






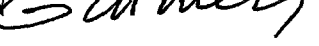
T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

İNSAN SERUM PARAOKSONAZ ENZİMİNİN YENİ BİR
YÖNYTEMLE SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI
ANTİBİYOTİKLERİN ENZİM ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

SELMA SİNAN

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Oktay ARSLAN 
Yrd. Doç. Dr. Feray KÖÇKAR (İkinci danışman) 
Sınav Tarihi: 14. 04.2005

Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Şule PEKYARDIMCI (Başkan) 
Prof. Dr. Esmâ KILIÇ 
Prof. Dr. Mahir ALKAN 
Prof. Dr. Gülendam TÜMEN 

Balıkesir, Nisan-2005

ÖZET

İNSAN SERUM PARAOKSONAZ ENZİMİNİN YENİ BİR YÖNYTEMLE SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI ANTİBİYOTİKLERİN ENZİM ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Selma SİNAN

Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı

(Doktora Tezi /Tez Danışmanı: Prof. Dr. Oktay ARSLAN)

(İkinci Danışman: Yrd. Doç. Dr. Feray KÖÇKAR)

Balıkesir, 2005

Bu çalışmada, detoksifikasyon ve antioksidan aktivitesi ile metabolizmada önemli fizyolojik fonksiyona sahip paraoksonaz (PON1) enzimini saflaştırmak için yeni bir hidrofobik etkileşim kromatografisi jeli sentezlenmiştir. Hidrofobik etkileşim kromatografisi jeli, CNBr ile aktive edilmiş Sepharose-4B'ye uzantı kolu olarak L-tirozin bağlandıktan sonra ligand olarak hidrofobik bir molekül olan 1-naftilaminin L-tirozine kenetlenmesi sonucu sentezlenmiştir.

Sentezlenen hidrofobik etkileşim jeli ile uygulanan hidrofobik etkileşim kromatografisi ve amonyum sülfat çöktürmesi yöntemleri kullanılarak insan serumundan PON1 enzimi saflaştırılmıştır. Saflaştırılan PON1 enzimi SDS poliakrilamid jel elektroforezine uygulanarak yaklaşık 43kDa molekül ağırlığına sahip tek bant elde edilmiştir.

İnsan serum PON1 enziminin paraokson substratına karşı K_M ve V_{max} değerleri Lineweaver-Burk yöntemi ile sırasıyla 4,16mM ve 227,27 U/ml olarak bulunmuştur.

Yaygın olarak kullanılan gentamisin sülfat, sodyum ampisilin, sefazolin sodyum, siprofloksasin, klaritromisin, kloramfenikol, rifamisin SV, klindamisin fosfat antibiyotiklerin saflaştırılmış serum PON1 enzimi üzerindeki *in vitro* etkisi belirlenmiştir. Söz konusu antibiyotikler rifamisin SV antibiyotiği hariç hepsi *in vitro* olarak PON1 enzimini inhibe ettiği saptanmıştır. İnhibisyon etkisi gösteren antibiyotiklerden, sodyum ampisilin, sefazolin sodyum, kloramfenikol ve klindamisin fosfat kompetitif türü inhibisyon gösterirken; gentamisin sülfat, klaritromisin ve siprofloksasinin nonkompetitif inhibisyon etkisi gösterdiği bulunmuştur.

Ayrıca söz konusu antibiyotiklerin fare serum ve karaciğer PON1 enzimi üzerindeki 2, 4 ve 6 saat sonraki *in vivo* etkisi araştırılmıştır. Antibiyotikler uygulandıktan 2, 4 ve 6 saat sonraki serum ve karaciğer PON1 enzim aktivitesi üzerindeki etkisi ile hiç antibiyotik uygulanmamış kontrol grubunun PON1 enzim aktivitesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığı tespit edilmiştir.

Antibiyotiklerin model olarak seçilen insan karaciğer hücreleri (HepG2) tarafından üretilen PON1 enzim aktivitesi üzerindeki *in vitro* etkisi belirlenmiştir. Doku kültüründe üretilen hücreler üzerinde antibiyotiklerin tümünün uygulandıktan 2, 4 ve 6 saat sonra doza bağlı olarak inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: Paraoksonaz (PON1), Hidrofobik etkileşim kromatografisi, Gentamisin sülfat, Sefazolin sodyum, Sodyum ampisilin, Klaritromisin, Kloramfenikol, Siprofloksasin, Klindamisin fosfat, Rifamisin SV, İnhibisyon.

ABSTRACT

THE PURIFICATION OF HUMAN SERUM PARAOXONASE (PON1) BY NEWLY METHOD AND EFFECTS OF SOME ANTIBIOTICS ON THIS ENZYME

SELMA SİNAN

Balikesir University, Institute of Science, Department of Chemistry

(PhD. Thesis / Supervisor: Prof. Dr. Oktay ARSLAN)

(Cosupervisor: Dr. Feray KOÇKAR)

Balikesir, Turkey, 2005

In this study, a new gel of hydrophobic interaction chromatography for purification of paraoxonase (PON1), which is of important physiological function in metabolism with detoxification and antioxidant activity. The gel was synthesized with Sepharose-4B-L-tyrosine and 1-naphthylamine as a hydrophobic ligand. Sepharose-4B was activated with CNBr and than L-tyrosine was add as a extension arm.

Human serum paraoxonase was purified with ammonium sulfate precipitation and synthesized hydrophobic interaction chromatography. On SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, purified human serum paraoxonase to give a single band on SDS-PAGE with about weight of 43kDa.

The K_M and V_{max} values were determined by the method of Lineweaver-Burk plots, using paraoxon as a substrate. The K_M and V_{max} is 4.16mM and 227.27 U/mL, respectively.

The effect of some antibiotics which is commonly used on purified human serum paraoxonase *in vitro* was determined. The name of antibiotics was gentamycin sulfate, sodium ampicillin, cefazolin sodium, ciprofloxacin, clarithromycin, chloramphenicol, rifamycin SV, clindamycin phosphatet. Except of rifamycin SV, all of them caused an inhibition effect on purified human serum paraoxonase *in vitro*. In addition, the inhibition of paraoxonase activity by sodium ampicillin, cefazolin sodium, chloramphenicol and clindamicin phosphate has competetive and gentamycin sulfate, clarithromycin and ciprofloxacin has non-competetive type inhibition effect was determined.

Furthermore, effects of these antibiotics on mouse serum and liver paraoxonase activity were investigated, after drug administration of 2, 4 and 6 hour. The control group which is any drug administration and experiment group was comparison with a statistical analysis.

In addition, effects of these antibiotics on paraoxonase, produced by human hepatoma cell line (HepG2), which is a model of human liver paraoxonase, *in vitro*. The data indicate that, these antibiotics have inhibition effects which is depend on dose on human hepatoma cell line after drug administration of 2, 4 and 6 hour.

KEY WORDS: Paraoxonase (PON1), Hydrophobic interection chromatography, Gentamycin sulfate, Cefazolin sodium, Sodium ampicillin, Clarithromycin, Chloramphenicol, Ciproflokccacin, Clindamicin phosphate, Rifamycin SV, Inhibition

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET, ANAHTAR SÖZCÜKLER	ii
ABSTRACT, KEY WORDS	iv
İÇİNDEKİLER	vi
SEMBOL LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ	x
ÇİZELGE LİSTESİ	xiv
ÖNSÖZ	xviii
1. GİRİŞ	1
1.1. Paraoksonaz Enziminin Biyokimyası	2
1.1.1. Adlandırılması	2
1.1.2. PON Gen Ailesi	2
1.1.3. Paraoksonaz Enziminin Özellikleri ve İnce Yapısı	3
1.1.4. Enzimin Katalitik Mekanizması	5
1.1.5. Katalizlediği Reaksiyonlar ve Substratları	6
1.2. PON1'in HDL'ye Bağlanması	10
1.3. PON1'in Sentezlenmesi ve Salgılanması	10
1.4. PON1 Polimorfizmi	11
1.5. Paraoksonaz Enziminin Kalp Damar Hastalıkları ve Diğer Hastalıklar ile İlişkisi	13
1.6. Enzimin Saflaştırılması	15
1.7. Gentamisin Sülfat	16
1.8. Kloramfenikol	17
1.9. Sefazolin sodyum	18

1.10. Sodyum Ampisilin	19
1.11. Siprofloksasin	20
1.123. Klaritromisin	22
1.13. Rifamisin SV	23
1.14. Klindamisin Fosfat	24
1.15. Paraoksonaz Enzimi Üzerinde Etkili Olan Tıbbi İlaçlar	25
2. MATERYAL VE YÖNTEMLER	27
2.1. Materyaller	27
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	27
2.1.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar	28
2.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması	29
2.2. Yöntemler	34
2.2.1. Kan serumunun ayrılması	34
2.2.2. Enzim Aktivite Tayini	34
2.2.3. Bradford Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini	34
2.2.4. Farelerin Beslenmesi	35
2.2.4.1. Antibiyotiklerin Uygulanması	35
2.2.4.2. Doku Aktivitelerinin Bulunması	37
2.2.5. Enzimin Saflaştırılması	38
2.2.5.1. Amonyum sülfat Çöktürme Aralığının Belirlenmesi	38
2.2.5.2. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Enzimin Saflaştırılması	39
2.2.5.2.1. Sepharose 4B'nin aktifleştirilmesi	39
2.2.5.2.2. L-tirozinin Bağlanması	39
2.2.5.2.3. 1-Naftilamin Bileşiğinin Bağlanması	40
2.2.5.3. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) İle Enzim Saflığının Kontrolü	41
2.2.6. Optimum şartlarda K_M ve V_{max} Değerlerinin Bulunması	43
2.2.7. Antibiyotikler İçin I_{50} Değerlerini Bulunması	43
2.2.8. Antibiyotikler İçin K_i değerlerinin Bulunması	43
2.2.9. Antibiyotiklerin HepG2 Hücreleri Tarafından Üretilen PON Üzerindeki Etkisi	44

2.2.9.1. Hücrelerin Doku Kültüründe Yetiştirilmesi	44
2.2.9.2. Doku Kültürü Laboratuvarının Temizliği ve Sterilizasyonu	45
2.2.9.3. Cam Pipetlerin ve Diğer Cam Malzemenin Hazırlanması	45
2.2.9.4. Medyum, PBS, TE Isıtılması	45
2.2.9.5. Hücrelerin Büyütülmesi	45
2.2.9.6. Hücre Kültürünün Pasajlanması	46
2.2.9.7. Hücrelerin Sayımı	46
2.2.9.8. Antibiyotiklerin Hücre Kültürüne Uygulanması ve Aktivitesinin Bulunması	46
2.2.11. İstatistik Analiz	47
3. BULGULAR	47
3.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri	47
3.2. Antibiyotiklerin Fare Serum ve Karaciğer PON Enzimi Üzerindeki Etkisi	48
3.2.1. Antibiyotiklerin Serum PON Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	48
3.2.2. Antibiyotiklerin Karaciğer PON Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	51
3.3. Enzimin Saflaştırılması	57
3.3.1. Amonyum sülfat Çöktürme Aralığının Belirlenmesi	57
3.3.2. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Enzimin Saflaştırılması	59
3.3.3. Serum Paraoksonaz Enziminin SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi	62
3.4. Optimum şartlarda K_m ve V_{max} Değerlerinin Bulunması	63
3.5. İnhibisyona Sebep Olan Antibiyotiklerin I_{50} ve K_i Değerlerinin Bulunması	65
3.6. Antibiyotiklerin HepG2 Hücreleri Tarafından Üretilen PON Üzerindeki Etkisi	85
3.7. İstatistiksel Analiz	106
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	107
5. KAYNAKLAR	119

SEMBOL LİSTESİ

Simge	Adı
PON1	Paraoksonaz 1 enzimi
hPON1	İnsan paraoksonaz enzimi
fPON1	Fare paraoksonaz enzimi
SDS	Sodyum dodesil sülfat
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
U	Enzim Ünitesi
ΔA	Absorbans Farkı
TEMED	N,N,N', N', -tetrametiletildiamin
I	Gentamisin sülfat
II	Sodyum ampisilin
III	Sefazolin sodyum
IV	Siprofloksasin
V	Kloramfenikol
VI	Klaritromisin
VII	Rifamisin SV
VIII	Klindamisin fosfat

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil Numarası	Adı	Sayfa
Şekil 1.1	Paraoksonaz enziminin üç boyutlu görünümü. (a) β -kırmalı tabakalar ve (b) hidrofobik bölgelerin (H1, H2, H3) β -kırmalı tabakalara göre durumu	4
Şekil 1.2	Paraoksonazın katalitik mekanizması	5
Şekil 1.3	Lakton hidrolizi	7
Şekil 1.4	İnsektisitlerde yaygın olarak kullanılan okson metabolitlerinin hidrolizi	9
Şekil 1.5	Sinir gazlarının hidrolizi	9
Şekil 1.6	Aromatik esterlerin hidrolizi	10
Şekil 1.7	Gentamisin sülfat bileşiğinin molekül şekli	17
Şekil 1.8	Kloramfenikol bileşiğinin molekül şekli	18
Şekil 1.9	Sefazolin sodyum bileşiğinin molekül şekli	19
Şekil 1.10	Sodyum ampisilin bileşiğinin molekül şekli	20
Şekil 1.11	Siprofloksasin bileşiğinin molekül şekli	21
Şekil 1.12	Klaritromisin bileşiğinin molekül şekli	22
Şekil 1.13	Rifamisin SV bileşiğinin molekül şekli	23
Şekil 1.14	Klindamisin fosfat bileşiğinin molekül şekli	24
Şekil 2.1	Farelerin beslendiği kafesler ve ucu tüplü olan suluklar	35
Şekil 2.2	Farelerin kafes içinde görünümü	35
Şekil 2.3	Sepharose 4B'nin aktifleştirilmesi	38
Şekil 2.4	L-tirozinin bağlanması	39
Şekil 2.5	1-Naftilamin bileşiğinin bağlanması	40
Şekil 2.6	İnsan karaciğer hücre hattı (HepG2)	44

Şekil 3.1	Bradford yöntemi ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan standart grafik	48
Şekil 3.2	Antibiyotiklerin <i>in vivo</i> şartlarda serum paraoksonazının % aktivitesi üzerine etkisi	56
Şekil 3.3	Antibiyotiklerin <i>in vivo</i> şartlarda karaciğer paraoksonazının % aktivitesi üzerine etkisi	57
Şekil 3.4	Amonyum sülfat çöktürmesinde çöken kısımların aktivite ve protein miktarları	59
Şekil 3.5	Hidrofobik etkileşim kolonundan PON1 enziminin elüsyon grafiği	61
Şekil 3.6	Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılan paraoksonaz enziminin SDS-polakrilamid jel elektroforezi.	63
Şekil 3.7	Saflaştırılmış insan serum paraoksonaz enziminin paraokson substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.	64
Şekil 3.8	Saflaştırılmış insan serum paraoksonaz enzimi üzerine 2 mM paraokson substratı konsantrasyonunda gentamisin sülfat için % aktivite-[I] grafiği	68
Şekil 3.9	Saflaştırılmış insan serum paraoksonaz enzimi üzerine 2mM paraokson substratı konsantrasyonunda sodyum ampisillin için % aktivite-[I] grafiği	68
Şekil 3.10	Saflaştırılmış insan serum paraoksonaz enzimi üzerine 2mM paraokson substratı konsantrasyonunda sefazolin sodyum için % aktivite-[I] grafiği	70
Şekil 3.11	Saflaştırılmış insan serum paraoksonaz enzimi üzerine 2mM paraokson substratı konsantrasyonunda siprofloksasin için % aktivite-[I] grafiği	70
Şekil 3.12	Saflaştırılmış insan serum paraoksonaz enzimi üzerine 2mM paraokson substratı konsantrasyonunda kloramfenikol için % aktivite-[I] grafiği	72
Şekil 3.13	Saflaştırılmış insan serum paraoksonaz enzimi üzerine 2mM paraokson substratı konsantrasyonunda klaritromisin için % aktivite-[I] grafiği	72
Şekil 3.14	Saflaştırılmış insan serum paraoksonaz enzimi üzerine 2mM paraokson substratı konsantrasyonunda rifamisin	74

SV için % aktivite-[I] grafiği

Şekil 3.15	Saflaştırılmış insan serum paraoksonaz enzimi üzerine 2mM paraokson substratı konsantrasyonunda klindamisin fosfat için % aktivite-[I] grafiği	74
Şekil 3.16	Saflaştırılmış insan serum paraoksonaz enzimi aktivitesi üzerine gentamisin sülfatın inhibisyon etkisi [I ₁]=0,190 mg/ml, [I ₂]=0,762 mg/ml	77
Şekil 3.17	Saflaştırılmış insan serum paraoksonaz enzimi aktivitesi üzerine sodyum ampisillinin inhibisyon etkisi [I ₁]=0,0101 mg/ml, [I ₂]=0,0135 mg/ml	77
Şekil 3.18	Saflaştırılmış insan serum paraoksonaz enzimi aktivitesi üzerine sefazolin sodyumun inhibisyon etkisi [I ₁]=0,0089 mg/ml, [I ₂]=0,012 mg/ml	80
Şekil 3.19	Saflaştırılmış insan serum paraoksonaz enzimi aktivitesi üzerine siprofloksasinin inhibisyon etkisi [I ₁]=0,190 mg/ml, [I ₂]=0,381 mg/ml	80
Şekil 3.20	Saflaştırılmış insan serum paraoksonaz enzimi aktivitesi üzerine kloramfenikolün inhibisyon etkisi [I ₁]=0,0237 mg/ml, [I ₂]=0,0316 mg/ml	83
Şekil 3.21	Saflaştırılmış insan serum paraoksonaz enzimi aktivitesi üzerine klaritromisinin inhibisyon etkisi [I ₁]=4,761 mg/ml, [I ₂]=6,19 mg/ml	83
Şekil 3.22	Saflaştırılmış insan serum paraoksonaz enzimi aktivitesi üzerine klindamisin fosfatın inhibisyon etkisi [I ₁]=0,0476 mg/ml, [I ₂]=0,0952 mg/ml	85
Şekil 3.23	Gentamisin sülfat'ın doku kültüründeki 2, 4 ve 6 saatlik <i>in vitro</i> etkisi	88
Şekil 3.24	Ampisillinin doku kültüründeki 2, 4 ve 6 saatlik <i>in vitro</i> etkisi	90
Şekil 3.25	Sefazolin sodyumun doku kültüründeki 2, 4 ve 6 saatlik <i>in vitro</i> etkisi	92
Şekil 3.26	Siprofloksasinin doku kültüründeki 2, 4 ve 6 saatlik <i>in vitro</i> etkisi	94
Şekil 3.27	Kloramfenikolün doku kültüründeki 2, 4 ve 6 saatlik <i>in vitro</i> etkisi	96

Şekil 3.28	Klaritromisin'in doku kültüründeki 2, 4 ve 6 saatlik <i>in vitro</i> etkisi	98
Şekil 3.29	Rifamisin SV'nin doku kültüründeki 2, 4 ve 6 saatlik <i>in vitro</i> etkisi	100
Şekil 3.30	Klindamisin fosfat'ın doku kültüründeki 2, 4 ve 6 saatlik <i>in vitro</i> etkisi	102
Şekil 3.31	HepG2 karaciğer hücreleri üzerinde 2 saat sonunda konsantrasyona bağlı aktivitede görülen değişimler	104
Şekil 3.32	HepG2 karaciğer hücreleri üzerinde 4 saat sonunda konsantrasyona bağlı aktivitede görülen değişimler	105
Şekil 3.33	HepG2 karaciğer hücreleri üzerinde 6 saat sonunda konsantrasyona bağlı aktivitede görülen değişimler	106
Şekil 4.1	PON1 enziminin HDL yüzeyine bağlanma modeli	109

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge Numarası	Adı	Sayfa
Çizelge 2.1	SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının miktarları	32
Çizelge 2.2	Uygulanan antibiyotiklerin miktarları	36
Çizelge 3.1	Antibiyotik uygulanan farelerin serum aktivitelerinin ölçümünde kullanılan çözelti miktarları ve elde edilen sonuçlar.	50
Çizelge 3.2	Antibiyotik uygulanan farelerin serum aktivitelerinin ölçümünde kullanılan çözelti miktarları ve elde edilen sonuçlar.	51
Çizelge 3.3	Antibiyotik uygulanan farelerin karaciğer aktivitelerinin ölçümünde kullanılan çözelti miktarları ve elde edilen sonuçlar.	53
Çizelge 3.4	Antibiyotik uygulanan farelerin karaciğer aktivitelerinin ölçümünde kullanılan çözelti miktarları ve elde edilen sonuçlar	54
Çizelge 3.5	Uygulanan antibiyotiklerin serum ve karaciğer paraoksonaz enzim aktivitesi üzerine etkisinin istatistiksel değerlendirilmesi	55
Çizelge 3.6	Amonyum sülfat çöktürme aralığının belirlenmesinde kullanılan çözeltiler ve hacimleri	58
Çizelge 3.7	Saflaştırma tablosu	62
Çizelge 3.8	İnsan serum paraoksonaz enziminin paraokson substratı kullanılarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$.	65
Çizelge 3.9	Serum PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren gentamisin sülfat ve sodyum ampisilin'in I_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	67

Çizelge 3.10	Serum PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren sefazolin sodyum ve siprofloksasin'in I_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	69
Çizelge 3.11	Serum PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren kloramfenikol ve klaritromisin'in I_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	71
Çizelge 3.12	Serum PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren klindamisin fosfat ve göstermeyen rifamisin SV'nin I_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	73
Çizelge 3.13	Serum PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren gentamisin sülfat'ın K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	75
Çizelge 3.14	Serum PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren sodyum ampisilin'in K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	76
Çizelge 3.15	Serum PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren sefazolin sodyum'un K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	78
Çizelge 3.16	Serum PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren siprofloksasin'in K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	79
Çizelge 3.17	Serum PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren kloramfenikol'ün K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	81

Çizelge 3.18	Serum PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren klaritromisin'in K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	82
Çizelge 3.19	Serum PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren klindamisin fosfat'ın K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	84
Çizelge 3.20	İnsan serum paraoksonaz enzimi için 2mM paraokson substrat konsantrasyonunda %50 inhibisyona sebep olan antibiyotik konsantrasyonları ve Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan inhibisyon tipleri ve K_i değerleri.	85
Çizelge 3.21	İnsan karaciğer hücresinin (HepG2) PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren gentamisin sülfat'ın I_{50} değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	87
Çizelge 3.22	İnsan karaciğer hücresinin (HepG2) PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren sodyum ampisilin'in I_{50} değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	89
Çizelge 3.23	İnsan karaciğer hücresinin (HepG2) PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren sefazolin sodyum'un I_{50} değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	91
Çizelge 3.24	İnsan karaciğer hücresinin (HepG2) PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren siprofloksasin'in I_{50} değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	93
Çizelge 3.25	İnsan karaciğer hücresinin (HepG2) PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren kloramfenikol'ün I_{50} değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	95

Çizelge 3.26	İnsan karaciğer hücresinin (HepG2) PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren klaritromisin'in I_{50} değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	97
Çizelge 3.27	İnsan karaciğer hücresinin (HepG2) PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren rifamisin SV'nin I_{50} değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	99
Çizelge 3.28	İnsan karaciğer hücresinin (HepG2) PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren klindamisin fosfat'ın I_{50} değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	101
Çizelge 3.29	İnsan karaciğer paraoksonaz enzimi için 2mM paraokson substrat konsantrasyonunda 2, 4 ve 6 saat sonra %50 inhibisyona sebep olan antibiyotik konsantrasyonları	103

ÖNSÖZ

Doktora çalışmalarımın her safhasında her türlü desteklerini gördüğüm, insanlara yaklaşımını ve bilimsel yönlerini kendime örnek aldığım çok kıymetli danışman hocalarım sayın Prof. Dr. Oktay ARSLAN'a ve Yrd. Doç. Dr. Feray KÖÇKAR'a öncelikle en derin minnet ve şükranlarımı arz ederim.

Doktora tez izleme sınavları esnasında değerli bilgi ve yorumları ile bizleri yönlendiren çok kıymetli hocalarım sayın Prof. Dr. Şule PEKYARDIMCI'ya ve Prof. Dr. Gülendir TÜMEN'e en derin saygılarımı sunarım.

Çalışmalarında yardımlarını gördüğüm ve her konuda desteklerini esirgemeyen grup arkadaşlarım Arş. Gör. Hatice BOZKURT'a ve Nahit GENÇER'e teşekkür gönül borcumdur. Ayrıca tezin yazılması sırasında yardımlarından dolayı Selda KIRANOĞLU'na ve Semra IŞIK'a ve değerli öğrencim Mustafa ÇAKIR'a teşekkür ederim.

Ayrıca biyoloji bölümünde olduğum halde kimya bölümünde doktora yapmam için beni kabul eden bütün kimya bölümü öğretim üyelerine ve bunun için beni dışlamayan tüm biyoloji bölüm öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Bu tez Balıkesir Üniversitesi Araştırma Fonu 2002/02 nolu proje tarafından desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı Balıkesir Üniversitesi Araştırma Fonu Başkanlığına teşekkür ederim.

Ayrıca bana her şeyin başarılabilir olduğuna inandıran ve her yönden desteklerini gördüğüm Denizli'deki ailemin her bir ferdine sonsuz teşekkürler.

Son olarak doktora çalışmalarım esnasında bana manevi desteğini esirgemeyen sevgili eşim Olcay SİNAN'a sonsuz teşekkürlerimi belirtmek ve bu tezi henüz dünyaya gelmemiş olan oğluma hediye etmek isterim.

Balıkesir, 2005

Selma Sinan

1. GİRİŞ

Yıllardan beri tarımda, insan sağlığına verdiği zararlar göz ardı edilerek, sadece ürün verimini arttırmak amaçlı çeşitli zararlılara karşı organofosfatlı kimyasallar kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılan insektisit olan parathion bileşiğinin katabolik ürünü sonucu oluşan paraokson, başta sinir uyarılarının iletiminde önemli rol oynayan asetilkolin esteraz ve diğer bazı enzimleri inhibe etmektedir. Ancak organizma bu etkilerin birçoğuna karşı savunma sistemleri ile donatılmıştır. Bunlardan paraoksonaz (PON1) sadece bir tanesidir. Bu enzim paraoksani hidroliz ederek onun zararlı etkilerini ortadan kaldırmaktadır [1, 2]. Enzimin detoksifikasyon özelliğini ortaya koyan bu aktivitesinin yanında antioksidan aktiviteye de sahiptir. PON1 bu özelliği ile LDL fosfolipidlerinin oksidasyonunu önlediği bilinmektedir. LDL'nin oksidasyonu ateroskleroz sürecinin başlangıç evresini oluşturması, enzimin antioksidant özelliğinin önemini ortaya koymaktadır [3-6].

Son yıllarda artan antibiyotik tüketimi, bu bileşiklerin yan etkilerinin daha fazla araştırılmasına sebep olmaktadır. Özellikle metabolizmada önemli fizyolojik fonksiyonlara sahip enzimlerin aktivitelerinin bu bileşiklerden ne ölçüde etkilendiği son derece önemlidir. Bu çalışmamızda özellikle ülkemizde sıklıkla kullanılan 8 farklı grupta antibakteriyel antibiyotiklerin, detoksifikasyon ve antioksidan aktiviteye sahip bu enzim üzerindeki *in vitro* ve *in vivo* etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca söz konusu antibiyotiklerin doku kültürü ortamında *in vitro* etkisi araştırılmıştır. Bunun için aşağıdaki çalışmalar planlanmıştır.

- İnsan serumundan hidrofobik etkileşim kromatografisi ile Paraoksonaz enziminin saflaştırılması
- SDS-PAGE elektroforezi ile saflığının kontrolü.

- Optimum şartlarda enzimin substrata ilgisinin biyokimyasal ifadesi olan K_M ve V_{max} değerlerinin bulunması
- Sekiz farklı grup antibiyotiğin saf enzim üzerindeki *in vitro* etkisi
- İnhibisyona neden olan ilaçların inhibisyon mekanizmasının belirlenmesi
- Antibiyotiklerin fare serumu ve karaciğeri üzerindeki *in vivo* etkisi
- Söz konusu antibiyotiklerin hücre kültüründe insan karaciğer hücreleri model olan HepG2 hücre hattında etkisinin araştırılması

1.1 Paraoksonaz Enziminin Biyokimyası

1.1.1 Adlandırılması

Yapılan ilk araştırmalara göre paraoksonaz enzimi, paraoksonaz aktivitesi gibi arilesteraz aktivitesi gösteren ve paraokson gibi çok sayıda aromatik karboksilik asit esterlerini hidrolizleyebilme özelliğine sahip A-esterazları grubunda yer alan ve EC 3.1.1.2 enzim kodu ile isimlendirilmiştir [7]. Ancak isimlendirme komitesi (International Union of Biochemistry and Molecular Biology Nomenclature Committee) bu sınıflandırmayı tekrar düzenleyerek, söz konusu enzimi, enzim kodu girişi EC 3.1.8 olan fosfo triester hidrolazlar veya organofosfat hidrolazlar grubunun 1 numaralı enzimi olarak belirlenmiştir [8]. Paraoksonaz enzimi de arildialkilfosataz ismi ve EC 3.1.8.1. kodu ile bu grupta yer almaktadır [9]. Bu grupta yer alan paraoksonaz enzimi, aktivitesinin ölçümünde ilk olarak paraokson substratı kullanıldığı için bu ismi almıştır [10, 11].

1.1.2 PON Gen Ailesi

Paraoksonaz enzimi ilk olarak 1953 yılında Aldridge tarafından insan kan serumunda bulunmuştur [12, 13]. Ancak daha sonra yapılan çalışmalarda, paraoksonaz enziminin sadece insan serumunda değil hayvanlarda da farklı seviyelerde olduğu tespit edilmiştir. Özellikle tarımda kullanılan organofosfatlı

pestisitlerden en kolay etkilenebilecek hayvanlarda yüksek seviyelerde bulunmuştur. Söz konusu enzim; balık, kurbağa, hindi, tavuk, tavşan, köpek, sıçan, koyun fare ve balık gibi organizmalarda araştırılmış ve enziminin yapısal ve kinetik özellikleri tespit edilmiştir [14-20].

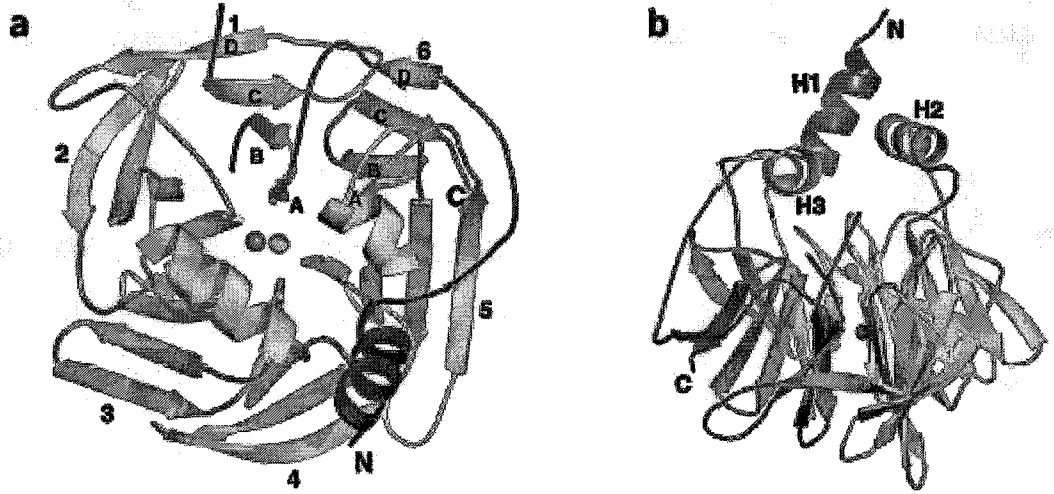
1996 yılında, paraoksonaz aktivitesinden sorumlu genin bir multigen ailesinin üyesi olduğu tespit edilmiş ve sırasıyla PON1, PON2 ve PON3 olarak isimlendirilmiştir [18]. Çalışmalar daha çok PON1 üzerine yoğunlaşmıştır. PON1'in karaciğerden sentezlendiği daha sonra serumda HDL'ye bağlı olarak bulunduğu tespit edilmiştir [21-24]. Ayrıca karaciğerde, endoplazmik retikulum membranlarının parçacıklarının uçları kapanarak oluşan mikrozomlarda da bulunmaktadır [25, 26]. PON3 enzimi de PON1'e benzer şekilde büyük çoğunlukta karaciğerden sentezlenir ve serumda HDL'ye bağlı olarak bulunur. Ayrıca PON3 daha düşük seviyelerde böbrekte sentezlenmektedir ve PON3 geninin mRNA'sı ve proteinine insanlardan farklı olarak sıçanların makrofajlarında rastlanmıştır [27]. PON2 diğer üyelerden farklı olarak plazmada bulunmamaktadır. Ancak beyin, karaciğer, böbrek ve testis gibi pek çok dokuda sentezlenmektedir [28].

1.1.3. Paraoksonaz Enziminin Özellikleri ve İnce Yapısı

Paraoksonaz, aktivitesi ve kararlılığı için Ca^{+2} iyonuna bağımlı 43-45 kDa molekül ağırlığına sahip bir enzimdir. İzoelektrik noktası 5.1'dir. 355 aminoasit içeren serum PON1 enziminin aminoasit bileşimi yüksek lösin içeriği dışında bir özellik göstermez [29, 30]. Yapısında yer alan 3 sistein aminoasitinden 284'deki serbest iken 42 ve 353. sistein rezidüleri arasında tek disülfid bağı bulunur. Her molekül toplam ağırlığının %15.8'ini oluşturan üç karbohidrat zinciri içermektedir [31, 32]. *In situ* hibridizasyon çalışmaları ile PON1 geninin 7. kromozomun uzun kolu üzerinde q21-q22' de bulunduğu gösterilmiştir [33].

PON1'in ince yapısı 4 adet zincirden oluşmuş 6 adet β -kırmalı yapıdan meydana gelmiştir. Enzim 42. ve 353. sistein rezidüleri arasındaki disülfid köprüsü

ile sonlanarak üç boyutlu yapısını kazanır [34]. N terminal ve C terminal uçlarının bu şekilde kovalent bağlanması β -kırmalı yapıları enzimlerde nadir görülür (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Paraoksonaz enziminin üç boyutlu görünümü. (a) β -kırmalı tabakalar ve (b) hidrofobik bölgelerin (H1, H2, H3) β -kırmalı tabakalara göre durumu [35].

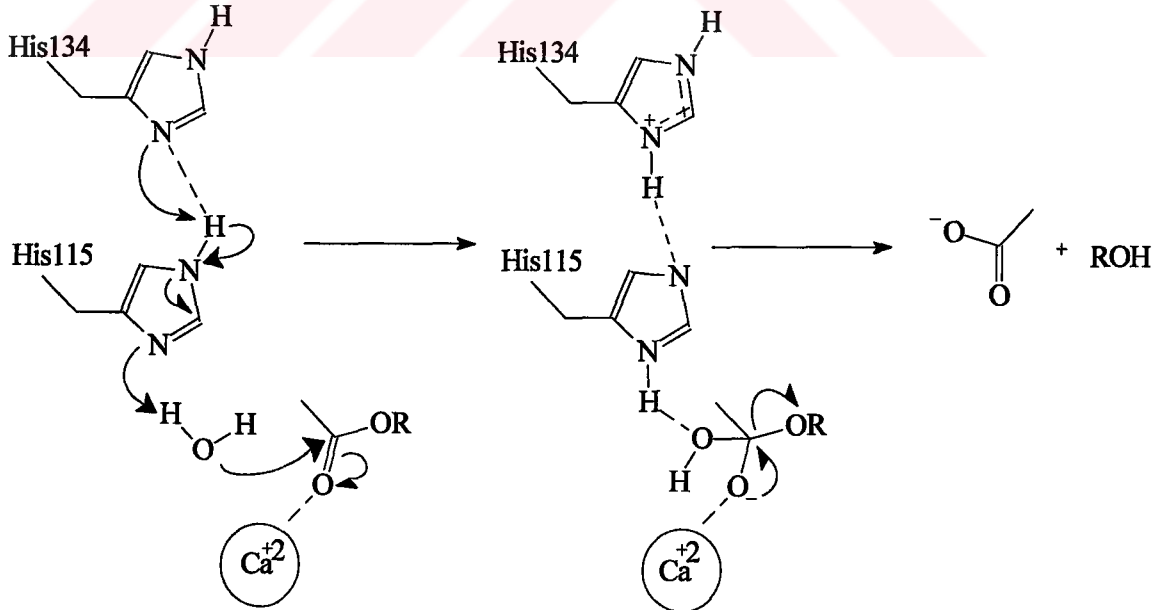
Üç boyutlu yapıda; β -kırmalı tabakaların merkezinde 7,4 Å aralıklı iki adet Ca^{+2} iyonu bulunmaktadır. Bunlardan bir tanesi yapısal kalsiyum olup yapıdan uzaklaştırılması dönüşümsüz denatürasyona neden olmaktadır [36]. Diğeri ise katalitik etkinlikte görev alan kalsiyumdur. Bu kalsiyum iyonu 2,2-2,5 Å uzaklıkta 5 adet aminoasit (Asn224, Asn270, Asn168, Asp269 ve Glu 53) ile etkileşim halindedir. Aynı kalsiyum iyonu bir su molekülü ile fosfat iyonunun oksijeni ile etkileşmektedir. PON1'in yapısı 6 adet β -kırmalı tabaka ile merkezdeki Ca^{+2} iyonları açısından diisopropilfluorofosfataz (DFPase) enzimi ile benzerlik göstermektedir [37]. Ancak PON1 esteraz, fosfotriesteraz ve laktonaz aktivitesi gösterirken, DFPase sadece fosfotriesterase aktivitesi gösterir. Ancak bu iki enzimin aminoasit dizilerinde belirgin bir benzerlik yoktur [38]. PON1 aktif bölgede diğer β -kırmalı yapılardan farklı olarak hidrofobik heliks (H₂ ve H₃) yapıları vardır. Bunlar aynı zamanda sonlanma noktalarıdır. Bu yapı aktif bölgenin korunması ve enzimin HDL'ye bağlanması gibi kritik rollere sahiptir. PON1 sentezlendiğinde monomerik yapı şeklindedir [39]. Eğer HDL'ye bağlanmazsa, oligomerizasyon yapabilir. Bu olay *in*

vitro deterjanlı ortamda H₂ ve H₃ heliksleri ile deterjan misellerine bağlanarak gerçekleşir [40].

PON1 üzerinde 4 tane potansiyel N-glikozillenme bölgesi vardır. İki tanesi (Asn 227 ve Asn 270) β-kırmalı tabakaların merkezinde, diğer ikisi ise yüzeye bakan bölgede (Asn 253 ve Asn 324) yer almaktadır. PON1 memeli hücrelerinde ekspres edildikten sonra bu noktalardan glikozillenir [19]. PON ailesinin hidrolitik aktivitesi için glikolizasyon önemli değildir [41, 42]. Ancak enzimin yapısında bulunan bu karbohidrat molekülleri spesifik olmayan hücre membranlarına bağlanmada veya kararlılığı ve çözünürlüğü arttırmada etkili olabilir [43].

1.1.4. Enzimin Katalitik Mekanizması

Enzimin aktif bölgesinde bulunan His-His çifti, kalsiyum iyonu ve su molekülü, esteraz aktivitesinde önemli rollere sahiptir (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Paraoksonazın katalitik mekanizması [35]

Katalitik etkinlik gösteren Ca^{+2} iyonu, substrattaki fosfat iyonunun negatif yüklü oksijenine 2,2 Å uzaklıktadır. Aktif bölgedeki His-His çifti, su molekülünün bir protonunu alarak bu molekülün nükleofilik gücünü artırır. Oluşan hidroksil iyonu karbonil veya fosfat esterine saldırır. Bu esnada meydana gelen kompleks tetrahedral bir düzlem sonucu Ca^{+2} iyonu ile kararlı kılınır. Oluşan yapıdaki Ca^{+2} iyonu negatif yüklü oksijenden uzaklaşarak bağ tekrar fosfat veya karbonilin üzerine yıkılır ve ester bağı kopar.

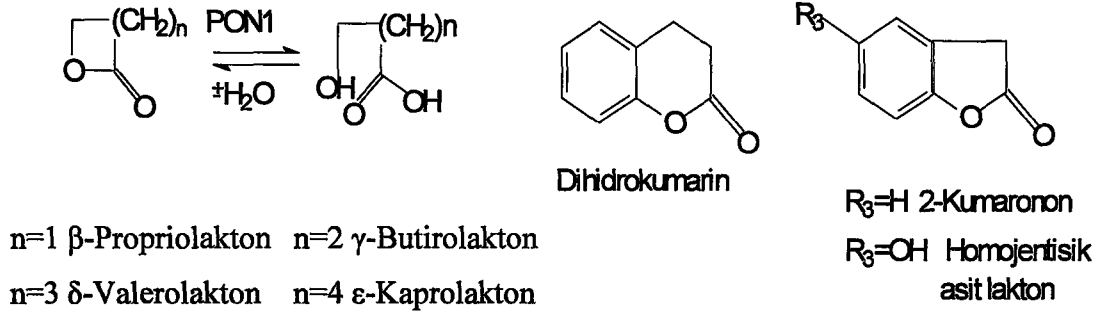
PON1'in mekanizmasını açıklamak amacıyla, esteraz aktivitesi için 2-naftilasetat ve fosfotriesteraz aktivitesi için paraoksan substratları kullanılmıştır. Bu substratların optimum pH aralıkları saptanmış ve substratın yapısında bulunan yan zincirin katalizlenmeye direkt katılmadığı sonucu bulunmuştur [35].

1.1.5 Katalizlediği Reaksiyonlar ve Substratları

Paraoksonaz enzimi geniş bir substrat özgüllüğü gösterirken, fizyolojik substratı tam olarak belirlenmemiştir. Ancak arilesteraz, organofosfataz ve laktonaz aktivitelerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Söz konusu aktivitelerin tümünün tek bir aktif merkezde mi yoksa birden fazla aktif merkezde mi gerçekleştiği, substrat seçiciliğinin nasıl belirlendiği de henüz tespit edilmemiştir.

Son yıllarda PON1'in arterosklerozisin önlenmesinde ve ilaç metabolizmasında önemli rol oynadığı bilinmektedir [19, 44, 45]. PON1 özellikle LDL ve HDL lipitlerinin yükseltgenmesini önleyerek ve lipit peroksitlerini metabolize ederek arterosklerozise karşı koruyuculuğunu sahip olduğu laktonaz aktivitesi ile göstermektedir [46-48]. Söz konusu enzim 4 atomdan 7 atoma kadar değişen lakton halkası ihtiva eden en az 30 çeşit laktonu hidrolizleyebilmektedir. Alifatik lakton substratı olan δ -valerolakton (6 halkalı lakton), γ -butirolakton (5 halkalı lakton) ve ϵ -kaprolaktondan(7 halkalı lakton) daha hızlı hidrolizlenmektedir. PON1 enziminin aromatik laktonlar afinitesi alifatik laktonlara oranla daha fazladır ve daha kolay hidrolizlenirler. Ancak ilgi çekicidir ki, pek çok ilacın etken

maddesinde bulunan kumarin bileşiğinin lakton halkasında α ve β çift bağı olmasına rağmen PON1 tarafından hidrolizlenememektedir, fakat dihidrokumarin hidrolizlenmektedir [49-52] (Şekil 1.3).



Şekil 1.3 Lakton hidrolizi [19]

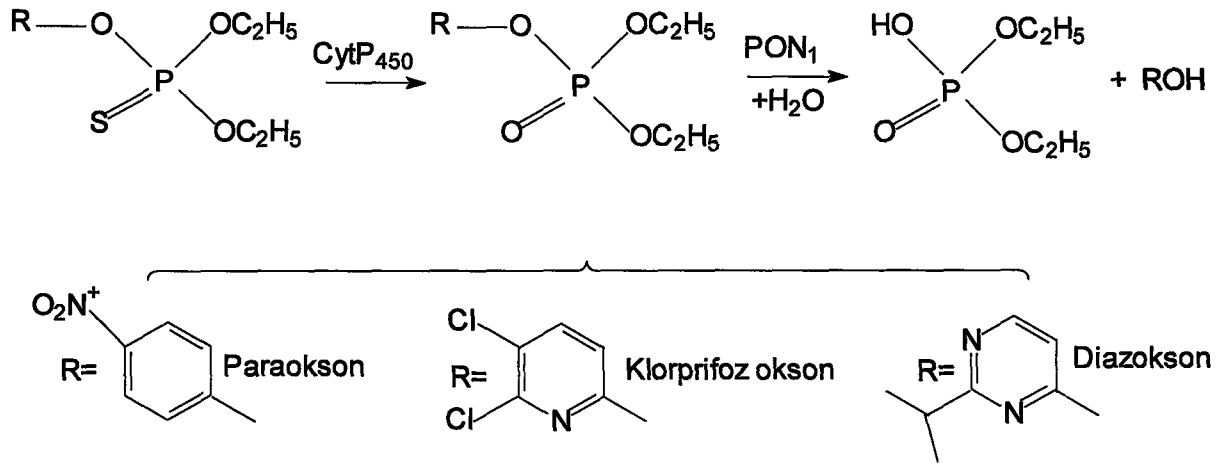
Önceleri PON1'in yapısının ve substratlarla olan ilişkisinin belirlenmesinde yapı-aktivite analizi üzerine çalışmalar yapılmıştır. Bu konuda ilk olarak, Augustinson ve Ekedahl aromatik halkalı veya çift bağı aromatik esterlerin PON1 tarafından hidrolizlendiklerini bulmuştur. Bu reaksiyonda PON1'in substrat olarak kullanacağı ester karbon-karbon çift bağının birbirine çok yakın olması gerektiği tespit edilmiştir [53]. Ayrıca, yapılan bir başka çalışmada, vinil asetat ve Δ^2 -siklopentil asetatın PON1 tarafından hidrolizlenmesi fakat etil asetat ve siklopentan asetatın PON1 tarafından hidrolizlenememesi bu öneriyi desteklemektedir [46]. Lakton halkasının oluşturduğu uzaysal yapı, bu yapıyı içeren bazı substratların enzimin aktif merkezine girmesini sağlayarak etkileşmelerine ve hidrolizlenmelerine izin verir. Bu etkileşim benzer şekildeki içte bulunan ester formları için mümkün değildir. Örneğin etil asetat PON1 ile hidrolizlenmezken, aynı sayıda atom ve ester yapısı gösteren γ -bütirolakton iyi hidrolizlenmektedir [19, 46].

PON1 enziminin laktonaz aktivitesi için 284. rezidüde bulunan serbest sistein aminoasiti oldukça önemlidir. Bu serbest sistein rezidüsünün, söz konusu enzimin LDL'nin okside olmasını önlemesinde de rol alması; PON1'in sahip olduğu laktonaz aktivitesi aracılığıyla LDL ve HDL fosfolipitlerinin yükseltgenmeye karşı koruduğu

düşünülmektedir [54, 55]. Sorenson ve arkadaşları 284. pozisyonda bulunan serbest sistein rezidüsünün arilesteraz ve paraoksonaz aktivitesinde gerekli olmadığını göstermişlerdir [32]. Ancak aktif merkezdeki histidin rezidülerinin paraoksonaz ve arilesteraz hidrolitik aktivitelerini göstermesinde çok gerekli olduğu gösterilmiştir. [56].

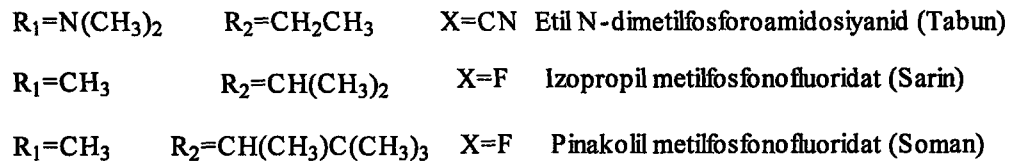
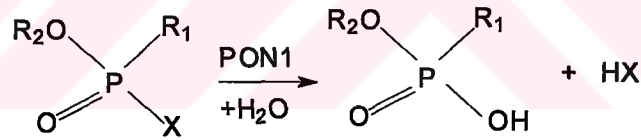
PON1 bazı lakton ve karbonat esterlerini içeren ilaçları ve ilaç ön maddelerini de hidrolizleyebilmektedir. Örneğin, diüretik bir ilaç olan spironolakton ve 3-hidroksimetilglutaril-CoA redüktaz inhibitörleri olan mevastatin, lovastatin ve simvastatin bu enzim tarafından hidrolizlenir. Önceleri yapılan çalışmalarda bu hidroksimetil glutaril-CoA redüktaz inhibitörlerinin hidrolizlenmesi söz konusu enzimin statinaz aktivitesi olarak tanımlanmıştır [57, 58]. Ayrıca PON1 glukokortikoid δ -laktonların [59] sistemik metabolize edilmesinde ve ön ilaç maddesi olan karbonat ester yapısındaki prulifloksasinin aktivasyonunda [60] rol oynamaktadır. Bunun gibi PON1'in laktonaz aktivitesinden başlıca yönetici ajanların metabolize edilmesinde ve bunların istenmeyen yan etkilerinin azaltılmasında yararlanılmaktadır [59]. Laktonların isosterik formları olan laktamlar oksijen halkası yerine azot halkası ihtiva ederler. Laktamlar PON1'in substratını oluşturmazlarken enzimi inhibe ederler. *In vitro* çalışmalarda δ -valerolaktam, ϵ -kaprolaktam ve 2-hidroksikinolin gibi laktamlar PON1 enziminin güçlü inhibitörleridir [46].

İnsan serum PON1 enzimi ayrıca paration, diazinon ve klorpirifos gibi çok sayıda insektisit toksik okson metabolitlerini (Şekil 1.4)[61, 62] ve soman, sarin ve tabun gibi organofosfat sinir ajanlarını hidrolizleyebilmektedir [63-66]. İnsan sağlığı açısından organofosfatlı bileşikler ise terörizm tehdidi kadar bir çevresel risk oluşturur [35]. PON1 enziminin çok yönlü bir araştırma konusu olmasının en önemli nedenlerinden biri budur.



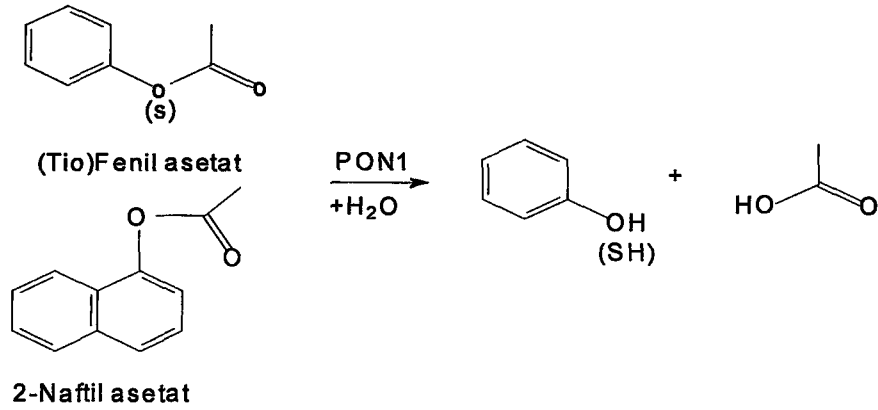
Şekil 1.4 İnsektisitlerde yaygın olarak kullanılan okson metabolitlerinin hidrolizi

[19]



Şekil 1.5 Sinir gazlarının hidrolizi [19]

Bu aktivitelerinin yanında PON1 enzimi sınıflandırılmada yer aldığı A-esteraz grubunda bulunması ile fenilasetat gibi ester substratlarını da hidrolizleyebilmektedir. Ayrıca, tiofenil asetat ve 2-naftil asetat PON1'in aromatik ester substratları arasındadır (Şekil 1.6) [29, 32, 61].



Şekil 1.6 Aromatik esterlerin hidrolizi [19]

1.2. PON1'in HDL'ye Bağlanması

PON1 ve PON3 karaciğerde sentezlendikten sonra kana salınır, orada spesifik olarak HDL'ye bağlanır. HDL periferik hücrelerden kolesterolün taşınmasını sağlayan ve kendisine bağlı platelet aktive eden faktör, PON1, LCAT ve PON3 gibi enzimler ile LDL'nin yükseltgenmesini önler [67, 68].

HDL yaklaşık 10 nm çapında kompleks bir yapıdır. Bileşiminde öncelikle membran bileşenleri (fosfolipidler, kolesterol ve kolesterol esterleri), apolipoprotein A1 ve aromatik heliksler yer alır [69]. HDL'ye bağlı olan enzimlerden ilk kez üç boyutlu yapısı aydınlatılan PON1 enzimidir [70, 71]. PON1 hidrofobik N terminal ucuyla sonlanır, H₂ ve H₁ hidrofobik heliksler bir araya gelerek potansiyel membrana bağlanma yüzeyi oluşturular [72-74]. Heliks yapılar lizin, triptofan ve tirozin yan zincirleri ile oluşturdukları yapı karakteristiği ile HDL ara yüzeyine girebilmektedir [75].

1.3. PON1'in Sentezlenmesi ve Salgılanması

PON1 sentezi karaciğerde gerçekleştiğinden dolayı, serumdaki PON1 seviyesini belirleyen başlıca faktör karaciğer fonksiyonlarıdır. Serumdaki PON seviyesi ve aktivitesi bireyler arasında çok değişkendir [76]. Bunun nedeni enzim aktivitesini ve

peptit konsantrasyonunu etkileyen PON1 geninin kodlanma ve promoter bölgesinde çok sayıda polimorfizm göstermesidir. PON1'in serumdaki aktivitesini ve konsantrasyonunu belirleyen promoter aktivitesi üzerinde en önemli polimorfizm -107 pozisyonundadır [77-79]. PON1 sentezinde önemli olan bir diğer faktör karaciğer hücrelerindeki kolesterol dengesidir. Ayrıca PON1'in karaciğerden sentezini herhangi bir hastalık durumu da etkilemektedir [80-82].

PON1 karaciğerden sentezlendikten sonra serumda HDL'ye veya karaciğerde mikrozomlara bağlanabilmesi için sentez sırasında N-terminal hidrofobik bölgesi olması gerekmektedir. N-terminal hidrofobik bölgesi bağlamada belirleyici olduğu kadar salgılanma prosedüründe de önemli role sahiptir [24, 83]. Yapılan çalışmalarda hamster ovaryum hücresi ve insan hepatosit hücresine katılarak PON1 sentezlendikten sonra hücre zarının dış yüzeyine bağlandığı gösterilmiştir [84]. PON1 karaciğerde sentezlendikten sonra da önce mikrozomlara, daha sonra hücrenin dış yüzeyine bağlandığı düşünülmektedir [85, 86]. Hücrenin zarının dış yüzeyinden salınması ve HDL'ye bağlanması tesadüf değildir, bu bağlanmada fosfolipit kompleksi önemli rol oynamaktadır ve LDL PON1'in hücreden salınmasına ve kendisine bağlanması için fosfolipit içeriği yeterli değildir [84, 85].

1.4. PON1 Polimorfizmi

Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda, bir kısmı PON1 geninin kodlanma bölgesinde, diğerleri intronlarda ve genin düzenleyici yani promoter bölgesinde olmak üzere 160'dan fazla polimorfizm tespit edilmiştir [87]. PON1 enzim aktivitesindeki polimorfizm farklı etnik kökenli dağılımlara göre değişkenlik gösterir [88]. İlk olarak 1973'de Von Mallinckrodt ve arkadaşları tarafından enzimin genetik polimorfizm gösterdiği ve enzim aktivitelerinin trimodal dağılıma sahip olduğu gösterilmiştir [89]. Daha sonra 1976'da Playfer ve arkadaşları PON1'in insanlar arasında düşük, orta ve yüksek aktiviteye sahip polimorfik dağılım gösterdiğini daha detaylı bulgularla açıklamıştır [90, 91]. Paraoksonaz aktivite polimorfizminin moleküler temeli, PON1'in kodlanma bölgesindeki kendiliğinden olan mutasyonlar sonucu iki aminoasitin yer değiştirmesi ile ilişkilidir. Bu mutasyonlarda birincisi

kodlanma bölgesindeki 192. kodonda glutaminden (Q) arjinine (R) olan değişimdir [92]. Bu PON1 aktivitesindeki polimorfizm substrata bağımlıdır [92]. Kodlanma bölgesindeki ikinci değişim 55. pozisyonda lösinden (L), metiyonine (M) olan değişimdir. Bu mutasyonun PON1'in aktivitesi üzerinde etkisi çok az iken, serumdaki protein seviyesini etkilediği tespit edilmiştir [93, 94]. PON1'in R allelinin kodlandığı proteinin paraoksan hidroliz aktivitesi Q allele göre sekiz kat daha yüksektir [95]. Ayrıca PON1 Q formu yükseltgenmiş HDL ve LDL'nin metabolize edilmesinde R formundan daha etkilidir [96]. Bu genetik polimorfizm serum protein konsantrasyonunu da etkiler. Homozigot R bireyler homozigot Q'ya göre daha yüksek enzim konsantrasyonuna sahiptir [97]. Farklı popülasyonlardaki polimorfik dağılım bireyler arasında varyasyona neden olur [98]. PON1 allozimlerinin kalitatif ve kantitatif olarak farklı olduklarının keşfi ile fenotipleme metodları geliştirilmiştir. İlk olarak 1983'te Eckerson tarafından iki izoenzimin tuz ve pH'a farklı yanıtlarını temel alarak iki fenotip tanımlanmıştır [29]. Tuz (NaCl) varlığında homozigot R allozim (RR) paraoksana karşı daha yüksek enzim aktivitesine sahiptir.

Paraoksonaz polimorfik dağılımı ırklar arasında oldukça değişim göstermektedir [99]. Türk popülasyonunda RR allel oldukça düşük bir oranda bulunmuştur. Trimodal dağılım için QQ, QR ve RR allellerinin frekansı sırasıyla %48,6, %41,0 ve % 10,4 olarak tespit edilmiştir [100]. Düşük aktivite gösteren Q allel Avrupa, Kanada ve Amerika'da yüksek, Avusturalya, Aborigin ve Zambiya'da düşüktür.

PON1'in kodlanma bölgesindeki diğer bir polimorfizm 102. kodonda izolosinden valine olan değişimdir [101]. PON1'in promoter bölgesinde 5 tane polimorfizm tespit edilmiştir. Bunlardan plazma PON1 seviyesini etkileyen en önemli olanı C108T polimorfizmidir [93, 94].

PON1 enziminin aktivitesi polimorfizme bağlı olarak oldukça değişim göstermektedir. Söz konusu enzimin organizmada fizyolojik fonksiyonu tam olarak açıklanamamasına rağmen, klinik yayınlarda PON enzim aktivitesi ile çeşitli hastalıklar arasında ilişkinin belirlenmesine yönelik pek çok çalışmaya rastlanmıştır

[102-108]. Ayrıca yapılan çalışmalarda özellikle incelenen hastalıklar ile PON1 polimorfizmi arasında bir bağlantı olup olmadığı araştırılmıştır [109-119].

Öncelikle yapılan pek çok çalışmada kalp damar hastalıkları ile PON1 R/Q192 polimorfizmi arasında önemli bir ilişki olduğu gösterilmiştir [102, 109-114]. Ancak başka çalışmada PON1'in Arjinin 192 polimorfizmi ile kalp damar hastalık riski ile ilişkili olmadığı gösterilmiştir [115]. Benzer şekilde PON1'in M/L55 polimorfizmi ile kalp damar hastalıkları oluşma riski arasında bir grup çalışmada bağlantı var iken [87, 115], diğer bir çalışma grubunda herhangi bir ilişki olmadığı gösterilmiştir [116-119]. Sonuç olarak, PON1 192. ve 55. polimorfizm genotipleri direkt enzim aktivitesini etkilemektedir. PON1 aktivitesi de geleneksel risk faktörleri dışında, kalp damar hastalıkları oluşma tehlikesini bize önceden haber vermektedir.

Yapılan bir çalışmada, PON1'in 192R ve 55M polimorfizmlerinin erkeklerde prostat kanseri riski ile istatistiksel olarak herhangi ilişkisi olmadığı gösterilmiştir [101]. Japon toplumunda tip 2 şeker hastalarında yapılan bir çalışmada, PON1 enziminin Q192R polimorfizmi ile hastalık arasında önemli bir bağlantı olmadığı tespit edilmiştir [120]. Paraoksonaz enziminin 192. kodonda Q alleli bulunduran kişilerde Parkinson hastalığı olma riskinin istatistiksel olarak ($p < 0,005$) yüksek olduğu tespit edilmiştir [121]. Alzheimer hastalarında yapılan bir çalışmada, PON1 geninin 192. polimorfizmi R allel görülme sıklığı kontrol grubuna göre oldukça düşük bulunmuştur [122].

1.5 Paraoksonaz Enziminin Kalp Damar Hastalıkları ve Diğer Hastalıklar ile İlişkisi

İlk kez Mackness tarafından; paraoksonaz enziminin serumda özellikle HDL'ye bağlı olarak bulunması ile bu enzimin lipit metabolizmasında önemli fizyolojik rolü olduğu tespit edilmiştir [21, 22]. PON1'in bu rolü özellikle lipit peroksidlerini metabolize etmesi ve LDL lipitlerinin okside olmasını önlemesi olarak gösterilmektedir [31, 123, 124] Özellikle PON1'in fizyolojik fonksiyonunun belirlenmesinde, söz konusu enzime sahip olmayan fareler ile yapılan çalışmalar

önemli ipuçları vermiştir. Örneğin, bu enzime sahip olmayan farelere lipit açısından zengin diyetle beslendiklerinde damar sertliği (arterosklerosis) oluşmuştur ve bu farelerin HDL yapıları LDL'nin yükseltgenmesini önlemede başarısız olmuştur [125]. Saflaştırılmış paraoksonaz enziminin de ateroskleroz sürecinin başlangıç evresi olan LDL fosfolipidlerinin yükseltgenmeye karşı korunmasında önemli olduğu gösterilmiştir [54, 126]. Ateroskleroza karşı koruyucu etkisinde başlangıçta ters kolesterol transpotundaki rolüne odaklanılmış, 1990'larda atardamar duvarında LDL'yi oksidatif modifikasyondan korunması ve yükseltgenmiş LDL'nin zararlı etkilerine karşı koruma gibi farklı anti-aterojenik özelliklere sahip olduğu saptanmıştır [5, 127-129]. PON1'in LDL'nin yanı sıra lipid peroksidlerin taşıyıcısı HDL'i de koruduğu, böylece makrofajlardan kolesterol çıkışındaki etkinliğini arttırdığı tanımlanmıştır [55].

PON1'in enzim aktivitesi ve serumdaki seviyesi, bireyler arasında 13 kattan fazla oranda değişim gösterebilmektedir. Bu farklılık herhangi bir hastalık durumunda, beslenmeye bağlı olarak, yaşama biçimi ve çevresel faktörlerle ortaya çıkmaktadır [87, 130-132].

Paraoksonaz HDL'ye bağlı olup, kalp damar hastalıkları ile ilişkisinin yanı sıra, pek çok klinik yayınlarda gösterildiği gibi enzimin aktivitesinin diğer hastalıklarla da ilişkili olduğu tespit edilmiştir [87, 115, 133-135]. Slavonski Broad çevresinde yapılan bir çalışmada, PON1'in paraoksonaz ve arilesteraz aktivitesi hemodiyaliz hastalarının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.001$) düzeyde bir azalma gözlenmiştir [136]. Diğer bir çalışmada, kalp krizi geçirmiş kişilerde, serumdaki PON1 aktivitesi ve konsantrasyonu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında son derece düşük olduğu tespit edilmiştir [137, 138]. İnsülin bağımlı şeker hastalarında ve yüksek kolesterolü olan hastalarda da serum paraoksonaz aktivitesinde azalma gözlenmiştir [132]. Paraoksonaz aktivitesinin romatizmal kireçlenme ile bir ilişkisi tespit edilmiştir. Kireçlenme görülen romatizma hastalarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında serum paraoksonaz aktivitesinde önemli bir azalma olduğu belirlenmiştir [139]. Yüksek tansiyon ve tip 2 şeker hastaları yapılan başka bir çalışmada, kontrol grubunun paraoksonaz aktivitesi ile hasta grubunun enzim aktivitesi arasında önemli bir farklılık

gözlenmemiştir [140]. Tip 1 şeker hastalarında da kontrol grubu ile karşılaştırıldığında paraoksonaz enzim aktivitesinde önemli bir farklılık gözlenmemiştir. Ancak aynı çalışmada tip 1 şeker hastalarında HDL seviyesi kontrol grubundan oldukça yüksek bulunmuştur [141].

1.6 Enzimin Saflaştırılması

Paraoksonaz enzimi karaciğerde, endoplazmik retikulum membranlarının parçacıklarının uçları kapanarak oluşan mikrozomlarda, serumda HDL'ye bağlı olarak bulunmaktadır [26]. Saflaştırma prosedürlerinde öncelikle söz konusu enzimin bağlı olarak bulunduğu yapılardan uzaklaştırılması gerekmektedir.

İlk olarak A-esterazları (diizopropil fosforidat hidrolaz) Mazur tarafından tavşan böbreğinden yaklaşık 13 kat [142] ve daha sonra Mounter tarafından 65-100 kat saflaştırılmıştır [143]. Ancak paraoksonaz ismi ile ilk saflaştırma koyun serumundan 330-385 kat etanol, pH ve iyonik çöktürme yöntemleri kullanılarak Main tarafından başarılmıştır [144]. Daha sonra Furlong ve arkadaşları tarafından insan ve tavşandan söz konusu enzim saflaştırılmış ve cDNA'sı karakterize edilmiştir [145].

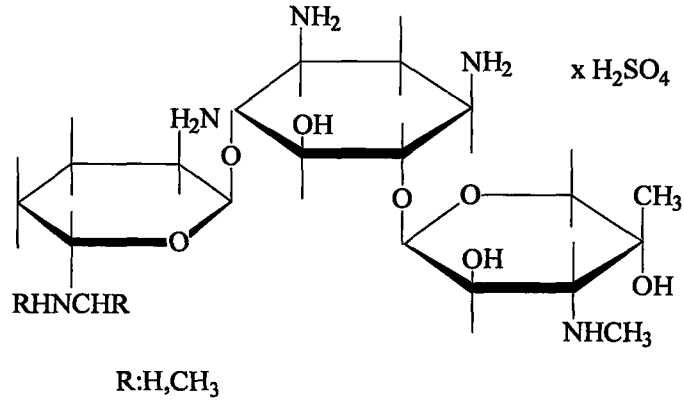
Paraoksonaz enziminin saflaştırılması için, ulaşılmak istenen saflık derecesine ve enzimin serumda veya karaciğerde bulunuş durumuna göre değişen çok çeşitli metotlar tanımlanmıştır. Bu metotlardan sıklıkla uygulananları hidroksiapatit adsorbsiyonu, DEAE-Sepharose CL-6B iyon değiştirme kromatografisi, Cibacron Blue 3GA spesifik olmayan afinite kromatografisi, amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE anyon değiştirme kromatografisi, Concanavalin A-Sepharose afinite kromatografisi, mono Q HR 5/5 anyon değiştirme kromatografisi ve DEAE biojel kromatografisidir. Uygulanan metotların sırası enzim kaynağının serum veya karaciğer olmasına bağlı olarak değişebilir. Bazı durumlarda bir yada diğer saflaştırma basamağı tekrar kullanılabilir. Örneğin; Gan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada insan serum paraoksonazının saflaştırma prosedürü için iki DEAE anyon değiştirme kromatografisi kullanılmıştır [30]. Furlong tavşan ve insan serumundan

paraoksonaz enzimini Cibacron Blue 3GA-Agaroz, Sephadex G-75, DEAE Trisacril M ve tekrar Sephadex G-75 jel filtrasyon kromatografi yöntemlerini kullanarak saflaştırmıştır [14]. Sıçan karaciğerinden paraoksonaz enzimi sırasıyla hidroksiapatit adsorbsiyonu, DEAE-Sepharose CL-6B iyon değiştirme, Cibacron Blue 3GA spesifik olmayan afinite Mono Q HR 5/5 anyon değiştirme kromatografisi ile saflaştırılmıştır [146]. Sıçan karaciğerinden PON3 enzimi de sırasıyla hidroksiapatit adsorbsiyonu, DEAE-Sepharose CL-6B iyon değiştirme, Cibacron Blue 3GA spesifik olmayan afinite, birinci DEAE anyon değiştirme, ikinci DEAE anyon değiştirme ve konkanavalin A-Sepharose afinite kromatografisi ile saflaştırılmıştır.

Paraoksonaz enzimi karaciğerde mikrozomlara, serumda da HDL'ye bağlı olmasından dolayı homojen bir saflık elde etmek oldukça zordur [147-150]. Söz konusu enzimin saflaştırılması sırasında bağlı olduğu yapılardan uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu amaçla, karaciğerde enzimi mikrozomlardan ayırmak için TritonX-100 kullanılırken [151] serumda HDL'den uzaklaştırılması için deterjan veya yüksek tuz konsantrasyonu kullanılması gerekmektedir [14, 30].

1.7 Gentamisin Sülfat

Gentamisin, bir aktinomiset olan *Mikromonospora purpurea*'dan elde edilen, duyarlı bakterilerin normal protein sentezini inhibe ederek etkisini gösteren bakterisid etkili bir aminoglikozid antibiyotiktir. Gentamisin E. coli, indol pozitif ve negatif *Proteus* türleri *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* grubu türleri *Citrobacter* türleri ve penisilin ve metisiline dirençli *Staphylococcus* türleri de dahil geniş etki spektrumuna sahiptir. Ayrıca *Shigella* ve *Salmonella* türlerine karşı da *in vitro* olarak etkilidir. Gentamisine karşı bakteriyel direnç zor gelişmektedir. Gentamisin hücre duvarı sentezini etkileyen antibiyotikler ile kombine kullanıldığı zaman D grubu streptokok suşları üzerinde sinerjik bir etki göstermektedir. Gentamisin intramüsküler yolla verilmesinden sonra kısa sürede (30-60 dakika) en yüksek plazma konsantrasyonlarına ulaşır. Böbrek fonksiyonu normal kişilerde gentamisinin yarı ömrü 2 saatten biraz fazladır [152].

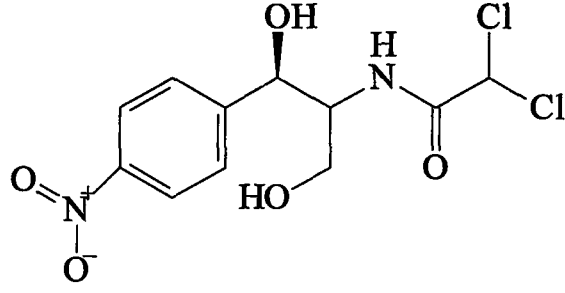


Şekil 1.7 Gentamisin sülfat bileşiğinin molekül şekli (0-2-amino-2-deoxy-D-glucopyranosyl-(1.4)-O-[3-deoxy-3-(methylamino)-D-xylopyranosyl-(1 6)]-2-deoxy-D-streptamine.)

Yapılan bir çalışmada, gentamisin sülfat antibiyotiği *in vitro* ortamda glutatyon metabolizmasında rol oynayan glutatyon redüktaz enziminin aktivitesini arttırdığı tespit edilmiştir [153]. Shigenobu tarafından yapılan bir başka çalışmada insan nötrofil hücrelerinde ve hücre dışında *in vitro* ortamda NADPH oksidaz enzimi üzerinde gentamisin sülfatın doza bağımlı olarak inhibisyona neden olduğu gösterilmiştir [154]. Ayrıca gentamisin sülfatın koyun göz merceğindeki glikoz-6 fosfat dehidrogenaz enzimini de inhibe ettiği bulunmuştur [155].

1.8 Kloramfenikol

Kloramfenikol, *in vitro* olarak birçok gram-negatif ve gram-pozitif bakteri üzerinde bakteriyostatik etkiye sahip *Rickottsiae*, *lymphogranuloma-psittacosis* grubu ve *vibrio cholera*'ya karşı etkili, geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. Özellikle *Salmonella typhi* ve *Hemophilus influenza*'ya karşı aktiftir. Tesirini sağlam hücrelerde ve hücre içermeyen sistemlerde protein sentezini etkileyerek veya inhibe ederek gösterir. Kloramfenikol intramüsküler yoldan verildikten sonra süratle difüzyona uğrar ancak dağılımı tek tip değildir. Karaciğer böbreklerde yüksek konsantrasyonlara, beyin ve serebrospinal sıvıda ise düşük konsantrasyonlara ulaşır [152].

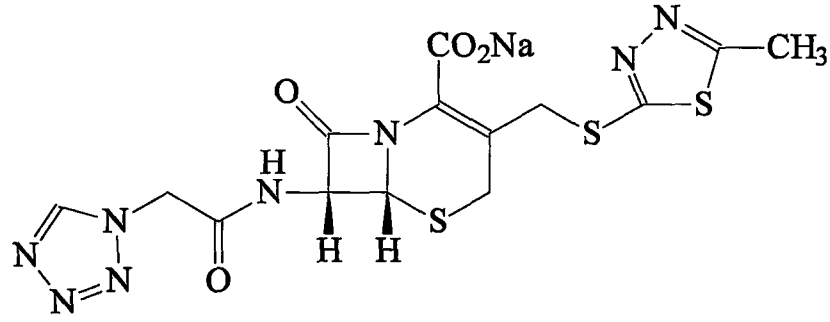


Şekil 1.8 Kloramfenikol bileşiğinin molekül şekli

Yapılan bir çalışmada, kloramfenikol antibiyotikinin sitokrom P-450 enziminin aktif bölgesindeki lizin aminoasidi ile kovalent amid bağı yaparak söz konusu enzimi döntüşümsüz inhibe ettiğini bulunmuştur [156].

1.9. Sefazolin sodyum

Sefazolin sodyum bakteri hücre duvarı sentezini inhibe ederek bakterisid etki gösteren bir sefalosporindir. Sefazolin sodyum enjeksiyondan sonra kanda hızla yüksek konsantrasyonlara ulaşır. Böbrek, karaciğer ve akciğer dokularına kolaylıkla geçer. Sefazolin sodyum intramüsküler uygulandıktan 1 saat sonra serumda maksimum konsantrasyona ulaşır ve bu düzey en etkili olduğu andır. Sefazolin sodyumun serum yarılanma ömrü intramüsküler uygulamada yaklaşık 2 saattir. Sefazolin sodyumun % 90'dan fazlası idrarda değişmeden dışarı atılır. Sefazolin sodyum *Staphylococcus aureus*, (penisilaz üreten suşlar dahil) *Staphylococcus epidermidis* (metisiline dirençli stafilkoklar hariç) A grubu beta hemolitik streptokoklar ve diğer streptokok suşları, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella türleri* *Enterobacter aerogenes*, *Haemophilus influenza* 'ya karşı duyarlıdır. [152].



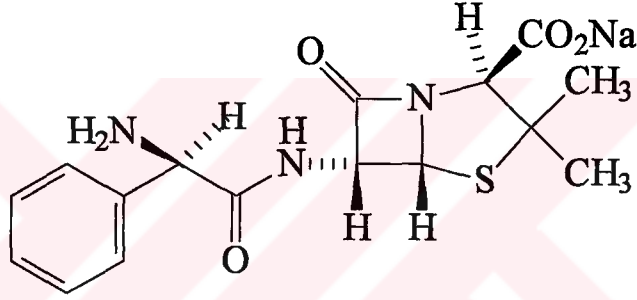
Şekil 1.9 Sefazolin sodyum bileşiğinin molekül şekli ((6R,7R)-3-(5-metil-1,3,4-tiyadizol-2-sülfanilmetil)-8-okso-7-[2-(1H-tetrazol-1-il) asetilamino]-5-tiya-1-azabisiklo [4.2.0]okt-2ene-2-karboksilat)

Sefazolin sodyum ile yapılan *in vitro* bir çalışmada koyun karaciğerinden saflaştırılan glikoz 6-fosfat dehidrogenaz enzimi üzerinde güçlü inhibisyon gösterirken [157], koyun gözünden salınan glikoz-6 fosfat dehidrogenaz enzimi üzerinde aktivasyonuna neden olmaktadır [155]. Benzer şekilde sefazolin sodyum antibiyotiği insan eritrositlerinden saflaştırılan karbonik anhidraz I ve II enzimi üzerinde güçlü bir inhibisyon etkisi göstermiştir [158]. Sefazolin sodyumun bulunduğu sefalosporinler ana antibiyotik grubunda bulunan sefatoksim antibiyotiği sığır eritrositlerinden saflaştırılan Glutasyon Redüktaz enzimi üzerinde yarışmalı bir inhibisyon göstermiştir [153].

1.10. Sodyum Ampisilin

Bir aminopenisilanik asit türevi olan ampisilin geniş bir spektruma sahip olup gram (+) ve gram (-) aerob ve anerob mikroorganizmalara karşı bakterisit etkilidir; bu etkisini bakterilerin hücre duvarı mukopeptit biyosentezini inhibe ederek gösterir. Ampisilin beta-laktamazlara karşı dayanıklı değildir; kolayca parçalandığından etkisiz bir duruma gelir. Ampisilin beta-laktamaz salgılayan ve salgılamayan *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* ile *Staphylococcus faecalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* ve *Streptococcus viridans*'a *in vitro* etkilidir. Ayrıca gram (-) mikroorganizmalardan,

beta-laktamaz salgılayan ve salgılamayan *Haemophilus influenzae*, *Branhamella catarrhalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Proteus mirabilis*, *Neisseria gonorrhoeae* ve *Proteus vulgaris*, *Providencia rettgeri*, *Providencia stuartii*, *Morganella morganii* ampisiline duyarlıdır. Anaerob mikroorganizmalardan, Clostridium türleri, *Peptococcus* türleri, *Peptostreptococcus* türleri ve *B. Fragilis* dahil *Bacteroides* türlerine ampisilin etkilidir. Ampisilin intravenöz ve intramüsküler uygulamadan sonra kanda yüksek konsantrasyonlar oluşturur ve ortalama yarılanma süresi sağlam bireylerde yaklaşık 1 saattir. Uygulandıktan sonra ilk 8 saat içinde %75-85 oranında değişmeden idrarla atılır [152].



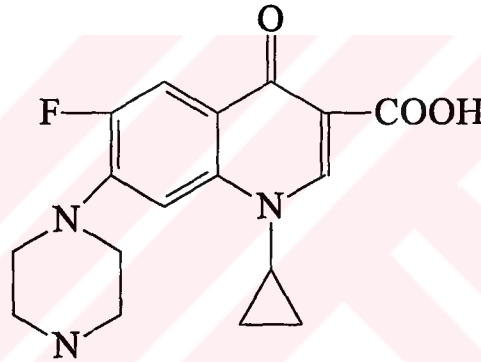
Şekil 1.10 Sodyum ampisilin bileşiğinin molekül şekli (Monosodyum (2S, 5R, 6R)-6-[(2R)-2-amino-2-fenilasetilamino]-3,3-dimetil-7-okso-4-tiyo-1-aza bisiklo [3.2.0] heptan-2-karboksilat)

Yapılan bir *in vitro* çalışmada insan eritrositlerinden izole edilen karbonik anhidraz I ve II enzimi üzerinde ampisilin inhibisyon etkisi tespit edilmiştir [159]. Benzer şekilde insan eritrosit glikoz-6 fosfat dehidrogenaz enzimi üzerinde ampisilin *in vitro* inhibisyon etkisi göstermiştir [160].

1.11. Siprofloksasin

Siprofloksasin kinolon grubunda yeni bir aktif maddedir. Bu grup maddeler jiraz inhibitörleri olarak bilinmektedirler. Siprofloksasin geniş bir bakteri

spektrumuna karşı güçlü bir antibakteriyel etkiye sahiptir. Siprofloksasin bakterinin normal metabolizması için gerekli bilginin kromozomdan okunmasını engelleyerek çoğalma kapasitesinde hızlı bir düşüşe neden olur. Ayrıca siprofloksasin, bu özel etki mekanizmasından dolayı jiraz inhibitörleri dışında kalan antibiyotiklere genel olarak paralel direnç göstermesi ile de karakterizedir. Bundan dolayı siprofloksasin, aminoglikozidler, penisilinler, sefalosporinler, tetrasiklinler ve diğer antibiyotiklere dirençli bakterilere de yüksek derecede etkilidir. Siprofloksasin *pseudomonas*, *streptokoklar* ve *stafilokok* suşlarına karşı oldukça etkilidir. Serumda yarılanma süresi 3-5 saattir. Serumda proteinlere bağlanma özelliği yaklaşık olarak % 30'dur [152].

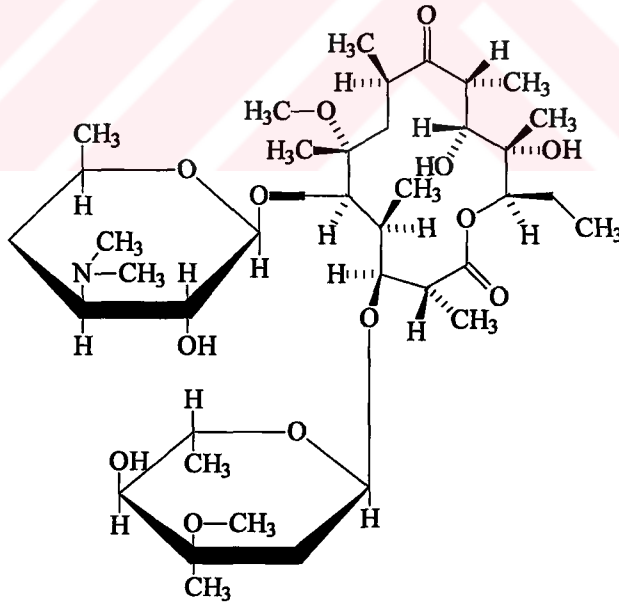


Şekil 1.11 Siprofloksasin bileşiğinin molekül şekli

Siprofloksasinin de içinde bulunduğu kinolon antibiyotik grubu üyeleri ultraviyole ışığa maruz bırakıldıklarında toksik ve mutagenik özellik göstermektedirler. Bu özelliğini örneğin siprofloksasin insan topoizomera IIa enzimini inhibe ederek göstermektedir [161]. Siprofloksasin antibiyotiğinin katalitik DNA zincir pasaj aktivitesini inhibe ettiği bulunmuştur [162]. Ayrıca insan karaciğer mikrozomları ile yapılan doku kültürü çalışmalarında bu antibiyotiğin karaciğer metabolizmasında önemli bir yeri olan P-450 enzimlerinden CYP1A2 enziminin güçlü bir yarışmalı inhibitörü olduğu tespit edilmiştir [163].

1.12. Klaritromisin

Klaritromisin bir semi-sentetik makrolid antibiyotiktir. Klaritromisin ve metaboliti 14-OH klaritromisin vücut dokularına ve sıvılarına kolayca dağılır. Yüksek intraselüler konsantrasyonundan dolayı, doku konsantrasyonları, serum konsantrasyonlarından daha yüksektir. Klaritromisin, duyarlı bakterinin 50S ribozom alt ünitelerine bağlanarak antibakteriyel etkisini gösterir ve protein sentezini inhibe eder. Klaritromisin *in vitro* olarak birçok aerob ve anaerob gram-pozitif ve gram-negatif organizmalar olan *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenza*, *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*, *Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes*, *Bordetella pertussis*, *Pasteurella multocida* ve *Propionibacterium acnes*'e karşı etkilidir. Ayrıca *myobacterium avium* kompleks organizmalarına da etkilidir. Klaritromisinin ortalama terminal faz plazma yarı ömrü doza bağımlı olup 2,1 ila 4,5 saat arasında değişmektedir [152].

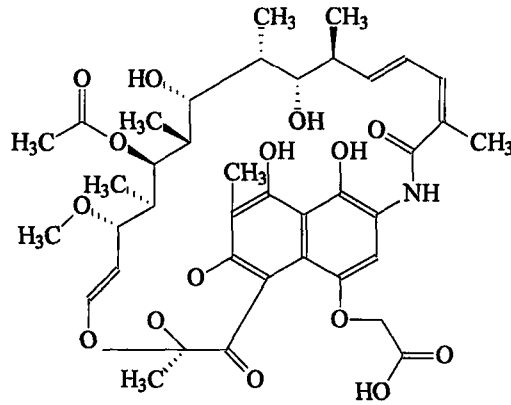


Şekil 1.12 Klaritromisin bileşiğinin molekül şekli

Makrolid grubunda yer alan klaritromisin antibiyotiği karaciğer metabolizmasında önemli bir yeri olan P-450 enzimlerinden CYP3A enziminin dönüştürsüz inhibitörüdür [164, 165]. Klaritromisin ile CYP1A2, CYP2C9 ve CYP2D6 enzimlerinin substratları arasında bir ilişki olduğu tespit edilmiş [166-168] ve klaritromisinin *in vivo* ortamda insanlar üzerinde yapılan bir çalışmada CYP1A2, CYP2C9 ve CYP2D6 enzimlerinin inhibe ettiği gösterilmiştir [169].

1.13. Rifamisin SV

Rifamisin SV yüksek bakterisid etkiye sahip bir antibiyotiktir. *In vitro* antimikrobiyel etki diğer antibiyotiklere karşı dirençli olsalar bile, gram pozitif mikroorganizmalar üzerinde çok düşük konsantrasyonlarda ve gram-negatif mikroorganizmalar üzerinde daha yüksek konsantrasyonlarda kendini gösterir. Antibakteriyel spektrumu *Myobacterium tuberculosis*'i de kapsar. Rifosin rifamisin grubu haricinde diğer antibiyotiklerle çapraz direnç oluşturmaz. Klinik deneyler Rifosin'in gram-pozitif mikroorganizmaların (*stafilokok*, *streptokok*, *pnömokok* ve benzerleri) neden olduğu enfeksiyonlar ile gram-negatif mikroorganizmaların neden olduğu bazı enfeksiyonların tedavisinde özellikle etkili olduğunu göstermiştir. Rifosin'in safrada yüksek konsantrasyona ulaşması onu safra kesesi enfeksiyonlarının tedavisinde özellikle kullanılması gereken bir ilaç haline getirir. Rifosin intramusküler uygulamadan 6 saat sonra organizmada maksimum etki seviyesine ulaşır [152].

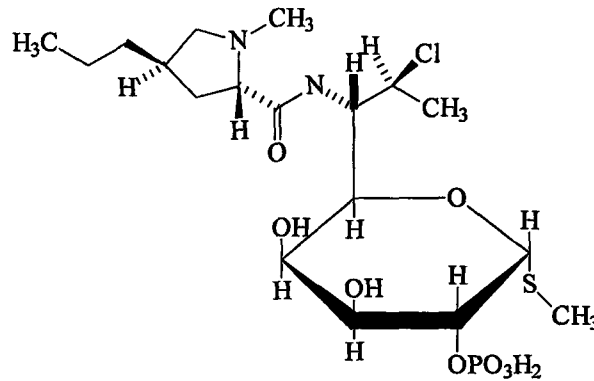


Şekil 1.13 Rifamisin SV bileşiğinin molekül şekli

Çalışmamızda kullandığımız rifosin grubundan rifamisin SV antibiyotığının yapılan bir çalışmada DNA polimeraz enziminin güçlü inhibitörü olduğu tespit edilmiştir [170]. Ayrıca Rifamisin SV türevlerinin insan nötrofil hücrelerinin fonksiyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir [171].

1.14. Klindamisin fosfat

Klindamisin fosfat, *in vivo* koşullarda hızla hidroliz olarak antibakteriyel etkiye sahip klindamisine dönüşür. Klindamisin, makrolidlere benzer şekilde bakteri ribozomlarının 50S alt birimine bağlanarak, protein sentezinin ilk aşamasını inhibe eder. Temel olarak bakteriyostatik olmakla birlikte, yüksek konsantrasyonlarda duyarlı suşlara karşı bakterisid etki gösterir. Klindamisin, şu mikroorganizmalar karşı *in vitro* olarak etkilidir; Aerob gram pozitif koklardan; *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, streptokoklar ve pnömokoklar. Anaerob gram negatif basillerden; *Bacteroides* türleri ve *Fusobacterium* türleri. Anaerob gram pozitif spor yapmayan basillerden; *Propionibacterium*, *Eubacterium* ve *Actinomyces* türleri. Anaerob ve mikroaerofilik gram pozitif koklardan *Peptococcus* türleri, *Peptostreptococcus* türleri ve mikroaerofilik streptokoklar. *Clostridium perfringens* suşlarının çoğu klindamisine duyarlıdır [152].



Şekil 1.14 Klindamisin fosfat bileşiğinin molekül şekli (Metil 7-klor-6,7,8-trideoksi-6-[(2S, 4R)-1-metil-4-propilpyrrolidin-2-karboksamido]-1-L-treo- α -D-galakto- β -D-galaktopyranosit 2-dihidrojen fosfat)

Klindamisin fosfat intramüsküler yoldan uygulandığında, serumdaki en yüksek aktif klindamisin konsantrasyonlarına erişkinlerde 3 saat içinde ulaşılır. Aktif klindamisin serumdaki yarılanma süresi 3 saattir.

1.15 Paraoksonaz Enzimi Üzerinde Etkili Olan Tıbbi İlaçlar

Tıbbi ilaçların PON1 aktivitesi üzerine etkisinin araştırılmasına yönelik yapılan çalışmalar, daha çok PON1'in HDL'ye bağlı olmasından dolayı lipit seviyesini etkileyen ilaçlar üzerine yoğunlaşmıştır. Örneğin, HMG koenzim A redüktaz inhibitörleri olan kolesterol ve trigliserit düşürücü olarak kullanılan statinler ve lipit düzenleyicisi olarak kullanılan fibratlar.

İnsan karaciğer hücre hattı olan HuH7 hücreleri ile yapılan bir *in vitro* çalışmada pravastatin, simvastatin ve fluvastatin (10-100 µM) kültür ortamında PON1 aktivitesi üzerinde %25-50 azalmaya neden olmuştur ve benzer şekilde PON1'in mRNA seviyesinde de azalmaya neden olmuştur [172]. Aynı hücreler üzerinde yapılan diğer bir çalışmada fenofibrik asit (250 µM) PON1 aktivitesinde % 50, mRNA seviyesini % 30 arttırmıştır [172]. Total kolesterol, LDL ve trigliserit düzeylerini düşürmede kullanılan statinler PON1 enzim aktivitesini artırırken fenofibrik asit PON1 geninin promoter bölgesini aktif hale geçirerek aktivitesinin artmasına neden olmuştur [172]. Bunun yanında, simvastatinin insan karaciğer hücresi olan HepG2 hücrelerinde (1,5-25 µg/ml) PON1 in promoter aktivitesini düzenlediği bulunmuştur [79]. Lipoproteinlerin izole edildiği bir diğer *in vitro* çalışmada, atorvastatinin (5-50µM) yükseltgenmiş iki metaboliti ve gemfibrozil metabolitinin (2-80 µM) HDL'ye bağlı olan PON1 aktivitesini arttırdığı bulunmuştur [54].

In vitro ortamda etkisi araştırılan ve lipit seviyesini düzenleyen ilaçların sıçanlarda *in vivo* etksi de araştırılmıştır. Örneğin, sıçanlarda yapılan bir çalışmada, fluvastatinin düşük dozu (2 mg/kg/gün) sadece karaciğer PON1 aktivitesini etkilerken, fluvastatinin (20 mg/kg/gün 3 hafta boyunca) hem karaciğer hem de kandaki PON1 aktivitesini azaltmıştır. Ancak pravastatin (4 veya 40 mg/kg/gün 3 hafta boyunca) önemli bir etki göstermemektedir [173].

Söz konusu ilaçları kullanan insanlar üzerinde yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Simvastatin ve diğer statinler olan gemfibrozil ve fenofibrate ile tedavi edilmiş hastalarda serumdaki PON1 aktivitesinde bir artış tespit edilmiştir [79, 174-176]. Bunun yanında, başka bir çalışmada ciprofibrate, bezafibrate ve gemfibrozil ile tedavi edilmiş hastalarda serum PON1 aktivitesinde herhangi bir değişiklik olmadığı gösterilmiştir [177, 178].

İn vitro bir başka çalışmada antikolinerjik olarak kullanılan atropin, insan plazma ve domuz karaciğer PON1 enzimini inhibe ettiği gösterilmiştir [179]. Bir başka çalışmada, sürekli aspirin kullanıcılarında PON1 aktivitesi ve konsantrasyonunda önemli bir artış olduğu gösterilmiştir [180]. Bu etkisinin kızarıklıklara ve ödeme karşı etkili olması (anti-inflammatory) özelliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Hayvanlarda ateş yükselmesi durumunda serum PON seviyesi azalır ve aspirin antioksidan olarak etki eder [180]. Ateş düşürücü etkiye sahip glukokortikoid deksametosa (1 mM) fare serum ve karaciğerinde *in vivo* olarak PON1 mRNA seviyesinin sekiz kat artmasına neden olmuştur [181].

2. MATERYAL VE YÖNTEMLER

2.1. MATERYALLER

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneysel çalışmalarda kullanılan, Sepharose-4B, 1-Naftilamin, L-tirozin, standart serum albumin, N,N,N,N'tetrametiletilediamin (TEMED), trihidroksimetil aminometan (Tris-Base), paraoksan, Tris-HCl, Triton X-100, DMEM, TE, Fetal Calf Serum (FCS) Sigma Chemical'den; sodyum hidroksit, amonyum sülfat, glisin, fosforik asit, asetik asit, etil alkol, hidroklorik asit, sodyum dihidrojen fosfat, β -merkaptobetanol, sodyum dodesil sülfat, akrilamid, N,N-metilen bis-akrilamid, amonyum persülfat, bromofenol mavisi, gliserol, Coomassie brilliant blue G-250, sodyum bikarbonat, sodyum fosfat, potasyum fosfat, kalsiyum klorür Merk'den sağlandı.

Araştırmada, antibiyotiklerin *in vivo* etkilerini incelemek için kullanılan deney fareleri (*Mus musculus*) T.C. Tarım ve Köy işleri Bakanlığı Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiştir. Paraoksonaz enzimini saflaştırma amaçlı çalışmamızda Balıkesir Devlet Hastahanesi biyokimya laboratuvarından alınan insan kanı enzim kaynağı olarak kullanıldı. Kullanılan antibiyotikler (gentamisin sülfat, sefazolin sodyum, sodyum ampisillin, siprofloksasin, kloramfenikol, klaritromisin, klindamisin fosfat, rifamisin SV) çevremizde yaygın olarak kullanılan antibiyotikler olup yerel eczaneden temin edilmiştir. Çalışmada HepG2 karaciğer hücre hattı kullanılmıştır. Hücre hattı İzmir'den temin edilmiştir.

2.1.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Bu çalışmada aşağıdaki alet ve cihazlardan yararlanılmıştır.

Soğutmalı santrifüj	Sigma 3K15
Soğutmalı Ultrasantrifüj	Hettich EBA 12R
Multi Santrifüj (Falkon santrifüjü)	Thermo IEC
pH metre	Hana pH 211 Microprocessor
UV-Spektrofotometre (Plaka okuyuculu)	Biotek Power Wave XS
Manyetik karıştırıcı	Torrey Pines Scientific
Peristaltik pompa	Atta SJ1211
Terazi	Sartorius BL 210S
Otomatik pipetler	Hi-Tech ve Finipipette
Homojenizatör	Micra XRT
Elektroforez Sistemi	Hofer, HSI
Kromatografi Kolonu	Sigma (1 cm çap ve 20 cm uzunluk)
Derin Dondurucu (-80 °C)	CFC Free
Vorteks	Fisons Whirli Mixer
Laminar Flow	Telstar Bio IIA
Mikroskop	Nikon TE 2000-S
Gradient Mikser	Atta Magnetik Karıştırıcı ve Gradient Tüp
Otoklav	Hirayama HV 85
Buz makinesi	Fiocchetti AF 10
Su Banyosu	Elektro-mag
Thermo-block	Eliwell FALC
İnkübatör	Nuare CO ₂ -Water Jacket Incubator
Jel Görüntüleme Sistemi	Gel Doc-H Imaging System (UVP)

2.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

➤ **Hidrofobik jelin sentezinde kullanılan tamponlar**

➤ *0.1M NaHCO₃ tamponu (pH 10.0); 8,401g (0.1 mol) NaHCO₃ 950 mL distile suda çözülerek, 1N NaOH ile pH'sı 10,0'a getirildi ve son hacim 1 L'ye tamamlandı.*

➤ *0.2 M NaHCO₃ tamponu (pH 8.8); 8,401 g (0.1 mol) NaHCO₃ 450 mL distile suda çözülerek, 1N NaOH ile pH'ı 8,8'e getirildi ve son hacim distile su ile 500 mL'ye tamamlandı.*

➤ *0.01 M Na₂HPO₄ tamponu (pH 6.0); 1,42 g (0,01 mol) Na₂HPO₄ 950 mL distile suda çözülerek, 1N NaOH ile pH'sı 6.0'a getirildi ve son hacim distile su ile 1L'ye tamamlandı.*

➤ **Hidrofobik jelin dengelenmesi için kullanılan tampon: 1M**

(NH₄)₂SO₄ içeren, 0.1 M Na₂HPO₄ tamponu (pH 8.0); 14,2g (0.1 mol) Na₂HPO₄ ve 132,14 g (1 mol) NH₄(SO)₂ 950 mL distile suda çözülerek, 1N HCl ile pH'sı 8,0'e getirildi ve son hacim distile su ile 1L'ye tamamlandı.

➤ **Hidrofobik jele bağlanmış PON1 enziminin elüsyonu için kullanılan çözelti:** *1M NH₄(SO)₂ içeren, 0.1 M Na₂HPO₄ tamponu (pH 8,0) ve 0.1 M Na₂HPO₄ tamponu (pH 8,0) ile gradient mikser kullanılarak tuz gradienti oluşturuldu; 14,2g (0.1 mol) Na₂HPO₄ ve 132,14 g (1 mol) NH₄(SO)₂ 950 mL distile suda çözülerek, 1N HCl ile pH'sı 8.0'e getirildi ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı. 14,2 g (0.1 mol) Na₂HPO₄ 950 mL distile suda çözülerek, 1 N HCl ile pH'sı 8,0'e getirildi ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.*

➤ **Proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti:** 100 mg Coomassie brilliant blue G-250, 50 mL etanol de çözüldü. Bu çözeltiliye 100

mL %95'lik fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin son hacmi distile su ile 1L'ye tamamlandı.

➤ **Amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda oluşan çökeleğin alındığı tampon:** 0,1 M Tris-Baz tamponu (pH 8,0); 1.211 g (0,01 mol) tris-Baz 95 mL distile suda çözülerek, 1N HCl ile pH'ı 8,0'a getirildi ve son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

➤ **Substrat çözeltisi:** 2 mM paraokson çözeltisi; 10,8 µl paraokson, 1 mL asetonda iyice çözüldükten sonra üzerine 1 mL bazal aktivite tamponu eklendi ve iyice karıştırıldıktan sonra kullanıldı.

➤ **Paraoksonaz aktivite ölçümünde kullanılan bazal aktivite tamponu:** 2 mM CaCl₂ içeren 100 mM tris-HCl, pH=8; 3,0285 g (25mmol) Tris, 200 mL distile suda çözüldü. 1 N HCl ile pH'ı 8,0'e getirildi. 0,0555 g (0,5 mmol) CaCl₂ katılarak son hacim 250 mL'ye tamamlandı.

➤ **Karaciğer dokusunun paraoksonaz aktivite ölçümü için hazırlanmasında kullanılan çözelti:** 0,25 M Sukroz içeren 5 mM tris-HCl, pH=7,4, 0,1513 g (1,25 mmol) tris, 200 mL distile suda çözüldü. 1 N HCl ile pH:7,4 yapıldı. 21,394 g (0,0625 mol) sukroz katılarak son hacim 250 mL'ye tamamlandı.

➤ **Karaciğer dokusunun paraoksonaz aktivite ölçümü için hazırlanmasında kullanılan çözelti:** 5 mM tris-HCl, pH=7,4; 0,1513 g (1,25 mmol) Tris, 200 mL distile suda çözüldü. 1 N HCl ile pH:7,4 yapılarak son hacim 250 mL'ye tamamlandı.

➤ **DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium);** DMEM besiyeri 1000 mg/L glikoz ve pridoksin HCl ve NaHCO₃ ihtiva eden hazır besi yeridir. Besiyeri hücrelere verilmeden önce 10 000 µg/mL konsantrasyonunda penisilin/streptomisin'den 5 mL ve son konsantrasyon 2 mM olacak şekilde L-glutamin eklendi.

➤ **Tuz ihtiva eden fosfat tamponu (PBS);** Tablet şeklinde ticari olarak alınmış PBS tamponu içerisinde; 137 mM sodyum klorür, 2 mM potasyum klorür ve 10 mM fosfat tamponu (pH 7,4) ihtiva etmektedir. 1 tablet 100 mL distile suda çözüldükten sonra otoklavda steril edilmiştir.

➤ **Tripsin/EDTA çözeltisi (TE);** %0,05 tripsin/ %0,02 EDTA (w/v) ve Ca^{+2} , Mg^{+2} içeren hazır çözelti şeklinde alınmıştır.

➤ **Liziz Tamponu (HepG2 hücrelerinin paraoksonaz enzim aktivitesi belirlemeden önce lizisinde kullanılan tampon);** % 0,2 (v/v) Triton X-100 ihtiva eden 0,5 M K_2HPO_4 tamponu (pH 7,8); 4,35 g (0,025 mol) K_2HPO_4 45 mL distile suda çözüldü ve 1N HCl ile pH'ı 7,8'e ayarlandı. Son hacim 50 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan tampona % 0,2'lik Triton X-100 eklendi ve son hacim toplam 250 mL'ye distile su ile tamamlandı.

➤ **SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan numune tamponu;**

0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	2,5 mL
% 10'luk SDS	4,0 mL
Gliserol	2,0 mL
β -merkaptoetanol	1,0 mL
Bromfenol mavisi	0,01 g
Distile su	0,5 mL

➤ **SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan tank tamponu;**

Tris-HCl	3 g
Glisin	14,4 g
SDS-	1,0 g

- **SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan ayırma ve yığma jellerinin hazırlanışı;** SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının hazırlanışı ve kullanılan miktarları Çizelge 2.1’de verilmektedir.

- **SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renklendirme çözeltisi;** 0,66 g Coomassie brilliant blue G-250, 120 mL metanolde çözüldü. Bu çözeltiye 24 mL saf asetik asit ve 120 mL distile su ilave edildi.

- **SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renk açma çözeltisi;** Hacimce % 7,5 asetik asit, % 5 metanol ve % 87,5 mL distile su içermektedir. Bu amaçla 75 mL asetik asit ve 50 mL metanol, 875 mL saf su ile karıştırıldı.



Çizelge 2.1. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının miktarları.

	Ayırma Jeli	Yığıma Jeli
	%10	%3
<u>Akril amid/Bis</u>		
Akril amid 15 g		
Bis 0,4 g	16,65	2,6 mL
Alınarak son hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlanır.		
<u>Distile su</u>	20,1 mL	12,2 mL
<u>1.5 M tris-HCL (pH 8.8)</u>		
Tris-HCl 11.82		
Alınarak pH 8.8 oluncaya kadar 0.1 M NaOH ilave edilerek son hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlanır.	12,5 mL	-
<u>0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)</u>		
Tris-HCl 3.94 g		
Alınarak pH 6.8 oluncaya kadar 0.1 M NaOH ilave edilerek son hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlanır.	-	5 mL
<u>% 10 'luk SDS</u>		
SDS 1g		
Alınarak son hacim distile su ile 10 mL'ye tamamlanır.	0,5 µL	200 µL
<u>TEMED</u>	25 µL	20 µL
<u>%10'luk amonyum persülfat</u>		
Amonyum persülfat 1g		
Alınarak son hacim distile su ile 10 mL'ye tamamlanır.	750 µL	400 µL

2.2. YÖNTEMLER

2.2.1. Kan serumunun ayrılması

Kan numuneleri, kuru santrifüj tüpüne alındıktan sonra 5000 rpm'de, +4°C'de ve 10 dakika santrifüj edilerek serumlarının ayrılması sağlanmıştır. Ayrılan serum aktivite ölçümüne kadar -70°C'de bekletilmiştir. Daha sonra enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

2.2.2. Enzim Aktivite Tayini

Paraoksonaz enziminin aktivitesi spektrofotometrik olarak tayin edildi. Aktivite ölçümü için 0,05 mL enzim çözeltisi (serum) alınıp daha önceden hazırlanmış olan 1mL tampon (100 mM tris-baz pH:8,00) + substrat (2 mM paraoxon) + koenzim (2 mM CaCl₂) çözeltisine çabuk bir şekilde eklendikten sonra 412 nm'de 1 dakikadaki 37 °C'de absorbansta meydana gelen değişme okundu. Bu şekilde paraoxonun p-nitrofenole enzimatik dönüşüm hızı tespit edildi. Aynı işlem enzim olmadan tekrarlanarak aradaki fark enzim aktivitesi olarak belirlendi. 1 ünite paraoksonaz dakikada meydana gelen p-nitrofenolün nmol'ü olarak tayin edildi.

2.2.3. Bradford Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini

Amonyum sülfat çöktürmesi sırasında elde edilen çözeltilerdeki protein miktar tayinleri bu yöntemle belirlendi. Bu yöntem fosforik asitli ortamda proteinlerin, Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi ile kompleks oluşturması, oluşan kompleksin 595 nm'de maksimum absorban göstermesi esasına dayanır [182]. Bu yöntemin diğer protein tayini yöntemlerinden üstün tarafı, çok kısa sürede uygulanması, bozucu faktörlerin az olması, protein boya kompleksinin çözeltilerde uzun süre kalmasıdır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır.

Protein tayini işleminde şu yol izlendi: 1 mL'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albümin çözeltilisinden tüplere 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µl alındı. 100mM Tris-HCl tamponu (pH:8,00) ile tüm tüplerin hacimleri 0.1mL'ye tamamlandı. 5mL Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi her bir tüpe ilave edildi. Tüpler vorteks ile karıştırılarak 10 dakika sonra 595 nm'de 3 mL'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak 0,1 mL'lik 100 mM Tris-HCl (pH:8,00) tamponu olan 1. tüp kullanıldı. Okunan absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri ile standart grafik hazırlandı (Şekil 3.1).

Hazırlanacak enzim çözeltilerinden 0,1'er mL 2 ayrı tüpe alınarak üzerlerine 5'er mL Coomassie reaktifi ilave edildi. Vortekste karıştırıldıktan 10 dakika sonra 595 nm'de absorbansları ölçüldü. İki ölçümün ortalama absorbansına karşılık gelen protein miktarı standart grafik yardımıyla hesaplandı.

2.2.4. Farelerin Beslenmesi

Hayvanlar, Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsünden getirildikten sonra 20 gün ortama uyumu sağlandı. Ortama adapte olmayanlar öldü. Deney hayvanları 25°C sıcaklıkta sabah ve akşam günde iki kez olmak üzere yem fabrikasından alınan kuzu küşesi ile beslendi. Bakımlarında özellikle susuz kalmamalarına özen gösterildi. Çalışmamızda yalnızca erkek fareler kullanıldı. Elimizdeki fareler tartılarak ortalama ağırlıkları 25 g olarak tespit edildi.

2.2.4.1. Antibiyotiklerin Uygulanması

Her bir antibiyotik aşağıda belirtilen miktarlarda 9 adet fareye kas içine enjekte edilmiştir. Enjekte edildikten sonra 2, 4 ve 6 saat arayla 3 er adet fare servikal dislokasyon yöntemiyle öldürüldü. Öldürülen farelerin kanı kalbinden enjektörle kuru tüpe alınmıştır. Daha önce belirtilen yöntemle kan serumu ayrıldı. Öldürülen farelerin karaciğeri ependorf içinde doğrudan sıvı azota alındı. Sıvı azottan alınan karaciğer dokusu ile kandan ayrılan serum daha sonra aktivite ölçümü için yapılacak uygulamalara kadar -70°C'deki derin dondurucuda saklanmıştır.



Şekil 2.1. Farelerin beslendiği kafesler ve ucu tüplü olan suluklar



Şekil 2.2. Farelerin kafes içinde görünümü

Çizelge 2.2. Uygulanan antibiyotiklerin miktarları

Antibiyotik	Ampüldeki Miktarı	Uygulanan Miktar
Gentamisin sülfat (I)	40 mg/mL	3,2 mg/kg
Sodyum ampisillin (II)	0,285 g/mL	428 mg/mL
Sefazolin sodyum (III)	125 mg/mL	106,25 mg/kg
Siprofloksasin (IV)	2 mg/mL	3,2 mg/kg
Kloramfenikol (V)	0,166 g/mL	12,5 mg/kg
Klarithromysin (VI)	50 g/mL	7,14 mg/kg
Rifomycin SV (VII)	83,33 mg/mL	3,56 mg/kg
Klindamisin fosfat (VIII)	150 mg/mL	2,143 mg/kg

2.2.4.2. Doku Aktivitelerinin Bulunması

Dokuların aktivitesinin belirlenmesinde Fernando Gil ve arkadaşlarının [60] metodu modifiye edilerek uygulandı. Bu amaçla sırasıyla aşağıdaki yollar izlenmiştir.

Doku örneğinin miktarı belirlendikten sonra ağırlığının 4 katı kadar tamponla sulandırıldı (5 mM Tris-HCl pH: 7,4, 0,25 M sukroz). Örnek, 6 dakika 10.500 dakika⁻¹ devirde mekanik homojenizatörde homojenize edildi ve 1000 rpm'de 10dk santrifüj edilerek çöken büyük partiküller ve nukleus uzaklaştırıldı. Daha sonra süpernatant 16000 rpm'de 60 dakika santrifüj edilerek mikrozomların çökmesi sağlandı. Süpernatant uzaklaştırıldı. Mikrosomal pellet 1 mL tamponla sulandırıldı. (5 mM Tris-HCl pH: 7,4). Sulandırılmış mikrosomal pelletten Paraoksonaz enziminin ekstraksiyonu için % 0,75'lik Triton X-100 eklendi. Vorteksle iyice karıştırıldı. Paraoksonaz enziminin çözeltiye alınması için +4°C'de 30 dakika bekletildi. Çözelti 16000 rpm'de 60 dakika santrifüj edildi. Süpernatanta bulunan paraoksonaz enziminin aktivitesine bakıldı.

2.2.5. Enzimin saflaştırılması

2.2.5.1. Amonyum sülfat çöktürme aralığının belirlenmesi

Amonyum sülfat, belirli doygunluk derecelerine göre belirli proteinlerin çökelmesini sağlayan 2 değerlikli, çok kullanılan bir tuzdur. Öncelikle, kullanılacak uygun amonyum sülfat konsantrasyonu aşağıda verilen formülle tespit edildi:

$$g(NH_4)_2SO_4 = \frac{1.77xVx(S_2 - S_1)}{3.54 - S_2}$$

V : Serum hacmi

S₁ : 1'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu

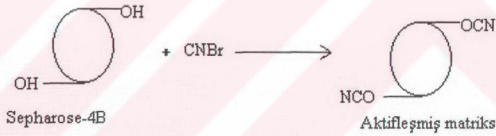
S₂ : 1'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğu

Paraoksonaz enzimini saflaştırmak için 0-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100 aralıklarında çöktürme yapıldı. Her bir aralıkta elde edilen çökelti en ufak hacimdeki tamponda çözülerek aktivitesi ve protein miktarı tespit edildi.

2.2.5.2. Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile enzimin saflaştırılması

2.2.5.2.1. Sepharose 4B'nin aktifleştirilmesi

10 mL Sepharose-4B jeli, saf su ile iyice yıkanarak dekante edildi. Eşit hacimde distile su ile birleştirildi. Karıştırılmakta olan jel süspansiyonuna 4 g CNBr'in hepsi birden katıldı. pH metre kullanılarak süspansiyonun pH'sı 4 M NaOH ile hemen 11'e çıkarıldı ve reaksiyon bu pH'da muhafaza edildi. Reaksiyona pH değişmeyene kadar devam edildi. (10-15 dakika) Çok miktarda buz süspansiyona katıldı ve karışım bir buhner hunisine nakledildi. Daha sonra 250 mL soğutulmuş 0,1 M Na₂HCO₃ tamponu (pH 10,00) ile yıkandı (Şekil 2.3).

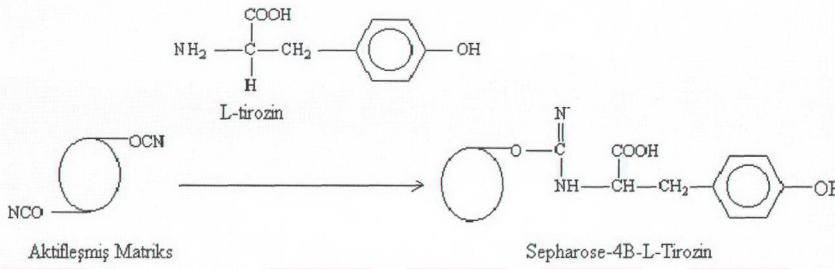


Şekil 2.3. Sepharose 4B'nin aktifleştirilmesi

2.2.5.2.2. L-tirozinin Bağlanması

CNBr ile aktifleştirilmiş matris üzerine, 20 mL'sinde 15 mg tirozin içeren 0,1 M NaHCO₃ tamponunun (pH 10,00) soğuk çözeltisi ilave edilerek 90 dk karıştırıldı. Bundan sonra süspansiyon 16 saat 4°C'de bekletildi. Bu sürenin bitiminde yıkama suyu 280 nm'de absorbans vermeyinceye kadar bol su ile yıkandı. Böylece reaksiyona girmeyen tirozin tamamen uzaklaştırılmış oldu. Yıkama 100 mL

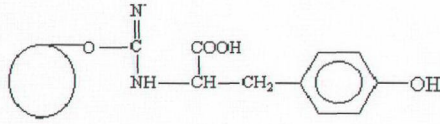
0,2 M NaHCO₃ tamponu (pH: 8,8) ile tekrarlandı. Tirozinle modifiye sepharose-4B aynı tamponun 40 mL'si içine alındı (Şekil 2.4).



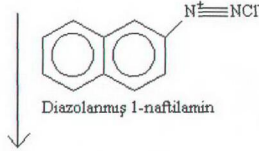
Şekil 2.4. L-Tirozinin Bağlanması

2.2.5.2.3. 1-Naftilamin Bileşiğinin Bağlanması

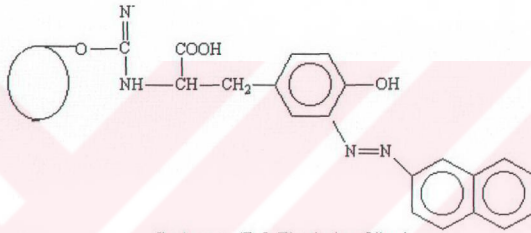
25 mg 1-naftilamin 0 °C civarında 10 mL 1M HCl içerisinde çözüldü. 75 mg NaNO₂ ihtiva eden 0 °C'deki 5 mL çözelti, 1-naftilamin çözeltisine damla damla katıldı. (1-Naftilamin çözeltisi hazırlanırken etanol ilave edilerek ısıtıldı) 10 dakika reaksiyondan sonra diazolanmış bulunan 1-Naftilamin, 40 mL Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonuna ilave edildi. pH: 9,5'a çıkarılarak sabit tutuldu ve 3 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Daha sonra 1 L saf su ve ardından 200 mL 0,01M Na₂HPO₄ (pH: 6,0) tamponu ile yıkandı ve aynı tamponda muhafaza edildi (Şekil 2.5).



Sepharose-4B-L-Tirozin



Diazolanmış 1-naftilamin



Sepharose-4B-L-Tirozin-1-naftilamin

Şekil 2.5. 1-Naftilamin bileşiğinin bağlanması

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

Paraoksonaz enziminin hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılmasından sonra iki farklı akrilamid konsantrasyonunda; yığıma jeli % 3, ayırma jeli % 10 olacak şekilde kesikli sodyum dodesil sülfat jel elektroforezi (SDS-PAGE) Laemli [183] tarafından belirtilen yöntemle yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi.

Bu amaçla elektroforez cam plakaları önce su, sonra etil alkol ile iyice temizlendi. Daha sonra plakalar arasına plastik aralık oluşturucusu yerleştirilerek iki cam plaka birbiri üzerine konuldu ve elektroforezin dökme aparatına sabitlendi. Çizelge 2.1'de belirtildiği şekilde hazırlanan ayırma jeli plakalar arasına üstten 2-3 cm kalana kadar enjektörle döküldü. Jel içerisinde hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. Jel yüzeyinin düzgün olması için n-bütanol ile ince bir tabaka oluşturuldu. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra (1 gece) üst yüzeydeki n-bütanol döküldü. Daha sonra cam plakaların arasına tamamen doluncaya kadar polimerleşmiş ayırma jelinin üzerine yığılma jeli ilave edildi. Jel kasetindeki yükleme jelinin üzerine tarak dikkatlice yerleştirilerek jelin polimerleşmesi beklendi (30 dakika). Yükleme jeli polimerleştikten sonra tarak kuyucukların arasının bozulmamasına dikkat edilerek çıkarıldı. Kuyucuklar önce saf suyla sonra tank tamponuyla yıkandı. Polimerize jellerin bulunduğu kaset elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konuldu.

Hidrofobik etkileşim kromatografisi sonucunda elde edilen fraksiyonlardan yüksek aktivite gösterenler birleştirildi. Elde edilen çözelti toplam hacim 100 µl olacak şekilde 1:1 oranında numune tamponuyla karıştırıldı. β-galaktosidaz (118.0 kDa), sığır serum albumin (79.0 kDa), yumurta albumini (47.0 kDa), karbonik anhidraz (33.0 kDa), β-laktoglobulin (25.0 kDa) ve Lizozim (19.5 kDa) içeren standart protein çözeltisi 1:1 oranında numune tamponuyla karıştırıldı. Jele yüklenecek numuneler 3 dakika 100 °C'de termoblok da bekletildi. Numuneler soğutulmuş kuyucuklara yüklendi. Elektroforez güç kaynağına bağlanarak 80 volt'a ayarlandı. Proteinlerin jeldeki hareketini incelemeye yarayan numune tamponu içindeki boyaya ait bant ayırma jeline ulaştığında voltaj 150 volt'a yükseltildi. Yürütme işlemine proteinler, jelin altına 1cm kalana kadar devam edildi. Daha sonra akım kesilerek yürütme durduruldu. Cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı yığılma jeli kesilip ayrıldıktan sonra protein bantlarını içeren ayırma jeli renklendirme çözeltisi içine konuldu ve 1,5-2 saat kadar çalkalayıcı üzerine bırakıldı. Daha sonra jel renklendirme çözeltisinden çıkartılarak renksizleştirme çözeltisine kondu. Belirli aralıklarla değiştirmek suretiyle jelin zemin rengi açılıp protein bantları

belirginleşinceye kadar bu çözelti içinde çalkalandı. Jel renksizleştirme çözeltisinden çıkarıldıktan sonra jel görüntüleme sistemi (UVP) ile görüntü bilgisayara aktarıldı.

2.2.6. Optimum şartlarda K_M ve V_{max} değerlerinin bulunması

K_M ve V_{max} değerlerinin tespit edilmesi amacıyla optimum şartlarda paraokson substratının sekiz farklı konsantrasyonunda enzim aktivitesi ölçümü yapıldı. Her ölçüm iki defa tekrarlanarak, bulunan değerlerin ortalaması alındı.

$1/V$ ve $1/[S]$ değerleri bulunarak Lineweaver-Burk grafiği çizildi. K_M ve V_{max} değerleri grafiğin denklemlerinden yararlanılarak bulundu.

2.2.7. Antibiyotikler için I_{50} değerlerini bulunması

Farklı antibiyotiklerin I_{50} değerlerini bulmak için, optimum şartlarda paraokson substratının 2 mM sabit konsantrasyonunda çalışıldı. Önce antibiyotiksiz ortamda enzim aktivitesi bulundu. Bu değer %100 aktivite olarak kullanıldı. Değişik antibiyotik konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbanslar 412 nm'de köre karşı okundu. Elde edilen absorbans değerlerinden % aktivite hesaplandı. % Aktivite $-[I]$ grafikleri çizildi. Bu grafiklerden yararlanarak her bir antibiyotik için I_{50} değerleri hesaplandı.

2.2.8. Antibiyotikler için K_i değerlerinin bulunması

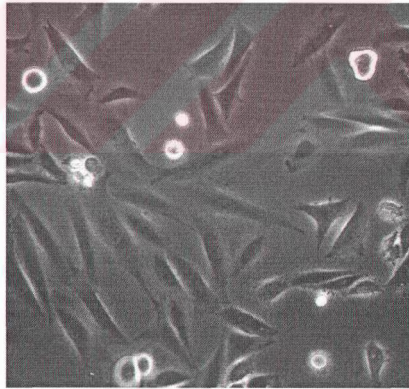
Farklı antibiyotikler için K_i değerlerinin bulunması için önce antibiyotiksiz ortamda optimum şartlarda sekiz farklı paraokson substratı konsantrasyonu kullanılarak aktivite bulundu. Daha sonra her bir antibiyotik için 2 değişik sabit antibiyotik konsantrasyonunda optimum şartlarda aktivite paraokson substratı kullanılarak tespit edildi. $1/V$ ve $1/[S]$ değerlerinden Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Bu grafiklerden yararlanarak inhibisyon türleri ve K_i değerleri yarışmalı (kompetitif) inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrisinde $1/[S]$ eksenini kestiği nokta olan $-1/K_M (1+[I]/K_i)$ ifadesinden, yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon için $1/V$ eksenini kestiği nokta olan $1/V_{max} (1+[I]/K_i)$ ifadesinden yararlanarak hesaplandı.

Denklemlerde kullanılan K_M ve V_{max} değerleri antibiyotiksiz ortamda bulunan değerlerdir.

2.2.9. Antibiyotiklerin HepG2 hücresi tarafından üretilen PON üzerindeki etkisi

2.2.9.1. Hücrelerin doku kültüründe yetiştirilmesi

HepG2 hücreleri penisilin (100 U/mL) ve streptomisin (100 µg/mL) ihtiva eden, ısıyla inaktive edilmiş (60 dakika, 56 °C) %10 (v/v)'luk fetal serumu eklenmiş DMEM besiyerinde yetiştirildi. Penisilin, streptomisin ve fetal serum (HI-FCS) besiyerine eklenmeden önce, 0,2 µm gözenek büyüklüğüne sahip filtreden geçirilerek filtre sterilizasyonu yapıldı. Hücreler 37 °C'de nemli ve hava karışımında %5 (v/v) CO₂ ihtiva eden inkübatörde yetiştirildi. Hücre kültür ortamı 3 günde bir değiştirildi.



Şekil 2.6. İnsan karaciğer hücre hattı (HepG2)

2.2.9.2. Doku kültürü laboratuvarının temizliği ve sterilizasyonu

Doku Kültürü Laboratuvarı her hafta periyodik olarak çamaşır suyu içeren sıvılarla temizlendi. UV lamba kullanılarak odanın havasının sterilizasyonu sağlandı. Çalışmaya başlamadan en az yarım saat önce laminar flow açılarak çalışma ortamının sterilizasyonu sağlandı.

2.2.9.3. Cam pipetlerin ve diğer cam malzemenin hazırlanması

Isıya dayanıklı cam pipetler öncelikle birkaç saat kromik asit temizleme çözeltisinde bekletildi. Daha sonra deterjanlı su ile yıkandı, çeşme suyu ile durulandıktan sonra üç kez dH₂O ile yıkandı. 180 °C pastör fırınında 90 dakika sterilize edildi. Isıya dayanıklı diğer cam malzemeler, pipet uçları, ependorflar, santrifüj tüpleri, bakteri kültür ortamları 121 °C' de 20 dakika (1,02 atm basınçta) otoklavda steril edildi.

2.2.9.4. Medyum, PBS, TE ısıtılması

Hücrelerde kullanılan her türlü çözeltinin hücrelere zarar vermemesi için 37°C sıcaklığında olması gereklidir. Çalışmaya başlamadan en az yarım saat önce çözeltiler su banyosunda istenilen sıcaklığa getirildi.

2.2.9.5. Hücrelerin büyütülmesi

Hücreler 5 mL medyumda 25 cm² flasklarda, içerisinde 100 U/mL penisilin, 10 µg/mL streptomisin, 0,2 mM L-glutamine ve % 10 FCS içeren DMEM medyumunu içerisinde haftada 2 kez rutin pasaj yapılarak üretildi.

2.2.9.6. Hücre kültürünün pasajlanması

Flask (75'lik) içerisindeki hücre topluluğu 3 kez PBS ile yıkandı, 3mL tripsin-EDTA çözeltisi kullanılarak hücreler plastikten ayrılincaya kadar 37 °C'de birkaç dakika inkübe edildi. Plastikten ayrılan hücreler santrifüj tüpüne alınarak 1000g'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüjlemeden sonra hücre pelleti %10'luk fetal serum içeren (HI-FCS) ortamda yeniden 1:6 oranında taze doku kültürüne yayıldı. (örneğin bir doku kültürü petrisinden alınan hücreler 6 yeni doku kültürü petrilere subkültüre edildi).

2.2.9.7. Hücrelerin Sayımı

Toplam hücre süspansiyonun mililitresindeki hücre sayısını hesaplamak için, üzeri dokuz küçük kareye ayrılmış, 1mm² alan, 0.1 mm derinliği olan ve böylelikle toplam hacmin hesaplanabildiği hemositometre lamı kullanıldı. Canlı ve ölü hücreleri ayırt etmek için 10 µl hücre süspansiyonu eşit hacimde trypan blue (1:1 sulandırma oranında) ile 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Ölü hücreler mavi boyanırken canlı olanlar boyanmadıkları için sayım bu şekilde yapıldı.

Toplam canlı hücre sayısı/mL = hemositometre sayım sonucu $\times 2 \times 10^4$

2.2.9.8. Antibiyotiklerin hücre kültürüne uygulanması ve aktivitesinin Bulunması

Flaskta yetiştirilen hücreler (HepG2) sayıldıktan sonra her bir kuyucukta 250000 hücre olacak şekilde 12 kuyucuklu (4x3) plakalara ekildi. Hücrelere ekimden 24 saat sonra değişik konsantrasyonlarda antibiyotikler uygulandı. Antibiyotik uygulandıktan 2, 4 ve 6 saat sonra hücreler tarafından üretilen paraoksonaz enziminin aktivitesine bakıldı. Aktivite belirlenmeden önce hücreler lizis tamponu ile parçalandı. Bunun için her bir kuyucuk 3 kez soğuk PBS ile yıkandı ve kuyucuklara 1mL soğuk PBS eklendi ve hücre kazıyıcıları ile kazındı. Daha sonra oluşan hücre süspansiyonu ependorfa alındı ve 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet soğuk PBS ile tekrar çözüldü. Daha sonra 10.000 rpm'de 1 dk

santrifüj edildi. Çökelti üzerine 100 µl lizis tamponu eklendi ve vortex ve pipetajla hücrelerin parçalanması sağlandı. 10,000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek üstte kalan çözeltinin paraokson substratına karşı aktivitesi belirlendi.

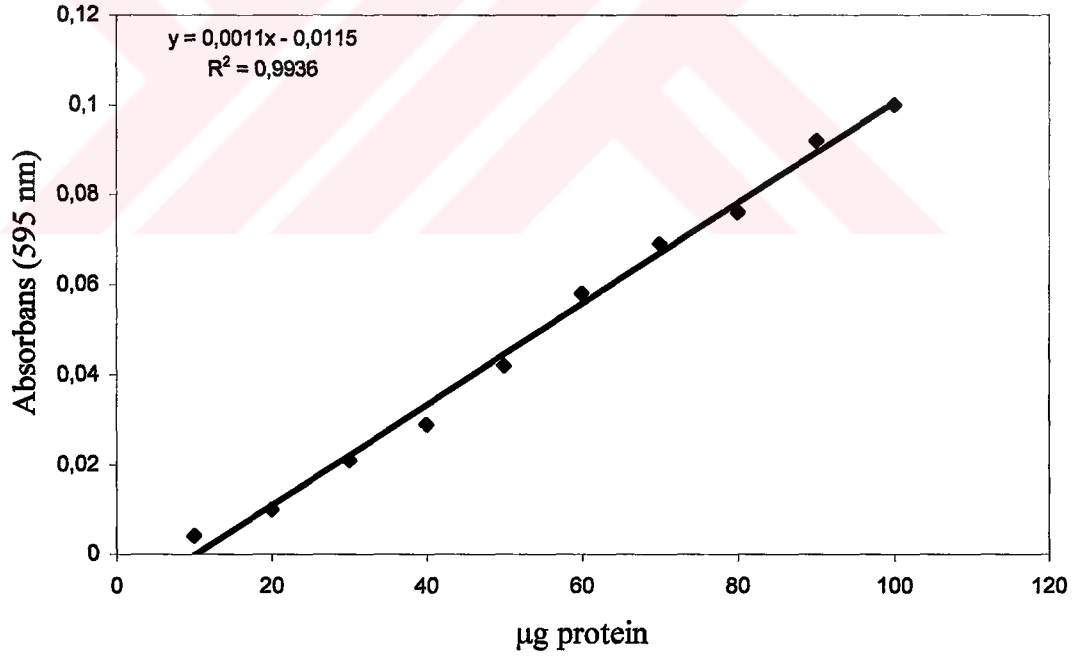
2.2.11. İstatistik Analiz

İstatistik analiz için Minitab (versiyon 1.0) programı kullanılmıştır. Örneklerin ve kontrol grubunun analizi t-testi ile yapıldı. $p < 0,05$ değeri için kontrol grubu ile örnek arasındaki fark anlamlıdır.

3. BULGULAR

3.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri

Kantitatif protein tayininde Bradford yöntemi kullanıldı. Standart grafik bölüm 2.2.3’de açıklandığı gibi hazırlandı. Serumdan elde edilen enzim çözeltisi ve saflaştırma basamakları sonundaki enzim çözeltilerinin protein miktarları bu standart grafiğe göre belirlendi. Standart çözeltideki μg proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 3.1’de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Bradford yöntemi ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan standart grafik

3.2. Antibiyotiklerin Fare Serum ve Karaciğer PON Enzimi Üzerindeki Etkisi

3.2.1. Antibiyotiklerin Serum PON Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Antibiyotiklerin fare serum paraoksonaz enzim aktivitesi üzerine etkilerini belirlemek için bölüm 2.2.4.1'de anlatıldığı gibi serum ayrıldı. Daha sonra ayrılan serumda 412 nm'de paraokson substratına karşı aktivite belirlendi. PON aktivitesi belirlenmesinde, küvette toplam hacim 1,05 mL' dir. Küvette bulunan paraokson subatratının son konsantrasyonu [S]; 2mM, 2 mM CaCl₂ ihtiva eden 100 mM tris-baz (pH 8,0) tamponu 1ml ve enzim kaynağı olarak kullanılan serum hacmi 50 µl'dir. Söz konusu hacimlerde 37°C'de belirlenen bir dakikadaki oluşan ürün (p-nitrofenol) nmol cinsinden konsantrasyonu enzim ünitesi olarak hesaplandı. Sonuçlar çizelge 3.1 ve çizelge3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Antibiyotik uygulanan farelerin serum aktivitelerinin ölçümünde kullanılan çözelti miktarları ve elde edilen sonuçlar.

Kullanılan Antibiyotik	Farelerin öldürülme süreleri (saat)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/mLdakika)
Gentamisin Sülfat	2	0,097	119,532
		0,099	122,192
		0,056	69,385
	4	0,105	128,94
		0,124	152,28
		0,207	254,21
	6	0,091	111,75
		0,121	148,59
		0,122	149,82
Sefazolin Sodyum	2	0,115	141,84
		0,072	87,80
		0,060	73,07
	4	0,121	148,59
		0,126	152,12
		0,106	130,17
	6	0,213	262,19
		0,142	174,38
		0,094	115,43
Sodyum Ampisilin	2	0,188	230,87
		0,301	369,64
		0,301	369,64
	4	0,073	89,65
		0,102	124,65
		0,072	88,42
	6	0,284	349,9
		0,213	261,58
		0,183	224,73
Kontrol Grubu	-	0,176	216,14
		0,178	218,59
		0,171	209,99

Çizelge 3.2. Antibiyotik uygulanan farelerin serum aktivitelerinin ölçümünde kullanılan çözelti miktarları ve elde edilen sonuçlar.

Kullanılan Antibiyotik	Farelerin öldürülme süreleri (saat)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/mLdakika)
Siprofloksasin	2	0,015	18,421
		0,007	8,596
		0,027	33,157
	4	0,020	24,561
		0,016	19,649
		0,014	17,193
	6	0,032	39,298
		0,056	68,771
		0,052	63,859
Kloramfenikol	2	0,016	19,649
		0,025	30,701
		0,005	6,140
	4	0,05	61,403
		0,026	31,929
		-	-
	6	0,041	50,350
		0,040	49,122
		0,024	29,473
Klaritromisin	2	0,025	30,701
		0,023	28,245
		0,026	31,929
	4	0,024	29,473
		0,028	34,385
		0,028	34,385
	6	0,074	90,877
		0,025	30,701
		0,021	25,789
Rifamisin SV	2	0,041	50,350
		0,018	22,105
		0,043	52,807
	4	0,012	14,737
		0,014	17,192
		0,043	52,807
	6	0,038	46,666
		0,051	62,615
		0,055	67,543
Klindamisin Fosfat	2	0,023	28,245
		0,033	40,526
		0,037	45,438
	4	-	-
		0,035	42,982
		0,026	31,929
	6	0,025	30,701
		0,012	14,736
		0,022	27,017
Kontrol Grubu	-	0,025	30,701
		0,020	24,561
		0,033	40,526

3.2.2. Antibiyotiklerin karaciğer PON enzim aktivitesi üzerine etkisi

Antibiyotiklerin fare karaciğer paraoksonaz enzim aktivitesi üzerine etkilerini belirlemek için bölüm 2.2.4.2'de anlatıldığı gibi karaciğer dokusunun 412 nm'de paraokson substratına karşı aktivitesi belirlendi. PON aktivitesi belirlenmesinde, küvette toplam hacim 1,05 ml'dir. Küvette son konsantrasyonu 2,0 mM olacak şekilde 100 µl substrat, 2 mM CaCl₂ ihtiva eden 100 mM tris-baz (pH 8,0) tamponundan 850 µl ve enzim kaynağı olarak kullanılan karaciğer ekstraktından 100 µl eklendi. Söz konusu hacimlerde 37°C'de belirlenen bir dakikadaki oluşan ürün (p-nitrofenol) nm cinsinden konsantrasyonu enzim ünitesi olarak hesaplandı. Sonuçlar çizelge 3.3 ve çizelge3.4'de verildi.

Çizelge 3.3. Antibiyotik uygulanan farelerin karaciğer aktivitesinin ölçümünde kullanılan çözelti miktarları ve elde edilen sonuçlar.

Kullanılan Antibiyotik	Farelerin öldürülme süreleri (saat)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/mLdakika)
Gentamisin Sülfat	2	0,042	25,79
		0,043	26,77
		0,067	41,14
	4	0,029	17,80
		0,035	21,49
		0,045	28,24
	6	0,088	54,035
		0,099	60,79
		0,092	57,10
Sefazolin Sodyum	2	0,021	13,50
		0,034	21,49
		0,027	17,19
	4	0,044	27,01
		0,054	33,16
		0,041	25,17
	6	0,076	46,66
		0,075	46,05
		-	-
Sodyum Ampisilin	2	0,052	31,93
		0,071	44,21
		0,063	39,29
	4	0,027	16,58
		0,041	25,17
		0,038	23,33
	6	0,024	14,73
		0,026	15,96
		0,044	27,63
Kontrol Grubu	-	0,020	15,35
		0,042	25,79
		0,043	26,40

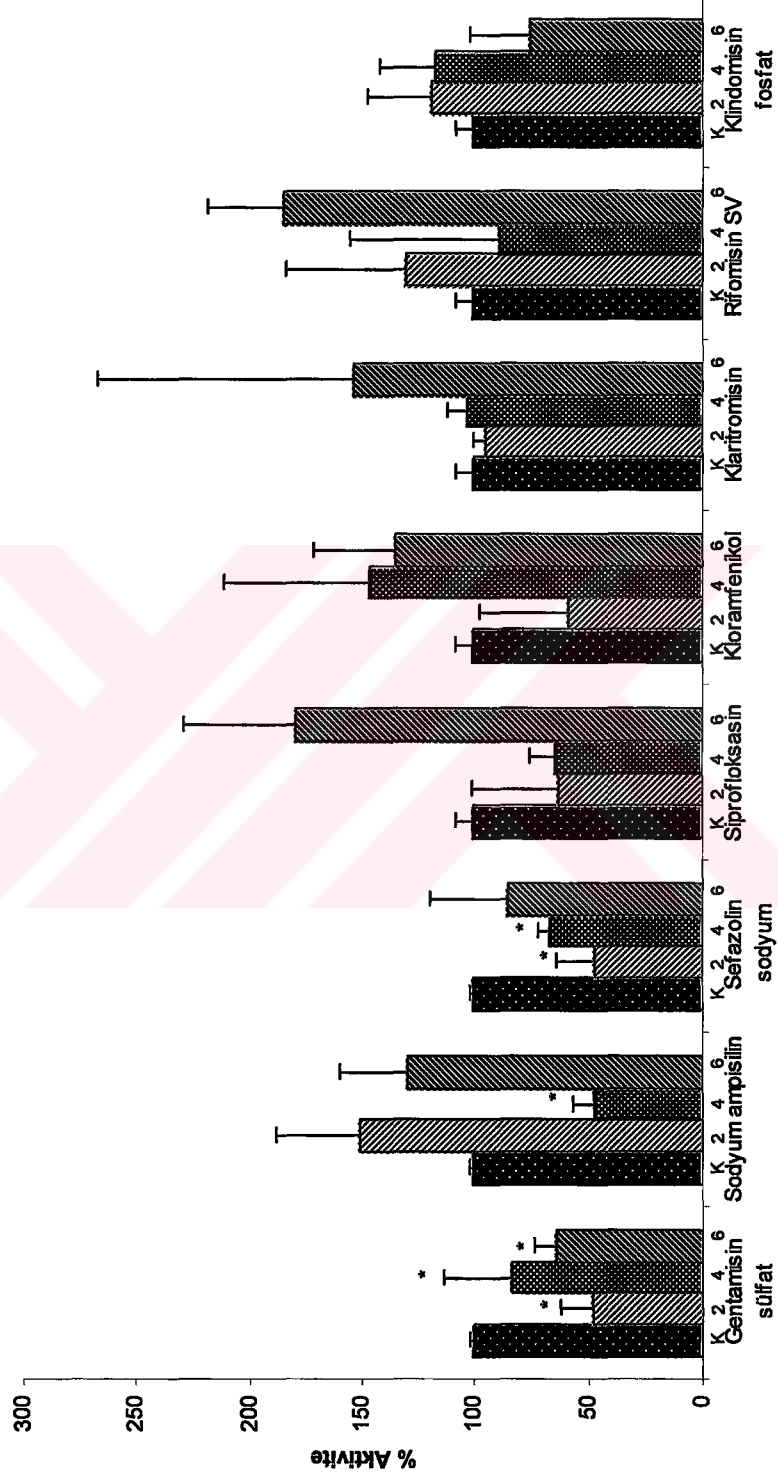
Çizelge 3.4. Antibiyotik uygulanan farelerin karaciğer aktivitelerinin ölçümünde kullanılan çözelti miktarları ve elde edilen sonuçlar.

Kullanılan Antibiyotik	Farelerin öldürülme süreleri (saat)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/mLdakika)
Siprofloksasin	2	0,032	19,649
		0,024	14,736
		0,022	13,508
	4	0,019	11,666
		0,022	13,508
		0,017	10,438
	6	0,028	17,192
		0,028	17,192
		0,039	23,947
Kloramenikol	2	0,023	14,122
		0,039	23,947
		0,021	12,894
	4	0,019	11,666
		0,011	6,754
		0,021	12,894
	6	0,022	13,508
		0,014	8,596
		0,015	9,210
Klaritromisin	2	0,029	17,807
		0,019	11,666
		0,020	12,280
	4	0,017	10,438
		0,023	14,122
		0,019	11,666
	6	0,015	9,210
		0,009	5,526
		0,017	10,438
Rifamisin SV	2	0,026	15,964
		0,018	11,052
		0,021	12,894
	4	0,013	7,982
		0,019	11,666
		0,015	9,210
	6	0,027	16,578
		0,025	15,350
		0,022	13,508
Klindamisin Fosfat	2	0,045	27,631
		0,040	24,561
		0,051	31,315
	4	0,036	22,105
		0,029	17,807
		0,035	21,491
	6	0,021	12,890
		0,022	13,508
		0,021	12,894
Kontrol Grubu	-	0,020	15,35
		0,042	25,79
		0,043	26,40

Çizelge 3.5. Uygulanan antibiyotiklerin serum ve karaciğer paraoksonaz enzim aktivitesi üzerine etkisinin istatistiksel değerlendirilmesi

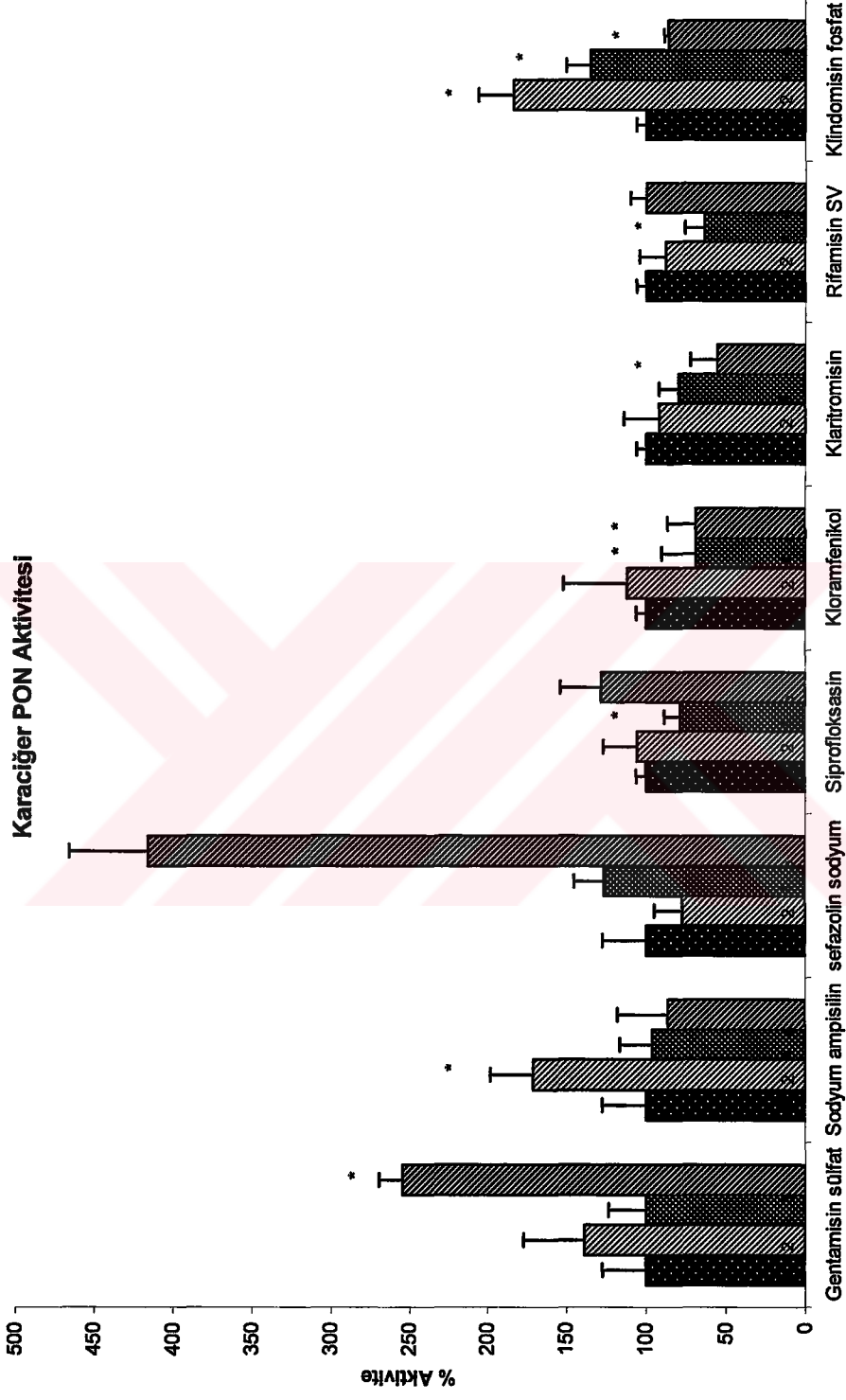
Antibiyotik	Süre (saat)	Aktivite (Serum)		Aktivite (Karaciğer)	
		Ortalama±SD	p	Ortalama±SD	p
Gentamicin sülfat	Kontrol	214,91±4,43	-	22,513±6,211	-
	2	103,69±29,73	0,003	31,233±8,593	>0,05
	4	178,48±66,62	0,004	22,510±5,294	>0,05
	6	136,72±21,63	0,004	57,307±3,385	0,001
Sodyum ampisilin	Kontrol	214,91±4,43	-	22,513±6,211	-
	2	323,38±80,12	>0,05	38,477±6,180	0,034
	4	100,91±20,57	0,001	21,693±4,523	>0,05
	6	278,74±64,32	>0,05	19,440±7,119	>0,05
Sefazolin sodyum	Kontrol	214,91±4,43	-	22,513±6,211	-
	2	101,16±35,95	0,006	17,393±3,999	>0,05
	4	143,63±11,79	0,001	28,447±4,184	>0,05
	6	184,00±73,85	>0,05	93,53± 81,72	>0,05
Siprofloksasin	Kontrol	31,929±8,053	-	15,145±0,938	-
	2	20,06±12,36	>0,05	15,964±3,250	>0,05
	4	20,468±3,752	>0,05	11,871±1,545	0,035
	6	57,31±15,79	>0,05	19,444±3,900	>0,05
Kloramfenikol	Kontrol	31,929±8,053	-	15,145±0,938	-
	2	31,93± 8,05	>0,05	16,988±6,058	>0,05
	4	46,67±20,84	>0,05	10,438±3,249	0,048
	6	42,98±11,71	>0,05	10,438±2,676	0,045
Klaritromisin	Kontrol	31,929±8,053	-	15,145±0,938	-
	2	30,292±1,876	>0,05	13,918±3,382	>0,05
	4	32,748±2,836	>0,05	12,075±1,876	>0,05
	6	49,12±36,24	>0,05	8,391±8,391	0,013
Rifamisin SV	Kontrol	31,929±8,053	-	15,145±0,938	-
	2	41,75±17,06	>0,05	13,303±2,481	>0,05
	4	28,25±21,31	>0,05	9,619±1,876	0,010
	6	58,941±7,51	>0,05	15,145±1,545	>0,05
Klindamisin Fosfat	Kontrol	31,929±8,053	-	15,145±0,938	-
	2	38,070±8,856	>0,05	27,836±3,382	0,003
	4	37,455±7,816	>0,05	20,468±2,325	0,021
	6	24,151±8,359	>0,05	13,097±0,356	0,024

Serum PON Aktivitesi



Şekil 3.2. Antibiyotiklerin *in vivo* şartlarda serum paraoksonazının % aktivitesi üzerine etkisi

* İstatistik olarak anlamlı değerler ($p < 0,05$), K; kontrol grubu, 2, 4, 6; 2.saat, 4 saat ve 6 saat sonraki %aktiviteler



Şekil 3.3. Antibiyotiklerin *in vivo* şartlarda karaciğer paraoksonazının % aktivitesi üzerine etkisi

* İstatistik olarak anlamlı değerler ($p < 0.05$), K; kontrol grubu, 2, 4, 6; 2 saat, 4 saat, 4 saat sonraki %aktiviteler

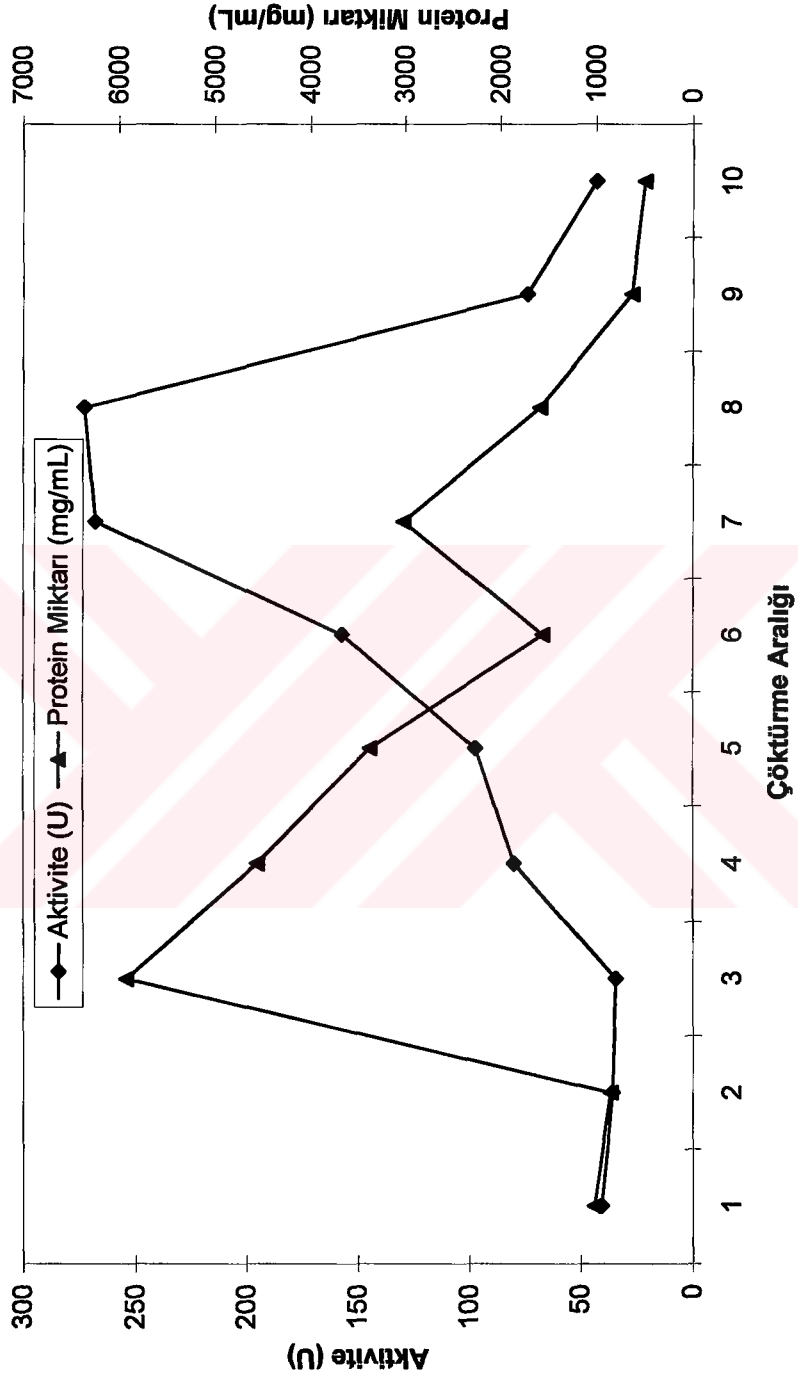
3.3. Enzimin Saflaştırılması

3.3.1. Amonyum sülfat Çöktürme Aralığının Belirlenmesi

Amonyum sülfat çöktürme aralığını belirlemek için; Çizelge 3.1'de verilen hacimlerdeki serum örneğine yine Çizelge 3.6'da verilen amonyum sülfat miktarları 0°C'de eklenmiştir. 30 dakika manyetik karıştırıcıda yavaşça karıştırılarak eklenen amonyum sülfatın çözünmesi sağlandı. Daha sonra 15000 rpm'de 4°C'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Çökelek çözülebilen minimum hacimde tamponla (100 mM Tris-Baz pH:8,00) çözülmüştür.

Çizelge 3.6. Amonyum sülfat çöktürme aralığının belirlenmesinde kullanılan çözeltiler ve hacimleri

Aralık Değeri	Çöktürme Aralığı	Hacim (mL)	Kullanılan Amonyum sülfat miktarı (g)	Protein Miktarı (mg/mL)	Aktivite (U)
1	0-10	50	2,57	1020,00	40,53
2	10-20	50	2,64	855,71	35,61
3	20-30	48	2,62	5927,14	34,38
4	30-40	47	2,65	4555,71	79,82
5	40-50	45	2,62	3370,00	97,02
6	50-60	45	2,71	1555,70	157,19
7	60-70	43	2,68	3020,00	267,72
8	70-80	41	2,65	1584,28	272,63
9	80-90	40	2,68	634,20	73,68
10	90-100	38	2,65	498,57	42,98

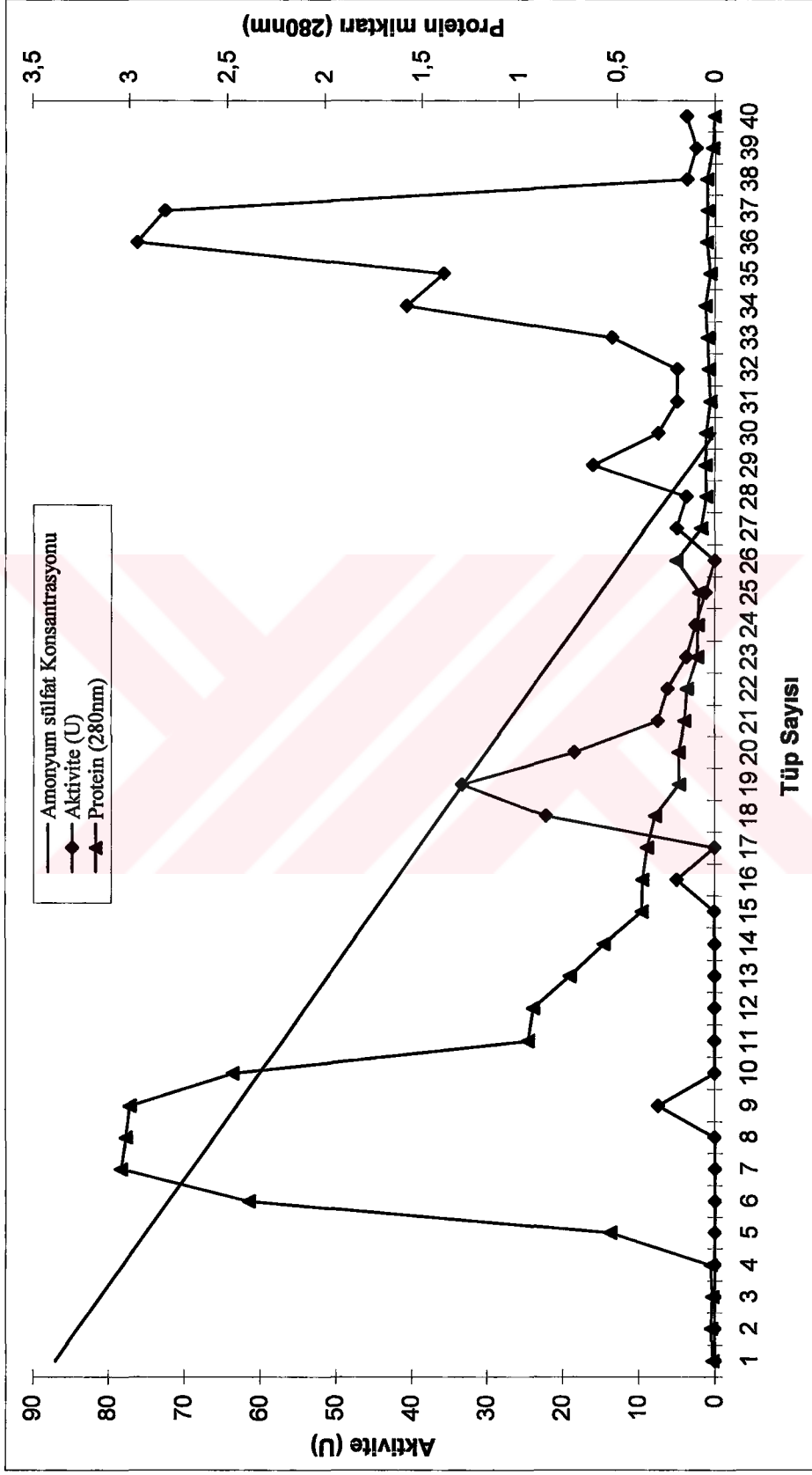


Şekil 3.4 Amonyum sülfat çöktürmesinde çöken kısımların aktivite ve protein miktarları.

Şekil 3.4.'de görüldüğü gibi amonyum sülfat çöktürme aralığı 60-80 aralığı olarak belirlenmiştir.

3.3.2. Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile enzimin saflaştırılması

Bölüm 2.2.3.3.1'de belirtildiği şekilde hazırlanan hidrofobik etkileşim kolonu önce 1M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içeren 0,1 M Tris-HCl pH:8,0 tamponu ile dengelendi. Kolonun dengeleme işlemi bittikten sonra, jel üzerindeki tampon çözeltisi jel seviyesine kadar indirildi. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen serum enzim çözeltisi 1 M amonyum sülfat doygunluğuna getirildikten sonra kolona tatbik edildi. Kolona 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içeren 0,1 M Tris-HCl pH:8,0 tamponu ve 0,1 M Tris-HCl pH:8,0 tamponu ile oluşturulan yüksek tuz konsantrasyonundan düşük tuz konsantrasyonuna doğru tuz gradienti uygulandı. Alttan gelen yıkama ve elüsyon çözeltisi 1,5 mL halinde tüplere toplandı. Yıkama ve elüsyon işlemi 280 nm'deki absorbans sıfır oluncaya kadar devam edildi. 0,1 M Tris-HCl pH:8,0 tamponu kör olarak kullanılarak her bir tüpte 280 nm'de kalitatif protein tayini ve 412 nm'de aktivite tayini yapıldı. Elde edilen değerlerin tüp numarasına karşı aktivite ve protein miktarı grafiği çizildi (Şekil 3.5). Hidrofobik etkileşim kromatografisi sonunda enzim aktivitesine rastlanan tüpler birleştirildi. Kolona tatbik edilen numune ve birleştirilen elüat çözeltileri için Bradford metoduyla kantitatif protein ve aktivite tayinleri yapılarak spesifik aktiviteler ve saflaştırma oranları tespit edildi. Sonuçlar çizelge 3.7'de verildi.



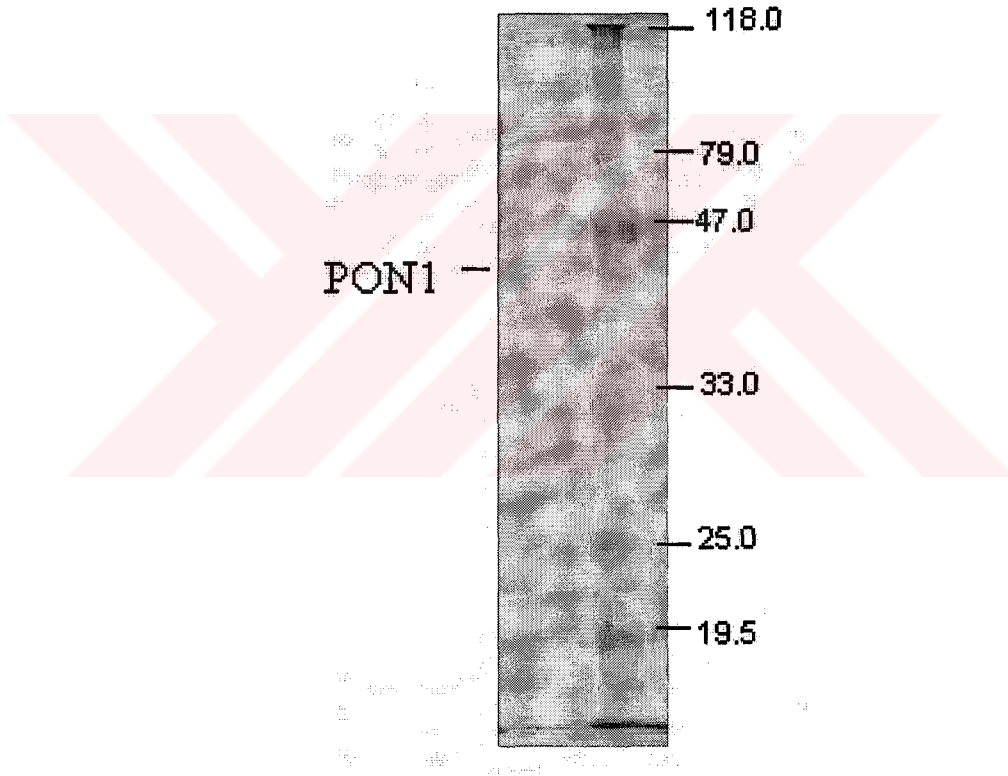
Şekil 3.5. Hidrofobik etkileşim kolonundan PON1 enziminin elüsyon grafiği (kolondaki jel yüksekliği 5 cm ve çap 1 cm)

Çizelge 3.7. Saflaştırma tablosu

Basamak	Haci m (ml)	Aktivite (U/ml)	Toplam Aktivite (U/ml)	Protein Miktarı (mg/ml)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	% Verim	Saflaştırma Derecesi
Serum	11	42,98	472,28	225,57	2481,27	0.190	100	-
Amonyum Sülfat Çöktürmesi	15	29,47	442,05	130,64	1959,6	0.225	93,59	1,18
Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi	4.5	76,14	342,63	1,490	6,705	51.1	72,54	227

3.3.3. Serum Paraoksonaz Enziminin SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi

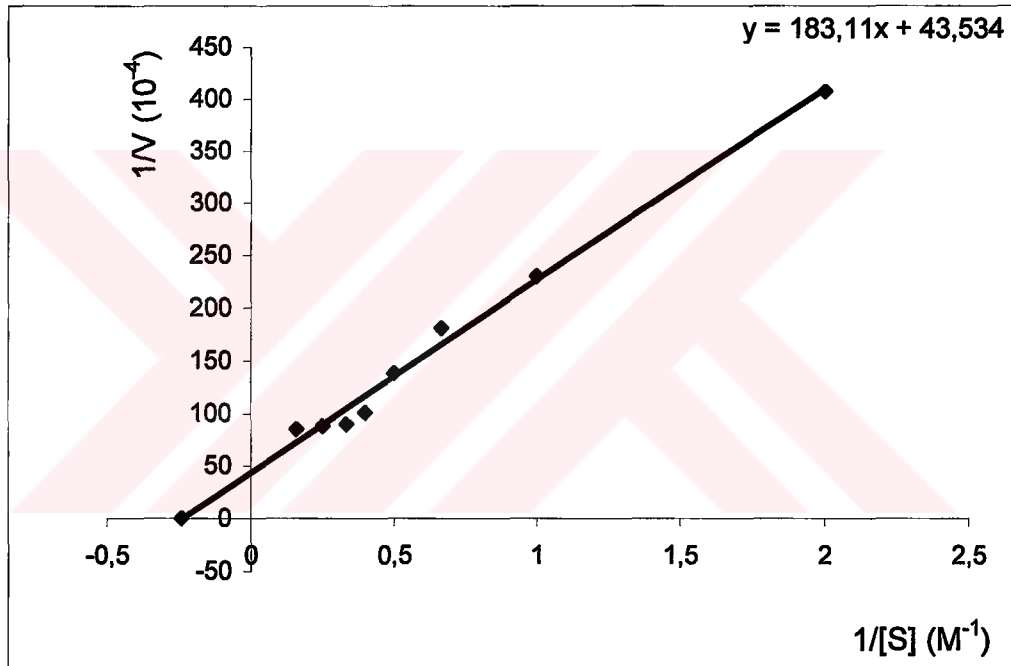
Hidrofobik etkileşim kolonundan saflaştırılan serum paraoksonaz enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla bölüm 2.2.3.4’de anlatıldığı şekilde hazırlanan SDS poliakrilamid jel elektroforezine serumdan saflaştırılan paraoksonaz enzim numunesi tatbik edildi. Protein bantları içeren jellerin görüntüleri jel görüntüleme sistemi ile bilgisayara aktarıldı (Şekil 3.6).



Şekil 3.6 Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılan paraoksonaz enziminin SDS-polakrilamid jel elektroforezi. Molekül ağırlık standartları; (β -galaktosidaz (118.0kDa), sığır serum albumin (79.0kDa), yumurta albumini (47.0 kDa), karbonik anhidraz (33.0 kDa), β -laktoglobulin (25.0kDa) ve Lizozim (19.5 kDa)

3.4 Optimum şartlarda K_M ve V_{max} Değerlerinin Bulunması

K_M ve V_{max} değerlerinin bulunması amacıyla, optimum şartlarda paraokson substratının değişen konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ölçümleri yapıldı. Her ölçüm iki defa yapılarak bulunan değerlerin ortalaması alındı. 412 nm'de ölçülen aktivite değerleri reaksiyon hızı (U/ml dakika) olarak alındı. $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri bulunarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi (Şekil 3.7). Grafikten yararlanarak K_M değeri 4,16 mM ve V_{max} değeri 227,27 U/ml dakika olarak bulundu.



Şekil 3.7. Saflaştırılmış insan serum paraoksonaz enziminin paraokson substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.

Çizelge 3.8. İnsan serum paraoksonaz enziminin paraokson substratı kullanılarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$.

100mM Tris tamponu (µl)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µl)	Substrat çözeltisinin hacmi (µl)	Küvetteki toplam hacim (µl)	Küvetteki Substrat Kons [S] (mM)	ΔOD (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
975	25			0,5	0,020	24,561	407	2
950	50			1	0,035	42,982	230	1
925	75			1,5	0,045	55,26	181	0,66
900	100			2	0,059	72,456	138	0,5
875	50	125	1050	2,5	0,080	98,245	101	0,4
850		150		3	0,090	110,526	90	0,33
800		200		4	0,092	112,982	88	0,25
700		300		6	0,095	116,666	85	0,16

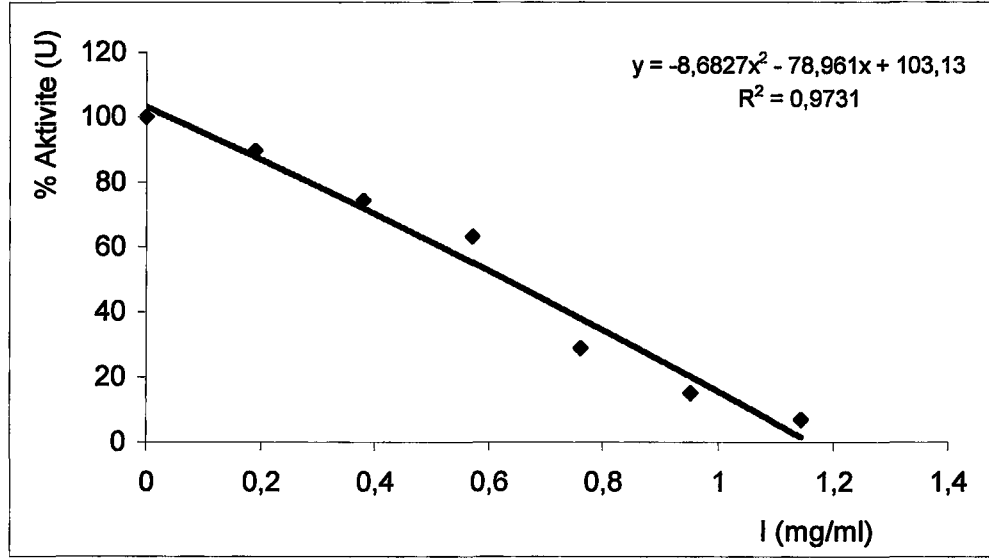
3.5. İnhibisyona Sebep Olan Antibiyotiklerin I_{50} ve K_i Değerlerinin Bulunması

Çalışmamızda kullandığımız antibiyotiklerin I_{50} değerlerini bulmak için, optimum şartlarda paraokson substratının 2 mM sabit konsantrasyonunda çalışıldı. Substrat çözeltisi her ölçümde 0,1ml paraokson alındı ve antibiyotik çözeltilerinden ise değişik hacimlerde alınarak toplam 1,05mL'lik bir reaksiyon hacmi oluşturuldu. Önce antibiyotiksiz ortamda enzim aktivitesi bulundu. Bu değer %100 aktivite olarak kullanıldı. Daha sonra optimum pH ve sıcaklıkta 0,05 mL enzim çözeltisi alınıp daha önceden hazırlanmış olan 1 mL tampon+substrat +antibiyotik çözeltisine çabuk bir şekilde eklendikten sonra 412 nm'de bir dakikada absorbansta meydana gelen değişme okundu. Elde edilen absorban değerlerinden % aktivite hesaplandı. % Aktivite-[I] grafikleri çizildi. (Şekil 3.8-3.15). Bu grafiklerden yararlanarak her bir antibiyotik için I_{50} değerleri hesaplandı.

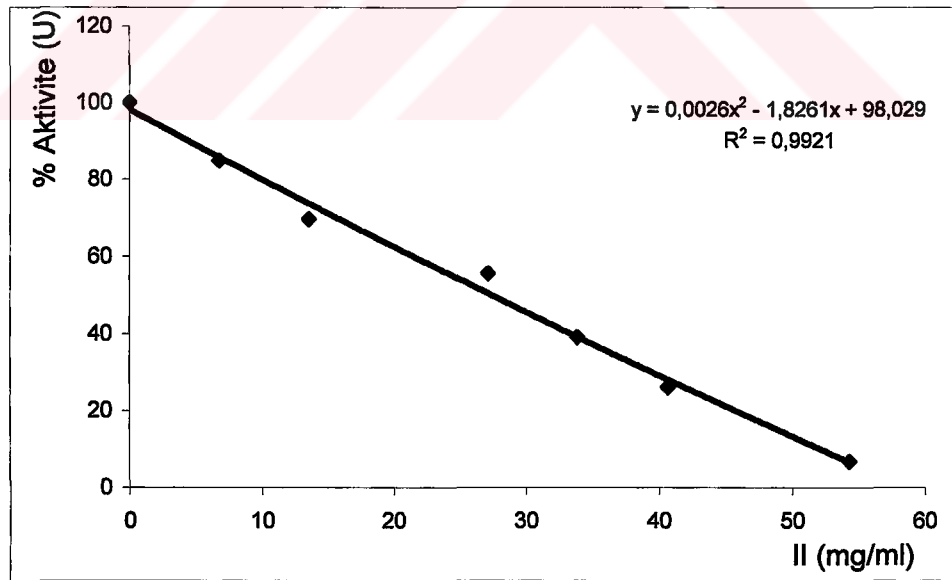
Farklı antibiyotiklerin K_i sabitlerinin bulunması amacıyla, önce antibiyotiksiz ortamda, optimum şartlarda, 5-8 farklı paraokson substrat konsantrasyonuna bağlı olarak aktivite bulundu. Daha sonra her bir antibiyotik için 2 değişik sabit antibiyotik konsantrasyonunda, standart aktivite ölçüm koşullarında, paraokson substratı kullanılarak aktivite belirlendi. $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri hesaplanarak, Lineweaver–Burk grafikleri çizildi (Şekil 3.16, 3.17, 3.18, 3.19, 3.20, 3.21, 3.22). Bu grafiklerden yararlanarak K_i değerleri ve inhibisyon türleri tespit edildi. K_i değerleri bölüm 2.2.8'de anlatıldığı gibi bulundu.

Çizelge 3.9. Serum PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren gentamisin sülfat ve sodyum ampisilin'in I_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

100mM Tris tamponu (μ l)	Antibiyotik	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Substrat çözeltisinin hacmi (μ l)	Antibiyotik Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Küvetteki Antibiyotik Kons. [I] (mg/ml)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite
900	Gentamisin sülfat	50	100	-	-	0,087	106,84	100
875				25	0,19	0,078	95,789	89,65
850				50	0,38	0,064	79,210	74,139
825				75	0,571	0,055	67,543	63,210
800				100	0,762	0,025	30,701	28,73
775				125	0,952	0,013	15,96	14,93
750				150	1,142	0,006	7,368	6,896
900	Sodyum ampisilin	50	100	-	-	0,092	112,98	100
875				25	3,392	0,078	95,789	84,78
850				50	6,785	0,064	78,596	69,56
800				100	13,571	0,051	62,631	55,435
775				150	20,357	0,036	44,210	39,13
750				175	23,75	0,024	29,473	26,086
700				200	27,142	0,006	7,368	6,52



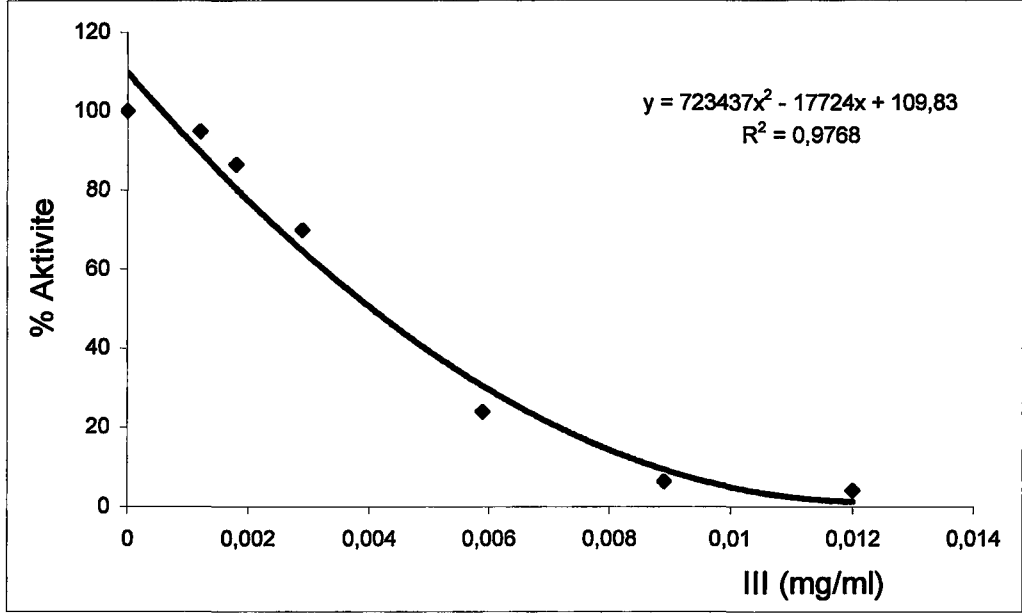
Şekil 3.8. Saflaştırılmış insan serum paraoksonaz enzimi üzerine 2mM paraokson substratı konsantrasyonunda gentamisin sülfat için % aktivite-[I] grafiği



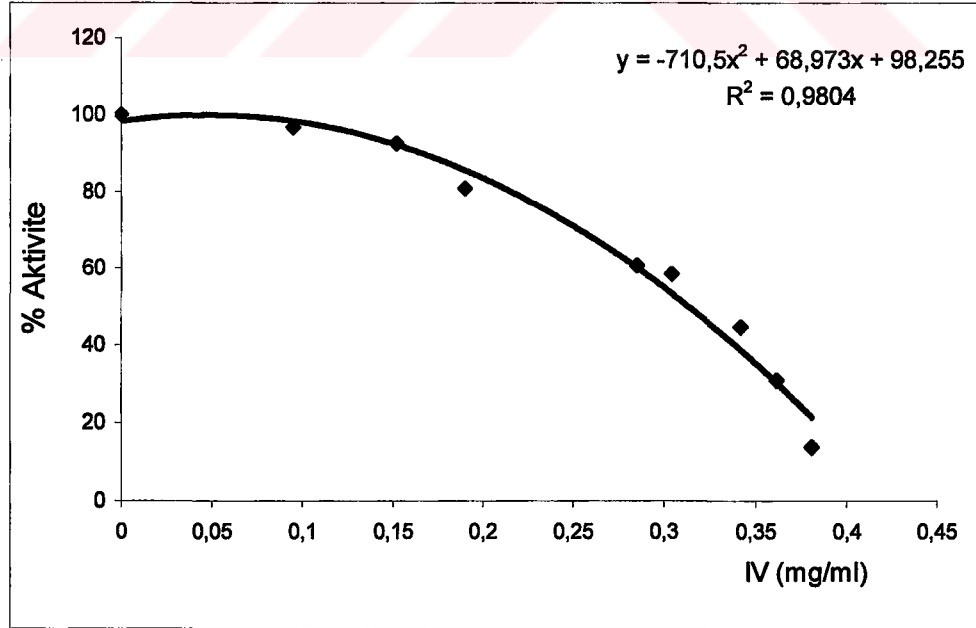
Şekil 3.9. Saflaştırılmış insan serum paraoksonaz enzimi üzerine 2mM paraokson substratı konsantrasyonunda sodyum ampisillin için % aktivite-[I] grafiği

Çizelge 3.10. Serum PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren sefazolin sodyum ve siprofloksasin'in Iso değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

100mM Tris tamponu (µl)	Antibiyotik	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µl)	Substrat çözeltisinin hacmi (µl)	Antibiyotik Çözeltisinin Hacmi (µl)	Küvetteki Antibiyotik Kons. [U] (mg/ml)	AA (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite
900				-	-	0,096	117,89	100
890				10	0,0012	0,091	111,75	94,79
885				15	0,0018	0,083	101,93	86,46
875	Sefazolin Sodyum	50	100	25	0,0029	0,067	82,28	69,79
850				50	0,0059	0,023	28,24	23,95
825				75	0,0089	0,06	7,368	6,25
800				100	0,012	0,04	4,912	4,116
900				-	-	0,094	115,44	100
850				50	0,095	0,091	111,75	96,8
820				80	0,152	0,087	106,84	92,55
800				100	0,190	0,076	93,33	79,78
750	Siprofloksasin	50	100	150	0,285	0,057	69,99	60,63
740				160	0,304	0,055	67,54	58,51
720				180	0,342	0,042	51,58	44,68
710				190	0,362	0,029	35,61	30,85
700				200	0,381	0,013	15,964	13,829



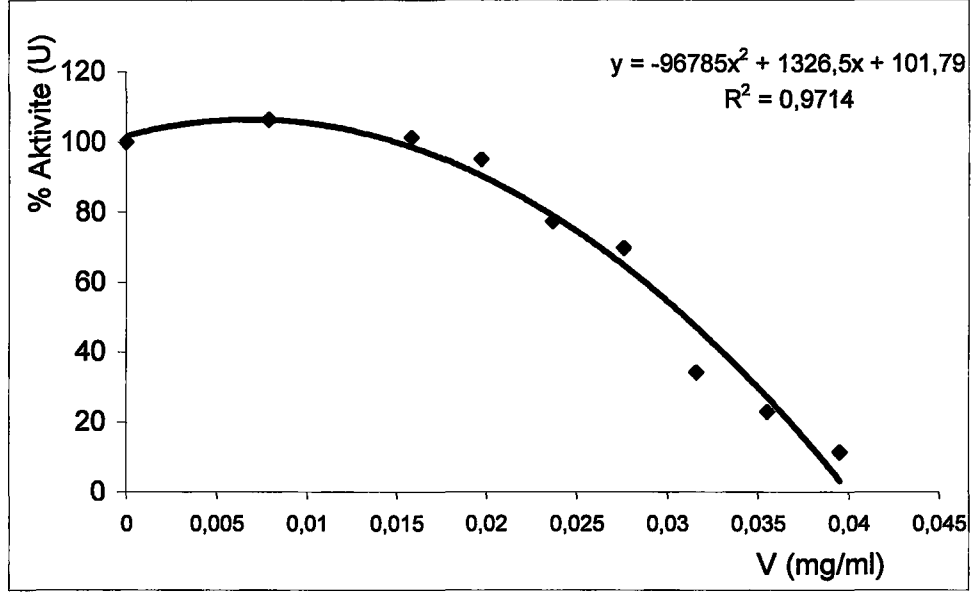
Şekil 3.10. Saflaştırılmış insan serum paraoksonaz enzimi üzerine 2mM paraokson substratı konsantrasyonunda sefazolin sodyum için % aktivite-[I] grafiği



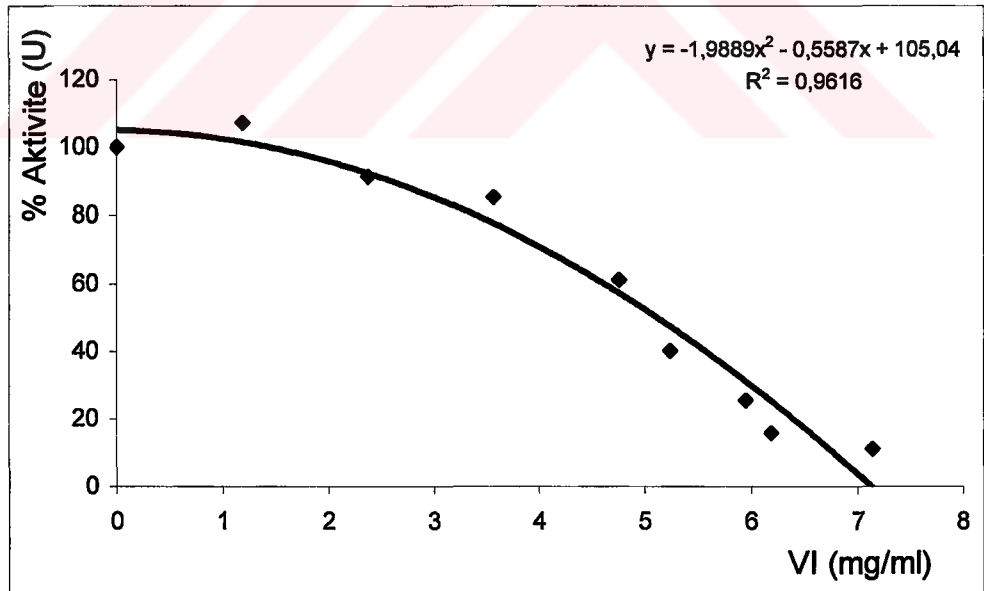
Şekil 3.11. Saflaştırılmış insan serum paraoksonaz enzimi üzerine 2mM paraokson substratı konsantrasyonunda siprofloksasin için % aktivite-[I] grafiği

Çizelge 3.11. Serum PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren kloramfenikol ve klaritromisin'in I₅₀ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

100mM Tris tamponu (µl)	Antibiyotik	Enzim Çözeltisini n Hacmi (µl)	Substrat çözeltisinin hacmi (µl)	Antibiyotik Çözeltisinin Hacmi (µl)	Küvetteki Antibiyotik Kons. [I] (mg/ml)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite
900				-	-	0,079	97,017	100
850				50	0,0079	0,084	103,157	106,33
825				75	0,0118	0,092	112,98	116,45
800				100	0,0158	0,080	98,24	101,26
875			100	125	0,0197	0,075	92,10	94,93
750				150	0,0237	0,061	74,91	77,21
725				175	0,0276	0,055	67,54	69,62
700				200	0,0316	0,027	33,15	34,17
675				225	0,0355	0,018	22,10	22,78
900				-	-	0,082	100,70	100
875				25	1,19	0,088	108,07	197,31
850				50	2,38	0,075	92,105	91,46
825				75	3,57	0,070	85,964	85,36
800			100	100	4,76	0,050	61,40	60,97
790				110	5,23	0,033	40,52	40,24
775				125	5,95	0,021	25,78	25,60
770				130	6,19	0,013	15,96	15,85
750				150	7,14	0,009	11,05	10,97
	Kloramfenikol	50	100					
	Klaritromisin	50	100					



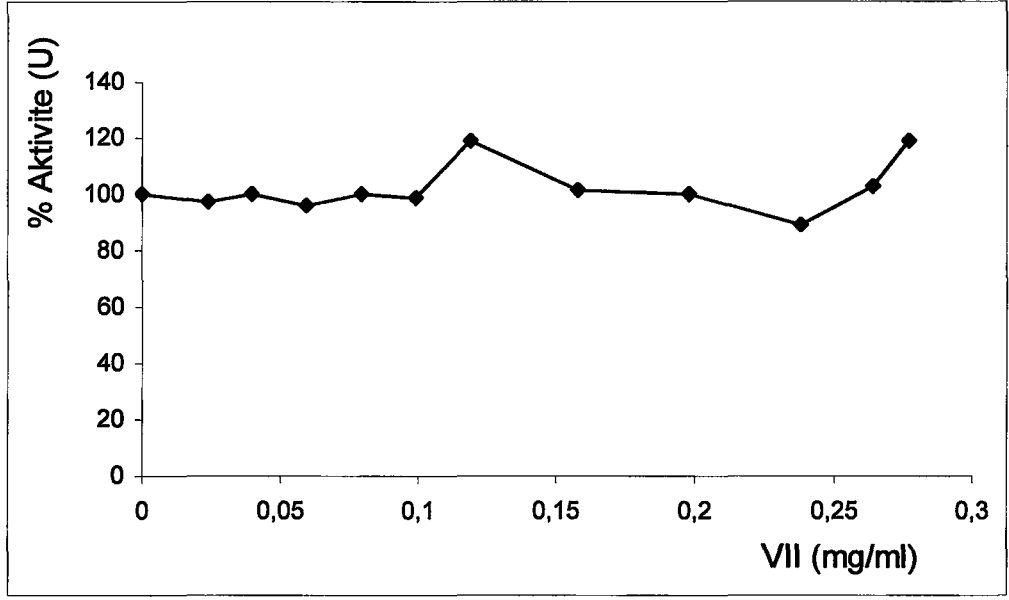
Şekil 3.12. Saflaştırılmış insan serum paraoksonaz enzimi üzerine 2mM paraokson substratı konsantrasyonunda kloramfenikol için % aktivite-[I] grafiği



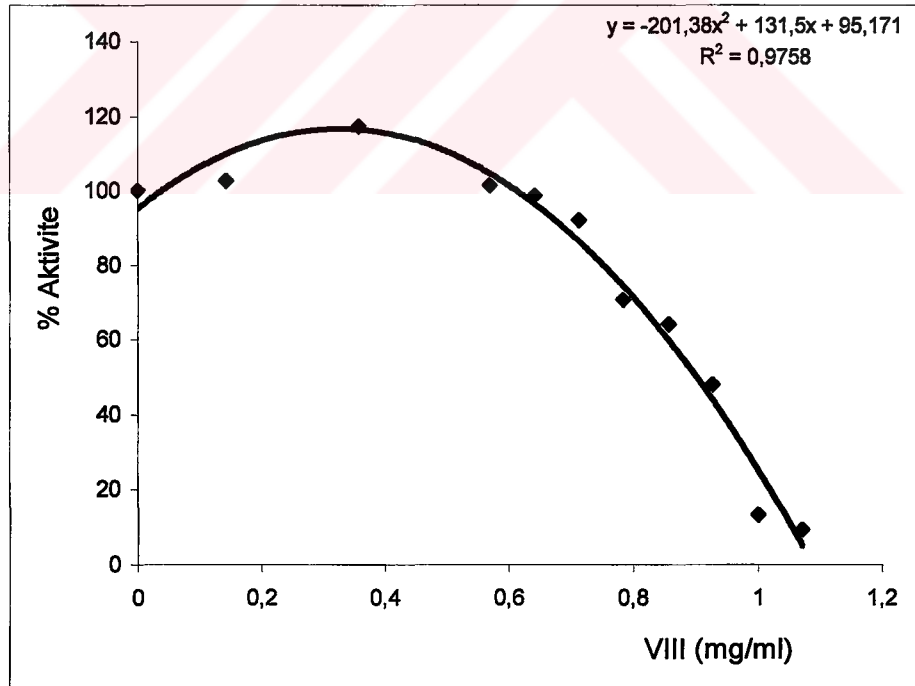
Şekil 3.13. Saflaştırılmış insan serum paraoksonaz enzimi üzerine 2mM paraokson substratı konsantrasyonunda klaritromisin için % aktivite-[I] grafiği

Çizelge 3.12. Serum PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren klindamisin fosfat ve göstermeyen rifamisin SV'nin I₅₀ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

100mM Tris tamponu (µl)	Antibiyotik	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µl)	Substrat çözeltisinin hacmi (µl)	Antibiyotik Çözeltisinin Hacmi (µl)	Küvetteki Antibiyotik Kons. [I] (mg/ml)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite
900				-	-	0,074	90,87	100
890				10	0,0239	0,072	88,42	97,29
880				20	0,0396	0,074	90,87	100
875	Rifamisin	50	100	25	0,0595	0,071	87,19	95,94
870				30	0,0793	0,074	90,87	100
860	SV			40	0,0991	0,073	77,36	98,64
850				50	0,119	0,088	108,07	118,91
840				60	0,158	0,075	92,10	101,35
830				70	0,198	0,074	90,87	100
900				-	-	0,075	92,10	102,66
880				20	0,143	0,077	94,56	117,33
850				50	0,357	0,088	108,07	124,00
825				75	0,536	0,093	114,21	101,33
820	Klindamisin			80	0,571	0,076	93,33	98,66
810		50	100	90	0,643	0,074	90,87	92,00
800	Fosfat			100	0,714	0,069	84,73	70,66
790				110	0,785	0,053	65,08	64,00
780				120	0,857	0,048	58,94	48,00
770				130	0,928	0,036	44,21	13,33
760				140	1,00	0,010	12,28	9,33



Şekil 3.14. Saflaştırılmış insan serum paraoksonaz enzimi üzerine 2mM paraokson substratı konsantrasyonunda rifamisin SV için % aktivite-[I] grafiği



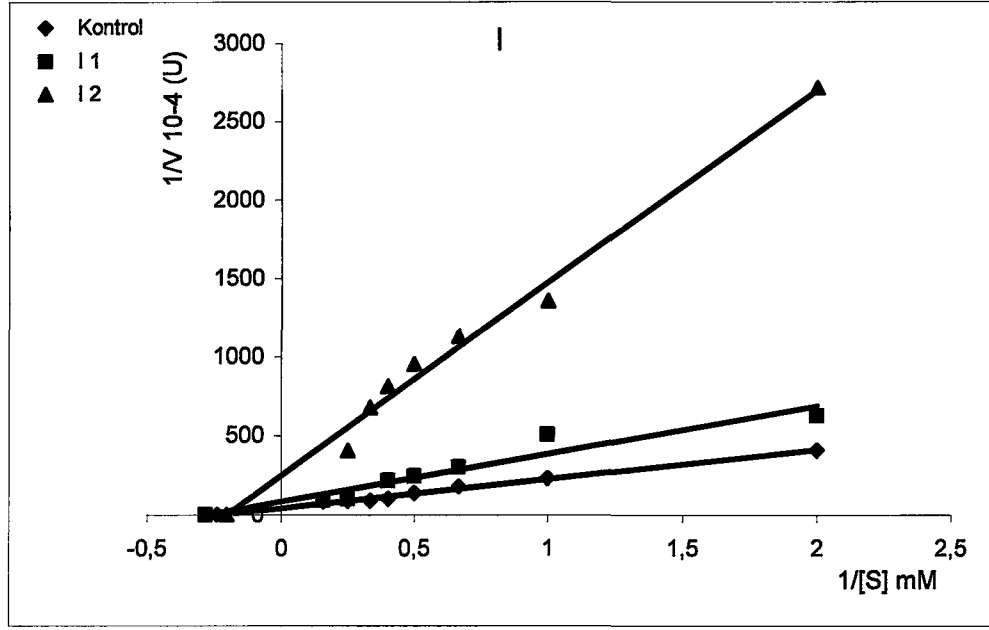
Şekil 3.15. Saflaştırılmış insan serum paraoksonaz enzimi üzerine 2mM paraokson substratı konsantrasyonunda klindamisin fosfat için % aktivite-[I] grafiği

Çizelge 3.13. Serum PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren gentamisin sülfat'ın K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

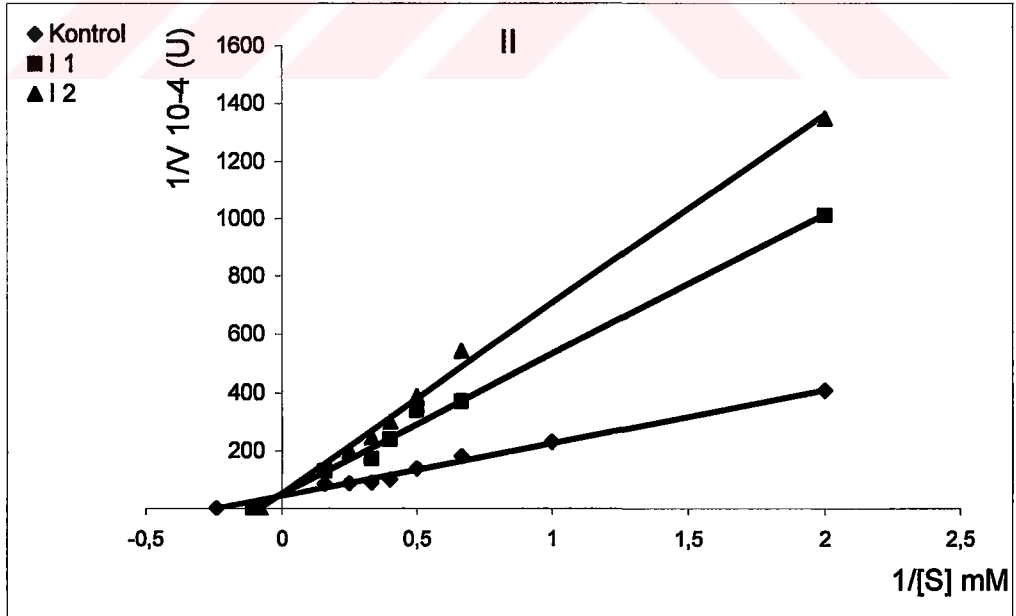
100mM Tris tamponu (μ l)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Substrat çözeltisinin hacmi (μ l)	Antibiyotik Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Küvetteki Toplam Hacim (μ l)	Küvetteki Substrat Kons. [S] (mM)	Küvetteki Antibiyotik Kons. [I] (mg/ml)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
950		25	25		0,5	0,190	0,013	15,97	626	2
925		50	25		1,0	0,190	0,016	19,65	508	1
900		75	25		1,5	0,190	0,027	33,15	301	0,66
850		125	25		2,5	0,190	0,038	46,66	214	0,4
775		200	25		4,0	0,190	0,079	97,01	103	0,25
725		250	25		5,0	0,190	0,085	104,38	95	0,2
875	50	25	100	1050	0,5	0,762	0,003	3,68	2714	2
850		50	100		1,0	0,762	0,006	7,37	1357	1
825		75	100		1,5	0,762	0,007	8,59	1130	0,66
800		100	100		2,0	0,762	0,009	11,05	958	0,5
775		125	100		2,5	0,762	0,010	12,28	814	0,4
750		150	100		3,0	0,762	0,012	14,73	678	0,33
700		200	100		4,0	0,762	0,020	24,56	407	0,25

Çizelge 3.14. Serum PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren sodyum ampisilin'in K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

100mM Tris tamponu (μ l)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Substrat çözeltisinin hacmi (μ l)	Antibiyotik Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Küvetteki Toplam Hacim (μ l)	Küvetteki Substrat Kons. [S] (mM)	Küvetteki Antibiyotik Kons. [I] (mg/ml)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
900		25	75		0,5	0,0101	0,008	9,90	1010	2
850		75	75		1,5	0,0101	0,022	27,02	370	0.66
825		100	75		2,0	0,0101	0,024	29,49	339	0.5
800		125	75		2,5	0,0101	0,034	41,84	239	0.4
775		150	75		3,0	0,0101	0,047	57,80	173	0.33
625	50	300	75	1050	6,25	0,0101	0,063	77,52	129	0.16
875		25	100		0,5	0,0135	0,006	7,40	1350	2
825		75	100		1,5	0,0135	0,015	18,45	542	0.66
800		100	100		2,0	0,0135	0,021	25,84	387	0.5
775		125	100		2,5	0,0135	0,027	33,22	301	0.4
750		150	100		3,0	0,0135	0,033	40,65	246	0.33
700		200	100		4,0	0,0135	0,040	50,0	200	0.25



Şekil 3.16. Safılaştırılmış insan serum paraoksonaz enzimi aktivitesi üzerine gentamisin sülfatın inhibisyon etkisi $[I_1]=0.190\text{mg/ml}$, $[I_2]=0.762\text{mg/ml}$



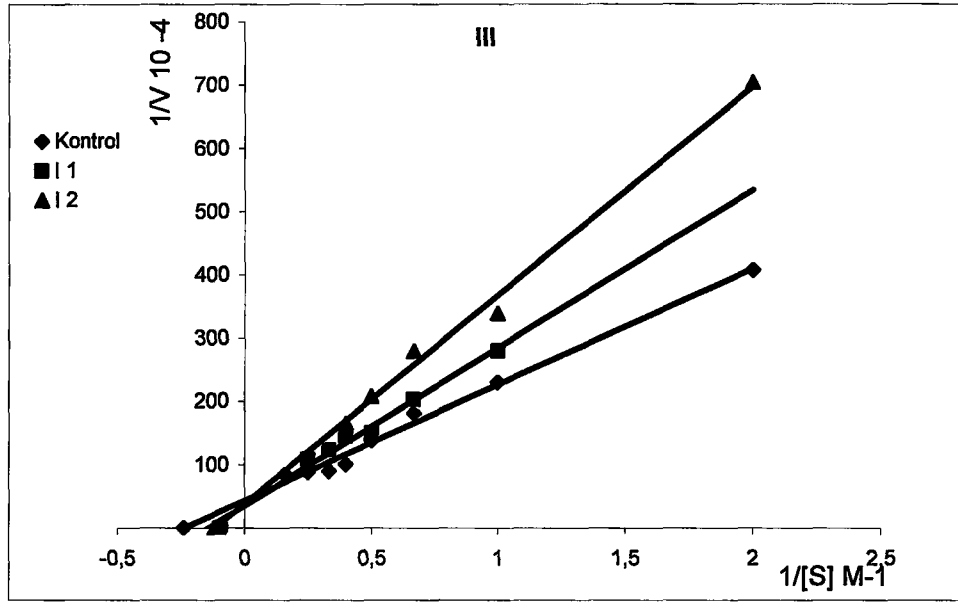
Şekil 3.17. Safılaştırılmış insan serum paraoksonaz enzimi aktivitesi üzerine sodyum ampisillinin inhibisyon etkisi $[I_1]=0.0101\text{mg/ml}$, $[I_2]=0.0135\text{mg/ml}$

Çizelge 3.15. Serum PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren sefazolin sodyum'un K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

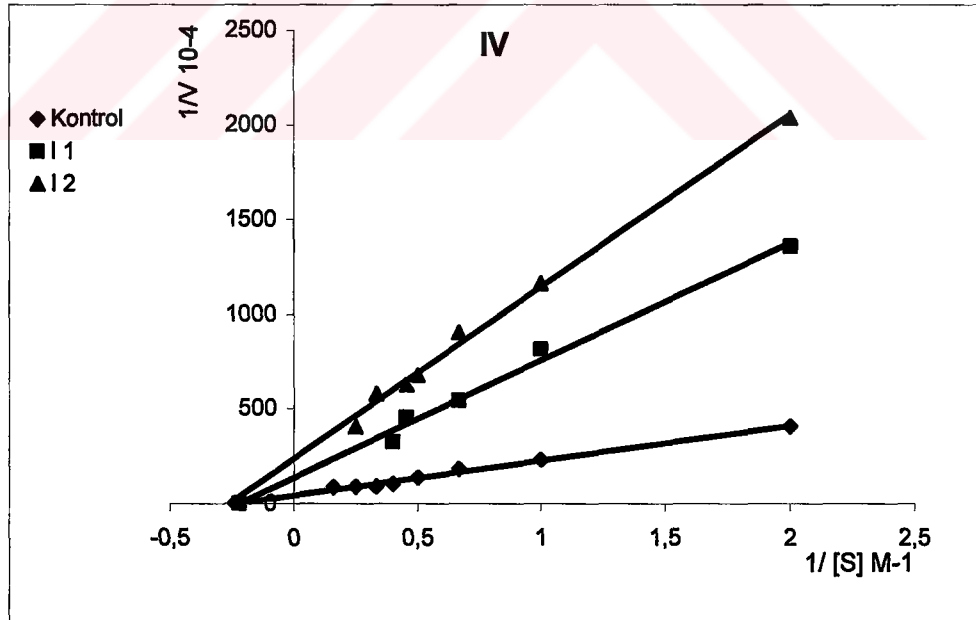
100mM Tris tamponu (μ l)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Substrat çözeltisinin hacmi (μ l)	Antibiyotik Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Küvetteki Toplam Hacim (μ l)	Küvetteki Substrat Kons. [S] (mM)	Küvetteki Antibiyotik Kons. [I] (mg/ml)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
875	50	50	75	1050	1,0	0,0089	0,029	35,71	280	1
850		75	75		1,5	0,0089	0,040	49,26	203	0.66
825		100	75		2,0	0,0089	0,054	66,66	150	0.5
800		125	75		2,5	0,0089	0,056	68,96	145	0.4
775		150	75		3,0	0,0089	0,066	81,30	123	0.33
725		200	75		4,0	0,0089	0,075	92,59	108	0.25
875		25	100		0,5	0,012	0,011	14,20	704	2
850		50	100		1,0	0,012	0,024	29,49	339	1
825		75	100		1,5	0,012	0,029	35,71	280	0.66
800		100	100		2,0	0,012	0,039	48,07	208	0.5
775	125	100	2,5	0,012	0,049	60,24	166	0.4		

Çizelge 3.16. Serum PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren siprofloksasin'in K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

100mM Tris tamponu (μ l)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Substrat çözeltisinin hacmi (μ l)	Antibiyotik Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Küvetteki Toplam Hacim (μ l)	Küvetteki Substrat Kons. [S] (mM)	Küvetteki Antibiyotik Kons. [I] (mg/ml)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
875		25	100		0,5	0,190	0,006	7,37	1357	2.0
850		50	100		1,0	0,190	0,010	12,28	814	1.0
825		75	100		1,5	0,190	0,015	18,45	542	0.66
790		110	100		2,2	0,190	0,018	22,12	452	0.454
775		125	100		2,5	0,190	0,025	30,77	325	0.4
775	50	25	200	1050	0,5	0,381	0,004	4,91	2035	2.0
750		50	200		1,0	0,381	0,007	8,59	1163	1.0
725		75	200		1,5	0,381	0,009	11,06	904	0.66
700		100	200		2,0	0,381	0,012	14,75	678	0.5
690		110	200		2,2	0,381	0,013	15,97	626	0.454
650		150	200		3,0	0,381	0,014	17,21	581	0.33
600		200	200		4,0	0,381	0,020	24,57	407	0.25



Şekil 3.18. Safılaştırılmış insan serum paraoksonaz enzimi aktivitesi üzerine sefazolin sodiyumun inhibisyon etkisi $[I_1]=0.0089\text{mg/ml}$, $[I_2]=0.012\text{mg/ml}$



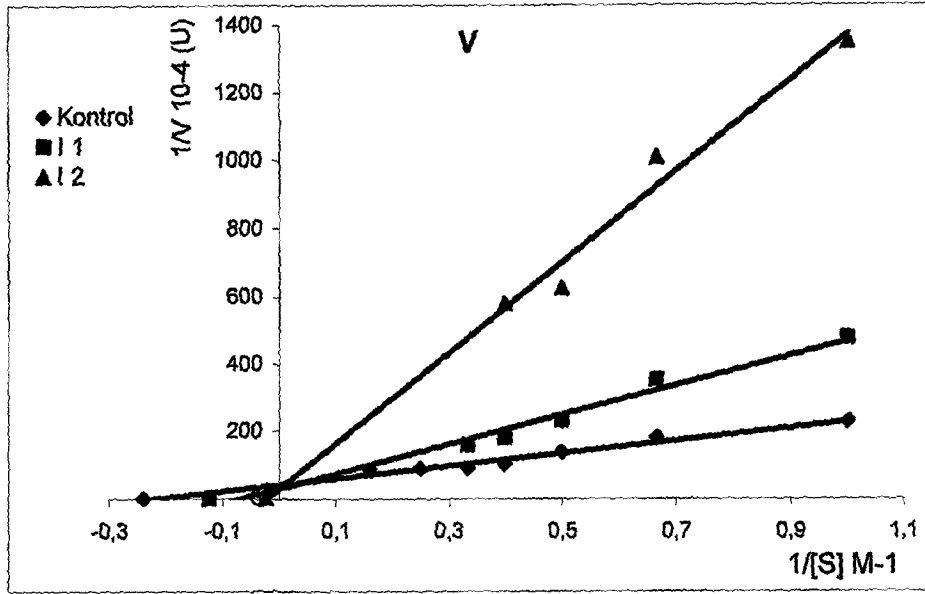
Şekil 3.19. Safılaştırılmış insan serum paraoksonaz enzimi aktivitesi üzerine siprofloksasinin inhibisyon etkisi $[I_1]=0.190\text{mg/ml}$, $[I_2]=0.381\text{mg/ml}$

Çizelge 3.17. Serum PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren kloramfenikol'ün K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

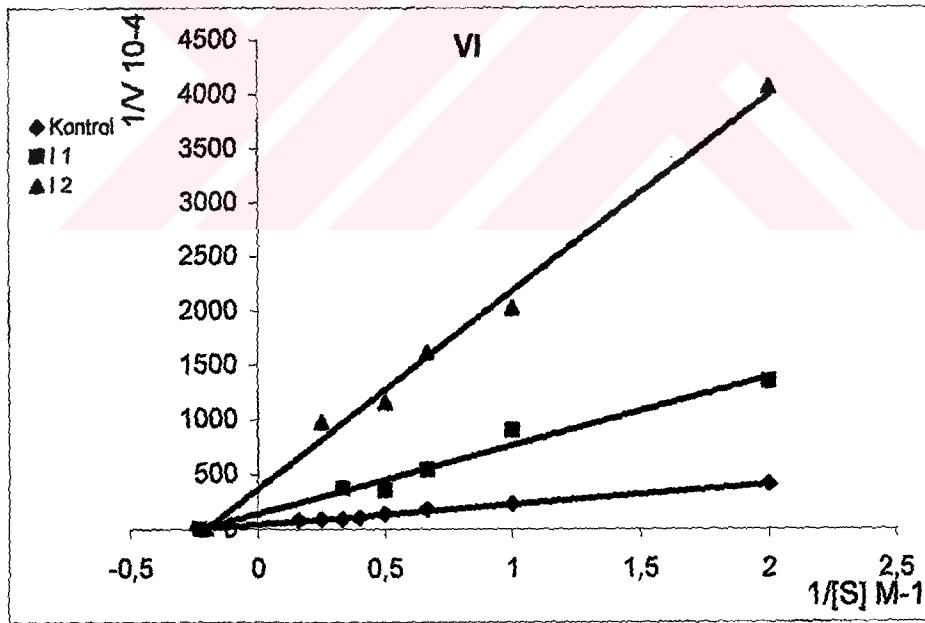
100mM Tris tamponu (μ l)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Substrat çözeltisinin hacmi (μ l)	Antibiyotik Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Küvetteki Toplam Hacim (μ l)	Küvetteki Substrat Kons. [S] (mM)	Küvetteki Antibiyotik Kons. [I] (mg/ml)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
800	50	50	150	1050	1,0	0,0237	0,017	20,92	478	1,0
775		75	150		1,5	0,0237	0,023	28,25	354	0,66
750		100	150		2,0	0,0237	0,035	43,10	232	0,5
725		125	150		2,5	0,0237	0,045	55,55	180	0,4
700		150	150		3,0	0,0237	0,051	62,89	159	0,33
750		50	200		1,0	0,0316	0,006	7,41	1350	1,0
725		75	200		1,5	0,0316	0,008	9,9	1010	0,66
700		100	200		2,0	0,0316	0,013	15,97	626	0,5
675		125	200		2,5	0,0316	0,014	17,21	581	0,4

Çizelge 3.18. Serum PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren klaritromisin'in K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

100mM Tris tamponu (μ l)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Substrat çözeltisinin hacmi (μ l)	Antibiyotik Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Küvetteki Toplam Hacim (μ l)	Küvetteki Substrat Kons. [S] (mM)	Küvetteki Antibiyotik Kons. [I] (mg/ml)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
875	50	25	100	1050	0,5	4,761	0,006	7,40	1350	2.0
850		50	100		1,0	4,761	0,009	11,06	904	1.0
825		75	100		1,5	4,761	0,015	18,45	542	0.66
790		110	100		2,2	4,761	0,023	28,25	354	0.5
775		125	100		2,5	4,761	0,022	27,02	370	0.33
845		25	130		0,5	6,19	0,002	2,45	4070	2.0
820		50	130		1,0	6,19	0,004	4,92	2030	1.0
795		75	130		1,5	6,19	0,005	6,17	1620	0.66
770		100	130		2,0	6,19	0,007	8,62	1160	0.5
760		110	130		2,2	6,19	0,009	10,19	981	0.25



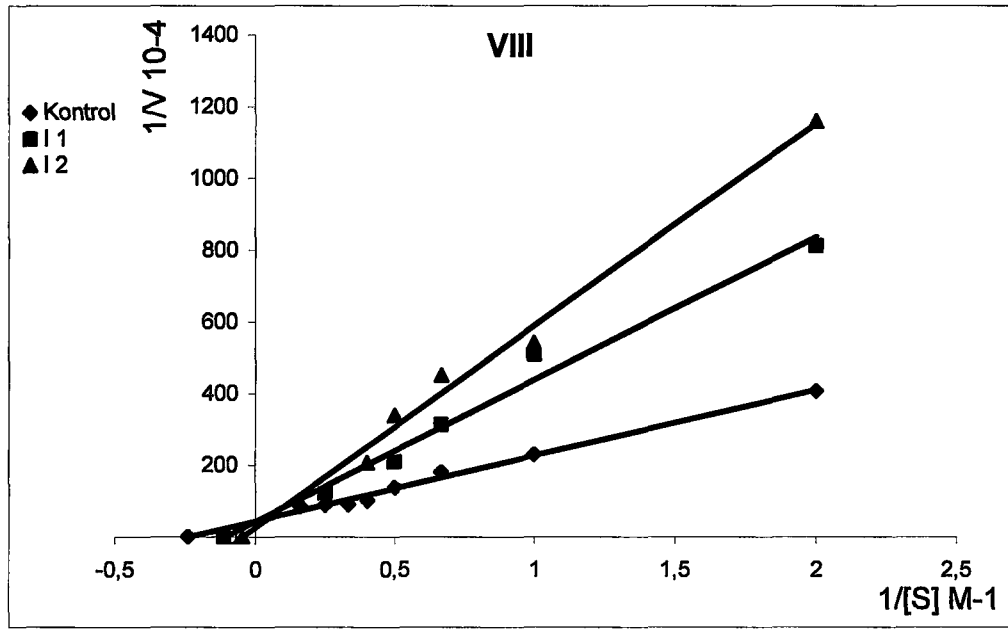
Şekil 3.20. Saflaştırılmış insan serum paraoksonaz enzimi aktivitesi üzerine kloramfenikolün inhibisyon etkisi $[I_1]=0.0237\text{mg/ml}$, $[I_2]=0.0316\text{mg/ml}$



Şekil 3.21. Saflaştırılmış insan serum paraoksonaz enzimi aktivitesi üzerine klaritromisinin inhibisyon etkisi $[I_1]=4.761\text{mg/ml}$, $[I_2]=6.19\text{mg/ml}$

Çizelge 3.19. Serum PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren klindamisin fosfat'ın K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

100mM Tris tamponu (µl)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µl)	Substrat çözeltisinin hacmi (µl)	Antibiyotik Çözeltisinin Hacmi (µl)	Küvetteki Toplam Hacim (µl)	Küvetteki Substrat Kons. [S] (mM)	Küvetteki Antibiyotik Kons. [I] (mg/ml)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
925	50	25	50	1050	0,5	0,0476	0,010	12,34	810	2.0
900		50	50		1,0	0,0476	0,016	19,68	508	1.0
875		75	50		1,5	0,0476	0,026	31,94	313	0.66
850		100	50		2,0	0,0476	0,039	48,07	208	0.5
750		200	50		4,0	0,0476	0,067	82,64	121	0.25
875		25	100		0,5	0,0952	0,007	8,62	1160	2.0
850		50	100		1,0	0,0952	0,015	18,45	542	1.0
825		75	100		1,5	0,0952	0,018	22,12	452	0.66
800		100	100		2,0	0,0952	0,024	29,49	339	0.5
775		125	100		2,5	0,0952	0,039	48,31	207	0.4



Şekil 3.22. Saflaştırılmış insan serum paraoksonaz enzimi aktivitesi üzerine klindamisin fosfatın inhibisyon etkisi $[I_1]=0.0476\text{mg/ml}$, $[I_2]=0.0952\text{mg/ml}$

Çizelge 3.20. İnsan serum paraoksonaz enzimi için 2mM paraokson substrat konsantrasyonunda %50 inhibisyona sebep olan antibiyotik konsantrasyonları ve Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan inhibisyon tipleri ve K_i değerleri.

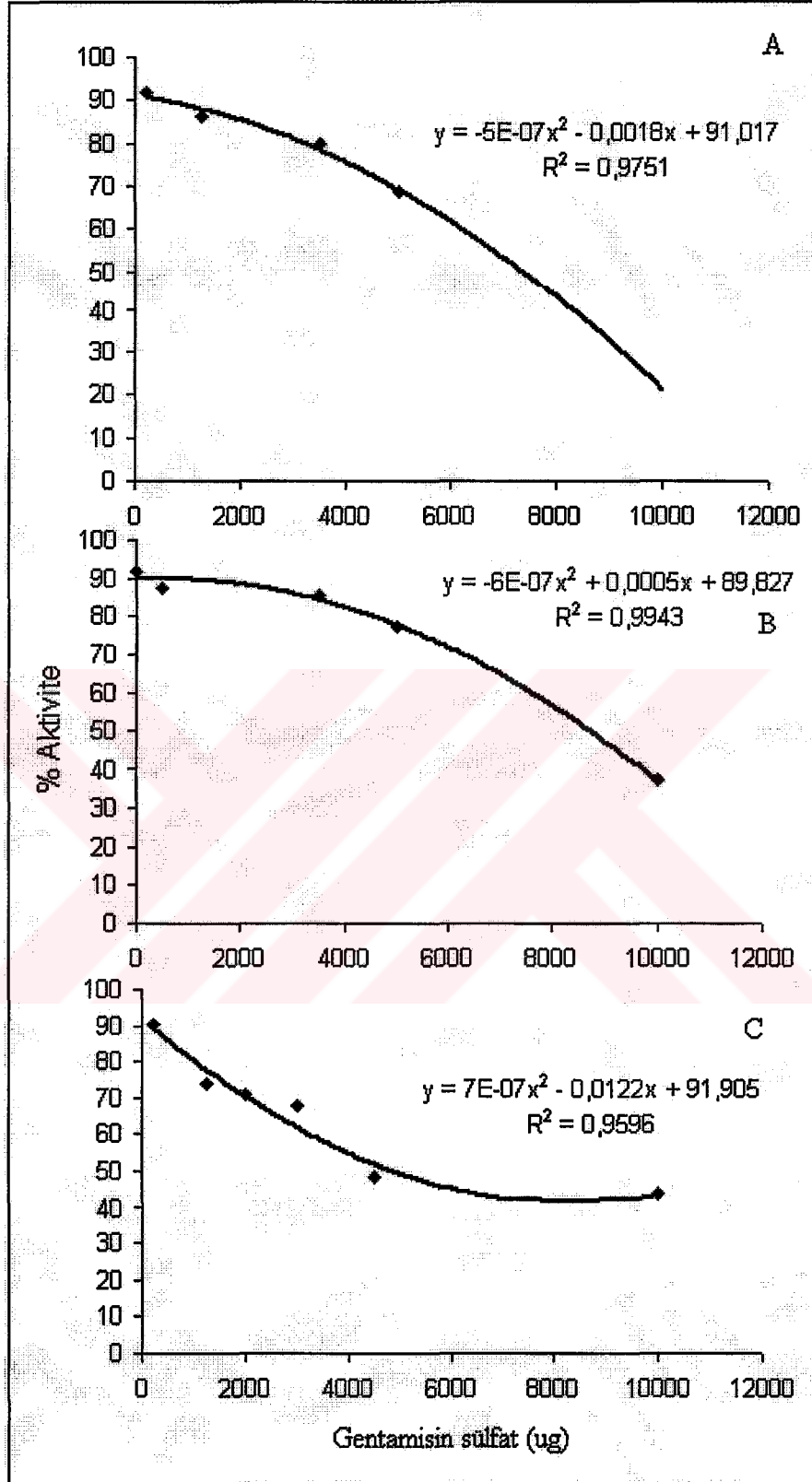
Antibiyotik	I_{50} (mg/ml)	K_i (mM)	İnhibisyon Tipi
Gentamisin sülfat	0,6293	0,221±0,005	Yarışmasız
Sodyum ampisillin	27,51	0,00714±0,00068	Yarışmalı
Sefazolin sodyum	0,00404	0,0121±0,00065	Yarışmalı
Klaritromisin	5,12	0,00011±0,000036	Yarışmasız
Kloramfenikol	0,0309	0,00642±0,00317	Yarışmalı
Siprofloksasin	0,313	$6,5 \times 10^{-6} \pm 4,59 \times 10^{-7}$	Yarışmasız
Rifamisin SV	Etkisiz	Etkisiz	Etkisiz
Klindamisin fosfat	0,902	0,0291±0,0077	Yarışmalı

3.6. Antibiyotiklerin HepG2 Hücreleri Tarafından Üretilen PON Üzerindeki Etkisi

Çalışmamızda kullandığımız antibiyotiklerin insan karaciğer hücresi HepG2 tarafından üretilen paraoksonaz aktivitesi üzerindeki etkisini araştırmak için bölüm 2.2.9.8'de anlatıldığı gibi doku kültüründe yetiştirilen hücrelerin üzerine, farklı konsantrasyonlarda antibiyotikler uygulanmıştır. Antibiyotikler uygulandıktan 2,4 ve 6 saat sonra hücreler lizis edilerek 2mM paraokson substratına karşı aktivitesi belirlenmiştir. Önce antibiyotik uygulanmayan ortamda üretilen paraoksonaz aktivitesi bulundu. Bu değer %100 aktivite olarak kullanıldı. Daha sonra farklı konsantrasyonlarda antibiyotik uygulanan ortamda üretilen paraoksonaz aktiviteleri optimum pH ve sıcaklıkta belirlendi. Elde edilen aktivite değerlerinden % aktiviteler hesaplandı. Antibiyotik konsantrasyonuna karşı % aktivite grafiği çizildi (Şekil 3.23, 3.24, 3.25, 3.26, 3.27, 3.28, 3.29, 3.30). Bu grafiklerden yararlanarak her bir antibiyotik için uygulandıktan 2, 4 ve 6 saat sonra aktiviteyi % 50 azaltan antibiyotik konsantrasyonu (I_{50}) hesaplandı.

Çizelge 3.21. İnsan karaciğer hücrelerinin (HepG2) PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren gentamisin sülfat'ın I₅₀ değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

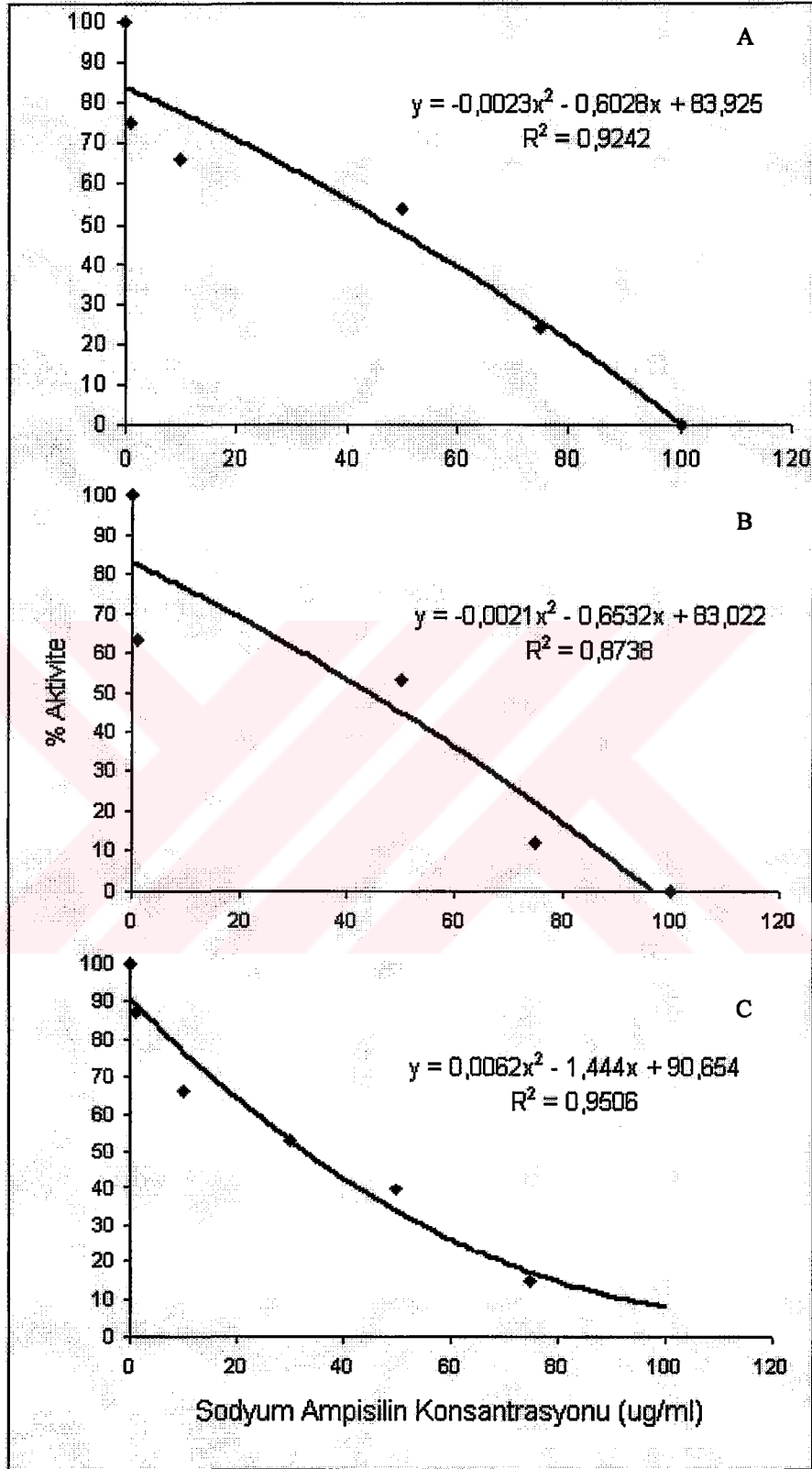
100mM Tris tamponu (µl)	Lizis edilmiş Hücre çözeltisi hacmi (µl)	Substrat çözeltisinin hacmi (µl)	Ant. Uyg. Sonra Hüc. Lizis süresi (s)	Antibiyotik Çözeltisinin Hacmi (µl)	Kuyucuktaki Antibiyotik Kons. [U] (µg/µl)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite
			2	-	-	0,036	22,10	100
				10	0,2	0,033	20,26	91,65
				62,5	1,25	0,031	19,03	86,11
				175	3,5	0,028	17,19	77,76
				250	5,0	0,024	14,73	66,65
				500	10,0	0,022	13,51	61,09
				-	-	0,039	23,94	100
			4	10	0,2	0,033	20,26	84,62
				175	3,5	0,030	18,42	76,94
				250	5	0,027	16,57	69,21
				500	10	0,013	7,94	33,33
				-	-	0,031	19,03	100
			6	10	0,2	0,028	17,19	90,33
				62,5	1,25	0,023	14,12	74,19
				100	2,0	0,022	13,51	70,99
				150	3,0	0,021	12,89	67,73
				225	4,5	0,015	9,21	48,39
				500	10	0,012	7,36	38,67
850	100	100						



Şekil 3.23. Gentamisin sülfat'ın doku kültüründeki 2 (A), 4 (B) ve 6 (C) saat sonraki *in vitro* etkisi

Çizelge 3.22. İnsan karaciğer hücrelerinin (HepG2) PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren sodyum ampisilin'in I₅₀ değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

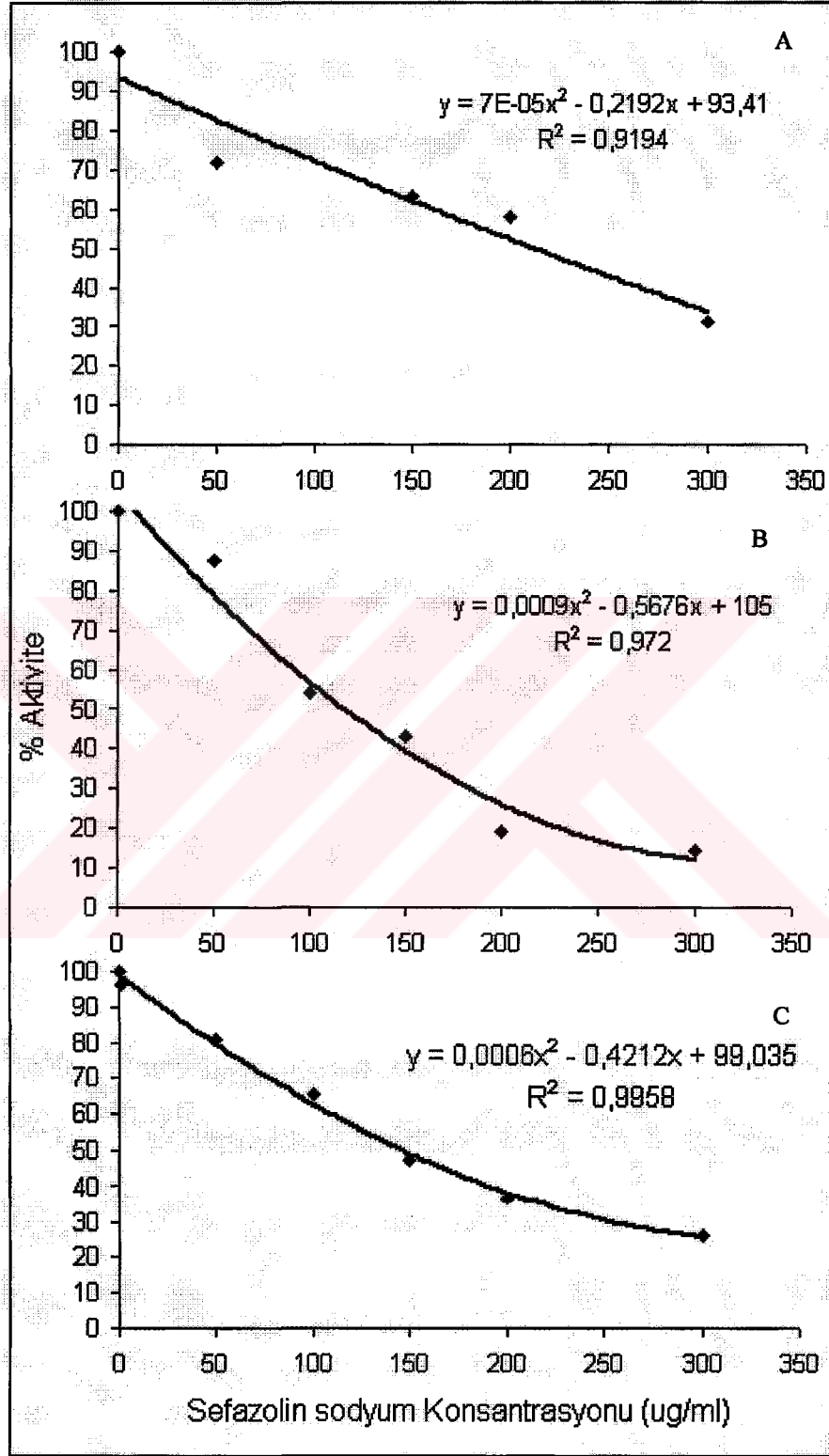
100mM Tris tamponu (µl)	Lizis edilmiş Hücre çözeltilisi hacmi (µl)	Substrat çözeltilisinin hacmi (µl)	Farelerin Öldürülme Süreleri (s)	Antibiyotik Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Kuyucuktaki Antibiyotik Kons. [I] (µg/ml)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite	
			2	-	-	0,021	12,89	100	
				3,5	1,0		0,012	7,368	75
				34,96	10,0		0,010	6,508	66,24
				104,89	30,0		0,007	4,298	-
				174,8	50,0		0,008	5,280	53,74
				262,23	75,0		0,005	3,070	23,81
			349,6	100		0	0	0	
				-	-	0,023	14,49	100	
			4	3,5	1	0,015	9,210	63,56	
				34,96	10			-	-
				104,89	30		0,013	7,368	50,84
				174,8	50		0,012	7,736	53,38
				262,23	75		0,003	1,535	11,90
				349,6	100		0	0	0
				-	-	0,021	12,89	100	
			6	3,5	1	0,018	11,23	87,17	
				34,96	10		0,016	10,00	66,22
				104,89	30		0,013	7,98	52,84
				174,8	50		0,008	5,09	39,55
				262,23	75		0,004	2,22	14,70
				349,6	100		0,003	2,026	15,71



Şekil 3.24. Ampisillinin doku kültüründeki 2 (A), 4 (B) ve 6 (C) saat sonraki *in vitro* etkisi

Çizelge 3.23. İnsan karaciğer hücrelerinin (HepG2) PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren sefazolin sodyum'un I₅₀ değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

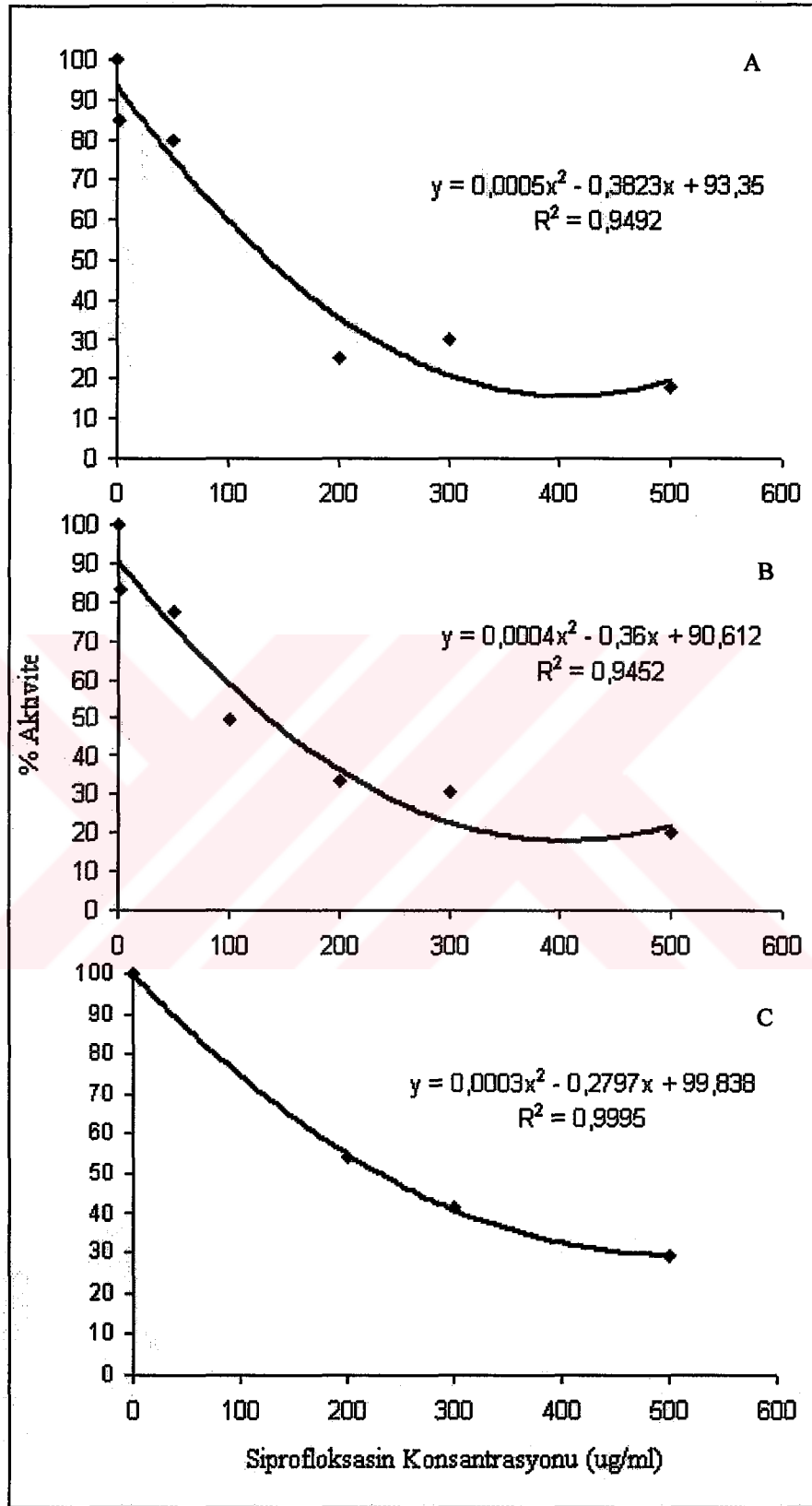
100mM Tris tamponu (µl)	Lizis edilmiş Hücre çözeltilisi hacmi (µl)	Substrat çözeltilisinin hacmi (µl)	Farelerin Öldürülme Süreleri (s)	Antibiyotik Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Kuyucuktaki Antibiyotik Kons. [I] (µg/ml)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite	
			2	-	-	0,032	19,65	100	
				3,0	1,0		0,026	15,96	81,25
				150	50		0,023	14,12	71,87
				300	100		0,019	11,66	59,34
				450	150		0,012	7,36	-
				600	200		0,011	6,75	57,92
			900	300		0,006	3,68	31,59	
				-	-	0,024	14,73	100	
				3,0	1,0	0,019	11,66	79,12	
				150	50	0,020	12,89	87,47	
				300	100	0,013	7,98	54,15	
				450	150	0,009	5,52	42,81	
				600	200	0,004	2,45	19,04	
				900	300	0,003	1,84	14,28	
				-	-	0,026	15,96	100	
				3,0	1,0	0,025	15,35	96,15	
				150	50	0,021	12,89	80,76	
				300	100	0,017	10,43	65,38	
				450	150	0,009	5,52	47,36	
				600	200	0,007	4,29	36,84	
				900	300	0,005	3,07	26,31	
850	100	100	4						



Şekil 3.25. Sefazolin sodyumun doku kültüründeki 2 (A), 4 (B) ve 6 (C) saat sonraki *in vitro* etkisi

Çizelge 3.24. İnsan karaciğer hücrelerinin (HepG2) PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren siprofloksasin'in I₅₀ değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

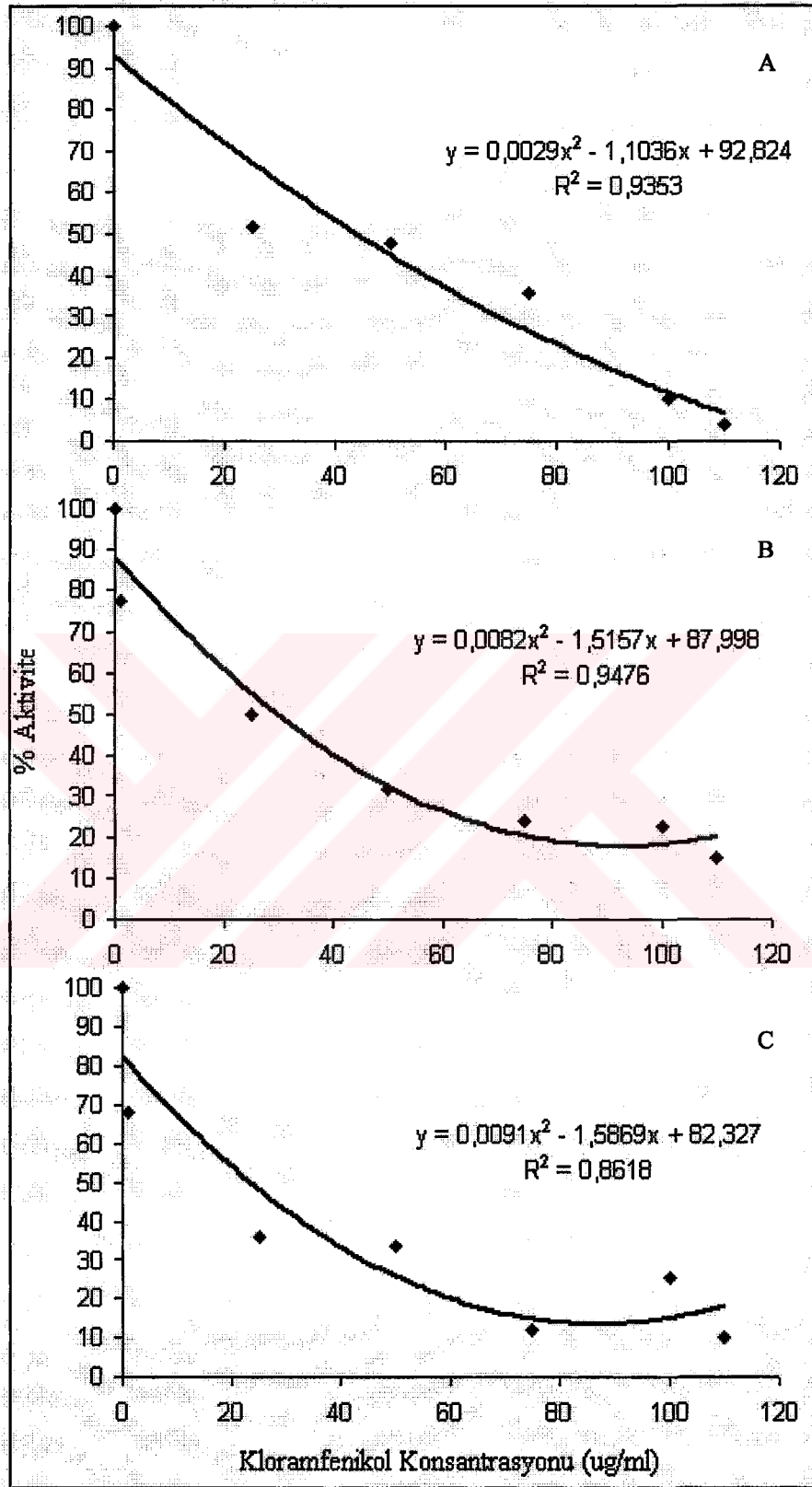
100mM Tris tamponu (µl)	Lizis edilmiş Hücre çözeltilisi hacmi (µl)	Substrat çözeltilisinin hacmi (µl)	Farelerin Öldürülme Süreleri (s)	Antibiyotik Çözeltisinin Hacmi (µl)	Kuyucuktaki Antibiyotik Kons. [I] (µg/ml)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite
			2	-	-	0,019	12,28	100
				0,5	1,0	0,017	10,43	85,0
				25	50	0,016	9,82	79,96
				50	100	0,004	2,64	21,49
				100	200	0,005	3,07	25,0
				150	300	0,006	3,68	29,96
			250	500	0,003	2,21	17,99	
				-	-	0,018	11,05	100
			4	0,5	1,0	0,015	9,21	83,33
				25	50	0,014	8,59	77,72
				50	100	0,009	5,52	49,94
		100		100	200	0,006	3,68	33,29
850	100			150	300	0,005	3,37	30,49
				250	500	0,003	2,21	19,00
				-	-	0,024	14,73	100
			6	0,5	1,0	0,011	6,75	45,82
				25	50	0,009	5,52	37,47
				50	100	0,010	6,14	41,68
				100	200	0,013	7,98	54,17
				150	300	0,010	6,14	41,68
				250	500	0,007	4,29	29,12



Şekil 3.26. Siprofloksasinin doku kültüründeki 2 (A), 4 (B) ve 6 (C) saat sonraki *in vitro* etkisi

Çizelge 3.25. İnsan karaciğer hücrelerinin (HepG2) PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren kloramfenikol'ün I_{50} değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

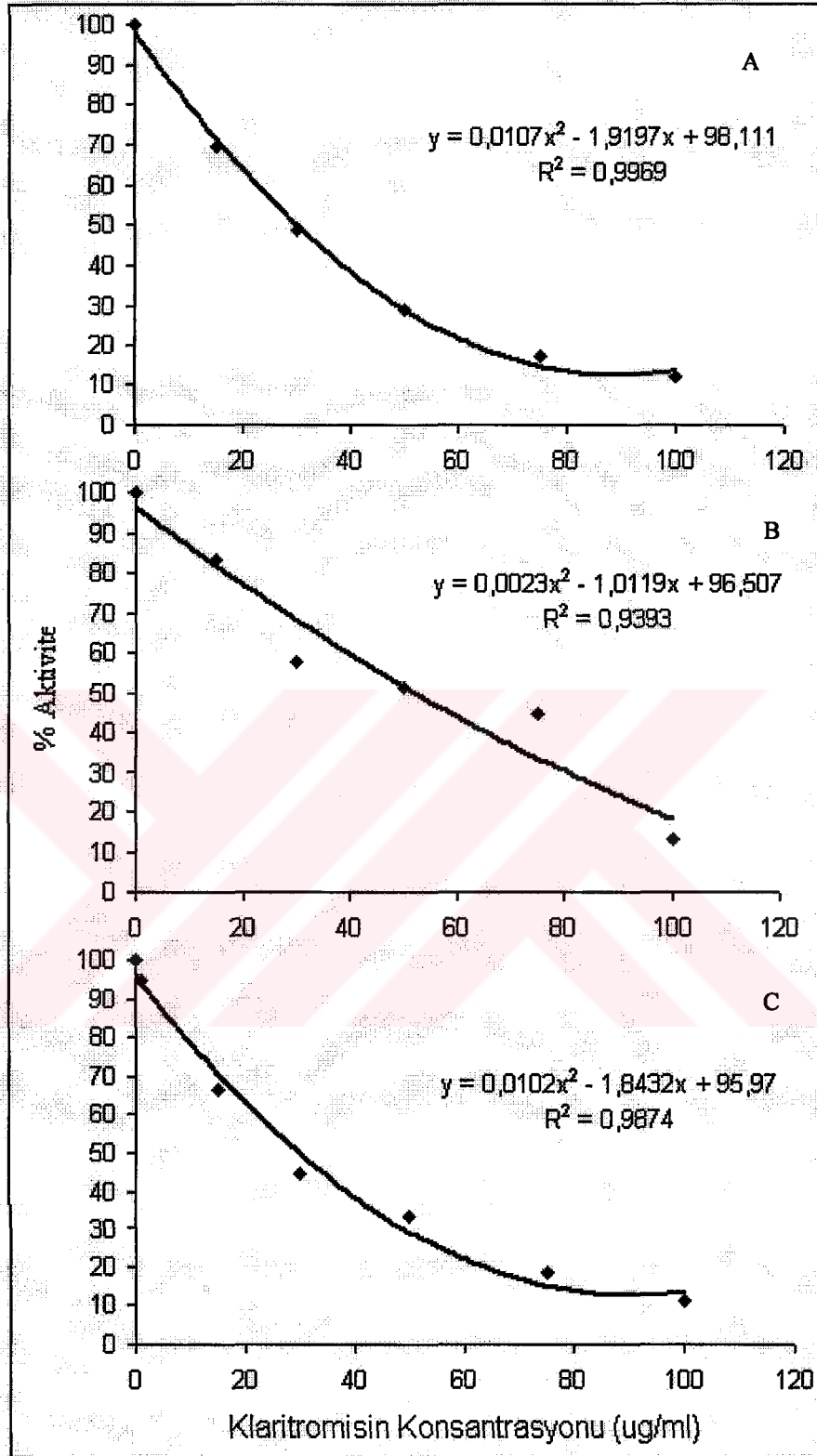
100mM Tris tamponu (μ l)	Lizis edilmiş Hücre çözeltilisi hacmi (μ l)	Substrat çözeltilisinin hacmi (μ l)	Farelerin Öldürülme Süreleri (s)	Antibiyotik Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Kuyucuktaki Antibiyotik Kons. [I] (μ g/ml)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite
				-	-	0,025	15,35	100
			2	6	1,0	0,014	8,59	56,0
				150	25	0,013	7,98	51,98
				301	50	0,012	7,36	47,94
				451	75	0,009	5,52	35,96
				602	100	0,002	1,535	10,0
				662	110	0,001	0,614	4,0
				-	-	0,022	13,51	100
			4	6	1,0	0,017	10,43	77,27
				150	25	0,011	6,75	49,97
				301	50	0,007	4,29	31,81
				451	75	0,0055	3,25	24,08
				602	100	0,005	3,07	22,72
				662	110	0,003	2,02	14,99
				-	-	0,025	15,35	100
			6	6	1,0	0,017	10,43	68,00
				150	25	0,009	5,52	35,96
				301	50	0,008	5,21	34,00
				451	75	0,003	1,84	11,98
				602	100	0,006	3,86	25,19
				662	110	0,002	1,53	10,00
850	100	100						



Şekil 3.27. Kloramfenikolün doku kültüründeki 2 (A), 4 (B) ve 6 (C) saat sonraki *in vitro* etkisi

Çizelge 3.26. İnsan karaciğer hücrelerinin (HepG2) PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren klaritromisin'in I₅₀ değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

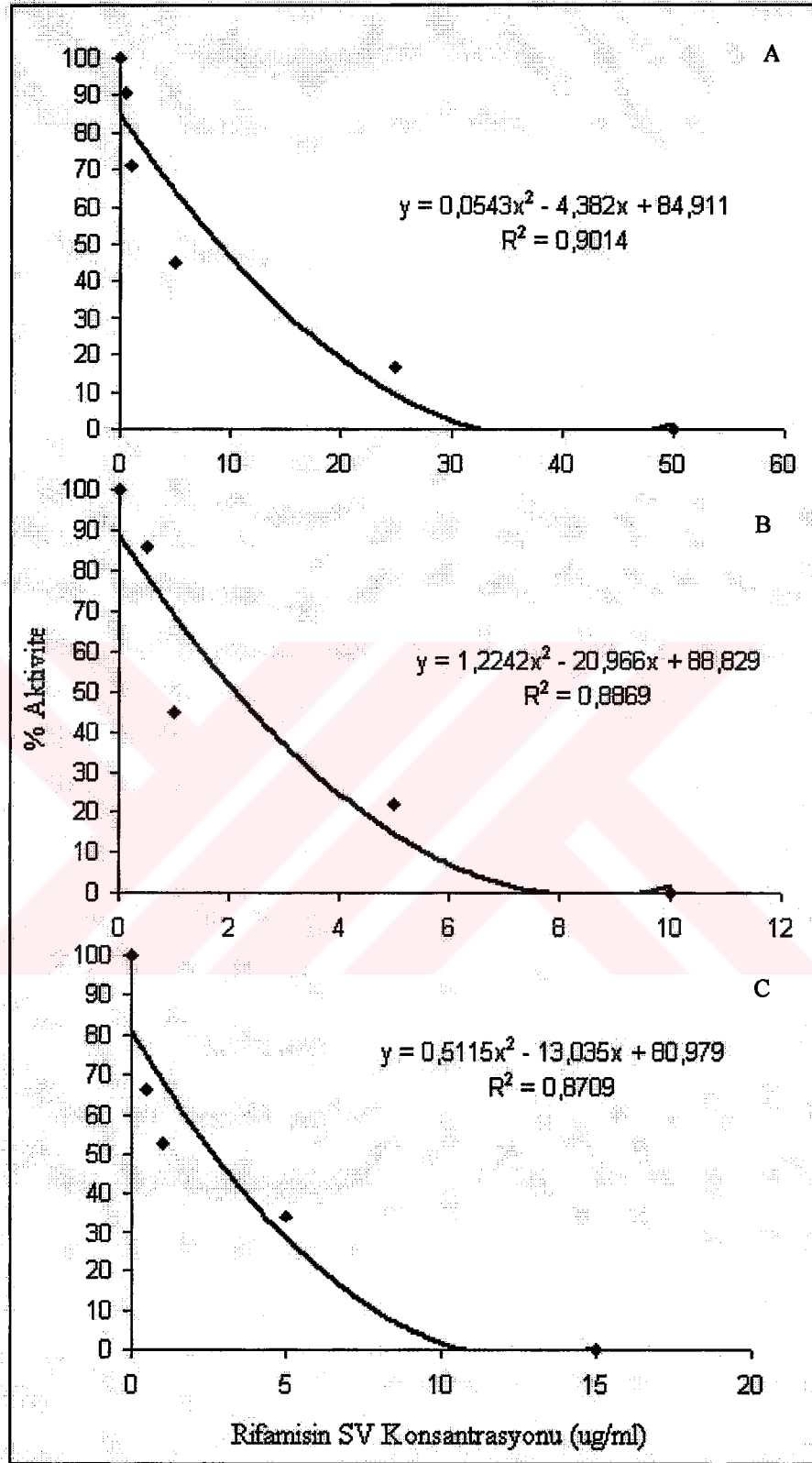
100mM Tris tamponu (µl)	Lizis edilmiş Hücre çözeltilisi hacmi (µl)	Substrat çözeltilisinin hacmi (µl)	Farelerin Öldürülme Süreleri (s)	Antibiyotik Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Kuyucuktaki Antibiyotik Kons. [I] (µg/ml)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite
				-	-	0,020	12,58	100
			2	4,0	1,0	-	-	-
				60	15	0,014	8,78	69,75
				120	30	0,009	6,14	48,78
				200	50	0,006	3,68	29,26
				300	75	0,0035	2,14	17,07
				400	100	0,002	1,53	12,19
				-	-	0,015	9,57	100
			4	4,0	1,0	-	-	-
				60	15	0,013	7,98	83,32
				120	30	0,009	5,52	57,62
				200	50	0,008	4,91	51,27
				300	75	0,007	4,29	44,78
				400	100	0,002	1,22	12,81
				-	-	0,0018	11,05	100
			6	4,0	1,0	0,0017	10,43	94,44
				60	15	0,012	7,36	66,59
				120	30	0,008	4,91	44,42
				200	50	0,006	3,68	33,33
				300	75	0,003	2,02	18,33
				400	100	0,002	1,22	11,11
850	100	100						



Şekil 3.28. Klaritromisinin doku kültüründeki 2 (A), 4 (B) ve 6 (C) saat sonraki *in vitro* etkisi

Çizelge 3.27. İnsan karaciğer hücrelerinin (HepG2) PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren rifamisin SV'nin I₅₀ değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

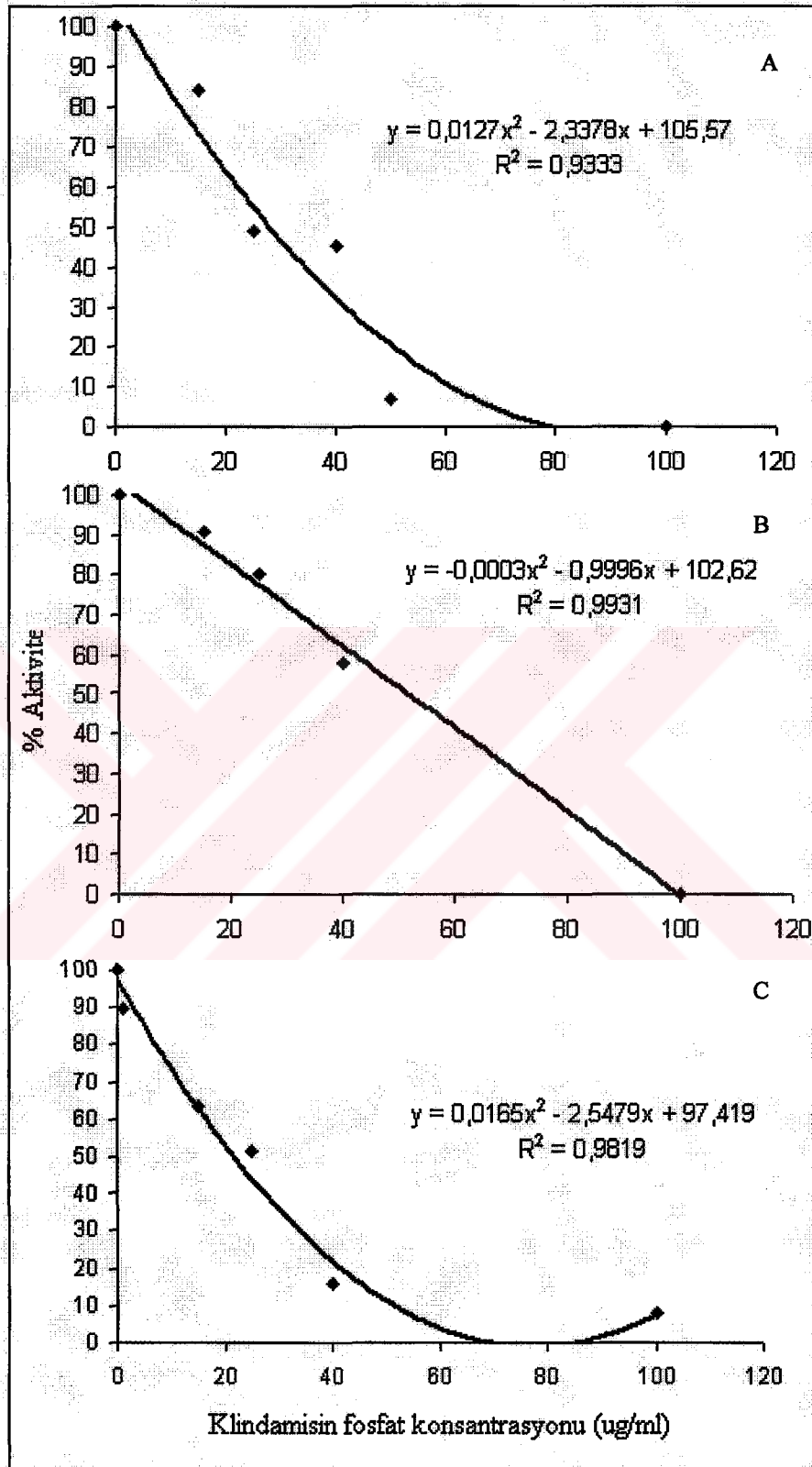
100mM Tris tamponu (µl)	Lizis edilmiş Hücre çözeltisi hacmi (µl)	Substrat çözeltisinin hacmi (µl)	Farelerin Öldürülme Süreleri (s)	Antibiyotik Çözeltisinin Hacmi (µl)	Kuyucuktaki Antibiyotik Kons. [I] (µg/ml)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite
			2	-	-	0,024	14,73	100
				6	0,5	0,012	7,73	52,52
				12	1,0	0,011	7,36	50,02
				60	5,0	0,007	4,29	29,17
				180	15	-	-	-
				300	25	0,004	2,45	16,67
			600	50	0	0	0	
				-	-	0,021	12,89	100
			4	6	0,5	0,018	11,05	85,72
				12	1,0	0,005	3,37	26,19
850	100	100		60	5,0	0,004	2,82	21,87
				180	15	0	0	0
				300	25	0	0	0
				600	50	0	0	0
				-	-	0,019	11,66	100
			6	6	0,5	0,012	7,73	66,29
				12	1,0	0,009	6,14	52,65
				60	5,0	0,006	3,99	34,22
				180	15	0	0	0
				300	25	0	0	0
				600	50	0	0	0



Şekil 3.29. Rifamisin SV'nin doku kültüründeki 2 (A), 4 (B) ve 6 (C) saat sonraki *in vitro* etkisi

Çizelge 3.28. İnsan karaciğer hücrelerinin (HepG2) PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren klindamisin fosfat'ın I₅₀ değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

100mM Tris tamponu (µl)	Lizis edilmiş Hücre çözeltilisi hacmi (µl)	Substrat çözeltilisinin hacmi (µl)	Farelerin Öldürülme Süreleri (s)	Antibiyotik Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Kuyucuktaki Antibiyotik Kons. [I] (µg/ml)	ΔOD (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite	
			2	-	-	0,014	8,78	100	
				6,66	1,0	-	-	-	-
				100	15	0,012	7,36	83,91	
				166,6	25	0,007	4,29	48,95	
				266,6	40	0,006	3,99	45,45	
				33,33	50	0,001	0,614	6,99	
				666,6	100	0	0	0	
			4	-	-	0,014	8,78	100	
				6,66	1,0	-	-	-	-
				100	15	0,013	7,98	90,91	
		100		166,6	25	0,011	7,06	80,41	
				266,6	40	0,008	5,09	58,04	
				33,33	50	0,001	0,614	6,99	
				666,6	100	0	0	0	
			6	-	-	0,012	7,73	100	
				6,66	1,0	0,011	6,93	89,69	
				100	15	0,008	4,91	63,49	
				166,6	25	0,006	3,99	51,59	
				266,6	40	0,002	1,22	15,87	
				33,33	50	0,008	4,91	63,49	
				666,6	100	0,001	0,614	7,93	



Şekil 3.30. Klindamisin fosfat'ın doku kültüründeki 2 (A), 4 (B) ve 6 (C) saat sonraki *in vitro* etkisi

Çizelge 3.29. İnsan karaciğer paraoksonaz enzimi için 2mM paraokson substrat konsantrasyonunda 2, 4 ve 6 saat sonra %50 inhibisyona sebep olan antibiyotik konsantrasyonları

Antibiyotik	I ₅₀ (mg/ml)		
	2 saat	4 saat	6 saat
Gentamisin sülfat	7,4	6,34	4,70
Sodyum ampisillin	47,43	44,23	32,66
Sefazolin sodyum	215,71	119,77	146,66
Klaritromisin	30,116	52,152	15,77
Kloramfenikol	43,89	29,98	23,62
Siprofloksasin	139,3	132,5	239,5
Rifamisin SV	8,94	2,11	2,65
Klindamisin fosfat	28,06	54,33	21,75

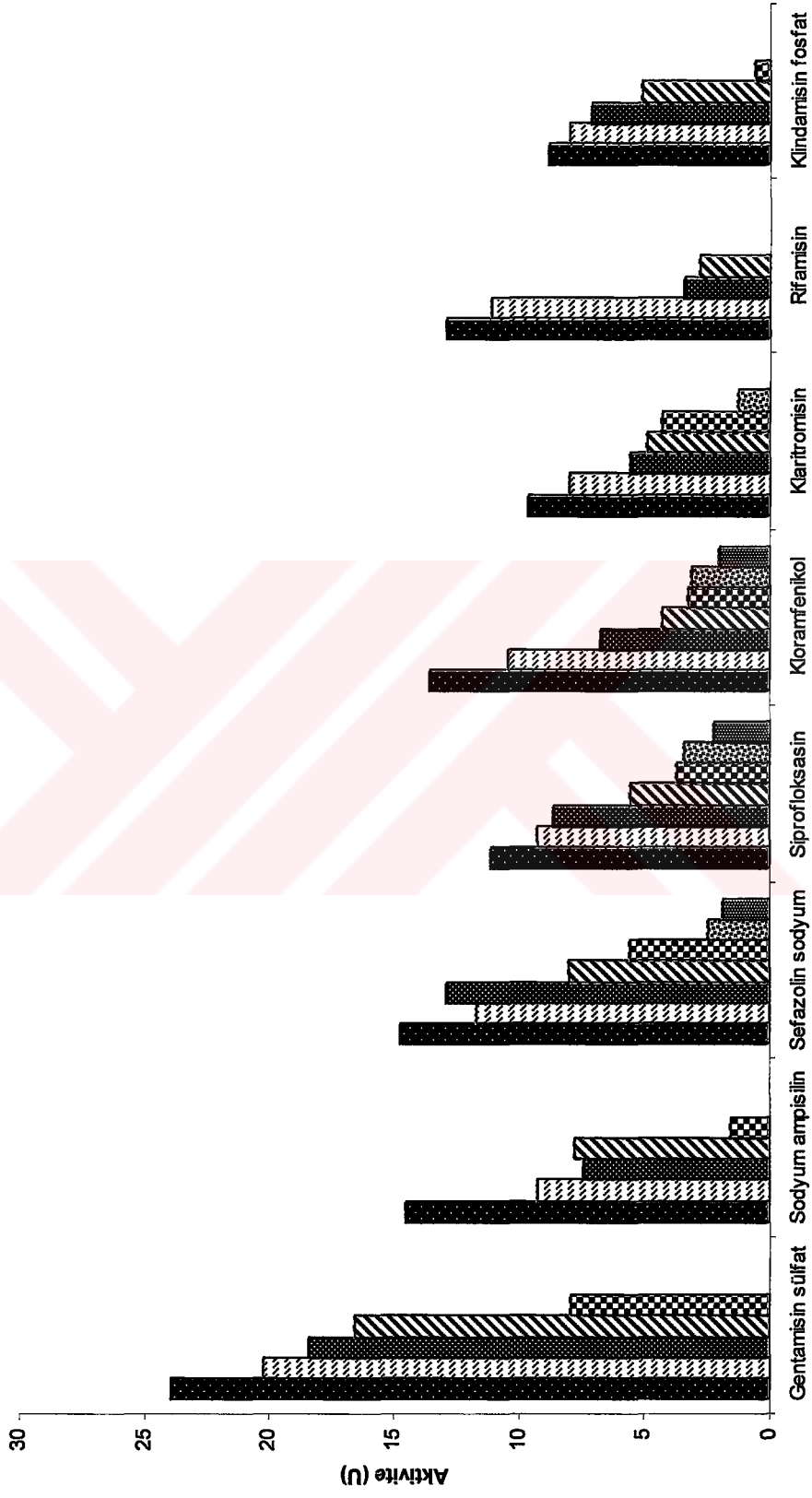
Doku kültüründe üretilen PON1 enzim aktivitesi üzerine antibiyotiklerin etkisi ve doza bağlı olarak aktivitede meydana gelen azalma şekil 3.31, 3.32 ve 3.33'de sütun grafiği şeklinde verilmiştir. Şekillerde görüldüğü gibi doza bağlı olarak farklı sürelerde aktivitede ani azalma veya lineer azalma gözlenmektedir.

2 SAAT



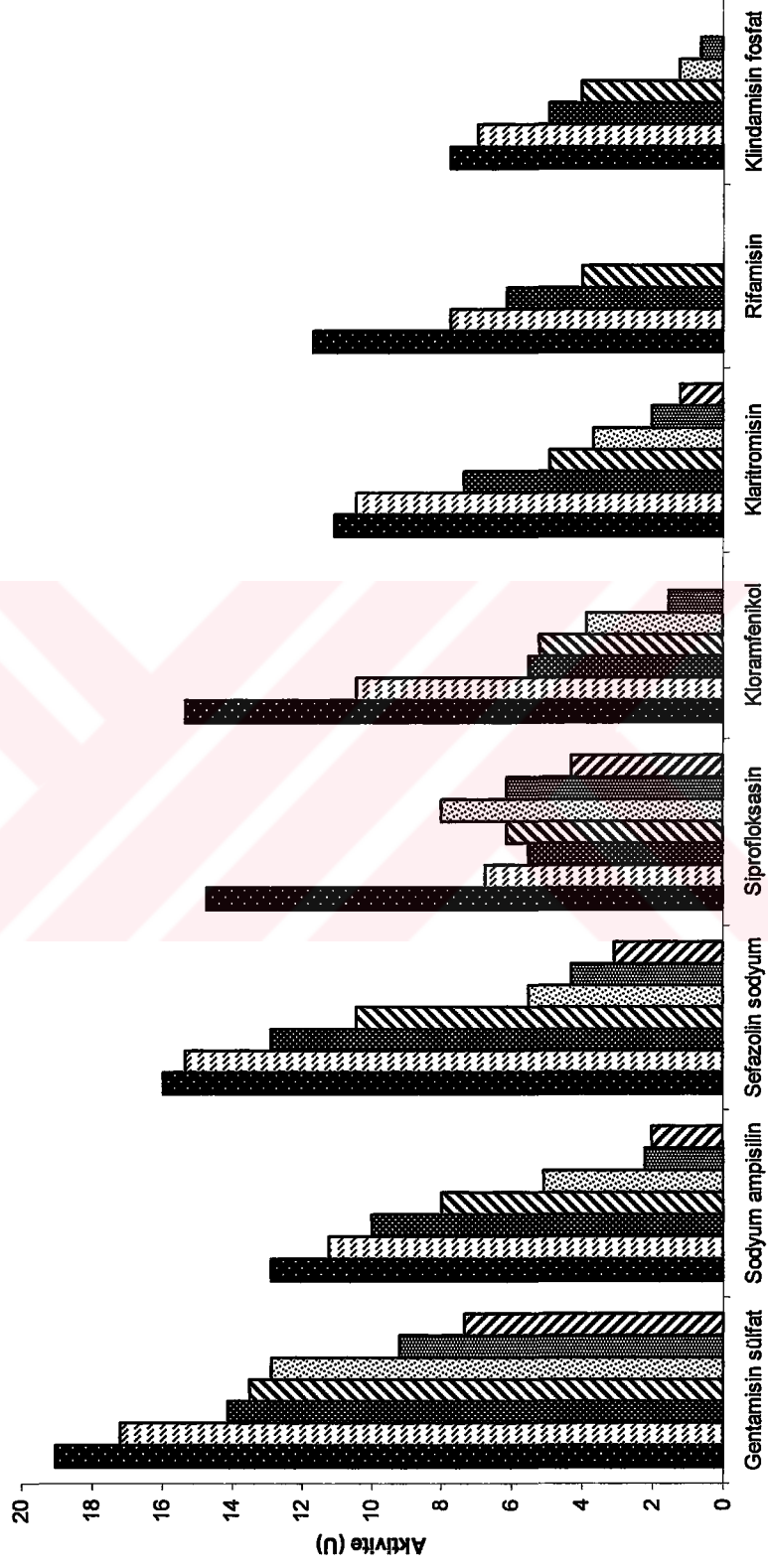
Şekil 3.31. HepG2 karaciğer hücreleri üzerinde 2 saat sonunda konsantrasyona bağlı aktivitede görülen değişimler

4 SAAT



Şekil 3.32. HepG2 karaciğer hücreleri üzerinde 4 saat sonunda konsantrasyona bağlı aktivitede görülen değişimler

6 SAAT



Şekil 3.33. HepG2 karaciğer hücreleri üzerinde 6 saat sonunda konsantrasyona bağlı aktivitede görülen değişimler

3.7. İstatistiksel Analiz

Antibiyotiklerin fare serum ve karaciğer paraoksonaz enzim aktivitesinin bölüm 2.2.4.4’de anlatıldığı gibi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı tespit edilmiştir. Kontrol grubu değerleri ile karşılaştırma ve standart sapma değerleri ile birlikte sonuçlar çizelge 3.3’de verilmiştir.



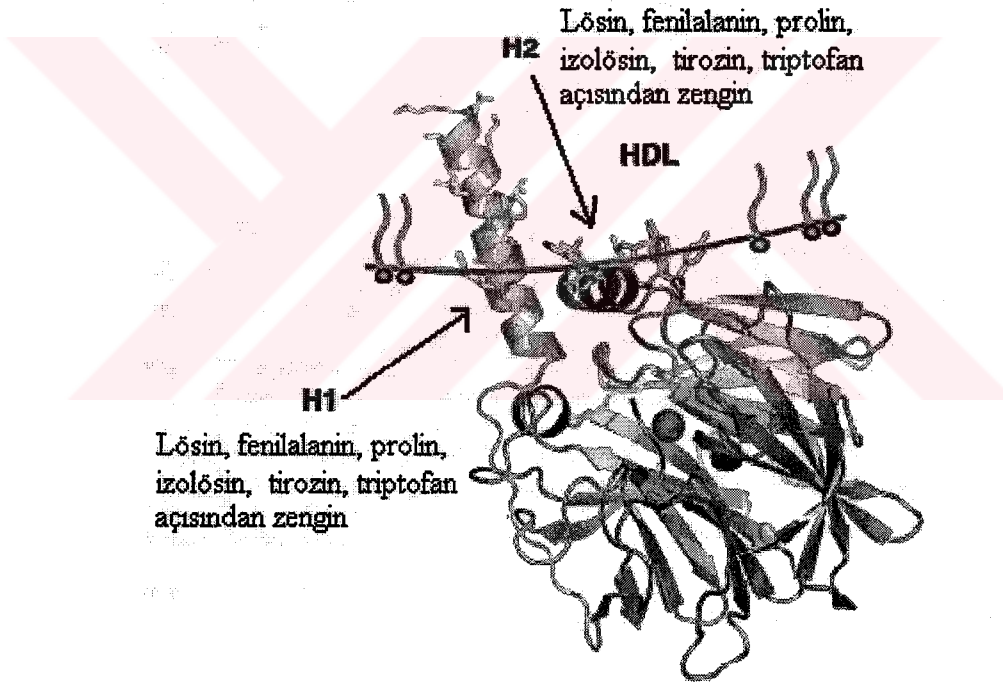
4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, detoksifikasyon ve antioksidan aktivitesi ile metabolizmada önemli fizyolojik fonksiyona sahip PON1 enziminin hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılması için yeni bir jel sentezlendi. Sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin kimyasal yapısına sahip bu jel kullanılarak insan serumundan PON1 enzimi saflaştırılmış, kinetik ve elektroforetik özellikleri incelenmiştir.

PON1 enziminin hidrofobik karakteri bu tekniğin seçilmesinde en önemli sebeplerden birisi olmuştur. Söz konusu enzim, N terminal bölgesinde bulunan H1 ve H2 heliks yapısı olarak isimlendirilen hidrofobik yapılar ile HDL'ye bağlanmaktadır (Şekil 4.1) [35, 85 184]. N-terminal bölgesini lösin, fenil alanin, prolin, isolösin, tirozin, triptofan ve valin gibi aminoasitleri ihtiva eden 7-18 residüel arası H1 hidrofobik ucu, 185-202 residüel arası da H2 hidrofobik ucu oluşturmaktadır. Ayrıca PON1'in hidrofobik yüzeyi ile HDL arasında triptofan, tirozin ve lizin aminoasitlerince zengin aromatik ve kısmen hidrofilik bölge bulunmaktadır [35, 74].

Hidrofobik etkileşim kromatografisinde kullanılan jel, ardışık üç basamakta sentezlenmiştir. Önce matriks olarak seçilen Sepharose-4B, CNBr ile aktifleştirildi ve buna uzantı kolu olarak L-tirozin bağlandıktan sonra, diazolanmış 1-naftilamin bileşiği katıldı. Sepharose-4B'nin matriks olarak seçilmesinin başlıca sebebi çok iyi akış özelliğine sahip olması ve ayrıca serbest -OH grupları taşıdığından, CNBr ile çok kısa bir süre içerisinde aktifleştirilebilmesidir. Bu amaçla literatürde karbodiimid bileşiklerinin de kullanıldığı bildirilmektedir [185]. Karbodiimid ile aktifleştirilmiş matrikse primer amin grubunun bağlanması ile amid bağı oluşmaktadır. Bu bağ kromatografi işlemlerinde dayanıklıdır. Fakat aktifleştirilme sırasında jel, pH 4,5'da 24 saat süre ile karıştırılmaktadır. Bu işlem kromatografi sırasında jelin akış özelliklerini olumsuz yönde etkilemektedir [185]. Bir başka aktifleştirme işleminde epoksi bileşiklerinden yararlanılmıştır [186]. Kromatografi

işlemlerinde gayet dayanıklı olan bu yapılar, 16 saat aktiveleştirme ve 16 saat ligand bağlama süresi olmak üzere toplam 32 saatte gerçekleşmektedir. pH'nın 10 civarında olması, jelin kimyasal yapısını etkilememesine rağmen uzun süre karıştırma işlemleri, polisakkarit partiküllerinin fiziksel yapısının deformasyonuna sebep olabilir. Sonuç olarak, hazırlanacak hidrofobik jelin akış özellikleri olumsuz yönde etkilenecektir. Çalışmamızda kullanılan CNBr ile aktiveleştirme işlemi sadece 5 dakikada gerçekleştirilmektedir. Böylece jelin fiziksel yapısındaki deformasyon sakıncaları ortadan kaldırılmış oldu.



Şekil. 4.1. PON1 enziminin HDL yüzeyine bağlanma modeli [35]

Literatürde kromatografik matriks olarak kullanılan bir başka bileşik EUPERGIT C-250L ticari ismi ile temin edilen ve oksiran grupları içeren jeller de kullanılmıştır. Söz konusu bileşik bağlamada spesifik olmamasına rağmen, üzerinde taşıdığı oksiran grupları ile çeşitli proteinlerin saflaştırılmasında kromatografik matriks olarak seçilmiştir [187]. Ayrıca bu jel herhangi bir aktivasyona gerek duyulmadan ligand immobilize edilebilmektedir. Bunun yanında uzun süre kullanılabilir olması, mekanik etkilere karşı dayanıklı olması ve akış özelliğinin iyi olması sebebiyle de oldukça kullanışlıdır. Fakat yapılan bir çalışmada sepharose-4B ile sentezlenen afinite jeli ile Eupergit ile hazırlanan afinite jeli karşılaştırıldığında Sepharose-4B ile daha iyi akışkanlık ve saflık elde edilmiştir [188].

Araştırmamızda matriks olarak seçilen Sepharose-4B'ye hidrofobik ligand (1-Naftilamin) L-tirozin bileşiği aracılığı ile immobilize edilmiştir. Burada L-tirozin uzantı kolu olarak da görev yapmaktadır. Uzantı kolunun hidrofobik etkileşim kromatografisindeki önemi afinite kromatografisinde olduğu gibi [189,190] açıkça belirtilmemesine rağmen, hidrofobik etkileşimde de L-tirozin bileşiğinin önemli olduğu kanaatindeyiz.

Bu kromatografinin temel prensibi, yüksek tuz konsantrasyonunda saflaştırılacak biyomolekülde bulunan hidrofobik yüzey ile apolar ligand arasındaki hidrofobik etkileşimdir. Bu etkileşimin gerekçesi artan entropi ile açıklanmaktadır. Bu teknikte ligand ve matriks yapısının son derece önemli olduğu bildirilmektedir [191]. Kullanılacak ligantın hidrofobik karakteri kritik bir öneme sahiptir. Düşük hidrofobik karaktere sahip ligandlar kullanıldığı zaman ayrılacak moleküllerin kolanda etkileşimini sağlayabilmek için yüksek tuz konsantrasyonu uygulama zorunluluğu vardır. Bu durumda proteinlerin kendi aralarında hidrofobik etkileşim riski daha fazladır. Yüksek hidrofobik karaktere sahip ligand tercih edildiği durumda ise saflaştırılacak molekül ile ligand arasındaki etkileşim artacağı için elüsyon sırasında problemler ortaya çıkabilir [191]. Genellikle ticari olarak bulunan hidrofobik etkileşim kromatografi jellerinde hidrofobik uç olarak düz zincirli alkil ligandları ve aril ligandları gibi moleküller kullanılmaktadır [192]. Bunlardan isopropil, butil, oktil ve fenil bileşikler en çok tercih edilen ligandlardır. En popüler

hidrofobik etkileşim jelinin fenil-sepharose olduğu literatürde görülmektedir [190]. Düz zincirli alkil ligandları saf hidrofobik karakter gösterirlerken, aril ligandlarında hem hidrofobik hem de aromatik etkileşimler gözlenir. Bu amaçla çalışmamızda ligand olarak 1-naftilamin bileşiği kullanılmıştır. PON1 enziminin H1 ve H2 bölgelerinde fenil alanin, tirozin, triptofan gibi aromatik rezidülerin bulunması tarafımızdan seçilen ligandın ve immobilizasyon için kullanılan L-tirozinin söz konusu bölgelerle hem hidrofobik hem de aromatik etkileşim yapacağı göz önüne alınarak, oldukça uygun bileşik olduğu kanaatindeyiz.

Hidrofobik etkileşim kromatografisinde kullanılan tuzun tipi ve konsantrasyonu da oldukça önemlidir. Bu kromatografide yaygın olarak kullanılan tuzlar Na_2SO_4 , K_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl , NH_4Cl , NaBr , NaSCN olmasına rağmen amonyum sülfat en çok tercih edilendir [193, 194].

Araştırmamızda PON1 enzimini insan serumundan saflaştırmak için hidrofobik etkileşim kromatografisi uygulanmadan önce bu kromatografi prosedürüne uygun ön saflaştırma yöntemi olarak amonyum sülfat çöktürmesi yapılmıştır. Paraokson substratı kullanılarak PON1 enziminin amonyum sülfat çöktürme aralığı %60-80 bulunmuştur. Literatürde PON1 enzimi için amonyum sülfat çöktürme yöntemi ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak genel olarak serum esterazlarının saflaştırılmasında amonyum sülfat ve etanol çöktürmesi uygulanmıştır. Serum proteinlerinin organik çözücüler ile çöktürülmesi yöntemi amonyum sülfat çöktürme yönteminden daha çok tercih edildiği bildirilmektedir [143]. Ancak çalışmamızda saflaştırma yönteminin ikinci basamağı olan hidrofobik etkileşim kromatografisi için amonyum sülfat çöktürmesi uygun olduğu için seçilmiştir. Literatürde yer alan insan serumundan PON1 enziminin izolasyon yöntemlerinde genellikle saflaştırmanın ilk basamağı bir çeşit hidrofobik jel olan Cibacron Blue 3GA'dır. Ancak jel ticari olarak alınmaktadır ve içeriği tam olarak bilinmemektedir.

Bu yöntemle insan serumundan PON1 enzimi 227 kat saflaştırılmıştır. Furlong ve arkadaşları 4 basamaktan oluşan agarose blue, sephadex G-200, DEAE Trisakril M ve Sephadex G-75 yöntemlerini kullanarak tarafımızdan gözlenen

saflaştırma katsayısından daha düşük bir değer (62,1) elde etmişlerdir [14]. Ancak bir başka çalışmada sadece üç basamaktan oluşan blue agaroz, DEAE I ve DEAE II yöntemlerini kullanarak yaklaşık 600 kat saflaştırma derecesine ulaşmışlardır. Bu çalışmada ayrıca üç basamakta PON1 enziminin Q ve R polimorfik formları ayrı ayrı saflaştırılmıştır [30].

Ayrıca PON1 enzimi sıçan ve tavşan karaciğer ve serumundan saflaştırılmıştır [146, 14, 195, 196]. Enzimin serumdan ve karaciğerden saflaştırma basamaklarında kısmen farklılık bulunmaktadır. Serumdan HDL'ye bağlı olan PON1'in izolasyonunda, Cibacron blue 3GA ve daha sonra değişik DEAE bio gel, DEAE Sepharose CL-6B, DEAE-selüloz, Sephadex G-75, DEAE Trisakril M gibi kromatografi yöntemleri kullanılmıştır [14, 15, 30, 146].

Araştırmamızda saflaştırılan enzim için SDS-PAGE uygulanmıştır. Molekül ağırlığı yaklaşık 43 kDa olarak tahmin edilen PON1 enzimi tek bant olarak SDS-PAGE jelinde gözlenmiştir. Bu değer literatürle uygunluk göstermektedir. PON1'in minimum molekül ağırlığını Gan ve arkadaşları 43kDa olarak belirlemişlerdir [30]. Çünkü enzimin yapısında, toplam molekül ağırlığının %15.8'i kadar karbohidrat molekülü bulunmaktadır. Molekül ağırlığı taşıdığı karbohidrat zincirinin varlığına bağlı olarak değişmektedir [14]. İhtiva ettiği bu karbohidrat zinciri enzimin hidrolizleme reaksiyonu için gerekli değildir. Söz konusu molekülün PON1'in çözünürlüğünü ve kararlılığını arttırmada ve zar yapısına bağlanmada görevi olduğu düşünülmektedir [41, 42]. Karbonhidrat içermeyen PON1 enziminin molekül ağırlığı 37 kDa'dur [14]. Ayrıca PON1 serumda HDL'ye bağlı olduğu bölgelerin yakınında bulunan proteinler (Apo A1) ile bir arada da saflaştırılabilmektedir. Bu durumda molekül ağırlığı 47-54kDa olduğu rapor edilmiştir [150]. PON1 enziminin molekül ağırlığı türden türe değişmemekte ve insan PON1 enziminin molekül ağırlığı ile tavşan, sıçan ve koyunun PON1 enziminin molekül ağırlığı benzerlik göstermektedir [14-18].

Sepharose-4B-L-tirozin-1-Naftilamin yapılı jel kullanılarak saflaştırılan insan serum paraoksonaz enziminin kinetik sabitleri (K_M ve V_{max}) optimum pH ve

sıcaklıkta [197] paraokson substratı kullanılarak belirlenmiştir. Lineweaver-Burk grafiklerinden elde edilen K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 4,16mM ve 227,27 U/ml'dak olarak bulunmuştur. Literatürde farklı kaynaklardan elde edilen PON1 enzimlerinin paraokson substratı için farklı K_M ve V_{max} değerleri bildirilmektedir. İnsan serum PON1 enziminin paraokson substratının K_m değeri 3,8 mM [198] ve 2,5 mM [65] olarak verilmiştir. Sıçanlarda K_M değeri 1,690 mM ve 7,5mM arasında değişmektedir [146, 199]. İnsan serum PON1 enziminin paraokson substratına karşı V_{max} değeri olarak 47,64 [200] ve 233,7 [32]. Sorenson ve arkadaşlarının çalışmalarında insan serum PON1 enziminin paraokson substratına karşı V_{max} değeri tarafımızdan tespit edilen V_{max} değeri ile benzerlik göstermektedir.

Çalışmamızın bu bölümünde fare serum ve karaciğer PON1 enzimi üzerinde gentamisin sülfat, sodyum ampisilin, sefazolin sodyum, siprofloksasin, kloramfenikol, klaritromisin, rifamisin SV ve klindamisin fosfat antibiyotiklerinin *in vivo* etkisi incelenmiştir. Bu amaçla özellikle antibiyotik olarak kullanılan moleküller suda çözünmedikleri için eczaneden flakon şeklinde enjekte edilebilen formları seçilmiştir. Günümüzde bilinçsizce kullanılan ve giderek artan antibiyotik kullanımı insan neslinin daha zayıf ve bakterilerin daha güçlü olmalarına neden olduğu bildirilmektedir [152]. Bunun nedeni antibiyotik belirli dozda ve belirli süre kullanıldığında ancak etki edebildiği, mikroorganizmaları yok etmektedir. Bilinçsizce kullanım sonucu söz konusu mikroorganizmalar kullanılan antibiyotiğe direnç geliştirmekte ve daha etkili antibiyotiklere ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca antibiyotiklerin vücuda alındıktan 2-12 saat arasında değişen bir süre sonra maksimum etki gösterdikleri bilinmektedir [152]. Çalışmamızda antibiyotiklerin bu süreleri dikkate alınarak antibiyotikler fareye uygulandıktan 2,4 ve 6 saat sonra söz konusu enzim aktivitelerine bakılmıştır. Literatürde çeşitli enzimler üzerinde bu antibiyotiklerin etkileri sıçanlarda yapılan çalışmalarla belirlenmiştir [153, 157, 159].

Antibiyotiklerin *in vivo* etkisi için yapılan çalışmamızda farelerden kan ve karaciğer dokularını almak için farelerin öldürülmesinde servikal dislokasyon yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemin kullanılmasının amacı öldürülme sırasında farenin fizyolojisinde hiçbir değişim olmamasıdır [201].

Araştırmamızda kullanılan antibiyotikler serum fPON1 enzimi üzerinde farklı etkiler gösterdiği saptanmıştır. Makrolid grubunun en sık kullanılan antibiyotiklerinden gentamisin sülfat fareye uygulandıktan 2saat, 4 saat ve 6 saat sonra anlamlı bir inhibisyona sebep olduğu belirlenmiştir. Sodyum ampisilin ise sadece uygulandıktan 4 saat sonra istatistik açıdan anlamlı bir inhibisyona sebep olurken 2ve 6. saatler sonunda belirli bir aktivasyona sebep olduğu görülmektedir. Ancak bu aktivasyon istatistik açıdan anlamlı değildir. Sefazolin sodyum bileşiği ise uygulandıktan sonra 2 ve 4. saatler sonunda önemli bir inhibisyona sebep olduğu bulunmuştur. Uygulanan diğer antibiyotikler serum fPON1 enzimi üzerinde farklı etkilere sebep olduğu bulunmuş ancak bunların istatistik açıdan önemli olmadığı saptanmıştır.

Antibiyotik uygulanmış farelerden elde edilen karaciğer PON1 enzim aktivitelerinin ise farklı şekilde etkilendiği saptanmıştır. Kloramfenikol, klaritromisin, rifamisin SV ve klindamisin fosfat serum fPON1 enzimi üzerinde istatistik açıdan önemli bir etki göstermezken, karaciğer fPON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gözlenmiştir. Ayrıca gentamisin sülfat, sodyum ampisilin ve sefazolin sodyum serum fPON1 enzimi üzerinde istatistik açıdan önemli bir inhibisyona sebep olurken karaciğer fPON1 enzimi üzerinde aynı etkiyi göstermediği saptanmıştır.

Literatürde söz konusu antibiyotikler ile yapılan *in vivo* çalışmalarda da bazı enzimler üzerinde inhibisyon etkisi gösterdikleri belirtilmektedir. Gentamisin sülfat, sıçanlara kas içine uygulandıktan 3 saat sonra eritrositlerde bulunan karbonik anhidraz enzim aktivitesi üzerinde önemli bir inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir [202]. Benzer şekilde penisilin grubu antibiyotiklerinden sodyum ampisilin de sıçan eritrositlerinde bulunan karbonik anhidraz enzim aktivitesi üzerinde 3 saat sonunda inhibisyona neden olduğu bildirilmektedir [203]. Sodyum ampisilin antibiyotiği için tarafımızdan elde edilen sonuçlardan farklı olarak; yapılan bir çalışmada, sıçanlara uygulanan sodyum ampisilin uygulandıktan 2,4 ve 6 saat sonunda 6-fosfaglukonat dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı gösterilmiştir [204]. Ayrıca sefalosporinler grubunda yer alan sefazolin sodyum benzeri bir antibiyotik olan sodyum sefuroksim bileşiğinin glikoz 6-fosfat dehidrogenaz enzim aktivitesini sıçanlara uygulandıktan 2.5 saat sonunda inhibe

ettiği tespit edilmiştir [205]. Yukarıda belirtilen antibiyotiklerin, karaciğerde bulunan herhangi bir enzim aktivitesi üzerine etkisi konusunda *in vivo* bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Çalışmamızda seçtiğimiz antibiyotiklerin aynı zamanda insan serumundan saflaştırılan PON1 enzimi üzerindeki *in vitro* etkisi araştırılmıştır. İnhibisyona neden olan antibiyotiklerin inhibisyon etkisi K_i ve I_{50} olmak üzere iki farklı değerle verilebilir. En uygun parametre K_i sabitleridir. Çünkü materyal ve yöntemde belirtildiği gibi K_i sabitinin belirlenmesi için en az iki sabit inhibitör konsantrasyonunda çalışmalar yapılmakta ve her bir sabit antibiyotik konsantrasyonunda beş farklı substrat konsantrasyonu için hız değerleri belirlenmektedir. Bunun sonucu olarak çok hassas sonuçlar elde edilmektedir [188]. Ayrıca bu yöntemle inhibisyon mekanizması saptanmaktadır. Fakat bazı araştırmacıların inhibisyon etkisini tespit etmek için I_{50} değerini de kullandıkları bilinmektedir. Bu amaçla substrat konsantrasyonları sabit tutularak, değişik antibiyotik konsantrasyonlarında, yüzde aktivite belirlenmekte ve daha sonra grafik yolu ile % 50 inhibisyona sebep olan antibiyotik konsantrasyonu hesaplanmaktadır. Bu yöntem, K_i sabitinin tespit edilmesine göre daha az hassas olmasına rağmen, uygulaması daha kolay olduğu için pratikte kullanılmaktadır. Yukarıdaki sebepler göz önüne alınarak hem K_i hem de I_{50} değerleri insan serumundan saflaştırılan PON1 enzimi için tespit edilmiştir.

Farklı antibiyotiklerin I_{50} değerlerini bulmak için optimum şartlarda paraokson substratının 2 mM sabit konsantrasyonunda çalışıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.8-3.15 ve Çizelge 3.9-3.12'de verildi. Uygulanan antibiyotikler içinde, çok düşük konsantrasyonda aktiviteyi % 50 azaltması ile sefazolin sodyum en kuvvetli inhibitör olarak tespit edilmiştir. Elde edilen sefazolin sodyum antibiyotiğinin inhibisyon özelliğini *in vivo* çalışma da desteklemektedir. Sefazolin sodyum *in vitro* etkisine benzer şekilde *in vivo* şartlarda fare serum PON1 enzimi üzerinde 2 ve 4 saat sonunda istatistiksel olarak anlamlı inhibisyona neden olmuştur. Literatürde sefazolin sodyum antibiyotiğinin, önemli fizyolojik fonksiyonları olan glikoz 6-fosfat dehidrogenaz, karbonik anhidraz I ve II ve glutatyon redüktaz enzimleri üzerinde *in vitro* ortamda güçlü inhibisyona neden olduğu tespit edilmiştir [153, 158, 204].

Rifamisin antibiyotiği saf hPON1 enzim aktivitesi üzerinde herhangi bir inhibisyon etkisi gözlenmemiştir. Benzer şekilde *in vivo* çalışmada serum fPON1 enzimi üzerinde anlamlı bir inhibisyon göstermezken, karaciğer fPON1 enzim aktivitesi üzerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığına anlamlı bir inhibisyona neden olmuştur. Aynı antibiyotiğin DNA polimeraz enzimi üzerinde güçlü inhibisyon etkisi gösterdiği ve insan nötrofil hücrelerinin fonksiyonlarını inhibe ettiği bilinmektedir [170, 171]. PON1 enzimi üzerinde *in vivo* etkisi araştırılan bir başka çalışmada klasik enzim indükleyicisi olarak bilinen fenobarbital ile yapılmıştır. Sıçanlarda yapılan bu çalışmada kas içine uygulanan fenobarbital, serumdaki hPON1 enzim aktivitesinde bir değişmeye neden olmaz iken, karaciğer hPON1 enzim aktivitesinde ve miktarında önemli bir artışa neden olmuştur [206].

PON1 enzimi üzerindeki etkisi incelenen antibiyotiklerden sodyum ampisilin *in vitro* enzim aktivitesi üzerinde diğerleri ile karşılaştırıldığında yüksek konsantrasyonda (27,51mg/ml) ancak % 50 inhibisyona neden olduğu bulunmuştur. Fakat fare karaciğer ve serumunda ise sırasıyla 2 ve 4 saat sonunda istatistiksel olarak anlamlı bir inhibisyon göstermiştir. Yapılan araştırmalarda, sodyum ampisilin antibiyotiğinin saflaştırılmış insan karbonik anhidraz ve glukoz 6 fosfataz enzimleri üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği bulunmuştur [159, 160]. Antikolinergik olarak kullanılan atropin ilacının PON1 enzim aktivitesi üzerine *in vitro* etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada insan plazma ve fare karaciğerinden saflaştırılmış PON1 enzim aktivitesi üzerinde inhibisyona neden olduğu bildirilmiştir [179].

Antibiyotiklerin inhibisyon mekanizmasını belirlemek amacı ile sabit inhibitör ve farklı substrat konsantrasyonunda PON1 enzim aktiviteleri saptanmıştır. Lineweaver Burk grafiklerinden yararlanılarak inhibisyon mekanizmaları ve K_i değerleri bulunmuştur. İnhibisyon etkisi gösteren antibiyotiklerden, sodyum ampisilin, sefazolin sodyum, kloramfenikol ve klindamisin fosfat kompetitif türü inhibisyon gösterirken; gentamisin sülfat, klaritromisina ve siprofloksasin nonkompetitif türü inhibisyon etkisi gösterdiği bulunmuştur. Literatürde, sefazolin sodyum benzeri bir başka antibiyotik olan sefatoksim ve sefadizim antibiyotiklerinin insan eritrositlerinde bulunan glutatyon redüktaz enzimi üzerinde kompetitif

inhibisyon etkisi gösterdiği bildirilmektedir [153]. Ayrıca yapılan pek çok çalışmada çeşitli maddelerin serum veya karaciğer PON1 enziminin inhibisyonuna neden olduğu bulunmuştur [160, 199, 207, 208]. Örneğin insan karaciğerinden saflaştırılan PON1 enzimi üzerinde EDTA bileşiğinin, Mg^{+2} , Co^{+2} , Ba^{-2} , La^{+3} , Zn^{+2} , Cu^{+2} , Hg^{+2} gibi metallerin ve cıva p-hidroksi benzoat gibi cıvanın inhibisyon etkisi araştırılmıştır. EDTA, baryum, lantan, bakır ve p-hidroksicıva benzoat bileşiğinin kompetitif bir inhibisyona neden olduğu ve çinkonun ise nonkompetitif bir inhibisyon gösterdiği bildirilmektedir [199]. Ayrıca karbon sayısı değişen çeşitli alifatik alkollerin ve kobalt, nikel ve kadmiyum gibi metallerin de insan serum PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir [207, 208].

Çalışmamızda, PON1 enzim aktivitesi üzerindeki *in vitro* ve *in vivo* etkisini incelediğimiz antibiyotiklerin, insan karaciğer PON1 enziminin aktivitesi üzerine etkisini de incelemek amacıyla HepG2 insan karaciğer hücresi model olarak kullanılmıştır. Bu amaçla PON1 enzimini doğal olarak üreten HepG2 hücreleri üzerine farklı konsantrasyonlarda antibiyotikler uygulanmıştır. Daha sonra *in vivo* çalışmamıza paralellik göstermesi açısından antibiyotikler uygulandıktan 2,4 ve 6 saat sonra PON1 aktivitesine bakılmıştır. İnhibisyona neden olan her bir antibiyotiğin PON1 enzim aktivitesini % 50 azaltan konsantrasyonu belirlenmiştir. Uygulanan antibiyotiklerin I_{50} değerleri karşılaştırıldığında insan karaciğer PON1 enzim aktivitesinde en etkili antibiyotiğin rifamisin olduğu bulunmuştur. Ayrıca PON1 üzerinde inhibisyon etkisi gösteren antibiyotikler en fazla etkilerini genellikle 4 ve 6 saat sonunda göstermişlerdir.

Tıbbi ilaçların PON1 aktivitesi üzerine etkisinin araştırılmasına yönelik yapılan çalışmalarda, daha çok PON1'in HDL'ye bağlı olmasından dolayı lipit seviyesini etkileyen ilaçlar üzerine yoğunlaşmıştır. Örneğin, HMG koenzim A redüktaz inhibitörleri olan kolesterol ve trigliserit düşürücü olarak kullanılan statinler ve lipit düzenleyicisi olarak kullanılan fibratlar [55, 172, 177]. Lipit seviyesini düzenleyen bu ilaçlar daha çok insan karaciğer PON1 enzim aktivitesi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla, doku kültüründe yetiştirilen ve insan karaciğer hücre hattı olan HuH7 ve HepG2 hücreleri üzerinde çalışılmıştır. HuH7 hücreleri ile yapılan bir *in vitro* çalışmada pravastatin, simvastatin ve fluvastatin (10-100 μM)

kültür medyumunda PON1 aktivitesi üzerinde %25-50 azalmaya neden olmuştur [138]. Aynı hücreler üzerinde yapılan diğer bir çalışmada fenofibrik asit (250 µM) PON1 aktivitesinde % 50, mRNA seviyesini % 30 arttırmıştır [172]. Bunun yanında, simvastatinin insan karaciğer hücresi olan HepG2 hücrelerinde (1,5-25 µg/ml) PON1 in promoter aktivitesini düzenlediği bulunmuştur [173]. Lipoproteinlerin izole edildiği bir diğer in vitro çalışmada, atorvastatinin (5-50 µM) yükseltgenmiş iki metaboliti ve gemfibrozil metabolitinin (2-80 µM) HDL'ye bağlı olan PON 1 aktivitesini arttırdığı bulunmuştur [55].

Sonuç olarak yapılan çalışmalarda aşağıdaki bulgular elde edilmiştir.

- ✓ İnsan serum PON1 enzimini saflaştırmak için Sepharose 4BL-tirozin 1-naftilamin kimyasal yapısına sahip yeni bir hidrofobik etkileşim kromatografisi jeli sentezlenmiştir.
- ✓ Sepharose-4B-L-tirozin-1-Naftilamin yapısına sahip hidrofobik jel kullanılarak insan serumundan PON1 enzimi saflaştırılmıştır
- ✓ Amonyum sülfat çöktürmesi ve hidrofobik etkileşim kromatografisi yöntemi ile saflaştırılan insan serum PON1 enzimi SDS-PAGE elektroforezinde yaklaşık 43 kDa molekül ağırlığında tek bant elde edilmiştir.
- ✓ Yaygın olarak kullanılan aminoglikozit grubu antibiyotiklerden gentamisin sülfat, sefalosporinler grubundan sefazolin sodyum, penisilin grubu sodyum ampisilin, amfenikol grubu kloramfenikol, makrolid grubu olan klaritromisin, kinolon grubu siprofloksasin, aminosalisilik asit türevi olan rifamisin SV ve linkozamid grubundan klindamisin fosfat gibi antibiyotiklerin serum fPON1 ve karaciğer fPON1 enzim aktivitesini *in vivo* olarak farklı düzeylerde etkilediği saptanmıştır.
- ✓ Söz konusu antibiyotikler sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin yapısına sahip hidrofobik jel ile saflaştırılan serum hPON1 enzim aktivitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu bileşiklerden gentamisin sülfat, sodyum ampisilin, sefazolin

sodyum, siprofloksasin, kloramfenikol, klaritromisin ve klindamisin fosfatın inhibisyon etkisi gösterdiği saptanmıştır.

- ✓ İnhibisyona sebep olan antibiyotiklerin inhibisyon mekanizmaları saptanmıştır
- ✓ Söz konusu antibiyotiklerin karaciğer hPON1 enzimi üzerine *in vitro* etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla HepG2 insan karaciğer hücresi kullanılmıştır. Uygulanan bütün antibiyotiklerin doza bağlı bir inhibisyon gösterdiği tespit edilmiştir.



5. KAYNAKLAR

- [1] Costa, L.G., Li, W.F., Richter, R.J., Shih, D.M., Lusic, A. and Furlong, C.E., "The role of paraoxonase (PON 1) in the detoxication of organophosphates and its human polymorphism", *Chem. Biol. Interact.*, (1999) **119-120**, 429.
- [2] La Du, B.N., Aviram, M., Billecke, S., Navab, M., Primo-Parmo, S., Sorenson, R.C. and Standiford, T.J., "On the physiological role(s) of the paraoxonases", *Chemico-Biological Interaction*, (1999) **119-120**, 379.
- [3] Aviram, M., Rosenblat, M. and Billecke, S., "Human serum paraoxonase (PON1) is inactivated by oxidised low density lipoprotein and preserved by antioxidants", *Free Radicals Biol. Med.*, (1999) **26**, 892.
- [4] Mackness, M.I., Arrol, S., Abbott, C. and Durrington, P.N., "Protection of low density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase", *Atherosclerosis*, (1993) **104**, 129.
- [5] Mackness, M.I., Arrol, S. and Durrington, P.N., "Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low density lipoprotein", *FEBS Lett.*, (1991) **286**, 152.
- [6] Graham, A., David, G.H., Rafique, S. and Owen, J.S., "Evidence for a paraoxonase- independent inhibition of low density lipoprotein oxidation by high-density lipoprotein", *Atherosclerosis*, (1997) **135**, 193.
- [7] Aldridge, W.N., Reiner, E., "Enzyme inhibitors as substrates: interaction of esterases with esters of organophosphorus and carbamic acid", (1975) 176-189, American Elsevier, New York.
- [8] Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry. Enzyme Nomenclature. Recommendation 1984 Suppl. 2, correction and additions. *European Journal of Biochemistry* (1989) 489-533.
- [9] Mackness, M.I., Thompson, H.M., Hardy, A.R., Walker, C.H., "Distinction between A-esterase and arylesterase. *Biochemistry Journal* (1987) **245**, 293-296.

- [10] Main, A.R., "The role of A- esterase in the acute toxicity of paraoxon, TEPP and parathion", *Can. J. Biochem. Physiol.*, (1956) **34**, 197.
- [11] La Du, B.N., Furlong, C.E. and Reiner, E., "Recomended nomenclature system for the paraoxonases", *Chemico-Biological Interaction*, (1999) **119-120**, 599.
- [12] Aldridge, W.N., "Serum esterases I: two types of esterases (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate propionate and butyrate and a method their determination", *Biochem J.*, (1953a) **53**, 110.
- [13] Aldridge, W.N., "Serum esterases II: an enzyme hydrolyzing diethyl p-nitrophenyl phosphate (E600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera", *Biochem. J.*, (1953b) **53**, 117.
- [14] Furlong, C.E., Richter, R.J., Chapline, C. and Crabb, J.W., "Purification of Rabbit and Human Serum Paraoxonase", *Biochemistry*, (1991) **30**, 10133.
- [15] Rodrigo, L., Gil, F., Hernandez, A.F. and Pla, A., "Identification of two rat liver proteins with paraoxonase activity: biochemical evidence for the identity of paraoxonase and arylesterase", *Chem. Biol. Interact.*, (1999) **263**, 119-120,.
- [16] Bastos, C., Rossini, A., Alves, M.V., Ceccarelli, P.S., Lima, J.A.F. and Bastos, J.C., "Paraoxonase activity in sera from *Piaractus mesopotamicus* holmberg (Characidae) and *Hypostomus punctatus* valenciennes (Siluridae)", *Revta bras. Zool.*, (1998) **15(3)**, 665.
- [17] Keizer, J., D'Agostina, G. and Vittozi, L., "The importance of biotransformation in the toxicity of xenobiotics to fish. I. Toxicity and bioaccumulation ox diazinon in guppy (*Poecilia reticulata*) and zebra fish (*Brachydanio reriro*)", *Aquatic toxic.*, (1991) **21**, 239.
- [18] Primo-Parmo, S.L., Sorenson, R.S., Teiber, J. and La Du, B.N., "The human serum paraoxonase/arylesterase gen (PON1) is one member of a multigene family", *Genomics*, (1996) **33**, 498.
- [19] Draganov, D.I. and La Du, B.N., "Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review", *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, (2004) **369**, 78.

- [20] Chemnitz, J.M., Losch, H., Losch, K. and Zech, R., "Organophosphate detoxicating hydrolases in different vertebrate species", *Comp. Biochem. Physiol.*, (1983) **76C**, 85.
- [21] Mackness, M.I., "Commentary. 'A' esterases, Enzymes looking for a role?", *Biochem Pharmacol*, (1989a) **38**, 385.
- [22] Mackness, M.I., (1989b) Possible medical significance of human serum 'A' esterases In: Reiner, E., Aldridge, W.N., Hoskin, F.C.G., *Enzymes hydrolyzing organophosphorus compounds*. Ellis Horwood, Chichester, 202-213.
- [23] Mackness, M.I., Mackness, B., Arrol, S., Wood, G., Bhatnagar, D. and Durrington, P.N., "Presence of paraoxonase in human interstitial fluid", *Febs Letter*, (1997) **416**, 377.
- [24] Hassett, C., Richter, R.J., Humbert, R., Chapline, C., Crabb, J.W., Omiecinski, C.J. and Furlong, C.E., "Characterization of cDNA clones encoding rabbit and human serum paraoxonase: the mature protein retains its signal sequence", *Biochemistry*, (1991) **30**, 10141.
- [25] La Du, B.N., "Structural and functional diversity of paraoxonases", *Nat. Med.*, (1996) **2**, 1186.
- [26] Klimov, A.N., Gurevich, V.S., Nikiforova, A.A., Shatilina, L.V., Kuzmin, A.A., Plavinsky, S.L. and Teryukova, N.P., "Antioxidative activity of high-density lipoproteins in vivo", *Atherosclerosis*, (1993) **100**, 13.
- [27] Rosenblat, M., Draganov, D., Watson, C.E., Bisgaier, C.L., La Du, B.N. and Aviram, M., "Mouse macrophage paraoxonase 2 activity is increased whereas cellular paraoxonase 3 activity is decreased under oxidative stress", *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.*, (2003) **23**, 468.
- [28] Mochizuki, H., Scherer, S.W., Xi, T., Nickle, D.C., Majer, M., Huizenga, J.J., Tsui, L.C. and Prochazka, M., "Human PON2 gene at 7q21.3: cloning, multiple mRNA forms, and missense polymorphisms in the coding sequence", *Gene*, (1998) **213**, 149.
- [29] Eckerson, H.W., Wyte, C.M. and La Du, B.N., "The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism", *Am. J. Hum. Genet.*, (1983) **35**, 1126.

- [30] Gan, K.N., Smolen, A., Eckerson, H.W., La Du, B.N., "Purification of human serum paraoxonase/arylesterase", *Drug Metab. Dispos.*, (1991) **19**, 100.
- [31] Mackness, M.I., Mackness, B., Durrington, P.N., Connelly, P.W. and Hegele, R.A., "Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins", *Curr. Opin. Lipidol.*, (1996) **7**, 69.
- [32] Sorenson, R.C., Primo-Parmo, S.L., Kuo, C.L., Adkins, S., Lockridge, O. and La Du, B.N., "Reconsideration of the catalytic center and mechanism of mammalian paraoxonase/arylesterase", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1995) **92**, 7187.
- [33] Humbert, R., Adler, D.A., Disteché, C.M., Hassett, C., Omiecinski, C.J. and Furlong, C.E., "The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism", *Nature Genetics*, (1993) **3**, 73.
- [34] Jawad, Z. and Paoli, M., "Novel sequences propel familiar folds", *Structure (Camb)*, (2002) **10(4)**, 447. Review.
- [35] Harel, M., Aharoni, A., Gaidukov, L., Brumshtein, B., Khersonsky, O., Meged, R., Dvir, H., Ravelli, R.B.G., McCarthy, A., Toker, L., Silman, I., Sussman, J.L. and Dan S. Tawfik, "Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes", *Nature Struct. Mol. Biol.* (2004) **11**, 412.
- [36] Kuo, C.L. and La Du, B.N., "Calcium binding by human and rabbit serum paraoxonases. Structural stability and enzymatic activity", *Drug Metab. Dispos.*, (1998) **26**, 653.
- [37] Scharff, E.I., Koepke, J., Fritsch, G., Lücke, C. and Rüterjans, H., "Crystal structure of diisopropylfluorophosphatase from *Loligo vulgaris*", *Structure*, (2001) **9**, 493.
- [38] Fokine, A., Morales, R., Contreras-Martel, C., Carpentier, P., Renault, F., Rochu, D. and Chabriere, E., "Direct phasing at low resolution of a protein copurified with human paraoxonase (PON1)", (2003) **59(12)**, 2083.
- [39] James, R.W., and Deakin, S.P., "The importance of high-density lipoproteins for paraoxonase-1 secretion, stability and activity", *Free Radical Biology and Medicine*, (2004) **37(12)**, 1986.

- [40] Josse, D., Ebel, C., Stroebel, D., Fontaine, A., Borges, F., Echalié, A., Baud, D., Renault, F., Le Maire, M., Chabrieres, E., Mason, P., "Oligomeric states of the detergent-solubilized human serum paraoxonase (PON1)", (2002) **277(36)**, 33386.
- [41] Aharoni, A., "Directed evolution of mammalian paraoxonases PON1 and PON3 for bacterial expression and catalytic specialization", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (2004) **101**, 482.
- [42] Josse, D., "Identification of residues essential for human paraoxonase (PON1) arylesterase/organophosphatase activities", *Biochemistry*, (1999) **38**, 2816.
- [43] Jonas, A., "Lecithin cholesterol acyltransferase", *Biochim. Biophys. Acta*, (2000) **1529**, 245.
- [44] Lusis, A.J., "Atherosclerosis", *Nature*, (2000) **407**, 233.
- [45] Mackness, B., Davies, G.K., Turkei, W., Lee, E., Roberts, D.H., Hill, E., Roberts, C., Durrington, P.N. and Mackness, M.I., "Paraoxonase Status in Coronary Heart Disease", *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* (2001) **21**, 1451.
- [46] Billecke, S., Draganov, D., Councell, R., Stetson, P., Watson, C., Hsu, C. and La Du, B.N., "Human serum paraoxonase (PON1) isozymes Q and R hydrolyse lactones and cyclic carbonate esters", *Drug Metab. Dispos.*, (2000) **28(11)**, 1335
- [47] Biggadike, K., Angell, R.M., Burgess, C.M., Farrell, R.M., Hancock, A.P., Harker, A.J., Irving, W.R., Ioannou, C., Panayiotis, A., Procopiou, P.A., Shaw, R.E., Solanke, Y.E., Singh, O.M.P., Snowden, M.A., Stubbs, R.J., Walton, S. and Weston, H.E., "Selective plasma hydrolysis of glucocorticoid γ -lactones and cyclic carbonates by the enzyme paraoxonase: An ideal plasma inactivation mechanism", *J. Med. Chem.* (2000) **43**, 19.
- [48] Teiber, J.F., Draganov, D.I., La Du, B.N., "Lactonase and Lactonizing of Human Serum Paraoxonase (PON1) and Rabbit Serum PON3", *Biochemical Pharmacology*, (2003) **66**, 887.

- [49] Billecke, S., Draganov, D. and Rosenblat, M., "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*, (2000) **101**, 2510.
- [50] Jakubowski, H., "Calcium-dependent human serum homocysteine thiolactone hydrolase. A protective mechanism against protein N-homocysteinylation", *J. Biol. Chem.*, (2000) **275**, 3957.
- [51] Kearny, A.S, Crawford, L.F., Mehta, S.C. and Radebaugh, G.W., "The interconversion kinetics, equilibrium, and solubilities of the lactone and hydroxyacid forms of the HMG-CoA reductase inhibitor, CI-981", *Pharm. Res.*, (1993) **10**, 1461.
- [52] Garrett, E.R., Lippold, B.C. and Mielck, J.B., "Kinetics and mechanisms of lactonization of coumarinic acids and hydrolysis of coumarins I", *J. Pharm. Sci.*, (1971) **60**, 396.
- [53] Augustinsson, K.B., Homologous enzymes and biochemical evolution, (eds) In: Van Thoai N., Roche J., Gordon and Breach, New York, (1968), 299-311.
- [54] Aviram, M., Billecke, S., Sorenson, R., Bisgaier, C., Newton, R., Rosenblat, M., Erogul, J., Hsu, C., Dunlop, C. and La Du, B.N., "Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities. Selective action of human paraoxonase allozymes Q and R", *Arterioscler. Thromb Vasc. Biol.*, (1998) **18**, 1617.
- [55] Aviram, M., Rosenblat, M., Bisgaier, C.L., Newton, R.S., Primo-Parmo, L.S. and La Du, B.N., "Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase", *J. Clin. Invest.*, (1998) **101(81)**, 1581.
- [56] Doorn, J.A., Sorenson, R.C., Billecke, S.S., Hsu, C. and La Du, B.N., "Evidence that several conserved histidine residues are required for hydrolytic activity of human paraoxonase/arylesterase", *Chemico-Biological Interaction*, (1999) **119-120**, 235.

- [57] Vickers, S., Duncan, C.A., Chen, I-W., Rosegay, A. and Duggan, D.E., "Metabolic disposition studies of simvastatin, a cholesterol-lowering prodrug", *Drug Metab Dispos* (1990) **18**, 138.
- [58] Tang, B.K. and Kalow, W., "Variable activation of lovastatin by hydrolytic enzymes in human plasma and liver", *Eur. J. Clin. Pharmacol.* (1995) **47**, 449.
- [59] Biggadike, K., Angell, R.M., Burgess, C.M., Farrel, R.M., Hancock, A.P., Harker, A.J., Irving, W.R., Ioannou, C., Procopiou, P.A., Shaw, R.E., Solanke, Y.E., Singh, O.M., Snowden, M.A., Stubbs, R.J., Walton, S. and Weston, H.E., "Selective plasma hydrolysis of glucocorticoid gamma-lactones and cyclic carbonates by the enzyme paraoxonase: an ideal plasma inactivation mechanism", *J. Med. Chem.*, (2000) **43**, 19.
- [60] Tougou, K., Nakamura, A., Watanabe, S., Okuyama, Y. and Morino, A., "Paraoxonase Has a Major Role in the Hydrolysis of Prulifloxacin (NM441), a Prodrug of a New Antibacterial Agent", *Drug Metab. Dispos.*, (1998) **26**, (4), 355.
- [61] La Du, B.N., Human serum paraoxonase/arylesterase, In *Pharmacogenetics of Drug Metabolism*, ed. Kalow, W., Pergamon Pres, New York, (1992), p.51.
- [62] Costa, L.G., Li, W.F., Richter, R.J.,. "PON1 and organophosphate toxicity", pp. (2002) 165–83
- [63] Broomfield, C.A. and Ford, K.W., "Hydrolysis of nerve gasses by plasma enzymes", *Proceedings of the 3rd International Meeting on Cholinesterases*, La Grande-Motte, France, (1991), 167.
- [64] Davies, H.G., Richter, R.J., Keifer, M., Broomfield, C.A., Sowalla, J. and Furlong, C.E., "The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin", *Nature Genetics*, (1996) **14**, 334.
- [65] Reiner, E., Aldridge, W.N., Hoskin, F.C.G., *Enzymes Hydrolyzing Organophosphorus Compounds*, John Wiley & Sons, New York, (1989).

- [66] Baillie, T.A., Moldeus, P., Mason, R.P. Younes, M., *Enzymes Interacting with Organophosphorus Compounds*, Elsevier Scientific Publishers Ireland Ltd, Shannon, (1993).
- [67] Lund-Katz, S., Liu, L.J., Thuahnai, S.T. and Philips, M.C., "High density lipoprotein structure", *Front. Biosci.*, (2003) **8**, D1044.
- [68] Navab, M., "High density associated enzymes: their role in vascular biology", *Curr. Opin. Lipidol.*, (1998) **9**, 449.
- [69] Borhani, D.W., Rogers, D.P., Engler, J.A. and Brouillette, C.G., "Crystal structure of truncated human apolipoprotein A-1 suggests a lipid-bound conformation", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1997) **94**, 12291.
- [70] Blatter, M.C., James, R.W., Messmer, S., Barja, F. and Pometta, D., "Identification of a distinct human high-density lipoprotein subspecies defined by a lipoprotein-associated protein, K-45: identity of K-45 with paraoxonase", *Eur. J. Biochem.*, (1993) **211**, 871.
- [71] Kelso, G.J., Stuart, W.D., Richter, R.J., Furlong, C.E., Jordan-Starck, T.C. and Harmony, J.A.K., "Apolipoprotein J is associated with paraoxonase in human plasma", *Biochemistry*, (1994) **33**, 832.
- [72] Deakin, S., Leviev, I., Gomaraschi, M., Calabresi, L., Franceschini, G. and James, R.W., "Enzymatically active paraoxonase-1 is located at the external membrane of producing cells and released by a high affinity, saturable, desorption mechanism", *J. Biol. Chem.*, (2002) **277**, 4301.
- [73] Deakin, S.P., James, R.W., "Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase-1", *Clinical Science*, (2004) **107**, 435.
- [74] Killian, J.A., Von Heijne, G., (2000), How proteins adapt to a membrane-water interface. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 429-434.
- [75] James, R. W., Blatter Garin, M. C., Calabresi, L. et al. (1998) Modulated serum activities and concentrations of paraoxonase in high density lipoprotein deficiency states. *Atherosclerosis* **139**, 77-82

- [76] Blatter, G, M.C., Abbott, C., Messmer, S., Mackness, M., Durrington, P.N., Pometta, D. and James, R.W., "Quantification of human serum paraoxonase by enzyme-linked immunoassay: population differences in protein concentrations", *Biochem. J.*, (1994) **304**, 549.
- [77] Leviev, I., Negro, F. and James, R.W., "Two alleles of the human paraoxonase gene produce different amounts of mRNA: an explanation for differences in serum concentrations of paraoxonase associated with the (Leu-Met54) polymorphism", *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, (1997) **17**, 3935.
- [78] Leviev, I. and James, R.W., "Promoter polymorphisms of the human paraoxonase PON1 gene and serum paraoxonase activities and concentrations", *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, (2000) **20**, 516.
- [79] Deakin, S., Leviev, I., Guernier, S. and James, R.W., "Simvastatin modulates expression of the PON1 gene and increases serum paraoxonase: a role for sterol regulatory element-binding protein-2", *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, (2003) **23**, 2083.
- [80] Feingold, K-R., Memon, R-A., Moser, A-H. and Grunfeld, C., "Paraoxonase activity in the serum and hepatic mRNA levels decrease during the acute phase response", *Atherosclerosis*, (1998) **139**, 307.
- [81] Van Lenten, B.J., Wagner, A.C., Nayak, D.P., Hama, S., Navab, M. and Fogelman, A.M., "HDL loses its anti-inflammatory properties during acute influenza A infection", *Circulation*, (2001) **103**, 2283.
- [82] Cabana, VG., Reardon, C.A, Feng, N., Neath, S.X., Lukens, J.R. and Getz, G.S., "Serum paraoxonase: effect of the apoproteins of HDL and the acute phase response", *J. of Lipid Research*, (2003) **44(4)**, 780.
- [83] Martoglio, B. and Dobberstein, B., "Signal sequences - more than just greasy peptides", *Trends Cell Biol.*, (1998) **8**, 410.
- [84] Deakin, S., Leviev, I., Nicaud, V., Brulhart Meynet, M. C., Tiret, L. and James, R. W. (2002) Paraoxonase-1 L55M polymorphism is associated with an abnormal oral glucose tolerance test and differentiates high risk coronary disease families. *J. Clin. Endocrinol.Metab.* **87**, 1268–1273

- [85] Sorenson, R.C., Bisgaier, C.L., Aviram, M., Hsu, C., Billecke, S. and La Du, B.N., "Human serum paraoxonase/arylesterase's retained hydrophobic N-terminal leader sequence associates with high density lipoproteins by binding phospholipids: apolipoprotein A-1 stabilizes activity", *Atheroscler Thromb Vasc Biol*, (1999) **19**, 2214.
- [86] Oda, M.N., Bielicki, J.K., Berger, T. and Forte, T.M., "Cysteine substitutions in apolipoprotein a-I primary structure modulate paraoxonase activity", *Biochem*, (2001) **40**, 1710.
- [87] Costa, L.G., Cole, T.B., Jarvik, G.P. and Furlong, E.F., "Functional Genomics of the Paraoxonase (PON1) Polymorphisms: Effects on Pesticide Sensitivity, Cardiovascular Disease, and Drug Metabolism", *Annu. Rev. Med.*, (2003) **54**, 371.
- [88] Costa, L.G. and Furlong, C.E., *Paraoxonase (PON1) in Health and Disease: Basic and Clinical Aspects*. Norwell, MA: Kluwer Acad. (2002)
- [89] Geldmacher-von Mallinckrodt, M., Lindorf, H.H., Petenyi, M., Flugel, M., Fischer, T. and Hiller, T., "Genetically determined polymorphism of human serum paraoxonase (E.C.3.1.1.2)", *Humangenetic*, (1973) **17(4)**, 331.
- [90] Geldmacher-von Mallinckrodt, M. and Diepgen, T.L., "The human paraoxonase-polymorphism and specificity", *Toxicol. Environment. Chem.*, (1988) **18**, 79.
- [91] Playfer, J.R., Eze, L.C., Bullen, M.F. and Evans, D.A., "Genetic polymorphism and interethnic variability of plasma paraoxonase activity", *J. Med. Genet.*, (1976) **13**, 337.
- [92] Humbert, R., Adler, D.A., Disteché, C.M., Hassett, C., Omiecinski, C.J. and Furlong, C.E., "The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism", *Nature Genet.*, (1993) **3**, 73.
- [93] Brophy, V.H., Hastings, M.D., Clendenning, J.B., Richter, R.J., Jarvik, G.P. and Furlong, C.E., "Polymorphisms in the human paraoxonase (PON1) promoter", *Pharmacogenetics*, (2001a) **11**, 77.

- [94] Brophy, V.H., Jampsa, R.L., Clendenning, J.B., McKinstry, L.A., Jarvik, G.P. and Furlong, C.E., "Effects of 5' regulatory-region polymorphisms on paraoxonase-gene (PON1) expression", *Am. J. Hum. Genet.*, (2001b) **68**, 1428.
- [95] Davies, H.G., Richter, R.J., Keifer, M., Broomfield, C.A., Sowalla, J. and Furlong, C.E., "The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin", *Nature Genet.*, (1996) **4**, 334.
- [96] Aviram, M., Hardak, E., Vaya, J., Mahmood, S., Milo, S., Hoffman, A., Billecke, S., Draganov, D. and Rosenblat, M., "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*, (2000) **101**, 2510.
- [97] Mackness, M.I., Mackness, B., Durrington, P.N., Connely, P.W., Hegele, R.A., "Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins", *Cur. Opin. Lipid.*, (1996) **7**, 69.
- [98] Aynacioglu, A.S., Cascorbi, I., Mrozikiewicz, P.M., Nacak, M., Tapanyigit, E.E. and Roots, I., "Paraoxonase 1 (PON1) mutations in a Turkish population", *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, (1999) **157**, 174.
- [99] Azarsız, E. and Sözmen, E.Y., "Paraoksonaz ve Klinik Önemi", *Türk Biyokimya Dergisi*, (2000) **25**, (3) 109.
- [100] Aynacıoğlu, A.S. and Kepekçi, Y., "The human paraoxonase Gln-Arg 192 (Q/R) polymorphism in Turkish patients with coronary artery disease", *International Journal of Cardiology*, (2000) **74**, 33.
- [101] Marchesani, M., Hakkarainen, A., Tuomainen, T.P., Kaikkonen, J., Pukkala, E., Uimari, P., Seppala, E., Matikainen, M., Kallioniemi, O.P., Schleutker, J., Lehtimäki, T. and Salonen, J.T., "New paraoxonase 1 polymorphism I102V and the risk of prostate cancer in Finnish men", *J. Natl. Cancer Inst.*, (2003) **4**, 95(11), 812.
- [102] Mackness, B., Durrington, P.N., Mackness, M.I., PON1 and other diseases, In: Costa LG, Furlong CE (eds) *Paraoxonase (PON1) in health and disease*. Kluwer, Norwell, (2002) pp 185–195.

- [103] Boemi, M., Leviev, I., Sirolla, C., Pieri, C., Marra, M. and James, R.W., "Serum paraoxonase is reduced in type 1 diabetic patients compared to non-diabetic, first degree relatives; influence on the ability of HDL to protect LDL from oxidation", *Atherosclerosis*, 1(2001) **55**, 229.
- [104] Mackness, B., Durrington, P.N., Boulton, A.J., Hine, D. and Mackness, M.I., "Serum paraoxonase activity in patients with type 1 diabetes compared to healthy controls", *Eur. J. Clin. Invest.*, (2002b) **32**, 259.
- [105] Kao, Y.L., Donaghue, K., Chan, A., Knight, J., Silink, M., "A variant of paraoxonase (PON1) gene is associated with diabetic retinopathy in IDDM", *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 8(1998) **3**, 2589.
- [106] Murata, M., Nakagawa, M. and Takahashi, Y., "Molecular variant of the human paraoxonase/arylesterase gene is associated with central retinal vein occlusion in the Japanese population", *Ophthalmologica*, (1998) **212**, 257.
- [107] Akhmedova, S., Anisimov, S., Yakimovsky, A. and Schwarz, E., "Gln→Arg 191 polymorphism of paraoxonase and Parkinson's disease", *Hum. Hered.*, (1999) **49**, 178.
- [108] Dantoine, T.F., Drouet, M., Debord, J., Merle, L., Cogne, M. and Charmes, J.P., "Paraoxonase 1 192/55 gene polymorphisms in Alzheimer's disease", *Ann. NY. Acad. Sci.*, (2002) **977**, 239.
- [109] Osei-Hyiaman, D., Hou, L., Mengbai, F., Zhiyin, R., Zhiming, Z. and Kano, K., "Coronary artery disease risk in Chinese type 2 diabetics: is there a role for paraoxonase 1 gene (Q192R) polymorphism?", *Eur. J. Endocrinol.*, (2001) **144**, 639.
- [110] Ito, T., Yasue, H., Yoshimura, M., Nakamura, S., Nakayama, M., Shimasaki, Y., Harada, E., Mizuno, Y., Kawano, H. and Ogawa, H., "Paraoxonase gene Gln192Arg (Q192R) polymorphism is associated with coronary artery spasm", *Hum. Genet.*, (2002) **110**, 89.
- [111] Zhang, Z., Zhang, L., Yepes, M., Jiang, Q., Li, Q., Arniago, P., Coleman, T.A., Lawrence, D.A. and Chopp, M., "Adjuvant treatment with neuroserpin increases the therapeutic window for tissue-type plasminogen activator administration in a rat model of embolic stroke", *Circulation*, (2002) **106**, 740.

- [112] Cherry, N., Mackness, M., Durrington, P.N., Povey, A., Dippnall, M., Smith, T. and Mackness, B., "Paraoxonase (PON1) polymorphisms in farmers attributing ill health to sheep dip", *Lancet*, (2002) **359**, 763.
- [113] Worth, J., "Paraoxonase polymorphisms and organophosphates", *Lancet*, (2002) **360**, 802.
- [114] Allebrandt, K.V., Souza, R.L. and Chautard-Freire-Maia, E.A., "Variability of the paraoxonase gene (PON1) in Euro- and Afro-Brazilians", *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, (2002) **180**, 151.
- [115] Hegele, R.A., "Paraoxonase genes and disease", *Ann. Med.*, (1999) **31**, 217.
- [116] Yamada, M., Sodeyama, N., Itoh, Y., Suematsu, N., Otomo, E., Matsushita, M. and Mizusawa, H., "No association of paraoxonase genotype or atherosclerosis with cerebral amyloid angiopathy", *Stroke*, (2002) **33**, 896.
- [117] Arca, M., Ombres, D., Montali, A., Campagna, F., Mangieri, E., Tanzilli, G., Campa, P.P., Ricci, G., Verna, R. and Pannitteri, G., "PON1 L55M polymorphism is not a predictor of coronary atherosclerosis either alone or in combination with Q192R polymorphism in an Italian population", *Eur. J. Clin. Invest.*, (2002) **32**, 9.
- [118] Sangvanich, P., Mackness, B., Gaskell, S.J., Durrington, P. and Mackness, M., "The effect of high-density lipoproteins on the formation of lipid/protein conjugates during in vitro oxidation of low-density lipoprotein", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (2003) **300**, 501.
- [119] Malin, R., Knuuti, J., Janatuinen, T., Laaksonen, R., Vesalainen, R., Nuutila, P., Jokela, H., Laakso, J., Jaakkola, O., Solakivi, T. and Lehtimäki, T., "Paraoxonase gene polymorphisms and coronary reactivity in young healthy men", *J. Mol. Med.*, (2001) **79**, 449.
- [120] Ikeda, T., Obayashi, H., Hasegawa, G., Nakamura, N., Yoshikawa, T., Imamura, Y., Koizumi, K., Kinoshita, S., "Paraoxonase gene polymorphisms and plasma oxidized low-density lipoprotein level as possible risk factors for exudative age-related macular degeneration", *Am. J. Ophthalmol.*, (2001) **132**, 191.
- [121] Kondo, I. and Yamamoto, M., "Genetic polymorphism of paraoxonase 1 (PON1) and susceptibility to Parkinson's disease", *Brain Res.*, 8(1998) **06**, 271.

- [122] Scacchi, R., Gambina, G., Martini, M.C., Broggio, E., Vilardo, T. and Corbo, R.M., "Different pattern of association of paraoxonase Gln192-->Arg polymorphism with sporadic late-onset Alzheimer's disease and coronary artery disease", *Neurosci. Lett.*, (2003) **13**; 339(1)
- [123] Laplaud, P.M., Dantoine, T. and Chapman, M.J., "Paraoxonase as a risk marker for cardiovascular disease: facts and hypotheses", *Clin. Chem. Lab. Med.*, (1998) **36**, 431.
- [124] Shih, D.M., Gu, L., Hama, S., Xia, Y-R., Navab, M., Fogelman, A.M. and Lusis, A.J., "Genetic-dietary regulation of serum paraoxonase expression and its role in atherogenesis in a mouse model", *J. Clin. Invest.*, (1996) **97**, 1630.
- [125] Shih, D.M., Gu, L., Xia, Y-R., Navab, M., Li, W-F., Hama, S., Castellani, L.W., Furlong, C.E., Costa, L.G., Fogelman, A.M. and Lusis, A.J., "Serum paraoxonase knockout mice are susceptible to organophosphate insecticides and lipoprotein oxidation", *Nature*, (1998) **394**, 284.
- [126] Navab, M., Hama, S.Y., Wagner, A.C., Hough, G., Watson, A.D., Reddy, S.T., Van Lenten, B.J., Laks, H. and Fogelman, A.M., "Protective action of HDL-associated PON1 against LDL oxidation. In: Costa LG, Furlong CE (eds) Paraoxonase (PON1) in health and disease. Kluwer, Norwell, (2002) pp 125–136.
- [127] Mackness, M.I., and Durrington, P.N., "Paraoxonase: another factor in NIDDM cardiovascular disease", *Lancet*, (1995) **346**, 856.
- [128] Bonnefont-Rousselot, D., Therond, P., Beaudoux, J.L., Peynet, J., Legrand, A. and Delattre, J., *Clin. Chem. Lab Med.*, (1999) **37**, 939.
- [129] Stein, O. and Stein, Y., "Atheroprotective mechanisms of HDL", *Atherosclerosis*, (1999) **144**, 285.
- [130] Forte, T.M., Subbanagounder, G., Berliner, J.A., "Altered activities of anti-atherogenic enzymes LCAT, paraoxonase, and platelet-activating factor acetylhydrolase in atherosclerosis-susceptible mice", *J. Lipid Res.*, (2002) **43**, 477.

- [131] Hedrick, C.C., Kholood, H. and Hough, G.P., "Short term feeding of atherogenic diet to mice results in reduction of HDL and paraoxonase that may be mediated by an immune response", *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.*, (2000) **20**, 1946.
- [132] Mackness, M.I., Harty, D., Bhatnagar, D., Winocour, P.H., Arrol, S., Ishola, M. and Durrington, P.N., "Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolaemia and insulin-dependent diabetes mellitus", *Atherosclerosis.*, (1991) **86**, 193.
- [133] Heinecke, J.W. and Lusis, A.J., "Paraoxonase-gene polymorphisms associated with coronary heart disease: support for the oxidative damage hypothesis?", (Letter) *Am. J. Hum. Genet.*, (1998) **62**, 20.
- [134] Durrington, P.N., Mackness, B. and Mackness, M.I., "Paraoxonase and atherosclerosis", *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, (2001) **21**, 473.
- [135] Brophy, V.H., Jarvik, G.P., Furlong, C.E., PON1 polymorphisms. In: Costa LG, Furlong CE (eds) *Paraoxonase (PON1) in health and disease*. Kluwer, Norwell, (2002) pp 53–78.
- [136] Juretiæ, D., Tadijanoviæ, M., Rekiæ, B., Simeon-Rudolf, V., Reiner, E., Bariëiæ, M., "Serum Paraoxonase Activities in Hemodialyzed Uremic Patients: Cohort Study", (2001) **42(2)**, 146.
- [137] McElveen, J., Mackness, M.I., Colley, C.M., Peard, T., Warner, S. and Walker, C.H., "Distribution of paraoxon hydrolytic activity in the serum of patients after myocardial infarction", *Clin. Chem.*, (1986) **32(4)**, 671.
- [138] Ayub, A., Mackness, M.I., Arrol, S., Mackness, B., Patel, J. and Durrington, P.N., "Serum Paraoxonase After Myocardial Infarction", *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, (1999) **19**, 330.
- [139] Tanimoto, N., Kumon, Y., Suehiro, T., Ohkubo, S., Ikeda, Y., Nishiya, K. and Hashimoto, K., "Serum paraoxonase activity decreases in rheumatoid arthritis", *Life Sciences*, (2003) **72**, 2877.
- [140] Sozmen, B., Delen, Y., Girgin, F.K. and Sozmen, E.Y., "Catalase and paraoxonase in hypertensive type 2 diabetes mellitus: correlation with glycemic control", *Clin. Biochem.*, (1999) **32(6)**, 423.

- [141] Valabhji, J., Mccoll, A.I., Schachter, M., Dhanjil, S., Richmond, W., and Elkeles, R.S., "High-density lipoprotein composition and paraoxonase activity in Type I diabetes", *Clinical Science*, (2001) **101**, 659.
- [142] Mazur, A., An Enzyme In Animal Tissues Capable of Hydrolyzing The Phosphorus-Fluorine Bond of Alkyl Fluorophosphates *J. Biol. Chem.* **164** (1946) 271-289.
- [143] Mounter, L.A., Floyd, C.S. and Chanutin, A., Dialkylfluorophosphatase of Kidney I. Purification And Properties, *J. Biol. Chem.* (1953) **204** 221-232
- [144] Main, A. R. (1956) *Can. J. Biochem. Physiol.* **34**, 197-216.
- [145] Furlong, C.E., Costa, L.G., Hassett, C., Richter, R.J., Sundstrom, J.A., Adler, D.A., Disteché, C.M., Omiecinski, C.J., Chapline, C., Crabb, J.W. and Humbert, R., "Human and rabbit paraoxonase: purification, cloning, sequencing, mapping and role of polymorphism in organophosphate detoxification", *Chem. Biol. Interact.*, (1993) **87**, 35.
- [146] Rodrigo, L., Gil, F., Hernández, A.F., Marina, A., Vázquez, J. and Pla, A., "Purification and characterization of paraoxon hydrolase from rat liver", *Biochem. J.*, (1997) **321**, 595.
- [147] Kitchen, B.J., Masters, C.J. and Winzor, D.J., "Effects of lipid removal on the molecular size and kinetic properties of bovine plasma arylesterase", *Biochem J*, (1973) **135**, 93.
- [148] Don, M.M., Masters, C.J. and Winzor, D.J., "Further evidence for the concept of bovine plasma arylesterase as a lipoprotein", *Biochem J*, (1975) **151**, 625.
- [149] Mackness, M.I., Halam, S.D., Peard, T., Warner, S. and Walker, C.H., "The separation of sheep and human serum 'A'-esterase activity into the lipoprotein fraction by ultracentrifugation", *Comp. Biochem. Physiol.*, (1985) **82**, 675.
- [150] Zimmerman, J.K., Grothusen, J.R., Bryson, P.K., Brown, T.M., Partial purification and characterization of paraoxonase from rabbit serum. In "Enzymes Hydrolyzing Organophosphorus Compounds", Ellis Horwood Ltd., Chichester, UK, (1989) 128-142.

- [151] Gil, F., Pla, A., Gonzalvo, M.C., Hernández, A.F. and Villanueva, E., "Partial purification of paraoxonase from rat liver", *Chem. Biol. Interact.*, (1993) **87**, 69.
- [152] Ommaty, R., Vademecum, Hacettepe Taş Kitapçılık, Ankara, (2004), 220-1138.
- [153] Erat, M., Sakiroglu, H. and Ciftci, M., "Purification and characterization of glutathione reductase from bovine erythrocytes", *Prep. Biochem. Biotechnol.*, (2003) **33(4)**, 283.
- [154] Umeki, S., "Anti-inflammatory action of gentamycin through inhibitory effect on neutrophil NADPH oxidase activity", *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, (1995) **110(4)**, 817.
- [155] Beydemir, S., Kulacoglu, D., Ciftçi, F. and Küfrevioğlu, Ö.İ., "The effects of some antibiotics on sheep lens glucose 6-phosphate dehydrogenase in vitro", *Eur. J. Ophthalmol.*, (2003) **13**, 155.
- [156] Best, W., *Enzymes; Their Modes of Action and Inhibition Biological Chemistry, Lecture*, (1998).
- [157] Çiftçi, M., Türkoğlu, V. and Aldemir, S., "Effects of some antibiotics on glucose 6-phosphate dehydrogenase in sheep liver", *Vet. Med-Czech*, (2002) **47**, 283.
- [158] Çoban, A.T., Nalbantoglu, B., Çıl, M.Y., Özdemir, H., Küfrevioğlu, O.İ., "Investigation of the Inhibition Effects of Some Antibiotics on Human Erythrocyte Carbonic Anhydrase Isozymes", *Tr. J. of Medical Sciences*, (1998) **28**, 407.
- [159] Beydemir, Ş., Çiftçi, M., Özmen, İ., Okuroğlu, M.E.B., Özdemir, H. and Küfrevioğlu, Ö.İ., "Effects of Some Medical Drugs on Enzyme Activities of Carbonic Anhydrase from Human Erythrocytes in vitro and from Rat Erythrocytes in vivo", *Pharmacological Research*, (2000) **42**, 187.
- [160] Çiftçi, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., Gündoğdu, M. and Özmen, İ., "Effects of Some Antibiotics on Enzyme Activity of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from Human Erythrocyte", *Pharmacol Res.*, (2000) **41**, 109.

- [161] Perrone, C., Takahashi, K.C., Williams, G.M., "Inhibition of Human Topoisomerase II α by Fluoroquinolones and Ultraviolet A Irradiation", *Toxicological Science*, (2002) **69**, 16.
- [162] Barret, J.F., Gootz, T.D., McGuirk, P.R., Farrel, C.A. and Sokolowski, S.A., "Use of in vitro topoisomerase-II assays for studying quinolone antibacterial agents", *Antimicrob. Agents Chemother.*, (1989) **33**, 1697.
- [163] Fuhr, U., Anders, E-M., Mahr, G., Sorgel, F. and Staib, A.H., "Inhibitory potency of quinolone antibacterial agents against cytochrome P4501A2 activity in vivo and in vitro", *Anrinzign,b AgcutN Chenithe*, (1992) **36**, 942.
- [164] Rodrigues, A.D., Roberts, E.M., Mulford, D.J., Yao, Y. and Ouellet, D., "Oxidative metabolism of clarithromycin in the presence of human liver microsomes. Major role for the cytochrome P4503A (CYP3A) subfamily", *Drug Metab Dispos*, (1997) **25**, 623.
- [165] Gorski, J.C., Jones, D.R., Haehner-Daniels, B.D., Hamman, M.A., O'Mara, E.M. Jr. and Hall, S.D., "The contribution of intestinal and hepatic CYP3A to the interaction between midazolam and clarithromycin", *Clin. Pharmacol. Ther.*, (1998) **64**, 133.
- [166] Flockhart, D.A., Drici, M.D., Kerbusch, T., Soukhova, N., Richard, E., Pearle, P.L., Mahal, S.K. and Babb, V.J., "Studies on the mechanism of a fatal clarithromycin-pimozide interaction in a patient with Tourette syndrome", *J. Clin. Psychopharmacol.*, (2000) **20**, 317.
- [167] Gooderham, M.J., Bolli, P. and Fernandez, P.G., "Concomitant digoxin toxicity and warfarin interaction in a patient receiving clarithromycin [see comments]", *Ann Pharmacother.*, (1999) **33**, 796.
- [168] Desta, Z., Kerbusch, T., Soukhova, N., Richard, E., Ko, J.W. and Flockhart, D.A., "Identification and characterization of human cytochrome P450 isoforms interacting with pimozide", *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, (1998) **285**, 428.
- [169] Bruce, M.A., Hall, S.D., Haehner-Daniels, B.D. and Gorski, J.C., "In vivo Effects of Clarithromycin on Multiple Cytochrome P450S", *Drug Metabolism and Disposition*, (2001) **29(7)**, 1023.

- [170] Frolova, L.Y., Meldrays, Y.A., Kochkina, L.L., Giller, S.A., Eremeyev, A.V., Grayevskaya, N.A. and Kisselev, L.L., "DNA-polymerase inhibitors. Rifamycin derivatives", *Nucleic Acids Research*, (1977) **4(3)**, 523.
- [171] Spisani, S., Traniello, S., Onori, A.M., Rizzuti, O., Martuccio, C. and Callai, L., "3-(Carboxylathio) Rifamycin San d SV Derivatives Inhibit Human Neuthrophil Functions", *Inflammation*, (1998) **22(5)**, 459.
- [172] Gouedard, C., Koum-Besson, N., Barouki, R. and Morel, Y., "Opposite regulation of the human paraoxonase-1 gene PON1 by fenofibrate and statins", *Mol. Pharmacol.*, (2003) **63**, 945.
- [173] Beltowski, J., Wojcicka, G. and Jamroz, A., "Effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors (statins) or tissue paraoxonase 1 and plasma platelet activating factor acetylhydrolase activities", *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, (2004) **43**, 121.
- [174] Jarvik, G.P., Trevanian Tsai, N., McKinstry, L.A., Wani, R., Brophy, V.H. and Richter, R.J., "Vitamins C and E intake is associated with increased paraoxonase activity", *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, (2002) **22**, 1329.
- [175] Balogh, Z., Seres, I., Marangi, M., Kovacs, P., Kakuk, G. and Paragh, G., "Gemfibrozil increases paraoxonase activity in type 2 diabetic patients. A new hypothesis of the beneficial action of fibrates?", *Diabetes Metab.*, (2001) **27**, 604.
- [176] Paragh, G., Seres, I., Harangi, M., Balogh, Z., Illyes, L. and Boda, J., "The effects of micronized fenofibrate on paraoxonase activity in patients with coronary heart disease", *Diabetes Metab.*, (2003) **29**, 613.
- [177] Turay, J., Grniakova, V. and Vakla, J., "Changes in paraoxonase and apolipoprotein A-I, B, B-III and E in subjects with combined familiar hyperlipoproteinemia treated with ciprofibrate", *Drugs Exp. Clin. Res.*, (2000) **26**, 83.
- [178] Durrington, P.N., Mackness, M.I., Bhatnagar, D., Julier, K., Prais, H. and Arrol, S., "Effects of two different fibric acid derivatives on lipoproteins, cholesterol ester transfer, fibrinogen, plasminogen activator inhibitor and paraoxonase activity in type IIb hyperlipoproteinemia", *Atherosclerosis*, (1998) **138**, 217.

- [179] Radic, Z. and Reiner, E., "Effect of atropine on esterases from human blood and pig liver", *Acta Pharm. Jugosl.*, (1986) **36**, 1.
- [180] Blatter-Garin, M.C., Kalix, B., De Pre, S. and James, R.W., "Aspirin use is associated with higher serum concentrations of the antioxidant enzyme, paraoxonase-1", *Diabetologia*, (2003) **46**, 593.
- [181] Ali, B., Zhang, Q., Lim, Y.K., Feng, D., Retnam, L. and Lim, S.K., "Expression of major HDL-associated antioxidant PON1 is gender dependent and regulated during inflammation", *Free Radic. Biol. Med.*, (2003) **34**, 824.
- [182] Bradford M.M.: A rapid and sensitive method for the quantition of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, (1976), **72**, 248–251
- [183] Laemmli, D. K., "Cleavage of Structural Proteins During in Assembly of the Head of Bacteriophage T₄. Nature, London, 227, 680, (1970).
- [184] Sorenson, RC., Aviram, M., Bisgaier, CL., Billecke, S., La Du BN., "Properties of the retained N-terminal hydrophobic leader sequence in human serum paraoxonase/arylesterase" *Chem. Biol. Interact.* (1999) **119-120**, 243-249.
- [185] Keha, E.E., Karbonik anhidraz enziminin saflaştirılması için geliştirilmiş bir afinite kromatografisi metodu, Doçentlik Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Erzurum.
- [186] Wistrand, P.J., Lindahl, S. and Wahlstrand, T., "Human renal carbonic anhydrase. Purification and properties", *Eur J. Biochem.*, (1975) **57**, 189.
- [187] Canales, I., Manjon, A. and Iborra, J.L., "Immobilization of β -glucuronidases on an epoxy-activated polyacrylic matrix", *Biotechnol. Tech.*, (1990) **4**, 205
- [188] Ozensoy, O., Arslan, O. and Sinan, S.O., "A new method for purification of carbonic anhydrase Isozymes by affinity chromatography", *Biochemistry (Moscow)*, (2004) **69(2)**, 216.

- [189] Arslan, O., Nalbantoğlu, B., Küfrevioğlu, O. I., Synthesis and investigation of inhibition effects of new carbonic anhydrase inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* (1997) **5** (3): 515-518.
- [190] Jakoby, B., Wilchek, M., Coupling reaction of ligands and general methodology of affinity chromatography, in *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, (1974).
- [191] Robyt, JF., White, BJ., "Biochemical Techniques Theory and Practice", (1990), Waveland Press, Inc.p:98.
- [192] <http://www.chromatography.amershambiosciences.com>
- [193] Aguiar, J.A.K. and Michelacci, Y.M. "Preparation and purification of *Flavobacterium heparinum* chondroitinases AC and B by hydrophobic interaction chromatography". *Braz J Med Biol Res*, May (1999), **32**(5) 545-550.
- [194] Kminkova, M. and Jiri Kucera, J. "Single-Step Separation Of Lactate Dehydrogenase Using Thiophilic Chromatography", *Czechoslovak Chemical Communications*, (1998) **63**(6), 851-856.
- [195] Pond, AL., Chambers, HW., Coyne, CP., Chambers, JE., Purification of two rat hepatic proteins with A-esteraseactivity toward chlorpyrifos-oxon and paraoxon, *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*, (1998), **286**(3), 1404-1411.
- [196] Draganov, DI., Stetson, PL., Watson, CE., Billecke, SS., La Du BN., "Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation", *J. Biol. Chem.* (2000) **275**, 33435-33442.
- [197] Gülcü, F., Gürsu, MF., "Paraoksonaz ve arilesteraz aktivite ölçümlerinin standardizasyonu", *Turkish Journal of Biochemistry*, (2003), **28**(2) 45-49.
- [198] Brushia, RJ., Forte, TM., Oda, MN., La Du BN., Bielicki, JK., "Baculovirus-mediated expression and purification of human serum paraoxonase 1A", *Journal of Lipid Research*, (2001), **42**, 951-958

- [199] Pellin, MC., Moretto, A., Lotti, M., Vilanova, E., Distribution and biochemical properties of rat paraoxonase activity *Neurotoxicol Teratol* (1990) 12, 611-614.
- [200] Gonzalvo, MC., Gil, F., Hernandez, F., Villanueva, E., Pla, A., "Inhibition of paraoxonase activity in human liver microsomes by exposure to EDTA, metals and mercurials"., *Chemico-Biological Interactions* (1997) 105, 169-179.
- [201] Oğur, R., Tekbaş, ÖF., "Laboratuar hayvanları el kitabı", (2001), p:25-51
- [202] Beydemir, Ş., Çiftçi, M., Küfrevioğlu Öİ., Büyükokuroğlu, ME., "Effects of Gentamicin Sulfate on Enzyme Activities of Carbonic Anhydrase from Human Erythrocytes *in Vitro* and from Rat Erythrocytes *in Vivo*",(2002) *Biological-Pharmaceutical Bulletin*, 25(8) 966.
- [203] Beydemir Ş., Çiftçi M., Özmen I., Büyükokuroğlu M.E., Özdemir H., Küfrevioğlu Ö.I.: Effects of some medical drugs on enzyme activity of carbonic anhydrase from human erythrocytes *in vitro* and from rat erythrocytes *in vivo*. *Pharmacol. Res.*, (2000), 42, 187-191
- [204] Çiftçi, M., Beydemir, Ş., Yılmaz, H., Bakan, E., "Effects of some drugs on rat erythrocyte 6-phosphogluconate dehydrogenase: an *in vitro* and *in vivo* study", *Polish Journal of Pharmacology*, (2002) 54, 275-280.
- [205] Çiftçi, M., Küfrevioğlu, Öİ., Gündoğdu, M., Özmen, I., "Effects of some antibiotics on enzyme activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes", *Pharmacol Res.* (2000), 41(1):109-13.
- [206] Ateşşahin, A., Karahan, İ., Prinçci, İ., Gürsu, F., Gülcü, F., "Effects of phenobarbital on serum and liver paraoxonase and arylesterase activities in rats"., *Turkish J. Veterinary animal Science* (2004) 28, 363-367.
- [207] Debord, J., Dantoine, T., Bollinger, JC., Abraham, MH., Verneuil, B., Merle, L. "Inhibition of arylesterase by aliphatic alcohols", *Chemico-Biological Interactions* (1998), 113, 105-115.
- [208] Debord, J., Bollinger, JC., Lous, M., Dantoine, T., "Inhibition of human serum arylesterase by metal chlorides", *Journal of Inorganic Biochemistry*, (2003), 94, 1-4.