

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

BAZI İLAÇLARIN PARAOKSONAZ İZOENZİMLERİ (PON1 VE PON2)
ÜZERİNE ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AYLA SOLMAZ AVCIKURT

Balıkesir Temmuz 2009

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

BAZI İLAÇLARIN PARAOKSONAZ İZOENZİMLERİ (PON1 VE PON2)
ÜZERİNE ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AYLA SOLMAZ AVCIKURT

Tez Danışmanları : Doç.Dr. Feray KOÇKAR

Doç.Dr.Selma SİNAN

Sınav Tarihi : 29.07.2009

Jüri Üyeleri: Doç.Dr. Feray KOÇKAR (Danışman-BAÜ)

Prof.Dr. Oktay ARSLAN (BAÜ)

Doç.Dr. Serap DOĞAN (BAÜ)

Balıkesir Temmuz 2009

ÖZET

BAZI İLAÇLARIN PARAOKSONAZ İZOENZİMLERİ (PON1 VE PON2) ÜZERİNE ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Ayla Solmaz Avcıkurt

Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilimdalı

Yüksek Lisans tezi

(Tez Danışmanları : Doç. Dr. Feray KÖÇKAR, Doç. Dr. Selma SİNAN)

Balıkesir, 2009

Bu çalışmanın amacı, bazı ilaçların, fizyolojik ve pato-fizyolojik durumlarda önemleri belirlenmiş PON1 ve PON2 enzimleri üzerinde *in vitro* etkilerinin belirlenmesidir. Çalışma, günümüzde kullanımı artan antidepresan ve antipsikotik ilaçların PON1 enzim aktivitesi ve antibiyotiklerin sınırlı olarak makrofajlarda ifade edilen, PON2 enzim aktivitesi üzerindeki *in vitro* etkisinin araştırılması olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Antidepresan ve antipsikotik tedavide kullanılan haloperidol, fluoksetin hidro klorür, diazepam ve asepromazin maleat ilaçlarının *in vitro* etkisi için, insan serumundan amonyum sülfat ve hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılan PON1 enzimi kullanılmıştır. Sefazolin sodyum, gentamisin sülfat, ampicilin sodyum, kloramfenikol sodyum süksinat antibiyotiklerinin hücre kültüründe yetiştirilen U937 insan makrofaj hücrelerinde bulunan PON2 enzim aktivitesi üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

Haloperidol ve Fluoksetine Hidroklorür ilaçlarının insan serum PON1 enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi olduğu tespit edilmiş ve IC₅₀ değerleri sırasıyla 5,5mM ve 13.9mM olarak belirlenmiştir. Her iki ilacın inhibisyon tipi yarı yarışmalı olarak belirlenmiş ve Ki değerleri sırasıyla 4,15 ve 0,007 olarak tespit edilmiştir.

Ayrıca, antibiyotiklerin U937 makrofaj hücre hattında, doğal olarak bulunan PON2 enzim aktivitesi üzerinde farklı sürelerde inhibisyon ve aktivasyon etkilerinin olmadığı tespit edilmiştir.

Anahtar sözcükler: paraoksonaz, nöroleptik ilaç, saflaştırma, inhibisyon

ABSTRACT

THE DETERMINATION OF EFFECT OF SOME DRUGS ON PARAOXONASE ISOENZYMES (PON1 AND PON2) ACTIVITIES

Ayla Solmaz Avcıkurt

Balikesir University, Institute of Science, Department of Biology

Msc. Thesis

(Supervisors: Assoc. Prof. Dr. Feray KÖÇKAR, Assoc. Prof. Dr. Selma SİNAN)

Balikesir-Turkey, 2009

The aim of the study is to determine the *in vitro* effect of some drugs on enzymes, PON1 and PON2, involving in important roles in physiological and pathophysiological circumstances. This study could be divided into two parts, one involves the determination of some antidepressant and antipsychiatric drugs on PON1 enzyme activity and the other includes the investigation of the effect of PON2 enzyme that is restrictly expressed in macrophages. In order to determine the effect of, haloperidol, fluoxetine hydrochloride, diazepam and azepromazine maleate drugs used for the therapy of Antidepressant and antipsychiatric diseases. PON1 enzyme was purified by ammonium sulphate precipitation followed by hydrophobic interaction chromatography from human serum. The inhibition effect of some antibiotics, Cefazolin sodium, Gentamicin sulphate, ampicillin sodium and Chloramphenicol sodium succinate on PON2 enzyme activity were investigated in human macrophages cell, namely U937 cells .

It was determined that the most inhibitory effect showing drugs on PON1 enzyme were Haloperidol and Fluoxetine HCl with 5.5 and 13.9mM IC_{50} values respectively. Both drugs exhibit semi competitive inhibition effect and K_i values were found as 4, 15 and 0,007, respectively.

In addition, the used antibiotics on PON2 enzyme in U937 macrophages cells were found that it did not exhibit the differential effects including inhibitory or activatory effects in different time points and concentrations of drugs.

Key words : paraoxonase, neuroleptic drug, purification, inhibition

	<u>Sayfa</u>
İÇİNDEKİLER	
ÖZET, ANAHTAR SÖZCÜKLER	ii
ABSTRACT, KEY WORD	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SEMBOL LİSTESİ	vi
ŞEKİL LİSTESİ	vii
ÇİZELGE LİSTESİ	ix
ÖNSÖZ	x
1. GİRİŞ	1
1.1 Paraoksonaz Enzimi (PON) (EC. 3.1.8.1.)	2
1.1.1 PON2	4
1.1.2 PON3	5
1.2 Paraoksonaz Tarihçe	6
1.3 Paraoksonazın Görevleri	7
1.4 Paraoksonaz Yapısı	9
1.5 Paraoksonaz Polimorfizmi Ve Hastalıklarla İlişkisi	10
1.5.1 PON ve Kardiyovasküler Hastalıklar	11
1.5.2 PON ve Diabet	14
1.5.3 PON ve Nörolojik Hastalıklar	15
1.5.4 PON ve Enfeksiyon (Quorum Sensing)	16
1.6 Çalışmamızda Kullanılan İlaçlar	18
1.6.1 Nöroleptik ve Antidepresanlar	18
1.6.1.1 Fluoksetin Hidroklorür	18
1.6.1.2 Haloperidol	18
1.6.1.3 Asepromazin Maleat	19
1.6.1.4 Diazepam	19
1.6.2 Antibiyotikler	19
1.6.2.1 Gentamisin Sülfat	19
1.6.2.2 Sefazolin sodyum	20
1.6.2.3 Sodyum Ampisilin	21
1.6.2.4 Kloramfenikol	22
2. MATERYAL VE METOD	24
2.1 Materyaller	24
2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler	24

2.1.2	Kullanılan Alet ve Cihazlar	24
2.1.3	Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması	26
2.2.	METOD	31
2.2.1	Kan serumunun ayrılması	31
2.2.2	Enzim Aktivite Tayini	31
2.2.3	Lowry Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini	31
2.2.4	Enzimin saflaştırılması	32
2.2.4.1	Amonyum sülfat çöktürme	32
2.2.4.2	Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile enzimin saflaştırılması	33
2.2.4.3	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzim saflığının kontrolü	34
2.2.5	Optimum şartlarda K_M ve V_{max} değerlerinin bulunması	35
2.2.6	İlaçlar için I_{50} değerlerini bulunması	35
2.2.7	İlaçlar için K_i değerlerinin bulunması	36
2.2.8	İlaçların U937 hücreleri tarafından üretilen PON2 üzerindeki etkisi	36
2.2.8.1	Hücrelerin doku kültüründe yetiştirilmesi	36
2.2.8.2	Doku kültürü laboratuvarının temizliği ve sterilizasyonu	37
2.2.8.3	Cam pipetlerin ve diğer cam malzemenin hazırlanması	37
2.2.8.4	Medyum, PBS, TE ısıtılması	37
2.2.8.5	Hücrelerin büyütülmesi	37
2.2.8.6	Hücre kültürünün pasajlanması	37
2.2.8.7	Hücrelerin Sayımı	38
2.2.8.8	İlaçların hücre kültürüne uygulanması ve aktivitesinin Bulunması	38
3.	BULGULAR	39
3.1	İnsan Serum PON1 Enzimi Üzerine Bazı Antipsikiyatrik İlaçların Etkilerinin Belirlenmesi	39
3.1.1	Serum PON1 Saflaştırılması	39
3.1.2	Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Egri	40
3.1.3	Serum Paraoksonaz 1 İzoenziminin SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi	41
3.1.4	Optimum Sartlarda K_m ve V_{max} Degerlerinin Bulunması	42
3.2	İlaçların U937 Hücreleri Tarafından Üretilen PON2 Üzerindeki Etkisi	56
4.	TARTIŞMA VE SONUÇ	59
5.	KAYNAKLAR	61

SEMBOL LİSTESİ

Simge

BSA
E.C.
EDTA
PAGE
SDS
U
UV
PON

Adı

Sığır serum albumini
Enzim kod numarası
Ethylendiamintetrasedik asit
Poliakrilamid jel elektroforezi
Sodium dodesil sülfat
Enzim Ünitesi
Ultra-viyole
Paraoksonaz

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil No</u>	<u>Adı</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1	Paraoksonaz enziminin üç boyutlu görünümü	3
Şekil 1.2	Paraoksonaz Enzim Mekanizması	4
Şekil 1.3	PON1 enziminin HDL yüzeyine bağlanması	7
Şekil 1.4	PON1 in biyolojik etkilerinin düzenlenmesi	9
Şekil 1.5	Normal ve ateroskleroz gelişmiş atardamar yapısı	12
Şekil 1.6	Psödomonas aeruginosa bakterisinin biofilm geliştirme modeli	18
Şekil 1.7	Gentamisin sülfat bileşiğinin molekül şekli	20
Şekil 1.8	Sefazolin sodyum bileşiğinin molekül şekli	21
Şekil 1.9	Sodyum ampisilin bileşiğinin molekül şekli	22
Şekil 1.10	Kloramfenikol bileşiğinin molekül şekli	22
Şekil 3.1	Lowry yöntemi ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan standart grafik	41
Şekil 3.2.	Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflastırılan paraoksonaz	42
Şekil 3.3	İnsan serumundan saflastırılan enzimin optimum şartlarda Vmax ve Km grafiği	44
Şekil 3.4	Haloperidol adlı ilacın IC ₅₀ değer grafiği	46
Şekil 3.5	Fluoksetin hidroklorür adlı ilacın IC ₅₀ değer grafiği	48
Şekil 3.6	Diazepam adlı ilacın değer grafiği	49
Şekil 3.7	Asepromazin adlı ilacın değer grafiği	49
Şekil. 3.8	Haloperidol ilacının inhibisyon tipinin belirlenmesinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği	52
Şekil 3.9	Fluoxetine HCl ilacının inhibisyon tipinin belirlenmesinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği	55

Şekil.3.10 Gentamisin sülfatın doku kültüründeki PON2 enziminin arilesteraz ve laktonaz aktiviteleri üzerindeki, ilaç uygulandıktan 30dk, 60dk ve 120dk sonraki in vitro etkisi	57
Şekil 3.11 Ampisilin sodyum'un doku kültüründeki PON2 enziminin arilesteraz ve laktonaz aktiviteleri üzerindeki, ilaç uygulandıktan 1s, 2s ve 3s sonraki in vitro etkisi	57
Şekil 3.12 Kloramfenikol sodyum süksinat'ın doku kültüründeki PON2 enziminin arilesteraz ve laktonaz aktiviteleri üzerindeki, ilaç uygulandıktan 1s, 2s ve 3s sonraki in vitro etkisi	58
Şekil 3.13 Sefazolin sodyum'un doku kültüründeki PON2 enziminin arilesteraz ve laktonaz aktiviteleri üzerindeki, ilaç uygulandıktan 45dk, 90dk ve 135dk sonraki in vitro etkisi	58

ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge No</u>	<u>Adı</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1	SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının miktarları	30
Çizelge 3.1	PON1 enziminin saflaştırma tablosu	40
Çizelge 3.2	Km ve Vmax değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, 1/V ve 1/[S] değerleri	43
Çizelge 3.3	PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren haloperidol adlı ilacın IC ₅₀ değerlerinin hesaplanmasın kullanılan ilaç,tampon ve substrat miktarları	45
Çizelge 3.4	PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren fluoksetin hidroklorür adlı ilacın IC ₅₀ değerlerinin hesaplanmasın kullanılan ilaç,tampon ve substrat miktarları	47
Çizelge 3.5	PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi olan haloperidol adlı ilacı 50 µl Ki değerlerinin hesaplanmasında kullanılan ilaç, enzim ve substrat konsantrasyonları	50
Çizelge 3.6	PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi olan haloperidol adlı ilacı 30 µl Ki değerlerinin hesaplanmasında kullanılan ilaç,enzim ve substrat konsantrasyonları	51
Çizelge 3.7	PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi olan fluoksetin hidroklorür adlı ilacı 100µl Ki değerlerinin hesaplanmasında kullanılan ilaç, enzim ve substrat konsantrasyonları	53
Çizelge 3.8	PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi olan fluoksetin hidroklorür adlı ilacı 300µl Ki değerlerinin hesaplanmasında kullanılan ilaç, enzim ve substrat konsantrasyonları	54
Çizelge 3.9	İnsan serum PON1 enziminin paraoksonaz enzim aktivitesi üzerine %50 inhibisyona sebep olan ilaçların konsantrasyonları ve Lineweaver-Burk grafiğiklerinden bulunan inhibisyon tipleri ve Ki değerleri	56

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmamın deneysel kısmı, Balıkesir Üniversitesi Temel Bilimler Uygulama ve Araştırma Merkezi Biyoloji ve Kimya laboratuvarlarında, Balıkesir Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi öğretim üyesi Doç.Dr.Feray KÖÇKAR ve Balıkesir Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi öğretim üyesi Doç.Dr.Selma SİNAN yönetiminde gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmanın tamamlanmasında engin bilgilerinden yararlandığım, çalışmam süresince beni yönlendiren, benden ilgi ve yardımlarını esirgemeyen hocalarım Doç.Dr.Feray KÖÇKAR ve Doç.Dr.Selma SİNAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca bu yola çıkamamda bana destek olan Balıkesir Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi öğretim üyesi Prof.Dr. Oktay ASLAN'a,

Çalışmamın her aşamasında desteklerini esirgemeyen, Meltem AYDIN' a, Sümeyye Aydoğan'a, Hatice YILDIRIM'a, Dr.Mithat ÇITAK'a, Dr.Ertürk GENÇOĞLU'na, Aynur AYBEY' e, Dudu DEMİR'e, Ferit KARANFİL'e ve diğer çalışma arkadaşlarıma,

Beni bugünlere getiren, her türlü maddi ve manevi desteklerini aldığım anne ve babama, hep yanı başımda olan ve anlayışıyla beni yalnız bırakmayan eşim Cevdet AVCIKURT, çocuklarım Eray ve Kutay a ,

En içten saygı , sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Balıkesir, Temmuz 2009

Ayla Solmaz Avcıkurt

1. GİRİŞ

Paraoksonaz (PON1) karaciğerde sentez edilip oradan seruma salgılanan yüksek yoğunluktaki lipoproteine (HDL) bağlı kalsiyum bağımlı bir esterazdır [1]. Paraoksonazın organofosfatların detoksifikasyonunda rolü vardır [2]. PON1 adını insektisid olan parathionun toksik metaboliti olan paraoksondan alır. PON1 aynı zamanda diğer birkaç organofosfor insektisidide (örneğin, Chlorpyrifos Oxon, diazoxon) ve bunun yanı sıra sarin, soman gibi sinir ajanlarını da hidroliz eder. [3]

PON1'in aktivitesi kardiyovasküler hastalıklarla ters orantılı bir şekilde bağlantılıdır [4]. PON1 LDL'nin oksidasyonu ile lipit peroksidlerin oluşumuna ve bakteri endotoksinlerine karşı koruyucu etkisi vardır. LDL'nin oksidasyonu arteroskleroz sürecinin başlangıç evresini oluşturması, enzimin antioksidant özelliğinin önemini ortaya koymaktadır [5, 6]. Tüm dünyada Kardiyovasküler hastalıklar (KVH) ölüm nedenlerinin ilk sırasında yer alır. Kardiyovasküler hastalıkların sıklığı, gelişmiş ülkelerde azalma eğilimine girmesine karşın, gelişmekte olan ülkelerde artma eğilimindedir. Gelişmekte olan ülkelerde, kardiyovasküler hastalıklar ölümlerin %80'inini sağlığı bozucu durumların ise %87'sini oluşturmaktadır [7]. ABD'de KVH'ların direkt ve indirekt ücreti 2006 yılı için 400 milyar dolardır. Bu ücret pek çok da gelişmekte olan ülkenin bütçesine karşılık gelmektedir [8]. Bu durum PON1 in önemini daha arttırmaktadır.

Ruh sağlığı sorunları, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde, her sosyoekonomik katmanda, her ırkta ve her kültürel grupta görülebilir. Dünya Sağlık Örgütü'ne (DSÖ) göre, her dört kişiden biri ruhsal ya da nörolojik hastalık geçirme riski ile karşı karşıyadır [9]. Ayrıca dünyada en çok sakatlığa neden olan on hastalıktan beşinin ruhsal kaynaklı olduğu saptanmıştır. Birleşmiş Milletler Raporları'na göre, yeryüzünde 450 milyon kişi halen bir ruhsal veya nörolojik hastalıkla mücadele etmektedir. Birçok ülkede yapılan toplum taramaları, ruhsal hastalıkların sanılandan çok daha yaygın olduğunu göstermektedir. Bu nedenle tüm

lkelerde ruh sağlığı sorunları, bir toplum sağlığı sorunu olarak kabul edilmektedir [10].

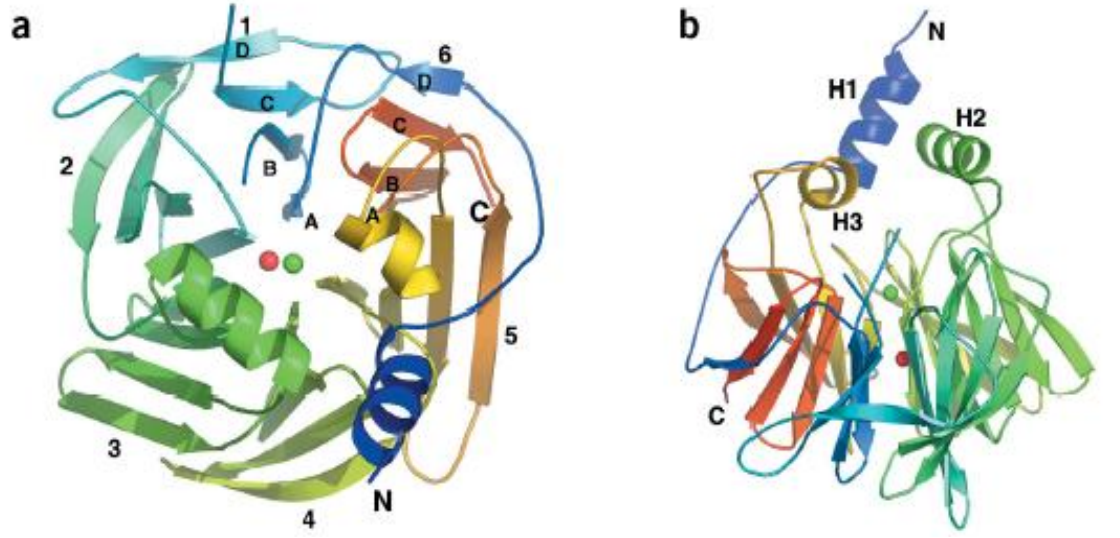
Son yıllarda ruhsal hastalıkların görülme sıklığı dünyada ve ülkemizde giderek artmaktadır ve ekonomik sıkıntılar, zorlu iş koşulları, parçalanmış aile yapısı, azalan sosyal destek vb. nedenler bu sonuçta önemli rol oynamaktadır [10].

1.1 Paraoksonaz Enzimi (PON) (EC. 3.1.8.1.)

Paraoksonaz, Aldridge sınıflama sistemine göre A grubu arildialkilfosfataz sınıfı ester hidrolaz enzimidir. Önceleri organofosfat bileşiklerini hidroliz etme özelliği nedeni ile toksikoloji alanında çalışılmış, son yıllarda ise antioksidan etkileri nedeni ile KVH riskinden korunulabileceği düşünülerek güncellik kazanmıştır [11].

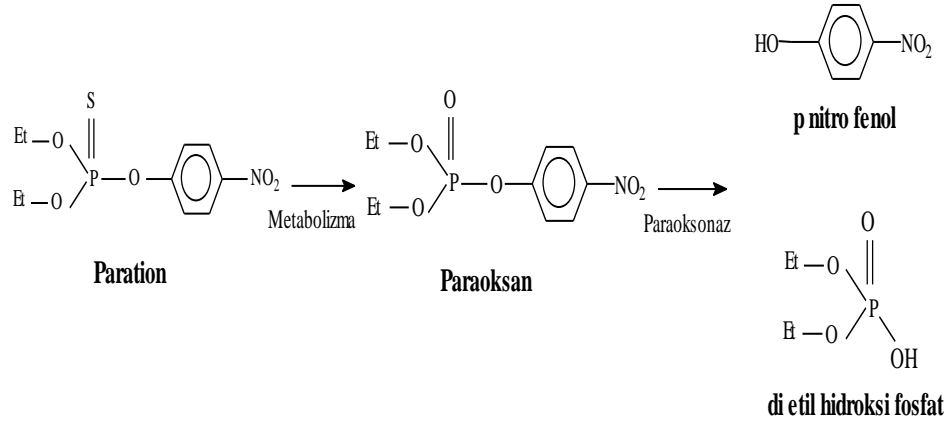
Yapılan alışmalar paraoksonazın organofosfatların detoksifikasyonunda rolü olduğunu ve koroner kalp hastalıklarının gelişiminde risk faktörü olan bir enzim olduğunu göstermiştir. Esterazlar A-esterazlar ve B-esterazlar olmak üzere ikiye ayrılmışlardır. Esterazların bu sınıflaması temelde organofosfatlarla ilişkilerine göre belirlenmektedir. A-esterazlar organofosfatları hidrolize ederler. B-esterazlar ise inhibe ederler. A-esterazlar yani organofosfatları hidrolize edenler karbamatlar ve aromatik karboksilik esterler diye de bilinirler [2].

PON1'in ince yapısı 4 adet zincirden oluşmuş 6 adet β -kırmalı yapıdan meydana gelmiştir. Enzim 42. ve 353. sistein rezidüleri arasındaki disülfit köprüsü ile sonlanarak  boyutlu yapısını kazanır (şekil 1.1)[12]



Şekil 1.1 Paraoksonaz enziminin üç boyutlu görünümü. (a) β -kırmalı tabakalar ve (b) hidrofobik bölgelerin (H1, H2, H3) β -kırmalı tabakalara göre durumu [13]

Paraoksonaz (E.C.3.1.8.1) ismi enzimin aktivitesini ölçmede yaygın olarak kullanılan substrat paraokson' dan gelmektedir. İnsektisid olan parathion bileşiğinin katabolik ürünü paraoksondur. Paraokson sinir iletiminde rol oynayan asetil kolin esteraz ve diğer bazı enzimleri inhibe etmektedir. Paraoksonun bu zararlı etkilerini ortadan kaldıran paraoksonaz enzimidir (şekil 1.2). Yapısında iki adet Ca^{+2} bulunmaktadır. Enzimin hem aktivitesi hem de stabilitesi için Ca^{+2} gerekmektedir ki bu özellik onu diğer A-esterazlardan ayırır. Öyleki diisopropil propilfosfatazlar aktiviteleri için Co^{+2} , Mn^{+2} veya Mg^{+2} gerektirir [2].



Şekil 1.2. Paraoksonaz Enzim Mekanizması [12].

Aslında paraoksonaz denildiğinde terminolojide paraoksonaz1 enzimi anlaşılmalı beraber ayrıca PON1 dışında iki farklı üyeyi de kapsar. Serum paraoksonaz ailesi insan paraoksonaz 1 (PON1), PON2 ve PON3 'ten oluşmaktadır [14]. Bu üç insan paraoksonazı 7. kromozomun uzun kolunda lokalize olmuşlardır. PON1 355 aminoasitten meydana gelmiştir Bu üç insan paraoksonazı aminoasit seviyeleri bakımından %65, nükleotid seviyeleri bakımından %70 benzerlik gösterir. İnsan PON1 ve PON3 birincil olarak karaciğerde sentezlenirken insan PON2 daha geniş bir dağılım göstermektedir. Kalp, böbrek karaciğer, akciğer, plesanta , ince bağırsak ,dalak, mide,ve testiste bulunmaktadır [14].

1.1.1 PON2

PON2 serumda bulunmaz, çeşitli doku ve hücrelerde bulunmaktadır. Atardamar makrofaj hücreleri içinde de bulunmaktadır [15, 16]. PON2, hücreleri oksidatif strese korur ve hücrel antioksidant olarak görev yapar. Bununla birlikte PON2'nin mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır [17]. PON2 moleküler ağırlığı yaklaşık 44 kDa olan yaygın bir şekilde hücre içinde ekspre olan bir proteindir [18] Fizyolojik ve patofizyolojik rolü ile ilgili henüz çok az bilgi bulunan PON2 enziminin son dönemde özellikle antioksidan özellikleriyle ilgili yayınlar

bulunmaktadır. Rosenblat ve arkadaşları saflaştırılmış rekombinant PON2'nin LDL oksidasyonunu engellediğini göstermişlerdir [19].

PON2 geninin iki polimorfizmi vardır. Birincisi Ala148Gly (148 alanin aminoasitin glisine değişimi), ikincisi Ser311Cys (311 serin aminoasidinin sistein ile değişimi) polimorfizmleridir. Hegele ve arkadaşlarının Kanada'da yaptığı bir çalışmada tip2 diabet hastalarında homozigot PON2 Gly148 alleli taşıyanlarda diğer iki genotipi taşıyanlara göre plazma glukoz seviyelerinin oldukça yüksek olduğu bulunmuştur [20]. Asya da yaşayan Hintlilerde PON2 ser 311 alleli taşıyanlarda kontrol grubuna göre koroner kalp hastalıkları oldukça yüksek oranda rastlanmıştır. PON2 koroner kalp hastalıklarında PON1 geni ile sinerjistik bir rol oynamaktadır. Kuzey Çin'de yapılan araştırmada da PON2 ser-311 alleli taşıyanlarda tip2 diabet arasında ciddi bir ilişki bulunmuş hatta bu çalışmada tip 2 diabetlilerde görülen hipertansiyonla PON2 geninin bir ilişkisi olduğu kanıtlanmıştır [21, 22].

1.1.1 PON3

İnsan PON3 enzimi yaklaşık 43 kDa ağırlığında serumda HDL ile bulunan seviyesi PON1 enziminden oldukça az olan bir proteindir. PON proteinlerinden PON3 en geç bulunan ve karakterize edilenidir [23]. Son dönemde 311 kodonda serin/treonin (S/T311) ve 324 kodonda glisin ve aspartik asit (G/D324) değişimi güney İtalya'da yapılan çalışmada gösterilmiştir [24].

PON1'in aksine PON3 paraoksonaz aktivitesi değil, arilesteraz aktivitesi göstermektedir. PON1 ve PON2 ye benzer bir şekilde PON3'ün antioksidan özellikleri bulunmaktadır [25].

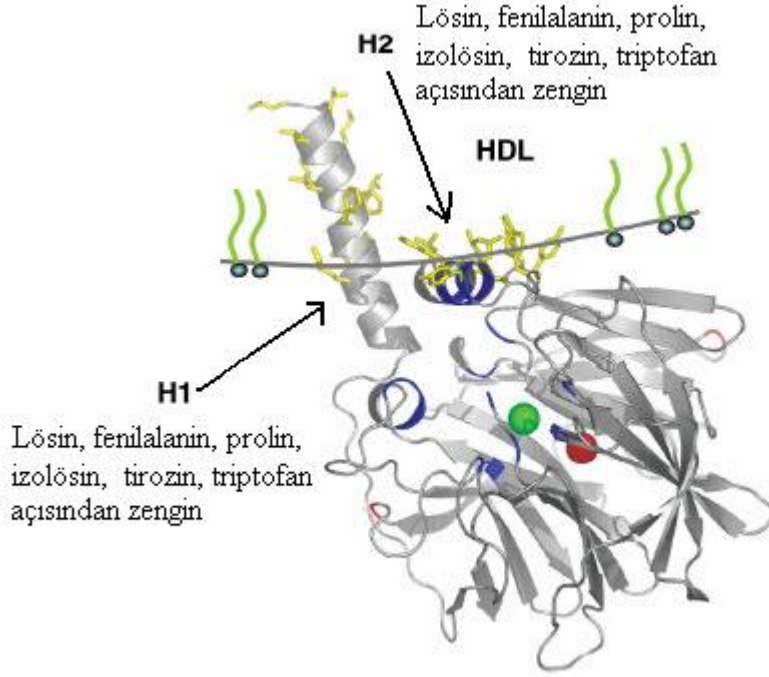
1.2 Paraoksonaz Tarihçe

İlk olarak Dr. Abraham Mazur 1946 yılında organofosfor bileşiklerin enzimler tarafından hidroliz edildiğini keşfetti [25]. Norman Aldridge tavşan ve

sıçanların farklı dokularında paraokson hidrolizi ile ilgili çalıştı. Aldridge tavşan plazmasında çok yüksek PON1 seviyeleri bulunduğunu ve paraoksonaz saflaştırmada kullanışlı olduğunu kanıtlamıştır. Ayrıca Aldridge esterazları iki gruba ayırmıştır. Substratları hidrolize ederken katalitik olanlar A-esterazlar ve substratların hidrolize olmasını inhibe eden B-esterazlar. Paraoksonaz A-esteraz grubundadır. Aldridge farklı tür ve dokularda A- ve B-esterazların inhibitör ve substratlarını çalışmıştır [26, 27]. Aldridge'in takip eden yayınlarında serum A-esteraz paraoksonaz diye ifade edilmiş ve temelde parationun toksik okson metabolitini hidrolize etme yeteneği olan paraoksondur. 1961 de Uriel paraoksonazı insan serumunda elektroforezden sonra HDL immunopresipitatlarında saptamıştır.

1980'lerde insan populasyonunda plazma PON aktivitesi polimorfik dağılımı üzerine olmuştur. 1990'dan önceki çalışmalar PON1'in saflaştırılması, insan PON1 geninin klonlanması üzerine olmuştur[23].

Takip eden keşiflerde birbiriyle benzer iki enzim daha bulunmuştur. Paraoksonaz diye ifade edilen PON1 den başka PON2 ve PON3 [19]. İnsan serum PON1'i ultrasantrifüj edildiğinde, PON1 HDL ile beraber çökmektedir [28]. Bu bulguları birçok araştırmacı doğrulamıştır. Gerçekten insan serumundan PON1 saflaştırması boyunca apoA1'in ayrılması oldukça güçtür. Apo-A1 ve PON1 oldukça sıkı bağlıdır PON1 oldukça güçlü hidrofobik bir N-terminale sahiptir (şekil 1.3.) [29].



Şekil 1.3 PON1 enziminin HDL yüzeyine bağlanması [14]

PON1 enzimi protein yapısı bulunmuş olmasına rağmen PON1 i saflaştırmak halen zor olmaktadır. Bunun nedeni PON1 in HDL (apoA1) ile sıkı ilişkisidir [30].

PON1 enziminin protein yapısı bulunmuş olmasına rağmen daha endojen substratları bilinmemektedir [31]. Daha yakın zamanlarda, rekombinant mühendislik PON1'in moleküler yapısını aydınlatmıştır [23].

1.3 Paraoksonazın Görevleri

Paraoksonazlar hayvanlar arasında geniş bir şekilde dağılmışlardır. Birçok dokudan elde edilebilirler. Özellikle karaciğer, böbrek, ince bağırsaklar ve serumdan elde edilirler. Genellikle böceklerde paraoksonaz yoktur. Kuşlarda OF selektif toksisitesi ile ilgili yapılan ayrıntılı çalışmalar, kuşlarda serum paraoksonazı tamamen kayıptır [32].

PON1, parathion, chlorpyrifos, diazinon gibi organofosfatları hidrolize eder. Bununla beraber PON1 in *in vitro* da OF ları hidrolize edebilmesi *in vivo*' da OF' ların toksisitesini hafifletebildiğini göstermektedir. Organofosfat pestisidler ki parathion tipik örneğidir, genellikle tarımda kullanılan göreceli olarak toksik olmayan sülfür (thion) türevleridir. Bu pestisidler *in vivo* da oksidatif desülfürasyon süreci olarak bilinen sitokrom P-450 bağlı mikrozomal monooksijenazları aktive ederler. Bu süreç glutatyon-S-tranferaz, monooksijenaz ve paraoksonaz gibi hem thionlar hemde oksonları detoksifiye etme özelliği olan ve yaygın bir şekilde karaciğerde bulunan bu enzimler tarafından gerçekleştirilir. Bu nedenle hepatik organofosfat metabolizmasının dengesi detoksikasyona karşı gelişmiştir [33]. Memelilerde hepatik detoksifikasyondan kaçan oksonlar serumda paraoksonaz tarafından etkisizleştirilir. Bazı organofosfatlar örneğin pirimifoz-metilokson serumda paraoksonaz tarafından çok hızlı hidroliz edilir. Birçok çalışmalar göstermiştir ki memelilerde organofosfatların detoksifikasyonundaki farklılık serum paraoksonazlarında çok önemli rol oynamaktadır [34]. Ayrıca PON1 de polimorfizm varlığı da ki bu da farklı enzim seviyeleri ve katalitik etkinliği gösterir bazı OF a maruz kalan kişilerin zehirlenme etkilerini daha fazla göstermesine neden olabilir.

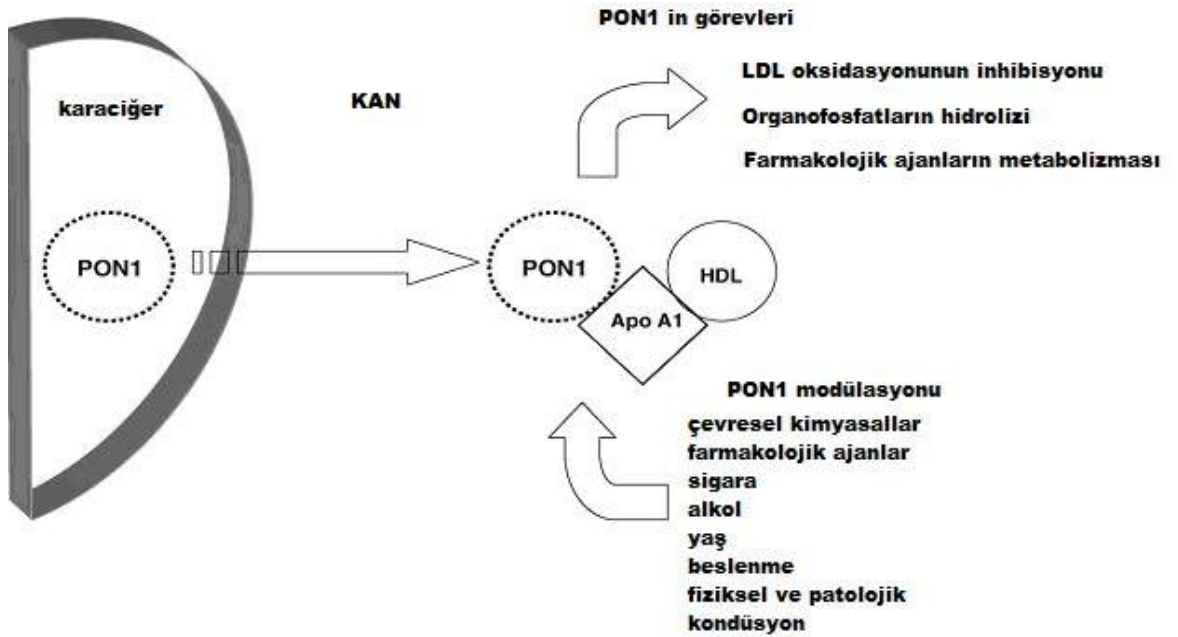
PON1 bir esteraz olmasına rağmen PON2 ve PON3 ün paraoksonaz aktivitesi oldukça düşüktür. Bu üç PON proteinin tamamında aslında aromatik ve uzun zincirli alifatik laktonları hidrolize ederler, yani laktonazdırlar. 5-HETE lakton ve 5-iodolakton gibi lakton türevleri PON1 tarafından hidrolize olmakta ve potansiyel endojen substratları olduğu düşünülmüştür. PON1'in laktonaz aktivitesinden lokal etkili glukokortikoid ilaçların gelişmesinde faydalanılmıştır. Öyle ki bu glukokortikoid ilaçlar çok hızlı hidrolize olmakta ve dolaşım sisteminde çok hızlı inaktive olmaktadır. PON1 sayesinde glukokortikoidlerin yan etkileri de azalmıştır [35].

Statin laktonlar (simvastatin ve lovastatin) ve diüretik spironolakton, önceleri PON1 tarafından hidrolize edildiği rapor edilmesine rağmen, PON3 tarafından metabolize olduğu ortaya çıkmıştır. Ancak PON1 antibakteriyel ilaç olan prulifloxacini özellikle PON1 R192 aleli bulunanlarda çok yüksek oranda hidrolize ve aktive eder. Son yıllarda yapılan çalışmalarda PON1 ve PON2'nin bir başka

görevi ortaya çıkmıştır. *Psödomonas* bakterisinin patogenez ve biyofilm oluşturmasını kontrol eden tanıma moleküllerini (N-açilhomoserin lakton) hidrolize ettiği gösterilmiştir. PON'ların laktonaz aktiviteleri ile yağ asitlerinin oksidasyonu ve genel yağ metabolizmasında rol oynadığı gözlenmiştir [23].

1.4 Paraoksonaz Yapısı

PON1 aktivitesi Uriel tarafından 1961'de insan serumundan HDL'nin immuno-presipitasyonundan sonra elektroforezle ilk kez gösterilmiştir [36] Sonraki araştırmalarda birbirinden farklı memeli türlerinde bu bulgular doğrulandı [37]. Koyunlarda PON1 aktivitesinin çoğu HDL ile çok sıkı bir ilişki içindedir ve bu HDL parçacıkları apolipoprotein A1 (apoA1) içermektedir. İnsan serum PON1'i ultrasantrifüj edildiğinde, PON1-HDL ile beraber çökmektedir. İnsan serumundan PON1 saflaştırılması boyunca apoA1 in ayrılması oldukça güçtür. ApoA1 ve PON1 oldukça sıkı bağlıdır. PON1 oldukça güçlü hidrofobik bir N-terminale sahiptir (Şekil 1.4) [38].



Şekil 1.4 PON1 in biyolojik etkilerinin düzenlenmesi [3].

Saflaştırılmış insan serum paraoksonazı molekül ağırlığı yaklaşık 43-45 kDa ağırlığında ve yaklaşık ağırlığının %15.8'i üç karbonhidrat zincirinden oluşan bir moleküldür iki yapısal izoformu vardır. PON un yapısında intramoleküler disülfid bağı Cys-41 ve Cys-352 arasında bulunmaktadır (şekil 1.4). Birde 283 pozisyonda tek serbest sistein rezidüsü bulunmaktadır [39].

Kalsiyum iyonunu varlığı, katalitik mekanizmada iki farklı rol oynamaktadır Birinci olarak, kalsiyum aktif bölümün devamlılığı için zorunludur. Hem katalitik reaksiyonun uygunluğu, hemde aktif bölümün konformasyonunun uygunluğunun devamlılığı için bulunması zorunludur. İkinci kalsiyum aktif bölümdeki dietil fosfatın ortadan kaldırılmasını kolaylaştırır, paraoksonun polarize P-O çift bağına nükleofilik atakta fosforu duyarlı kılar. Pratikte, EDTA enzim çalışmalarında PON1'i engeller. PON1 aktivitesi yenidoğan ve prematür bebeklerde erişkindeki seviyesinin yarısı kadardır. Doğumdan bir sene sonra normal yetişkin seviyelerine ulaşır ve ömür boyunca aynı seviyelerde kalır. PON1'in HDL ile ilişkisi olmasına rağmen kadınlar ve erkekler arasında açıkça dolaşan HDL farklı olmasına rağmen PON1 aktivitesinde bir farklılık yoktur [2].

1.5 Paraoksonaz Polimorfizmi ve Hastalıklarla İlişkisi

1960 ve 1970'lerde yapılan çalışmalar insan popülasyonunda plazma PON1 aktivitesinin polimorfik dağılımı üzerinde olmuştur. Bu çalışmalar sonucunda iki bilgiye ulaşılmıştır. Bu bilgilerden ilki bireyler arasında plazma ve serum PON1 aktivitesi çok büyük farklılıklar göstermektedir.

Takip eden çalışmalarda PON1 polimorfizminde birçok farklı ölçüm geliştirilmiştir. Çeşitli pH seviyelerinde, tuz konsantrasyonlarında ve EDTA varlığında ve yokluğunda paraoksonaz aktivitesi farklılık göstermektedir Sonraki yıllarda Dr. La Du ve arkadaşları PON1 polimorfizmi çalışmalarına birkaç farklı yöntem geliştirdi [40]. 1M NaCl'da Paraoksanaz'ın arilesteraz aktivitesinin toplu dağılımında düşük, orta ve yüksek oranlarda aktivite görülmesi üç fenotipin akla

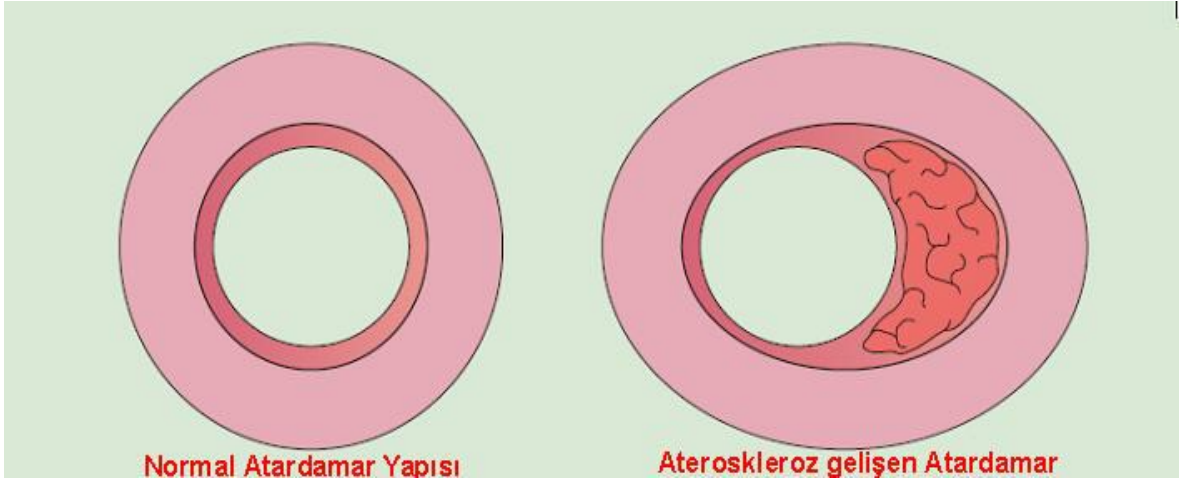
uygun olduğunu göstermiştir. Bu oranların histogramları üç fenotip aktivitesini iyi bir şekilde sağlamıştır [41].

PON1 enzim aktivitesindeki polimorfizm substrat bağımlıdır ve farklı populasyonlara göre değişkenlik göstermektedir [12]. Bu mutasyonlardan birincisi kodlanma bölgesindeki 192. kodonda glutaminden (Q), arjinine (R) olan değişimdir [42]. 192. kodonda arjinin varsa (PON1-R192) aynı kodonda glutamin bulunması (PON1-Q192) durumundan çok daha fazla paraoksonu hidrolize etmektedir. PON1-Q192 ise dizokson, sarin, somon, gibi substratları 8 kat daha hızlı hidrolize eder. İkinci polimorfizm ise 55.-lösin/metionin aminoasitlerindeki değişimle oluşmuştur. Eğer 55. aminoasit metiyoninse (PON1-M55) plazma PON1 seviyeleri aynı pozisyonda lösin (PON1-L55) olduğundan daha düşüktür. PON enziminin serumda ki seviyeleriyle birebir ilişkili olan PON1-M55L polimorfizminin genin düzenleyici bölgesindeki PON1T108C polimorfizmiyle güçlü bir bağlantısı olduğu tespit edilmiştir. Ancak düzenleyici bölgedeki PON1-T(-108)C polimorfizminin enzimin serum seviyesini belirlemede herhangi bir etkisi olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca PON geninin düzenleyici bölgesinde de diğer polimorfizmleri olduğu bulunmuştur. Söz konusu polimorfizmlerin 126, 162, 832, ve 909 pozisyonlarda olduğu ve serum PON1 protein seviyeleri üzerinde bir etkileri olmadığı tespit edilmiştir. PON1 geninin düzenleme, kodlama ve intron bölgelerinde 160 kadar tek nükleotid polimorfizmleri olduğu tespit edilmiştir. Söz konusu polimorfizmlerin pek çoğu henüz iyi karakterize edilmemiştir [43].

1.5.1 PON ve Kardiyovasküler Hastalıklar

Çeşitli epidemiyolojik çalışmalar PON1 ve koroner kalp hastalıkları arasında ilişki bulmuştur. Mc Elveen ve arkadaşları düşük serum PON1 aktivitesi ve KVH arasındaki ilişkiyi ilk gösterenlerdir [44]. Benzer şekilde Navab ve arkadaşları, düşük HDL ve yüksek PON1 aktivitesine sahip hastaların KVH'a, yüksek, HDL ve düşük PON1 e göre daha az duyarlı olduklarını göstererek, KVH'a karşı korunmada PON1 ilişkisinin altını çizmiştir. Açıklandığı üzere hayvan deneylerinden elde edilen sonuçlar PON'lar aterogeneze karşı koruyucudur [45].

Arter duvarında okside olmuş LDL varlığı aterosklerozun başlamasının ve ilerlemesinin en büyük sebebidir. HDL ateroskleroz gelişimine karşı korur ve LDL nin okside olmasını azaltır. HDL nin bu özelliği büyük oranda PON1 ve PON3 enzimleriyle beraber bulunmasından gelir [46]. Aterosklerotik lezyon yapısı, arteriyel makrofajların yanısıra lipoproteinlerdeki atak lipidler ve artmış oksidatif stresle karakterizedir . Oksidatif stres artmış süperoksit anyon ürünleri ve arterlerde lipoproteinlerde artmış lipid peroksidasyonu ile ilişki içindedir. Hücrelerin bu durumda kolesterol depolama kabiliyeti artmıştır. Makrofajlar köpük hücresi haline gelir. Bu köpük hücreleri aterosklerozun erken karakteristik özelliğidir (Şekil 1.5) [47]. Paraoksonaz 1 (PON1) HDL'ye bağlı bir laktonazdır [48]. Oksidatif strese karşı koruyucu bir etki göstermektedir. PON1'in aktivitesi kardiovasküler hastalıklarla ters orantılı bir şekilde bağlantılıdır [49].



Şekil 1.5 Normal ve ateroskleroz gelişmiş atardamar yapısı [50].

PON1 in sadece LDL oksidasyonuna karşı koruyucu değil aynı zamanda makrofajdan kolesterol sızıntısıyla ilgili HDL'yide arttırma yeteneği vardır. PON1 e benzer şekilde PON2 ve PON3 lipid peroksidasyonunu inhibe eder ve monosit kemotaksisini uyaran pre-aterojenik lipitleri de inhibe ederler [51].

Koroner kalp hastalıkları gelişimindeki en önemli risk faktörlerinden biri düşük HDL seviyesidir. Klinik epidomiyolojik kanıtlar KVH'nın varlığı ile plazma

HDL yoğunluğu arasında ters ilişki olduğunu göstermektedir [52]. Bu korumanın HDL tarafından sağlanmasını gösteren herhangi bir açıklama bulunmamakla birlikte açıktır ki bu parçadaki apoproteinler olağanüstü şekilde dağılmaktadır. HDL, LDL'nin oksidatif modifikasyonunu ve bu yüzden okside olan LDL'nin arter duvarına zarar verici etkilerini önceden engelleyebilir [53]. HDL ve PON ilişkisi HDL'nin bu antioksidatif etkilerini güçlendirir.

Ayrıca kolesterol taşınım sürecinde, HDL'nin merkezi rolü, kolesterolün karaciğere taşınımı ve böylece periferik dokulardan kolesterolün uzaklaştırılmasıdır. İşte HDL 'nin ateroskleroz gelişimine koruyucu asıl etkisi de budur [54]. Bununla birlikte HDL'nin diğer ateroskleroz karşıtı ve koruyucu etkileri çok çeşitlidir. Anti-oksidatif, anti-inflamatuar ve anti-fibrinolitik etkileri ve bunun yanı sıra normal endotel fonksiyonu plak oluşumunda matriks metalloproteinlerinin inhibisyonu ve endotelien yenilenmenin sağlanması asıl en seçici özellikleridir [55].

1980'ler ve 1990'ların başındaki çalışmalar, HDL' nin *in vitro* ve *in vivo*'da LDL oksidasyonunu inhibe edebildiğini göstermiştir. Oksidasyon döngüsünde, LDL'deki lipid peroksit ürünün azaltılması, HDL'nin en önemli rolüdür [56]. HDL-bağlı PON1 HDL'nin antioksidan fonksiyonundan öncelikle sorumludur. Diğer birkaç HDL bağımlı proteinler, apo A1, lesitin, kolesterol açıl transferaz (LCAT) ve platelet aktivatör faktör açıltransferaz (PAFAH) da antioksidan özelliklere sahiptir, ama PON1 antioksidant enzimler içinde en baskın olandır [57, 58].

PON1 geninde hem protein kodlayan bölgede hemde promoter bölümünde birkaç fonksiyonel polimorfizm meydana gelmiştir. Kesin substratların hidrolizinin oranını büyük oranda engelleyen bölge enzimin kodlama bölgesinde Q192R polimorfizmidir [59]. Örneğin paraokson R192R izoformu çok yüksek oranda hidrolize eder Q192Q izoenziminin tam karşıtı diğer substratları hidrolize eder. Halbuki L55M polimorfizmi, promoter bölgesi C108T polimorfizmi ile bağlantılıdır, PON1 seviyelerini etkiler. Q192R ve L55M polimorfizminin etkisi, HDL'nin LDL oksidasyonunu zayıflatmaktadır.

Koroner aterosklerotik hastalığın, en ağır formu, miyokard enfarktüsü (MI), birçok ülkede en önde gelen ölüm nedenidir ve 2020 yılında küresel olarak en büyük hastalık yükü nedeni olarak tahmin edilmektedir. Lipoprotein oksidasyonu ateroskleroz oluşma süreci için önemli bir başlangıç faktörüdür. Serum PON1 enzimi düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) 'nin oksidasyonunu önler [60].

Karın bölgesinde yağ birikmesi olan kişilerde (metabolik sendrom) insülin dirençli tip 2 şeker hastalığı ve kalp hastalığı daha sık görülmektedir. Metabolik sendromda artmış oksidatif stres ve insülin direnci, hızlandırılmış ateroskleroz gelişiminin nedenlerindedir [61].

1.5.2 PON ve Diabet

Diabet tüm dünyada 150 milyondan fazla insanı etkilemektedir. 2025 yılına kadar bu rakamın 299 milyona yükseleceği tahmin edilmektedir. Kardiovasküler hastalıklardan kaynaklanan ölüm oranı ölümlerin büyük bir çoğunluğunu oluşturan koroner arter hastalığı olmayan diabet hastalarından 2'den 8 kata kadar daha yüksektir. Yüksek glukozun biyokimyasal etkileri ateroskleroz, nöropati ve kardiyomyopatinin patofizyolojini açıklamaktadır. İnsülin bağımsız diabet hastalığı sonucu ölümlerin ve iş göremezliğin en büyük nedeni, bu hastalarda kardiovasküler hastalıkların gelişmesidir. Diabetik hastalarda yüksek oranda ateroskleroz gelişme ihtimali vardır. Bu yüksek risk birkaç nedene bağlıdır. Bunlar yüksek kan şekereine eşlik eden arteriel hipertansiyon, dislipidemi ve artmış oksidatif strestir [62].

PON1 aktivitesi diabet hastalarında düşük olarak gözlenmiştir. Tip 1 diabette glikoz konsantrasyonu ile PON1 aktivitesi arasında zıt ilişki bulunmuştur. PON1 A162 G promoter polimorfizmine sahip Tip 1 diabet hastalığına sahip Avusturyalı adenosanslarda görülen mikroalbümineri ile bu polimorfizm arasında bir ilişki olduğu saptanmıştır. Bunun yanı sıra Tip 1 Diabet ve Tip 2 Diabet hastalarında görülen diabetik komplikasyonların PON1 geninin çeşitli varyantları arasında ilişki tespit edilmiştir. PON1-192, PON1-55 ve PON1(-108) polimorfizmleri ile diabet hastalarındaki kardiyovasküler hastalıklar arasında bir ilişki olduğunu gösterilmiştir

[63]. PON1(-108) polimorfizmi ile serum glukoz konsantrasyonu arasındaki ilişki insülin bağımsız diabet hastalarındaki insülin resistansı ile bu polimorfizmin ilişkili olduğunu akla getirmektedir [64].

Çalışmalar göstermiştir ki, diabetik hastalarda serum PON1 aktivitesi oldukça düşmüştür [65]. Bu değişim belki de birkaç farklı mekanizma ile meydana gelmiştir. PON1 aktivitesi, belki de artmış oksidatif stresi inhibe etmekte ve 284 pozisyonundaki sisteindeki serbest sülfidril gruplarının yükseltgenme indirgenme durumlarını değiştirmektedir [66]. Diğer çalışmalarda gösterilmiştir ki PON1 lipoprotein olmayan serumda HDL ile yer değiştirmekte ve enzim yokluğunda inaktif durumda olmakta ve lipit peroksidasyonuna karşı yada makrofaj hücrelerine kolesterol akışı stimülasyonunu engelleyememektedir [67]. Tip 2 Diabet hastalarında sonuçta PON1 belki de glikasyonu inaktive etmektedir. Bu hipotez henüz tam olarak ispat edilmemesine rağmen kültüre edilmiş endotelial hücrelerde şekerlenmiş olan HDL sağlığa zararlı etkiler göstermektedir [68].

1.5.3 PON ve Nörolojik Hastalıklar

Alzheimer hastalığı (AH) amiloid plaklar ve nörofibriler yumakların ilerleyici bir şekilde karakterize olduğu, yaşlı kişilerde daha sık görülen bir nörolojik hastalıktır [69]. Buna ilaveten hastalar sıklıkla vasküler komplikasyonlardan zarar görürler [70]. Öte yandan, AH kalıtsal faktörleri olan bir hastalıktır. Bazı çalışmalar PON1 polimorfizmi ile AH'nin arasında ilişki bulmuştur [71].

PON1-192 polimorfizminde R allel taşıyıcıları genel populasyonda daha seyrekdir. R alleli ise bu hastalığa karşı koruyucu görünmektedir. Bununla birlikte sonuçlar bir yargıya varacak kadar kesin değildir. Çünkü bu durumu doğrulamayan birkaç araştırmada bulunmaktadır [72].

PON2 geninin polimorfizmleri ile Alzheimer hastalığı ile ilişkisi de bulunmuştur. Bir çalışmada, bu hastalarda PON2(311) geninin C allel taşıyıcılarına yüksek sıklıkta rastlanmıştır. Son zamanlarda Kafkas ve Afrika kökenli Amerikalılar

arasında yapılan çalışmada, PON1, PON2 ve PON3 gen kümesi ve AH'daki 29 tek nükleotit polimorfizmi arasında bir ilişki saptanmıştır. AH hastalarında bulunan amiloid plaklar yüksek oksidize LDL içerir. Bu hastalarda serum PON1 aktivitesi düşüktür. Bu demans hastalarında defektin HDL bağlı antioksidant kapasitenin patogeneizde rol oynadığı düşünülmektedir. PON1 belki de aynı zamanda başka bir mekanizma ile de AH başlamasını sağlamaktadır. AH oluşmasında klasik düşünce kolinerjik nöronların kaybı ile asetilkolin seviyelerinin düşmesidir. Kolinesteraz inhibitörleri kullanılarak plazma kolinesteraz seviyesi artırılarak AH tedavisi, başarıyla yapılmaktadır [73]. Ancak birkaç araştırma göstermiştir ki AH da kolinesteraz inhibitörlerine cevap verenler ve vermeyenler diye iki hasta popülasyonu vardır. PON1 kuvvetle ihtimaldir ki çoklu biyolojik aktiviteye sahiptir ve aynı zamanda çok güçlü kolinesteraz inhibitörüdür. Pola ve arkadaşları göstermiştir ki PON1(192) geninin R allel taşıyıcıları AH sahip tedaviye cevap vermeyen %41 hastadan, %70 gibi yüksek oranda tedaviye cevap verenler grubundandır.

Parkinson hastalığı (PH) ikinci olarak en sık görülen dejeneratif hastalıktır. PH 60 yaşın üstündeki bireylerde %1 oranında görülmektedir. Etiyolojisi bilinmemesine rağmen bu hastalığa hem genetik hemde çevresel koşulların neden olduğu düşünülmektedir [74]. Kırsal alanda yaşamak, artezyen kuyularından su içmek ve tarım ilaçlarına maruz kalmak PH oluşma olasılığını arttırmaktadır [75]. PON1(192) ve PON1(55) gen polimorfizmi artmış PH ile ilişkilidir. PON1(55)-M aleli düşük PON1 protein seviyeleri ile ilişkilidir, bu nedenle belkide bu allel taşıyıcılarında çevresel nörotoksinlerin detoksifikasyonunda bir problem vardır. Buna ilaveten, PON1(192) geninin R allel taşıyıcısı bireyler paraokson ve klorprifos okzon substratlarına karşı yüksek enzim aktivitesi vardır. Fakat diazokson, soman ve sarin substratlarına karşı düşük enzim aktiviteleleri vardır [76, 77].

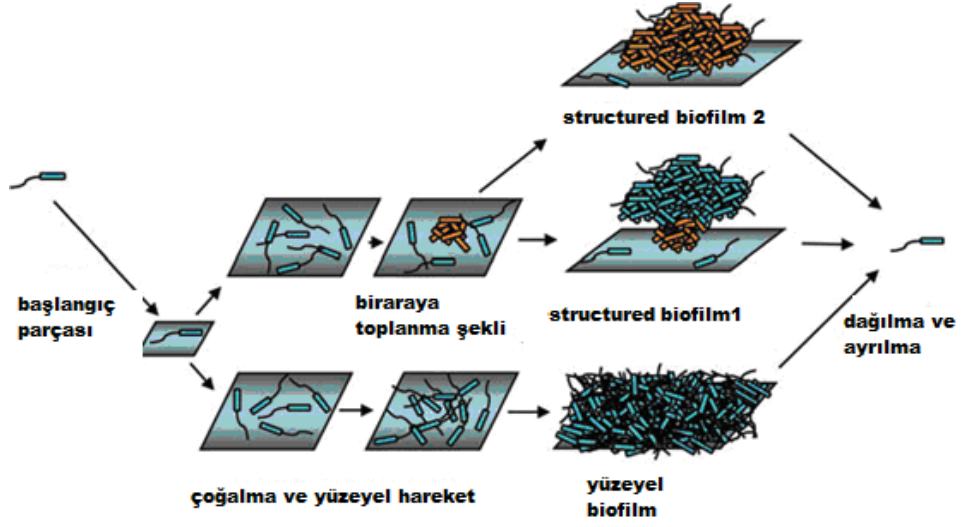
1.5.4 PON ve Enfeksiyon

Quorum sensing (QS) bakteri hücrelerinin çevrelerindeki popülasyon yoğunluğunu algılama özelliğidir. Bakteriler bu algılama sonucu, çevresel koşullara

yanıt olarak gen anlatımlarını düzenleyebilmektedir. QS süreci otoindükleyici adı verilen özel sinyallerin üretimi, çevreye salınması ve bu sinyallerin yine bakteriler tarafından tanınması aşamalarını izler. Hücre dışına salgılanan sinyal moleküllerinin konsantrasyonu bakteri hücre sayısına bağlı olarak artar. Sinyal konsantrasyonu belli bir eşik değerine ulaştığında bakteri hücreleri gen anlatımında değişikliğe gider. Özel genlerin anlatımının ancak otoindükleyici varlığında gerçekleşmesi, bakterilerin belli davranışları ancak birlik halindeyken gösterebileceğini göstermiştir. Bu genlerin kodladığı fonksiyonlar genellikle çok sayıda bakteri tarafından yapılabilecek üretime yönelik davranışlardır (Şekil 1.6) [78].

Pseudomonas aeruginosa fırsatçı bir bakteridir. İmmün sistemi zayıf kişilerde ve kistik fibroz gibi hastalıklarda ciddi enfeksiyonlara neden olur. Birçok Gram-negatif bakteri *P. aeruginosa* acyl-homoserine lactone (AHL) üretir *N*-(3-Oxododecanoyl)-L-homoserine lactone (3OC12-HSL) *P. Aeruginosa*nın ekstrasellüler virülans faktörlerinin düzenlenmesinde ve biofilm oluşmasında anahtar rol oynamaktadır. Sıçan ve fareler, 3OC12-HSL üretme yeteneğini kaybetmiş *P. aeruginosa* ile enfekte edildiğinde, önemli akciğer patolojileri, bakteriyel yayılma ve ölüm ile sonuçlanmıştır. Böylece, 3OC12 HSL, *P. Aeruginosa* patojenitesinde önemli bir rol oynadığı görülmüştür. 3OC12 HSL ökaryotik hücrelerde immün düzenleyici etkiler göstermektedir. Bunlar lökosit proliferasyonunu inhibe etmek, makrofaj ve nötrofilleri aktive etmektir [79].

PON ailesi enzimler bakteriyel tanıma molekülleri (quorum sensing) olan açıl homoserin laktonları hidroliz etme yeteneğine sahiptir. Özellikle PON2'nin bu tanıma faktörlerine karşı çok yüksek ilgisi olduğu gösterilmiştir.



Şekil 1.6. *Psödomonas aeruginosa* bakterisinin biofilm geliştirme modeli [80].

1.6 Çalışmamızda Kullanılan İlaçlar

1.6.1 Nöroleptik ve Antidepresanlar

1.6.1.1 Fluoksetin Hidroklorür

Günümüz sanayileşmiş toplumunda depresyon çok yaygın bir şekilde karşımıza çıkan bir hastalıktır. Bununla beraber depresyonda kullanılan ilaçlarda bir o kadar çok piyasaya sürülmekte ve yaygın olarak kullanılmaktadır.

Fluoksetin hidroklorür selektif serotonin geri alım inhibitörüdür. Antidepresif olarak kullanılır [81]. Depresyon buna eşlik eden anksietenin, ayrıca bulimia neuroza ve obsesif kompulsif hastalık tedavisinde kullanılır. Doruk plazma konsantrasyonuna 6-8 saatte ulaşılır[82].

1.6.1.2 Haloperidol

Haloperidol genellikle şizofreni veya psikoz gibi hastalıkları olan insanların tedavisine yardımcı olmak için kullanılan ve “antipsikotikler” adı verilen ilaç grubuna aittir [83]. Tedavide kullanıldığı hastalıklar şunlardır; akut ve kronik şizofreni, mani ve hipomani, organik psikozlar, motor tikler, psikolojik ajitasyon,anksiete nevrozu, gerilim durumları, depresyon durumlarının anksiete ile birlikte görülen karışık nevrozlarında endikedir [84].

Kas içine verildikten 10-20 dakika sonra plazma doruk konsantrasyonuna ulaşır. En yüksek etkinlik 30-45 dakika sonra oluşur. Ağızdan alındıktan sonra 3-6 saatte plazma doruk seviyesine ulaşır. Yarılanma ömrü 12-22 saattir

1.6.1.3 Asepromazin Maleat

Major endikasyonu psikoz, tedavisidir. Bunun yanında kusma ve bulantı, hıçkırıkta, alkolik halüsinasyonlarda ve diğer nöropsikiyatrik rahatsızlıklarda kullanılan bir antipsikotiktir. Manik durumlar, paranoya, şizofreni, ajitasyon gibi psikozlarda endikedir [85, 86].

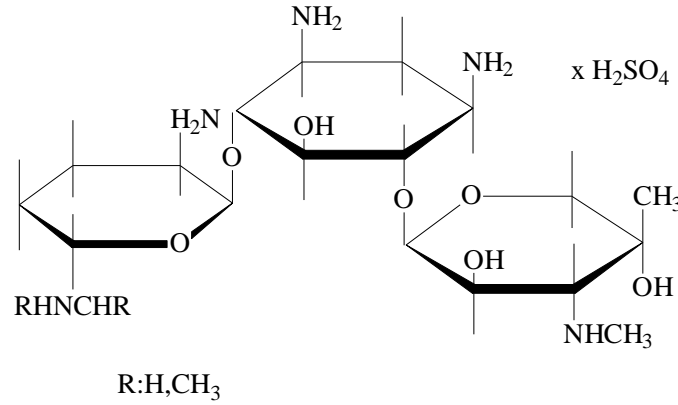
1.6.1.4 Diazepam

Anksiyolitik, antikonvülsan, sedatif, kas gevşetici ve hafıza zayıflatıcı etkilere sahiptir. Bu şekli de anksiyete, uyuyamama, nöbetler, alkol yoksunluğu, ve kas spazmları gibi hastalıkların tedavisinde kullanılır. En önemli endikasyonu anksiyete hastalıklarıyla anksiyeteye bağlı semptomların kısa süreli tedavileridir. Akut alkol yoksunluğuna bağlı akut krizlerde, tremor, akut delirium tremens ve halüsiyonasyonlarda kullanılır. Diazepam, lokal patolojik nedenlere bağlı (mafsal ve kas enflamasyon veya travmaları) iskelet kas spazmları, üst motor nöron hastalıkları (serebral felç ve paraplejiler) atetoz, stiffman sendromu gibi durumlarda ve çeşitli konvülzif hastalıklarda tedavi amacıyla kullanılır [87].

1.6.2 Antibiyotikler

1.6.2.1 Gentamisin Sülfat

Antibakteriyel etkilidir. Duyarlı mikroorganizmaların yol açtığı idrar yolları, solunum yolları, merkezi sinir sistemi ,gastrointestinal kanal, kemik ve yumuşak doku enfeksiyonları ile septisemi, gonore, enfekte yara, peritonit, septik abortus, sepsis komplike yanıklarda endikedir [88]. 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.

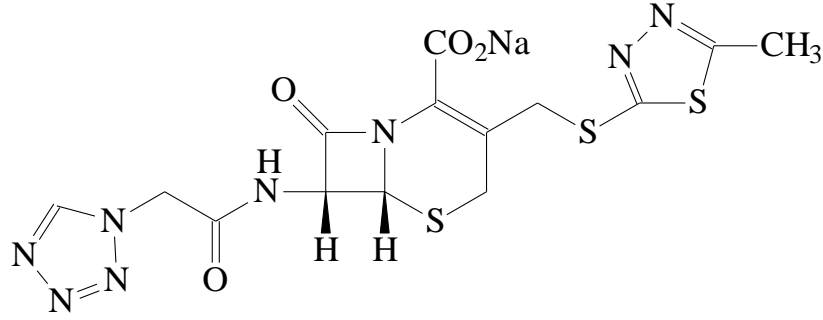


Şekil 1.7 Gentamisin sülfat bileşiğinin molekül şekli (0-2-amino-2-deoxy-D-glucopyranosyl-(1.4)-O-[3-deoxy-3-(methylamino)-D-xylopyranosyl-(1 6)]-2-deoxy-D-streptamine).

1.6.2.2 Sefazolin sodyum

Antibakteriyel etkilidir. Duyarlı patojenlerin neden olduğu septisemi, bakteriyel endokardit, kolanjit, kolesistit, peritonit, lenfanjit, lenfadenit, piyolonefrit, pyelit, sistit, üretrit, osteomyelit, artrit, arpacık, panoftalmi gibi solunum yolu, deri ve yumuşak doku jinekolojik enfeksiyonların tedavisinde endikedir[89]. Sefazolin sodyum bakteri hücre duvarı sentezini inhibe ederek, öldürücü etki gösteren bir

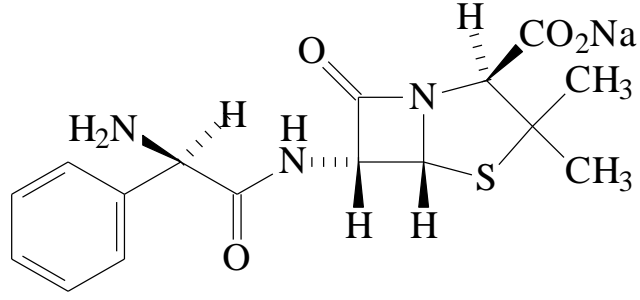
sefalosporindir. Sefazolin sodyum enjeksiyondan sonra kanda hızla yüksek konsantrasyonlara ulaşır. Böbrek, karaciğer ve akciğer dokularına kolaylıkla geçer. Sefazolin sodyum intramüsküler uygulandıktan 1 saat sonra, serumda maksimum konsantrasyona ulaşır ve bu düzey en etkili olduğu andır. Sefazolin sodyumun serum yarılanma ömrü intramüsküler uygulamada yaklaşık 2 saattir. Sefazolin sodyumun % 90'dan fazlası idrarda değişmeden dışarı atılır.



Şekil 1.8 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).

1.6.2.3 Sodyum Ampisilin

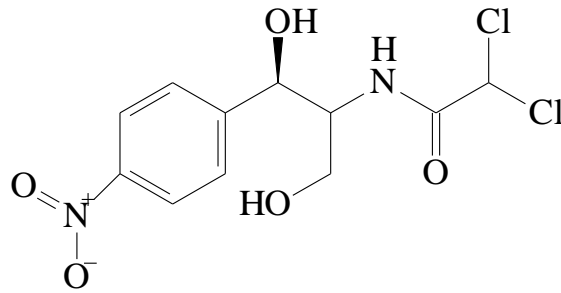
Bir aminopenisilanik asit türevi olan ampisilin geniş bir spektruma sahip olup gram (+) ve gram (-) aerob ve anerob mikroorganizmalara karşı bakterisit etkilidir; bu etkisini bakterilerin hücre duvarı mukopeptit biyosentezini inhibe ederek gösterir. Ampisilin beta-laktamazlara karşı dayanıklı değildir; kolayca parçalandığından etkisiz bir duruma gelir. Ampisilin 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



Şekil 1.9 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).

1.6.2.4 Kloramfenikol

Kloramfenikol, *in vitro* olarak birçok gram-negatif ve gram-pozitif bakteri üzerinde bakteriyostatik etkiye sahip, 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.



Şekil 1.10 Kloramfenikol bileşiğinin molekül şekli

AMAÇ

Pek çok hastalıklarla direkt yada indirekt ilgileri rapor edilen ve özellikle kardiyovasküler hastalıklarla ilgisi geniş bir şekilde araştırılan PON ailesinin üyelerinin, vücutta patofizyolojik durumlarda kullanılan bazı ilaçlardan nasıl etkilendikleri bilinmemektedir.

Bu çalışmada farklı gruptaki ilaçların, PON1 ve PON2 enzimleri üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmaktadır.

Bu çalışmamızda toplumda artık çok sık kullanılmaya başlanan depresyon ilaçları ve bazı nöroleptik ilaçların, son yıllarda kardiyovasküler hastalıklardan korunmada önemi olan PON1 enzimi üzerindeki etkilerini incelemek olmuştur.

Bazı nöroleptik ve antidepresan ilaçlar ilk grup olarak seçilmiştir. Dünya Sağlık Örgütü'nün 1997 yılında yaptığı çalışmanın sonuçlarına göre depresyonun 2020 yılına kadar zaman kaybına ve ölüme neden olan etkenler arasında ikinci sırada yer alacağı tahmin edilmektedir. Ayrıca 2020 yılında depresyonun hastalık yükü açısından gelişmiş ülkelerde ilk sırada, gelişmekte olan ülkelerde ise üçüncü sırada olacağı bildirilmektedir [90] Bu nedenle bu grup ilacın en yaygın bulunan PON1 enzimi üzerinde etkisi *in vitro* olarak araştırılacaktır.

Ayrıca bu çalışmada ikinci grup olarak alınan antibiyotikler, günümüzde çok yaygın biçimde kullanılmakta olup hücre hattı üzerinde antioksidan etkisi yüksek olan PON2 enzimi üzerine etkilerini incelemek amaçlanmıştır.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. MATERYALLER

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneysel çalışmalarda kullanılan, N,N,N,N'tetrametiletildiamin (TEMED), Sepharose-4B, 1-Naftilamin, L-tirozin, standart serum albumin, 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 -merkaptotanol, sodyum dodesil sülfat, akrilamid, N,N-metilen bis-akrilamid, amonyum persülfat, bromofenol mavisi, gliserol, sodyum bikarbonat, sodyum fosfat, potasyum fosfat, kalsiyum klorür Merk'den sağlandı.

Çalışmada U937 makrofaj hücre hattı kullanılmıştır. Hücre hattı Cardiff Üniversitesi İngiltere'den temin edilmiştir. Araştırmada kullanılan ilaçlar fluoksetin hidroklorür, asepromazin maleat, haloperidol, ampisilin sodyum, kloramfenikol sodyum süksinat, sefazolin sodyum, gentamisin sülfat yerel eczaneden 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	Hoefer, 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

Gadient Mikser	Atta Magnetik Karıştırıcı ve Gadient 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 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 çözeltiler:

Fenol ayırıcı : Folin-fenol ve distile sudan bire bir oranda alınarak hazırlandı

Ayıraç A : % 2'lik Na₂CO₃ 0.1 M NaOH' da çözüldü.

Ayıraç B : %1 NaK tartarat distile suda çözüldü

Ayıraç C : % 0.5'lik CuSO₄ distile suda çözüldü.

Ayıraç D : 48mL A ayıracından, 1mL B ayıracından, 1mL C ayıracından konulup hazırlandı.

Sığır Serum Albumini (BSA) : 5mg 5ml suda çözülerek taze olarak hazırlandı.

Protein tayini işleminde şu yol izlendi: 1 mL sinde 1mg protein içeren standart sığır albümin çözeltilisinden tüplere 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 µl alındı. Her tüpe 2mL D ayıracından eklendi. 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Her tübe 0,2mL folin-fenol çözeltilisinden eklenip vorteks ile zaman kaybetmeden karıştırıldı ve 30 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. 600nm de köre karşı absorbans değerleri okundu. Okunan absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri ile standart grafik hazırlandı (Şekil 3.1.).

Protein miktarını ölçmek için hazırlanan enzim çözeltilerinde 0,1 mL 2 ayrı tüpe konuldu.. Üzerlerine 2mL D ayıracından eklendi. Oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi. Daha sonra her tüpe 0,2ml folin-fenol bileşiği eklenip vorteksle karıştırıldı. 30 dk oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 595 nm de absorbansları okundu. Ölçümlerin ortalama absorbansına karşılık gelen protein miktarı standart grafik yardımıyla hesaplandı.

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

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

Paraoksonaz aktivite ölçümünde kullanılan bazal aktivite tamponu: 2 mM CaCl₂ içeren 100mM tris-HCl, pH=8; 3,0285g (25mmol) Tris, 200mL distile

suda çözüldü. 1 N HCl ile pH'ı 8,0'e getirildi. 0,0555 g(0,5 mmol) CaCl₂ katılarak son hacim 250mL'ye tamamlandı.

Laktonaz aktivite ölçümünde kullanılan bazal aktivite tamponu: 50 mM tris-HCl, pH=8,0; 6,057 g Tris 80 mL distile suda çözüldü. 1N HCl ile pH'ı 8,0'e getirildi. Son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

Arilesteraz aktivite ölçümünde kullanılan bazal aktivite tamponu: 100 mM tris-HCl, pH=10,5; 1.2114 gTris 80 mL distile suda çözüldü. 1 N HCl ile pH'ı 10,5'e getirildi. son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

RPMI (Roswell Park Memorial Institute): RPMI besiyeri 2000mg/L glikoz, pridoksin HCl ve NaHCO₃ ihtiva eden hazır besi yeridir. Besiyeri hücrelere verilmeden önce 10 000µg/mL konsantrasyonunda penisilin/streptomisin'den 5 mL ve son konsantrasyon 2mM olacak şekilde L-glutamin eklendi.

Tuz ihtiva eden fosfat tamponu (PBS); Tablet şeklinde ticari olarak alınmış PBS tamponu içerisinde; 137mM sodyum klorür, 2mM potasyum klorür ve 10mM fosfat tamponu (pH 7,4) ihtiva etmektedir. 1 tablet 100mL 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 (U937 hücrelerinin paraoksonaz enzim aktivitesi belirlemeden önce lizisinde kullanılan tampon); %0,2 (v/v) Triton X-100 ihtiva eden 0,5M K₂HPO₄ tamponu (pH 7,8); 4,35g (0,025 mol) K₂HPO₄ 45mL distile suda çözüldü ve 1N HCl ile pH'ı 7,8'e ayarlandı. Son hacim 50mL'ye tamamlandı. Hazırlanan tampona % 0,2'lik Triton X-100 eklendi ve son hacim toplam 250mL'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, 120mL metanolde çözüldü. Bu çözeltiliye 24 mL saf asetik asit ve 120mL 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 75mL asetik asit ve 50mL metanol, 875mL saf su ile karıştırıldı.

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

	Ayırma Jeli	Yığıma Jeli
	%10	%3
<p><u>Akril amid/Bis</u> Akril amid 15 g Bis 0,4 g Alınarak son hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlanır.</p>	16,65mL	2,6mL
Distile su	20,1mL	12,2mL
<p><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.</p>	12,5mL	–
<p><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.</p>	–	5mL
<p><u>% 10 'luk SDS</u> SDS 1g Alınarak son hacim distile su ile 10 mL'ye tamamlanır.</p>	0,5µL	200µL
TEMED	25µL	20µL
<p><u>%10'luk amonyum persülfat</u> Amonyum persülfat 1g Alınarak son hacim distile su ile 10 mL'ye tamamlanır.</p>	750µL	400µL

2.2. METOD

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

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) ve substrat (2 mM paraoxon) ve koenzim (2mM 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 µmol'ü olarak tayin edildi.

2.2.3. Lowry Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini

Amonyum sülfat çöktürmesi sırasında elde edilen çözeltilerdeki protein miktar tayinleri bu yöntemle belirlendi. Bu yöntem alkali koşullar altında biüret reaksiyonu ve aromatik aminoasitlerin Cu^{+2} katalizli oksidasyonundan sonra, ayrıca bulunan fosfomolibdik, fosfotungisdik asiti ile heteropolimolibden mavisine indirgenmeyi içeren Folin- Ciocalteu reaksiyonunun bir kombinasyonudur. Özetle deneyin prensibi alkali ortamda proteinlerin peptid bağlarının ve tirozin artıklarının bakır ile kompleks oluşturmasına dayanır [91]. Koyu mavi oluşu karakteristiktir ve 600 nm dalga boyunda absorbans verir. Yöntem çok duyarlıdır. Ancak pH'ya bağlıdır. Hassasiyet aralığı 5-100' $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'dir. Ortam pH'sı 10-10.5 olmalıdır. Bu yöntem triptofan ve tirozin içeriği fazla olan proteinlerin miktar tayini için avantajlıdır. Zira ayrıca bu aminoasitlere daha yüksek hassasiyet gösterir. Bu yöntemde 4 farklı çözelti kullanılır.

Protein tayini işleminde şu yol izlendi: 1 mL sinde 1mg protein içeren standart sığır albümin çözeltisinden tüplere 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 μl alındı. Her tüpe 2mL ayıracından eklendi. 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Her tübe 0,2 mL folin-fenol çözeltisinden eklenip vorteks ile zaman kaybetmeden karıştırıldı ve 30 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. 600nm de köre karşı absorbans değerleri okundu. Okunan absorbans değerlerine karşılık gelen μg protein değerleri ile standart grafik hazırlandı(şekil 3.1.).

Protein miktarını ölçmek için hazırlanan enzim çözeltilerinde 0,1ml 2 ayrı tüpe konuldu.. Üzerlerine 2mL ayıracından eklendi. Oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi. Daha sonra her tüpe 0,2 ml folin-fenol bileşiği eklenip vorteksle karıştırıldı. 30 dk oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 595 nm de absorbansları okundu. Ölçümlerin ortalama absorbansına karşılık gelen protein miktarı standart grafik yardımıyla hesaplandı.

2.2.4. Enzimin saflaştırılması

2.2.4.1. Amonyum sülfat çöktürme

Amonyum sülfat, belirli doygunluk derecelerine göre belirli proteinlerin çökmesini 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 %60-80 aralığında çöktürme yapılmıştır.

2.2.4.2. Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile enzimin saflaştırılması

Hidrofobik etkileşim kromatografisi yöntemi için laboratuvarımızda daha önce sentezlenen Sepharose-4B-L-tirozin-1-Naftilamin yapısında hidrofobik jel kullanılmıştır. Hazırlanan hidrofobik etkileşim kolonu önce 1M (NH₄)₂SO₄ içeren 0,1M 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 1M amonyum sülfat doygunluğuna getirildikten sonra kolona tatbik edildi. Kolona 1 M (NH₄)₂SO₄ içeren 0,1M Tris-HCl pH:8,0 tamponu ve 0,1M Tris-HCl pH:8,0 tamponu ile

olusturulan 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 absorpsiyon sıfır oluncaya kadar devam edildi. 0,1M 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.

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

Paraoksonaz enziminin hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılmasından sonra iki farklı akrilamid konsantrasyonunda; yığılma jeli % 3, ayırma jeli % 10 olacak şekilde kesikli sodyum dodesil sülfat jel elektroforezi (SDS-PAGE) Laemli tarafından belirtilen yöntemle yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi [92].

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 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 kuyucuklarının 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 soğutularak 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 yağma 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.

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

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

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

2.2.6. İlaçlar için IC₅₀ değerlerini bulunması

Farklı ilaçların I₅₀ değerlerini bulmak için, optimum şartlarda paraoksan substratının 2 mM sabit konsantrasyonunda çalışıldı. Önce ilaçsız ortamda enzim aktivitesi bulundu. Bu değer %100 aktivite olarak kullanıldı. Değişik ilaç konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbanslar 412nm'de köre karşı okundu. Elde edilen absorbans değerlerinden % aktiviter hesaplandı. % Aktivite –[I] grafikleri çizildi. Bu grafiklerden yararlanarak her bir ilaç için IC₅₀ değerleri hesaplandı.

2.2.7. İlaçlar için K_i değerlerinin bulunması

Farklı ilaçların için K_i değerlerinin bulunması için önce ilaçsız ortamda optimum şartlarda yirmi farklı paraokson substratı konsantrasyonu kullanılarak aktiviter bulundu. Daha sonra her bir ilaç için 2 değişik sabit ilaç konsantrasyonunda optimum şartlarda aktiviter paraokson substratı kullanılarak tespit edildi. 1/V ve 1/[S] değerlerinden Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Bu grafiklerden yararlanarak inhibisyon türleri ve K_i değerleri, 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 ilaçsız ortamda bulunan değerlerdir.

2.2.8. İlaçların U937 hücreleri tarafından üretilen PON2 üzerindeki etkisi

2.2.8.1. Hücrelerin doku kültüründe yetiştirilmesi

U937 hücreleri penisilin (100 U/mL) ve streptomisin (100 µg/mL) ihtiva eden, ısıyla inaktive edilmiş (60dak., 56 °C) %10 (v/v)'luk fetal serumu eklenmiş RPMI 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.

2.2.8.2. 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.

2.2.8.3. 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 steril 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 dak (1,02 atm basınçta) otoklavda steril edildi.

2.2.8.4. 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.

2.2.8.5. Hücrelerin büyüülmesi

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

2.2.8.6. Hücre kültürünün pasajlanması

Flask (75'lik) içerisindeki hücre topluluğu santrifüj tüpüne alınarak 1000g'de 5dk 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 pasajlandı.

2.2.8.7. 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 10µl 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 x 2 x 10⁴

2.2.8.8. İlaçların hücre kültürüne uygulanması ve aktivitesinin Bulunması

Flaskta yetiştirilen hücreler (U937) sayıldıktan sonra her bir kuyucukta 250000 hücre olacak şekilde 12 kuyucuklu (4x3) plakalara ekildi. Hücrelere ekimden 24 saat sonra değişik konsantrasyonlarda ilaçlar uygulandı. İlaç uygulandıktan sonra her bir ilacın serumda etki süresine göre farklı süreler sonunda hücreler tarafından

üretilen paraoksonaz enziminin aktivitesine bakıldı. Aktivite belirlenmeden önce hücreler lizis tamponu ile parçalandı.. Daha sonra oluşan hücre süspansiyonu ependorfa alındı ve 1000rpm’de 5 dakika santrifuj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet soğuk PBS ile tekrar çözüldü. Daha sonra 10.000 rpm’de 30 dk santrifuj edildi. Çökelti üzerine 100µl lizis tamponu eklendi ve sonikatör (20x20sn) kullanılarak hücrelerin parçalanması sağlandı. 15,000 rpm’de 30 dakika santrifuj edilerek üstte kalan çözeltinin, laktonaz ve arilesteraz aktiviteleri belirlendi.

3. BULGULAR

Bu çalışmada iki farklı gruptaki ilaçların paraoksonaz enzimleri üzerinde inhibisyon etkileri belirlenmiştir. Çalışmanın ilk aşamasında, son yıllarda pek çok ülkede üretimi, kullanımını artan çağımızın hastalığı olarak kabul edilen psikiyatrik hastalıklarda tedavi amaçlı kullanılan psikiyatrik grubu ilaçların, insan serumunda saflaştırılmış PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkilerinin belirlenmiştir.

Çalışmamızın ikinci aşamasında, farklı gruptaki 4 farklı antibiyotiğin PON2 enzimleri üzerinde *in vitro* etkileri belirlenmesi amaçlanmıştır. Hücre içinde ekspre olan ve katalitik laktonaz aktivitesi PON1 e göre yüksek olan ve makrofaj hücrelerinde ekspre olan PON2 enziminin inhibisyon etkilerinin belirlenmesi oldukça önem arz etmektedir. Özellikle bağışıklık sisteminde, tanıma moleküllerinin oluşumunda görevi olduğu rapor edilen PON2 enziminin bu hücreleri de bağışıklık sisteme yardımcı olarak kullanılan antibiyotikler üzerinde etkilerinin belirlenmesi gerekmektedir. Bu nedenle çalışmada, makrofaj hücre hattı modeli U937 hücre hattı üzerinde, bu antibiyotiklerin etkileri belirlenmesi amaçlanmaktadır.

3.1 İnsan serum PON1 enzimi üzerine bazı antipsikiyatrik ilaçların etkilerinin belirlenmesi

3.1.1 Serum PON1 saflaştırılması

Bölüm 2.2.5.1 ve 2.2.5.2’de belirtildiği gibi amonyum sülfat ve hidrofobik etkileşim kromatografisi yöntemleri kullanılarak PON1 enzimi insan serumundan kısmen izole edilmiştir. Çizelge 3.1 saflaştırma tablosunda gösterildiği gibi söz konusu enzim %9,96 verimle 125 kat saflaştırılmıştır.

Çizelge. 3.1. PON1 enziminin saflaştırma tablosu

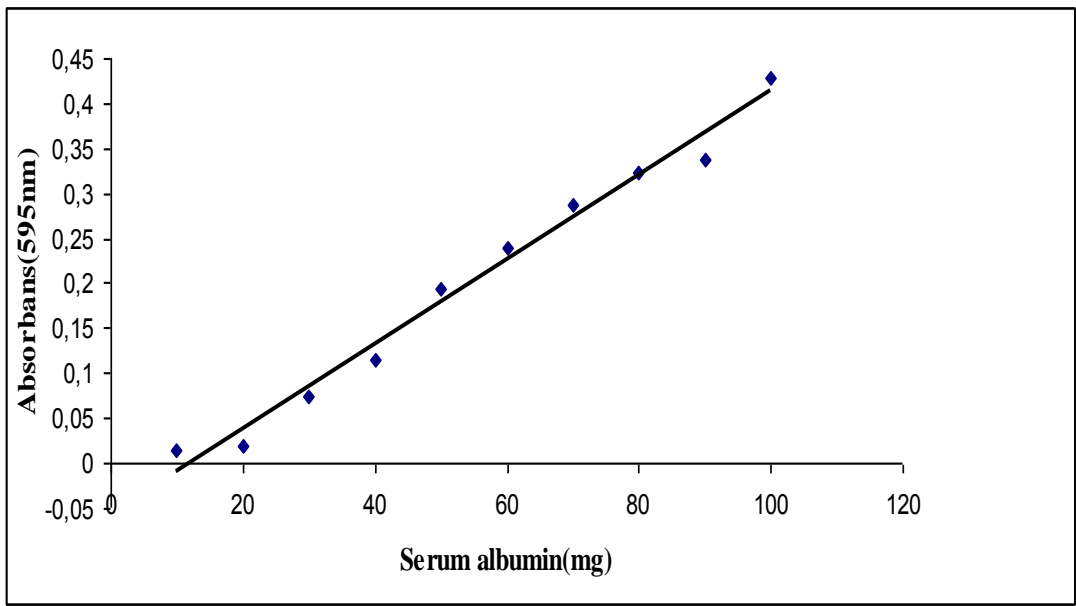
Basamak	Hacim (mL)	Aktivite (U/mL)	Toplam Aktivite (U/mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	% Verim	Saflaştırma Derecesi
Serum	57	57,72	3290,04	1271,34	72466,38	0,0454	100	-
Amonyum Sülfat								
Çöktürmesi	20	85,96	1719,2	1084,8	21696	0,0791	52,25	1,74
Hidrofobik								
Etkileşim	3	109,29	327,87	10,98	32,94	9,95	9,96	125,6
Kromatografisi								

3.1.2. Kantitatif Protein Tayini için Hazırlanan Standart Eğri

Hidrofobik etkileşim kromatografisi sonunda enzim aktivitesine rastlanan tüpler birleştirildi. Kolona tatbik edilen numune ve birleştirilen elüat çözeltileri için Lowry metoduyla kantitatif protein tayini yapıldı. Daha sonra aktivite tayinleri yapılarak spesifik aktiviteler ve saflaştırma oranları tespit edildi. Sonuçlar çizelge 3.1'de verildi. Paraoksonaz aktivitesi Gan ve arkadaşlarının uyguladığı yöntem kullanılarak insan serumundan belirlenmiştir. Bu yöntemle göre, 1 ünite paraoksonaz dakikada meydana gelen 4-p-nitrofenol'ün μmol 'ü olarak tayin

edilmektedir. Paraoksonun hidrolizi ile açığa çıkan 4-p-nitrofenolün 37°C’de, 412nm’de absorbands ölçümüne dayanmaktadır [93].

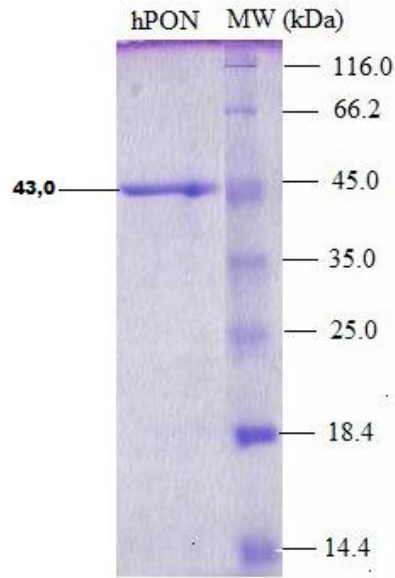
Serumdan elde edilen enzim çözeltisi ve saflastırma basamakları sonundaki enzim çözeltilerinin protein miktarları standart grafiğe göre belirlendi. Standart çözeltideki mg proteine karşılık gelen absorbands değerleri Sekil 3.1’de gösterilmiştir.



Sekil 3.1 Lowry yöntemi ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan standart grafik

3.1.3. Serum Paraoksonaz 1 izoenziminin SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrez

Hidrofobik etkilesim kolonundan saflastırılan serum paraoksonaz enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla bölüm 2.2.5.3.’de anlatıldığı şekilde hazırlanan SDS poliakrilamid jel elektrofrezine serumdan saflastırılan paraoksonaz enzim numunesi tatbik edildi. Protein bantları içeren jellerin görüntüleri jel görüntüleme sistemi ile bilgisayara aktarıldı (Sekil 3.2).



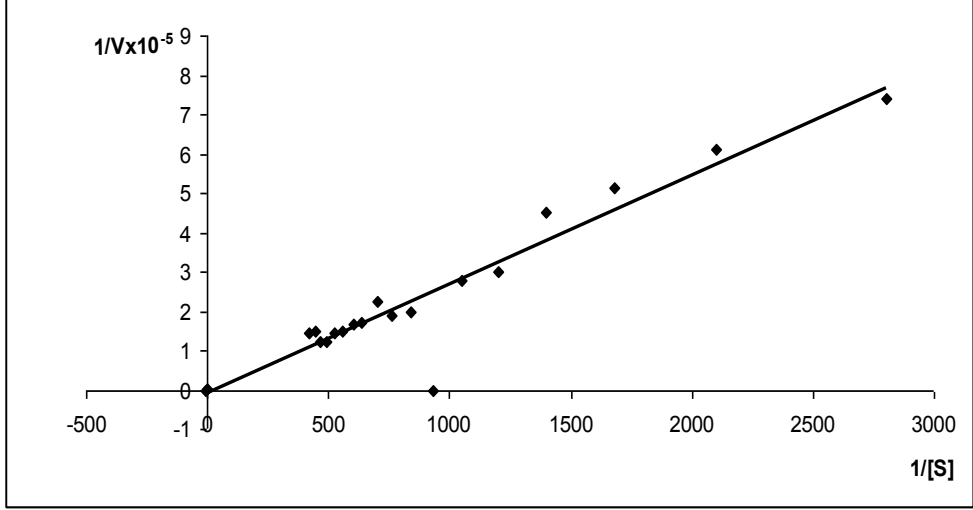
Sekil 3.2. Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılan paraoksonaz enziminin SDS-polakrilamid jel elektroforezi. Molekül ağırlık standartları; (β -galaktosidaz (116.0 kDa), sığır serum albumin (66.0 kDa), yumurta albumini (45.0kDa), karbonik anhidraz (33.0 kDa), β -laktoglobulin (25.0kDa) ve Lizozim (19.5kDa), saf PON1 Qve R (43.0 kDa).

3.1.4 Optimum Sartlarda Km ve Vmax Degerlerinin Bulunması

Km ve Vmax değerlerinin bulunması amacıyla, optimum şartlarda paraokson substratının değişen konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ölçümleri yapıldı. Her ölçüm iki defa yapılarak bulunan degerlerin ortalaması alındı. 412 nm’de ölçülen aktivite değerleri reaksiyon hızı (U/ml dakika) olarak alındı. $1/V$ ve $1/[S]$ degerleri bulunarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi Grafikten yararlanarak PON1 için Km degeri 0.15mM ve Vmax degeri $5 \times 10^{+6}$ U/mg olarak tespit edilmiştir (Şekil3.3).

Çizelge 3.2. Km ve Vmax degerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, 1/V ve 1/[S] değerleri

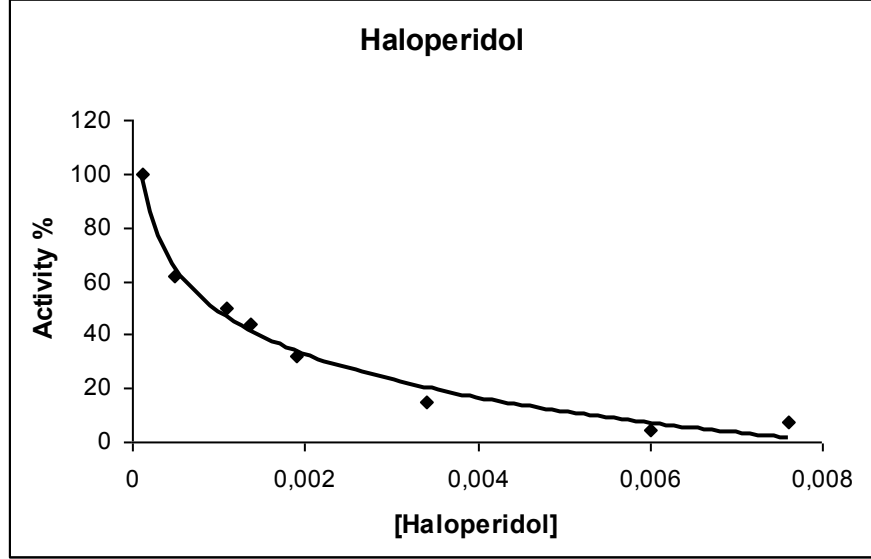
100mM Tristamponu (µl)	Enzim çözeltilisinin Hacmi (µl)	Substrat çözeltilisinin Hacmi (µl)	Küvetteki toplam hacim(µl)	Küvetteki Substrat kons.(mM)	AOD (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	1/V x10 ⁻⁴	1/[S] (Mm ⁻¹)
945	100	5	1050	0,00011	9	11052,63	0,904	9090,9
940		10		,000238	10	12280,7	0,814	4201,68
935		15		0,000357	11	13508,77	0,74	2800,006
930		20		0,000476	12	14736,84	0,678	2100,002
925		25		0,000595	13	15964,91	0,626	1680
920		30		0,000714	18	22105,26	0,452	1400,16
915		35		0,000833	27	33157,89	0,301	1200,48
910		40		0,000952	29	35614,03	0,28	1050,42
905		45		0,00107	31	38070,17	0,262	933,35
900		50		0,00119	41	50350,87	0,198	840,33
895		55		0,0013	43	52807,01	0,189	763,65
890		60		0,00142	36	44210,52	0,226	700,03
885		65		0,00154	48	58947,36	0,169	634,517
880		70		0,001666	49	60175,43	0,166	600,24
875		75		0,00178	54	66315,78	0,15	560,004
870		80		0,0019	56	68771,92	0,145	525,21
865		85		0,00202	67	82280,69	0,121	494,31
860		90		0,00214	67	82280,69	0,121	467,28
855		95		0,00226	55	67543,85	0,148	442,47



Şekil 3.3. İnsan serumundan saflaştırılan enzimin optimum şartlarda Lineweaver-Burk (K_m ve V_{max}) grafiği

Çizelge 3.3. PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren holoperidol adlı ilaın IC₅₀ değerlerinin hesaplanmasın kullanılan ilaç,tampon ve substrat miktarları

100mM Tris tamponu (µl)	ilaç	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µL)	İlaç Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Küvetteki İlaç Konsantrasyonu [I] (mM)	ΔA (412 nm)	% Aktivite
845	Holoperidol	100	100	5	0,00011904	68	100
840				10	0,000476	42	61,7
839				11	0,000576	32	45,58
837				13	0,000766	31	45,58
835				15	0,0011	34	50,00
833				17	0,001376	30	44,10
830				20	0,0019	21	32,35
820				30	0,00342	10	14,70
810				40	0,00761	5	7,352
800				50	0,0119	3	4,411
790				60	0,017	0	1,477

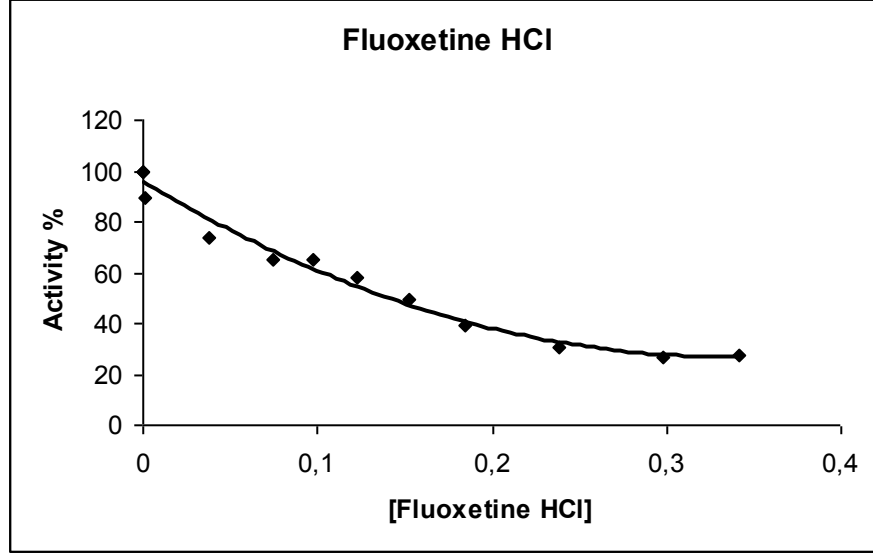


Şekil.3.4.Haloperidol adlı ilacın IC₅₀ değer grafiği

Antipsikotik bir ilaç olan Haloperidol'ün insan serumundan saflaştırılan PON1 enzimin paraoksonaz enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi belirlenmiştir. Şekil 3.4'de görüldüğü gibi enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan karışıma eklenen değişik miktarlardaki ilacın lineer bir etkisi olduğu tespit edilmiştir. Şekil 3.4'de belirtilen inhibisyon grafiğinden IC₅₀ değeri 5.5mM olarak hesaplanmıştır.

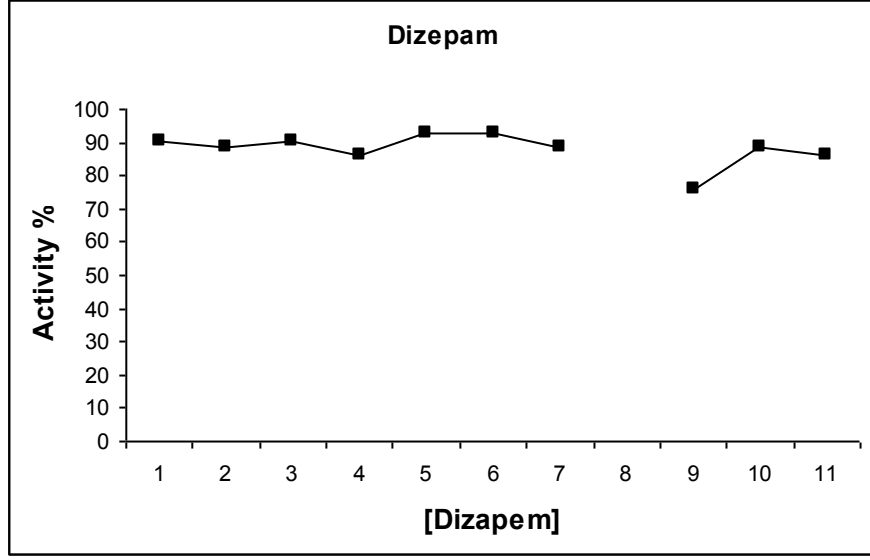
Çizelge 3.4. PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren fluoksetin hidroklorür adlı ilaın IC₅₀ değerlerinin hesaplanmasın kullanılan ila, tampon ve substrat miktarları

100mM Tris tamponu (µl)	İla	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µl)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µl)	İla Çözeltisinin Hacmi (µl)	Küvetteki İla Konsantrasyonu [I] (mM)	ΔA (412 nm)	% Aktivite
845	Fluoksetin Hidroklorür	100	100	5	0,0000952	69	100
840				10	0,000381	58	84
830				20	0,00152	62	89,8
820				30	0,00342	56	81,1
800				50	0,00952	52	75
750				100	0,038	51	73,91
710				140	0,0746	45	65,2
690				160	0,097	45	65,2
670				180	0,123	40	57,9
650				200	0,152	34	49,2
630				220	0,88	27	39,1
600				250	0,238	21	30,43
570				280	0,298	18	26,8
550				300	0,342	20	27,53
450				400	0,609	19	15,9
350				500	0,952	11	15,9
250				600	1,37	0	0

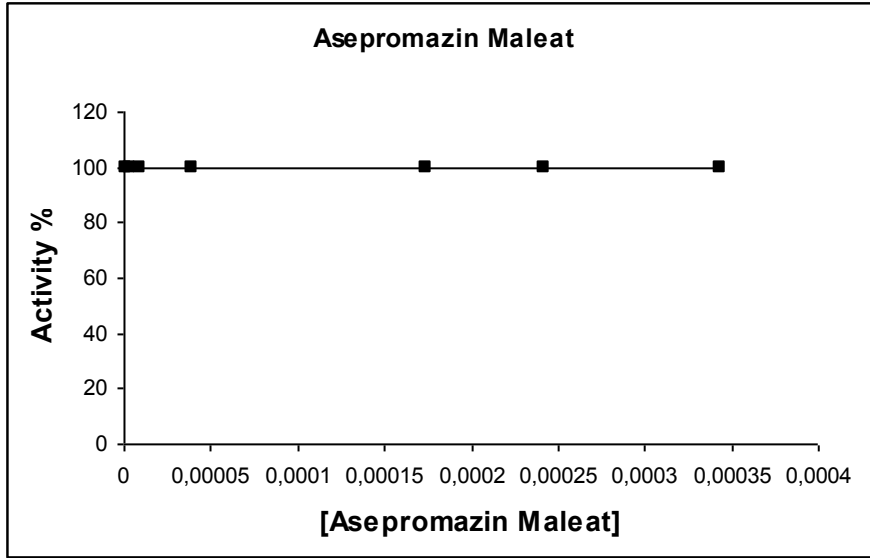


Şekil 3.5.Fluoksetin hidroklorür adlı ilacın IC₅₀ değer grafiği

Antidepresan bir ilaç olan Fluoxetine HCl'in insan serumundan saflaştırılan PON1 enzimin paraoksonaz enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi belirlenmiştir. Şekil 3.5'de görüldüğü gibi enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan karışıma eklenen değişik miktarlardaki ilacın lineer bir etkisi olduğu tespit edilmiştir. Şekil 3.5'de belirtilen inhibisyon grafiğinden IC₅₀ değeri 13.9mM olarak hesaplanmıştır.



Şekil.3.6. Diazepam adlı ilacın değer grafiği



Şekil 3.7. Asepromazin adlı ilacın değer grafiği

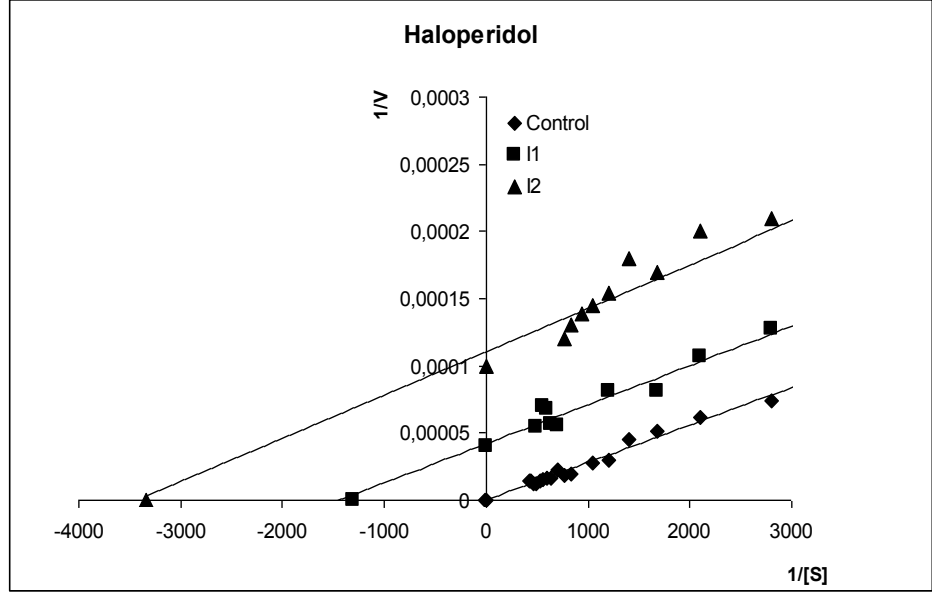
Nöroleptik ilaç grubundan olan dizapem ve asepromazin maleat'ın insan serumundan saflaştırılan PON1 enziminin paraoksonaz enzim aktivitesi üzerinde herhangi bir inhibisyon etkisi gözlenmemiştir.

Çizelge 3.5. PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi olan haloperidol adlı ilacı 50 µl Ki değerlerinin hesaplanmasında kullanılan ilaç, enzim ve substrat konsantrasyonları

100mM Tris Tamponu (µL)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µL)	İlaç Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Küvetteki Toplam Hacim (µL)	Küvetteki Substrat Konst. [S] (mM)	Küvetteki İlaç Kons. [I] (mM)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	1/Vx10- 4	1/[S] (Mm ⁻¹)
895	100	5	50	1050	0,000119048	0,0119	5	6140,35	1,628	8400
890		10			0,000238095		5	6140,35	1,628	4200
885		15			0,000357143		9	11052,63	0,904	2800
880		20			0,00047619		9	11052,63	0,904	2100
875		25			0,000595238		9	11052,63	0,904	1680
870		30			0,000714286		8	9824,56	1,017	1400
865		35			0,000833333		10	12280,7	0,814	1200
860		40			0,000952381		14	17192,98	0,581	1050
855		45			0,001071429		13	15964,91	0,626	933,33
850		50			0,001190476		11	13508,77	0,740	840
845		55			0,001309524		7	8596,49	1,163	763,63
840		60			0,001428571		7	8596,49	1,163	700
835		65			0,001547619		7	8596,49	1,163	646,15
830		70			0,001666667		8	9824,56	1,017	600
825		75			0,001785714		8	9824,56	1,017	560
820		80			0,001904762		9	11052,63	0,904	525
815		85			0,00202381		8	9824,56	1,017	494,11
810		90			0,002142857		12	14736,84	0,678	466,66
805		95			0,002261905		17	20877,19	0,479	442,10

Çizelge 3.6. PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi olan haloperidol adlı ilacı 30 µl Ki değerlerinin hesaplanmasında kullanılan ilaç,enzim ve substrat konsantrasyonları

100mM Tris Tamponu (µL)	Enzim Çözeltisi Hacmi (µl)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	İlaç Çözeltisi Hacmi (µL)	Küvet Toplam Hacim (µl)	Küvetteki Substrat Konst. [S] (mM)	Küvet İlaç Kons. [I] (mM)	ΔA 412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	1/Vx10 ⁻⁴	1/[S] (Mm ⁻¹)
915	100	5	30	1050	0,00011904	0,00342	12	14736,84	0,67857	8400
910		10			0,00023809		9	11052,63	0,90476	4200
905		15			0,00035714		14	17192,98	0,58163	2800
900		20			0,00047619		6	7368,42	1,35714	2100
895		25			0,00059523		10	12280,7	0,81429	1680
890		30			0,00071428		11	13508,77	0,74026	1400
885		35			0,00083333		10	12280,7	0,81429	1200
880		40			0,00095238		1	1228,07	8,14286	1050
875		45			0,00107142		6	7368,42	1,35714	933,33
870		50			0,00119047		8	9824,56	1,01786	840
865		55			0,00130952		11	13508,77	0,74026	763,63
860		60			0,00142857		7	8596,49	1,16327	700
855		65			0,00154761		9	11052,63	0,90476	646,15
850		70			0,00166666		12	14736,84	0,67857	600
845		75			0,00178571		10	12280,7	0,81429	560
840		80			0,00190476		13	15964,91	0,62637	525
835		85			0,00202381		15	18421,05	0,54286	494,11
830		90			0,00214285		9	11052,63	0,90476	466,66
825		95			0,00226190		11	13508,77	0,74026	442,10



Şekil. 3.8. Haloperidol ilacının inhibisyon tipinin belirlenmesinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği

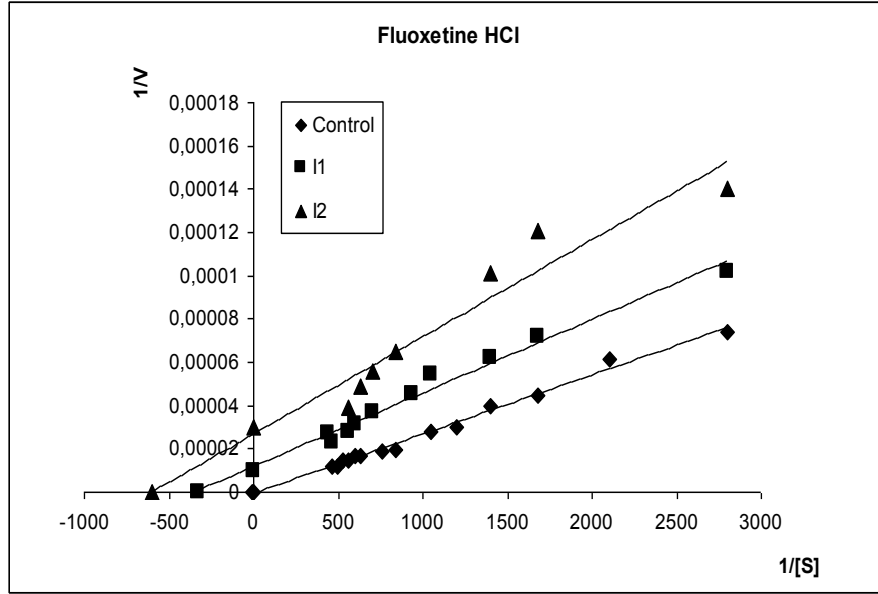
Şekil 3.8'deki Lineweaver-Burk grafiğinde görüldüğü gibi haloperidolün insan serum PON1 enziminin paraoksonaz aktivitesi üzerinde unkompetitif tip inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir. Haloperidolün iki farklı konsantrasyonu (0,00342mg/ml ve 0,0119mg/ml) kullanılarak çizilen grafikten K_i değeri hesaplanmıştır. K_i değeri, yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyon için $1/V$ eksenini kestiği nokta olan $1/V_{max}$ ($1+[I]/K_i$) ifadesinden yararlanarak 4.15mM olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 3.7. PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi olan fluoksetin hidroklorür adlı ilacı 100µl Ki değerlerinin hesaplanmasında kullanılan ilaç, enzim ve substrat konsantrasyonları

100mM Tris Tamponu (µL)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	İlaç Çözeltisinin Hacmi (µL)	Küvet Toplam Hacim (µL)	Küvetteki Substrat Konst. [S] (mM)	Küvetteki İlaç Kons. [I] (mM)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	1/Vx10 ⁴	1/[S] (Mm ⁻¹)
845	100	5	100	1050	0,000119	0,0380	5	6140,35	1,628	8400
840		10			0,000238		9	11052,63	9,500	4200
835		15			0,000357		8	9824,56	1,017	2800
830		20			0,000476		9	11052,63	9,069	2100
825		25			0,000595		8	9824,56	1,017	1680
820		30			0,000714		11	13508,77	0,740	1400
815		35			0,000833		10	12280,7	0,814	1200
810		40			0,00095		15	18421,05	0,542	1050
805		45			0,00107		18	22105,26	0,452	933,33
800		50			0,00119		11	13508,77	0,740	840
795		55			0,00130		14	17192,98	0,585	763,63
790		60			0,00142		22	27017,54	0,370	700
785		65			0,00154		30	36842,1	0,271	646,15
780		70			0,00166		26	31929,82	0,313	600
775		75			0,00178		29	35614,03	0,280	560
770		80			0,00190		38	46666,66	0,214	525
765		85			0,00202		39	47894,73	0,208	494,11
760		90			0,00214		35	42982,45	0,232	466,66
755		95			0,00226		30	36842,1	0,271	442,10

Çizelge 3.8. PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi olan fluoksetin hidroklorür adlı ilacı 300µl Ki değerlerinin hesaplanmasında kullanılan ilaç, enzim ve substrat konsantrasyonları

100mM Tris Tamponu (µL)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µL)	İlaç Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Küvetteki Toplam Hacim (µL)	Küvetteki Substrat Konst. [S] (mM)	Küvetteki İlaç Kons. [I] (mM)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	1/Vx10 ⁻⁴	1/[S] (Mm ⁻¹)
645	100	5	300	1050	0,000119	0,342	11	13508,77	0,740	8400
640		10			0,000238		9	11052,63	0,904	4200
635		15			0,000357		14	17192,98	0,585	2800
630		20			0,000476		21	25789,47	0,387	2100
625		25			0,000595		25	30701,75	0,325	1680
620		30			0,000714		28	34385,96	0,290	1400
615		35			0,000833		26	31929,82	0,313	1200
610		40			0,00095		20	24561,4	0,390	1050
605		45			0,00107		24	29473,68	0,339	933,33
600		50			0,00119		44	54035,08	0,198	840
595		55			0,00130		31	38070,17	0,262	763,63
590		60			0,00142		40	49122,8	0,203	700
585		65			0,00154		40	49122,8	0,203	646,15
580		70			0,00166		41	50350,87	0,198	600
575		75			0,00178		39	47894,73	0,280	560
570		80			0,00190		40	49122,8	0,242	525
565		85			0,00202		35	42982,45	0,232	494,11
560		90			0,00214		35	42982,45	0,232	466,66
555		95			0,00226		28	34385,96	0,290	442,10



Şekil. 3.9. Fluoxetine HCl ilacının inhibisyon tipinin belirlenmesinde kullanılan Lineweaver-Burk grafiği

Şekil 3.9'daki Lineweaver-Burk grafiğinde görüldüğü gibi fluoxetine HCl'in insan serum PON1 ezniminin paraoksonaz aktivitesi üzerinde unkompetitif tip inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir. Fluoxetine HCl'in iki farklı konsantrasyonu (0,0380mg/ml ve 0,342mg/ml) kullanılarak çizilen grafikten K_i değeri hesaplanmıştır. K_i değeri, yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyon için $1/V$ eksenini kestiği nokta olan $1/V_{max}$ $(1+[I]/K_i)$ ifadesinden yararlanarak 0,007mM olarak hesaplanmıştır.

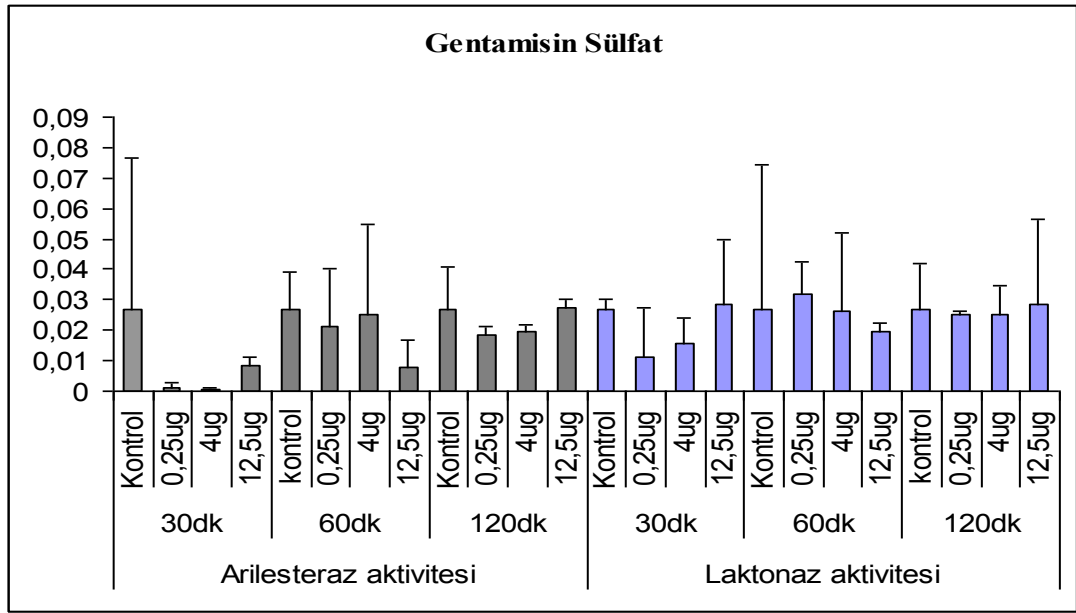
Çizelge 3.9. İnsan serum PON1 enziminin paraoksonaz enzim aktivitesi üzerine %50 inhibisyona sebep olan ilaçların konsantrasyonları ve Lineweaver-Burk grafiğiklerinden bulunan inhibisyon tipleri.

İLAÇ	IC ₅₀ (Mm)	İNHİBİSYON TİPİ
FLUOKSETİN HİDRO KLORÜR	13,9	YARI YARIŞMALI
HALOPERİDOL	5,5	YARI YARIŞMALI

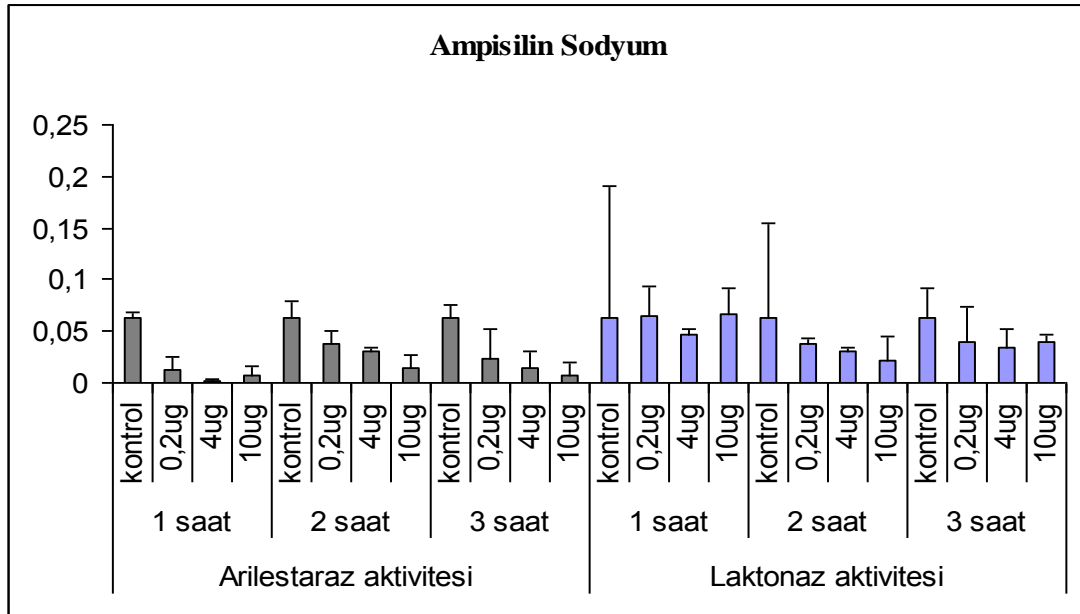
Fluoksetin hidroklorür adlı ilacın Ki değeri;0,007 mM, haloperidol adlı ilacın Ki değeri 4,15 mM olarak bulunmuştur.

3.2 İlaçların U937 hücreleri tarafından üretilen PON2 üzerindeki etkisi

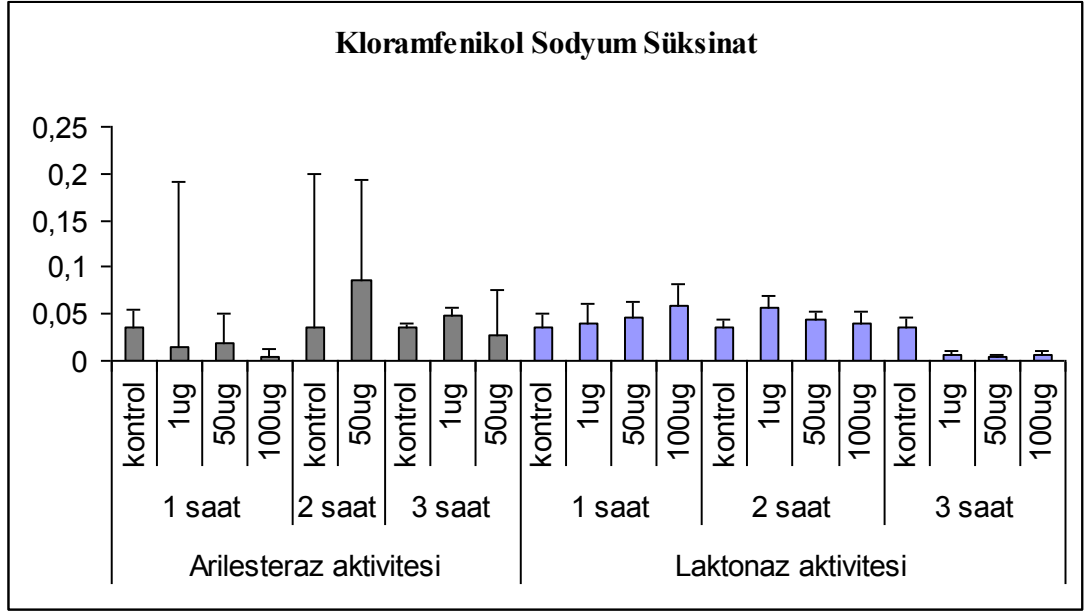
Bölüm 2.2.9.1 de anlatıldığı gibi yetiştirilen hücreler üzerinde Gentamisin sülfat, ampisilin sodyum, kloramfenikol sodyum süksinat, sefazolin sodyum, antibiyotiklerinin PON2 arilesteraz ve laktonaz aktiviteleri üzerindeki etkisi tespit edilmiştir. Hücrelere uygulanan söz konusu antibiyotiklerin serumdaki etki seviyesine bağlı olarak belirlenen sürelerde, bölüm 2.2.9.8. de anlatıldığı gibi alınan hücrelerin arilesteraz ve laktonaz aktiviteleri Şekil 3.10, Şekil 3.11, Şekil 3.12, Şekil 3.13'te gösterilmiştir.



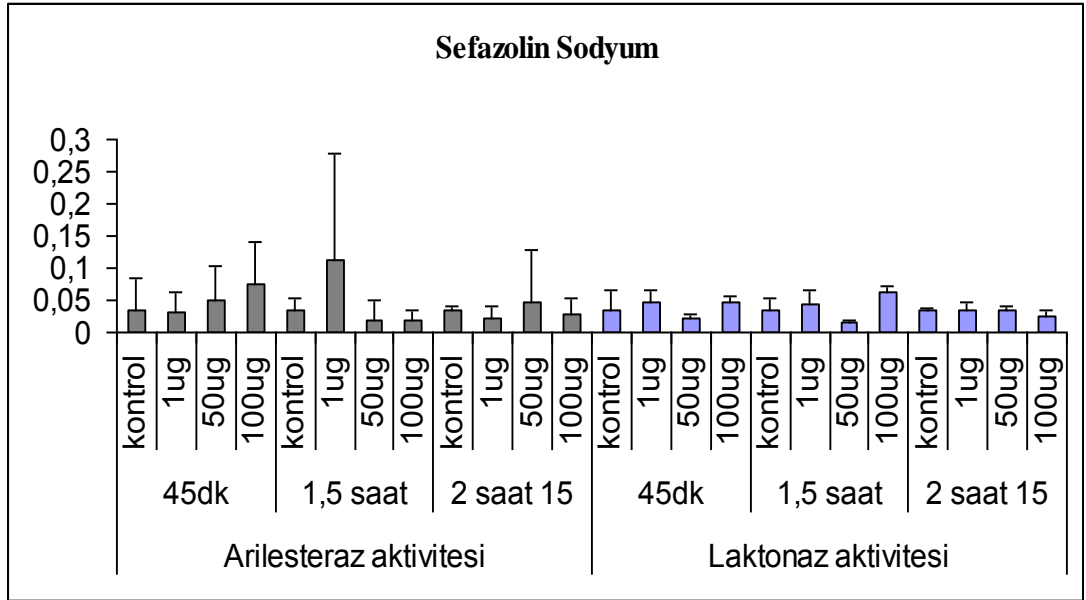
Şekil.3.10. Gentamisin sülfatın doku kültüründeki PON2 enziminin arilesteraz ve laktonaz aktiviteleri üzerindeki, ilaç uygulandıktan 30dk, 60dk ve 120dk sonraki *in vitro* etkisi



Şekil 3.11 Ampisilin sodyum'un doku kültüründeki PON2 enziminin arilesteraz ve laktonaz aktiviteleri üzerindeki, ilaç uygulandıktan 1s, 2s ve 3s sonraki *in vitro* etkisi.



Şekil 3.12 Kloramfenikol sodyum süksinat'ın doku kültüründeki PON2 enziminin arilesteraz ve laktonaz aktiviteleri üzerindeki, ilaç uygulandıktan 1s, 2s ve 3s sonraki *in vitro* etkisi.



Şekil 3.13 Sefazolin sodyum'un doku kültüründeki PON2 enziminin arilesteraz ve laktonaz aktiviteleri üzerindeki, ilaç uygulandıktan 45dk, 90dk ve 135dk sonraki *in vitro* etkisi.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Paraoksonaz enzim ailesi, PON1, PON2 ve PON3 olmak üzere üç üyeden oluşmakta olup, bunlardan PON1 ve PON3 kanda HDL ye bağlı olarak bulunmakta, PON2 ise hücre içi enzim olarak sınırlı olarak makrofajlarda ekspre olmaktadır. İlk izole edilen üyesi olan PON1, iyi huylu kolesterol olarak bilinen HDL ye bağlı bulunması, aktivitesinin kardiyovasküler hastalıklar karşı koruyucu etkisi olabileceği düşüncesini de beraber getirmiştir. Özellikle PON1 ve PON2 gen polimorfimlerinin aktivitede farklılıklar meydana getirmesi ve diyabet, alzheimer, felç, kardiyovasküler hastalıklarla ilişkileri de bu enzim aktiviteleriyle korele olduğu pek çok çalışmada rapor edilmiştir[53, 54, 61, 64, 65, 66, 73, 74, 77, 78]. Fizyolojik substratları ve görevi tam olarak bilinmeyen PON ailesinin paraoksonaz, arilesteraz ve laktonaz aktivitelerine sahip olduğu belirlenmiştir. Son yıllarda, özellikle laktonaz aktivitesi ile PON'unun Quorum sensing özelliği ile bakteriler arasındaki haberci moleküllerin hidrolizini sağladığı, böylece bağışıklık sistemde görev aldığı belirlenmiştir [80,81].

Hastalıklarla ilişkisi detaylı olarak ortaya konmuş olan PON enzimlerinin ilaçlardan nasıl etkilendiğine dair sınırlı sayıda çalışma vardır. PON1 enziminin bu tip ilaçlar kullanıldığında aktivitesindeki değişiklik ilgi çekicidir. Sinan ve arkadaşları yaptıkları çalışmada antibiyotik olan ampisilin sodyum, klindamisin ve siprofloksasinin, saflaştırılmış PON1 enzimi aktivitesinde düşüşe neden olabilecek etkilere sahip olduğu *invitro*, *invivo* ve karaciğer hücre hattı HEP3Blerde göstermiştir[94]. Daha sonra Ekinci ve ark tarafından yapılan çalışmada PON1 enziminin yine farklı antibiyotiklerden etkilendikleri belirlenmiştir[95].

Çeşitli hastalıklarda kullanılan ilaçların kan serumunda HDL ye bağlı olarak bulunan PON1 enzimi üzerinde etkilerinin olduğu farklı ilaçlarında bu enzim üzerinde etkilerinin belirlenmesi gerekliliğini ortaya koymuştur. Çalışmamızın ilk kısmını *invitro* olarak PON1 enzimi üzerinde bazı antipsikiyatrik ilaçların etkilerinin

belirlenmesi oluşturmaktadır. Bu ilaçların kullanımı gelişen dünyada hızlı bir şekilde artmaktadır. Ayrıca genellikle kullanımları uzun dönemleri kapsamaktadır.

Ruh sağlığı sorunları gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde, her sosyoekonomik katmanda, her ırkta ve her kültürel grupta görülebilir. Dünya Sağlık Örgütü'ne (DSÖ) göre, her dört kişiden biri ruhsal ya da nörolojik hastalık geçirme riski ile karşı karşıyadır[96] Ayrıca dünyada en çok sakatlığa neden olan on hastalıktan beşinin ruhsal kaynaklı olduğu saptanmıştır. Birleşmiş Milletler Raporları'na göre, yeryüzünde 450 milyon kişi halen bir ruhsal veya nörolojik hastalıkla mücadele etmektedir. Birçok ülkede yapılan toplum taramaları, ruhsal hastalıkların sanılandan çok daha yaygın olduğunu göstermektedir. Bu nedenle tüm ülkelerde ruh sağlığı sorunları, bir toplum sağlığı sorunu olarak kabul edilmektedir [97].

Dünya Sağlık Örgütü'nün 1997 yılında yaptığı çalışmanın sonuçlarına göre depresyonun 2020 yılına kadar zaman kaybına, yeti yitimine ve ölüme neden olan etkenler arasında ikinci sırada yer alacağı tahmin edilmektedir. Ayrıca 2020 yılında depresyonun hastalık yükü açısından gelişmiş ülkelerde ilk sırada, gelişmekte olan ülkelerde ise üçüncü sırada olacağı bildirilmektedir [10].

Son yıllarda ruhsal hastalıkların görülme sıklığı dünyada ve ülkemizde giderek artmaktadır ve ekonomik sıkıntılar, zorlu iş koşulları, parçalanmış aile yapısı, azalan sosyal destek vb. nedenler bu sonuçta önemli rol oynamaktadır [98].

Bu durumda bireylerin ruhsal hastalıklar için kullanılan ilaçları daha fazla kullandıklarını, hatta bundan sonraki dönemlerde artan bir şekilde kullanmaya devam edecekleri açıkça ortadadır.

Çalışmamızda piyasada çok sık olarak kullanılan fluoksetin hidroklorür ve haloperidol isimli ilaçların, kan serumundan saflaştırılmış PON1 üzerinde etkileri belirlenmiştir. Haloperidol ve fluoksetin hidroklorür'ün PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkileri bulunduğu belirlenmiştir. IC₅₀ değerleri, haloperidol ve fluoksetin hidroklorür için sırasıyla 5,5 ve 13,9 mM olarak belirlenmiştir. Buna göre

haloperidol en etkili PON1 enzimi inhibe ettiği bulunmuştur. Ayrıca inhibisyon mekanizmalarıda yarı yarışmalı olarak belirlenmiştir. Buna karşılık, Diazepam ve asepromazin maleat'ın ise herhangi bir etkisi olmamıştır.

Son yıllarda antioksidan özellikleri ve laktonaz aktivitesi ile bakteriyel quorum quensing faktörü olarak önemi ortaya çıkan PON2 enziminin; özellikle enfeksiyonlarda çok fazla kullanılan antibiyotikler karşısında aktivitesinin değişikliğe uğrayıp uğramadığı çalışmamızın ikinci odağı olmuştur. PON2 enzimi hücre içi görev yapmakta olup, ifadesi bazı hücre tiplerine sınırlıdır. Özellikle bağışıklık sistemimizde etkin bir şekilde görev alan makrofajlar PON üyeleri içinde sadece PON2 yi ekspre etmektedir. PON2, laktonaz ve arilesteraz aktivitesine sahip olan üyesidir. Bu nedenle vücuttaki bir enfeksiyona karşı kullanılan antibiyotiklerin spesifik olarak PON2 enzim aktivitesine karşı etkilerinin belirlenmesi oldukça önemlidir. Bu nedenle sadece PON2'yi ekspre eden U937 hücre hattı kullanılmış farklı zaman aralıklarında ve farklı konsantrasyonlarda etkileri belirlenmiştir. Yaygın olarak kullanılan aminoglikozit grubu antibiyotiklerden gentamisin sülfat, sefalosporinler grubundan sefazolin sodyum, penisilin grubu sodyum ampisilin, amfenikol grubu kloramfenikol seçilmiştir. Antibiyotikler, farklı konsantrasyonlarda ve zamanlarda PON1 enzimi üzerinde etkileri saptanmıştır. Bu çalışma sadece PON2 enziminin inhibisyonunu gösteren ilk çalışma niteliğindedir.

Sonuç olarak yapılan çalışmalarda aşağıdaki bulgular elde edilmiştir.

1-Sepharose-4B-L-tirozin-1-Naftilamin yapısına sahip hidrofobik jel kullanılarak insan serumundan PON1 enzimi saflaştırılmıştır

2-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.

3-Yaygın olarak kullanılan aminoglikozit grubu antibiyotiklerden gentamisin sülfat, sefalosporinler grubundan sefazolin sodyum, penisilin grubu sodyum

ampisilin, amfenikol grubu kloramfenikol'ün makrofaj hücre hatlarında PON2 enzimi aktivitesini *in vitro* olarak farklı düzeylerde etkilediği saptanmıştır

4-Çalışmanın diğer basamağında antidepresif ve anti psikotik olarak kullanılan; diazepam, fluoksetin hidroklorür, haloperidol ve asepromazin maleat adlı ilaçların sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin yapısına sahip hidrofobik jel ile saflaştırılan serum hPON1 enzim aktivitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu bileşiklerden fluoksetin hidroklorür ve haloperidol adlı ilaçların inhibisyon etkisi gösterdiği saptanmıştır.

5-İnhibisyona sebep olan fluoksetin hidroklorür ve haloperidol adlı ilaçların inhibisyon mekanizmalarının yarı yarışmalı olduğu saptanmıştır.

KAYNAKLAR

- [1] Teiber, JF., Draganov, DI, La Du Bert.” *Lactonase and lactonizing activities human serum paraoxonase(PON1) and rabbit serum PON3*”. Biochemical Pharmacology 66 (2003) 887–896
- [2] Mackness B., Durrington,P.N., Mackness,MI, “*Human Serum Paraoxonase*” Gen. Pharmac. Vol. 31, No. 3, pp. 329–336, 1998
- [3] Costa, L., Vitalone,A., Colea, TB., Furlong, CE., *Modulation of paraoxonase (PON1) activity* Biochemical Pharmacology 69 (2005) 541–550
- [4] Mackness , M., Mackness, B., “Paraoxonase 1 and atherosclerosis: is the gene or the protein more important?” Free radical biology & medicine 37,(2004.)1317-1323
- [5] P.N. Durrington, B.M., M.I. Mackness, "*Paraoxonase and Atherosclerosis*". Arterioscler Thromb Vasc Biol., 21: p. 473-480.(2001).
- [6] Carey J. Ng, D.M.S., Susan Y. Hama, Natividad Villa,MohamaNavab,SrinivasaT.Reddy, "*The Paraoxonase Gene Family and Atherosclerosis*". Free Radical Biology & Medicine,, 38: p. 153– 163.(2005).
- [7] The World Health Organization (WHO). (http://www.who.int/mental_health/en/), 2002.(15.07.2009)
- [8] Metintaş, S., Arıkan, İ., *Place of the Community-Based Protection Projects in Preventing the Cardiovascular Diseases* TAF Preventive Medicine Bulletin, 2008; 7(4):357-362
- [9] The World Health Organization (WHO). (http://www.who.int/mental_health/en/), 2002.(02.07.2009)
- [10] The World Health Organization (2001) .(02.07.2009)

- [11] E. Azarsız, E.Y.S., "*Paraoksonaz ve Klinik Önemi*". Türk Biyokimya Dergisi, 25(3): p. 109-119.(2000).
- [12] Jawad, Z. and Paoli, M., "*Novel sequences propel familiar folds*", *Structure (Camb)*, (2002) **10(4)**, 447. Review.
- [13] 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.
- [14] Lu,H.,Zhu, Z.,Ze,Y.,Qin,J.,'*Cloning, Purification,And Refolding Of Human Paraoxonase-3 Expressed In Escherichia Coli And Its Characterization* Protein Expression And Purification 46 ,92-99 (2006).
- [15] Shiner, M., Fuhrman, B., Aviram, M., "*A biphasic U-shape effect of cellular oxidative stress on the macrophage anti-oxidant paraoxonase 2 (PON2) enzymatic activity*" *Biochem Biophys Res Commun* 349 (2006) 1094-1099
- [16] Fuhrman, B., Khateeb, J., Nitzan, O., Karry,R.,Volkova, N., Aviram, M.,"*Urokinase Plasminogen Activator Upregulates Paraoxonase 2 Expression In Macrophages Via An NADPH Oxidase-Dependent Mechanism*" , *Arteioscler Thromb. Vasc. Biol* **28** (2008) 1361-1367
- [17] Liang, H.-L.L.D.-P.L.C.-C., "*Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress, and disease*"s. *J Mol Med*, **81**: p. 766–779, (2003).
- [18] Primo-Parmo, S.L.S., R. C.; Teiber, J.; La Du, B. N, "*The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family*". *Genomics*, **33**: p. 498-507, (1996).
- [19] 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*", *Arteioscler Thromb. Vasc. Biol.*, (2003) **23**, 468.

- [20] Hegele, R. A., Connelly, P. W., Scherer, S. W., Hanley, A. J. G., Harris, S. B., Tsui, L.-C., Zinman, B. “*Paraoxonase-2 Gene (PON2) G148 Variant Associated with Elevated Fasting Plasma Glucose in Noninsulin-Dependent Diabetes Mellitus*”, *J Clin Endocrinol Metab*, **82**, (1997), 3373–3377.
- [21] Qu, Y., Yang, Z., Jin, F., Sun, L., Zhang, C., L., Ji, Sun, H., Wang, B., Wang, L., “The Ser 311Cys variation in the *paraoxonase 2* gene increases the risk of type 2 diabetes in northern chinese”, *Journal of genetics* **87** (2008) 165-169
- [22] Costa, L. G., Cole, T. B., Furlong, C. E., “Paraoxonase (PON1): from toxicology to cardiovascular medicine”, *Acta Biomed*, (2005), 2, 50-57.
- [23] Rodrigo, L., Gil,F., Hernandez, A.F., Lopez, O., Pla, A.,”*Identification of paraoxonase 3 in rat liver microsomes: purification and biochemical properties*” *Biochem. J.* (2003) 376, 261–268
- [24] Carey, J.N., Shih, D.M., Hama, S.Y., Villa,N., Navab,M.,Reddy,S.T. “*The Paraoxonase Gene Family And Atherosclerosis*” *Free Radical Biology And Medicine* **38** (2005)153-163
- [25] Mazur, A., “*An Enzyme In Animal Tissues Capable of Hydrolyzing The Phosphorus-Fluorine Bond of Alkyl Fluorophosphates*”, *J. Biol. Chem.* **164**, (1946), 271-289.
- [26] Aldridge, W.N.,a, “*Serum esterases. I. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination*”. *Biochem.J*(1953), **53**, 110-117.
- [27] Aldridge, W.N., b, “*Serum esterases. II. An enzyme hydrolysing diethyl p-nitrophenyl phosphate (E600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera*”. *Biochem. J.* (1953), **53**, 117-124.
- [28] Mackness MI, Hallam SD, Peard T, Warner S, Walker CH., “*The separation of sheep and human serum "A"-esterase activity into the lipoprotein fraction by ultracentrifugation*”, *Comp Biochem Physiol B.*, 82, 4,(1985), 675-7.
- [29] La Du, B. N., Adkins, S., Kuo, C.-L., Lipsig, D., “*Studies on human serum paraoxonase/arylesterase*”, *Chem Biol Interact*, 87, 1-3, (1993), 25-34.
- [30] Marie-Claude” Garn, B., Abbott, C., Messmer, T. S., Mackness, M., Durrington, P., Pometta, T.D., James, R. W “*Quantification of human serum paraoxonase by enzyme-linked immunoassay: population differences in protein concentrations* *Biochem. J.*, 304, (1994), 549-554.

- [31] Sorenson, R. C., Bisgaier, C. L., Aviram, M., Hsu, C., Billecke, S., La Du, B. N., "*Human Serum Paraoxonase/Arylesterase's Retained Hydrophobic N-Terminal Leader Sequence Associates With HDLs by Binding Phospholipids Apolipoprotein A-I Stabilizes Activity*" *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 19, (1999), 2214-2225.
- [32] Mackness, M. I., Durrington, N., B., Paul, Connelly, P. W., Hegele, R. A., "*Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins*". *Current Opinion in Lipidology*, 7, (1996), 69-76.
- [34] Costa, L. G., T.B.C., Vitalone, A., Furlong, C. E., "*Measurement of paraoxonase (PON1) status as a potential biomarker of susceptibility to organophosphate toxicity*" *Clinica Chimica Acta*, 352, (2005), p. 37-47.
- [35] Li, WF., Furlong, CE., Costa, LG., "*Paraoxonase protects against chlorpyrifos toxicity in mice*", *Toxicol Lett*, 76, 3, (1995), 219-26.
- [36] Furlong, C. E., Cole, T. B., Jarvik, G. P., Pettan-Brewer, C., Geiss, G. K., Richter, R. J., Shih, D. M., Tward, A. D., Lusic, A. J., Costa, L. G., "*Role of Paraoxonase (PON1) Status in Pesticide Sensitivity: Genetic and Temporal Determinants*" *NeuroToxicology*, 26, (2005), 651-659.
- [37] Uriel, A., "*Characterisation des cholinesterases et d'autres esterase carboxylique apres electrophorese et immunoelectrophorese en gelose, I; applications a l'etude des esterase du serum humain normal*". *Am Insit Pasteur*, (1961), 101-104.
- [38] Chemnitz, J.M., Losch, H., Losch, K. and Zech, R., "*Organophosphate detoxicating hydrolases in different vertebrate species*", *Comp. Biochem. Physiol.*, (1983) 76C, 85.
- [39] Mackness, M.I., Walker, C.H., "*Multiple forms of sheep serum A-esterase activity associated with the high-density lipoprotein*" *Biochem. J.*, 250, (1988), 539-545.
- [40] Sorenson, R.C., Primo-Parmo, S.L., Kuot, C.L., Adkins, S., Lockridge, O., La Du, B.N., "*Reconsideration of the catalytic center and mechanism of mammalian paraoxonase/arylesterase*" *Genetics* 92, (1995), 7187-7191.
- [41] Eckerson, H.W., Wyte, C.M., La Du, B.N., "*The Human Serum Paraoxonase/Arylesterase Polymorphism*" *Am J Hum Genet* 35., 1983, 1126-1138.
- [42] Eckerson, H., Romson, J., Wyte, C., La Du, B.N., "*The Human Serum*

Paraoxonase Polymorphism: *identification of Phenotypes by Their Response to Salts*". Am J Hum. Genet., 35, 2, (1983), 214-227.

- [43] Humbert, R., Adler, DA., Disteché, CM., Hasset, C., Omiecinski, CJ., Furlong, CE., "The Molecular Basis of The Human Serum Paraoxonase Activity Polymorphism" *Nat. Genet.*, 3, 1, (1993), 73-76.
- [44] Mohamed Ali., S., Chia, S.E., "Interethnic Variability of Plasma Paraoxonase (PON1) Activity towards Organophosphates and PON1 Polymorphisms among Asian Populations" *Industrial Health* 46, (2008), 309–317.
- [45] McElveen, J., Macknees, M.I., CoVey, C.M., Peard, T., Warner, S., CoHn H. "Distribution of Paraoxon Hydrolytic Activity in the Serum of Patient safter Myocardial Infarction " *Walker Clin.Chem.*, 32, 4, (1986), 671-673.
- [46] Rozenberg, O., Aviram, M., "S-Glutathionylation regulates HDL-associated paraoxonase 1 (PON1) activity" *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 351, (2006), 492–498.
- [47] Liu, Y., Mackness, B., Mackness, M. "Comparison of the ability of paraoxonases 1 and 3 to attenuate the in vitro oxidation of low-density lipoprotein and reduce macrophage oxidative stres", *Free Radical Biology & Medicine*, 45, (2008), 743–748.
- [48] Baykal, Y., Tüzün, A., Kocabalkan, F. "Aterosklerozun Patogenezi", *T Klin Tıp Bilimleri* (1998), 18, 360-368.
- [49] Gaidukov, L., Tawfik, D.S., "High Affinity, Stability, and Lactonase Activity of Serum Paraoxonase PON1 Anchored on HDL with ApoA-I" *Biochemistry*, (2005), 44, 11843-11854.
- [50] Mackness, B., Mackness, M., " *Paraoxonase 1: biochemistry and contribution to atherosclerosis*" *University International Congress Series*, 1262, (2004), 91– 94.
- [51] <http://www.kalpcerrahisi.net/damary1.jpg> 15.07.2009
- [52] Precourta, L.-P., Seidmanb, E., Delvinc, E., Amred, D., Deslandresd, C., Domingueza, M., Sinnett, D., Levy, E., "Comparative expression analysis reveals differences in the regulation of intestinal paraoxonase family members", *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41, (2009), 1628–1637

- [53] Aviram, M., Rosenblat, M., “*Paraoxonases 1, 2, and 3, oxidative stress, and macrophage cell formation during atherosclerosis development*”, *Free Rad Biol Med*, 37, (2004), 1304-1316.
- [54] Mohamad Navab; Judith A. Berliner; Andrew D. Watson; Susan Y. Hama; Mary C. Territo; Aldons J. Lusis; Diana M. Shih; Brian J. Van Lenten; Joy S. Frank; Linda L. Demer; Peter A. Edwards; Alan M. Fogelman ‘*The Yin and Yang of Oxidation in the Development of the Fatty Streak*’ *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1996;16:831-842
- [55] Rader, D.J., “*Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies*” *J. Clin. Invest.*, 116, (2006), 3090–3100.
- [56] Kontush, A., Chapman, M. J. “*Functionally Defective High-Density Lipoprotein: A New Therapeutic Target at the Crossroads of Dyslipidemia, Inflammation, and Atherosclerosis* *Pharmacol*”, 58, 342–374, 2006.
- [57] Raveh, O., Pinchuk, I., Fainaru, M., Lichtenberg, D., “*Kinetics of lipid peroxidation in mixtures of hdl and ldl, mutual effects*”, *Free Radical Biology & Medicine*, 31, 11, (2001), 1486–1497.
- [58] Mackness, B., Hunt, R., Durrington, P. N., Mackness, M. I., “*Increased Immunolocalization of Paraoxonase, Clusterin, and Apolipoprotein A-I in the Human Artery Wall With the Progression of Atherosclerosis* *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, (1997), 17, 1233-1238.
- [59] Mertens, A., Verhamme, P., Bielicki, J.K., Phillips, M.C., Quarck, R., Verreth, W., Stengel, D., Ninio, E., Navab, M., Mackness, B., Mackness, M., Holvoet, P., “*Increased Low-Density Lipoprotein Oxidation and Impaired High-Density Lipoprotein Antioxidant Defense Are Associated With Increased Macrophage Homing and Atherosclerosis in Dyslipidemic Obese Mice* *LCAT Gene Transfer Decreases Atherosclerosis Circulation*”, 107, (2003), 1640-1646.
- [60] Davies, H.G., Richter, R.J., Keifer, M., Broomfield, C.A., Sowalla, J., Furlong, C.E., “*The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin*”, *Nature Genetics*, 14, (1996), 334 - 336.
- [61] Li, J., Wang, X., Huo, Y., Niu, T., Chen, C., Zhu, G., Huang, Y., Chen, D., Xu, X., “*PON1 polymorphism, diabetes mellitus, obesity, and risk of myocardial infarction: Modifying effect of diabetes mellitus and obesity on the association between PON1 polymorphism and myocardial infarction*”

- [62] Mackness, B., Quarck, R., Verreth, W., Mackness, M. and Holvoet, P. "Human paraoxonase-1 overexpression inhibits atherosclerosis in a mouse model of metabolic syndrome", *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, (2006), 1545-1550.
- [63] Francia, P., Cosentino, F., Schiavoni, M., Huang, Y., Perna, E., Camici, G.G., Lüscher, T.F., Volpe, M., "p66Shc protein, oxidative stress, and cardiovascular complications of diabetes: the missing link", Springer-Verlag *J Mol Med* DOI 10.1007/s00109-009-0499-3 (2009)
- [64] Connelly, P.W., Zinman, B., Maguire, G.F., Mamakesick, M., Harris, S.B., Hegele, R.A., Retnakaran, R., Hanley, J.G.A., "Association of the novel cardiovascular risk factors paraoxonase 1 and cystatin C in type 2 diabetes" *J. Lipid Res.*, 50, (2009), 1216–1222.
- [65] Leviev, I., Kalix, B., Brulhart Meynet, MC and James, RW (2001) "The paraoxonase PON1 promoter polymorphism C(-107)T is associated with increased serum glucose concentrations in non-diabetic patients." *Diabetologia*, 44, 1177-1183.
- [66] Rozenberg, O., Shiner, M., Aviram, M. and Hayek, T. (2008) *Paraoxonase 1 (PON1) attenuates diabetes development in mice through its antioxidative properties*. *Free Rad Biol Med* 44 , pp. 1951-1959.
- [67] Abbott, C.A., Mackness, M.I., Kumar, S., Boulton, A.J., Durrington, P.N., "Serum Paraoxonase Activity, Concentration, and Phenotype Distribution in Diabetes Mellitus and Its Relationship to Serum Lipids and Lipoproteins", *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, (1995), 15, 1812-1818.
- [68] Rosenblat, M., Karry, R., Aviram, M., "Paraoxonase 1 (PON1) is a more potent antioxidant and stimulant of macrophage cholesterol efflux, when present in HDL than in lipoprotein-deficient serum: Relevance to diabetes
- [69] Camps J., Marsillach J., Joven J., "The paraoxonases: role in human diseases and methodological difficulties in measurement" *Rev Clin Lab Sci.*, (2009), 46, 2, 83-106.
- [70] Erlich, P. M., Lunetta, K. L., Cupples, L. A., Huyck, M., Green, R. C., Baldwin, C. T., Farrer, L. A., "Polymorphisms in the PON gene cluster are associated with Alzheimer disease", *Human Molecular Genetics*, (2006), 15, 1, 77–85.
- [71] Roher, A. E., Esh, C., Rahman, A., Tyler, A. K., Beach, T.G., "Atherosclerosis of Cerebral Arteries in Alzheimer Disease", (2004), 35, 2623-2627

- [72] Cellini, E., Tedde, A., Bagnoli, S., Nacmias, B., Piacentini, S., Bessi, V., Bracco, L., Sorbi, S., “Association analysis of the paraoxonase-1 gene with Alzheimer's disease”, *Neuroscience Letters*, 408, 3, (2006), 199-202
- [73] HE Xiao-ming, ZHANG Zhen-xin, ZHANG Jun-wu, ZHOU Yong-tao, TANG Mou-ni, WU Cheng-bin and HONG Zhen Gln192Arg polymorphism in paraoxonase 1 gene is associated with Alzheimer disease in a Chinese Han ethnic population *Chin Med J* 2006; 119(14):1204-1209
- [74] Standridge, J., “Pharmacotherapeutic Approaches to the Prevention of Alzheimer's Disease” *The American Journal of Geriatric Pharmacotherapy*, 2, 2, (2004), 119-132
- [75] Costa, L.G., Kelada,S.N., Costa-mallen, P., Farin, F.M., Viernes, H.A., Weller,T.S., Franklin,G.M., Longstreth, W.T., Swanson,P.D., Checkhoway, H., Furlong,C.E., *Paraoxonase2(PON2) Polymorphisms And Parkinson's Disease* *Neuroscience Research Communications*, 34 (2004) no:3
- [76] Benmoyal-Segal, L., Vander, T., Shifman, S., Bryk, B., Ebstein, R., Marcus, E.-L., Stessman, J., Darvasi, A., Herishanu, Y., Friedman, A., Soreq, H., “Acetylcholinesterase/paraoxonase interactions increase the risk of insecticide-induced Parkinson's disease”, *The FASEB Journal express article*, 3, (2005)
- [77] Marsillach, J., Camps, J., Ferré, N., Beltran, R., Rull, A., Mackness, B., Mackness, M., Joven, J., “*Paraoxonase-1 is related to inflammation, fibrosis and PPAR delta in experimental liver disease*”, *BMC Gastroenterology*, 9, 3, (2009)
- [78] Keskin, M., Dolar, E., Dirican, M., Kiyici, M., Yilmaz, Y., Gurel, S., Nak, S. G., Erdinc, S., Gulden, M., “Baseline and salt-stimulated paraoxonase and arylesterase activities in patients with chronic liver disease: relation to disease severity” *Internal Medicine Journal*, 39, (2009), 243–248.
- [79] Yanga, F., , Wanga, L.-H., Wanga, J., Donga, Y.-H., Hu, J. Y. , , Zhanga, L.-H., “Quorum quenching enzyme activity is widely conserved in the sera of mammalian species” *FEBS Letters*, 579, (2005), 3713–3717
- [80] Teiber, J.F., Horke, S., Haines, D.C., Chowdhary, P.K., Junhui Xiao, J.,Gerald L. Kramer, Robert W. Haley,1 and Dragomir I. Draganov *Dominant Role of Paraoxonases in Inactivation of thePseudomonas aeruginosa Quorum-Sensing SignalN-(3-Oxododecanoyl)-L-Homoserine Lactone_* *Infection And Immunity*, June 2008, p. 2512–2519

- [81] Mary Jo Kirisits¹ and Matthew R. Parsek “Does *Pseudomonas aeruginosa* use intercellular signalling to build biofilm communities?” Cellular Microbiology (2006) 8(12), 1841–1849.
- [82] <http://www.ilacabak.com/etkengoster.php?Id=N06AB03> (02.07.2009)
- [83] Güneş,B., Farmalist Vademecum,Farma tıp yayıncılık Ankara 2006-922-923
- [84] http://beh.zedcore.com/dl/9301_1736379082.pdf/as/HALOPERIDOL
2.07.2009
- [85] Güneş,B., Farmalist Vademecum,Farma tıp yayıncılık Ankara 2006-794
- [86] Güneş,B., Farmalist Vademecum,Farma tıp yayıncılık Ankara 2006 887
- [87] <http://www.ilacabak.com/etkengoster.php?Id=N05AA04> 02.07.2009
- [88] <http://www.guncelle.com/guncel-kaynak/216322-diazepam.html>02.07.2009
- [89] Ommaty,R., Vademecum Ankara 2005 651
- [90] Ommaty,R., Vademecum Ankara 2005 435
- [91] Özdemir, H., Rezaki,M., *Depresyon Saptanmasında Genel Sağlık Anketi -12* Türk Psikiyatri Dergisi; 18(1):13-21 (2007)
- [92] <http://veteriner.istanbul.edu.tr/vetfakdergi/yayinlar/2000-2/Makale-14.pdf>
15.07.2009
- [93] Laemmli, D. K., “Cleavage of Structural Proteins During in Assembly of the Head of Bacteriophage T₄”, Nature, London, 227, 680, (1970)
- [94] Gan, K.N., Smolen, A., Eckersen, H.W., LaDu, B.N., “Purification Of Human Serum Paraoksonase/Arylesterase. Evidence For One Esterase Catalyzing Both Activities”, Drug metab. Dispos., 19(1), (1991), 100
- [95] Sinan,S., Kockar, F., Gencer, N., Yıldırım, H., Arslan,O., “Effects of Some Antibiotics on Paraoxonase from Human Serum *in Vitro* and from Mouse Serum and Liver *in Vivo*” Biol. Pharm. Bull. (2006) **29**(8) 1559—1563

- [96] Ekinci,D., Beydemir,Ş.,” Evaluation of the impacts of antibiotic drugs on PON 1; a major bioscavenger against cardiovascular diseases” European Journal of Pharmacology EJP-66004; No of Pages 6
- [97] The World Health Organization
(WHO).(http://www.who.int/mental_health/en/), 2002.
- [98] Özdemir, H., Rezaki,M., *Depresyon Saptanmasında Genel Sağlık Anketi -12*
Türk Psikiyatri Dergisi; 18(1):13-21 2007)