar ortalama \pm SD olarak ifade edilmiştir. G6PD enzim aktivitesi için verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-wilk testi ile test edildi. Verilerin normal dağılıma uyduğu görüldü. Gruplar arası farkın değerlendirilmesinde oneway ANOVA analizi kullanıldı. Varyansların homojenliği Levene testi ile test edildi. Grup içi karşılaştırmalarda Tukey HSD testi kullanıldı. GSH için veriler aynı test yöntemleri kullanılmıştır.

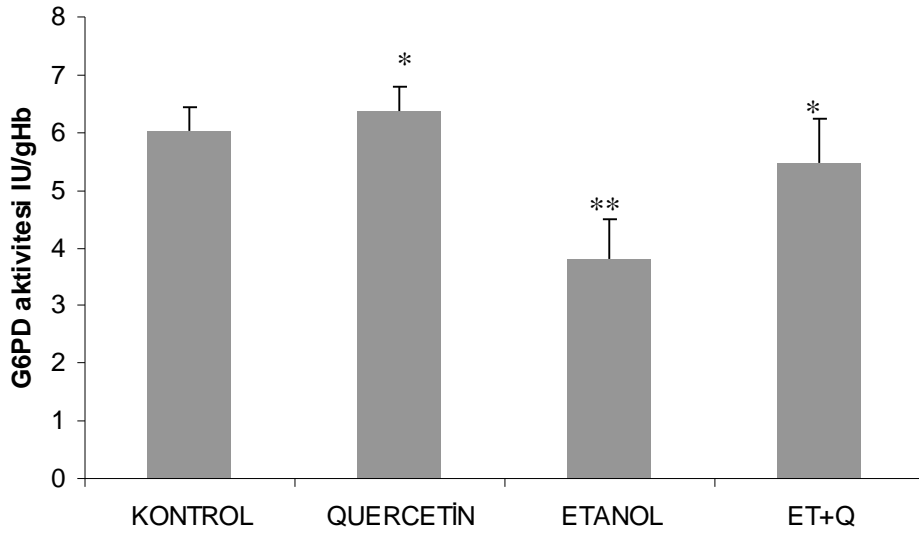
3.BULGULAR

3. 1. G6PD Düzeyleri

Eritrosit G6PD enzim aktivitesinde kontrol grubu ile etanol grubu karşılaştırıldığında etanol grubunda anlamlı düşük bulundu ($p<0,001$). Kontrol ile alkol + quercetin grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=0,384$). Etanol grubu ile quercetin grubu karşılaştırıldığında quercetin grubunda anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0,001$). Quercetin ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p=0,704$). Quercetin + etanol grubu ile etanol grubu karşılaştırıldığında quercetin + etanol grubunda olarak anlamlı yüksek bulundu ($p<0,001$).

Gruplar	Eritrosit G-6-P-D aktivitesi (IU/gHb)
Kontrol (n=6)	6,03 ± 0,4
Quercetin (n=7)	6,38 ± 0,4
Etanol (n=7)	3,82 ± 0,67
Etanol + Quercetin (n=5)	5,46 ± 0,78

Tablo 3. 1. Grupların G6PD enzim aktivite ortalama değerleri.



Şekil 3. 1. Eritrosit G6PD enzim aktivitelemi

* $p < 0,001$ Etanol grubu ile kıyaslandığında

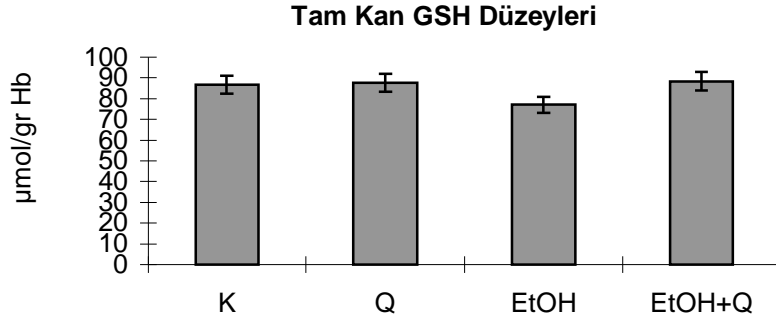
** $p < 0,001$ Kontrol grubu ile kıyaslandığında

3. 2. Tam Kan GSH Düzeyleri

Tam kan GSH değeri arasında herhangi bir anlamlılık gözlenememiştir ($p=0,054$).

Gruplar	Ortalama \pm SD $\mu\text{mol/gr Hb}$
Kontrol (n=6)	86,71 \pm 3,388
Quercetin (n=7)	87,56 \pm 2,63
Etanol (n=7)	77,08 \pm 3,002
Quercetin + Etanol (n=5)	88,34 \pm 2,451

Tablo 3. 2. Grupların GSH ortalama değeri.



Şekil 3. 2. GSH değerleri.

4. TARTIŞMA

Alkol kullanımı ve buna bağılı direkt veya indirekt sorunlar çağımızda hemen hemen bütün batı toplumlarının en önemli sorunlarından biri olmuş ve, sadece alkol kullanımıyla ilişkili bozuklukların, ABD’de topluma direkt ve indirekt maliyetinin 150 milyar dolardan daha fazla, kişi başına yaklaşık 600 dolar olduğu hesaplanmıştır. Alkol kullanımının bu büyük çaptaki sağlık sorunları yanında trafik kazaları, intiharlar, suça yönelme, aile parçalanması, iş hayatının bozulması, meslek kayıpları ve diğer ekonomik problemler gibi, toplumlara pek çok zararı olan çok boyutlu bir bio-psiko-sosyal sorun olduğu görülmektedir (60).

Bugün ABD’de kalp hastalığı ve kanserden sonra alkolle ilişkili bozukluklar üçüncü büyük sağlık sorununu oluşturmaktadır. Alkolle ilişkili bozukluk oranı Almanya, İngiltere’de yaklaşık ABD’deki kadar iken, Portekiz, İspanya, İtalya,Fransa ve eski Sovyetler Birliği’nde ABD’deki oranlardan daha yüksektir. Orta Doğu ve Asya ülkelerindeki oranlar daha düşük olmakla birlikte zamanla arttığı gözlenmektedir (60).

Ülkemizde alkol kullanımı ve alkolle ilişkili bozuklukların sıklık ve yaygınlığı açısından istatistiki rakamlar mevcut değilse de, Devlet İstatistik Enstitüsü(D.İ.E.) verilerine göre, nüfus başına tüketilen alkol miktarı büyük bir hızla artmaktadır. Alkol tüketimi, şehirlerde kırsal alanlara göre daha fazladır (60).

Bütün dünyada erkeklerde kadınlardan daha fazla alkol kullanımı söz konusudur. Ancak gelişmiş ülkelerde kadınlardaki oran erkeklere yaklaşmaktadır. ABD’de alkolle ilişkili bozuklukların erkek/kadın oranı 2/1 veya 3/1’dir. Ülkemizde kadınlarda alkol kötüye kullanımı ve alkol kullanımına seyrek olarak rastlanmasına karşılık son yıllarda alkol tüketiminin kadınlar arasında da hızla arttığı gözlenmektedir. Alkol kullanımı en çok 20-35 yaş grubunda görülür. Bu yaş grubu aktif alkol kullanıcılarının en yüksek yüzdesine ve alkol tüketiminin en büyük payına sahiptir (60).

Etiolojik olarak alkolle ilişkili bozukluklar, bio-psiko-sosyal teori ve yaklaşımların, belki de, en fazla geçerli olduğu heterojen bir hastalık grubudur (60).

Alınan alkolün yaklaşık %10’u mideden, kalanı ise ince barsaklardan emilerek kısa sürede kana karışır. Mide boş ise alkolün absorpsiyonu daha hızlı,

midede besinler olduğu takdirde ise daha yavaştır. Alkolün aç veya tok karna alınmış olmasına bağlı olarak, kanda alkol konsantrasyonunun pik yapma süresi 30-90 dakika arasında değişir (60).

Bazı çalışmalar kadınlarda ADH'ın erkeklerden daha az olduğunu göstermiştir ki bu bulgu, aynı miktarda alkol alan kadınların erkeklere göre daha ağır intoksikasyon gösterme eğilimini açıklamaktadır. Benzer şekilde, alkolün metabolize edilmesi ile ilgili enzimlerin, bazı Asya ülkelerinin insanlarında düşük seviyelerde olması, bu insanların kolay intoksike olmalarına ve ağır semptomlar göstermelerine sebep olmaktadır (60).

Beyin ve merkezi sinir sistemine olan etkisi; kötüye kullanılan bir çok madde için, hedef reseptörler tanımlanmış olmasına rağmen alkolün etkileri için mediyatör olabilecek bağımsız bir moleküler hedef tanımlanamamıştır (60).

Kronik alkol kullanımı olan kişilerde, alkolün karaciğerde yıkılması sırasında ortaya çıkan asetaldehidin, doğrudan doğruya beyni ve beyindeki nörotransmitterleri etkilemesi sonucunda oluşan, opioid benzeri maddelerin bağımlılık oluşumu ve tolerans gelişmesinden sorumlu olduğu düşünülmektedir (60).

Alkol primer olarak karaciğerde yıkılırken ortaya çıkan zararlı metabolitleri nedeniyle karaciğer harabiyeti meydana gelmektedir. Alkol karaciğerde yağlı karaciğer ve hepatik siroz gelişmesine neden olmaktadır. Alkol sindirim sistemi üzerinde ise uzun süreli kullanımında mide, barsaklar ve pankreasta ağır bozukluklar ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Ağır alkol kullanımı gerek direk etkileri ve gerekse sindirim sisteminde ortaya çıkardığı bozukluklar sebebiyle beslenme bozukluklarına yol açar. Alkolün fazla alınması, tansiyon yükselmelerine, trigliserit ve lipoprotein regülasyonunun bozulmasına sebep olur ve myokard enfarktüsü ve serebro-vasküler hastalıkların riskini arttırır (60).

ROS'un biyolojik sistemlerde membran lipitlerine, proteinlere, karbonhidratlara, nükleik asitler ve DNA üzerinde olan zararlı etkileri bilinmektedir. Reaktif oksijen ürünleri oluşumunu birkaç sınıfta toplamak mümkündür. Bu zararlı ajanlar biyolojik sistemlerde (aktive olmuş fagositler, alkol ve uyuşturucu maddeler gibi), intraselüler kaynaklı (elektron transport zinciri, sitokrom P₄₅₀ gibi) ve geçiş metalleri aracılı oluşabilir (10).

Karaciğer metabolizması alkolden çok ciddi boyutlarda etkilenmektedir. Alkol metabolizmasında negatif kontrol mekanizması bulunmadığı için alkolün oksidasyonu diğer besinlerin oksidasyonundan önce gelmektedir. Bu nedenle alkol metabolizması tepkimeleri enerji üreten yol olmaktan çok detoksifikasyon sistemi olarak geliştiği düşünülmektedir (53).

Kronik alkolizmde oluşan doku hasarının çoğu, yüksek dozlarda alkol alındıktan sonra karaciğerde biriken ve kana salgılanan asetaldehiden kaynaklanmaktadır. Oldukça reaktif olan asetaldehid amino gruplarına, nükleotidlere ve fosfolipitlere kovalan olarak bağlanmaktadır. Etkilenen proteinler arasında hemoglobin, kalmodülin, ribonükleaz ve tubulin bulunmaktadır. Asetaldehid takısının oluşması sonrasında lipit peroksidasyonu artmakta ve serbest radikal hasarı kalıcı hale gelmektedir. Doğrudan GSH'a bağlanan asetaldehid, H₂O₂ ile hasar oluşturmaya karşın GSH'ın koruyucu etkisini azaltmakta ve hidroksil oluşumunu arttırmaktadır. MEOS uyarılması da serbest radikal oluşumunu hızlandırmaktadır (53).

Canlılar ROS'un bu zararlı etkilerine karşı kendilerini çeşitli şekillerde korurlar. Bunlara antioksidan savunma sistemleri yada kısaca antioksidanlar denir. Antioksidanlar, doğal (eksojen) kaynaklı ve endojen kaynaklı antioksidanlar şeklinde ayrılabilceği gibi serbest radikallerin oluşumunu engelleyici yada var olanları etkisiz hale getirenler şeklinde sınıflandırılabilirler. Antioksidanlar etkilerini toplayıcı, zincir kırıcı, bastırıcı ve onarıcı etki şeklinde gösterirler (10).

Doğal antioksidanlar arasında flavonoidler de yer alırlar. Flavonoidler sarı renkli olmaları nedeniyle Latince sarı anlamına gelen flavus sözcüğünden türetilerek flavonoid adını almışlardır. 15 C atomlu 2-fenil benzopiron (difenil propan) yapısı (C₆-C₃-C₆) gösterirler. Bu yapıları nedeniyle polifenolik bileşikler olarak kabul edilirler. İskelet yapılarının farklı olmasına göre flavon, flavonol, flavonon, biflavonoid, kalkon gibi türleri vardır. Flavonoidler bitkisel gıdalarda bol ve yaygın olarak bulunan bileşiklerdir. Bitkilerin ikincil metabolitlerindedir. Yaşamsal gereksinimleri için kullandıkları karbohidratlardan, aminoasitler gibi birincil metabolitlerden türerler. Fenil benzopiran yapısı A,B,C halkalarından meydana gelmiştir. Sayıları yaklaşık 4000'in üzerinde olduğu tahmin edilmektedir. Elma, soğan, baklagiller, hububat, domates, turunçgiller, çay ve kırmızı şarapta bol

bulunurlar. Flavonoidlerin antioksidan etkisi onların serbest radikal toplayıcı etkilerinin sonucudur. Etkilerini gösterebilmek için serbest radikallerle reaksiyona girerek onları etkisiz hale getirirler (37).

Flavonoidlerin serbest radikal toplama ve antioksidan özelliklerinin yapılarında bulunan üç gruptan ileri geldiği öne sürülmektedir (37).

1, B halkasındaki o-hidroksi (kateşol) grubu (radikal hedef yeri).

2, C halkasındaki 4-okzo grubu ile 2-3 çift bağı (elektron delokalizasyonu için gereklidir).

3, 3 ve 5 hidroksil grupları (maksimal radikal yakalama ve metal şelatlama için gereklidir).

Bizim yapmış olduğumuz çalışmada kullandığımız ve flavonoid ailesinin bir üyesi olan quercetin bu üç fonksiyonel grubu üzerinde bulundurmaktadır. Bu üç gruba sahip olan flavonoidler maksimal aktivite gösterirken eksik gruba sahip olanlar ise düşük aktivite gösterirler (36-37).

Quercetin flavonol iskeletinde 3,5,7,3',4' C atomlarına –OH gruplarının substutasyonu ile oluşur. İnsanların günlük quercetin alımının günde ortalama 50-500 mg olduğu sanılmaktadır. Quercetin lipofilik bir antioksidandır. Fakat α -tokoferolden daha hidrofilitir. Quercetin muhtemelen membranın polar yüzüne yakın şekilde lokalize olmaktadır. Quercetin peroksil radikallerini kolayca yakalamakta ve böylece lipit peroksil radikallerine α -tokoferolden daha hızlı şekilde etki etmektedir (36-37).

Flavonoidlerin birçok klinik etkileri rapor edilmiştir. Bunlar;

- Antiaterosklerotik etki,
- Antiinflamatuvar etki,
- Antitümör etki,
- Antitrombojenik etki,
- Antiosteoporotik etki,
- Antiviral etki,
- Antialerjik etki gibi (36-37).

Eritrositler bilindiği gibi akciğerlerden dokulara ihtiyacı olan O_2 taşıyıp dokulardan da akciğerlere CO_2 taşımakla görevli olmalarından dolayı yüksek O_2

parsiyel basıncı (PO_2)'na sahiptirler. Bu nedenden dolayı ROS'un zararlı etkilerine maruz kalmaktadır. Eritrosit enerjisi tamamen glukozla bağılı olan hücrelerdendir. Oksidatif stres altında olmayan eritrositte glukozun %90 kadarı Embden-Mayerhof yolu (anaerobik glikoliz) ile pirüvat ve laktata parçalanmaktadır. Diğer %10'u ise pentoz fosfat yolunda kullanılmaktadır (7,12).

ROS'un bugüne kadar pek çok zararlı etkileri tanımlanmıştır. Ortaklanmamış elektronlarından dolayı oldukça reaktiftirler. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller moleküler oksijen kaynaklı olan radikallerdir. Reaktif oksijen ürünlerinin en zararlı olanı ise hidroksil ($OH\cdot$) radikalidir (10).

ROS'un membran lipitleri üzerine, proteinlere, DNA'ya, RNA'ya ve karbonhidratlar üzerine olan zararlı etkileri mevcuttur. Canlı hücreler bu oksidan ajanların zararlı etkilerinden çeşitli şekillerde kendilerini korurlar. Bunlar antioksidan savunma sistemleri yada kısaca antioksidanlar olarak bilinirler. Bu savunma sistemleri arasında endojen, eksojen ve gıdasal antioksidanlar olarak sınıflandırılabilirler (10).

Olgun eritrositlerde nükleus ve mitokondri gibi organellerden yoksundur. Eritrositler oksidan ajanların zararlı etkilerine karşı NADPH bağımlı glutatyon peroksidaz ile detoksifiye ederler. Eritrositlerde NADPH'in tek kaynağı pentoz fosfat yoludur. PFY'nda NADPH'in üretimini engelleyen herhangi bir enzim eksikliğinde nükleosu bulunmadığı için sentez edilemez. Böylece hücre ROS'un zararlı etkilerinden korunamadığı için hücrenin ölümü ile sonuçlanır (7,12).

Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD; EC 1.1.1.49) PFY'nun ilk ve düzenleyici enzimi olup, glukoz-6-fosfatın 6-fosfoglukonalaktona dönüşümünü $NADP^+$ varlığında irreversibil olarak kataliz etmektedir. PFY ATP üretmez ancak iki temel işlevi bulunur: birincisi yağ asidi ve steroid biyosentezleri (adipoz doku, karaciğer, adrenal korteks ve süt veren meme bezi) gibi indirgeyici özellikteki sentezler için NADPH üretimi ve ikincisi ise nükleotid ve nükleik asid biyosentezi için riboz sağlanmasıdır (8).

PFY kilit enzimi olan G6PD geni X kromozomunun q28 bölgesinde yer almakta ve 13 eksondan oluşmaktadır. Genin transkripsiyon veya translasyona bağılı hatalı sentezi veya posttranslasyonel dönemdeki bozukluğu enzim eksikliğine neden

olmaktadır. Bu durum özellikle eritrositlerde oksidan ilaç ve maddelere maruz kalındığında hemolitik anemiye neden olmaktadır (11,15, 20-23) .

G6PD enzim eksikliği ilk kez 1950’li yılların ortasında keşfedildiğinde niçin bazı insanların antimalarial ilaç olan primaquinenin etkisine hassas olduğu merak edilmiştir. Daha sonra etkilenenlerin çoğunun asemptomatik olduğu görülmüştür. Bununla beraber eksiklik bireylerde bazı ilaçların alımında, bazı enfeksiyonlar esnasında, favizmde, yenidoğan sarılığı ile akut hemolitik anemi şeklinde ortaya çıkmaktadır. G6PD enzim eksikliği dünya genelinde en yaygın enzimopati olma özelliği ile hemoglobinopatilerden sonra ikinci sıklıkla görülen kalıtsal bir hastalıktır ve sıtmanın endemik olduğu bölgelerde saptanmaktadır. Dünyada 400 milyondan fazla insan G6PD enzim eksikliğinden etkilenmektedir. Ülkemiz genelinde G6PD eksikliğinin rastlanma sıklığı %0,6 olarak rapor edilmiştir. Ülkemizde G6PD enzim eksikliği en fazla Çukurova Bölgesinde gözlenmekte ve karşılaşma sıklığı %8,2 olarak rapor edilmiştir (20).

Dünyada bugüne kadar 400’ün üzerinde G6PD varyantı rapor edilmiştir. Ülkemizde ise 20’ye yakın varyant rapor edilmiş olup bunların büyük bir kısmı Çukurova ve Antalya bölgesinde rapor edilmiştir. Dünyada en yaygın olarak gözlenen G6PD varyantı Gd-Akdeniz’dir (20).

Bu çalışmada amacımız etanol verilen ratlarda alkol kaynaklı serbest radikallerin G6PD enzim aktivitesi üzerine olan zararlı etkileri ve antioksidan özellikteki quercetin’in bu zararlı etki üzerine olan koruyucu etkisinin araştırılmasıdır.

Çalışmamız G6PD enzim aktivitesi eritrositlerde çalışıldı, G6PD enzim aktivite tayini spektrofotometrik olarak Modifiye Zinkham Metodu ile çalışıldı (63). Çalışmamızda eritrosit G6PD enzim aktivitesinde kontrol grubu ile alkol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p<0,001$). Bu farklılığın nedeni alkol grubunda alkol derive serbest radikallerin eritrosit G6PD enzim aktivitesini inhibe etmesidir. Kontrol ile alkol + quercetin grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=0,384$). Bunun nedeni de alkolün indüklediği ROS oluşumunda quercetin’in bu ürünlerin zararlı etkilerini detoksifiye etmede başarılı olduğunu göstermektedir. Alkol grubu ile quercetin grubu arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulundu ($p<0,001$). Bunun nedeni ise alkol

grubunda eritrositler ROS ürünlerinin zararlı etkilerine maruz kalmasıdır. Quercetin grubunda ise ROS ürünlerinin detoksifiye edilmesi ile başarılmıştır. Quercetin ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p=0,704$). Bu da bize kontrol grubunun çalışma süresince herhangi bir oksidan strese maruz kalmadığını göstermektedir. Alkol grubu ile quercetin + alkol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görüldü ($p<0,001$). Bu sonuç bize alkol kaynaklı olan ROS'un zararlı etkilerine karşı quercetin'in koruyucu etkisinin olduğunu göstermekte ve bu zararlı ajanları ortadan kaldırdığını, detoksifiye ettiğini gösterir. Tam kan GSH düzeylerinde gruplar arası anlamlı bir fark bulunamadı (0,054).

Literatürde, alkolün G6PD enzim aktivitesi üzerindeki zararlı etkisinin antioksidan quercetin tarafından detoksifikasyonuyla ilgili çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Fakat mevcut çalışmalarda bulgular bizim bulduğumuz sonuçlar ile aynı yöndedir.

Büyükokuroğlu ve arkadaşlarının (61) 2002 yılında yapmış oldukları çalışmada alkolün G6PD enzim aktivitesi üzerine etkisini *invivo* ve *invitro* olarak incelemiştir. *Invitro* inceleme için örnekler insanlardan, *invivo* inceleme için ise ratlardan sağlanmıştır. *Invitro* çalışmada G6PD enzim aktivitesinin eritrositlerde etanol konsantrasyonunun artması ile paralel ve istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir. Etanol ile *invitro* çalışmadaki inhibisyon % olarak 1,3 ve 6. saatte sırası ile %59, %40 ve %6 oranında inhibisyon olduğunu rapor edilmiş olup, aynı çalışmada etanol tüketimini takip eden bir saat içerisinde G6PD enzim aktivitesinin maksimum inhiye olduğu ve bu inhibisyonun 3 saat sonra bile anlamlı olarak devam ettiğini gözlemlenmiştir. Bu çalışmada etanolün plazma pik seviyesi ve G6PD enzim aktivitesinin maksimal inhibisyonu ve etanolün plazma yarılanma ömrü ile inhibisyon arasında korelasyon olduğunu rapor etmişlerdir. Çalışma sonucunda etanolün G6PD enzim aktivitesi üzerinde hem *invivo* hem de *invitro* olarak inhibitör etkisinin olduğu görüşünü ileri sürmüşlerdir. Etanolün *invitro* olarak eritrosit G6PD enzim aktivitesinin potent bir inhibitörü olduğunu ve etanolla indüklenen hemolize neden olabileceğini rapor etmişlerdir (61).

Tedesco ve arkadaşları (62) 2000 yılında yapmış oldukları çalışmada kırmızı şarap fenollerinin eritrositler üzerindeki antioksidan özelliklerini araştırmışlardır. Bu amaçla insan eritrositlerinde H_2O_2 ile indüklenen oksidasyona karşı kırmızı şarap

fenollerinin etkisi araştırılmıştır. ROS'un sebep olduğu hemoliz, methemoglobin üretimi ve lipit peroksidasyonun analizi yapılmıştır. Ayrıca çalışmada myricetin, epicatechin, rutin, quercetin ve resveratrol seviyeleri de ölçülmüştür. Çalışma sonucunda kırmızı şarap fenollerinin invitro olarak normal insan eritrositlerinde yüksek seviyesi oksidatif hasarın azaltılmasında etkili olduğu bulunmuştur. Bu çalışmadaki veriler kırmızı şarap ekstratlarının ROS'un çöpçüsü olabileceği fikrini ileri sürmüşlerdir. Yapılan bu çalışma bizim çalışmadaki quercetin ROS'un zararlı etkileri üzerine olan koruyucu etkisi ile uyumludur (62).

Terao ve arkadaşlarının (41) 2001 yılında yapmış oldukları çalışmada sigara tar-extratı ile indüklenen eritrosit yapı bozukluğu üzerine quercetin koruyucu etkisi araştırmışlardır. Quercetin aglikon etkisinin bilinmesi ve onun bir metaboliti olan quercetin-3-O- β -D glukronid sigara tar-extratı ile indüklenen eritrosit yapı bozukluğu ile ilişkilendirilmiştir. Mikrokanal cihazı ile eritrositlerin geçiş zamanı eritrosit deformabilitesinin indeksi olarak verilmiştir. Q3GA 10 μ M konsantrasyonunda eritrosit geçiş zamanını düşürdüğü ve aynı konsantrasyonda Q3G geçiş zamanını etkilemediği, G3GA'nın etkisi Q-aglikondan daha güçlü olmasına rağmen eritrosit deformabilitesini arttırdığını göstermişlerdir. Eritrosit süspansiyonundaki %0,25 etanol solusyonu kullanılarak yapılan çalışmada eritrosit geçiş zamanının kontrolden daha düşük olmadığı gösterilmiştir. Bu sonuç quercetin etanolün etkisinden bağımsız olarak eritrosit deformabilitesini artırma kapasitesine sahip olduğu, quercetin-aglikon eritrosit deformabilitesinin bozukluğunu membran lipit peroksidasyonunu baskıladığı, aynı etki Q-3-O- β -D glukronid ile de bulunduğu rapor edilmiştir. Fakat bunun etkisinin Quercetin-aglikondan daha az olduğu ve böylece sigara içimi sonucunda oluşan ROS zararlı etkileri quercetin toplayıcı etkisi ile korunduğunu rapor etmişlerdir. Sonuç olarak quercetinden bir besin alımı sigara içimi ile oluşan eritrosit membran bozukluğuna karşı korumada yararlı olabileceği, quercetin lipit peroksidasyonu üzerindeki koruyucu etkisi bizim çalışmamız ile uyum içerisinde (41).

Tyulina ve arkadaşlarının (63) 2000 yılında yapmış oldukları çalışmada etanol metabolizmasının eritrosit hemolizini etkileyip etkilemediğini araştırmışlardır. Bu amaçla etanol ve etanol metabolizmasında ortaya çıkan asetaldehidin tavşan eritrositlerindeki hemolitik stabilitesini karşılaştırmışlardır. Etanol ve eritrositlerin

normal inkübasyonu hem asidik hemde oksidatif hemolizle kolaylaştırılmıştır. Asetaldehit eritrositlerin benzer destabilize edici etkisini sadece oksidatif hemolizde kullanılmıştır. Etanolün destabilize edici etkisi asidik, fakat oksidatif olmayan durumlar altında CAT ile inaktive olan eritrositlerde gözlenmiş, bu etanolün astaldehide oksidasyonunun destabilize edici etkisi sadece oksidatif hemoliz durumlarında gözlemlenmiştir. İki hemoliz ölçümünde de etanol preinkübasyonu T-max'ın redüksiyonu ve %max'ın artmasını etkilediği bulunmuştur. Her ikisi de azalmış eritrosit stabilitesini gösterdiği, etanol ile preinkübasyondan sonra her iki tip hemolizde T-max'ın anlamlı olarak azaldığı ve %max'ın da arttığı gösterilmiştir. Asetaldehit oksidatif hemolizde T-max'ı azalttığı % max'ı arttırdığını gözlemlenmiştir. Buradaki sonuçlar asidik ve oksidatif hemoliz mekanizmasındaki farklılıkların yansımaları gösterdiği, ayrıca bulunan bir diğer sonuç ne zaman eritrosit CAT aktivitesi inaktive edilirse hücreler üzerindeki etanolün destabilize edici etkisi halen asidik şartlar altında meydana geldiği rapor edilmiştir. Buda destabilizasyonunun eritrosit katalazı ile etanol oksidasyonunun ilişkili olmadığını ileri sürülmüş ve eritrositler üzerindeki etanolün destabilize edici etkisi direk olarak eritrosit membranı veya diğer hücre komponentleri ile birlikte olan metabolize olmayan etanolün interaksyonu ile olabileceği rapor edilmiştir. Oksidatif hemoliz durumunda bu çalışmadaki sonuçlar yıkanmamış eritrositlerin preinkübasyondan sonra etanolün destabilize edici etkisini gösterdiği ileri sürülmüştür. Asetaldehit üretimi oksidatif durumlardaki hücre stabilitesini azalmasını etkileyen bir faktör olabileceği düşünülmüştür. Çünkü yıkanmış hücrelerdeki asetaldehidin destabilize edici etkisi görülebileceği söylenmiştir. Sonuç olarak etanol ile indüklenen eritrosit instabilitesi hücre üzerindeki metabolize olmayan etanolün etkilerinin ve eritrosit CAT tarafından asetaldehide oksidasyonunun kombinasyonu ile meydana gelebileceği düşünülmüştür. Alkolün eritrositler üzerindeki zararlı etkilerinin incelendiği bu çalışma bizim bulgular ile uyum içerisindedir (63).

Lındı ve arkadaşları (64) 1997 yılında kronik etanol alımından sonra lipit peroksidasyonuna rat eritrositlerinin hassasiyetini araştıran bir çalışma yapmışlardır. Bu amaçla 2 aylık ve 7 aylık erkek Wistar ratlar etanol içeren sıvı diyeti ile kronik olarak beslendikten sonra eritrositlerin eritrositlerin lipit peroksidasyonuna olan hassasiyeti TBARS ürünleri olarak gibi ölçülmüştür. Düşük alkol tüketiminin bir

kısımında erişkin ratlar etanol ile muameleden çok etkilendiği rapor edilmiştir. Eritrosit membranları alkolik hayvanlarda hazırlanmıştır. Bunlar kontrol ratlarına göre lipit peroksidasyonuna daha hassas olduğu, daha fazla etkilendiği gözlenmiştir. Her iki yaş gruplarında lipit analizi benzer sonuç farklılıkları gösterdiği; i) artmış kolesterol fosfolipit molar oranı yüksek kolesterol içeriğinden meydana geldiği, düşük membran akışkanlığını ve invitro etanol ile meydana gelen bozuklukların yüksek toleransını içerdiğini göstermişlerdir. ii) özellikle fosfolipit ansature yağasitlerinin artması bu fosfolipit yapısının disfonksiyonu , etanol grubu için de PE (fosfatidiletanolain)'nin artması ve azalması ile ve PS (fosfatidilserin) seviyelerinin azalması ile karakterize olduğu rapor edilmiştir. Üstelik anyonik fosfolipitlerinin anlamlı artışları erişkin grubunda tespit edilebileceği fikri ileri sürülmüştür. Etanol ile muamele edilen yaşlı ratlar peroksidasyonundan daha fazla etkilendiği görülmüştür. Lipit peroksidasyonu her iki grupta da kontrole göre daha yüksek bulunmuştur. Eritrosit fosfolipitlerinin asıl yağ asidi bileşimi yaş tarafından düzenlenmediğini ileri sürülmüştür. Etanol ile muamele edilen ratlarda palmitik ve oleik asitlerde düşüklük ve araşidonik asitte yükseklik gözlemlenmiştir. Sature/poliansature yağ asit oranının azaldığını gösterdiğini ve bunun daha çok erişkinlerde gözlendiği rapor edilmiştir. Yaşlı eritrositlerin lipit peroksidasyonuna olan hassasiyeti onların yüksek fosfolipit içerikleriyle ilişkili olduğunu ileri sürmüşlerdir. Alkol polienlerin içeriğini özellikle polienoik asiti arttırdığı ileri sürülmüştür. Bu her iki yaş grubunda da polienle muamele edilen ratlarda görülmüştür. Fakat erişkinlerdeki sonuçlar daha anlamlı olduğu gözlemlenmiştir. Benzer sonuçlar etanol ile ilişkili kültür hücrelerinin ve hayvan dokularının membranlarında gözlenmiştir. Membran lipit peroksidasyonu aynı zamanda kolesterol ve lipit içeriği ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür. Etanol diyeti ile beslenen ratlar lipit bileşiminin değişimini ve eritrosit membranlarının lipit peroksidasyonunun yaşa bağlı duyarlılığı ile ilişkili olarak akıcılığını değiştirdiği ileri sürülmüştür (64).

Akkuş ve arkadaşlarının (65) 1997 yılında orta derecede alkol alımının plazma, eritrosit ve lökositte bazı antioksidan enzimlerin lipit peroksidasyonu üzerine olan etkisini araştıran bir çalışma yapmışlardır İçicilerin eritrosit lipit peroksidasyonu kontrol grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak ($p<0,05$) azaldığı bulunmuştur (MDA ölçümü yapılarak). Günde 140g'dan daha az alkol alanlarda anlamlılık

bulunamamış ve bu gruba 140 g'dan fazla alkol alması sağlanmıştır ($p<0,05$). Plazma GGT seviyeleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak arttığı görülmüştür ($p<0,001$). Aynı zamanda serum GGT seviyesi ve alkol miktarı arasında anlamlı bir korelasyon gösterilmiştir ($p=0,01$). Her iki grubun diğer parametreleri arasında anlamlı bir farklılık olmadığı görülmüştür. Antioksidan enzimlerin aktivitelerinde artış olmaksızın eritrosit lipit peroksidasyonunun azaltılması bu buluşlar için gerekli olan mekanizmayı gösterdiği rapor edilmiştir. Bu mekanizma da eritrosit membranındaki lipit kompozisyonundaki değişiklik olduğu düşünülmüştür. Alkol grubu için günde 140 g'dan fazla alkol alanlarda kontrol grubuna göre lipit peroksidasyonu anlamlı olarak yüksek olduğu gözlenmiş, içicilerin plazma lipit peroksidasyon seviyeleri kontrol grubuna göre biraz daha yüksek olduğu, fakat bunun anlamlı olmadığı görülmüştür. Aynı zamanda lökosit lipit peroksidasyonu ve eritrositlerin SOD veya GPx aktiviteleri arasında anlamlı bir farklılık olmadığı, diğer taraftan GGT aktiviteleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek bulunduğu ve aynı zamanda serum GGT seviyesi ile alkol miktarı arasında anlamlı bir korelasyon olduğu rapor edilmiştir. Sonuç olarak alkol eritrositlerdeki lipit peroksidasyonu azalttığını ve bunun membran lipit bileşiminde değişikliklerle sonuçlanabileceği ileri sürülmüştür. Lökositler alkolün bu etkisine daha dirençli olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışmada alkolün düşük konsantrasyonlarda lipit peroksidasyonuna sebep olmadığı bununla membranın lipit içeriği ile başarıldığı ileri sürülmüştür (65).

Pushpalatha ve arkadaşlarının (66) yapmış oldukları çalışmada yaş ve etanol ile indüklenen oksidatif strese eksersiz rat myokardiumundaki GSH üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Rat myokardial GSH, GRx, GPx ve GST'nin spesifik etkilerini yaşa bağlı olarak etanol ve eksersiz ile indüklenen oksidatif stres altında anlamlı değişiklikler gösterebileceği ileri sürülmüştür. Bu çalışmada eksersiz anlamlı olarak enzimlerin aktivitelerini inhibe ettiği, GRx, ve GSH'nin inhibisyonu etanol ile indüklenen oksidatif stres boyunca GSH sentezini azalttığı rapor edilmiştir. Eksersiz boyunca GPx'in artan aktivitesi hidroperoksitlerin detoksifikasyonunu arttırdığı, bu durumun enzimin hidroperoksitleri ve lipit peroksitlerinin azaltılmasında koruyucu bir rolü olduğu ileri sürülmüştür. GST'nin stimülasyonu detoksifikasyon işlemindeki multifonksiyonel proteinlerin varlığını işaret ettiği rapor edilmiştir.

Buradaki buluşlar GSH metabolizmasındaki enzim aktivitelerindeki etanol ile indüklenen oksidatif strese bağlı biyokimyasal değişiklikler olduğu ve bunların ratlarda eksersiz ile birlikte anlamlı olarak değiştiği rapor edilmiştir (66).

Aydın ve arkadaşlarının (67) 2002 yılındaki çalışmalarında rat plazma ve beyin dokusundaki antioksidan sistem üzerindeki etanol etkisinin N-asetilsistein (NAC) tarafından indirgenmesi ile ilgili bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmaya göre; kronik etanol tüketimi santral sinir sistemi (SSS)'ndeki oksidatif hasarı indüklediği, antioksidan özelliği olan NAC, SH donörü gibi davrandığı ve bunun GSH'ın rejenerasyonunda bağlantılı olduğu ve hidroksil radikalleri ile birlikte direk reaksiyona girebileceği düşünülmüştür. Buradaki sonuçlar kronik etanol alımının istatistiksel olarak MDA ve NO seviyelerinde artma SOD ve GSH seviyelerinde ise azalma beyin dokusunda anlamlı olduğu gösterilmiştir ($p < 0,001$). Eritrositlerde GPx seviyesi azalmış, CAT aktivitesi ise sadece beyin dokusunda azaldığı rapor edilmiştir. Sonuç olarak ROS'un en az etanol ile indüklenen beyin hücrelerinin içerdiğini ve NAC'ın rat plazma ve beyin dokusundaki oksidan ve antioksidan sistem üzerindeki etanolün toksik etkileri olduğu rapor edilmiştir. Alkolün hem oksidatif stresi indüklediği hem de beyin gibi birçok dokudaki antioksidan aktiviteyi indirgediği rapor edilmiştir (67).

Porta'nın (68) ratlardaki alkolik karaciğer hastalığında peroksidatif stresin diyetel modülasyonu isimli çalışmasına göre; etanol ile beslenen ratlar yağdan zengin karbohidrattan fakir diyetin hepatik patoloji ile değişiklikler lipit peroksidasyonunu arttırdığı ve etanol toksisitesinden çok diyetel diyetel farklılıklara bağlı olduğu düşünülmüştür. Diyetel yağın tipi ve miktarı hepatik oksidatif stres ve morfofonksiyonel reaktiviteleri modüle ettiği ileri sürülmüştür. Diyetel Vit. E oksidatif stresi veya lipit peroksidasyonunu modüle etmesine rağmen kronik alkolizmi farklı hayvan modellerindeki hepatik patolojik değişikliklerin gelişmesini etkilemediği, daha önceki ratlarda yapılan çalışmalar fazla miktarda etanol ile beslenen ve diyetlerinde birçok miktarda lipotroplar, vitamin E ve mineraller alan ratların hepatik peroksidanların çoğunu anlamlı olarak modüle etmediği, fakat birçok antioksidanı azalttığı rapor edilmiştir (vitamin E, ubikinoller ve GPx). Vitamin E'deki düşük etanol seviyeleri hepatik TBARS'ı ve kemilüminesansı azalttığı ve antioksidan faktörlerin bazılarını azalttığı ileri sürülmüştür. Halen hepatik prooksidan

faktörleri etkilenmemiş ve karaciğer hasarı tespit edilmemiştir. Bu ve diğer buluşlar diyetin tipi ve oksidatif strese bağlı deneysel alkolik karaciğer hastalığındaki oksidatif stresin kanıtsal tespitinde anlamlı bir heterojenik rol oynayabileceği düşünülmüştür (68).

Fernandez ve arkadaşlarının (69) yapmış oldukları çalışmaya göre; elektron transport zinciri moleküler oksijen tüketim ürünlerinde olduğu gibi ROS üretmekte olduğu, aerobik solunum boyunca üretilen süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit geçiş metallerinin katılımı ile birlikte hidroksil radikallerinin prekürsörü olduğu ileri sürülmüştür. Mitokondrideki GSH, H₂O₂'yi metabolize etmek için sadece bir defans olduğu söylenmiştir. Kronik etanol ile beslenen hücreler mitokondride taşıyıcı GSH'ın sitozolden mitokondrial matrikse transportu için gerekli olan taşıyıcının detektif operasyonuna bağlı olarak GSH'ı tükettiği ileri sürülmüştür. Bu limiti alkolik hepatositlerin sitokinler ve prooksidan etkilerinin etanolün oksidatif metabolizması ile üretilmesini etkilediği, glutatyonun mitokondrial transporttaki selektif olarak defektine bağlı mekanizma mitokondrial iç membranın akıcılığının azalması ile ve kronik etanol tüketimi ile indüklendiği söylenmiştir. SAM tedavisi ile bunun akıcılığı GSH'ın mitokondrideki kararlı seviyelerini normalleştirdiği ve bu etanolün oksidatif metabolizması ile oluşan oksidatif stresle bağlantılı olabileceği ileri sürülmüştür (69).

Uzun ve arkadaşlarının çalışmasında (70), intragastrik olarak etanol verilen ratlarda nitrik oksidin zararlı etkilere karşı L-NAME (nito-L-arginin metil ester)'in koruyucu etkilerini araştırmışlardır. L-NAME'nin etanol ile indüklene karaciğer üzerinde oksidatif stresin azaltılması ve antioksidan durumun artırılması aracılığı ile koruyucu etkisini göstermiş olabileceği ileri sürülmüştür (70).

Gümüşlü ve arkadaşlarının çalışmasında (71) G6PD eksikliği olan eritrositlerin antioksidan kapasitelerine bakmışlardır. Tüm ölçümlerin hepsi oksidatif stres yaratılmadan normal durumlarda düzenlenmiş ve G6PD, SOD, CAT, GSHPx, GSH ve GST seviyeleri ve eritrosit plazma TBARS seviyeleri ölçülmüştür. Her gruptaki tüm parametreler G6PD seviyelerini anlamlı olarak ayıramadığı görülmüştür. Bu verilerden de yola çıkarak G6PD eksikliği olan bireylerin oksidatif stresle karşılaşmadıkları sürece normal durumlarını koruyabileceğini gösterilmiştir (71).

Mee ve arkadaşlarının (72) etanol ile beslenen rat testislerinde aspartatın koruyucu rolünü araştırmışlar. Ölçümler sonucunda testislerde doku TBARS seviyelerinde artma, aspartat verilmesi ile de arttığı gözlenmiştir. Buna ek olarak ALP testi ile karaciğer fonksiyon testine bakılmış ve aspartat kullanımının oksidatif stres üzerinde azaltıcı etkisinin olduğu gözlemlenmişlerdir. Testis stoplazmasında G6PD aktiviteleri ve GST etanol ile muamele edilen ratlarda azaldığını gözlemlenmişlerdir. Bu veriler peroksidasyon üzerindeki redoks ile ilişkili koruyucu etkiler boyunca rat testislerinde aspartatın etanol ile indüklenen doku hasarına azalttığı bulunmuştur (72).

Armutçu ve arkadaşlarının (73) alkol alışkanlığı olanlarda oksidan ve antioksidan parametre düzeylerini araştırmışlardır. MDA, NO, ksantin oksidaz, SOD ve CAT aktiviteleri değerlendirilen çalışmada alkol alışkanlığının eritrosit oksidan ve antioksidan dengeyi etkilediğini bunun da lipit peroksidasyonu bağlı olarak meydana gelen bu değişikliklerin alkolle ilişkili hastalıklar ve komplikasyonlardan kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür (73).

Sonuç olarak yapmış olduğumuz bu çalışmada etanolün eritrosit G6PD enzim aktivitesi üzerinde zararlı bir etkisinin olduğu ve bu zararlı etkinin ortadan kaldırılmasında antioksidan özellikteki quercetin'in başarılı olduğu sonucuna varılmıştır.

5. SONUÇ

Eritrositler kemik iliğinde kök hücrelerden olgunlaşmaları esnasında nükleus, ribozom ve mitokondri gibi organellerini kaybederler ve dolaşıma salıverilirler. Mitokondrileri olmadığı için eritrositlerde enerji üretimi çok sınırlıdır. Oksidatif fosforilasyon ve Krebs döngüsü aktivitesi olmadığı için enerji gereksinimini glikolitik yoldan sağlamaktadır. Oksidatif stress etkisinde olmayan eritrositte glukozun %90 kadarı Embden-Mayerhof yolu (anaerobik glikoliz) ile pirüvat ve laktata parçalanmaktadır. Enerjisi tamamen glukozla bağlı hücrelerden olan eritrositlerde glukoz laktik aside metabolize olmakta ve net 2 ATP enerji kazanılmaktadır. Eritrositlerin iyonik dengesinin sağlanması için $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPaz sisteminde, membran yapısının deformasyon yeteneğinin sürdürülmesinde ve eritrositlerin bikonkav şeklinin korunmasında ATP şeklinde enerjiye gereksinim bulunmaktadır.

Heksoz monofosfat yolu (pentoz fosfat yolu) ile (NADPH) ve pentoz fosfatlar sağlanmaktadır. NADPH üretimi eritrositler için hayati önem taşımaktadır. NADPH eritrositlerde GSH metabolizmasında rol oynamaktadır. Moleküler oksijen, membran lipitlerinden aktivitesi yüksek peroksitler oluşmaktadır. Çok az miktarda glukozun kullanıldığı pentoz fosfat yolunda oksidatif basamakta G6PD enzim aktivitesi ile üretilen NADPH, eritrositin oksidatif hasara karşı korunmasında kullanılmaktadır. Alkolün metabolizması sırasında ROS oluşumu artmakta ve eritrositler bu zararlı ajanların etkilerine maruz kalmaktadır. G6PD enzim aktivitesi azalmakta ve yeteri miktarda NADPH üretilmemektedir. Bunun sonucunda da okside glutatyon indirgenememekte ve ROS'un bu zararlı etkileri ortadan kaldırılamadığı için eritrosit membran bütünlüğü bozulmakta ve bu da hemolizle sonuçlanmaktadır. Ancak bu zararlı ajanların etkileri ortadan kaldırılır ise hücre normal yaşantısına devam edebilir ve dokulara oksijen taşıyabilir. Bizde çalışmamızda antioksidan özellikteki quercetin bu zararlı etkilere karşı eritrosit üzerindeki koruyucu etkisini araştırdık. G6PD enzim aktivitesi quercetin grubunda alkol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulduk. Enzim aktivitesi kontrol grubunda alkol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Kontrol grubu ile alkol+quercetin grubunda ise anlamlı bir farklılık gözlenmedi. Enzim aktivitesinde alkol+quercetin grubunda alkol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.

Çalışmamızda bulmuş olduğumuz bu sonuçlar ışığında amaç kısmında değinilen hedeflere ulaşıldığını yani alkolün indüklediği karaciğer harabiyetinde quercetin eritrosit G6PD enzim aktivitesi üzerinde koruyucu rolünün olduğunu gördük.

KAYNAKLAR

1. Keskin N. (2001) Denizli Yöresindeki G6PD Enzim Yetmezlikli Bireylerde Akdeniz Mutasyon Sıklığının ve Eritrositlerdeki İnce Yapı Değişikliklerinin Araştırılması. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi.
2. Aslan D. (2002) Kanın Yapısı ve Özellikleri In: Onat T., Emerk K., Sözmen E. T. (eds) *İnsan Biyokimyası 975-8624-20-02 İstanbul Palme Yayıncılık*.
3. Yalın E. A., Yalın S., Yıldız Ş. M., Yüzbaşıoğlu S., Aksoy K.(2001), Eritrosit Membran Proteinlerine Serbest Radikallerin Etkisi Cilt:**26**, Sayı:**4**
4. Serteser M.(1999) Deneysel Global Serebral İskemi-Reperfüzyon Hasarında Nitrik Oksit Oluşumu, Lipit Peroksidasyonu ve Protein Oksidasyonu: Glutamat Salınım İnhibisyonunun Nöroprotektif Etkisi. Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi.
5. Apak H. (2001) Hemoglobinopatiler ve Talasemiler. *İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp eğitimiEtkinlikleri 19-20 Nisan 2001, İstanbul,s. 1499-162*
6. Bakan E. . (2002) Proteinler In: Onat T., Emerk K., Sözmen E. T.(eds) *İnsan Biyokimyası 975-8624-20-02 İstanbul Palme Yayıncılık*
7. Onar T. (2002) Karbohidratlar In: Onat T., Emerk K., Sözmen E. T.(eds) *İnsan Biyokimyası 975-8624-20-02 İstanbul Palme Yayıncılık*
8. Mayes A. P., Menteş G.(1993) Pentoz Fosfat Yolu ve Heksoz Metabolizmasının Diğer Yolları In: Murray K. R., Mayes A. P., Granner K. D., Rodwell W. V.(eds) *Harper'ın Biyokimyası 975-95 331-1-1 Barış Kitebevi*
9. Tuncel P. (2000) Heksoz Monofosfat Yolu In: Champe P. C. , Harvey R. A. (Eds). *Lippincott's Mustrated Reviews Biyokimya İstanbul*
10. Akkuş İ.(1995) Enzimatik Antioksidanlar In: Akkuş İ. (ed) *Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri 1-54*
11. Metha A., Mason J. P., Vulliamy J. T., et al. (2000) Glukose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Ballieres Clinical Haematology 13*, 21-38.
12. Gözükara M. E., (1997) Karbohidratlar In: Gözükara M. E. (ed) *Biyokimya 2 ,3 Nobel Tıp Kitabevi İstanbul*.
13. Voet D., Voet J. G., Pratt C. W.,(eds) In: *Fundamentals Of Biochemistry, ISBN, 0-471-58650-1, QD415.V63 5572-dc21 / 1998-USA,*

14. Nelson D., Cox M. M., *Lehninger Principles Of Biochemistry, Third Edition, Worth Publishers, 41 Manison Avenue, 2000-New York, NY10010/USA*
15. Salati M. L., Batoul A. A., et al. (2001) Dietary regulation of expression of glukose-6-phosphate dehydrogenase *Annu. Rev. Nutr* **21**, 121-140.
16. Decherf G., Egee S., Staines M. H., Ellory C. J., Thomas L. S. et al. (2004) Anionic channels in malaria-infected human red blood cells *Blood Cell, Molecules, and Diseases* **32**, 366-371.
17. Becher K., Tilley L., Jonathan L. V., Roberts D., Rogerson S., Ginsburg H. et al (2003). Oxidative stres in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions *International Journal for Parasitology* **34**, 163-189.
18. Jacobasch (2000). Biochemical and genetic basis of red cell enzyme deficiencies. *Ballieres Clinical Haemayology* **13**, 1-20.
19. Fieorelli G., Montemuros M.F., Cappellini D. M., (2000). Chronic non-spherocytic haemolytic disorders associated with glukose-6-phosphate dehydrogenase variants. *Ballieres Clinical Haemayology* **13**, 39-55.
20. Aksoy K., Ünal B., Tamer L. (1998). Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzim eksikliği gözlenen olgularda eritrosit zarı Na-K/Mg adenozin 5-trifosfataz, eritrosit süperoksit dismutaz ve plazma malondialdehit düzeyleri. *Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* **23**,114-118.
21. Aksoy K., Ünlükurt İ., Yalın E., Yalın S. (2001). Çukurova bölgesinde saptanan g6pd varyantlarının kinetik özellikleri. *Türk Biyokimya Dergisi* **26**, 83-89.
22. Beutler E. (1994) G6PD Deficiency. *The American Society of Haemotology*. **84** 3613-3636.
23. Weimer T. A., Salzano M. F., Beutler E. (1998). G6PD Variants in Three South American Ethnic Groups: Population Distribution and Description of Two New Mutations. *Hum Hred* **48**, 92-96.
24. Vulliamy J. T., Beutler E. (2002). Hematologically Important Mutations: Glukose-6-phosphate Dehydrogenase. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* **28**, 93-103.
25. Katz SH., Schall J.(1979). Fava bean consumption and biocultural evolution. *Medical Antropology* **3**, 459-476.

26. Gren L. (1993). G6PD deficiency as protection against falciparum malaria: an epidemiologic critique of population and experimental studies. *Yearbook of Physical Anthropology* **36**, 153-178.
27. Beutler E., Herschel M. (2001). Low Glukose-6-phosphate Dehydrogenase Enzyme Activity Level at the Time of Hemolysis in a Male Neonate with the African Type of Deficiency. *Blood Cells, Molecules and Disease* **27**, 918-923.
28. Lien I.R., Chou H. Y., Weng H. Y. (2002). Hyperbilirubinemia in healthy neonatas with glukose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Early Human Development* **71**, 129-136.
29. Amid A., Mehrani H., Abolghasemi H. (2003). An update on the prevalence of glukose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and neontal Jaundice in Tehran neonates. *Clinical Biochemistry* **37**, 241-244.
30. Khusaiby S. M., Nair K. A. (2003). Kernicterus and G6PD Deficiency-a Case Series from Oman. *Journal of Tropical Pediatrics*, **49**, 74-77.
31. Kaplan M., Herschel M., Hammerman C., James D. H., Stevenson K. D. (2005). Hyperbilirubinemia Among African American, Glukose-6-phosphate Dehydrogenase Deficient Neonates. *American Academy of Pediatrics* **114**, 213-219.
32. Ninfali P., Perini P. M., Bresolin N. et al (1999). Iron Release and Oxidant Damage in Human Myoblasts by Divicine. *Life Sciences*, **66**, 85-91.
33. Jollow J. D., McMillan C. D. et al. (1999). Favism: Divicine Hematotoxicity in the Rat. *Toxicological Sciency* **51**, 310-316.
34. White J. N., Snounou G. et al (2004). The co-existence of Plasmodium: sidelights from falciparum and vivax malaria in Thaliand. *Trends in Parsitology* **20**, 333-339.
35. Shimkim M. B., Anderson N. N. (1936). Acute toxicities of retonone and mixed pyrethrins in mammals. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **34**, 135-138.
36. Kahraman A. (1998). Ultraviole A(UVA) Işığının Oluşturduğu Oksidatif Stres Üzerindeki Quercetinin rolü. Doktora Tezi.
37. Kahraman A., Serteser M., Köken T. . (2002). Flavonoidler. *KocatepeTip Dergisi*. **3**, 01-08.

38. Terao J., Murota K. et al (2003). Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **417**, 12-17.
39. Blomhoff R., Myhrstad M., Crlsen H., Moskaug Q. J. et al (2004). Molecular imaging of the biological effects of quercetin and quercetin-rich foods. *Mechanism of Ageing and Development* **125**, 315-324.
40. Fuhrmann F. G., Kornmann F., Martin J. H. (2003). The inhibitory effects of flavonoids and antiestrogens on the Glut 1 glucose transporter in human erythrocytes. *Chemico-Biological Interactions*. **146**, 225-235.
41. Terao J., Begum N. A. et al (2001). Protective effect of quercetin against cigarette tar extract-induced impairment of erythrocytes deformability. *Journal of Nutritional Biochemistry* **13**, 265-272.
42. Alcaraz J. M., Ferrandiz M.L. et al (1991). Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. *Agents and Actions* **32**, 283-288.
43. Prior L. R. (2003). Fruits and in the prevention of cellular oxidative damage. *Am J Clin Nutr* **78**, 570-578.
44. Young F. J., Nielsen E. S., Crozier A. et al (1999). Effect of fruit juice intake on urinary quercetin excretion and biomarkers of antioxidative status. *Am J Clin Nutr* **69**, 87-94.
45. Robert J. N., Els N., Danny EC. H., Petra G. B., Klaske N., Leeuwen AM. P. et al (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* **74**, 418-443.
46. Ferrali M., Caciotti B., Sugherini L., et al. (1997). Protection against oxidative damage of erythrocytes membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS Letters* **416**, 123-129.
47. Elliott M. Jr., Chithan K. et al (1994). Free radical scavenging and antioxidant of plant flavonoids. *Plenum Pres. New York, 1994*.
48. Lieber C. S. (1999). Mikrosomal Ethanol-Oxidizing System (MEOS): The First 30 Years (1968-1998). *Alcohol Clin Exp Res.* **23**, 991-1007.
49. Lieber S. C. (2003). CYP2E1: from ASH to NASH. *Hepatology Research* **28**, 1-11.

50. Celec P., Peter J., Lucia S. et al (2003). Effects of anabolic steroids and antioxidant vitamins on ethanol induced tissue injury. *Life Sciences*. **74**, 419-434.
51. Cederbaum I. A. (2003). Iron and CYP2E1-dependent oxidative stress and toxicity. *Alcohol*. **30**, 115-120.
52. Albano E., Samuel W. F., Magnus I. S. (2003). Hydroxyethyl Radicals in Ethanol Hepatotoxicity. *Div. of Molecular Toxicology, Institute of Environmental Medicine, Karolinska Institute, Box 210*, 171-186.
53. Oktay G. (2002). Alkol ve metabolizması (ed). In: Onat T., Emerk K., Sözmén E. T. (eds) *İnsan Biyokimyası 975-8624-20-02 İstanbul Palme Yayıncılık*.
54. Ateş E. Varderele E. (2003). Alkolik karaciğer hastalığı. (eds). Dilek O. N. *Karaciğer ISBN:975-7150-72-X Cilt II Uyum Ajans*.
55. Cederbaum I. A., Wu D. et al (2003). Alcohol, Oxidative Stress, and Free Radical Damage. *Alcohol Research & Health*. **27**, 277-284,
56. Ethanol and The Liver (1994). *Biochemical and Biophysical Research Communications* **205(2)**:1064-1071.
57. Fairbanks V.F., Klee G.G., Biochemical aspects of hematology. In: Tietz N.W., (ed) *Textbook of clinical chemistry*. Philadelphia, PA: WB Saunders.
58. WHO (1967). Standardisation of procedures for the study of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Techn Rep Ser*, **366**, 5-53.
59. Beutler E., Robson M. J., Buttenvieser E. (1957). The Glutathione Instability of Drug Sensitivity Red Cells. *J. Lab Med* **49**, 84
60. Schuckit, Marc A. (1993). Alkol ve Madde Kötüye Kullanımı. *Seray Medical* 7-20
61. Büyükokuroğlu E. M., Altıkat S., Mehmet Ç. et al (2002). The effect of ethanol on glucose-6-phosphate dehydrogenase enzyme activity from human erythrocytes invitro and rat erythrocytes invivo. *Alcohol & Alcoholism* **37**, 327-329.
62. Tedesco I., Russo M., Russo P. et al (2000). Antioxidant effect of red wine polyphenols on red blood cells. *J. Nutr. Biochem.* **11**, 114-119.
63. Tyulina V. O., Huentelman J. M., Prokopieva D. V., Boldyrev A. A., Johnson P. et al (2000). Does ethanol metabolism affect erythrocytes hemolysis. *Biochimica et Biophysica Acta* **1535**, 69-77.

64. Lindı C., Montorfano G., Marciani P. et al (1998). Rat erythrocytes susceptibility to lipit peroxidation after chronic ethanol intake. *Alcohol***16**, 311-316.
65. Akkuş İ., Gültekin F., Aköz M. et al (1997). Effect of moderate alcohol intake on lipit peroxidation in plasma, erythrocytes and leukocyte and on some antioxidant enzyme. *Clinica Chimica Acta* **266**, 141-147.
66. Pushpalatha K., Reddy S. K. et al (2002). Age and ethanol-induced oxidative stress: impact of exercise training on glutathione metabolism in rat myocardium. *Tirupati-517502,A.p., INDIA*.
67. Aydın S., Ozaras R., Uzun H. et al (2002). N-acetylcysteine reduced the effect of ethanol on antioxidant system in rat plasma and brain tissue. *TohokuJ. Exp. Med.*,**198**, 71-77.
68. Porta A. E. (1997). Dietary modulation of oxidative stress in alcoholic liver disease in rats. *American Society for Nutritional Sciences*. 912-915.
69. Fernandez C. J. C., Ruiz G., Morales A. et al (1998). Oxidative stress: role of mitochondria and protection by glutathione. *Biofactörs* **8**, 7-11.
70. Uzun H., Simsek G., Unal E., Aydın S. et al (2005). Potential effects of L-NAME on alcohol-induced oxidative stress. *World J. Gastroenterol* **4**, 600-604.
71. Bilmen S., Aksu A. T., Gümüşlü S., Korgun K. D., Canatan D. et al (2001). Antioxidant capacity of G-6-PD-deficiency erythrocytes. *Clinica Chimica Acta* **303**, 83-86.
72. Oh I. S., Lee S. M., Kim C., Song Y. K., Park C. S. et al (2002). Aspartate modulates the ethanol-induced oxidative stress and glutathione utilizing enzyme in rat testes. *Experimental and Molecular Medicine* **34**, 47-52.
73. Armutcu F., Gürel A., Söğüt S., Aksu N., Ünalacak M. et al (2004). Alkol alışkanlığı olanlarda eritrosit oksidan ve antioksidan paremetre düzeyleri. *Fırat Tıp Dergisi*.**2**,50-53.

