

ARAŞTIRMA MAKALESİ /RESEARCH ARTICLE

YENİ BETA - LAKTAMAZ İNHİBİTÖRLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Yağmur TUNALI¹, Hülya KARACA¹, Yusuf ÖZTÜRK², Seval KORKMAZ³

ÖZ

Klinikte kullanımda olan beta-laktamazları geri dönüşümsüz olarak inhibe eden 3 farklı inhibitör söz konusudur; bunlar klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktamdır. Kendileri tek başlarına antibakteriyel etki göstermemekle beraber, penisilinler ve sefalosporinlerle birlikte kombine uygulandıklarında bu antibiyotiklerin etkilerini güçlendirirler.

Bu çalışmada çay polifenollerinden olan epigallokateşin gallat, kateşin, kateşin gallat ve epikateşinin antibakteriyel özelliğe sahip olup olmadığı araştırılmıştır. Bu çalışma için ciddi enfeksiyon etkenlerinden olan ve beta-laktamaz enzimine sahip *Echerichia coli*, *Klebsiella pnemoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterobacter faecalis* tercih edilmiştir ve çay polifenollerinin etkinlikleri denirken Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsünce belirlenen (CLSI, 2006) metotlar kullanılmıştır.

Anahtar Kelimeler : Beta-laktamaz, Penisilinaz, Çay polifenolleri, Disk hassasiyet testleri.

THE INVESTIGATION OF THE NEW BETA-LACTAMASE INHIBITORS

ABSTRACT

There are three different clinically used inhibitors inhibiting irreversibly beta-lactamase; these are clavulanic acid, sulbactam and tazobactam. Although they do not exhibit any antibacterial effect alone when applied in combination they strenghten the effectiveness of penicillins and cephalosporins.

In the present study, it was investigated whether tea polyphenols, epigallocatechin gallate, catechin, catechin gallate and epicatechin have antibacterial activities or not. For this study, *Echerichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter faecalis* which are serious infection causes and have the beta-lactamase enzyme have been preferred, and while testing tea polyphenols effectiveness, the methods taking place in Clinical and Laboratory Standarts Institute (CLSI, 2006) have been used.

Keywords: Beta-lactamase, Penicillinase, Tea polyphenols, Disk susceptibility tests.

¹ Anadolu Üniversitesi, Yunus Emre Kampusu, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 26470, Eskişehir Tel.: +90-222-3350581-3747; Fax: +90-222-3350750.

E-mail adresi: yagmurt@anadolu.edu.tr (Y. Tunalı)

² Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji ABD, Eskişehir, TÜRKİYE.

³ FARGEM (Farmasötik Araştırma-Geliştirme Merkezi) A.Ş., Sancaklar Köyü Mevkii, 81100, Düzce

Bu çalışma Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir. Proje No: 040315.

Geliş: 5 Şubat 2009; **Düzeltilme:** 25 Haziran 2009; **Kabul:** 20 Ağustos 2009

1. GİRİŞ

Beta laktamazlar kemoterapotikler içinde kullanımı en yaygın olan beta laktam antibiyotiklere karşı bakterilerin geliştirdiği en önemli enzimlerden olup; sıklıkla klinik *Enterobacteriaceae* izolatları tarafından sentezlenen tüm dünyada gittikçe büyüyen önemli bir patojenite kriteridir. Beta laktamaz enzimine sahip *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterobacter faecalis* salgın hastalıklar, sağaltımda başarısızlık, artan mortalite gibi ciddi problemlere sebep olmaktadır (Gür, 2002). Klinikte kullanımda olan beta laktamazları geri dönüşümsüz inhibe eden 3 farklı inhibitör söz konusudur; klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam. Tek başlarına antibakteriyel etki göstermeyen veya zayıf etki gösteren bu ajanlar penisilinler ve sefalosporinlerle beraber kombine uygulandıklarında antibiyotiklerin etkilerini güçlendirirler (Cho, 2008). Ancak etkili kombinasyonlar sınırlıdır ve bu sebeple yeni kombinasyonlar oluşturulabilecek yeni beta-laktamaz inhibitörlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Yapılan araştırmalarda doğal ürünlerin de beta laktamazları inhibe edebileceği özellikle çay polifenollerinde bulunan kateşinlerin bu amaçla kullanılabileceği gösterilmiştir (Du Bois ve ark., 1995).

Çay dünyada sudan sonra en çok tüketilen içecek olup dünya çapında üretilen çayın % 76' sını siyah çay, % 22' sini yeşil çay ve % 2' sini oolong çay oluşturur (Jazani, 2007). Çay yaprağındaki polifenollerin yaklaşık $\frac{3}{4}$ ' ünü flavanoller, flavanollerin de % 60-70' ini epigallokateşin-3-gallat (EGCG) oluşturur (Katiyar ve Mukhtar, 1997). Yapılan çalışmalarda kateşinlerin antioksidatif, antienflamatuar, antimutajenik, antikarsinojenik, antianjiyojenik, apoptotik, antiobezite, hipokolesterolemik, antiaterosklerotik, antidiyabetik, antibakteriyel, antiviral, yaşlanmayı geciktirici gibi değişik farmakolojik etkileri olduğu gösterilmiştir (Fujiki, 1999, Alvarez-Castro, 2004).

Klinikte kullanımı olası yeni beta-laktamaz enzim inhibitörleri araştırılarak, bu amaç doğrultusunda çay polifenollerinden olan epigallokateşin gallat, kateşin, kateşin gallat ve epikateşin ile çalışılmıştır. Bir çay polifenolu olan epigallokateşin gallatın beta-laktamaz enzim inhibitörü özelliğini *S. aureus* haricinde diğer bakterilerde de gösterip göstermediği ve diğer çay polifenollerine olan kateşin, kateşin gallat ve epikateşin'in de bu özelliğe sahip olup olmadığı araştırılmıştır.

2. MATERYAL ve METOD

2.1 Mikroorganizmalar

Gram-pozitif bakterilerden *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ve *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 ile Gram-negatif bakterilerden *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *E. coli* ATCC 35218 [(beta-laktamaz (+)), *E. coli* ATCC 25922 [(beta-laktamaz (-) kontrol suşu], suşları kullanılmış; mikroorganizmalar Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Laboratuvarından temin edilmiştir.

Bakterilerin stok kültür sürekliliği 20 gün aralıklarla *Nutrient Agar* (Difco) yatık besiyerine yapılan pasajlarla sağlanmıştır. Deneylede kullanılacak stok kültürler 35 ± 1 °C' de 24 saatlik inkübasyonun ardından $+4$ °C' de saklanmıştır.

2.2 Mikroorganizmaların Hazırlanması

Canlandırılmış bakteri kültürleri *Müller-Hinton Broth* besiyerlerine inoküle edilerek 35 ± 1 °C' ye ayarlanmış inkübatörde 18 saatlik gecelik inkübasyon süreleri sonunda, mikroorganizma hücre sayıları *McFarland* No:5 bulanıklık standardına uygun olarak $0.5-2.5 \times 10^5$ canlı mikroorganizma sayısı/mL olacak şekilde ayarlanmıştır.

2.3 Beta-Laktamaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Projede kullanılan bakteri suşlarının beta-laktamaz enzim aktivite ölçümleri *Double-Disk Synergy* testi (Jones, 1988) ile *Müller-Hinton Agarda* yapılmıştır.

2.4 Mikroorganizmaların Beta-Laktam İlaçlar ve Çay Polifenollerine Hassasiyetlerinin Belirlenmesi

Amoksisilin (20µg), ampisilin (20µg), ve penisilin G (20µg) antibiyotikleri ile kombine edilen çay polifenollerinden epikateşin (EC), epikateşin gallat (EG), epigallokateşin (EGC) ve epigallokateşin gallat (EGCG)' in (3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 µg) amoksisilin, ampisilin ve penisilin G antibiyotiklerine hassasiyet ve direnç gösteren standart mikroorganizmalar ile aktivite belirlenmiştir.

2.5 Çay Polifenollerinin Beta-Laktamaz (Penisilinaz) Aktivitesini İnhibisyonunun Belirlenmesi

Çay polifenollerinden EC, EG, EGC ve EGCG' nin beta-laktamaz (penisilinaz) aktivitesinin direkt inhibisyonunun ölçümü için saf penisilinaz (10 U/mL) (*Bacillus cereus*, Sigma, St. Louis, Mo.) 96 kuyucuklu kültür plakasında farklı konsantrasyonlardaki (3.125, 6.25, 12.5, 25 ve 50 µg/mL) çay polifenollerini ile muamele edilmiştir. Öncelikle 96 kuyucuklu kültür plakasına 100 ml MHB (*Mueller Hinton Broth*) ve penisilinaz enzimi ilave edilerek 35 °C' de 18 saat bir ön inkübasyonun ardından kontrol dışındaki kuyucuklara çay polifenollerini bir seri seyreltme ile dağıtılmıştır. Tüm kuyucuklara substrat olarak nitrosefin (250 µg/mL) (Oxoid, Basingstoke, United Kingdom) ilave edilerek 10 dakika sonra 492 nm dalga boyuna ayarlanmış ELISA cihazında optik dansite değerleri okunmuştur. Reaksiyon sırasında beta-laktamaz (Penisilinaz) enzimi Nitrosefinin yapısındaki beta-laktam halkasının amit bağını kırarak sarı renkli bileşiğin kırmızı renkli son ürüne dönüşümünü sağlar. Çay polifenollerinin enzim aktivitesinin % 50' sini inhibe ettiği konsantrasyonlar (IC₅₀ değeri), aynı koşullardaki penisilinaz ile hazırlanan standart eğriye göre belirlenmiştir.

3. TARTIŞMA VE SONUÇ

Gram-pozitif bakterilerden *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ve *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 ile Gram-negatif bakterilerden *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *E. coli* ATCC 35218 [(beta-laktamaz (+)), *E. coli* ATCC 25922 [(beta-laktamaz (-) kontrol suşu], bakteri suşlarının beta-laktamaz aktiviteyi standart beta-laktam antibiyotik disklerinden amoksisilin+klavulanik asit (AMC) (20/10 µg), tikarsilin+klavulanik asit (TIM) (75/10 µg), ampisilin+sulbaktam (SAM) (20/10 µg), penisilin G (P) (10 U), imipenem (IPM) (10 µg), teikoplanin (TEC) (30 µg), astreonam (ATM) (30 µg) kullanılarak (*Becton Dickinson Microbiology Systems*) araştırılmış, sonuçlar Tablo 1' de gösterilmiş olup çalışmada kullanılan tüm mikroorganizmalar İmipenem (10 µg)' e karşı hassas bulunmuştur. Teikoplanin (30 µg)' e karşı sadece *S. aureus*; amoksisilin+klavulanik asite (20/10 µg) karşı sadece *P. aeruginosa*; Penisilin G (10 U)' ye karşı da sadece *E. faecalis* hassasiyet göstermektedir, diğer mikroorganizmalar dirençli bulunmuştur.

Tikarsilin+klavulanik asit, ampisilin+sulbaktam ve astreonam karşı hassasiyet dereceleri mikroorganizmalarda değişkenlik göstermiştir. Sonuçlardan yola çıkılarak amoksisilin, ampisilin ve penisilin G antibiyotikleri ile kombine edilen çay polifenollerinden EC, EG, EGC ve EGCG, amoksisilin, ampisilin ve penisilin G antibiyotiklerine hassasiyet ve direnç gösteren iki standart mikroorganizma ile aktivitelerinin araştırılmıştır. Bu amaçla antibiyotik diskleri içerdikleri konsantrasyonlar amoksisilin (20 µg), ampisilin (20 µg) ve penisilin G (10 U) ve kombine çay polifenollerini ise 3.125, 6.25, 12.5, 25 ve 50 µg olacak şekilde ayarlanarak hazırlanarak mikroorganizmalarla muamele edildiğinde bulunan sonuçlar Tablo 2-4' de özetlenmiştir.

Çay polifenollerinin beta-laktamaz enzimi inhibisyonu çalışmalarının sonuçlarına göre, EC ve EGC' nin beta-laktamaz enzim aktivitesi üzerine direkt etkileri bulunamamıştır. Alınan değerler, kontrol grubuna yakın bulunduğundan, EC ve EGC gruplarının grafikleri çalışmaya alınmamıştır. Daha önce EC ve EGC' nin nitrosefin ile yapılmış olan ya da direkt beta-laktamaz enzim inhibisyonlarını gösteren başka bir çalışmaya, literatür araştırmalarımız sırasında rastlanılmadığı için bu konuda daha fazla bir yorum yapılamamaktadır. EGC ve EGCG' nin beta-laktamaz enzimi üzerine inhibitör etkisi saptanmış (Şekil 1 ve Şekil 2) ve grafiklerden EGC' nin IC₅₀ değeri 2,62 µg /mL, EGCG' nin IC₅₀ değeri ise 39,45 µg /mL olarak kaydedilmiştir. Daha önce yapılan bir çalışmada EGCG' nin IC₅₀ değeri 10 µg /mL olarak bulunmuştur (Zhao ve ark., 2002).

Çay polifenollerini sağlık için yararlı etkilerinin yanında, değişik infeksiyon ajanlarına karşı gösterdikleri antimikrobiyal etkiler ile de dikkat toplamaktadır. Antimikrobiyal aktivite mekanizmaları bilinmemekle beraber; gösterdikleri etkinin, patojenin hücre duvarı üzerine ya da diğer bilinen hedefler üzerine olduğu düşünülmektedir; ancak, biyoyararlanımının düşük ve kimyasal olarak stabil olmamaları sebebi ile ancak alternatif ilaç ya da kombine kullanımları düşünülmektedir (Song ve Seong, 2007; Hamilton-Miller, 1995). Yapılan çalışmalarda, çay polifenollerinin beta-laktamazı bloke ederek etki gösterdiği ve çeşitli patojen bakterilere karşı, antibakteriyel ilaçlarla kombine kullanımlarında ilacın MİK değerinin % 50 azalmasına sebep oldukları gösterilmiştir (Hatano ve ark., 2003; Hatano ve ark., 2004; Hu ve ark., 2001; Stapleton ve ark., 2006; Sudano ve ark., 2004; Yanagawa ve ark., 2003; Zhao ve ark., 2001; Zhao ve ark., 2002; Zhao ve ark., 2003).

Tablo 1. Mikroorganizmaların beta-laktam ilaçlara hassasiyetleri*

Mikroorganizmalar	Beta-Laktam Antibiyotikler ve Zon Çapları (mm)						
	AMC (20/10 µg)	TIM (75/10 µg)	SAM (20/10 µg)	P (10 U)	IPM (10 µg)	TEC (30 µg)	ATM (30 µg)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	17±0	45±0,76	36±0,66	28±0,66	30±0,45	15±0,82	zon yok
Hassasiyet Derecesi	R	S	S	R	S	S	R
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	13±0	23±0,50	30±0	23±0,66	30±0	10±0	zon yok
Hassasiyet Derecesi	R	S	S	S	S	R	R
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	19±0	12±0,33	zon yok	zon yok	18±0,50	zon yok	25±0,66
Hassasiyet Derecesi	S	R	R	R	S	R	S
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	zon yok	20±0	9±0,33	zon yok	28±0	zon yok	26±0,66
Hassasiyet	R	S	R	R	S	R	S
<i>E. coli</i> ATCC 35218+	12±0,33	zon yok	10±0,33	28±0	28±0,45	zon yok	14±0,33
Hassasiyet Derecesi	R	R	R	R	S	R	S
<i>E. coli</i> ATCC 25922-	zon yok	18±0,33	23±0,86	0.9±0,11	32±0	zon yok	25±0,45
Hassasiyet Derecesi	R	I	S	R	S	R	S

* Mikroorganizmalar *Müller-Hinton Agarda* 18 saat 35-37 °C'de inkübe edilmiştir. İnhibisyon zonları *BSAC* Standart Disk Hassasiyet Testlerine göre değerlendirilmiştir. Elde edilen değerler 3 paralel çalışmanın ortalamasıdır ($p \leq 0.005$).

R (Dirençli), I (Orta dereceli hassas), S (Hassas).

AMC: amoksisilin+klavulanat; TIM: tikarsilin+klavulanat; SAM: ampisilin+sulbaktam; P: penisilin; IPM: imipenem; TEC: teikoplanin; ATM: astreonam.

Tablo 2. Mikroorganizmaların amoksisilin/EC, amoksisilin/ECG, amoksisilin/EGC, amoksisilin/EGCG hassasiyeti*

Mikroorganizmalar	Amoksisilin (20 µg /EC 50-3.125 µg) ve zon çapları (mm)					
	Amoksisilin/EC (20/50 µg)	Amoksisilin/EC (20/25 µg)	Amoksisilin/EC (20/12.5 µg)	Amoksisilin/EC (20/6.25 µg)	Amoksisilin/EC (20/3.125 µg)	Kontrol Amoksisilin (20 µg)
<i>Staphylococcus aureus</i>	26±0, S	25±0,5, S	25±0,5, S	38±0, S	38±0,33, S	13±0, R
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	zon yok, R	zon yok, R	zon yok, R	zon yok, R	zon yok, R	zon yok, R
Mikroorganizmalar	Amoksisilin (20 µg /ECG 50-3.125 µg) ve zon çapları (mm)					
	Amoksisilin/ECG (20/50 µg)	Amoksisilin/ECG (20/25 µg)	Amoksisilin/ECG (20/12.5 µg)	Amoksisilin/ECG (20/6.25 µg)	Amoksisilin/ECG (20/3.125 µg)	Kontrol Amoksisilin (20 µg)
<i>Staphylococcus aureus</i>	40±0,5, S	31±0,33, S	32±0, S	33±0,5, S	32±0,33, S	13±0, R
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24±0,5, S	22±0,33, S	22±0, S	15±0,33, I	12±0,33, R	zon yok
Mikroorganizmalar	Amoksisilin (20 µg /EGC 50-3.125 µg) ve zon çapları (mm)					
	Amoksisilin/EGC (20/50 µg)	Amoksisilin/EGC (20/25 µg)	Amoksisilin/EGC (20/12.5 µg)	Amoksisilin/EGC (20/6.25 µg)	Amoksisilin/EGC (20/3.125 µg)	Kontrol Amoksisilin (20 µg)
<i>Staphylococcus aureus</i>	39±0, S	39±0, S	38±0,66, S	39±0,33, S	39±0, S	13±0,33, R
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	zon yok, R	zon yok, R	zon yok, R	zon yok, R	zon yok, R	zon yok, R
Mikroorganizmalar	Amoksisilin (20 µg /EGCG 50-3.125 µg) ve zon çapları (mm)					
	Amoksisilin/EGCG (20/50 µg)	Amoksisilin/EGCG (20/25 µg)	Amoksisilin/EGCG (20/12.5 µg)	Amoksisilin/EGCG (20/6.25 µg)	Amoksisilin/EGCG (20/3.125 µg)	Kontrol Amoksisilin (20 µg)
<i>Staphylococcus aureus</i>	41±0,5, S	41±0, S	41±0,2, S	39±0,33, S	38±0,33, S	13±0, R
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25±0,33, S	25±0, S	zon yok, R	zon yok, R	zon yok, R	zon yok, R

* Mikroorganizmalar *Müller-Hinton Agar*da 18 saat 35-37 °C'de inkübe edilmiştir. İnhibisyon zonları *BSAC* Standart Disk Hassasiyet Testlerine göre değerlendirilmiştir. Elde edilen değerler 3 paralel çalışmanın ortalamasıdır ($p \leq 0.005$).

R (Dirençli), I (Orta dereceli hassas), S (Hassas).

EC: Epikateşin; ECG: Epikateşin galat; EGC: Epigallokateşin; EGCG; Epigallokateşin gallat.

Tablo 3. Mikroorganizmaların ampisilin/EC, ampisilin/ECG, ampisilin/EGC, ampisilin/EGCG hassasiyeti*

Mikroorganizmalar	Ampisilin (20 µg /EC 50-3.125 µg) ve zon çapları (mm)					
	Ampisilin/EC (20/50 µg)	Ampisilin/EC (20/25 µg)	Ampisilin/EC (20/12.5 µg)	Ampisilin/EC (20/6.25 µg)	Ampisilin/EC (20/3.125 µg)	Ampisilin Kontrol (20 µg)
<i>E. coli ATCC 35218</i>	7±0, R	zon yok, R	zon yok, R	zon yok, R	zon yok, R	zon yok, R
<i>E. coli ATCC 25922</i>	16±0,33, I	16±0, I	15±0, I	13±0,33, R	13±0 R	13±0,33, R
Mikroorganizmalar	Ampisilin (20 µg /EC 50-3.125 µg) ve zon çapları (mm)					
	Ampisilin/ECG (20/50 µg)	Ampisilin/ECG (20/25 µg)	Ampisilin/ECG (20/12.5 µg)	Ampisilin/ECG (20/6.25 µg)	Ampisilin/ECG (20/3.125 µg)	Ampisilin Kontrol (20 µg)
<i>E. coli ATCC 35218</i>	zon yok, R	zon yok, R	zon yok, R	zon yok, R	zon yok, R	zon yok, R
<i>E. coli ATCC 25922</i>	18±0,22, S	17±0, S	13±0,33, R	12±0, R	12±0, R	13±0, R
Mikroorganizmalar	Ampisilin (20 µg /EC 50-3.125 µg) ve zon çapları (mm)					
	Ampisilin/EGC (20/50 µg)	Ampisilin/EGC (20/25 µg)	Ampisilin/EGC (20/12.5 µg)	Ampisilin/EGC (20/6.25 µg)	Ampisilin/EGC (20/3.125 µg)	Ampisilin Kontrol (20 µg)
<i>E. coli ATCC 35218</i>	zon yok, R	zon yok, R	zon yok, R	zon yok, R	zon yok, R	zon yok, R
<i>E. coli ATCC 25922</i>	11±0,33, R	9±0, R	9±0, R	11±0, R	11±0, R	13±0,22, R
Mikroorganizmalar	Ampisilin (20 µg /EC 50-3.125 µg) ve zon çapları (mm)					
	Ampisilin/EGCG (20/50 µg)	Ampisilin/EGCG (20/25 µg)	Ampisilin/EGCG (20/12.5 µg)	Ampisilin/EGCG (20/6.25 µg)	Ampisilin/EGCG (20/3.125 µg)	Ampisilin Kontrol (20 µg)
<i>E. coli ATCC 35218</i>	8±0, R	zon yok, R	zon yok, R	zon yok, R	zon yok, R	zon yok, R
<i>E. coli ATCC 25922-</i>	11±0,22, R	1±01, R	11±0, R	11±0, R	12±0,33, R	13±0, R

* Mikroorganizmalar *Müller-Hinton Agarda* 18 saat 35-37 °C'de inkübe edilmiştir. İnhibisyon zonları *BSAC* Standart Disk Hassasiyet Testlerine göre değerlendirilmiştir. Elde edilen değerler 3 paralel çalışmanın ortalamasıdır ($p \leq 0.005$).

R (Dirençli), I (Orta dereceli hassas), S (Hassas).

EC: Epikateşin; ECG: Epikateşin galat; EGC: Epigallokateşin; EGCG; Epigallokateşin gallat.

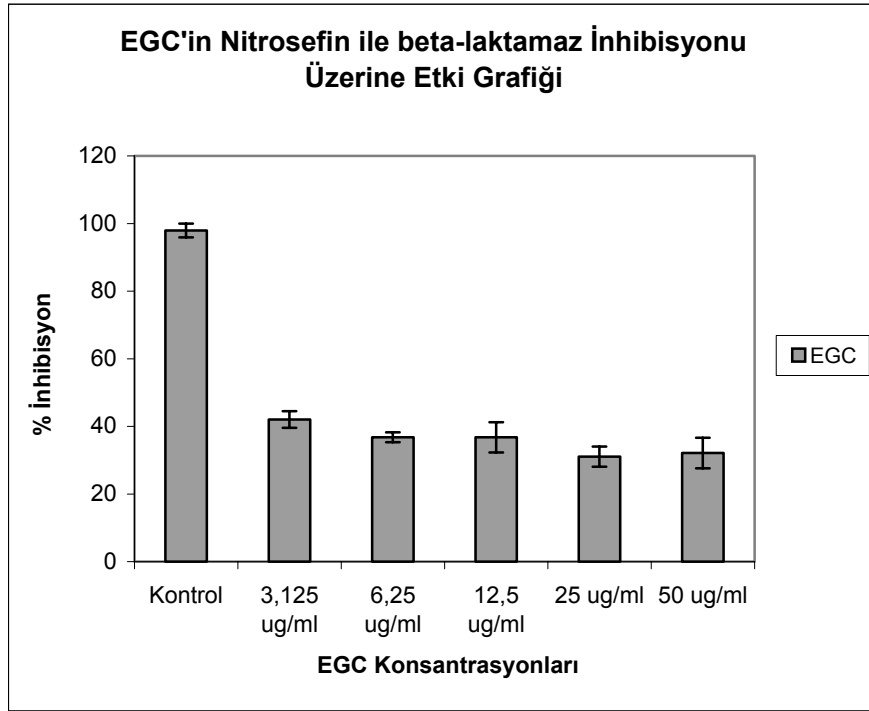
Tablo 4. Mikroorganizmaların Penisilin G/EC, Penisilin G/ECG, Penisilin G/EGC, Penisilin G/EGCG hassasiyeti*

Mikroorganizmalar	Penisilin G (10 U/EC 50-3.125 µg) ve zon çapları (mm)					
	Penisilin G/EC (20/50 µg)	Penisilin G/EC (20/25 µg)	Penisilin G/EC (20/12.5 µg)	Penisilin G/EC (20/6.25 µg)	Penisilin G /EC (20/3.125 µg)	Kontrol Penisilin G (10 U)
<i>Enterococcus faecalis</i>	29±0,24, S	28±0, S	27±0, S	28±0, S	26±0,33, S	24±0, S
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	11±0,33, R	10±0,22, R	10±0, R	10±0, R	8±0, R	Zon yok, R
Mikroorganizmalar	Penisilin G (10 U/ECG 50-3.125 µg) ve zon çapları (mm)					
	Penisilin G /ECG (20/50 µg)	Penisilin G /ECG (20/25 µg)	Penisilin G /ECG (20/12.5 µg)	Penisilin G /ECG (20/6.25 µg)	Penisilin G /ECG (20/3.125 µg)	Kontrol Penisilin G (10 U)
<i>Enterococcus faecalis</i>	27±0, S	26±0, S	27±0,33, S	26±0, S	25±0, S	23±0, S
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12±0,5, R	12±0, R	10±0, R	11±0,33, R	10±0, R	Zon yok, R
Mikroorganizmalar	Penisilin G (10 U/EGC 50-3.125 µg) ve zon çapları (mm)					
	Penisilin G /EGC (20/50 µg)	Penisilin G /EGC (20/25 µg)	Penisilin G /EGC (20/12.5 µg)	Penisilin G /EGC (20/6.25 µg)	Penisilin G /EGC (20/3.125 µg)	Kontrol Penisilin G (10 U)
<i>Enterococcus faecalis</i>	27±0, S	26±0,32, S	27±0, S	27±0, S	26±0,23, S	25±0, S
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10±0,5, R	10±0, R	8±0, R	8±0, R	6±0, R	Zon yok, R
Mikroorganizmalar	Penisilin G (10 U/EGCG 50-3.125 µg) ve zon çapları (mm)					
	Penisilin G / EGCG (20/50 µg)	Penisilin G / EGCG (20/25 µg)	Penisilin G / EGCG (20/12.5 µg)	Penisilin G / EGCG (20/6.25 µg)	Penisilin G / EGCG (20/3.125 µg)	Kontrol Penisilin G (10 U)
<i>Enterococcus faecalis</i>	30±0,5, S	29±0, S	30±0,33, S	30±0, S	29±0, S	23±0, S
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	17±0,33, R	15±0, R	15±0, R	15±0, R	10±0, R	Zon yok, R

* Mikroorganizmalar *Müller-Hinton Agarda* 18 saat 35-37 °C'de inkübe edilmiştir. İnhibisyon zonları *BSAC* Standart Disk Hassasiyet Testlerine göre değerlendirilmiştir. Elde edilen değerler 3 paralel çalışmanın ortalamasıdır ($p \leq 0.005$).

R (Dirençli), I (Orta dereceli hassas), S (Hassas).

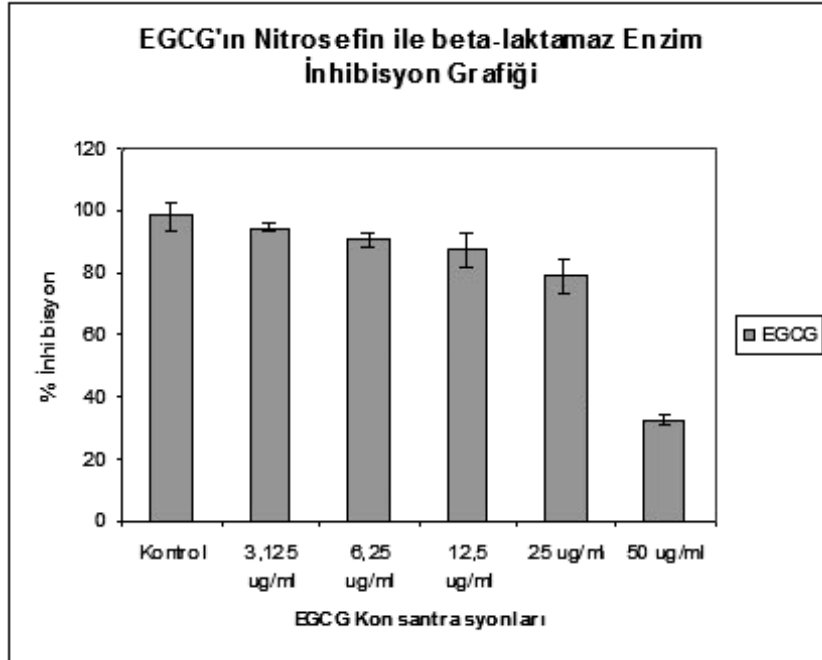
EC: Epikateşin; ECG: Epikateşin galat; EGC: Epigallokateşin; EGCG; Epigallokateşin gallat.



Şekil 1. Epigallokateşin ile beta-laktamaz (penisilinaz) aktivitesinin direkt inhibisyonu*

* Enzim aktiviteleri Bölüm 2.5' de anlatıldığı şekilde ölçülmüştür. Elde edilen değerler 3 paralel çalışmanın ortalamasıdır. n=4, p<0.005.

EGC: Epigallokateşin.



Şekil 2. Epigallokateşin gallat ile beta-laktamaz (penisilinaz) aktivitesinin direkt inhibisyonu*

*Enzim aktiviteleri Bölüm 2.5' de anlatıldığı şekilde ölçülmüştür. Elde edilen değerler 3 paralel çalışmanın ortalamasıdır. n=4, p<0.005.

EGCG: Epigallokateşin gallat.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre; ECG' nin Amoksisilin ile kombinasyonları *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 üzerinde, EGC' nin amoksisilin ile kombinasyonları *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 üzerinde, EGC' nin amoksisilin ile kombinasyonları hem *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 hem de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 üzerinde, EGC ve EGC' nin penisilin G ile kombinasyonları da *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 üzerinde, zon çapını yüksek oranda artırıcı şekilde etkiler göstermiştir. EC' nin bu sonucu vermemesi ve sadece galat yapı içeren çay polifenollerinin beta-laktamaz enzim inhibitörü olma özelliklerinin, moleküllerdeki gallat yapısından kaynaklandığını düşündürmektedir. Gallat yapı içeren çay polifenollerini tüm mikroorganizmalar üzerine aynı derecede inhibitör etkiler göstermiştir. Beta-laktamaz enzim inhibitörleri ve çay polifenollerinin kombine kullanılacağı antibiyotiklerin etkisi, patojen mikroorganizma türü ile de yakından ilişkili bulunmuştur. Sonuç olarak; beta-laktamaz enzim inhibisyonunun saptanması için hangi antibakteriyel ajanlarla birlikte kullanıldıklarında, hangi tür patojeni, ne oranda etkileyecekleri iyi bilinmeli ve bunun yanında kullanıldıkları dozlarda vücuttaki yan etkileri de saptanmalıdır.

KAYNAKLAR

- Alvarez-Castro, E., Campos-Toimil, M. ve Orallo, F. (2004). Epigallocatechin-3-gallate induces contraction of the rat aorta by a calcium influx-dependent mechanism. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 369, 496–506.
- Cho, Y.S., Schiller, N.L., Oh, K-H. (2008). Antibacterial effects of green tea polyphenols on clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Curr. Microbiol.* 57, 542-546.
- Clinical and Laboratory Standards Institute, (2006). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, approved standard M2-A9, 9 th ed., CLSI, Wayne, PA.
- Du Bois, S.K., Marriott, M.S. ve Amyes, S.G.B. (1995). TEM and SHV-derived extended spectrum beta-lactamases: relationship between selection, structure, and function. *J. Antimicrob. Chemother.* 35, 7–22 (Abstract).
- Fujiki, H. (1999). Two stages of cancer prevention with green tea. *Cancer Res. Clin. Oncol.* 125, 589–597.
- Gür, D. (2002). Laktamazlar, *Hacettepe Tıp Dergisi* 33, 102–109.
- Hamolton-Miller, J.M.T. (1995). Antimicrobial Properties of Tea. *Antimicrobial Agents and Chemother.* 39, 2375-2377.
- Hatano, T., Kusuda, M., Hori, M., Shiota, S., Tsuchiya, T., Yoshida, T. ve Theasinensin, A. (2003). A tea polyphenol formed from (-)epigallocatechin gallate, suppresses antibiotic resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Planta Med.* 69, 984–989.
- Hatano, T., Kusuda, M., Inada, K., Ogawa, T.O., Shiota, S., Tsuchiya, T. ve Yoshida, T. (2004). Effects of tannins and related polyphenols on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry* 66, 2047–2055.
- Hu, Z.Q., Zhao, W.H., Hara, Y. ve Shimamura, T. (2001). Epigallocatechin gallate synergy with ampicillin/sulbactam against 28 clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 48, 361–364.
- Hu, Z.Q., Zhao, W.H., Yoda, Y., Asano, N., Hara, Y. ve Shimamura, T. (2002). Additive, indifferent and antagonistic effects in combinations of epigallocatechin gallate with 12 non-beta-lactam antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 50, 1051–1054.
- Jazani, N.H., Shahabi Sh. ve Ali, A.A. (2007). Antibacterial effects of water soluble green tea extracts on multi- antibiotic resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Pakistan J. Biol. Sci.* 10, 1544-1546.
- Jones, R.N. (1998). Important and emerging β -lactamase-mediated resistance in hospital-based pathogens the Amp C enzymes. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 31, 461-466.
- Katiyar, S.K. ve Mukhtar, H. (1997). Tea Antioxidants in Cancer Chemoprevention. *J. Cell. Biochem.* 27, 59–67.
- Park, B.J., Park, J-C., Taguchi, H., Fukushima, K., Hyon, S-H. ve Takatori, K. (2006). Antifungalsusceptibility of epigallocatechin 3-O-gallate (EGCg) on clinical isolates of pathogenic yeasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 347, 401–405.

Song, J.M. ve Seong, B.L. (2007). Tea catechins as a potential alternative anti-infectious agent. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 5, 497–506.

Stapleton, P.D., Shah, S., Hara, Y. ve Taylor, P.W. (2006). Potentiation of catechin gallate-mediated sensitization of *Staphylococcus aureus* to oxacillin by nongalloylated catechins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 752–755.

Sudano Roccaro, A., Blanco, A.R., Giuliano, F., Rusciano, D. ve Enea, V. (2004). Epigallocatechin-gallate enhances the activity of tetracycline in *Staphylococci* by inhibiting its efflux from bacterial cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 1968–1973.

Yanagawa, Y., Yamamoto, Y., Hara, Y. ve Shimamura, T. (2003). A combination effect of epigallocatechin gallate, a major compound of green tea catechins, with antibiotics on *Helicobacter pylori* growth in vitro. *Curr. Microbiol.* 47, 244-249.

Zhao, W.H., Hu, Z.Q., Okubo, S., Hara, Y. ve Shimamura, T. (2001). Mechanism of synergy between epigallocatechin gallate and beta-lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 1737-1742.

Zhao, W.H., Hu, Z.Q., Hara, Y. ve Shimamura, T. (2002). Inhibition of penicillinase by epigallocatechin gallate resulting in restoration of antibacterial activity of penicillin against penicillinase-producing *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 2266-2268.

Zhao, W.H., Asano, N., Hu, Z.Q. ve Shimamura, T. (2003) Restoration of antibacterial activity of beta-lactams by epigallocatechin gallate against beta-lactamase-producing species depending on location of beta-lactamase. *J. Pharm. Pharmacol.* 55, 735-740.



Yağmur TUNALI, 1969 yılında Ankara’da doğmuş, ilk, orta, lise öğrenimini Ankara’da tamamlamıştır. Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden 1990 yılında Fakülte ve Bölüm birinciliği ile mezun olarak Yüksek Lisans eğitimine başlamıştır. 1992 yılında aynı bölümde Genel Biyoloji Anabilim Dalına Araştırma Görevlisi olarak atanmıştır.

1993 yılında Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Genel Biyoloji-Mikrobiyoloji programında Yüksek Lisans eğitimini bitiren TUNALI, yine 2003 yılında Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji programında başladığı Doktora eğitimini 2001 yılında tamamlamıştır. 2001-2003 yılları arasında Ankara Emniyet Genel Müdürlüğü Kriminal Polis Laboratuvarında Doktor Biyolog olarak görev yapmıştır. 2003 yılında Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Eczacılık Temel Bilimleri Bölümüne Yardımcı Doçent olarak atanmış, 2006 yılında Doçent ünvanını almıştır. Çalışma konuları Antimikrobiyal aktivite testleri, Hücre kültürü uygulamaları, toksisite, biyouyumluluk testleri, biyoadsorpsiyon çalışmalarıdır. Halen aynı fakültede Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalında görev yapan TUNALI evli ve iki erkek çocuk annesidir.



Hülya KARACA, 1980 yılında Malatya’da doğmuş; ilk, orta, lise eğitimini Malatya’da tamamlamıştır. 2003 yılında İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünden mezun olmuştur. 2004 yılında Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Eczacılık Temel Bilimleri Bölümü Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalına Araştırma Görevlisi olarak atanmıştır. Yüksek Lisans eğitimini Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde 2006 yılında tamamlamış; halen aynı enstitüye bağlı olarak doktorasını yapmaktadır. Medeni hali bekarıdır.



Yusuf ÖZTÜRK, 1958 yılında Ankara’da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Ankara’da tamamladı. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesinden 1980 yılında mezun oldu. Aynı fakültenin Farmakoloji Anabilim Dalında “Sıçan duodenumundaki bradikinin reseptörleri” başlıklı tezi ile 1985 yılında TÜBİTAK bursu ile doktorasını tamamladı. 1984 yılında Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalına araştırma görevlisi olarak atandı. 1986 yılında Yardımcı Doçent, 1987 yılında Doçent ve 1993 yılında Profesör oldu. 1997 yılında Eczacıbaşı Tıp ve Eczacılık Ödülü ile TÜBİTAK Bilim Teşvik ödülünü, 2001 yılında Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Ödülünü, 2005 yılında Eczacılık Akademisi Bilim Ödülünü, 2006 yılında Popüler Bilim Dergisi Bilim Ödülünü kazandı. 1987 yılından Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Farmakoloji Anabilim Dalının başkanlığını yürütmektedir.



Seval KORKMAZ, 1967 yılında Ruse-Bulgaristan'da doğmuştur. İlk ve orta ve lise öğretiminin tamamını Eskişehir'de tamamlamıştır. 1992 yılında Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesinden mezun olarak 1995 yılında SSK

Eskişehir Bölge Hastanesinde eczacı olarak göreve başlamıştır. 1996 yılında Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Yüksek Lisans Programını tamamlayarak Uzman Eczacı ünvanını almış ve Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalına Araştırma Görevlisi olarak atanmıştır. 2002 yılında Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Doktora programını tamamlayarak Farmakoloji Anabilim Dalına Yardımcı Doçent olarak atanmıştır. Korkmaz 2004 yılında Mustafa Nevzat Eczacılık Ödülü'nü kazanmıştır. 2006 yılı sonunda, FARGEM (Farmasötik Araştırma Geliştirme Merkezi) A.Ş.' den aldığı teklif üzerine Türk İlaç Endüstrisinde biyoeşdeğerlik öncesi in vitro permeabilite çalışmalarının yapıldığı ilk hücre kültürü laboratuvarının kuruculuğunu yapmıştır. Halen aynı şirkette Hücre Kültürü Bölüm Sorumlusu olarak görev yapmaktadır. Çalışmalarının büyük kısmı bitkisel ve sentetik ilaçların antikanser, yara iyileştirici ve yaşlanmayı geciktirici etkileri üzerinedir; ancak son zamanlarda, in vitro biyolojik bariyer modellerinde ilaçların davranışları ve erken ilaç araştırmalarında HTS (High- Throughput Screening, Yüksek Verimli Tarama) çalışmalarını sürdürmektedir. Korkmaz bir erkek çocuk annesidir.

