

Atf İçin: Çoban C, Temel Y, Çiftci M, 2022. Koyun Dalak Dokusundan Saflaştırılan Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz ve Glutasyon Redüktaz Enzimi Üzerine Diklofenak Sodyumun *In Vitro* Etkileri. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 12(3): 1624 - 1634.

To Cite: Çoban C, Temel Y, Çiftci M, 2022. In Vitro Effects of Diclofenac Sodium on Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase and Glutathione Reductase Enzymes Purified from Sheep Spleen Tissue. Journal of the Institute of Science and Technology, 12(3): 1624 - 1634.

Koyun Dalak Dokusundan Saflaştırılan Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz ve Glutasyon Redüktaz Enzimi Üzerine Diklofenak Sodyumun *In Vitro* Etkileri

Çiğdem ÇOBAN¹, Yusuf TEMEL¹, Mehmet ÇİFTÇİ^{2*}

ÖZET: Bu çalışmada, artrit ve akut yaralanmalarda enflamasyonu önlemek ve ağrıyı dindirmek için kullanılan diklofenak sodyumun, koyun dalak dokusundan saflaştırılan glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi (G6PD; E.C. 1.1.1.49) ve glutasyon redüktaz enzimi (GR; E.C. 1.8.1.7) üzerine *in vitro* etkileri araştırıldı. Çalışmanın ilk aşamasında G6PD ve GR enzimleri koyun dalak dokusundan, amonyum sülfat (NH₄)₂SO₄ çöktürmesi ve 2', 5' ADP-Sepharose-4B jel afinite kromatografisi ile saflaştırıldı. Enzimlerin saflık dereceleri sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) metodu ile kontrol edildi. Çalışmanın ikinci aşamasında saf olarak elde edilen enzim aktiviteleri üzerine diklofenak sodyumun etkileri araştırıldı. Enzimler üzerinde inhibisyon etkisi gösteren diklofenak sodyumun için % Aktivite-[I] grafiği çizilerek IC₅₀ değerleri hesaplandı. Ayrıca beş farklı substrat konsantrasyonu ve üç farklı inhibitör konsantrasyonlarıyla ölçümler yapılarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Elde edilen bu grafiklerden diklofenak sodyumun G6PD enzimini 0.51 mM, IC₅₀ değeri ve 0.48 ± 0.01 mM Ki değeri ile yarışmasız olarak inhibe ettiği belirlendi. GR enzimini ise 6.55 mM IC₅₀ değeri ve 15.69 ± 0.84 mM Ki değeri ile yarışmasız olarak inhibe ettiği tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: G6PD, GR, diklofenak sodyum, inhibisyon

***In Vitro* Effects of Diclofenac Sodium on Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase and Glutathione Reductase Enzymes Purified from Sheep Spleen Tissue**

ABSTRACT: In this study, *in vitro* effects of diclofenac sodium, which is used to prevent inflammation and alleviate pain in arthritis and acute injuries, on glucose-6-phosphate dehydrogenase enzyme (G6PD; EC 1.1.1.49) and glutathione reductase enzyme (GR; EC 1.8.1.7) purified from sheep spleen tissue were investigated. In the first stage of the study, G6PD and GR enzymes were purified from sheep spleen tissue by ammonium sulfate (NH₄)₂SO₄ precipitation and 2', 5' ADP-Sepharose-4B gel affinity chromatography. The purity levels of the enzymes were checked by the sodium dodesilsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) method. In the second stage of the study, the effects of diclofenac sodium on the pure enzyme activities were investigated. IC₅₀ values were calculated by plotting the % Activity-[I] graph for diclofenac sodium, which has an inhibitory effect on enzymes. In addition, Lineweaver-Burk graphs were drawn by making measurements with five different substrate concentrations and three different inhibitor concentrations. From these graphs, it was determined that G6PD enzyme inhibited with 0.51 mM IC₅₀ value and 0.48 ± 0.01 mM Ki value non competitively, by diclofenac sodium. It was determined that the GR enzyme inhibited with an 6.55 mM IC₅₀ value of and 15.69 ± 0.84 mM Ki value non competitively.

Keywords: G6PD, GR, diclofenac sodium, inhibition

¹ Çiğdem ÇOBAN ([Orcid ID: 0000-0003-1141-544X](https://orcid.org/0000-0003-1141-544X)), Yusuf TEMEL ([Orcid ID: 0000-0001-8148-3718](https://orcid.org/0000-0001-8148-3718)), Solhan Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Bingöl, Türkiye

^{2*} Mehmet ÇİFTÇİ ([Orcid ID: 0000-0002-1748-3729](https://orcid.org/0000-0002-1748-3729)), Bingöl Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Bingöl, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Mehmet ÇİFTÇİ, e-mail: mciftci@bingol.edu.tr

GİRİŞ

Oksidatif reaksiyonlarda indirgenmiş halde bulunan glutasyon (GSH) molekülü çoğunlukla peroksitlerin parçalanmasında enzimatik reaksiyonlarla okside glutasyon (GSSG)'a dönüşür (Knapen et al., 1999; Gill et al., 2013). Bu dönüşümde çeşitli enzimler görev yapmaktadır. GSSG'nin GSH'a dönüştürülmesini katalizleyen, hücre içi savunma sisteminde yer alan enzim GR'dir. Hücre için hayati öneme sahip GSH/GSSG oranı bu enzim sayesinde belirli seviyede kalır. GSSG ve GSH olmak üzere iki formda bulunan glutasyon molekülü yapısında tripeptit içeren önemli bir tiyol (-SH)'dur. Bu molekül, yapısında hücre içi serbest -SH gruplarını büyük bölümünü bulundurduğundan dolayı özellikle serbest radikallere karşı hücreyi koruyucu antioksidan etki yapmaktadır (Knapen et al., 1999; Demir ve ark., 2006). Ayrıca deoksiribo nükleik asit (DNA) ve protein sentezi, aminoasit taşınması, bazı antineoplastik ilaçların ve bazı metabolik son ürünlerin detoksifikasyonunu yapması, hücrede sistein deposu halinde olması, disülfid bağları içeren insülin gibi bazı proteinlerin disülfid yapılarının koparılması ve bazı enzimlerin metabolik reaksiyonlarında rol oynaması şeklinde sıralanabilecek birçok görevi bulunmaktadır. Bu önemli görevlerden dolayı hücre içindeki glutasyon konsantrasyon eksikliği sonucu metabolizmada bozukluklar meydana gelebilmektedir. Eritrosit hücrelerinde bu oranın düşmesi ile hemoliz gerçekleşmektedir (Carlberg and Mannervik., 1981; Çiftci ve ark., 2000; Keha ve Küfrevioğlu.,2010).

Glutasyonun indirgenebilmesi için nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH)'a ihtiyaç vardır. Gerekli olan NADPH pentoz fosfat yolundan elde edilir (Akkemik ve ark., 2011; Adem ve Ciftci., 2012). Pentoz fosfat yolunun ilk enzimi olan G6PD enzimi nikotinamid adenin dinükleotid (NAD⁺) varlığında NADPH üretimiyle beraber riboz fosfatlarını da sentezleyen önemli bir enzimdir. Reaksiyonda NADPH'a ihtiyaç duyulması glutasyon redüktaz ile glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzimi arasındaki ilişkiyi de ortaya koymaktadır. Riboz fosfatları, adozin trifosfat (ATP), flavin adenin dinükleotit (FAD), ribonükleik asit (RNA), asetil koenzim A (CoA), NAD⁺ ve DNA gibi hayati öneme sahip biyomoleküllerin bileşenidir (Çiftci ve ark., 2000; Adem ve Ciftci, 2012). NADPH ise; glutasyon molekülünde olduğu gibi başka bir antioksidan olan tiyoredoksinin (Trx) indirgenmesinde de koenzim görevi görmektedir (Kose ve ark., 2015). NADPH üretiminden sorumlu olan G6PD enziminin inhibisyonundan dolayı GSH üretimi olumsuz şekilde etkilenebilmektedir. Tiyoredoksin sistemi, DNA sentezinde, hücre sel büyümede, oksidatif stresin ve peroksitlerin hasarının önlenmesinde, apoptozda ve transkripsiyon faktör aktivitesinin uyarılmasında önemli bir role sahiptir (Carlberg and Mannervik., 1981; Çiftci ve ark., 2000; Altikat ve ark., 2002; Keha ve Küfrevioğlu.,2010). Bu nedenle NADPH üretimini sağlayan G6PD enzimi aynı zamanda in direkt antioksidan enzim olarak da bilinir (Çiftci ve ark., 2000; Altikat ve ark., 2002; Keha ve Küfrevioğlu.,2010).

Metabolik reaksiyonların her basamağında yer alan enzimler günümüzde biyokimyasal çalışmaların çoğunluğunu oluşturmaktadır ve yaklaşık 2000 kadar enzim saflaştırılmış ve tanımlanmıştır (Çiftci ve ark., 2000). Ayrıca metabolizmanın özellikle kilit noktalarında yer alan enzimler üzerinde inhibisyon çalışmalarına önem verilmiştir. Bir enzimin aktivitesini azaltan veya tamamen ortadan kaldıran bileşiklere inhibitörler denmektedir. İnhibitörler enzimlere dönüşümlü veya dönüşümsüz bağlanabilir ve bir enzimin aktif bölgesine substratın bağlanmasını engelleyebilir ya da reaksiyonun katalizlenmesini önleyebilir. İnsan ve hayvan tedavisinde kullanılan antibiyotik ve ilaçların çoğunluğu enzim inhibitörleri olduğu için farmakolojik çalışmalarda aktif bir sahayı oluşturmaktadır (Çiftci ve ark., 2000; Adem ve Ciftci., 2012). Enzim inhibisyonu canlı hücrelerde önemli bir kontrol mekanizması oluşturduğundan dolayı ilaç ve antibiyotikler fonksiyonlarını bu yolla gerçekleştirirler. Dolayısıyla

metabolizmanın kilit enzimlerinde meydana gelebilecek bir inhibisyon metabolik bir bozukluğun düzeltilmesini sağlayabilir.

Hayvanların nesillerini tehdit eden nedenler arasında habitatın tahribatı, kontrolsüz avlanma, çevresel ısınma ve çevresel toksinler özellikle önemlidir. Çok yaygın olarak hayatiyetini sürdüren herhangi bir hayvan türü yukarıda sayılan nedenlerden dolayı kısa bir zaman dilimi içinde yok olma ile karşı karşıya kalabilir. Örneğin ABD'nin doğusundaki habitatın tahribatı burada yaşayan güvercinlerin yok olmasına sebep olmuştur. 1990 yılında önce Hindistan'da 40 milyon civarında bir popülasyona sahip olan akbabaların sayısı kısa sürede %99,9 oranında azalmış ve sadece Bengal akbabaları hayatta kalabilmişlerdir. Yapılan araştırmalarda bunun sebebinin antienflamatuar olarak kullanılan bir ilaç olan diklorofenilaminofenilasetik asit (diklofenak) olduğu tespit edilmiştir.

Yapılan literatür taramalarında G6PD ve GR enzimlerinin birçok dokudan saflaştırılıp karakterizasyonunun yapıldığı, ayrıca birçok ilacın bu enzimlerin aktiviteleri üzerinde inhibisyon çalışmalarının gerçekleştirildiği, fakat bu enzimlerin koyun dalak dokusundan saflaştırılmadığı ve diklofenak sodyum ilacının bu enzimler üzerinde inhibisyon çalışmalarının yapılmadığı tespit edildi (Danner et al., 1977; Çiftci ve ark., 2000; Adem ve Ciftci., 2012). Bu çalışmada metabolizmadaki önemi vurgulanan G6PD ve GR enzimlerinin ve koyun dalak dokusundan saflaştırılması ve saflaştırılan bu enzimlerin aktiviteleri üzerine diklofenak sodyumun etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Materyal

Çalışmamızda kullanılan 2', 5' ADP-Sepharose-4B afinite jeli Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO), dikloron sodyum ilacı piyasadan, NADPH, NADP⁺, GSSG, GSH, TEMED, EDTA, elektroforez kimyasalları, protein standartları ve diğer kimyasallar Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO) veya Merck'den (Darmstadt, Germany) temin edildi.

Homojenatın Hazırlanması

Çalışmamızda kullanılan koyun dalak dokusu Bingöl İli Et ve Süt Kurumundan temin edilerek soğuk zincir kuralına göre laboratuvara getirildi. G6PD enzim homojenatı hazırlamak için 10 gram koyun dalak dokusu küçük parçalara bölündü. Daha sonra üzerine 30 mL 1 M Tris-HCl (pH= 8,0) tamponu ilave edildi ve bu doku homojenizatörle süspansiyon edildi. Elde edilen süspansiyon 10.000xg de 1 saat süreyle santrifüj edilerek çökelek atıldı ve böylece homojenat oluşturuldu. GR enzimi için ise; dalak dokusundan 15 gram alındı ve küçük parçalara bölündü. Daha sonra parçalanan doku 45 mL 50 mM KH₂PO₄ (pH= 8,0) tamponunda homojenizatör ile süspansiyon edildi. Bu süspansiyon 10.000xg de 1 saat santrifüj edilerek pelet atılıp homojenat oluşturuldu. Hazırlanan homojenatlarda enzim aktiviteleri spektrofotometrik olarak ölçüldü (Keha ve Küfrevioğlu, 2010; Temel ve ark., 2017a).

Enzimlerin Aktivitesi Ölçümleri

Glutatyon redüktaz enziminin aktivitesi spektrofotometrik metod kullanılarak, GSSG substratı varlığında NADPH'nin yükseltgenmesi sonucu azalan NADPH'nin 340 nm'de maksimum absorbansı esas alınarak belirlendi (Carlberg ve Mannervik, 1981). G6PD enzim aktivitesi ölçümü ise bu enziminin katalizlediği reaksiyonda koenzim olan NADP⁺'nin GSH substratı vasıtasıyla indirgenmesi sonucu oluşan NADPH'nin 340 nm'de maksimum absorbans vermesi esas alınarak ölçüldü (Keha ve Küfrevioğlu, 2010; Ungprasert et al., 2015, Temel and Kocuyigit, 2017).

Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Diyaliz

GR ve G6PD enzimlerinin amonyum sülfat tuzu ile çöktürme işlemi salting-out metoduna göre yapıldı. GR enzimi için en uygun çöktürme aralığı % 20-70 olarak tespit edilirken, G6PD enzimi için en uygun aralık % 40-70 olarak belirlendi. Amonyum sülfat çöktürmesi sonrası elde edilen çökelek homojenat tamponunda çözülerek 2 saat boyunca 50 mM K-asetat / 50 mM K-fosfat (pH= 7.0) tamponu ile diyaliz edildi. Aynı şekilde GR enzim çökeleği de 50 mM KH₂PO₄ (pH = 8,0) tamponunda çözülerek 2 saat süreyle 10 mM K-fosfat, 1 mM EDTA pH=7.5 tamponu ile diyaliz edildi (Temel ve ark., 2018; Keha ve Küfrevioğlu, 2010).

2', 5'-ADP Sepharose-4B Afinite Kromatografisi ile Koyun dalak G6PD ve GR Enzimlerinin Saflaştırılması

Amonyum sülfat çöktürmesiyle kısmen saflaşan enzimler için afinite kolonu kullanılarak ayrı ayrı saflaştırma işlemleri yapıldı. Öncelikle 10 mL'lik kolon hacmi için 2 g 2', 5'-ADP Sepharose-4B jeli tartılarak ve 500 mL deiyonize su ile birkaç defa yıkandı. Yıkama süresince şişirilmiş olan jelde oluşan hava su trompu vasıtası ile alındı ve jel paketleme tamponu ile afinite jeli süspansiyon edildi. Süspansiyon edilen afinite jeli kolona paketlendikten sonra yıkama ve dengeleme tamponu ile peristaltik pompa kullanılarak yıkandı. Daha sonra amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz sonrası elde edilen homojenat kolona yüklendi ve kolon sırası ile 25 mL 0,1M KH₂PO₄ +0,1M K-asetat (pH= 6,0), 25 mL 0,1 M KH₂PO₄ +0,1M K-asetat (pH= 7,85) ve 25 mL 0,1M KH₂PO₄ + 0,1M KCl (pH= 7,85) çözeltileriyle yıkandı. Yıkama işlemi spektrofotometrede takip edilerek absorbans değerinin 0,05 olmasıyla sonlandırıldı. Ardından G6PD enzimi, elüsyon tamponu (80 mM KH₂PO₄ + 80 mM KCl + 0,5 mM NADP⁺ + 10 mM EDTA pH= 7,85) ile afinite kolonundan elüe edildi. Bu aşamadan sonra kolon 0,1 M Na-asetat, 0,5 M NaCl, pH=4,5 tamponu ve 0,1 M Tris/ HCl, 0,5 M NaCl, pH=8,5 tamponu ile rejenere edildi. Kolon rejenere edildikten sonra homojenat kolona yüklendi ve kolon dengelendi. Dengelenen kolon 25'er mL sırasıyla 0,1 M K-asetat / 0,1 M K-fosfat, (pH=6,0) tamponu, 0,1 M K-fosfat/0,1 M KCl, (pH=7,85) tamponu ve 50 mM KH₂PO₄ /1 mM EDTA (pH=7,0) tamponu ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra GR enzimi, elüsyon tamponu (50 mM KH₂PO₄ /1 mM EDTA, 1mM GSH ve 0,5 mM NADPH, pH 7,3) ile elüe edildi (Bradford, 1976; Demir ve ark., 2006; Keha ve Küfrevioğlu, 2010; Temel ve ark., 2017b Temel ve Taysı, 2019; Temel ve ark., 2020).

SDS-PAGE ile Enzim Saflığının Kontrolü

Enzimlerin saflık kontrolü %3-8 kesikli sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) kullanılarak Laemmli metoduna göre yapıldı (Laemmli, 1970).

Protein Tayini

Enzim homojenatlarında, amonyum sülfat çökeltileri ve saf enzim numunelerinde ayrı ayrı Bradford Metodu kullanılarak proteini tayini gerçekleştirildi. Standart olarak sığır serum albümini (BSA) kullanıldı (Bradford, 1976).

Kinetik Çalışmalar

Kinetik çalışmalarda diklofenak sodyum ilacının hem GR hem de G6PD enzim aktiviteleri üzerine etkileri araştırıldı. İlacın her iki enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi, yapılan aktivite ölçümleriyle belirlendi ve farklı inhibitör konsantrasyonlarında ölçümler yapılarak % İnhibisyon - [I] grafikleri oluşturuldu ve bu grafikler yardımıyla IC₅₀ değerleri hesaplandı. Ayrıca beş farklı substrat ve üç farklı inhibitör konsantrasyonlarında ölçümler yapılarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi ve Ki sabitleri ile inhibisyon tipleri de tespit edildi (Keha ve Küfrevioğlu, 2010; Temel ve ark., 2017c).

BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada koyun dalak dokusundan G6PD ve GR enzimleri amonyum sülfat tuzu kullanılarak salting out metodu ve 2', 5'-ADP-Sepharose-4B afinite kromatografisi ile iki basamakta saflaştırıldı. Enzimlere ait saflaştırma basamakları Çizelge 1 ve Çizelge 2'de gösterildi.

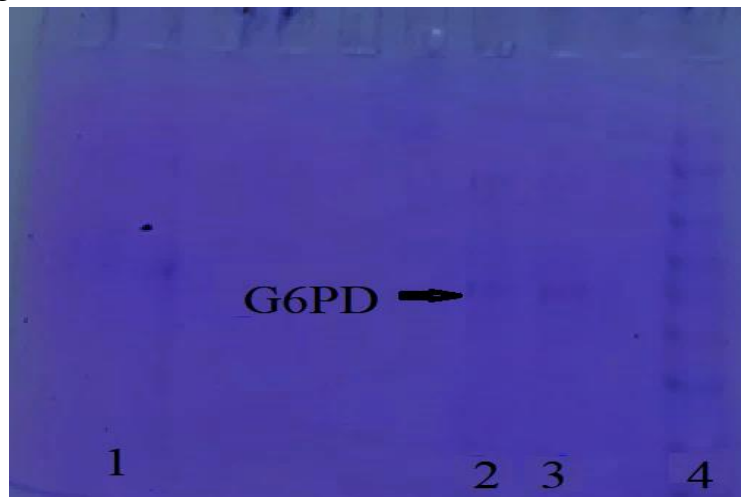
Çizelge 1. Koyun dalak dokusu G6PD enziminin saflaştırma basamakları.

Saflaştırma Basamağı	Toplam Hacim (mL)	Aktivite (EÜ mL ⁻¹)	Protein (mg mL ⁻¹)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite	Spesifik Aktivite (EÜ mg protein ⁻¹)	%Verim	Saflaştırma Kat sayısı
Homojenat Amonyum sülfat çöktürmesi (%40-70)	25	1.205	108.62	2715	30.125	0.0111	100	1
Afinite Kromatografisi	11	1.414	109.87	1208	15.554	0.013	51.63	1.171
	7.5	1.272	0.093	0.70	9.54	13.65	31.66	1052.2

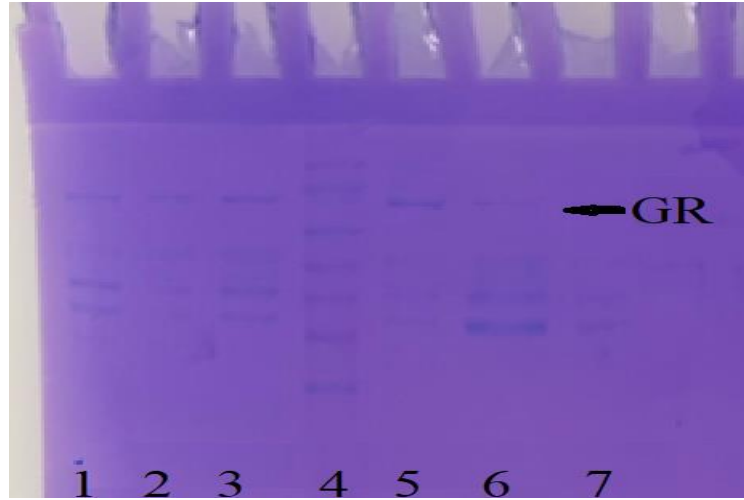
Çizelge 2. Koyun dalak dokusu GR enziminin saflaştırma basamakları

Saflaştırma Basamağı	Toplam Hacim (mL)	Aktivite (EÜ mL ⁻¹)	Protein (mg mL ⁻¹)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite	Spesifik Aktivite (EÜ mg protein ⁻¹)	% Verim	Saflaştırma kat sayısı
Homojenat Amonyum sülfat çöktürmesi % (20-70)	25	0.522	43.125	1078	13.05	0.0121	100	1
Afinite Kromatografisi	13	0.688	56.125	730	8.944	0.0123	68.53	1.02
	7.5	0.589	0.031	0.232	4.41	19.07	33.79	1589.1

Enzimlerin saflık dereceleri SDS-PAGE yöntemiyle kontrol edilerek SDS-PAGE fotoğrafları Şekil 1 ve Şekil 2'de gösterildi.



Şekil 1. 1. 2 ve 3. kuyu: afinite kolonundan elüe edilen saf G6PD enzimi. 4. kuyu: standart proteinler (14kDa - 175 kDa).

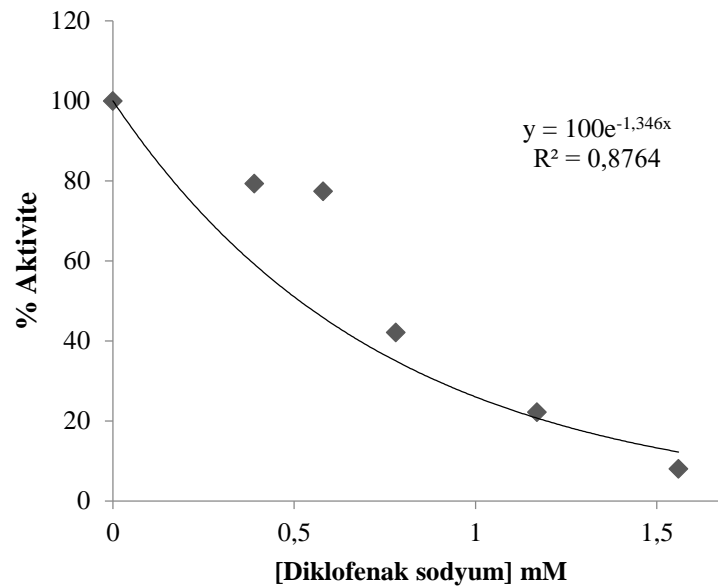


Şekil 2. 5. kuyu: afinite kolonundan elüe edilen saf GR enzimi. 4. kuyu: standart proteinler (14kDa - 175 kDa).

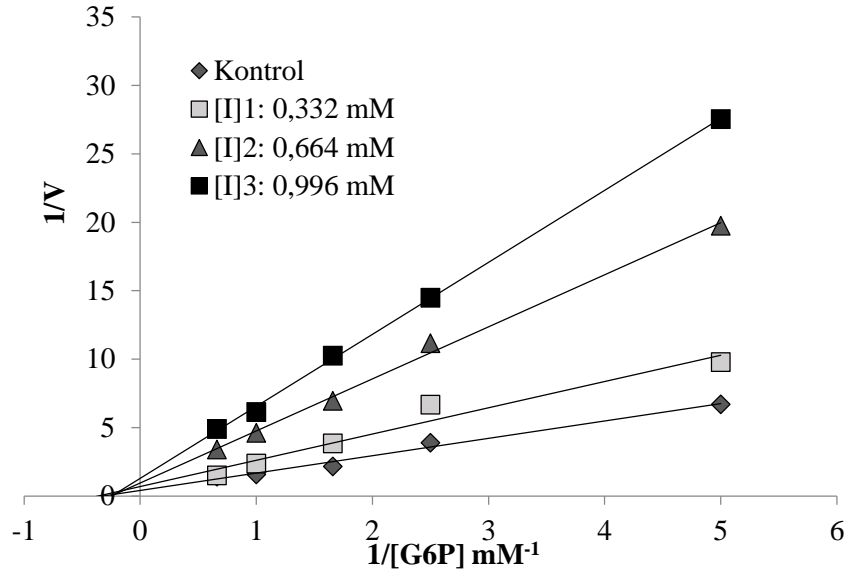
Kinetik çalışmalarda G6PD ve GR enzim aktiviteleri üzerine farklı konsantrasyonlarda diklofenak sodyumun etkileri araştırıldı. G6PD enzimi üzerine 0.39, 0.58, 0.78, 1.17 ve 1.56 mM; GR enzimi üzerine ise 0.39, 0.78, 1.56, 3.9, 7.8, 11.7 ve 15.6 mM derişimlerine sahip diklofenak sodyum kullanıldı ve % Aktivite-[I] grafikleri çizilerek IC_{50} değerleri bulundu. Ayrıca 3 farklı inhibitör (diklofenak sodyum) ve 5 farklı substrat konsantrasyonlarında her iki enzim için Linevaver-Burk grafikleri (Şekil. 4 ve 6) çizilerek diklofenak sodyum için K_i sabitleri ve inhibisyon tipleri belirlendi. Her iki enzim için elde edilen IC_{50} değerleri ve K_i sabitleri Tablo 3'te gösterildi.

Çizelge 3. Koyun dalak G6PD ve GR enzimlerini inhibe eden diklofenak sodyum için elde edilen IC_{50} değerleri ve K_i değerleri.

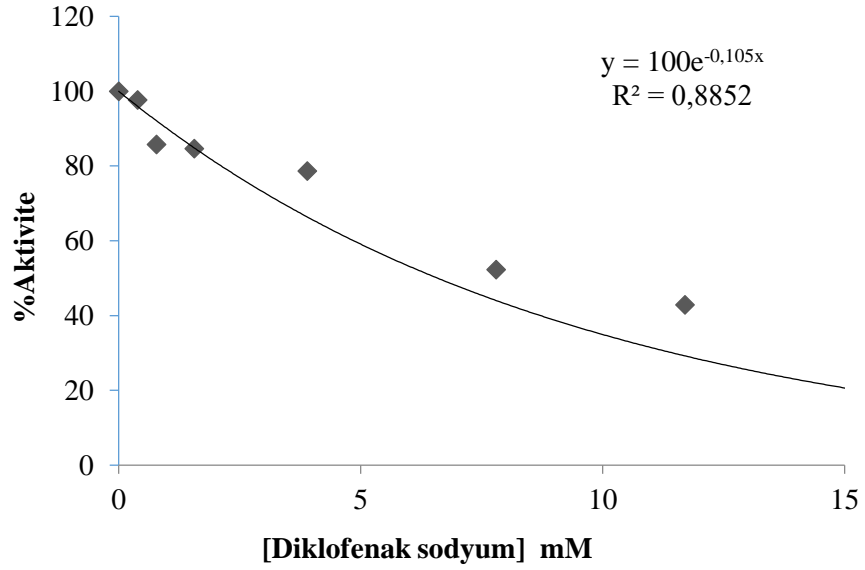
Enzim	IC_{50} (mM)	K_i	İnhibisyon Tipi
G6PD	0.51	0.481 ± 0.015	Yarışmasız
GR	6.55	15.686 ± 0.849	Yarışmasız



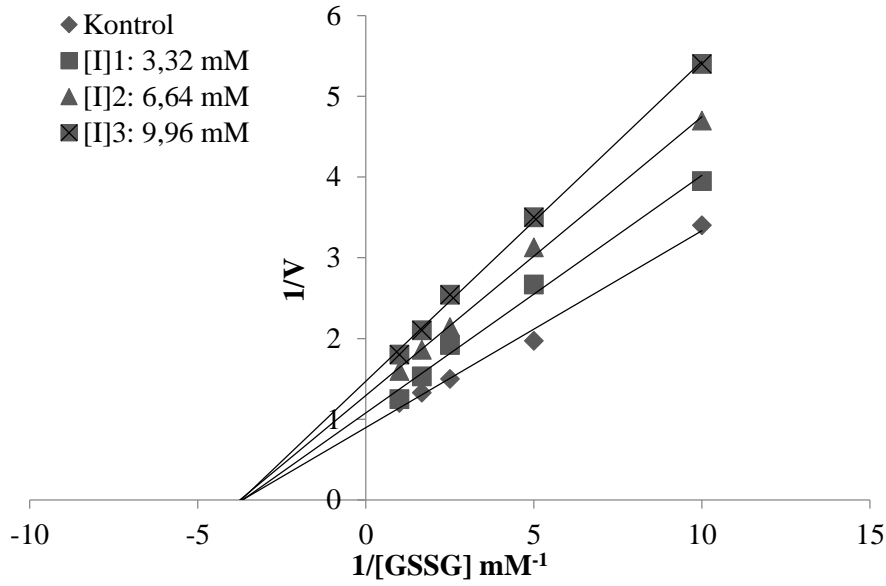
Şekil 3. Koyun dalak G6PD enzimi için 5 farklı diklofenak sodyum konsantrasyonunda çizilen [Diklofenak sodyum]-%Aktivite grafiği.



Şekil 4. Koyun dalak G6PD enzimi için 5 farklı substrat ve 3 farklı diklofenak sodyum konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği.



Şekil 5. Koyun dalak GR enzimi için 6 farklı diklofenak sodyum konsantrasyonunda çizilen [Diklofenak sodyum]-%Aktivite grafiği.



Şekil 6. Koyun dalak GR enzimi için 5 farklı substrat ve 3 farklı diklofenak sodyum konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği.

Hayvanların nesillerini tehdit eden nedenler arasında habitatın tahribatı, kontrolsüz avlanma, çevresel ısınma ve çevresel toksinler özellikle önemlidir. Çok yaygın olarak hayatiyetini sürdüren herhangi bir hayvan türü yukarıda sayılan nedenlerden dolayı kısa bir zaman dilimi içinde yok olma ile karşı karşıya kalabilir. Örneğin ABD'nin doğusundaki habitatın tahribatı burada yaşayan güvercinlerin yok olmasına sebep olmuştur. 1990 yılında önce Hindistan'da 40 milyon civarında bir popülasyona sahip olan akbabalara sayısı kısa sürede %99,9 oranında azalmasının ve sadece Bengal akbabalara hayatta kalabilmesinin diklofenak ilacı ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Beutler, 1971; Zhang et al., 2017).

Diklofenak dünyada reçeteli ve reçetesiz olarak en çok kullanılan, nonsteroidal analjezik, antipiretik ve antiinflamatuvar ilaçlardan biridir. Antiinflamatuvar ilaçlar dünyada en çok kullanılan ilaçlar arasında yer alır (Zhu and Zhang, 2012). Diklofenak ağrı kesici ve iltihap giderici olarak yaygın bir şekilde insanlarda ve hayvanlarda kullanılan bir ilaçtır. Diklofenak ve benzeri ilaçlar analjezik ve prostaglandin (PG) sentezinin baskılanması yoluyla ateş düşürücü etki yapar (Zhu and Zhang, 2012). Diklofenak sodyumun yan etkileri arasında gastrointestinal şikâyetler, kan oluşumundaki bozukluklar, baş dönmesi, yorgunluk, mide kanaması, karaciğer değerlerindeki artış, böbrek hasarları ve uzun süreli kullanımda kalp krizi gibi yan etkiler sayılabilir.

Bu çalışmada amonyum sülfat tuzu kullanılarak salting out metodu ve 2', 5'-ADP Sepharose-4B afinite kromatografisi kullanılarak, 13.65 EÜ mg⁻¹.protein spesifik aktivitesine sahip koyun dalak G6PD enzimi %31.66 verimle yaklaşık olarak 1052 kat (Tablo 1), 19.07 EÜ mg⁻¹.protein spesifik aktivitesine sahip koyun dalak GR enzimi %33 verimle yaklaşık olarak 1589 kat saflaştırılmış (Tablo 2) ve saflık dereceleri SDS-PAGE ile kontrol edilmiştir (Şekil 1 ve 2). Daha önce yapılan çalışmalarda G6PD ve GR enzimleri farklı hayvan dokularından ve insan dokularından saflaştırılmış ve diklofenak sodyumun ve diğer ilaçların çeşitli enzimler üzerine inhibisyon etkileri araştırılmıştır. Melatonin hormonunun insan alyuvarlar hücrelerinden saflaştırılan GR enzim aktivitesi üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmada GR enzimi insan alyuvarlarından % 24 verimle, 5.823 kat saflaştırılmıştır (Erat ve Çiftci, 2006). Farklı bir çalışmada hindi karaciğerinden GR enziminin %10.75 verimle ve 2476 kat saflaştırılması gerçekleştirilmiştir (Taşer ve Çiftci, 2012). Saflaştırma sonuçları literatür bilgileri ile karşılaştırıldıklarında önceki çalışmalara göre daha kısa bir zamanda ve yüksek saflıkta enzim elde edildiği belirlenmiştir (Danner et al., 1977; Keha ve Küfrevioğlu, 2010; Adem ve Ciftci, 2012).

Çalışmanın ikinci safhasında diklofenak sodyumun koyun dalak dokusu G6PD ve GR enzimleri üzerine inhibisyon etkisi araştırıldı (Tablo 3). Elde edilen sonuçlar IC₅₀ değerleri sırasıyla 0.51mM ve 6.55 mM, K_i sabitlerinin ise 0.481±0.015 mM ve 15.686±0.849 mM şeklinde olduğunu göstermektedir. Sıçanlarla yapılan bir çalışmada süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) enzimlerinin diklofenak tarafından inhibe edildiği ve GSH miktarının önemli derecede azaldığı tespit edilmiştir (Zhu and Zhang, 2012). Farelerle yapılan diğer bir çalışmada da 50 mg kg⁻¹ dozundaki diklofenak sodyumun P450 redüktaz enzim aktivitelerinde çok önemli derecede inhibisyona neden olduğu tespit edilmiştir (Bayramoğlu Akkoyun et al., 2018). GR enziminin insan eritrosit hücrelerinden saflaştırıldığı bir çalışmada enzim üzerine bazı analjezik ve anestetik ilaçların etkileri araştırılmıştır. Bu ilaçlar diklofenak sodyum, tenoxicam, etomidat, ketoprofen, lornoxicam, morphine ve propofol'dur. Araştırma sonucunda propofol yarışmasız inhibisyon gösterirken diğerlerinin yarışmalı inhibisyon gösterdiği belirlenmiştir (Şentürk ve ark., 2009). Başka bir çalışmada G6PD, 6PGD ve GR enzimleri sıçan kalp ve akciğer dokularından saflaştırılarak aktiviteleri üzerine bazı ilaçların etkileri araştırılmıştır. Bu ilaçlar; sefuroksim, metilprednisol, teikoplanin furosemid, gentamisin, seftazidim, digoksin, dopamin, furosemidin, adrenalin, lidokain, metoprolol tartarat, verapamil HCl, levofloksasin, sefazolin ve kotin'dir. Sıçan akciğer dokusu GR enzimini bu ilaçlardan sefazolin, seftazidim, sefuroksim furosemid, gentamisin, levofloksasin, metilprednisol, teikoplanin inhibe etmiştir (Adem and Çiftci, 2016). Farklı bir çalışmada yeni sentezlenen rodanin türevlerinin rat eritrositlerinden saflaştırılan G6PD enzimini 6.57 ± 2.03 IC₅₀ ve 91.60 ± 9.25 µM Ki değerleriyle inhibe ettiği belirlenmiştir (Karaman et al., 2021). Çoban ve Çiftci tarafından yapılan bir çalışmada koyun dalak dokusundan saflaştırılan G6PD enzim aktivitesi üzerine iveral, linkomisin, gentamisin, amoksisilin, ampisilin, streptomisin sülfat, novamizol, ketojezik, sefuroksim, sefazolin sodyum ve tylosin ilaçlarının etkileri araştırılmıştır. Araştırma sonuçları, iveral, gentamisin, streptomisin sülfat ve linkomisin ilaçlarının sırasıyla 0.62 mM, 21.6 mM, 173.2 mM ve 231 mM IC₅₀ değerleri ile enzimi inhibe ettikleri belirlenmiştir (Çoban ve Çiftci, 2022).

SONUÇ

Bu çalışma sonuçları, tüm dünyada reçeteli ve reçetesiz olarak en çok kullanılan, nonsteroidal analjezik, antipiretik ve antiinflamatuvar ilaçlardan biri olan diklofenak sodyum'un her iki enzimin aktivitesini önemli derecede inhibe ettiğini, özellikle G6PD enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon derecesinin çok daha yüksek olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla tedavide diklofenak sodyum ilacının kullanılması durumunda bu değerlerin göz önünde bulundurularak doz ayarlamasının yapılmasının faydalı olacağı değerlendirilmektedir.

Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Adem S, Ciftci M, 2012. Purification of rat kidney glucose 6 phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase, and glutathione reductase enzymes using 2', 5'-ADP sepharose 4B affinity in a single chromatography step. *Protein Expression and Purification*, 81(1):1-4.
- Adem S, Ciftci M, 2016. Purification and biochemical characterization of glucose 6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase and glutathione reductase from rat lung and

- inhibition effects of some antibiotics. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 31(6): 1342-1348.
- Akkemik E, Şentürk M, Özgeriş FB, Taşer P, Çiftci M, 2011. In vitro effects of some drugs on human erythrocyte glutathione reductase, *Turkish Journal of Medical Sciences*, 41(2): 235-41.
- Bayramoğlu Akkoyun M, Bengü AŞ, Temel Y, Akkoyun HT, Ekin S, Ciftci M, 2018. The effect of astaxanthin and cadmium on rat erythrocyte G6PD, 6PGD, GR, and TrxR enzymes activities in vivo and on rat erythrocyte 6PGD enzyme activity in vitro. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 32(8), e22170.
- Beutler E, 1971. *Red Cell Metabolism Manual of Biochemical Methods*; Academic Press: London,
- Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(12): 248-254.
- Carlberg I, Mannervik B, 1981. Purification and characterization of glutathione reductase from calf liver. An improved procedure for affinity chromatography on 2', 5'-ADP-Sepharose 4B. *Analytical Biochemistry*, (116):531-536.
- Ciftci M, Kufreviöglu OI, Gundogdu M, Ozmen I, 2000. Effects of some antibiotics on enzyme activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. *Pharmacological Research*. 41(1):109-113.
- Çoban Ç, Çiftci M, 2022. Bazı ilaçların koyun dalak dokusundan saflılaştırılan glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi üzerine in vitro etkileri. *Türk Doğa ve Fen Dergisi*, 11(1): 29-35.
- Danner J, Lenhoff HM, Heagy W, 1977. Affinity chromatography of glutathione reductase: Bound by immobilized GSSG, eluted by NADPH. *Analytical Biochemistry*, (82):586-590.
- Demir H, Erat M, Şakiroğlu H, 2006. In vitro effects of some antibiotics on glutathione reductase obtained from chicken liver. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, (30):513-519.
- Erat M, Ciftci M, 2006. effect of melatonin on enzyme activities of glutathione reductase from human erythrocytes in vitro and from rat erythrocytes in vivo *European journal of pharmacology*, 537: 59-63.
- Gill SS, Anjum NA, Hasanuzzaman M, Gill R, Trivedi DK, Ahmad I, Tuteja N, 2013. Glutathione and glutathione reductase: a boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. *Plant Physiology and Biochemistry*, (70):204-212.
- Knapen MF, Zusterzeel PL, Peters WH, Steegers EA, 1999. Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction, *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, (82):171-184.
- Karaman, M, Temel Y, Bayindir S, 2020. Inhibition effect of rhodanines containing benzene moieties on pentose phosphate pathway enzymes and molecular docking. *Journal of Molecular Structure*, 1220, 128700.
- Keha EE, Küfreviöglu Öİ. *Biyokimya, Aktif Yayınevi*, 6. Baskı, İstanbul, 2010.
- Laemmli UK. 1970 Nature Publishing Group. *Nat Publ Gr*. 1970;228:1979.
- Şentürk M, Kufreviöglu Öİ, Çiftci M, 2009. Effects of Some Analgesic Anaesthetic Drugs on Human Erythrocyte Glutathione Reductase: An In Vitro Study. *J. Enz. Inh. Med.Chem* 24(2): 420-424
- Taşer P, Ciftci M, 2012. Purification and characterization of glutathione reductase from turkey liver. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 36(5): 546-553.
- Temel Y, Bozkuş T, Karagözoğlu Y, Çiftçi M, 2017a. Glutasyon redüktaz (GR) enziminin japon bildircin (*Coturnix coturnix japonica*) eritrositlerinden saflılaştırılması ve karakterizasyonu. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 7.3: 143-150.

- Temel Y, Ayna A, Hamdi Shafeeq, I, Ciftci M, 2020. In vitro effects of some antibiotics on glucose-6-phosphate dehydrogenase from rat (*Rattus norvegicus*) erythrocyte. *Drug and chemical toxicology*, 43(2), 219-223.
- Temel Y, Kocyigit U M, 2017. Purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase from rat (*Rattus norvegicus*) erythrocytes and inhibition effects of some metal ions on enzyme activity. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 31(9), e21927.
- Temel Y, Küfrevioğlu Öİ, Ciftci M, 2017b. Investigation of the effects of purification and characterization of turkey (*Meleagris gallopavo*) liver mitochondrial thioredoxin reductase enzyme and some metal ions on enzyme activity. *Turkish Journal of Chemistry*, 41(1), 48-60.
- Temel Y, Taysi MŞ, 2019. The effect of mercury chloride and boric acid on rat erythrocyte enzymes. *Biological Trace Element Research*, 191(1), 177-182.
- Temel Y, Bengü AŞ, Akkoyun HT, Akkoyun M, Ciftci M, 2017c. Effect of astaxanthin and aluminum chloride on erythrocyte G6PD and 6PGD enzyme activities in vivo and on erythrocyte G6PD in vitro in rats. *Journal of Biochemical And Molecular Toxicology*, 31(10), e21954.
- Temel Y, Taher SSM, Hamza MA, Shafeeq İH, Koçyiğit ÜM, Çiftçi M. 2018. Investigation of the inhibition effects of some metal ions on glutathione reductase enzyme from japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) liver. *Cumhuriyet Science Journal*, 39(3): 679-687.
- Ungrasert P, Cheungpasitporn W, Crowson CS, Matteson EL, 2015. Individual Non-Steroidal Anti Inflammatory Drugs and Risk of Acute Kidney Injury: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. *European Journal International Medicine*, (26):285-291.
- Zhang X, Donnan PT, Bell S, Guthrie B, 2017. Non-Steroidal anti-inflammatory drug induced acute kidney injury in the community dwelling general population and people with chronic kidney disease: systematic review and meta-analysis. *BMC Nephrology*;(18):256.
- Zhu Y, Zhang QY, 2012. Role of intestinal cytochrome P450 enzymes in diclofenac-induced toxicity in the small intestine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 343(2):362-370.