



Van Kedisi Eritrositi'nden 6-Fosfoglukonat Dehidrogenaz Enzimi (E.C. 1.1.1.44)'nin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Kinetik Özellikleri*

Serpil KILIÇ¹, Fikret KARATAŞ²

1. Akdeniz Üniversitesi, Gıda Güvenliği ve Tarımsal Araştırmalar Merkezi, Antalya, TÜRKİYE.
2. Fırat Üniversitesi, Fen Fakültesi, Elazığ, TÜRKİYE.

| Geliş Tarihi/Received | Kabul Tarihi/Accepted | Yayın Tarihi/Published |
|-----------------------|-----------------------|------------------------|
| 09.11.2016 | 03.04.2017 | 30.10.2017 |

Öz: Bu çalışmada, 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enzimi (6PGD; E.C.1.1.1.44) Van Kedisi eritrositinden afinite kromatografisi ile saflaştırıldı. Netilmicin sülfat, Ampicillin ve Amoxicillin'in inhibitör etkisi incelendi. Enzim aktivitesi Beutler metoduna göre spektrofotometre ile 340 nm'de ölçüldü. Sonra enzimin optimum pH ve optimum sıcaklığı sırasıyla 8.0 ve 50 °C olarak tespit edildi. Enzimin saflığı sodyumdodesilsülfat- poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile kontrol edildi. 6PGD eritrositi için saflaştırma oranı 1787 olarak bulundu. NADP⁺ ve 6PGA substratları için K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı. Netilmicin sülfat, Ampicillin ve Amoxicillin'in inhibitör etkileri incelendi, K_i değerleri ve inhibisyon tipleri Lineweaver-Burk grafiğinden tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Afinite kromatografisi, 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enzimi, eritrosit, kinetik özellikler, Van Kedisi.

Purification, Characterisation and Kinetic Properties of 6-Phosphogluconate Dehydrogenase Enzyme (E.C. 1.1.1.44) from the Van Cat Erythrocyte

Abstract: In this study, 6-phosphogluconate dehydrogenase enzyme (6PGD; E.C.1.1.1.44) was purified from erythrocyte the Van Cat by affinity chromatography. The inhibitor effect of Netilmicin sulphate, Ampicillin and Amoxicillin were also examined. Enzyme activity was measured by spectrophotometer according to Beutler method at 340 nm. Then the optimum pH and optimum temperature of the enzyme were determined to be 8.0 and 50 °C, respectively. In order to control the purification of enzyme, sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was used. The purification rate for erythrocyte 6PGD was found as 1787. K_M and V_{max} were also determined for NADP⁺ and 6PGA as substrates. The inhibitor effect of Netilmicin sulphate, Ampicillin and Amoxicillin were also examined and K_i values and the types of inhibition were determined by the Lineweaver-Burk graph.

Keywords: Affinity chromatography, 6-Phosphogluconate dehydrogenase enzyme, erythrocyte, kinetic properties, Van Cat.

[✉] Serpil KILIÇ

Akdeniz Üniversitesi, Gıda Güvenliği ve Tarımsal Araştırmalar Merkezi, Antalya, TÜRKİYE.
e-posta: serpilkilic@akdeniz.edu.tr

*Bu çalışma, Serpil Kılıç'ın "Van kedisi'nden 6-Fosfoglukonat Dehidrogenaz Enzimi (E.C. 1.1.1.44)'nin Saflaştırılması, Karakterizasyonu, Kinetiği ve HPLC İle Tayin Metodunun Geliştirilmesi" başlıklı doktora tezinin bir kısmından özetlenmiştir.

GİRİŞ

Enzimler, canlı organizmadaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürün oluşmasına fırsat vermeden %100'lük bir ürün verimi sağlayan protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir. Bu katalizörlerin en önemli özellikleri; katalizleme güçleri ve spesifiklikleridir. Bunlardan biri olan 6-Fosfoglukonat dehidrogenaz (6PGD; E.C.1.1.1.44), hekzomonofosfat yan yolu olarak da bilinen pentoz fosfat metabolik yolunun ikinci oksidatif basamağını katalizleyen önemli bir enzimdir ve bu tepkime sonucu D-ribuloz-5-fosfat, CO₂ ve NADPH+H⁺ oluşur (1,2).

6-Fosfoglukonat dehidrogenaz'ın defektif varyantları, ilk olarak 1964 yılında Brewer ve Dern tarafından, siyah bir Amerikan ailesinde tanımlanmış ancak fertlerde hemolitik anemi saptanmamıştır. Enzim eksikliği sonucu oluşan kronik hemolitik anemi vakaları ise daha sonraki yıllarda rapor edilmiştir (3-5). Bu enzimin eksikliği hücrede 6-fosfoglukonat (6-PG)'in birikmesine, fosfoglukoz izomerazın ve glukoz metabolizmasının tümüyle inhibe olmasına bağlı olarak toksik etki yaratmaktadır. Bu nedenle kemoterapilerde hedef enzim olarak yararlanılabilir (6).

Inhibitörler, enzimatik aktiviteyi kontrol eden bu küçük moleküller, biyolojik sistemler üzerinde büyük ölçüde kontrol sağladıkları için çok önemlidirler. Birçok ilaç ve toksik madde de enzim inhibitörü gibi davranırlar. Enzimatik inhibisyon dönüşümlü ve dönüşümsüz olmak üzere başlıca iki şekilde sınıflandırılır. Dönüşümsüz inhibisyonda, enzimin bir veya daha fazla fonksiyonel grubu etkilenir (7). Enzim aktivatörleri ise genellikle küçük iyonlar veya fazla büyük olmayan moleküllerdir. Bunlar kofaktörlerin aksine kataliz olayına her zaman katılmazlar. Aktivatörleri iki grupta toplamak mümkündür. Birinci gruptakiler sadece substratla birleşerek aktivatör rolü oynayan bileşikler iken ikinci gruptakiler ise serbest enzimle birleşerek aktivatör rolü oynayan bileşiklerdir (8).

6-fosfoglukonat dehidrogenaz enziminin daha önceden birçok canlı ve dokulardan saflaştırılmış ve karakterizasyonu yapılmıştır. Fakat Van Kedisi üzerinde bu saflaştırma yapılmamış ve özellikleri araştırılmamıştır. Bu çalışmada, Van Kedisi eritrositlerinden 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılıp enzimin karakterizasyonu incelenmiştir. Saflaştırılan bu enzim üzerine çeşitli ilaçların in vitro olarak inhibisyon etkilerinin araştırılarak benzer çalışmalarla karşılaştırılmıştır.

MATERYAL ve METOT

Kan Örneklerinin Alınması ve Hemolizatin Hazırlanması

Araştırma için Van Kedisi Araştırma Merkezi'nde barındırılan; 1-4 yaş aralığında, ortalama canlı ağırlıkları 2950-3170 g dişi ve 3350-5220 g erkek olan Van Kedileri kullanıldı. Deney için alınan kedi kanı, antikoagulant olarak kullanılan EDTA'lı tüplere alındı. Böylece hem pıhtılaşma önlenmiş hem de eritrositler için iyi bir beslenme ortamı sağlanmış oldu. Kanlar alındıktan sonra 4°C'de muhafaza edildi ve en çok iki gün içerisinde kullanıldı.

Eritrositleri ayırmak için tüplere konuldu. Yirmi dakika 1500 rpm'de santrifüj edildi. Sonra tüplerin üst kısmındaki plazma ve lökosit tabakası dikkatli bir şekilde ayrıldı. Altta kalan eritrositler, 0.16 M KCl çözeltisi ile üç defa yıkayıp üstteki kısımlar atıldı. Eritrositlerin hacimleri 5 hacim distile buzlu su ile hemoliz edildi. Hemolizin tam gerçekleşmesi için 4°C'de yarım saat karıştırıldı. Hücre zarlarından ayırmak için hemolizat 12000 rpm'de 30 dk santrifüj edildi. Tüplerin dibindeki beyaz renkli hücre zarları atılıp üstteki hemolizat dikkatli bir şekilde alındı. Hücre zarlarından arındırılmış olan hemolizatin pH'sı katı potasyum fosfat ile 6'ya ayarlanarak, hemolizat kolona tatbik edilecek duruma getirildi (9, 10).

Afinite Jelinin Hazırlanması

On ml'lik yatak hacmi için 2 g kuru 2',5'- ADP-Sepharose 4B jeli tartıldı. Safsızlıkların uzaklaştırılması için 400 ml distile su ile birkaç defa yıkandı. Yıkama esnasında jel şişti. Bütün bu işlemler laboratuvar şartlarında yapıldı. Şişmiş jelin havası alındıktan sonra % 25 dengeleme tamponu (0.1 M K-Asetat / 0.1 M K-Fosfat) ve % 75 jel olacak şekilde, jel süspanse edildi. Süspanse edilen jel (1.3x10) kolona paketlenildi. Daha sonra dengeleme tamponu ile dengelendi. Jel çöktükten sonra peristaltik pompa kullanılarak dengeleme tamponu ile yıkandı. Dengeleme ve yıkamada akış hızı 20 ml/saat olarak uygulandı. Kolonun dengelenmiş olduğu elüat absorbansı ile tampon absorbansının eşitlenmesinden anlaşıldı (11).

Eritrosit Hemolizatının Afinite Kolonuna Tatbiki ve Enzim Elüsyonu

Hazırlanan afinite jeli 1.3x10 cm boyutundaki kolona paketlenerek dengeleme tamponu ile 48 saat süreyle dengelendi. Hazırlanan hemolizat kolona tatbik edildi. Hemolizat kolondan geçtikten sonra yarım saat bekletildi. Sonra 25 ml dengeleme tamponu ile ve yıkama tamponu ile kolon yıkandı. En son elüsyon tamponu geçirilerek 2'şer ml'ler halinde fraksiyonlar toplandı. Bütün fraksiyonların, 6PGD aktivitelerinin tayinleri yapıldı. Protein miktarı ve 6PGD aktivitesi belirlenerek, saflaştırma oranı hesaplandı.

Sodyum Dodesilsülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile Enzim Saflığının Kontrolü

Elektroforez çalışmalarında, tarafından tanımlanan %3 kesikli sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) uygulandı. Buna göre Jel çözeltisine %10 SDS ilave edildi. Jel, 30 dakika boyunca (%50 propanol +% 10 TCA +% 40 distile su) ihtiva eden çözeltide stabilize edildi. 1/1 oranında enzim çözeltisi, SDS ile muamele edilerek 20 µg olacak şekilde tarak boşluğuna enjekte edildi. Marker olarak ise Page Ruler™ Protein Ladder,

Fermentas; 200, 150, 120, 100, 85, 70, 60 kDa kullanıldı. Örneklerin yürütülmesi için elektroforez işlemi başlatıldı. Tankın kapağı kapatılarak, üstte katot (-) altta anot (+) olacak şekilde güç kaynağına bağlandı. Önce 80 voltta yarım saat ve daha 150 voltta 4-5 saat boyunca numunenin hızlı koşması sağlandı. Elektroforez tankından çıkarılan jel (%50 metanol + % 10 asetik asit içinde % 0.1 Coomassie Brilliant Blue R-250 solüsyonunda) yaklaşık 2 saat boyunca boyandı. Sonra yıkama işlemi protein bantları berrak olana kadar (% 50 metanol +% 10 asetik asit +% 40 distile su) solüsyonu içinde gerçekleştirildi (11,12).

Protein Tayini

Afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltilerdeki protein miktarı tayinleri bu yöntemle belirlendi. Bu yöntem; fosforik asitli ortamda proteinlerin coomassie brilliant-blue G-250 reaktifi ile kompleks oluşturması, oluşan kompleksin 595 nm'de maksimum absorbans göstermesi esasına dayanır. Bu yöntemin diğer protein tayin yöntemlerinden üstün tarafı, çok kısa sürede uygulanması, bozucu faktörlerin pek söz konusu olmaması, protein-boya kompleksinin çözeltilerde uzun süre kalmasıdır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır (13,14).

6PGD Enziminin Aktivite Tayini

Aktivite ölçüm çalışmalarında, reaksiyon sonucu oluşan NADPH göz önüne alınır. 340 nm'de NADPH maksimum absorbans verdiği için enzimin aktivitesi, bu dalga boyunda ve 25°C'de NADP⁺'nin indirgenmesi sonucu oluşan NADPH'ın spektrofotometrik metotla absorpsiyon artışı sonucu ölçüldüğü ifade edilmektedir (9,15).

Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Enzim aktivitesine etki eden faktörlerden biri sıcaklık parametresidir. Enzimin aktivitesinin en fazla olduğu sıcaklığa "optimum sıcaklık" denir. Optimum sıcaklık inkübasyon süresine çok bağlıdır. İnkübasyon süresi ne kadar uzatılırsa optimum sıcaklıkta aynı şekilde düşer. Optimum sıcaklık tayini

için 20-70°C arasında, sabit pH (7.5)'da 0.1 mM Tris-HCl tamponu kullanılarak 10 dakika inkübatörde bekletilerek aktivite tayinleri yapıldı (16).

Enzim Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

Bir enzimin reaksiyonu en fazla hızlandığı pH'ya "optimum pH" denir ve pH enzim üzerindeki iyonize olabilen grupların yüklerini değiştirerek enzim aktivitesini etkiler. Optimum pH dışında hız azalır ve belirli bir pH'da enzim tamamen inaktif hale gelir ki bu pH'ya "izoelektrik pH" denir. 0.1 mM Tris-HCl+0.5 mM EDTA tamponunun pH'sı 4 ile 12 arasında değiştirilerek sabit sıcaklıkta (25°C) aktivite tayinleri yapıldı (11).

Enzim *in vitro* İlaç Çalışmaları

Çalışmalarda en uygun beş farklı substrat konsantrasyonu, substrat stok çözeltileri kullanılarak ön denemelerle belirlendi. Yine aynı şekilde her bir substrat konsantrasyonu için en uygun 3 sabit inhibitör konsantrasyonu inhibitör stok çözeltileri kullanılarak ön çalışmayla tespit edildi. Daha sonra Van Kedisi eritrositinden saflaştırılan 6PGD enzimi için üç farklı inhibitör konsantrasyonunda V-[S] değerleri belirlenerek her bir inhibitör için ayrı ayrı Lineveawer-Burk grafikleri çizilerek Ki değerleri belirlendi (17).

Tablo 1. Van Kedisi 6PGD enziminin saflaştırılması sonuçları.

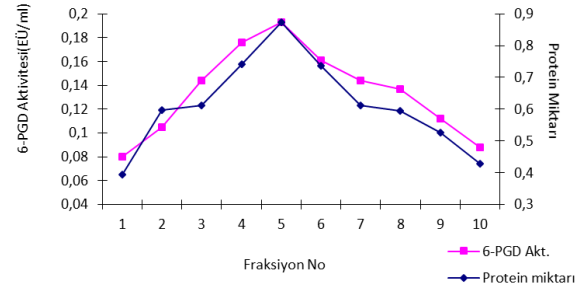
Table 1. Purification results of Van Cat erythrocytes G6PG enzyme.

| Saflaştırma Basamakları | Toplam Hacim (ml) | Toplam Protein (mg) | Toplam Aktivite (EÜ) | Spesifik Aktivite (EÜ/mg) | Verim (%) | Saflaştırma Katsayısı |
|-------------------------|-------------------|---------------------|----------------------|---------------------------|-----------|-----------------------|
| Hemolizat | 100 | 1861.5 | 4.03 | 1.125 | 100 | 1 |
| 2'5'-ADP Sepharose 4B | 10 | 0.5 | 1.93 | 3.86 | 48 | 1787 |

Değişik sıcaklıklarda gerçekleştirilen aktivite tayin çalışmaları Tablo 2'de verilmiştir. Buna göre enzimin

BULGULAR

Van Kedisi eritrositinden 6PGD enzimi 2',5'-ADP Sepharose 4B afinite jel kromatografisi ile saflaştırıldı. Enzim aktivitesi tayini yapıldı. Enzim 1787 kat saflaştırıldı. Spesifik aktivite 3.86 U/mg olarak bulundu ve enzim %48 saflaştırılmış oldu. Sonuçlar ise Şekil 1'de gösterildi.



Şekil 1. Van Kedisi eritrosit 6PGD enziminin saflaştırma grafiği.

Figure 1. Purification graph of Van Cat erythrocytes 6PGD enzyme.

Numuneye ait protein ve aktivite değerleri hesaplanarak saflaştırma tablosu ise Tablo 1'de verilmiştir.

aktivitesinin en yüksek olduğu sıcaklık 50°C olarak belirlendi.

Tablo 2. Enzim aktivitesinde sıcaklık etkisi.**Table 2.** Effect of temperature on the enzyme activity.

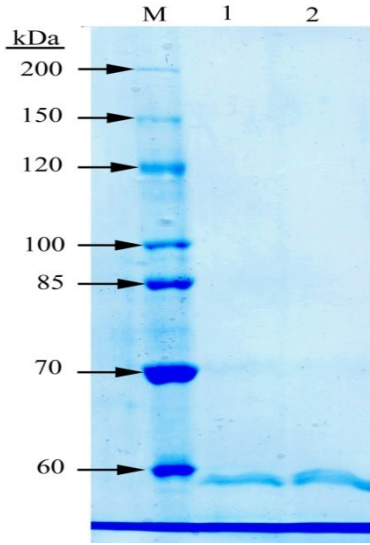
| (°C) | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 | 45 | 50 | 55 | 60 | 70 |
|------|------|------|------|------|------|------|-----|----|------|-----|
| %Ak | 16.6 | 27.7 | 44.4 | 55.5 | 61.1 | 66.6 | 100 | 70 | 55.5 | 5.5 |

Enzimin pH değişimine karşı gösterdiği davranışlardan elde edilen sonuçlar Tablo 3'de bir

araya getirilmiştir. Enzim aktivitesi, birkaç pH değerinde ölçüldüğü zaman optimum pH 8.0 olarak gözlenmiştir.

Tablo 3. Enzim aktivitesinde pH etkisi.**Table 3.** Effect of pH on the enzyme activity.

| pH | 4.5 | 5 | 6 | 6.5 | 7 | 7.5 | 8 | 8.5 | 9 | 9.5 | 10 | 11 |
|-----|-----|------|------|------|------|------|-----|------|------|------|------|----|
| %Ak | 0 | 18.1 | 27.2 | 36.3 | 45.4 | 81.8 | 100 | 90.9 | 72.7 | 63.6 | 54.5 | 0 |

**Şekil 2.** Enzimin SDS-PAGE bantları (Marker (M): Page Ruler™ Protein Ladder, Fermentas; 200, 150, 120, 100, 85, 70, 60 kDa).**Figure 2.** SDS-PAGE bands of enzyme (Marker (M): Page Ruler™ Protein Ladder, Fermentas; 200, 150, 120, 100, 85, 70, 60 kDa).

Her bir proteinin oluşturulan standart grafikten saflaştırılan 6PGD enziminin molekül ağırlığı 52602 Da olarak bulundu. Şekil 2 elektroforez sonuç fotoğrafında kullanılan protein molekül ağırlıkları Marker (M), 1 ve 2 numaralı kuyucuklarda ise saflaştırılan 6PGD enziminin SDS-PAGE bantları bulunmaktadır.

Değişik ilaçların I_{50} ve K_i değerleri belirlenirken; uygun seyreltilmiş enzim üzerine değişik ilaçlardan 5 farklı konsantrasyonda ilave edildi. İlave edilen inhibitör sonrası enzim aktiviteleri hesaplandı. % Aktivite-[I] grafikleri çizildi. Bu grafiklerden her bir ilacın I_{50} değerleri hesaplandı. Bu ilaçların K_i değerleri ise; kinetik çalışmanın bu aşamasında her bir ilaç için inhibitörün 5 farklı konsantrasyonunda çalışıldı. Sonuçlar Lineweaver-Burk grafiğine dönüştürüldü. Grafikten inhibisyon türü belirlendi ve ilgili formül kullanılarak K_i değerleri hesaplandı ve Tablo 4'de verildi.

Tablo 4. Van Kedisi eritrosit 6PGD enzimi için Ki değerleri ve inhibisyon tipleri.**Table 4.** The Ki values and inhibition types for of Van Cat erythrocyte 6PGD.

| Inhibitor | [I] | K _i | Medium K _i Values | Inhibition Type |
|-------------------|-----------------------|----------------|---------------------------------|-----------------|
| Netilmicin sülfat | 3x10 ⁻³ M | 0.39 mM | 3.9x10 ⁻¹ mM | Noncompetitive |
| | 6x10 ⁻³ M | 0.35 mM | | |
| | 9x10 ⁻³ M | 0.43 mM | | |
| | 20x10 ⁻³ M | 0.16 mM | | |
| Ampicillin | 25x10 ⁻³ M | 0.15 mM | 1.5x10 ¹ mM | Noncompetitive |
| | 35x10 ⁻³ M | 0.14 mM | | |
| | 20x10 ⁻³ M | 0.3 mM | | |
| Amoxicillin | 30x10 ⁻³ M | 0.45 mM | 5x10 ⁻¹ mM | Competitive |
| | 40x10 ⁻³ M | 0.75 mM | | |

TARTIŞMA ve SONUÇ

Biyokimyasal reaksiyonları katalizleme görevini yerine getiren enzimlerin saflaştırılması ve nitelendirilmesi diğer çalışmalar için bir ön basamak niteliği taşımaktadır. Bu nedenle belirli kriterlere göre saflaştırma stratejisi belirlenmelidir. Temel kriter en düşük maliyetle, en yüksek saflık ve enzim aktivitesi elde etmektir. Bunlara göre de diğer basamaklar düzenlenir.

Yapılan çalışma sonucu Van Kedisi eritrositinden saflaştırılan 6PGD enziminin saflaştırma oranı 1787 kat olarak belirlendi. Beydemir ve ark. (11) tarafından yapılan çalışmada ise 2'-5' ADP Sepharose-4B dolgu maddesini kullanılarak afinite kromatografisi ile rat eritrositinden saflaştırma oranı 2575 kat'lık bir saflaştırma gerçekleştirmiştir. Başka bir çalışmada da insan beyninden saflaştırılmasında bu oran 400 kat bulunmuştur (18). Demir ve ark. (19) tarafından yapılan bir diğer çalışma maydanoz yapraklarından DEAE-Sephadex A50 iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılmasında ki oran 339 kat bulunmuştur. Ayrıca yapılan diğer bir çalışmada ıspanak yapraklarından saflaştırılan 6PGD'nin saflaştırma oranı ise 1000 kat olarak bulunmuştur (20).

Elektroforez çalışmalarından elde edilen protein bandı bir monomeri gösterdiğinden koyun kaynaklı 6PGD enziminin elde edilen ağırlık değeri bir tek monomerin ağırlığıdır. Ceyhan ve ark. (21) tarafından

yapılan bir çalışmada 52 kDa, Ohara ve ark.(22) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise 32.8 kDa olarak bulunmuştur. 6-Fosfoglukonat Dehidrogenaz enziminin molekül ağırlığı, standart karışımındaki son 3 proteinin standart değerlerine göre 52602 Da olarak bulunmuştur. Bulunan bu miktar ise literatürlerle uyum halinde olduğu görülmektedir.

6PGD enziminin aktivite tayini yapıldı (9). Bu yöntemle prensip olarak reaksiyon ortamında 6-Fosfoglukonat'ın, D-Ribuloz-5-Fosfat'a dönüşümü esnasında oluşan NADPH'nin 340 nm'de spektrofotometrik olarak verdiği absorbans farkının ölçümüne dayanır. Birim zamanda NADPH'a dönüşen NADP⁺ miktarı hesaplanarak, 6PGD enziminin spesifik aktivitesi 3.86 EU/mg protein olarak belirlendi. Kinetik çalışmalar da 25°C ölçümleri gerçekleştirildiği halde, optimum sıcaklığın belirlenmesi için yapılan çalışmalarda, optimum sıcaklık 50°C olarak belirlenmiştir. Bu farkın materyalden kaynaklandığı düşüncesindeyiz. Çünkü, Beydemir ve ark. (11) rat eritrositinde yaptıkları çalışmada optimum sıcaklığın 45°C olduğunu rapor etmektedirler. Yine bu sıcaklık, Demir ve ark. (16) tarafından maydanoz yapraklarıyla yapılan çalışmada ise 50°C, Erat (23) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise optimum sıcaklığın 60°C olduğu belirtilmektedir.

Optimum pH'nın belirlenmesi için yapılan deneylerde, optimum pH değeri 8.0 olarak belirlenmiştir. Beydemir ve ark. (11) rat eritrositinde

yaptıkları çalışmada optimum pH'yı 7.0, Demir ve ark. (19) maydanoz yapraklarıyla çalıştıklarında ise optimum pH'yı 8.0 olarak saptamışlardır. Bu çalışmamızın sonuçları diğer çalışmalarla büyük bir uyum içinde olduğu görülmüştür.

Saflaştırılan 6PGD enzimine inhibitörlerin etkisini araştırmak amacıyla piyasada yaygın olarak kullanılan 3 antibiyotik tercih edildi. Bu antibiyotikler Netilmicin sülfat, Ampicillin ve Amoxicillin'dir. Bunların I_{50} değerleri ise sırasıyla; 5.13 mM, 24.66 mM ve 15.57 mM'dir. K_i değerleri ise sırasıyla; $3.66 \times 10^{-2} \text{ mol}^{-1} \text{ dak}^{-1}$, $1.4 \times 10^{-2} \text{ mol}^{-1} \text{ dak}^{-1}$ ve $4.5 \times 10^{-2} \text{ mol}^{-1} \text{ dak}^{-1}$ olarak belirlendi. Genellikle ilaçların inhibisyon etkileri I_{50} değeri olarak literatürlerde verilir. 6PGD enzimi için literatürlerde birçok kinetik çalışma mevcuttur. Örneğin tavuk karaciğerinde yapılan bir çalışmada NADP^+ için I_{50} değeri, 2.751 mM olduğu tespit edilmiştir (24). Rat eritrositinde kullanılan ilaçlarda I_{50} değerleri, Cefepime için 4.213 mM, Penicilin G için 161.162 mM, Gentamicin sülfat için ise 4.932 mM olduğu bulunmuştur (15).

Buna göre çalışmamızda kullanılan ilaçların 6PGD enzimi üzerindeki inhibisyon etkilerinin I_{50} değerlerine göre büyükten küçüğe doğru sıralanışı; Netilmicin sülfat, Ampicillin ve Amoxicillin şeklindedir.

Bulunan sonuçlara göre kullanılan ilaçlar uygulanmadan önce 6PGD eksikliğinin olup olmadığı araştırılması gerekmektedir. Özellikle 6PGD eksikliğinde bu ilaçların kontrolsüz kullanımı tehlikeli olabilir. Ayrıca enzimi inhibe eden bu ilaçlar başka enzimlere de etki edebileceğide düşünülmelidir.

KAYNAKLAR

- Toews ML., Kanji M., Carper W., 1976. 6-phosphogluconate dehydrogenase. The J of Biolog Chem, 251, 7127-7131.
- Tandoğan B., Ulusu NN., 2003. 6-fosfoglukonat dehidrogenaz: Moleküler ve kinetik özellikleri. Türk Biyo Dergisi, 28, 268-273.
- Caprari P., Caforio MP., Cianciulli P., Maffi D., Pasquino MT., Tarzia A., Amadori S., Salvati AM., 2001. 6-Phosphogluconate dehydrogenase deficiency in an Italian family. Annals of Hemato, 80, 41-44.
- Corrons V., Colomer D., Pujades A., Rovira A., Aymerich M., Merino A., 1996. Congenital 6-phosphogluconate dehydrogenase deficiency Associated with chronic hemolytic anemia in a Spanish family. American J of Hemato, 53, 221-227.
- Walzem RL., Storebakken T., Hung SSO., Hansen RJ., 1991. Relationship between growth and selected liver enzyme activities of individual rainbow trout. J of Nutrition, 121, 1090-1098.
- Barrett P., 1997. The pentose phosphate pathway and parasitic protozoa. Parasitol Today, 13 (1), 11-16.
- Keha EE., Küfrevioğlu Ö., 2000. Biyokimya. 344-345, Aktif Yayınevi, Ankara.
- Gözükara E., 1989. Enzimler. "Biyokimya", 572-576, Ofset Repromat Ltd. Şti., Ankara.
- Beutler E., 1971. Redcell metabolism. "Manual of biochemical methods", 12, 68-70, Academic press, London.
- Gür F., Beydemir Ş., Gümüştekin K., Bakan N., 2014. Ketoprofenin 6-fosfoglukonat dehidrogenaz aktivitesi üzerine in vitro ve in vivo etkisinin araştırılması. Atatürk Üni Vet Bil Derg, 9, 173-179.
- Beydemir Ş., Çiftçi M., Yılmaz H., Küfrevioğlu OI., 2004. 6-phosphogluconate dehydrogenase: Purification, characterization and kinetic properties from Rat erythrocytes. Turk J of Vet Ani Sci, 28, 707-714.
- Laemmli DK., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680-683.
- Bradford MM., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analy Biochem, 7, 248-254.
- Özabacıgil F., 2005. İnsan eritrosit 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enziminin saflaştırılması, bazı ilaçların enzim aktivitesi üzerine in vitro ve tavşanlarda in vivo etkisinin

- incelenmesi. Atatürk Üni, Sağ Bil Ens, Erzurum, Türkiye.
15. Akyüz M., Erat M., Çiftçi M., Gümüştekin K., Bakan N., 2004. Effects of some antibiotics on human erythrocyte 6-Phospho Gluconate Dehydrogenase: An in vitro and in Vivo study. J of Enzyme Inhi and Medicinal Chem, 19, 361-365.
 16. Adem Ş., Çiftçi M., 2007. Effects of some drugs on human erythrocyte 6-phosphogluconate dehydrogenase: an in vitro study. J of Enzyme Inhi and Med Chem, 22, 751-754.
 17. Ciftci M., Beydemir S., Yılmaz H., Bakan E., 2002. Effects of some drugs on rat erythrocyte 6-phosphogluconate dehydrogenase: An in vitro and in vivo study. J Pharma, 54:275-280.
 18. Weisz KS., Schofield PJ., Edwards MR., 1985. Human brain 6-PGD: Purification and kinetic properties. J of Neurochem, 44, 510-517.
 19. Demir H., Çiftçi M., Küfrevioğlu Öi., 2003. Purification of 6-phosphogluconate dehydrogenase from Parsley (Petroselinum hortense) leaves and investigation of some kinetic properties. Prep Biochemhem and Biotech ,33, 39-52.
 20. Krepinsky K., Plaumann M., Martin W., Schnarrenberger C., 2001. Purification and cloning of chloroplast 6-PGD from spinach. Euro J of Biochem, 268, 2678-2686.
 21. Ceyhan D., Danısan A., Oğu, IH., Ozer N., 2005. Purification and kinetic properties of 6-phosphogluconate dehydrogenase from rat small intestine. The Protein J, 24, 293-301.
 22. Ohara H., Russell RA., Uchide K., Kondo H., 2004. Purification and characterization of NAD specific 6-phosphogluconate dehydrogenase from Leuconostoc lactis SHO-54. J of Biosci and Bioengin, 98, 126-128.
 23. Erat M., 2005. Purification of 6-phosphogluconate dehydrogenase from chicken liver and investigation of same kinetic properties. Prep Biochemhem and Biotechno, 35, 53-69.