



## ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.  
2016; 30 (2): 95 - 101  
http://www.fusabil.org

### Kuzu Karaciğerinden Saflaştırılan Sitolik $\beta$ -Glukozidaz Aktivitesine Albendazol, Rikobendazol ve Eprinomectinin İnhibisyon Etkileri: *in vitro*\*

Hatibe KARA<sup>1</sup>  
Dilek AKŞİT<sup>2</sup>  
Hasan AKŞİT<sup>1</sup>  
Onur YILDIZ<sup>1</sup>  
Kamil SEYREK<sup>3</sup>  
Yusuf TURAN<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Balıkesir Üniversitesi,  
Veteriner Fakültesi,  
Biyokimya Anabilim Dalı,  
Balıkesir, TÜRKİYE

<sup>2</sup> Balıkesir Üniversitesi,  
Veteriner Fakültesi,  
Farmakoloji ve Toksikoloji  
Anabilim Dalı,  
Balıkesir, TÜRKİYE

<sup>3</sup> Balıkesir Üniversitesi,  
Tıp Fakültesi,  
Tıbbi Biyokimya Anabilim  
Dalı,  
Balıkesir, TÜRKİYE

<sup>4</sup> Balıkesir Üniversitesi,  
Fen Edebiyat Fakültesi,  
Biyoloji Bölümü,  
Balıkesir, TÜRKİYE

Geliş Tarihi : 25.01.2016  
Kabul Tarihi : 22.03.2016

#### Yazışma Adresi Correspondence

Hatibe KARA

Balıkesir Üniversitesi,  
Veteriner Fakültesi,  
Biyokimya Anabilim Dalı,  
Balıkesir - TÜRKİYE

hatbertuk@yahoo.com

Albendazol (ABZ), rikobendazol (RBZ) ve eprinomectin (EPM) sığır, koyun ve keçilerde yaygın olarak kullanılan antiparaziter ilaçlardır. ABZ karaciğerde okside olarak RBZ aktif metabolite dönüşür. Bu çalışmada, ABZ, RBZ ve EPM'nin karaciğer enzimlerinden sitozolik  $\beta$ -glukozidaz aktivitesine etkileri araştırıldı. Bunun için sitozolik  $\beta$ -glukozidaz kuzu karaciğerinden saflaştırıldı. Saflaştırma işlemi amonyum sülfat çöktürme ve hidrofobik etkileşim kromatografisi yöntemleriyle iki aşamada gerçekleştirildi. İşlemler sonunda enzimin %10.7 verimle 26.7 kat saflaştırıldığı hesaplandı. Saflaştırılan enzim sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)'de yaklaşık 55 kDa'da tek bant olarak görüntüledi.

ABZ, RBZ ve EPM'in saflaştırılan kuzu karaciğer sitozolik  $\beta$ -glukozidazına *in vitro* etkisi *p/o*-NPG substratları kullanılarak tespit edildi. İlaçların inhibisyon etkisinin belirlenmesi için % aktiviteye karşı ilaç konsantrasyonu grafiği kullanıldı. Her iki substrat kullanılarak yapılan çalışmada ABZ'ün enzim aktivitesini değiştirmedeği tespit edildi. EPM'in enzim aktivitesini düşürdüğü ancak etkisinin kuvvetli olmadığı görüldü. RBZ'ün ise enzimi inhibe ettiği belirlendi. Enzim aktivitesini yarıya düşüren RBZ konsantrasyon değerlerinin *p/o*-NPG substratları için sırasıyla 4.8 ve 5.9 mM olduğu tespit edildi. RBZ'ün hem *p*-NPG hem de *o*-NPG substratları varlığında enzimi yarışmalı olarak inhibe ettiği belirlendi ve Ki değerlerinin sırasıyla  $3.9 \times 10^{-5} \pm 0.3 \times 10^{-5}$  ile  $1.5 \times 10^{-5} \pm 0.1 \times 10^{-5}$  olduğu hesaplandı.

Bu çalışmada ABZ ve EPM'in kuzu karaciğer sitozolik  $\beta$ -glukozidazını inhibe etmezken RBZ'ün enzimi inhibe ettiği tespit edildi. Ancak ABZ'ün de *in vivo* ortamda çok hızlı bir şekilde RBZ'e metabolize olması ABZ'ün de enzim aktivitesini dolaylı olarak olumsuz etkileyeceğini düşündürmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Kuzu karaciğeri,  $\beta$ -glukozidaz, enzim saflaştırma, antiparaziter ilaç

#### Inhibitory Effects of Albendazole, Ricobendazole and Eprinomectin on Purified Cytosolic $\beta$ -Glucosidase Activity Purified From Lamb Liver: An *in vitro* Study

Albendazole (ABZ), ricobendazole (RBZ) and eprinomectin (EPM) are commonly used antiparasitic drugs in cattle, sheep and goats. ABZ is oxidized in the liver and converted to its active metabolite RBZ. In this study, the effects of ABZ, RBZ and EPM were investigated on the cytosolic  $\beta$ -glucosidase activity of the liver enzymes. For this purpose, cytosolic  $\beta$ -glucosidase from lamb liver was purified. Purification was performed in two phases by ammonium sulfate precipitation and hydrophobic interaction chromatography methods. At the end of the procedures, it was calculated that the enzyme was purified 26.7 folds with a yield of 10.7%. The purified enzyme was visualized on SDS-PAGE as a single band at about 55kDa.

*In vitro* effects of ABZ, RBZ, EPM on purified lamb liver  $\beta$ -glucosidase with using *p/o*-NPG substrates were determined. % activity against drug concentration chart was used to determine the inhibitory effects of drugs. ABZ did not change the enzyme activity as determined with both substrates. EPM decreased the enzyme activity but its inhibition effect was not strong. RBZ was determined that it inhibite the enzyme. It was determined RBZ concentration reducing by half the enzyme activity for the substrates *p/o*-NPG were 4.8 and 5.9 mM, respectively. It was determined that RBZ had competitive inhibition both against *p/o*-NPG substrates, and Ki values were calculated as  $3.9 \times 10^{-5} \pm 0.3 \times 10^{-5}$  and  $1.5 \times 10^{-5} \pm 0.1 \times 10^{-5}$  mM, respectively.

In this study, RBZ inhibited the enzyme while ABZ and EPM did not inhibit lamb liver cytosolic  $\beta$ -glucosidase. However ABZ also be metabolized very rapidly to RBZ *in vivo* is thought to ABZ indirectly affect the enzyme activity adversely.

**Key Words:** Lamb liver,  $\beta$ -glucosidase, enzyme purification, antiparasitic drug

#### Giriş

$\beta$ -glukozidazlar iki glikon rezidüsü ya da bir karbohidrat ile aglikon rezidüleri arasındaki  $\beta$ -glikozidik bağı hidroliz eden enzimlerdir.  $\beta$ -glukozidazların bakteri, mantar, bitki ve hayvan dokularında yer aldığı ve birçok biyolojik işlevde anahtar rol oynadıkları bilinmektedir (1). Bu enzimler Aile 1 ve Aile 3 glikozid hidrolazlar üyeleri arasında

\* 6. Ulusal Veteriner Biyokimya ve Klinik Biyokimya Kongresi, 25-27 Haziran 2013, Kars/TÜRKİYE.

sınıflandırılmaktadır (2). Memeli dokularında birkaç çeşit  $\beta$ -glukozidaz tanımlanmıştır. Bunlar intestinal laktaz phlorizin hidrolaz (LPH), lizozomal  $\beta$ -glukozidaz (asit  $\beta$ -glukozidaz, glukoserebrosidaz, GBA1), non-lizozomal  $\beta$ -glukozidaz (GBA2) ve sitozolik  $\beta$ -glukozidaz (GBA3)'dir (3). LPH (EC.3.2.1.62/108) bağırsak epitel hücrelerindeki mikrovilluslarda bulunur ve bir tür sindirim enzimi fonksiyonu görür. LPH'nin diyetle alınan laktoz ve glukozilseramidi hidrolize ettiği ve eksikliğinde laktoz intoleransı görüldüğü bildirilmiştir (4). Memeli hücrelerinde bulunan lizozomal  $\beta$ -glukozidaz (EC 3.2.1.45) eksikliğinde, lizozomal enzim eksikliği hastalıklarından "Gaucher hastalığı" görülmektedir. Lizozomal  $\beta$ -glukozidaz lizozomun membranında yer alır ve glikolipitlerden glukozilseramidi (GlcCer) metabolize eder (5, 6). Non-lizozomal  $\beta$ -glukozidazlarla ilgili saflaştırma ve identifikasyonlar 1990'larda yapılmasına rağmen mekanizmaları ve fonksiyonları son yıllardaki çalışmalarda ortaya konulmaktadır (5, 7-9). Non-lizozomal GBA2, endoplazmik retikulum ve golginin sitozolik yüzeyinde lokalizedir. İntegral membran proteini değildir ve hücre membranlarıyla zayıf bağlıdır. İnsanda en çok testis, beyin ve karaciğer dokularında rastlanmıştır. GBA2 eksikliği görülen farelerde, ilgili dokularda GlcCer birikimi görülmüştür (10, 11). Sitolik beta glikozidazın karaciğerde ksenobiyotik bileşiklerin detoksifikasyonunda görevli olduğu belirtilmektedir. Vücuda alınan ksenobiyotikler (doğal olarak oluşan glikozitler) bozulmadan bağırsaktan emilir ve karaciğere taşınırsa sitozolik beta-glikozidaz ile etkileşebilir. Bu durumda enzim, bileşiğin glikozit bağlarını koparır ve yüklü hale geçen maddelerin suda çözünürlüğünü artırarak vücuttan uzaklaştırılmasını sağlar (12). Sitolik beta-glukozidaz memeli böbrek, karaciğer, dalak, bağırsak ve lenfositlerinde çözünebilir protein olarak bulunmaktadır. Optimum şartının pH 6.5 civarında olduğu belirtilmiştir (6). Sitolik  $\beta$ -glukozidaz, piridoksin 5P-L-glukozid molekülünün piridoksine hidrolizini katalizler ve bu da vitamin B<sub>6</sub>'nın baskın aktif formudur (13). LaMarco ve Glew (14) yaptıkları bir çalışmada domuz karaciğer sitozolik  $\beta$ -glukozidazının bir bitki fenolik glukozidi olan L-picein'i hidroliz ettiğini belirtmişlerdir. Daha sonraki çalışmalarda da insanda ve hayvanlarda diyetle alınan diğer bitkisel glikozidler üzerine sitozolik  $\beta$ -glukozidazın hidroliz etkisi gösterilmiştir (15). İnsanlarda, diyetle yaygın olarak alınan flavonoidlerin, basit fenolik bileşiklerin ve siyanojenlerin glikozit türevlerine karşı yüksek aktivite göstermesi enzimin ksenobiyotik metabolizmasında önemli bir rolü olduğunu düşündürmektedir (6).

Benzimidazol türevi ilaçlar, düşük konakçı toksisitesi göstermeleri nedeniyle veteriner hekimlikte akciğer nematodu, tenya ve gastro-intestinal nematodlara karşı oldukça sık kullanılan geniş spektrumlu antelmantikler arasındadır. Benzimidazollerin sülfür içeren türevleri (fenbendazol, oksfendazol, albendazol) özellikle akciğer ve gastro-intestinal nematodlara karşı en çok tercih edilen antelmantiklerdir (16). Albendazol (ABZ) büyükbaş ve küçükbaş hayvanlarda oral uygulama sonrası flavin

ihativa eden mono-oksijenaz sistemi etkisi ile karaciğerde hızlı bir şekilde okside olur. ABZ'ün aktif metaboliti, albendazol sülfoksit (ABZSO) ya da rikobendazol (RBZ), plazmada anti-paraziter aktivite gösteren bir aktif molekül olarak tespit edilmiştir. RBZ'ün etkisini plazmada dolaşan, pek çok doku ve organda difüzyonunu kolaylaştıran iyonik formu belirler. Avermektinler (ivermektin, abamektin, doramektin, eprinomektin) toprakta yaşayan mikroorganizmalardan *Streptomyces avermitilis*' in fermentasyon ürünüdürler. Bunlar makrosiklik laktan olarak adlandırılan kimyasal gruba dahildirler. Düşük konsantrasyonlarda dahi nematod ve artropodlara karşı etkilidirler. Eprinomektin (EPM), 16 üyeli avermektin ailesine ait bir makrosiklik laktandır. Nematodlar ve *Ostergya ostertagi* larvalarına karşı güçlü bir etkiye sahiptir. EPM'nin büyük miktarı safra ve dışkı ile vücuttan atılırken az bir kısmı da idrar ve süt ile vücuttan uzaklaştırılmaktadır (17).

Albendazol ve onun metabolitleri ile avermektinlerin toksik etkilerinin farklı çalışmalarda araştırıldığı görülmektedir (18-20). Baliharova ve ark. (20)'nin yapmış oldukları çalışmada albendazol ve metabolitlerinin siçan ve koyun karaciğer dokularındaki sitokrom P450 aktivitesine etkileri *in vitro* olarak tespit edilmiştir. Değişik ilaç gruplarının da memeli enzimleri üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmalar literatürde mevcuttur. Adem ve Ciftci (21)'nin yaptıkları çalışmada, siçan kalbinden saflaştırılan glukoz 6-fosfat dehidrogenaz, 6-fosfoglukonat dehidrogenaz ve glutatyon redüktaz enzimlerine, furosemid, dopamin ile digoksin ilaçlarının inhibisyon etkileri belirlenmiştir. İkinci ve ark. (22)'nin, saflaştırdıkları insan karbonik anhidraz I ve II enzimlerine bazı antibiyotiklerin etkilerini *in vitro* olarak belirledikleri görülmektedir. Van Gölü inci kefalı karaciğer ve eritrositlerinden saflaştırılan glutatyon redüktaz enzimi üzerine bazı antibiyotiklerin etkisinin belirlendiği çalışma da literatürde yerini almaktadır (23).

Anthelmantiklerin de içinde bulunduğu pek çok ilaç, enzimleri inhibe etmeleri ya da indüklemeleri sonucunda karaciğer enzim yapısını değiştirebilmektedirler. Bu çalışma kapsamında, karaciğerde metabolize oldukları bilinen ABZ ve RBZ ile safra yoluyla vücuttan uzaklaştırılan EPM'nin, karaciğer enzimlerinden olan ve bitkisel kökenli glikozidlerin hidrolizinde görevli sitozolik  $\beta$ -glukozidaz aktivitesine *in vitro* etkileri araştırıldı.

## Gereç ve Yöntem

**Karaciğer Materyali:** Çalışmada kullanılan kuzu karaciğer dokusu, mezbahada kesilen hayvanlardan alındı. Alınan doku örnekleri soğuk zincirde laboratuvara getirildi. Dokular kullanılabilecek kadar küçük parçalar halinde -80 °C'de saklandı.

**Kimyasallar:** p-NPG, o-NPG, Sepharose-4B, 1-Naftilamin, L-tirozin, standart sığır serum albümin (BSA), EPM, RBZ, ABZ ve elektroforez kimyasalları Sigma Chemical'dan; sodyum hidroksit, amonyum sülfat, hidroklorik asit, sodyum dihidrojen fosfat, sodyum

bikarbonat, sodyum fosfat, potasyum fosfat, kalsiyum klorür Merck firmasından temin edildi.

**Enzim Ekstraksiyonu:** Enzim ekstraksiyonunda Bause ve ark. (24)'ünün yöntemi kısmen değiştirilerek uygulandı. Kuzu karaciğeri küçük parçalara ayrıldıktan sonra ağırlığının iki katı hacimde 0.25 M sukroz ilave edildi. Örnek buz içerisinde 2 dakika homojenize edildikten sonra 12.000 g'de 30 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant saklandı ve pellet 2 katı kadar 0.25 M sukroz ile çözülerek tekrar 12000 g'de 30dk santrifüj edildi. Süpernatantlar birleştirildi ve 21000 g'de 90 dk santrifüj edildi. Bu işlem sonrasında pellet 10 mM fosfat tamponu, pH 6.5, ile çözüldü. Elde edilen çözelti 21000 g'de 90 dk santrifüj edildi ve pellet 200 mM fosfat tamponunda çözülerek +4 °C'de 30 dk bekletildi. Ardından 21000 g'de 90 dk santrifüj edildi ve süpernatant birinci ekstrakt olarak saklandı. Pellete 200 mM fosfat tamponu ilave edilerek buzda bir saat bekletildi. Ardından 21000 g'de 90 dk santrifüj edildi ve süpernatant ikinci ekstrakt olarak elde edildi. Her iki ekstrakt birleştirilerek ham ekstrakt olarak kullanıldı.

**Enzim Saflaştırma:** Enzim saflaştırma işlemi Kara ve ark. (25)'nin yöntemine göre iki aşamada yapıldı. Birinci aşamada ham ekstrakta %80 doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesi uygulandı ve 15000 rpm'de 30 dk santrifüj edildikten sonra pellet minimum hacimde çözüldü. İkinci aşamada ise Sinan ve ark. (26)'nin yöntemine göre, laboratuvarında sentezlenen sepharoz-4B-L-tirozin-1-naftilamin hidrofobik jeli kullanılarak hidrofobik etkileşim kromatografisi yöntemi uygulandı.

**Enzim Aktivitesi ve Protein Miktar Tayini:** Kuzu sitozolik  $\beta$ -Glukozidaz enziminin aktivitesi fotometrik olarak tayin edildi. Ürün olarak *p*-NP açığa çıkaran substrat için *p*-NP standart eğrisi kullanılırken, *o*-NP açığa çıkaran substratın aktivitesinin hesaplanmasında ise 420 nm molar ekstinksiyon ( $\epsilon$ ) katsayısı kullanıldı, *Orto*-nitrofenolün 420 nm'deki  $\epsilon$  değeri  $4.55 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (27) olarak alındı. Bir enzim ünitesi 1 dakikada  $1 \mu\text{mol}$  *p*-NP/*o*-NP açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Spektrofotometrik ölçümlerde Thermo Scientific well-plate okuyuculu fotometre kullanıldı.

Kalitatif protein tayini 280 nm'de absorbans ölçümü ile belirlenirken kantitatif protein tayini Lowry ve ark. (28)'nin yöntemine göre yapıldı.

**SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrez:** Beta-glukozidaz enziminin hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılmasından sonra iki farklı akrilamid konsantrasyonunda; yığma jeli %3, ayırma jeli %10 olacak şekilde, kesikli sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektrofrez (SDS-PAGE) Laemmli (29) tarafından belirtilen yöntemle yapılarak, enzimin saflık derecesi kontrol edildi.

SDS-PAGE'de belirteç olarak molekül ağırlık standartları; ( $\beta$ -galaktosidaz (116.0 kDa), sığır serum albumin (66.2 kDa), yumurta albumini (45.0 kDa), laktat

dehidrogenaz (35.0 kDa), REase Bsp981 (E.coli) (25.0 kDa),  $\beta$ -laktoglobulin (18.4 kDa) ve lizozim (14.4 kDa) içeren standart protein çözeltisi kullanıldı.

**In vitro İnhibisyon Çalışmaları:** ABZ, RBZ ve EPM'in enzim aktivitesi üzerindeki *in vitro* etkisini belirlemek için *para*-nitrofenol  $\beta$ -D-glukopiranosid (*p*-NPG) ve *orto*-nitrofenol  $\beta$ -D-glukopiranosid (*o*-NPG) substratları kullanıldı. Söz konusu kimyasalların inhibisyon etkisini gösteren  $IC_{50}$  değerinin belirlenmesinde % aktiviteye karşı çizilen ilaç konsantrasyonu grafiği çizildi ve grafik denkleminde  $IC_{50}$  değerleri hesaplandı. Enzimi inhibe ettiği belirlenen ilaçların inhibisyon tipleri Lineweaver–Burk grafikleri çizilerek tespit edildi.

## Bulgular

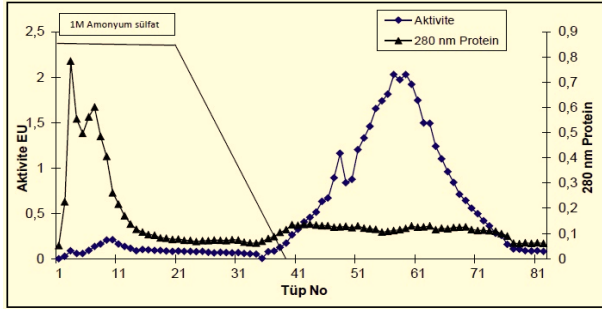
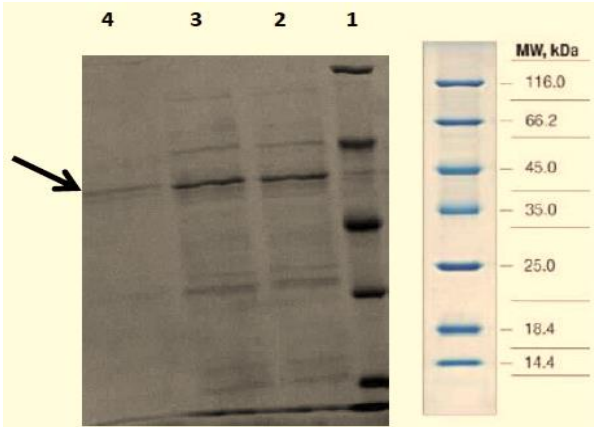
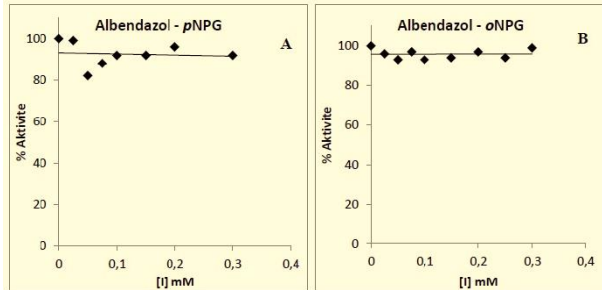
Sitozolik  $\beta$ -glukozidaz, kuzu karaciğerinden, amonyum sülfat tuz çöktürmesi ve hidrofobik etkileşim kromatografisi yöntemleriyle iki aşamada saflaştırıldı. Yapılan işlemler sonunda enzimin %10.7 verimle 26.7 kat saflaştırıldığı hesaplandı ve saflaştırma aşamalarına ait bilgiler Tablo 1'de verildi. Hidrofobik etkileşim kromatografisi aşamasında elüentler 2 mL'lik tüplere alınarak her bir tüpün enzim aktivitesi ile kalitatif protein miktarları belirlendi. Şekil 1'de verilen saflaştırma grafiğinde en yüksek enzim aktivitesinin 57-59. tüplerde olduğu görülmektedir. En yüksek enzim aktivitesi gösteren tüp SDS-PAGE'de yürütüldü ve Şekil 2'de gösterildiği gibi ~55 kDa'da tek bant olarak görüntüldü.

Saflaştırma sonucunda yüksek enzim aktivitesi gösteren tüpler birleştirilerek saf enzim olarak kullanıldı. Saf kuzu karaciğer sitozolik  $\beta$ -glukozidazına antiparaziter ilaçların etkileri incelendiğinde, Şekil 3'de gösterilen *p*-NPG ve *o*-NPG substratları varlığındaki % Aktivite-İnhibitör konsantrasyonu grafiklerine bakılarak ABZ'ün enzim aktivitesini etkilemediği belirlendi. ABZ'ün metaboliti olan RBZ aktif maddesinin söz konusu enzimi inhibe ettiği, *p*-NPG ve *o*-NPG substratları varlığında  $IC_{50}$  değerlerinin sırasıyla 4.8 mM ve 5.9 mM olduğu tespit edildi. RBZ'ün saf enzim üzerine etkisini gösteren % Aktivite-İnhibitör konsantrasyonu grafikleri Şekil 4'de görülmektedir. Avermektin grubu ilaçlardan EPM'in kuzu karaciğer sitozolik  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitesini düşürdüğü ancak aktiviteyi %50'nin altına düşürecek kadar etki etmediği Şekil 5'de verilen grafiklerde görülmektedir.

Kuzu karaciğerinden saflaştırılan sitozolik  $\beta$ -glukozidaz aktivitesini etkileyen RBZ'ün *p*-NPG ve *o*-NPG substratları varlığında enzimi yarışmalı olarak inhibe ettiği Şekil 6'da gösterilmektedir. İnhibitör etkisi gösteren RBZ'ün  $K_i$  değerlerinin *p*-NPG ve *o*-NPG substratları için sırasıyla  $3.9 \times 10^{-5} \pm 0.3 \times 10^{-5} \text{ mM}$  ile  $1.5 \times 10^{-5} \pm 0.1 \times 10^{-5} \text{ mM}$  olduğu bulundu. Antiparaziter ilaçların *p/o*-NPG substratları varlığındaki enzim aktivitesine etkileri Tablo 2'de özetlendi.

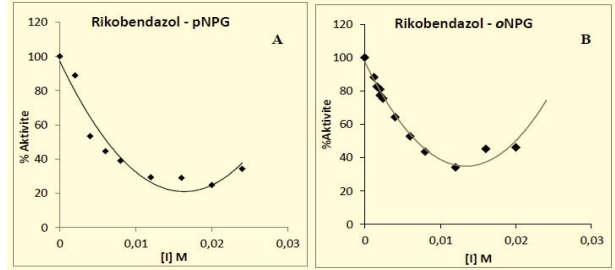
**Tablo 1.** Kuzu karaciğer sitozolik  $\beta$ -glukozidazının saflaştırma tablosu

Basamak	Hacim (mL)	Aktivite (U/mL)	Toplam Aktivite (U/mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	% Verim	Saflaştırma Derecesi
Ham Ekstrakt	7	4.06	28.42	2.01	14.1	2.02	100	1
Amonyum Sülfat Çöktürmesi	1.85	7.44	13.77	2.68	4.96	2.78	48.4	1.37
Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi	1.5	2.02	3.03	3.04	0.06	53.72	10.7	26.7

**Şekil 1.** Kuzu karaciğer sitozolik  $\beta$ -glukozidazının hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılmasını gösteren grafik.**Şekil 2.** Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılan kuzu karaciğer sitozolik  $\beta$ -glukozidazının SDS-PAGE jel görüntüsü. 1: Protein belirteç. 2, 3, 4: Yüksek enzim aktivitesi gösteren farklı elüsyon tüpleri**Şekil 3.** ABZ'nin kuzu karaciğer sitozolik  $\beta$ -glukozidaz aktivitesine etkisi,

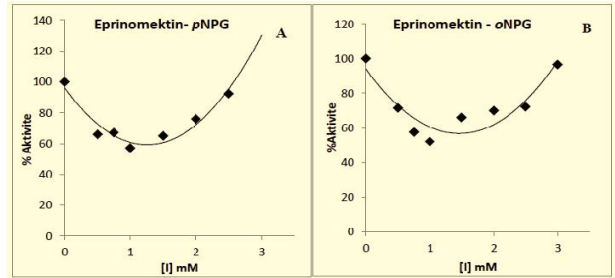
a. *p*-NPG substratı kullanılarak çizilen % aktivite- ABZ konsantrasyonu grafiği

b. *o*-NPG substratı kullanılarak çizilen % aktivite- ABZ konsantrasyonu grafiği

**Şekil 4.** RBZ'nin kuzu karaciğer sitozolik  $\beta$ -glukozidaz aktivitesine etkisi,

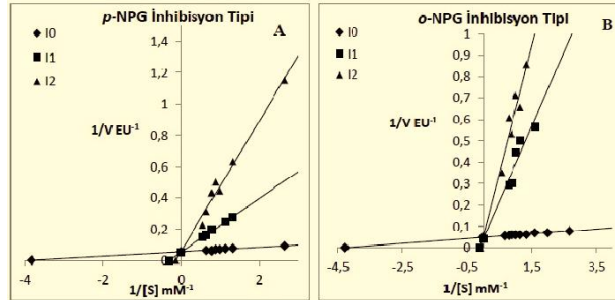
a. *p*-NPG substratı kullanılarak çizilen % aktivite- RBZ konsantrasyonu grafiği

b. *o*-NPG substratı kullanılarak çizilen % aktivite- RBZ konsantrasyonu grafiği

**Şekil 5.** EPM'in kuzu karaciğer sitozolik  $\beta$ -glukozidaz aktivitesine etkisi,

a. *p*-NPG substratı kullanılarak çizilen % aktivite- EPM konsantrasyonu grafiği

b. *o*-NPG substratı kullanılarak çizilen % aktivite- EPM konsantrasyonu grafiği

**Şekil 6.** Kuzu karaciğer sitozolik  $\beta$ -glukozidaz enzimini inhibe eden RBZ'nin farklı substratlarda inhibisyon tiplerini belirten Lineweaver-Burk grafikleri

a. *p*-NPG substratı kullanılarak çizilen Lineweaver-Burk grafiği

b. *o*-NPG substratı kullanılarak çizilen Lineweaver-Burk grafiği

**Tablo 2.** *p*-NPG ve *o*-NPG substratları varlığında antiparaziter ilaçların kuzu karaciğer sitozolik  $\beta$ -glukozidazına inhibisyon etkileri

Antiparaziter	IC <sub>50</sub>		İnhibisyon Tipi		K <sub>i</sub>	
	<i>p</i> -NPG	<i>o</i> -NPG	<i>p</i> -NPG	<i>o</i> -NPG	<i>p</i> -NPG	<i>o</i> -NPG
RBZ	4.8 mM	5.9 mM	Yarışmalı	Yarışmalı	$3.9 \times 10^{-5} \pm 0.3 \times 10^{-5}$	$1.45 \times 10^{-5} \pm 0.11 \times 10^{-5}$
ABZ	–	–	Etkisiz	Etkisiz	–	–
EPM	–	–	Zayıf inhibitör	Zayıf inhibitör	–	–

## Tartışma

Sitozolik  $\beta$ -glukozidazın farklı memeli dokularından iyon değişim kromatografisi ve hidrofobik etkileşim kromatografisi yöntemleri ile saflaştırıldığı görülmektedir (30-32). Bu çalışmada da hidrofobik etkileşim kromatografisi kullanılarak enzim 26.7 kat ve %10.7 verimle saflaştırılmıştır. Aynı hidrofobik jel kullanılarak farklı kaynaklardan  $\beta$ -glukozidaz enzimlerinin saflaştırıldığı görülmektedir (25, 33, 34). Şekil 1'de görülen saflaştırma grafiğinde enzimin tuz gradienti bittikten sonra kolondan gelmesi proteinin hidrofobik özellikleri hakkında bilgi sunmaktadır. Farklı memeli dokularından saflaştırılan sitozolik  $\beta$ -glukozidazların 53-55 kDa aralığında olduğu belirtilmiştir (3, 6, 30, 35). Çalışmamızda SDS-PAGE ile görüntülenen kuzu karaciğer sitozolik  $\beta$ -glukozidazın molekül ağırlığı farklı çalışmalarla uyumlu olarak yaklaşık 55 kDa olarak belirlendi.

ABZ ve RBZ'ün çeşitli hayvan türleri ve insanlardaki teratojenik etkilerini araştıran çalışmalar bulunmaktadır (36-39). Gebe koyun ve sıçanlarda yapılan bir çalışmada; yaklaşık 10 mg/kg doz ABZ'ün embriyotoksik ve teratojenik etkiye neden olduğu, bunun da sebebinin ABZ'ün hızlı bir şekilde sülfoksite dönüştürülmesi ve annenin dokularına göre kanda daha yüksek konsantrasyonlarda bulunması olduğu şeklinde açıklanmıştır (36). Benzer şekilde Gokbulut ve ark. (40)'nin eşeklerde yaptıkları çalışmada da yine benzer şekilde ABZ'ün plazmada tespit edilmese de onun sülfoksit ve sülfon metabolitlerinin ağızdan ABZ uygulamasını takiben plazmada ortaya çıktığı belirtilmiştir. ABZ'ün plazmada tespit edilmese de (insanda tespit edilme sınırı olan 0.02  $\mu$ g/mL'in altında) (41) RBZ ile tedavinin teratojenik etkiyi arttırdığı farklı çalışmalarda ortaya konulmuştur (38, 42). İlginç bir şekilde insan kolorektal adenokarsinom hücre soyunda (ASO HT-29) ise ABZ'ün RBZ'e göre 20 kat daha fazla sitotoksik olduğu bulunmuştur (39) Carlsson ve ark. (18)'nin zebra balığında yaptıkları çalışmada da ABZ'ün RBZ'e göre 100 kat daha fazla embriyotoksik etki

gösterdiği belirtilmiştir. Albendazolün fare, sıçan, tavşan ve koyunlarda kraniofasial ve kemik kusurlarına neden olduğu gösterilmiş ve yine benzimidazolere maruz kalan zebra balığı embriyolarında da benzer etkiler gözlemlendiği açıklanmıştır (19). Yapmış olduğumuz çalışmada ABZ'ün ilgili enzim aktivitesini hem *p*-NPG hem de *o*-NPG substratları varlığında değiştirmediği görülmüştür. Ancak ABZ'ün karaciğerde metabolize olduktan sonra oluşan aktif metaboliti RBZ'ün kuzu karaciğer sitozolik  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitesini inhibe ettiği ve her iki substrata karşı inhibisyon tipinin yarışmalı olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç RBZ'ün teratojenik etkisinin ABZ'e göre daha yüksek olduğunu ortaya koyan sonuçlara benzerlik göstermektedir. RBZ'ün karaciğerde oluştuğu düşünülürse ksenobiyotik metabolizmasında görevli sitozolik  $\beta$ -glukozidazı inhibe etmesi olumsuz olarak değerlendirilebilir.

Bu çalışma sonucunda, RBZ'ün kuzu karaciğer sitozolik  $\beta$ -glukozidaz aktivitesini düşürdüğü ve enzimi yarışmalı tipte inhibe ettiği bulunmuştur. ABZ'ün ise enzim aktivitesini değiştirmediği tespit edilse de *in vivo* ortamda ABZ'ün çok hızlı bir şekilde RBZ'e dönüşmesi ABZ'ün de enzimi dolaylı olarak inhibe edebileceğini düşündürmektedir. Avermektinlerden EPM'in ise saflaştırılmış kuzu karaciğer sitozolik  $\beta$ -glukozidaz aktivitesini düşürdüğü ancak enzim aktivitesinde %50'lik bir kayba sebep olmadığı görülmüştür. Eksojen kaynaklı bitki glikozitlerinin yıkımında ve ksenobiyotik metabolizmasında görevli olan sitozolik  $\beta$ -glukozidazı inhibe eden/edebilecek RBZ ve ABZ'ün kullanımında, ilgili enzim aktivitesi açısından EPM'e göre daha dikkatli olunması gerektiği sonucuna varılmıştır. Yapılan çalışmalarda teratojenik ve embriyotoksik etkilerine dikkat çekilen ABZ ve RBZ'ün, karaciğer enzimleri açısından da araştırılması gerektiği düşünülmektedir. Özellikle ABZ'ün karaciğerde metabolize olması, ABZ metabolitlerinin karaciğer enzimlerine etkisini akla getirmektedir. Bu çalışmanın benzer çalışmalara örnek olacağı kanaatine varılmıştır.

## Kaynaklar

1. Esen A, Blanchard DJ. A Specific  $\beta$ -glucosidase-aggregating factor is responsible for the  $\beta$ -glucosidase null phenotype in maize. *Plant Phys* 2000; 122: 563-572.
2. Henrissat B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* 1991; 280: 309-316.

3. Graaf MD, Veen ICV, Meulen-Muileman VD, et al. Cloning and characterization of human liver cytosolic  $\beta$ -glucosidase. *Biochem J* 2001; 910: 907-910.
4. Naim HY. Molecular and cellular aspects and regulation of intestinal lactase-phlorizin hydrolase. *Histol Histopathol* 2001; 16: 553-561.
5. Krschen HG, Yildiz Y, Raju DN, et al. The non-lysosomal  $\beta$ -glucosidase GBA2 is a non-integral membrane-associated protein at the endoplasmic reticulum (ER) and Golgi. *J Biol Chem* 2013; 288: 3381-3393.
6. Berrin J-G, McLauchlan WR, Needs P, et al. Functional expression of human liver cytosolic beta-glucosidase in *Pichia pastoris*. Insights into its role in the metabolism of dietary glucosides. *Eur J Biochem* 2002; 269: 249-258.
7. Aureli M, Bassi R, Loberto N, et al. Cell surface associated glycohydrolases in normal and Gaucher disease fibroblasts. *J Inherit Metab Dis* 2012; 35: 1081-1091.
8. Raju D, Schonauer S, Hamzeh H, et al. Accumulation of glucosylceramide in the absence of the beta-glucosidase GBA2 alters cytoskeletal dynamics. *PLoS Genet* 2015; 11: e1005063.
9. Yildiz Y, Hoffmann P, Vom Dahl S, et al. Functional and genetic characterization of the non-lysosomal glucosylceramidase 2 as a modifier for Gaucher disease. *Orphanet J Rare Dis* 2013; 8: 151.
10. Gonzalez-Carmona MA, Sandhoff R, Tacke F, et al. Beta-glucosidase 2 knockout mice with increased glucosylceramide show impaired liver regeneration. *Liver Int* 2012; 32: 1354-1362.
11. Yildiz Y, Matern H, Thompson B, et al. Mutation of  $\beta$ -glucosidase 2 causes glycolipid storage disease and impaired male fertility. *J Clin Invest* 2006; 116: 2860-2869
12. Hays WS, Wheeler DE, Egtesad B, Glew RH, Johnston DE. Expression of cytosolic beta-glucosidase in guinea pig liver cells. *Hepatology* 1998; 28: 156-163.
13. Esen A. The mammalian cytosolic broad-specificity  $\beta$ -glucosidase. In: Glew RH, Gopalan V, Forsyth GW, Vanderjagt DJ. (Editors). *Beta Glucosidases, Biochemistry and Molecular Biology*. Washington DC: American Chemical Society, 1993: 83-110.
14. LaMarco KL, Glew RH. Hydrolysis of a naturally occurring beta-glucoside by a broad-specificity beta-glucosidase from liver. *Biochem J* 1986; 237: 469-476.
15. Gopalan V, Jagt DJV, Libell DP, Glews RH. Transglucosylation as a Probe of the Mechanism of Action of Mammalian Cytosolic  $\beta$ -Glucosidase. *J Biol Chem* 1992; 267: 9629-9638.
16. Wu Z, Razzak M, Tucker IG, Medicott NJ. Physicochemical characterization of ricobendazole: I. Solubility, lipophilicity, and ionization characteristics. *J Pharm Sci* 2005; 94: 983-993.
17. Kozuh Erzen N, Hodoscek L, Cerkenik-Flajs V. Analytical procedure for determination of the time profile of eprinomectin excretion in sheep faeces. *Anal Bioanal Chem* 2007; 387: 1329-1335.
18. Carlsson G, Patring J, Ullers E, Oskarsson A. Developmental toxicity of albendazole and its three main metabolites in zebrafish embryos. *Reprod Toxicol* 2011; 32: 129-137.
19. Carlsson G, Patring J, Kreuger J, Norrgren L, Oskarsson A. Toxicity of 15 veterinary pharmaceuticals in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Aquat Toxicol* 2013; 126: 30-41.
20. Baliharov V, Velk J, Fimanov K, et al. Inhibitory effect of albendazole and its metabolites on cytochromes P450 activities in rat and mouflon in vitro. *Pharmacol Rep* 2005; 57: 97-106.
21. Adem S, Ciftci M. Purification and characterization of glucose 6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase and glutathione reductase from rat heart and inhibition effects of furosemide, digoxin and dopamine on the enzymes activities. *J Biochem Mol Toxicol* 2016; 30: 295-301.
22. Ekinci D, Beydemir Ő, Alim Z. Some drugs inhibit in vitro hydratase and esterase activities of human carbonic anhydrase-I and II. *Pharmacol Reports* 2007; 59: 580-587.
23. Altun M, Trkođlu V, Őelik İ. The effect of some antibiotics on glutathione reductase enzyme purified from liver and erythrocyte of Lake Van pearl mullet. *Pharm Biol* 2015; 53: 1647-1652.
24. Bause E, Schweden J, Gross A, Orthen B. Purification and characterization of trimming glucosidase I from pig liver. *Eur J Biochem* 1989; 183: 661-669.
25. Kara HE, Sinan S, Turan Y. Purification of beta-glucosidase from olive (*Olea europaea* L.) fruit tissue with specifically designed hydrophobic interaction chromatography and characterization of the purified enzyme. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2011; 879: 1507-1512.
26. Sinan S, Kockar F, Arslan O. Novel purification strategy for human PON1 and inhibition of the activity by cephalosporin and aminoglikozide derived antibiotics. *Biochimie* 2006; 88: 565-574.
27. Hsieh M, Graham TL. Partial purification and characterization of a soybean  $\beta$ -glucosidase with high specific activity towards isoflavone conjugates. *Phytochemistry* 2001; 58: 995-1005.
28. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
29. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
30. Hays WS, Jenison S, Yamada T, Pastuszyn A, Glew RH. Primary structure of the cytosolic beta-glucosidase of guinea pig liver. *Biochem J* 1996; 319: 829-837.
31. Daniels LB, Coyle PJ, Chiao YB, Glew RH, Labow RS. Purification and characterization of a cytosolic broad specificity beta-glucosidase from human liver. *J Biol Chem* 1981; 256: 13004-13013.
32. Berrin JG, Czjzek M, Kroon PA, et al. Substrate (aglycone) specificity of human cytosolic beta-glucosidase. *Biochem J* 2003; 373: 41-48.
33. AŐi A, BeŐi L, Muhovi I, Dogan S, Turan Y. Purification and characterization of  $\beta$ -Glucosidase from *Agaricus*

- bisporus* (White Button Mushroom). Protein J 2015; 34: 453-461.
34. Kara HE, Turan Y, Er A, et al. Purification and characterization of  $\beta$ -glucosidase from greater wax moth *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: pyralidae). Arch Insect Biochem Physiol 2014; 86: 209-219.
  35. Lambert N, Kroon PA, Faulds CB, et al. Purification of cytosolic L-glucosidase from pig liver and its reactivity towards flavonoid glycosides. Biochimica et Biophysica Acta 1999; 1435: 110-116.
  36. Eckardt K, Kaltenhäuser J, Kilb C, Seiler A, Stahlmann R. Relative potency of albendazole and its sulfoxide metabolite in two in vitro tests for developmental toxicity: the rat whole embryo culture and the mouse embryonic stem cell test. Reprod Toxicol 2012; 34: 378-384.
  37. Mattsson A, Ullerås E, Patring J, Oskarsson A. Albendazole causes stage-dependent developmental toxicity and is deactivated by a mammalian metabolism system in a modified zebrafish embryotoxicity test. Reprod Toxicol 2012; 34: 31-42.
  38. Teruel MT, Felipe AE, Solana HD, Sallovitz JM, Lanusse CE. Placental and fetal toxicity of albendazole sulphoxide in Wistar rats. Vet Hum Toxicol 2003; 45: 131-136.
  39. Whittaker SG, Faustman EM. Effects of benzimidazole analogs on cultures of differentiating rodent embryonic cells. Toxicol Appl Pharmacol 1992; 113: 144-151.
  40. Gokbulut C, Akar F, McKellar QA. Plasma disposition and faecal excretion of oxfendazole, fenbendazole and albendazole following oral administration to donkeys. Vet J 2006; 172: 166-172.
  41. Marriner S, Morris D, Dickson B, Bogan J. Pharmacokinetics of albendazole in man. Eur J Clin Pharmacol 1986; 30: 705-708.
  42. Capece BPS, Navarro M, Arcalis T, et al. Albendazole sulphoxide enantiomers in pregnant rats embryo concentrations and developmental toxicity. Vet J 2003; 165: 266-275.