

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

**KSANTİN OKSİDAZ (XO) ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI İÇİN YENİ
BİR AFİNİTE JELİNİN SENTEZİ, SAFLAŞTIRILAN ENZİM İLE
TİYOSEMİKARBAZON TÜREVLERİNİN BİYOTRANSFORMASYONU VE
BAZI ANTİBİYOTİKLERİN ENZİM ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Serap BEYAZTAŞ

Balıkesir, Haziran– 2010

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

KSANTİN OKSİDAZ (XO) ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI İÇİN YENİ
BİR AFİNİTE JELİNİN SENTEZİ, SAFLAŞTIRILAN ENZİM İLE
TİYOSEMİKARBAZON TÜREVLERİNİN BİYOTRANSFORMASYONU VE
BAZI ANTİBİYOTİKLERİN ENZİM ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

Serap BEYAZTAŞ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Oktay ARSLAN

Sınav Tarihi: 18.06.2010

Jüri Üyeleri:

Prof. Dr. Oktay ARSLAN (Danışman-BAÜ)

Prof. Dr. Tülin AYDEMİR (CBÜ)

Doç. Dr. Ayten SAĞIROĞLU (TÜ)

Doç. Dr. Feray KÖÇKAR (BAÜ)

Yrd. Doç. Dr. Semra IŞIK (BAÜ)

Balıkesir, Haziran - 2010

“Bu doktora çalışması Balıkesir Üniversitesi 2009 / 17 No’ lu Araştırma Projesi ile desteklenmiştir. Teşekkür ederiz.”

ÖZET

KSANTİN OKSİDAZ (XO) ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI İÇİN YENİ BİR AFİNİTE JELİNİN SENTEZİ, SAFLAŞTIRILAN ENZİM İLE TİYOSEMİKARBAZON TÜREVLERİNİN BİYOTRANSFORMASYONU VE BAZI ANTİBİYOTİKLERİN ENZİM ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Serap BEYAZTAŞ

Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

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

Balıkesir, 2010

Ksantin oksidaz (XO), pürin metabolizmasında anahtar role sahiptir. Bunun yanında XO, NAD^+ 'nın rejenerasyonu, demir absorpsiyonu ve mobilizasyonu, nitratların indirgenmesi gibi biyolojik fonksiyonlarıyla dikkat çeken bu enzimi saflaştırmak için yeni bir afinite kromatografisi jeli sentezlenmiştir. Afinite kromatografisi jeli, CNBr ile aktive edilmiş Sepharose-4B'ye uzantı kolu olarak L-tirozin bağlandıktan sonra, ligand olarak 4-aminobenzamidinin L-tirozine kenetlenmesi sonucu sentezlenmiştir.

Sentezlenen afinite jeli ile uygulanan afinite kromatografisi ve amonyum sülfat çöktürmesi yöntemleri kullanılarak süttten XO enzimi saflaştırılmıştır. Saflaştırılan XO enzimi SDS poliakrilamid jel elektroforezine uygulanarak yaklaşık 150 kDa molekül ağırlığına sahip tek bant elde edilmiştir.

Klinikte yaygın olarak kullanılan Gentamisin sülfat, Sodyum ampisilin, Sefazolin sodyum, Klaritromisin, Rifamisin SV, Klindamisin fosfat ve Kanamisin sülfat antibiyotiklerin saflaştırılmış serum XO enzimi üzerindeki *in vitro* etkileri

belirlenmiştir. Makrolid grubu antibiyotiklerden, Gentamisin sülfat ve Kanamisin sülfatın XO enzimi üzerine etkisi incelendiğinde Gentamisin sülfatın enzim aktivitesini arttırdığı fakat kanamisin sülfatın inhibisyon etkisi olduğu gözlenmiştir. Ayrıca Sodyum ampicilin ve Rifamisin SV'nin de belirli bir aktivasyona sebep olduğu görülmektedir. Sefazolin sodyum, Klaritromisin ve Klindamisin fosfatın XO enzimi üzerine inhibisyon etkisi olduğu gözlenmiştir. Çalışılan antibiyotikler içerisinde $5,4 \times 10^{-4}$ mg/mL IC₅₀ değeriyle Sefazolin sodyum en güçlü inhibitör olarak bulunmuştur. Bu değer söz konusu enzimin klasik inhibitörleri için bulunan değerlere yakın bir değerdir.

Sepharose-4B-L-tirozin-4-aminobenzamidin yapılı afinite jeli kullanılarak saflaştırılan XO enziminin kinetik sabitleri (K_M ve V_{max}) ksantin ve orijinal olarak sentezlenen tiyosemikarbazon bileşikler substrat olarak kullanılarak belirlenmiştir. Ksantin substrat olarak kullanıldığında Lineweaver-Burk grafiklerinden elde edilen K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 1.7×10^{-4} M ve 0,58 U/mL.dak olarak bulunmuştur. Literatürde XO enzimi enziminin ksantin substratına karşı V_{max} ve K_M değerleri tarafımızdan tespit edilen V_{max} ve K_M değerleri ile benzerlik göstermektedir. Tiyosemikarbazon bileşiklerinin farklı pH tamponları kullanılarak yapılan çalışmalarda her bir bileşiğin K_M ve V_{max} değerleri belirlenmiş ve bu bileşiklerinde substrat olarak kullanılacağı bulunmuştur.

Araştırmamızda, ayrıca saflaştırılan enzimin, yeni sentezlenen tiyosemikarbazon türevleri üzerindeki etkisi incelenmiştir. Orijinal olarak sentezlenen tiyosemikarbazon bileşikleriyle yapılan biyotransformasyon işleminde, özellikle dörtlü halkada parçalanma gözlenmiştir. Elde edilen sonuçların sentetik organik kimya açısından önemli olabileceği düşünülmüş ve biyotransformasyonda kullanılmıştır.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: Ksantin oksidaz (XO), afinite kromatografisi, Gentamisin sülfat, Sefazolin sodyum, Sodyum ampicillin, Klaritromisin, Klindamisin fosfat, Rifamisin SV, tiyosemikarbazon türevleri, biyotransformasyon.

ABSTRACT

SYNTHESIS OF A NOVEL AFFINITY GEL FOR PURIFICATION OF XANTHINE OXIDASE (XO) ENZYME, BIOTRANSFORMATION OF THIOSEMICARBAZONE DERIVATIVES VIA PURIFIED ENZYME AND INVESTIGATIONS OF THE EFFECTS OF SOME ANTIBIOTICS ON THE ENZYME

Serap BEYAZTAŞ

Balikesir University, Institute of Science, Department of Chemistry

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

Balikesir, Turkey, 2010

In this study, a novel affinity chromatography gel was synthesized for purification of xanthine oxidase (XO) which has important physiological function in purine metabolism with regeneration of NAD^+ , absorption and mobilization of ferrous and reduction of nitrate. The gel was synthesized with Sepharose-4B-L-tyrosine and 4-aminobenzamidine as an affinity ligand. Sepharose-4B was activated with CNBr and then L-tyrosine was added as a spacer arm.

Xanthine oxidase was precipitated with ammonium sulfate and purified with synthesized affinity chromatography gel. On SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, purified xanthine oxidase gave a single band on SDS-PAGE with about weight of 150 kDa.

The effect of some antibiotics which is commonly used in clinical on purified xanthine oxidase was determined *in vitro*. The name of antibiotics was Gentamycin sulfate, Sodium ampicillin, Cefazolin sodium, Clarithromycin, Rifamycin SV, Clindamycin phosphate and Kanamycin sulfate. Macrolid group of antibiotics, the

effects of Gentamycin sulfate and Kanamycin sulfate were determined on purified xanthine oxidase. Gentamycin sulfate increased xanthine oxidase enzyme activity but kanamycin sulfate caused an inhibitory effect on xanthine oxidase enzyme activity. In addition, sodium ampicillin and rifamycin SV caused activation on enzyme activity. Cefazolin sodium, Chlarithromycin and Clindamicin phosphate indicated inhibitory effect on xanthine oxidase enzyme activity. Cefazolin sodium is the most effective inhibitor in studied antibiotics with the value of $5,4 \times 10^{-4}$ mg/mL. This value is close to the other values found for XO's classical inhibitors.

The kinetic constants (K_M ve V_{max}) of XO which was purified with the structure of *Sepharose-4B-L-tirozin-4-aminobenzamidine* affinity gel were determined with xanthine and originally synthesized thiosemicarbazone derivatives. The values of K_M and V_{max} are 1.7×10^{-4} M ve 0, 58 U/mL.min., respectively, that using to xanthine as a substrate. The values are similar to other studies that used to xanthine as a substrate. In this study, K_M and V_{max} values for thiosemicarbazone derivatives were determined by using different pH buffer solutions. The results indicated that these compounds can be used as a substrate.

In this study, the effect of purified XO on original thiosemicarbazone derivatives was examined. In biotransformation process via originally synthesized thiosemicarbazone compounds, especially in quartet rings, a degradation was observed. These results were important in synthetic organic chemistry and we used these compounds in biotransformation.

KEY WORDS: Xanthine oxidase (XO), affinity chromatography, Gentamycin sulfate, Cefazolin sodium, Sodium ampicillin, Chlarithromycin, Clindamicin phosphate, Rifamycin SV, Kanamycin sulfate, thiosemicarbazone derivatives, biotransformation.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET, ANAHTAR SÖZCÜKLER	ii
ABSTRACT, KEY WORDS	iv
İÇİNDEKİLER	vi
SEMBOL LİSTESİ	xi
ŞEKİL LİSTESİ	xiii
ÇİZELGE LİSTESİ	xix
ÖNSÖZ	xxiii
1. GİRİŞ	1
1.1 Araştırmanın Amacı	2
1.2 Ksantin Oksidoredüktaz Enziminin Biyokimyası	2
1.2.1 Ksantin Oksidoredüktaz Enziminin Yapısı	2
1.2.2 Ksantin Oksidoredüktaz Enziminin Substratları	5
1.2.3 Ksantin Oksidoredüktaz Enziminin Dağılımı ve Fizyolojik Önemi	6
1.2.4 Ksantin Oksidoredüktaz Enziminin Etki mekanizması	8
1.2.5 Ksantin Oksidoredüktaz Enziminin Hastalıklarla İlişkisi	10
1.3 Biyotransformasyon	14
1.3.1 Biyotransformasyon ve Enzimler	16
1.3.2 Enzimatik Reaksiyonların Avantajları	16
1.3.3 Biyotransformasyonda Kullanılan Enzim Sistemleri	18
1.3.4 Biyotransformasyonda Reaksiyon Tipleri	18

1.3.5 Biyotransformasyon Reaksiyonlarını Etkileyen Faktörler	18
1.4 Tiyosemikarbazon Türevleri	19
1.4.1 Geometrik İzomerlik	22
1.4.2 Tiyosemikarbazonların Biyolojik Aktiviteleri	24
1.5 Çalışmamızda Kullanılan Antibiyotikler	27
1.5.1. Gentamisin Sülfat	27
1.5.2. Sefazolin Sodyum	28
1.5.3. Sodyum Ampisilin	29
1.5.4. Klaritromisin	30
1.5.5. Rifamisin SV	31
1.5.6. Klindamisin Fosfat	32
1.5.7 Kanamisin Sülfat	33
2. MATERYAL VE YÖNTEMLER	35
2.1. Materyaller	35
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	35
2.1.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar	35
2.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması	36
2.1.3.1 Afinite jeli sentezinde kullanılan tamponlar	36
2.1.3.1.1 0.1 M NaHCO ₃ , pH 10.0 Tamponu	36
2.1.3.1.2. 0.2 M NaHCO ₃ , pH 8.8 Tamponu	36
2.1.3.1.3. 0.05 M Tris-SO ₄ , pH 7.5 Tamponu	36
2.1.3.2. Afinite Kromatografisinin Uygulanmasında Kullanılan Tamponları	37

2.1.3.2.1 Dengeleme Tamponu	37
2.1.3.2.2 Jel Yıkama Tamponu	37
2.1.3.2.3 Elüsyon Tamponu	37
2.1.3.3 Ksantin Oksidaz Enzim Aktivitesi İçin Kullanılan Tamponlar	37
2.1.3.3.1 Aktivite Tamponu	37
2.1.3.3.2 Substrat Çözeltisi	37
2.1.3.4 SDS-PAGE Elektroforezinde Kullanılan Tamponlar	37
2.2. YÖNTEMLER	40
2.2.1 Ksantin Oksidoredüktaz Enzimi Çözeltisinin Hazırlanması	40
2.2.2 Ksantin Oksidoredüktaz Enziminin Aktivite Tayini	41
2.2.3 Bradford Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini	41
2.2.4 Enzimin Saflaştırılması	42
2.2.4.1 Amonyum Sülfat Çöktürmesi	42
2.2.4.2 Afinite kromatografisi ile enzimin saflaştırılması	42
2.2.4.2.1 Sepharose-4B'nin aktifleştirilmesi	43
2.2.4.2.2 L-Tirozinin bağlanması	43
2.2.4.2.3 4-aminobenzamidinin Kenetlenmesi	43
2.2.4.3 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) İle Enzim Saflığının Kontrolü	44
2.2.5 Enzimin Kinetik Sabitlerinin Belirlenmesi	45
2.2.5.1 Tiyosemikarbazon Bileşikleri Kullanılarak Enzimin Kinetik Sabitlerinin Belirlenmesi	46

2.2.5.2	Ksantin Bileşigi Kullanılarak Enzimin Kinetik Sabitlerinin Belirlenmesi	47
2.2.6	IC ₅₀ Değerlerinin Bulunması	48
2.2.6.1	Mo ve Fe İyonlarının Enzim Aktivitesine Etkisi	48
2.2.6.2	Antibiyotiklerin Ksantin Oksidaz Enzimi Üzerine Afinite Etkisinin Araştırılması	48
2.2.7	Enzim İnaktivasyon Çalışması	51
2.2.8	Kolon Kapasitesine pH'ın Etkisi	52
2.2.9	Kolon Kapasitesine İyonik Şiddetin Etkisi	52
2.2.10	Tiyosemikarbazon Türevlerinin Sentezi	52
2.2.11	Ksantin Oksidaz Enzimi kullanılarak Tiyosemikarbazon Bileşiklerinin Biyotransformasyonu	54
3.	BULGULAR	55
3.1	Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri	55
3.2	Enzimin Saflaştırılması	56
3.2.1	Ksantin Oksidoredüktaz Enziminin Hazırlanması	56
3.2.2	Amonyum Sülfat Çöktürmesi	56
3.2.3	Ksantin Oksidoredüktaz Enziminin Saflaştırılması	56
3.3.1	Sentezlenen Afinite Jelinin FT-IR Spektrumları	58
3.4	SDS-PAGE ile Enzim Saflığının Kontrolü	60
3.5	Mo ve Fe İyonlarının Enzim Aktivitesine Etkisi	60
3.6	Spektrofotometre Sıcaklığının Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	67
3.7	Enzim İnaktivasyon Çalışması	67

3.8	Antibiyotiklerin Ksantin Oksidaz Enzimi Üzerine Afinite Etkisinin Araştırılması	68
3.9	Kolon Kapasitesine pH'ın Etkisi	79
3.10	Kolon Kapasitesine İyonik Şiddetin Etkisi	82
3.11	Tiyosemikarbazon Türevlerinin NMR Görüntüleri	84
3.11.1	Tiyosemikarbazon Türevlerinin Ksantin Oksidaz Enzimi Üzerine Afinite Etkisinin Araştırılması	93
3.12.2	Tiyosemikarbazon Bileşiklerinin Kinetik Sabitlerinin Belirlenmesi	97
3.12.2.1	Optimum şartlarda K_m ve V_{max} Değerlerinin Bulunması	97
4.	TARTIŞMA VE SONUÇ	117
5.	KAYNAKLAR	126
6.	EKLER	136

SEMBOL LİSTESİ

Simge	Adı
XOR	Ksantin oksidoredüktaz
XO	Ksantin oksidaz
XDH	Ksantin dehidrogenaz
FAD	Flavin adenin dinükleotit
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotit
ATP	Adenozin tri fosfat
ROS	Reaktif oksijen türevleri
I/R	İskemi/Reperfüzyon
GMP	Guanozin monofosfat
IMP	İnozin monofosfat
PRPP	5-fosforibozil 1-pirofosfat
NADP ⁺	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
ADP	Adenozin difosfat
DNA	Deoksiribonükleik asit
UV	Ultra violet
IR	Infra red
NMR	Nükleer manyetik rezonans
HIV	İnsan bağışıklık yetmezlik virüsü
RNA	Ribonükleik asit
SDS	Sodyum dodesil sülfat

PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
TEMED	N,N,N', N', -tetrametiletildiamin
EDTA	Etilendiamintetra asetik asit
Tris	Trihidroksi metil aminometan
Tris-HCl	Tris(hidroksimetil)aminometan HCl
Mtc	(Z)-1-((Z)-7-(4-methoxybenzylidene)bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-ylidene)thiosemicarbazide
Ctc	(Z)-1-((Z)-7-(4-chlorobenzylidene)bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-ylidene)thiosemicarbazide
4Mtc	(Z)-1-((Z)-7-(4-metilbenzylidene)bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-ylidene)thiosemicarbazide
Btc	Z)-1-((Z)-7-(4-bromobenzylidene)bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-ylidene)thiosemicarbazide

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil Numarası	Adı	Sayfa
Şekil 1. 1	Ksantin oksidoredüktaz enziminin kristal yapısı	3
Şekil 1. 2	Molibden kofaktörün yapısı	3
Şekil 1. 3	Ksantin dehidrogenaz enziminin moleküler şekli	4
Şekil 1. 4	Ksantin oksidaz enziminin moleküler şekli	4
Şekil 1. 5	XDH enziminin XO enzimine dönüşmesi	5
Şekil 1. 6	Pürinlerin hidrolizi	7
Şekil 1. 7	Ksantin oksidaz enziminin ksantin substratına karşı reaksiyon mekanizması	9
Şekil 1. 8	Progesteronun mikrobiyal biyotransformasyonu	15
Şekil 1. 9	Tiyosemikarbazon sentezi ve su ile hidrolizi	20
Şekil 1.10	Karbonil kondenzasyon bileşiklerinin reaksiyonları	21
Şekil 1.11	Semikarbazon ve oksim oluşum mekanizması	22
Şekil 1.12	Semikarbazon bileşiklerinin izomerleri	23
Şekil 1.13	Tiyosemikarbazid üzerindeki azot atomlarının özelliği	23
Şekil 1.14	p-Asetaminobenzaldehid tiyosemikarbazonun molekül şekli	24
Şekil 1.15	Tiyon ve Tiyol molekül şekli	26
Şekil 1.16	Gentamisin sülfat bileşiğinin molekül şekli	28
Şekil 1.17	Sefazolin sodyum bileşiğinin molekül şekli	29
Şekil 1.18	Sodyum ampisilin bileşiğinin molekül şekli	30
Şekil 1.19	Klaritromisin bileşiğinin molekül şekli	31
Şekil 1.20	Rifamisin SV bileşiğinin molekül şekli	32
Şekil 1.21	Klindamisin fosfat bileşiğinin molekül şekli	33
Şekil 1.22	Kanamisin sülfat bileşiğinin molekül şekli	34
Şekil 2. 1	Afinite jeli sentezinin şematik gösterimi	44
Şekil 2. 2	Tiyosemikarbazon Bileşiklerin Molekül Şekilleri	47

Şekil 2. 3	Ksantin Oksidaz Enzimi Üzerine Etkisi Araştırılan Antibiyotiklerin Molekül Şekilleri	51
Şekil 2. 4	Tiyosemikarbazon bileşiklerin sentezi	53
Şekil 3. 1	Bradford yöntemi ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan standart grafik	55
Şekil 3. 2	XOR Enziminin Sepharose 4B-L-tirozin-benzamidin jeli ile saflaştırma grafiği	57
Şekil 3.3	Sephorose-4B- CNBr aktifleştirilmesi sonucu elde edilen bileşiğin FT-IR spektrumu	58
Şekil 3.4	Sephorose-4B- CNBr- L-tirozin bileşiğinin FT-IR spektrumu	59
Şekil 3.5	Sephorose-4B- CNBr- L-tirozin-benzamidin bileşiğinin FT- IR spektrumu	59
Şekil 3.6	Afinite kromatografisi ile saflaştırılan XOR enziminin SDS-PAGE görüntüsü	60
Şekil 3.7	1×10^{-3} M stok FeCl_3 bileşiğinin % 50'lik $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürmesi sonrası etkisi	61
Şekil 3.8	1×10^{-3} M stok FeCl_3 bileşiğinin % 50'lik $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürmesi sonrası diyaliz yapıldıktan sonra etkisi	61
Şekil 3.9	1×10^{-3} M stok MoO_3 bileşiğinin % 50'lik $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürmesi sonrası etkisi	64
Şekil 3.10	1×10^{-3} M stok MoO_3 bileşiğinin % 50'lik $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürmesi sonrası diyaliz yapıldıktan sonra etkisi	64
Şekil 3.11	Farklı sıcaklıklara ayarlanmış spektrofotometre ile enzim aktiviteleri ölçüm değerleri	67
Şekil 3.12	Farklı sıcaklıklarda ve farklı sürelerle maruz bırakılmış XO enziminin aktivite ölçüm grafiği	68
Şekil 3.13	Saflaştırılmış Ksantin oksidaz enzimi üzerine Gentamisin sülfat antibiyotiğinin % aktivite-[A] grafiği	68
Şekil 3.14	Saflaştırılmış Ksantin oksidaz enzimi üzerine Sefazolin sodyum antibiyotiğinin % aktivite-[I] grafiği	70
Şekil 3.15	Saflaştırılmış Ksantin oksidaz enzimi üzerine Sodyum ampisilin antibiyotiğinin % aktivite-[A] grafiği	70

Şekil 3.16	Saflaştırılmış Ksantin oksidaz enzimi üzerine Klaritromisin antibiyotiğinin % aktivite-[I] grafiği	73
Şekil 3.17	Saflaştırılmış Ksantin oksidaz enzimi üzerine Rifamisin SV antibiyotiğinin % aktivite-[A] grafiği	73
Şekil 3.18	Saflaştırılmış Ksantin oksidaz enzimi üzerine Klindamisin fosfat antibiyotiğinin % aktivite-[I] grafiği	76
Şekil 3.19	Saflaştırılmış Ksantin oksidaz enzimi üzerine Kanamisin sülfat antibiyotiğinin % aktivite-[I] grafiği	76
Şekil 3.20	Ksantin oksidaz enziminin pH=9 tamponları kullanılarak elde edilen saflaştırma grafiği	79
Şekil 3.21	Ksantin oksidaz enziminin pH=8 tamponları kullanılarak elde edilen saflaştırma grafiği	80
Şekil 3.22	Ksantin oksidaz enziminin pH=7 tamponları kullanılarak elde edilen saflaştırma grafiği	80
Şekil 3.23	Ksantin oksidaz enziminin pH=6 tamponları kullanılarak elde edilen saflaştırma grafiği	81
Şekil 3.24	Ksantin oksidaz enziminin pH=5 tamponları kullanılarak elde edilen saflaştırma grafiği	81
Şekil 3.25	pH- Aktivite grafiği	82
Şekil 3.26	Ksantin oksidaz enziminin 0,1 M Na ₂ SO ₄ tuzu kullanılarak hazırlanan tamponlarla elde edilen saflaştırma grafiği	83
Şekil 3.27	Ksantin oksidaz enziminin 0,5 M Na ₂ SO ₄ tuzu kullanılarak hazırlanan tamponlarla elde edilen saflaştırma grafiği	83
Şekil 3.28	Ksantin oksidaz enziminin 1,0 M Na ₂ SO ₄ tuzu kullanılarak hazırlanan tamponlarla elde edilen saflaştırma grafiği	84
Şekil 3.29	Btc bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	85
Şekil 3.30	Btc bileşiğinin ¹³ C- NMR spektrumu	86
Şekil 3.31	Ctc bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	87
Şekil 3.32	Ctc bileşiğinin ¹³ C- NMR spektrumu	88

Şekil 3.33	4Mtc bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	89
Şekil 3.34	4Mtc bileşiğinin ¹³ C- NMR spektrumu	90
Şekil 3.35	Mtc bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	91
Şekil 3.36	Mtc bileşiğinin ¹³ C- NMR spektrumu	92
Şekil 3.37	Mtc maddesinin XOR enzimi ile % Aktivite-[A] grafiği	93
Şekil 3.38	Ctc maddesinin XOR enzimi ile % Aktivite-[A] grafiği	93
Şekil 3.39	4Mtc maddesinin XOR enzimi ile % Aktivite-[A] grafiği	95
Şekil 3.40	Btc maddesinin XOR enzimi ile % Aktivite-[A] grafiği	95
Şekil 3.41	pH=8 Tris-HCl tamponu ve substrat olarak Mtc maddesi kullanılarak kinetik sabitlerinin belirlenmesi için elde edilen grafik	97
Şekil 3.42	pH=8 Tris-HCl tamponu ve substrat olarak Ctc maddesi kullanılarak kinetik sabitlerinin belirlenmesi için elde edilen grafik	99
Şekil 3.43	pH=8 Tris-HCl tamponu ve substrat olarak 4Mtc maddesi kullanılarak kinetik sabitlerinin belirlenmesi için elde edilen grafik	99
Şekil 3.44	pH=8 Tris-HCl tamponu ve substrat olarak Btc maddesi kullanılarak kinetik sabitlerinin belirlenmesi için elde edilen grafik	102
Şekil 3.45	pH=7 Tris-HCl tamponu ve substrat olarak Mtc maddesi kullanılarak kinetik sabitlerinin belirlenmesi için elde edilen grafik	102
Şekil 3.46	pH=7 Tris-HCl tamponu ve substrat olarak Ctc maddesi kullanılarak kinetik sabitlerinin belirlenmesi için elde edilen grafik	105
Şekil 3.47	pH=7 Tris-HCl tamponu ve substrat olarak 4Mtc maddesi kullanılarak kinetik sabitlerinin belirlenmesi için elde edilen grafik	105
Şekil 3.48	pH=7 Tris-HCl tamponu ve substrat olarak Btc maddesi kullanılarak kinetik sabitlerinin belirlenmesi için elde edilen grafik	108

Şekil 3.49	pH=6 Tris-HCl tamponu ve substrat olarak Mtc maddesi kullanılarak kinetik sabitlerinin belirlenmesi için elde edilen grafik	108
Şekil 3.50	pH=6 Tris-HCl tamponu ve substrat olarak Ctc maddesi kullanılarak kinetik sabitlerinin belirlenmesi için elde edilen grafik	111
Şekil 3.51	pH=6 Tris-HCl tamponu ve substrat olarak 4Mtc maddesi kullanılarak kinetik sabitlerinin belirlenmesi için elde edilen grafik	111
Şekil 3.52	Saflaştırılmış ksantin oksidaz enziminin ksantin substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği	114
Şekil 3.53	pH-K _M grafiği	116
Şekil 3.54	pH-K _M /V _{max} grafiği	116
Şekil 6.1.1–6.1.4	Btc Bileşiğinin Ksantin Oksidaz Enzimiyle Biyotransformasyonu Sonucu Elde Edilen Ürünün ¹ H-NMR Spektrumu	136
Şekil 6.2.1 -6.2.3	Btc Bileşiğinin Ksantin Oksidaz Enzimiyle Biyotransformasyonu Sonucu Elde Edilen Ürünün ¹³ C-NMR Spektrumu	140
Şekil 6.3.1–6.3.5	4Mtc Bileşiğinin Ksantin Oksidaz Enzimiyle Biyotransformasyonu Sonucu Elde Edilen Ürünün ¹ H-NMR Spektrumu	143
Şekil 6.4.1–6.4.3	4Mtc Bileşiğinin Ksantin Oksidaz Enzimiyle Biyotransformasyonu Sonucu Elde Edilen Ürünün C ¹³ -NMR Spektrumu	148
Şekil 6.5.1–6.5.3	Mtc Bileşiğinin Ksantin Oksidaz Enzimiyle Biyotransformasyonu Sonucu Elde Edilen Ürünün ¹ H-NMR Spektrumu	151
Şekil 6.6.1–6.6.2	Mtc Bileşiğinin Ksantin Oksidaz Enzimiyle Biyotransformasyonu Sonucu Elde Edilen Ürünün ¹³ C-NMR Spektrumu	154
Şekil 6.7.1–6.7.6	Ctc Bileşiğinin Ksantin Oksidaz Enzimiyle Biyotransformasyonu Sonucu Elde Edilen Ürünün ¹ H-NMR Spektrumu	156
Şekil 6.8.1	Ctc Bileşiğinin Ksantin Oksidaz Enzimiyle Biyotransformasyonu Sonucu Elde Edilen Ürünün ¹³ C-	162

NMR Spektrumu

Şekil 6.9.2–6.9.2	Ctc Bileşğinin Ksantin Oksidaz Enzimiyle Biyotransformasyonu Sonucu Elde Edilen Ürünün IR Spektrumu	163
Şekil 6.10.1–6.10.2	Btc Bileşğinin Ksantin Oksidaz Enzimiyle Biyotransformasyonu Sonucu Elde Edilen Ürünün IR Spektrumu	165
Şekil6.11.1–6.11.2	4Mtc Bileşğinin Ksantin Oksidaz Enzimiyle Biyotransformasyonu Sonucu Elde Edilen Ürünün IR Spektrumu	167
Şekil 6.12.1–6.12.2	Mtc Bileşğinin Ksantin Oksidaz Enzimiyle Biyotransformasyonu Sonucu Elde Edilen Ürünün IR Spektrumu	169

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge Numarası	Adı	Sayfa
Çizelge 2.1	Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Gereçleri	35
Çizelge 2.2	SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan numune tamponu	37
Çizelge 2.3	SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan yürütme tamponu	38
Çizelge 2.4	SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan ayırma ve yığma jellerinin hazırlanışı	38
Çizelge 2.5	SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renklendirme çözeltisi	39
Çizelge 2.6	SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renk açma çözeltisi	40
Çizelge 3.1	Saflaştırma tablosu	57
Çizelge 3.2	Ksantin oksidaz enzimi üzerine 1×10^{-3} M stok FeCl_3 bileşiğinin % 50'lik $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürmesi sonrası etkisi çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, FeCl_3 çözeltisi konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	62
Çizelge 3.3	Ksantin oksidaz enzimi üzerine 1×10^{-3} M stok FeCl_3 bileşiğinin % 50'lik $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürmesi sonrası diyaliz yapıldıktan sonra etkisi çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, FeCl_3 çözeltisi konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	63
Çizelge 3.4	Ksantin oksidaz enzimi üzerine 1×10^{-3} M stok MoO_3 bileşiğinin % 50'lik $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürmesi sonrası etkisi çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, MoO_3 bileşiğinin konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	65
Çizelge 3.5	Ksantin oksidaz enzimi üzerine 1×10^{-3} M stok MoO_3 bileşiğinin % 50'lik $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürmesi sonrası diyaliz yapıldıktan sonra etkisi çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, MoO_3 bileşiğinin konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	66
Çizelge 3.6	Ksantin oksidaz enzimi üzerinde afinite etkisi gösteren gentamisin sülfatın çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	69

Çizelge 3.7	Ksantin oksidaz enzimi üzerinde afinite etkisi gösteren sefazolin sodyum çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	71
Çizelge 3.8	Ksantin oksidaz enzimi üzerinde afinite etkisi gösteren Sodyum ampisilin çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	72
Çizelge 3.9	Ksantin oksidaz enzimi üzerinde afinite etkisi gösteren Klaritromisin çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	74
Çizelge 3.10	Ksantin oksidaz enzimi üzerinde afinite etkisi gösteren Rifamisin SV çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	75
Çizelge 3.11	Ksantin oksidaz enzimi üzerinde afinite etkisi gösteren Klindamisin fosfat çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	77
Çizelge 3.12	Ksantin oksidaz enzimi üzerinde afinite etkisi gösteren kanamisin sülfat çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	78
Çizelge 3.13	İnhibitörlerin XO enzimi üzerindeki IC ₅₀ değerleri	79
Çizelge 3.14	Ksantin Oksidaz enzimi üzerine gösteren tiyosemikarbazon bileşiklerinin afinite etkisinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, tiyosemikarbazon bileşiklerinin konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	94
Çizelge 3.15	Ksantin Oksidaz enzimi üzerine gösteren tiyosemikarbazon bileşiklerinin afinite etkisinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, tiyosemikarbazon bileşiklerinin konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	96
Çizelge 3.16	Ksantin Oksidaz enziminin pH=8 Tris-HCl tamponu ve substrat olarak Mtc maddesi kullanılarak K _m ve V _{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, 1/V ve 1/[S]	98

Çizelge 3.17	Ksantin Oksidaz enziminin pH=8 Tris-HCl tamponu ve substrat olarak Ctc maddesi kullanılarak K_m ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$.	100
Çizelge 3.18	Ksantin Oksidaz enziminin pH=8 Tris-HCl tamponu ve substrat olarak 4Mtc maddesi kullanılarak K_m ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$.	101
Çizelge 3.19	Ksantin Oksidaz enziminin pH=8 Tris-HCl tamponu ve substrat olarak Btc maddesi kullanılarak K_m ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$.	103
Çizelge 3.20	Ksantin Oksidaz enziminin pH=7 Tris-HCl tamponu ve substrat olarak Mtc maddesi kullanılarak K_m ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$.	104
Çizelge 3.21	Ksantin Oksidaz enziminin pH=7 Tris-HCl tamponu ve substrat olarak Ctc maddesi kullanılarak K_m ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$.	106
Çizelge 3.22	Ksantin Oksidaz enziminin pH=7 Tris-HCl tamponu ve substrat olarak 4Mtc maddesi kullanılarak K_m ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$.	107
Çizelge 3.23	Ksantin Oksidaz enziminin pH=7 Tris-HCl tamponu ve substrat olarak Btc maddesi kullanılarak K_m ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$.	109
Çizelge 3.24	Ksantin Oksidaz enziminin pH=6 Tris-HCl tamponu ve substrat olarak Mtc maddesi kullanılarak K_m ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$.	110
Çizelge 3.25	Ksantin Oksidaz enziminin pH=6 Tris-HCl tamponu ve substrat olarak Ctc maddesi kullanılarak K_m ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$.	112
Çizelge 3.26	Ksantin Oksidaz enziminin pH=6 Tris-HCl tamponu ve substrat olarak 4Mtc maddesi kullanılarak K_m ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$.	113

Çizelge 3.27	Ksantin Oksidaz enziminin ksantin substratı kullanılarak, K_m ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$.	115
Çizelge 4.1	Ksantin oksidaz enziminin organik çözücülerle çöktürme sonrası enzim aktiviteleri	

ÖNSÖZ

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmanın deneysel aşamaları Balıkesir Üniversitesi Temel Bilimler Uygulama ve Araştırma Merkezi Biyoloji ve Kimya Laboratuvarlarında yapılmış olup, Balıkesir Üniversitesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Oktay ARSLAN danışmanlığında sonuçlanmıştır.

Yüksek lisans ve doktora çalışmalarımın her safhasında her türlü desteğini benden esirgemeyen ve engin bilgi ve tecrübeleriyle beni yetiştiren ve bana yol gösteren insanlara yaklaşımını ve bilimsel yönlerini kendime örnek aldığım çok kıymetli danışman hocam sayın Prof. Dr. Oktay ARSLAN' a öncelikle en derin minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tez izleme sınavları esnasında değerli bilgi ve yorumları ile beni yönlendiren çok kıymetli hocalarım sayın Prof. Dr. Tülin AYDEMİR'e ve Doç. Dr. Feray KÖÇKAR' a en derin saygılarımı sunarım.

Her zaman yanımda olan değerli hocalarım Doç. Dr. Selma SİNAN'a, Yrd. Doç. Dr. Semra IŞIK'a, Yrd. Doç. Dr. Özen ÖZENSOY GÜLER'e ve Yrd. Doç. Dr. Nahit GENÇER'e teşekkür etmek isterim.

Beni bugünlere getiren, her türlü maddi ve manevi desteklerini aldığım, hep yanımda olan sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım. İyi ki varsınız.

Balıkesir, 2010

Serap BEYAZTAŞ

1. GİRİŞ

Ksantin oksidoredüktaz (XOR) enzimi ilk saflaştırılan flavoproteinlerden birisidir. Ayrıca söz konusu enzim molibden içeren önemli proteinler arasındadır [1-4]. XOR enziminin, ksantin oksidaz (XO; EC: 1.2.3.22) ve ksantin dehidrogenaz (XDH; EC: 1.1.3.204) olmak üzere birbirine dönüşebilen iki farklı yapıya sahiptir [4-6]. Bu yapılardan XO, elektron alıcı olarak moleküler oksijeni kullanması sonucu reaktif oksijen türleri oluşturmaktadır [6]. Bu nedenle özellikle klinik açıdan XDH formuna göre daha fazla ilgi görmektedir.

Ksantin oksidaz pürin metabolizmasında anahtar role sahiptir [3,7]. Bu enzim pürin yıkımının son iki basamağını katalizlemesinin yanı sıra hız belirleyici enzim olması da metabolizma için son derece önemlidir. Bunun yanında XO, NAD⁺'nin rejenerasyonu, demir absorpsiyonu ve mobilizasyonu, nitratların indirgenmesi gibi biyolojik fonksiyonlarıyla dikkat çekmektedir [8- 20]. Ayrıca XOR'ın çok sayıda organik bileşiklerin hidroksilasyonunu da katalizlemesi bu enzimin biyotransformasyonda kullanma potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Bu durum bu enzimin endüstriyel önemini de artırmaktadır. Ksantin oksidoredüktaz enziminin ticari olarak geniş bir kullanım alanı vardır. Ksantin, hipoksantin ve inozinin belirlenmesinde, dolayısıyla guanin ve guanozinin saptanmasında önemli bir araçtır [21- 22]. Buna ilaveten, guanaz ve nükleosit fosforilaz enzimlerinin aktivite ölçümlerinde kullanılır [23].

Ksantin oksidaz, bakteriler de dahil olmak üzere incelenen tüm türlerde saptanmıştır [8, 13, 16]. Memeli dokularında çok geniş bir dağılım göstermekle birlikte en fazla karaciğer, ince barsak mukozasında ve böbreklerde bulunmaktadır. Ayrıca söz konusu enzim sütte bol miktarda bulunduğu için XO'ın saflaştırılmasında en çok tercih edilen kaynaktır [7, 24].

Ksantin oksidaz'ın bazı dokularda yüksek seviyede olması doku hasarı ve ciddi hastalıklarla ilişkilendirilmiştir [25- 26]. Çünkü sitotoksik oksijen metabolit ürünleri (H₂O₂, O₂⁻ ve OH⁻), hücrelerin oksidatif hasarına neden olduğuna inanılmaktadır [25]. Buna karşın reaktif oksijen türlerinin organizmaya vereceği

hasara karşı XDH'nin önemli antioksidan bir bileşik olan ürik asidin sentezinde önemli rolü bilinmektedir [27].

1.1. Araştırmanın Amacı

Araştırmamızı üç ana başlıkta toplamak mümkündür. İlk olarak yukarıda anlatıldığı gibi önemli fizyolojik fonksiyonlara sahip XO'nun saflaştırılması için yeni bir afinite jeli sentezlenecektir. Bu şekilde biyotransformasyonda kullanma potansiyeline sahip bu enzimin daha kısa sürede ve yüksek saflıkta elde edilmesinin önemli olacağını düşünmekteyiz.

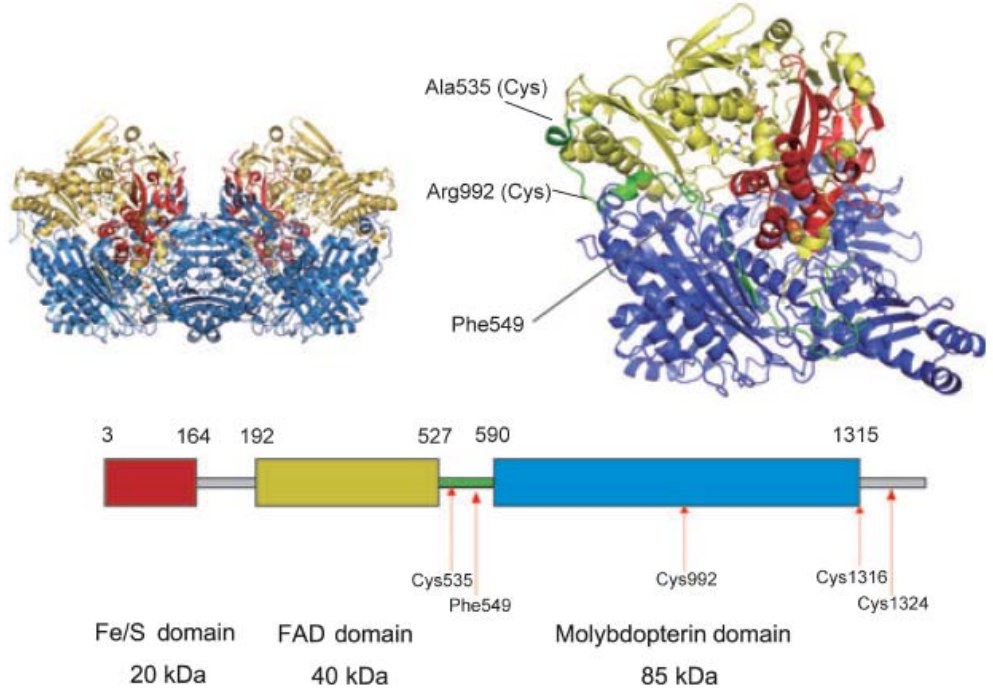
Araştırmamızın ikinci bölümünde saflaştırılan enzimin klinikte yaygın olarak kullanılan aminoglikozit grubu bazı antibiyotiklere karşı ilgisi araştırılacaktır. Önemli fizyolojik fonksiyona sahip bu enzimin aktivitesinin söz konusu antibiyotiklerden nasıl etkilendiği ortaya çıkarılacaktır.

Araştırmamızın son bölümünde ise, saflaştırılan enzimin yeni sentezlenen tiyosemikarbazon türevleri üzerindeki etkisinin araştırılması planlanmıştır. Elde edilecek sonuçların sentetik organik kimya açısından önemli olabileceği gibi söz konusu bileşiklerin substrat olarak kullanılabileceğini gündeme getirecektir.

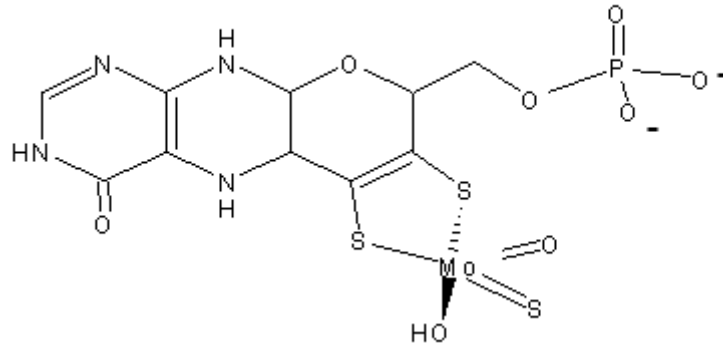
1.2. Ksantin Oksidoredüktaz Enziminin Biyokimyası

1.2.1 Ksantin Oksidoredüktaz Enziminin Yapısı

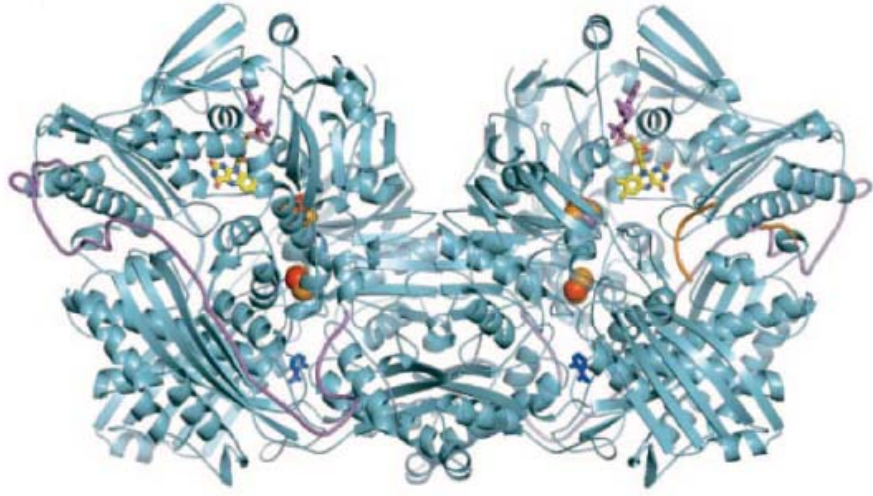
Ksantin oksidoredüktaz, hidroksilaz ailesinin bir üyesidir (Şekil 1.1) [4]. Enzim, 300 kDa. ağırlığında dimerik yapıda olduğu saptanmıştır. Her bir alt birim, flavin kofaktörü bağlanma gölgesinde molibden (Şekil 1.2)-demir içeren 1333- 1358 amino asit rezidülerinden oluşmuş bir enzimdir [4- 5]. Memelilerde XOR, birbirine dönüşebilen iki formu bulunmaktadır. Bu izoformlardan birisi, elektron alıcısı olarak NAD^+ kullanan ksantin dehidrogenaz (XDH; EC: 1.1.3.204) (Şekil 1.3) ve elektron alıcısı olarak O_2 kullanan ksantin oksidaz (XO; EC: 1.2.3.22)'dir (Şekil 1.4)[6].



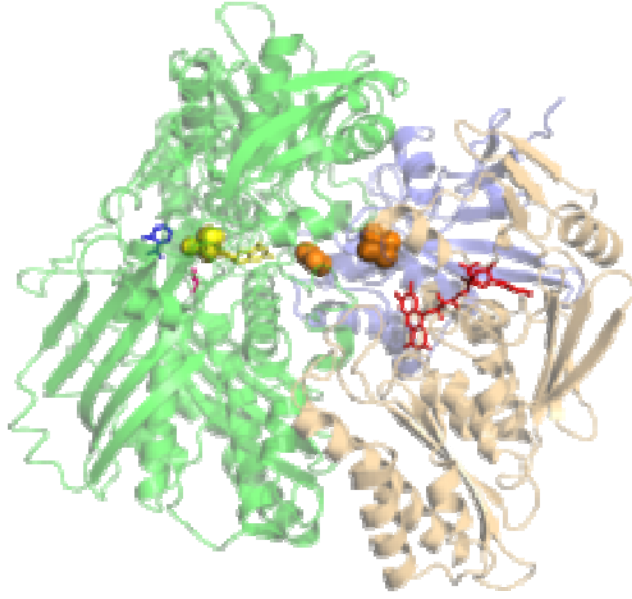
Şekil 1.1 Ksantin oksidoredüktaz enziminin kristal yapısı [28]



Şekil1.1.2 Molibden kofaktörün yapısı [16]



Şekil 1.3 Ksantin dehidrogenaz enziminin moleküler şekli [29]

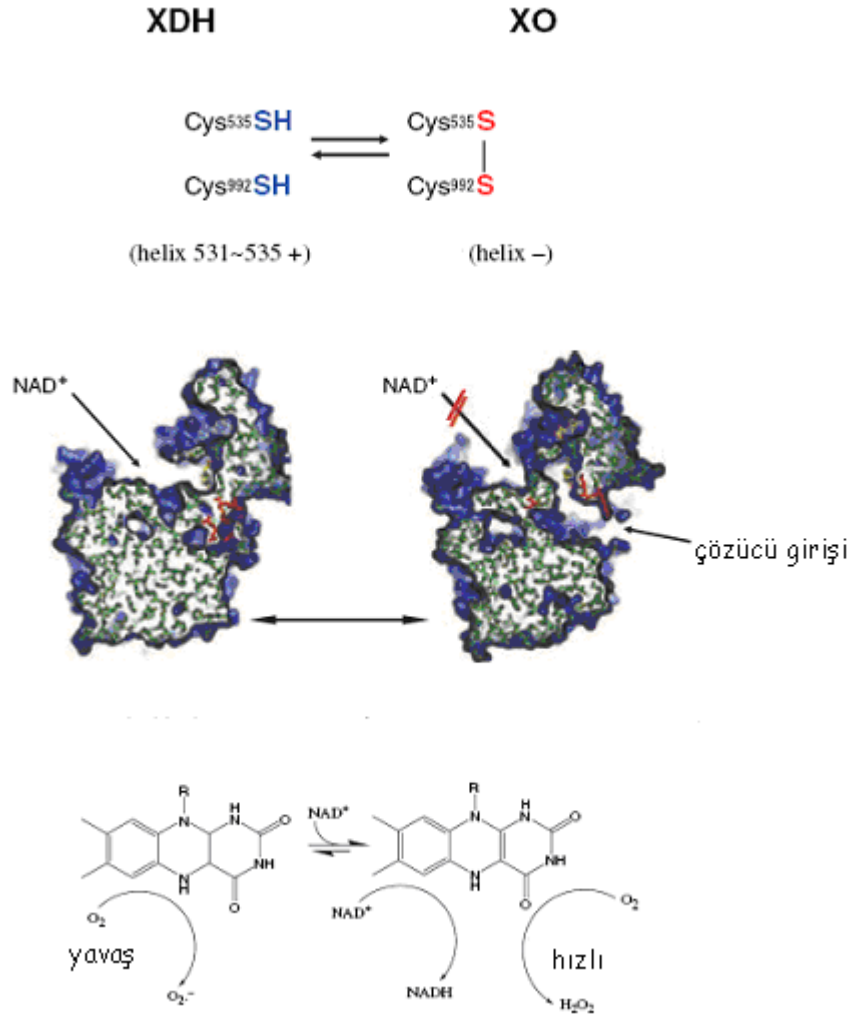


Şekil 1.4 Ksantin oksidaz enziminin moleküler şekli [30]

XDH ve XO enzimlerin biyolojik rollerinde farklılıklar belirlenmiştir [31].

Her iki enzim formu, geniş substrat aralığında yükseltgenme kapasitesi, bakımından ve büyüklükleri, alt birim kompozisyonu ve kofaktör ihtiyacı bakımından benzerlik göstermektedir [4]. Organizmalarda yapılan çalışmalarda XDH'ın birincil gen ürünü ve memeli dokularındaki bu enzimin baskın form

şeklinde bulunduğu saptanmıştır [32-34]. Hücresel mekanizmanın, XDH ve XO formlarının nispi doku seviyelerinin düzenlenmesinde XOR'ın işlevi henüz belirlenmemiştir. Sülfhidril oksidasyonunun ya da proteolitik proseslerin sonucu olarak XDH, XO'a dönüşür [4] (Şekil 1.5).



Şekil 1.5 XDH enziminin XO enzime dönüşmesi [28]

1.2.2 Ksantin Oksidoredüktaz Enziminin Substratları

Ksantin oksidoredüktaz çok sayıda substratın oksidasyonunu katalizler [9, 35, 36]. Bunlardan bazıları, asetaldehit, pürin, hipoksantin, ksantin, 1-metilksantin, NADH, allopurinol, pteridin, 6-tioksantin ve 2-hidroksipirimidindir. Bu substratlara

karşı enzimin spesifitesini belirlemek değişik çalışmalarda farklı okside edici substratların kullanılması ve farklı pH'larda ölçümler yapılmış olması nedeniyle zordur. Ayrıca XOR'ın oksijen, metilen mavisi ve 2,6-diklorofenol indofenol gibi kimyasal boyalar, ferrisiyanid, NAD⁺, kinonlar ve çok sayıda diğer bileşiklerde söz konusu enzimin substratları arasındadır [16].

1.2.3 Ksantin Oksidoredüktaz Enziminin Dağılımı ve Fizyolojik Önemi

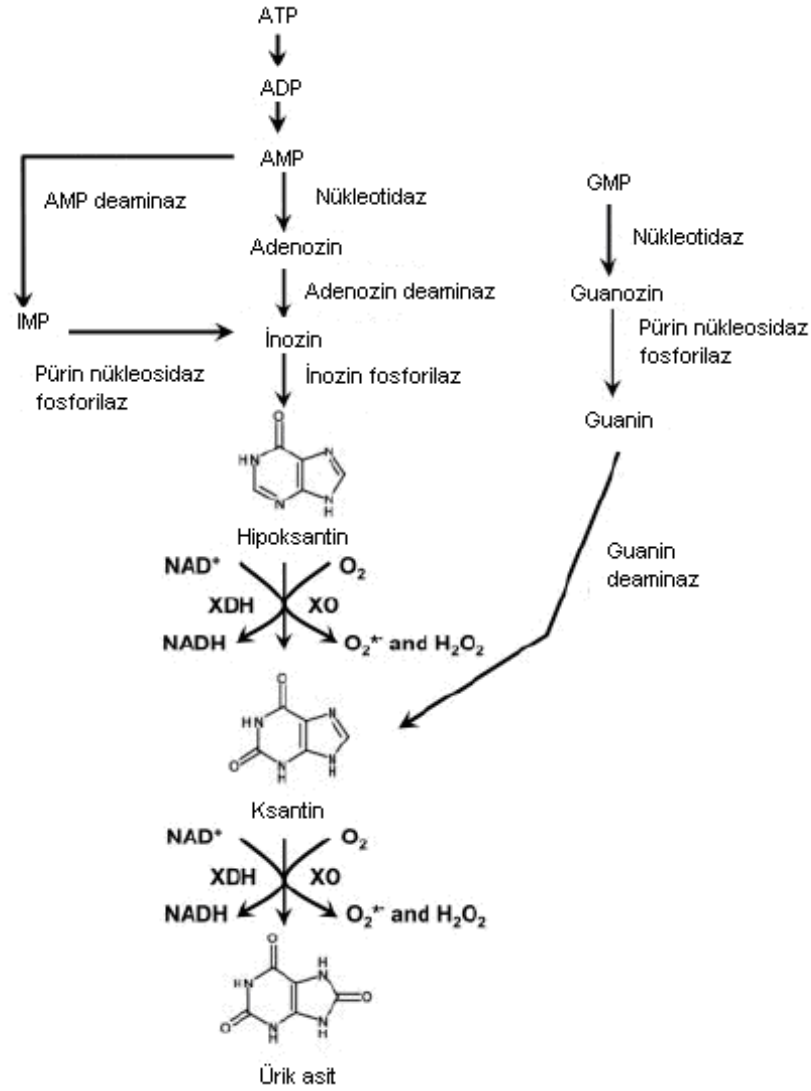
Ksantin oksidoredüktaz aktivitesi, bakterilerden insana kadar incelenen tüm türlerde saptanmıştır [8, 13, 16]. Memeli dokularında aktivite geniş bir dağılım göstermektedir [8].

İnsan dokularında yapılan immuno-histokimyasal çalışmalarda, sitozolik bir enzim olan XOR'ın karaciğerde, ince barsak mukozasında, süt salgılayan meme bezlerinde, kalp, böbrek, beyin, aort, akciğer, iskelet kası, meme bezi ve barsakların küçük damarların endotel hücrelerinde [8,16, 37, 38, 39], anne sütünde bulunduğu tespit edilmiştir [40, 41]. Esas olarak sitoplazmik yerleşim gösteren enzimin peroksizomlarında da bulunduğu bildirilmiştir [16, 42].

Ksantin oksidoredüktaz enzimi; pürin metabolizmasında pürin yıkımının son iki basamağını katalizler. Pürin katabolizmasının hız kısıtlayıcı enzimidir. Hipoksantinin ksantine, ksantinün ürik asite dönüşümünü katalizlerken serbest radikallerin oluşumuna neden olur. İnsanlarda urat oksidaz enzimi bulunmadığı için ürik asit, reaksiyonun son ürünüdür [8, 16] (Şekil 1.6).

NADH oksidaz aktivitesinde, indirgeyici substratların çoğu Mo-co bölgesi ile etkileşirken, NADH elektronlarını FAD bölgesine aktarır. Redoks merkezlerindeki hızlı dengelemeyi takiben elektronlar genelde FAD bölgesinde NAD⁺ veya moleküler oksijene geçerler [1, 9, 16].

In vivo ve *in vitro* çalışmalar XOR'ın ince barsakta demir absorpsiyonu ve karaciğerde demir mobilizasyonu üzerinde önemli rol oynadığını göstermektedir [11, 12, 16]. Diyetle alınan demir, Fe⁺² formunda absorblanır ve mukozal hücrelerde XO tarafından Fe⁺³ formuna yükseltgenir. Böylece XO, demirin transferrine bağlanarak mukoza hücrelerinden transsellüler transportunu düzenler. XO'ın ferooksidaz aktivitesi seruloplazminden 1000 kat daha fazladır [10,16]. Karaciğerde, XDH ferritin demirinin indirgeyici salınımını uyararak demir metabolizmasını etkiler [16].



Şekil 1.6 Pürinlerin hidrolizi [29]

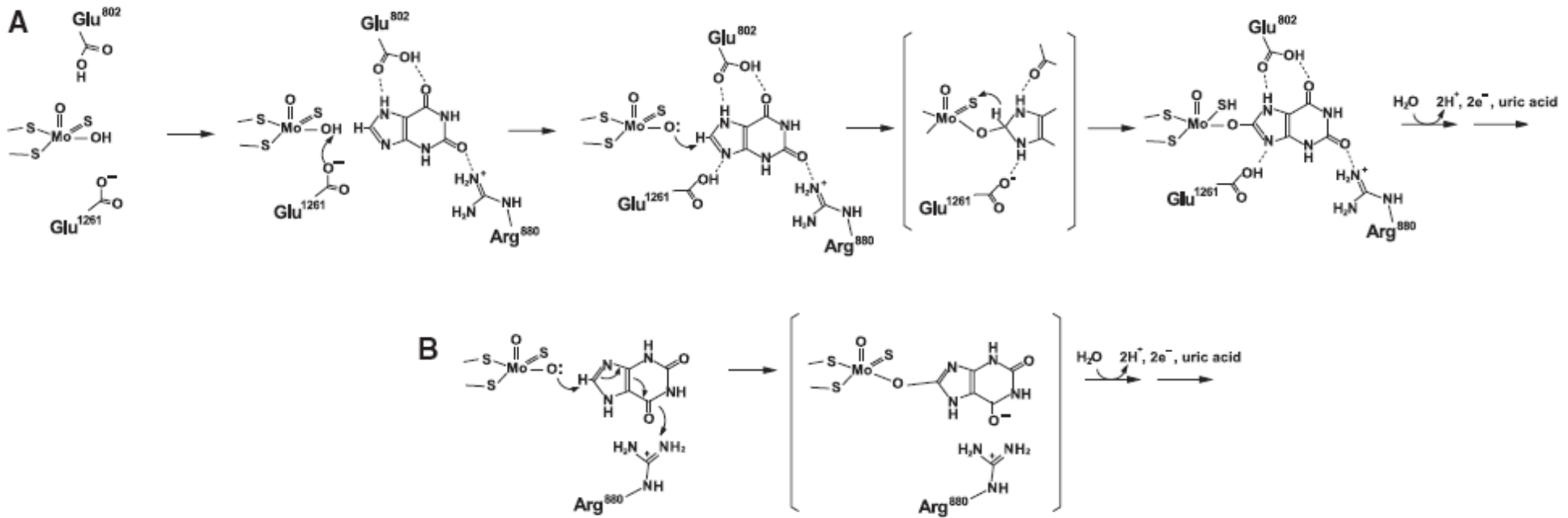
Ksantin oksidoredüktaz çok sayıda N-heterosiklik ve aldehit substratların, piridinlerin, pteridinlerin hidroksilasyonunu da katalizler [13, 16]. Ayrıca ksantin oksidoredüktazın, nitratların nitritlere ve nitrik oksite indirgenmesini katalizlediği gösterilmiştir [14]. Buna ilaveten XOR, glutatyonda olduğu gibi sülfidril gruplarının oksidasyonunu katalizler. Enzimin inorganik iyodür ile proteinlerin iyodinasyonunu katalizlediği de saptanmıştır [15, 16].

Ksantin oksidoredüktazın hipoksantin varlığında bakterisidal etkinlik gösterdiği ve *in vivo* olarak bakteriyel enfeksiyonlara cevapta aktive olduğu uzun zamandan beri bilinmektedir [18, 16]. Enzimin bu işlevine serbest radikal oluşturabilme kapasitesi aracılık etmektedir. Bu etki yalnızca süperoksit için söz

konusu değildir. Nitrit varlığında XOR tarafından oluşturulabilen peroksinitrit güçlü bir bakterisidal ajandır [16, 19]. XOR'ın nitrit oksit oluşturabilme yeteneği de göz önünde bulundurulursa peroksinitrit daha da önem kazanmaktadır. Enzimin bakterisidal rolü, anne sütünde bulunmasına da bir açıklama getirmektedir. Bakterisidal etkinliği ile XOR enzimi yeni doğanın steril sindirim sistemini patojen bakterilerden koruyucu etkinliğe sahiptir [20]. Anne sütündeki bu etkinlik sindirim sistemi epitelinde bulunan XOR enzim aktivitesi ile de özdeş ve birbirini tamamlayıcıdır [16].

1.2.4 Ksantin Oksidoredüktaz Enziminin Etki mekanizması

XO, ksantinün ürik asite oksidasyonunu katalizlerken moleküler oksijenin eş zamanlı redüksiyonuna da neden olmaktadır. Reaksiyon sırasında, önce ksantin enzimin Mo-co bölgesine bağlanır. Ksantin hızla ürata okside olurken aynı zamanda Mo^{+6} ve Mo^{+4} 'e indirgenir. Molibdenden bir elektronun transferi ile ilgili reaksiyonlar sonrası Mo^{+6} değerlikli duruma geçerken FAD iki elektron alarak indirgenir ve $FADH_2$ bunu takiben, moleküler oksijen, $FADH_2$ 'e bağlanır ve iki elektron alarak indirgenir [1, 16]. İndirgenen moleküler oksijen serbestleşir ve böylece iki elektron alarak indirgenmiş olan enzim rejenere olarak eski haline dönüşür [43, 44] (Şekil 1.7).



Şekil 1.7 Ksantin oksidaz enziminin ksantin substratına karşı reaksiyon mekanizması [45, 46]

1.2.5 Ksantin Oksidoredüktaz Enziminin Hastalıklarla İlişkisi

Ksantin oksidoredüktazın biyolojik işlevlerini etkileyen başlıca patolojiler kalıtsal ksantinüri, hiperürisemi, gut ve iskemi-reperfüzyon injürisidir [16].

Bunlardan kalıtsal ksantinüri, ksantin oksidoredüktaz, aldehit oksidaz (AO) ve sülfid oksidaz molibden kofaktör içeren enzimleridir. Kalıtsal ksantinüri bu enzimlerin yetersizlikleri ile kendini gösteren ve otozomal resesif geçişli kongenital bir bozukluktur. Klasik ksantinüri tip I, klasik ksantinüri tip II ve molibden kofaktör eksikliği olmak üzere üç tipi vardır [16].

Klasik ksantinüri tip I, XOR genindeki mutasyonlar ile ortaya çıkar ve XOR aktivitesi yoktur. Klasik ksantinüri tip II, insan molibden kofaktör sülfüraz genindeki mutasyonlar sonucunda ortaya çıkar ve hem XOR hem de AO'nun aktiviteleri yetersizdir [47, 48]. Molibden kofaktör eksikliğinde Mo-co sentezini düzenleyen genlerin defektleri ile ortaya çıkar [16, 49].

Ksantin oksidoredüktazın, iskemi reperfüzyon (IR) hasarında anahtar role sahip olduğu bulunmuştur. Bu patolojik mekanizmanın merkezinde enzimin reaktif oksijen türevleri (ROS) oluşturma özelliği yatar [50- 56]. Buna göre, iskemi oluşan dokuda ATP yıkımına bağlı hücrel enerji yük azalması sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonunu artırır. İntrasellüler Ca^{+2} artışı, Ca^{+2} veya Ca^{+2} kalmadulün bağımlı proteazları aktive eder. Bu proteazlar, kısmi proteoliz ile fizyolojik koşullarda dokularda bulunan esas XOR formu olan XDH'nin XO'ya dönüşümüne neden olur [16, 57]. Aynı zamanda ATP yıkımını takiben hücrelerde hipoksantin birikir. Reperfüzyon fazında, dokularda artmış olan hipoksantin, O_2 ve XO birlikte bol miktarda süperoksit ve hidrojen peroksit oluşturur. Bu oluşan serbest radikaller de doku hasarına sebep olur [57- 62].

Gut hastalığı, genellikle erkeklerde görülen ve eklemler ile böbreklerin özellikle etkilendiği bu hastalıkta görülen en önemli biyokimyasal değişiklik serum ürat düzeyinin artmasıdır. Özellikle eklemlerde yüksek miktarda sodyum ürat kristallerinin birikmesi enflamasyon, ağrı ve artrit genişlemesine yol açmaktadır. Akut artrit atakları ile başlayan ve kronik gut artritine doğru ilerleyen hastalık, ilk olarak genellikle ayak başparmağında ortaya çıkmakta ve zamanla diğer eklemlere yayılmaktadır. Ürat konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak böbrek tübüllerinde hasara neden olmaktadır [63, 64].

İnsanlarda pürin metabolizmasının son ürünü olan ve suda az çözünen ürik asidin pKa değeri 5.75 civarındadır. Zayıf asit olan ürik asit, fizyolojik pH değerinde (pH=7.4) % 98 oranında iyonize olmakta ve monosodyum ürata çevrilmektedir. Ürik aside göre daha fazla çözünen monosodyum üratın vücut sıvılarındaki çözünürlüğü 6,4 mg/dL kadardır. Özellikle eklemler ve kulak memesi gibi yumuşak dokularda biriken monosodyum ürat, polimorf çekirdekli lökosit ve makrofajların artışı ile şiddetli enflamasyona neden olmaktadır. Lökositlerde çoğunlukla anaerobik glikolizin kullanılması ile artan laktat konsantrasyonu, ortamın pH değerinin azalmasına yol açmaktadır. Asit ortamda üratlar, tuz olmayan ve daha fazla çözünen yapılara dönüştüklerinden ürat kristallerinin çökmesi kolaylaşmaktadır. İdrar genellikle asit olduğundan gutta gözlenen mesane taşı oluşumunda hiperürisemi önemli rol oynamaktadır [63, 64].

Sıcaklık, monosodyum üratın çözünürlüğünü etkileyen bir başka etkidir. Sıcaklığın azalması ile monosodyum üratın çözünürlüğü azalmaktadır. Bu nedenle eklem içi sıcaklığı daha düşük olan eklemler daha kolay etkileneceği için gut atakları öncelikle periferik eklemlerde (ayak başparmağında) başlamaktadır [63].

Gutta biyokimyasal mekanizma henüz anlaşılammıştır. Özellikle primer gutta üratın aşırı üretimine neden olan genetik bir kusurun rol oynadığı bildirilmektedir. Lesch-Nyhan sendromunda olduğu gibi bazı gutlu hastalarda, İnozin monofosfat (IMP) ve GMP kurtarma yolundaki hipoksantin-guanin fosforibozil transferazın kısmen eksikliğinin bulunduğu gösterilmiştir. Bu enzim eksikliğinde kurtarma yolu ile IMP ve GMP sentezi azaldığı için guanin ve hipoksantin ürik aside yıkılması hiperürisemiye yol açmaktadır. Bu arada kurtarma yoluna katılmadığı için konsantrasyonu artan 5-fosforibozil 1-pirofosfat (PRPP), *de nova* pürin biosentezini uyarmaktadır. *De nova* sentezin atması daha çok yıkım ve daha yüksek ürik asit düzeyi anlamına gelmektedir. Ancak bu hastalıkta görülen enzim eksikliği, Lesch-Nyhan sendromundaki nörolojik belirtilerin ortaya çıkmasına yol açacak kadar aşırı değildir [63].

Aktif fosforibozilpirofosfat sentetaz düzeyinin anormal şekilde yükseldiği bazı gut hastalarında, genetik İR nedene bağlı olarak enzimin allosterik kontrolünün bozulduğu gösterilmiştir. Bu durumda PRPP sentezini artması, *de nova* pürin sentezini arttırmaktadır. Sonuçta bu hastalarda pürin katabolizması artmakta damar ürik asit konsantrasyonu yükselmektedir [10].

Kalıtsal bir bozukluk olan tip I glikojen depo hastalığı (Von Gierke hastalığı), primer gut hastalığı nedenleri arasında bulunmaktadır. Glukoz 6-fosfat aktivitesinin bozulduğu bu hastalıkta artan Glukoz 6-fosfat düzeyi pentoz fosfat yolunun aktivitesini artırmaktadır. Bu yolun aktivitesinin artması sonucu konsantrasyonu yükselen riboz fosfat, hücrel PRPP düzeyinin artmasına yol açmaktadır. Buna bağlı olarak artan *de nova* pürin nükleotid sentezi, pürin katabolizmasının hızlanmasına ve hiperürisemiye bağlı gut görülmesine neden olmaktadır [63].

Hiperürisemi oluşturarak primer guta yol açan bir diğer kalıtsal bozuklukta ise glutatyon redüktaz aktivitesinin artmasına bağlı olarak hücrel NADP⁺ düzeyi çok artmaktadır. NADP⁺ artışı ile aktivitesi artan pentoz fosfat yolunda riboz fosfat sentezi hızlanmakta ve tip I glikojen depo hastalığında olduğu gibi gut oluşmaktadır. Ayrıca Lesch-Nyhan sendromu, kanser ve kronik böbrek yetmezliği gibi başka hastalıklara bağlı olarak sekonder gut gelişebilmektedir [63].

Gut hastalığının tedavisinde nükleoprotein içeriği zengin besinlerin kısıtlanmasının yanı sıra, serum ürat düzeyinin azalmasına yol açan ilaçlar kullanılmaktadır. Ksantin oksidazı inhibe eden ve bir hipoksantin analogu olan allopürinol, tedavide yaygın şekilde kullanılmaktadır [63].

Ksantin oksidaz için önce substrat olarak davranan bu bileşik, daha sonra inhibisyon etkisi yapmaktadır. Ksantin oksidazın allopürinolu hidrosillemesi ile oluşan alloksantin, ksantin oksidazın aktif merkezine bağlanarak inhibe etmektedir. Böylece ürik asit oluşumu azalmakta, çözünürlüğü ürik aside oranla daha fazla olan hipoksantin ve ksantin serum düzeyleri artmaktadır. Serum düzeyleri artan hipoksantin ve ksantin, hiperürisemide olduğu gibi sorunlara neden olmamaktadır. Tedavide ayrıca idrarla ürat atılımını kolaylaştıran ürikozürik ilaçlar yararlı olmaktadır. Gut ağrılarının ve ataklarının azaltılmasında bir alkaloid olan kolşisinden yararlanılmaktadır. Yüksek konsantrasyonlarda sitozolik mikrotübülleri depolimerize eden kolşisinin düşük konsantrasyonlarda benzer etkisi bulunmamaktadır. Düşük kolşisin konsantrasyonlarında oluşan tübül-kolşisin kompleksi, mikrotübüllere bağlanarak büyümesini önlemektedir [63, 64].

Antioksidan etkisi bulunan ürat oldukça reaktif ve zararlı olan serbest radikallere karşı (hidroksil, süperoksit, singlet oksijen) koruyucu bir etki

göstermektedir. Üratın bu antioksidan etkisinin en az askorbik asit kadar olduğu bilinmektedir [63].

Lesch-Nyhan Sendromu, X-bağılı resesif kalıtsal bir bozukluk olan bu hastalık, 2-3 yaşlarında nörolojik belirtilerle ortaya çıkmaktadır. El ve ayak parmakları ile dudaklarını ısırarak kendi kendilerine zarar veren bu çocukların saldırgan davranışları başkalarına da yönelik olabilmektedir. Bu hastalarda ayrıca zeka geriliği ve spastik kusurlar da görülmektedir [63].

Kurtarma yollarında IMP ve GMP sentezi için gerekli olan hipoksantin-guanin fosforibozil transferaz aktivitesinin eksik olması veya bulunmaması bu hastalıktaki en önemli biyokimyasal kusurdur. Enzimin eksikliğinde guanin ve hipoksantin katabolizmasının artmasından ötürü ürik asit düzeyi yükselmektedir. Yine PRPP artışına bağlı olarak *de nova* pürin sentezi artmaktadır. Ürik asit düzeyi artan hastalarda normal yaşam devam etmekte, ileri yaşlarda gut ortaya çıkmaktadır. Bu enzimin eksikliği ile nörolojik belirtiler arasındaki ilişki henüz tam olarak anlaşılammıştır. Normal koşullarda beyindeki hipoksantin-guanin fosforibozil transferaz düzeyi ise de daha düşüktür. Bu nedenle beyin IMP ve GMP sentezi için kurtarma yollarına daha çok bağımlıdır. Bu hastalıkta ürik asit yapımını azaltan allopürinol *de nova* pürin sentezini azaltmadığı için nörolojik sorunların ortadan kalkmasına yardımcı olamamaktadır [63, 64].

Pürin nükleozid fosforilaz eksikliği, otozomal resesif olarak kalıtılan hastalıkta T lenfositlerinde fonksiyon bozukluğu olduğu halde, B lenfositlerin fonksiyonları normaldir. Pürin nükleozid fosforilaz eksikliğine bağlı olarak pürin nükleotidlerin katabolizması yavaşladığı için ürik asit sentezi azalmış, guanozin, dedoksiguanozin, inozin ve dedoksiinozin düzeyleri ise artmıştır. Eritrositlerde özellikle dGTP birikmektedir. dGTP ve ADP moleküllerinden oluşan dADP, ribonükleotid redüktazın bilinen en güçlü inhibitörü olan dATP molekülüne çevrilmektedir. UDP molekülünün indirgenerek CDP oluşturması, dGTP tarafından inhibe edilmektedir [63, 64].

Hipoürisemi, urat sentezinin azalmasına veya atılımının artışına bağlı olarak görülen nadir bir bozukluktur. Kalıtsal ksantin oksidaz eksikliğinde, şiddetli karaciğer hastalığında ve Fanconi sendromu gibi renal tübüler bozukluklarda hipöürisemi görülebilmektedir. Allopürinol ile aşırı tedavi ve ürikozürük ilaç kullanımı sonrasında hipöürisemi ortaya çıkmaktadır [63].

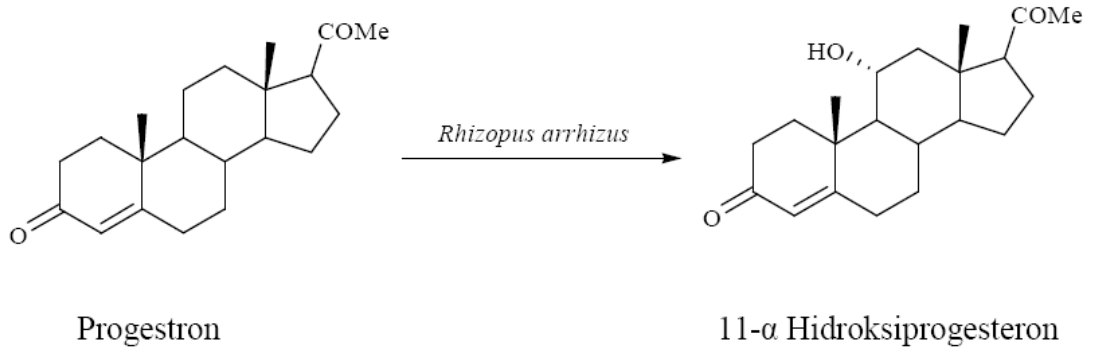
1.3 Biyotransformasyon

Biyotransformasyon, biyolojik sistemlerin veya enzimlerin katalizör olarak kullanılmasıyla gerçekleştirilen kimyasal dönüşüm reaksiyonlarıyla endüstriyel öneme sahip bileşiklerin elde edilmesi olarak tanımlanır. Biyotransformasyon reaksiyonlarında biyolojik sistemlerin doğal yaşam alanlarında doğal substratları üzerinde gerçekleştirdikleri biyosentezden farklı olarak, doğal substratları olmayan moleküller üzerinde meydana getirdikleri dönüşümler söz konusudur [65].

Günümüzde önemi giderek artan biyoteknolojik çalışmaların çok önemli bir alanını oluşturan biyotransformasyon, İlaç etken maddeleri üretimi, koku maddeleri üretimi, gıda katkı maddesi üretimi, enerji üretimi, antibiyotik üretimi, amino asit üretimi gibi pek çok kullanım alanı dışında toksik endüstriyel atıkların yıkımı, atık suların temizlenmesi ve geri kazanılması gibi çevre sorunlarının giderilmesi amacıyla da uygulanabilmektedir [65].

Biyotransformasyon alanındaki ilk uygulamayı, Pasteur tarafından 1858 yılında *P. Glaucum* bakteri kültürü ile DL-amonyum tartarattan L-amonyumun, D-enantiyomerinin seçimli yıkımı ile elde edilmesi oluşturmaktadır. Yine 1864 yılında Pasteur tarafından yapılan çalışmada, etanolün *Acetobacter aceti* ile asetik aside dönüşümü gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma biyotransformasyon alanında literatürde yayımlanan ilk çalışmadır. Bu çalışmalar 1886'da Brown tarafından genişletilmiş ve etanolün oksidasyonunu da gerçekleştiren *Bacterium aceti* olarak adlandırılan mikroorganizma ile propanol propiyonik aside yükseltgenmiştir. Bu çalışma aynı organizma ile mannitolün fruktoza ve dekstrozun glukonik aside biyotransformasyonu ile ilgili Berthelot tarafından daha önce yapılan çalışmaların devamıdır. Bununla birlikte daha önceki çalışmaların çoğunda saf kültürlerin eksikliği söz konusudur. 1874'te Dumas tarafından yapılan bir çalışmada *Saccharomyces cerevisiae* ile sülfürün hidrojen sülfüre indirgendiği belirtilmiştir. Bunu 1898'de Windisch tarafından furfuralın, furfural alkole indirgenebileceğinin açıklanması izlemiştir. Bu yüzyılın başlarında *S. cerevisiae* maya kültürünün kullanımına dayanan pek çok biyotransformasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. Özellikle Liebig ve Neuberg tarafından gerçekleştirilen bu biyotransformasyonların bazıları 1. Dünya savaşı süresince aseton, gliserol ve bütanolün mikrobiyolojik olarak üretimine yöneliktir. 1921'de Neuberg tarafından maya ile kiral aseton

kondenzasyonu geliştirilmiştir. Fermantasyon ortamına benzaldehidin ilave edilmesi ile asetaldehit kondenzasyonu gerçekleştirilmiş ve sonuçta ketol oluşmuştur. Bu 1934'te bir alkaloid olan epedrinin ticari sentezine temel oluşturmuştur. Yine 1930'larda vitamin C'nin sentezi endüstriyel uygulamalarda yararlı bir gelişmedir. Modern uygulamaların temelini steroid hormonların mikrobiyal transformasyonu oluşturmuştur. Buna en iyi örnek dehidroizoandrosteron ve testesteron arasındaki dönüşüm reaksiyonudur. 1937 yılında *S. cerevisiae* ile gerçekleştirilen bu dönüşümün ilk aşamasında, söz konusu maya kültür dehidroizoandrosteronu androsterodiona oksitlemiş, daha sonra da C-17'de bulunan keto grubu seçimli ve sterospesifik olarak testosteron vermek üzere alkole indirgenmiştir [65- 70]. 1952 yılında ise Murray tarafından *R. arrhizus* fungal kültürü ile progesteronun 11. pozisyonuna bir hidroksil grubunun G- konumunda sterospesifik olarak ilavesi gerçekleştirilerek 11G-hidroksiprogesteron molekülü sentezlenmiştir [65, 68, 70] (Şekil 1.8).



Şekil 1.8 Progesteronun mikrobiyal biyotransformasyonu [65, 68]

Bu çalışmayı takiben androstenedionun bakteriyel biyotransformasyonu ile çeşitli steroid hormonların eldesi gerçekleştirilmiştir. İlaç etken maddesi üretiminde önemli bir gelişme, *P. chrysogenum* tarafından üretilen doğal penisilinin β -laktam, ampisilin ve amoksilin gibi yarı sentetik penisilinlerin etken maddesi olan 6-aminopenisillanik aside transformasyonunun keşfedilmesidir. İlaç etken maddesi özelliğine sahip moleküllerin içerdiği fonksiyonel grupların stereokimyası, ilaçların etkinliği bakımından çok önemlidir. Genellikle yararlı etkileri bir enantiyomerde bulunan bu moleküllerin hazırlanmasında çoğu zaman güncel kimyasal yöntemler yetersiz kalmaktadır. Özellikle 1960'lardaki talidomit felaketiyle diğer

enantiyomerlerin yan etki hatta zehir kaynağı olabileceği anlaşılmıştır. Bu nedenle spesifik enantiyomerin üretimi ilaç endüstrisinde önemlidir. Biyotransformasyonla tek enantiyomerin seçimli üretimi daha kolay gerçekleştirilmiştir. *Pseudomonas putida*, bu amaç için kullanılan mikroorganizmalardan biridir [65, 70].

Geçmişteki spesifik enzim uygulamaları, hazır enzim sistemlerine ulaşılamaması nedeniyle kısıtlı iken, genetik mühendislik ve yeni geliştirilen DNA teknikleriyle bir organizmadan diğerine genetik bilgi transferine olanak sağlanmış ve bu sınırlama ortadan kaldırılmıştır [65].

1.3.1 Biyotransformasyon ve Enzimler

Biyotransformasyon reaksiyonları enzimlerle gerçekleşir. Bu enzimler izole enzimler ya da bütün hücre sistemlerinde bulunan enzimlerdir [49].

1.3.2 Enzimatik Reaksiyonların Avantajları

Enzimatik bir reaksiyon, enzimsiz gerçekleşen aynı reaksiyona göre 10^8-10^{10} kat daha hızlıdır. Bu değer kimi zaman 10^{12} düzeyine de ulaşabilir ki bu kimyasal katalizörlerin ulaşamayacağı bir hızı ifade eder. Kimyasal bir katalizör işlevini gerçekleştirilmesi için genellikle % 0,1–1 mol aralığına ihtiyaç duyarken enzimatik bir reaksiyonda bu oran % $10^{-3}-10^{-4}$ düzeyine düşer. Bu da enzimleri oldukça etkili kılar [65].

Enzimatik reaksiyonlar pH 5–8 (genellikle pH 7) ve 20–40°C (genellikle 30°C) koşullarında gerçekleşir. Bu ılımlı koşullar sayesinde istenmeyen yan reaksiyonlar minimum düzeye indirgenir [65, 70].

Enzimlerin çalışma koşulları benzer ya da aynı olduğundan tek bir ortamda çeşitli biyokatalitik reaksiyonlar gerçekleştirilebilir. Multienzim sistemleriyle ardışık reaksiyonlar gerçekleştirilebilmesi reaksiyon prosesini kolaylaştırır [65].

Enzimler bu özellikleri ile doğal substratları olmayan sentetik substratlar üzerinde de etkili olabilirler. Ayrıca sıklıkla sulu ortamda çalışmayı gerektirmezler. Bu da organik çözücülerin kullanılmasını gerektiren durumlar için bir avantajdır [65, 68].

Tüm katalizörler gibi enzimler de bir reaksiyonu hızlandırır, ancak reaksiyonun termodinamik dengesi yönünde etkileri olmadığından bazı enzim katalizli reaksiyonlar her iki yönde de gerçekleşebilir. Ayrıca organik reaksiyonların hemen her tipine karşılık gelen bir enzimatik reaksiyon vardır. Örneğin; ester, amid, lakton, laktam, eter, asit anhidrit, epoksit ve nitrillerin hidrolizi ya da sentezi, alkan, alken, aromatik, alkol, aldehit ve keton, sülfid ve sülfoksitlerin yükseltgenmesi ya da indirgenmesi, halojenasyon ve dehalojenasyon, alkilasyon ve dealkilasyon, izomerizasyon, alkiloin ve aldol reaksiyonları gibi [65, 66].

Kimyasal seçicilik, fonksiyonel grubun bir tek tipi üzerine seçicilik gösteren enzimlerin bu özelliği sayesinde reaksiyon verimli ve yan ürün olasılığı düşük olarak gerçekleşir [65]. Bölgesel seçicilik, kompleks üç boyutlu yapıları sayesinde enzimler aynı substrat molekülün farklı bölgelerindeki fonksiyonel gruplara seçicilik gösterirler [65]. Enantiyomer seçicilik, Enzimlerin substrattaki kiral seçiciliğidir. Özellikle enantiomerik olarak istenen ürünün hazırlanmasında çok önemli bir özelliktir [65].

Organik sentez yöntemleriyle gerçekleştirilmesi çok zor ya da imkansız reaksiyonlar enzimatik olarak kolayca gerçekleştirilebilir

Enzimatik reaksiyonların sağladığı önemli avantajlar nedeniyle, biyotransformasyon uygulamaları güncel kimyasal reaksiyonlarla karşılaştırıldığında önemli üstünlüklere sahiptir. Bunlardan başlıcaları aşağıda sıralanmıştır [65].

İlaçların, zirai kimyasalların ve gıda katkı maddeleri gibi çeşitli kimyasalların hazırlanmasında,

- Enzimatik reaksiyonlarla doğal olarak ya da kimyasal olarak sentezlenmiş çeşitli bileşiklerin özel modifikasyonlarının hazırlanmasında,
- Yapı etki ilişkilerinin araştırılması için türevlerin hazırlanmasında,
- Biyolojik sistemlerde metabolizma çalışmalarının açıklanmasında,
- Biyolojik sentez çalışmaları ve biyolojik sistemlerin taklit edilmesinde,
- Biyodegradasyonda (çevre, ekoloji, geri dönüşüm, biokütle, biyoenerji konularında) ön plana çıkmaktadır. Ayrıca bu özellikleri ile biyotransformasyon reaksiyonları daha ekonomik ve çevre dostu olarak nitelendirilirler [65].

1.3.3 Biyotransformasyonda Kullanılan Enzim Sistemleri

Biyotransformasyon reaksiyonları temel olarak bütün hücre sistemleri ya da izole enzim sistemleri ile gerçekleştirilir. Bütün hücre sistemleri kapsamında değerlendirilen biyokatalizörler şunlardır [65],

- Mikroorganizmalar,
- Canlı bitki, bitki doku ve hücre kültürleri,
- Canlı hayvan, hayvan doku ve hücre kültürleri,
- İnsan metabolizması [65].

1.3.4 Biyotransformasyonda Reaksiyon Tipleri

Aşağıda sıralanan reaksiyon tipleri, biyotransformasyonların neredeyse tüm sentetik reaksiyonlara eşdeğer reaksiyonları yapabileceğini göstermektedir [65].

- Oksidasyon (hidroksilasyon, epoksidasyon, dehidrojenasyon, Baeyer Villiger oksidasyonu, kısmi oksidatif degradasyon),
- Redüksiyon (aldehitlerin, ketonların, karboksilik asitlerin, heteroatomların indirgenmesi, çifte bağların halojenasyonu),
- Hidrolitik reaksiyonlar (esterlerin, C-N ve epoksitlerin hidrolizi, C=C bağlarına su girişi, N-demetilasyon),
- Katılım ve kondenzasyon, (ester ve amit bağlarının oluşumu, asikloin kondenzasyonu, C=C bağlarına amonyak ilavesi, birleşme reaksiyonları),
- İzomerizasyon,
- Yeni C-C bağlarının oluşumu,
- Yeni heteroatomların ilavesi [65, 68].

1.3.5 Biyotransformasyon Reaksiyonlarını Etkileyen Faktörler

Biyotransformasyon reaksiyonlarının katalizörleri canlı sistemler ve enzimler olduğundan bu reaksiyonların gerçekleşmesi için gerekli şartlar kimyasal reaksiyonlara oranla daha çeşitli ve hassas olabilmektedir. Biyotransformasyon reaksiyonlarını etkileyen önemli faktörler arasında besiyerinin bileşimi, materyalin toksisitesi ve konsantrasyonu (tolerans aralığı % 0,1–10>), ortam sıcaklığı (değişim

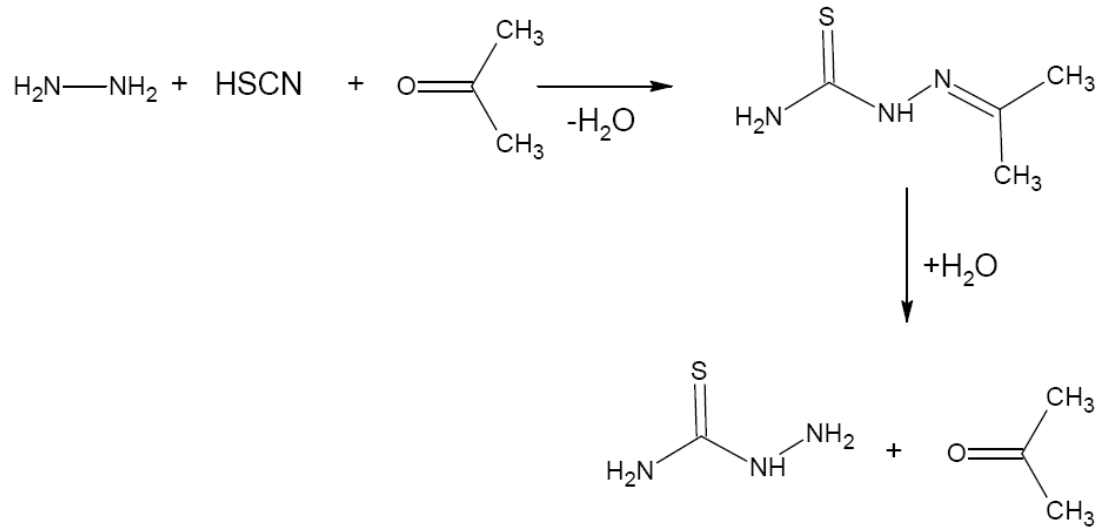
limiti $\pm 2^{\circ}\text{C}$), çalkalama hızı (rpm), zaman (saat-ay), oksijen miktarı, pH (genellikle nötr) ve mikroorganizma suşunun kökeni sayılabilir. Yine biyotransformasyonda materyalin antimikrobiyal etkisi ve bu etkinin görüldüğü konsantrasyon dikkat edilmesi gereken önemli faktörler arasındadır [65]. Ayrıca enzimlerle biyotransformasyon yapıldığında; enzimlerin dayanıklılığı, ortam şartları (pH, iyonik şiddet, sıcaklık vb.) önemlidir.

1.4 Tiyosemikarbazon Türevleri

Tiyosemikarbazonlar, tiyosemikarbazidlerin uygun aldehitler veya ketonlar ile kondenzasyonundan elde edilen bileşiklerin sınıfını oluştururlar [71]

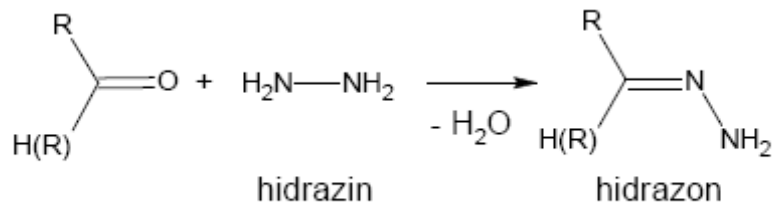
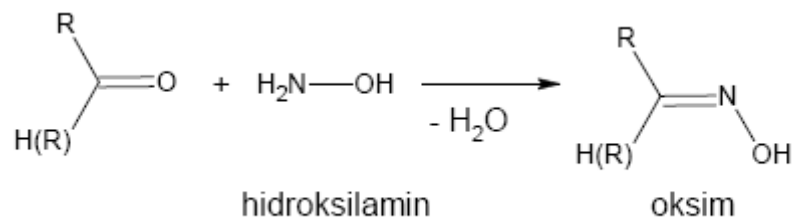
Kondenzasyon için kullanılan aldehit veya ketonun cinsine bağlı olarak tiyosemikarbazonlar metal iyonları ile monodentat (tek dişli), bidentat (iki dişli) ve multidentat (çok dişli) şelatlar oluşturabilir. Meydana gelen kompleksler renklidir ve bu özelliklerinden dolayı metal iyonlarının seçici ve hassas olarak tayininde kullanılır [71].

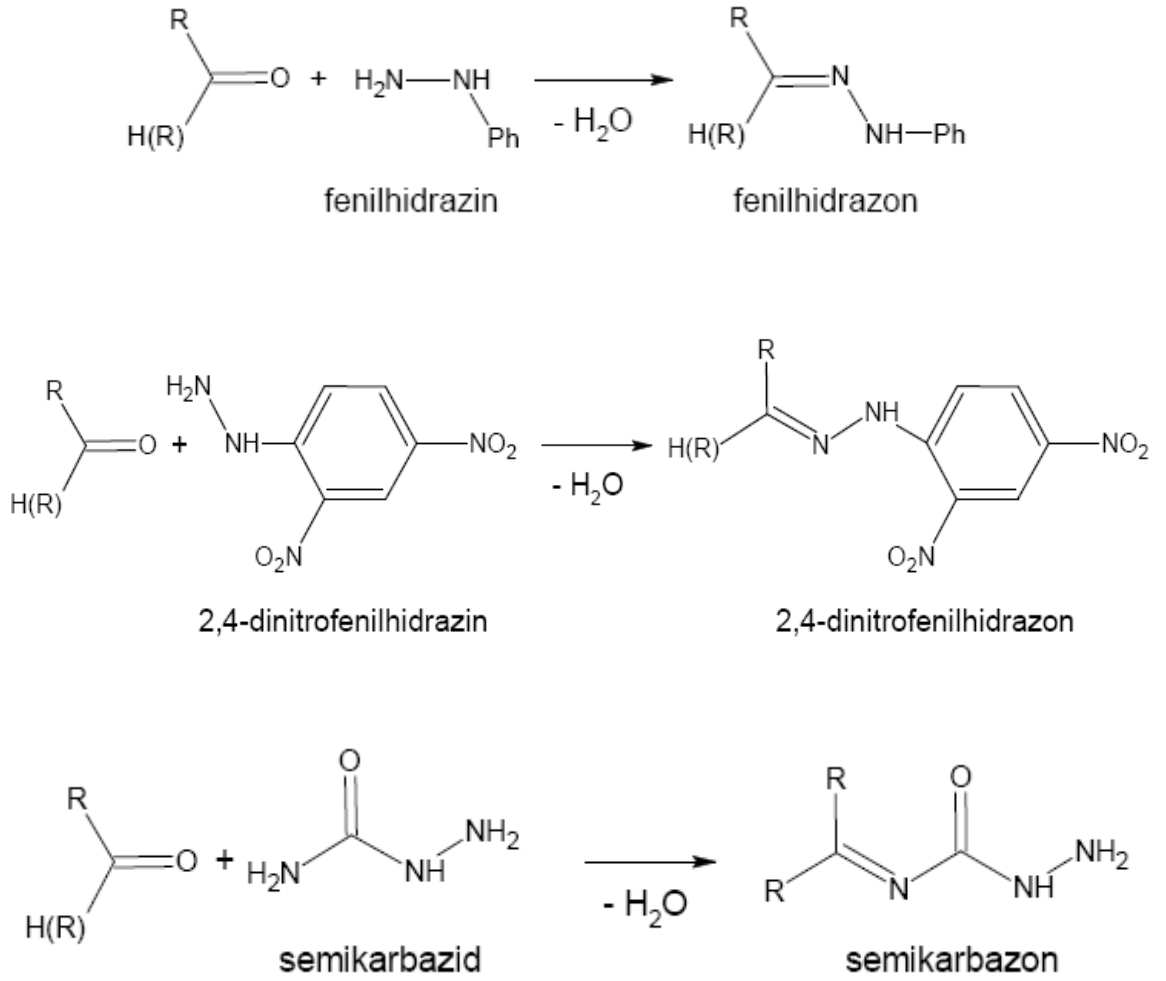
Tiyosemikarbazon bileşiklerinin temel çıkış maddeleri hidrazin ve rodanürlerdir. İlk defa 1896 yılında Martin Freund tarafından hidrazin rodanidin termik parçalanmasından düşük bir verimle elde edilmiştir. Sonraları değişik usüller geliştirilerek çeşitli ülkelerde patentler alınmıştır. Örneğin; bir Alman patentinde hidrazin sülfat çözeltisi K_2CO_3 ve CO_2 ile muamele edilerek, potasyum rodanürle reaksiyona sokulmakta ve yüksek verim sağlandığı bildirilmektedir. 1954 yılında yayınlanan bir araştırmada hidrazin hidratin, potasyum rodanürle geri soğutucu altında kaynatılarak % 56,6'lık bir verimle tiyosemikarbazid elde edildiği yazılmaktadır. Ayrıca organik fazlarda reaksiyon ortamı düşünülmüş, toluen ve glikolmonometil eter gibi çözücüler içinde sentez çalışmaları yapılmış ve patentleri alınmıştır. Geliştirilen son reçetelerde, aseton ve diğer ketonların katalizör etkisinden faydalanılmaktadır. Reaksiyonda önce aseton tiyosemikarbazon oluşur ve bunun sulu ortamda kolayca hidrolizi ile madde elde edilir (Şekil 1.9) [72].



Şekil 1.9 Tiyosemikarbazon sentezi ve su ile hidrolizi [72]

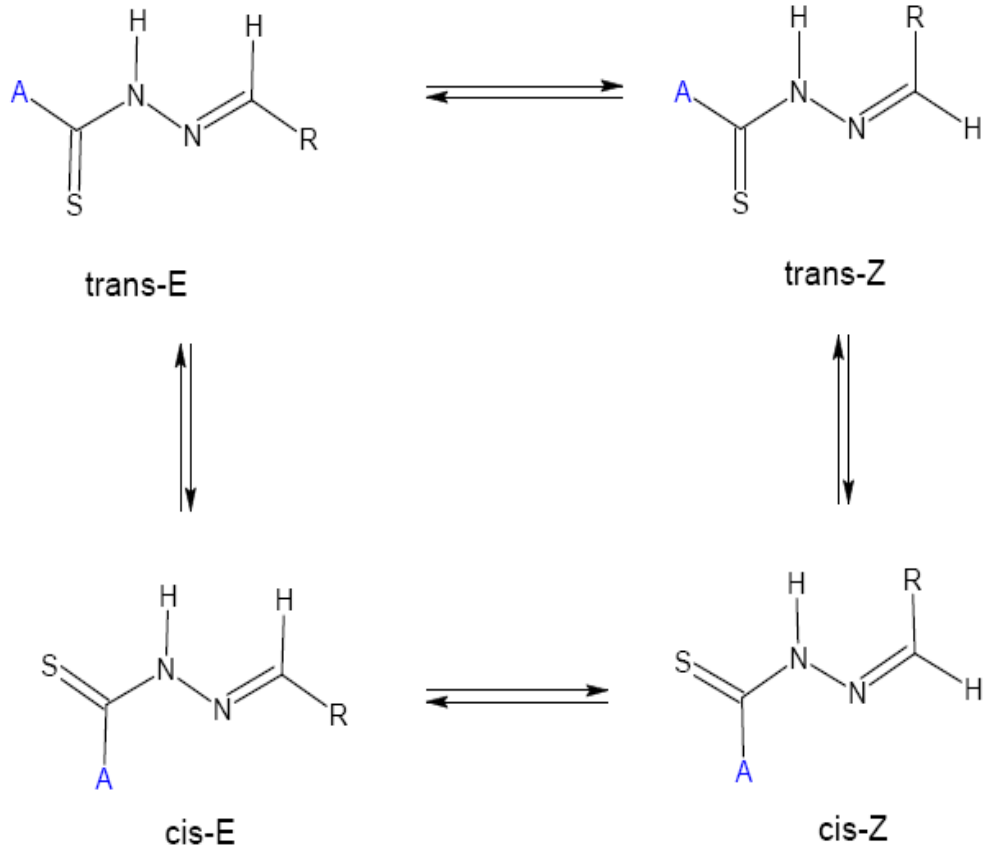
Tiyosemikarbazon geniş tedavi edici özelliği olan bileşik sınıfına aittir. Bu sınıfın birçok üyesi antineoplastik, anti-inflatuvar, tuberkulosik, anti-HIV aktiviteleri göstermektedir. Kanser hücrelerine karşı sitotoksik aktivitesi hala araştırma konusudur [72- 74]. Karbonil bileşiklerinin $\text{H}_2\text{N}-\text{Z}$ şeklindeki amonyak türevleri ile verdiği karbonil-imin bileşikleri genellikle kararlı bileşiklerdir ve bunların çoğu kolay kristallenip, kesin erime noktası gösterirler. Aldehid veya ketonları tanımak için kullanılırlar. Bu amaç için kullanılan bazı bileşikler ve reaksiyonları aşağıda verilmiştir (Şekil 1.10) [71, 72].





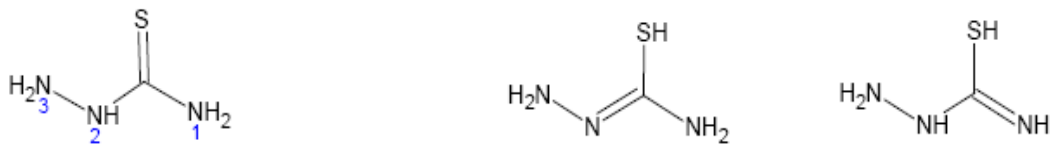
Şekil 1.10 Karbonil kondenzasyon bileşiklerinin reaksiyonları [72]

Semikarbazon ve oksim oluşum mekanizması (Şekil 1.11) ayrıntılı bir şekilde araştırılmıştır. Bu reaksiyonlar asit ile katalizlenmekte ve belirli pH ta ürün oluşumu maksimuma ulaşmaktadır. Jenks ve diğerlerine göre (1959,1962) gözlenen optimum pH, asit konsantrasyonu ile hız belirleyen basamaktaki geçişin değişimindedir. Aşağıdaki mekanizmayı incelediğimizde (Z = -NHCONH₂ veya -OH) [72]:



Şekil 1.12 Semikarbazon bileşiklerinin izomerleri [72]

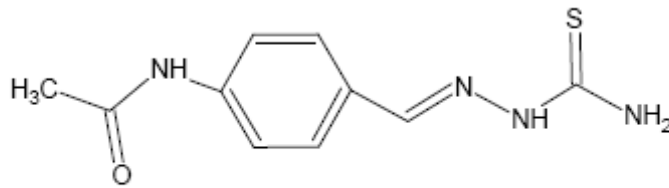
Tiyosemikarbazid üzerinde üç ayrı azot atomu bulunmaktadır. Her bir azot atomu üzerinde de ortaklanmamış elektron çiftleri bulunmasına rağmen yalnız bir azot atomu karbonil grubuna saldırır. 1 ve 2 numaralı azot atomları üzerinde bulunan elektronlar karbonil grubu ile delokalize olduğundan bu atomlar nükleofilik özelliklerini kısmen kaybederler. 3 Numaralı azot atomunda ise böyle bir delokalizasyon söz konusu olmadığından tiyosemikarbazid bu azot atomu ile karbonil gruplarına saldırır (Şekil 1.13) [72].



Şekil 1.13 Tiyosemikarbazid üzerindeki azot atomlarının özelliği [72]

1.4.2 Tiyosemikarbazonların Biyolojik Aktiviteleri

Tüberküloz, herkes tarafından bilinen önemli bulaşıcı hastalıklardan biridir. Dünya nüfusunun (1,86 milyon insan) yaklaşık % 32'si tüberküloz enfeksiyonu kapmıştır. Her yıl yaklaşık 8 milyon tüberküloz bulaştırılmış insanlar, aktif tüberkülozu geliştirmekte ve bunların iki milyonu bu hastalık yüzünden ölmektedir. Son on yılda tüberküloza yakalanma oranı devamlı olarak artmakta ve bu artışa paralel olarak HIV virüsü artış göstermektedir. Tüberküloz ve HIV arasında o kadar dramatik bir ilişki vardır ki tüberküloz tanısı konulan hastaların 2/3'ünde HIV pozitif çıkmaktadır. Buna ilaveten birçok çalışma tüberkülozun HIV virüsünün ilerlemesinde kofaktör olduğunu ortaya koymuştur. Tüberküloz hastalığına müdahale hastalığın alışıla gelmiş ilaçlara karşı gösterdiği direnç nedeniyle gittikçe komplike bir hal almaktadır. Tüberkülozun çoklu ilaçlara karşı gösterdiği direncin artması sadece tedavi problemine neden olmamakta aynı zamanda masrafları da artmaktadır. Bu nedenle hali hazırdaki tedavi problemi için yeni ilaçlar gerekmektedir [72, 73]. p-Asetaminobenzaldehid tiyosemikarbazonun (Tibion) (Şekil 1.14) anti-tuberkulostatik aktivitesi nedeniyle bir çok tiyosemikarbazon biyolojik aktiviteleri için sentezlenmektedir [72–75].



p-asetaminobenzaldehid tiyosemikarbazon (Tibion)

Şekil 1.14 p-Asetaminobenzaldehid tiyosemikarbazonun molekül şekli [71]

2-Thenaldehid tiyosemikarbazon tuberkulosa karşı *in vitro* olarak yüksek derecede etki göstermektedir. Bunlara ek olarak 2-asetothienon, 2-propiothienon, 2-butirothienon ve 2,5- dimethyl-3-asetothienon tiyosemikarbazonları içinde *in vitro* testleri Anderson tarafından denenmiş ve 2-propiothienon tiyosemikarbazon en

mükemmel korumayı göstermiştir. Daha sonraki çalışmada tuberkulos ile aşılanmış farelerde 2-thenaldehid tiyosemikarbazonun zayıf bir etki gösterdiği ortaya çıkmıştır. Diğer bir çalışmada Hamre ve çalışma arkadaşları *vaccinia virüs* ile aşılanmış civciv ve fare embriyosunda p-aminobenzaldehid tiyosemikarbazonun ölümü ertelediğini göstermişlerdir. Bu gözlem diğer bir çalışmada, Thompson, Price ve Minton, benzaldehid tiyosemikarbazonun, embriyonik dokuda *vaccinia virüsün* çoğalmasını engellediği belirtilmekte fakat benzen çekirdeğinin para pozisyonundaki substitusyonu virostatik aktiviteyi azalttığını ifade etmektedirler [72- 82].

Ribonükleotid redüktaz, yaşayan tüm hücrelerde bulunmakta ve deoksiribonükleosid trifosfatın sentezinde hız belirleyen basamağında katalizör olarak rol almaktadır. Ribonükleotid difosfatın redüktazın inhibe edilmesi molekül içinde deoksiribosid trifosfatın seviyesini düşürdüğünden, önemli derecede DNA biyosentezinin bloke edilmesinde etkilidir. Tümör büyüme oranı ve ribonükleotit redüktazın spesifik aktivitesi arasında ilgi çekici bir ilişki mevcuttur. Bu nedenle ribonükleotid difosfat redüktazın inhibe edilmesi kansere karşı mücadelede oldukça yararlıdır. Sartorelli ve arkadaşları birçok heterosiklik karboksaldehid tiyosemikarbazonu, ribonükleotid difosfat redüktazını inhibe etmek için sentezlediler. Bunlar arasında en etkili madde 3-aminopiridin-2-karboksaldehid tiyosemikarbazondur [72, 77]. İlaveten aromatik aldehid tiyosemikarbazonlar insanlarda bir hücreli protozoal parazitlerin neden olduğu sıtma, Chagas ve uyku hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır [72, 73, 79]. Tiyosemikarbazon ve metal kompleksleri kimyasal yapıları ve biyolojik özellikleri nedeniyle birçok çalışmanın ilgi odağı olmuşlardır. Tiyosemikarbazon genellikle tiyon formunda bulunmaktadır fakat çözelti içinde çok yönlü şelat oluşturabilmesi için tiyon ve tiyol (Şekil 1.15) yapısının dengede olduğu karışım halindedir. Bu kompleksler genellikle ya ana grup metal ya da değişik değerlikte geçiş metal iyonları içerirler. Tiyosemikarbazonlar genellikle metal iyonu ile ya nötr tiyon veya anyonik tiyolat formunda N,S-donör veya N,N-donör gibi davranarak 4 veya 5 üyeli şelat halkası oluştururlar [71, 72].



Şekil 1.15 Tiyon ve Tiyol molekül şekli [72]

Yapılarında yer alan kükürt ile hidrazin kısmındaki azot atomları, metallere bağ yaparak kararlı, koyu renkli kompleksleri oluştururlar, bunlarda spektrofotometrik bulgular için idealdir. HPLC ayırımları ve bulguları için bazı metal iyon ligandları kullanılmaktadır, bunlar; 2-pikonaldehid-4-fenil-3-tiyosemikarbazon, 2-tiyofenaldehid-4-fenil-3-tiyosemikarbazon, 2-asetilpiridin-4-fenil-3-tiyosemikarbazon, glioksal ditiyosemikarbazon, glioksal bis(4-fenil-3-tiyosemikarbazon) ve diasetil bis(4-dimetilamino-fenil)-3-tiyosemikarbazon [72, 73]. Farelerin kanlarındaki aşırı demir *N*-heterosiklik tiyosemikarbazonlarla şelat oluşturarak iyileştirici etki sergilemektedir [73].

Tiyosemikarbazon ve schiff bazı türevleri; antiviral, antimalarial, antifungal ve antibakteriyel özelliklerinden dolayı birçok hastalıkta tedavi edici olarak kullanılmaktadır [73- 76]. Tiyosemikarbazon türevlerinin DNA ve RNA sentezini inhibe edici etkileri nedeniyle antineoplastik amaçla da kullanıldıkları [77], ayrıca antitiroid aktivite gösterdikleri de belirtilmektedir [78, 79]. Williams ve arkadaşları [80] 4-metil-5-amino-1-formilkinolin tiyosemikarbazon (MAIQ)'nun bazı karaciğer enzimlerini *in vitro* olarak inhibe ettiğini bildirmişlerdir.

Tiyosemikarbazon-metal komplekslerinin aktif oksijen türleri gibi toksik etkiler oluşturduğu da ileri sürülmüştür [81]. Tümör gelişiminin inhibisyonunda tiyosemikarbazon-çinko bileşiklerinin ilişkisini araştıran bazı çalışmalar, bazı inorganik çinko ve kompleks bileşiklerinin antitümör etkilerinin olduğunu bildirmişlerdir [72].

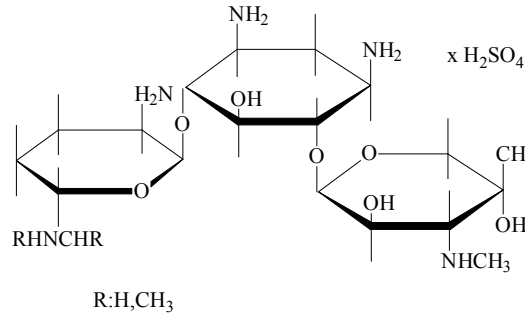
Ratlarda tiyosemikarbazon türevi Schiff bazı olan 4-(1-fenil-1-metil siklobütil-3-il)-2-(2-hidroksibenziliden hidrazino) tiyazol ile çinko ve bakır komplekslerinin oksidatif stres üzerine etkileri araştırılmış ve ligandın oksidatif stres oluşturmadığı, bakır-ligand kompleksinin oksidatif stres oluşturduğu, çinko-ligand kompleksinin ise bir antioksidan gibi davrandığı rapor edilmiştir [81-83].

Antitümör ilaç araştırması L. Brockman ve arkadaşlarının 2-formilpridin tiyosemikarbazonun farelerde L1210, L4946 lösemiye karşı aktif olduğunun bulunmasıyla başlamıştır [84]. 1-formilizoquinolinin 22 tane tiyosemikarbazon türevi sentez edilip hücre kültürünün *in vivo*'da fare tümör sisteminin birçoğuna karşı test edilmiştir. Başlıca test tümörleri ve L1210 lösemi, Sarcoma 180, L-5178Y lösemidir [85]. Değerlendirme dâhilinde *in vitro*'da insan tümörü orijinli ribonükleosit difosfat redüktaz (RDR) enzimine karşı geniş çapta α -(N)-formilheteroaromatik tiyosemikarbazon türevlerinin inhibisyon sürekliliği gösterdiği ve L1210 lösemi hücre kültürünün *in vivo* da fare neoplazmasının büyümesinde inhibitör olarak kullanıldığı French ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda belirlenmiştir [86]. Shijun ve arkadaşları 30 tane Schiff bazı hidroksisemikarbaziti (Ar-CH=NNHCONHOH) sentez edip L1210 murine lösemi hücrelerine karşı test edip ve 17 tanesinin L1210 hücrelerine karşı hidroksi üreden daha fazla inhibitör aktivitesinin olduğunu tespit ettiler [87].

1.5 Çalışmamızda Kullanılan Antibiyotikler

1.5.1 Gentamisin Sülfat

Gentamisin (Şekil 1.16), bir aktinomiset olan *Mikromonospora purpurea*'dan elde edilen, duyarlı bakterilerin normal protein sentezini inhibe ederek etkisini gösteren bakterisid etkili bir aminoglikozid antibiyotığıdır. Gentamisin, *E. coli*, indol pozitif ve negatif *Proteus* türleri *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* grubu türleri *Citrobacter* türleri ve penisilin ve metisiline dirençli *Staphylococcus* türleri de dahil geniş etki spektrumuna sahiptir. Ayrıca *Shigella* ve *Salmonella* türlerine karşı da *in vitro* olarak etkilidir. Gentamisine karşı bakteriyel direnç zor gelişmektedir. Gentamisin hücre duvarı sentezini etkileyen antibiyotikler ile kombine kullanıldığı zaman D grubu streptokok suşları üzerinde sinerjik bir etki göstermektedir. Gentamisin intramüsküler yolla verilmesinden sonra kısa sürede (30-60 dakika) en yüksek plazma konsantrasyonlarına ulaşır. Böbrek fonksiyonu normal kişilerde gentamisinin yarı ömrü 2 saatten biraz fazladır [88].



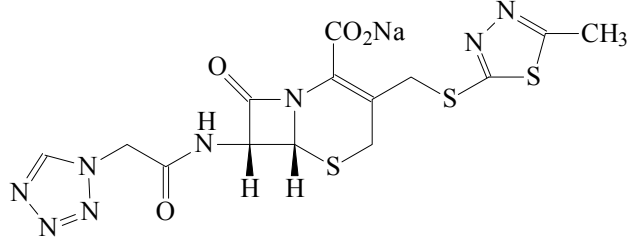
Şekil 1.16 Gentamisin sülfat bileşiğinin molekül şekli (0-2-amino-2-deoxy-D-glucopyranosyl-(1.4)-O-[3-deoxy-3-(methylamino)-D-xylopyranosyl-(1 6)]-2-deoxy-D-streptamine.) [89]

Yapılan bir çalışmada, gentamisin sülfat antibiyotiği *in vitro* ortamda glutatyon metabolizmasında rol oynayan glutatyon redüktaz enziminin aktivitesini arttırdığı tespit edilmiştir [90]. Shigenobu tarafından yapılan bir başka çalışmada insan nötrofil hücrelerinde ve hücre dışında *in vitro* ortamda NADPH oksidaz enzimi üzerinde gentamisin sülfatın doza bağımlı olarak inhibisyona neden olduğu gösterilmiştir [91]. Ayrıca gentamisin sülfatın koyun göz merceğindeki glikoz-6 fosfat dehidrogenaz enzimini de inhibe ettiği bulunmuştur [92].

1.5.2. Sefazolin Sodyum

Sefazolin sodyum (Şekil 1.17) bakteri hücre duvarı sentezini inhibe ederek bakterisid etki gösteren bir sefalosporindir. Sefazolin sodyum enjeksiyondan sonra kanda hızla yüksek konsantrasyonlara ulaşır. Böbrek, karaciğer ve akciğer dokularına kolaylıkla geçer. Sefazolin sodyum intramüsküler uygulandıktan 1 saat sonra serumda maksimum konsantrasyona ulaşır ve bu düzey en etkili olduğu andır. Sefazolin sodyumun serum yarılanma ömrü intramüsküler uygulamada yaklaşık 2 saattir. Sefazolin sodyumun % 90'dan fazlası idrarda değişmeden dışarı atılır. Sefazolin sodyum *Staphylococcus aureus*, (penisilaz üreten suşlar dahil) *Staphylococcus epidermidis* (metisiline dirençli stafilokoklar hariç) A grubu beta hemolitik streptokoklar ve diğer streptokok suşları, *Streptococcus pneumoniae*,

Escherichia coli, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella türleri* *Enterobacter aerogenes*, *Haemophilus influenza* 'ya karşı duyarlıdır [88, 89].



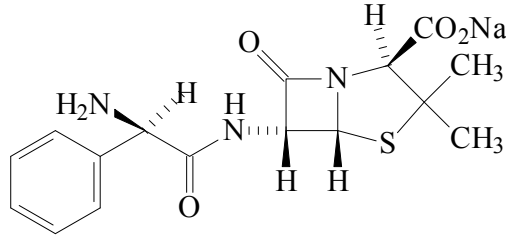
Şekil 1.17 Sefazolin sodyum bileşiğinin molekül şekli ((6R,7R)-3-(5-metil-1,3,4-tiyadizol-2-sülfanilmetil)-8-okso-7-[2-(1H-tetrazol-1-il) asetilamino]-5-tiya-1-azabisiklo [4.2.0]okt-2ene-2-karboksilat) [89]

Sefazolin sodyum ile yapılan *in vitro* bir çalışmada koyun karaciğerinden saflaştırılan glikoz 6-fosfat dehidrogenaz enzimi üzerinde güçlü inhibisyon gösterirken [93], koyun gözünden salınan glikoz-6 fosfat dehidrogenaz enzimi üzerinde aktivasyonuna neden olmaktadır [92]. Benzer şekilde sefazolin sodyum antibiyotiği insan eritrositlerinden saflaştırılan Karbonik anhidraz I ve II enzimi üzerinde güçlü bir inhibisyon etkisi göstermiştir [94]. Sefazolin sodyumun bulunduğu sefalosporinler ana antibiyotik grubunda bulunan sefatoksim antibiyotiği sığır eritrositlerinden saflaştırılan Glutatyon redüktaz enzimi üzerinde yarışmalı bir inhibisyon göstermiştir [89, 90].

1.5.3. Sodyum Ampisilin

Bir aminopenisilanik asit türevi olan ampisilin (Şekil 1.18) geniş bir spektruma sahip olup gram (+) ve gram (-) aerob ve anerob mikroorganizmalara karşı bakterisit etkilidir; bu etkisini bakterilerin hücre duvarı mukopeptit biyosentezini inhibe ederek gösterir. Ampisilin beta-laktamazlara karşı dayanıklı değildir; kolayca parçalandığından etkisiz bir duruma gelir. Ampisilin beta-laktamaz salgılayan ve salgılamayan *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* ile *Staphylococcus faecalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* ve *Streptococcus viridans*'a *in vitro* etkilidir.

Ayrıca gram (-) mikroorganizmalardan, beta-laktamaz salgılayan ve salgılamayan *Haemophilus influenzae*, *Branhamella catarrhalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Proteus mirabilis*, *Neisseria gonorrhoeae* ve *Proteus vulgaris*, *Providencia rettgeri*, *Providencia stuartii*, *Morganella morganii* ampisiline duyarlıdır. Anaerob mikroorganizmalardan, *Clostridium* türleri, *Peptococcus* türleri, *Peptostreptococcus* türleri ve *B. Fragilis* dahil *Bacteroides* türlerine ampisilin etkilidir. Ampisilin intravenöz ve intramüsküler uygulamadan sonra kanda yüksek konsantrasyonlar oluşturur ve ortalama yarılanma süresi sağlam bireylerde yaklaşık 1 saattir. Uygulandıktan sonra ilk 8 saat içinde %75-85 oranında değişmeden idrarla atılır [88, 89].



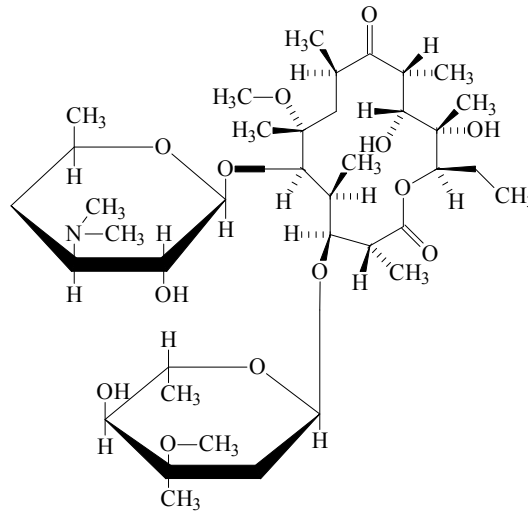
Şekil 1.18 Sodyum ampisilin bileşiğinin molekül şekli (Monosodyum (2S, 5R, 6R)-6-[(2R)-2-amino-2-fenilasetilamino]-3,3-dimetil-7-okso-4-tiyo-1-aza bisiklo [3.2.0] heptan-2-karboksilat) [89]

Yapılan bir *in vitro* çalışmada insan eritrositlerinden izole edilen karbonik anhidraz I ve II enzimi üzerinde ampisilin inhibisyon etkisi tespit edilmiştir [90]. Benzer şekilde insan eritrosit glikoz-6 fosfat dehidrogenaz enzimi üzerinde ampisilin *in vitro* inhibisyon etkisi göstermiştir [95].

1.5.4. Klaritromisin

Klaritromisin (Şekil 1.19) bir semi-sentetik makrolid antibiyotiktir. Klaritromisin ve metaboliti 14-OH klaritromisin vücut dokularına ve sıvılarına kolayca dağılır. Yüksek intraselüler konsantrasyonundan dolayı, doku konsantrasyonları, serum konsantrasyonlarından daha yüksektir. Klaritromisin, duyarlı bakterinin 50S ribozom alt ünitelerine bağlanarak antibakteriyel etkisini gösterir ve

protein sentezini inhibe eder. Klaritromisin *in vitro* olarak birçok aerob ve anaerob gram-pozitif ve gram-negatif organizmalar olan *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenza*, *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*, *Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes*, *Bordetella pertussis*, *Pasteurella multocida* ve *Propionibacterium acnes*'e karşı etkilidir. Ayrıca *myobacterium avium* kompleks organizmalarına da etkilidir. Klaritromisin'in ortalama terminal faz plazma yarı ömrü doza bağımlı olup 2,1 ila 4,5 saat arasında değişmektedir [88, 89].



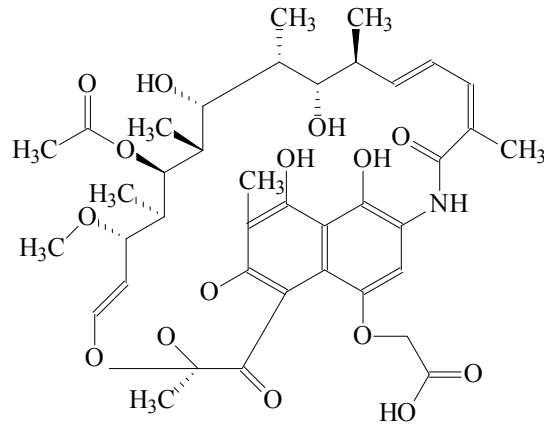
Şekil 1.19 Klaritromisin bileşiğinin molekül şekli [89]

Makrolid grubunda yer alan klaritromisin antibiyotiği karaciğer metabolizmasında önemli bir yeri olan P-450 enzimlerinden CYP3A enziminin dönüşümsüz inhibitörüdür [96, 97]. Klaritromisin ile CYP1A2, CYP2C9 ve CYP2D6 enzimlerinin substratları arasında bir ilişki olduğu tespit edilmiş [98, 99] ve klaritromisin'in *in vivo* ortamda insanlar üzerinde yapılan bir çalışmada CYP1A2, CYP2C9 ve CYP2D6 enzimlerinin inhibe ettiği gösterilmiştir [100].

1.5.5 Rifamisin SV

Rifamisin SV (Şekil 1.20) yüksek bakterisid etkiye sahip bir antibiyotiktir. *In vitro* antimikrobiyel etki diğer antibiyotiklere karşı dirençli olsalar bile, gram pozitif

mikroorganizmalar üzerinde çok düşük konsantrasyonlarda ve gram-negatif mikroorganizmalar üzerinde daha yüksek konsantrasyonlarda kendini gösterir. Antibakteriyel spektrumu *Myobacterium tuberculosis*'i de kapsar. Rifosin rifamisin grubu haricinde diğer antibiyotiklerle çapraz direnç oluşturmaz. Klinik deneyler Rifosin'in gram-pozitif mikroorganizmaların (*stafilokok*, *streptokok*, *pnömokok* ve benzerleri) neden olduğu enfeksiyonlar ile gram-negatif mikroorganizmaların neden olduğu bazı enfeksiyonların tedavisinde özellikle etkili olduğunu göstermiştir. Rifosin'in safrada yüksek konsantrasyona ulaşması onu safra kesesi enfeksiyonlarının tedavisinde özellikle kullanılması gereken bir ilaç haline getirir. Rifosin intramusküler uygulamadan 6 saat sonra organizmada maksimum etki seviyesine ulaşır [88, 89].



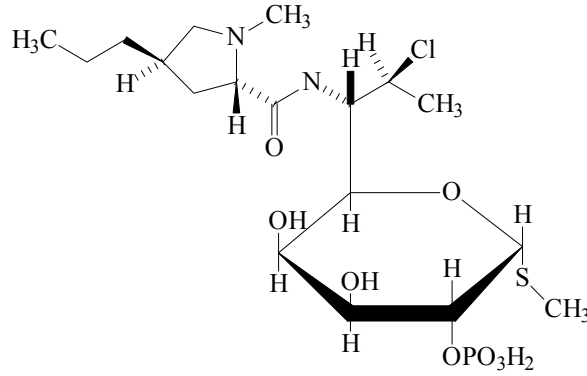
Şekil 1.20 Rifamisin SV bileşiğinin molekül şekli [89]

Çalışmamızda kullandığımız rifosin grubundan rifamisin SV antibiyotiğinin yapılan bir çalışmada DNA polimeraz enziminin güçlü inhibitörü olduğu tespit edilmiştir [100]. Ayrıca Rifamisin SV türevlerinin insan nötrofil hücrelerinin fonksiyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir [101].

1.5.6. Klindamisin Fosfat

Klindamisin fosfat (Şekil 1.21), *in vivo* koşullarda hızla hidroliz olarak antibakteriyel etkiye sahip klindamisine dönüşür. Klindamisin, makrolidlere benzer şekilde bakteri ribozomlarının 50S alt birimine bağlanarak, protein sentezinin ilk

aşamasını inhibe eder. Temel olarak bakteriyostatik olmakla birlikte, yüksek konsantrasyonlarda duyarlı suşlara karşı bakterisid etki gösterir. Klindamisin, şu mikroorganizmalar karşı *in vitro* olarak etkilidir; Aerob gram pozitif koklardan; *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, streptokoklar ve pnömokoklar. Anaerob gram negatif basillerden; *Bacteroides* türleri ve *Fusobacterium* türleri. Anaerob gram pozitif spor yapmayan basillerden; *Propionibacterium*, *Eubacterium* ve *Actinomyces* türleri. Anaerob ve mikroaerofilik gram pozitif koklardan *Peptococcus* türleri, *Peptostreptococcus* türleri ve mikroaerofilik streptokoklar. *Clostridium perfringens* suşlarının çoğu klindamisine duyarlıdır [88, 89].



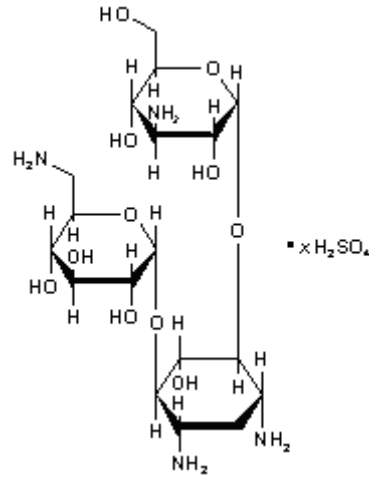
Şekil 1.21 Klindamisin fosfat bileşiğinin molekül şekli (Metil 7-klor-6,7,8-trideoksi-6-[(2S, 4R)-1-metil-4-propilpiyrolidin-2-karboksamido]-1-L-treo- α -D-galakto-oksapiyranosit 2-dihidrojen fosfat) [89]

Klindamisin fosfat intramüsküler yoldan uygulandığında, serumdaki en yüksek aktif klindamisin konsantrasyonlarına erişkinlerde 3 saat içinde ulaşılır. Aktif klindamisin serumdaki yarılanma süresi 3 saattir [89].

1.5.7 Kanamisin Sülfat

Kanamisin (Şekil 1.22), aminoglikozid yapısındaki antibiyotiklerden biridir. Etkili bir antibiyotik olmasına karşın, toksik etkisi azdır. Kas içine enjekte edilebileceği gibi ağız yoluyla da verilir. Fakat bu son yolda emilim iyi değildir. Kanamisin “Sepsis” vakalarında (vücuttaki cerahat yapıcı bakterilerin ve bunların zararlı ürünlerinin (toksinleri – zehirleri) kan yoluyla vücuda dağılması)

kullanılabileceği gibi, ağız yoluyla uygulanarak bağırsakların bakterilerden temizlenmesinde de yararlanılabilir. Kanamisin, daha çok işitme bozukluklarına yol açıcı etkiye sahiptir. Uzun süre kanamisin kullanmak zorunda olan hastalarda ilacın 5–7 günlük sürelerle kesilmesi ve günlük dozun azaltılması işitme kayıplarını önleme bakımından yararlıdır. Bu önlem özellikle böbrek bozukluğu bulunan hastalarda gereklidir [102].



Şekil 1.22 Kanamisin sülfat bileşiğinin molekül şekli (3-Amino-3-deoksi-α-D-glukopironozil-(1→6)-[6-amino-6-deoksi- α-D-glukopironozil-(1→4)]-2-deoksi-D-streptamin sülfat) [102]

2. MATERYAL VE METOD

2.1 MATERYAL

2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bu çalışma için kullanılan; Sepharose 4-B, Sülfonamit, L-trozin, p-nitrofenil asetat, diyaliz torbaları, Akrilamit, N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin(TEMED),N,N'- metilen bisakrilamit, β - merkaptotanol, SDS, Glisin, Coomassie Brilliant Blue G-250, Coomassie Brilliant Blue R-250, Fenol red ve Bromtimol mavisi, Ksantin, Etilendiamintetra asetik asit (EDTA), tris(hidroksimetil)aminometan HCl (Tris-HCl), Allopurinol, Benzamidin, Ditionitrol Sigma Chemical Comp.'den; Sodyum hidroksit, Trihidroksi metil aminometan (Tris), Sodyum sitrat dihidrat, Sitrik asit, Soyduz klorür, Sodyum sülfat, Sodyum perklorat, Sodyum asetat, Hidroklorik asit, Asetik asit, Sülfürik asit, Fosforik asit, Sodyum azotür, Sodyum nitrat, Sodyum tiyosiyanat ve Sodyum siyanür Merck A.G'den; Metanol, Etanol, Amonyum persülfat ve Dekstroz Riel de Haen A.G'den temin edildi.

2.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar

Çizelge 2.1 Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Gereçleri

Kullanılan Gereç	Modeli
Buz Makinesi	Fiocchetti Frigoriferi Scientifici, İtalya
Buzdolabı	Profilo, Türkiye
Çalkalamalı İnkübatör	She-Lab, USA
Elektroforez	Apelex, İngiltere
Elektronik Tartı	Sartorius, Almanya
Etüv	WTB, German, Nüve, Türkiye

Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı	Velp Scientifica, İspanya
Kromatografi Kolonu	Sigma (1,5 cm çap ve 10cm uzunluk)
pH Metre	WTW, Almanya
Dijital Görüntüleme Sistemi	UVP, İngiltere
Saf su cihazı	Destilasyon 3.1 (Comecta Sa,)
MikroSantrifüj	Sigma Laborzentrifugen, Germany
Santrifüj	Hettich Zentrifugen, Germany
SDS PAGE Aparatları	Atto, Japonya
Çalkalayıcı	GFL, Almanya
Elektroforez için Güç Kaynağı	Consort, İngiltere
Sıcak su banyosu	Elektro-mag, Türkiye
Isı kontrollü Çalkalamalı etüv	GFL , Almanya
UV visible Spektrofotometreler	Heios α (Unicam), Metro Lab,
Vorteks	Elektromag,Türkiye

2.1.3 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

2.1.3.1 Afinite jeli sentezinde kullanılan tamponlar

2.1.3.1.1 0,1 M NaHCO₃, pH 10,0: 8.401 g NaHCO₃ tartıldı ve 950 mL destile suda çözülerek, 1 M NaOH ile pH'sı 10,0'a getirildi ve son hacim destile su ile 1 L'ye tamamlandı.

2.1.3.1.2. 0.2 M NaHCO₃, pH 8.8: 8.401 g NaHCO₃ tartıldı ve 450 mL destile suda çözülerek, 1 M NaOH ile pH'sı 8.8'e getirildi ve son hacim destile su ile 500 mL'ye tamamlandı.

2.1.3.1.3. 0.05 M Tris-SO₄, pH 7.5: 6.055 g Tris-base tartıldı ve 950 mL destile suda çözülerek, 1 M NaSO₄ ile pH'sı 7.5'e getirildi ve son hacim destile su ile 1 L'ye tamamlandı.

2.1.3.2. Afinite Kromatografisinin Uygulanmasında Kullanılan Tamponları

2.1.3.2.1 Dengeleme Tamponu: 2,9220 g NaCl ve 3,7535 g glisin tartıldı ve 450 mL suda çözüldü. 4 M NaOH ile pH'sı 9'a ayarlanarak toplam hacim 500 mL'ye tamamlandı.

2.1.3.2.2 Jel Yıkama Tamponu: 1,8768 g glisin tartıldı ve 220 mL suda çözüldü. 4 M NaOH ile pH'sı 9'a ayarlanarak toplam hacim 250 mL' ye tamamlandı.

2.1.3.2.3 Elüsyon Tamponu: 1,4610 g NaCl, 1,8768 g glisin ve 0,9788 g benzamidin dihidroklorür tartıldı ve 220 mL suda çözüldü. 4 M NaOH ile pH'sı 9'a ayarlanarak toplam hacim 250 mL' ye tamamlandı.

2.1.3.3 Ksantin Oksidaz Enzim Aktivitesi İçin Kullanılan Tamponlar

2.1.3.3.1 Aktivite Tamponu (0,15 M pH 7,6 Tris-HCl) : 1,8126 g Tris-HCl tartıldı ve 80 mL suda çözüldü. pH'sı 7,6'ya ayarlanır ve toplam hacim 100 mL' ye tamamlandı.

2.1.3.3.2 Substrat Çözeltisi: 0,01521 g ksantin tartıldı ve 80 mL destile su ile çözülür 500 µL 4 M NaOH eklenir ve 100 mL' ye tamamlanır.

2.1.3.4 SDS-PAGE Elektrofrezinde Kullanılan Tamponlar

Çizelge 2.2 SDS-PAGE elektrofrezinde kullanılan numune tamponu:

Kimyasal Madde	Miktar
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
Destile su	0.5 mL

Çizelge 2.3 SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan yürütme tamponu:

Kimyasal Madde	Miktar
Tris-HCl	3.0 g
Glisin	14.4 g
SDS	1.0 g
Destile su ile son hacim 1L'ye tamamlanır	

Çizelge 2.4 SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan ayırma ve yığıma jellerinin hazırlanışı:

	Ayırma Jeli	Yığıma Jeli
	% 10	% 3
<u>Akrilamid/Bis (% 30)</u>		
Akrilamid 15 g		
Bisakrilamid 0.4 g		
Son hacim destile su ile 50 mL'ye tamamlanır.	16.65 mL	2.6 mL
Destile su	20.1 mL	12.2 mL
<u>1.5 M Tris-HCl (pH:8.8)</u>		
Tris-HCl 11.82 g		

pH:8.8 oluncaya kadar 0.1 M NaOH ilave edilerek son hacim destile su ile 50 mL'ye tamamlanır.	12.5 mL	–
<u>0.5 M Tris-HCl (pH:6.8)</u> Tris-HCl 3.94 g pH:6.8 oluncaya kadar 0.1 M NaOH ilave edilerek son hacim destile su ile 50 mL'ye tamamlanır.	–	5 mL
<u>% 10'luk SDS</u> SDS 1 g Son hacim destile su ile 10 mL'ye tamamlanır.	0.5 mL	200 µL
<u>TEMED</u>	25 µL	20 µL
<u>% 10'luk amonyum persulfat</u> Amonyum persulfat 1 g Son hacim destile su ile 10 mL'ye tamamlanır.	750 µL	400 µL

Çizelge 2.5 SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renklendirme çözeltisi:

Kimyasal Madde	Miktar
Coomassie Brilliant blue R-250	0.66 g
Metanol	120 mL
Glasiyal asetik asit	24 mL
Destile su	120 mL

Çizelge 2.6 SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renk açma çözeltisi: % 7.5 asetik asit, % 5 metanol ve % 87.5 mL destile su

Kimyasal Madde	Miktar
Metanol	50 mL
Glasiyal asetik asit	75 mL
Destile su	875 mL

2.2 YÖNTEMLER

2.2.1 Ksantin Oksidoredüktaz Enzimi Çözeltisinin Hazırlanması

Taze, işlem görmemiş süt +4 °C’de buzdolabında bir gece bekletildi. Hacimce %3 oranında toluen ve hacimce %2 olacak şekilde 0.1 M. EDTA’dan eklendi ve blender ile 30 dakika boyunca muamele edildi. Bu sürenin sonunda sıcaklık yükseldi ve sıcaklık +4 °C’ye gelinceye kadar buzdolabında bekletildi. Tekrar 30 dakika boyunca blender ile muamele edildi ve sıcaklık +4 °C’ye gelinceye kadar buzdolabında bekletildi [103]. Blender ile işlem görmüş süte %38’lik amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı ve arkasından +4 °C’de 45 dakika boyunca 15000 rpm’de ve santrifüj yapılarak, süspansiyonda üste biriken yağimsı kısım atıldı. Daha sonra %50 amonyum sülfat eklendi ve +4 °C’de 45 dakika boyunca 15000 rpm’de santrifüj yapıldı. Üsteki süpernanant atıldı ve altta kalan çökelek 0,1 M pH=7.6 Tris-HCl ‘den her tüpe 1 mL olacak şekilde eklendi ve çökeleğin çözülmesi sağlandı.

2.2.2 Ksantin Oksidoredüktaz Enziminin Aktivite Tayini

XOR'ın aktivitesi Massey Metoduna göre 37 °C'de ksantinün ürik asit oluşumu esnasında 295 nm'de absorbans artışının spektrofotometrik olarak ölçümü ile tayin edilecek ($\epsilon_{292}=9,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [104]. Reaksiyon karışımı pH=7,6, 50 mM Tris-HCl tamponu ve 0.1 mM ksantin ve enzim içermektedir. 1 ünite XO'ın, 1 µmol ksantini 1 dakikada ürik aside dönüştüren enzim miktarıdır [104].

2.2.3 Bradford Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini

Saflaştırma basamaklarında elde edilen çözeltilerdeki protein miktarları, Bradford yöntemi kullanılarak tayin edilmiştir. Bu yöntem fosforik asitli ortamda proteinlerin, Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi ile kompleks oluşturması, oluşan kompleksin 595 nm dalga boyunda maksimum absorbans göstermesi esasına dayanır. Bu yöntemin diğer protein tayini yöntemlerinden üstün tarafı, çok kısa sürede uygulanması, bozucu faktörlerin az olması, protein boya kompleksinin çözeltilerde uzun süre kalmasıdır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır.

1mL'sinde 1mg protein ihtiva eden standart sığır albümin çözeltisinden tüplere 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µl alındı. Tüplerin hacimleri 100mM Tris-HCl tamponu (pH:8.00) kullanılarak 0,1 mL'ye tamamlandı. 5mL Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi her bir tüpe ilave edildi. Tüpler vorteks ile karıştırılarak 10 dakika sonra 595nm'de 3ml'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okutuldu. Kör olarak 0,1 mL'lik 100mM Tris-HCl (pH:8.00) tamponu olan 1. tüp kullanıldı. Okunan absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri ile standart grafik hazırlandı.

Hazırlanan enzim çözeltilerinden 0,1' er ml 2 ayrı tüpe alınarak üzerlerine 5'er ml Coomassie reaktifi ilave edildi. Vortekste karıştırıldıktan 10 dakika sonra 595 nm'de absorbansları ölçüldü. İki ölçümün ortalama absorbansına karşılık gelen protein miktarı standart grafik yardımıyla hesaplandı [105].

2.2.4 Enzimin Saflaştırılması

2.2.4.1 Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Amonyum sülfat, belirli doygunluk derecelerine göre belirli proteinlerin çökmesini sağlayan 2 değerlikli, çok kullanılan bir tuzdur. Öncelikle, kullanılacak 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: Blender ile işlem görmüş süt hacmi,

S₁: 1'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu,

S₂: 1'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğu

2.2.4.2 Afinite kromatografisi ile enzimin saflaştırılması

Afinite jeli, Sepharose 4B katı destek materyali üzerinde hazırlanmıştır. Sepharose 4B'nin serbest -OH grupları literatürde daha çok CNBr ile aktifleştirilmiştir. Bu çalışmada da aynı yöntem kullanılarak Sepharose 4B afinite jelinin CNBr ile aktifleştirilmesinden sonra, tirozin kovalent olarak bağlandı. Daha sonra 4-amino benzamidin dihidroklorür diazolanarak L-tirozine kenetlendirildi [106]. Burada afinite jelinin; uzantı kolunu L-tirozin, enzimi spesifik olarak bağlayan kısmını da 4 amino benzamidin dihidro klorür oluşturur. Benzamidin XOR enziminin spesifik bir inhibitörüdür.

2.2.4.2.1 Sepharose-4B'nin aktifleştirilmesi

20 mL Sepharose 4B jeli destile su ile iyice yıkanarak dekante edildi. Eşit hacimdeki destile su ile birleştirilerek bir süspansiyon elde edildi. Karıştırılmakta olan süspansiyona 4 g toz haline getirilmiş CNBr katıldı. pH-metre kullanılarak

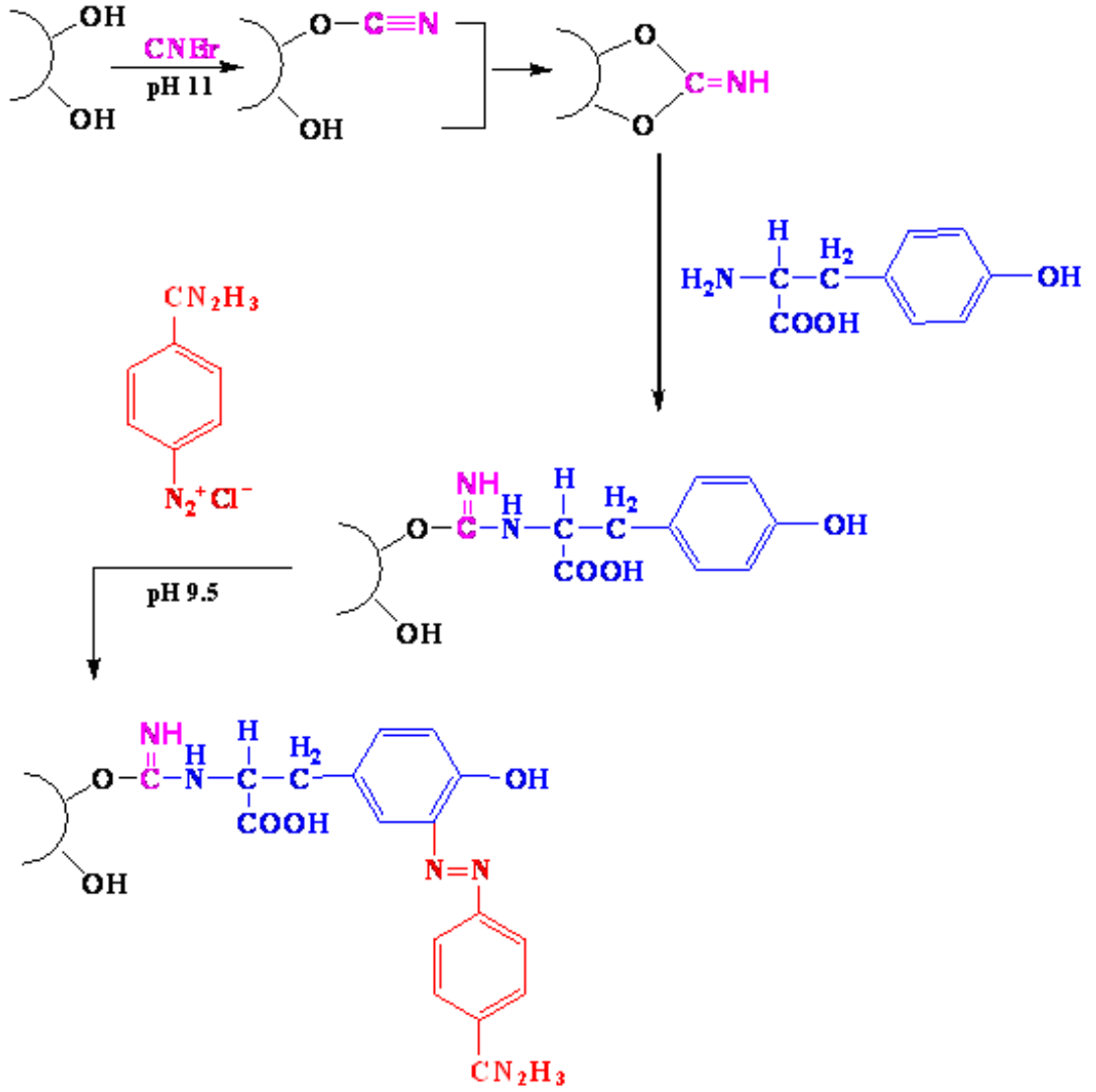
süspansiyonun pH'ı 4 M NaOH ile hemen 11 değerine çıkarılarak reaksiyon bu pH değerinde sabit tutuldu. Reaksiyona pH değişmeyinceye kadar devam edildi (10-15 dakika). Çok miktarda buz süspansiyona katıldı ve karışım bir buncher hunisine nakledildi. Daha sonra 250 mL soğuk 0,1 M NaHCO₃ tampon çözeltisi (pH=10) ile yıkandı ve bir behere aktarıldı [106].

2.2.4.2.2 L-Tirozinin bağlanması

CNBr ile aktifleştirilmiş matriks üzerine 20 mL'sinde 8 mg tirozin içeren 0,1 M NaHCO₃ tamponunun (pH=10) soğuk çözelti behere ilave edilerek yavaşça karıştırılan süspansiyon 90 dakika boyunca karıştırıldı. Bundan sonra süspansiyon, 4°C'de 16 saat süresince bekletildi. Bu sürecin sonunda jel, yıkama suyu 280 nm dalga boyunda absorbans vermeyinceye kadar bol su ile yıkandı. Böylece reaksiyona girmeyen tirozin tamamen ortamdan uzaklaştırılmış oldu. Yıkama 100 mL 0,2 M NaHCO₃ tamponu (pH=8,8) ile tekrarlandı. Tirozin takılı jel aynı tamponun 40 mL'si içine alındı [106].

2.2.4.2.3 4-aminobenzamidinin Kenetlenmesi

20 mg 4-aminobenzamidin dihidroklorür, 0 °C civarında 10 mL 1 M HCl içerisinde çözüldü. 75 mg NaNO₂ ihtiva eden 0 °C'deki 5 mL çözelti, benzamidin çözeltisine damla damla katıldı. 10 dakika reaksiyondan sonra diazolanmış olarak bulunan benzamidin 40 mL Sepharose 4B-L-Tirozin süspansiyonuna ilave edildi. pH=9,5 değerine çıkarılarak sabit tutuldu ve 3 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Daha sonra 1 L destile su ve 200 mL 0,05 M Tris-SO₄ (pH=7,5) tamponu ile yıkandı ve aynı tampon içerisinde saklandı (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Afinite jeli sentezinin şematik gösterimi

2.2.4.3 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) İle Enzim Saflığının Kontrolü

Afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzimin saflığı SDS-PAGE ile kontrol edildi. Bu amaçla iki farklı akrilamid konsantrasyonunda; yığılma jeli % 3, ayırma jeli % 10 konsantrasyonlarında olacak şekilde kesikli sodyum dodesil sülfat jel elektrofrezisi (SDS-PAGE) Laemelli tarafından belirtilen yöntem uygulandı [107].

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 kıskaçlarla tutturularak jel hazırlama cihazına yerleştirildi. Çizelge 2.18’te belirtildiği gibi 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 (yaklaşık 15 dakika) üst yüzeydeki n-bütanol uzaklaştırıldı. Daha sonra cam plakaların arası tamamen doluncaya kadar polimerleşmiş ayırma jelinin üzerine yığma jeli ilave edildi. Jel kasetindeki yükleme jelinin üzerine tarak dikkatlice yerleştirilerek jelin polimerleşmesi beklendi (yaklaşık 30 dakika). Yükleme jeli polimerleştikten sonra tarak, kuyucukların arasının bozulmamasına dikkat edilerek çıkarıldı. Kuyucuklar önce saf suyla sonra tank tamponuyla yıkandı. Polimerize jellerin bulunduğu kaset elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konuldu.

Afinite kromatografisi sonucunda elde edilen fraksiyonlardan toplam hacim 100 µL olacak şekilde 1:1 oranında numune tamponuyla karıştırıldı. Jele yüklenecek numuneler 3 dakika kaynar su banyosunda bekletildi. Numuneler soğutulmuş olarak enjektörle kuyucuklara yüklendi. Elektroforez güç kaynağına bağlanarak 80 volta ayarlandı. Proteinlerin jeldeki hareketini incelemeye yarayan numune tamponu içindeki boyaya ait bant yükleme jelinden ayırma jeline vardığında voltaj 200 volta çıkartıldı. Bromfenol mavisinden kaynaklanan mavi bant jelin altına 0.5 cm kalana kadar yürütüldükten sonra akım kesilerek yürütme durduruldu. Cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı yığma jel ayrıldıktan sonra protein bantlarını içeren ayırma jeli renklendirme çözeltisi içine konuldu ve 1–1.5saat kadar çalkalayıcı üzerinde bırakıldı. Daha sonra jel renklendirme çözeltisinden çıkarılarak renk açma çözeltisine konuldu. Belirli aralıklarla değiştirmek suretiyle jelin zemin rengi açılıp protein bantları belirginleşinceye kadar bu çözelti içinde çalkalandı. Jel, renk açma çözeltisinden çıkarıldıktan sonra fotoğrafı çekildi.

2.2.5 Enzimin Kinetik Sabitlerinin Belirlenmesi

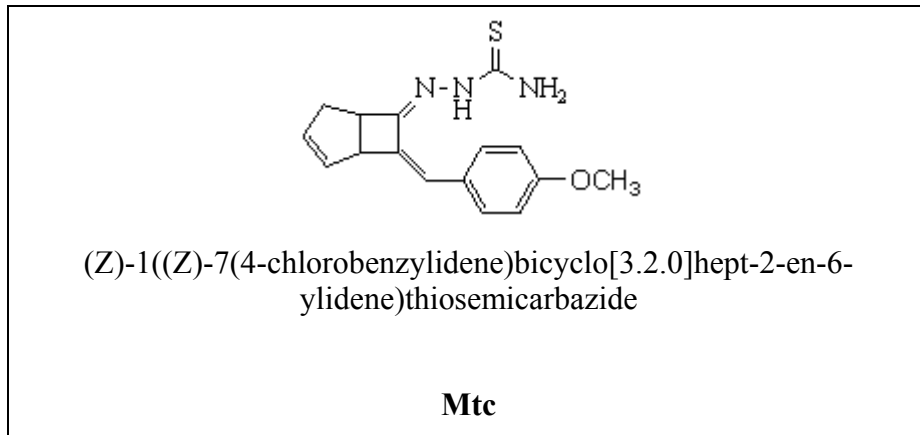
K_M ve V_{max} değerlerinin tespit edilmesi amacıyla optimum şartlarda XOR, ksantin substratının altı farklı substrat konsantrasyonlarındaki enzim aktivitesi ölçümü yapıldı. Her ölçüm iki defa tekrarlanarak, bulunan değerlerin ortalaması alındı.

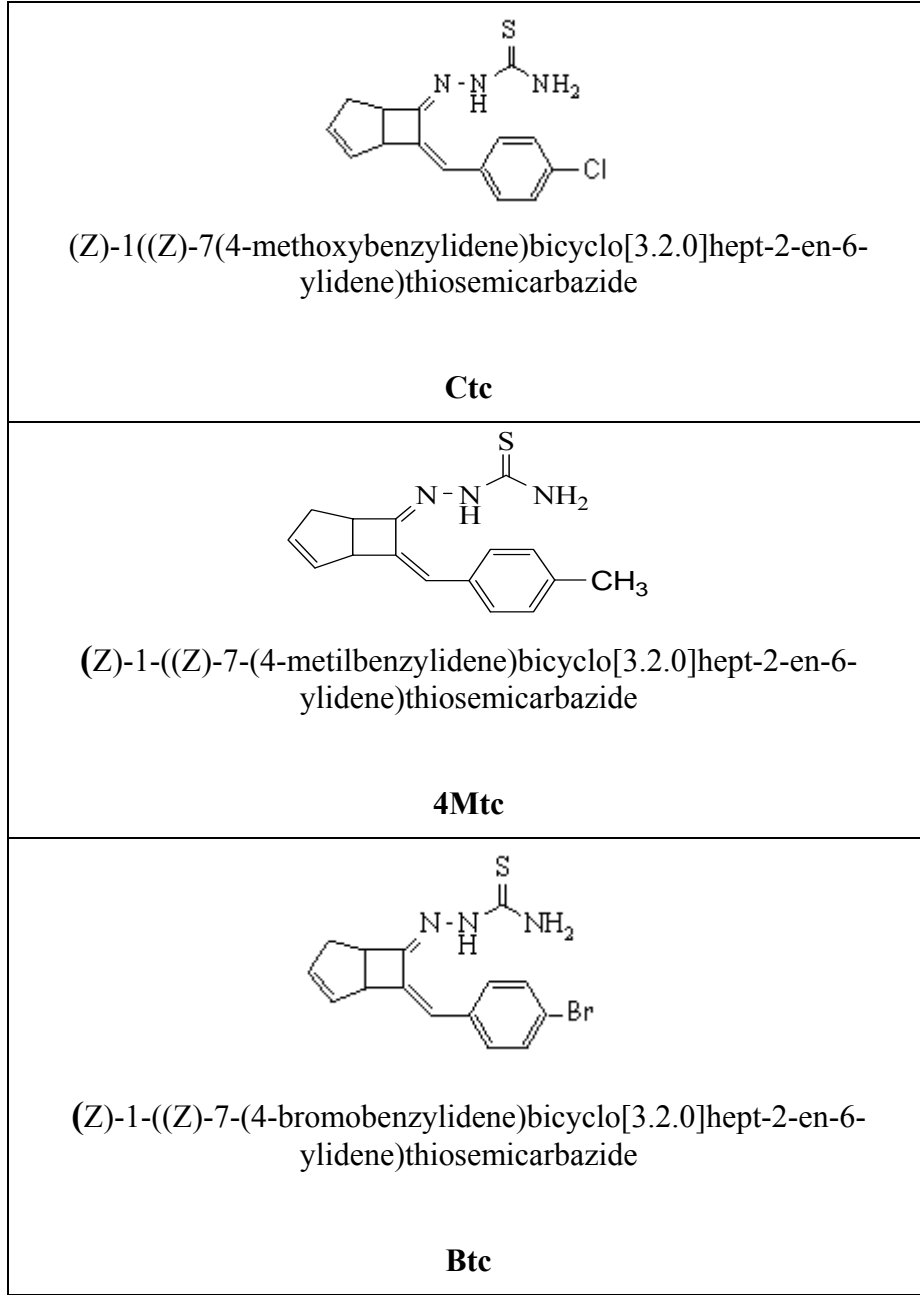
Buna dayalı olarak, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri bulunarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi [108, 109]. K_M ve V_{max} değerleri grafiğin denklemlerinden yararlanılarak bulundu.

2.2.5.1 Tiyosemikarbazon Bileşikleri Kullanılarak Enzimin Kinetik Sabitlerinin Belirlenmesi

K_M ve V_{max} değerlerinin bulunması amacıyla, optimum şartlarda orijinal olarak sentezlenen tiyosemikarbazon bileşikleri (Şekil 2.2) substrat olarak kullanıldı ve substratın değişen konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ölçümleri yapıldı. Her ölçüm iki defa yapılarak bulunan değerlerin ortalaması alındı. 295 nm'de ölçülen aktivite değerleri reaksiyon hızı (U/ml dak) olarak alındı. $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri bulunarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Grafikten yararlanarak K_M değerleri ve V_{max} değerleri U/ml dak olarak bulundu.

Aktivite ölçümünü farklı pH'larda hazırlanan Tris-HCl tamponları kullanarak yapıldı (Çizelge 3.16–3.26) ve grafikler elde edildi.





Şekil 2.2 Tiyosemikarbazon Bileşiklerin Molekül Şekilleri

2.2.5.2 Ksantin Bileşiği Kullanılarak Enzimin Kinetik Sabitlerinin Belirlenmesi

K_M ve V_{max} değerlerinin bulunması amacıyla, optimum şartlarda ksantin substratının değişen konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ölçümleri yapıldı. Her ölçüm iki defa yapılarak bulunan değerlerin ortalaması alındı. 295 nm'de ölçülen

aktivite değerleri reaksiyon hızı (U/ml dak) olarak alındı. $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri (Çizelge 3.27) bulunarak Linewear-Burk grafikleri çizildi.

2.2.6 IC₅₀ Değerlerinin Bulunması

2.2.6.1 Mo ve Fe İyonlarının Enzim Aktivitesine Etkisi

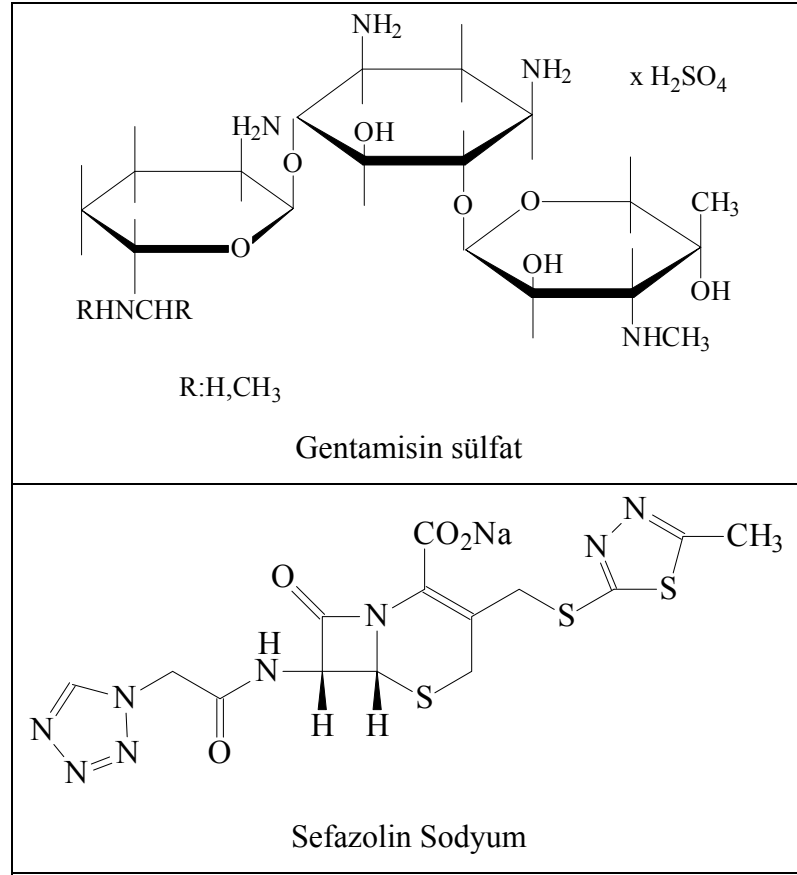
Çalışmamızda kullandığımız bileşikler enzimin yapısında bulunan Fe ve Mo iyonlarını içermektedir. Afinite etkisini araştırmak için, optimum şartlarda ksantin substratının 0,1 mM sabit konsantrasyonunda çalışıldı. Substrat çözeltisi her ölçümde 0.5 mL alındı ksantin ve Fe ve Mo iyonlarını içeren çözeltilerinden ise değişik hacimlerde alınarak toplam 1.005 ml'lik bir reaksiyon hacmi oluşturuldu. Önce Fe ve Mo iyonlarını içermeyen ortamda enzim aktivitesi bulundu. Bu değer %100 aktivite olarak kullanıldı. Daha sonra optimum pH ve sıcaklıkta 0.07 mL enzim çözeltisi alındı ve tampon, substrat, ve Fe veya Mo iyonlarını içeren çözelti ortamı oluşturuldu bu ortam çabuk bir şekilde oluşturulduktan sonra 295 nm'de bir dakikada absorbansta meydana gelen değişme okundu (Çizelge 3.2–3.5). Elde edilen absorban değerlerinden % aktivite hesaplandı. % Aktivite-[A] grafikleri çizildi.

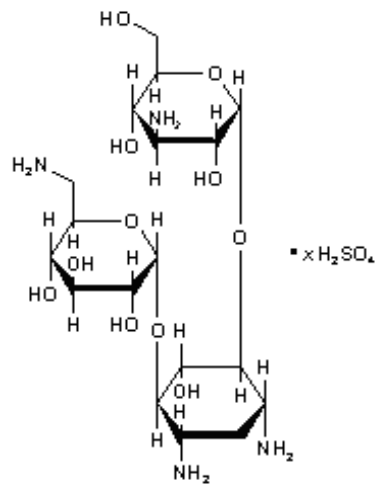
2.2.6.2 Antibiyotiklerin Ksantin Oksidaz Enzimi Üzerine Afinite Etkisinin Araştırılması

İnhibisyon çalışmalarında klinik amaçlı kullanılan antibiyotikler kullanıldı. Bu inhibitörlerin IC₅₀ değerlerinin belirlenmesi amacıyla substrat konsantrasyonu sabit tutulmak suretiyle farklı konsantrasyonlarda inhibitör çözeltileri kullanılarak enzim aktivite belirlendi.

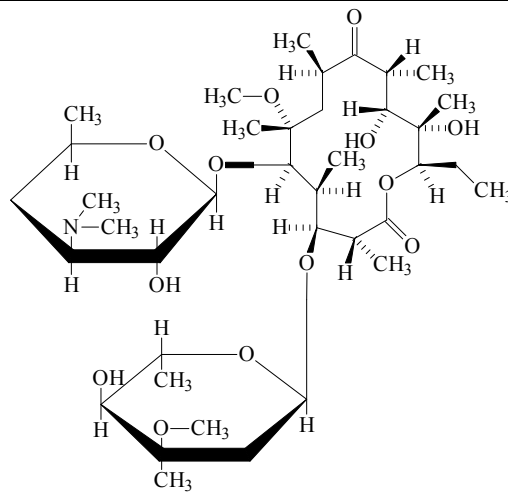
Çalışmamızda kullandığımız antibiyotiklerin (Şekil 2.3) IC₅₀ değerlerini bulmak için, optimum şartlarda ksantin substratının 0,1 mM sabit konsantrasyonunda çalışıldı. Substrat çözeltisi her ölçümde 0.5 mL alındı ksantin ve antibiyotik çözeltilerinden ise değişik hacimlerde alınarak toplam 1.005 mL'lik bir reaksiyon hacmi oluşturuldu. Önce antibiyotiksiz ortamda enzim aktivitesi bulundu. Bu değer

%100 aktivite olarak kullanıldı. Daha sonra optimum pH ve sıcaklıkta 0.07 mL enzim çözeltisi alındı ve tampon, substrat, antibiyotik ve enzim çözeltisi ortamı oluşturuldu bu ortam çabuk bir şekilde oluşturulduktan sonra 295 nm’de bir dakikada absorbansta meydana gelen değişme okundu (Çizelge 3.6–3.12). Elde edilen absorban değerlerinden % aktiviteler hesaplandı. % Aktivite-[I] grafikleri çizildi. Bu grafiklerden yararlanarak her bir antibiyotik için IC₅₀ değerleri hesaplandı (Çizelge 3.13).

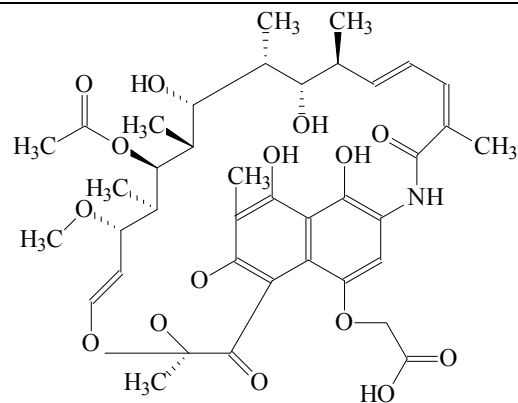




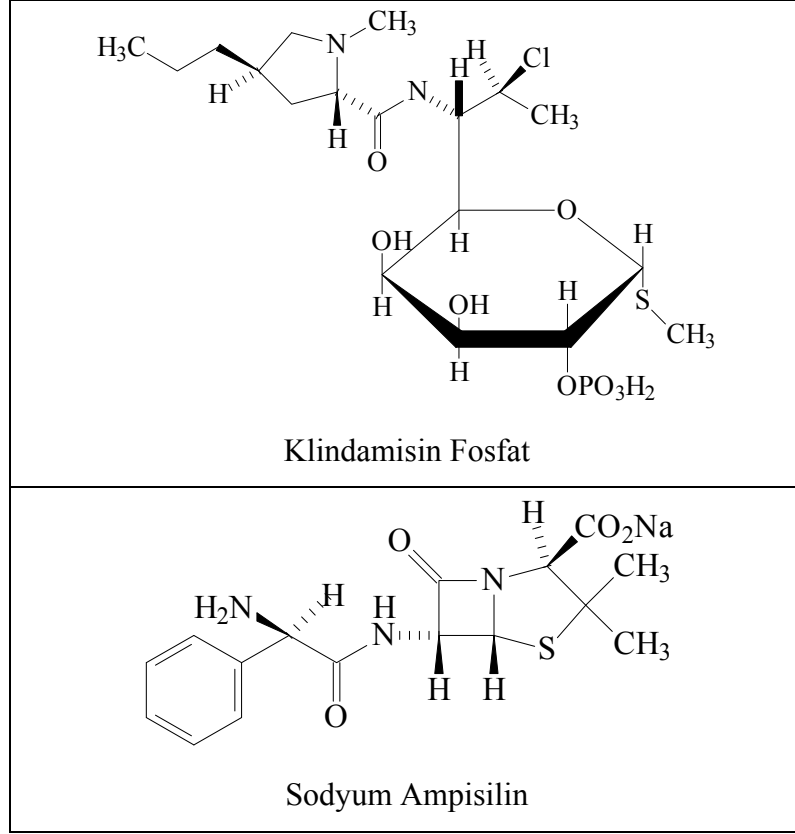
Kanamisin Sulfat



Klaritromisin



Rifamisin SV



Şekil 2.3 Ksantin Oksidaz Enzimi Üzerine Etkisi Araştırılan Antibiyotiklerin Molekül Şekilleri

2.2.7 Enzim İnaktivasyon Çalışması

Ksantin oksidaz enziminin sıcaklığa bağımlı denatürasyon özelliğini belirlemek amacıyla; 45°C, 50°C, 65°C ve 60 °C'lerde 15, 30, 45 ve 60 dakika süreyle inkübasyonu sonrası koruduğu aktivite değerleri, 0,1 mM ksantin substratı kullanarak, standart aktivite ölçüm koşullarında saptandı.

Her bir sıcaklıktaki bekleme süresi sonunda yapılan ölçümlerden elde edilen aktivite değerleri hesaplandı. Farklı sıcaklık derecelerinde inkübasyon süresi-aktivite grafiği çizildi.

2.2.8 Kolon Kapasitesine pH'in Etkisi

Saflaştırma işlemi daha önce tarafımızdan sentezlenen *Sepharose-4B-L-tirozin-4-aminobenzamidin* yapısına sahip afinite jeli ile aşağıdaki şekilde farklı pH'lardaki tampon çözeltiler (pH=9, pH=8, pH=7, pH=6 ve pH=5) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Saflaştırma işleminde dengeleme tamponu olarak 0,1 M glisin/ 0,1 M NaCl pH=9,0 çözelti kullanılmıştır. Yıkama işlemi 0,1 M pH= 9,0 glisin tamponu ile gerçekleştirildi. ve diğer proteinlerin ortamdan uzaklaştırılması sağlandı. Elüsyon tamponu olarak içerisinde 25 mM benzamidin içeren 0,1 M glisin/ 0,1 M NaCl pH=9,0 tamponu kullanıldı. Elüatlar 2 mL'lik fraksiyonlar halinde toplanmış her bir fraksiyona aktivite ölçümü ve protein miktar tayini yapılmıştır.

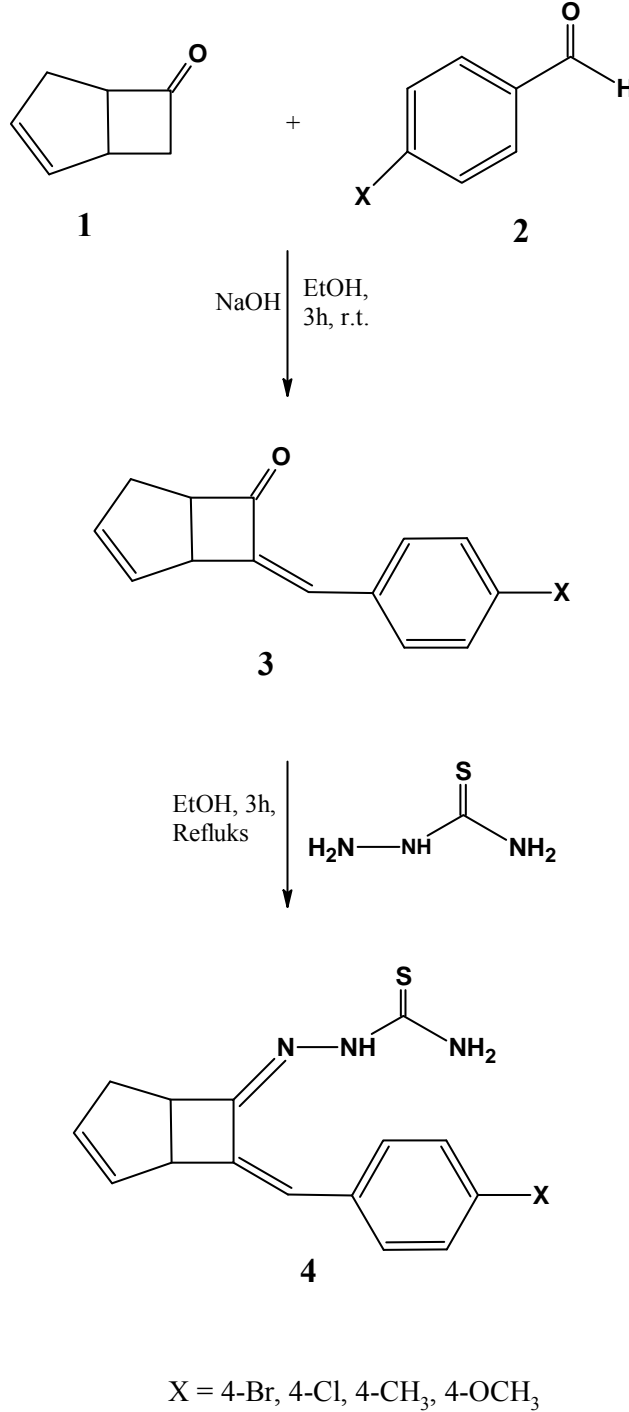
2.2.9 Kolon Kapasitesine İyonik Şiddetin Etkisi

Saflaştırma işlemi daha önce tarafımızdan sentezlenen *Sepharose-4B-L-tirozin-4-aminobenzamidin* yapısına sahip afinite jeli ile gerçekleştirildi. Saflaştırma işleminde farklı konsantrasyonlarda Na₂SO₄ çözeltisi (0,1 M, 0,5 M ve 1,0 M) kullanılmıştır

Saflaştırma işleminde 0,1 M Na₂SO₄ kullanılmıştır. Dengeleme tamponu 0,1 M glisin/ 0,1 M Na₂SO₄ pH=9,0 çözeltisi kullanıldı. Yıkama 0,1 M pH= 9,0 glisin tamponu ile gerçekleştirildi. Elüsyonda, içerisinde 25 mM benzamidin içeren 0,1 M glisin/ 0,1 M NaSO₄ pH=9,0 tamponu kullanıldı. Elüatlar 2 mL'lik fraksiyonlar şeklinde toplanmış ve her bir fraksiyona aktivite ölçümü ve protein miktar tayini yapılmıştır.

2.2.10 Tiyosemikarbazon Türevlerinin Sentezi

Tiyosemikarbazon bileşiklerin sentezi Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen-edebiyat Fakültesi Organik Kimya A.B.D öğretim üyesi Doç. Dr. Mustafa CEYLAN ve grubu tarafından aşağıdaki prosedür kullanılarak sentezlenmiştir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4 Tiyosemikarbazon bileşiklerinin sentezi

2.2.11 Ksantin Oksidaz Enzimi kullanılarak Tiyosemikarbazon Bileşiklerinin Biyotransformasyonu

Transformasyon işleminde kullanılan ksantin oksidaz enzimi daha önce sentezlenme yöntemi anlatılan *Sephorose-4B-L-tirozin-4-aminobenzamidin* yapısına sahip afinite jeli ile süttten saflaştırılmıştır. Saflaştırılan ksantin oksidaz enzimi üzerine tiyosemikarbazon bileşikleri ilave edildi ve 37°C ve 200 rpm'de 4 saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra enzimle etkileşen tiyosemikarbazon bileşiklerinin transformasyonu sonucu oluşan ürünlerin ¹³C-NMR, ¹H-NMR ve IR spektrumları alındı ve spektrumlar ekler bölümünde verildi.

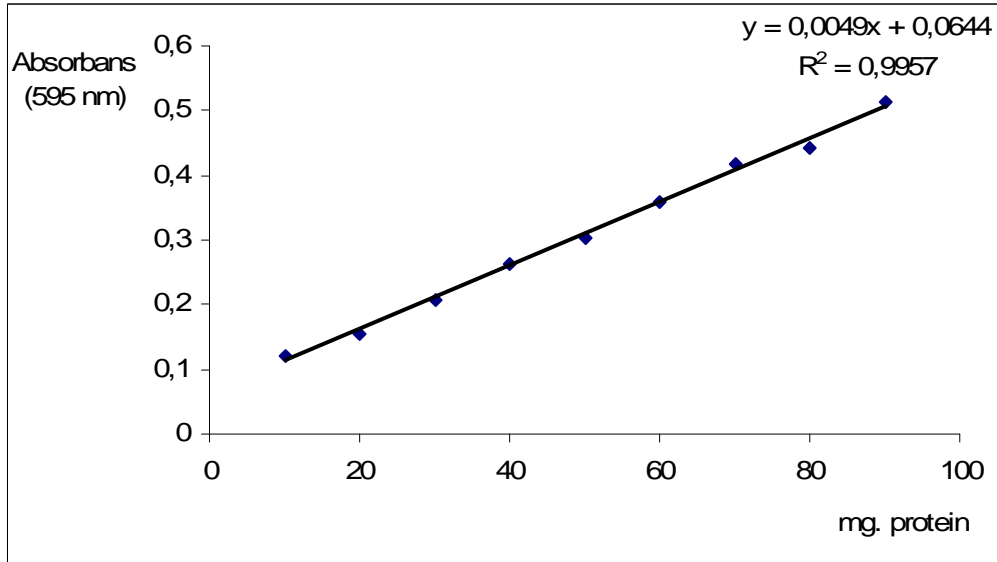
3. BULGULAR

3.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri

Kantitatif protein tayininde bradford yöntemi kullanıldı. Standart grafik bölüm 2.2.5 açıklandığı gibi hazırlandı. Çeşitli basamaklardan sonra süten elde edilen enzim çözeltisi ve saflaştırma basamakları sonundaki enzim çözeltilerinin protein miktarları bu standart grafiğe göre belirlendi..

Okunan absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri ile standart grafik hazırlandı (Şekil 3.1) .

İki ölçümün ortalama absorbansına karşılık gelen protein miktarı standart grafik yardımıyla hesaplandı.



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

3.2. Enzimin Saflaştırılması

3.2.1 Ksantin Oksidoredüktaz Enziminin Hazırlanması

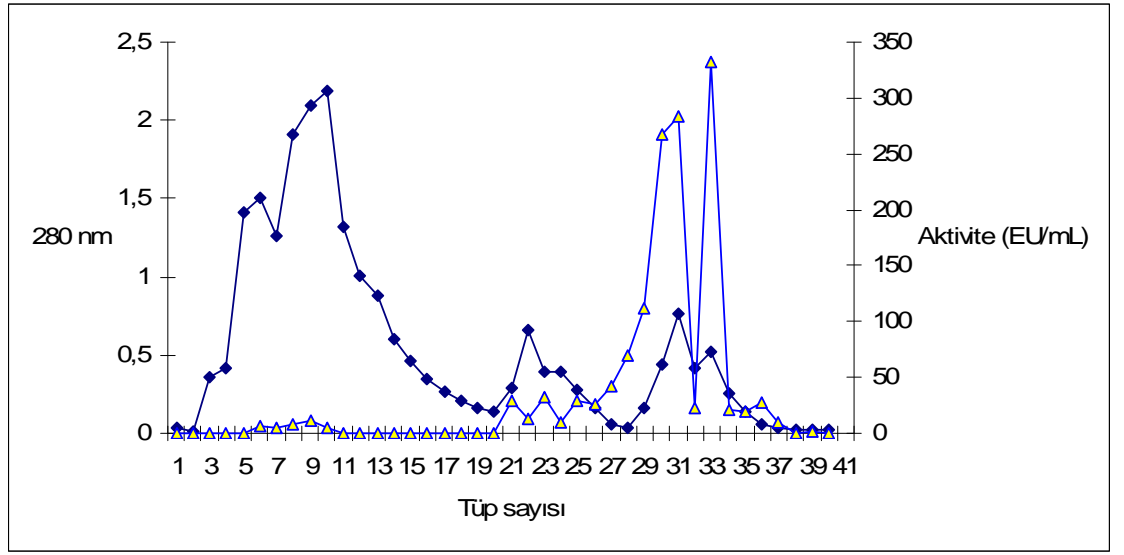
Taze, işlem görmemiş süt +4 °C'de buzdolabında bir gece bekletildi. Hacimce %3 oranında toluen ve hacimce %2 olacak şekilde 0.1 M. EDTA'dan eklendi ve blender ile 30 dakika boyunca muamele edildi.

3.2.2 Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Blender ile işlem görmüş süte %38'lik amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı ve 45 dakika boyunca 15000 rpm'de ve +4 °C'de santrifüj yapıldı. Santrifüj işleminden sonra üste biriken yağimsı kısım atıldı. Altta kalan süpernananta %50 amonyum sülfat çöktürmesi ve 45 dakika boyunca 15000 rpm'de ve +4 °C'de santrifüj yapıldı. Üsteki süpernanant atıldı ve altta kalan çökelek 0,1 M pH=7.6 Tris-HCl 'den her tüpe 1 mL olacak şekilde eklendi ve çökeleğin çözülmesi sağlandı.

3.2.3 Ksantin Oksidoredüktaz Enziminin Saflaştırılması

Saflaştırma işleminde dengeleme tamponu olarak 0,1 M glisin/ 0,1 M NaCl pH=9,0 çözelti kullanıldı. Yıkama işlemi 0,1 M pH= 9,0 glisin tamponu ile gerçekleştirildi. ve diğer proteinlerin ortamdan uzaklaştırılması sağlandı. Elüsyon tamponu olarak içerisinde 25 mM benzamidin içeren 0,1 M glisin/ 0,1 M NaCl pH=9,0 tamponu kullanıldı. Elüatlar 2 mL'lik fraksiyonlar halinde toplanmış her bir fraksiyona aktivite ölçümü ve protein miktar tayini yapıldı (Şekil 3.2).



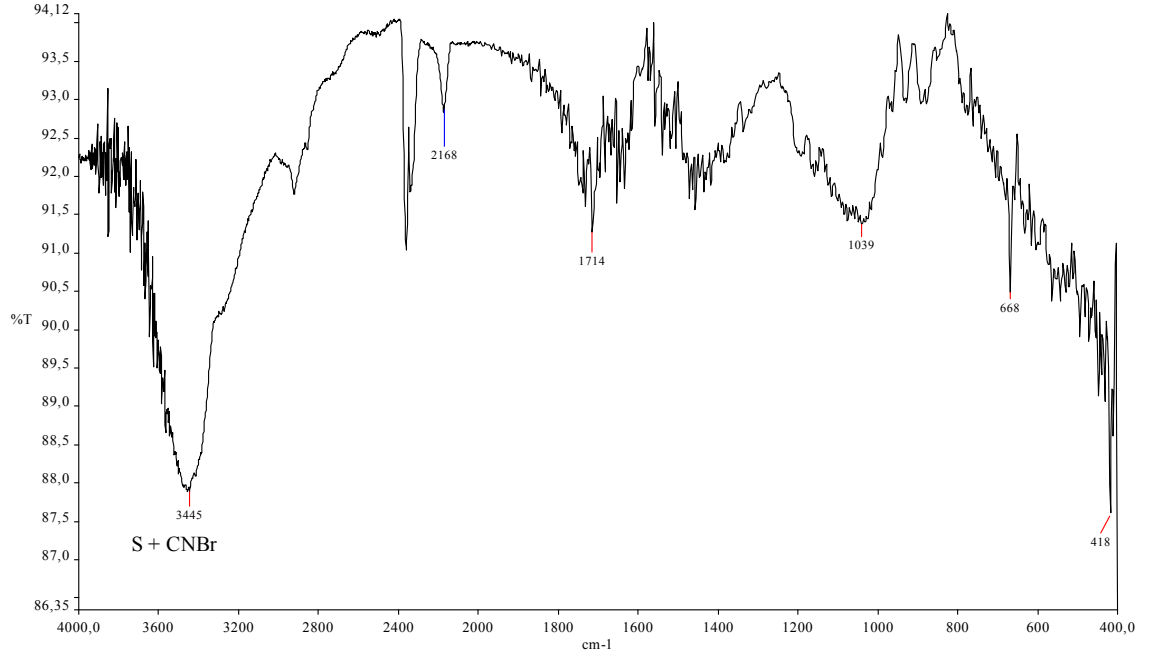
Şekil 3.2 XOR Enziminin Sepharose 4B-L-Tirozin-Benzamidin jeli ile saflaştırma grafiği

Çizelge 3.1 Saflaştırma tablosu

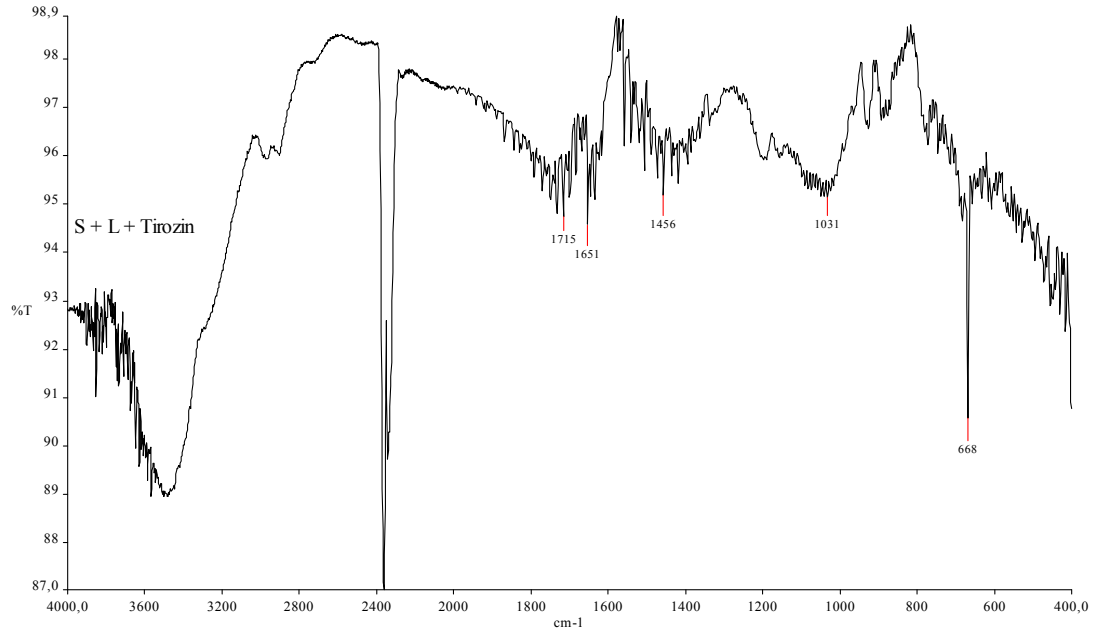
Basamak	Hacim (ml)	Aktivite (U/mL)	Toplam Aktivite (U)	Protein Miktarı (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	% Verim	Saflaştırma Derecesi
Süt	125	65,80	8225,45	4,15	518,75	15,85	100	-
Amonyum Sülfat Çöktürmesi	22,5	135,99	3059,87	4,38	98,55	31,04	37,2	1,95
Afinite Kromatografisi	3,0	561,90	1685,71	0,011	0,033	51082,22	20,49	1645,69

3.3.1 Sentezlenen Afinite Jelinin FT-IR Spektrumları

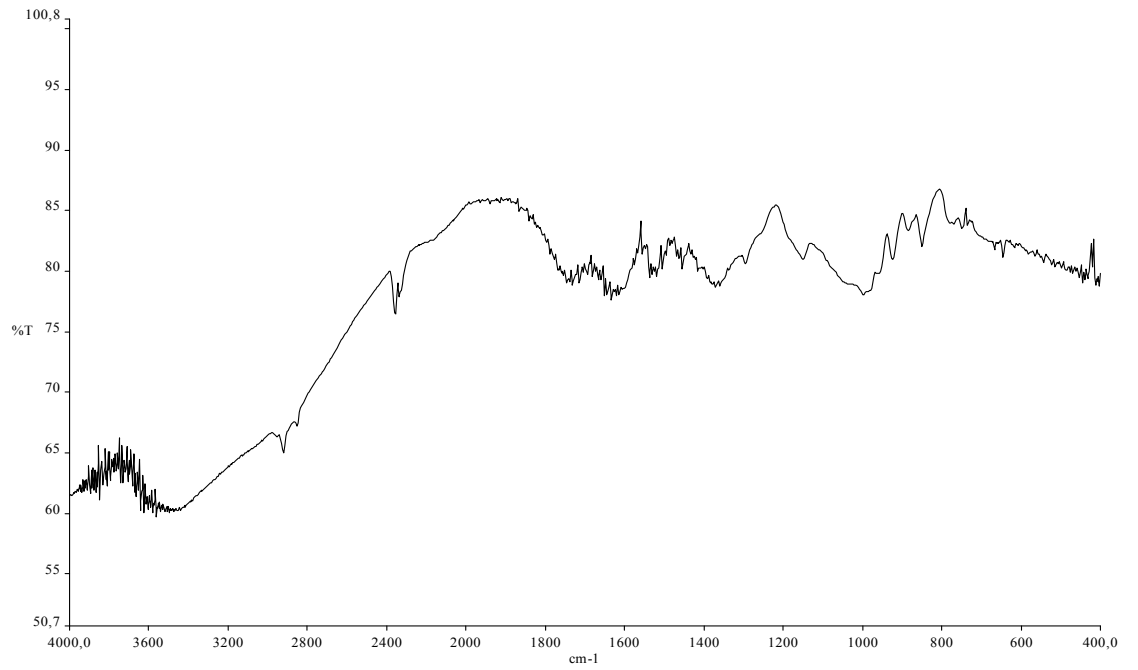
2.2.4.'te anlatılan prosedüre göre tarafımızdan sentezlenen *Sephorose-4B-L-trozin-4 aminobenzamidin* yapısına sahip afinite jeli kullanıldı. Ayrıca jel sentezinin çeşitli aşamalarında FT-IR spektrumları çekildi ve aşağıda verildi (Şekil 3.3-3.5).



Şekil 3.3 Sephorose-4B- CNBr aktifleştirilmesi sonucu elde edilen bileşiğin FT-IR spektrumu



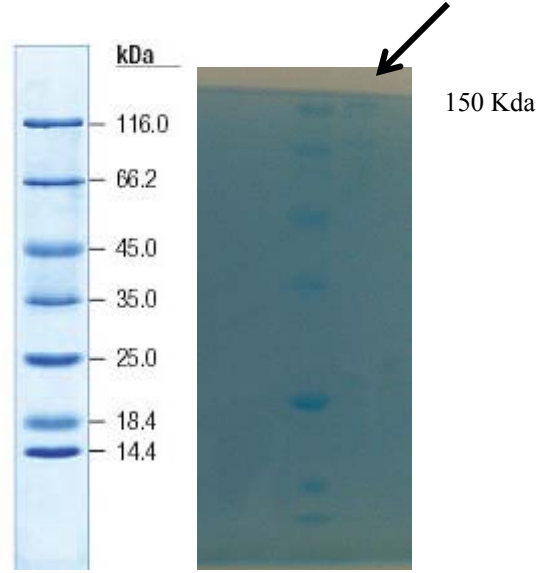
Şekil 3.4. Sephorose-4B- CNBr- L-tirozin bileşiğinin FT-IR spektrumu



Şekil 3.5. Sephorose-4B- CNBr- L-tirozin-benzamidin bileşiğinin FT- IR spektrumu

3.4. SDS-PAGE ile Enzim Saflığının Kontrolü

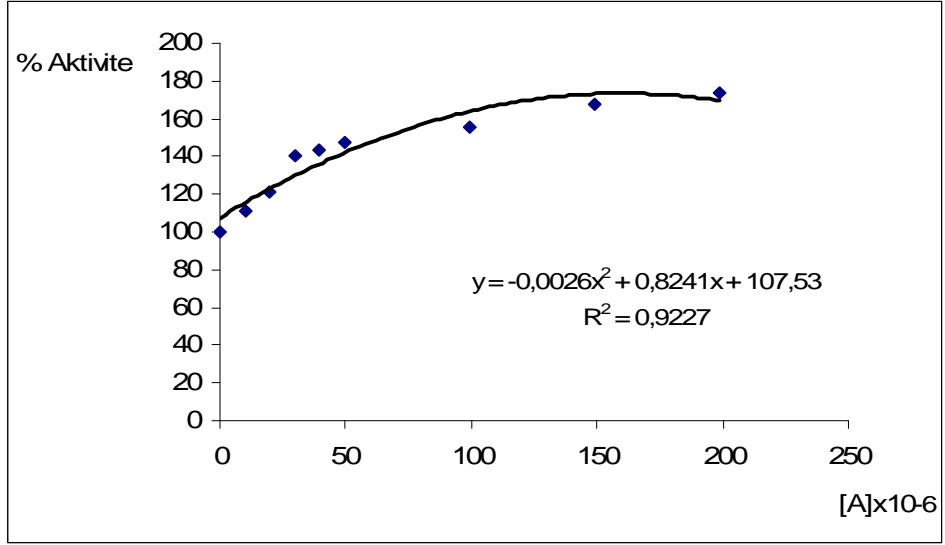
XO enziminin saflık kontrolü, yığıma jeli %3, ayırma jeli %10 konsantrasyonlarında olacak şekilde kesikli sodyum dodesil sülfat jel elektroforezi ile Laemelli tarafından belirtilen yöntemle yapıldı (Şekil 3.6).



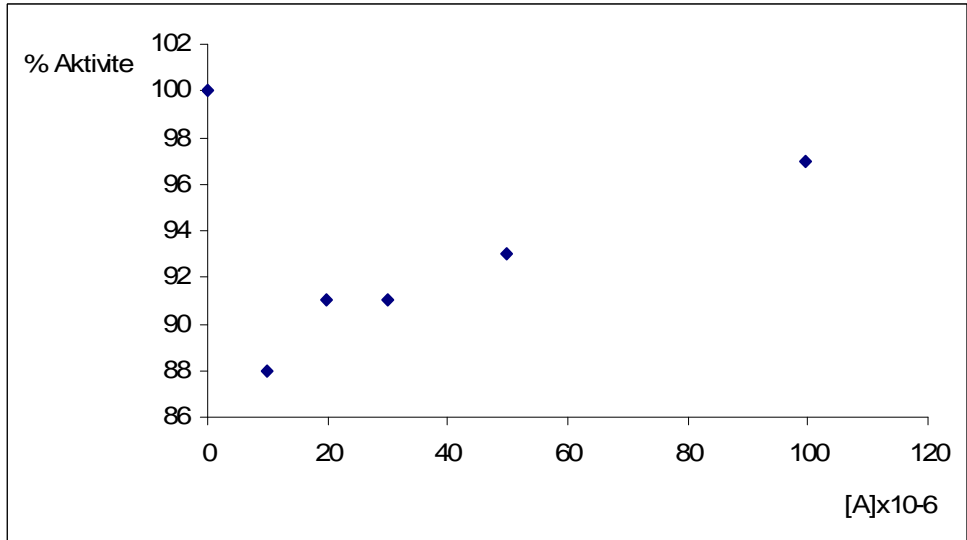
Şekil 3.6 Afinite kromatografisi ile saflaştırılan XOR enziminin SDS-PAGE görüntüsü. Molekül ağırlık standartları β -galaktosidaz (116.0 kDa), sığır serum albumin (66,2 kDa), yumurta albumini (45.0 kDa), laktat dehidrogenaz (35,0 kDa), endonükleaz (25.0 kDa), β -laktoglobulin (18.4 kDa) ve Lizozim (14.4 kDa)

3.5. Mo ve Fe İyonlarının Enzim Aktivitesine Etkisi

Çalışmamızda kullandığımız bileşikler enzimin yapısında bulunan Fe ve Mo iyonlarını içermektedir. Afinite etkisini araştırmak için, optimum şartlarda ksantin substratının 0,1 mM sabit konsantrasyonunda çalışıldı. Elde edilen absorbans değerlerinden % aktivite hesaplandı. % Aktivite-[A] grafikleri çizildi. (Şekil 3.7-3.10).



Şekil 3.7 1×10^{-3} M stok FeCl_3 bileşiğinin % 50'lik $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürmesi sonrası etkisi



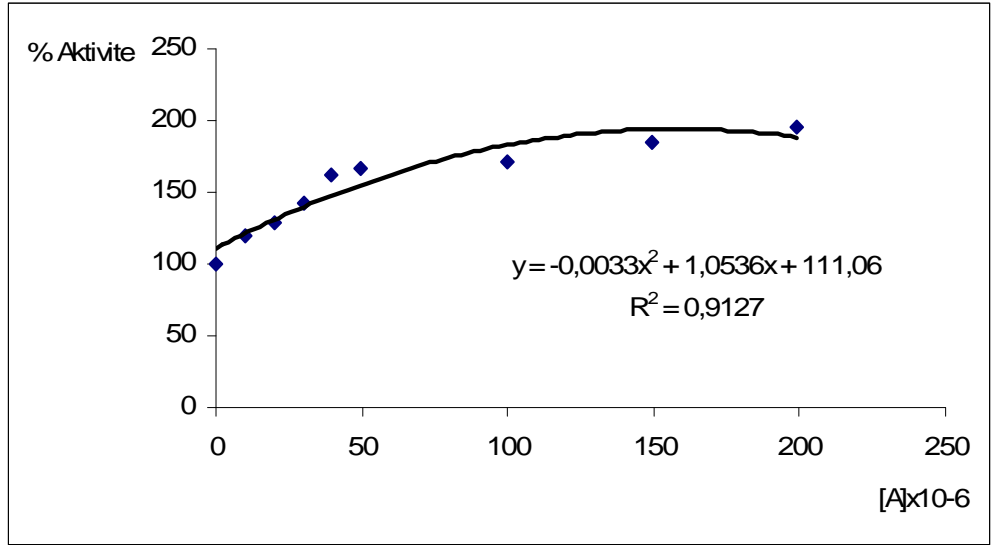
Şekil 3.8 1×10^{-3} M stok FeCl_3 bileşiğinin % 50'lik $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürmesi sonrası diyaliz yapıldıktan sonra etkisi

Çizelge 3.2. Ksantin oksidaz enzimi üzerine 1×10^{-3} M stok FeCl_3 bileşiğinin % 50'lik $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürmesi sonrası etkisi çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, FeCl_3 çözeltisi konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

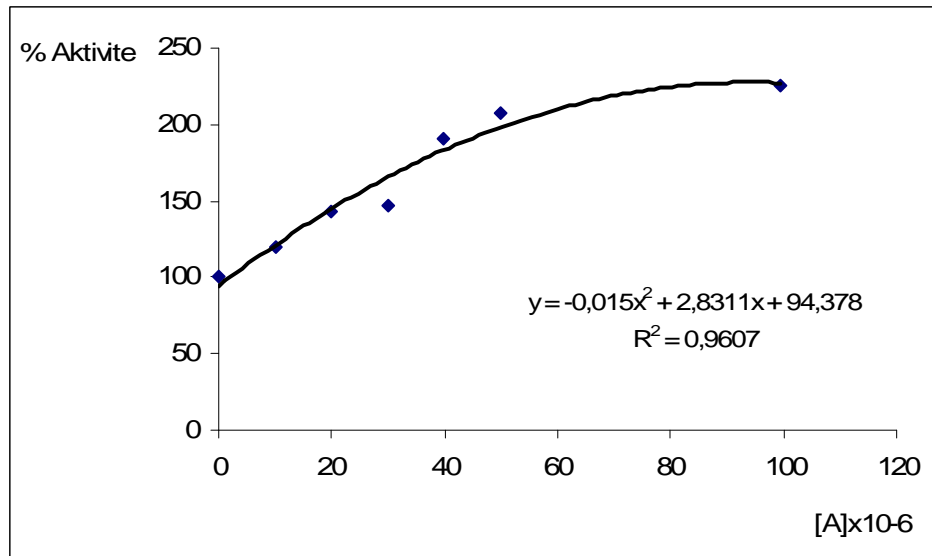
pH=7,6 50 mM Tris tamponu (μl)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μl)	Substrat çözeltisinin hacmi (μl)	FeCl_3 Çözeltisinin Hacmi (μl)	Küvetteki FeCl_3 Kons. [A] (M) $\times 10^{-6}$	ΔOD (295 nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite
435	70	500	-	-	0,185	276,67	100
425			10	9,95	0,206	308,08	111,35
415			20	19,90	0,224	335	121,08
405			30	29,85	0,259	387,34	140
395			40	39,80	0,266	397,81	143,78
385			50	49,75	0,273	408,28	147,57
335			100	99,50	0,288	430,71	155,68
285			150	149,25	0,310	463,62	167,57
235			200	199,00	0,322	481,56	174,05

Çizelge 3.3. Ksantin oksidaz enzimi üzerine 1×10^{-3} M stok FeCl_3 bileşiğinin % 50'lik $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürmesi sonrası diyaliz yapıldıktan sonra etkisi çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, FeCl_3 çözeltisi konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

pH=7,6 50 mM Tris tamponu (μl)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μl)	Substrat çözeltisinin hacmi (μl)	FeCl_3 Çözeltisinin Hacmi (μl)	Küvetteki FeCl_3 Kons. [A] (M) $\times 10^{-6}$	ΔOD (295 nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite
435	70	500	-	-	0,067	100,20	100
425			10	9,95	0,059	88,24	88
415			20	19,90	0,061	91,23	91
405			30	29,85	0,061	91,23	91
395			40	39,80	0,057	85,24	85
385			50	49,75	0,062	92,72	93
335			100	99,50	0,065	97,21	97
285			150	149,25	0,059	88,24	88



Şekil 3.9 1×10^{-3} M stok MoO_3 bileşiğinin % 50'lik $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürmesi sonrası etkisi



Şekil 3.10 1×10^{-3} M stok MoO_3 bileşiğinin % 50'lik $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürmesi sonrası diyaliz yapıldıktan sonra etkisi

Çizelge 3.4 Ksantin oksidaz enzimi üzerine 1×10^{-3} M stok MoO_3 bileşiğinin % 50'lik $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürmesi sonrası etkisi çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, MoO_3 bileşiğinin konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

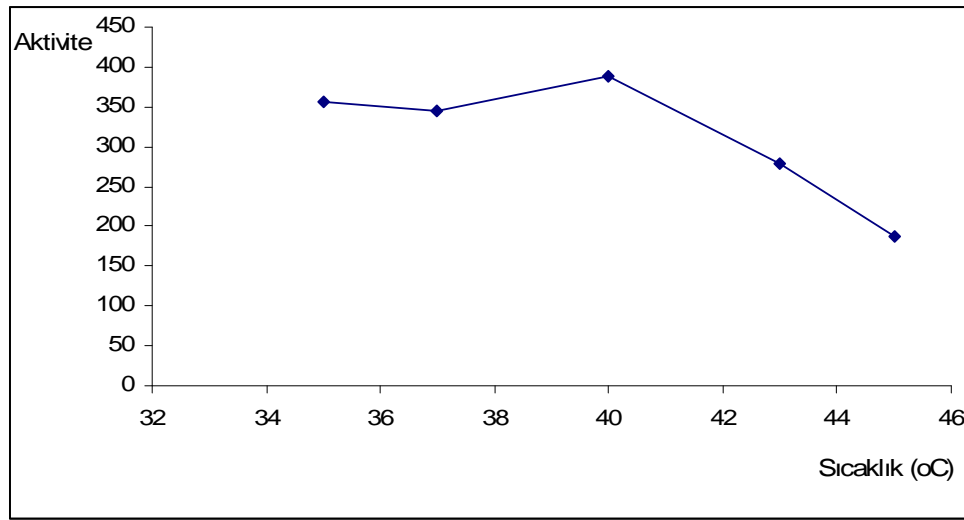
pH=7,6 50 mM Tris tamponu (μl)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μl)	Substrat çözeltisinin hacmi (μl)	MoO_3 Çözeltisinin Hacmi (μl)	Küvetteki MoO_3 Kons. [A] (M) $\times 10^{-6}$	ΔOD (295 nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite
435	70	500	-	-	0,164	245,27	100
425			10	9,95	0,196	293,12	119,51
415			20	19,90	0,212	317,05	129,27
405			30	29,85	0,233	348,46	142,07
395			40	39,80	0,265	396,32	161,58
385			50	49,75	0,273	408,28	166,46
335			100	99,50	0,282	421,74	171,95
285			150	149,25	0,303	453,15	184,76
235			200	199,00	0,320	478,57	195,12

Çizelge 3.5 Ksantin oksidaz enzimi üzerine 1×10^{-3} M stok MoO_3 bileşiğinin % 50'lik $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürmesi sonrası diyaliz yapıldıktan sonra etkisi çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, MoO_3 bileşiğinin konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

pH=7,6 50 mM Tris tamponu (μl)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μl)	Substrat çözeltisinin hacmi (μl)	MoO_3 Çözeltisinin Hacmi (μl)	Küvetteki MoO_3 Kons. [A] (M) $\times 10^{-6}$	ΔOD (295 nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite
435	70	500	-	-	0,055	82,25	100
425			10	9,95	0,066	98,70	120
415			20	19,90	0,079	118,15	143,36
405			30	29,85	0,081	121,14	147,27
395			40	39,80	0,105	157,03	190,90
385			50	49,75	0,114	170,49	207,27
335			100	99,50	0,124	185,45	225,45

3.6 Spektrofotometre Sıcaklığının Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

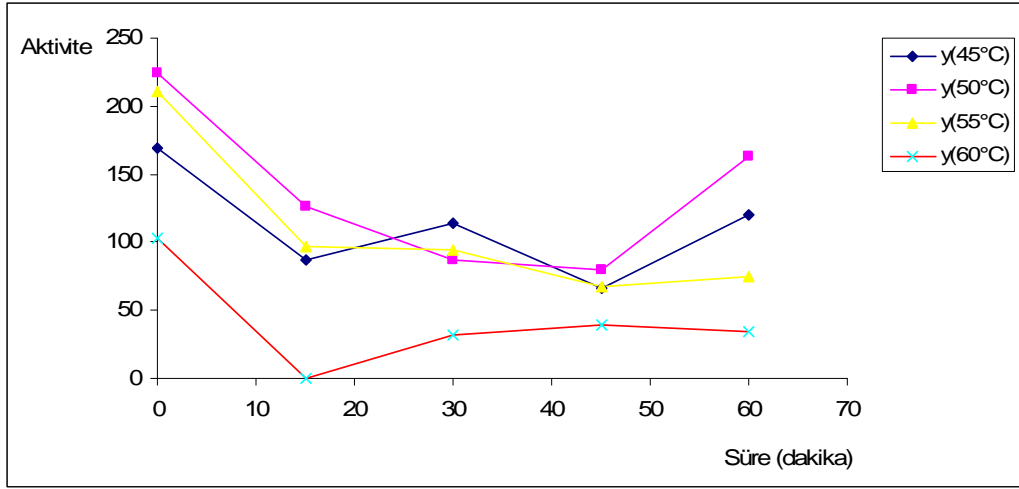
Bölüm 2’de anlatıldığı şekilde işlem yapıldı ve elde edilen absorbans değerlerinden enzim aktiviteleri hesaplandı. Sıcaklık-aktivite grafiği çizildi. (Şekil 3.11)



Şekil 3.11 Farklı sıcaklıklara ayarlanmış spektrofotometre ile enzim aktiviteleri ölçüm değerleri

3.7 Enzim İnaktivasyon Çalışması

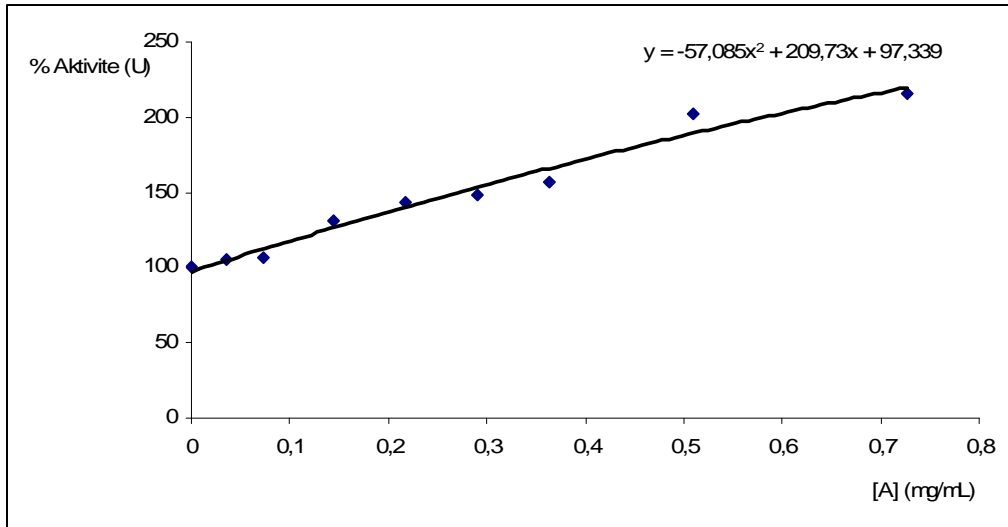
Bölüm 2’de anlatıldığı şekilde işlem yapıldı ve elde edilen absorbans değerlerinden enzim aktiviteleri hesaplandı. Farklı sıcaklık derecelerinde inkübasyon süresi-aktivite grafiği çizildi. (Şekil 3.12)



Şekil 3.12 Farklı sıcaklıklarda ve farklı sürelerle maruz bırakılmış XO enziminin aktivite ölçüm grafiği

3.8 Antibiyotiklerin Ksantin Oksidaz Enzimi Üzerine Afinite Etkisinin Araştırılması

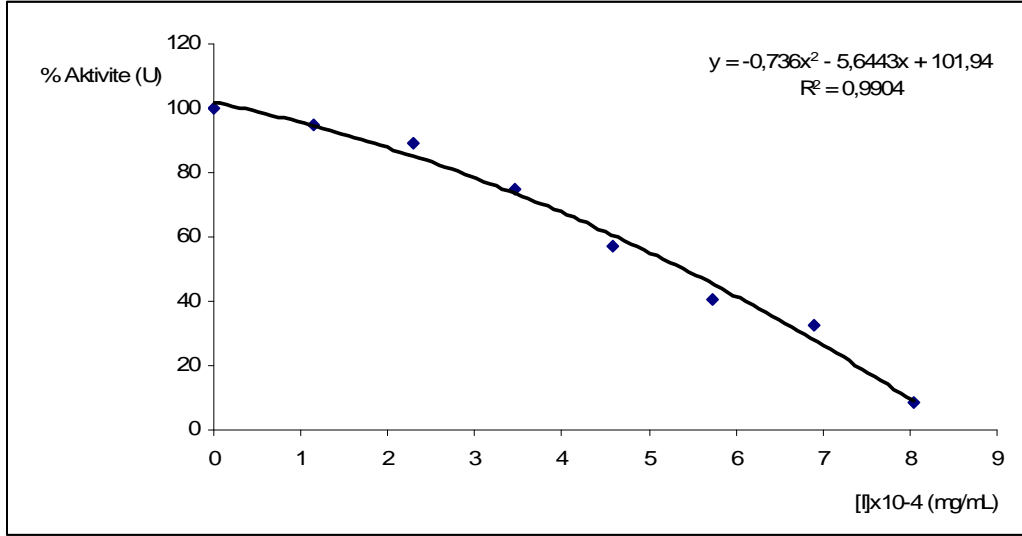
Bölüm 2’de anlatıldığı şekilde işlem yapıldı ve elde edilen absorbans değerlerinden % aktiviteler hesaplandı. % Aktivite-[I] grafikleri çizildi. (Şekil 3.13-3.19) Bu grafiklerden yararlanarak her bir antibiyotik için IC₅₀ değerleri hesaplandı (Çizelge 3.14).



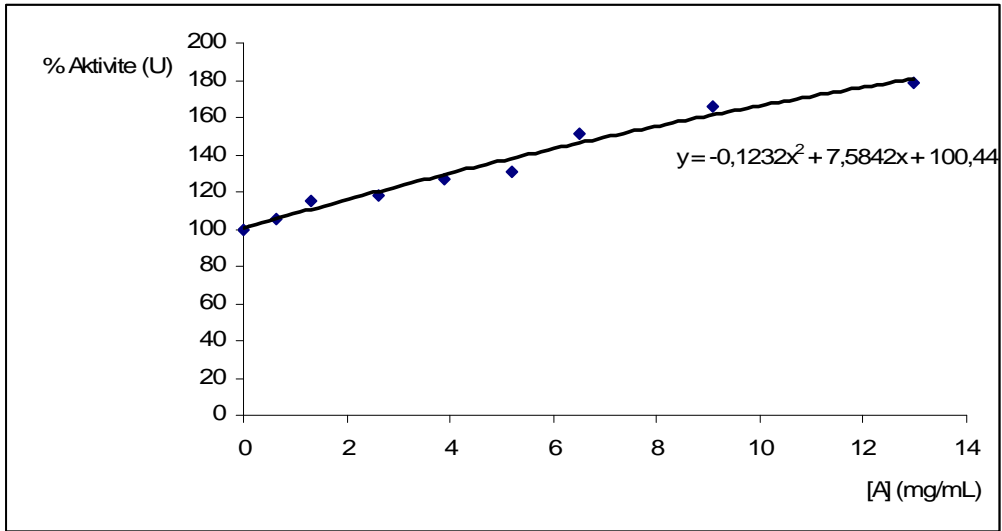
Şekil 3.13 Saflaştırılmış Ksantin oksidaz enzimi üzerine Gentamisin sülfat antibiyotiğinin % aktivite-[A] grafiği

Çizelge 3.6 Ksantin oksidaz enzimi üzerinde afinite etkisi gösteren gentamisin sülfatın çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

pH=7,6 50 mM Tris tamponu (μ l)	Antibiyotik	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Substrat çözeltisinin hacmi (μ l)	Antibiyotik Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Küvetteki Antibiyotik Kons. [A] (mg/ml) $\times 10^{-2}$	Δ OD (295 nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite
435	Gentamisin Sülfat	70	500	-	-	0,180	269,19	100
430				5	3,64	0,189	282,66	105
425				10	7,27	0,193	288,64	107,22
415				20	14,54	0,236	352,95	131,11
405				30	21,82	0,258	385,85	143,33
395				40	29,10	0,267	399,31	148,33
385				50	36,37	0,282	421,74	156,66
365				70	50,92	0,364	544,37	202,22
335				100	72,74	0,389	581,76	216,11



Şekil 3.14 Saflaştırılmış Ksantin oksidaz enzimi üzerine Sefazolin sodyum antibiyotiğinin % aktivite-[I] grafiği ($IC_{50} = 5.40 \times 10^{-4}$ mg/mL)



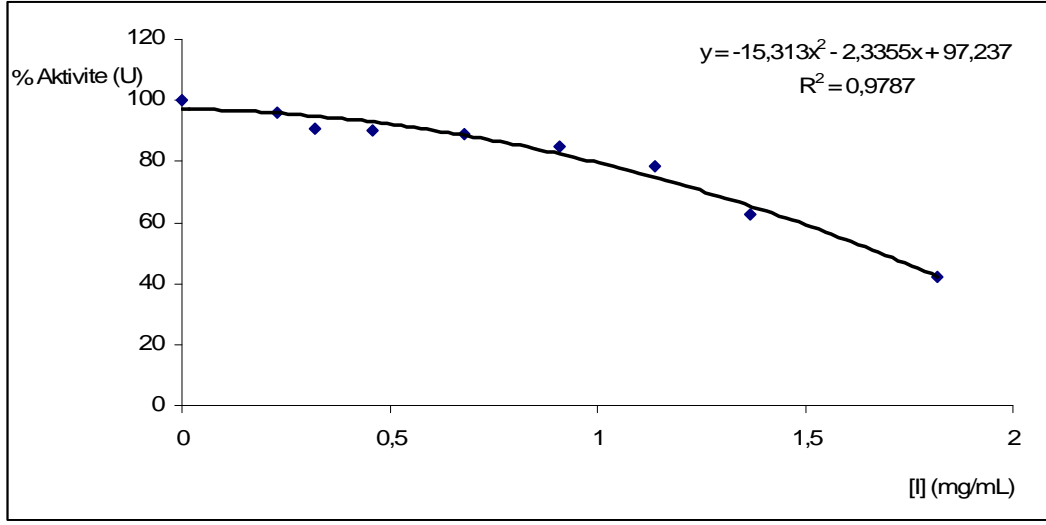
Şekil 3.15 Saflaştırılmış Ksantin oksidaz enzimi üzerine Sodyum ampisilin antibiyotiğinin % aktivite-[A] grafiği

Çizelge 3.7 Ksantin oksidaz enzimi üzerinde afinite etkisi gösteren sefazolin sodyum çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

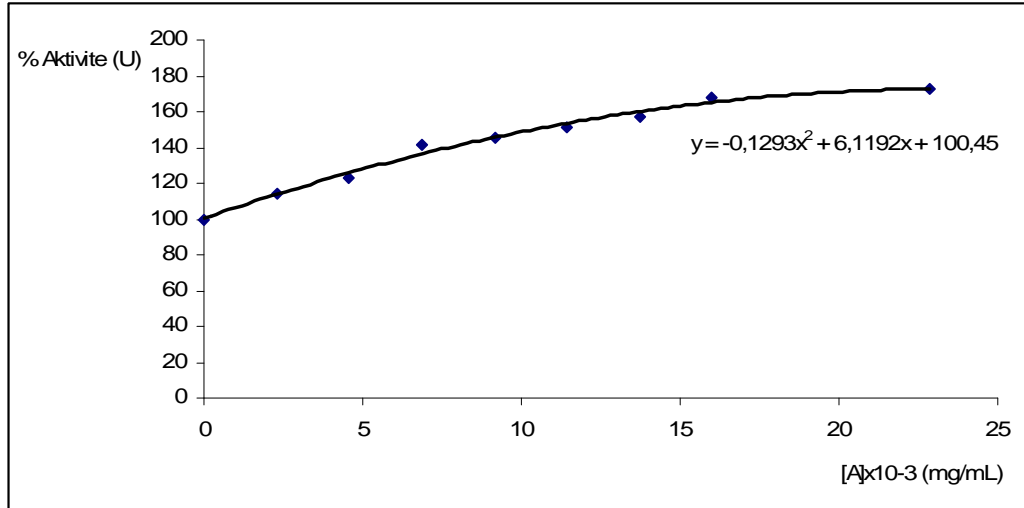
pH=7,6 50 mM Tris tamponu (μ l)	Antibiyotik	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Substrat çözeltisinin hacmi (μ l)	Antibiyotik Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Küvetteki Antibiyotik Kons. [I] (mg/ml) $\times 10^{-4}$	Δ OD (295 nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite
435	Sefazolin Sodyum	70	500	-	-	0,258	385,85	100
434				1	1,15	0,245	366,41	94,96
433				2	2,3	0,230	343,97	89,15
432				3	3,45	0,193	288,64	74,81
431				4	4,59	0,148	221,34	57,36
430				5	5,74	0,105	157,03	40,7
429				6	6,89	0,084	125,62	32,56
428				7	8,04	0,022	32,90	8,53

Çizelge 3.8 Ksantin oksidaz enzimi üzerinde afinite etkisi gösteren Sodyum ampisilin çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

pH=7,6 50 mM Tris tamponu (μ l)	Antibiyotik	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Substrat çözeltisinin hacmi (μ l)	Antibiyotik Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Küvetteki Antibiyotik Kons. [A] (mg/ml)	Δ OD (295 nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite
435	Sodyum ampisilin	70	500	-	-	0,216	323,03	100
430				5	0,65	0,228	340,98	105,55
425				10	1,36	0,249	372,39	115,28
415				20	2,71	0,256	382,86	118,52
405				30	4,07	0,273	408,28	126,39
395				40	5,42	0,282	421,74	130,55
385				50	6,78	0,327	489,04	151,39
365				70	9,50	0,358	535,40	165,74
335				100	13,57	0,386	577,28	178,70



Şekil 3.16 Saflaştırılmış Ksantin oksidaz enzimi üzerine Klaritromisin antibiyotiğinin % aktivite-[I] grafiği (IC₅₀= 1.68 mg/mL)



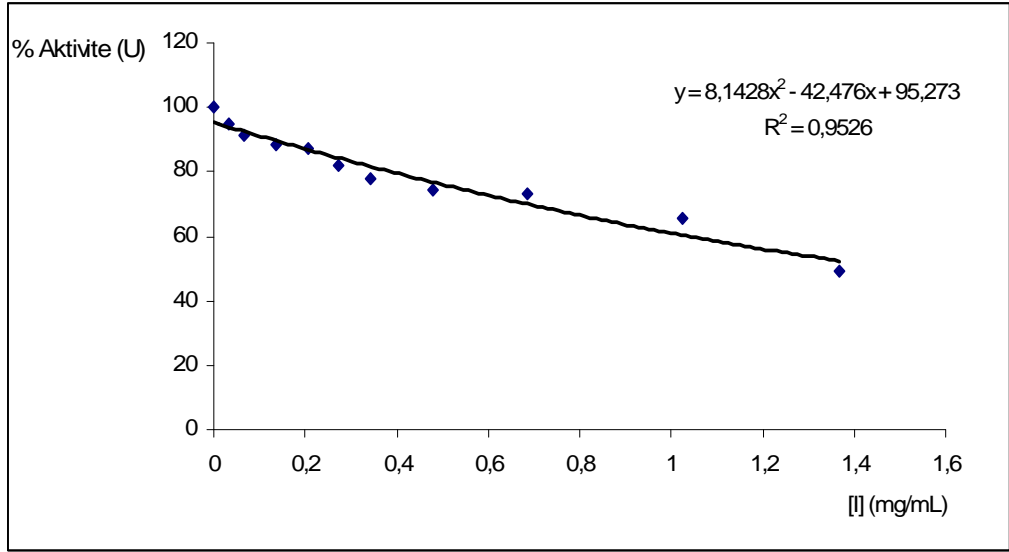
Şekil 3.17 Saflaştırılmış Ksantin oksidaz enzimi üzerine Rifamisin SV antibiyotiğinin % aktivite-[A] grafiği

Çizelge 3.9 Ksantin oksidaz enzimi üzerinde afinite etkisi gösteren Klaritromisin çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

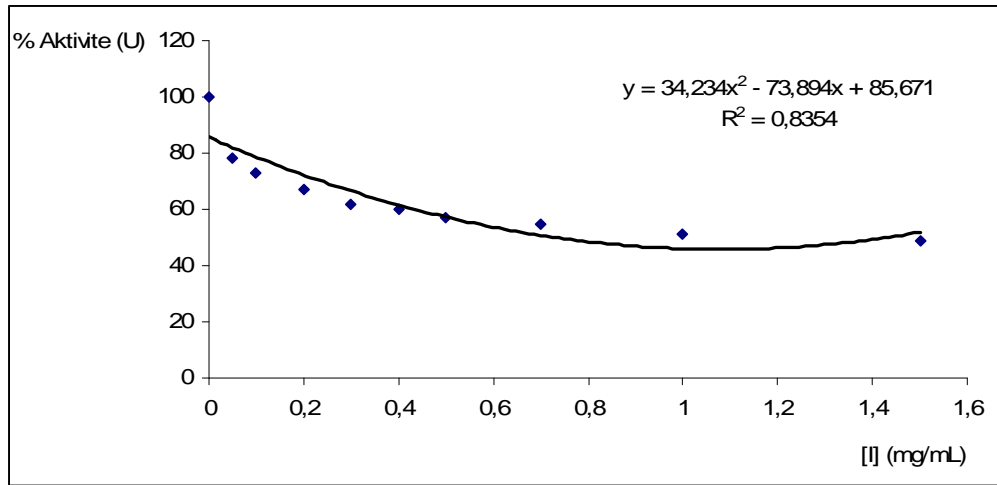
pH=7,6 50 mM Tris tamponu (μ l)	Antibiyotik	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Substrat çözeltisinin hacmi (μ l)	Antibiyotik Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Küvetteki Antibiyotik Kons. [I] (mg/ml)	Δ OD (295 nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite
435	Klaritromisin	70	500	-	-	0,266	397,81	100
430				5	0,23	0,256	382,86	96,24
428				7	0,32	0,242	361,92	90,98
425				10	0,46	0,240	358,93	90,22
420				15	0,68	0,237	354,44	89,1
415				20	0,91	0,226	337,99	84,96
410				25	1,14	0,208	311,07	78,19
405				30	1,37	0,166	248,26	62,41
395				40	1,82	0,112	167,50	42,10

Çizelge 3.10 Ksantin oksidaz enzimi üzerinde afinite etkisi gösteren Rifamisin SV çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

pH=7,6 50 mM Tris tamponu (µl)	Antibiyotik	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µl)	Substrat çözeltisinin hacmi (µl)	Antibiyotik Çözeltisinin Hacmi (µl)	Küvetteki Antibiyotik Kons. [A] (mg/ml)x10 ⁻³	ΔOD (295 nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite
435	Rifamisin SV	70	500	-	-	0,201	314,06	100
434				1	2,29	0,230	343,97	114,43
433				2	4,58	0,247	369,40	122,88
432				3	6,86	0,285	426,23	141,79
431				4	9,15	0,292	436,70	145,27
430				5	11,44	0,304	454,64	151,24
429				6	13,73	0,316	472,59	157,21
428				7	16,01	0,338	505,49	168,16
425				10	22,87	0,347	518,95	172,63



Şekil 3.18 Safleştirilmiş Ksantin oksidaz enzimi üzerine Klindamisin fosfat antibiyotiğinin % aktivite-[I] grafiği ($IC_{50} = 1.39$ mg/mL)



Şekil 3.19 Safleştirilmiş Ksantin oksidaz enzimi üzerine Kanamisin sülfat antibiyotiğinin % aktivite-[I] grafiği ($IC_{50} = 1.49$ mg/mL)

Çizelge 3.11 Ksantin oksidaz enzimi üzerinde afinite etkisi gösteren Klindamisin fosfat çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

pH=7,6 50 mM Tris tamponu (μ l)	Antibiyotik	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Substrat çözeltisinin hacmi (μ l)	Antibiyotik Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Küvetteki Antibiyotik Kons. [I] (mg/ml) $\times 10^{-2}$	Δ OD (295 nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite
435	Klindamisin fosfat	70	500	-	-	0,284	424,73	100
430				5	3,42	0,269	402,30	94,72
425				10	6,84	0,259	387,34	91,10
415				20	13,69	0,251	375,38	88,38
405				30	20,53	0,247	369,40	86,97
395				40	27,37	0,233	348,46	82,04
385				50	34,22	0,221	330,51	77,82
365				70	47,90	0,211	315,56	74,30
335				100	68,43	0,208	311,07	73,24
285				150	102,65	0,186	278,17	65,5
235				200	136,90	0,140	209,37	49,29

Çizelge 3.12 Ksantin oksidaz enzimi üzerinde afinite etkisi gösteren kanamisin sülfat çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, antibiyotik konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

pH=7,6 50 mM Tris tamponu (μ l)	Antibiyotik	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Substrat çözeltisinin hacmi (μ l)	Antibiyotik Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Küvetteki Antibiyotik Kons. [I] (mg/ml)	Δ OD (295 nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite
435	Kanamisin sülfat	70	500	-	-	0,448	670,00	100
430				5	0,05	0,350	523,44	78,12
425				10	0,1	0,328	490,53	73,21
415				20	0,2	0,301	450,16	67,19
405				30	0,3	0,278	415,76	62,05
395				40	0,4	0,270	403,79	60,27
385				50	0,5	0,255	381,36	56,92
365				70	0,7	0,244	364,91	54,46
335				100	1	0,230	343,97	51,34
285				150	1,5	0,220	329,02	49,11

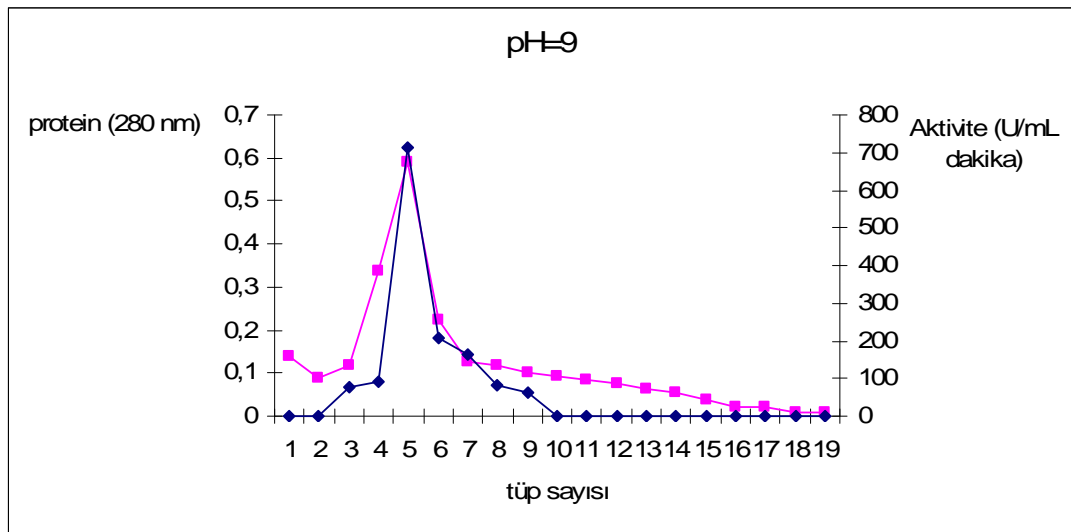
Çizelge 3.13 İnhibitörlerin XO enzimi üzerindeki IC₅₀ değerleri

İnhibitör	IC ₅₀ Değerleri (mg/mL)
Gentamisin sülfat	Aktive etti
Sefazolin Sodyum	5.40x10 ⁻⁴
Sodyum Ampisilin	Aktive etti
Klaritromisin	1.68
Rifamisin SV	Aktive etti
Klindamisin Fosfat	1.39
Kanamisin Sülfat	1.49

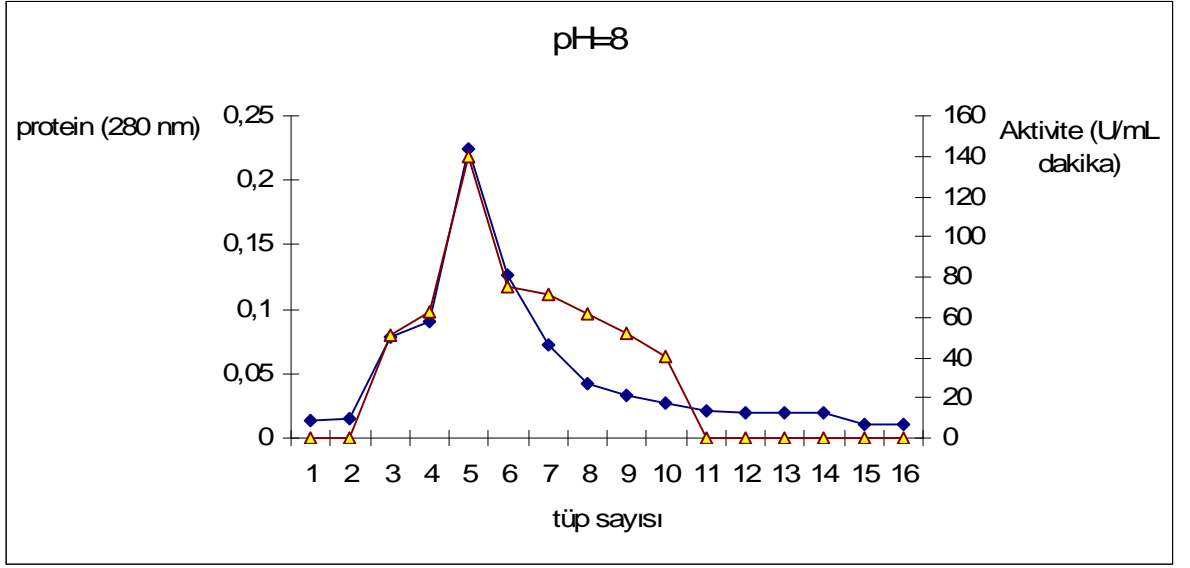
3.9 Kolon Kapasitesine pH'ın Etkisi

Saflaştırma işlemi daha önce tarafımızdan sentezlenen Sephorose-4B-L-Trozin-Benzamidin yapısına sahip afinite jeli ile aşağıdaki şekilde farklı pH'lardaki tampon çözeltiler kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

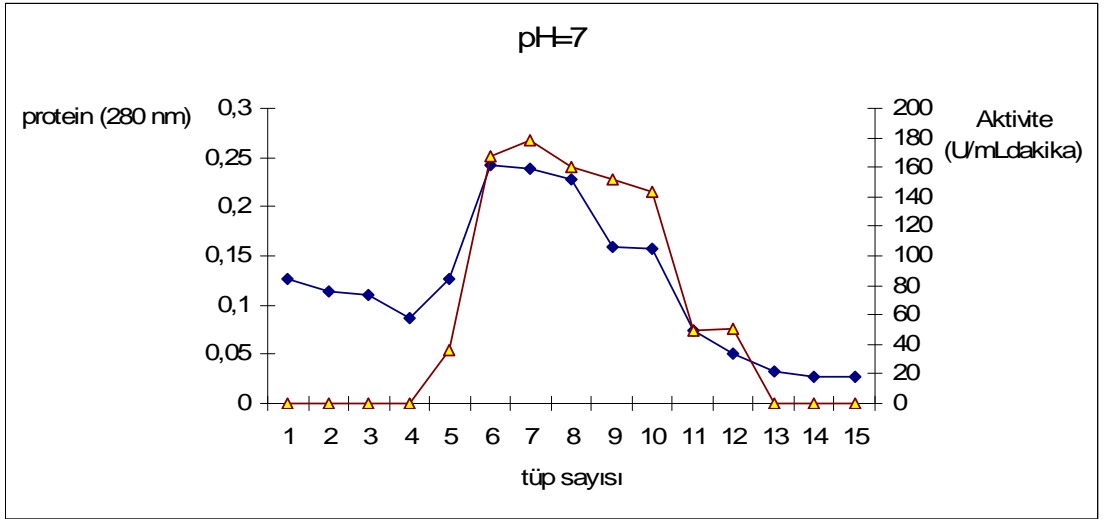
Bölüm 2'de anlatıldığı üzere işlem yapıldı ve elüatlar 2 mL'lik fraksiyonlar halinde toplandı her bir fraksiyona aktivite ölçümü ve protein miktar tayini yapıldı ve saflaştırma grafikleri çizildi (Şekil 3.20- 3.24).



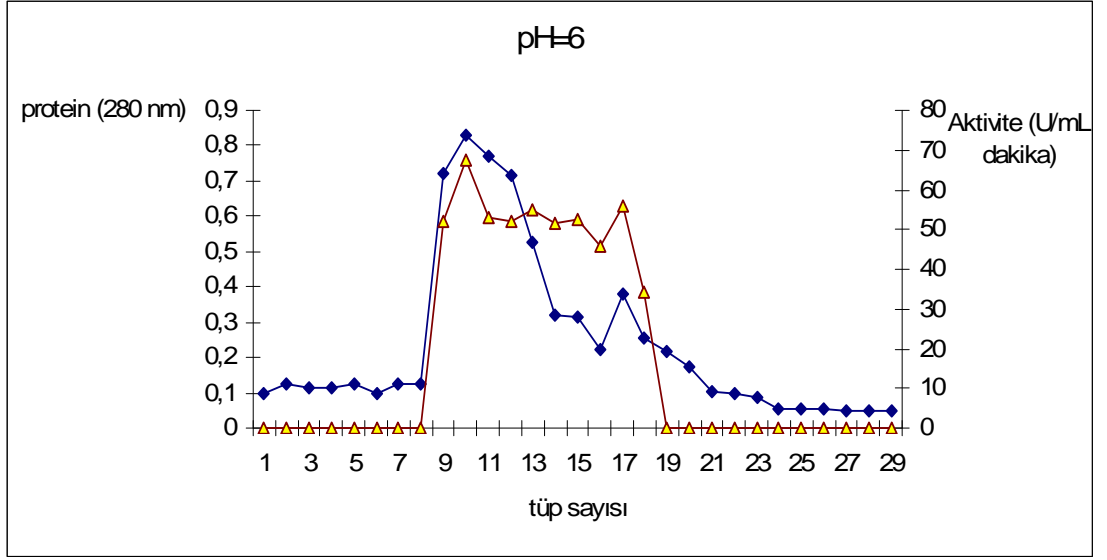
Şekil 3.20 Ksantin oksidaz enziminin pH=9 tamponları kullanılarak elde edilen saflaştırma grafiği



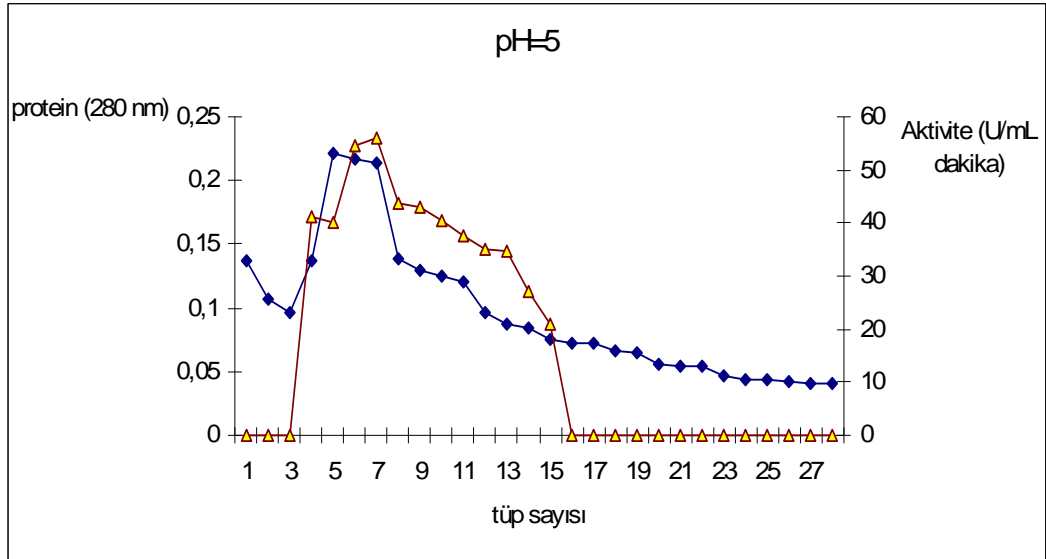
Şekil 3.21 Ksantin oksidaz enziminin pH=8 tamponları kullanılarak elde edilen saflaştırma grafiği



Şekil 3.22 Ksantin oksidaz enziminin pH=7 tamponları kullanılarak elde edilen saflaştırma grafiği

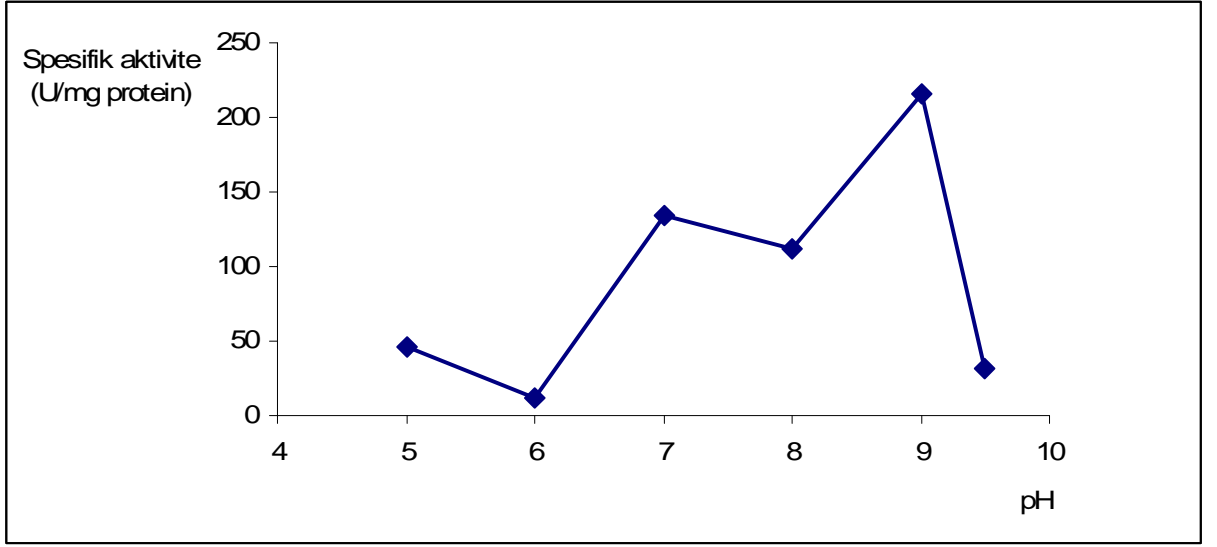


Şekil 3.23 Ksantin oksidaz enziminin pH=6 tamponları kullanılarak elde edilen saflaştırma grafiği



Şekil 3.24 Ksantin oksidaz enziminin pH=5 tamponları kullanılarak elde edilen saflaştırma grafiği

Farklı pH tamponlarıyla saflaştırılmış ksantin oksidaz enziminin pH-spesifik aktivite grafiği aşağıda verilmiştir (Şekil 3.25).

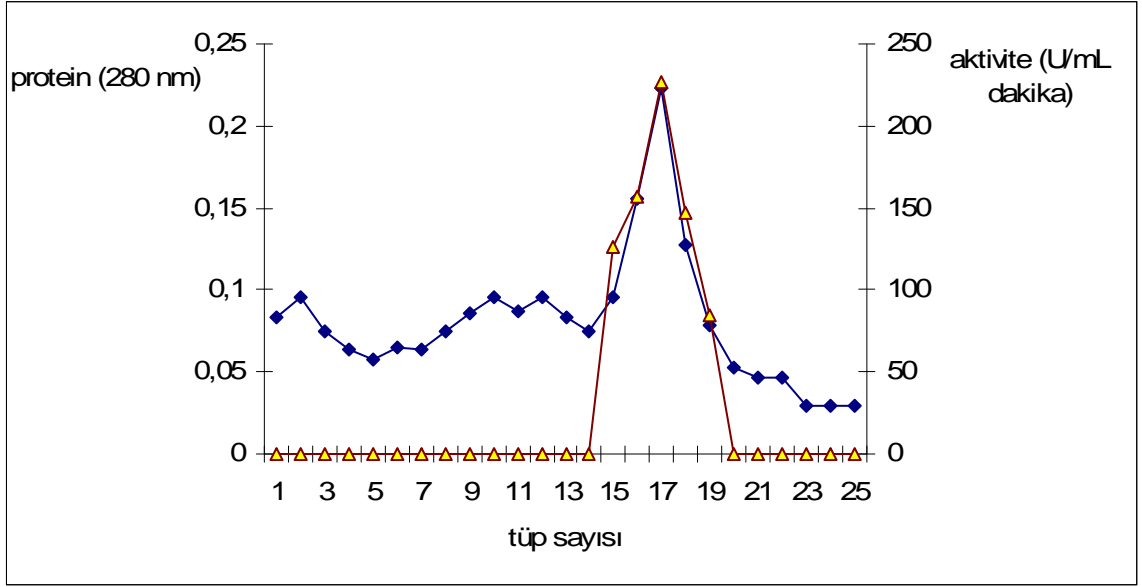


Şekil 3.25 pH- Aktivite grafiği

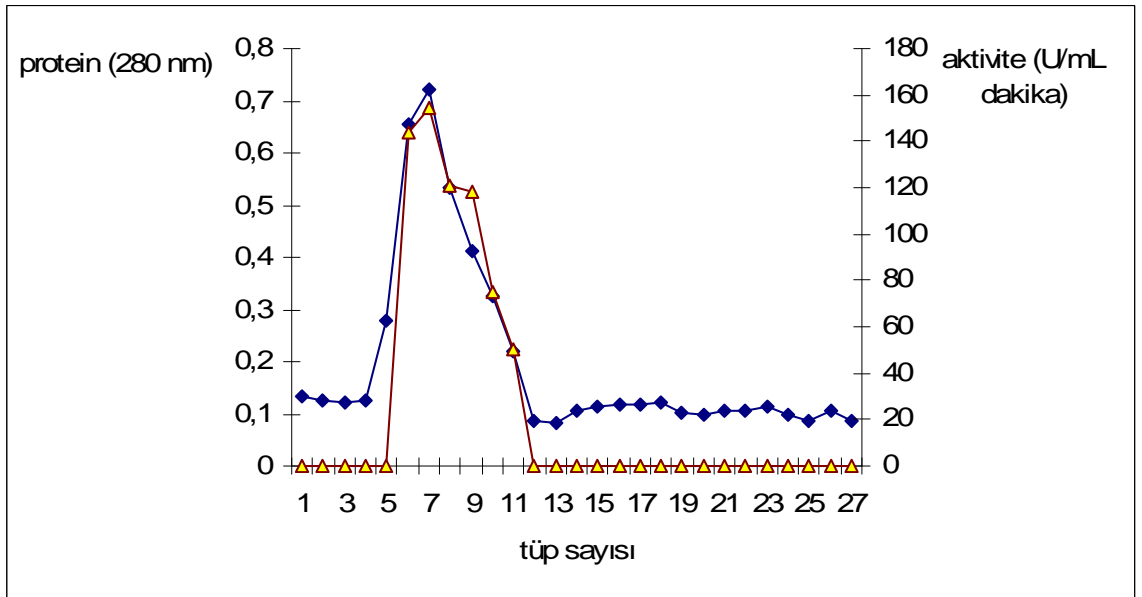
3.10 Kolon Kapasitesine İyonik Şiddetin Etkisi

Safılaştırma işlemleri daha önce tarafımızdan sentezlenen Sepharose-4B-L-Trozin-Benzamidin yapısına sahip afinite jeli ile gerçekleştirildi.

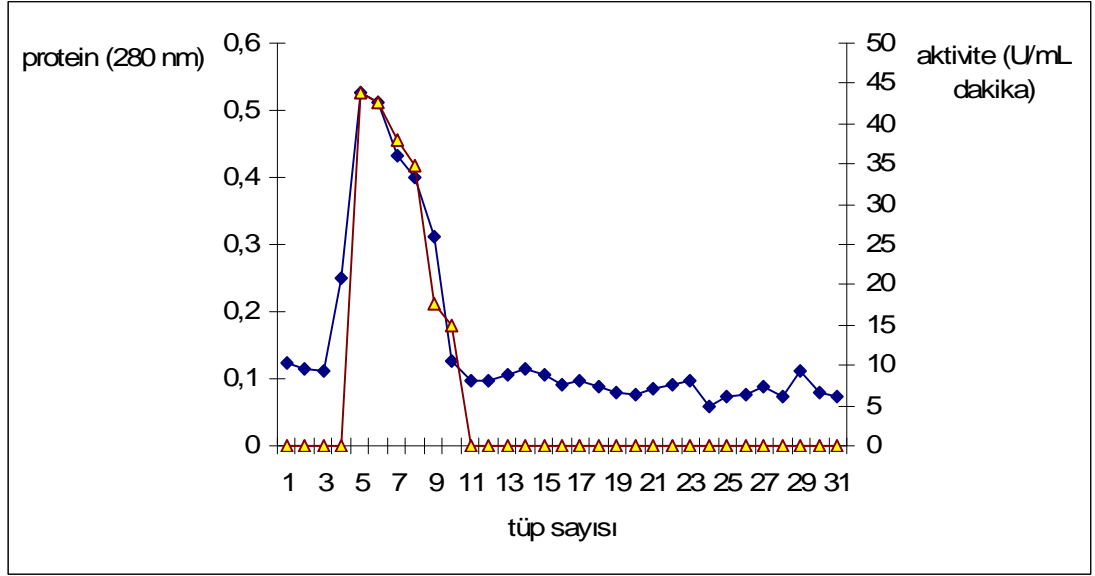
Bölüm 2’de anlatıldığı şekilde işlem yapıldı ve elüatlar 2 mL’lik fraksiyonlar şeklinde toplandı ve her bir fraksiyona aktivite ölçümü ve protein miktar tayini yapıldı ve safılaştırma grafikleri çizildi (Şekil 3.26- 3.28).



Şekil 3.26 Ksantin oksidaz enziminin 0,1 M Na₂SO₄ tuzu kullanılarak hazırlanan tamponlarla elde edilen saflaştırma grafiği



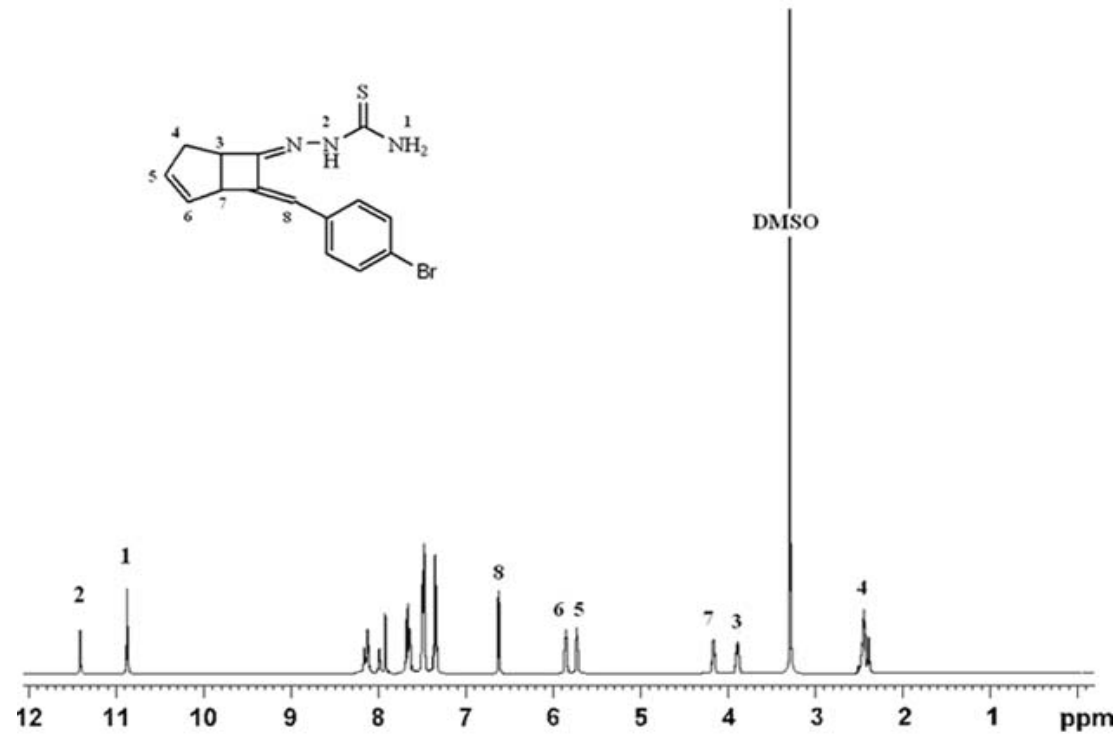
Şekil 3.27 Ksantin oksidaz enziminin 0,5 M Na₂SO₄ tuzu kullanılarak hazırlanan tamponlarla elde edilen saflaştırma grafiği



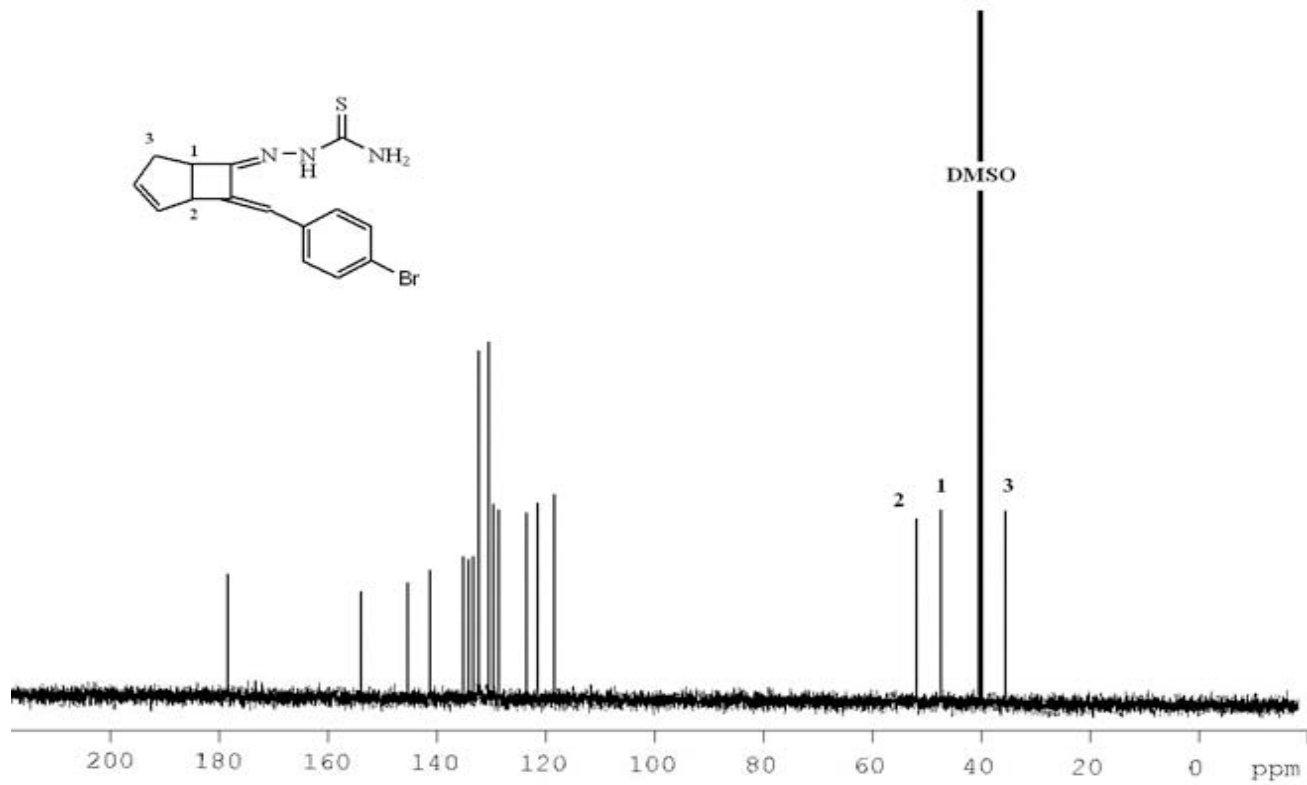
Şekil 3.28 Ksantin oksidaz enziminin 1,0 M Na₂SO₄ tuzu kullanılarak hazırlanan tamponlarla elde edilen saflaştırma grafiği

3.11 Tiyosemikarbazon Türevlerinin NMR Görüntüleri

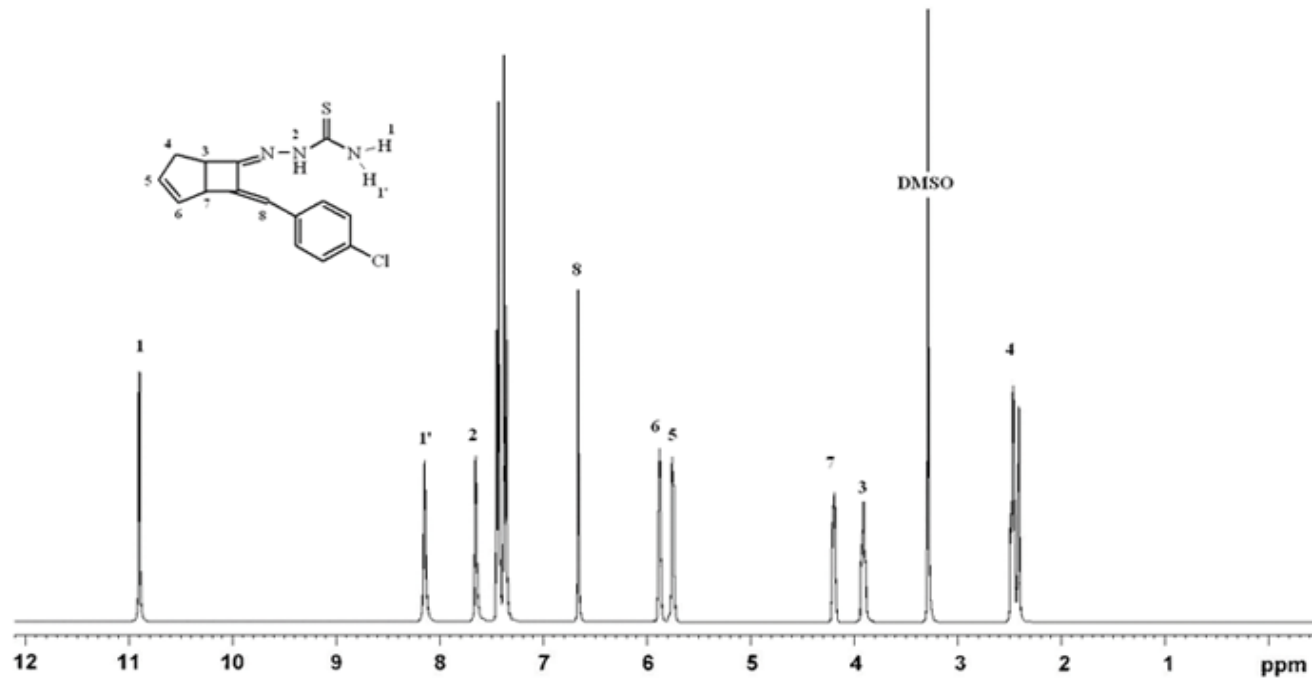
Orijinal olarak sentezlenen tiyosemikarbazon bileşiklerinin NMR spektrumları aşağıda verildi (Şekil 3.29-3.36).



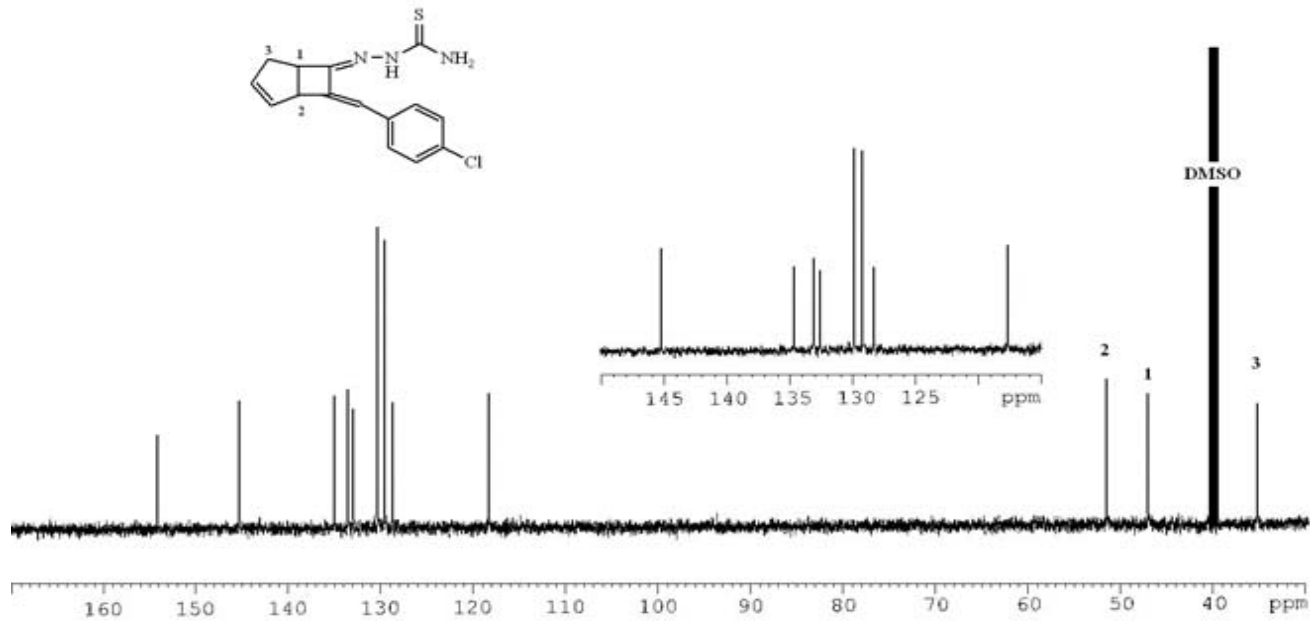
Şekil 3.29 Btc bileşiğinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu



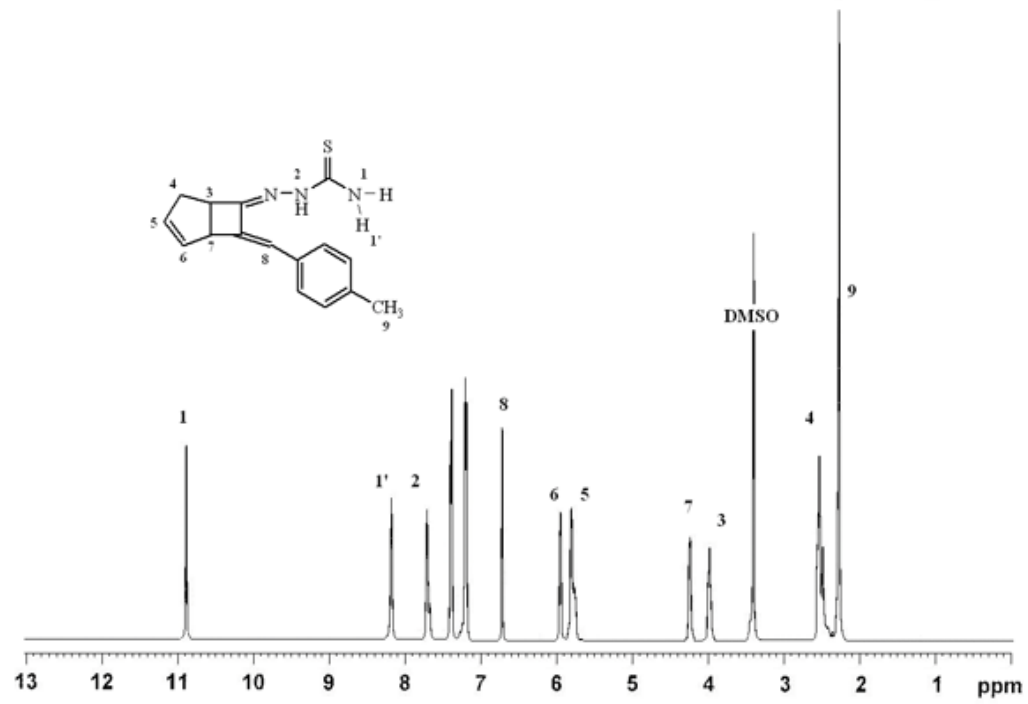
Şekil 3.30 Btc bileşiğinin ^{13}C - NMR spektrumu



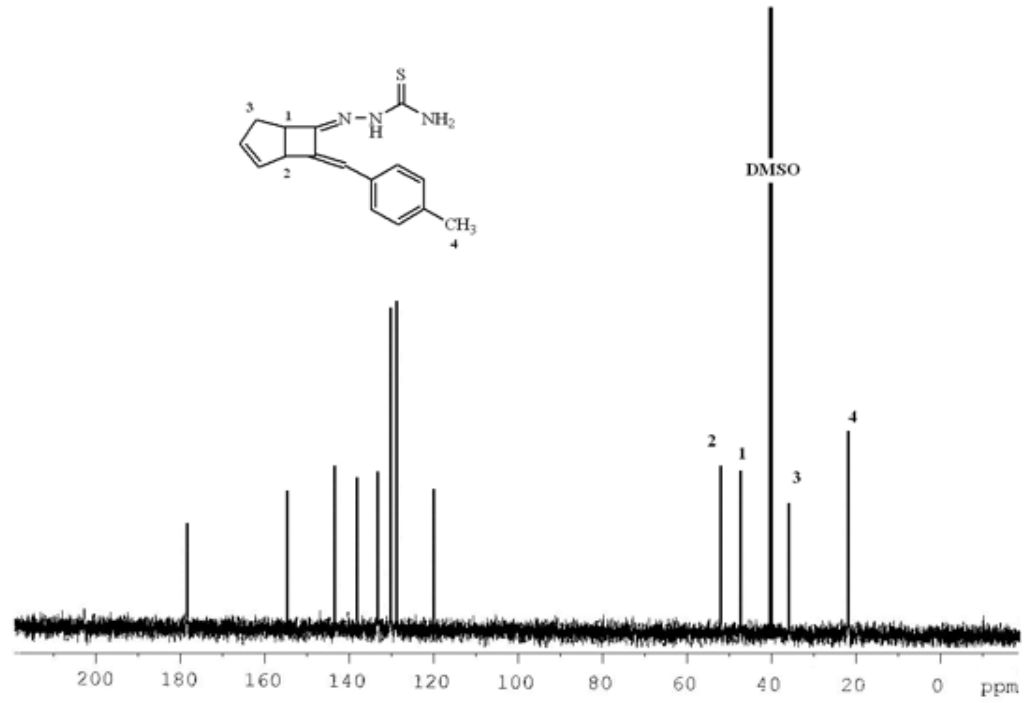
Şekil 3.31 Ctc bileşiğinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu



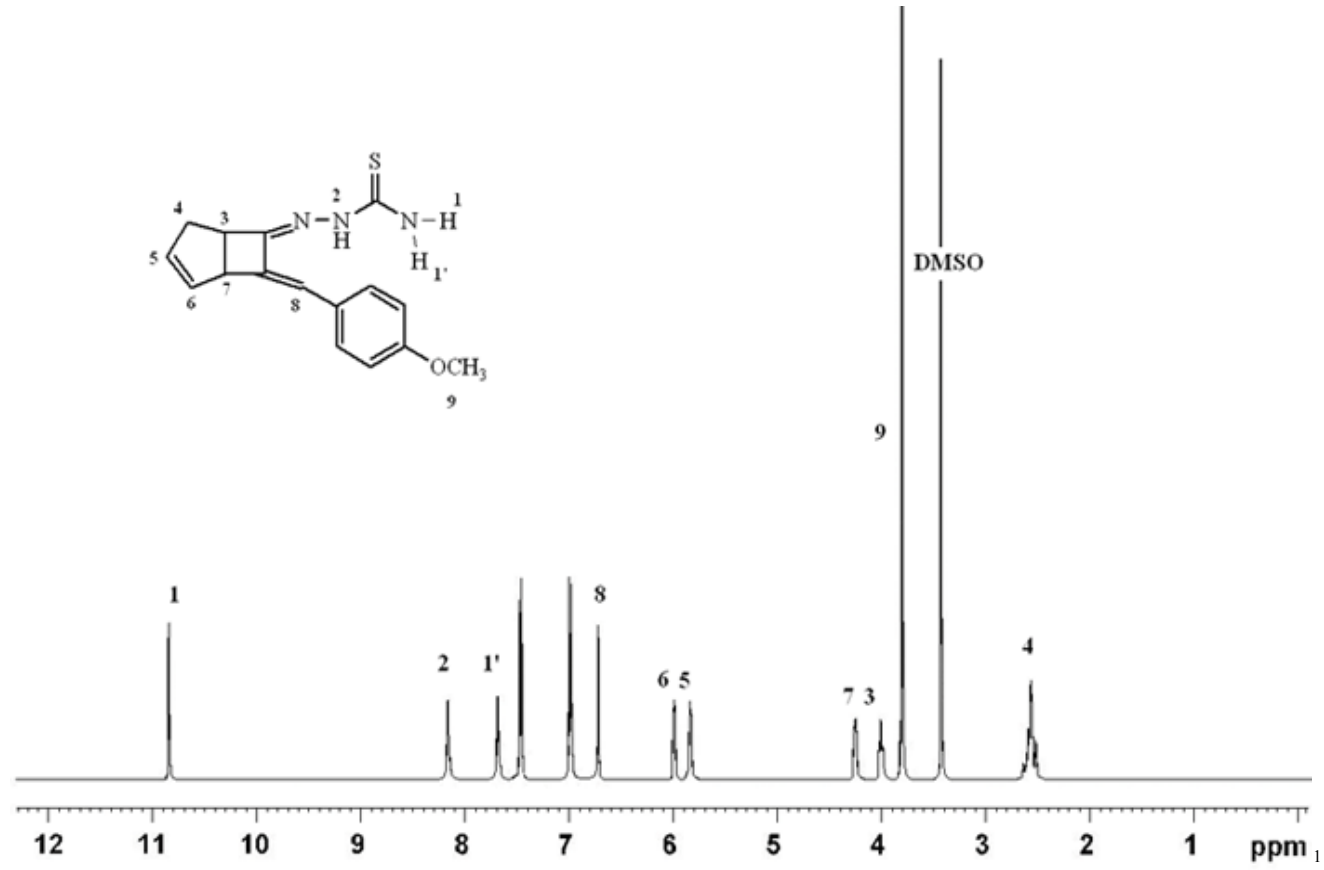
Şekil 3.32 Ctc bileşiğinin ^{13}C - NMR spektrumu



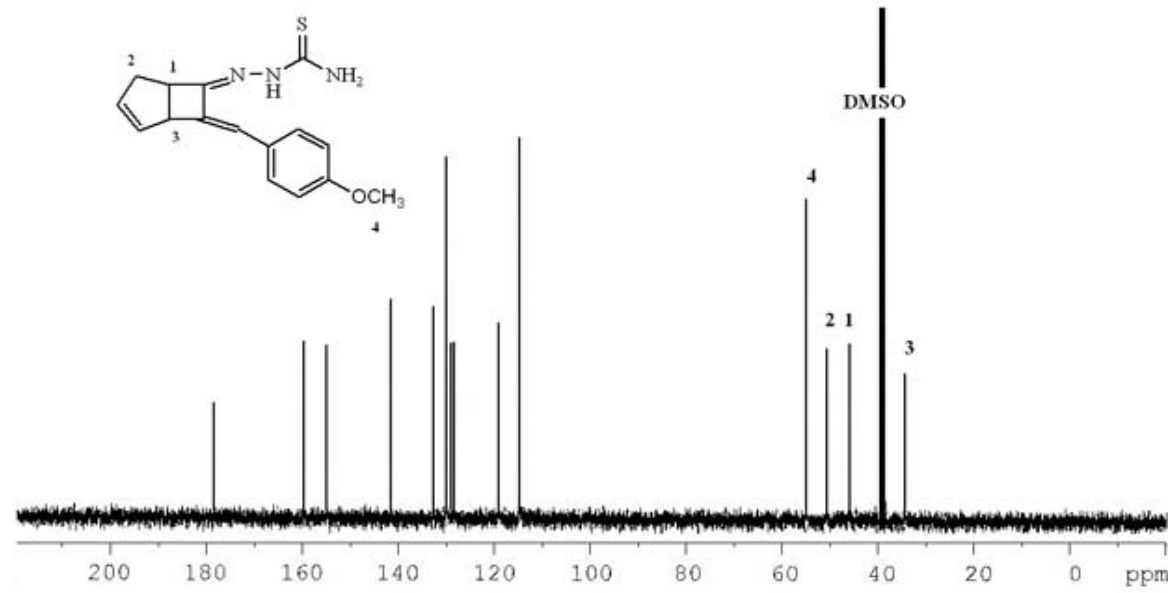
Şekil 3.33 4Mtc bileşiğinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu



Şekil 3.34 4Mtc bileşiğinin ^{13}C - NMR spektrumu



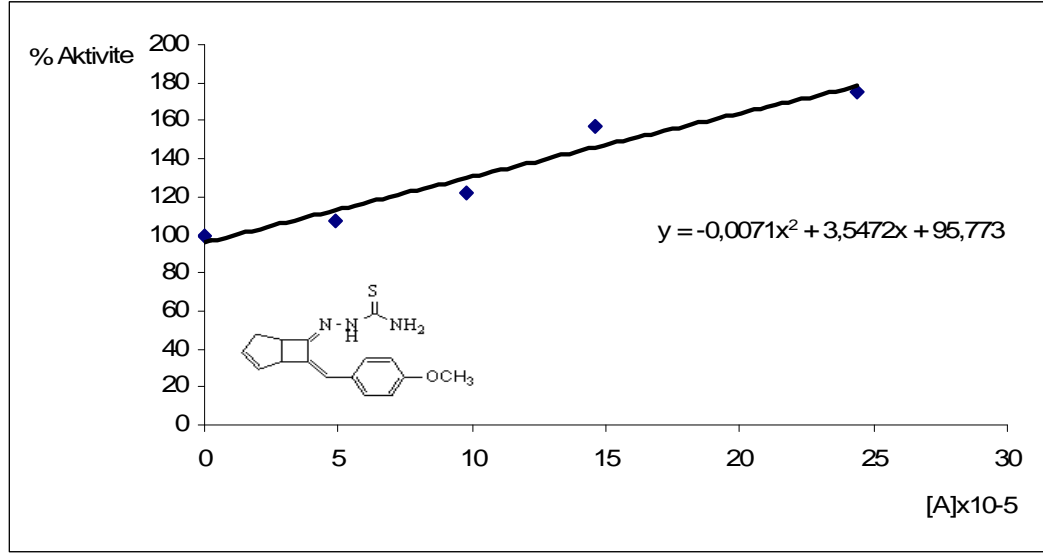
Şekil 3.35 Mtc bileşiminin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu



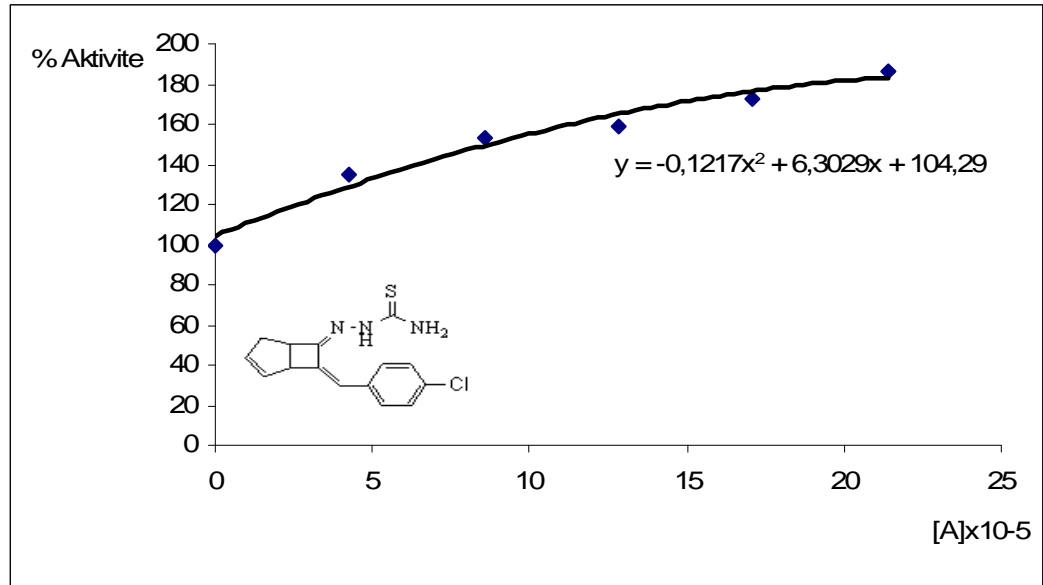
Şekil 3.36 Mtc bileşiğinin ^{13}C - NMR spektrumu

3.11.1 Tiyosemikarbazon Türevlerinin Ksantin Oksidaz Enzimi Üzerine Afinité Etkisinin Araştırılması

Bölüm 2’de anlatıldığı gibi işlemler yapıldı ve elde edilen absorbans değerlerinden % aktivite hesaplandı. % Aktivite-[A] grafikleri çizildi. (Şekil 3.37-3.40)



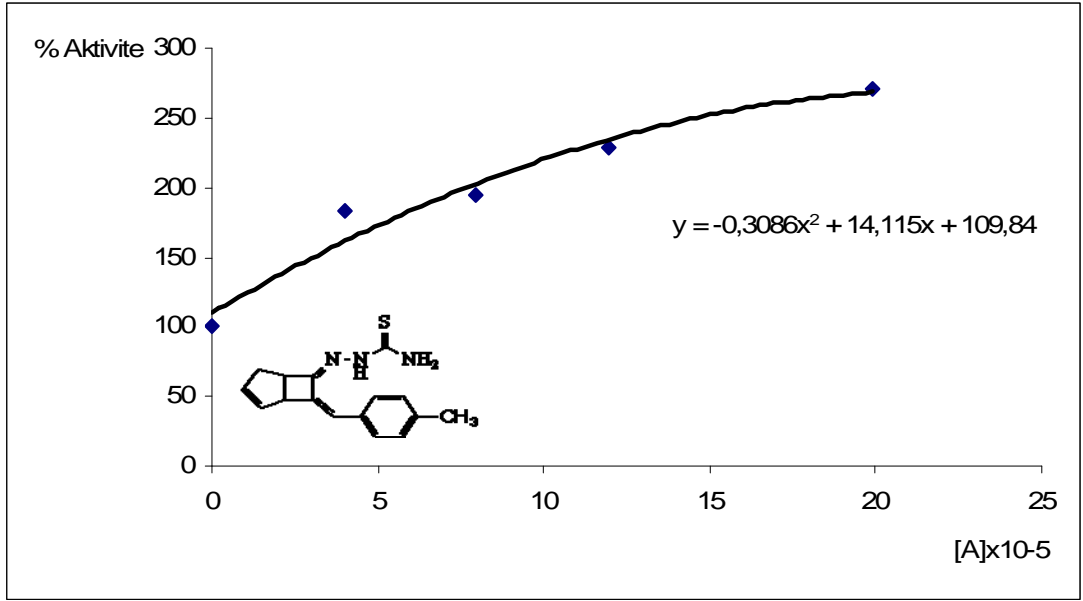
Şekil 3.37 Mtc maddesinin XOR enzimi ile % Aktivite-[A] grafiği



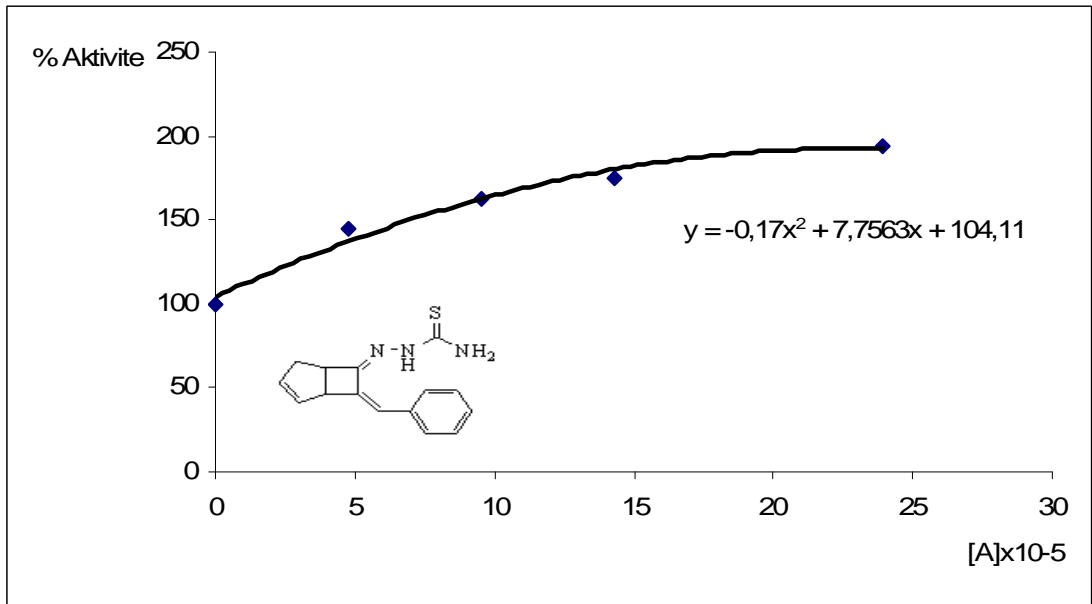
Şekil 3.38 Ctc maddesinin XOR enzimi ile % Aktivite-[A] grafiği

Çizelge 3.14 Ksantin Oksidaz enzimi üzerine gösteren tiyosemikarbazon bileşiklerinin afinite etkisinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, tiyosemikarbazon bileşiklerinin konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

pH=7,6 50 mM Tris tamponu (μ l)	Tiyosemikarbazon	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Substrat çözeltilisinin hacmi (μ l)	Tiyosemikarbazon Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Küvetteki Tiyosemikarbazon Kons. [A] ($M \times 10^{-5}$)	Δ OD (295 nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite
435	Mtc maddesi	70	500	-	-	0,078	116,65	100
434				1	4,87	0,084	125,62	107,69
433				2	9,75	0,122	182,45	122,41
432				3	14,63	0,184	275,18	156,89
430				5	24,38	0,197	294,62	175,56
435	Ctc maddesi	70	500	-	-	0,182	272,19	100
434				1	4,28	0,246	367,90	135,16
433				2	8,56	0,279	417,25	153,3
432				3	12,83	0,290	433,70	159,34
431				4	17,11	0,315	471,09	173,08
430				5	21,39	0,340	508,48	186,81



Şekil 3.39 4Mtc maddesinin XOR enzimi ile % Aktivite-[A] grafiği



Şekil 3.40 Btc maddesinin XOR enzimi ile % Aktivite-[A] grafiği

Çizelge 3.15 Ksantin Oksidaz enzimi üzerine gösteren tiyosemikarbazon bileşiklerinin afinite etkisinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, tiyosemikarbazon bileşiklerinin konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

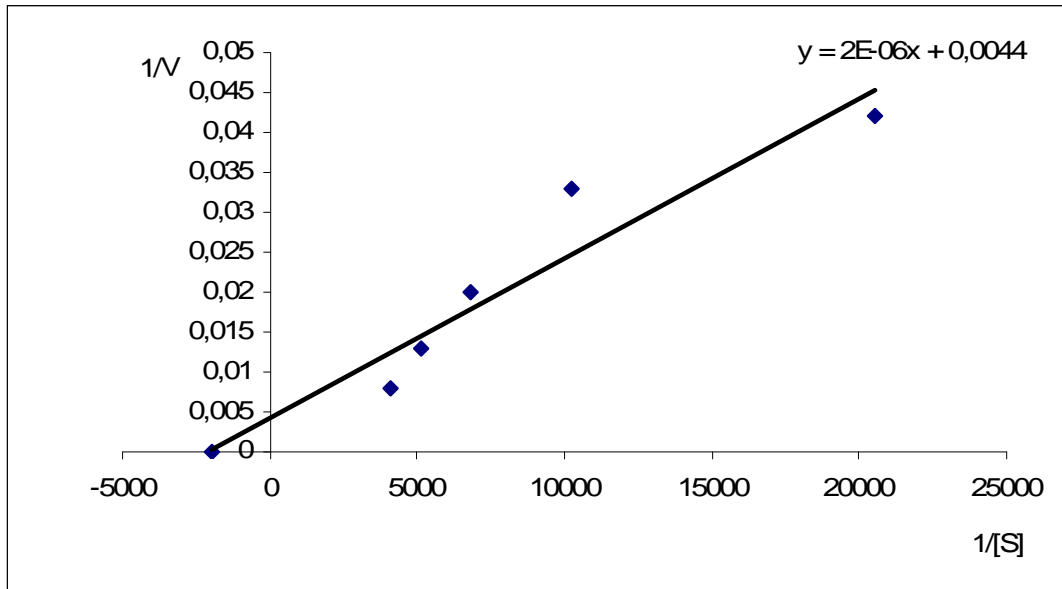
pH=7,6 50 mM Tris tamponu (µl)	Tiyosemikarbazon	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Substrat çözeltilisinin hacmi (µl)	Tiyosemikarbazon Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Küvetteki Tiyosemikarbazon Kons. [A] (M x10 ⁻⁵)	ΔOD (295 nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite
435	4Mtc maddesi	70	500	-	-	0,132	197,41	100
434				1	3,98	0,241	360,42	182,57
433				2	7,96	0,257	384,35	194,7
432				3	11,94	0,301	450,16	228,03
430				5	19,90	0,358	535,40	271,21
435	Btc maddesi	70	500	-	-	0,216	323,03	100
434				1	4,78	0,313	468,10	144,91
433				2	9,55	0,352	526,43	162,96
432				3	14,33	0,378	565,31	175
430				5	23,88	0,419	626,63	193,98

3.12.2 Tiyosemikarbazon Bileşiklerinin Kinetik Sabitlerinin Belirlenmesi

3.12.2.1 Optimum şartlarda K_m ve V_{max} Değerlerinin Bulunması

Bölüm 2’de anlatıldığı gibi işlemler yapıldı ve aktivite ölçümünü farklı pH’larda hazırlanan Tris-HCl tamponları kullanarak yapıldı ve aşağıda grafikler elde edildi (Şekil 3.41- 3.51).

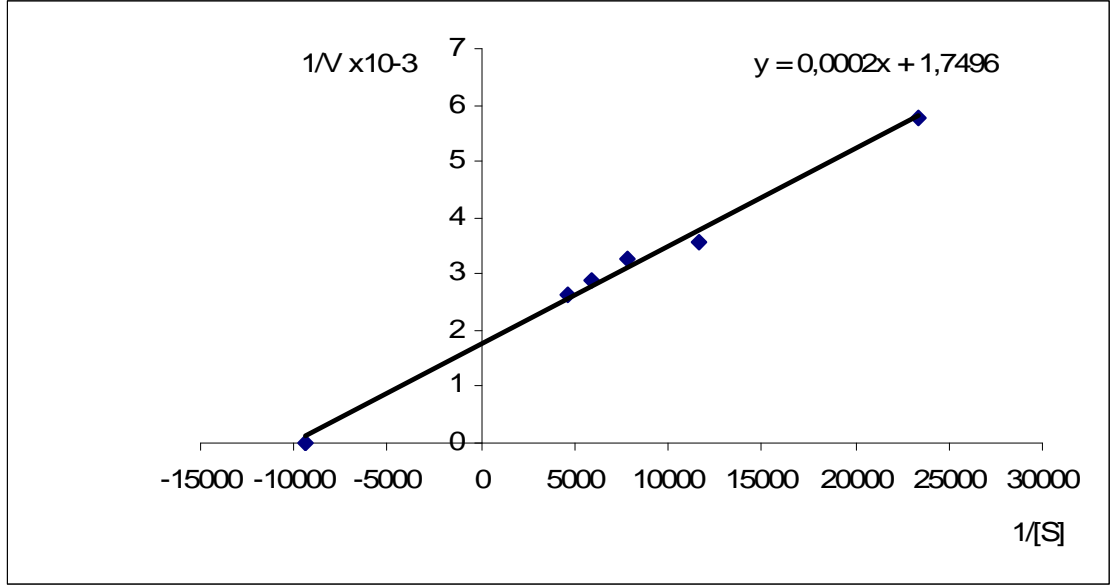
pH=9 tamponu kullanılarak yapılan ölçümlerde dikkate değer veriler elde edilemedi.



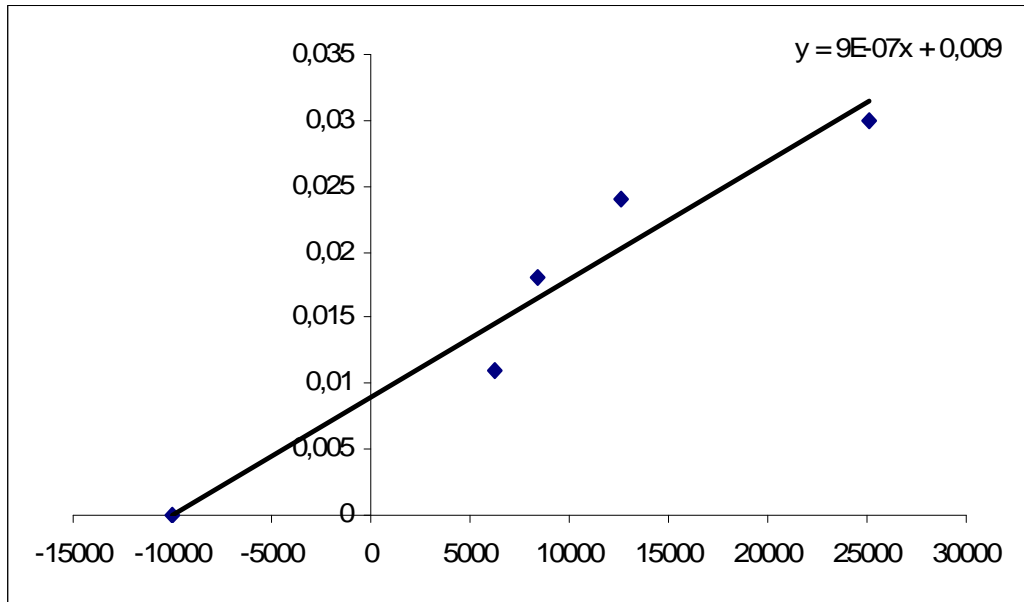
Şekil 3.41 pH=8 Tris-HCl tamponu ve substrat olarak Mtc maddesi kullanılarak kinetik sabitlerinin belirlenmesi için elde edilen grafik ($V_{max} = 277.78$ U/ml.dak , $K_M = 5 \times 10^{-4}$ M)

Çizelge 3.16 Ksantin Oksidaz enziminin pH=8 Tris-HCl tamponu ve substrat olarak Mtc maddesi kullanılarak K_m ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri,aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$.

pH=7,6 50 mM Tris tamponu (μ l)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Substrat çözeltilisinin hacmi (μ l)	Küvetteki toplam hacim (μ l)	Küvetteki Substrat Kons [S] (M)x10 ⁻⁵	Δ OD (295 nm)	Aktivite (U/ml dak)	$1/V \times 10^{-3}$	$1/[S]$
934		1		4,87	0,016	23,81	42	20533,88
933		2		9,75	0,020	30,30	33	10256,41
932	70	3	1005	14,63	0,033	50	20	6835,27
931		4		19,50	0,051	76,92	13	5128,2
930		5		24,38	0,083	125	8	4101,72



Şekil 3.42 pH=8 Tris-HCl tamponu ve substrat olarak Ctc maddesi kullanılarak kinetik sabitlerinin belirlenmesi için elde edilen grafik ($V_{max} = 0,57 \text{ U/ml.dak}$, $K_M = 1.063 \times 10^{-4} \text{ M}$)



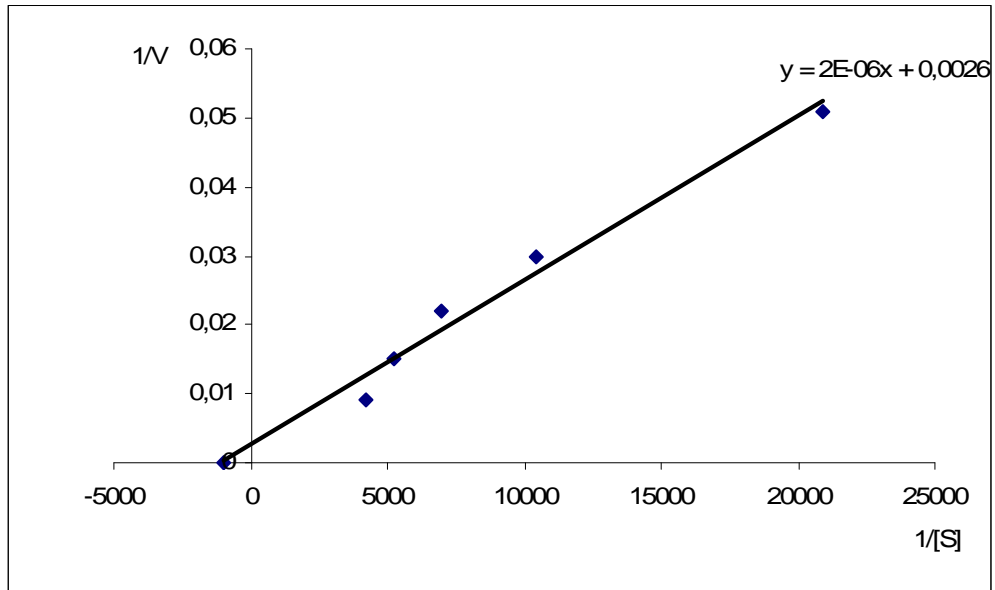
Şekil 3.43 pH=8 Tris-HCl tamponu ve substrat olarak 4Mtc maddesi kullanılarak kinetik sabitlerinin belirlenmesi için elde edilen grafik ($V_{max} = 111,11 \text{ U/ml.dak}$, $K_M = 1 \times 10^{-4} \text{ M}$)

Çizelge 3.17 Ksantin Oksidaz enziminin pH=8 Tris-HCl tamponu ve substrat olarak Ctc maddesi kullanılarak K_m ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri,aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$.

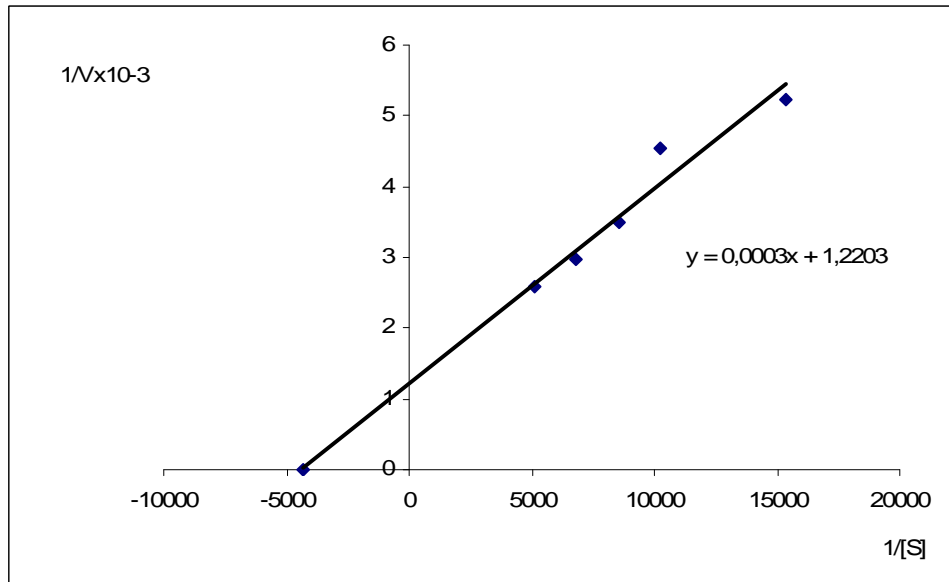
pH=7,6 50 mM Tris tamponu (μ l)	Enzim	Substrat	Küvetteki	Küvetteki	ΔOD (295 nm)	Aktivite (U/ml dak)	$1/V \times 10^{-3}$	$1/[S]$
	Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	çözeltilisinin hacmi (μ l)	toplam hacim (μ l)	Substrat Kons [S] (M) $\times 10^{-5}$				
934		1		4,28	0,116	173,61	5,76	23364,48
933		2		8,56	0,187	279,33	3,58	11682,24
932	70	3	1005	12,83	0,205	306,75	3,26	7794,23
931		4		17,11	0,232	347,22	2,88	5844,53
930		5		21,39	0,252	377,36	2,65	4675,08

Çizelge 3.18 Ksantin Oksidaz enziminin pH=8 Tris-HCl tamponu ve substrat olarak 4Mtc maddesi kullanılarak K_m ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$.

pH=7,6 50 mM Tris tamponu (μ l)	Enzim	Substrat	Küvetteki	Küvetteki	ΔOD (295 nm)	Aktivite (U/ml dak)	$1/V \times 10^{-3}$	$1/[S]$
	Çözeltisinin Hacmi (μ l)	çözeltisinin hacmi (μ l)	toplam hacim (μ l)	Substrat Kons [S] (M) $\times 10^{-5}$				
934		1		3,98	0,022	33	30	25125,63
933		2		7,96	0,028	41,67	24	12562,81
932	70	3	1005	11,94	0,037	55,55	18	8375,21
931		4		15,92	0,061	90,90	11	6281,41



Şekil 3.44 pH=8 Tris-HCl tamponu ve substrat olarak Btc maddesi kullanılarak kinetik sabitlerinin belirlenmesi için elde edilen grafik ($V_{max} = 384,61$ U/ml.dak, $K_M = 1 \times 10^{-3}$ M)



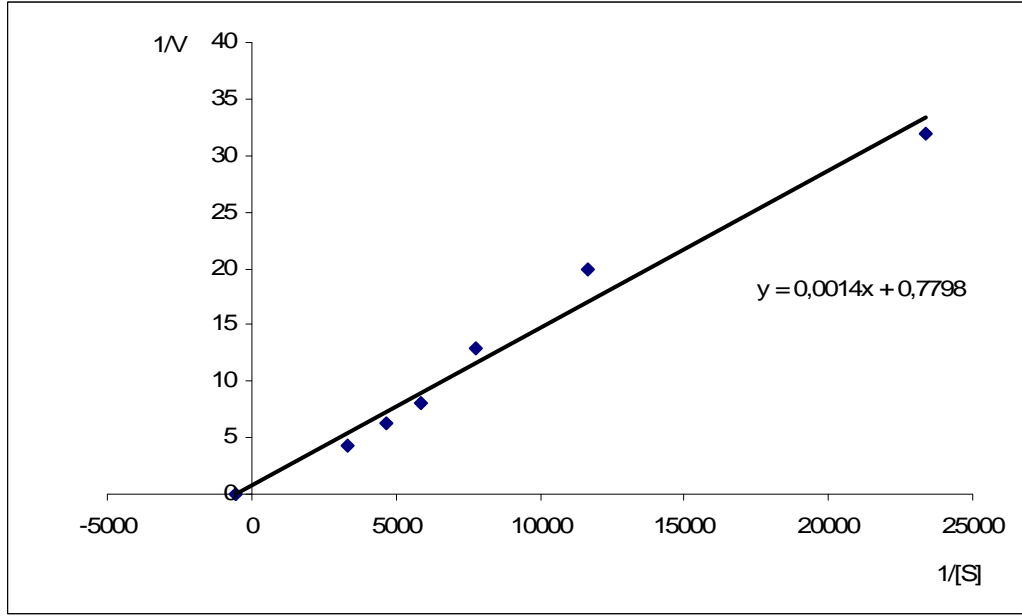
Şekil 3.45 pH=7 Tris-HCl tamponu ve substrat olarak Mtc maddesi kullanılarak kinetik sabitlerinin belirlenmesi için elde edilen grafik ($V_{max} = 0,819$ U/ml.dak, $K_M = 2,32 \times 10^{-4}$ M)

Çizelge 3.19 Ksantin Oksidaz enziminin pH=8 Tris-HCl tamponu ve substrat olarak Btc maddesi kullanılarak K_m ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri,aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$.

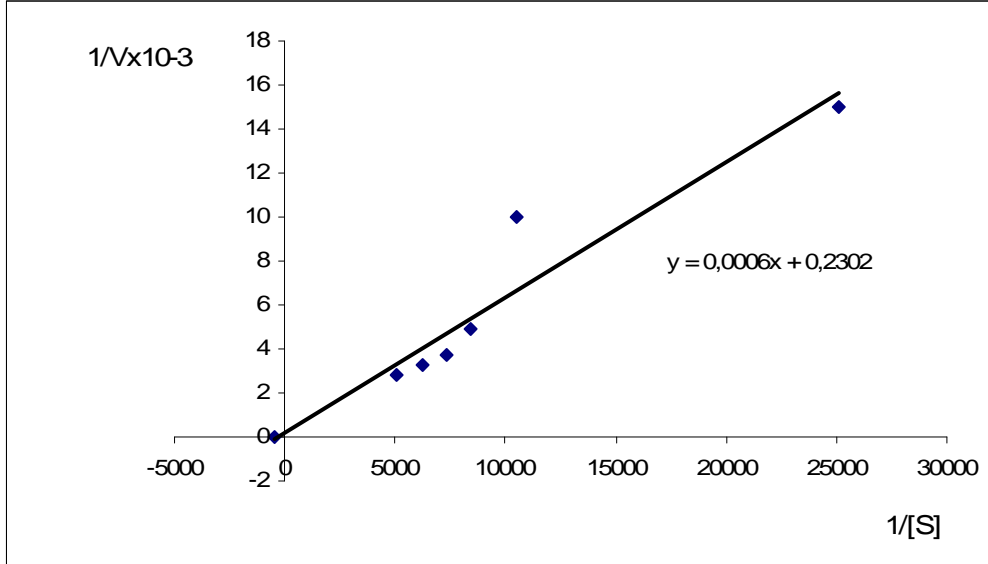
pH=7,6 50 mM Tris tamponu (μ l)	Enzim	Substrat	Küvetteki	Küvetteki	ΔOD (295 nm)	Aktivite (U/ml dak)	$1/V \times 10^{-3}$	$1/[S]$
	Çözeltisinin Hacmi (μ l)	çözeltisinin hacmi (μ l)	toplam hacim (μ l)	Substrat Kons [S] (M) $\times 10^{-5}$				
934		1		4,78	0,013	20	51	20920,5
933		2		9,55	0,022	33,33	30	10471,2
932	70	3	1005	14,33	0,031	45,45	22	6978,39
931		4		19,10	0,045	66,67	15	5235,6
930		5		23,88	0,074	111,11	9	4187,6

Çizelge 3.20 Ksantin Oksidaz enziminin pH=7 Tris-HCl tamponu ve substrat olarak Mtc maddesi kullanılarak K_m ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri,aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$.

pH=7,6 50 mM Tris tamponu (μ l)	Enzim	Substrat	Küvetteki	Küvetteki	ΔOD (295 nm)	Aktivite (U/ml dak)	$1/V \times 10^{-3}$	$1/[S]$
	Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	çözeltilisinin hacmi (μ l)	toplam hacim (μ l)	Substrat Kons [S] (M) $\times 10^{-5}$				
933,5		1,5		6,50	0,127	191	5,22	15395,14
933		2		9,75	0,147	220	4,55	10256,41
932,5	70	2,5	1005	11,70	0,191	286	3,5	8545,84
932		3		14,63	0,225	336	2,97	6835,27
931		4	105	19,50	0,257	385	2,6	5128,2



Şekil 3.46 pH=7 Tris-HCl tamponu ve substrat olarak Ctc maddesi kullanılarak kinetik sabitlerinin belirlenmesi için elde edilen grafik ($V_{max} = 1,28 \times 10^{-3}$ U/ml.dak, $K_M = 1,79 \times 10^{-3}$ M)



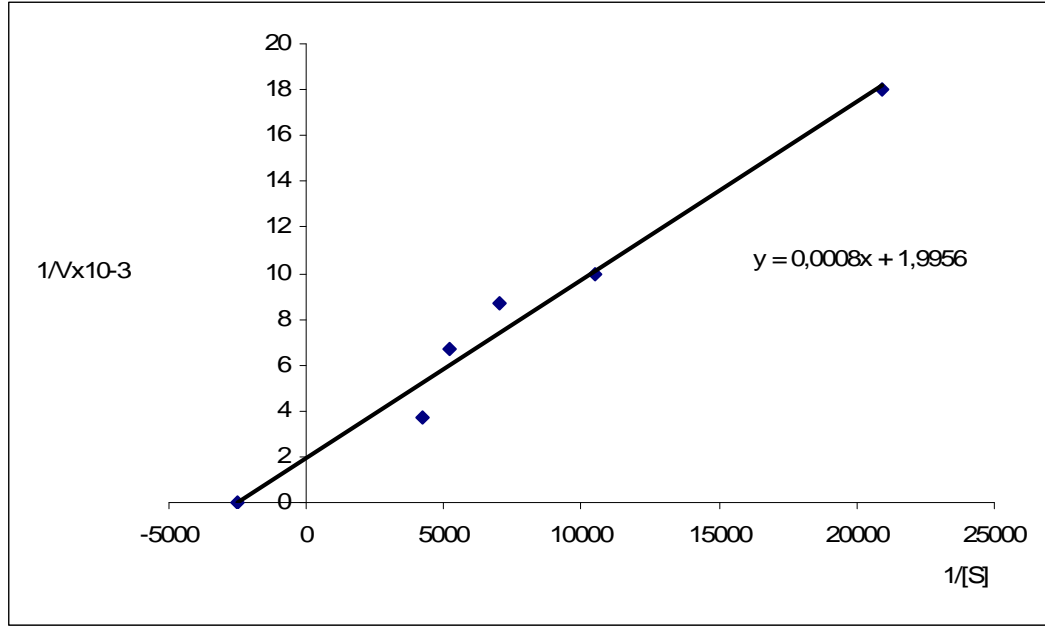
Şekil 3.47 pH=7 Tris-HCl tamponu ve substrat olarak 4Mtc maddesi kullanılarak kinetik sabitlerinin belirlenmesi için elde edilen grafik ($V_{max} = 5,32 \times 10^{-3}$ U/ml.dak, $K_M = 3,22 \times 10^{-3}$ M)

Çizelge 3.21 Ksantin Oksidaz enziminin pH=7 Tris-HCl tamponu ve substrat olarak Ctc maddesi kullanılarak K_m ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri,aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$.

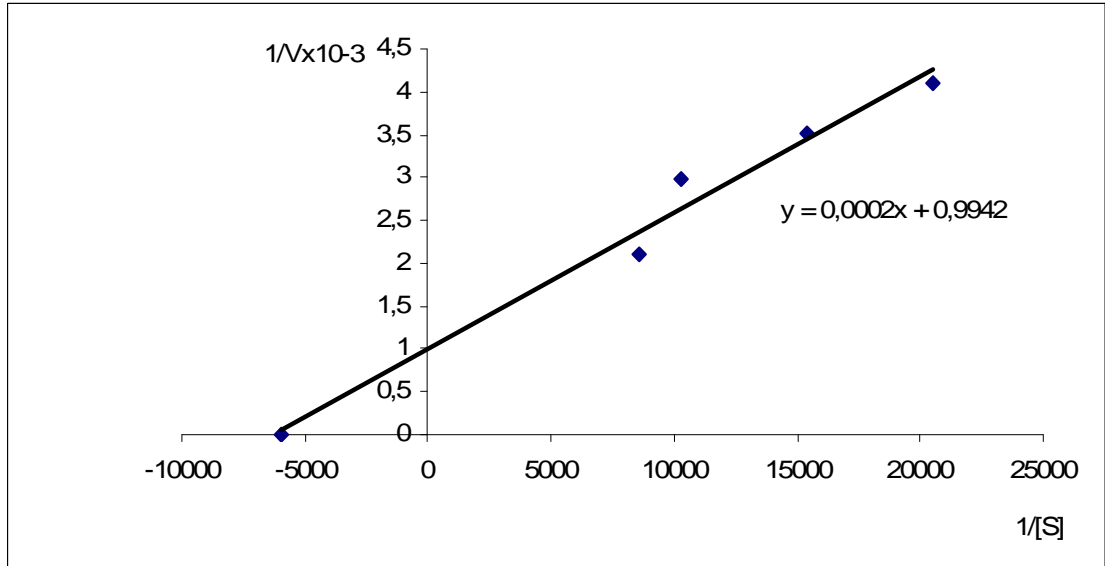
pH=7,6 50 mM Tris tamponu (μ l)	Enzim	Substrat	Küvetteki	Küvetteki	Δ OD (295 nm)	Aktivite (U/ml dak)	$1/V \times 10^{-3}$	$1/[S]$
	Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	çözeltilisinin hacmi (μ l)	toplam hacim (μ l)	Substrat Kons [S] (M) $\times 10^{-5}$				
934		1		4,28	0,021	31,25	32	23364,48
933		2		8,56	0,033	50	20	11682,24
932	70	3	1005	12,83	0,051	76,92	13	7794,23
931		4		17,11	0,082	122,70	8,15	5844,53
930		5		21,39	0,106	158,73	6,3	4675,08
928		7		29,95	0,156	233,10	4,29	3338,9

Çizelge 3.22 Ksantin Oksidaz enziminin pH=7 Tris-HCl tamponu ve substrat olarak 4Mtc maddesi kullanılarak K_m ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri,aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$.

pH=7,6 50 mM Tris tamponu (μ l)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Substrat çözeltilisinin hacmi (μ l)	Küvetteki toplam hacim (μ l)	Küvetteki Substrat Kons [S] (M)x10 ⁻⁵	Δ OD (295 nm)	Aktivite (U/ml dak)	$1/V \times 10^{-3}$	$1/[S]$
934		1		3,98	0,045	66,67	15	25125,63
933		2		9,55	0,067	100	10	10469,01
932	70	3	1005	11,94	0,137	204,92	4,88	8375,21
931		4		13,65	0,179	268,10	3,73	7328,31
930		5		15,92	0,204	304,75	3,26	6281,41
929		6		19,90	0,236	353,36	2,83	5025,12



Şekil 3.48 pH=7 Tris-HCl tamponu ve substrat olarak Btc maddesi kullanılarak kinetik sabitlerinin belirlenmesi için elde edilen grafik ($V_{max} = 2 \times 10^{-3}$ U/ml.dak, $K_M = 3,95 \times 10^{-4}$ M)



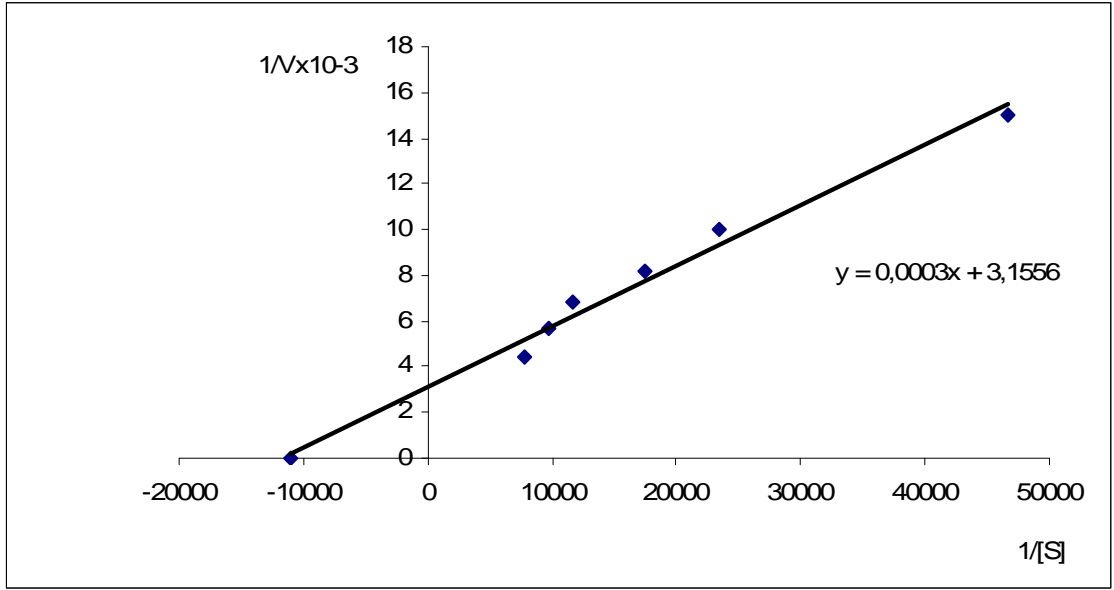
Şekil 3.49 pH=6 Tris-HCl tamponu ve substrat olarak Mtc maddesi kullanılarak kinetik sabitlerinin belirlenmesi için elde edilen grafik ($V_{max} = 1 \times 10^{-3}$ U/ml.dak, $K_M = 2,01 \times 10^{-4}$ M)

Çizelge 3.23 Ksantin Oksidaz enziminin pH=7 Tris-HCl tamponu ve substrat olarak Btc maddesi kullanılarak K_m ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri,aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$.

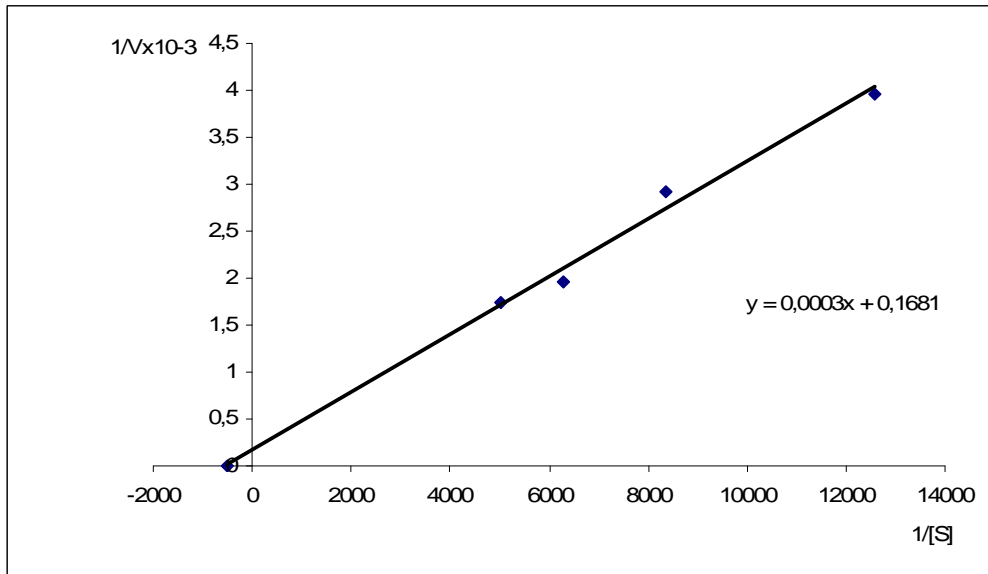
pH=7,6 50 mM Tris tamponu (μ l)	Enzim	Substrat	Küvetteki	Küvetteki	Δ OD (295 nm)	Aktivite (U/ml dak)	$1/V \times 10^{-3}$	$1/[S]$
	Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	çözeltilisinin hacmi (μ l)	toplam hacim (μ l)	Substrat Kons [S] (M) $\times 10^{-5}$				
934		1		4,78	0,037	55,5	18	20920,5
933		2		9,55	0,067	100	10	10471,2
932	70	3	1005	14,33	0,077	115,21	8,68	6978,39
931		4		19,10	0,100	149,48	6,69	5235,6
930		5		23,88	0,180	269,54	3,71	4187,6

Çizelge 3.24 Ksantin Oksidaz enziminin pH=6 Tris-HCl tamponu ve substrat olarak Mtc maddesi kullanılarak K_m ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri,aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$.

pH=7,6 50 mM Tris tamponu (μ l)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Substrat çözeltilisinin hacmi (μ l)	Küvetteki toplam hacim (μ l)	Küvetteki Substrat Kons [S] (M)x10 ⁻⁵	Δ OD (295 nm)	Aktivite (U/ml dak)	$1/V \times 10^{-3}$	$1/[S]$
934		1		4,87	0,163	243,90	4,1	20533,88
933,5		1,5		6,49	0,190	284,09	3,52	15395,14
933	70	2	1005	9,75	0,224	335,57	2,98	10256,41
932,5		2,5		11,70	0,318	476,19	2,1	8545,84



Şekil 3.50 pH=6 Tris-HCl tamponu ve substrat olarak Ctc maddesi kullanılarak kinetik sabitlerinin belirlenmesi için elde edilen grafik ($V_{max} = 0,32 \times 10^{-3}$ U/ml.dak, $K_M = 9,03 \times 10^{-5}$ M)



Şekil 3.51 pH=6 Tris-HCl tamponu ve substrat olarak 4Mtc maddesi kullanılarak kinetik sabitlerinin belirlenmesi için elde edilen grafik ($V_{max} = 5,95 \times 10^{-3}$ U/ml.dak, $K_M = 2 \times 10^{-3}$ M)

Çizelge 3.25 Ksantin Oksidaz enziminin pH=6 Tris-HCl tamponu ve substrat olarak Ctc maddesi kullanılarak K_m ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri,aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$.

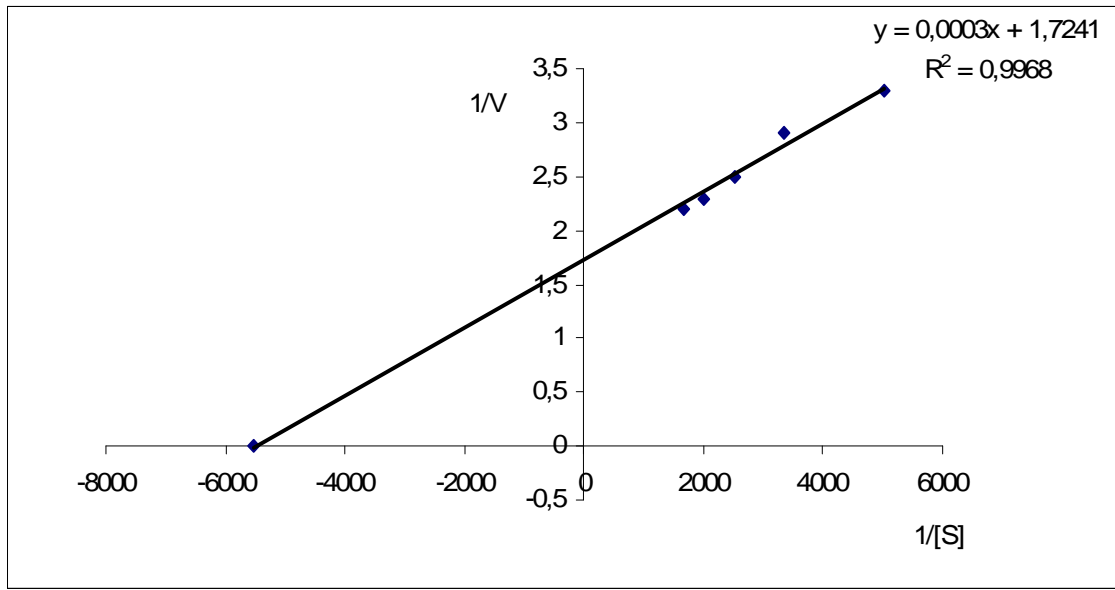
pH=7,6 50 mM Tris tamponu (μ l)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Substrat çözeltilisinin hacmi (μ l)	Küvetteki toplam hacim (μ l)	Küvetteki Substrat Kons [S] (M)x10 ⁻⁵	Δ OD (295 nm)	Aktivite (U/ml dak)	$1/V \times 10^{-3}$	$1/[S]$
934		1		2,14	0,044	66	15	46728,96
933		2		4,28	0,067	100,20	9,98	23364,48
932,5	70	2,5	1005	5,71	0,082	122,70	8,15	17523,36
932		3		8,56	0,098	146,63	6,82	11682,24
931		4		10,27	0,117	175,13	5,71	9738,23
930		5		12,83	0,152	227,27	4,4	7794,23

Çizelge 3.26 Ksantin Oksidaz enziminin pH=6 Tris-HCl tamponu ve substrat olarak 4Mtc maddesi kullanılarak K_m ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri,aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$.

pH=7,6 50 mM Tris tamponu (μ l)	Enzim	Substrat	Küvetteki	Küvetteki	Δ OD (295 nm)	Aktivite (U/ml dak)	$1/V \times 10^{-3}$	$1/[S]$
	Çözeltisinin Hacmi (μ l)	çözeltisinin hacmi (μ l)	toplam hacim (μ l)	Substrat Kons [S] (M) $\times 10^{-5}$				
933		2		7,96	0,169	252,52	3,96	12562,81
932		3		11,94	0,228	341,30	2,93	8375,21
931	70	4	1005	15,92	0,341	510,20	1,96	6281,41
928		6		19,90	0,382	571,42	1,75	5025,12

pH=6 Tris-HCl tamponu ve substrat olarak Btc maddesi kullanılarak yapılan deneylerde anlamlı veriler elde edilememiştir.

K_M ve V_{max} değerlerinin bulunması amacıyla, optimum şartlarda ksantin substratının değişen konsantrasyonlarında (Çizelge 3.28) enzim aktivitesi ölçümleri yapıldı ve Linewear-Burk grafikleri çizildi. Grafikten yararlanarak K_M değeri 1.7×10^{-4} M ve V_{max} değeri 0,58 U/ml.dak olarak bulundu (Şekil 3.52).

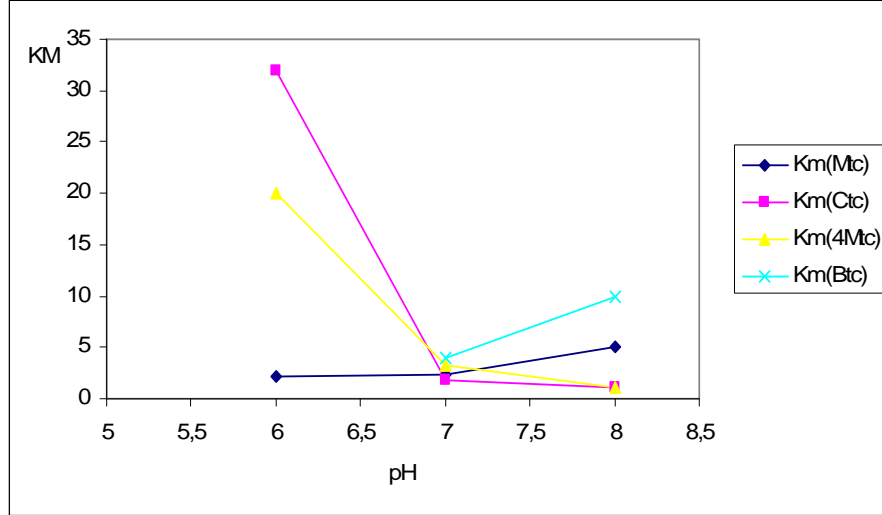


Şekil 3.52 Saflaştırılmış ksantin oksidaz enziminin ksantin substratı ile elde edilen Linewear-Burk grafiği.

Çizelge 3.27 Ksantin Oksidaz enziminin ksantin substratı kullanılarak, K_m ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri,aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$.

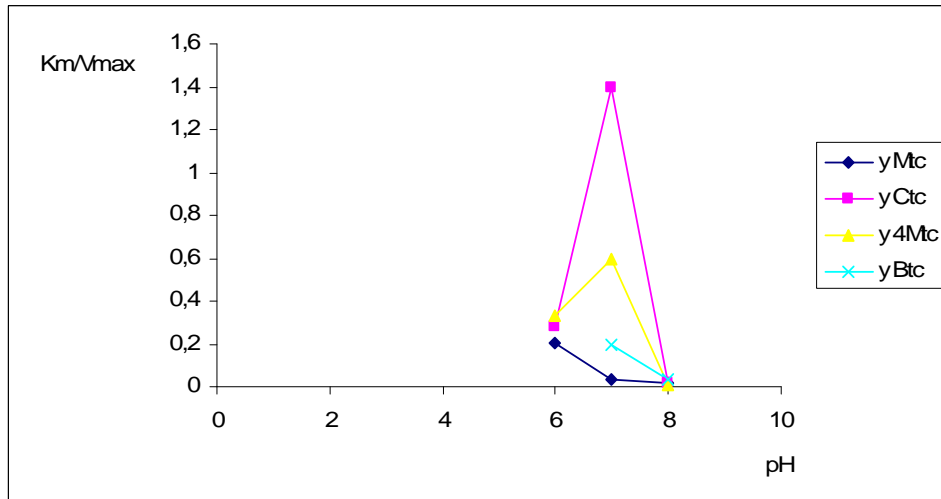
pH=7,6 50 mM Tris tamponu (μ l)	Enzim	Substrat	Küvetteki	Küvetteki	Δ OD (295 nm)	Aktivite (U/ml dak)	$1/V \times 10^{-3}$	$1/[S]$
	Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	çözeltilisinin hacmi (μ l)	toplam hacim (μ l)	Substrat Kons [S] (mM) $\times 10^{-3}$				
835		100		9,95	0,146	218,35	4,58	10050
735		200		19,90	0,202	302,1	3,3	5025
635	70	300	1005	29,85	0,228	340,98	2,9	3350
535		400		39,80	0,262	391,83	2,5	2512
435		500		49,75	0,285	426,23	2,3	2010
335		600		59,70	0,293	438,20	2,2	1675

XO enzimi için substrat olarak kullanılan orijinal olarak sentezlenen tiyosemikarbazon bileşiklerinin farklı pH'larda elde edilen K_M değerlerinin grafiği aşağıda verildi (Şekil 3.53).



Şekil 3.53 pH- K_M grafiği

XO enzimi için substrat olarak kullanılan orijinal olarak sentezlenen tiyosemikarbazon bileşiklerinin farklı pH'larda elde edilen K_M/V_{max} değerlerinin grafiği aşağıda verildi (Şekil 3.54).



Şekil 3.54 pH- K_M/V_{max} grafiği

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Araştırmamızı üç ana başlıkta toplamak mümkündür. İlk olarak XO'ın saflaştırılması için yeni bir afinite jeli sentezlenmiştir. Araştırmamızın ikinci bölümünde saflaştırılan enzimin klinikte yaygın olarak kullanılan aminoglikozit grubu bazı antibiyotiklere karşı ilgisi araştırılmıştır. Araştırmamızın son bölümünde ise, saflaştırılan enzimin yeni sentezlenen tiyosemikarbazon türevleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

Ksantin oksidaz enziminin daha ekonomik ve hızlı bir şekilde saflaştırılması gereklidir. Çünkü enzimin geniş substrat spesifikliğine sahip olması, preparatif organik kimya açısından önemlidir. XO enziminin, son yıllarda birçok organik sentezlerde kullanıldığı bilinmektedir. Ayrıca bu enzimin endüstriyel öneminin de olması daha pratik saflaştırma metodlarının gerekliliğini ortaya koymaktadır [46].

Ksantin oksidaz enziminin saflaştırılması için *Sepharose 4B-L-tirozin-4-aminobenzamidin* kimyasal yapısına sahip jel sentezlenmiştir. Bu amaçla matriks olarak Sepharose 4B seçilmiştir. Agaroz yapısına sahip bu jel, iyi akış özelliğine sahip olmasının yanında hidrofilik karakteri amacımıza son derece uygundur. Ayrıca hidroksil grupları içermesi aktifleştirmenin kısa sürede ve kolayca gerçekleştirilmesini sağlamaktadır.

Araştırmamızda CNBr aktivasyon metodu kullanılmıştır. CNBr, Sepharose 4B üzerindeki hidroksil gruplarıyla reaksiyona girerek oldukça reaktif siyanat esterlerini oluşturur. Söz konusu esterler, nükleofilik ataklara karşı duyarlı oldukları için primer amin gruplarıyla ılıman şartlarda reaksiyon verirler.

Araştırmamızda kullandığımız aktivasyon prosedürü oldukça kısa sürede gerçekleşmektedir. Ayrıca işlem sonucunda elde edilen afinite jellerinin kimyasal stabilitesinin yüksek olması, farklı elüsyon koşullarında güvenli bir şekilde kullanılmasını sağlamaktadır. Bu amaçla literatürde karbodiimid bileşiklerinin de kullanıldığı bildirilmektedir [110]. Karbodiimid ile aktifleştirilmiş matrikse primer amin grubunun bağlanması ile amid bağı oluşmaktadır. Bu bağ kromatografi işlemlerinde dayanıklıdır. Fakat aktifleştirilme sırasında jel, pH 4,5'da 24 saat süre

ile karıştırılmaktadır. Bu işlem kromatografi sırasında jelin akış özelliklerini olumsuz yönde etkilemektedir [110]. Bir başka aktiveştirme işleminde epoksi bileşiklerinden yararlanılmıştır [115]. Kromatografi işlemlerinde gayet dayanıklı olan bu yapılar, 16 saat aktiveştirme ve 16 saat ligand bağlama süresi olmak üzere toplam 32 saatte gerçekleşmektedir. pH'nın 10 civarında olması, jelin kimyasal yapısını etkilememesine rağmen uzun süre karıştırma işlemleri, polisakkarit partiküllerinin fiziksel yapısının deformasyonuna sebep olabilir. Sonuç olarak, hazırlanacak hidrofobik jelin akış özellikleri olumsuz yönde etkilenecektir. Çalışmamızda kullanılan CNBr ile aktiveştirme işlemi sadece 5 dakikada gerçekleştirilmektedir. Böylece jelin fiziksel yapısındaki deformasyon sakıncaları ortadan kaldırılmış oldu.

Afinite kromatografisinde önemli konulardan birisi de ligant ve uzantı kolu seçimidir. Genel olarak molekül ağırlığı 5000'in altında olan ve nispeten küçük ligantların kullanılması önemli bir problem olan sterik engeli ortaya çıkarmaktadır. Araştırmamızda kullandığımız ligantın molekül ağırlığının son derece düşük olması uzantı kolu kullanılmasını zorunlu hale getirmiştir. Bu amaçla L-tirozin uzantı kolu olarak kullanılmıştır. Literatürde genel olarak düşük molekül ağırlığına sahip ligantlar için 6-8 atom uzunluğunda uzantı kolları kullanılmıştır. Uzantı kolunun uzunluğu, kritik bir değerdir. Kısa uzantı kolları sterik engelden dolayı ligantla hedef molekül arasındaki bağlanmayı zayıflatacak ve verimi düşürecektir. Gereğinden uzun olması durumunda nonspesifik etkileşmelerle saflaştırma derecesini düşürdüğü saptanmıştır [108]. Tarafımızdan kullanılan L-tirozin molekülünün boyutunun uygun olması yanında, hidrofil karakteri, kolon içerisindeki olası hidrofobik etkileşmeyi azaltmaktadır.

Araştırmamızda 4-aminobenzamidin bileşiği ligant olarak seçilmiştir. Bu bileşik enzimin spesifik inhibitörüdür. Afinite tekniğinde saflaştırma derecesinin yüksek olması, seçilecek ligantın spesifikliğine ve bağlanma derecesine büyük oranda bağlıdır. Ligantın, hedef moleküle bağlanma derecesi tekniğin uygulanması açısından önemlidir. Bağlanma derecesi düşük olduğu durumlarda hedef molekül yıkama işlemi sırasında safsızlıklarla birlikte gelmekte ve verim düşmektedir. Bağlanma derecesi çok yüksek olduğu durumlarda ise, liganta bağlı hedef molekülü çoğu durumda elüe etmek için daha sert elüsyon koşulları gerekmektedir. Bu koşullarda hedef proteinin denatüre olduğu saptanmıştır.

Ksantin oksidaz enzimi, karaciğerde, ince barsak mukozasında, süt salgılan meme bezlerinde, kalp, böbrek, beyin, aort, akciğer, iskelet kası ve barsakların küçük damarların endotel hücrelerinde [8,16, 37, 38, 39], anne sütünde bulunduğu tespit edilmiştir [40, 41]. Esas olarak sitoplazmik yerleşim gösteren enzimin peroksizomlarında gibi birçok dokuda bulunmasına rağmen sütte oldukça bol bulunmaktadır. Bu nedenle enzim kaynağı olarak süt tercih edilmiştir. Ön saflaştırma tekniği olarak uygulaması oldukça kolay olan amonyum sülfat çöktürme işlemi uygulanmıştır.

Araştırmamızda XO enzimini sığır sütünden saflaştırmak için afinite kromatografisi tekniğini uygulamadan önce ön saflaştırma işlemi yapılmıştır. Bu amaçla amonyum sülfat çöktürme işlemi yapılmıştır. Amonyum sülfat çöktürme aralığı, XO için % 38–50 olduğu literatürde bildirilmiştir [103]. Proteinlerinin organik çözücüler ile çöktürülmesi yöntemi de tercih edildiği bildirilmektedir fakat farklı organik çözücülerle yapılan çalışmamızda XO enzim aktivitesinin çok büyük oranda düştüğü gözlenmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 Ksantin oksidaz enziminin organik çözücülerle çöktürme sonrası enzim aktiviteleri

Organik Çözücüler	Aktiviteler (Toplam EU)	
	Süpernatant	Çökelek
Etil alkol	1452,88	160,21
Aseton	790,42	1559,64
Kloroform	512,71	1.02
(NH ₄) ₂ SO ₄ çöktürmesi sonrası enzim	14015,29	
Saf enzim	15254,57	

Tarafımızdan sentezlenen afinite jeli kullanılarak, saflaştırma işlemleri farklı pH ve iyonik şiddetlerde (25 mM benzamidin içeren 0,1 M glisin/ 0,1 M Na₂SO₄, 25 mM benzamidin içeren 0,1 M glisin/ 0,5 M Na₂SO₄ ve 25 mM benzamidin içeren 0,1 M glisin/ 1,0 M Na₂SO₄) elüsyon tamponu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar (Şekil 3.20–3.24) en uygun pH değerinin 9,0 olduğu saptanmıştır. Enzimin söz konusu inhibitöre karşı afinitesinin yüksek pH'larda fazla olduğu

bilinmektedir. Elde ettiğimiz sonuç bu literatür bilgisi ile uyumlu haldedir. Enzimin denatürasyon riski düşünülerek söz konusu pH'tan daha yüksek değerlerde çalışma yapılmamıştır. Farklı iyonik şiddetlerde elde edilen bulgular kısmında verilmiştir (Şekil 3.26–3.28). En uygun iyonik şiddet değerinin ise 0,1 M Na₂SO₄ olduğu saptanmıştır.

pH= 9,0 ve 0,1 M NaCl iyonik şiddette en yüksek saflaştırma derecesi 1645 olarak tespit edilmiştir. Bu değer literatürle bulunan değerle karşılaştırıldığı zaman oldukça yüksektir. Örneğin fare karaciğer dokusundan söz konusu enzim, amonyum sülfat çöktürme, Sephadex-G25 ile jel filtrasyonu, HTP kolonu ve son olarak Q-Sepharose iyon değiştirici kromatografisi teknikleri ard arda uygulanmış ve 1167 kat saflaştırma işlemi yapılmıştır. Oysa tarafımızdan sentezlenen afinite jeli kullanılarak sadece iki basamak sonucunda 1645 kat saflaştırma derecesi elde edilmiştir [112]. Ayrıca literatürde %50 amonyum sülfat çöktürmesinden sonra fare karaciğer dokusundan Benzamidin-Sepharose afinite jeliyle yapılan XO enziminin saflaştırılmasında enzim 199 kat saflaştırılmıştır [113]. Sütten %38–50 amonyum sülfat çöktürmesinden sonra DEAE-Sepharose kolonuyla saflaştırma yapıldığında 328 kat saflaştırma elde edilmiştir [103].

Enzimin saflığının kontrolü için SDS-PAGE uygulanmıştır. Araştırmamızda, saflaştırılan enzim için SDS-PAGE uygulanmıştır. Molekül ağırlığı 116 kDa'dan daha yüksek olduğu bulunmuş ve tahmin edilen XO enzimi tek bant olarak SDS-PAGE jelinde gözlenmiştir. Bu değer literatürle uygunluk göstermektedir. XO'nun molekül ağırlığını SDS-PAGE ile McManaman ve arkadaşları yaklaşık 150 kDa olarak native elektroforez ile 150 kDa'dan büyük olarak belirlemişlerdir [113]. Çünkü enzimin yapısı homodimer yapıda olduğu deneysel çalışmalarla doğrulanmıştır [112].

Çalışmamızın bu bölümünde süttten saflaştırılan XO enzimi üzerinde Gentamisin sülfat, Sodyum ampisilin, Sefazolin sodyum, Kanamisin sülfat, Klaritromisin, Rifamisin SV ve Klindamisin fosfat antibiyotiklerinin *in vitro* etkisi incelenmiştir. Bu antibiyotiklerin seçilmesinin en önemli nedeni klinikte oldukça sık bir şekilde kullanılmasıdır. Giriş bölümünde ayrıntılı bir şekilde belirtildiği gibi önemli fizyolojik fonksiyonlara sahip bu enzim üzerine söz konusu antibiyotiklerin nasıl etkili olduğunun saptanmasının önemli olduğu düşüncesindeyiz. Ayrıca bu antibiyotiklerin XO enzimi üzerindeki etkilerin hakkında literatürde herhangi bir

bilgiye rastlanmamış olması çalışmanın orijinalliğini daha da arttırdığı kanısındayız. İnhibisyona neden olan antibiyotiklerin inhibisyon etkisi IC₅₀ değerleri bulunarak verilmiştir. Bazı araştırmacıların inhibisyon etkisini tespit etmek için IC₅₀ değerini kullandıkları bilinmektedir. Bu amaçla substrat konsantrasyonları sabit tutularak, değişik antibiyotik konsantrasyonlarında, yüzde aktiviteler belirlenmekte ve daha sonra grafik yolu ile % 50 inhibisyona sebep olan antibiyotik konsantrasyonu hesaplanmaktadır. Bu yöntem, IC₅₀ değerleri süttten saflaştırılan XO enzimi için tespit edilmiştir. Söz konusu antibiyotiklerin, saf enzim üzerinde çalışılması sonuçların güvenilirliği açısından önemli olduğu düşüncesindeyiz. Çünkü saf olmayan herhangi bir biyolojik sıvıda uygulanan bileşiklerin, istenilen enzimle etkileşmesi diğer nonspesifik proteinler tarafından engellenebilir.

Çalışılan antibiyotikler içerisinde $5,4 \times 10^{-4}$ mg/mL IC₅₀ değeriyle Sefazolin sodyum en güçlü inhibitör olarak bulunmuştur. Bu değer söz konusu enzimin klasik inhibitörleri için bulunan değerlere yakındır. Diğer bileşiklerin Klaritromisin, Klindamisin fosfat ve Kanamisin sülfat çalışılan konsantrasyonlarda enzimi belirli ölçüde inhibe ettiği gözlenmiştir. Ancak Gentamisin sülfat, Sodyum ampisilin ve Rifamisin SV ise söz konusu enzim üzerinde aktivasyon etki saptanmıştır. Elde edilen Sefazolin sodyum antibiyotiğinin inhibisyon özelliğini grubumuzca PON enzimi üzerine *in vitro* olarak çalışılan başka çalışma da desteklemektedir [89]. Literatürde Sefazolin sodyum antibiyotiğinin, önemli fizyolojik fonksiyonları olan Glikoz 6-fosfat dehidrogenaz, Karbonik anhidraz I ve II ve Glutasyon redüktaz enzimleri üzerinde *in vitro* ortamda güçlü inhibisyona neden olduğu tespit edilmiştir [90, 94, 114]. Antibiyotik uygulanmış farelerden elde edilen karaciğer PON1 enzim aktivitelerinin ise farklı şekilde etkilendiği saptadığı belirtilmiştir. Kloramfenikol, klaritromisin, rifamisin SV ve klindamisin fosfat serum fPON1 enzimi üzerinde önemli bir etki göstermediği, karaciğer fPON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gözlemlendiği belirtilmektedir. Ayrıca Gentamisin sülfat, Sodyum ampisilin ve Sefazolin sodyum serum fPON1 enzimi üzerinde önemli bir inhibisyona sebep olduğu karaciğer fPON1 enzimi üzerinde aynı etkiyi göstermediği saptandığı belirtilmektedir [89].

Literatürde söz konusu antibiyotikler ile yapılan *in vivo* çalışmalarda da bazı enzimler üzerinde inhibisyon etkisi gösterdikleri belirtilmektedir. Gentamisin sülfat, sıçanlara kas içine uygulandıktan 3 saat sonra eritrositlerde bulunan Karbonik

anhidraz enzim aktivitesi üzerinde önemli bir inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir [115]. Benzer şekilde penisilin grubu antibiyotiklerinden sodyum ampisilin de sıçan eritrositlerinde bulunan Karbonik anhidraz enzim aktivitesi üzerinde 3 saat sonunda inhibisyona neden olduğu bildirilmektedir [203]. Sodyum ampisilin antibiyotiği için elde edilen sonuçlardan farklı olarak; yapılan bir çalışmada, sıçanlara uygulanan sodyum ampisilin uygulandıktan 2,4 ve 6 saat sonunda 6-fosfaglukonat dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı gösterilmiştir [114]. Ayrıca sefalosporinler grubunda yer alan Sefazolin sodyum benzeri bir antibiyotik olan Sodyum sefuroksim bileşiğinin Glikoz 6-fosfat dehidrogenaz enzim aktivitesini sıçanlara uygulandıktan 2.5 saat sonunda inhibe ettiği tespit edilmiştir [116]. Yukarıda belirtilen antibiyotiklerin, karaciğerde bulunan herhangi bir enzim aktivitesi üzerine etkisi konusunda *in vivo* bir çalışmaya rastlanmamıştır [89].

Rifamisin antibiyotiği saf hPON1 enzim aktivitesi üzerinde herhangi bir inhibisyon etkisi gözlenmediği belirtilmiştir. Benzer şekilde *in vivo* çalışmada serum fPON1 enzimi üzerinde anlamlı bir inhibisyon göstermediği, karaciğer fPON1 enzim aktivitesi üzerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığına anlamlı bir inhibisyona neden olduğu belirtilmiştir. Aynı antibiyotiğin DNA polimeraz enzimi üzerinde güçlü inhibisyon etkisi gösterdiği ve insan nötrofil hücrelerinin fonksiyonlarını inhibe ettiği bilinmektedir [100, 101]. PON1 enzimi üzerinde *in vivo* etkisi araştırılan bir başka çalışmada klasik enzim indükleyicisi olarak bilinen fenobarbital ile yapılmıştır. Sıçanlarda yapılan bu çalışmada kas içine uygulanan fenobarbital, serumdaki hPON1 enzim aktivitesinde bir değişmeye neden olmaz iken, karaciğer hPON1 enzim aktivitesinde ve miktarında önemli bir artışa neden olmuştur [117].

XO enzimi üzerindeki etkisi incelenen antibiyotiklerden Sodyum ampisilin *in vitro* enzim aktivitesi üzerinde aktivasyon etkisi olduğu bulunmuştur. Yapılan araştırmalarda, Sodyum ampisilin antibiyotiğinin saflaştırılmış insan Karbonik anhidraz ve Glukoz 6 fosfataz enzimleri üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği bulunmuştur [95, 96].

Günümüzde bilinçsizce kullanılan ve giderek artan antibiyotik kullanımı insan neslinin daha zayıf ve bakterilerin daha güçlü olmalarına neden olduğu bildirilmektedir [88]. Bunun nedeni antibiyotik belirli dozda ve belirli süre kullanıldığında ancak etki edebildiği, mikroorganizmaları yok etmektedir.

Bilinçsizce kullanım sonucu söz konusu mikroorganizmalar kullanılan antibiyotiğe direnç geliştirmekte ve daha etkili antibiyotiklere ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca antibiyotiklerin vücuda alındıktan 2–12 saat arasında değişen bir süre sonra maksimum etki gösterdikleri bilinmektedir [88].

Sepharose-4B-L-tirozin-4-aminobenzamidin yapılu afinite jeli kullanılarak saflaştırılan XO enziminin kinetik sabitleri (K_M ve V_{max}) ksantin ve orijinal olarak sentezlenen tiyosemikarbazon bileşikleri substrat olarak kullanılarak belirlenmiştir. Lineweaver-Burk grafiklerinden elde edilen K_M ve V_{max} değerleri ksantin substrat olarak kullanıldığında sırasıyla 1.7×10^{-4} M ve 0,58 U/ml'dak olarak bulunmuştur. Literatürde XO enzimi enziminin ksantin substratına karşı V_{max} ve K_M değerleri tarafımızdan tespit edilen V_{max} ve K_M değerleri ile benzerlik göstermektedir [35]. Tiyosemikarbazon bileşiklerinin farklı pH tamponları kullanılarak yapılan çalışmalarda her bir bileşiğin K_M ve V_{max} değerleri belirlenmiş ve bu bileşiklerinde substrat olarak kullanılacağı bulunmuştur. pH 5 ve 9 tamponları kullanılarak yapılan çalışmalarda anlamlı sonuçlar elde edilememiştir. pH=8 Tris-HCl tamponu kullanılarak yapılan çalışmalarda, substrat olarak Mtc maddesi kullanılarak elde edilen kinetik sabitler $V_{max} = 277.78$ U/ml'dak, $K_M = 5 \times 10^{-4}$ M, substrat olarak Ctc maddesi kullanılarak elde edilen kinetik sabitler $V_{max} = 0,57$ U/ml'dak, $K_M = 1.063 \times 10^{-4}$ M, 4Mtc maddesi kullanılarak elde edilen kinetik sabitler $V_{max} = 111,11$ U/ml'dak, $K_M = 1 \times 10^{-4}$ M ve 4Mtc maddesi kullanılarak elde edilen kinetik sabitler $V_{max} = 111,11$ U/ml'dak, $K_M = 1 \times 10^{-4}$ M'dır. pH=7 Tris-HCl tamponu kullanılarak Mtc maddesi için $V_{max} = 0,819$ U/ml'dak, $K_M = 2,32 \times 10^{-4}$ M, Ctc için $V_{max} = 1,28 \times 10^{-3}$ U/ml'dak, $K_M = 1,79 \times 10^{-3}$ M, 4Mtc maddesi için $V_{max} = 5,32 \times 10^{-3}$ U/ml'dak, $K_M = 3,22 \times 10^{-3}$ M, ve Btc maddesi için $V_{max} = 2 \times 10^{-3}$ U/ml'dak, $K_M = 3,95 \times 10^{-4}$ M'dır. pH=6 Tris-HCl tamponu ve tiyosemikarbazon bileşikleri için, Mtc maddesi için $V_{max} = 1 \times 10^{-3}$ U/ml'dak, $K_M = 2,01 \times 10^{-4}$ M, Ctc maddesi için $V_{max} = 0,32 \times 10^{-3}$ U/ml'dak, $K_M = 9,03 \times 10^{-5}$ M ve 4Mtc maddesi için $V_{max} = 5,95 \times 10^{-3}$ U/ml'dak, $K_M = 2 \times 10^{-3}$ M'dır. Fakat pH=6 Tris-HCl tamponu ve substrat olarak Btc maddesi kullanılarak yapılan deneylerde anlamlı veriler elde edilememiştir. Bu değerler XO enzimi için, ksantin substratı kullanılarak elde edilen kinetik sabitlerle uyum göstermektedir.

Orijinal olarak sentezlenen tiyosemikarbazon bileşikleriyle yapılan biyotransformasyon işleminde, özellikle dörtlü halkada parçalanma gözlenmiştir. Bu

halka parçalanması biyotransformasyon sonucu oluşan ürünün ekler bölümünde verilen ¹H-NMR, ¹³C-NMR ve IR spektrumlarıyla desteklenmektedir.

Sonuç olarak yapılan çalışmalarda aşağıdaki bulgular elde edilmiştir.

- ✓ Sütten XO enzimini saflaştırmak için *Sepharose 4B-L-tirozin 4-aminobenzamidin* kimyasal yapısına sahip yeni bir afinite kromatografisi jeli sentezlenmiştir.
- ✓ *Sepharose-4B-L-tirozin-4-aminobenzamidin* yapısına sahip afinite jeli kullanılarak sütten XO yüksek verimde ve yapılan literatür araştırmasında daha önce yapılan çalışmalardan yüksek saflaştırma derecesinde enzim saflaştırılmıştır.
- ✓ *Sepharose 4B-L-tirozin 4-aminobenzamidin* kimyasal yapısına sahip yeni afinite kromatografisi jelinin farklı pH'larda ve iyonik şiddette kolan şartları incelenmiştir.
- ✓ Amonyum sülfat çöktürmesi ve afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırılan XO enzimi SDS-PAGE elektroforezinde yaklaşık 150 kDa molekül ağırlığında tek bant elde edilmiştir.
- ✓ Yaygın olarak kullanılan aminoglikozit grubu antibiyotiklerden Gentamisin sülfat ve Kanamisin sülfat, sefalosporinler grubundan Sefazolin sodyum, penisilin grubu Sodyum ampisilin, makrolid grubu olan Klaritromisin, aminosalisilik asit türevi olan Rifamisin SV ve linkozamid grubundan Klindamisin fosfat gibi antibiyotiklerin XO enzim aktivitesini *in vitro* olarak farklı düzeylerde etkilediği saptanmıştır.
- ✓ Söz konusu antibiyotikler *Sepharose-4B-L-tirozin-4-aminobenzamidin* yapısına sahip afinite jeli ile saflaştırılan XO enzim aktivitesi üzerine *in vitro* olarak yapılan çalışmalarda; Gentamisin sülfat, Sodyum ampisilin ve Rifamisin SV'nin enzim aktivitesini arttırdığı fakat Sefazolin sodyum, Kanamisin sülfat, Klaritromisin ve Klindamisin fosfatın inhibisyon etkisi gösterdiği saptanmıştır.

- ✓ XO enzimi, *Sepharose 4B-L-tirozin 4-aminobenzamidin* kimyasal yapısına sahip afinite kromatografisi jeliyle saflaştırılmış ve enziminin substrat spesifikliği düşük olduğundan biyotransformasyonda kullanılabileceği düşünülmüş ve termal denatürasyonu incelenmiştir.

- ✓ Orijinal olarak sentezlenen tiyosemikarbazon türevlerinin biyotransformasyonu incelenmiş ve daha önce organik sentez çalışmalarında sentezlenmemiş bileşiklerin sentezi gerçekleştirilmiştir.

5. KAYNAKLAR

- [1] Pritsos, C.A., Cellular distribution, metabolism and regulation of the xanthine oxidoreductase enzyme system. *Chemico-Biological Interactions*, 129, 195-208, 2000
- [2] Keha E.E., Küfrevioğlu Ö.İ., *Biyokimya. Aktif Yayınevi. Erzurum* (2000)
- [3] Murray R. K., Granner D.K., Mayes P. A., Rodwell V. W., *Harper Biyokimya. Nobel Tıp Kitabevleri* (2004),
- [4] Bray, R.C. (1975) *in The Enzymes*, Vol. 12B, 3rd ed., pp. 299-419, Academic Press, New York.
- [5] Hart LJ, McGartoll MA, Chapman HR, Bray RC. The composition of milk xanthine oxidase. *Biochem J* 1970;116:851-64.
- [6] Nelson CA, Handler P. Preparation of bovine xanthine oxidase and the subunit structures of some iron flavoproteins. *J Biol Chem* 1968;243:5368-73.
- [7] Massey V, Brumby PE, Komai H. Studies on milk xanthine oxidase: Some spectral and kinetic properties. *J Biol Chem* 1969;244:1682-91.
- [8] Parks, D. A., Granger, D.N., Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. *Acta Physiol. Scand.*, 548, 87-99, 1986
- [9] Bray, R.C., Molybdenum iron-sulphure flavin hydroxylases and related enzyme. *In the Enzymes*, Ed.: P.D. Boyer, , New Academic Press, 12, 299-417, 1975
- [10] Topham, R.W., Jackson, M.R., Joslin, S.A., Walker, M.C., Studies of the ferroxidase activity of native and chemically modified xanthine oxidoreductase. *Biochem. J.*, 235, 39-44, 1986
- [11] Topham, R.W., Walker, M.C., Calisch M.P., Jackson, M.R., Evidence for the participation of intestinal xanthine oxidase in the mucosal processing of iron. *Biochemistry*, 21, 4529-4535, 1982
- [12] Topham, R.W., Walker, M.C., Calisch M.P., Liver xanthine dehydrogenase and iron mobilization. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 109, 1240-1246, 1982
- [13] Krenitsky, T.A., Tuttle, J.V., Cattau, E.C., Wang, P., A comparison of the distribution and electron acceptor specificities of xanthine oxidase and aldehyde oxidase. *Comp. Biochem. Physiol.*, 49, 687-703, 1974

- [14] Godber, B.L.J., Doel, J.J., Sapkota, G.P., Blake, D.R., Stevens, C.R., Eisenthal, R., Harrison, R., Reduction of nitrite to nitric oxide catalysed by xanthine oxidoreductase. *J. Biol. Chem.*, 275, 7757-7763, 2000
- [15] Fried, R., Fried, L.V., Babin, D.R., Biologic role of xanthine oxidase and tetrazolium reductase inhibitor. *Eur. J. Biochem.*, 33, 439-445, 1973
- [16] Gürkan Metinyurt, Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Plazma Ksantin Oksidaz Aktivitesi Ölçümü ve Hipogonadizimli Hastalarda Ksantin oksidaz Düzeylerinin Belirlenmesi, Genelkurmay Başkanlığı Gülhane Askeri Tıp Akademisi Askeri Tıp Fakültesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı Başkanlığı, Uzmanlık Tezi, Ankara 2003
- [17] Green, D.R., Pauli, R., The antibacterial action of the xanthine oxidase system. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 54, 148-150, 1943
- [18] Tubaro, E., Lotti, B., Santiangelli, C., Cavallo, G., Xanthine oxidase increase in polymorphonuclear leucocytes and macrophages in mice in three pathological situations. *Biochem Pharmacol*, 29:1945-1948, 1980
- [19] Brunelli, L., Crow, J.P., Beckman, J.S., The comparative toxicity of nitric oxide and peroxynitrite to *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 316, 327-334, 1995
- [20] Kenan, T.W., Patton, S., The structure of milk: implications for sampling and storage. The milk globule membrane. In *Handbook of Milk Composition*, Ed.: Jensen, R.G., New York, Academic Press, 1995, 5-50
- [21] Coddington A. In: Bergmeyer HU, editor, *Methoden der Enzymatischen Analyse*, Verlag Chemie, Weinheim, 1970, p. 1862 and 1866.
- [22] Mcmanaman J. L., Neville M. C., Wright R. M., 'Mouse mammary gland Xanthine oxidoreductase purification, characterization and regulation' *Archives of Biochem. and Biophys.* Vol. 371 No 2, November 15, pp 308-316, 1999
- [23] Price VE, Otey C, Plesner P. Preparation of nucleoside phosphorylase from calf spleen. In: Colowick SP, Kaplan NO, editors, *Methods in enzymology*, Vol. 2, Academic Press, New York, 1955, pp. 448-53.
- [24] Murray R. K., Granner D.K., Mayes P. A., Rodwell V. W., Harper Biyokimya. Nobel Tıp Kitabevleri (2004)
- [25] Cross, C. E. (1987) *Ann. Internal Med.* 107, 526-545.
- [26] Southorn, P. A., and Powis, G. (1988) *Mayo Clin. Proc.* 63, 390-408.
- [27] Hilliker A. J., Duyf, B., Evans, D., and Phillips, J. P. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 4343-4347.

[28] Tomoko Nishino, Ken Okamoto, Bryan T. Eger, Emil F. Pai and Takeshi Nishino, Mammalian Xanthine Oxidoreductase – Mechanism Of Transition From Xanthine Dehydrogenase To Xanthine Oxidase, *The Febs Journal*, Review Article, Nisan 2008

[29] Tomoko Nishino, Ken Okamoto, Yuko Kawaguchi, Hiroyuki Horish, Tomohiro Matsumura, Bryan T. Eger , Emil F. Pai, and Takeshi Nishino, Mechanism of the Conversion of Xanthine Dehydrogenase to Xanthine Oxidase: Identification of the Two Cysteine Disulfide Bonds And Crystal Structure of A Non-Convertible Rat Liver Xanthine Dehydrogenase Mutants, JBC Papers in Press, May 4, 2005

[30] <http://wpcontent.answers.com> (Mart, 2010)

[31] Horecker BL, Heppel LA. Xanthine oxidase from milk. In: Colowick SP, Kaplan NO, editors, *Methods in enzymology*, Vol. 2, Academic Press, New York, 1955, pp. 482–5.

[32] Waud, W. R., and Rajagopalan, K. V. (1976) *Arch. Biochem. Biophys.* 172, 365–379.

[33] Krenitsky, T. A., and Tuttle, J. V. (1978) *Arch. Biochem. Biophys.* 185, 370–375.

[34] Waud WR, Brady FO, Wiley RD, Rajagopalan KV. A new purification procedure for bovine milk xanthine oxidase: Effect of proteolysis on the subunit structure. *Arch Biochem Biophys* 1975;169:695–701.

[35] McCord, J.M., Fridovich, I., The reduction of cytochrome by milk xanthine oxidase., *J. Biol. Chem.*, 243, 5753-5760, 1968

[36] Morita, M., Feller, D.R., Gilette, J.R., Reduction of niridazole by rat liver xanthine oxidase. *Biochem. Pharmacol.*, 20, 217-226, 1971

[37] Fridovich, I., Competitive inhibition of xanthine oxidase by urea and guanidinium ion., *J. Biol. Chem.*, 239, 3519-3521, 1964

[38] Schoutsen, B., De Jong, J.W., Harmsen, E., De Tombe, P.P., Achterberg, P.W., Myocardial xanthine oxidase/dehydrogenase. *Biochemica et Biophysica Acta*, 762, 519-524, 1983

[39] Werns, S.W., Lucchesi, B.R., Free radical and ischemic tissue injury. *Trends Pharmacol. Sci.*, 11, 161-166, 1990

[40] Linder, N., Rapola., J., Raivio, K.O., Cellular expression of xanthine oxidoreductase protein in normal human tissues. *Lab. Invest.*, 79, 967-974, 1999

[41] Moriwaki, Y., Yamamoto, T., Suda, M., Nasako, Y., Takahashi, S., Agdebana, O.E., Hda, T., Higashino, K., Purification and immunohistochemical tissue

localization of human xanthine oxidase. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1164, 327-330, 1993

[42] Argermuller, S., Bruder, G., Volkl, A., Wesch, H., Fahimi, H.D., Localization of xanthine oxidase in crystalline cores of peroxisomes. A cytochemical and biochemical study. *Eur. J. Cell Biol.*, 45, 137-144, 1987

[43] Della Corte, E., Stirpe, F., The regulation of rat liver xanthine oxidase. Involvement of thiol groups in the conversion of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) into oxidase (type O) and purification of the enzyme. *Biochem. J.*, 126, 739-745, 1972

[44] Hile, R., Nishino, T., Flavoprotein structure and mechanism. 4. Xanthine oxidase and xanthine oxidoreductase. *FASEB J.*, 9, 995-1003, 1995

[45] Yamaguchi Y, Matsumura T, Ichida K, Okamoto K & Nishino T (2007) Human xanthine oxidase changes its substrate specificity to aldehyde oxidase type upon mutation of amino acid residues in the active site: roles of active site residues in binding and activation of purine substrate. *J Biochem (Tokyo)* 141, 513–524.

[46] Pauff JM, Hemann CF, Junemann N, Leimkuhler S & Hille R (2007) The role of arginine 310 in catalysis and substrate specificity in xanthine dehydrogenase from *Rhodobacter capsulatus*. *J Biol Chem* 282, 12785–12790.

[47] Ichida, K., Amaya, Y., Kamatani, N., Nishino, T., Hosoya, T., Sakai, O., Identification of two mutations in human xanthine dehydrogenase gene responsible for classical type I xanthinuria. *J. Clin. Invest.* 99, 2391-2397, 1997

[48] Ichida, K., Matsumura, t., Sakuma, R., Hosoya, T., Nishino, T., Mutation of human molybdenum cofactor sulfurase gene is responsible for classical xanthinuria II. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282, 1194-1200, 2001

[49] Reiss, J., Genetics of molybdenum cofactor deficiency. *Hum. Genet.* 106, 157-163, 2000

[50] Packer L, Glazer AN. *Methods in Enzymology, Volume 186 Oxygen Radicals in Biological Systems Part B, Oxygen Radicals and Antioxidants*, Academic Press, 1990; 651-656.

[51] Laycock SK, McMurray J, Kane KA and Parratt JR Effect of xanthine oxidase system on cardiac function in anaesthetised rats. *Free Radic Bio! Med* 1993; 15: 249-255.

[52] Dhalla NJ, Elmoselhi AF3, Hata T, Makino N. Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2000; 47: 446-456.

[53] Ostadal B, Ostadalova i. And Dhalla NS. Development of cardiac sensitivity to oxygen deficiency: comparative and ontogenetic aspects. *Physioi Rev* 1999; 79; 635-659.

- [54] Manning A, Bernier M, Crome R, Little S. and Hearse D. Reperfusion-induced arrhythmias: a study of the role of xanthine oxidase-derived free radicals in the rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 1988; 20: 35-45.
- [55] Downey JM, Miura T, Eddy LJ, et al. Xanthine oxidase is not a source of free radical in the ischemic rabbit heart. *J Mol Cell Cardiol* 1987; 19: 1053- 1060.
- [56] Bray RC. Xanthine oxidase. In: Boyer PD, Lardy HA, Myrback K, editors, second ed, *The enzymes*, Vol. 7, Academic Press, New York, 1963, pp. 533–55.
- [57] Granger, D.R., Hollwarth, M.E., Parks, D.A., Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals. *Acta Physiol. Scand.*, 548, 47-63, 1986
- [58] McCord, J.M., Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N.Engl. J. Med.*, 312, 159-163, 1985
- [59] Fadiloglu E., Ozyurt H., Erdogan H. ‘ Xanthine oxidase activities and malondialdehyde in heart tissue after myocardial ischemia-reperfusion on rats with hypertension induced by L-NAME’ *Ege tip dergisi* 40(2).75-81, 2004
- [60] Xia Y and Zweier JL. Substrate control of free radical generation from xanthine oxidase in the postischemic heart. *JBC* 1995. 270: 18797- 18803.
- [61] Netticadan T, Temsah R, Osada M and Dhalla NS. Status of Ca⁺²/calmodulin protein kinase phosphorylation of cardiac SR proteins in ischemia-reperfusion. *Am J Physiol (Cell Physiol)* 1999; 277: C384-C391.
- [62] Coetzee WA, Owen P, Dennis SC, Saman S and Opie LH. Reperfusion damage: free radicals mediate delayed membrane changes rather than early ventricular arrhythmias. *Cardiovasc Res* 1990; 24: 156-164.
- [63] Onat T., Emerk K., Sözmen E.Y., *İnsan Biyokimyası*, Palme Yayıncılık, Ankara, 2006
- [64] Terada LS, Radisavljevic Z, Mahr NN, Jacobson ED. Xanthine oxidase decreases production of gut wall nitric oxide. *Proc Soc Exp Bio. Med* 1997; 216 (3): 40-413.
- [65] Tamer Akar, Furanosterod Yapılı Bazı Bileşiklerin Antifungal Etkinliğinin Ve *Neurospora Crassa* Fungal Kültürünün Biyotransformasyon Ve Biyosorpsiyon Özelliklerinin İncelenmesi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Eskişehir, Aralık 2005, Doktora Tezi
- [66] Hanson, J.R., “An Introduction to Biotransformations in Organic Chemistry”, W.H. Freeman Spektrum, 1-58, New York, USA, 1995.
- [67] Arnold, L., “Small Bugs, Big Business: The Economic Power of the Microbe”, *Biotechnology Advances*, 18, 499-514, 2000.

- [68] Yıldırım, K., “ The Biotransformation and Synthesis of Some Steroids”, D. Phil. Thesis, Sussex University, 8-81, England, 2001.
- [69] Peterson, D. H., Murray, H. C., “Microbial Oxygenation of Steroids at Carbon 11”, *Journal of American. Chemical. Society*, 74, 1871-1872, 1952.
- [70] Ülkü Bağcıoğlu, Bazı Steroidlerin *Cephalosporium Aphidicola* Küfü İle Biyotransformasyonu, Sakarya üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2006
- [71] Nesrin Özyunar, Tiyosemikarbazonların Oksim Türevlerinin Ve Komplekslerinin Sentezi, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın,2006. Yüksek Lisans Tezi
- [72]Sabriye Çobanoğlu, Substitue Tiyosemikarbazonlar Ve Tiyadiazollerin Sentezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2005, Yüksek Lisans Tezi
- [73] Liberta AE, West DX. Antifungal and antitumour activity of heterocyclic thiosemicarbazones and their metal complexes. *Biometals* 1992; 5: 121- 126.
- [74] Cory JG, Cory AH, Rappa G, et al. Structurefunction relationships for a new series of pyridine- 2-carboxaldehyde thiosemicarbazones on ribonucleotide reductase activity and tumor cell growth in culture and in vivo. *Adv Enzyme Regul* 1995; 35: 55- 68.
- [75] Teitz Y, Barko N, Abramoff M, et al. Relationship between structure and antiretroviral activity of thiosemicarbazone derivatives. *Chemotherapy* 1994; 40: 195- 200.
- [76] Greenbaum DC, Mackey Z, Hansell E, et al. Synthesis and structure-activity relationships of parasiticidal thiosemicarbazone cysteine protease inhibitors against plasmodium falciparum, trypanosoma brucei, and trypanosoma cruzi. *J Med Chem* 2004; 47: 3212- 3219.
- [77] Dilović I, Rubčić M, Vrdoljak V, et al. Novel thiosemicarbazone derivatives as potential antitumor agents: Synthesis, physicochemical and structural properties, DNA interactions and antiproliferative activity. *Bioorg Med Chem* 2008; 16(9): 5189- 5198.
- [78] Rosu T, Gulea A, Nicolae A, et al. Complexes of 3d(n) metal ions with thiosemicarbazones: synthesis and antimicrobial activity. *Molecules* 2007; 12(4):782- 796.
- [79] Kumamoto T, Toyooka K, Nishida M, et al. Effect of 2,4-dihydro-3h-1,2,4-triazole-3- thiones and thiosemicarbazones on iodide uptake by the mouse thyroid: the relationship between their structure and anti-thyroid activity. *Chem Pharm Bull* 1990; 38(9): 2596- 2606.

- [80] Williams MT, Simonet L, Cory AH, et al. Liver microsomal inactivation of 4-methyl-5-amino-1-formylisoquinoline thiosemicarbazone as an inhibitor of ribonucleotide reductase. *Cancer Res* 1988; 48: 6375-6378.
- [81] Byrnes RW, Mohan M, Antholine WE, et al. Oxidative stress induced by a copperthiosemicarbazone complex. *Biochemistry* 1990; 29(30): 7046- 7053.
- [82] Perez JM, Matesanz AI, Martin-Ambite A, et al. Synthesis and characterization of complexes of p-isopropylbenzaldehyde and methyl-2-pyridyl ketone thiosemicarbazones with Zn (II) and Cd(II) metallic centers, cytotoxic activity and induction of apoptosis in p38⁺ cells. *J Inorg Biochem* 1999; 75: 255-261.
- [83] Karatepe M, Karatas F. Antioxidant, prooxidant effect of the thiosemicarbazone derivative Schiff base (4-(1-phenylmethylcyclobutane-3-yl)-2-(2-hydroxybenzylidene-hydrazino)thiazole) and its metal complexes on rats. *Cell Biochem Funct* 2006; 24(6): 547- 554.
- [84] Brockman, R. W., Thompson, J. R., Bell, M. J., Skipper, H. E. (1956). Observations on the antileukemic activity of pyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone and thiocarbohydrazone. *Cancer Res.*, 16 (2), 167- 170.
- [85] French, F. A., Blanz, E. J., Amaral, J. R. D., French, D. A. (1970). Carcinostatic activity of thiosemicarbazones of formyl heteroaromatic compounds. VI. 1-Formylisoquinoline derivatives bearing additional ring substituents, with notes on mechanism of action. *J. of Med. Chem.*, 13 (6), 1117- 1124.
- [86] French, F. A., Blanz, E. J., Shaddix, S. C., Brockman, R. W. (1974). α -(N)-Formylheteroaromatic thiosemicarbazones. Inhibition of tumor-derived ribonucleoside diphosphate reductase and correlation with in vivo antitumor activity. *J. of Med. Chem.*, 17 (2), 172- 181.
- [87] Ren, S., Wang, R., Komatsu, K., Bonaz-Krause, P., Zyrianov, Y., McKenna, C. E., Csipke, C., Tokes, Z. A., Lien, E. J. (2002). Synthesis, biological evaluation, and quantitative structure-activity relationship analysis of new Schiff bases of hydroxysemicarbazide as potential antitumor agents. *J. of Med. Chem.*, 45 (2), 410-419.
- [88] Ommat, R., Vademecum, Hacettepe Taş Kitapçılık, Ankara, (2004), 220-1138.
- [89] Selma Sinan, İnsan Serum Paraoksonaz Enziminin Yeni Bir Yöntemle Saflaştırılması Ve Bazı Antibiyotiklerin Enzim Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir, 2005
- [90] Erat, M., Sakiroglu, H. and Ciftci, M., "Purification and characterization of glutathione reductase from bovine erythrocytes", *Prep. Biochem. Biotechnol.*, (2003) 33(4), 283.

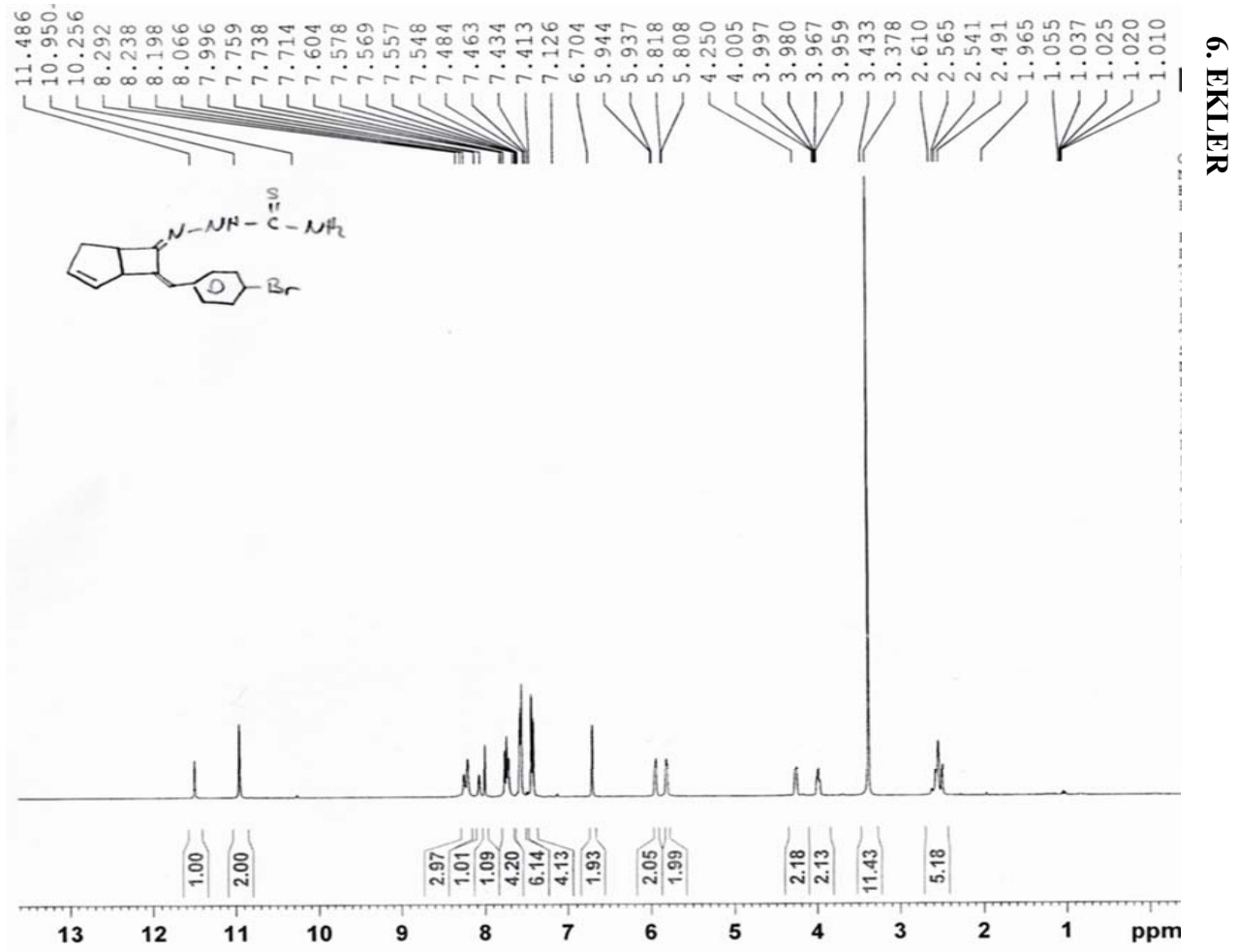
- [91] Umeki, S., “Anti-inflammatory action of gentamycin through inhibitory effect on neutrophil NADPH oxidase activity”, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, (1995) 110(4), 817.
- [92] Beydemir, S., Kulacoglu, D., Ciftçi, F. and Küfrevioğlu, Ö.I., “The effects of some antibiotics on sheep lens glucose 6-phosphate dehydrogenase in vitro”, *Eur. J. Ophthalmol.*, (2003) 13, 155.
- [93] Çiftçi, M., Türkoğlu, V. and Aldemir, S., “Effects of some antibiotics on glucose 6-phosphate dehydrogenase in sheep liver”, *Vet.Med-Czech*, (2002) 47, 283.
- [94] Çoban, A.T., Nalbantoglu, B., Çıl, M.Y., Özdemir, H., Küfrevioğlu, O.I., “Investigation of the Inhibition Effects of Some Antibiotics on Human Erythrocyte Carbonic Anhydrase Isozymes”, *Tr. J. of Medical Sciences*, (1998) 28, 407.
- [95] Beydemir, Ş., Çiftçi, M., Özmen, İ., Okuroğlu, M.E.B., Özdemir, H. and Küfrevioğlu, Ö.İ., “Effects of Some Medical Drugs on Enzyme Activities of Carbonic Anhydrase from Human Erythrocytes in vitro and from Rat Erythrocytes in vivo”, *Pharmacological Research*, (2000) 42, 187.
- [96] Çiftçi, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., Gündoğdu, M. and Özmen, İ., “Effects of Some Antibiotics on Enzyme Activity of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from Human Erythrocyte”, *Pharmacol Res.*, (2000) 41, 109.
- [97] Rodrigues, A.D., Roberts, E.M., Mulford, D.J., Yao, Y. and Ouellet, D., “Oxidative metabolism of clarithromycin in the presence of human liver microsomes. Major role for the cytochrome P4503A (CYP3A) subfamily”, *Drug Metab Dispos*, (1997) 25, 623.
- [98] Gorski, J.C., Jones, D.R., Haehner-Daniels, B.D., Hamman, M.A., O’Mara, E.M. Jr. and Hall, S.D., “The contribution of intestinal and hepatic CYP3A to the interaction between midazolam and clarithromycin”, *Clin. Pharmacol. Ther.*, (1998) 64, 133.
- [99] Bruce, M.A., Hall, S.D., Haehner-Daniels, B.D. and Gorski, J.C., “In vivo Effects of Clarithromycin on Multiple Cytochrome P450S”, *Drug Metabolism and Disposition*, (2001) 29(7), 1023.
- [100] Frolova, L.Y., Meldrays, Y.A., Kochkina, L.L., Giller, S.A., Eremeyev, A.V., Grayevskaya, N.A. and Kisselev, L.L., “DNA-polymerase inhibitors. Rifamycin derivatives”, *Nucleic Acids Research*, (1977) 4(3), 523.
- [101] Spisani, S., Traniello, S., Onori, A.M., Rizzuti, O., Martuccio, C. and Callai, L., “3-(Carboxylathio) Rifamycin San d SV Derivatives Inhibit Human Neutrophil Functions”, *Inflammation*, (1998) 22(5), 459.
- [102] http://jpdb.nihs.go.jp/jp/gif_eng/Kanamycin_Sulfate.gif (Mart, 2010)

- [103] Ozer N., Muftuoglu M., Ataman D., Ercan A., Ogus I.H., ‘ Simple, high-yield purification of xanthine oxidase from bovine milk’ *J. Biochem. Biophys. Methods* 39 (1999) 152- 159
- [104] Massey V., Brumby P.E., ‘ Studies on milk xanthine oxidase: Some spectral and kinetic properties.’ *J. Biol. Chem.* 1969;244:1682- 91
- [105] Bradford, M. M., , “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”, *Anal. Biochem.*, (1976) 72, 248.
- [106] Arslan, O., Nalbantoğlu, B., Demir, N., Özdemir, and H., Küfrevioğlu, İ. Ö., “A New Method for the Purification of Carbonic anhydrase Isozymes by Affinity Chromatography”, *Turk J. Med Sci.*, 26, (1995), 163-166.
- [107] Laemmli, D. K., “Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T₄”, *Nature*, London, (1970), 227-680.
- [108] Arslan, O., Inhibition of bovine carbonic anhydrase by new sulfonamide compounds. *Biochemistry (Moscow)* (2001) 66, 9, 1206-1208.
- [109] Arslan, O., Çakır, Ü. and Uğraş, H.İ. “Synthesis of New Sulfonamide Inhibitors of Carbonic Anhydrase” *Biochemistry (Moscow)* (2002) 67, 9, 1273-1276.
- [110] Keha, E.E., Karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması için geliştirilmiş bir afinite kromatografisi metodu, Doçentlik Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Erzurum.
- [111] Wistrand, P.J., Lindahl, S. and Wahlstrand, T., “Human renal carbonic anhydrase. Purification and properties”, *Eur J. Biochem.*, (1975) 57, 189.
- [112] Luisa Maia, and Lurdes Mira, Xanthine Oxidase and Aldehyde Oxidase: A Simple Procedure for the Simultaneous Purification from Rat Liver, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 400 (1) , 48–53, 2002
- [113] J. L. McManaman, V. Shellman, R. M. Wright, and J. E. Repine, Purification of Rat Liver Xanthine Oxidase and Xanthine Dehydrogenase by Affinity Chromatography on Benzamidine-Sepharose, *Archives Of Biochemistry And Biophysics*, 332 (1),135–141, 1996
- [114] Çiftçi, M., Beydemir, Ş., Yılmaz, H. ,Bakan, E., “Effects of some drugs on rat erythrocyte 6-phosphogluconate dehydrogenase: an *in vitro* and *in vivo* study”, *Polish Journal of Pharmacology*, (2002) 54, 275-280.

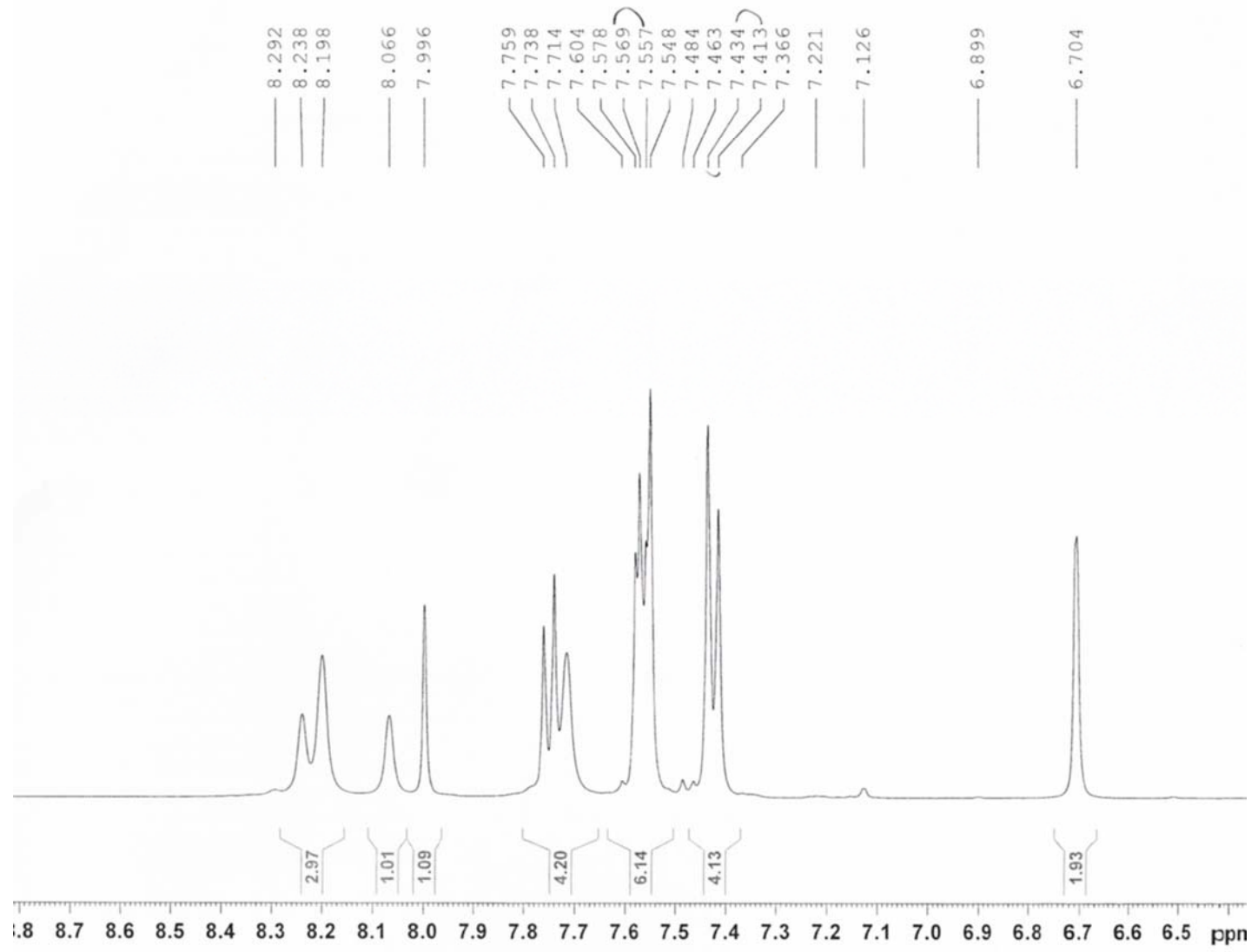
[115] Beydemir, Ş., Çiftçi, M., Küfrevioğlu Öİ., Büyükokuroğlu, ME., “Effects of Gentamicin Sulfate on Enzyme Activities of Carbonic Anhydrase from Human Erythrocytes *in Vitro* and from Rat Erythrocytes *in Vivo*”,(2002) *Biological-Pharmaceutical Bulletin*, 25(8) 966.

[116] Çiftçi, M., Küfrevioğlu, Öİ., Gündoğdu, M., Özmen, I., “Effects of some antibiotics on enzyme activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes”, *Pharmacol Res.* (2000), 41(1):109-13.

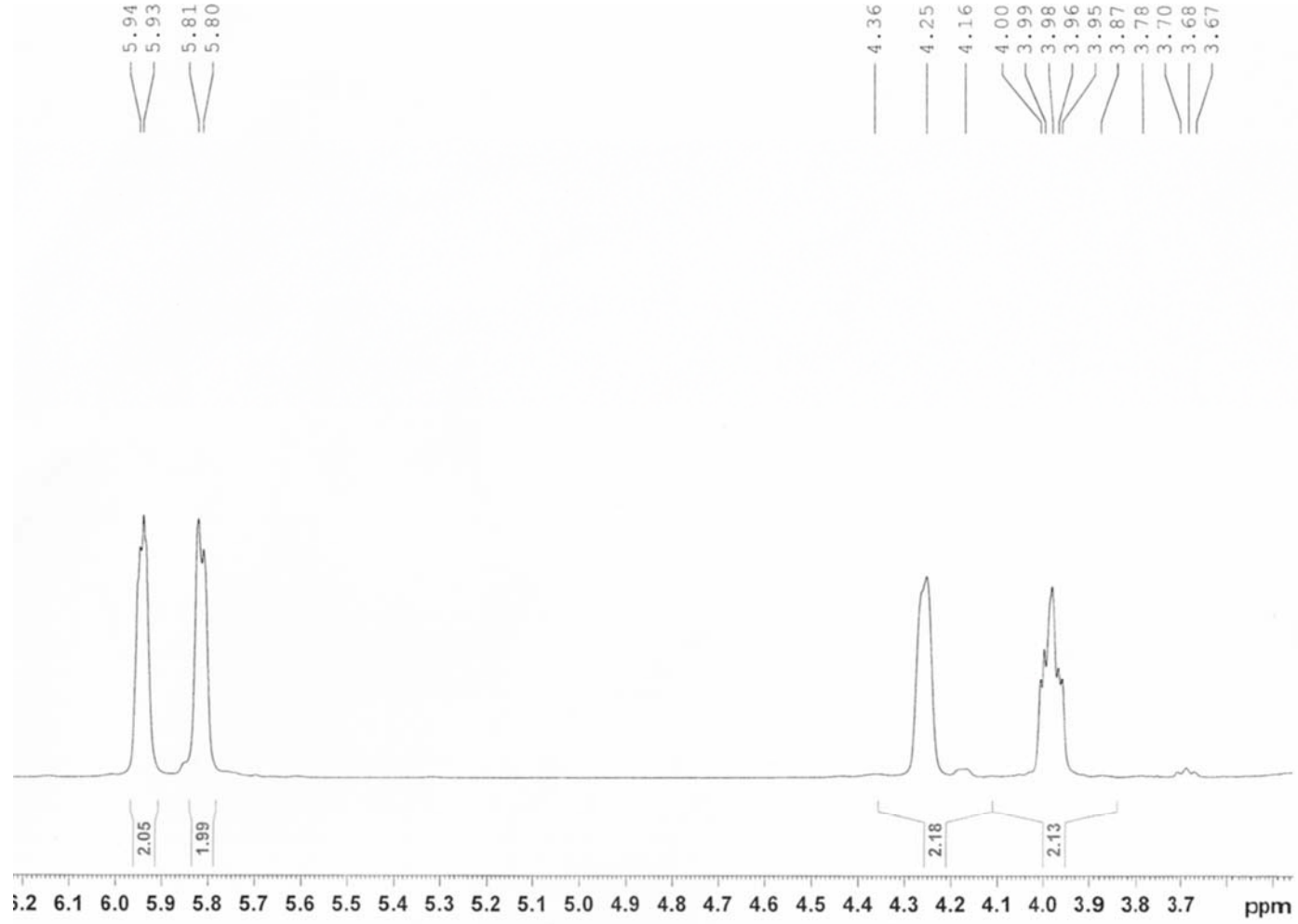
[117] Ateşşahin, A., Karahan, İ., Prinçci, İ., Gürsu, F., Gülcü, F., “Effects of phenobarbital on serum and liver paraoxonase and arylesterase activities in rats”., *Turkish J. Veterinary animal Science* (2004) 28, 363-367.



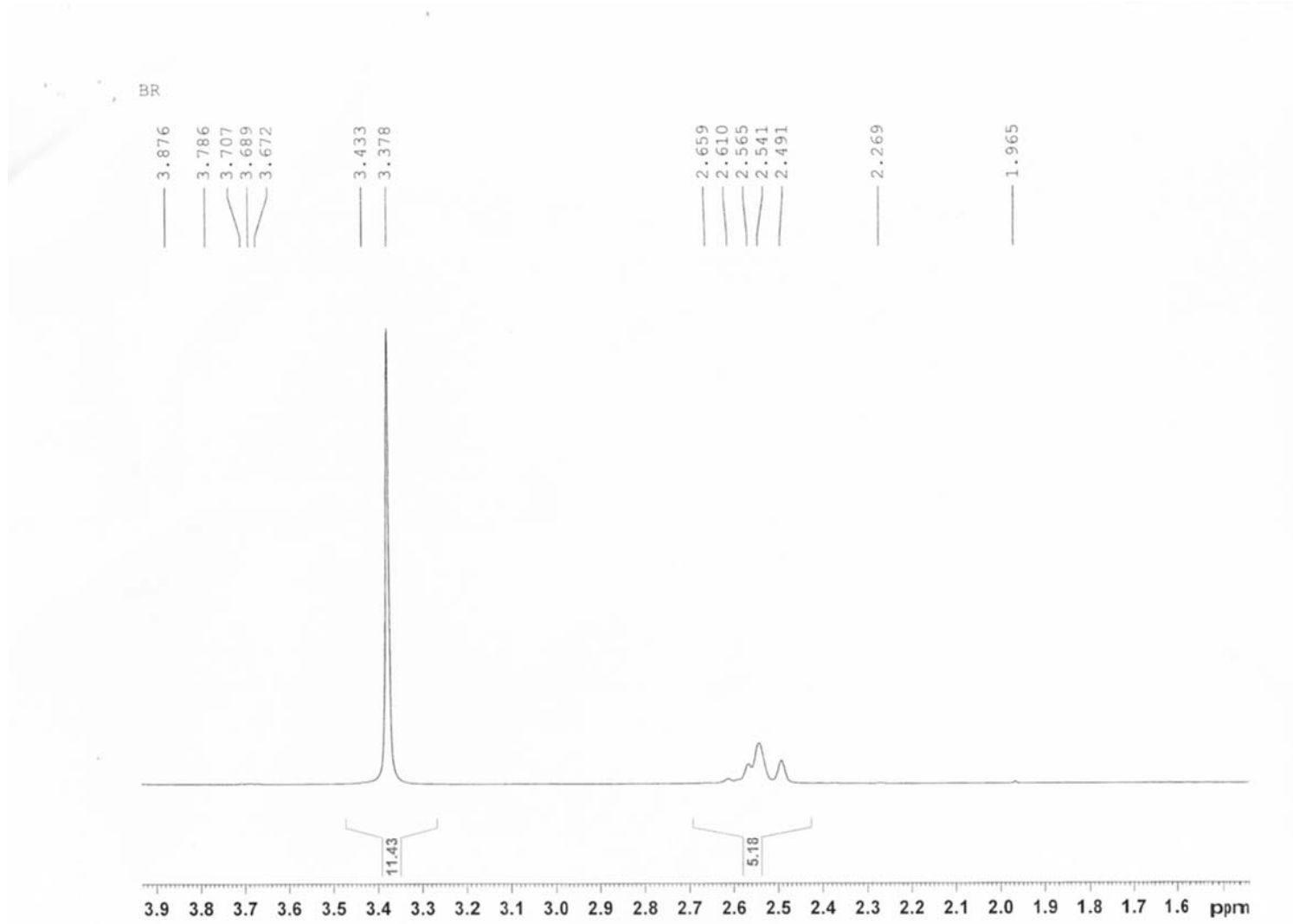
Şekil 6.1.1 Btc Bileşiğinin Ksantin Oksidaz Enzimiyle Biotransformasyonu Sonucu Elde Edilen Ürünün ¹H-NMR Spektrumu



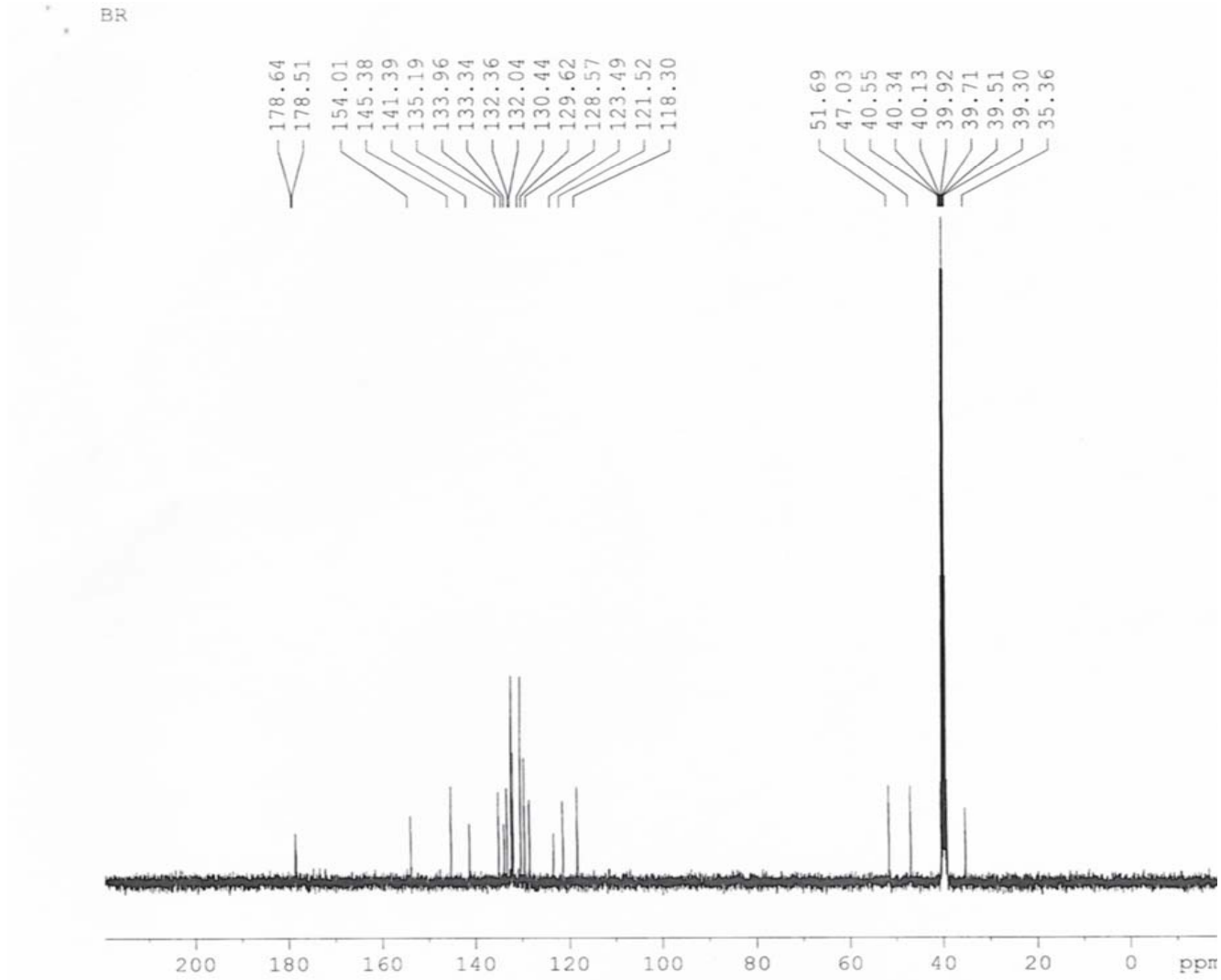
Şekil 6.1.2 Btc Bileşiğinin Ksantin Oksidaz Enzimiyle Biotransformasyonu Sonucu Elde Edilen Ürünün $^1\text{H-NMR}$ Spektrumu



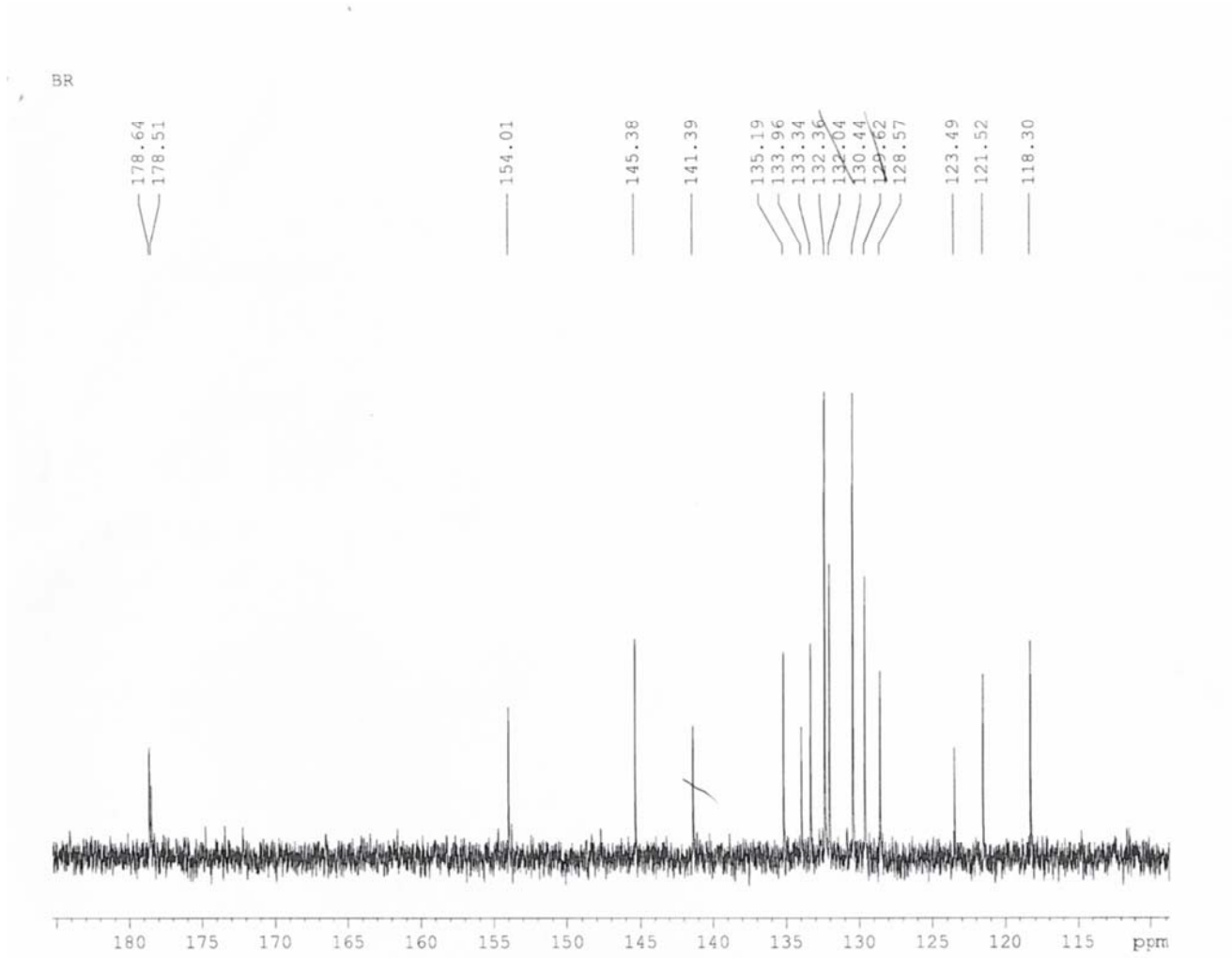
Şekil 6.1.3 Btc Bileşiğinin Ksantin Oksidaz Enzimiyle Biyotransformasyonu Sonucu Elde Edilen Ürünün $^1\text{H-NMR}$ Spektrumu



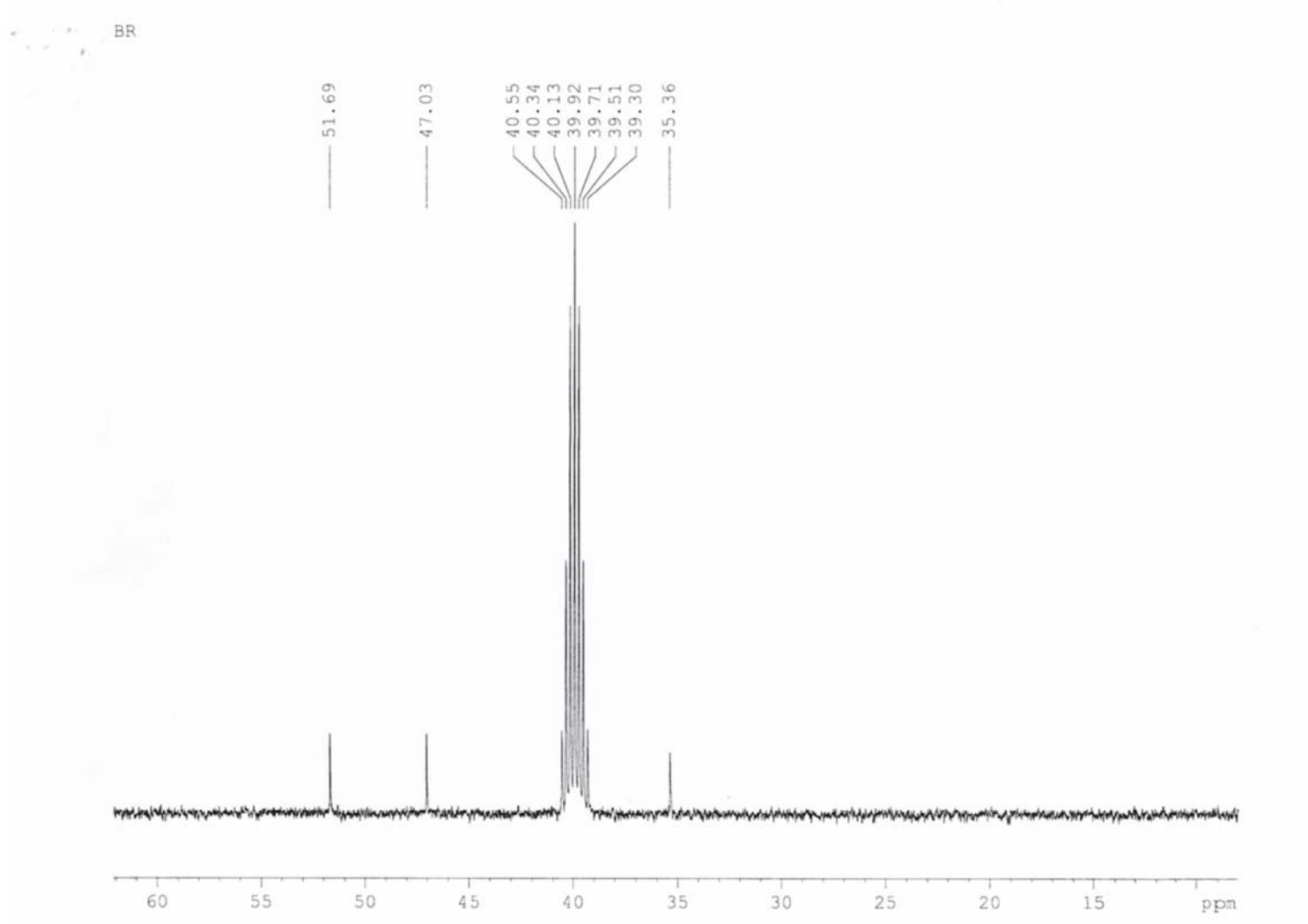
Şekil 6.1.4 Btc Bileşiğinin Ksantin Oksidaz Enzimiyle Biotransformasyonu Sonucu Elde Edilen Ürünün $^1\text{H-NMR}$ Spektrumu



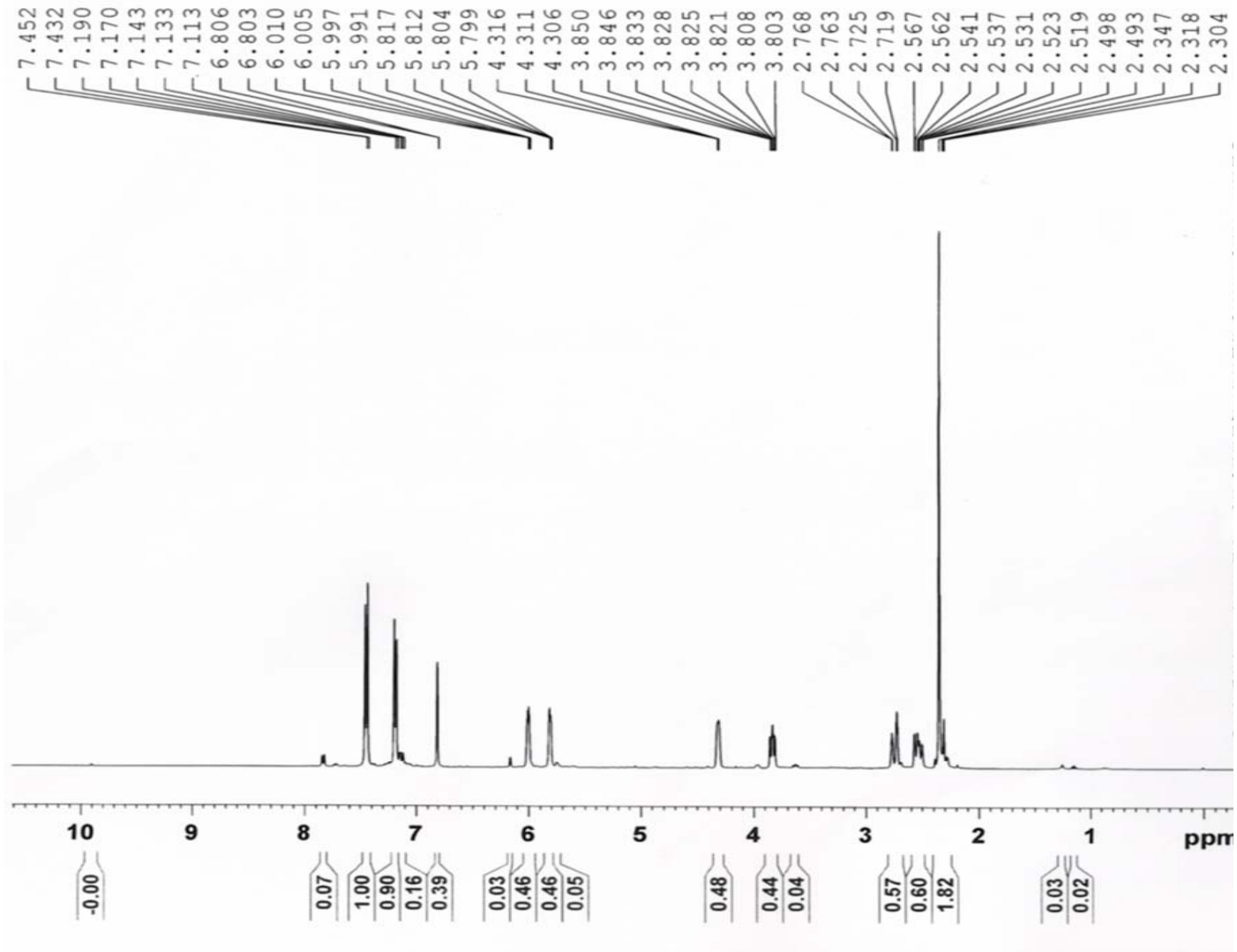
Şekil 6.2.1 Btc Bileşiğinin Ksantin Oksidaz Enzimiyle Biotransformasyonu Sonucu Elde Edilen Ürünün ^{13}C -NMR Spektrumu



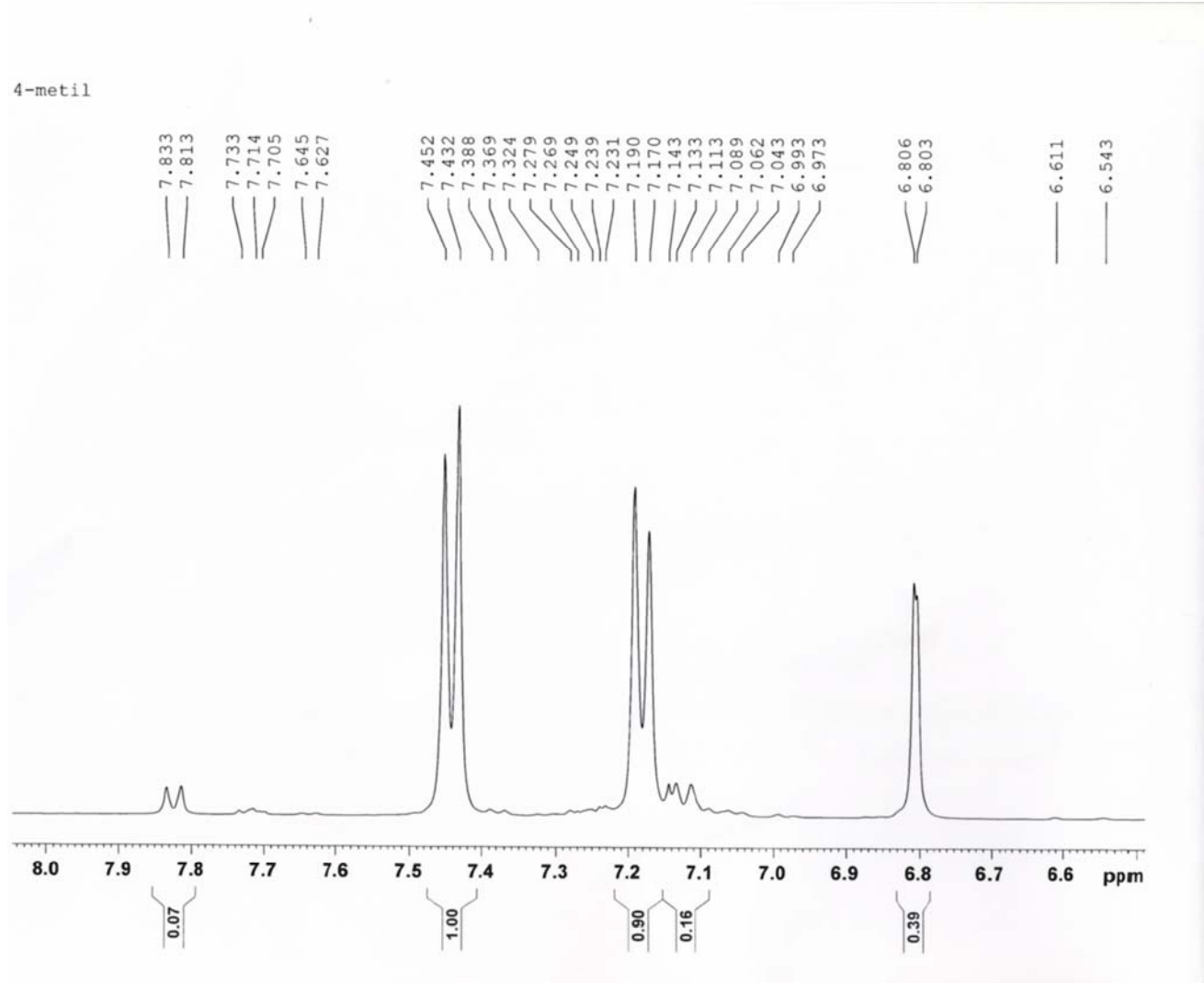
Şekil 6.2.2 Btc Bileşiğinin Ksantin Oksidaz Enzimiyle Biotransformasyonu Sonucu Elde Edilen Ürünün ^{13}C -NMR Spektrumu



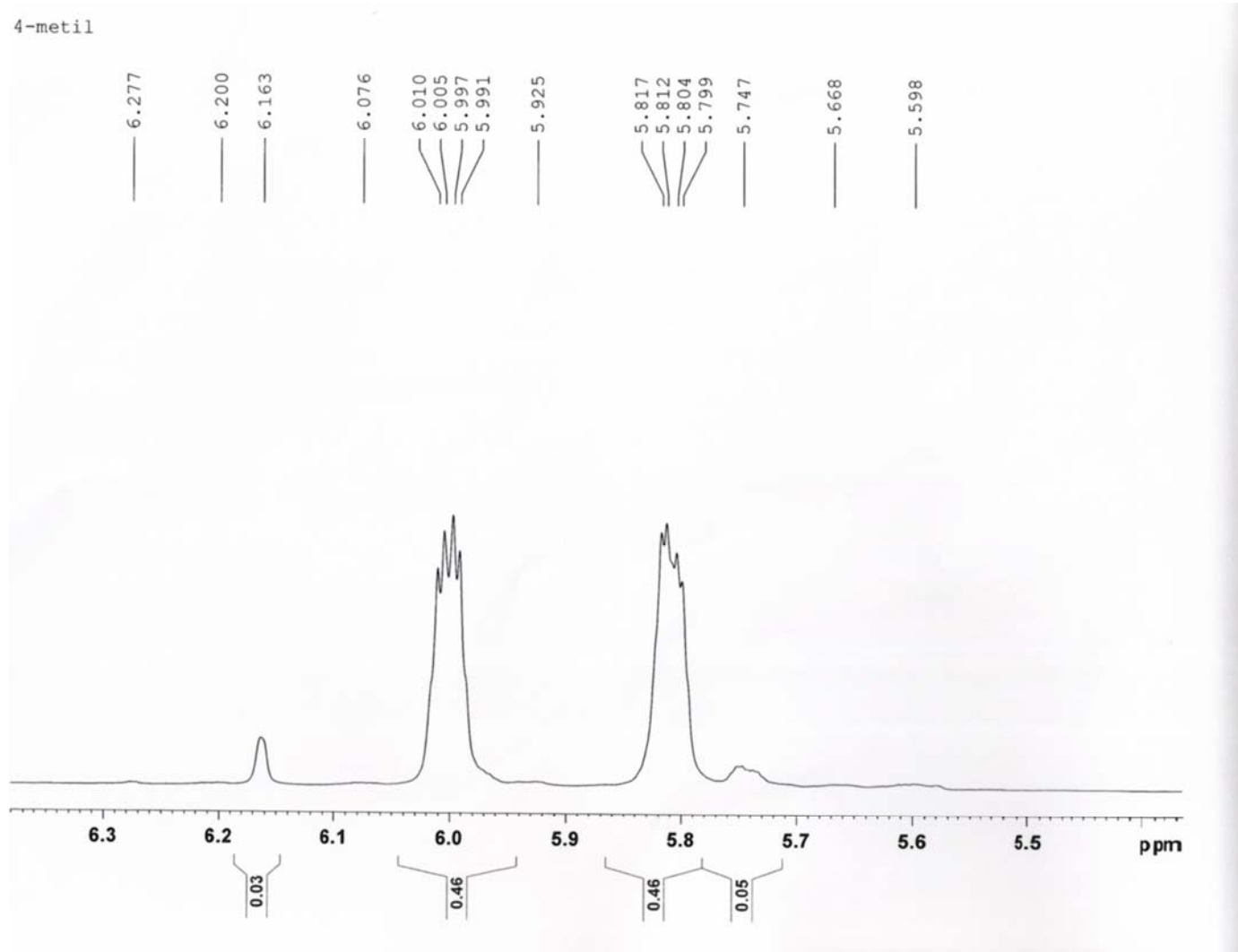
Şekil 6.2.3 Btc Bileşiğinin Ksantin Oksidaz Enzimiyle Biotransformasyonu Sonucu Elde Edilen Ürünün ^{13}C -NMR Spektrumu



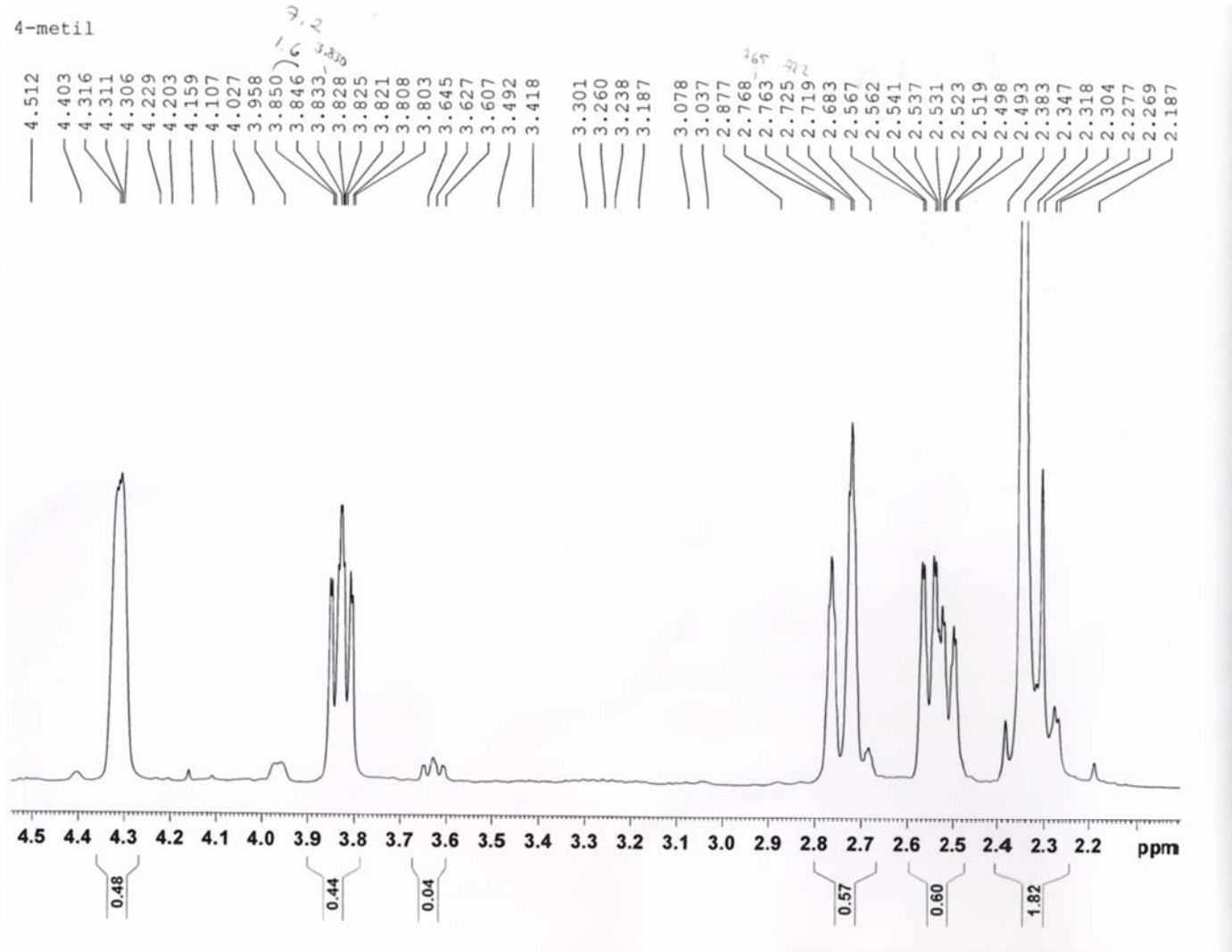
Şekil 6.3.1 4Mtc Bileşiğinin Ksantin Oksidaz Enzimiyle Biotransformasyonu Sonucu Elde Edilen Ürünün $^1\text{H-NMR}$ Spektrumu



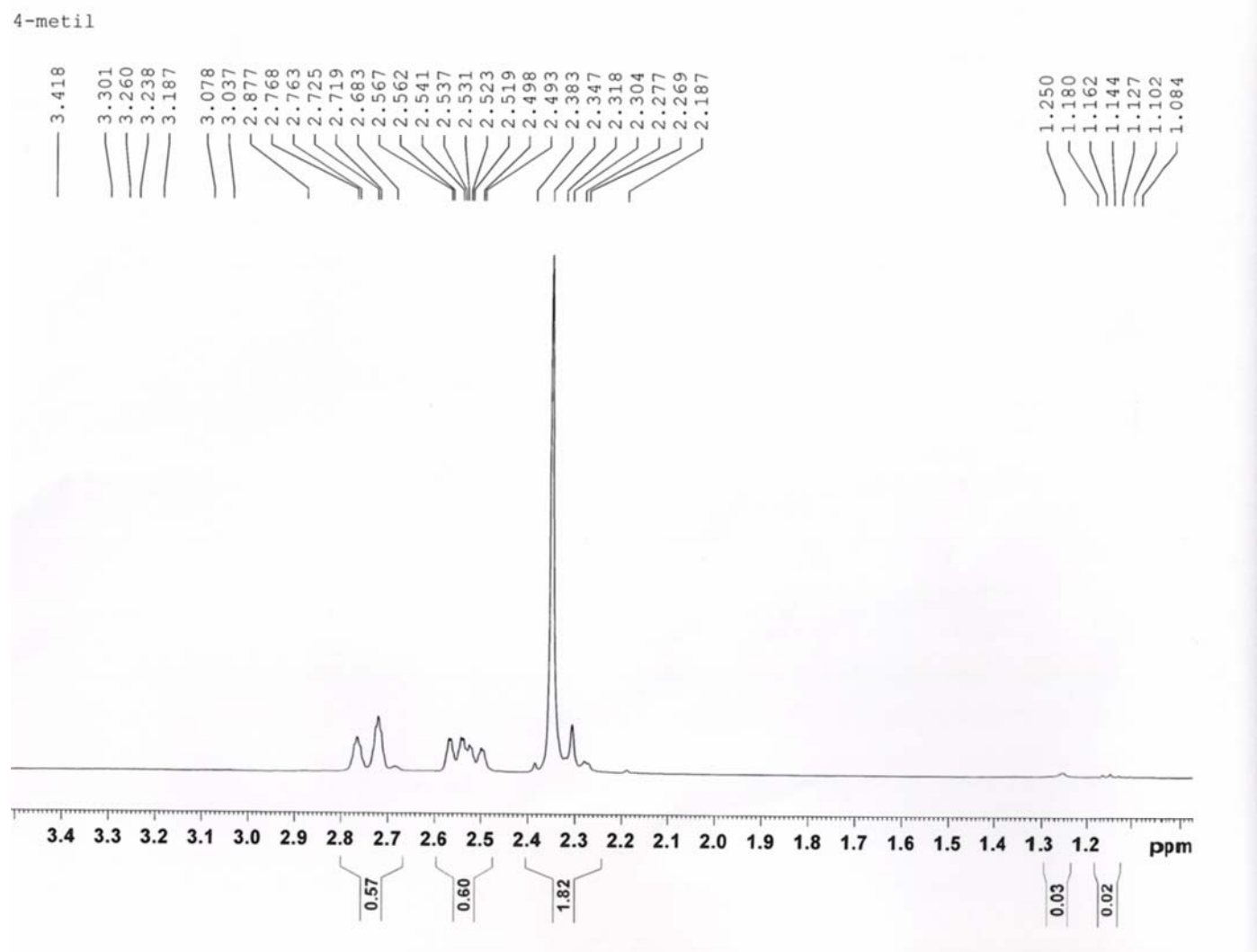
Şekil 6.3.2 4Mtc Bileşiğinin Ksantin Oksidaz Enzimiyle Biotransformasyonu Sonucu Elde Edilen Ürünün ¹H-NMR Spektrumu



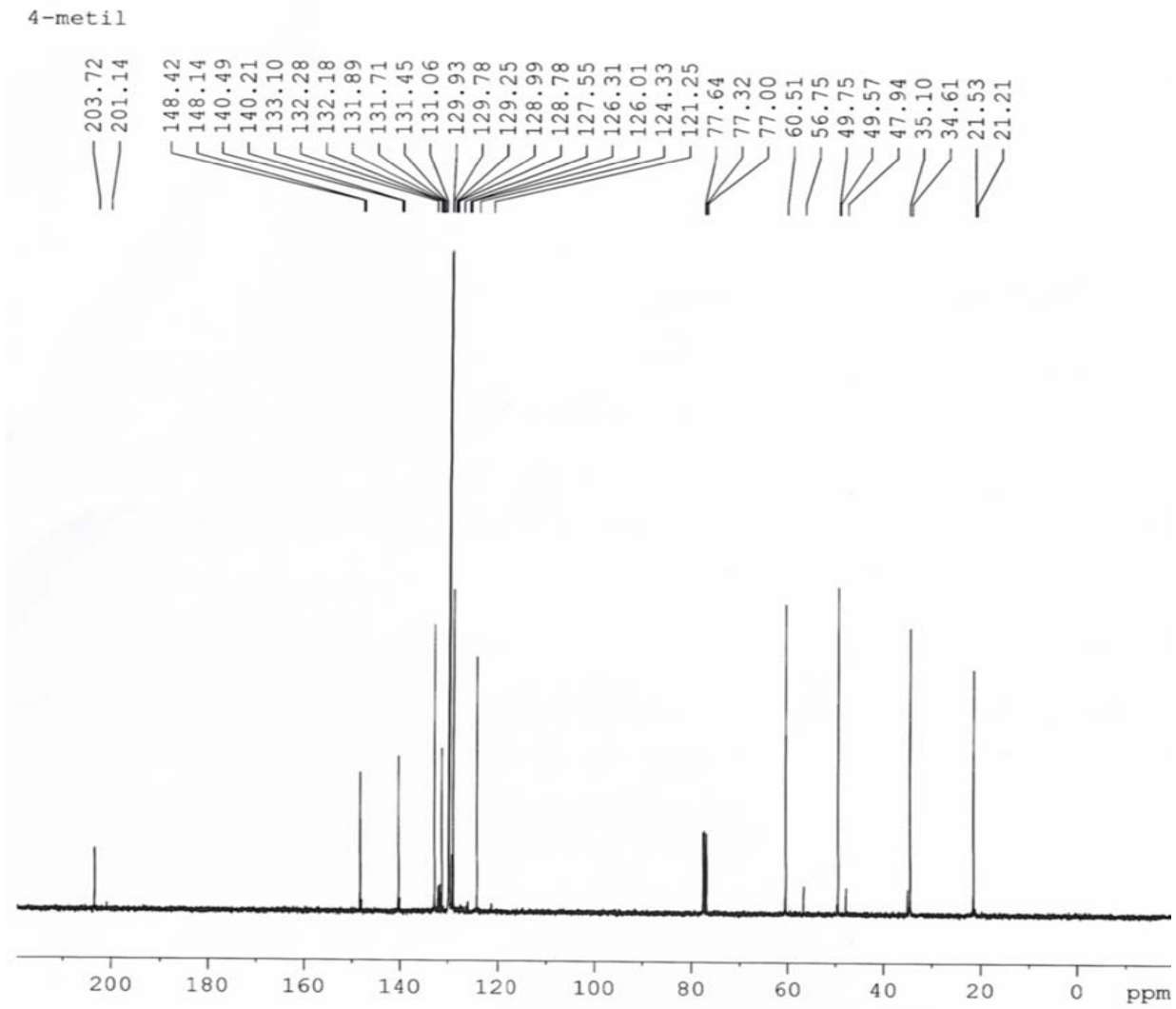
Şekil 6.3.3 4Mtc Bileşiğinin Ksantin Oksidaz Enzimiyle Biotransformasyonu Sonucu Elde Edilen Ürünün $^1\text{H-NMR}$ Spektrumu



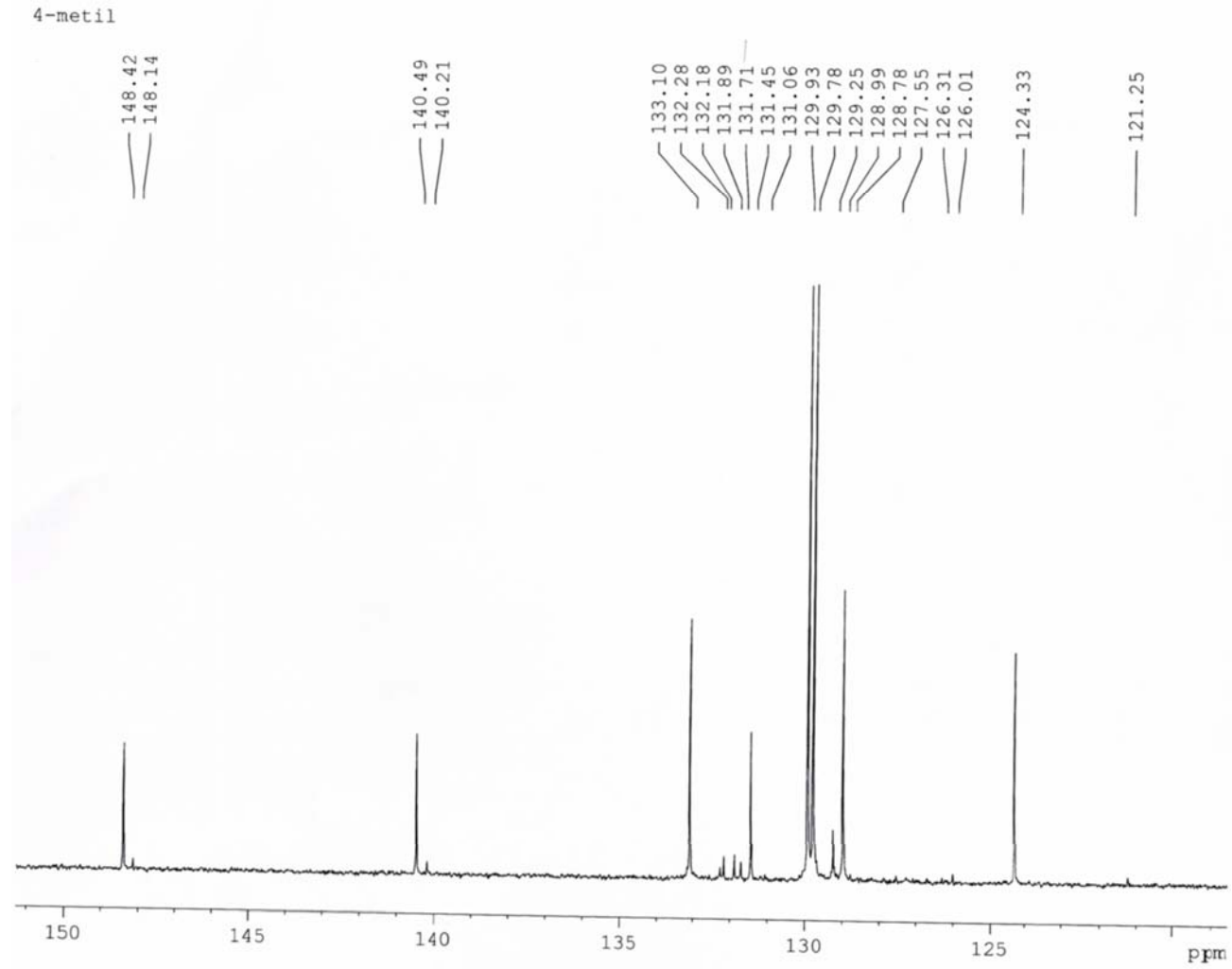
Şekil 6.3.4 4Mtc Bileşiğinin Ksantin Oksidaz Enzimiyle Biotransformasyonu Sonucu Elde Edilen Ürünün $^1\text{H-NMR}$ Spektrumu



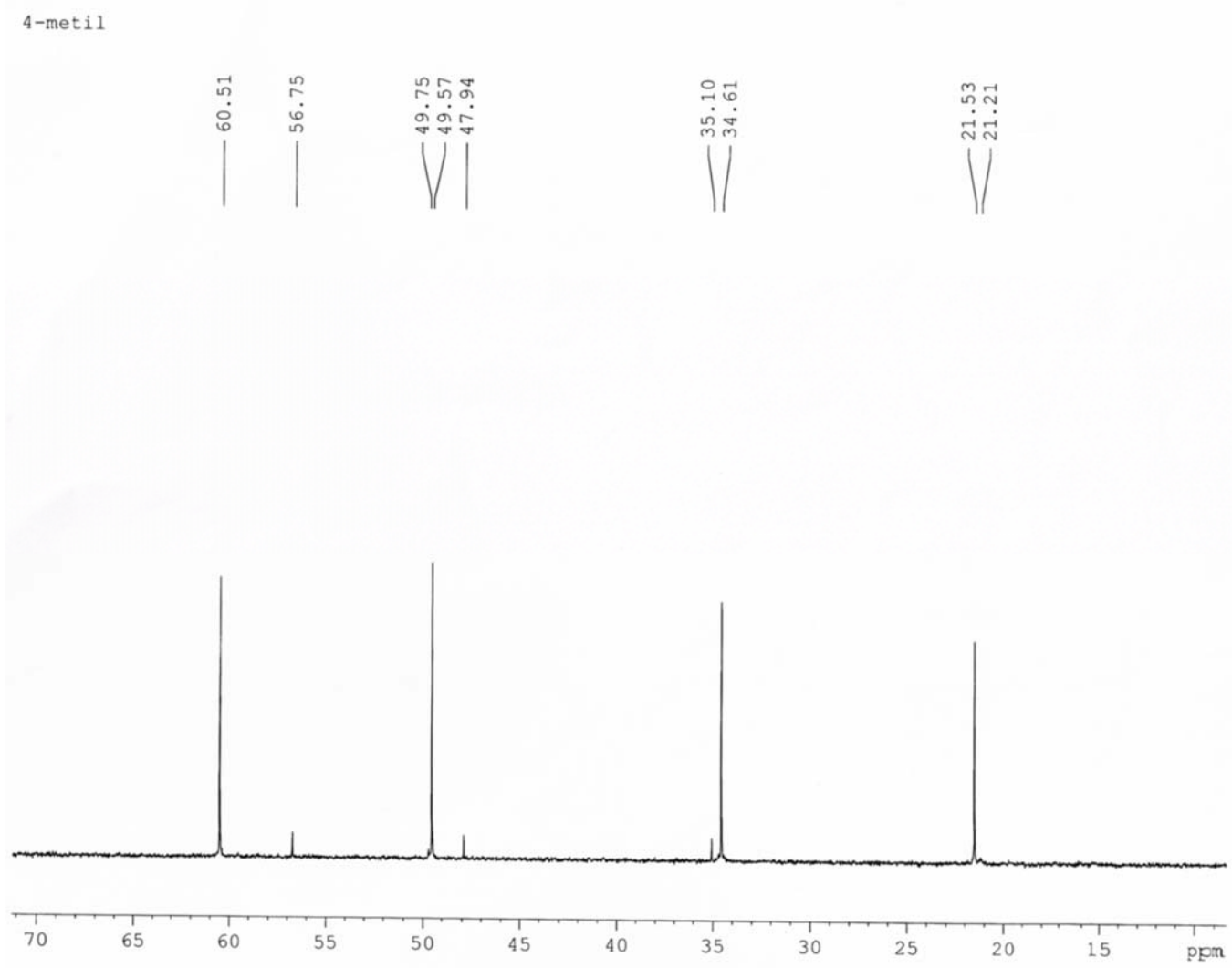
Şekil 6.3.5 4Mtc Bileşiminin Ksantin Oksidaz Enzimiyle Biotransformasyonu Sonucu Elde Edilen Ürünün $^1\text{H-NMR}$ Spektrumu



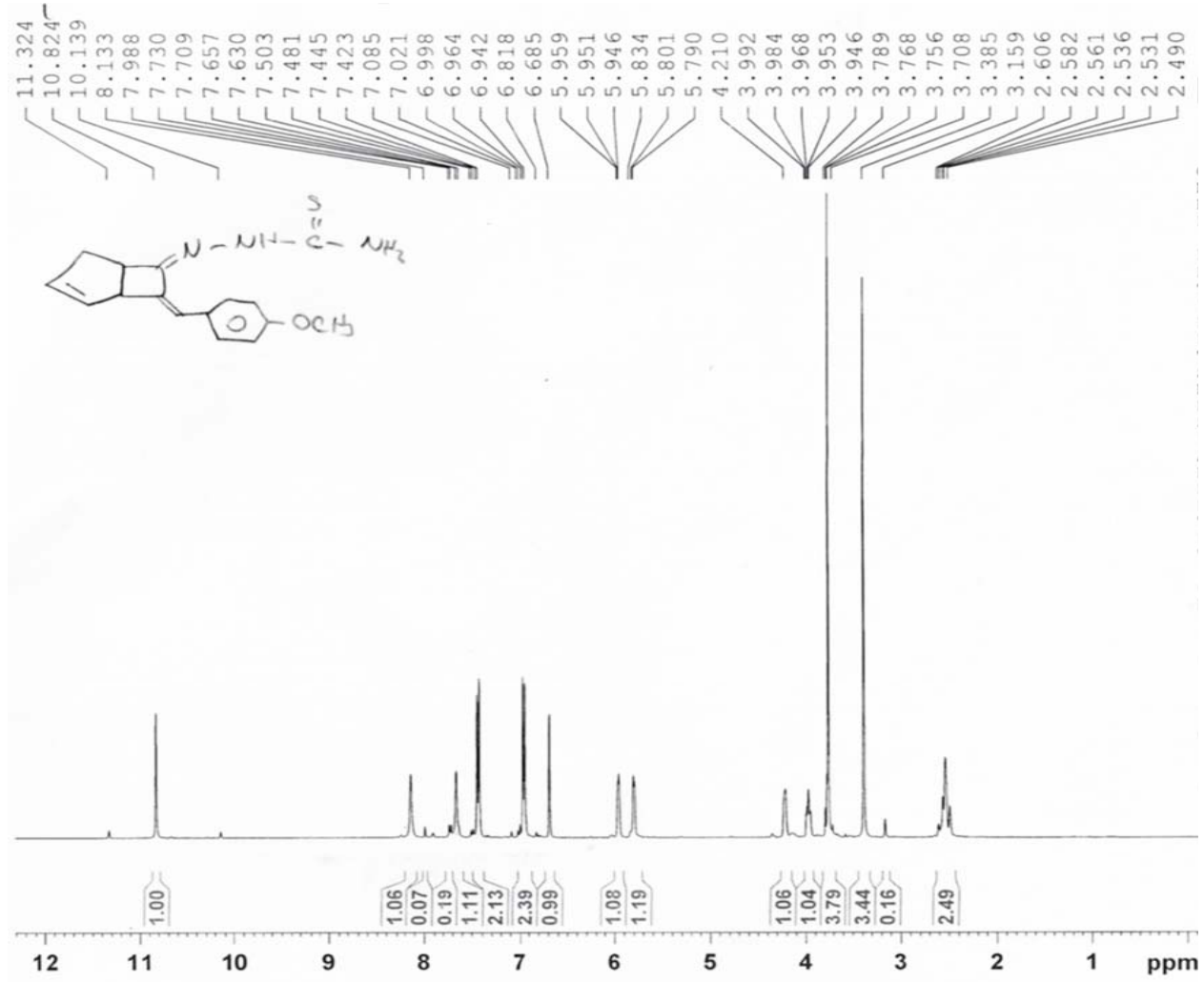
Şekil 6.4.1 4Mtc Bileşiğinin Ksantin Oksidaz Enzimiyle Biotransformasyonu Sonucu Elde Edilen Ürünün ^{13}C -NMR Spektrumu



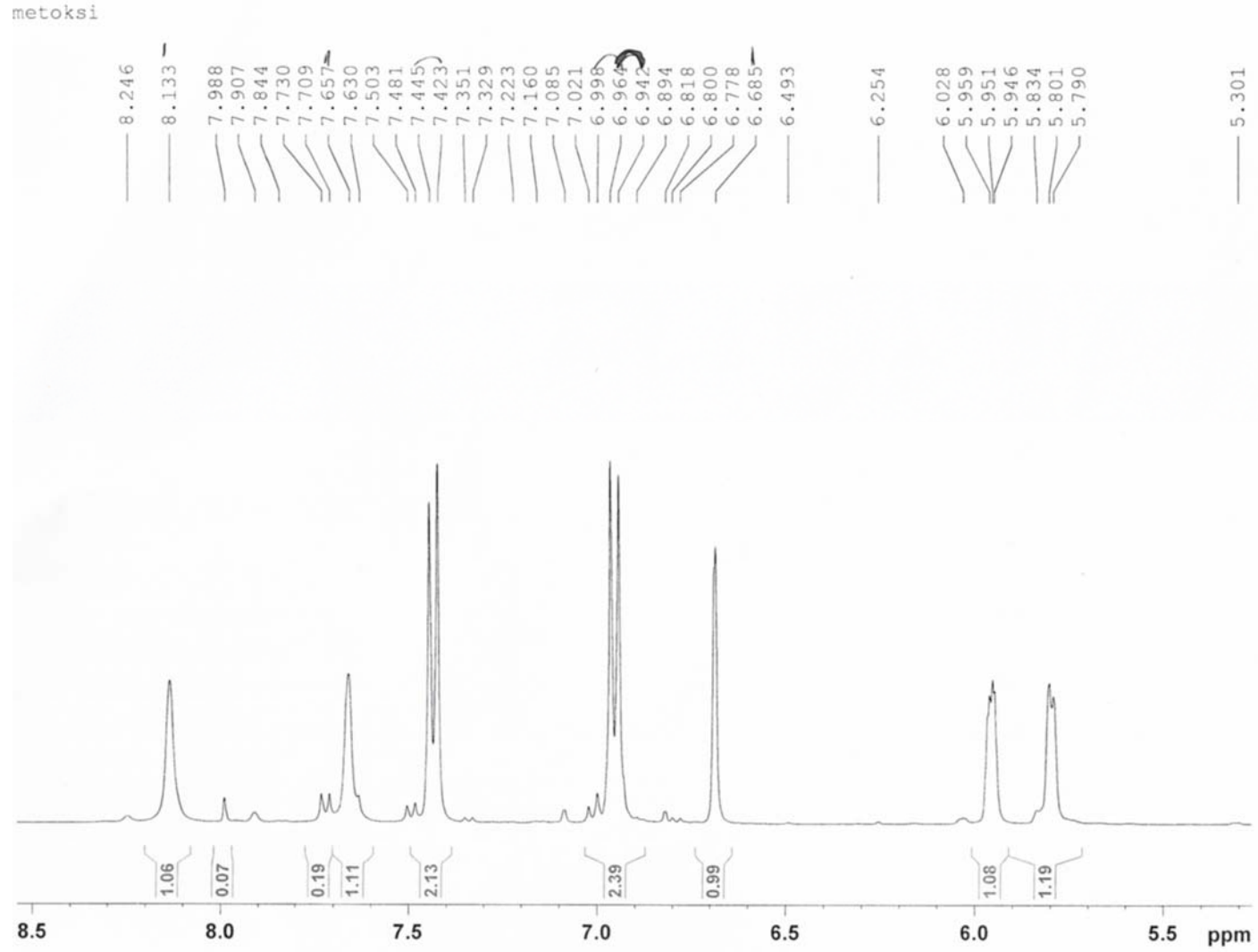
Şekil 6.4.2 4Mtc Bileşiğinin Ksantin Oksidaz Enzimiyle Biotransformasyonu Sonucu Elde Edilen Ürünün ^{13}C -NMR Spektrumu



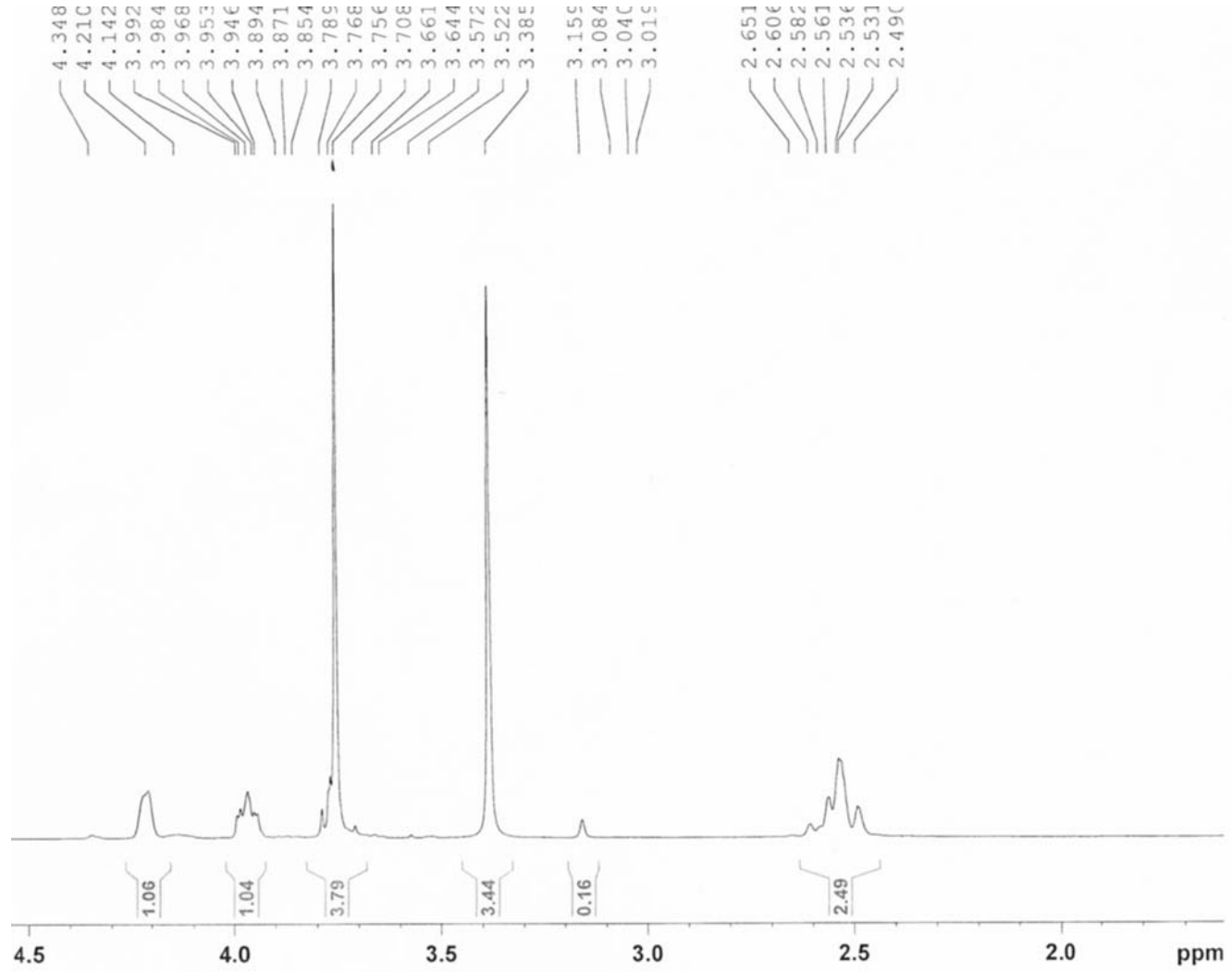
Şekil 6.4.3 4Mtc Bileşiğinin Ksantin Oksidaz Enzimiyle Biotransformasyonu Sonucu Elde Edilen Ürünün ^{13}C -NMR Spektrumu



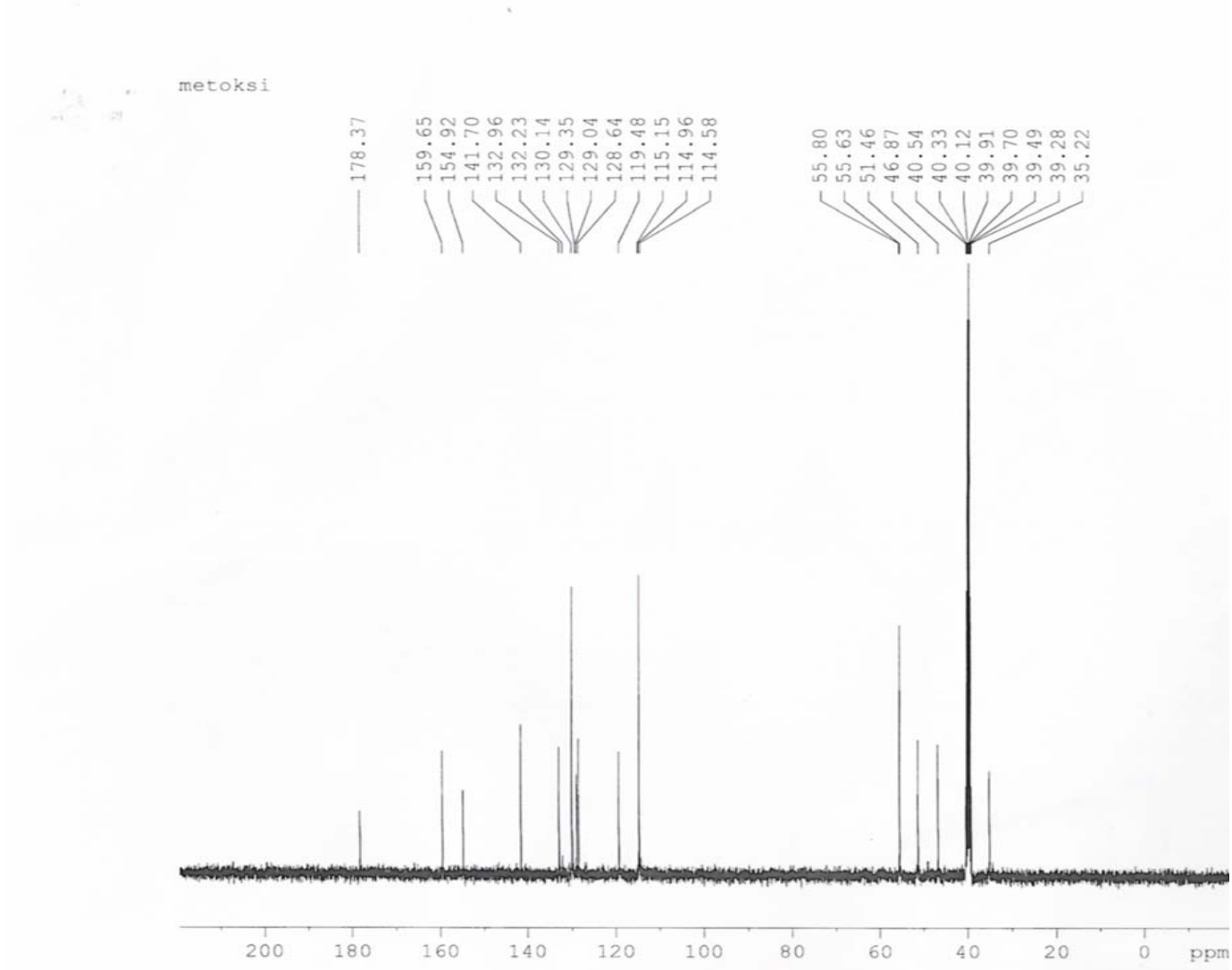
Şekil 6.5.1 Mtc Bileşiğinin Ksantin Oksidaz Enzimiyle Biotransformasyonu Sonucu Elde Edilen Ürünün ¹H-NMR Spektrumu



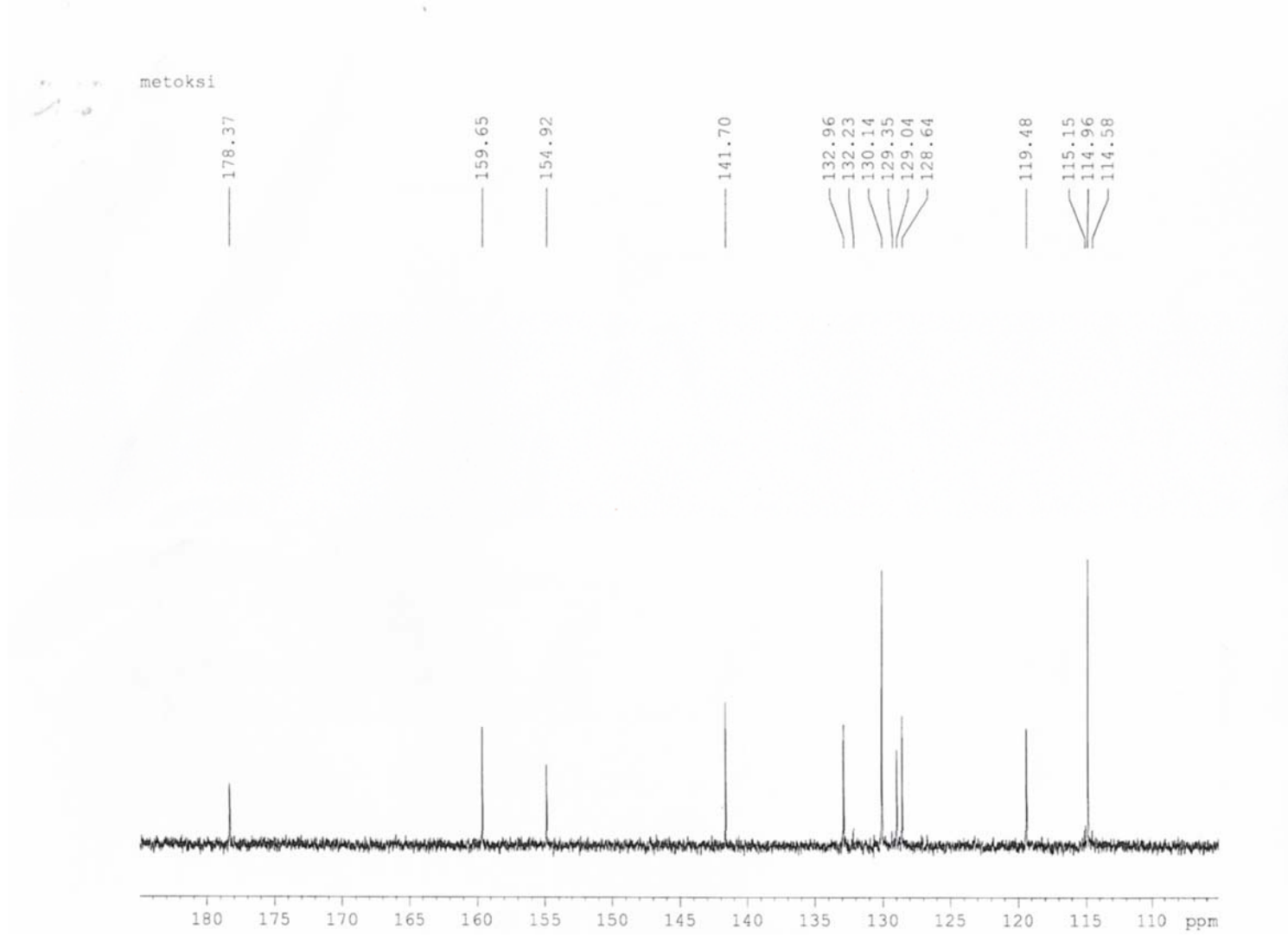
Şekil 6.5.2 Mtc Bileşiğinin Ksantin Oksidaz Enzimiyle Biotransformasyonu Sonucu Elde Edilen Ürünün ¹H-NMR Spektrumu



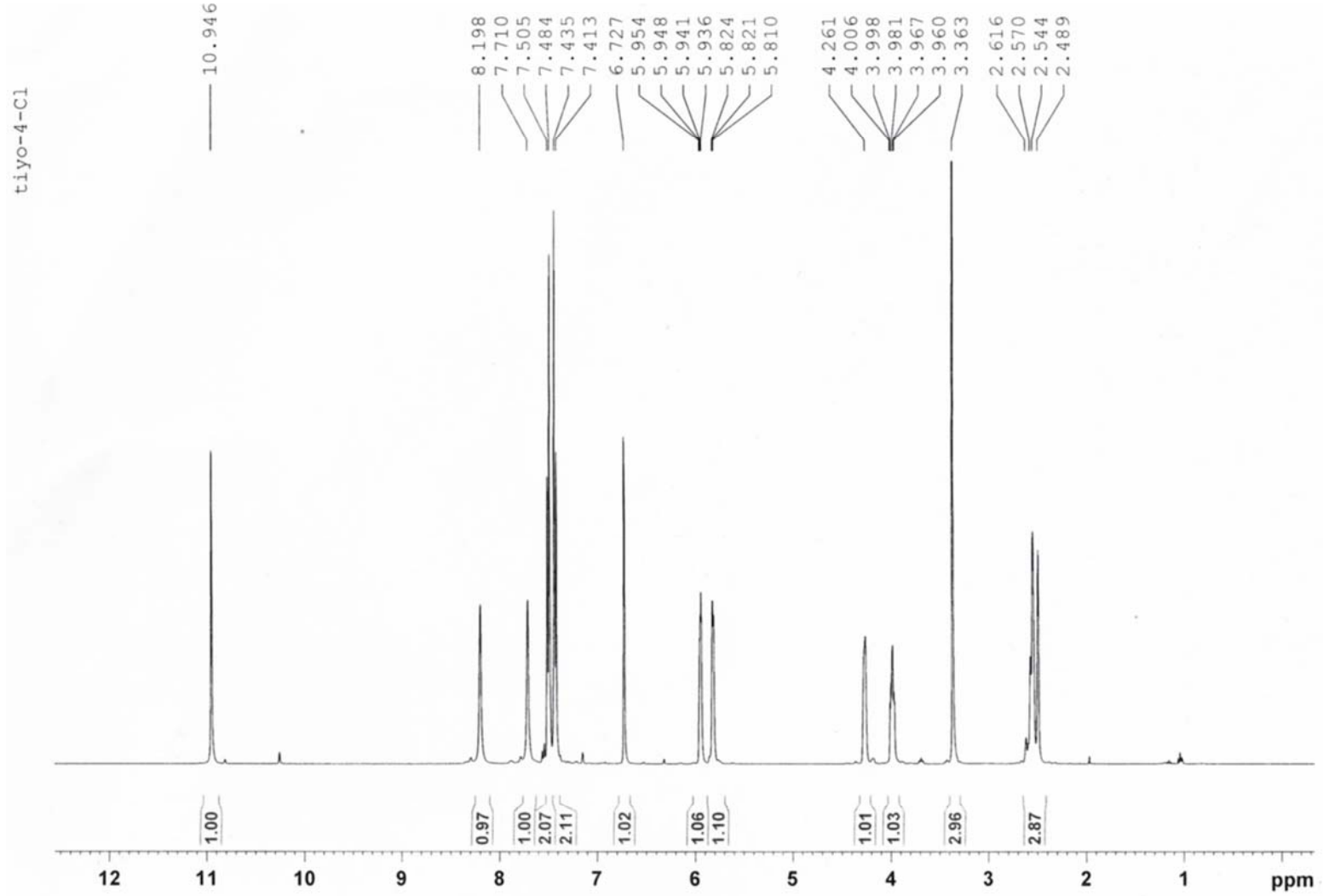
Şekil 6.5.3 Mtc Bileşiğinin Ksantin Oksidaz Enzimiyle Biotransformasyonu Sonucu Elde Edilen Ürünün ¹H-NMR Spektrumu



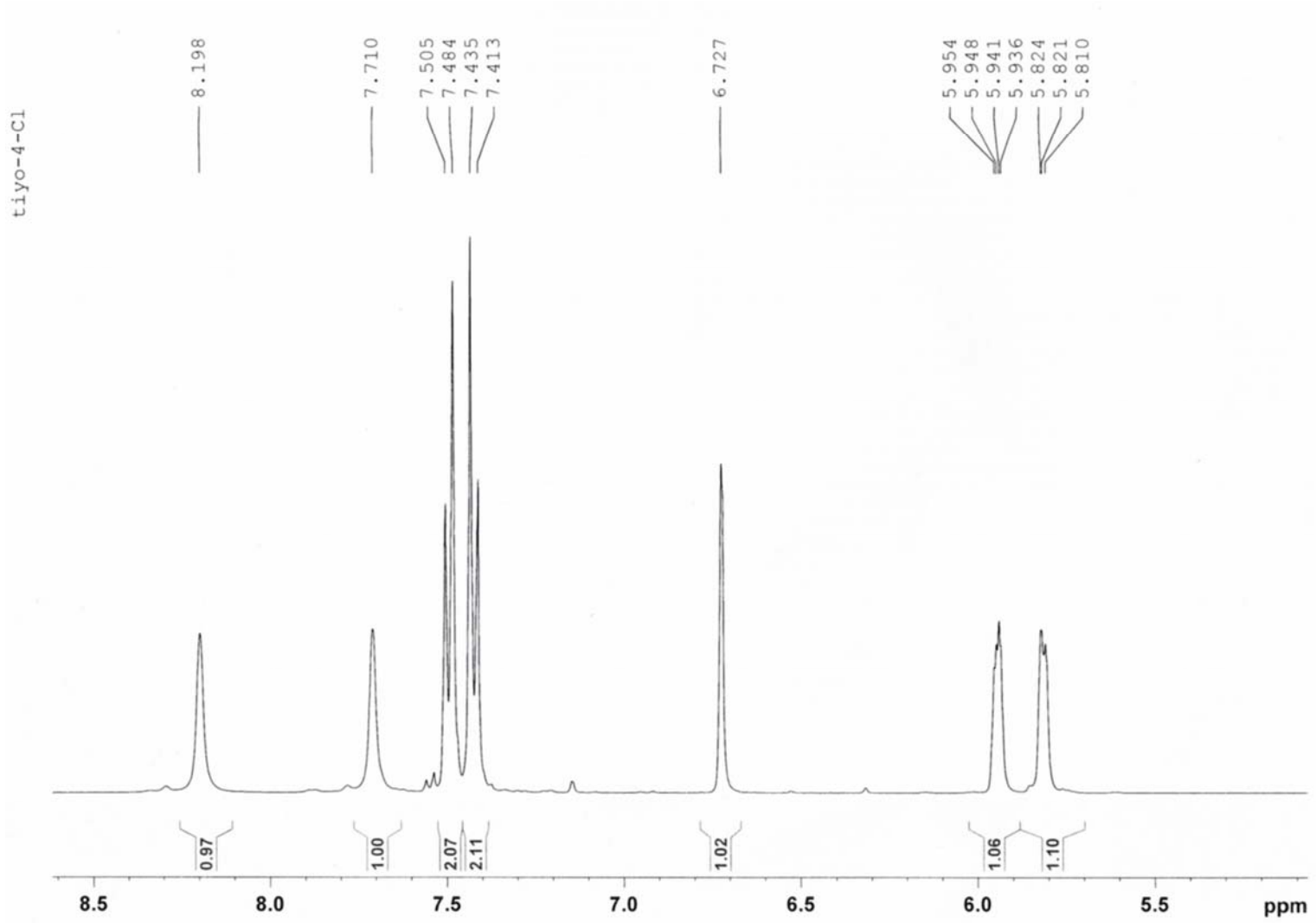
Şekil 6.6.1 Mtc Bileşiğinin Ksantin Oksidaz Enzimiyle Biotransformasyonu Sonucu Elde Edilen Ürünün ^{13}C -NMR Spektrumu



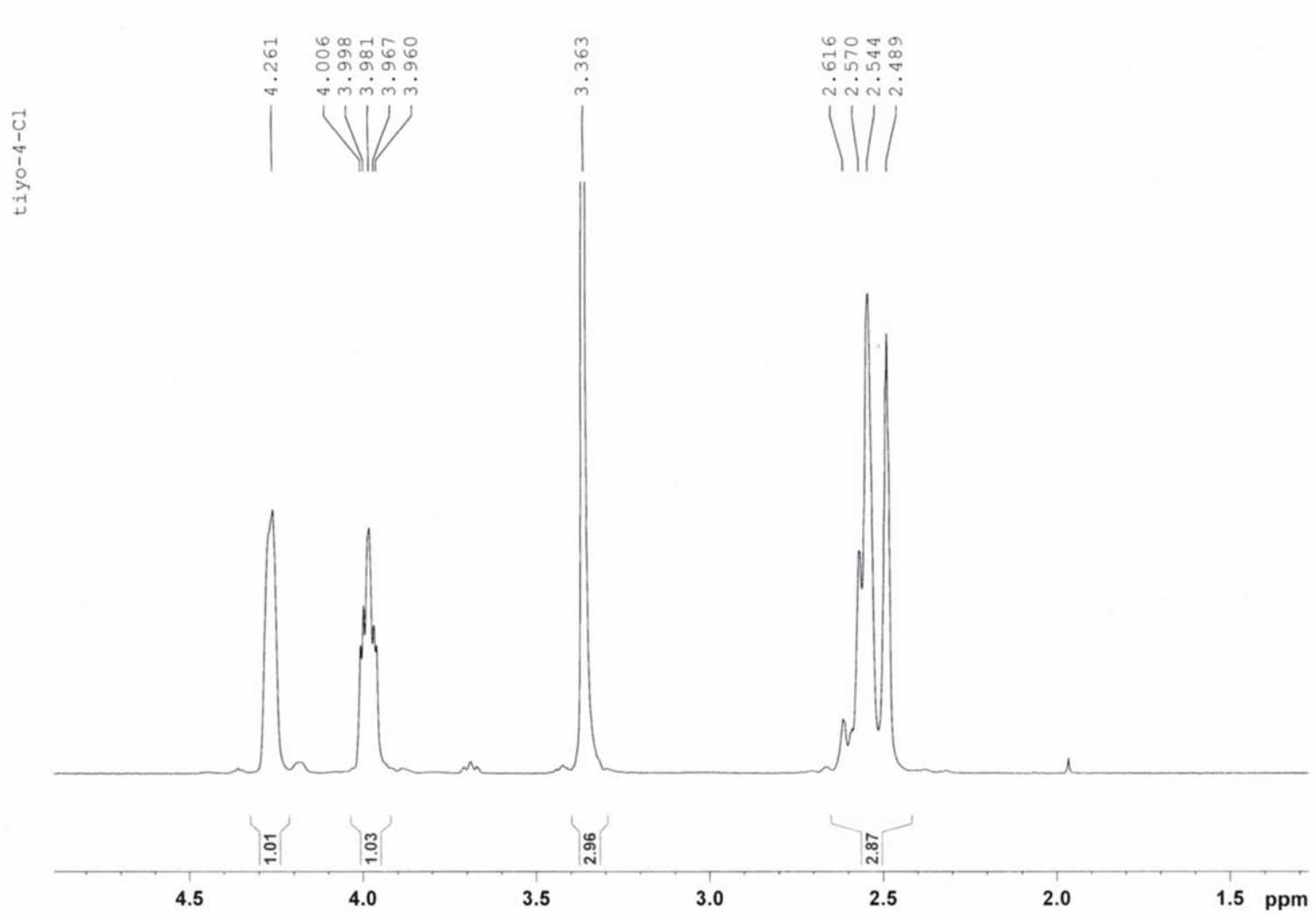
Şekil 6.6.2 Mtc Bileşiğinin Ksantin Oksidaz Enzimiyle Biotransformasyonu Sonucu Elde Edilen Ürünün ^{13}C -NMR Spektrumu



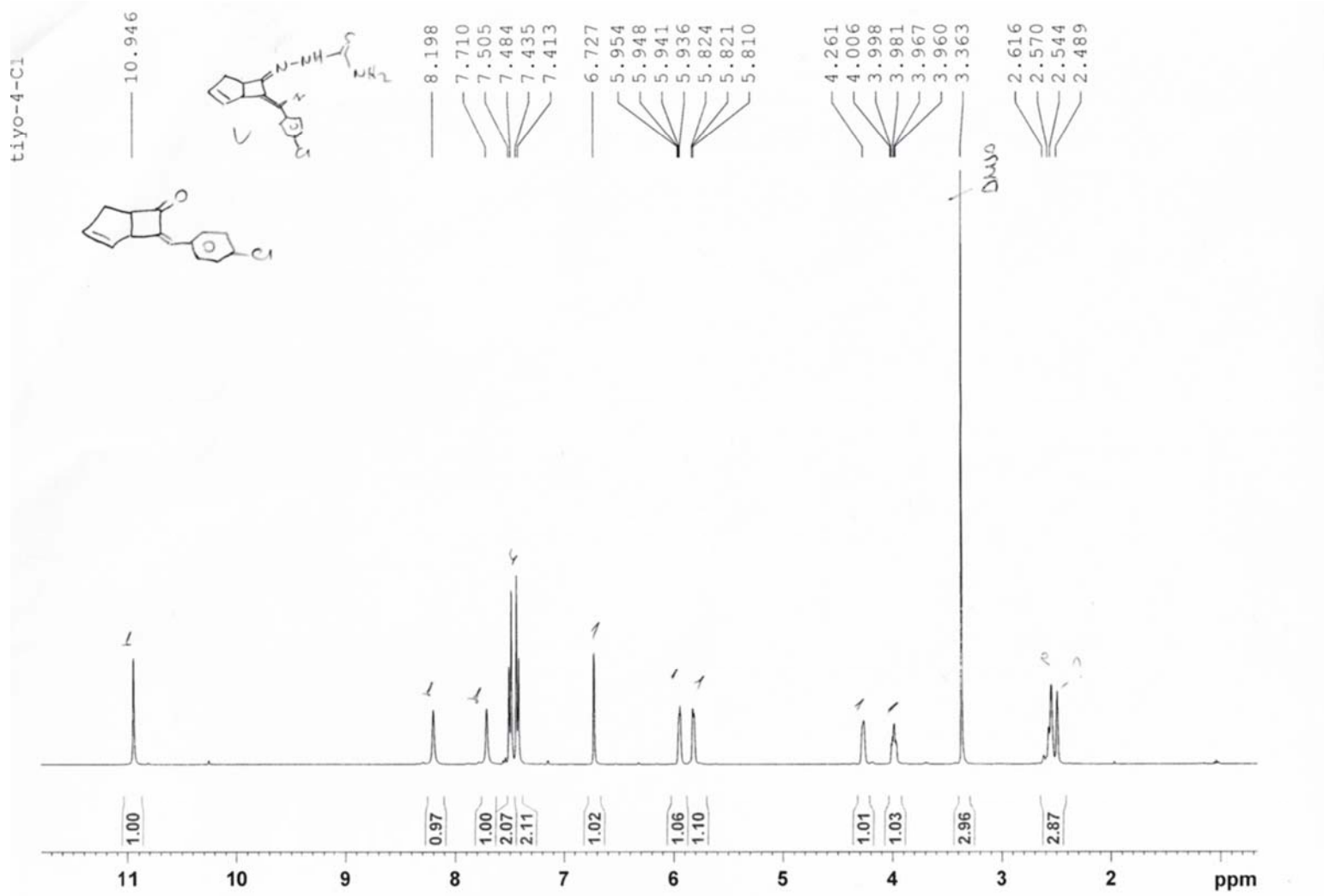
Şekil 6.7.1 Ctc Bileşiğinin Ksantin Oksidaz Enzimiyle Biotransformasyonu Sonucu Elde Edilen Ürünün $^1\text{H-NMR}$ Spektrumu



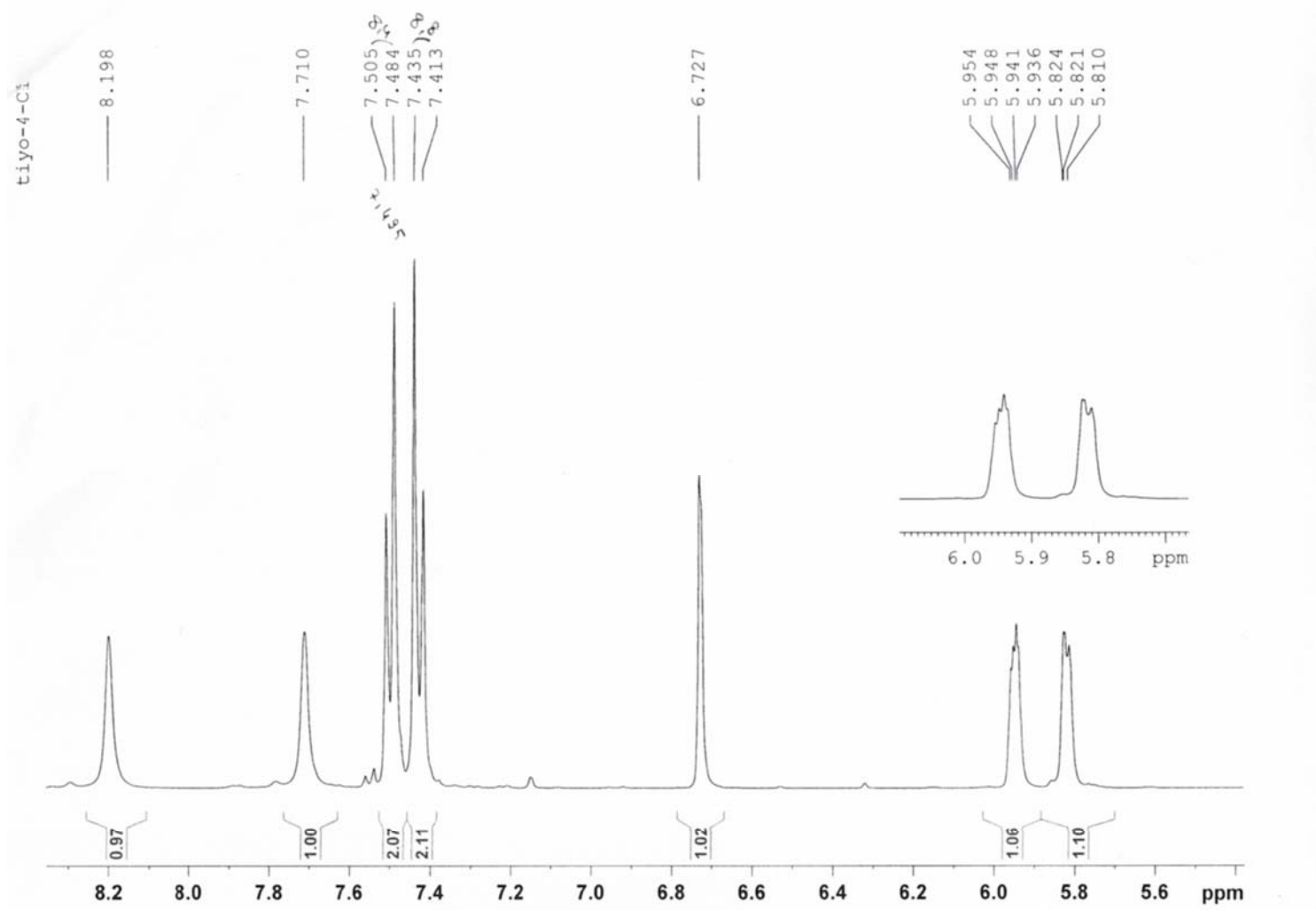
Şekil 6.7.2 Ctc Bileşiğinin Ksantin Oksidaz Enzimiyle Biotransformasyonu Sonucu Elde Edilen Ürünün ¹H-NMR Spektrumu



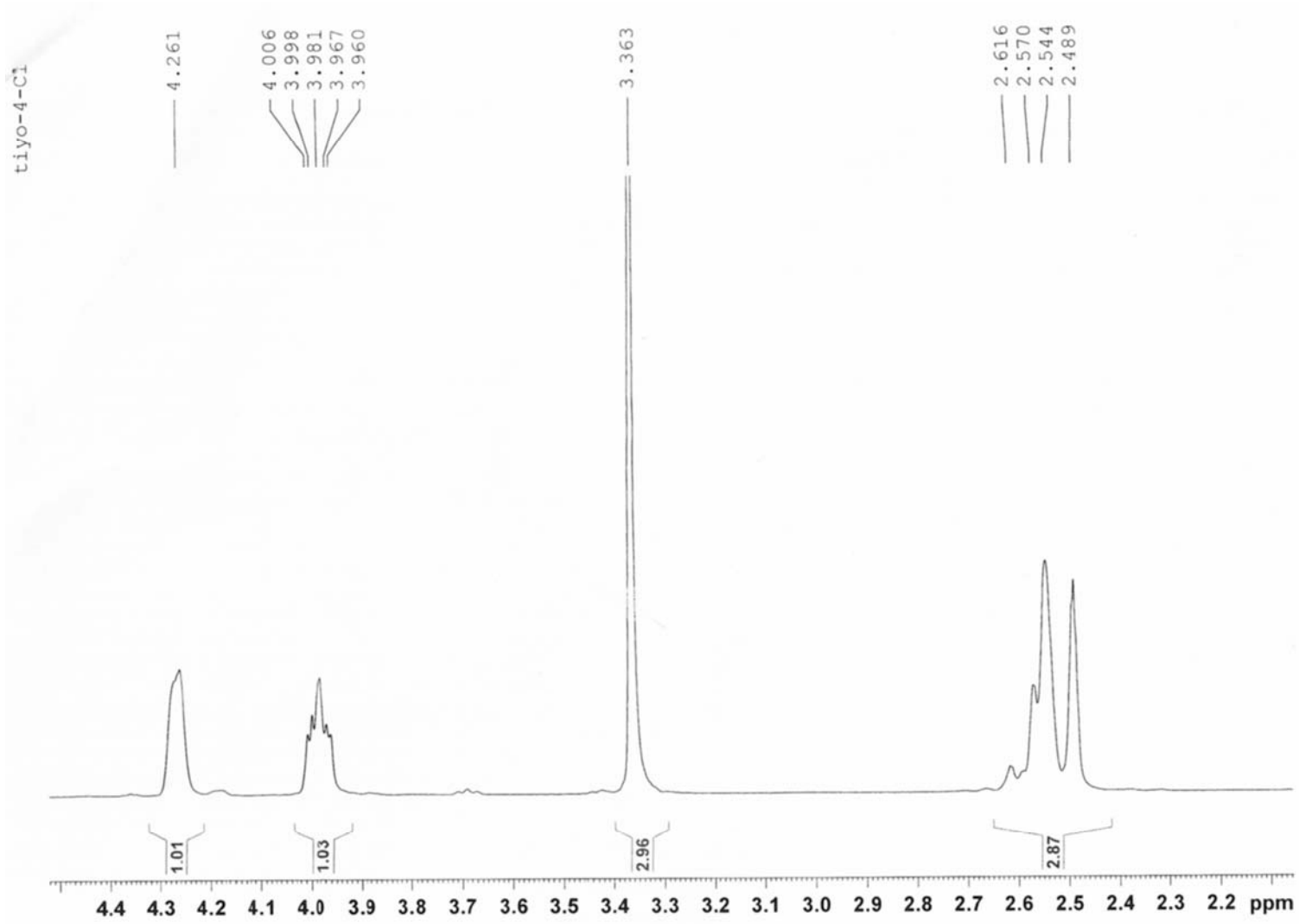
Şekil 6.7.3 Ctc Bileşiğinin Ksantin Oksidaz Enzimiyle Biotransformasyonu Sonucu Elde Edilen Ürünün ¹H-NMR Spektrumu



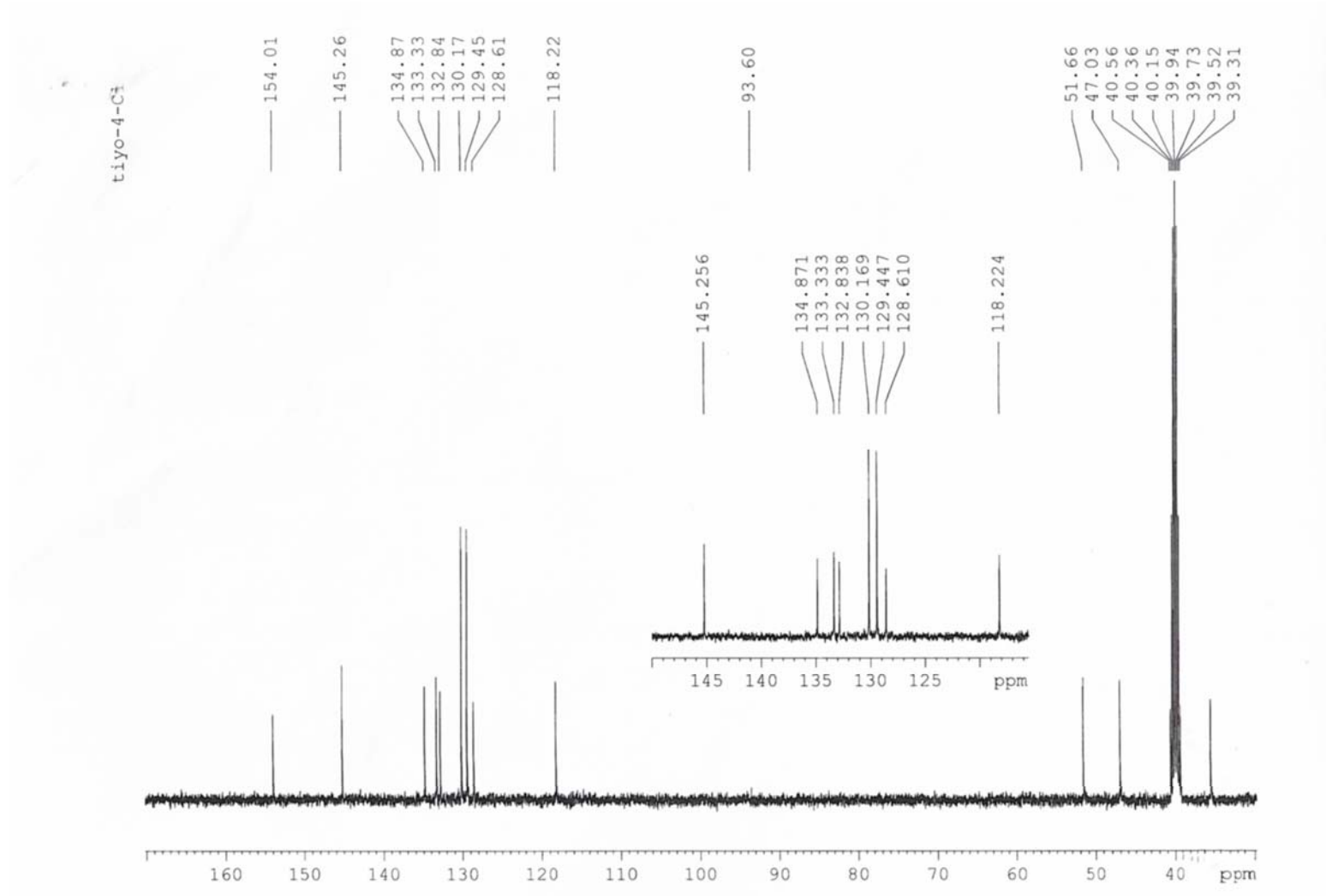
Şekil 6.7.4 Ctc Bileşiğinin Ksantin Oksidaz Enzimiyle Biotransformasyonu Sonucu Elde Edilen Ürünün $^1\text{H-NMR}$ Spektrumu



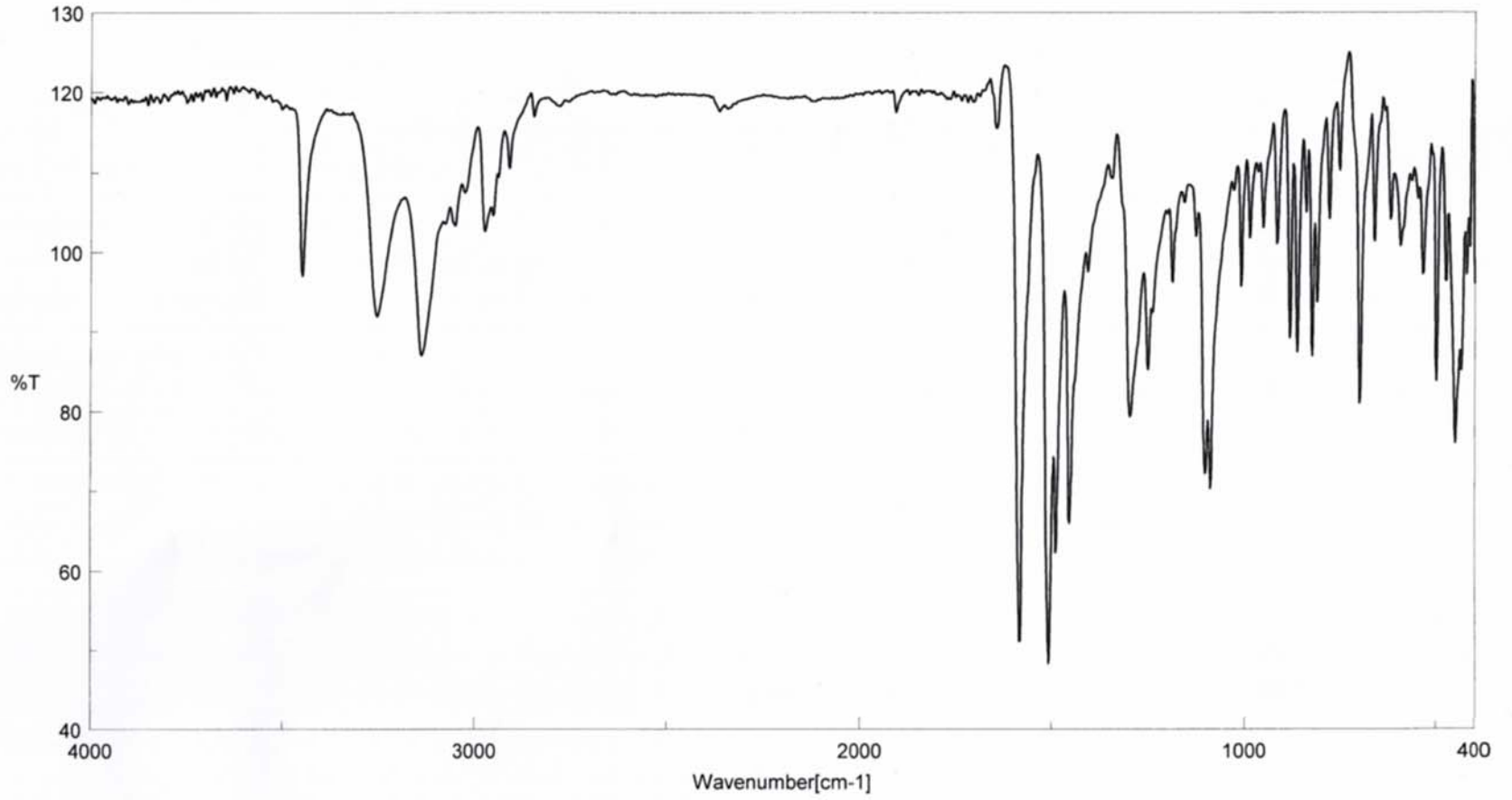
Şekil 6.7.5 Ctc Bileşiğinin Ksantin Oksidaz Enzimiyle Biotransformasyonu Sonucu Elde Edilen Ürünün $^1\text{H-NMR}$ Spektrumu



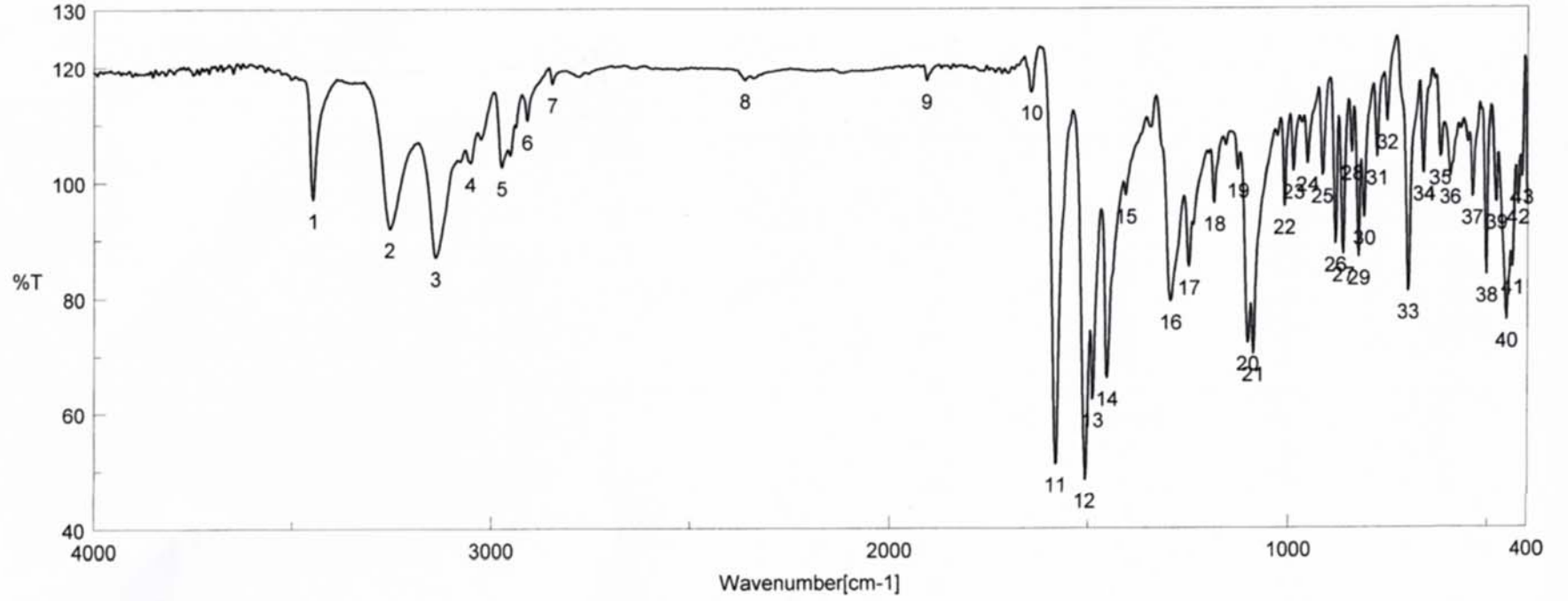
Şekil 6.7.6 Ctc Bileşiğinin Ksantin Oksidaz Enzimiyle Biotransformasyonu Sonucu Elde Edilen Ürünün $^1\text{H-NMR}$ Spektrumu



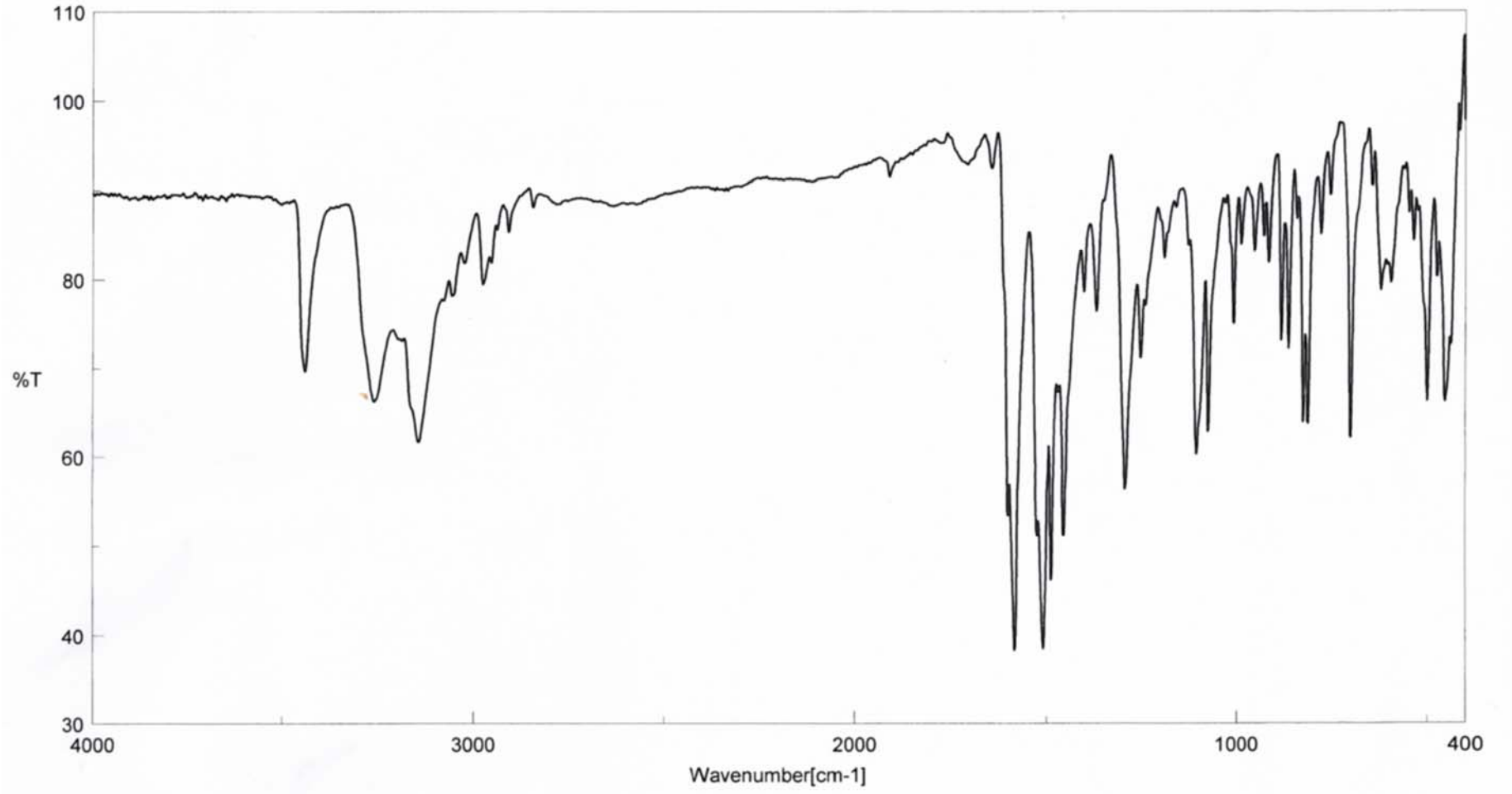
Şekil 6.8.1 Ctc Bileşiğinin Ksantin Oksidaz Enzimiyle Biotransformasyonu Sonucu Elde Edilen Ürünün ^{13}C -NMR Spektrumu



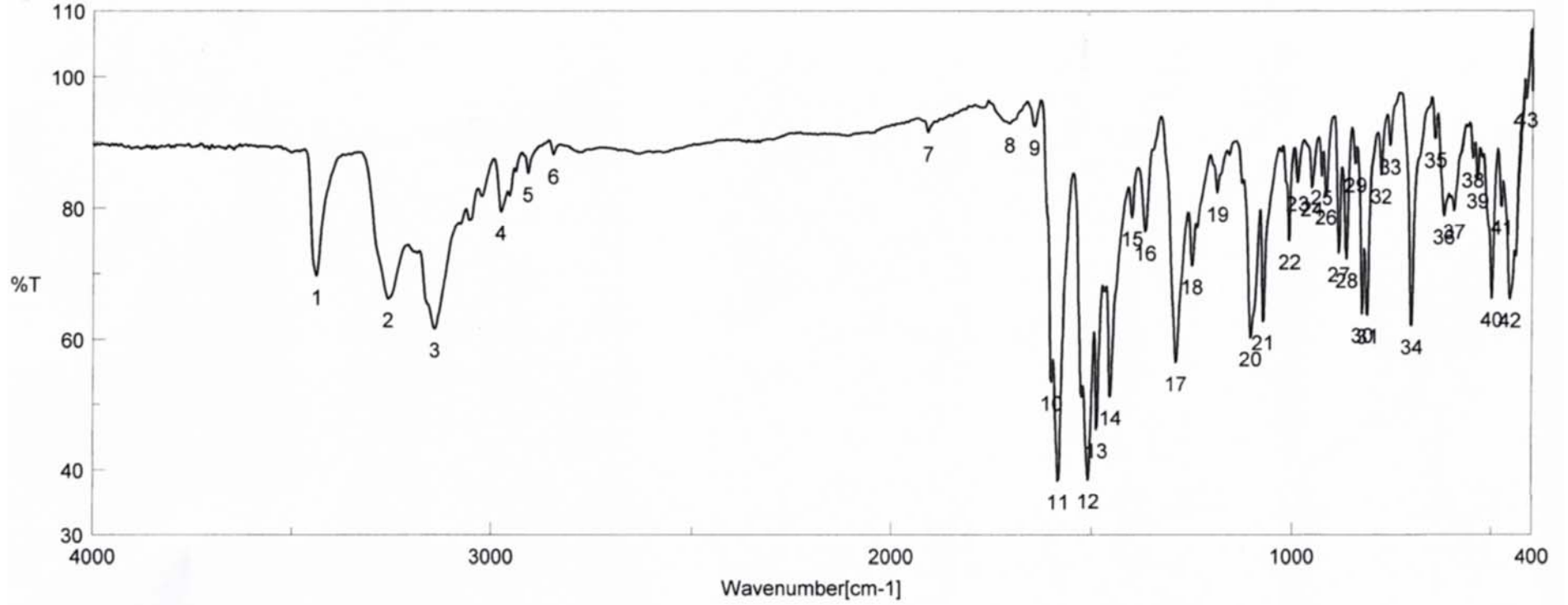
Şekil 6.9.1 Ctc Bileşiğinin Ksantin Oksidaz Enzimiyle Biotransformasyonu Sonucu Elde Edilen Ürünün IR Spektrumu



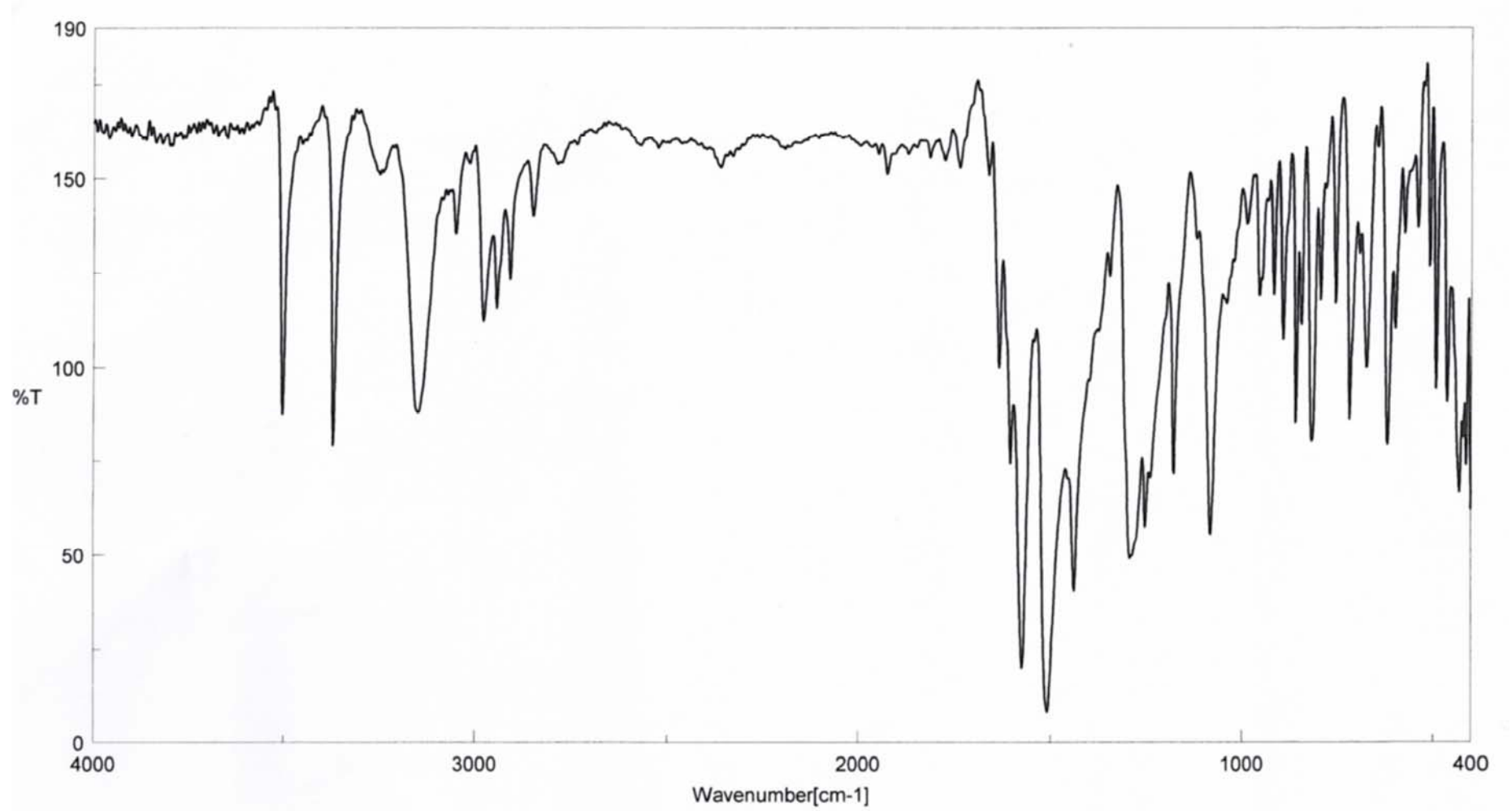
Şekil 6.9.2 Ctc Bileşiğinin Ksantin Oksidaz Enzimiyle Biotransformasyonu Sonucu Elde Edilen Ürünün IR Spektrumu



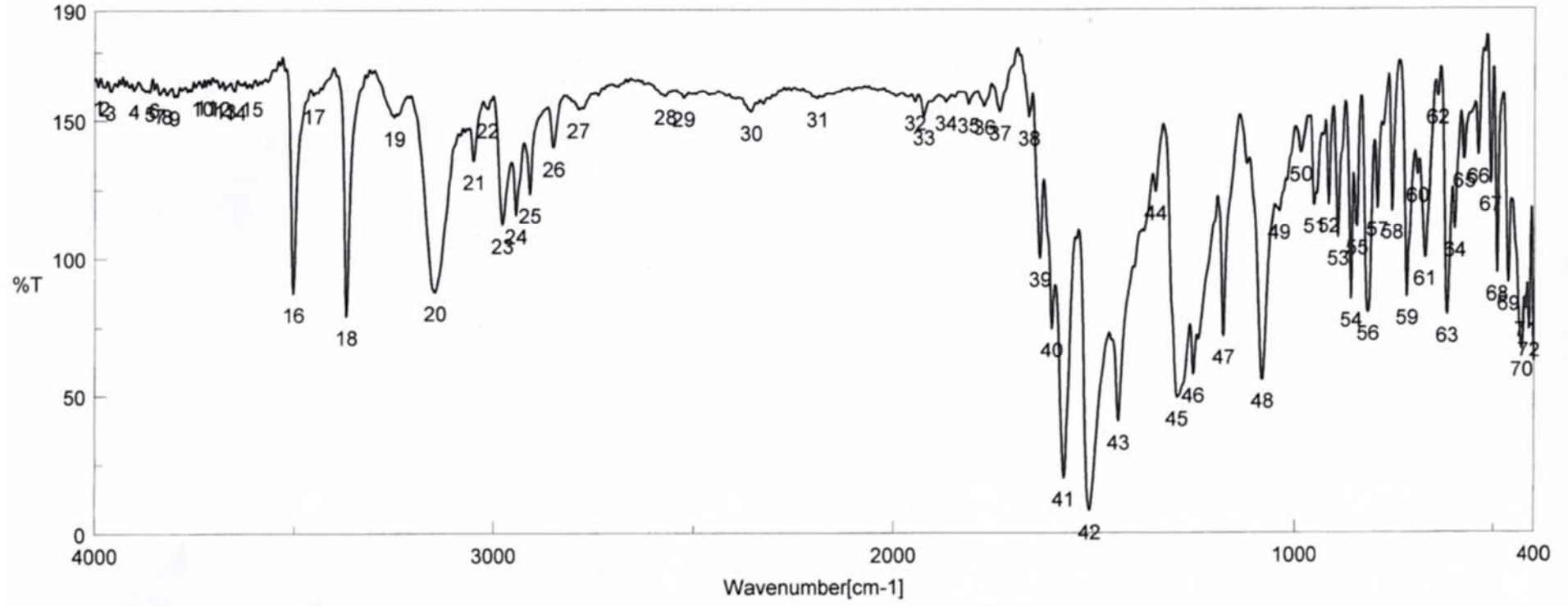
Şekil 6.10.1 Btc Bileşğinin Ksantin Oksidaz Enzimiyle Biyotransformasyonu Sonucu Elde Edilen Ürünün IR Spektrumu



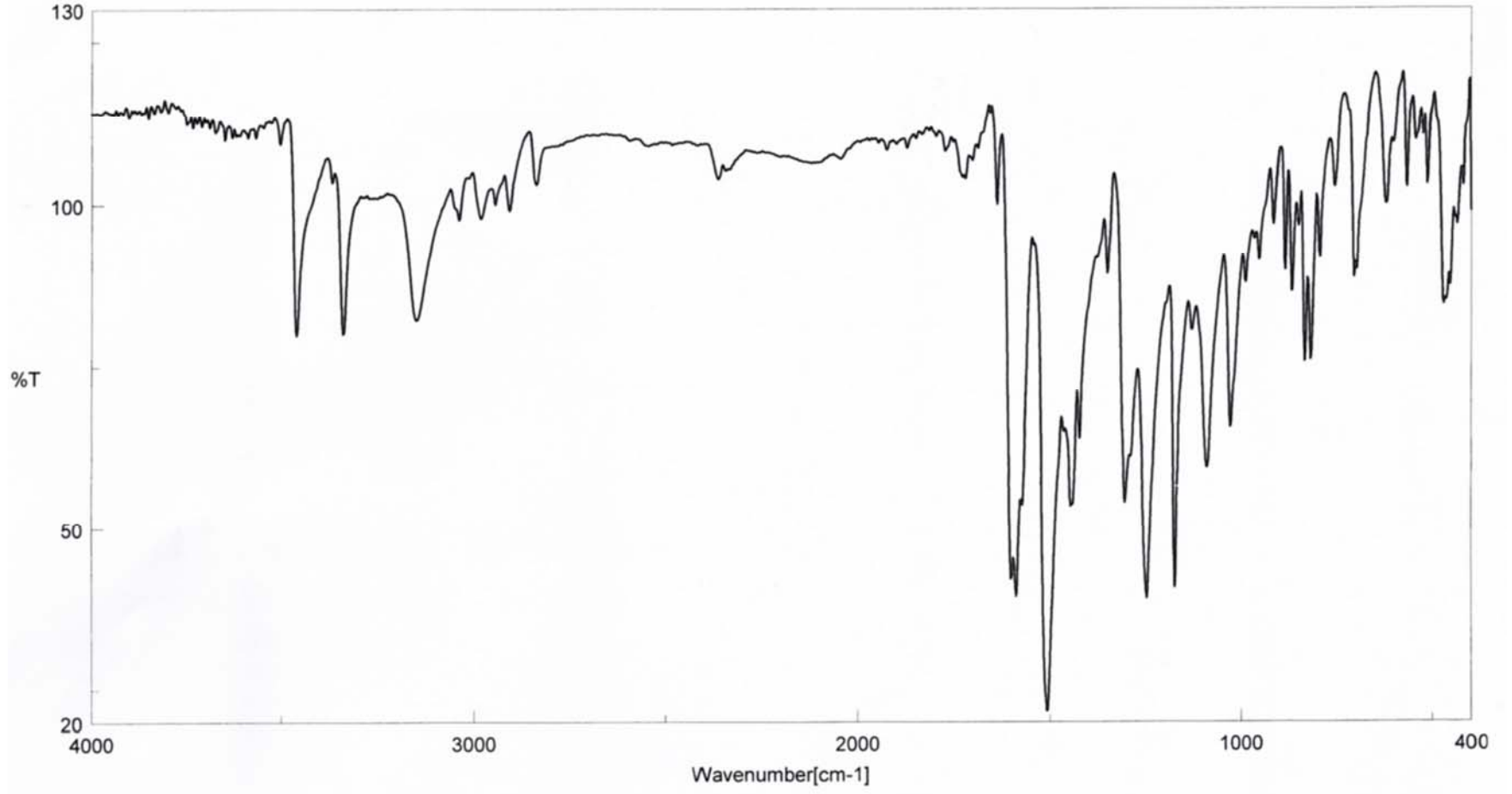
Şekil 6.10.2 Btc Bileşiğinin Ksantin Oksidaz Enzimiyle Biotransformasyonu Sonucu Elde Edilen Ürünün IR Spektrumu



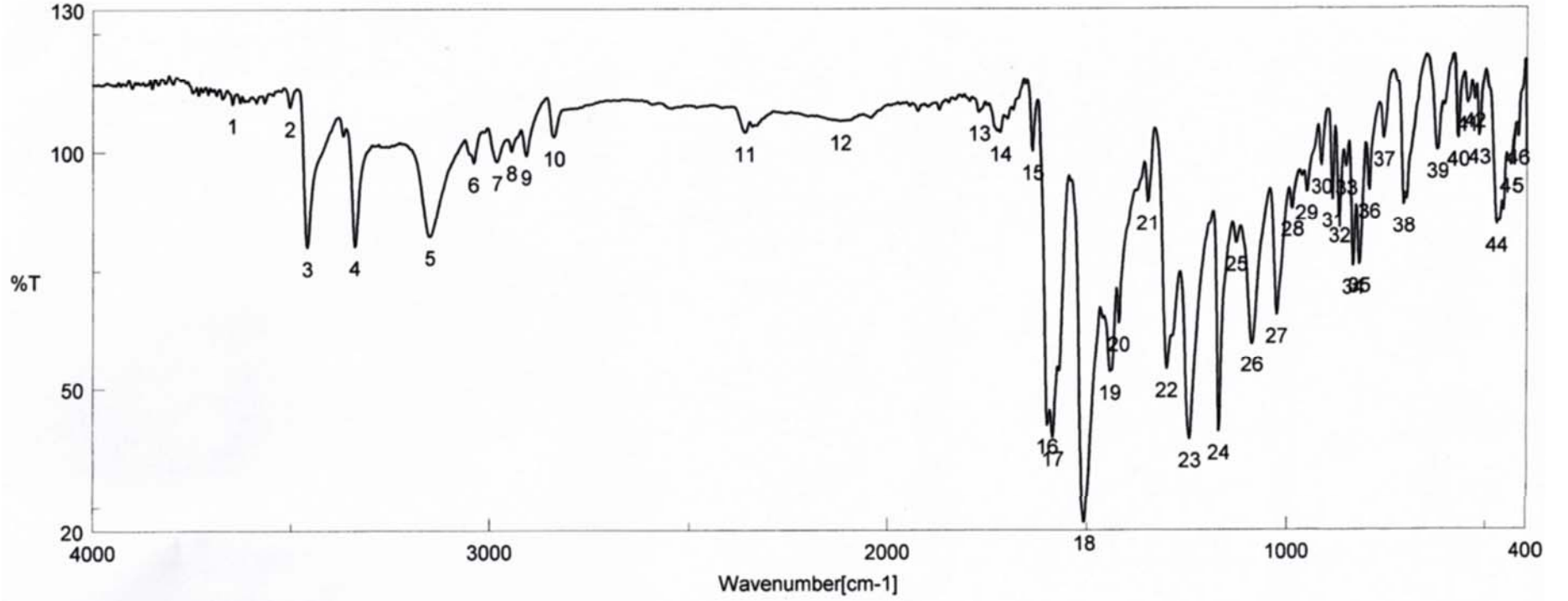
Şekil 6.11.1 4Mtc Bileşiğinin Ksantin Oksidaz Enzimiyle Biotransformasyonu Sonucu Elde Edilen Ürünün IR Spektrumu



Şekil 6.11.2 4Mtc Bileşiğinin Ksantin Oksidaz Enzimiyle Biotransformasyonu Sonucu Elde Edilen Ürünün IR Spektrumu



Şekil 6.12.1 Mtc Bileşğinin Ksantin Oksidaz Enzimiyle Biotransformasyonu Sonucu Elde Edilen Ürünün IR Spektrumu



Şekil 6.12.1 Mtc Bileşiğinin Ksantin Oksidaz Enzimiyle Biotransformasyonu Sonucu Elde Edilen Ürünün IR Spektrumu