



## Bazı İlaçların Koyun Dalak Dokusundan Saflaştırılan Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Enzimi Üzerine *In Vitro* Etkileri

Çiğdem ÇOBAN<sup>1</sup>, Mehmet ÇİFTÇİ<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Bingöl Üniversitesi, Solhan Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, Bingöl/Türkiye

<sup>2\*</sup> Bingöl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Bingöl/Türkiye

Çiğdem ÇOBAN ORCID No: 0000-0003-1141-544X

Mehmet ÇİFTÇİ ORCID No: 0000-0002-1748-3729

\* Sorumlu yazar: [mciftci@bingol.edu.tr](mailto:mciftci@bingol.edu.tr)

(Alınış: 29.04.2021, Kabul: 13.07.2021, Online Yayınlanma: 25.03.2022)

**Anahtar Kelimeler**  
 Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz, Saflaştırma, İlaç, İnhibisyon, İveral, Gentamisin

**Öz:** Bu çalışmada bazı ilaçların, koyun dalak dokusundan saflaştırılan glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi (G6PD; E.C. 1.1.1.49) üzerine *in vitro* etkileri araştırıldı. Çalışmanın ilk aşamasında G6PD enzimi koyun dalak dokusundan *salting out* (amonyum sülfat çöktürmesi) metodu ve 2', 5' ADP-Sepharose 4B afinite kromatografisi ile saflaştırıldı ve enzimin saflık derecesi SDS-PAGE metodu ile kontrol edildi. Çalışmanın ikinci aşamasında iveral, linkomisin, gentamisin, amoksisilin, ampisilin, streptomisin sülfat, novamizol, ketojezik, sefuroksim, sefazolin sodyum ve tylosin ilaçlarının enzim aktivitesi üzerindeki etkileri araştırıldı. Araştırma sonuçları; iveral, gentamisin, streptomisin sülfat ve linkomisin ilaçlarının G6PD enzimini sırasıyla 0,62 mM, 21,6 mM, 173,2 mM ve 231 mM, IC<sub>50</sub> değerleri ile inhibe ettiğini, amoksisilin, ampisilin, novamizol, ketojezik, sefuroksim sodyum, sefazolin sodyum ve tylosin ilaçlarının ise enzim üzerinde önemli bir aktivasyon ya da inhibisyon etkisine sahip olmadıklarını gösterdi.

## *In Vitro* Effects of Some Drugs on Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Enzyme Purified from Sheep Spleen Tissue

**Keywords**  
 Glucose 6-phosphate dehydrogenase, Purification, Drug, Inhibition, İveral, Gentamicin

**Abstract:** In this study, *in vitro* effects of some drugs on glucose-6-phosphate dehydrogenase enzyme (G6PD; E.C. 1.1.1.49) purified from sheep spleen tissue were investigated. In the first step of the study, G6PD enzyme was purified from sheep spleen tissue by *salting out* (ammonium sulfate precipitation) method and 2', 5' ADP-Sepharose 4B gel affinity chromatography and the purity of the enzyme was checked by SDS-PAGE method. In the second phase of the study, the effects of iveral, lincomycin, gentamicin, amoxicillin, ampicillin, streptomycin sulfate, novamizole, ketogesic, cefuroxime, cefazolin sodium and tylosin drugs on enzyme activity were investigated. Research results showed that iveral, gentamicin, streptomycin sulfate and lincomycin drugs inhibit the G6PD enzyme with IC<sub>50</sub> values of 0.62 mM, 21.6 mM, 173.2 mM and 231 mM, respectively, amoxicillin, ampicillin, novamizole, ketogenic, cefuroxime sodium, cefazolin sodium and tylosin drugs did not have a significant activation or inhibition effect on the enzyme.

## 1. GİRİŞ

Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi (G6PD; E.C. 1.1.1.49) pentoz fosfat yolunun birinci reaksiyonunu katalizleyerek NADP<sup>+</sup> varlığında NADPH üretimi ile birlikte, glukoz 6-fosfatın, 6-fosfoglukono laktone dönüşümünü gerçekleştiren kilit noktada bulunan bir enzimdir [1-3]. Reaksiyon ürünlerinden D-ribuloz 5-fosfat, ATP, CoA, NAD<sup>+</sup>, FAD, RNA ve DNA gibi hayati öneme sahip biyomoleküllerin bileşeni olan riboz 5-fosfata izomerize olur. Reaksiyon sırasında oluşan NADPH ise yağ asitleri, steroidler ve bazı amino asitlerin sentezinde kullanılan önemli bir koenzimdir [4-6]. Glutasyon ve tiyoredoksin sistemleri hücre içi iki ana antioksidan sistemidir. Bir tripeptid olan glutasyonun yapısında bulunan sülfhidril grubu (-SH), hücreleri okside moleküllerin zararlı etkilerine karşı korur. Ayrıca, DNA ve protein sentezine, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonuna, amino asit taşınmasına ve enzimatik reaksiyonlara katılır [7-9]. Tiyoredoksin sistemi, DNA sentezinde, hücre sel büyümede, oksidatif stresin neden olduğu hücre sel hasarın önlenmesinde, apoptozda, peroksitlerin olumsuz etkilerinden hücrelerin korunmasında ve transkripsiyon faktör aktivitesinin uyarılmasında önemli bir role sahiptir [10-12]. Hem glutasyonun hem de tiyoredoksinin indirgenmesinde NADPH koenzim olarak görev yapar. Bu nedenle NADPH üretimine sebebiyet veren G6PD enzimi aynı zamanda indirekt antioksidan enzim olarak da bilinir [2, 13].

Günümüzde insan ve hayvan tedavisinde birçok antibiyotik ve ilacın kullanıldığı bilinmektedir [14-16]. Kullanılan ilaçların birçoğunun hedefi metabolizmada önemli görevleri olan düzenleyici enzimlerdir. Metabolizmada kavşak noktalarda yer alan düzenleyici enzimlerin aktivitesinde meydana gelen bir inhibisyon bazı durumlarda bir patojenin ölümünü ya da metabolik bir bozukluğun düzeltilmesini sağlayabilir. İnhibitörler enzimlere dönüşümlü ya da dönüşümsüz olarak bağlanırlar. Bir inhibitörün bağlanması, bir substratın enzimin aktif bölgesine bağlanmasını durdurabilir veya enzimin reaksiyonunu katalize etmesini engelleyebilir. Hastalıkların tedavisinde kullanılan birçok ilaç molekülü enzim inhibitörleridir, bu nedenle keşifleri ve iyileştirmeleri biyokimya ve farmakolojide aktif bir araştırma alanıdır [17,18].

Ancak kullanılan bu kimyasal maddelerin organizmada bulunan enzimler üzerinde olabilecek muhtemel etkilerinin çoğu henüz çalışılmamıştır. Bugüne kadar G6PD enziminin birçok canlı dokusundan saflaştırıldığı, kinetik özelliklerinin belirlendiği ve birçok ilaç ve kimyasal maddenin enzim üzerine etkilerinin tespit edildiği bilinmektedir [2,19-23]. Ancak literatür kaynaklarından araştırdığımız kadarı ile şu ana kadar koyun dalak G6PD enzimi ile ilgili herhangi bir saflaştırma ve kinetik çalışma yapılmamıştır.

Bu çalışmada G6PD enziminin koyun dalak dokusundan saflaştırılması ve bazı ilaçların enzim aktivitesi üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

## 2. MATERYAL VE METOT

### 2.1. Materyal

Bu çalışmada kullanılan ilaçlar piyasadan, G6P, NADP<sup>+</sup>, Tris, elektroforez kimyasalları, protein standartları, amonyum sülfat, 2', 5' ADP-Sepharose 4B afinite jeli ve diğer kimyasallar Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO) ve Merck (Darmstadt, Germany) den temin edildi.

### 2.2. Homojenatın Hazırlanması

Çalışmamızda kullanılan koyun dalak dokusu Bingöl ili Kombine Et ve Süt Kurumundan soğuk zincir kurallarına göre temin edildi. Alınan 15 gram dalak dokusu küçük parçalara ayrılarak 45 mL, 1 M Tris-HCl (pH= 8,0) tamponu içerisinde süspanse edildi. Elde edilen süspanسیون 10.000xg de 1 saat santrifüj edildikten sonra çöktelti atılarak homojenat oluşturuldu [24].

### 2.3. Amonyum Sülfat Çöktürmesi ve Diyaliz

Koyun dalak dokusundan elde edilen homojenat için %0-%90 doygunluk konsantrasyonlarında amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı ve G6PD enzimi için en uygun çöktürme aralığı % 40-60 olarak tespit edildi. Enzim bu doygunlukta amonyum sülfat tuzu ile salting out metoduna göre çöktürüldü. Elde edilen süspanسیون 10.000xg'de 15 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Geriye kalan çökelek 1 M Tris-HCl tamponunda (pH= 8,0) çözüldü ve enzim için aktivite kontrolü yapıldı. Daha sonra enzim çözeltisi diyaliz torbalarına konarak 2 saat 50 mM K-asetat / 50 mM K-fosfat (pH= 7,0) tamponuna karşı diyaliz edildi [25].

### 2.4. Afinite Kolonunun Hazırlanması ve Koyun dalak G6PD Enziminin Saflaştırılması

Amonyum sülfat çöktürme ve diyaliz sonrası elde edilen enzim numunesi 2', 5' ADP Sepharose-4B afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırıldı. Öncelikle 2', 5' ADP Sepharose-4B afinite kolonu hazırlandı. 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 yıkandı. Yıkama esnasında jel şişirilmiş oldu. Şişirilmiş jelin havası su trompu kullanılarak vakum ile alındıktan sonra, dengeleme tamponu (0,1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 0,1M K-asetat pH= 6,0) ilave edilerek jel süspanse edildi. Süspanse edilmiş jel, 1x10 cm'lik kapalı sistemden oluşan soğutmalı kolona paketlenildi. Jel çöktükten sonra peristaltik pompa yardımıyla yıkama ve dengeleme tamponu ile yıkandı. Kolonun dengelenmiş olduğu elüat ile tamponun 280 nm'de absorbanlarının ve pH'larının yaklaşık olarak eşitlenmesinden anlaşıldı. Böylece afinite kolonu hazırlanmış oldu. Daha önce hazırlanmış olan enzim numunesi hazırlanan 2', 5'- ADP- sepharose 4B afinite kolonuna tatbik edildi. Afinite kolonu sırası ile 25 mL 0,1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 0,1M K-asetat (pH= 6,0), 25 mL, 0,1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 0,1M K-asetat (pH= 7,85) ve 25 mL 0,1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 0,1M KCl (pH= 7,85) çözeltileriyle yıkandı. Yıkama işlemi spektrofotometrik olarak takip edildi. Yıkama işlemine kolondan alınan numunenin absorban

değeri ile kör arasındaki fark 0,05 olana kadar devam edildi. Kolon yıkandıktan sonra G6PD enzimi elüsyon tamponu (80 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 80 mM KCl + 0,5 mM NADP<sup>+</sup> + 10 mM EDTA pH= 7,85) ile afinite kolonundan elüe edildi [26].

## 2.5. Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz Enzimi Aktivitesi Ölçümü

G6PD enziminin aktivite ölçümü Beutler metoduna göre spektrofotometrik olarak ölçüldü. Bu metod, G6PD enziminin katalizlediği reaksiyonda NADP<sup>+</sup>'nin indirgenmesi sonucu oluşan NADPH'nin 340 nm'de maksimum absorban vermeye esasına dayanmaktadır [27].

## 2.6. Protein Tayini

Kantitatif protein miktarı spektrofotometrik olarak 595 nm'de Bradford metoduna göre yapıldı. Standart grafik sığır serum albümin proteini kullanılarak oluşturuldu [28].

## 2.7. SDS-PAGE ile Enzim Saflığının Kontrolü

Enzimin saflık kontrolü %3-8 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) kullanılarak Laemmli metoduna göre gerçekleştirildi [29].

## 2.8. Kinetik Çalışmalar

Kinetik çalışmalarda iveral, linkomisin, gentamisin, amoksisilin, ampisilin, streptomisin sülfat, novamizol, ketojezik, sefuroksim, sefazolin sodyum ve tylosin ilaçlarının enzim aktivitesi üzerindeki etkileri araştırıldı. Aktivite ölçümleri sonucu inhibisyon etkisi gösteren iveral, lincocin, genta, streptomisin sülfat için farklı inhibitör konsantrasyonlarında % İnhibisyon - [I] grafikleri çizilerek IC<sub>50</sub> değerleri hesaplandı [30].

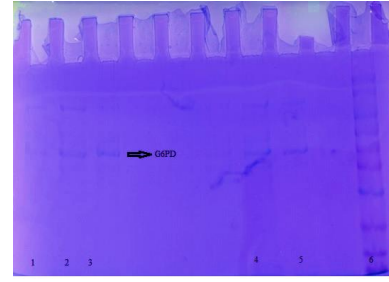
## 3. BULGULAR

Bu çalışmada, koyun dalak dokusundan G6PD enzimi homojenatın hazırlanması, amonyum sülfat çöktürmesi ve 2', 5', ADP-Sepharose-4B afinite kromatografisi kullanılarak 13,68 EU/mg protein spesifik aktivite ile %33 verimle 1302,8 kat saflaştırıldı ve sonuçlar Tablo 1'de gösterildi.

**Tablo 1.** Koyun dalak dokusu G6PD enzimi saflaştırma basamakları.

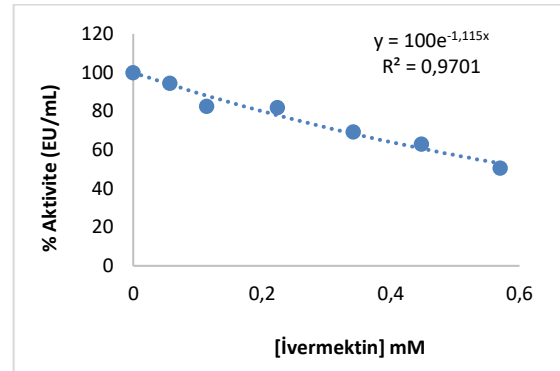
Saflaştırma Basamağı	Toplam Hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Protein (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite	Spesifik Aktivite (EU/mg protein)	%Verim	Saflaştırma Kat sayısı
Homojenat	25	1,128	106,62	2666	28,200	0,0105	100	1
Amonyum sülfat çöktürmesi (%40-70)	11	1,334	108,51	1193	14,674	0,0123	52,36	1,171
Afinite Kromatografisi	7,5	1,259	0,092	0,69	9,44	13,68	33,48	1302,8

Enzim saflık derecesinin tespiti için %3-8 kesikli sodyum SDS-PAGE yapıldı. Jel üzerinde tek bant elde edilmesi enzimin saf olarak elde edildiğini gösterdi (Şekil 1).

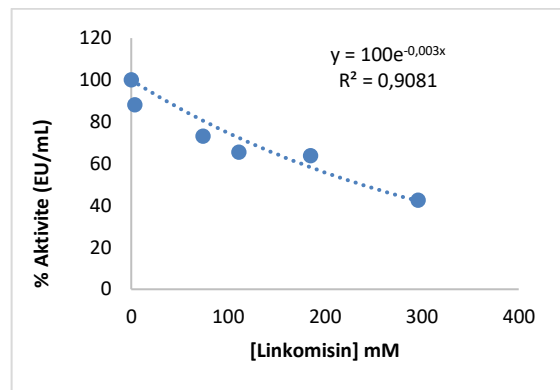


**Şekil 1.** Amonyum sülfat çöktürmesi ve afinite kromatografisi sonrası elde edilen koyun dalak dokusu G6PD enzimi (\*1. 2. 3. 4. ve 5. kuyu: afinite kolonundan elüe edilen saf G6PD enzimi. 6. kuyu: standart proteinler (14 kDa - 175 kDa).

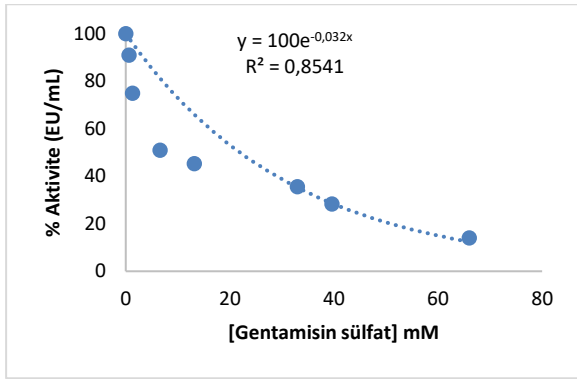
*In vitro* kinetik çalışmalarda farklı konsantrasyonlarda iveral (0,057, 0,114, 0,224, 0,342, 0,448 ve 0,57 mM), linkomisin (3,7, 74, 111, 185, 296 mM), gentamisin (0,66, 1,32, 6,6, 13,2, 33, 39,6 ve 66 mM) streptomisin sülfat (4,29, 8,4, 16,8, 42, 84, 168 ve 210 mM) novamizol (3,2, 6,4, 9,6, 12,8 ve 16 mM), ketojezik (0,78, 1,56, 2,34, 3,1 ve 3,9 mM) amoksisilin (0,114, 0,228, 0,456, 1,14, 2,28, 3,42, 4,56, 5,7 ve 6,84 mM) ampisilin (0,095, 0,19, 0,38, 0,95, 1,9, 2,85, 3,8 ve 7,6 mM), sefuroksim sodyum (0,448, 0,896, 1,344, 1,790 ve 2,24 mM), sefazolin sodyum (0,83, 1,66, 2,49, 3,32 ve 4,15 mM) ve tylosin (0,095, 0,190, 0,285, 0,475 ve 0,95 mM) ilaçlarının enzim aktivitesi üzerindeki etkileri araştırıldı. Enzim üzerinde inhibisyon etkisi gösteren iveral, gentamisin, streptomisin sülfat ve linkomisin ilaçları için % Aktivite-[I] grafikleri çizilerek IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 0,62 mM, 21,6 mM, 173,2 mM ve 231 mM olarak hesaplandı (Şekil. 2, 3, 4 ve Tablo. 2). Amoksisilin, ampisilin, novamizol, ketojezik, sefuroksim sodyum, sefazolin sodyum ve tylosin ilaçlarının ise enzim üzerinde önemli bir aktivasyon ya da inhibisyon etkisine sahip olmadıkları belirlendi (Tablo. 2).



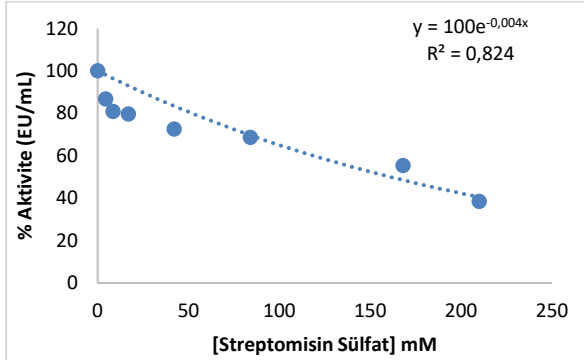
**Şekil 2.** İvermektinin koyun dalak G6PD enzimi üzerine etkisi.



**Şekil 3.** Linkomisin'in koyun dalak G6PD enzimi üzerine etkisi.



Sekil 4. Gentamisin sülfat'ın koyun dalak G6PD enzimi üzerine etkisi.



Sekil 5. Streptomisin sülfat'ın koyun dalak G6PD enzimi üzerine etkisi.

Tablo 2. Bazı ilaçları koyun dalak G6PD enzim aktivitesi üzerine etkileri.

İlaç	IC <sub>50</sub> (mM)	R <sup>2</sup>
iveral	0,62 mM	0,97
gentamisin	21,60 mM	0,85
streptomisin sülfat	173,2 mM	0,82
linkomisin	231 mM	0,91
amoksisilin	-	-
ampisilin	-	-
novamizol	-	-
ketojezik	-	-
sefuroksim sodyum	-	-
sefazolin sodyum	-	-
tylosin	-	-

#### 4. SONUÇ

Pentoz fosfat metabolik yolu hücrelerin büyüme ve gelişiminde önemli rol oynar. Pentoz fosfat yolunun birinci basamak reaksiyonunu katalizleyen allosterik enzimi G6PD aktivitesinin işlevsiz bir durumu, normal hücre çoğalmasının yanı sıra embriyonik ve organizma gelişimini önler. G6PD'nin anormal aktivasyonu tümör oluşumu ile ilişkilidir [31]. Tümör oluşumu, tümör gelişiminin her durumunun yakından ilişkili olduğu dinamik ve karmaşık bir süreçtir. Hızlı büyüyen kanser hücreleri, NADPH üretimi ve nükleik asit sentezi talebini karşılamak için G6PD'yi uyarmak için çok sayıda mekanizma geliştirmiştir [32]. G6PD, lösemi, akciğer kanseri, yumurtalık kanseri, renal hücreli karsinom ve gliomada proliferasyonu, tümör hücrelerinin göçünü, glukoz alımını, NADPH üretimini artırır ve reaktif oksijen türlerini (ROS) azaltır. Birçok çalışmaya göre, G6PD'nin yüksek ekspresyon seviyesi, mesane kanserinin kötü prognozu için bir risk faktörüdür ve G6PD aktivitesindeki artış farklı kanser türleri için kemoterapide ilaç direnci oluşturur. G6PD enzimi birçok hastalığın oluşum, tanı ve tedavisine aracılık ettiği ve etkilediği için G6PD

inhibitörlerinin araştırılması ve geliştirilmesi önem arz etmektedir [33].

İvermektin, lakton grubu bir parazit ilacıdır ve *Streptomyces avermitilis* kültürlerinden elde edilir. İvermektin, parazitlerin sinir sisteminde Gama Amino Butirik Asit (GABA) salgısını artırarak klor kanallarını açık tutar ve impuls geçişini önleyerek parazitin felç olmasına ya da ölmesine neden olur [34]. Gentamisin, çoğunlukla *Pseudomonas*, *Proteus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia* ve Gram-pozitif *Staphylococcus* dahil olmak üzere çok çeşitli bakteriyel enfeksiyonlara karşı etkili bir antibiyotiktir [35]. Streptomisin aminoglikozid sınıfı, hem gram negatif hem de gram pozitif organizmalara ve *Mycobacterium*'a karşı aktif olan bakterisidal bir antibiyotiktir. Mikrobiyal hücrelerin protein sentezini inhibe ederek hücrenin ölümüne yol açar [36]. Linkozamidler gram pozitif koklar (özellikle stafilokoklar, streptokoklar ve enterokoklar), basil ve gram negatif koklara karşı etkilidirler [37]. Amoksisilin ve ampisilin beta laktam grubuna dahil aminopenisilinlerdendir. Bu antibiyotikler penisilin G gibi Gram pozitif bakterilere ve *H. influenza*, *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *salmonella*, *shigella* gibi Gram negatif basillere karşı da etkilidirler [38]. Sefuroksim ve sefazolin üst solunum yolu enfeksiyonlarında kullanılan sefalosporin grubu antibiyotiklerdir [39]. Novamizol, metamizol sodyum içeren bir antienflamatuardır [40]. Ketojezik, ketoprofen içeren bir antienflamatuar ve analjeziktir [41]. Tylosin, *Streptomyces fradiae* suşları tarafından üretilen makrolid grubu bir antibiyotiktir [42]. Bu çalışmanın birinci safhasında koyun dalak dokusundan G6PD enzimi amonyum sülfat çöktürmesi ve 2', 5' ADP-Sepharose-4B afinite kromatografisi ile saflaştırıldı. Afinite kromatografisi protein, DNA, RNA ve diğer makromoleküllerin saflaştırılmasında kullanılan ve spesifik etkileşimlere dayanan bir kromatografi yöntemidir. Bu yöntem günümüzde enzim saflaştırmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır [12,43-45]. Bu çalışmada afinite kromatografisi kullanılarak kısa zamanda ve yüksek saflıkta enzim elde edildi. Çalışmanın ikinci safhasında insan hekimliğinde ve veteriner hekimlikte yaygın olarak kullanılan, iveral, gentamisin, streptomisin sülfat, linkomisin, amoksisilin, ampisilin, novamizol ketojezik, sefuroksim sodyum, sefazolin sodyum ve tylosin ilaçlarının koyun dalak dokusundan saflaştırılan G6PD enzimi üzerine etkileri araştırıldı. Çalışma sonuçları, iveral, gentamisin, streptomisin sülfat ve linkomisin'in enzim aktivitesini inhibe ettiğini diğer ilaçların ise enzim aktivitesi üzerine herhangi bir etkileri olmadığını göstermektedir. Çalışma sonuçları analiz edildiğinde iveral'ın 0,62 mM IC<sub>50</sub> değeriyle enzim üzerinde en etkili inhibitör olduğu, linkomisin'in ise 231 mM IC<sub>50</sub> değeriyle enzim üzerinde inhibisyon etkisi en düşük ilaç olduğu tespit edildi. Literatürde G6PD enzimi farklı dokulardan çeşitli kromatografik teknikler yardımıyla saflaştırılarak karakterize edilmiş ve bazı ilaç ve organik bileşiklerin enzim aktivitesi üzerine etkileri incelenmiştir [6,46,47]. Çiftçi ve ark. insan eritrositlerinden afinite kromatografisi ile saflaştırdıkları G6PD enzim aktivitesi üzerine melatonin'in *in vitro* ve rat eritrosit G6PD enzimi üzerine *in vivo* etkisini incelemiştir.



Çalışma sonuçları melatonin'in G6PD enzim aktivitesini hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak artırdığını göstermiştir [1]. Beydemir ve ark. yapmış oldukları çalışmada G6PD enzimini koyun eritrosit dokusundan afinite kromatografisi ile saflaştırmış ve gentamisin sülfat, penisilin G potasyum ve amikasin antibiyotiklerin enzim aktivitesi üzerine etkilerini incelemişlerdir. Araştırma sonuçları gentamisin sülfat'ın 10,01 mM, penisilin G potasyum'un 12,83 mM ve amikasin'in 41,88 mM, IC<sub>50</sub> değerleriyle G6PD enzimini inhibe ettiğini göstermektedir [48]. Bu araştırmanın sonuçları ile bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar birbiri ile uyumludur. Temel ve ark. G6PD enzimini rat eritrositlerinden afinite kromatografisi ile saflaştırmış ve gentamisin, klindamisin ve furosemid antibiyotiklerinin enzim aktivitesi üzerine etkilerini araştırmıştır. Araştırma sonuçları gentamisin'in 1,75 mM, klindamisin'in 34,65 mM ve furosemid'in 0,526 mM IC<sub>50</sub> değerleriyle G6PD enzimini inhibe ettiğini göstermiştir [16]. Çağlayan ve Gülçin yaptıkları çalışmada keçi karaciğerinden afinite kromatografisi ile saflaştırdıkları karbonik anhidraz (CA) enzimi üzerine bazı avermektin ilaçlarının inhibisyon etkilerini incelemiştir. Çalışma sonuçları abamectin, doramectin, eprinomectin, and moxidectin ilaçlarının sırasıyla 0.283, 0.153, 0.232, and 0.317 nM, *Ki* değerleriyle enzimi inhibe ettiğini göstermektedir (49).

Sonuç olarak, G6PD enziminin aşırı ekspresyonu bazı hastalıkların patofizyolojisi ile ilişkilidir. Hedefi enzim olan tedavi yaklaşımları için inhibitörler büyük önem arz etmektedir. Bu çalışmada iveral, gentamisin, streptomisin sülfat ve linkomisin'in koyun dalak dokusu G6PD enzimini inhibe ettiği belirlenmiştir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar hedefi G6PD enzimi olan tedavi yaklaşımları için yol gösterici olacaktır.

## KAYNAKLAR

- [1] Ciftci M, Bilici D, Kufrevioğlu OI. Effects of metamizol and magnesium sulfate on enzyme activities of glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes *in vitro* and from rat erythrocytes *in vivo*. *Pharmacol Res.* 2001;44(1):7–11.
- [2] Adem S, Ciftci M. Purification and biochemical characterization of glucose 6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase and glutathione reductase from rat lung and inhibition effects of some antibiotics. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2016; 31(6):1342-1348.
- [3] Temel Y, Kocyigit UM. Purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase from rat (*Rattus norvegicus*) erythrocytes and inhibition effects of some metal ions on enzyme activity. *J Biochem Mol Toxicol.* 2017;31(9): e21927.
- [4] Gumustekin K, Ciftci M, Coban A, Altikat S, Aktas O, Gul M, et al. Effects of nicotine and vitamin E on glucose 6-phosphate dehydrogenase activity in some rat tissues *in vivo* and *in vitro*. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2005;20(5):497–502.
- [5] Temel Y, Ayna A, Hamdi Shafeeq I, Ciftci M. *In vitro* effects of some antibiotics on glucose-6-phosphate dehydrogenase from rat (*Rattus norvegicus*) erythrocyte. *Drug Chem Toxicol [Internet].* 2020;43(2):219–23.
- [6] Temel Y, Bayındır S. The Synthesis of Thiosemicarbazone-Based Aza-Ylides as Inhibitors of Rat Erythrocyte Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase Enzyme. *J Inst Sci Technol.* 2019;9(3):1503–12.
- [7] Pljesa-Ercegovac M, Savic-Radojevic A, Matic M, Coric V, Djukic T, Radic T, et al. Glutathione transferases: Potential targets to overcome chemoresistance in solid tumors. *Int J Mol Sci.* 2018;19(12).
- [8] Lu J, Holmgren A. Free Radical Biology and Medicine The thioredoxin antioxidant system. *Free Radic Biol Med [Internet].* 2014;66:75–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.036>
- [9] Taysi MŞ, Temel Y. Glutathione S-transferase: Purification and Characterization from Quail (*Coturnix coturnix japonica*) Liver and the Impact of Some Metal Ions on Enzyme Activity. *Bionanoscience.* 2021;11(1):91–8.
- [10] Arnér ESJ, Holmgren A. The thioredoxin system in cancer. *Semin Cancer Biol.* 2006;16(6):420–6.
- [11] Carvalho CML, Chew E, Hashemy SI, Lu J, Holmgren A. Inhibition of the Human Thioredoxin System A Molecular Mechanism Of Mercury Toxicity. 2008;283(18):11913–23.
- [12] Temel Y, Kufrevioğlu ÖI, Çiftci M. 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 J Chem.* 2017;41(1).
- [13] Akkemik E, Şentürk M, Özgeriş FB, Taşer P, Çiftci M. *In vitro* effects of some drugs on human erythrocyte glutathione reductase. 2011;41(2):235–41.
- [14] Dilek EB, Ömer İ, Beydemir Ş. mpacts of some antibiotics on human serum paraoxonase 1 activity. 2013;28(February 2012):758–64.
- [15] Zhang D, Liu Y, Luo Z, Chen Y, Xu A, Liang Y, et al. The novel thioredoxin reductase inhibitor A-Z2 triggers intrinsic apoptosis and shows efficacy in the treatment of acute myeloid leukemia. *Free Radic Biol Med.* 2020;146(November 2019):275–86.
- [16] Temel Y, Ayna A, Hamdi Shafeeq I, Ciftci M. *In vitro* effects of some antibiotics on glucose-6-phosphate dehydrogenase from rat (*Rattus norvegicus*) erythrocyte . *Drug Chem Toxicol.* 2020;43(2):219–223.
- [17] Shapiro R, Vallee BL. Interaction of Human Placental Ribonuclease with Placental Ribonuclease Inhibitor. *Biochemistry.* 1991;30(8):2246–55.
- [18] Kose LP, Gülçin İ, Özdemir H, Atasever A, Alwasel SH, Supuran CT. The effects of some avermectins on bovine carbonic anhydrase enzyme. *J Enzyme Inhib Med Chem [Internet].* 2015;6366(February 2017):1–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26207514>
- [19] Adem S, Ciftci M. 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 Expr Purif.* 2012;81(1):1-4.
- [20] Özasan MS, Balcı N, Demir Y, Gürbüz M, Küfrevioğlu Öİ. Inhibition effects of some antidepressant drugs on pentose phosphate pathway enzymes. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2019;72(March).
- [21] Temel Y, Ciftci M, Akkoyun HT, Akkoyun M. Effect of astaxanthin and aluminum chloride on erythrocyte G6PD and 6PGD enzyme activities in vivo and on erythrocyte G6PD in vitro in rats. 2017;31(10): e21954.
- [22] Temel Y, Taysi MŞ. The Effect of Mercury Chloride and Boric Acid on Rat Erythrocyte Enzymes. *Biol Trace Elem Res.* 2019;191(1):172-187.
- [23] Altikat S, Ciftci M, Buyukokuroglu ME. In vitro effects of some anesthetic drugs on enzymatic activity of human red blood cell glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Pol J Pharmacol [Internet].* 2002;54(1):67-71.
- [24] Temel Y, Bozkuş T, Karagözoğlu Y, Çiftçi M. Glutathion Redüktaz ( GR ) Enziminin Japon Bildircin ( *Coturnix coturnix japonica* ) Eritrositlerinden Saflaştırılması ve Karakterizasyonu Purification and Characterization of Glutathion Reductase Enzyme From Japanese Quail ( *Coturnix coturnix japonica* ) *Er.* 2017;7(3):143-50.
- [25] Perosa F, Carbone R, Ferrone S, Dammacco F. Purification of human immunoglobulins by sequential precipitation with caprylic acid and ammonium sulphate. *J Immunol Methods.* 1990;128(1):9-16.
- [26] Mannervik B, Jacobsson K, Boggarum V. Department of Biochemistry, Arrhenius Laboratory, University of Stockholm, Stockholm, Sweden. 1976;66(2):221-4.
- [27] Buyukokuroglu ME. the Effects of Ethanol on Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase Enzyme Activity From Human Erythrocytes in Vitro and Rat Erythrocytes in Vivo. *Alcohol Alcohol.* 2002;37(4):327-9.
- [28] Bradford MM. Interactive effects of drought stress and chitosan application on physiological characteristics and essential oil yield of *Thymus daenensis* Celak. *Crop J.* 2017;5(5):407-15.
- [29] Laemmli UK. 1970 Nature Publishing Group. *Nat Publ Gr.* 1970;228:1979.
- [30] Lineweaver H, Burk D. The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *J Am Chem Soc.* 1934;56(3):658-66.
- [31] Jiang P, Du W, Wu M. Regulation of the pentose phosphate pathway in cancer. *Protein Cell.* 2014;5(8):1-11.
- [32] Patra KC, Hay N. The pentose phosphate pathway and cancer. *Trends Biochem Sci.* 2014;39(8):347-54.
- [33] Luo Z, Du D, Liu Y, Lu T, Liu L, Jiang H, et al. Discovery and characterization of a novel glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) inhibitor via high-throughput screening. *Bioorg Med Chem Lett.* 2021;40(February):127905.
- [34] Goa Karen L, Donna McTavish, Stephen PC. Ivermectin: A review of its antifilarial activity, pharmacokinetic properties and clinical efficacy in onchocerciasis. *Drugs.* 1991;42(4):640-58.
- [35] Sader HS, Farrell DJ, Flamm RK, Jones RN. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms isolated from patients hospitalized in intensive care units in United States and European hospitals (2009-2011). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2014;78(4):443-8.
- [36] Kumar M, Kakkar V, Mishra AK, Chuttani K, Kaur IP. Intranasal delivery of streptomycin sulfate (STRS) loaded solid lipid nanoparticles to brain and blood. *Int J Pharm.* 2014;461(1-2):223-33.
- [37] Leclercq R, Courvalin P. Erratum: Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification (*Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 35 (1268)). *Antimicrob Agents Chemother.* 1991;35(10):2165.
- [38] Poole K. Resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. *Cell Mol Life Sci.* 2004;61(17):2200-23.
- [39] El-Shaboury SR, Saleh GA, Mohamed FA, Rageh AH. Analysis of cephalosporin antibiotics. *J Pharm Biomed Anal.* 2007;45(1):1-19.
- [40] Gökçimen A, Özgüner M, Bayram D, Ural M, Sulak O. Metamizol sodyumun sıçan karaciğer, böbrek ve akciğer dokuları üzerine etkisi. *SDÜ Tıp Fakültesi Derg.* 2009;13(1):27-31.
- [41] Alkimin GD, Soares AMVM, Barata C, Nunes B. Evaluation of ketoprofen toxicity in two freshwater species: Effects on biochemical, physiological and population endpoints. *Environ Pollut.* 2020;265:114993.
- [42] Hendrickson OD, Zvereva EA, Zherdev A V., Godjevargova T, Xu C, Dzantiev BB. Development of a double immunochromatographic test system for simultaneous determination of lincomycin and tylosin antibiotics in foodstuffs. *Food Chem.* 2020;318(February):126510.
- [43] Adem S, Ciftci M. 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 Expr Purif.* 2012;81(1):1-4.
- [44] Aksoy M, Ozaslan MS, Kufrevioglu OI. Purification of glutathione S-transferase from Van Lake fish (*Chalcalburnus tarichii* Pallas) muscle and investigation of some metal ions effect on enzyme activity. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2016;31(4):546-50.
- [45] Ceylan M, Temel Y, Kocuyigit UM, Alwasel SH, Gülçin I, Gürbüzlü B. Synthesis , carbonic anhydrase I and II isoenzymes inhibition properties , and antibacterial activities of novel tetralone-based 1 , 4-benzothiazepine derivatives. 2017; 31(4):e21872
- [46] Bayindir S, Temel Y, Ayna A, Ciftci M. The synthesis of N-benzoylindoles as inhibitors of rat erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase. *J Biochem Mol Toxicol.* 2018;32(9):1-9.
- [47] Bayindir S, Ayna A, Temel Y, Çiftçi M. The synthesis of new oxindoles as analogs of natural product 3,3'-bis(indolyl)oxindole and in vitro evaluation of the enzyme activity of G6PD and 6PGD. *Turkish J Chem.* 2018;42(2):332-345.
- [48] Beydemir S, Ciftçi M, Küfrevioğlu OI. Purification

and characterization of glucose 6-phosphate dehydrogenase from sheep erythrocytes and inhibitory effects of some antibiotics on enzyme activity. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2002;17(4):271-7.

- [49] Caglayan C. The toxicological effects of some avermectins on goat liver carbonic anhydrase enzyme. 2018;32(1):e22010.