

**İNSAN SERUMUNDAN PARAOKSONAZ-1 VE İNSAN
TROMBOSİTLERİNDEN SİKLOOKSİGENAZ-1
ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, BAZI İLAÇLARIN BU
ENZİMLERİN AKTİVİTELERİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Esra DİLEK

Doktora Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Prof. Dr. Ö.İrfan KÜFREVİOĞLU

2012

Her hakkı saklıdır.

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**İNSAN SERUMUNDAN PARAOKSONAZ-1 VE İNSAN
TROMBOSİTLERİNDEN SİKLOOKSİGENAZ-1 ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI, BAZI İLAÇLARIN BU ENZİMLERİN
AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Esra DİLEK

KİMYA ANABİLİMDALI

ERZURUM

2012

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

İNSAN SERUMUNDAN PARAOKSONAZ-1 VE İNSAN TROMBOSİTLERİNDEN
SİKLOOKSİGENAZ-1 ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, BAZI İLAÇLARIN BU
ENZİMLERİN AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU danışmanlığında, Esra DİLEK tarafından hazırlanan bu çalışma 10/09/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından, Kimya Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak **oybirliği ile** kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ö.İrfan KÜFREVİOĞLU

İmza :

Üye : Prof. Dr. Münir OKTAY

İmza :

Üye : Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR

İmza :

Üye : Doç. Dr. T. Abdulkadir ÇOBAN

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. B.Mesut HALICI

İmza :

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU
Enstitü Müdürü

Bu çalışma BAP projeleri kapsamında desteklenmiştir.

Proje No: 2009/81

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Doktora Tezi

İNSAN SERUMUNDAN PARAOKSONAZ-1 VE İNSAN TROMBOSİTLERİNDEN
SİKLOOKSİGENAZ-1 ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, BAZI İLAÇLARIN BU
ENZİMLERİN AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Esra DİLEK

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ö.İrfan KÜFREVİOĞLU

Paraoksonaz 1 (PON-1, E.C.3.1.8.1) enzimi insan serumundan amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-Sephadex A 50 anyon değişim kromatografisi ve Sephadex G-200 jel filtrasyon kromatografisi teknikleri kullanılarak %44,8 verimle yaklaşık 257 kat saflaştırılmıştır. Siklooksigenaz-1 (COX-1, EC 1.14.99.1) enziminin ise insan trombositlerinden Sepharose-4B-1,6-diaminoheksan afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırılması başarılmıştır. PON-1 enziminin molekül kütlesi 42,5 kDa; COX-1 enziminin molekül kütlesi 71,5 kDa olarak belirlenmiştir. Saflaştırılan PON-1 enzimi üzerine *in vitro* inhibisyon etkisi gösteren netilmisin sülfat, linkomisin hidroklorür, streptomisin sülfat, oksitetrasiklin hidroklorür, penisilin G potasyum kristalize, klindamisin fosfat, akarboz, pioglitazon hidroklorür ve metotreksat ilaçları için IC₅₀ değerleri ve K_i sabitleri hesaplanarak inhibisyon tipleri belirlenmiştir. Saflaştırılan COX-1 enzimi üzerine *in vitro* inhibisyon etkisi gösteren metotreksat, metilprednisolon sodyum süksinat ve azatioprin ilaçları için IC₅₀ değerleri belirlenmiştir. EIA (Enzim immunoanaliz) yöntemi kullanılarak aynı ilaçların COX-1 (koyun) enzimi üzerindeki *in vitro* inhibisyon etkilerine bakılmıştır ve saflaştırılan COX-1 enzimi ile benzer sonuçlar verdiği bulunmuştur.

2012, 136 sayfa

Anahtar Kelimeler: Paraoksonaz-1 enzimi, siklooksigenaz-1 enzimi, saflaştırma, ilaç, inhibisyon

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

PURIFICATION OF PARAOXONASE-1 ENZYME FROM HUMAN SERUM AND CYCLOOXYGENASE-1 ENZYME FROM HUMAN PLATELETS, INVESTIGATION EFFECTS OF SOME DRUGS ON THE ENZYMES ACTIVITY

Esra DİLEK

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Ö.İrfan KÜFREVİOĞLU

Paraoxonase 1 (PON-1, EC 3.1.8.1) enzyme was purified from human serum using the ammonium sulfate precipitation, DEAE-Sephadex A 50 anion exchange chromatography and Sephadex G-200 gel filtration chromatography techniques with 44.8% yield approximately 257-fold. Cyclooxygenase-1 (COX-1, EC 1.14.99.1) enzyme was purified from human platelets using Sepharose-4B-1.6-diaminoheksan affinity chromatography. PON-1 enzyme's molecular mass of approximately 42.5 kDa, COX-1 enzyme's molecular mass of approximately 71.5 kDa was determined. In addition, effects of some drugs on human serum PON-1 enzyme activity and human platelet COX-1 enzyme activity were investigated. IC₅₀ values and Ki values were calculated for the drugs netilmicin sulfate, lincomycin hydrochloride, streptomycin sulfate, oxytetracycline hydrochloride, penicillin G potassium crystalline, clindamycin phosphate, acarbose, pioglitazone hydrochloride and methotrexate. IC₅₀ values of purified COX-1 enzyme was calculated for the drugs methotrexate, azathioprine and methylprednisolone sodium succinate. Using the same drugs, the in vitro inhibition effects on COX-1 (ovine) enzyme were investigated with EIA (enzyme immunoassay analysis) method. Similar results were obtained with the purified COX-1 enzyme.

2012, 136 pages

Keywords: Paraoxonase-1 enzyme, cyclooxygenase-1 enzyme, purification, drug, inhibition

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu alışmanın büyük bir blm Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Blm Biyokimya Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Kalan çalışmaların bir kısmı Tıp Fakültesi Biyokimya Bölümünde bir kısmı ise Veterinerlik Fakültesi Biyokimya Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Bütün çalışmalarım süresince anlayışını, sabrını ve desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerini kendime örnek aldığım çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. . İrfan KüFREVİOğLU'na sonsuz şükran duygularımı sunarım. Yine yardımlarını ve desteklerini gördüğüm Sayın Prof. Dr. şükrü BEYDEMİR'e sonsuz teşekkür ederim.

Çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Bünyamin Mesut HALICI'ya teşekkür ederim. Bana sağladığı çalışma olanaklarından dolayı Kimya bölümüne ve Biyokimya alışma grubu arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Mali destek sağlamak suretiyle araştırmanın gerçekleşmesini kolaylaştıran TUBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Programına ayrıca teşekkür ederim.

Beni bugünlere getiren, hayatım boyunca hep yanımda olan ve her türlü maddi ve manevi desteklerini aldığım anneme ve babam Zümrüt BAYRAM'a, desteğini, sevgisini ve anlayışını esirgemeyen sevgili eşim Fatih DİLEK'e, yaşama sevinlerim kızım Feryal ve oğlum Berkay'a en içten sevgi, saygı ve şükranlarımı sunarım.

Esra DİLEK

Ağustos, 2012

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1.GİRİŞ	1
1.1 Enzimler	1
1.1.1 Enzimlerin kimyasal yapısı	1
1.1.2 Enzim inhibisyonu	2
1.2 Paraoksonaz Enzimi	11
1.2.1 Paraoksonaz enzimi ve yapısı	11
1.2.3. PON-1 enzimi üzerine etkileri incelenen ilaçlar ve özellikleri	17
1.3 Siklooksigenaz Enzimi	22
1.3.1 Siklooksigenaz enzimi ve yapısı	22
1.3.2. Siklooksigenaz enzimleri arasındaki yapısal farklılıklar	26
1.3.3. COX reaksiyonu	29
1.3.4. COX enzimi aktivite belirleme yöntemleri	31
1.3.5. ELİSA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)	33
1.3.6. EIA yöntemi ile COX-1 (koyun) enzim aktivitesinin belirlenmesi	37
1.3.7. “Kemilüminesans Siklooksigenaz Aktivite Kit” kullanılarak insan trombositlerinden saflaştırılan COX-1 enzim aktivitesinin belirlenmesi	38
1.3.8. COX-1 (koyun) ve insan trombositlerinden saflaştırılan COX-1 enzimi üzerine etkileri incelenen ilaçlar ve özellikleri	40
2.KAYNAK ÖZETLERİ	43
2.1. PON Enzimi	43
2.2. COX Enzimi	48
3.MATERYAL ve YÖNTEM	52
3.1. Materyal	52

3.1.1.Kullanılan kimyasal maddeler.....	52
3.1.2.Yararlanılan alet ve cihazlar.....	52
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması.....	54
3.2.Yöntemler.....	59
3.2.1. İnsan serum paraoksonaz-1 enzimi.....	59
3.2.2. İnsan trombositlerinden saflaştırılan COX-1 enzimi.....	65
3.2.3. Protein tayini.....	66
3.2.4. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzim saflığının kontrolü.....	68
3.2.5. Sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzimin molekül kütlesi tayini.....	69
3.2.6. İnsan serum paraoksonaz-1 enziminin aktivitesi üzerine bazı ilaçların <i>in vitro</i> etkilerinin belirlenmesi.....	69
3.2.7. İnsan serum paraoksonaz-1 enziminin aktivitesi üzerine inhibitör etkisi gösteren antibiyotik ve ilaçlar için IC ₅₀ ve K _i değerlerinin belirlenmesine ait çalışmalar.....	69
3.2.8. EIA yöntemi ile COX-1 (koyun) enzim aktivitesi üzerine bazı ilaçların etkilerinin belirlenmesi.....	85
3.2.9. “Kemilüminesans Siklooksigenaz Aktivite Kit” kullanılarak insan trombositlerinden saflaştırılan COX-1 enzim aktivitesi üzerine bazı ilaçların etkilerinin belirlenmesi.....	86
4.ARAŞTIRMA BULGULARI.....	88
4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik.....	88
4.2. İnsan Serum PON-1 Enziminin Saflaştırılması Sonuçları.....	89
4.3. İnsan Serum PON-1 Enziminin SDS-PAGE ile Saflık Kontrolü.....	89
4.4. İnsan Serum Paraoksonaz-1 Enziminin Aktivitesi Üzerine Bazı Antibiyotik ve İlaçlar İçin IC ₅₀ Değerlerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışmaların Sonuçları.....	91
4.5. İnsan Serum PON-1 Enzimi Üzerine İnhibitör Etkisi Gösteren Bazı Antibiyotikve İlaçlar İçin K _i Değerlerinin Belirlenmesine Ait Çalışmaların Sonuçları.....	96
4.6. EIA Yöntemi İle COX-1 (koyun) Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı İlaçların Etkilerinin Belirlenmesine Ait Çalışmaların Sonuçları.....	1011
4.7. İnsan Trombositlerinden Saflaştırılan COX-1 Enziminin SDS-PAGE ile Saflık Kontrolü.....	1033

4.8. “Kemilüminesans Siklooksigenaz Aktivite Kit” Kullanılarak İnsan Trombositlerinden Saflaştırılan COX-1 Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı İlaçların Etkilerinin Belirlenmesi	105
5.TARTIŞMA ve SONUÇ	10909
KAYNAKLAR	1266
ÖZGEÇMİŞ	137

SİMGELER DİZİNİ

AA	Araşidonik asit
AChE	Asetilkolinesteraz
Apo A1	Apolipoprotein A1
ASA	Autism spectrum disorders
BOS	Beyin-omurilik sıvısı
BSA	Bovin serum albumin
COX	Siklooksigenaz
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribinükleik asit
DTT	Dityotreitol
E	Enzim
EC	Enzim komisyon numarası
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
EGF	Epidermal büyüme faktörü
EI	Enzim-inhibitör kompleksi
EIA	Enzyme immunoanalyze
ELİSA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ES	Enzim substrat kompleksi
ESI	Enzim-Substrat-İnhibitör kompleksi
EÜ	Enzim ünitesi
GİS	Gastrointestinal sistem
HDL	High dansity lipoprotein (Yüksek yoğunluklu lipoprotein)
I	İnhibitör
IC ₅₀	Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
K _i	Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti
LDL	Low density lipoprotein (Düşük yoğunluklu lipoprotein)
LIF	Laser-induced fluorescence
LPS	Lipopolisakkarit

NSAİ	Non steroidal anti-inflamatuar ilaç
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PER	Amonyum peroksidisülfat
PG	Prostaglandin
PLIF	Planar laser-induced fluorescence
PON	Paraoksonaz
POX	Peroksidasyon
RA	Romatoid artrit
RLU	Relative Light Unit
RNA	Ribonükleik asit
S	Substrat
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TCA	Triklor asetik asit
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilendiamin
Tris	Trihidroksimetil amino metan
TX	Tromboksan
V _{max}	Maksimum hız
VLDL	Very-low-density lipoprotein (Çok düşük yoğunluklu lipoprotein)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	(a) Yarışmalı ve (b) Yarı yarışmalı inhibisyon.....	4
Şekil 1.2.	Yarışmasız inhibisyon.....	4
Şekil 1.3.	Proteinlerin saflaştırılmasında kullanılan iyon değişim kolon maddeleri.....	9
Şekil 1.4.	Afinite kromatografisinin şematik gösterimi	10
Şekil 1.5.	İnsektisitlerde yaygın olarak kullanılan okson metabolitlerinin hidrolizi ...	12
Şekil 1.6.	İnsan paraoksonaz enziminin yapısı (Aviram <i>et al.</i> 1999).....	13
Şekil 1.7.	Paraoksonaz enziminin üç boyutlu görünümü (Harel <i>et al.</i> 2004).....	13
Şekil 1.8.	Aromatik esterlerin hidrolizi.....	15
Şekil 1.9.	Sinir gazlarının hidrolizi	15
Şekil 1.10.	Lakton hidrolizi.....	15
Şekil 1.11.	HDL partikülü ve paraoksonaz enzimi (Renault 2006).....	16
Şekil 1.12.	Netilmisin sülfat molekülünün yapısal formülü	17
Şekil 1.13.	Linkomisin HCl molekülünün yapısal formülü	18
Şekil 1.14.	Streptomisin sülfat molekülünün yapısal formülü	19
Şekil 1.15.	Oksitetrasiklin HCl molekülünün yapısal formülü	19
Şekil 1.16.	Penisilin G potasyum molekülünün yapısal formülü.....	20
Şekil 1.17.	Klindamisin fosfat molekülünün yapısal formülü	21
Şekil 1.18.	Akarboz molekülünün yapısal formülü	21
Şekil 1.19.	Pioglitazon HCl molekülünün yapısal formülü	22
Şekil 1.20.	Metotreksat molekülünün yapısal formülü	22
Şekil 1.21.	Araşidonik asitten prostaglandin ve tromboksanların sentez şeması.....	24
Şekil 1.22.	COX'un homodimer yapısı (Garavito 1999)	26
Şekil 1.23.	COX-1 ve COX-2 izoformlarının farklı amino asit kompozisyonu ve aktif bölgelerinin dıştan görünüşü.....	29
Şekil 1.24.	COX enzimlerinin reaksiyon mekanizması	30
Şekil 1.25.	Enzimler ve kromojen substratları	34
Şekil 1.26.	Dolaylı, sandviç ve yarışmalı ELİSA diyagramı	36
Şekil 1.27.	Asetilkolinesteraz tarafından katalizlenen reaksiyon.....	38
Şekil 1.28.	COX reaksiyonu.....	38

Şekil 1.29. Metotreksat molekülünün yapısal formülü	40
Şekil 1.30. Metilprednisolon sodyum süksinat molekülünün yapısal formülü	41
Şekil 1.31. Azatioprin molekülünün yapısal formülü	42
Şekil 3.1. PG standartlarının hazırlanışı.....	58
Şekil 3.2. Sephadex G-200 jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılan insan serum PON-1 enziminin elüsyon grafiği	64
Şekil 3.3. COX-1 (koyun) enzimi için yapılan plate çalışma çanı.....	86
Şekil 3.4. İnsan trombositlerinden saflaştırılan COX-1 enzimi için yapılan plate çalışma planı	87
Şekil 4.1. Bradford yöntemiyle proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart grafik	88
Şekil 4.2. İnsan serum PON-1 enziminin saflaştırma sonucu SDS-PAGE resmi.....	90
Şekil 4.3. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yöntemiyle insan serum paraoksanaz-1 enziminin molekül kütlesi tayininde kullanılan standart grafik.....	90
Şekil 4.4. İnsan serum PON-1 enzimi üzerine netilmisin sülfat ilacının etkisi.....	91
Şekil 4.5. İnsan serum PON-1 enzimi üzerine linkomisin hidroklorür ilacının etkisi .	92
Şekil 4.6. İnsan serum PON-1 enzimi üzerine streptomisin sülfat ilacının etkisi.....	92
Şekil 4.7. İnsan serum PON-1 enzimi üzerine oksitetrasiklin hidroklorür ilacının etkisi	93
Şekil 4.8. İnsan serum PON-1 enzimi üzerine penisilin G potasyum kristalize ilacının etkisi	93
Şekil 4.9. İnsan serum PON-1 enzimi üzerine klindamisin fosfat ilacının etkisi	94
Şekil 4.10. İnsan serum PON-1 enzimi üzerine akarboz ilacının etkisi.....	94
Şekil 4.11. İnsan serum PON-1 enzimi üzerine pioglitazon hidroklorür ilacının etkisi	95
Şekil 4.12. İnsan serum PON-1 enzimi üzerine metotreksat ilacının etkisi.....	95
Şekil 4.13. Netilmisin sülfat ilacı için Ki sabitinin bulunmasına yönelik çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	96
Şekil 4.14. Linkomisin hidroklorür ilacı için Ki sabitinin bulunmasına yönelik çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	97
Şekil 4.15. Streptomisin sülfat ilacı için Ki sabitinin bulunmasına yönelik çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	97

Şekil 4.16. Oksitetrasiklin hidroklorür ilacı için Ki sabitinin bulunmasına yönelik çizilen Lineweaver-Burk grafiği	98
Şekil 4.17. Penisilin G potasyum kristalize ilacı için Ki sabitinin bulunmasına yönelik çizilen Lineweaver-Burk grafiği	98
Şekil 4.18. Klindamisin fosfat ilacı için Ki sabitinin bulunmasına yönelik çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	99
Şekil 4.19. Akarboz ilacı için Ki sabitinin bulunmasına yönelik çizilen Lineweaver-Burk grafiği	99
Şekil 4.20. Pioglitazon hidroklorür ilacı için Ki sabitinin bulunmasına yönelik çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	100
Şekil 4.21. Metotreksat ilacı için Ki sabitinin bulunmasına yönelik çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	100
Şekil 4.22. COX-1 (koyun) enzimi üzerine metotreksat ilacının etkisi	102
Şekil 4.23. COX-1 (koyun) enzimi üzerine metilprednisolon sodyum süksinat ilacının etkisi.....	102
Şekil 4.24. COX-1 (koyun) enzimi üzerine azatioprin ilacının etkisi.....	103
Şekil 4.25. İnsan trombositlerinden COX-1 enziminin saflaştırılması sonucu SDS-PAGE resmi	104
Şekil 4.26. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yöntemiyle insan trombositleri COX-1 enziminin molekül kütlesi tayininde kullanılan standart grafik.....	104
Şekil 4.27. İnsan trombositlerinden saflaştırılan COX-1 enzimi üzerine metilprednisolon sodyum süksinat ilacının etkisi.....	107
Şekil 4.28. İnsan trombositlerinden saflaştırılan COX-1 enzimi üzerine azatioprin ilacının etkisi	107
Şekil 4.29. İnsan trombositlerinden saflaştırılan COX-1 enzimi üzerine metotreksat ilacının etkisi	108
Şekil 5.1. Paraoksonaz1 enziminin ismini aldığı reaksiyon.....	118

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1.	Enzim inhibisyon çeşitleri	5
Çizelge 1.2.	Prostanoidlerin lokalize oldukları yerler ve biyolojik aktiviteleri.....	25
Çizelge 3.1.	İnsan serum PON-1 enziminin aktivite ölçüm kuvvet içeriği	70
Çizelge 3.2.	İnsan serumundan saflaştırılan PON-1 enzimi üzerinde netilmisin sülfat'ın IC ₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	71
Çizelge 3.3.	İnsan serumundan saflaştırılan PON-1 enzimi üzerinde linkomisin hidroklorür'ün IC ₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	72
Çizelge 3.4.	İnsan serumundan saflaştırılan PON-1 enzimi üzerinde streptomisin sülfat'ın IC ₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	72
Çizelge 3.5.	İnsan serumundan saflaştırılan PON-1 enzimi üzerinde oksitetrasiklin hidroklorür'ün IC ₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	73
Çizelge 3.6.	İnsan serumundan saflaştırılan PON-1 enzimi üzerinde penisilin G potasyum kristalize'nin IC ₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	73
Çizelge 3.7.	İnsan serumundan saflaştırılan PON-1 enzimi üzerinde klindamisin fosfat'ın IC ₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	74

Çizelge 3.8.	İnsan serumundan saflaştırılan PON-1 enzimi üzerinde akarboz'un IC ₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	74
Çizelge 3.9.	İnsan serumundan saflaştırılan PON-1 enzimi üzerinde pioglitazon hidroklorür'in IC ₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	75
Çizelge 3.10.	İnsan serumundan saflaştırılan PON-1 enzimi üzerinde metotreksat'ın IC ₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	75
Çizelge 3.11.	İnsan serumundan saflaştırılan PON-1 enzimi üzerinde netilmisin sülfat'ın K _i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları	76
Çizelge 3.12.	İnsan serumundan saflaştırılan PON-1 enzimi üzerinde linkomisin hidroklorür'ün K _i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	77
Çizelge 3.13.	İnsan serumundan saflaştırılan PON-1 enzimi üzerinde streptomisin sülfat'ın K _i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları	78
Çizelge 3.14.	İnsan serumundan saflaştırılan PON-1 enzimi üzerinde oksitetrasiklin hidroklorür'ün K _i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	79
Çizelge 3.15.	İnsan serumundan saflaştırılan PON-1 enzimi üzerinde penisilin G potasyum kristalize'nin K _i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	80
Çizelge 3.16.	İnsan serumundan saflaştırılan PON-1 enzimi üzerinde klindamisin fosfat'ın K _i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları	81

Çizelge 3.17.	İnsan serumundan saflaştırılan PON-1 enzimi üzerinde akarboz'un K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	82
Çizelge 3.18.	İnsan serumundan saflaştırılan PON-1 enzimi üzerinde pioglitazon hidroklorür'ün K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	83
Çizelge 3.19.	İnsan serumundan saflaştırılan PON-1 enzimi üzerinde metotreksat'ın K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	84
Çizelge 3.20.	COX-1 (koyun) enzim aktivitesi üzerine bazı ilaçların etkilerinin belirlenmesi için yapılan pipetlemelerin özeti.....	86
Çizelge 3.21.	İnsan trombositlerinden saflaştırılan COX-1 enzim aktivitesi üzerine bazı ilaçların etkilerinin belirlenmesi için yapılan pipetlemelerin özeti	87
Çizelge 4.1.	İnsan serum PON-1 enziminin saflaştırılması basamakları.....	89
Çizelge 4.2.	İnsan serum paraoksonaz-1 enzimi için bulunan K_i ve IC_{50} değerleri...	101
Çizelge 4.3.	COX-1 (koyun) enzimi için bulunan IC_{50} değerleri	103
Çizelge 4.4.	Metilprednisolon sodyum süksinat ilacının insan trombositlerinden saflaştırılan COX-1 enzimi aktivitesi üzerine etkisi.....	105
Çizelge 4.5.	Azatioprin ilacının insan trombositlerinden saflaştırılan COX-1 enzimi aktivitesi üzerine etkisi	106
Çizelge 4.6.	Metotreksat ilacının insan trombositlerinden saflaştırılan COX-1 enzimi aktivitesi üzerine etkisi.....	106
Çizelge 4.7.	İbufren ve meloksikam ilaçlarının insan trombositlerinden saflaştırılan COX-1 enzimi aktivitesi üzerine etkisi.	106
Çizelge 4.8.	İnsan trombositlerinden saflaştırılan COX-1 enzimi için bulunan IC_{50} değerleri.....	108
Çizelge 5.1.	Araşidonik asit yolunda meydana gelen bazı ürünler ve etkileri	113

1.GİRİŞ

1.1 Enzimler

Enzimler, canlı organizmalarda kimyasal oluşumunu sağlayan, reaksiyon hızını artıran ve yan ürün oluşmaksızın %100 ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Enzimlerin çoğunluğu protein yapısındadır. Katalitik aktivite gösteren küçük bir RNA grubu da mevcuttur (Keha ve Küfrevioğlu 2005).

Biyokimyasal araştırmaların büyük çoğunluğunu enzim çalışmaları oluşturmaktadır. Bu alandaki en büyük gelişmelerden biri 1926 yılında J.B.Summer'in üreaz enzimini "Jack Bean" bitkisinden elde edip kristallendirmesi ve protein yapısında olmasını keşfetmesidir. Günümüzde 2000 kadar enzim tanımlanmış, birçoğu saflaştırılmış, karakterize edilmiş ve 200'den fazla enzim de kristallendirilmiştir (Keha ve Küfrevioğlu 2005).

1.1.1 Enzimlerin kimyasal yapısı

Enzimler diğer proteinler gibi, yaklaşık olarak 12,000'den 1 milyona değişen molekül ağırlığına sahiptir. Bazı enzimler amino asit kalıntıları dışında aktivite için kimyasal gruplara gereksinmez. Diğerleri kofaktör olarak adlandırılan Fe^{+2} , Mg^{+2} veya Zn^{+2} gibi bir veya daha fazla inorganik iyon veya koenzim olarak adlandırılan kompleks organik ve metalloorganik moleküllere gereksinir. Bazı enzimler aktivite için hem koenzime hem de bir ya da birden fazla metal iyonuna gereksinir. Enzim proteinine çok sıkı olarak veya hatta kovalent olarak bağlanan bir koenzim veya metal iyonu bir prostetik grup olarak adlandırılır. Metal iyonlarıyla ve/veya koenzimiyle birlikte katalitik olarak aktif olan bir enzim holoenzim olarak adlandırılır. Bu gibi enzimlerin protein kısmı apoenzim veya apoprotein olarak adlandırılır. Koenzimler özgül işlevsel grupların geçici taşıyıcısı olarak işlev yapar. Koenzimler çoğunlukla diyetle küçük miktarlarda bulunan gerekli organik besinler olan vitaminlerden türer.

Sonuç olarak bazı enzim proteinleri fosforillenme, glikozillenme ve diğer süreçlerle kovalent olarak modifiye edilir. Bu değişimlerin birçoğu enzim aktivitesinin düzenlenmesini de kapsar (Nelson and Cox 2005).

1.1.2 Enzim inhibisyonu

Bazı bileşikler tarafından enzimlerin *in vivo* ve *in vitro* aktivitelerinin azaltılması ya da tamamen yok edilmesi olayına inhibisyon adı verilir. İnhibisyona sebep olan bileşiklere inhibitör denir. İnhibitörler genellikle küçük molekül yapısına sahip bileşikler ya da iyonlardır. Enzim inhibisyonu biyolojik sistemlerde başlı başına bir kontrol mekanizması oluşturduğu için önemlidir. Birçok kimyasal madde, ilaç ve zehirli bileşikler de fonksiyonlarını bu yolla gerçekleştirirler (Keha ve Küfrevioğlu 2005).

Enzim inhibisyon çeşitleri

Enzimatik inhibisyon dönüşümlü ya da dönüşümsüz olabilir. Dönüşümsüz inhibisyonda enzimin bir ya da daha fazla fonksiyonel grubu etkilenir. İnhibitör, enzime ya kovalent olarak bağlanır ya da kompleks oluşturur. V_{max} azalırken, K_M değişmeden kalır.

Dönüşümsüz inhibisyonun aksine dönüşümlü inhibisyonda enzim ile inhibitör etkileşmesi, bir denge reaksiyonu şeklindedir. Dönüşümlü inhibisyon üç grupta incelenir. Bunlar: yarışmalı (kompetitif) inhibisyon, yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon ve yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyondur. Dönüşümlü inhibisyonun en basit tipi yarışmalı inhibisyondur. Yarışmalı inhibitör yapı itibariyle substrata benzer ve enzimin aktif bölgesine bağlanır. Böylece substratın enzime bağlanması önlenmiş olur. Fakat substrat konsantrasyonu artırılmakla inhibisyon etkisi ortadan kaldırılabilir. Yani enzimin V_{max} değeri değişmezken, K_M değeri artar.

Yine dönüşümlü tip olan yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyonda inhibitör ve substrat enzim molekülüne aynı anda bağlanabilir. Bu durum bağlanmanın enzimin aynı bölgesine olmadığını gösterir. Yarışmasız bir inhibitör, etkisini; bir enzimin turnover

sayısını, yani katalitik aktivitesini düşürerek gösterir. Burada substrat ve inhibitör arasında yarışma söz konusu değildir. Substrat konsantrasyonu artırılmakla inhibisyon ortadan kaldırılamaz. Enzimin V_{max} değeri azalırken, K_M sabit kalır. Substrat ve inhibitör, farklı bölgelere bağlanabildiğinden enzimin iki çeşit inaktif kompleksi meydana gelir.

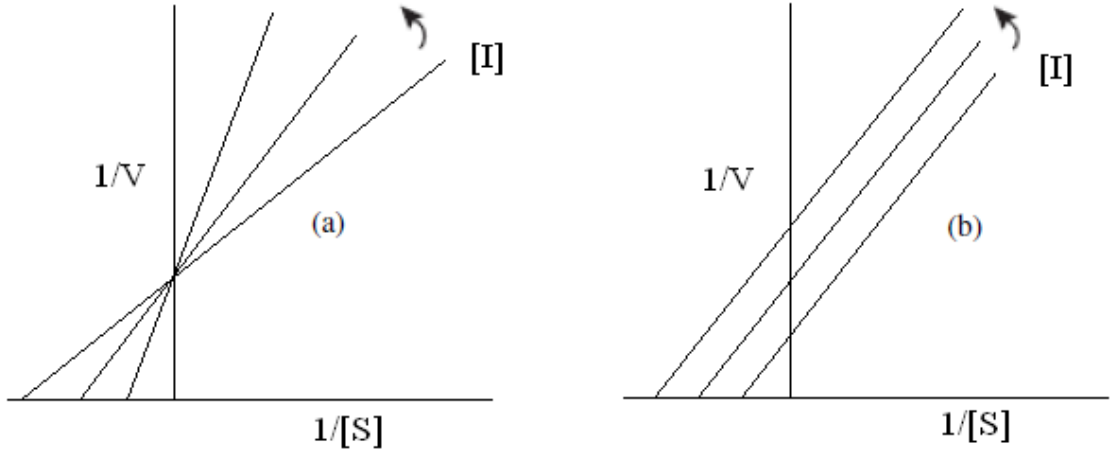
Bir başka dönüşümlü inhibisyon tipi de yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyonudur. Bu inhibisyon çeşidinde inhibitör serbest enzime bağlanamaz. Sadece enzim-substrat (ES) kompleksine bağlanır. Tek substratlı sistemlerde yarı yarışmalı inhibisyona nadir rastlanır. Daha çok birden fazla substratlı enzimler için geçerlidir. Enzim-substrat inhibitör (ESI) kompleksi ortamda bulunacağından yarı yarışmalı inhibitörün varlığında V_{max} azalır. ESI kompleksinin oluşumu vasıtasıyla S kompleksi ortamdan sürekli çekileceğinden enzim ve substrattan ES kompleksinin oluşumu dengesini daha fazla sağa kaydırır ve K_M değeri küçülür.

Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyonunun özel bir çeşidi olan lineer karışık tip inhibisyon dönüşümlü inhibisyon çeşitleri arasındadır. Bu tür inhibisyonda enzim, substrat ve inhibitörün bağlanma denge sabitleri farklılaşmaktadır. Birçok multienzim sistemi net reaksiyon hızlarını kendileri düzenleme kapasitesine sahiptir. Bu sistemlerin çoğunda seri reaksiyonların son ürünü belirli bir konsantrasyona eriştiğinde sistemin ilk enzimini veya dallanma noktasındaki enzimi inhibe eder. Bu enzimlere “allosterik enzimler” denir ve bu olaya da “feed-back” inhibisyonu adı verilir. Birden fazla polipeptit zinciri ihtiva eden allosterik enzimlerde inhibitörlerin enzime bağlanmasıyla değişik alt birimlerin bağlanma merkezleri arasındaki etkileşimlerle allosterik inhibisyon olayı meydana gelir. Allosterik enzimleri etkileyen bileşiklere “modülatör” denir.

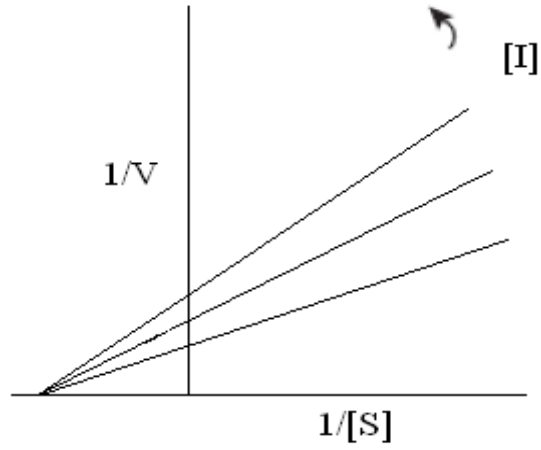
Inhibisyon çeşidinin ve K_i sabitinin belirlenmesi için en çok kullanılan yöntem, Lineweaver–Burk grafikleridir. Bu yöntemde $1/V-1/S$ grafikleri sabit inhibitör ve beş farklı substrat konsantrasyonunda çizilerek K_i sabitleri hesaplanır. K_i sabitlerinin bulunmasında ikinci yol Dixon grafikleri yoludur. Bu yöntemde en az iki basit substrat

konsantrasyonunda $1/V$ - $[I]$ grafiği çizilerek kesim noktalarından K_i sabitleri hesaplanır (Keha ve Küfrevioğlu 2005; Nelson and Cox 2005).

Enzim inhibisyon türlerine özđü grafikler Şekil 1.1 ve Şekil 1.2'de görüldüğü gibidir.



Şekil 1.1. (a) Yarışmalı ve (b) Yarı yarışmalı inhibisyon



Şekil 1.2. Yarışmasız inhibisyon

Çizelge 1.1. Enzim inhibisyon çeşitleri

İnhibisyon Çeşidi	Şematik Gösterimi	K _m , V _{max}
Yarışmalı İnhibisyon	$E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P$ $\begin{array}{c} \updownarrow \pm I \\ EI \end{array}$	V _{max} değişmez K _M artar
Yarışmasız İnhibisyon	$E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P$ $\begin{array}{c} \updownarrow \pm I \\ EI \end{array} \quad \begin{array}{c} \updownarrow \pm I \\ ESI \end{array}$	V _{max} azalır K _M değişmez
Yarı yarışmalı İnhibisyon	$E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P$ $\begin{array}{c} \updownarrow \pm I \\ ESI \end{array}$	V _{max} azalır K _M azalır

Çeşitli organizmalar kendilerine has proteinlere sahip oldukları gibi, her hücre tipi de birçok değişik protein ihtiva etmektedir. Bunun yanında proteinler, biyolojik aktivitelerini ancak belirli pH ve sıcaklık sınırlarında gösterebilirler. Bu sebeplerden dolayı bir proteinin saf halde bir hücre veya dokudan izolasyonu güç bir iştir. Bu güçlükler rağmen şimdiye kadar birçok protein saf olarak elde edilmiştir. Binin üzerinde enzim kısmen saflaştırılmış ve iki yüzden fazlası saf kristal halde elde edilmiştir. Ayrıca hiçbir enzimatik aktivite göstermeyen yüzlerce protein çeşitli kaynaklardan yüksek saflık derecesinde izole edilmiştir. Proteinler üç boyutlu yapıları, sıcaklık, pH, yüzey gerilimi gibi birçok faktörden hızlı bir şekilde etkilenerek kısa sürede enzim aktivitelerini kaybedebilmektedirler. Bu nedenle enzim izolasyonu deneyleri oldukça dikkat gerektiren çalışmalardır.

Safılaştırma işlemleri genelde enzimlerin;

1. Molekül büyüklüğü,
2. Çözünürlük farklılıkları,
3. Elektriksel yük,
4. Adsorbsiyon davranışlarındaki farklılıklar,
5. Diğer moleküllere karşı biyolojik afinite,

esasına göre gerçekleştirilmektedir (Keha ve Küfrevioğlu 2005).

Proteinlerin en çok göze çarpan özellikleri büyüklükleridir. Bu durum, bir proteini diğer proteinlerden ve küçük moleküllerden ayırmayı mümkün kılar. Bu esasa dayalı proteinleri ayırma metodları diyaliz, ultrafiltrasyon, yoğunluk gradienti santrifügasyonu ve jel filtrasyon kromatografisidir.

Genel adıyla dışarılama kromatografisi adıyla bilinen jel filtrasyon kromatografisinde kolon materyali olarak Sepharose, Biogel gibi polimerler yanında yaygın olarak kullanılan ve bir karbohidrat türevi olan Sephadex polimeridir. Sephadex yapısında fazla miktarda hidroksil grubu ihtiva etmesi dolayısıyla suya ve elektrolit çözeltilerine ilgisi fazladır. Bu teknikte küçük molekül kütleli proteinler ve diğer safsızlıklar Sephadex'in porlarına takılırlar. Büyük molekül kütleli proteinler ise Sephadex'in porlarına takılmazlar ve molekül kütlelerinin büyüklük sırasına göre kolondan elüe edilirler. Bu da proteinlerin ayırımları için oldukça avantajlı bir durumdur.

Jellerin özelliklerini belirlemede kullanılan temel terim "su kazanım değeri" dir. Bir gram kuru jelin emebildiği su miktarına o jelin su kazanım değeri denir. Bu değeri 10 ile çarpılarak jelin ticari adının sonuna yazılır. Örneğin Sephadex G-15 jelinin su kazanım değeri 1,5'tir (1 g madde 1,5 g su emebilir). Bir jelin su kazanım değeri arttıkça gözenek büyüklüğü de artar.

Daha büyük moleküllerin, mesela bazı proteinler ve virüslerin ayrılmasında agardan elde edilen ve nötral bir polisakkarit olan agaroz jeli kullanılır. Jel filtrasyon kromatografisinde karışımların ayrılmasında karışımda bulunan maddelerin molekül büyüklükleri rol oynar. Moleküller büyüdükçe ayrılma molekül büyüklüğünden ziyade molekül kütlelerine göre olur. Örneğin; G-100 ve G-200 tipi jellerde elüe etme hacmi yaklaşık olarak molekül kütlelerinin logaritması ile doğru orantılıdır. Bunlardan yararlanılarak büyük moleküllü bileşiklerin mesela proteinlerin molekül kütleleri tayin edilebilir (Küfrevioğlu ve Çiftçi 2008; Oktay 2010).

Proteinlerin saflaştırılmasında kullanılan diğer bir özellik de çözünürlük farklılığıdır. Proteinlerin çözünürlüğü başlıca pH, iyonik şiddet, çözücünün dielektrik özelliği ve sıcaklığa bağlıdır. Bu esaslara dayalı proteinleri ayırma metotları izoelektrik çökeltme, nötral tuzlarla çöktürme, çözücülerle fraksiyonlama ve sıcaklıkla çöktürmedir.

Çoğu globuler proteinlerin çözünürlüğü, sistemin pH değerinden etkilenir. Değişik proteinlerin iyonlaşabilir R grupları taşıyan aminoasitlerinin sayısı farklı olduğundan, izoelektrik pH'ları da farklıdır ve bu yüzden çok defa birbirinden izoelektrik çökeltme ile ayrılabilirler. Her protein için izoelektrik pH ortamın iyon muhtevasına göre kolayca değişebilir; çünkü proteinler belirli anyon ve katyonları bağlayabilirler. Eğer bir protein çözültisi, H^+ ve OH^- dışındaki küçük iyonları uzaklaştırmak için saf suya karşı diyaliz edilirse, izoelektrik pH, izoionik pH'da gerçekleşir ve bu da proteine göre sabittir.

Nötral tuzlar düşük konsantrasyonlarda protein moleküllerinin çözünürlüğünü artırır. Bu olaya salting-in denir. $MgCl_2$ ve $(NH_4)_2SO_4$ gibi iki değerlikli tuzlar, $NaCl$, NH_4Cl ve KCl gibi tek değerliklilerden daha etkilidir. Nötral tuzların bu özelliği, onların iyon şiddetlerine bağlıdır. Bu iyonlar protein molekülünde yan grupların ayrışmasını modifiye ederler. Yeteri kadar yüksek tuz konsantrasyonunda bir protein bir çözültiden hemen hemen kantitatif olarak çökeltiler; yani yüksek tuz konsantrasyonunda proteinlerin çözünürlüğü azalır ve hatta çökerler. Bu olaya salting-out adı verilir.

Suda çözünebilen nötral organik çözücülerin, özellikle etanol ve asetonun ilavesi, çoğu globuler proteinlerin sudaki çözünürlüğünü çökelme derecesine kadar azaltabilir. Bu etkinin kantitatif araştırmaları, sabit pH ve sabit iyonik şiddette çözünürlüğün ortamın dielektrik sabitinin bir fonksiyonu olduğunu göstermiştir. Etanol sudan daha küçük bir dielektrik sabitine sahip olduğundan sulu protein çözeltilisine etanolun ilavesiyle zıt yüklerin çekimi artar ve proteinler kümelenerek çökerler.

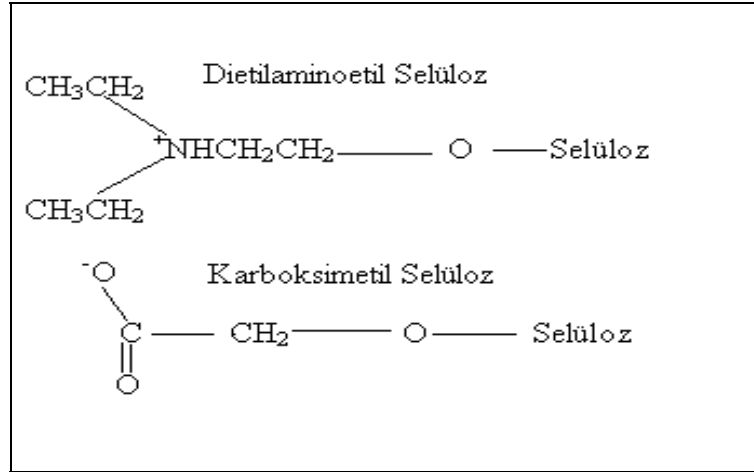
Globuler proteinlerin çözünürlüğüne etki eden bir başka faktör de sıcaklıktır. Genelde çözünürlükleri 40°C üzerinde azalır ve birçoğu denatüre olur. Bu nedenle proteinlerin ayrılması işlemleri daha çok düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilir.

Proteinlerin elektriksel yüklerine göre ayrılması, polipeptid zincirlerindeki iyonlaşabilir yan grupların sayısı ve cinsi ile belirlenen asit baz özelliklerine dayanmaktadır. Proteinler, aminoasit bileşiminde ve dizilişinde farklılık gösterdiklerinden, her protein özel bir asit baz davranışına sahiptir. Elektriksel yük farkına dayanan ayırma metotlarından biri olan iyon değişim kromatografisinde duran fazda bulunan ve yerlerinden kolaylıkla ayrılabilen iyonlar çevrelerindeki iyonlar ile yer değiştirir. Bu değişim sonucunda duran fazın fiziki görünümünde değişme olmaz. İyon değişim kromatografisi ile basit inorganik ve organik iyonlar birbirlerinden ayrılabilceği gibi enzimler, hormonlar ve nükleik asitler gibi biyolojik önemi olan polielektrolitler de ayrılabilir.

İyon değişim kromatografisinde kullanılan materyaller, çoğunlukla selülozun sentetik olarak hazırlanmış türevleridir. Dietilaminoetil selüloz (DEAE-selüloz), pH 7,0'da pozitif yüklü grupları ihtiva eder ve bu yüzden bir anyon değiştiricidir. Karboksimetil selüloz (CM-selüloz) ise, nötral pH'da negatif yüklü gruplar ihtiva eder ve bir katyon değiştiricidir (Şekil 1.3).

Proteinlerin DEAE-selüloz kolonları üzerinde ayrılmasında ve her bir komponentin sırasıyla elüsyonunda, azalan pH'lı tamponların bir serisi veya artan iyonik şiddetli tuz çözeltilerinin bir serisi kullanılır. Bunların kolondan geçirilmesi sırasında anyonik

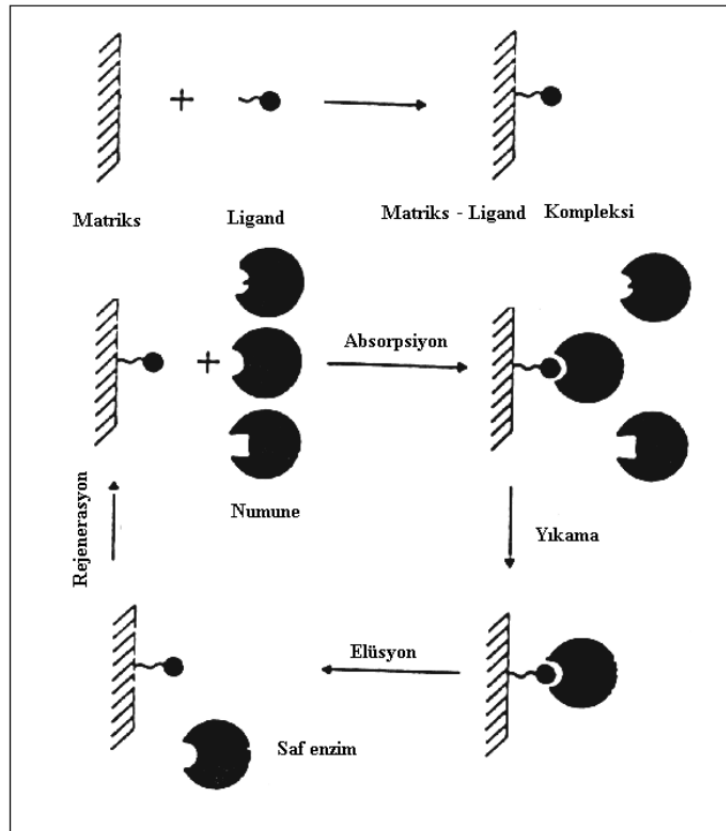
proteinlerin bağlanması azaltılır. Çünkü pH'nın düşmesiyle birlikte, iyon değiştiriciye tutunan proteinlerin negatif yüklü bölgeleri nötral hale gelir. Yine iyonik şiddetin artmasıyla pozitif iyonlar proteinin negatif yüklü bölgelerine bağlanırlar; negatif iyonlar ise, proteinlerle iyon değiştiriciye bağlanma hususunda yarışa girerler. Böylece proteinler bu bölgeye daha yavaş bir kuvvetle bağlanırlar ve hatta koparlar. Elüatlar küçük fraksiyonlarda toplanarak gerekli analizler yapılır. Bu metodun önemli bir tarafı da, iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisini kombine edebilmesidir. Örneğin, DEAE-Sephadex kullanılarak proteinleri yüklerine ve molekül büyüklüklerine göre ayırmak mümkündür (Keha ve Küfrevioğlu 2005; Oktay 2010).



Şekil 1.3. Proteinlerin saflaştırılmasında kullanılan iyon değişim kolon maddeleri

İyon değişim kromatografisi yöntemiyle proteinlerin saflaştırılması sırasında kolonun hazırlanması, dengelenmesi, numune tatbiki ve elüsyon işlemleri jel filtrasyon kromatografisindeki çok benzer. En önemli fark elüsyon işlemindedir. Genelde iki farklı elüsyon uygulanır: basamaklı elüsyonda, kolondan proteinlerin elüsyonu sırasında değişik pH'lı ve değişik iyonik şiddetli çözeltiler sırasıyla geçirilir. Bu yöntem çok zaman alıcıdır. Gradientli elüsyonda ise bir gradient mikser kullanılır. Elüsyon tamponunda bir pH gradienti oluşturulur. Her protein izoelektrik pH'sına geldiğinde yüksüzleşir ve duran faza tutunamayarak elüe edilir. Benzer durum iyonik şiddet gradienti olarak da uygulanabilir (Küfrevioğlu ve Çiftçi 2008; Oktay, 2010).

Proteinlerin ayrılması için kullanılan bir başka yöntem spesifik ligand esasına dayanan afinite kromatografisidir. Bazı proteinler afinite kromatografisiyle çok kere bir basamakta çok kompleks karışımlardan izole edilebilirler. Afinite kromatografisi bir çeşit adsorpsiyon kromatografisi olup, saflaştırılması istenen molekülün, matriks adı verilen bir kolon maddesine kovalent olarak immobilize edilmiş bir komplementer bağlanma bileşiğine spesifik ve tersinir bağlandığı bir tekniktir. Matriks olarak Sephadex, Sepharose, Biogel gibi farklı jeller kullanılabilir. Kullanılacak ligandın saflaştırılacak madde için spesifik ve tersinir bağlanma afinitesi olmalıdır. Küçük ligandları (enzim inhibitörleri gibi) doğrudan matrikse bağlamak suretiyle hazırlanan adsorbanlar, matriks ile liganda bağlanan maddeler arasında sterik engellemelerden dolayı küçük ayırma kapasitesi gösterebilirler. Bu durumlarda uzantı kolları, etkili bağlanmayı kolaylaştırmak için matriksle ligand arasına sokulurlar (Keha ve Küfrevioğlu 2005; Oktay 2010).



Şekil 1.4. Afinite kromatografisinin şematik gösterimi

Biyokimya alanında günümüze kadar en çok araştırma yapılan konu enzimlerdir. Günümüzde birçok enzim saflaştırılmış, karakterize edilmiş ve 200'den fazla enzim de kristallendirilmiştir. Enzimler sağlıktan endüstriyel konulara kadar uygulama alanı bulmuştur. Kataliz olayı ile ilgili ilk denemeler 1760-1825 yılları arasında midedeki enzimatik sindirim üzerine yapılmıştır. Belirli bir enzim üzerindeki ilk çalışma 1860 yılında Pasteur tarafından yapılmış ve fermantasyon olayının enzimlerce yürütüldüğünü ispat etmiştir. Bu yüzden enzimler için "Ferment" terimi kullanılmıştır. Buchner kardeşler 1897'li yıllarda maya hücrelerinde alkolik fermantasyonu katalize eden enzimleri elde etmeyi başarmışlardır. Bu buluş enzimlerin aktivite göstermeleri için hücre içinde bulunmalarının şart olmadığını ortaya koymuştur. Yapılan genetik çalışmalar ve hücre içindeki kimyasal reaksiyonların çeşitliliği daha birçok enzimin keşfedilmediğini göstermektedir. Bütün canlı hücrelerde meydana gelen reaksiyonlar enzimlerle ilgilidir. Enzimler canlı hücrelerde sentezlenir ve hücre canlılığını yitirdikten sonra uzun süre etkili kalırlar (Keha ve Küfrevioğlu 2005).

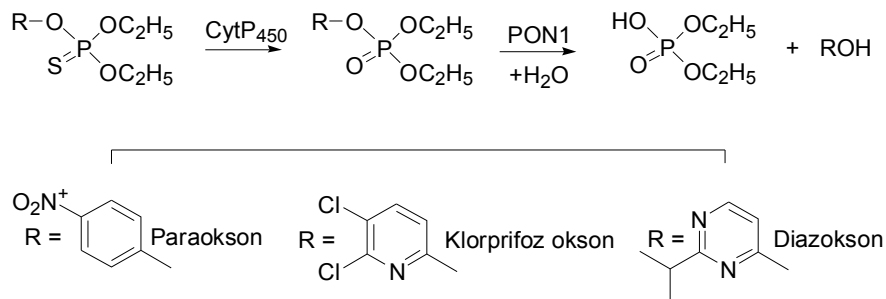
1.2 Paraoksonaz Enzimi

1.2.1 Paraoksonaz enzimi ve yapısı

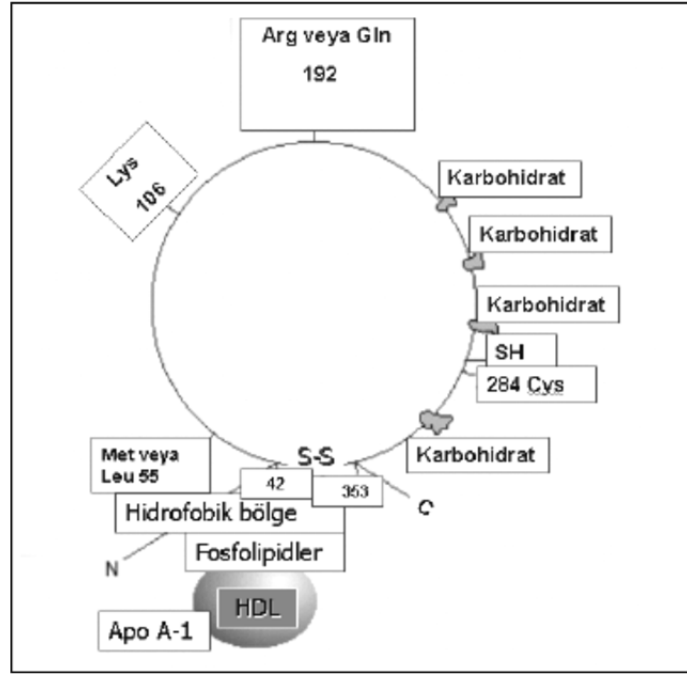
HDL bağımlı antioksidan bir enzim olan paraoksonaz (PON), LDL ve HDL'yi lipit peroksidasyonundan korumakta ve HDL'nin başlıca anti-aterosklerotik (damar sertleşmesini önleyici) bileşeni olarak düşünülmektedir. Yapılan çeşitli çalışmalarda diyabet, ailesel hiperkolesterolemi ve böbrek rahatsızlıkları gibi ateroskleroz gelişimine yatkın bireylerde PON aktivitesinin düşük olduğu bulunmuştur (Mackness *et al.* 2004). PON enzim aktivitesinin yetişkinlerde yaşın artışıyla ilişkili olarak azaldığına dikkat çekilmiştir (Seres 2004). Paraoksonaz enzim aktivitesi, yeni doğanlarda ve prematüre bebeklerde yetişkindekine yaklaşık yarısı kadardır. Doğumdan yaklaşık bir yıl sonra erişkindeki düzeyine ulaşır (Mackness *et al.* 1998). Kardiyovasküler hastalıklara önyak olan diyet ve yaşam tarzı faktörlerinin PON-1 aktivitesini ve/veya konsantrasyonunu etkilediği gözlemlenmiştir (Kudchodkar 2000; Klemola 2002).

Son birkaç yıl içerisinde, memelilerde PON gen ailesinin PON-1, PON-2 ve PON-3 olmak üzere 3 üyesi olduğu belirlenmiştir. Bu üç paraoksonaz enzim genlerinin memeli türleri arasında yüksek benzerlik içeren bir aminoasit dizisine sahip olduğu bulunmuştur (Primo-Parmo 1996; La 1999). PON-1 ve PON-3 karaciğerden sentezlenirken, PON-2 beyin, karaciğer, böbrek ve testisler gibi birçok organdan sentezlenmektedir (La 1999). PON-2 enzimi insanda hemen hemen tüm dokularda bulunmasına rağmen, serumda bu enzime rastlanamamıştır (Ng *et al.* 2001). *In vitro* çalışmalarda PON-2, aynen PON-1'in gösterdiği LDL'nin lipit peroksidasyonunu önleme ve kısmen okside olmuş LDL'yi indirgeme gibi antioksidan özellikleri olduğu belirlenmiştir (Ng *et al.* 2001) PON-3 plazmada HDL'ye bağımlı olarak bulunur ve ilk olarak karaciğerde tespit edilmiştir (Reddy 2001). PON-3 enzimi LDL'yi oksidasyondan korumada PON-1'den daha etkilidir (Draganov 2000).

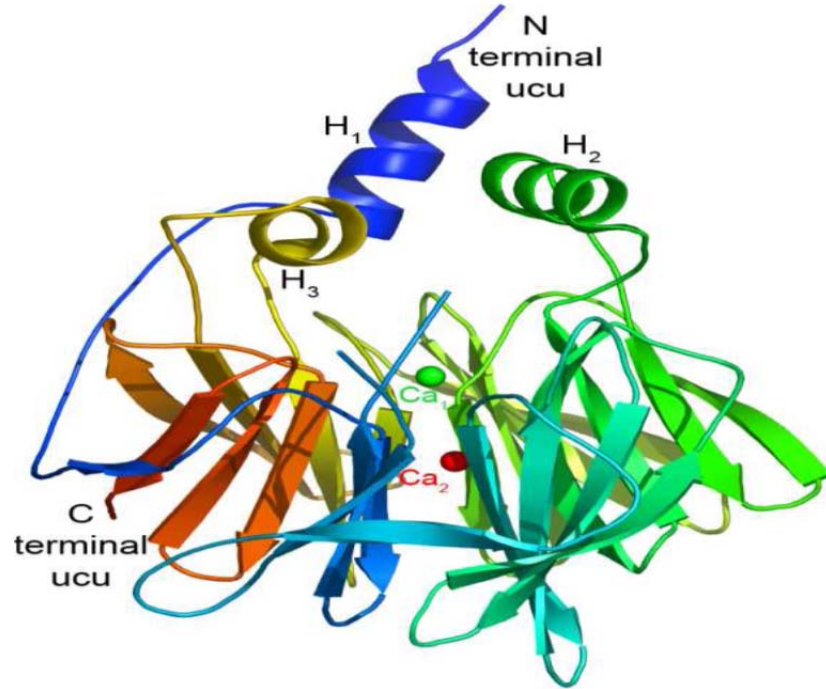
Paraoksonaz enzimi (PON-1, E.C.3.1.8.1) paraoksonaz, arilesteraz ve diazokson gibi üç aktiviteye sahip HDL ile ilişkili bir enzimdir. Bu enzim karaciğerden sentezlenen Ca^{2+} bağımlı bir serum esteraz olan 354 amino asitli bir proteindir (43 kDa) (Canales 2003; Blatter 1993). Enzim, paraoksonu p-nitrofenol ve dietilfosfata hidroliz edebilme özelliğinden dolayı bu ismi almıştır (Aldrige WN 1953). Paraoksonaz enzimi, paraoksondaki O-P ester bağının hidrolizinden sorumlu olan esterazdır (Şekil 1.5) (Sinan *et al.* 2006). Güçlü bir asetilkolin esteraz inhibitörü olan paraokson, bir böcek öldürücü olan paratiyonun sitokrom P-450 enzim sisteminde mitokondriyal oksidasyonu ile oluşmaktadır.



Şekil 1.5. İnsektisitlerde yaygın olarak kullanılan okson metabolitlerinin hidrolizi



Şekil 1.6. İnsan paraoksonaz enziminin yapısı (Aviram *et al.* 1999)



Şekil 1.7. Paraoksonaz enziminin üç boyutlu görünümü (Harel *et al.* 2004).

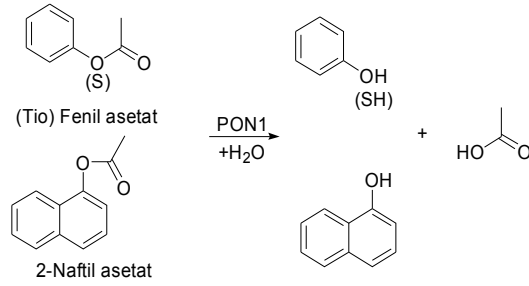
Enzimin üç boyutlu yapısında β -kırmalı tabakaların merkezinde birbirlerine 7,4 Å uzaklıkta 2 tane Ca^{+2} iyonu bulunmaktadır. Farklı afiniteye sahip olan bu kalsiyum iyonlarından birisi (Ca_1) üstte, diğeri (Ca_2) ise merkezde bulunmaktadır. Ca_1 yapısal özellikli olup yapıdan uzaklaştırılması dönüşsüz denatürasyona neden olmaktadır (Kuo *et al.* 1998).

Katalitik etkinlikte rol oynayan diğeri (Ca_2) kalsiyum iyonu ise 2,2-2,5 Å uzaklığında bulunan 5 adet amino asit rezidüsü (Asn224, Asn270, Asn168, Asp269, Glu53) bir su molekülü ve fosfat iyonunun oksijeniyle etkileşim halindedir.

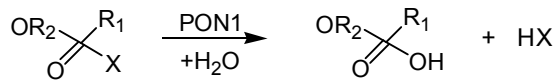
PON-1 enzimi, pervane şeklinde yerleşmiş ve her biri 4 sıradan oluşan 6 adet β -kırmalı tabakadan meydana gelmiştir. Enzim, amino terminaline yakın 6D tabakasında bulunan Cys42 kalıntısı ile 6C tabakasında bulunan Cys353 kalıntısı arasında disülfid bağıyla bağlanarak üç boyutlu yapısını kazanmaktadır (Jawad *et al.* 2002).

PON üzerinde 4 tane potansiyel N-glikozillenme bölgesi vardır. iki tanesi (Asn227 ve Asn270) β -tabakaların merkezinde, diğeri ikisi yüzeye bakan bölgede (Asn253 ve Asn324) yer almaktadır. PON-1 memeli hücrelerinde sentezlendikten sonra bu noktalardan glikozillenir (Harel *et al.* 2004).

Paraoksonaz enzimine (PON-1) ilk olarak 1961 yılında insan serumunun elektroforezi sonrası yüksek yoğunluklu lipoproteinlerde oluşan immuno çökeleklerde rastlanılmıştır. (Mackness *et al.* 2004). Paraoksonaz hakkında yapılan ilk çalışmalar, enzimin organofosfatları, yaygın olarak kullanılan böcek ilaçlarını hidroliz etme özelliği üzerine yapılan çalışmalardır. Paraoksonaz enzimi detoksifiye ve anti-aterojenik (damar sertliğini azaltıcı) etkileri ile bilinmektedir. PON-1 birçok organofosfat bileşiklerini, sinir ajanlarını (soman, sarin gibi) (Şekil 1.8) ve çevreyi tehdit edici özelliklerdeki böcek ilaçlarını (klorpirifoz, okson ve diazokson gibi) (Şekil 1.5) hidroliz etme özelliğine sahiptir. PON'un aynı zamanda aromatik karboksilik asit esterlerini ve laktonları da hidroliz edebildiği görülmüştür (Şekil 1.7 ve Şekil 1.9). Enzim, fenil asetat gibi diğeri sentetik esterleri de yüksek bir katalitik verimle hidroliz edebilmektedir (Şekil 1.7).

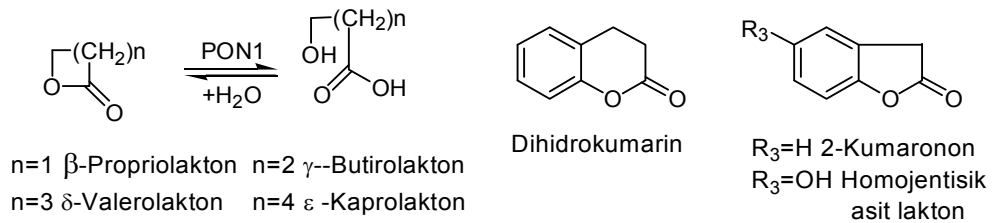


Şekil 1.8. Aromatik esterlerin hidrolizi



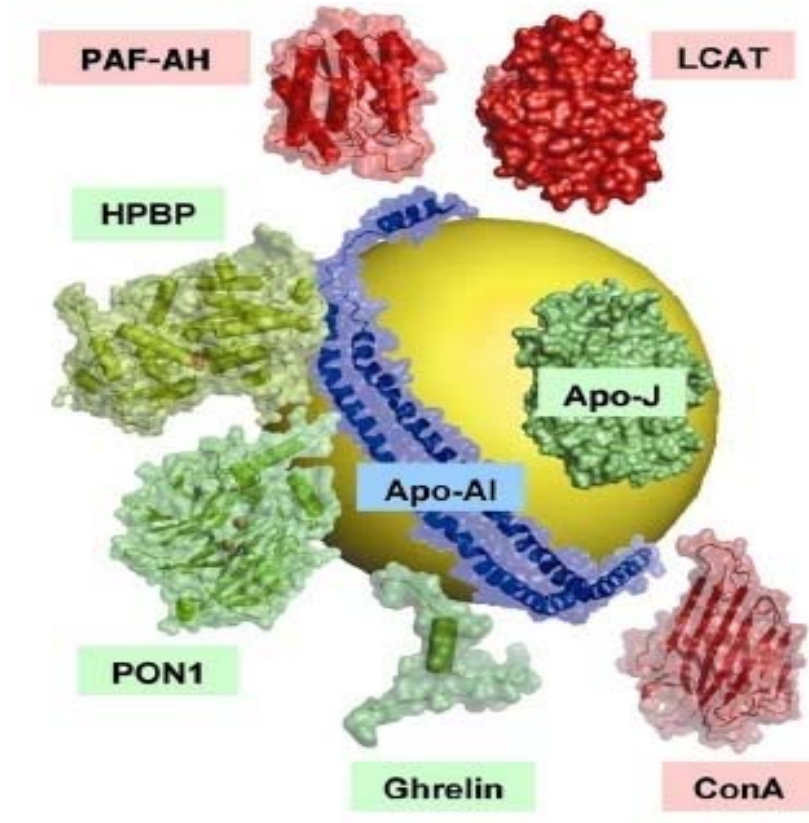
$R_1 = \text{N}(\text{CH}_3)_2$	$R_2 = \text{CH}_2\text{CH}_3$	$X = \text{CN}$	Etil N-dimetilfosforoamidosiyanid (Tabun)
$R_1 = \text{CH}_3$	$R_2 = \text{CH}(\text{CH}_3)_2$	$X = \text{F}$	Izopropil metilfosfonofluoridat (Sarin)
$R_1 = \text{CH}_3$	$R_2 = \text{CH}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{CH}_3)_3$	$X = \text{F}$	Pinakolil metilfosfonofluoridat (Soman)

Şekil 1.9. Sinir gazlarının hidrolizi



Şekil 1.10. Lakton hidrolizi

İnsan serum PON-1 enzimi; HDL'nin yapısında olmakla birlikte öncelikli olarak LDL'yi oksidasyondan koruma gibi fizyolojik role sahip bir enzimdir (Durrington 2001). Yapılan immunoafinite kromatografi çalışmaları insan serum paraoksonazın gerçekte apolipoprotein A-1 ve klusterin (Apolipoprotein J) içeren HDL tipleri ile ilişkili olduğunu ve PON'un toplam HDL'nin çok küçük bir bölümünü oluşturduğunu göstermiştir (Şekil 1.10) (Mackness *et al.* 1996). Apo A-1, PON-1'in HDL ile birleşmesi için gerekli olmamasına rağmen PON-1-HDL kompleksinin stabilizasyonunu sağlar (Sorenson 1999; Oda 2001).



Şekil 1.11. HDL partikülü ve paraoksonaz enzimi (Renault 2006)

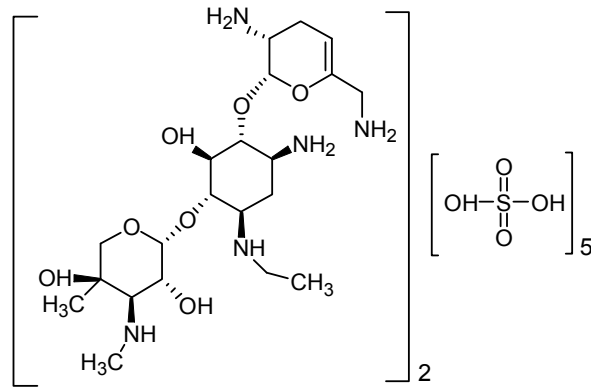
Yüksek yoğunluklu lipoproteinler olan HDL'lerin uzun bir zamandır anti-aterojenik bir etkiye sahip oldukları bilinmekte ve bu koruyucu etki kendilerine bağlı bulunan enzimlere atfedilmektedir (Gordon and Rifkind 1989; Navab 1996). HDL'ye bağlı bu enzimlerden biri olan PON-1, karaciğerden sentezlenen ve burada depolanan, geniş bir substrat özgüllüğüne sahip olan, HDL'nin bu antioksidan etkiyi göstermesinde büyük bir sorumluluk üstlenen bir enzimdir (Mackness *et al.* 1995; Primo-Paro 1996).

Paraoksonaz, okside LDL'deki kolsteril linoleat hidroperoksitleri ve spesifik okside fosfolipitleri hidroliz eder (Aviram *et al.* 2000). Oksidatif stres altında sadece lipoproteinler değil hücrenin yapısındaki lipitler de lipit peroksidasyonuna uğramaktadır. Paraoksonaz enzimi, lipit peroksitlerinin aterojenik etkilerini nötralize eder, hücre membranlarını koruyucu etki gösterir (Aviram *et al.* 2000).

1.2.3. PON-1 enzimi üzerine etkileri incelenen ilaçlar ve özellikleri

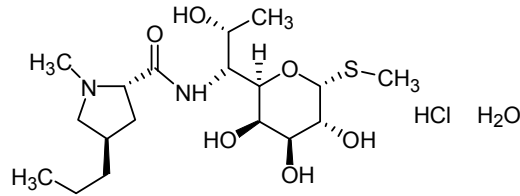
İnsan serumundan saflaştırılan PON-1 enzimi üzerine etkileri incelenen ilaçların bazı özellikleri aşağıda anlatılmaktadır.

Netilmisin sülfat: Sisomisin'den türetilen yarı sentetik yeni bir aminoglikozid antibiyotiktir. Bakterilerin salgıladığı inaktive edici enzimlerin çoğuna karşı dayanıklı; sadece asetilazlar tarafından inaktive edilir (Kayaalp 2002). *Escherichia coli*, *Enterobakter* ve *Serratia* grubu bakteriler, *Sitrobakter* türleri, *Proteus* türleri (indol pozitif ve indol negatif türler), *Pseudomonas aeruginosa*, koagülaz pozitif, koagülaz negatif, penisilin ve metisiline dirençli *Stafilokok* türleri ve *Neisseria gonorrhoeae*'nin duyarlı türlerinin neden olduğu bakteriyemi, neonatal sepsis ve diğer septisemiler, solunum yollarında görülen ağır enfeksiyonlar, ürogenital sistem enfeksiyonları, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, kemik ve eklem enfeksiyonları, yanıklar, yaralar, perioperatif enfeksiyonlar, peritonit ve diğer karıncı enfeksiyonlar ve sindirim sistemi enfeksiyonlarının tedavisinde endikedir. Netilmisin, tanısı konmuş ya da kuşkulanılan Gram negatif enfeksiyonların ilk tedavisinde endikedir. Netilmisin ya da diğer aminoglikozidlere aşırı duyarlılığı olan ya da toksik reaksiyon gösteren hastalarda kontrendikedir. Aminoglikozid kullanan hastalar, uygulamaya bağlı olarak çıkabilecek toksik etkiler nedeniyle yakından izlenmelidir. Netilmisin tedavisi sırasında görülebilen nefrotoksisite genellikle hafif olmasına rağmen, tedavi sırasında böbrek işlevlerinin yakından izlenmesi önerilir (Anonim 2011)



Şekil 1.12. Netilmisin sülfat molekülünün yapısal formülü

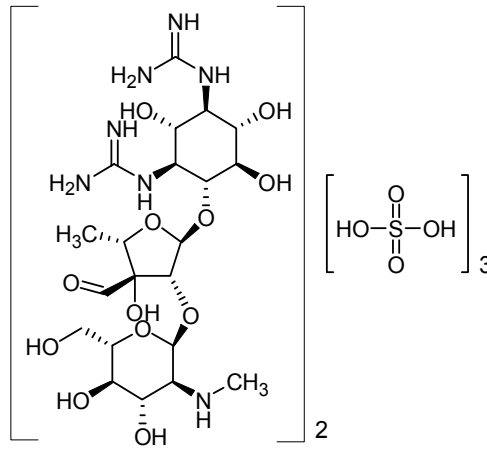
Linkomisin HCl: Streptomyces lincolnensis'ten elde edilen doğal antibiyotiktir. Absorpsiyon hızı ve derecesi daha düşüktür; besinler linkomisin'in absorpsiyonunu daha da düşürürler. Plazma proteinlerine %90 oranında bağlanır. İltihap hücrelerine, doku ve vücut sıvılarına (balgam, akciğer, karaciğer, safra, safra kesesi, apendiks, yumuşak dokular, kemikler, eklemler ve prostat dahil) iyi nüfuz eder; fakat menenjit halinde bile BOS (beyin-omurilik sıvısı) içine yetersiz derecede girebilir. Göze az nüfuz eder. Polimorfonükleer lökositler, alveoler makrofajlar ve abselerde birikir (Kayaalp 2002). Linkomisin hidroklorüre duyarlı streptokok, pnömokok ve stafilokok gibi gram pozitif aerob ve anaerob bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlarda kullanılır. Penisilinin kullanılmadığı yerlerde ve penisiline allerjisi olanlarda kullanılır. Solunum yolu enfeksiyonlarında, osteomyelitte, yumuşak doku enfeksiyonlarında ve difteride (antitoksinle birlikte), tonsillit, farenjit, kızıl, yara enfeksiyonu, fronküloz, pnömonioosteomyelit sinüzit, orta kulak iltihabı, akne, bronşit, nonspesifik ürogenital enfeksiyonlarında ve ayrıca septik artrit, septisemi, subakut bakteriyel endokardit, ampiyem ve idrar yolu enfeksiyonlarında kullanılır (Anonim 2011).



Şekil 1.13. Linkomisin HCl molekülünün yapısal formülü

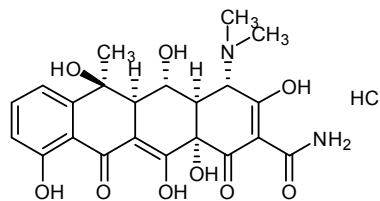
Streptomisin sülfat: Streptomisin, diğer antimikobakteriyel ilaçlarla birlikte başlıca tüberküloz tedavisinde kullanılan bir aminoglikozid antibiyotik olup, primer antitüberküloz ilaç olarak sınıflandırılır. Streptomisin, enfeksiyona neden olan duyarlı mikroorganizmaların neden olduğu tüberkülozun tüm formlarında etkilidir. Sadece diğer antitüberküloz ilaçlarla birlikte kombine halde kullanılmalıdır. Tüberküloz dışındaki enfeksiyonlarda streptomisin, potansiyel açıdan daha az zararlı terapötik ilaçların etkisiz olduğu veya kontrendike olduğu Pasteurella pestis (veba), Pasteurella tularensis (tularemia); Donovanosis (Granuloma inguinale); Brucella; H. ducreyi (yumuşak şankr); H. İnfluenza (solunum yolları, endokardiyal, meningeal

enfeksiyonlarda diğer antibakteriyel ilaçlarla birlikte); *K. pneumoniae* pnömonisi (diğer antibakteriyel ilaçlarla birlikte); *E. coli*, *Proteus*, *A. aerogenes*, *K. pneumoniae* ve *Streptococcus faecalis*'in neden olduğu üriner sistem enfeksiyonlarında; *Strep. viridans*, *Strep. faecalis* (endokardiyal enfeksiyonlarda penisilinle birlikte); Gram negatif basillerin yol açtığı bakteriyemide (diğer antibakteriyel ilaçlarla birlikte) endikedir (Anonim 2011)



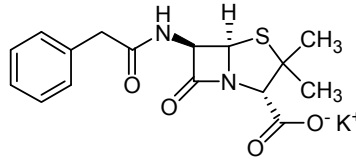
Şekil 1.14. Streptomisin sülfat molekülünün yapısal formülü

Oksitetrasiklin HCl: Tetrasiklik bir bileşik olan naftasenkarboksamid'den türeyen geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. Plazma proteinlerine en az bağlanan tetrasiklinlerdendir. Oral veya parenteral uygulanır. Bakteri ribozomlarında protein sentezini inhibe etmek suretiyle bakteriyostatik etki oluştururlar. Memeli hücresi içine fazla girmemelerine karşın, hücre içinde yerleşen riketsiyenlar ve klamidyalar gibi mikroorganizmalara karşı güçlü antimikrobik etkinlik gösterebilmelerinin nedeni açıklanamamıştır (Kayaalp 2002).



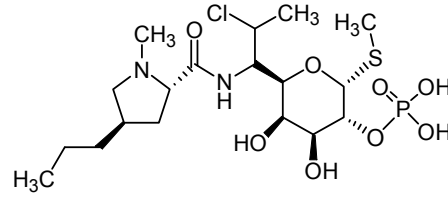
Şekil 1.15. Oksitetrasiklin HCl molekülünün yapısal formülü

Penisilin G potasyum: 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. Üst solunum yolu infeksiyonları, alt solunum yolu infeksiyonları, cilt ve yumuşak doku infeksiyonları, santral sinir sistemi infeksiyonları, infektif endokarditler, gastrointestinal ve intraabdominal infeksiyonlar, idrar yolu infeksiyonları, cinsel yolla bulaşan hastalıklar, kemik ve eklem infeksiyonlarında ve nötropenik hastalarda kullanılır (Kayaalp 2002).



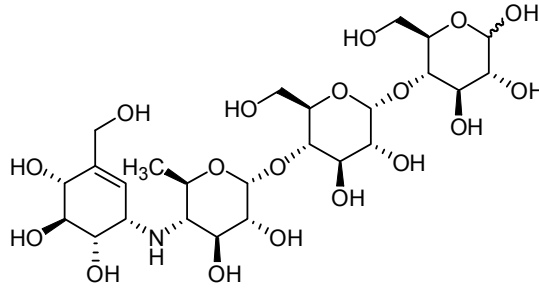
Şekil 1.16. Penisilin G potasyum molekülünün yapısal formülü

Klindamisin fosfat: Linkomisin molekülünde bir hidroksil grubu yerine bir klor atomunun sokulması ile elde edilen yarı sentetik bir antibiyotiktir. Yapılarındaki bu ufak değişiklik farmakokinetik ve farmakolojik özelliklerinde belirgen farklılığa neden olur. Klindamisin barsaktan daha kolay absorbe edilmesi, antibakteriyel etkinliğinin daha güçlü olması ve olasılıkla daha az toksik olması nedeniyle linkomisin'e göre üstünlük gösterir. Plazma proteinlerine %90 oranında bağlanır. İltihap hücrelerine, doku ve vücut sıvılarına (balgam, akciğer, karaciğer, safra, safra kesesi, apendiks, yumuşak dokular, kemikler, eklemler ve prostat dahil) iyi nüfuz eder; fakat menenjit halinde bile BOS içine yeterli derecede giremez. Göze az nüfuz eder. Polimorfonükleer lökositler, alveoler makrofajlar ve abselerde birikir. Klindamisin vücutta aktif ve inaktif metabolitlere önemli ölçüde metabolize edilir; ancak %10'u böbreklerden değişmeden atılır. Kısmen safra içinde barsağa atılır ve enterohepatik dolanıma girer (Kayaalp 2002).



Şekil 1.17. Klindamisin fosfat molekülünün yapısal formülü

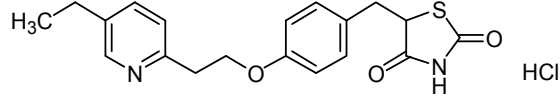
Akarboz: Diabetes mellitus hastalığı tedavisinde kullanılan antidiyabetik ilaçtır. İnce barsak epitelyum hücrelerinin apikal membranında bulunan alfa-glikozidaz enzimi besinler içinde alınan nişasta gibi polisakkaritler ve sükroz (şeker) gibi disakkaritleri glukoz, fruktoz ve diğer monosakkaritlere hidroliz ederek sindirir. Bu sayede besinsel karbonhidratlar glukoz ve benzerleri şeklinde bağırsaktan absorbe edilebilir hale getirilmiş olur. Oligosakkarit analogu olan akarboz bu enzime, sindirilecek karbonhidrat moleküllerine göre bin kez veya daha yüksek afinite ile bağlanır ve karbonhidratların bağlanmasını yarışmalı (kompetitif) şekilde inhibe eder. Absorbe edilmediği için enterositlerin apikal membranı, üzerindeki enzimi lokal etkisi ile inhibe eder (Kayaalp 2002).



Şekil 1.18. Akarboz molekülünün yapısal formülü

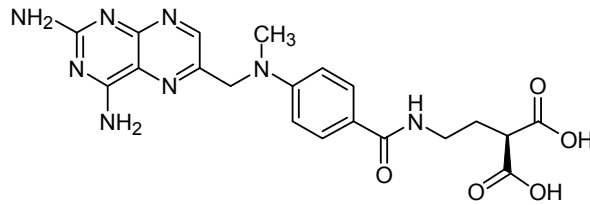
Pioglitazon HCl: Antidiyabetiktir. Hepatotoksik etki potansiyeli düşüktür. Hiperinsülineminin ve insülin direncinin eşlik etmesi nedeniyle sadece tip 2 diyabette kullanılırlar. Tip 1 diyabette yeri yoktur. Kilo almına sebep olurlar. Vücutta su tutulması ve ödem yapabilirler; kalp yetmezliği olanlarda kontraindikedirler. Çok düşük dansiteli lipoprotein (VLDL) içindeki trigliseridlerin hidrolizini artırdıklarından VLDL

düzeşini düşürürler. Yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) düzeyini arttıırlar (Kayaalp 2002).



Şekil 1.19. Pioglitazon HCl molekülünün yapısal formülü

Metotreksat: Antineoplastik etkilidir. Trofoblastik tümörler, lenfosarkom, meme, over ve akciğer kanseri, akut lenfoblastik çocuk lösemisi ve psöriazisin kemoterapisinde kullanılır. Ağız yoluyla, kas içine, damar içine veya intratekal (beyni çevreleyen zar bölgesinin içine) uygulanabilmektedir. Folik asidi tetrahidrofobik aside redükleyen dihidrofolat redüktazı geri dönüşümlü olarak inhibe eder. Genellikle malignan hücreleri, kemik iliğı, fetal hücreler, yanak ve barsak mukozası ve mesane hücreleri gibi çoğalan dokular metotreksat'a daha duyarlıdır (Kayaalp 2002).



Şekil 1.20. Metotreksat molekülünün yapısal formülü

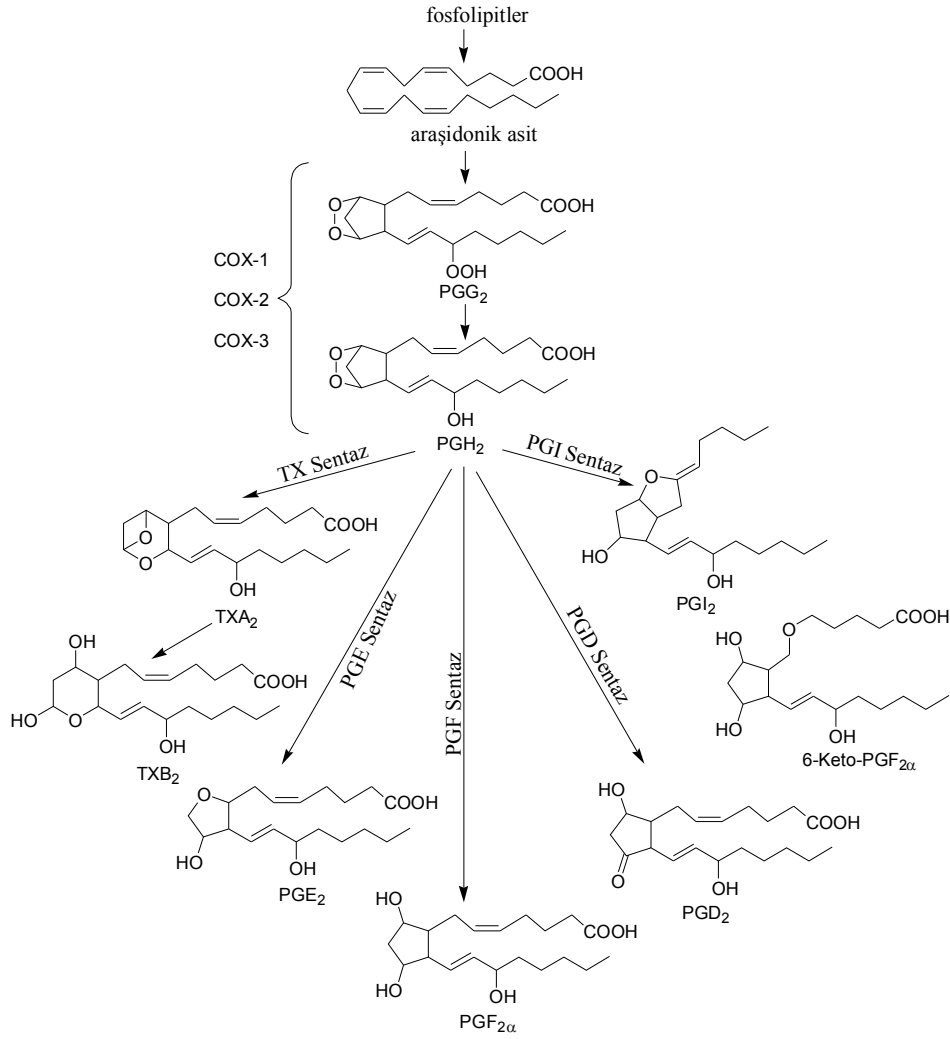
1.3 Siklooksigenaz Enzimi

1.3.1 Siklooksigenaz enzimi ve yapısı

Prostaglandin H₂ sentaz ya da prostaglandin endoperoksit H sentaz olarak da adlandırılan bu enzimler (EC 1.14.99.1) bifonksiyonel, integral membran proteinleridir (Garavito 1999, 2003). 1990'lara kadar sadece bir COX enziminin mevcut olduğu düşünülüyordu. Ancak konu üzerinde yapılan kapsamlı çalışmalar sonucunda COX enziminin iki farklı izoformunun olduğu anlaşıldı (Kujubu *et al.* 1991; Xie *et al.* 1991;

Garavito 1999). COX-1'in çok sayıda memeli hücresinde normal fizyolojik koşullar altında eksprese edildiği, özellikle trombositler, böbrek tübülleri, gastrointestinal sistem (GİS) ve endotel hücrelerinin COX-1'ce zengin olduğu ifade edilmektedir. COX-1 izoenzimi organizmada homeostazın sürdürülmesi için gereklidir. COX-2 genellikle indüklenebilir bir izoformdur. COX-2 sitokinler, endotoksinler, mutajenler, inflamatuvar mediyatörler, tümör promotörleri ve büyüme faktörlerine cevaben indüklenir (Garavito 1999; Katori 2000; Fiorucci 2001). Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar böbrekler, gastrik doku, uterus, damar endoteli gibi bazı dokularda COX-2'nin normal fizyolojik şartlarda eksprese edildiğini göstermiştir (Katori 2000).

Siklooksigenaz enzimi (COX), membran bağımlı bifonksiyonel bir enzim olup siklooksigenaz (COX) ve peroksidaz (POX) olmak üzere iki farklı aktiviteye sahiptir. Prostaglandinlerin (PG) ve tromboksanların (TX) oluşumuyla sonuçlanan prostaglandin sentez metabolik yolundaki ilk iki basamağı katalizlemektedir. İlk basamakta COX, araşidonik asiti siklize eder ve araşidonik asite iki molekül oksijen katarak siklik hidroperoksit PGG₂'yi (9,11-endoperoksit-15-hidroperoksit) oluşturur. Ardından COX, PGG₂'yi POX katalizörlüğünde (Garavito 1999) PGH₂'ye (15-hidroperoksit) redükler. Biyosentezde yer alan PGH₂ dayanıksız bir endoperoksit olduğu için spesifik sentaz ve izomerazlar tarafından PGE₂, PGF₂, PGD₂, PGI₂ (prostasiklin) ve TXA₂'ye dönüştürülür (Claria 2003). Bu metabolik yollar Şekil 1.21'de gösterilmiştir. Prostaglandinler beş karbonlu halka (siklopentan halkası) üzerinde yer alan gruplara ve çift bağların sayısı ile konumlarına göre isimlendirilirler. Hidroksil (OH) grupları siklopentan halkası düzleminin üstünde ise alfa (α) izomerlerleri adını alır ve vücutta sadece α izomerleri oluşur. Siklopentan halkasındaki farklılığa göre A, B, C, D, E, F ve İ gibi ana sınıflara ayrılan prostaglandinlerin biyolojik yönden en önemli olanları E ve F sınıfı prostaglandinlerdir. Her sınıf kendi içinde düz yan zincirlerdeki doymamış çift bağ sayısını gösteren ve sınıfı belirleyen harfin alt kesimine konulan 1, 2, 3 doymamış çift bağları ile simgelenir (PGE₁, PGE₂, PGE₃), ayrıca prostaglandinin izomerini açıklamak için bu alt sayıların hemen yanına Yunan harfleri eklenmektedir (PGF_{1α}, PGF_{2α}) (Yılmaz 1999; Gardne 2007).



Şekil 1.21. Araşidonik asitten prostaglandin ve tromboksanların sentez şeması

Hangi prostaglandinlerin üretileceği doku tipine bağlı olarak değişir. Prostaglandinlerin biyolojik etkileri reseptörleriyle etkileşimine ve üretilen prostaglandin türünün göreceli miktarına bağlıdır. Prostaglandinlerin otokrin, parakrin, endokrin yolda etkili olabileceği literatürde belirtilmiştir (Osiri 1999). Siklooksijenaz aktivitesi sonucu elde edilen prostanoidlerin biyolojik aktiviteleri Çizelge 1.2.'de gösterilmiştir (Mardini 2001).

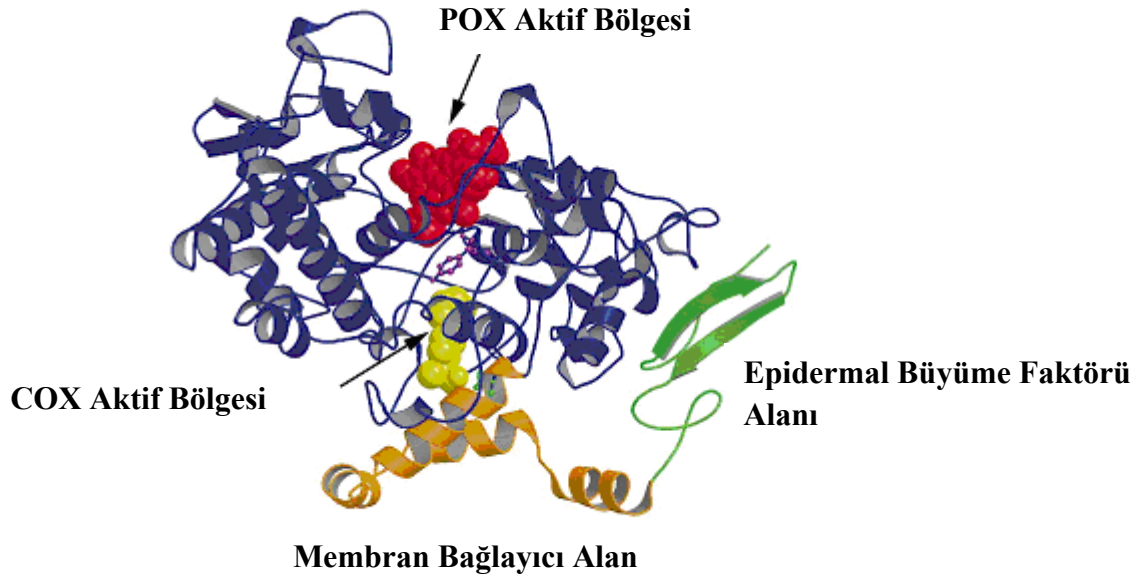
Çizelge 1.2. Prostanoidlerin lokalize oldukları yerler ve biyolojik aktiviteleri.

Prostanoid	Predominant lokasyon	Fonksiyon
TXA ₂ (Tromboksan A ₂)	Platelet ve monositler	Platelet agregasyonu; bronko-vazokonstriksiyon; hücrel proliferasyon
PGI ₂ (Prostasiklin)	Vasküler endotel ve subendotel	Platelet agregasyon ve adhezyon inhibisyonu; bronko-vazodilatasyon; arteriyal hücrelerden kolestrol sızması ve vasküler sızma
PGD ₂	Mast hücreleri; PGD sentaz beyinde de sentezlenir.	Bronkospazm ve alerjik astma; Platelet agregasyonu inhibisyonu; uyku
PGF _{2α}	Beyin, uterus	Bronşiyal ve uterus kasılması; doğum

Her iki izoenzim hücre membranı, çekirdek membranı ve endoplazmik retikulum membranının lümene bakan yüzeyinde lokalize olmuşlardır. Membranda iki katlı lipit tabakasının yalnızca tek bir tabakasına entegredirler (monotropik düzenlenme). COX-1 ve COX-2 izoenzimleri endoplazmik retikulumda post-translasyonel işlemlere uğradıktan sonra homodimerler halinde salınırlar. Molekül kütleleri 67-72 kDa civarındadır. 1 mol monomer 1 mol hem prostetik grubunu (ferik-protoporfirin IX) yapısına dahil eder. COX enzimleri hem bağımlı peroksidaz enzim ailesinin üyeleridirler (Garavito 1999, 2003).

COX membranda glikozillenmiş formda bulunur. Her bir alt ünite üç ayrı yapısal bölümden oluşur.

- N-terminal epidermal büyüme faktörü (EGF) benzeri bölge
- Membrana bağlayıcı motif
- C-terminal globüler katalitik bölge



Şekil 1.22. COX'un homodimer yapısı (Garavito 1999)

EGF benzeri bölge, katalitik bölge ile birlikte dimerde bir alt ünite oluşturur. EGF benzeri bölgenin COX'un membranda lipit çift tabaka içerisine girmesinde rol oynadığı belirtilmiştir (Garavito 2003) (Şekil 1.21). Membrana bağlayıcı motif, birkaç hidrofobik amino asit ihtiva eden dört adet kısa, ardışık, amfipatik α -heliks yapıdan oluşur.

1.3.2. Siklooksigenaz enzimleri arasındaki yapısal farklılıklar

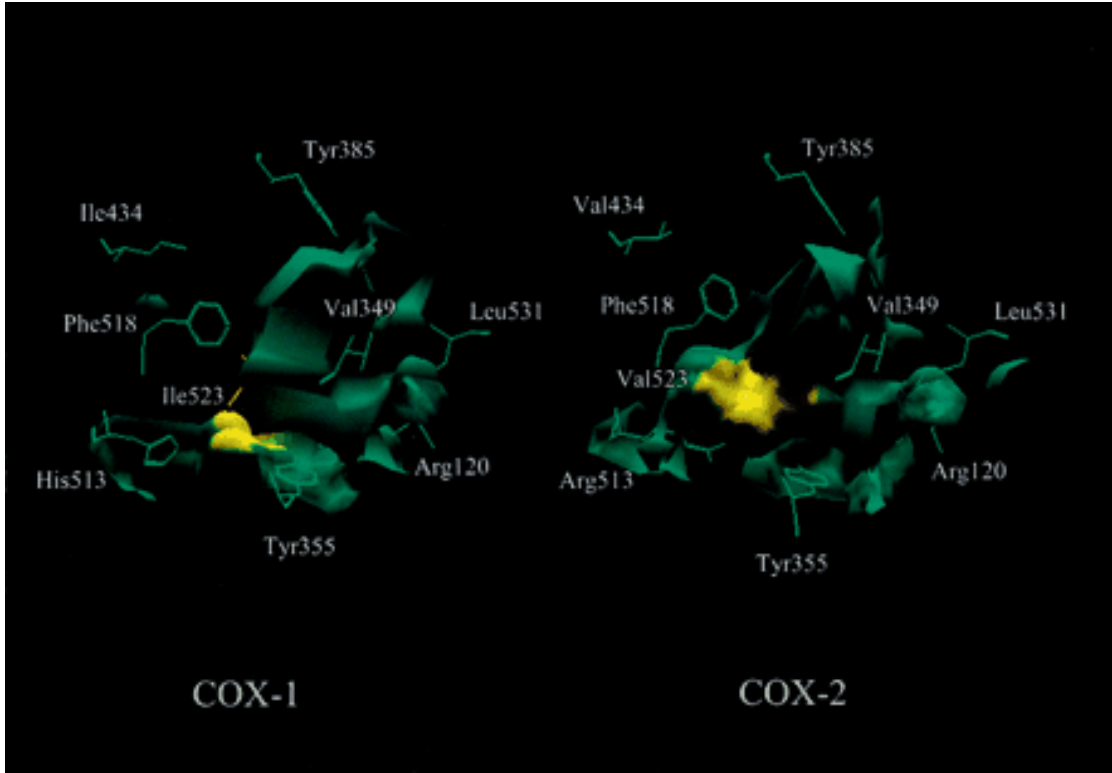
1988 yılında Needleman ve arkadaşları lipopolisakkarit (LPS) ile indüklenmeyen ve deksametoksazon ile inhibe edilemeyen prostaglandin oluşumundan iki çeşit siklooksigenaz enzimini sorumlu tutmuşlardır: COX-1 ve COX-2. COX-1 konstitütif bir enzim olup birçok dokuda fizyolojik fonksiyonların devam ettirilmesinden sorumludur. Bazal koşullar altında konstitütif enzim olan COX-1 kolon, böbrek, dalak, karın karaciğer, kalp ve beyin de dahil hemen hemen tüm dokularda bulunur. COX-1 böbrek ve karında vazodilatör (damar genişletici) etki gösterirken böbrekte sistemik vazokonstriksiyon (damar daralması) esnasında renal plazma akışını ve glomeruler filtrasyonu sürdürmeye yardımcı olur. Benzer şekilde gastrik antrumda lokal vazodilatasyon (damar genişlemesi) ile mukozal savunmada kritik bir rol oynar. Trombositlerdeki COX-1 ise tromboksan üreterek platelet agregasyonunda anahtar bir

rol oynar. COX-2 ise enflamasyon reaksiyonlarına eşlik eden değişik uyarımlarla indüklenebilen bir enzimdir. COX-2 ekspresyonunu, sinoviyosit, makrofaj ve endotelial hücrelerde enflamatuvar bir uyarım olmaksızın tespit etmek çok güçtür (Dannhardt 2001). Her ne kadar COX-1 fizyolojik fonksiyonların sürdürülmesinden sorumlu bir enzim, COX-2 ise enflamasyon durumunda indüklenen bir enzim olarak bilinse de bu hipotez tam anlamıyla doğru değildir. Çünkü COX-1'in de bazı durumlarda indüklenebildiği, ileri düzeyde düzenlenebildiği ve COX-2'nin de beyin ve böbrek gibi organlarda konstitütif olarak bulunduğu (Sui 2000) ve ovulasyon regülasyonu, fetüste duktus arteriyosusun kapanması ve gastrik ülser iyileşmesinde rol oynadığı belirtilmiştir (Wilton 2004). COX-2'nin keşfi COX biyolojisini anlamada çok büyük bir ilerleme olsa bile bu durum herşeyi açıklamaya yeterli değildir. Örneğin; asetaminofenin etki mekanizması bilinmemektedir ve asetaminofen terapötik konsantrasyonlarda COX-1 ve COX-2'yi çok zayıf bir şekilde inhibe eder. Benzer bir şekilde aspirinin analjezik ve antipiretik etkisini antienflamatuvar etki göstermeksizin nasıl gösterdiği hala bilinmemektedir. Bu durumu açıklamak için ilk defa Willoughby başka bir COX enziminin varlığından bahsetmiştir: COX-3 (Claria 2003; Wilton 2004). COX-1 varyantı olan COX-3'ün insan serebral korteksi ve kalbinde bol miktarda bulunduğu ve asetaminofen ve benzeri bileşiklere duyarlı olduğuna dair bilgilere literatürlerde rastlanmaktadır (Claria 2003).

C-terminal globüler katalitik bölge enzim proteininin %80'ini ihtiva eder. COX'un hem COX hem de POX bölgesi ve hem'in bağlandığı bölge katalitik kısımda yerleşiktir (Garavito 1999, 2003; Kurumbail 2001). COX-1 ve COX-2 izoenzimleri tersiyer ve kuarterner yapıları bakımından homolog sekansa sahip olmalarına rağmen, primer yapıda 3 ayrı alanda farklılıklar bulunmaktadır. Bunlar;

1. Her iki izoform aminoasit kompozisyonu ve uzunluğu bakımından farklı sinyal peptidlerine sahiptir.
2. İki izoform arasındaki zincir farklılığı membran bağlayıcı motifte bulunmaktadır.
3. COX-2 izoformu 18 aminoasitlik farklı bir bölge ihtiva eder. Bu bölgenin fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir.

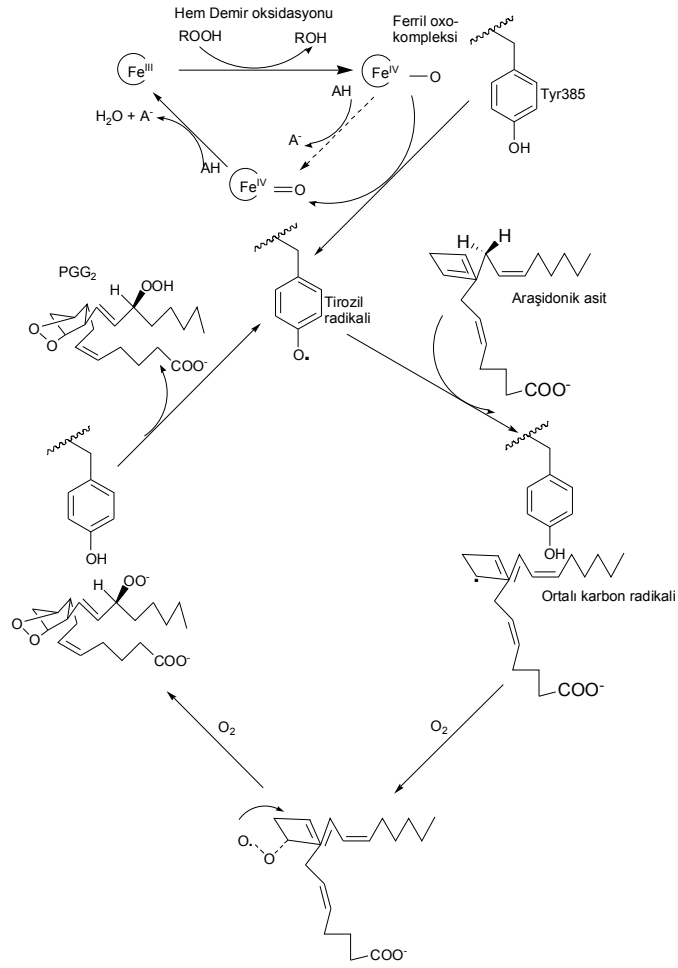
COX izoformlarının aktif bölgelerinde COX substratlarının ve inhibitörlerinin bağlanmasında önemli role sahip üç aminoasit tanımlanmıştır. Bu aminoasitler arginin (Arg) 120, serin (Ser) 530 ve tirozin (Tyr) 385 olup hidrofobik kanallarının üzerinde, aktif bölgelere yakın biçimde yerleşik olarak bulunmaktadır. Arg 120, flurbiprofen gibi NSAİİ (Non Steroidal Anti-İnflamatuar İlaçlar)'lerin COX izoformlarına bağlandıkları yerdir. Ser 530, aspirinin COX-1 izoformunu asetilledığı bölgedir (geri dönüşümsüz inhibisyona yol açar). Tyr 385, Arg 120'ye yakın olarak yerleşmiştir ve bu nedenle NSAİİ'lerin COX izoformlarını, bu izoformlara ve muhtemelen COX kanalı boyunca yer alan başka alt bölgelere bağlanarak inhibe ettiklerine inanılmaktadır. Bu bağlanma PG sentezini, AA (araşidonik asit)'in enzimin aktif bölgelerine girmesini bloke etmek yoluyla ya da aktif bölgelerin şeklinde biçimsel bir değişikliğe yol açmak suretiyle inhibe eder. COX-1 ve COX-2 arasındaki önemli bir diğer yapısal fark, COX-2 kanalının COX-1 kanalından daha geniş olmasıdır. Kanalların genişliğindeki farklılıklara ek olarak aktif bölgelerinin aminoasit bileşiminde iki fark bulunur. COX-1 aktif bölgesi 523 pozisyonunda bir izölösün aminoasidi içermekte, buna karşılık COX-2 aktif bölgesinin aynı pozisyonu bir valin aminoasiti ihtiva etmektedir. Bir metil grubunun olmayışı COX-2 yapısında aktif bölgeye bitişik bir "yan cep" oluşumuna ve COX-2 aktif bölgesinin hacminin artmasına yol açar. COX-2 de 434 pozisyonundaki valinin yerini, COX-1'in aynı pozisyonunda izölösün alması bu hacmi daha da arttırır. Bu iki aminoasit farklılığının kombinasyonu, COX-2'de 518 pozisyonundaki fenilalaninin yön değiştirmesine ve sonuç olarak yan cebe girişin artışına olanak verir. COX-1'de 513 pozisyonunda histidinin yerini COX-2'de Arg'in alması yan cebin çevresinin kimyasını değiştirir (Şekil 1.22). Arg polar ortamla etkileşime girer ve COX-2 inhibitörlerinin etkisini arttırır. COX-1'e kıyasla COX-2'de daha geniş ana kanal bu izoformun NSAİİ bağlayan bölgesini %25 oranında arttırır (Garavito 1999, 2003). COX-2 kanalının daha geniş hacmi Arg 120 aminoasidinin neden olduğu sterik ve iyonik engelleri azaltarak nonasidik NSAİİ'lerin COX-2 ile bağlanmasını arttırabilir (Garavito 2003). COX izoformlarında, biri izoformun aktif bölgesinde, diğeri aktif bölge dışında olmak üzere mevcut olan iki aminoasitte gözlenen değişiklikler bu enzim izoformlarının COX-2 selektif inhibitörlere gösterdikleri farklı hassasiyeti açıklamaktadır (Garavito 1999).



Şekil 1.23. COX-1 ve COX-2 izoformlarının farklı amino asit kompozisyonu ve aktif bölgelerinin dıştan görünüşü

1.3.3. COX reaksiyonu

AA'in PGG₂'ye dönüşümü çoklu doymamış yağ asidi otooksidasyonunun analogu olan bir seri radikalik reaksiyonlar olarak açıklanabilir. COX reaksiyonunda ilk olarak bir hidroperoksit (ROOH), enzimin prostetik grubu olan hem'in yapısındaki demir (Fe) ile reaksiyona girer. ROOH, alkole (ROH) indirgenirken enzimin oksiferril hem radikal katyonu oluşur (Şekil 1.23).



Şekil 1.24. COX enzimlerinin reaksiyon mekanizması

Radikal katyon, Tyr 385 aminoasidine molekül içi geçiş yapar ve tirozil radikali oluşur. Buraya kadar gerçekleşen reaksiyonlar enzimin POX aktivitesi vasıtasıyla yürür. COX aktif bölgesi AA ile tamamen işgal edildiğinde tirozil radikali AA'ten 13proS hidrojenini kopararak reaksiyonu başlatır. Oluşan araşidonil radikali moleküler oksijen (O_2) ile reaksiyona girer ve 11- peroksil radikali meydana gelir. Radikal yapı C-9 atomuna kayar ve ardından C-8'de oluşan karbon merkezli radikal C-12 ile siklik bir yapı oluşturarak endoperoksiti meydana getirir (Şekil 1.24). İkinci bir O_2 'nin reaksiyona dahil olması sonucu 15-peroksil radikali oluşur ve bu radikal Tyr 385'den bir elektron kaparak PGG_2 'ye indirgenir. POX reaksiyonu tekrar aktive olur ve PGG_2 , PGH_2 'ye indirgenir. Reaksiyonlar sonucunda ortamda bulunan tirozil radikali ya yeni bir COX reaksiyonunu başlatır ya da intihar yoluyla radikalik reaksiyonlar zincirini sonlandırır.

POX reaksiyonunun AA metabolizmasında COX'tan sonra ikinci basamakta gerçekleştiği düşünülmesine rağmen, (PGG₂'nin PGH₂'ye indirgenmesi) COX reaksiyonunun başlayabilmesi için POX aktivitesinin gerekli olduğu anlaşılmaktadır (Garavito 1999, 2003; Marnett 2000).

1.3.4. COX enzimi aktivite belirleme yöntemleri

Siklooksigenaz aktivitesini belirlemek için çeşitli yöntemler belirlenmiştir (Maxey *et al.* 2001).

Polarografi (Oksigraf)

Siklooksigenaz aktivitesi, oksijen elektrot ile teçhizatlanmış oksigraf ile oksijen tüketiminin görüntülenerek ölçülmesi ile belirlenmektedir. Reaksiyon karışımı EDTA, hematin, fenol ve COX içeren Tris tampon (pH 8.0) içermektedir. Reaksiyon araşidonat ile başlamakta ve grafik kağıdına çizilmektedir (Maxey *et al.* 2001).

Bu yöntem oksijen tüketimini ölçtüğü için kesin, COX aktivitesini doğrudan ölçtüğü için sürekli ve inhibitör enzim mekanistik çalışmalarını ayrıntılı verdiği için mükemmel bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Fakat cihazın birçok laboratuvarında bulunmaması ve yöntem için ~50 ünite enzim gerekmesi bu yöntem için dezavantaj oluşturmaktadır (Maxey *et al.* 2001).

Peroksidaz aktivitesi ölçümü

Siklooksigenaz enzimi, siklooksigenaz (COX) ve peroksidaz aktivitesi olan bifonksiyonel bir enzimdir. Hidroperoksi endoperoksit (PGG₂) komponentinin alkol olan PGH₂'ye indirgenmesi peroksidaz katalizi sonucu gerçekleşmektedir. Hidroperoksidin indirgendiği esnada, yükseltgenecek ikinci bir substrata ihtiyaç duyulmaktadır. Fenol, COX aktivite testlerinde kullanılan indirgeyici substratlardan

birisidir. İndirgeyici substratlar, okside olduklarında renk oluşturmakta ve bu renk UV/VIS spektrofotometri ya da luminesans ölçüm ile belirlenmektedir. Peroksidaz aktivitesi için çeşitli yöntemler öne sürülmüştür (Maxey *et al.* 2001).

a) Hidrojen peroksit ya da araşidonik asitin substrat olarak kullanıldığı N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamin (TMPD) oksidasyonunu takip eden kolorimetrik belirleme ile peroksidaz aktivitesi ölçülebilmektedir.

b) Siklooksigenaz peroksidaz aktivitesi indirgeyici substrat olarak luminol kullanıldığında luminesans meydana getirmekte ve luminesans luminometre ile ölçülmektedir.

c) Peroksidaz aktivitesi 5-fenil-4-pentil hidroperoksit (PPHP)'nin 5-fenil-4-pentil alkol (PPA)'ya indirgenmesi ile ölçülebilmektedir. Ters faz C18 kolonda HPLC ile analiz yapılmakta ve PPA ve PPHP konsantrasyonları internal standart kullanılarak hesaplanmaktadır.

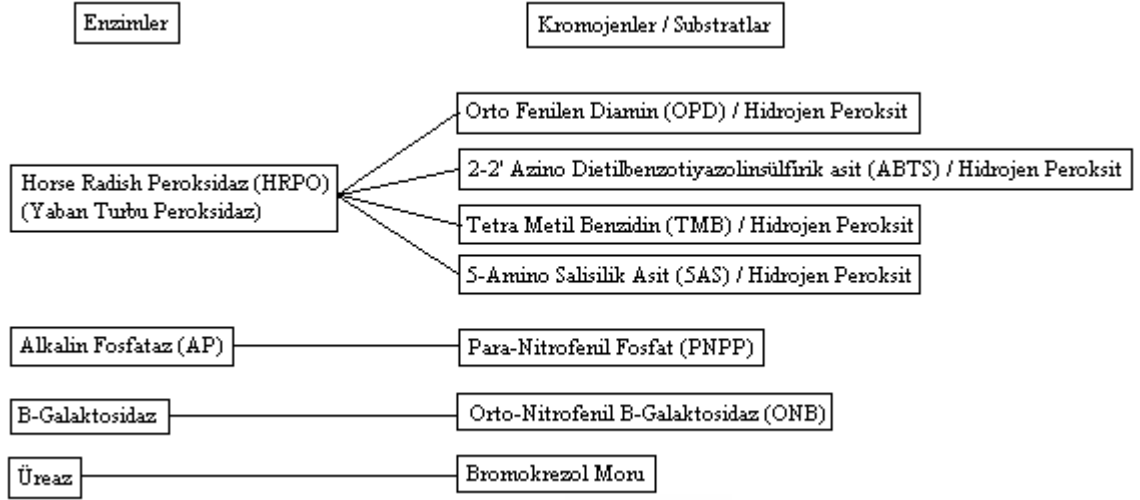
Prostaglandin ölçümü

Siklooksigenaz reaksiyonunda üretilen prostaglandinlerin miktarı, enzim immüanaliz ile de ölçülmektedir. Reaksiyon karışımı EDTA, hematin, fenol ve COX içeren Tris tampondur (pH = 8,0). Reaksiyon araşidonik asitle başlatılmakta ve belirli bir sıcaklıkta belirli derecede inkübe edildikten sonra asitlendirilmektedir. PGH₂'yi daha dayanıklı olan PGH_{2α}'ya indirmek için doymuş kalay klorür (SnCl₂) eklenmekte ve prostaglandin miktarı ölçülmektedir. Bu yöntem genel inhibitör görüntüleme için mükemmel bir araç ve 1 üniteden daha az enzim gerektirdiği için hassas bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Numunelerin enzim kaynağına bağlı olarak saflaştırma gerektirebilmesi ve tek zaman noktalı test sistemi olması bu yöntem için dezavantaj oluşturmaktadır (Maxey *et al.* 2001).

1.3.5. ELİSA (Enzim bağlı immunosorbent tayini)

ELİSA (Enzim bağlı immunosorbent tayini); peptit, protein, antikor ve hormon gibi maddeleri tespit etmek ve miktarını belirlemek için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde enzim immünoanaliz de (EIA) denilmektedir (Introduction to ELİSAs). ELİSA'nın çalışma ilkesi, immunoreaktif bir moleküle (bir antikor veya protein A) bağlı bir enzimin kullanılarak mevcut antijenin belirlenmesidir. Burada enzim katalizli reaksiyonun neden olduğu güçlendirme, yöntemi etkili kılmaktadır (Oktay 2010).

ELİSA yönteminde antijen katı bir yüzeye sabitlenmekte ve antijen enzime bağlı bir antikor ile bir kompleks oluşturmaktadır. Enzim kompleksi saptanabilir bir ürün üreten substrat ile inkübe edildikten sonra spesifik antikor-antijen etkileşiminin tespiti gerçekleştirilebilmektedir (Introduction to ELİSAs). ELİSA testleri, genellikle antikor ve proteinlerin pasif olarak bağlandıkları 96 ya da 384 kuyucuklu plakalarda gerçekleştirilmektedir. Mikropłakanın yüzeyine yerleştirilen ELİSA re ajanları, bağlanmış ve bağlanmamış maddelerin yıkanarak uzaklaştırılmasını kolaylaştırırken, ELİSA testini spesifik bağlanmaları ölçme açısından güçlü bir yöntem haline getirmektedir. ELİSA yönteminde saptanacak enzim, ya doğrudan primer antikora ya da primer antikorun tanıyacağı sekonder antikora bağlanabilmektedir (Introduction to ELİSAs). Genellikle kullanılan enzimler yaban turpu peroksidaz (horseradish peroksidaz) ya da alkalın fosfataz işaretli enzimlerdir (Introduction to ELİSAs). Enzimler renksiz substratı renkli ürünlere çevirirler, örneğin alkalın fosfataz p-nitrofenilfosfatı (pNPP) sarı renkli p-nitro fenole çevirmektedir (Introduction to Antibodies). ELİSA yönteminde kullanılan enzimler ve kromojen substratları Şekil 1.25'de gösterilmiştir.



Şekil 1.25. Enzimler ve kromojen substratları

Başlıca dört farklı tür ELİSA bulunmaktadır:

Doğrudan ELİSA

Doğrudan ELİSA, 1940'lı yıllarda Coons ve arkadaşlarının doku antijenlerini işaretlemek için floresan işaretli antikolar kullanmalarıyla ortaya çıkmıştır. Doğrudan ELİSA, ELİSA yöntemleri arasında çok geniş kullanım alanına sahip olmamakla birlikte dokuların ve hücrelerin immunkimyasal boyamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Hızlı bir yöntem olması, tek bir antikor kullanılması ve sekonder antikorun çapraz reaktivitesinin olmaması, bu yöntem için avantaj oluşturmaktadır (Introduction to ELİSAs). Primer antikorun işaretleme sonucu immunreaktivitesinin azalabilmesi, her primer antikorun işaretlenmesinin zaman alması ve pahalı olması, primer antikor seçiminde esnekliğin olmaması ve düşük sinyal amplifikasyonu bu yöntem için dezavantaj oluşturmaktadır (Introduction to ELİSAs).

Dolaylı ELİSA

Dolaylı ELİSA yöntemi iki basamaklı bir yöntem olup saptama için ikinci bir antikor kullanır. Bu yöntem Weller ve Coons tarafından 1954 yılında bulunmuştur ve hala yaygın bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Dolaylı ELİSA'da primer antikor, antijen ile inkübe edilir ve ardından primer antikoru tanıyan işaretli ikinci bir antikor ile inkübe edilir (Introduction to ELİSAs). İşaretli sekonder antikorların çeşidinin çok ve ucuz olması, primer antikorların tek bir türde yapılması ve aynı işaretli antikorların saptama için kullanılabilir olması, primer antikorumun immun reaktivitesinin işaretleme ile etkilenmemesi, primer antikorların işaretli sekonder antikorların bağlanacağı çeşitli epitoplarının olmasından dolayı duyarlı olması ve aynı primer antikor için değişik görselleştirme belirteçlerinin kullanılabilmesi, bu yöntem için bir avantaj oluşturmaktadır (Introduction to ELİSAs). Sekonder antikorumun çapraz reaktivitesinin oluşabilmesi ve yöntemin fazladan bir inkübasyon basamağının olması bu yöntem için dezavantaj oluşturmaktadır (Introduction to ELİSAs).

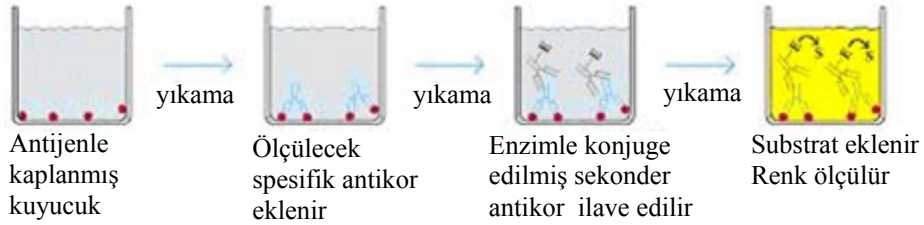
Sandviç ELİSA

İki antikor kullanılarak gerçekleştirilen en kullanışlı immunanaliz yöntemlerinden birisi sandviç ELİSA'dır. Eğer saflaştırılmış antijen standardı mevcutsa bu test ile bilinmeyen numunedeki antijen miktarı kesin olarak saptanabilmektedir. Bu yöntemde, yakalama (capture) antikoru denilen bir antikor saflaştırılır ve plaka kuyucuğunun alt kısmındaki katı faza bağlanır. Antijen eklenir ve bağlanmış antikor ile bir kompleks oluşturması sağlanır. Bağlanmayan ürünler yıkama ile uzaklaştırılır ve işaretli ikinci antikor (saptama antikoru) antijene bağlanır ve sandviç oluşturulur. Kolorimetrik substrat ilavesinden sonra işaretli ikinci antikorumun miktarı ölçülür (Introduction to Antibodies). Bu yöntemin çok spesifik olması ve antijenin kullanılmadan önce saflaştırma gerektirmemesi bu yöntem için avantaj oluşturmaktadır (Introduction to Antibodies). Tüm antikorların kullanılamaması bu yöntem için dezavantaj oluşturmaktadır (Introduction to Antibodies).

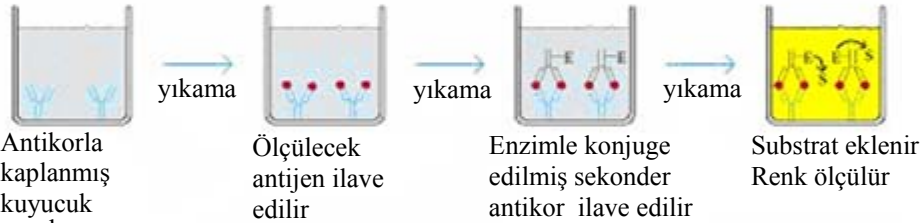
Yarışmalı ELİSA

Bu yöntem ELİSA diğer 3 yöntem ELİSA'yı kapsamaktadır. Bu yöntem ile antikor ya da antijen miktarı ölçülebilmektedir. Yarışmalı ELİSA'yı tanımlamak için C-ELİSA, inhibitör ELİSA'yı tanımlamak için de IELİSA kısaltmaları kullanılmaktadır. Eğer test örneği yakalayıcı antijen ve saptama antikorunu konjugat karışımına ilave edilirse buna yarışmalı ELİSA denilir. Eğer test örneği konjugat ilavesinden önce yakalayıcı antikorla bir süre inkübe edilirse buna inhibitör ELİSA denilir. Bu yöntem özetlenecek olursa, plakanın tabanı primer antikor ile kaplandıktan sonra işaretlenmemiş standart veya test örnekleriyle inkübe edilir. Bu reaksiyon dengeye ulaştıktan sonra konjuge immunojen eklenir ve bu konjugat primer antikorun işaretlenmemiş immunojenlerle işgal edilmemiş kısımlarına bağlanır. Son olarak da plakaya substrat ilave edilir ve renk değişikliği ölçülür (Introduction to Antibodies; Oktay 2010).

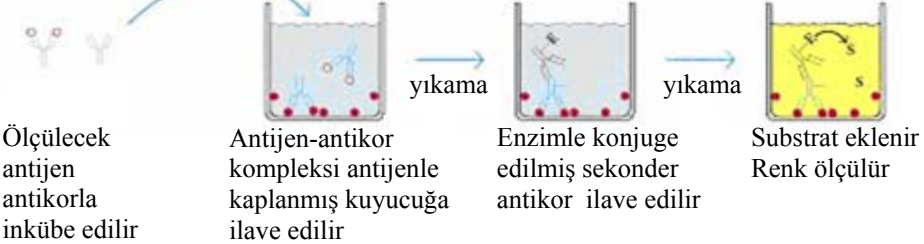
a) Dolaylı ELİSA



b) Sandviç ELİSA



c) Yarışmalı ELİSA

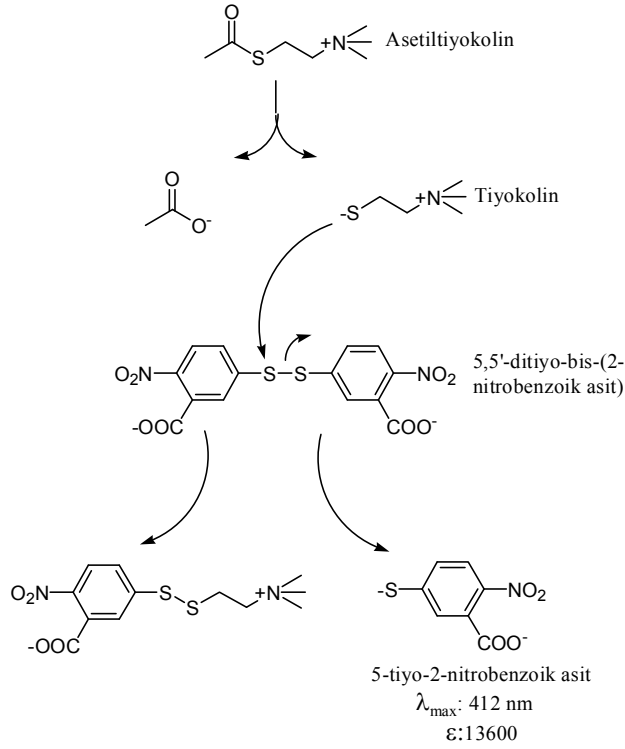


Şekil 1.26. Dolaylı, sandviç ve yarışmalı ELİSA diyagramı

1.3.6. EIA yöntemi ile COX (koyun) enzim aktivitesinin belirlenmesi

Ölçüm, prostaglandin (PG) ve PG-asetilkolinesteraz konjugatı arasında PG antiserumu (belirli oranda) için yaptıkları yarış esasına dayanır. Çünkü PG konsantrasyonu değişken iken işaretli PG konsantrasyonu sabit tutulur. PG antiserumuna bağlanabilen işaretli PG miktarı plate kuyusundaki PG konsantrasyonu ile ters orantılıdır. Tavşanlardan elde edilen PG antiserumu plate kuyusuna önceden kaplanmış olan bir fare monoklonal anti-tavşan antikoruna bağlanır. Plate yıkanarak bağlanmamış materyaller uzaklaştırılır. Daha sonra asetilkolinesteraz substratı içeren Elman ayıracı ilave edilir. Böylece 412 nm'de kuvvetli absorbans veren belirgin sarı renkli ürün oluşur. Bu rengin şiddeti ile bağlanmamış işaretli PG arasında serbest PG ile zıt oranlı olan bir oran vardır (COX Inhibitor Screening Assay Kit).

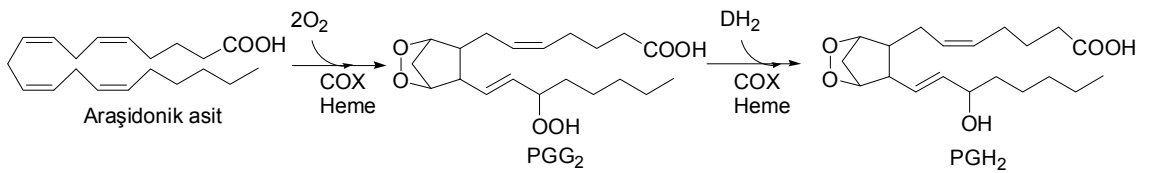
Asetilkolinesteraz (AChE)'in bir molekülüne kovalent olarak bağlı analitin molekülü ACE enzim immunoassay'deki tracer olarak görev yapar. Tracer miktarı Elman Reaktifini ile AChE aktivitesini ölçerek elde edilir. Bu reaktif asetiltiyokolin ve 5,5'-ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asit) içerir. AChE tarafından asetiltiyokolinin hidrolizi tiyokolin üretir. 5,5'-ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asit) ile tiyokolinin enzimatik olmayan reaksiyonu sonucu 412 nm'de şiddetli absorbans veren 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit üretir ($\epsilon = 13600$) (COX Inhibitor Screening Assay Kit).



Şekil 1.27. Asetilkolinesteraz tarafından katalizlenen reaksiyon

1.3.7. “Kemilüminesans Siklooksigenaz Aktivite Kit” kullanılarak insan trombositlerinden saflaştırılan COX-1 enzim aktivitesinin belirlenmesi

“Kemilüminesans Siklooksigenaz Aktivite Kit”, COX enziminin peroksidaz aktivitesini ölçer. Bunun için spesifik bir kemilüminesans substrat kullanır. NSAİ ilaçların inhibisyonundan sonra kalan COX aktivitesi özel bir lüminesans substrat ve araşidonik asit ilavesi ile belirlenir. Bu çalışmadaki bir ünite COX aktivitesi, 37°C’de 1 dakikada 1 nmol oksijeni tüketmek için gerekli olan enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır.



Şekil 1.28. COX reaksiyonu

İnsan trombositlerinden saflaştırılan COX-1 enzim aktivitesi üzerine metotreksat, metilprednisolon sodyum süksinat ve azatioprin ilaçlarının etkisi “Kemilüminesans Siklooksijenaz Aktivite Kit” kullanılarak incelendi.

Kemilüminesans ya da kimyasal ışıltama, madde içinde gerçekleşen kimyasal reaksiyon sonucu çok az miktarda ısı ışıma ve ışık ışıması durumudur. Kimya da pek çok uygulaması görülür. Gündelik hayatta ise en çok yanma reaksiyonları sonucu gözlemlenir. Işığın bir yüzeyden yayımlanmasından farklı olarak burada ışığın yayımlanma nedeni kimyasal reaksiyondur. Kimyasal reaksiyon sonucu ortaya çıkan enerji, reaksiyonda görev alan her bir molekülün ve hatta ara ürünler olan radikallerin enerji seviyelerinde değişime neden olurlar ve bu bahsi geçen molekül ve radikallerin karakterlerine uygun olarak belirli bir dalgaboyunda foton yayımlarlar. Absorbsiyon spektroskopisi kuralları doğrultusunda yayımlanan fotonlar reaksiyona giren maddelerin karakterini ve türünü ortaya koyan renklerde görülmelerinin sebebidir.

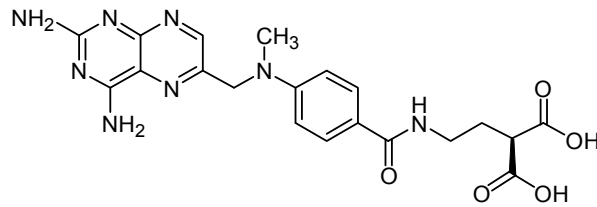
Örneğin; CH^+ radikali görünür hidrokarbon alevinde beyaza çalan mavi renktedir (~431 nm). OH^+ radikalının etkisi de genelde yanmış gazların yoğun olduğu bölgede enerjinin de fazla olmasından ötürü renk tayfında mora yakın UV'de kaymıştır (~308 nm). Bu farklılıklardan faydalanarak çeşitli optik ölçüm yöntemleri geliştirilmiştir ve aynı isimle anılmaktadır.

Kemilüminesans ile ölçüm metodu göreceli olarak düzlemsel lazerle uyarılmış floresan (Planar laser-induced fluorescence: PLIF), lazerle uyarılmış floresan (Laser-induced fluorescence: LIF) gibi diğer ölçüm tekniklerinden daha basit ve uygulanması daha kolaydır. Reaksiyon sonucu açığa çıkan enerjinin ortamda bulunan molekül ve ara ürünlerce emilmesi daha sonra da bu emilen enerjinin foton olarak, her bir molekül ve radikalın karakterine uygun şekilde yayımlanması sonucunda gerçekleşir (Vikipedi)

1.3.8. COX-1 (koyun) ve insan trombositlerinden saflaştırılan COX-1 enzimi üzerine etkileri incelenen ilaçlar ve özellikleri

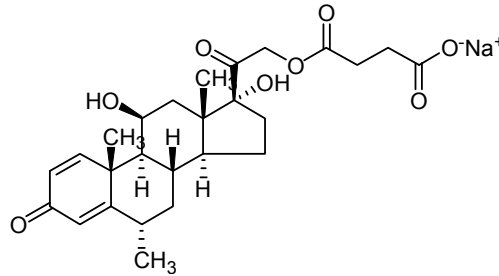
Non steroidal anti-inflamatuar ilaçlar; ağrı, ateş, artrit, osteoartrit ve benzeri romatizmal hastalıklar gibi genellikle enflamasyona bağlı durumlarda kullanılan ve dünya çapında geniş kullanım alanına sahip olan ilaçlardır (Kayaalp 2002; Claria 2003). NSAİİ, farmakolojik etkilerini prostaglandin sentezindeki siklooksigenaz metabolik yolunu inhibe ederek göstermektedirler. Fakat bu ilaçların gastrointestinal ve renal yan etkileri bu ilaçların kullanımını sınırlandırmaktadır. Prostaglandinlerin gastrointestinal kanaldaki sitoprotektif etkileri ve renal kan akışını düzenleme fonksiyonları NSAİİ'nin yan etkilerinin farmakolojik etkilerinden ayrılamayacağı kanısına yol açmıştır. Fakat prostaglandin sentezindeki ikinci basamağı katalizleyen siklooksigenaz-1 (COX-1) ve siklooksigenaz-2 (COX-2) izoenziminin bulunması NSAİİ'nin farmakolojik etkilerinin yan etkilerinden ayrılabilceğini göstermiştir (Sui 2000).

Metotreksat: Antineoplastik etkilidir. Trofoblastik tümörler, lenfosarkom, meme, over ve akciğer kanseri, akut lenfoblastik çocuk lösemisi ve psöriazisin kemoterapisinde kullanılır. Ağız yoluyla, kas içine, damar içine veya intratekal (beyni çevreleyen zar bölgesinin içine) uygulanabilmektedir. Folik asidi tetrahidrofobik aside redükleyen dihidrofolat redüktazı geri dönüşümlü olarak inhibe eder. Genellikle malignat hücreleri, kemik iliği, fetal hücreler, yanak ve barsak mukozası ve mesane hücreleri gibi çoğalan dokular metotreksat'a daha duyarlıdır (Kayaalp 2002).



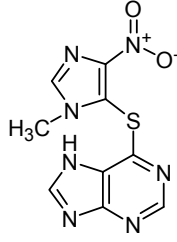
Şekil 1.29. Metotreksat molekülünün yapısal formülü

Metilprednisolon sodyum süksinat: Glukokortikoid ilaçtır. Suda fazla çözünen bir metilprednizolon esteridir. Başta antiinflamatuvar ve antialerjik etkileri olmak üzere çeşitli etkileri nedeniyle sık kullanılan ilaçlardandır (Kayaalp 2002). Genel olarak sistemik glukokortikoid tedavisi gerektiren hastalıklarda endikedir. Doğrudan hayatı tehdit eden şok gibi durumlarda glukokortikoidler intravenöz yoldan uygulanmalıdır. En çok kullanıldığı durumlar alerjik reaksiyonlar ve romatizmal hastalıklardır. Başlıca endikasyonlar; bronşiyal astım, saman nezlesi, ilaç alerjisi, ürtiker, ekzema ve dermatit gibi deri hastalıkları, akut romatizma, romatizmal eklem iltihabı ve kas romatizmasıdır. Ayrıca; edinsel hemolitik anemi, idiyopatik trombopeni, agranülositoz, miyeloblastoz, lenfogranulomatoz gibi kan hastalıkları, iç organların ülseroz kolit ve nefrotik sendrom gibi hastalıkları, pemfigüs grubundan deri hastalıkları, Lupus eritematozis, dermatomyozit, transplantasyon sonrası immüsupresyon, sitostatik tedavisi ile radyoterapinin desteklenmesi, sürrenal korteksinin primer yetmezliği (Addison hastalığı) ve adrenalektomiden sonra yerine koymada da kullanılır (Anonim 2011).



Şekil 1.30. Metilprednisolon sodyum süksinat molekülünün yapısal formülü

Azatioprin: Antiproliferatif ilaçtır. Böbrek ve diğer organ transplantasyonlarında allogreftin reddini önlemek için glukokortikoidlerle kombine olarak kullanılabilirler. Ayrıca, daha az toksik ilaçlara cevap vermeyen aşağıdaki otoimmün hastalıkların tedavisinde de yararlı olabilirler; romatoid artrit, inflamatuvar barsak hastalıkları (Crohn hastalığı vb.), sistemik lupus eritematozus, kronik aktif hepatit, otoimmün hemolitik anemi, immün trombositopeni, lipoid nefroz, sistemik nekrotizan vaskülit, ağır psöriyazis, Wegener granülomatozu, dolaşan antikoagülanlar ve Goodpasture sendromu (Kayaalp 2002).



Şekil 1.31. Azatioprin molekülünün yapısal formülü

Bu tez kapsamında paraoksonaz enzimi insan serumundan saflaştırılmış ve enzim aktivitesi üzerine antibiyotik türü ilaç olan netilmisin sülfat, linkomisin HCl, streptomisin sülfat, oksitetrasiklin HCl, penisilin G potasyum ve klindamisin fosfat, şeker hastalığı tedavisinde kullanılan akarboz ve pioglitazon HCl, romatoid artrit (RA) hastalığının tedavisinde kullanılan metotreksat ilaçlarının inhibisyon etkileri incelenmiştir. İnsan trombositlerinden siklooksigenaz enzimi saflaştırılmış ve enzim aktivitesi üzerine azatioprin, metotreksat ve metilprednisolon sodyum süksinat ilaçlarının inhibisyon etkileri incelenmiştir. Aynı zamanda EIA yöntemi kullanılarak koyundan saflaştırılmış siklooksigenaz enzimi aktivitesi üzerine azatioprin, metotreksat ve metilprednisolon sodyum süksinat ilaçlarının inhibisyon etkileri incelenmiştir.

2.KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. PON Enzimi

İnsan serum paraoksonaz enzimi; karaciğerde sentezlenen, arildialkil fosfataz olarak da adlandırılan Ca^{+2} bağımlı, HDL ile ilişkili ve 43-45 kDa molekül kütleli bir ester hidrolazdır (Mackness *et al.* 1997; Mackness *et al.* 1998; Aviram *et al.* 1999). Paraoksonaz enzimi, önceleri fizyolojik etkilerinden dolayı bir laktonaz gibi düşünülse de, günümüzde birçok substrata sahip ve pek çok fonksiyonu olan bir enzim olduğu anlaşılmıştır (Aharoni *et al.* 2005).

Fareler üzerinde yapılan çalışmalar sonucu serum paraoksonaz-1 enziminin, antioksidan ve antiaterojenik etkilere sahip, HDL bağımlı bir laktonaz olduğu bulunmuştur (Getz and Reardon 2004). Paraoksonaz-1 enziminden yoksun farelerde ateroskleroz gelişiminin hızlandığı ve oksidatif stresin arttığı gözlenmiştir (Shih *et al.* 2000; Rozenberg *et al.* 2003), oysa paraoksonaz-1 enzimi transfer edilen farelerde, oksidatif stresin azaldığı, lezyonların küçüldüğü ve sayısının azaldığı görülmüştür (Tward *et al.* 2002; Rozenberg *et al.* 2005).

Yapılan birçok çalışmada; insan serum paraoksonaz enziminin memelilerde çeşitli organofosfatların detoksifiye edilmesinde önemli rol oynadığı görülmüştür (Li *et al.* 1995; Pond *et al.* 1995). Ayrıca yapılan ayrıntılı çalışmalarda kuşların organofosfatlara karşı memelilerden çok daha hassas bir seçici toksisite gösterdiği bulunmuştur ve bunun da kuşlardaki serum paraoksonaz enziminin neredeyse hiç bulunmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Brealey *et al.* 1980).

Paraoksonaz-1 enzim aktivitesine ilk olarak 1961 yılında Uriel tarafından insan serumunun elektroforezi sonrası HDL'lerin immunoçökeleklerinde rastlanmıştır (Uriel 1961). Kısmi saflaştırılmış sığır PON-1 enziminin lipitlerle ilişkili olduğu ve HDL partikülleriyle yaklaşık aynı moleküler kütleyle sahip olduğu bulunmuştur (Kitchen *et al.*

1973; Don *et al.* 1975). Koyunlarda, PON-1 aktivitesinin çoğunluğunun apolipoprotein A1 (Apo A1) içeren HDL partikülleriyle sıkı ilişkili olduğu belirlenmiştir (Mackness and Walker 1988). İnsan serumundan saflaştırılması esnasında apolipoprotein A1'i paraoksonazdan ayırmanın çok güç olması, Apo A1 ve PON-1'in birbirleriyle sıkı ilişkili olduğunu düşündürmüştür (La Du and Novais 1989). Yapılan immunoaffinite çalışmaları sonucu PON-1'in HDL'ye özgü parçacıklar olan Apo A1 ve klusterin ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Blatter *et al.* 1993; Kelso *et al.* 1994).

Yapılan laboratuvar çalışmaları; HDL'nin okside edici şartlar altında bekletildiğinde LDL üzerindeki lipit peroksit birikimini enzimatik bir mekanizmayla azalttığını göstermiştir (Mackness *et al.* 1993a). Yapılan bir diğer çalışma ise paraoksonaz-1 enziminin HDL'nin bu özelliğiyle ilgili parçalardan biri olduğunu göstermiştir (Mackness *et al.* 1991a, 1993b). Ayrıca; paraoksonaz-1 enziminin okside LDL ve HDL partiküllerinin birikmesini sınırladığı, LDL'lerin proaterojenik partiküllere dönüşümünü önlediği ve okside LDL partiküllerin biyolojik etkilerini tersine çevirdiği ve böylece ateroskleroz lezyonlarının oluşmasını ve ilerlemesini engellediği görülmüştür (Mackness *et al.* 1991b, 1993b; Watson *et al.* 1995; Aviram *et al.* 1998).

Paraoksonaz-1 enzimi; gerek HDL'nin aterosklerozdan koruyucu etkisinde rol oynayarak, gerekse lipoprotein peroksidasyonunu ve LDL kolesterolün oksidasyonunu önleyerek, aterosklerotik süreçte koruyucu bir role sahip olduğu düşünülen antioksidan bir enzimdir (Mackness *et al.* 1998).

PON-1 düzeyinin kardiyovasküler hastalıklarda, sigara içenlerde, hiperkolesterolemi hastalarında, ileri yaşta insanlarda, obezitede, menopozda ve böbrek yetmezliklerinde azaldığı bulunmuştur (Mackness *et al.* 1998). Nishio ve arkadaşları yaptıkları *in vitro* çalışmalarda, sigarada bulunan toksik maddelerin PON-1'in enzimatik aktivitelerini inhibe ettiğini göstermişlerdir (Nishio and Watanabe 1997). Aşırı düzeyde sigara içen bireylerde sigaranın bileşiminde yer alan maddelerin PON-1 aktivitesini azalttığı, serum oksidan aktiviteyi ise arttırdığı, Gürsu ve arkadaşları tarafından da bildirilmiştir (Gürsu ve Özdin 2002). Aşırı sigara içenlerde serum LDL ve diğer lipid düzeylerinin yüksek

bulunması, PON-1 aktivitesi ve HDL düzeylerinin düşük bulunması ve diğer majör ve minör risk faktörlerinin birlikte olması koroner arter hastalığı oluşumunu arttırmaktadır (Gürsu ve Özdin 2002).

Körfez Savaşı Sendromu olarak adlandırılan hastalık, Irak'a gönderilen Amerikan askerlerinde tespit edilmiştir. Askerlerin bazılarında bu hastalığa bağlı olarak yorgunluk, nörolojik hasarlar ve kas güçsüzlüğü görülürken, diğer askerlerde bu sendromun belirtilerine rastlanmamıştır. Irak tarafından kimyasal silah olarak kullanıldığı düşünülen sarin, diazokson gibi OF bileşiklerinin PON enzimi tarafından detoksifiye edildiğinin anlaşılmasından sonra körfez savaşına katılan askerlerin PON aktiviteleri araştırılmış ve körfez savaşı sendromu görülen hastalarda PON aktivitesi oldukça düşük bulunmuştur (Furlong *et al.* 2000).

Plazma lipoprotein düzeylerinin normalden farklı olduğu Fish-eye sendromunda, HDL kolesterol plazma konsantrasyonunun %90 oranında, PON-1 aktivitesinin ise %89 oranında azaldığı gösterilmiştir. Diğer yandan bir başka lipoprotein metabolizma hastalığı olan Tangier hastalığında ise PON-1 enzim aktivitesi tayin edilememiştir (Laitinen *et al.* 1993; Mackness *et al.* 1997).

Yapılan çalışmalar sonucu paraoksonaz aktivitesinin diyabet ve ailesel hiperkolesterolemi gibi ateroskleroz ile yakından ilişkili olan hastalıklarda düşük olduğu gözlemlenmiştir (Mackness *et al.* 1991b). Yapılan çalışmalara göre paraoksonaz-1 enzimi; kronik kalp hastalıkları riskini, aterosklerotik lezyon ilerlemesinde gerekli proinflatuar molekülleri yıkarak azaltır (Azarsız *et al.* 2000).

PON-1 aktivitesi ile semen (meni) parametreleri arasında herhangi bir ilişki olup olmadığı araştırılmıştır ve anormal semen parametrelerine sahip erkeklerde PON-1 aktivitesinin düşük olduğu gözlemlenmiştir. Sonuç olarak PON-1 aktivitesinin subfertilite patojenezinde önemli bir rol oynayabileceği belirtilmiştir (Verit *et al.* 2008).

Soran ve arkadaşları (2008) diz osteoartriti olan hastalarda serum paraoksonaz, aril esteraz, lipid hidroperoksit ve serbest tiyol seviyelerini incelemişlerdir. Çalışmalarını 36 hasta ve 30 sağlıklı birey üzerinde yapmışlar ve hastalarda serum HDL kolesterol, serbet tiyol, paraoksonaz ve arilestreraz seviyelerinin kontrol grubuna göre önemli ölçüde düşük; lipid hidroperoksit ve LDL seviyelerinin ise yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu yüzden, düşük paraoksonaz ve arilesteraz aktivitelerinin osteoartritli hastalarda lipid peroksidasyonuna artan duyarlılık ile ateroskleroz patojenezinde önemli rol oynadığını belirtmişlerdir (Soran *et al.* 2008)

Nitritlerin PON-1 aktivitesi üzerindeki herhangi bir modifiye edici etki gösterip göstermedikleri araştırılmıştır. Sonuç olarak PON-1 aktivitesinin nitritler tarafından doz ve zaman bağımlı olarak inhibe olduğu görülmüştür. PON-1 inhibisyonunun, triptofan, indirgenmiş glutatyon ve katalaz ilavesiyle azaltıldığı gözlemlenmiş ve nitrillerin inhibisyon etkisini enzimdeki fenil rezidülerini nitratlayarak gösterdiği ve triptofan gibi aromatik aminoasitlerin ilavesinin bu etkiyi azaltacağı belirtilmiştir (Abd-Allah and Mariee 2008).

Bir çalışmada kırmızı şaraptan elde edilen polifenolik ekstraktın hiperhomosisteinemi olan fareler üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Düşük konsantrasyonlardaki ekstraktın plazma homosistein seviyesini düşürdüğü ve kronik hiperhomosisteinemiden kaynaklanan hepatik ve serum PON-1 aktivitesindeki azalmayı restore ettiği gözlenmiştir. Bu sonuçlar kırmızı şarap polifenolik ekstraktının, hiperhomosisteinemiye dayalı fonksiyon bozukluklarının biyokimyasal işaretçileri üzerinde faydalı etkiye sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır (Noll *et al.* 2008).

Atamer ve arkadaşları, karaciğer yağlanması olan hastalarda lipid peroksidasyonu, nitrik oksit ve paraoksonaz aktivitesi bakımından oksidatif durumdaki değişimleri değerlendirmişlerdir. Çalışma 49 hasta ve 25 sağlıklı birey ile gerçekleştirilmiştir. Hastalarda PON-1 aktivitesinin ve nitrik oksit seviyelerinin önemli derecede azaldığını gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak oksidatif stresin bu hastalarda PON-1 sentezini baskıladığını belirtmişlerdir (Atamer *et al.* 2008)

Alıcı ve arkadaşları intravenöz anestezi ilaçları olarak kullanılan etomidat, propofol ve ketaminin PON-1 enzim aktivitesi üzerine *in vivo* ve *in vitro* etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada bu ilaçların enzim aktivitesini önemli ölçüde azalttığını belirtmişlerdir (Alıcı *et al.* 2008).

Pasca ve arkadaşları psikolojik bir fonksiyon bozukluğu olan ASD (Autism spectrum disorders)'li hastalarda paraoksonaz aktivitesi ve polimorfizmini araştırmışlar ve ASD'li hastalarda PON-1'in katalitik aktivitesinin ve biyoyararlılığının bozulduğunu gözlemlemişlerdir (Pasca *et al.* 2008).

Bir çalışmada hiperkolesterolemik postmenapozal kadınlarda serum lipoprotein konsantrasyonu ve PON-1 aktivitesi üzerine soya fasulyesinin etkilerini araştırmışlardır. Sonuç olarak soya fasulyesinin serum lipoproteinlerindeki azalmayı ılımlı hale getirmesi ve PON-1 aktivitesini artırması nedeniyle kardiyovasküler hastalık riskini azalttığını belirtmişlerdir (Shidfar *et al.* 2008).

Liu ve arkadaşları rekombinant PON-1 ve PON-3 enzimlerini; LDL oksidasyonunu geciktirme, makrofaj oksidatif stresi önleme ve makrofaj kolesterol akıntısını artırma açısından kıyaslamışlardır. Her iki enzim de LDL oksidasyonunu geciktirmiştir. Fakat PON-1 daha etkili olmuştur. Ne PON-1 ne de PON-3 enzimleri makrofaj oksidatif stresi önleyememiştir. PON-3 makrofaj kolesterol akıntısını artırmıştır. Fakat PON-1 makrofajlara karşı sitotoksik bulunmuştur (Liu *et al.* 2008).

Verit ve arkadaşları hamilelik dönemine ait bir hastalık olan hiperemesis gravidarum'lu hastalarda PON-1 seviyelerini araştırmışlardır. 34 hasta ve 31 sağlıklı bireyden oluşan çalışmada PON-1 aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Hastalarda PON-1 seviyesinin düşük; lipid hidroperoksit seviyelerinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Düşük PON-1 aktivitesinin hamilelik sırasındaki enflamasyon ve artan oksidatif stresle alakalı olabileceğini belirtmişlerdir (Verit *et al.* 2008).

İlk olarak Mallinckrodt ve arkadaşları, enzimin genetik polimorfizm gösterdiğini bulmuşlardır (Mallinckrodt *et al.* 1979). Paraoksonaz enziminde, biri 55. pozisyonda (metiyonin veya lösin), diğeri 192. pozisyonda (arginin veya glutamin) olmak üzere iki çeşit polimorfizm bulunmaktadır. Proteinin 192. pozisyonundaki arginin aminoasiti yüksek aktiviteli (B formu) paraoksonazı belirtirken, bu pozisyonda glutamin aminoasitinin bulunması ise düşük aktiviteli enzimi (A formu) belirtmektedir (Adkins *et al.* 1993). Polimorfizm, paraoksonaz izoenzimlerinin lipid peroksitlerle olan hidrolitik aktivitesini etkilemektedir (Mackness *et al.* 1998) ve paraoksonaz-1 192 R allelinin kronik kalp hastalıklarıyla pozitif olarak ilişkili olduğu bulunmuştur (Mackness *et al.* 1998). Enzimin 192. pozisyonundaki Q ve R allelleri substrat bağımlı polimorfizm oluşturur. R polimorfizmi, paraokson gibi substratları daha hızlı bir şekilde hidroliz ederken, Q allozimi somon ve sarin gibi bileşikleri daha hızlı hidroliz eder (Durrington *et al.* 2001); her iki allozim fenilasetatı yaklaşık aynı hızda hidroliz eder. PON-1 R192 polimorfizminin laktonaz aktivitesinin Q192 polimorfizminden yaklaşık iki kat fazla olduğu bulunmuştur (Khersonsky and Tawfik 2006).

2.2. COX Enzimi

Prostaglandin H₂ sentaz ya da prostaglandin endoperoksit H sentaz olarak da adlandırılan siklooksijenaz enzimleri (EC 1.14.99.1) bifonksiyonel, integral membran proteinleridir (Garavito 1999, 2003; Haeringen 2000). COX enzimleri hem (demir) bağımlı peroksidaz enzim ailesinin üyeleridirler (Garavito 1999, 2003). 1990'lara kadar sadece bir COX enziminin mevcut olduğu düşünülüyordu. Ancak konu üzerinde yapılan kapsamlı çalışmalar sonucunda COX enziminin iki farklı izoformunun olduğu anlaşılmıştır (Kujubu *et al.* 1991; Xie *et al.* 1991; Garavito 1999).

Siklooksijenaz enzimi ile yapılan ilk çalışmalardan biri 1986 yılında Boopathy ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada koyun trombositlerinden COX-1 enzimi saflaştırılmaya çalışılmıştır. Bunun için ibufren-Sepharose-4B, (imunodiasetikasit) IDA/Zn-Sepharose-4B, (trisetilendiamin) TED/Zn-Sepharose-4B ve Hem-Sepharose-4B afinite kolonları kullanılmıştır. Bu kolonlardan en iyi sonucu

ibufren-Sepharose-4B afinite kolonundan elde etmişlerdir. COX enzimini %63 verimle 60 kat saflaştırabilmişlerdir. Aktivite tayini olarak malondialdehit (MDA) analizi yapılmıştır (Boopathy *et al.* 1986). SDS poliakrilamid jel elektroforezi ile molekül ağırlığını yaklaşık 72 000 Da bulmuşlardır (Boopathy *et al.* 1986; Kurumbail *et al.* 2001).

Siklooksijenaz enziminin izoformu olan COX-2'nin 1990'lı yıllarda bulunmasıyla birlikte COX-1'i etkilemeyen ancak analjezik ve anti-inflamatuar etkisi fazla olan seçici COX-2 inhibitörleri bulunmuştur (Kujubu *et al.* 1991; Xie *et al.* 1991; Smith, 1994). NSAİ ilaçların yan etkilerinden korunmak için NSAİ ilaçların yapı ve dağılımlarında değişikliklere gidilmektedir. Bunu sağlamak için COX-2'yi inhibe ederken, COX-1'e karşı etki göstermeyen ilaçlar sentezlenmelidir.

COX-1 ve COX-2 izoenzimleri farklı genler tarafından kodlanırken, aminoasit dizilimleri benzerdir. İnsan dokusu DNA'sında COX-1 1991'de, COX-2 1992'de tanımlanmıştır (Funk *et al.* 1991, Sano *et al.* 1992). Sıçan dokusundaki bir çalışmada, değişik organlarda COX-1 ve COX-2 mRNA'nın değişik seviyelerde etkili olduğu gösterilmiştir. COX-1 mRNA; karaciğer, akciğer ve böbrekte etkili olurken, COX-2 mRNA; kalp ve böbrekte etkilidir. COX-1 mRNA'nın kalpte, COX-2 mRNA'nın ise akciğerde etkisi yoktur. Bu sonuçlar COX-1 ve COX-2'lerin regülatuar fizyolojik rollerinin organ spesifik olduğunu desteklemektedir (Okamoto and Hino 2000). COX-1 insan kromozom 9'da, COX-2 ise insan kromozom1'de saptanmıştır (Price *et al.* 1990; Kremer *et al.* 1992).

COX-1 birçok dokuda yapısal olarak bulunur ve hemoastatik ve sitoprotektif prostanooidlerin sentezinden sorumludur (gastrik mukoza, endotel, trombositler, böbrekler gibi). NSAİ ilaçların yan etkilerinin birçoğu yapısal PG'lerin inhibisyonuna bağlı olarak gelişir. COX-2 enzimi ise inflamasyondan sorumlu PG sentezini sağlar. Lökositler, damar düz kas hücreleri, romatoid sinoviositleri ve beyin nöron hücrelerinde bulunur ve mitojenler, sitokinler ve endotoksinlerce stimüle edilir (Kujubu *et al.* 1991; Xie *et al.* 1991; Gilkeson, 1997; Robinson, 1997; Jouzau *et al.* 1997; Needleman *et al.* 1997; Bolten, 1998; Haeringen *et al.* 2000; Fiorucci *et al.* 2001). Omurilik, böbrek,

yumurtalık ve rahimde yapısal olarak bulunmaktadır. Omurilikte ağrı uyarısı (Malmberg 1992; Hay and Balleroche 1997), böbreklerde su ve sodyum ihtiyacından (Schnermann 1998) sorumludur.

COX enziminin en azından iki izoformunun olduğunun gösterilmesi, antiinflamatuvar ilaçların bu formlara karşı seçicilik derecelerinin incelenmesine yol açmıştır (Bakhle, Battistini, Botting, 1994). Yapılan çalışmalarda NSAİ ilaçların COX izoenzimlerine karşı aktiviteleri; hayvan enzimlerinin homojenatları veya saflaştırılmış halleri (izole enzim sistemi), insan kan hücreleri (tüm kan sistemleri), hayvan hücresi-insan hücre kültürü ve karışık hücreli sistemler (hücre ve hücre kültürü sistemi) gibi biyolojik sistem kullanılarak tespit edilmiştir (Jauzeau *et al.* 1997).

NSAİ ilaçların COX-1 ve COX-2'ye karşı seçiciliği, bir ilacın enzimi %50 inhibe ettiği konsantrasyon değeri olan IC₅₀ olarak tanımlanabilir (Lecomte *et al.* 1994; Spanger 1996; Grisvold and Adams 1996; Fenner 1997; Jauzeau *et al.* 1997).

Bilinen NSAİ ilaçların COX izoenzimlerini inhibe etme potansiyelleriyle ilgili yapılan çalışmalar, COX-2/COX-1 oranı düşük olan ilaçların diğerlerine göre daha az yan etki gösterdiklerini ortaya koymuştur (Katzung 1998).

NSAİ'ler COX enzimini inhibisyonlarına göre gruplara ayrılır (Rome and Land 1975; Ouellet and Percival 1995). 1. grup; basit, yarışmalı inhibitörler; 2. grup; yarışmalı, zamana bağımlı, tersinir ya da hafif sıkı bağımlı inhibitörler (flurbiprofen, indometasin, diklofenak gibi.), 3. grup; yarışmalı, zamana bağımlı, tersinmez inhibitörler (salisilat türevleri gibi.) (Lecomte *et al.* 1994; Mancini *et al.* 1994).

Seçici COX-1 inhibitörleriyle ilgili yapılan Class çalışmasında, osteoartritli hastalardan bir grup 400 mg celecoxib (günde 2 kez), diğer grup 800 mg ibuprofen (günde 3 kez) veya 75 mg Diclofenac (günde 2 kez) almışlardır. Gereken durumlarda hastalar aspirin kullanmışlardır. Kardiyovasküler olaylarda Celecoxib'in diğer gruba göre kardiyovasküler olaylarda artışa neden olmadığı saptanmıştır (Silverstein *et al.* 2000).

Haeringen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, flurprofen ve meloksikam antiinflatuar ilaçlarının COX-1 ve COX-2 enzim aktiviteleri üzerindeki seçici inhibisyonları incelenmiştir. COX-1 enzim aktivitesi için heparinli tüm kan 25 mM kalsiyum iyonofor A23187 ile inkübe edilerek tromboksan B₂ (TxB₂) oluşturulmuştur. COX-2 enzim aktivitesi için ise PGE₂ oluşturularak enzim immunoanaliz (EIA) yöntemi ile TxB₂ ve PGE₂ analizi ile aktiviteler belirlenmiştir. Sonuç olarak her iki enziminde seçici olarak COX-2 enzimini inhibe ettikleri belirlenmiştir (Haeringen *et al.* 2000).

COX inhibitörleri antikanserojen etkilerini; apoptozisin uyarılması, DNA hasarına ve tümörün büyümesine neden olan PG'lerin ve sitokinlerin salınımının baskılanması, neovaskülarizasyonun engellenmesi ve immün yanıtın Th1 yönüne doğru çevrilmesi ile gösterir (Smith and Skelton 2002; Lee *et al.* 2003).

Son yıllarda, COX-2 inhibitörü rofecoxib ve COX-1 ve COX-2 inhibitörü naproksenle yapılan, plasebo kontrollu, çift kör, randomize çalışmada, ilaçların hafif ve orta Alzheimer hastalığında (AH)'nda kognitif yıkımı yavaşlatmadığı bulunmuştur. Yazarlar bu durumu, hastalık başladıktan ve nöropatolojik değişiklikler ilerledikten sonra NSAİİ'lerin etkili olmadığına bağlamışlardır (Tuppo and Arias 2005).

Demircan (2005), yaptığı çalışmada mannik bazı türevi olan C1 (3-benzoil-1-metil-4-fenil-4-piperidinol hidroklorür) maddesi ile COX inhibisyonuna bakmış ve indometazin, nimesülid ve refekoksib ilaçları ile kıyaslama yapmıştır. İndometazin ve nimesülidden daha güçlü, refekoksibden daha zayıf olduğunu bulmuştur. Sonuç olarak, C1'in antiinflatuar etkiye sahip olduğunu idda etmektedir (Demircan 2005).

3.MATERYAL ve YÖNTEM

3.1.Materyal

3.1.1.Kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmalarımızda kullanılan standart serum albümin, N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin (TEMED), diyaliz torbaları, hematin, ibuprofen, araşidonik asit, fenol, Triton X-100, 1,6-diaminohekzan, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodi-imid, Sepharose-4B Sigma Chemical Comp.'den; sodyum hidroksit, trihidroksimetilaminometan (Tris), amonyum sülfat, sodyum klorür, sodyum asetat, sodyum karbonat, hidroklorik asit, glisin, fosforik asit, borik asit, sodyum azotür, gliserin, potasyum fosfat, potasyum bisfosfat, potasyum asetat, potasyum klorür, etanol, metanol, asetik asit, sodyum asetat, izopropanol, dioksan E.Merc AG'den; akrilamid, N,N'-metilen bisakrilamid, coomassie brilliant blue G-250, brom timol mavisi, sodyum dodesil sülfat (SDS), Sephadex G-200, agar, 1-naftilamin, amonyum persülfat, β -merkaptto etanol Pharmacia'dan; COX inhibitör screening assay kit Cayman Chemical ACETM,den; Chemiluminescent Cyclooxygenase Activity Kit Assay design'dan; çalışmada kullanılan ilaçlar ise piyasadan temin edilmiştir.

3.1.2.Yararlanılan alet ve cihazlar

Çalışmalar esnasında aşağıdaki alet ve cihazlardan faydalanılmıştır.

Satirifüj	: MSE Mistral 2000
Afinite kolonu	: Kapalı sistem oluşturucu (1x10cm), sigma (ABD)
Buzdolapları	: Arçelik
Çalkalayıcı	: Midi Dual 14
Derin dondurucu (-85°C'ye kadar)	: Sanyo Ultra Low

Derin dondurucu (-20°C'ye kadar)	: Sanyo Madical Freezer
Elektroforez tankı	: BIO RAD (dikey)
ELİSA okuyucu	: BIO-TEK Instruments-MQX200R, USA
Güç kaynağı	: 1-Bio Rad Power Pac 3000
Hassas terazi	: Gecavery (UK)
Kar makinesi	: Scotsman AF-20 (Authomatic ice machines)
Karıştırıcı (Shaker)	: GFL 3025
Karıştırıcı(Vorteks)	: Fısons whirli-mixer
Liyofilizatör	: Snijders
Lüminometre	: Turner Bio Systems Modul TM Microplate Reader, California, USA
Magnetik karıştırıcı	: Chiltan Hotplate Magmetic Stirrer HSBI
Masa santrifüjü	: MSE Mistral 2000
Otomatik pipet	: Eppendorf
Peristaltik pompa	: İsmatec
Plate çalkalayıcı	: IRMA Shaker, Labsan, USA
pH metre	: Schott pH-Meter CG840
Saf su cihazı	: Barnstead Easy Pure UV/UF
Soğutmalı satrifüj	: Heraeus Sepatech (Suprafuge 22)
Soğutmalı satrifüj	: Hermle Z 323 K(Germany)
Spektrofotometre	: CHEBİOS s.r.l. (Optimum-one/UV-VIS)
Su banyosu	: Clifton

3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

Çözelti hazırlamak amacıyla kullanılan su, saf ve deiyonize sudur. Ayrıca bazı çözeltilerde kullanılan su sterilize edilmiştir.

PON-1 enzimi için yapılan çalışmalarda kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

a) Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler

1. 1 mM CaCl_2 içeren 50 mM glisin/NaOH tamponu (pH=10,5): 3,750 g glisin ve 0,111 g CaCl_2 alınarak 900 ml destile suda çözüldü. NaOH çözeltisi ile pH 10,5'e ayarlandı. Daha sonra toplam hacim su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

2. Substrat çözeltisinin hazırlanması: 35 µl paraokson alınarak 1 ml asetonda çözüldü. Karışım 50 ml suya manyetik karıştırıcı eşliğinde yavaş yavaş ilave edilip karıştırıldı.

b) Amonyum sülfat çökeltisinin çözünmesi ve diyaliz için kullanılan çözeltiler

1. 100 mM Na-fosfat tamponu (pH=7,0): 11,998 g NaH_2PO_4 alınıp 800 ml destile suda çözüldü. pH'sı 1 M NaOH ile 7,0'e ayarlandı. Daha sonra toplam hacim destile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

2. (Diyaliz için) 1 mM Na-fosfat tamponu (pH=7,0): 0,12 g NaH_2PO_4 alınıp 900 ml destile suda çözüldü. pH'sı 7,0'e ayarlandı. Daha sonra toplam hacim destile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

c) DEAE-Sephadex iyon değişim kromatografisi için kullanılan çözelti

1. 250 ml 100 mM Na-fosfat tamponu (pH=7,0): 2,99 g NaH_2PO_4 alınıp 200 ml destile suda çözüldü. pH'sı 1 M NaOH ile 7,0'e ayarlandı. Daha sonra toplam hacim destile su ile 250 ml'ye tamamlandı.

d) Jel filtrasyon kromatografi kolonunda kullanılan tampon çözelti

1. 100 mM Na-fosfat tamponu (pH=7,0): 11,99 g NaH_2PO_4 alınıp 800 ml destile suda çözüldü. pH'sı 1 M NaOH ile 7,0'e ayarlandı. Daha sonra toplam hacim destile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

COX-1 enzimi için yapılan çalışmalarda kullanılan çözeltiler ve hazırlanması**a) COX-1 enziminin ekstrakte edilmesi için kullanılan çözelti**

1. 20 mM KH_2PO_4 (pH=7,5) /0,7 mM fenol /1 mM β -merkaptöetanol (A tamponu): 2,72 g KH_2PO_4 , 71 μl β -merkaptöetanol ve 1000 μl fenol alınarak yaklaşık 800 ml destile suda çözüldü. pH'sı 1M NaOH ile 7,5'e ayarlandı. Daha sonra toplam hacim destile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

b) Afinite kolonunda kullanılan çözeltiler

1. 0,1 M Na_2CO_3 sodyum karbonat tamponu (pH=9,5): 10,6 g Na_2CO_3 alınarak 800 ml destile suda çözüldü. pH'sı 1 M NaOH ile 9,5'e ayarlandı. Daha sonra toplam hacim destile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

2. 0,1 M H_3BO_3 sodyum borat tamponu (pH=9,5): 6,18 g H_3BO_3 alınarak 800 ml destile suda çözüldü. pH'sı 1 M NaOH ile 9,5'e ayarlandı. Daha sonra toplam hacim destile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

3. 1 M NaCl çözeltisi: 58,5 g NaCl alınarak bir miktar destile suda çözüldü. Daha sonra toplam hacim destile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

4. 0,1 M 1-etil-3 (3-dimetil aminopropil) karbodiimid: 0,1917 g 1-etil-3 (3-dimetil aminopropil) karbodiimid alınarak 10 ml diaminohekzan-Sepharose 4B'ye ilave edildi.

c) COX-1 (koyun) enziminin aktivitesini belirlemede kullanılan çözeltiler

1. Reaksiyon tamponu: 5 ml reaksiyon tamponu 45 ml ultrasaf su ile seyreltildi (0,1 M Tris-HCl, pH=8, 5 mM EDTA ve 2 mM fenol). Bu reaksiyon tamponu COX reaksiyonlarında ve hem'in seyreltilmesinde kullanıldı. Oda sıcaklığında en az 1 ay stabildir. Kullanılmadan önce 37°C'de dengelenmelidir.

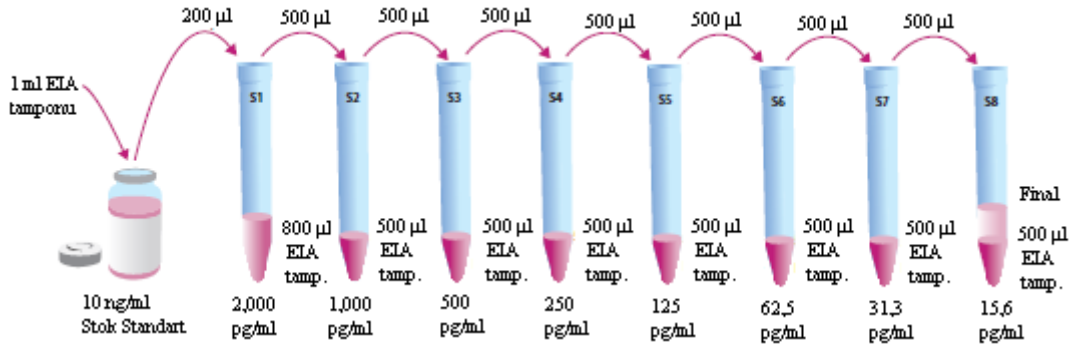
2. COX-1 (koyun): Koyuna ait türden elde edilen saf COX-1 enzimi kit içinde kullanıma hazır halde bulunmaktadır. -80°C'de muhafaza edildi. Kullanılacağı zaman buz üzerinde erimeye bırakıldı ve hemen kullanıldı.

3. Hem çözeltisi: Kit içinde DMSO içerisinde çözülmüş hem çözeltisi bulunmaktadır. 100 µl hem 400 µl reaksiyon tamponu ile seyreltildi. Seyreltikten hemen sonra kullanıldı.

3. Araşidonik asit (substrat): Kit içinde etanolde çözülmüş araşidonik asit bulunmaktadır. Bu çözeltiden 50 µl alınıp üzerine 50 µl KOH (0,1 M) ilave edildi ve 400 µl ultrasaf su ile seyreltildi. Son konsantrasyon 10 mM'dir. Bu çözeltide 1 saat içerisinde tüketildi.

4. Potasyum hidroksit (KOH): Kit içinde 0,1 M kullanıma hazır halde bulunmaktadır.

5. Hidroklorik asit (HCl): Kit içinde 1 M HCl bulunmaktadır. 500 µl alınır 4,5 µl ultrasaf su ile seyreltilerek 0,1 M HCl elde edildi. Doygun kalay klorür çözeltisi hazırlamada kullanıldı.
6. Kalay klorür (SnCl_2): Kit içinde kristal halde SnCl_2 bulunur. 5 ml 0,1 M HCl ilave edildi. Vortekslenerek doygun SnCl_2 çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan çözelti 8 saat içerisinde kullanıldı.
7. Enzyme Immunoassay (EIA) tamponu: Kit içindeki EIA tamponunun bulunduğu şişeye 90 ml ultrasaf su ilave edilerek seyreltildi.
8. Yıkama tamponu: Kit içinde bulunan yıkama tamponu içerisine 1 ml Tween 20 ve son hacim 2 litre olacak şekilde ultrasaf su ilave edilerek seyreltildi. Seyreltilen bu tampon $+4^\circ\text{C}$ 'de 2 ay stabildir.
9. Prostaglandin (PG) standartları: Kit içindeki liyofilize edilmiş PG standart şişesi içerisine 1 ml EIA tamponu ilave edilerek çözüldü. Oluşan stok standart çözeltinin konsantrasyonu 10 ng/ml olup $+4^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edildi. 8 küçük tüp 1'den 8'e kadar numaralandırıldı. 1.tüp içerisine 800 µl, 2'den 8'e kadar olan tüplere ise 500 µl EIA tamponu ilave edildi. 1.tüp içerisine 200 µl hazırlanan stok standart çözeltisinden ilave edildi ve iyice karıştırıldı. 1.tüp içindeki seyreltilen standart çözeltiden 500 µl alınarak 2.tüp içerisine ilave edildi ve iyice karıştırıldı. 2.tüp içindeki seyreltilen standart çözeltiden 500 µl alınarak 3.tüp içerisine ilave edildi ve iyice karıştırıldı. Bu işlem 8.tüpe kadar tekrarlandı. Hazırlanan standart çözeltiler 24 saat içerisinde kullanıldı.



Şekil 3.1. PG standartlarının hazırlanışı

d) İnsan trombositlerinden saflaştırılan COX-1 enziminin aktivitesini belirlemede kullanılan çözeltiler

1. (100 mM) Tris – (0,5 mM) fenol tamponu (pH=7,3): 2,42 g Tris ve 8,78 µl fenol ($d_{\text{fenol}}=1,071$ g/ml) alındı. Bir miktar destile suda çözülüp pH'sı 7,3'e ayarlandı. Toplam hacim destile su ile 200 ml'ye tamamlandı.
2. 100 mM KH_2PO_4 tamponu (pH=7,5): 2,72 g KH_2PO_4 alındı. Bir miktar destile suda çözüldü. pH'sı 7,5'e ayarlandıktan sonra hacmi destile su ile 200 ml'ye tamamlandı. Bu tampon çözelti enzim seyreltmede ve hematin çözeltisi hazırlamada kullanıldı.
3. Hematin çözeltisi (0,12 µM) : 1,000 mg hematin alındı. 2,5 ml DMSO'da çözüldü. DMSO'da çözülmüş hematinden 19 µl alındı. Hacmi fosfat tamponu ile 100 ml'ye tamamlandı.
4. Araşidonik asit (A.A) çözeltisi: 10 µl A.A ($d_{\text{A.A}}=0,922$ g/ml) alındı. 200 µl etanol içinde (sıvı azot varlığında) çözüldü.

Elektroforez için kullanılan çözeltiler

- 1.1 M Tris-HCl (pH=8,8): 12,11 g Tris (0,1 mol) tartılarak 80 ml suda çözüldü, pH ayarı 1 M HCl ile yapıldıktan sonra 100 ml'ye tamamlandı.

2.1 M Tris-HCl (pH=6,8): 12,11 g Tris (0,1 mol) tartılarak 80 ml suda çözüldü, pH ayarı 1 M HCl ile yapıldıktan sonra 100 ml'ye tamamlandı.

3.%30 Akrilamid-%0,8 Bisakrilamid çözeltisi: 15 g akrilamid, 0,4 g bisakrilamid ve 34,6 g su karıştırılarak çözüldü.

4.%10'luk amonyum persülfat çözeltisi: 1 g amonyum persülfat tartılarak su ile 10 ml'ye tamamlandı.

5.%10'luk SDS: 1 g SDS, 9 g suda çözülerek elde edildi.

6.Yürütme tamponu: 1,51 g Tris (12,5 mmol) ve 7,51 g glisin (0,1 mol) tartılarak 450 ml suda çözüldü; %10'luk SDS'den 5 ml ilave edildi, pH=8,3'e ayarlandı ve toplam hacim 500 ml'ye tamamlandı.

7.Numune tamponu: 1 M Tris-HCl (pH=8)'den 0,5 ml, %10'luk SDS'den 1 ml, %100'lük gliserinden 1 ml ve %0,1'lik bromtimol mavisinden 1 ml alınarak suyla 10 ml'ye tamamlandı. Bu tampona kullanılmadan önce 950 µl numune tamponundan 50 µl olacak şekilde β-merkaptoetanol ilave edildi.

8.Sabitleştirme çözeltisi (jelde yürütülen proteinlerin sabitleştirilmesi için kullanılan çözelti):%50 izopropanol, %10 TCA ve %40 su olacak şekilde karıştırılarak hazırlandı.

9.Jel boyama çözeltisi: 50 ml metanol, 10 ml asetik asit ve 40 ml su içerisinde 0,1 g coomassie brilliant blue R-250 reaktifinin çözülmesiyle hazırlandı.

10.Jel yıkama çözeltisi: 50 ml metanol, 10 ml asetik asit ve 40 ml su karıştırılarak elde edildi.

11.Antikoagulant çözelti: 26,3 g Na-sitrat (dihidrat) (115,35 mmol), 3 g sitrik asit (15,62 mmol), 31,9 g glukoz (monohidrat) (177 mmol), 2,2 g NaH₂PO₄ H₂O (15,94 mmol) ve 0,35 g adenin (2,6 mmol) tartılarak suda çözüldü ve 1 L'ye tamamlandı.

12.Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi (proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti): 100 mg coomassie brilliant blue G-250, 50 ml %95'lik etanolde çözüldü. Bu çözeltiye %95'lik 100 ml fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin hacmi suyla 1L'ye tamamlandı.

13.%0,04'lük brom timol mavisi çözeltisi: 0,1 g indikatör 16 ml 0,01 M NaOH içerisinde çözüldü ve toplam hacim suyla 250 ml'ye tamamlandı.

3.2.Yöntemler

3.2.1. İnsan serum paraoksonaz-1 enzimi

İnsan serum paraoksonaz-1 enziminin aktivitesinin ölçümü

PON-1 enziminin paraoksonaz aktivitesi 25°C'de 1mM CaCl₂ içeren 50 mM glisin/NaOH tamponu (pH=10,5) içerisinde paraoksonun (1 mM) substrat olarak kullanılmasıyla belirlendi. Aktivite ölçümü paraokson ile PON-1'in reaksiyonu sonucu oluşan paranitrofenol'ün 412 nm'de absorpsiyon vermesi esasına dayanır. Paranitrofenol'ün molar ekstinksiyon katsayısı ($\epsilon = 18290\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ pH=10,5) aktivitenin hesaplanması için kullanılır. Paraoksonazın enzim ünitesi, 1 dakikada hidroliz olan paraokson'un mikromol sayısıdır (Renault *et al.* 2006). PON-1 enzimi için aktivite hesabı aşağıdaki gibi yapıldı:

$$\text{EU/ml} = \frac{\Delta_{\text{OD}}}{18,290} \times \frac{V_{\text{T}}}{V_{\text{E}}} \times 1000$$

Bu formülde yer alan simgeler aşağıda açıklanmıştır;

EU/ml : 1 ml'deki enzim ünitesi

Δ_{OD} : Bir dakikadaki absorbans değişimi

18,290 : Paranitrofenolün pH=10,5'deki molar ekstinksiyon katsayısı

V_T : Ölçümün yapıldığı toplam küvet hacmi

V_E : Ölçümün yapıldığı küvete ilave edilen enzim numunesinin hacmi

İnsan serum paraoksonaz enziminin saflaştırılması

a) Amonyum sülfat çöktürmesi

Proteinler çok değerlikli elektrolitler oldukları için iyonlara benzer şekilde hareket ederler. Yüksek tuz konsantrasyonlarında, protein moleküllerini çevreleyen ve çözünür halde tutan su molekülleri, amonyum sülfat tuzundaki iyonlar tarafından çekilir ve proteinler çöker (salting-out). Gerçekleştirilen amonyum sülfat çöktürmesi deneyleri proteinlerin bu özellikleri esasına dayanmaktadır.

Serum PON-1 enziminin amonyum sülfat çöktürme aralığı Sinan ve arkadaşlarının yaptığı gibi %60-80 arasında gerçekleştirildi (Sinan *et al.* 2006). Çöktürme için kullanılan katı $(NH_4)_2SO_4$ yavaş yavaş katılarak manyetik karıştırıcı üzerinde bar ile iyice çözünmesi sağlandı. Katı amonyum sülfat miktarı aşağdaki formülden hesaplandı.

$$g (NH_4)_2SO_4 = \frac{1,77 \times V \times (S_2 - S_1)}{3,54 - S_2}$$

V: Enzim çözeltisinin hacmi

S_1 : 1'in kesri olarak çözeltideki amonyum sülfat doğunluğu

S_2 : 1'in kesri olarak istenen amonyum sülfat doğunluğu

Önce %60 doğunlukta amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Numune santrifüj tüplerine konularak 5000xg'de 15 dakika santrifüj yapıldı (böylece yabancı proteinlerin çökmesi

sağlandı). Daha sonra %80 doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesi gerçekleştirildi. Elde edilen numune santrifüj tüplerine konularak 5000xg'de 15 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant kısmı atıldı çökelek minimum fosfat tamponunda (100 mM Na-fosfat, pH=7,0) çözüldü. Amonyum sülfat çöktürmesi işlemleri sırasında ortam +4°C'de sabit tutulmaya çalışıldı.

b) Diyaliz

Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen numune diyaliz torbasına yerleştirilerek iki saat süreyle diyaliz tamponuna (25 mM Na-fosfat pH=7,0) karşı 2 defa diyaliz edildi. Diyaliz işlemi, soğuk ortamda gerçekleştirildi.

c) DEAE-Sephadex A 50 iyon değişim kromatografisi

Çalışmada anyon değiştirici olarak kullanılan DEAE-Sephadex iyon değişim reçinesinin önce şişirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla 45-50 ml yatak hacmi elde edebilmek için 10 g jel 100 ml destile suya konularak 80-90°C'de 5 saat süre ile bekletilerek şişirildi. Şişirilmiş jel 0,5 N 100 ml soğuk HCl içinde 1 saat bekletildikten sonra 100 ml 0,5 N NaOH ile nötralize edildi. Jel materyalinden çözünmüş gaz vakum yardımıyla uzaklaştırılıp 3 cm² x 30 cm ebadındaki kolona doldurulduktan sonra 100 mM Na-fosfat tamponu (pH=7,0) ile dengelendi. Kolonun akış hızı peristaltik pompa yardımıyla 15-20 ml/saat'e ayarlandı. Jel üzerindeki tampon seviyesi jel düzeyine indirilerek diyalizden elde edilen enzim çözeltisi pipet vasıtasıyla kolona tatbik edildi. Daha sonra 100 mM Na-fosfat tamponu (pH=7,0) ile yıkama işlemi yapıldı. Yıkama işlemine üstten ilave edilen yıkama tamponunun pH ve 280 nm'deki absorbans değerleri eşit oluncaya kadar devam edildi.

Yıkama tamamlandıktan sonra elüsyon için gradient mikserin kolona bağlı olan ve bir mekanik karıştırıcı ile karıştırılan haznesine 250 ml 100 mM Na-fosfat tamponu (pH=7,0), bu hazneye açılan diğer hazneye ise 250 ml 1,5 M NaCl çözeltisi dolduruldu. Artan iyonik şiddetle lineer gradient elüsyonu başlatıldı. Elüatlar, kolon akış hızı 15

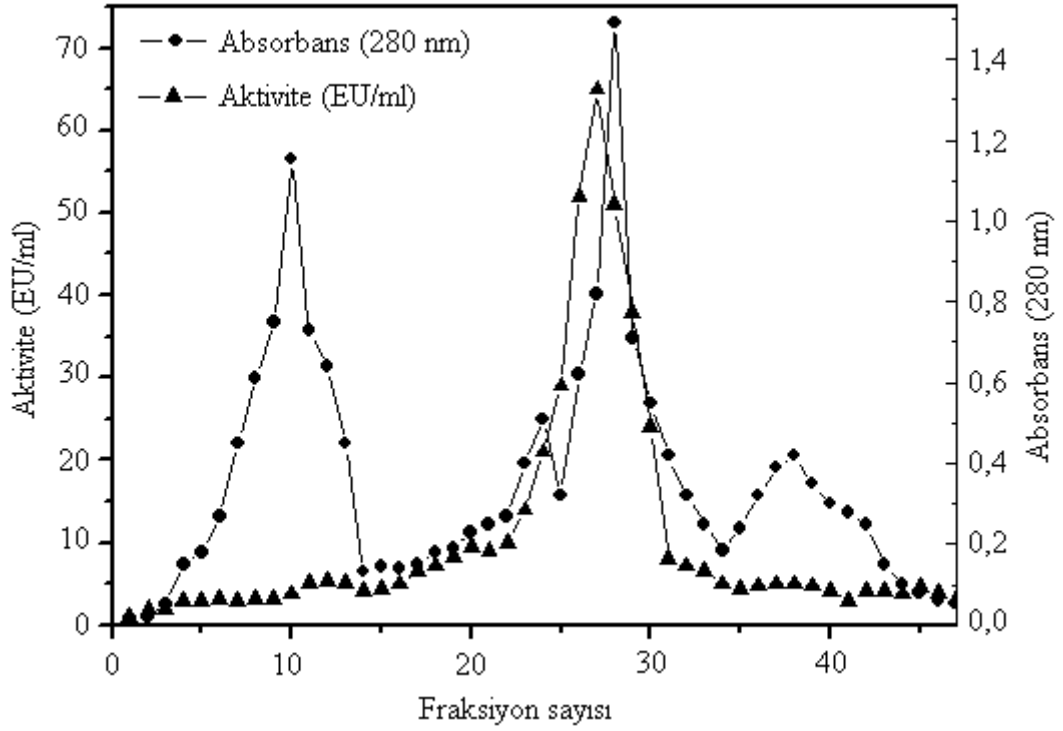
ml/saat'e ayarlanarak 3 ml'lik hacimler halinde tüplere alındı. Her bir elüatın 280 nm'de absorbansı ve 412 nm'de de aktivitesine bakıldı. Enzim aktivitesine sahip tüpler jel filtrasyon kromatografisi kolonuna tatbik edilmek üzere birleştirildi. Birleştirilen elüat çözeltileri ve kolona tatbik edilen numuneler için Bradford metoduyla kantitatif protein tayini ve aktivite tayinleri yapıldı. Spesifik aktiviteler hesaplanarak saflaştırma oranları belirlendi.

d) Sephadex G-200 jel filtrasyon kromatografisi

Kolon materyali olarak Sephadex G-200'ün 5 g'ı tartılarak 200 ml saf su içerisine konuldu. 90 °C'de 4 saat bekletilerek şişirildi. Şişirilmiş polimer materyalin içerisinde bulunan hava kabarcıkları su trombu kullanılarak vakumla alındı. Şişirilmiş ve havası uzaklaştırılmış jel pH'sı 7,0 olan 100 mM Na-fosfat tamponuyla dolu kolona aktarıldı ve paketlenildi. Kolonun dengelenmesi yine aynı tampon ile yapıldı. Kolonun akış hızı peristaltik pompayla 3 ml/saat'e ayarlandı. Dengeleme tamponu kolondan uzun süre geçirilerek ilave edilen tampon ile alttan akan tamponun 280 nm'de absorbansı ile pH değerinin aynı olduğu anda kolonun dengelendiği anlaşıldı.

Dengelenmiş kolona numunelerin tatbiki için jelin üzerinde birikmiş tamponun emilmesi beklendi. Tampon tam jelin üzerine indiği anda iyon değişim kolonundan elüe edilip 0,125 ml gliserol ile karıştırılan enzim numunesi jelin üzerine tatbik edildi. Tatbik edilen numunenin emilmesi beklendi ve üzerine pipetle dikkatli bir şekilde yürütme tamponu eklendi. Daha sonra sistem, stok tampon çözelti ile kapalı sistem oluşturularak sabit hızla akış sağlandı.

Kolonun üzerine enzim çözeltisi uygulandıktan sonra elüsyon alınmaya başlandı, alınan tüplerde 280 nm'de absorbans değerleri ve 412 nm'de aktivite değerleri okundu. Elüsyon işlemine aktivite değerinin bitmesine kadar devam edildi. Bu tüplerde protein ve aktivite değerleri belirlenerek (Şekil 3.2) saflaştırma katsayısı ve verimi hesaplandı. Yüksek aktivite gösteren tüpler birleştirildi ve elektroforez yapmak için derişikleştirme işlemine tabi tutuldu. Bu amaçla liyofilizatör kullanıldı.



Şekil 3.2. Sephadex G-200 jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılan insan serum PON-1 enziminin elüsyon grafiği

Enzim numunesini liyofilize etmek için -85°C 'de bekletilerek iyice donduruldu. Bu sırada liyofilizatör çalıştırılarak basınç ve sıcaklık değerlerinin ayarlanması sağlandı. Tamamen dondurulmuş enzim numunesi hemen çıkarılarak, hazır hale gelmiş liyofilizatöre takıldı ve liyofilizasyon işlemi başlatıldı. Liyofilizasyon işlemi enzim numunesinin yaklaşık %80 oranında suyu uzaklaştırılıncaya kadar devam edildi. Elde edilen derişik insan serum PON-1 enzim numunesi saflığını kontrol etmek için SDS-PAGE'de yürütüldü. İlaç ve kimyasal maddelerin etkilerinin araştırılmasında kullanılan enzim numunesi liyofilize edilmeden kullanıldı.

3.2.2. İnsan trombositlerinden COX-1 enziminin saflaştırılması

İnsan trombositlerinden homojenat elde edilmesi

a) İnsan trombositlerinin temin edilmesi

7 gün içinde non steroid anti-inflamatuar ilaç (NSAİİ) almamış sağlıklı kişilerden trombositler vakumlu kan alma tüplerine alınarak -80°C 'de muhafaza edildi. Trombositler Erzurum Araştırma Hastanesi Kan Merkezi'nden temin edilmiştir.

b) Enzimin ekstrakte edilmesi

Tüm işlemler $0-4^{\circ}\text{C}$ 'de yapıldı. -80°C 'de muhafaza edilen trombositler tartılarak 4 gram alındı. Alınan trombositler sıvı azot varlığında havan içerisinde iyice dövülerek parçalandı. Parçalanmış trombositler %0,5 (v/v) Triton X-100 içeren 8 ml 20 mM potasyum fosfat tamponu ($\text{pH}=7,5$) /0,7 mM fenol /1 mM β -merkaptoetanol (A tamponu) içerisinde homojenize edildi ve 4°C 'de 1 saat muhafaza edildi. Daha sonra $20.000\times\text{g}$ 'de 120 dakika santrifüj edildi. Siklooksijenaz enzim aktivitesine sahip olan berrak süpernatant alındı. Elde edilen homojenat afinite kolonuna tatbik edildi.

Sepharose-4B-1,6-diaminohekzan afinite kromatografisi

a) Sepharose'a (altı karbonlu uzantı kolu olarak) 1,6-diaminohekzan'ı bağlama

CNBr ile aktifleştirilmiş olan Sepharose-4B jeli 2 gram tartılarak alındı. Yaklaşık 10 ml saf su ile şişirildi. Önceden soğutulmuş 1 litre 0,1 M Na_2CO_3 ($\text{pH}=9,5$) ve takiben 200 ml soğuk 0,1 M sodyum borat tamponu ($\text{pH}=9,5$) ile yıkandı. Yıkanan jel eşit hacimde 0,1 M borat tamponu ($\text{pH}=9,5$) ile süspansiyon edildi ve jele aynı tamponun küçük bir hacminde bulunan 4,64 g 1,6-diaminohekzan ilave edildi. pH , 5 M HCl ile 9,5'e ayarlandı ve jel en son 24 saat 4°C 'de karıştırılmaya bırakıldı. Jel hacminin 20 katı

hacminde 1 M NaCl ve bunu takiben fazla amini uzaklaştırmak için su ile yıkandı. Aminlenen jel eşit hacim su ile süspanse edildi ve 4°C’de muhafaza edildi.

b) Sepharose 4B-diaminoheksan’a ibuprofen bağlama

15 ml dioksan içerisindeki ibuprofen (200 mg) 0,1 M 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodi-imid varlığında diaminoheksan-Sepharose (10 ml)’a ilave edildi ve 2 M HCl ile pH 4,5’e ayarlandı. 16 saat 27°C’de karıştırdıktan sonra jel hacminin 20 katı hacimde 1 M NaCl ve bunu takiben fazla amini uzaklaştırmak için su ile yıkandı. Aminlenen jel eşit hacim su ile süspanse edildi ve 4°C’de muhafaza edildi.

c) İbuprofen afinite kolonu kullanarak hidrofobik kromatografinin uygulanması

Çözünmüş enzim önceden A tamponu ile dengelenmiş ibuprofen-Sepharose-4B afinite kolonuna (6,5 cm x 1,5 cm) 1/3 oranında uygulandı. Kolon alttan ve üstten alınan örneklerin 280 nm’deki absorbans değerleri eşit oluncaya kadar A tamponu ile yıkandı ve sonra kolon akış hızı 20 ml/saat’e ayarlanarak %1 (v/v) Triton X-100 içeren A tamponu ile elüe edildi. Fraksiyonlar 2 ml’lik hacimler halinde tüplere toplandı. 280 nm’de spektrofotometrede okuma yapıldı ve absorbans gösteren tüplerde sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzim varlığı kontrol edildi.

3.2.3. Protein tayini

a) Kalitatif protein tayini

Kalitatif protein tayini, 280 nm’de proteinlerin yapısında bulunan triptofan, tirozin ve fenilalanin amino asitlerinin maksimum absorbans göstermesi esasına dayanmaktadır (Segel 1968). Bu metod yardımıyla kromatografi işlemlerinde fraksiyon toplayıcısı yardımıyla eşit hacimde alınan bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı.

Fraksiyonlar kuartz küvetlere alınarak, absorbansları spektrofotometrede köre karşı okundu.

b) Bradford yöntemiyle protein tayini

Serum, amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltilerindeki protein miktarı bu yöntemle belirlendi. Bu yöntemde boya olarak kullanılan Coomessie brilliant blue G-250 negatif bir yüke sahiptir ve protein üzerindeki pozitif yüke bağlanır. Boyanın kırmızı ($\lambda_{\max}=465$ nm) ve mavi ($\lambda_{\max}=595$ nm) formu mevcuttur. Proteinin bağlanması, kırmızı formun mavi forma dönüşümünü sağlar. Bu yöntemin bozucu faktörlere girişimi oldukça azdır ve hassasiyeti 1-100 μg arasındadır. Reaksiyon yüksek oranda tekrarlanabilir ve hızlı cereyan eder, iki dakikada tamamlanır. Renk stabilitesi iki saat'in üzerinde devam edebilir (Bradford 1976).

Bu yöntem ile protein tayini edebilmek için standart bir grafiğe ihtiyaç vardır. Bu amaçla 1 ml'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albumin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 μl konuldu. Saf su ile bütün tüplerin hacmi 0,1 ml'ye tamamlandı ve 5 ml Coomessie brilliant blue G-250 çözeltisi ilave edilip vorteks ile karıştırıldı. 10 dakika inkübe edildikten sonra 595 nm'de 3 ml'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak, 0,1 ml enzim numunesinin içinde bulunduğu tampondan ve 5 ml Coomessie brilliant blue G-250 çözeltisinden oluşan karışım kullanıldı. Elde edilen sonuçlardan absorbans değerlerine karşılık gelen μg protein değerleri standart grafik haline getirildi (Şekil 4.1).

Tüplere insan serumundan ve adı geçen saflaştırma basamaklarından elde edilen enzim numunelerinden 0,1'er ml konularak üzerine 5'er ml Coomessie brilliant blue G-250 reaktifi ilave edildi. Vorteks ile karıştırıldıktan sonra 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Sonra 595 nm'de absorbans değerleri okundu. Her bir numuneden üçer adet deneme yapılarak bu üç değer aritmetik ortalamasından gerçek değer tesbit edildi. Elde edilen

bu değerlere göre standart grafikten yararlanılarak protein miktarları belirlendi. Bu metodla saflaştırılan enzim çözeltisinde ve serumda protein tayini yapıldı.

3.2.4. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzim saflığının kontrolü

Enzim saflaştırıldıktan sonra %3-8 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) Laemmli metoduna göre yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi (Laemmli 1970).

Bunun için elektroforez plakaları önce su ile sonra alkol ile iyice yıkandı. Her iki kenarında aralık oluşturucu bir plaka ile düz bir plaka üst üste getirilerek kısıkaçlarla tutturuldu. Sabitleştirilen plakalar, içerisinde sızdırmayı önleyen sünger ihtiva eden jel hazırlama kabinine konuldu. nce ayırma jeli hazırlandı ve enjektörle plakaların arasına üst kesimde 0,5 cm kalıncaya kadar dolduruldu. İki saat jelin donması beklendi, ayırma jelinin katılaştığından emin olunduktan sonra yığma jeli hazırlandı. Jelin st kısmındaki boşluğa dolduruldu ve numune kuyucuklarının oluşması için tarak dikkatlice yerleştirildi. Yığma jelinin katılaşması beklenirken ıslatılmış süzgeç kağıdı sistemin üzerine kapatıldı ve kuruması nlendi. Yığma jeli katılaştıktan sonra tarak dikkatlice çıkartılarak numune kuyuları belirlendi. nce saf su, sonra da yürütme tamponuyla yıkandı ve jel plakalarla birlikte elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu dolduruldu. Enzim rnekleri yaklaşık 20 µg protein olacak Şekilde hazırlandı. Toplam hacim 50 µl olacak Şekilde 1/1 oranında numune tamponu katıldı. Üç dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi. Elektroforez tankı kapatılarak alt tarafından (+) anot, üst taraftan ise (-) katot yerleştirildi. nce 40 voltta 20 dakika yürütüldü ve örnek ayırma jeline kadar gelip yığıldı. Sonra akım 80 volt'a çıkartılarak numunelerin jelin alt sınırına gelmesine kadar yürütüldü. Numunelerin takip edilmesi, numune tamponuna katılan brom timol mavisi yardımıyla anlaşıldı. Yürütme işlemi bittikten sonra akım kesilerek plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı ve sabitleşirme çözeltisine konuldu. Sabitleşirme çözeltisinde 20 dakika bekletilen jel, çıkarılarak boyama çözeltisi içine konuldu ve çalkalayıcı üzerinde bir gece bekletildi.

Jel boyandıktan sonra çıkarılarak yıkama çözeltisine konuldu. Rengi açılıp, protein bantları belirginleşene kadar çalkalayıcı üzerinde yıkanan jel çıkarılarak fotoğrafı çekildi (Şekil 4.2 ve Şekil 4.25).

Ayrırma jeli şöyle hazırlandı: 3,75 ml 1M Tris-HCl (pH=8,8), 3,3 ml %30 Akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,15 ml %10'luk SDS, 0,1 ml %5'lik TEMED, 0,2 ml %1,5'lik PER ve 2,35 ml saf su karıştırıldı.

Yığıma jeli şöyle hazırlandı: 0,31 ml 1 M Tris-HCl (pH=6,8), 0,3325 ml %30 Akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,025 ml %10'luk SDS, 0,025 ml %5'lik TEMED, 0,05 ml %1,5'lik PER ve 1,84 ml saf su karıştırıldı. PER çözeltisi taze hazırlandı.

3.2.5. Sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzimin molekül kütlesi tayini

Laemmli (1970), metoduna göre molekül kütlesi tayini şu şekilde yapıldı; standart protein olarak PON-1 enzimi için; tavşan kas aldolaz 47,5 kDa, E.coli triozfosfat izomeraz 32,5 kDa, soya tripsin inhibitörü (24 kDa); COX1 enzimi için sığır serum albumin (66,0 kDa), tavuk ovalbumin (45,0 kDa) kullanıldı. Elektroforez işleminden sonra standart proteinlerin R_f değerleri hesaplanarak log MK- R_f standart grafiği çizildi. Daha sonra koyun karaciğerinden elde edilen SDH enzimi için R_f değeri hesaplandı ve standart grafikte yerine konularak SDH enziminin log MK'sı belirlendi. Bu değer antilogaritması alınarak numunenin molekül kütlesi belirlendi.

Proteinlerin R_f değerleri;

$$R_f = \frac{X_e}{X_{boya}}$$

formülü kullanılarak belirlendi.

X_e = Proteinin yürüme mesafesi

X_{boya} = Boyanın yürüme mesafesi

3.2.6. İnsan serum paraoksonaz-1 enziminin aktivitesi üzerine bazı ilaçların *in vitro* etkilerinin belirlenmesi

İnsan serum PON-1 enzim aktivitesi üzerine bazı antibiyotik ve ilaçların etkilerini belirlemek amacıyla küvet ortamına değişik konsantrasyonlarda ilaç katılarak aktivite değerleri okundu. Kullanılan antibiyotik ve ilaçların farklı konsantrasyonlarını oluşturmak için stok çözeltiler seyreltildi. Kullanılan stok çözelti hacmi gereken derişimi sağlamadığı zaman küvete katılan su hacmi azaltılarak stok çözelti hacmi yükseltildi. Bu şekilde gereken konsantrasyon ayarlandı. PON-1 enzimi için inhibitörlü ve inhibitörsüz ortamdaki aktivite küvet içeriği tablo halinde gösterilmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. İnsan serum PON-1 enziminin aktivite ölçüm küvet içeriği

Stok aktivite çözeltileri	Kontrol Küveti		Numune Küveti	
	Hacim(μ l)	Kons. (mM)	Hacim(μ l)	Kons. (mM)
Glisin/NaOH (pH=10,5)	500	50	500	50
Substrat Çözeltisi	330	3	330	3
Destile su	120	-	Değişken	-
İlaç Çözeltisi	0	-	Değişken	Değişken
Enzim Numunesi	50	-	50	-

3.2.7. İnsan serum paraoksonaz-1 enziminin aktivitesi üzerine inhibitör etkisi gösteren antibiyotik ve ilaçlar için IC₅₀ ve K_i değerlerinin belirlenmesine ait çalışmalar

İnhibitör çalışmalarıyla ilgili farklı inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapılarak inhibitör etkisi gösteren antibiyotik ve ilaçlar belirlendi. Bu maddelerden inhibisyon etkisi yüksek olanların %Aktivite-[I] grafikleri çizildi, eğri denkleminde IC₅₀ değerleri hesaplandı. Bu maddelerin K_i değerlerini belirlemek amacıyla insan serumundan saflaştırılan PON-1 enzim aktivitesini yarıya düşüren antibiyotik ve ilaç konsantrasyonu ile bu değer in altında ve üstünde iki sabit inhibitör konsantrasyonlarında uygun beş substrat konsantrasyonu ile aktivite ölçümleri yapıldı. Çalışmalarda uygun 5 farklı substrat konsantrasyonu stok çözelti kullanılarak ön deneme ile belirlendi. Elde edilen değerlerle her bir inhibitör için Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Grafik denkleminde yarışmalı inhibisyon için eğime eşit olan $K_M/V_{max}(1+[I]/K_i)$ ifadesinden, yarışmasız ve yarı yarışmalı inhibisyon için $V_{max}=V_{max}^I(1+[I]/K_i)$ formülünden yararlanılarak K_i değerleri belirlendi. Sonuçlar Çizelge 4.2’de verildi.

Çizelge 3.2. İnsan serumundan saflaştırılan PON-1 enzimi üzerinde netilmisin sülfat’ın IC₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tampon Glisin/NaOH (pH=10.5) (µl)	Paraokson (3 mM) (µl)	Enzim (µl)	Saf su (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki Paraokson kons. (mM)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
500	330	50	120	0	1	-	1
500	330	50	100	20	1	1,1	1
500	330	50	80	40	1	2,8	1
500	330	50	70	50	1	3,5	1
500	330	50	60	60	1	4,1	1
500	330	50	40	80	1	5,6	1
500	330	50	20	100	1	7,0	1
500	330	50	0	120	1	8,3	1
480	330	50	0	140	1	9,7	1

Çizelge 3.3. İnsan serumundan saflaştırılan PON-1 enzimi üzerinde linkomisin hidroklorür'ün IC₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tampon Glisin/NaOH (pH=10.5) (µl)	Paraokson (3 mM) (µl)	Enzim (µl)	Saf su (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki Paraokson kons. (mM)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
500	330	50	120	0	1	-	1
500	330	50	115	5	1	3,3	1
500	330	50	110	10	1	6,5	1
500	330	50	105	15	1	9,8	1
500	330	50	100	20	1	13	1
500	330	50	95	25	1	16,3	1
500	330	50	90	30	1	19,6	1
500	330	50	80	40	1	26,1	1
500	330	50	70	50	1	32,6	1

Çizelge 3.4. İnsan serumundan saflaştırılan PON-1 enzimi üzerinde streptomisin sülfat'ın IC₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tampon Glisin/NaOH (pH=10.5) (µl)	Paraokson (3 mM) (µl)	Enzim (µl)	Saf su (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki Paraokson kons. (mM)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
500	330	50	120	0	1	-	1
500	330	50	100	20	1	6,9	1
500	330	50	95	25	1	8,6	1
500	330	50	80	40	1	13,7	1
500	330	50	50	70	1	24,0	1
500	330	50	20	100	1	34,3	1
470	330	50	0	150	1	51,5	1
440	330	50	0	180	1	61,7	1
420	330	50	0	200	1	68,6	1

Çizelge 3.5. İnsan serumundan saflaştırılan PON-1 enzimi üzerinde oksitetrasiklin hidroklorür'ün IC₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tampon Glisin/NaOH (pH=10.5) (µl)	Paraokson (3 mM) (µl)	Enzim (µl)	Saf su (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki Paraokson kons. (mM)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
500	330	50	120	0	1	-	1
500	330	50	117	3	1	0,045	1
500	330	50	115	5	1	0,075	1
500	330	50	113	7	1	0,105	1
500	330	50	112	8	1	0,120	1
500	330	50	110	10	1	0,150	1
500	330	50	105	15	1	0,225	1
500	330	50	102	18	1	0,270	1
500	330	50	100	20	1	0,300	1
500	330	50	95	25	1	0,375	1
500	330	50	90	30	1	0,450	1

Çizelge 3.6. İnsan serumundan saflaştırılan PON-1 enzimi üzerinde penisilin G potasyum kristalize'nin IC₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tampon Glisin/NaOH (pH=10.5) (µl)	Paraokson (3 mM) (µl)	Enzim (µl)	Saf su (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki Paraokson kons. (mM)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
500	330	50	120	0	1	-	1
500	330	50	111	9	1	23,3	1
500	330	50	106	14	1	38,5	1
500	330	50	101	19	1	51,6	1
500	330	50	108	22	1	59,2	1
500	330	50	95	25	1	67,3	1
500	330	50	93	27	1	72,6	1
500	330	50	88	32	1	86,1	1
500	330	50	85	35	1	94,2	1

Çizelge 3.7. İnsan serumundan saflaştırılan PON-1 enzimi üzerinde klindamisin fosfat'ın IC₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tampon Glisin/NaOH (pH=10.5) (µl)	Paraokson (3 mM) (µl)	Enzim (µl)	Saf su (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki Paraokson kons. (mM)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
500	330	50	120	0	1	-	1
500	330	50	100	20	1	6,0	1
500	330	50	80	40	1	11,9	1
500	330	50	50	70	1	20,9	1
500	330	50	20	100	1	29,8	1
470	330	50	0	150	1	44,7	1
420	330	50	0	200	1	59,6	1
370	330	50	0	250	1	74,5	1

Çizelge 3.8. İnsan serumundan saflaştırılan PON-1 enzimi üzerinde akarboz'un IC₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tampon Glisin/NaOH (pH=10.5) (µl)	Paraokson (3 mM) (µl)	Enzim (µl)	Saf su (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki Paraokson kons. (mM)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
500	330	50	120	0	1	-	1
500	330	50	114	6	1	1,9	1
500	330	50	108	12	1	3,7	1
500	330	50	100	20	1	6,2	1
500	330	50	90	30	1	9,3	1
500	330	50	80	40	1	12,4	1
500	330	50	70	50	1	15,5	1
500	330	50	60	60	1	18,6	1

Çizelge 3.9. İnsan serumundan saflaştırılan PON-1 enzimi üzerinde pioglitazon hidroklorür'ün IC₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tampon Glisin/NaOH (pH=10.5) (µl)	Paraokson (3 mM) (µl)	Enzim (µl)	Saf su (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki Paraokson kons. (mM)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
500	330	50	120	0	1	-	1
500	330	50	116	4	1	0,061	1
500	330	50	113	7	1	0,107	1
500	330	50	111	9	1	0,138	1
500	330	50	108	12	1	0,184	1
500	330	50	105	15	1	0,230	1
500	330	50	103	17	1	0,260	1
500	330	50	100	20	1	0,306	1
500	330	50	97	23	1	0,352	1
500	330	50	94	26	1	0,398	1
500	330	50	90	30	1	0,460	1

Çizelge 3.10. İnsan serumundan saflaştırılan PON-1 enzimi üzerinde metotreksat'ın IC₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tampon Glisin/NaOH (pH=10.5) (µl)	Paraokson (3 mM) (µl)	Enzim (µl)	Saf su (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki Paraokson kons. (mM)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
500	330	50	120	0	1	-	1
500	330	50	118	2	1	0,11	1
500	330	50	117	3	1	0,17	1
500	330	50	116	4	1	0,22	1
500	330	50	115	5	1	0,28	1
500	330	50	114	6	1	0,33	1
500	330	50	113	7	1	0,39	1
500	330	50	112	8	1	0,44	1
500	330	50	111	9	1	0,50	1
500	330	50	110	10	1	0,55	1

Çizelge 3.11. İnsan serumundan saflaştırılan PON-1 enzimi üzerinde netilmisin sülfat'ın K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tampon 50mM glisin/NaOH (pH=10,5) (µl)	Enzim (µl)	Saf su (µl)	Paraokson (3mM) (µl)	Küvetteki Paraokson kons.(mM)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
500	50	400	50	0,15	-	1
500	50	360	90	0,30	-	1
500	50	310	140	0,45	-	1
500	50	260	190	0,60	-	1
500	50	220	230	0,75	-	1
500	50	480	50	0,15	1,39	1
500	50	340	90	0,30	1,39	1
500	50	290	140	0,45	1,39	1
500	50	240	190	0,60	1,39	1
500	50	200	230	0,75	1,39	1
500	50	350	50	0,15	3,48	1
500	50	310	90	0,30	3,48	1
500	50	260	140	0,45	3,48	1
500	50	210	190	0,60	3,48	1
500	50	170	230	0,75	3,48	1
500	50	300	50	0,15	6,95	1
500	50	260	90	0,30	6,95	1
500	50	210	140	0,45	6,95	1
500	50	160	190	0,60	6,95	1
500	50	120	230	0,75	6,95	1

Çizelge 3.12. İnsan serumundan saflaştırılan PON-1 enzimi üzerinde linkomisin hidroklorür'ün K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tampon 50mM glisin/NaOH (pH=10,5) (µl)	Enzim (µl)	Saf su (µl)	Paraokson (3mM) (µl)	Küvetteki Paraokson kons.(mM)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
500	50	400	50	0,15	-	1
500	50	360	90	0,30	-	1
500	50	310	140	0,45	-	1
500	50	260	190	0,60	-	1
500	50	220	230	0,75	-	1
500	50	395	50	0,15	0,152	1
500	50	355	90	0,30	0,152	1
500	50	305	140	0,45	0,152	1
500	50	255	190	0,60	0,152	1
500	50	215	230	0,75	0,152	1
500	50	380	50	0,15	0,227	1
500	50	340	90	0,30	0,227	1
500	50	290	140	0,45	0,227	1
500	50	240	190	0,60	0,227	1
500	50	200	230	0,75	0,227	1
500	50	320	50	0,15	0,455	1
500	50	280	90	0,30	0,455	1
500	50	230	140	0,45	0,455	1
500	50	180	190	0,60	0,455	1
500	50	140	230	0,75	0,455	1

Çizelge 3.13. İnsan serumundan saflaştırılan PON-1 enzimi üzerinde streptomisin sülfat'ın K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tampon 50mM glisin/NaOH (pH=10,5) (µl)	Enzim (µl)	Saf su (µl)	Paraokson (3mM) (µl)	Küvetteki Paraokson kons.(mM)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
500	50	400	50	0,15	-	1
500	50	360	90	0,30	-	1
500	50	310	140	0,45	-	1
500	50	260	190	0,60	-	1
500	50	220	230	0,75	-	1
500	50	380	50	0,15	6,9	1
500	50	340	90	0,30	6,9	1
500	50	290	140	0,45	6,9	1
500	50	240	190	0,60	6,9	1
500	50	200	230	0,75	6,9	1
500	50	330	50	0,15	24,0	1
500	50	290	90	0,30	24,0	1
500	50	240	140	0,45	24,0	1
500	50	190	190	0,60	24,0	1
500	50	150	230	0,75	24,0	1
500	50	220	50	0,15	61,7	1
500	50	180	90	0,30	61,7	1
500	50	130	140	0,45	61,7	1
500	50	80	190	0,60	61,7	1
500	50	40	230	0,75	61,7	1

Çizelge 3.14. İnsan serumundan saflaştırılan PON-1 enzimi üzerinde oksitetrasiklin hidroklorür'ün K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tampon 50mM glisin/NaOH (pH=10,5) (µl)	Enzim (µl)	Saf su (µl)	Paraokson (3mM) (µl)	Küvetteki Paraokson kons.(mM)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
500	50	400	50	0,15	-	1
500	50	360	90	0,30	-	1
500	50	310	140	0,45	-	1
500	50	260	190	0,60	-	1
500	50	220	230	0,75	-	1
500	50	395	50	0,15	0,075	1
500	50	355	90	0,30	0,075	1
500	50	305	140	0,45	0,075	1
500	50	255	190	0,60	0,075	1
500	50	215	230	0,75	0,075	1
500	50	390	50	0,15	0,150	1
500	50	350	90	0,30	0,150	1
500	50	300	140	0,45	0,150	1
500	50	250	190	0,60	0,150	1
500	50	210	230	0,75	0,150	1
500	50	380	50	0,15	0,300	1
500	50	340	90	0,30	0,300	1
500	50	290	140	0,45	0,300	1
500	50	240	190	0,60	0,300	1
500	50	200	230	0,75	0,300	1

Çizelge 3.15. İnsan serumundan saflaştırılan PON-1 enzimi üzerinde penisilin G potasyum kristalize'nin K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tampon 50mM glisin/NaOH (pH=10,5) (µl)	Enzim (µl)	Saf su (µl)	Paraokson (3mM) (µl)	Küvetteki Paraokson kons.(mM)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
500	50	400	50	0,15	-	1
500	50	360	90	0,30	-	1
500	50	310	140	0,45	-	1
500	50	260	190	0,60	-	1
500	50	220	230	0,75	-	1
500	50	391	50	0,15	23,3	1
500	50	351	90	0,30	23,3	1
500	50	301	140	0,45	23,3	1
500	50	251	190	0,60	23,3	1
500	50	211	230	0,75	23,3	1
500	50	386	50	0,15	38,5	1
500	50	346	90	0,30	38,5	1
500	50	296	140	0,45	38,5	1
500	50	246	190	0,60	38,5	1
500	50	206	230	0,75	38,5	1
500	50	378	50	0,15	59,2	1
500	50	338	90	0,30	59,2	1
500	50	288	140	0,45	59,2	1
500	50	238	190	0,60	59,2	1
500	50	198	230	0,75	59,2	1

Çizelge 3.16. İnsan serumundan saflaştırılan PON-1 enzimi üzerinde klindamisin fosfat'ın K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tampon 50mM glisin/NaOH (pH=10,5) (µl)	Enzim (µl)	Saf su (µl)	Paraokson (3mM) (µl)	Küvetteki Paraokson kons.(mM)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
500	50	400	50	0,15	-	1
500	50	360	90	0,30	-	1
500	50	310	140	0,45	-	1
500	50	260	190	0,60	-	1
500	50	220	230	0,75	-	1
500	50	393	50	0,15	20,9	1
500	50	353	90	0,30	20,9	1
500	50	303	140	0,45	20,9	1
500	50	253	190	0,60	20,9	1
500	50	213	230	0,75	20,9	1
500	50	390	50	0,15	29,8	1
500	50	350	90	0,30	29,8	1
500	50	300	140	0,45	29,8	1
500	50	250	190	0,60	29,8	1
500	50	210	230	0,75	29,8	1
500	50	385	50	0,15	44,7	1
500	50	345	90	0,30	44,7	1
500	50	295	140	0,45	44,7	1
500	50	245	190	0,60	44,7	1
500	50	205	230	0,75	44,7	1

Çizelge 3.17. İnsan serumundan saflaştırılan PON-1 enzimi üzerinde akarboz'un K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tampon 50mM glisin/NaOH (pH=10,5) (µl)	Enzim (µl)	Saf su (µl)	Paraokson (3mM) (µl)	Küvetteki Paraokson kons.(mM)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
500	50	400	50	0,15	-	1
500	50	360	90	0,30	-	1
500	50	310	140	0,45	-	1
500	50	260	190	0,60	-	1
500	50	220	230	0,75	-	1
500	50	380	50	0,15	6,2	1
500	50	340	90	0,30	6,2	1
500	50	290	140	0,45	6,2	1
500	50	240	190	0,60	6,2	1
500	50	200	230	0,75	6,2	1
500	50	370	50	0,15	9,3	1
500	50	330	90	0,30	9,3	1
500	50	280	140	0,45	9,3	1
500	50	230	190	0,60	9,3	1
500	50	190	230	0,75	9,3	1
500	50	360	50	0,15	12,4	1
500	50	320	90	0,30	12,4	1
500	50	270	140	0,45	12,4	1
500	50	220	190	0,60	12,4	1
500	50	180	230	0,75	12,4	1

Çizelge 3.18. İnsan serumundan saflaştırılan PON-1 enzimi üzerinde pioglitazon hidroklorür'ün K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tampon 50mM glisin/NaOH (pH=10,5) (µl)	Enzim (µl)	Saf su (µl)	Paraokson (3mM) (µl)	Küvetteki Paraokson kons.(mM)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
500	50	400	50	0,15	-	1
500	50	360	90	0,30	-	1
500	50	310	140	0,45	-	1
500	50	260	190	0,60	-	1
500	50	220	230	0,75	-	1
500	50	378	50	0,15	0,184	1
500	50	338	90	0,30	0,184	1
500	50	288	140	0,45	0,184	1
500	50	238	190	0,60	0,184	1
500	50	198	230	0,75	0,184	1
500	50	373	50	0,15	0,260	1
500	50	333	90	0,30	0,260	1
500	50	283	140	0,45	0,260	1
500	50	233	190	0,60	0,260	1
500	50	193	230	0,75	0,260	1
500	50	277	50	0,15	0,352	1
500	50	337	90	0,30	0,352	1
500	50	287	140	0,45	0,352	1
500	50	237	190	0,60	0,352	1
500	50	197	230	0,75	0,352	1

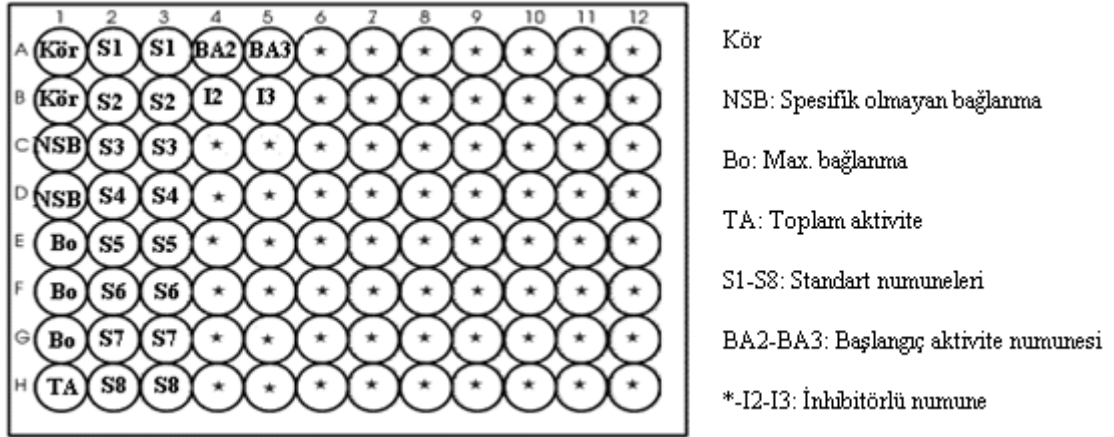
Çizelge 3.19. İnsan serumundan saflaştırılan PON-1 enzimi üzerinde metotreksat'ın K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tampon 50mM glisin/NaOH (pH=10,5) (µl)	Enzim (µl)	Saf su (µl)	Paraokson (3mM) (µl)	Küvetteki Paraokson kons.(mM)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
500	50	400	50	0,15	-	1
500	50	360	90	0,30	-	1
500	50	310	140	0,45	-	1
500	50	260	190	0,60	-	1
500	50	220	230	0,75	-	1
500	50	398	50	0,15	0,11	1
500	50	358	90	0,30	0,11	1
500	50	308	140	0,45	0,11	1
500	50	258	190	0,60	0,11	1
500	50	218	230	0,75	0,11	1
500	50	396	50	0,15	0,22	1
500	50	356	90	0,30	0,22	1
500	50	306	140	0,45	0,22	1
500	50	256	190	0,60	0,22	1
500	50	216	230	0,75	0,22	1
500	50	394	50	0,15	0,33	1
500	50	354	90	0,30	0,33	1
500	50	304	140	0,45	0,33	1
500	50	254	190	0,60	0,33	1
500	50	214	230	0,75	0,33	1

3.2.8. EIA yöntemi ile COX-1 (koyun) enzim aktivitesi üzerine bazı ilaçların etkilerinin belirlenmesi

İlk olarak tüp içerisinde COX reaksiyonu gerçekleştirildi. Kör tüplerine 3 dakika kaynayan su banyosunda inaktive edilen 10 µl saf COX-1 (koyun) enzimi, 10 µl hem ve 970 µl reaksiyon tamponu ilave edildi. Başlangıç aktivite tüplerine 10 µl saf COX-1 (koyun) enzimi, 10 µl hem ve 970 µl reaksiyon tamponu ilave edildi. İnhibitörlü tüplere ise 10 µl saf COX-1 (koyun) enzimi, 10 µl hem, 950 µl reaksiyon tamponu ve 20 µl farklı konsantrasyonlardaki inhibitörler ilave edildi. 10 dakika 37°C’de inkübe edildikten sonra 10 µl araşidonik asit (A.A) ilave edilip reaksiyon başlatıldı. 2 dakika 37°C’de bekletildikten sonra 50 µl 1M HCl ilave edilerek reaksiyon durduruldu. Daha sonra 100 µl doygun SnCl₂ çözeltisi ilave edilerek 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi.

96 kuyulu plate için bir çalışma sayfası oluşturuldu (Şekil 3.3). Kör, non-spesifik bağlanma, maksimum bağlanma, toplam aktivite, prostaglandin standartları ve inhibitörlü numunelerin bulunduğu kuyular işaretlenerek belirlendi. İnhibitör olarak halk arasında iltihaplı romatizma olarak adlandırılan romatoid artrit (RA) hastalığının tedavisinde kullanılan, aynı zamanda anti-inflamatuar olan metotreksat, metilprednisolon sodyum süksinat ve azatioprin ilaçları kullanıldı. Gerekli reaktifler hazırlandıktan sonra kuyulara pipetlemeler yapılarak analiz başlatıldı. 18 saatlik inkübasyon süresinden sonra Elman reaktifi ile renk reaksiyonu başlatıldı. 60 dakikalık bir inkübasyon süresinden sonra plate okuyucuda 412 nm dalga boyunda okuma yapıldı. Elde edilen veriler www.caymanchem/analysis/eia websitesinde yer alan veri analiz tablosuna yerleştirilerek hesaplamalar yapıldı.



Şekil 3.3. COX-1 (koyun) enzimi için yapılan plate çalışma planı

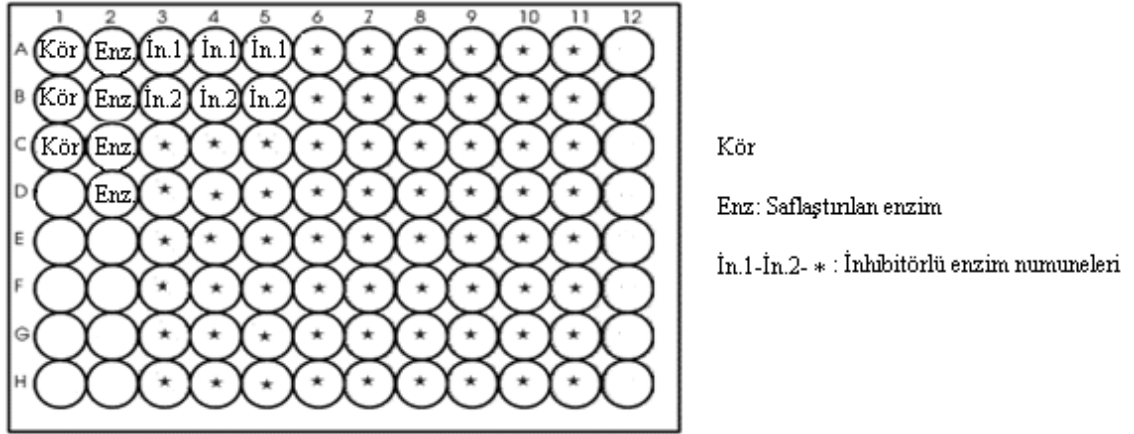
Çizelge 3.20. COX-1 (koyun) enzim aktivitesi üzerine bazı ilaçların etkilerinin belirlenmesi için yapılan pipetlemelerin özeti

Kuyu	EIA Tamponu	Standart/ Numune	Tracer	Antiserum
Kör	-	-	-	-
TA	-	-	5 µl (plate 18 saat bekletildikten sonra)	-
NSB	100 µl	-	50 µl	-
Bo	50 µl	-	50 µl	50 µl
Std/Numune	-	50 µl	50 µl	50 µl

3.2.9. “Kemilüminesans Siklooksigenaz Aktivite Kit” kullanılarak insan trombositlerinden saflaştırılan COX-1 enzim aktivitesi üzerine bazı ilaçların etkilerinin belirlenmesi

“Kemilüminesans Siklooksigenaz Aktivite Kit” COX enziminin peroksidaz aktivitesini ölçer. Bunun için spesifik bir kemilüminesans substrat kullanır. NSAİ ilaçların inhibisyonundan sonra kalan COX aktivitesi özel bir lüminesans substrat ve araşidonik asit ilavesi ile ölçülür. Bu çalışmadaki bir ünite COX aktivitesi, 37°C’de 1 dakikada 1 nmol oksijeni tüketmek için gerekli olan enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır.

Çalışma için plate çalışma planı oluşturuldu (Şekil 3.4). Bu plana göre gerekli pipetlemeler yapılarak (Çizelge 3.21) 5 saniye içerisinde lüminometrede okuma yapıldı. Değerler RLU olarak kaydedildi.



Şekil 3.4 İnsan trombositlerinden saflaştırılan COX-1 enzimi için yapılan plate çalışma planı

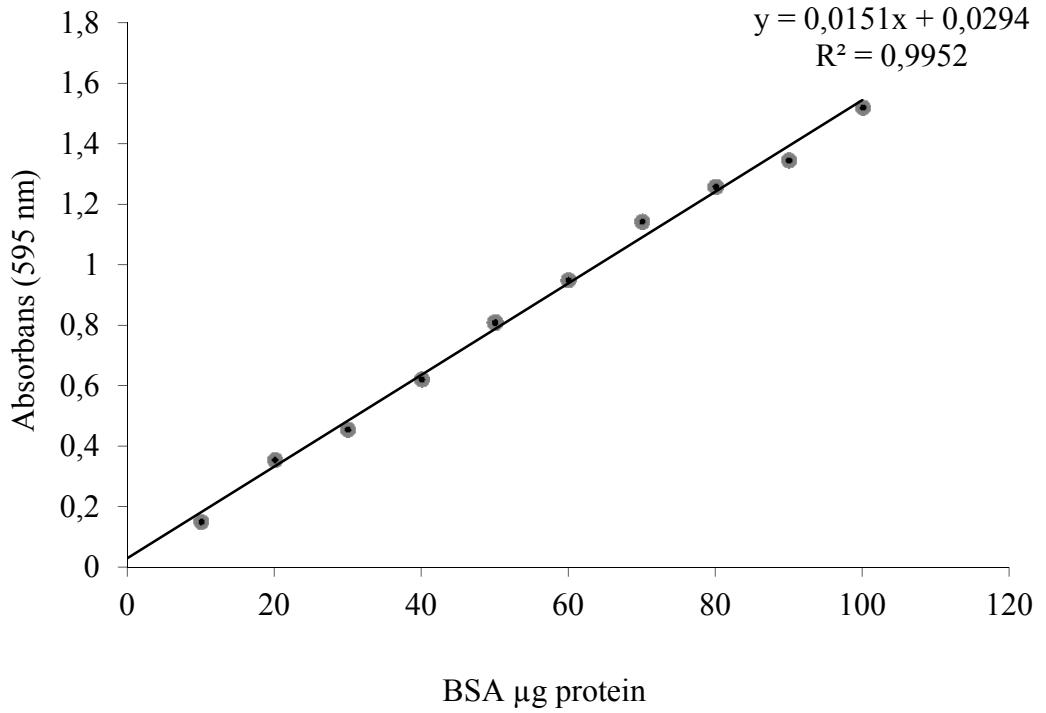
Çizelge 3.21. İnsan trombositlerinden saflaştırılan COX-1 enzim aktivitesi üzerine bazı ilaçların etkilerinin belirlenmesi için yapılan pipetlemelerin özeti

Kuyu	Tris-fenol tamponu	Hematin çözeltisi	Saflaştırılan COX-1 enzimi	İnhibitör	COX kemilüminesans substrat	Araşidonik asit
Kör	50 µl	50 µl	-	-	50 µl	50 µl
Enzim/ Numune	50 µl	50 µl	50 µl	-	50 µl	50 µl
İnhibitör/ Numune	50 µl	50 µl	50 µl	25 µl	50 µl	50 µl

4.ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

Elde ettiğimiz enzim çözeltilerindeki kantitatif protein tayini Bradford yöntemiyle belirlendi. Ham hemolizat, amonyum sülfat çöktürmesi, afinite kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi sonucu elde edilen enzim çözeltilerindeki kantitatif protein tayinin bu standart grafikten faydalanılarak bulundu. Standart çözeltilerin μg proteine karşılık gelen absorban değerleri Şekil 4.1’de gösterildi.



Şekil 4.1. Bradford yöntemiyle proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart grafik

4.2. İnsan Serum PON-1 Enziminin Saflaştırılması Sonuçları

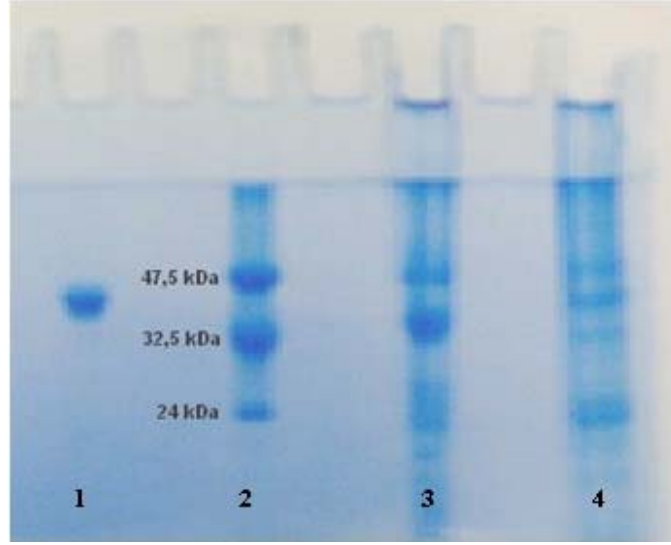
İnsan serum PON-1 enziminin saflaştırılması çalışmalarında uygulanan her bir yöntem sonunda elde edilen örneklerde protein ve aktivite değerleri belirlenerek saflaştırma tablosu oluşturuldu (Çizelge 4.1).

Çizelge.4.1. İnsan serum PON-1 enziminin saflaştırılması basamakları

	Aktivite (EU/ml)	Toplam Hacim (ml)	Protein (mg/ml)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (EU)	Spesifik Aktivite (EU/mg protein)	Verim (%)	Saflaştırma Katsayısı
Triton X-100 uygulanmış serum çözeltisi	135	28,0	8,20	229,6	3780	16,5	100,0	-
Amonyum sülfat çöktürmesi (%60-80) ve diyaliz	185	16,0	5,30	84,8	2960	34,9	78,3	2,1
DEAE Sephadex A-50 iyon değişim kromatografisi	230	8,5	0,08	0,7	1955	2792,9	51,7	170,3
Sephadex G-200 jel filtrasyon kromatografisi	242	7,0	0,06	0,4	1694	4235,0	44,8	~ 256,6

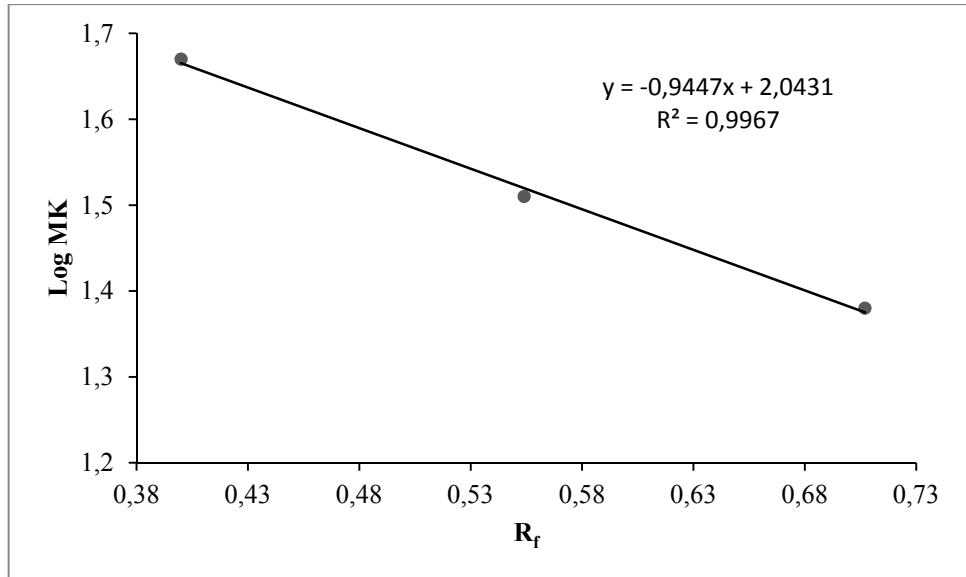
4.3. İnsan Serum PON-1 Enziminin SDS-PAGE ile Saflık Kontrolü

İnsan serumundan elde edilen paraoksonaz-1 enzimi numunelerinin, Triton X-100 uygulanmış serum numunesi, DEAE-Sephadex iyon değişim ve Sephadex G-200 iyon değişim kromatografisinden elde edilen elüatlardaki enzimlerin saflığını kontrol etmek için kesikli SDS-PAGE yöntemi kullanıldı. Bu amaçla elektroforez sistemi kurularak enzim numuneleri sırayla kuyulara uygulandı ve yürütüldü. Elde edilen bantları gösteren fotoğraf Şekil 4.2'de gösterildi. İnsan serumundan saflaştırılan paraoksonaz-1 enziminin molekül kütlesi log MK-R_f grafiği çizilerek grafikten hesaplandı (Şekil 4.3).



Şekil 4.2. İnsan serum PON-1 enziminin saflaştırma sonucu SDS-PAGE resmi

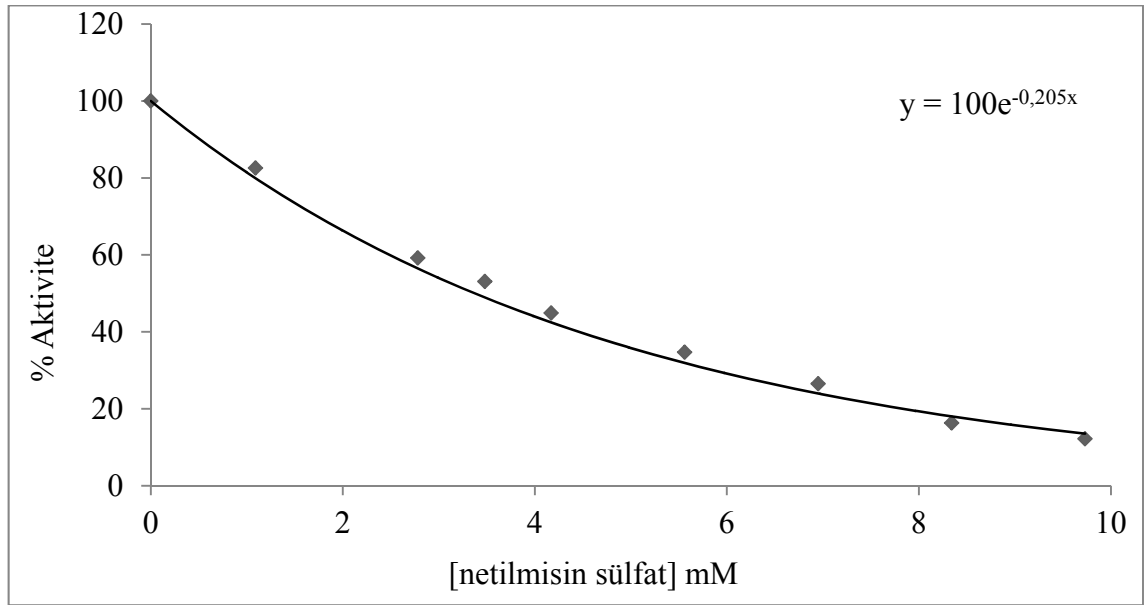
* **1.Kanal;** Jel filtrasyon kromatografisi sonrası saflaştırılan PON-1, **2.Kanal;** Standart proteinler; tavşan kas aldolaz 47,5 kDa, E.coli triozfosfat izomeraz 32,5 kDa, soya tripsin inhibitörü 24 kDa, **3.Kanal;** İyon değişim kromatografisi sonrası elde edilen numune, **4.Kanal;** Triton X-100 uygulanmış serum numunesi



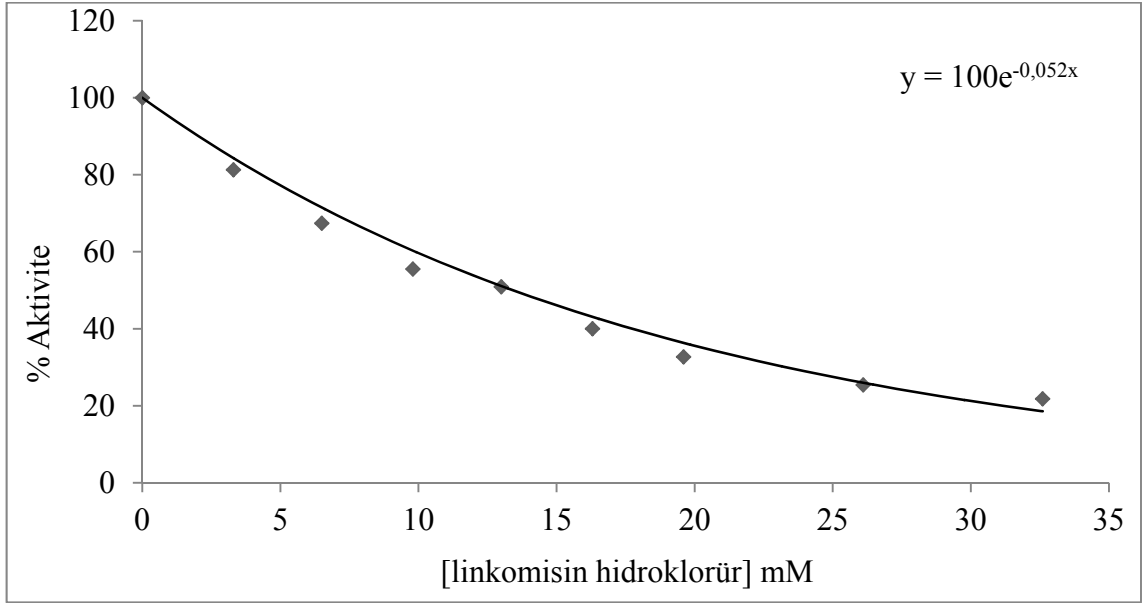
Şekil 4.3. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yöntemiyle insan serum paraoksanaz-1 enziminin molekül kütlesi tayininde kullanılan standart grafik (PON-1 için R_f=0,443)

4.4. İnsan Serum Paraoksonaz-1 Enziminin Aktivitesi Üzerine Bazı Antibiyotik ve İlaçlar İçin IC₅₀ Değerlerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışmaların Sonuçları

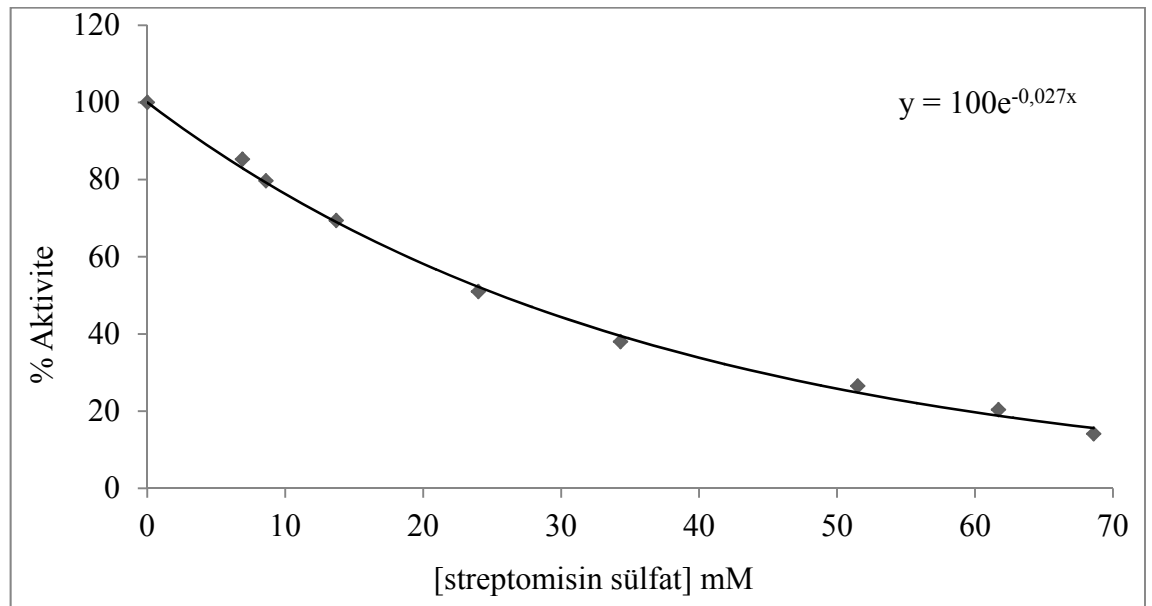
İnsan serumundan saflaştırılan paraoksonaz-1 enzim aktivitesi üzerine bazı ilaçların etkilerini belirlemek amacıyla bu bileşiklerin stok çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerden değişik konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanarak insan serumundan saflaştırılan PON-1 enzim aktivitesi üzerine etkileri araştırıldı. Elde edilen aktivite değerleri kullanılarak; %Aktivite-[I] değerleri bulundu. %Aktivite-[I] grafikleri çizilerek her bir ilaç için IC₅₀ değerleri hesaplandı. Grafikler Şekil 4.4 - 4.12'de gösterildi.



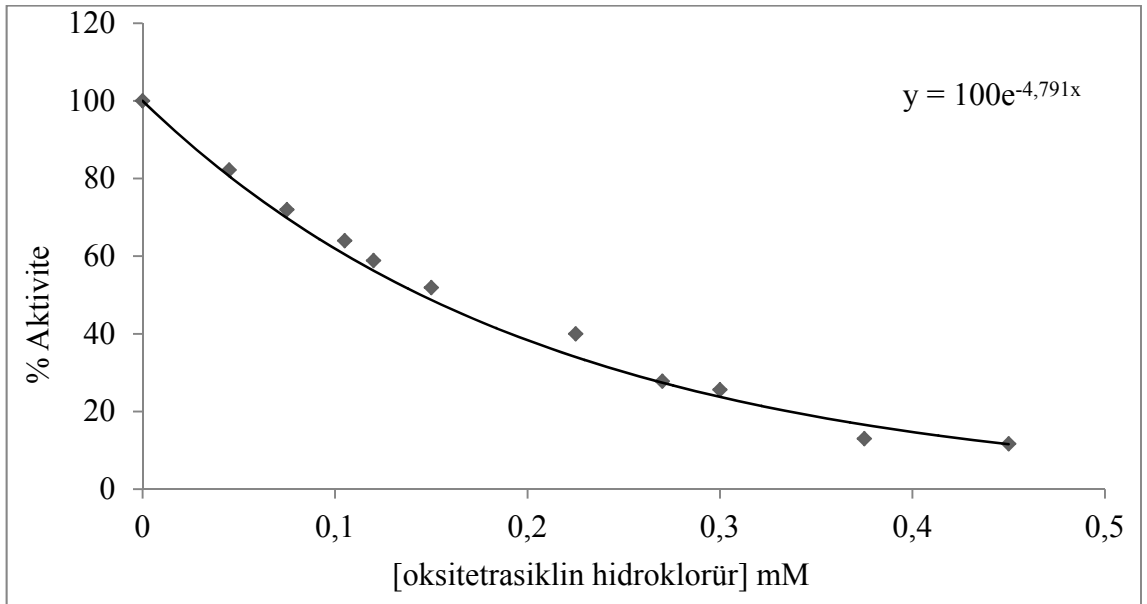
Şekil 4.4. İnsan serum PON-1 enzimi üzerine netilmisin sülfat ilacının etkisi



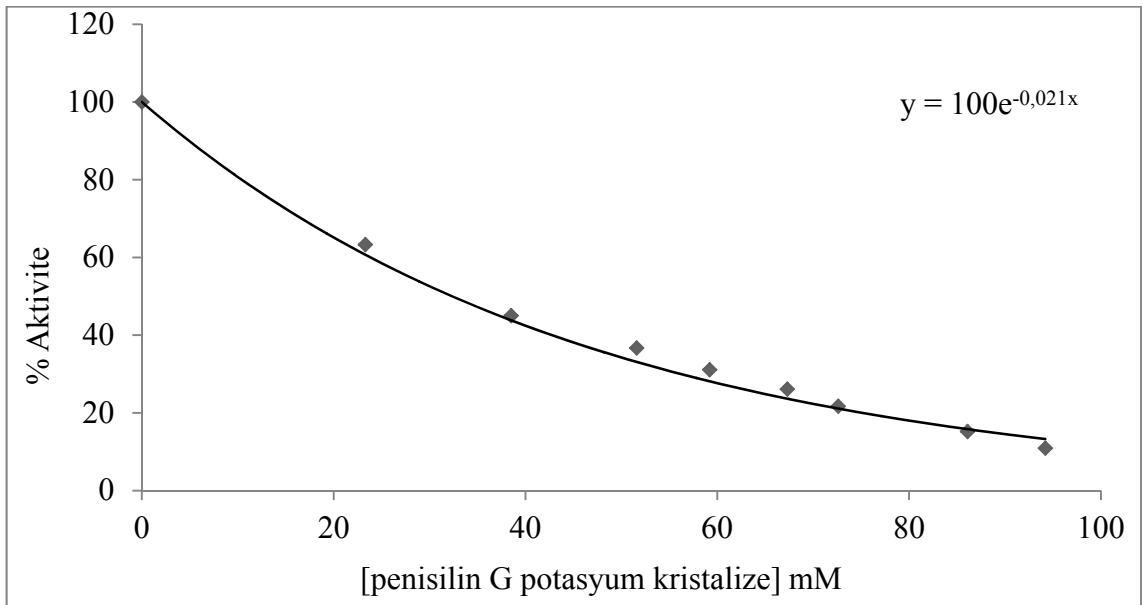
Şekil 4.5. İnsan serum PON-1 enzimi üzerine linkomisin hidroklorür ilacının etkisi



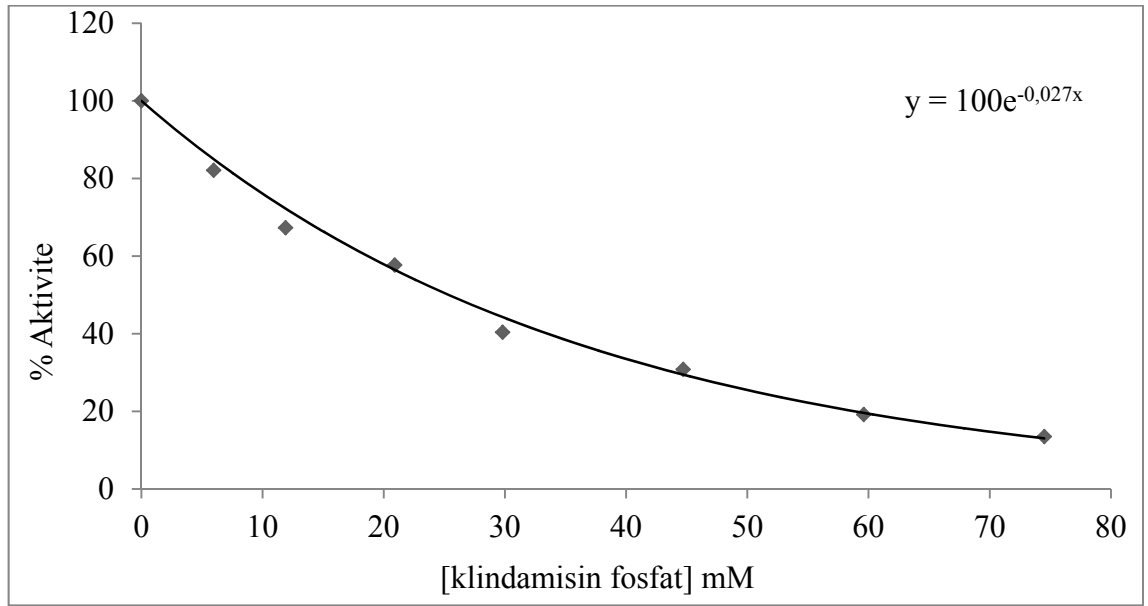
Şekil 4.6. İnsan serum PON-1 enzimi üzerine streptomisin sülfat ilacının etkisi



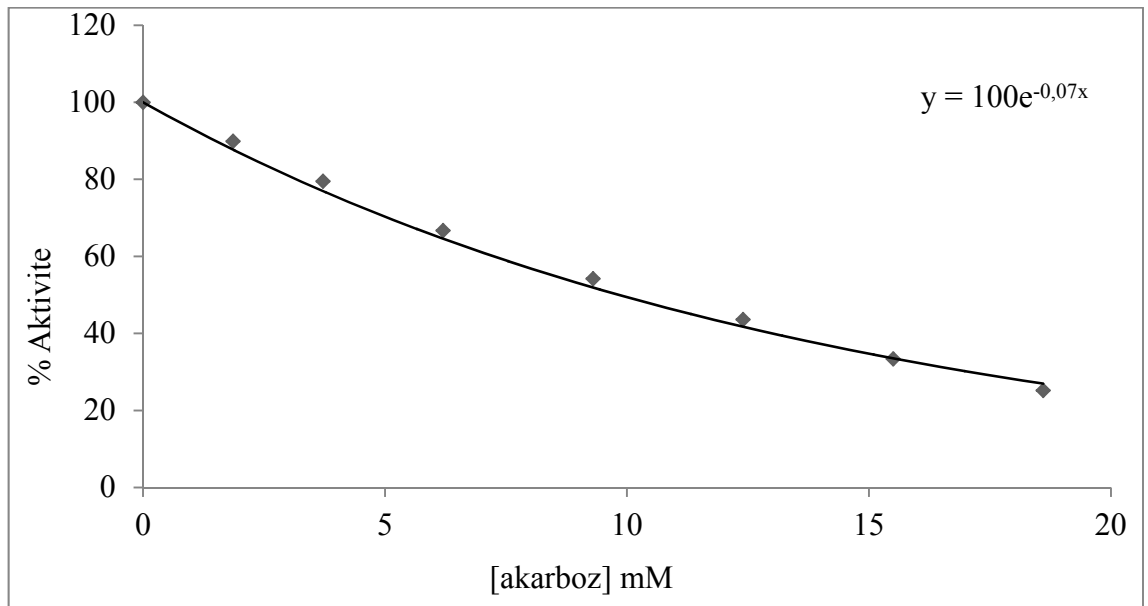
Şekil 4.7. İnsan serum PON-1 enzimi üzerine oksitetrasiklin hidroklorür ilacının etkisi



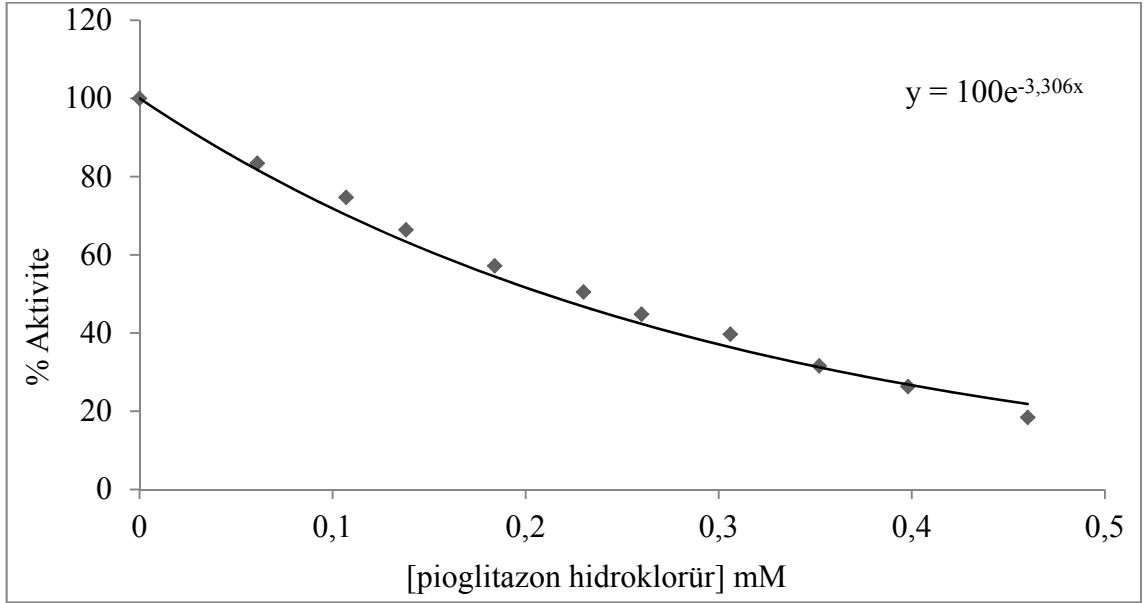
Şekil 4.8. İnsan serum PON-1 enzimi üzerine penisilin G potasyum kristalize ilacının etkisi



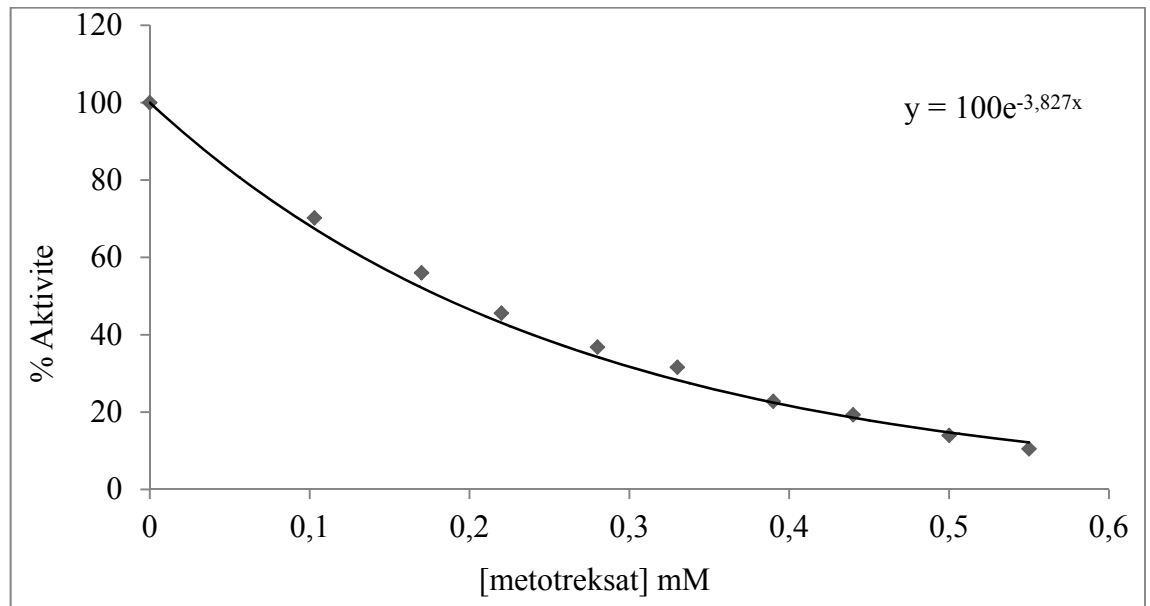
Şekil 4.9. İnsan serum PON-1 enzimi üzerine klindamisin fosfat ilacının etkisi



Şekil 4.10. İnsan serum PON-1 enzimi üzerine akarboz ilacının etkisi



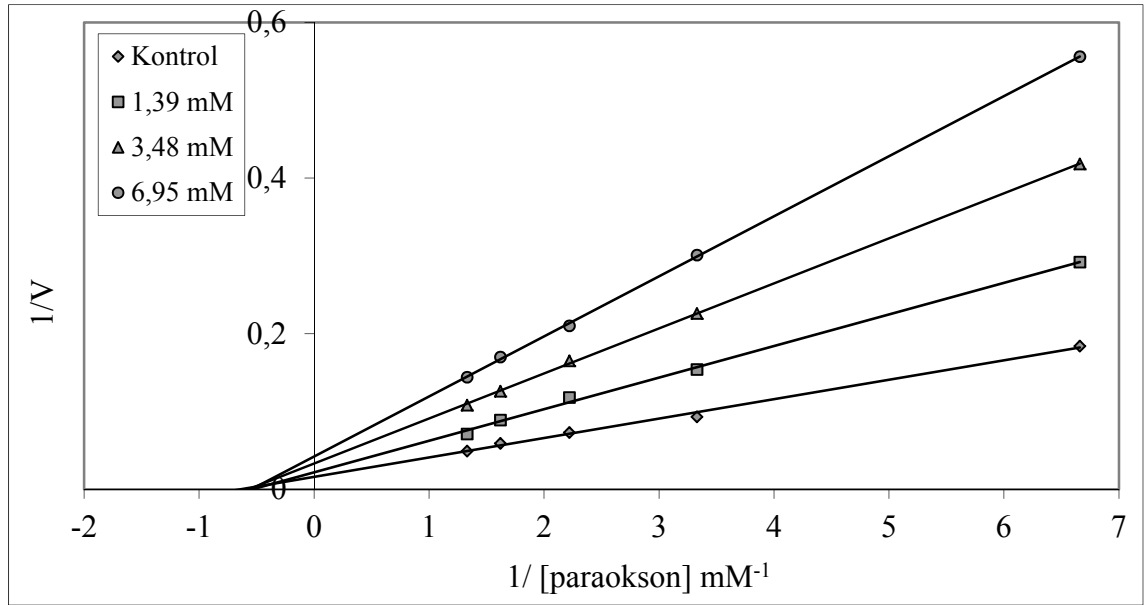
Şekil 4.11. İnsan serum PON-1 enzimi üzerine pioglitazon hidroklorür ilacının etkisi



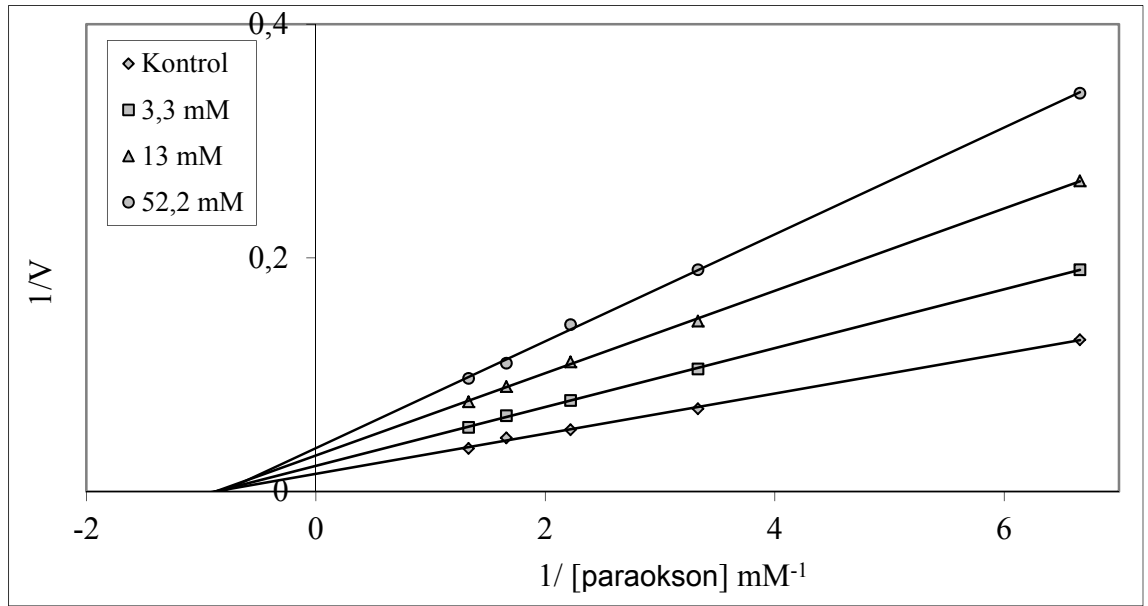
Şekil 4.12. İnsan serum PON-1 enzimi üzerine metotreksat ilacının etkisi

4.5. İnsan Serum PON-1 Enzimi Üzerine İnhibitör Etkisi Gösteren Bazı Antibiyotik ve İlaçlar İçin K_i Değerlerinin Belirlenmesine Ait Çalışmaların Sonuçları

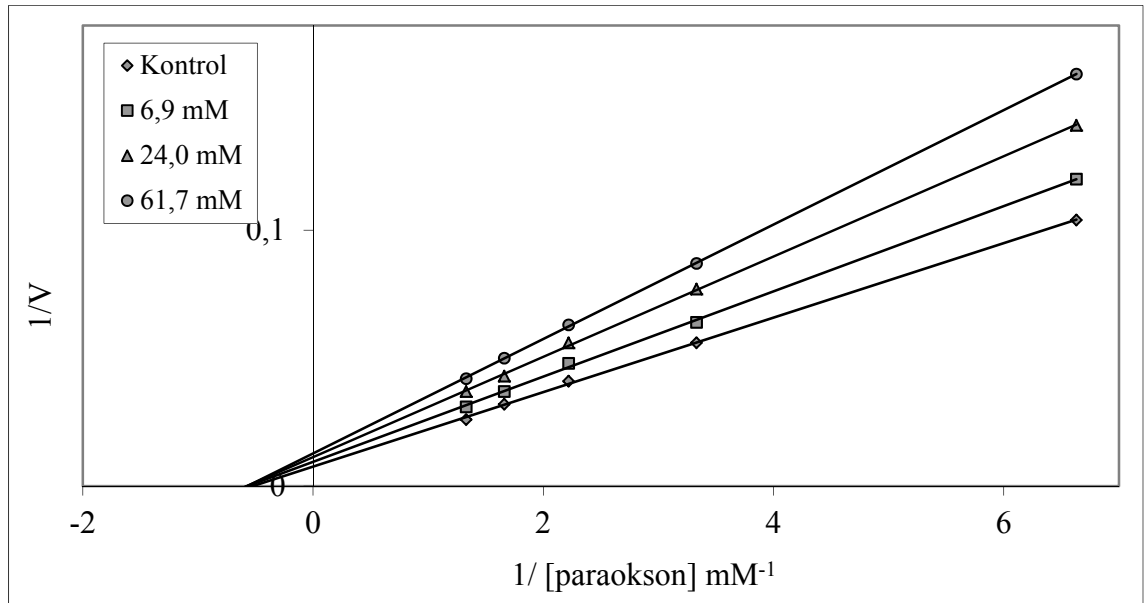
İnsan serumundan saflaştırılan paraoksanaz-1 enziminin inhibitörsüz ve inhibitörlü ortamda beş farklı substrat konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapıldı. Daha sonra kullanılan ilaçlar için üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonu ve beş farklı substrat konsantrasyonunda elde edilen aktivite değerleri kullanılarak; $1/V - 1/[S]$ değerleri bulundu. Lineweaver- Burk grafikleri çizilerek K_i değerleri hesaplandı. İnsan serum Paraoksanaz-1 enzimi için elde edilen sonuçlar Şekil 4.13- 4.21 ve Çizelge 4.2. ile aşağıda verildi.



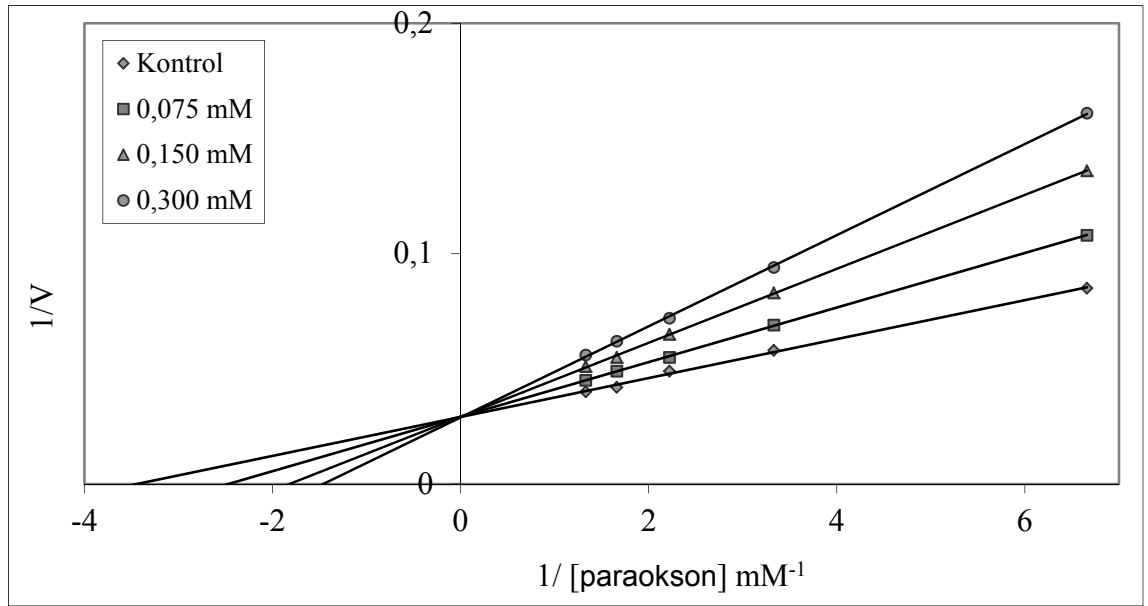
Şekil 4.13. Netilmisin sülfat ilacı için K_i sabitinin bulunmasına yönelik çizilen Lineweaver-Burk grafiği ($[I_1] = 1,39 \text{ mM}$, $[I_2] = 3,48 \text{ mM}$, $[I_3] = 6,95 \text{ mM}$)



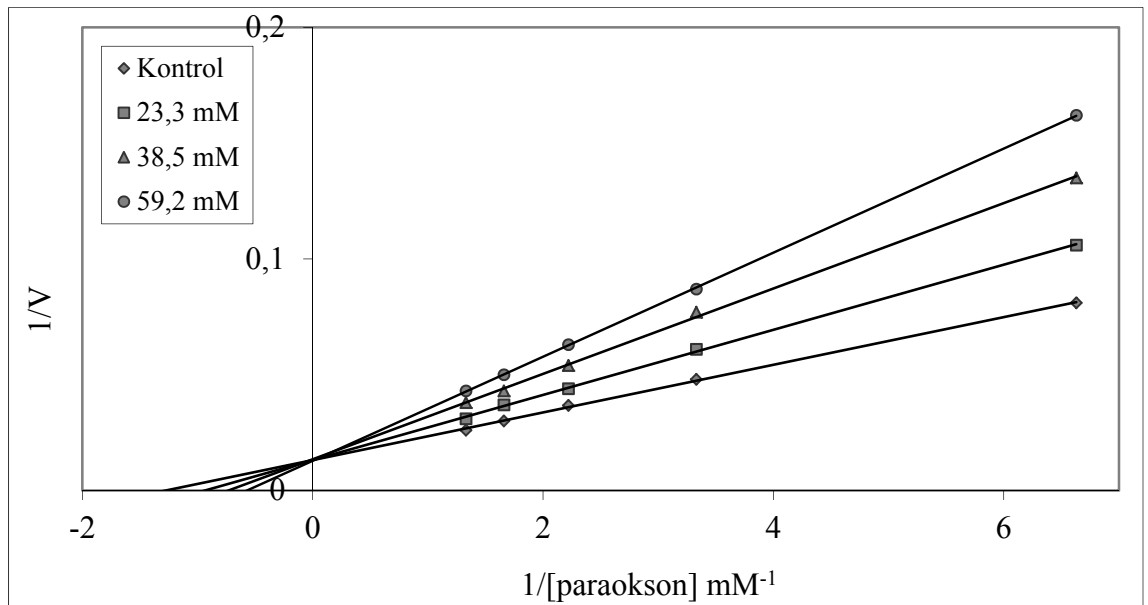
Şekil 4.14. Linkomisin hidroklorür ilacı için K_i sabitinin bulunmasına yönelik çizilen Lineweaver-Burk grafiği ($[I_1] = 3,3 \text{ mM}$, $[I_2] = 13,0 \text{ mM}$, $[I_3] = 52,2 \text{ mM}$)



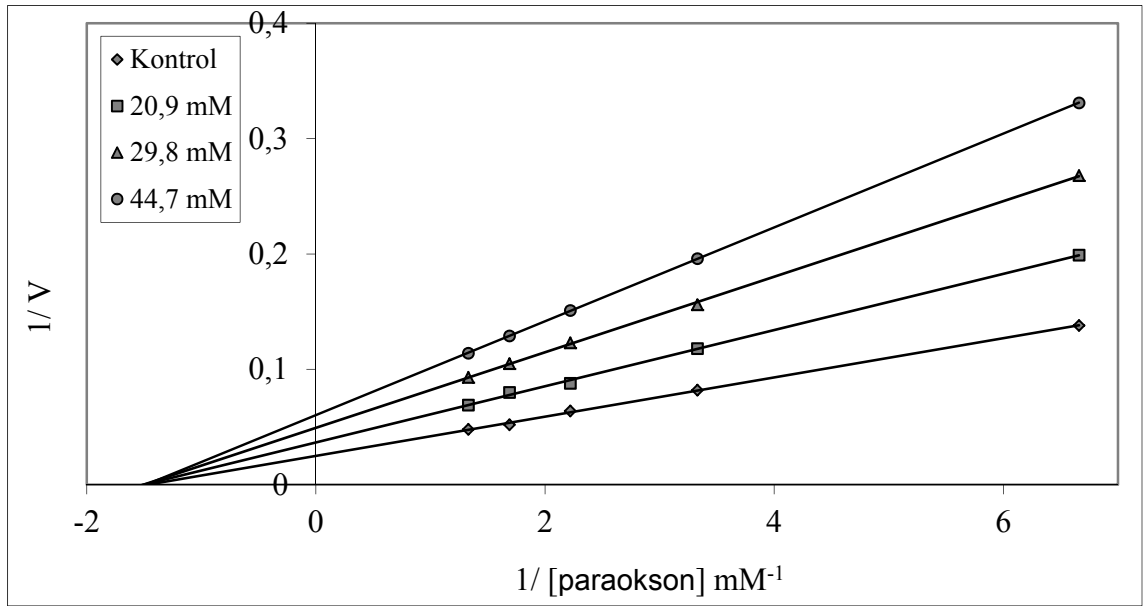
Şekil 4.15. Streptomisin sulfat ilacı için K_i sabitinin bulunmasına yönelik çizilen Lineweaver-Burk grafiği ($[I_1] = 6,9 \text{ mM}$, $[I_2] = 24,0 \text{ mM}$, $[I_3] = 61,7 \text{ mM}$)



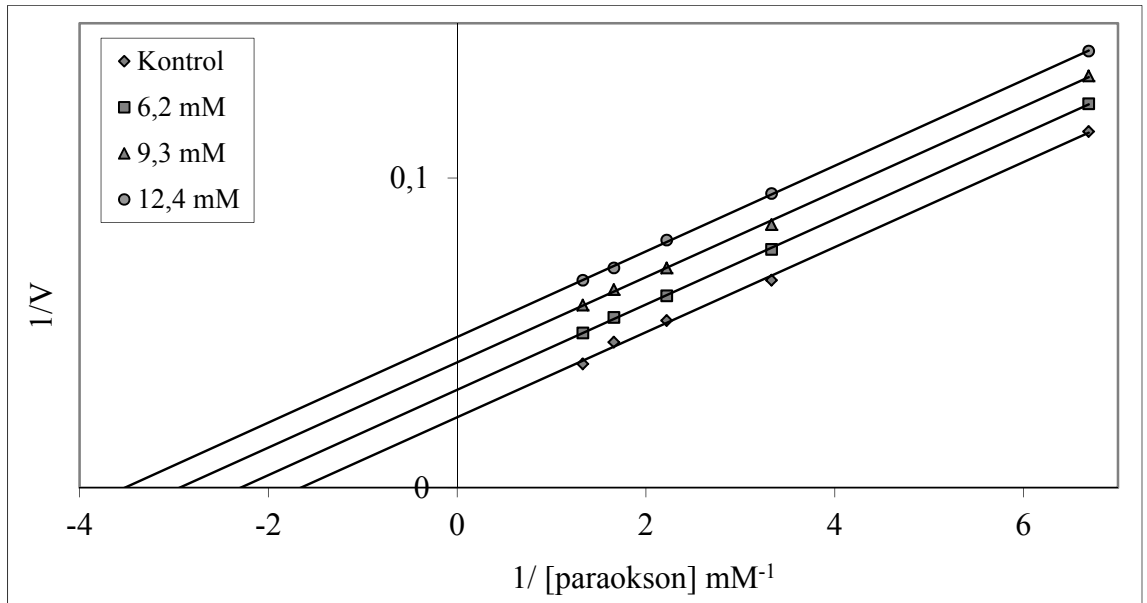
Şekil 4.16. Oksitetrasiklin hidroklorür ilacı için K_i sabitinin bulunmasına yönelik çizilen Lineweaver-Burk grafiği ($[I_1] = 0,075 \text{ mM}$, $[I_2] = 0,150 \text{ mM}$, $[I_3] = 0,300 \text{ mM}$)



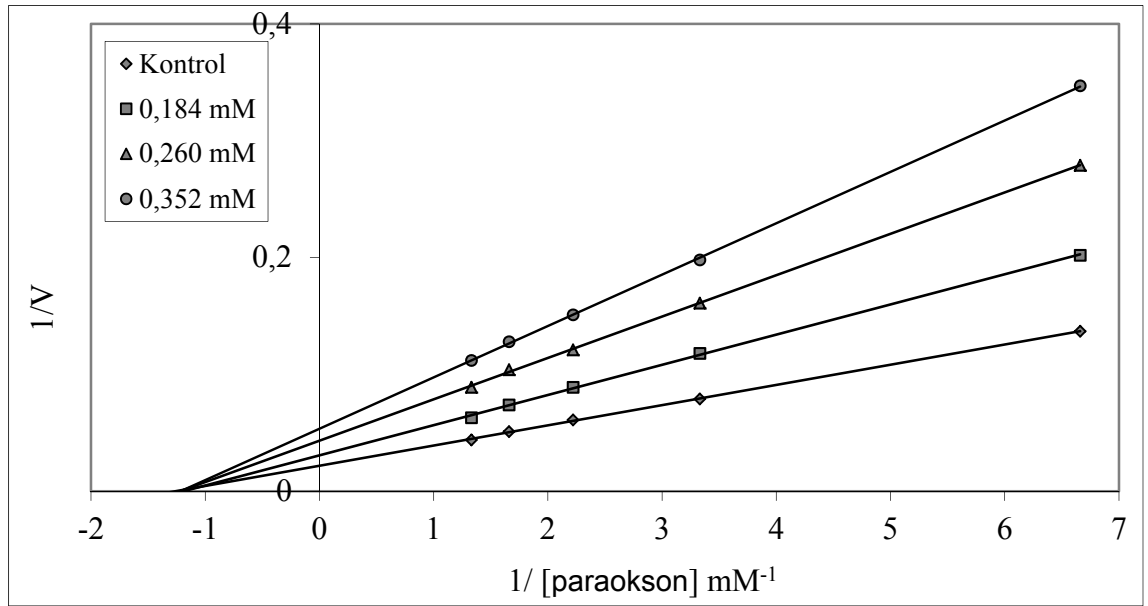
Şekil 4.17. Penisilin G potasyum kristalize ilacı için K_i sabitinin bulunmasına yönelik çizilen Lineweaver-Burk grafiği ($[I_1] = 23,3 \text{ mM}$, $[I_2] = 38,5 \text{ mM}$, $[I_3] = 59,2 \text{ mM}$)



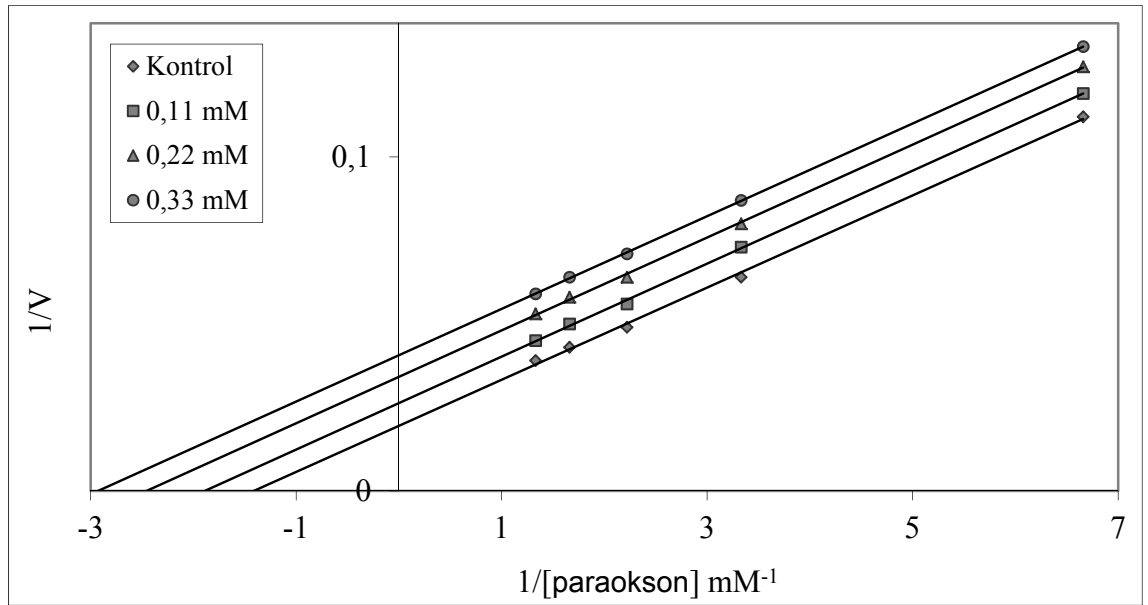
Şekil 4.18. Klindamisin fosfat ilacı için K_i sabitinin bulunmasına yönelik çizilen Lineweaver-Burk grafiği ($[I_1] = 20,9$ mM, $[I_2] = 29,8$ mM, $[I_3] = 44,7$ mM)



Şekil 4.19. Akarboz ilacı için K_i sabitinin bulunmasına yönelik çizilen Lineweaver-Burk grafiği ($[I_1] = 6,2$ mM, $[I_2] = 9,3$ mM, $[I_3] = 12,4$ mM)



Şekil 4.20. Pioglitazon hidroklorür ilacı için K_i sabitinin bulunmasına yönelik çizilen Lineweaver-Burk grafiği ($[I_1] = 0,184 \text{ mM}$, $[I_2] = 0,260 \text{ mM}$, $[I_3] = 0,352 \text{ mM}$)



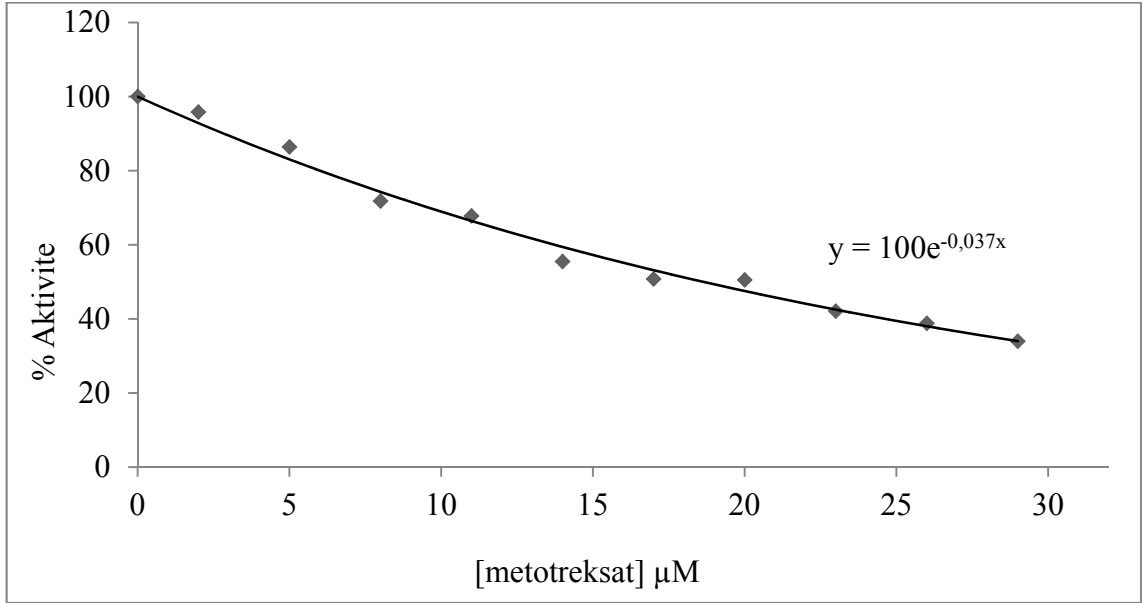
Şekil 4.21. Metotreksat ilacı için K_i sabitinin bulunmasına yönelik çizilen Lineweaver-Burk grafiği ($[I_1] = 0,11 \text{ mM}$, $[I_2] = 0,22 \text{ mM}$, $[I_3] = 0,33 \text{ mM}$)

Çizelge 4.2. İnsan serum paraoksonaz-1 enzimi için bulunan K_i ve IC_{50} değerleri

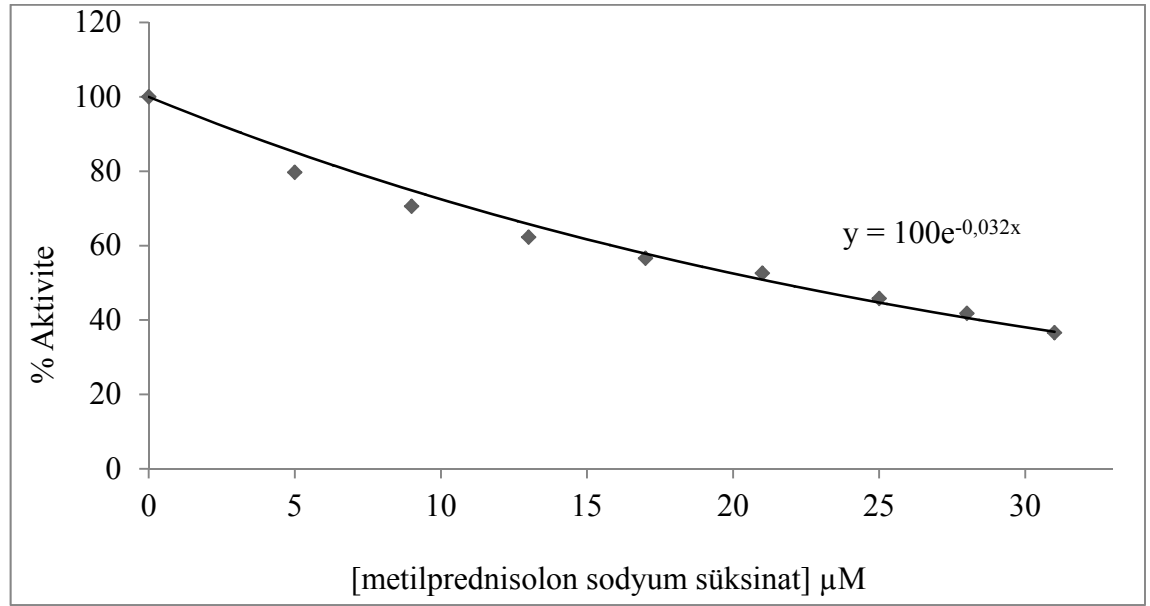
İnhibitör	IC_{50} (mM)	Ortalama K_i (mM)	İnhibisyon Türü
Netilmisin sülfat	3,39	$3,73 \pm 0,33$	Yarışmasız
Linkomisin hidroklorür	13,30	$18,30 \pm 13,00$	Yarışmasız
Streptomisin sülfat	25,39	$56,30 \pm 26,60$	Yarışmasız
Oksitetrasiklin hidroklorür	0,15	$0,20 \pm 0,02$	Yarışmalı
Penisilin G potasyum kristalize	32,50	$54,70 \pm 4,20$	Yarışmalı
Klindamisin fosfat	25,40	$35,80 \pm 6,40$	Yarışmasız
Akarboz	9,82	$13,10 \pm 1,30$	Yarı Yarışmalı
Pioglitazon hidroklorür	0,22	$0,32 \pm 0,08$	Yarışmasız
Metotreksat	0,18	$0,26 \pm 0,07$	Yarı Yarışmalı

4.6. EIA Yöntemi İle COX-1 (koyun) Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı İlaçların Etkilerinin Belirlenmesine Ait Çalışmaların Sonuçları

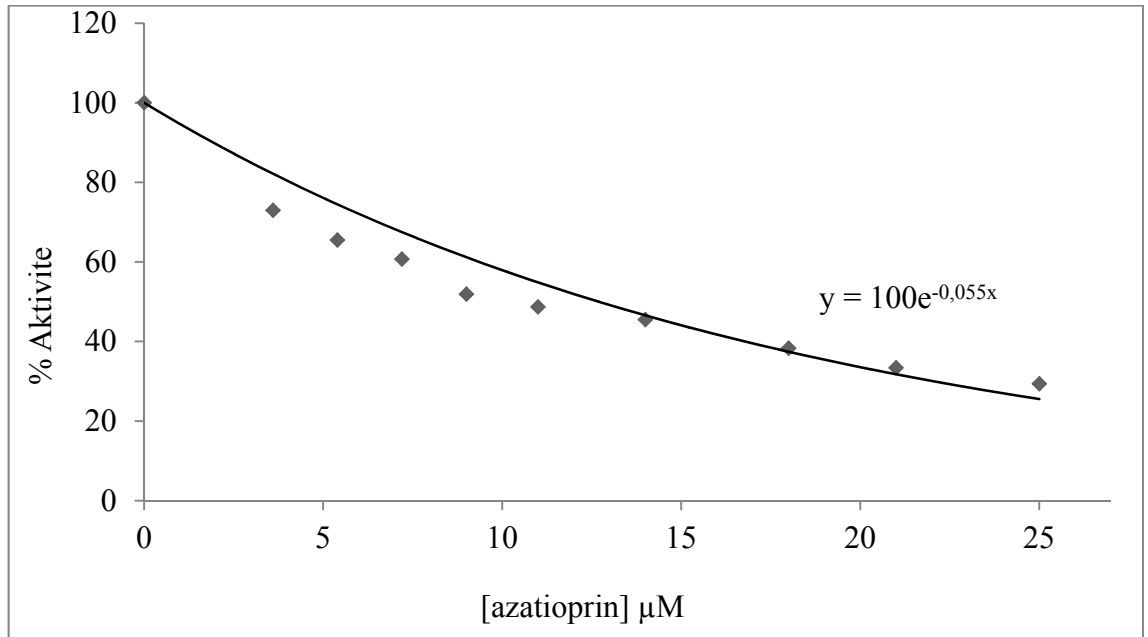
COX-1 (koyun) enziminin aktivitesi üzerine bazı ilaçlar için IC_{50} değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışmaların sonuçları bu bölümde Çizelge 4.3 ve Şekil 4.22-4.24 ile gösterilmiştir.



Şekil 4.22. COX-1 (koyun) enzimi üzerine metotreksat ilacının etkisi



Şekil 4.23. COX-1 (koyun) enzimi üzerine metilprednisolon sodyum süksinat ilacının etkisi



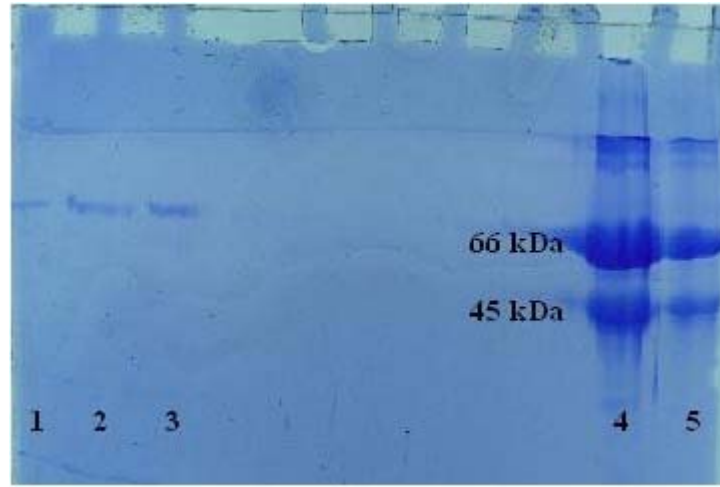
Şekil 4.24. COX-1 (koyun) enzimi üzerine azatioprin ilacının etkisi

Çizelge 4.3. COX-1 (koyun) enzimi için bulunan IC₅₀ değerleri

İnhibitör	IC ₅₀ (µM)
Metotreksat	18,73
Metilprednisolon sodyum süksinat	21,66
Azatioprin	12,60

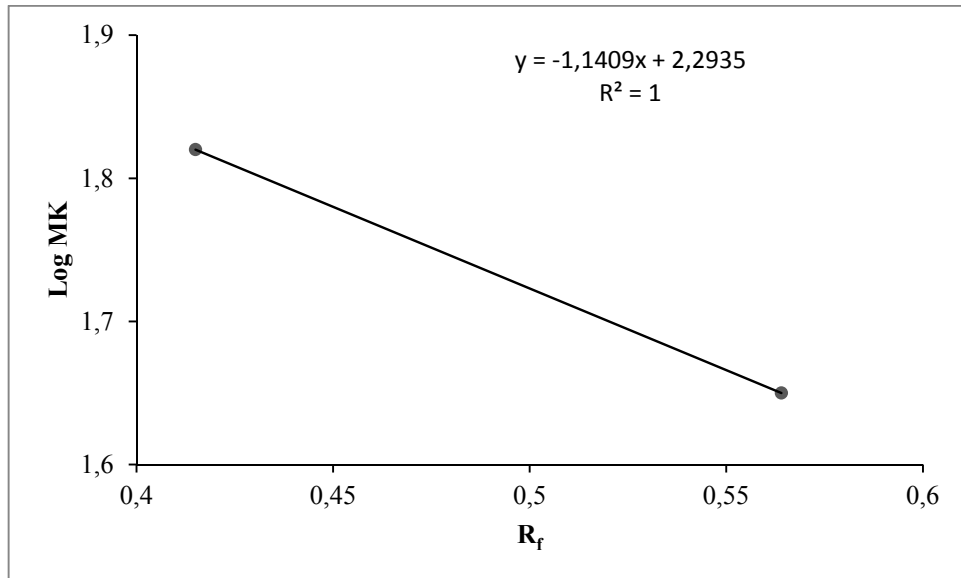
4.7. İnsan Trombositlerinden Saflaştırılan COX-1 Enziminin SDS-PAGE ile Saflık Kontrolü

İnsan trombositlerinden elde edilen siklooksigenaz enzimi numunelerinin, afinite kromatografisinden elde edilen elüatlardaki enzimlerin saflığını kontrol etmek için kesikli SDS-PAGE yöntemi kullanıldı. Bu amaçla elektroforez sistemi kurularak enzim numuneleri sırayla kuyulara uygulandı ve yürütüldü. Elde edilen bantları gösteren fotoğraf Şekil 4.25'de gösterildi. İnsan trombositlerinden saflaştırılan siklooksigenaz enziminin molekül kütlesi log MK-R_f grafiği çizilerek grafikten hesaplandı (Şekil 4.26).



Şekil 4.25. İnsan trombositlerinden COX-1 enziminin saflaştırılması sonucu SDS-PAGE resmi

* **1.Kanal;** **2.Kanal;** **3.Kanal;** afinite kromatografisi sonrası saflaştırılan COX enzimi, **4.Kanal;** **5.Kanal;** standart proteinler; sığır serum albumin 66,0 kDa, tavuk ovalbumin 45,0 kDa



Şekil 4.26. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yöntemiyle insan trombositleri COX-1 enziminin molekül kütlesi tayininde kullanılan standart grafik (COX-1 için R_f=0,386)

4.8. “Kemilüminesans Siklooksigenaz Aktivite Kit” Kullanılarak İnsan Trombositlerinden Saflaştırılan COX-1 Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı İlaçların Etkilerinin Belirlenmesi

“Kemilüminesans Siklooksigenaz Aktivite Kit” COX enziminin peroksidaz aktivitesini ölçer. Bunun için spesifik bir kemilüminesans substrat kullanır. NSAİ ilaçların inhibisyonundan sonra kalan COX aktivitesi özel bir lüminesans substrat ve araşidonik asit ilavesi ile ölçülür. Bu çalışmadaki bir ünite COX aktivitesi, 37°C’de 1 dakikada 1 nmol oksijeni tüketmek için gerekli olan enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır.

%İnhibisyon ve %Aktivite değerleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı:

$$\%İnhibisyon = \left(1 - \frac{\text{İnhibitör katılmış enzim numunesi için Net RLU}}{\text{İnhibitör katılmamış enzim numunesi için Net RLU}} \right) \times 100$$

$$\%Aktivite = 100 - \%İnhibisyon$$

İnsan trombositlerinden saflaştırılan COX-1 enzim aktivitesi üzerine metotreksat, metilprednisolon sodyum süksinat ve azatioprin ilaçlarının etkisi “Kemilüminesans Siklooksigenaz Aktivite Kit” kullanılarak incelendi ve aşağıdaki sonuçlar elde edildi.

Çizelge 4.4. Metilprednisolon sodyum süksinat ilacının insan trombositlerinden saflaştırılan COX-1 enzimi aktivitesi üzerine etkisi

Numune	İlaç Konsantrasyonu (mM)	Net RLU	%İnhibisyon	%Aktivite
*M-0	0	7580	0	100
*M-1	0,005	5780	23,7	76,3
*M-2	0,020	4180	44,9	55,1
*M-3	0,050	1880	75,2	24,8
*M-4	0,100	880	88,4	11,6
*M-5	0,130	560	92,6	7,4

*M:Metilprednisolon sodyum süksinat

Çizelge 4.5. Azatioprin ilacının insan trombositlerinden saflaştırılan COX-1 enzimi aktivitesi üzerine etkisi

Numune	İlaç Konsantrasyonu (mM)	Net RLU	%İnhibisyon	%Aktivite
*A-0	0	7580	0	100
*A-1	0,010	5480	27,7	72,3
*A-2	0,030	3080	59,4	40,6
*A-3	0,050	1980	73,9	26,1
*A-4	0,070	980	87,1	12,9
*A-5	0,090	730	90,4	9,6

*A:Azatioprin

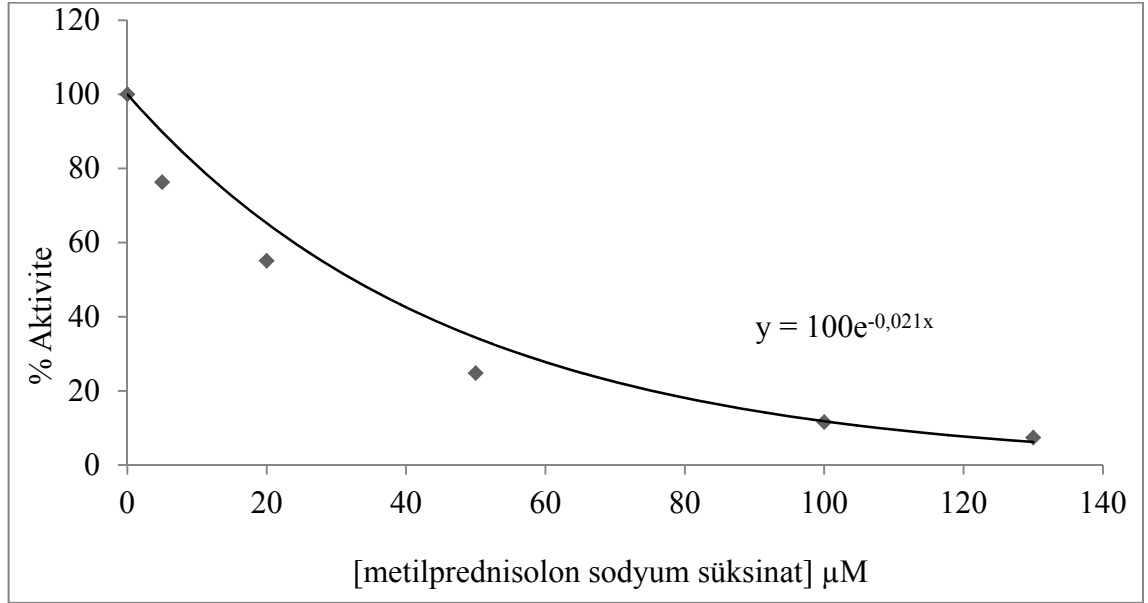
Çizelge 4.6. Metotreksat ilacının insan trombositlerinden saflaştırılan COX-1 enzimi aktivitesi üzerine etkisi

Numune	İlaç Konsantrasyonu (mM)	Net RLU	%İnhibisyon	%Aktivite
*M-0	0	7580	0	100
*M-1	0,002	5680	25,1	74,9
*M-2	0,007	4580	39,6	60,4
*M-3	0,010	3380	55,4	44,6
*M-4	0,030	1180	84,4	15,6
*M-5	0,050	530	93,0	7,0

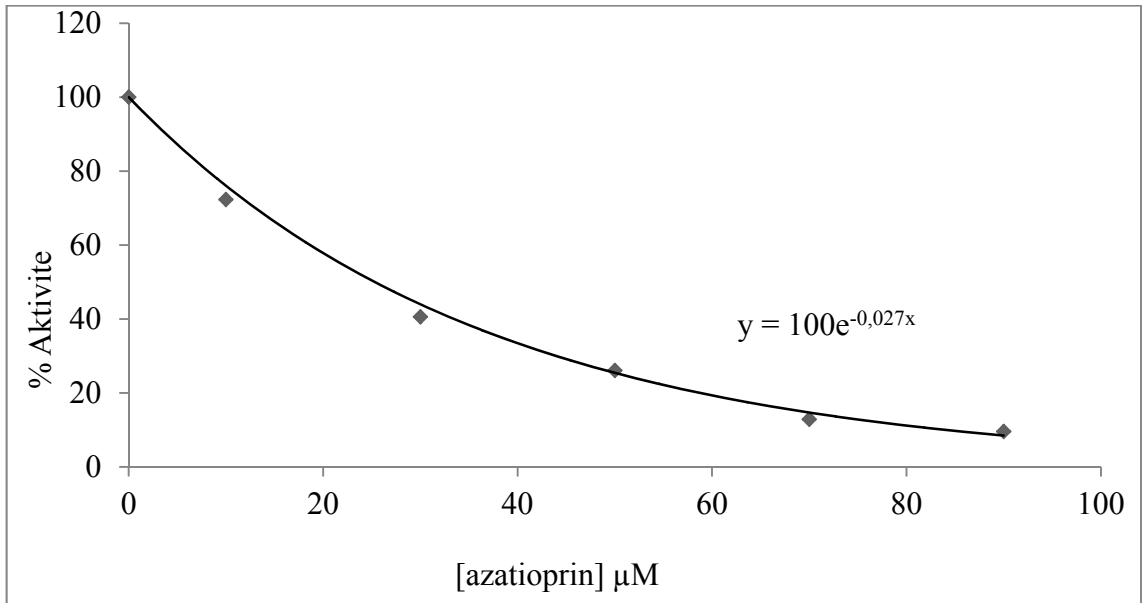
*M: Metotreksat

Çizelge 4.7. İbuprofen ve meloksikam ilaçlarının insan trombositlerinden saflaştırılan COX-1 enzimi aktivitesi üzerine etkisi

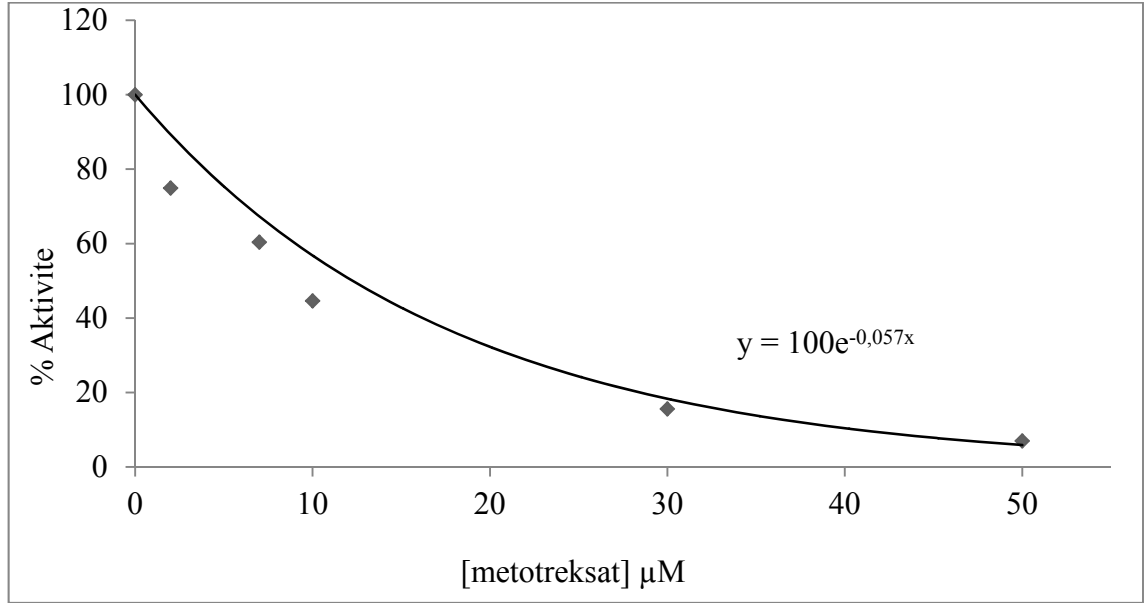
Numune	İlaç Konsantrasyonu (mM)	Net RLU	%İnhibisyon	%Aktivite
Saf enzim	0	7580	0	100
İbuprofen	42,80	840	88,9	11,1
Meloksikam	0,14	3480	54,1	45,9



Şekil 4.27. İnsan trombositlerinden saflaştırılan COX-1 enzimi üzerine metilprednisolon sodyum süksinat ilacının etkisi



Şekil 4.28. İnsan trombositlerinden saflaştırılan COX-1 enzimi üzerine azatioprin ilacının etkisi



Şekil 4.29. İnsan trombositlerinden saflaştırılan COX-1 enzimi üzerine metotreksat ilacının etkisi

Çizelge 4.8. İnsan trombositlerinden saflaştırılan COX-1 enzimi için bulunan IC_{50} değerleri

İnhibitör	IC_{50} (µM)
Metotreksat	12
Metilprednisolon sodyum süksinat	30
Azatioprin	25

5.TARTIŞMA ve SONUÇ

Serum paraoksonaz enzimi (PON), organofosfatların hidrolizini katalizleyen kalsiyum bağımlı bir esterazdır. Karaciğer, böbrek, bağırsak gibi çeşitli dokularda ve ayrıca HDL bağımlı olarak serumda bulunur. PON'un doğal fizyolojik substratları tamamen bilinmemekle birlikte enzim aktivitesini izleyebilmek amacıyla sentetik substratlar kullanılmaktadır. PON aktivitesinin miyokard enfarktüsü, ailesel hiperkolesterolemi ve diabetes mellitus hastalarında sağlıklı hastalara nazaran azaldığı tesbit edilmiştir. PON'un organofosfat toksisitesini azalttığı önerilmekle birlikte fizyolojik rolü hala bilinmemektedir (Aviram *et al.* 1998).

Memeli türleri arasında geniş bir dağılıma sahip olan paraoksonaz enzimi, balıklarda, kuşlarda ve eklembacaklılar gibi omurgasızlarda mevcut değildir. Literatürde memelilerde, en azından insanlarda ve farelerde, aynı kromozom üzerinde birbirine komşu üç ayrı PON geni (PON-1, 2 ve 3) belirtilmektedir.

Main (1956), Costa *et al.* (1990) ve Li *et al.* (1993, 1995) tarafından gerçekleştirilen ilk deneylerde, saflaştırılmış tavşan PON-1 enjeksiyonunun, paraokson, klorprifoz, ve klorprifoz oksona karşı koruma sağladığı gözlenmiştir. Shih, Lusi ve arkadaşları tarafından yapılan ve genetik olarak modifiye edilmiş farelerin kullanıldığı deneyler farede PON-1 yokluğunun fareyi klorprifoz oksona karşı aşırı derecede hassas hale getirdiğini kanıtlamıştır (Shih *et al.* 1998). Yine PON-1'den yoksun fareler diazokson ve diazinona karşı artan hassasiyet göstermiştir.

PON-1'in lipid metabolizmasındaki ve vasküler hastalıklara karşı koruyucu rollerin anlaşılması için çalışmalar, 1961 yılında plazma esterazlarının karakterizasyonu ile başlamıştır (Uriel 1961). Enzimin vasküler hastalıkları koruyucu rolünü anlamaya yönelik anahtar bulgu 1991 yılında Mackness ve arkadaşları tarafından tesbit edilmiştir ve bu çalışmada PON-1'in okside lipidlerin LDL partiküllerindeki birikimini

engellediği gözlemlenmiştir. Bunu takiben Watson *et al.* (1995) PON-1'in okside LDLnin biyolojik aktivitesini azalttığını açıklamıştır.

PON-1'in ateroskleroz gelişiminde rolü olduğu gösterilmiştir ve antiaterojenik özellikleri LDL, HDL ve makrofajların oksidatif stresten korunmasını kapsamaktadır (Rozenberg *et al.* 2005; Aviram *et al.* 1998; Mackness *et al.* 1993; Aviram and Rosenblat 2004). Diyabetik hastalar ateroskleroz gelişimi için yüksek risk altındadırlar (Mackness *et al.* 2006; Li *et al.* 2005). Çalışmaların çoğu PON-1 aktivitesinin tip 1 ve 2 diyabetli hastalarda PON-1 genotipine bağlı olmaksızın azaldığını göstermiştir (Boemi *et al.* 2001; Letellier *et al.* 2002; Juretic *et al.* 2006). Tip 2 diyabetlerde düşük PON-1 aktivitesinin hastaların plazma okside LDL seviyeleri ve vasküler komplikasyonlarla orantılı olduğu gösterilmiştir (Tsuzura *et al.* 2004; Karabina *et al.* 2005). Son zamanlarda çıkan bir çalışmada, tip 1 diyabetik hastalarda sağlıklı bireylere nazaran yüksek seviyede lipid hidroperoksit ve düşük PON-1 aktivitesi olduğu kanıtlanmıştır. Bunun yanı sıra bu hastaların HDL'leri, normal bireylere göre eritrosit membranlarını oksidatif hasara karşı daha etkisiz bir şekilde korumuştur (Ferretti *et al.* 2004).

Rozenberg *et al.* (2005) PON-1 eksikliğinin serum ve makrofajdaki oksidatif stresi artırdığını ve bunun aksine makrofajlara PON-1 ilavesinin oksidatif stresi azalttığını kanıtlamışlardır. Bu sebepten dolayı PON-1'in hücrelerin dış membranında bulunduğu ve bu yüzden makrofajlardaki lipid peroksidleri hidroliz edebildiği ve bunun da hücrel oksidatif stresi azalttığı önerilmiştir.

HDL-ilişkili PON-1 okside fosfolipidleri metabolize ederek LDL'nin oksidasyonunu *in vivo* ve *in vitro* olarak engeller ve bu yüzden aterojenik etkilerini baskılar. Genetik polimorfizmdense düşük PON-1 aktivitesi koroner rahatsızlıklar için bağımsız güçlü bir risk faktörüdür. Bu alanda daha fazla çalışma gereklidir. PON enziminin HDL'nin antioksidatif ve antiinflamatuvar etkilerinin çoğundan sorumlu olması muhtemeldir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, PON ezimlerinin fizyolojik önemini aydınlatmaya yönelik çalışmaların önümüzdeki yıllarda artarak devam edeceğinin sinyalini

vermektedir. Hayvan model çalışmalarından bellidir ki PON-1'in bilinen aktiviteleri gerçekten fizyolojik öneme sahiptir. Spesifik organofosfatların PON-1 tarafından hidrolizi fizyolojik olarak çok önemlidir. Bir A-oksonaz ailesi üyesi olan paraoksonaz, asetil kolin esteraz inhibitörlerini kolin esterazlara bağlanmadan önce parçalarlar ve bu sebeple insanları düşük dozlardaki organofosfat pestisitlerin zararlarından korur. Bugün dünya çapında her yıl 220 000 insanın bu tür maddelere maruz kalmalarından dolayı hayatını kaybettiği tahmin edilmektedir. Pestisitlerin kullanıldığı çevrelerdeki insanlar daha yüksek risk altındadırlar. Ayrıca lipid metabolizmasındaki rolü ne olursa olsun düşük PON-1 seviyeleri vasküler hastalıklar için önemli bir risk faktörüdür (James and Deakin 2004; Jarvik *et al.* 2000, 2003a; Mackness and Mackness 2004; Mackness *et al.* 2001). PON enzimlerinin farmakokinetik rolleri önemlidir ve çok daha fazla çalışmayı gerektirmektedir. Bu açıklamalardan anlaşılmalıdır ki PON-1 seviyeleri hiçbir durumda önemsiz olamaz.

COX-1 birçok dokuda yapısal olarak bulunur ve hemoastatik ve sitoprotektif prostanooidlerin sentezinden sorumludur (gastrik mukoza, endotel, trombositler, böbrekler gibi). NSAİ'lerin yan etkilerinin birçoğu yapısal PG'lerin inhibisyonuna bağlı olarak gelişir. COX-2 enzimi ise enflamasyondan sorumlu PG sentezini sağlar. Lokositler, damar düz kas hücreleri, romatoid sinoviositleri ve beyin nöron hücrelerinde bulunur ve mitojenler, sitokinler ve endotoksinlerce stimüle edilir. Ancak beyin, böbrek, uterus ve hatta az da olsa GİS'de de yapısal olarak bulunmaktadırlar. Spesifik COX-2 inhibitörlerinde antitrombositler etki bulunmaz, çünkü TXA₂'nin sentezinden COX-1 sorumludur. COX-1 enzimini COX-2'ye göre daha fazla inhibe eden klasik NSAİİ'in yan etkilerinin daha fazla olması aşıkardır.

Antienflamatuvar, analjezik (ağrı kesici) ve antipiretik (ateş düşürücü) ilaçlar, çoğu organik asit yapısında olan, yapısal olarak genellikle heterojen olmalarına rağmen benzer terapötik ve yan etkileri gösteren ilaçlar grubudur. Aspirin bu grup ilaçların ilk örneğidir ve bu nedenle bunlar aspirin benzeri ilaçlar veya daha sıklıkla nonsteroid antienflamatuvar (NSAİ) ilaçlar olarak tanımlanır. Bu çalışmada COX enzimi için kullanılan ilaçlar da bu sınıfta yer almaktadırlar.

COX enzim tipleri üzerine olan etkileri bakımından NSAİİ, iki gruba ayrılırlar. İlk grup; vücutta mide, böbrekler ve plateletlerin fizyolojik fonksiyonlarını sürdürmesinde hayati önem taşıyan, yapısal bir enzim niteliğindeki COX-1 enzimini inhibe eden ilaçlardan oluşur. İkinci grupta ise, enflamatuvar süreçlerde rol oynayan, indüklenebilir nitelikteki COX-2 enziminin aktivitesini baskılayarak etki gösteren ilaçlar bulunur (Ely, 2003).

Her ne kadar bu grup ilaçların *in vitro* koşullarda çok değişik reaksiyonları inhibe ettikleri gösterilmişse de, bu etkileri ile antienflamatuvar etkileri arasındaki ilişki 1971 yılına kadar ortaya konamamıştır. Bu yıllarda gerek prostaglandinlerin enflamasyon patogenezisindeki rollerinin ve gerekse düşük konsantrasyonlardaki indometazin ile aspirinin prostaglandinlerin enzimatik oluşumunu inhibe ettiklerinin gösterilmesi, bu grup ilaçların antienflamatuvar etkilerini otakoidlerin biyosentezini inhibe ederek gösterdikleri hipotezinin doğmasına neden olmuştur. Nitekim, bu hipotez sonrası sürdürülen çalışmalar sonucunda enflamasyona neden olan uyarıların araşidonik asitten prostasiklin ve prostaglandinlerin sentezlerini artırdıkları ve bu sıradaki siklik endoperoksitler denilen PGG₂ ve PGH₂ maddelerinin, tromboksan A₂ ve trombosit aktivite edici faktör (PAF) oluşumunun arttığı ve bu maddelerin veya bunlardan oluşan stabil metabolitlerinin iltihap dokusunda varlığı gösterilmiştir (Anonim 2011)

Genel olarak prostanoidler olarak da adlandırılan siklooksijenaz ürünü eikozanoidler; prostaglandinler, prostasiklinler ve tromboksanlardır. Söz konusu bu ürünlerin ön maddeleri olan prostaglandin G ve H, araşidonik asitten siklooksijenaz enzimleri tarafından oluşturulur. Genel bir kural olarak diğer bazı otakoidler gibi prostaglandinlerin çoğu damar düz kaslarını gevşetirken, diğer yapıların düz kaslarını (barsak ve uterus gibi) kasarlar. Siklooksijenaz enziminin neden olduğu ürünler ve etkileri Çizelge 5.1’de verilmiştir.

Antienflamatuvar ilaçlar siklooksijenaz enzimini inhibe ederek enflamasyona aracılık eden siklooksijenaz ürünlerinin oluşumunu azaltırlar. Bu ilaçların antienflamatuvar etki güçleri ile siklooksijenaz enzimini inhibe etme güçleri arasında yakın bir korelasyon söz konusudur.

Çizelge 5.1. Araşidonik asit yolunda meydana gelen bazı ürünler ve etkileri

PGE ₁ PGE ₂	Vazodilatasyon (damar genişlemesi) Vasküler permeabilitede (geçirgenlik) artma Oksitosik (uterus düz kasını uyarıcı ve hareketliliği arttırıcı) etki Bronş düz kaslarında gevşeme Mide asit salgısında azalma Sitoprotektif (mide ve ince barsak mukozası üzerinde koruyucu) etki Duyusal afferent sinir liflerinde hiperaljezi (ağrıya karşı aşırı duyarlılık) Lökositlerin infiltrasyonu Trombosit agregasyonunun inhibisyonu Vazopressin etkisinde azalma Mast hücrelerin stabilizasyonu
PGD ₂	Vazodilatasyon Bronkokonstriksiyon (akciğer hava yollarındaki damarlarda daralma) Duyusal afferent sinir liflerinde hiperaljezi
PGF _{2α}	Ven (toplardamar) ve venüllerde (en ince toplardamar) büzülme Oksitosik etki Luteolizis Bronkokonstriksiyon Vazodilatasyon Trombosit agregasyonunda inhibisyon
Tromboksan A ₂	Vazokonstriksiyon (damar daralması) Trombosit agregasyonunda stimülasyon Vasküler permeabilitede artma

NSAİ ilaçların etki güçlerinin hemen hemen birbirine yakın olmasına karşın yan etki profillerinde belirgin farklılık bulunması, bu grup ilaçların antienflamatuvar etkilerine aracılık eden siklooksijenaz enziminin farklı izoformlarının bulunabileceği düşüncesini doğurmuştur. Nitekim 1990'lı yılların başında siklooksijenaz (COX) enziminin en az iki formunun olduğu ortaya konmuştur. Bunlardan COX-1 konstitütif bir enzimdir, pek çok hücrede devamlı sentez edilir ve bulunur. Prostaglandinlerin ve tromboksanın fizyolojik etkilerinden, COX-1 tarafından sentez edilen prostanoidler sorumludur. COX-2 izoformu ise iltihap hücreleri ve diğer bazı hücrelerin interlökin-1, TNF ve benzeri iltihap mediyatörleri ve büyüme faktörleri tarafından aktivasyonu sonucu indüklenir. COX-2, aktivasyon yokluğunda sentez edilemez ve bu nedenle aktivite gösteremez. Son yıllarda yapılan çalışmalar COX-1 ve COX-2 izoformlarının yapısal olarak benzerliklerinin % 60 olduğunu ve her iki izoformun da araşidonik asitten

prostaglandinleri oluşturma güçlerinin aynı olduğunu ortaya koymuştur. Diğer taraftan bu iki izoformun substrat spesifikleri arasında farklılık söz konusudur: COX-1'in 20:4 serbest yağ asitlerine olan spesifikliği 20:3 yağ asitlerinden daha fazladır. Buna karşın COX-2, C18 ve C20 karboksilik asitlere eşit spesifiklik gösterir.

COX-1 mide asit sekresyonunu azaltarak, mukus tabakasının kalınlığının azalmasını önler, ayrıca bikarbonat sekresyonunu stimule ederek ve mukozal kan akımını iyileştirerek GİS mukozasının korunmasını sağlar (Tegeder *et al.* 2000; Hawkey 2000; Takeuchi 2002). PGE₂ gastrik epitelyal hücrelerde cAMP yi aktive ederek mukus salgısını artırır (Tani *et al.* 2002).

Rofekoksibin COX-2'yi COX-1'e kıyasla 800 kez daha fazla inhibe ettiği bilinmektedir (Kayaalp 1998). Rofekoksib COX enzim fonksiyonlarına dayanarak ilaçların GİS yan etkilerini azaltmak için geliştirilmiş analjezik, antiinflamatuar ve antipiretik etkili bir ilaçtır. Çok sayıda çalışma bu ilaçların (COX-2 selektif inhibitörlerin) mide dokusunda hasar oluşturmadığını ve hastalar tarafından GİS etkileri bakımından daha iyi tolere edildiğini göstermiştir (Buttgereit *et al.* 2001). COX-1'i COX-2'ye göre daha fazla inhibe eden ilaçlar başta indometazin olmak üzere naproksen, ibuprofen ve diğer NSAİİ'ler, gastrik dokuda daha fazla hasara yol açarlar (Laudanno *et al.* 2000). Çalışmamızda da metotreksat, metilprednisolon sodyum süksinat ve azatioprin ilaçları COX-1 enzimini güçlü bir şekilde inhibe ettikleri bulunmuştur.

NSAİİ'lerin antiinflamatuar etkilerinden COX-2, GİS yan tesirlerinden ise COX-1 enzim inhibisyonunun sorumlu olduğu ileri sürülmektedir (Zhao *et al.* 2001). COX-2'nin çeşitli büyüme faktörleri, proinflamatuar sitokinler, endotoksinler, mitojenik ajanlar, proinflamatuar ajanlar ve tümör ajanları tarafından indüklenmesi bu enzimin inflamasyon ve kanser gibi patolojik olayların oluşmasında rol aldığını göstermektedir (Mitchel *et al.* 1994; Vane *et al.* 1994; Siegle *et al.* 1998). Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar COX-2 nin gastrik doku, böbrek, uterus epiteli, insan miyometriyumu ve fetal membranlarda, göz ve beyinde fizyolojik rollere sahip olduğunu ifade etmektedir (Krötz *et al.* 2005).

PGI₂ ve TXA₂ fizyolojik vasküler homeostazın regülasyonunda rol alan en önemli iki prostanoiddir (Krötz *et al.* 2005). Selektif COX-2 inhibitörleri vasküler PGI₂ sentezini azaltarak protrombotik ve antitrombotik eikosanoidler arasındaki dengeyi bozabilmektedirler. COX-1 inhibitörlerinin TXA₂'yi inhibe edici etkisinin aksine selektif COX-2 inhibitörleri böyle bir antitrombotik özelliğe sahip değildirler. Bu yüzden protrombotik TXA₂'nin inhibe edilmeyip, antitrombotik PGI₂'nin inhibisyona maruz kalması trombotik kardiovasküler problemlere yol açabilir (Mukherjee 2002; DeMaria and Weir 2003; Borer and Simon 2005; Gaddi *et al.* 2004). Bu nedenle COX-2 selektif inhibitörlerle tedavi edilen hastaların tedavilerine düşük doz aspirin (antitrombotik) ilave edilmesinin trombotik kardiovasküler problem riskini azaltacağı ifade edilmektedir (DeMaria and Weir 2003; Borer and Simon 2005). Rofekoksibin uzun süreli kullanımı sonucunda gözlenen ciddi tromboembolik yan etkilerin artan insidansı nedeniyle bugün Rofekoksib (Vioxx) piyasadan çekilmiştir (Patrignani *et al.* 2005). Bugün artık kesin olarak bilinmektedir ki böbrekte hem COX-1 hem de COX-2 izoenzimleri yapısal formda mevcuttur. Bunun sonucunda selektif COX-2 inhibitörlerinin nonselektif NSAİİ'ler ile benzer yan etkilere sahip olduğu düşünülmektedir.

Böbrekte en önemli role sahip PG'ler PGE₂ ve PGI₂'dir. PGE₂ Henle kıvrımının çıkan kolunda sodyum reabsorpsiyonunu azaltır. PGI₂, renin salınımını stimüle eder ve aldosteron düzeyi artar. Aldosteron distal nefronda sodyum reabsorpsiyonunu ve potasyum sekresyonunu artırır. PGI₂ ayrıca renal kan akımını ve glomerüler filtrasyon hızını (GFR) düzenleyen güçlü bir vazodilatördür. Renal PG'lerin fonksiyonları ve fizyolojik etkileri incelendiğinde, bunların sentezlerinin inhibisyonunun doğuracağı sonuçlar tahmin edilebilir. PGE₂'nin inhibisyonu sodyum tutulumuna neden olur ve bunun sonucunda kilo alma, periferik ödem ve nadiren kongestif kalp yetmezliği görülebilir. Sodyum tutulumundan dolayı kan basıncı artabilir. Bu durum özellikle antihipertansif tedavi gören hipertansiyonlu kişilerde sıklıkla gözlenir. PGI₂'nin inhibisyonu hiperkalemiye yol açabilir veya NSAİİ'lerin renal yan etkileri bakımından risk altındaki hastalarda akut renal yetmezlikle sonuçlanabilir (Brater 2002).

COX enziminin en azından iki izoformunun olduğunun gösterilmesi, antienflamatuvar ilaçların bu formlara karşı selektiflik derecelerinin incelenmelerine, COX-2'yi inhibe eden ve COX-1'i etkilemeyen veya minimum derecede etkileyen, dolayısı ile COX-1 inhibisyonuna bağlı olarak meydana gelen yan tesirleri göstermeyen yeni antienflamatuvar ilaçların geliştirilmesi çabasına yol açmıştır. Bilinen NSAİ'nin COX-2 ve COX-1'i inhibe etme güçleri ile ilgili yapılan çalışmalar, COX-2/COX-1 inhibisyon oranı düşük olan ilaçların yan etki profillerinin diğerlerine göre daha düşük olduğunu ortaya koymuştur. Kobay makrofaj modelinde yapılan bir çalışmada meloksikamın COX-2/COX-1 oranı 0,33 iken, bu değer diklofenak için 2,2, piroksikam için 33, indometazin için 30 ve tenidap için ise 122 bulunmuştur. Yukarıdaki tablodan da anlaşılacağı gibi, halen kullanılan ilaçların COX-1 ve COX-2'ye selektifliklerinin, etkinin incelendiği yere göre büyük değişiklik gösterdiğini ortaya koymaktadır. Bu nedenle söz konusu oranla ilgili değerlendirmeler yapılırken, deney koşulları ve enzim aktivitelerinin ölçüldüğü yerler göz önünde bulundurulmalıdır (Anonim 2011).

Görüldüğü gibi PON-1 enzimi ve COX-1 enzimi canlılar için hayati bir önem taşımaktadır ve inhibisyonu durumunda hayati tehlike doğuran sonuçlar ortaya çıkabilmektedir. Dolayısıyla yaptığımız bu çalışmanın önemi gayet açıktır.

Bu çalışmada insan serum PON-1 enziminin ve insan trombositlerinden COX-1 enziminin kromatografik metotlar denenerek saflaştırılması, bazı antibiyotik ve ilaçların bu enzimler üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada PON-1 enzimin saflaştırılması işlemi i) serum numuneleri için amonyum sülfat çöktürmesi, ii) elde edilen numuneler için iyon değişim ve jel filtrasyon kromatografisi yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

COX-1 enzimi için ise afinite kromatografisi yöntemi kullanılmıştır. Bütün saflaştırma işlemleri sırasında sıcaklık +4°C'de tutulması gerektiğinden işlemler soğuk ortamda gerçekleştirilmiştir. Böylece ısının sebep olacağı enzim aktivitesindeki kaybın önüne geçilmiştir.

Bilindiği gibi enzimleri saflaştırmak oldukça zor bir işlemdir. Enzimler protein yapısındaki makromoleküller olduklarından şartların değişmesine karşı oldukça hassastırlar. Bu yüzden bir çözeltideki enzim varlığı, enzimin etki ettiği substrat molekülü veya reaksiyon sonucu oluşan ürün ya da enzimatik reaksiyona aracılık eden diğer parametreler üzerinden tespit edilmektedir. Enzimlerin aktivitesi üzerinde etkili olan faktörler arasında, substrat konsantrasyonu, enzim konsantrasyonu, pH, sıcaklık, allosterik etkiler, iyonik şiddet, hormonlar ve bazen amino asitler, inhibitör veya aktivatörlerin varlığı sayılabilir.

HDL ile olan sıkı ilişkisinden dolayı PON-1'i saflaştırmak oldukça güç olmuştur. Birkaç farklı araştırmacı grubu tarafından gerçekleştirilen ilk girişimlerde değişik kaynaklardan PON-1'in saflaştırılması esnasında arilesteraz ve paraoksonaz aktivitesi kullanılmıştır (Choi and Forster 1967a, b; Don *et al.* 1975; Kitchen *et al.* 1973; Mackness *et al.* 1988; Main 1960; Wilde and Kekwick 1964; Zimmerman *et al.* 1989). Sonunda 1991 yılında tavşan ve insan PON-1'lerinin saflaştırıldığı rapor edilmiştir. Her iki raporda PON-1'in hem paraokson hem de fenilasetatı hidroliz ettiğini belirtmiştir.

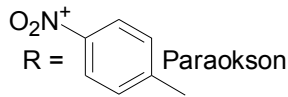
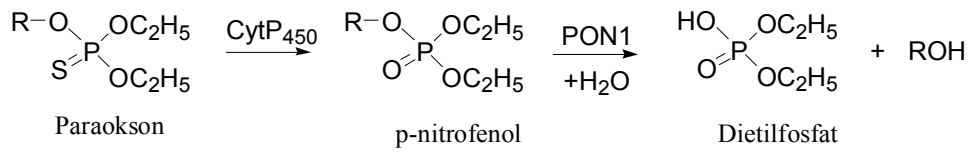
Siklooksigenaz enzimini insan trombositlerinden saflaştırmak da oldukça güç olmuştur. Bunun sebebi siklooksigenazın kararsız bir enzim olması ve stabilitesinin olmamasıdır. Stabilitesini sağlamak için kullanılan tampon çözelti içerisine fenol ve β -merkaptoetanol katılmıştır. Aktivite kaybını önlemek için ise tüm işlemler soğuk (buzlu) ortamda gerçekleştirilmiştir.

Gan ve arkadaşları serum PON-1'in 43.000 daltonluk molekül kütesine sahip olduğunu ve toplam kütenin %15,8'lik kısmını üç adet karbohidrat zincirinin oluşturduğunu keşfetmiştir. Tavşan PON-1 enziminin saflaştırılması çalışmasında Furlong *et al.* (1991), 35 kDa ve 38 kDa'luk iki bant elde etmişler ve bu bantları jelden kesip tekrar yürüttüklerinde 43 ve 48 kDa'luk iki tane zayıf bant elde etmişlerdir. Aynı durum insan PON-1'i için de gözlenmiştir. Bu durum yüksek molekül kütesine ait olan bantların kısmi olarak katlanmamış PON-1'i temsil ettiğini işaret etmektedir. Tavşan PON-1 enziminin aktif yapının devamlılığı için gerekli olan Ca^{+2} iyonuna daha sıkı bağlı

olduğu için insan PON-1'den çok daha stabil olduğunu belirtmişlerdir. İnsan PON-1 enziminin SDS-PAGE jeli üzerinde daha yavaş hareket etmesi muhtemelen daha az sıkı katlanmış protein yapısından kaynaklandığı düşüncesini ortaya çıkarmıştır (Kuo and La Du 1998).

Tavşan PON-1 enziminin jelle saflaştırılması, bu proteinin sekans analizini ve tavşan karaciğer cDNA kütüphanesinden PON-1 cDNA'sının izolasyonunda kullanılan oligonükleotid problemlerin dizaynını mümkün kılmıştır (Hassett *et al.* 1991). Tavşan PON-1 cDNA'sı insan karaciğer cDNA kütüphanesinden insan cDNA klonlarının izolasyonu için prob olarak kullanılmıştır. Karakterize edilmiş insan cDNA klonları, iki aminoasit polimorfizmini göstermiştir (L55M ve Q192R). İnsan ve tavşanda nükleotid ve aminoasit sekanslarının %85'ten fazla oranda benzer olduğu belirtilmiştir (Adkins *et al.* 1993; Hassett *et al.* 1991).

PON-1 aktivitelerin belirlenmesinde kullanılan yöntem aşağıdaki tepkimeden anlaşılmaktadır (Şekil 5.1). p-nitrofenolün oluşum hızı PON-1 aktivitesine bağlıdır ve spektrofotometrik olarak 412 nm'de absorbanstaki artışın izlenmesi ile belirlenebilir (Renault *et al.* 2006).



Şekil 5.1. Paraoksonaz-1 enziminin ismini aldığı reaksiyon

COX-1 enziminin aktivitesini belirlemek de çok güç olmuştur. Bunun için spektrofotometrik yöntem denenmiş fakat başarılı olunamamıştır. Aktivite belirlemede enzim miktarının az olduğunu ve aktiviteyi koruyamadığımızı düşünerek hassas bir yöntem olan ELİSA yöntemini kullanmayı tercih ettik.

Enzimlerin saflığını kontrol etmek için sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yapılmıştır. Jelde tek bandın gözlenmesi ile insan serumundan elde edilen PON-1 enziminin ve insan trombositlerinden saflaştırılan COX-1 enziminin saf oldukları ispatlanmıştır (Şekil 4.2, Şekil 4.25).

Çalışmamızda insan serum PON-1 enzimi üzerinde inhibisyon etkilerini araştırmak üzere 5'i antibiyotik, 2 tanesi şeker hastalığı tedavisinde kullanılan ve 2 tanesi de romatoid artrit (RA) hastalığının tedavisinde kullanılan ilaçlar olmak üzere toplam 9 ilaç belirlenmiştir. COX-1 (koyun) ve insan trombositlerinden saflaştırılan COX-1 enzimi üzerinde inhibisyon etkilerini araştırmak üzere romatoid artrit (RA) hastalığının tedavisinde kullanılan ve non-steroid antiinflamatuvar etkisi olan 3 ilaç belirlenmiştir. PON-1 enzimi için seçilen antibiyotikler hekimler ile fikir alışverişinde bulunularak belirlenmiştir. Mümkün olduğu kadar sık kullanılan antibiyotikler tercih edilmiştir. COX-1 enzimleri için seçilen ilaçlar ise bu enzimlerin spesifik inhibitörleri olan non-steroid antiinflamatuvar ilaç grubunda olmalarına dikkat edilerek seçilmiştir. Bunun için son dönemlerde çok sık rastlanan romatoid artrit (RA) hastalığının tedavisinde sıklıkla kullanılan ilaçlar belirlenmiştir. Çalışmada insan serum PON-1 enzimi için seçilen antibiyotik ve ilaçların, COX-1 (koyun) ve insan trombositlerinden saflaştırılan COX-1 enzimi için seçilen ilaçların enzim üzerinde etkilerinin araştırıldığı hiçbir literatüre rastlanmamıştır.

İnsan trombositlerinden saflaştırılan COX-1 enzimi için ibufren ve meloksikam ilaçlarının da inhibisyonlarına bakıldı ve literatürle uyumlu olduğu gözlemlendi. Afinite kolonunda kullanılan ibufrenin de yüksek oranda COX-1 enziminin inhibitörü olduğu belirlendi. Bu sonuçtan da anlaşılacağı gibi kolonda yer alan ibufren sayesinde COX-1 enzimi kolona tutturuldu. Daha sonra uygun bir tampon çözeltiyle elimine edilerek saflaştırıldı.

İnsan serum PON-1 enzimi için yapılan inhibitör çalışmasında ilaçlar için yaklaşık sekiz farklı konsantrasyonda çalışmalar yapıldı ve elde edilen sonuçlara göre IC_{50} değerleri sırasıyla şu şekilde belirlendi: oksitetrasiklin hidroklorür ilacı için 0,15 mM,

metotreksat için 0,18 mM, pioglitazon hidroklorür için 0,22 mM, netilmisin sülfat için 3,39 mM, akarboz için 9,82 mM, linkomisin hidroklorür için 13,30 mM, klindamisin fosfat için 25,40 mM, penisilin G potasyum kristalize için 32,50 mM, streptomisin sülfat için 25,39 mM.

COX-1 (koyun) enzimi için yapılan inhibitör çalışmasında ilaçlar için yaklaşık dokuz farklı konsantrasyonda çalışmalar yapıldı ve elde edilen sonuçlara göre IC_{50} değerleri sırasıyla şu şekilde belirlendi: metotreksat ilacı için 18,73 μ M, metilprednisolon sodyum süksinat ilacı için 21,66 μ M ve azatioprin ilacı için 12,60 μ M.

İnsan trombositlerinden saflaştırılan COX-1 enzimi için yapılan inhibitör çalışmasında ilaçlar için yaklaşık dokuz farklı konsantrasyonda çalışmalar yapıldı ve elde edilen sonuçlara göre IC_{50} değerleri sırasıyla şu şekilde belirlendi: metotreksat ilacı için 12 μ M, metilprednisolon sodyum süksinat ilacı için 30 μ M ve azatioprin ilacı için 25 μ M.

Yukarıdaki COX-1 enzimleri için bulunan IC_{50} değerleri kıyaslandığında enzim kaynaklarının farklı olmasına karşın hesaplanan değerlerin birbirleriyle uyumlu oldukları gözlemlendi.

Genel olarak ilaç ve kimyasal maddelerin enzimler üzerindeki inhibisyon etkileri IC_{50} (enzimin aktivitesini %50 inhibe eden ilaç konsantrasyonu) değeri olarak verilmektedir. Kinetik çalışmalar sırasında enzim aktivitesini inhibe eden antibiyotik ve ilaçların IC_{50} değerleri de belirtilmiştir. Bilindiği gibi IC_{50} değeri küçük olan inhibitörün inhibisyon etkisi daha yüksektir. Bu sonuçlara göre PON-1 enzimi için kullanılan antibiyotik ve ilaçların enzim üzerindeki inhibisyon etkilerinin büyükten küçüğe doğru sıralanması; oksitetrasiklin hidroklorür > metotreksat > pioglitazon hidroklorür > netilmisin sülfat > akarboz > linkomisin hidroklorür > streptomisin sülfat > klindamisin fosfat > penisilin G potasyum kristalize şeklindedir.

COX-1 (koyun) enzimi için kullanılan ilaçların enzim üzerindeki inhibisyon etkilerinin büyükten küçüğe doğru sıralanması; azatioprin > metotreksat > metilprednisolon sodyum süksinat şeklindedir.

İnsan trombositlerinden saflaştırılan COX-1 enzimi için kullanılan ilaçların enzim üzerindeki inhibisyon etkilerinin büyükten küçüğe doğru sıralanması; metotreksat > azatioprin > metilprednisolon sodyum süksinat şeklindedir.

Çalışmada insan serum PON-1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren ilaçlar için K_i sabitlerinin belirlenmesi işleminde Lineweaver-Burk grafikleri kullanıldı (Segel 1975, Telefoncu 1986). Sonuçların hassas bulunabilmesi için her inhibitörlü çalışma için 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri elde edilmiştir (Şekil 4.13 – Şekil 4.21). Grafik çiziminde Microsoft-Excel programından faydalanılmıştır.

K_i sabiti küçük olan inhibitörün enzime ilgisi büyük olduğundan dolayı enzimin katalitik aktivitesi üzerine inhibisyon etkisinin büyük olacağı bilinmektedir. İnsan serum PON-1 enzimi için Çizelge 4.2’de verilen K_i değerlerine göre küçükten büyüğe doğru antibiyotik ve ilaçların sıralanışı; oksitetrasiklin hidroklorür > metotreksat > pioglitazon hidroklorür > netilmisin sülfat > akarboz > linkomisin hidroklorür > klindamisin fosfat > penisilin G potasyum kristalize > streptomisin sülfat şeklindedir. Bu sonuçlara göre en yüksek inhibisyon etkisine sahip olan antibiyotik türü olan oksitetrasiklin hidroklorür ilacıdır. Oksitetrasiklin hidroklorür ilacında bulunan çok sayıda hidroksil ve amino gibi elektronegatif grupların etkili bir inhibisyona sebep olduğunu düşünmekteyiz. Buradan vardığımız sonuç PON-1 enziminin klor, amino ve hidroksil gruplarına karşı hassas olduğu ve bu grupları serbest olarak ihtiva eden moleküllerin PON-1 enzimi için potansiyel inhibitör olabileceğidir.

K_i değerlerine göre yapılan sıralama IC_{50} değerleri ile ilgili yapılan sıralama ile hemen hemen aynıdır. Oksitetrasiklin hidroklorür ilacı için üç sabit inhibitör konsantrasyonunda hesaplanan K_i sabitlerinin ortalaması $0,20 \pm 0,02$ mM, metotreksat için $0,26 \pm 0,07$ mM, pioglitazon hidroklorür için $0,26 \pm 0,07$ mM, netilmisin sülfat için

3,73 ± 0,33 mM, akarboz için 13,10 ± 1,30 mM, linkomisin hidroklorür için 18,30 ± 13,00 mM, klindamisin fosfat için 35,80 ± 6,40 mM, penisilin G potasyum kristalize için 54,70 ± 4,20 mM, streptomisin sülfat için 56,30 ± 26,60 mM olarak bulundu. Çizilen Lineweaver-Burk grafikleri yardımıyla K_i sabitleri hesaplanarak inhibitörlerin inhibisyon tipleri belirlenmiştir. Buna göre oksitetrasiklin hidroklorür ve penisilin G potasyum kristalize antibiyotikleri enzimi yarışmalı olarak inhibe ettikleri bulunmuştur. Bunun sebebinin bu moleküllerin yapısında bulunan ester gruplarından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Çünkü PON-1 enzimi esteraz aktivitesi göstermektedir ve bu inhibitörler aktif bölgeye bağlanma konusunda substratla yarışma içerisindedir. Akarboz ve metotreksat yarı yarışmalı inhibisyon gösterirken, netilmisin sülfat, linkomisin hidroklorür, streptomisin sülfat, klindamisin fosfat ve pioglitazon hidroklorür yarışmasız inhibisyon göstermiştir. Bu inhibitörler enzimin aktif bölgesi dışında bir bölgeye bağlanarak inhibisyon etkisi gösterirler.

Son yıllarda PON-1 enzimi ve ilaçlar arasındaki etkileşimleri içeren çalışmalar yapılmaktadır. Örneğin daha önceki grup arkadaşlarımızın çalışmasında lornoksikam, indometazin, tenoksikam, diklofenak sodyum, ketoprofen ve linkomisin analjezik ilaçlarının insan serum PON-1 aktivitesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Analjeziklerin de PON-1 enzimini düşük dozlarda inhibe ettiği gözlenmiştir (Ekinci and Beydemir 2008).

Yine grup arkadaşlarımız tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada intravenöz anestezi ilaçlarının PON-1 enzimi üzerine etkileri araştırılmış ve anestezi ilaçlarının serum PON-1 enzimini düşük dozlarda *in vitro* ve *in vivo* olarak inhibe ettiği gözlenmiştir (Alicı *et al.* 2008). Benzer şekilde başka bir çalışmada lipid seviyesini düşürücü bir ilaç olan simvastatinin serum PON-1 aktivitesi üzerine etkileri araştırılmıştır. Çalışmada PON-1 aktivitesinin simvastatin tedavisine bağlı olarak arttığı gözlenmiş ve simvastatinin antioksidan özelliklere sahip olabileceği belirtilmiştir (Tomas *et al.* 2000). Diğer bir çalışmada gentamisin sülfat ve sefazolin sodyum ilaçlarının insan serum PON-1 enzimini doz ve zaman bağımlı olarak inhibe ettiği belirtilmiştir (Sinan *et al.* 2006). Yine başka bir çalışmada teikoplanin, rifamisin, tobramisin, seftriakson sodyum,

sefuroksim sodyum, seftazidim pentahidrat, ornidazol, amikasin antibiyotikleri ve Pb^{+2} , Cr^{+2} , Fe^{+2} , Zn^{+2} metal iyonları için IC_{50} değerleri ve K_i sabitleri hesaplanarak inhibisyon tipleri belirlenmiştir (Ekinci 2009).

PON-1 enzimi aktivitesi üzerine ilaç inhibisyonu ile ilgili çalışmaların az da olsa literatürde mevcut olduğu görülmektedir. Bununla birlikte, bilim adamları PON enzimlerinin oksidatif strese ve ksenobiyotiklerin (organizmaya yabancı madde) toksik etkilerine karşı koruyucu rolünün daha iyi anlaşılması için daha kapsamlı inhibisyon çalışmalarının gerekli olduğunu ifade etmektedirler. Bu bilgiler göz önüne alınırsa bu tez kapsamında yapılan çalışmaların önemi anlaşılmaktadır.

COX-1 enzim aktivitesi üzerine ilaç inhibisyonu ile ilgili çalışmalara bakıldığında ise hemen hemen tüm NSAİ ilaçlarıyla deneme yapılmıştır. İnhibisyon etkisi gösteren ilaçlarda seçici COX-2 inhibitörlerine bakılmıştır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar da hep bu yönde olmuştur. Seçici olarak COX-2 inhibisyonu yapan madde ve ilaçlarla denemeler yapılmaktadır. Giers ve arkadaşları izoenzim tekniği ile COX-2/COX-1 inhibisyon oranını Indometazinde 9, Naproksende 3, Ibuprofende 11 olarak bulmuşlardır. Başka bir çalışmada bu oran Indometazin'de 60/1, Ibuprofen'de 15/1 olarak verilmektedir (Anonim 2011). Son zamanlarda COX-2'yi inhibe eden COX-1'i inhibe etmeyen ilaçlar üzerinde çalışmalar yoğunlaşmıştır. Böylece yapısal COX-1 ürünlerinin tamamen inhibisyonu engellenmiş olur.

Bu çalışmada COX-1 enzimi için NSAİ ilaçlar grubuna dahil olmayan fakat antiinflammatuar etkisi olan ilaçları seçmeye çalıştık. Bundan sonraki amacımız ise; COX-2 enzimini saflaştırmak olacaktır. COX-1 enzimi için çalışmış olduğumuz ilaçlarla COX-2 inhibisyonu bakıp, COX-1 inhibisyonu ile COX-2 inhibisyonu arasındaki oranı belirlemek olacaktır. Farklı madde ve ilaçlarla da bu oranı hesaplayarak selektif COX-2 inhibitörleri belirlemeyi hedeflemekteyiz.

Sonuç olarak bu tez kapsamında;

1. İnsan serumundan PON-1 ve insan trombositlerinden COX-1 enzimi olmak üzere iki farklı enzimin saflaştırılması gerçekleştirilmiştir.
2. Her iki enzimde kaynaklarından saf halde elde edilmiş ve saflaştırma basamaklarından elde edilen sonuçların literatürle uyumlu olduğu tespit edilmiştir.
3. Çalışma sonucunda insan serum PON-1 enzimi %44,8 verimle 256,6 kat saflaştırılabilmektedir. Enzimin saflığı elektroforezle kontrol edilerek tek bant gözlenmiştir.
4. İnsan serumundan saflaştırılan PON-1 enzimi üzerine bazı antibiyotik ve ilaçların inhibisyon etkileri incelenmiştir. Bu amaçla oksitetrasiklin hidroklorür, netilmisin sülfat, linkomisin hidroklorür, klindamisin fosfat, penisilin G potasyum kristalize, streptomisin sülfat antibiyotikleri ve metotreksat, akarboz ve pioglitazon hidroklorür ilaçları ile çalışılmıştır.
5. Bu antibiyotik ve ilaçlar için IC_{50} ve K_i değerleri hesaplanmış ve inhibisyon tipleri belirlenmiştir. IC_{50} değerleri sırasıyla şu şekilde belirlendi: oksitetrasiklin hidroklorür ilacı için 0,15 mM, metotreksat için 0,18 mM, pioglitazon hidroklorür için 0,22 mM, netilmisin sülfat için 3,39 mM, akarboz için 9,82 mM, linkomisin hidroklorür için 13,30 mM, klindamisin fosfat için 25,40 mM, penisilin G potasyum kristalize için 32,50 mM, streptomisin sülfat için 25,39 mM. K_i sabitlerinin ortalaması ise şu şekilde belirlendi: oksitetrasiklin hidroklorür için $0,20 \pm 0,02$ mM, metotreksat için $0,26 \pm 0,07$ mM, pioglitazon hidroklorür için $0,26 \pm 0,07$ mM, netilmisin sülfat için $3,73 \pm 0,33$ mM, akarboz için $13,10 \pm 1,30$ mM, linkomisin hidroklorür için $18,30 \pm 13,00$ mM, klindamisin fosfat için $35,80 \pm 6,40$ mM, penisilin G potasyum kristalize için $54,70 \pm 4,20$ mM, streptomisin sülfat için $56,30 \pm 26,60$ mM. İnhibisyon çalışmaları sonucunda bu antibiyotik ve ilaçların düşük dozlarda PON-1 enzimini inhibe ettiği gözlenmiştir. PON-1 enziminin aktivitesinin azalması bazı durumlarda hayati tehlike doğuran sonuçlara neden olabilir. Özellikle organofosfatlara maruz kalan insanlarda ve vasküler hastalık riski olan insanlarda bu enzimin aktivitesinin değişmemesi gerekmektedir. Bu nedenle bu enzimin hangi maddeler tarafından inhibe edildiğinin araştırılması önemlidir.

6. Ayrıca enzimin serbest klor, amino ve hidroksil grubu içeren moleküllere karşı hassas olduğu önerilmiştir. Bu da enzimle ilgili yapısal ve kinetik çalışmalar için önemlidir. Bu bulgulardan, yaptığımız çalışmaların literatüre önemli katkılarda bulunduğu ve PON-1 enzimi ile ilgili ileriki çalışmalara ışık tutacağı açıkça görülmektedir.

7. EIA yöntemi kullanılarak "COX Activity Assay Kit" ile COX-1 (koyun) enzimi üzerine bazı ilaçların inhibisyon etkileri incelenmiştir. Bu amaçla metotreksat, metilprednisolon sodyum süksinat ve azatioprin ilaçları ile çalışılmıştır. Bu ilaçlar için IC_{50} değerleri hesaplanmıştır. IC_{50} değerleri sırasıyla şu şekilde belirlendi: metotreksat ilacı için 18,73 μ M, metilprednisolon sodyum süksinat ilacı için 21,66 μ M ve azatioprin ilacı için 12,60 μ M.

8. İnsan trombositlerinden afinite kromatografisi kullanılarak COX-1 enzimi saflaştırılmıştır. Enzimin saflığı elektroforezle kontrol edilerek tek bant gözlenmiştir.

9. İnsan trombositlerinden saflaştırılan COX-1 enzimi üzerine bazı ilaçların inhibisyon etkileri incelenmiştir. Bu amaçla COX-1 (koyun) enzimi üzerinde denenen ilaçlar seçilmiştir; metotreksat, metilprednisolon sodyum süksinat ve azatioprin. Bu ilaçlar için IC_{50} değerleri hesaplanmıştır. IC_{50} değerleri sırasıyla şu şekilde belirlendi: metotreksat ilacı için 12 μ M, metilprednisolon sodyum süksinat ilacı için 30 μ M ve azatioprin ilacı için 25 μ M.

10. İnhibisyon çalışmaları sonucunda bu ilaçların düşük dozlarda hem COX-1 (koyun) hem de insan trombositlerinden saflaştırılan COX-1 enzimini inhibe ettiği gözlenmiştir. Farklı kaynaklardan elde edilen COX-1 enzimi için denenen ilaçların benzer sonuçlar verdiği de gözlemlenmiştir.

11. NSAİİ'lerin bugün dünya üzerinde en fazla kullanılan ilaçlar olduğu düşünülürse, bu ilaçların beraberinde getireceği yan etkilerin sonuçları da göz ardı edilmemelidir.

12. Selektif COX-2 inhibitörlerinin olumsuz yan etkileri bakımından nonselektif inhibitörler kadar tartışmalı ilaçlar olduğu artık bilinmektedir. Bu nedenle COX-1/COX-2 inhibisyon oranı optimal düzeyde olan ilaçların tercih edilmesi ve yeni NSAİİ'lerin geliştirilmesi yeni çözümler üretebilir.

KAYNAKLAR

- Abd-Allah, G.M., Mariee, A.D., 2008. Nitrite-mediated inactivation of human plasma paraoxonase-1: possible beneficial effect of aromatic amino acids. *Appl Biochem Biotechnol.* 150 (3):281-8.
- Adkins, S., Gan, K.N., Mody, M., and La Du, B.N., 1993, Molecular basis for the polymorphic forms of human serum paraoxonase/arylesterase: Glutamine or arginine at position 191 for the respective A or B allozymes. *Am. J. Hum. Genet.* 52, 598–608.
- Aharoni, A., Gaidukov L., Khersonsky O., McQGould S., Roodveldt C., Tawfik D.S., 2005. The ‘evolvability’ of promiscuous protein functions. *Nat. Genet.* 37, 73–76.
- Aldridge, W.N., 1953. *Biochem J.*, 53,117-124
- Alici, H.A., Ekinci, D., Beydemir, S., 2008. Intravenous Anesthetics Inhibit Human Paraoxonase-I (PON-1) Activity *In vitro* and *In vivo*. *Clin. Biochem.* 41, 1384-1390.
- Atamer, A., Bilici, A., Yenice, N., Selek, S., Ilhan, N., Atamer, Y., 2008. The importance of paraoxonase 1 activity, nitric oxide and lipid peroxidation in hepatosteatosis. *J Int Med Res.* 36(4):771-6.
- Aviram, M., Hardak, E., Vaya, J., Mahmood, S., Milo, S., Hoffman, A., Billicke, S., Draganov, D., Rosenblat, M., 2000. Human serum Paraoxonase (PON-1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions. *Circulation*, 101, 2510-17.
- Aviram, M., Rosenblat M., Billecke S., Eroglu J., Sorenson R., Bisgaier C.L., Newton R.S., La Du B.N., 1999. Human serum paraoxonase (PON-1) is inactivated by oxidised low density lipoprotein and reserved by antioxidants. *Free Radic Biol Med.* 26, 892–904
- Aviram, M., Rosenblat M., Bisgaier C.L., 1998. Paraoxonase inhibits high density lipoprotein (HDL) oxidation and preserves its functions: a possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest*, 101, 2215-57.
- Aviram, M., Rosenblat, M., Bisgaier, C.L., Newton, R.S., Primo- Parmo, S.L., La Du, B.N., 1998. Paraoxonase inhibits high density lipoprotein (HDL) oxidation and preserves its functions: a possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest.* 101:1581–1590.
- Azarsız, E., Sönmez E.Y., 2000. Paraoksonaz ve klinik önemi. *Türk Biyokimya Dergisi*, 25, 109-119.
- Blatter, M.C., James R.W., Messmer S., Barja F., and Pometta D., 1993. Identification of a distinct human high-density lipoprotein subspecies defined by a lipoprotein-associated protein, K-85: identity of K-85 with paraoxonase. *Eur. J. Biochem.* 211, 871–879.
- Blatter, M.C., James, R.W., Messmer, S., *et al.* 1993. Identification of a distinct human high-density lipoprotein subspecies defined by a lipoprotein associated protein, K-45. Identity of K-45 with paraoxonase. *European Journal of Biochemistry*, 211, 871-9.

- Boemi, M., Leviev, I., Sirolla, C., Pieri, C., Marra, M., James, R.W., 2001. Serum paraoxonase is reduced in type 1 diabetic patients compared to non-diabetic, first degree relatives; influence on the ability of HDL to protect LDL from oxidation. *Atherosclerosis*. 155:229–235.
- Bolten, W. 1998. Scientific rationale for specific inhibition of COX-2 *J. Rheumatol* 24 Supply 49: 6-8
- Boopathy, R., Balasubramanian, A.S. 1986. Purification and characterization of sheep platelet cyclo-oxygenase Acetylation by aspirin prevents haemin binding to the enzyme *Biochem. J.* 239, 371-377.
- Borer JS, Simon LS. 2005. Cardiovascular and gastrointestinal effects of COX-2 inhibitors and NSAIDs: achieving a balance. *Arthritis Res Ther.* 7:S14-S22.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248.
- Brater DC. 2002. Renal effects of cyclooxygenase-2-selective inhibitors. *J Pain Symptom Manage.* 23:S15-S20.
- Brealey, C.J., Walker C.H., and Baldwin B.C., 1980. A-esterase activities in relations to the differential toxicity of primiphos-methyl to birds and mammals. *Pestic. Sci.* 11, 546–554.
- Buettner, G.R., Oberley, L.W. 2005. *Free Radical and Radiation Biology and Medicine*, Spring. 77: 222
- Buttgereit F, Burmester GR, Simon LS. 2001. Gastrointestinal toxic side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs of and cyclooxygenase-2-specific inhibitors. *Am J Med.* 19: 13S-19S.
- Canales, A., Sanchez-Muniz, F.J., 2003. Paraoxonase something more than an enzyme. *Med Clin (Barc)*, 121, 537–48.
- Chemiluminescent Cyclooxygenase Activity Kit, assay designs, Catalog No. 907-003
- Choi, S.S., and Forster, T.L., 1967a, Triton X-155 as a stabilizer of bkoyun plasma arylesterase activity. *J. Dairy Sci.*, 50, 1088–1091.
- Claria, J. 2003. “Cyclooxygenase-2 Biology ” ; *Current Pharmaceutical Design*, 9: 2177-2190
- Costa LG. 2006. Current issues in organophosphate toxicology. *Clin Chim Acta.* Apr;366(1-2):1-13. Epub 2005 December 6. Review. PMID: 16337171
- Costa, L.G., Vitalone, A., Cole, T.B., and Furlong, C.E., 2005, Modulation of paraoxonase (PON-1) activity. *Biochem. Pharmacol.*, 69, 541–550.
- COX Activity Assay Kit, Cayman Chemical, Catalog No. 760151
- Dannhardt, G., Kiefer, W. 2001. “Cyclooxygenase inhibitors – current status and future prospects” *European Journal of Medicinal Chemistry* 36 109-126
- DeMaria AN, Weir MR. 2003. Coxibs-Beyond the GI Tract: Renal and Cardiovascular Issues. *J Pain Symptom Manage.* 25:S41-S49.
- Demircan, B. 2006. C1’in (3-benzoil-1-metil-4-fenil-4-piperidinol hidroklorür) COX aktivitelerive NO düzeylerine *in vivo* ve *in vitro* etkilerinin diğer NSAİ’lerle karşılaştırmalı olarak araştırılması. Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
- Don, M.M., Masters, C.J., Winzor, D.J., 1975, Further evidence for the concept of bkoyun plasma arylesterase as a lipoprotein. *Biochem. J.*, 151, 625–630.

- Draganov, D., Stetson, P.L., Watson, C.E., *et al.* 2000. Rabbit serum paraoxonase-3 is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 33435–33442.
- Durrington, P.N., Mackness, B., Mackness, M.J., 2001. Paraoxonase and atherosclerosis, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21, 473–480.
- Ekinci, D. 2009. İnsan Serumundan Paraoksonaz 1 Enziminin Saflaştırılması, Bazı Metal İyonların ve Antibiyotiklerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
- Ekinci, D., Beydemir, S., 2008. Effect of some analgesic on purified paraoxonase-1 from human serum. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.*
- Ely T. 2003. Conotoxins reveal significant psychopharmacological effectiveness: the future of pain management. *Journal of Psychology and Behavioral Sciences*, 17: 18-33.
- Enzyme Linked Immunosorbent Assay, <http://www.naweb.iaea.org/nafa/aph/public/ras-ai-ELISAI.pdf>. (15.03.2009)
- Fener, H. 1997. Differentiating among nonsteroidal antiinflammatory drugs by pharmacokinetic and pharmacodynamic profiles. *Semin Arthritis Rheum* 26 Supply 1: 28-33
- Ferretti, G., Bacchetti, T., Busni, D., Rabini, R.A., Curatola, G., 2004. Protective effect of paraoxonase activity in high-density lipoproteins against erythrocyte membranes peroxidation: a comparison between healthy subjects and type 1 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 89:2957–2962.
- Fiorucci, S., Meli, R., Bucci, M., Cirino, G. 2001. Dual inhibitors of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. A new avenue in anti-inflammatory therapy? *Biochem Pharmacol.* 62: 1433-1438.
- Funk, C.D., Funk, L.B., Kennedy, M.E., Pong, A.S., Fitzgerald, G.A. 1991. Human platelet/erythrocyte cell prostaglandin G/H synthase: cDNA cloning, expression, and gene chromosomal assignment. *FASEB J.* 5: 2304-12.
- Furlong, C.E., 2000. PON-1 status and neurologic symptom complexes in Gulf War veterans. *Genome Res.*, 10(2),153-5 Review.
- Furlong, C.E., Richter, R.J., Chapline, C., Crabb, J.W., 1991, Purification of rabbit and human serum paraoxonase. *Biochemistry*, 30,10133–10140.
- Gaddi A, Cicero AF, Pedro E. 2004. Clinical perspectives of antiinflammatory therapy in the elderly: the lipoxygenase (LOX)/cyclooxygenase (COX) inhibition concept. *Arch Gerontol Geriatr.* 38:201-212.
- Garavito, R.M., DeWitt, D.L. 1999. The cyclooxygenase isoforms: structural insights into the conversion of arachidonic acid to prostaglandins. *Biochim Biophys Acta*, 1441: 278-287.
- Garavito, R.M., Mulichak, A.M. 2003. The structure of mammalian cyclooxygenase. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 32: 183-206.
- Gardne, D. G. 2007. Greenspan's Basic & Clinical Endocrinology. New York: The McGraw-Hill Companies.
- Getz, G.S., Reardon C.A., 2004. Paraoxonase, a cardioprotective enzyme: continuing issues, *Curr. Opin. Lipidol*, 15, 261–267.

- Glikeson, G.S. 1997. Arachidonic acid derivatives, kinins, clotting factors, amines, nitric oxygen species. Primer on the rheumatic diseases 11th ed. Atlanta: Arthritis Foundation p. 58-63
- Gordon, D.J., Rifkind, B.M., 1989. High density lipoprotein – the clinical implications of recent studies. *N Engl J Med*, 321, 1311–6.
- Griswold, D.E., Adams, J.L. 1996. Constitutive cyclooxygenase (COX-1) and inducible cyclooxygenase (COX-2): rationale for selective inhibition and progress to date. *Med Res Rev* 16: 181-206
- Gürsu, M.F., Özdin M., 2002. Sigara içenlerde serum paraoksonaz (PON-1) aktiviteleri ile malondialdehit düzeylerinin araştırılması. *Fırat Tıp Dergisi*, 7, 732-737.
- Haeringen, N.J., Sorge, A.A., Delft, J.L., Carballosa Coré-Bodelier, V.M.W. 2000. Flurbiprofen and enantiomers in ophthalmic solution tested as inhibitors of prostanoid synthesis in human blood. *J Ocular Pharmacol*; 16:345-52
- Harel, M., Aharoni A., Gaidukov L., Brumshtein B., Khersonsky O., Meged R., Dvir H., Ravelli R.B., McCarthy A., Toker L., Silman I., Susman J.L., Tawfik D.S., 2004. Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and antiatherosclerotic enzymes. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 11, 412-419.
- Hassett, C., Richter, R.J., Humbert, R., Chapline, C., Crabb, J.W., Omiecinski, C.J., and Furlong, C.E., 1991, Characterization of cDNA clones encoding rabbit and human serum paraoxonase, the mature protein retains its signal sequence. *Biochemistry*, 30, 10141–10149.
- Hawkey CJ. 2000. Nonsteroidal antiinflammatory drug gastropathy. *Gastroenterology*. 119:521-535.
- Hay, C., de Balleroche, J. 1997. Carrageenan-induced hyperanalgesia is associated with increased cyclo-oxygenase-2 expression in spinal cord. *Neuroreport* 8: 1249-1251
- http://tip.erciyes.edu.tr/Ders_Notlari/Dahili_Tip/Ftr/Huseyin_Demir/NONSTERO%C4%B0D%20ANT%C4%B0ENFLAMATUAR%20%20%C4%B0LA%C3%87LAR.pdf (11.04.2011)
- <http://www.forumfokurtu.com/tip-biyoloji-farmakoloji/57118-nonstereoid-antienflamatuar-ilaclarin-etki-mekanizmalari-fas.html> (11.04.2011)
- <http://www.ilaclar.gen.tr/1412/streptomycineflakon-2-ilaclar/streptomycineflakon-2.html> (05.04.2011)
- <http://www.ilaclar.gen.tr/4274/prednol-l-ampul-2-ilaclar/prednol-l-ampul-2.html> (05.04.2011)
- <http://www.ilaclar.gen.tr/903/netromycineampul-ilaclar/netromycineampul.html> (05.04.2011)
- <http://www.ilaclar.gen.tr/934/lincocinflakon-ilaclar/lincocinflakon.html> (05.04.2011)
- Introduction to Antibodies - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), <http://www.millipore.com/immunodetection/id3/ELISA> (15.03.2009)
- Introduction to ELISAs, <http://www.piercenet.com/Proteomics/browse.cfm?fldID=F88ADEC9-1B43-4585-922E-836FE09D8403> (15.03.2009)
- James, R.W., Deakin S.P., 2004. The importance of high-density lipoproteins for paraoxonase-1 secretion, stability, and activity. *Free Radic. Biol. Med.*, 37, 1986– 1994.
- Jarvik, G.P., Hatsukami, T.S., Carlson, C., Richter, R.J., Jampsa, R., Brophy, V.H. *et al.*, 2003. Paraoxonase activity, but not haplotype utilizing the linkage

- disequilibrium structure, predicts vascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 231: 1465–1471.
- Jarvik, G.P., Rozek, L.S., Brophy, V.H., Hatsukami, T.S., Richter, R.J., Schellenberg, G.D., Furlong, C.E., 2000. Paraoxonase (PON-1) phenotype is a better predictor of vascular disease than is PON-1192 or PON-155 genotype. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* 20: 2441–2447.
- Jawad, Z., Paoli, M., 2002. Noval Sequences Propel Familiar Folds. *Structure*, 10, 447-454.
- Jouzeau, J.Y., Terlain, B., Abid, A., Nedelac, E., Netter, P. 1997. Cyclo-oxygenase isoenzymes. *Drugs* 53: 563-582.
- Juretic, D., Motejlkova, A., Kunovic, B., Rekec, B., Flegar-Mestric, Z., Vujic, L., Mesic, R., Lukac-Bajalo, J., Simeon-Rudolf, V., 2006. Paraoxonase/arylesterase in serum of patients with type II diabetes mellitus. *Acta Pharm.* 56:59–68.
- Karabina, S.A., Lehner, A.N., Frank, E., Parthasarathy, S., Santanam, N., 2005. Oxidative inactivation of paraoxonase- implications in diabetes mellitus and atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta.* 1725:213–221.
- Katori, M., Majima, M. 2000. Cyclooxygenase-2: its rich diversity of roles and possible application of its selective inhibitors. *Inflamm Res* 49: 367-392.
- Katzung, B.G. Seventh Edition, (ed) 1998. Nonsteroidal antiinflammatory drugs: Disease-modifying antirheumatic drugs: nonopioid analgesics: drugs used in gout. In *Basic and Clinical Pharmacology*.
- Kayaalp SO. 1998. Non steroidal antiinflammatuar ilaclar. In: Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Ankara: Hacettepe-Taş, 1026-1061.
- Kayaalp, S.O. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji s-960
- Keha, E.E., ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 2005. Biyokimya. Aktif Yayınevi, 91-95, 118 s, İstanbul.
- Kelso, G.J., Stuart W.D., Richter R.J., Furlong C.E., Jordan-Starck T.C., and Harmony J. A.K., 1994. Apolipoprotein J is associated with paraoxonase in human plasma. *Biochemistry*, 33, 832–839.
- Khersonsky, O., Tawfik, D.S., 2006. Chromogenic and fluorogenic assays for the lactonase activity of serum paraoxonases. *Chem. Biol. Chem.*, 7, 49–53.
- Kitchen, B.J., Masters C.J., and Winzor D.J., 1973. Effects of lipid removal on the molecular size and kinetic properties of bkoyun plasma arylesterase. *Biochem. J.*, 135, 93–99.
- Klemola, P., Freese, R., Jauhiainen, M., *et al.* 2002. Dietary determinants of serum paraoxonase activity in healthy humans. *Atherosclerosis*, 160, 425–32.
- Kraemer, S.A., Made, S.A., DeWitt, D.L. 1992. Prostaglandin endoperoxidase synthase gene structure: identification of the transcriptional start side and 5'-flanking regulatory sequences. *Arch Biochem Biophys* 293: 391-400
- Krötz F, Schiele TM, Klauss V, Sohn H. 2005. Selective COX-2 inhibitors and risk of myocardial infarction. *J Vasc Res.* 42:312-324.
- Kudchodkar, B.J., Lacko, A.G., Dory, L., *et al.* 2000. Dietary fat modulates serum paraoxonase-1 activity in rats. *J Nutr*, 130, 2427 – 33.
- Kujubu, D.A., Fletcher, B.S., Varnum, B.C. Lim, R.W., Herschman, H.R. 1991. TIS10, a phorbol ester tumor promoter inducible m RNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/ cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem.* 266: 12866-12872.

- Kuo, C.-L., La Du, B.N., 1998, Calcium binding by human and rabbit serum paraoxonases. Structural stability and enzymatic activity. *Drug. Metab. Dispos.* 26, 653–660.
- Kurumbail, R.G., Kiefer, J.R., Marnett, L.J. 2001. Cyclooxygenase enzymes: catalysis and inhibition. *Curr Opin Struct Biol*, 11: 752-760.
- Küfrevioğlu, Ö.İ. ve Çiftçi M, 2008. Kromatografiye giriş ders notları, Erzurum
- La Du, B., Aviram, N., Billecke, S., Navab, M., Primo-Parmo, S., Sorenson, R.C., Standiford, T.J., 1999. On the physiological role(s) of the paraoxonases. *Chem. Biol. Interact.* 119–120, 379–388.
- La Du, B.N., and Novais J., 1989. Human serum organophosphatase: biochemical characteristics and polymorphic inheritance in *Enzymes hydrolysing organophosphorus compounds* (Edited by Reiner E., Aldrige W. N. and Hoskin F. C. G.), 41–52 p, Ellis Horwood, Chichester.
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680.
- Laitinen, L.A., Laitinen A, Haahtela T., 1993. Airway mucosal inflammation even in patients with newly diagnosed asthma. *Am Rev Respir Dis.*, 147, 697-704.
- Laudanno OM, Cesolari JA, Esnarriaga J, San MP, Bedini OA. 2000. *In vivo* selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs and gastrointestinal ulcers in rats. *Dig Dis Sci.* 45:1359-1365.
- Lecomte, M., Laneuvile, O., Ji, C., DeWitt, D.L., Smith, W.L. 1994. Acetylation of human prostaglandin peroxide synthase-2 (cyclooxygenase-2) by aspirin. *J Biol Chem* 269: 13207-13215.
- Lee, L., Mukhtar, H., Bickers, D.R., Kopelovich, L., Athar, M. 2003. Cyclooxygenases in the skin: pharmacological and toxicological implications. *Toxicol Appl Pharmacol*; 192(3): 294-306.
- Letellier, C., Durou, M.R., Jouanolle, A.M., Le Gall, J.Y., Poirier, J.Y., Ruelland, A., 2002. Serum paraoxonase activity and paraoxonase gene polymorphism in type 2 diabetic patients with or without vascular complications. *Diabetes Metab.* 28:297–304.
- Li, W.-F., Costa, L.G., and Furlong, C.E., 1993, Serum paraoxonase status: a major factor in determining resistance to organophosphates. *J. Toxicol. Environ. Health*, 40, 337–346.
- Li, W.F., Furlong C.E., Costa L.G., 1995. Paraoxonase protects against chlorpyrifos toxicity in mice. *Toxicol Lett.*, 76, 219-226.
- Liu, Y., Mackness, B., Mackness, M., 2008. Comparison of the ability of paraoxonases 1 and 3 to attenuate the *in vitro* oxidation of low-density lipoprotein and reduce macrophage oxidative stress. *Free Radic Biol Med.*
- Mackness, B., Davies, G.K., Turkie, W., Lee, E., Roberts, D.H., Hill, E., Roberts, C., Durrington, P.N., Mackness, M.I., 2001. Paraoxonase status in coronary heart disease. Are activity and concentration more important than genotype? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21: 1451–1457.
- Mackness, B., Durrington P.N., Mackness M.I., 1998. Human serum Paraoxonase. *Gen Pharmacol*, 31, 329-336.
- Mackness, B., Durrington P.N., Mackness M.I., 2004. Human serum paraoxonase. *Gen Pharmacol*, 39, 56-66.

- Mackness, B., Macness M.I., Arrol S., Turkie W., Durrington P.N., 1998. Effect of the human serum paraoxonase 55 and 192 genetic polymorphisms on the protection by high density lipoprotein against low density lipoprotein oxidative modification. *FEBS Lett.*, 423, 57–60.
- Mackness, M., Mackness B., 2004. Paraoxonase 1 and atherosclerosis: is the gene or the protein more important? *Free Radic Biol Med.*, 37, 1317-1323.
- Mackness, M.I., Abbott C.A., Arrol S., and Durrington P.N., 1993(a). The role of highdensity lipoprotein and lipid-soluble antioxidant vitamins in inhibiting lowdensity lipoprotein oxidation. *Biochem. J.*, 294, 829–834.
- Mackness, M.I., and Walker C.H., 1988. Multiple forms of sheep serum A-esterase activity associated with the high-density lipoprotein. *Biochem. J.*, 250, 539–545.
- Mackness, M.I., Arrol S., Abbott C.A., and Durrington P.N., 1993(b). Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase. *Atherosclerosis*, 104, 129–135.
- Mackness, M.I., Arrol S., and Durrington P.N., 1991(a). Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett.*, 286, 152–154.
- Mackness, M.I., Arrol S.I., Mackness B., Durrington P.N., 1997. Alloenzymes of paraoxonase and effectiveness of high density lipoproteins in protecting low density lipoprotein against lipid peroxidation. *The Lancet.*, 349, 22.
- Mackness, M.I., Durrington P.N., 1995. HDL, its enzymes and its potential to influence lipid peroxidation. *Atherosclerosis*, 115, 243-53.
- Mackness, M.I., Harty D., Bhatnagar D., Winocour P.H., Arrol S., Ishola M., and Durrington P.N., 1991(b). Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolemia and insulin-dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis*, 86, 193–199.
- Mackness, M.I., Mackness B., Arrol S., Wood G., Bhatnagar D., Durrington P.N., 1997. Presence of paraoxonase in human interstitial fluid. *FEBS Letters*, 416, 377-380.
- Mackness, M.I., Mackness B., Durrington P.N., Connely P.W., Hegele R.A., 1996. Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Cur Opin Lipit.*, 7, 69-76.
- Main, A.R., 1956, The role of A-esterase in the acute toxicity of paraoxon, TEEP and parathion. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 34, 197–216.
- Main, A.R., 1960, The purification of the enzyme hydrolysing diethyl-p-nitrophenyl phosphate (paraoxon) in sheep serum. *Biochem. J.*, 74,10–20.
- Mallinckrodt, M., Geldmacher V., Hommel G., Dumbach J., 1979. On the genetics of the human serum paraoxonase (EC 3.1.1.2). *Hum Genet. Sep.*, 50(3), 313-26.
- Malmberg, A.B., Yaksh, T.L. 1992. Anti-nociceptive actions of spinal non steroidal anti-inflammatory agents on the formalin test in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 263: 136-145.
- Mancini, J.A., O'Neill, G.P., Baylay, C., Vickers, P.J. 1994. Mutation of serine 516 in human prostaglandin G/H synthase-2 to methionine or aspirin acetylation of this residue stimulates 15-R-HETE synthesis. *FEBS Lett* 342: 33-37.
- Mardini, I.A and FitzGerald, G.A. 2001. "Selective Inhibitors of Cyclooxygenase-2 : A Growing Class of Anti-Inflammatory Drugs" ; *Molecular Interventions* April, 1, 1, 30-38
- Marnett, L.J. 2000. Cyclooxygenase Mechanisms. *Curr Opin Chem Biol*, 4: 545-552.

- Maxey K., Johnson J., 2001. Detecting and Measuring Cyclooxygenases, in Cayman Chemical, Currents Issue 10, Spring.
- Mitchell JA, Belvisi MG, Akarasereenont P *et al.* 1994. Induction of cyclooxygenase-2 by cytokines in human pulmonary epithelial cells. *Br J Pharmacol.* 113:1008-1014.
- Mukherjee D. 2002. Selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors and potential risk of cardiovascular events. *Biochem Pharmacol.* 63: 817-821.
- Navab, M., Berliner, J.A., Watson, A.D., *et al.* 1996. The yin and yang of oxidaiton in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lymann Duff Memorial Lecture. *Arterioscler Thromb Vasc. Biol*, 16, 831–42.
- Needleman, P., Isakson, P.C. 1997. The discovery and function of COX-2 *J. Rheumatol* 24 Supply 51: 2-7
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2005. *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri*. Palme yarıncılık, Ankara.
- Ng, C.J., Wadleigh, D.J., Gangopadhyay, A., *et al.* 2001. PON2 is ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *J Biol. Chem*, 276, 44444–44449.
- Nishio, E., Watanabe Y., 1997. Cigarette smoke extract inhibits plasma paraoxonase activity by modification of the enzyme's free thiols. *Biochem Biophys Res Commun*, 236 (2), 289-293.
- Noll, C., Hamelet, J., Matulewicz, E., Paul, J.L., Delabar, J.M., Janel, N., 2008. Effects of red wine polyphenolic compounds on paraoxonase-1 and lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 in hyperhomocysteinemic mice. *J Nutr Biochem.* (In press).
- Oda, M.N., Bielicki, J.K., Berger, T., *et al.* 2001. Cystein substitutions in apolipoprotein A-I primary structure modulate paraoxonase activity. *Biochemistry*, 40, 1710-8.
- Okamoto, T., Hino, O. 2000. Expression of cyclooxygenase-1 and -2 mRNA in rat tissues tissue-specific difference in the expression of the basal level of mRNA. *Int J Mol Med.* 6: 455-7.
- Oktay, M. 2010. *Protein Saflaştırma Rehberi*. Aktif Yayınevi, Ankara
- Osiri, M and Moreland, L.W. 1999. "Specific Cyclooxygenase-2 Inhibitors : A New Choice of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug Therapy " ; *Arthritis Care and Research.* 12: 5, 351-362
- Ouellet, M., Percival, M.D. 1995. Effect of inhibitor time –dependency on selectivity towards cyclooxygenase isoforms. *Biochem J* 306: 247-251.
- Pasca, S.P., Dronca, E., Nemes, B., Kaucsár, T., Endreffy, E., Iftene, F., Benga, I., Cornean, R., Dronca, M., 2008. Paraoxonase 1 activities and polymorphisms in autism spectrum disorders. *J Cell Mol Med.* (In press).
- Patrignani P, Tacconelli S, Sciulli MG, Capone ML. 2005. New insights into COX-2 biology and inhibition. *Brain Res Rev.* 48:352-359.
- Pond, A.L., Chambers H.M., Chambers J.E., 1995. Organophosphate detoxification potential of various rat tissues via A-esterase and aliesterase activities. *Toxicol Lett*, 78, 245-252.
- Price, A.H., Fletcher, M. 1990. Mechanisms of NSAID- induced gastroenteropathy. *Drugs* 40 Supply 5: 1-11.

- Primo-Parmo, S.L., Sorenson, R.C., Teiber, J., *et al.* 1996. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON-1) is one member of a multigene family. *Genomics*, 33, 498-507.
- Reddy, S.T., Wadleigh, D.J., Grijalva, V., *et al.* 2001. Human paraoxonase-3 is an HDL associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*, 21, 542-547.
- Renault, F., Chabriere, E., Andrieu, J.P., Dublet, B., Masson, P., Rochu, D. 2006. Tandem purification of two HDL-associated partner proteins in human plasma, paraoxonase (PON-1) and phosphate binding protein (HPBP) using hydroxyapatite chromatography. *Journal of Chromatography B*, 836, 15–21
- Ribas, V., Sanchez-Quesada, J.L., Anton, R., *et al.* 2004. Human apolipoprotein A-II enrichment displaces paraoxonase from HDL and impairs its antioxidant properties: a new mechanism linking HDL protein composition and antiatherogenic potential. *Circ Res*, 95, 789-97.
- Robinson, D.R. 1997. Eicosanoids and related compounds. *Arthritis and allied conditions* 13 th edition p.515-528.
- Rome, L.H., Lands, W.E.H. 1975. Structural requirements for time- dependent inhibition of prostaglandin biosynthesis by anti-inflammatory drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72: 4863-4865.
- Rozenberg, O., Rosenblat M., Coleman R., Shih D.M., Aviram M., Paraoxonase (PON-1) 2003. Deficiency is associated with increased macrophage oxidative stress: studies in PON-1-knockout mice. *Free Radic. Biol. Med*, 34, 774–784.
- Rozenberg, O., Shih D.M., Aviram M., 2003. Paraoxonase 1 (PON-1) attenuates macrophage oxidative status: studies in PON-1 transfected cells and in PON-1 transgenic mice, *Atherosclerosis*, 181, 9–18.
- Rozenberg, O., Shih, S.D., Aviram, M. 2005. Paraoxonase 1 (PON-1) attenuates macrophage oxidative status: studies in PON-1 transfected cells and in PON-1 transgenic mice. *Atherosclerosis*. 181:9–1818.
- Sano, T., Hla, T., Maier, J.A.M., Crofford, L.J., Case, J.P., Maciag, T., *et al* 1992. *In vitro* cyclooxygenase expression in synovial tissues of patient with rheumatoid arthritis and osteoarthritis and rats with adjuvant and streptococcal cell wall arthritis. *J. Clin Invest* 89: 97-108.
- Schnermann, J., 1998. Juxtaglomerular cell complex in the regulation of renal salt excretion. *Am. J Physiol*. 274: R263-279.
- Segel, I.H., 1968. *Biochemical Calculations*, Inc, New York, p: 403.
- Seres, I., Paragh, G., Deschene, E., Fulop, T. Jr., Khalil, A., 2004. Study of factors influencing the decreased HDL associated PON-1 activity with aging. *Exp. Gerontol*, 39, 59-66.
- Shidfar, F., Ehrampshosh, E., Heydari, I., Haghghi, L., Hosseini, S., Shidfar, S., 2008. Effects of soy bean on serum paraoxonase 1 activity and lipoproteins in hyperlipidemic postmenopausal women. *Int J Food Sci Nutr*. (In press).
- Shih, D.M., Xia Y.R., Wang X.P., Miller E., Castellani L.W., Subbanagounder G., Cheroutre H., Faull K.F., Berliner J.A., Witztum J.L., Lusis A.J., 2000. Combined serum paraoxonase knockout/apolipoprotein E knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *J. Biol. Chem*. 275, 17527–17535.

- Siegle I, Klein T, Backmann JT, Saal JG, Nusing RM, Fritz P. 1998. Expression of cyclooxygenase-2 in human synovial tissue. *Arthritis Rheum.* 41:122-129.
- Silverstein FE, Faich G, Goldstein JL, Simon LS, Pincus T, Whelton A, *et al.* 2000. Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: the CLASS study: a randomized controlled trial. Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study. *JAMA*; 284:1247-1255.
- Sinan, S., Koçkar, F., Arslan, O., 2006. Novel purification strategy for human PON-1 and inhibition of the activity by cephalosporin and aminoglikozide derived antibiotics. *Biochimie*, 88, 565-574.
- Smith, K.F., Skelton, H. 2002. Arachidonic acid-derived bioactive lipids: their role and the role for their inhibitors in dermatology. *J Cutan Med Surg*; 6(3): 241-55.
- Smith, W.L., Meade, E.A., DeWitt, D.L. 1994. Interactions of PGH synthase isoenzymes-1 and-2 with NSAIDs. *Ann N Y Acad Sci* 744: 50-57
- Soran, N., Altindag, O., Cakir, H., Celik, H., Demirkol, A., Aksoy, N., 2008. Assessment of paraoxonase activities in patients with knee osteoarthritis. *Redox Rep.*13(5):194-8.
- Sorenson, R.C., Bisgaier, C.L., Aviram, M., *et al.* 1999. Human serum paraoxonase/arylesterase's retained hydrophobic N-terminal leader sequence associates with HDLs by binding phospholipids: apolipoprotein A-I stabilizes activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19, 2214-25.
- Spanger, R.S. 1996. Cyclooxygenase 1 and 2 in rheumatic diseases: implication of non steroidal antiinflammatory drug therapy. *Semin Arthritis Rheum* 26: 436-437.
- Sui, Z., Guan, J., Ferro, M.P., McCoy, K., Watcher, M., Murray, W., Singer, M., Steber, M., Ritchie, D.M and Argentieri, D.C. 2000. " 1,3-Diarylcycloalkanopyrazoles and Diphenyl Hyrazides as Selective Inhibitors of Cyclooxygenase-2 " ; *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 10. 601-604
- Takeuchi K, Kagawa S, Mimaki H, Aoi M, Kawauchi S. 2002. COX and NOS isoforms involved in acid-induced duodenal bicarbonate secretion in rats. *Dig Dis Sci.* 47:2116-2124.
- Tani S, Suzuki T, Kano S *et al.* 2002. Mechanisms of gastric mucus secretion from cultured rat gastric epithelial cells induced by carbachol, cholecystokinin octapeptide, secretion, and prostaglandin E2 . *Biol Pharm Bull.* 25:14-18.
- Tegeder I, Neupert W, Guhring H, Geisslinger G. 2000. Effects of selective and unselective cyclooxygenase inhibitors on prostanoid release from various rat organs. *J Pharmacol Exp Ther.* 292:1161-1168.
- Telefoncu, A., 1986. Temel ve uygulamalı Enzimoloji. Ege üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Yayını (Der), 59 s, İzmir.
- Tomás, M., Senti, M., Garcia-Faria, F., Vila, J., Torrents, A., Covas, M., Marrugat, J., 2000. Effect of simvastatin therapy on paraoxonase activity and related lipoproteins in familial hypercholesterolemic patients, *Arterioscl. Throm. Vas.* 20, 2113-2119.
- Tsuzura, S., Ikeda, Y., Suchiro, T., Ota, K., Osaki, F., Arie, K., Kumon, Y., Hashimoto, K., 2004. Correlation of plasma oxidized low-density lipoprotein levels to vascular complications and human serum paraoxonase in patients with type 2 diabetes. *Metabolism.* 53:297-302.

- Tuppo, E.E., Arias, H.R. 2005. The international journal of Biochemistry & Cell Biology ; 37: 289-305.
- Tward, A., Xia Y.R., Wang X.P., Shi Y.S., Park C., Castellani L.W., Lusic A.J., and Shih D.M., 2002. Decreased atherosclerotic lesion formation in human serum paraoxonase transgenic mice. *Circulation*, 106, 484–490.
- Uriel, J., 1961, Characterization of cholinesterase and other carboxylic esterases after electrophoresis and immunoelectrophoresis on agar. I. Application to the study of esterases of normal human serum. *Ann Inst Pasteur (Paris)*, 101, 104–119.
- Vane JR, Mitchell JA, Appleton I *et al.* 1994. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric oxide synthase in inflammation. *Proc Natl Acad Sci, USA.* 91:2046-2050.
- Verit, F.F., Erel, O., Celik, H., 2008. Paraoxonase-1 activity in patients with hyperemesis gravidarum. *Redox Rep.* 13(3):134-8.
- Verit, F.F., Verit, A., Ciftci, H., Erel, O., Celik, H., 2008. Paraoxonase-1 Activity in Subfertile Men and Relationship to Sperm Parameters. : *J Androl.* (In press).
- Wikipedi, <http://tr.wikipedia.org/wiki/Kemil%C3%BCminesans> (05.04.2011)
- Watson, A., Berliner, J.A., Hama, S.Y., La Du, B.N., Faull, K.F., Fogelman, A.M., and Navab, M. 1995. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase – inhibition of the biological activity of minimally oxidized lowdensity lipoprotein. *J. Clin. Invest.*, 96, 2882–2891.
- Wilde, C.E., and Kekwick, R.G.O. 1964. The arylesterases of human serum. *Biochem. J.*, 91, 297–307.
- Wilton, T. 2004. “Cyclooxygenase-2 Inhibitors : Do they have a role in emergency department prescribing ?” ;*Emergency medicine Australasia.* 16: 65-73
- Xie, W.L., Chipman, J.G., Rubotson, D.L., Ericson, R.L., Simons, D.L. 1991. Expression of amitogen-reponsive gene encoding prostaglandin synthase in regulated by Mrna spling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 2692-2696
- Yılmaz, B. 1999. *Hormonlar ve Üreme Fizyolojisi.* Ankara: Feryal Matbaacılık.
- Zhao SZ, Reynolds MW, Lejkowith J, Whelton A, Arellano FM. 2001. A comparison of renal-related adverse drug reactions between rofecoxib and celecoxib, based on the World Health Organization/Uppsala Monitoring Centre safety database. *Clin Ther.* 23:1478-1491.
- Zimmerman, J.K., Grothusen, J.R., Bryson, P.K., and Brown, T.M. 1989. Partial purification and characterization of paraoxonase from rabbit serum, In: *Enzymes Hydrolysing Organophosphorus Compounds.* E.Reiner, W.N.Aldridge, F.C.G. Haskin, eds., Ellis Horwood Ltd., Chichester: pp. 128–142.

ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Erzincan'da doğdu. İlk öğrenimini Ankara'da, orta ve lise öğrenimini Erzurum'da tamamladı. 2000 yılında kazandığı Atatürk Üniversitesi Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi Kimya Öğretmenliği Bölümünden 2005 yılında bölüm birincisi olarak mezun oldu. 2006 yılında doktora eğitimine başladığı Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Bilim Dalı'nda, 2007 yılı mart ayında araştırma görevliliğine atandı ve 2012 yılında doktorasını tamamladı. Evli ve iki çocuk annesidir.