

T.C.
ERZİNCAN BİNALİ YILDIRIM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AMELİYAT SONRASI HASTALARA VERİLEN BAZI
ANTİBİYOTİKLERİN İNSAN SERUMUNDAN SAFLAŞTIRILAN
PARAOKSONAZ-I ENZİMİNİN AKTİVİTESİ ÜZERİNE *İN*
VİTRO ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

AYCAN YILMAZ

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Esra DİLEK

KİMYA
ANABİLİM DALI

ERZİNCAN

2018

Her Hakkı Saklıdır.

Kabul ve Onay Sayfası

Dr. Öğr. Üyesi Esra DİLEK danışmanlığında, Aycan YILMAZ tarafından hazırlanan bu çalışma 30.11.2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Kimya Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul oybirliği ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Murat ÇANKAYA

İmza:

Üye : Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

İmza:

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Esra DİLEK

İmza:

Yukarıdaki sonuç Enstitü Yönetim Kurulunun 07/01 / 2019 tarih ve 1./...1..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatih ERTUGAY
Enstitü Müdürü

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

Bilimsel Etiğe Uygunluk Sayfası

“Ameliyat Sonrası Hastalara Verilen Bazı Antibiyotiklerin İnsan Serumundan Safılaştırılan Paraoksanaz-I Enziminin Aktivitesi Üzerine *İn Vitro* Etkilerinin İncelenmesi ” isimli “Yüksek Lisans” tezim tarafımca intihal tespit programı ile incelenmiştir. Buna göre tezimde bilimsel etik ihlali ve intihal olarak nitelendirilebilecek herhangi bir durum olmadığını taahhüt ederim.

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir biçimde elde edildiğini; aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi beyan ederim. 30/11/2018


Aycan YILMAZ



ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

AMELİYAT SONRASI HASTALARA VERİLEN BAZI ANTİBİYOTİKLERİN İNSAN SERUMUNDAN SAFLAŞTIRILAN PARAOKSONAZ-I ENZİMİNİN AKTİVİTESİ ÜZERİNE *İN VİTRO* ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Aycan YILMAZ

Erzincan Binalı Yıldırım Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Esra DİLEK

Paraoksonaz (PON1; E.C.3.1.8.1), karaciğerde sentezlenen, arildialkilfosfataz olarak da adlandırılan, yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) ile ilişkili kalsiyum bağımlı A-esterazlar grubundan bir enzimdir.

Bu çalışmada PON1 enzimi, insan serumundan amonyum sülfat çöktürmesi (%60-80 aralığında), DEAE-Sephadex A-50 iyon değişim kromatografisi ve Sephadex G-200 jel filtrasyon kromatografisi basamakları kullanılarak, %47,5 verimle yaklaşık 322,6 kat saflaştırıldı. Enzimin saflığı SDS poliakrilamid jel elektroforezi ile kontrol edilerek molekül kütlesi yaklaşık 43 kDa olarak belirlendi.

Ayrıca çalışmamızda insan serum PON1 enzimi aktivitesi üzerine ameliyattan sonra verilen bazı antibiyotiklerin (fosfomisin, sefiksim, sefuroksim, sefaklor monohidrat) *in vitro* şartlarda etkileri incelendi. İnhibisyon etkisi gösteren bu ilaçların IC₅₀ değerleri ve K_i sabitleri belirlendi. Düşük dozlarda farklı inhibisyon mekanizmaları ile enzimin aktivitesini inhibe ettiği görüldü. Bu antibiyotik ilaçlardan sefiksimin *in vitro* PON1 aktivitesini daha fazla düşürdüğü görüldü.

2018, 78 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Antibiyotikler, İnhibisyon, Paraoksonaz-I enzimi, Saflaştırma

ABSTRACT

Master Thesis

INVESTIGATION THE *IN VITRO* EFFECTS OF SOME ANTIBIOTICS GIVEN TO PATIENTS AFTER SURGERY ON PARAOXONASE-I ENZYME ACTIVITY PURIFIED FROM HUMAN SERUM

Aycan YILMAZ

Erzincan Binali Yıldırım University
Institute of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Asist. Prof. Dr. Esra DİLEK

Paraoxonase (PON1; E.C.3.1.8.1) is an enzyme from the group of calcium-dependent A-esterases associated with high-density lipoprotein (HDL), also called aryl dialkylphosphatase synthesized in the liver.

In this study, PON1 enzyme was purified from human serum with ammonium sulfate precipitation (in the range of 60-80%), DEAE-Sephadex A-50 ion exchange chromatography and Sephadex G-200 gel filtration chromatography steps to be approximately 322,6 fold with 47,5% yield. The purity of the enzyme was controlled by SDS polyacrylamide gel electrophoresis to determine the molecular mass of about 43 kDa.

In our study, the effects of some antibiotic drugs (fosfomycin, cefixime, cefuroxime, cefaclor monohydrate) given after surgery on human serum PON1 enzyme activity were investigated *in vitro*. IC₅₀ values and K_i constants of these drugs were determined. It was observed that inhibition of enzyme activity was effected by low inhibition mechanisms. It was observed that cefixim from these antibiotics decreased more *in vitro* PON1 activity.

2018, 78 Pages

Keywords: Antibiotics, Inhibition, Paraoxonase-I enzyme, Purification

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım süresince bilgisi, deneyimi ve yakın ilgisi ile bana her zaman destek olan danışman hocam, Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Dr. Öğr. Üyesi Esra DİLEK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Başkanı Prof. Dr. Ekrem KÖKSAL'a, Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Dr. Öğr. Üyesi Cüneyt TÜRKEŞ'e ve Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Dr. Öğr. Üyesi Sevil KARAHAN YILMAZ'a ve ders döneminde yardımlarını esirgemeyen Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Erzincan Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürü Sayın Adem ÇAKAR'a ve Erzincan Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Varlıklarıyla bana güven veren ve beni her zaman destekleyen aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

FYL-2018-564 nolu proje ile tez çalışmalarımı destekleyen Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (BAP) Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Aycan YILMAZ

Kasım, 2018

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ	vi
TABLolar LİSTESİ	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR	x
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	28
3. MATERYAL ve YÖNTEM	37
3.1. Materyal	37
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler	37
3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar	37
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması	38
3.1.3.1. Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler	38
3.1.3.2. Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz için kullanılan tampon çözeltiler.....	38
3.1.3.3. DEAE-Sephadex iyon değişim kromatografisi için kullanılan çözeltiler.....	39
3.1.3.4. Jel filtrasyon kromatografi kolonunda kullanılan tampon çözeltiler	39
3.1.3.5. Elektroforez için kullanılan çözeltiler	39
3.1.3.6. Protein tayini için kullanılan çözeltiler	40
3.2. Yöntem	40
3.2.1. Kan serumunun ayrılması	40
3.2.2. İnsan serum PON1 enziminin aktivitesinin ölçümü	41
3.2.3. İnsan serum PON enziminin saflaştırılması	41
3.2.3.1. Amonyum sülfat çöktürmesi	41
3.2.3.2. Diyaliz	42
3.2.3.3. DEAE-Sephadex A 50 iyon değişim kromatografisi	42
3.2.3.4. Sephadex G-200 jel filtrasyon kromatografisi	43
3.2.4. Protein tayini.....	44

3.2.4.1. Kalitatif protein tayini	44
3.2.4.2. Bradford yöntemi ile kantitatif protein tayini	44
3.2.5. İnsan serum PON1 enziminin aktivitesi üzerine bazı antibiyotiklerin <i>in vitro</i> etkilerinin belirlenmesi	45
3.2.5.1. İnsan serum PON1 enziminin aktivitesi üzerine inhibitör etkisi gösteren antibiyotikler için IC ₅₀ ve K _i değerlerinin belirlenmesine ait çalışmalar	45
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	52
4.1. Protein Tayini Sonuçları.....	52
4.2. İnsan Serum PON1 Enziminin Saflaştırılması Sonuçları.....	52
4.2.1. Amonyum sülfat çöktürmesi sonuçları.....	52
4.2.2. DEAE-Sephadex A-50 iyon değişim kromatografisi sonuçları.....	52
4.2.3. Jel filtrasyon kromatografisi sonuçları	52
4.3. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi Sonuçları	53
4.4. İnsan Serum PON1 Enziminin Aktivitesi Üzerine Bazı Antibiyotikler İçin IC ₅₀ Değerlerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışmaların Sonuçları	54
4.5. İnsan Serum PON1 Enzimi Üzerine İnhibitör Etkisi Gösteren Bazı Antibiyotikler İçin K _i Değerlerinin Belirlenmesine Ait Çalışmaların Sonuçları	56
5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	59
KAYNAKLAR.....	65
EKLER.....	77
Ek-1. Tez Çalışması Süresince Yapılan Akademik Çalışmalar	78
ÖZGEÇMİŞ	79

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1.1. Tek substratlı enzimatik reaksiyon.....	5
Şekil 1.2. İki substratlı enzimatik reaksiyon	5
Şekil 1.3. Enzimlerin çift yer değiştirme (ping-pong) mekanizması.....	6
Şekil 1.4. Ardışık/düzensiz enzim mekanizması	6
Şekil 1.5. Yarışmalı (kompetitif) inhibisyonun şematik gösterimi	8
Şekil 1.6. Yarışmasız (kompetitif) inhibisyonun şematik gösterimi	9
Şekil 1.7. Yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyonun şematik gösterimi	9
Şekil 1.8. Dönüşümsüz inhibisyonun şematik gösterimi	10
Şekil 1.9. (a) Yarışmalı (b) Yarı yarışmalı inhibisyon ve (c) Yarışmasız inhibisyon ..	11
Şekil 1.10. İyon değiştiriciler a) Anyon değiştiriciler ve değiştirilebilir karşı iyonlar b) Katyon değiştiriciler ve değiştirilebilir karşı iyonlar	16
Şekil 1.11. Paraokson, metilparaokson ve klormetil paraoksonun kimyasal yapıları	18
Şekil 1.12. PON1 enziminin hidroliz reaksiyonu	19
Şekil 1.13. İnsan PON1 enziminin yapısı.....	20
Şekil 1.14. PON enziminin üç boyutlu görünümü	20
Şekil 1.15. İnsektisitlerde yaygın olarak kullanılan okson metabolitlerinin hidrolizi....	21
Şekil 1.16. Sınır gazlarının hidrolizi.....	22
Şekil 1.17. Lakton hidrolizi	22
Şekil 1.18. Aromatik esterlerin hidrolizi	22
Şekil 1.19. HDL partikülü ve PON enzimi.....	23
Şekil 1.20. Fosfomisin molekülünün yapısal formülü.....	25
Şekil 1.21. Sefiksim molekülünün yapısal formülü	26
Şekil 1.22. Sefuroksim aksetil molekülünün yapısal formülü.....	27
Şekil 1.23. Sefaklor molekülünün yapısal formülü	27
Şekil 4.1. İnsan serum PON1 enziminin saflaştırma sonucu SDS-PAGE resmi.....	53
Şekil 4.2. İnsan serum PON1 enzimi üzerine fosfomisin etkisi	54
Şekil 4.3. İnsan serum PON1 enzimi üzerine sefiksim etkisi	54
Şekil 4.4. İnsan serum PON1 enzimi üzerine sefuroksim etkisi	55
Şekil 4.5. İnsan serum PON1 enzimi üzerine sefaklor monohidrat etkisi.....	55

Şekil 4.6. Fosfomisin için K_i sabitinin bulunmasına yönelik çizilen Lineweaver-Burk grafiği	56
Şekil 4.7. Sefksim için K_i sabitinin bulunmasına yönelik çizilen Lineweaver-Burk grafiği	57
Şekil 4.8. Sefuroksim için K_i sabitinin bulunmasına yönelik çizilen Lineweaver-Burk grafiği	57
Şekil 4.9. Sefaklor monohidrat için K_i sabitinin bulunmasına yönelik çizilen Lineweaver-Burk grafiği	58



TABLolar LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 1.1. Kofaktör olarak işlev gören inorganik iyonlar ve ilgili enzimler	2
Tablo 1.2. Grup transferi gerçekleştiren bazı koenzimler	3
Tablo 1.3. Enzimler tarafından oluşturulan bazı hız artışları	7
Tablo 3.1. İnsan serum PON1 enziminin aktivite ölçüm kuvvet içeriği	45
Tablo 3.2. İnsan serumundan saflaştırılan PON1 enzimi üzerinde fosfomisin'in IC ₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	46
Tablo 3.3. İnsan serumundan saflaştırılan PON1 enzimi üzerinde sefiksim'in IC ₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	46
Tablo 3.4. İnsan serumundan saflaştırılan PON1 enzimi üzerinde sefuroksim'in IC ₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	47
Tablo 3.5. İnsan serumundan saflaştırılan PON1 enzimi üzerinde sefaklor monohidrat'ın IC ₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	47
Tablo 3.6. İnsan serumundan saflaştırılan PON1 enzimi üzerinde fosfomisin'in K _i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	48
Tablo 3.7. İnsan serumundan saflaştırılan PON1 enzimi üzerinde sefiksim'in K _i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	49
Tablo 3.8. İnsan serumundan saflaştırılan PON1 enzimi üzerinde sefuroksim'in K _i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	50
Tablo 3.9. İnsan serumundan saflaştırılan PON1 enzimi üzerinde sefaklor monohidrat'ın K _i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	51
Tablo 4.1. İnsan serum PON1 enzimi için saflaştırma basamakları.....	53

Tablo 4.2. İnsan serum PON1 enzimi için bulunan K_i ve IC_{50} değerleri58



SİMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler

A°	Angström
°C	Santigrat Derece
Da	Dalton
dk	Dakika
g	Gram
IU	Enzim Aktivitesi
kDa	Kilodalton
kcat	Turnover Sayısı
L	Litre
M	Molar
mL	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
nmol	Nanomol
pI	İzoelektrik Nokta
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
t _{1/2}	Yarılanma Süresi
β	Beta
ε	Molar Ekstinksiyon Katsayısı
λ _{max}	Dalga Boyu
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μmol	Mikromol

Kısaltmalar

A-esteraz	Aril esteraz
A-oksonaz	Aril oksonaz

Apo A1	Apolipoprotein A1
Apo A2	Apolipoprotein A2
ASD	Autism Spectrum Disorders
Asn	Asparagin
Asp	Aspartik Asit
BOS	Beyin-Omurilik Sıvısı
CoA	Kolinin Asetil
Cys	Sistein
DNA	Deoksiribinükleik Asit
E	Enzim
E.C.	Enzim Kod Numarası
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EI	Enzim İnhibitör Kompleksi
ESI	Enzim-Surbstrat-İnhibitör Kompleksi
ES	Enzim Surbstrat Kompleksi
ESWL	Extracorporeal Shock Wave Litotripsi (Şok Dalga Litotripsi)
Glu	Glutamik Asit
I	İnhibitör
IC ₅₀	Maksimum Hızı Yarıya Düşüren İnhibitör Konsantrasyonu
IUBMB	Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği
HDL	High Dansity Lipoprotein (Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein)
HPBP	Phosphate Binding Apolipoprotein (Fosfat Bağlayıcı Apolipoprotein)
K _i	Enzim İnhibitör Kompleksinin Ayrışma Sabiti
K _M	Enzimin Surbstrata İlgisini Gösteren Sabit
LDL	Low Density Lipoprotein (Düşük Yoğunluklu Lipoprotein)
MurA	Enol Pirüvil Transferaz
NAD ⁺	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NADP ⁺	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NAMA	N-asetil Muramik Asit
TCA	Trikloroasetik Asit

TPP	Tiamin Pirofosfat
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilendiamin
Tris	Trihidroksimetil Amino Metan
UDP	Üridin Difosfat
ÜSE	Üriner Sistem Enfeksiyonu
PEG	Polietilen Glikol
PON	Paraoksonaz
RA	Romatoid Artrit
RNA	Ribonükleik Asit
S	Substrat
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	Sodyum Dodesilsülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
V _{max}	Maksimum Hız

1. GİRİŞ

İnsanoğlunun enzimleri kullanmaya başlaması, medeniyetin başlangıcından daha eskidir. Enzimlerin doğası ve nasıl çalışmaya başladığıyla ilgili bilgiler 19. yüzyıldan önce aydınlatılamamıştır. Bu alandaki en büyük gelişmelerden biri 1926 yılında James B. Sumner'in üreaz enzimini "JackBean" bitkisinden elde edip kristallendirmesi ve protein yapısında olmasını keşfetmesidir. Enzimlerin protein yapısında olduklarının anlaşılmasıyla birlikte, analiz ve saflaştırma tekniklerinin tasarım çalışmaları 20. yüzyılda hız kazanmıştır. Günümüzde 2000 kadar enzim tanımlanmış, birçoğu saflaştırılmış, karakterize edilmiş ve 200'den fazla enzim de kristallendirilmiştir (Polaina ve MacCabe, 2007; Keha ve Küfrevioğlu, 2012).

Enzimler; canlı hücreler tarafından sentezlenen, canlı organizmalardaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran, ayrıca yan ürün oluşumuna izin vermeyen %100'lük bir ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörlerdir (Sayın, 2009).

Enzimler birçok özelliği bulunan proteinlerdir. Katalitik özellikleri birçok inorganik ve sentetik katalizörlerden çok daha fazladır. Substratları için yüksek afiniteye sahiptirler. Kimyasal reaksiyonları büyük ölçüde hızlandırır ve sıvı çözeltilerde pH ve sıcaklığın optimum olduğu koşullarda etkilerini gösterirler. Enzimler kimyasal enerjiyi korur, dönüştürür ve basit moleküllerden biyolojik makromoleküller üretirler (Nelson ve Cox, 2005).

Enzimler, yaklaşık olarak 12.000'den 1.000.000 Da'ya değişen molekül ağırlığına sahip, uzun aminoasit zincirleridir. Enzimlerin kendine mahsus amino asit dizilimlerinden dolayı farklı üç boyutlu yapıları vardır (Lehninger, 2005). Enzimler son derece spesifikler ve sadece bir substrata veya aynı fonksiyonlu grubu olan substrat serisine karşı etkindirler. Hatta aynı maddenin izomerlerinden sadece birisiyle reaksiyon verebilen çok spesifik enzimler de vardır. Bu yüksek seçicilik sayesinde en basit hücrelerde bile aynı anda çok sayıda biyokimyasal reaksiyon birlikte meydana gelir.

Bazı enzimler katalizleme işlevleri için kofaktör adı verilen gruplara ihtiyaç duyarken; bazıları ise bu işlevleri sadece protein yapıları ile oluştururlar. Kofaktör, Fe^{2+} , Mg^{2+} veya Zn^{2+} gibi bir veya daha fazla inorganik iyon ya da koenzim denen organik veya metal-organik kompleks bir moleküldür (Lehninger, 2005).

Enzimler 50-60 °C sıcaklığın üzerine çıkıldığında denatüre olurlar. Kofaktörler ise bu sıcaklıklarda dayanıklıdır. Bir protein aktivitesini göstermek için yardımcı faktörlere ihtiyaç duyar. Bu haliyle katalitik olarak aktif olan enzim-kofaktör kompleksine holoenzim; kofaktörü olmayan sadece protein kısmından oluşan katalitik olarak inaktif kısmına ise apoenzim denir (Altan, 2000; Keha ve Küfrevioğlu, 2012).

Enzimler özgül olmaları nedeniyle kimyasal katalizörlerden farklıdır. Katalitik etkinlikleri kimyasal katalizörlerden 10^6 - 10^{16} kat daha fazladır. Genellikle enzimler belirli maddeler arasındaki belirli reaksiyonları katalize ederler. Enzimlerin etkinlik değeri “Turnover Sayısı” ile tanımlanmakta ve birim zamanda bir mol enzimin ürüne dönüştürdüğü substratın mol sayısı olarak ifade edilmektedir.

Tablo 1.1. Kofaktör olarak işlev gören inorganik iyonlar ve ilgili enzimler (Lehninger, 2005)

İyonlar	Enzimler
Fe ²⁺ veya Fe ³⁺	Cytochrome oxidase, Catalase peroxidase
Cu ²⁺	Cytochrome oxidase
Zn ²⁺	Carbonic anhydrase, Alcohol dehydriyogenase
Mg ²⁺	Hexokinase, Glucose-6-phosphatase, Pyruvate kinase
Mn ²⁺	Arginase, Ribonucleotide reductase
K ⁺	Pyruvate kinase
Ni ²⁺	Urease
Mo	Dinitrogenase
Se	Glutathione peroxidase

Koenzimler genellikle elektronlar, belirli atom veya fonksiyonel grupların geçici taşıyıcısı olarak görev yaparlar (Lehninger, 2005). Genellikle koenzimler tiamin (B1 vitamini), riboflavin (B2 vitamini), nikotinamid (B3 vitamini), pantotenik asit (B5 vitamini) ve lipoik asit gibi suda çözünen B vitamininin türevleridir. Bu bileşikler hayvan organizmaları tarafından sentezlenemediğinden diyetle alınmaları gerekir (Keha ve Küfrevioğlu, 2012). Koenzim fonksiyonuna sahip olan ve suda çözünen vitaminlerin aksine sadece bir tane yağda çözünen K vitamini bulunmaktadır (Lippincott, 2007).

Tablo 1.2. Grup transferi gerçekleştiren bazı koenzimler (Keha ve Küfrevioğlu, 2012)

Koenzim	Taşımlı Birim
FAD	Hidrojen atomları (elektronlar)
NAD ⁺	Hidrojen atomları (elektronlar)
NADP ⁺	Hidrojen atomları (elektronlar)
CoA	Açıl grupları
TPP	TPP

Enzimler isimlendirilirken her bir enzime iki ad verilmiştir. İlki kısa ve önerilen isimdir. İkincisi ise detaylı bir tanımlama için daha kapsamlı ve sistematik isimdir. Enzim isimlerinde en sık kullanılan, reaksiyonunun substratına; örneğin, glukozidaz, üreaz, sükröz veya yapılan işin tanımına göre; örneğin, laktat dehidrogenaz ve adenilat siklaz, gibi -az eki eklenmiştir. Bazı enzimlerde reaksiyon hakkında her hangi bir bilgi vermeyen, orijinal isimleriyle kullanılırlar. Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği, enzimlerin her birinin, sayısız alt grup içeren, altı ana sınıfa bölüdüğü, bir adlandırma sistemini geliştirmiş ve -az eki katalizlenen kimyasal reaksiyonunun oldukça kapsamlı tanımına eklenmiştir. Örneğin; D-gliseraldehit-3-fosfat:NAD⁺ oksidoredüktaz gibi. IUBMB isimleri, nettir ve bilgi vericidir. Fakat bazen genel kullanım için oldukça zordur (Lippincott, 2007).

Her enzime, Enzim Komisyonu kod numarası verilmiştir. Bu numara E.C. harflerinden sonra arka arkaya gelen dört rakamdan oluşur (Yüreğir, 1981). Birinci rakam, enzimin bağlı olduğu grubu gösterirken, ikincisi alt grubu, üçüncüsü alt-alt grubu belirtir. Dördüncü rakam ise enzimin aynı üç rakama sahip enzimler arasındaki sırasını gösterir (Keha ve Küfrevioğlu, 2012).

Örneğin, E.C.3.1.8.1. kod numarasındaki 3 rakamı, bu enzimin bir hidrolaz enzimi olduğunu; 1 rakamı, ester bağlarına etki ettiğini; 8 rakamı, fosforik triesterleri hidroliz ettiğini ve son 1 rakamı ise bu enzimin arildialkil fosfataz enzimleri arasında ilk sırayı aldığını göstermektedir. Burada söz konusu olan enzim, paraoksonaz, arilesteraz ve diazokson gibi üç aktiviteye sahip olan yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) ile ilişkili paraoksonaz enzimidir (Türkeş, 2010).

Enzimler, katalizledikleri tepkimelere göre sınıflandırılırlar. Çoğu enzimler, elektronların, atomların veya işlevsel grupların transferini katalizler. Böylece bunlar kod

numaralarına ve transfer tepkimesinin tipine, grup vericisine ve grup alıcısına göre sınıflandırılırlar (Lehninger, 2005).

Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği tarafından enzimler altı ana sınıfa ayrılmaktadırlar (Champe vd., 2007; Keha ve Küfrevioğlu, 2012). Bunlar;

Oksidoredüktazlar: İndirgenme ve yükseltgenme (redoks) tepkimelerini katalizlerler.

Transferazlar: Yapısında Karbon (C), Azot (N) ve Fosfor (P) taşıyan grupların transferini katalizlerler.

Hidrolazlar: Moleküllerin yapısındaki bağlara su katarak bağların hidroliz olduğu reaksiyonları katalizlerler.

Liyazlar: Reaksiyona giren substratlardan bazı grupları uzaklaştırarak çift bağ oluşumunu katalizlerler.

İzomerazlar: Geometrik, optik veya yapısal izomerlerin birbirine dönüştürülmesini katalize eden enzimlerdir.

Ligazlar: İki farklı molekülün birleşerek yeni molekül oluşumu reaksiyonunu katalizlerler. Bu sırada enerji yönünden yüksek enerjili bir bağın kopması ile oluşan enerjiyi kullanırlar.

Enzimle katalizlenen bir reaksiyonun ayırıcı özelliği; aktif bölge denilen enzim üzerindeki sınırlandırılmış özel bir cep ya da bir bölgenin içinde oluşmasıdır. Substrat aktif bölgeye bağlanan ve enzimin üzerinde aktivite gösterdiği büyük veya küçük molekülüdür (Bakan, 2007).

İlk olarak 1880’de Adolphe Wurtz tarafından varlığı gösterilmiş olan enzim-substrat kompleksi; enzim aktivitesinde merkezi bir rol oynar. ES kompleksi, aynı zamanda enzim mekanizmalarının teorik tanımlanması ve enzimle katalizlenen tepkimelerin kinetik davranışını açıklayan matematiksel işlemler için başlama noktasıdır (Lehninger, 2005).

Enzimlerin etki mekanizmasına iki farklı açıdan bakılabilir. Birincisinde kataliz, tepkime sırasında oluşan enerji değişimi yönünden değerlendirilir. Enzimler katalizlenmiş reaksiyondan farklı, enerji açısından tercih edilen alternatif bir reaksiyon

yolu sağlarlar. İkincisinde ise aktif bölgenin kimyasal olarak katalizi nasıl hazırladığı tarif edilir (Lippincott, 2007).

Enzimle substrat, enzimin aktif bölgesinde bağlanmaktadır. Bu bağlanmanın şekli substrat veya enzimin durumuna göre değişiklik göstermektedir.

a. Tek substratlı enzimatik reaksiyonlar.

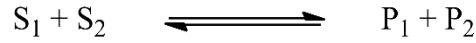
- Anahtar kilit modeli
- İndüklenmiş uyum (Induced-fit) modeli



Şekil 1.1. Tek substratlı enzimatik reaksiyon

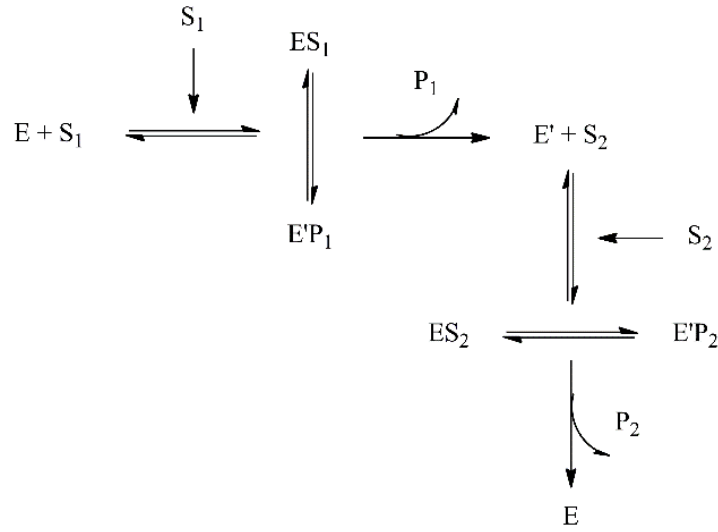
b. İki substratlı enzimatik reaksiyonlar

- Çift yer değiştirme (ping-pong) mekanizması
- Ardışık/düzensiz mekanizma



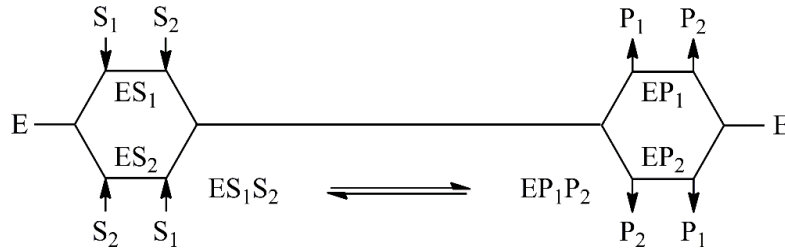
Şekil 1.2. İki substratlı enzimatik reaksiyon

Çift yer değiştirme (ping-pong) mekanizmasında iki substratın ise karıştığı reaksiyonlarda, aktif merkeze öncelikle S_1 bağlanır. Bir süre sonra ilgisi azalarak ürün oluşur. Enzimin yapısı değişir. Sonra ikinci substrat bağlanır ve yine ürün oluşur. En son enzim ilk haline geri döner.



Şekil 1.3. Enzimlerin çift yer değiştirme (ping-pong) mekanizması

Ardışık/düzensiz mekanizma modelinde enzime önce bağlanan S_1 veya S_2 diğer substratın bağlanmasını kolaylaştırmakta ve üçlü ara bir kompleks (ES_1S_2) oluşmaktadır. Bu üçlü ara kompleksten oluşan bir diğer üçlü kompleks (EP_1P_2) yapısından ürünler (P_1 ve P_2) sırayla ayrılmaktadır (Türkeş, 2010).



Şekil 1.4. Ardışık/düzensiz enzim mekanizması

Enzimlerin neden olduğu hız artışları $10^5 - 10^{17}$ büyüklüğündedir. Bu oldukça yüksek seçicilikteki hız artışları iki şekilde açıklanabilir:

Birincisi; enzimatik kataliz tepkimeleri süresince kovalent bağların yeniden düzenlenmesidir. Kimyasal tepkimelerin birçoğu substratlar ve enzim işlevsel grupları (özgül amino asit yan zincirleri, metal iyonları ve koenzimler) arasında meydana gelir. Enzim üzerindeki katalitik işlevsel gruplar substratla kovalent bağ oluşturabilir ve bunu tepkime için aktifleştirebilir. Bazı gruplar substrattan enzim üzerindeki gruba geçici olarak aktarılabilir. Birçok durumda, bu tepkimeler yalnızca enzimin aktif bölgesinde

meydana gelir. Enzimlerin tepkimeyi hızlandırması; alternatif bir yol olarak daha düşük enerjili tepkime yolu sağlayarak aktivasyon enerjisini düşürmelerinin sonucudur.

İkincisi ise enzim ve substrat arasındaki kovalent olmayan etkileşimdir. Aktivasyon enerjisini düşürmek için gereken enerjinin çoğu substrat ve enzim arasındaki zayıf kovalent olmayan etkileşimlerden kaynaklanır. Enzimleri enzimatik olmayan çoğu katalizörden gerçekten ayıran faktör özgül bir ES kompleksinin oluşmasıdır. Bu komplekste, enzim ve substrat arasındaki protein yapısını sabitleyen hidrojen bağları, hidrofobik ve iyonik etkileşimleri içeren bazı güçler tarafından oluşturulur. ES kompleksindeki her bir zayıf etkileşimin oluşumuna, etkileşimde kararlılığın derecesini sağlayan serbest enerji salınımı eşlik eder. Enzim-substrat etkileşiminden kaynaklanan bu bağlanma enerjisi, tepkimelerin aktivasyon enerjisini düşürmek için enzimler tarafından kullanılan serbest enerjinin ana kaynağıdır (Lehninger, 2005).

Tablo 1.3. Enzimler tarafından oluşturulan bazı hız artışları (Lehninger, 2005)

Enzim	Hız artışı
Siklofilin	10^5
Karbonik anhidraz	10^7
Triozfosfat izomeraz	10^9
Karboksipepsidaz A	10^{11}
Fosfogluko mutaz	10^{12}
Süksinil CoA transferaz	10^{13}
Üreaz	10^{14}
Orotidin monofosfat dekarboksilaz	10^{17}

Enzimle katalize edilen reaksiyonların hızını arttıran madde aktivatör olarak adlandırılır. Aktivatörler genel olarak küçük iyonlar ya da fazla büyük olmayan bileşiklerdir (Gözükara, 1989). Enzimle katalize edilen reaksiyonların hızını azaltan maddelere de inhibitör denir. İnhibitörler genel olarak küçük molekül yapısına ait bileşikler ya da iyonlardır. Enzimin aktif merkezine bağlanıp, enzim substrat kompleksinin oluşumunu önlerler (Voet ve Voet, 2000).

Enzimin aktivitesi, enzimin katalizlediği reaksiyonun hızının, optimal şartlarda belirli zamanda ürüne dönüşen substrat miktarına göre ifade edilir. Enzimin etkisi ve aktivitesi yüksekse aynı zamanda daha fazla substrat molekülünü ürüne çevirebilir. En çok

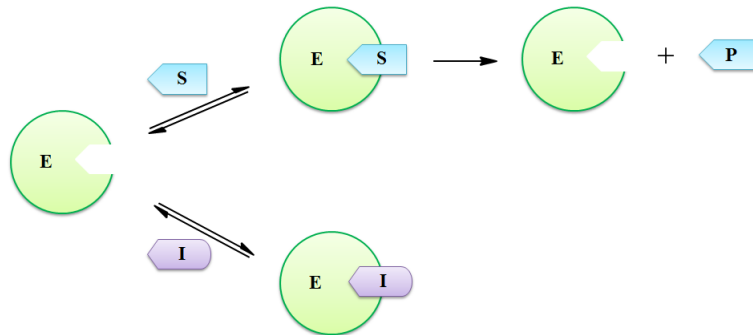
kullanılan enzim aktivitesi birimi, IU'dir. Optimal koşullarda, 1 dakikada 1µmol substratı değiştiren enzim etkinliği 1 IU enzim aktivitesidir. Bu da 1 saniyede 16,67 nmol substratın ürüne dönüştürülmesine karşılık gelmektedir.

Optimal pH, 25 °C sıcaklık ve doymuş substrat konsantrasyonunda sadece enzim molekülü tarafından birim zamanda ürüne dönüştürülen substrat molekülü sayısına, enzimin dönüşüm sayısı denir ve kcat ile sembolize edilir.

Bazı bileşikler tarafından enzimlerin *in vivo* ve *in vitro* aktivitelerinin azaltılması ya da tamamen yok edilmesi olayına inhibisyon adı verilir. İnhibisyona neden olan bileşiklere inhibitör denir. Biyolojik sistemlerde enzimlerin inhibe olması başlı başına bir kontrol mekanizması oluşturur. Birçok kimyasal madde, ilaç ve zehirli bileşikler de etkilerini bu şekilde gösterirler (Dilek, 2012). Enzimatik aktivite inhibisyonu dönüşümlü ve dönüşümsüz olmak üzere iki ana gruba ayrılır.

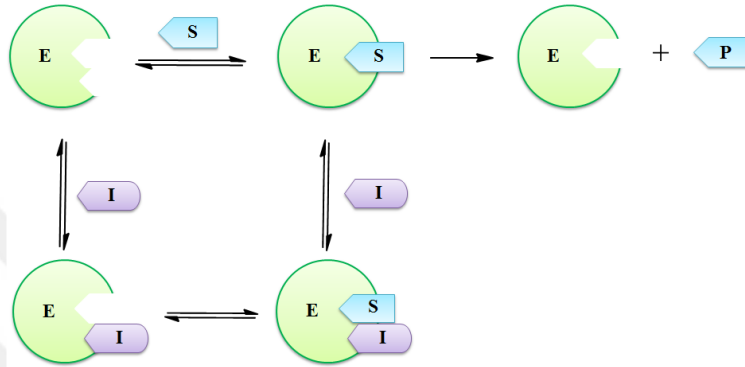
Dönüşümlü inhibisyonda enzim ile inhibitör etkileşmesi, bir denge reaksiyonu şeklindedir. Bu inhibisyon türü üç gruba ayrılır. Bunlar;

- Yarışmalı (kompetitif) inhibisyon: Dönüşümlü inhibisyonun en basit tipi olan bu inhibisyon türünde inhibitör enzimin aktif bölgesine bağlanmada substratla yarış halindedir. İnhibitör yapı itibariyle substrata benzediği için enzimin aktif bölgesine kolaylıkla bağlanır. Fakat substrat konsantrasyonu arttırılarak inhibisyon etkisi ortadan kaldırılabilir. Yani enzimin V_{max} (enzimatik reaksiyonda ulaşılacak maksimum hız) değişmezken, K_M (enzimin substrata ilgisini gösteren sabit) artar (Şekil 1.5) (Segel, 1975; Telefoncu, 1986; Keha ve Küfrevioğlu, 2012).



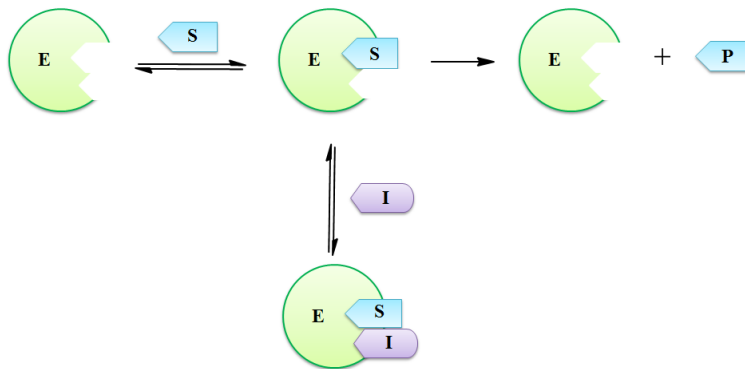
Şekil 1.5. Yarışmalı (kompetitif) inhibisyonun şematik gösterimi

- Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon: Bu inhibisyon türünde inhibitör ve substrat enzim aktif bölgeye bağlanırken bir yarış içinde değildirler. Çünkü inhibitör yapı itibariyle substrata benzemediği için enzimin substrattan farklı bir bölgesine bağlanır ve EI ve ESI olarak iki farklı inaktif kompleks oluşur. Enzimin V_{max} değeri azalırken K_M değeri sabit kalır (Şekil 1.6) (Telefoncu, 1986; Keha ve Küfrevioğlu, 2012).



Şekil 1.6. Yarışmasız (kompetitif) inhibisyonun şematik gösterimi

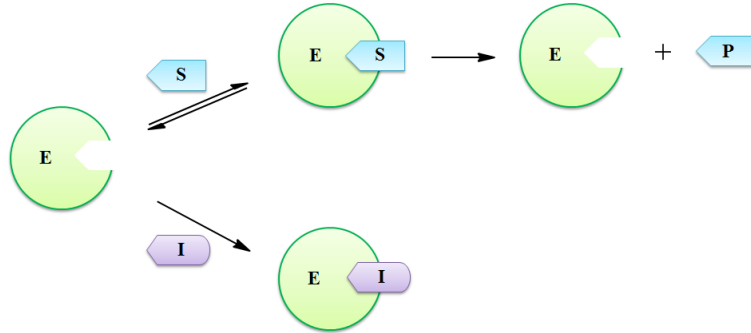
- Yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyon: Bu inhibisyon türü ise; daha çok iki substratlı reaksiyonlarda görülmektedir. İnhibitör serbest enzime değil sadece enzim-substrat (ES) kompleksine bağlanır. Bu şekilde ürün oluşumu sonlanmaktadır. İnhibitörlerin varlığında ortamdaki ES kompleksi sürekli azalır ve sonuç olarak da K_M değeri azalır. Ayrıca bu ortamda ESI kompleksi sürekli var olacağından V_{max} değeri de düşer (Şekil 1.7) (Keha ve Küfrevioğlu, 2012).



Şekil 1.7. Yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyonun şematik gösterimi

Multienzim sistemlerinin çoğu bir takım seri reaksiyonlar göstermektedirler. Bu durumda Lineer karışık tip inhibisyon çeşidi karşımıza çıkmaktadır. Dönüşümlü inhibisyon çeşitlerinden biri olan nonkompetitif (yarışmasız) inhibisyonunun farklı çeşidi olan lineer karışık tip inhibisyonunda; E, S ve I'nın bağlanma denge sabitleri farklılık gösterir. Bir seri reaksiyonun son ürünü, belirli bir konsantrasyona ulaştığında sistemin ilk enzimini ya da ara noktadaki enzimi inhibe eder. Gerçekleşmiş olan bu olaya da feed-back (geri besleme) inhibisyonu denir ve bu tür enzimlere allosterik enzim adı verilir.

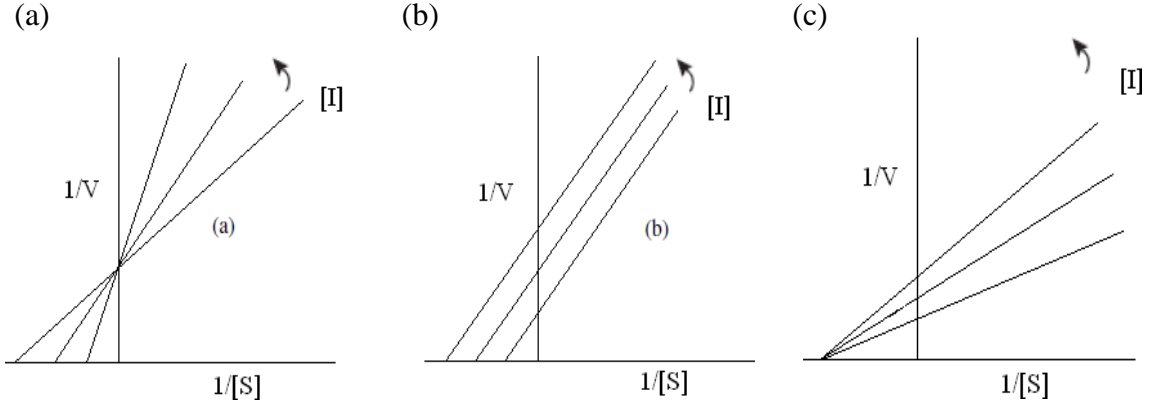
Dönüşümsüz inhibisyonunda, enzimlerin sahip olduğu bir veya birden fazla fonksiyonel grupları etkilenir. Bu inhibisyon inhibitörün kovalent olarak enzime bağlanması veya zor ayrılan bir kompleks oluşturması ile oluşur. İnhibitör enzimin aktif bölgesine kovalent olarak bağlanır ve enzim yapısını bozar. Bu yüzden geriye dönüş olmaz. Dönüşümsüz inhibisyon da V_{max} değeri azalır, K_M değeri değişime uğramaz (Şekil 1.8) (Segel, 1975; Keha ve Küfrevioğlu, 2009). Bu durum yarışmasız inhibisyona benzerlik gösterir. Bu sebepten iki inhibisyon türünü birbirinden ayırmak için farklı enzim konsantrasyonlarında V_{max} ölçülerek bir grafik oluşturulur. Elde edilen eğriden inhibisyon türüne karar verilir.



Şekil 1.8. Dönüşümsüz inhibisyonun şematik gösterimi (İnal, 2013)

İnhibisyon türünün ve K_i sabitinin belirlenmesi için en çok kullanılan metot, 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 ve Cox, 2005).

Enzim inhibisyon türlerine özgü grafikler Şekil 1.9'de görüldüğü gibidir.



Şekil 1.9. (a) Yarışmalı (b) Yarı yarışmalı inhibisyon ve (c) Yarışmasız inhibisyon (Dilek, 2012)

İlk kez 1938 yılında Berzelius tarafından kullanılan “protein” adı yunanca bir kelime olan “proteuo” kelimesinden türetilmiştir. Proteinler canlıda hem yapının oluşmasında hem de pek çok görevin yapılmasında doğrudan etkilidir. Sayısız hayat fonksiyonu proteinlere bağlıdır. Proteinlerin enzimatik kataliz, büyüme ve farklılaşmanın kontrolü, koordine hareket, sinir impluslarının transmisyonu, depolama, taşıma, mekanik destek ve immün koruma gibi birçok işlevi bulunmaktadır. Proteinlerin saflaştırılması; hem bu işlevleri yapan molekülün tespiti ve olayın mekanizmasının açıklanması hem de *in vitro* koşullarda endüstriyel veya analitik amaçla kullanılma olanağının araştırılması yönünden önemlidir (Telefoncu, 1996).

Proteinleri saflaştırmadaki amaç saf protein elde etmekle birlikte daha sonraki araştırmalar için kullanılacak bir protein preparatı sağlamaktır. Bu araştırmalar; protein yapısı veya yapı fonksiyon ilişkisi ile protein aktivitesinin araştırılmasına ve bu aktiviteden biyoteknolojik üretim, analitik veya tedavi edici amaçla yararlanılmasına yöneliktir (Karadağ, 2007).

Proteinlerin saflaştırılmasında kullanılacak yöntemlerin sıralaması aşağıdaki gibidir:

- Homojenizasyon
- Çöktürme
- İyon değişim kromatografisi
- Afinite kromatografisi
- Jel geçirgenlik kromatografisi

Saflaştırmanın ilk basamaklarında daha çok derişikleştirmeye yönelik (yüksek performanslı) yöntemler uygulanır. Bu sayede ortamdaki su büyük oranda uzaklaşır. Bu amaçla çöktürme, ekstraksiyon ve absorpsiyon kromatografi yöntemleri kullanılmaktadır. Afinite ve ultrafiltrasyon yöntemlerinin bir arada kullanılması, yüksek ayırma güçlü tekniklerin kullanılması saflaştırma işlemlerinin sayısını oldukça azaltır. Ancak afinite yönteminin maliyetinden dolayı çöktürme gibi ucuz yöntemlerle istenmeyen madde ve madde karışımlarının önemli oranda uzaklaştırılmasından sonra tatbik edilmelidir (Dalkavrayan, 2011).

Enzimler protein yapısında olduklarından, proteinlerin saflaştırma yöntemleri enzimler içinde uygulanır. Proteinlerin çözelti içindeki davranışlarından faydalanılarak, saflaştırma işlemleri yapılmaktadır.

Saflaştırma işlemleri genelde enzimlerin;

- Molekül büyüklüğü
- Çözünürlük farklılıkları
- Elektriksel yük
- Adsorpsiyon davranışlarındaki farklılıklar
- 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 olarak dışarılama kromatografisi adıyla bilinen jel filtrasyon kromatografisi, molekül büyüklüklerine göre proteinleri ayırmada kullanılan en uygun ve en etkili metottur. Yöntemin temeli, dekstran esaslı metaryelleri kullanarak makromolekülleri molekül büyüklüklerindeki farklılıklara göre ayırmaktır. Yöntem esasen, proteinlerin molekül ağırlıklarının saptanmasında ve protein çözeltilerinin tuz derişimlerinin dönüştürülmesinde uygulanır. Basit bir çalışma prensibi vardır. Kolon küresel yapılı ve belirli boyutta gözeneklere sahip inert jel parçacıklarından oluşmuştur. Farklı boyutta molekülleri içeren bir çözelti kolondan geçirildiğinde, büyük moleküller gözenekli

taneciklerin aralarındaki boşluklardan geçerek kolonda hızlı ilerlerler, gözenek boyutlarından küçük moleküller ise gözenek içerisine difüzenir ve molekül küçüldükçe artan bir alıkonma süresi ile kolondan çıkarlar.

Bazı proteinler, belli koşullarda jel filtrasyonu materyaline adsorba olabilmektedir. Adsorbsiyon, iyon değişimi etkilerinden veya hidrofobik etkileşimlerinden ileri gelmektedir. Bu nedenle iyonik kuvveti yüksek tamponlardan kaçınmak gerekir. Enzimlerin molekül ağırlığı genelde 12.000-1.000.000 Da arasında değiştiğinden, uygun seçilmiş 2-3 filtrasyon kolonu, başarılı bir ayırım için yeterli olabilmektedir. Kolonun boşluk hacmi, toplam kolon hacminin genellikle %30-35'i ve ayırım için uygun hacim, toplam hacmin yaklaşık %55'idir. Böylece 100 mL'lik toplam hacme sahip ideal bir kolonda protein ayırımı 35-90 mL'lik elüsyon hacimlerinde ve en iyi ayırımlar da 60 mL'ye kadar gözlenecektir. Fakat difüzyon nedeniyle kolonun ideallikten sapmasıyla bu değerler değişebilir. En uygun şartlarda proteinler sadece moleküler difüzyona bağımlı olarak ilerlerler. Ayrıca tanecikler arasındaki kapalı alanlara sıvıların sıkışması ile doğan akışlar kolondaki ayrışımın bozulmasına neden olur. Bu etkilerin her ikisi daha küçük partikül boyutlu metallerin kullanılması ile azaltılabilir ve daha iyi ayırım gücüne ulaşılabilir. Bu nedenle tanecik içi ve dışı arasındaki denge daha çabuk kurulacağından, daha büyük akış hızlarında çalışmak mümkündür. Fakat daha küçük tanecik boyutu kolonda sıvı akışı için daha büyük basınç uygulamasını gerektirir. Bu artış taneciklerin küresel yapılarının bozulmasına ve akış hızının giderek azalmasına sebep olabilir (Arda ve Ertan, 2008).

Jel filtrasyon kromatografisinde kolon materyali olarak Sepharose, Biogel gibi polimerler yanında yaygın olarak kullanılan ve bir karbohidrat türevidir 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 değer 10 ile çarpılarak jelin ticari adının sonuna yazılır. Örneğin Sephadex G-15 jelinin su kazanım

değeri 1,5'dir (1 g madde 1,5 g su emebilir). Bir jelin su kazanım değeri arttıkça gözenek büyüklüğü de artar (Dilek, 2012).

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; Dilek, 2012).

Proteinlerin saflaştırılmasında kullanılan bir özellik de çözünürlük farklılığıdır. Bu işlem genelde proteinleri buldukları çözücüde ayırmak ve konsantre etmek için kullanılır. Protein çökeltisinin az miktarda uygun bir sıvıda süspansiyon edilmesi ile başlangıçtakine göre daha yüksek konsantrasyonda bir protein çözeltisi elde edilmiş olur. 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 çözeltisi, 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 çözeltiden hemen hemen kantitatif olarak çökeltilebilir; yani yüksek tuz konsantrasyonunda

proteinlerin çözünlüğü azalır ve hatta çökerler. Bu olaya salting-out adı verilir (Dilek, 2012).

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

Analitik amaçlı çöktürme için trikloroasetik asit (TCA) veya organik çözücüler (aseton, etanol, metanol) kullanılır. Kuvvetli bir asit olan TCA, proteindeki amino asitlerin yan zincirlerindeki iyonik grupların yüklerini değiştirerek iç elektrostatik dengeyi bozar ve protein denatürasyonuna yol açar. Denatüre olan proteinler çözünlükleri değişeceğinden çökerler. Eğer çalışmada denatürasyonunun bir önemi yoksa TCA çöktürmesi uygulanır. Aseton, etanol, metanol gibi organik çözücüler proteinlerin çözünlüğünü azaltarak çökmelerine yol açarlar. Denatürasyona yol açmamak için işlem soğukta (0-4 °C) gerçekleştirilir.

Preparatif amaçlı çöktürme için tuzlar (örneğin, amonyum sülfat), organik çözücüler (aseton, etanol, metanol) veya polietilen glikol (PEG) gibi organik polimerler kullanılır. Tuzla çöktürme proteinlerin deriştirmesinde ve saflaştırılmasında genellikle kullanılan bir yöntemdir. Ortama eklenecek nötral tuz, proteinlerin moleküler yapısının bozulmadan bir araya gelmelerine ve çözeltiden ayrılarak çökmelerine yol açar. Proteinler farklı tuz konsantrasyonlarında çöktürülerek birbirinden ve diğer moleküllerden ayrılabilir. Çöktürme işleminde genellikle amonyum sülfat ((NH₄)₂SO₄) kullanılır. Amonyum sülfat ucuz ve etkin olması yanında çözeltide fazla ısınmaya yol açmayan, çözünlüğü yüksek, pH'ı fazla etkilemeyen bir tuzdur. Birçok protein %55 amonyum sülfat doyumluğunda çöker. %70 doyumluk genelde tamamının çökmesini sağlar (Arda ve Ertan, 2008).

Elektriksel yük farkına dayanan ayırma metotlarından biri olan iyon değişim kromatografisinde duran fazda bulunan ve yerlerinden kolaylıkla ayrılabilen iyonlar çevrelerindeki (yürüyen sıvıdaki ve karışım içindeki) iyonlarla yer değiştirirler. Bu değişim sonucunda duran fazın fiziki görünümünde değişme meydana gelmez. İyon

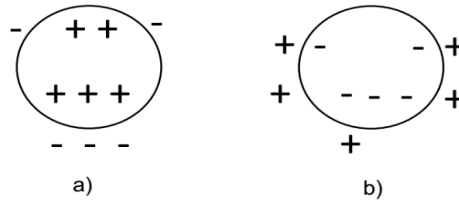
değişim kromatografisi ile basit inorganik ve organik iyonlar birbirlerinden ayrılacağı gibi enzimler, hormonlar ve nükleik asitler gibi biyolojik önemi olan polielektrolitler de kolaylıkla ayrılabilir.

İyon değişim kromatografisi ile ayırım için iyonik yapı şarttır. Başlıca üç tip iyon değişim materyali vardır. Bunlar; iyon değişim reçineleri, iyon değişim jelleri, iyon değişim selülozlarıdır.

İyon değiştiriciler iki bölümden oluşur:

- Matriks; içinde ve yüzeyinde kimyasal olarak (kovalent bağlarla) bağlanmış yüklü gruplar bulunan üç boyutlu, çapraz bağlarla bağlanmış çözünür olmayan dolgu maddesidir.
- Hareketli karşı iyonlar; karşı iyonlar tersinir olarak aynı yükteki başka iyonlarca değiştirilebilirler, çözünür olmayan dolgu maddesinde herhangi bir değişikliğe yol açmazlar (Boyer, 1993).

İyon değiştirici dolgu maddesi şayet pozitif gruplarla kimyasal olarak bağlanmışsa, karşı iyonlar negatif olup, bu tür iyon değiştiriciler negatif iyonları değiştirdiklerinden anyon değiştiriciler olarak adlandırılırlar. Şayet dolgu maddesi negatif gruplarla kimyasal olarak bağlanmışsa, karşı iyonlar pozitif olup, bu tür iyon değiştiriciler pozitif iyonları değiştirdiklerinden katyon değiştiriciler olarak adlandırılırlar.



Şekil 1.10. İyon değiştiriciler a) Anyon değiştiriciler ve değiştirilebilir karşı iyonlar b) Katyon değiştiriciler ve değiştirilebilir karşı iyonlar (Pharmacia Fine Chemicals AB, 1980)

En geniş çapta kullanılan anyon değiştiricilerdeki pozitif yüklü işlevsel gruplar, aminoetil $C_2H_4N^+H_3$, trietilaminoetil $C_2H_4N^+(C_2H_5)_3$ ve dietilaminoetil $C_2H_4NH^+(C_2H_5)_2$ gruplarıdır. Katyon değiştiriciler ise negatif yüklü gruplar olarak, genelde sülfü (SO_3^-) ve karboksimetil (CH_2COO^-) grupları bulunur.

Dolgu maddesi alüminyum silikatlar, sentetik reçineler, polisakkaritler vb. olabilir. Dolgu maddesinin tabiatı iyon değiştiricilerin mekanik kararlılığını, akış özelliğini, bozulabilen biyolojik maddelere karşı davranışını ve kısmen de kapasitesini belirler.

pH 4-9'un dışındaki pH'larda stabilitesini koruyan enzim sayısı çok az olduğundan iyon değişimi kromatografisinde kullanılan absorban sayısında sınırlıdır. En çok kullanılan absorbanlar selüloz, agoroz ve dekstranın karboksimetil ve dietilaminoetil türevleridir.

Safılaştırma için en uygun işlevsel grubu içeren matriksin seçiminde, proteinin pH stabilitesi de dikkate alınmalıdır. Seçilecek matriksin por özelliği, bağlama kapasitesini etkilediği için göz önünde tutulmalıdır (Arda ve Ertan, 2008).

İyon değişim kromatografisi temelde iki etaptan oluşur: Birincisi örnek tatbiki ve iyon değiştirici üzerinde adsorpsiyon, ikincisi ise adsorbe edilen örnek bileşenlerinin kolondan ayrılarak elüe edilmeleridir (Boyer, 1993).

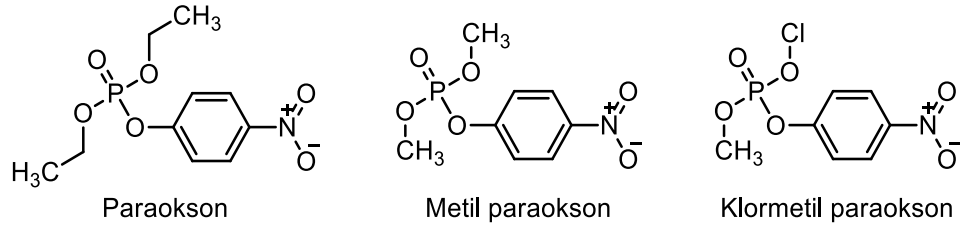
Proteinler iyon değiştiricilere zıt yüklü gruplar arasındaki iyonik etkileşimle tersinir olarak bağlanırlar. Bağlanan proteinler ya tampon çözeltisinin iyonik gücü kademeli olarak arttırılarak ya da tampon çözeltisinin pH'ı değiştirilmek suretiyle protein yüzeyindeki etkileşen grupların yükü yok edilmek suretiyle kolondan ayrı ayrı elüe edilirler. Bütün bu işlemler esnasında iyonik değiştiricinin yükü sabit kalacak bir pH aralığı seçilmelidir yoksa bütün proteinler kolondan ayrılmadan birlikte elüe olurlar. Bağlanma gücü hem proteinin izoelektrik noktasıyla hem de toplam yükü ile ilişkilidir. Dolayısıyla aynı izoelektrik noktasına sahip iki protein denge izoelektrik odaklama ile ayrılmazken iyon-değişim kromatografisiyle ayrılabilirler (Johnstone ve Thorpe, 1982).

Enzimlerin safılaştırma yöntemlerinden biri olan afinite kromatografisinde, spesifik ligandları esasına dayanılarak proteinlerin ayrılması yöntemidir. Ligand enzime son derece spesifik olduğundan hemen enzime bağlanır. Diğer enzim ve moleküller ortamda tutunamadıklarından hemen kolonun akış yönüne ilerleyerek safılaştırmak istediğimiz enzimi yalnız bırakırlar.

Protein tayiniyle safılaştırmanın verimi, birim protein kütlesi başına fonksiyonel aktivitenin ölçülmesi ile de kaç kat safılaştırıldığı belirlenir. Protein saflık testi ve kaç yabancı protein içerdiği jel elektroforezi ile tespit edilir. Safsızlıkların molekül kütleleri SDS-PAGE ile belirlenir ve safsızlıklar jel geçirgenlik kromatografisi ile uzaklaştırılır.

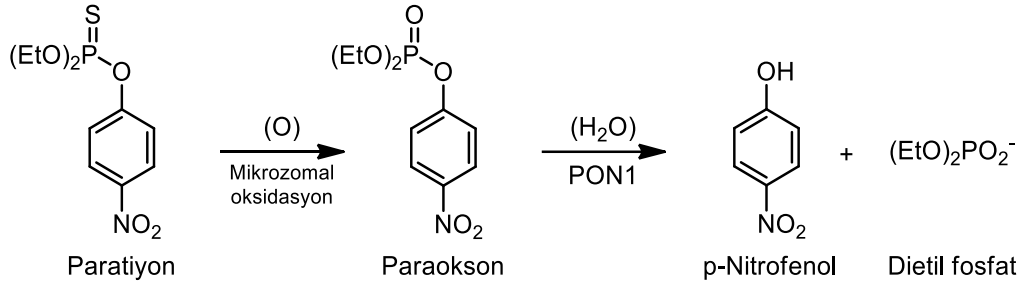
Paraoksonaz (PON), organik fosforlu bir insektisit olan paratiyonun aktif metaboliti paraoksonu hidroliz etme yeteneğine sahip, A-esterazlar grubundan önemli bir karaciğer enzimidir. Düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oksidasyonunun ateroskleroz sürecinin başlangıç evresini oluşturması, enzimin antioksidan özelliğinin önemini ortaya koymaktadır (Durrington vd., 2001; Ng vd., 2005). PON enziminin önceleri yalnızca organofosfat bileşiklerini hidroliz etme özelliğinin bilinmesi nedeniyle, sadece toksikoloji alanındaki araştırma çalışmaları yapılmış, son yıllarda ise antioksidan özelliği ile HDL'nin yapısında bulunduğunun anlaşılmasından dolayı, kronik arter hastalığıyla ilişkisine yönelik çalışmalar artmıştır (Azarsız, 2000).

Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği'nin (IUBMB) enzim adlandırma sistemine göre ise PON enzimi iki farklı enzim numarası (E.C.3.1.1.1 ve E.C.3.1.8.1) ile eşleştirilmiştir. Fakat 1990'lı yıllarda, PON enziminin arilesterazdan farklı olarak sadece fenolik esterleri değil de fosforik ve fosfinik asit esterlerini de hidroliz etmesinin anlaşılmasından dolayı tek bir enzim numarasıyla (E.C.3.1.8.1) tanımlanmasına karar verilmiştir (Erdem, 2004). Enzim, paraokson, metil paraokson ve klormetil paraokson'a karşı yüksek derecede afinite gösterdiğinden ve ayrıca aktivitesinin ölçümünde ilk olarak paraokson substratı kullanıldığından PON adını almıştır (Mackness vd., 1998).



Şekil 1.11. Paraokson, metilparaokson ve klormetil paraoksonun kimyasal yapıları

PON enzimi geniş bir substrat özgüllüğü gösterirken, fizyolojik substratı henüz tam olarak belirlenememiştir. Fakat arilesteraz, organofosfataz ve laktonaz aktivitelerine sahip olduğu tespit edilmiştir. İnsan serum PON enzimi, paratiyon'un metabolik ürünü olan ve organizmaya zararlı bir pestisit olan paraoksondaki O-P ester bağının hidrolizinden sorumlu olan esterazdır (Aviram vd., 1998). PON enzimi, paratiyon'un oksidatif modifikasyonu ile metabolizmada oluşan paraoksonu hidroliz ederek paraoksone oranla göreceli olarak daha az zararlı olan p-nitrofenol ile dietil fosfat bileşiklerini oluşturmaktadır (Şekil 1.12) (Mackness vd., 1998; Lee vd., 2001).

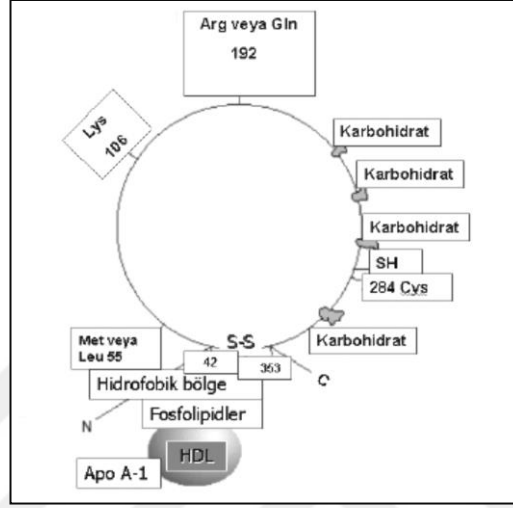


Şekil 1.12. PON1 enziminin hidroliz reaksiyonu (Bargota vd., 2003)

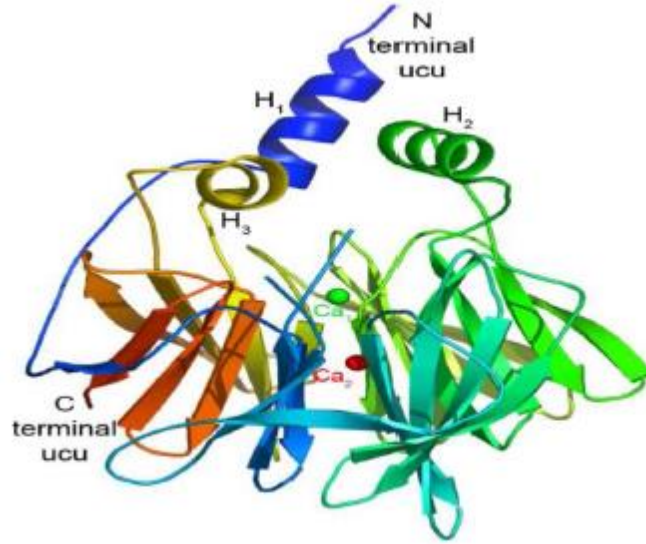
HDL bağımlı antioksidan bir enzim olan PON, LDL ve HDL'yi lipid peroksidasyonundan korumakta ve HDL'nin başlıca anti-aterosklerotik (damar sertleşmesini önleyici) bileşeni olarak düşünülmektedir. Yapılan çeşitli çalışmalarda diyabet, ailesel hiperkolesterolemi ve böbrek rahatsızlıkları gibi ateroskleroz gelişimine yatkın bireylerde PON aktivitesinin düşük olduğu bulunmuştur (Mackness vd., 2004). PON enzim aktivitesinin yetişkinlerde yaşın artışıyla ilişkili olarak azaldığına dikkat çekilmiştir (Seres, 2004). PON enzim aktivitesi, yeni doğanlarda ve prematüre bebeklerde yetişkindekine yaklaşık yarısı kadardır. Doğumdan yaklaşık bir yıl sonra erişkindeki düzeyine ulaşır (Mackness vd., 1998). Kardiyovasküler hastalıklara önyak olan diyet ve yaşam tarzı faktörlerinin PON1 aktivitesini ve/veya konsantrasyonunu etkilediği gözlemlenmiştir (Kudchodkar, 2000; Klemola, 2002).

Memeli türleri arasında geniş bir dağılıma sahip olan PON enzimi, balıklarda, kuşlarda ve eklembacaklılar gibi omurgasızlarda mevcut değildir. PON gen ailesinin PON1, PON2 ve PON3 olmak üzere 3 üyesi olduğu belirlenmiştir. Çalışmalar daha çok PON1 üzerine yoğunlaşmıştır. Bu üç PON enzim genlerinin memeli türleri arasında yüksek benzerlik içeren bir aminoasit dizisine sahip olduğu bulunmuştur (Primo-Parmo, 1996; La, 1999). PON1 ve PON3 karaciğerden sentezlenirken, PON2 beyin, karaciğer, böbrek ve testisler gibi birçok organdan sentezlenmektedir (La, 1999). PON2 enzimi insanda hemen hemen tüm dokularda bulunmasına rağmen, serumda bu enzime rastlanamamıştır (Ng vd., 2001). *İn vitro* çalışmalarda PON2, aynen PON1'in gösterdiği LDL'nin lipid peroksidasyonunu önleme ve kısmen okside olmuş LDL'yi indirgeme gibi antioksidan özellikleri olduğu belirlenmiştir (Ng vd., 2001). PON3 plazmada HDL'ye bağımlı olarak bulunur ve ilk olarak karaciğerde tespit edilmiştir (Reddy, 2001). PON3 enzimi LDL'yi oksidasyondan korumada PON1'den daha etkilidir (Draganov, 2000).

PON, aktivitesi ve kararlılığı için Ca^{2+} iyonuna bağımlı, 43-45 kDa molekül ağırlığına sahip bir enzimdir (Canales, 2003; Blatter, 1993). İzoelektrik noktası 5,1'dir. 354 amino asit içeren serum PON1 enziminin amino asit bileşimi yüksek lösin içeriği dışında bir özellik göstermez (Gan vd., 1991). Yapısında yer alan 3 sistein rezidüsünden 284'deki serbest iken 42. ve 353. sistein rezidüleri arasında tek disülfid bağı bulunur (Şekil 1.13).



Şekil 1.13. İnsan PON1 enziminin yapısı (Aviram vd., 1999)



Şekil 1.14. PON enziminin üç boyutlu görünümü (Harel vd., 2004)

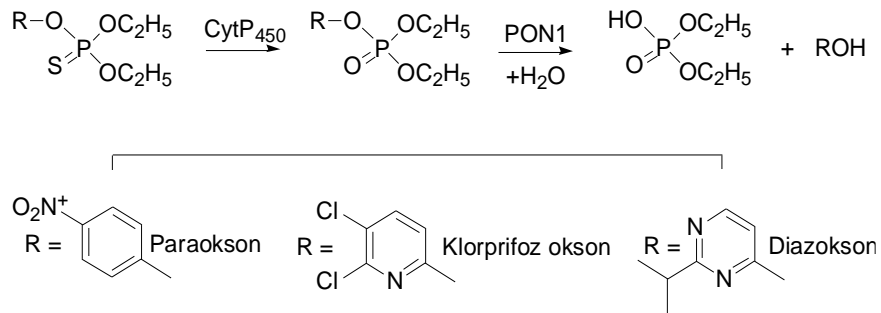
Enzimin üç boyutlu yapısında β -kırmalı tabakaların merkezinde birbirlerine $7,4 \text{ \AA}$ uzaklıkta 2 tane Ca^{2+} iyonu bulunmaktadır. Farklı afiniteye sahip olan bu kalsiyum iyonlarından birisi (Ca_1) üstte, diğeri (Ca_2) ise merkezde bulunmaktadır. Ca_1 yapısal

özelliği olup yapıdan uzaklaştırılması dönüşümsüz denatürasyona neden olmaktadır (Kuo vd., 1998). Katalitik etkinlikte rol oynayan diğer (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.

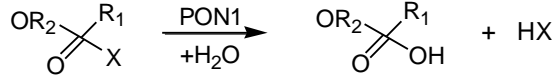
PON1 enzimi, pervane şeklinde yerleşmiş ve her biri 4 sıradan oluşan 6 adet β-kırmalı tabakadan meydana gelmiştir. Enzim, amino terminaline yakın 6D tabakasında bulunan Cys42 kalıntısı ile 6C tabakasında bulunan Cys353 kalıntısı arasında disülfid bağıyla bağlanarak üç boyutlu yapısını kazanmaktadır (Jawad vd., 2002).

PON üzerinde 4 tane potansiyel N-glikozillenme bölgesi vardır. İki tanesi (Asn227 ve Asn270) β-tabakaların merkezinde, diğer ikisi yüzeye bakan bölgede (Asn253 ve Asn324) yer almaktadır. PON1 memeli hücrelerinde sentezlendikten sonra bu noktalardan glikozillenir (Harel vd., 2004).

PON1 enzime ilk olarak 1961 yılında insan serumunun elektroforezi sonrası yüksek yoğunluklu lipoproteinlerde oluşan immuno çökeleklerde rastlanılmıştır (Mackness vd., 2004). PON hakkında yapılan ilk çalışmalar, enzimin organofosfatları, yaygın olarak kullanılan böcek ilaçlarını hidroliz etme özelliği üzerine yapılan çalışmalardır. PON enzimi detoksifiye ve antiaterojenik (damar sertliğini azaltıcı) etkileri ile bilinmektedir. PON1 birçok organofosfat bileşiklerini, sinir ajanlarını (soman, sarin gibi) ve çevreyi tehdit edici özelliklerdeki böcek ilaçlarını (klorpirifos okson ve diazokson gibi) hidroliz etme özelliğine sahiptir (Şekil 1.16 ve Şekil 1.15). PON'un aynı zamanda laktonları da hidroliz edebildiği görülmüştür (Şekil 1.17).

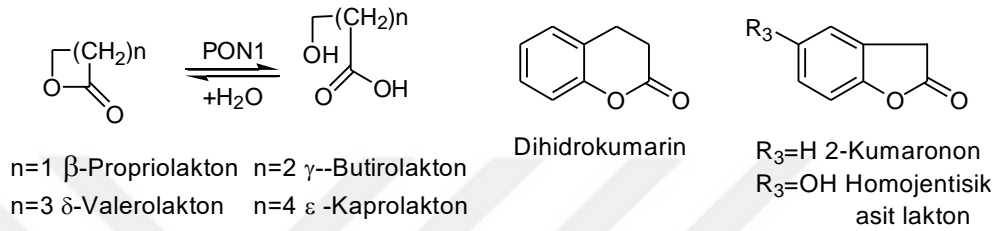


Şekil 1.15. İnsektisitlerde yaygın olarak kullanılan okson metabolitlerinin hidrolizi



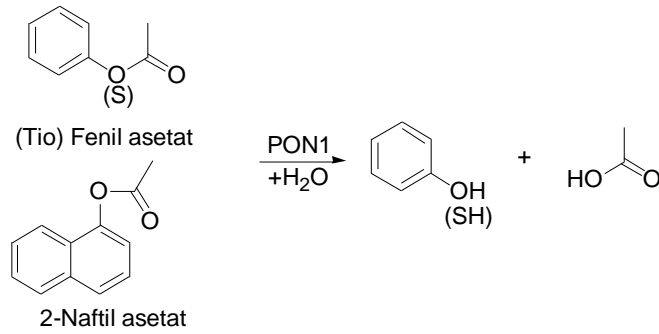
$\text{R}_1=\text{N}(\text{CH}_3)_2$	$\text{R}_2=\text{CH}_2\text{CH}_3$	$\text{X}=\text{CN}$	Etil N-dimetilfosforoamidosiyanid (Tabun)
$\text{R}_1=\text{CH}_3$	$\text{R}_2=\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	$\text{X}=\text{F}$	Izopropil metilfosfonofluoridat (Sarin)
$\text{R}_1=\text{CH}_3$	$\text{R}_2=\text{CH}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{CH}_3)_3$	$\text{X}=\text{F}$	Pinakolil metilfosfonofluoridat (Soman)

Şekil 1.16. Sinir gazlarının hidrolizi



Şekil 1.17. Lakton hidrolizi

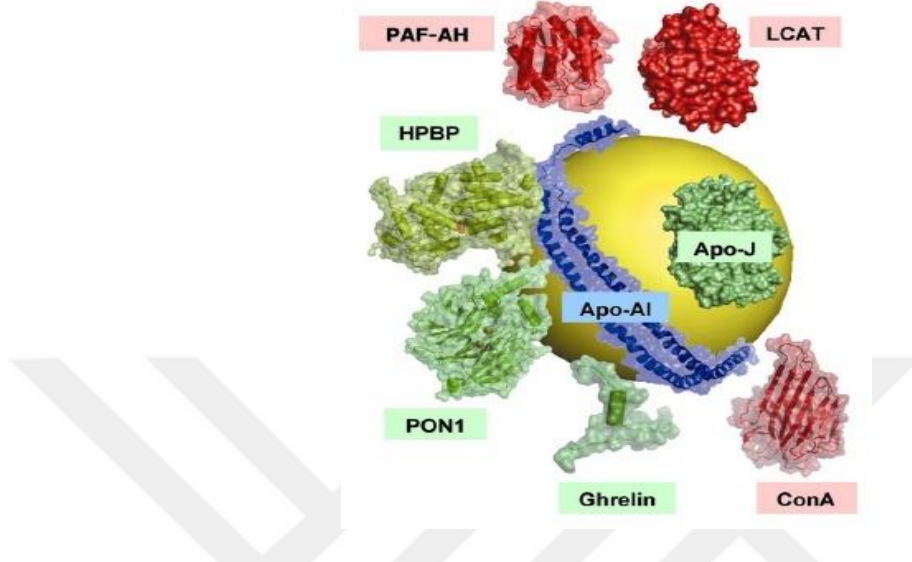
PON1 enzimi bu aktivitelerinin yanısıra sistematik sınıflandırmada yer aldığı A-esterazlar grubunun özelliği nedeniyle fenilasetat gibi ester substratlarını da hidrolizleyebilmektedir. Ayrıca, tiyofenil asetat ve 2-naftil asetat da PON1 enziminin aromatik ester substratları arasında bulunmaktadır (Şekil 1.18) (Eckerson vd., 1983; La Du, 1992; Sorenson vd., 1995).



Şekil 1.18. Aromatik esterlerin hidrolizi

İnsan serum PON1 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 PON'un gerçekte Apo A1 ve klusterin (Apolipoprotein J) içeren HDL tipleri ile ilişkili olduğunu ve PON'un toplam HDL'nin çok küçük bir bölümünü oluşturduğunu göstermiştir (Şekil 1.19)

(Mackness vd., 1996). Apo A1, PON1'in HDL ile birleşmesi için gerekli olmamasına rağmen PON1-HDL kompleksinin stabilizasyonunu sağlar (Sorenson, 1999; Oda, 2001).



Şekil 1.19. HDL partikülü ve PON 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 ve Rifkind, 1989; Navab, 1996). HDL'ye bağlı bu enzimlerden biri olan PON1, karaciğerden sentezlenen ve burada depolanan, geniş bir substrat özgüllüğüne sahip olan, HDL'nin bu antioksidan etkiyi göstermesinde büyük bir sorumluluk üstlenen bir enzimdir (Primo-Parmo vd., 1996; Mackness vd., 1995).

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

İnsan serumundan saflaştırılan PON1 enzimi üzerine etkileri incelenen antibiyotiklerin bazı özellikleri aşağıda anlatılmaktadır.

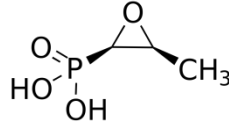
Monurol; etkin maddesi 3 g fosfomisin olup, eşdeğeri 5,631 g fosfomisin trometamol'dur. Fosfomisin alt üriner sistem enfeksiyon tedavisinde kullanılan bir antibiyotik türü olup, karakteristik farmakolojik özellikleri ve terapötik aralığıyla geniş antimikrobiyal spektruma sahiptir. Fosfomisin, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* ve glikopeptidlere duyarlı veya dirençli *enterokoklar* gibi gram-pozitif ve birçok antibiyotiğe dirençli *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Salmonella* cinslerine ait türler ile *E.coli* gibi gram-negatif patojenlerin çoğuna karşı hızlı bakterisidal aktiviteye sahiptir. Oral yoldan verilmesinden sonra idrarda yüksek seviyelere ulaşması ve serum yarılanma ömrünün uzun olması nedeniyle fosfomisin, *E.coli* ve *Enterococcus faecalis* tarafından oluşturulan idrar yolu enfeksiyonlarının tek doz tedavisinde kullanılır.

Fosfomisine duyarlı bakterilerin neden olduğu idrar yolu enfeksiyonlarının (iltihap oluşturan mikrobik hastalık) tedavisinde ve cerrahi girişimlerin neden olabileceği idrar yolu enfeksiyonların önlenmesinde kullanılır. Ayrıca transüretal olarak yapılacak her türlü tanı ve tedavi amaçlı cerrahi girişimlerde (polip eksizyonu, transüretal prostat rezeksiyonu, ESWL işlemi, kateter uygulanması gibi) profilaktik olarak kullanılır.

Fosfomisin, *Streptomyces fradiae*, *Streptomyces viridochromogenes* ve *Streptomyces wedmorensis* türlerinin fermentasyon ürünü olup fosfoenolpirüvat analogudur. Bakteri hücre duvarını oluşturan peptidoglikan tabakası, N-asetil glikozamin ve N-asetil muramik asidin (NAMA) birbirini takip eden birimlerinin pentapeptid çapraz bağları ile bağlanması sonucu oluşmaktadır. Bakterinin hücre duvar sentezinde ilk basamak stoplazmada gerçekleşmekte ve bu basamak, üridin difosfat (UDP)-NAG'ın 3'-hidroksil grubundan inorganik fosfatın ayrılması ile fosfoenol pirüvattan gelen enol pirüvatın UDP-NAG'a eklenmesini içermektedir. Bu reaksiyon, *E.coli* gibi bakterilerde gerekli temel bir sitoplazmik enzim olan UDP-NAG enol pirüvil transferaz (MurA) enzimi tarafından katalize edilir (Baylan, 2010).

Fosfomisin antibakteriyel spektrumu *in vitro* üriner sistem enfeksiyonlarında sık olarak izole edilen birçok gram negatif ve gram pozitif bakteriyi içermektedir. Bunlardan bazıları *E.coli*, *Citrobacter* türleri, *Klebsiella* türleri, *Proteus* türleri, *Staphylococcus* türleri, *Salmonella*, *Streptococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Serratia* türleridir. İndol pozitif proteuslar orta derece duyarlı veya dirençlidir. Fosfomisin trometamol *in vitro* olarak bakterinin üriner sistem epiteline yapışmasını engeller.

Duyarlı patojenlerin neden olduğu komplike olmamış alt üriner sistem enfeksiyonlarının tedavisinde endikedir.



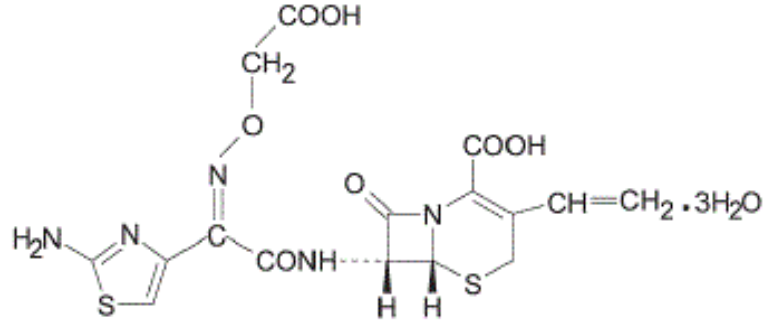
Şekil 1.20. Fosfomisin molekülünün yapısal formülü

Suprax; sefiksim adlı bir ilacın etkin maddesini içermektedir. Bu ilaç üçüncü kuşak sefalosporinler olarak bilinen bir antibiyotik grubuna dahildir. *E.coli* ve *Proteus mirabilis*'e bağlı üriner sistem enfeksiyonlarında, *Haemophilus influenza* ve *Streptococcus pyogenes*'in neden olduğu otitis mediyada, *Streptococcus pyogenes*'e bağlı faranjitte ve komplike olmamış gonorede oral yolla etkilidir. Oral süspansiyonu suprax ve diğerleridir. Sefiksimin yarılanma süresi ($t_{1/2}$)'si 3-4 saattir ve hem idrar ile hem de safra ile vücuttan dışarı atılır (Dandan ve Brunton, 2017).

Pek çok antibakteriyal ilacın etkilemediği ciddi enfeksiyonlarda kullanılır. Ameliyat öncesi veya sonrası enfeksiyonlardan korunmak için kullanılabilir. Oral kullanılan sefiksim, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Branbaella catarrhalis*lerin etken olduğu bronşit, sinüzit, akut otitis edia, akut pyelonefritte kullanılır.

Toksisiteleri düşük olan antibakteriyel ilaçlardır. En sık görülen istenmeyen tesirleri alerjik reaksiyonlardır. Penisiline alerji öyküsü olan kişilerde alerjik reaksiyon oluşma riski %5-10 artar (Dural, 2008).

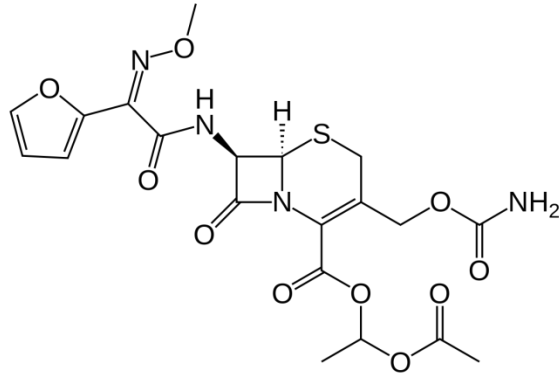
Sefalosporinler β -laktam halkası taşıyan 7-aminosefalosporanikasit yapısını teşkil etmektedirler. Vücuda giren bakterilerin etkisiz hale gelmesi için bakterilerin yapılarında bulunan koruyucu görevindeki hücre duvarının yapımını önleyerek bakterisidal/ bakteriostatik (konsantrasyona göre) etki göstermektedirler.



Şekil 1.21. Sefiksım molekülünün yapısal formülü

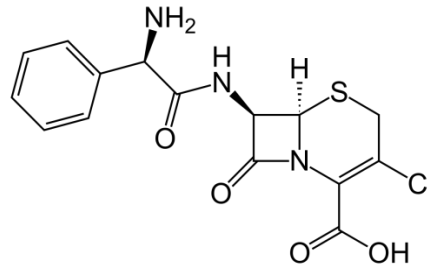
Cefurol; bakterilerin üzerinde öldürücü etkiye sahip ikinci kuşak sefalosporin grubu bir antibiyotiktir. Etkin madde olarak 500 mg sefuroksime eşdeğer miktarda sefuroksim aksetil içerir. Sefuroksim bazı *Citrobacter* ve *Enterobacter* türlerine karşı daha geniş gram-negatif etkinlik ile lorakarbefe benzer. Sefuroksimin *Bacteroides fragilis*'e etkinliği yoktur. İlaç 8 saatte bir verilir. BOS konsantrasyonları, plaza konsantrasyonunun yaklaşık %10'udur ve *Haemophilus influenzae* (ampisiline duyarlı şuşlar dahil), *Neisseria meningitidis* ve *Streptococcus pneumoniae*'a bağlı menenjit tedavisinde etkilidir. Sefuroksim aksetil, sefuroksimin 1-asetiloksietil esteridir. Oral dozun %30-50'si emilir ve sonra ilaç sefuroksime hidrolize olur; bunun sonucu plazma konsantrasyonları değişir (Dandan ve Brunton, 2017).

Streptococcus pneumoniae, *Haemophilus influenzae* ve *Moraxella catarrhalis* tarafından hastane dışında oluşturulan akut pnömonilerin tedavisinde kullanılacak en optimal ikinci kuşak oral sefalosporin olarak kabul edilmektedir. Epiglottit, akut sinüzit, yumuşak doku enfeksiyonları, komplike olmayan üriner sistem enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılır (Akova vd., 2005). Erken Lyme hastalığının (kene ısırması ile insana geçen *Borrelia burgdorferi* adlı bakterinin yol açtığı hastalık) tedavisinde de kullanılır. Kardiyak, pulmoner, özofajiyel ve vasküler operasyonlarda değişik dozlarda kullanılmaktadır. İkinci kuşak sefalosporin grubunda olan bu ilaçlar plasentayı geçerler, kemiklere iyi nüfuz ederler. Bundan dolayı ortopedide profilaksizde ameliyat ya da tedavi öncesi kullanılır.



Şekil 1.22. Sefuroksim aksetil molekülünün yapısal formülü

Sefklav; ağız yoluyla verilen ikinci kuşak sefalosporin grubu antibiyotiktir. 1000 mg sefaklor'a eşdeğer 1048,965 mg Sefaklor Monahidrat ve 125 mg Klavulanik Asit'e eşdeğer 297,876 mg Potasyum Klavulanat; Syloid Karışımı içerir. Klavulanik asitin sefklav formülündeki varlığı, sefaklorun β -laktamaz enzimlerince parçalanmaktan korur ve sefaklorun etkisini normalde dirençli olan çok sayıda bakteriyi de içine alacak şekilde genişletir. Gram (+) mikroorganizmalara daha az etkili olmalarına karşın anaeroblara ve gram (-) basillere karşı yüksek aktivite gösterirler. İndol (+) proteus ve 1. kuşak sefalosporinlere dirençli olan *E.coli* ve *Klebsiella* bunlara duyarlıdır (Dural, 2008). *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *E.coli* ve *Proteus mirabilis* tarafından sentezlenen β -laktamazlara dayanıklıdır. Alt solunum yolu enfeksiyonları, üst solunum yolu enfeksiyonları, idrar yolu enfeksiyonları, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları tedavisinde kullanılır. En önemli kullanılış yeri ampisiline-rezistan *Haemophilus influenzae*'ye bağlı otitis media'dır. Diğer üst solunum yolu enfeksiyonlarına katkıda bulunan *Moraxella catarrhalis*'e karşı etkilidir (Akova vd., 2005).



Şekil 1.23. Sefaklor molekülünün yapısal formülü

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Main (1956), Costa vd. (1990) ve Li vd. (1993, 1995) tarafından gerçekleştirilen deneylerde, saflaştırılmış tavşan PON1 enjeksiyonunun, paraokson, klorprifoz ve klorprifoz oksona karşı koruma sağladığı gözlenmiştir. Shih vd. (1998) tarafından yapılan ve genetik olarak modifiye edilmiş farelerin kullanıldığı deneyler farede PON1 yokluğunun fareyi klorprifoz oksona karşı aşırı derecede hassas hale getirdiğini kanıtlamıştır. Yine PON1'den yoksun fareler diazokson ve diazinona karşı artan hassasiyet göstermiştir (Shih vd., 1998).

PON1 enzim aktivitesine ilk olarak Uriel (1961) tarafından insan serumunun elektroforezi sonrası HDL'lerin immuno çökeleklerinde rastlanmıştır. Kısmi saflaştırılmış sığır PON1 enziminin lipitlerle ilişkili olduğu ve HDL partikülleriyle yaklaşık aynı moleküler kütleyle sahip olduğu bulunmuştur (Kitchen vd., 1973; Don vd., 1975). Koyunlarda, PON1 aktivitesinin çoğunluğunun Apo A1 içeren HDL partikülleriyle sıkı ilişkili olduğu belirlenmiştir (Mackness ve Walker, 1988). İnsan serumundan saflaştırılması esnasında Apo A1'i PON'dan ayırmanın çok güç olması, Apo A1 ve PON1'in birbirleriyle sıkı ilişkili olduğunu düşündürmüştür (La Du ve Novais, 1989). Yapılan immunoaffinite çalışmaları sonucu PON1'in HDL'ye özgü parçacıklar olan Apo A1 ve klusterin ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Blatter vd., 1993; Kelso vd., 1994).

PON1'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 vd. (1991) tarafından tesbit edilmiştir ve bu çalışmada PON1'in okside lipidlerin LDL partiküllerindeki birikimini engellediği gözlemlenmiştir. Bunu takiben Watson vd. (1995) PON1'in okside LDL'nin biyolojik aktivitesini azalttığını açıklamıştır.

İlk olarak Mallinckrodt vd. (1979) yaptıkları çalışmada enzimin genetik polimorfizm gösterdiğini bulmuşlardır. PON1 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 vd., 1993). Polimorfizm, PON izoenzimlerinin lipid peroksitlerle olan hidrolitik aktivitesini etkilemektedir. Mackness vd. (1998) PON1 192 R allelinin kronik kalp hastalıklarıyla pozitif olarak ilişkili olduğunu bulmuştur. 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 vd., 2001); her iki allozim fenilasetatı yaklaşık aynı hızda hidroliz eder. PON1 R192 polimorfizminin laktonaz aktivitesinin Q192 polimorfizminden yaklaşık iki kat fazla olduğu bulunmuştur (Khersonsky ve Tawfik, 2006).

PON enzimi ilk olarak, Mackness vd. (1991) tarafından, insan serumunun ultra santrifüjlenmesi ile HDL'den ayrıştırılmış olup, HDL üzerinde Apo A1'e bağımlı olarak aktivite gösterdiği ve LDL üzerindeki lipoperoksit birikimini azalttığı tespit edilmiştir. Ayrıca PON1'in HDL'nin çok küçük bir bölümünü oluşturduğu görülmüştür. Farklı popülasyonlarda (Fransa, Sudan halkı vs) yapılan polimorfizm analizleri sonrasında enzimin allellik formları ile HDL, Apo A1 ve Apo A2 arasındaki istatistiksel ilişki saptanmıştır (Mackness vd., 1996; Azarsız, 2000). Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda ise farklı türdeki kardiyovasküler hastalıklarla, PON enziminin aktivitesi arasındaki bağlantı araştırılmış, lipoproteinler ile lipid peroksidasyonu arasındaki bağlantı incelenmiş ve enzimin aminoasit dizisi belirlenmiştir (Erdem, 2004).

Plazma lipoprotein düzeylerinin normalden farklı olduğu Fish-eye sendromunda, HDL kolesterol plazma konsantrasyonunun %90 oranında, PON1 aktivitesinin ise %89 oranında azaldığı gösterilmiştir. Diğer yandan bir başka lipoprotein metabolizma hastalığı olan Tangier hastalığında ise PON1 enzim aktivitesi tayin edilememiştir (Laitinen vd., 1993; Mackness vd., 1997).

Yapılan birçok çalışmada; insan serum PON enziminin memelilerde çeşitli organofosfatların zehirin etkisini gidermede önemli rol oynadığı görülmüştür (Li vd., 1995; Pond vd., 1995). Ayrıca yapılan ayrıntılı çalışmalarda kuşların organofosfatlara karşı memelilerden çok daha hassas bir seçici toksisite gösterdiği bulunmuştur ve bunun da kuşlardaki serum PON enziminin neredeyse hiç bulunmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Brealey vd., 1980).

Sorenson vd. (1995) yaptıkları çalışmada saflaştırılmış insan ve tavşan PON1 enziminin doğal halinde serbest sülfhidril grubu bulunduğunu tespit etmişler ve 284. pozisyonundaki sistein rezidüsünün enzimin antioksidan etkisi için gerekli aktif bölgesinin bir parçası olduğunu bulmuşlardır.

Yapılan laboratuvar çalışmaları; HDL'nin okside edici şartlar altında bekletildiğinde LDL üzerindeki lipit peroksit birikimini enzimatik bir mekanizmayla azalttığını göstermiştir (Mackness vd., 1993a). Yapılan bir diğer çalışma ise PON1 enziminin HDL'nin bu özelliğiyle ilgili parçalardan biri olduğunu göstermiştir (Mackness vd., 1991a, 1993b). Ayrıca; PON1 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 vd., 1991b, 1993b; Watson vd., 1995; Aviram vd., 1998).

PON1 düzeyinin kardiyovasküler hastalıklarda, sigara içenlerde, hiperkolesterolemi hastalarında, ileri yaşta insanlarda, obezitede, menopozda ve böbrek yetmezliklerinde azaldığı bulunmuştur (Mackness vd., 1998). Nishio ve Watanabe (1997) yaptıkları *in vitro* çalışmalarda, sigarada bulunan toksik maddelerin PON1'in enzimatik aktivitelerini inhibe ettiğini göstermişlerdir. Aşırı düzeyde sigara içen bireylerde sigaranın bileşiminde yer alan maddelerin PON1 aktivitesini azalttığı, serum oksidan aktiviteyi ise arttırdığı, Gürsu vd. (2002) tarafından da bildirilmiştir.

Körfez Savaşı Sendromu olarak adlandırılan hastalık, Irak'a gönderilen Amerikan askerlerinde belirlenmiştir. Askerlerin bazılarında bu hastalığa bağlı olarak yorgunluk, nörolojik hasarlar ve kas güçsüzlüğü gibi belirtiler tespit edilmiştir. Bazılarında ise bu belirtilere rastlanmamıştır. Irak tarafından kimyasal silah olarak kullanıldığı düşünülen sarin, diazokson gibi organofosfat bileşiklerinin PON enzimi tarafından zehirin etkisini giderdiğinin anlaşılmasından sonra körfez savaşına katılan askerlerin PON aktiviteleri araştırılmış ve körfez savaşı sendromu görülen hastalarda PON aktivitesi oldukça düşük tespit edilmiştir (Furlong vd., 2000).

Yapılan çalışmalar sonucu PON aktivitesinin diyabet ve ailesel hiperkolesterolemi gibi ateroskleroz ile yakından ilişkili olan hastalıklarda düşük olduğu gözlemlenmiştir (Mackness vd., 1991b). Yapılan çalışmalara göre PON1 enzimi; kronik kalp hastalıkları

riskini, aterosklerotik lezyon ilerlemesinde gerekli proinflamatuvar molekülleri yıkarak azaltığı bulunmuştur (Azarsız vd., 2000).

Fareler üzerinde yapılan çalışmalarda serum PON1 enziminin, antioksidan ve antiaterojenik etkilere sahip, HDL bağımlı bir laktonaz olduğu bulunmuştur (Getz ve Reardon, 2004). PON1 enziminden yoksun farelerde ateroskleroz gelişiminin hızlandığı ve oksidatif stresin arttığı gözlenmiştir (Shih vd., 2000; Rozenberg vd., 2003). Oysa PON1 enzimi transfer edilen farelerde, oksidatif stresin azaldığı, lezyonların küçüldüğü ve sayısının azaldığı görülmüştür (Tward vd., 2002; Rozenberg vd., 2005).

Çelik vd. (2005) organik solventlere maruz kalan işçiler üzerinde araştırmalar yapmışlar, organik solventlere maruz kalan işçilerden sigara içenler ile 15 yıldan daha fazla çalışanların, antioksidan PON1 enzimi aktivitesinde istatistiksel olarak önemli olmayan bir azalma tespit etmişlerdir. Bu gibi işyerlerinde çalışan işçilerin sigara kullanımının önlenmesi ve işçilerin periyodik muayenelerini yaptırmaları konusunda eğitilmeleri gerektiğini belirtmişlerdir (Çelik vd., 2005).

Sarkar vd. (2006) genç hastalarda kronik kalp hastalığı ile PON1 enzimi arasındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla yapmış oldukları çalışmalarda, enzimin, kronik kalp hastalarında fenil asetata karşı daha düşük aktivite gösterdiğini gözlemlemişlerdir.

Nitritlerin PON1 enzimi aktivitesi üzerindeki modifiye etkisi üzerine yapılan bir araştırmada, PON1 enzimi aktivitesinin nitritler tarafından doz ve zaman bağımlı olarak inhibe olduğu tespit edilmiştir. PON1 enziminin inhibisyonunun, triptofan, indirgenmiş glutatyon ve katalaz ilavesiyle azaltıldığı gözlemlenmiş, nitritlerin inhibisyon etkisinin enzimdeki fenil rezidülerini nitratlayarak gösterdiği ve triptofan gibi aromatik amino asitlerin ilavesinin bu etkiyi azaltacağı belirtilmiştir (Abd-Allah ve Mariee, 2008).

PON1 aktivitesi ile semen (meni) parametreleri arasında herhangi bir ilişki olup olmadığı araştırılmıştır ve anormal semen parametrelerine sahip erkeklerde PON1 aktivitesinin düşük olduğu gözlemlenmiştir. Sonuç olarak PON1 aktivitesinin subfertilite patojenezinde önemli bir rol oynayabileceği belirtilmiştir (Verit vd., 2008).

Soran vd. (2008) yaptıkları çalışmada diz osteoartriti olan hastalarda serum PON, A-esteraz, lipid hidroperoksit ve serbest tiyol seviyelerini incelemişlerdir. Çalışmalarını 36 hasta ve 30 sağlıklı birey üzerinde yapmışlar ve hastalarda serum HDL kolesterol,

serbest tiyol, PON ve arilestreraz seviyelerinin kontrol grubuna göre önemli ölçüde düşük; lipid hidroperoksit ve LDL seviyelerinin ise yüksek olduğunu gözlemlemiştir. Bu yüzden, düşük PON ve arilesteraz aktivitelerinin osteoartritli hastalarda lipid peroksidasyonuna artan duyarlılık ile ateroskleroz patojenezinde önemli rol oynadığını belirtmişlerdir (Soran vd., 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 PON1 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 vd., 2008).

Atamer vd. (2008) tarafından 49 hasta ve 25 sağlıklı bireylerde yaptıkları çalışmada karaciğer yağlanması olan hastalarda lipid peroksidasyonu, nitrik oksit ve PON aktivitesi bakımından oksidatif durumdaki değişimleri değerlendirmişlerdir. Hastalarda PON1 aktivitesinin ve nitrik oksit seviyelerinin önemli derecede azaldığını gözlemlemiştir. Sonuç olarak oksidatif stresin bu hastalarda PON1 sentezini baskıladığını belirtmişlerdir (Atamer vd., 2008).

Alici vd. (2008) yaptıkları çalışmada intravenöz anestezi ilaçları olarak kullanılan etomidat, propofol ve ketaminin PON1 enzim aktivitesi üzerine *in vivo* ve *in vitro* etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada bu ilaçların enzim aktivitesini önemli ölçüde azalttığını belirtmişlerdir (Alici vd., 2008).

Pasca vd. (2008) psikolojik bir fonksiyon bozukluğu olan ASD (Autism spectrum disorders)'li hastalarda PON aktivitesi ve polimorfizmini araştırmışlar ve ASD'li hastalarda PON1'in katalitik aktivitesinin ve biyoyararlılığının bozulduğunu gözlemlemiştir.

Liu vd. (2008) yaptıkları çalışmada rekombinant PON1 ve PON3 enzimlerini; LDL oksidasyonunu geciktirme, makrofaj oksidatif stresi önleme ve makrofaj kolesterol akıntısını artırma açısından kıyaslamışlardır. Her iki enzim de LDL oksidasyonunu geciktirmiştir. Fakat PON1 daha etkili olmuştur. Ne PON1 ne de PON3 enzimleri

makrofaj oksidatif stresi önleyememiştir. PON3 makrofaj kolesterol akıntısını artırmıştır. Fakat PON1 makrofajlara karşı sitotoksik bulunmuştur (Liu vd., 2008).

Verit vd. (2008) hamilelik dönemine ait bir hastalık olan hiperemesis gravidarum'lu hastalarda PON1 seviyelerini araştırmışlardır. 34 hasta ve 31 sağlıklı bireyden oluşan çalışmada PON1 aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Hastalarda PON1 seviyesinin düşük; lipid hidroperoksit seviyelerinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Düşük PON1 aktivitesinin hamilelik sırasındaki enflamasyon ve artan oksidatif stresle alakalı olabileceğini belirtmişlerdir (Verit vd., 2008).

Bir çalışmada hiperkolesterolemik postmenapozal kadınlarda serum lipoprotein konsantrasyonu ve PON1 aktivitesi üzerine soya fasulyesinin etkilerini araştırmışlardır. Sonuç olarak soya fasulyesinin serum lipoproteinlerindeki azalmayı ılımlı hale getirmesi ve PON1 aktivitesini artırması nedeniyle kardiyovasküler hastalık riskini azalttığını belirtmişlerdir (Shidfar vd., 2009).

Ekinci ve Beydemir (2009a) yaptıkları çalışmada insan serum PON1 enzimini %34,2 verim ve 3840 U mg⁻¹ aktivite ile saflaştırmış ve PON1 enzim aktivitesi üzerine analjezik ilaçlar olarak kullanılan, lornoksikam, indometazin, tenoksikam, diklofenak sodyum, ketoprofen ve lincomycinin *in vitro* etkilerini araştırmışlardır. Sonuçlara göre analjezik ilaçlar farklı inhibisyon mekanizmaları göstermiş, inhibisyon etkisi büyükten küçüğe lornoksikam, indometasin, tenoksikam, diklofenak sodyum, ketoprofen, lincomycin olarak belirlenmiştir (Ekinci ve Beydemir, 2009a).

Başka bir çalışmada *in vitro* koşullarda insan serumundan PON1 enzim aktivitesi üzerine gemsitabin hidroklorür, asiklovir ve 5-florouracil tıbbi ilaçlarının inhibisyon etkileri araştırılmıştır. PON1 enzimi, insan serumundan amonyum sülfat çökteltme, DEAE-Sephadex A-50 iyon değişimi kromatografisi ve Sephadex G-200 jel kromatografisi kullanılarak yaklaşık %34,2 verimle yaklaşık 231 kat saflaştırılmıştır. Enzim SDS poliakrilamid jel elektroforezinin saflık tayini için kullanılmış ve bu yöntemle moleküler kütle yaklaşık olarak 43 kDa belirlenmiştir. Gemsitabin hidroklorür, asiklovir ve 5- florouracil için IC₅₀ değerleri sırasıyla 26,610 mM, 255,885 mM ve 564,334 mM olarak hesaplanmıştır (Türkeş vd., 2010).

Akbaba vd. (2013) yaptıkları çalışmada yeni bromfenollerin sentezi ve PON aktiviteyi incelenmiştir. PON1 insan serumundan yaklaşık %42 ve 3584 EU x mg⁻¹ spesifik aktivitesi ile saflaştırılmıştır. Sentezlenen bileşikler bir organofosfat hidrolizörü ve bir antioksidan enzim olan PON1 üzerinde inhibitör etkileri göstermiştir. IC₅₀ değerleri 0,123-1,212 mM aralığında belirlenmiştir (Akbaba vd., 2013).

Bazı enzimlerin, organizmalar için kritik olabilen ilaç hedef inhibisyonları olduğu bilinmektedir. PON1, lipid peroksidasyonunu inhibe ederek aterogenezi önlemede kritik bir role sahiptir. PON1 sadece düşük dansiteli lipoprotein değil, HDL'nin de lipid oksidasyonunu önlemek için HDL yapısı üzerinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Bazı tıbbi ilaçların PON1 aktivitesi üzerindeki insan serumundan *in vitro* etkilerini araştırılmıştır. Oksitetrasiklin hidroklorür, netilmisin sülfat, lincomycin hidroklorür, klindamisin fosfat ve streptomisin sülfat için K_i sabitleri sırasıyla 0,2; 3,73; 18,30; 35,80 ve 56,30 mM olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar, yaygın olarak kullanılan bu ilaçların enzimin aktivitesini farklı inhibisyon mekanizmaları ile çok düşük dozlarda inhibe ettiğini göstermektedir (Dilek vd., 2013).

Türkeş vd. (2014) yaptıkları çalışmada kalsiyum kanal blokerleri olan nifedipin, nitrendipin, isradipin ve amlodipin besilatın PON1 aktivitesi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Kalsiyum kanal blokerleri *in vitro* koşullarda PON1 aktivitesini azaltmıştır. İnhibisyon mekanizması amlodipin besilatın yarışmasız iken, nifedipin, nitrendipin ve isradipin rekabetçi olarak belirlenmiştir. Nifedipin, nitrendipin, isradipin ve amlodipin besilat için IC₅₀ değerleri sırasıyla 0,121 mM, 0,130 mM, 0,255 mM ve 0,304 mM olduğu ve K_i sabitleri sırasıyla 0,222 ± 0,049 mM, 0,151 ± 0,067 mM, 0,286 ± 0,137 mM ve 0,321 ± 0,002 mM olduğu hesaplanmıştır ve sonuç olarak kalsiyum kanal blokerlerinin PON1 üzerinde düşük seviyede inhibitör etki gösterdiği belirlenmiştir (Türkeş vd., 2014).

Türkeş vd. (2015) yaptıkları başka bir çalışmada ise insan serumu PON1 üzerine antibakteriyel ilaçların moksifloksasin hidroklorür, levofloksasin hemihidrat, sefepim hidroklorür, sefotaksim sodyum ve seftizoksim sodyumun *in vitro* inhibisyon etkilerini incelemişlerdir. Antibakteriyel ilaçlar düşük konsantrasyonlarda PON1 üzerinde inhibitör etki göstermiştir. K_i sabitleri sırasıyla 2,641 ± 0,040 mM, 5,525 ± 0,817 mM, 35,092 ± 1,093 mM, 252,762 ± 5,749 mM ve 499,244 ± 10,149 mM olarak hesaplanmıştır. Moksifloksasin hidroklorürün inhibisyon mekanizması rekabetçi iken,

levofloksasin hemihidrat, sefepim hidroklorür, sefotaksim sodyum ve seftizoksım sodyum, rekombinant olmayan inhibitörler olduğu belirlenmiştir (Türkeş vd., 2015).

Bir çalışmada steroid olmayan antiinflamatuvar ilaç naprokseninden elde edilen mono ve dinükleer bakır (II) komplekslerinin insan serum PON1 aktivitesi üzerindeki etkileri incelenmiştir. İnsan PON1 enziminin, naproksenden türetilen iki Cu (II) kompleks ile inhibisyonu, substrat olarak dietil 4-nitrofenil fosfat ile PON aktivite yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Kompleksler $[Cu_2(\mu\text{-nap})_4(3\text{-pic})_2]$ (1) ve $[Cu(\text{nap})_2(\text{H}_2\text{O})(4\text{-pic})_2]$ (2) farklı inhibisyon mekanizmaları ile *in vitro* PON1 aktivitesini düşürmüştür. Kompleks 1'in inhibisyon mekanizması, komplikasyonsuz iken, kompleks 2 rekabetsiz inhibitör olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada, yukarıda bahsedilen kompleksler PON1 üzerinde etkili inhibitör aktivite göstermiştir (Dilek ve Çağlar, 2015).

Çağlar vd. (2016) yaptıkları çalışmada sentezlenen ve karakterize edilen yeni bakır (II) komplekslerinden biri olan piridin-2,5-dikarboksilik asitin insan serum PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisini araştırmışlardır. PON1 enziminin spektrofotometrik olarak PON aktivitesini ölçmek için bir substrat olarak dietil 4-nitrofenil fosfat kullanılmıştır. $[Cu(2,5\text{-pydc})(2\text{-aepy})(\text{H}_2\text{O})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ ve $[Cu(2,5\text{-pydc})(2\text{-ampy})(\text{H}_2\text{O})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ komplekslerinin *in vitro* PON1 aktivitesini farklı inhibisyon mekanizmaları ile azaltmıştır. Kompleksler 1 ve 2, bu enzimin PON aktivitesini sırasıyla rekabetçi ve kompansız olarak inhibe etmiştir (Çağlar vd., 2016).

İnsan serum PON1 enzim aktivitesi üzerinde romatoid artrit (RA) tedavisinde sıklıkla kullanılan üç farklı ilacın (ibuprofen, meloksikam ve metotreksat) *in vitro* etkileri incelenmiştir. RA tedavisinde kullanılan bu ilaçların *in vitro* PON1 aktivitesini azaltmıştır. İnhibisyon mekanizmaları ibuprofen ve metotreksat için yarışmasız iken, meloksikam için yarışmalı olarak belirlenmiştir. İbuprofen, meloksikam ve metotreksat için IC_{50} değerleri sırasıyla 0,35 mM, 0,10 mM ve 0,18 mM olarak ve K_i sabitleri sırasıyla 0,890 mM, 0,125 mM ve 0,260 mM olarak hesaplanmıştır. IC_{50} ve K_i değerleri, meloksikam ilaçlarının maksimum inhibisyonunu belirtmiştir. Bulunan sonuçlar, *in vitro* RA tedavisinde sıklıkla kullanılan bu ilaçların, düşük dozlarda farklı inhibisyon mekanizmaları ile enzimin aktivitesini inhibe ettiğini göstermiştir (Dilek ve Polat, 2016).

Palonosetron hidroklorür, bevacizumab ve siklofosfamidin ilaçlarının insan serumundan saflaştırılmış PON1 üzerinde *in vitro* inhibitör etkileri incelenmiştir. PON1 enzimi %34,2 verimle % 231 kat saflaştırılmıştır. K_i sabitleri sırasıyla $0,033 \pm 0,001$; $0,054 \pm 0,003$ mM ve $3,419 \pm 0,518$ mM olarak bulunmuştur. İlaçların inhibisyon oranları kıyaslanmış ve palonosetron hidroklorürün maksimum inhibisyon oranına sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca ilaçların inhibisyon mekanizmaları yarışmasız olarak belirlenmiştir (Türkeş vd., 2016).

Dilek vd. (2018) yaptıkları çalışmada dört yeni mononükleer palladyum (II) ve platin (II) kompleksinin insan serum PON1 aktivitesi üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. İlk olarak, dört yeni mononükleer palladyum (II) ve platin (II) kompleksleri, bir nitrojen donör ligandı 1-(2-aminoetil) piperidin ve nonsteroidal anti-enflamatuar ilaçlar diklofenak, mefenamik asit ile sentezlenmiştir. Bu bileşikler, endoskopik, termal ve elementel analizlere tabi tutulmuştur. PON1 insan serumundan yaklaşık toplam verim %39,4 ve 5651,4 EU mg/mL spesifik aktivitesi ile 304,3 kat saflaştırılmıştır. Bu kompleksler, düşük dozlarda farklı inhibisyon mekanizmaları ile PON1 enziminin aktivitesini azaltmıştır. Dolayısıyla bu komplekslerin iyi bir PON1 inhibitörleri olduğu belirlenmiştir (Dilek vd., 2018).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1.Kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmalarımızda kullanılan Sepharose-4B, standart serum albümin, Triton X-100, N,N,N',N'-tetraetil etilendiamin (TEMED) ve diyaliz torbaları Sigma Aldrich; trihidroksimetilaminometan (Tris), sodyum hidroksit, sodyum klorür, amonyum sülfat, sodyum karbonat, glisin, sodyum asetat, fosforik asit, hidroklorik asit, sodyum azotür, potasyum fosfat, gliserin, potasyum bifosfat, potasyum klorür, potasyum asetat, etanol, metanol, sodyum asetat, asetik asit Merck Chemicals; coomassie brilliant blue G-250, N,N'-metilen bisakrilamid, akrilamid, brom timol mavisi, Sephadex G-200, sodyum dodesil sülfat (SDS), β -merkaptotanol, amonyum persülfat Pharmacia; çalışmada kullanılan antibiyotikler ise piyasadan temin edilmiştir.

3.1.2.Yararlanılan alet ve cihazlar

Çalışmalar esnasında aşağıdaki alet ve cihazlardan faydalanılmıştır.

Buzdolapları	Bosch, KGN57V00NE
Çalkalamalı inkübatör (8-60 °C)	Shalllab SSI5
Derin dondurucu	Sanyo Ultra Low
Etüv	Şimşek Labortechnik, ST120
Gama ışını kaynağı	Izotop Ob-Servo Iğnıs
Girdaplı tüp karıştırıcı (Vortex)	Elektromag (M16)
Güç kaynağı	Thermo, EC 300XL
Hassas terazi	And, GH202
Kar makinası	Scotsman AF-20
Kuru blok ısıtıcı (5-120 °C)	IKA Dry Block Heater 1
Manyetik karıştırıcı	Şimşek Labortechnik, MK-200
Masaüstü soğutmalı satrifüj	Nüve, NF 800R
Otomatik pipet	Brand
Peristaltik pompa	İsmatec, MCP

Protein elektroforez düzeneği	Bio-Rad Mini-PROTEAN Tetra Cell Sistem
Otoklav	Sümer SM3
pH metre	Hanna HI2211
Ultra saf su cihazı	Millipore, Direct-Q3
Spektrofotometre	Shimadzu, UV mini
Spektrofotometre	Hach-Lange, DR5000
Su banyosu	Nüve NB20
Vakum pompası	Diaphragm
Yatay jel elektroforez tankı	Thermo Owl Easycast B2-BP

3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

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

3.1.3.1. Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler

- 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 saf su ile 1000 mL'ye tamamlandı.
- Substrat çözeltisinin hazırlanması: 35 µl paraokson alınarak 1 mL asetonda çözüldü. Karışım 50 mL suya manyetik karıştırıcı eşliğinde yavaş yavaş ilave edilip karıştırıldı.

3.1.3.2. Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz için kullanılan tampon çözeltiler

- 100 mM Na-fosfat tamponu (pH=7,0): 11,998 g NaH_2PO_4 alınıp 800 mL saf suda çözüldü. pH'sı 1 M NaOH ile 7,0'e ayarlandı. Daha sonra toplam hacim saf su ile 1000 mL'ye tamamlandı.
- (Diyaliz için) 1 mM Na-fosfat tamponu (pH=7,0): 0,12 g NaH_2PO_4 alınıp 900 mL saf suda çözüldü. pH'sı 7,0'e ayarlandı. Daha sonra toplam hacim saf su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.3. DEAE-Sephadex iyon değişim kromatografisi için kullanılan çözeltiler

- 250 mL 100 mM Na-fosfat tamponu (pH=7,0): 2,99 g NaH₂PO₄ alınıp 200 mL saf suda çözüldü. pH'sı 1 M NaOH ile 7,0'e ayarlandı. Daha sonra toplam hacim saf su ile 250 mL'ye tamamlandı.
- 0,5 N HCl çözeltisi: d=1,18 g/mL, %36,23'lük HCl çözeltisinden 4,26 mL alınıp toplam hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.
- 0,5 N NaOH çözeltisi: 2 g NaOH alınıp bir miktar saf suda çözüldü. Daha sonra toplam hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.
- 1,5 M NaCl çözeltisi: 21,915 g NaCl alınıp bir miktar saf suda çözüldü. Daha sonra toplam hacim saf su ile 250 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.4. Jel filtrasyon kromatografi kolonunda kullanılan tampon çözeltiler

- 100 mM Na-fosfat tamponu (pH=7,0):11,99 g NaH₂PO₄ alınıp 800 mL saf suda çözüldü. pH'sı 1 M NaOH ile 7,0'e ayarlandı. Daha sonra toplam hacim saf su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.5. Elektroforez için kullanılan çözeltiler

- 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.
- 1 M Tris-HCl (pH=6,8): 12,11 g Tris (0,1 mol) tartılarak 80 mL saf suda çözüldü, pH ayarı 1 M HCl ile yapıldıktan sonra 100 mL'ye tamamlandı.
- %30 Akrilamid-%0,8 Bisakrilamid çözeltisi: 15 g akrilamid, 0,4 g bisakrilamid ve 34,6 g saf suda karıştırılarak çözüldü.
- %10'luk amonyum persülfat çözeltisi: 1 g amonyum persülfat tartılarak saf su ile 10 mL'ye tamamlandı.
- %10'luk SDS: 1 g SDS, 9 g saf suda çözülerek elde edildi.
- Yürütme tamponu: 1,51 g Tris (12,5 mmol) ve 7,51 g glisin (0,1 mol) tartılarak 450 mL saf suda çözüldü; %10'luk SDS'den 5 mL ilave edildi, pH=8,3'e ayarlandı ve toplam hacim 500 mL'ye tamamlandı.
- 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 saf

suyla 10 mL'ye tamamlandı. Bu tampona kullanılmadan önce 950 µl numune tamponundan 50 µl olacak şekilde β-merkaptoetanol ilave edildi.

- Sabitleştirme çözeltisi (jelde yürütülen proteinlerin sabitleştirilmesi için kullanılan çözelti): %50 izopropanol, %10 TCA ve %40 saf su olacak şekilde karıştırılarak hazırlandı.
- Jel boyama çözeltisi: 50 mL metanol, 10 mL asetik asit ve 40 mL saf su içerisinde 0,1 g coomassie brillant blue R-250 reaktifinin çözülmesiyle hazırlandı.
- Jel yıkama çözeltisi: 50 mL metanol, 10 mL asetik asit ve 40 mL saf su karıştırılarak hazırlandı.
- 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 NaH₂PO₄H₂O (15,94 mmol) ve 0,35 g adenin (2,6 mmol) tartılarak suda çözüldü ve 1 L'ye tamamlandı.
- Coomassie brillant blue G-250 reaktifi (proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti): 100 mg coomassie brillant blue G-250, 50 mL %95'lik etanolde çözüldü. Bu çözeltiliye %95'lik 100 mL fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin hacmi saf suyla 1L'ye tamamlandı.
- %0,04'lük bromtimol mavisi çözeltisi: 0,1 g indikatör 16 mL 0,01 M NaOH içerisinde çözüldü ve toplam hacim saf suyla 250 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.6. Protein tayini için kullanılan çözeltiler

- Coomassie brillant blue G-250 reaktifi 100 mg coomassie brillant blue G-250, 50 mL %95'lik etanolde çözüldü. Bu çözeltiliye %95'lik 100 mL fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin hacmi saf suyla 1L'ye tamamlandı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Kan serumunun ayrılması

Sağlıklı bireylere ait olan kan numuneleri temiz bir tüpe alındı. Oda sıcaklığında pıhtılaşmanın tamamlanması için 10-30 dakika bekletildi. 1.500-3.000 rpm'de, +4 °C'da 15 dakika santrifüjlenerek şekilli elemanların çökmesi sağlandı. Üstteki sarımtırak sıvı kısım olan serum dikkatli bir şekilde ayrıldı. Ayrılan serum aynı gün deneysel çalışmalarda kullanıldı.

3.2.2. İnsan serum PON1 enziminin aktivitesinin ölçümü

PON1 enziminin paraoksonaz aktivitesi 25 °C’de 1 mM CaCl₂ içeren 50 mM glisin/NaOH tamponu (pH=10,5) içerisinde paraoksonun (1 mM) substrat olarak kullanılmasıyla belirlendi. Aktivite ölçümü paraokson ile PON1’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 paraoksonun mikromol sayısıdır (Renault vd., 2006). PON1 enzimi için aktivite hesabı aşağıdaki gibi yapıldı:

$$\text{EU/ml} = \frac{\Delta\text{OD}}{18,290} \times \frac{V_T}{V_E} \times 1000$$

EU/mL : 1 mL’deki enzim ünitesi

ΔOD : 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

3.2.3. İnsan serum PON enziminin saflaştırılması

3.2.3.1. 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 PON1 enziminin amonyum sülfat çöktürme aralığı Sinan vd. (2006) yaptığı gibi %60-80 arasında gerçekleştirildi. Çöktürme için kullanılan katı (NH₄)₂SO₄ yavaş yavaş katılarak manyetik karıştırıcı üzerinde bar ile iyice çözünmesi sağlandı. Katı amonyum sülfat miktarı aşağıdaki formülden hesaplandı.

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

g : Katı amonyum sülfat miktarı

V : Enzim çözeltisinin hacmi (mL)

S₁ : Çözeltideki amonyum sülfat doygunluğu (1'in kesri şeklinde)

S₂ : İstenilen amonyum sülfat doygunluğu (1'in kesri şeklinde)

Önce %1'lik Triton X-100 uygulanmış numune %60 doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Numune santrifüj tüplerine konularak 5.000xg'de 15 dakika santrifüj yapıldı (böylece yabancı proteinlerin çökmesi sağlandı). Daha sonra %80 doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesi gerçekleştirildi. Elde edilen numune santrifüj tüplerine konularak 5.000xg'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.

3.2.3.2. 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.

3.2.3.3. DEAE-Sephadex A 50 iyon değişim kromatografisi

İyon değiştirici reçine olarak DEAE-Sephadex iyon değişim reçinesi kullanıldı. 45-50 mL yatak hacmi elde edebilmek için 10 g jel 100 mL saf 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 pompası ile uzaklaştırılıp 3 cm² x 30 cm ebadındaki kolona dolduruldu. Daha 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 işlemi bittikten 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 tüp için 280 nm'de absorbans değeri ve 412 nm'de de aktivite değerleri ölçüldü. Aktivite gösteren tüpler birleştirilerek jel filtrasyon kromatografisi kolonuna tatbik edildi. Birleştirilen tüplerde kantitatif protein tayini ve aktivite tayinleri yapıldı. Spesifik aktiviteler hesaplanarak saflaştırma oranları belirlendi.

3.2.3.4. Sephadex G-200 jel filtrasyon kromatografisi

Sephadex G-200 5 g tartıldı ve 200 mL saf su içerisinde karıştırıldı. 90 °C'de 4 saat bekletilerek şişirildi. Bekleyen polimer kolon materyali içerisinde bulunan hava kabarcıkları vakum pompası ile giderildi. Kolona uygulanacak jel pH'sı 7,0 olan 100 mM Na-fosfat tamponu ile önceden doldurulan kolona aktarıldı ve paketlenildi. Aynı tampon ile kolon dengelendi. Kolonun akış hızı peristaltik pompayla 3 mL/saat'e ayarlandı. Dengeleme tamponu ile elüsyon sonucu alttan alınan tamponun 280 nm'de absorbansına ve pH değerine bakıldı. Değerler eşit olduğu anda kolonun dengelendiği anlaşıldı.

Kolon materyalinin üzerine yukarıdan numune tatbik edildi. Bunun için tampon tam jelin üzerine inmesi beklendi. Numune 0,125 mL gliserol ile karıştırıldıktan sonra jelin üzerine tatbik edildi. Jelin numuneyi tamamen emmesi beklendi ve üzerine pipetle dikkatli bir şekilde yürütme tamponu eklendi. Daha sonra sistem, stok tampon çözelti ile kapalı sistem oluşturularak sabit hızla akış sağlandı.

Elüsyon yapılırken elüatlar yaklaşık 5 mL'lik tüplere toplandı. Her tüp için 280 nm'de absorbans değerleri ve 412 nm'deki aktivite değerlerine bakıldı. Aktivitenin olmadığı gözlemlendiği anda elüsyon işlemi durduruldu. Aktivite gösteren tüpler birleştirilerek protein ve aktivite değerleri belirlendi. Bu değerlerden faydalanarak saflaştırma katsayısı ve verim hesaplandı (Tablo 4.1).

Elde edilen insan serum PON1 enzim numunesinin saflığını kontrol etmek için SDS-PAGE yapıldı.

3.2.4. Protein tayini

3.2.4.1. Kalitatif protein tayini

Kalitatif protein tayini, 280 nm'de proteinlerin yapısında bulunan triptofan, tirozin ve fenilalanin amino asitlerinin maksimum absorbans göstermesi esasına dayanmaktadır (SegeI, 1968). Bu metod yardımıyla kromatografi işlemlerinde fraksiyon toplayıcısı yardımıyla eşit hacimde alınan bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Fraksiyonlar kuvarz küvetlere alınarak, absorbansları spektrofotometrede köre karşı okundu.

3.2.4.2. Bradford yöntemi ile kantitatif 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 Coomassie brilliant blue G-250 negatif bir yüke sahiptir ve protein üzerindeki pozitif yüke bağlanır. İki formu olan bu boyanın kırmızı formu $\lambda_{max}=465$ nm'de absorbans verirken, mavi formu ise $\lambda_{max}=595$ nm'de absorbans verir. Proteinin bağlandığı zaman kırmızı form mavi forma dönüşür. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 μ g arasındadır. Tekrarlanabilirliği yüksek ve oldukça hızlı gerçekleşen bir reaksiyondur. Reaksiyon iki dakika içerisinde gerçekleşir. Renk stabilitesi iki saat üzerinde devam edebilir (Bradford, 1976).

Tüplere insan serumundan ve adı geçen saflaştırma basamaklarından elde edilen enzim numunelerinden 0,1'er mL konularak üzerine 5'er mL Coomassie 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 metotla saflaştırılan enzim çözeltilerinde ve serumda protein tayini yapıldı.

3.2.5. İnsan serum PON1 enziminin aktivitesi üzerine bazı antibiyotiklerin *in vitro* etkilerinin belirlenmesi

İnsan serum PON1 enzim aktivitesi üzerine bazı antibiyotiklerin etkilerini belirlemek amacıyla küvet ortamına değişik konsantrasyonlarda antibiyotik katılarak aktivite değerleri okundu. Kullanılan antibiyotiklerin farklı konsantrasyonlarını oluşturmak için stok çözeltiler seyreltildi. Kullanılan stok çözelti hacmi gereken derişimi sağlamadığı zaman küvete katılan saf su hacmi azaltılarak stok çözelti hacmi yükseltildi. Bu şekilde gereken konsantrasyon ayarlandı. PON1 enzimi için inhibitörlü ve inhibitörsüz ortamdaki aktivite küvet içeriği tablo halinde gösterilmiştir (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. İnsan serum PON1 enziminin aktivite ölçüm küvet içeriği

Stok Aktivite Çözeltileri	Kontrol Küveti		Numune	
	Hacim (µl)	Kons.(mM)	Hacim (µl)	Kons.(mM)
Glisin/NaOH (pH=10,5)	500	50	500	50
Substrat Çözeltisi	330	3	330	3
Saf Su	120	-	Değişken	-
İlaç Çözeltisi	0	-	Değişken	Değişken
Enzim Numunesi	5	-	50	-

3.2.5.1. İnsan serum PON1 enziminin aktivitesi üzerine inhibitör etkisi gösteren antibiyotikler için IC₅₀ ve K_i değerlerinin belirlenmesine ait çalışmalar

İnhibitör çalışmalarıyla ilgili farklı inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapılarak inhibitör etkisi gösteren antibiyotikler 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 PON1 enzim aktivitesini yarıya düşüren antibiyotik konsantrasyonu ile bu değerlerin 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 $V_{max}=V_{I_{max}}(1+[I]/K_i)$ formülünden yararlanılarak K_i değerleri belirlendi. Sonuçlar Tablo 4.2’de verildi.

Tablo 3.2. İnsan serumundan saflaştırılan PON1 enzimi üzerinde fosfomisin’in IC_{50} değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tampon Glisin/NaOH (pH=10.5) (μ l)	Paraokson (3 mM) (μ l)	Enzim (μ l)	Saf su (μ l)	İnhibitör Hacmi (μ l)	Küvetteki Paraokson kons. (mM)	Küvetteki inhibitör kons. (mM)	Toplam hacim (mL)
500	330	50	120	0	1	-	1
500	330	50	115	5	1	3,63	1
500	330	50	110	10	1	7,25	1
500	330	50	100	20	1	14,50	1
500	330	50	90	30	1	21,75	1
500	330	50	80	40	1	36,30	1
500	330	50	70	50	1	43,50	1
500	330	50	60	60	1	50,80	1
500	330	50	50	70	1	58,00	1

Tablo 3.3. İnsan serumundan saflaştırılan PON1 enzimi üzerinde sefiksim’in IC_{50} değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tampon Glisin/NaOH (pH=10.5) (μ l)	Paraokson (3 mM) (μ l)	Enzim (μ l)	Saf su (μ l)	İnhibitör Hacmi (μ l)	Küvetteki Paraokson kons. (mM)	Küvetteki inhibitör kons. (mM)	Toplam hacim (mL)
500	330	50	120	0	1	-	1
500	330	50	115	5	1	0,111	1
500	330	50	110	10	1	0,222	1
500	330	50	100	20	1	0,446	1
500	330	50	90	35	1	0,777	1
500	330	50	80	40	1	0,888	1
500	330	50	70	50	1	1,110	1
500	330	50	60	60	1	1,332	1
500	330	50	40	80	1	1,776	1

Tablo 3.4. İnsan serumundan saflaştırılan PON1 enzimi üzerinde sefuroksim'in 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 kons. (mM)	Toplam hacim (mL)
500	330	50	120	0	1	-	1
500	330	50	115	5	1	0,124	1
500	330	50	110	10	1	0,249	1
500	330	50	100	20	1	0,498	1
500	330	50	90	30	1	0,747	1
500	330	50	80	40	1	0,996	1
500	330	50	70	50	1	1,240	1
500	330	50	60	60	1	1,494	1
500	330	50	50	70	1	1,743	1

Tablo 3.5. İnsan serumundan saflaştırılan PON1 enzimi üzerinde sefaklor monohidrat'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 kons. (mM)	Toplam hacim (mL)
500	330	50	120	0	1	-	1
500	330	50	110	10	1	1,29	1
500	330	50	100	20	1	2,58	1
500	330	50	90	30	1	3,87	1
500	330	50	80	40	1	5,16	1
500	330	50	70	50	1	6,45	1
500	330	50	50	70	1	9,03	1
500	330	50	40	80	1	10,32	1
500	330	50	30	90	1	11,61	1

Tablo 3.6. İnsan serumundan saflaştırılan PON1 enzimi üzerinde fosfomisin'in K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tampon 50mM glisin/NaOH (pH=10,5) (μ l)	Enzim (μ l)	Saf su (μ l)	Paraokson (3mM) (μ l)	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	390	50	0,15	7,25	1
500	50	350	90	0,30	7,25	1
500	50	300	140	0,45	7,25	1
500	50	250	190	0,60	7,25	1
500	50	210	230	0,75	7,25	1
500	50	350	50	0,15	36,3	1
500	50	310	90	0,30	36,3	1
500	50	260	140	0,45	36,3	1
500	50	210	190	0,60	36,3	1
500	50	170	230	0,75	36,3	1
500	50	330	50	0,15	50,8	1
500	50	290	90	0,30	50,8	1
500	50	240	140	0,45	50,8	1
500	50	190	190	0,60	50,8	1
500	50	150	230	0,75	50,8	1

Tablo 3.7. İnsan serumundan saflaştırılan PON1 enzimi üzerinde sefiksim'in K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tampon 50mM glisin/NaOH (pH=10,5) (μ l)	Enzim (μ l)	Saf su (μ l)	Paraokson (3mM) (μ l)	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	390	50	0,15	0,45	1
500	50	350	90	0,30	0,45	1
500	50	300	140	0,45	0,45	1
500	50	250	190	0,60	0,45	1
500	50	210	230	0,75	0,45	1
500	50	365	50	0,15	0,78	1
500	50	325	90	0,30	0,78	1
500	50	275	140	0,45	0,78	1
500	50	225	190	0,60	0,78	1
500	50	185	230	0,75	0,78	1
500	50	340	50	0,15	1,11	1
500	50	300	90	0,30	1,11	1
500	50	250	140	0,45	1,11	1
500	50	200	190	0,60	1,11	1
500	50	160	230	0,75	1,11	1

Tablo 3.8. İnsan serumundan saflaştırılan PON1 enzimi üzerinde sefuroksim'in K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tampon 50mM glisin/NaOH (pH=10,5) (μ l)	Enzim (μ l)	Saf su (μ l)	Paraokson (3mM) (μ l)	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	0,50	1
500	50	340	90	0,30	0,50	1
500	50	290	140	0,45	0,50	1
500	50	240	190	0,60	0,50	1
500	50	200	230	0,75	0,50	1
500	50	360	50	0,15	1,00	1
500	50	320	90	0,30	1,00	1
500	50	270	140	0,45	1,00	1
500	50	220	190	0,60	1,00	1
500	50	180	230	0,75	1,00	1
500	50	340	50	0,15	1,49	1
500	50	300	90	0,30	1,49	1
500	50	250	140	0,45	1,49	1
500	50	200	190	0,60	1,49	1
500	50	160	230	0,75	1,49	1

Tablo 3.9. İnsan serumundan saflaştırılan PON1 enzimi üzerinde sefaklor monohidrat'ın K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tampon 50mM glisin/NaOH (pH=10,5) (μ l)	Enzim (μ l)	Saf su (μ l)	Paraokson (3mM) (μ l)	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	2,58	1
500	50	340	90	0,30	2,58	1
500	50	290	140	0,45	2,58	1
500	50	240	190	0,60	2,58	1
500	50	200	230	0,75	2,58	1
500	50	350	50	0,15	3,87	1
500	50	310	90	0,30	3,87	1
500	50	260	140	0,45	3,87	1
500	50	210	190	0,60	3,87	1
500	50	170	230	0,75	3,87	1
500	50	320	50	0,15	6,45	1
500	50	280	90	0,30	6,45	1
500	50	230	140	0,45	6,45	1
500	50	180	190	0,60	6,45	1
500	50	140	230	0,75	6,45	1

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Protein Tayini Sonuçları

Amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltilerindeki proteinlerin kantitatif tayinleri, Bradford yöntemiyle yapılmıştır.

4.2. İnsan Serum PON1 Enziminin Saflaştırılması Sonuçları

4.2.1. Amonyum sülfat çöktürmesi sonuçları

İnsan serumundan hazırlanan hemolizat %60-80 aralığında amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı (Sinan vd., 2006). Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen çökelek, diyaliz torbasına yerleştirilerek iki saat süreyle 1 mM Na-fosfat (pH: 7,0) tampon çözeltisine karşı +4 °C’da diyaliz edildi. Her bir işlem sonrasında aktivite ölçüldü.

4.2.2. DEAE-Sephadex A-50 iyon değişim kromatografisi sonuçları

Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz işlemi sonrası elde edilen enzim çözeltisi, anyon değiştirici DEAE-Sephadex A-50 kolonuna tatbik edildi. 3'er mL'lik hacimler halinde tüplere alınan her bir elüatın 280 nm'deki absorbansı ve 412 nm'deki aktivitesi ölçüldü. Aktivite gösteren tüpler jel filtrasyon kromatografisinde kullanılmak üzere birleştirildi. Tüp Sayısı/Aktivite grafiği çizildi. Kolona tatbik edilen numune ve birleştirilen elüsyon çözeltileri için kantitatif protein tayini ve aktivite tayini yapılarak spesifik aktiviteler hesaplandı, saflaştırma oranı tespit edildi.

4.2.3. Jel filtrasyon kromatografisi sonuçları

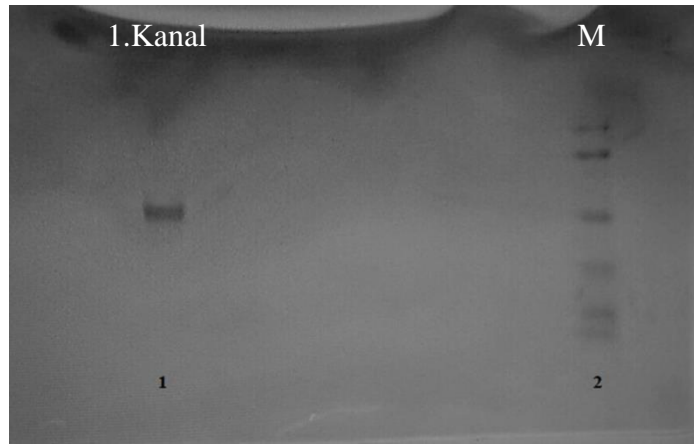
DEAE-Sephadex A-50 iyon değişim kromatografisi sonrası elde edilen enzim çözeltisi jel filtrasyon kolonuna tatbik edildi. Kolon dolgu materyali olarak Sephadex G-200 kullanıldı. Tüp Sayısı/Absorbans-Aktivite grafiği çizildi. Kolona tatbik edilen numune ve elüsyon çözeltileri için kantitatif protein tayini ve aktivite tayini yapılarak spesifik aktiviteler hesaplandı, saflaştırma oranı tespit edildi.

Tablo 4.1. İnsan serum PON1 enzimi için saflaştırma basamakları

	Aktivite (EU/mL)	Protein (mg/mL)	Toplam Aktivite (EU)	Spesifik Aktivite (EU/mg protein)	Verim (%)	Saflaştırma Katsayısı
Triton X-100 Uygulanmış Serum A.S (%60-80) ve Diyaliz	110	8,2	2420	10,9	100	-
DEAE Sephadex A50 İyon Değişim	140	5,3	1750	21,6	72,3	1,98
Sepdadex G-200 Jel Filtrasyon Kromatografisi	190	0,084	1330	2166,1	54,9	198,7
	230	0,061	1150	3516,8	47,5	322,6

4.3. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi Sonuçları

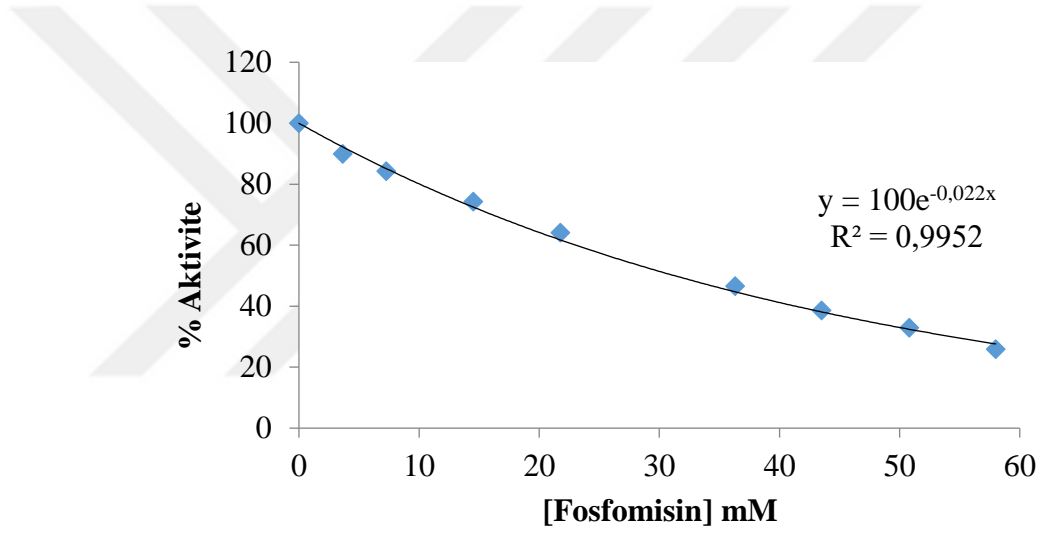
Amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz, DEAE-Sephadex A-50 iyon değişim kromatografisi ve Sephadex G-200 jel filtrasyon kromatografisi ile enzimin saflaştırma basamakları tamamlandıktan sonra Laemmli metoduna göre %3-8 kesikli SDS-PAGE yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi.



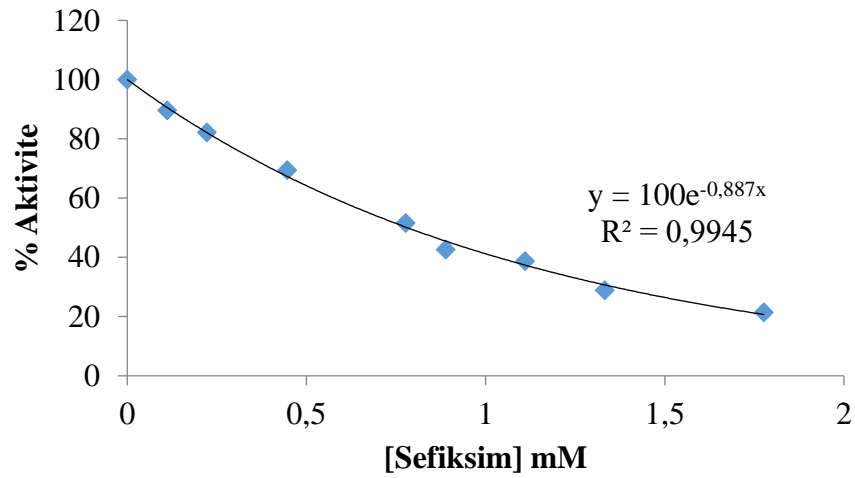
Şekil 4.1. İnsan serum PON1 enziminin saflaştırma sonucu SDS-PAGE resmi (1.Kanal; Jel filtrasyon kromatografisi sonrası saflaştırılan PON1, M; Standart proteinler; 70-18 kDa)

4.4. İnsan Serum PON1 Enziminin Aktivitesi Üzerine Bazı Antibiyotikler İçin IC₅₀ Değerlerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışmaların Sonuçları

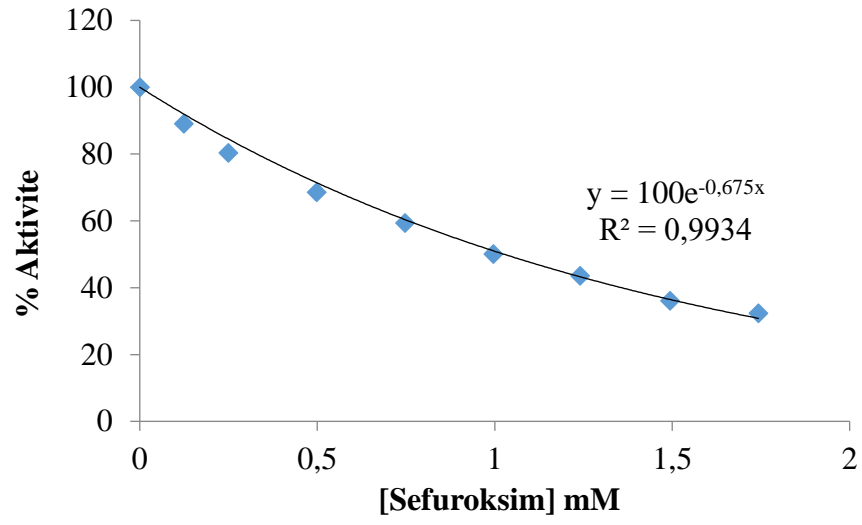
İnsan serumundan saflaştırılan PON1 enzim aktivitesi üzerine bazı ilaçların etkilerini belirlemek amacıyla bu bileşiklerin stok çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerden değişik konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanarak insan serumundan saflaştırılan PON1 enzim aktivitesi üzerine etkileri araştırıldı. Elde edilen aktivite değerleri kullanılarak; %Aktivite-[I] değerleri bulundu. %Aktivite-[I] grafikleri çizilerek her bir antibiyotik için IC₅₀ değerleri hesaplandı. Grafikler Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5’de gösterildi.



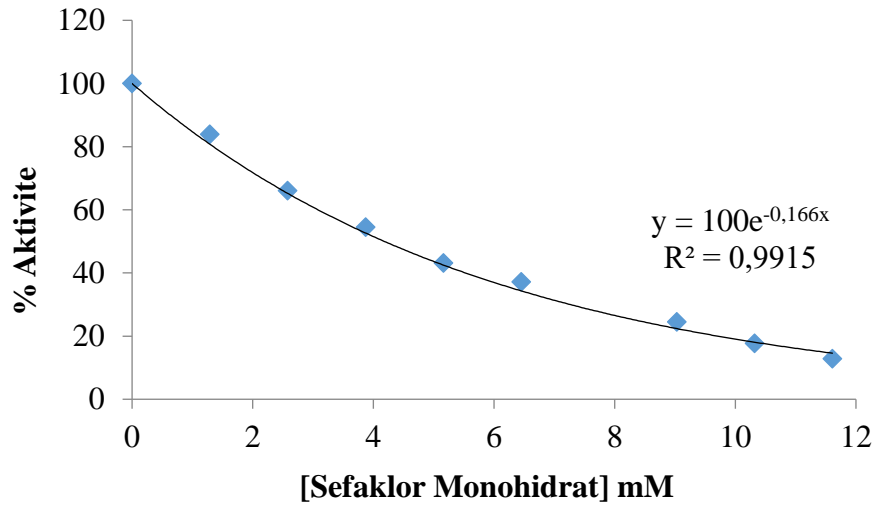
Şekil 4.2. İnsan serum PON1 enzimi üzerine fosfomisin etkisi



Şekil 4.3. İnsan serum PON1 enzimi üzerine sefiksim etkisi



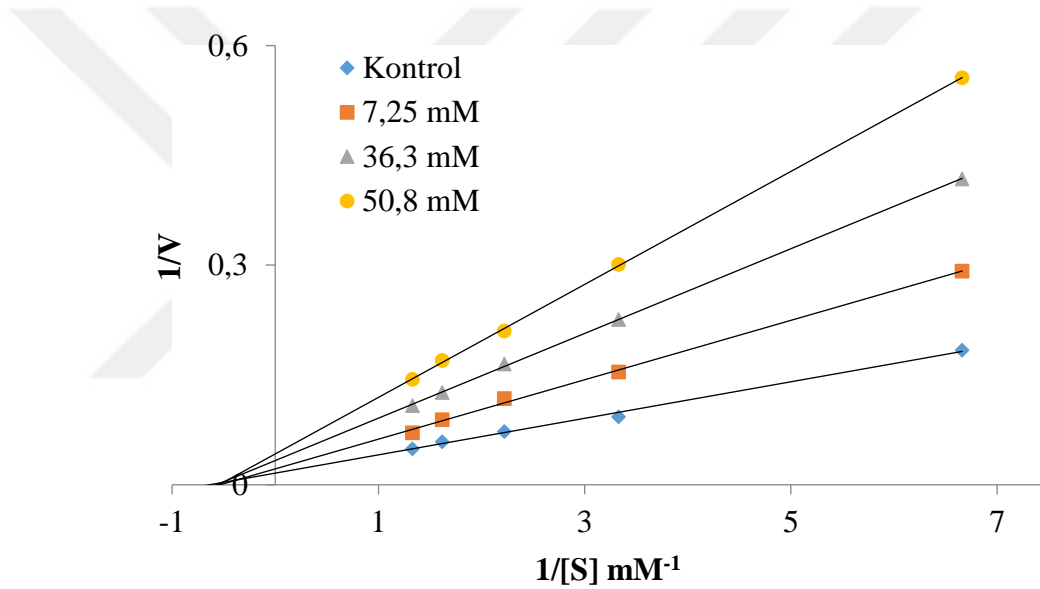
Şekil 4.4. İnsan serum PON1 enzimi üzerine sefuroksim etkisi



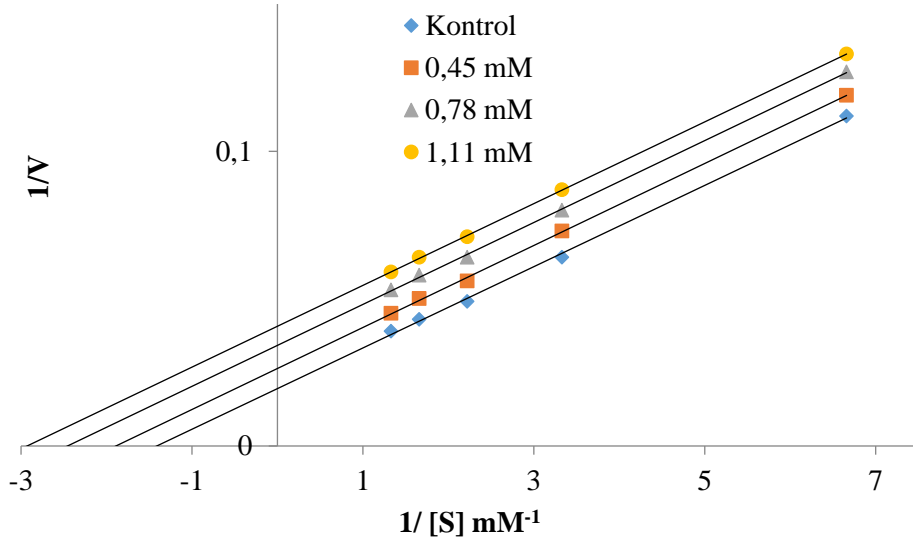
Şekil 4.5. İnsan serum PON1 enzimi üzerine sefaklor monohidrat etkisi

4.5. İnsan Serum PON1 Enzimi Üzerine İnhibitör Etkisi Gösteren Bazı Antibiyotikler İçin K_i Değerlerinin Belirlenmesine Ait Çalışmaların Sonuçları

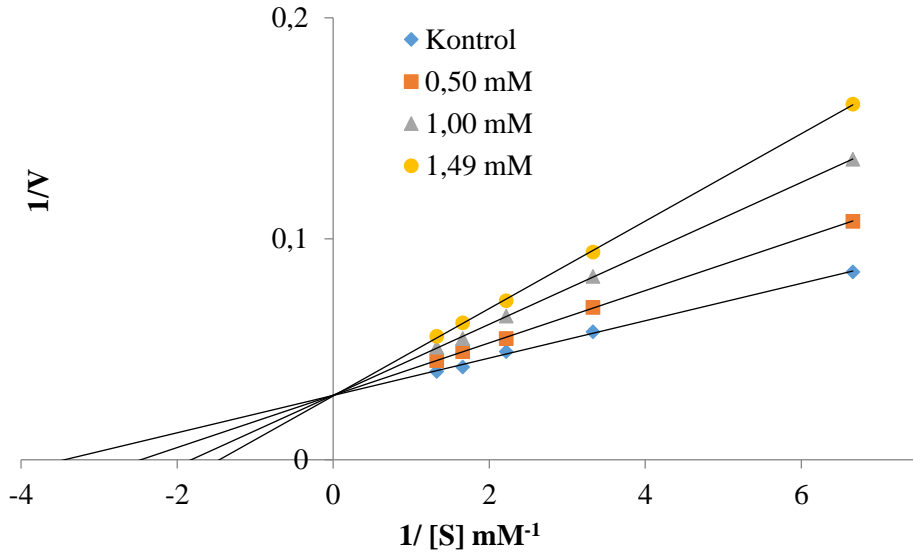
İnsan serumundan saflaştırılan PON1 enziminin inhibitörsüz ve inhibitörlü ortamda beş farklı substrat konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapıldı. Daha sonra kullanılan ilaçlar için üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonu ve beş farklı substrat konsantrasyonunda elde edilen aktivite değerleri kullanılarak; $1/V - 1/[S]$ değerleri bulundu. Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek (Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9) K_i değerleri hesaplandı. İnsan serum PON1 enzimi için elde edilen sonuçlar Tablo 4.2 ile aşağıda verildi.



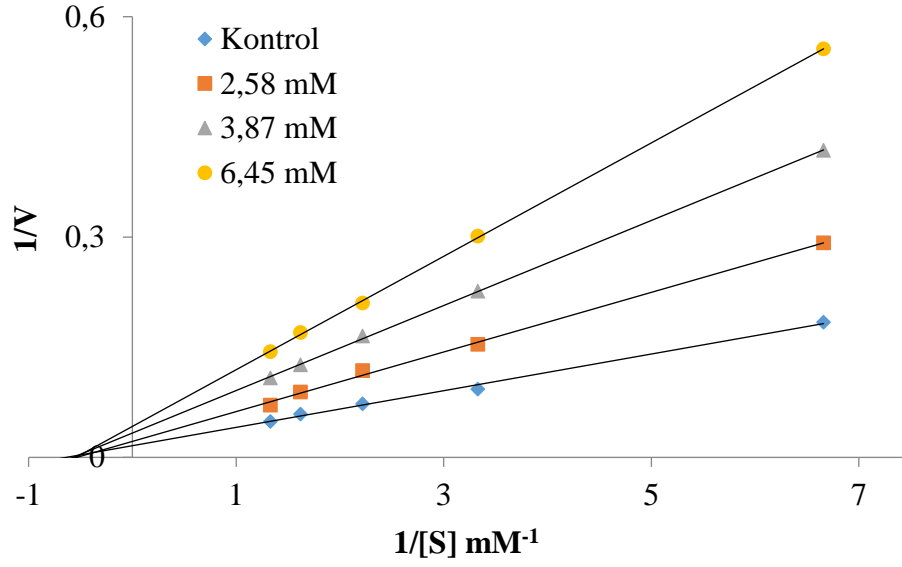
Şekil 4.6. Fosfomisin için K_i sabitinin bulunmasına yönelik çizilen Lineweaver-Burk grafiği ($[I_1] = 7.25 \text{ mM}$, $[I_2] = 36.3 \text{ mM}$, $[I_3] = 50.8 \text{ mM}$)



Şekil 4.7. Sefixim için K_i sabitinin bulunmasına yönelik çizilen Lineweaver-Burk grafiği ($[I_1] = 0.45$ mM, $[I_2] = 0.78$ mM, $[I_3] = 1.11$ mM)



Şekil 4.8. Sefuroksim için K_i sabitinin bulunmasına yönelik çizilen Lineweaver-Burk grafiği ($[I_1] = 0.50$ mM, $[I_2] = 1.00$ mM, $[I_3] = 1.49$ mM)



Şekil 4.9. Sefaklor monohidrat için K_i sabitinin bulunmasına yönelik çizilen Lineweaver-Burk grafiği ($[I_1] = 2.58$ mM, $[I_2] = 3.87$ mM, $[I_3] = 6.45$ mM)

Tablo 4.2. İnsan serum PON1 enzimi için bulunan K_i ve IC_{50} değerleri

İnhibitör	IC_{50} (mM)	Ortalama K_i (mM)	İnhibisyon Türü
Fosfomisin	31,5	$27,98 \pm 12,25$	Yarışmasız
Sefiksim	0,781	$1,12 \pm 0,32$	Yarı yarışmalı
Sefuroksim	1,03	$2,20 \pm 0,22$	Yarışmalı
Sefaklor monohidrat	4,18	$4,81 \pm 2,25$	Yarışmasız

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Serum PON enzimi, 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 vd., 1998).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, PON enzimlerinin fizyolojik önemini aydınlatmaya yönelik çalışmaların önümüzdeki yıllarda artarak devam edeceğinin sinyalini vermektedir. Spesifik organofosfatların PON1 tarafından hidrolizi fizyolojik olarak çok önemlidir. Bir A-oksonaz ailesi üyesi olan PON, 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 PON1 seviyeleri vasküler hastalıklar için önemli bir risk faktörüdür (James ve Deakin, 2004; Jarvik vd., 2000, 2003a; Mackness ve Mackness, 2004; Mackness vd., 2001). PON enzimlerinin farmakokinetik rolleri önemlidir ve çok daha fazla çalışmayı gerektirmektedir ve her durumda PON1 seviyeleri önemlidir.

PON1 enziminin saflaştırılması aşamasında ulaşılmak istenen saflık derecesi ile enzimin serumda veya karaciğerde bulunuş durumuna göre değişen çeşitli metotlar tanımlanmıştır. Bu metotlardan çoğunlukla kullanılanlar; hidroksiapatit adsorbsiyonu, DEAE-Sepharose CL-6B iyon değişim kromatografisi, Cibacron Blue 3GA spesifik olmayan afinite kromatografisi, amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE anyon değişim kromatografisi, Concanavalin A-Sepharose afinite kromatografisi, mono Q HR 5/5 anyon değişim kromatografisi ve DEAE biojel kromatografisidir.

Bazı durumlarda saflaştırma basamakları birden fazla tekrarlanabilir. Örneğin; Gan vd. (1991) yaptığı bir çalışmada insan serum PON Q ve R izoenzimlerinin saflaştırma prosedürü için iki defa DEAE anyon değişim kromatografisi kullanmıştır. Furlong vd. (1991) ise tavşan ve insan serumundan PON enzimini, Cibacron Blue 3GA-Agaroz, Sephadex G-75, DEAE Trisacril M ve tekrar Sephadex G-75 jel filtrasyon kromatografisi yöntemlerini kullanarak saflaştırmışlardır (Furlong vd., 1991).

PON1 enziminin, karaciğerde mikrozoamlara, serumda ise HDL'ye bağlı olması nedeniyle homojen bir saflık elde etmek için bağlı olduğu yapılardan uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu amaçla, karaciğerde bulunan enzimi mikrozoamlardan ayırmak için Gil vd. (1993) Triton X-100 kullanılırken; serumda bulunan enzimi HDL'den uzaklaştırmak için deterjan veya yüksek tuz konsantrasyonunun kullanılması gerekmektedir (Furlong vd., 1991).

İnsan serum PON1 enziminin saflaştırılmasına yönelik yapılan ilk çalışmalarda heparin ve $MnCl_2$ kullanılarak düşük yoğunluklu lipoproteinler çöktürülmüş; soğuk aseton yöntemiyle de lipidsizleştirme gerçekleştirilmiştir (Kitchen vd., 1973; Rozenberg vd., 2005). Yapılan bu işlemlerle PON1 enzimi ancak kısmi olarak saflaştırılabilmektedir. Daha sonra Gan vd. (1991) tarafından lipidsizleştirme basamağını gerektirmeyen yeni bir yöntem geliştirilmiş ve daha sonraki PON enzimine yönelik saflaştırma çalışmalarının birçoğu ise bu yöntemi esas almıştır (Debord vd., 2003; Yeung vd., 2004). Söz konusu çalışmada PON1 enzimi, 1L insan serumundan Cibacron Blue 3GA agaroz ve ardarda iki defa DEAE iyon değişim kromatografisi kullanılarak saflaştırılmıştır. Ancak bazı araştırmacılar bu yöntemle saflaştırılan enzim örneklerinde albümin ve APO kontaminasyonu olasılığınedeniyle Concavalin A afinite kromatografisini de ilave etmişlerdir (Rodrigo vd., 2001; Marathe vd., 2003). Bu yöntemde ise Concavalin A afinite kromatografisinin kullanımına bağlı olarak, saflaştırılan enzim örneklerinde bir miktar lektin kontaminasyonu olabileceği bildirilmiştir.

İnsan serum PON1 enzimi Sinan vd. (2006) tarafından amonyum sülfat çöktürmesi ve hidrofobik etkileşim kromatografisi yöntemleri kullanılarak; Alıcı vd. (2008), Türkes (2010) ve Dilek (2012) tarafından ise DEAE-Sephadex iyon değişim kromatografisi ile Sephadex G200 jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak saflaştırılmıştır. Yavuz (2014) çalışmasında ise sentezlenen hidrofobik etkileşim jeli ile hidrofobik etkileşim

kromatografisi ve amonyum sülfat çöktürmesi yöntemleri ile insan serum PON1 enzimini saflaştırmıştır.

Çalışmamızda PON1 enzimini saflaştırmak için kaynak olarak insan serumu seçilmiş ve amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-Sephadex A-50 iyon değişim kromatografisi ve Sephadex G-200 jel filtrasyon kromatografisi basamakları kullanılmıştır.

Amonyum sülfat çöktürmesi uzun zamandan beri bilim adamları tarafından genellikle kullanılan kısmi saflaştırma yöntemlerindedir. Bu yöntem sayesinde enzim numunesindeki birçok safsızlıklar uzaklaştırılarak proteinler daha derişik halde elde edilebilmektedir. Bu nedenle iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi öncesinde ön saflaştırma yöntemi olarak %60-80 aralığında amonyum sülfat çöktürmesi yapılmıştır (Sinan vd., 2006). Bu işlemde sonra elde edilen enzim çözeltisi diyaliz edilerek çözeltideki iyonlar uzaklaştırılmış ve bir sonraki aşamada enzimin kolona daha kolay bir şekilde tutunması sağlanmıştır.

Bu çalışmada saflaştırma yönteminin ikinci basamağında DEAE-Sephadex A-50 iyon değişim kromatografisi kullanılmıştır. Amonyum sülfat çöktürmesi basamağında elde edilen yaklaşık 18 ml'lik enzim çözeltisi iyon değişim kromatografisi kolonuna tatbik edilmiş ve enzime bağlı olan proteinler DEAE-Sephadex A-50'den 1,5 M NaCl tuz konsantrasyonunda elüe edilmiştir.

DEAE-Sephadex A-50 iyon değişim kromatografisi kolonundan alınan ve enzim aktivitesi gösteren elüatlar birleştirilerek Sephadex G-200 jel filtrasyon tekniği kullanılarak enzimimizin moleköl büyüklüğüne göre saflaştırılması sağlanmıştır. Aktivite gösteren tüpler elektroforez yapılmak üzere birleştirilerek derişikleştirme işlemine tabi tutulmuştur. Elde edilen derişik insan serum PON1 enzimi, saflığının kontrolü için tekrar SDS-PAGE'de yürütülmüştür. Yapılan bu işlemler sonrasında enzimin elektroforetik olarak saf olduğu diğer proteinlerden ayrıldığı izlenmiştir.

Çalışmamızda insan serum PON1 enzimi %47,5 verimle yaklaşık 322,6 kat saflaştırılmıştır. Literatürde ise %44,8 verimle yaklaşık 256,6 kat, %34,2 verimle yaklaşık 231 kat, %39,4 verimle 304,3 kat saflaştırma yapılmıştır (Dilek, 2012; Türkes vd., 2016; Dilek vd., 2018). Bütün bu çalışmalar birbirleriyle uygunluk göstermektedir. Yavuz (2014) %16,17 verimle yaklaşık 674 kat saflaştırma yaptığı çalışmasında

amonyum sülfat çöktürmesi ve hidrofobik etkileşim kromatografisi yöntemlerini uygulamıştır.

Çalışmamızda molekül kütlesi yaklaşık 43 kDa olarak tahmin edilen insan serum PON1 enzimi, tek bir bant olarak SDS-PAGE jelinde gözlemlenmiştir. Bulunan bu değer literatürle uygunluk göstermektedir (Gan vd., 1991; Li vd., 2000; Nguyen ve Dai-Eun, 2003; Alici vd., 2008; Ekinci ve Beydemir, 2009b; Dilek, 2012; Yavuz, 2014; Türkeş vd., 2016; Dilek vd., 2018). Kuo vd. (2012) iki tane N-bağlı şeker zinciri içeren insan serum PON1 enziminin molekül kütlesini 44,3 kDa, karbonhidrat içermeyen PON1 enziminin molekül kütlesini ise 37,3 kDa olarak belirlemişlerdir. Çünkü enzimin yapısında, toplam molekül kütlesinin %15'i kadar karbonhidrat molekülü bulunmaktadır ve bu molekül kütlesi, karbonhidrat zincirinin varlığına bağlı olarak değişmektedir. Saflaştırma işlemi sırasında enzimin karbonhidrat içeriği değişebilmektedir. Enzimin aktivitesi için karbonhidrat zinciri gerekli değildir, fakat bu karbonhidrat zincirinin PON1 enziminin yarı ömrünü, çözünürlüğünü, kararlılığını arttırmada ve HDL' ye bağlanmada görevli olduğu düşünülmektedir (Josse vd., 1999; Aharoni vd., 2004). Ayrıca PON1 enziminin, serumda HDL ile ilişkili olduğu bölgenin yakınında bulunan proteinler (özellikle HPBP ve Apo A1) ile bir arada saflaştırılırsa, görünür molekül kütlesinin daha geniş bir aralıkta değişkenlik göstereceği rapor edilmiştir (Gaidukov ve Tawfik, 2005; Renault vd., 2006). PON1 enziminin molekül kütlesi türden türe değişmemekte ve insan serum PON1 enziminin molekül kütlesi ile tavşan, sıçan ve koyunun PON1 enziminin molekül kütlesi benzerlik göstermektedir (Kuo vd., 1995; Kuo vd., 1998; Allebrandt vd., 2002).

Enzim çalışmaları, oldukça pratik bir öneme sahiptir. Bazı hastalıklarda, özellikle kalıtsal genetik bozukluklarda, bir veya birden fazla enzimin eksikliği ya da tamamen yokluğu, söz konusu olabilir. Diğer bir grup hastalıklara da enzimin aşırı aktivitesi, neden olabilir. Enzimlerin aktivitelerinin kan plazmasında, eritrositlerde veya doku örneklerinde ölçülmesi, belli hastalıkların tanısında önemlidir. Birçok ilaç, biyolojik etkilerini, enzimlerle etkileşerek ortaya çıkartır (Lehninger, 2005).

Enzimatik aktivitenin inhibisyonu, biyolojik sistemlerde başlı başına bir kontrol mekanizması oluşturduğundan önemli bir olaydır. Enzimler hemen hemen bütün hücrel süreçleri katalizlediğinden, enzim inhibitörlerinin bilinen en önemli

farmakolojik ajanlar arasında olması tesadüfi değildir. Birçok ilaç ve zehirli bileşikler etkilerini bu yolla gösterirler (Keha ve Küfrevioğlu, 2012).

Yaptığımız çalışma kapsamında insan serum PON1 enzimi aktivitesi üzerinde bazı antibiyotiklerin *in vitro* şartlarda etkileri incelenerek IC₅₀ değerleri ve K_i sabitleri belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan antibiyotiklerin, insan serum PON1 enzimi üzerinde etkilerinin incelenmesiyle ilgili herhangi bir çalışmaya literatürde rastlanılmamıştır.

Çalışmamızda insan serum PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren ilaçlar için K_i sabitlerinin belirlenmesi işleminde Lineweaver-Burk grafikleri kullanılmıştır (Segel 1975; Telefoncu, 1986). Sonuçların hassas bulunabilmesi için her inhibitörlü çalışma için üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda 1/V ile 1/[S] değerleri elde edilmiştir. K_i sabiti düşük olan inhibitörün enzime ilgisi büyük olduğundan, enzimin katalitik aktivitesi üzerine inhibisyon etkisinin büyük olacağı bilinmektedir.

Genel olarak ilaçların enzimler üzerindeki inhibisyon etkileri IC₅₀ (enzimin aktivitesini %50 inhibe eden ilaç konsantrasyonu) değeri olarak verilmektedir. Kinetik çalışmalar sırasında enzim aktivitesini inhibe eden antibiyotik, antineoplastik ve kalsiyum kanal blokerlerinin IC₅₀ değerleri belirtilmiştir (IC₅₀ değeri düşük olan inhibitörün inhibisyon etkisi daha yüksektir).

Yapılan başka çalışmalarda insan serum PON1 enzimi aktivitesi üzerinde başka antibiyotiklerin ve ilaçların *in vitro* şartlarda etkileri incelenerek IC₅₀ değerleri ve K_i sabitleri belirlenmiştir. Ekinci ve Beydemir (2009a) IC₅₀ değerleri analjezik ilaçlar olan bilinen lornoksikam, indometasin, tenoksikam, diklofenak sodyum, ketoprofen ve lincomycin için sırasıyla 0,136; 0,195; 0,340; 1,639; 6,23 ve 9,638 mM; K_i sabitleri sırasıyla 0,009; 0,097; 0,306; 0,805; 13,010 ve 11,116 mM belirlemiştir. Türkeş (2010) ise yaptığı çalışmada IC₅₀ değerlerini palonosetron hidroklorür, bevasizumab, nifedipin, nitrendipin, isradipin, amlodipin besilat, moksifloksasin hidroklorür, siklofosamid, levofloksasin hemihidrat, sefepim hidroklorür, gemitabin hidroklorür için sırasıyla 0,025; 0,040; 0,121; 0,130; 0,255; 0,304; 1,839; 2,462; 3,959; 21,115; 26,610 mM; K_i sabitleri sırasıyla 0,033; 0,054; 0,222; 0,151; 0,286; 0,321; 2,641; 3,419; 5,525; 35,092; 39,598 mM hesaplamıştır. Dilek (2012) çalışmasında IC₅₀ değerlerini netilmisin sülfat, linkomisin hidroklorür, streptomisin sülfat, oksitetrasiklin hidroklorür, penisilin G

potasyum kristalize, klindamisin fosfat, akarboz, pioglitazon hidroklorür, metotreksat için sırasıyla 3,39; 13,30; 25,39; 0,15, 32,50; 25,40; 9,82; 0,22; 0,18 mM; K_i sabitleri sırasıyla 3,73; 18,30; 56,30; 0,20; 54,70; 35,80; 13,10; 0,32; 0,26 mM belirlemiştir. Çalışmamızda bulunan IC_{50} değerleri sefiksim, sefuroksim, sefaklor monohidrat, fosfamisin için sırasıyla 0,781; 1,03; 4,18; 31,5 mM; K_i sabitleri ise sırasıyla 1,12; 2,20; 4,81; 27,98 mM belirlenmiştir. Bütün çalışmalarda kullanılan antibiyotik ve ilaçlar bu çalışmada kullanılan antibiyotikler gibi PON1 enzimini düşük dozlarda dahi inhibe etmektedir.

Sonuç olarak bu tez kapsamında;

- İnsan serumundan PON1 enzimi saflaştırılmıştır.
- Enzimin saflaştırma basamaklarından elde edilen sonuçların literatürle uyumlu olduğu tespit edilmiştir.
- Çalışma sonucunda insan serum PON1 enzimi %47,5 verimle yaklaşık 322,6 kat saflaştırılabilmektedir. Enzimin saflığı elektroforezle kontrol edilmiş ve tek bant gözlemlenmiştir.
- İnsan serumundan saflaştırılan PON1 enzimi üzerine fosfamisin, sefiksim, sefuroksim ve sefaklor monohidrat antibiyotiklerinin inhibisyon etkileri incelenmiştir.
- Bu antibiyotikler için IC_{50} ve K_i değerleri hesaplanmış ve inhibisyon tipleri belirlenmiştir. IC_{50} değerleri; fosfamisin için 31,5 mM, sefiksim için 0,781 mM, sefuroksim için 1,03 mM, sefaklor monohidrat için 4,18 mM olarak, K_i sabitlerinin ortalaması ise; fosfamisin için $27,98 \pm 12,25$ mM, sefiksim için $1,12 \pm 0,32$ mM, sefuroksim için $2,20 \pm 0,22$ mM, sefaklor monohidrat için $4,81 \pm 2,25$ mM hesaplanmıştır. İnhibisyon çalışmaları sonucunda bu antibiyotiklerin düşük dozlarda dahi PON1 enzimini inhibe ettiği gözlemlenmiştir. PON1 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.

KAYNAKLAR

- Abd-Allah, G. M and Mariee, A. D. (2008) "Nitrite-mediated inactivation of human plasma paraoxonase-I: Possible beneficial effect of aromatic amino acids", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 150(3), 281-288.
- 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", *American Journal of Human Genetics*, 52(3), 598-608.
- Aharoni, A., Gaidukov, L., Yagur, S., Toker, L., Silman, I. and Tawfik, D. S. (2004) "Directed evolution of mammalian paraoxonases PON1 and PON3 for bacterial expression and catalytic specialization", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(2), 482-487.
- Aharoni, A., Gaidukov L., Khersonsky O., Gould S. M, Roodveldt C. and Tawfik D. S. (2005) "The evolvability of promiscuous protein functions", *Nature Genetics*, 37(1), 73.
- Akbaba, Y., Türkeş, C., Polat, L., Söyüt, H., Şahin, E., Menzek, A. and Beydemir, Ş. (2013) "Synthesis and paroxonase activities of novel bromophenols" *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 28(5), 1073-1079.
- Akova, M., Birincioğlu M., Bozkurt, A., Dülger, G., Gürdal, H., Kalyoncu, N., Oktay Ş., Onaran, O., Örer, H. S., Tunçok, Y., Türker, A., Yarış, E. ve Yaşar, Ü. (2005) Tıbbi Farmakoloji, Oğuz Kayaalp, *Hacettepe-Taş Kitabevi*, Ankara, 188-193.
- Alici, H. A., Ekinci, D. ve Beydemir, Ş. (2008) "Intravenous anesthetics inhibit human paraoxonase-I (PON1) activity *in vitro* and *in vivo*", *Clinical Biochemistry*, 41(16-17), 1384-1390.
- Allebrandt, K. V., Souza, R. L. and Chautard-Freire-Maia, E. A. (2002) "Variability of the paraoxonase gene (PON1) in Euro-and Afro-Brazilians", *Toxicology and Applied Pharmacology*, 180(3), 151-156.
- Altan, N. (2000) Biyokimya Olgu Sunumlu Yaklaşım, *Palme Yayıncılık*, Ankara, 69-74.
- Arda, N. ve Ertan, H. (2008) "Protein İzolasyonu ve Saflaştırılması", Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, Temizkan G., Arda N., *Nobel Tıp Kitabevi*, İstanbul, 161-274.
- Atamer, A., Bilici, A., Yenice, N., Selek, S., Ilhan, N. and Atamer, Y. (2008) "The importance of paraoxonase-I activity, nitric oxide and lipid peroxidation in hepatosteatosis", *Journal of International Medical Research*, 36(4), 771-776.
- Aviram, M., Rosenblat, M., Bisgaier, C. L., Newton, R. S., Primo-Parmo, S. L. and La Du, B. N. (1998) "Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase", *The Journal of Clinical Investigation*, 101(8), 1581-1590.

- Aviram, M., Rosenblat M., Billecke S., Erogul J., Sorenson R., Bisgaier C. L., Newton R. S. and La Du B. N. (1999) "Human serum paraoxonase (PON1) is inactivated by oxidised low density lipoprotein and reserved by antioxidants", *Free Radical Biology and Medicine*, 26(7-8), 892-904.
- Aviram, M., Hardak, E., Vaya, J., Mahmood, S., Milo, S., Hoffman, A. and Rosenblat, M. (2000) "Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions: PON1 esterase and peroxidase-like activities", *Circulation*, 101(21), 2510-2517.
- Azarsız, E., ve Sönmez, E. Y. (2000) "Paraoksonaz ve Klinik Önemi", *Türk Biyokimya Dergisi*, 25(3), 109-119.
- Bakan, N. (2007) "Kimyasal Kinetik ve Kataliz-Enzimler", Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Biyokimya Bölümü Ders Notları, Erzurum, 63.
- Bargota, R. S., Akhtar, M., Biggadike, K., Gani, D. and Allemann, R. K. (2003) "Structure-activity relationship on human serum paraoxonase (PON1) using substrate analogues and inhibitors", *Bioorganic and Medicinal Chemistry letters*, 13(10), 1623-1626.
- Baylan, O. (2010) "Fosfomycin: past, present and future", *Mikrobiyoloji Bülteni*, 44(2) 311-321.
- 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-45: Identity of K-45 with paraoxonase", *European Journal of Biochemistry*, 211(3), 871-879.
- Boyer, R. F. (1993) "Gel exclusion chromatography", *Modern Experimental Biochemistry*, 81-89.
- 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(1-2), 248-254.
- Brealey, C. J., Walker, C. H. and Baldwin, B. C. (1980) "A-esterase activities in relation to the differential toxicity of pirimiphos-methyl to birds and mammals", *Pesticide Science*, 11(5), 546-554.
- Caglar, S., Dilek, E., Caglar, B., Adiguzel, E., Temel, E., Buyukgungor, O. and Tabak, A. (2016) "New metal complexes with diclofenac containing 2-pyridineethanol or 2-pyridinepropanol: synthesis, structural, spectroscopic, thermal properties, catechol oxidase and carbonic anhydrase activities", *Journal of Coordination Chemistry*, 69(22), 3321-3335.
- Canales, A. and Sanchez-Muniz, F. J. (2003) "Paraoxonase, something more than an enzyme?", *Medicina Clinica*, 121(14), 537-548.

- Celik, M., Gulcu, F., Ozan, G. and Gursu, M. F. (2005) "Paraoxonase and arylesterase activity levels in workers exposed to organic solvents", *Turkish Journal of Biochemistry*, 30(2), 194-199.
- Champe, P. C., Harvey, R. A. and Ferrier, D. R. (2007) Lippincott's Illustrated Reviews Serisinden: Biyokimya, Engin Ulukaya, *Nobel Tıp Kitabevi*, Bursa, 69-82.
- Costa, L. G., McDonald, B. E., Murphy, S. D., Omenn, G. S., Richter, R. J., Motulsky, A. G. and Furlong, C. E. (1990) "Serum paraoxonase and its influence on paraoxon and chlorpyrifos-oxon toxicity in rats", *Toxicology and Applied Pharmacology*, 103(1), 66-76.
- Cuatrecasas, P., Fuchs, S. and Anfinsen, C. B. (1968) "The effect of a competitive inhibitor on the acetylation of tyrosyl and lysyl residues of staphylococcal nuclease", *Biochimica et Biophysica Acta*, 159(2), 417-419.
- Dalkavrayan, S. (2011) "Cspirulina platensis'ten Süperoksit Dismütaz (SOD) Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu", Yüksek Lisans Tezi, *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Adana, 16-20.
- Dandan, R. H. and Brunton, L. (2017) Goodman and Gilman'ın Farmakoloji ve Tedavi El Kitabı, Remzi Erdem, *Güneş Tıp Kitabevi*, Ankara, 906- 909.
- Debord, J., Bollinger, J. C., Merle, L. and Dantoine, T. (2003) "Inhibition of human serum arylesterase by metal chlorides", *Journal of Inorganic Biochemistry*, 94(1-2), 1-4.
- Dilek, E. (2012) "İnsan Serumundan Paraoksonaz-I ve İnsan Trombositlerinden Siklooksigenaz-I Enziminin Saflaştırılması, Bazı İlaçların Bu Enzimlerin Aktiviteleri Üzerine Etkilerinin İncelenmesi", Doktora Tezi, *Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Erzurum.
- Dilek, E. B., Küfrevioğlu, Ö. İ. and Beydemir, Ş. (2013) "Impacts of some antibiotics on human serum paraoxonase-I activity", *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 28(4), 758-764.
- Dilek, E. and Çağlar, S. (2015) "Effects of mono and dinuclear copper (II) complexes derived from non-steroidal anti-inflammatory drug naproxen on human serum paraoxanase-I (PON1) activity", *International Journal of Pharmaceutical Chemistry*, 5(6), 189-195.
- Dilek, E. and Polat M.F. (2016) "In vitro inhibition of three different drugs used in rheumatoid arthritis treatment on human serum paraoxanase-I enzyme activity", *Protein and Peptide Letters*, 23(1), 3-8.
- Dilek, E., Çağlar, S., Erdoğan, K., Çağlar, B. and Sahin, O. (2018) "Synthesis and characterization of four novel palladium (II) and platinum (II) complexes with 1-(2-aminoethyl) pyrrolidine, diclofenac and mefenamic acid: In vitro effect of

these complexes on human serum paraoxanase-I activity”, *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 32(4), e22043.

Draganov, D. I., Stetson, P. L., Watson, C. E., Billecke, S. S. and La Du, B. N. (2000) “Rabbit serum paraoxonase-3 (PON3) is an HDL-associated lactonase and protects LDL against oxidation”, *Journal of Biological Chemistry*, 275(1), 33435-33442.

Dural E.A.Ö. (2008) Farmakoloji, *Nobel Tip Kitabevi*, İstanbul, 433-436.

Durrington, P. N., Mackness, B. and Mackness, M. J. (2001) “Paraoxonase and atherosclerosis”, *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 21(4), 473-480.

Eckerson, H. W., Wyte, C. M., and La Du, B. N. (1983) “The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism”, *American Journal of Human Genetics*, 35(6), 1126.

Ekinci, D. and Beydemir, S. (2009a) “Effect of some analgesic on purified paraoxonase-I from human serum”, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 24(4), 1034-1039.

Ekinci, D. and Beydemir, S. (2009b) “Evaluation of the impacts of antibiotic drugs on PON1; a major bioscavenger against cardiovascular diseases”, *European Journal of Pharmacology*, 617(1), 84-89.

Erdem, M. S. T. İ. (2004) ST Elevasyonlu Miyokard İnfarktüsü (Stemi) Hastalarda İnsan Paraoxonase Geni Met-Leu/55 Polimorfizmi, *Dr. Siyami Ersek Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Merkezi*, İstanbul.

Furlong, C. E., Richter, R. J., Chapline, C. and Crabb, J. W. (1991) “Purification of rabbit and human serum paraoxonase”, *Biochemistry*, 30(42), 10133-10140.

Furlong, C. E. (2000) “PON1 status and neurologic symptom complexes in Gulf War veterans”, *Genome Research*, 10(2), 153-155.

Gaidukov, L. and Tawfik, D. S. (2005) “High affinity, stability, and lactonase activity of serum paraoxonase PON1 anchored on HDL with ApoA-I”, *Biochemistry*, 44(35), 11843-11854.

Gan, K. N., Smolen, A., Eckerson, H. W. and La Du, B. N. (1991) “Purification of human serum paraoxonase / arylesterase. Evidence for one esterase catalyzing both activities”, *Drug Metabolism and Disposition*, 19(1), 100-106.

Getz, G. S. and Reardon, C. A. (2004) “Paraoxonase, a cardioprotective enzyme: continuing issues”, *Current Opinion in Lipidology*, 15(3), 261-267.

Gil, F., Pla, A., Gonzalvo, M. C., Hernández, A. F. and Villanueva, E. (1993) “Partial purification of paraoxonase from rat liver”, *Chemico-Biological Interactions*, 87(1-3), 69-75.

- Gordon, D. J. and Rifkind, B. M. (1989) "High-density lipoprotein-the clinical implications of recent studies", *New England Journal of Medicine*, 321(19), 1311-1316.
- Gözükara, E. M. (1989) Biyokimya, *Ofset Repromat*, Ankara, 792-795.
- Gürsu, M. F. ve Özdin M. (2002) "Sigara içenlerde serum paraoksonaz (PON1) aktiviteleri ile malondialdehit düzeylerinin araştırılması", *Fırat Tıp Dergisi*, 7(2) 732-737.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. and Cross, C. E. (1992) "Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? ", *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 119(6), 598-620.
- 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. and Tawfik, D. S. (2004) "Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and antiatherosclerotic enzymes", *Nature Structural and Molecular Biology*, 11(5), 412.
- Illustrated Reviews (2007) Biochemistry, *Nobel Tıp Kitabevi*, İstanbul, 536.
- İnal, S. (2013) "Afinite Kromatografisi Tekniği ile Peroksidaz Enziminin Kırmızı Pancardan (beta vulgaris) Saflaştırılması ve Karakterizasyonu", Yüksek Lisans Tezi, *Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Erzurum, 1-5.
- James, R. W. and Deakin, S. P. (2004) "The importance of high-density lipoproteins for paraoxonase-1 secretion, stability, and activity", *Free Radical Biology and Medicine*, 37(12), 1986-1994.
- Jarvik, G. P., Rozek, L. S., Brophy, V. H., Hatsukami, T. S., Richter, R. J., Schellenberg, G. D. and Furlong, C. E. (2000) "Paraoxonase (PON1) phenotype is a better predictor of vascular disease than is PON1 192 or PON1 55 genotype", *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 20(11), 2441-2447.
- Jarvik, G. P., Hatsukami, T. S., Carlson, C., Richter, R. J., Jampsa, R., Brophy, V. H. and Heagerty, P. J. (2003) "Paraoxonase activity, but not haplotype utilizing the linkage disequilibrium structure, predicts vascular disease", *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 23(8), 1465-1471.
- Jawad, Z. and Paoli, M. (2002) "Novel sequences propel familiar folds", *Structure*, 10(4), 447-454.
- Johnstone, A. and Thorpe, R. (1982) Immunochemistry In Practice, *Blackwell Scientific Publications*, Oxford, 9-16.

- Josse, D., Xie, W., Renault, F., Rochu, D., Schopfer, L. M., Masson, P. and Lockridge, O. (1999) "Identification of residues essential for human paraoxonase (PON1) arylesterase/organophosphatase activities", *Biochemistry*, 38(9), 2816-2825.
- Karadağ, H. (2007) "Süperoksit Dismutaz Enziminin İnsan Eritrositlerinden Saflaştırılması ve Bazı Pestisitlerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi", Doktora Tezi, *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Adana.
- Keha, E. E. ve Küfrevioğlu, Ö. İ. (2012) Biyokimya, *Aktif Yayınevi*, İstanbul, 643.
- Kelso, G. J., Stuart, W. D., Richter, R. J., Furlong, C. E., Jordan-Starck, T. C. and Harmony, J. A. (1994) "Apolipoprotein J is associated with paraoxonase in human plasma", *Biochemistry*, 33(3), 832-839.
- Khersonsky, O. and Tawfik, D. S. (2006) "Chromogenic and fluorogenic assays for the lactonase activity of serum paraoxonases", *Chembiochem*, 7(1), 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 bovine plasma arylesterase", *Biochemical Journal*, 135(1), 93-99.
- Kleemola, P., Freese, R., Jauhiainen, M., Pahlman, R., Alfthan, G. and Mutanen, M. (2002) "Dietary determinants of serum paraoxonase activity in healthy humans", *Atherosclerosis*, 160(2), 425-432.
- Kudchodkar, B. J., Lacko, A. G., Dory, L. and Fungwe, T. V. (2000) "Dietary fat modulates serum paraoxonase-I activity in rats", *The Journal of Nutrition*, 130(10), 2427-2433.
- Kuo, C. L. and La Du, B. N. (1995) "Comparison of purified human and rabbit serum paraoxonases", *Drug Metabolism and Disposition*, 23(9), 935-944.
- Kuo, C. L. and La Du, B. N. (1998) "Calcium binding by human and rabbit serum paraoxonases: structural stability and enzymatic activity", *Drug Metabolism and Disposition*, 26(7), 653-660.
- Küfrevioğlu, Ö.İ. ve Çiftci M. (2008) Kromatografiye Giriş Ders Notları, Erzurum.
- La Du, B. N. and Novais, J. (1989) "Human serum organophosphatase: biochemical characteristics and polymorphic inheritance", *Enzymes Hydrolysing Organophosphorus Compounds*, 41-52.
- La Du, B. N. (1992) "Human serum paraoxonase/arylesterase", *Pharmacogenetics of Drug Metabolism*, 51-91.
- La Du, B. N., Aviram, M., Billecke, S., Navab, M., Primo-Parmo, S., Sorenson, R. C. and Standiford, T. J. (1999) "On the physiological role (s) of the paraoxonases", *Chemico-Biological Interactions*, 119, 379-388.

- Laitinen, L. A., Laitinen, A. and Haahtela, T. (1993) "Airway mucosal inflammation even in patients with newly diagnosed asthma", *American Review of Respiratory Disease*, 147, 697-697.
- Lee, J., Prohaska, J. R. and Thiele, D. J. (2001) "Essential role for mammalian copper transporter Ctr1 in copper homeostasis and embryonic development", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(12), 6842-6847.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L. and Cox, M. M. (2005) *Lehninger principles of biochemistry*, **WH Freeman and Co**, New York, 4, 1100.
- Li, W. F., Costa, L. G. and Furlong, C. E. (1993) "Serum paraoxonase status: a major factor in determining resistance to organophosphates", *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues*, 40(2-3), 337-346.
- Li, W. F., Furlong, C. E. and Costa, L. G. (1995) "Paraoxonase protects against chlorpyrifos toxicity in mice", *Toxicology Letters*, 76(3), 219-226.
- Li, W. F., Costa, L. G., Richter, R. J., Hagen, T., Shih, D. M., Tward, A. and Furlong, C. E. (2000) "Catalytic efficiency determines the *in-vivo* efficacy of PON1 for detoxifying organophosphorus compounds", *Pharmacogenetics and Genomics*, 10(9), 767-779.
- Liu, Y., Mackness, B. and 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 Radical Biology and Medicine*, 45(6), 743-748.
- Mackness, M. I., Arrol, S. and Durrington, P. N. (1991a) "Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein", *Febs Letters*, 286(1-2), 152-154.
- Mackness, M. I., Harty, D., Bhatnagar, D., Winocour, P. H., Arrol, S., Ishola, M. and Durrington, P. N. (1991b) "Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolaemia and insulin-dependent diabetes mellitus", *Atherosclerosis*, 86(2-3), 193-199.
- Mackness, M. I., Abbott, C. A., Arrol, S. and Durrington, P. N. (1993a) "The role of high-density lipoprotein and lipid-soluble antioxidant vitamins in inhibiting low-density lipoprotein oxidation", *Biochemical Journal*, 294(3), 829-834.
- Mackness, M. I., Arrol, S., Abbott, C. and Durrington, P. N. (1993b) "Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase", *Atherosclerosis*, 104(1-2), 129-135.
- Mackness, M. I. and Durrington, P. N. (1995) "HDL, its enzymes and its potential to influence lipid peroxidation", *Atherosclerosis*, 115(2), 243-253.

- Mackness, M. I., Mackness, B., Durrington, P. N., Connelly, P. W. and Hegele, R. A. (1996) "Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins", *Current Opinion in Lipidology*, 7(2), 69-76.
- Mackness, M. I., Mackness, B., Arrol, S., Wood, G., Bhatnagar, D. and Durrington, P. N. (1997a) "Presence of paraoxonase in human interstitial fluid", *Febs Letters*, 416(3), 377-380.
- Mackness, M. I., Arrol, S., Mackness, B. and Durrington, P. N. (1997b) "Alloenzymes of paraoxonase and effectiveness of high-density lipoproteins in protecting low-density lipoprotein against lipid peroxidation", *The Lancet*, 349(9055), 851-852.
- Mackness, B., Durrington, P. N. and Mackness, M. I. (1998) "Human serum paraoxonase", *General Pharmacology: The Vascular System*, 31(3), 329-336.
- Mackness, B., Davies, G. K., Turkie, W., Lee, E., Roberts, D. H., Hill, E., Roberts, C., Durrington, P.N. and Mackness, M. I. (2001) "Paraoxonase status in coronary heart disease: are activity and concentration more important than genotype?", *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 21(9), 1451-1457.
- Mackness, M. and Mackness, B. (2004) "Paraoxonase-I and atherosclerosis: is the gene or the protein more important?", *Free Radical Biology and Medicine*, 37(9), 1317-1323.
- Main, A. R. (1956) "The role of A-esterase in the acute toxicity of paraoxon, TEPP and parathion", *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 34(2), 197-216.
- Mallinckrodt, M. G. V., Hommel, G. and Dumbach, J. (1979) "On the genetics of the human serum paraoxonase (EC 3.1.1.2)", *Human Genetics*, 50(3), 313-326.
- Marathe, G. K., Zimmerman, G. A. and McIntyre, T. M. (2003) "Platelet-activating factor acetylhydrolase, and not paraoxonase-I, is the oxidized phospholipid hydrolase of high density lipoprotein particles", *Journal of Biological Chemistry*, 278(6), 3937-3947.
- Navab, M., Berliner, J. A., Watson, A. D., Hama, S. Y., Territo, M. C., Lusis, A. J. and Edwards, P. A. (1996) "The yin and yang of oxidation in the development of the fatty streak: a review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture", *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 16(7), 831-842.
- Nelson, D.L. and Cox, M.M. (2005) Lehninger Biyokimyanın İlkeleri, *Palme Yayıncılık*, Ankara, 243-260.
- Ng, C. J., Wadleigh, D. J., Gangopadhyay, A., Hama, S., Grijalva, V. R., Navab, M. and Reddy, S. T. (2001) "Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein", *Journal of Biological Chemistry*, 276(48), 44444-44449.

- Ng, C. J., Shih, D. M., Hama, S. Y., Villa, N., Navab, M. and Reddy, S. T. (2005) "The paraoxonase gene family and atherosclerosis", *Free Radical Biology and Medicine*, 38(2), 153-163.
- Nguyen, S. D. and Dai-Eun, S. O. K. (2003) "Beneficial effect of oleoylated lipids on paraoxonase-I: protection against oxidative inactivation and stabilization", *Biochemical Journal*, 375(2), 275-285.
- Nishio, E. and Watanabe Y. (1997) "Cigarette smoke extract inhibits plasma paraoxonase activity by modification of the enzyme's free thiols", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 236 (2), 289-293.
- Noll, C., Hamelet, J., Matulewicz, E., Paul, J. L., Delabar, J. M. and Janel, N. (2009) "Effects of red wine polyphenolic compounds on paraoxonase-I and lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-I in hyperhomocysteinemic mice", *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 20(8), 586-596.
- Oda, M. N., Bielicki, J. K., Berger, T. and Forte, T. M. (2001) "Cysteine substitutions in apolipoprotein AI primary structure modulate paraoxonase activity", *Biochemistry*, 40(6), 1710-1718.
- Oktaý, M. (2010) Protein Saflařtırma Rehberi, *Aktif Yayınvevi*, Ankara.
- Pasca, S. P., Dronca, E., Nemeş, B., Kaucsar, T., Endreffy, E., Iftene, F., Benga, I., Cornean, R. and Dronca, M. (2008) "Paraoxonase-I activities and polymorphisms in autism spectrum disorders", *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(3), 600-607.
- Peterson, E. A. and Sober, H. A. (1956) "Chromatography of proteins. I. Cellulose ion-exchange adsorbents", *Journal of the American Chemical Society*, 78(4), 751-755.
- Pharmacia Fine Chemicals Ab, (1980) Ion Exchange Chromatography: Principles and Methods, *Rahmsi Lund*, Sweden, 4-8.
- Polaina, J. and MacCabe, A. P. (2007) Industrial Enzymes, *Springer*, The Netherlands, 9.
- Primo-Parmo, S. L., Sorenson, R. C., Teiber, J. and La Du, B. N. (1996) "The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family", *Genomics*, 33(3), 498-507.
- Reddy, S. T., Wadleigh, D. J., Grijalva, V., Ng, C., Hama, S., Gangopadhyay, A. and Fogelman, A. M. (2001) "Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-I protein but is not regulated by oxidized lipids", *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 21(4), 542-547.
- Renault, F., Chabrière, E., Andrieu, J. P., Dublet, B., Masson, P. and Rochu, D. (2006) "Tandem purification of two HDL-associated partner proteins in human plasma,

- paraoxonase (PON1) and phosphate binding protein (HPBP) using hydroxyapatite chromatography”, *Journal of Chromatography B*, 836(1-2), 15-21.
- Rodrigo, L., Mackness, B., Durrington, P. N., Hernandez, A. and Mackness, M. I. (2001) “Hydrolysis of platelet-activating factor by human serum paraoxonase”, *Biochemical Journal*, 354(1), 1-7.
- Rozenberg, O., Rosenblat, M., Coleman, R., Shih, D. M. and Aviram, M. (2003) “Paraoxonase (PON1) deficiency is associated with increased macrophage oxidative stress: studies in PON1-knockout mice”, *Free Radical Biology and Medicine*, 34(6), 774-784.
- Rozenberg, O., Shih, D. M. and Aviram, M. (2005) “Paraoxonase-I (PON1) attenuates macrophage oxidative status: studies in PON1 transfected cells and in PON1 transgenic mice”, *Atherosclerosis*, 181(1), 9-18.
- Sarkar, P. D., Shivaprakash, T. M. and Madhusudhan, B. (2006) “Association between paraoxonase activity and lipid levels in patients with premature coronary artery disease”, *Clinica Chimica Acta*, 373(1-2), 77-81.
- Sayın, M. (2009) “Sığır Serum Paraoksonaz Enziminin Saflaştırılması ve İmmobilizasyonu”, Yüksek Lisans Tezi, *Balikesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Balikesir.
- Segel, I.H. (1968) Biochemical Calculations, *Interscience*, New York, 403.
- Segel, I. H. (1975) Enzyme Kinetics, *John Wiley and Sons*, New York.
- Seres, I., Paragh, G., Deschene, E., Fulop Jr, T. and Khalil, A. (2004) “Study of factors influencing the decreased HDL associated PON1 activity with aging”, *Experimental Gerontology*, 39(1), 59-66.
- Shidfar, F., Eshramphosh, E., Heydari, I., Haghghi, L., Hosseini, S. and Shidfar, S. (2009) “Effects of soy bean on serum paraoxonase-I activity and lipoproteins in hyperlipidemic postmenopausal women”, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60(3), 195-205.
- Shih, D. M., Gu, L., Xia, Y. R., Navab, M., Li, W. F., Hama, S. and Lusis, A. J. (1998) “Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis”, *Nature*, 394(6690), 284.
- 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. and Lusis, A. J. (2000) “Combined serum paraoxonase knockout/apolipoprotein E knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis”, *Journal of Biological Chemistry*, 275(23), 17527-17535.

- Sinan, S., Kockar, F. and Arslan, O. (2006) "Novel purification strategy for human PON1 and inhibition of the activity by cephalosporin and aminoglikozide derived antibiotics", *Biochimie*, 88(5), 565-574.
- Soran, N., Altindag, O., Çakır, H., Çelik, H., Demirkol, A. and Aksoy, N. (2008) "Assessment of paraoxonase activities in patients with knee osteoarthritis", *Redox Report*, 13(5), 194-198.
- Sorenson, R. C., Primo-Parmo, S. L., Kuo, C. L., Adkins, S., Lockridge, O. and La Du, B. N. (1995) "Reconsideration of the catalytic center and mechanism of mammalian paraoxonase/arylesterase", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(16), 7187-7191.
- Sorenson, R. C., Bisgaier, C. L., Aviram, M., Hsu, C., Billecke, S. and La Du, B. N. (1999) "Human serum paraoxonase/arylesterase's retained hydrophobic N-terminal leader sequence associates with HDLs by binding phospholipids: apolipoprotein AI stabilizes activity", *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 19(9), 2214-2225.
- Telefoncu, A. (1986) Temel ve Uygulamalı Enzimoloji, *Ege Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Yayını*, İzmir, 59.
- Tward, A., Xia, Y. R., Wang, X. P., Shi, Y. S., Park, C., Castellani, L. W., Lusis A. J. and Shih, D. M. (2002) "Decreased atherosclerotic lesion formation in human serum paraoxonase transgenic mice", *Circulation*, 106(4), 484-490.
- Türkeş, C. (2010) "İnsan Serumundan Paraoksonaz-I Enziminin Saflaştırılması ve Bazı İlaçların Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi", Yüksek Lisans Tezi, *Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Erzurum.
- Türkeş, C., Söyüt, H. and Beydemir, Ş. (2014) "Effect of calcium channel blockers on paraoxonase-I (PON1) activity and oxidative stress", *Pharmacological Reports*, 66(1), 74-80.
- Türkeş, C., Söyüt, H. and Beydemir, Ş. (2015) "Human serum paraoxonase-I (hPON1): *in vitro* inhibition effects of moxifloxacin hydrochloride, levofloxacin hemihydrate, cefepime hydrochloride, cefotaxime sodium and ceftizoxime sodium", *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 30(4), 622-628.
- Türkeş, C., Söyüt, H. and Beydemir, Ş. (2016) "*In vitro* inhibitory effects of palonosetron hydrochloride, bevacizumab and cyclophosphamide on purified paraoxonase-I (hPON1) from human serum", *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 42, 252-257.
- 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", *In Annales de l'Institut Pasteur*, 101, 104-119.

- Verit, F. F., Erel, O. and Celik, H. (2008) "Paraoxonase-I activity in patients with hyperemesis gravidarum", *Redox Report*, 13(3), 134-138.
- Verit, F. F., Verit, A., Ciftci, H., Erel, O. and Çelik, H. (2009) "Paraoxonase-I activity in subfertile men and relationship to sperm parameters", *Journal of Andrology*, 30(2), 183-189.
- Voet, D. and Voet, J.G. (2000) Biochemistry, *John Wiley and Sons*, New York, 346-350.
- Watson, A. D., 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 low density lipoprotein", *The Journal of Clinical Investigation*, 96(6), 2882-2891.
- Yavuz, E. (2014) "Paraoksonaz-I enziminin yeni bir hidrofobik jel ile saflaştırılması", Yüksek Lisans Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Balıkesir.
- Yeung, D. T., Josse, D., Nicholson, J. D., Khanal, A., McAndrew, C. W., Bahnsen, B. J. and Cerasoli, D. M. (2004) "Structure/function analyses of human serum paraoxonase (HuPON1) mutants designed from a DFPase-like homology model", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1702(1), 67-77.
- Yüreğir, G. T. (1981) "Enzimler ve Enzim Kinetikleri", Temel Biyokimya, *Kemal Matbaası*, Adana, 1, 148-167.



EKLER

Ek-1. Tez Çalışması Süresince Yapılan Akademik Çalışmalar

Yılmaz, A., Dilek, E. (2018) “Ameliyat Sonrası Hastalara Verilen Bazı Antibiyotiklerin İnsan Serumundan Saflaştırılan Paraoksonaz-I Enziminin Aktivitesi Üzerine *İn Vitro* Etkilerinin İncelenmesi”, *Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi BAP Projesi (Proje No:FYL-2018-564)*.

Yılmaz, A., Dilek, E. (2018) “Ameliyat Sonrası Hastalara Verilen Bazı Antibiyotiklerin İnsan Serumundan Saflaştırılan Paraoksonaz-I Enziminin Aktivitesi Üzerine *İn Vitro* Etkilerinin İncelenmesi”, *International Eurasian Conference On Science, Engineering and Technnology*, Ankara.



ÖZGEÇMİŞ

1971 yılında İstanbul Küçükköy’de doğdu. İlkokulu ve ortaokulu Kırklareli’nde, liseyi Erzincan’da bitirdi. Atatürk Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü’nden 1992 yılında mezun oldu. 1997-2001 yılları arasında Milli Eğitim Bakanlığı’na bağlı çeşitli okullarda öğretmen olarak görev yaptı. 2001 yılından beri Tarım ve Orman Bakanlığı Erzincan Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü’nde Kimya Mühendisi olarak çalışmakta ve halen Kalite Yönetim Birimi ile Kimyasal Laboratuvar Birimi Sorumlusu olarak görevini yürütmektedir.

