

**Bazı Antibiyotiklerin ve Sülfamidlerin Tavuk
Embriyonu Myoglobininin Fizikokimyasal
Özellikleri Üzerine Olan
Etkilerini İnceleme ***

Die Wirkung Mancher Antibiotika und Sulfonamiden Über
Die Physikochemische Eigenschaften Der Myoglobin Der
Hühnerembryo

Serpil BİLGE ** Gazanfer BİNGÖL **

G İ R İ Ő

Tedavi amacı ile kullanılan bazı ilâçlar protein biyosentezine çeşitli şekillerde etkimektedir. Bu etkiler biyosentezi uyarıcı yönde olabileceği gibi inhibe edici, azaltıcı yönde de olabilir. Özellikle kemoterapötikler yaşamın belirli döneminde, örneğin embriyonal dönem ile ilk çocukluk dönemi arasında gelişigüzel bir şekilde kullanıldıklarında gelişme üzerinde olumsuz sonuçlar doğurabilmektedir.

Biz bu tür ilâçların etkilerini kasın fonksiyonel proteinlerinden biri olan myoglobin üzerinde denemek istedik. Bunun için de ilk aşama olarak embriyonal tavuk myoglobininin izolasyonu üzerinde çalıştık. Sonra bazı antibiyotik ve sülfamidlerin bu proteinin biyosentezi üzerinde etkili olup olmadıklarını inceledik.

DENEL KISIM

MATERYAL

Deneyler için Leghorn cinsi 2250 adet tohumluk yumurta kullanıldı. Yumurtalar gruplar halinde 37 °C lik etüvlerde inkübasyona

Redaksiyona Verildiği Tarih: 8 Aralık 1975

* Ecz. Serpil Bilge'nin "Bazı Antibiyotiklerin ve Sülfamidlerin Tavuk Embriyonu Myoglobininin Fizikokimyasal Özellikleri Üzerine Olan Etkilerini İnceleme" isimli Doktora Tezinin Özeti'dir. Sınav Tarihi : Nisan 1975. TBTA V.Bilim Kongresinde tebliğ edilmiştir.

** Biyokimya Kürsüsü, Eczacılık Fakültesi, Ankara Üniversitesi.

bırakıldı. İnkübasyonun 3. gününde bir kısım yumurtalara belirli dozda ilaç ve diğer kısma da kontrol için % 0.9 NaCl enjekte edildi (1).

Tablo I. Her seride yumurtalara enjekte edilen ilaçlar ve dozları.

<u>Kullanılan ilaç</u>		<u>Dozu</u>
Streptomisin	bir seride	5 mg
Streptomisin	"	10 mg
Tetrasiklin	"	100 μ
Tetrasiklin	"	10 mg
Kloramfenikol	"	10 mg
Sülfaguanidin	"	0.150 mg
Penisilin G	"	0.030 mg

Enjeksiyon Tekniği:

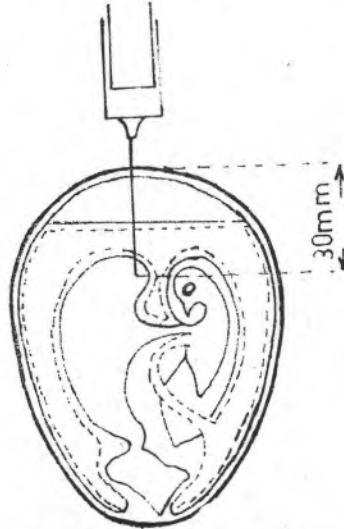
1. Yumurtaların hava boşluğu inkübasyona başlamadan önce işaretlendi.

İşaretlenen bölge % 7 lik Fenol veya 70° lik alkolle temizlendi.

3. Hava boşluğunun ortası özel steril bir iğne ile delindi.

4. İlaç steril şartlarda 2.5 cm lik bir iğne ile yumurta sarısına verildi.

5. Parafinle delik kapatıldı (2). İnkübasyona devam edildi.



Şek. 1. Yumurta sarısına enjeksiyon.

Normal ve ilâç verilmiş embriyolar inkübasyonun 14. gününde yumurtadan çıkarıldı.

YÖNTEM

1- Tüketme - İzolasyon:

Etüvden çıkarılan yumurtaların amnion boşluğu üzerindeki kabuk kesildi. Embriyolar dışarı alınarak % 0,9 luk NaCl ile yıkandı. Eşit ağırlıkta distile su ile birlikte 20 000 devirli homojenizatörde parçalandı. Homojenizat + 4°C de bir gece bekletildi. Ekstre 6000 rpm de santrifüj edilerek süzüntü alındı. pH sı 7 ye ayarlandı. Oda ısısında 1/4 oranında Pb (CH₃COO)₂ ile karıştırılarak diğer proteinleri ve yabancı maddeleri çöktürüldü. Karışım süzülerek içinde, myoglobin bulunan filtrat alındı. Kurşunun fazlası bir miktar katı (NH₄)₂SO₄ ile giderildi. (3, 4, 5). Myoglobini ayırmak için (NH₄)₂SO₄ ile basamaklı fraksiyonlama metodu uygulandı. Solüsyon (NH₄)₂SO₄ ile % 60 doymuş hale getirilerek hemoglobin ve diğer proteinleri çöktürüldü. Süzüntü % 100 doymuş hale getirilerek çökelek toplandı (6, 7). Çökelek distile suda çözülerek niteliğini tayin için fizikokimyasal metotlar uygulandı.

2- Elektroforez:

Selüloz asetat elektroforezi myoglobinin tanınmasında ve fraksiyonların ayrılmasında iyi sonuçlar verdiği için tercih edilmiştir. Deney için değişik tamponlar ve 15×15 cm boyutlarındaki Gelman Sepraphor III selüloz asetat şeritler kullanılmıştır (8). Örnekler şeritlere 3 µl miktarlarda tatbik edilmiştir.

Kullanılan tamponlar:

pH 8,9 Barbital tampon ile 1,5 saat 250 Voltta,

pH 9,1 ,0,13 M Tris-EDTA-Borik asit tamponunda 2 saat 300 Voltta,

pH 8,7 ,0,05 M Tris-EDTA-Borik asit tamponunda 2 saat 300 Voltta,

pH 9,5 Tris-Glisin tamponunda 3 saat 250 Voltta.

Şeritler bu sürelerin sonunda bir hemoprotein boyası olan Benzidin-H₂O₂ ile (9) ve protein boyası olan Amidoschwarz 10 B ile boyandı (10).

3- Sephadex Jel Filtrasyonu:

Örneklerin jel kromatografileri Sephadex G-100 ile yapıldı. (Pharmacia, Uppsala). Jel uygun miktarda % 0.9 NaCl ile şişirildikten sonra 2.5×40 cm boyutlarındaki kolona dolduruldu. Elüsyon için pH 7.4, 0.01 M Fosfat tamponu kullanıldı. (11). Örnekler kolona 5-10 mg/ml konsantrasyonda tatbik edildi. Eluatlar 3 ml lik fraksiyonlar halinde toplandı. Proteinlerin maksimum absorpsiyon gösterdiği 280 nm ve myoglobinin maksimum absorpsiyon gösterdiği 409 nm de optik dansiteleri okundu.

4- İyon Değişimi Kromatografisi:

Örneklerin saflaştırılması için DEAE-Selüloz iyon değiştirici reçinesi kullanıldı. Reçine HUISMAN'ın metoduna göre şişirildi ve 0.9×20 cm boyutlarındaki kolona dolduruldu (12). Örnekler 1 ml lik hacimlerde tatbik edildi. Tampon olarak pH 8.5 ,0.02 M Tris-HCl ve 0.2 M NaCl kullanıldı. Bu metoda göre eğer bir karışımda myoglobin ve hemoglobin varsa, myoglobin 0.02 M Tris tamponu ile sürüklenmekte, hemoglobin üst kısımda kalmaktadır. Hemoglobin ise 0.2 M NaCl ile sürüklenmektedir (11, 13, 14). Kolondan çıkan elüatlar 1 ml lik fraksiyonlar halinde toplanarak 409 nm de optik dansiteleri okundu.

5- Spektrofotometrik Özellikler:

Elde edilen myoglobin örneklerinin dalga boyu taramaları Beckman Spectrofotometer DB-GT aletinde yapıldı ve hangi dalga boylarında maksimum absorpsiyon verdikleri bulundu.

6- Miktar Tayinleri:

Örnekler CNMetMb halinde iken miktar tayinleri yapıldı (15). Bunun için üzerinde çalışılacak çözelti, % 0.05 $K_3Fe(CN)_6$ ile son konsantrasyonu 0.6 milimol/lit ve 0.2 NaCN ile son konsantrasyonu 0.8 milimol/lit olacak şekilde CNMet şekline çevrildi. 540 nm de optik dansiteleri okundu ve formüle uygulandı.

$$\text{mg pigment/g doku} = \frac{\text{O.D.}}{11300} \frac{17000 (a + d)}{\text{g doku}} \frac{1000}{1000}$$

O.D. : 540 nm de okunan optik dansite,

- 11300 : CNMetMb in 540 nm deki molar ekstinksiyon katsayısı,
 17000 : pigmentin ekivalan ağırlığı,
 a : litre olarak kullanılan ekstre hacmi,
 d : ekstreyi met şekline çevirmek için kullanılan siyanit miktarı.

Sonucun mg cinsinden çıkması için 1000 ile çarpılır.

BULGULAR

Yumurtadan 14. günde çıkarılan embriyolar yıkandıktan sonra tartıldı ve şu sonuçlar elde edildi (Tablo II).

Tablo II. Kullanılan ilaçların embriyo gelişmesine etkileri

Verilen ilaç	Bir embriyonun ortalama ağırlığı	Canlı çıkan embriyo (%)
Normal (% 0.9 NaCl)	6.52	72.5
Tetrasiklin (100 μ)	5.05	42.6
Tetrasiklin (10 mg)	4.32	43.1
Kloramfenikol (10 mg)	4.34	16
Streptomisin (5 mg)	4.20	66
Streptomisin (10 mg)	4.50	67
Sülfaguanidin (0.150 mg)	4.35	58.5
Penisilin G (0.030 mg)	6.64	70

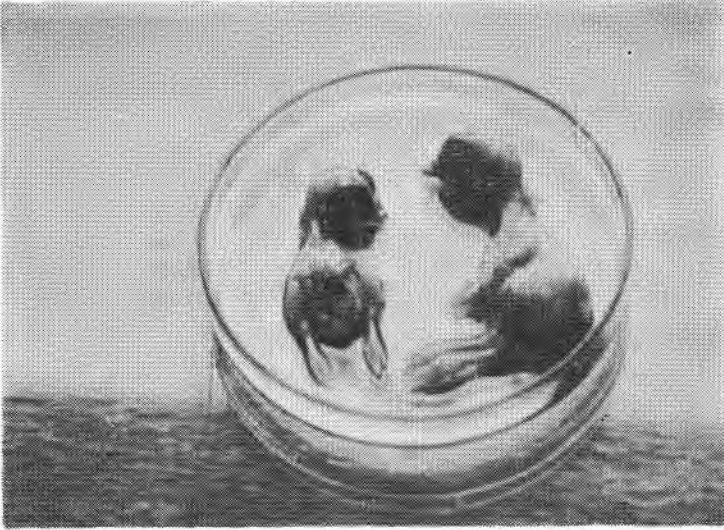
Pensilin dışında verilen bütün ilaçlar, embriyoların ortalama ağırlıklarında 2 g civarında bir düşmeye sebep olmuştur (Resim 1).

Ayrıca yine bu ilaçların verildiği embriyolarda, normale oranla daha yüksek bir ölüm oranı görülmüştür.

Bu embriyolardan elde edilen örneklerle yapılan deneylerde şu sonuçlar elde edilmiştir.

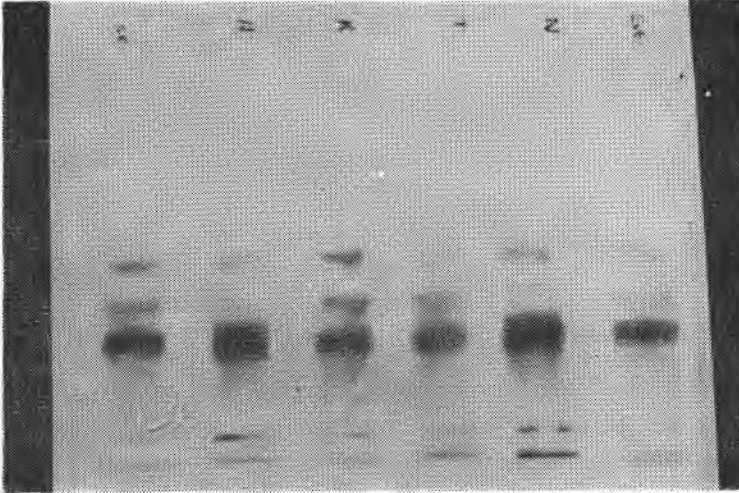
1- Elektroforez:

Selüloz asetat elektroforezinde, diğer hayvanlardan elde edilen myoglobinden farklı fraksiyonlar elde edilmiştir.



Resim 1. Normal (sağda) ve Sülfaguanidinli (solda) embriyolar 14. günde.

1- pH 8.9 Barbital tampon: Bu tamponla yapılan çalışmalarda normal myoglobinin üç fraksiyonu elde edilmiştir. (Resim 2). En



Resim 2. pH 8.9 Barbital tamponunda normal, tetrasiklinli, kloramfenikollü ve sülfaguanidinli örneklerin elektroforezi. Boya: Amidoschwarz 10 B.

arkada görülen bant denatüre olmuş proteinin verdiği lekedir. Myoglobinin birinci ve ikinci bantları birbirine yakın göç etmektedir. Üçüncü bant diğer fraksiyonlardan daha hızlı göç etmektedir. Amidoschwarz ile yapılan boyamalarda görülen dördüncü fraksiyon nonhem protein izleridir.

0.030 mg penisilin verilmiş preparatlarda (P), aynı sonuçlar elde edilmiştir. Ancak 10 mg streptomisin (S), 100 μ - 10 mg tetrasiklin (T), 10 mg kloramfenikol (KF), 0.150 mg sülfaguanidin (SG) enjekte edilmiş preparatlarda değişik durumlar izlenmiştir; birinci fraksiyonda bir azalma buna karşılık üçüncü fraksiyonda bir artma olmuştur. Bu artma ilk fraksiyondan ayrılan bir komponentin hızlı yürümesi şeklinde düşünülebilir.

2- pH 9.5 Tris-Glisin tamponu: Normal myoglobinin dört bantı izlenmektedir. Bu bantların dışında Amidoshwarz ile yapılan çalışmalarda nonhem protein lekeleri görülmektedir. Penisilin dışında verilen ilâçlar dördüncü bantın azalmasına yol açmışlardır.

3- pH 8.7 ve pH 9.1 Tris-EDTA-Borikasıit tamponları: Bu tampon ile yapılan çalışmalarda benzer sonuçlar elde edilmiştir.

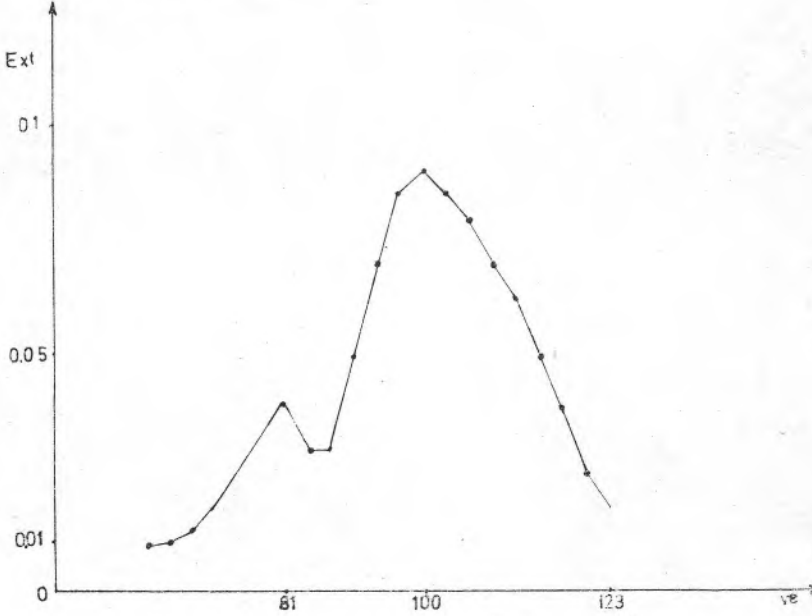
2- Sephadex Jel Filtrasyon:

Örnekler Sephadex G-100 jelinden geçirildi. Myoglobinin elüsyon volümü 100 ml olarak saptandı (Grafik 1). Normal ve ilâç verilmiş embriyo myoglobinlerinde bir fark bulunamadı. Myoglobinin verdiği bu elüsyon volümü, aşıında 34.400 molekül ağırlığında bulunan proteinlere eş olduğu için molekülün agregat şeklinde olduğu düşünüldü ve deney dimerkaptto etanolle tekrarlanarak molekülün kısmen parçalanması sağlandı (Grafik 2).

3- Spektrofotometrik Özellikler:

Örneklerin dalga boyu taramaları yapılmış, Soret bantı, α ve β bantlarında verdikleri absorpsiyonlar tesbit edilmiştir. Soret bantı 409 nm de görülmektedir. 538 ve 576 nm de bantların iyi görünmemesi örneklerin çalışma sırasında met şekline döndüğünü göstermektedir (Grafik 4). Normal ve ilâç verilmiş embriyo myoglobinleri aynı eğrileri vermektedir.

Jel tipi : Sephadex G-100
 V₀ : 62 ml.
 Örnek : Mb_N
 Dalga boyu : 409 nm
 Tampon : pH= 7,4 Fosfat t.
 Jel tipi : Sephadex G-100
 V₀ : 52 ml.



Grafik 1. Normal myoglobinin Sephadex G-100 jelinden elüsyonu. Tampon: pH 7.4 Fosfat t.

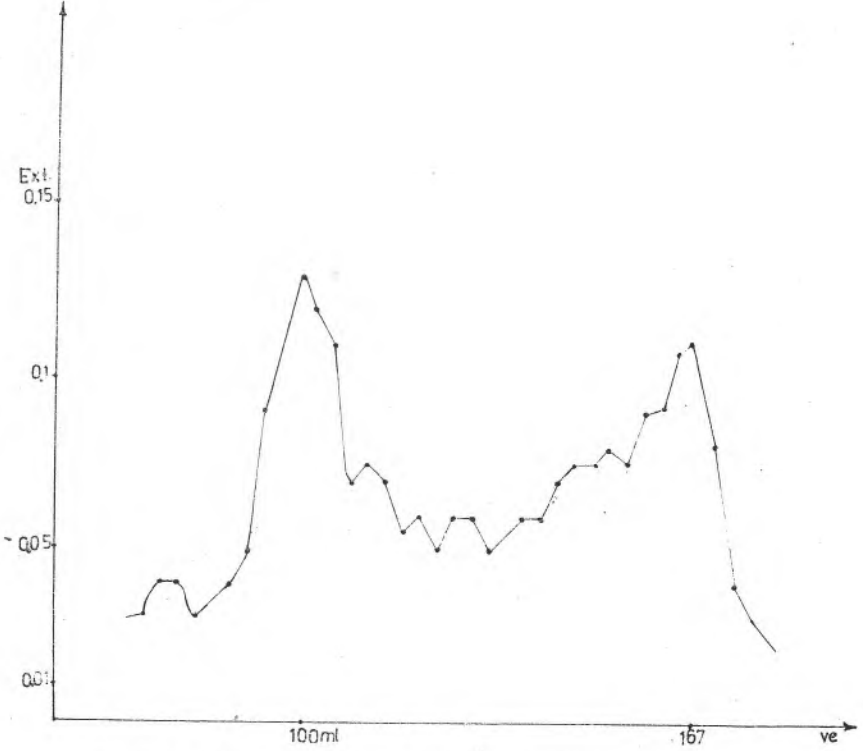
4- İyon Değişimi Kromatografisi:

Kolona tatbik edilen bütün örnekler 0.02 M Tris-HCl tamponu ile 39-40 ml de elüe olmuştur. Bu tampon ile kolonun üstünde kalan bir fraksiyon olmamıştır. Daha sonra kolona tatbik edilen 0.2 M NaCl ile sürüklenen bir madde görülmemiştir.

5- Miktar Tayini:

Normal ve ilaç verilen embriyo myoglobinlerinde CNMetMb üzerinden miktar tayinleri yapılmış ve şu sonuçlar elde edilmiştir. (Tablo III).

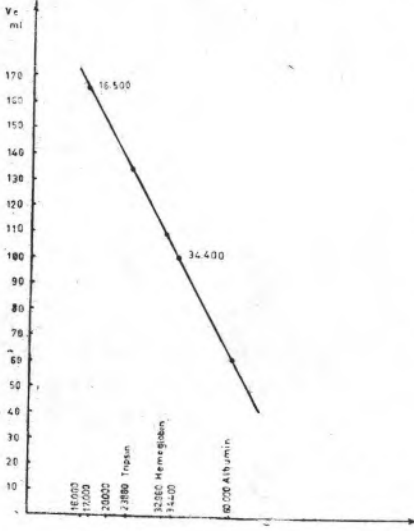
Örnek : Mb_N
 Dalga boyu : 409 nm.
 Tampon : pH= 7,4 Fosfat t. (0.2 M Dimerkaptöetanol)
 V_{e1} : 100 ml.
 V_{e2} : 167 ml.



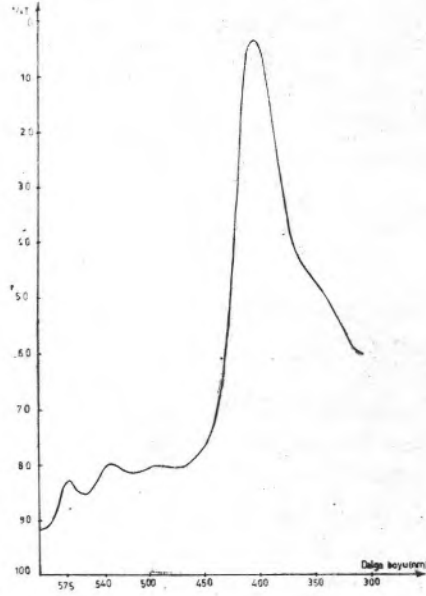
Grafik 2. Normal myoglobinin Sephadex G-100 jelinden elüsyonu.
 Tampon: pH 7.4 Fosfat t. (0.2 M dimerkaptöetanol).

Bulgulardan görüldüğü gibi tavuk embriyosu myoglobini fizikokimyasal yönden at, insan, siğır ve diğér bazı canlıların myoglobinlerine benzemektedir. Antibiyotikler ve sülfamitler embriyonun belirli bir süre içindeki büyüme hızını yavaşlatmaktadır. Myoglobin sentezi yönünden kantitatif olarak belirgin bir azalma olmasa bile ilaç uygulanan embriyolarda elektroforetik yönden değışik myoglobin davranışlarına rastlanmaktadır. Antibiyotikler arasında değışikliklere en az şekilde etken olan penisilindir. Gerek kantitatif gerek

kalitatif olarak myoglobin teşekkülünde penisilin normale göre pek ufak değişikliklere sebep olmaktadır. En fazla etki gösteren maddeler ise sülfaguanidin, kloramfenikol, streptomisin ve tetrasiklidir.



Grafik 3. Sephadex G-100 kalibrasyon eğrisi.



Grafik 4. Normal Myoglobinin dalga boyu taraması,

Tablo III. Verilen ilâçlara göre CNMetMb miktarı.

Verilen ilâç	CNMetMb
Normal (% 0.9 NaCl)	0.534
Tetrasiklin (100 μ)	0.290
Tetrasiklin (10 mg)	0.310
Kloramfenikol (10 mg)	0.485
Streptomisin (5 mg)	0.530
Streptomisin (10 mg)	0.069
Sülfaguanidin (0.150 mg)	0.368
Penisilin (0.030 mg)	0.510

ÖZET

Tavuk embriyosu üzerinde yaptığımız araştırmanın ilk aşamasında embriyonal myoglobini izole ettik. Myoglobinin izolasyonu için $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ile basamaklı fraksiyonlama metodu uyguladık ve elde ettiğimiz örnekler üzerinde bazı fizikokimyasal denemeler yaptık. Tavuk embriyosu myoglobininin molekül ağırlığını Sephadex G-100 jeli ile 16.500–17.000 olarak saptadık. Selüloz asetat elektroforezinde Barbitol tampon ile üç bant, Tris tamponları ile dört bant elde ettik. Yapılan dalga boyu taramalarında ise α , β ve Soret bantlarının 576, 538 ve 409 nm de olduklarını saptadık. Bu deneyler sonucu elde ettiğimiz bulguları, diğer myoglobinlerle karşılaştırdık ve sonuçların kıyaslanabilir olduklarını gördük.

Çalışmamızın ikinci aşamasında yumurtaya çeşitli dozlarda antibiyotik ve sülfamid enjekte ederek bu ilaçların embriyonal myoglobin üzerinde nicelik ve nitelik yönünden etkili olup olmadıklarını araştırdık. Bulduğumuz sonuçlara göre streptomisin, kloramfenikol, tetrasiklin ve sülfaganidin, embriyonal myoglobinin elektroforetik davranışında değişiklik yapmakta ve her iki tamponda da elde edilen bantlardan yavaş göç eden birinci bantta niceliksel bir azalma olmaktadır. Yalnız penisilin verilen embriyo myoglobinleri normal myoglobine benzer bir elektroforetik davranış göstermektedir.

İlaç enjekte edilen yumurtaların embriyolarında CNMetMb üzerinden myoglobin miktar tayini yaptık ve bir azalma gördük. Antibiyotik ve sülfamid verilen yumurtalardan canlı çıkan embriyo sayısında ve her bir embriyonun ortalama ağırlığında da düşüşler saptadık. Ancak sadece penisilin verilen yumurtalardan elde edilen myoglobin miktarında, embriyo sayısında ve ağırlığında bir düşüş olmamış, normal myoglobine yakın sonuçlar elde edilmiştir.

ZUSAMMENFASSUNG

Bei der ersten Stufe unserer Forschung über die Hühnerembryo haben wir die embryonische Myoglobin isoliert. Dazu haben wir einige physikalische und chemische Untersuchungen mit dieser Myoglobin versucht. Die Molekulargewicht der embryonische Myoglobin ist mit Sephadex Gel Filtration als 16.500–17.000 festgestellt worden. Bei der Cellulose acetat electrophorese mit Barbitol Buffer

ergab Myoglobin 3 Bände und mit Tris Buffer 4 Bände. Die maximale Wellenlänge sind bei 576, 538 und 409 nm beobachtet worden. Wir haben die Ergebnisse, welche wir aus diesen Versuchen erhalten haben, miteinander verglichen und beobachtet, dass unsere Ergebnisse sich mit diesen übereinstimmen. Bei der zweiten Stufe haben wir den Hühnereier verschiedene Antibiotika und Sulfonamiden eingespritzt und die Wirkung dieser Mittel über embryonische Myoglobinverbindung untersucht. Wie wir beobachtet haben das electrophoretische Aussehen dieser Myoglobin, die wir von Streptomycin, Chloramphenicol, Tetracylin, Sulphaguanidin eingespritzte Eiern erhalten haben, ändert sich, so dass sie erste Band fehlt. Nur die embryonische Myoglobin, die wir von Penicilline eingespritzte Eiern erhielten, sah ähnlich wie die Normale aus.

Wir haben die quantitative Bestimmung über CNMetMb gemacht und beobachtet, dass die Menge der embryonische Myoglobin bei dem Mittel eingespritzte Eiern sich erniedrigt, gegenüber die Normale und Penicillin gegebene Myoglobin. Auch das Gewicht der einzelnen Embryonen und die Zahl der Lebenden nach Inkubation nimmt ab gegenüber den Normalen und den Penicillin eingespritzten Embryonen.

LİTERATÜR

- 1— Kagen, L.J., Linder, S., *Develop Biol.*, **22**, 200 (1970).
- 2— Lepine, P., Sohier, R., *Techniques de Laboratoire appliques au diagnostic des maladies a virus*, Libraires de L'academis de medecine, 1954.
- 3— Theorell, A.H.T., *Biochem Ztschr.*, **252**, 1 (1932).
- 4— Theorell, A.H.T., *ibid.*, **268**, 46 (1934).
- 5— Theorell, A.H.T., De Duve, C., *Cl. Arch. Biochem*, **12**, 113 (1947).
- 6— Jonxis, J.H.P., Wadman S. K., *Nature*, **169**, 884 (1952).
- 7— Nakagawa, J., Hudgins, P. G., *Anal. Biochem*, **26**, 358 (1968).
- 8— Sudaka, P., Claudio J., *Rev.Europ. Etud. Clin. Biol.*, **15**, 220 (1970).
- 9— Stransky, Z., Srch, M., *Dtsch. Z ges gerichtl Med.*, **66**, 123 (1969).
- 10— Orsini, A. ve ark., *Pediatric T. XXV*. No: 3, 291 (1970).
- 11— Gröschel, U., Stewart, U., *Experientia*, **27**, 512 (1971).
- 12— Huisman, T.H.J., Dozy, A.M., *J.Chromat.*, **19**, 160 (1965).
- 13— Goldbloom, D.E., Brown, W.D., *Arch. Biochem. Biophys.*, **147**, 367 (1971).
- 14— Deconinck, M. ve ark., *Biochimie.*, **54**, 969 (1972).
- 15— Fleming, H.P. ve ark., *J. Am. sci.*, **19**, 1164 (1960).