

2015

YÜKSEK LİSANS TEZİ

N.TÜRKMEN

T.C.

BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI



SIÇAN KARACİĞER VE BÖBREK DOKULARINDAN
SAFLAŞTIRILAN BETA-GLUKOZİDAZLAR ÜZERİNE
BAZI ANTİBİYOTİKLERİN *İN VİTRO* ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nihal TÜRKMEN

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Hatibe KARA

BALIKESİR-2015

**T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**SIÇAN KARACİĞER VE BÖBREK DOKULARINDAN
SAFLAŞTIRILAN BETA-GLUKOZİDAZLAR ÜZERİNE BAZI
ANTİBİYOTİKLERİN *İN VİTRO* ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nihal TÜRKMEN

TEZ SINAV JÜRİSİ

Prof. Dr. Elif DEMİRKAN
Uludağ Üniversitesi – Başkan

Prof. Dr. Kamil SEYREK
Balıkesir Üniversitesi - Üye

Yrd. Doç. Dr. Hatibe KARA
Balıkesir Üniversitesi - Üye

Tez Danışmanı
Yrd. Doç. Dr. Hatibe KARA

Bu araştırma; Balıkesir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2014/153 nolu proje ile desteklenmiştir.

BALIKESİR-2015



T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TEZ KABUL VE ONAY


Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan
"Sıçan Karaciğer ve Böbrek Dokularından Safılaştırılan Beta-glukozidazlar Üzerine
Bazı Antibiyotiklerin *in vitro* Etkilerinin Araştırılması"
başlıklı tez çalışması, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 29/12 / 2015

TEZ SINAV JÜRİSİ


Prof. Dr. Elif DEMİRKAN
Uludağ Üniversitesi
Başkan


Prof. Dr. Kamil SEYREK
Balıkesir Üniversitesi
Üye

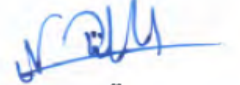

Yrd. Doc. Dr. Hatibe KARA
Balıkesir Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki ~~Doktora~~ / Yüksek Lisans Tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun
04 / 01 / 2016 tarih ve 20.16 / 01 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Özlem YAVUZ
Enstitü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tezde kullanılmış olan tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.(27.11.15)



Nihal TÜRKMEN

TEŐEKKÜR

Tez çalıőmam sűresince bana rehberlik eden, bilgi ve tecrűbelerini esirgemededen aktaran danıőman hocam Yrd.Doç.Dr.Hatibe KARA'ya en içten teőekkűrlerimi sunarım. Çalıőmamın her aőamasında bilgilerinden faydalandıėım ve çalıőmam sűresince beni destekleyen Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Őėretim Őyeleri Sayın Prof.Dr.Őzlem YAVUZ, Sayın Prof.Dr.Kamil SEYREK ve Sayın Doç.Dr.Adnan Adil HIŐMİŐULLARI'na,bu araőtırmaya saėladıėı desteklerden dolayı Balıkesir Őniversitesi Bilimsel Araőtırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne, her zaman ve her koőulda yanımda olan, beni fedakarca ve sabırla destekleyen sevgili aileme teőekkűr ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1 Karbohidratlar.....	5
2.2. β -Glukozidazlar.....	6
2.2.1. β -Glukozidazların Biyokimyası.....	6
2.2.1.1. Adlandırılması	6
2.2.1.2. Yapısal Özellikleri.....	6
2.2.1.3. Katalizleme Mekanizması.....	7
2.2.1.4. Katalizlediği Reaksiyonlar ve Substratları	9
2.2.1.5. Enzimin Önemi	11
2.3. Memeli β -Glukozidazları.....	15
2.3.1. Sitozolik β -Glukozidaz (GBA3).....	15
2.3.1.1. Sitozolik β -Glukozidaz Mekanizması.....	16
2.3.1.2. Enzimin Önemi.....	16
2.3.2. Lizozomal β -Glukozidaz (GBA1).....	17
2.3.2.1. Substratları.....	18
2.3.2.2. Enzimolojisi.....	19
2.3.3. Non-Lizozomal β -Glukozidaz (GBA2)	20
2.4. Antibiyotikler.....	21
2.4.1. Çalışmada Kullanılan Antibiyotikler.....	24
2.4.1.1. Sefuroksim sodyum.....	24
2.4.1.2. Amoksisilin trihidrat/potasyum klavulanat.....	24
2.4.1.3. Sefazolin sodyum.....	25
2.4.1.4. Gentamisin sülfat	26
2.4.1.5. Seftriakson disodyum	27
2.4.1.6. Ampisilin/sulbaktam.....	28
3. GEREÇ ve YÖNTEM	29

3.1. Gereçler.....	29
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	29
3.1.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar.....	29
3.1.3. Kullanılan Çözeltiler.....	30
3.2. Yöntemler.....	33
3.2.1. Deney Hayvanları.....	33
3.2.2. Enzim Ekstratının Hazırlanması.....	33
3.2.3. Enzim Aktivite Tayini.....	33
3.2.4. Lowry Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini.....	34
3.2.5. Enzimin Saflaştırılması.....	35
3.2.5.1. Amonyum Sülfat Çöktürme Aralığının Belirlenmesi.....	35
3.2.5.2 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi	36
3.2.5.3 Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ...	37
3.2.6. Antibiyotiklerin Uygulanması.....	38
3.2.7. Antibiyotiklerin (inhibitörlerin) IC ₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi.....	39
3.2.8. Antibiyotiklerin (inhibitörlerin) K _i Değerlerinin Bulunması.....	39
4. BULGULAR	41
4.1. Kantitatif Protein Tayininde Kullanılan Standart Eğri.....	41
4.2. Karaciğer GBA2 Saflaştırılması ve Bazı Antibiyotiklerin Etkilerinin Araştırılması.....	42
4.2.1. Karaciğer GBA2'nin Amonyum Sülfat Çöktürme Aralığının Belirlenmesi.....	42
4.2.2. Karaciğer GBA2'nin Saflaştırılması.....	43
4.2.3 Karaciğer GBA2 SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi.....	47
4.2.4 Karaciğer GBA2 Üzerine Bazı Antibiyotiklerin IC ₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi.....	48
4.2.4.1. Sefuroksim Sodyum Antibiyotiğinin IC ₅₀ Değerinin Belirlenmesi	48
4.2.4.2. Gentamisin Sülfat Antibiyotiğinin IC ₅₀ Değerinin Belirlenmesi.....	50
4.2.4.3. Sefazolin Sodyum Antibiyotiğinin IC ₅₀ Değerinin Belirlenmesi.....	52
4.2.4.4. Seftriakson Disodyum Antibiyotiğinin IC ₅₀ Değerinin Belirlenmesi.....	54
4.2.4.5. Amoksisilin trihidrat/Potasyum klavulanat Antibiyotiğinin IC ₅₀ Değerinin Belirlenmesi.....	56

4.2.4.6. Ampisilin/Sulbaktam Antibiyotiğinin IC ₅₀ Değerinin Belirlenmesi.....	58
4.2.4.7. Karaciğer GBA2'yi İnhibe Eden Sefuroksim Sodyum Antibiyotiğinin İnhibisyon Tipi ve K _i Değerinin Belirlenmesi.....	60
4.3. Böbrek GBA2 Saflaştırılması ve Bazı Antibiyotiklerin Etkilerinin Araştırılması.....	64
4.3.1. Böbrek GBA2'nin Amonyum Sülfat Çöktürme Aralığının Belirlenmesi	64
4.3.2. Böbrek GBA2'nin Saflaştırılması.....	66
4.3.3 Böbrek GBA2 SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi.....	69
4.3.4 Böbrek GBA2 Üzerine Bazı Antibiyotiklerin IC ₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi.....	70
4.3.4.1. Sefuroksim Sodyum Antibiyotiğinin IC ₅₀ Değerinin Belirlenmesi.....	70
4.3.4.2. Gentamisin Sülfat Antibiyotiğinin IC ₅₀ Değerinin Belirlenmesi.....	72
4.3.4.3. Sefazolin Sodyum Antibiyotiğinin IC ₅₀ Değerinin Belirlenmesi.....	74
4.3.4.4. Seftriakson Disodyum Antibiyotiğinin IC ₅₀ Değerinin Belirlenmesi.....	76
4.3.4.5. Amoksisilin trihidrat/Potasyum klavulanat Antibiyotiğinin IC ₅₀ Değerinin Belirlenmesi.....	78
4.3.4.6. Ampisilin/Sulbaktam Antibiyotiğinin IC ₅₀ Değerinin Belirlenmesi.....	80
4.3.4.7. Böbrek GBA2'yi İnhibe Eden Sefuroksim Sodyum Antibiyotiğinin İnhibisyon Tipi ve K _i Değerinin Belirlenmesi.....	82
4.3.4.8. Böbrek GBA2'yi İnhibe Eden Amoksisilin trihidrat/potasyum klavulanat Antibiyotiğinin İnhibisyon Tipi ve K _i Değerinin Belirlenmesi.....	85
4.3.4.9. Böbrek GBA2'yi İnhibe Eden Sefazolin sodyum Antibiyotiğinin İnhibisyon Tipi ve K _i Değerinin Belirlenmesi.....	89
4.3.4.10. Böbrek GBA2'yi İnhibe Eden Ampisilin/sulbaktam Antibiyotiğinin İnhibisyon Tipi ve K _i Değerinin Belirlenmesi.....	91
5. TARTIŞMA.....	91
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	96
KAYNAKLAR.....	98
EKLER.....	
EK-1 ÖZGEÇMİŞ.....	113
EK-2 ETİK KURUL RAPORU.....	115

ÖZET

Sıçan Karaciğer ve Böbrek Dokularından Saflaştırılan Beta-glukozidazlar Üzerine Bazı Antibiyotiklerin *in vitro* Etkilerinin Araştırılması

Bu çalışmanın amacı; memeli karaciğer ve böbrek dokularında bulunan, metabolik aktivitelerinin bir kısmı tanımlanmış, bir kısmı ise hala araştırılan β -glukozidaz enzimleri üzerine, bazı antibiyotiklerin etkilerinin araştırılmasıdır.

Sıçan karaciğer ve böbrek GBA2 enzimleri amonyum sülfat çöktürme ve ardından hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Çalışmamızda, sıçan karaciğer GBA2 % 43.4 verimle 30.2 kat, böbrek GBA2 % 12.2 verimle 5.1 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılan sıçan karaciğer ve böbrek β -glukozidazları SDS-PAGE'de yürütülmüştür. Sıçan karaciğer β -glukozidazı 58 ve 110 kDa' da, böbrek β -glukozidazı 90 ve 109 kDa' da görülmüştür.

Sıçan karaciğer ve böbrek dokularından saflaştırılan GBA2 enzimleri üzerine sefuroksim sodyum, ampisilin/sulbaktam, amoksisilin trihidrat/potasyum klavulanat, sefazolin sodyum, gentamisin sülfat ve seftriakson disodyum antibiyotiklerinin inhibisyon etkileri incelenmiştir. Bu amaçla saflaştırılan sıçan karaciğer ve böbrek GBA2 enzim aktivitelerini yarıya düşüren antibiyotik konsantrasyonları olan IC₅₀ değerleri tespit edilmiştir. Ampisilin/sulbaktam antibiyotiğinin sıçan karaciğer GBA2 için IC₅₀ değeri 62.97 mg/ml bulunmuş ve çalışılan diğer antibiyotiklerin karaciğer enzimini inhibe etmediği belirlenmiştir. Böbrek GBA2'ye antibiyotiklerin etkisi incelendiğinde; ampisilin/sulbaktam, sefuroksim sodyum, amoksisilin trihidrat/potasyum klavulanat, sefazolin sodyum antibiyotiklerinin IC₅₀ değerleri sırasıyla; 32.23 mg/ml, 85.02 mM, 20.06 mg/ml, 98.81 mM olarak belirlenmiş ve gentamisin sülfat ve seftriakson disodyumun enzimi inhibe etmediği görülmüştür. Sıçan karaciğer GBA2'yi ampisilin/sulbaktam antibiyotiğinin yarışmalı tipte inhibe ettiği gözlenmiştir. Sıçan böbrek GBA2'yi sefuroksim sodyumun yarı-yarışmalı, ampisilin/sulbaktam, amoksisilin trihidrat/potasyum klavulanat ve sefazolin sodyum antibiyotiklerinin ise yarışmasız tipte inhibe ettikleri bulunmuştur.

Sonuç olarak bu çalışmada; ampisilin/sulbaktam antibiyotiğinin, hem karaciğer, hem de böbrek GBA2'yi inhibe ettiği; amoksisilin trihidrat/potasyum klavulanat, sefazolin sodyum ve sefuroksim sodyumun sadece böbrek GBA2'yi inhibe ettiği bulunmuştur. Gentamisin sülfat ve seftriakson disodyumun ise karaciğer ve böbrek GBA2'yi inhibe etmediği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: β -glukozidaz, karaciğer, böbrek, enzim saflaştırma, sıçan, antibiyotik.

ABSTRACT

Investigation of the *in vitro* effects of some antibiotics on the purified Beta-glucosidases from the rat liver and kidney

The aim of this study; investigation of some antibiotics' effects onto β -glucosidases that located in mammals liver and kidney tissues and identified some of the metabolic activity and some part is still under investigation.

Rat liver and kidney GBA2 enzymes were purified by ammonium sulfate precipitation and then hydrophobic interaction chromatography. In our study, while rat liver GBA2 was purified at 30.2-fold with 43.4% yield rat kidney GBA2 was purified 5.1-fold with %12.2 yield. Purified rat liver and kidney β -glucosidases were run at SDS-PAGE. Rat liver β -glucosidase was illustrated 58 and 110 kDa, kidney β -glucosidase was illustrated 90 and 109 kDa.

It was investigated inhibition effects of cefuroxime sodium, ampicillin-sulbactam, amoxicillin trihydrate/potassium clavulanate, cefazolin sodium, gentamicin sulfate and ceftriaxone disodium antibiotics onto purified GBA2 from rat liver and kidney tissues. IC_{50} values, antibiotic concentration which reduces by half the enzyme activity of the purified rat liver and kidney GBA2, was determined for this purpose. IC_{50} value of ampicillin/ sulbactam antibiotic for rat liver GBA2 was found 62.97 mg/ml and it was determined that studied other antibiotics didn't inhibit to liver enzyme. When examined effect of antibiotics onto kidney GBA2, the IC_{50} values for ampicillin/sulbactam, cefuroxime sodium, amoxicillin trihydrate/potassium clavulanate, cefazolin sodium antibiotics 32.23 mg/ml, 85.02 mM, 20.06 mg/ml, 98.81 mM were determined respectively and gentamicin sulfate and ceftriaxone disodium were found to not inhibit the enzyme. Ampicillin/sulbactam antibiotic was observed that the competitive type inhibition to rat liver GBA2. Cefuroxime sodium was inhibited un-competitive type and ampicillin/sulbactam, amoxicillin trihydrate/potassium clavulanate and cefazolin sodium antibiotics were found that non-competitive types inhibition.

As a result, in this study was found; while ampicillin sulbactam antibiotic was inhibited both liver and kidney GBA2, amoxicillin trihydrate/potassium clavulanate, cefazolin sodium, and cefuroxime sodium were inhibited only kidney GBA2. Gentamicin sulfate and ceftriaxone disodium have been shown to not inhibit the liver and kidney GBA2.

Keywords: β -glucosidase, liver, kidney, enzyme purification, rat, antibiotics.

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

GBA1	: Lizozomal β -glukozidaz
GBA2	: Non-lizozomal β -glukozidaz 2
GBA3	: Non-lizozomal β -glukozidaz 3
GlcCer	: Glukozilseramid
LPH	: İntestinal Laktaz-Phlorizin Hidrolaz
ER	: Endoplazmik retikulum
GH	:Glikozid hidrolaz
HCN	:Hidrojen siyanür
IC50	: Enzim aktivitesini %50 ye düşüren inhibitör konsantrasyonu
pNP	: Para-nitrofenol
pNPG	: Para-nitrofenol β -D-glikopiranosid
4MUG	: 4-metilumbelliferil β -D-glikopiranosid
4MuGal	4-metilumbelliferil β -D galaktozid
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
UVP	: Jel görüntüleme sistemi
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
Tris	: Tris (hidroksimetil) aminometan
TEMED	: N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin
APS	: Amonyum persülfat
BSA	: Sığır serum albümini
[S]	: Substrat konsantrasyonu
Km	: Michaelis-Menten sabiti
Ki	: Enzim-inhibitör veya enzim-substrat-inhibitör komplekslerinin enzime veya enzim-substrat kompleksine ayrışma sabiti
Vmax	: Maksimum hız
mM	: Milimolar
μ M	: Mikromolar
kDa	: kilo dalton
EU	: Enzim ünite birimi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. β -glukozidaz mekanizması.....	8
Şekil 2.2. Linamarin moleküler formu.....	9
Şekil 2.3. Amigdalin β -glukozid formu	9
Şekil 2.4. β -glukozidazların doğal substratlarından bazıları	10
Şekil 2.5. Enzimin yapay substratlarından bazıları	11
Şekil 2.6. Siyanojenez olayı	13
Şekil 2.7. Vanilin parçalanması.....	14
Şekil 2.8. Glukoserebrosidaz enziminin metabolik yolağı	19
Şekil 2.9. GBA2 ER ve Golgi içerisinde lokalizedir.....	20
Şekil 2.10. GBA2 molekül yapısı.....	21
Şekil 2.11. Sefuroksim sodyum bileşiğinin molekül formu.....	24
Şekil 2.12. Amoksisilin trihidrat bileşiğinin molekül formu.....	25
Şekil 2.13. Potasyum klavulanat bileşiğinin molekül formu.....	25
Şekil 2.14. Sefazolin sodyum bileşiğinin molekül formu.....	26
Şekil 2.15. Gentamisin sülfat bileşiğinin molekül formu.....	27
Şekil 2.16. Seftriakson sodyum bileşiğinin molekül formu.....	27
Şekil 2.17. Ampisilin/sulbaktam bileşiğinin molekül formu.....	28
Şekil 3.1. Hidrofobik etkileşim kromatografisinde kullanılan hidrofobik jel.....	36
Şekil 4.1. Lowry yöntemi ile protein miktarının tayininde kullanılan standart grafik.....	41
Şekil 4.2. Karaciğer GBA2 amonyum sülfat çöktürme aralığının tespitinde kullanılan grafik.....	43
Şekil 4.3. Hidrofobik etkileşim kromatografisi kolonundan karaciğer GBA2'nin saflaştırma grafiği.....	45
Şekil 4.4. Hidrofobik etkileşim kromatografisi sonunda saflaştırılmış karaciğer GBA2.....	47
Şekil 4.5. Sefuroksim sodyum antibiyotiğinin % enzim aktivitesi – ilaç konsantrasyon grafiği.....	48
Şekil 4.6. Gentamisin sülfat antibiyotiğinin % enzim aktivitesi – ilaç konsantrasyonu grafiği.....	50

Şekil 4.7. Sefazolin sodyum antibiyotiğinin % enzim aktivitesi – ilaç konsantrasyon grafiği.....	52
Şekil 4.8. Seftriakson disodyum antibiyotiğinin % enzim aktivitesi – ilaç konsantrasyonu grafiği.....	54
Şekil 4.9. Amoksisilin trihidrat/potasyum klavulanat antibiyotiğinin % enzim aktivitesi – ilaç konsantrasyonu grafiği.....	56
Şekil 4.10. Ampisilin/sulbaktam antibiyotiğinin % enzim aktivitesi – ilaç konsantrasyonu grafiği.....	58
Şekil 4.11 Ampisilin/sulbaktam karaciğer GBA2 aktivitesi üzerine inhibisyon tipinin belirlenmesinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği.....	60
Şekil 4.12. Böbrek GBA2 için amonyum sülfat çöktürme aralığının tespitinde kullanılan grafik.....	65
Şekil 4.13. Hidrofobik etkileşim kromatografisi kolonundan böbrek GBA2'nin saflaştırma grafiği.....	67
Şekil 4.14. Hidrofobik etkileşim kromatografisi sonunda saflaştırılmış böbrek GBA2.....	69
Şekil 4.15. Sefuroksim sodyum antibiyotiğinin % enzim aktivitesi – ilaç konsantrasyonu grafiği.....	70
Şekil 4.16. Gentamisin sülfat antibiyotiğinin % enzim aktivitesi – ilaç konsantrasyon grafiği.....	72
Şekil 4.17. Sefazolin sodyum antibiyotiğinin % enzim aktivitesi ilaç konsantrasyonu grafiği.....	74
Şekil 4.18. Seftriakson disodyum antibiyotiğinin % enzim aktivitesi ilaç konsantrasyonu grafiği.....	76
Şekil 4.19. Amoksisilin trihidrat/potasyum klavulanat antibiyotiğinin % enzim aktivitesi ilaç konsantrasyonu grafiği.....	78
Şekil 4.20. Ampisilin/sulbaktam antibiyotiğinin % enzim aktivitesi ilaç konsantrasyonu grafiği.....	80
Şekil 4.21. Sefuroksim sodyum antibiyotiğinin böbrek GBA2 aktivitesi üzerine inhibisyon tipinin belirlenmesinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği	82
Şekil 4.22. Amoksisilin trihidrat/potasyum klavulanat antibiyotiğinin böbrek GBA2 aktivitesi üzerine inhibisyon tipinin belirlenmesinde kullanılan	

Lineweaver-Burk grafiği.....	85
Œekil 4.23. Sefazolin sodyum antibiyotiğinin böbrek GBA2 aktivitesi üzerine inhibisyon tipinin belirlenmesinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği.....	88
Œekil 4.24. Ampisilin/sulbaktam antibiyotiğinin böbrek GBA2 aktivitesi üzerine inhibisyon tipinin belirlenmesinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği.	91

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1. Antibiyotiklerin etki mekanizmalarına göre sınıflandırılması.....	23
Tablo 3.1. SDS-PAGE de kullanılan jel karışımlarının miktarları.....	32
Tablo 3.2. Antibiyotiklerin substrat tamponu ile hazırlanması.....	38
Tablo 4.1. Karaciğer GBA2 amonyum sülfat çöktürme aralığının belirlenmesinde kullanılan çözelti hacimleri, kullanılan tuz miktarı ve elde edilen değerler.....	42
Tablo 4.2. Karaciğer GBA2 Saflaştırma Tablosu.....	46
Tablo 4.3. Sefuroksim sodyum antibiyotiğinin IC ₅₀ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ile elde edilen sonuçlar.....	49
Tablo 4.4. Gentamisin sülfat konsantrasyon antibiyotiğinin IC ₅₀ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ile elde edilen sonuçlar.....	51
Tablo 4.5. Sefazolin sodyum antibiyotiğinin IC ₅₀ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ile elde edilen sonuçlar.....	53
Tablo 4.6. Seftriakson disodium antibiyotiğinin IC ₅₀ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ile elde edilen sonuçlar.....	55
Tablo 4.7 Amoksisilin trihidrat/potasyum klavulanat antibiyotiğinin IC ₅₀ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ile elde edilen sonuçlar.....	57
Tablo 4.8. Ampisilin/sulbaktam antibiyotiğinin antibiyotiğinin IC ₅₀ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ile elde edilen sonuçlar.....	59
Tablo 4.9. Karaciğer GBA2 enzimi üzerine ampisilin/sulbaktam antibiyotiğinin K _i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin hacimleri ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	61

Tablo 4.10. Karaciğer GBA2 enzimi üzerine ampisilin/sulbaktam antibiyotiğinin K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin hacimleri ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	62
Tablo 4.11. Karaciğer GBA2 aktivitesi üzerine araştırılan antibiyotiklerin etkileri.....	63
Tablo 4.12. Böbrek GBA2 amonyum sülfat çöktürme aralığının belirlenmesinde kullanılan çözelti hacimleri, kullanılan tuz miktarı ve elde edilen değerler.....	64
Tablo 4.13. Böbrek GBA2 Saflaştırma Tablosu.....	68
Tablo 4.14. Sefuroksim sodyum antibiyotiğinin IC_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ile elde edilen sonuçlar.....	71
Tablo 4.15. Gentamisin sülfat antibiyotiğinin IC_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ile elde edilen sonuçlar.....	73
Tablo 4.16. Sefazolin antibiyotiğinin IC_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ile elde edilen sonuçlar.....	75
Tablo 4.17. Seftriakson disodyum antibiyotiğinin IC_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ile elde edilen sonuçlar.....	77
Tablo 4.18. Amoksisilin trihidrat/potasyum klavulanat antibiyotiğinin IC_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ile elde edilen sonuçlar.....	79
Tablo 4.19. Ampisilin/sulbaktam antibiyotiğinin antibiyotiğinin IC_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ile elde edilen sonuçlar.....	81
Tablo 4.20. Böbrek GBA2 enzimi üzerine sefuroksim sodyum antibiyotiğinin	

K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin hacimleri ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	83
Tablo 4.21. Böbrek GBA2 enzimi üzerine sefuroksim sodyum antibiyotiğinin K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin hacimleri ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	84
Tablo 4.22. Böbrek GBA2 enzimi üzerine amoksisilin trihidrat/potasyum klavulanat antibiyotiğinin K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin hacimleri ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	86
Tablo 4.23. Böbrek GBA2 enzimi üzerine amoksisilin trihidrat/potasyum klavulanat antibiyotiğinin K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin hacimleri ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	87
Tablo 4.24. Böbrek GBA2 enzimi üzerine sefazolin sodyum antibiyotiğinin K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin hacimleri ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	89
Tablo 4.25. Böbrek GBA2 enzimi üzerine sefazolin sodyum antibiyotiğinin K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin hacimleri ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	90
Tablo 4.26. Böbrek GBA2 enzimi üzerine ampisilin/sulbaktam antibiyotiğinin K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin hacimleri ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	92
Tablo 4.27. Böbrek GBA2 enzimi üzerine ampisilin/sulbaktam antibiyotiğinin K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin hacimleri ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	93
Tablo 4.28. Böbrek GBA2 aktivitesi üzerine araştırılan antibiyotiklerin etkileri.....	94

1. GİRİŞ

Enzimler, bir kimyasal reaksiyonun hızını artıran ve katalizledikleri reaksiyon sırasında tüketilmeyen protein katalizörlerdir (Champe ve ark., 2007a). Enerji sağlamak için besinlerin yıkılması ve kimyasal yapının engellenmesi, genetik bilgiyi kodlayan DNA ve hücre hareketlerinin devamı için enerji kullanımının tümü, dikkatlice düzenlenen enzim davranışlarıyla mümkündür (Murray ve ark., 2004).

Klinik biyokimya kapsamına giren enzimler, klinik enzimoloji kapsamında değerlendirilebilir. Enzimler, klinik laboratuvar analiz menüsünün oldukça önemli bir kısmını teşkil eder ve çok geniş bir hastalık grubunun tanısında ve tedavilerinin takibinde, bu enzimlerin plazma aktiviteleri çok değerlidir. Özellikle ayırıcı tanıda enzimlerin veya izo-enzimlerin dokulara göre spesifiklik göstermesi önem arz etmektedir. Bu bakımdan, plazma enzimlerinin doku kaynaklarını ve hücredeki lokalizasyonlarını bilmek, doğru yorumlama açısından son derece önemlidir (Bakan, 2015).

Karbohidratlar, doğada en bol bulunan organik moleküllerdir. Karbohidratların çok çeşitli fonksiyonları vardır; canlıların diyetindeki enerji kaynaklarının başlıcası olması, vücutta enerji depose olarak görev yapması, hücreler arası iletişimi sağlayan hücre zarının ögesi olması gibi (Champe ve ark., 2007b). Genellikle basit şekerler (monosakkaridler) veya bunların bir araya gelmesiyle ortaya çıkan oligo- ve polisakkaridler halinde bulunurlar. Glukoz, fruktoz, galaktoz birer monosakkaridtirler. Monosakkaridler, glikozid bağlarıyla birleşerek daha büyük yapıları oluşturabilirler (Altınışik, 2015).

β -glukozidazlar, iki glikon rezidüsü arasındaki ya da glikoz ve bir aril/alkil olan aglikon rezidüleri arasındaki β -glikozidik bağına hidroliz etmektedirler (Henrissat ve Bairoch, 1996). β -glukozidazlara yapısal ve katalitik özelliklerine göre canlılar aleminde (bitki, mantar, memeli, bakteri) hemen her yerde rastlanabilmektedir. Son yıllarda β -glukozidazların biyokimyasal ve moleküler biyoloji anlamında elde edilen verileri, spesifik organizmalar adına önemli bir

gelişme teşkil etmektedir. Bilhassa da biyokütle dönüşümü, siyanogenezis, çoklu-parazit etkileşimi ve Gaucher hastaları adına β -glukozidazların önemi büyüktür (Ketudat Cairns ve Esen, 2010; Esen, 1993).

Memelilerde ağırlıklı olarak karaciğer ve böbreklerde bulunan 3 önemli β -glukozidaz karakterize edilmiştir; lizozomal glukoserobrozidaz, intestinal laktaz-phlorizin hidrolaz (LPH) ve sitozolik β -glukozidaz. LPH, diyetle alınan laktoz ve glukozilseramidi hidrolize eder ve eksikliğinde laktoz intoleransı görülür (Naim, 2001). Glukoserebrozidaz (lizozomal glikozidaz), endojen membran glikolipidlerden glukozilseramidi metabolize eder; eksikliğinde Gaucher hastalığına sebep olur. Karaciğerde yer alan sitozolik β -glikozidazların ksenobiyotik bileşiklerin detoksifikasyonunda görevli olduğu bilinirken böbrek rahatsızlıklarında da idrarla yüksek oranda atılması; ilgili enzimin teşhis belirteci olarak kullanımını sağlamıştır. Devam eden çalışmalarla beraber sitozolik β -glikozidaz için ne metabolik, ne de ilişkili olduğu spesifik bir hastalık tanımlanamamıştır (Esen, 1993). Tüm bu bulguların ışığında, β -glukozidaz enzimlerinin memeliler için ne denli önemli olduğundan bahsetmek mümkündür.

Glukozilseramid (GlcCer), oldukça kompleks olan glikosifingolipitin katabolik yolunda ara (sondan bir evvelki) bir üründür (Esen, 1993). Glukozilseramid, 3 farklı enzim tarafından glukoz ve seramide indirgenir. Bunlar; lizozomal β -glukozidaz (GBA1) ve lizozomal olmayan β -glukozidazlar GBA2 ve GBA-3 (de Graaf ve ark., 2001). Bu 3 protein de yapısal ve dizilim olarak benzerlik göstermezler. Ancak benzer enzimatik aktiviteyi paylaşırlar (Harzer ve ark., 2012).

Karaciğer, sağ hipokondriumda yer alan büyük bir organ olup sağ ve sol iki lobdan meydana gelir; sağ lob daha büyüktür. Metabolizmayı ayarlayıcı olarak görev alır (metabolik şef). Sadece % 10-20 fonksiyon gören bir karaciğer bile yaşamın sürdürülmesi için yeterlidir. Karaciğerin % 60'ını hepatositler (parankim hücreleri), % 30'unu retikülo-endotelial hücreler ve hepatik yıldız hücreleri, % 10'unu bazal membran (sinüzoidler, kan dolaşımı) ve apikal membran (safra kanalcığı) oluşturur. Karaciğerin temel fonksiyonları; sindirim, boşaltım, sentez (amino asit ve plazma protein sentezi, üre sentezi), metabolizma ve biyotransformasyon, çözübilirlik-taşıma-depolama, koruma-detoksifikasyon-inaktivasyondur (Altıntaş, 2015).

Böbrekler, retroperitoneal bölgede bulunan, her biri yaklaşık 120-150 gram ağırlığında olan organlardır. Böbreğin makroskopik incelemesinde; en dışta fibröz bir kapsül, kapsülün altında korteks ve en içte medulla bulunur. Her iki böbrekte yaklaşık 2.000.000 nefron vardır ve her nefron, tek başına idrar yapma yeteneğine sahiptir. Böbreğin temel fonksiyonları; vücut sıvı ve elektrolit dengesinin korunması, metabolic artık ürünlerin atılımı, ilaçlar, toksinler ve metabolitlerinin detoksifikasyonu ve atılımı, ekstrasellüler sıvı hacmi ve kan basıncının hormonal düzenlenmesi, hormon üretimi ve metabolizmasına katkı, peptit hormonların yıkımı, metabolik etki (glukoneogenez, lipid metabolizması) (Klahr, 1988; Akpolat ve Utaş, 2000).

Antibiyotik terimi, tedavide kullanılan kemoterapötik ve antibiyotik niteliğindeki maddeler için genel bir ad olarak kullanılır. Antibiyotikler, bakteriyel enfeksiyon tedavisinde ve önlenmesinde kullanılan ilaçlardır. Antibiyotiklerin etki mekanizmaları; bakteri hücre duvar sentezini inhibe ederek ve otolitik enzimlerini aktive ederek, sitoplazma membran permeabilitesini bozarak, bakteri ribozomlarında protein sentezini inhibe ederek, DNA ve RNA sentezini (nükleik asit sentezini) bozarak ve antimetabolit etki göstermeleridir (Tekin, 2015). Bununla birlikte, yanlış veya gereksiz kullanımları ise organizmaya faydadan çok zarar verir. Bu nedenle, antibiyotiklerin ne zaman kullanılması gerektiğini bilmek çok önemlidir.

Bilinçsiz ve aşırı antibiyotik kullanımı, bakterilerin kullanılan antibiyotiğe karşı direnç kazanmasına neden olabilir. İki çeşit antibiyotik direnç mekanizması sözkonusudur: 1.Biyokimyasal (membran, enzim ve geçirgenlik değişimi), 2. Genetik (kromozomal, plazmidlere ve transpozonlara bağlı direnç.). Antibiyotik direnciyle savaşmak için reçetelerin azaltılması, uygun endikasyonda, uygun doz ve sürede kullanılması, gereksiz kullanımdan kaçınma, direnç konusunda gelişmelerin takip edilmesi, viral enfeksiyonlar ve tıp dışı amaçlarla antibiyotik kullanımını durdurmak gereklidir (WHO, 2015).

Sağlık Bakanlığı'nın 2013 yılında ilk kez gerçekleştirdiği araştırmaya göre; ülkemiz antibiyotik kullanımında 40 Avrupa ülkesi arasında, birinci sırada yer almaktadır. Türkiye'de kişi başına düşen günlük antibiyotik tüketimi 42 birim iken

bu rakam, Hollanda'da sadece 14 birim seviyesindedir. Bir Türk vatandaşı günde, Hollandalı bir kişiden 3 kat fazla antibiyotik tüketmektedir (Ünal, 2015). Sonuç itibariyle ülkemizde ne yazık ki gelişigüzel bir antibiyotik kullanımı söz konusudur.

Bu tez çalışmasının amacı, yaygın olarak kullanılan antibiyotiklerin memeli karaciğer ve böbrek dokularındaki beta-glukozidaz enzim aktivitelerine etkilerini araştırmaktır. Memelilerde bulunan ve biyolojik aktiviteleri ile hastalıklarla ilişkilerine yönelik araştırmaların son yıllarda ivme kazandığı görülen beta-glukozidazlar öncelikle sıçan karaciğer ve böbrek dokularından saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimlere yaygın olarak kullanılan antibiyotiklerin etkileri *in vitro* olarak tespit edilmiştir. Böylece bilinçsiz antibiyotik kullanımının önemli işlevleri olan karaciğer ve böbrek enzimlerine olumsuz etkileri tespit edilmiş olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2. 1. Karbohidratlar

Karbohidratlar, canlılarda bulunan organik moleküllerin üçüncü büyük grubunu oluşturur. C, H ve O elementlerinin $C_n(H_2O)_n$ formülüne göre birleşmesiyle meydana gelir. Polihidroksi-alkollerin veya onların hidroliz ürünlerinin aldehit veya keton türevleridir Suda kolayca çözünürler ve hücreler tarafından yapısal materyaller, taşınabilir enerji, enerjinin depolanabilir şekli olarak kullanılırlar. Karbohidratlar, şekerleri ve polimerleri kapsar. Basit Karbohidratlar, monosakkaridler ya da basit şekerlerdir. Disakkaridler, bir kondenzasyon reaksiyonuyla iki monosakkaridden oluşurlar. Polisakkaridler ise monosakkaridlerin polimerleridir (Altıntaş, 2015).

Karbohidratlar, Karbohidrat olmayan yapılara glikozidik bağlarla bağlanabilirler. Karbohidrat olmayan bu yapılar arasında pürin ve pirimidin, aromatik halkalar, proteinler ve lipidler sayılabilir. Aldozların 1.karbonu ya da ketozların 2.karbonu glikozidik bağa katılır. Bu şekere glukozil kalıntısı (glukozil rezidüsü) denir (Champe ve ark., 2007b).

Şekerler arasındaki glikozid bağ, birleşen karbonların numaraları ve şekerin anomerik hidroksil grubu da dikkate alınarak adlandırılır. Eğer anomerik hidroksil grubu α konfigürasyonunda ise α -bağı, β konfigürasyonundaysa β -bağı denir. Örneğin; laktoz, β -galaktozun 1.karbonu ve glukozun 4.karbonu arasında glikozid bağı oluşmasıyla meydana gelir. Bu bağa $\beta(1-4)$ glikozidik bağ denir (Champe, 2007b).

2.2. β -Glukozidazlar

Karbohidratların sentez ve yıkımında, pek çok enzim görev yapar. Bu enzimlerden birisi de β -glukozidazlardır. İlgili enzimin Karbohidratlardaki $\beta(1-4)$ glikozidik bağlarını hidroliz ederek birçok biyolojik işlevde anahtar rol oynadıkları tespit edilmiştir (Whitaker ve ark., 2002).

β -glukozidazlar, pek çok canlı organizmada birçok biyolojik işlevde görev almaktadır. Bu nedenle β -glukozidaz enzimleri tarım ve ormancılık alanlarında, protein mühendisliğinde, biyoteknolojik çalışmalarda oldukça sık çalışılmaktadır (Kara, 2010).

2.2.1. β -Glukozidaz Enziminin Biyokimyası

2.2.1.1. Adlandırılması

Beta glukozidazlar, Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) tarafından oluşturulan 6 sınıflandırma biriminden hidrolazların bulunduğu 3.sınıfta yer alırlar (EC.3) (Henrissat, 1991).

EC 3. Hidrolazlar

EC 3.2. Glikozid Hidrolazlar (Glikozil bileşiklerini hidroliz edenler)

EC 3.2.1. O- ve S-glikozil bileşiklerini hidroliz edenler

EC 3.2.1.21 β -glukozidazlar (1,4- β -glukozidaz)

EC 3.2.2. N-glikozil bileşiklerini hidroliz edenler

EC 3.2.3. S-glikozil bileşiklerini hidroliz edenler

2.2.1.2. Enzimin Yapısal Özellikleri

Ökaryot, Arkea ve bakterilerde bulunan Glikozid Hidrolaz (GH) Aile 1 enzimleri G-O-X ya da G-S-X tipindeki substratları hidroliz eder. Burada G, β -bağlı glukozil, galaktozil, mannozil, fukozil, 6-fosfoglukozil ya da 6-fosfogalaktozil

rezidüsünü, X ise diğer glikozil rezidüsünü ya da aglikonu temsil eder (Xu, 2004; Kara, 2010).

Literatürde incelenen β -glukozidazların;

1. SDS-PAGE'de 55-65 kDa aralığında oldukları (Esen, 1993),
2. Monomerlerinin peptit uzunluklarınının 447-527 aminoasit aralığında olduğu (Whitaker ve ark., 2002),
3. Enzim pH.4-10 ve sıcaklık 0-4 °C aralığında stabil olduğu, (pH.7'de en yüksek stabilite görülmüştür),
4. Monomerlerinin her birinin yapısında yüksek korunumlu peptit motifleri bulunmaktadır (Sanz-Aparicio, 1998) (SAYQI, YRFSI ve aktif bölgeleri TFNEP, YITENE),
5. 55-60 °C üzerinde geri dönüşümsüz olarak inaktive oldukları, 50-55 °C aralığında ise en yüksek aktiviteyi gösterdikleri bildirilmiştir.

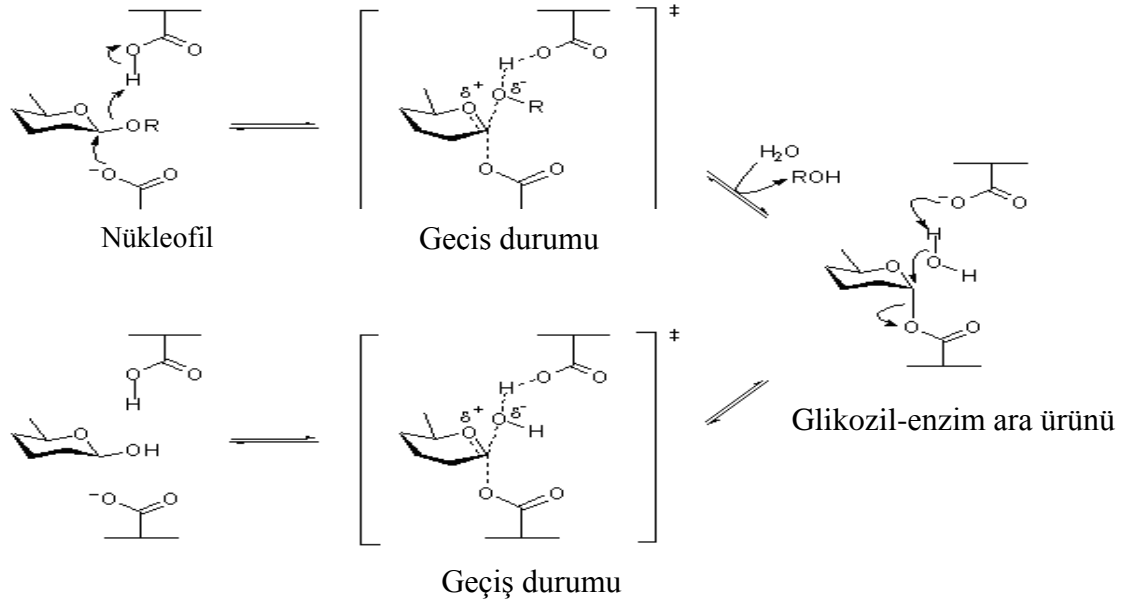
2.2.1.3. Enzimin Katalizleme Mekanizması

β -Glukozidazların sistematik adı β -D-glukozid glukohidrolaz, EC 3.2.1.21 olarak bilinmektedir. Enzim, iki glikon rezidüsü arasındaki ya da glikoz ve bir aril/alkil olan aglikon rezidüleri arasındaki β -glikozidik bağı hidroliz etmektedir (Henrissat ve Bairoch, 1996). Glikozid hidrolizi, iki basamakta meydana gelir;

1.Basamak (Glikozillenme): Ayrılan grubun salıverilmesine yol açar ve karbokasyon gerçekleşir. Son olarak H₂O katılır.

2.Basamak (Deglikozillenme): Ara ürün üzerine nükleofilik atak gerçekleştirilir.

β -glukozidazların katalitik mekanizması, tersinirdir.



Şekil 2.1. β -glukozidaz katalizleme mekanizması (Kara, 2010).

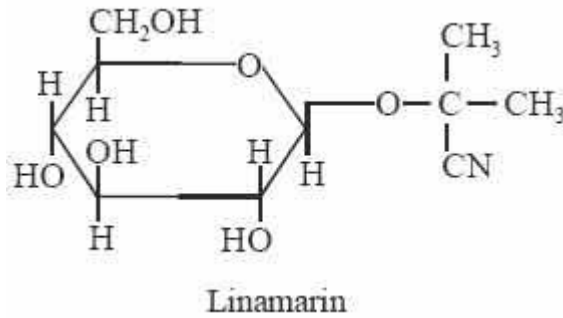
Beta glukozidazlar, homodimerik yapılı enzimlerdir. Her bir zincir, proteinin bir alt birimini oluşturan 438 rezidüden meydana gelmektedir. Her bir alt birim, katalitik alan içerir. Bir glikozidik bağın enzimatik hidrolizi, iki kritik rezidü gerektirmektedir. Bunlar bir proton verici ve bir nükleofilik/baz denebilecek bir proton alıcısıdır (Davies and Henrissat, 1995). Bu gruplardan birisi E (Glu) glutamik asit kalıntısıdır. β -glukozidazlar amino asit dizilerine benzer kinetik, inhibitör, kimyasal modifikasyon ve afinite, mutagenesis gösterirler (Esen, 1993). Asidik amino asitlerden olan aspartat ve glutamat katalizlerini kanıt olarak kullanmışlar. İki asidik rezidü (Asp/Glu) aktif merkezinde hidrolize katılarak orada kovalent bağlı enzim-substrat geçişi oluşturur (Ketudat Cairns ve Esen, 2010). Yani β -glukozidazların korunmuş bölgelerinden biri, korunmuş rezidülerinin ortasında yer almaktadır. İki glutamik asit rezidüsünün aktif bölgeye katılmasıyla hidrolize olur.

Aguilar ve arkadaşları (2008), β -glukozidaz kataliz mekanizmasını anlamak için *Thermotoga maritima*'da ilgili enzimi çalışmışlardır. Her bir β -glukozidazda, iki korunmuş Glutamat (166-351) rezidüsünü ve üçüncü bir rezidü olarak da Asparajini (293) göstermişlerdir. Glutamat rezidüleri ve Aspartat, birbiriyle kapalı ligand bir yapı oluşturmaktadır. Burada enzimin katalitik bölgesi, iki glutamat ve bir asparajinden oluşmaktadır. β -glukozidazlarda, glutamat nükleofilik ara ürün olarak,

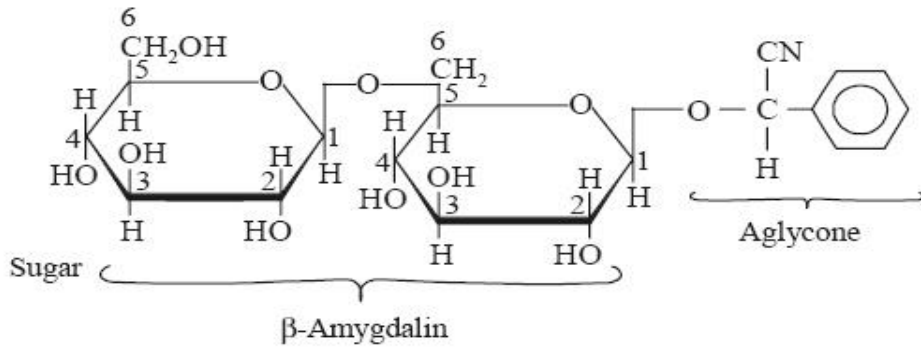
Asp ise ayrılan grubu (glikoz) protone etmesi ve daha sonra da suyun protonasyonu için asit-baz katalizörü olarak yer almaktadır (Aguilar ve ark., 2008).

2.2.1.4. Enzimin Katalizlediği Reaksiyonlar ve Substratları

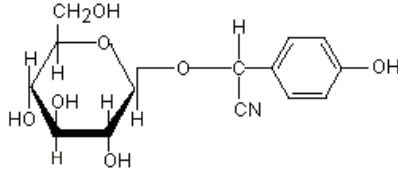
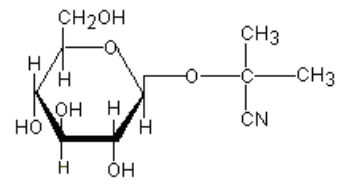
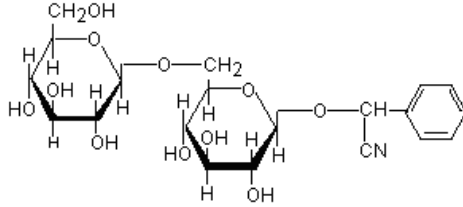
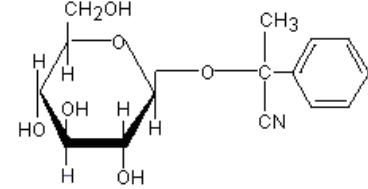
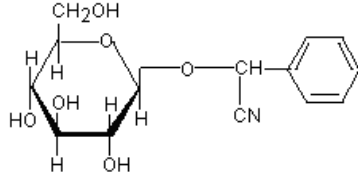
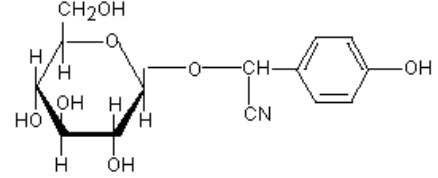
β -glukosidaz substratlarında bulunan sabit monosakkarite bağlı kimyasal grupların çeşitliliği, β -glukosidazların substrat çeşitliliğinin esasını oluşturur. Glikoza bağlanan grup ya disakkaritlerde ve oligosakkaritlerde olduğu gibi farklı bir glikon ya da glikokonjugatlarda olduğu gibi bir aglikondur. Bu aglikon kısım, linamarinde olduğu gibi bir alkil grup veya prunasin, dhurrin ve DIMBOAGlc'da olduğu gibi bir aril grup olabilir.



Şekil 2.2. Linamarin moleküler formu (Banea-Mayambu ve ark., 1997).



Şekil 2.3. Amigdalin β -glukozid formu (Bolarinwa ve ark., 2014).

Dhurrin**Linamarin****Amygdalin****Lotaustralin****Prunasin****Taxiphyllin****Şekil 2.4.** β -glukozidazların doğal substratlarından bazıları (Kara, 2010).

β -glukozidazlar, substrat spesifitesine göre 3 alt sınıfa bölünür (Terra, 1994);

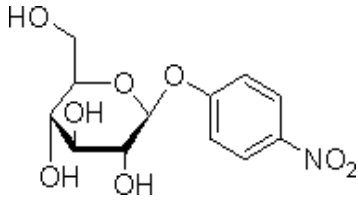
Sınıf 1 Enzimleri glikozil- β -glukozidaz ve aril(alkil)- β -glukozidaz aktivitesi ile sellobiyoz, laktoz, β -p-nitrofenilglikozid, β -p-nitrofenilgalaktozid, β -p-nitrofenilfruktozid ve diğer benzer substratları hidroliz edebilirler.

Sınıf 2 enzimlerinin sadece glikozil- β -glukozidaz aktivitesi olduğu için sellobiyoz ve laktoz gibi substratları hidroliz edebilirler.

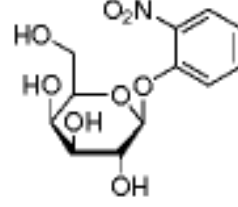
Sınıf 3 enzimleri sadece aril(alkil)- β -glukozidaz aktivitesi olduğu için β -p-nitrofenilglikozid ve benzer substratları hidroliz edebilirler (Acar, 2013).

Enzimin doğal substratları dışında yapay substratları da mevcuttur. Mısır β -glukozidaz izoenzimi Glu1'in, aglikon parçası olarak p- ve o-NP, 4-metilumbelliferil, 6-bromo-2-naftil, indoksil, 5-bromo-4-kloro-3-indolil ve sitokinin içeren bileşikleri hidroliz ettiği görülmüştür (Çiçek ve Esen, 1998).

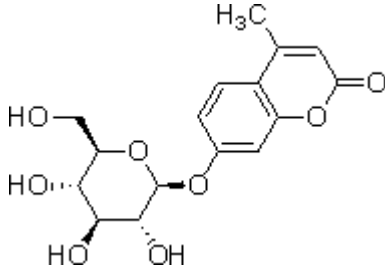
Literatüre bakıldığında; β -glukozidaz enzimleriyle ilgili çalışmalarda, en yaygın olarak *p*NPG substratının kullanıldığı görülmektedir.



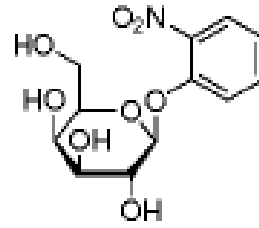
*p*NPG



*o*NPG



4-MUG



*o*NPGal

Şekil 2.5. Enzimin yapıy substratlarından bazıları (Kara, 2010)

2.2.1.5. β -glukozidaz Enziminin Önemi

β -glukozidazlar, tüm canlı organizmalarda birçok biyolojik işlevde rol oynamaktadırlar. Bu nedenle β -glukosidaz enzimleri protein mühendisliğinde, tarım ve ormancılık alanlarında ve biyoteknolojik çalışmalarda oldukça sık çalışılmaktadır. β -glukosidazların bilinen bazı özellikleri;

1. β -glukozidaz, doğrudan selüloz üzerine etki etmemesine rağmen sellobiyoz inhibisyonunda endo-glukanazların ve ekzo-glukanazların etkilerini ortadan kaldırarak selüloz yıkılmasında büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle β -glukosidaz aktivitesi, selüloz parçalanmasında 'oran sınırlayıcı bir faktör' olarak kabul edilmektedir (Li ve ark., 2014). Sellobiyoz degradasyonunu artırdığı bilinmektedir.

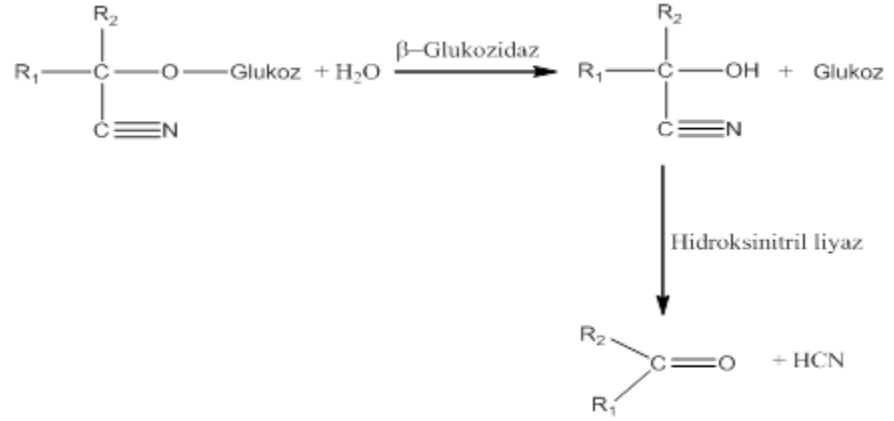
Günümüzde ticari olarak kullanılan selülozik enzimler; *Trichoderma* ve *Aspergillus* mantarlarından elde edilmektedirler (Persson ve ark., 1991).

2. Yeni β -glukozidaz çalışmalarında, enzimin lignin selülozik biyokitleden yüksek maliyetli biyoyakıt üretiminde yüksek verime sahip olduğu gösterilmiştir. Ruminantlar, diyetle aldıkları polisakkaritleri iştembede fermantasyon ve verimli bir mikrobiyal süreçle sindirirler. Buradaki kültürsüz ruminal mikropların % 85'den fazlasının saf kültürden kaçındığı belirtilmiştir. Buradan yola çıkılarak *Miscanthus sinensis*' in metagenomik çalışmalarıyla yeni sellobiyotik enzimlerin keşfi sağlanmıştır (Li ve ark., 2014).

3. Zhou ve arkadaşları, kanser tedavisinde yönelimli enzim/ön-ilaç terapisini geliştirmişlerdir. *In vivo* olarak yapılan çalışmada, manyetik demir-oksit nanotaneçikleriyle tutulan β -glukozidazlar, magnetophoretic (manyetoforetik) hareketlilik yöntemiyle farede deri altında oluşturulan tümör lezyonları üzerine yönlendirilmiştir. Yapılan karakteristik analizde, β -glukozidazların tümör üzerine yüksek afinitesi tespit edilmiştir (Zhou ve ark., 2014).

4. Bitkiler, zararlılara karşı savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir. Bunun için bünyelerinde toksik maddeleri biriktirirler ve ihtiyaç halinde salıverirler. Bu kimyasal maddeler, β -glukozidler ve bazı dikotillerde de β -glukosinolatlardır. β -glukozidik substratlar ve β -glukozidazlar, hücrenin farklı alt yapılarında ya da doku bölümlerinde stoklanır. Patojen veya herbivorların bitki dokularına gelmesiyle hücrede oluşan zarar sonucu substrat ile enzim karşılaşır. Bu esnada substratların hidrolizi başlar ve hidroliz sonucu açığa çıkan aglikonlar ya da diğer parçalanma ürünleri, toksik etki yaratır (Thayer ve Conn, 1981).

5. β -glukozidazlar, endojen siyanojenik glikozidlerdeki β -glukozidik bağın hidrolizi ile aglikan ve siyanohidrinlerin oluşumunu katalizlemektedirler (Geiger, 1999). Doğada siyanohidrinler, siyanojenik glikozidlerin aglikan kısmı olarak bulunurlar. Bu bileşikler, HCN kaynağı olarak görev alırlar ve ayrıca azot transport metabolizmasında rol oynarlar. Bu olayın tümü 'siyanojenez' olarak bilinmektedir (Ergöçen, 2013).

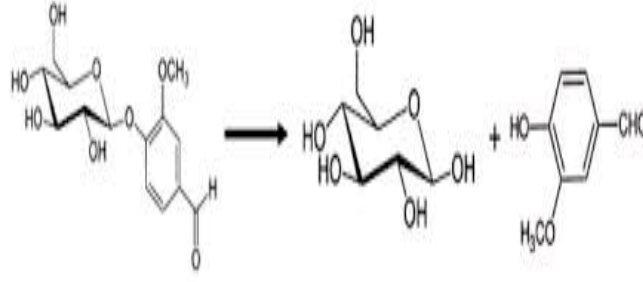


Şekil 2.6. Siyanojenez olayı (Ergöçen, 2013).

Siyanojenezde oluşan HCN herbivoral ve fungal ataklar sonucu oluşan doku yaralanmalarında bitkiyi koruduğu, L-asparajinin biyosentezinde azot kaynağı olarak kullanıldığı bildirilmektedir (Hayano, 1977).

6. Bitkilerde tat ve lezzet oluşumunda etkili birkaç yüz β -glukozidik ürün teşhis edilmiştir. Bu moleküllerin aglikon parçalarının, besin kalitesi ve üretimi üzerine etkili olduğu belirtilmiştir. Bu yüzden, β -glukozidazların transgenik bitki üretiminde genetik mühendisliği açısından oldukça önemli oldukları düşünülmektedir (Kara, 2010).

Vanilya bitkisinde bulunan bir β -glukozidaz enziminin vanilin- β -glukozid (glukovanilin) olarak bilinen aroma öncüllerinin hidrolizinden sorumlu olduğu ve vanilya aromasının bu substratın hidroliziyle açığa çıkan ürünlerle ilgili olduğu bildirilmiştir (Odoux ve ark., 2003).



Şekil 2.7. Vanilin parçalanması (Converti, 2010).

7. Karaciğerde yer alan sitozolik β -glikozidazların, ksenobiyotik bileşiklerin detoksifikasyonunda görevli olduğu bilinmektedir (Bautler, 1992). Sitozolik β -glikozidazın endojen substratların hidrolizinde yetersiz olması, 'enzimin vücuda dışarıdan alınan ksenobiyotik glikozidlerin detoksifikasyonunu içerir.' hipotezini ortaya çıkarmıştır. Eğer vücuda alınan bu (ksenobiyotik), doğal olarak oluşan glikozidler bozulmadan bağırsaktan emilir ve karaciğere taşınırsa, sitozolik β -glikozidaz ile etkileşebilir (Hays ve ark., 1998). Bu durumda enzim, bileşiğin glikozid bağlarını koparır ve yüklü hale geçen maddelerin suda çözünürlüğünü artırarak vücuttan uzaklaştırılmasını sağlar.

8. Sitozolik β -glikozidazlar, üriner biyobelirteçler arasında yer almaktadırlar (Köse ve Maden, 2015).

9. Asit glukoserebrozidazın eksik aktivite göstermesi, Gaucher hastalığına sebep olmaktadır. Gaucher hastalığının, nörolojik tutulum olup olmaması ve nörolojik hastalığa ilerleme durumuna göre 3 alt tipi bulunmaktadır. Tip-1 erişkin formu olup, nörolojik tutulum görülmez. Tip-2 infantil veya akut nöronopatik tip, Tip-3 juvenil subakut nöronopatik tipidir. Otozomal resesif pan-etnik bir hastalıktır. Fakat Tip-1 en çok Ashkenazi Jewish (Yahudi) popülasyonunda ortaya çıkmıştır. Gaucher hastalığı, en yaygın lizozomal depo rahatsızlıkları arasındadır (Khann ve ark., 2010, Grabowski ve ark., 1990).

2.3. Memeli β -Glukozidazları

Memelilerde ağırlıklı olarak karaciğer ve böbreklerde bulunan β -glukozidazlar; (Hays ve ark., 1996; Day ve ark., 1998; Yıldız ve ark., 2006)

- Lizozomal β -glukozidaz (GBA1, asit β -glukozidaz/glukoserebrosidaz)
- Non-lizozomal β -glukozidaz (GBA2)
- Sitozolik β -glukozidaz (GBA3)
- İntestinal Laktaz-phlorizin Hidrolaz (LPH)

LPH ve lizozomal glukoserebrosidazın metabolik rolleri ve eksikliklerinde ortaya çıkan spesifik hastalıklar bilinmektedir. LPH, diyetle alınan laktoz ve glukozilseramidi hidrolize eder ve eksikliğinde laktaz intoleransı görülür (Semenza ve Auricchio, 1989) Glukoserebrosidaz (lizozomal glikozidaz), endojen membran glikolipitlerden glukozilseramidası metabolize eder, eksikliği Gaucher hastalığına sebep olur (Grabowski ve ark., 2010). Sitozolik beta glikozidaz için ne metabolik ne de ilişkili olduğu spesifik bir hastalık tanımlanmamıştır (Esen, 1993).

2.3.1. Sitozolik β -Glukozidaz (GBA3)

GBA-3, Klotho ilişkili sitozolik bir proteindir. Bu aile β -glukozidaza benzer domain gösterir. Ancak diğer fizyolojik fonksiyonları bilinmemektedir.

Sitozolik β -glikozidaz; memeli karaciğerinde, dalakta, böbreklerde, az miktarda bağırsakta ve lenfositlerin sitozölü içerisinde yer alır (Graaf ve ark., 2001). Moleküler kütlesi yaklaşık olarak 53 kDa, optimum pH 5,5-6.0 ve glikolize değildir (Daniels ve ark., 1981). Çok düşük konsantrasyonda sodyum taurocholate tarafından inhibe edilir (Legler ve Liedtke, 1988). Lizozomal β -glikozidazın aksine sitozolik β -glikozidaz conduritol B-epoxide tarafından inhibe edilmez (McMahon ve ark., 1998). 4-methyl-umbelliferone (4-MUG ve 4-MuGal) ve p-nitrophenol'ün β -D glukozid ve β -D galaktozid türevleri için yüksek afinite sergiler (Yaqoob, 1980; Daniels ve ark., 1981).

2.3.1.1. Sitozolik β -Glukozidaz Mekanizması

Birkaç araştırmacı, sitozolik β -glukozidaz tarafından aril glikozitlerin hidrolizinin temel mekanizmasını formüle etmişlerdir. Memelilerde sitozolik β -glukozidazın β -D glukozidlerin hidrolizi mekanizması nükleofilik yerdeğıştirme ile anomerik konfigürasyonunun tutulması olarak tanımlanmıştır. Bu mekanizma, tüm memeli β -glukozidazları için analogtur.

Reaksiyon mekanizmasına göre; bir proton vericisi, ilk olarak glikozitte anomerik konfigürasyonu protonlayarak aglikon yarımının salınmasını kolaylaştırır. Bu esnada, bir oxokarbonium üretilir ve nükleofil tarafından nötrale edilene kadar enzimin aktif bölgesinde negatif yüklü residü tarafından stabilize edilir. C atomunun glikozil oxokarbonium iyonu sp^2 formundadır ve karbokasyonun yarım halka ya da zikzaklı daire formunda olması önerilir. Enzimle etkileşimden sonra glikozil oxokarbonium iyonu merkezde yer alır. Stereskobik solvolize izin verir, çözünmenin (çözücü H_2O/ROH) son basamağıdır. Böylece β -D-glukozidaz ürünü oluşumu sağlanır. Glukozil karbokasyonun stereospesifik nükleofilik hareketi hidroliz ya da transglukolizasyon olarak tanımlanmıştır (Esen, 1993).

2.3.1.2. Enzimin Önemi

- Flavonid glikozidler pişirildiklerinde fermentasyon ve otolizis ile aglikonun salınmasına rağmen çoğunlukla parçalanmazlar. Son yıllara dek flavonoidlerin kalın bağırsağı gelene kadar β -glukozid bağlarının hidrolizinin gerçekleşmediğı düşünülürdü. Ancak memeli ince bağırsağında bulunan sitozolik β -glukozidaz ile yapılan çalışmalarda, enzimin flavonoidlerin soğan zarlarının β -glikozidlerinin yıkımını katalizlediğı gözlenmiştir (Day ve ark., 1998).
- Sitozolik β -glukozidaz, piridoksin 5P-L-glukozidin piridoksine hidrolizini katalizler ve bu da vitamin B₆'nın baskın aktif formudur (Esen, 1993)
- LaMarco ve Glew (1986), domuz sitozolik β -glukozidaz enziminin, bir bitki fenolik glukozid (L-picein) üzerine hidroliz etkisini belirtmişler. Daha

sonraki çalışmalarda da insanda ve hayvanlarda diyetle alınan diğer bitkisel glikozidleri üzerine sitozolik β -glukozidazın hidroliz etkisi gösterilmiştir (Gopalan ve ark., 1992). Bu bilgiler, memelilerde yenilen siyanojenik bitkisel glikozidlerin daha sonra siyanid zehirlenmesi yapabileceğini belgelemiştir. Sitozolik β -glukozidaz, fenolik glikozidlerin ya da siyanojenik glikozidlerin hidrolizini katalizler (domuz sitozolik karaciğerinde siyanojenik bileşiklerden D-amigdalın, fenolik bileşiklerden arbutin, salisin üzerinde test edilmiştir). Pirimidin glikozid, vicine toksiktir ve favizme (bakla zehirlenmesi) bağlı hemolitik anemiye neden olur. Sitozolik β -glukozidaz bu toksik maddenin hidrolizinde yardımcı olarak vücuttan uzaklaşmasını sağlar (LaMarco ve Glew, 1986).

- Sitozolik β -glukozidazın endojen substratların hidrolizinde yetersiz olması, 'enzimin vücuda dışarıdan alınan ksenobiyotik glikozitlerin detoksifikasyonunu içerir' hipotezini ortaya çıkarmıştır. Eğer vücuda alınan bu (ksenobiyotik) doğal olarak oluşan glikozidler, bozulmadan bağırsaktan emilir ve karaciğere taşınırsa, sitozolik β -glukozidaz ile etkileşebilir (Hays, 1998). Bu durumda enzim, bileşiğin glikozid bağlarını koparır ve yüklü hale geçen maddelerin suda çözünürlüğünü artırarak vücuttan uzaklaştırılmasını sağlar.
- Sitozolik β -glukozidazlar, üriner biyobelirteçler arasında yer almaktadırlar (Köse ve Maden, 2015). Böbrek rahatsızlığı olan model hayvanlarda yapılan çalışmalarda; proteinüri ortaya çıkmadan önce idrarda sitozolik β -glukozidaz seviyesinin yüksek oranda olduğu tespit edilmiştir (Dance, 1970). Daha sonra enzimin idrarda yüksek oranda atılımı, böbrek nakillerinde doku uyumsuzluğuna karşı uyarıcı ve böbrek hasarlarının belirlenmesi için teşhis edici bir belirteç olarak kullanılabileceğini göstermiştir (Wellwood, 1973). Bu buluş, sitozolik β -glukozidazın karakterize edilmesinde ilk ivmeyi oluşturmuştur.

2.3.2. Lizozomal β -Glukozidaz (GBA1)

Asit β -glukozidaz (E.C.3.2.1.45; N-açil-sifingosil- β -D-glukopiranozidaz: glukohidrolaz), memeli lizozomal β -glukozidaz enzimi membran-bağlantılı lizozomal bir enzimdir (McCarter ve ark., 1994).

Glukosfingolipid metabolizmasında kritik bir öneme sahiptir (Grabowski ve ark., 1990). GlcCer parçalanması, ilk olarak lizozomal yol ile başlar. GlcCer, endozomal yol ile lizozomlara ulaşır ve lizozomal β -glukozidaz (GBA1) tarafından parçalanır (Matern ve ark., 1997). Glukoseramidin β -glikozidik bağlarını parçalar. Oluşan β -glukoz ve seramid ürünleri, asit seramidaz tarafından sfingosine ve yağ asidine indirgenir (Esen, 1993). β -glikozidler, bu enzimin hem doğal, hem de sentetik substratlarıdır. Asit β -glukozidaz için doğal substrat acylsphingosyl-1-O- β -D-glukoziddir. Bu bileşik glukozilseramid, seramid β -glukozid, glukoserebrosit isimleriyle de bilinmektedir. Bu yüzden lizozomal β -glukozidaz glukosilseramidaz, seramid β -glukozidaz, glukoserebrosidaz ve asit β -glukozidaz olarak da adlandırılmaktadır. Sistemik adı E.C.3.2.1.45; N-acyl-sphingosyl- β -glucopyranoside; glucohydrolase. Asidik pH'da optimum aktivite gösterir (Carter ve Fujino, 1956, Grabowski ve ark., 2010).

Asit glukoserebrosidaz'ın eksik aktivite göstermesi, Gaucher hastalığına sebep olmaktadır. Gaucher hastalığının nörolojik tutulum olup olmaması ve nörolojik hastalığa ilerleme durumuna göre 3 alt tipi bulunmaktadır. Tip -1 erişkin formu olup, nörolojik tutulum görülmez. Tip-2 infantil veya akut nöronopatik tip, Tip-3 juvenil subakut nöronopatik tipidir. Otozomal resesif pan-etnik bir hastalıktır. Fakat tip-1 en çok Ashkenazi Jewish popülasyonunda ortaya çıkmıştır. En yaygın lizozomal depo hastalıkları arasındadır (Khann ve ark., 2010).

2.3.2.1. Substratları

Enzim için doğal substratlar; N-açıl-sifingosil-1-O- β -D glukositleri, glukozilseramid, Açıl yağ asitleri ve dokularda kısmi sfingosil bağımlı kaynaklardır (Grabowski, 1990). Bunlara ek olarak Gaucher Hastalarının dokularından tanımlanmış küçük bir ürün; glukozilseramidin açillendirilmemiş analogu; β -glukozilsfingosil de belirlenmiştir. 18-22 C uzunluğundaki sfingosil substratlarından en çok kullanılanı ve en bol olanı 18 C'lu sfingosindir (Grabowski ve ark., 2010).

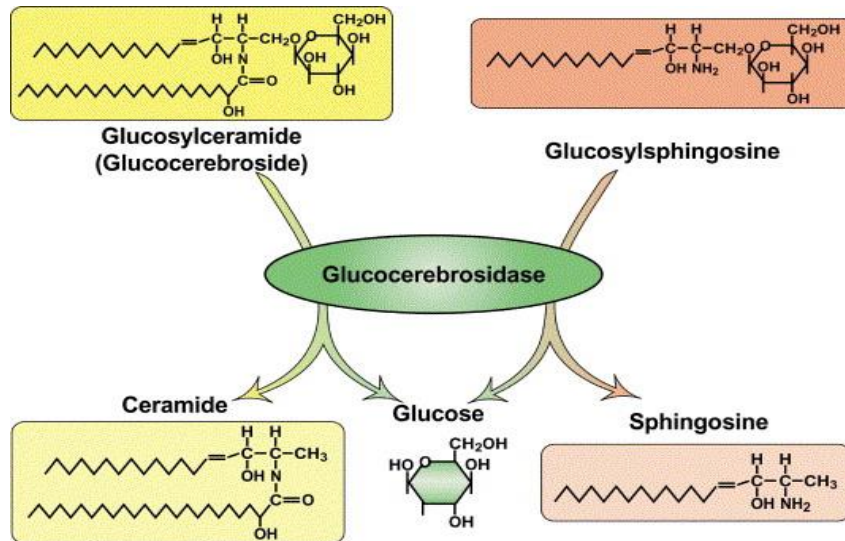
Sentetik substrat 4 metilumbelliferil- β -D glukopiranosit asit β glukozidaz için mükemmel bir substrattır. Kolay temin edilebilirlik, uygun fiyat ve kullanım

kolaylığı gibi avantajları vardır. Diğer doğal substratlardan 4MU-Glc'nin sayısız deterjan, fosfolipid ve yağ asit kombinasyonlarında, ham doku ekstratlarında ve saf enzim preparatlarında görünen Km değeri 1,5-4 mM arasında glukozilseramiden yaklaşık 100 kat daha fazladır (Legler, 1985; Grabowski ve ark., 1990).

Glukozilseramidazlar, sulu ortamlarda çözünmezler; lipidel ortama ihtiyaç duyarlar. Sentetik substrat olarak 4MU_Glc geniş bir kullanım alanına sahiptir. Fakat sulu ortamlarda dağılımı sınırlıdır. Bu yüzden, asit β -glukozidazın analizleri, heterojen dağılım içerisinde yürütülmektedir. Enzimin bazı fiziksel kompozisyonları, aktivitesini ve fiziki durumunu etkileyebilir (Nilson ve ark., 1985). Bu sınırlamalara rağmen çeşitli laboratuvar analizlerinden elde edilen sonuçlara göre; yönetici miseller ve parça miseller; polioksietilen eter (Triton X-100), safra asitleri (sodyum taurocholate), yağ asitleri (oleik asit), negatif yüklü fosfolipid/glikosfingolipidlerde çözünebilmektedir (Esen, 1993).

2.3.2.2. Enzimolojisi

Glukozilseramid, oldukça kompleks olan glikosifingolipitin katabolik yolunda ara (sondan bir evvelki ürün) ürünüdür. Asit β -glukozidaz tarafından glikozidik bağın yıkılması ile β -glukoz ve seramid ürünleri oluşur. Reaksiyonun son basamağında ise sfingosin ve yağ asiti oluşmaktadır (Esen, 1993).

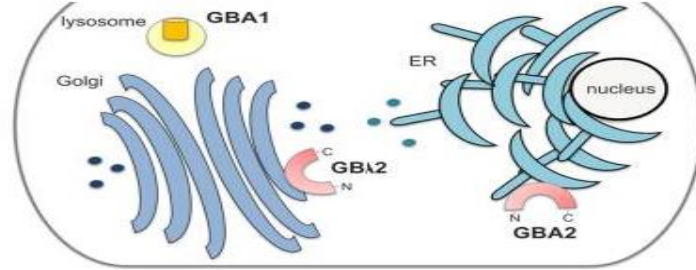


Şekil 2.8. Glukoserebrosidaz enziminin metabolik yolağı (Ayyıldız, 2009).

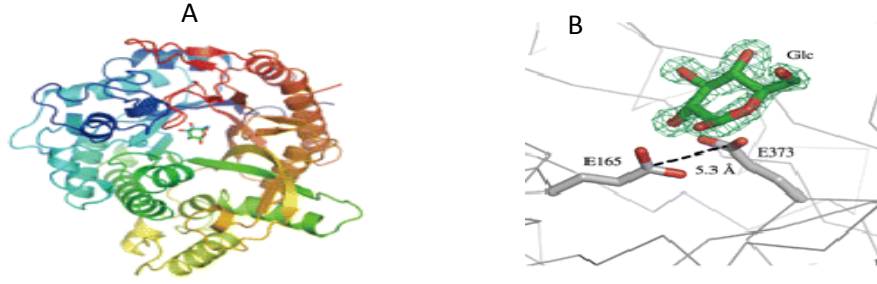
2.3.3. Non-Lizozomal β -glukozidaz (GBA2)

Lizozomal olmayan β -glukozidazlar (GBA2, GBA3), ilk olarak 1993 yılında tanımlanmasına rağmen, mekanizmaları ve fonksiyonları tam olarak anlaşılamamıştır.

Lizozomal olmayan beta glukozidaz GBA2, uzun bir N terminali içeren glukozidaz domainini takiben kısa bir C terminali ve bir transmembran domaininden oluşan tek geçişli bir transmembran proteindir (Boot ve ark., 2007). Safra asit glukozitlerinin hem yapımında, hem de hidrolizinde aktiftirler. Bu nedenle, safra asit β -glukozidazları olarak da bilinmektedirler. GBA2, lizozomdan ziyade endoplazmik retikulum ve golginin sitozolik yüzeyinde lokalizedir. İntegral membran proteini değildir. Hücre membranlarıyla zayıf bağlıdır. En çok testis, beyin ve karaciğer dokularında rastlanmıştır. GBA2 eksikliği görülen farelerde, ilgili dokularda GlcCer birikimi görülmüştür. GlcCer birikimi, başlıca iki sonucu vardır; erkek doğurganlığı, anormal sperm oluşumuna bağlı olarak bozulur ve parsiyel hepatektomi sonrası karaciğer rejenerasyonu gecikir. Bununla birlikte GlcCer sinyalizasyon işlevi, tam olarak anlaşılamamıştır. Çünkü bu fenotiplere sahip hastalar tanımlanamamıştır (Gonzalez-Carmona ve ark., 2012; Yıldız ve ark., 2006).



Şekil 2.9. GBA2, ER ve Golgi içerisinde lokalizedir (Körschen ve ark., 2013).



Şekil 2.10. A: Memeli GBA2 molekül yapısı. **B:** GBA2 molekül konformasyonu ve katalitik glutamat residüleri (Glu ¹⁶⁵; asit-baz kataliti ve Glu ³⁷³; nükleofil) (Hayashi ve ark., 2007).

2.4. Antibiyotikler

Antibiyotik çağı, 1928’de Sir Alexander Fleming’in penisilini bulması ile başlamıştır. *Penicillium notatum*’un etrafında *S.aureus* kolonilerinin bulunmadığını farketmiş ve bakterileri öldüren bu maddeye penisilin adını vermiştir. Antibiyotik, bakterileri inhibe eden veya öldüren, doğal olarak bulunan maddedir (Tekin, 2015).

Antibiyotikler, ilgili organizmalar üzerine (GATA, 2000);

1. Bakteri hücre duvarı sentezini inhibe ederek ve otolitik enzimlerini aktive ederek
2. Sitoplazma membran permeabilitesini bozarak
3. Bakteri ribozomlarında protein sentezini inhibe ederek
4. DNA ve RNA sentezini (nükleik asit sentezini) bozarak
5. Antimetabolit etki gösterirler.

Antibiyotik ve kemoterapötikleri çeşitli kriterlere göre sınıflandırmak mümkündür; (Tekin, 2015).

- Hedef hücreye etkilerine göre
- Etki mekanizmalarına göre
- Etki gösterdiği mikroorganizma grubuna göre

- Etki spektrumuna göre
- İmmun-modölatör etkilerine göre

Ancak bugün en fazla kullanılan sınıflandırma, bu ilaçların etki mekanizmalarına ve etki güçlerine göre yapılanlarıdır (Akkan, 1997).

Antibiyotiklerin Etki Güçlerine Göre Sınıflandırılmaları (Erdoğan, 2015);

1. Bakterisidler (bakterileri öldürenler): Penisilinler, sefalosporinler, aminoglikozidler, vankomisin, rifampisin, florokinolonlar, polimiksinler, teikoplanin.
2. Bakteriyostatikler (bakterilerin üremelerini engelleyenler): Tetrasiklinler, kloramfenikol, sülfonamidler, eritromisin, klindamisin, mikonazol, etambutol.

Antibiyotikler, etki mekanizmalarına göre 5 gruba ayrılırlar (Akkan, 1997);

Tablo 2.1. Antibiyotiklerin etki mekanizmalarına göre sınıflandırılması.

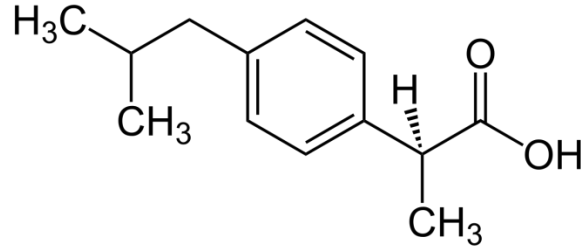
Bakteri hücre duvar sentezini bozan ve litik enzimleri aktive edenler	Sitoplazma membran permeabilitesini bozanlar	Ribozomlarda protein sentezini bozanlar	Bakteri genetik materyali üzerine etki yapanlar (DNA ve RNA sentezini bozanlar)	Bakteriyel antimetabolitler
1. β -Laktamlar Penisilinler Sefalosporinler Monobaktamlar Karbapenemler	■ Polimiksinler	■ Tetrasiklinler	■ Florokinolonlar	■ Sülfonamidler
2. Sikloserin	■ Gramisidin	■ Aminoglikozidler	■ Rifamisinler	■ Sülfonlar
3. Ristosetin	■ Nistatin	■ Makrolidler	■ Nalidiksik asit	■ PAS (Para Amino Salisilik asit)
4. Basitrasin	■ Amfoterisin B	■ Amfenikoller	■ Metronidazol	■ İzoniazid (INH)
5. Teikoplanin	■ Kandisein	■ Linkozamidler	■ Bleomisin	■ Etambutol
6. Vankomisin	■ Ketokonazol ve diğer antifungal imidazoller	■ Fusidik asid	■ Asiklovir	■ Trimetoprim
	■ Flukonazol ve diğer antifungal trizoller ■ Hekzaklorofen ■ Katyonik deterjanlar		■ Doksorubisin ■ Daunorubisin ■ Aktinomisinler ■ Mitomisinler	

2.4.1. Çalışmada Kullanılan Antibiyotikler

2.4.1.1. Sefuroksim sodyum

Sefuroksim; çoğu β -laktamazlara dayanıklı, semisentetik, geniş spektrumlu, parenteral yoldan kullanılabilen, ikinci kuşak sefalosporin grubundan bir antibiyotiktir. Birçok Gram-negatif ve Gram-pozitif mikroorganizmaya karşı *in vitro* bakterisid etkinliğe sahiptir. Bakteriyel β -laktamazlara karşı iyi bir stabilite gösterir ve sonuç olarak ampisilin ve amoksisiline dirençli suşların çoğuna etkilidir. Sefuroksimin bakterisid aktivitesi, mikroorganizmaların hücre duvarı sentezini inhibe etmesine bağlıdır (Nobel İlaç Sanayii, 2015).

Sefuroksim plazma proteinlerine %50 oranında bağlanır. Birlikte kullanılan probenesid sefuroksim'in tübüler sekresyonunu yavaşlatır, buna bağlı olarak plazma doruk konsantrasyonu ve yarılanma ömrü %30 oranında artar. Sekiz saat içinde, verilen dozun yaklaşık % 89'u değişmemiş ilaç halinde, idrarda yüksek konsantrasyon oluşturarak böbrekler yoluyla atılır (Nobel İlaç Sanayii, 2015).



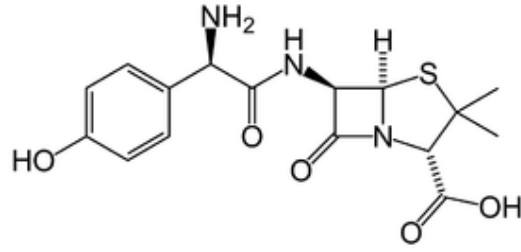
Şekil 2.11. Sefuroksim sodyum bileşiğinin molekül formu (Nemutlu ve Kır, 2009)

2.4.1.2. Amoksisilin trihidrat/potasyum klavulanat

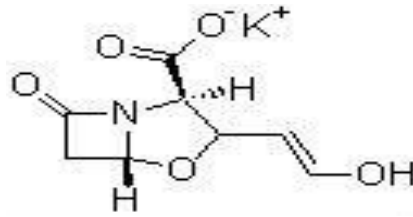
Amoksisilin/klavulanik asit (ko-amoksiklav), yarı sentetik bir antibiyotik olan amoksisilin ile bir β -laktamaz inhibitörü olan potasyum klavulanatın oluşturduğu oral bir antibakteriyel kombinasyonudur. Amoksisilin, özellikleri iyi bilinen bir oral penisilindir. Klavulanik asit, *Streptomyces clavuligerus*'un fermentasyonu ile elde

edilir ve yapısal olarak penisilinlere benzeyen bir β -laktamdır. Klavulanik asit, β -laktamaz enzimlerini, aktif kısımlarını bloke etmek suretiyle inaktif hale çevirme özelliğine sahiptir. Klavulanatın bu özelliği, diğer β -laktam antibiyotiklere dirençli olan bakteri türlerini de amoksisilinin etki spektrumu içine sokar (İE Ulagay İlaç Sanayii, 2015a).

Kombinasyonun oral uygulanmasından sonra, amoksisilinin yarı ömrü 1.3 saat iken klavulanik asidinki 1 saattir. Bu süre, yenidoğanlarda ve yaşlılarda ve özellikle de böbrek yetmezliği olan hastalarda artabilir. Her iki bileşen için alınan oral dozun % 60 kadarı, 6 saat içinde değişmemiş olarak idrarla atılır. Her iki bileşen de dokulara ve vücut sıvılarına (beyin ve omurilik sıvısı hariç) yaygın dağılım göstermektedir (İE Ulagay İlaç Sanayii, 2015a).



Şekil 2.12. Amoksisilin trihidrat bileşiğinin molekül formu (Nemutlu ve Kır, 2009)



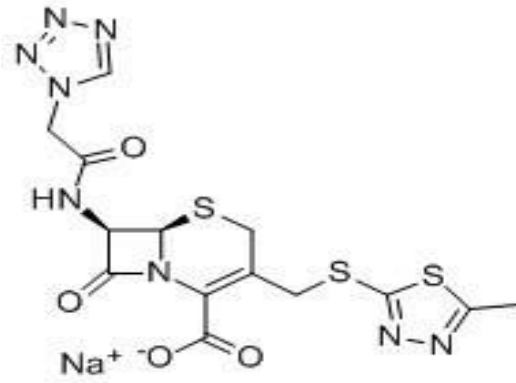
Şekil 2.13. Potasyum klavulanat bileşiğinin molekül formu (Nemutlu ve Kır, 2009)

2.4.1.3. Sefazolin sodyum

Antibakteriyel etkilidir. Duyarlı patojenlerin neden olduğu septisemi, bakteriyel endokardit, kolanjit, kolesistit, peritonit, lenfanjit, lenfadenit, piyelonefrit, piyelit, sistit, üretrit, osteomyelit, artrit, hordeolum, panoftalmi gibi solunum yolu, deri ve yumuşak doku jinekolojik enfeksiyonlarının tedavisinde endikedir. Sefazolin

sodyum, bakteri hücre duvarı sentezini inhibe ederek öldürücü etki gösteren bir sefalosporindir (Ommaty, 2005).

Sefazolin sodyum, enjeksiyondan sonra kanda hızla yüksek konsantrasyonlara ulaşır. Böbrek, karaciğer ve akciğer dokularına kolaylıkla geçer. Sefazolin sodyum, intramüsküler uygulandıktan 1 saat sonra serumda maksimum konsantrasyona ulaşır ve bu düzey, en etkili olduğu andır. Sefazolin sodyumun serum yarılanma ömrü, intramüsküler uygulamada yaklaşık 2 saattir. Sefazolin sodyumun % 90'dan fazlası, idrarda değişmeden dışarı atılır (Ommaty, 2005).

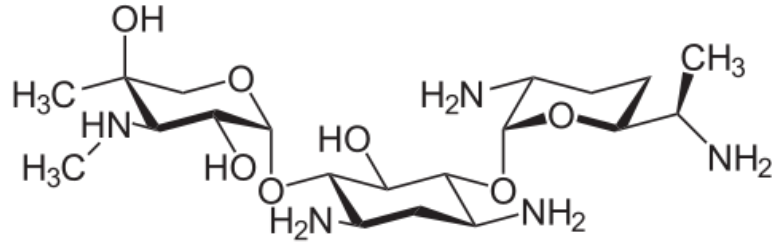


Şekil 2.14. Sefazolin sodyum bileşiğinin molekül formu (Nemutlu ve Kır, 2009)

2.4.1.4. Gentamisin sülfat

Antibakteriyel etkilidir. Duyarlı mikroorganizmaların yol açtığı idrar yolları, solunum yolları, merkezi sinir sistemi, gastrointestinal kanal, kemik ve yumuşak doku enfeksiyonları ile septisemi, gonore, enfekte yara, peritonit, septik abortus, septik komplike yanıklarda endikedir (Ommaty, 2005).

Gentamisin, intramüsküler yolla verilmesinden sonra kısa sürede (30-60 dakika), en yüksek plazma konsantrasyonlarına ulaşır. Böbrek fonksiyonu normal kişilerde, gentamisin yarı ömrü, 2 saatten biraz fazladır.

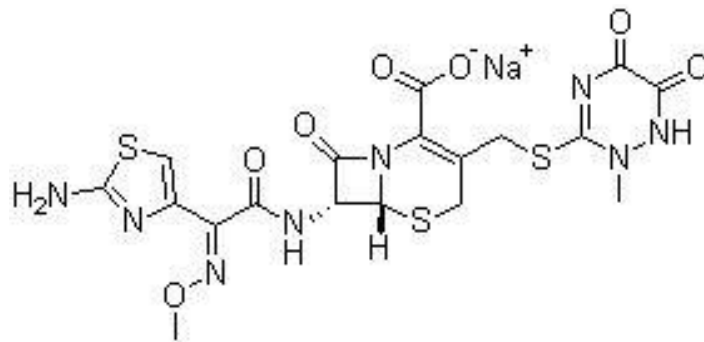


Şekil 2.15. Gentamisin sülfat bileşiğinin molekül formu (Carr, 2015).

2.4.1.5. Seftriakson disodyum

Seftriakson, parenteral olarak uygulanabilen semi-sentetik, geniş spektrumlu sefalosporin grubu bir antibakteriyeldir. Duyarlı bakterilerin duvar sentezini inhibe ederek bakterisid etki gösterir. Seftriakson, penisilinaz ve sefalosporinaz gibi betalaktamaz enzimlerine karşı ileri derecede dirençlidir (Eczacıbaşı İlaç Sanayii, 2015).

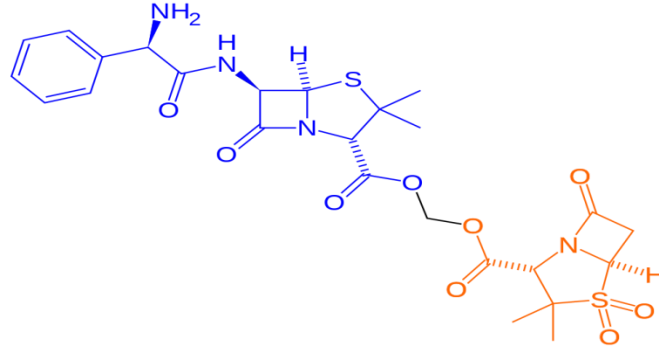
Seftriakson, sistematik olarak metabolize edilmez, fakat bağırsak florası tarafından inaktif metabolitlere dönüştürülür. Yetişkinlerde eliminasyon yarı ömrü, yaklaşık 8 saattir. Eliminasyon: Total plazma klirensi 10-22 ml/dakikadır. Renal klirens 5-12 ml/dakikadır. Seftriaksonun % 50-60'ı, değişmemiş olarak idrarla, % 40-50'si ise değişmemiş olarak safrayla atılır (Eczacıbaşı İlaç Sanayii, 2015).



Şekil 2.16 . Seftriakson sodyum bileşiğinin molekül formu (Nemutlu ve Kır, 2009).

2.4.1.6. Ampisilin/Sulbaktam

Ampisilin, birçok Gram pozitif ve Gram negatif aerob ve anaerob bakterilere karşı geniş spektrumlu bir bakterisid aktiviteye sahiptir. Ancak ampisilin, β -laktamazlar tarafından parçalandığından, aktivite spektrumu bu enzimleri üreten organizmaları kapsamamaktadır. Penisilinlere ve sefalosporinlere dirençli mikroorganizmalar tarafından üretilen β -laktamazların sulbaktam tarafından irreversibl olarak inhibe edildiği biyokimyasal çalışmalarla kanıtlanmıştır. Her ne kadar sulbaktam, *Neisseriaceae* dışındaki mikroorganizmalara karşı önemli bir antibakteriyel aktivite göstermese de çalışılan bütün mikroorganizmalar, sulbaktamın β -laktamaz üreten suşlarına karşı da ampisilin aktivite göstermesini sağladığını kanıtlamıştır. Ampisilin ve sulbaktamın yaklaşık % 75-85 kadarı, normal renal fonksiyonu olan kişilere uygulamadan sonraki ilk 8 saat sırasında idrarla değişmemiş olarak atılmaktadır (İE Ulagay İlaç Sanayii, 2015b).



Şekil 2.17. Ampisilin/sulbaktam bileşiğinin molekül formu (Wikipedia, 2015).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneyisel çalışmalarda kullanılan N,N,N,N-tetrametiletildiamin (TEMED), Sepharose-4B, 1-Naftilamin, L-tirozin, standart serum albumin, trihidroksimetil aminometan (Tris-Base), para oksan, Tris-HCl, Triton X-100, DMEM, TE, Fetal Calf Serum (FCS) SİGMA Chemical'den; sodyum hidroksit, amonyum sülfat, glisin, fosforik asit, asetik asit, etil alkol, hidroklorik asit, sodyum dihidrojen fosfat, β -merkaptotanol, sodyum dodesil sülfat, akrilamid, N,N-metilen bis-akrilamid, amonyum persülfat, bromofenol mavisi, gliserol, sodyum bikarbonat, sodyum fosfat, potasyum fosfat, kalsiyum klorür MERCK'den sağlandı.

Araştırmada kullanılan ilaçlar; sefuroksim sodyum, seftriakson disodyum, ampisilin/sulbaktam, sefazolin sodyum, amoksisilin trihidrat/potasyum klavulanat, gentamisin sülfat, yerel eczaneden temin edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Soğutmalı Ultrasantrifüj	Hettich EBA 12R
pH metre	Hana pH
UV-Spektrofotometre	Thermo scientific Multiscan FC
Manyetik karıştırıcı	Ika C-MAG HS7
Terazi	Denver SI 234
Otomatik pipetler	Brand
Homojenizatör	Stuart SHM1
Elektroforez Sistemi	Bio- Rad

Kromatografi Kolonu	Sigma (1 cm çap ve 15 cm uzunluk)
Derin Dondurucu (-80 °C)	NuAire
Buzdolabı (-20 °C)	Vestel
Vorteks	Stuart
Buz makinesi	Fiocchetti AF 10
Su Banyosu	Memmert
Thermo-block	Ika
İnkübatör	Memmert
Jel Görüntüleme Sistemi	Gel Doc-H Imaging System (UVP)

3.1.3. Kullanılan Çözeltiler

Hidrofobik jelin dengelenmesi için kullanılan tampon: 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içeren 50 mM Na_2HPO_4 tamponudur (pH 6.8). Bunun için 7.095g (0.05 mol) Na_2HPO_4 ve 132.14 g (1 mol) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 950 mL distile suda çözülerek, 1 N HCl ile pH'sı 6.8'e getirildi ve son hacim, distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

Hidrofobik jele bağlanmış β -glukosidaz enziminin elüsyonu için kullanılan çözelti: 1 M $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ içeren 50 mM Na_2HPO_4 tamponu (pH 6.8) ve 50 mM Na_2HPO_4 tamponu (pH 6.8) ile gradient mikser kullanılarak tuz gradienti oluşturuldu. Bunun için 7.095g (0.05 mol) Na_2HPO_4 ve 132.14 g (1 mol) $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ 950 mL distile suda çözülerek, 1 N HCl ile pH'sı 6.8'e getirildi ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı. 7.095 g (0.05 mol) Na_2HPO_4 950 mL distile suda çözülerek, 1 N HCl ile pH'sı 6.8'e getirildi ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

Amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda oluşan çökeğin alındığı tampon çözelti: 1 M $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ içeren, 50 mM Na_2HPO_4 tamponu (pH 6.8) ve 50

mM Na₂HPO₄ tamponu (pH 6.8). 7.095g (0.05 mol) Na₂HPO₄ ve 132.14 g (1 mol) NH₄(SO)₂ 950 mL distile suda çözülerek, 1 N HCl ile pH'sı 6.8'e getirildi ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

Enzim aktivitesinin ölçüldüğü ve substrat çözeltisinin hazırlandığı tampon: 50 mM, pH 5.5 olan sodyum asetat tamponu; 6.804g Na-Ac 900mL distile suda çözüldü ve glasiyal asetik asit ile pH 5.5'e ayarlandıktan sonra son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

Substrat çözeltisi: 5 mM p-NPG çözeltisi; 0.0075g pNPG 5 mL, 50 mM pH 5.5 sodyum asetat tamponu içinde vortekste karıştırılarak çözüldü.

Reaksiyon durdurma tamponu: 0.5 M Na₂CO₃; 26.498g Na₂CO₃ son hacim 500 mL olacak şekilde distile suda çözülerek hazırlandı.

Doku ekstraksiyon tamponu: 0,25 M sukroz sükroz içeren 5 mM Tris-HCl tamponu pH:7.4 olarak ayarlanıp son hacim 100 mL olarak tamamlandı.

SDS-PAGE'de kullanılan ayırma ve yığma jellerinin hazırlanışı; SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının hazırlanışı ve kullanılan miktarları, Tablo 3.1'de verilmiştir.

SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renklendirme çözeltisi; 0.66 g Coomassie brilliant blue G-250, 120 mL metanolde çözüldü. Bu çözeltiye 24 mL saf asetik asit ve 120 mL distile su ilave edildi.

SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renk açma çözeltisi; Hacimce % 7.5 asetik asit, % 5 metanol ve % 87.5 mL distile su içermektedir. Bu amaçla 75 mL asetik asit ve 50 mL metanol, 875 mL saf su ile karıştırıldı.

Tablo 3.1. SDS-PAGE’de kullanılan jel karışımlarının miktarları.

%10’luk Ayırma Jeli		Hacim	
Acrylamide/bis-Acrylamide % 40 solution (Sigma)		1.56 ml	
% 10’luk SDS		62.5 µl	
1.5 M Tris-HCl pH 8.8		1.56 ml	
Distile Su		3.02 ml	
TEMED		3.13 µl	
% 10’luk APS (en son ilave edilecek)		93.75 µl	
% 3’lük Yığıma Jeli		Hacim	
Acrylamide/bis-Acrylamide % 40 solution (Sigma)		247.5 µl	
% 10’luk SDS		25 µl	
Distile su		1.612 ml	
TEMED		2.5 µl	
0.5 M Tris-Base pH. 6.8		630 µl	
% 10’luk APS (en son ilave edilecek)		50 µl	
Numune Tamponu	Hacim	Tank Tamponu	Hacim
0.5 M Tris-Base pH 6.8	2.5 ml	Tris-HCl	3 g
% 10’luk SDS	4 ml	Glisin	14.4 g
Gliserol	2 ml	SDS	1 g
β-Merkapto-etanol	1 ml		
Bromfenol mavisi	0.01 g		
Distile su	0.5 ml		

3.2. Yöntemler

3.2.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada, deney hayvanı olarak 7 adet, 15-17 haftalık, 170-210 gram ağırlığında erkek Wistar-Albino türü sıçanlar kullanıldı. Hayvanlar, eter anestezisine alınarak dekapite edildi ve karaciğer ile böbrek dokuları alındı. Alınan dokular, kullanılana kadar -80 °C derin dondurucuda saklandı.

3.2.2. Enzim Ekstratının Hazırlanması

Karaciğer ve böbrek dokularındaki GBA2 aktivitelerinin belirlenmesinde sırasıyla şu basamaklar izlenmiştir (Avcıkurt ve ark., 2015; Sinan ve ark., 2015);

1. Karaciğer ve böbrek doku örneklerinin miktarları belirlendikten sonra ağırlıklarının 4 katı kadar 5 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.25 M sükröz tamponu ile sulandırıldı.

2. Örnek, 6 dakika $10.500 \text{ dakika}^{-1}$ devirde, mekanik homojenizatörde homojenize edildi ve 1000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek çöken büyük partiküller ve nükleus uzaklaştırıldı.

3. Süpernatant, 16000 rpm'de 60 dakika santrifüj edilerek mikrozoamların çökmesi sağlandı. Süpernatant uzaklaştırıldı.

4. Mikrosomal pellet, 1 mL 5 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.25 M sükröz tamponuyla sulandırıldı. Sulandırılmış mikrosomal pelletten GBA2'nin ekstraksiyonu için % 0.75'lik Triton X-100 eklendi. Vorteks ile iyice karıştırıldı.

5. GBA2'nin çözeltiye alınması için +4 °C'de 30 dakika bekletildi.

6. Çözelti, 16000 rpm'de 60 dakika santrifüj edildi. Süpernatantta bulunan GBA2'nin aktivitesine bakıldı.

3.2.3. Enzim Aktivite Tayini

Karaciğer ve böbrek dokularında GBA2 aktivitesi spektrofotometrik olarak tayin edildi. Aktivite ölçümü için 70 µL, 5 mM pNPG substrat çözeltisi ve üzerine 70

μL enzim çözeltisi 96'lık plakaya (well-plate) koyuldu. Kör olarak 70 μL 50 mM pH 5.5 Na-Ac tamponu ve üzerine 70 μL enzim çözeltisi koyuldu. Ettüvde 37 °C'de, 30 dk inkübe edildi. 30 dk'nın sonunda reaksiyon 70 μL 0.5 M Na_2CO_3 ile durduruldu. Spektrofotometrede 405nm'de köre karşılık absorbans değeri okundu.

Enzim aktivitesi oluşturulan p-NP, standart grafiğine göre belirlenmiştir. Bir Enzim Ünitesi, dakikada oluşan p-nitrofenolün μmol 'ü olarak belirlendi.

3.2.4. Lowry Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini

Protein miktarı ölçümleri, Lowry Metoduna göre hesaplanmıştır. Bu yöntem için aşağıdaki solüsyonlar hazırlandı;

Solüsyon A : % 2'lik Na_2CO_3 , 0.1 M NaOH'da çözüldü.

Solüsyon B : % 1'lik NaK tartarat, distile suda çözüldü.

Solüsyon C : % 0.5'lik CuSO_4 , distile suda çözüldü.

Solüsyon D : 48 mL solüsyon A, 1 mL solüsyon B, 1 mL solüsyon C alınarak hazırlandı.

Solüsyon E : Folin-fenol ve distile sudan, bire bir oranında alınarak hazırlandı .

Sığır Serum Albumini (BSA) : 5mg 5ml suda çözülerek taze olarak hazırlandı.

Protein tayini işleminde, şu yol izlendi;

1. 1 mL'sinde 1mg protein içeren standart sığır albümin çözeltisinden, tüplere 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 μL alındı ve miktar her tüpte 100 μL olacak şekilde üzerleri saf su ile tamamlandı.

2. Kör olarak kullanılmak üzere de bir tüpe 100 μL saf su koyuldu.

3. Her tüpe, 2 ml Solüsyon D eklendi ve 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.

4. 10 dk sonunda tüplere 0.2 mL Solüsyon E eklenip vorteks ile zaman kaybetmeden karıştırıldı ve 30 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.

5. Örnekler, 96'lık plakanın kuyucuklarına 200'er μL koyularak 600 nm de absorbansları köre karşı okundu. Okunan absorbans değerlerine karşılık gelen μg protein değerleri ile standart grafik hazırlandı (Şekil 4.1.).

Saflaştırma basamaklarında protein miktarı belirlenecek numunelerden 0.1'er mL tüplere alındı ve standart grafik için uygulanan yöntem, aynı şekilde numune tüpleri için de uygulandı. Daha sonra numuneler içindeki protein miktarı, standart grafikten elde edilen doğru denklemi kullanılarak hesaplandı (Laemmli, 1970).

3.2.5. Enzimin Saflaştırılması

3.2.5.1. Amonyum Sülfat Çöktürme Aralığının Belirlenmesi

Amonyum sülfat, belirli doygunluk derecelerine göre, belirli proteinlerin çökmesini sağlayan 2 değerlikli, çok kullanılan bir tuzdur. Öncelikle kullanılacak uygun amonyum sülfat konsantrasyonu, aşağıda verilen formül ile tespit edildi;

$$g(NH_4)_2SO_4 = \frac{1.77xVx(S_2 - S_1)}{3.54 - S_2}$$

V : Serum hacmi

S₁ : 1'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu

S₂ : 1'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğu

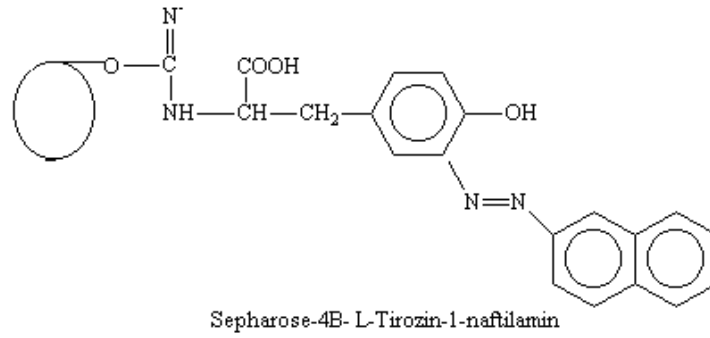
Amonyum sülfat çöktürme aralığının belirlenmesi için ham ekstrakta 0-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100 aralıklarında çöktürme yapıldı. Her bir aralık için yukarıdaki formüle göre hesaplanan amonyum sülfat miktarları 0 °C'de eklendi. 30 dakika manyetik karıştırıcıda yavaşça karıştırılarak ilave edilen amonyum sülfatın çözünmesi sağlandı. Daha sonra 15000 rpm'de 4°C'de 30 dakika santrifüj edildi. Çökeleklerin her biri 1 mL, 50 mM, pH 6.8 sodyum fosfat tamponunda çözüldü.

Her bir aralıkta çözülen numunenin enzim aktivitesi ve Lowry yöntemiyle kantitatif protein miktarı belirlendi. Enzim numuneleri renkli olduğundan 405nm'de aktivite belirlenirken absorbans değerinin yanlış çıkmaması için her bir aralıktaki enzim çözeltisi kendi körüne karşı okundu. 0-10 aralığının enzim aktivitesi bulunurken, 70 µL bu aralıktaki enzim çözeltisi ve 70 µL substrat karışımının

absorbans değeri, 70 µL bu aralıktaki enzim çözeltisi ve 70 µL aktivite tamponu körüne karşı okundu. Bu durumda 10 farklı tuz aralığı için 10 ayrı kör kullanılmış oldu. 37 °C’de 30 dakika inkübe sonunda reaksiyonlar 70 µL 0.5 M Na₂CO₃ ile durduruldu ve 405nm’de absorbans değerleri okundu. Her bir aralığın kantitatif protein miktarları Bölüm 3.2.4’de verilen Lowry metoduna göre hesaplandı.

3.2.5.2 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Enzimin Saflaştırılması

Karaciğer ve böbrek dokularından GBA2’nin saflaştırılmasında amonyum sülfat çöktürmesinin ardından, hidrofobik etkileşim kromatografisi tercih edilmiştir. Bunun için laboratuvarında sentezlenen ve Şekil 3.2’de verilen hidrofobik jel sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin kullanılmıştır (Yu ve ark., 2007).



Şekil 3.1 Hidrofobik etkileşim kromatografisinde kullanılan hidrofobik jel (Avcıkurt, 2009).

Hazırlanan hidrofobik etkileşim kolonu, önce 1M (NH₄)₂SO₄ içeren 50 mM, pH 6.8 sodyum fosfat tamponu ile dengelendi. Kolonun dengeleme işlemi bittikten sonra, jel üzerindeki tampon çözeltisi jel seviyesine kadar indirildi. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen enzim çökeleği en küçük hacimde 1M (NH₄)₂SO₄ içeren 50 mM, pH 6.8 sodyum fosfat tamponu çözüldü. Ardından çözeltinin enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak belirlendikten sonra kolona tatbik edildi. Kolona 1 M (NH₄)₂SO₄ içeren 50 mM, pH 6.8 sodyum fosfat tamponu ve 50 mM, pH 6.8 sodyum fosfat tamponu ile oluşturulan yüksek tuz konsantrasyonundan düşük tuz konsantrasyonuna doğru tuz gradienti uygulandı. Tuz gradienti ile kolondan elüe

standartları; (β -galaktosidaz (116.0kDa), sığır serum albumin (66.2 kDa), yumurta albumini (45.0 kDa), laktat dehidrogenaz (35.0 kDa), REase Bsp98I (E.coli) (25.0 kDa), β -laktoglobulin (18.4 kDa) ve Lizozim (14.4 kDa) içeren standart protein çözeltisi 1 : 1 oranında numune tamponuyla karıştırıldı. Jele yüklenecek numuneler, 5 dakika 95 °C’de termoblok da bekletildi. Numuneler soğutulmuş kuyucuklara yüklendi. Elektroforez güç kaynağına bağlanarak 80 volta (V) ayarlandı. Proteinlerin jeldeki hareketini incelemeye yarayan numune tamponu içindeki boyaya ait bant, ayırma jeline ulaştığında voltaj 150 V’a yükseltildi. Yürütme işlemine proteinler, jelin altına 1cm kalana kadar devam edildi. Daha sonra akım kesilerek yürütme durduruldu. Cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı ve yığılma jeli kesilip ayrıldıktan sonra protein bantlarını içeren ayırma jeli, renklendirme çözeltisi içine konuldu ve 1.5-2 saat kadar çalkalayıcı üzerine bırakıldı. Daha sonra jel renklendirme çözeltisinden çıkartılarak renksizleştirme çözeltisine kondu. Belirli aralıklarla değiştirmek suretiyle jelin zemin rengi açılıp protein bantları belirginleşinceye kadar bu çözelti içinde çalkalandı. Jel renksizleştirme çözeltisinden çıkarıldıktan sonra jel görüntüleme sistemi (UVP) ile görüntü bilgisayara aktarıldı.

3.2.6. Antibiyotiklerin Kullanımı

Her bir antibiyotik, Tablo 3.2.’e göre enzime uygulanmak üzere hazırlanmıştır.

Tablo 3.2. Antibiyotiklerin substrat tamponu ile hazırlanması.

Antibiyotik	Ampuldeki Miktarı	Çözmek için Kullanılan Substrat Tampon
Gentamisin sülfat	160 mg gentamisin sülfat	-
Ampisillin + sulbaktam	1 g ampisilin + 0.5 g sulbaktam	3.5 ml
Sefazolin sodyum	750 mg	4 ml
Sefuroksim sodyum	750 mg	6 ml
Seftriakson disodyum	1 g	3.5 ml
Amoksisilin trihidrat + potasyum klavulanat	1000 mg	10 ml

Ticari olarak temin edilen antibiyotikler yukarıdaki tabloya göre hazırlanıp, tablo 4.3. – 4.19. daki gibi uygulanmıştır.

3.2.7. Antibiyotiklerin (inhibitörlerin) IC₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi

Enzim aktivitesi üzerine etkisi araştırılan antibiyotiklerin (inhibitörlerin) IC₅₀ değerlerini bulmak için p-NPG substratının reaksiyon hacminde 1.75 mM konsantrasyonunda çalışıldı. Antibiyotik eklenmemiş ortamda enzim aktivitesi bulunarak bu değer % 100 aktivite olarak alındı. Farklı inhibitör konsantrasyonlarında enzim aktivite değerleri bulundu ve % aktivite değerleri hesaplandı. % Aktivite-[I] grafikleri çizildi. (Şekil 4.5. - 4.20.). Bu grafiklerden yararlanarak enzim aktivitesini % 50 oranında azaltan inhibitör konsantrasyonu olan IC₅₀ değerleri hesaplandı.

3.2.8. Antibiyotiklerin (inhibitörlerin) K_i Değerlerinin Bulunması

β -glukozidazların yaygın substratı olan p-NPG substratı kullanılarak karaciğer ve böbrek dokularından saflaştırılan GBA2 aktivitesi üzerine bazı antibiyotiklerin inhibisyon tipleri ile K_i değerleri belirlenmiştir. K_i değerlerinin tespiti için antibiyotiksiz (inhibitörsüz) ortamda, 12 farklı pNPG substrat konsantrasyonu varlığında, aktivite değerleri bulundu. Bulunan bu aktivitelere 1/V değerleri hesaplandı. 1/V- 1/[S] değerleri ile Lineweaver–Burk grafiği çizildiğinde, I₀ doğrusu elde edildi. Her bir inhibitör maddenin (antibiyotik) iki farklı sabit konsantrasyonunda, p-NPG substratının 12 değişik konsantrasyonuna karşılık gelen enzim aktiviteleri belirlendi. İki farklı inhibitör (antibiyotik) konsantrasyonu varlığında, farklı substrat konsantrasyonuna karşılık gelen aktiviteler kullanılarak çizilen Lineweaver–Burk grafiğinde, 1/V ve 1/[S] değerleri ile I₁ ve I₂ doğruları oluşturuldu. Lineweaver–Burk grafiklerden yararlanarak K_i değerleri hesaplandı ve inhibisyon türleri tespit edildi. K_i değerleri;

Yarışmalı (kompetitif) inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrisinde 1/[S] eksenini kestiği nokta olan $-1/K_M (1+[I]/K_i)$ ifadesinden,

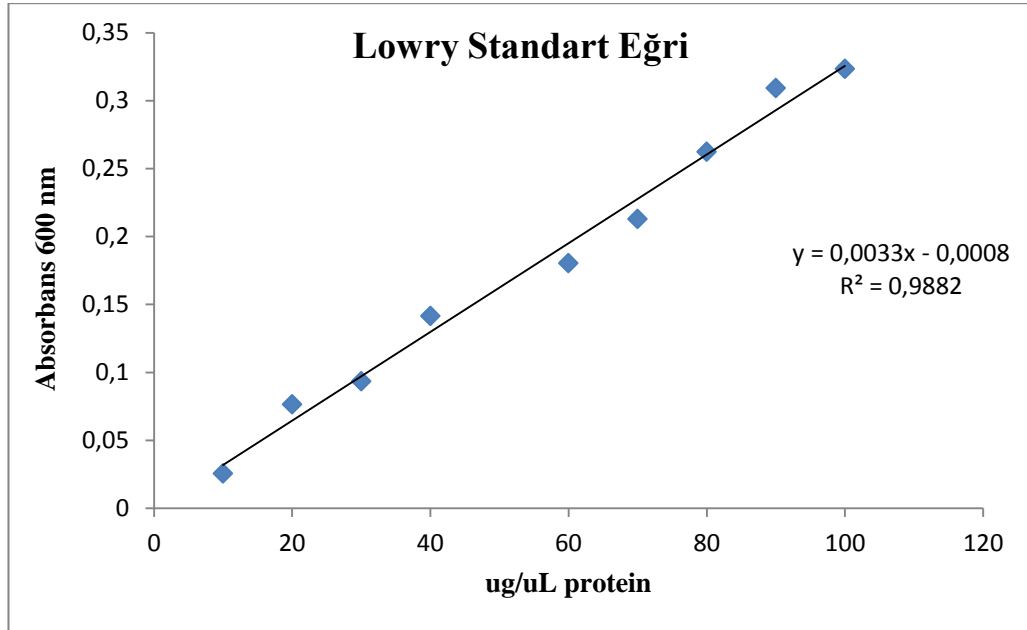
Yarışmasız (non-kompetitif) inhibisyon için $1/V$ eksenini kestiği nokta olan $1/V_{\max} (1+[I]/K_i)$ ifadesinden,

Yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyon tipi için $1/V$ eksenini kestiği nokta olan $1/V_{\max} (1+[I]/K_i)$ ifadesinden yararlanılarak hesaplandı. K_i değerlerinin hesaplanmasında kullanılan denklemlerdeki K_M ve V_{\max} değerleri, antibiyotiksiz (inhibitörsüz) ortamda bulunan değerlerdir.

4. BULGULAR

4.1. Kantitatif Protein Tayininde Kullanılan Standart Eğri

Saflaştırma basamaklarında kantitatif protein tayini için Lowry metodu kullanılmıştır. Bu yöntem ile sığır serum albümin proteini standart olarak kullanılmıştır. Standart çözeltideki mg proteine karşılık gelen absorbans değerlerine göre, Şekil 4.1.'deki grafik elde edilmiştir. Elde edilen grafiğin doğru denklemiyle ilgili absorbansa karşılık gelen mg protein miktarı hesaplanmıştır.



Şekil 4.1. Lowry yöntemi ile protein miktarının tayininde kullanılan standart grafik.

4.2.Karaciğer GBA2 Saflaştırılması ve Bazı Antibiyotiklerin Etkilerinin Araştırılması

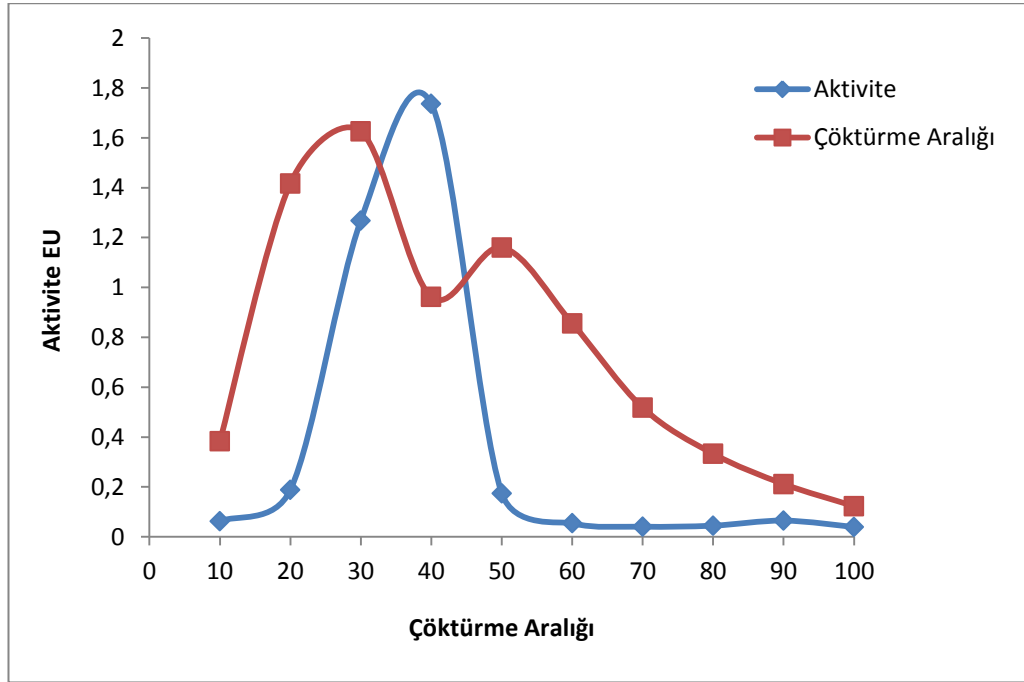
4.2.1. Karaciğer GBA2'nin Amonyum Sülfat Çöktürme Aralığının Belirlenmesi

Amonyum sülfat çöktürme aralığının belirlenmesi için ham ekstrakta Tablo 4.1.'de verilen amonyum sülfat miktarları eklenerek Bölüm 3.2.5.1'de belirtilen yöntem uygulanmıştır. Her bir aralıktaki enzim numunelerinin 405 nm'deki absorbansları kendi körlerine karşı okunmuştur. Elde edilen veriler, Tablo 4.1.'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Karaciğer GBA2 amonyum sülfat çöktürme aralığının belirlenmesinde kullanılan çözelti hacimleri, kullanılan tuz miktarı ve elde edilen değerler.

Aralık Değeri	Çöktürme Aralığı	Hacim (mL)	Kullanılan amonyum sülfat miktarı (g)	Protein miktarı (mg/mL)	Aktivite (EU)	Absorbans 405 nm
1	0-10	10	0.514	0.383	0.0624	0.047
2	10-20	10.1	0.534	1.417	0.1884	0.14
3	20-30	10.1	0.551	1.626	1.2684	0.937
4	30-40	9.7	0.546	0.962	1.7359	1.282
5	40-50	9.7	0.564	1.16	0.1749	0.13
6	50-60	9.5	0.571	0.856	0.0543	0.041
7	60-70	9.5	0.592	0.518	0.0407	0.031
8	70-80	9.3	0.600	0.333	0.0448	0.034
9	80-90	9.3	0.623	0.383	0.0651	0.049
10	90-100	9.2	0.641	1.417	0.0394	0.03

Tablo 4.1'deki değerler kullanılarak Şekil 4.2.'deki amonyum sülfat oktrme aralığı-aktivite grafiği çizilmiŐtir. Özelikle oktrme aralığının belirlenmesinde protein miktarının düşük; buna karşılık enzim aktivitesinin yüksek olduğu aralık tespit edilmiştir. Grafiğe göre enzimin oktğ tuz konsantrasyonu % 20-50 aralığı olarak belirlenmiş ve saflaştırma işlemlerinde % 20-50 amonyum sülfat tuz oktrmesi uygulanmıştır.

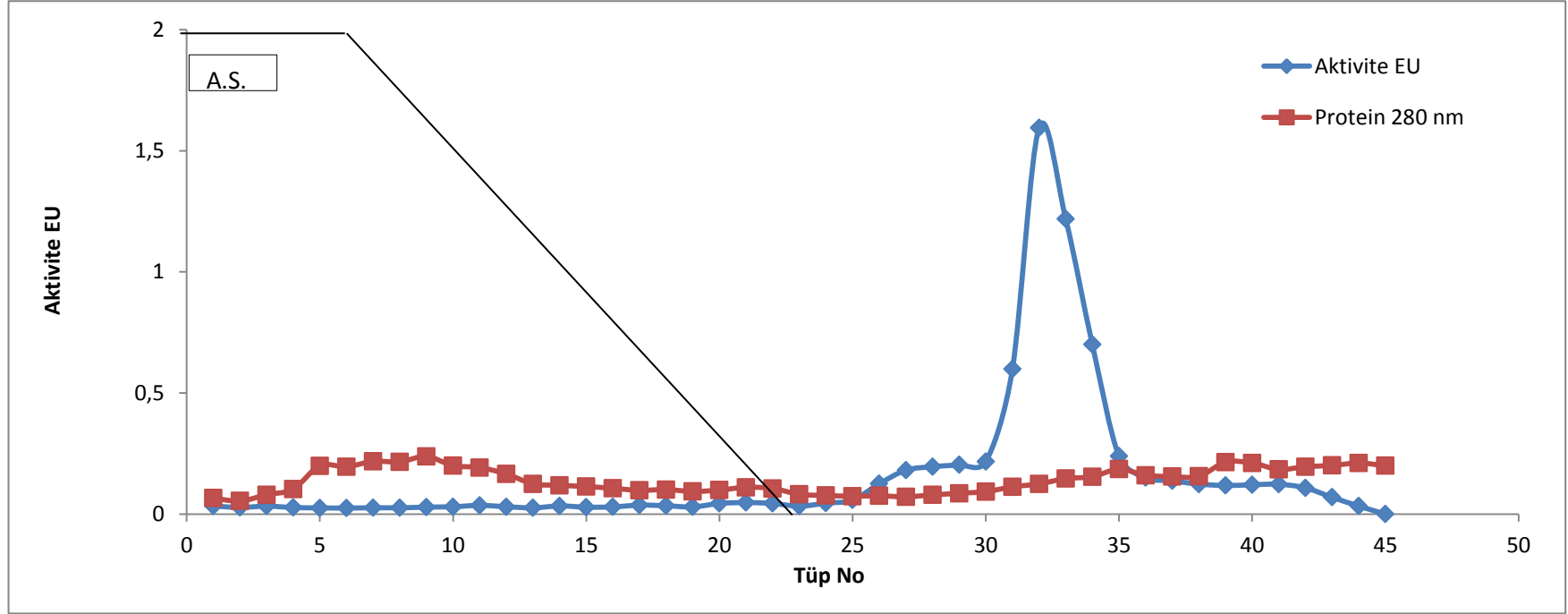


Şekil 4.2. Karaciğer GBA2 amonyum sülfat oktrme aralığının tespitinde kullanılan grafik.

4.2.2. Karaciğer GBA2'nin Saflaştırılması

Bölüm 3.2.5.2'de belirtildiği gibi % 20-50 amonyum sülfat oktrmesi sonunda elde edilen numune, laboratuvarıda sentezlenmiş sepharose 4B-L-tirozin-1-naftilamin hidrofobik jeli içeren kolona yüklenmiştir. Kolondaki jel yüksekliliği 7 cm ve çap 1 cm'dir. Kolondan alınan numunelerin 50 mM sodyum fosfat pH:6.8 tamponu kr olarak kullanılarak 280 nm'de kalitatif protein tayini yapılmıştır. Elüsyondaki her bir tüpün aktivite tayini, kendi numunesinden oluşan körüne karşı

yapılmıştır. Elde edilen değerlerin, tp numarasına karşı aktivite ve protein miktarı Şekil 4.3'deki grafikten de grldğu gibi yüksek aktivite gösteren 31, 32, 33 ve 34 numaralı tüpler birleştirilmiştir. Kolona tatbik edilen ve birleştirilen elatlar için Lowry metodu ile kantitatif protein ve aktivite tayinleri yapılarak spesifik aktiviteler ve saflaştırma oranları hesaplanmıştır (Tablo 4.2.).



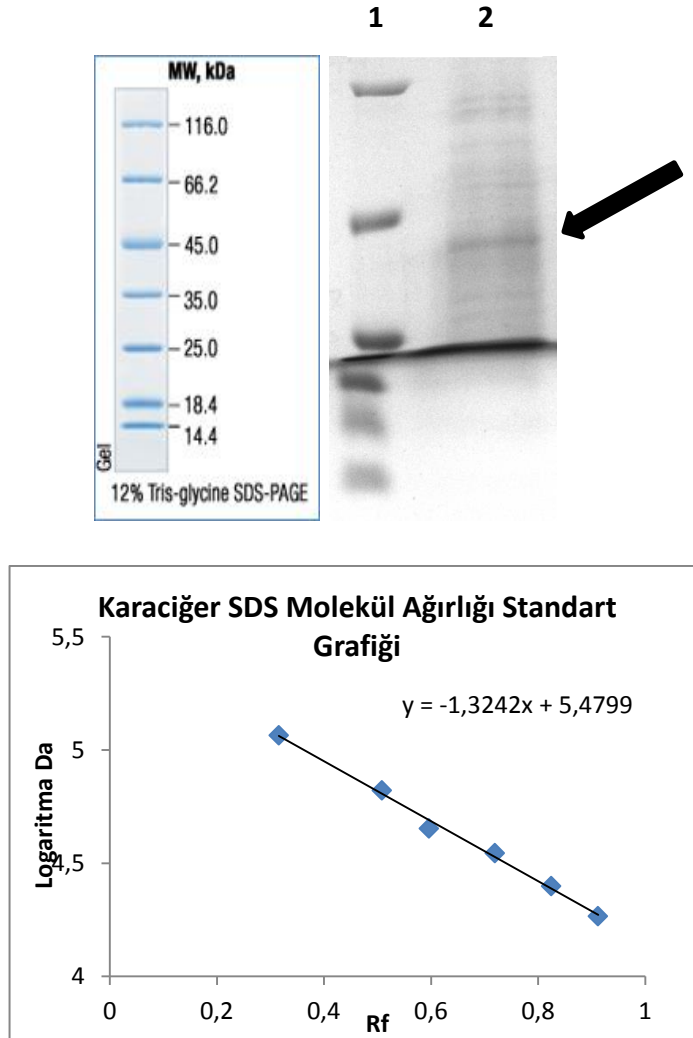
Şekil 4.3. Hidrofobik etkileşim kromatografisi kolonundan karaciğer GBA2'nin saflaştırma grafiği.

Tablo 4.2. Karaciğer GBA2 Saflaştırma Tablosu.

Basamak	Hacim (ml)	Aktivite (U/ml)	Toplam Aktivite (U/ml)	Protein Miktarı (mg/ml)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	% Verim	Saflaştırma Derecesi
Ham ekstrakt	6	1,65	9,95	2,59	15,56	0,63	100	1
Amonyum sülfat Çöktürmesi (% 50)	3,5	1,97	6,90	0,53	1,85	3,71	69,39	5,81
Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi 32.tüp	2	2,16	4,32	0,11	0,22	19,32	43,43	30,23

4.2.3 Karaciğer GBA2 SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Hidrofobik etkileşim kolonundan saflaştırılan karaciğer GBA2 enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla Bölüm 2.2.5.3’de anlatıldığı şekilde hazırlanan SDS poliakrilamid jel elektrofrezine, saflaştırılan enzim numunesi yüklendi. Protein bantları içeren jellerin görüntüleri, jel görüntüleme sistemi ile bilgisayara aktarıldı (Şekil 4.4.).

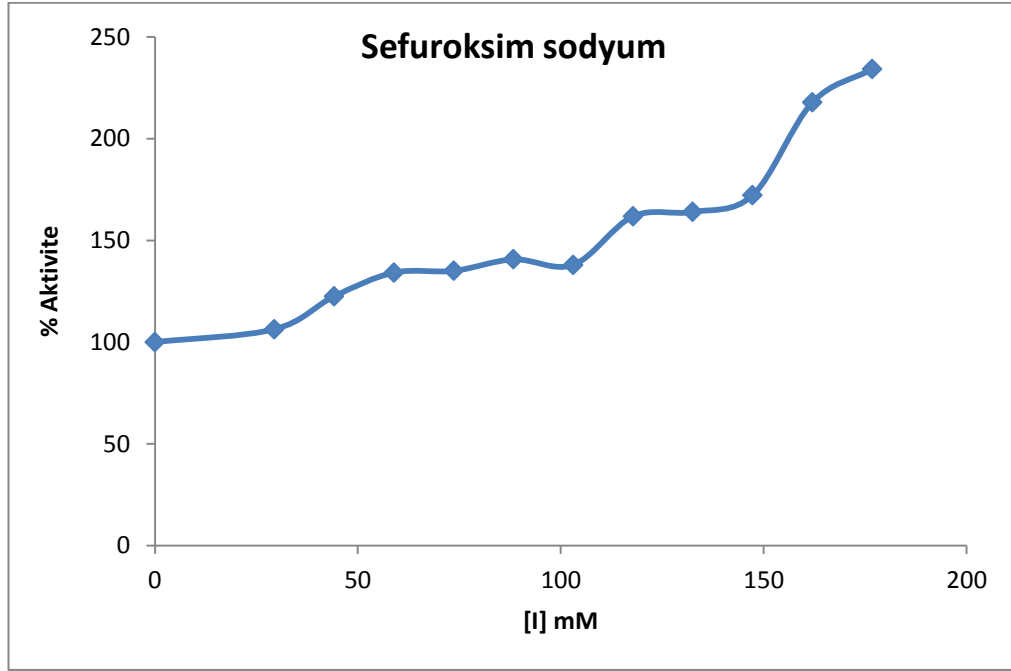


Şekil 4.4. Hidrofobik etkileşim kromatografisi sonunda saflaştırılmış karaciğer GBA2. **1:** Protein belirteç. Molekül ağırlık standartları; (β -galaktosidaz (116.0kDa), sığır serum albumin (66.2 kDa), yumurta albumini (45.0 kDa), laktat dehidrogenaz (35.0 kDa), REase Bsp98I (E.coli) (25.0 kDa), β -laktoglobulin (18.4 kDa) ve Lizozim (14.4 kDa) **2:** Hidrofobik etkileşim kromatografisi sonundaki saflaştırılmış karaciğer GBA2.

4.2.4 Karaciğer GBA2 Üzerine Bazı Antibiyotiklerin IC₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi

4.2.4.1. Sefuroksim Sodyum Antibiyotiğinin IC₅₀ Değerinin Belirlenmesi

Sefuroksim sodyumun karaciğer GBA2 aktivitesi üzerine etkisi incelenirken, p-NPG substratının reaksiyon hacmindeki konsantrasyonu 1.75 mM kullanılmıştır. Sefuroksim sodyum bulunmayan ortamdaki enzim aktivitesi % 100 aktivite olarak alınmış ve sefuroksim sodyumun 29.454 - 176.725 mM arasında değişen konsantrasyonlarındaki % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan veriler, Tablo 4.8.'de gösterilmiştir.



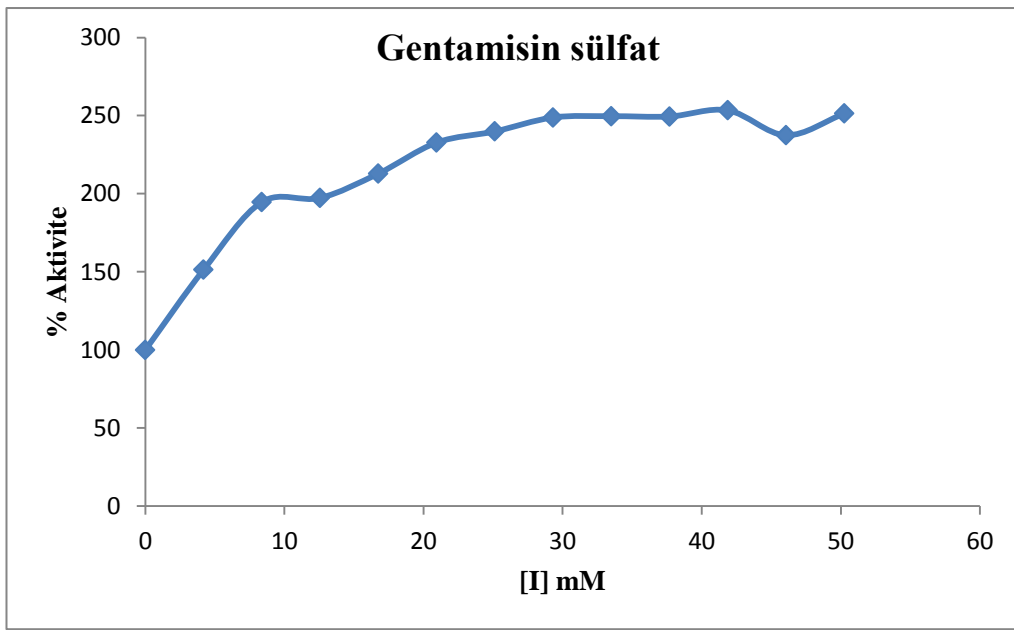
Şekil 4.5. Sefuroksim sodyum antibiyotiğinin % enzim aktivitesi-ilaç konsantrasyon grafiği.

Tablo 4.3.'deki verilere göre, sefuroksim sodyum antibiyotiğinin *p*-NPG substratı varlığında, karaciğer GBA2 % aktivite-ilaç konsantrasyonu grafiği Şekil 4.5.'deki gibidir. Sefuroksim sodyumun çalışılan konsantrasyon aralığında, karaciğer GBA2'yi aktive ettiği görülmüştür.

50 mM Substrat Tamponu (μl)	Antibiyotik	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μl)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (μl)	Antibiyotik Çözeltilisinin Hacmi (μl)	Kuyudaki Antibiyotik Konsantrasyonu [I] mM	Absorbans (405 nm)	Aktivite (U/ml dak.)	% Aktivite
0	Sefuroksim sodyum	70	70	0	0	0.257	0.2017	100
50				10	29.454	0.272	0.2145	106.335
45				15	44.181	0.312	0.2472	122.526
40				20	58.908	0.340	0.2706	134.161
35				25	73.635	0.342	0.2724	135.031
30				30	88.362	0.355	0.2837	140.662
25				35	103.090	0.349	0.2783	137.971
20				40	117.817	0.406	0.3264	161.822
15				45	132.544	0.412	0.3308	163.975
10				50	147.271	0.431	0.3473	172.174
5				55	161.998	0.542	0.4394	217.805
-				60	176.725	0.581	0.4725	234.203

4.2.4.2. Gentamisin sülfat Antibiyotiğinin IC₅₀ Değerinin Belirlenmesi

Gentamisin sülfat antibiyotiğinin karaciğer GBA2 aktivitesi üzerine etkisi incelenirken, p-NPG substratının reaksiyon hacmindeki konsantrasyonu 1.75 mM kullanılmıştır. Gentamisin sülfat bulunmayan ortamdaki enzim aktivitesi % 100 aktivite olarak alınmış ve gentamisin sülfat 4.187-50.251 mM arasında değişen konsantrasyonlarındaki % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan veriler Tablo 4.9.'da gösterilmiştir.



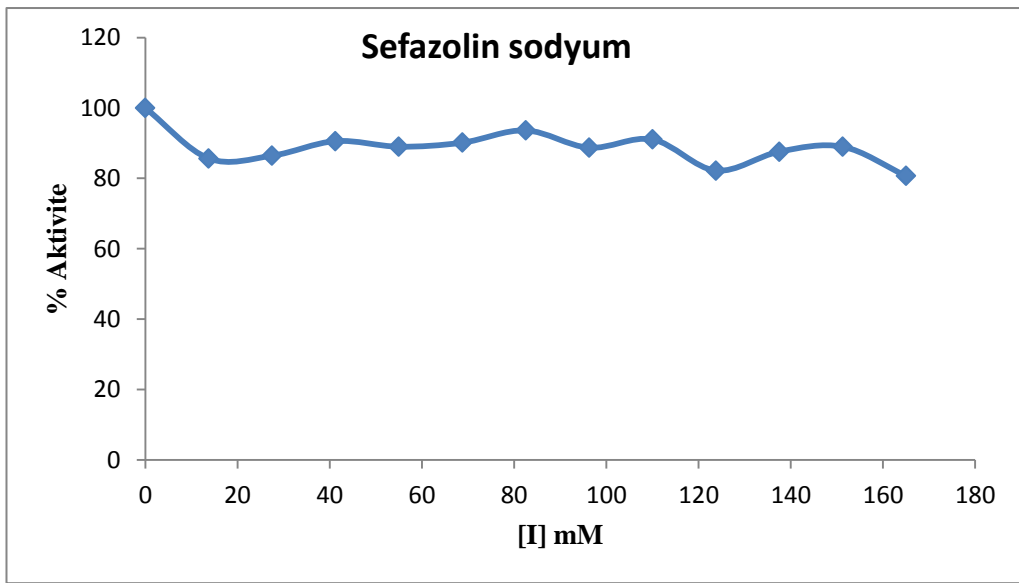
Şekil 4.6. Gentamisin sülfat antibiyotiğinin % enzim aktivitesi – ilaç konsantrasyonu grafiği.

Tablo 4.4.'deki verilere göre, gentamisin sülfat antibiyotiğinin *p*-NPG substratı varlığında, karaciğer GBA2 % aktivite-ilaç konsantrasyonu grafiği Şekil 4.6.'daki gibidir. Gentamisin sülfatın çalışılan konsantrasyon aralığında, karaciğer GBA2'yi aktive ettiği bulunmuştur.

50 mM Substrat Tamponu (μl)	Antibiyotik	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μl)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (μl)	Antibiyotik Çözeltilisinin Hacmi (μl)	Kuyudaki Antibiyotik Konsantrasyonu [I] mM	Absorbans (405 nm)	Aktivite (U/ml dak.)	% Aktivite
0	Gentamisin sülfat	70	70	0	0	0.647	0.527	100
50				10	4.187	0.971	0.798	151.298
45				15	8.375	1.245	1.027	194.664
40				20	12.562	1.262	1.040	197.276
35				25	16.75	1.750	1.123	212.872
30				30	20.931	1.485	1.227	232.710
25				35	25.125	1.531	1.265	239.883
20				40	29.313	1.587	1.312	248.812
15				45	33.501	1.592	1.317	249.636
10				50	37.688	1.591	1.316	249.446
5				55	41.876	1.616	1.336	253.372
-				60	46.063	1.515	1.252	237.429

4.2.4.3. Sefazolin sodyum Antibiyotiğinin IC₅₀ Değerinin Belirlenmesi

Sefazolin sodyum antibiyotiğinin karaciğer GBA2 aktivitesi üzerine etkisi incelenirken, p-NPG substratının reaksiyon hacmindeki konsantrasyonu 1.75 mM kullanılmıştır. Sefazolin sodyum bulunmayan ortamdaki enzim aktivitesi %100 aktivite olarak alınmış ve sefazolin sodyumun 13.751-165.012 mM arasında değişen konsantrasyonlarındaki % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan veriler Tablo 4.5.'de gösterilmiştir.



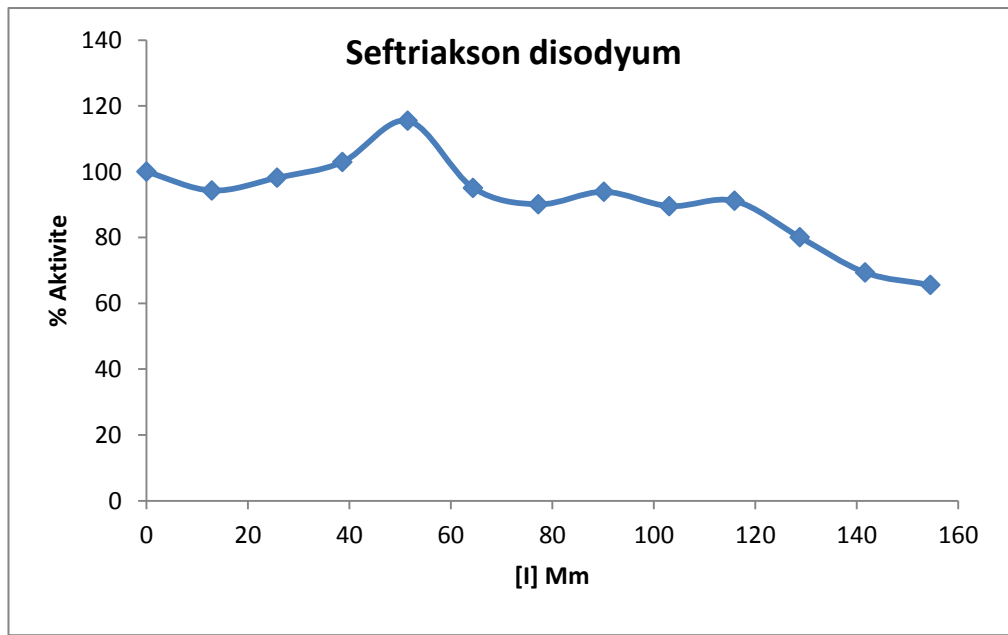
Şekil 4.7. Sefazolin sodyum antibiyotiğinin % enzim aktivitesi-ilaç konsantrasyon grafiği.

Tablo 4.5.'deki verilere göre, sefazolin sodyum antibiyotiğinin *p*-NPG substratı varlığında, karaciğer GBA2 % aktivite-ilaç konsantrasyonu grafiği Şekil 4.7.'deki gibidir. Sefazolin sodyumun çalışılan konsantrasyon aralığında, karaciğer GBA2'yi inhibe etmediği görülmüştür.

50 mM Substrat Tamponu (µl)	Antibiyotik	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Antibiyotik Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Kuyudaki Antibiyotik Konsantrasyonu [I] mM	Absorbans (405 nm)	Aktivite (U/ml dak.)	% Aktivite
0	Sefazolin sodyum	70	70	0	0	0.647	0.527	100
50				10	13.751	0.557	0.451	85.655
45				15	27.501	0.562	0.456	86.447
40				20	41.253	0.588	0.477	90.579
35				25	55.004	0.578	0.469	88.996
30				30	68.755	0.585	0.475	90.136
25				35	82.506	0.607	0.493	93.619
20				40	96.257	0.576	0.468	88.711
15				45	110.008	0.591	0.480	91.054
10				50	123.759	0.535	0.433	82.219
5				55	137.510	0.569	0.462	87.587
-				60	151.261	0.578	0.469	88.980

4.2.4.4. Seftriakson disodyum Antibiyotiğinin IC₅₀ Değerinin Belirlenmesi

Seftriakson disodyum antibiyotiğinin karaciğer GBA2 aktivitesi üzerine etkisi incelenirken, p-NPG substratının reaksiyon hacmindeki konsantrasyonu 1.75 mM kullanılmıştır. Seftriakson disodyum bulunmayan ortamdaki enzim aktivitesi % 100 aktivite olarak alınmış ve seftriakson disodyum 12.879 - 154.557 mM arasında değişen konsantrasyonlarındaki % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan veriler Tablo 4.6.'da gösterilmiştir.



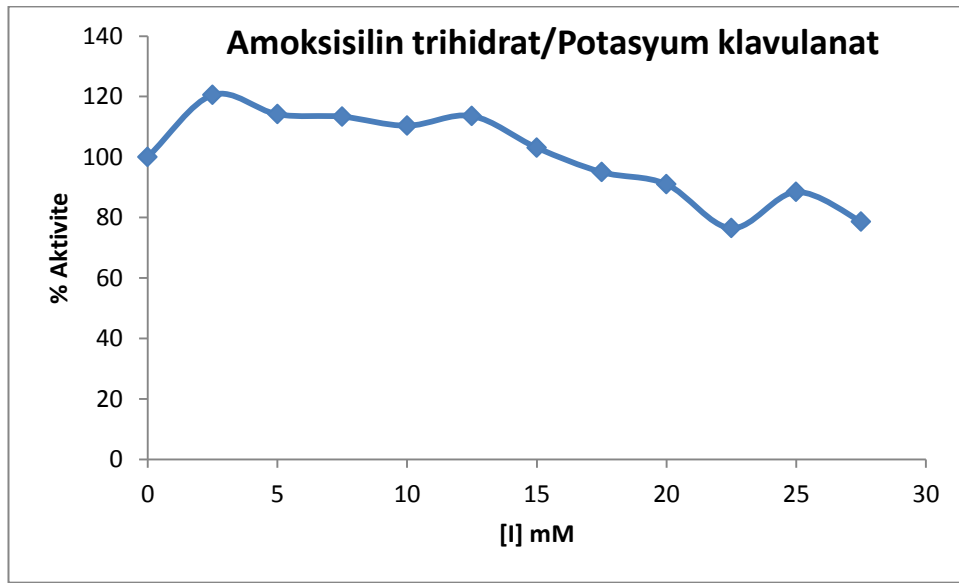
Şekil 4.8. Seftriakson disodyum antibiyotiğinin % enzim aktivitesi-ilaç konsantrasyonu grafiği.

Tablo 4.6.'daki verilere göre, seftriakson disodyum antibiyotığının *p*-NPG substratı varlığında, karaciğer GBA2 % aktivite- ilaç konsantrasyonu grafiği Şekil 4.8.'deki gibidir. Seftriakson disodyumun çalışılan konsantrasyon aralığında, karaciğer GBA2'yi inhibe etmediği görülmüştür.

50 mM Substrat Tamponu (μ l)	Antibiyotik	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Antibiyotik Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Kuyudaki Antibiyotik Konsantrasyonu [I] mM	Absorbans (405 nm)	Aktivite (U/ml dak.)	% Aktivite
0	Seftriakson sodyum	70	70	0	0	0.6477	0.5276	100
50				10	12.879	0.6117	0.4975	94.300
45				15	25.759	0.6362	0.5180	98.179
40				20	38.639	0.6665	0.5433	102.976
35				25	51.519	0.7455	0.6093	115.484
30				30	64.398	0.6168	0.5018	95.107
25				35	77.278	0.5852	0.4754	90.104
20				40	90.158	0.6093	0.4955	93.920
15				45	103.038	0.5818	0.4725	89.566
10				50	115.917	0.5917	0.4808	91.133
5				55	128.797	0.5221	0.4227	80.114
-				60	141.677	0.4542	0.3659	69.363

4.2.4.5. Amoksisilin trihidrat/Potasyum klavulanat Antibiyotiğinin IC₅₀ Değerinin Belirlenmesi

Amoksisilin trihidrat/potasyum klavulanat antibiyotiğinin karaciğer GBA2 aktivitesi üzerine etkisi incelenirken, p-NPG substratının reaksiyon hacmindeki konsantrasyonu 1.75 mM kullanılmıştır. Amoksisilin trihidrat/potasyum klavulanat bulunmayan ortamdaki enzim aktivitesi % 100 aktivite olarak alınmış ve amoksisilin trihidrat/ potasyum klavulanat 2.5-30 mg/ml arasında değişen konsantrasyonlarındaki % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan veriler Tablo 4.7.'de gösterilmiştir.



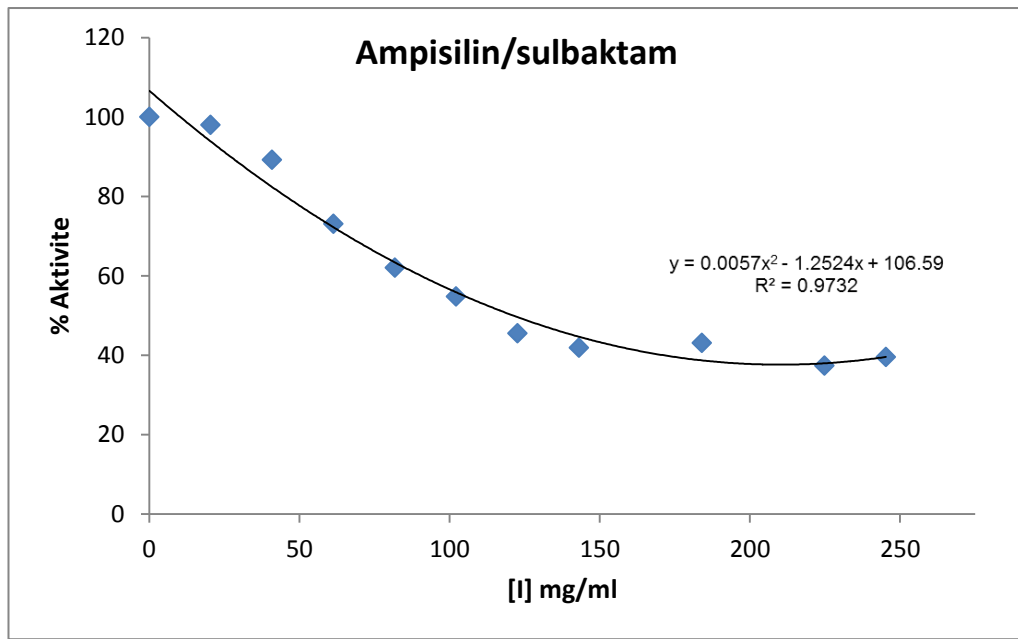
Şekil 4.9. Amoksisilin trihidrat/potasyum klavulanat antibiyotiğinin % enzim aktivitesi-ilaç konsantrasyonu grafiği.

Tablo 4.7.'deki verilere göre, amoksisilin trihidrat/potasyum klavulanat antibiyotiğinin *p*-NPG substratı varlığında, karaciğer GBA2 % aktivite- ilaç konsantrasyonu grafiği Şekil 4.9.'daki gibidir. Amoksisilin trihidrat/potasyum klavulanat çalışılan konsantrasyon aralığında karaciğer GBA2'yi inhibe etmediği görülmüştür.

50 mM Substrat Tamponu (μ l)	Antibiyotik	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Antibiyotik Çözeltisinin Hacmi (ml)	Kuyudaki Antibiyotik Konsantrasyonu [I] mg/ml	Absorbans (405 nm)	Aktivite (U/ml dak.)	% Aktivite
0	Amoksisilin trihidrat/potasyum klavulanat	70	70	0	0	0.647	0.5276	100
50				0.005	2.5	0.777	0.6359	120.519
45				0.01	5	0.737	0.6022	114.138
40				0.015	7.5	0.732	0.5980	113.347
35				0.02	10	0.713	0.5822	110.354
30				0.025	12.5	0.733	0.5992	113.568
25				0.03	15	0.667	0.5438	103.071
20				0.035	17.5	0.427	0.3438	95
15				0.04	20	0.590	0.4800	90.975
10				0.045	22.5	0.498	0.4033	76.440
5				0.05	25	0.574	0.4665	88.426
-				0.055	27.5	0.512	0.4148	78.625

4.2.4.6. Ampisilin/sulbaktam Antibiyotiğinin IC₅₀ Değerinin Belirlenmesi

Ampisilin/sulbaktam antibiyotiğinin karaciğer GBA2 aktivitesi üzerine etkisi incelenirken, p-NPG substratının reaksiyon hacmindeki konsantrasyonu 1.75 mM kullanılmıştır. Ampisilin/sulbaktam bulunmayan ortamdaki enzim aktivitesi % 100 aktivite olarak alınmış ve ampisilin/sulbaktam 10.714 - 117.856 mg/ml arasında değişen konsantrasyonlarındaki % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan veriler Tablo 4.8.'de gösterilmiştir.



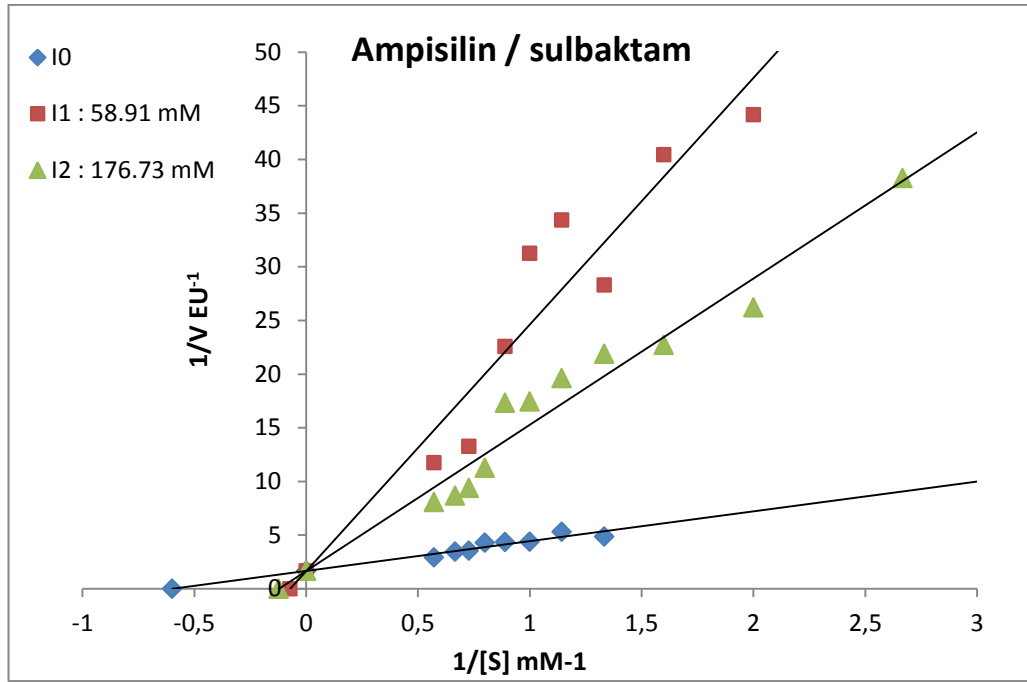
Şekil 4.10. Ampisilin/sulbaktam antibiyotiğinin % enzim aktivitesi-ilaç konsantrasyonu grafiği

Tablo 4.8.'deki verilere göre, ampicilin/sulbaktam antibiyotiğinin *p*-NPG substratı varlığında, karaciğer GBA2 % aktivite-ilaç konsantrasyonu grafiği Şekil 4.10.'daki gibidir. Grafik denkleminde yararlanılarak ampicilin/sulbaktam IC50 değeri 62.97 mg/ml bulunmuştur.

50 mM Substrat Tamponu (μ l)	Antibiyotik	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Antibiyotik Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Kuyudaki Antibiyotik Konsantrasyonu [I] mM	Absorbans (405 nm)	Aktivite (U/ml dak.)	% Aktivite
0	Ampicilin/sulbaktam	70	70	0	0	0.647	0.5276	100
55				5	10.71425	0.661	0.5395	98
50				10	21.4285	0.579	0.4706	89.202
45				15	32.14275	0.477	0.3857	73.100
40				20	42.857	0.407	0.3272	62.017
35				25	53.57125	0.362	0.2892	54.813
30				30	64.2855	0.303	0.2401	45.519
25				35	74.99975	0.280	0.2212	41.925
15				45	96.42825	0.288	0.2275	43.128
10				50	107.1425	0.252	0.1972	37.381
5				55	117.8568	0.265	0.2086	39.550

4.2.4.7. Karaciğer GBA2'yi İnhibe Eden Ampisilin/Sulbaktam Antibiyotiğinin İnhibisyon Tipi ve K_i Değerinin Belirlenmesi

Ampisilin/sulbaktam antibiyotiğinin karaciğer GBA2 aktivitesini inhibe ettiği belirlenmiştir. Ampisilin/sulbaktam enzim üzerine inhibisyon tipinin belirlenmesi için Bölüm 3.2.8'de açıklandığı gibi çalışma yapılmış ve bulunan deneysel sonuçlar Tablo 4.9 ve Tablo 4.10.'da verilmiştir. Tablo 4.9'daki değerler ile Şekil 4.11'deki Lineweaver-Burk grafiği elde edilmiştir.



Şekil 4.11 Ampisilin/ ulbaktam antibiyotiğinin karaciğer GBA2 aktivitesi üzerine inhibisyon tipinin belirlenmesinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği.

Şekil 4.11.'deki Lineweaver-Burk grafiğinden ampisilin/sulbaktam karaciğer GBA2'yi yarı yarışmalı tipte inhibe ettiği görülmektedir. Ampisilin/sulbaktam $[I_1] = 58.91$ mM ve $[I_2] = 176,73$ mM konsantrasyonlardaki aktivite değerleri kullanılarak çizilen grafikten K_i değerinin 14.30 ± 3.35 mg/mL olduğu hesaplanmıştır.

Tablo 4.9. Karaciğer GBA2 enzimi üzerine ampisilin/sulbaktam antibiyotiğinin K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin hacimleri ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.

50 mM Na-Ac tamponu (μ l)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (μ l)	İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Kuyudaki Toplam Hacim (μ l)	Kuyudaki Substrat Kons. [S] (mM)	Kuyudaki İnhibitör Kons. [I] (mM)	ΔA (405 nm)	Aktivite (U/ml dak)	1/V	1/[S]
110	70	20	-	200	0.5	-	0.1910	0.146115	6.843	2
100		30			0.75		0.2623	0.116124	8.611	1.6
90		40			1		0.2897	0.228571	4.375	1
85		45			1.125		0.2917	0.230242	4.343	0.88888
80		50			1.25		0.2954	0.233333	4.285	0.8
75		55			1.375		0.3535	0.281871	3.547	0.72727
70		60			1.5		0.3641	0.290727	3.439	0.66666
60		70			1.75		0.4267	0.343024	2.915	0.57142

Tablo 4.10. Karaciğer GBA2 enzimi üzerine ampisilin/sulbaktam antibiyotiğinin K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin hacimleri ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.

50 mM Na- Ac tamponu (μ l)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (μ l)	İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Kuyudaki Toplam Hacim (μ l)	Kuyudaki Substrat Kons. [S] (mM)	Kuyudaki İnhibitör Kons. [I] (mM)	ΔA (405 nm)	Aktivite (U/ml dak)	1/V	1/[S]				
95	70	15	20	200	0.375	81.77	0.27	0.2133	4.686	2.666				
85		25			0.625		0.33	0.2658	3.761	1.6				
80		30			0.75		0.36	0.2875	3.477	1.333				
75		35			0.875		0.41	0.3325	3.006	1.142				
70		40			1		0.45	0.3624	2.758	1				
65		45			1.125		0.47	0.3859	2.590	0.889				
60		50			1.25		0.55	0.4489	2.227	0.8				
55		55			1.375		0.56	0.4605	2.171	0.727				
50		60			1.5		0.62	0.5071	1.971	0.666				
40		70			1.75		0.76	0.6246	1.600	0.571				
55		70			15		60	200	0.6170	245.31	0.67	0.5469	1.828	2.666
45					25				0.6446		0.64	0.5250	1.904	1.6
40	30		0.6890	0.68	0.5621	1.778			1.6					
35	35		0.7032	0.70	0.5740	1.742			1.333					
30	40		0.6794	0.67	0.5541	1.804			1.142					
25	45		0.7509	0.75	0.6138	1.625			1					
20	50		0.8107	0.81	0.6638	1.506			0.888					
15	55		0.8366	0.83	0.6854	1.458			0.8					
10	60		0.8627	0.86	0.7072	1.413			0.727					
0	70				8.660	0.86			0.7100		1.408	0.666		

Tablo 4.11. Karaciğer GBA2 aktivitesi üzerine araştırılan antibiyotiklerin etkileri.

İlaç (inhibitör)	IC₅₀	İnhibisyon Tipi	Ki
Sefuroksim sodyum	İnhibisyon yok		
Ampisilin/sulbaktam	62.97 mg/ml	Yarışmalı	14.30 ± 3.35 mg/mL
Amoksisilin trihidrat/ potasyum klavulanat	İnhibisyon yok	-	
Sefazolin sodyum	İnhibisyon yok	-	
Gentamisin sülfat	İnhibisyon yok	-	
Seftriakson disodyum	İnhibisyon yok	-	

4.3. Böbrek GBA2 Saflaştırılması ve Bazı Antibiyotiklerin Etkilerinin Araştırılması

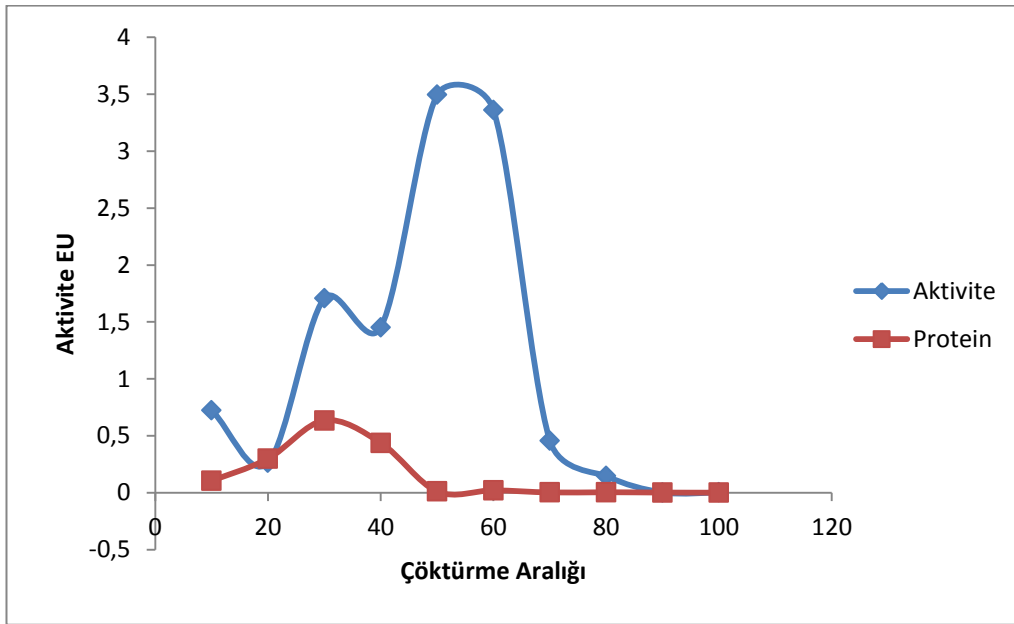
4.3.1. Böbrek GBA2'nin Amonyum sülfat Çöktürme Aralığının Belirlenmesi

Amonyum sülfat çöktürme aralığının belirlenmesi için ham ekstrakta Tablo 4.12.'de verilen amonyum sülfat miktarları eklenerek Bölüm 3.2.5.1'de belirtilen yöntem uygulanmıştır. Her bir aralıktaki enzim numunelerinin 405 nm'deki absorbansları kendi körlerine karşı okunmuştur. Elde edilen veriler, Tablo 4.12'de verilmiştir.

Tablo 4.12. Böbrek GBA2 amonyum sülfat çöktürme aralığının belirlenmesinde kullanılan çözelti hacimleri, kullanılan tuz miktarı ve elde edilen değerler.

Aralık Değeri	Çöktürme Aralığı	Hacim (mL)	Kullanılan Amonyum sülfat Miktarı (g)	Protein Miktarı (mg/mL)	Aktivite (EU)	Absorbans 405 nm
1	0-10	6.5	0.334	0.1052	0.7224	0.534
2	10-20	5.5	0.291	0.2989	0.2626	0.194
3	20-30	5	0.273	0.6347	1.7077	1.261
4	30-40	4.5	0.253	0.4378	1.4525	1.072
5	40-50	4	0.250	0.0111	3.4953	2.580
6	50-60	4	0.240	0.0206	3.3623	2.482
7	60-70	3.1	0.193	0.0021	0.4575	0.338
8	70-80	2.850	0.184	0.004	0.1464	0.109
9	80-90	3	0.201	0.001	0.0020	0.002
10	90-100	3	0.323	0.0001	0.0023	0,002

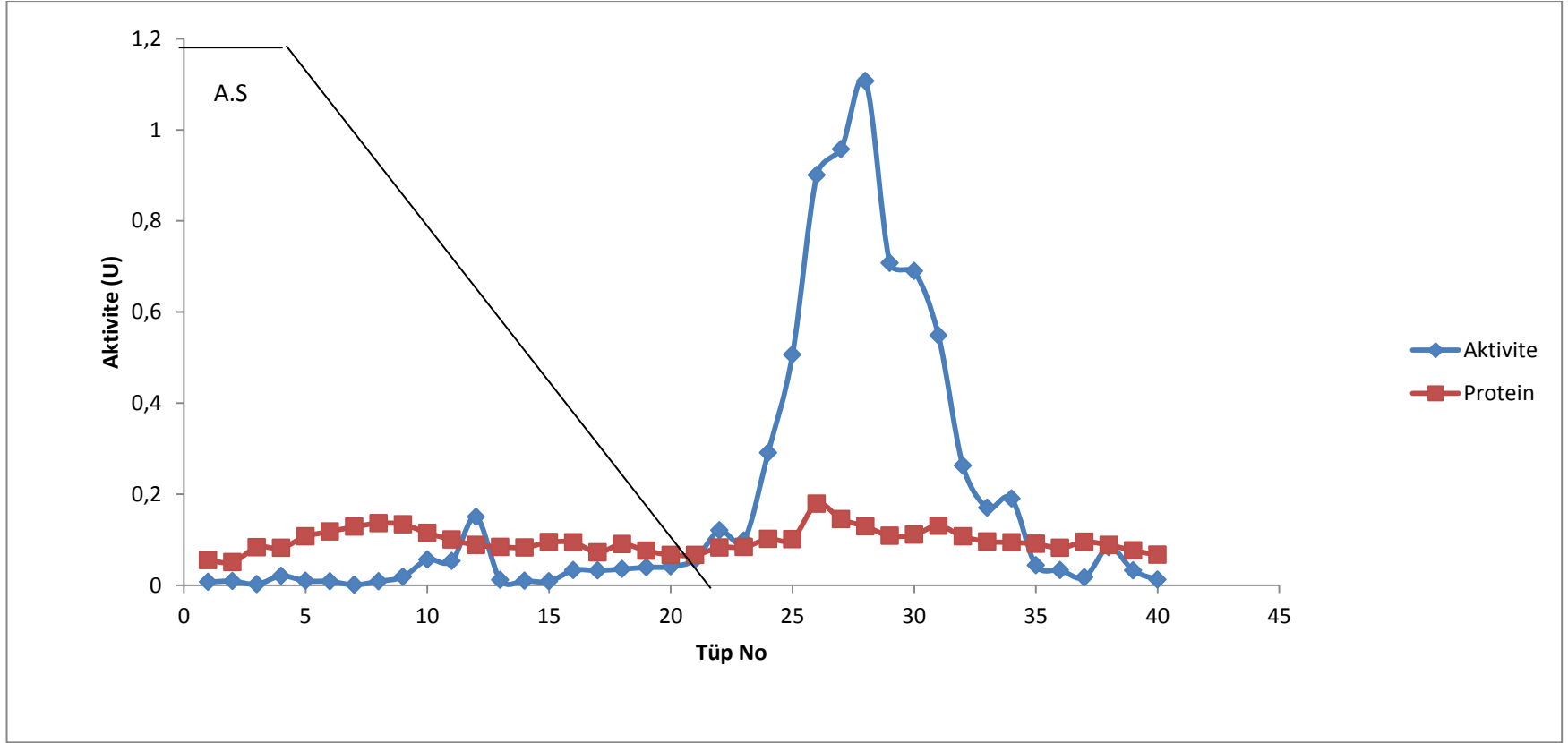
Tablo 4.11'deki değerler kullanılarak Şekil 4.12.'deki amonyum sülfat çöktürme aralığı-aktivite grafiği çizilmiŐtir. Özelikle ktrme aralığının belirlenmesinde protein miktarının düşük; buna karşılık enzim aktivitesinin yüksek olduğu aralık tespit edilmiştir. Grafiğe göre enzimin çöktüğü tuz konsantrasyonu % 20-60 aralığı olarak belirlenmiş ve saflaştırma işlemlerinde % 20-60 amonyum sülfat tuz çöktürmesi uygulanmıştır.



Şekil 4.12. Böbrek GBA2 amonyum sülfat çöktürme aralığının tespitinde kullanılan grafik.

4.3.2. Böbrek GBA2'nin Saflaştırılması

Bölüm 3.2.5.2'de belirtildiği gibi % 20-60 amonyum sülfat çöktürmesi sonunda elde edilen numune, laboratuvarında sentezlenmiş sepharose 4B-L-tirozin-1-naftilamin hidrofobik jeli içeren kolona yüklenmiştir. Kolondaki jel yüksekliği 7 cm ve çap 1 cm'dir. Kolondan alınan numunelerin 50 mM sodyum fosfat pH 6.8 tamponu kör olarak kullanılarak 280 nm'de kalitatif protein tayini yapılmıştır. Elüsyondaki her bir tüpün aktivite tayini, kendi numunesinden oluşan köre karşı yapılmıştır. Elde edilen değerlerin, tüp numarasına karşı aktivite ve protein miktarı Şekil 4.3.'deki grafikten de görüldüğü gibi yüksek aktivite gösteren 26, 27, 28, 29 ve 30 numaralı tüpler birleştirilmiştir. Kolona tatbik edilen ve birleştirilen elüatlar için Lowry metodu ile kantitatif protein ve aktivite tayinleri yapılarak spesifik aktiviteler ve saflaştırma oranları hesaplanmıştır (Tablo 4.13.).



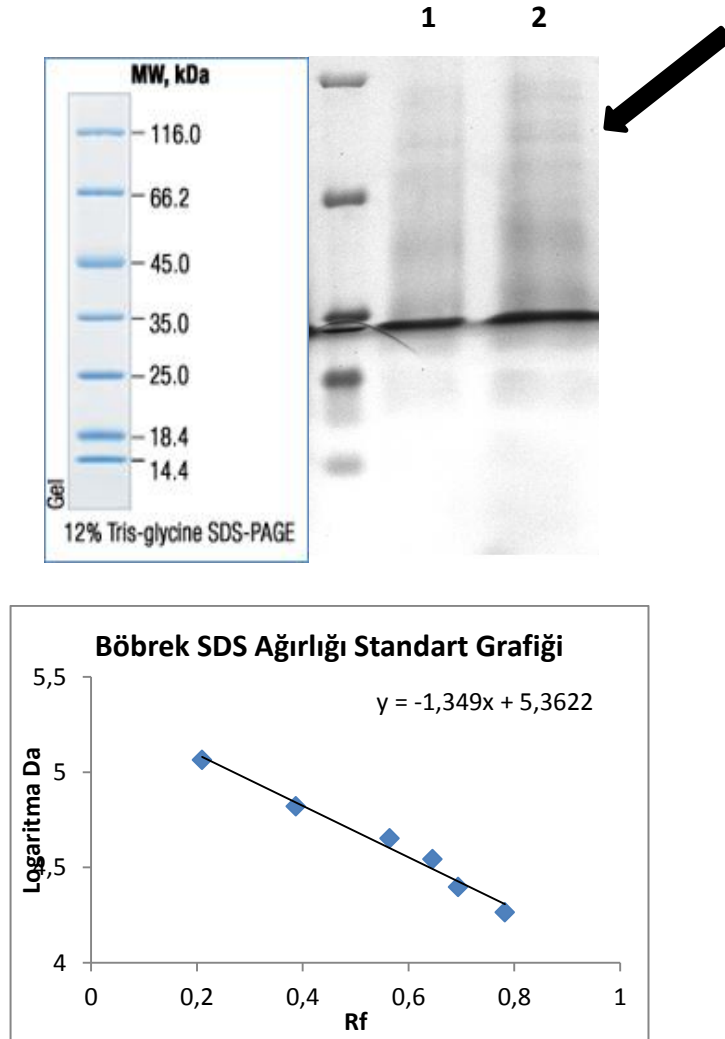
Şekil 4.13. Hidrofobik etkileşim kromatografisi kolonundan böbrek GBA2'nin saflaştırma grafiği.

Tablo 4.13. Böbrek GBA2 Saflaştırma Tablosu.

Basamak	Hacim (ml)	Aktivite (U/ml)	Toplam Aktivite (U/ml)	Protein Miktarı (mg/ml)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	% Verim	Saflaştırma Derecesi
Ham ekstrakt	6	4.09	24.56	1.89	11.39	2.15	100	1
Amonyum sülfat çöktürmesi (% 50)	3,1	6.23	19.32	1.90	5.91	3.26	78.68	1.52
Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi 32.tüp	2	1.50	3	0.13	0.27	10.94	12.21	5.08

4.3.3 Böbrek GBA2 SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrez

Hidrofobik etkileşim kolonundan saflaştırılan Böbrek GBA2 enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla Bölüm 3.2.5.3’de anlatıldığı şekilde hazırlanan SDS poliakrilamid jel elektrofrezine, saflaştırılan enzim numunesi yüklendi. Protein bantları içeren jellerin görüntüleri, jel görüntüleme sistemi ile bilgisayara aktarıldı (Şekil 4.14.).

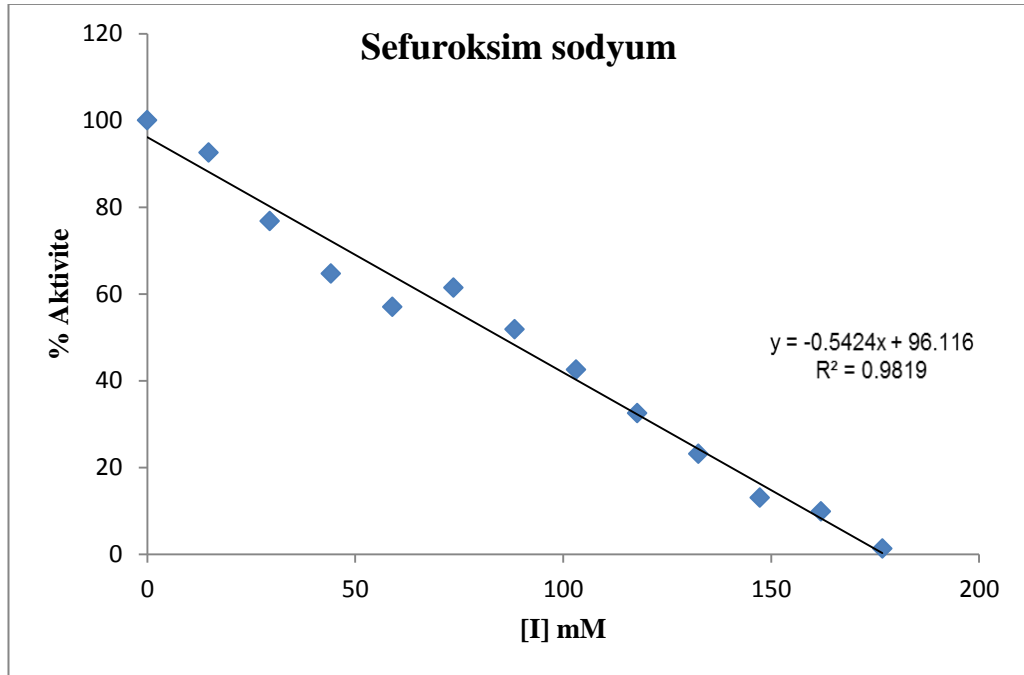


Şekil 4.14. Hidrofobik etkileşim kromatografisi sonunda saflaştırılmış böbrek GBA2. **1:** Protein belirteç. Molekül ağırlık standartları; (β -galaktosidaz (116.0kDa), sığır serum albumin (66.2 kDa), yumurta albumini (45.0 kDa), laktat dehidrogenaz (35.0 kDa), REase Bsp98I (E.coli) (25.0 kDa), β -laktoglobulin (18.4 kDa) ve Lizozim (14.4 kDa) **2:** Hidrofobik etkileşim kromatografisi sonundaki saflaştırılmış böbrek GBA2.

4.3.4 Böbrek GBA2 Üzerine Bazı Antibiyotiklerin IC₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi

4.3.4.1. Sefuroksim sodyum Antibiyotiğinin IC₅₀ Değerinin Belirlenmesi

Sefuroksim sodyumun böbrek GBA2 aktivitesi üzerine etkisi incelenirken, p-NPG substratının reaksiyon hacmindeki konsantrasyonu 1.75 mM kullanılmıştır. Sefuroksim sodyum bulunmayan ortamdaki enzim aktivitesi % 100 aktivite olarak alınmış ve sefuroksim sodyumun 14.727 - 176.725 mM arasında değişen konsantrasyonlarındaki % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan veriler Tablo 4.14'de gösterilmiştir.



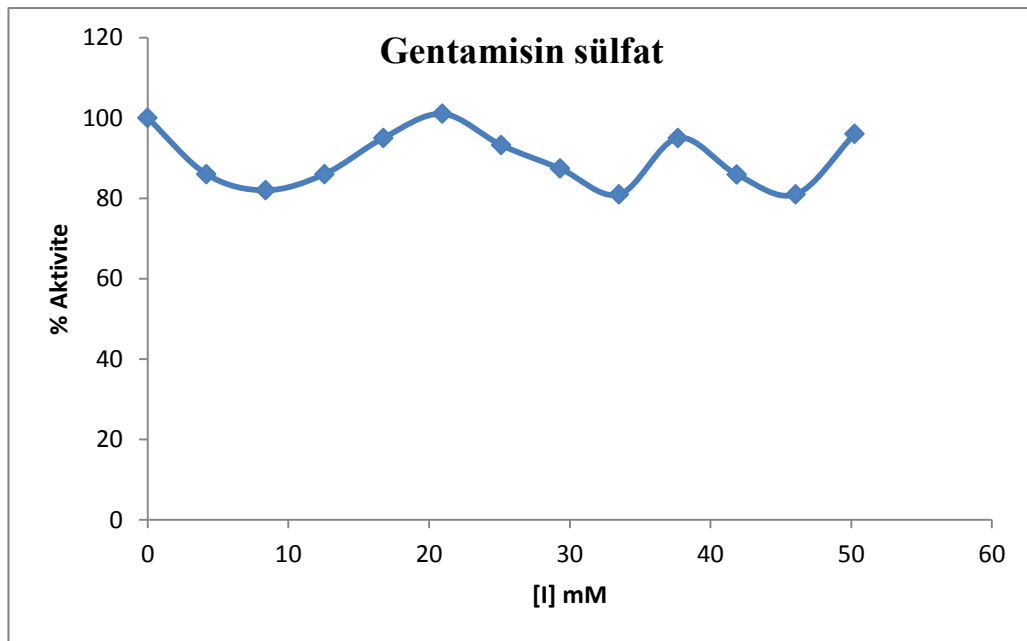
Şekil 4.15. Sefuroksim sodyum antibiyotiğinin % enzim aktivitesi-ilaç konsantrasyonu grafiği.

Tablo 4.14.'deki verilere göre, sefuroksim sodyum antibiyotiğinin *p*-NPG substratı varlığında, böbrek GBA2 % aktivite-ilaç konsantrasyonu grafiği, Şekil 4.15.'deki gibidir. Grafik denkleminde yararlanılarak sefuroksim sodyum IC₅₀ değeri, 85.02 mM bulunmuştur.

50 mM Substrat Tamponu (µl)	Antibiyotik	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi ((µl))	Antibiyotik Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Kuyudaki Antibiyotik Konsantrasyonu [I] mM	Absorbans (405 nm)	Aktivite (U/ml dak.)	% Aktivite
0	Sefuroksim sodyum	70	70	0	0	1.863	46.308	100
55				5	14.727	1.726	42.862	92.558
50				10	29.454	1.434	35.553	76.776
45				15	44.181	1.211	29.954	64.685
40				20	58.908	1.069	26.395	57.000
35				25	73.635	1.151	28.448	61.433
30				30	88.362	0.972	23.977	51.777
25				35	103.090	0.801	19.679	42.496
20				40	117.817	0.615	15.027	32.451
15				45	132.544	0.442	10.696	23.098
10				50	147.271	0.256	6.0325	13.027
5				55	161.998	0.198	4.5614	9.8500
-				60	176.725	0.038	0.5714	1.2339

4.3.4.2. Gentamisin sülfat Antibiyotiğinin IC₅₀ Değerinin Belirlenmesi

Gentamisin sülfat antibiyotiğinin böbrek GBA2 aktivitesi üzerine etkisi incelenirken, p-NPG substratının reaksiyon hacmindeki konsantrasyonu 1.75 mM kullanılmıştır. Gentamisin sülfat bulunmayan ortamdaki enzim aktivitesi % 100 aktivite olarak alınmış ve gentamisin sülfat 4.187 - 50.251 mM arasında değişen konsantrasyonlarındaki % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan veriler, Tablo 4.15’de gösterilmiştir.



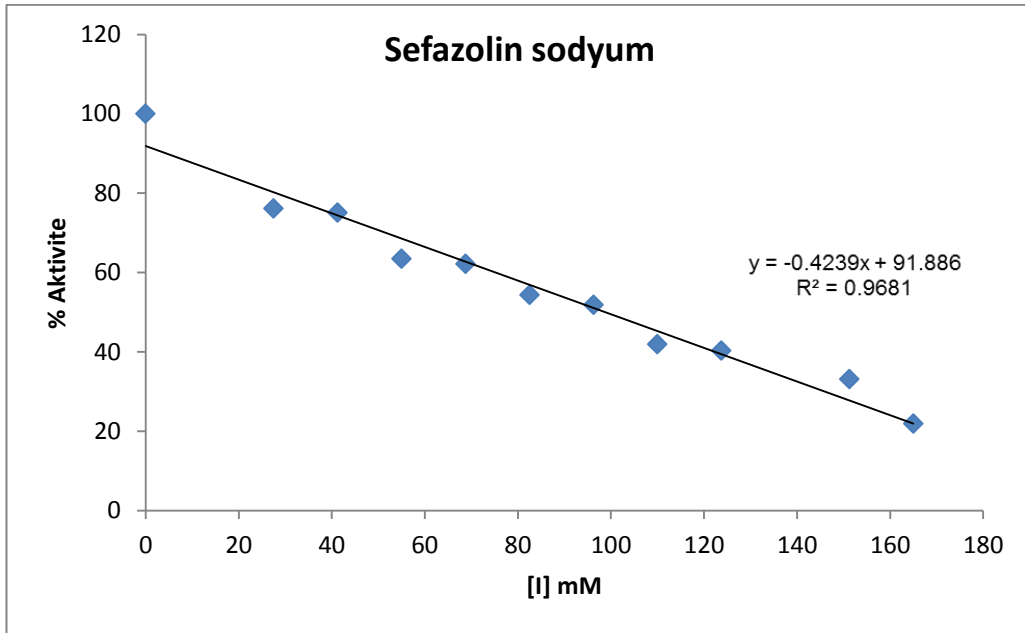
Şekil 4.16. Gentamisin sülfat antibiyotiğinin % enzim aktivitesi-ilaç konsantrasyon grafiği.

Tablo 4.15.'deki verilere göre, gentamisin sülfat antibiyotığının *p*-NPG substratı varlığında, böbrek GBA2 % aktivite-ilaç konsantrasyonu grafiği, Şekil 4.16.'daki gibidir. Gentamisin sülfatın çalışılan konsantrasyon aralığında, karaciğer GBA2'yi inhibe etmediği görülmüştür.

50 mM Substrat Tamponu (μl)	Antibiyotik	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μl)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (μl)	Antibiyotik Çözeltilisinin Hacmi (μl)	Kuyudaki Antibiyotik Konsantrasyonu [I] mM	Absorbans (405 nm)	Aktivite (U/ml dak.)	% Aktivite
0	Gentamisin Sülfat	70	70	0	0	1.863	1.5436	100
55				5	4.187	1.604	1.3269	85.966
50				10	8.375	1.408	1.1628	82
45				15	12.562	1.479	1.2224	86
40				20	16.750	1.808	1.4974	95
35				25	20.938	1.958	1.6230	101
30				30	25.125	1.738	1.4392	93.240
25				35	29.313	1.630	1.3488	87.384
20				40	33.501	1.512	1.2497	80.965
15				45	37.688	1.887	1.5634	95
10				50	41.876	1.603	1.3259	85.901
5				55	46.063	1.487	1.2288	81
-				60	50.251	1.790	1.4822	96.027

4.3.4.3. Sefazolin sodyum Antibiyotiğinin IC₅₀ Değerinin Belirlenmesi

Sefazolin sodyum antibiyotiğinin böbrek GBA2 aktivitesi üzerine etkisi incelenirken, p-NPG substratının reaksiyon hacmindeki konsantrasyonu 1.75 mM kullanılmıştır. Sefazolin sodyum bulunmayan ortamdaki enzim aktivitesi % 100 aktivite olarak alınmış ve sefazolin sodyum 27.502 - 165.012 mM arasında değişen konsantrasyonlarındaki % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan veriler Tablo 4.16' da gösterilmiştir.



Şekil 4.17. Sefazolin sodyum antibiyotiğinin % enzim aktivitesi-ilaç konsantrasyonu grafiği.

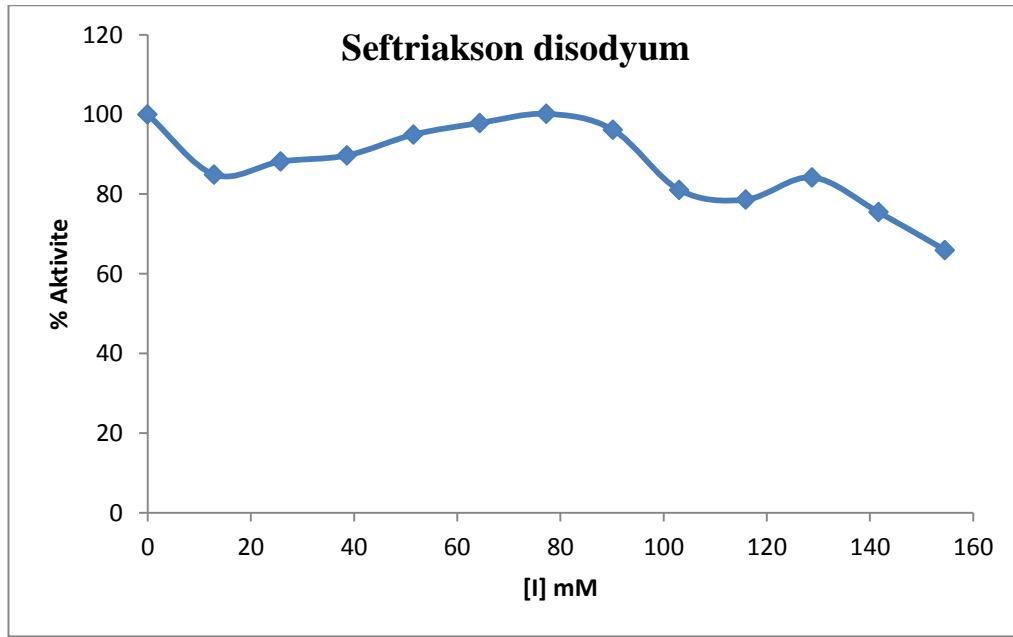
Tablo 4.16.'daki verilere göre, sefazolin sodyum antibiyotiğinin *p*-NPG substratı varlığında, böbrek GBA2 % aktivite-ilaç konsantrasyonu grafiği, Şekil 4.17.'deki gibidir. Grafik denkleminde yararlanılarak sefazolin sodyum IC₅₀ değeri, 98.81 mM bulunmuştur

50 mM Substrat Tamponu (µl)	Antibiyotik	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µl)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µl)	Antibiyotik Çözeltisinin Hacmi (µl)	Kuyudaki Antibiyotik Konsantrasyonu [I] mM	Absorbans (405 nm)	Aktivite (U/ml dak.)	% Aktivite
0	Sefazolin sodyum	70	70	0	0	1.863	1.543	100
50				10	27.502	1.422	1.174	76.094
45				15	41.253	1.402	1.158	75.050
40				20	55.004	1.188	0.979	63.457
35				25	68.755	1.164	0.959	62.142
30				30	82.506	1.020	0.838	54.337
25				35	96.257	0.974	0.800	51.859
20				40	110.008	0.790	0.646	41.900
15				45	123.759	0.761	0.622	40.314
5				55	151.261	0.628	0.511	33.116
-				60	165.012	0.420	0.337	21.886

4.3.4.4. Seftriakson disodyum Antibiyotiğinin IC₅₀ Değerinin

Belirlenmesi

Seftriakson disodyum antibiyotiğinin böbrek GBA2 aktivitesi üzerine etkisi incelenirken, p-NPG substratının reaksiyon hacmindeki konsantrasyonu 1.75 mM kullanılmıştır. Seftriakson disodyum bulunmayan ortamdaki enzim aktivitesi % 100 aktivite olarak alınmış ve seftriakson disodyum 12.879 - 154.557 mM arasında değişen konsantrasyonlarındaki % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan veriler Tablo 4.17' de gösterilmiştir.



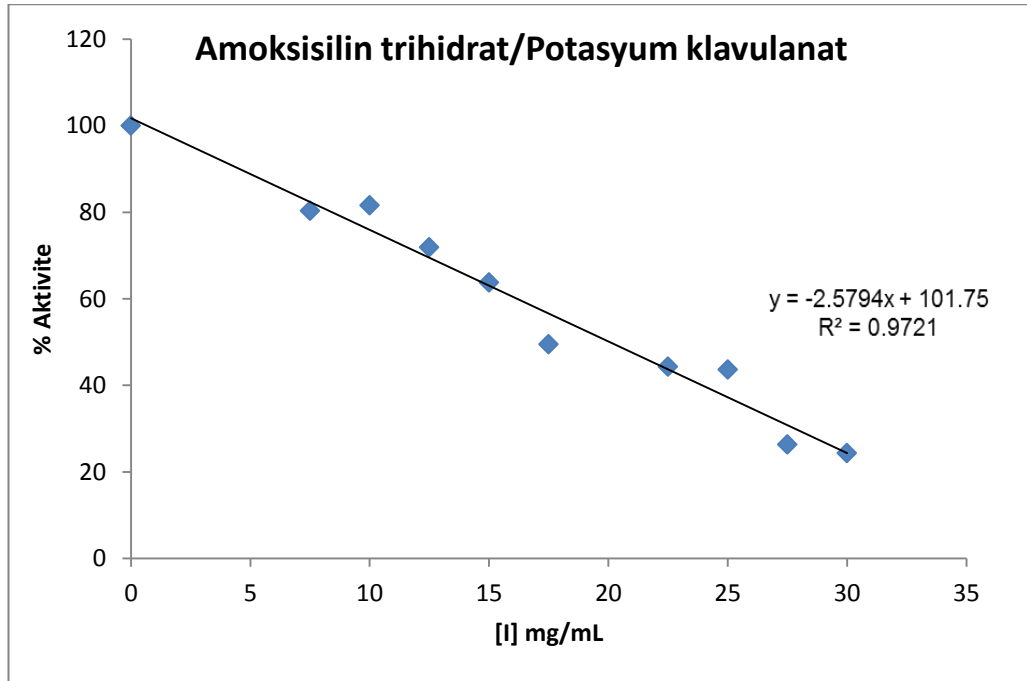
Şekil 4.18. Seftriakson disodyum antibiyotiğinin % enzim aktivitesi-ilaç konsantrasyonu grafiği.

Tablo 4.17.'deki verilere göre, seftriakson disodyum antibiyotığının *p*-NPG substratı varlığında, böbrek GBA2 % aktivite-ilaç konsantrasyonu grafiği Şekil 4.18.'deki gibidir. Seftriakson disodyumun çalışılan konsantrasyon aralığında, karaciğer GBA2'yi inhibe etmediği görülmüştür.

50 mM Substrat Tamponu (μl)	Antibiyotik	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μl)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (μl)	Antibiyotik Çözeltilisinin Hacmi (μl)	Kuyudaki Antibiyotik Konsantrasyonu [I] mM	Absorbans (405 nm)	Aktivite (U/ml dak.)	% Aktivite
0	Seftriakson disodyum	70	70	0	0	1.863	1.5436	100
55				5	12.879	1.585	1.3106	84.910
50				10	25.759	1.645	1.7510	88.174
45				15	38.639	1.673	1.3848	89.716
40				20	51.519	1.770	1.4653	94.928
35				25	64.398	1.824	1.5104	97.851
30				30	77.278	1.866	1.5456	100.13
25				35	90.158	1.792	1.4843	96.162
20				40	103.038	1.513	1.2511	81.052
15				45	115.917	1.468	1.2136	78.622
10				50	128.797	1.571	1.2995	84.191
5				55	141.677	1.410	1.1647	75.455
-				60	154.557	1.234	1.0180	65.952

4.3.4.5. Amoksisilin trihidrat/Potasyum klavulanat Antibiyotiğinin IC₅₀ Değerinin Belirlenmesi

Amoksisilin trihidrat/potasyum klavulanat antibiyotiğinin böbrek GBA2 aktivitesi üzerine etkisi incelenirken, p-NPG substratının reaksiyon hacmindeki konsantrasyonu 1.75 mM kullanılmıştır. Amoksisilin trihidrat/potasyum klavulanat bulunmayan ortamdaki enzim aktivitesi % 100 aktivite olarak alınmış ve amoksisilin trihidrat/potasyum klavulanat 2.5-30 mg/ml arasında değişen konsantrasyonlarındaki % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan veriler, Tablo 4.18.'de gösterilmiştir.



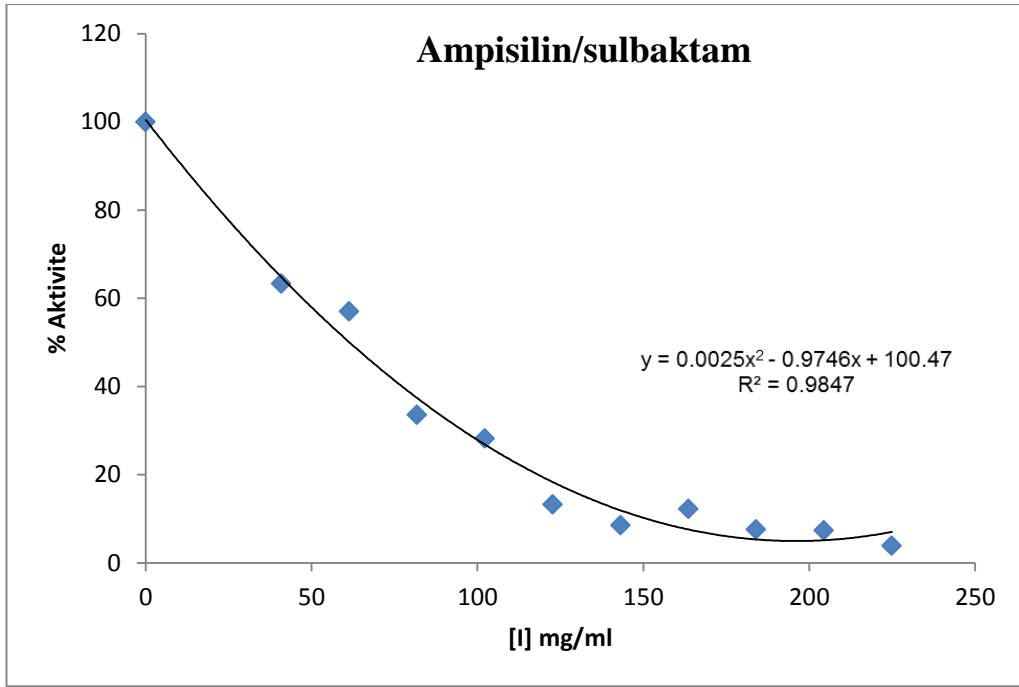
Şekil 4.19. Amoksisilin trihidrat/potasyum klavulanat antibiyotiğinin % enzim aktivitesi-ilaç konsantrasyonu grafiği.

Tablo 4.18.'deki verilere göre, amoksisilin trihidrat/potasyum klavulanat antibiyotiğinin *p*-NPG substratı varlığında, böbrek GBA2 % aktivite-ilaç konsantrasyonu grafiği, Şekil 4.19.'daki gibidir. Grafik denkleminde yararlanılarak amoksisilin trihidrat/potasyum klavulanat IC₅₀ değeri, 20.06 mg/mL bulunmuştur.

50 mM Substrat Tamponu (μ l)	Antibiyotik	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Antibiyotik Çözeltilisinin Hacmi (ml)	Kuyudaki Antibiyotik Konsantrasyonu [I] mg/mL	Absorbans (405 nm)	Aktivite (U/ml dak.)	% Aktivite
0	Amoksisilin trihidrat/Potasyum klavulanat	70	70	0	0	1.863	1.543	100
45				0.015	7.5	1.500	1.239	80.310
40				0.02	10	1.523	1.259	81.577
35				0.025	12.5	1.344	1.109	71.867
30				0.03	15	1.193	0.983	63.733
25				0.035	17.5	0.929	0.763	49.450
15				0.045	22.5	0.834	0.683	44.303
10				0.05	25	0.821	0.673	43.600
5				0.055	27.5	0.501	0.405	26.281
-				0.06	30	0.464	0.374	24.289

4.3.4.6. Ampisilin/sulbaktam Antibiyotiğinin IC₅₀ Değerinin Belirlenmesi

Ampisilin/sulbaktam antibiyotiğinin böbrek GBA2 aktivitesi üzerine etkisi incelenirken, p-NPG substratının reaksiyon hacmindeki konsantrasyonu 1.75 mM kullanılmıştır. Ampisilin/sulbaktam bulunmayan ortamdaki enzim aktivitesi % 100 aktivite olarak alınmış ve ampisilin/sulbaktam 10.714 – 128.516 mg/ml arasında değişen konsantrasyonlarındaki % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan veriler, Tablo 4.19.'da gösterilmiştir.



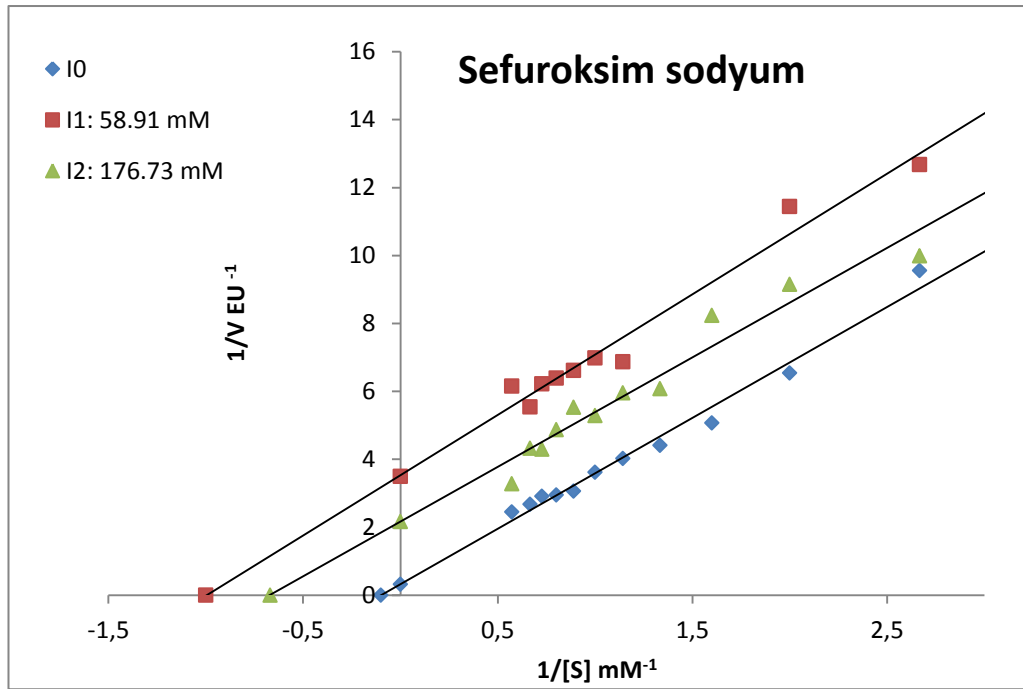
Şekil 4.20. Ampisilin/sulbaktam antibiyotiğinin % enzim aktivitesi-ilaç konsantrasyonu grafiği.

Tablo 4.19.'daki verilere göre, ampisilin/sulbaktam antibiyotiğinin *p*-NPG substratı varlığında, böbrek GBA2 % aktivite-ilaç konsantrasyonu grafiği, Şekil 4.20.'deki gibidir. Grafik denkleminin yararlanılarak amoksisilin trihidrat/potasyum klavulanat IC₅₀ değeri, 32.23 mg/ml bulunmuştur.

50 mM Substrat Tamponu (μ l)	Antibiyotik	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Antibiyotik Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Kuyudaki Antibiyotik Konsantrasyonu [I] mM	Absorbans (405 nm)	Aktivite (U/ml dak.)	% Aktivite
0	Ampisilin/sulbaktam	70	70	0	0	1.863	1.543	100
50				10	21.4285	1.185	0.995	63.305
45				15	32.14275	1.069	0.977	56.989
40				20	42.857	0.636	0.879	33.571
35				25	53.57125	0.537	0.518	28.202
30				30	64.2855	0.260	0.435	13.248
25				35	74.99975	0.174	0.204	8.54
20				40	85.714	0.241	0.131	12.198
15				45	96.42825	0.155	0.188	7.560
10				50	107.1425	0.152	0.116	7.376
5				55	117.8568	0.087	0.113	3.880

4.3.4.7. Böbrek GBA2'yi İnhibe Eden Sefuroksim sodyum Antibiyotiğinin İnhibisyon Tipi ve K_i Değeri Belirlenmesi

Sefuroksim sodyum antibiyotiğinin böbrek GBA2 aktivitesini inhide ettiği belirlenmiştir. Sefuroksim sodyumun enzim üzerine inhibisyon tipinin belirlenmesi için Bölüm 3.2.8'de açıklandığı gibi çalışma yapılmış ve bulunan deneysel sonuçlar, Tablo 4.20. ve Tablo 4.21.'de verilmiştir. Bu verilerle de Şekil 4.21.'deki Lineweaver-Burk grafiği elde edilmiştir.



Şekil 4.21. Sefuroksim sodyum antibiyotiğinin böbrek GBA2 aktivitesi üzerine inhibisyon tipinin belirlenmesinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği.

Şekil 4.21.'deki Lineweaver-Burk grafiğinden sefuroksim sodyumun böbrek GBA2'yi yarışmasız tipte inhide ettiği görülmektedir. Sefuroksim disodyumun $[I_1] = 58.91$ mM ve $[I_2] = 176.73$ mM konsantrasyonlardaki aktivite değerleri kullanılarak çizilen grafikten K_i değerinin 28.37 ± 6.35 mg/mL olduğu hesaplanmıştır.

Tablo 4.20. Böbrek GBA2 enzimi üzerine sefuroksim sodyum antibiyotığının K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin hacimleri ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.

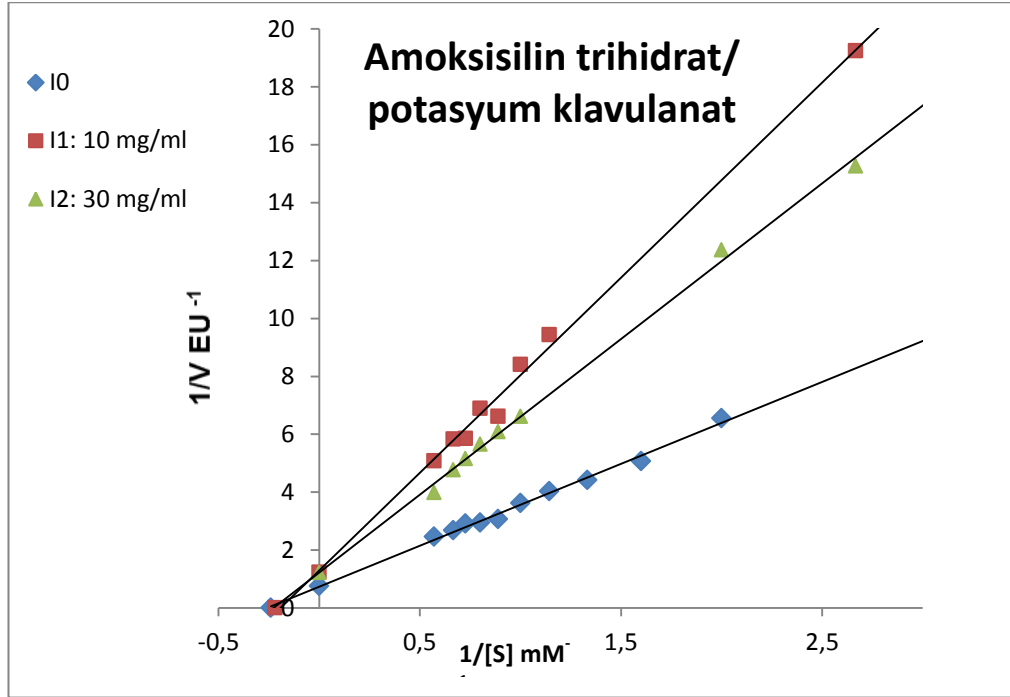
50 mM Na- Ac tamponu (μ l)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Substrat çözeltilisinin hacmi (μ l)	İnhibitör Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Kuyudaki Toplam Hacim (μ l)	Kuyudaki Substrat Kons. [S] (mM)	Kuyudaki İnhibitör Kons. [I] (mM)	ΔA (405 nm)	Aktivite (U/ml dak)	1/V	1/[S]
120	70	10	-	200	0.25	-	0.0805	0.0538	18.586	4
115		15			0.375		0.1413	0.1045	9.560	2.666
110		20			0.5		0.1989	0.1527	6.548	2
105		25			0.625		0.2522	0.1972	5.069	1.6
100		30			0.75		0.2872	0.2264	4.415	1.333
95		35			0.875		0.3130	0.2480	4.031	1.145
90		40			1		0.3469	0.2763	3.618	1
85		45			1.125		0.4065	0.3261	3.066	0.888
80		50			1.25		0.4220	0.3390	2.949	0.8
75		55			1.375		0.4271	0.3433	2.912	0.727
70		60			1.5		0.4624	0.3728	2.682	0.666
60		70			1.75		0.5037	0.4073	2.454	0.571

Tablo 4.21. Böbrek GBA2 enzimi üzerine sefuroksim sodyum antibiyotığının K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin hacimleri ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.

50 mM Na-Ac tamponu (μ l)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Substrat çözeltisinin hacmi (μ l)	İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Kuyudaki Toplam Hacim (μ l)	Kuyudaki Substrat Kons. [S] (mM)	Kuyudaki İnhibitör Kons. [I] (mM)	ΔA (405 nm)	Aktivite (U/ml dak)	1/V	1/[S]
95	70	15	20	200	0.375	58,91	0.1105	0.0788	12.680	2.666
90		20			0.5		0.1207	0.0873	11.443	2
75		35			0.875		0.1903	0.145	6.871	1.142
70		40			1		0.1874	0.1431	6.987	1
65		45			1.125		0.1969	0.1510	6.620	0.888
60		50			1.25		0.2033	0.1563	6.394	0.8
55		55			1.375		0.2085	0.1607	6.221	0.727
50		60			1.5		0.2320	0.1803	5.544	0.666
40		70			1.75		0.2105	0.1624	6.157	0.571
95		70			15		60	200	0.375	176,73
90	20		0.5	0.1469	0.1092	9.151			2	
85	25		0.625	0.1613	0.1213	8.243			1.6	
80	30		0.75	0.2130	0.1644	6.079			1.333	
75	35		0.875	0.2171	0.1679	5.955			1.142	
70	40		1	0.2425	0.1891	5.287			1	
65	45		1.125	0.2322	0.1805	5.539			0.888	
60	50		1.25	0.2618	0.2052	4.871			0.8	
55	55		1.375	0.2943	0.2324	4.302			0.727	
50	60		1.5	0.2925	0.2309	4.330			0.666	
40	70		1.75	0.3810	0.3048	3.280			0.571	

4.3.4.8. Böbrek GBA2'yi İnhibe Eden Amoksisilin trihidrat/Potasyum klavulanat Antibiyotiğinin İnhibisyon Tipi ve K_i Değerinin Belirlenmesi

Amoksisilin trihidrat/potasyum klavulanat antibiyotiğinin böbrek GBA2 aktivitesini inhibe ettiği belirlenmiştir Amoksisilin trihidrat/potasyum klavulanat antibiyotiğinin enzim üzerine inhibisyon tipinin belirlenmesi için Bölüm 3.2.8'de açıklandığı gibi çalışma yapılmış ve bulunan deneysel sonuçlar, Tablo 4.22. ve Tablo 4.23.'de verilmiştir. Bu veriler ile de Şekil 4.22.'deki Lineweaver-Burk grafiği elde edilmiştir.



Şekil 4.22. Amoksisilin trihidrat/potasyum klavulanat antibiyotiğinin böbrek GBA2 aktivitesi üzerine inhibisyon tipinin belirlenmesinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği.

Şekil 4.22.'deki Lineweaver-Burk grafiğinden, amoksisilin trihidrat/potasyum klavulanatın böbrek GBA2'yi yarışmasız tipte inhibe ettiği görülmektedir. Amoksisilin trihidrat/potasyum klavulanat $[I_1] = 10$ mg/ml ve $[I_2] = 30$ mg/ml konsantrasyonlardaki aktivite değerleri kullanılarak çizilen grafikten K_i 27.19 ± 12.04 mg/mL olduğu hesaplanmıştır.

Tablo 4.22. Böbrek GBA2 enzimi üzerine amoksisilin trihidrat/potasyum klavulanat antibiyotiğinin K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin hacimleri ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.

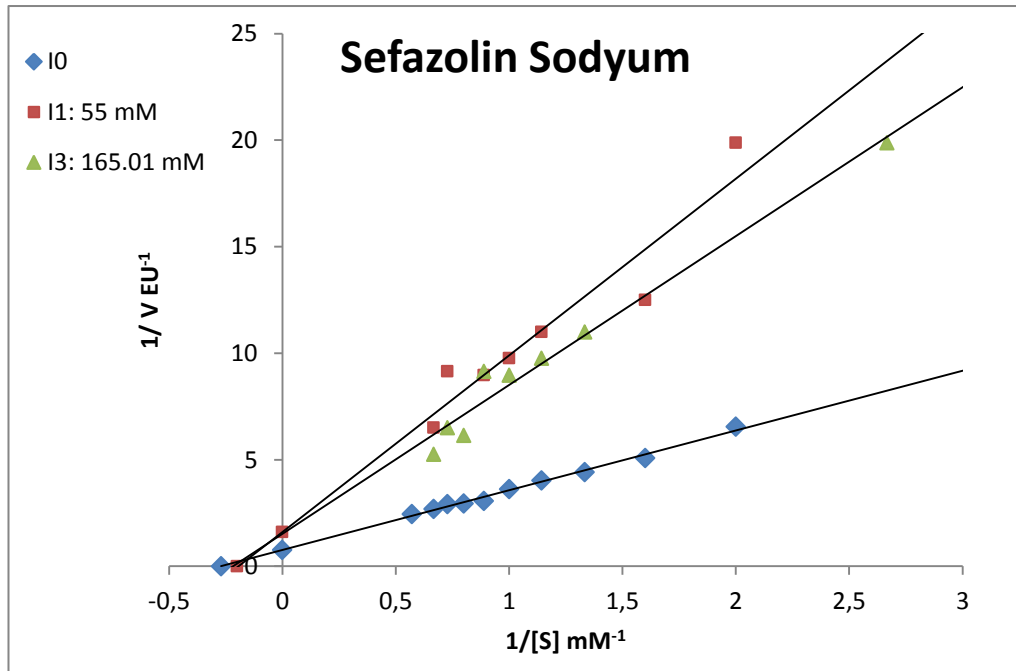
50 mM Na-Ac tamponu (μ l)	Enzim Çözeltisin in Hacmi (μ l)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (μ l)	İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Kuyudaki Toplam Hacim (μ l)	Kuyudaki Substrat Kons. [S] (mM)	Kuyudaki İnhibitör Kons. [I] (mM)	ΔA (405 nm)	Aktivite (U/ml dak)	1/V	1/[S]
110	70	20	-	200	0.5	-	0.0792	0.052715	18.9698	2
105		25			0.625		0.1419	0.105096	9.51510	1.6
100		30			0.75		0.1118	0.07995	12.5078	1.333
95		35			0.875		0.1430	0.106015	9.43262	1.142
90		40			1		0.1585	0.118964	8.40589	1
85		45			1.125		0.1970	0.151128	6.61691	0.889
80		50			1.25		0.1897	0.145029	6.89516	0.8
75		55			1.375		0.2207	0.170927	5.85044	0.722
70		60			1.5		0.2215	0.171596	5.82765	0.66666
60		70			1.75		0.2519	0.196992	5.07633	0.57142

Tablo 4.23. Böbrek GBA2 enzimi üzerine amoksisilin trihidrat/potasyum klavulanat antibiyotiğinin K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin hacimleri ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

50mM Na-Ac tamponu (μ l)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (μ l)	İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Kuyudaki Toplam Hacim (μ l)	Kuyudaki Substrat Kons. [S] (mM)	Kuyudaki İnhibitör Kons. [I] (mM)	ΔA (405 nm)	Aktivite (U/ml dak)	1/V	1/[S]
90	70	20	20	200	0.5	10	0.079	0.0527	18.969	2
85		25			0.625		0.141	0.1050	9.515	1.6
80		30			0.75		0.111	0.0795	12.507	1.333
75		35			0.875		0.143	0.1060	9.432	1.1428
70		40			1		0.158	0.1189	8.405	1
65		45			1.125		0.197	0.1511	6.616	0.888
60		50			1.25		0.189	0.1450	6.895	0.8
55		55			1.375		0.220	0.1709	5.850	0.727
50		60			1.5		0.221	0.1715	5.827	0.666
40		70			1.75		0.251	0.1969	5.076	0.571
55		70			15		60	200	0.375	30
50	20		0.5	0.112	0.0808	12.365			2	
45	25		0.625	0.103	0.0730	13.680			1.6	
40	30		0.75	0.127	0.0931	10.735			1.333	
35	35		0.875	0.127	0.0930	10.745			1.142	
30	40		1	0.196	0.1510	6.620			1	
25	45		1.125	0.212	0.1642	6.088			0.888	
20	50		1.25	0.227	0.1768	5.654			0.8	
15	55		1.375	0.248	0.1938	5.159			0.727	
10	60		1.5	0.267	0.2096	4.768			0.666	
-	70		1.75	0.316	0.2509	3.984			0.571	

4.3.4.9. Böbrek GBA2'yi İnhibe Eden Sefazolin sodyum Antibiyotiğinin İnhibisyon Tipi ve K_i Değerinin Belirlenmesi

Sefazolin sodyum antibiyotiğinin böbrek GBA2 aktivitesini inhibe ettiği belirlenmiştir. Sefazolin sodyumun enzim üzerine inhibisyon tipinin belirlenmesi için Bölüm 3.2.8'de açıklandığı gibi çalışma yapılmış ve bulunan deneysel sonuçlar Tablo 4.24. ve Tablo 4.25.'de verilmiştir. Bu verilerle de Şekil 4.23.'deki Lineweaver-Burk grafiği elde edilmiştir.



Şekil 4.23. Sefazolin sodyum antibiyotiğinin böbrek GBA2 aktivitesi üzerine inhibisyon tipinin belirlenmesinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği.

Şekil 4.23.'deki Lineweaver-Burk grafiğinden sefazolin sodyum antibiyotiğinin böbrek GBA2'yi yarışmasız tipte inhibe ettiği görülmektedir. Sefazolin sodyum $[I_1] = 55$ mM ve $[I_2] = 165,01$ mM konsantrasyonlardaki aktivite değerleri kullanılarak çizilen grafikten K_i değerinin $101,9 \pm 47,1$ mM olduğu hesaplanmıştır.

Tablo 4.24. Böbrek GBA2 enzimi üzerine sefazolin sodyum antibiyotiğinin K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin hacimleri ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.

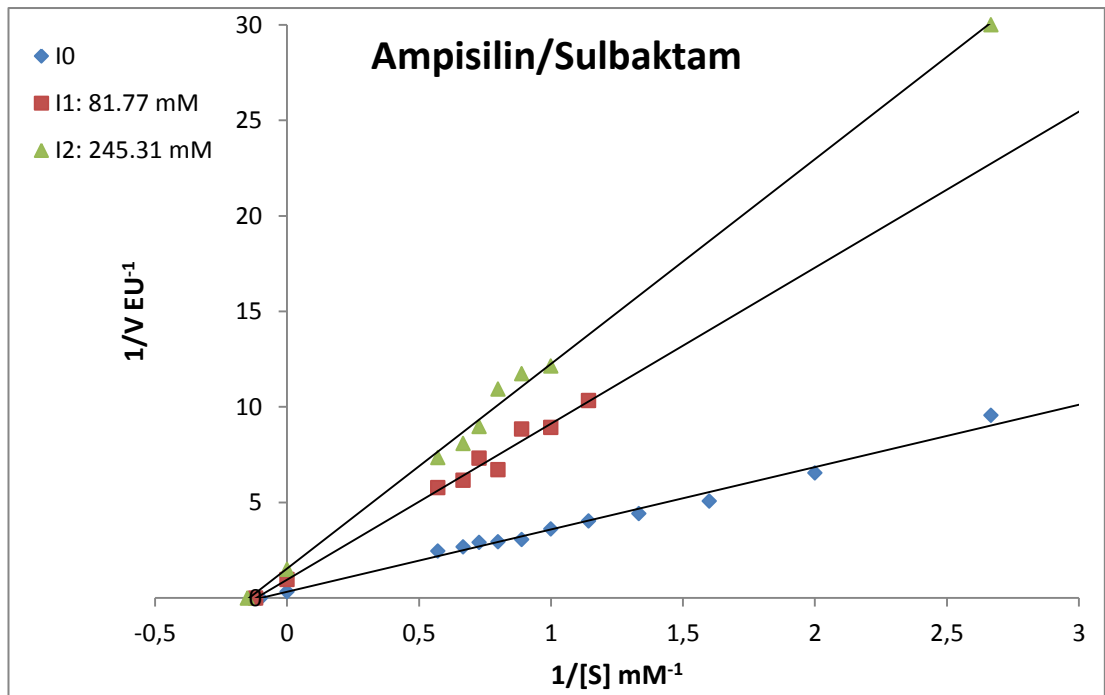
50 mM Na-Ac tamponu (μ l)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (μ l)	İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Kuyudaki Toplam Hacim (μ l)	Kuyudaki Substrat Kons. [S] (mM)	Kuyudaki İnhibitör Kons. [I] (mM)	ΔA (405 nm)	Aktivite (U/ml dak)	1/V	1/[S]
110	70	20	-	200	0.5	-	0.079	0.0527	18.969	2
105		25			0.625		0.141	0.1050	9.515	1.6
100		30			0.75		0.111	0.0799	12.50	1.333
95		35			0.875		0.143	0.1060	9.432	1.142
90		40			1		0.158	0.1189	8.405	1
85		45			1.125		0.197	0.1511	6.616	0.888
80		50			1.25		0.189	0.1450	6.895	0.8
75		55			1.375		0.220	0.1709	5.850	0.727
70		60			1.5		0.221	0.1715	5.827	0.666
60		70			1.75		0.251	0.1969	5.076	0.571

Tablo 4.25. Böbrek GBA2 enzimi üzerine sefazolin sodyum antibiyotiğinin K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin hacimleri ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.

50 mM Na-Ac tamponu (μ l)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (μ l)	İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Kuyudaki Toplam Hacim (μ l)	Kuyudaki Substrat Kons. [S] (mM)	Kuyudaki İnhibitör Kons. [I] (mM)	ΔA (405 nm)	Aktivite (U/ml dak)	1/V	1/[S]
90	70	20 ml	20	200	0.5	55	0.076	0.0502	19.883	2
85		25 ml			0.625		0.111	0.0800	12.494	1.6
80		30 ml			0.75		0.229	0.1784	5.603	1.333
75		35 ml			0.875		0.124	0.0908	11.001	1.142
70		40 ml			1		0.138	0.1024	9.763	1
65		45 ml			1.125		0.149	0.1114	8.973	0.888
60		50 ml			1.25		0.147	0.1625	6.151	0.8
55		55 ml			1.375		0.210	0.1093	9.144	0.727
50		60 ml			1.5		0.200	0.1536	6.508	0.666
55		70			15		60	200	0.375	165.01
40	30		0.75	0.152	0.0908	11.001			1.333	
35	35		0.625	0.173	0.1024	9.763			1.142	
30	40		0.875	0.198	0.1114	8.973			1	
25	45		1	0.208	0.1093	9.144			0.888	
20	50		1.125	0.227	0.1625	6.151			0.8	
15	55		1.25	0.272	0.1536	6.508			0.727	
10	60		1.375	0.296	0.1899	5.263			0.666	

4.3.4.10. Böbrek GBA2'yi İnhibe eden Ampisilin/sulbaktam Antibiyotiğinin İnhibisyon Tipi ve K_i Değerinin Belirlenmesi

Ampisilin/sulbaktam antibiyotiğinin böbrek GBA2 aktivitesini inhibe ettiği belirlenmiştir Ampisilin/sulbaktamın enzim üzerine inhibisyon tipinin belirlenmesi için Bölüm 3.2.8'de açıklandığı gibi çalışma yapılmış ve bulunan deneysel sonuçlar Tablo 4.26. ve Tablo 4.27.'de verilmiştir. Bu verilerle de Şekil 4.24.'deki Lineweaver-Burk grafiği elde edilmiştir.



Şekil 4.24. Ampisilin/sulbaktam antibiyotiğinin böbrek GBA2 aktivitesi üzerine inhibisyon tipinin belirlenmesinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği.

Şekil 4.24.'deki Lineweaver-Burk grafiğinden sefazolin sodyum antibiyotiğinin böbrek GBA2'yi yarışmasız tipte inhibe ettiği görülmektedir. Ampisilin/sulbaktam $[I_1] = 81.77$ mM ve $[I_2] = 245.31$ mM konsantrasyonlardaki aktivite değerleri kullanılarak çizilen grafikten K_i değerinin 28.37 ± 6.35 mg/mL olduğu hesaplanmıştır.

Tablo 4.26. Böbrek GBA2 enzimi üzerine ampisilin/sulbaktam antibiyotiğinin K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin hacimleri ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.

50 mM Na-Ac tamponu (μ l)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	İnhibitör Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Kuyudaki Toplam Hacim (μ l)	Kuyudaki Substrat Kons. [S] (mM)	Kuyudaki İnhibitör Kons. [I] (mM)	ΔA (405 nm)	Aktivite (U/ml dak)	1/V	1/[S]
115	70	15	-	200	0.375	-	0.141	0.1045	9.560	2.666
110		20			0.5		0.198	0.1527	6.548	2
105		25			0.625		0.252	0.1972	5.069	1.6
100		30			0.75		0.287	0.2264	4.415	1.333
95		35			0.875		0.313	0.2480	4.031	1.142
90		40			1		0.346	0.2763	3.618	1
85		45			1.125		0.406	0.3261	3.066	0.888
80		50			1.25		0.422	0.3390	2.949	0.8
75		55			1.375		0.427	0.3433	2.912	0.727
70		60			1.5		0.462	0.3728	2.682	0.666
60		70			1.75		0.503	0.4073	2.454	0.571

Tablo 4.27. Böbrek GBA2 enzimi üzerine ampisilin/sulbaktam antibiyotiğinin K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin hacimleri ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

50 mM Na-Ac tamponu (μ l)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (μ l)	İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Kuyudaki Toplam Hacim (μ l)	Kuyudaki Substrat Kons. [S] (mM)	Kuyudaki İnhibitör Kons. [I] (mM)	ΔA (405 nm)	Aktivite (U/ml dak)	1/V	1/[S]
80	70	30	20	200	0.75	81,77	0.121	0.0877	11.4	1.333
75		35			0.875		0.131	0.0967	10.336	1.142
70		40			1		0.150	0.1119	8.932	1
65		45			1.125		0.151	0.1131	8.840	0.888
60		50			1.25		0.194	0.1487	6.720	0.8
55		55			1.375		0.179	0.1365	7.321	0.727
50		60			1.5		0.210	0.1624	6.157	0.666
40		70			1.75		0.223	0.1729	5.782	0.571
30		70			40		60	200	1	245,31
25	45		1.125	0.118	0.0852	11.735			0.888	
20	50		1.25	0.125	0.0913	10.941			0.8	
15	55		1.375	0.149	0.1113	8.979			0.727	
10	60		1.5	0.164	0.1236	8.087			0.666	
-	70		1.75	0.179	0.1360	7.348			0.571	

İlaç (İnhibitör)	IC ₅₀	İnhibisyon Tipi	Ki
Sefuroksim sodyum	85.02 mM	Yarı yarışmalı	18.65 ± 12.65 mM
Ampisilin/sulbaktam	32.23 mg/ml	Yarışmasız	28.37 ± 6.35 mg/mL
Amoksisilin trihidrat/ Potasyum klavulanat	20.06 mg/mL	Yarışmasız	27.19 ± 12.04 mg/mL
Sefazolin sodyum	98.81 mM	Yarışmasız	101.90 ± 47.09 mM
Gentamisin sülfat	İnhibisyon yok	-	-
Seftriakson disodyum	İnhibisyon yok	-	-

Tablo 4.28. Böbrek GBA2 aktivitesi üzerine araştırılan antibiyotiklerin etkileri.

5. TARTIŞMA

β -glukozidazlar, oligosakkaritlerdeki veya diğerk glukoz bileşiklerindeki β -glikozid bağlarını hidroliz eden enzimlerdir (Ketudat Cairns ve Esen, 2010). β -glukozidazların bakteri, mantar, memeli ve bitkilerde yaygın olarak buldukları ve biyolojik yollarda önemli görevleri üstlendikleri bilinmektedir (Esen, 1993).

Bitkilerde tat ve lezzet oluşumunda pek çok glikozid türevi ürününün aglikon kısımlarının besin kalitesini artırdığı belirtilmiştir. Aglikonların ortaya çıkması için glikozidik maddenin β -glukozidazlar tarafından hidrolize uğramaları gerekmektedir (Esen, 1993). Bu biyokimyasal bilgiler ışığında yapılan çalışmalarda; vanilya bitkisinde, üzüm, papaya ve zeytin meyvelerinde ayrıca çay yapraklarında ilgili enzimin aromatik tat oluşumu, meşrubat üretimi, meyve tatlanması üzerine etkili olduğu gösterilmiştir (Odooux ve ark., 2003; Lecas ve ark., 1991; Hartman-Schreier ve Schreier, 1986; Wang ve ark., 2000; Kara ve ark., 2011).

Selüloz, doğada bol bulunur ve bitkilerin yapısal elemanıdır. Selülozun parçalanmasında bakteri ve mantarlarda bulunan β -glukozidaz enzim ailesinden selüloz sorumludur. Selüloz, son zamanlarda yenilenebilir enerji kaynağı olmaya adaydır. Yakın gelecekte pahalı olmayan selüloz kaynağı ve atıklarının etkili bir şekilde hidrolizi ve işlenmesi ile biyo-etanolden biyoyakıt üretimi ekonomik açıdan önem arz etmektedir (Bhat, 2000; Dembitsky, 2004).

Memelilerde öne çıkan 3 tip β -glukozidaz karakterize edilmiştir; bunlar glukoserebrosidlerin β -glikozidik bağlarının hidrolizinden sorumlu lizozomal β -glukozidaz (asit β -glukozidaz), diyetle alınan laktoz ve diğerk β -glukozidlerin hidrolizinde görevli, ince bağırsakta membran bağımlı laktaz pilorizin hidrolaz (LPH) ve aril β -glukozidlerin hidrolizini katalizleyen sitozolik β -glukozidazlar (Tseung ve ark., 2004; Hays ve ark. 1996).

Literatürde yer alan son çalışmalar incelendiğinde; glikozilseramidi glukoz ve seramide parçalayan 3 β -glukozidaz tanımlanmaktadır: Lizozomal β -glukozidaz (GBA1), non-lizozomal β -glukozidazlar (GBA2 ve GBA3). Bu üç β -glukozidaz enzimi, yapısal ve sekans benzerliği göstermemesine rağmen benzer enzimatik aktiviteye sahiptirler. Bunlardan GBA1 lizozom lumeninde yerleşmiş olup, GBA2'nin endoplazmik retikulum ve Golginin sitozolik yüzeyinde yerleşik olduğu bildirilmiştir (Körschen, 2013).

GBA1, membran bağlantılı bir enzimdir. Glukosilseramid ve diğer glikosfingolipidler arasındaki glukoz-sfingosin bağına hidroliz eder. GBA1 eksikliğinde ya da ilgili gendeki mutasyonlar sonucu Gaucher hastalığı gözlenir. Glukozilseramid metabolizmasındaki ikinci hidroliz enzimi; GBA2, ER'da membran ilişkili bir enzimdir. Makrofajlarda bol miktarda bulunurlar (Futerman ve ark., 2004). Safra asit glikozitlerinin hem yapımında, hem de hidrolizinde aktiftirler. Safra asit glikozitlerinde glukoz, safra asidinin 3.karbon atomuna β -bağı ile bağlıdır. Karaciğerde sentezlenip, idrarla dışarı atılan bu glikozitlerin hidrolizinde GBA2 β -bağının kırılmasından sorumludur. GBA2 mutantlarında safra asit metabolizması normal görünürken, glukozilseramidlerin birikmesi sonucu anormal sperm gelişimleri ve erkeklerde kısırlık görülmektedir (Yildiz ve ark., 2006; Marschall ve ark., 1987).

Bu tez çalışmasında, sıçan karaciğer ve böbrek dokularındaki non-lizozomal β -glukozidazlardan GBA2 saflaştırılmış ve yaygın kullanılan bazı antibiyotiklerin enzim aktivitelerine *in vitro* etkileri belirlenmiştir. Saflaştırma işlemlerinde, Wistar-Albino cinsi sıçanların karaciğer ve böbrek dokuları kullanılmıştır. Dokulardan GBA2 saflaştırılması işleminde, ilk olarak ham ekstrakt hazırlanmıştır. Ham ekstraktı hazırlama basamakları, literatürde yer alan tavşan plasentasından glukoserebrosit β -glukozidazın saflaştırılması, sıçan karaciğer mikrozomlarından β -glukozidazın saflaştırılması, PON'un sıçan karaciğerinden saflaştırılması çalışmalarında kullanılan yöntemler temel alınarak benzer şekilde gerçekleştirilmiştir (Braidman ve Gregoriadis, 1977; Kosaka ve ark., 1985; Rodrigo ve ark., 2009; Avcıkurt ve ark., 2015).

Karaciğer ve böbrek dokularından GBA2 saflaştırılmasında ham ekstraktın elde edilmesinden sonra numunelere sırasıyla % 20-50 ve % 50 amonyum sülfat tuz çöktürmesi yapılmış ve ardından sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin hidrofobik jeli ile hidrofobik etkileşim kromatografisi yöntemleri uygulanmıştır. Hidrofobik etkileşim kromatografisi sonunda yüksek aktivite gösteren tüpler birleştirilmiş ve saf enzim olarak çalışmalarda kullanılmıştır. İki aşamalı saflaştırma yöntemi kullanılarak enzimin aktivitesini kaybetmemesi amaçlanmıştır. Ayrıca tuz çöktürmesinden sonra hidrofobik etkileşim kromatografisi için ortamdaki tuzun uzaklaştırılması gerekmemektedir. Hidrofobik etkileşim kromatografisinde, laboratuvarımızda sentezlenmiş sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin hidrofobik jeli kullanılmıştır. Bu yöntemin literatürde farklı kaynaklardan saflaştırılan β -glukozidazlar için kullanıldığı görülmektedir. *Olea europea* (zeytin) meyvesinden β -glukozidazı saflaştırmak için % 0-50 amonyum sülfat tuz çöktürmesi çöktürmesi ve hidrofobik etkileşim kromatografisi yöntemi uygulanmıştır (Kara, 2010). Benzer şekilde *Aspergillus niger* küfünden β -glukozidaz'ı saflaştırmak üzere % 0-90 amonyum sülfat tuz çöktürmesi ve devamında hidrofobik etkileşim kromatografisi gerçekleştirilmiştir (Baybaş, 2014).

Saflaştırma işlemleri sonucunda sıçan karaciğer GBA2 % 43.4 verimle 30.2 kat saflaştırılırken, sıçan böbrek GBA2 % 12.5 verimle 5.1 kat saflaştırılmıştır. Memeli β -glukozidazların saflaştırılmasına dair çalışmalar incelendiğinde literatürde birbirinden farklı yöntemlerin kullanıldığı görülmektedir. Fleury ve arkadaşları insan sitozolik β -glukozidazının Sf9 böcek hücrelerinde ekspresyonu sonrasında saflaştırma işleminde Ni^{++} affinite kromatografisi ve iyon değişim kromatografisi yöntemlerini uygulamışlardır (Fleury ve ark., 2007). Farklı bir çalışmada insan karaciğer dokusundan sitozolik β -glukozidaz saflaştırılmasında sırasıyla katyon değişim kromatografisi ve ardından affinite kromatografisi gibi davranan oktil sepharose hidrofobik jel kromatografisi kullanılmıştır (Berrin ve ark., 2002). Sıçan karaciğer mikrozomlarından β -glukozidaz saflaştırılmasında Con A Sepharose affinite kromatografisi; rat karaciğer mikrozomlarından glukozidaz II saflaştırılmasında protamin sülfat çöktürmesi, iyon değişim kromatografisi ve affinite kromatografisi yöntemleri; Gaucher hastalarından alınan deri fibroblast ve antikor hücrelerinden glukoserebrozidazın saflaştırılmasında immunoaffinite kromatografisi uygulanmıştır

(Kosoka ve ark, 1985; Alonso ve ark., 1991; van Weely ve ark., 1993). Yapmış olduğumuz çalışmada kullanılan hidrofobik jeldeki 1-Naftilaminin hidrofobik özelliğinin yanında söz konusu enzimin inhibitörü olabileceği ve dolayısıyla kullanılan jelin affinite jeli gibi davranabileceği düşünülmektedir. Çünkü GBA2'nin bazı polisiklik hidrofobik türevi maddelerle inhibe edildiği bildirilmektedir (Overkleeft ve ark., 1998; Ghisaidoobe ve ark., 2010).

Bu çalışmada, iki basamakta saflaştırılan sıçan karaciğer ve böbrek GBA2 enzimi SDS poliakrilamid jel elektroforezinde görüntülenmiştir. Şekil 4.4'de görüldüğü gibi karaciğer GBA2 58 ve 110 kDa'da bant tespit edilmiştir. Şekil 4.14'de verilen böbrek GBA2'nin SDS görüntüsünde enzim 90 ve 109 kDa olarak görüntülenmiştir. Literatürde beta-glukozidazların moleküler ağırlıkları konusunda farklı bilgiler sunulmaktadır. Bunun da sebebinin asit beta-glukozidazların akrilamid ya da agaroz jelde anormal göçünün olduğu bildirilmiştir (Grabowski ve ark, 1990). Ancak genel olarak GBA2'nin 110 kDa civarında olduğu belirtilmiştir (Matern ve ark., 1997; Körschen ve ark., 2012; Boot ve ark., 2007)

Antibiyotiklerden seftriakson sodyum, sefuroksim sodyum, sefazolin sodyum, gentamisin sülfat, ampisilin/sulbaktam, amoksisilin/klavulanik asit ilaçlarının, sıçan karaciğer ve böbrek dokularından saflaştırılan GBA2 aktivitesine *in vitro* etkileri incelenmiştir. Saflaştırılan enzim aktivitesini % 50 azaltan ilaç konsantrasyonu olan IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Ampisilin + sulbaktam antibiyotiklerinin sıçan karaciğer GBA2 için IC₅₀ değeri 62.97 mg/mL bulunmuş ve çalışılan diğer antibiyotiklerin karaciğer enzimini inhibe etmediği belirlenmiştir. Sıçan böbrek GBA2'sine antibiyotiklerin etkisi incelendiğinde; sefuroksim sodyum, ampisilin/sulbaktam, amoksisilin trihidrat/potasyum klavulanat, sefazolin sodyum antibiyotiklerinin IC₅₀ değerleri sırasıyla; 32.23 mg/mL, 61.48 mM, 20.06 mg/mL, 98.81 mM olarak belirlenmiş ve gentamisin sülfat ve seftriakson disodyumun enzimi inhibe etmediği görülmüştür. Ampisilin/sulbaktam antibiyotiklerinin sıçan karaciğer GBA2 enzimini yarışmalı, böbrek GBA2'yi yarışmasız tipte inhibe ettiği bulunmuştur. Sıçan böbrek GBA2'yi sefuroksim sodyumun yarı-yarışmalı, amoksisilin trihidrat/potasyum klavulanat ve sefazolin sodyum antibiyotiklerinin ise yarışmasız tipte inhibisyon etkisi gösterdikleri bildirilmiştir.

Literatürde farklı enzimler üzerine benzer antibiyotik çalışmaları yapılmıştır. İnsan eritrositlerinden saflaştırılan glukoz-6-fosfat dehidrojenaz aktivitesi üzerine sodyum seftizoksim, sodyum ampisilin, sodyum sefuroksim, sodyum sefazolin, gentamisin sülfat antibiyotiklerinin etkisi araştırılmış ve ilgili enzim üzerine bu antibiyotiklerin inhibisyon etkisi olduğu tespit edilmiştir. Sodyum ampisilin, sodyum sefuroksim, sodyum sefazolin, gentamisin sülfatın ilgili enzimle ilişkili IC₅₀ değerleri sırasıyla; 105, 6.7, 125, 12 mM olarak verilmiştir (Çiftçi ve ark., 2000). Sodyum ampisilinin sıçan karaciğer ve böbrek GBA2 enzimini, insan eritrosit enzimine göre daha kuvvetli inhibe ettiği belirlenmiştir. Sodyum ampisilin antibiyotiğinin sıçan böbrek GBA2 ve insan eritrosit G6PD enzimlerini yarışmasız tipte inhibe ettiği görülmektedir. IC₅₀ değerleri karşılaştırılarak sefuroksim sodyumun insan eritrosit G6PD'nı sıçan böbrek GBA'ya göre daha güçlü inhibe ettiği söylenebilir. Sefazolin sodyum, karşılaştırılan her iki enzimi IC₅₀ açısından birbirine yakın değerde inhibe etmiş ve yine her iki enzim de yarışmasız tipte inhibisyon mekanizması göstermiştir. Gentamisin sülfat sıçan karaciğer ve böbrek GBA2'yi inhibe etmezken, insan eritrosit G6PD'ı inhibe ettiği bildirilmiştir.

İnsan eritrositlerinde yapılan başka bir çalışmada; glutatyon redüktaz aktivitesi üzerine streptomisin sülfat, gentamisin sülfat, tiamfenikol, penisilin G, ampisilin, sefotaksim, sefodizim antibiyotiklerinin etkileri araştırılmış ve IC₅₀ değerleri; sefotaksim için 12.179, sefodizim için 1.682 mM olarak bildirilmiştir (Erat ve ark., 2005). Karaciğer ve bağırsak dokularında β -glukuronidaz aktivitesine bazı antibiyotiklerin etkisi araştırılmış; levofloksin, streptomisin, ampisilin ve amoksisilin/klavulanat antibiyotiklerinin inhibisyon etkisi gözlenmezken, siprofloksin antibiyotiğinin ilgili enzim için inhibitör etkisi gösterdiği bildirilmiştir (Kodawara ve ark., 2015). Glukozidazlar üzerine makrolid antibiyotiklerin etkisinin araştırıldığı bir çalışmada; Khomami ve arkadaşları eritromisin ve klaritromisinin azitromisine göre daha güçlü inhibisyon etkisi gösterdiklerini belirtmişlerdir (Khomami ve ark., 2008).

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak yapılan bu çalışmada, aşağıdaki bulgular elde edilmiştir;

- Sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin yapılı hidrofobik jel kullanılarak sıçan karaciğer GBA2 ve sıçan böbrek GBA2 enzimleri saflaştırılmıştır. Bu yöntem ve jel yapısının, ilgili enzimlerin saflaştırılmasında daha önce kullanılmamış olması, çalışmayı orijinal kılmaktadır.
- Amonyum sülfat çöktürmesi ve hidrofobik etkileşim kromatografisi yöntemleri ile saflaştırılan sıçan karaciğer GBA2 % 43.4 verim ile 30.2 kat saflaşırken, sıçan böbrek GBA2'nin % 12.21 verim ile 5.1 kat saflaştığı hesaplanmıştır.
- Sıçan karaciğer GBA2, SDS-PAGE'de, 58 ve 110 kDa molekül ağırlığında ve böbrek GBA2, 90 ve 110 kDa aralığında iki bant şeklinde görüntülenmiştir.
- Yaygın olarak kullanılan aminoglikozid grubu antibiyotiklerden gentamisin sülfat, sefalosporinler grubundan sefuroksim sodyum, sefazolin sodyum ve seftriakson disodyum antibiyotikleri karaciğer GBA2'yi inhibe etmezken, penisilin grubundan ampisilin/sulbaktamın enzimi inhibe ettiği ve inhibisyon mekanizmasının yarışmalı olduğu bulunmuş ve Ki değerinin $14.30 \pm 3.35\text{mM}$ olduğu hesaplanmıştır.
- Böbrek dokularından saflaştırılan sıçan GBA2 üzerine aynı antibiyotiklerden gentamisin sülfat ve seftriakson disodyumun inhibisyon etkisi gözlenmezken, amoksisilin trihidrat/potasyum klavulanat, sefazolin sodyum ve sefuroksim sodyum antibiyotiklerinin bu enzimi, çalışılan konsantrasyon değerlerinde inhibe ettikleri bulunmuştur. Bu antibiyotiklerin inhibisyon mekanizmaları için sefuroksim sodyumun yarı-yarışmalı, ampisilin/sulbaktam, amoksisilin trihidrat/potasyum klavulanat ve sefazolin sodyum antibiyotiklerinin ise

yarışmasız tipte inhibisyon etkisi gösterdikleri bildirilmiştir. İnhibisyon etkisi gösteren ve inhibisyon mekanizmaları belirlenen bu antibiyotiklerin K_i değerleri sırasıyla; 18.65 ± 12.65 mM, 28.37 ± 6.35 mg/mL, 27.19 ± 12.04 mM, 101.90 ± 47.09 mM olduğu hesaplanmıştır.

- Yapılan alışma sonucunda; sıçan karaciğer ve böbrek GBA2 enzimlerinin saflaştırılmasına yönelik olarak kullanılan hidrofobik jeldeki 1-naftilamin yapısının, ilgili enzimler açısından inhibitör olup olmadığının araştırılması önerilmektedir. Őayet inhibitör özellik gösterirse, bu yapının affinite kolonu olması ihtimali söz konusu olacaktır. Dolayısıyla ilgili enzimlerin dokulardan saflaştırılması veya ekspresyon sonrası saflaştırma işlemlerinde kullanımının söz konusu olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Acar M. Mandalina (*Citrus reticulata*) meyvesinden saflaştırılan β -glukozidaz enziminin nanopartiküllere immobilizasyonu ve meyve suyu aroma artırma etkisi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir, Balıkesir Üniversitesi, 2013.
- Aguilar M, Gloster TM, Garcia-Moreno MI, Ortiz Mellet C, Davies GJ, Llebaria A, Casas J, Egado-Gabas M, Garcia-Fernandez, JM. Molecular basis for β -glucosidase inhibition by ring-modified calystegine analogues. *ChemBioChem*, 2008, 9(16): 2612-18.
- Akkan GA. Antibiyotiklerin sınıflandırılması. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Pratikte Antibiyotik Kullanımı Sempozyumu, İstanbul, 1997, 53-62.
- Akpolat T, Utaş C. Nefroloji El Kitabı. 2. Baskı. Süleymanlar G. Güzel Sanatlar Matbaası, İstanbul, 2000.
- Alonso MJ, Santa-Cecila A, Calvo P. Glucosidase 2 from rat liver mikrosomes. *Biochem J*, 1991, 278: 721-727.
- Altınışık M. Karbohidrat Biyokimyası. www.mustafaaltinisik.org.uk/m057a.ppt. 16 Kasım 2015.
- Altıntaş A. Karaciğer-fizyopatoloji ve karaciğer fonksiyon testleri. http://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/1042/mod_resource/content/1/4.%20Karacgr-Fzyptlji.pdf. 16 Kasım 2015.
- Astudillo L, Therville N, Colacios C, Ségui B, Andrieu-Abadie N, Levade T, Glucosylceramidases and Malignancies in Mammals, *Biochimie*, 2015.
- Avcikurt AS, Sinan S, Kockar F. Antidepressant and antipsychotic drugs differentially affect PON1 enzyme activity. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2015, 30(2): 245-249.

Ayyıldız ZT. Gaucher hastalarında enzim replasman tedavisi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 2009.

Bakan E. Tanıda Laboratuvar. 2 Baskı. İstanbul, Aktif yayınevi, 2015, 31-37.

Banea-Mayambu JP, Tylleskar T, Gitebo N, Matadi N, Gebre-Medhin M, Rosling H. Geographical and seasonal association between linamarin and cyanide exposure from cassava and the upper motor neurone disease konzo in former Zaire. *Trop Med Int Health*, 1997, 2(12): 1143-51.

Bautler E. Gaucher disease: New molecular approaches to diagnosis and treatment. *Science*, 1992, 794-798

Baybaş C. Ağaç kabuklarından izole edilen *Aspergillus niger* küfünden β -glikozidaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir, Balıkesir Üniversitesi, 2014.

Berrin JG, McLauchlan WR, Needs P, Williamson G, Puigserver A, Kroon PA and Juge N. Functional expression of human liver cytosolic beta-glucosidase in *Pichia pastoris*. Insights into its role in the metabolism of dietary glucosides. *Eur J Biochem*. 2002. 269: 249-258.

Bhat MK. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnol. Adv.* 2000, 18: 355–383.

Bolarinwa IF, Orfila C, Morgan MRA. Amygdalin content of seeds, kernels and food products commercially-available in the UK. *Food Chemistry*, 2014, 152: 133–139.

Boot RG, Verhoek M, Donker-Koopman W, Strijland A, van Marle J, Overkleeft HS, Wennekes T, Aerts JM. Identification of the non-lysosomal glucosylceramidase as beta-glucosidase 2. *J Biol Chem*, 2007, 282: 1305–1312.

Braidman PI, Gregoriadis G. Rapid paryisl purification of placental glucoserebroside beta-glucosidase and its entrapment in liposomes. *Biochem J*, 1977, 164:439-445.

Carr C. Redesigned aminoglycoside may eliminate risk of hearing loss. *The Pharmaceutical Journal*, 2015, 294.

Carter HE, Fujino Y. Biochemistry of the sphingolipids. 9.Configuration of the cerebrosides. *J Biol Chem*, 1956. 21(879).

Champe PC, Harvey RA, Ferrier DR. Enzimler. *İçinde: Noyan T. (Çeviri editörü). Biyokimya*, 3.baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi, 2007a :53-68.

Champe PC, Harvey RA, Ferrier DR. Karbohidratlara Giriş. *İçinde: Noyan T. (Çeviri editörü). Biyokimya*, 3.baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi, 2007b :83-88.

Cicek M, Esen A. Structure and expression of dhurrinase from sorghum. *Plant Physiol*, 1998, 116:1469-1478.

Convertı A, Aliakbarian B. Domínguez JM, Bustos vázquez G, PEREGO P. Microbial production of biovanillin. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2010, 41: 519-530.

Çiftçi M, Küfrevioğlu Öİ, Gündoğdu M Özmen İ. Effects of some antibiotics on enzyme activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. *Pharmacological Research*, 2000, 41:110-113.

Dance N. The excretion of N-acetyl-beta-glucosaminidase and beta-galactosidase by patients with renal disease. *B.Clin.Acta*. 1970, 27: 87-92.

Daniels LB, Coyle PJ, Chiao YB, Glew RH, Labow RS. Purification and characterization of a cytosolic broad specificity β -glucosidase from human liver. *J Biol Chem*, 1981 256, 13004-13013

Davies G, Henrissat B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure Biochem So Trans*, 1995, 3(9): 853-901.

Day AJ, Dupont MS, Ridley S, Rhodes M, Rhodes MJ, Morgan MR, Williamson G.

Deglycosylation of flavonoid glycosides by human small intestine and liver β -glycosidase activity. *FEBS Lett*, 1998 436, 71-75.

De Graaf M, van Veen IC, van der Meulen-Muileman IH, Gerritsen WR, Pinedo HM, Haisma HJ. Cloning and characterization of human liver cytosolic-glycosidase. *Biochem J*, 2001, 356:907–910

Dembitsky VM. Astonishing diversity of natural surfactants: 1.Glycosides of fatty acids and alcohols. *Lipids*, 2004. 39: 933-953.

Eczacıbaşı-Zentiva Sağlık Ürünleri San. ve Ticaret A.Ş. Novosef® 1 g IM. steril, ajirojen flakon http://www.sanaleczanemiz.com.tr/pdf/Novosef_1_g_IM_Flakon.pdf 22 Kasım 2015.

Erat M, Şakiroğlu H, Çiftçi M. 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*, 2005; 20(1): 69–74

Ergöçen G. β -glukozidaz enziminin kayısı (*Prunus armeniaca*) çekirdeklerinden saflaştırılması ve karakterizasyonu. Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Adana, Çukurova Üniversitesi. 2013.

Esen A. The Mammalian Cytosolic Broad-Specificity β -Glucosidase. In: Glew RH, Gopalan V, Forsyth GW ve Vanderjagt DJ.(eds.). *Beta Glucosidases, Biochemistry and Molecular Biology*. Washington, DC, American Chemical Society, 1993: 83-110.

Fleury D, Domaingue P, Gillard C, Touitou R, Mollat P. Expression, purification, characterization and crystallization of a recombinant human cytosolic β -glucosidase produced in insect cells. *Protein Expr Purif*, 2007, 52:96-103.

Futerman AH, Sussman JL, Horowitz M, Silman I, Zimran A. New directions in the treatment of Gaucher Disease. *Trends Pharmacol Sci*, 2004, 25:147-151.

Geiger G, Furrer G, Funk F, Brandl H, Schulli R. Heavy metal effects on β -glucosidase activity influenced by pH and buffer. *Journal Enzyme Inhib*, 1999, 365-379.

Ghisaidoobe A, Bikker P, de Bruijn AC, Godschalk FD, Rogaar E, Guijt MC, Hagens P, Halma JM, Van't Hart SM, Luitjens SB, van Rixel VH, Wijzenbroek M, Zweegers T, Donker-Koopman WE, Strijland A, Boot R, van der Marel G, Overkleeft HS, Aerts JM, van den Berg RJ. Identification of potent and selective glucosylceramide synthase inhibitors from a library of N-alkylated iminosugars, *ACS Med Chem Lett*, 2010, 2: 119-123.

Glew RH, Peters SP, Christopher A. Isolation and characterization of β -glucosidase from the cytosol of rat kidney cortex. *Enzymology*, 1976, 422:176-179.

Gopalan V, Pastuszyn AP, Galey WR, Glew RH. Exolytic hydrolysis of toxic plant glucosides by guinea pig liver cytosolic beta-glucosidase. *J Biol Chem*. 1992, 15;267: 14027-14032.

Gonzalez-Carmona MA, Sandhoff R, Tacke F, Vogt A, Weber S, Canbay AE, Rogler G, Sauerbruch T, Lammert F, Yildiz Y. Beta-glucosidase 2 knockout mice with increased glucosylceramide show impaired liver regeneration. *Liver Int*, 2012, 32: 1354–1362.

Graaf M, Van Veen IC, Van MeulenMuileman IH, Gerritsen WR, Pinedo HM, Haisma HJ. Cloning and characterization of human liver cytosolic beta-glycosidase. *Biochem J*, 2001, 356, 907-910.

Grabowski GA, Petsko GA, Kolodny EH. The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. *Gaucher Disease Biochemistry and Molecular Biology*, 2010.

Gülhane Tıp Akademisi Komutanlığı İnfeksiyon Kontrol Komitesi. Antibiyotik Kullanımı. GATA Basımevi, Ankara, 2000.

Hartman Schreier J, Schreier P. Purification and partial characterization of β -glucosidase from papaya fruit. *Phytochemistry*. 1986, 54, 2271-2274:

Hayano KK. Extraction of β -glucosidase activity from peafield. *Soil Biology and Biochemistry* . 1977, 17: 553-557.

Hayashi Y, Okino N, Kakuta Y, Shikanai T, Tani M, Narimatsu H, Ito M. Klotho-related protein is a novel cytosolic neutral-glycosylceramidase. *J Biol Chem*, 2007, 282:30889–30900.

Hays WS, VandrJag DJ, Bose B, Serianni AS, Glew RH. Catalytic mechanism and specificity for hydrolysis and transglycosylation reactions of cytosolic β -glucosidase from guinea pig liver. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(52), 34941-34948.

Hays WS, VandrJag DJ, Bose B, Serianni AS, Glew RH. Primary structure of the cytosolic β -glucosidase of guinea pig liver. *Biochem J*, 1996 319, 829-837.

Harzer K, Blech-Hermoni Y, Goldin E, Felderhoff-Mueser U, Igney C, Sidransky E, Yildiz Y. Beta-glucosidase 1 (GBA1) is a second bile acid β -glucosidase in addition to β -glucosidase 2 (GBA2). Study in β -glucosidase deficient mice and humans. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012, 423: 308-312.

Henrissat B, Bairoch A. Updating the sequence-based classification of glycosyl hidrolases. *Biochem J*, 1996 316, 695-696.

Henrissat B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J*, 1991, 309-316.

İE Ulagay İlaç Sanayii Türk A.Ş. Croxilex-BID 1000 mg Film Tablet.

<http://files.vademecumonline.com.tr/ProspectusFile/croxilex-bid-film-tablet-875-mg125-mg-14-film-tabletlik-ambalaj--pros-29052013.pdf> 22 Kasım 2015a.

İE Ulagay ilaç Sanayii Türk A.Ş. Sulcid® 1 g im/iv enjektabl toz içeren flakon.

<http://files.vademecumonline.com.tr/ProspectusFile/sulcid-ivim-flakon-1-g3.5-ml-1x3.5-ml-lik-flakon--pros-31052013.pdf> 22 Kasım 2015b.

Kara, H. β -glukozidaz enziminin hidrofobik etkileşim kromatografisi ile *Olea europa* meyvesinden saflaştırılması, karakterizasyonu ile bazı pestisit ve ağır metallere karşı afinitesinin araştırılması. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim

Dalı, Doktora Tezi, Balıkesir, Balıkesir Üniversitesi, 2010.

Kara H, Sinan S, Turan Y. Purification of beta-glucosidase from olive (*Olea europaea L.*) fruit tissue with specifically designed hydrophobic interaction chromatography and characterization of the purified enzyme. *Journal of Chromatography B*, 2011, 879(19):1507-12.

Ketudat Cairns JR, Esen A. β -glucosidases, overview. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2010, 67; 3389-3405.

Klahr S. Structure and function of the kidney. *Cecil Textbook of Medicine*. In: Wyngaarden JB, Smith LL (eds). WB Saunders Company, Philadelphia, 1988:508-520.

Khomami AS, Lumsden MD, Jakeman DL. Glycosidase Inhibition by macrolide antibiotics elucidated by STD-NMR spectroscopy. *Chemistry & Biology*, 2008, 15, 739–749.

Khann R, Benjamin ER, Pellegrino L, Schilling A, Rigat BA, Soska R, Nafar H, Raney RE, Feng J, Powe AC, Palling DJ, Wustman BA, Schiffmann R, Mhuran DJ, Lockhart DJ, Valenzano KJ. The pharmacological chaperone isofagomine increases the activity of the Gaucher Disease L444P mutant form of beta-glucosidase. *FEBS Journal*, 2010, 277, 1618-1638.

Kodawara T, Higashi T, Negoro Y, Kamitani Y, Igarashi T, Watanabe K, Tsukamoto H, Yano R, Masada M, Iwasaki H, Nakamura T. The inhibitory effect of ciprofloxacin on the β -Glucuronidase-mediated deconjugation of the irinotecan metabolite SN-38-G. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2015. In press, doi: 10.1111/bcpt.12511.

Kosaka H, Isemura M, Yosizawa Z, Ono T. Glycosidase activities in the rat liver microsomes. *Tohoku J Exp Med*, 1985, 146;201-210.

Körschen HG, Yildiz Y, Raju DN, Schonauer S, Bönigk W, Jansen V, Kremmer E, Kaupp UB, Wachten D. The non-lysosomal β -glucosidase GBA2 is a non-integral membrane-associated protein at the endoplasmic reticulum (ER) and Golgi. *J Biol*

Chem, 2013, 288(5):3381-93.

Köse SI, Maden M. Üriner biyobelirteçler. *Turkiye Klinikleri J Vet Sci*, 2015; 6(1), 2-13.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature*, 1970, 227:680-685.

LaMarco K, Glew L. Hydrolysis of a naturally occurring beta-glucoside by a broad-specificity beta glucosidase from liver. *Biochem.J.* 1986, 237:469-476.

Lecas M, Gunata ZY, Sopic JC, Bayonove CL. Purification and partial characterization of β -glucosidase from grape. *Phytochemistry*, 1991, 30:451-454

Legler G, Liedtke H. Isolation of a cytosolic β -glucosidase from calf liver and characterization of its activity site with alkyl glucosides and basic glycosyl derivatives. *Arch Biochem Biophys*, 1988, 260, 427-436.

Legler G. Glucosylceramidase from calf spleen. Characterization of its active site with 4-n-alkylumbelliferyl beta-glucosides and N-alkyl derivatives of 1-deoxynojirimycin. *Eiol. Chem. Hoppe. Seyler.* 1985,366: 1113-1122.

Li Y, Liu N, Yang H, Zhao F, Yu Y, Tian Y, Lu X. Cloning and characterization of a new β -glucosidase from a metagenomic library of rumen of cattle feeding with *Miscanthus sinensis*. *BMC Biotechnology*, 2014, 14(1):14-85.

Marschall HU, Egested B, Matern H, Matern S, Sjøvall J. Evidence for bile acid glucosides as normal constituents of human urine. *FEBS Lett*, 1987, 213; 411-414.

Matern H, Heinemann H, Legler G, Matern S. Purification and characterization of a microsomal bile acid-glucosidase from human liver. *J Biol Chem*, 1997, 272: 11261-11267.

McCarter, JD, Adam MJ, Hartman NG, Withers SG. *In vivo* inhibition of beta-glucosidase and β -mannosidase activity in rats by 2-deoxy-2-fluoro-beta-glycosyl fluorides and recovery of activity *in vivo* and *in vitro*. *Biochem J*, 1994, 301, 343-348.

McMahon LG, Nakano H, Levy MD, Gregory JF. Cytosolic pyridoxine- β -D-glucoside hydrolase from porcine jejunal mucosa. Purification, properties and comparison with broad specificity β -glucosidase. *J Biol Chem*, 1998, 272, 32025-32033.

Murray KR, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. Enzimler: Genel Özellikleri. *İçinde: Inal ME. (Çeviri editörü). Harper Biyokimya, 25.baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi, 2004:74-85.*

Naim H. Molecular and cellular aspects and regulation of intestinal lactase-phlorizin hydrolase. *Histol Histopathol*, 2001, 16: 553-5561.

Nemutlu E, Kır S. Üçüncü ve dördüncü kuşaktan seçilmiş sefalosporinlerin insan kaynaklı biyolojik materyallerden HPLC ile tayinleri. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 2009, 28:185-207.

Nilson O, Grabowski GA, Ludman MD, Desmick RJ, Svennerholm L. Glycosphingolipid studies of visceral tissues and brain from type-1 Gaucher Disease variants. *Clin Genet*, 1985, 27: 443-450.

Nobel İlaç Sanayii Türk A.Ş. Aksef 750 mg I.M. enjektabl toz içeren flakon. http://www.nobel.com.tr/Dosyalar/AKSEF_750_mg_IM_Flakon_Lid_3_mL.pdf 22 Kasım 2015.

Odox E, Chauwin A, Brillouet JM. Purification and characterization of vanilla bean (*Vanilla planifolia Andrews*) β -glucosidase. *J Agric Food Chem*, 2003, 51, 3168–3173.

OmMaty R. Vademecum, Ankara. 2005, 651.

Overkleeft HS, Renkema GH, Neele J, Vianello P, Hung IO, Strijland A, van der Burg AM, Koomen GJ, Pandit UK, Aerts JM. Generation of specific deoxynojirimycin-type inhibitors of the non-lysosomal glucosylceramidase. *J Biol Chem*, 1998, 273: 26522-26527.

Persson I, Tjerneld F, Hahn-Hagerdal B. Fungal cellulolytic enzyme production. *Process Biochemistry*, 1991, 65-74.

- Rodrigo L, Gil F, Hernandez AP. Identification of two rat liver proteins with paraoxonase activity: Biochemical evidence for the identity of paraoxonase and arylesterase. *Chemico-Biological Interactions*, 1999, 120:263–275.
- Semenza G, Auricchio S. Small intestinal disaccharidases. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sey WS, Valle D (eds.). *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. 4th ed. New York. 1989, 2: 2975-2997.
- Sinan S, Kockar F, Arslan O. Novel purification strategy for human PON1 and inhibition of the activity by cephalosporin and aminoglikozide derived antibiotics. *Biochimie*, 2006, 88:565–574.
- Tekin R. Antibiyotik sınıflandırılması ve etki mekanizması. <http://www.dicle.edu.tr/Contents/1847d747-6909-48e9-86cd-357b541e8ed4.pdf>. 16 Kasım 2015.
- Terra WR. Insect digestive enzymes: Properties, compartmentalization and function. *Comp Biochem Physiol*, 1994, 109: 1-62.
- Thayer SS, Conn EE. Subcellular localization of dhurrin β -glucosidase and hydroxynitrile lyase in the mesophyll cells of sorghum leaf blades. *Plant Physiol*, 1981, 67, 617-622.
- Tseung CW, McMahon LG, Vázquez J, Pohl J, Gregory JF. Partial amino acid sequence and mRNA analysis of cytosolic pyridoxine-beta-D-glucoside hydrolase from porcine intestinal mucosa: proposed derivation from the lactase-phlorizin hydrolase gene. *Biochem J*. 2004, 380: 211-218.
- Ünal R. Antibiyotik kullanımında Türkiye şampiyon. <http://www.milliyet.com.tr/antibiyotikte-turkiye-sampiyon/gundem/detay/1793714/default.htm>. 16.Kasım 2015.
- Wang D, Yoshimura T, Kubota K, Kobayashi A. Analysis of glycosidically bound aroma precursors in tea leaves. I. Qualitative and quantitative analyses of glycosides with aglycons as aroma compounds. *J Agric Food Chem*, 2000, 48, 5411-5418 .
- Wellwood, J. (1973). *Brit Med J*, 7, 261-265.

Whitaker J, Vorage A, Wong D. β -glucosidase. In: Esen A. (eds.). *Handbook of Food Enzymology*. New York, 2002: 791-803.

Wikipedia <https://en.wikipedia.org/wiki/Ampicillin/sulbactam> 22 Kasım 2015.

World Health Organization (WHO). <http://www.who.int/mediacenter/factsheets/antibiotic-resistance/en/>. 16 Kasım 2015.

Xu Z, Escamillo-Trevino L, Zeng L, Lalgondar M, Bevan D, Winkel B, Mohamed A, Cheng CL, Shih MC, Poulton J, Esen A. Functional genomic analysis of *Arabidopsis thaliana* glycoside hydrolase family 1. *Plant Molecular Biology*, 2004, 55:343-367.

van Weely S, van den Berg M, Barranger JA, Sa Miranda MC, Tager JM, Aerts JMFG. Role of pH in determining the cell-type-specific residual activity of glucocerebrosidase in Type 1 Gaucher Disease. *J Clin Invest*, 1993, 91:1167-1175.

Yahata K, Mori K, Arai H, Koide S, Ogawa Y, Mukoyama M, Sugawara A, Ozaki S, Tanaka I, Nabeshima Y, Nakao K. Molecular cloning and expression of a novel klotho-related protein. *J Mol Med*, 2000, 78: 389–394.

Yaqoob MC. *J Biol Chem*, 1980, 185:541-543.

Yildiz Y, Matern H, Thompson B, Allegood JC, Warren RL, Ramirez DM, Hammer RE, Hamra FK, Matern S, Russell DW. Mutation of beta-glucosidase 2 causes glycolipid storage disease and impaired male fertility. *J Clin Invest*, 2006, 116:2985-2994.

Yu HL, Xu JH, Lu WY, Lin GQ. Identification, purification and characterization of β -glucosidase from apple seed as a novel catalyst for synthesis of *O*-glucosides. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 40: 354–361.

Zhou J, Zhang J, Allan ED, Yang VC. Magnetic tumor targeting of β -glucosidase immobilized iron oxide nanoparticles. *NIH Public Access Nanotechnology*, 2014, 24(37). doi: 10.1088/0957-4484/24/37/375102.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Ad, Soyad : Nihal Türkmen

Cinsiyet : Bayan

Doğum Tarihi : 27/01/1988

İLETİŞİM BİLGİLERİ

Adres Bilgileri : Bahçelievler Mah. Teknik Lise Cad. 322. Sok. Bahar APT. No: 15/4 Altteylül/Balıkesir

Cep Tel : 0(534) 0522344

E-posta : turkmen_nihal@hotmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans Balıkesir Üniversitesi – Balıkesir

Tıbbi Biyokimya – 08/2013 – Halen Devam Etmekte

Üniversite Balıkesir Üniversitesi – Fen Ed. Fakültesi

Biyoloji – 09/2008 – 06/2012 (Mez.Not Ort: **3.19/4**)

Lise Bilgem Lisesi – Elazığ

Fen-Matematik – 09/2002 – 06/2006

YABANCI DİL BİLGİSİ

İngilizce : Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: Orta

YDS Puanı : 60

TEZLER

Turkmen,N. 2012. ‘Evlerdeki kimyasal tehlikeden haberdar mısınız?’ Balıkesir Üniversitesi,Biyoloji Bölümü,Bitirme Tezi, Balıkesir, 40s. ,(yayımlanmamış)
Danışman: Doç. Dr. Serap Doğan

Turkmen,N. 2015. ‘Rat Karaciğer ve Böbrek Beta Glukozidaz Enzimi Üzerine Bazı Antibiyotiklerin in Vitro Etkisinin İncelenmesi’ Balıkesir Üniv. Sağlık Bil. Enst. Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Danışman: Yrd. Doc.Dr Hatibe Kara

BİLDİRİLER

Turkmen,N., Kara,H., Sinan,S. ve Turan,S. ‘Erik (*Prunus domestica*) Çekirdeğinden Saflaştırılan Beta-Glukozidaz Enziminin Bazı Kinetik Özelliklerinin Belirlenmesi’ 1.Ulusal Bitki Biyolojisi Kongresi 02-04 Eylül 2015, Bolu

Turkmen,N. ve Kara,H., ‘Rat karaciğer sitozolik β -glukozidazına bazı antibiyotik ve antidepresanların *in vitro* etkileri’ Türk Biyokimya Derneği xxvii. Ulusal Biyokimya Kongresi 3 - 6 Kasım 2015, Antalya

Kara,N., Aşkun,T., **Turkmen,N.** ve Baybaş,C. ‘Purification and Characterization of Beta-glucosidase from *Penicillium frequentans*’ 3.rd international molecular biology and biotechnology congress, 02-06 Haziran 2014, Bosna Hersek

Kara,H., **Turkmen,N.,** Tümay,S., Sinan,S., ve Turan,Y., ‘Nane (*Mentha piperita*) Beta-Glukozidazının Saflaştırılması ve Bazı Ağır Metallerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin Araştırılması’ 22.Ulusal Biyoloji Kongresi, 23-27 Haziran 2014, Eskişehir

MESLEKİ DENEYİM

Staj: Üsküdar Devlet Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı (15 Gün).



T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KURULU

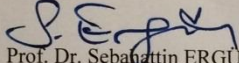
Sayı : B.30.2.ÇAÜ.0.05.06- 050.04 -62
Konu : Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı

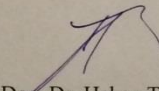
02/10/2015

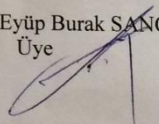
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

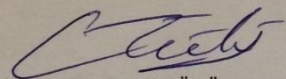
TOPLANTI TARİHİ :02.10.2015
TOPLANTI SAYISI :2015/08
DOSYA KAYIT NUMARASI :2015/91
KARAR NUMARASI :2015/08-24
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR :Nihal TÜRKMEN
HAYVAN TÜRÜ VE SAYISI :Wistar Albino sıçan (200-250gr) 10 adet

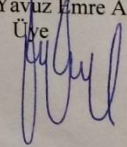
Yrd. Doç. Dr. Hatibe KARA, tarafından Etik Kurulumuza sunulan "Rat Karaciğer Beta-Glukozidazları Üzerine Bazı Antibiyotiklerin *in vitro* Etkilerinin Araştırılması" başlıklı proje Hayvan Deneylerine ilişkin mevzuatın emirleri doğrultusunda incelenerek, ilgili mevzuat hükümleri çerçevesinde Hayvan Deneyleri Etiği açısından uygun olduğuna; oybirliği ile karar verilmiştir.

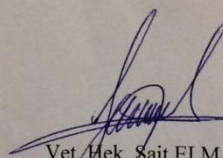

Prof. Dr. Sebahattin ERGÜN
Üye
(Başkan)


Yrd. Doç. Dr. Hakan TÜRKÖN
Üye


Yrd. Doç. Dr. Eyüp Burak SANCAK
Üye


Yrd. Doç. Dr. Cemil TÖLÜ
Üye


Yrd. Doç. Dr. Yavuz Emre ARSLAN
Üye


Vet. Hek. Sait ELMAS
Üye

Tayfun TAŞBİLEK
Sivil Üye

Erdoğan GÜRSEL
Sivil Üye

