

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



**KARBAZOL β -LAKTAM TÜREVLERİNİN PARAOKSONAZ
ENZİMİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

BAŞAK GÖKÇE

BALIKESİR, AĞUSTOS-2013

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



**KARBAZOL β -LAKTAM TÜREVLERİNİN PARAOKSONAZ
ENZİMİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

BAŞAK GÖKÇE

BALIKESİR, AĞUSTOS-2013

KABUL VE ONAY SAYFASI

Başak GÖKÇE tarafından hazırlanan “KARBAZOL β -LAKTAM TÜREVLERİNİN PARAOKSONAZ ENZİMİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI” adlı tez çalışmasının savunma sınav 26.08.2013 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / ~~oy çokluğu~~ ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

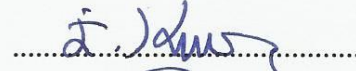
Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Prof. Dr. Oktay ARSLAN



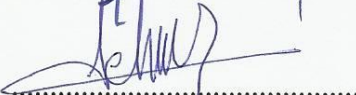
Üye
Prof. Dr. İsmail KIRAN



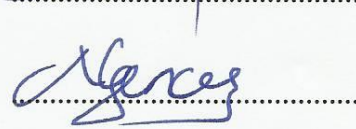
Üye
Doç. Dr. Mustafa ZENGİN



Üye
Doç. Dr. Selma SİNAN



Üye
Yrd. Doç. Dr. Nahit GENCER



Jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş olan bu tez BAÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Hilmi NAMLI

.....

Bu tez çalışması Balıkesir Üniversitesi Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2012/36 nolu proje ile desteklenmiştir.

ÖZET

**KARBAZOL β -LAKTAM TÜREVLERİNİN PARAOKSONAZ ENZİMİ
ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ
DOKTORA TEZİ
BAŞAK GÖKÇE
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. OKTAY ARSLAN)
BALIKESİR, 26.08.2013**

Paraoksonaz (PON1), arilesteraz, paraoksonaz ve laktonaz aktivitesine sahip bir ester hidrolazdır. Detoksifikasyon ve antioksidan aktivitesi ile metabolizmada önemli fizyolojik fonksiyona sahip olan paraoksonaz (PON1) enziminin fizyolojik substratı henüz tanımlanmamıştır.

Bu araştırma iki bölümden oluşmaktadır. Birinci bölümde, insan serum paraoksonaz (PON1) enzimi, amonyum sülfat çöktürmesi ve hidrofobik etkileşim kromatografisi (Sepharose 4B-L-tirozin-1-Naftilamin) yöntemleri kullanılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış enzim SDS-Poliakrilamid jel elektroforezinde yaklaşık 43 kDa molekül ağırlığında tek bant vermiştir.

Araştırmanın ikinci bölümünde ise hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılan paraoksonaz (PON1) enzimi üzerinde 36 farklı karbazol β -laktam türevlerinin *in vitro* etkileri incelenmiştir. Bileşiklerin tamamının enzimi belirli ölçüde aktive ettiği saptanmıştır.

ANAHTAR KELİMELER: paraoksonaz (PON1), hidrofobik etkileşim kromatografisi, karbazol β -laktam bileşikleri, *in vitro*

ABSTRACT

INVESTIGATING OF EFFECT OF CARBAZOLE β -LACTAM DERIVATIVES ON PARAOXONASE ENZYME

PH.D THESIS

BAŞAK GÖKÇE

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

CHEMISTRY

(SUPERVISOR: PROF. DR. OKTAY ARSLAN)

BALIKESİR, 26.08.2013

Paraoxonase (PON1) is a ester hydrolase, which has arylesterase, paraoxonase and lactonase activity. Paraoxonase (PON1) enzyme has important physiological function on metabolism by detoxification and antioxidant activity. Its physiological substrate has not been determined yet.

This study consist of two parts. In the first chapter, human serum paraoksonaz (PON1) was purified by using ammonium sulfate precipitation and hydrophobic interaction chromatography (Sepharose 4B-L-tyrosine-1-Naftilamin). Purified enzyme was shown a single band with 43 kDa in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

The second part of the study, the effects of 36 different carbazole β -lactam derivatives *in vitro* were investigated on paraoxonase (PON1) enzyme purified with hydrophobic interaction chromatography. It was determined that all of the compounds activate the enzyme activity by different rate.

KEYWORDS: paraoxonase (PON1), hydrophobic interaction chromatography, carbazole β -lactam compounds, *in vitro*

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ.....	viii
SEMBOL LİSTESİ.....	xii
ÖNSÖZ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Paraoksonaz Enziminin Tarihçesi.....	2
1.2 Paraoksonaz Gen Ailesi	3
1.2.1 Paraoksonaz Enziminin (PON1) Genel Özellikleri ve Yapısı	4
1.2.2 Paraoksonaz1'in Fonksiyonları.....	7
1.2.2.1 Ksenobiyotik Metabolizması Üzerine Etkisi.....	7
1.2.2.2 Organofosfatlara Karşı Koruma (Hidrolik Aktivite).....	7
1.2.2.3 Bakteriyal Endotoksinlerden Kaynaklanan Toksikiteye Karşı Koruma	8
1.2.2.4 LDL ve HDL Oksidasyonunun Önlenmesi.....	8
1.2.2.5 Klinik Önemi ve Genetik Polimorfizm.....	9
1.2.3 Enzimin Katalitik Mekanizması.....	10
1.2.4 PON1'in Substratları	11
1.2.5 PON1'in İnhibitörleri	13
1.2.6 Enzimin Saflaştırılması.....	14
1.3 β -Laktam ve β -Laktam Türevlerinin Genel Özellikleri	15
2. MATERYAL VE YÖNTEMLER.....	17
2.1 MATERYALLER	17
2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler	17
2.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar	20
2.1.3 Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	21
2.2 YÖNTEMLER.....	24
2.2.1 Kan Serumunun Ayrılması	24
2.2.2 Enzim Aktivite Tayini	24
2.2.3 Lowry Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini.....	25
2.2.4 Enzimin Saflaştırılması.....	26
2.2.4.1 Amonyum Sülfat Çöktürmesi.....	26
2.2.4.2 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Enzimin Saflaştırılması	26
2.2.5 Yeni Karbazol β -Laktam Türevlerinin PON Aktivitesi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi	277
2.2.6 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile Enzim Saflığının Kontrolü	28
3. BULGULAR.....	30
3.1 Enzimin Saflaştırılması	30
3.1.1 Amonyum Sülfat Çöktürmesi	30

3.1.2	Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Enzimin Saflaştırılması...	30
3.1.3	Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri	33
3.2	Yeni Laktam Türevlerinin İnsan Serum Paraoksonaz Enzimi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi.....	33
3.2.1	Serum Paraoksonaz Enziminin SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile Enzim Saflığının Kontrol Edilmesi.....	74
4.	SONUÇ VE ÖNERİLER	75
5.	KAYNAKLAR	82

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Paraoksonaz enziminin yapısı.	4
Şekil 1.2: Paraoksonaz enziminin üç boyutlu yapısının görünümü.	6
Şekil 1.3: Paraoksonazın katalitik mekanizması.	10
Şekil 1.4: PON1 enziminin katlizlediği substratlar.	11
Şekil 1.5: Staudinger tepkimesi.....	16
Şekil 2.2: Hidrofobik jel sepharose 4B L-tirozin 1 naftilamin.	27
Şekil 3.1: Hidrofobik etkileşim kolonundan PON1 enziminin elüsyon grafiği. ...	31
Şekil 3.2: Lowry yöntemi ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan standart grafik.	33
Şekil 3.3: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı derişiminde 3a için % aktivite-[I] grafiği.	35
Şekil 3.4: 3a maddesinin açık yapısı.	35
Şekil 3.5: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı derişiminde 3b için % aktivite-[I] grafiği.	36
Şekil 3.6: 3b maddesinin açık yapısı.	36
Şekil 3.7: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı derişiminde 3c için % aktivite-[I] grafiği.	37
Şekil 3.8: 3c maddesinin açık yapısı.	37
Şekil 3.9: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı derişiminde 3d için % aktivite-[I] grafiği.	38
Şekil 3.10: 3d maddesinin açık yapısı.	38
Şekil 3.11: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substrat derişiminde 3e için % aktivite-[I] grafiği.	39
Şekil 3.12: 3e maddesinin açık yapısı.	39
Şekil 3.13: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı derişiminde 3f için % aktivite-[I] grafiği.	40
Şekil 3.14: 3f maddesinin açık yapısı.	40
Şekil 3.15: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı derişiminde 3g için % aktivite-[I] grafiği.	41
Şekil 3.16: 3g maddesinin açık yapısı.	41
Şekil 3.17: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson derişiminde 3h için % aktivite-[I] grafiği.	42
Şekil 3.18: 3h maddesinin açık yapısı.	42
Şekil 3.19: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substrat derişiminde 3i için % aktivite-[I] grafiği.	43
Şekil 3.20: 3i maddesinin açık yapısı.	43
Şekil 3.21: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı derişiminde 3j için % aktivite-[I] grafiği.	44
Şekil 3.22: 3j maddesinin açık yapısı.	44
Şekil 3.23: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı derişiminde 3k için % aktivite-[I] grafiği.	45
Şekil 3.24: 3k maddesinin açık yapısı.	45
Şekil 3.25: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı derişiminde 4a için % aktivite-[I] grafiği.	46
Şekil 3.26: 4a maddesinin açık yapısı.	46

Şekil 3.27: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı derişiminde 4b için % aktivite-[I] grafiği.	47
Şekil 3.28: 4b maddesinin açık yapısı.	47
Şekil 3.29: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1mM paraokson substratı derişiminde 4c için % aktivite-[I] grafiği.	48
Şekil 3.30: 4c maddesinin açık yapısı.	48
Şekil 3.31: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1mM paraokson substratı derişiminde 4d için % aktivite-[I] grafiği.	49
Şekil 3.32: 4d maddesinin açık yapısı.	49
Şekil 3.33: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1mM paraokson substratı derişiminde 4e için % aktivite-[I] grafiği.	50
Şekil 3.34: 4e maddesinin açık yapısı.	50
Şekil 3.35: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1mM paraokson substratı derişiminde 4f için % aktivite-[I] grafiği.	51
Şekil 3.36: 4f maddesinin açık yapısı.	51
Şekil 3.37: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1mM paraokson substratı derişiminde 4g için % aktivite-[I] grafiği.	52
Şekil 3.38: 4g maddesinin açık yapısı.	52
Şekil 3.39: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1mM paraokson substratı derişiminde 4h için % aktivite-[I] grafiği.	53
Şekil 3.40: 4h maddesinin açık yapısı.	53
Şekil 3.41: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1mM paraokson substratı derişiminde 4i için % aktivite-[I] grafiği.	54
Şekil 3.42: 4i maddesinin açık yapısı.	54
Şekil 3.43: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1mM paraokson substratı derişiminde 4k için % aktivite-[I] grafiği.	55
Şekil 3.44: 4k maddesinin açık yapısı.	55
Şekil 3.45: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1mM paraokson substratı derişiminde 4m için % aktivite-[I] grafiği.	56
Şekil 3.46: 4m maddesinin açık yapısı.	56
Şekil 3.47: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1mM paraokson substratı derişiminde 4n için % aktivite-[I] grafiği.	57
Şekil 3.48: 4n maddesinin açık yapısı.	57
Şekil 3.49: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1mM paraokson substratı derişiminde 5a için % aktivite-[I] grafiği.	58
Şekil 3.50: 5a maddesinin açık yapısı.	58
Şekil 3.51: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1mM paraokson substratı derişiminde 5b için % aktivite-[I] grafiği.	59
Şekil 3.52: 5b maddesinin açık yapısı.	59
Şekil 3.53: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1mM paraokson substratı derişiminde 5c için % aktivite-[I] grafiği.	60
Şekil 3.54: 5c maddesinin açık yapısı.	60
Şekil 3.55: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1mM paraokson substratı derişiminde 5d için % aktivite-[I] grafiği.	61
Şekil 3.56: 5d maddesinin açık yapısı.	61
Şekil 3.57: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1mM paraokson substratı derişiminde 5e için % aktivite-[I] grafiği.	62
Şekil 3.58: 5e maddesinin açık yapısı.	62
Şekil 3.59: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1mM paraokson substratı derişiminde 5f için % aktivite-[I] grafiği.	63

Şekil 3.60: 5f maddesinin açık yapısı.	63
Şekil 3.61: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1mM paraokson substratı derişiminde 5g için % aktivite-[I] grafiği.	64
Şekil 3.62: 5g maddesinin açık yapısı.	64
Şekil 3.63: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1mM paraokson substratı derişiminde 5h için % aktivite-[I] grafiği.	65
Şekil 3.64: 5h maddesinin açık yapısı.	65
Şekil 3.65: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1mM paraokson substratı derişiminde 5i için % aktivite-[I] grafiği.	66
Şekil 3.66: 5i maddesinin açık yapısı.	66
Şekil 3.67: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1mM paraokson substratı derişiminde 5k için % aktivite-[I] grafiği.	67
Şekil 3.68: 5k maddesinin açık yapısı.	67
Şekil 3.69: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1mM paraokson substratı derişiminde 5l için % aktivite-[I] grafiği.	68
Şekil 3.70: 5l maddesinin açık yapısı.	68
Şekil 3.71: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1mM paraokson substratı derişiminde 5m için % aktivite-[I] grafiği.	69
Şekil 3.72: 5m maddesinin açık yapısı.	69
Şekil 3.73: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1mM paraokson substratı derişiminde 5n için % aktivite-[I] grafiği.	70
Şekil 3.74: 5n maddesinin açık yapısı.	70
Şekil 3.75: Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılan paraoksonaz enziminin SDS-polakrilamid jel elektroforezi.	74
Şekil 4.1: PON1 enziminin HDL yüzeyine bağlanma modeli [39].....	75
Şekil 4.2: 1.10^{-5} M madde derişimindeki β -laktam bileşiklerinin % PON1 aktivitesi üzerine pozitif modulator etkisi.....	79

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1: Orjinal karbazol β -laktam türevlerinin numaraları ve isimleri.	17
Tablo 2.2: Karbazol β -laktam türevlerinin fonksiyonel grupları ve kod numaraları.	20
Tablo 2.3: SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının miktarları.	23
Tablo 3.1: Hidrofobik etkileşim kromatografisi için saflaştırma tablosu.	32
Tablo 3.2: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren 3a 'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.	35
Tablo 3.3: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren 3b 'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.	36
Tablo 3.4: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren 3c 'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.	37
Tablo 3.5: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren 3d 'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.	38
Tablo 3.6: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren 3e 'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.	39
Tablo 3.7: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren 3f 'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.	40
Tablo 3.8: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren 3g 'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.	41
Tablo 3.9: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren 3h 'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.	42
Tablo 3.10: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren 3i 'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.	43
Tablo 3.11: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren 3j 'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.	44

Tablo 3.12: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren 3k 'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.....	45
Tablo 3.13: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren 4a 'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.....	46
Tablo 3.14: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren 4b 'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.....	47
Tablo 3.15: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren 4c 'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.....	48
Tablo 3.16: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren 4d 'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.....	49
Tablo 3.17: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren 4e 'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.....	50
Tablo 3.18: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren 4f 'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.....	51
Tablo 3.19: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren 4g 'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.....	52
Tablo 3.20: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren 4h 'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.....	53
Tablo 3.21: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren 4i 'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.....	54
Tablo 3.22: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren 4k 'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.....	55
Tablo 3.23: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren 4m 'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.....	56
Tablo 3.24: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren 4n 'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve	

bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.....	57
Tablo 3.25: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren 5a 'nın % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.....	58
Tablo 3.26: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren 5b 'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.....	59
Tablo 3.27: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren 5c 'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.....	60
Tablo 3.28: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren 5d 'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.....	61
Tablo 3.29: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren 5e 'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.....	62
Tablo 3.30: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren 5f 'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.....	63
Tablo 3.31: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren 5g 'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.....	64
Tablo 3.32: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren 5h 'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.....	65
Tablo 3.33: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren 5i 'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.....	66
Tablo 3.34: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren 5k 'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.....	67
Tablo 3.35: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren 5l 'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.....	68
Tablo 3.36: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren 5m 'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.....	69

Tablo 3.37: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren 5n 'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.....	70
Tablo 3.38: PON1 enziminin grafiklerden bulunan 1.10^{-5} M madde (3.grup) için % pozitif modülatör değerleri.....	71
Tablo 3.39: PON1 enziminin grafiklerden bulunan 1.10^{-5} M madde (4.grup) için % pozitif modülatör değerleri.....	72
Tablo 3.40: PON1 enziminin grafiklerden bulunan 1.10^{-5} M madde (5.grup) için % pozitif modülatör değerleri.....	73

SEMBOL LİSTESİ

PON1:	Paraoksonaz 1 enzimi
SDS:	Sodyum dodesil sülfat
PAGE:	Poliakrilamid jel elektroforezi
U:	Enzim Ünitesi
ΔA:	Absorbans Farkı
TEMED:	N,N,N', N', -tetrametiletildiamin

ÖNSÖZ

Tez çalışmam sırasında engin düşünce ve fikirlerinden yararlandığım, insanlara yaklaşımını ve bilimsel yönlerini kendime örnek aldığım çok kıymetli danışman hocam Prof. Dr. sayın Oktay ARSLAN'a öncelikle en derin şükran ve saygılarımı sunarım.

Doktora tez izleme sınavları esnasında olumlu katkıları ile beni yönlendiren Prof. Dr. sayın İsmail KIRAN'a en derin saygılarımı sunarım.

Doktora tez çalışmamdaki bileşikleri sentezleyen, Sakarya Üniversitesi Organik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Mustafa Zengin ve ekibine teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman yanımda olan, sevgisini ve ilgisini hiçbir zaman esirgemeyen, tecrübeleriyle beni yönlendiren değerli hocam Doç. Dr. Selma SİNAN'a çok teşekkür eder, saygı ve sevgilerimi sunarım.

Bana çalışmalarımın her aşamasında önerileri ile yol gösteren, yardım eden değerli hocam Yrd. Doç. Nahit GENCER'e sonsuz teşekkür eder, saygı ve sevgilerimi sunarım.

Ayrıca doktora çalışmalarım boyunca her zaman yanımda olan Yrd. Doç. Dr. Semra IŞIK'a, yardımlarını gördüğüm Yrd. Doç. Dr. Dudu DEMİR'e, Yrd. Doç. Dr. Serap BEYAZTAŞ'a ve değerli grup arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Beni bugünlere getiren en büyük destekçim aileme; bana hiç bir emeğin karşılıksız kalmayacağını inandırdıkları için, en içten sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Balıkesir, 2013

Başak GÖKÇE

1. GİRİŞ

Paraoksonaz HDL'ye bağlı olarak bulunan, organofosfat ajanları (OP) ve sinir gazlarını hidroliz ederek LDL'nin oksidasyonu ile lipit peroksitlerin oluşumuna ve bakteri endotoksinlerine karşı koruyucu etkisi olan önemli bir karaciğer enzimidir. LDL'nin oksidasyonu ateroskleroz sürecinin başlangıç evresini oluşturması, enzimin antioksidant özelliğinin önemini ortaya koymaktadır [4,5]. Bu enzim hakkında son yıllarda oldukça fazla sayıda araştırma yapılmış olup, sahip olduğu fonksiyonlar ve hastalıklardaki rolü hakkında büyük ilerleme kaydedilmiştir [1].

Serum paraoksonaz enziminin, aromatik karboksilik asid esterleri ve paraokson, diazookson, sarin, soman gibi organofosfat türevlerini detoksifiye ettiği pek çok çalışma ile gösterilmiştir [55, 64, 65, 85,86]. Son yıllarda PON1'in ayrıca laktonaz, siklik karbonat esterleri ve farmakolojik ajanları da hidroliz ettiği gösterilmiştir [59]. Ancak fizyolojik substratı henüz belirlenememiştir.

Bu çalışmada, ilk olarak daha önceden bilinen Sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin hidrofobik etkileşim kromatografisi jeli kullanılarak insan serumundan paraoksonaz enziminin saflaştırılması [2] ve saflaştırılan paraoksonaz enziminin sodyum dodesil sülfat (SDS) jel elektroforezi ile enziminin yaklaşık moleköl ağırlığının tespit edilmesi planlanmıştır.

Çalışmanın ikinci kısmında; paraoksonaz enziminin katalizlediği substratlardan laktonların, nitrojen analogu olan laktam bileşiklerinin söz konusu enzim üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla; literatürde paraoksonaz enzimi üzerinde sadece inhibisyon etkisi gösteren laktamların, orjinal bazı karbazol β türevlerininin saf PON1 enzimi üzerindeki *in vitro* etkilerinin çalışılması hedeflenmiştir.

1.1 Paraoksonaz Enziminin Tarihçesi

Paraoksonaz enzimi ilk kez 1946'da Abraham Mazur tarafından keşfedilmiştir. Mazur, hayvan dokusunda organofosfor bileşiklerini hidroliz edebilen bir enzim varlığını bildirmiştir [3]. Daha sonra W. Norman Aldridge 1953'ten itibaren bu enzim hakkında çok sayıda çalışma yapmaya başlamıştır. Aldridge paraoksonazı, propiyonat, bütirat ve p-nitrofenil asetatı hidroliz eden A-esteraz olarak teşhis etmiştir [4]. Aldridge substratları, hidroliz ederken katalitik olanları A-esterazlar, substratların hidroliz olmasını inhibe eden grubu B-esterazlar olmak üzere esterazları iki gruba ayırmıştır. 1961'de Uriel tarafından yapılan bir çalışmada ilk kez HDL ile PON ilişkisi gösterilmiştir [5]. 1973'te Mallinck ve ark. insan serumunda PON'un varlığının genetik olduğunu tespit etmişlerdir [6]. Takip eden yıllarda paraoksonazın çeşitli poliformizmleri tespit edilmiştir [7]. 1983'te paraoksonazın aktivitesinin Ca^{+2} iyonuna bağlı olduğu belirlenmiştir [8]. Mackness ve arkadaşları [9] yaptıkları çalışmalar ile 1985'te PON'un HDL üzerinde bulunduğunu, 1988'de PON'un HDL üzerinde apoA-1'e bağımlı olarak aktivite gösterdiğini [10] ve 1991 yılında da LDL üzerindeki lipidperoksit birikimini azalttığını bulmuşlardır [11]. PON'un antioksidan özelliğinin bilinmesi, daha sonraki yıllarda hastalıkların teşhisi ve tedavisinde önemli rol oynamıştır [12,13].

Gan ve arkadaşları [14] 1991 yılında ki çalışmalarında paraoksonazı insan serumundan saflaştırmışlar ve enzimin hem paraoksonaz hem de arilesteraz aktivitesi gösterdiğini tespit etmişlerdir. PON sıçan karaciğerinde 1993'de kısmen, 1997'de tamamen saflaştırılmıştır [15,16]. Primo ve ark. [17] paraoksonaz/arilesteraz (PON/AE) enzim ailesinin üç formdan (paraoksonaz 1; PON1, paraoksonaz 2; PON2, paraoksonaz 3; (PON3) oluştuğunu rapor etmişlerdir. Paraoksonazın diizopropil florofosfat, soman, sarin, p-nitro fenil asetat, 2-nitrofenil asetat, 2-naftil asetat ve fenil asetat [14,18] içeren pek çok substratı hidroliz edebildiği belirlenmiştir. Son yıllarda PON1'in ayrıca laktonaz, siklik karbonat esterleri ve farmakolojik ajanları da hidroliz ettiği gösterilmiştir [19].

1.2 Paraoksonaz Gen Ailesi

Aslında paraoksonaz denildiğinde terminolojide paraoksonaz1 enzimi anlaşılmalı beraber, PON1 dışında iki farklı üyeyi de kapsar. Paraoksonaz insan gen ailesi; PON1, PON2 ve PON3 olmak üzere bilinen 3 üyeye sahiptir [20]. Bu üç insan paraoksonazı 7. kromozomun uzun kolunda lokalize olmuşlardır. Bu genler büyük yapısal benzerlikler göstermektedir ve ortak evrimsel öncüden gen dublikasyonlarının meydana gelmesiyle oluşur. Memeli türleri içerisinde PON1, PON2 ve PON3 aminoasit düzeyinde % 60, nükleotid düzeyinde % 70 benzerlik gösterir. Bununla birlikte memeli türleri arasında bu üç genin her biri aminoasit düzeyinde % 79-90, nükleotid düzeyinde % 81-91 benzerlik göstermektedir [21,22]. Bu üç enzimden şimdiye kadar en çok çalışılan PON1 olmasına rağmen, son araştırmalarda ilgi PON2 ve PON3 enzimlerinin fonksiyonlarının daha kapsamlı anlaşılması üzerindedir [23] .

PON1, PON2 ve PON3 ile karşılaştırıldığında 4. ekzonda kodlanan 105 aminoasit içinde üç nükleotid rezidüsüyle ayrılır [21, 24]. PON1 enzime ismini veren paraokson da dahil pestisit ve organofosfatları hidroliz etme yeteneğine sahip kalsiyum bağımlı bir hidrolazdır. 43-45 kDa ağırlığında bir glikoprotein olan PON1 başlıca karaciğerden olmak üzere çeşitli dokulardan sentezlenir[25] ve kan dolaşımında HDL'ye bağlı olarak bulunur [26]. HDL'ye bağlı olması araştırmacıların dikkatini çekmiştir, çünkü bu özelliği LDL'nin oksidatif strese karşı koruyucu kapasitesinin nedenidir. Köpük hücre oluşumunu azaltır ve aterosklerozisin gelişimini engeller [27]. PON1 polimorfizm koroner kalp hastalığı [28], Parkinson [29], tip 2 diyabet [30] ve bağırsak iltihabı [31] gibi birçok hastalıkla ilişkilidir.

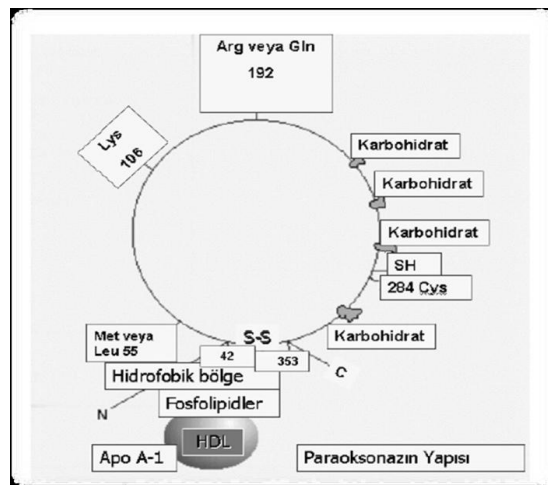
PON2'ye artan ilgiye rağmen, fonksiyonu ve karakteri hakkında halen çok az bilgi mevcuttur. PON ailesinin bir üyesi olmasına rağmen dolaşımda HDL ile bulunmaz, fakat hücreleri oksidatif stresten korur ve hücrel antioksidant olarak görev yapar. Aterosklerozisin azaltılmasında koruyucu fonksiyonu vardır. Rosenblat ve arkadaşları saflaştırılmış rekombinant PON2'nin LDL oksidasyonunu engellediğini göstermişlerdir [32]. PON1 ve PON3'ten farklı olarak plazmada bulunmayan PON2, akciğer, karaciğer, kalp ve bağırsak gibi neredeyse tüm insan dokularından sentezlenmektedir [33]. Atardamar makrofaj hücreleri içinde de

bulunur [34, 35] ve moleküler ağırlığı yaklaşık 40-43 kDa'dır. PON2 geninin iki polimorfizmi vardır [36]. PON2 gen polimorfizm kardiyovasküler hastalıklar [37,38], tip 2 diyabet [39,40] ve bağırsak iltihabı [41] gibi çeşitli insan hastalıkları ile ilişkilidir.

Çoklügen ailesinin 3. üyesi olan PON3, PON1'in ekspresyonuna fonksiyon ve lokasyon olarak benzer. İnsan PON3 enzimi yaklaşık 43 kDa ağırlığında serumda HDL'ye bağlı bulunan ve miktarı PON1 enziminden oldukça az olan bir proteindir. Hem rekombinat PON1, hem de PON3 LDL oksidasyonunu engelleme yeteneğine sahiptir, ancak PON1 daha etkilidir [42]. PON1'in aksine PON3 paraoksonaz aktivitesi değil, arilesteraz aktivitesi göstermektedir [3]. PON proteinlerinden, PON3 en geç bulunan ve karakterize edilendir [43]. PON3'ün polimorfizm ve hastalıklarla ilişkisi konusunda şu an çok az bilgi mevcuttur [44].

1.2.1 Paraoksonaz Enziminin (PON1) Genel Özellikleri ve Yapısı

İnsan serum paraoksonaz enzimi; karaciğerde sentezlenen, arildialkilfosfataz olarak da adlandırılan Ca^{+2} bağımlı, HDL ile ilişkili ve 43-45 kDa molekül ağırlıklı bir ester hidrolazdır [45-47]. Kalsiyum, enzimin hem aktivitesi hem de stabilitesi için gerekmektedir ve katalitik mekanizmada da rol oynamaktadır. Aktif bölgeden dietilfosfatın uzaklaştırılması bu bölgenin uygun konformasyonel yapı kazanmasını sağlar [45, 48, 49]. Paraoksonaz enziminin yapısı (Şekil 1.1) özetlenmiştir [50].



Şekil 1.1: Paraoksonaz enziminin yapısı.

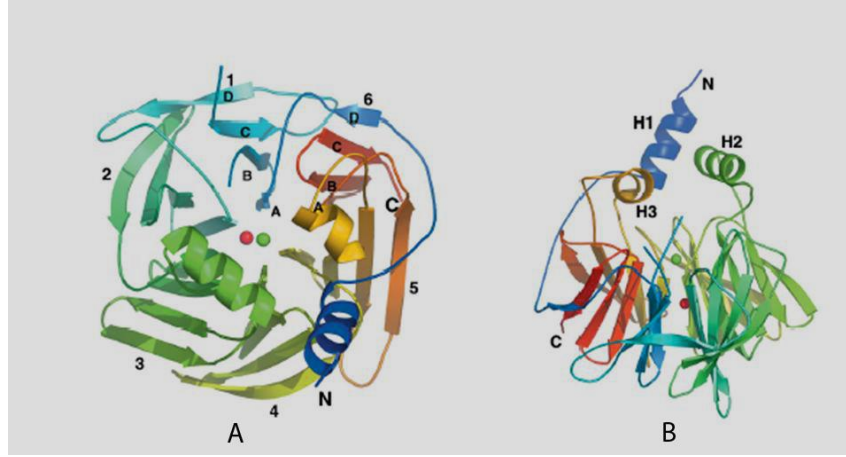
Paraoksonazın yapısında bulunan N-terminal hidrofobik sinyal peptidi, HDL ile etkileşim için gerekmektedir. Paraoksonaz enzimi N-terminal hidrofobik sinyal peptidi aracılığı ile fosfolipidlere ve lipoproteinlere bağlanır [51,52]. İnsan PON1 ve PON3 birincil olarak karaciğerde sentezlenirken insan PON2 daha geniş bir dağılım göstermektedir. [45, 53, 54].

Paraoksonaz aktivitesi, yeni doğanlarda ve prematüre bebeklerde yetişkinlerdekinin yaklaşık yarısı kadardır. Doğumdan yaklaşık bir yıl sonra erişkinlerdeki düzeyine ulaşır ve hayat boyu değişmeden devam eder [45]. Paraoksonaz, 3 tane sistein molekülü içerir, bunlardan iki tanesi molekül içi disülfid bağının oluşumuna katılırken, 284. pozisyondaki sistein molekülü ise serbest halde bulunur. Sistein 284'ün, enzimin aktif merkezine yakın bölgede bulunduğu ve bu bölgenin substrata bağlanma için gerekli olduğu düşünülmektedir. Son yıllarda, sigara kullanımının enzimin serbest tiyol gruplarını modifiye ederek; PON1 enzim aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir [46, 55, 56]. Üç sistein rezidüsünün varlığı PON1'in serin esterazların katalitik merkezlerinde serin amino asitleri yerine nükleofilik sistein amino asitlerini kullanan bir sistein esteraz olduğu hipotezini desteklemektedir [57].

Paraoksonaz enzimi, bir insektisit olan parathionun oksidatif desülfürilasyonu ile oluşan paraoksonu hidroliz ederek p-nitrofenol ve dietilfosfat oluşumuna yol açar. Paraokson oluşumu karaciğer ve diğer dokularda mikrozomal sitokrom p-450 enzim sistemi ile kataliz edilmektedir [45,48]. Paraoksonaz enzim aktivitesi -20°C'de 1 yıl stabildir.

Enzimin izoelektrik noktası 5.1'dir. Paraoksonaz enzimi yüksek oranda lösün içermektedir. Her molekül toplam ağırlığının %15.8'ini oluşturan üç karbohidrat zinciri içermektedir [58, 59].

Paraoksonazın genel yapısına bakıldığında 6 adet β -kırmalı yapıdan oluşmuş 4 adet zincirden meydana geldiği görülür. Enzimin yapısında görülen N terminal ve C terminal uçlarının kovalent bağlanması β -kırmalı yapıya sahip enzimlerde son derece ender görülen bir durumdur [60].



Şekil 1.2: Paraoksonaz enziminin üç boyutlu yapısının görünümü.

(A) β -kırmalı tabakalar ve (B) H1, H2, H3 ile gösterilen hidrofobik bölgelerin β -kırmalı tabakalara göre durumu.

Şekil 1.2’de de görüldüğü gibi; β -kırmalı yapıların ortasında $7,4 \text{ \AA}$ aralıklarla iki tane kalsiyum iyonu bulunmaktadır. Bu kalsiyum iyonlarından bir tanesi yapısal olup, uzaklaştırılması dönüşümsüz denatürasyona sebep olmaktadır. Diğer kalsiyum iyonu ise katalitik etkinlikte görevlidir. Ayrıca bu kalsiyum iyonu $2,1-2,5 \text{ \AA}$ mesafesinde Asn224, Asn270, Asn168, Asp269 ve Glu53’ den oluşan 5 adet aminoasit ile etkileşim halindedir. Bunun yanında aynı kalsiyum iyonu, fosfat iyonunun oksijeni ve bir su molekülü ile etkileşmektedir [61].

PON1 enzimi protein yapısı bulunmuş olmasına rağmen PON1’i saflaştırmak halen zor olmaktadır. Bunun nedeni PON1’in HDL (apoA1) ile sıkı ilişkisidir [62].

PON1 enziminin protein yapısı bulunmuş olmasına rağmen daha endojen substratları bilinmemektedir [59]. Daha yakın zamanlarda, rekombinant mühendislik PON1’in moleküler yapısı aydınlatılmıştır [43].

1.2.2 Paraoksonaz1'in Fonksiyonları

1.2.2.1 Ksenobiyotik Metabolizması Üzerine Etkisi

Ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunu sağlayan oksidasyon, redüksiyon, hidroliz ve konjugasyon gibi tepkimelerin sıklıkla böbreklerde gerçekleştiği bilinmektedir [63]. İmmunohistokimyasal olarak, glomerüler yumak ve proksimal tübüllerin epitel hücrelerinde lokalize olduğu gösterilen PON1' in, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonuna fonksiyonel katkısının olabileceği düşünülmektedir. Renal epitel hücrelerinde anyon transport sistemleri ve PON1'in benzer intrasellüler dağılıma sahip olması; ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda ve toksik etkilerine karşı organizmanın korunmasında PON1'in önemli rol oynayabileceği görüşünü desteklemektedir [64].

1.2.2.2 Organofosfatlara Karşı Koruma (Hidrolitik Aktivite)

Organofosfatlara karşı koruma, PON1'in sadece kan veya doku düzeylerine değil; izoenzimlerine de bağlıdır. PON1'in, organofosfatları ve diğer organik esterleri hidroliz edebilme kapasitesi, kişiler arasında geniş varyasyon gösterir. R tipi, Q tipine göre paraoksonun hidrolizinde daha etkili olmasına rağmen; organofosfatların çoğu, Q izoenzimi ile daha iyi hidroliz edilirler [66]. PON1'in en iyi bilinen fonksiyonu, hidroliz yoluyla, organofosfat türevi sinir gazlarını ve insektisitleri zararsız hale getirmesidir [65]. İsektisit olarak yaygın olarak kullanılan paratyon ve klorpiroposokson gibi organofosfat bileşikleri ile somon ve sarin gibi sinir gazları, PON1'in başlıca substratlarıdır. [66,64,67]. Ancak, memelilerde bulunan PON1'in bu substratlara karşı afinitesi düşük olduğundan, tarımsal alanda çalışanlarda organofosfat zehirlenmelerine sık rastlanır. Bununla beraber, kronik olarak düşük dozda organofosfat türevlerine maruz kalanlarda, PON1'in daha etkili olduğu bildirilmiştir [25]. Organofosfatlar, PON1'in yanı sıra, sinapslarda ve nöromuskuler kavşaklarda bulunan psödokolinesteraz ve asetilkolinesteraz gibi B-esterazların da substratlarıdır. Bu enzimler, organofosfatlar tarafından dönüşümlü

olarak inhibe edildiklerinden; PON1 dolaşımında ki organofosfatları hidroliz etmek suretiyle, sinir sistemini koruyan bir ajan olarak da görev yapmaktadır [68].

1.2.2.3 Bakteriyal Endotoksinlerden Kaynaklanan Toksikiteye Karşı Koruma

Son yıllarda, HDL kompleksinin, gram negatif enfeksiyonlar sırasında gelişen endotoksemiye karşı savunmada rol oynadığı; bakteriyal lipoprotein polisakkarid ile makrofaj spesifik protein arasındaki etkileşimin, HDL tarafından henüz bilinmeyen bir mekanizmayla önlediği düşünülmektedir. Böylece, karaciğer ve böbrek yetmezliğine, septik şokun çeşitli semptomlarına ve hatta ölüme yol açabilen sitokinlerin salınımı engellenmektedir. PON1'in sitokinlerin salınımının önlenmesinde rol oynayabileceği düşünülmektedir [66].

1.2.2.4 LDL ve HDL Oksidasyonunun Önlenmesi

Oksidatif stres altında lipid peroksidasyonu sadece LDL'de değil; HDL'deki lipidlerde de meydana gelmektedir [69]. PON1'in hem LDL'yi, hem de HDL'yi oksidasyondan koruduğu bildirilmiştir [67]. PON1'in HDL vasıtasıyla antioksidan etkiye katkıda bulunduğu ve HDL'nin inhibitör etkisinde, metal iyon selasyonu ve/veya peroksidaz benzeri aktivite ile ilişkili olabileceği ileri sürülmektedir. HDL-PON1, uzun zincirli okside fosfolipidleri hidroliz edebilme yeteneğine sahiptir [70]. HDL'nin LDL oksidasyonu üzerine koruyucu etkisinin öncelikle PON'dan kaynaklandığı düşünülmektedir. PON1'in, Cu^{2+} 'nin indüklediği lipoprotein oksidasyonunu *in vitro* olarak inhibe ettiği ve yarışmasız PON1 inhibitörlerinin serbest radikal oluşumunu ve Cu^{2+} 'nin indüklediği HDL oksidasyonunu artırdığı gösterilmiştir. Ayrıca, PON1'in makrofajlardan kolesterol çıkışını artırdığı da bildirilmiştir [26].

1.2.2.5 Klinik Önemi ve Genetik Polimorfizm

Son yıllarda yapılan çalışmalarla, aterosklerozun patogeneğinde oksidatif stresin önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Serumda bulunan LDL, oksidasyona maruz kalarak aterojenik şekli olan okside LDL formuna dönüşmekte ve okside ürünlerin makrofajlarda birikimiyle köpük hücreleri oluşmakta; böylelikle endotelyumda yağ çizgileri meydana gelmektedir. Son olarak da aterom plağı gelişmektedir [71]. Bu prosesin, başlangıç aşamasında serum PON aktivitesinin koruyucu rol oynadığı ileri sürülmüştür. Bu nedenle, LDL'nin oksidatif modifikasyonunun önlenmesi ateroskleroza karşı savunmada öncelikle gereklidir [67]. PON1, sadece lipoproteinlerle ilişkili peroksidlerin değil, aynı zamanda H₂O₂ üzerine de etkilidir. H₂O₂ ateroskleroz oluşumu sırasında arteriyal duvar hücreleri tarafından üretilen başlıca reaktif oksijen metabolitidir ve oksidatif stres sırasında daha etkili radikallere dönüştürülerek LDL oksidasyonuna neden olur. HDL ile ilişkili PON1'in H₂O₂'yi hidroliz edebilme özelliği ateroskleroz sırasında oluşan oksidanların elimine edilmesinde önemli rol oynayabilir [67,72]. Ayrıca, şeker hastalığı [73] ve kronik renal yetmezlikli olan hastalarda [74] PON1 aktivitelerinin düştüğü bildirilmiştir.

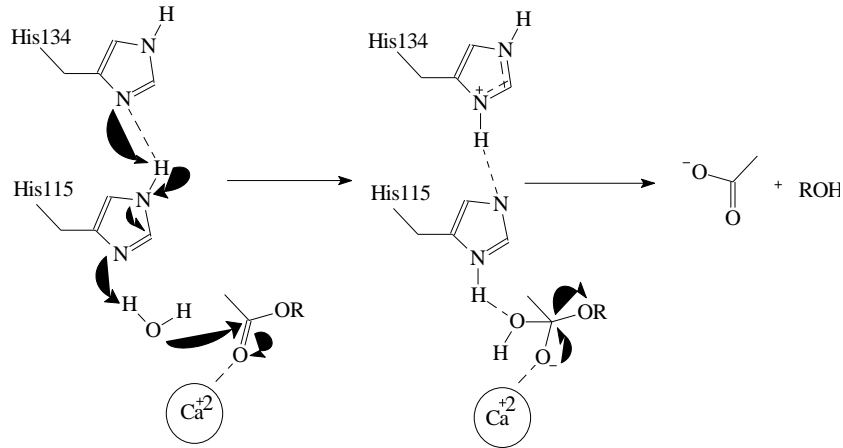
PON1, enzimiyle ilgili yapılan ilk çalışmalarda insanların serum PON1 aktivitesi ölçüldüğünde, paraoksonaz aktivitesi yönünden kişilerin, yüksek, orta ve düşük aktivite gösterenler olmak üzere üç grupta toplandığı ortaya çıkmıştır [74]. İlerleyen yıllarda PON1 geninin sekansı belirlendiğinde genin kodlayan bölgesinde iki tane polimorfizm tespit edilmiştir. Polimorfizminin moleküler temeli, PON1'in kodlanma bölgesindeki kendiliginden olan mutasyonlar sonucu iki aminoasitin yer değiştirmesi ile ilişkilidir [75]. Bu polimorfizmlerden ilki (192Q/R) enzimin sentezlenmesi sırasında 192. amino asit olarak glutamin (Q) yerine arjinin (R) eklenmesine neden olur [76]. Bu polimorfizm enzimin katalitik aktivitesini bazı substratlara karşı ciddi şekilde etkilemektedir. Yapılan ilk çalışmalarda 192R izoformunun paraoksonu 192Q izoformundan 6 kat daha hızlı hidrolizlediği belirlenmiştir. Diazokson, sarin ve soman hidrolizi yönünden ise tam tersi bir durum gözlenmiştir: 192Q izoformu diazokson, sarin ve somanı 192R izoformundan daha iyi hidrolizlemektedir. Klorprifos okson ve fenil asetat gibi bir grup substrat için ise PON1 192Q ve 192R izoformlarının hidroliz hızının aynı olduğu görülmüştür [75]. Ancak, enzim aktivitesi ölçümleri fizyolojik koşullarda, ortamda daha az NaCl

kullanılarak yapıldığında, 192R ve 192Q izoformlarının diazoksonu aynı hızda hidrolize ettiği ve 192R izoformunun klorprifos okson hidroliz hızının 192Q izoformundan daha yüksek olduğu görülmüştür [77].

PON1 geninin kodlayan bölgesinde tespit edilmiş olan diğer polimorfizm (55L/M) ise enzimin 55. amino asitinde lösinden (L) metiyonine (M) değişime yol açar [78]. Enzimin 55. pozisyonunda metiyonin taşıyan bireylerin (55M), 55L izoformunu taşıyanlardan daha düşük PON1 aktivitesine sahip oldukları gözlenmiştir. Ancak bu polimorfizmin enzimin katalitik aktivitesini direkt etkilemediği, plazmada bulunan enzim seviyesi ile ilişkili olduğu için aktiviteyi dolaylı olarak etkilediği ortaya çıkmıştır [76]. PON1 geninin promotor bölgesinde de çok sayıda genetik farklılıklar belirlenmiştir [77].

1.2.3 Enzimin Katalitik Mekanizması

Enzimin aktif bölgesinde bulunan His-His çifti, kalsiyum iyonu ve su molekülü, esteraz aktivitesinde önemli rollere sahiptir (Şekil 1.3).



Şekil 1.3: Paraoksonazın katalitik mekanizması.

Katalitik etkinlik gösteren kalsiyum iyonu, substrattaki fosfat iyonunun negatif yüklü oksijenine 2,2 Å uzaklıktadır. Aktif bölgedeki His-His çifti, su molekülünün bir protonunu alarak bu molekülün nükleofilik gücünü artırır. Oluşan hidroksil iyonu karbonil veya fosfat esterine saldırır. Bu esnada meydana gelen kompleks tetrahedral bir düzlem sonucu kalsiyum iyonu ile kararlı kılınır. Oluşan

yapıdaki kalsiyum iyonu negatif yüklü oksijenden uzaklaşarak bağ tekrar fosfat veya karbonilin üzerine yıkılır ve ester bağı kopar [96].

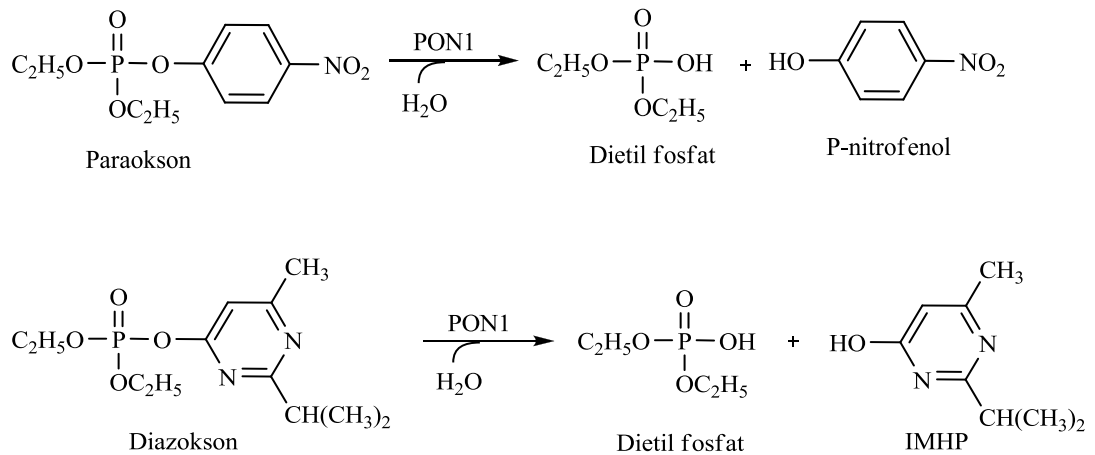
PON1'in mekanizmasını açıklamak amacıyla, esteraz aktivitesi için 2-naftilasetat ve fosfotriesteraz aktivitesi için ise paraoksan substratları kullanılmıştır. Bu substratların optimum pH aralıkları saptanmış ve substratın yapısında bulunan yan zincirin katalizlenmeye direkt katılmadığı sonucu bulunmuştur [96].

1.2.4 PON1'in Substratları

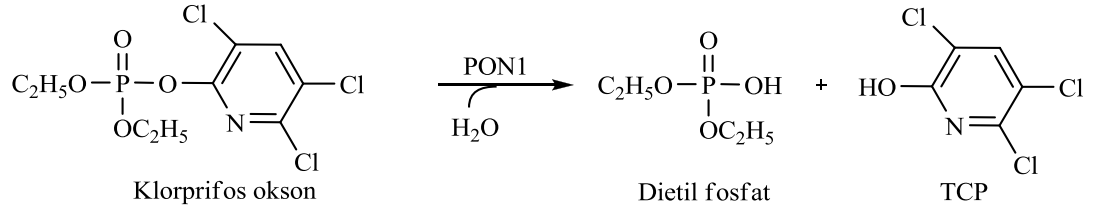
PON1, enzimi adını laboratuvarında en sık kullanılan substratı olan paraoksondan almıştır. Aslında PON1 bazı sentetik substratlara karşı çok usta bir esteraz olmasına rağmen, paraoksonaz aktivitesi biraz zayıftır. Dolayısıyla paraoksonaz enziminin adı, tarihsel bir addir. PON1, çok geniş substrat yelpazesi olan bir hidrolazdır. PON1'in hidroliz ettiği substratlar arasında paration, diazinon ve klorprifos gibi organofosfatlı insektisitlerin toksik okson metabolitleri, sarin, soman ve tabun gibi sinir gazları, fenil asetat gibi aromatik ester ile, homogentisik asit lakton, dihidrokumarin, γ -butirolakton ve homosistein tiolakton gibi birçok aromatik ve alifatik lakton, siklik karbonatlar yer almaktadır (Şekil 1.4).

Şekil 1.4: PON1 enziminin katlızlediği substratlar.

a) Organofosfatlı bileşiklerin toksik okson metabolitlerinin hidrolizi

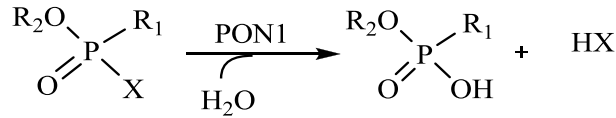


IMHP: 2-izopropil-4-metil-6-hidroksi pirimidin.



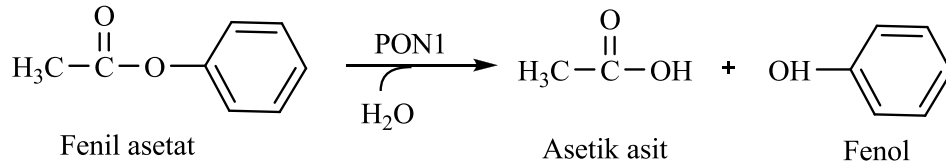
TCP: 3,5,6-trikloro-2-piridinol.

b) Sinir gazlarının hidrolizi

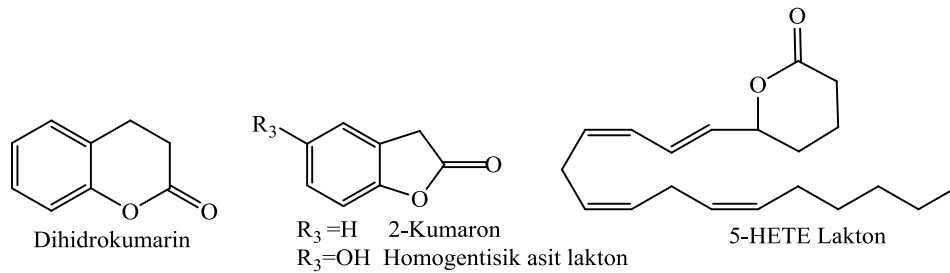
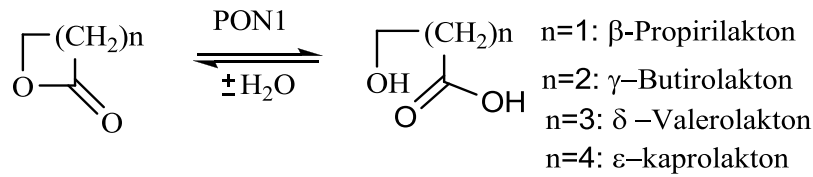


$\text{R}_1 = \text{N}(\text{CH}_3)_2$ $\text{R}_2 = \text{CH}_2\text{CH}_3$ $\text{X} = \text{CN}$ Etil N-dimetil fosforamidosiyanidat (Tabun)
 $\text{R}_1 = \text{CH}_3$ $\text{R}_2 = \text{CH}(\text{CH}_3)_2$ $\text{X} = \text{F}$ izopropil metilfonoforidat (Sarin)
 $\text{R}_1 = \text{CH}_3$ $\text{R}_2 = \text{CH}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{CH}_3)_3$ $\text{X} = \text{F}$ Pinakolimetilfonoforidat (Soman)

c) Aromatik esterlerin hidrolizi



d) Laktonların hidrolizi ve hidroksi asitlerin laktonlara dönüştürülmesi



PON1 laktonları hidrolize ettiği gibi bu reaksiyonun tersini de, yani γ ve δ -hidroksikarboksilik asitlerin laktonizasyonunu da katalizler [80, 81].

PON1 aynı zamanda fosfolipit hidroperoksitleri hidrolizleyerek LDL ve HDL'yi oksidatif değişimlere karşı korumasıyla da tanınmaktadır [82]. Bilindiği gibi okside olmuş LDL aterosjeniktir [83]. PON1'in aterosklerozun oluşumunu ve ilerlemesini engellediğini ortaya koyan birçok çalışma yapılmıştır [84,85]. Ateroskleroz, koroner kalp hastalığı, kalp krizi, beyin damar hastalıkları ve felç gibi ciddi hastalıklara neden olduğu için büyük önem taşımaktadır. Bundan dolayı son yıllarda, insanlarda görülen oksidatif stres kaynaklı birçok hastalıkta PON1'in enzim aktivitesinin ölçümü ve PON1'i kodlayan gende bulunan polimorfizmlerin tespit edilmesi, popüler araştırma konuları olmuştur [86-89].

1.2.5 PON1'in İnhibitörleri

Gonzalvo ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada insan karaciğer mikrozomundan saflaştırılan PON1 enzimi üzerinde EDTA bileşiğinin, Mg^{2+} , Co^{2+} , Ba^{2+} , La^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} ve Hg^{2+} gibi metallerin ve p-hidroksiciva benzoatın inhibisyon etkisi araştırılmıştır. EDTA, baryum, lantan, bakır ve p-hidroksiciva benzoat bileşiğinin yarışmalı bir inhibisyona neden olduğu ve çinkonun ise yarışmasız bir inhibisyon gösterdiği bildirilmektedir [90].

Literatürde laktamların PON1 tarafından hidroliz edilmediği, ancak PON1 aktivitesini inhibe ettiği bildirilmiştir. Laktamlar, laktonların izosterik formudur, yani laktonda bulunan oksijenin azotla yer değiştirmiş şeklidir. 2000 yılında yapılan bir çalışmada, yedi tane laktam bileşiğinin insan serum paraoksonaz enziminin yarışmalı inhibitörü olduğu belirlenmiştir. Söz konusu laktam bileşikler; oksindol, isatin, 3,4-dihidro-2(1H)-kinolin, 2-hidroksikinolin, δ -valerolaktam, ϵ -kaprolaktam ve N-Bromo- ϵ -kaprolaktam'dır. İsatın ve N-Bromo- ϵ -kaprolaktam'ın PON1'i dönüşümsüz olarak inhibe ettiği görülmektedir. Dönüşümsüz inhibisyon olarak etki eden bu iki bileşiğin, enzimin aktif bölgesinde hangi etkileşimlere neden olduğu henüz araştırılmamıştır [91].

2006'da Sinan ve arkadaşlarının gentamisin sülfat ve sefazalin sodyumun insan serum PON1'i inhibe ettiğini çalışmalarında göstermişlerdir. IC_{50} değerleri sırasıyla 0,887 mM ve 0,0084 mM'dır. Ancak çalışmada kullanılan antibiyotiklerin karaciğer PON1'i inhibe etmediği gösterilmiştir [92].

Bazı analjezik ilaçlar (larnokziom, indo metosin, enokziom, diklofenak sodyum, ketoprofen, linkomisin) insan serum PON1'i çok düşük konsantrasyonlar da inhibe etmiştir. İlaçların inhibisyon etkisi sırayla larnokziom> indo metosin> enokziom> diklofenak sodyum>ketoprofen> linkomisin olarak belirlenmiştir [93].

Hg, Co, Cd, Cu, Ni ve Mn ağır metallerinin ve 4 pestisit türünün (Purtapyr, Practicur, Agroform ve Roundup) saflaştırılan serum PON1Q ve PON1R izoenzim aktiviteleri üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu bileşiklerin hepsinin farklı derecede inhibisyon etkisi gösterdiği saptanmıştır [94].

Başka bir çalışmada; bazı sülfonamid türlerinin serum PON1 üzerinde inhibisyon etkisi araştırılmıştır. Sonuçlar sülfosatamid, sülfosalazin, furosamid, asetozolamid, 1,3,4-tiyadiaz-2-sülfosatamid bileşiklerinin insan serum PON1'i inhibe ettiğini göstermiştir [95].

1.2.6 Enzimin Saflaştırılması

Paraoksonaz enzimi karaciğerde, endoplazmik retikulum membranlarının parçacıklarının uçları kapanarak oluşan mikrozomlarda, serumda HDL'ye bağlı olarak bulunmaktadır [97]. Saflaştırma prosedürlerinde öncelikle söz konusu enzimin bağlı olarak bulunduğu yapılardan uzaklaştırılması gerekmektedir.

İlk olarak A-esterazları (diizopropil fosforidat hidrolaz) Mazur tarafından tavşan böbreğinden yaklaşık 13 kat [3] ve daha sonra Mounter tarafından 65-100 kat saflaştırılmıştır [98]. Ancak paraoksonaz ismi ile ilk saflaştırma koyun serumundan 330-385 kat etanol, pH ve iyonik çöktürme yöntemleri kullanılarak Main tarafından başarılmıştır [99]. Daha sonra Furlong ve arkadaşları tarafından insan ve tavşandan söz konusu enzim saflaştırılmış ve cDNA'sı karakterize edilmiştir [100].

Paraoksonaz enziminin saflaştırılması için, ulaşılmak istenen saflık derecesine ve enzimin serumda veya karaciğerde bulunuş durumuna göre değişen çok çeşitli metotlar tanımlanmıştır. Bu metotlardan sıklıkla uygulananları hidroksiapatit adsorbsiyonu, DEAE-Sepharose CL-6B iyon değiştirme kromatografisi, Cibacron Blue 3GA spesifik olmayan afinite kromatografisi, amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE anyon değiştirme kromatografisi, Concanavalin A-Sepharose afinite kromatografisi, mono Q HR 5/5 anyon değiştirme

kromatografisi ve DEAE biojel kromatografisidir. Uygulanan metotların sırası enzim kaynağının serum veya karaciğer olmasına bağlı olarak değişebilir. Bazı durumlarda bir ya da diğer saflaştırma basamağı tekrar kullanılabilir. Örneğin; Gan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada insan serum paraoksonaz Q ve R izoenzimlerinin saflaştırma prosedürü için iki DEAE anyon değiştirme kromatografisi kullanılmıştır [14]. Furlong tavşan ve insan serumundan paraoksonaz enzimini Cibacron Blue 3GA-Agaroz, Sephadex G-75, DEAE Trisacril M ve tekrar Sephadex G-75 jel filtrasyon kromatografi yöntemlerini kullanarak saflaştırmıştır [101].

Paraoksonaz enzimi, karaciğerde mikrozoamlara, serumda da HDL'ye bağlı olduğu için homojen bir saflık elde etmek oldukça zordur [102]. Söz konusu enzimin saflaştırılması sırasında bağlı olduğu yapılardan uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu amaçla, karaciğerde enzimi mikrozoamlardan ayırmak için TritonX-100 kullanılırken [15] serumda HDL'den uzaklaştırılması için deterjan veya yüksek tuz derişimi kullanılması gerekmektedir [101].

1.3 β -Laktam ve β -Laktam Türevlerinin Genel Özellikleri

1929 yılında Fleming bir petri kutusunda *Penicillium* kolonisinin çevresindeki *Staphylococcus aureus* kolonilerinin üremesinin durduğunu gözlemlemiş ve bu etkiyi penisilin adını verdiği maddenin yaptığını bildirmiştir [103]. 1940 yılında Chain ve arkadaşları penisilinın dayanıklı aktif şeklini bol miktarda sentezleyerek tedavide kullanma yolunu açmışlardır [104]. Penisilinın antibiyotik etkiden sorumlu çekirdek kısmında β -laktam halkası bulunur. β -laktam halkasının β -laktamaz gibi enzimlerle değişmesi sonucu penisilinın biyolojik aktivitesi yok olur [105].

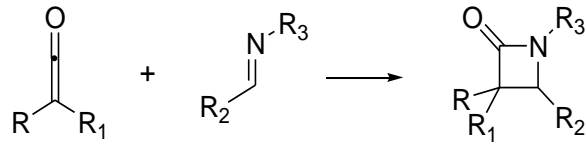
Benzil veya diğer doğal penisilinlere birçok mikroorganizma üründen elde edilen amidofen etkisi ile 6-aminopenilanik asit elde edilir. Başka yan zincirler ilavesi ile birçok yarı sentetik penisilin elde edilmiştir.

Penisilin tedavide kullanılmaya başlandığı 1940 yılından beri pek çok yeni tip penisilin elde edilmiştir. Ayrıca kimyasal yapısı peniline benzeyen başka antibiyotiklerde bulunmuştur [105].

β -laktam ve 2-azetidion, siklobütan amitlere verilen genel isimlerdir. Penisilinin antibiyotik etkisinin içerdığı β -laktam halkasından kaynaklandığı kanıtlandıktan sonra bu halkanın önemi giderek artmış ve sentezi için günümüze dek süren oldukça fazla çalışma yapılmıştır [106, 107].

2-Azetidinon için birçok sentez yöntemi rapor edilmiş olmasına rağmen [107] en çok kabul göreni iminlerin ketenlere [2+2] siklo katılma reaksiyonlarını içeren Staudinger tepkimesidir. Staudinger tepkimesinde genel olarak açıl klorürün trietilaminle keten oluşturması hemen ardından ortamdaki iminin ketene katılması sonucu β -laktam halkası oluşumunu içerir.

β -laktam halkasının ilk sentezi 1907 yılında Hermann Staudinger tarafından gerçekleştirilmiştir ve bu tepkime “Staudinger Tepkimesi” olarak tanınmıştır (Şekil 1.5) [108].



Şekil 1.5: Staudinger tepkimesi.

2. MATERYAL VE YÖNTEMLER

2.1 MATERYALLER

2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

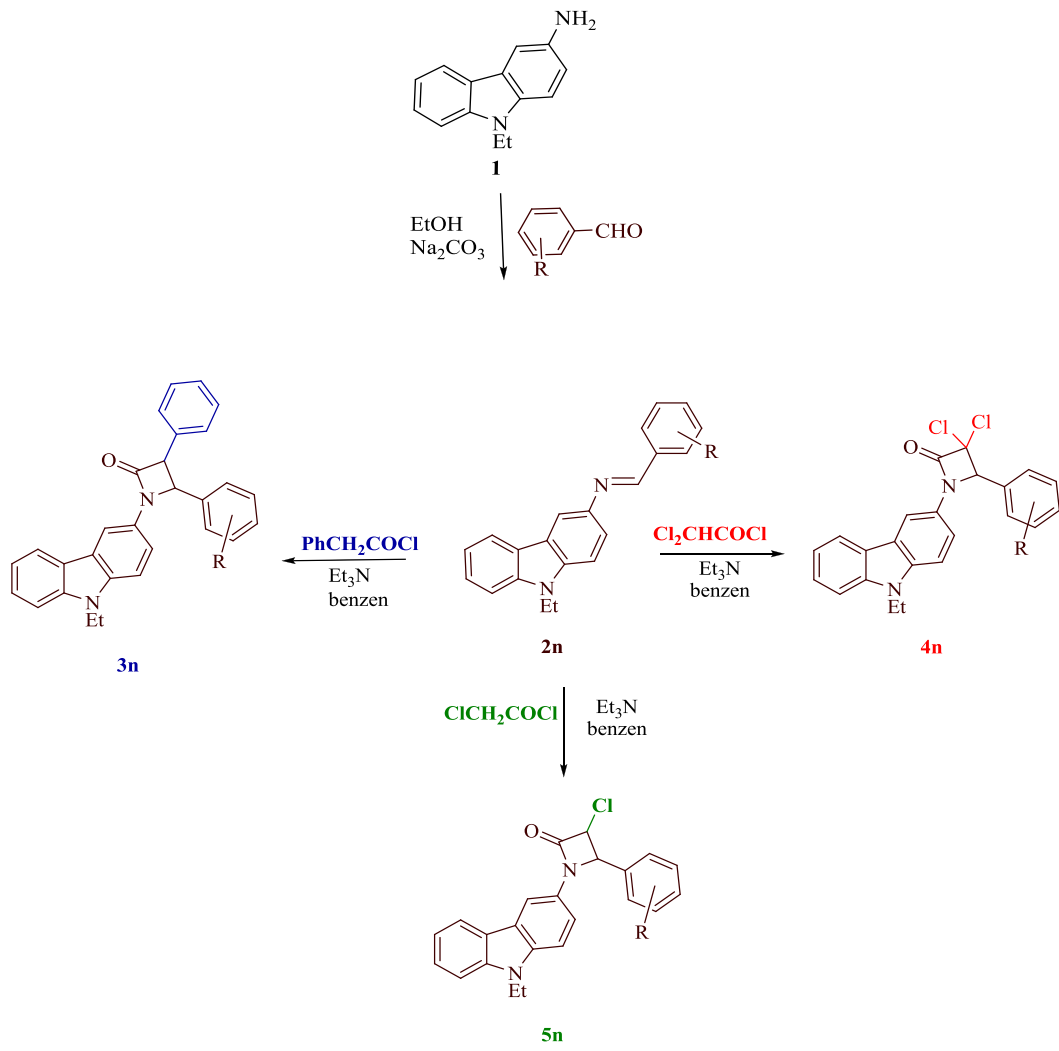
Deneysel çalışmalarda kullanılan, Sepharose-4B, CNBr, L-tirozin, Tris-HCl Tris-Baz (trihidroksimetil aminometan), 1-naftilamin, 7-amino-3,4dihidro-2(1H)-kinolin, standart serum albumin, N,N,N,N'tetrametiletilediamin (TEMED), paraoksan, Sigma Chemical'den; sodyum hidroksit, amonyum sülfat, glisin, fosforik asit, asetik asit, etil alkol, hidroklorik asit, sodyum dihidrojen fosfat, β -merkaptotanol, sodyum dodesil sülfat, akrilamid, N,N-metilen bis-akrilamid, amonyum persülfat, bromofenol mavisi, gliserol, Coomassie brillant blue G-250, sodyum bikarbonat, sodyum fosfat, potasyum fosfat, kalsiyum klorür Merk'den sağlanmıştır.

Bu çalışmada kullanılan organik bileşikler Sakarya Üniversitesi Organik Kimya Laboratuvarlarında sentezlenen orjinal karbazol β -laktam türevleridir . Söz konusu bileşiklerin tamamı (DMSO) dimetil sülfoksit çözeltisinde çözülmüştür. Bileşiklerin numaraları, isimleri ve fonksiyonel grupları Tablo 2.1-2.2'de gösterilmiştir. Orjinal β -laktam türevlerinin sentezi Şekil 2.1'de gösterilmiştir

Tablo 2.1: Orjinal karbazol β -laktam türevlerinin numaraları ve isimleri.

Bileşiğin Numarası	Bileşiğin Adı
3a	1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-3,4-difenilazetid-2-on
3b	1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-3-fenil-4-p-tolilazetid-2-on
3c	1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-3-fenil-4-m-tolilazetid-2-on
3d	1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-4-(4-metoksifenil)-3-fenilazetid-2-on
3e	1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-4-(3-metoksifenil)-3-fenilazetid-2-on

3f	4-(3-klorofenil)-1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-3-fenilazetidin-2-on
3g	1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-4-(4-nitrofenil)-3-fenilazetidin-2-on
3h	1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-4-(3-nitrofenil)-3-fenilazetidin-2-on
3i	1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-4-(2-nitrofenil)-3-fenilazetidin-2-on
3j	4-(2-bromofenil)-1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-3-fenilazetidin-2-on
3k	1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-4-(4-florofenil)-3-fenilazetidin-2-on
4a	3,3-diklor-1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-4-fenilazetidin-2-on
4b	3,3-diklor-1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-4-p-tolilazetidin-2-on
4c	3,3-diklor-1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-4-m-tolilazetidin-2-on
4d	3,3-diklor-1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-4-(4-metoksifenil) azetidin-2-on
4e	3,3-diklor-1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-4-(3-metoksifenil) azetidin-2-on
4f	3,3-diklor-4-(4-klorofenil)-1-(9-etil-9H-karbazol-3-il) azetidin-2-on
4g	3,3-diklor-4-(3-klorofenil)-1-(9-etil-9H-karbazol-3-il) azetidin-2-on
4h	3,3-diklor-1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-4-(4-nitrofenil) azetidin-2-on
4i	3,3-diklor-1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-4-(3-nitrofenil) azetidin-2-on
4k	4-(4-bromofenil)-3,3-diklor-1-(9-etil-9H-karbazol-3-il) azetidin-2-on
4m	4-(2-bromofenil)-3,3-diklor-1-(9-etil-9H-karbazol-3-il) azetidin-2-on
4n	3,3-diklor-1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-4-(4-florofenil) azetidin-2-on
5a	3-klor-1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-4-fenilazetidin-2-on
5b	3-klor-1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-4-p-tolilazetidin-2-on
5c	3-klor-1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-4-m-tolilazetidin-2-on
5d	3-klor-1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-4-(4-metoksifenil) azetidin-2-on
5e	3-klor-1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-4-(3-metoksifenil) azetidin-2-on
5f	3-klor-4-(4-klorofenil)-1-(9-etil-9H-karbazol-3-il) azetidin-2-on
5g	3-klor-4-(3-klorofenil)-1-(9-etil-9H-karbazol-3-il) azetidin-2-on
5h	3-klor-1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-4-(4-nitrofenil) azetidin-2-on
5i	3-klor-1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-4-(3-nitrofenil) azetidin-2-on
5k	4-(4-bromofenil)-3-klor-1-(9-etil-9H-karbazol-3-il) azetidin-2-on
5l	4-(3-bromofenil)-3-klor-1-(9-etil-9H-karbazol-3-il) azetidin-2-on
5m	4-(2-bromofenil)-3-klor-1-(9-etil-9H-karbazol-3-il) azetidin-2-on
5n	3-klor-1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-4-(4-florofenil) azetidin-2-on



Şekil 2.1: Karbazol β-laktam türevlerinin sentezi.

Tablo 2.2: Karbazol β -laktam türevlerinin fonksiyonel grupları ve kod numaraları.

	R		R
a	H	h	3-Cl
b	4-CH ₃	i	4-NO ₂
c	3-CH ₃	j	3-NO ₂
d	4-OCH ₃	k	2-NO ₂
e	3-OCH ₃	l	4-Br
f	4-Cl	m	3-Br
g	H	n	2-Br

2.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar

Soğutmalı santrifüj	Sigma 3K15
pH metre	Hana pH 211 Microprocessor
UV-Spektrofotometre	Biotek Power Wave XS
Manyetik karıştırıcı	Torrey Pines Scientific
Terazi	Sartorius BL 210S
Otomatik pipetler	Hi-Tech ve Finipipette
Elektroforez sistemi	BIORAD
Kromatografi kolonu	Sigma (1,5x10 cm)
Vorteks	Fisons Whirli Mixer
Gadient mikser	Atta Magnetik Karıştırıcı ve Gadient Tüp
Buz makinesi	Fiocchetti AF 10
Jel görüntüleme sistemi	Gel Doc-H Imaging System (UVP)

2.1.3 Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere aşağıdaki çözeltiler hazırlandı.

Hidrofobik jelin sentezinde kullanılan tamponlar:

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

0,2 M NaHCO₃ tamponu (pH 8,8); 8,401 g (0,1 mol) NaHCO₃ 450 mL distile suda çözülerek, 1N NaOH ile pH'ı 8,8'e getirildi ve son hacim distile su ile 500 mL'ye tamamlandı.

0,01 M Na₂HPO₄ tamponu (pH 6,0); 1,42 g (0,01 mol) Na₂HPO₄ 950 mL distile suda çözülerek, 1N NaOH ile pH'sı 6,0'a getirildi ve son hacim distile su ile 1L'ye tamamlandı.

Amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda oluşan çökeleğin alındığı tampon: 0,1 M Tris-Baz tamponu (pH 8,0); 1,211 g (0,01 mol) tris-Baz 95 mL distile suda çözülerek, 1N HCl ile pH'ı 8,0'a getirildi ve son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı

Hidrofobik jelin dengelenmesi için kullanılan tampon: 1M (NH₄)₂SO₄ içeren, 0,1 M Na₂HPO₄ tamponu (pH 8,0); 14,2 g (0,1 mol) Na₂HPO₄ ve 132,14 g (1 mol) (NH₄)₂SO₄ 950 mL distile suda çözülerek, 1N HCl ile pH'ı 8,0'e getirildi ve son hacim distile su ile 1L'ye tamamlandı.

Hidrofobik jele bağlanmış PON1 enziminin elüsyonu için kullanılan tampon: 1M (NH₄)₂SO₄ içeren, 0,1 M Na₂HPO₄ tamponu (pH 8,0) ve 0,1 M Na₂HPO₄ tamponu (pH 8,0) ile gradient mikser kullanılarak tuz gradienti oluşturuldu; 14,2 g (0,1 mol) Na₂HPO₄ ve 132,14 g (1 mol) (NH₄)₂SO₄ 950 mL distile suda çözülerek, 1N HCl ile pH'sı 8,0'e getirildi ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı. 14,2 g (0,1 mol) Na₂HPO₄ 950 mL distile suda çözülerek, 1 N HCl ile pH'ı 8,0'e getirildi ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

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

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

Stok madde çözeltileri: *in vitro* çalışmalarda kullanılan karbazol β-laktam bileşiklerinin tamamı 1.10⁻³ M olacak şekilde, dimetil sülfoksit (DMSO) ile çözüldü.

Proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözeltiler:

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

Ayıraç A: % 2'lik Na₂CO₃ 0,1 M NaOH'da çözüldü.

Ayıraç B: % 1 NaK tartarat distile suda çözüldü

Ayıraç C: % 0,5'lik CuSO₄ distile suda çözüldü.

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

Sığır serum albumini (BSA): 5 mg 5 mL suda çözülerek taze olarak hazırlandı.

SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan numune tamponu;

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

SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan tank tamponu;

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

SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan ayırma ve yığma jellerinin hazırlanışı: SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının hazırlanışı ve kullanılan miktarları Tablo 2.3’de verilmektedir.

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

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

Tablo 2.3: SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının miktarları.

	Ayırma Jeli	Yığma Jeli
	% 10	% 3
<u>Akril amid/Bis</u> Akril amid : 15 g Bis : 0,4 g Alınarak son hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlanır.	16,65 mL	2,6 mL
Distile su	20,1 mL	12,2 mL
<u>1,5 M tris-HCL (pH 8,8)</u> Tris-HCl 11,82 g Alınarak pH 8,8 oluncaya kadar 0,1 M NaOH ilave edilerek son hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlanır.	12,5 mL	–
<u>0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)</u> Tris-HCl 3,94 g	–	5 mL

Alınarak pH 6,8 oluncaya kadar 0,1 M NaOH ilave edilerek son hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlanır.		
<u>% 10 'luk SDS</u>		
SDS 1g Alınarak son hacim distile su ile 10 mL'ye tamamlanır.	0,5 µL	200 µL
TEMED	25 µL	20 µL
<u>%10'luk amonyum persülfat</u>		
Amonyum persülfat 1g Alınarak son hacim distile su ile 10 mL'ye tamamlanır.	750 µL	400 µL

2.2 YÖNTEMLER

2.2.1 Kan Serumunun Ayrılması

Kan numuneleri, kuru santrifüj tüpüne alındıktan sonra 5000 rpm'de, +4°C'de, 10 dakika santrifüj edilerek serumlarının ayrılması sağlanmıştır. Ayrılan serum aynı gün deneysel çalışmalarda kullanılmıştır.

2.2.2 Enzim Aktivite Tayini

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

ünitesi paraoksonaz dakikada meydana gelen p-nitrofenolün $\mu\text{mol}'\text{ü}$ olarak tayin edildi.

2.2.3 Lowry Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini

Amonyum sülfat çöktürmesi sırasında elde edilen çözeltilerdeki protein miktar tayinleri bu yöntemle belirlendi. Bu yöntem alkali koşullar altında biüret reaksiyonu ve aromatik aminoasitlerin Cu^{2+} katalizli oksidasyonundan sonra, ayrıca bulunan fosfomolibdik, fosfotungisdik asiti ile heteropolimolibden mavisine indirgenmeyi içeren Folin-Ciocalteu reaksiyonunun bir kombinasyonudur. Özetle deneyin prensibi alkali ortamda proteinlerin peptid bağlarının ve tirozin artıklarının bakır ile kompleks oluşturmasına dayanır [109]. Koyu mavi oluşu karakteristiktir ve 600 nm dalga boyunda absorpsiyon verir. Yöntem çok duyarlıdır. Ancak pH'ya bağlıdır. Hassasiyet aralığı 5-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'dir. Ortam pH'sı 10-10,5 olmalıdır. Bu yöntem triptofan ve tirozin içeriği fazla olan proteinlerin miktar tayini için avantajlıdır. Zira ayıraç bu aminoasitlere daha yüksek hassasiyet gösterir. Bu yöntemde 4 farklı çözelti kullanılır.

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

Protein miktarını ölçmek için hazırlanan enzim çözeltilerinde 0,1 mL 2 ayrı tüpe konuldu. Üzerlerine 2 mL D ayırıcından eklendi. Oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi. Daha sonra her tüpe 0,2 mL folin-fenol bileşiği eklenip vorteksle karıştırıldı. 30 dk oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 600 nm'de absorpsiyonları okundu. Ölçümlerin ortalama absorpsiyonuna karşılık gelen protein miktarı standart grafik yardımıyla hesaplandı.

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. Bu amaçla literatürden bakılarak %60-80 amonyum sülfat çöktürmesi [2] aşağıda verilen formülle belirlendi;

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

V: Serum hacmi

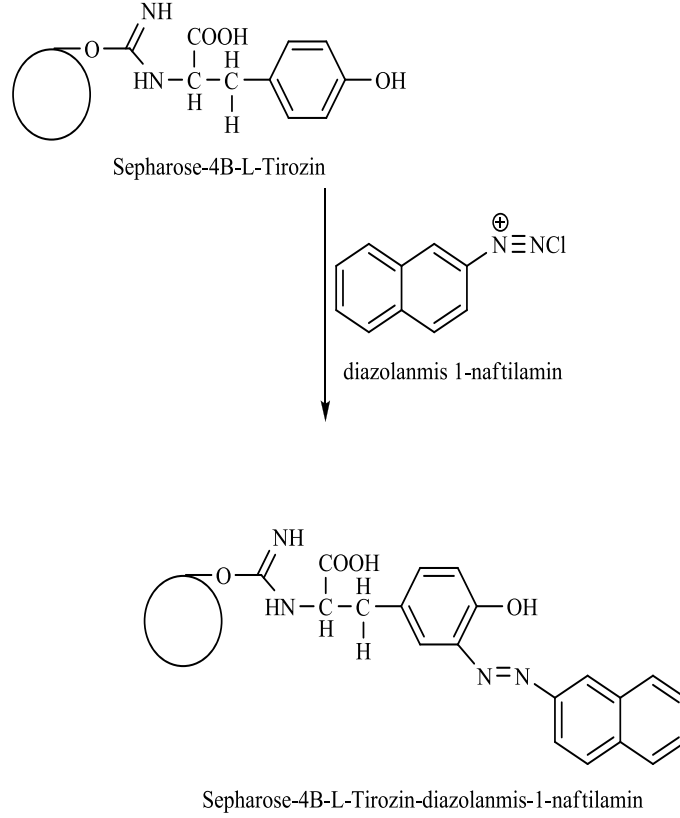
S₁: 1'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu

S₂: 1'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğu

2.2.4.2 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Enzimin Saflaştırılması

PON1 enziminin saflaştırılmasında amonyum sülfat çöktürmesinin ardından hidrofobik etkileşim kromatografisi kullanılmıştır. Bunun için de laboratuvarımızda sentezlediğimiz hidrofobik jel sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin kullanılmıştır. (Şekil 2.2). Hazırlanan hidrofobik etkileşim kolonu önce 1M (NH₄)₂SO₄ içeren 0,1M Tris-HCl pH 8,0 tamponu ile dengelendi. Kolonun dengeleme işlemi bittikten sonra, jel üzerindeki tampon çözeltisi jel seviyesine kadar indirildi. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen enzim çözeltisi 5 mL çökelek tamponu ile çözüldükten sonra, 1M amonyum sülfat doygunluğuna getirildi. Ardından çözeltinin enzim aktivitesi spektrometrik olarak belirlendikten sonra kolona tatbik edildi. Kolona 1 M (NH₄)₂SO₄ içeren 0,1M Tris-HCl pH 8,0 tamponu ve 0,1M Tris-HCl pH 8,0 tamponu ile oluşturulan yüksek tuz konsantrasyonundan düşük tuz konsantrasyonuna doğru tuz gradienti uygulandı. Kolondan toplanan yıkama ve elüsyon çözeltisi 2 mL halinde tüplere alındı. Yıkama ve elüsyon işlemi 280 nm'deki absorbans sıfır oluncaya kadar devam edildi. 0,1M Tris-HCl pH 8,0 tamponu kör

olarak kullanılarak her bir tüpte 280 nm’de kalitatif protein tayini ve 412 nm 1dk 37°C’de aktivite tayini yapıldı. Elde edilen değerlerin tüp numarasına karşı aktivite ve protein miktarı grafiği çizildi (Şekil 3.1).



Şekil 2.2: Hidrofobik jel sepharose 4B L-tirozin 1 naftilamin.

2.2.5 Yeni Karbazol β -Laktam Türevlerinin PON Aktivitesi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

Laktam bileşiklerinin paraoksonaz enzimi üzerindeki etkilerini belirlemek için, optimum şartlarda paraoksan substratının 1 mM sabit derişimde çalışıldı. Önce maddesiz ortamda enzim aktivitesi bulundu. Bu değer % 100 aktivite olarak kullanıldı. Değişik β -laktam bileşikleri derişimlerine karşılık gelen absorbanslar 412 nm’de köre karşı okundu. Elde edilen absorbans değerlerinden % aktivite

hesaplandı. % Aktivite–derişim gafikleri çizildi. Bütün β -laktam bileşikleri için, $1,10^{-5}$ M madde derişimindeki % enzim aktivite değerleri bulundu.

2.2.6 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) ile Enzim Saflığının Kontrolü

Paraoksonaz enziminin hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılmasından sonra iki farklı akrilamid tepkimesinde; yığma jeli % 3, ayırma jeli % 10 olacak şekilde kesikli sodyum dodesil sülfat jel elektrofrez (SDS-PAGE) Laemmli [110] tarafından belirtilen yöntemle yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi.

Bu amaçla elektrofrez 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 elektrofrezin dökme aparatına sabitlendi. Tablo 2.3'te belirtildiği şekilde hazırlanan ayırma jeli plakalar arasına üstten 2-3 cm kalana kadar döküldü. Jel içerisinde hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. Jel yüzeyinin düzgün olması için n-bütanol ile ince bir tabaka oluşturuldu. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra üst yüzeydeki n-bütanol döküldü. Daha sonra cam plakaların arasına tamamen doluncaya kadar polimerleşmiş ayırma jelinin üzerine yığma jeli ilave edildi. Jel kasetindeki yükleme jelinin üzerine tarak dikkatlice yerleştirilerek jelin polimerleşmesi beklendi (30 dakika). Yükleme jeli polimerleştikten sonra tarak kuyucukların arasının bozulmamasına dikkat edilerek çıkarıldı. Kuyucuklar önce saf suyla sonra tank tamponuyla yıkandı. Polimerize jellerin bulunduğu kaset elektrofrez tankına yerleştirildi. Elektrofrez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konuldu.

Hidrofobik etkileşim kromatografisi sonucunda elde edilen fraksiyonlardan yüksek aktivite gösterenler birleştirildi. Elde edilen çözelti toplam hacim 100 μ L olacak şekilde 1:1 oranında numune tamponuyla karıştırıldı. β -galaktosidaz (116,0 kDa), sığır serum albumin (66,2 kDa), yumurta albumini (45,0 kDa), laktat dehidrogenaz (35,0 kDa), β -laktoglobulin (25,0 kDa) ve lizozim (19,5 kDa) içeren standart protein çözeltisi 1:1 oranında numune tamponuyla karıştırıldı. Jele yüklenecek numuneler 3 dakika 100 °C'de termoblokda bekletildi. Numuneler

soğutularak kuyucuklara yüklendi. Elektroforez güç kaynağına bağlanarak 80 volt'a ayarlandı. Proteinlerin jeldeki hareketini incelemeye yarayan numune tamponu içindeki boyaya ait bant ayırma jeline ulaştığında voltaj 120 volt'a yükseltildi. Yürütme işlemine proteinler, jelin altına 1cm kalana kadar devam edildi. Daha sonra akım kesilerek yürütme durduruldu. Cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı yığma jeli kesilip ayrıldıktan sonra protein bantlarını içeren ayırma jeli renklendirme çözeltisi içine konuldu ve 1,5-2 saat kadar çalkalayıcı üzerine bırakıldı. Daha sonra jel renklendirme çözeltisinden çıkartılarak renksizleştirme çözeltisine kondu. Belirli aralıklarla değiştirmek suretiyle jelin zemin rengi açılıp protein bantları belirginleşinceye kadar bu çözelti içinde çalkalandı. Jel renksizleştirme çözeltisinden çıkarıldıktan sonra jel görüntüleme sistemi (UVP) ile görüntü bilgisayara aktarıldı.

3. BULGULAR

3.1 Enzimin Saflaştırılması

3.1.1 Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Amonyum sülfat, belirli doygunluk derecelerine göre belirli proteinlerin çökmesini sağlayan 2 değerlikli, çok kullanılan bir tuzdur. Bu amaçla %60-80 amonyum sülfat çöktürmesi [2] aşağıda verilen formülle tespit yapıldı:

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

V: Serum hacmi

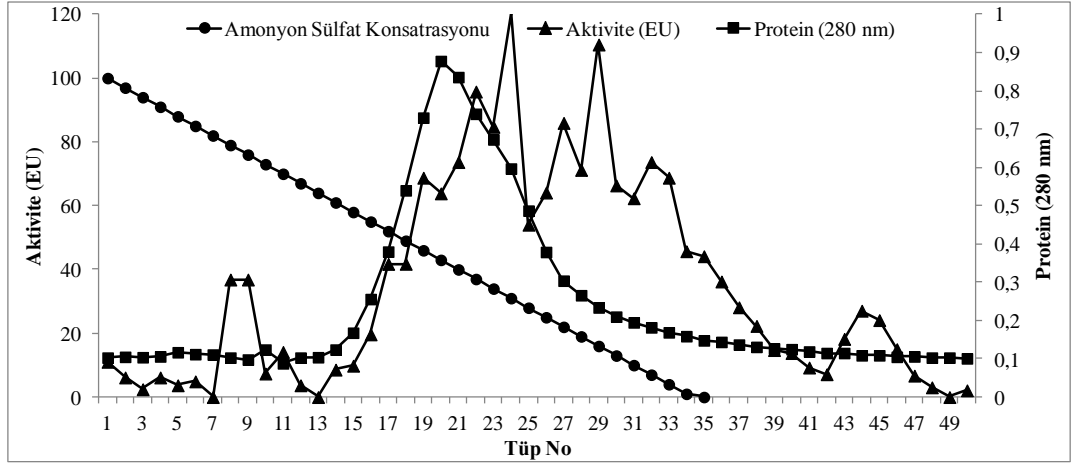
S₁: 1'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu

S₂: 1'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğu

3.1.2 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Enzimin Saflaştırılması

Hidrofobik etkileşim (sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin) kolonu önce 1M (NH₄)₂SO₄ içeren 0,1 M Tris-HCl pH 8,0 tamponu ile dengelendi. Kolonun dengeleme işlemi bittikten sonra, jel üzerindeki tampon çözeltisi jel seviyesine kadar indirildi. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen serum enzim çözeltisi 1 M amonyum sülfat doygunluğuna getirildikten sonra kolona tatbik edildi. Kolona 1 M (NH₄)₂SO₄ içeren 0,1 M Tris-HCl pH 8,0 tamponu ve 0,1 M Tris-HCl pH 8,0 tamponu ile oluşturulan yüksek tuz konsantrasyonundan düşük tuz konsantrasyonuna doğru tuz gradienti uygulandı. Altan gelen yıkama ve elüsyon çözeltisi 2 mL halinde tüplere toplandı. Yıkama ve elüsyon işlemi 280 nm'deki absorbans sıfır oluncaya kadar devam edildi. 0,1 M Tris-HCl pH 8,0 tamponu kör olarak kullanılarak her bir tüpte 280 nm'de kalitatif protein tayini ve 412 nm'de aktivite

taini yapıldı. Elde edilen değerlerin tüp numarasına karşı aktivite ve protein miktarı grafiği çizildi (Şekil 3.1). Hidrofobik etkileşim kromatografisi sonucunda aktivite gösteren tüpler (44. ve 45.) birleştirildi. Serum, kolona tatbik edilen numune ve birleştirilen elüat çözeltileri için Lowry metoduyla kantitatif protein ve aktivite tayinleri yapılarak, spesifik aktiviteler ve saflaştırma dercesi belirlendi. Sonuçlar Tablo 3.1’de verildi.



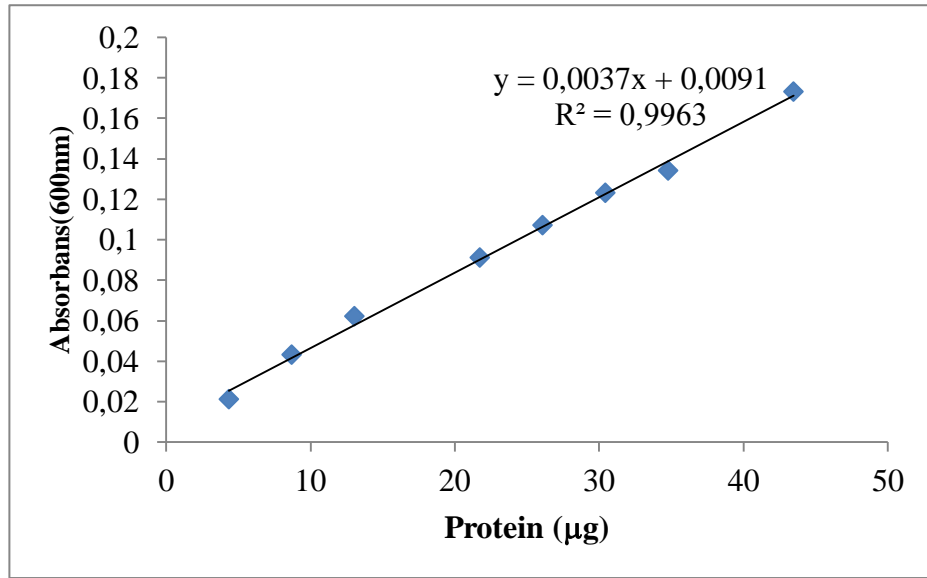
Şekil 3.1: Hidrofobik etkileşim kolonundan PON1 enziminin elüsyon grafiği.

Tablo 3.1: Hidrofobik etkileşim kromatografisi için saflaştırma tablosu.

Basamak	Hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Toplam Aktivite (EU/mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (EU/mg)	% Verim	Saflaştırma Derecesi
Serum	37	28,2601	1045,624	1220,22	52868	0,0198	100	-
Amonyum Sülfat Çöktürmesi	15	52,843	792,5115	1067,5	16012	0,0494	75,79	2,49
Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi	2	130,1754	260,3509	10,34	10,34	25,18	24,89	509,71

3.1.3 Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri

Saflaştırma basamaklarında kantitatif protein tayini için Lowry metodu kullanılmıştır. Lowry metodu kantitatif diğer protein tayinlerinden oldukça hassas olup hassasiyet aralığı 5-100 µg/mL'dir. Söz konusu yöntemle protein miktar tayininde sığır serum albümin proteini standart olarak kullanılmıştır. Standart çözeltideki mg proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 3.2'de gösterilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi regresyon katsayısı 0.9963 olarak belirlenmiştir. Söz konusu grafiğin doğru denkleminde ilgili absorbansa karşılık gelen mg protein miktarı tespit edilmiştir.

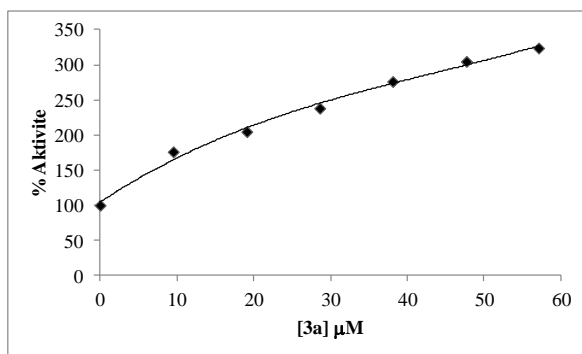


Şekil 3.2: Lowry yöntemi ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan standart grafik.

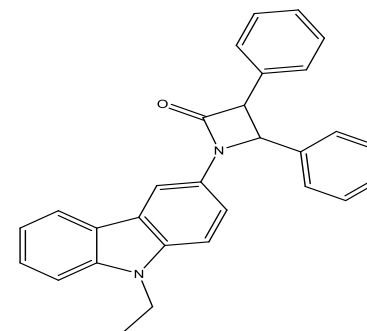
3.2 Yeni Laktam Türevlerinin İnsan Serum Paraoksonaz Enzimi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

Çalışmamızda kullandığımız laktam bileşiklerinin paraoksonaz enzimi üzerindeki in vitro etkilerini belirlemek bulmak için, optimum şartlarda paraokson substratının 1 mM sabit derişiminde çalışıldı. Her ölçümde substrat çözeltisi 0,05 mL paraokson ve 0,05 mL enzim çözeltisi alındı ve laktam bileşiklerin çözeltilerinden ise değişik hacimlerde alınarak toplam 1,0 mL'lik bir reaksiyon hacmi oluşturuldu. Önce

maddesiz ortamda enzim aktivitesi bulundu. Bu değer %100 aktivite olarak kullanıldı. Daha sonra optimum pH ve sıcaklıkta 0,05 mL enzim çözeltilisi alınıp daha önceden hazırlanmış olan 1 mL tampon + substrat + laktam maddelerinin çözeltilisine çabuk bir şekilde eklendikten sonra 412 nm'de bir dakikada absorbansta meydana gelen değişme okundu. Elde edilen absorbans değerlerinden % aktivite hesaplandı. % Aktivite-[I] grafikleri çizildi.



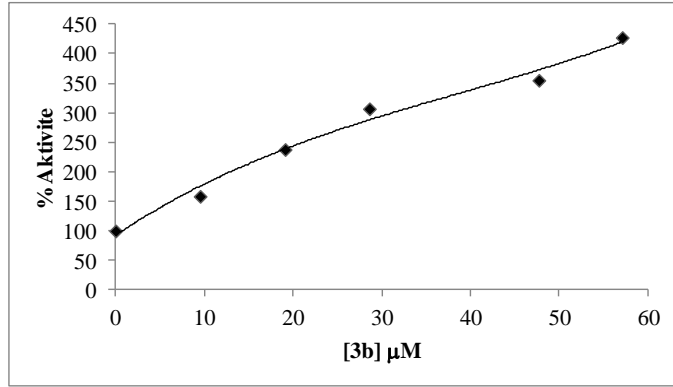
Şekil 3.3: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı derişiminde **3a** için % aktivite-[I] grafiği.



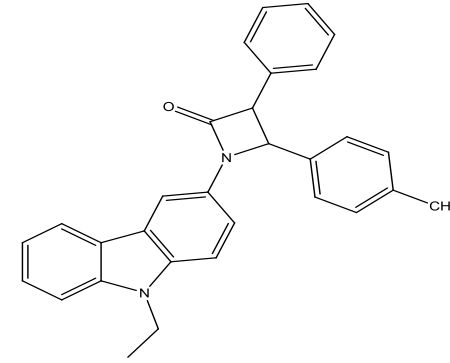
Şekil 3.4: **3a** maddesinin açık yapısı.

Tablo 3.2: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren **3a**'nın % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.

100 mM Tris tamponu (μL)	Madde	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Madde Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Küvetteki Madde Derişimi (mM)	A (412 nm)	Aktivite (EU/mL dak)	% Aktivite
850	3a	100	100	-	0	0,021	27,790	100
840				10	$9,52 \cdot 10^{-06}$	0,037	45,439	176,190
830				20	$1,91 \cdot 10^{-05}$	0,043	52,807	204,762
820				30	$2,86 \cdot 10^{-05}$	0,050	61,403	238,095
810				40	$3,81 \cdot 10^{-05}$	0,058	71,228	276,190
800				50	$4,77 \cdot 10^{-05}$	0,064	78,596	304,762



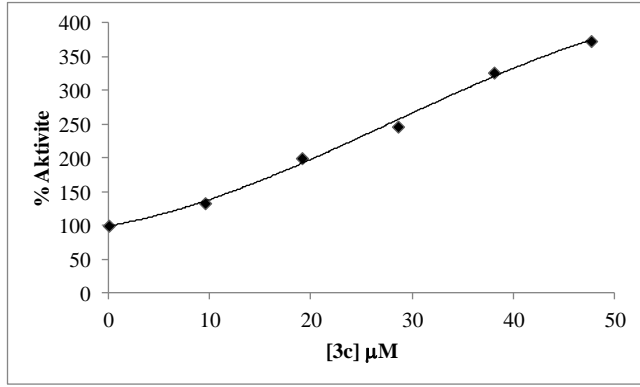
Şekil 3.5: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı derişiminde **3b** için % aktivite-[I] grafiği.



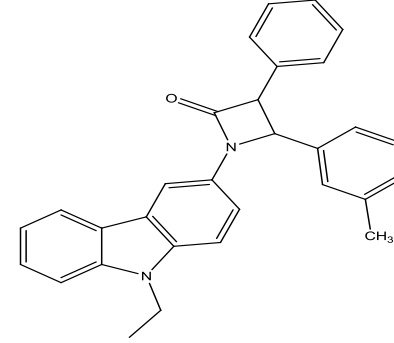
Şekil 3.6: **3b** maddesinin açık yapısı.

Tablo 3.3: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren **3b**'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.

100 mM Tris tamponu (μL)	Madde	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Madde Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Küvetteki Madde Derişimi (mM)	A (412 nm)	Aktivite (EU/mL dak)	% Aktivite
850	3b	100	100	-	0	0,029	35,61	100
840				10	$9,52 \cdot 10^{-06}$	0,046	56,49	158,621
830				20	$1,91 \cdot 10^{-05}$	0,069	84,74	237,931
820				30	$2,86 \cdot 10^{-05}$	0,089	109,29	306,897
810				50	$4,77 \cdot 10^{-05}$	0,103	126,49	355,172
800				60	$5,71 \cdot 10^{-05}$	0,124	152,28	427,586



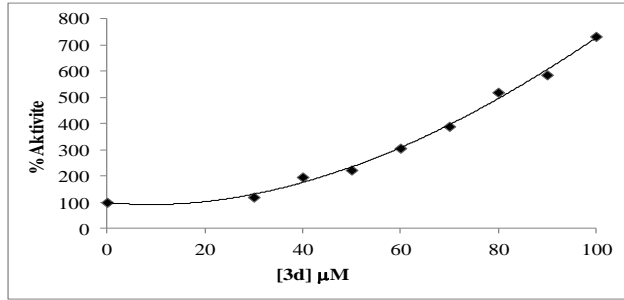
Şekil 3.7: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı derişiminde **3c** için % aktivite-[I] grafiği.



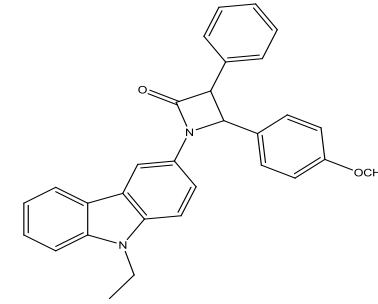
Şekil 3.8: **3c** maddesinin açık yapısı.

Tablo 3.4: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren **3c**'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.

100 mM Tris tamponu (μL)	Madde	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Madde Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Küvetteki Madde Derişimi (mM)	A (412 nm)	Aktivite (EU/mL dak)	% Aktivite
850	3c	100	100	-	0	0,015	18,42	100
840				10	$9,52 \cdot 10^{-06}$	0,020	24,56	133,333
830				20	$1,91 \cdot 10^{-05}$	0,030	36,84	200
820				30	$2,86 \cdot 10^{-05}$	0,037	45,44	246,667
810				40	$3,81 \cdot 10^{-05}$	0,049	60,17	326,667
800				50	$4,77 \cdot 10^{-05}$	0,056	68,77	373,333



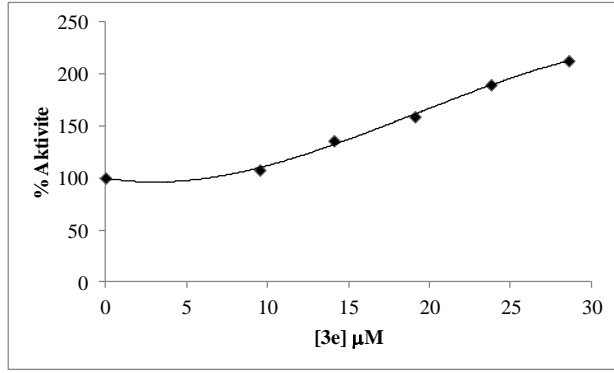
Şekil 3.9: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı derişiminde **3d** için % aktivite-[I] grafiği.



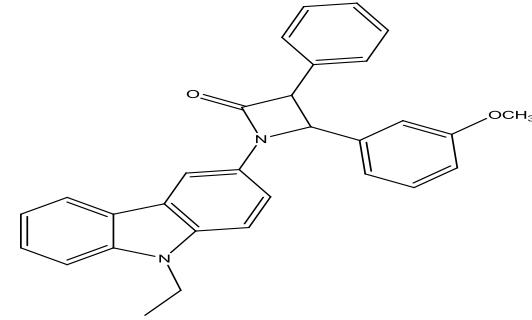
Şekil 3.10: **3d** maddesinin açık yapısı.

Tablo 3.5: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren **3d**'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.

100 mM Tris tamponu (μL)	Madde	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Madde Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Küvetteki Madde Derişimi (mM)	A (412 nm)	Aktivite (EU/mL dak)	% Aktivite
900	3d	50	50	-	-	0,030	35,09	100
870				30	$3 \cdot 10^{-05}$	0,036	42,10	119,98
860				40	$4 \cdot 10^{-05}$	0,059	69,01	196,67
850				50	$5 \cdot 10^{-05}$	0,067	78,36	223,31
840				60	$6 \cdot 10^{-05}$	0,092	107,60	306,64
830				70	$7 \cdot 10^{-05}$	0,117	136,84	389,97
820				80	$8 \cdot 10^{-05}$	0,156	182,46	520



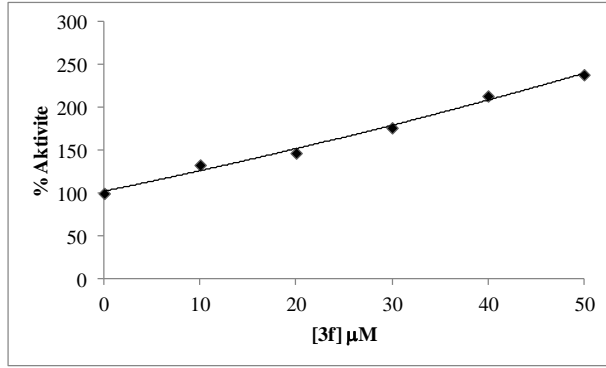
Şekil 3.11: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substrat derişiminde **3e** için % aktivite-[I] grafiği.



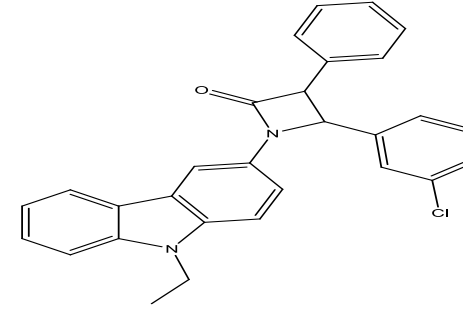
Şekil 3.12: **3e** maddesinin açık yapısı.

Tablo 3.6: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren **3e**'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.

100 mM Tris tamponu (μL)	Madde	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Madde Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Küvetteki Madde Derişimi (mM)	A (412 nm)	Aktivite (EU/mL dak)	% Aktivite
850	3e	100	100	-	0	0,039	47,895	100
840				10	$9,52 \cdot 10^{-06}$	0,042	51,579	107,692
835				15	$1,41 \cdot 10^{-05}$	0,053	65,088	135,897
830				20	$1,91 \cdot 10^{-05}$	0,062	76,140	158,974
825				25	$2,38 \cdot 10^{-05}$	0,074	90,878	189,743
820				30	$2,86 \cdot 10^{-05}$	0,083	101,929	212,820



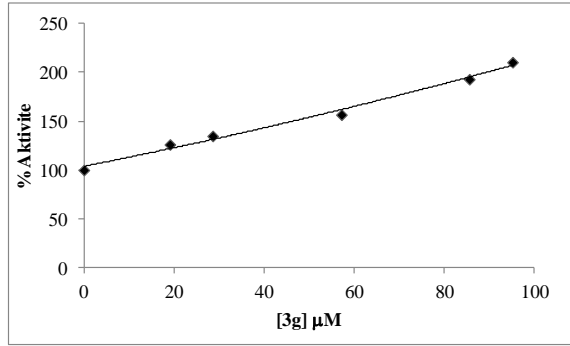
Şekil 3.13: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı derişiminde **3f** için % aktivite-[I] grafiği.



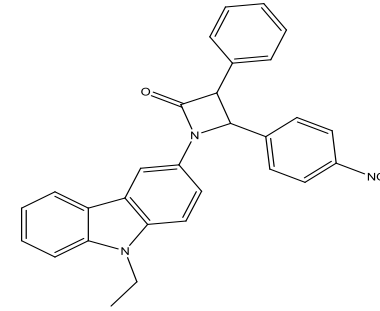
Şekil 3.14: **3f** maddesinin açık yapısı.

Tablo 3.7: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren **3f**'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.

100 mM Tris tamponu (µL)	Madde	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Madde Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Küvetteki Madde Derişimi (mM)	A (412 nm)	Aktivite (EU/mL dak)	% Aktivite
900	3f	50	50	-	0	0,034	37,77	100
890				10	$1 \cdot 10^{-05}$	0,043	50,29	133,15
880				20	$2 \cdot 10^{-05}$	0,0475	55,55	147,07
870				30	$3 \cdot 10^{-05}$	0,057	66,67	176,51
860				40	$4 \cdot 10^{-05}$	0,069	80,70	213,66
850				50	$5 \cdot 10^{-05}$	0,077	90,06	238,44



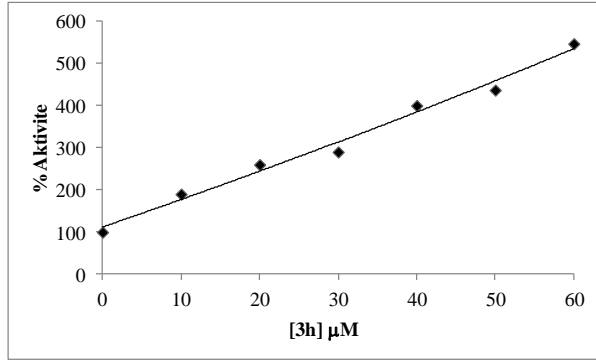
Şekil 3.15: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1mM paraokson substratı derişiminde **3g** için % aktivite-[I] grafiği.



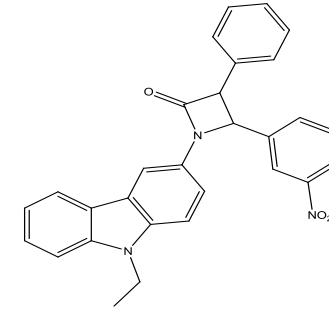
Şekil 3.16: **3g** maddesinin açık yapısı.

Tablo 3.8: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren **3g**'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.

100 mM Tris tamponu (µL)	Madde	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Madde Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Küvetteki Madde Derişimi (mM)	A (412 nm)	Aktivite (EU/mL dak)	% Aktivite
950	3g	50	50	-	0	0,069	84,74	100
930				20	$1,91 \cdot 10^{-05}$	0,087	106,842	126,087
920				30	$2,86 \cdot 10^{-05}$	0,093	114,210	134,783
890				60	$5,72 \cdot 10^{-05}$	0,108	132,631	156,522
860				90	$8,56 \cdot 10^{-05}$	0,133	163,333	192,753
850				100	$9,52 \cdot 10^{-05}$	0,145	178,070	210,145



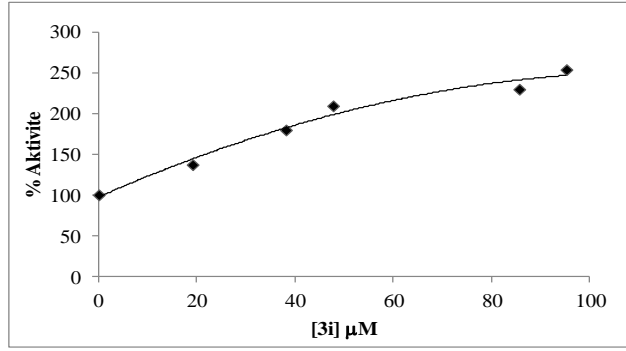
Şekil 3.17: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson derişiminde **3h** için % aktivite-[I] grafiği.



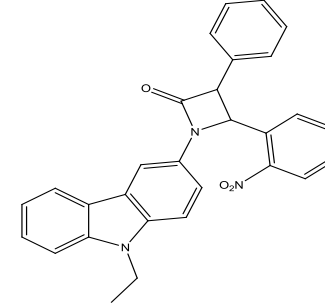
Şekil 3.18: **3h** maddesinin açık yapısı.

Tablo 3.9: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren **3h**'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.

100 mM Tris tamponu (µL)	Madde	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Madde Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Küvetteki Madde Derişimi (mM)	A (412 nm)	Aktivite (EU/mL dak)	% Aktivite
900	3h	50	50	-		0,030	35,04	100
890				10	1.10^{-05}	0,057	66,67	190,27
880				20	2.10^{-05}	0,078	91,23	260,36
870				30	3.10^{-05}	0,087	101,75	290,38
860				40	4.10^{-05}	0,120	140,35	400,54
850				50	5.10^{-05}	0,131	153,22	437,27



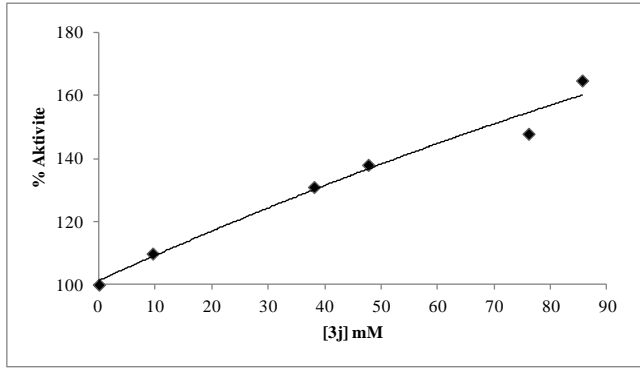
Şekil 3.19: Sıfırlanmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substrat derişiminde **3i** için % aktivite-[I] grafiği.



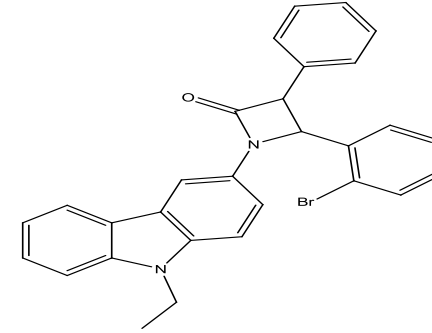
Şekil 3.20: **3i** maddesinin açık yapısı.

Tablo 3.10: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren **3i**'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.

100 mM Tris tamponu (µL)	Madde	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Madde Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Küvetteki Madde Derişimi (mM)	A (412 nm)	Aktivite (EU/mL dak)	% Aktivite
950	3i	50	50	-	0	0,054	66,316	100
930				20	$1,91 \cdot 10^{-05}$	0,074	90,877	137,037
910				40	$3,81 \cdot 10^{-05}$	0,097	119,122	179,629
900				50	$4,77 \cdot 10^{-05}$	0,113	138,771	209,259
860				90	$8,56 \cdot 10^{-05}$	0,124	152,280	229,629
850				100	$9,52 \cdot 10^{-05}$	0,137	168,245	253,704



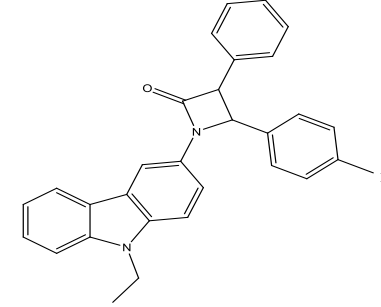
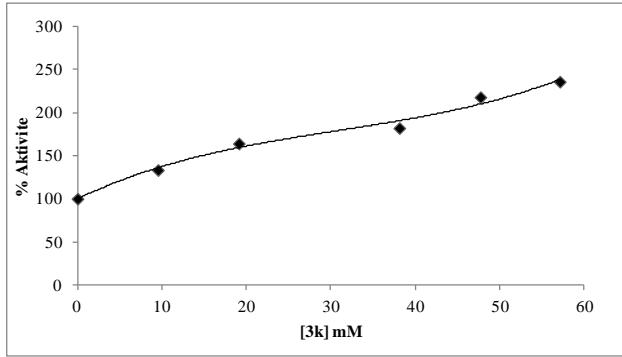
Şekil 3.21: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı derişiminde **3j** için % aktivite-[I] grafiği.



Şekil 3.22: **3j** maddesinin açık yapısı.

Tablo 3.11: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren **3j**'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.

100 mM Tris tamponu (µL)	Madde	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Madde Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Küvetteki Madde Derişimi (mM)	A (412 nm)	Aktivite (EU/mL dak)	% Aktivite
950	3j	50	50	-	0	0,071	87,193	100
940				10	$9,52 \cdot 10^{-06}$	0,078	95,789	109,86
910				40	$3,81 \cdot 10^{-05}$	0,093	114,210	130,99
900				50	$4,77 \cdot 10^{-05}$	0,098	120,350	138,03
870				80	$7,61 \cdot 10^{-05}$	0,105	128,947	147,88
860				90	$8,56 \cdot 10^{-05}$	0,117	143,684	164,79

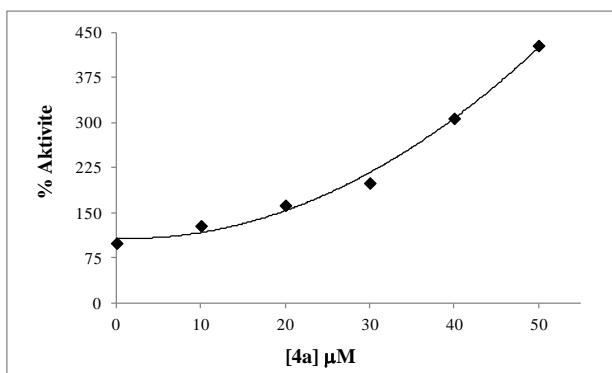


Şekil 3.24: 3k maddesinin açık yapısı.

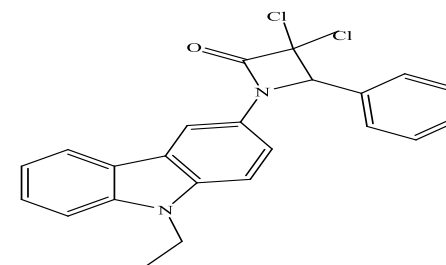
Şekil 3.23: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı derişiminde 3k için % aktivite-[I] grafiği.

Tablo 3.12: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren 3k 'nın % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.

100 mM Tris tamponu (µL)	Madde	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Madde Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Küvetteki Madde Derişimi (mM)	A (412 nm)	Aktivite (EU/mL dak)	% Aktivite
850	3k	100	100	-	0	0,039	47,895	100
840				10	$9,52 \cdot 10^{-06}$	0,052	63,859	133,333
830				20	$1,91 \cdot 10^{-05}$	0,064	78,596	164,103
810				40	$3,81 \cdot 10^{-05}$	0,071	87,193	182,051
800				50	$4,77 \cdot 10^{-05}$	0,085	104,386	217,949
790				60	$5,71 \cdot 10^{-05}$	0,092	112,982	235,897



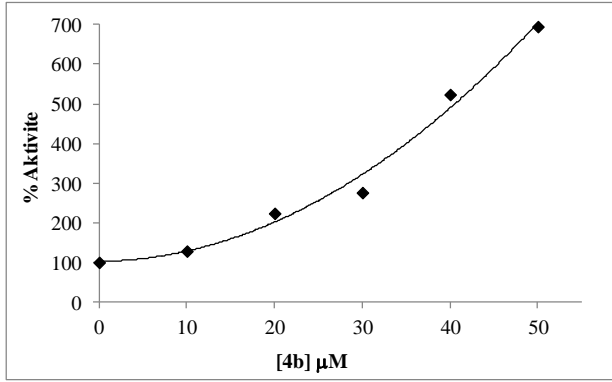
Şekil 3.25: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1mM paraokson substratı derişiminde **4a** için % aktivite-[I] grafiği.



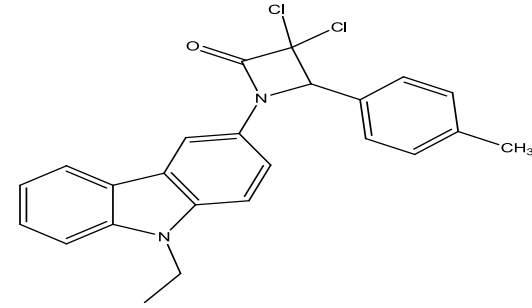
Şekil 3.26: **4a** maddesinin açık yapısı.

Tablo 3.13: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren **4a**'nın % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.

100 mM Tris tamponu (μL)	Madde	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Madde Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Küvetteki Madde Derişimi (mM)	A (412 nm)	Aktivite (EU/mL dak)	% Aktivite
900	4a	50	50	-	0	0,021	24,56	100
890				10	$1 \cdot 10^{-05}$	0,026	30,41	123,82
880				20	$2 \cdot 10^{-05}$	0,034	39,77	162,93
870				30	$3 \cdot 10^{-05}$	0,042	49,12	200
860				40	$4 \cdot 10^{-05}$	0,068	75,53	307,53
850				50	$5 \cdot 10^{-05}$	0,090	105,26	428,58



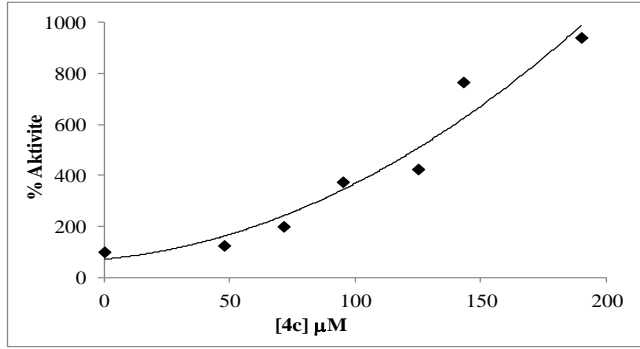
Şekil 3.27: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı derişiminde **4b** için % aktivite-[I] grafiği.



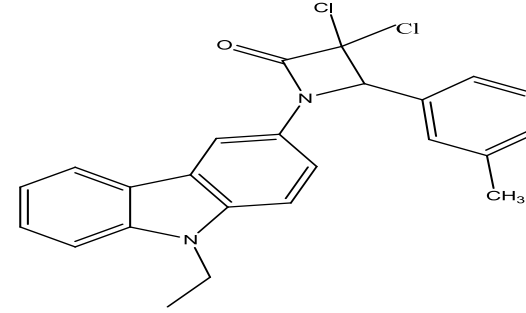
Şekil 3.28: **4b** maddesinin açık yapısı.

Tablo 3.14: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren **4b**'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.

100 mM Tris tamponu (μL)	Madde	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Madde Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Küvetteki Madde Derişimi (mM)	A (412 nm)	Aktivite (EU/mL dak)	% Aktivite
900	4b	50	50	-	0	0,021	24,56	100
890				10	$1 \cdot 10^{-05}$	0,027	31,58	128,58
880				20	$2 \cdot 10^{-05}$	0,047	54,97	223,82
870				30	$3 \cdot 10^{-05}$	0,058	67,84	276,22
860				40	$4 \cdot 10^{-05}$	0,110	128,65	523,82
850				50	$5 \cdot 10^{-05}$	0,146	170,76	695,28



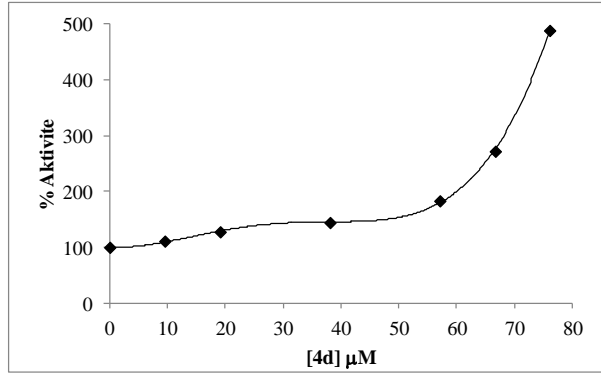
Şekil 3.29: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1mM paraokson substratı derişiminde **4c** için % aktivite-[I] grafiği.



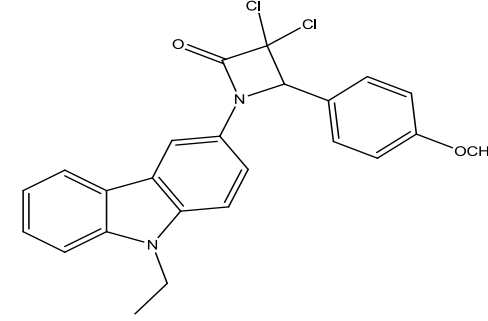
Şekil 3.30: **4c** maddesinin açık yapısı.

Tablo 3.15: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren **4c**'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.

100 mM Tris tamponu (µL)	Madde	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Madde Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Küvetteki Madde Derişimi (mM)	A (412 nm)	Aktivite (EU/mL dak)	% Aktivite
950	4c	50	50	-	0	0,012	14,74	100
900				50	$4,77 \cdot 10^{-05}$	0,015	18,42	125
875				75	$7,14 \cdot 10^{-05}$	0,024	29,47	200
850				100	$9,5 \cdot 10^{-05}$	0,045	55,26	375
825				125	$12,5 \cdot 10^{-05}$	0,051	62,63	425
800				150	$1,43 \cdot 10^{-04}$	0,092	112,98	766,67
750				200	$1,9 \cdot 10^{-04}$	0,113	138,77	941,67



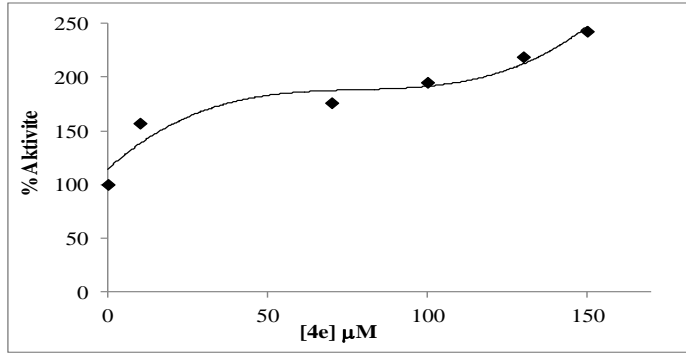
Şekil 3.31: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı derişiminde **4d** için % aktivite-[I] grafiği.



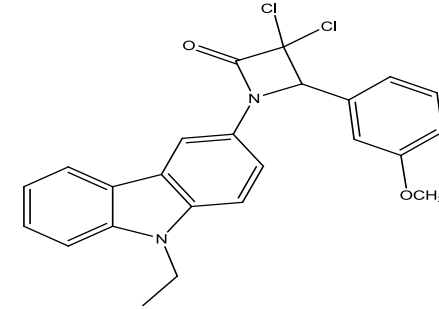
Şekil 3.32: **4d** maddesinin açık yapısı.

Tablo 3.16: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren **4d**'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.

100 mM Tris tamponu (μL)	Madde	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Madde Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Küvetteki Madde Derişimi (mM)	A (412 nm)	Aktivite (EU/mL dak)	% Aktivite
950	4d	50	50	-	0	0,018	22,11	100
940				10	$9,52 \cdot 10^{-06}$	0,020	24,56	111,11
930				20	$1,91 \cdot 10^{-05}$	0,023	28,24	127,78
910				40	$3,81 \cdot 10^{-05}$	0,026	31,93	144,44
890				60	$5,71 \cdot 10^{-05}$	0,033	40,53	183,33
880				70	$6,67 \cdot 10^{-05}$	0,049	60,17	272,22
870				80	$7,61 \cdot 10^{-05}$	0,088	108,07	488,89



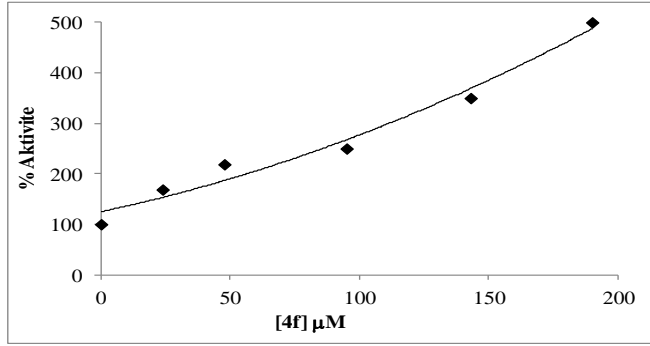
Şekil 3.33: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1mM paraokson substratı derişiminde **4e** için % aktivite-[I] grafiği.



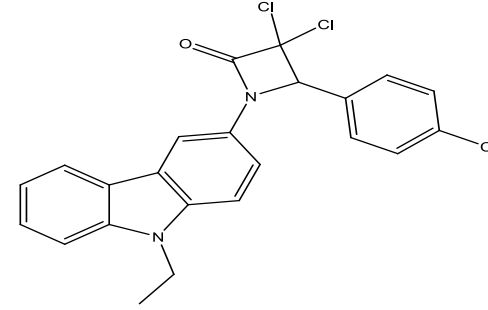
Şekil 3.34: **4e** maddesinin açık yapısı.

Tablo 3.17: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren **4e**'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.

100 mM Tris tamponu (μL)	Madde	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Madde Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Küvetteki Madde Derişimi (mM)	A (412 nm)	Aktivite (EU/mL dak)	% Aktivite
900	4e	50	50	-	0	0,021	25,79	100
890				10	1.10^{-05}	0,033	40,53	157,14
830				70	7.10^{-05}	0,037	45,44	176,19
800				100	1.10^{-04}	0,041	50,35	195,24
770				130	$1,3.10^{-04}$	0,046	56,49	219,05
750				150	$1,5.10^{-04}$	0,051	62,63	242,86



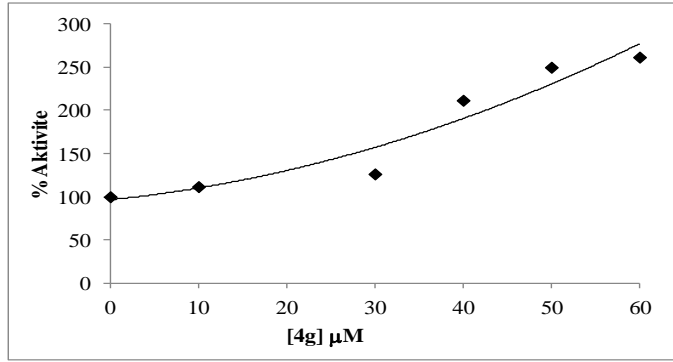
Şekil 3.35: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı derişiminde **4f** için % aktivite-[I] grafiği.



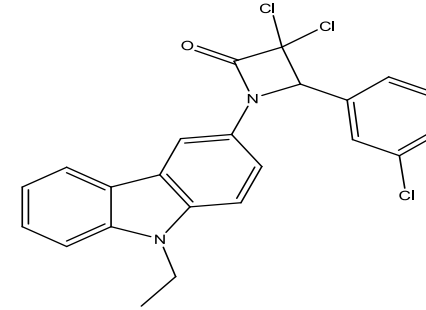
Şekil 3.36: **4f** maddesinin açık yapısı.

Tablo 3.18: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren **4f**'nin % aktivite değeri bulmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.

100 mM Tris tamponu (µL)	Madde	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Madde Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Küvetteki Madde Derişimi (mM)	A (412 nm)	Aktivite (EU/mL dak)	% Aktivite
950	4f	50	50	-	0	0,016	19,65	100
925				25	$2,38 \cdot 10^{-05}$	0,027	33,16	168,75
900				50	$4,77 \cdot 10^{-05}$	0,035	42,98	218,75
850				100	$9,5 \cdot 10^{-05}$	0,040	49,12	250
800				150	$1,43 \cdot 10^{-04}$	0,056	68,77	350
750				200	$1,9 \cdot 10^{-04}$	0,080	98,24	500



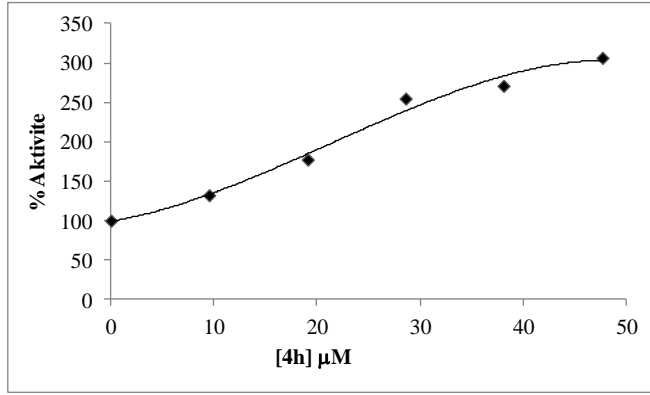
Şekil 3.37: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1mM paraokson substratı derişiminde 4g için % aktivite-[I] grafiği.



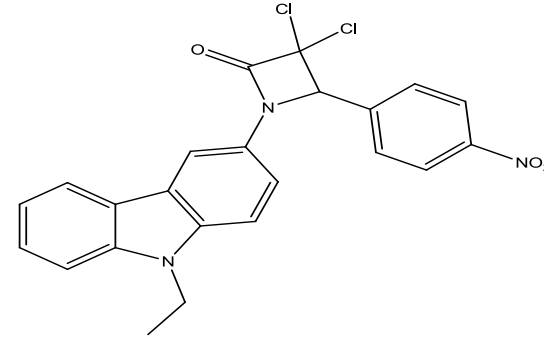
Şekil 3.38: 4g maddesinin açık yapısı.

Tablo 3.19: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren 4g'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.

100 mM Tris tamponu (µL)	Madde	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Madde Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Küvetteki Madde Derişimi (mM)	A (412 nm)	Aktivite (EU/mL dak)	% Aktivite
900	4g	50	50	-	0	0,034	39,77	100
890				10	$1 \cdot 10^{-05}$	0,038	44,44	111,74
880				30	$3 \cdot 10^{-05}$	0,043	50,29	126,45
870				40	$4 \cdot 10^{-05}$	0,072	84,21	211,74
860				50	$5 \cdot 10^{-05}$	0,085	99,42	249,99
850				60	$6 \cdot 10^{-05}$	0,089	104,09	261,73



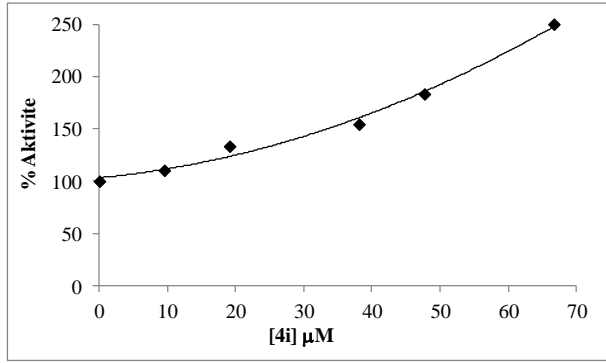
Şekil 3.39: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1mM paraokson substratı derişiminde 4h için % aktivite-[I] grafiği.



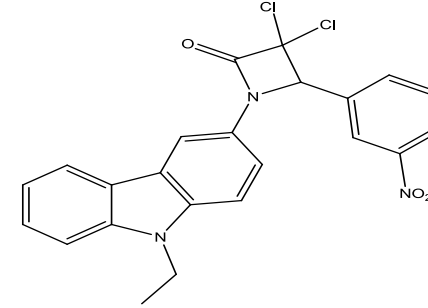
Şekil 3.40: 4h maddesinin açık yapısı.

Tablo 3.20: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren 4h'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.

100 mM Tris tamponu (µL)	Madde	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Madde Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Küvetteki Madde Derişimi (mM)	A (412 nm)	Aktivite (EU/mL dak)	% Aktivite
950	4h	50	50	-	0	0,031	38,0701	100
940				10	$9,52 \cdot 10^{-06}$	0,041	50,3508	132,2581
930				20	$1,91 \cdot 10^{-05}$	0,055	67,5438	177,4194
920				30	$2,86 \cdot 10^{-05}$	0,076	97,0175	254,8387
910				40	$3,81 \cdot 10^{-05}$	0,084	103,157	270,9677
900				50	$4,77 \cdot 10^{-05}$	0,095	116,666	306,4516



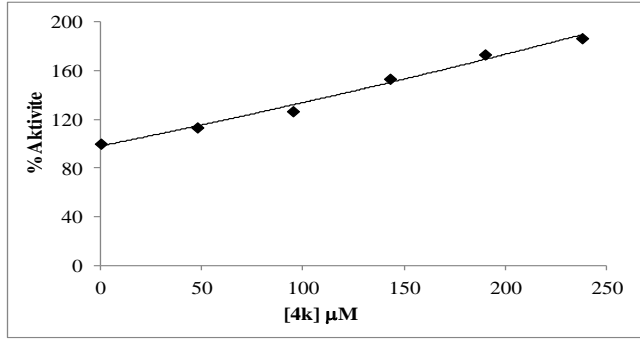
Şekil 3.41: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1mM paraokson substratı derişiminde **4i** için % aktivite-[I] grafiği



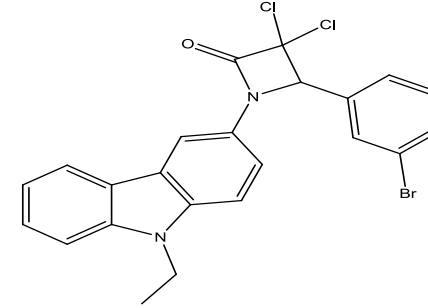
Şekil 3.42: **4i** maddesinin açık yapısı.

Tablo 3.21: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren **4i**'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.

100 mM Tris tamponu (μL)	Madde	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Madde Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Küvetteki Madde Derişimi (mM)	A (412 nm)	Aktivite (EU/mL dak)	% Aktivite
950	4i	50	50	-	0	0,048	58,947	100
940				10	$9,52 \cdot 10^{-06}$	0,067	81,947	110,417
930				20	$1,91 \cdot 10^{-05}$	0,075	92,105	133,417
910				40	$3,81 \cdot 10^{-05}$	0,077	94,561	154,417
900				50	$4,77 \cdot 10^{-05}$	0,109	133,859	183,333
880				70	$6,67 \cdot 10^{-05}$	0,134	164,561	250



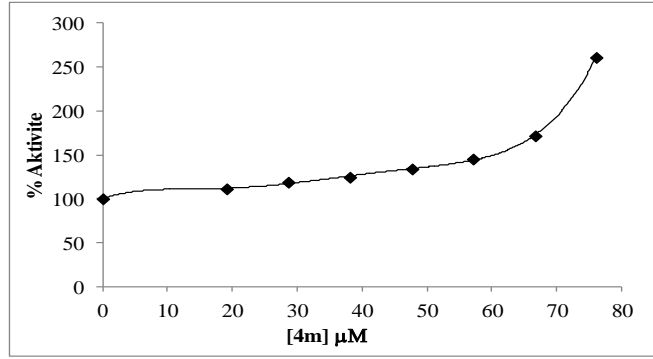
Şekil 3.43: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1mM paraokson substratı derişiminde **4k** için % aktivite-[I] grafiği.



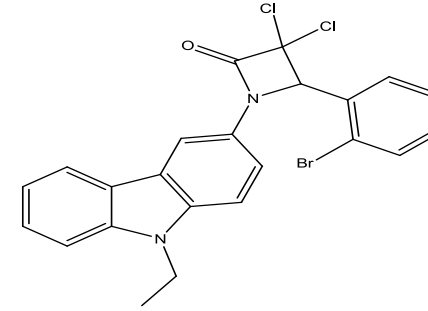
Şekil 3.44: **4k** maddesinin açık yapısı.

Tablo 3.22: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren **4k**'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.

100 mM Tris tamponu (μL)	Madde	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Madde Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Küvetteki Madde Derişimi (mM)	A (412 nm)	Aktivite (EU/mL dak)	% Aktivite
950	4k	50	50	-	0	0,015	18,421	100
900				50	$4,77 \cdot 10^{-05}$	0,017	20,877	113,333
850				100	$9,5 \cdot 10^{-05}$	0,019	23,333	126,666
800				150	$1,43 \cdot 10^{-04}$	0,023	28,245	153,333
750				200	$1,9 \cdot 10^{-04}$	0,026	31,929	173,333
700				250	$2,38 \cdot 10^{-04}$	0,028	34,385	186,666



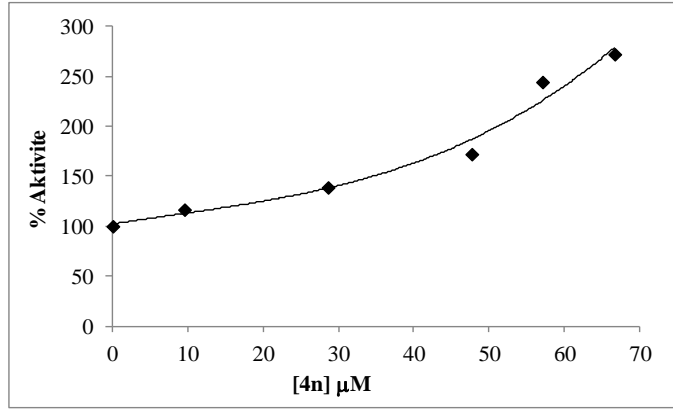
Şekil 3.45: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı derişiminde **4m** için % aktivite-[I] grafiği.



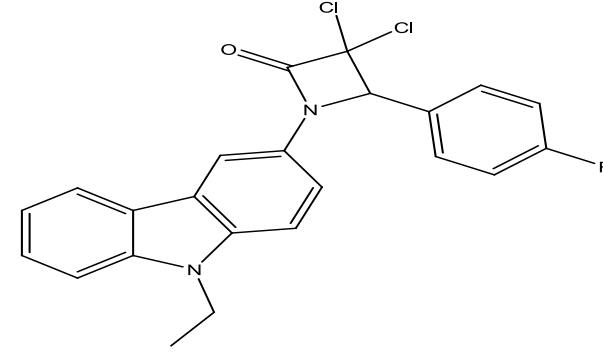
Şekil 3.46: **4m** maddesinin açık yapısı.

Tablo 3.23: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren **4m**'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.

100 mM Tris tamponu (μL)	Madde	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Madde Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Küvetteki Madde Derişimi (mM)	A (412 nm)	Aktivite (EU/mL dak)	% Aktivite
950	4m	50	50	-	0	0,053	65,088	100
930				20	$1,91 \cdot 10^{-05}$	0,059	72,456	111,321
920				30	$2,86 \cdot 10^{-05}$	0,063	77,368	118,868
910				40	$3,81 \cdot 10^{-05}$	0,066	81,052	124,528
900				50	$4,77 \cdot 10^{-05}$	0,071	87,193	133,962
890				60	$5,71 \cdot 10^{-05}$	0,077	94,561	145,283
880				70	$6,67 \cdot 10^{-05}$	0,091	111,754	171,697



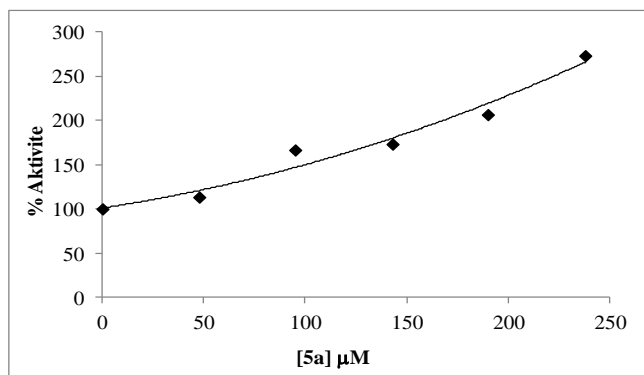
Şekil 3.47: Saflaştırılmış insan serumu PON1 enzimi üzerine 1mM paraokson substratı derişiminde **4n** için % aktivite-[I] grafiği.



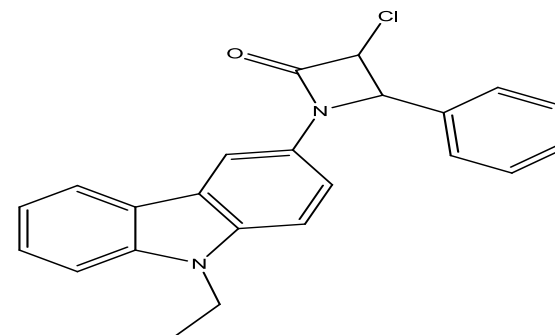
Şekil 3.48: **4n** maddesinin açık yapısı.

Tablo 3.24: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren **4n**'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.

100 mM Tris tamponu (μL)	Madde	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Madde Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Küvetteki Madde Derişimi (mM)	A (412 nm)	Aktivite (EU/mL dak)	% Aktivite
950	4n	50	50	-	0	0,018	22,105	100
940				10	$9,52 \cdot 10^{-06}$	0,021	25,789	116,67
920				30	$2,86 \cdot 10^{-05}$	0,025	30,702	138,89
800				50	$4,77 \cdot 10^{-05}$	0,031	38,070	172,22
790				60	$5,71 \cdot 10^{-05}$	0,044	54,035	244,44
780				70	$6,67 \cdot 10^{-05}$	0,049	60,175	272,22



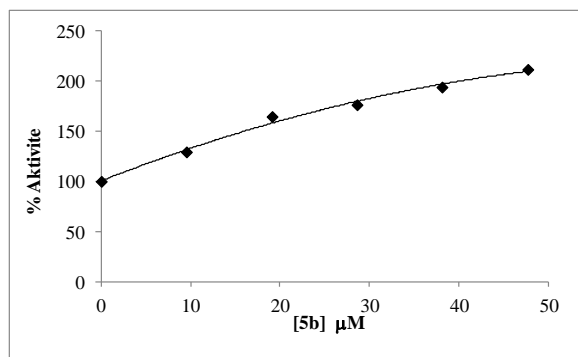
Şekil 3.49: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1mM paraokson substratı derişiminde **5a** için % aktivite-[I] grafiği.



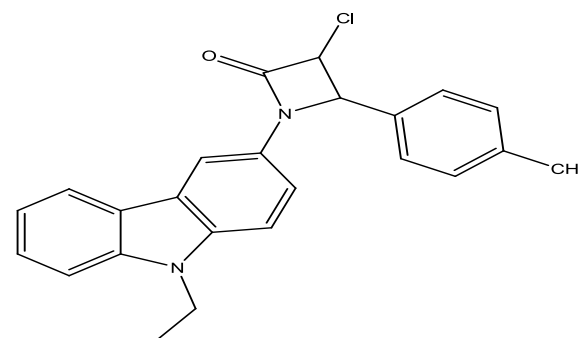
Şekil 3.50: **5a** maddesinin açık yapısı.

Tablo 3.25: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren **5a**'nın % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.

100 mM Tris tamponu (µL)	Madde	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Madde Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Küvetteki Madde Derişimi (mM)	A (412 nm)	Aktivite (EU/mL dak)	% Aktivite
950	5a	50	50	-	0	0,015	18,421	100
900				50	$4,77 \cdot 10^{-05}$	0,017	20,877	113,333
850				100	$9,5 \cdot 10^{-05}$	0,025	30,702	166,667
800				150	$1,43 \cdot 10^{-04}$	0,026	31,929	173,333
750				200	$1,9 \cdot 10^{-04}$	0,031	38,070	206,667
700				250	$2,38 \cdot 10^{-04}$	0,041	50,351	273,333



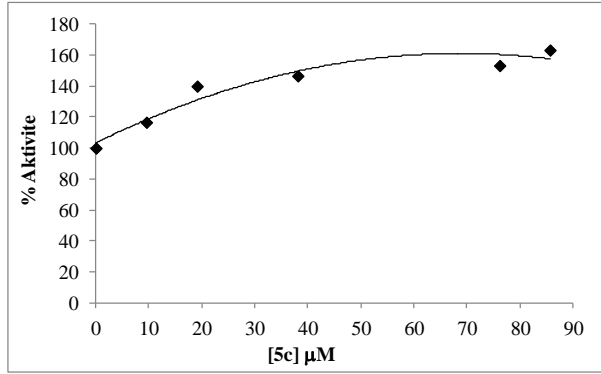
Şekil 3.51: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1mM paraokson substratı derişiminde **5b** için % aktivite-[I] grafiği.



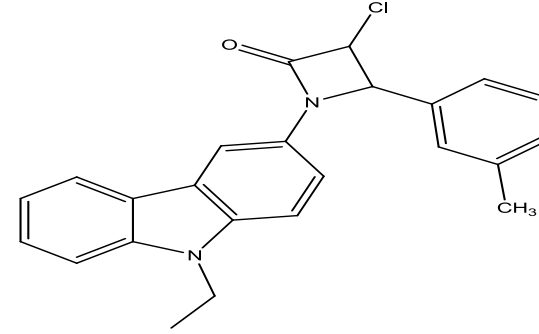
Şekil 3.52: **5b** maddesinin açık yapısı.

Tablo 3.26: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren **5b**'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.

100 mM Tris tamponu (μL)	Madde	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Madde Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Küvetteki Madde Derişimi (mM)	A (412 nm)	Aktivite (EU/mL dak)	% Aktivite
950	5b	50	50	-	0	0,017	20,88	100
940				10	$9,52 \cdot 10^{-06}$	0,022	27,02	129,41
930				20	$1,91 \cdot 10^{-05}$	0,028	34,39	164,71
920				30	$2,86 \cdot 10^{-05}$	0,030	36,84	176,47
910				40	$3,81 \cdot 10^{-05}$	0,033	40,53	194,12
900				50	$4,77 \cdot 10^{-05}$	0,036	44,21	211,76



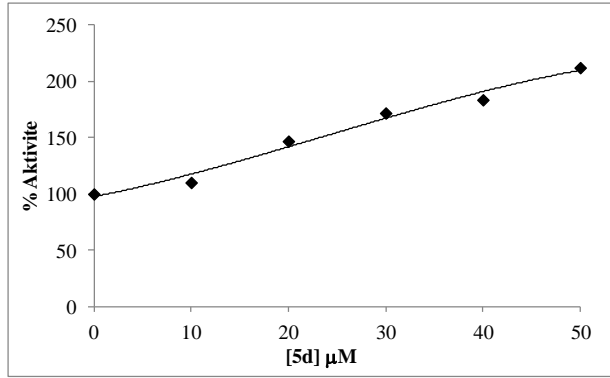
Şekil 3.53: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı derişiminde **5c** için % aktivite-[I] grafiği.



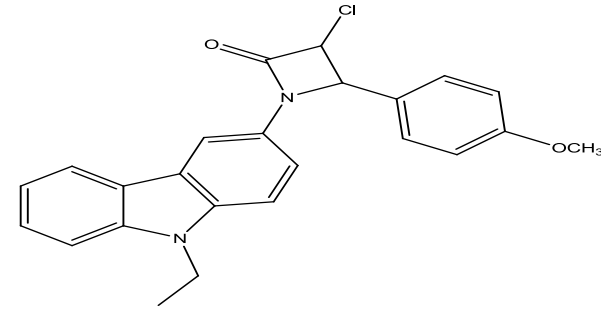
Şekil 3.54: **5c** maddesinin açık yapısı.

Tablo 3.27: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren **5c**'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.

100 mM Tris tamponu (μL)	Madde	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Madde Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Küvetteki Madde Derişimi (mM)	A (412 nm)	Aktivite (EU/mL dak)	% Aktivite
950	5c	50	50	-	0	0,060	73,722	100
940				10	$9,52 \cdot 10^{-06}$	0,070	86,009	116,66
930				20	$1,91 \cdot 10^{-05}$	0,084	103,210	140
910				40	$3,81 \cdot 10^{-05}$	0,088	108,125	146,66
870				80	$7,62 \cdot 10^{-05}$	0,092	113,040	153,333
860				90	$8,57 \cdot 10^{-05}$	0,098	120,412	163,333



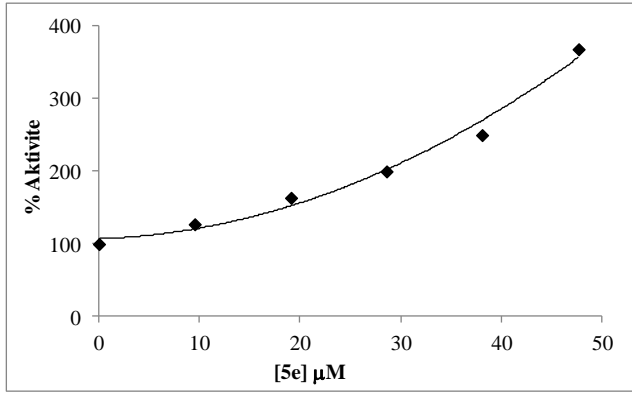
Şekil 3.55: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1mM paraokson substratı derişiminde **5d** için % aktivite-[I] grafiği.



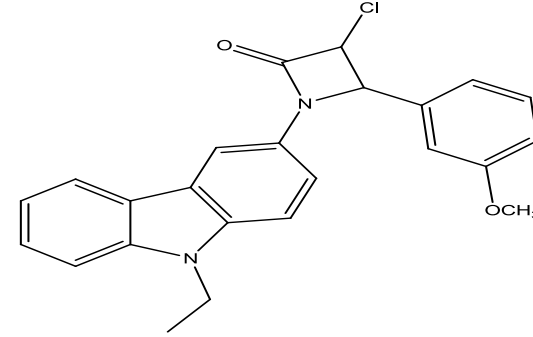
Şekil 3.56: **5d** maddesinin açık yapısı.

Tablo 3.28: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren **5d**'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.

100 mM Tris tamponu (μL)	Madde	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Madde Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Küvetteki Madde Derişimi (mM)	A (412 nm)	Aktivite (EU/mL dak)	% Aktivite
900	5d	50	50	-	0	0,049	57,31	100
890				10	$1 \cdot 10^{-05}$	0,054	63,16	110,21
880				20	$2 \cdot 10^{-05}$	0,072	84,21	146,94
870				30	$3 \cdot 10^{-05}$	0,084	98,25	171,44
860				40	$4 \cdot 10^{-05}$	0,090	105,26	183,67
850				50	$5 \cdot 10^{-05}$	0,104	121,64	212,25



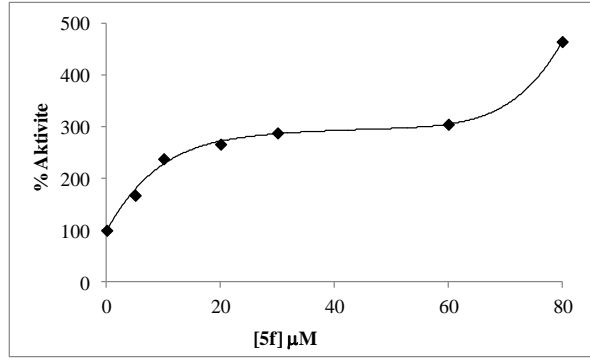
Şekil 3.57: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı derişiminde **5e** için % aktivite-[I] grafiği.



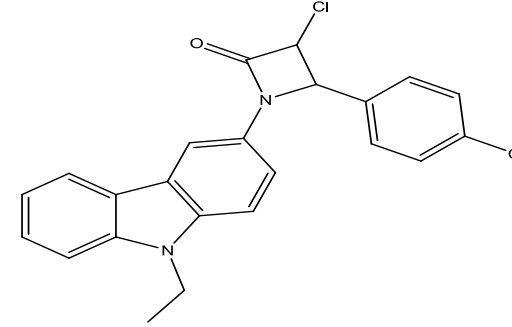
Şekil 3.58: **5e** maddesinin açık yapısı.

Tablo 3.29: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren **5e**'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.

100 mM Tris tamponu (μL)	Madde	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Madde Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Küvetteki Madde Derişimi (mM)	A (412 nm)	Aktivite (EU/mL dak)	% Aktivite
950	5e	50	50	-	0	0,022	27,018	100
940				10	$9,52 \cdot 10^{-06}$	0,028	34,386	127,277
930				20	$1,91 \cdot 10^{-05}$	0,036	44,211	163,636
920				30	$2,86 \cdot 10^{-05}$	0,044	54,035	200
910				40	$3,81 \cdot 10^{-05}$	0,055	67,544	250
900				50	$4,77 \cdot 10^{-05}$	0,081	99,474	368,182



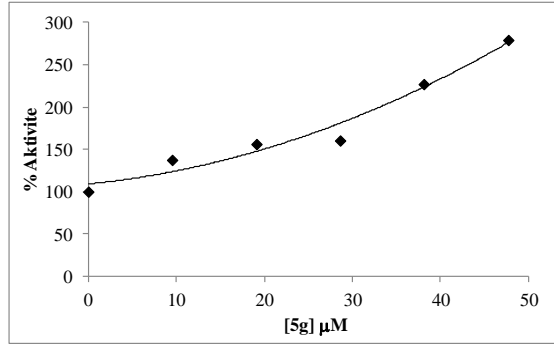
Şekil 3.59: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı derişiminde **5f** için % aktivite-[I] grafiği.



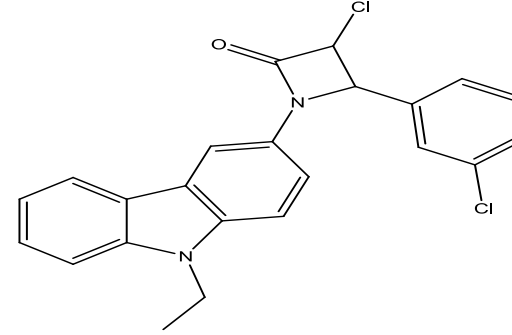
Şekil 3.60: **5f** maddesinin açık yapısı.

Tablo 3.30: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren **5f**'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.

100 mM Tris tamponu (μL)	Madde	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Madde Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Küvetteki Madde Derişimi (mM)	A (412 nm)	Aktivite (EU/mL dak)	% Aktivite
900	5f	50	50	-	0	0,034	39,77	100
895				5	$5 \cdot 10^{-06}$	0,057	66,67	167,64
890				10	$1 \cdot 10^{-05}$	0,081	94,74	238,22
880				20	$2 \cdot 10^{-05}$	0,089	104,09	266,42
870				30	$3 \cdot 10^{-05}$	0,098	114,62	288,21
860				60	$6 \cdot 10^{-05}$	0,104	121,64	304,86
850				80	$8 \cdot 10^{-05}$	0,158	184,80	464,67



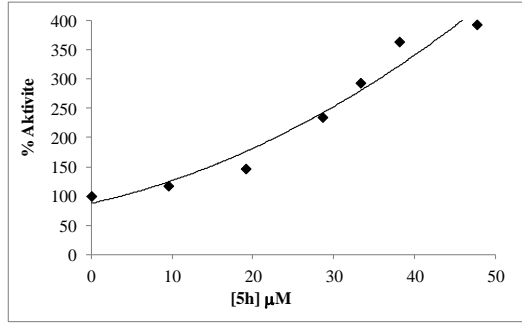
Şekil 3.61: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı derişiminde 5g için % aktivite-[I] grafiği.



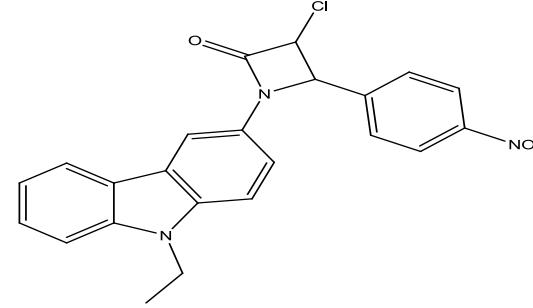
Şekil 3.62: 5g maddesinin açık yapısı.

Tablo 3.31: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren 5g'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.

100 mM Tris tamponu (µL)	Madde	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Madde Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Küvetteki Madde Derişimi (mM)	A (412 nm)	Aktivite (EU/mL dak)	% Aktivite
950	5g	50	50	-	0	0,048	58,947	100
940				10	$9,52 \cdot 10^{-06}$	0,066	81,053	137,50
930				20	$1,91 \cdot 10^{-05}$	0,075	92,105	156,25
920				30	$2,86 \cdot 10^{-05}$	0,077	94,561	160,417
910				40	$3,81 \cdot 10^{-05}$	0,109	133,859	227,083
900				50	$4,77 \cdot 10^{-05}$	0,134	164,561	279,167



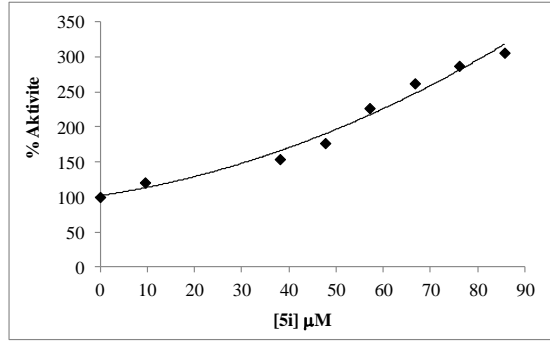
Şekil 3.63: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1mM paraokson substratı derişiminde **5h** için % aktivite-[I] grafiği.



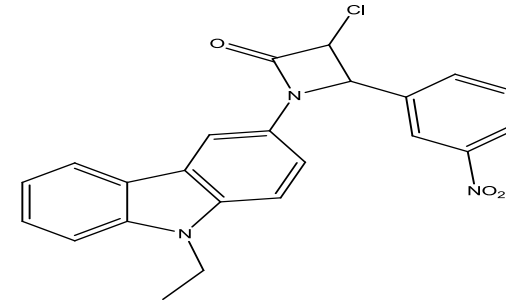
Şekil 3.64: **5h** maddesinin açık yapısı.

Tablo 3.32: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren **5h**'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.

100 mM Tris tamponu (µL)	Madde	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Madde Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Küvetteki Madde Derişimi (mM)	A (412 nm)	Aktivite (EU/mL dak)	% Aktivite
950	5h	50	50	-	0	0,017	20,878	100
940				10	$9,52 \cdot 10^{-06}$	0,020	24,561	117,647
930				20	$1,91 \cdot 10^{-05}$	0,025	30,702	147,059
920				30	$2,86 \cdot 10^{-05}$	0,040	49,123	235,294
915				35	$3,33 \cdot 10^{-05}$	0,050	61,403	294,117
910				40	$3,81 \cdot 10^{-05}$	0,062	76,140	364,706
900				50	$4,77 \cdot 10^{-05}$	0,067	82,281	394,118



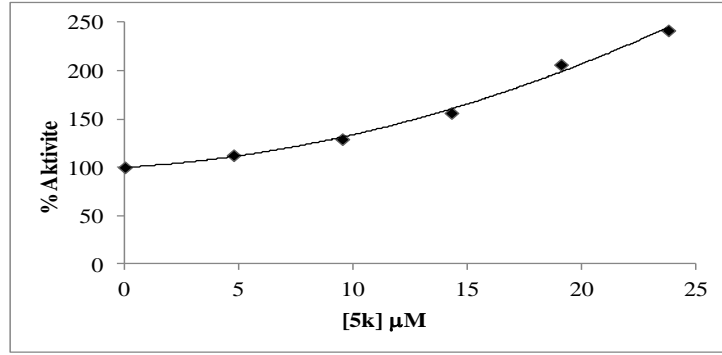
Şekil 3.65: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı derişiminde **5i** için % aktivite-[I] grafiği.



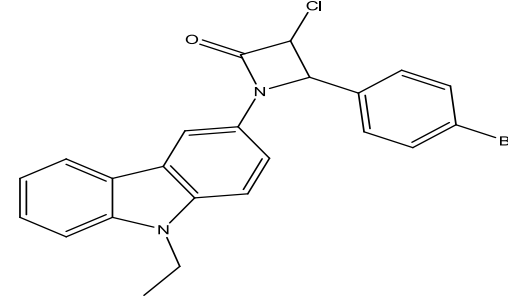
Şekil 3.66: **5i** maddesinin açık yapısı.

Tablo 3.33: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren **5i**'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.

100 mM Tris tamponu (μL)	Madde	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Madde Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Küvetteki Madde Derişimi (mM)	A (412 nm)	Aktivite (EU/mL dak)	% Aktivite
950	5i	50	50	-	0	0,048	58,947	100
940				10	$9,52 \cdot 10^{-06}$	0,058	71,228	120,833
910				40	$3,81 \cdot 10^{-05}$	0,074	90,877	154,167
900				50	$4,77 \cdot 10^{-05}$	0,085	104,386	177,083
890				60	$5,71 \cdot 10^{-05}$	0,109	133,859	227,083
880				70	$6,67 \cdot 10^{-05}$	0,126	154,736	262,5
870				80	$7,61 \cdot 10^{-05}$	0,138	169,473	287,5



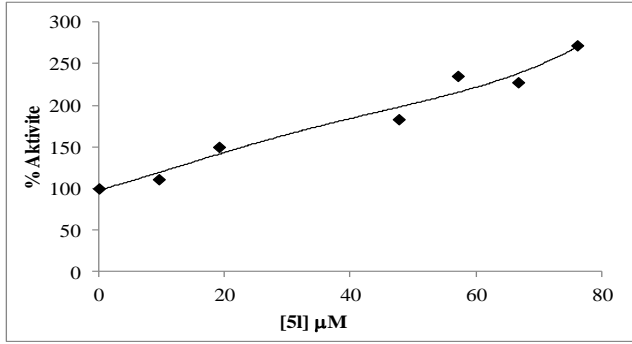
Şekil 3.67: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1mM paraokson substratı derişiminde **5k** için % aktivite-[I] grafiği.



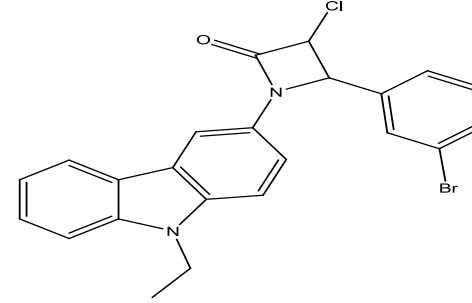
Şekil 3.68: **5k** maddesinin açık yapısı.

Tablo 3.34: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren **5k**'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.

100 mM Tris tamponu (μL)	Madde	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Madde Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Küvetteki Madde Derişimi (mM)	A (412 nm)	Aktivite (EU/mL dak)	% Aktivite
950	5k	50	50	-	0	0,048	58,947	100
945				5	$4,76 \cdot 10^{-06}$	0,054	66,316	112,5
940				10	$9,52 \cdot 10^{-06}$	0,062	76,140	129,166
935				15	$1,431 \cdot 10^{-05}$	0,075	92,105	156,25
930				20	$1,91 \cdot 10^{-05}$	0,099	121,579	206,25
925				25	$2,385 \cdot 10^{-05}$	0,116	142,456	241,666



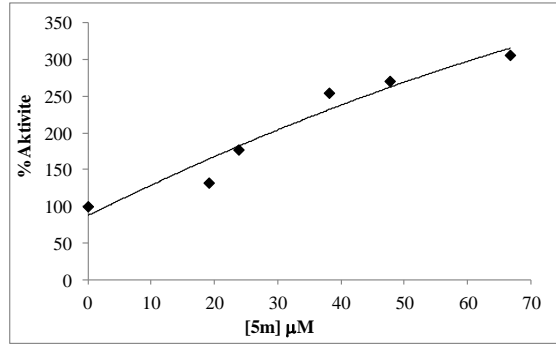
Şekil 3.69: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı derişiminde **5I** için % aktivite-[I] grafiği.



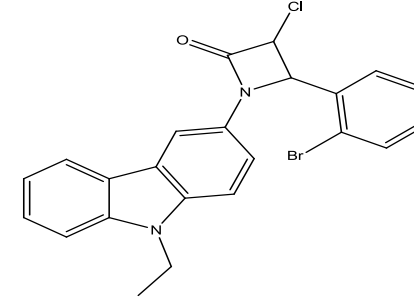
Şekil 3.70: **5I** maddesinin açık yapısı.

Tablo 3.35: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren **5I**'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.

100 mM Tris tamponu (µL)	Madde	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Madde Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Küvetteki Madde Derişimi (mM)	A (412 nm)	Aktivite (EU/mL dak)	% Aktivite
950	5I	50	50	-	0	0,036	44,210	100
940				10	$9,52 \cdot 10^{-06}$	0,040	49,123	111,111
930				20	$1,91 \cdot 10^{-05}$	0,054	66,316	150
900				50	$4,77 \cdot 10^{-05}$	0,066	81,052	183,333
890				60	$5,71 \cdot 10^{-05}$	0,08475	104,079	235,417
880				70	$6,67 \cdot 10^{-05}$	0,082	100,702	227,778
870				80	$7,61 \cdot 10^{-05}$	0,098	120,351	272,222



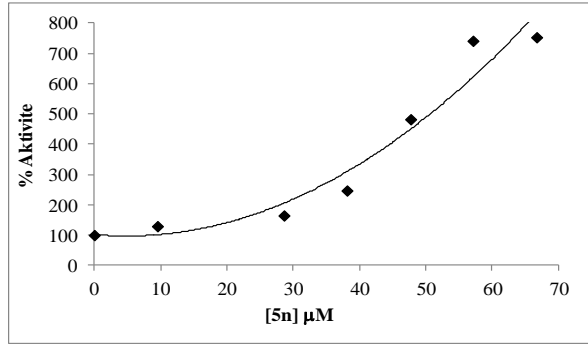
Şekil 3.71: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı derişiminde **5m** için % aktivite-[I] grafiği.



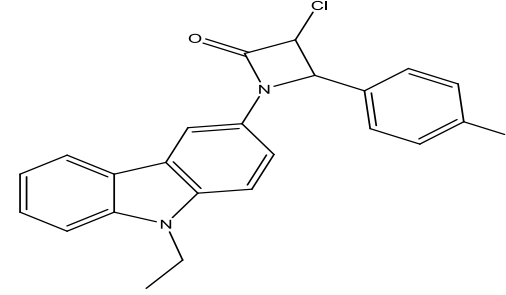
Şekil 3.72: **5m** maddesinin açık yapısı.

Tablo 3.36: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren **5m**'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.

100 mM Tris tamponu (µL)	Madde	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Madde Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Küvetteki Madde Derişimi (mM)	A (412 nm)	Aktivite (EU/mL dak)	% Aktivite
950	5m	50	50	-	0	0,035	38,070	100
940				20	$1,91 \cdot 10^{-05}$	0,041	50,351	132,258
930				25	$2,385 \cdot 10^{-05}$	0,055	67,544	177,419
920				40	$3,81 \cdot 10^{-05}$	0,076	97,017	254,839
910				50	$4,77 \cdot 10^{-05}$	0,084	103,157	270,968
900				60	$6,67 \cdot 10^{-05}$	0,095	116,666	306,452



Şekil 3.73: Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1mM paraokson substratı derişiminde **5n** için % aktivite-[I] grafiği.



Şekil 3.74: **5n** maddesinin açık yapısı.

Tablo 3.37: Serum PON1 enzimi üzerinde aktivasyon etkisi gösteren **5n**'nin % aktivite değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, madde derişimleri ve elde edilen sonuçlar.

100 mM Tris tamponu (µL)	Madde	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Madde Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Küvetteki Madde Derişimi (mM)	A (412 nm)	Aktivite (EU/mL dak)	% Aktivite
950	5n	50	50	-	0	0,017	20,877	100
940				10	$9,52 \cdot 10^{-06}$	0,022	27,017	129,41
920				30	$2,86 \cdot 10^{-05}$	0,028	34,386	164,7
910				40	$3,81 \cdot 10^{-05}$	0,042	51,579	247,06
900				50	$4,77 \cdot 10^{-05}$	0,082	100,702	482,35
890				60	$5,71 \cdot 10^{-05}$	0,126	154,737	741,18

Tablo 3.38: PON1 enziminin grafiklerden bulunan 1.10^{-5} M madde (**3.grup**) için % pozitif modölatör değerleri.

No	Karbazol β -Laktam Türevlerinin İsimleri	PON aktivitesinin % pozitif modölatör etkisi
3a	1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-3,4-difenilazetidin-2-on	85,07
3b	1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-3-fenil-4-p-tolilazetidin-2-on	78,92
3c	1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-3-fenil-4-m-tolilazetidin-2-on	38,63
3d	1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-4-(4-metoksifenil)-3-fenilazetidin-2-on	16,66
3e	1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-4-(3-metoksifenil)-3-fenilazetidin-2-on	11,85
3f	4-(3-klorofenil)-1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-3-fenilazetidin-2-on	33,15
3g	1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-4-(4-nitrofenil)-3-fenilazetidin-2-on	12,96
3h	1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-4-(3-nitrofenil)-3-fenilazetidin-2-on	90,27
3i	1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-4-(2-nitrofenil)-3-fenilazetidin-2-on	22,69
3j	4-(2-bromofenil)-1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-3-fenilazetidin-2-on	9,23
3k	1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-4-(4-florofenil)-3-fenilazetidin-2-on	37,21

Tablo 3.39: PON1 enziminin grafiklerden bulunan 1.10^{-5} M madde (**4.grup**) için % pozitif modölatör değerleri.

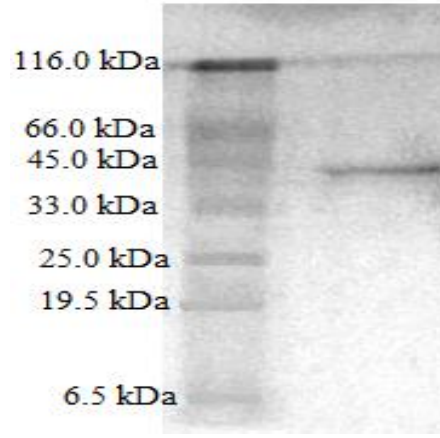
No	Karbazol β -Laktam Türevlerinin İsimleri	PON aktivitesinin % pozitif modölatör etkisi
4a	3,3-diklor-1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-4-fenilazetidin-2-on	23,82
4b	3,3-diklor-1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-4-p-tolilazetidin-2-on	28,58
4c	3,3-diklor-1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-4-m-tolilazetidin-2-on	10,11
4d	3,3-diklor-1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-4-(4-metoksifenil) azetidin-2-on	13,4
4e	3,3-diklor-1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-4-(3-metoksifenil) azetidin-2-on	57,14
4f	3,3-diklor-4-(4-klorofenil)-1-(9-etil-9H-karbazol-3-il) azetidin-2-on	35,99
4g	3,3-diklor-4-(3-klorofenil)-1-(9-etil-9H-karbazol-3-il) azetidin-2-on	11,74
4h	3,3-diklor-1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-4-(4-nitrofenil)azetidin-2-on	36,3
4i	3,3-diklor-1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-4-(3-nitrofenil)azetidin-2-on	11,72
4k	4-(4-bromofenil)-3,3-dikloro-1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)azetidin-2-on	1,437
4m	1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-3,4-difenilazetidin-2-on	15,41
4n	1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-3-fenil-4-p-tolilazetidin-2-on	20,1

Tablo 3.40: PON1 enziminin grafiklerden bulunan 1.10^{-5} M madde (**5.grup**) için % pozitif modölatör değerleri.

No	Karbazol β -Laktam Türevlerinin İsimleri	PON aktivitesinin % pozitif modölatör etkisi
5a	1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-3-fenil-4-m-tolilazetidin-2-on	3,4
5b	1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-4-(4-metoksifenil)-3-fenilazetidin-2-on	42,3
5c	1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-4-(3-metoksifenil)-3-fenilazetidin-2-on	18,2
5d	4-(3-klorofenil)-1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-3-fenilazetidin-2-on	10,21
5e	1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-4-(4-nitrofenil)-3-fenilazetidin-2-on	36,2
5f	1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-4-(3-nitrofenil)-3-fenilazetidin-2-on	38,22
5g	1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-4-(2-nitrofenil)-3-fenilazetidin-2-on	41,5
5h	4-(2-bromofenil)-1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-3-fenilazetidin-2-on	20,65
5i	1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-4-(4-florofenil)-3-fenilazetidin-2-on	23,83
5k	3,3-dikloro-1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-4-fenilazetidin-2-on	31,12
5l	3,3-dikloro-1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-4-p-tolilazetidin-2-on	13,2
5m	3,3-dikloro-1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-4-m-tolilazetidin-2-on	25
5n	3,3-dikloro-1-(9-etil-9H-karbazol-3-il)-4-(4-metoksifenil)azetidin-2-on	45,2

3.2.1 Serum Paraoksonaz Enziminin SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezine ile Enzim Saflığının Kontrol Edilmesi

Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılan serum paraoksonaz enzimlerinin saflığını kontrol etmek amacıyla bölüm 2.2.6'da anlatıldığı şekilde hazırlanan SDS poliakrilamid jel elektrofrezine serumdaki saflaştırılan paraoksonaz enzim numunesi tatbik edildi. Protein bantları içeren jellerin görüntüleri jel görüntüleme sistemi ile bilgisayara aktarıldı (Sekil 3.75).

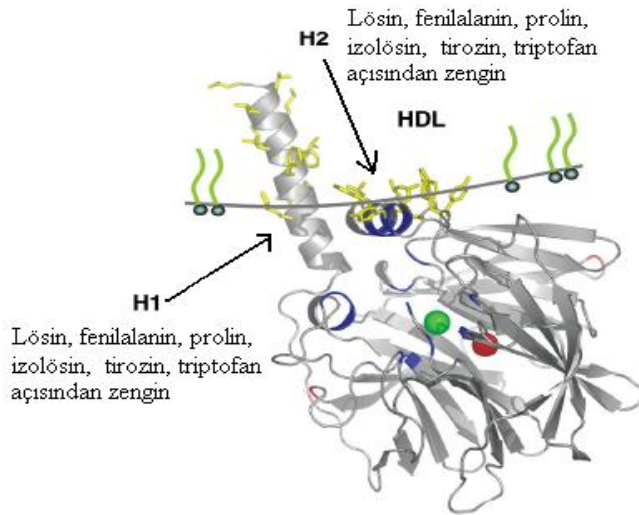


Şekil 3.75: Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılan paraoksonaz enziminin SDS-polakrilamid jel elektrofrezine.

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Paraoksonaz (PON), hem arilesteraz hem de paraoksonaz aktivitesine sahip bir ester hidrolazdır. Fizyolojik substrat(lar)'ı henüz tanımlanamayan PON, insektisit ve sinir gazı yapımında yaygın olarak kullanılan organofosfat bileşiklerinin hidrolizini katalizlediğinden; *in vivo* ksenobiyotik metabolizması ve toksikolojik çalışmalar için büyük önem taşımaktadır [5]. Diğer taraftan, plazmada yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) yapısında bulunduğu belirlendikten sonra; PON'un fizyolojik fonksiyonlarına yönelik çalışmalar giderek artmaktadır [7]. Günümüzde PON'un kardiyovasküler fizyolojideki yeri, lipid ve lipoprotein metabolizmasıyla ilişkisi, potansiyel antiaterojenik etkisi ve peroksidatif hasara karşı antioksidan özellikleri, yoğun bir şekilde araştırılmakta ve gün geçtikçe daha da önem kazanmaktadır [3].

Bu araştırma iki bölümden oluşmaktadır. Birinci bölümde, insan serum paraoksonaz (PON1) enzimi, amonyum sülfat çöktürmesi ve hidrofobik etkileşim kromatografisi (Sepharose 4B-L-tirozin-1-Naftilamin) [2] yöntemleri kullanılarak saflaştırılmıştır.



Şekil 4.1: PON1 enziminin HDL yüzeyine bağlanma modeli [96].

PON enziminin hidrofobik karakteri bu tekniğin seçilmesinde en önemli sebeplerden birisi olmuştur. Söz konusu enzim, N terminal bölgesinde bulunan H1 ve H2 heliks yapısı olarak isimlendirilen hidrofobik yapılar ile HDL'ye bağlanmaktadır

(Şekil 4.1) [51, 59, 96]. N-terminal bölgesini lösin, fenil alanin, prolin, isolösin, tirozin, triptofan ve valin gibi aminoasitleri ihtiva eden 7-18 residüler arası H1 hidrofobik ucu, 185-202 residüler arası da H2 hidrofobik ucu oluşturmaktadır. Ayrıca PON1'in hidrofobik yüzeyi ile HDL arasında triptofan, tirozin ve lizin aminoasitlerince zengin aromatik ve kısmen hidrofilik bölge bulunmaktadır [96,111].

Bu kromatografinin temel prensibi, yüksek tuz derişiminde saflaştırılacak biyomolekülde bulunan hidrofobik yüzey ile apolar ligand arasındaki hidrofobik etkileşimdir. Bu etkileşimin gerekçesi artan entropi ile açıklanmaktadır. Bu teknikte ligand ve matriks yapısının son derece önemli olduğu rapor edilmiştir. Kullanılacak ligandın hidrofobik karakteri kritik bir öneme sahiptir. Düşük hidrofobik karaktere sahip ligandlar kullanıldığı zaman ayrılacak moleküllerin kolonda etkileşimini sağlayabilmek için yüksek tuz konsantrasyonu uygulama zorunluluğu vardır. Bu durumda proteinlerin kendi aralarında hidrofobik etkileşim riski daha fazladır. Yüksek hidrofobik karaktere sahip ligand tercih edildiği durumda ise saflaştırılacak molekül ile ligand arasındaki etkileşim artacağı için elüsyon sırasında problemler ortaya çıkabilir [112]. Genellikle ticari olarak bulunan hidrofobik etkileşim kromatografi jellerinde hidrofobik uç olarak düz zincirli alkil ligandları ve aril ligandları gibi moleküller kullanılmaktadır [113]. Bunlardan isopropil, butil, oktil ve fenil bileşikleri en çok tercih edilen ligandlardır. En popüler hidrofobik etkileşim jelinin fenil-sepharose olduğu literatürde görülmektedir [112]. Düz zincirli alkil ligandları saf hidrofobik karakter gösterirlerken, aril ligandlarında hem hidrofobik hem de aromatik etkileşimler gözlenir. Bu amaçla çalışmamızda ligand olarak 1-naftilamin bileşiği kullanılmıştır.

Hidrofobik etkileşim kromatografisinde kullanılan tuzun tipi ve derişimi de oldukça önemlidir. Bu kromatografide yaygın olarak kullanılan tuzlar Na_2SO_4 , K_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl , NH_4Cl , NaBr ve NaSCN olmasına rağmen $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en çok tercih edilendir [114]

Araştırmamızda paraoksonaz enzimini insan serumundan saflaştırmak için hidrofobik etkileşim kromatografisi uygulanmadan önce bu kromatografi prosedürüne uygun ön saflaştırma yöntemi olarak $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürmesi yapılmıştır. Literatürde paraoksonaz enziminin en uygun amonyum sülfat çöktürme aralığı %60-80 olarak rapor edilmiştir [2].

Bu yöntemle insan paraoksonaz enzimi 508 kat saflaştırılmıştır. Enzimin serumdan ve karaciğerden saflaştırma basamaklarında kısmen farklılık bulunmaktadır. Serumdan HDL'ye bağlı olan paraoksonaz'ın izolasyonunda, Cibacron blue 3GA ve daha sonra değişik DEAE bio gel, DEAE Sepharose CL-6B, DEAE-selüloz, Sephadex G-75, DEAE Trisakril M gibi kromatografi yöntemleri kullanılmıştır [100].

Araştırmamızda saflaştırılan enzim için SDS-PAGE uygulanmıştır. Molekül ağırlığı yaklaşık 43 kDa olarak tahmin edilen paraoksonaz enzimi tek bant olarak SDS-PAGE jelinde gözlenmiştir. Bu değer literatürle uygunluk göstermektedir. Paraoksonaz'ın minimum molekül ağırlığını Gan ve arkadaşları 43 kDa olarak belirlemişlerdir [115]. Fakat enzimin yapısında, toplam molekül ağırlığının %15.8'i kadar karbohidrat molekülü bulunmaktadır. Molekül ağırlığı taşıdığı karbohidrat zincirinin varlığına bağlı olarak değişmektedir [116]. İçerdiği bu karbohidrat zinciri enzimin hidrolizleme tepkimesi için gerekli değildir. Söz konusu molekülün paraoksonaz'ın çözünürlüğünü ve kararlılığını arttırmada ve zar yapısına bağlanmada görevi olduğu düşünülmektedir [117]. Paraoksonaz'ın molekül ağırlığı türden türe değişmemekte ve insan, tavşan, sıçan ve koyunun paraoksonaz enziminin molekül ağırlığı hemen hemen benzerlik göstermektedir [100].

Araştırmanın ikinci bölümünde, hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılan paraoksonaz (PON1) enzimi üzerinde 36 farklı karbazol β -laktam türevlerinin *in vitro* etkileri incelenmiştir. Maddelerin tamamı DMSO'da çözülmüştür.

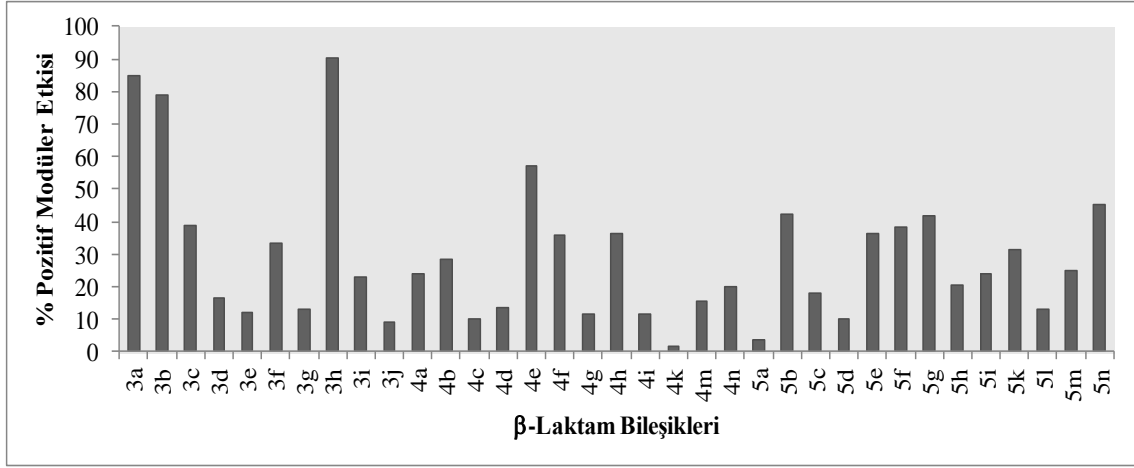
Paraoksonaz enzimi geniş bir substrat özgüllüğü gösterirken, fizyolojik substratı tam olarak belirlenememiştir. Ancak arilesteraz, organofosfataz ve laktonaz aktivitelerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Söz konusu aktivitelerin tümünün tek bir aktif merkezde mi yoksa birden fazla aktif merkezde mi gerçekleştiği, substrat seçiciliğinin nasıl belirlendiği de henüz tespit edilmemiştir [7].

Araştırmamızda PON1'in hidrolizlediği substratlardan laktonların, izosterik formu olan laktam bileşikleri ile çalışılmıştır. Laktamlar, laktonlardan farklı olarak oksijen halkası yerine azot halkası ihtiva ederler. Laktamlar PON1'in substratını oluşturmazlarken enzimi inhibe ederler. *In vitro* çalışmalarda δ -valerolaktam, ϵ -

kaprolaktam ve 2-hidroksikinolin gibi laktamlar PON1 enziminin güçlü inhibitörleridir [91].

Çalışmamızda PON1 üzerine *in vitro* etkilerinin çalışıldığı bileşikler, enzimin güçlü inhibitörleri olan laktam yapılarından farklı olarak β laktam yapısındadır. Ayrıca tüm bileşikler, iki benzen ve bir pirol halkası ile oluşan karbazol yapı ihtiva etmektedir. Literatürde karbazol halkasına sahip β -laktam bileşiklerin DNA polimeraz enziminin güçlü inhibitörleri olduğu bilinmektedir [118]. Karbazol halkasına sahip β -laktam yapılarının PON1 enzimi üzerine etkilerinin incelendiği çalışmalar mevcut değildir. Ancak; β -laktam yapısına sahip antibiyotiklerin paraoksonaz enzimi üzerine etkilerinin incelendiği araştırmalar yapılmıştır. Sinan ve arkadaşları sodyum amfisilin antibiyotiğinin *in vitro* enzim aktivitesi üzerinde yüksek konsantrasyonda (27,51 mg/ml) % 50 inhibisyona neden olduğunu fakat fare karaciğer ve serumunda ise sırasıyla 2 ve 4 saat sonunda istatistiksel olarak daha anlamlı bir inhibisyon gösterdiğini tespit etmişlerdir [2]. İkinci ve arkadaşları seftazidim pentahidrat, sefuroksim sodium, seftriakson sodium antibiyotiklerinin serum PON1 enzimini inhibe ettiğini çalışmalarında göstermişlerdir [119].

Araştırmamızda söz konusu bileşiklerin tamamının enzimi belirli ölçüde pozitif modüle ettiği saptanmıştır. Sonuçlar şekil 4.2’de gösterilmiştir. Pozitif modülatörler, enzimin aktivitesini artırır; negatif modülatörler ise enzimin aktivitesini azaltır. Negatif modülatörlere inhibitör denildiği gibi, pozitif modülatörlere simülatör ya da aktivatör denir. Bazı enzimlerin iki veya daha fazla modülatörü vardır ki; birkaç modülatörlü enzimler genellikle her bir modülatör için farklı spesifik yere sahiptirler. Birçok enzim için substrat, stimülatör etkili modülatördür. Modülatörü ve substratı aynı olan enzimler olabileceği gibi modülatörü substratından farklı olan enzimler de olabilir [120].



Şekil 4.2: 1.10^{-5} M madde derişimindeki β -laktam bileşiklerinin % PON1 aktivitesi üzerine pozitif modulator etkisi

Maddelerinin tamamının 1.10^{-5} M madde derişiminde ki PON1 aktivitesinin pozitif modülatör yüzdeleri hesaplanmıştır. Çalışılan bileşikler arasında en güçlü pozitif modülatör etkisine sahip bileşikler 3a, 3b ve 3h olarak belirlenmiştir. Söz konusu bileşiklerin, serum PON1 aktivitesinde sırayla % 85.07, % 78.92 ve % 90.27'lik artış tespit edilmiştir. Bu maddelerin ortak özelliği 4. ve 5. gruptakilerin foksiyonel gruplarından (Cl, Cl-Cl) farklı olarak benzen halkası içermesidir. Benzer şekilde çalışmamızda kullanılan orijinal karbazol β -laktam bileşikleri, PON1 üzerinde inhibisyon etkisi gösteren β -laktam antibiyotiklerden çok daha apolar yapıya sahiptirler.

Literatürde de, aromatik yapıların alifatik yapılardan daha iyi hidrolize olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. PON1 enziminin aromatik laktonlar afinitesi alifatik laktonlara oranla daha fazladır ve daha kolay hidrolizlenirler [91]. Önceleri PON1'in yapısının ve substratlarla olan ilişkisinin belirlenmesinde yapı-aktivite analizi üzerine çalışmalar yapılmıştır. Bu konuda ilk olarak, Augustinson ve Ekedahl aromatik halkalı veya çift bağlı aromatik esterlerin PON1 tarafından hidrolizlendiklerini bulmuştur [122]. Bu reaksiyonda PON1'in substrat olarak kullanacağı esterin karbon-karbon çift bağının birbirine çok yakın olması gerektiği tespit edilmiştir [91]. Ayrıca, yapılan bir başka çalışmada, vinil asetat ve Δ 2-siklopentil asetatın PON1 tarafından hidrolizlenmesi fakat etil asetat ve siklopentan asetatın PON1 tarafından hidrolizlenememesi bu öneriyi desteklemektedir [91]. Lakton halkasının oluşturduğu uzaysal yapı, bu yapıyı içeren bazı substratların enzimin aktif merkezine girmesini sağlayarak etkileşmelerine ve hidrolizlenmelerine

izin verir. Bu etkileşim benzer şekildeki içte bulunan ester formları için mümkün değildir. [79, 91]

Paraoksonaz enziminin laktonaz aktivitesinin, paraoksonaz ve arilesteraz aktivitelerinden farklı bir mekanizma üzerinden yürür. PON1 enziminin laktonaz aktivitesi için 284. rezidüde bulunan serbest sistein aminoasiti oldukça önemlidir. Bu serbest sistein rezidüsünün, söz konusu enzimin LDL'nin okside olmasını önlemesinde de rol alması; PON1'in sahip olduğu laktonaz aktivitesi aracılığıyla LDL ve HDL fosfolipitlerinin yükseltgenmeye karşı koruduğu düşünülmektedir [123, 124]. Sorenson ve arkadaşları 284. pozisyonda bulunan serbest sistein rezidüsünün arilesteraz ve paraoksonaz aktivitesinde gerekli olmadığını göstermişlerdir [59]. Ancak aktif merkezdeki histidin rezidülerinin paraoksonaz ve arilesteraz hidrolitik aktivitelerini göstermesinde çok gerekli olduğu gösterilmiştir. [125].

Paraoksonaz enziminin hastalıklarla ve metabolizmayla olan ilişkisi yoğun bir şekilde araştırılmakta ve gün geçtikçe daha da önem kazanmaktadır. Araştırmamızın, paraoksonaz enzimin kendi özgül substratlarının, katalizlediği reaksiyonların belirlenebilmesi ve enzimin fizyolojik fonksiyonlarının aydınlatılması adına yapılacak çalışmalara önemli katkılar sağlayacağını düşünmekteyiz.

Sonuç olarak yapılan çalışmalarda aşağıda bulgular elde edilmiştir:

- İnsan serum paraoksonaz 1 enzimi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürmesi ve Sepharose 4B L-tirozin 1-naftilamin kimyasal yapısına sahip bir hidrofobik etkileşim kromatografisi jeli ile iki aşamada saflaştırılmıştır.
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürmesi ve hidrofobik etkileşim kromatografisi yöntemi ile saflaştırılan insan serum PON1 enzimi SDS-PAGE elektroforezinde yaklaşık 43 kDa molekül ağırlığında tek bant elde edilmiştir
- Enzimin orijinal karbazol β -laktam türevlerine karşı ilgisi araştırılmıştır. Bu maddelerin tamamının insan serum PON1 enzimini aktive ettiği tespit edilmiştir. Bu orijinal karbazol β -laktam türevlerinin PON1 enzimi üzerine etkisi tarafımızdan ilk defa incelenmiştir.

- Sodyum dodesil sülfat (SDS) jel elektroforezi ile her iki jelden de saflaştırılan PON1 enzimlerinin yaklaşık moleköl ağırlıkları tespit edilmiştir.

5. KAYNAKLAR

- [1] Goswami, B. Tayal, D. Gupta, N. and Mallika, V. 'Paraoxonase: A Multifaceted Biomolecule' *Clinica Chimica Acta* 410, 1–12, (2009)
- [2] Sinan S., Kockar F., Arslan O. 'Novel purification strategy for human PON1 and inhibition of the activity by cephalosporin and aminoglycoside derived antibiotics'. *Biochimie*; 88:565–574. (2006)
- [3] Mazur A. 'An enzyme in animal tissues capable of hydrolyzing the phosphorus-fluorine bond of alkyl fluorophosphates'. *J Biol Chem* (1946); 164: 271–89.
- [4] Aldridge WN. 'Serum esterases. I. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination'. *Biochem J* (1953); 53: 110–17.
- [5] Uriel J. 'Characterization of cholinesterase and other carboxylic esterases after electrophoresis and immunoelectrophoresis on agar. I. Application to the study of esterases of normal human serum'. *Ann Inst Pasteur* (1961); 101: 104–19.
- [6] Geldmacher-Von Mallinck, Lindorf HH, Petenyi M, Flü gel M, Fischer T, Hiller T. 'Genetically determined polymorphism of human serum paraoxonase (EC 3.1.1.2)'. *Humangenetik* (1973); 17: 331–5.
- [7] Eckerson HW, Wyte CM, La Du BN. 'The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism2. *Am J Hum Ge net* (1983); 35: 1126–38.
- [8] Mackness MI, Walker CH. 'Partial purification and properties of sheep serum A-esterases'. *Biochem Phar macol* (1983); 32: 2291–6.
- [9] Mackness MI, Hallam SD, Peard T, Warner S, Walker CH. 'The separation of sheep and human serum A- esterase activity into the

lipoprotein fraction by ultracentrifugation'. *Comp Biochem Physiol B* (1985); 82: 675–7.

- [10] Mackness MI, Walker CH. 'Multiple forms of sheep serum A-esterase activity associated with the highdensity lipoprotein'. *Biochem J* (1988); 250: 539–45.
- [11] Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. 'Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein'. *FEBS Lett* (1991); 286: 152–4.
- [12] Moradi H, Pahl MV, Elahimehr R, Vaziri ND. 'Impaired antioxidant activity of high-density lipoprotein in chronic kidney disease'. *Transl Res* (2009); 153: 77–85.
- [13] Seo D, Goldschmidt-Clermont P. 'The paraoxonase gene family and atherosclerosis'. *Curr Atheroscler Rep* (2009); 11: 182–7.
- [14] Gan KN, Smolen A, Eckerson HW, La Du BN. 'Purification of human serum paraoxonase/arylesterase. Evidence for one esterase catalyzing both activities'. *Drug Metab Dispos* (1991); 19: 100–6.
- [15] Gil F, Pla A, Gonzalvo MC, Hernández AF, Villanueva E. 'Partial purification of paraoxonase from rat liver'. *Chem Biol Interact* (1993); 87: 69–75.
- [16] Rodrigo L, Gil F, Hernandez AF, Marina A, Vazquez J, Pla A. 'Purification and characterization of paraoxon hydrolase from rat liver'. *Biochem J* (1997); 321: 595–601
- [17] Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN. 'The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family'. *Genomics* (1996); 33: 498–507.
- [18] Davies HG, Richter RJ, Keifer M, Broomfield CA, Sowalla J, Furlong CE. 'The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin'. *Nat Genet* (1996); 14: 334–6.

- [19] Aviram M, Rosenblat M, Scott B, Eroglu J, Sorenson R, Bisgaier CI, Newton RS, La Du B. 'Human serum paraoxonase (PON 1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants'. *Free Rad Biol & Med.* (1999), 26, 892-904.
- [20] Lu,H.,Zhu, Z.,Ze,Y.,Qin,J.,'Cloning, 'Purification, And Refolding Of Human paraoxonase-3 Expressed In Escherichia Coli And Its Characterization Protein Expression And Purification' 46 ,92-99 (2006).
- [21] Michael I. Mackness, B.M., Paul N. Durrington, 'Paraoxonase and coronary heart disease'. *Atherosclerosis Supplements.* 3, (2000), 49-55
- [22] Liang, H.-L.L.D.-P.L.C.-C., 'Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress, and diseases'. *J Mol Med,* 81, (2003), 766–779
- [23] Précourta L, Amreb D, Denisa M, Lavoie JC, Delvinc E, Seidmand E, Levy E, 'The three-gene paraoxonase family: Physiologic roles, actions and regulation'. *Journal Atherosclerosis* 214 (2011) 20–36
- [24] Kirsty S. Robertson, Emma Hawe,1, George J. Miller, Philippa J. Talmud, Steve E. Humphries, 'Human Paraoxonase Gene Cluster Polymorphisms As Predictors of Coronary Heart Disease Risk in The Prospective Northwick Park Heart Study II' *Biochimica et Biophysica Acta,* 1639, (2003), 203– 12
- [25] Marsillach J, Mackness B, Mackness M, et al. 'Immunohistochemical analysis of paraoxonases-1, 2, and 3 expression in normal mouse tissues'. *Free Radic Biol Med* (2008);45:146–57.
- [26] La Du BN. 'Structural and functional diversity of paraoxonases'. *Nat Med* (1996);2:1186–7.
- [27] Aviram M, Rosenblat M. 'Paraoxonases 1, 2, and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development'. *Free Radic Biol Med* (2004);37:1304–16.

- [28] Ito T, Yasue H, Yoshimura M, et al. 'Paraoxonase gene Gln192Arg (Q192R) polymorphism is associated with coronary artery spasm'. *Hum Genet* (2002);110:89–94.
- [29] Zintzaras E, Hadjigeorgiou GM. 'Association of paraoxonase 1 gene polymorphisms with risk of Parkinson's disease: a meta-analysis'. *J Hum Genet* (2004);49:474–81.
- [30] Hofer SE, Bennetts B, Chan AK, et al. 'Association between PON 1 polymorphisms, PON activity and diabetes complications'. *J Diabetes Complications* (2006);20:322–8.
- [31] Karban A, Hartman C, Eliakim R, et al. 'Paraoxonase (PON)1 192R allele carriage is associated with reduced risk of inflammatory bowel disease'. *Dig Dis Sci* (2007);52:2707–15.
- [32] Rosenblat M, Draganov D, Watson CE, et al. 'Mouse macrophage paraoxonase2 activity is increased whereas cellular paraoxonase3 activity is decreased under oxidative stress'. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2003);23:468–74.
- [33] Ng CJ, Wadleigh DJ, Gangopadhyay A, et al. 'Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein'. *J Biol Chem* (2001);276:44-9
- [34] Shiner, M., Fuhrman, B., Aviram, M., 'A biphasic U-shape effect of cellular oxidative stress on the macrophage anti-oxidant paraoxonase 2 (PON2) enzymatic activity' *Biochem Biophys Res Commun* 349 (2006) 1094-1099
- [35] Fuhrman, B., Khateeb, J., Nitzan, O., Karry,R.,Volkova, N., Aviram, M., 'Urokinase Plasminogen Activator Upregulates Paraoxonase 2 Expression In Macrophages Via An NADPH Oxidase-Dependent Mechanism' , *Arteioscler Thromb. Vasc. Biol* 28 (2008) 1361-1367

- [36] Horke S, Witte I, Wilgenbus P, et al. 'Paraoxonase-2 reduces oxidative stress in vascular cells and decreases endoplasmic reticulum stress-induced caspase activation'. *Circulation* (2007);115:2055–64.
- [37] Leus FR, Zwart M, Kastelein JJ, et al. 'PON2 gene variants are associated with clinical manifestations of cardiovascular disease in familial hypercholesterolemia patients'. *Atherosclerosis* (2001);154:641–9.
- [38] Pan JP, Lai ST, Chiang SC, et al. 'The risk of coronary artery disease in population of Taiwan is associated with Cys-Ser 311 polymorphism of human paraoxonase (PON)-2 gene'. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)* (2002);65:415–21.
- [39] Mackness B, McElduff P, Mackness MI. 'The paraoxonase-2-310 polymorphism is associated with the presence of microvascular complications in diabetes mellitus'. *J Intern Med* (2005);258:363–8.
- [40] Hegele RA, Connelly PW, Scherer SW, et al. 'Paraoxonase-2 gene (PON2) G148 variant associated with elevated fasting plasma glucose in noninsulindependent diabetes mellitus'. *J Clin Endocrinol Metab* (1997);82:3373–7.
- [41] Sanchez R, Levy E, Seidman E, et al. 'Paraoxonase 1, 2 and 3 DNA variants and susceptibility to childhood inflammatory bowel disease'. *Gut* (2006);55:1820–1.
- [42] Liu Y, Mackness B, Mackness M. 'Comparison of the ability of paraoxonases1 and 3 to attenuate the in vitro oxidation of low-density lipoprotein and reduce macrophage oxidative stress'. *Free Radic Biol Med* (2008);45:743–8.
- [43] Rodrigo, L., Gil,F., Hernandez, A.F., Lopez, O., Pla, A., 'Identification of paraoxonase 3 in rat liver microsomes: purification and biochemical properties —*Biochem. J.* (2003) 376, 261–268

- [44] Campo S, Sardo AM, Campo GM, et al. 'Identification of paraoxonase 3 gene (PON3) missense mutations in a population of southern Italy'. *Mutat Res* (2004);546:75–80.
- [45] Mackness B, Durrington PN, Mackness MI., 'Human serum Paraoxonase'. *Gen Pharm.* (1998), 3, 329-36.
- [46] Aviram M, Rosenblat M, Scott B, Eroglu J, Sorenson R, Bisgaier CI, Newton RS, La Du B. , 'Human serum paraoxonase (PON 1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants'. *Free Rad Biol & Med.* (1999), 26, 892-904.
- [47] Mackness MI, Mackness B, Arrol S, Wood G, Bhatnagar D, Durrington PN. 'Presence of paraoxonase in human interstitial fluid'. *FEBS Letters.* (1997), 416, 377-80.
- [48] Lee J, Prohaska JR, Thiele DJ. 'Essential role for mammalian copper transporter Ctr 1 in copper homeostasis and embryonic development'. *Proc Natl Acad Sci*, (2001), 98, 6842-47.
- [49] Draganov DI, Stetson PL, Watson CE, Billecke SS, La Du BN. 'Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation'. *J Biol Chem.* (2000), 275, 4435-42.
- [50] Aviram M. 'Does paraoxonase play a role in susceptibility to cardiovascular disease?'. *Mol Med Today* (1999), 5, 381-6.
- [51] Sorenson RC, Bisgaier CL, Aviram M, Hsu C, Billecke S, La Du BN. 'Human serum paraoxonase/arylesterase's retained hydrophobic N-terminal leader sequence associates with HDLs by binding phospholipids'. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (1999), 19, 2214-25.
- [52] Sönmez H. 'Lipid metabolizmasının ana hatları, primer ve sekonder hiperlipidemiler'. *Türkiye Klinikleri.* (2000), 13, 1-8.

- [53] Ali AB, Zhang Q, Lim YK, Fang D, Retnam L, Lim SK. 'Expression of major HDL-associated antioxidant PON-1 is gender and regulated during inflammation'. *Free Rad Bio & Med.* (2003), 34, 824-9.
- [54] Lu,H.,Zhu, Z.,Ze,Y.,Qin,J.,'Cloning, Purification,And Refolding Of Human Paraoxonase-3 Expressed an Escherichia Coli and Its Characterization'. *Protein Expression And Purification.* (2006), 46, 92-99.
- [55] Aviram M, Hardak E, Vaya J, Mahmood S, Milo S, Hoffman A, Billicke S, Draganov D, Rosenblat M. ,, 'Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions'. *Circulation.* (2000), 101, 2510-17.
- [56] La Du, B.N., 'Human serum paraoxonase/arylesterase, In *Pharmacogenetics of Drug Metabolism*', ed. Kalow, W., Pergamon Pres, New York, (1992), p.51.
- [57] Cathcart MK, McNally AK, Chisolm GM. ,, 'Lipoxygenase-mediated transformation of human low density lipoprotein to oxidized and cytotoxic complex'. *J Lipid Res* (1991), 32, 63-70.
- [58] Broomfield, C.A. and Ford, K.W., 'Hydrolysis of nerve gasses by plasma enzymes', *Proceedings of the 3rd International Meeting on Cholinesterases, La Grande-Motte, France,* (1991), 167.
- [59] Mackness, M.I., Mackness, B., Durrington, P.N., Connelly, P.W. and Hegele, R.A. 'Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins'. *Curr. Opin. Lipidol.* (1996) 7, 69
- [60] Sorenson, R.C., Primo-Parmo, S.L., Kuo, C.L., Adkins, S., Lockridge, O. and La Du, B.N. 'Reconsideration of the catalytic center and mechanism of mammalian paraoxonase/arylesterase'. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1995), 92, 7187.
- [61] Jawad, Z. and Paoli, M. ,, 'Novel sequences propel familiar folds'. *Structure (Camb) Review.* (2002), 10(4), 447.

- [62] Scharff, E.I., Koepke, J., Fritsch, G., Lücke, C. and Rüterjans, H. 'Crystal structure of diisopropylfluorophosphatase from *Loligo vulgaris*'. *Structure*. (2001), 9, 493.
- [63] Marie-Claude Garn, B., Abbott, C., Messmer, T. S., Mackness, M., Durrington, P., Pometta, T.D., James, R. W., 'Quantification of human serum paraoxonase by enzyme-linked immunoassay: population differences in protein concentrations'. *Biochem. J.* (1994), 304, 549-554.
- [64] Lock EA, Reed CJ. 'Xenobiotic metabolizing enzymes of the kidney'. *Toxicol Pathol* (1998); 26: 18-25
- [65] Rodrigo L, Hernandez F, Caballero L, Gil F, Pla 'A. Immunohistochemical evidence for the expression and induction of paraoxonase in rat liver, kidney, lung and brain tissue. Implications for its physiological role'. *Chem Biol Interact* (2001); 137: 123-137.
- [66] Walker CH, Mackness MI. 'A-esterases and their role in regulating the toxicity of organophosphates'. *Arch Toxicol* (1987); 60:30-33
- [67] La Du BN, Aviram M, Billecke S, et al. 'On the physiological role(s) of the paraoxonases'. *Chem Biol Interact* (1999); 119-120: 379-388.
- [68] Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Parmo SL, La Du BN. 'Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase'. *J Clin Invest* (1998); 101: 1581-1590.
- [69] Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. 'Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2001); 21: 473-480.
- [70] Hahn M, Subbiah MT. 'Significant association of lipid peroxidation products with high density lipoproteins'. *Biochem Mol Biol Int* 1994; 33: 699-704.
- [71] Watson AD, Berliner JA, Hama SY, et al. 'Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological

activity of minimally oxidised low density lipoprotein'. *J Clin Invest* 1995; 96: 2882-2891.

- [72] Steinberg D. Beyond cholesterol: 'Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity'. *New England J Med* 1989; 320: 915-924.
- [73] Wilkins GM, Leae DS. 'The effect of free radical scavenger on the oxidation of lowdensity lipoproteins by macrophages'. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1215: 250-258
- [74] Mackness MI, Harty D, Bhatnagar D, et al. 'Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolaemia and insulin-dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis*' 1991; 86: 193-199.
- [75] Paragh G, Asztalos LK, Seres I, et al. 'Serum paraoxonase activity changes in uremic and kidney-transplanted patients'. *Nephron* 1999; 83: 126-131
- [76] Playfer, J., Eze, LC., Bullen, MF., Evans, AP, 'Genetic Polimorphism and interethnic variability of plasma paraoxonase activity'. *J. Med. Genet.*, 13, (1976), 337-342
- [77] Humbert, R., Adler, DA., Disteche, CM., Hasset, C., Omiecinski, CJ., Furlong, CE., 'The Molecular Basis of The Human Serum Paraoxonase Activity polymorphism'. *Nat. Genet.*, 3(1) , (1993), 73-76
- [78] Eckerson, H. Romson, J., Wyte, C., La Du, BN., 'The Human Serum Paraoxonase Polymorphism: Identification of Phenotypes by Their Response to Salts'. *Am J Hum. Genet.*, 35(2) ,(1983), 214-227
- [79] Brophy VH, J.R., Clendenning JB, McKinstry LA, Jarvik GP, Furlong CE, 'Effects of 5' Regulatory-Region Polymorphisms on Paraoxonase-Gene (PON1) Expression'. *Am J Hum. Genet.*, 68, (2001), 1428-1436
- [80] Draganov DI, La Du BN. 'Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review'. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, (2004); 369(1): 78-88.

- [81] Chambers JE. 'PON1 multitasks to protect health'. PNAS, (2008); 105 (35): 12639-40.
- [82] Tougou K, Nakamura A, Watanabe S, Okuyama Y, Morino 'A. Paraoxonase has a major role in the hydrolysis of prulifloxacin (NM441), a prodrug of a new antibacterial agent'. Drug Metab Dispos, (1998); 26(4): 355-9.
- [83] Mackness MI, Arrol S, Abbott CA, Durrington PN. 'Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase'. Atherosclerosis, (1993); 104: 129-35.
- [84] Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. 'Beyond cholesterol: modifications of low density lipoprotein that increase its atherogenicity'. N Engl J Med, (1989); 320: 915-24.
- [85] Shih D, Gu L, Xia YR, et al. 'Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis'. Nature, (1998); 394: 284-7.
- [86] Mackness B, Quarck R, Verreth W, Mackness M, Holvoet P. 'Human paraoxonase1 overexpression inhibits atherosclerosis in a mouse model of metabolic syndrome'. Arterioscler Thromb Vasc Biol, (2006); 26: 1545-50.
- [87] Serrato M, Marian AJ. 'A variant of human paraoxonase/arylesterase (HUMPONA) gene is a risk factor for coronary artery disease'. J Clin Invest, (1995); 96: 3005-8.
- [88] Mackness B, Durrington P, McElduff P, et al. 'Low paraoxonase activity predicts coronary events in the Caerphilly prospective study'. Circulation, (2003); 107(22): 2775-9.
- [89] Can Demirdöğen B, Türkanoglu A, Bek S, et al. 'Paraoxonase/arylesterase ratio, PON1 192Q/R polymorphism and PON1

status are associated with increased risk of ischemic stroke'. Clin Biochem, (2008); 41 (1-2): 1-9.

- [90] Demirdöğen BC, Demirkaya Ş, Türkanoglu A, Bek S, Arınç S, Adalı O. 'Analysis of paraoxonase 1 (PON1) genetic polymorphisms and activities as risk factors for ischemic stroke in Turkish population'. Cell Biochem Funct, (2009); 27(8): 558-67.
- [91] Gonzalvo et. Al 'Inhibition of paraoxonase activity in human liver microsomes by exposure to EDTA, metals and mercurials' (1997) Chemico-Biological Interaction:105:3:169-176
- [92] S. Billecke, D. Draganov, R. Counsell, P. Stetson, C. Watson, C. Hsu, And B. N. La Du 'Human Serum Paraoxonase(PON1) Isozymes Q And R Hydrolyze Lactones And Cyclic Carbonate Esters' The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics (2000) 28, No 72/859392
- [93] Sinan S. 'In vitro inhibition of the paraoxonase from human serum with sulfonamide'. (2008) Afr J Biotechnol;7:508–512.
- [94] Alici H.A., Ekinci D., Beydemir S. 'Intravenous anesthetics inhibit human Paraoxonase-I (PON1) activity in vitro and in vivo'. (2008) Clin Biochem;41:1384–1390.
- [95] N. Gencer, O. Arslan "Purification human PON1Q192 and PON1R192 isoenzymes by hydrophobic interaction chromatography and investigation of the inhibition by metals" (2009) J. Of Chromatography B; 87:3: 134-140
- [96] D. Ekinci M. Şentürk, Ş. Beydemir, O.I. Küfrevioğlu and C.T. Supuran "An Alternative Purification Method for Human Serum Paraoxonase 1 and its Interactions with Sulfonamides" Chem Biol Drug Des (2010); 76: 552–558 Research Letter
- [97] Harel, M., Aharoni, A., Gaidukov, L., Brumshtein, B., Khersonsky, O., Meged, R., Dvir, H., Ravelli, R.B.G., McCarthy, A., Toker, L., Silman,

- I., Sussman, J.L. and Dan S. Tawfik, 'Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes', *Nature Struct. Mol. Biol.* (2004) 11, 412.
- [98] Klimov, A.N., Gurevich, V.S., Nikiforova, A.A., Shatilina, L.V., Kuzmin, A.A., Plavinsky, S.L. and Teryukova, N.P., 'Antioxidative activity of highdensity lipoproteins in vivo', *Atherosclerosis*, (1993) 100, 13.
- [99] Mounter, L.A., Floyd, C.S. and Chanutin, A., 'Dialkylfluorophosphatase of Kidney I. Purification And Properties', *J. Biol. Chem.* (1953) 204, 221-232 99. Main, A. R. *Can. J. Biochem. Physiol.* **34**, (1956) 197-216.
- [100] Furlong, C.E., Costa, L.G., Hassett, C., Richter, R.J., Sundstrom, J.A., Adler, D.A., Disteche, C.M., Omiecinski, C.J., Chapline, C., Crabb, J.W. and Humbert, R., 'Human and rabbit paraoxonase: purification, cloning, sequencing, mapping and role of polymorphism in organophosphate detoxification', *Chem. Biol. Interact.*, (1993) 87, 35.
- [101] Furlong, C.E., Richter, R.J., Chapline, C. and Crabb, J.W., 'Purification of Rabbit and Human Serum Paraoxonase', *Biochemistry*, (1991) 30, 10133.
- [102] Kitchen, B.J., Masters, C.J. and Winzor, D.J., 'Effects of lipid removal on the molecular size and kinetic properties of bovine plasma arylesterase', *Biochem J*, (1973) 135, 93.
- [103] Fleming A. 'On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to their Use in the Isolation of B. Influenze', *The British J of Experimental Pathology*, (1929) 10(3): 226-236
- [104] Chain, E.; Florey, H. W.; Gardner, A. D.; Heatley, N. G.; Jennings, M. A.; Orr-Ewing, J.; Sanders, A. G 'Penicillin as a chemotherapeutic agent', *Nature*, (1940) 226-8
- [105] Rihmond MH. ' β -Lactam Antibiotics and B-Lactamase: Two Sides of Contioning Story', *Rev Infec Dis*, (1979) 30-1

- [106] Jubie, S., Gowramma, B., Muthal, N.K., Kalirajan, R., Gomathi, S., Elango, K., 'Synthesis and antimicrobial evaluation of some 2-azetidinone derivatives'. *Int. J. Chem. Tech. Res.*, 1(2), 153-157, 2009.
- [107] Kale, A.S., Puranik, V.G., Deshmukh, A., 'A practical formal synthesis of D-(+)-biotin from 4-formylazetidin-2-one synthesis'. *Synlett*, 8, 1159–1164, 2007.
- [108] Tidwell, T.T., Hugo'Schiff bases and a century of β -lactam synthesis'. 4(6), 1016–1020, 2008.
- [109] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L & Randall R J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265, 1951. 110. Laemmli, D. K., 'Cleavage of Structural Proteins During in Assembly of the Head of Bacteriophage T4'. *Nature, London*, 227, 680, (1970).
- [110] Wistrand, P.J., Lindahl, S. and Wahlstrand, T., 'Human renal carbonic anhydrase. Purification and properties', *Eur J. Biochem.*, (1975) 57, 189.
- [111] Jakoby, B., Wilchek, M., 'Coupling reaction of ligands and general methodology of affinity chromatography, in *Methods in Enzymology*', Academic Press, New York, (1974).
- [112] Robyt, JF., White, BJ., 'Biochemical Techniques Theory and Practice', (1990), Waveland Press, Inc. p:98
- [113] Aguiar, J.A.K. and Michelacci, Y.M. 'Preparation and purification of Flavobacterium heparinum chondroitinases AC and B by hydrophobic interaction chromatography'. *Braz J Med Biol Res*, May (1999), 32(5) 545-550.
- [114] Gan, K.N., Smolen A., Eckerson HW., La Du BN., 'Purification of Human Serum Paraoksonase/Arylesterase, Evidence for One Esterase Catalyzing Both Activities'. *Drug Metab. Dispos.*, 19 (1) , (1991), 100-6 116.

- [115] Mueller RF, Hornung S, Furlong CE, Anderson J, Giblett ER, Motulsky AG. 'Plasma paraoxonase polymorphism: a new enzyme assay, population, family biochemical and linkage studies'. *Am J Hum Genet* (1983); 35:393–408.
- [116] Ahoroni, A.e.a., 'Directed Evolution of Mammalian Paraoxonases PON1 and PON3 for Bacterial Expression and Catalytic Specialization'. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, (2004), 482-487
- [117] Tao Ming, 'Synthesis and structure–activity relationships of novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitors' *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, (2006), 16: 4 938–942
- [118] Ekinçi D, Beydemir Ş. 'Evaluation of the impacts of antibiotic drugs on PON 1; a major bioscavenger against cardiovascular diseases' *European J of Pharmacology*, (2009), 617:1–3, 84–89
- [119] <http://www.wikipedia.org/>
- [120] Augustinsson, K.B., Homologous enzymes and biochemical evolution, (eds) In: Van Thoai N., Roche J., Gordon and Breach, New York, (1968), 299-311
- [121] KB Augustinsson, G Ekedahl - 'On the specificity of arylesterase' *Acta chem. scand*, (1962)
- [122] Aviram, M., Billecke, S., Sorenson, R., Bisgaier, C., Newton, R., Rosenblat, M., Erogul, J., Hsu, C., Dunlop, C. and La Du, B.N., 'Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities. Selective action of human paraoxonase allozymes Q and R', *Arterioscler. Thromb Vasc.Biol.*, (1998) 18, 1617.
- [123] Aviram, M., Rosenblat, M., Bisgaier, C.L., Newton, R.S., Primo-Parmo, L.S. and La Du, B.N., 'Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein

oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase', *J. Clin. Invest.*, (1998) 101(81), 1581.

[124] Doorn, J.A., Sorenson, R.C., Billecke, S.S., Hsu, C. and La Du, B.N., 'Evidence that several conserved histidine residues are required for hydrolytic activity of human paraoxonase/arylesterase', *Chemico-Biological Interaction*, (1999) 119-120, 235.

