

***Capoeta umbla* (Heckel, 1843) Böbrek Dokusundan Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz Enziminin Saflaştırılması ve Bazı Antibiyotiklerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi**

¹Muammer KIRICI*, ²Muhammed ATAMANALP

¹Bingöl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Su Ürünleri Bölümü, 12000, Bingöl, Türkiye

²Atatürk Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Su Ürünleri Yetiştiriciliği Bölümü, 25240, Erzurum, Türkiye

*Sorumlu yazar: muammerkirici@hotmail.com

Geliş Tarihi: 18.05.2016

Düzeltilme Geliş Tarihi: 21.06.2016

Kabul Tarihi: 21.06.2016

Özet

Bu çalışmada, metabolizma için oldukça önemli olan glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzimi (E.C.1.1.1.49; G6PD), *Capoeta umbla* böbrek dokularından saflaştırılmıştır. Saflaştırma işlemi, homojenatin hazırlanması, amonyum sülfat çöktürmesi ve 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi yöntemleriyle gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemler sonucunda, spesifik aktivitesi 11.26 EÜ/mg protein olan enzim, %22.7 verimle 402.14 kat olarak saflaştırılmıştır. Enzim saflığı sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile kontrol edilmiştir. Enzim aktivitesi spektrofotometre ile 340 nm'de Beutler metoduna göre ölçülmüştür. Ayrıca bazı antibiyotiklerin (ampisilin, gentamisin, penisilin G ve sefuroksim sodyum) *C. umbla* böbrek G6PD enzim aktivitesi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Kullanılan tüm antibiyotiklerin enzim üzerine inhibisyon etkisi tespit edilmiştir. İnhibisyon etkisi gösteren antibiyotikler için IC₅₀ ve K_i değerleri hesaplanmıştır. Sonuç olarak, kullanılan antibiyotikler arasında gentamisinin, enzimi daha fazla inhibe ettiği belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Antibiyotik, *Capoeta umbla*, glukoz 6-fosfat dehidrogenaz, inhibisyon

Purification of Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase Enzyme from *Capoeta Umbla* Kidney Tissue and Examination of The Effects of Some Antibiotics On Enzyme Activity

Abstract

In this study, glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD; EC 1.1.1.49) enzyme which is of great importance for the metabolism was purified from *Capoeta umbla* kidney tissue. The purification was performed by preparation of homogenates, ammonium sulphate precipitation and 2',5'-ADP Sepharose 4B affinity chromatography. As a result of these procedures, the enzyme having the specific activity of 11.26 EU/mg proteins was purified 402.14-fold with a yield of 22.7 %. Enzyme purification was checked by performing sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Enzyme activity was determined with the Beutler method by using a spectrophotometer at 340 nm. Furthermore, the effects of some antibiotics (ampicillin, gentamicin, penicillin G and sefuroxime sodium) were investigated on *C. umbla* kidney enzyme activity. All used antibiotics indicated the inhibitory effects on the enzyme. IC₅₀ and K_i values were calculated for this antibiotics which show inhibition effects. In conclusion, gentamicin inhibits the enzyme activity more than ampicillin, penicillin G and sefuroxime sodium.

Key words: Antibiotic, *Capoeta umbla*, glucose 6-phosphate dehydrogenase, inhibition

Giriş

Türkiye iç su varlığı yönünden dünya ortalamasının altında olmasına karşın, bulunduğu bölge itibari ile zengin sayılabilecek kaynaklara sahiptir. Doğu Anadolu Bölgesi ise bu bakımdan

daha şanslı bir bölgedir. Mevcut iç su potansiyelinin %35'i ve tür zenginliğinin %20'sine sahiptir (Akyurt ve ark., 1990). Bölgedeki mevcut türlerin yalnızca birkaçı ekonomik anlamda avlanma kompozisyonuna girmekte (alabalık, inci kefali,

yayın, aynalı sazan, siraz (*C. umbla*), karabalık (*C. trutta*) gibi) ve diğer türler üzerinde ciddiyle durulmamaktadır. Mevcut türlerin gerek üretim ve ekonomik potansiyelleri gerekse ekolojik bakımdan önemleri de dikkate alındığında bütün türlerin çalışılmasının gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Bununla beraber gelecekte hangi balıkların daha stratejik noktalarda kullanılabileceği henüz bilinmediğinden biyolojik zenginliklerimizin bir bütün olarak ele alınıp çalışılması kaçınılmaz olmaktadır (Güneş, 2007).

Dünyadaki mevcut omurgalı hayvanların % 42'sini oluşturan balıkların, 40000 civarında türü olduğu ve bu sayının %40 gibi büyük bir bölümünü sazangillerin (Cyprinidae) oluşturduğu ileri sürülmektedir (Çelikkale, 1991). Cyprinidae familyasına mensup *Capoeta* cinsi, Güney Çin, Kuzey Hindistan, Afganistan, Türkistan, Aral Gölü, Ortadoğu ve Anadolu'yu içermekte olup çok geniş bir coğrafyada dağılım göstermektedir (Geldiay ve Balık, 1996). Yapılan çalışmalar sonucunda, *C. angorae*, *C. antalyensis*, *C. baliki*, *C. banarescui*, *C. barroisi*, *C. caelestis*, *C. capoeta*, *C. bergamae*, *C. damascina*, *C. ekmekciae*, *C. erhani*, *C. kosswigi*, *C. mauricii*, *C. pestai*, *C. sieboldii*, *C. tinca*, *C. trutta* ve *C. umbla* olmak üzere ülkemiz iç sularında 18 *Capoeta* türü tespit edilmiştir (Çoban ve ark., 2013). Bunlar içinde insanlar tarafından fazlaca tüketilen ve ekonomik değeri yüksek olan türlerden biri *C. umbla*'dır. *C. umbla*, başta Fırat ve Dicle nehir sisteminde olmak üzere Hazar gölü, Murat nehri, Karasu, Munzur suyu, Haman suyu, Batman suyu gibi Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi'ndeki birçok akarsu ve göllere yayılmıştır (Geldiay ve Balık, 1996).

Antioksidan savunma sisteminin önemli enzimlerinden biri olan glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzimi (E.C.1.1.49; G6PD) pentoz fosfat metabolik yolunun ilk basamağını katalizleyen anahtar bir enzimdir. Bu enzim NADP⁺ varlığında glukoz 6-fosfatın, 6-fosfoglukonata dönüşümünü sağlar ve bunun sonucunda hücreler için son derece önemli olan NADPH oluşur. Canlılarda NADPH oluşumu için pentoz fosfat metabolik yolu oldukça önemli olup G6PD eksikliğinde NADPH ciddi ölçüde azalır. NADPH'nin bir diğer rolü ise okside glutatyonun (GSSG) indirgenmesini sağlamaktır. Bu reaksiyon glutatyon redüktaz enzimi tarafından katalizlenir. GSH, serbest tiyol grubu ihtiva eden bir tripeptiddir. Serbest tiyol grubu, proteinleri indirgenmiş halde tutarak sülfidril tamponu görevini görür; aynı zamanda hidrojen peroksit ve organik peroksitlerle reaksiyona girerek detoksifikasyon olaylarında rol alır (Keha ve Küfrevioğlu, 2004).

İnsan ve hayvan dokularında antibiyotiklerin G6PD enzimi üzerine etkileri ile ilgili literatürde birçok

çalışma bulunmasına rağmen (Çiftçi ve ark., 2000; Çiftçi ve ark., 2002; Beydemir ve ark., 2003; Erdoğan ve ark., 2004), *C. umbla* böbrek dokusunda bu enzim üzerine antibiyotiklerin etkileri ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu eksikliği gidermek amacıyla çalışmamızda ülkemiz iç sularında yoğun şekilde bulunan *C. umbla* böbrek dokusundan, önemli bir antioksidan enzim olan G6PD enzimi saflaştırılarak bazı antibiyotiklerin *in vitro* olarak enzim üzerine inhibisyon etkileri incelenmiştir.

Materyal ve Yöntem

Balık materyali

İç sularımızda bulunan ve kaliteli gıda kaynağı olarak insanlar tarafından özellikle İç Anadolu, Doğu Anadolu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde fazlaca tüketilen *C. umbla* balıkları çalışmada kullanılmıştır. Balık materyali örnekleri, Bingöl İli Genç İlçesi'nden geçen Murat Nehri'nde tek istasyondan alınmıştır.

Homojenatın hazırlanması

Ortalama ağırlıkları yaklaşık 200 g olan 10 adet balık soğuk zincir kuralına göre laboratuvara getirilerek böbrek dokuları hızlı bir şekilde çıkarılmış ve bir kompozit oluşturulmuştur. Çalışmaya 24 saat içinde başlanmış ve dokular çalışmaya başlanacağı süreye kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Hazırlanan kompozitten 10 g alınarak kan ve diğer kirlilikleri elimine etmek için % 0.9'luk NaCl ile 3 defa yıkanmıştır. Doku homojenatlarını hazırlamak için, ilk olarak dokular ultra-turrax cihazı kullanılarak parçalanmıştır. Daha sonra sıvı azot içinde parçalanarak toz haline getirilmiş ve 3 ml/g olacak şekilde 50 mM KH₂PO₄ (pH 7.4) homojenat tampon çözeltisi içinde homojenize edilmiştir. Bu süspansiyon 60 dakika 13000 rpm'de 2 defa santrifüj edilmiş ve pelet atılarak, süpernatant daha sonraki saflaştırma basamaklarında kullanılmıştır (Çam, 2011).

Enzim aktivitesinin ölçümü

G6PD enziminin aktivitesi 25 °C'de Beutler metoduna göre 340 nm'de spektrofotometrede ölçülerek belirlenmiştir. Beutler yönteminde temel nokta, spektrofotometrede 340 nm'de NADP⁺'nin indirgenmesinden dolayı oluşan NADPH'nin absorpsiyon vermesidir (Beutler, 1971).

Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz

C. umbla böbrek dokusundan elde edilen G6PD enzim homojenatı sırasıyla % 0-20, % 20-30, % 30-40, % 40-50, % 50-60, % 60-70 ve % 70-80 aralıklarında katı amonyum sülfat ile çöktürülmüştür. Çöktürme işlemleri sırasında 13000 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüj yapılmıştır. Her defasında çökelekte ve süpernatantda enzim

aktivitesine bakılmıştır. Amonyum sülfat çöktürmesi sırasında homojenata katı amonyum sülfat yavaş yavaş katılmış ve her defasında daha önce katılan amonyum sülfatın çözünmüş olmasına dikkat edilmiştir. Amonyum sülfatın homojenatta çözünme işlemi buz banyosunda manyetik karıştırıcı ile yapılmıştır. İşlem sonucunda, *C. umbla* böbrek G6PD aktivitesinin tamamının % 40-80 aralığında çöktüğü belirlenmiştir.

C. umbla böbrek homojenatına % 0-40 aralığında amonyum sülfat çöktürmesi yapılmıştır. Numune santrifüj tüplerine konularak 13000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra elde edilen homojenatta % 40-80 aralığında amonyum sülfat çöktürmesi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen numune 13000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı atılarak çökelek çözünebileceği minimum fosfat tamponunda (50 mM KH₂PO₄, pH 7.4) çözülmüştür. Amonyum sülfat çöktürmesi işlemleri sırasında ortam sıcaklığı buz banyosuyla düşük tutulmaya çalışılmıştır. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen numune diyaliz torbasına yerleştirilerek bir saat süreyle diyaliz tamponuna (50 mM K-asetat + 50 mM K-fosfat, pH 7.5) karşı diyaliz edilmiştir (Ninfali ve Palma, 1990). Çalışmada enzimin kullanıldığı bütün aşamalar +4 °C'de gerçekleştirilmiştir.

Afinite kolonunun hazırlanması

10 ml'lik yatak hacmi için 2 g kuru 2',5'-ADP Sepharose 4B jeli tartılarak, 400 ml destile su ile katı maddelerin uzaklaştırılması için birkaç defa yıkanmıştır. Yıkama esnasında jel şişmiştir. Şişirilmiş jelin havası su trompu kullanılarak vakum ile alındıktan sonra dengeleme tamponu (0.1 M K-asetat + 0.1 M K-fosfat, pH 6.0) ilave edilerek jel süspanse edilmiştir. Süspanse edilmiş jel, 1x10 cm'lik kapalı sistemden oluşan soğutmalı kolona paketlenmiştir. Jel çöktükten sonra peristaltik pompa yardımıyla dengeleme tamponu kullanılarak yıkanmıştır. Dengeleme ve yıkamada akış hızı 50 ml/h absorbansının eşitlenmesinden anlaşılmıştır. Böylece afinite kolonu numunenin yüklenmesi için hazır hale getirilmiş oldu (Çam, 2011).

Numunenin afinite kolonuna tatbiki ve G6PD'nin elüsyonu

Amonyum sülfat çöktürmesinden elde edilen derişikleştirilmiş numune, 0.1 M K-asetat + 0.1 M K-fosfat (pH 6.0) tamponu ile dengelenmiş kolona tatbik edilmiştir. Daha sonra kolon sırasıyla 25 ml 0.1 M K-asetat + 0.1 M K-fosfat (pH 6.0), 25 ml 0.1 M K-asetat + 0.1 M K-fosfat (pH 7.85) ve 25 ml 0.1 M KCl + 0.1 M K-fosfat (pH 7.85) çözeltisiyle

yıkanmıştır. Dengeleme ve yıkama hızı 50 ml/h'e ayarlanmıştır. Akış hızı peristaltik pompa ile kontrol altında tutulmuştur. Böylece enzimin büyük bir kısmı jele tutunmuş ve diğer safsızlıklar uzaklaştırılmıştır. Daha sonra 80 mM K-fosfat + 80 mM KCl + 0.5 mM NADP⁺ + 10 mM EDTA (pH 7.85) çözeltisi kolona uygulanarak enzim elüe edilmiştir. Elüsyonlar 1 ml olacak şekilde ependorf tüplere alınmış ve herbirinde aktivite ayrı ayrı ölçülmüştür. Bütün bu işlemler esnasında sıcaklık +4 °C'de kontrol altında tutulmuştur (Ninfali ve Palma, 1990).

Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

Enzim saflaştırıldıktan sonra % 3-8 kesikli SDS-PAGE Laemmli (1970) metoduna göre yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edilmiştir (Şekil 1).

Protein miktarının hesaplanması

Protein miktarının ölçümü Bradford metoduna göre 595 nm'de spektrofotometre kullanılarak yapılmıştır. Ölçümde bovin serum albümin proteini standart olarak kullanılmıştır (Bradford, 1976).

In Vitro olarak antibiyotiklerin etkisi

İnhibitör olarak ampisilin, gentamisin, penisilin G ve sefuroksim sodyum antibiyotikleri kullanılmıştır. İnhibitör uygulanan ve inhibitör uygulanmayan çalışmalarda substrat (G6-P) konsantrasyonları, 0.03, 0.06, 0.09, 0.15 ve 0.27 mM olarak uygulanmıştır. IC₅₀ değerini hesaplamak için beş farklı inhibitör konsantrasyonu belirlenmiştir. Belirlenen IC₅₀ değerleri ampisilin için 1, 5, 7.5, 8.5 ve 10 mM; gentamisin için 0.063, 0.084, 0.143, 0.168 ve 0.21 mM; penisilin için 1.5, 2.25, 4.8, 5.4 ve 6 mM; sefuroksim sodyum için 0.74, 1.03, 1.48, 1.77 ve 2.21 mM'dir. Her bir antibiyotik için 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda % Aktivite-[Antibiyotik] grafikleri (Şekil 2) çizilmiştir. Antibiyotik uygulanmayan küvetin aktivitesi % 100 kabul edilmiş ve % 50 inhibisyona neden olan antibiyotik konsantrasyonu (IC₅₀), % Aktivite-[Antibiyotik] grafiklerinden hesaplanmıştır.

IC₅₀ değerleri hesaplanan antibiyotiklerin K_i değerlerini belirlemek amacıyla *C. umbla* böbrek G6PD enzim aktivitesini yarıya düşüren antibiyotik konsantrasyonu ile bu değer altında ve üstünde iki sabit antibiyotik konsantrasyonu alınarak, uygun beş substrat konsantrasyonu ile aktivite ölçümleri yapılmıştır. Çalışmalarda uygun beş farklı substrat konsantrasyonu stok çözelti kullanılarak ön deneme ile belirlenmiştir. Elde edilen değerlerle her bir inhibitör için Lineweaver-Burk grafikleri (Şekil 3) çizilmiştir. Grafik denkleminde yarışmalı inhibisyon için eğime eşit olan Eşitlik 1 formülünden, yarışmasız inhibisyon için Eşitlik 2 formülünden

yararlanılarak K_i değerleri belirlenmiştir (Çam, 2011).

$$K_M/V_{max}=(1+[I]/K_i) \quad (\text{Eşitlik 1})$$

$$V_{max}=V_{max}^l(1+[I]/K_i) \quad (\text{Eşitlik 2})$$

Bu eşitliklerde; K_M , Michaelis-Menten sabiti; V_{max} , Maksimum hız; I , inhibitör; K_i , Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti; V_{max}^l , İnhibitörün maksimum hızını ifade etmektedir.

Bulgular ve Tartışma

G6PD enzimi insandan, hayvanlardan, bitkilerden ve mikroorganizmalardan saflaştırılmıştır (Beydemir ve ark., 2003; Esposito ve ark., 2005; İbraheem ve ark., 2005; Wei-Fu ve ark., 2007). Ayrıca enzimin saflaştırma işlemleri çok farklı yöntemlerle yapılmaktadır. Bununla beraber en çok kullanılan yöntem bu çalışmada da kullanılmış olan 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi yöntemidir. Bu yöntemle enzim, kısa sürede, en az masrafla ve yüksek verimle saflaştırılabilmektedir (Keha ve Küfrevioğlu, 2004).

Birçok araştırmacı tarafından bakteriyel balık patojenlerine karşı antibiyotiklerin antibakteriyel etkileri araştırılmıştır (Akinbowale ve ark., 2006; İspir ve ark., 2013). Antibiyotiklerin çoğu canlı dokularında enzim sistemi üzerine aktivatör ya da inhibitör olarak etki eder (Jacobasch ve Rappoport, 1996; Çiftçi ve ark., 2002). Pek çok antibiyotik *in vivo* ve *in vitro* olarak aynı etkiyi gösterirken, özellikle enzim aktiviteleri üzerine farklı etkiler göstermektedir (Beydemir ve ark., 2000). Bununla beraber, balıklarda G6PD enzimi ve diğer enzimler üzerine antibiyotiklerin etkileri ile ilgili bazı çalışmalar mevcut olmasına rağmen yeterli düzeyde değildir (Erdoğan ve ark., 2004; Çomaklı ve ark., 2011). Ayrıca, insanlar ve birçok hayvan türünde enzim aktiviteleri üzerine antibiyotiklerin etkileri araştırılmıştır (Çiftçi ve ark., 2000; Çiftçi ve ark., 2002; Erat ve ark., 2003; Erat ve ark., 2005).

Çizelge 1. *C. umbla* böbrek G6PD enziminin saflaştırılma basamakları

Numune türü	Aktivite (EÜ/ml)	Protein (mg/ml)	Toplam hacim (ml)	Toplam aktivite (EU)	Toplam protein (mg)	Spesifik aktivite (EÜ/mg protein)	Saflaştırma katsayısı	% Verim
Homojenat	0.274	9.78	31	8.494	303.18	0.028	1	100
Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz	0.462	14.2	6	2.772	85.2	0.033	1.18	32.6
2',5'- ADP Sepharose-4B afinite kromatografisi	0.642	0.057	3	1.926	0.171	11.26	402.14	22.7

Çalışma sonucunda Çizelge 1'de görüldüğü gibi balık böbrek dokusundan G6PD enzimi, spesifik aktivitesi 11.26 EÜ/mg protein ve % 22.7 verimle 402.14 kat saflaştırılmıştır. Benzer yöntem kullanılarak yapılan çalışmalarda araştırmacılar farklı canlılardan G6PD enzimini farklı oranlarda saflaştırmışlardır. Örneğin; Çiftçi ve ark. (2002) koyun karaciğerinden spesifik aktivitesi 11.76 EÜ/mg protein ve % 35.72 verimle 1.913 kat; Beydemir ve ark. (2003) insan eritrositlerinden 97.6 EÜ/mg protein ve % 39 verimle 9760 kat; Beydemir ve ark. (2005) gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) eritrositlerinden spesifik aktivitesi 16.7 EÜ/mg protein ve % 60.6 verimle 1.852 kat; Çiftçi ve ark. (2007) inci kefali (*Chalcalburnus tarischi*) balığından 34.16 EÜ/mg protein ve % 46.24 verimle 899 kat olarak G6PD enzimini saflaştırmışlardır. Ayrıca enzim saflığı SDS-PAGE yapılarak kontrol edilmiş ve tek bant gözlenmiştir (Şekil 1).

Maddelerin enzim üzerine inhibisyon etkilerini göstermek amacıyla en uygun parametre K_i değeriye, bazı araştırmacılar IC_{50} değerini de kullanmışlardır. Bu çalışmamızda antibiyotiklerin etkilerinin daha iyi belirlenmesi ve anlaşılması amacıyla her iki değer yani K_i ve IC_{50} değerleri hesaplanmıştır. İnhibisyon etkisi gösteren antibiyotiklerin IC_{50} değerleri % Aktivite-[Antibiyotik] grafikleri (Şekil 2) çizilerek hesaplanırken, K_i değerleri Lineweaver-Burk grafikleri (Şekil 3) çizilerek hesaplanmıştır.

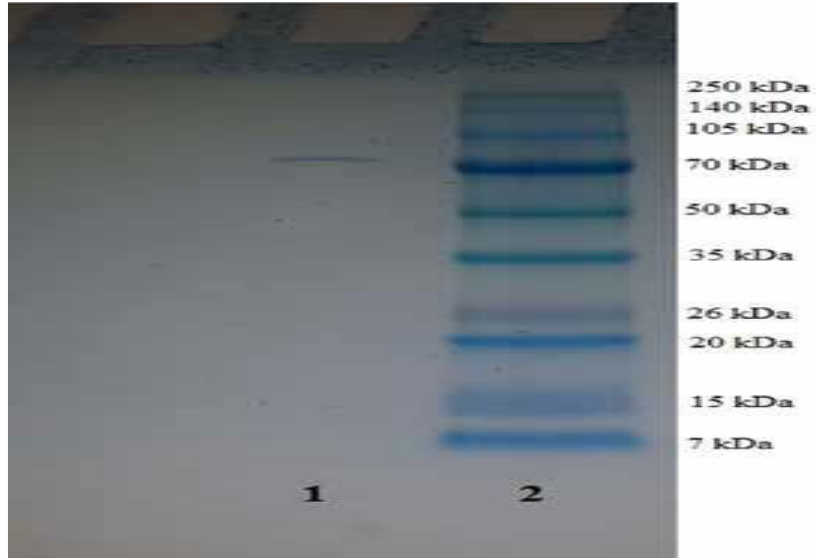
Çalışmada *C. umbla* böbrek dokusu G6PD enzimine uygulanan ampisilin, gentamisin, penisilin G ve sefuroksim sodyum için IC_{50} değerleri sırasıyla 7.97, 0.14, 4.31, 1.41 mM olarak hesaplanmıştır. Ayrıca K_i değerleri ve inhibisyon tipleri, ampisilin için 5.275 ± 1.346 mM ve yarışmasız; gentamisin için 0.041 ± 0.027 mM ve yarışmalı; penisilin G için 2.231 ± 0.414 mM ve yarışmasız; sefuroksim sodyum için 0.578 ± 0.097 mM ve yarışmasız olarak

belirlenmiştir. K_i ve IC_{50} değerleri göstermektedir ki inhibitör etkisi en yüksek antibiyotik gentamisinidir. Gentamisini sırasıyla sefuroksim sodyum, penisilin G ve ampisilin izlemektedir (Çizelge 2).

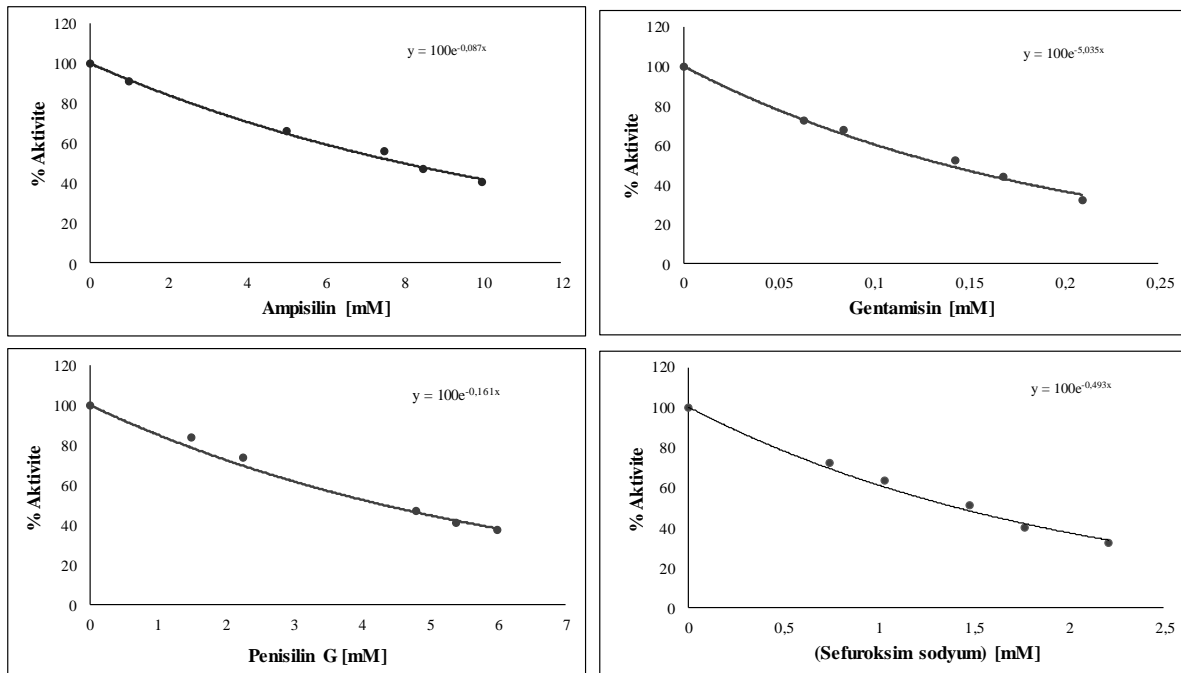
Benzer şekilde Erdoğan ve ark. (2004) gentamisinin gökkuşuğu alabalığı eritrositinden saflaştırılan G6PD enzimini inhibe ettiğini belirlemişlerdir. Çomaklı ve ark. (2011) gentamisin sülfat ve sefuroksim sodyumun gökkuşuğu alabalığı eritrositlerinden saflaştırılan glutatyon S-transferaz enzimini inhibe ettiğini ve ampisilin ise inhibe

etmediğini belirtmişlerdir. Ekinci (2009) sefuroksim insan serumundan saflaştırılan paraoksonaz 1 enzimini inhibe ettiğini belirtmiştir.

Bunun yanında Erat ve ark. (2005) ampisilin, gentamisin sülfat ve penisilin G'nin insan eritrositlerinden saflaştırılan glutatyon redüktaz enzimini aktive ettiğini belirlemiştir. Ayrıca Erat ve ark. (2003) gentamisin sülfat ve ampisilin sığır eritrositinden saflaştırılan glutatyon redüktaz enzimini inhibe etmediğini belirtmişlerdir.



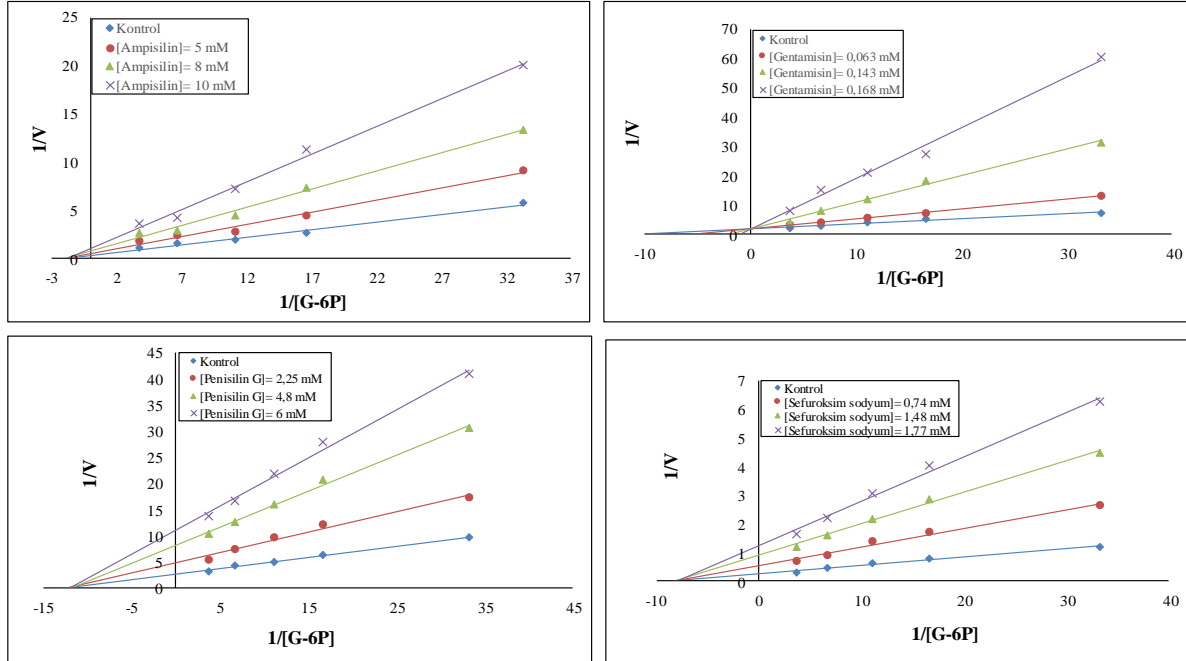
Şekil 1. *C. umbla* böbrek dokusundan saflaştırılan G6PD enziminin SDS-PAGE bandları (1: Böbrek; 2: Standart Proteinler)



Şekil 2. *C. umbla* böbrek G6PD enzimi için beş farklı antibiyotik konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Antibiyotik] grafiği

Çizelge 2. *C. umbla* böbrek G6PD enzimi için IC₅₀, K_i değerleri ve inhibisyon tipleri

Antibiyotikler	IC ₅₀ (mM)	K _i (mM)	inhibisyon tipi
Ampisilin	7.97	5.275 ± 1.346	Yarışmasız
Gentamisin	0.14	0.041 ± 0.027	Yarışmalı
Penisilin G	4.31	2.231 ± 0.414	Yarışmasız
Sefuroksim sodyum	1.41	0.578 ± 0.097	Yarışmasız

**Şekil 3.** *C. umbla* böbrek G6PD enzimi için 3 sabit antibiyotik ve 5 farklı substrat konsantrasyonlarında çizilen Lineweaver-Burk grafikleri

Sonuç ve Öneriler

Günümüzde balık hastalıklarının tedavisinde antibiyotikler yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Antibiyotiklerin kullanımı sırasında dozu çok iyi ayarlanmalıdır. Yapılan çalışmalarda görüldüğü gibi antibiyotiklerin çok küçük miktarları bile balık metabolizmasına zarar vermektedir. Ayrıca fazla kullanılan antibiyotikler balık vücudunda birikerek besin zinciri yoluyla insanlara da zarar verebilmektedir.

Kaynaklar

- Akinbowale, O.L., Peng, H. and Barton M.D. 2006. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. *Journal of Applied Microbiology*, 100: 1103-1113.
- Akyurt, İ., Tarım, S. ve Yanık, T., 1990. Doğu Anadolu'nun su kaynakları ve balık potansiyeli yönünden değerlendirilmesi. Doğu Anadolu'da Tarımın Verimlilik Sorunları Sempozyumu, Van, s. 41-50.
- Beutler, E. 1971. *Red Cell Metabolism. Manual of Biochemical Methods*. 6th ed., Academic Press, London, pp. 68-70.

Beydemir, Ş., Çiftçi, M., Özmen, İ., Büyükokuroğlu, M., Özdemir, H. ve Küfrevioğlu, Ö.İ. 2000. Effects of some medical drugs on enzyme activities of carbonic anhydrase from human erythrocytes *in vitro* and from rat erythrocytes *in vivo*. *Pharmacological Research*, 42: 187-191.

Beydemir, S., Kulaçoğlu, D.N., Çiftçi, M. ve Küfrevioğlu Ö.İ. 2003. The effects of some antibiotics on sheep lens glucose 6-phosphate dehydrogenase *in vitro*. *European Journal of Ophthalmology*, 13: 155-161.

Beydemir, Ş., Gülçin, İ., Hisar, O., Küfrevioğlu, Ö.İ. and Yanık, T. 2005. Effect of melatonin on glucose-6-phosphate dehydrogenase from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) erythrocytes *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Applied Animal Research*, 28: 65-68.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochemistry*, 72: 248-254.

Çam, M. 2011. Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enziminin çipura karaciğer ve solungaç dokularından saflaştırılması ve enzim aktivitesi üzerine bazı metallerin etkilerinin

- incelenmesi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Çelikkale, M.S. 1991. *Balık Biyolojisi*. Karadeniz Teknik Üniversitesi Sürmene Deniz Bilimleri Fakültesi Yayınları, Trabzon, 387 s.
- Çiftçi, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., Gündoğdu, M. and Özmen, İ. 2000. Effects of some antibiotics on enzyme activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. *Pharmacological Research*, 41: 109-113.
- Çiftçi, M., Türkoğlu, V. and Aldemir, S. 2002. Effects of some antibiotics on glucose 6-phosphate dehydrogenase in sheep liver. *Veterinari Medicina Czech*, 47: 283–288.
- Çiftçi, M., Türkoğlu, V. and Çoban, T.A. 2007. Effects of some drugs on hepatic glucose 6-phosphate dehydrogenase activity in Lake Van Fish (*Chalcalburnus tarischii* Pallas, 1811). *Journal of Hazardous Materials*, 143: 415-418.
- Çoban, M.Z., Gündüz, F., Demiroğlu, F., Örnekcı, G.N., Karakaya, G., Türkgülü, İ. and Alp, A. 2013. Population dynamics and stock assessment of *Capoeta umbla* (Heckel, 1843) in Lake Hazar, Elazığ, Turkey. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 13: 221-231.
- Çomaklı, V., Çiftçi, M. and Küfrevioğlu, Ö.İ. 2011. Purification of glutathione s-transferase enzyme from rainbow trout erythrocytes and examination of the effects of certain antibiotics on enzyme activity. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 39: 413-419.
- Ekinci, D. 2009. İnsan serumundan paraoksonaz 1 enziminin saflaştırılması, bazı metal iyonları ve antibiyotiklerin enzim aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Erat, M., Şakiroğlu, H. ve Çiftçi, M. 2003. Effects of some antibiotics on glutathione reductase from bovine erythrocytes. *Veterinari Medicina Czech*, 48: 305-312.
- Erat, M., Şakiroğlu, H. ve Çiftçi, M. 2005. Effects of some antibiotics on glutathione reductase activities from human erythrocytes *in vitro* and from rat erythrocytes *in vivo*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 20: 69-74.
- Erdoğan, O., Çiftçi, M., Çiltaş, A. and Hisar, O. 2004. Inhibition effects of some antibiotics on the activity of glucose 6-phosphate dehydrogenase enzyme from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) erythrocytes. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 28: 675-681.
- Eposito, S., Guarriero, G., Vona, V., Rigano, D.M.V., Carfagna, S. and Rigano, C. 2005. Glutamate synthase activities and protein changes in relation to nitrogen nutrition in barley: The dependence on different plastidic glucose-6P dehydrogenase isoforms. *Journal of Experimental Botany*, 56: 55-64.
- Geldiay, R. ve Balık, S. 1996. *Türkiye Tatlı Su Balıkları*. Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, s. 357-362.
- Güneş, M. 2007. Tercan baraj gölü ve Tuzla çayı'nda yaşayan *Capoeta capoeta umbla heckel*, 1843 populasyonlarının bazı biyo-ekolojik özellikleri, total yağ ve yağ asidi kompozisyonlarının karşılaştırılması. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Ibraheem, O., Adewale, I.O. and Afolayan, A. 2005. Purification and properties of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Aspergillus aculeatus*. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 38: 584-590.
- İspir, Ü., Türk, C. ve Kırıcı, M. 2013. Bingöl'de ticari bir gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) çiftliğinde *Flavobacterium psychrophilum* salgını. *Menba Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, 2: 25-29.
- Jacobasch, G., Rappoport, S.M. 1996. Hemolytic anemias due to erythrocyte enzyme deficiencies. *Molecular Aspects of Medicine*, 17: 143-170.
- Keha, E. ve Küfrevioğlu, Ö.İ. 2004. *Biyokimya*. Aktif Yayınevi, Erzurum, 642 s.
- Laemmli, D.K. 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Ninfali, P. and Palma, F. 1990. Comparative study of glucose-6-phosphate dehydrogenase from rabbit tissues. *Journal of Experimental Zoology*, 254: 6-12.
- Wei-Fu, K., Jian-Ye, C., Zhi-Xia, H., Peng-Fei, W., Ji-Cheng, Z., Quihong, P. and Wei-Dong, H. 2007. Activity and subcellular localization of glucose 6-phosphate dehydrogenase in peach fruits. *Journal of Plant Physiology*, 164: 934-944.