

**T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI**



**YENİ BİR METODLA HYALÜRONİDAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI BİLEŞİKLERİN BU ENZİM
ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

MUSTAFA OĞUZHAN KAYA

BALIKESİR, AĞUSTOS-2013

**T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI**



**YENİ BİR METODLA HYALÜRONİDAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI BİLEŞİKLERİN BU ENZİM
ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

MUSTAFA OĞUZHAN KAYA

BALIKESİR, AĞUSTOS-2013

KABUL VE ONAY SAYFASI

Mustafa Oğuzhan KAYA tarafından hazırlanan “YENİ BİR METOTLA HYALÜRONİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI BİLEŞİKLERİN BU ENZİM ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 26.08.2013 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.


Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Prof. Dr. Oktay ARSLAN



Üye
Prof. Dr. İsmail KIRAN



Üye
Doç. Dr. Mustafa ZENGİN



Üye
Yard. Doç. Dr. Nahit GENÇER



Üye
Yard .Doç. Dr. Semra IŞIK



Jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş olan bu tez BAÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca onanmıştır

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Hilmi NAMLI

.....

Bu tez çalışması Balıkesir Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2012/38 nolu proje ile desteklenmiştir.

ÖZET

YENİ BİR METODLA HYALÜRONİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI BİLEŞİKLERİN BU ENZİM ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ
MUSTAFA OĞUZHAN KAYA
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: PROF.DR. OKTAY ARSLAN)
BALIKESİR, AĞUSTOS-2013

Hyalüronidaz enzimi, terapötik ve çeşitli tıbbi alanlarda bir yayılma faktörü olarak uygulanmaktadır. Geniş substrat özgüllüğünden dolayı, zincir uzunlukları değişen glikozaminoglikan oligosakaritlerinin hazırlanması gibi glikoteknolojik uygulamalar için oldukça önemlidir. Ayrıca sıgır testis hyalüronidazı (BTH) suni tohumlamada da önemli derecede etkili olduğu bilinmektedir.

Bu çalışmada sıgır testis hyalüronidazını saflaştırmak için yeni bir afinite kromatografisi jeli sentezlenmiştir. CNBr ile aktive edilen Sepharose-4B' ye uzantı kolu olarak L-tirozin bağlanmıştır. Oluşan Sepharose-4B-l-tirozin yapısına ligand olarak BTH enziminin spesifik bir inhibitörü olan m-anisidin kenetlenmiştir. Sonuç olarak Sepharose-4B-l-tirozin-m-anisidin kimyasal yapısına sahip afinite jeli elde edilmiştir.

Amonyum sülfat çöktürmesi ve afinite kromatografisi ile saflaştırılan sıgır testis hyalüronidaz enzimi %16.95 verimle ve 881.78 saflaştırma derecesi ile elde edilmiştir. Enzimin saflığı SDS poliakrilamid jel elektroforezi ile kontrol edilmiş ve 55 kDa civarında tek bant gözlenmiştir.

Sıgır testis hyalüronidazının kinetik sabitleri (K_M ve V_{max}) hyalüronik asit substrat olarak kullanılarak belirlenmiştir. Linewear-Burk grafiğinden elde edilen K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 2.23 mM ve 19.85 U/mL olarak bulunmuştur.

Bu çalışmada, ticari antibiyotiklerin etken maddeleri olan kanamisin sülfat, sodyum ampisilin, oksitetrasiklin, linkomisin-HCl, gentamisin sülfat, penisilin G-potasyum, trimetoprim ve sülfametaksazol; $Cu(OAc)_2 \cdot H_2O$, $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, $Hg(NO_3)_2 \cdot H_2O$ ve $HgCl_2$ ağır metalleri ve 1,1-dimetilpiperidinium klorür, β -naftoksiasetik asit, giberallik asit etken maddeli bazı kimyasalların, saflaştırılmış BTH üzerindeki *in vitro* etkisi belirlenmiştir. Söz konusu kimyasallardan giberallik asit etken maddesi, ağır metallerden $HgCl_2$ ve antibiyotik etken maddelerinden ise trimetoprim BTH enzimini en iyi inhibe eden maddeler olarak saptanmıştır.

ANAHTAR KELİMELELER: Sıgır testis hyalüronidaz (BTH), afinite kromatografisi, antibiyotik, ağır metal, inhibisyon

ABSTRACT

A NEW METHOD FOR THE PURIFICATION OF HYALURONIDASE ENZYME AND INVESTIGATION THE EFFECTS OF SOME COMPOUNDS ON THIS ENZYME

PH.D THESIS
MUSTAFA OĞUZHAN KAYA
BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
CHEMISTRY
(SUPERVISOR: PROF.DR. OKTAY ARSLAN)
BALIKESİR, AUGUST 2013

Hyaluronidase enzyme is used as a spreading factor on therapeutic and various medical fields. Because of wide substrate specificity it is quite important for glucotechnological applications such as preparation of varying chain lengths glycosaminoglycan oligosaccharides. Bovine testicular hyaluronidase is also known to be substantially effective in the delivery of artificial insemination.

In this study, a new affinity chromatography gel for the purification of bovine testicular hyaluronidase was synthesized. L-tyrosine was added as the extension arm to the Sepharose-4B activated with CNBr. *m*-Anisidine, a specific inhibitor of bovine testicular hyaluronidase enzyme, was clamped to the newly formed Sepharose-4B-L-tyrosine as a ligand. As a result an affinity gel having the chemical structure of Sepharose-4B-L-tyrosine-*m*-anisidine was obtained.

Bovine testicular hyaluronidase purified by ammonium sulfate precipitation and affinity chromatography was obtained with %16.95 yield and 881.78 degree of purity. Purity of the enzyme was checked by using SDS polyacrylamide gel electrophoresis and a single band was observed around 55 kDa.

Kinetic constants (K_M and V_{Max}) for bovine testicular hyaluronidase were determined by using hyaluronic acid as a substrate. K_M and V_{max} values obtained from the Lineweaver-Burk graph were found to be 2.23 mM and 19.85 U/mL, respectively.

The *in vitro* effects of some chemical and antibiotic active ingredients, and heavy metals were determined on purified BTH enzyme. Antibiotic active ingredients were kanamycin sulfate, sodium ampicillin, oxytetracycline, lincomycin-HCl, gentamicin sulfate, penicillin G- potassium, trimethoprim and sulfamethoxazole. Heavy metals were $Cu(OAc)_2 \cdot H_2O$, $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, $Hg(NO_3)_2 \cdot H_2O$ and $HgCl_2$. Some chemical active ingredients were 1,1-dimethyl piperidinium chloride, β -naphthoxyacetic acid and gibberellic acid. The best inhibition effects shown by the compounds on BHT enzyme were determined as trimethoprim, $HgCl_2$ and gibberellic acid, respectively.

KEYWORDS: Bovine testicular hyaluronidase (BTH), affinity chromatography, antibiotic, heavy metal, inhibition

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ	viii
SEMBOL LİSTESİ.....	x
ÖNSÖZ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Hyalüronik Asit	1
1.1.1 Oluşumu ve Fizyolojik Önemi.....	3
1.2 Hyalüronidazlar	3
1.2.1 Hyalüronidazların Sınıflandırılması	4
1.2.2 Ökaryot Hyalüronidazları	5
1.2.2.1 Memeli Hyalüronidazları (EC 3.2.1.35)	5
1.2.2.1.1 Hyalüronidaz-1 (Hyal-1).....	6
1.2.2.1.2 Hyalüronidaz-2 (Hyal-2).....	6
1.2.2.1.3 Hyalüronidaz-3 (Hyal-3).....	6
1.2.2.1.4 Hyalüronidaz-4 (Hyal-4).....	7
1.2.2.1.5 Hyalüronidaz-PH-20 (Hyal-PH-20)	7
1.2.2.1.6 Sığır Testis Hyalüronidazı (BTH).....	9
1.2.2.1.7 Arı Zehri Hyalüronidazı.....	11
1.2.3 Prokaryot Hyalüronidazları.....	13
1.2.4 Enzimin Substratları	13
1.2.4.1 Kondroitin Sülfat.....	14
1.2.4.2 Dermatan Sülfat	15
1.2.4.3 Hyalüronik Asit.....	16
1.2.5 Endo-Tip Glikozidazların Glikokonjügelere Üzerine Etkileri	17
1.2.5.1 N-glikan.....	17
1.2.5.2 O-glikan.....	17
1.2.5.3 Proteoglikan	18
1.2.5.4 Glikolipid	18
1.2.6 Hyalüronidaz Dizilerinin Genomik Organizasyonları	20
1.2.7 Kansere ve Hyalüronidazlar	24
1.2.8 Enzimin Saflaştırılması.....	25
1.2.9 Ağır Metaller Ve Çeşitli İyonların Çevre Üzerine Etkileri.....	26
1.2.10 Pestisitlerin İnsan ve Çevre Üzerine Etkileri	28
1.2.10.1 Pestisitlere Karşı Dayanıklılık Oluşumu.....	29
1.2.10.2 Hedef Olmayan Organizmalar Üzerine Etkisi	30
1.2.10.2.1 İnsanlar Üzerine Etkileri.....	30
1.2.10.2.2 Çevre Üzerine Etkileri	31
1.2.10.3 Çalışmalarda Kullanılan Pestisitler Ve Kullanım Yerleri.....	34
1.2.10.3.1 (1,1-dimetilpiperidinium klorür).....	34
1.2.10.3.2 β -Naftoksiasetik Asit	35
1.2.10.3.3 Giberallik Asit.....	35
1.2.11 Antibiyotiklerin İnsan Ve Çevre Üzerine Etkileri	36

1.2.11.1	İdeal Bir Antimikrobiyal İlacın Özellikleri.....	36
1.2.11.2	Antibiyotiklerin Seçici Toksisiteleri	36
1.2.11.3	Çalışmamızda Kullanılan Antibiyotikler	37
1.2.11.3.1	Gentamisin Sülfat	37
1.2.11.3.2	Sodyum Ampisilin	38
1.2.11.3.3	Kanamisin Sülfat.....	39
1.2.11.3.4	Penisilin G Prokain Ve Penisilin G Potasyum.....	40
1.2.11.3.5	Sülfametoksazol Ve Trimetoprim.....	42
1.2.11.3.6	Oksitetrasiklin	43
1.2.11.3.7	Linkomisin	44
2.	MATERYAL VE YÖNTEMLER.....	46
2.1	MATERYALLER	46
2.1.1	Kullanılan Kimyasal Maddeler	46
2.1.2	Kullanılan Alet Ve Cihazlar	47
2.1.3	Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması.....	47
2.2	YÖNTEMLER	51
2.2.1	Testis Örneğinin Hazırlanması	51
2.2.2	Enzimin Aktivite Tayini	51
2.2.3	Bradford Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini.....	51
2.2.4	Enzimin Saflaştırılması.....	52
2.2.4.1	Amonyum Sülfat Çöktürmesi	52
2.2.4.2	Afinite Kromatografisi ile Enzimin Saflaştırılması.....	53
2.2.4.2.1	Sepharose 4B'nin Aktifleştirilmesi.....	53
2.2.4.2.2	L-tirozinin Bağlanması	53
2.2.4.2.3	m-Anisidin Bileşiğinin Bağlanması.....	54
2.2.4.3	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) İle Enzim Saflığının Kontrolü	56
2.2.5	Optimum Şartlarda K_M ve V_{max} Değerlerinin Bulunması.....	57
2.2.6	Bazı Antibiyotikler için IC_{50} değerlerini bulunması.....	57
2.2.7	Bazı Pestisitler İçin IC_{50} Değerlerini Bulunması	57
2.2.8	Bazı Ağır Metaller İçin IC_{50} Değerlerinin Bulunması.....	58
3.	BULGULAR	59
3.1	Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri.....	59
3.2	Enzimin Saflaştırılması	59
3.2.1	Amonyum Sülfat Çöktürmesi	59
3.2.2	m-Anisidin Bileşiğinin BTH enzimi üzerine pH-Aktivite Etkisi	60
3.2.3	Afinite Kromatografisi İle Enzimin Saflaştırılması.....	60
3.2.4	Sentezlenen Afinite Jelinin FT-IR Spektrumları	62
3.2.5	BTH Enziminin SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi	64
3.3	Optimum Şartlarda K_m ve V_{max} Değerlerinin Bulunması.....	64
3.4	İnhibisyona Sebep Olan Antibiyotiklerin IC_{50} Değerlerinin Bulunması.....	67
3.5	İnhibisyona Sebep Olan İyonların IC_{50} Değerlerinin Bulunması	76
3.6	İnhibisyona Sebep Olan Pestisitlerin IC_{50} Değerlerinin Bulunması.....	83
4.	TARTIŞMA VE SONUÇ	88
5.	KAYNAKLAR.....	98

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Glukronik asit ve N-asetil glukozamin.....	3
Şekil 1.2: Meyer'e göre Hyalüronidazların sınıflandırılması	4
Şekil 1.3: Döllenme olayında hyalüronidazın önemi ve etkisi	8
Şekil 1.4: Hyalüronanın BTH ile parçalanma mekanizması	10
Şekil 1.5: Sığır Testis Hyalüronidazın Hidrofobik Rezidülerinin Model Gösterimi (A) N- ve C-terminal bölgelerin içerdiği hidrofobik aminoasitler (Siyah Bölgeler) (B) N-terminal bölgesi aspartat ve glutamat rezüdülerinin karşısında bulunan korunmuş aktif bölge (Siyah Bölgeler).....	11
Şekil 1.6: Arı zehri hyalüronidaz yapısı	12
Şekil 1.7: BTH ve arı zehir hyalüronidazlarının aminoasit dizi modeli.(Gri bölgeler BTH ve arı zehir hyalüronidazları için yapısı aydınlatılmamış bölgelerdir.).....	12
Şekil 1.8: <i>S. agalactiae</i> 'dan elde edilen Hyalüronat liyazın Hyalüronanı parçalama mekanizması. Hyalüronikasitin substrat olarak değerlendirilmesiyle disakkarit birimleri olarak HA1 ve HA2 , ayrıca Tyr488, His 479 ve Asn429' nin zincir pozisyonunun şematik gösterimi	13
Şekil 1.9: D-glukuronatın kimyasal yapısı	14
Şekil 1.10: Kondroitin sülfatın kimyasal yapısı	15
Şekil 1.11: Kondroitin sülfatın parçalanma tepkimesi	15
Şekil 1.12: Kondroitinin, kondroitin-6-sülfotransferaz enzimi yardımıyla kondroitin-6-sülfata dönüşmesi.....	15
Şekil 1.13: Dermatan sülfatın kimyasal yapısı	16
Şekil 1.14: Dermatan sülfatın parçalanma tepkimesi	16
Şekil 1.15: Hyalüronan (Hyalüronik asit) kimyasal yapısı.....	17
Şekil 1.16: Glikokojügelere üzerinde etkin olan endo-tip-glikozidazlar.....	18
Şekil 1.17: Endo-Tip Glikozidazlar kullanılarak glikokojüğe sentezi	19
Şekil 1.18: Hyal-1'in endoproteolitik prosesinin şematik gösterimi	19
Şekil 1.19: Hyalüronidaz geninin kromozomal dizilimi	20
Şekil 1.20: Arı zehri hyalüronidazı, Hyal-1 (plazma hyalüronidazı) ve PH-20 (sperm hyalüronidazı) nin varsayılan bölgelerinin şematik gösterimi.....	22
Şekil 1.21: Altı insan ve dört fare hyalüronidazının filogenik analizi.....	23
Şekil 1.22: Hyalüronidaz genlerinin genomik yapısı	24
Şekil 1.23: (1,1-dimetilpiperidinium klorür) kimyasal yapısı	34
Şekil 1.24: β -Naftoksiasetik asit kimyasal yapısı	35
Şekil 1.25: Giberallik asit kimyasal yapısı	35
Şekil 1.26: Antibiyotiklerin potansiyel hedefleri	37
Şekil 1.27: Gentamisin sülfat bileşiğinin molekül şekli (0-2-amino-2-deoksi-D-glukopiranozil-(1.4)-O-[3-deoksi-3-(metilamino)-D-ksilopiranozil-(1 6)]-2-deoksi-D-streptamin.).....	38

Şekil 1.28: Sodyum ampisilin bileşiğinin molekül şekli (Monosodyum (2S, 5R, 6R)-6-[(2R)-2-amino-2-fenilasetilamino]-3,3-dimetil-7-okso-4-tiyol-1-aza bisiklo [3.2.0] heptan-2-karboksilat)	39
Şekil 1.29: Kanamisin sülfat bileşiğinin molekül şekli (3-Amino-3-deoksi- α -D-glukopironozil-(1 \rightarrow 6)-[6-amino-6-deoksi- α -D-glukopironozil-(1 \rightarrow 4)]-2-deoksi-D-streptamin sülfat)	40
Şekil 1.30: Penisilinlerin 6- aminopenisilanik asid ve penisilok asid türevlerine dönüşümü	41
Şekil 1.31: Penisilin G molekül şekli	41
Şekil 1.32: Penisilin G Prokain.....	42
Şekil 1.33: Penisilin G Potasyum molekül şekli.....	42
Şekil 1.34: Sülfametoksazol ((4-Amino-N-(5-metil-3-izoksazolil) benzenesulfonamide, N ¹ -(5-Metilizoksazol-3-il)sulfanilamid)) molekül şekli.....	43
Şekil 1.35: Trimetoprim ((2,4-diamino-5-(3,4,5-trimetoksibenzil) pirimidin)) molekül şekli	43
Şekil 1.36: Oksitetrasiklin([(4S-(4 α ,4 $\alpha\alpha$,5 α ,5 $\alpha\alpha$,6 β ,12 $\alpha\alpha$]-4-(dimetilamino)1-,4,4 α ,5,5 α ,6,11,12 α -oktahid-ro-3,5,6,10-12,12 α -hekzahidroksi-6-metil,11-diokso-2-naftasenekarboksamid)].....	44
Şekil 1.37: Linkomisin-HCl	45
Şekil 2.1: Sepharose 4B'nin aktifleştirilmesi	53
Şekil 2.2: L-Tirozinin Bağlanması	54
Şekil 2.3: m-anisidin bileşiğinin bağlanması.....	55
Şekil 3.1: Bradford yöntemi ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan standart grafik	59
Şekil 3.2: m-Anisidin Bileşiğinin %60 (NH ₄) ₂ SO ₄ çöktürmesi sonrası BTH enzimi üzerine pH-Aktivite Etkisi.....	60
Şekil 3.3: Sepharose-4B bileşiğinin FT-IR spektrumu.....	62
Şekil 3.4: Sepharose-4B-L-tirozin bileşiğinin FT-IR spektrumu	63
Şekil 3.5: Sepharose-4B-L-tirozin-m-anisidin bileşiğinin FT- IR spektrumu.....	63
Şekil 3.6: Afinite kromatografisi ile saflaştırılan BTH enziminin SDS-polakrilamid jel elektroforezi görüntüsü.	64
Şekil 3.7: Saflaştırılmış BTH enziminin hyalüronik asit substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.	65
Şekil 3.8: Saflaştırılmış BTH enzimi üzerine 12.3 mM hyalüronik asit substratı derişiminde kanamisin sülfat için % aktivite-[I] grafiği.....	69
Şekil 3.9: Saflaştırılmış BTH enzimi üzerine 12.3 mM hyalüronik asit substratı derişiminde sodium ampisilin için % aktivite-[I] grafiği	69
Şekil 3.10: Saflaştırılmış BTH enzimi üzerine 12.3 mM hyalüronik asit substratı derişiminde oksitetrasiklin için % aktivite-[I] grafiği.....	71
Şekil 3.11: Saflaştırılmış BTH enzimi üzerine 12.3 mM hyalüronik asit substratı derişiminde Linkomisin-HCl için % aktivite-[I] grafiği	71
Şekil 3.12: Saflaştırılmış BTH enzimi üzerine 12.3 mM hyalüronik asit substratı derişiminde Gentamisin-Sülfat için % aktivite-[I] grafiği	73
Şekil 3.13: Saflaştırılmış BTH enzimi üzerine 12.3 mM hyalüronik asit substratı derişiminde Penisilin G-Potasyum için % aktivite-[I] grafiği	73
Şekil 3.14: Saflaştırılmış BTH enzimi üzerine 12.3 mM hyalüronik asit substratı derişiminde Trimetoprim için % aktivite-[I] grafiği	75
Şekil 3.15: Saflaştırılmış BTH enzimi üzerine 12.3 mM hyalüronik asit substratı derişiminde Sülfametaksazol için % aktivite-[I] grafiği	75

Şekil 3.16: Saflaştırılmış BTH enzimi üzerine 12.3 mM hyalüronik asit substratı derişiminde $\text{Cu}(\text{OAc})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ için % aktivite-[I] grafiği	78
Şekil 3.17: Saflaştırılmış BTH enzimi üzerine 12.3 mM hyalüronik asit substratı derişiminde $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ için % aktivite-[I] grafiği.....	78
Şekil 3.18: Saflaştırılmış BTH enzimi üzerine 12.3 mM hyalüronik asit substratı derişiminde $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ için % aktivite-[I] grafiği	80
Şekil 3.19: Saflaştırılmış BTH enzimi üzerine 12.3 mM hyalüronik asit substratı derişiminde $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ için % aktivite-[I] grafiği.....	80
Şekil 3.20: Saflaştırılmış BTH enzimi üzerine 12.3 mM hyalüronik asit substratı derişiminde $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ için % aktivite-[I] grafiği.....	82
Şekil 3.21: Saflaştırılmış BTH enzimi üzerine 12.3 mM hyalüronik asit substratı derişiminde HgCl_2 için % aktivite-[I] grafiği.....	82
Şekil 3.22: Saflaştırılmış BTH enzimi üzerine 12.3 mM hyalüronik asit substratı derişimlerinde 1,1-dimetilpiperidinium klorür için % aktivite-[I] grafiği	85
Şekil 3.23: Saflaştırılmış BTH enzimi üzerine 12.3 mM hyalüronik asit substratı derişiminde β -naftoksiasetik asit için % aktivite-[I] grafiği	85
Şekil 3.24: Saflaştırılmış BTH enzimi üzerine 12.3 mM hyalüronik asit substratı derişiminde Giberallik Asit için % aktivite-[I] grafiği.....	87

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1: Glikozaminoglikanlar (GAG) ve vücutta lokalize olduğu yerler	14
Tablo 1.2: Hyalüronidaz genleri ve ürettikleri proteinler	21
Tablo 2.1: SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının miktarları.	50
Tablo 3.1: m-Anisidin Bileşiğinin BTH enzimi üzerine pH-Aktivite (U/mL'dak) Etkisi	60
Tablo3.2: Afinite kromatografisi kolonundan BTH enziminin saflaştırma grafiği.....	61
Tablo 3.3: Saflaştırma tablosu.....	62
Tablo3.4: BTH enziminin hyalüronik asit substratı kullanılarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$	66
Tablo 3.5: BTH enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren kanamisin sülfat ve sodyum ampisilin'in IC_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik derişimleri ve elde edilen sonuçlar.....	68
Tablo 3.6: BTH enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Oksitetrasiklin ve Linkomisin-HCl'in IC_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik derişimleri ve elde edilen sonuçlar.....	70
Tablo 3.7: BTH enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Gentamisin sülfat ve Penisilin G-Potasyum'un IC_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik derişimleri ve elde edilen sonuçlar	72
Tablo 3.8: BTH enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Trimetoprim ve Sülfametaksazol'un IC_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik derişimleri ve elde edilen sonuçlar.....	74
Tablo 3.9: Çalışmada kullanılan antibiyotikler ve IC_{50} değerleri (mg/mL).....	76
Tablo 3.10: BTH enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren $Cu(OAc)_2 \cdot H_2O$ ve $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$ 'un IC_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, iyon derişimleri ve elde edilen sonuçlar.....	77
Tablo 3.11: BTH enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ve $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ 'nun IC_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, iyon derişimleri ve elde edilen sonuçlar.....	79
Tablo 3.12: BTH enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren $Hg(NO_3)_2 \cdot H_2O$ ve $HgCl_2$ 'nun IC_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, iyon derişimleri ve elde edilen sonuçlar	81
Tablo 3.13: Çalışmada kullanılan iyonlar ve IC_{50} değerleri (mg/mL)	83

Tablo3.14: BTH enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren 1,1-dimetilpiperidinium klorür ve β -naftoksiasetik asit 'in IC ₅₀ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, iyon derişimleri ve elde edilen sonuçlar	84
Tablo3.15: BTH enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Giberallik Asit 'in IC ₅₀ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, iyon derişimleri ve elde edilen sonuçlar	86
Tablo 3.16: Çalışmada kullanılan pestisitler ve IC ₅₀ değerleri (mg/mL).....	87
Tablo 4.1: Hyalüronidazın Sülfat Çöktürmesi, Afinite Kromatografisi (Sephrose Blue), Immunoafinite Kromatografisi, Anyon Değişim Kromatografisi ve Dışlama (Exclusion) Kromatografisi ile saflaştırma sonuçları.....	92

SEMBOL LİSTESİ

BTH	:Sığır Testis Hyalüronidazı
SDS-PAGE	:Sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforez
HA	:Hyalüronik asit
HYAL	:Hyalüronidaz
EU	:Enzim Ünitesi
DNA	:Deoksiribonükleik Asit
RNA	:Ribonükleik Asit
mRNA	:Mesajcı Ribonükleik Asit
NAG	:N-Asetil Glukozamin
UV	:Ultra Viole
IR	:Infra Red
NMR	:Nükleer Manyetik Rezonans
TEMED	:N,N,N',N'-tetrametiletildiamin
BVH	:Arı zehri hyalüronidazı

ÖNSÖZ

Akademik ünvanların en güzeli olarak belirtilen “Doktor” ünvanımı almamda ve mesleğimin ayrıntılarını öğrenmem, insanlığa faydalı olmam için önümde aşmam gereken birçok engelimin olduğunu sürekli hatırlatarak her zaman daha fazla çalışmamı söyleyen lisans, yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca ilminden faydalandığım, yanında çalışmaktan onur duyduğum, çalışmalarım süresince yakın ilgi ve desteğini gördüğüm kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. Oktay ARSLAN’a içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın her aşamasında hoşgörü ve yardımlarını esirgemeyen Prof.Dr.İsmail KIRAN hocama çok teşekkür ederim.

Yardımlarından dolayı sevgili arkadaşlarım Uzman Feyzullah TOKAY ve Arş.Gör. Serdar SÖNMEZ’e teşekkürü bir borç bilirim.

Deneysel çalışmalarım süresince enzim kaynağı olarak kullanılan materyallerimin temininde yardımlarını esirgemeyen Sönmezler Et Mezbahanesi ve çalışanlarına teşekkür ederim.

Bu günlere gelmemde en büyük pay sahibi olan, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili annem Turunç KAYA, sevgili babam Saim KAYA, canım kardeşlerim Mihrap ve Zeynep KAYA’ya en derin minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Hayattaki en iyi arkadaşım olan sevgili eşim Yeşim KAYA’ ya tez çalışmalarım boyunca gösterdiği o engin sabır ve benim için harcadığı onca zamandan dolayı en kalbi duygularıyla teşekkürü bir borç bilirim.

Son olarak bu tezimi biricik oğlum Muhammed Onurhan KAYA’ya hediye etmek isterim.

1. GİRİŞ

1.1 Hyalüronik Asit

Hyalüronat ve hyalüronan olarak da bilinen hyalüronik asit (HA) yüksek molekül ağırlıklı, non-sülfat, doğrusal, dalsız bir glikozaminoglikandır. İlk olarak Meyer ve Palmer tarafından 1934 yılında vitreus cisimciğinden izole edilmiştir ve adını üronik asit içeren glassy (camlı-camsı) anlamına gelen Yunanca *hyalos* kelimesinden almıştır. β -1,4-D glukronik asitle β -1,3-N asetil-glukozamin zincir halkasıyla bağlanan bir makromoleküldür. Organizmada her yerde dağılmış olmasına rağmen en yüksek oranda bağ dokusunda bulunur.

Önceleri HA ekstrasellüler matriksin pasif, yapısal bir bileşeni olarak düşünülmeyle birlikte, günümüzde hücre migrasyonu ve morfogenezisin de içinde bulunduğu bazı biyolojik olaylarda dinamik olarak yer aldığı bilinmektedir. HA aktif hücre büyüme bölgelerinde lokalize olan spesifik reseptörlere de bağlanabilmektedir. Bu reseptörler, hücre siklusunun ayrılma periyoduyla ilişkilidir ve bölünmeyen hücrelerde hiç bulunmadığı bilinmektedir. Matriks polisakariti olan HA hücre farklılaşması, motilitesi ve hücrelerin adherensi (bağlanması) üzerinde çok önemli bir etkiye sahiptir.

HA'nın molekül ağırlığı farklı doku ve sıvılarda 1×10^5 ile 10^7 Da arasında değişiklik göstermektedir. Bu moleküler ağırlık sayesinde HA makromoleküller için bir filtre olarak görev yaparken aynı zamanda hücre yüzey proteinlerine ve diğer matriks proteinlerine bağlanabilmektedir.

Hyaluronan seviyesi, erişkin bireylere oranla fetusta daha yüksektir. Hyaluronanın fetal doku yaralanmasının nispeten iyileşmesinde katkısı olduğu öne sürülmüştür. Doku yaralanmasından sonra yetişkin dokuların HA seviyesi 7 gün sonra normal seviyeye dönmesine karşın fetal dokuların yüksek hyaluronan seviyesinin 3 haftaya kadar korudukları bilinmektedir.

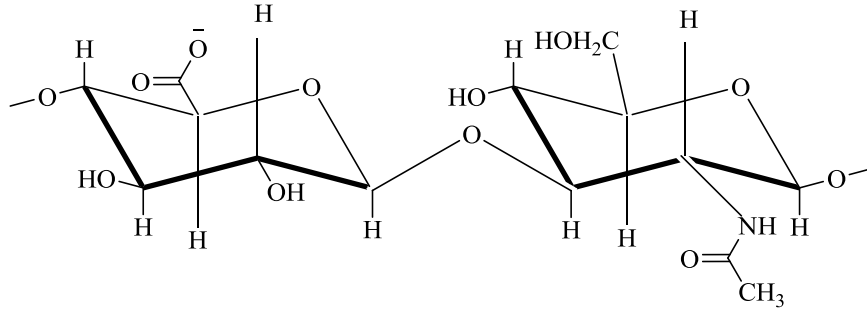
Yapılan araştırmalar HA sentezinin birçok faktörden etkilendiğini göstermiştir. Bu faktörler arasında hormonlar, enflamatuar ara bulucular (mediatörler) ve büyüme faktörleri gibi çok sayıda değişken vardır.

Diğer glukozaminoglikanlar golgi cisimciğinde sentezlenirken HA, plazma membranının sitoplazmasında sentezlenir. Ayrıca hyaluronan nonslfat olması ve proteinlere kovalent olarak bağlama özelliği ile de diğer glukozaminoglikanlardan farklıdır.

Tüm dokuların ekstrasellüler matriksinde bulunan HA tüm türlerde aynı, basit kimyasal yapıya sahiptir. Yapılan çalışmalarda tüm HA'nın yaklaşık olarak yarısının deride, 1/4'lk kısmının da iskelet ve eklemlerde olduğu, geri kalanının ise kaslar ve i organlara eşit miktarlarda dağılmış olarak bulunduğu gösterilmiştir. En yüksek HA derişimi göbek bağı, sinoviyal sıvı, deri ve vitreus cisimciği gibi bağ dokularında bulunmaktadır. Akciğer, böbrek, beyin ve kaslarda da kayde değer miktarlarda bulunurken karaciğerde az oranda bulunmaktadır. En düşük derişim kan serumundandır. Serum HA seviyesinde patolojik artışlar olabilmektedir. Siroz, romatoid artrit, skleroderma gibi enflamatuar durumlarda, çeşitli kanser türlerinde HA sentezinin arttığı bilinmektedir.

Lokal metabolizma ile HA yıkımının %20-30 kadarı deri ve eklemlerde, geri kalanı ise lenfatik yolla olmaktadır. HA'nın yarılanma ömrü yarım gnle 2-3 gün arasında değişmektedir. Kan dolaşımına ulaşan HA'nın yaklaşık %85-90'ı hepatik sinusidial hücrelerde katabolizmaya uğratılır. Böbreklerde yaklaşık %10 kadarı elimine edilir. Bununla birlikte, yalnızca %1-2 kadarı idrarla birlikte atılır.

Tüm iyileşme ve rejenerasyon için çok önemli bir özellik olan suya bağlanma yeteneği HA'da oldukça yüksek seviyededir. Polimere oranla 1000 kat daha fazla su tutabilen oldukça higroskopik bir yapıya sahiptir. Diğer proteoglikanlarla karşılıklı etkileşimde bulunan bu makromolekül, normal fizyolojik şartlar altında tüm dokuların ekstrasellüler matriksine stabilite, elastikiyet ve yüzey doldurucu yapı özelliği kazandırır. Böylece yara iyileşmesini daha iyi organize edebilmekte ve iyi bir şekilde iyileşme sağlayabilmektedir [1].



Şekil 1.1: Glukronik asit ve N-asetil glukozamin

1.1.1 Oluşumu ve Fizyolojik Önemi

Hyaluronan, tüm omurgalıların doku ve vücut sıvılarında bulunmakla birlikte bazı streptokok soylarının kapsüllerinde de mevcuttur. Ekstrasellüler matriksin bir bileşeni olarak hyaluronan bazı dokularda önemli bir bileşendir [1].

1.2 Hyalüronidazlar

“Hyalüronidaz” terimi Karl Meyer tarafından 1941 yılında, söz konusu enzimin HA’yı parçalamasından dolayı bu ifadeyle tanıtılmıştır [2]. Hyalüronidazların keşfi, araştırmanın iki bağımsız sonucudur. Memeli testis ekstraktları ve diğer dokular, bir “yayıma faktörü” olarak görev görebilirler. Öyleki, anti-viral aşılar, boyalar ve toksinlerin enjeksiyonunun difüzyonunu kolaylaştırıcı madde içerdiklerini 1928 yılında Duran-Reynals tarafından gösterilmiştir [3]. HA’nın göz sıvısından (vitröz hümör) ilk kez izole edilmesiyle [4] Meyer ve arkadaşları tarafından otolizatlarda ve pnömokoklarda HA’yı parçalayan bir enzim tanımlandı [5]. 1939 yılında memeli testislerinden ekstrakte edilen yayılma faktörünün bir enzim olduğu ve bu enzimin HA’yı parçalayan enzim olduğu gösterilmiştir [6].

Bunu izleyen yıllarda hyalüronidazlar çok sayıda dokularda ve organizmalarda tespit edildi. Örneğin bunlar bazı bakteriler (bakteriyofaj-bakteriyel hyalüronidaz), patojenik fungi (Candida, Streptomisisler) ve omurgasız hayvanlardır (kabuklular, böcekler). Omurgalılardaki hyalüronidazlar kertenkele ve yılan zehrinde, testislerde, karaciğer, böbrek ve lenfatik sistem gibi çeşitli somatik

dokularda bulunmaktadır. İzole edilmiş enzimlerin moleküler kütlesi, substrat spesifikliği, optimum pH'sı ve substrat bozunum mekanizmaları farklıdır [7-10].

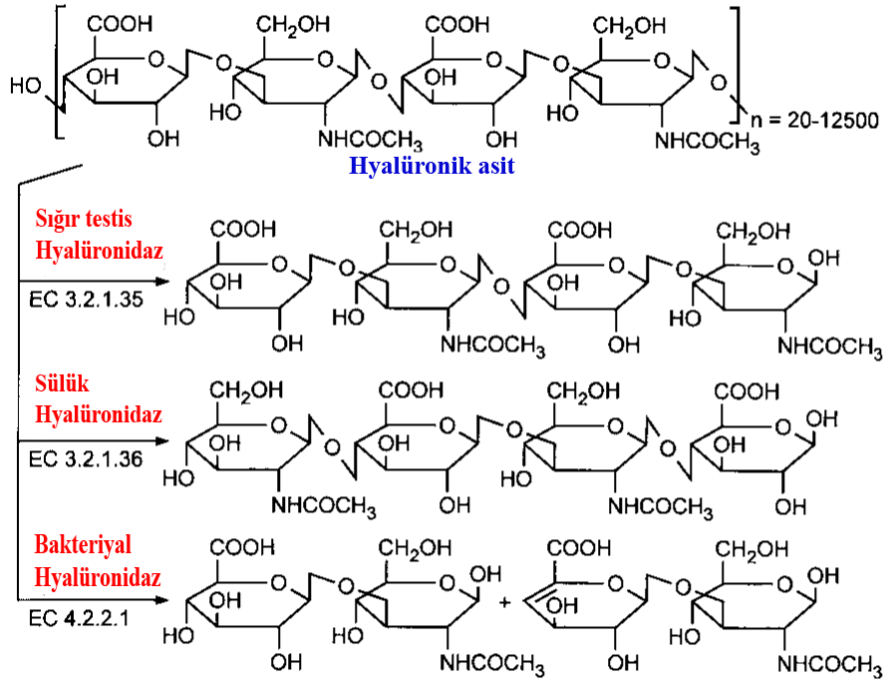
1.2.1 Hyalüronidazların Sınıflandırılması

Hyalüronidazlar için ilk sınıflandırma şeması Karl Meyer tarafından 1971 yılında kurulmuştur. Katalitik mekanizmalarına göre hyalüronidaz türleri üç ana aileye ayrılmaktadır [11].

1) Memeli Hyalüronidazları (EC 3.2.1.35)

2) Bakteriyal Hyalüronidazlar (EC 4.2.2.1)

3) Sülük, diğer parazit ve kabuklu Hyalüronidazları (EC 3.2.1.36)



Şekil 1.2: Meyer'e göre Hyalüronidazların sınıflandırılması [11]

Hyalüronidaz gruplarından ilki olan hyalüronat 4-glikanohidrolaz (E.C.3.2.1.35) HA'yı β-1,4-glikozidik bağlarından parçalayarak ana ürün olarak tetrasakkaritlere dönüştürür. Bu glikozidaz enzimleri hem hidrolitik ve hem de

transglikozidaz aktivitesi ile HA, kondroitin, kondroitin-4-ve-6-sülfat ve küçük ölçüde dermatan sülfatı parçalamaktadır. En iyi bilinen enzimler testis, lizozomal ve arı zehiri hyalüronidazlarıdır.

İkinci tip hyalüronidazlar, sülüklerin tükürük bezlerinde ve kancalı kurtlarda meydana gelen hyalüronidazlardır. Hyalüronat 3-glikanohidrolazlar (EC 3.2.1.36) HA'yı β -1,3-glikozidik bağından parçalayarak indirgen uç olan ve glukuronik asit içeren şeker fragmentlerini oluşturur. Ana bozunma ürünü yine tetrasakkaritlerdir.

Üçüncü grup hyalüronidazlar, mikrobiyal hyalüronidazlar (4.2.2.1) yani hyalüronat liyazlardır. Bunlar HA'yı β -eliminasyon tepkimesi ile doymamış disakkarit 2-asetamid-2-deoksi-3-O-(β -D-gluko-4-enepyransyluronik asit)-D-glukoz gibi ana ürünlerine parçalar. Hyalüronat liyazlar, çeşitli mikroorganizmalar; örneğin *Clostridium*, *Micrococcus*, *Streptococcus* ve *Streptomyces* içeren suşlardan substrat spesifikliğine göre izole edilmiştir.

Meyer tarafından kurulan hyalüronidazların sınıflandırılması enzimler ve tepkime ürünlerinin biyokimyasal analizine dayanıyordu. Moleküler genetik analizi, alternatif olarak, hyalüronidazların amino asit dizisi homolojisine göre iki ana grup altında ökaryotlar ve prokaryotlar olarak toplanabilirliğini göstermiştir.

1.2.2 Ökaryot Hyalüronidazları

1.2.2.1 Memeli Hyalüronidazları (EC 3.2.1.35)

Son yıllarda, birbirine yaklaşık % 40 benzer kimliğe sahip altı hyalüronidaz gen dizisi, insan genomunda tespit edilmiştir. Üç gen (*HYAL1*, *HYAL2* ve *HYAL3*) 3p21.3 kromozomu üzerinde Hyal-1, Hyal-2 ve Hyal-3 enzimlerini kodlamak için kümelenmiştir. Diğer iki gen (*HYAL4* and *PH20 (SPAMI)*), Hyal-4 ve PH-20'yi kodlamak için ve pisödogen (yalancı sözde gen) olarak ifade edilen (*HYALP1*) benzer şekilde 7q31.3 kromozomu üzerinde kümelenmiştir.

1.2.2.1.1 Hyalüronidaz-1 (Hyal-1)

Hyal-1 ilk kez insan plazmasından izole edilmiştir. Hyal-1 memeli hyalüronidazlarının içinde baskın olan hyalüronidazdır ve plazmada, idrarda, yüksek miktarda karaciğerde, böbreklerde, dalakta ve kalpte bulunmaktadır. Söz konusu enzim lizozomlarda lokalize olmuştur ve asidik pH'larda aktiftir. HYAL 1 genindeki mutasyonlar lizozomal düzensizliğe sebep olur. Ayrıca, HYAL-1, tümör oluşumunda rol oynar. *HYALI* (genelde *LUCAI* diye bilinmektedir) tümör baskılayıcı gen olmaya adaydır öyleki tütün tabanlı tümörleri inaktive etmektedir. Buna ek olarak Hyal1 tümör hücre döngüsünü teşvik ettiği bulunmuştur [12].

1.2.2.1.2 Hyalüronidaz-2 (Hyal-2)

HYAL-2 proteini yetişkin beyni dışında bir çok dokuda tespit edilmiştir [13]. Söz konusu enzim lizozomlara veya plazma membranına glikozilfosfatidilinositol bağıyla lokalize olmuştur. Hyal-1 enzimi gibi Hyal-2 enzimi de pH:4 'de optimum atkiviteyi göstermektedir. Ancak *Xenopus laevis* 'den izole edilen Hyal-2 fizyolojik durumlar altında, düşük aktiviteler de gösterebilmektedir. Hyal-2 alışılmadık bir substrat spesifikliğine sahiptir [14]. Yüksek moleküler ağırlıklı HA'yı 20 kDa gibi orta boyutlarda parçacıklara ayırır. HYAL-1 ile aynı şekilde, HYAL-2 proteini, tümör oluşumunda yer almaktadır. Ya bir onkogen veya tümör baskılayıcı gen ürünü olarak işlev görebilir. HYAL-2 aşırı ekspresyonu fare astrositom hücrelerinin oluşumunu hızlandırdığı rapor edilmiştir. Diğer yandan Hyal-2 nin apoptozu hızlandırdığı saptanmıştır [15,16].

1.2.2.1.3 Hyalüronidaz-3 (Hyal-3)

Hyal-3 proteini hakkında çok az şey bilinmektedir. Geniş ölçüde testislerde, kemik iliğinde bulunmakla birlikte kullanılmakta olan hyalüronidaz aktivite metodlarıyla herhangi bir aktivite gözlemlenememiştir [17].

1.2.2.1.4 Hyalüronidaz-4 (Hyal-4)

Hyal-4, kondroitinaz gibi görünmektedir. Çünkü kondroitin ve kondroitin sülfata karşı kesin bir spesifikliğe sahipken HA'yı parçalama yeteneğine sahip değildir. Bu substrat spesifikliği HYAL-1 ve PH-20 enzimlerine belirgin bir tezat oluşturur. Çünkü her ikisi de HA ve kondroitin sülfatı -yavaş bir hızda- parçalarken Hyal-4 de bu durum söz konusu değildir [17].

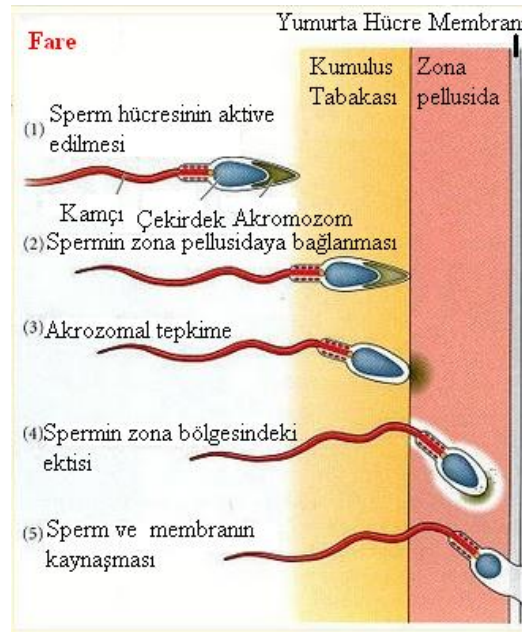
1.2.2.1.5 Hylüronidaz-PH-20 (Hyal-PH-20)

PH-20 proteini, bir çok fonksiyonlu bir protein olduğu bilinmektedir. Trübner ve ark. sperm membran proteinleri ile ilgili geniş bir literatür taraması yapmıştır. Buna göre spermatozoa membranında spesifik antijenler (tirozin kinaz sp 95, proakrozin, PH-20, PH-30, sp 56, galaktoziltransferaz, spermadezinler, progesteron reseptörü) ve başka somatik dokularda da bulunabilen, hücre-hücre yada hücre-matriks etkileşimini yürüten nonspesifik proteinler, veya matriks proteinleri, (kollagen, fibronektin, laminin, adezyon molekülleri) olmak üzere iki grup madde yer alır. Adezyon molekülleri 4 grupta incelenebilir: immünoglobülinler, kadherinler, selektinler ve integrinler.

İnsan spermatozoasında bulunan bir diğer membran proteini ise PH-20 glikozilfosfatidilinozitol (GPI)'dir. Hem plazma membranında hem de iç akrozom membranında bulunur [18]. Bir fonksiyonu hyalüronidaz aktivitesi sayesinde kumulus ooforusun (Gelişen Graaf folikülünde yumurtayı çevreleyerek folikül boşluğuna doğru çıkıntı yapan granulos hücreleri kümesi) hyalüronik asit komponentinin depolimerizasyonu ile penetrasyonudur. Diğer fonksiyonu ise sperm-zona pellusida etkileşimidir. Yapılan çalışmalar hyalüronidazın akrozomal matriksten kaynaklanan çözünebilen bir enzim olduğunu ortaya koymuştur. Cherr PH-20'nin 64kDa ve 53kDa olmak üzere iki ayrı moleküler ağırlıkta formu bulunduğunu göstermiştir. Plazma membranı ve iç akrozomal membranda normalde 64kDa formu bulunurken, akrozom tepkimesi sırasında bu çözünebilen durumdaki 53 kDa formuna dönüşür ve etkisini bu şekilde gösterir. PH-20'nin 53kDa'luk formu ise sadece iç akrozom membranında bulunur ve miktarı 64kDa'dan çok daha azdır. Çözünebilir durumda olan 53kDa PH-20'nin büyük kısmı akrozom tepkimesi

sırasında açığa çıkan proteazlar, glikozidazlar ve fosfolipazlar tarafından PH-20'nin 64kDa formu tarafından yapılır. Major endoproteaz olan akrozin de iç akrozom membranında lokalize halde bulunur. Ming ise normal ve sperm mebranları çıkarılmış spermatozoalar ile yaptığı çalışmasında PH-20 proteinini nötral pH'da maksimum hyalüronidaz aktivitesi gösteren plazma membranı kaynaklı PH-20 ve asidik pH'da maksimum hyalüronidaz aktivitesi gösteren iç akrozomal membran kaynaklı PH-20 olmak üzere iki formda incelemiştir [19].

Spermi çevreleyen kumulusun penetrasyonu için gerekli hyalüronidaz aktivitesi akrozom içeriğinde bulunmaktan ziyade plazma membranından kaynaklanır. Çünkü eğer sperm akrozom tepkimesini kumulusun dışında veya hemen içinde tamamladıysa, plazma membranı harap olmuş olacağından kumulus penetrasyonu gerçekleşemez. Çalışmalar, akrozom tepkimesini tamamlamış bir spermde hyalüronidaz aktivitesinin ancak %0.5'nin salınabildiğini ortaya koymuştur. Geri kalanı membrana bağlı konumda bulunur. İnsanda hyalüronidaz aktivitesi gösteren tek enzim PH-20'dir. Ancak hyalüronidaz aktivitesi sürekli değildir. Akrozom tepkimesini takiben kısa bir süre için perizonal ortam akrozomal içeriğe bağlı olarak asidiktir ve bu nedenle iç akrozomal membran kaynaklı ve asitte aktif 53 kDa-hyalüronidaz fonksiyon görerek zonayı penetre edebilir. Ama hemen arkasından akrozomal içeriğin tükenmesi ile ortam yine nötral pH'ya döner ve hyalüronidazın proteolitik aktiviteside kaybolur.



Şekil 1.3: Döllenme olayında hyalüronidazın önemi ve etkisi

1.2.2.1.6 Sığır Testis Hyalüronidazı (BTH)

Memeli testis ekstraktlarının hyalüronidaz aktivitesi içerdiği uzun zamandır bilinmektedir [20]. Büyükbaş ve küçükbaş testis hyalüronidaz preparatları yıllardır terapötik ve çeşitli tıbbi alanlarda bir yayılma faktörü olarak uygulanmaktadır [21]. 1997 yılında ana çözünebilir hyalüronidazın boğa testis ekstraktlarında bulunduğu tespit edilmiş ve membrana bağlı PH-20 enziminin bir parçası olduğu anlaşılmıştır [22].

BTH, HA'yı β -1,4-glikozidik bağından parçalayabilen bir endoglikanohidrolazdır (EC 3.2.1.35). HA'ya ek olarak BTH aynı zamanda kondroitin, kondroitin -4- ve kondroitin -6-sülfat ve küçük ölçüde de olsa dermatan sülfatı parçalayabilmektedir [23].

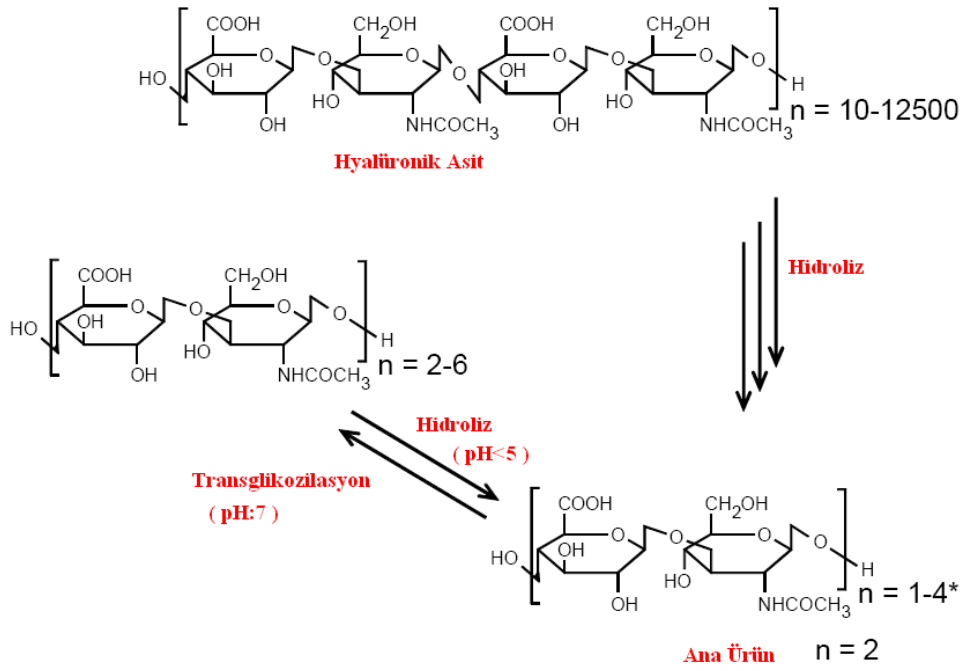
BTH'nin geniş substrat özgüllüğünden dolayı , zincir uzunlukları değişen glikozaminoglikan oligosakkaritlerinin hazırlanması gibi glikoteknolojik uygulamalar için çok değerlidir [23]. Hyalüronidazlar aynı anda hidrolitik ve transglikozilasyon faaliyetlerini gösterebilmektedir [24-27].

Transglikozilasyon hidrolizi için daha uygun olan koşullar altında ilerler. HA'nın ticari BTH ile hidrolizi için optimum koşullar pH:4.0 ve NaCl'ün bulunmadığı ortamdır. Oysaki transglikozilasyon için optimum koşullar, pH:7.0 ve NaCl 'ün yokluğudur [26-28].

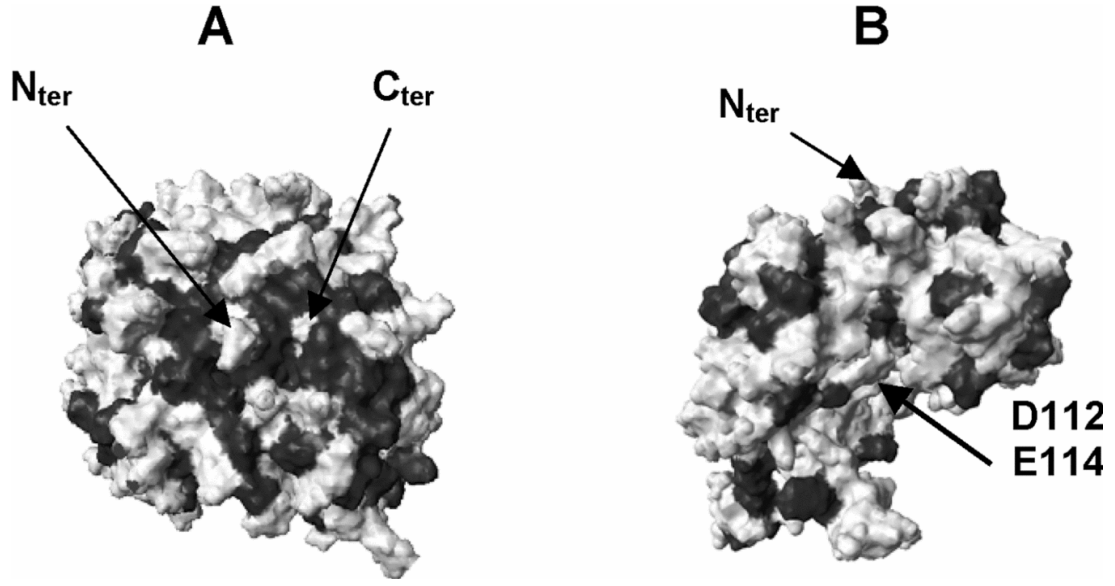
BTH'nin HA'yı parçalama mekanizması oldukça karmaşıktır. BTH aynı zamanda substratın parçalama ve uzama tepkimelerini sırasıyla hidroliz ve transglikozilasyon tepkimeleriyle katalizler. Çünkü oligosakaritler her iki tepkime için sıralı substratlar olarak hareket edebilirler ve tepkime ürünlerini, nasıl üretildiklerini tespit etmek zordur. HA'nın hyalüronidaz tarafından parçalanma mekanizması ve kinetiği daha önceleri kolorimetrik tepkimeler de dahil olmak üzere kapiler bölge elektroforezi ve iyon çifti HPLC gibi değişik metodlarla bulunmuştur [23,24,29-32].

BTH genellikle asidik ve nötral pH'larda aktivite gösterebilmektedir. Optimum BTH aktivitesi asidik pH 'larda (pH 3.5 - 4.0) ve aynı zamanda zayıf asidik bölge ve nötral bölgede bulunmuştur [33].

Hidrolize ek olarak BTH transglukozilasyon ters tepkimeleri de katalizler (Şekil 1.4). BTH'nin transglukozilasyon aktivitesi pH değerine bağlıdır ve inkübasyon tamponu tuz içermektedir. Saitoh ve arkadaşlarının çalışmaları sonucu transglukozilasyon tepkimesinin optimum pH' sı 7.0 olarak bulunmuştur. Oysa hidroliz tepkimeleri pH<5.0 değerlerinde optimumdur. En yüksek transglukozilasyon aktivitesi NaCl yokluğunda gözlenmekle birlikte 0.5 M NaCl derişiminden yüksek derişimlerde neredeyse tamamen inhibe olmaktadır [34].



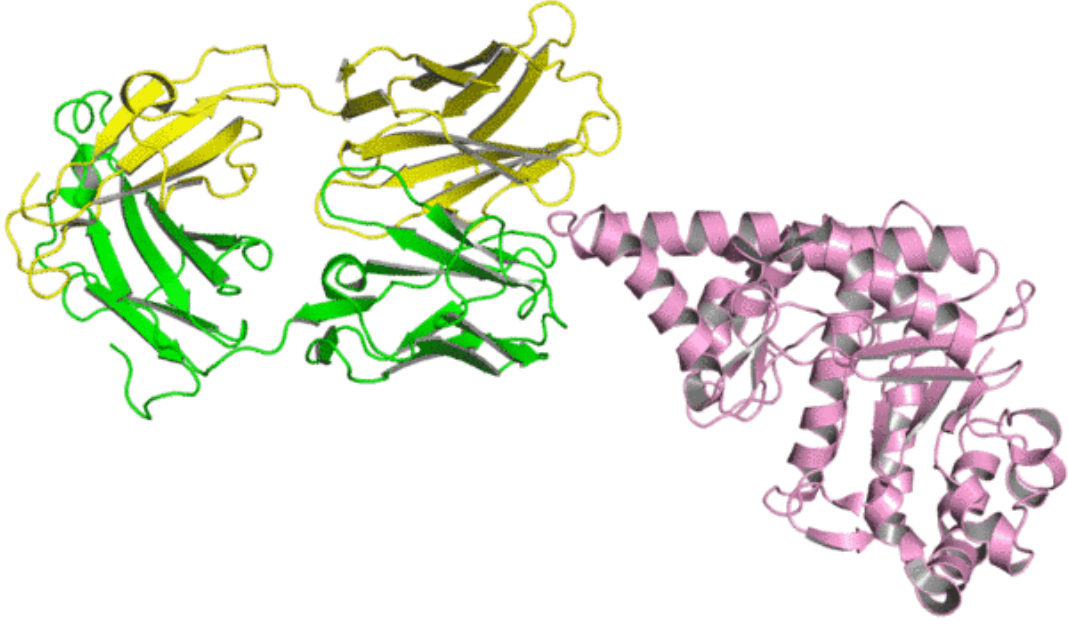
Şekil 1.4: Hyalüronanın BTH ile parçalanma mekanizması [35]



Şekil 1.5: Sığır Testis Hyalüronidazın Hidrofobik Rezidülerinin Model Gösterimi (A) N- ve C-terminal bölgelerin içerdiği hidrofobik aminoasitler (Siyah Bölgeler) (B) N-terminal bölgesi aspartat ve glutamat rezidülerinin karşısında bulunan korunmuş aktif bölge (Siyah Bölgeler) [36]

1.2.2.1.7 Arı Zehri Hyalüronidazı

Arı zehri hyalüronidazı (BVH), arı zehrinin önemli bir alerjeni olmakla birlikte memeli hyalüronidazlarına 30 % benzerlik gösteren bir hyalüronat 4-glikanohidrolazdır (E.C. 3.2.1.35). Sığır testis hyalüronidazı ve insan hyalüronidazı ile karşılaştırıldığında C-Terminal bölgesindeki 120-150 aminoasit eksikliğiyle bilinmektedir [37]. Sığır testis hyalüronidazında (BTH) olduğu gibi, arı zehri hyalüronidazı da HA' ya ek olarak kondroitin sülfatı parçalayabilmektedir. Allalouf ve grubu tarafından yapılan çalışmalar BVH' in pH-Aktivite profilinin, maksimum aktivitenin pH:4.5 de gösterdiğini ve nötral pH larda da dikkate değer aktivitenin olduğunu açıklamaktadır [38].



Şekil 1.6: Arı zehri hyalüronidaz yapısı [39]

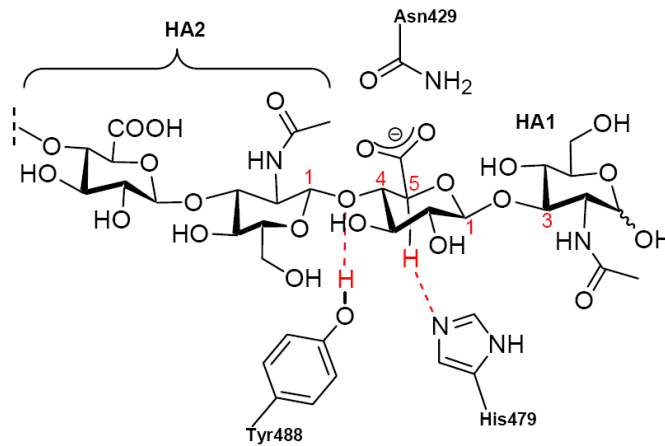
HYA_BOVINE	LDFRAPPLISNTSFLWAWNAPVERCVNRRFQLPPDLRLFSVKGSPQKSAT	50
HYA_BEE	---TPDNNKTVREFNVYWNVPTFMCHKYGLRFEEVSEKYGILQNWMDKFR	47
HYA_BOVINE	GQFITLFYADRLGYYPHIDEKTGKTVEG---GIPQLGNLKSHLEKAKNDI	97
HYA_BEE	GEEIAILYDP--GMFPALLKDPNGNVVARNGGVPQLGNLTKHLQVFRDHL	95
HYA_BOVINE	AYYIPNDSVG-LAVIDWENNRPTWARNWPKDVYRDESVELVLQKNPQLS	146
HYA_BEE	INQIPDKSFPVGVGVIDFESWRPIFRQNWASLQPYKKLSVEVVRRHEHPFD	145
HYA_BOVINE	FPEASKIAKVDVFETAGKSEMQETLKLGLLRPNHLWGYYLFPDCYNHNNH	196
HYA_BEE	DQRVEQEAQRREFEKYQQLFMEETLKAARKMRPAANWGYAYPYCYNLTEN	195
HYA_BOVINE	QPTYNGNCPDVEKRRNDLEWLWKESTALFPSVYLNIRLKSTQNAALYVR	246
HYA_BEE	QP--SAQCEATTMQENDKMSWLFESQEDVLLPSVYLRWNLTSGERVGLVG-	242
HYA_BOVINE	NRVQEAIRLSKIASVESPLPVFYARPVFTDGSSTYLSQGDVNSVGEIV	296
HYA_BEE	GRVKEALRIARQMTTSRKK-VLPYYWYKYQDRRDTDLRADLEATLRKIT	291
HYA_BOVINE	SLGASGIIMWGSNLNLSLVQSCMNLGTYLNTTLNPIYIINVTLAAKMCSQV	346
HYA_BEE	DLGADGFIIWGSSDDINTKAKCLQFREYLNNELGPAVKRIALNNNANDRL	341
HYA_BOVINE	LCHDGGVCTRKHWNSSDYHLNPMNFAIQTGEGGKYTVPGTLTLEDLQKE	396
HYA_BEE	TVDVSDQV-----	350
HYA_BOVINE	SDTFYCSCYNSLSCKKRVDIKNVHSVDVCMEDVCI DAFLKPP	439
HYA_BEE	-----	

Şekil 1.7: BTH ve arı zehir hyalüronidazlarının aminoasit dizi modeli.(Gri bölgeler BTH ve arı zehir hyalüronidazları için yapısı aydınlatılmamış bölgelerdir.) [36]

1.2.3 Prokaryot Hyalüronidazları

Mikroorganizmaların çok çeşitli türleri hyalüronatı parçalayabilen enzimler üretebilmektedir. Mikrobiyal hyalüronidazlar üzerinde ayrıntılı bakışlar Suzuki, Hynes ve Walton tarafından gerçekleştirilmiştir [40,41].

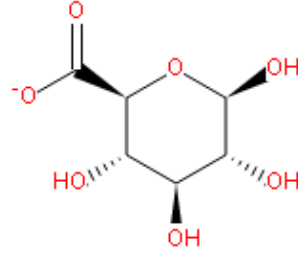
Bu güne kadar prokaryotlardan elde edilen çeşitli hyalüronidazların aminoasit dizileri belirlenmiştir [42]. En iyi bilinen ve karakterize edilen bakteriyel hyalüronidazlar *Streptococcus pneumoniae* ve *Streptococcus agalactiae* (grup B streptococcus, GBS) hyalüronat liyazlardır [43-45]. Her iki enzimde HA' yı yüksek verimle, β -eliminasyon tepkimesiyle ana ürün olarak doymamış disakkarit olan 2-asetamid-2-deoksi-3-O-(β -D-gluko-4-enpiranozilüronik asit)-D-glukoz (Δ DiHA) birimlerine dönüştürür [46,47].



Şekil 1.8: *S. agalactiae*'dan elde edilen Hyalüronat liyazın Hyalüronanı parçalama mekanizması. Hyalüronikasitin substrat olarak değerlendirilmesiyle disakkarit birimleri olarak HA1 ve HA2 , ayrıca Tyr488, His 479 ve Asn429' nin zincir pozisyonunun şematik gösterimi [48]

1.2.4 Enzimin Substratları

D-glukuronat genellikle heksapiranoz halka yapısını oluşturan bir karboksilik asittir. Heksapiranozik β -D-glukuronat formu glikozaminoglikanlardan olan kondroitin sülfat, dermatan sülfat, heparin ve heparan sülfat ve hyalüronik asitte bulunur [49].



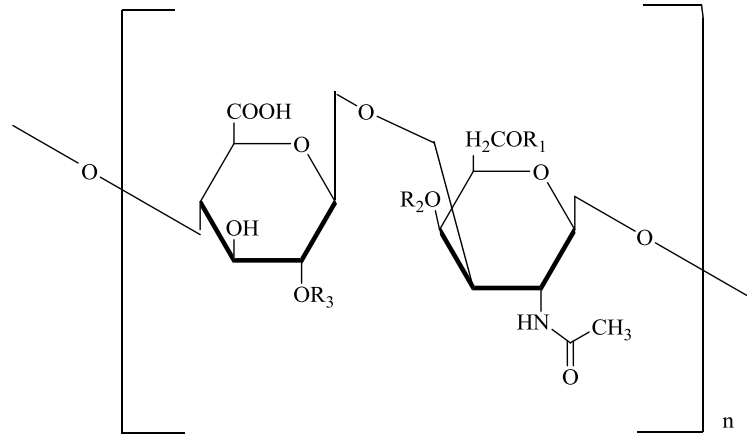
Şekil 1.9: D-glukuronatın kimyasal yapısı [49].

Tablo 1.1: Glikozaminoglikanlar (GAG) ve vücutta lokalize olduğu yerler

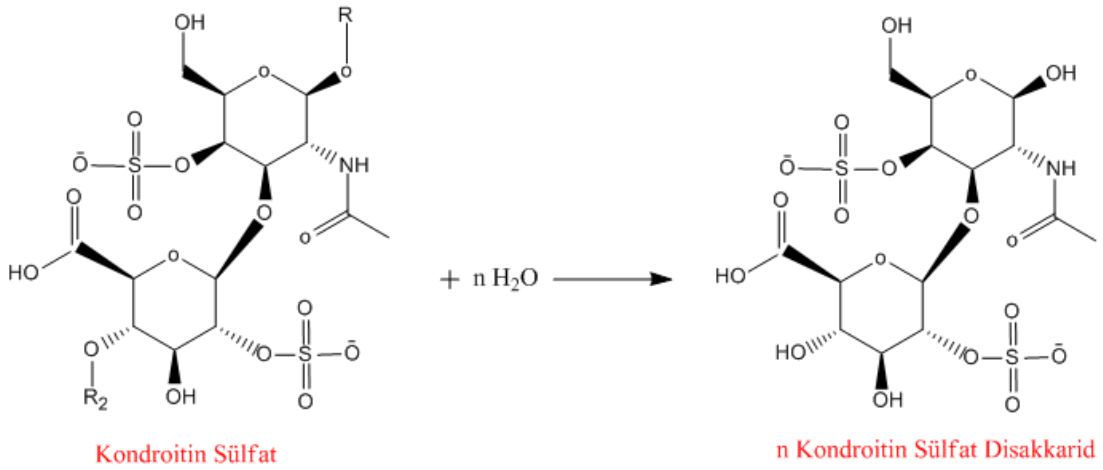
Hyalüronik Asit	Çeşitli bağ dokularında, Deride, Kıkırdak Dokuda, Sinoviyal Sıvıda
Kondroitin Sülfat	Kıkırdak Dokuda , Deride, Kemikte, Korneada, Arterlerde
Dermatan Sülfat	Deride, Kan Damarlarında, Kalpte,Kalp Kapaklarında
Heparan Sülfat	Akciğerlerde, Arterlerde, Hücre Yüzeylerinde
Heparin	Akciğerde, Karaciğerde, Bazı Bağışıklık Sistemi Hücrelerinde
Keratan Sülfat	Kıkırdak Dokuda, Korneada, Omur Disklerinde

1.2.4.1 Kondroitin Sülfat

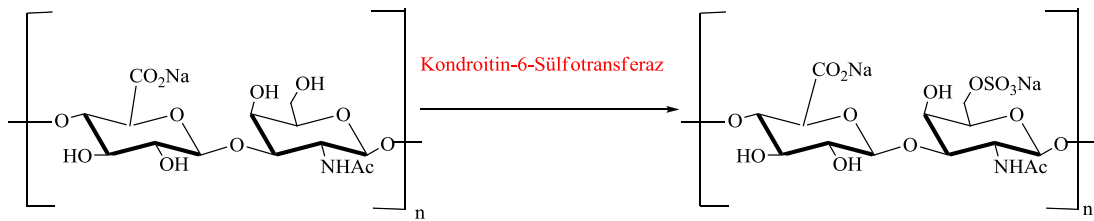
Kondroitin sülfat, tekrarlanan N-asetil- β -D-galaktozamin (β 1,3) β -D-glukuronat birimlerinin kendi aralarında β (1,4) bağı yaparak oluşturduğu bir glikozaminoglikandır. Genellikle bir proteoglikan parçası olarak proteinlere bağlı bulunmaktadır. Kondroitin sülfat, tıpkı deri ve kıkırdak dokuda olduğu gibi bağ doku matriksinin önemli bir bileşenidir. Aynı zamanda hücre yüzeyi, hücre bazal membranı üzerinde ve belirli hücre içi granüllerde bulunan bir yapıdır. Matriks bölgelerinde ve membranlarda asıl olarak reseptör görevi görmektedir [49].



Şekil 1.10: Kondroitin sülfatın kimyasal yapısı [49].



Şekil 1.11: Kondroitin sülfatın parçalanma tepkimesi [50].

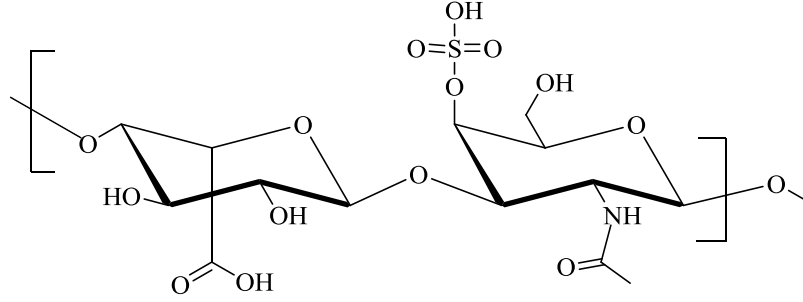


Şekil 1.12: Kondroitinin, kondroitin-6-sülfotransferaz enzimi yardımıyla kondroitin-6-sülfata dönüşmesi [50].

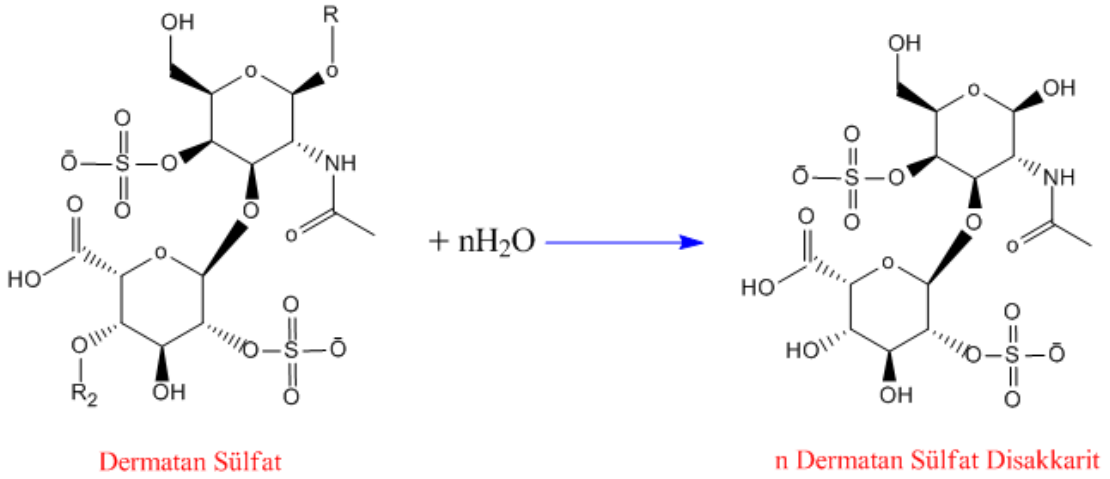
1.2.4.2 Dermatan Sülfat

Dermatan sülfat, tekrarlanan disakkarit birimlerinin değişik şekillerde kompozisyonu sonucu oluşan sülfatlanmış glikozaminoglikanlardır. Dermatan sülfat

birçok memeli dokularında bulunmakla birlikte deride de baskın olarak bulunan bir glikandır. Yapılan çalışmalar sonucu dermatan ve dermatan sülfat proteoglikanlarının kardiyovasküler hastalıklar, tümöröenez, yara onarımı, fibrozisde etkisinin olduğu tespit edilmiştir [51-55].



Şekil 1.13: Dermatan sülfatın kimyasal yapısı [51].

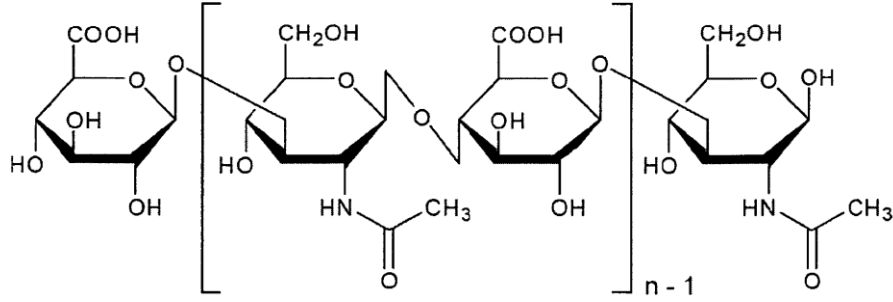


Şekil 1.14: Dermatan sülfatın parçalanma tepkimesi [51].

1.2.4.3 Hyalüronik Asit

Hyalüronat, hyalüronan olarak da bilinen hyalüronik asit (HA) yüksek molekül ağırlıklı, non-sülfat, lineer, dalsız bir glikozaminoglikandır [56]. Bazı biyolojik olaylarda dinamik olarak yer aldığı bilinmektedir. HA'nın molekül ağırlığı farklı doku ve sıvılarda 1×10^5 ile 10^7 Da arasında değişiklik göstermektedir. Diğer glukozaminoglikanlar golgi cisimciğinde sentezlenirken HA, plazma membranının

sitoplazmasında sentezlenir. Ayrıca hyaluronan nonsülfat olması ve proteinlere kovalent olarak bağlama özelliği ile de diğer glukozaminoglikanlardan farklıdır [57].



Hyaluronan

Şekil 1.15: Hyalüronan (Hyalüronik asit) kimyasal yapısı [58]

1.2.5 Endo-Tip Glikozidazların Glikokojügelere Üzerine Etkileri

Endo-tip glikozidazların iki tipi vardır; biri karbohidratların bağlandığı bölgede ve glikokojügelere temel parçası (peptid veya lipid) üzerinde etkinken, bir diğeri karbohidrat zincirinin iç kısmında yer alan ayrı bağlantı bölgesinde görev görür [23,26,59].

1.2.5.1 N-glikan

- (1) Endo-beta-N-asetilglukozaminidaz
- (2) Endo-beta-mannosidaz

1.2.5.2 O-glikan

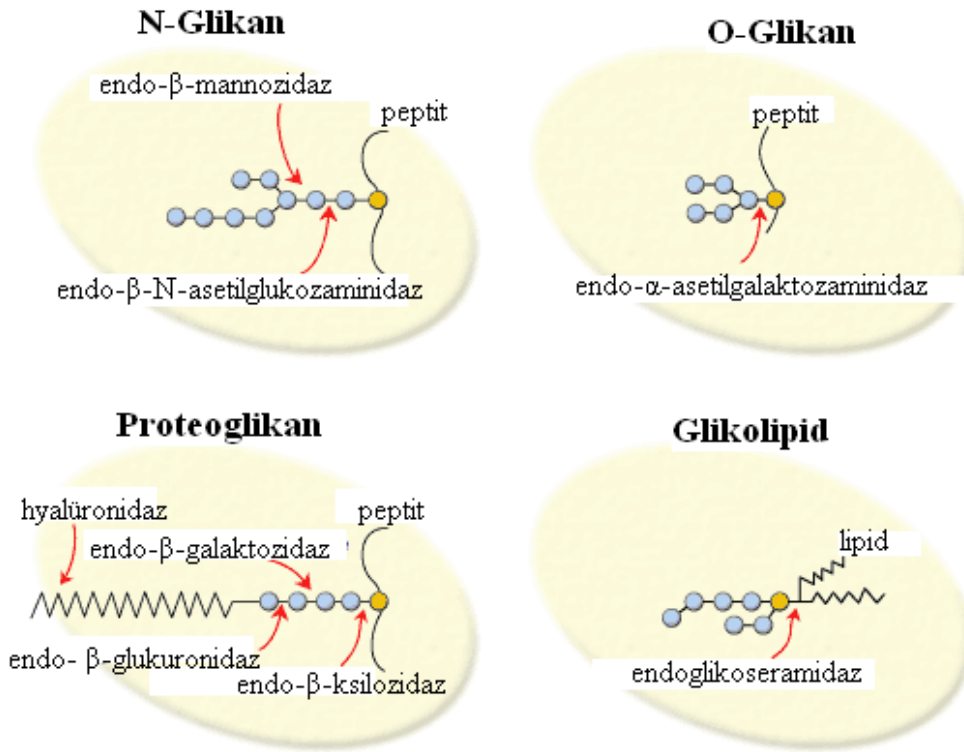
Endo-alfa-N-asetilgalaktozaminidaz

1.2.5.3 Proteoglikan

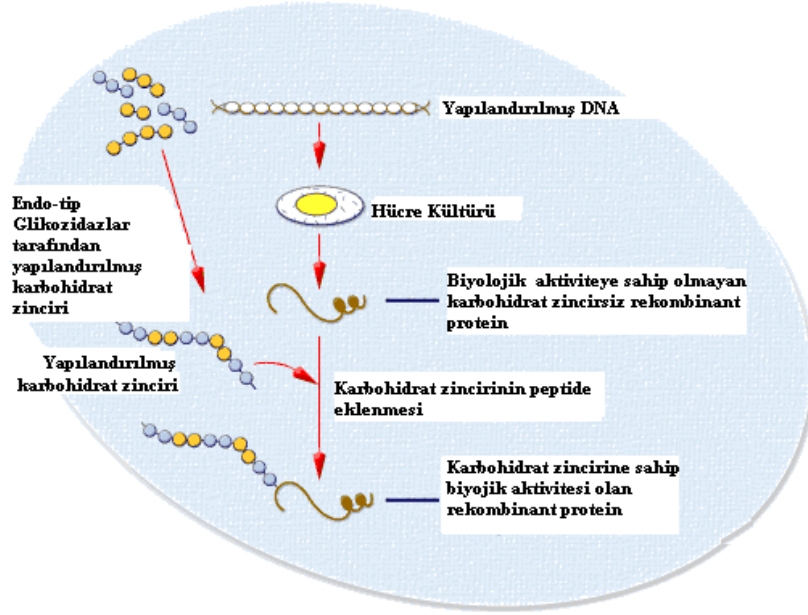
- (1) Endo-beta-ksilosidaz, endo- beta-galaktosidaz ve endo- beta-glukuronidaz
- (2) Testis hyalüronidazı, endo- beta-N-asetilheksosaminidaz (Glikozaminoglikan zincirinin iç kısmında görev alır : hyalüronik asit ve kondroitin sülfat)

1.2.5.4 Glikolipid

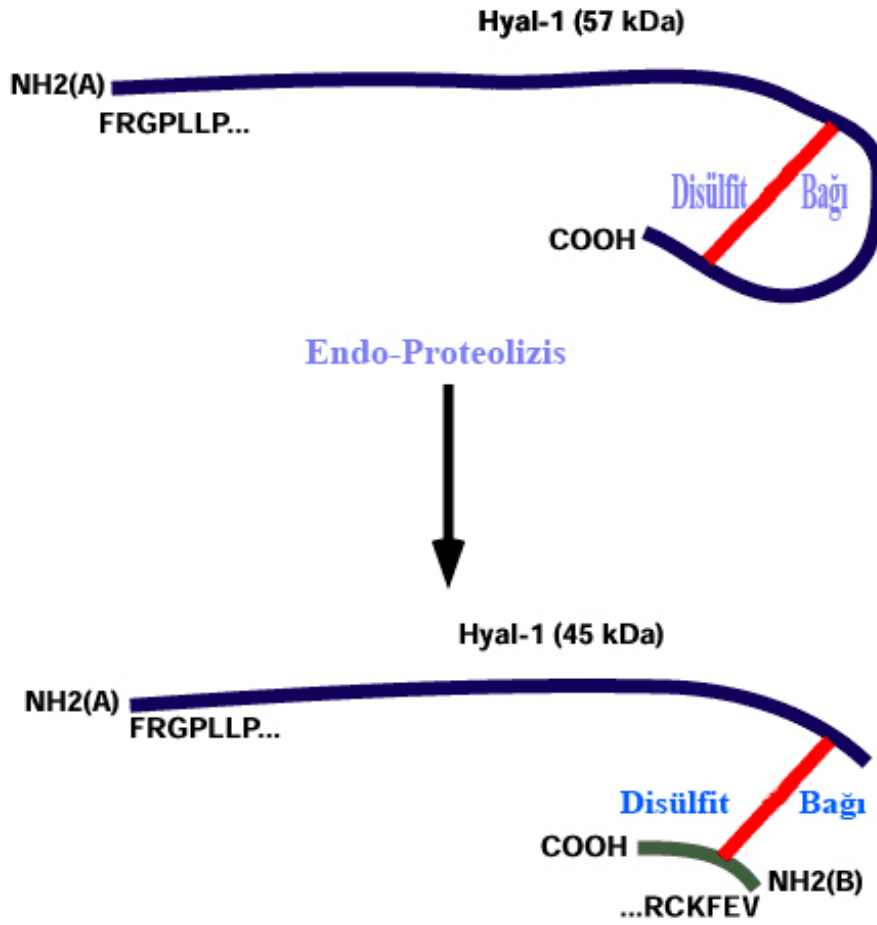
- (1) Endoglikoseramidaz



Şekil 1.16: Glikokonjüger üzerinde etkin olan endo-tip-glikozidazlar [23,26,59]



Şekil 1.17: Endo-Tip Glikozidazlar kullanılarak glikokonjüge sentezi [23,26,59]

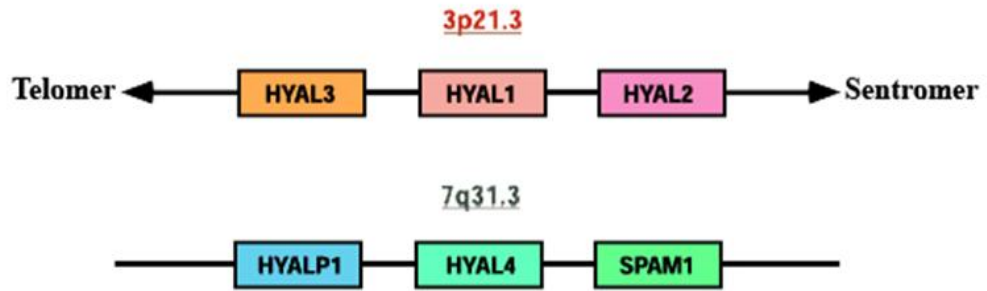


Şekil 1.18: Hyal-1'in endoproteolitik prosesinin şematik gösterimi [60].

Endoproteolitik proses sonrası iki adet fragment oluşumu ve bunların N-terminal bölgeleri gösterilmiştir. Muhtemelen 22 aminoasit rezidüsü disülfid bağları ile proteinin geri kalan kısmına bağlanırlar [60].

1.2.6 Hyalüronidaz Dizilerinin Genomik Organizasyonları

İnsan Hyal-1 geninin dizisi *HYAL-1* olarak nitelendirilir ve EST (expressed sequence tag) bilgilerinden bu şekilde olduğu tespit edilmiştir. Bu analize ek olarak *Plasmodium falciparum* mikrobiyal genomuna ait bilgiler insan genomunda 6 paralog hyalüronidaz geninin bulunduğu ve bunların yaklaşık %40 benzer olduğu aydınlatılmıştır. Bu genler, bağlı bir şekilde insan kromozomunun 3p21.3 ve 7q31.3 bölgelerinde üçerli gruplar halinde bulunduğu tespit edilmiştir [60].

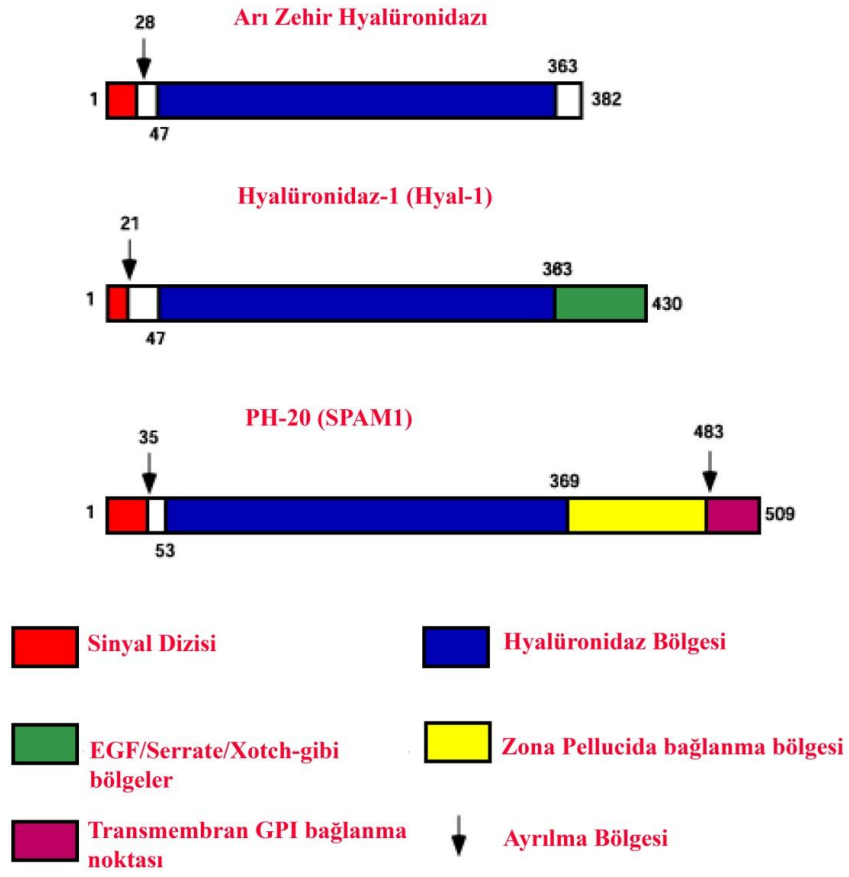


Şekil 1.19: Hyalüronidaz geninin kromozomal dizilimi [60]

Tablo 1.2: Hyalüronidaz genleri ve ürettikleri proteinler [60].

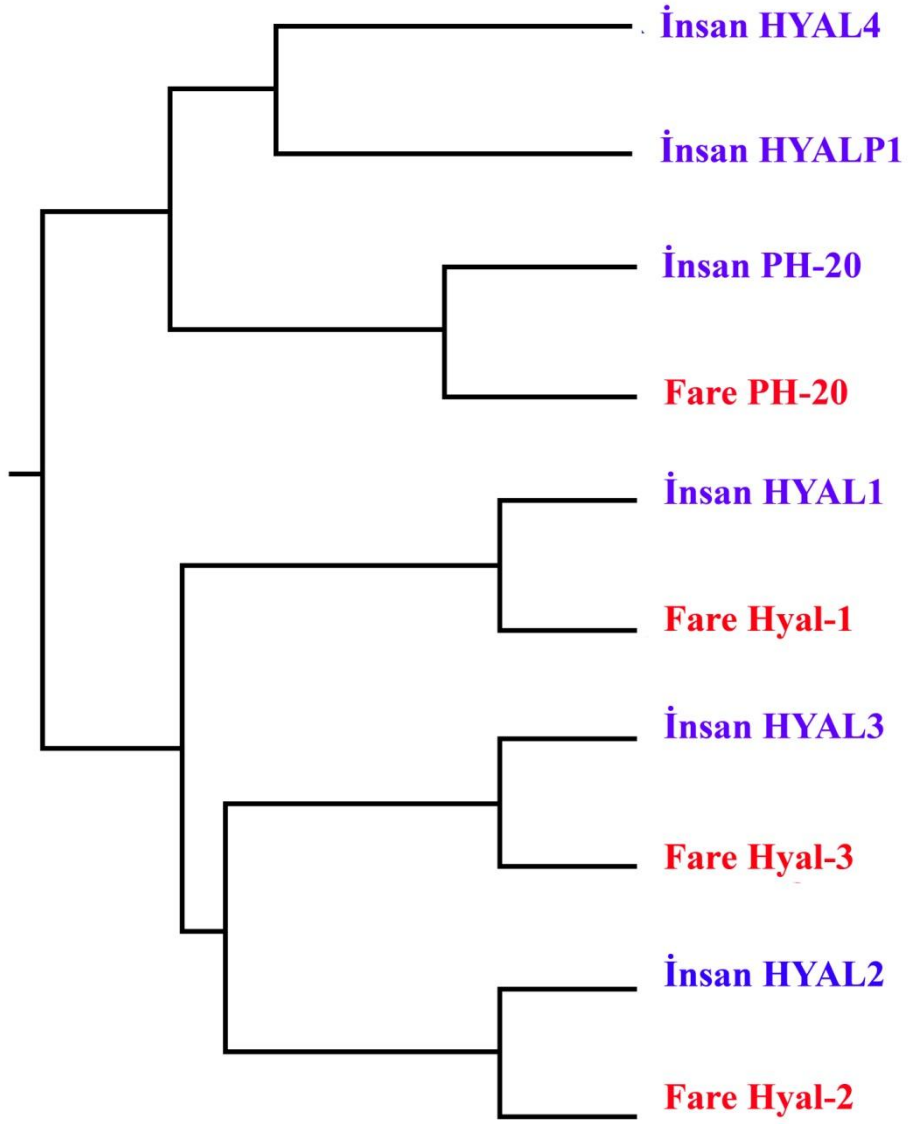
	Gen	Protein
3p21.3	HYAL1	Hyal-1
	HYAL2	Hyal-2
	HYAL3	Hyal-3
7q31.3	HYAL4	Hyal-4
	SPAM1	PH-20
	HYALP1	---

6 kromozomal hyalüronidaz geninin belirtilen kromozomal bölgelerdeki dizilimi ve onlara ait gen ürünleri belirtilmiştir. Kromozom 7' de bulunan genlerin dizilimi bilinmesine karşın bu dizilimin kromozomun sentromer ve telomer bölgeleriyle olan ilişkisi henüz belirlenmemiştir [60].

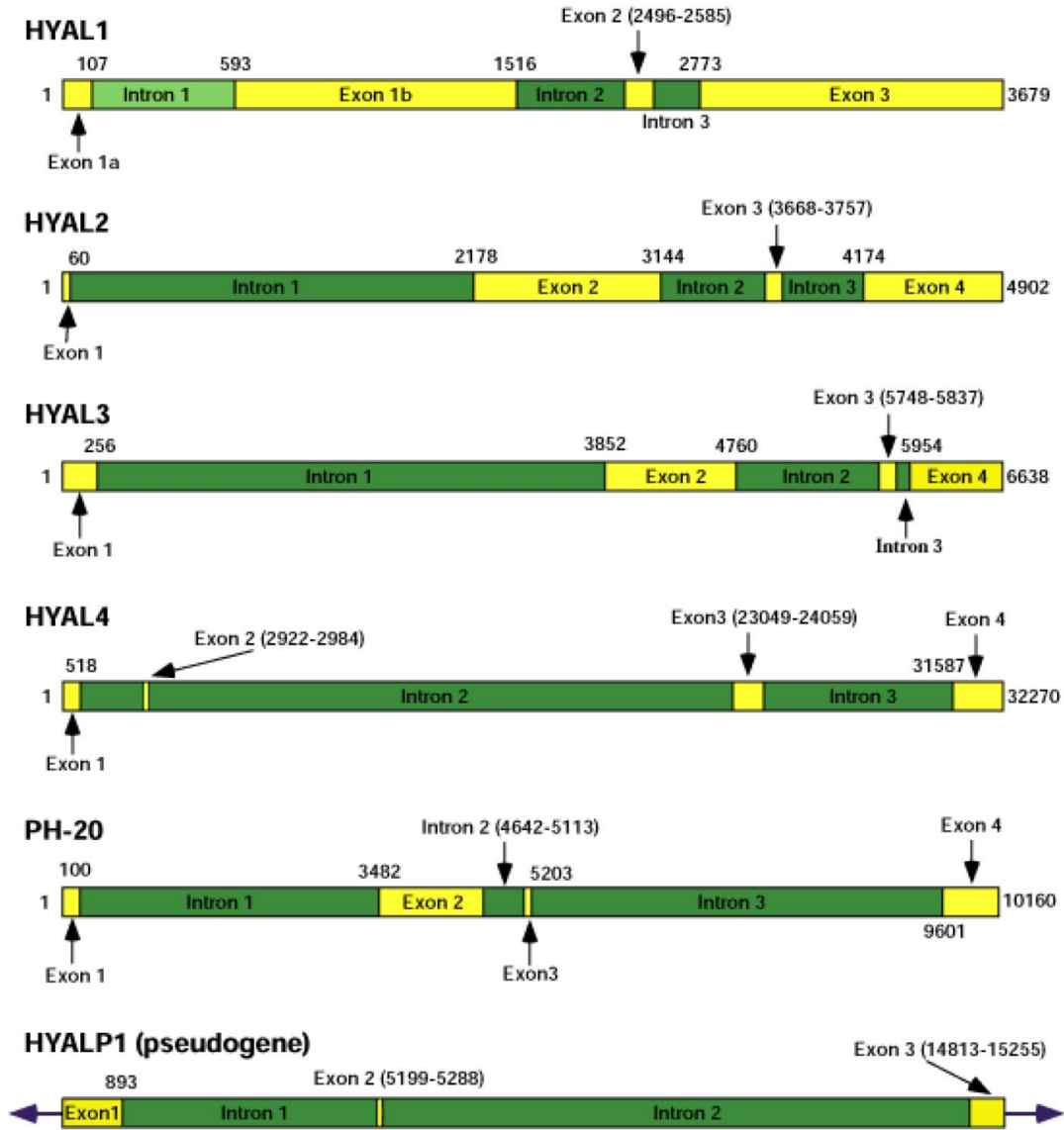


Şekil 1.20: Arı zehri hyalüronidazı, Hyal-1 (plazma hyalüronidazı) ve PH-20 (sperm hyalüronidazı) nin varsayılan bölgelerinin şematik gösterimi [60]

İkincisi de SPAM1 (sperm adezyon molekülü 1) olarak bilinmektedir. Üç enzim arasındaki güçlü homoloji bölgesi mavi ile belirtilmiştir. Zona pellucida bağlama bölgesi, PH-20 için karboksi bölgesinde meydana gelir. PH-20 ye benzer şekilde, Hyal-1 de EGF gibi bölgeleri karboksi bölgesinde içermektedir [60].



Şekil 1.21: Altı insan ve dört fare hyalüronidazının filogenik analizi [60]



Şekil 1.22: Hyalüronidaz genlerinin genomik yapısı [60].

1.2.7 Kanser ve Hyalüronidazlar

Tümör invazyonu ve metastatik yayılma mekanizmalarında çeşitli faktörler gibi hyalüronidazlar da etkili olduğu tespit edilmiştir. Hyalüronan seviyesi, tümör hücrelerinin gelişimi ve kötü sonuçlarıyla ilişkilidir. Aşırı hyalüronan üretimi bağımsız büyümeyi arttırdığı tespit edilmiştir. Hyalüronidaz aktivitesi kaybı tümör gelişimi açısından bir çok adımlardan biri olarak sayılabilir. HYAL1 geni (Lung Cancer-1, LUCA-1 olarak da bilinir) tümör baskılayıcı aktivitesi ve homozigot silinmesi fonksiyonuyla yeni bir tümör baskılayıcı gen adayıdır. Hemizigote (Belli bir özelliği belirleyen gen çiftinin sadece bir gen (allele) 'ine sahip olma hali) veya

iki allelden birinin kaybı birçok ağız, baş, boyun ve akciğer kanserinin bu bölgede oluşmasına neden olur. Homozigot kaybı kalan alel mutasyonlarının gerçekleşmesi için gerekli olacaktır (her iki allel fonksiyon kaybı). Enzimler için, doğada katalitik olarak, bu iki alelden sadece birinin kaybı zararlı olmayacağı varsayılmaktadır ve kalan allelin, hücre için yeterli düzeyde aktivite kaynağı olabilir. Her iki allelin kaybı veya homozigot kaybı bir etki uygulamak için gerekli olacaktır. Bununla birlikte, HYAL1 bölgesindeki herhangi bir mutasyon, kapsamlı aramalar rağmen kanser oluşumundaki etkisi bulunamamıştır. Bu tümör baskılayıcı genin (TSG) TSG bölgesi için uygulanabilir olmadığını göstermektedir. Ancak Stern R. ve grubu tarafından yapılan çalışmalar sonucu HYAL1 gen ürününü bastırıcı fonksiyona sahip bir lezyon tespit edilmiştir. HYAL1 için mRNA mevcut olmasına rağmen ne hyalüronidaz enzim aktivitesi ne de Hyal-1 proteini kanser hücre hatlarında tespit edilememiştir. Alışılmışın dışında büyük 5'UTR korunmuş bir intronun varlığını göstermektedir. Bu korunmuş intron, doğru başlama metionin kodonunun ribozoma bağlanmasını önleyerek translasyonu bloke eder. Böyle bir genin kanser yayılımının baskılanmasında ne kadar etkili olduğu bilinmemektedir. Ancak bu bulgu, kanser gelişimi sürecinde hyalüronidaz aktivite kaybının önemini vurgulamaktadır. Hyalüronidaz aktivite kaybı ve hylüronanca zengin ortam kanser hücrelerinin büyümesini, hareketini ve metastazını uyarır. Bu bileşenlerin tümü kanser oluşumunun sebebidir. Kanser hücreleri muhtemelen istenmeyen gen ürünlerinin baskılanması için olan mekanizmaların geniş bir bölümüne adapte olmuştur. Görünüşe göre tümör baskılayıcı genler sadece genomik DNA da değil aynı zamanda HYAL1 durumunda olduğu gibi ve mRNA düzeylerinde de meydana gelebilir. Bu aynı zamanda 7q31.3 alanında da TSG bölgesinin olduğu unutulmamalıdır [60].

1.2.8 Enzimin Saflaştırılması

Yapılan araştırmalar sonunda hyalüronidazlar çok sayıda dokularda ve organizmalarda tespit edilmiştir. Örneğin bunlar bazı bakteriler (bakteriyofaj-bakteriyel hyalüronidaz), patojenik fungi (Candida, Streptomisisler) ve omurgasız hayvanlardır (kabuklular, böcekler). Omurgalılarıdaki hyalüronidazlar kertenkele ve yılan zehrinde, testislerde, karaciğer, böbrek ve lenfatik sistem gibi çeşitli somatik

dokularda bulunmaktadır. İzole edilmiş enzimlerin moleküler kütlesi, substrat spesifikliği, optimum pH'sı ve substrat bozunum mekanizmaları farklıdır.

Bu çalışmaların yanında sığır testis hyalüronidazı A. K. Barsukov ve grubu tarafından çeşitli saflaştırma teknikleri ile saflaştırılmıştır. Söz konusu enzim bahsi geçen grup tarafından afinite kromatografisi tekniğiyle 40-42 kat saflaştırıldığı belirtilmiştir [61].

1.2.9 Ağır Metaller Ve Çeşitli İyonların Çevre Üzerine Etkileri

Çevre insanla birlikte tüm canlı varlıklar, cansız varlıklar ve canlı varlıkların eylemlerini etkileyen ya da etkileyebilecek fiziksel, kimyasal, biyolojik ve toplumsal nitelikteki tüm etkenlerdir [62]. Ancak bu etkenlerin insanların nüfus artışı, teknolojik gelişmeler ve tüketim alışkanlıklarına bağlı olarak zarar görmesi ve bu zararın rahatsız edici seviyelere ulaşması sonucu kirlenmesi söz konusudur. Böylece çevre kirliliği ortaya çıkmaktadır. Çevre kirliliği geçici veya sürekli bir biçimde canlılara zarar veren gaz, sıvı ve katı maddeler ile radyasyonun; cisim, sistem ve çevrede meydana getirdiği olumsuz değişimlerdir. Bir başka deyişle hava, su ve toprağın fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerinde meydana gelen arzu edilmeyen değişimlerdir [63]. Çevre kirliliğine neden olan ve gittikçe daha büyük boyutlarda tehlike oluşturan etmenlerin başında ağır metaller ve çeşitli iyonlar gelmektedir. Ağır metallerin ve çeşitli iyonların (Ag,As, Cd, Cu, Fe, Ni, Pb, Zn, Mo, Co, Cr, NH₄Cl, NH₄F, CaCl₂, ZnCl₂ gibi) toprak kirlenmesi ve çevreye yaptığı zararlar çok önemli güncel sorunlar haline gelmiştir. Hızlı şehirleşme, endüstrileşme, gübreleme ve pestisit kullanımı, toprak ve su kaynaklarında toksik metal kirliliği ile sonuçlanmaktadır. Toksik metallerin birikimindeki artma, ekosistemde dengesizliğe neden olmakta, toksik metallerin yüksek miktarlarda çoğu habitatın canlı gelişimi boyunca birikmektedir. Bu durum biyolojik büyüme sürecinde besin zinciri boyunca transfer edilmekte ve biriktirmektedir. Ayrıca bu metallerin besin zincirindeki yüksek derişimi yasayan insan ve hayvan sağlığını çeşitli şekillerde tehdit etmesiyle sonuçlanmaktadır. Esansiyal olsun veya olmasın ağır metallerin yüksek derişimleri mikroorganizmalar, bitkiler, hayvanlar ve insanları içeren canlılar alemi için toksik etkisi bilinen bir gerçektir [63,64]. Önemli bir kirleticisi grubu oluşturdukları bilinen ağır metallerin ve iyonların; toksik ve kanserojen etkileri olduğu gibi, canlı

organizmalarda birikmesi de söz konusudur. Krom, civa, kurşun, kadmiyum, mangan, kobalt, nikel, bakır ve çinko gibi metaller doğada genellikle sülfür, oksit, karbonat ve silikat mineralleri şeklinde bulunmaktadır. Bunların suda çözünürlükleri oldukça düşüktür. Çok küçük miktarlarda bile genellikle kuvvetli zehir etkisine sahip olan ağır metaller, kirlenmiş sularda metal, katyon, tuz ve kısmen anyon şeklinde bulunurlar [65]. Ağır metaller ve çeşitli iyonlar biyolojik döngü içinde en önemli zararlarını bitkilerde meydana getirmektedir. Tohum çimlenmesi, çıkış, fide büyüme ve gelişimi, bitkilerde büyüme ve gelişmede gerilikler, biyomas üretiminin düşmesi, çiçek ve meyve tutumunda azalma, verimde düşme ve ürün kalitesinde bozulma bu zararlardan bazılarıdır. Bundan başka ağır metallerin ve çeşitli iyonların fotosentetik aktiviteyi sekteye uğratması, azot döngüsü ve bağlanmasını bozması, klorofil miktarını azaltması, enzim sistemlerinde bozulmalara yol açması; bitkilere yararlı diğer elementlerin alımını engellemesi gibi hücre içi mekanizmalarda da olumsuz etkileri bulunmaktadır [66].

Genelde ağır metallerin ve çeşitli iyonların çevre açısından yarattığı sorunlar; insan, hayvan ve bitki sağlığı ile su ekosistemleri üzerindeki etkileri açısından önemli olmaktadır.

Bakır (Cu); Bitkiler için gerekli bir eser element olan bakır özellikle asit karakterli topraklarda yüksek derişimlerde bulunur. Endüstride çok yaygın olarak kullanılan bu madde toprağa havadan yağışla karışmak suretiyle geçer. Fakat bakırın toprakta ve bitkide asıl birikmesi bakır sülfat olarak bazı meyve bahçelerinde pestisit olarak kullanılmasıyla geçer. Halk dilinde ‘göz taşı’ olarak bilinen bakır sülfat gerek kuru toz halinde ve daha yaygın olarak suda erimiş halde bağlara ve narenciye bahçelerine spreyleme yoluyla püskürtülür. Daha sonra bu madde gerek püskürtülme anında doğrudan gerekse daha sonra yağmur sularıyla yıkanmak suretiyle toprağa geçer. Bakır sülfat topraktaki yararlı mikroorganizmalar içinde toksik etki yaptığından topraktaki humus oluşumunu kısıtlayarak toprağın organik bakımdan fakirleşmesine neden olabilir [67].

Civa (Hg); Civa metalinin keşfi tam olarak bilinmemektedir. Bilinen en önemli minerali zencefre (HgS) dir. Civa çok uçucu bir element olduğundan oda sıcaklığında kolayca buharlaşır. Zehirli bir element olduğu için sıcaklık arttıkça buharlaşma hızı artacağı için tehlike boyutu da artar. Herhangi bir yüzeye civa

döküldüğü zaman üzerine toz kükürt dökülmelidir ve oluşan karışım temizlenirken dikkat edilmelidir. HgS mineralinin kavrulmasıyla HgO elde edilir. Bu oksit bileşiğinin ısıtılması ile de elementel civa elde edilir [68].

1.2.10 Pestisitlerin İnsan ve Çevre Üzerine Etkileri

Pestisit deyimi, insektisit (böcek öldürücü), herbisit (yabani ot öldürücü), fungusit (küf öldürücü), rodentisit (kemirgen öldürücü) vb. şeklinde sınıflandırılan kimyasal maddelerin tümünü kapsamaktadır. Pestisitler, etkili maddelerinin kökenlerine göre de gruplara ayrılabilir:

1. İnorganik maddeler
2. Doğal organik maddeler
 - a) Bitkisel maddeler
 - b) Petrol yağları vb.
3. Sentetik organik maddeler
 - a) Klorlu hidrokarbonlar
 - b) Organik fosforular
 - c) Diğer sentetik organik maddeler (azotlu bileşikler, piretroidler)

Pestisitlerin kullanımı çok eski tarihlere dayanmaktadır. M.Ö. 1500'lere ait bir papirüs üzerinde bit, pire ve eşek arılarına karşı insektisitlerin hazırlanışına dair kayıtlar bulunmuştur. 19.yy'da zararlılara karşı inorganik pestisitler kullanılmış, 1940'lardan sonra pestisit üretiminde organik kimyadan faydalanılmış, DDT ve diğer iyi bilinen insektisit ve herbisitler keşfedilmiştir. Bugüne kadar 6000 kadar sentetik bileşik patent almasına karşın, bunlardan 600 kadarı ticari kullanım olanağı bulmuştur. Ülkemizde tarımı yapılan kültür bitkileri, sayıları 200'ü aşan hastalık ve zararlıların tehdidi altında olup yeterli savaşım yapılmadığı için toplam ürünün yaklaşık 1/3'i kayba uğramaktadır. Bu kayıpların önlenmesi bakımından pestisitlerin daha uzun yıllar büyük bir kullanım potansiyeline sahip olacağı kuşkusuzdur.

Formülasyon olarak 30000 ton civarında olan pestisit kullanımımızda en yoğun kullanılan gruplar sırasıyla herbisitler, insektisitler, fungusitler ve yağlardır.

Bununla beraber, yoğun ve bilinçsiz pestisit kullanımının sonucunda gıdalarda, toprak, su ve havada kullanılan pestisit kendisi ya da dönüşüm ürünleri kalabilmektedir. Hedef olmayan diğer organizmalar ve insanlar üzerinde olumsuz etkileri görülmektedir. Pestisit kalıntılarının önemi ilk kez 1948 ve 1951 yıllarında insan vücudunda organik klorlu pestisitlerin kalıntılarının bulunmasıyla anlaşılmıştır. Pestisitlerin bazıları toksikolojik açıdan bir zarar oluşturmazken, bazılarının kanserojen, sinir sistemini etkileyici ve hatta mutasyon oluşturuıcı etkiler saptanmıştır. Pestisit kalıntılarının en önemli kaynağı gıdalardır. Bu nedenle 1960 yılında FAO ve WHO “Pestisit Kalıntıları Kodeks Komitesi”ni kurmuşlar ve bu komitenin çalışmaları sonucu konu ile ilgili tanımlamalar yapılmış, bilimsel araştırma verilerine dayanılarak gıdalarda bulunmasına izin verilen maksimum kalıntı değerleri saptanmıştır. Ülkemizde de tarımsal ürünlerde kullanılan pestisitlerin gıdalarda bulunması müsaade edilebilir maksimum miktarları ürün ve ilaç bazında belirlenmiştir. Bu bilgilere Tarım Bakanlığının Web sayfasından kolaylıkla ulaşmak mümkündür [69].

1.2.10.1 Pestisitlere Karşı Dayanıklılık Oluşumu

Savaşında kullanılan pestisitlere karşı zararlı ve hastalıkların dayanıklılık kazandıkları bilinmektedir. Dayanıklılığın pratikteki anlamı hastalık ve zararlıların daha önce kendilerine karşı başarıyla uygulanan toksik maddelerden artık etkilenmedikleridir. 1970’de dayanıklı olarak saptanan tür sayısı 244 iken, 1980’de bu sayı 428’e yükselmiştir. Tarımsal ürün zararlılarında meydana gelen çeşitli tipteki dayanıklılıklar sonucunda pestisit etkinliğindeki azalmayı aşmak için daha yüksek dozlarda uygulama gerekmede, bu da hem maliyetin artmasına ve ürün veriminde azalmalara yol açmakta, hem de üründe ve çevrede kalıntı miktarının ve kirliliğın artmasına neden olmaktadır.

1.2.10.2 Hedef Olmayan Organizmalar Üzerine Etkisi

Hemen bütün insektisitler spesifik olmadıkları için sadece hedef organizmaları öldürmez, omurgalı ve omurgasız diğer organizmaları da etkilerler. Zararlı etkilerin şiddeti, insektisit ve formülasyonun tipine, uygulama şekline ve tarımsal arazinin tipine bağlı olarak değişmektedir. En genel yan etkiler şunlardır:

1. Arılar, kuşlar ve balıklar, mikroorganizmalar ve omurgasızlar gibi hedef olmayan organizmalarda ölümler,
2. Kuş, balık ve diğer organizmalarda üreme potansiyelinin azalması,
3. Hedef olmayan organizmalarda dayanıklılık oluşması sonucu insanlara hastalık taşıyan böcek ve parazitlerin kontrolden çıkması,
4. Ekosistemin yapısının ve türlerinin sayılarındaki değişme gibi uzun dönemli etkiler.

1.2.10.2.1 İnsanlar Üzerine Etkileri

Pestisitlerin insanlarda belirli miktarlarda toksik olmaları nedeniyle savaşımında çalışan herkesin bunların kullanımını sırasında meydana gelebilecek potansiyel zarardan sakınmaları gerekir. İnsanların pestisitlere maruz kalması mesleki zehirlenmeler veya kaza ile meydana gelebilmektedir. Her iki tür zehirlenmenin ana nedenleri:

1. Halkın bu konuda yeterli eğitime sahip olmaması ve pestisitlerin toksisite potansiyellerinin bilinmemesi,
2. Uygun olmayan koşullarda depolama,
3. Kaza ile saçılma sonucu gıdaların kontamine olması,
4. Dikkatsiz yükleme ve taşıma,
5. Yıkanmamış pestisit kaplarının kullanımı,
6. Genel bakım ve atık değerlendirme işlemleri

Mesleki zehirlenmeler, üretim, formülasyon hazırlama, taşıma, yükleme ve uygulama sırasında deri ve solunum yoluyla maruz kalma (akut zehirlenme) olarak tanımlanabilir. Daha çok organik fosforlar ve karbamatlılar bu tip zehirlenmeye neden olurlar. Bunlar vücutta kolin esteraz enzimini inhibe ederek asetil kolin birikimine yol açarlar. Kaza ile meydana gelen zehirlenmelerde pestisitlerin yaprak ve topraktaki kalıntıları veya onların toksik dönüşüm ürünleriyle temas sonucu hastalıklar meydana gelebilmektedir. Aşırı dozlarda alınmadıkça organik klorlu pestisitlerin insanlara akut zehirlilikleri enderdir. Bu bileşikler daha çok kronik zehirlenmeler meydana getirmektedir. Sinir sistemini etkiler ve karaciğere zarar verirler. Son yıllarda ilaçların besin maddelerindeki kalıntılarının insanlar için kronik toksisitesi iki şekilde ele alınmaktadır:

1. Kabul edilebilir günlük alım (Acceptable Daily Intake-ADI): Bir kişinin bir günde alabileceği kabul edilebilir günlük ilaç miktarını mg/kg olarak ifade eden değerdir.
2. Maksimum kalıntı limitleri (Maximum Residue Limits-MRL): Gıda maddelerinde bulunmasına izin verilen en fazla ilaç miktarını (ppm) ifade eden değerdir.

“Codex Alimentarius”, USEPA (United States Environmental Protection Agency) gibi kuruluşların bu değerleri içeren listeleri mevcuttur. Bu miktarlar tarımsal ürünlerin dış pazarlaması bakımından da önemlidir. Zira tolerans miktarını aşan değerlerde pestisit kalıntısı tespit edilen tarımsal ürünler alıcı ülkeler tarafından geri çevrilmektedir.

Pestisitlerin kalıntı yoluyla kronik toksisiteleri yanında bazılarının insanlarda mutajenik, teratojenik ve kanserojen etkilerinin de olduğu son yıllarda yapılan çalışmalarla saptanmıştır.

1.2.10.2.2 Çevre Üzerine Etkileri

Tarımsal alanlara, orman veya bahçelere uygulanan pestisitler havaya, su ve toprağa, oradan da bu ortamlarda yaşayan diğer canlılara geçmekte ve dönüşüme uğramaktadır. Bir pestisitinin çevredeki hareketlerini onun kimyasal yapısı, fiziksel

özellikleri, formülasyon tipi, uygulama şekli, iklim ve tarımsal koşullar gibi faktörler etkilemektedir.

Pestisitlerin püskürtülerek uygulanması sırasında bir kısmı evaporasyon ve dağılma nedeniyle kaybolurken, diğer kısmı bitki üzerinde ve toprak yüzeyinde kalmaktadır. Havaya karışan pestisit rüzgarlarla taşınabilir; yağmur, sis veya kar yağışıyla tekrar yeryüzüne dönebilir. Bu yolla hedef olmayan diğer organizma ve bitkilere ulaşan pestisit, bunlarda kalıntı ve toksisiteye neden olabilir.

Toprak ve bitki uygulamalarından sonra toprak yüzeyinde kalan pestisitler, yağmur suları ile yüzey akışı şeklinde veya toprak içerisinde aşağıya doğru yıkanmak suretiyle taban suyu ve diğer su kaynaklarına ulaşabilirler. Eğim, bitki örtüsü, formülasyon, toprak tipi ve yağış miktarına bağlı olarak taşınan pestisitler, bu sularda balık ve diğer omurgasız su organizmalarının ölmesine; bu organizmalardaki pestisit kalıntısının insanların gıda zincirine girmesi ve kontamine olmuş suların içilmesiyle kronik toksisitenin oluşmasına neden olurlar.

Toprağa geçen pestisitler güneş ışınlarının etkisiyle fotokimyasal bozunmaya, bitki, toprak mikroorganizmaları ve diğer organizmaların etkisiyle biyolojik bozunmaya uğramakta; toprak katı maddeleri (kil ve organik madde) tarafından adsorlanıp desorplanmakta veya kimyasal bozunmaya uğramaktadırlar. Toprak içine geçmiş pestisitler kapiller su vasıtasıyla toprak yüzeyine taşınmakta ve buradan havaya karışabilmektedir. Toprağın yapısı, kil tipi ve miktarı, organik madde içeriği, demir ve alüminyum oksit içeriği, pH'sı ve toprakta var olan baskın mikroorganizma türleri tüm bu olayları etkileyen faktörlerdir. Toprakta pestisit tutulmasıyla hareketi ve biyolojik alımı engellenmekte ve çeşitli şekillerde bozunması ile ya toksik özelliğini kaybetmekte ya da daha toksik metabolitlerine dönüşebilmektedir. Pestisit kendisinin ya da toksik dönüşüm ürünlerinin hedef olmayan yerleri veya organizmaları kontamine etmesi istenmediğinden tüm bu olayların bilinmesi ve incelenmesi önem taşımaktadır.

Bitki ve hayvan neslinin genetik yapısı üzerinde değişiklik çalışmaları, tarım alanlarında gereksiz ya da gereğinden fazla, bilinçsizce ilaç kullanılarak hedef olmayan tüm canlılar tehlikeye atılmış olmaktadır [70].

Pestisit kalıntılarının çok düşük düzeylerinin bile canlı organizmalarda birikim oluşturarak çeşitli hastalıklara neden olduğu bilinmektedir. Bu kalıntıların çok yüksek düzeyde oluşturdukları zehirlenmeler ‘akut’, düşük dozda oluşturdukları zehirlenmeler ‘kronik’ zehirlenmeler olarak adlandırılmaktadır. Bu etkiler uzun dönem sonunda insan ve hayvan vücut yağlarında birikebilme özelliğine sahip olduklarından ağırlık açısından çok önemli problemler yaratabilir [71].

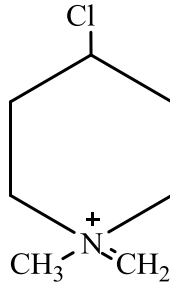
Pestisit kullanımının tartışılmaz yararlarına karşın etkin denetimden yoksun ve aşırı miktarlarda uygulanması insan dahil hedef olmayan diğer canlılarda zehirlenmelere ve ölümlere neden olmakta, ekosistemlerin ve besinlerin kirlenmesine yol açmaktadır. Pestisitlerin yaygın olarak kullanılmasından kısa süre sonra 1950' li yıllarda önce DDT nin daha sonra da kullanılan diğer ilaçların [72,73] insanlar ve yabani yaşamda hedef olmayan canlılara zararlı etkileri ortaya konmaya başlanmıştır. Tarım ilaçlarının canlılar üzerindeki etkileri fetal yaşamdan itibaren başlamaktadır [74]. Bu ilaçlar plasentadan fötüse geçmekte, bunun sonucunda düşükler, hiperpigmente, hiperkeratik çocuk doğumları görülmektedir. Yapılan hayvan deneylerinde ise radyoaktif işaretli ilaç verilmesinden 5 saat sonra ilacın plasentaya geçtiği, fötüsün göz, sinir sistemi ve karaciğerinde yerleştiği gözlenmiştir [74]. Pestisitlerden bir bölümü (Organofosfatlı ve karbamatlı insektisitler) de etkilerini doğrudan doğruya periferik ve merkezi sinir sistemi üzerinde göstererek organizmanın yaşamını tehdit etmektedir. Örneğin parathion ve malathion insektisitleri periferik sinir sistemini etkileyerek organizmada lakrimasyon, ishal, titreme gibi belirtilerle etkisini ortaya koymaktadır [75,76]. Tarım ilaçlarının kanın şekilli elemanlarına yani eritrosit ve lökositlere olan zararlı etkileri de yapılan hayvan deneylerinde gözlenmiştir. Organofosforlu insektisitler eritrositlerin membran özelliklerini değiştirerek eritrosit fonksiyonlarını engellemektedir [77]. Diğer bazı pestisitler de eritrositlerin boyutları ve yüzey şekillerinde bozulmalara neden olmaktadır [78]. Eritrositlerde *in vitro* koşullarda yapılan bir deneyde ise eritrosit antioksidan sistem enzimlerinin aktivitelerinin değiştiği de gözlenmiştir [79]. Diğer taraftan pestisitler asetilkolinesteraz enzimini inhibe etmekte, alt beyin kökünde solunum kontrol merkezlerinin baskılanması ile canlının ölümüne neden olmaktadır. [80]. Yine pestisitlerle yapılan deneylerde TCA enzimlerinin (malat dehidrogenaz, süksinat dehidrogenaz) inaktif olduğu bulunmuştur [81]. Yapılan diğer bir çalışmada da pestisitlerin karaciğer ve kas bozulmalarına neden olduğu saptanmıştır [82].

Pestisitlerin, kullanıldığı tarım alanlarında insanlar üzerine toksik etkileri ile ilgili çalışmalarda renal va hepatik toksisiteyi arttırdığı saptanmıştır [83].

1.2.10.3 Çalışmalarda Kullanılan Pestisitler Ve Kullanım Yerleri

1.2.10.3.1 (1,1-dimetilpiperidinium klorür)

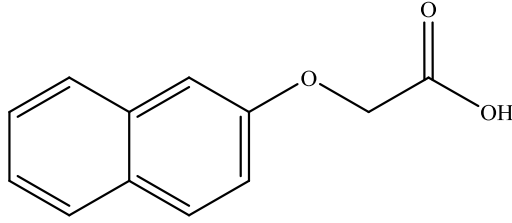
Genel adı Mepikuat klorür, kimyasal adı ise 1,1-Dimetilpiperidinium klorür olarak adlandırılır. Maddenin fiziksel hali sıvıdır. Mepikuat klorür'ün dünya genelinde en yaygın kullanım alanı pamuktur. Bunun dışında bazı ülkelerde soğan, sarımsak, patates ve bağda verimi artırmaya yönelik olarak kullanılmaktadır. Pamuğun erken çimlenme döneminde bitkilerin ortalama minimum 50 cm. yüksekliğe ulaştığı şartlarda yapraktan yapılmalıdır. Bağlarda ise çiçeklenme başlangıcında birinci, meyvelenme başlangıcında ikinci uygulama tavsiye edilmektedir. Mepikuat klorür'ün sağladığı yararlar sıralanacak olursa koyu yeşil yaprak rengi, boğum aralarının kısılması ve buna bağlı olarak derli toplu bir bitki oluşumu ve böylece; bitkinin sıra araları daha geç kapanır, güneş ışınları bitkiye daha iyi nüfuz eder ve alt dallardaki kozalara kadar ulaşır, bitkinin alt kısımlarında daha iyi bir hava sirkülasyonu oluşur ve böylece koza çürüklüğü önemli ölçüde azalır ve haşere kontrolü ve mücadelesi daha basit ve etkili olarak yapılabilir. Bunların yanı sıra daha az tarak ve elma dökümü, daha iri kozalar, kozaların daha erken olgunlaşması, erken hasat ve toplam verimde artış gözlenmektedir [84].



Şekil 1.23: (1,1-dimetilpiperidinium klorür) kimyasal yapısı [84]

1.2.10.3.2 β -Naftoksiasetik Asit

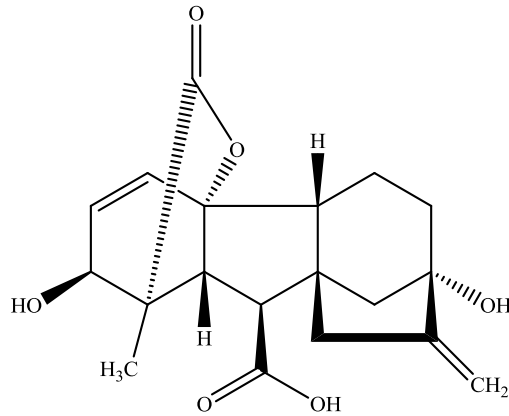
Kimyasal adı β -naftoksiasetikasit (BNOA) asit olan pestisit domateste; çiçek dökümünü önleyerek meyve bağlamasını artırmak ve erken olgunlaşmayı teşvik etmek için kullanılmakla birlikte çilek ve diğer üzüksü bitkilerde; çiçek tutumunu artırmaya yönelik kullanılmaktadır [85].



Şekil 1.24: β -Naftoksiasetik asit kimyasal yapısı [85]

1.2.10.3.3 Giberallik Asit

Kimyasal adı giberallik asit olan pestisit, çekirdeksiz üzümde; çekirdeksizliği teşvik, meyve ve salkım büyüklüğünü artırmak amacıyla kullanılmaktadır. Ayrıca giberallik asit gövde büyümesi, uzun gün bitkilerinde bolting, tohum çimlenmesini teşvik, çimlenme sırasında enzim üretimi, meyve oluşumu ve büyümesi, dioik bitkilerde erkekliği teşvik şeklinde özetlenebilir [86].



Şekil 1.25: Giberallik asit kimyasal yapısı [86]

1.2.11 Antibiyotiklerin İnsan Ve Çevre Üzerine Etkileri

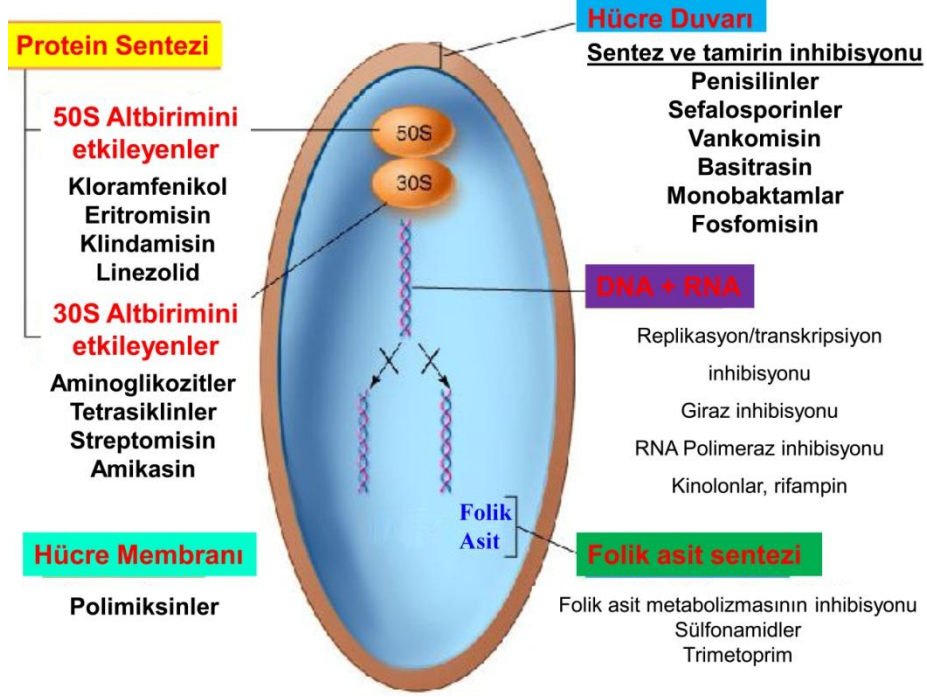
Mikroorganizmalarca üretilen veya yarı/total kimyasal sentez yoluyla elde edilmiş, düşük derişimlerde kullanıldığında diğer mikroorganizmaların büyümesini engelleyen kimyasallara antibiyotik denilmektedir [87].

1.2.11.1 İdeal Bir Antimikrobiyal İlacın Özellikleri

İdeal bir antibiyotikte aranan özellikler, mikroorganizmalara karşı seçici toksisite, mikrobisidal etki, kolay çözünür, uzun süre bozunmadan vücutta kalabilme, antimikrobiyal direnç gelişimine neden olmayan, enfeksiyon bölgesine kolay ulaştırılabilen, uygun fiyat ve konakçının sağlığını olumsuz etkilemeyen (alerji vb) şeklinde sıralamak mümkündür. Fakat bu özelliklerin tümünü barındıran, ideal ilaç yapılan çalışmalar sonucu bulunamamıştır [87].

1.2.11.2 Antibiyotiklerin Seçici Toksisiteleri

Antibiyotiklerin potansiyel hedefleri; hücre duvarı, nükleik asit sentezi, protein sentezi, hücre membranı ve metabolik yollardır (Örnek: Folik asit sentezi) [87].

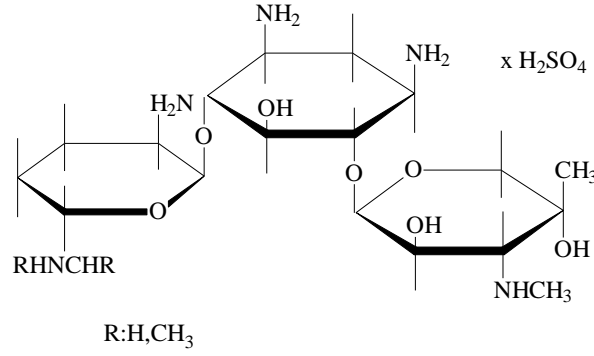


Şekil 1.26: Antibiyotiklerin potansiyel hedefleri [87]

1.2.11.3 Çalışmamızda Kullanılan Antibiyotikler

1.2.11.3.1 Gentamisin Sülfat

Gentamisin, bir aktinomiset olan *Mikromonospora purpurea* 'dan elde edilen, duyarlı bakterilerin normal protein sentezini inhibe ederek etkisini gösteren bakterisid etkili bir aminoglikozid antibiyotiktir. Gentamisin, *E. coli*, indol pozitif ve negatif *Proteus* türleri *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* grubu türleri *Citrobacter* türleri ve penisilin ve metisiline dirençli *Staphylococcus* türleri de dahil geniş etki spektrumuna sahiptir. Ayrıca *Shigella* ve *Salmonella* türlerine karşı da *in vitro* olarak etkilidir. Gentamisine karşı bakteriyel direnç zor gelişmektedir. Gentamisin hücre duvarı sentezini etkileyen antibiyotikler ile kombine kullanıldığı zaman D grubu streptokok suşları üzerinde sinerjik bir etki göstermektedir. Gentamisin intramüsküler yolla verilmesinden sonra kısa sürede (30-60 dakika) en yüksek plazma derişimlerine ulaşır. Böbrek fonksiyonu normal kişilerde gentamisinin yarı ömrü 2 saatten biraz fazladır [88].



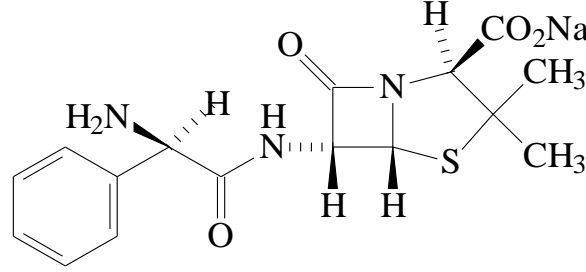
Şekil 1.27: Gentamisin sülfat bileşiğinin molekül şekli (0-2-amino-2-deoksi-D-glukopiranozil-(1.4)-O-[3-deoksi-3-(metilamino)-D-ksilopiranozil-(1 6)]-2-deoksi-D-streptamin.) [89]

Yapılan bir çalışmada, gentamisin sülfat antibiyotiği *in vitro* ortamda glutasyon metabolizmasında rol oynayan glutasyon redüktaz enziminin aktivitesini arttırdığı tespit edilmiştir [90]. Shigenobu tarafından yapılan bir başka çalışmada insan nötrofil hücrelerinde ve hücre dışında *in vitro* ortamda NADPH oksidaz enzimi üzerinde gentamisin sülfatın doza bağımlı olarak inhibisyona neden olduğu gösterilmiştir [91]. Ayrıca gentamisin sülfatın koyun göz merceğindeki glikoz-6 fosfat dehidrogenaz enzimini de inhibe ettiği bulunmuştur [92].

1.2.11.3.2 Sodyum Ampisilin

Bir aminopenisilanik asit türevi olan ampisilin geniş bir spektruma sahip olup gram (+) ve gram (-) aerob ve anerob mikroorganizmalara karşı bakterisit etkilidir. Bu etkisini bakterilerin hücre duvarı mukopeptit biyosentezini inhibe ederek gösterir. Ampisilin beta-laktamazlara karşı dayanıklı değildir; kolayca parçalandığından etkisiz bir duruma gelir. Ampisilin beta-laktamaz salgılayan ve salgılamayan *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* ile *Staphylococcus faecalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* ve *Streptococcus viridans*'a *in vitro* etkilidir. Ayrıca gram (-) mikroorganizmalardan, beta-laktamaz salgılayan ve salgılamayan *Haemophilus influenzae*, *Branhamella catarrhalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Proteus mirabilis*, *Neisseria gonorrhoeae* ve *Proteus vulgaris*, *Providencia rettgeri*, *Providencia stuartii*, *Morganella morganii* ampisiline duyarlıdır. Anaerob mikroorganizmalardan, *Clostridium* türleri, *Peptococcus* türleri, *Peptostreptococcus* türleri ve *B. Fragilis* dahil *Bacteroides* türlerine ampisilin etkilidir. Ampisilin intravenöz ve intramüsküler uygulamadan

sonra kanda yüksek derişimler oluşturur ve ortalama yarılanma süresi sağlam bireylerde yaklaşık 1 saattir. Uygulandıktan sonra ilk 8 saat içinde %75-85 oranında değişmeden idrarla atılır [88, 89].

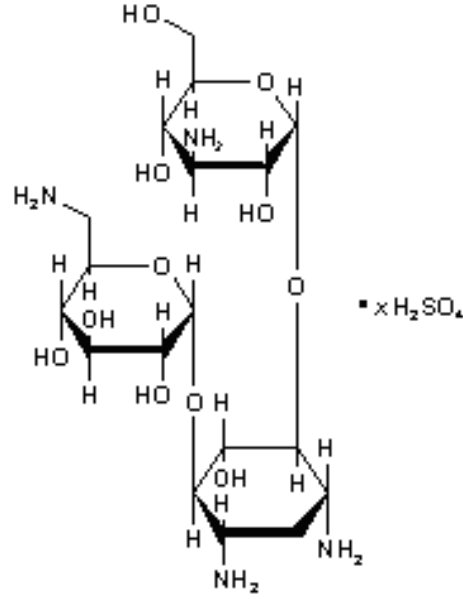


Şekil 1.28: Sodyum ampisilin bileşiminin moleköl şekli (Monosodyum (2S, 5R, 6R)-6-[(2R)-2-amino-2-fenilasetilamino]-3,3-dimetil-7-okso-4-tiyo-1-aza bisiklo [3.2.0] heptan-2-karboksilat) [89]

Yapılan bir *in vitro* çalışmada insan eritrositlerinden izole edilen karbonik anhidraz I ve II enzimi üzerinde ampisilin'in inhibisyon etkisi tespit edilmiştir [90]. Benzer şekilde insan eritrosit glikoz-6 fosfat dehidrogenaz enzimi üzerinde ampisilin'in *in vitro* inhibisyon etkisi göstermiştir [93].

1.2.11.3.3 Kanamisin Sülfat

Kanamisin, aminoglikozid yapısındaki antibiyotiklerden biridir. Etkili bir antibiyotik olmasına karşın, toksik etkisi azdır. Kas içine enjekte edilebileceği gibi ağız yoluyla da verilir. Fakat bu son yolda emilim iyi değildir. Kanamisin “Sepsis” vakalarında [vücuttaki cerahat yapıcı bakterilerin ve bunların zararlı ürünlerinin (toksinleri – zehirleri) kan yoluyla vücuda dağılması] kullanılabilceği gibi, ağız yoluyla uygulanarak bağırsakların bakterilerden temizlenmesinde de yararlanılabilir. Kanamisin, daha çok işitme bozukluklarına yol açıcı etkiye sahiptir. Uzun süre kanamisin kullanmak zorunda olan hastalarda ilacın 5–7 günlük sürelerle kesilmesi ve günlük dozun azaltılması işitme kayıplarını önleme bakımından yararlıdır. Bu önlem özellikle böbrek bozukluğu bulunan hastalarda gereklidir [94].



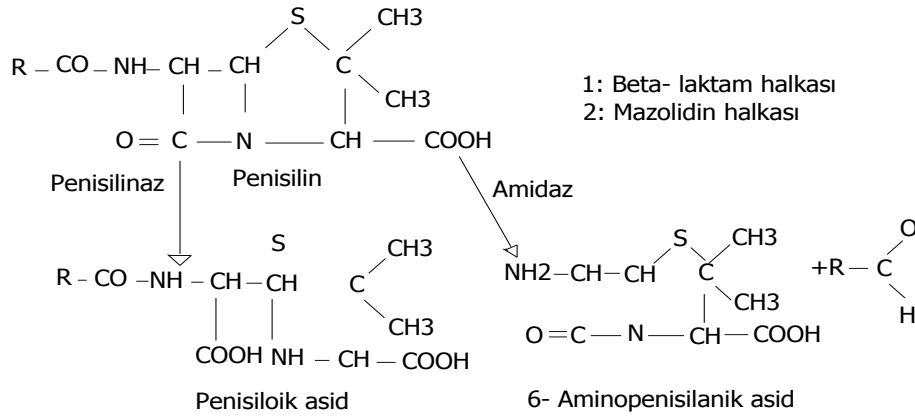
Şekil 1.29: Kanamisin sülfat bileşiminin molekül şekli (3-Amino-3-deoksi- α -D-glukopironozil-(1 \rightarrow 6)-[6-amino-6-deoksi- α -D-glukopironozil-(1 \rightarrow 4)]-2-deoksi-D-streptamin sülfat) [94]

1.2.11.3.4 Penisilin G Prokain Ve Penisilin G Potasyum

Penisilinler β - laktam ve tiyazolidin halkalarının karışmasından ortaya çıkmış çift halka içeren bir 6- aminopenisilanik asid (6- APA) türevleridirler. 6- APA, penisilinlerin amid bağından, bir çok bakteri ve mantarların oluşturduğu amidaz tarafından katalize edilen hidrolizle ayrılır. 6- APA bazı gram negatif organizmalara karşı belirgin bir anti bakteriyel etkiye sahiptir.

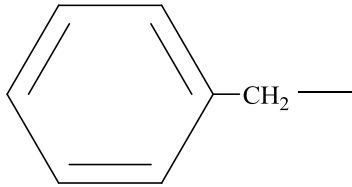
Bakteriler penisilini gibi β -laktamoz (penisilinaz) fermentini salgıyarak parçalanmaktadırlar. Bu yolla antibakteriyel etkisi olmayan penisiloik asid oluşmaktadır.

Yapısında bulunan açıl grubunun penisilinün özellikleri üzerine derin etkileri vardır. Mide suyuna direnç, emilme, bakterilerin oluşturduğu penisilinaza direnç ve anti bakteriyel spektrum özelliklerinin tümü büyük bir oranda bu grubun yapısına bağlıdır. Tiyazolidin halkasına bağlı bulunan karboksil grubunun başka maddelerle birleştirilmesi ile tuzlar oluşturulabilir. Örneğin prokain veya benzatin ile birleştirilmesi sonucu suda çok az eriyen tuzları aracılığı ile paranteral kullanıldıklarında uzun etkili penisilinler elde edilmiştir [95-97].



Şekil 1.30: Penisilinlerin 6- aminopenisilanik asid ve penisilok asid türevlerine dönüşümü [98]

Penisilin G' nin ilaç olarak kullanılan yalın şekli onun potasyum veya sodyum tuzudur; bunlar kristal şeklinde olduklarından kristalize penisilin G adını alırlar. Suda fazla çözündüklerinden suda solüsyon halinde kullanılırlar; bu nedenle aköz kristalize penisilin G diye de adlandırılırlar. Penisilin G 6- aminopenisilanik asid'in benzil ($C_6H_5-CH_2-$) türevidir; bu nedenle benzil penisilin diye de adlandırılır [95-98].

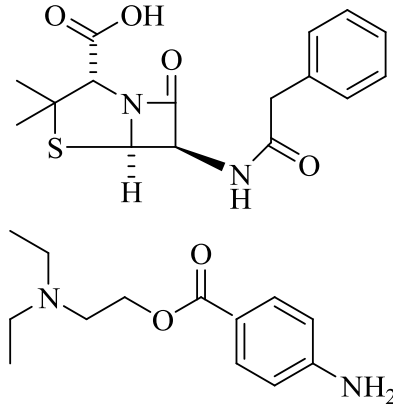


Kimyasal adı

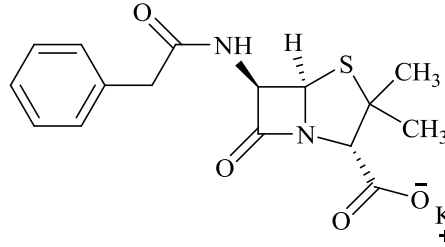
Benzil penisilin

Şekil 1.31: Penisilin G molekül şekli [98]

Prokain – penisilin G, klemizol- penisilin G ve özellikle benzantin- penisilin G suda çok az çözüdürler. Etkilerinin uzun sürmesinin nedeni kas içindeki injeksiyon yerinde, süspansiyonu oluşturan partiküllerden bileşimin yavaş salıverilmesi (yavaş dissolüsyonu) ve bu nedenle yavaş olarak absorpsiyonudur. Absorbe edildikten sonra ester halindeki bileşik hidroliz edilir ve penisilin G serbest (aktif) hale gelir. Prokain penisilin G'nin tek başına ya da kristalize penisilin G ile kombine (takviyeli) olmak üzere iki türü bulunur [95-98].



Şekil 1.32: Penisilin G Prokain [98]



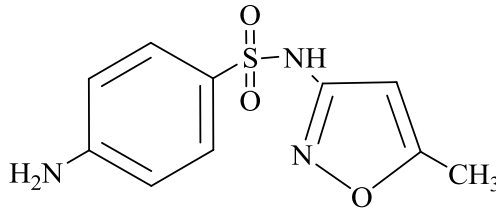
Şekil 1.33: Penisilin G Potasyum molekül şekli [98]

1.2.11.3.5 Sülfametoksazol Ve Trimetoprim

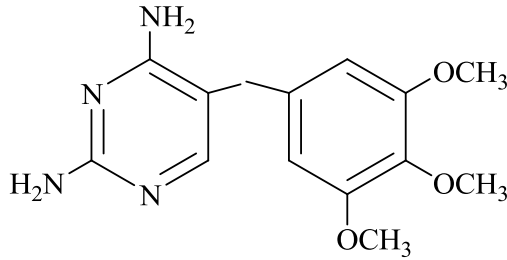
Sülfametoksazol (4-Amino-*N*-(5-metil-3-izoksazolil) benzenesulfonamide, *N*¹-(5-Metilizoksazol-3-il)sulfanilamid) bir sulfonamid türevidir ve veteriner hekimliğinde hastalıkların sağaltımında sıklıkla kullanılmakta olan sülfonamidler, paraaminobenzenesülfonamid (sülfanilamid)'in sentetik türevleri olup, insan ve hayvanlarda bakteriyel ve protozoal enfeksiyonların tedavisi ve önlenmesi amacıyla kullanılan ilk antibakteriyel ilaçlardır. Sülfonamidlerin antibakteriyel amaçla kullanılmaya başlanmasından sonra, özellikle hayvanlarda görülen hastalıkların ölüm ve yayılma hızında görülen düşüşler, bu ilaçların geniş bir şekilde kullanılmasına sebep olmuştur. Yeni antibakteriyel ilaçların kullanıma girmesiyle kullanım alanları daralmasına rağmen, sülfonamidler halen veteriner hekimliğinde çok sık kullanılan ilaçlar arasında yer alırlar. Günümüzde çok sayıda sülfonamid türevi sentezlenmiş olup, bunlardan sadece 25-30 kadarı uygulama alanı bulmuştur [99-102].

Sülfametoksazol beyaz-kirli beyaz renkte, kokusuz, suda son derece az (0,3 mg/mL), alkolde de az (20 mg/mL) çözünen, pKa'sı 5,6 olan kristal bir tozudur. Sülfizomezol, sülfametoksizol diye de bilinir [101].

Trimetoprim (2,4-diamino-5-(3,4,5-trimetoksibenzil) pirimidin) yapısına sahip, beyaz veya sarımsı-beyaz renkte, acı, kokusuz, suda son derece az (4.4 µg/mL) ve kloroformda da az (18 mg/mL) çözünen, organik bazik (pKa 7.3) bir maddedir. Laktat tuzu halinde suda 50 mg/mL miktarında çözünür [99,101].



Şekil 1.34: Sülfametoksazol ((4-Amino-N-(5-metil-3-izoksazolil) benzenesulfonamide, N¹-(5-Metilizoksazol-3-il)sulfanilamid)) molekül şekli [103]



Şekil 1.35: Trimetoprim ((2,4-diamino-5-(3,4,5-trimetoksibenzil) pirimidin)) molekül şekli [103]

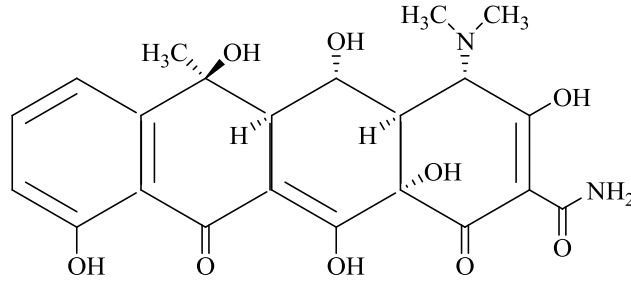
1.2.11.3.6 Oksitetrasiklin

Oksitetrasiklin, tetrasiklin türevi bir antibiyotiktir. Etkilerine karşı dirençli bakteri suşları ortaya çıkmış olmakla beraber, ülkemizde veteriner hekimlikte, halen en çok kullanılan antibiyotikler arasındadır; bunun en önemli sebebi etki spektrumunun son derece geniş olmasıdır.

Oksitetrasiklin 1949 yılında Finlav tarafından *Strep.rimosus* kültürlerinden elde edilmiştir. Asetat gruplarının glutamik asitle birleştirilmesiyle şekillenen 4 halkalı hidroksinaftasen çekirdeği ve buna bağlı karboksamid grubu ihtiva eder (Şekil1.42). Kimyasal olarak [(4S-(4α,4αα,5α,5αα,6β,12αα)]-4-(dimetilamino)1-

,4,4 α ,5,5 α ,6,11,12 α -oktahid-ro-3,5,6,10-12,12 α -heksahidroksi-6-metil,11-diokso-2-naftasenekarboksamid]'dir [104].

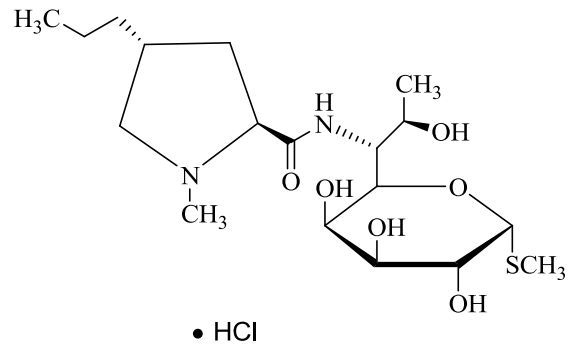
Oksitetrasiklin amfoter bir maddedir; asit ve bazlarla tuzlar yapar. Sağaltımda asitlerle yaptığı tuzları şeklinde kullanılır. En çok hidroklorür tuzu şeklinde bulunur. Oksitetrasiklin hidroklorür (terramisin) sarı renkte, acı lezzetli, su ve organik çözücülerde serbestçe çözünen, kristalize tozudur; 10 mg/mL sulu çözeltisi şiddetli asit (pH 2.5) tepkimelidir. pKa'sı 3.3, 7.3 ve 9.1'dir. Alkali şartlarda hidrolize uğrar ve kloro-5-salisilik asit oluşturur [105,106].



Şekil 1.36: Oksitetrasiklin([4S-(4 α ,4 $\alpha\alpha$,5 α ,5 $\alpha\alpha$,6 β ,12 $\alpha\alpha$)-4-(dimetilamino)1-,4,4 α ,5,5 α ,6,11,12 α -oktahid-ro-3,5,6,10-12,12 α -heksahidroksi-6-metil,11-diokso-2-naftasenekarboksamid]) [103]

1.2.11.3.7 Linkomisin

Linkomisin, linkozamidler grubunda yer alır. 1962'de *Strep. lincolnensis* kültürlerinden elde edilmiştir. Sağaltımda hidroklorür tuzu şeklinde kullanılır [107]. İlaç ağız ve parenteral yollarla verilir. İlaç vücudun tüm doku ve sıvılarına etkili yoğunluklarda geçer [108-110]. Linkozamidler bakterilerin 50S ribozomal alt birimine bağlanır ve protein sentezini bozarak etkir [108,111]. Etkisi genellikle Gram pozitif bakterilere yöneliktir ve dar spektrumludur [107]. İlaç, başta Stafilokok ve Streptokoklar olmak üzere, Gram pozitif bakterilerden ileri gelen solunum yolları, yumuşak doku, kemik iliği ve deri hastalıklarında başarıyla kullanılır. Sığırlarda, linkomisin deri altı ve kas içi olarak günde 1 sefer 20 mg/kg ve yavaş deri altı enjeksiyon günde 1-2 kez 20 mg/kg dozda uygulanır [109,110].



Şekil 1.37: Linkomisin-HCl [103]

2. MATERYAL VE YÖNTEMLER

2.1 MATERYALLER

2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bu çalışma için kullanılan; Sepharose 4-B, anisidin, L-tirozin, diyaliz torbaları, Akrlamit, N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin(TEMED),N,N'- metilen bisakrilamit, β -merkptoetanol, SDS, Glisin, Coomassie Brilliant Blue G-250 ve Brom-timol mavisi, Hyalüronik asit, tris(hidroksimetil)aminometan HCl (Tris-HCl), N-Asetil-Glukozamin, Ditioeritrol Sigma Chemical Comp.'den; Sodyum hidroksit, Trihidroksi metil aminometan (Tris), Sodyum sitrat dihidat, Sitrik asit, Soydum klorür, Sodyum sülfat, Sodyum perklorat, Sodyum asetat, Hidroklorik asit, Asetik asit, Sülfürik asit, Fosforik asit, Sodyum azotür, Sodyum nitrat, Sodyum tiyosiyanat ve Sodyum siyanür Merck A.G'den; Metanol, Etanol, Amonyum persülfat ve Dekstroze Riel de Haen A.G'den temin edildi.

2.1.2 Kullanılan Alet Ve Cihazlar

Bu çalışmada aşağıdaki alet ve cihazlardan yararlanılmıştır.

Buz Makinesi	Fiocchetti Frigoriferi Scientifici, İtalya
Buzdolabı	Profilo, Türkiye
Çalkalamalı İnkübatör	She-Lab, USA
Elektroforez	Apelex, İngiltere
Elektronik Tartı	Sartorius, Almanya
Etüv	WTB, German, Nüve, Türkiye
Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı	Velp Scientifica, İspanya
Kromatografi Kolonu	Sigma (1,5 cm çap ve 10cm uzunluk)
pH Metre	WTW, Almanya
Dijital Görüntüleme Sistemi	UVP, İngiltere
Saf su cihazı	Destilasyon 3.1 (Comecta Sa,)
MikroSantrifüj	Sigma Laborzentrifugen, Germany
Santrifüj	Hettich Zentrifugen, Germany
SDS PAGE Aparatları	Atto, Japonya
Çalkalayıcı	GFL, Almanya
Elektroforez için Güç Kaynağı	Consort, İngiltere
Sıcak su banyosu	Elektro-mag, Türkiye
Isı kontrollü Çalkalamalı etüv	GFL , Almanya
UV visible Spektrofotometreler	Heios α (Unicam), Metro Lab,
Vorteks	Elektromag, Türkiye

2.1.3 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

Afinite jeli sentezinde kullanılan tamponlar

0.1M NaHCO₃ tamponu (pH 10.0); 8,401g (0.1 mol) NaHCO₃ 950 mL distile suda çözülerek, 1N NaOH ile pH'sı 10,0'a getirildi ve son hacim 1 L'ye tamamlandı.

0.2 M NaHCO₃ tamponu (pH 8.8); 8,401 g (0.1 mol) NaHCO₃ 450 mL distile suda çözülerek, 1N NaOH ile pH'ı 8,8'e getirildi ve son hacim distile su ile 500 mL'ye tamamlandı.

0.01 M Na₂HPO₄ tamponu (pH 6.0); 1,42 g (0,01 mol) Na₂HPO₄ 950 mL distile suda çözülerek, 1N NaOH ile pH'sı 6.0'a getirildi ve son hacim distile su ile 1L'ye tamamlandı.

Ekstraksiyon (Testis hazırlama) tamponu; 8,20 g (0,1 mol) CH₃COONa ve 8,77 g (0,15 mol) NaCl 950 mL distile suda çözülerek, 1M HCl ile pH'sı 5.4'e getirildi ve son hacim distile su ile 1L'ye tamamlandı.

Afinite jelinin dengelenmesi için kullanılan tampon çözelti; 7,098 g (0,05 mol) Na₂HPO₄ 950 mL distile suda çözülerek, 1N NaOH ile pH'sı 7.0'a getirildi ve son hacim distile su ile 1L'ye tamamlandı.

Afinite jeline bağlanmış BTH enziminin elüsyonu için kullanılan tampon çözelti; 8,873 g (0,0625 mol) Na₂HPO₄ ve 7,305 g (0,125 mol) NaCl 200 mL distile suda çözüldü, 50 mM m-anisidin eklenerek 1N NaOH ile pH'sı 4.0'a getirildi ve son hacim distile su ile 250 mL'ye tamamlandı.

Proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan tampon çözelti: 100 mg Coomassie brilliant blue G-250, 50 mL etanol de çözüldü. Bu çözeltiliye 100 mL %95'lik fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin son hacmi distile su ile 1L'ye tamamlandı.

Amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda oluşan çökeğin alındığı tampon çözelti: 7,098 g (0,05 mol) Na₂HPO₄ 950 mL distile suda çözülerek, 1N NaOH ile pH'sı 7.0'a getirildi ve son hacim distile su ile 1L'ye tamamlandı.

Substrat çözeltisi: 12,3 mM hyalüronik asit çözeltisi; 5 mg hyalüronik asit çözeltisi 1 mL saf suda çözülerek kullanıldı.

BTH aktivite ölçümünde kullanılan aktivite tampon çözeltisi: 3,4 g (0,05 mol) HCOONa ve 1,461 g (0,025 mol) NaCl 200 mL distile suda çözülerek, 1N NaOH ile pH'sı 3,71'e getirildi ve son hacim distile su ile 250 mL'ye tamamlandı.

SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan numune tamponu;

0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	2,5 mL
% 10'luk SDS	4,0 mL
Gliserol	2,0 mL
β -merkaptoetanol	1,0 mL
Bromfenol mavisi	0,01 g
Distile su	0,5 mL

SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan tank tamponu;

Tris-HCl	3 g
Glisin	14,4 g
SDS-	1,0 g

SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan ayırma ve yığıma jellerinin hazırlanışı;

SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının hazırlanışı ve kullanılan miktarları Çizelge 2.1'de verilmektedir.

SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renklendirme çözeltisi; 0,66 g Coomassie brilliant blue G-250, 120 mL metanolde çözüldü. Bu çözeltiliye 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 2.1: SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının miktarları.

	Ayrırma Jeli	Yığıma Jeli
	% 10	% 3
<u>Akril amid/Bis</u> Akril amid 15 g Bis 0,4 g Alınarak son hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlanır.	16,65 mL	2,6 mL
<u>Distile su</u>	20,1 mL	12,2 mL
<u>1.5 M tris-HCL (pH 8.8)</u> Tris-HCl 11.82 Alınarak pH 8.8 oluncaya kadar 0.1 M NaOH ilave edilerek son hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlanır.	12,5 mL	–
<u>0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)</u> Tris-HCl 3.94 g Alınarak pH 6.8 oluncaya kadar 0.1 M NaOH ilave edilerek son hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlanır.	–	5 mL
<u>% 10 'luk SDS</u> SDS 1g Alınarak son hacim distile su ile 10 mL'ye tamamlanır.	0,5 µL	200 µL
<u>TEMED</u>	25 µL	20 µL
<u>%10'luk amonyum persülfat</u> Amonyum persülfat 1g Alınarak son hacim distile su ile 10 mL'ye tamamlanır.	750 µL	400 µL

2.2 YÖNTEMLER

2.2.1 Testis Örneğinin Hazırlanması

Testis numuneleri, mezbahaneden kesim sonrası taze alınarak küçük parçalara ayrılıp ekstraksiyon tamponunda homojenize edilmiştir. Homojenize edilen testis örneği 15000 rpm'de +4 °C'de 60 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası sıvı kısım alınarak aynı gün deneysel çalışmalarda kullanılmıştır.

2.2.2 Enzimin Aktivite Tayini

Hyalüronidaz enziminin aktivitesi spektrofotometrik olarak tayin edildi. Aktivite ölçümü için 0,05 mL enzim çözeltisi alınıp daha önceden hazırlanmış olan 1mL tampon (200 mM sodyum format pH 3.71) + substrat (12,3 mM hyalüronik asit çözeltisi) çözeltisine çabuk bir şekilde eklendikten sonra 232 nm'de 1 dakikadaki 37 °C'de absorbansta meydana gelen değişme okundu. Bu şekilde hyalüronik asitin N-asetilglukozamine (NAG) enzimatik dönüşüm hızı tespit edildi. Aynı işlem enzim olmadan tekrarlanarak aradaki fark enzim aktivitesi olarak belirlendi. 1 ünite hyalüronidaz dakikada meydana gelen NAG'in μmol 'ü olarak tayin edildi.

2.2.3 Bradford Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini

Amonyum sülfat çöktürmesi sırasında elde edilen çözeltilerdeki protein miktar tayinleri bu yöntemle belirlendi. Bu yöntem fosforik asitli ortamda proteinlerin, Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi ile kompleks oluşturması, oluşan kompleksin 595 nm'de maksimum absorban göstermesi esasına dayanır [112]. Bu yöntemin diğer protein tayini yöntemlerinden üstün tarafı, çok kısa sürede uygulanması, bozucu faktörlerin az olması, protein boya kompleksinin çözeltilerde uzun süre kalmasıdır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 μg arasındadır.

Protein tayini işleminde şu yol izlendi: 1 mL'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albümin çözeltisinden tüplere 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µL alındı. 100mM Tris-HCl tamponu (pH:8,00) ile tüm tüplerin hacimleri 0.1mL'ye tamamlandı. 5mL Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi her bir tüpe ilave edildi. Tüpler vorteks ile karıştırılarak 10 dakika sonra 595 nm'de 3 mL'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak 0,1 mL'lik 100 mM Tris-HCl (pH:8,00) tamponu olan 1. tüp kullanıldı. Okunan absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri ile standart grafik hazırlandı (Şekil 3.1).

Hazırlanacak enzim çözeltilerinden 0,1'er mL 2 ayrı tüpe alınarak üzerlerine 5'er mL Coomassie reaktifi ilave edildi. Vortekste karıştırıldıktan 10 dakika sonra 595 nm'de absorbansları ölçüldü. İki ölçümün ortalama absorbansına karşılık gelen protein miktarı standart grafik yardımıyla hesaplandı.

2.2.4 Enzimin Saflaştırılması

2.2.4.1 Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Amonyum sülfat, belirli doygunluk derecelerine göre belirli proteinlerin çökmesini sağlayan 2 değerlikli, çok kullanılan bir tuzdur. Bu amaçla literatürden bakılarak %40-60 amonyum sülfat çöktürmesi aşağıda verilen formülle tespit edildi:

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

V : Serum hacmi

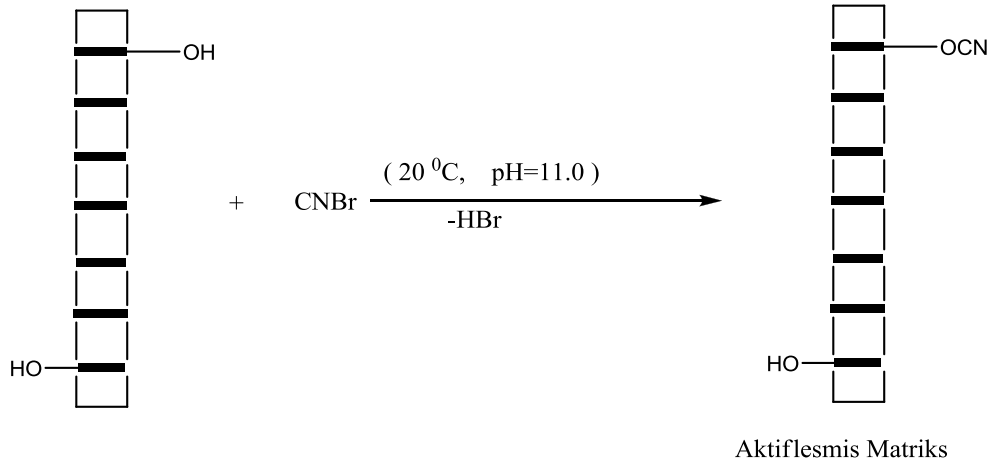
S₁ : 1'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu

S₂ : 1'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğu

2.2.4.2 Afinitte Kromatografisi ile Enzimin Saflaştırılması

2.2.4.2.1 Sepharose 4B'nin Aktifleştirilmesi

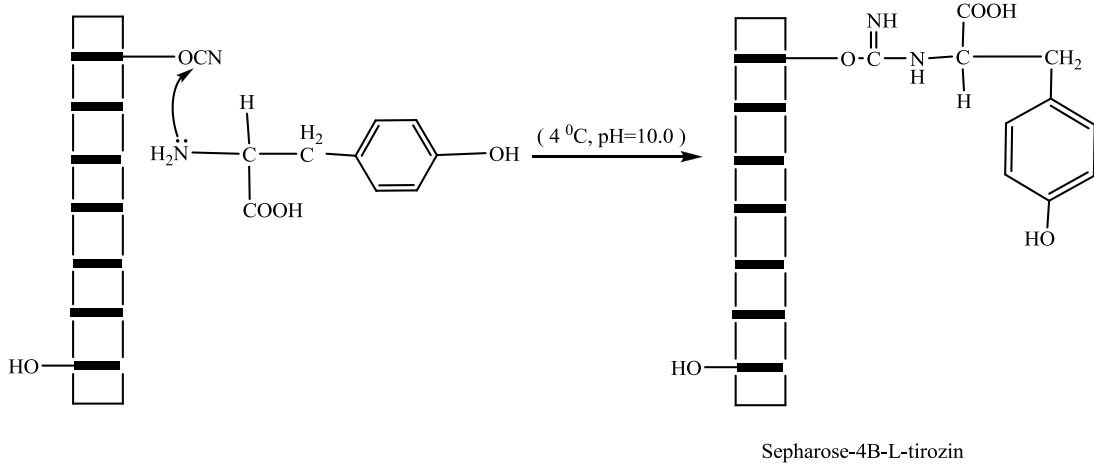
10 mL Sepharose-4B jeli, saf su ile iyice yıkanarak dekante edildi. Eşit hacimde distile su ile birleştirildi. Karıştırılmakta olan jel süspansiyonuna 4 g CNBr'in hepsi birden katıldı. pH metre kullanılarak süspansiyonun pH'sı 4 M NaOH ile hemen 11'e çıkarıldı ve tepkime bu pH'da muhafaza edildi. Tepkimeye pH değişmeye kadar devam edildi. (10-15 dakika) Çok miktarda buz süspansiyona katıldı ve karışım bir buhner hunisine nakledildi. Daha sonra 250 mL soğutulmuş 0,1 M Na₂HCO₃ tamponu (pH 10,00) ile yıkandı (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: Sepharose 4B'nin aktifleştirilmesi

2.2.4.2.2 L-tirozinin Bağlanması

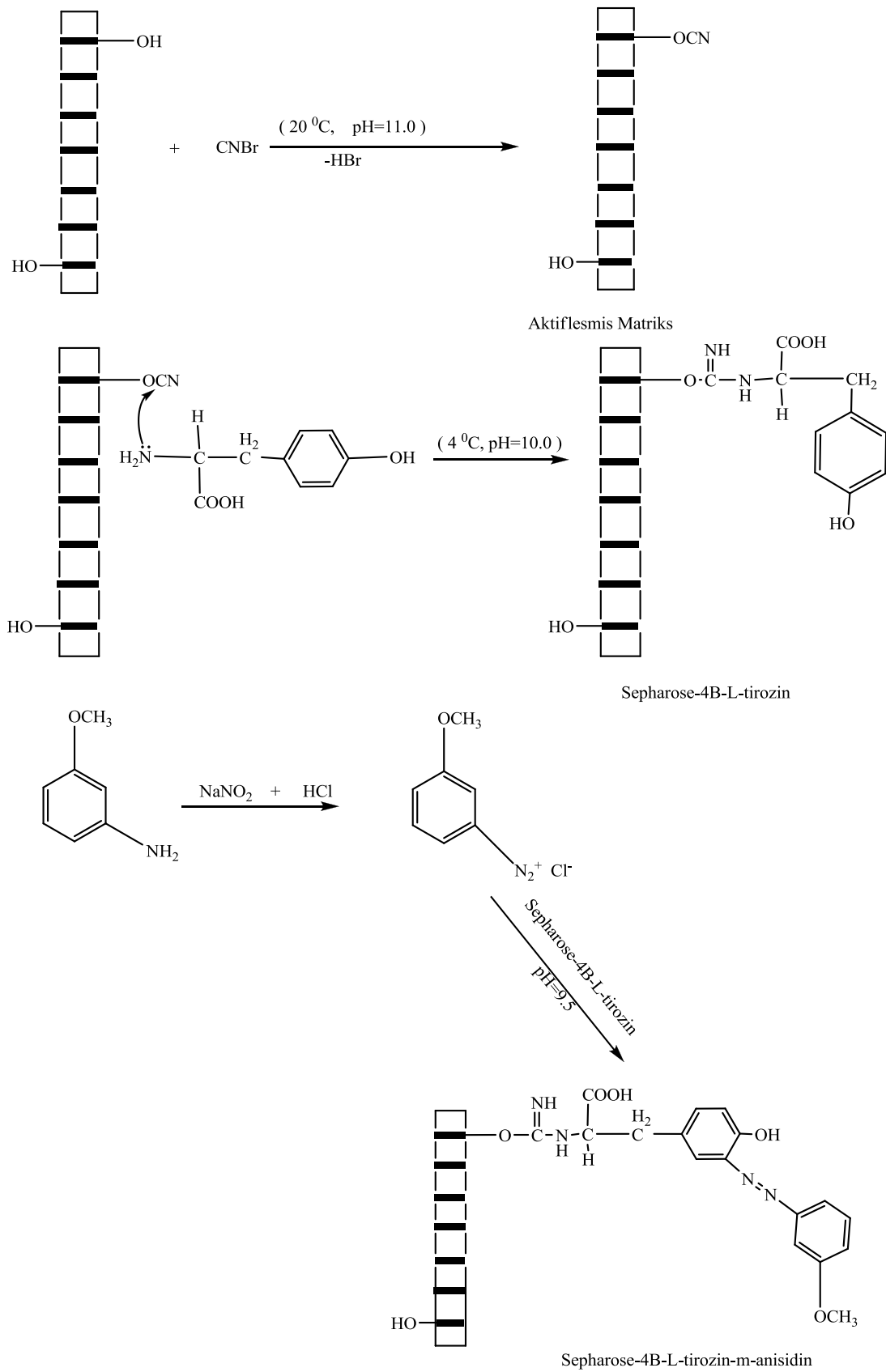
CNBr ile aktifleştirilmiş matriks üzerine, 20 mL'sinde 15 mg tirozin içeren 0,1 M NaHCO₃ tamponunun (pH 10,00) soğuk çözeltisi ilave edilerek 90 dk karıştırıldı. Bundan sonra süspansiyon 16 saat 4°C'de bekletildi. Bu sürenin bitiminde yıkama suyu 280 nm'de absorbanı vermeyinceye kadar bol su ile yıkandı. Böylece tepkimeye girmeyen tirozin tamamen uzaklaştırılmış oldu. Yıkama 100 mL 0,2 M NaHCO₃ tamponu (pH: 8,8) ile tekrarlandı. Tirozinle modifiye sepharose-4B aynı tamponun 40 mL'si içine alındı (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: L-Tirozinin Bağlanması

2.2.4.2.3 m-Anisidin Bileşiğinin Bağlanması

25 mg m-anisidin 0 °C civarında 10 mL 1M HCl içerisinde çözüldü. 75 mg NaNO₂ ihtiva eden 0 °C'deki 5 mL çözelti, m-anisidin çözeltisine damla damla katıldı. 10 dakika tepkimeden sonra diazolanmış bulunan m-anisidin, 40 mL Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonuna ilave edildi. pH: 9,5'a çıkarılarak sabit tutuldu ve 3 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Daha sonra 1 L saf su ve ardından 200 mL 0,01M Na₂HPO₄ (pH: 6,0) tamponu ile yıkandı ve aynı tamponda muhafaza edildi (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: m-anisidin bileşiğinin bağlanması

2.2.4.3 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) İle Enzim Saflığının Kontrolü

Hyalüronidaz enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılmasından sonra iki farklı akrilamid derişiminde; yığma jeli % 3, ayırma jeli % 10 olacak şekilde kesikli sodyum dodesil sülfat jel elektrofrez (SDS-PAGE) Laemli [113] tarafından belirtilen yöntemle yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi.

Bu amaçla elektrofrez cam plakaları önce su, sonra etil alkol ile iyice temizlendi. Daha sonra plakalar arasına plastik aralık oluşturucusu yerleştirilerek iki cam plaka birbiri üzerine konuldu ve elektrofrezin dökme aparatına sabitlendi. Tablo 2.1’de belirtildiği şekilde hazırlanan ayırma jeli plakalar arasına üstten 2-3 cm kalana kadar enjektörle döküldü. Jel içerisinde hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. Jel yüzeyinin düzgün olması için n-bütanol ile ince bir tabaka oluşturuldu. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra (1 gece) üst yüzeydeki n-bütanol döküldü. Daha sonra cam plakaların arasına tamamen doluncaya kadar polimerleşmiş ayırma jelinin üzerine yığma jeli ilave edildi. Jel kasetindeki yükleme jelinin üzerine tarak dikkatlice yerleştirilerek jelin polimerleşmesi beklendi (30 dakika). Yükleme jeli polimerleştikten sonra tarak kuyucukların arasının bozulmamasına dikkat edilerek çıkarıldı. Kuyucuklar önce saf suyla sonra tank tamponuyla yıkandı. Polimerize jellerin bulunduğu kaset elektrofrez tankına yerleştirildi. Elektrofrez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konuldu.

Afinite kromatografisi sonucunda elde edilen fraksiyonlardan yüksek aktivite gösterenler birleştirildi. Elde edilen çözelti toplam hacim 100 µL olacak şekilde 1:1 oranında numune tamponuyla karıştırıldı. Standart protein çözeltisi (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder #26619/20-Thermo fisher scientific)1:1 oranında numune tamponuyla karıştırıldı. Jele yüklenecek numuneler 3 dakika 100 °C’de termoblok da bekletildi. Numuneler soğutulularak kuyucuklara yüklendi. Elektrofrez güç kaynağına bağlanarak 80 volt’a ayarlandı. Proteinlerin jeldeki hareketini incelemeye yarayan numune tamponu içindeki boyaya ait bant ayırma jeline ulaştığında voltaj 150 volt’a yükseltildi. Yürütme işlemine proteinler, jelin altına 1cm kalana kadar devam edildi. Daha sonra akım kesilerek yürütme durduruldu. Cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı yığma 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.

2.2.5 Optimum Şartlarda K_M ve V_{max} Değerlerinin Bulunması

K_M ve V_{max} değerlerinin tespit edilmesi amacıyla optimum şartlarda hyalüronik asit substratının yedi farklı derişiminde enzim aktivitesi ölçümü yapıldı. Her ölçüm iki defa tekrarlanarak, bulunan değerlerin ortalaması alındı.

$1/V$ ve $1/[S]$ değerleri bulunarak Lineweaver-Burk gafiği çizildi. K_M ve V_{max} değerleri gafiğin denklemlerinden yararlanılarak bulundu.

2.2.6 Bazı Antibiyotikler için IC_{50} değerlerini bulunması

Farklı antibiyotiklerin IC_{50} değerlerini bulmak için, optimum şartlarda hyalüronik asit substratının 12.3 mM sabit derişiminde çalışıldı. Önce antibiyotiksiz ortamda enzim aktivitesi bulundu. Bu değer %100 aktivite olarak kullanıldı. Değişik antibiyotik derişimlerine karşılık gelen absorbanslar 232 nm'de köre karşı okundu. Elde edilen absorbans değerlerinden % aktivite hesaplandı. % Aktivite-[I] gafikleri çizildi. Bu gafiklerden yararlanarak her bir antibiyotik için IC_{50} değerleri hesaplandı.

2.2.7 Bazı Pestisitler İçin IC_{50} Değerlerini Bulunması

Farklı pestisitlerin IC_{50} değerlerini bulmak için, optimum şartlarda hyalüronik asit substratının 12.3 mM sabit derişiminde çalışıldı. Önce pestisitsiz ortamda enzim aktivitesi bulundu. Bu değer %100 aktivite olarak kullanıldı. Değişik pestisit derişimlerine karşılık gelen absorbanslar 232 nm'de köre karşı okundu. Elde edilen

absorbans değerlerinden % aktiviter hesaplandı. % Aktivite –[Pestisit] gafikleri çizildi. Bu gafiklerden yararlanarak her bir pestisit için IC₅₀ değerleri hesaplandı.

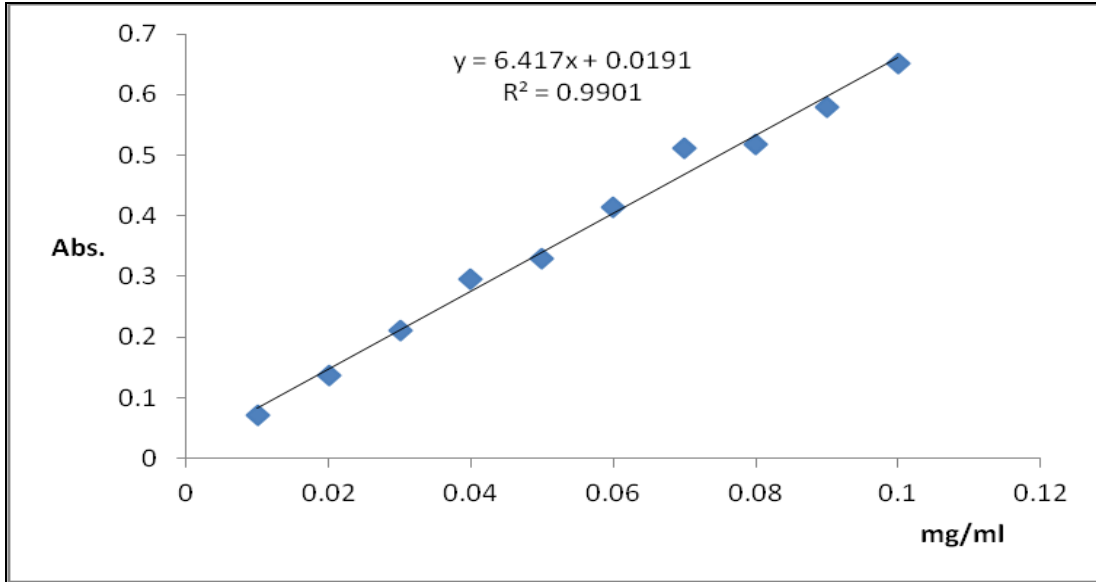
2.2.8 Bazı Ağır Metaller İçin IC₅₀ Değerlerinin Bulunması

Farklı ağır metallerin IC₅₀ değerlerini bulmak için, optimum şartlarda hyalüronik asit substratının 12,3 mM sabit derişiminde çalışıldı. Önce ağır metallerin olmadığı ortamda enzim aktivitesi bulundu. Bu değer %100 aktivite olarak kullanıldı. Değişik ağır metal derişimlerine karşılık gelen absorbanslar 232 nm’de köre karşı okundu. Elde edilen absorbans değerlerinden % aktiviter hesaplandı. % Aktivite-[Ağır metal] gafikleri çizildi. Bu gafiklerden yararlanarak her bir pestisit için IC₅₀ değerleri hesaplandı.

3. BULGULAR

3.1 Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri

Kantitatif protein tayininde Bradford yöntemi kullanıldı. Standart grafik bölüm 2.2.3’de açıklandığı gibi hazırlandı. Ekstraksiyon sonrası elde edilen enzim çözeltisi ve saflaştırma basamakları sonundaki enzim çözeltilerinin protein miktarları bu standart grafiğe göre belirlendi. Standart çözeltideki mg proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 3.1’de gösterilmiştir.



Şekil 3.1: Bradford yöntemi ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan standart grafik

3.2 Enzimin Saflaştırılması

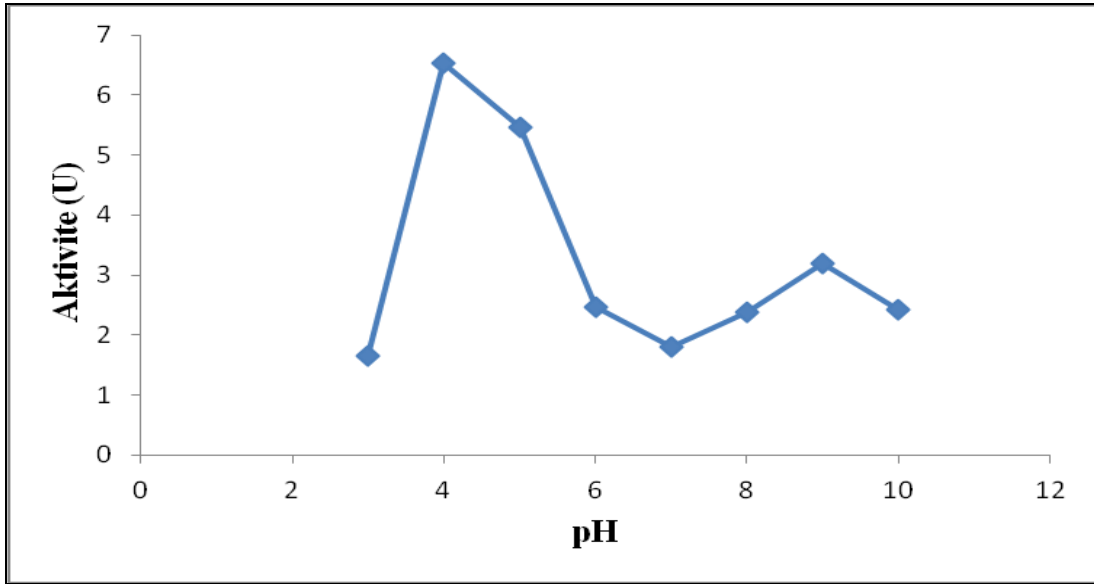
3.2.1 Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Söz konusu enzim için amonyum sülfat çöktürme aralığı literatürde %40-60 olarak verildiği için [35] deneysel çalışmada %40-60 amonyum sülfat çöktürme yapılmıştır.

3.2.2 m-Anisidin Bileşiminin BTH enzimi üzerine pH-Aktivite Etkisi

Tablo 3.1: m-Anisidin Bileşiminin BTH enzimi üzerine pH-Aktivite (U/mL dak) Etkisi

pH	ΔA (232 nm)	Aktivite (U/mL dak)
3	0.03	1.65
4	0.208	6.53
5	0.174	5.46
6	0.09	2.47
7	0.033	1.81
8	0.054	2.37
9	0.058	3.19
10	0.044	2.42

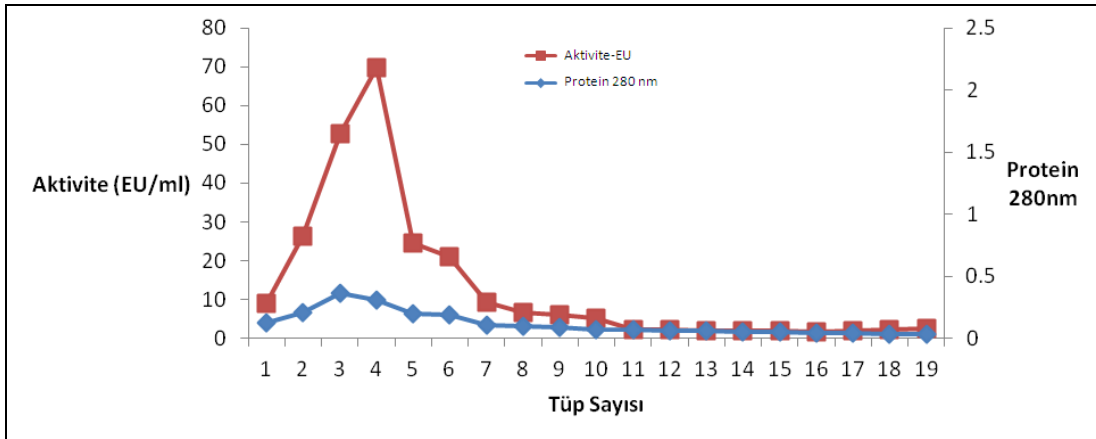


Şekil 3.2: m-Anisidin Bileşiminin %60 $(NH_4)_2SO_4$ çöktürmesi sonrası BTH enzimi üzerine pH-Aktivite Etkisi

3.2.3 Afinité Kromatografisi İle Enzimin Saflaştırılması

Bölüm 2.2.4.2 de belirtildiği şekilde hazırlanan afinite kromatografi kolonu önce 0.05 M Na_2HPO_4 pH:7,0 tamponu ile dengelendi. Kolonun dengeleme işlemi bittikten sonra, jel üzerindeki tampon çözeltisi jel seviyesine kadar indirildi.

Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen enzim çözeltisi kolona tatbik edildi. Kolon 0.05 M Na₂HPO₄ pH:7,0 tamponu yıkandı. Yıkama işlemi 280 nm'deki absorbans sıfır oluncaya kadar devam edildi. Kolondan 0.025 M Na₂HPO₄ ve 0.5 M NaCl, 50 mM m-anisidin içeren pH:4,0 elüsyon tamponu geçirildi ve elüsyon çözeltisi 1,5 mL halinde tüplere toplandı. Yıkama ve elüsyon işlemi 280 nm'deki absorbans sıfır oluncaya kadar devam edildi. 0.025 M Na₂HPO₄ ve 0.5 M NaCl, 50 mM m-anisidin içeren pH:4,0 tamponu kör olarak kullanılarak her bir tüpte 280 nm'de kalitatif protein tayini ve 0.2 M HCOONa ve 0.1 M NaCl pH:3,7 tamponu kullanılarak 232 nm'de aktivite tayini yapıldı. Elde edilen değerlerin tüp numarasına karşı aktivite ve protein miktarı grafiği çizildi (Tablo 3.2). Afinite kromatografisi sonunda enzim aktivitesine rastlanan tüpler birleştirildi. Kolona tatbik edilen numune ve birleştirilen elüat çözeltileri için Bradford metoduyla kantitatif protein ve aktivite tayinleri yapılarak spesifik aktiviteler ve saflaştırma oranları tespit edildi. Sonuçlar (Tablo 3.3)'de verildi.



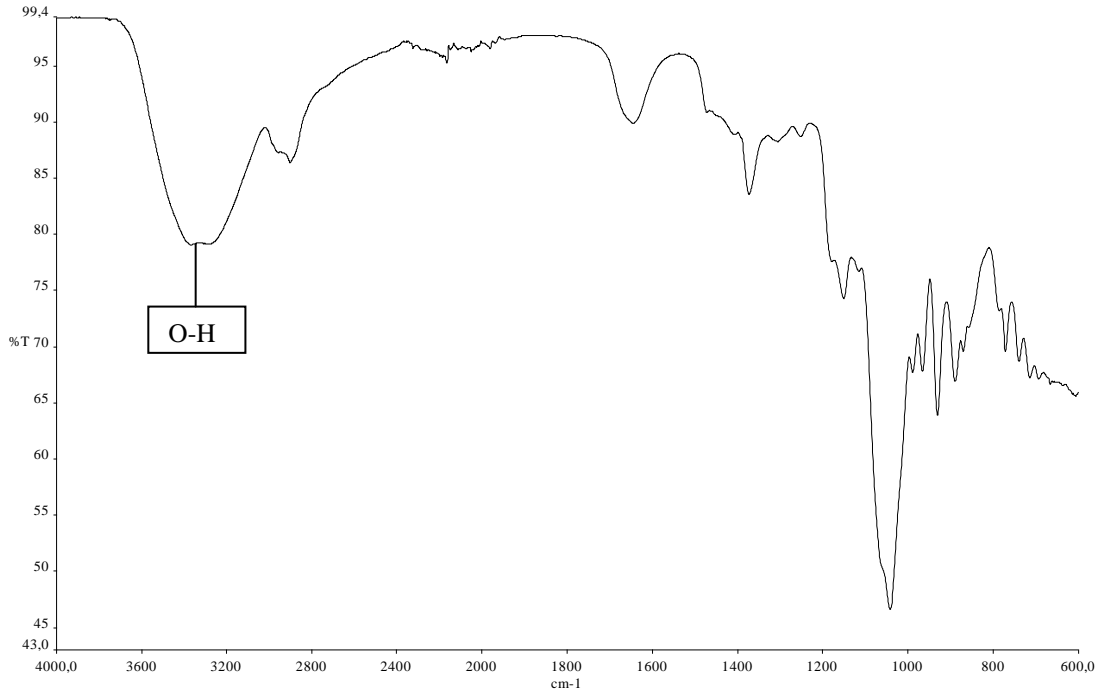
Tablo 3.2: Afinite kromatografisi kolonundan BTH enziminin saflaştırma grafiği

Tablo 3.3: Saflaştırma tablosu

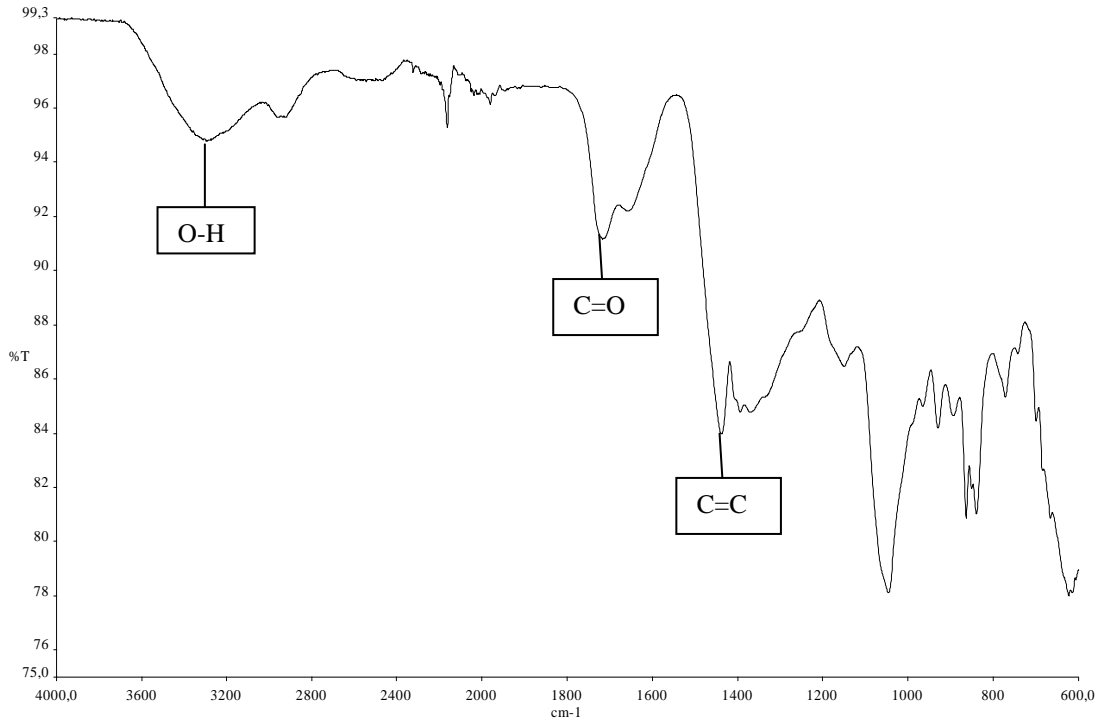
Basamak	Hacim (mL)	Aktivite (U/mL)	Toplam Aktivite (U)	Protein (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	% Verim	Saflaştırma Kat Sayısı
Sıyr Testisi	85	9.67	821.95	3.15	268	3.07	100	-----
Amonyum Sülfat Çöktürmesi	6	17.8	106.8	4.73	28.39	3.76	12.99	1.23
Afinite Kromatografisi	2	69.67	139.34	0.02	0.04	3317.62	16.95	881.78

3.2.4 Sentezlenen Afinite Jelinin FT-IR Spektrumları

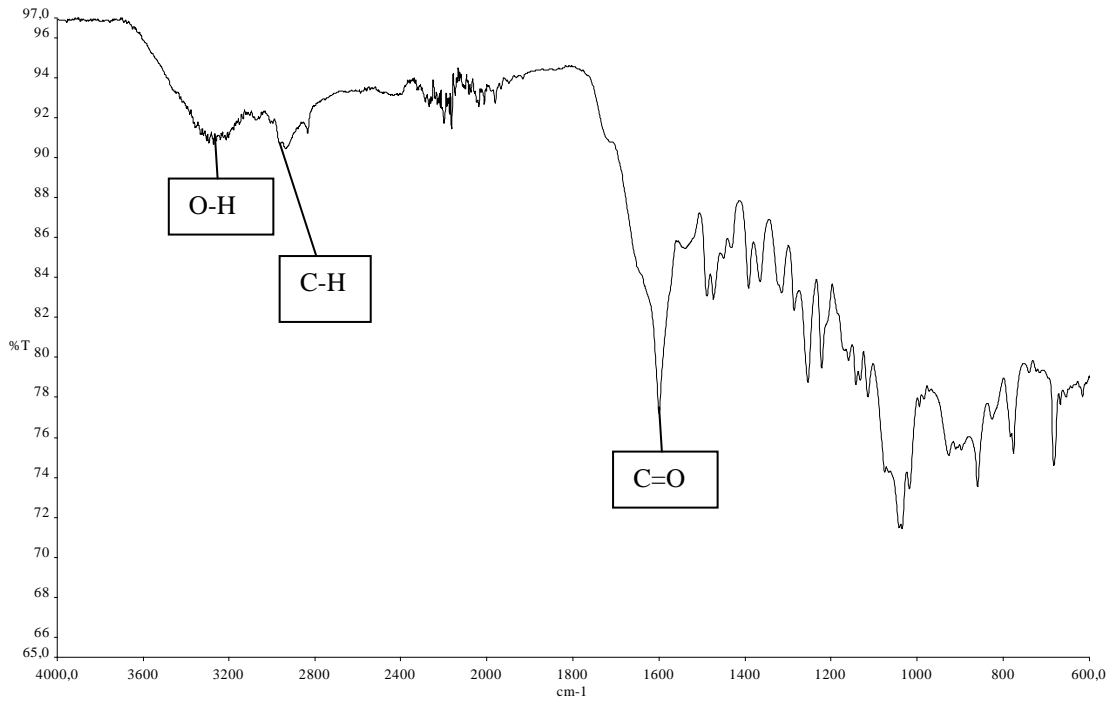
2.2.4.'te anlatılan prosedüre göre tarafımızdan sentezlenen *Sepharose-4B-L-tirozin-m-anisidin* yapısına sahip afinite jeli kullanıldı. Ayrıca jel sentezinin çeşitli aşamalarında FT-IR spektrumları çekildi ve aşağıda verildi (Şekil 3.3-3.4-3.5).



Şekil 3.3: Sepharose-4B bileşiğinin FT-IR spektrumu



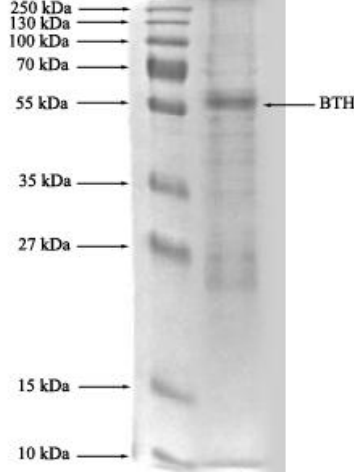
Şekil 3.4: Sepharose-4B-L-tirozin bileşiğinin FT-IR spektrumu



Şekil 3.5: Sepharose-4B-L-tirozin-m-anisidin bileşiğinin FT- IR spektrumu

3.2.5 BTH Enziminin SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi

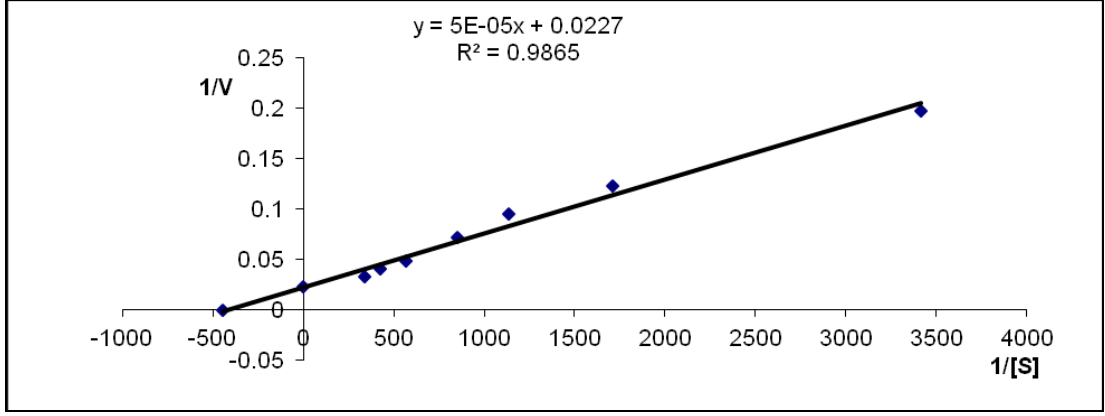
Afinite kromatografisi kolonundan saflaştırılan BTH enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla b3lüm 2.2.4.3’de anlatıldığı şekilde hazırlanan SDS poliakrilamid jel elektrofrezine sığır testisinden saflaştırılan BTH enzim numunesi tatbik edildi. Protein bantları içeren jellerin g3rünt3leri jel g3r3nt3leme sistemi ile bilgisayara aktarıldı (şekil 3.6).



şekil 3.6: Afinite kromatografisi ile saflaştırılan BTH enziminin SDS-polakrilamid jel elektrofrezisi g3r3nt3s3.

3.3 Optimum şartlarda K_M ve V_{max} Değerlerinin Bulunması

K_M ve V_{max} değerlerinin bulunması amacıyla, optimum şartlarda hyal3ronik asit substratının değişen derişimlerinde enzim aktivitesi 3l3mleri yapıldı. Her 3l3m iki defa yapılarak bulunan değerlerin ortalaması alındı. 232 nm’de 3l3len aktivite değerleri tepkime hızı (U/mL dakika) olarak alındı. $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri bulunarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi (şekil 3.7). Grafikten yararlanarak K_M değeri 2.23 mM ve V_{max} değeri 19.85 U/mLdakika olarak bulundu.



Şekil 3.7: Saflaştırılmış BTH enziminin hyalüronik asit substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.

Tablo 3.4: BTH enziminin hyalüronik asit substratı kullanılarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$.

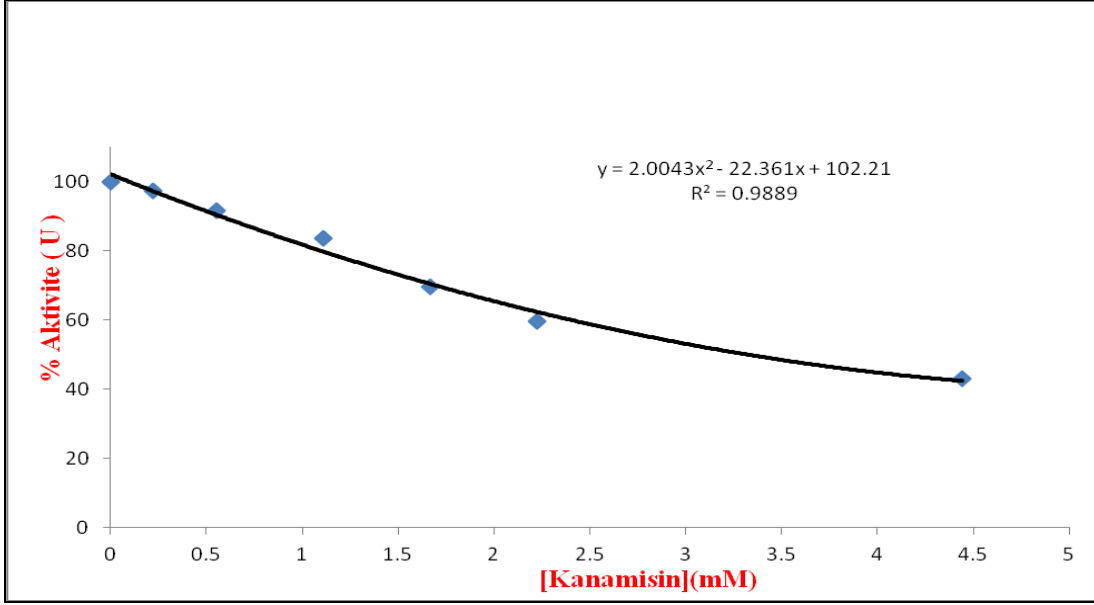
200 mM sodyum format +saf su (μL)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μL)	Substrat çözeltisinin hacmi (μL)	Küvetteki toplam hacim (μL)	Küvetteki Substrat Kons [S] (mM)	ΔOD (232 nm)	Aktivite (U/mL dak)	$1/V \times 10^{-3}$	$1/[S]$
975		25		0.3	0.023	5.055	197	3414
950		50		0.6	0.037	8.132	122	1707
925		75		0.9	0.048	10.549	94	1138
900	50	100	1050	1.2	0.063	13.846	72	853
850		150		1.8	0.094	20.659	48	569
800		200		2.3	0.113	24.835	40	426
750		250		3	0.14	30.769	32	341

3.4 İnhibisyona Sebep Olan Antibiyotiklerin IC₅₀ Değerlerinin Bulunması

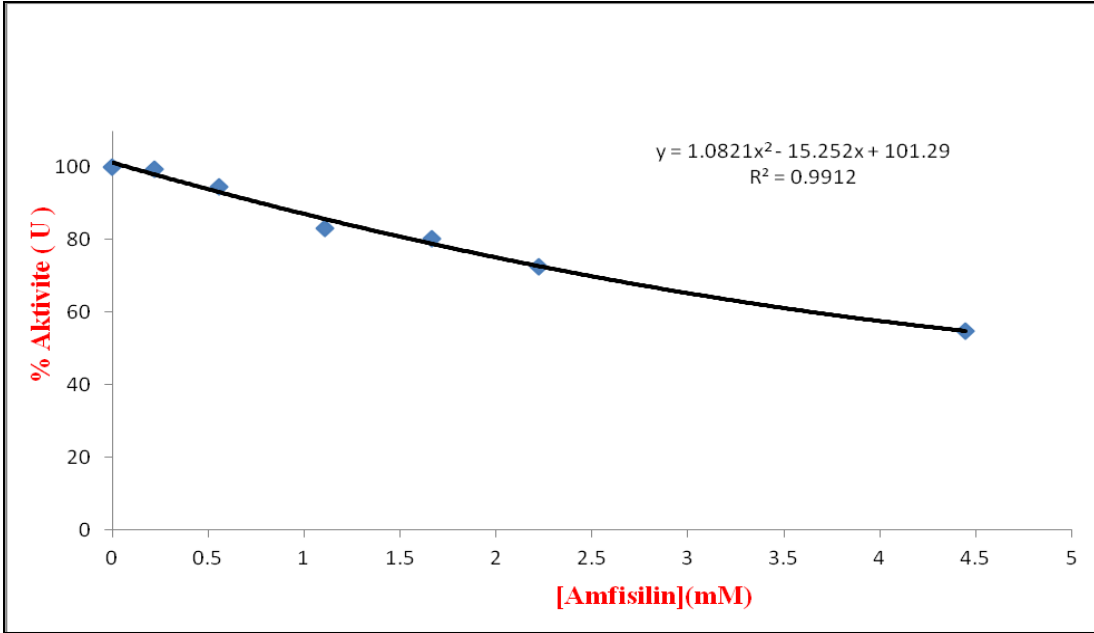
Çalışmamızda kullandığımız antibiyotiklerin IC₅₀ değerlerini bulmak için, optimum şartlarda hyalüronik asit substratının 12,3 mM sabit derişiminde çalışıldı. Substrat çözeltisi her ölçümde 0,225 mL hyalüronik asit alındı ve antibiyotik çözeltilerinden ise değişik hacimlerde alınarak toplam 1,05mL'lik bir tepkime hacmi oluşturuldu. Önce antibiyotiksiz ortamda enzim aktivitesi bulundu. Bu değer %100 aktivite olarak kullanıldı. Daha sonra optimum pH ve sıcaklıkta 0,05 mL enzim çözeltisi alınıp daha önceden hazırlanmış olan 1 mL tampon+substrat +antibiyotik+ saf su (400 µL)çözeltisine çabuk bir şekilde eklendikten sonra 232 nm'de bir dakikada absorbansta meydana gelen değişme okundu. Elde edilen absorbans değerlerinden % aktiviteler hesaplandı. % Aktivite-[I] grafikleri çizildi. Bu grafiklerden yararlanarak her bir antibiyotik için IC₅₀ değerleri hesaplandı.

Tablo 3.5: BTH enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren kanamisin sülfat ve sodyum ampisilin'in IC₅₀ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik derişimleri ve elde edilen sonuçlar

200 mM sodyum format +saf su (µL)	Antibiyotik	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Substrat çözeltilisinin hacmi (µL)	Antibiyotik Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Küvetteki Antibiyotik Kons. [I] (mg/mL)	ΔA (232 nm)	Aktivite (U/mL dak)	% Aktivite
775	Kanamisin sülfat	50	225	-	-	0.731	160.66	100
765				10	0.058	0.712	156.48	97.40082
750				25	0.146	0.67	147.25	91.65527
725				50	0.291	0.612	134.51	83.72093
700				75	0.435	0.51	112.09	69.76744
675				100	0.582	0.436	95.824	59.64432
575				200	1.164	0.314	69.011	42.95486
775				Sodyum ampisilin	50	225	-	-
765	10	0.037	0.726				159.56	99.31601
750	25	0.093	0.691				151.87	94.52804
725	50	0.185	0.607				133.41	83.03694
700	75	0.278	0.586				128.79	80.16416
675	100	0.371	0.531				116.7	72.64022
575	200	0.742	0.401				88.132	54.85636



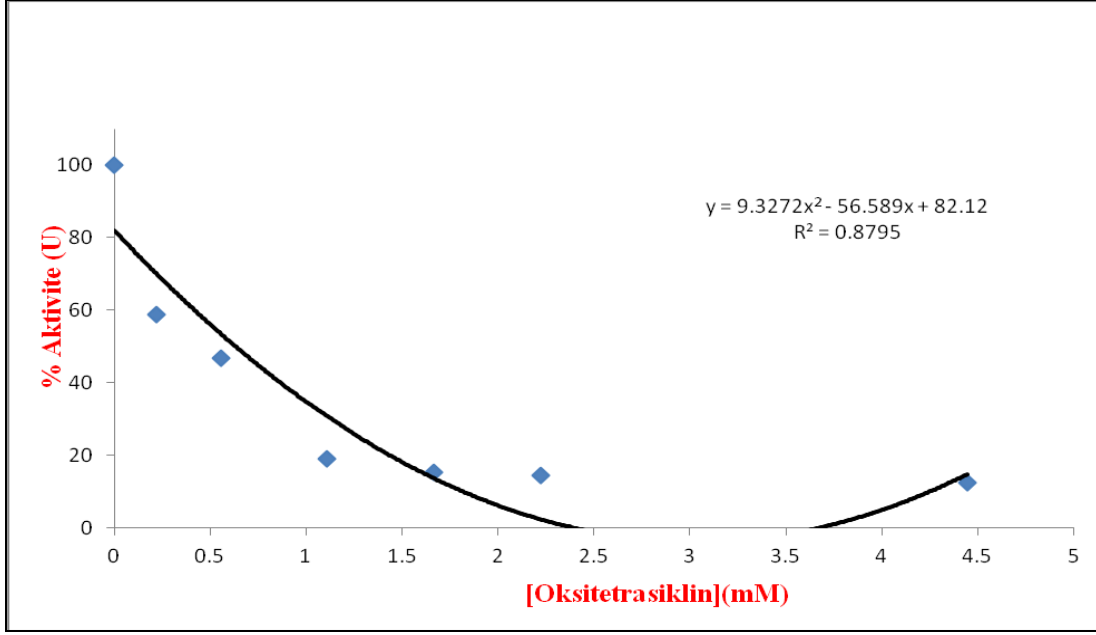
Şekil 3.8: Saflaştırılmış BTH enzimi üzerine 12.3 mM hyalüronik asit substratı derişiminde kanamisin sülfat için % aktivite-[I] grafiği



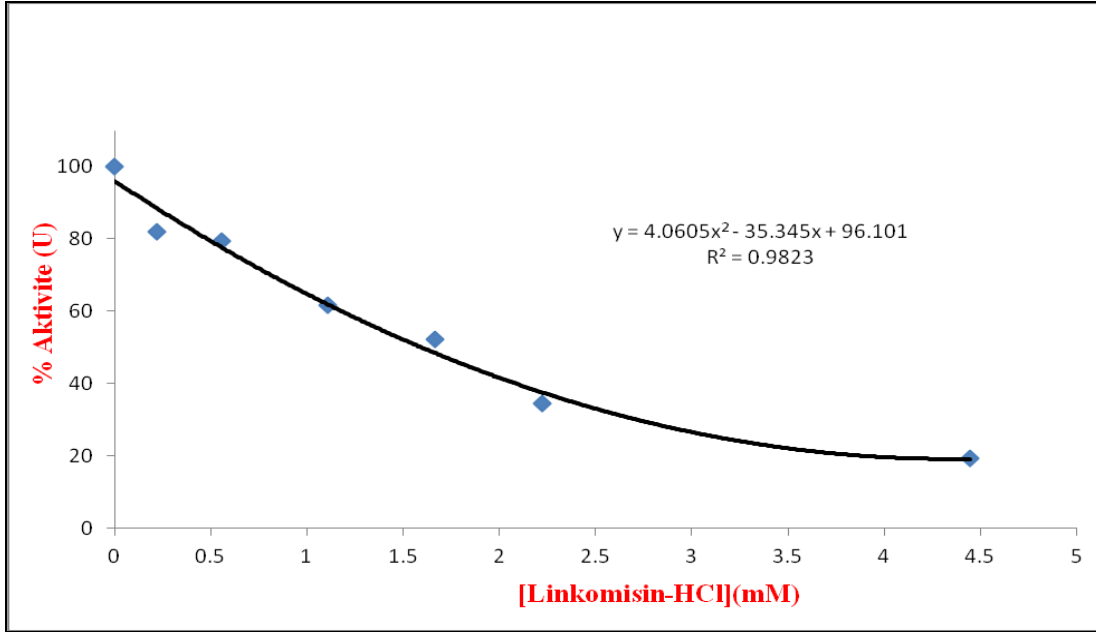
Şekil 3.9: Saflaştırılmış BTH enzimi üzerine 12.3 mM hyalüronik asit substratı derişiminde sodium ampisilin için % aktivite-[I] grafiği

Tablo 3.6: BTH enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Oksitetrasiklin ve Linkomisin-HCl'in IC₅₀ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik derişimleri ve elde edilen sonuçlar

200 mM sodyum format +saf su (µL)	Antibiyotik	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Substrat çözeltilisinin hacmi (µL)	Antibiyotik Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Küvetteki Antibiyotik Kons. [I] (mg/mL)	ΔA (232 nm)	Aktivite (U/mL dak)	% Aktivite
775	Oksitetrasiklin	50	225	-	-	0.731	160.66	100
765				10	0.046	0.431	94.725	58.96033
750				25	0.115	0.343	75.385	46.92202
725				50	0.230	0.14	30.769	19.15185
700				75	0.345	0.113	24.835	15.45828
675				100	0.460	0.106	23.297	14.50068
575				200	0.921	0.091	20	12.4487
775				Linkomisin-HCl	50	225	-	-
765	10	0.046	0.599				131.65	81.94254
750	25	0.115	0.581				127.69	79.48016
725	50	0.231	0.45				98.901	61.55951
700	75	0.346	0.383				84.176	52.39398
675	100	0.461	0.253				55.604	34.61012
575	200	0.922	0.142				31.209	19.42544



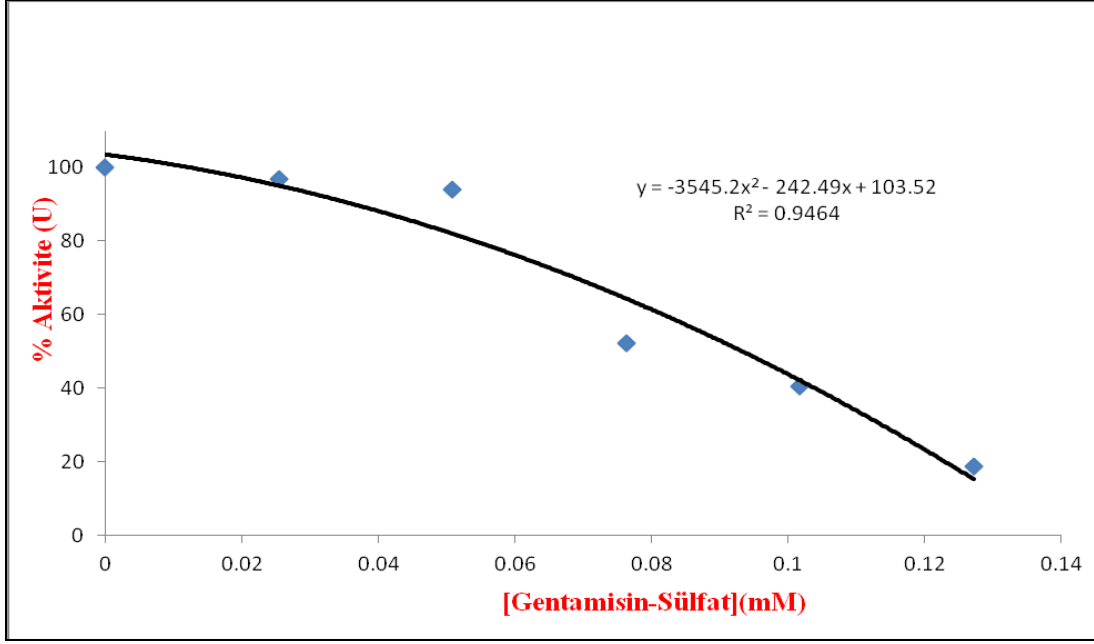
Şekil 3.10: Saflaştırılmış BTH enzimi üzerine 12.3 mM hyalüronik asit substratı derişiminde oksitetrasiklin için % aktivite-[I] grafiği



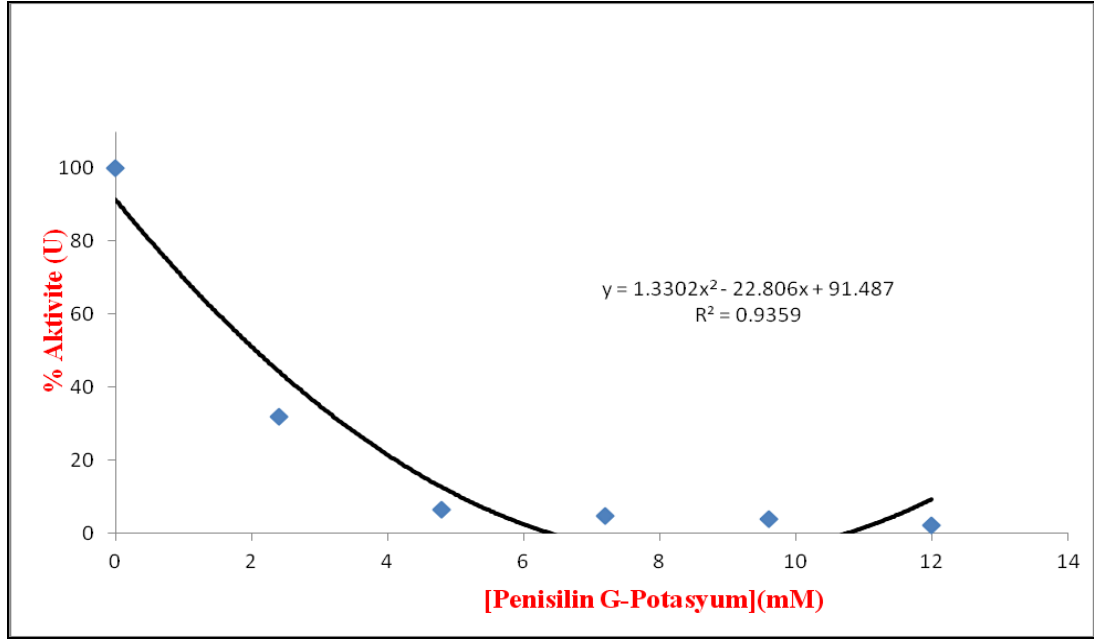
Şekil 3.11: Saflaştırılmış BTH enzimi üzerine 12.3 mM hyalüronik asit substratı derişiminde Linkomisin-HCl için % aktivite-[I] grafiği

Tablo 3.7: BTH enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Gentamisin sülfat ve Penisilin G-Potasyum'un IC₅₀ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik derişimleri ve elde edilen sonuçlar

200 mM sodyum format +saf su (µL)	Antibiyotik	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Substrat çözeltilisinin hacmi (µL)	Antibiyotik Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Küvetteki Antibiyotik Kons. [I] (mg/mL)	ΔA (232 nm)	Aktivite (U/mL dak)	% Aktivite
775	Gentamisin sülfat	50	225	-	-	0.43	94.51	100
770				5	0.256	0.417	91.65	96.97674
765				10	0.512	0.404	88.79	93.95349
760				15	0.768	0.225	49.45	52.32558
755				20	1.024	0.174	38.24	40.46512
750				25	1.280	0.081	17.8	18.83721
775	Penisilin G-Potasyum	50	225	-	-	0.43	94.51	100
770				5	0.626	0.137	30.11	31.86047
765				10	1.252	0.028	6.154	6.511628
760				15	1.878	0.021	4.615	4.883721
755				20	2.504	0.017	3.736	3.953488
750				25	3.130	0.009	1.978	2.093023



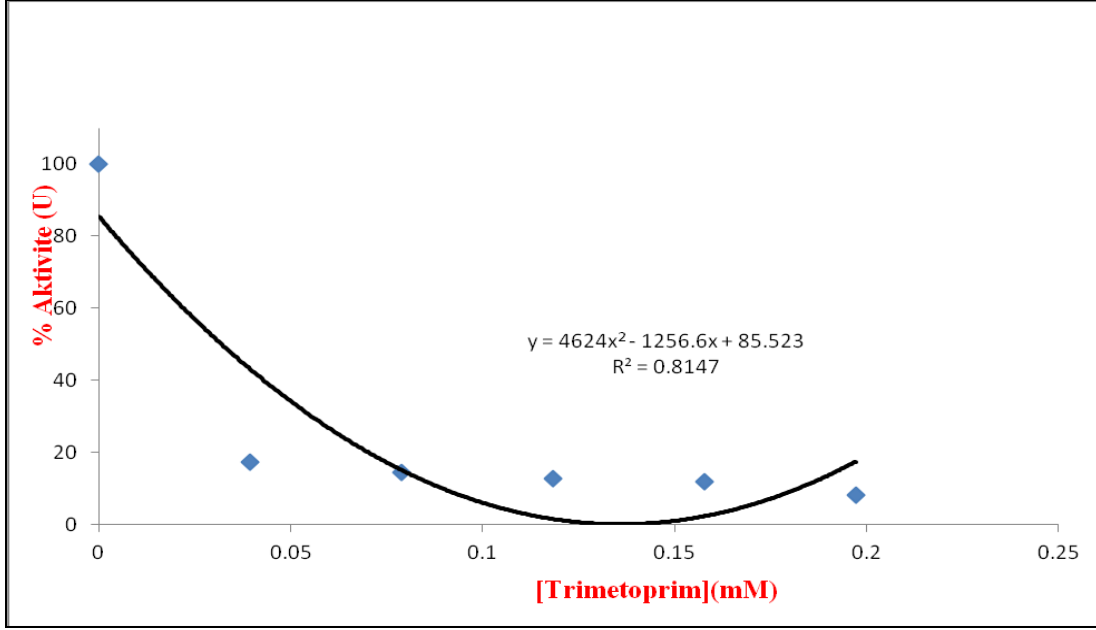
Şekil 3.12: Saflaştırılmış BTH enzimi üzerine 12.3 mM hyalüronik asit substratı derişiminde Gentamisin-Sulfat için % aktivite-[I] grafiği



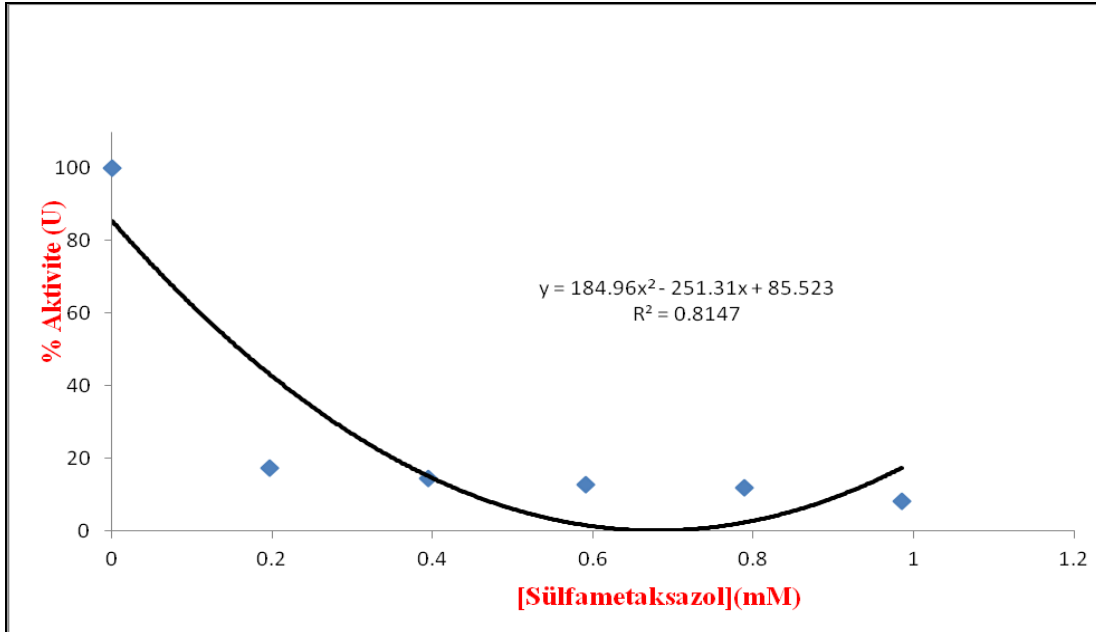
Şekil 3.13: Saflaştırılmış BTH enzimi üzerine 12.3 mM hyalüronik asit substratı derişiminde Penisilin G-Potasyum için % aktivite-[I] grafiği

Tablo 3.8: BTH enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Trimetoprim ve Sülfametaksazol'un IC₅₀ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik derişimleri ve elde edilen sonuçlar

200 mM sodyum format +saf su (µL)	Antibiyotik	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Substrat çözeltilisinin hacmi (µL)	Antibiyotik Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Küvetteki Antibiyotik Kons. [I] (mg/mL)	ΔA (232 nm)	Aktivite (U/mL dak)	% Aktivite
775	Trimetoprim	50	225	-	-	0.43	94.51	100
770				5	0.200	0.075	16.48	17.44186
765				10	0.400	0.063	13.85	14.65116
760				15	0.600	0.055	12.09	12.7907
755				20	0.800	0.052	8.791	12.09302
750				25	1.000	0.036	7.912	8.372093
775				Sülfametaksazol	50	225	-	-
770	5	1.000	0.075				16.48	17.44186
765	10	2.000	0.063				13.85	14.65116
760	15	3.000	0.055				12.09	12.7907
755	20	4.000	0.052				11.43	12.09302
750	25	5.000	0.036				7.912	8.372093



Şekil 3.14: Saflaştırılmış BTH enzimi üzerine 12.3 mM hyalüronik asit substratı derişiminde Trimetoprim için % aktivite-[I] grafiği



Şekil 3.15: Saflaştırılmış BTH enzimi üzerine 12.3 mM hyalüronik asit substratı derişiminde Sulfametaksazol için % aktivite-[I] grafiği

Tablo 3.9: Çalışmada kullanılan antibiyotikler ve IC₅₀ değerleri (mg/mL)

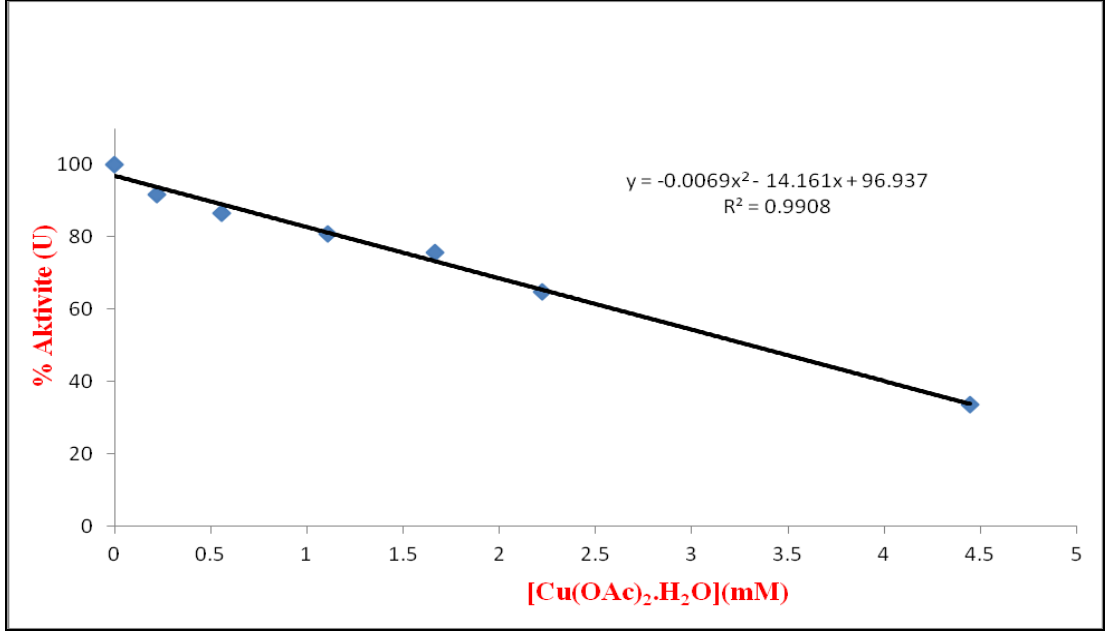
Antibiyotik	IC₅₀ mM
Kanamisin sülfat	3.326
Sodyum ampisilin	5.541
Oksitetrasiklin	0.632
Linkomisin-HCl	1.596
Gentamisin sülfat	0.093
Penisilin G-Potasyum	2.065
Trimetoprim	0.032
Sülfametaksazol	0.160

3.5 İnhibisyona Sebep Olan İyonların IC₅₀ Değerlerinin Bulunması

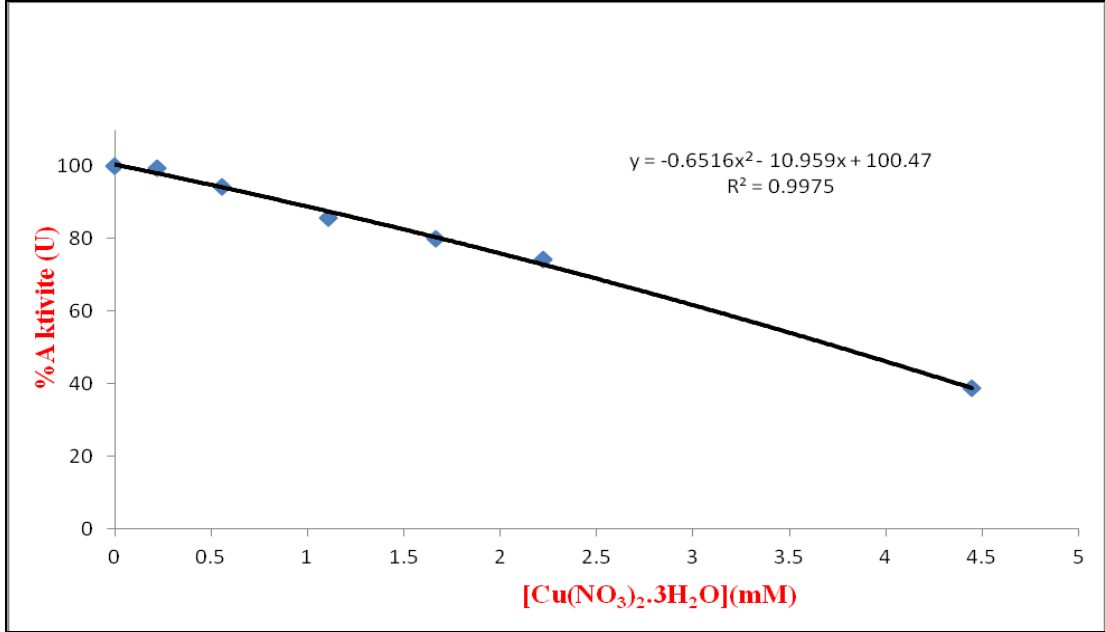
Çalışmamızda kullandığımız iyonların IC₅₀ değerlerini bulmak için, optimum şartlarda hyalüronik asit substratının 12,3 mM sabit derişiminde çalışıldı. Substrat çözeltisi her ölçümde 0,225 mL hyalüronik asit alındı ve iyon çözeltilerinden ise değişik hacimlerde alınarak toplam 1,05mL'lik bir tepkime hacmi oluşturuldu. Önce iyon içermeyen ortamda enzim aktivitesi bulundu. Bu değer %100 aktivite olarak kullanıldı. Daha sonra optimum pH ve sıcaklıkta 0,05 mL enzim çözeltisi alınıp daha önceden hazırlanmış olan 1 mL tampon+substrat+iyon+saf su (400 µL)çözeltisine çabuk bir şekilde eklendikten sonra 232 nm'de bir dakikada absorbansta meydana gelen değişme okundu. Elde edilen absorbans değerlerinden % aktivite hesaplandı. % Aktivite-[I] grafikleri çizildi. Bu grafiklerden yararlanarak her bir ağır metal için IC₅₀ değerleri hesaplandı.

Tablo 3.10: BTH enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren $\text{Cu}(\text{OAc})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ve $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 'un IC_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, iyon derişimleri ve elde edilen sonuçlar

200 mM sodyum format +saf su (μL)	İyon	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Substrat çözeltilisinin hacmi (μL)	İyon Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Küvetteki İyon Kons. [I] (mg/mL)	ΔA (232 nm)	Aktivite (U/mL dak)	% Aktivite
775	$\text{Cu}(\text{OAc})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	50	225	-	-	0.744	163.52	100
765				10	0.020	0.683	150.11	91.80108
750				25	0.050	0.644	141.54	86.55914
725				50	0.100	0.602	132.31	80.91398
700				75	0.150	0.564	123.96	75.80645
675				100	0.200	0.482	105.93	64.78495
575				200	0.400	0.251	55.165	33.73656
775				$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	50	225	-	-
765	10	0.024	0.739				162.42	99.32796
750	25	0.060	0.701				154.07	94.22043
725	50	0.120	0.638				140.22	85.75269
700	75	0.180	0.596				130.99	80.10753
675	100	0.240	0.552				121.32	74.19355
575	200	0.480	0.288				63.297	38.70968



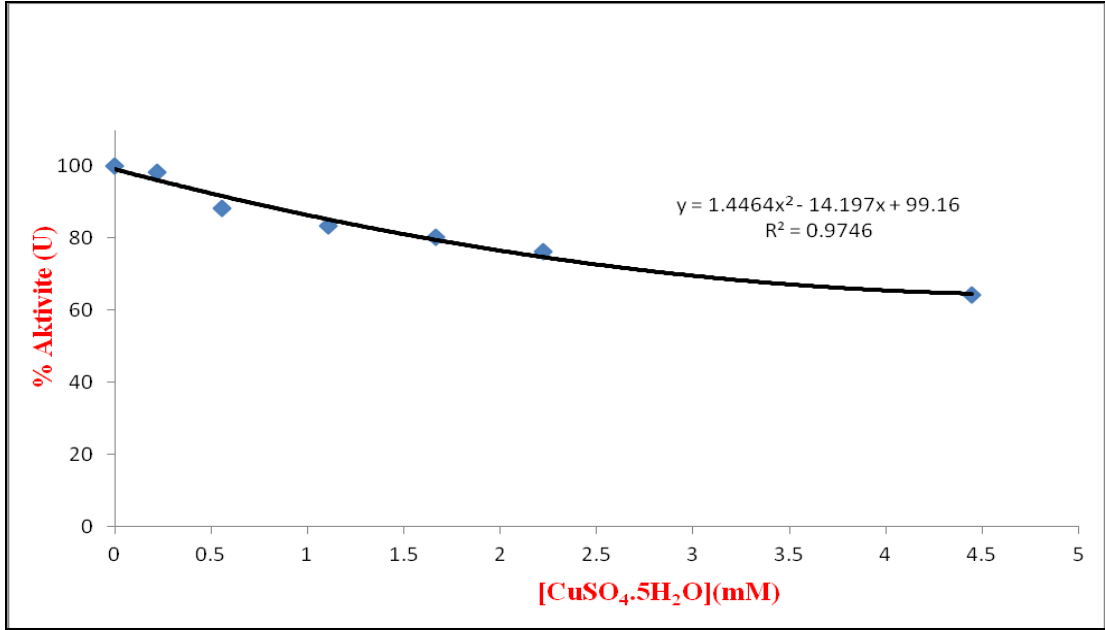
Şekil 3.16: Saflaştırılmış BTH enzimi üzerine 12.3 mM hyalüronik asit substratı derişiminde Cu(OAc)₂.H₂O için % aktivite-[I] grafiği



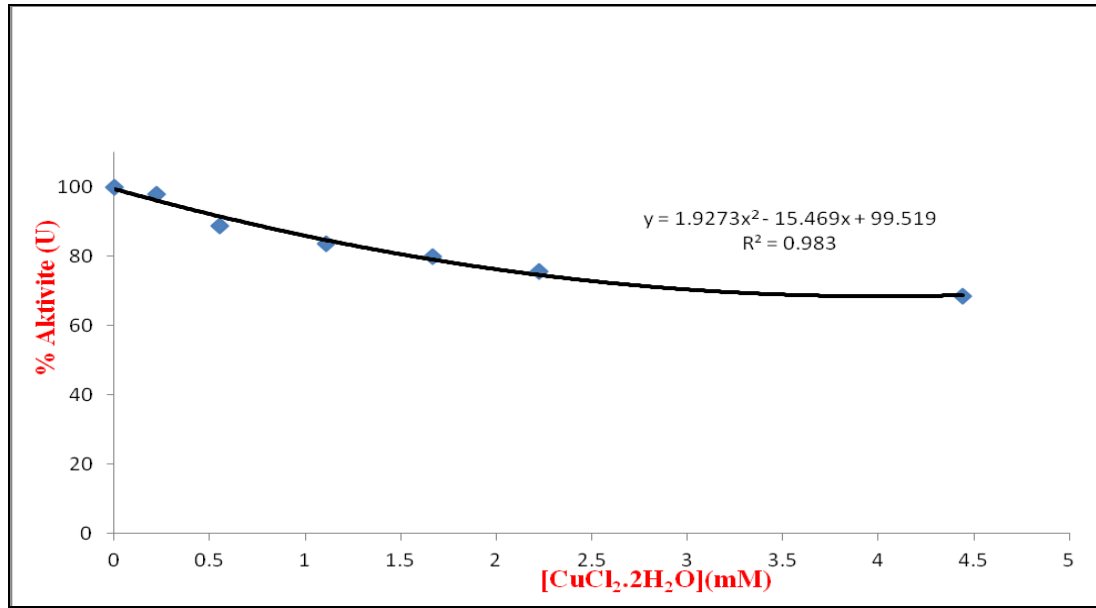
Şekil 3.17: Saflaştırılmış BTH enzimi üzerine 12.3 mM hyalüronik asit substratı derişiminde Cu(NO₃)₂.3H₂O için % aktivite-[I] grafiği

Tablo 3.11: BTH enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ve $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 'nun IC_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, iyon derişimleri ve elde edilen sonuçlar

200 mM sodyum format +saf su (μL)	İyon	Enzim Çözeltilerinin Hacmi (μL)	Substrat çözeltilerinin hacmi (μL)	İyon Çözeltilerinin Hacmi (μL)	Küvetteki İyon Kons. [I] (mg/mL)	ΔA (232 nm)	Aktivite (U/mL dak)	% Aktivite
775	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	50	225	-	-	0.602	132.31	100
765				10	0.025	0.592	130.11	98.33887
750				25	0.062	0.531	116.7	88.20598
725				50	0.125	0.503	110.55	83.55482
700				75	0.190	0.484	106.37	80.39867
675				100	0.250	0.459	100.88	76.24585
575				200	0.05	0.387	85.055	64.28571
775				$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	50	225	-	
765	10	0.017	0.59				129.67	98.00664
750	25	0.043	0.535				117.58	88.87043
725	50	0.085	0.503				110.55	83.55482
700	75	0.128	0.481				105.71	79.90033
675	100	0.170	0.455				100	75.5814
575	200	0.340	0.413				90.769	68.60465



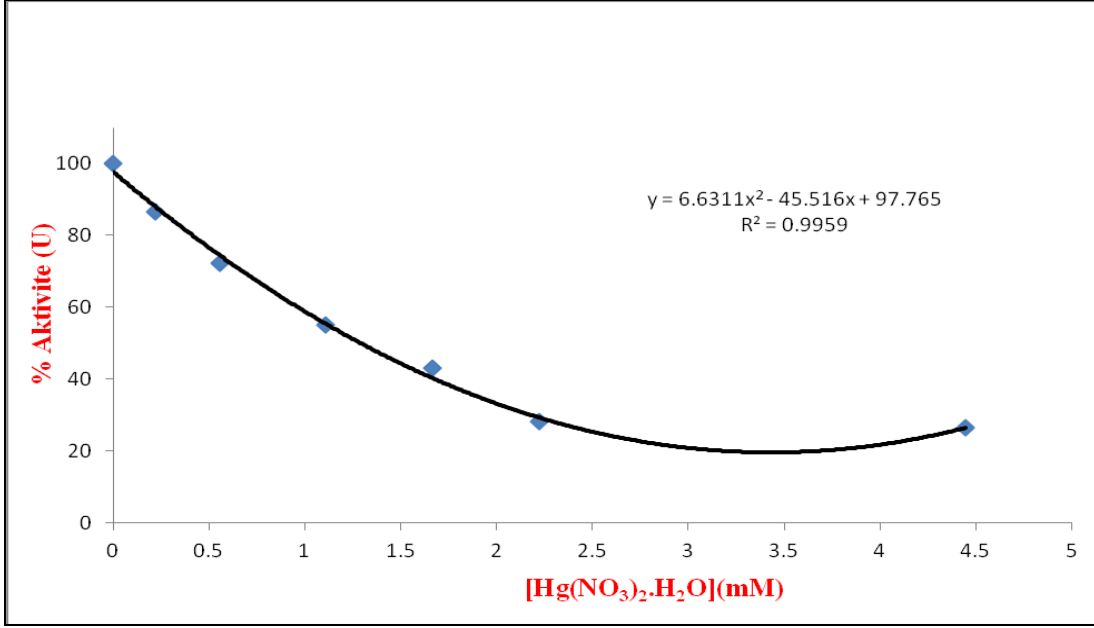
Şekil 3.18: Saflaştırılmış BTH enzimi üzerine 12.3 mM hyalüronik asit substratı derişiminde CuSO₄.5H₂O için % aktivite-[I] grafiği



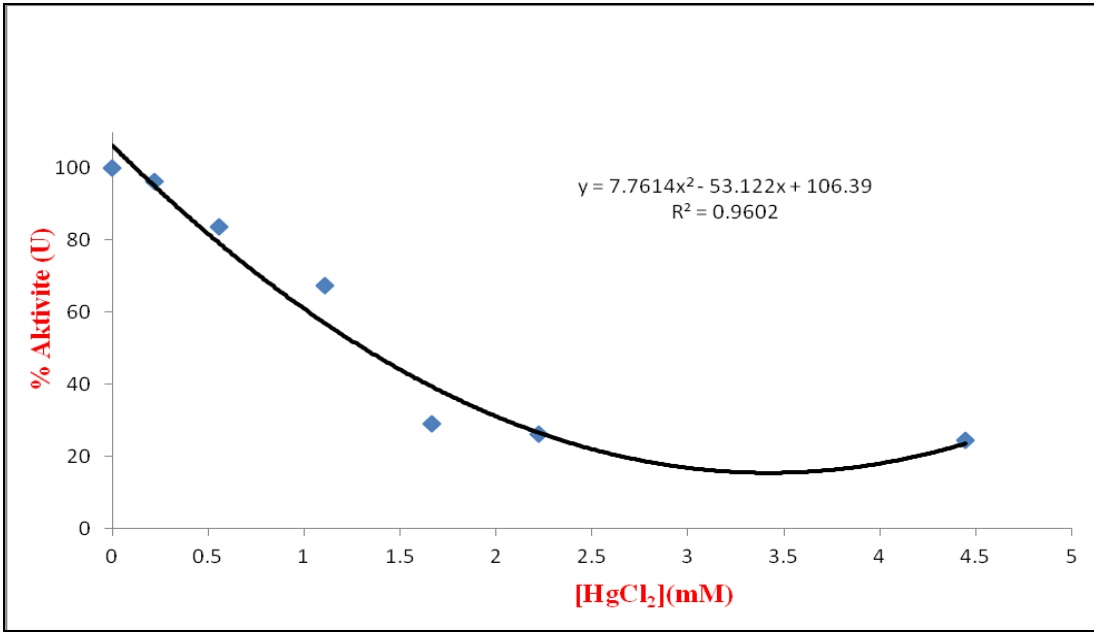
Şekil 3.19: Saflaştırılmış BTH enzimi üzerine 12.3 mM hyalüronik asit substratı derişiminde CuCl₂.2H₂O için % aktivite-[I] grafiği

Tablo 3.12: BTH enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Hg(NO₃)₂.H₂O ve HgCl₂ 'nun IC₅₀ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, iyon derişimleri ve elde edilen sonuçlar

200 mM sodyum format +saf su (µL)	İyon	Enzim Çözeltilerinin Hacmi (µL)	Substrat çözeltilerinin hacmi (µL)	İyon Çözeltilerinin Hacmi (µL)	Küvetteki İyon Kons. [I] (mg/mL)	ΔA (232 nm)	Aktivite (U/mL dak)	% Aktivite
775	Hg(NO ₃) ₂ .H ₂ O	50	225	-	-	0.602	132.31	100
765				10	0.034	0.522	114.73	86.71096
750				25	0.085	0.435	95.604	72.25914
725				50	0.170	0.332	72.967	55.1495
700				75	0.255	0.259	56.923	43.02326
675				100	0.340	0.17	37.363	28.2392
575				200	0.680	0.159	34.945	26.41196
775				HgCl ₂	50	225	-	
765	10	0.027	0.58				127.47	96.34551
750	25	0.068	0.504				110.77	83.72093
725	50	0.135	0.405				89.011	67.27575
700	75	0.202	0.176				38.681	29.23588
675	100	0.270	0.158				34.725	26.24585
575	200	0.540	0.147				32.308	24.4186



Şekil 3.20: Saflaştırılmış BTH enzimi üzerine 12.3 mM hyalüronik asit substratı derişiminde Hg(NO₃)₂.H₂O için % aktivite-[I] grafiği



Şekil 3.21: Saflaştırılmış BTH enzimi üzerine 12.3 mM hyalüronik asit substratı derişiminde HgCl₂ için % aktivite-[I] grafiği

Tablo 3.13: Çalışmada kullanılan iyonlar ve IC₅₀ değerleri (mg/mL)

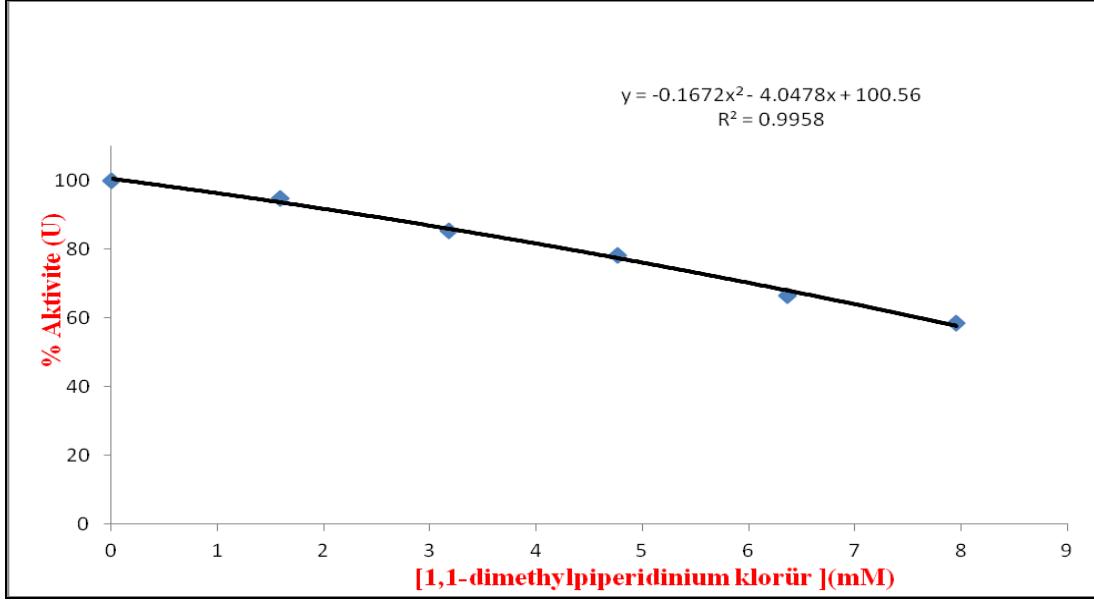
İyonlar ve Ağır Metaller	IC₅₀ mM
Cu(OAc) ₂ .H ₂ O	3.309
Cu(NO ₃) ₂ .3H ₂ O	3.761
CuSO ₄ .5H ₂ O	5.865
CuCl ₂ .2H ₂ O	6.490
Hg(NO ₃) ₂ .H ₂ O	1.292
HgCl ₂	1.313

3.6 İnhibisyona Sebep Olan Pestisitlerin IC₅₀ Değerlerinin Bulunması

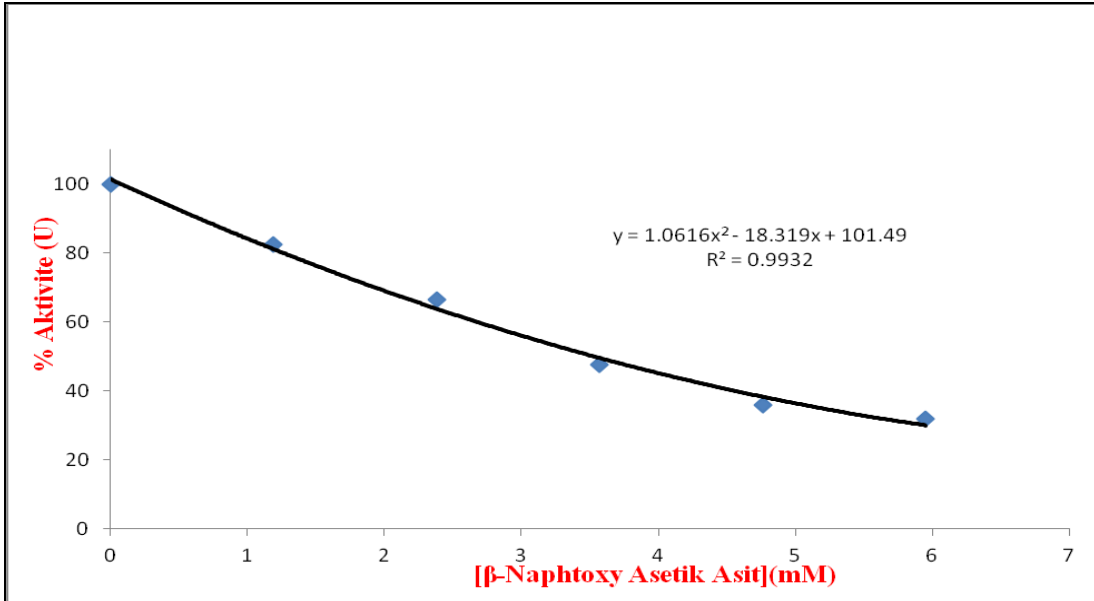
Çalışmamızda kullandığımız pestisitlerin IC₅₀ değerlerini bulmak için, optimum şartlarda hyalüronik asit substratının 12.3 mM sabit derişiminde çalışıldı. Substrat çözeltisi her ölçümde 0.225 mL hyalüronik asit alındı ve pestisit çözeltilerinden ise değişik hacimlerde alınarak toplam 1.05mL'lik bir tepkime hacmi oluşturuldu. Önce pestisit içermeyen ortamda enzim aktivitesi bulundu. Bu değer %100 aktivite olarak kullanıldı. Daha sonra optimum pH ve sıcaklıkta 0.05 mL enzim çözeltisi alınıp daha önceden hazırlanmış olan 1 mL tampon+substrat+pestisit+saf su (400 µL)çözeltisine çabuk bir şekilde eklendikten sonra 232 nm'de bir dakikada absorbansta meydana gelen değişme okundu. Elde edilen absorbans değerlerinden % aktivite hesaplandı. % Aktivite-[I] grafikleri çizildi. Bu grafiklerden yararlanarak her bir pestisit için IC₅₀ değerleri hesaplandı.

Tablo 3.14: BTH enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren 1,1-dimetilpiperidinium klorür ve β -naftoksiasetik asit 'in IC₅₀ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, iyon derişimleri ve elde edilen sonuçlar

200 mM sodyum format +saf su (μ L)	Kimyasal	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μ L)	Substrat çözeltilisinin hacmi (μ L)	Pestisit Çözeltilisinin Hacmi (μ L)	Küvetteki Pestisit Kons. [I] (mg/mL)	Δ A (232 nm)	Aktivite (U/mL dak)	% Aktivite
775	1,1-dimetilpiperidinium klorür	50	225	-	-	0.152	33.407	100
770				5	0.250	0.144	31.648	94.73684
765				10	0.500	0.13	28.571	85.52632
760				15	0.750	0.119	26.154	78.28947
755				20	1.000	0.101	22.198	66.44737
750				25	1.250	0.089	19.56	58.55263
775				β -naftoksiasetik asit	50	225	-	-
770	5	0.253	0.21				46.15	66.92913
765	10	0.506	0.169				37.14	66.53543
760	15	0.759	0.121				26.59	65.74803
755	20	1.012	0.091				20	35.82677
750	25	1.265	0.081				17.8	31.88976



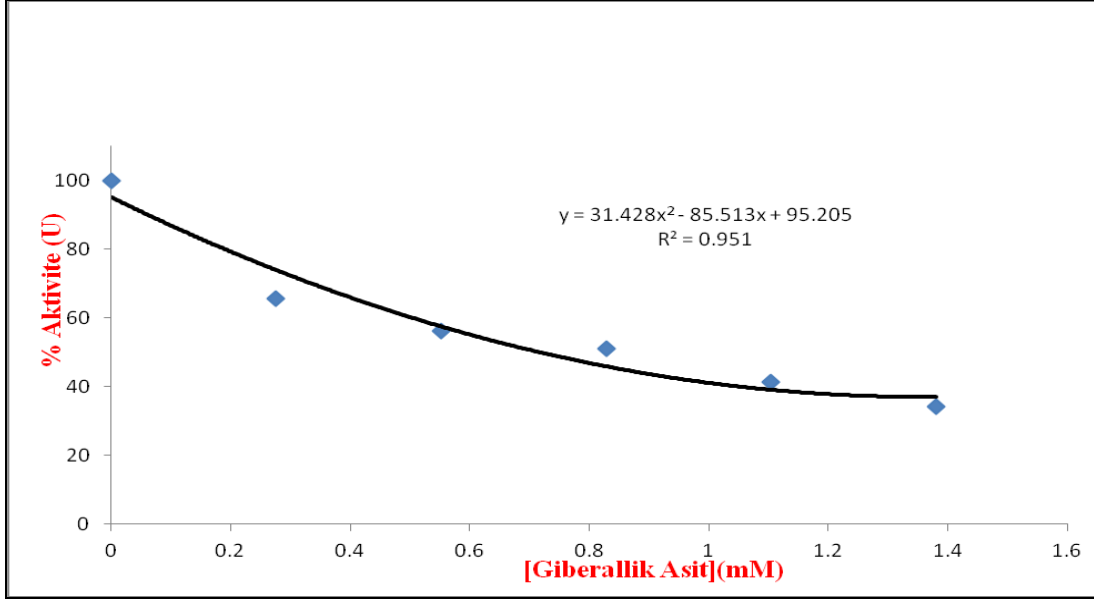
Şekil 3.22: Saflaştırılmış BTH enzimi üzerine 12.3 mM hyalüronik asit substratı derişimlerinde 1,1-dimetilpiperidinium klorür için % aktivite-[I] grafiği



Şekil 3.23: Saflaştırılmış BTH enzimi üzerine 12.3 mM hyalüronik asit substratı derişiminde β-naftoksiasetik asit için % aktivite-[I] grafiği

Tablo 3.15: BTH enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Giberallik Asit 'in IC₅₀ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, iyon derişimleri ve elde edilen sonuçlar

200 mM sodyum format +saf su (µL)	Kimyasal	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Substrat çözeltilisinin hacmi (µL)	Pestisit Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Küvetteki Pestisit Kons. [I] (mg/mL)	ΔA (232 nm)	Aktivite (U/mL dak)	% Aktivite
775	Giberallik Asit	50	225	-	-	0.254	55.82	100
770				5	0.100	0.167	36.7	65.74803
765				10	0.200	0.143	31.43	56.29921
760				15	0.300	0.13	28.57	51.1811
755				20	0.400	0.105	23.08	41.33858
750				25	0.500	0.087	19.12	34.25197



Şekil 3.24: Saflaştırılmış BTH enzimi üzerine 12.3 mM hyalüronik asit substratı derişiminde Giberallik Asit için % aktivite-[I] grafiği

Tablo 3.16: Çalışmada kullanılan pestisitler ve IC₅₀ değerleri (mg/mL)

Kimyasallar	IC ₅₀ mM
1,1-dimetilpiperidinium klorür	9.079
β -naftoksiasetik asit	3.534
Giberallik Asit	0.718

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Araştırmamızı dört ana başlıkta toplamak mümkündür. İlk olarak BTH'ın saflaştırılması için yeni bir afinite jeli sentezlenmiştir. Araştırmamızın ikinci bölümünde saflaştırılan enzimin klinikte yaygın olarak kullanılan aminoglikozit grubu bazı antibiyotiklere karşı ilgisi araştırılmıştır. Araştırmamızın üçüncü bölümünde ise, saflaştırılan enzimin çevre kirliliğine neden olan etkenlerden biri pestisitlere karşı afinitesi araştırılmıştır. Dördüncü bölümünde ise yine çevre kirliliğine neden olan ve gittikçe daha büyük boyutlarda tehlike oluşturan etmenlerin başında gelen ağır metaller ve çeşitli iyonların söz konusu enzim üzerindeki etkileri belirlenmiştir.

BTH enziminin daha ekonomik ve hızlı bir şekilde saflaştırılması gereklidir. Çünkü enzimin geniş substrat spesifikliğine sahip olması, preperatif organik kimya açısından önemlidir. BTH enzimine, son yıllarda birçok klinik çalışmada oldukça yoğun bir ilgi duyulduğu bilinmektedir. Ayrıca bu enzimin, çalışmamızın en önemli hedeflerinden olan suni tohumlama çalışmalarında kanser çalışmalarında ve endüstriyel alanda öneminin de olması daha pratik saflaştırma metotlarının gerekliliğini ortaya koymaktadır [114].

Bu araştırmada, enzim kaynağı olarak kullanılan testis örnekleri sığırlardan temin edilmiştir. Söz konusu enzimin suni tohumlamada son derece etkili olduğu bilindiğinden ve sığırların da bitkilerle beslendiği göz önünde bulundurularak pestisit etken maddeleri ve ağır metallerin çalışmamızda son derece önemli unsurlar olduğu planmış ve bu bileşiklerin kullanılmasına karar verilmiştir. Ayrıca hayvanlarda suni tohumlamada oluşabilecek patolojik durumların önlenmesi ve hastalık tedavisi amacıyla klinikte yaygın olarak kullanılan aminoglikozit grubu bazı antibiyotiklere karşı söz konusu enzimin ilgisi araştırılmıştır.

Sonuç olarak, yukarıda bahsi geçen tüm kimyasal yapıların suni tohumlama ve fertilizasyonda önemli bir etkisinin olduğunu düşündüğümüz BTH aktivitesi üzerine *in vitro* etkileri incelenmiştir.

BTH enziminin saflaştırılması için *Sepharose 4B-L-tirozin-m-anisidin* kimyasal yapısına sahip jel sentezlenmiştir. Bu amaçla matriks olarak Sepharose-4B seçilmiştir. Agaroz yapısına sahip bu jel, iyi akış özelliğine sahip olmasının yanında hidrofilik karakteri amacımıza son derece uygundur. Ayrıca hidroksil grupları içermesi aktifleştirilmenin kısa sürede ve kolayca gerçekleştirilmesini sağlamaktadır.

Araştırmamızda CNBr aktivasyon metodu kullanılmıştır. CNBr, Sepharose-4B üzerindeki hidroksil gruplarıyla tepkimeye girerek oldukça reaktif siyanat esterlerini oluşturur. Söz konusu esterler, nükleofilik ataklara karşı duyarlı oldukları için primer amin gruplarıyla ılıman şartlarda tepkime verirler.

Araştırmamızda kullandığımız aktivasyon prosedürü oldukça kısa sürede gerçekleşmektedir. Ayrıca işlem sonucunda elde edilen afinite jellerinin kimyasal stabilitesinin yüksek olması, farklı elüsyon koşullarında güvenli bir şekilde kullanılmasını sağlamaktadır. Bu amaçla literatürde karbodiimid bileşiklerinin de kullanıldığı bildirilmektedir [115]. Karbodiimid ile aktifleştirilmiş matrikse primer amin grubunun bağlanması ile amid bağı oluşmaktadır. Bu bağı kromatografi işlemlerinde dayanıklıdır. Fakat aktifleştirilme sırasında jel, pH 4,5'da 24 saat süre ile karıştırılmaktadır. Bu işlem kromatografi sırasında jelin akış özelliklerini olumsuz yönde etkilemektedir [115]. Bir başka aktifleştirme işleminde epoksi bileşiklerinden yararlanılmıştır [116]. Kromatografi işlemlerinde gayet dayanıklı olan bu yapılar, 16 saat aktifleştirme ve 16 saat ligand bağlama süresi olmak üzere toplam 32 saatte gerçekleşmektedir. pH'nın 10 civarında olması, jelin kimyasal yapısını etkilememesine rağmen uzun süre karıştırma işlemleri, polisakarit partiküllerinin fiziksel yapısının deformasyonuna sebep olabilir. Sonuç olarak, hazırlanacak afinite jelinin akış özellikleri olumsuz yönde etkilenecektir. Çalışmamızda kullanılan CNBr ile aktifleştirme işlemi sadece 5 dakikada gerçekleştirilmektedir. Böylece jelin fiziksel yapısındaki deformasyon sakıncaları ortadan kaldırılmış oldu.

Afinite kromatografisinde önemli konulardan birisi de ligant ve uzantı kolu seçimidir. Genel olarak molekül ağırlığı 5000'in altında olan ve nispeten küçük ligantların kullanılması önemli bir problem olan sterik engeli ortaya çıkarmaktadır. Araştırmamızda kullandığımız ligantın molekül ağırlığının son derece düşük olması uzantı kolu kullanılmasını zorunlu hale getirmiştir. Bu amaçla L-tirozin uzantı kolu

olarak kullanılmıştır. Literatürde genel olarak düşük molekül ağırlığına sahip ligantlar için 6-8 atom uzunluğunda uzantı kolları kullanılmıştır. Uzantı kolunun uzunluğu, kritik bir değerdir. Kısa uzantı kolları sterik engelden dolayı ligantla hedef molekül arasındaki bağlanmayı zayıflatacak ve verimi düşürecektir. Gereğinden uzun olması durumunda nonspesifik etkileşmelerle saflaştırma derecesini düşürdüğü saptanmıştır [117]. Tarafımızdan kullanılan L-tirozin molekülünün boyutunun uygun olması yanında, hidrofil karakteri, kolon içerisindeki olası hidrofobik etkileşmeyi azaltmaktadır.

Araştırmamızda m-anisidin bileşiği ligant olarak seçilmiştir. Bu bileşik enzimin spesifik inhibitörüdür. Afinite tekniğinde saflaştırma derecesinin yüksek olması, seçilecek ligantın spesifikliğine ve bağlanma derecesine büyük oranda bağlıdır. Ligantın, hedef moleküle bağlanma derecesi tekniğin uygulanması açısından önemlidir. Bağlanma derecesi düşük olduğu durumlarda hedef molekül yıkama işlemi sırasında safsızlıklarla birlikte gelmekte ve verim düşmektedir. Bağlanma derecesi çok yüksek olduğu durumlarda ise, liganta bağlı hedef molekülü çoğu durumda elüe etmek için daha sert elüsyon koşulları gerekmektedir. Bu koşullarda hedef proteinin denatüre olduğu saptanmıştır.

Araştırmamızda enzim kaynağı olarak sığır testis kullanılmıştır. Hyalüronidazlar çok sayıda dokularda ve organizmalarda tespit edilmiştir. Örneğin bunlar, bazı bakteriler (bakteriyofaj-bakteriyel hyalüronidaz), patojenik fungi (Candida, Streptomisler) ve omurgasız hayvanlardır (kabuklular, böcekler). Omurgalılardaki hyalüronidazlar kertenkele ve yılan zehrinde, testislerde, karaciğer, böbrek ve lenfatik sistem gibi çeşitli somatik dokularda bulunmaktadır [118-121].

Yukarıda da bahsedildiği üzere birçok dokuda yaygın olarak bulunmasına rağmen memeli testislerinde oldukça bol bulunması, kolay ulaşılabilirliği, taze olarak çalışılma avantajları gibi nedenlerden dolayı enzim kaynağı olarak sığır testisi tercih edilmiştir. Ön saflaştırma tekniği olarak uygulaması oldukça kolay olan amonyum sülfat çöktürme işlemi uygulanmıştır.

Araştırmamızda BTH enzimini sığır testisinden saflaştırmak için afinite kromatografisi tekniğini uygulamadan önce ön saflaştırma işlemi yapılmıştır. Bu amaçla amonyum sülfat çöktürme işlemi yapılmıştır. Amonyum sülfat çöktürme aralığı, BTH için % 40–60 olduğu literatürde bildirilmiştir [35].

Tarafımızdan sentezlenen afinite jeli kullanılarak, saflaştırma işlemi (0.025 M Na_2HPO_4 ve 0.5 M NaCl, 50 mM m-anisidin içeren pH:4.0) elüsyon tamponu kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

pH= 4.0 ve 50 mM m-anisidin, 0.5 M NaCl iyonik şidette en yüksek saflaştırma derecesi 881.78 olarak tespit edilmiştir. Bu değer literatürle bulunan değerle karşılaştırıldığı zaman oldukça yüksektir. Örneğin sığır testis dokusundan söz konusu enzim, amonyum sülfat çöktürmesi ve afinite kromatografisi yöntemleri kullanılarak 40-42 kat saflaştırma işlemi yapılmıştır [61] (Tablo:4:1). Oysa tarafımızdan sentezlenen afinite jeli kullanılarak sadece iki basamak sonucunda 881.78 kat saflaştırma derecesi elde edilmiştir.

Tablo 4.1: Hyalüronidazın Sülfat Çöktürmesi, Afinite Kromatografisi (Sepharose Blue), Immunoafinite Kromatografisi, Anyon Değişim Kromatografisi ve Dışlama (Exclusion) Kromatografisi ile saflaştırma sonuçları [61].

Saflaştırma Basamağı	Spesifik Aktivite (U/mg)	Saflaştırma Katsayısı	% Verim	Protein Bileşimi
Sülfat Çöktürmesi	1-1.4	1	100	Ağırlıkları 10-250 kDa aralığında olan 17 farklı protein vardır. Bunlardan β -glukuronidaz ve β -N-asetil-glukozaminidaz tespit edilebilmiştir.
Afinite Kromatografisi (Sepharose Blue)	42-59	40-42	3-97	Ağırlıkları 10-160 kDa aralığında olan proteinler vardır. Bunlardan β -glukuronidaz ve β -N-asetil-glukozaminidaz tespit edilebilmiştir.
Immunoafinite Kromatografisi	2940-3157	2255-2870	2-69	Ağırlıkları 10-160 kDa aralığında olan proteinler vardır. Bunlardan β -glukuronidaz ve β -N-asetil-glukozaminidaz tespit edilebilmiştir ve 90 kDa ağırlığında belirgin bir bant gözlenmiştir.
Anyon Değişim Kromatografisi	4450-4735	3382-4305	2-37	90 kDa ağırlığında belirgin büyük bir bant gözlenmiştir ve 10-160 kDa aralığında proteinler olduğu bulunmuş ve β -N-asetil-glukozaminidaz tespit edilebilmiştir.
Dışlama (Exclusion) Kromatografisi	6708-8523	6087-7749	2	90 kDa ağırlığında küçük bir bant gözlenmiştir ve 90 kDa üstündeki proteinler tespit edilmiştir.

Enzimin saflığının kontrolü için SDS-PAGE uygulanmıştır. Araştırmamızda, saflaştırılan enzim için SDS-PAGE uygulanmıştır. Molekül ağırlığı 55 kDa'dan daha yüksek olduğu bulunmuş ve tahmin edilen BTH enzimi tek bant olarak SDS-PAGE jelinde gözlenmiştir. Bu değer literatürle uygunluk göstermektedir. BTH'nin molekül ağırlığını SDS-PAGE ile Hoechstetter J. ve arkadaşları 58 kDa'dan büyük olarak belirlemişlerdir [35].

Çalışmamızın bu bölümünde sığır testisinden saflaştırılan BTH enzimi üzerinde Kanamisin sülfat, Sodyum ampisilin, Oksitetrasiklin, Linkomisin-HCl, Gentamisin sülfat, Penisilin G-Potasyum, Trimetoprim ve Sülfametaksazol antibiyotiklerinin *in vitro* etkisi incelenmiştir. Bu amaçla özellikle antibiyotik olarak kullanılan moleküller suda çözünmedikleri için eczaneden ve veteriner kliniklerinden flakon şeklinde enjekte edilebilen formları seçilmiştir. Bu antibiyotiklerin seçilmesinin en önemli nedeni klinikte ve veterinerlik çalışmalarında oldukça sık bir şekilde kullanılmasıdır. Giriş bölümünde ayrıntılı bir şekilde belirtildiği gibi önemli fizyolojik fonksiyonlara sahip bu enzim üzerine söz konusu antibiyotiklerin nasıl etkili olduğunun saptanmasının önemli olduğu düşüncesindeyiz. Ayrıca bu antibiyotiklerin çeşitli çalışmalarda [122] semenlerden elde edilen hyalüronidazların motilite (hareketliliği) ve bakteriyolojik ataklara karşı etkisinin araştırılmasına dair bilgilere ulaşmamıza rağmen BTH enzimi üzerindeki etkilerin hakkında literatürde herhangi bir bilgiye rastlanmamış olması çalışmanın orjinalliğini daha da arttırdığı kanısındayız. İnhibisyona neden olan antibiyotiklerin inhibisyon etkisi IC₅₀ değerleri bulunarak verilmiştir. Bazı araştırmacıların inhibisyon etkisini tespit etmek için IC₅₀ değerini kullandıkları bilinmektedir. Bu amaçla substrat derişimleri sabit tutularak, değişik antibiyotik derişimlerinde, yüzde aktivite belirlenmekte ve daha sonra grafik yolu ile % 50 inhibisyona sebep olan antibiyotik derişimi hesaplanmaktadır. Bu yöntem, IC₅₀ değerleri sığır testis örneklerinden saflaştırılan BTH enzimi için tespit edilmiştir. Söz konusu antibiyotiklerin, saf enzim üzerinde çalışılması sonuçların güvenilirliği açısından önemli olduğu düşüncesindeyiz. Çünkü saf olmayan herhangi bir biyolojik sıvıda uygulanan bileşiklerin, istenilen enzimle etkileşmesi diğer nonspesifik proteinler tarafından engellenebilir.

Çalışılan antibiyotikler içerisinde 0.032 mM (0.009 mg/mL) IC₅₀ değeriyle Trimetoprim en güçlü inhibitör olarak bulunmuştur. Diğer bileşiklerin Kanamisin sülfat, Sodyum ampisilin, Oksitetrasiklin, Linkomisin-HCl, Gentamisin sülfat,

Penisilin G-Potasyum ve Sülfametaksazol çalışılan derişimlerde enzimi belirli ölçüde inhibe ettiği gözlenmiştir. Elde edilen Trimethoprim antibiyotiğinin inhibisyon özelliğini semen hyalüronidazı üzerine *in vitro* ve *in vivo* olarak çalışılan başka çalışma da desteklemektedir [122].

Literatürde söz konusu antibiyotikler ile yapılan *in vivo* çalışmalarda da bazı enzimler üzerinde inhibisyon etkisi gösterdikleri belirtilmektedir. Gentamisin sülfat, sıçanlara kas içine uygulandıktan 3 saat sonra eritrositlerde bulunan Karbonik anhidraz enzim aktivitesi üzerinde önemli bir inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir [116]. Benzer şekilde penisilin grubu antibiyotiklerinden sodyum ampisilin de sıçan eritrositlerinde bulunan Karbonik anhidraz enzim aktivitesi üzerinde 3 saat sonunda inhibisyona neden olduğu bildirilmektedir [123]. Sodyum ampisilin antibiyotiği için elde edilen sonuçlardan farklı olarak; yapılan bir çalışmada, sıçanlara uygulanan sodyum ampisilin uygulandıktan 2,4 ve 6 saat sonunda 6-fosfaglukonat dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı gösterilmiştir [124]. Ayrıca Gentamisin sülfat ve Sodyum ampisilin serum fPON1 enzimi üzerinde önemli bir inhibisyona sebep olduğu karaciğer fPON1 enzimi üzerinde aynı etkiyi göstermediği saptandığı belirtilmektedir [89]. Yukarıda belirtilen antibiyotiklerin, karaciğerde bulunan herhangi bir enzim aktivitesi üzerine etkisi konusunda *in vivo* bir çalışmaya rastlanmamıştır [89].

BTH enzimi üzerindeki etkisi incelenen antibiyotiklerden Sodyum ampisilin *in vitro* enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi olduğu bulunmuştur. Yapılan araştırmalarda, Sodyum ampisilin antibiyotiğinin saflaştırılmış ksantin oksidaz (XO) enzimi üzerindeki *in vitro* etkisi incelenmiş ve aktivasyon etkisi olduğu bulunmuşken [125] insan Karbonik anhidraz ve Glukoz 6 fosfataz enzimleri üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği bulunmuştur [126, 127].

Günümüzde bilinçsizce kullanılan ve giderek artan antibiyotik kullanımı insan neslinin daha zayıf ve bakterilerin daha güçlü olmalarına neden olduğu bildirilmektedir [128]. Bunun nedeni antibiyotik belirli dozda ve belirli süre kullanıldığında ancak etki edebildiği, mikroorganizmaları yok etmektedir. Bilinçsizce kullanım sonucu söz konusu mikroorganizmalar kullanılan antibiyotiğe direnç geliştirmekte ve daha etkili antibiyotiklere ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca

antibiyotiklerin vücuda alındıktan 2–12 saat arasında değişen bir süre sonra maksimum etki gösterdikleri bilinmektedir [128].

Çalışmamızda seçtiğimiz ağır metallerin ve bazı pestisitlerin sıgır testisinden saflastırılan BTH enzimi üzerindeki *in vitro* etkisi araştırılmıştır. İnhibisyona neden olan metal ve pestisitlerin inhibisyon etkisi IC₅₀ değerle verilmiştir. Bu amaçla substrat derişimleri sabit tutularak, değişik inhibitör derişimlerinde, yüzde aktiviter belirlenmiş ve daha sonra grafik yolu ile % 50 inhibisyona sebep olan inhibitör derişimi hesaplanmıştır.

Farklı ağır metal ve pestisitlerin IC₅₀ değerlerini bulmak için optimum şartlarda hyalüronik asit substratının 12.3 mM sabit derişiminde çalışıldı. Elde edilen sonuçlar Tablo 3:13 ve Tablo 3:16'da verildi.

Uygulanan iyon ve ağır metaller içinde, 1.313 mM (0.356 mg/mL) gibi çok düşük derişimde aktiviteyi % 50 azaltması ile HgCl₂ en kuvvetli inhibitör olarak tespit edilmiştir. Literatürde bu ağır metallerin ve iyonların hyalüronik asit substratı kullanılarak BTH enzimi için inhibisyon değerleri ile çalışmamız sonucunda elde edilen değerlerin uyumlu olması dikkate değer olduğu düşüncesindeyiz [129].

Çalışmamızda adı geçen pestisitlerin BTH enzimi üzerine etkileri ile ilgili çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Uygulanan pestisit etken maddelerinin içinde, 0.718 mM (0.249 mg/mL) gibi çok düşük derişimde aktiviteyi % 50 azaltması ile Giberallik asit etken maddesine sahip Agro-Gibb ticari isimli kimyasal en kuvvetli inhibitör olarak tespit edilmiştir. Bu amaçla substrat derişimleri sabit tutularak, değişik antibiyotik derişimlerinde, yüzde aktiviter belirlenerek ve daha sonra grafik yolu ile % 50 inhibisyona sebep olan pestisit etken maddelerinin derişimi hesaplanmıştır. Söz konusu pestisit etken maddelerinin, saf enzim üzerinde çalışılması sonuçların güvenilirliği açısından önemli olduğu düşüncesindeyiz. Çünkü saf olmayan herhangi bir biyolojik sıvıda uygulanan bileşiklerin, istenilen enzimle etkileşmesi diğer nonspesifik proteinler tarafından engellenebilir.

BTH enzimi üzerine yukarıda belirttiğimiz sonuçlarımızın yanında literatürde diğer enzimler üzerine ağır metal, iyon ve pestisitlerin yapılan pek çok çalışmada inhibisyonuna neden olduğu bulunmuştur. Örneğin insan karaciğerinden saflastırılan PON1 enzimi üzerinde EDTA bileşiğinin, Mg⁺², Co⁺², Ba⁺², La⁺³, Zn⁺², Cu⁺², Hg⁺²

gibi metallerin ve p-hidroksiciva benzoatın inhibisyon etkisi gösterdiği bildirilmektedir [130].

A. Pla ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada fare karaciğerinden saflaştırılmış PON1 ve PON3 üzerinde bazı metal iyonlarının inhibisyon etkisi incelenmiştir. Yapılan bu çalışmada Co, Cu, Mn, ve Hg'nin inhibisyon tipleri tespit edilmiş olup PON1 için Hg'nin PON3 için Cu'nun en kuvvetli inhibitör olduğu bulunmuştur [131].

Gencer N. ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 4 pestisit (Purtapyr ((RS)-5-etil-2-(4-izopropil-4-metil-5-okzo-2-imidazolin-2-yl) nikotinik asit), Practicur (Propil-3-(dimetilamino), Agroform (2,4-Diklorofenoksiasetik asit dimetilamin) ve Roundup (N-(Fosfonometil) glisin)) serum PON1Q ve R izoenzim aktiviteleri üzerine etkisi araştırılmış ve bu bileşiklerin hepsinin farklı derecede inhibisyon etkisi gösterdiği saptanmıştır [132].

Sepharose-4B-L-tirozin-m-anisidin yapılı afinite jeli kullanılarak saflaştırılan BTH enziminin kinetik sabitleri (K_M ve V_{max}) hyalüronik asit bileşiği substrat olarak kullanılarak belirlenmiştir. Lineweaver-Burk grafiklerinden elde edilen K_M ve V_{max} değerleri hyalüronik asit substrat olarak kullanıldığında sırasıyla 2.23×10^{-3} M ve 19.85 U/mL olarak bulunmuştur. Literatürde BTH enziminin hyalüronik asit substratına karşı V_{max} ve K_M değerleri tarafımızdan tespit edilen V_{max} ve K_M değerleri ile benzerlik göstermektedir [35,129,133].

Sonuç olarak yapılan çalışmalarda aşağıdaki bulgular elde edilmiştir.

- ✓ Sığır testisinden BTH enzimini saflaştırmak için *Sepharose 4B-L-tirozin –m-anisidin* kimyasal yapısına sahip yeni bir afinite kromatografisi jeli sentezlenmiştir.
- ✓ *Sepharose 4B-L-tirozin-m-anisidin* yapısına sahip afinite jeli kullanılarak sığır testisinden BTH enzimini yüksek verimde ve yapılan literatür araştırmasında daha önce yapılan çalışmalardan yüksek saflaştırma derecesinde enzim saflaştırılmıştır.

- ✓ *Sepharose 4B-L-tirozin -m-anisidin* kimyasal yapısına sahip yeni afinite kromatografisi jelinin farklı pH'larda ve iyonik şiddette kolon şartları araştırılarak çalışmamızda kullanılan tamponların kriterleri bulunmuştur.
- ✓ Amonyum sülfat çöktürmesi ve afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırılan BTH enzimi SDS-PAGE elektroforezinde yaklaşık 55 kDa molekül ağırlığında tek bant elde edilmiştir.
- ✓ Yaygın olarak kullanılan aminoglikozit grubu antibiyotiklerden Gentamisin sülfat ve Kanamisin sülfat, penisilin grubu Sodyum ampisilin, Penisilin G-Potasyum ve diğer antibiyotik türlerinden olan Oksitetrasiklin, Linkomisin-HCl, Trimetoprim ve Sülfametaksazol antibiyotiklerinin BTH enzim aktivitesini *in vitro* olarak farklı düzeylerde etkilediği saptanmıştır.
- ✓ Söz konusu antibiyotikler *Sepharose 4B-L-tirozin -m-anisidin* yapısına sahip afinite jeli ile saflaştırılan BTH enzim aktivitesi üzerine *in vitro* olarak yapılan çalışmalarda; Gentamisin sülfat, Kanamisin sülfat, Sodyum ampisilin, Penisilin G-Potasyum, Oksitetrasiklin, Linkomisin-HCl, Trimetoprim ve Sülfametaksazol antibiyotiklerinin inhibisyon etkisi gösterdiği saptanmıştır.

5. KAYNAKLAR

- [1] Şimşek, G., “Kemik Defektlerinin İyileşmesinde Hyaluronik Asit Ve Heterojen Kemik Greftinin Etkilerinin Histopatolojik İncelenmesi” , Doktora Tezi, *Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ağız-Diş-Çene Hastalıkları Ve Cerrahisi Anabilim Dalı, Atatürk, (2004).*
- [2] Meyer, K., Hobby, G., Chaffee, E. and Dawson, M. H. *Proc Soc Exptl Biol Med* 44, 294, (1940).
- [3] Duran,R. and Exaltation, F., “l'activite du virus vaccinal par les extraits de certain organes.”, *CR Seances Soc Biol Fil* 99, 6-7, (1928).
- [4] Meyer, K. and Palmer, J. W. “The polysaccharide of the vitreous humor.”, *J Biol Chem* 107(3), 629-34, (1934).
- [5] Meyer, K., Dubos, R. and Smyth, E. M. “The hydrolysis of the polysaccharide acids of vitreous humor, of umbilical cord and of streptococcus by the autolytic enzyme of pneumococcus.” *J Biol Chem* 118(1), 71-78, (1937).
- [6] Chain, E. and Duthie, E. S. “A mucolytic enzyme in testis extracts.” *Nature* 144, 977-78, (1939).
- [7] Meyer, K. “Hyaluronidases.” In: *The enzymes* (Boyer, P. D., ed) Vol. V, 3rd Ed., Academic Press, New York, London, 307-20, (1971).
- [8] Kreil, G. “Hyaluronidases - a group of neglected enzymes.” *Protein Sci* 4, 1666-9, (1995).
- [9] Frost, G. I., Csoka, T. and Stern, R. “The hyaluronidases: a chemical, biological and clinical overview.” *Trends Glycosci Glycotechnol* 8, 419-34, (1996).
- [10] Csoka, T. B., Frost, G. I. and Stern, R. Hyaluronidases in tissue invasion. *Invasion Metastasis* 17(6), 297-311, (1997).
- [11] Muckenschnabela, I., Bernhardta, G., Sprussa, T., Dietlb, B. and Buschauer, A. “Quantitation of hyaluronidases by the Morgan–Elson reaction:comparison of the enzyme activities in the plasma of tumor patients and healthy volunteers”, *Cancer Letters*, 131, 13–20, (1998).
- [12] Csokaa, A.B., Frost, G.I. and Stern, R., “The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes”, *Matrix Biology*, 20, 499-508, (2001).
- [13] Lepperdinger, G., Strobl, B. and Kreil, G. *HYAL2*, “A human gene expressed in many cells, encodes a lysosomal hyaluronidase with a novel type of specificity.” *J Biol Chem* 273(35), 22466-70, (1998).

- [14] Lepperdinger, G., Müllegger, J. and Kreil, G. "Hyal2 - less active, but more versatile?", *Matrix Biol* 20(8), 509-14, (2001).
- [15] Novak, U., Stylli, S. S., Kaye, A. H. and Lepperdinger, "G. Hyaluronidase-2 overexpression accelerates intracerebral but not subcutaneous tumor formation of murine astrocytoma cells." *Cancer Res* 59(24), 6246-50, (1999).
- [16] Chang, N. S. "Transforming growth factor-beta1 blocks the enhancement of tumor necrosis factor cytotoxicity by hyaluronidase Hyal-2 in L929 fibroblasts." *BMC Cell Biol* 3(1), 8, (2002).
- [17] Stern, R. "Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet?" *Glycobiology* 13, 12, 105R-15R, (2003).
- [18] Yudin, A. I., Li, M. W., Robertson, K. R., Cherr, G. N. and Overstreet, J. W., "Characterisation of the active site of monkey sperm hyaluronidase." *Reproduction* 121(5), 735-43, (2001).
- [19] Cherr, G. N., Yudin, A. I. and Overstreet, J. W. "The dual functions of GPI-anchored PH-20: hyaluronidase and intracellular signaling." *Matrix Biol* 20(8), 515-25, (2001).
- [20] Chain, E. and Duthie, E. S. "A mucolytic enzyme in testis extracts." *Nature* 144, 977-78, (1939).
- [21] Baumgartner, G. and Moritz, A. "*Hyaluronidase: Anwendung in der Onkologie*" Springer, Wien, Berlin, Heidelberg, New York, (1988).
- [22] Meyer, M. F., Kreil, G. and Aschauer, H. "The soluble hyaluronidase from bull testes is a fragment of the membrane-bound PH-20 enzyme.", *FEBS Lett* 413(2), 385-8, (1997).
- [23] Takagaki, K., Nakamura, T., Izumi, J., Saitoh, H., Endo, M., Kojima, K., Kato, I. and Majima, "MCharacterisation of hydrolysis and transglycosylation by testicular hyaluronidase using ionspray mass spectrometry." *Biochemistry* 33(21), 6503-7, (1994).
- [24] Highsmith, S., Garvin, J.H. and Chipman, D.M., "Mechanism of action of bovine testicular hyaluronidase. Mapping of the active site." *J Biol Chem* 250, 7473-80, (1975).
- [25] Hoffman, P., Meyer, K. & Linker, A., "Transglycosylation during the mixed digestion of hyaluronic acid and chondroitin sulfate by testicular hyaluronidase." *J Biol Chem* 219, 653-63, (1956).
- [26] Saitoh, H., Takagaki, K., Majima, M., Nakamura, T., Matsuki, A., Kasai, M., Narita, H. and Endo, M. "Enzymic reconstruction of glycosaminoglycan

oligosaccharide chains using the transglycosylation reaction of bovine testicular hyaluronidase.” *J Biol Chem* 270, 3741–47, (1995).

[27] Weissmann, B., “The transglycosylative action of testicular hyaluronidase.” *J Biol Chem* 216, 783–794, (1955).

[28] Gorham, S.D., Olavesen, A.H. and Dodgson, K.S., “Effect of ionic strength and pH on the properties of purified bovine testicular hyaluronidase.” *Connect Tissue Res* 3, 17–25, (1975).

[29] Cramer, J.A., Bailey, L.C., Bailey, C.A, and Miller, R.,T., “Kinetic and mechanistic studies with bovine testicular hyaluronidase.” *Biochim Biophys Acta* 1200, 315–21, (1994).

[30] Deschrevel, B., Tranchepain, F. and Vincent, J.C. “Chain-length dependence of the kinetics of the hyaluronan hydrolysis catalyzed by bovine testicular hyaluronidase.”, *Matrix Biol* 27, 75–486, (2008).

[31] Hofinger, E.S., Bernhardt, G. and Buschauer, A., “Kinetics of Hyal-1 and PH-20 hyaluronidases: comparison of minimal substrates and analysis of the transglycosylation reaction.” *Glycobiology* 17, 963–71, (2007).

[32] Nakatani, H. “Monte Carlo simulation of hyaluronidase reaction involving hydrolysis, transglycosylation and condensation.” *Biochem J* 365, 701–705, (2002).

[33] Bonner, W. M., Jr. and Cantey, E. Y. “Colorimetric method for determination of serum hyaluronidase activity.” *Clin Chim Acta* 13(6), 746-52, (1966).

[34] Saitoh, H., Takagaki, K., Majima, M., Nakamura, T., Matsuki, A., Kasai, M., Narita, H. and Endo, M. “Enzymic reconstruction of glycosaminoglycan oligosaccharide chains using the transglycosylation reaction of bovine testicular hyaluronidase.” *J Biol Chem* 270(8), 3741-47, (1995).

[35] Hoechstetter, J., “Characterisation of bovine testicular hyaluronidase and a hyaluronate lyase from *Streptococcus agalactiae*”, *Regensburg University*, (2005).

[36] Belem-Gonçalves, S., Tsan, P., Lancelin, J.M., Alves, T.L., Salim, V.M. and Besson, F., “Interfacial behaviour of bovine testis hyaluronidase” *Biochem. J.* 398, 569-76, (2006).

[37] Gmachl, M. and Kreil, G. “Bee venom hyaluronidase is homologous to a membrane protein of mammalian sperm.” *Proc Natl Acad Sci* 90(8), 3569-73, (1993).

[38] Allalouf, D., Ber, A. and Ishay, J. “Properties of testicular hyaluronidase of the honey bee and oriental hornet: comparison with insect venom and mammalian hyaluronidases.” *Comp Biochem Physiol B* 50, 2B, 331-7, (1975).

- [39] Padavattan, S., Schirmer, T., Schmidt, M., Akdis, C., Valenta, R., Mittermann, I., Soldatova, L., Slater, J., Mueller, U. and Markovic-Housley, Z., "Identification of a B-cell epitope of hyaluronidase, a major bee venom allergen, from its crystal structure in complex with a specific Fab.", *J Mol Biol.*, 368, 742-52, (2007).
- [40] Suzuki, S. "Microbial hyaluronan lyases.", (25 April 2013), <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA14/HA14E.html>, (2000).
- [41] Hynes, W., Walton, L. and S. L. "Hyaluronidases of Gram-positive bacteria." *FEMS Microbiol Lett* 183(2), 201-7, (2000).
- [42] Coutinho, P. M. and Henrissat, B. "Carbohydrate-Active Enzymes server at" URL: <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>, (1999).
- [43] Jedrzejewski, M. J. and Chantalat, L. "Structural studies of *Streptococcus agalactiae* hyaluronate lyase." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56(4), 460-3, (2000).
- [44] Pritchard, D. G., Trent, J. O., Li, X., Zhang, P., Egan, M. L. and Baker, J. R. "Characterisation of the active site of group B streptococcal hyaluronan lyase." *Proteins* 40(4), 675, (2000).
- [45] Jedrzejewski, M. J. "Three-dimensional structures of hyaluronate lyases from *Streptococcus* species and their mechanism of hyaluronan degradation." (16 April 2013), <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA24/HA24E.html>, (2002).
- [46] Pritchard, D. G., Lin, B., Willingham, T. R. and Baker, J. R. "Characterisation of the group B streptococcal hyaluronate lyase." *Arch Biochem Biophys* 315(2), 431-37, (1994).
- [47] Li, S., Kelly, S. J., Lamani, E., Ferraroni, M. and Jedrzejewski, M. J. "Structural basis of hyaluronan degradation by *Streptococcus pneumoniae* hyaluronate lyase." *Embo J* 19(6), 1228-40, (2000).
- [48] Li, S. and Jedrzejewski, M. J. "Hyaluronan binding and degradation by *Streptococcus agalactiae* hyaluronate lyase." *J Biol Chem* 276 (44), 41407-16, (2001).
- [49] Baeurle, S.A., Kiselev, M.G, Makarova, E.S., Nogovitsin, E.A. "Effect of the counterion behavior on the frictional-compressive properties of chondroitin sulfate solutions". *Polymer* 50(7), 1805-13, (2009).
- [50] Chun-Hung, L., Gwo-Jenn, S. and Chi-Huey W. "One-pot enzymatic sulfation process using 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate and recycled phosphorylated adenosine intermediates" , *The Scripps Research Institute*, (1996).
- [51] Trowbridge, J.M., Gallo, R.L., "Dermatan sulfate: new functions from an old glycosaminoglycan." *Glycobiology.*, 117-25, (2002).

- [52] Meyer, K., Rapport, M.,M., “The hydrolysis of chondroitin sulfate by testicular hyaluronidase.”, *Arch Biochem* 27 (2) , 287-93, (1950).
- [53] Fransson, L.A. and Roden, L., “Structure of dermatan sulfate. I. Degradation by testicular hyaluronidase.”, *J Biol Chem.*, 4161-9 , (1967).
- [54] Fransson, L.A. and Roden, L., “Structure of dermatan sulfate. II. Characterization of products obtained by hyaluronidase digestion of dermatan sulfate.”. *J Biol Chem*, 4170-5, (1967).
- [55] He, D., Xie, Q., Peng, H., Wei, W., Nie, L. and Yao, S., “Use of a quartz crystal impedance technique to monitor the degradation of chondroitin sulfate by hyaluronidase.” *Enzyme Microb Technol*, 5(29), 84-9, (2001).
- [56] Kennedy C. I., Haynes J. H. and Diegelmann, R. F., “Pages Proinflammatory cytokines differentially regulate hyaluronan synthase isoforms in fetal and adult fibroblasts” , *Journal of Pediatric Surgery*, 35 (6), 874–79, (2000).
- [57] Şimşek, G., (2004), “Kemik defektlerinin iyileşmesinde hyaluronik asit ve heterojen kemik greftinin etkilerinin histopatolojik olarak incelenmesi.” *Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*
- [58] Tsung-Chung, W.U., “Mixture of hyaluronic acid for treating and preventing peptic ulcer and duodenal ulcer.”, *European Patent Application*, 12, 806, (2011).
- [59] Takagaki, K., Kon, A., Kawasaki, H., Nakamura, T., Tamura, S., Endo, M. “Isolation and characterization of Patnopecten mid-gut gland endo-beta-xylosidase active on peptidochondroitin sulfate.” *J. Biol. Chem.* 265, 854-860, (1990).
- [60], Csokaa, A. B., Frostb, G. I. and Stern, R. “The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes” , *Matrix Biology*, 499-508, (2001).
- [61] Barsukov, A., K., Kozhevnikova, O. V. and Khokhryakova, A. V. “Isolation and Purification of Bovine Testicular Hyaluronidase” *Applied Biochemistry and Microbiology*, 39 (6), 549–52, (2003).
- [62] Topçu, S., (1998)., *Tarım Mühendisliğinde Çevre Sorunları.*, Adana.. Çukurova Üniversitesi Yayınları, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi.
- [63] Çepel, N., Toprak Kirliliği Erozyon ve Çevreye Verdigi Zararlar.Türkiye Erozyonla Mücadele, Ağaçlandırma ve Dogal Varlıkları Koruma Vakfı Yayın, 14, 3-35, (1997).
- [64] Rai, U.N., Tripathi, R.D., Vajpayee, P., Bioacumulation of Toxic Metals (Cr, Cd, Pb and Cu) by Seeds of Euryale Ferox Salisb. (Makhana).*Chemosphere* 46, 267-72. (2002).
- [65] Ceran, M., *İl Çevre Durum Raporu*, 53-61, Kayseri, (2004).

- [66] Pandey, N., Sharma, C.P., "Effect of Heavy Metals Co₂, Ni₂ and Cd₂ on Growth and Metabolism of Cabbage." *Plant Science* 163, 753-58. (2002).
- [67] Gençer, N., "Paraoksonaz Q Ve R İzoenzimlerinin Saflaştırılması Ve Bazı Çevre Kirleticilere Karşı Afinitesinin Araştırılması", *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı*, Balıkesir, (2008).
- [68] Karaca, G., Çelik, S., "Ağır Metallerin Bitkiler Üzerindeki Etkisi Nedir?", (20 April 2013), http://www.kimyaegitimi.org/sites/default/files/kuresel_isinma_projeleri/proje_tabanlı_ogrenme_modeli/agir_metallerin_bitkiler_uzerine_etkileri.pdf, (2010).
- [69] Cici, D., "İnsan Eritrositlerinden Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Enziminin Saflaştırılması Ve Bazı Pestisitlerin Enzim Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması" *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, Balıkesir, (2007).
- [70] Böke, M., "Pestisitlerin Ekolojik Sisteme Etkileri", (05 Mayıs 2013), <http://www.ekodenge.org.tr/tr/?p=509>, (2012).
- [71] Akın, P.P., "Pestisit kalıntılarının insan sağlığı üzerine etkisi", (29 Nisan 2013), http://www.tarimkutuphanesi.com/Pestisit_kalintilarinin_insan_sagligi_uzerine_etkisi_P.Pervin_AKIN_Il_Kontrol_Lab._Ziraat_Yuk._Muh._01260.html, (2007).
- [72] Amdur, M.O., Doull, J., Klassen, C.D., Casarett and Doull's Toxicology. "The basic science of poisons", *Pergamon Press*, New York 1033, (1991).
- [73] Guest, J.A., Copley, M.P., Homernic, K.L., "Carcinogenic effects of pesticides." *Pathol Pharmacol.*, 71 (3), 387-90, (1991).
- [74] Curley, F.D., "Arch. Environm." *Contam. Toxicol.*, (1977).
- [75] Ami, B.H., Haim, S. A., "Direct effect of phosphamidon on isolated working rat heart electrical and mechanical function." *Toxicol. Apply Pharmacol.*, 110 (3), 429-34, (1992).
- [76] Izushi, F., Ogata, M., "Hepatic and muscle injuries in mice treated with heptachlor" *Toxicol. Lett.* 54 (1), 47-54 (1990).
- [77] Weizman, Z., Sofer, S., "Acute pancreatitis in children with anticholinesterase insecticide intoxication". *Pediatrics*.204-6, (1992).
- [78] Blasiak, J., Walter Z. and Bawronska, M., "The changes of osmotic fragility of pig organophosphorus insecticides." *Acta Biochim.* 38 (1), 75-80. (1991).
- [79] Datta, C., Gupta, J., Sarkar, A., Sengupta, D., "Effects of organophosphorus insecticide phosphomidon on antioxidant defence components of human erythrocyte and plasma." *Indian J. Exp. Biol.* 30 (1), 65- 6, (1992).

- [80] Pope, C.N., Charracorti, T.K., “Dose-related inhibition of brain and plasma cholinesterase in neonatal and adult rats following sublethal organophosphate exposures.” *Toxicology*, 73, 35-42, (1992).
- [81] Philip, G.H., Reddy, P.M. and Sridevi, G., “Cypermethrin-induced in vivo alterations in the carbohydrate metabolism of freshwater fish, *Labeo rohita*.” *Ecotoxicol Environ* 31 (12), 173-8, (1995).
- [82] Izushi, F., Ogata M., “Hepatic and muscle injuries in mice treated with heptachlor”, *Toxicol Lett.* 54 (1), 47-54, (1990).
- [83] Brovwer, E.J., Evelo, C.T., Verplanke, A.J., van Welie, R.T., and Wolf, F.A., “Biological effect monitoring of occupational exposure to 1,3 dichloropropene : effects on liver and renal function and on glutathione conjugation.” *Br. J. ind. Med.* 48 (3), 167-172, (1991).
- [84] Aksoy, K., “Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enziminin yapısı” *Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları*, (1997).
- [85] Hollaran, N. and Kasım M.,U., “Meyve Ve Sebzelelerde Büyüme Düzenleyici Madde Kullanımı ve Kalıntı Düzeyleri” *GIDA* 27 (5), 351-59, (2002).
- [86] Davies, P. J., “Plant Hormones”, *P. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology.*, 2, 833, (1995).
- [87] Akgül, C., Ders Notları. *Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü, Biyokimya ABD*
- [88] Ommaty, R., “Vademecum”, Hacettepe Taş Kitapçılık, Ankara, 220-1138, (2004).
- [89] Sinan, S., (2005). İnsan Serum Paraoksonaz Enziminin Yeni Bir Yöntemle Saflaştırılması Ve Bazı Antibiyotiklerin Enzim Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması., Doktora Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı*, Balıkesir.
- [90] Erat, M., Sakiroglu, H. and Ciftci, M., “Purification and characterization of glutathione reductase from bovine erythrocytes”, *Prep. Biochem. Biotechnol.* 33 (4), 283, (2003).
- [91] Umeki, S., “Anti-inflammatory action of gentamycin through inhibitory effect on neutrophil NADPH oxidase activity”, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 110 (4), 817, (1995).
- [92] Beydemir, S., Kulacoglu, D., Ciftçi, F. and Küfrevioğlu, Ö.I., “The effects of some antibiotics on sheep lens glucose 6-phosphate dehydrogenase in vitro”, *Eur. J. Ophthalmol.*, 13, 155, (2003).

- [93] Beydemir, Ş., Çiftçi, M., Özmen, İ., Okuroğlu, M.E.B., Özdemir, H. and Küfrelioğlu, Ö.İ., “Effects of Some Medical Drugs on Enzyme Activities of Carbonic Anhydrase from Human Erythrocytes in vitro and from Rat Erythrocytes in vivo”, *Pharmacological Research*, 42, 187, (2000).
- [94] Beyaztaş, S., “Ksantin oksidaz (XO) enziminin saflaştırılması için yeni bir afinite jelinin sentezi, saflaştırılan enzim ile tiyosemikarbazon türevlerinin biyotransformasyonu ve bazı antibiyotiklerin enzim üzerindeki etkilerinin araştırılması” *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı*, Balıkesir, (2010).
- [95] Acar, J. F. “β- Lactamase inhibition: Pharmacology Antimicrobial Activity and Pharmacokinetics”, *Advanced Therapeutics Communications, Inc, Secausus, N.Jersey*, (1985).
- [96] Barza, M., “Penicilins”, *Handbook of Drug Therapy*'de (ed. R.R.Miller ve D.J. Greenblatt), *Elsevier*, 1, Newyork, (1979).
- [97] Cole, P., and Roberts, D.E., “Ampicillin and alternatives”, *Brit. Med.j.* 286, 1147, (1989).
- [98] Perçin, S. , Cantürk, M. ve Obuz, V., “Farmakoloji” , Ankara , (1992).
- [99] Nizamlioğlu, F., “Sülfonamid-trimetoprim kombinasyonu uygulanan broyler piliçlerin plazma, kırmızı kas ve karaciger ilaç düzeyleri ve atılma sürelerinin araştırılması.” *Veterinarium.* 3 (2), 22-27, (1992).
- [100] Pena, M. S., Acedo, M. J., Salinas, F., Mahedero, M. C. and Aron, J. J. “Analysis of sulfamethazine in the presence of sulfamerazine or sulfadiazine by firstderivative photochemically induced fluorescence.” *J Pharm Biomed Anal.* 13, 1107-12, (1995).
- [101] Kaya, S. “Kemoterapötikler”, *Veteriner Uygulamalı Farmakoloji*. Editörler: Kaya S., Pirinççi, A. Bilgili. 2. Baskı. 2. Cilt. A. Medisan Yayınevi.Ankara., 267-440, (2000).
- [102] Sahindokuyucu, F. “Sağlıklı ve koksidiyozlu etlik piliçlerde sülfakinoksalinin farmakokinetiği”, *Doktora Tezi, Türkiye Cumhuriyeti Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, (2003).
- [103] “Sulfamethoxazole”, (05May2013), <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/s7507?lang=en®ion=TR>.
- [104] “Oxytetracycline-Hydrochloride”, (05 May 2013), THE MERCK INDEX. 12th Ed.Merck&Co.,Inc.WhitehouseStation.USA.(1996),http://www.merckmillipore.com/life-science-research/oxytetracycline-hydrochloride/EMD_BIO-500105/p_qpKb.s1LAAoAAAEWhmEfVhTm.

- [105] Akman, M. Ş., (1974). Farmakoloji. Ankara Üniv. Basımevi. Ankara.
- [106] Kaya, S., (2002). Antibiyotikler. Alınmıştır: *Veteriner Hekimliğinde Farmakoloji*. Editörler: S. Kaya, İ. Pirinççi, A. Bilgili. Baskı 3. Cilt 2. Medisan Yayınevi. Ankara., 267-423.
- [107] Şanlı, Y., (1991), *Veteriner Farmakoloji Kemoterapotik İlaçlar*, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları, No: 412 Ankara.
- [108] Berkan, T., “Makrolid ve Linkozamidler”, İçinde Bökesoy TA, Çakıcı İ ve Mellı M, *Farmakoloji Ders Kitabı*, 548-552, Gazi Kitabevi: Ankara. (2000).
- [109] Kaya, S., (2000). Antibiyotikler, (eds), Kaya, S., Pirinççi, İ., Bilgili, A. *Veteriner Uygulamalı Farmakoloji*, 2, 28, 52, Medisan Yayın Serisi, Ankara.
- [110] Şener, S. (2006) *Veteriner Farmakoloji*, İstanbul Üniversitesi Yayınları, 4671, İstanbul.
- [111] Kayaalp, S.O., (2002), Kemoterapi, 185-312, İçinde Kayaalp SO (eds), *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*, Hacettepe-Taş Yayınları, Ankara.
- [112] Csokaa, A.B., Frost, G.I. and Stern, R., “The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes”, *Matrix Biology*, 20, 499-508, (2001).
- [113] Bradford, M. M., , “A rapid and sensitive method for the quantitaion of microgram quantites of protein utilizing the principle of protein-dye binding”, *Anal. Biochem.*, 72, 248, (1976).
- [114] Laemelli, D. K., “Cleavage of structural pteins during in assembly of the head of bacteriophage T₄”, *Nature*, London, 227-680, (1970).
- [115] Keha, E.E., “Karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması için geliştirilmiş bir afinite kromatografisi metodu”, Doçentlik Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Erzurum.
- [116] Beydemir, Ş., Çiftçi, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., Büyükokuroğlu, M.E., “Effects of Gentamicin Sulfate on Enzyme Activities of Carbonic Anhydrase from Human Erythrocytes *in Vitro* and from Rat Erythrocytes *in Vivo*”, *Biological-Pharmaetucal Bulletin*, 25 (8), 966, (2002).
- [117] Arslan, O., Inhibition of bovine carbonic anyhdrase by new sulfonamide compounds. *Biochemistry (Moscow)* 66 (9), 1206-1208, (2001).
- [118] Meyer, K. “Hyaluronidases”. In: *The enzymes* (Boyer, P. D., ed) 5, 3 Ed., Academic Press, New York, London, 307-20, (1971).
- [119] Kreil, G., “Hyaluronidases - a group of neglected enzymes.” *Protein Sci* 4 (9), 1666-9, (1995).

- [120] Frost, G. I., Csoka, T. and Stern, R. "The hyaluronidases: a chemical, biological and clinical overview". *Trends Glycosci Glycotechnol* 8, 419-34, (1996).
- [121] Csoka, T. B., Frost, G. I. and Stern, R. "Hyaluronidases in tissue invasion". *Invasion Metastasis* 17 (6), 297-311, (1997).
- [122] Tanyıldızı, S. and Bozkurt T., "The Effects of Lincomycin-Spectinomycin and Sulfamethoxazole-Trimethoprim on Hyaluronidase Activities and Sperm Characteristics of Rams." *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*.
- [123] Ozer N., Muftuoglu M., Ataman D., Ercan A. and Ogus I.H., " Simple, high-yield purification of xanthine oxidase from bovine milk" *J. Biochem. Biophys. Methods* 39, 152- 159, (1999).
- [124] Çiftçi, M., Beydemir, Ş., Yılmaz, H. and Bakan, E., "Effects of some drugs on rat erythrocyte 6-phosphogluconate dehydrogenase: an *in vitro* and *in vivo* study", *Polish Journal of Pharmacology*, 54, 275-280. (2002).
- [125] Beyaztaş, S., "Ksantin oksidaz (XO) enziminin saflaştırılması için yeni bir afinite jelinin sentezi, saflaştırılan enzim ile tiyosemikarbazon türevlerinin biyotransformasyonu ve bazı antibiyotiklerin enzim üzerindeki etkilerinin araştırılması" *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı*, Balıkesir, (2010).
- [126] Beydemir, Ş., Çiftçi, M., Özmen, İ., Okuroğlu, M.E.B., Özdemir, H. and Küfrevioğlu, Ö.İ., "Effects of Some Medical Drugs on Enzyme Activities of Carbonic Anhydrase from Human Erythrocytes *in vitro* and from Rat Erythrocytes *in vivo*", *Pharmacological Research*, 42, 187, (2000).
- [127] Çiftçi, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., Gündoğdu, M. and Özmen, İ., "Effects of Some Antibiotics on Enzyme Activity of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from Human Erythrocyte", *Pharmacol Res.*, 41, 109, (2000).
- [128] Ommaty, R., Vademecum, Hacettepe Taş Kitapçılık, Ankara, 220-1138. (2004).
- [129] "Carbohydrate Chemistry: Macromolecules", (26 April 2013), http://books.google.com.tr/books?id=r34xlcVQzeYC&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false.
- [130] Pellin, MC., Moretto, A., Lotti, M., Vilanova, E., "Distribution and biochemical properties of rat paraoxonase activity *Neurotoxicol Teratol*" 12, 611-614. (1990).
- [131] A. Pla , L. Rodrigo, A.F. Hern'andez, F. Gil, O. Lopez." Effect of metal ions and calcium on purified PON1 and PON3 from rat liver". *Chemico-Biological Interactions* 167, 63–70,(2007).

[132] Gençer, N., “Paraoksonaz Q Ve R İzoenzimlerinin Safılaştırılması Ve Bazı Çevre Kirleticilere Karşı Afinitesinin Araştırılması”, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı*, Balıkesir, (2008).

[133] Krishnapillai, Ashok M. and Taylor, K. D. Anthony and Morris, Anne E. J. and Quantick, P.C. Characterisation of Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) hyaluronidase and comparison with sheep and bovine testicular hyaluronidase. *Food Chemistry*, 65 (4), 515-521, (1999).