T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KOÇLARDA ERİTROSİT VE SPERMATOZOA GLUKOZ-6-FOSFAT DEHİDROJENAZ(G6PD) ENZİM DÜZEYLERİ

Hüseyin GÜREL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA (VET) ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Nuri BAŞPINAR

KONYA-2015

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KOÇLARDA ERİTROSİT VE SPERMATOZOA GLUKOZ-6-FOSFAT DEHİDROJENAZ(G6PD) ENZİM DÜZEYLERİ

Hüseyin GÜREL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA (VET) ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Nuri BAŞPINAR

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 11202010 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2015

ÖNSÖZ

Tezimin hazırlanmasında ve eğitimim süresince yetişmemde, büyük emeği geçen danışman hocam sayın Prof. Dr. Nuri BAŞPINAR'a,

Çalışmanın projelendirilmesi ve yürütülmesi aşamalarında yardımını esirgemeyen Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine,

Çalışmanın yürütülmesinde her türlü olanağı hazırlayan, bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım Sayın Yrd. Doç. Dr. Pınar Peker AKALIN'a ve Araştırma Görevlisi Şükrü GÜNGÖR'e

Teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Hüseyin GÜREL

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **iv**

1. GİRİŞ **1**

1.1. Genel Bilgi 2

1.1.1. Pentoz Fosfat Yolu 4

1.1.2. Pentoz Fosfat Yolu Reaksiyonları 8

1.1.3. Pentoz Fosfat Yolunun Düzenlenmesi 9

1.1.4. G6PD Enziminin Patofizyolojisi 10

2. GEREÇ ve YÖNTEM **14**

2.1. Gereç 14

2.2. Yöntem 14

2.2.1. Spermazotoanın Enzim Analizi İçin Hazırlanması 15

2.2.2. Eritrositlerin Enzim Analizi İçin Hazırlanması 15

2.2.3. G6PD Enzim Analizi Prosedürü 16

2.2.4. Eritrosit Hemoglobin Tayini 18

2.2.5. Spermatozoa Total Protein Tayini 19

3. BULGULAR **20**

4. TARTIŞMA **24**

5. SONUÇ VE ÖNERİLER **27**

6. KAYNAKLAR **28**

7. EKLER **32**

Ek-A:Etik Kurul Kararı 32

8. ÖZGEÇMİŞ **33**

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADP : Adenozin Di Fosfat
AS : Asthenozoospermia
ATP : Adenozin Tri Fosfat
C : Karbon
Ca : Kalsiyum
CAT : Katalaz
CO_2 : Karbondioksit
CoA : Koenzim A
Fe : Demir
g : Gram
G6P : Glukoz 6 Fosfat
G6PD : Glukoz 6 Fosfat Dehidrojenaz Enzimi
GPx : Glutasyon Peroksidaz
GR : Glutasyon redüktaz
GSH : Redükte Glutasyon
GSH-Px : Glutasyon peroksidaz
GSSG : Okside glutasyon
H_2O_2 : Hidrojen peroksit
H_3PO_4 : Fosforik Asit
Hb : Hemoglobin
HCl : Hidroklorik Asit
KCl : Potasyum Klorür
M : Molar
Mg : Miligram
µl : Mikrolitre
ml : Mililitre
mM : Milimol
NADP : Okside Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
$NADPH+H^+$: Redükte Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
O_2 : Oksijen
OH : Hidroksil
P : Fosfat
$R^{\bullet}$: Organik radikaller
SH : Sülfhidril Grubu
sn : Saniye
SOD : Süperoksit Dismutaz

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Koçlarda Eritrosit ve Spermatozoa Glukoz -6 -Fosfat Dehidrojenaz Enzim Düzeyleri

Hüseyin GÜREL
Biyokimya Anabilim Dalı
YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA-2015

Bu çalışmada sezon içi ve sezon dışında eritrosit ve spermatozoa enzim düzeyleri ile sperma kalitesi arasındaki olası bir ilişkinin saptanması amaçlanmıştır.

Çalışmada 1,5-2 yaşlı 14 baş sağlıklı Merinos ırkı koç kullanıldı. Hayvanlardan eritrosit Nisan (sezon dışı) ve Ekim (sezon içi) aylarında aynı gün, önce kan olmak üzere ve ejakülat örnekleri alındı. Hayvanlardan ejakulatlar alınır alınmaz sperma hacim (ml), kitle (1-5), motilite (%), yoğunluk (x106), HOS-test (%), akrozomal defekt, diğer defekt, anormal spermatozoa oranı ve canlı oranı (%) açısından muayene edildi. Eritrosit hemolizatında ve sperm hücrelerinde glikoz-6-fosfat dehidrojenaz aktiviteleri belirlendi.

Sezon içinde kan glikoz-6-fosfat dehidrojenaz düzeyleri (1,928±0,231 U/g hemoglobin) spermatozoa glikoz-6-fosfat dehidrojenaz (0,130 ±0,028 U/mg protein) düzeylerinden oldukça yüksek ($p<0.001$) iken sezon dışında bir farklılık gözlenmedi. Kan glikoz-6-fosfat dehidrojenaz düzeyi sezon içinde (1,928±0,231 U/g hemoglobin) sezon dışına (0,530±0,066 U/g hemoglobin) göre önemli oranda yüksek bulunmuştur ($p<0,001$). Diğer yandan sperm glikoz-6-fosfat dehidrojenaz düzeyleri sezon içinde (0,130±0,028 U/mg protein) sezon dışına (0,562±0,095 U/mg protein) göre düşük bulunmuştur ($p<0,001$). İncelenen sperm parametreleri yönünden sadece sezon içinde yoğunluk ile sperm glikoz-6-fosfat dehidrojenaz aktivitesi arasında pozitif bir ilgileşim belirlenmiştir ($r=0,053$, $p<0,05$).

Koçlarda mevsimsel olarak eritrosit ve spermatozoa plazma antioksidan potansiyelin farklı etkilenebileceği, ayrıca incelenen parametrenin sperma kalitesi ile ilişkisinin belirlenmesi için ileri çalışmaların yapılması gerektiği kanısına varılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Eritrosit; Koç; G6PD; Spermatozoa

SUMMARY

REBUBLIC of TURKEY
SELÇUK UNIVERSITY
HEALT SCIENCES INSTITUTE

Erytrocyte and Spermatozoa Glucose -6-Phosphate Dehydrogenase Levels In Merino Ram

Hüseyin GÜREL
Department of Biochemistry
MASTER THESIS / KONYA - 2015

It was aimed to determine erytrocyte and spermatozoa glucose-6-phosphate dehydrogenase levels and the relation with sperm quality in breeding and non-breeding season in Merino ram.

In the study, 1,5-2 year old, healthy, 14 Merino ram was involved. Ejaculates and blood samples were collected in April (non-breeding) and October (breeding). After collecting samples, sperm was evaluated in regards of volume (ml), motility (%), mass activity (1-5), concentration (x106), Hos-test (%), abnormal sperm, acrosome abnormality, other abnormality and viability (%), Glucose-6-phosphate dehydrogenase levels were determined in spermatozoa and erytrocytes.

In breeding season, blood glucose-6-phosphate dehydrogenase levels (1,928±0,231 U/g hemoglobin) were higher ($p<0,001$) from that in spermatozoa (0,130±0,028 U/mg protein). Blood glucose-6-phosphate dehydrogenase levels (1,928±0,231 U/g hemoglobin) were higher ($p<0,001$) in breeding season from that in non-breeding season (0,530±0,066 U/g hemoglobin) whereas spermatozoa enzyme levels in breeding season (0,130 ±0,028 U/mg protein) were lower ($p<0,001$) from that in non-breeding season (0,562±0,095 U/mg protein). As regards sperm parameters only a positive correlation was determined between spermatozoa glucose-6-phosphate dehydrogenase levels ($r=0,053$ $p<0,05$) and concentration in breeding-season.

As a result, it is suggested that, blood and spermatozoa antioxidant potential may be affected differently in breeding and non-breeding seasons and also, further investigations are needed to understand the relation of sperm quality and this enzyme.

Key Words: Erytrocyte; G6PD; Ram; Spermatozoa

1. GİRİŞ

G6PD pentoz fosfat metabolik yolunun ilk ve kontrol enzimidir (Mehta ve ark 2000). Pentoz fosfat yolu oksidatif ve nonoksidatif olmak üzere iki kısma ayrılır. Hücrede RNA, DNA ve nükleotit sentezi için gerekli riboz-5-fosfat ve redüktif biyosentezlerde indirgeyici güç olan NADPH' ları üretmek gibi başlıca iki görevi vardır (Krebs ve ark 1978). G6PD enzimi; mantar, bakteri, protozoa, balık ve memelileri içeren geniş bir canlı topluluğunda bulunmaktadır. Bu nedenle her canlıda var anlamına gelen 'ubiquitous' enzim olarak tanımlanmaktadır. Ayrıca üstlendiği biyokimyasal rol nedeniyle yaşam için gerekli olan anlamına gelen 'housekeeping' enzim olarak da isimlendirilmektedir (Persigo ve ark 1986, Rovira ve ark 2000).

Spermatozoada glikoz; glikolizis ve pentoz fosfat metabolik yolunda metabolize edilir. İlgili metabolik yollar boyun ve kuyruk bölümünde sınırlandırılmıştır (Urner ve Sakka 1999).

Urner ve Sakka (2005) farelerde spermatozoon baş bölgesinde de pentoz fosfat metabolik yolunun spermatozoon-ovum füzyonu için ihtiyaç duyulan NADPH'ın yerel üretiminden sorumlu olduğunu belirlemişlerdir. NADPH üretiminden sorumlu birkaç enzim vardır. Bunlar; izositrat dehidrojenaz, malik enzim, pentoz fosfat metabolik yolunun iki enzimi G6PD ve 6-fosfoglukonat dehidrojenaz (6PGD) enzimidir. Spermatozoada NADPH pentoz fosfat metabolik yolundan karşılanır (Yeni ve ark 2010). Bu yolun hız belirleyici enzimi G6PD enzimidir. 6-fosfoglukonat dehidrojenaz aktivitesi de G6PD'a bağımlıdır (Miraglia ve ark 2010).

Hücrede redükleyici güç olarak NADPH kullanan NADPH bağımlı enzimler; Antioksidan enzimler (Glutasyon redüktaz ve katalaz), nitrik oksit sentaz, dihidrofolat redüktaz, NADPH oksidaz, sitokrom p450 oksidoredüktaz ve lipit sentez enzimleri (3-hidroksi-3-metilglutaril-KoA redüktaz ve diğerleri) dir. Antioksidant güçde antioksidan enzimler için öncelikle ko-substrat NADPH'ın yeterince üretilmesi gerekir. G6PD enzimi NADPH'ın öncelikli kaynağı ve hücrede redoks sisteminin en önemli düzenleyicisidir (Kawakami ve ark 1999). Eritrositlere ait enzim defektlerinden en sık görüleni G6PD enzim eksikliğidir. G6PD monomerlerindeki polipeptit subünitesi

aminoasitlerinden bir veya birkaçının mutasyonu sonucu oluşur. İnsanlarda enzimin yaklaşık 400'ün üzerinde varyantı olduğu belirlenmiştir (Lanzkowsky 2005).

Sperm hücrelerinde de gelişim evrelerine göre G6PD enzim aktiviteleri değişir. Spermatositlerdeki, spermatitlerdekinden %20 daha çok, spermatitlerle karşılaştırıldığında spermatozoadaki önemli oranda azdır. G6PD enzim aktivitesi en yüksek spermatositlerde, sonra azalarak spermatitlerde ve en az düzeyde ise spermatozoadadır (Bajpai ve ark 1998).

İnsanlarda eritrosit G6PD enzim düzeyleri ile spermatozoa enzim düzeyleri arasında gözlemlenen ilişki (Sarkar ve ark 1977), köpeklerde spermatozoa enzim düzeyleri ile spermatolojik parametreler arasında gözlemlenmiştir (Kawakami ve ark 1999).

G6PD enzim aktivitesi ile ilgili insanlarda çok sayıda çalışma bulunmasına rağmen hayvanlarda özellikle fertiliteyle ilgili yeterince kaynağa ulaşılamamıştır. Bu çalışmada; Merinos ırkı koçlarda sezon içi ve sezon dışı eritrosit ve spermatozoa enzim düzeyleri ile bazı spermatolojik parametreler arasındaki olası bir ilişkinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

1.1. Genel Bilgi

Pentoz fosfat yolunun ilk ve hız belirleyici enzimi olan G6PD sitozolik bir enzimdir. İlk kez Otto WARBURG ve Christian tarafından keşfedilmiş "ZWSCHENFERMENT" olarak adlandırılmıştır (Büyükokuroğlu ve ark 2001).

Enzimin tanımlanması daha sonraki yıllarda NADP'ın keşfine neden olmuştur (Beutler 1991). G6PD enzim yetersizliği ilk tanımlanan enzim yetersizliğidir. 1950'li yıllarda antimalaryal ilaçlardan primakinin hemolitik etkisinin araştırılması sonucunda tanımlanmıştır. Bu yıllardaki çalışmalar G6PD enzim yetersizliğinin X kromozomuna bağlı kalıtıldığını ve yaşlı eritrositlerin daha çok etkilendiğini göstermiştir. G6PD enzim yetersizliği Akdeniz, Afrika, Doğu Asya kökenli insanlarda çok görülmektedir. Dünyada yaklaşık 400 milyondan fazla insanın G6PD enzim yetersizliğinden etkilendiği sanılmaktadır (MacDonald ve ark 1991, Cappellinni ve ark 1996).

Prokaryotlardan mayalara, protozoalara, bitki ve hayvanlara kadar canlıların her bir hücresinde bulunan enzim aynı monomerlerin bir araya gelmesiyle oluşan dimerik ve tetramerik yapılar şeklinde bulunur. Monomer halde inaktif, polimer halde iken aktiftir. Enzimin monomerleri 515 aminoasitlik subüniti içerirler ve 59265 dalton molekül ağırlığına sahiptirler. Monomerler dimerleri oluştururken, her dimer iki molekül NADP'yi sıkıca bağlar. Enzim hücre içinde çoğunlukla dimer-tetramer karışımı halinde bulunur (Beutler 1994, Luzzatto ve ark 2000).

G6PD enzimi memeli eritrositleri açısından çok önemlidir. Eritrositlerde NADPH oluşumu için tek kaynak pentoz fosfat yoludur ve G6PD eksikliğinde NADPH önemli oranda azalır. NADPH'ın eritrositlerdeki en önemli rolü okside glutasyonun redükte glutasyona indirgenmesini sağlamaktır. Bu reaksiyon glutasyon redüktaz tarafından katalizlenir (Reuter ve ark 1990, Keha ve Kührevioğlu 1997).

G6PD eritrositlerin membran stabilitesinin ve yaşama kabiliyetinin teminatıdır. Sağlıklı eritrositlerde G6PD enziminin yarılanma ömrü yaklaşık 62 gündür. İlk kez 1959 yılında enzim aktivitesinin yaşlı eritrositlerde düşük, genç eritrositlerde ise daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Eritrosit hücre hattında en yüksek düzeyde retikülositlerdedir (Morelli ve ark 1978).

Eritrositlerin temel enerji kaynağı glikozdur. Glikoz heksokinaz ile fosfatlanıp G6P'yi oluşturduktan sonra iki metabolik yoldan birine girer (MacDonald 1991).

a) Embden – Meyerhof Yolu

b) Pentoz-fosfat Yolu

Embden-Meyerhof yolu eritrositlerde iyon pompalarını aktif hale geçirebilmeleri, membran proteinlerini fosfatlayabilmeleri için gerekli olan enerjiyi Adenozin Trifosfat (ATP) olarak sağlar ve hemoglobini indirgenmiş halde koruyabilmeleri için NADH'yi temin eder. Ayrıca bu yolla hemoglobinin oksijene bağlanma özelliğini allosterik olarak etkileyen 2-3 difosfogliserat oluşumunu da gerçekleştirir. G6PD enzim yetersizliği eritrositlerin genetik özellikleri ile çevresel faktörlerin birlikte hemolize nasıl yol açtıklarının araştırılmasında bir model oluşturmaktadır. Anilin, antistin, bakla, metilen mavisi, klorokin, nitrit, benemid, daraprim gibi ilaç ve kimya-

salların alımına bağlı hemolitik anemi, enfeksiyona bağlı hemolitik anemi ve yenidoğan sarılığı G6PD enzim yetersizliğine bağlı olarak gelişen patolojilerdir. Bunlardan başka çocuklarda yetişkinlere göre daha sık görülen favizm, G6PD yetersizliğine bağlı olarak oluşuyorsa da her G6PD yetersizliği Favizm'e yol açmaz. Yeni doğan sarılığı G6PD enzim yetersizliğinin yaşamı tehdit eden en önemli sonuçlarından birisidir. Kinetik çalışmalar G6PD enzim eksikliği olan yenidoğanlarda şiddetli hiperbilirübinemiye eğilim olduğunu göstermektedir (Tuncel ve ark 1997).

1.1.1. Pentoz Fosfat Yolu

Pentoz fosfat yolu, heksozmonofosfat yolu veya fosfoglukonat yolu olarak da bilinmektedir. Pentoz fosfat yolunun temel amacı, redükleyici güce sahip olan $NADPH+H^+$ ve riboz-5-fosfat üretmektir. Ayrıca bu yolda üretilen D-riboz-5-fosfat ve D-deoksiriboz-5-fosfat nükleik asitlerin sentezinde kullanılır. Bu metabolik yolda ATP üretilmez. Pentoz fosfat yolu hücrenin sitozolünde gerçekleşir ve her bir G6P'ye karşılık 2 mol $NADPH+ H^+$ üretilir. Pentoz fosfat yolunda üretilen $NADPH+H^+$ ve D-riboz-5-fosfat kullanılarak birçok molekülün sentezi yapılabilir. İlgili reaksiyonları aşağıdaki gibi sıralanabilir (MacDonald 1991, Zubay 1993, Murray ve ark 2000).

* Yağ asiti sentezi

* Redükte glutasyon oluşumu

* Methemoglobin redüksiyonu

* Kolesterol sentezi

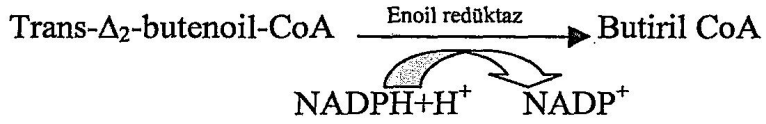
* Steroid hormon sentezi

* Bazı aminoasitlerin sentezi

* Nükleik asit, nükleotit yapılı koenzim ve hücre duvarı sentezi

Yağ asiti sentezi

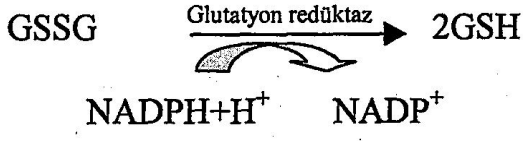
Yağ asiti biyosentezinde beta-ketoaçilredüktaz ve enoil redüktaz kademelerinde $NADPH+H^+$ molekülleri redüktör molekül olarak kullanılır (Murray ve ark 2000).





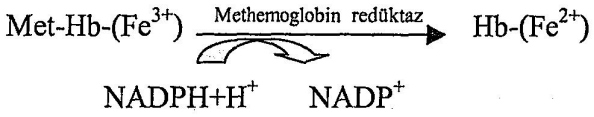
Redükte glutasyon oluşumu

Hücrede bulunan redükte glutasyon (GSH), çevresel oksidanların etkisini kendi üzerine çekerek hücrenin fonksiyonel proteinlerini okside olmaktan korur. Bu sırada GSH kendisi oksitlenir ve iki glutasyon molekülü disülfit bağı ile birbirine bağlanır. Okside glutasyonun (GSSG) fonksiyonunu yapabilmesi ancak redükte $NADPH+H^+$'ların kullanılması ve GR enziminin aracılığı ile glutasyonun tekrar redükte hale geçmesi ile mümkündür (Stryer 1988).



Methemoglobin redüksiyonu

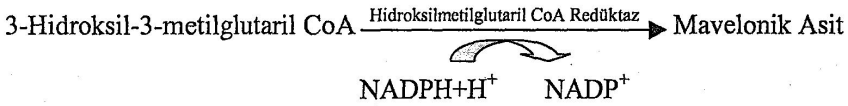
Eritrositlerde methemoglobin oksijeni bağlayamaz ve taşıyamaz. Ancak redükte $NADPH+H^+$'lar harcanarak methemoglobin redüktaz tarafından redüklendikten sonra oksijen taşıyabilir hale gelmektedir. Hücre ve dokuların oksijen gereksinimleri ancak bu sayede karşılanabilir (Beutler 1984).

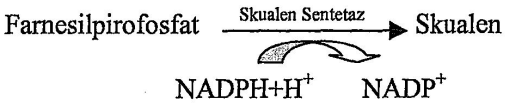




Kolesterol sentezi

Kolesterol sentez edilirken başlıca 3 basamakta hidroksimetilglutaril CoA redüktaz, skualen sentetaz ve desmosterol'ün kolesterole dönüştüğü aşamalarda redüktör molekül olarak redükte NADPH+H$^+$ kullanılmaktadır (Burtis ve Ashwood 1999).





Steroid hormon sentezi

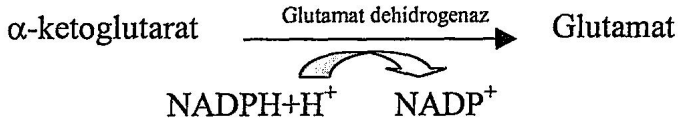
Steroid hormon sentezinin birçok basamaklarında redükte NADPH+H$^+$ indirgeyici molekül olarak kullanılmaktadır. Örneğin 11 deoksikortikosteron NADPH+H$^+$ molekülleri aracılığı ile kortikosterona, progesteron ise 21 hidroksiprogesterona dönüşmektedir.

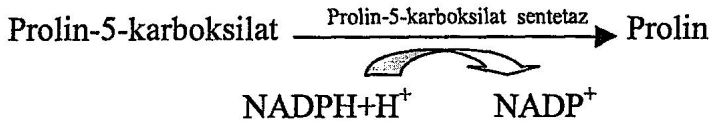


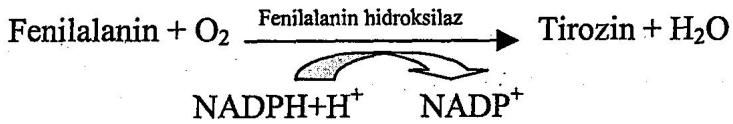


Bazı aminoasitlerin sentezi

α-ketoglutarik aside amino grubunun eklenmesi glutamat dehidrojenaz tarafından gerçekleştirilirken yine $NADPH+H^+$'lar koenzim olarak kullanılarak glutamik asit sentezlenmektedir. Aromatik aminoasitlerden fenilalanin $NADPH+H^+$'nın harcanması ve fenilalanin hidroksilaz enziminin aracılığı ile tirozine dönüştürülmektedir. Bu reaksiyonda ortaya çıkan dihidrobiyopterin, dihidrobiyopterin redüktaz enzimiyle ve $NADPH+H^+$'ların redükleme özelliği sayesinde tekrar redükte hale yani tetrahidrobiyopterin haline dönüştürülmektedir. Bunlara ilaveten $NADPH+H^+$, prolin-5-karboksilik asitin proline dönüşümünü sağlayarak prolin aminoasitinin sentezine de katılmaktadır. Ayrıca hidroksifolik asit sentezine eşlik ettiği de bilinmektedir (Tuncel 1997).







Nükleik asit, koenzim ve hücre duvarı sentezi

Pentoz fosfat yolunda sentezlenen riboz, deoksiriboz ve ribitol nükleik asitlerin, nükleotit yapıdaki koenzimlerin ve bazı organizmaların hücre duvarının sentezine katılmaktadır. Bütün bu faaliyetlerin aksamadan başarılması bu metabolik yolun

ilk ve düzenleyici enzimi olan G6PD enziminin aktivitesine bağlıdır. Bu biyosentez olayları hücrenin canlılığını sürdürme bakımından son derece önemlidir. Enzimin faaliyeti NADPH/NADP oranına bağlıdır. Eğer oran NADP lehine ise glukoz-6-fosfat, ribuloz-5-fosfata ve CO2'ye yıkılmaktadır. G6PD'nin NADP için Km' i 2-4 µmol/l olarak çok düşüktür, enzim NADPH'le kompetitif olarak güçlü bir şekilde inhibe edilir. Bu yüzden eritrositlerde NADPH/NADP oranı reaksiyon hızını belirler. NADPH/NADP oranının çok arttığı durumlarda, G6PD hemen hemen tamamen inhibe edilir (Kirkman ve ark 1975, Kirkman ve Gaetani 1986). NADPH oksitlendiğinde G6PD tekrar aktive olmaya başlar (Yoshida 1973).

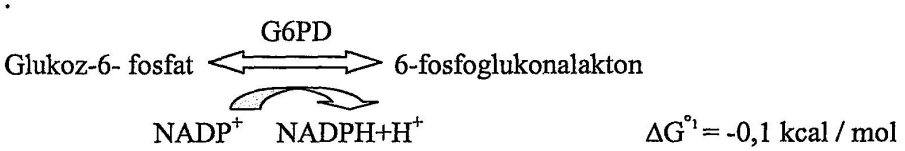
Ayrıca 4-hidroksi 2-nonenal gibi lipit peroksidasyon ürünleri de G6DP tarafından güçlü bir şekilde inaktive edebilir. Eğer hücrede G6PD eksikliği varsa $NADPH+H^+$ sentezi ve buna bağlı olarak metabolik olaylar yavaşlar. Bu durum hücrenin harabiyetine neden olur. Örneğin enzim bozukluğu olan eritrositlerde yeteri kadar $NADPH+H^+$ sentezi yapılamadığı için GSH seviyesi düşer. Glutasyonu kofaktör olarak kullanan GR enzimi az çalışır, katalaz düzeyi düşer. Eritrositlerde düşük oranda da olsa devam eden lipit sentezi tamamen durur veya çok azalır. GSH azlığı nedeni ile hemoglobin korunamaz –SH grupları okside olur. Protein denatüre olarak Heinz cisimcikleri halinde sferik inklüzyonlar oluşur ve sonunda eritrositler daha fazla hemoliz olurlar (Beutler 1984).

1.1.2. Pentoz Fosfat Yolu Reaksiyonları

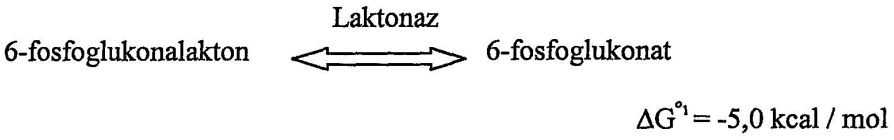
Pentoz fosfat yolunun temel amacı redükleyici özelliği olan NADPH+H+ ve riboz üretmektir. Hücre içinde glukoz, ATP varlığında heksokinaz enzimi aracılığıyla G6P'ye dönüşmektedir. Olay bir transfosforilasyondur. ATP'nin son fosfat grubu glukozun 6. karbonundaki hidroksil grubuna transfer edilmektedir (Burtis ve Aswood 1999).

$$\text{Glukoz} + \text{ATP} \xrightarrow[Mg2+]{\text{Heksokinaz}} \text{G6P} + \text{ADP}$$

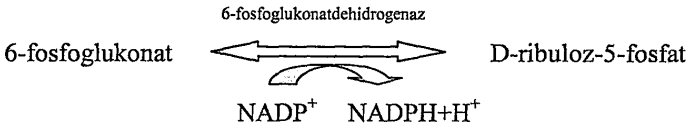
Pentoz fosfat yolunun ilk reaksiyonu G6P'den hidrojenler'in alınması sonucu 6-fosfoglukonalaktonun oluşumudur.



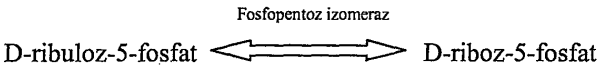
6-fosfoglukonalakton, spesifik bir laklonaz ile 6-fosfoglukonata dönüşmektedir.



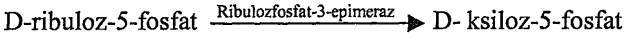
Bir basamak sonra 6-fosfoglukonat, 6-fosfoglukonat dehidrogenaz tarafından oksidasyona ve dekarboksilasyona uğratılarak karboksil grubu karbondioksit haline getirilmekte ve D-ribuloz-5-fosfat oluşmaktadır.



Bu basamaktan sonra D-ribuloz-5-fosfat, fosfopentoz izomerazenzimi tarafından D-riboz-5-fosfata dönüşmektedir.



Oluşan D-riboz-5-fosfat, ribulozfosfat-3-epimeraz enzimi ile D-ksiloz -5-fosfata dönüşür. Burada 3. karbonda bulunan hidroksil grubu sağ taraftan sol tarafa transfer edilmektedir.



1.1.3. Pentoz Fosfat Yolunun Düzenlenmesi

Pentoz fosfat yolu tüm hücreler için önemlidir. Ancak eritrositler, karaciğer, yağ dokusu ve böbrek için çok daha önemlidir. G6PD enzimi aktivitesi diyetle alınan büyük miktarlarda karbonhidrat ile artar. Bu kaba düzenleme yarışmalı inhibitör gibi hareket eden NADP ve enzim aktivitesinin kontrolü ile gerçekleşir. NADPH'nın konsantrasyonunun NADP konsantrasyonuna oranı 10'dan büyük olursa %90'dan fazla inhibisyon görülür. İnhibisyon sadece NADPH'nin NADP'ya oksidasyonuyla

değil, spesifik olarak hareket eden GSSH ile de sağlanır. G6PD aktivitesi proliferatif hücrelerde gelişmekte olanlarda daha yüksektir (Tian ve ark 1998).

Dehidroepiandosteron (DHEA) endojen bir steroiddir. G6PD' nin inhibitörü olarak hücre proliferasyonunu da inhibe edebilir. G6PD yetmezlikli hücrelerde büyüme oranı düşer (Gordon ve ark 1987).

D-glukoz-6-fosfatın hücresel konsantrasyonu yaklaşık olarak 1 mmol/lt'dir. Hücrenin ihtiyacına bağlı olarak pentoz fosfatın heksoz fosfat'a çevrilmesi zorunlu olmayabilir (Tuncel ve ark 1997, Gözükara 1978).

Reaksiyonun fosfogliseritlerin veya triaçilgliserolün biyosentezi veya pentoz fosfat yolunun çok belirgin olduğu eritrositlerde trioz fosfatın, 2, 3 bifosfogliserata çevrilmesi için gliserol-3-fosfat oluşturmaya eğilimi olabilir. Hücrenin ihtiyacına bağlı olarak glikolitik ve pentoz fosfat yollarındaki ara bileşiklerin akışının kombinasyonu; NADPH, riboz-5-fosfat veya 2,3 bifosfogliseratın uygun miktarlarını üretebilir (Murray ve ark 2000).

1.1.4. G6PD Enziminin Patofizyolojisi

Normal enzim (G6PD B), in vivo şartlarda yaklaşık 62 gün yarılanma ömrüne sahiptir. Enzim aktivitesi azaldığı zaman bile yaşlı eritrositler yeterli G6PD aktivitesine sahiptir ve oksidatif strese karsı GSH düzeyleri korunur. Ancak hemoliz görülen G6PD varyantlarının yarılanma ömrü kısalmıştır. Retikülositlerdeki G6PD A^{-} 'nin aktivitesi normaldir ancak yarılanma ömrü 13 güne kadar düşmüştür, G6PD Akdenizin stabilitesi düşüktür ve yarılanma ömrü saatlerle ifade edilebilir (Luzzatto ve ark 2000).

G6PD enzimi eksik olan eritrositler enfeksiyon, ilaçlar ve bakla gibi oksidanlarla karşılaştığı zaman GSH'u hızla tüketir. Bu reaksiyon hücresel hasarların merkezini oluşturmaktadır. Sülfidril grubu içeren proteinlerin oksidasyonda görev aldığı ve GSH düzeyini düşürdüğü rapor edilmiştir. Denatüre sülfohemoglobin veya globinin oluşumu hemoglobin üzerindeki sülfidril gruplarının okside olmasına yol açar. Sülfohemoglobin presipitatları eritrosit hücre membranı sülfidril gruplarıyla disülfit bağları kurarlar. Membrana bağlı bu presipitatlar Heinz cisimcikleri olarak adlandırılır-

lar. Sülfohemoglobin presipitatları eritrosit hücre membranı sülfidril gruplarıyla disülfit bağları kurarlar. Membrana bağlı bu presipitatlar Heinz cisimcikleri olarak adlandırılırlar. Daha sonra insoluble yapılar, Heinz cisimcikleri ve disülfît köprüleri hücre membranına yapışır. Hemoglobin oksidasyonuna ek olarak spektrin dimerleri ve spektrin ile diğer proteinler arasında disülfit köprülerinin oluşması nedeni ile membran polipeptit agregatlarının birikmesi, membran sülfidril gruplarının direkt oksidasyonuna zemin oluşturmaktadır (Glader ve Lukens 1999, Jablonska-Skwiecinska ve ark 1999, Zimran ve ark 2000).

G6PD enzim yetersizliği insanlarda hemoglobinopatilerden sonra ikinci sıklıkta görülen kalıtsal bir hastalıktır. Enzimin değişik kinetik özellik gösteren 400'ün üzerinde varyantı olduğu bildirilmektedir. Biyokimyasal özellikleri birbirinden farklı olan bu varyantların çok farklı olmadığı gözlemlenmiştir. G6P monomerlerini oluşturan polipeptit subünitindeki aminoasitlerden bir veya birkaçının mutasyonu sonucu enzim defekti ortaya çıkar (Capellini ve ark 1996).

İnsanlarda sıklıkla görülen enzim defektlerinin hayvanlarda olup olmadığı bilinmemektedir. En yüksek G6PD aktivitesi kemik iliği, dalakta olup en düşüğü ise kalp ve iskelet kasıdır. Eritroid hücre hattında en yüksek eritroblastlarda en düşük eritrositlerdedir (Niftali ve Palma 1990).

Karaciğer enzim aktiviteleri loplara göre değişir. Kurutaş ve ark (2005)'ları farelerde yaptıkları bir çalışmada; orta lobda 3,30±1,44 U/g doku (1,84±0,030µmol/g doku), sol lobda 2,43±1,42 U/g doku (1,06±0,21 µmol/g), sağ lobda 1,56±0,93U/g doku (0,57±0,25µmol/g) olarak bildirmişlerdir. Koyunlarda rumen mukozasında ise 0,88±0,08-1,01±0,09 µmol/dk/g doku'dur (Weekes 1984). Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre insanlarda eritrositlerde G6PD eksikliği en yaygın görülen gen mutasyonudur, başlıca beş sınıfa ayrılır. Enzim aktivitesi < % 1, < %10, %10-60, %60-90, > %110 görülenler, en yaygın olarak görüleni enzim aktivitesi %10-60 arası olanlardır (Minucci 2009). Reprodüktif patofizyolojide intrasellüler enzim aktivitesi fonksiyonel membran hasarının bir markırı olarak yaygın şekilde kullanılır. G6PD enzim aktivitesindeki düşme spermatozoada membran hasarı ile ilişkilendirilebilir (Glander 1984).

Spermatozoon plazma membranı doymamış yağ asitlerinden zengin olduğundan lipit peroksidasyonuna duyarlıdır. Lipit peroksidasyon ürünleri hem membran bütünlüğüne hem de DNA'da hasara yol açar (Shek-Vugroveckı ve ark 2011). Bu tür zararlar membran kalitesini düşür. Holştay boğalarda lipit kompozisyonundaki değişimler spermatozoon kalitesiyle ilişkilidir. Hem seminal sıvıda hem de spermatozoon membranında yağ asiti ve kolesterol düzeyleri mevsimsel değişimler gösterir (Argov-Argaman ve ark 2007).

Spermadaki (spermada, seminal sıvı) yağ asiti yüzde oranları mevsimsel değişime uğrarlar. Spermatozoada uzun zincirli doymamış yağ asitleri yazın, kışa göre daha fazladır. Genelde dokohekzaenoik asit (DHA. C22:6n^3) spermatozoada kışın % 24,94±0,74 iken yazın % 30,05±0,74, araşidonik asit (C20: 4n6) kışın % 0,97±0,05, yazın % 1,23±0,03'tür. Spermatozoada doymuş yağ asitleri oranı ise yazın daha düşüktür ($P<0.0001$). Genel olarak doymamış yağ asitleri (PUFA) yazın kışınkinden daha yüksektir (Argov-Argaman ve ark 2013).

Spermatozoa plazma membran ve stoplazmada çoklu doymamış yağ asitleri arttıkça reaktif oksijen radikallerine, oksidatif stres parametrelerine duyarlılık da artar (Alvarez ve Storey 1995). Enzimatik ve non-enzimatik oksidantlar spermatozoon membranlarını LPO'dan korurlar (Marti ve ark 2007). Öncelikli olanlar SOD (Fujıı ve ark 2003), GPx (Vaisberg ve ark 2005), CAT (Koskinen ve ark 2002), Glutasyon redüktaz (GR), albumin, GSH, pirüvat, taurin, hipotaurin, vit E ve vit C'dir (De Lamirande ve ark 1997). Enzimatik antioksidantların kofaktörleri pentoz-fosfat metabolik yolu ve bu yolda çok önemli olan G6PD enzimince yapılan NADPH'dır. Koçlarda sperm üretimi gün ışığı süresi, ısı, nem vb. mevsimsel faktörlerden etkilenir. GR ve GPx aktiviteleri yıl boyunca değişir. GR aktivitesi Temmuz ayında Ağustostakinden daha yüksektir (4,53-2,37 nmol substrat/dk/mg protein). GPx aktivitesi ise yıl boyunca değişmekle beraber, en yüksek düzey Eylülde gözlenmiştir (Folch 1984).

Boğalarda mevsimsel değişimler spermatozoa içeriğini etkiler. Boğa spermatozoa enzim aktiviteleri yaz ve kış aylarında sırasıyla Total-SOD; 6434±899-3839±297 U/g protein, GPx; 202±19-343±27 U/g protein'dir. Buna göre T-SOD düzeyleri yazın yükselirken kışın azalmış, GPx ise yazın azalırken kışın artmıştır. Aynı

çalışmada yazın 9,4±2,4 µmol/g lipit olan LPO düzeyleri kışın 22,0±2,9 µmol/g lipite yükselmiştir (Shek-Vugrovecki ve ark 2011). Strzezek ve ark. (2000) boğa seminal plazmasında yaz boyunca antioksidant kapasitesinin azaldığını bildirirken Marti ve ark. (2007) koçlarda antioksidant kapasitenin sezon dışında (ilkbahar-yaz) yükseldiğini, spermatozoon motilite ve canlılık değerlerinin düşük olduğu sezon dışında daha yüksek bir antioksidant korumasıyla açıklamışlardır.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gereç

Çalışmada bakım ve besleme şartları aynı olan 18-24 aylık erişkin 14 baş sağlıklı Merinos ırkı koç kullanıldı.

2.2. Yöntem

Konya ilinde koçlarda sezon içi olarak kabul edilen Ekim ve sezon dışı olarak kabul edilen Nisan aylarında, önce suni vajenle ejakülat örnekleri ve bunu takiben vena jugularislerinden EDTA'lı tüplere kan örnekleri alındı. Koçlardan alınan ejakulatlar spermatolojik parametreler (motilite, canlılık, membran bütünlüğü, morfoloji, hacim ve yoğunluk) bakımından incelendi. Spermatozoa motilitesi 37^{o}C'de ısıtma tablalı faz kontrat mikroskobun 40x büyütmesinde lam-lamel arasına alınan bir damla sperma numunesinde en az 4 mikroskop sahasına bakılarak yapıldı. Sahalardaki motilite değerlerinin ortalaması motilite oranı (%) olarak kaydedildi. Yoğunluk, hemositometrik yöntemle Hayem solusyonu ve Thoma lamı kullanılarak belirlendi (Bearden ve Fuquay 1992). Kitle (1-5) 0,1 ml aralıklı konikal tüplerde belirlendi.HOS (düşük osmotik basınçlı şişirme testi) test, 100 mOsm değerine sahip hipoozmotik sıvısından 100 µl'sinin 10 µl sperma numunesiyle karıştırılarak 37^{o}C'de 30 dk bekletilmesiyle yapıldı. Bu karışımdan yapılan frotide faz-kontrast mikroskobun 40x büyütmesinde toplam 200 spermatozoa sayıldı. Bu hücrelerden kıvrılmış kuyruğa sahip olanlar % olarak ifade edildi ve sağlam membran bütünlüğü olan spermatozoayı gösterdi. Spermatozoa morfolojisi oranı Hancock sıvısına alınan sperma numunesinin faz kontrast mikroskobun immersiyon objektifinde lam-lamel arasına alınan bir damlasında spermatozoa baş, orta, luyruk ve akrozom kısmı anomalilerin % olarak tespit edilmesiyle belirlendi. Spermalarda canlı spermatozoa oranının belirlenmesinde eozin-nigrozin boyama sıvısı kullanıldı. Isıtma tablasındaki lam üzerine bir kısım sperma numunesi dört kısım boyama sıvısı konarak karıştırıldı ve frotileri çekilerek kurutuldu. Bu şekilde hazırlanan frotilerde mikroskopta (40X büyütme) 400 spermatozoa sayılarak canlı spermatozoa oranı % olarak belirlendi. Spermatozoon baş kısmının boya almamasıcanlı spermatozoa oranını gösterdi. Enzim analizleri için ejakülatlar 600g x 10 dk +4^{o}C'de santrifüj edilerek seminal plazmaları ayrım-

landı sonra dipteki spermatozoa üzerine 0.16 M (izotonik) KCl ilave edildi karıştırıldı 600g x 10 dk +4^{o}C'de santrifüj edilerek üstteki sıvı uzaklaştırıldı, bu yıkama işlemi 3 defa tekrar edildi. Yıkama işleminin sonunda dipteki spermatozoa pelleti analize kadar -86 ^{o}C'de saklandı. EDTA' lı tüplere alınan kan örnekleri 600g x 10 dk +4^{o}C' de santrifüj edilerek üst kısımdaki plazma, lökosit tabakası ile beraber pipetle dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı daha sonra dipteki pellete 0.16 M KCl çözeltisi ilave edildi, karıştırıldı ve tekrar santrifüj edilerek üstteki yıkama sıvısı uzaklaştırıldı. Eritrosit yıkama işlemi 3 kez tekrarlandıktan sonra dipteki saf eritrosit pelleti analize kadar -86^{o}C'da saklandı.

2.2.1. Spermazotoanın Enzim Analizi İçin Hazırlanması

-86 ^{o}C'den çıkartılan spermatozoa pelleti TRİS-HCL buffer (PH=8)' la 0.5 ml'ye tamamlandı. Spermatozoa' nın homojenizasyonu için sonikatörle (SONIC vibra cells SONICS & MATERIALS, INC, USA, model: VCX 130 Seri no: 45822, net power output 130 W, Frekans 20 kHz, Amplitude %100, Prob: S&M 630-0422, Prob Model: CV18, Prob Seri No: 6837) soğuk ortamda 10 sn süreli 30 sn soğutmalı 5 tekrarlı sonikasyon işlemi uygulandı. Sonikasyon sonrasında 100µl homojenat üzerine 0.5 ml hemolysing (hemoliz edici) solüsyonu ilave edilip, vortekslendi ve 13.000 g x 15 x +4^{o}C'de santrifüj yapıldı. Üstteki süpernatant enzim analizi için kullanıldı.

2.2.2. Eritrositlerin Enzim Analizi İçin Hazırlanması

-86^{o}C' da saklanan eritrosit süspansoidi oda ısısında çözündürüldü bundan 50 µl alındı üzerine 450 µl hemolysing solüsyonu eklenip vortekslendi. 10000 g x 15 dk x +4 ^{o}C de santrifüj edildi. Süpernatantlar enzim analizi için kullanıldı.

Kullanılan Cihazlar

Soğutmalı santrifüj	Universal 32R Hettich (Almanya)
Derin dondurucu	Sanyo (Japon)
Otomatik pipetler	Eppendorf(Almanya)
Spektrofotometre	Shimadzu UV 1201V 2100 (Japonya)
Homojenizatör	Sartorius 37070 (Göttingen/Germany)
Hassas terazi	Shinko denshi (Japon)
Sonikatör	SONIC vibra cells., SONICS & MATERIALS, INC, USA

2.2.3.G6PD Enzim Analizi Prosedürü

Kullanılan Ayıraçlar

1- 1 M Tris-HCL/EDTA, pH=8: 60,6 g Tris (VWR Prolabo Katalog No: 28811.295), 0,93 g Na2-EDTA (Sigma Katalog No: E1644) tartıldı ve distile suya eklendi. %37' lik HCL (Merck Katalog No: 100307) ile pH= 8'e ayarlandı. Son hacim 500 ml'ye tamamlandı.

2- EDTA 10,27 mol/L, pH=7: 50,25 g EDTA (Sigma Katalog No: E1644) alındı distile suya eklendi. 0.1 M NaOH ile pH=7'ye ayarlandı. Son hacim 500 ml'ye tamamlandı.

3- 0,1 mol/L MgCL2: 10,2 g MgCl2 (Sigma Katalog No: M2670) alındı ve 500 ml'ye tamamlandı.

4- 2 mmol/L NADP: Beta-NADP (Sigma Katalog No: N8160) 10 mg/vial, 6,2 ml distile su ilave edilerek karıştırıldı.

5- 6 mmol/L Glikoz-6-Fosfat: Glikoz-6-Fosfat monosodyum tuzundan (Sigma Katalog No: G-7879) 0,0455 g tartıldı ve 1 M TRIS-HCL (pH=8) ile 25 ml'ye tamamlandı.

6- Stabilizing solution: 50 µl beta-merkaptoetanolden (Pharmacia biotech Katalog No: 17-1317-01), 1 ml 0,27 mol/L EDTA'dan alındı ve distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. pH 7'ye ayarlandı.

7- Hemolysing Solution: Triton-X-100 (Promega Corporation Katalog No: H5142)'den 2,5 ml alındı ve 20 ml distile su eklenerek karıştırıldı. Üzerine 0,27 mol/L EDTA çözeltisinden 0,5 ml eklendi ve üzerine 27 ml distile su ilave edildi. Daha sonra 25 µl beta-merkaptoetanol ilave edildi ve karıştırıldı.

Enzim analizleri, spektrofotometrik olarak 25 °C'de Beutler (1971)'in metoduna göre gerçekleştirildi.

Eritrosit hemolizatında

100 µl 1 M Tris-HCL + 100µl 0,1 mol/L $MgCL_2$ + 50µl Hemolizat + 550µl distile su, Blank için hemolizat yerine 50µl stabilizing solüsyonu konuldu karıştırıldı ve 37 ˚C de 10 dk bekletildi. İnkübasyon sonrası 100' er µl G6P ve NADP eklendi ve 25 ˚C de 340 nm' deki 5 dk' lık absorbans değişimi kaydedildi.100 µl 6 mmol/L G6P + 100 µl 2 mmol/L NADP eklendi ve enzim analizi 340 nm'deki absorbans artışının 5 dk boyunca takibi ile hesaplandı. Bir enzim ünitesi 25°C'de pH 8,0' de, 1 µmol NADP'nin 1 dk'daki redüksiyonudur. Düzeyler eritrositler için U/g hemoglobin, spermatozoa için U/mg protein üzerinden verildi.

	Örnek	Blank
1 M Tris-HCl	100	100
0,1 mol/L $MgCl_2$	100	100
Distile Su	550	550
Hemolizat	50	-
Stabilizing Sol	-	50
Karıştırıldı	37°C 10 dk benmari de bekletildi	
6 mmol/L G6P	100	100
2 mmol/L NADP+	100	100
	Karıştırıldı	Karış-tırıldı
25°C'de 340 nm dalga boyunda dk da bir olmak üzere 5 dk boyunca absorbansları kaydedildi.		

Spermatozoa enzim analizi için 100 µl spermatozoa homojenatı kullanıldı.

G6PD Enzim aktivite hesaplama

U/ml: (Delta Abs / 6.22) X (1000 / harcanan mikrolitre) X Sulandırma Katsayısı

Eritrosit:

U/g hemoglobin: (U/ml enzim) / (g/ml Hemoglobin) = U/g hemoglobin

Spermatozoa:

U/mg protein: (U/ml enzim) / (mg/ml protein) = U /mg protein

Total protein düzeyleri Bradford (1976) yöntemine göre 595 nm'de spektrofotometrik olarak belirlendi.

Hemoglobin düzeyleri Drabkin's (Sigma Katalog No: D5941-6VL) solüsyonu ile belirlendi.

2.2.4. Eritrosit Hemoglobin Tayini

Drabkins çözeltisi:

1 vial alındı 1 lt distile suda çözündürüldü. Aşağıdaki prosedür uygulandı:

	ÖRNEK	BLANK	STANDART
Drabkin's reagent	600µl	600µl	600µl
Örnek	40 µl	-	
Hb Standardı (13,3mg/dl)			40µl
Distile su	-	40µl	
Karıştır 10 dk oda ısısında bekletildi			
540 nm'de absorbanslar belirlendi			

Hesaplama:

Örnek absorbansı-Blank absorbansı / Standart absorbansı-Blank absorbansı X Standart konsantrasyonu (mg/dl) X Sulandırma katsayısı = mg/dl Hb

2.2.5. Spermatozoa Total Protein Tayini

Bradford Ayıracı:

40 mg Coomassie Brillant Blue G-250 (Sigma 27815-100G) 50 ml % 96' lık etil alkolde çözündürüldü, üzerine % 85' lik H_2PO_4 (Sigma 79617)' den 55 ml ilave edildi, distile su ile 1 lt' ye tamamlandı.

Deneyin Yapılışı:

20 µl spermatozoa hemolizatından alınıp üzerine 1 ml Bradford çözeltisi ilave edildi, oda ısısında 10 dk inkübe edilip 595 nm' de blank' a karşı absorbansları belirlendi.

Hesaplama:

Örnek absorbansı-Blank Absorbansı / Standart absorbansı-Blank Absorbansı X Standart konsantrasyonu X Sulandırma katsayısı = g/dl protein

İstatistik analiz

Elde edilen eritrosit ve spermatozoa G6PD enzim aktiviteleri ile spermatolojik parametreler Varyans analizi testleri ile analiz edildi, bunlar arasındaki ilişkilerin belirlenmesinde ise korelâsyon analizi kullanıldı.

3. BULGULAR

Sezon içi ve sezon dışında koçların eritrosit ve spermatozoa G6PD enzim aktiviteleri ve bazı sperm parametreleri ile ilgili bulgular çizelge 1, 2, 3, 4' de gösterildi.

Çizelge 3.1. Sezon içi Sezon Dışı Eritrosit ve Spermatozoa G6PD enzim düzeyleri ile Bazı Spermatolojik Parametreler (n=14).

	Sezon içi	**Sezon dışı**	
	Ort±SH	**Ort±SH**	**P**
Eritrosit G6PD (U/g hemoglobin)	1,928±0,231^{a} A	0,530±0,066^{b}	p<0,001
Spermatozoa G6PD (U/mg protein)	0,130 ±0,028^{a} B	0,562±0,095^{b}	p<0,001
Hacim (ml)	2,364±0,163^{a}	1,764±0,115^{b}	p<0.01
Kitle (1-5)	3,071±0,071	3,143±0,177	-
Motilite (%)	83,572±1,329	83,571±1,103	-
Yoğunluk (x10^{6})	2330,357±1,990	2611,429±1,130	-
HOST	82,929 ±3,49^{a}	73,214 ±2,32^{b}	p<0.05
Akrozomal Defekt	2,714±0,27^{a}	1,286±0,34^{b}	p<0.01
Diğer Defekt	4,643±0,45^{a}	16,929±0,97^{b}	p<0.001
Anormal Spermatozoa Oranı %	7,357±0,68^{a}	18,214±0,87^{b}	p<0.001
Canlı Oranı %	88,571±1,19	82,143±1,11	-
P	p<0,001	-	

A,B: Ayni sütundaki farklı harfler istatistikî olarak önemlidir.
a,b: Ayni satırdaki farklı harfler istatistikî olarak önemlidir.

Sezon içinde eritrosit G6PD düzeyleri (1,928±0,231 U/g Hb) spermatozoa G6PD (0,130±0,028 U/mg protein) düzeylerinden oldukça yüksekken sezon dışında bir farklılık görülmedi. Eritrosit G6PD düzeyleri sezon içinde (1,928±0,231 U/g Hb) sezon dışına (0,530±0,066 U/g Hb) göre önemli oranda yüksek bulunmuştur (p<0,001). Diğer yandan spermatozoa G6PD düzeyleri sezon içinde (0,130±0,028 U/mg protein) sezon dışına (0,562±0,095U/mg protein) göre düşük bulunmuştur (p<0,001).

Ejakülat hacmi sezon içinde 2,364 ± 0,163 ml iken sezon dışında 1,764 ± 0,115 ml olarak bulunmuştur (p<0,01).HOST, akrozomal defekt, anormal sperm, diğer defekt, kitle, motilite, yoğunluk yönünden yapılan değerlendirmelerde önemli bir farklılık görülememiştir.

Çizelge 3.2. Sezon içi Sezon Dışı Eritrosit ve Spermatozoa G6PD enzim düzeyleri ve bazı spermatolojik parametreler arasındaki korelâsyonlar (n=14).

Sezon içi	Sperm G6PD (U/mg protein)	Hacim (ml)	Kitle (1-5)	Motilite (%)	Yoğunluk (x10^6)	HOST	Akrozomal Defekt	Diğer Defekt	Anormal Sperm %	Canlı Oranı %
Eritrosit G6PD (U/g hemoglobin)	0,013	0,362	-0,066	0,008	-0,115	-0.173	0.338	-0.465	-0.444	-0138
Spermatozoa G6PD (U/mg protein)	-	0,440	-0,291	-0,178	0,553*	0.129	0.052	-0.200	-0.114	-0.242
Sezon Dışı										
Eritrosit G6PD (U/g hemoglobin)	-0,104	-0,255	-0,158	-0,213	0,418	0.363	-0.511	0.203	0.029	0.009
Spermatozoa G6PD (U/mg protein)	-	-0,197	-0,314	-0,047	-0,105	-0.154	-0.001	0.456	0.514	0.213

* $P<0,05$ r = 0,553

İncelenen spermatolojik parametreler yönünden sadece yoğunluk ile spermatozoa G6PD arasında pozitif bir korelâsyon belirlenmiş ($r=0,553$, $p<0,05$) diğer parametreler arasında herhangi bir korelâsyona rastlanılmamıştır.

Çizelge 3.3. Sezon için Eritrosit ve Spermatozoa G6PD enzim düzeyleri ile Bazı Spermatolojik Parametreler (n=14).

Hayvan no	**Eritrosit G6PD (U/g hemoglobin)**	**Spermatozoa G6PD (U/mg protein)**	**Hacim (ml)**	**Kitle (1-5)**	**Motilite (%)**	**Yoğunluk ($x10^6$)**	**HOST**	**Akrozomal Defekt**	**Diğer Defekt**	**Anormal Sperm %**	**Canlı Oranı %**
1	4,180	0,130	2,100	3,000	85,000	2690,000	74,000	2,000	3,000	5,000	90,000
2	1,741	0,022	2,100	3,000	90,000	1435,000	93,000	2,000	6,000	8,000	90,000
3	1,922	0,217	3,000	3,000	85,000	3200,000	90,000	2,000	3,000	5,000	92,000
4	3,223	0,179	4,000	3,000	85,000	1315,000	62,000	2,000	3,000	5,000	85,000
5	1,961	0,029	2,000	3,000	85,000	2095,000	90,000	2,000	4,000	6,000	93,000
6	1,846	0,144	2,400	3,000	85,000	1850,000	95,000	3,000	4,000	7,000	88,000
7	1,820	0,130	2,000	3,000	90,000	2275,000	85,000	3,000	6,000	9,000	95,000
8	1,846	0,038	2,000	3,000	80,000	1640,000	92,000	2,000	3,000	5,000	85,000
9	1,502	0,375	2,600	3,000	80,000	2990,000	90,000	4,000	5,000	9,000	85,000
10	1,731	0,022	1,600	4,000	85,000	3035,000	87,000	5,000	7,000	12,000	90,000
11	1,434	0,038	2,100	3,000	80,000	2200,000	80,000	2,000	3,000	5,000	90,000
12	2,134	0,155	3,000	3,000	70,000	2700,000	80,000	3,000	6,000	9,000	77,000
13	0,903	0,275	2,000	3,000	85,000	3700,000	93,000	2,000	4,000	6,000	90,000
14	0,754	0,062	2,200	3,000	85,000	1500,000	50,000	4,000	8,000	12,000	90,000
Ortalama	**1,928**	**0,130**	**2,364**	**3,071**	**83,571**	**2330,357**	**82,929**	**2,714**	**4,643**	**7,357**	**88,571**

Çizelge 3.4. Sezon Dışı Eritrosit ve Spermatozoa G6PD enzim düzeyleri ile Bazı Spermatolojik Parametreler (n=14).

Hayvan no	**Eritrosit G6PD (U/g hemoglobin)**	**Spermatozoa G6PD (U/mg protein)**	**Hacim (ml)**	**Kitle (1-5)**	**Motilite (%)**	**Yoğunluk ($x10^6$)**	**HOST**	**Akrozomal Defekt**	**Diğer Defekt**	**Anormal Sperm %**	**Canlı Oranı %**
1	0,573	0,610	1,400	3,000	85,000	2900,000	90,000	1,000	14,000	15,000	75,000
2	0,322	0,179	2,200	4,000	90,000	2535,000	70,000	0,000	21,000	21,000	80,000
3	0,314	0,961	2,400	4,000	90,000	2400,000	70,000	2,000	15,000	17,000	83,000
4	0,606	0,133	2,000	3,000	85,000	2750,000	70,000	0,000	15,000	15,000	82,000
5	0,378	0,230	1,600	4,000	85,000	2500,000	80,000	4,000	14,000	18,000	75,000
6	0,746	0,286	2,700	3,000	80,000	2700,000	80,000	2,000	13,000	15,000	90,000
7	0,652	0,210	1,500	2,000	75,000	3000,000	60,000	1,000	12,000	13,000	85,000
8	0,291	0,797	1,800	3,000	80,000	3100,000	70,000	2,000	16,000	18,000	85,000
9	1,155	0,902	1,300	3,000	85,000	3375,000	75,000	0,000	24,000	24,000	80,000
10	0,394	1,222	1,400	2,000	80,000	2000,000	65,000	1,000	19,000	20,000	85,000
11	0,312	0,754	2,000	3,000	85,000	2000,000	65,000	2,000	21,000	23,000	85,000
12	0,758	0,226	1,400	4,000	85,000	2000,000	85,000	0,000	17,000	17,000	80,000
13	0,585	0,844	1,600	3,000	80,000	2500,000	80,000	0,000	21,000	21,000	85,000
14	0,340	0,519	1,400	3,000	85,000	2800,000	65,000	3,000	15,000	18,000	80,000
Ortalama	**0,530**	**0,562**	**1,764**	**3,143**	**83,571**	**2611,429**	**73,214**	**1,286**	**16,929**	**18,214**	**82,143**

4. TARTIŞMA

Glikoz-6-fosfat dehidrojenaz canlıların tüm hücrelerinde bulunan, nükleotit metabolizması için riboz, redüktif reaksiyonlar için NADPH üreten pentoz-fosfat metabolik yolunun ilk basamağını katalize eden aynı zamanda bu metabolik yolu regüle eden bir enzimdir (Salati ve Amir-Ahmady 2001).

Antioksidan savunma sistemi için NADPH sağlayarak hücre redoks dengesinin en önemli modülatörüdür. Eritrositlerin fonksiyonel bütünlüğünün sürdürülmesinde GSH önemlidir (Stanbury ve ark 1960).

Yeterli düzeyde GSH yeterince NADPH'ın varlığında mümkündür, bunun için de yeterince G6PD aktivitesine ihtiyaç vardır. Eritrosit G6PD ile ilgili çalışmalarda koyun eritrositi kullanılır çünkü koyun eritrositlerinde G6PD aktiviteleri düşüktür (Smith 1968).

Hayvanlar arasında en düşük eritrosit G6PD aktivitesine sahip olanı koyunlardır. Kobay, rat, köpek, tavşan, maymun, keçi ve koyunlarda eritrosit G6PD aktiviteleri sırasıyla; 9,44±1,18; 13,82±1,19; 11,0±2,70; 11,86±1,52; 10,6±3,79; 1,98±0,27 ve 1,20±0,37 U/g Hb' dir (Cheun LH 1966).

Koyunlarda türlere ve sex karakterlerine göre enzim düzeyleri değişir. Koyunlarda eritrosit enzim düzeyleri 1,4-2,61 U/g Hb (Smith 1968) olarak bildirilmektedir. Koçlarda enzim aktivitesi dişilerdekinden yüksektir. Rahmani ırkı koçlarda eritrosit enzim aktivitesi 1,81 U/g Hb olarak gözlenirken aynı ırkın dişi koyunlarında 1,14 U/g Hb olarak belirlenmiştir. Mısır yağlı kuyruk (fat-tailed) koyunlarında yapılan çalışmada ortalama eritrosit G6PD aktiviteleri 0,65-1,54 U/g Hb düzeylerinde belirlenmiştir (Maronpot 1972). Rahmani, Kinnawi White, Asyuti White, Barki, Kinnawi Black, Ausimi ırkı koyunlarda eritrosit G6PD aktiviteleri sırasıyla; 1,54±0,15; 1,04±0,05; 0,86±0,08; 0,80±0,05; 0,79±0,08; 0,65±0,05 U/g Hb olarak bildirilmektedir. Aynı araştırıcılar eritrositlerin yaşına göre de enzim aktivitelerinin değiştiğini, genç eritrositlerde enzim aktivitesinin 0,69-2,61 U/g Hb, yaşlılarda ise 0,10-0,69 U/g Hb düzeylerinde olduğunu gözlemlemişlerdir (Maronpot 1972).

Bu çalışmada Merinos koçlarında eritrosit G6PD aktivitesi sezon içi örneklerde 1,928±0,231 U/g Hb, sezon dışında ise 0,130±0,028 U/g Hb olarak belirlenen düzeyler koyunlar için bildirilen düzeylerle uyumludur. Yapılan literatür taramalarında sezon içi ve sezon dışı enzim aktiviteleriyle ilgili çalışmaya rastlamadık. Araştırmada gözlemlenen sezon içi ve dışı farklılıkların mevsimsel değişimlerden kaynaklanabileceği sanılmaktadır. Spermatozoada NADPH, pentoz fosfat metabolik yolundan karşılanır (William ve Ford 2004).

Bu yolun hız belirleyici enzimi G6PD'dir. Sperm hücresi gelişim evrelerine göre G6PD aktivitesi farklılaşır. Sperm hücresi geliştikçe aktivite azalır, en düşük aktivite spermatozoadadır (Bajpai ve ark 1998).

Enzim aktiviteleri türlere göre değişir (Gronczewska ve ark 2003); balıklarda spermatozoa enzim aktiviteleri Herring (C. harengus)' de 0,16±0,05, Carp (C. carpio)' da 0,15±0,05, Catfish (C. Gariepinus)' de 0,02±0,01 nmol/dk/10^7 , insanda 3,3 nmol/dk/10^8 spermatozoadır (Storey ve ark 1996).

Kawakami ve ark (1999) asthenozoospermli (AS) beagle köpeklerinde yaptıkları çalışmada; sağlıklılarda spermatozoa G6PD aktivitesinin 11,3±3,0 nmol/dk/mg protein, AS' lilerde ise 3,4±0,2nmol/dk/mg protein olarak belirlemişlerdir. Aynı çalışmada semen hacmi, sperm yoğunluğu ve motilitesi enzim aktivitesi yüksek olanlarda yüksek, düşük olanlarda düşük bulunmuştur. Ayrıca enzim aktivitesi ile motilite arasında pozitif bir korelâsyon saptanmıştır. Sunulan çalışmada Merinos koçlarında sezon içi eritrosit G6PD aktivitesi 1,928±0,231 U/g Hb spermatozoa enzim aktiviteleri sezon içinde; 0,130±0,028 U/mg protein, sezon dışında; 0,562±0,095 U/mg protein olarak belirlendi. İnsanlarda eritrosit G6PD aktivitesi ile sperm enzim aktiviteleri arasındaki korelâsyonun araştırıldığı bir çalışmada (Yoshida ve ark 1967) eritrosit G6PD defekti (Enzim aktivitesi normalin %15 ine sahip olan A^- donörler) olan bireylerde hem eritrosit hem de spermatozoa enzim aktiviteleri düşük bulunmuştur. Sarkar ve ark. (1977) insanlarda sperm G6PD eksikliği olan (A^- donör) ve olmayan bireylerin eritrosit-sperm G6PD ve 6PGD aktiviteleriyle ilgili yaptıkları çalışmada; normal donörlerde sperm G6PD aktivitesi 1.0 pikomol/dk/sperm iken 6PGD 2,5 pikomol/dk/sperm , G6PD yetmezliklerde (A^- donör) ise G6PD 0,16 pikomol/dk/sperm; 6PGD 10,05 pikomol/dk/sperm olarak belirlemişlerdir. Koçlarda spermatozoa enzim aktivitesi ile ilgili herhangi bir çalışmaya ulaşılamadığından bulgula-

rımız karşılaştırılamadı. Sezon içi spermatozoa enzim aktivitesi ile yoğunluk arasında pozitif bir korelâsyon gözlendi. Koçlarda semen üretimi gün ışığı süresi, ısı, nem ve mevsimsel faktörlerden etkilenir (Folch 1984).

Marti ve ark. (2007) erişkin Rasa Aragonesa koçlarında antioksidant enzim aktivitelerine mevsimlerin etkilerini araştırdıkları çalışmada, seminal plazmada GR, GPx aktvitelerinin yıl boyunca değiştiğini belirlemişlerdir. Glutasyon Redüktaz (GR) aktivitesi temmuz ayında 4,53 nmol/dk/mg protein iken ağustos ayında 2,37 nmol/dk/mg protein olmuş, GPx aktivitesi de yıl boyunca değişim göstererek en yüksek aktivite eylül ayında gözlemlenmiştir. Koçlarda seminal plazma protein konsantrasyonu sezon içinde 40,4±1,7 mg/ml iken sezon dışında 30,7±1,6 mg/ml olarak belirlendi. Antioksidant enzimler GR sezon içinde 3,12±0,31; sezon dışında 4,14±0,22; GPx 6,85±0,78; 6,91±0,69; CAT 8,73±0,77; 16,70±1,55,;SOD 1,02±0,06; 1,44±0,08 nmol/dk/mg protein olarak belirlenmiş. Aylara göre ise GR Temmuz-Ağustosta yüksek, Martta düşüktür. Katalazda sezon dışında yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlara göre sezon dışında daha yüksek bir antioksidant korumanın olduğu görülür. Çalışmamızda spermatozoa G6PD aktivitesi 0,130±0,028 U/mg protein olan sezon içi düzeyler sezon dışında (Nisan) 0,562±0,095 U/mg protein olarak gözlemlendi. Sonuçlar Marti ve ark. (2007)'nın sezon dışı artmış antioksidant enzim aktiviteleriyle uyumludur. Çünkü ilgili antioksidant enzimler için gerekli ko-substrat NADPH artışı G6PD aktivitesi artışıyla karşılanabilir. Sunulan çalışmada görüldüğü gibi eritrosit ve spermatozoa G6PD aktiviteleri sezon içinde; 1,928±0,231 U/g Hb; 0,130±0,028 U/mg protein iken sezon dışında 0,530±0,066 U/g Hb, 0,562±0,095 U/mg protein olarak belirlendi. Sarkar ve ark.'nın (1977) belirlediği insanlarda eritrosit enzim aktivitesi ile spermatozoa enzim aktivitesi arasındaki korelasyon, koçlarda belirlenememiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak Merinos ırkı koçlarda sezon içi ve sezon dışı enzim aktiviteleri ve spermatolojik parametreler yönünden mevsimsel farklılıkların görüldüğü, sezon dışında spermatozoa G6PD aktivitesinin yükseldiği, sezon içi spermatozoa enzim aktivitesi ile yoğunluk arasında pozitif bir korelâsyonun bulunduğu, sperm kalitesinin belirlenmesinde bu enzim aktivitesinin tek başına yeterli olmadığı kanısındayız.

6. KAYNAKLAR

Alvarez JG, Storey BT, 1995. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. Mol Reprod Dev, 42, 334-346.

Argov-Argaman N, Mahgrefteh K, Zeron Y, Roth Z, 2013. Season-induced variation in lipid composition is associated with semen quality in Holstein bulls. Reproduction, 145, 479-489.

Argov-Argaman N, Sklan D, Zeron Y and Roth Z, 2007. Association between seasonal changes in fatty-acid composition, expression of VLDL receptor and bovine sperm quality. Theriogenology, 67, 878-885.

Bajpai M, Gopal G, Setty BS, 1998. Changes in carbohydrate metabolism of testicular germ cells during meiosis in the rat. European Journal Endocrinology, 138, 322-327.

Bearden HJ. Fuquay JW, 1992. Applied Animal Reproduction, Englewood Cliffs, New Jersey.

Beutler E, 1971. Red cell metabolism manual of biochemical methods. London, Academic Press, p. 68-70.

Beutler E, 1984. Red cell metabolism,In: A manuel of Biochemical Method's, Orlanda, Grune & Stratton Inc, p. 68-71.

Beutler E, 1991. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. New Engl J Med, 324, p. 169-174.

Beutler E, 1993. Study of glucose-6-phosphate dehydrogenase: History and molecular biology. Am J Hematol, 42, 53-58.

Beutler E, 1994. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Blood, 84(11), 3613-36.

Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 72, 248–251.

Burtis CA, Ashwood ER, 1999. Tietz Textbook of Clinical Chemistry 3 rd Edition, Eds: Fairbanks V, Klee GG, Philadelphia WB Saunders company, p. 1643-1649.

Büyükokuroğlu M.E, Altıkat S,Çiftçi M, Banoğlu Z.N, Göçer F, 2001. Klorpromazin ve Haloperidol'ün İnsan Eritrosit Glukoz-6-Fosfat Dehidrojenaz enzimi üzerine invitro etkileri. Klinik Psikofarmakoloji Bülteni, 11, 101-105.

Cappellini MD, Montemurtos FM, Bellis GD, Debernardi S, Dotti C, Fiorelli G, 1996. Multiple G6PD Mutations Are Associated With a Clinical and Biochemical Phenotype Similar to That of G6PD Mediterranean. Blood, 87(9), 3953-3958.

Cheun L.H, 1966. Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in erythrocytes of experimental animals. J Clin Path, 19, 614-616.

De Lamirande E, Jıang H, Zını A, Kodama H, Gagnon C, 1997. Reactive oxygen species and sperm physiology. Rev Repord, 2, 48-54.

Folch J, 1984. Influence of age, photoperiodism and temperature on semen production of rams. In: The Male In Farm Animal Reproduction, Eds: Courot M, Martinus N, Amsterdam, p. 141-60.

Fujıı J, Iuchı Y, Matsuki S, Ishıı T, 2003. Cooperative function of antioxidant and redox systems againts oxidative stress in male reproductive tissues. Asian J, Androl, 5, 231-242.

Glader B, Lukens JN, 1999. Glucose-6- phosphate dehydrogenase deficiency and related disorders of hexose monophosphate shunt and glutathione metabolism. Wintrobe's Clinical Hematology. 10 th, Egypt, Mass Publishing, p. 1176-1190.

Gordon GB, Shantz LM, Talalay P, 1987. Mechanism of inhibition of growth of 3T3-L1 fibroblasts and their differentiation to adipocytes by dehydroepiandrosterone and related steroids: role of glucose-6-phosphate dehydrogenase. Proc Natl Acad Sci U S A. Adv Enzyme Regul, 26, 355-382.

Glander HJ, 1984. Sperm metabolism, sperm motility and cryopreservation. Zentralbl Gynakol, 106, 892-9.

Gözükara EM, 1978. Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminin özellikleri metabolik ve klinik açıdan önemi. Biyokimya dergisi, p. 217-240.

Gronczewska J, Zietara MS, Biegniewska A, Skorkowski EF, 2003. Enzyme activities in fish spermatozoa with focus on lactate dehydrogenase isoenzymes from herring Clupea harengus. Comparative Biochemstry and Physiology Part B, 134, 399-406.

Gupta G, Bajpai, Setty BS, 1997. Seasonal variations in Sertoli and germ cell marker enzymes in testis of rheus and bonnet monkeys. Indian J Exp Biol, 35, 541-543.

Henderson LM. and Chappel JB, 1996. NADP oxidase of neutrophils. Biochim Biophys Acta, 1273(2), 87-107.

Jablonska-Skwiecinska E, Lewandowska I, Plochocka D, Topczewski J, Zimowski JG, Klopocka J, Burzynska B, 1996. Several mutations including two novel mutations of the glukose -6-phosphate dehydrogenase gene in Polish G6PD deficient subjects with chronic nonspherocytic hemolytic anemia acute hemolytic anemia and favism. Hum Mutat, 14, 477-484.

Kawakami E, Arai T, Nakamura U, 1999. Effects of medium containing heparin and theophylline on capacitation and metabolic enzyme activities of ejaculated spermatozoa from dogs with asthenozoospermia. Animal Reproduction Science, 54, 251-259.

Keha EE, Kührevioğlu Öİ, 1997. Biyokimya. Erzurum, Şafak Yayınevi.

Kirkman H N, Gaetani GD, Clemons EH, Mareni C, 1975. Red cell NADP+ and NADPH in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. J Clin Invest, 55(4), 875-880.

Kirkman HN, Gaetani GF, 1986. Regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase in human erytrocytes. J Biol Chem, 261, 4032.

Koskınen E, Karlsson M, Reılas T, Sankarı S, Esala AL, Katıla T, 2002. Catalase activity and total protein in fractionated stallion seminal plasma. Theriogenology, p. 58, 337-340.

Krebs HA, Eggleston LV, 1978. The regulation of the pentose phosphate cycle in rat liver. In: Adv enzyme regul. Ed: Weber G, Oxford, Permagon Press Ltd, p. 12, 421-33.

Kurutaş EB, Kılınç M, Çağlar Y, 2005. Mus Musculus karaciğerinin farklı loblarındaki Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz düzeyleri. Türkiye Klinikleri J Med Sci, 25(2), 149-153.

Lanzkowsky P, 2005. Hemolytic anemia. In: Manual of pediatric hematology and oncology, Ed: Lanzkowsky P, California: Elsevier Academic Press, p. 153-6.

Lee KW, Lee JH, Shın SW, Kım SJ, Lee HH, Park J W, 2007. Hepatocyte transplantation for glycogen storage disease type Ib. Cell Transplantation, 16(6), 629-637.

Levy HR, 1979. Glucose-6-phosphate dehydrogenase. In: Advan Enzymol, Ed: Meister A, New York: John Wiley and Sons Inc, 48, 97-191.

Li TK, 1975. The glutathione and thiol content of mammalian spermatozoa and seminal plasma. Biol. Reprod, 12, 641-646.

Luzzatto L, Mehta A, Vulliamy TJ, 2000. Glucose – phosphate dehydrogenase deficiency, In: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease 8th edition, Eds: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS and Valle L, McGraw-Hill New York, p. 4517-4553.

MacDonald D, Town M, Mason P, Vulliamy T, Luzzatto L, Goff DK, 1991. Deficiency in red blood cells Nature, 350, 115.

Maronpot RR, 1972. Erythrocyte Glucose-6-phosphate Dehydrogenase and Glutathione Deficiency in Sheep, Can J Comp Med.

Marti E, Mara L, Marti JI, Muino-Blanco t, Cebrian-Perez JA, 2007. Seasonal variations in antioxidant enzyme activity in ram seminal plasma. Theriogenology, 67, 1446-1454.

Mehta A, Mason PJ, Vulliamy TJ, 2000.Glukose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Baillieres Best Pract Res Clin Haematol, 13, 21- 38.

Minucci A, Giardina B, Zuppi C, Capoluongo E, 2009. Glucose-6-phosphate dehydrogenase laboratory assay: how, when and why? IUBMB Life, 61, 27-34.

Miraglia E, Lussiana C, Viarisio D, Racca C, Cipriani A, Gazzano E, Bosia A, Revelli A, Ghigo D, 2010. The pentose phosphate pathway plays an essential role in supporting human sperm capacitation, 93, 2437-40.

Morelli A, Benatti U, Gaetani GF, De Flora A, 1978. Biochemical mechanisms of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Proc Natl Acad Sci, 75(4), 1979-83.

Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW, 2000. Harper's Biochemistry. 25 th Ed, Connecticut, Appleton & Lange.

Persigo MG, Viglietto G, Martini G, 1986. Isolation of human glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) cDNA clones, primary structure of the protein and unusual 5 noncoding region. Nucleic Acids Res, 14, 2511-2522.

Reuter R, Naumann M, Metz P, Kopperschlager G, 1990. Purification and characterization of glocose-6-phophate dehydrogenase from Pseudomonas W6. Biomed Biochem Acta, 7, 539-46.

Rovira A, De Angioletti M, Camacho-Vanegas O, 2000. Stable in vivo expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) and rescue of G6PD deficiency in stem cells by gene transfer. Blood, 96, 4111-7.

Salati LM and Amir-Ahmadi B, 2001. Dietary regulation of expression og glucose-6-phosphate dehydrogenase. Annu Rev Nutr, 21, 121-140.

Sarkar S, Nelson , Jones OW, 1977. Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity of human sperm. J Med Genet, 14, 250-255.

Saunders MA, Hammer MF, Nachman MW, 2002. Nucleotide variability at G6pd and the signature of malarial selection in humans. Genetics, 162, 1849-1861.

Shek-Vugroveckı A, Aladrovıc J, Ljubıc BB, Laskaj R, Majıc-Balıc I, Milinkovic-Tur S, 2011. Seasonal variations in semen antioxidants of simmental bulls. Veterinarska Stanica 42-Supplement, p. 143-148.

Smith JE, 1968. Low erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and primaquine sensitivity in sheep. J Lab Clin Med, 71, 826-833.

Stanbury JB, Wyngaarden JB, Fredrickson DS, 1960. The Metabolic Basis of Inherited Disease, p. 1031-1067.

Storey BT, Alvarez JG and Thompson KA, 1996. NADPH production limits hydroperoxide reducing capacity of glutathione peroxidase-reductase system of human sperm. Biol Reprod, 52 (Suppl. 1), 182.

Storey BT, 1997. Biochemistry of the induction and prevention of lipo peroxidative damage in human spermatozoa. Mol Hum Reprod, p. 203-213.

Stryer L, 1988. Biochemistry. 3 rd Ed, New York: W. H. Freeman and Company, p. 427-431.

Strzezek J, Fraser L, Demianowicz W, Kordon W, Wysocki P, Holody D, 2000. Effect of depletion tests (DT) on the composition of boar semen. Theriogenology, 54, 949-963.

Tian WN, Braunstein LD, Pang J, Stuhlmeier KM, Xi QC, Tian X, Stanton RC, 1998. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity for cell growth. Journal of Biological Chemistry, 273, 10609-10617.

Tuncel P, Tokullugil A, Dirican M, Ulukaya E, 1997. Heksoz monofosfat yolu Biyokimya 2. Baskı İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri Ltd Şti, p. 111-117.

Urner F, Sakkas D, 1999. A possible role of the pentose phosphate pathway of spermatozoa in gamete fusion in the Mouse. Biol Reprod, 60, 733-739.

Urner F, Sakkas D, 2005. Involvement of the Pentose Phosphate Pathway and Redox Regulation in Fertilization in the Mouse. Molecular Reproduction and Development, 70, 494-503.

Vaisberg CN, Jelezarsky LV, Dishlianova B, Chaushev TA, 2005. Activity, substrate detection and immunolocalization of glutathione peroxidase (GPx) in bovine reproductive organs and semen. Theriogenology, 2, 416-428.

Weekes TEC, 1984. Activities of enzymes related to NADPH generation and amino acid metabolism in the ruminal mucosa of sheep, 114, 1724-1732.

Williams AC, Ford WC, 2004. Functional significance of the pentose phosphate pathway and glutathione reductase in the antioxidant defenses of human sperm. Biology of Reproduction, 71, 1309-1316.

Yoshida A, 1967. Stamatoyannopoulos G, Motulsky A.G. Negro variant of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency (A-) in man. Science, 155, 97-99.

Yoshida A, 1973. Hemolytic anemia and G6PD deficiency. Science, 179:532.

Yeni D, Gündoğan M, Ciğerci İH, Avdatek F, 2010. Seasonal Variation of Oxidative Stress Parameters in Ram Seminal Plasma, Journal of Animal and Veterinary Advances. 9(1), 49-54.

Zimran A, Wasser G, Forman L, Gelbart T, Beutler E, 2000. Effect of ozone on red blood cell enzymes and intermediates. Acta Haematol, 102, 148-153.

8. ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Karaman'da doğdu. İlköğrenimini Gazi Mustafa Kemal İlkokulunda, orta öğrenimini Konya Atatürk Sağlık Meslek Lisesi Laboratuvar bölümünde tamamladı. 2001-2003 yıllarında Ankara Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulunda Tıbbi Laboratuvar okudu. 2004 yılında Mardin Verem Savaş Dispanserinde Laroratuvar Teknisyeni olarak göreve başladı. 2005 yılında Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümüne dikey geçiş yaparak 2008 yılında mezun oldu. Halen Kartal Lütfi Kırdar Eğitim ve Araştırma Hastanesinde görev yapmaktadır.