

**NİTRİK OKSİT SENTAZ ENZİMİNİN SIĞIR BÖBREK
VE TROMBOSİTLERİNDEN SAFLAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZASYONU VE BAZI İLAÇLARIN ENZİM
AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

M. Mustafa İŞGÖR

**Doktora Tezi
Kimya Anabilim Dalı
Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR
Doç.Dr. Deniz EKİNCİ
2013
Her hakkı saklıdır**

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**NİTRİK OKSİT SENTAZ ENZİMİNİN SIĞIR BÖBREK
VE TROMBOSİTLERİNDEN SAFLAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZASYONU VE BAZI İLAÇLARIN ENZİM
AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

M.Mustafa İŞGÖR

KİMYA ANABİLİM DALI

**ERZURUM
2013**

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

NİTRİK OKSİT SENTAZ ENZİMİNİN SIĞIR BÖBREK VE TROMBOSİTLERİNDEN SAFLAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZASYONU VE BAZI İLAÇLARIN ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ

Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR danışmanlığında, Mehmet Mustafa İŞGÖR tarafından hazırlanan bu çalışma 08/04/2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya/Biyokimya Anabilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **oybirliği/oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVLİOĞLU

İmza :

Üye : Prof. Dr. Refiye YANARDAĞ

İmza :

Üye : Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR

İmza :

Üye : Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN

İmza :

Üye : Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

İmza :

Üye : Doç. Dr. Ahmet MAVİ

İmza :

Üye : Doç. Dr. Deniz EKİNCİ

İmza :

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Atatürk Üniversitesi BAP projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: 2011/88

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

ÖZET

Doktora Tezi

NİTRİK OKSİT SENTAZ ENZİMİNİN SIĞIR BÖBREK VE TROMBOSİTLERİNDEN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE BAZI İLAÇLARIN ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

M. Mustafa İŞGÖR

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR
Doç. Dr. Deniz EKİNCİ

Çalışma kapsamında sıgır böbrek dokusu ve trombositlerinden nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi, 2'5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi kullanılarak sırasıyla; %3,58 verimle 1217 kat ve %7,21 verimle 919 kat saflaştırıldı. Böbrek NOS enzimi için alt birim ve aktif form molekül kütleleri 104,9 kDa, 215 kDa ve trombosit NOS enzimi için 85,9 kDa, 165,4 kDa olarak hesaplandı. Saflaştırılan böbrek NOS enzimi için optimum pH, optimum iyonik şiddet, optimum sıcaklık ve stabil pH değerleri sırasıyla; 7,0, 50 mM (KH₂PO₄ tampon çözeltisi), 10°C ve 5,5-6,5 aralığı olarak belirlendi. Trombosit NOS enzimi için ise aynı değerler sırasıyla; 7,5, 50 mM, 40°C ve 6,5-7,0 aralığı olarak bulundu. Saflaştırılan NOS enzimlerinin NADPH ve sitokrom-c için K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı. Saflaştırılan her iki NOS enzim aktivitesinin NADPH ve Ca⁺² iyonuna ihtiyaç duydukları görüldü. *İn vitro* inhibisyon etkileri incelenen antibiyotiklerden Enrofloksasin, Kanamisin, Kloramfenikol, Gentamisin, Vankomisin, Sefazolin, Streptomisin ve Ampisilin ilaçlarının böbrek NOS enzimini ve Oksitetrasiklin, Ornidazol, Amikasin ve Linkomisin ilaçlarının ise trombosit NOS enzimini inhibe ettiği gözlemlendi.

2013, 112 sayfa

Anahtar Kelimeler: Nitrik oksit sentaz, karakterizasyon, sıgır böbrek ve trombosit, antibiyotik, inhibisyon

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF NITRIC OXIDE SYNTHASE FROM BOVINE KIDNEY AND PLATELETS AND INVESTIGATION OF SOME DRUGS ON THE ENZYME ACTIVITIES

M. Mustafa İŞGÖR

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR
Assoc. Prof.Dr. Deniz EKİNCİ

In this study, nitric oxide synthase (NOS) enzymes were purified by using 2'5'-ADP Sepharose 4B affinity chromatography from bovine kidney tissue and platelets with 3,58% yield, 1217-fold and 7,21% yield, 919-fold respectively. Subunit and the active form molecular masses of kidney NOS enzyme were calculated as 104,9 kDa, 215 kDa and they were 85,9 kDa, 165,4 kDa for platelet NOS enzyme. Optimum pH, optimum ionic strength, optimum temperature and stable pH values for purified kidney NOS enzyme were determined as 7,0, 50 mM (KH₂PO₄ buffer solution), 10°C and a range of 5,5-6,5 respectively. For platelet NOS enzyme, these values were 7,5, 50 mM, 40°C and a range of 6,5-7,0 respectively. K_m ve V_{max} values of purified NOS enzymes for NADPH and cytochrome-c were calculated. It was found that NADPH and Ca²⁺ ion were needed in both purified NOS enzyme activities. It was observed that Enrofloxacin, Kanamycin, Chloramphenicol, Gentamicin, Vancomycin, Cefazolin, Streptomycin and Ampicillin inhibited renal NOS enzyme activity and Oxytetracycline, Ornidazole, Amikacin and Lincomycin inhibited platelet NOS activity *in vitro*.

2013, 112 pages

Key Words: Nitric oxide synthase, characterization, bovine kidney and platelets, antibiotics, inhibition

TEŞEKKÜR

Doktora Tezi olarak sunduğum bu çalışmanın deneysel kısmı Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmam süresince her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen, ilgi, sabır ve anlayışla tez danışmanlığımı yürüten değerli hocam Sayın Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR'e şükranlarımı sunarım.

Ayrıca çalışmalarım esnasında her türlü desteğini gördüğüm Biyokimya Anabilim Dalı başkanımız ve Üniversitemiz Rektör yardımcısı Sayın Prof. Dr. Ö.İrfan KÜFREVİOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Bunun yanı, çalışmalarım esnasında bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım kıymetli hocalarım Sayın Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ, Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR ve Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN'e şükranlarımı sunarım.

Ayrıca laboratuarda ve bölümde birlikte çalıştığım değerli arkadaşlarım Sayın Arş.Gör. Zuhale ALIM, Namık KILINÇ, Bülent ŞENGÜL ve Yeliz DEMİR'e ve tüm Biyokimya Laboratuvarı çalışma grubu arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Bütün çalışmalarım süresince desteklerini esirgemeyen aileme teşekkür ederim.

M. Mustafa İŞGÖR

Mart 2013

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	28
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	34
3.1. Materyal.....	34
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler	34
3.1.2. Kullanılan alet ve cihazlar	34
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması	35
3.2. Yöntem	40
3.2.1. NOS enziminin saflaştırılması ile ilgili yöntemler.....	40
3.2.1.a. Böbrek doku homojenatının hazırlanması	40
3.2.1.b. Sığır trombositlerinin eldesi	40
3.2.1.c. 2'5'-ADP Sepharose 4B afinite kolonunun hazırlanması ve NOS enziminin saflaştırılması	41
3.2.1.d. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının belirlenmesi	41
3.2.2. NOS enziminin aktivite tayini	43
3.2.2.a. NADPH oksidasyonu metodu	43
3.2.2.b. Sitokrom-c redüktaz aktivite metodu	44
3.2.3. Protein tayini	45
3.2.3.a. Kalitatif protein tayini	45
3.2.3.b. Bradford yöntemiyle kantitatif protein tayini.....	45
3.2.4. NOS enziminin molekül kütlesi tayini	46
3.2.4.a. Sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzimin alt birim molekül kütlesi tayini	46

3.2.4.b. Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi metodu ile NOS enziminin aktif formunun molekül kütlelerinin tayini.....	46
3.2.5. NOS enziminin karakterizasyonu ve kinetik çalışmalar	48
3.2.5.a. Sığırdokularından saflaştırılan NOS enzimleri için optimum pH bulunmasına yönelik çalışmalar	48
3.2.5.b. Enzimin optimum iyonik şiddetinin belirlenmesine yönelik çalışmalar	48
3.2.5.c. Enzimin optimum sıcaklığının ve Q_{10} değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar	48
3.2.5.d. Enzimin stabil pH değerinin bulunmasına yönelik çalışmalar	49
3.2.5.e. Enzimin NADPH, L-arjinin ve Sitokrom-c için K_m ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik çalışmalar	49
3.2.5.f. Enzim aktivitesi için gerekli Ca^{+2} , NADPH, FAD, FMN ve BH_4 maddelerinin enzim aktivitesine etkilerinin incelenmesine yönelik çalışmalar	50
3.2.6. NOS enziminin aktivitesi üzerine bazı antibiyotiklerin <i>İn vitro</i> etkilerinin incelenmesine yönelik çalışmalar	50
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	51
4.1. Kantitatif protein tayini için elde edilen standart grafik.....	51
4.2. NOS enzimi için saflaştırma sonuçları	51
4.3. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının kontrolü.....	53
4.4. Nitrik oksit sentaz enziminin molekül kütlesi tayini ile ilgili bulgular	55
4.4.1. SDS-PAGE ile alt birim molekül kütlesi tayini	55
4.4.2. Jel filtrasyon kromatografisi metodu kullanılarak molekül kütlesi tayini	56
4.5. NOS enziminin karakterizasyonu ve kinetik çalışmalarla ilgili bulgular.....	58
4.5.1. Optimum pH belirlenmesine yönelik çalışmaların sonuçları	58
4.5.2. Optimum iyonik şiddet belirlenmesine yönelik çalışmaların sonuçları	61
4.5.3. Optimum sıcaklık ve Q_{10} değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışmaların sonuçları	64
4.5.4. Stabil pH bulunmasına yönelik çalışmaların sonuçları	67
4.5.5. NOS enziminin NADPH, L-arjinin ve sitokrom-c için K_m ve V_{max} değerlerinin bulunması ile ilgili bulgular	74

4.5.6. Enzim aktivitesi için gerekli Ca^{+2} iyonu, NADPH, FAD, FMN ve BH_4 maddelerinin enzim aktivitesine etkilerinin incelenmesi ile ilgili bulgular	76
4.6. Enzim aktivitesi üzerine bazı antibiyotiklerin <i>in vitro</i> etkilerinin incelenmesi ile ilgili çalışmaların sonuçları	79
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	93
KAYNAKLAR	107
ÖZGEÇMİŞ	113

KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ

6PGD	6-Fosfoglukonat dehidrogenaz
ADP	Adenozin difosfat
AG	Aminoguanidin
ATP	Adenozin trifosfat
BH ₄	Tetrahidrobiyopterin
BSA	Bovine serum albumin
CaM	Kalmodülin
cDNA	Komplementer deoksiribonükleik asit
cGMP	Siklik guanozin monofosfat
DEAE	Dietilaminoetil
DNA	Deoksiribonükleik asit
DTT	1,4-Ditiyotreitol
E	Enzim
EC	Enzim komisyon numarası
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit
EI	Enzim-inhibitör kompleksi
ES	Enzim-substrat kompleksi
ESI	Enzim-substrat-İnhibitör kompleksi
ESR	Elektron spin rezonans
EU	Enzim ünitesi
FAD	Flavin adenin dinüklotid
FMN	Flavin mononüklotid
G6PD	Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz
GR	Glutasyon redüktaz
I	İnhibitör
IC ₅₀	Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
L-Arg	L-arjinin
L-NAME	Nitroarjinin metil ester
L-NMMA	N-monometil L-arjinin

L-NNA	Nitroarjinin
mRNA	Mesajcı RNA
NAD ⁺	Nikotinamidadenindinükleotit (yükseltgenmiş form)
NADH	Nikotinamidadenindinükleotit (indirgenmiş form)
NADP ⁺	Nikotinamidadenindinükleotitfosfat (yükseltgenmiş form)
NADPH	Nikotinamidadenindinükleotitfosfat (indirgenmiş form)
NO	Nitrik oksit
NOHLA	N-omega-hidroksi L-arjinin
NOS	Nitrik oksit sentaz
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PER	Amonyum peroksidisülfat
PMSF	Fenilmetilsulfonilflorid
ROS	Serbest oksijen radikalleri
rpm	Devir/dakika
S	Substrat
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TCA	Trikloroasetikasit
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametilendiamin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Enzimlerin yarışmalı inhibisyonlarının şematik gösterimi.....	6
Şekil 1.2. Enzimlerin yarışmasız inhibisyonlarının şematik gösterimi.....	7
Şekil 1.3. Enzimlerin yarı yarışmalı inhibisyonlarının şematik gösterimi.....	7
Şekil 1.4. Düz kas hücrelerinin gevşemesinde NO'nun rolü	9
Şekil 1.5. NOS enziminin katalizlediği reaksiyon basamakları.....	10
Şekil 1.6. Nitrik oksit sentaz enziminin oksijenaz ve redüktaz bölgeleri arasındaki elektron akışı ve NO biyosentezi	13
Şekil 1.7. L-arjinin analogu NOS inhibitörleri	16
Şekil 1.8. Antibiyotiklerin sınıflandırılma çeşitleri	17
Şekil 1.9. Antibiyotiklerin kimyasal yapılarına göre sınıflandırılması.....	18
Şekil 1.10. Penisilin ilacının molekül yapısı.....	19
Şekil 1.11. Gentamisin ilacının molekül yapısı	19
Şekil 1.12. Amikasin ilacının molekül yapısı	20
Şekil 1.13. Tilozin ilacının molekül yapısı	20
Şekil 1.14 Enrofloksasin ilacının molekül yapısı	21
Şekil 1.15. Ampisilin ilacının molekül yapısı.....	21
Şekil 1.16. Kloramfenikol ilacının molekül yapısı	22
Şekil 1.17. Linkomisin ilacının molekül yapısı	22
Şekil 1.18. Kanamisin ilacının molekül yapısı	23
Şekil 1.19. Oksitetrasiklin ilacının molekül yapısı	23
Şekil 1.20. Seftriakson ilacının molekül yapısı	24
Şekil 1.21. Streptomisin ilacının molekül yapısı	24
Şekil 1.22. Vankomisin ilacının molekül yapısı	25
Şekil 1.23. Sefotaksim ilacının molekül yapısı.....	25
Şekil 1.24. Sefazolin ilacının molekül yapısı.....	26
Şekil 1.25. Sefuroksim ilacının molekül yapısı	26
Şekil 1.26. Ornidazol ilacının molekül yapısı.....	27
Şekil 4.1. Bradford metoduyla hazırlanan proteinlerin kantitatif tayini için kullanılan standart grafik.....	51

Şekil 4.2. Sığır böbreğinden 2'5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırılan NOS enziminin elüsyon grafiği	52
Şekil 4.3. Sığır trombositlerinden 2'5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırılan NOS enziminin elüsyon grafiği	53
Şekil 4.4. SDS- PAGE fotoğrafı; A ve E standart proteinler (domuz myosin 200 kDa, β-galaktozidaz 116 kDa, fosforilaz 97,4 kDa, sığır serum albumini 66 kDa, ovalbumin 45 kDa, sığır eritrosit karbonik anhidrazı 29 kDa), B sığır böbreği homojenatı, C ve D sığır böbreğinden saflaştırılan NOS enzimi.....	54
Şekil 4.5. Sığır trombositlerinden saflaştırılan NOS enzimi için SDS- PAGE fotoğrafı; *A standart proteinler; (250 kDa, 150 kDa, 100 kDa, 70 kDa, 50 kDa, 40 kDa, 30 kDa ve 20 kDa), B afinite kromatografisi sonrası	54
Şekil 4.6. Sığır böbreğinden saflaştırılan NOS enziminin SDS-PAGE yöntemiyle molekül kütlesi tayininde kullanılan standart grafik (bNOS için $R_f=0,261$)	55
Şekil 4.7. Sığır trombositlerinden saflaştırılan NOS enziminin SDS-PAGE yöntemiyle molekül kütlesi tayininde kullanılan standart grafik (tNOS için $R_f=0,268$) .	56
Şekil 4.8. Sığır böbreğinden saflaştırılan NOS enziminin molekül kütlesi tayini için kullanılan jel filtrasyon kromatografisi elüsyon grafiği	57
Şekil 4.9. Sığır trombositlerinden saflaştırılan NOS enziminin molekül kütlesinin tayininde kullanılan jel filtrasyon kromatografisi elüsyon grafiği	57
Şekil 4.10. Sığır böbrek ve trombositlerinden saflaştırılan NOS enzimlerinin molekül kütlelerinin tayininde kullanılan standart grafik	58
Şekil 4.11. Sığır böbreğinden saflaştırılan NOS enziminin farklı tampon çözeltiler içerisinde gösterdiği aktivite değerlerinden elde edilen grafik	60
Şekil 4.12. Sığır trombositlerinden saflaştırılan NOS enziminin değişik tampon çözeltileri içerisinde gösterdiği aktivite değerlerinden elde edilen grafik	61
Şekil 4.13. Sığır böbreğinden saflaştırılan NOS enzimi için farklı iyonik şiddetlerde elde edilen aktivite değerlerinin grafiği (Çizelge ve grafikte kuvvet içi iyonik şiddet konsantrasyonları kullanıldı)	62
Şekil 4.14. Sığır trombositlerinden saflaştırılan NOS enzimi için farklı iyonik şiddetlerde elde edilen aktivite değerlerinin grafiği (Çizelge ve grafikte kuvvet içi iyonik şiddet konsantrasyonları kullanıldı)	63

Şekil 4.15. Sığır böbreğinden saflaştırılan NOS enzimi için farklı sıcaklık değerlerinde elde edilen aktivite değerlerinin grafiği	65
Şekil 4.16. Sığır trombositlerinden saflaştırılan NOS enzimi için farklı sıcaklık değerlerinde elde edilen aktivite değerlerinin grafiği	66
Şekil 4.17. Sığır böbreğinden saflaştırılan NOS enziminin farklı pH'lardaki potasyum fosfat tampon çözeltileri içerisindeki aktivitelerinin grafiği	68
Şekil 4.18. Sığır böbreğinden saflaştırılan NOS enziminin farklı pH'lardaki Tris-HCl tampon çözeltileri içerisindeki aktivitelerinin grafiği	69
Şekil 4.19. Sığır böbreğinden saflaştırılan NOS enziminin farklı pH'lardaki Glisin-NaOH tampon çözeltileri içerisindeki aktivitelerinin grafiği.....	70
Şekil 4.20. Sığır trombositlerinden saflaştırılan NOS enziminin farklı pH'lardaki Potasyum fosfat tampon çözeltileri içerisindeki aktivitelerinin grafiği	71
Şekil 4.21. Sığır trombositlerinden saflaştırılan NOS enziminin farklı pH'lardaki Tris-HCl tampon çözeltileri içerisindeki aktivitelerinin grafiği	72
Şekil 4.22. Sığır trombositlerinden saflaştırılan NOS enziminin farklı pH'lardaki Glisin-NaOH tampon çözeltileri içerisindeki aktivitelerinin grafiği	73
Şekil 4.23. Sığır böbreğinden saflaştırılan NOS enziminin NADPH kofaktörü için K_m ve V_{max} değerlerinin bulunması amacıyla çizilen lineweaver-burk grafiği...	74
Şekil 4.24. Sığır böbreğinden saflaştırılan NOS enziminin sitokrom-c substratı için K_m ve V_{max} değerlerinin bulunması amacıyla çizilen lineweaver-burk grafiği...	75
Şekil 4.25. Sığır trombositlerinden saflaştırılan NOS enziminin NADPH kofaktörü için K_m ve V_{max} değerlerinin bulunması amacıyla çizilen lineweaver-burk grafiği	75
Şekil 4.26. Sığır trombositlerinden saflaştırılan NOS enziminin sitokrom-C substratı için K_m ve V_{max} değerlerinin bulunması amacıyla çizilen lineweaver-burk grafiği	76
Şekil 4.27. Sığır böbrek NOS enzim aktivitesine etki eden maddelerin yokluğunda enzim aktivitesindeki değişimlerin grafiksel gösterimi	77
Şekil 4.28. Sığır trombosit NOS enzim aktivitesine etki eden maddelerin yokluğunda NOS enzim aktivitesindeki değişimlerin grafiksel gösterimi	78
Şekil 4.29. Sığır böbreğinden saflaştırılan nitrik oksit sentaz enzim aktivitesi üzerine Gentamisin ilacının etkisini gösteren IC_{50} grafiği.....	80

Şekil 4.30. Sığır böbreğinden saflaştırılan nitrik oksit sentaz enzim aktivitesi	
Enrofloksasin ilacının üzerine etkisini gösteren IC ₅₀ grafiği	81
Şekil 4.31. Sığır böbreğinden saflaştırılan nitrik oksit sentaz enzim aktivitesi üzerine	
Ampisilin ilacının etkisini gösteren IC ₅₀ grafiği	82
Şekil 4.32. Sığır böbreğinden saflaştırılan nitrik oksit sentaz enzim aktivitesi üzerine	
Kloramfenikol ilacının etkisini gösteren IC ₅₀ grafiği.....	83
Şekil 4.33. Sığır böbreğinden saflaştırılan nitrik oksit sentaz enzim aktivitesi üzerine	
Kanamisin ilacının etkisini gösteren IC ₅₀ grafiği.....	84
Şekil 4.34. Sığır böbreğinden saflaştırılan nitrik oksit sentaz enzim aktivitesi üzerine	
Streptomisin ilacının etkisini gösteren IC ₅₀ grafiği.....	85
Şekil 4.35. Sığır böbreğinden saflaştırılan nitrik oksit sentaz enzim aktivitesi üzerine	
Vankomisin ilacının etkisini gösteren IC ₅₀ grafiği.....	86
Şekil 4.36. Sığır böbreğinden saflaştırılan nitrik oksit sentaz enzim aktivitesi üzerine	
Sefazolin ilacının etkisini gösteren IC ₅₀ grafiği	87
Şekil 4.37. Sığır trombositlerinden saflaştırılan nitrik oksit sentaz enzim aktivitesi	
üzerine Ornidazol ilacının etkisini gösteren IC ₅₀ grafiği	88
Şekil 4.38. Sığır trombositlerinden saflaştırılan nitrik oksit sentaz enzim aktivitesi	
üzerine Linkomisin ilacının etkisini gösteren IC ₅₀ grafiği.....	89
Şekil 4.39. Sığır trombositlerinden saflaştırılan nitrik oksit sentaz enzim aktivitesi	
üzerine Amikasin ilacının etkisini gösteren IC ₅₀ grafiği.....	90
Şekil 4.40. Sığır trombositlerinden saflaştırılan nitrik oksit sentaz enzim aktivitesi	
üzerine Oksitetrasiklin ilacının etkisini gösteren IC ₅₀ grafiği.....	91

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Kofaktör olarak metal iyonlarını kullanan bazı enzimler	3
Çizelge 1.2. Enzimlerin ayrıldıkları ana gruplar	4
Çizelge 1.3. Nitrik oksit sentaz enzim ailesi	14
Çizelge 4.1. Sığır böbreğinden saflaştırılan NOS enzimi için elde edilen saflaştırma sonuçları	52
Çizelge 4.2. Sığır trombositlerinden saflaştırılan NOS enzimi için elde edilen saflaştırma sonuçları	53
Çizelge 4.3. Saflaştırılan NOS enzimleri için molekül kütlesi belirleme çalışmalarının sonuçları	58
Çizelge 4.4. Sığır böbreğinden saflaştırılan NOS enziminin 50 mM KH_2PO_4 tampon çözeltileri (pH 5,0-8,0 aralığında) kullanılarak elde edilen aktivite değerleri	59
Çizelge 4.5. Sığır böbreğinden saflaştırılan NOS enziminin 50 mM Tris-HCl tampon çözeltileri (pH 7,5-9,0 aralığında) kullanılarak elde edilen aktivite değerleri	59
Çizelge 4.6. Sığır böbreğinden saflaştırılan NOS enziminin 50 mM Glisin-NaOH tampon çözeltileri (pH 9,0-10,5 aralığında) kullanılarak elde edilen aktivite değerleri	59
Çizelge 4.7. Trombosit NOS enziminin 50 mM KH_2PO_4 tampon çözeltileri (pH 5,0-8,0 aralığında) kullanılarak elde edilen aktivite değerleri	60
Çizelge 4.8. Trombosit NOS enziminin 50 mM Tris-HCl tampon çözeltileri (pH 7,5-9,0 aralığında) kullanılarak elde edilen aktivite değerleri	60
Çizelge 4.9. Trombosit NOS enziminin 50 mM Glisin-NaOH tampon çözeltileri (pH 9,0-10,5 aralığında) kullanılarak elde edilen aktivite değerleri	61
Çizelge 4.10. Sığır böbreğinden saflaştırılan NOS enziminin farklı iyonik şiddetlerde KH_2PO_4 tampon çözeltileri kullanılarak elde edilen aktivite değerleri	62
Çizelge 4.11. Sığır trombositlerinden saflaştırılan NOS enziminin farklı iyonik şiddetlerde KH_2PO_4 tampon çözeltileri kullanılarak elde edilen aktivite değerleri	63

Çizelge 4.12. Sığır böbreğinden saflaştırılan NOS enzimi için 0-60°C sıcaklık aralığında ölçülen enzim aktivite değerleri	64
Çizelge 4.13. Sığır böbreğinden saflaştırılan NOS enzimi için 0-60°C sıcaklık aralığında elde edilen Q_{10} değerleri	65
Çizelge 4.14. Sığır trombositlerinden saflaştırılan NOS enzimi için 0-60°C sıcaklık aralığında ölçülen enzim aktivite değerleri	66
Çizelge 4.15. Sığır trombositlerinden saflaştırılan NOS enzimi için 0-60°C sıcaklık aralığında elde edilen Q_{10} değerleri	67
Çizelge 4.16. Sığır böbreğinden saflaştırılan NOS enziminin farklı pH'lardaki potasyum fosfat tampon çözeltileri içerisinde farklı zaman aralıklarında ölçülen aktivite değerleri	68
Çizelge 4.17. Sığır böbreğinden saflaştırılan NOS enziminin farklı pH'lardaki Tris-HCl tampon çözeltileri içerisinde farklı zaman aralıklarında ölçülen aktivite değerleri	69
Çizelge 4.18. Sığır böbreğinden saflaştırılan NOS enziminin farklı pH'lardaki Glisin-NaOH tampon çözeltileri içerisinde farklı zaman aralıklarında ölçülen aktivite değerleri	70
Çizelge 4.19. Sığır trombositlerinden saflaştırılan NOS enziminin farklı pH'lardaki potasyum fosfat tampon çözeltileri içerisinde farklı zaman aralıklarında ölçülen aktivite değerleri	71
Çizelge 4.20. Sığır trombositlerinden saflaştırılan NOS enziminin farklı pH'lardaki Tris-HCl tampon çözeltileri içerisinde farklı zaman aralıklarında ölçülen aktivite değerleri	72
Çizelge 4.21. Sığır trombositlerinden saflaştırılan NOS enziminin farklı pH'lardaki Glisin-NaOH tampon çözeltileri içerisinde farklı zaman aralıklarında ölçülen göre aktivite değerleri	73
Çizelge 4.22. Saflaştırılan böbrek ve trombosit NOS enzimlerinin NADPH ve Sitokrom-c için elde edilen K_m ve V_{max} değerleri	76
Çizelge 4.23. Sığır böbrek NOS enzim aktivitesine etki eden maddelerin yokluğunda enzim aktivitesindeki değişimler	77
Çizelge 4.24. Sığır trombosit NOS enzim aktivitesine etki eden maddelerin yokluğunda enzim aktivitesindeki değişimler	78

Çizelge 4.25. Gentamisin ilacının sığır böbreğinden saflaştırılan NOS enzim aktivitesi üzerine etkisi	79
Çizelge 4.26. Enrofloksasin ilacının sığır böbreğinden saflaştırılan NOS enzim aktivitesi üzerine etkisi	80
Çizelge 4.27. Ampisilin ilacının sığır böbreğinden saflaştırılan NOS enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	81
Çizelge 4.28. Kloramfenikol ilacının sığır böbreğinden saflaştırılan NOS enzim aktivitesi üzerine etkisi	82
Çizelge 4.29. Kanamisin ilacının sığır böbreğinden saflaştırılan NOS enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	83
Çizelge 4.30. Streptomisin ilacının sığır böbreğinden saflaştırılan NOS enzim aktivitesi üzerine etkisi	84
Çizelge 4.31. Vankomisin ilacının sığır böbreğinden saflaştırılan NOS enzim aktivitesi üzerine etkisi	85
Çizelge 4.32. Sefazolin ilacının sığır böbreğinden saflaştırılan NOS enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	86
Çizelge 4.33 Sığır böbreğinden saflaştırılan nitrik oksit sentaz enzim aktivitesi üzerine bazı antibiyotiklerin etkileri.....	87
Çizelge 4.34. Ornidazol ilacının sığır trombositlerinden saflaştırılan NOS enzim aktivitesi üzerine etkisi	88
Çizelge 4.35. Linkomisin ilacının sığır trombositlerinden saflaştırılan NOS enzim aktivitesi üzerine etkisi	89
Çizelge 4.36. Amikasin ilacının sığır trombositlerinden saflaştırılan NOS enzim aktivitesi üzerine etkisi	90
Çizelge 4.37. Oksitetrasiklin ilacının sığır trombositlerinden saflaştırılan NOS enzim aktivitesi üzerine etkisi	91
Çizelge 4.38. Sığır trombositlerinden saflaştırılan nitrik oksit sentaz enzim aktivitesi üzerine bazı antibiyotiklerin etkileri.....	92
Çizelge 5.1. Sığır böbrek dokusundan saflaştırılan NOS enzimi için yapılan çalışmaların toplu sonuçları.....	105
Çizelge 5.2. Sığır trombositlerinden saflaştırılan NOS enzimi için yapılan çalışmaların toplu sonuçları.....	106

1. GİRİŞ

Bilindiği gibi canlı sistemler fonksiyonlarını icra ederlerken beklemeye tahammül edemezler. Örneğin, bir insan elini kaldırırken bir makine gibi yavaş yavaş değil de, bir anda bu fiili gerçekleştirir. Bu hareketini gerçekleştirirken aynı anda başka bir fonksiyonda görebilir, mesela; konuşabilir, bir şeye bakabilir veya yemek yiyebilir. Canlı sistemlerdeki bütün bu işler kimyasal reaksiyonlarla meydana gelir. Zaten böyle olmadığı düşünülürse, insan nefesle aldığı oksijenin hücrelerde kullanıldıktan sonra karbondioksit olarak tekrar dışarıya verilmesi çok zor olurdu. İşte canlılardaki bu reaksiyonları enzim adı verilen protein yapısındaki makromoleküller katalizlerler. Dolayısıyla, biyolojik sistemlerde proteinlerin en önemli fonksiyonlarından biri katalizdir. Enzimler canlı hücreler tarafından sentezlenen ve canlı metabolizmasındaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürün oluşturmada %100'lük bir ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Bilinen en hızlı katalizörler enzimlerdir ve bir reaksiyonun hızını 10^{20} kata kadar hızlandırabilirler. Oysa enzimatik olmayan katalistler için bu oran sadece 10^2 - 10^4 kat kadardır (Keha ve Küfrevioğlu 2005; Campbell and Farrell 2009).

Enzimler, besin moleküllerinin parçalanması, kimyasal enerjinin korunması ve dönüştürülmesi, basit öncüllerden biyolojik makromoleküllerin sentezlenmesi gibi yüzlerce reaksiyonların katalizlenmesini sağlayarak birçok biyokimyasal süreçte kilit rol oynarlar. Biyokimya tarihinde enzim çalışmalarının yeri oldukça geniş ve önemlidir. Biyolojik kataliz olayı ilk olarak 1700'lü yılların sonunda midede etin sindirimi ile ilgili çalışmalarla belirlenmiş ve tanımlanmıştır. Enzim çalışmalarının tıp alanında da çok büyük önem taşıdığı gözden kaçmamaktadır. Enzimlerin kan plazmasındaki, eritrositlerdeki veya doku örneklerindeki aktivitelerinin ölçümü hastalıkların teşhisinde önemli bir yer tutmaktadır. Birçok ilaç ve kimyasal maddeler biyolojik etkilerini enzim aktivitelerini inhibe veya aktive ederek gösterirler. Buna ilaveten enzimler sadece tıpta değil, aynı zamanda kimya endüstrisinde, gıda sektöründe ve tarım alanında yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Nelson and Cox 2004).

Enzimlerin sahip oldukları ortak özellikler şu şekilde sıralanabilir;

- 1) **Aktif bölge:** Enzimler, substratlarına karşı komplementer olan, üç boyutlu, cep ya da çukur şeklinde bir aktif bölgeye sahiptirler. Bu bölge sayesinde enzim substratıyla etkileşerek enzim-substrat (ES) kompleksini oluşturur ve böylece substrat ürüne dönüştürülür.
- 2) **Katalitik etkinlik:** Her enzim için, ürüne dönüştürülen substrat molekülü sayısını ifade eden bir turnover sayısı vardır. Turnover sayısı enzimin katalitik etkinliğinin ifadesidir.
- 3) **Spesifiklik:** Enzimler katalizledikleri kimyasal reaksiyonlarda etkileştikleri substratlarına spesifiktirler.
- 4) **Kofaktör gereksinimi:** Birçok enzim katalitik etkisini gösterebilmek için protein yapısında olmayan gruplara ihtiyaç duyar.
- 5) **Düzenleme:** Hücrenin ihtiyacına göre enzim aktivitesi düzenlenebilir, yani enzimler aktive veya inhibe edilebilirler.
- 6) **Lokalizasyon:** Enzimler, hücre içerisinde reaksiyon için uygun ortamı sağlayacak şekilde spesifik olarak lokalize olurlar (Champe *et al.* 2007).

Proteinlerin sınıflandırılmasında olduğu gibi, enzimleri de basit ve bileşik enzimler olarak sınıflandırmak mümkündür. Basit enzimler katalizleme fonksiyonlarını kendi protein yapılarıyla yerine getirebilirken, bileşik enzimler enzimatik aktiviteleri için protein yapısında olmayan, kofaktör adı verilen gruplara ihtiyaç duyarlar. Bileşik enzimlerin kofaktörsüz kısmına apoenzim, enzim-kofaktör kompleksine ise holoenzim denir. Apoenzim, katalitik olarak inaktiftir. Kofaktörler bazen bir metal iyonu olabildiği gibi, bazen de koenzim adı verilen kompleks bir organik bileşik olabilir. Bazı enzimlerde ise kofaktör enzime kovalent olarak ve sıkı bağlıdır. Böyle kofaktörlere prostetik grup adı verilir (Keha ve Küfrevioğlu 2005).

Enzim yapısına bağlı metal iyonlarının temelde iki çeşit görevi vardır:

- 1) Metal iyonu yapısal bir görev üstlenerek enzim ile substrat arasında köprü görevi görür ve koordinasyon kompleksi oluşumuyla enzim ile substratı birbirine bağlar.
- 2) Bazen de metal iyonunun kendisi katalitik bir işleve sahiptir.

Çizelge 1.1. Kofaktör olarak metal iyonlarını kullanan bazı enzimler (Nelson and Cox 2004)

METAL İYONU	ENZİM
Cu⁺²	Sitokrom oksidaz
Fe⁺² veya Fe⁺³	Sitokrom oksidaz, Katalaz, Peroksidaz
K⁺	Piruvat kinaz
Mg⁺²	Heksokinaz, Glukoz-6-fosfataz, Pirüvat kinaz
Mn⁺²	Arjinaz, Ribonükleotit redüktaz
Mo	Dinitrogenaz
Ni⁺²	Üreaz
Se	Glutatyon peroksidaz
Zn⁺²	Karbonik anhidraz, Alkol dehidrogenaz, Karboksi peptidaz A ve B

Birçok enzim, kendi substratının, katalizlediği reaksiyon adının veya kelimenin sonuna “-az” eki getirilerek adlandırılır. Örneğin; üreaz ürenin hidrolizini ve DNA polimeraz DNA oluşturmak için nükleotidlerin polimerizasyonu katalizler. Bazı enzimler katalizledikleri spesifik reaksiyon bilinmeden önce, geniş bir işlev gösterdikleri fonksiyonlara göre isimlendirilmiştir. Örneğin, Pepsin sindirim siteminde rol aldığı için ve lizozim bakteriyel hücre duvarlarını parçaladığı için bu isimleri almışlardır. Geleneksel isimlendirmede, bazen aynı enzimin iki veya daha fazla adı olduğu gözlemlenirken, bazen de iki farklı enzimin aynı ada sahip olduğu görülmüştür. Bu tip karışıklıkları önlemek amacıyla biyokimyacılar, uluslararası bir anlaşma ile, enzimlerin adlandırması ve sınıflandırması için bir sistem oluşturmuşlardır. Bu sistem, enzimleri

altı sınıfa bölmektedir ve her bir sınıf enzimin katalizlediği reaksiyon türünü belirten alt sınıflar içermektedir. Her bir enzimin dört sınıf rakamdan oluşan bir sistematik sınıflandırma ismi vardır. Örnek olarak, E.C.2.7.1.1. kod numarasında 2, bu enzimin bir transferaz enzimi olduğunu; 7, bir fosfat grubu transfer edildiğini; 1, fosfat transferinin alkol grubuna olduğunu ve son 1 rakamı bu enzimin alkol grubuna fosfat transferi sağlayan enzimler arasında ilk sırada yer aldığını belirtmektedir. Burada bahsedilen enzim geleneksel adıyla heksokinaz olarak bilinen ATP:D-heksoz-6-fosfotransferaz enzimidir.

Çizelge 1.2. Enzimlerin ayrıldıkları 6 ana grup (Nelson and Cox 2004)

Numara	Sınıf	Katalizlediği reaksiyon çeşidi
1	Oksidoredüktazlar	Elektron transferi (Hidrit iyonu ve Hidrojen atomu)
2	Transferazlar	Grup transferi reaksiyonları
3	Hidrolazlar	Fonksiyonel grupların suya transferi, hidroliz reaksiyonları
4	Liyazlar	Çift bağlara katılım veya çift bağ oluşumu reaksiyonları
5	İzomerazlar	İzomerik formların oluşumu reaksiyonları
6	Ligazlar	ATP veya GTP yardımıyla iki molekülün bağlanması reaksiyonları

Enzimlerin üç boyutlu yapıları ve aktiviteleri üzerinde gerçekleştirilen çalışmalar oldukça önemli bir yere sahiptir. Özellikle genetik bozukluklar sonucu ortaya çıkan bir ya da birden fazla enzimin eksikliği birçok önemli hastalığın oluşumuna sebep olabilmektedir. Bazen bir enzimin aşırı aktivitesi de metabolik hastalıklara sebep olabilmektedir. (Nelson and Cox 2004).

Enzimlerin bir hücre veya bir dokudan izolasyonu oldukça zor bir işlemdir. Buna rağmen bugüne kadar birçok enzim kısmen saflaştırılmış veya tamamen saf olarak elde

edilmiştir. Yapısının büyük çoğunluğunu proteinlerin oluşturduğu enzimler, bulundukları ortamdaki şartların değişmesine karşı oldukça hassastırlar. Enzimler, biyolojik aktivitelerini sadece belirli pH ve sıcaklık aralığında gösterebilirler. Bu sebeple enzim saflaştırma çalışmaları oldukça dikkat gerektiren çalışmalardır. Enzim aktivitesine, başka bir deyişle enzimlerin reaksiyon hızlarına etki eden faktörler; substrat konsantrasyonu, enzim konsantrasyonu, pH, sıcaklık, iyonik şiddet, varsa kofaktör konsantrasyonu, inhibitör veya aktivatörlerin varlığı şeklinde sıralanabilir (Keha ve Küfrevioğlu 2005).

Saflaştırılma işlemleri sırasında enzimlerin;

- a) molekül büyüklükleri
- b) çözünürlükleri
- c) elektriksel yükleri
- d) adsorbsiyonları
- e) ve diğer moleküllere karşı biyolojik afiniteleri

gibi davranışlarındaki farklılıklardan yararlanılarak saflaştırılmaları gerçekleştirilmektedir.

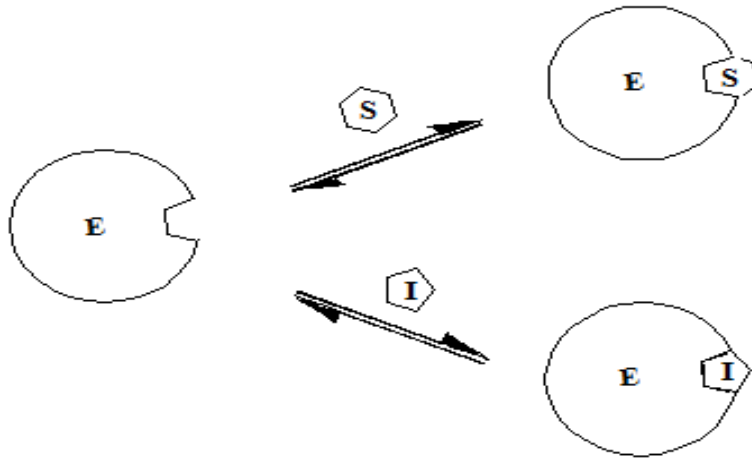
Enzimlerin kısmen saflaştırılmalarında veya tamamen saf olarak elde edilmelerinde en sık kullanılan metotların başında;

- 1) Amonyum sülfat çöktürmesi
 - 2) Jel filtrasyon kromatografisi
 - 3) İyon değişim kromatografisi
 - 4) Afinite kromatografisi
 - 5) Hidrofobik etkileşim kromatografileri
- gelmektedir.

Biyokimya alanında enzim-inhibitör etkileşimleri çalışmalarının ayrı bir önemi vardır. Öyle ki, bu tip çalışmalar enzim mekanizmaları ve bazı metabolik yolların

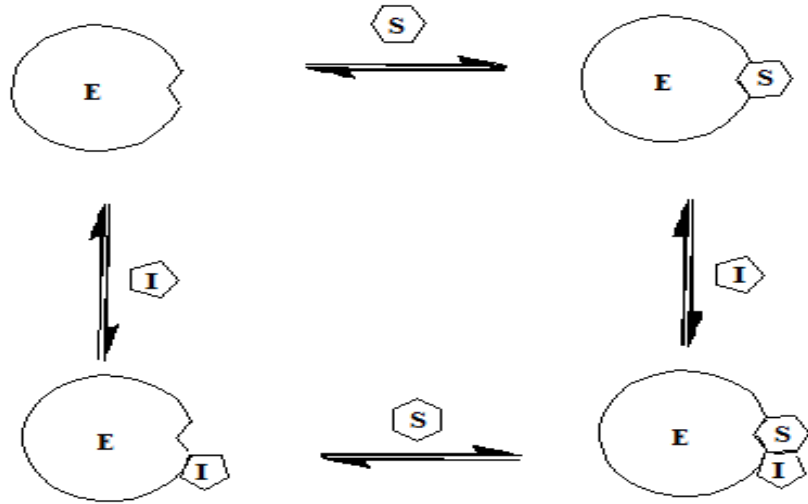
aydınlatılması konusunda kritik bilgiler verebilmektedir. İnhibitörler, enzim aktivitelerini hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak azaltan ve hatta durduran bileşiklerdir. Enzim aktivitelerinin inhibitörler tarafından azaltılması veya tamamen durdurulması olayına ise inhibisyon adı verilir. Enzim inhibisyonu geri dönüşümlü (reversible) veya geri dönüşümsüz (irreversible) olabilir. Geri dönüşümsüz inhibisyonda inhibitör enzime kovalent olarak bağlanır veya enzimle zor ayrışabilen bir kompleks oluşturur. Geri dönüşümlü inhibisyonda ise enzimle inhibitörün etkileşimi bir denge reaksiyonu şeklindedir.

Geri dönüşümlü inhibisyonun en yaygın tipi yarışmalı (kompetitif) inhibisyonudur. Yarışmalı inhibitörler yapı olarak substrata benzerler, aynen substrat gibi enzimin aktif bölgesine bağlanarak inhibisyona sebep olurlar. Bu tip inhibitörler, enzimin aktif bölgesine bağlanma konusunda substratla yarış halindedir. Substrat konsantrasyonunu arttırarak böyle bir inhibisyonun etkisi ortadan kaldırılabilir.



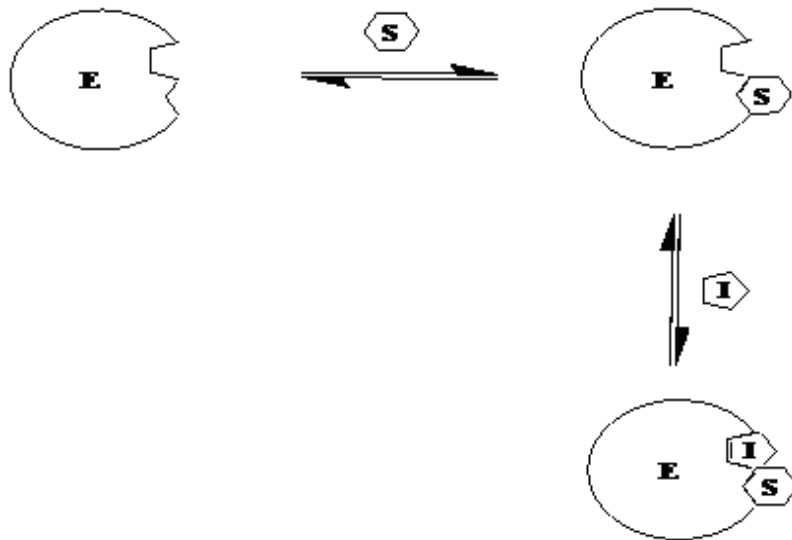
Şekil 1.1. Enzimlerin yarışmalı inhibisyonlarının şematik gösterimi

Yine dönüşümlü bir tip olan yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyonda inhibitör, enzimin aktif bölgesi dışında bir yere bağlanır. İnhibitör enzimin katalizleme gücünü ifade eden turnover sayısını düşürerek etki gösterir. Burada, substrat ve inhibitör arasında bir yarışma yoktur. Bu yüzden, bu tip bir inhibisyon substrat konsantrasyonunu arttırmakla kaldırılamaz.



Şekil 1.2. Enzimlerin yarışmasız inhibisyonlarının şematik gösterimi

Diğer bir dönüşümlü inhibisyon çeşidi olan yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyonda, inhibitör serbest enzime değil enzim-substrat (ES) kompleksine bağlanmaktadır. Yarı yarışmalı bir inhibitör varlığında substrat konsantrasyonunun artırılmasıyla inhibisyon artabilir. Bu inhibisyon tipi tek substratlı reaksiyonlarda nadiren görülür, iki substratlı reaksiyonlarda ise yaygındır (Nelson and Cox 2004; Keha ve Küfrevioğlu 2005).



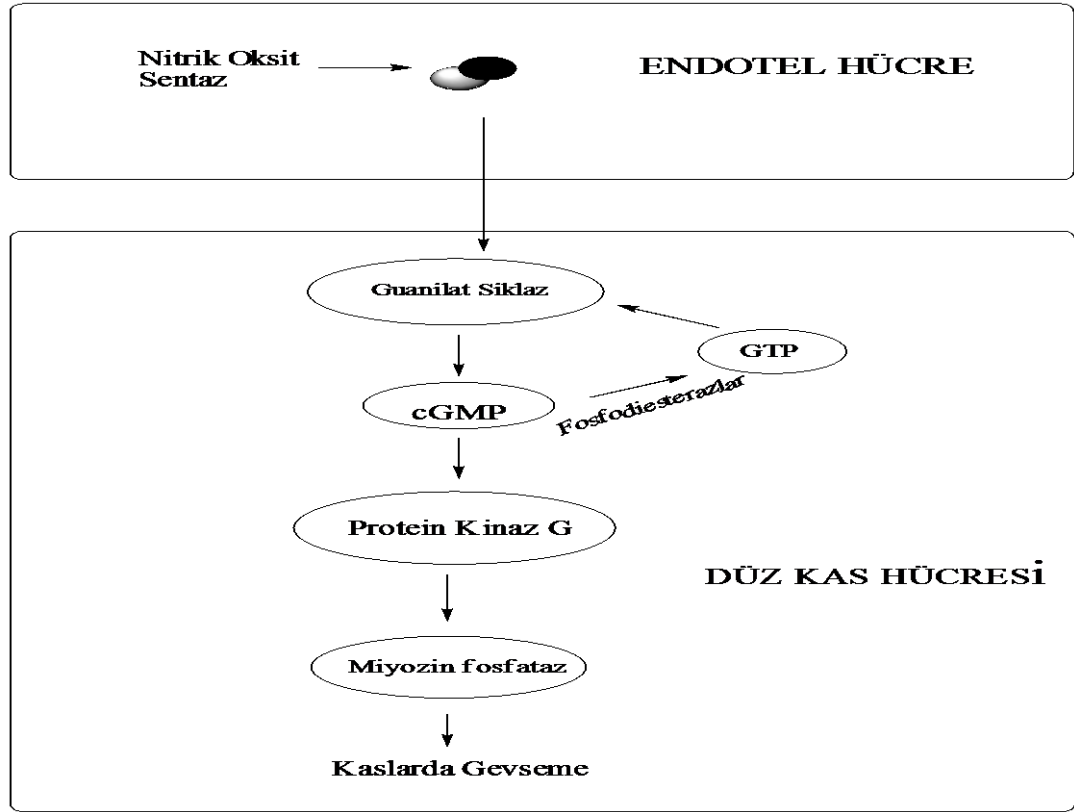
Şekil 1.3. Enzimlerin yarı yarışmalı inhibisyonlarının şematik gösterimi

Nitrik oksit (NO); nitrik oksit sentaz enzim ailesi (NOS; EC 1.14.13.39) olarak adlandırılan enzimler tarafından sentezlenir ve memelilerde önemli bir sinyal molekülüdür (Stuehr 1997; Mayer and Hemmens 1997; Pfeiffer *et al.* 1999).

Memelilerde azot oksitlerin oluşumu ile ilgili ilk kanıt ratlarda nitrat oluşumuyla ilgili yapılan deneylerle elde edilmiştir (Green *et al.* 1981). Memeli hücrelerin azot oksitleri sentezleyebilmeleri ile ilgili bu önemli buluş 1985 yılında makrofajların lipopolisakkaritler yardımıyla önemli miktarlarda nitrit (NO_2^-) ve nitrat (NO_3^-) oluşturarak indüklenbildiğini ortaya çıkardı (Stuehr and Marletta 1985). Daha sonra yapılan çalışmalar L-arjininin bu yolun substratı olduğunu ve reaksiyon sonucu L-sitrülin oluştuğunu ortaya çıkarmıştır (Iyengar *et al.* 1987; Hibbs *et al.* 1987). Bir yıl sonra NO'nun nitrit ve nitrat oluşumundaki ilk ürün olduğu belirlenmiştir (Marletta *et al.* 1988).

Nitrik oksit, birçok sistemlerde önemli bir fizyolojik arabulucu olarak görev alır (Moncada *et al.* 1991a). Nitrik oksit, hücre içi-hücrelerarası etkileşimler, homeostatik mekanizma ve bazı fizyolojik roller gibi birçok hücre fonksiyonlarını etkilemektedir (Bredt *et al.* 1992; Oswald *et al.* 1994).

NO; sekonder bir mesajcı molekül olan guanilat siklaz'a bağlanır ve cGMP üretimini artırır. cGMP; hücrelerarası etkileşimini cGMP-kapılı iyon kanalları gibi çeşitli cGMP reseptör proteinleri yardımıyla gerçekleştirir. NO böylelikle; artan cGMP konsantrasyonu hücreye Ca^{+2} girişini inhibe eder ve hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunu azaltır, potasyum kanallarını aktive ederek hiper polarizasyona ve gevşemeye sebep olur, cGMP bağımlı protein kinazı uyarır, miyozin hafif zincirini defosforile eden enzimi aktive eder ve böylelikle kaslarda gevşemeye sebep olur (Lincoln and Cornwell 1993; Friebe and Koesling 2003).



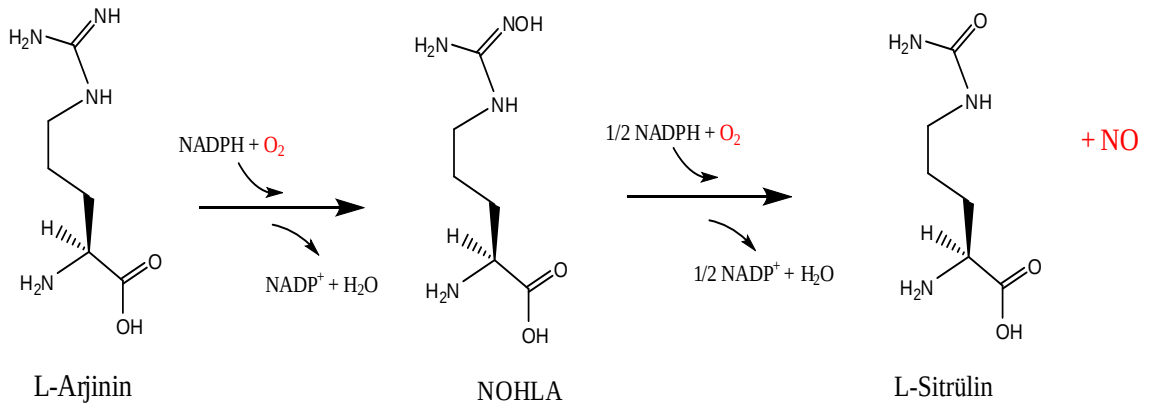
Şekil 1.4. Düz kas hücrelerinin gevşemesinde NO'nun rolü

Nitrik oksit, makrofajlarda (Hibbs *et al.* 1987), nötrofillerde (Condino-Neto *et al.* 1993), endotel hücrelerde (Palmer *et al.* 1987), beyincikte (Bredt and Snyder 1990), ve hepatositlerde (Curran *et al.* 1989) sentezlenmektedir. Makrofajlarda nitrik oksit sentaz enziminin kısmi saflaştırılması ile enzimin reaksiyon mekanizması ve karakteristik özellikleri çalışılmıştır (Marletta *et al.* 1988).

NO molekülünün sentezi ve etkileri ile ilgili araştırmalar, bu molekülün endojen olarak üretilen bir biyomolekül olduğunun anlaşılmasından sonra yoğunlaşmıştır. 1988 yılında, nitrik oksitin merkezi sinir sisteminde haberci bir molekül olarak işlev gördüğü bulunmuştur. 1989 yılında nitrik oksit'i sentezleyen enzimin (nitrik oksit sentaz) varlığına rastlanılmış ve bir yıl sonra ise bu enzim beyin homojenatlarından saflaştırılmıştır. Kısa sürede NOS enziminin cDNA'sı klonlanmış ve enzimin yapısal ve katalitik özellikleri aydınlatılmıştır. 80'li yılların sonunda konuyla ilgili araştırmaların

sayısı 40-50 ile ifade edilirken bu sayı 2000’li yıllarda onbinleri aşmıştır (Kılınç ve Kılınç 2003).

NOS enzimi; L-arjinin’in guanidino azotunun oksitlenmesi reaksiyonunu katalizleyerek nitrik oksit oluşumunu sağlar. L-arjinin’in L-sitrüline dönüşümü her defasında oksijen ve NADPH’nin kullanıldığı iki basamakta gerçekleşir ve birinci basamağın sonunda N^o-hidroksi-L-arjinin (NOHLA) ara ürünü oluşur. Nitrik oksit’in biyosentez reaksiyonunun her iki basamağı da birer monooksijenaz aktivitesi ile oluşmaktadır. NOS enzimi tarafından katalizlenen reaksiyonda 2 mol oksijen ve 1,5 mol NADPH kullanılarak 1 mol arjininden 1 mol sitrülün meydana gelmektedir. NO’nun yapısındaki oksijen atomunun kaynağı, arjinin amino asidine ilk monooksijenaz aktivitesi ile katılan atomdur. İkinci monooksijenaz reaksiyonu ile kullanılan oksijen atomu ise sitrülünün yapısındaki oksijen atomunun kaynağıdır (Kılınç ve Kılınç 2003; Stuehr *et al.* 1991a; Stuehr *et al.* 1991b).



Şekil 1.5. NOS enziminin katalizlediği reaksiyon basamakları

NO, NOS enzimleri tarafından L-arjinin amino asidinden sentezlenir. Şimdiye kadar üç nitrik oksit sentaz (NOS) izoformu belirlenmiştir: konstitütif olanlar izoform-I ve izoform-III, indüklenbilir NOS izoform-II’dir (Griffith and Stuehr 1995).

İzoform-I başlıca beyinde eksprese olur ve ilk olarak sıçan beyininden saflaştırılmıştır. Literatürde bu enzim bNOS (beyin NO sentaz), cNOS (konstitütif veya Ca^{+2} bağımlı NO sentaz), bcNOS (her ikisinin bileşimi) veya nNOS (nöronal NO sentaz) olarak da adlandırılmaktadır. İzoform-I ayrıca beyin ve nöronlar dışında farklı doku ve hücrelerde de salgılanmaktadır. Beyinde endotelial enzim de (izoform-III) salgılanmaktadır ve Ca^{+2} bağımlıdır. Beyin nöronal NOS oldukça çözünebilir bir enzimdir ve sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE) 150-160kDa civarında bant vermektedir (Bredt and Snyder 1990; Schmidt *et al.* 1991; Mayer *et al.* 1990). NO sentaz izoform-II konstitütif olarak salgılanmaz, fakat makrofajlarda ve diğer hücrelerde lipopolisakkarit ve/veya sitokin, enzimin bu izoformunun indüklenmesini uyarır (Stuehr *et al.* 1991a; Hevel *et al.* 1991). NO sentaz izoform-III endotel hücrelerde eksprese olur. Literatürde bu enzim eNOS veya ecNOS olarak da adlandırılmaktadır. (Förstermann *et al.* 1991).

Konstitütif NOS enzimlerinin başlıca özellikleri şöyle sıralanabilir;

- 1- Ca^{+2} veya kalmodülin bağımlıdır.
- 2- NADPH bağımlı, P450 benzeri hemoproteinlerdir.
- 3- Hücre içi yerleşimleri sitoplazma içerisinde (nNOS) veya zara bağlıdır (eNOS).
- 4- Sentezlenen NO kısa ömürlüdür.
- 5- Düşük aktivitelidirler (pmol NO/mg protein).
- 6- L-arjinin analogları tarafından inhibe edilirler.
- 7- Aktiviteleri glukokortikoidlerden etkilenmez (Kılınç ve Kılınç 2003).

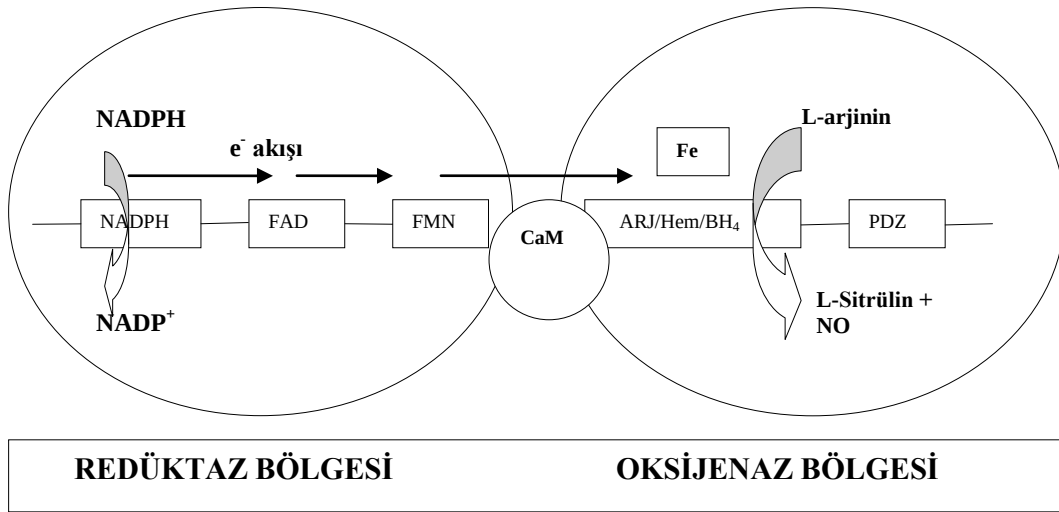
İndüklenebilir NOS enziminin özellikleri ise şöyle sıralanabilir;

- 1- Aktivitesi kalsiyuma bağlı değildir. Kalmodülin enzime sıkı sıkıya bağlıdır.
- 2- NADPH bağımlı, P450 benzeri hemoproteinlerdir.
- 3- Sitoplazmik bir enzimdir.
- 4- Uzun süreli NO sentezinin katalizlenmesini sağlar
- 5- Yüksek aktivitelidir (nmol NO/mg protein).

- 6- L-arjinin analogları tarafından inhibe edilirler.
- 7- Glukokortikoidler tarafından inhibe edilirler.
- 8- Sentezlenmeleri, uygun indükleyicilerle uyarılmaları ile gerçekleşir (Kılınç ve Kılınç 2003).

NOS enzim ailesinin üç izoform içerdiğini belirtmiştik. Bu enzimler kuvvetli bir homoloji göstermektedirler ve dimer yapıdadırlar; her bir monomer bir redüktaz ve moleküler oksijenin önemini ortaya koyan bir oksijenaz bölgesi içermektedir (Govers and Rabelink 2001). Redüktaz bölgesi flavin adenin dinükleotid (FAD), flavin mononükleotid (FMN) ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) için bağlanma bölgeleri içerir. Oksijenaz bölgesi ise L-arjinin ve tetrahidrobiyopterin (BH₄) için bağlanma bölgeleri ve bir hem grubu içerir. Ayrıca bu iki bölge arasında elektronları redüktaz bölgesinden oksijenaz bölgesine aktaran bir kalmodülin (CaM) bağlanma bölgesi vardır (Crane *et al.* 1997). Nöronal ve endotelial NOS izoformları, aktivasyonları için hücre içi Ca⁺² iyonu konsantrasyonuna bağımlı olmaları yönüyle indüklenebilir NOS izoformundan ayrılırlar (Bredt and Snyder 1990). İndüklenebilir NOS izoformu ise aktivasyonu için Ca⁺² iyonu konsantrasyonu artışına ihtiyaç duymaz ve kalmodülin kompleksi enzime sıkı bir şekilde bağlıdır (Nathan and Xie 1994).

NOS enziminin katalizlediği reaksiyon enzimin hem grubunu içeren oksijenaz bölgesinde meydana gelir ve tetrahidrobiyopterin bu olayda substratın ürüne dönüşümü için gerekli elektron ve proton transferini sağlayan önemli bir moleküldür. NOS enziminin hem grubu, sitokrom P450'deki gibi aktif haldeki demir penta yerleşimlidir ve oksijen hem grubuna altıncı ligand olarak bağlanır. Bu bölge ayrıca enzimin substratı olan arjinin ve ara ürün N-hidroksi arjinin için bağlanma bölgeleri içerir. Reaksiyon esnasında NADPH'ın elektronları redüktaz bölgesindeki FAD ve FMN'ye aktarılır. Bu iki bölge arasında elektronların aktarımında kalmodülin önemli rol oynar (Schmidt *et al.* 2001; Hurshman and Marletta 2002; Sørli *et al.* 2003)



Şekil 1.6. Nitrik oksit sentaz enziminin oksijenaz ve redüktaz bölgeleri arasındaki elektron akışı ve NO biyosentezi (Zhou and zhu 2009)

3 farklı NOS izoformundan ikisi (nöronal NOS, nNOS; endotelial NOS, eNOS) konstitütif olarak ekspresyon gösterirken, üçüncü izoformun (indüklenebilir NOS, iNOS) ekspresyonu ise bağışıklık sisteminin uyarılması ile gerçekleşir. Her bir izoform farklı gen lokuslarına sahip olup, nükleotid dizileri %60 oranında benzerlik gösterir (Förstermann *et al.* 1995, Michel and Feron 1997). Enzim aktiviteleri ise fosforilasyon ve Ca^{+2} bağlayıcı protein olan kalmodülin tarafından düzenlenir. iNOS ise daimi olarak kalmodülin molekülü barındırdığından bu izoformun aktivitesi düşük sitoplazmik Ca^{+2} seviyelerinde de görülmektedir (Mohan *et al.* 2004).

Ayrıca bu üç NOS izoformunun yanı sıra mtNOS (Mitokondriyal NOS) olarak adlandırılan yeni bir NOS tipi daha tanımlanmaya başlanmıştır. mtNOS'un kalsiyum bağımlı olduğu, mitokondrilerin enerji düzenlenmesinde rol aldığı ve uyarıldığında mitokondriyal matrikste asitleşmeye ve mitokondriyal membran potansiyelinde düşmeye yol açtığı gözlenmiştir (Kılınç ve Kılınç 2003).

Nitrik oksit (NO); damarlarda ve merkezi sinir sisteminde guanilil siklazı uyarıcı bir sinyal molekülü görevi üstlenir (Furchgott and Vanhoutte 1989; Ignarro 1991). Şimdiye dek, memelilerde L-argininin, L-sitrüline ve NO molekülüne dönüşümü reaksiyonunu

katalizleyen 3 farklı NOS enzimi bulunmuştur (eNOS, nNOS ve iNOS). Aynı reaksiyonu katalizleyen bu üç izoenzim, molekül kütleleri, hücre içi dağılımları ve düzenleme mekanizmaları gibi bazı özellikler bakımından farklılıklar göstermektedirler (Mayer *et al.* 1989; Busse and Mülsch 1990; Förstermann *et al.* 1991).

Çizelge 1.3. Nitrik oksit sentaz enzim ailesi

İzoform Adı	Lokalizasyonu	Molekül Kütleşi (kDa)	Düzenlenme mekanizması	Fonksiyonu
nNOS	Sinir dokusu, iskelet kası	160	Ca ⁺² bağımlı	Hücrelerarası iletişim
iNOS	Bağıışıklık sistemi, kardiyovasküler sistem	131	Ca ⁺² bağımsız	Patojenlere karşı bağıışıklık sistemi
eNOS	Endotel hücreler	133	Ca ⁺² bağımlı	Vazodilasyon

Konstitütif (eNOS ve nNOS) ve indüklenmiş NOS (iNOS) izoenzimlerinin benzer katalitik özellikler taşıdığı bilinmektedir. İzoenzimlerin üçü de katalitik etki gösterebilmek için NADPH, BH₄ (tetrahidrobiyopterin), ve moleküler oksijene kofaktör olarak ihtiyaç duymaktadırlar ve non-kovalent olarak bağlı FAD ve FMN içermektedirler. BH₄, NOS enzimi için esansiyel bir kofaktör olup, enzimin katalizlediği reaksiyonda L-arjinin'in, bir ara ürün olan NOHLA'ya dönüşümü reaksiyonunun hidroksilasyonu için gereklidir (Stuehr *et al.* 1991b).

NO sentazın, Ca⁺²/kalmodülin bağımlı, çözünebilen bir çeşit sitokrom-c redüktaz olduğu bulunmuştur. Enzim, süperoksit dismutaz ve KCN'den bağımsız bir şekilde sitokrom-c oksidazı indirgeme özelliğine sahiptir. Nitrik oksit sentaz enzimi; sitokrom P450 redüktaz enzimi ile %50-60 oranında bir amino asit homolojisi göstermektedir. Bu iki enzim kalmodülin bağlanma bölgelerinde birbirlerinden farklılaşmaktadırlar. Ayrıca NOS, sitokrom P450 redüktaza benzer bir C-terminal bölgesi içermektedir. Aralarındaki

bu yapısal benzerlikten dolayı NOS böyle bir enzimatik aktivite göstermektedir (Bredt *et al.* 1991; Klatt *et al.* 1992).

Hücre içi NO üretimi, NOS enzimi tarafından L-arjinin amino asidinin L-sitrüline dönüştürülmesi ile gerçekleştirilir. NO, biyolojik sistemlerde çok yönlü hücre içi haberci bir gaz molekülüdür (Alderton *et al.* 2001; Torreilles 2001). NO, beyinde nöronal iletim, kan basıncı ve sindirim sisteminin düzenlenmesi, kalp ve damar sistemi, platelet kümelenmesi, sitotoksiste, hipertansiyon, diyabet, ateroskleroz, öğrenme ve hafıza gibi fizyolojik ve patofizyolojik değişikliklerde önemli rol oynar (Bredt and Synder 1994; Gross and Wolin 1995).

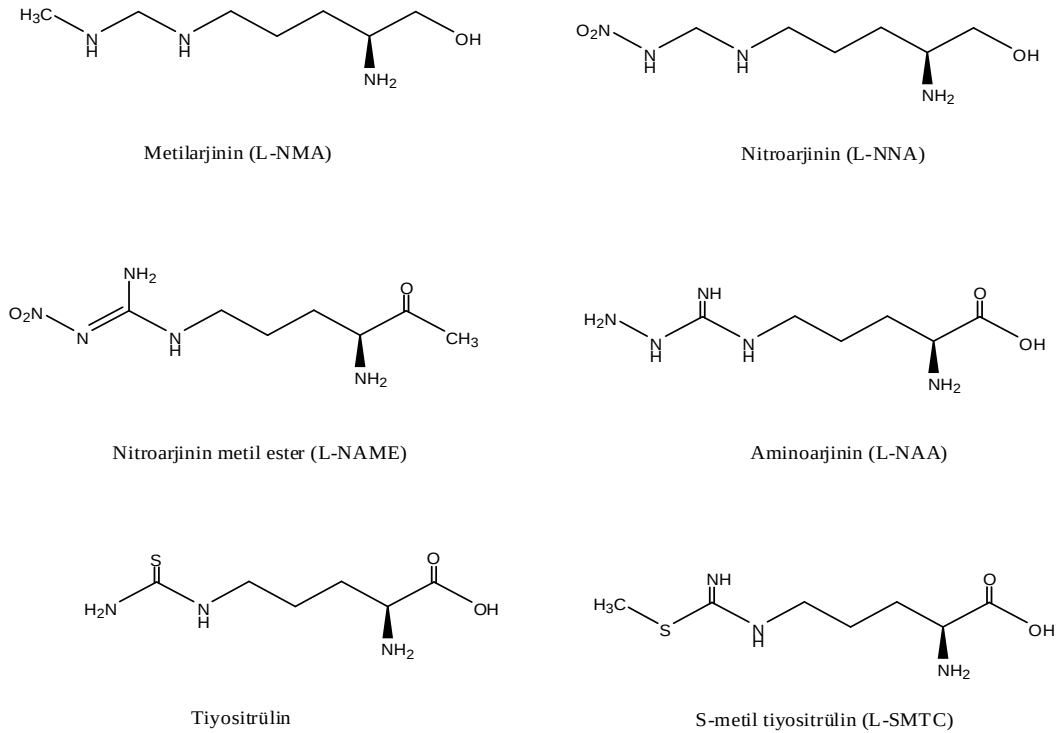
NO, membrandan kolaylıkla geçebildiği için sentezlendiği hücreden komşu hücreye geçerek metabolik olayları tetikler. NO, serbest radikal olup oksijen ve süperoksitlerle ve NO söndürücü olarak rol oynayan demir içeren hem gruplarıyla kolaylıkla reaksiyona girer. Bu yüzden NO'nun hemoglobin veya miyoglobinde yarılanma ömrü oldukça kısadır ve saniyelerle ifade edilir (Mohan *et al.* 2004). NO, ayrıca cGMP mekanizmasından bağımsız olarak kalp fonksiyonlarını düzenler.

Nitrik oksit kalp üzerine etkileri, kalbin kasılma gücünü azaltıcı ve sol ventriküler diastolik hacmi artırıcı yöndedir. Yapılan çalışmalar nitrik oksit miktarının, kalbin kasılma gücü üzerine etkili bir faktör olduğunu göstermektedir. Kalpte, kalp kası kasılmasını baskılamak üzere her üç nitrik oksit sentaz tarafından da nitrik oksit üretilmektedir. Kulakçıkta, koroner arterlerde ve iletim dokusunda nitrejik ve adrenerjik sinir sonlanmalarından salınan nNOS tarafından üretilen nitrik oksit, sempatik sinir uyarımı sırasında salınan noradrenalin yoğunluğunu azaltma yeteneğine sahiptir. Lipopolisakkarit veya farklı sitokinlerin uyarımı sonucunda iNOS tarafından fazla miktarda üretilen nitrik oksit, kalbin kasılma gücünü ve sıklığını azaltmaktadır (Benjamin *et al.* 1991).

Nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS) tarafından üretilen nitrik oksitin de kan basıncının düzenlenmesinde rol oynadığı düşünülmektedir. Rat beyinlerine küçük dozlarda NOS

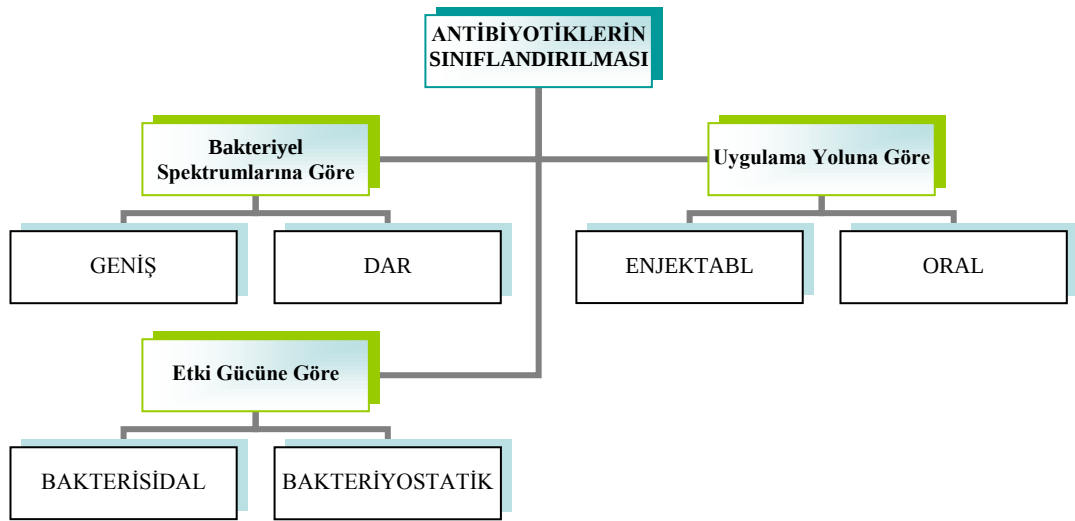
inhibitörlerinin uygulanması, hayvanların kan basıncını, böbreğin sempatik uyarımını ve kalp atım sayısını artırmıştır. Diğer yandan beyinde salınan nitrik oksitin, damarlarda sempatik tonusu azaltarak kan basıncının düzenlenmesinde etkili olduğu düşünülmektedir. Sinirsel aktivitenin lokal kan akımında bir artışa yol açtığı ve bu cevabın NOS inhibitörleriyle önlendiği gösterilmiştir (Li and Förstermann 2000).

Nitrik oksit sentezinin nitrik oksit inhibitörleriyle engellenmesi belirgin bir şekilde damar daralmasına ve kan basıncının artmasına neden olmaktadır. Nitrik oksit inhibitörü olan L-NMMA'nın hipertansiyonlu ve sağlıklı bireylere enjeksiyonu sonucunda hipertansif bireylerde sağlıklı bireylere oranla basınç artışının daha az olduğu, bununla beraber, normal ve hipertansiyonlu bireylere, nitrik oksit kaynağı olan nitroprussit verildiğinde her iki grupta da eşit miktarda damar gevşemesi cevabı olduğu bildirilmiştir. Bu bulgunun, hipertansiyonlu bireylerde endotel kaynaklı nitrik oksit üretiminde bir eksiklik olduğunu ve bu nedenle bazal nitrik oksit salınımının daha düşük seviyede bulunduğunu gösterdiği ifade edilmektedir (Cannon 1998).



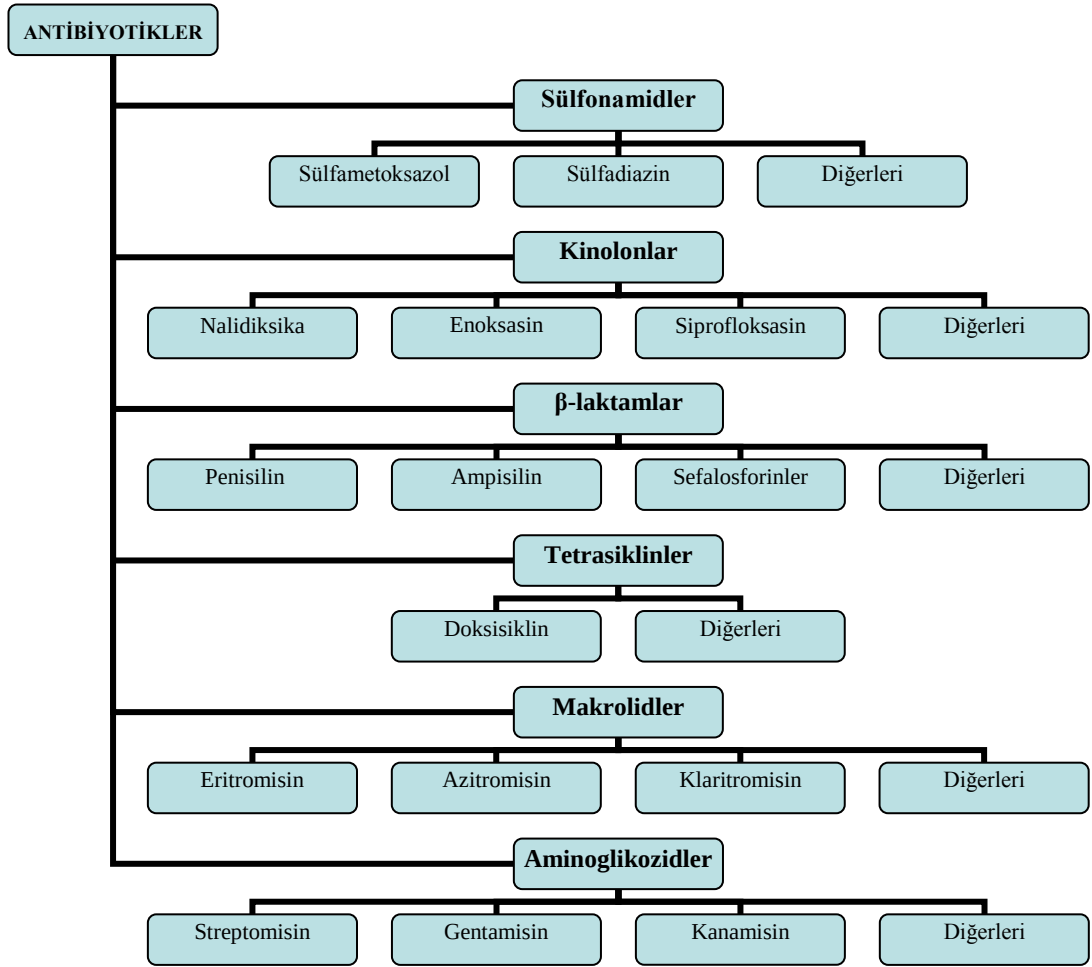
Şekil 1.7. L-arjinin analogu NOS inhibitörleri (Kılınç ve Kılınç, 2003)

Antibiyotikler; bakteriyel kaynaklardan üretilen ve bakteriyel enfeksiyonlarda mikroorganizmaların gelişimini durdurmak ve onları yok etmek için kullanılan ilaçlardır. Antibiyotikler, anti-enfektif ilaçların bir alt grubu olarak bilinirler ve antibakteriyeller olarak da adlandırılırlar. Mikroorganizmalardan elde edilen antibiyotikler olduğu gibi, günümüzde bu maddelerin çoğu sentetik olarak üretilmektedir. Bilinen ilk doğal antibiyotik, 1928 yılında Alexander Fleming tarafından keşfedilen penisilindir.



Şekil 1.8. Antibiyotiklerin sınıflandırılma çeşitleri

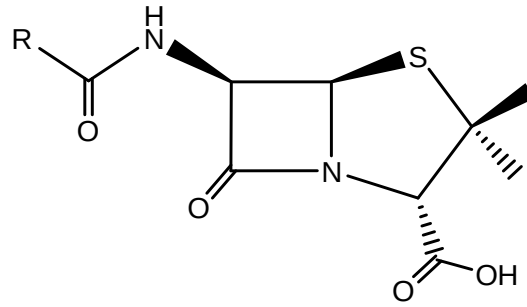
Antibiyotikler çeşitli özelliklerine göre sınıflandırılabilirler. Mesela; bakteriyel spektrumlarına, uygulama yoluna, etki gösterdiği aktivite türüne veya kimyasal yapılarına göre çeşitli gruplara ayrılabilirler. Başlıca bilinen antibiyotik grupları arasında sülfonamidler, kinolonlar ve floro-kinolonlar, β -laktamlar, tetrasiklinler, makrolidler ve aminoglikozidler yer almaktadır.



Şekil 1.9. Antibiyotiklerin kimyasal yapılarına göre sınıflandırılması

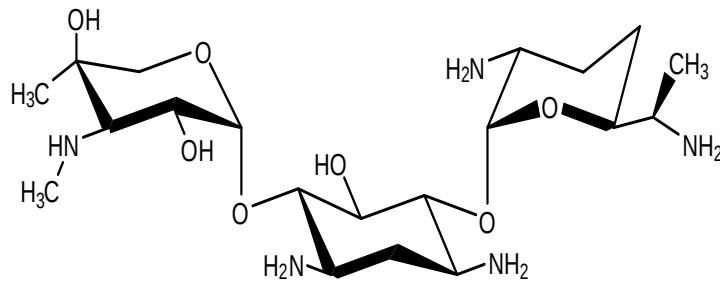
Çalışmada kullanılan bazı antibiyotikler ve bunlarla ilgili bilgiler şöyledir:

Penisilin-G: Penisilinler, bakterisid etkileri güçlü, toksisiteleri kısmen düşük olan ve yaygın olarak kullanılan doğal veya yarı sentetik antibiyotiklerdir. Penicillium mantarlarından elde edildikleri için bu adı almışlardır. Penisilin G, doğal olarak üretilen ve klinikteki değerini hala koruyan bir antibiyotiktir. Benzilpenisilin olarak da adlandırılır, serbest karboksil grubundan dolayı asidiktir. Etki mekanizmalarını duyarlı bakterilerin hücre duvarları sentezini inhibe ederek ve otolizle hücre duvarının erimesine sebep olarak gösterirler (Kayaalp 2002).



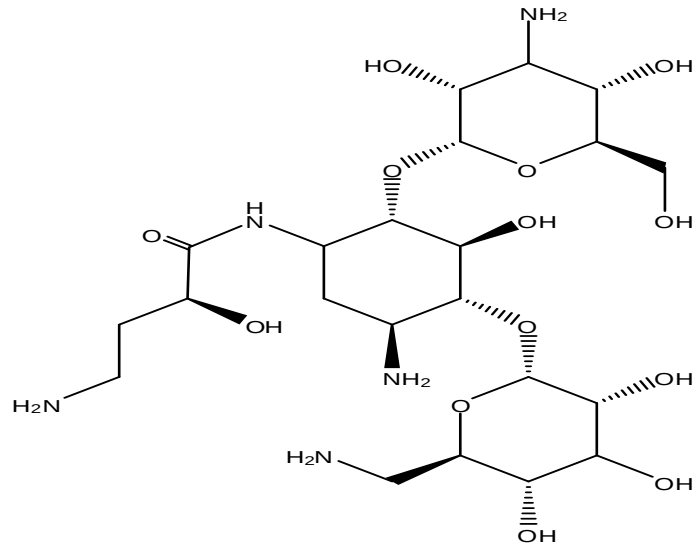
Şekil 1.10. Penisilin ilacının açık yapısı

Gentamisin: Aminoglikozid grubu ilaçlardır. Yapıca birbirine çok benzeyen üç gentamisin türünün karışımından ibarettir. Streptomisin, kanamisin ve amikasin gibi diğer aminoglikozid grubu ilaçlarla kıyaslandığında antibakteriyel etki gücü en yüksek ve amikasinden sonra spektrumu en geniş olandır. Bakterisid etkisi vardır. Pek çok bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılmakla beraber, özellikle gram negatif bakterilere karşı etkilidir. Isıya dayanıklı bir antibiyotiktir ve hatta otoklavlamadan sonra bile etkinliğini kaybetmez (Kayaalp 2002).



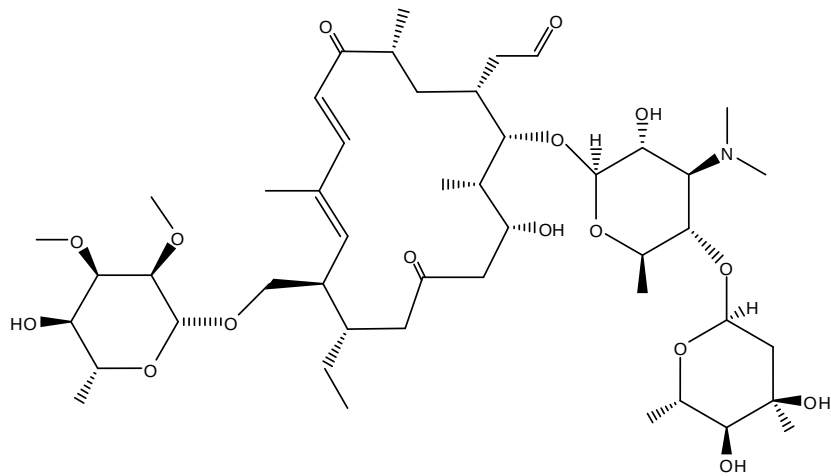
Şekil 1.11. Gentamisin ilacının açık yapısı

Amikasin: Aminoglikozid grubu ilaçlar arasında yarı sentetik olarak yapılan ilk türevidir. Doğal bir ilaç olan kanamisininden elde edilir. Bakteriyel enzimlere karşı dayanıklılığı nedeniyle aminoglikozid grubu ilaçlar arasında spektrumu en geniş olan ilaçtır. Diğer aminoglikozid grubu ilaçlarda olduğu gibi bakteri ribozomlarının 30s'lik alt birimlerine dönüşümsüz bağlanıp protein sentezini bloke ederek etki gösterir (Kayaalp 2002).



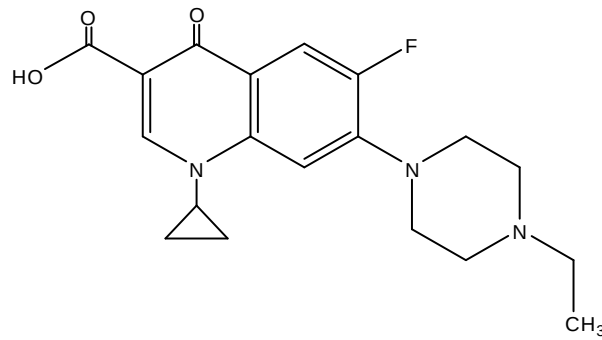
Şekil 1.12. Amikasin ilacının açık yapısı

Tilozin: Makrolid grubu bir antibiyotiktir. Kimyasal yapısında 16 karbonlu makrosiklik lakton halkası içermektedir. Tıpkı diğer makrolid grubu antibiyotikler gibi, bakteri ribozomlarının 50S alt birimine bağlanıp protein sentezini inhibe ederek bakteriyostatik bir etki gösterir. Veteriner hekimlikte hayvan yemlerinde koksidyostat olarak kullanılmaktadır. Gram pozitif bakterilere karşı geniş bir spektrumda etki etmektedir. Gram negatif bakterilerde ise etki alanı dardır. Diğer makrolid grubu antibiyotik ilaçların tersine tilozin insanlarda kullanılmamaktadır (Kayaalp 2002).



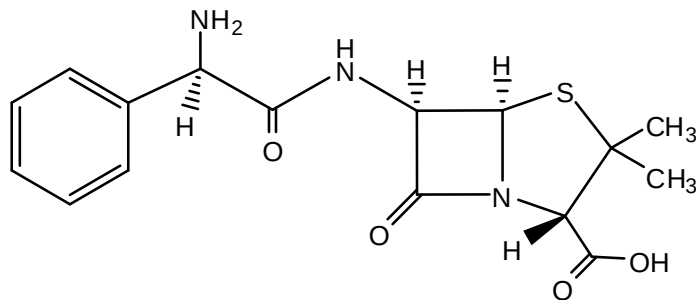
Şekil 1.13. Tilozin ilacının açık yapısı

Enrofloksasin: Enrofloksasin florokinolon grubu bir antibiyotiktir. Veteriner hekimlikte birçok gram pozitif ve gram negatif bakteri türlerine karşı etkili, geniş spektrumlu bir ilaçtır. Siprofloksasine, diğer bir florokinolon grubu antibiyotik, benzer bir spektruma sahiptir ve daha iyi bir biyoverimliliğe sahiptir. Bakterisid etkili bir ilaç olan enrofloksasinin etki mekanizması tam olarak bilinmemesine rağmen, bakterilerde DNA sentezini inhibe ettiği ve böylece bakterinin ölümüne yol açtığı düşünülmektedir (Kayaalp 2002).



Şekil 1.14. Enrofloksasin ilacının açık yapısı

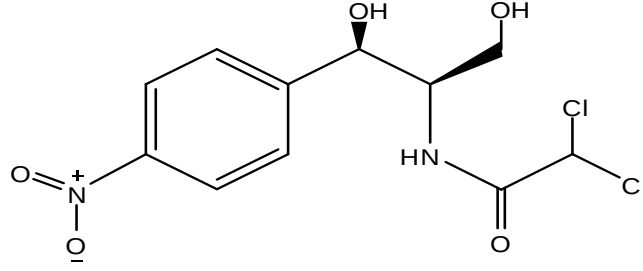
Ampisilin: Ampisilin geniş spektrumlu penisilinler grubu ilaçlardan olup, gram-pozitif ve negatif koklara karşı penisilin-G'ye yakın veya eşdeğer oranda etki gösterir. Yarı sentetiktir ve aside dayanıklıdır (Kayaalp 2002).



Şekil 1.15. Ampisilin ilacının açık yapısı

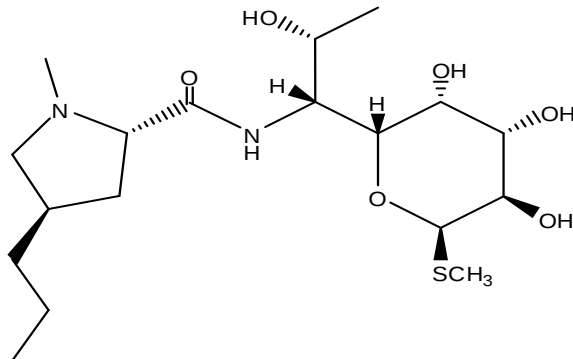
Kloramfenikol: Amfenikol grubu bir antibiyotiktir. İlk kez 1947 yılında *Streptomyces venezuelae* kültürlerinden elde edilmiş ve daha sonra da pazarlanmıştır. Basit bir kimyasal yapıya sahiptir ve dikloroasetik asit grubu içeren bir nitrobenzen türevidir.

Geniş spektrumlu oluşu, yan etkilerinin az olması, vücutta dağılımının iyi olması ve ucuz olması gibi özelliklere sahip olduğundan diğer antibiyotiklere göre üstünlüğü olan bir ilaçtır. Kloramfenikol, bakteri ribozomlarının 50s alt birimlerine bağlanarak protein sentezini dönüşümlü olarak inhibe eder (Kayaalp 2002).



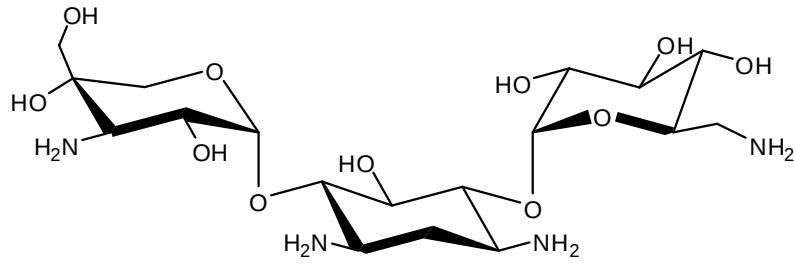
Şekil 1.16. Kloramfenikol ilacının açık yapısı

Linkomisin: Linkozamid grubu antibiyotikler sınıfından olup, makrosiklik lakton halkasından ibaret bir kimyasal yapıları vardır. Benzer antibakteriyel spektrumları, etki mekanizmaları, rezistans mekanizmaları ve klinik kullanılış amaçları nedeniyle genellikle makrolidlerle birlikte sınıflandırılırlar. Bu grup ilaçlardan tıbbi kullanıma ilk giren linkomisindir. Prolin aminoasidiyle 8 karbonlu amino şeker molekülünün oluşturduğu bir amid olan linkomisin, doğal bir antibiyotiktir. Bakterilerin 50s ribozomal alt birimlerine bağlanıp protein sentezini inhibe ederek bakteriyostatik etki gösterirler (Kayaalp 2002).



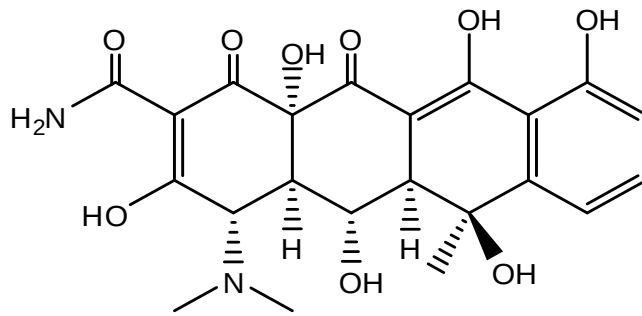
Şekil 1.17. Linkomisin ilacının açık yapısı

Kanamisin: Aminoglikozid grubu, bakteriyosid etkili bir antibiyotik olan kanamisin, birçok enfeksiyonların tedavisinde oral, intravenöz ve intramasküler olarak uygulanan bir ilaçtır. Kanamisin, bakteriyel ribozomun 30s alt birimine bağlanarak protein sentezini inhibe eder. Gram negatif bakterilerin geniş bir kısmına ve bazı gram pozitif bakterilere karşı etkilidir ve hücre kültürlerinin bakteriyel kontaminasyonlarını önlemede kullanılmaktadır (Kayaalp 2002).



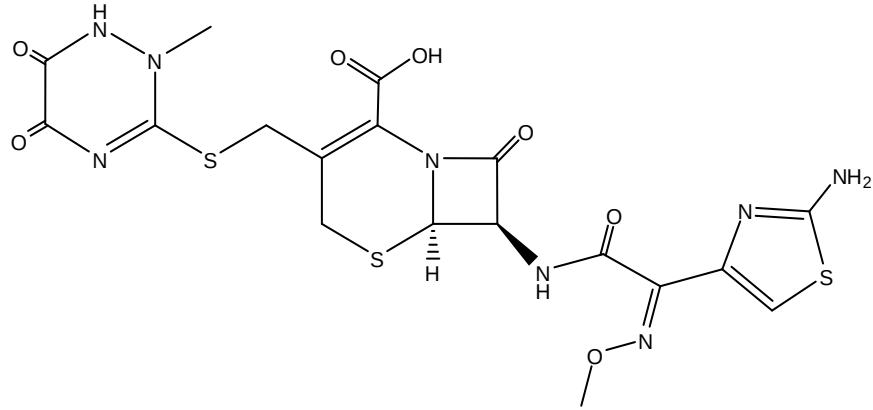
Şekil 1.18. Kanamisin ilacının açık yapısı

Oksitetrasiklin: Tetrasiklik bir bileşik olan oksitetrasiklin, kısa etki süreli bir tetrasiklin grubu antibiyotiktir. Bakteriyostatik etkisini, bakteri ribozomlarında protein sentezini inhibe ederek gösterir (Kayaalp 2002).



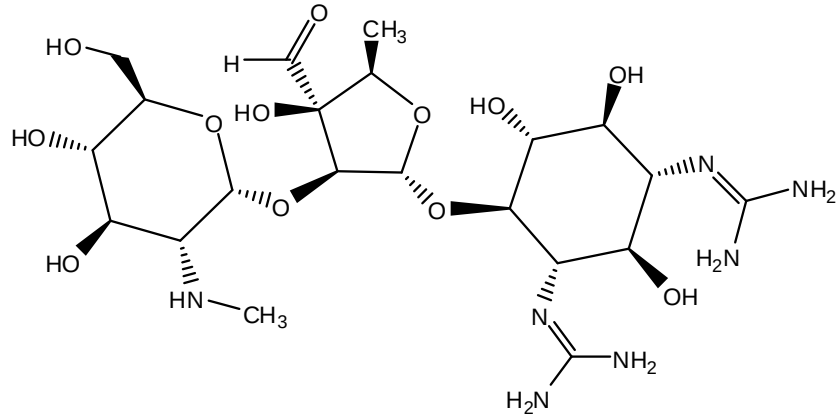
Şekil 1.19. Oksitetrasiklin ilacının açık yapısı

Seftriakson: Üçüncü kuşak sefalosforin grubu bir antibiyotik olan Seftriakson, gram negatif bakterilere karşı etkilidir. Sefotaksim ve seftizoksım benzeri bir gram negatif bakteri spektrumuna sahiptir. Bu grup antibiyotiklerin yaygın ve kontrolsüz kullanımlarından dolayı ciddi boyutta bir direnç artışı oluşmuştur (Kayaalp 2002).



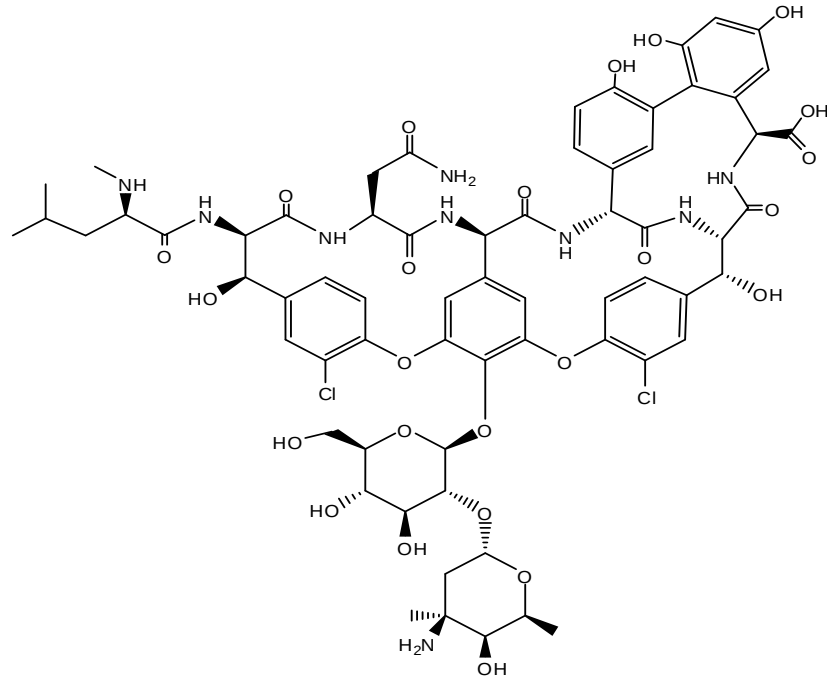
Şekil 1.20. Seftriakson ilacının açık yapısı

Streptomisin: Aminoglikozid grubu antibiyotiklerin ilk bulunan türevidir. Gram negatif bakterilere karşı etkindir, fakat bu etkinliği daha sonra bulunan aminoglikozidlere göre daha düşüktür. Streptomisin, tüberküloz bakterisi, brusella ve yersinia'lara karşı diğer aminoglikozidlerden daha etkilidir (Kayaalp 2002).



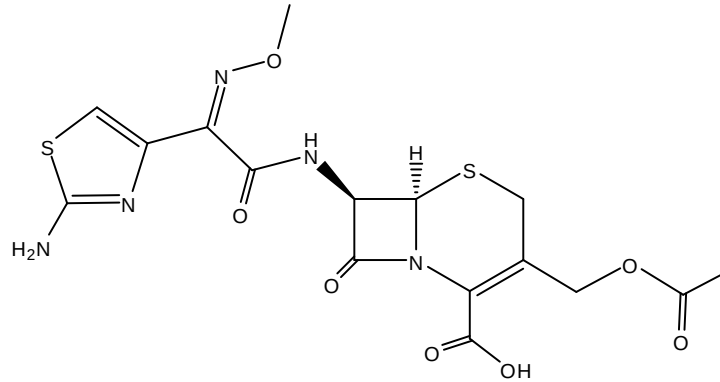
Şekil 1.21. Streptomisin ilacının açık yapısı

Vankomisin: Molekül kütlesi oldukça büyük, kompleks bir glikopeptid olan vankomisin, kimyasal yapısı bakımından diğer antibiyotiklerin hiçbirine benzemez. Açık kimyasal formülü belli değildir. Bakteri hücre duvarını bozarak etki göstermesi yönüyle penisilinlere benzemesine rağmen, etki mekanizması farklıdır. Bakteride peptidoglikan zincirinin biyosentezini inhibe eder. Bölünmekte olan duyarlı bakteriler üzerinde bakterisid etkiye sahiptir ve dar bir antibakteriyel spektruma sahiptir (Kayaalp 2002).



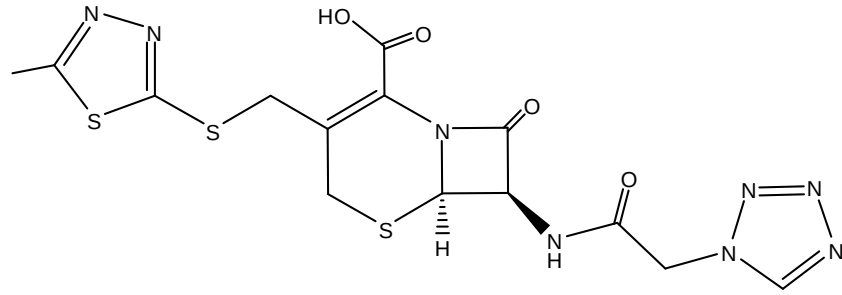
Şekil 1.22. Vankomisin ilacının açık yapısı

Sefotaksim: Üçüncü kuşak sefalosforin grubu antibiyotikler içerisinde tıpta ilk kullanılanıdır. Diğer sefalosforin grubu antibiyotiklerde olduğu gibi gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı etkili, geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. Özellikle, gram negatif bakteriler üzerinde etkilidir. Yarılanma ömrü bir saattir. Bakteri hücre duvarının oluşumunda peptidoglikan sentezinin son basamağını inhibe ederek, bakteri hücre duvarı oluşumunu engeller. Solunum yolları, deri, kemik, eklem ve ürogenital sistem enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılır (Kayaalp 2002).



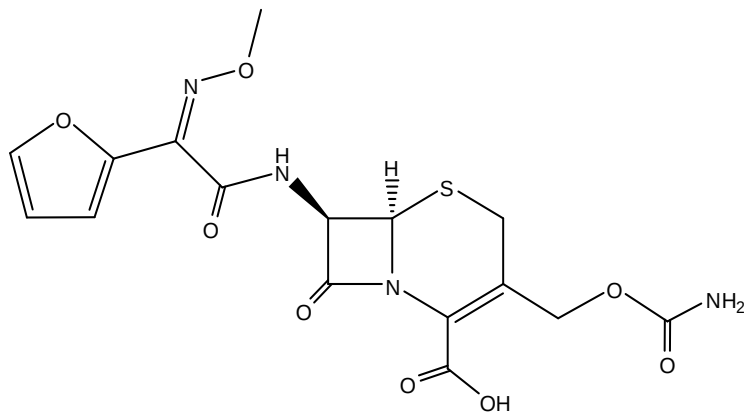
Şekil 1.23. Sefotaksim ilacının açık yapısı

Sefazolin: Birinci kuşak sefalosforin grubu bir antibiyotiktir. Plazma proteinlerine en fazla bağlanan sefalosforindir. Glomerüler filtrasyonla böbreklerden atılır ve yarılanma ömrü diğerlerine göre daha fazladır (Kayaalp 2002).



Şekil 1.24. Sefazolin ilacının açık yapısı

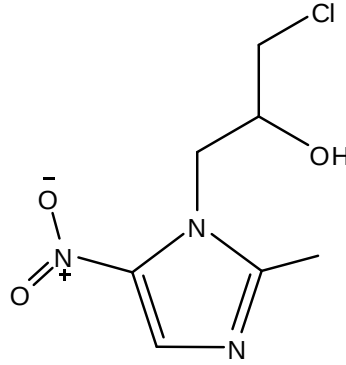
Sefuroksim: İkinci kuşak sefalosforin grubu bir antibiyotiktir. Yarı sentetik bir antibiyotik olan sefuroksimin kimyasal yapısı penisiline benzer. Diğer sefalosforin grubu antibiyotiklerde olduğu gibi bakteri hücre duvarının oluşumunu yavaşlatarak veya durdurarak etki gösterir. Alt ve üst solunum yolları, kulak, burun, boğaz enfeksiyonları ve idrar yolu enfeksiyonları gibi pek çok hastalığın tedavisinde kullanılan oldukça geniş spektrumlu bir antibiyotiktir (Kayaalp 2002).



Şekil 1.25. Sefuroksim ilacının açık yapısı

Ornidazol: Bakteriyal ve protozoan enfeksiyonların tedavisinde kullanılan ornidazol, nitroimidazol türevi antiprotozoal bir antibiyotiktir. Duyarlı bakterilerin hücre

DNA'sına bağlanarak, DNA sentezini inhibe eder ve mikroorganizmanın ölümüne sebep olur.



Şekil 1.26. Ornidazol ilacının açık yapısı

Çalışma kapsamında NOS enziminin saflaştırılması amacıyla alınan taze sığır böbrek dokusu ve trombositlerinden homojenat hazırlandı. Daha sonra 2'-5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi kullanılarak sığır böbrek ve trombosit NOS enzimleri ayrı ayrı tek basamakta saflaştırıldı. SDS-PAGE tekniği ile enzimlerin saflığı kontrol edildi ve tek bant gözlemlendi. Enzimlerin SDS-PAGE metoduyla alt birim molekül kütleleri ve Jel filtrasyon kromatografisi tekniğiyle aktif formunun molekül kütleleri hesaplandı. Saflaştırılan NOS enzimleri için karakterizasyon ve kinetik çalışmalar gerçekleştirildi. Enzim aktivitesi üzerine birtakım veteriner hekimlikte kullanılan antibiyotiklerin ve bunun yanı sıra insanlar için de kullanılan bazı antibiyotiklerin *in vitro* etkileri araştırıldı.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

NOS enzimi ile ilgili çalışmalar, enzimin katalizlediği reaksiyon sonucu oluşan NO'nun metabolizmada, dolaşım, sinir ve bağışıklık gibi birçok sistemde fizyolojik ve patofizyolojik süreçlerdeki rolünün aydınlatılması ile birlikte son 20-30 yıl içerisinde hız kazanmıştır. Enzimle ilgili çalışmalar başta saflaştırma, karakterizasyon, kinetik çalışmalar olmak üzere gen ekspresyonu, klonlama, enzim inhibisyonu, izoformların spesifik inhibitörlerinin bulunması, immünohistokimyasal çalışmalar ve mutasyonların enzim üzerindeki etkilerinin araştırılması gibi daha sayamadığımız pek çok alanda, oldukça geniş bir yelpazede yapılmaktadır.

Zakariassen ve arkadaşları (2008) tarafından yapılan bir çalışmada izotermal kalorimetri titrasyonu tekniği kullanılarak, tetrahidrobiyopterin varlığında nöronal NOS izoformunun oksijenaz bölgesine substrat bağlanma parametreleri çalışılmıştır. Yapılan çalışmada, N- ω -hidroksi L-arjinin (NOHLA) arabileşiğinin nNOS oksijenaz bölgesine L-arjininden (L-Arg) daha yüksek bir afinite gösterdiği belirlenmiştir. NOHLA bağlanmasının, aktif bölgeyle ekstra bir hidrojen bağı oluşturmamasından dolayı L-arjinine göre daha ekzotermik olduğu düşünülmektedir. Isı kapasitesindeki değişimlerin NOHLA ve L-Arg bağlanmalarının her ikisi için de düşük olduğu gözlemlenmiştir, bu da hidrofobik etkileşimlerin bağlanmayı çok az etkilediğini göstermektedir.

Nitrik Oksit Sentaz enzimi sığır pankreas dokusundan %30 amonyum sülfat çöktürmesi sonrası, 2'5'-ADP-agaroz ve kalmodülin agaroz kromatografi teknikleri kullanılarak %7,6 verimle 5,500 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılan sığır pankreatik NOS (bpNOS) enziminin alt birim molekül kütlesi SDS-PAGE tekniği yardımıyla 160 kDa olarak belirlenmiştir. Ayrıca, jel filtrasyon kromatografisi metodu ile enzimin doğal halinin molekül kütlesinin 320 kDa olduğu tespit edilmiştir. Saflaştırılan bpNOS enziminin spesifik aktivitesi 31,67 nmol/mg protein dakika, L-arjinin için K_m değeri 15,72 μ M olarak belirlenmiştir. Enzim aktivitesinin Ca^{+2} iyonu ve kalmodülin bağımlı olduğu ve NADPH, FAD ve FMN bileşiklerinin enzim aktivitesi için gerekli olduğu bulunmuştur. BH_4 'ün ise enzim aktivitesi için gerekli bir bileşen olmadığı tespit edilmiştir. L-arjinin

analoglarıyla yapılan inhibisyon çalışmaları sonucunda, N^G-nitro arjinin (NNA)'in bpNOS enzim aktivitesi üzerine en güçlü inhibitör etkiye sahip olduğu ve N^G,N^{G'}-dimetil-L-arjinin molekülünün ise herhangi bir inhibitör etki göstermediği bulunmuştur. Ayrıca beyin NOS antikoru kullanılarak immünohistokimyasal analiz çalışmaları sonucu, asinar hücrelerin bu antikora karşı yüksek bir immünoreaktivite gösterdiği gözlemlenmiştir (Nam *et al.* 1998).

Yapılan bir diğer çalışmada ise, bronşiyal epitel hücrelerdeki iNOS8292 ve tüm iNOS (iNOSFL) klonlanmıştır. 293 hücrede iNOS ekspresyonu sonucu, iNOS mRNA ve proteininin olduğu fakat NO oluşumu görülmediği belirtilmiştir. iNOSFL'nin aksine, iNOS8292'de dimer oluşumu gözlemlenmemiştir. iNOSFL'e benzer bir şekilde iNOS8292'nin de NADPH-diyaforaz aktivitesi gösterdiği ve sıkı bağlı kalmodülün içerdiği belirtilmiştir. 8 ve 9. ekzonla ifade edilen bölgelerin, iNOS enziminin dimerleşmesinde ve NO oluşumunda önemli olduğu fakat redüktaz aktivitesine etki etmediği belirtilmiştir. Bu bölgenin, terapötik müdahalelerde kullanılmak üzere, iNOS'un dimerleşmesi ve NO oluşumunun inhibisyonu için hedef bölge olabileceği ifade edilmiştir (Eissa *et al.* 1998).

Sığır beyninden NOS enziminin saflaştırıldığı çalışmada ise bazı triptik peptidlerin aminoasit sekans analizi yapılmıştır. Yapılan analiz sonucunda sığır beyin peptidlerinin diziliminin rat beyin NOS enzimi ile hemen hemen aynı dizilime sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bu dizilimle ilgili veriler, sığır aort endotelial hücre NOS enzimi (BAEC NOS) klonlarının izolasyonunda kullanılmak üzere PCR-tabanlı NOS cDNA problemlerinin dizaynı için gerekli olmuştur. 1205 amino asit içeren, 133 kDa molekül kütlesine sahip NOS cDNA klonu izole edilmiş ve bu klonun enzimatik aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir. BAEC NOS enziminin aminoasit diziliminin rat makrofaj ve beyin NOS izoformlarıyla %50-60 oranında benzerlik gösterdiği bulunmuştur (Lamas *et al.* 1992).

Elektron Spin Rezonans (ESR) tekniği NO'nun tespitinde kullanılan en önemli metotlardan birisidir. Bu bağlamda, EPR metodu yardımıyla NOS inhibitörlerinin ve

substratının bir değerlendirmesi yapılmıştır. Çalışmada, bir çözelti içerisinde iNOS, L-arjinin, NADPH, BH₄ ve Fe⁺²-N-(ditiyokarboksi) sarkozin (DTCS-Fe) maddelerinin varlığında ESR sinyal yoğunluğunun zamana bağlı olarak arttığı gözlemlenmiştir. Arjinin veya NADPH yokluğunda sinyalin oluşmadığı tespit edilmiştir. NO giderici hemoglobin veya NOS inhibitörleri NG-monometil-L-arjinin (L-NMMA), N^G-nitro-L-arjinin (L-NAME) ve aminoguanidin (AG) ilavesiyle konsantrasyona bağlı olarak sinyalin azaldığı gözlemlenmiştir. L-NAME ve AG'ye göre L-NMMA'nın iNOS aktivitesini daha fazla inhibe ettiği belirlenmiştir. Ayrıca, bu metot yardımıyla, arjinin için K_m ve L-NMMA için K_i değerleri sırasıyla 12,6 µM ve 6,1 µM olarak hesaplanmıştır. Elde edilen değerler oksihemoglobin ve sitrülin aktivite ölçüm metotlarıyla ölçülen değerlerle uyduğu belirtilmiştir (Saito and Kohno 2006).

Bir diğer çalışmada ise aktifleştirilmiş murin makrofajlarından iNOS enzimi, iki kolonlu bir prosedür uygulanarak saflaştırılmıştır. Saflaştırma işlemi 2'5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi ve takiben DEAE-Bio-Gel-A iyon değişim kromatografisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Enzimin molekül kütlesi SDS-PAGE tekniği yardımıyla 130 kDa olarak belirlenmiş ve jel filtrasyon metodu kullanılarak enzimin aktif formunun dimer yapıda olduğu ve molekül kütlesinin yaklaşık 260 kDa olduğu bulunmuştur. Saflaştırılan enzimin L-arjinin için K_m değeri 16 µM olarak bulunmuş ve enzim aktivitesinin NADPH bağımlı olduğu gözlemlenmiştir. BH₄ ve FAD'nin enzim aktivitesini arttırdığı, fakat Mg⁺² ve FMN'nin enzim aktivitesi üzerine etkilerinin olmadığı ifade edilmiştir. Ayrıca, enzimin her alt biriminin FAD ve FMN için bağlanma bölgeleri içerdiğini gözlemlemişlerdir (Hevel *et al.* 1991).

Golser ve arkadaşlarının (2003) yaptıkları bir çalışmada ise, *Pichia pastoris*'den eksprese edilen ve saflaştırılan rekombinant eNOS enzim fonksiyonlarının Glu298Asp mutasyonu ile nasıl etkilendiği araştırılmıştır. Kontrol ve mutant eNOS enzimlerinin L-arjinine karşı benzer afiniteler (K_m değerleri sırasıyla 4,4 ve 5,2 µM; V_{max} değerleri 142 ve 159 nmol L-sitrülin/mg) gösterdikleri bulunmuştur. E298D mutasyonunun redüktaz bölgesinde elektron transferini veya redüktif O₂ aktivasyonunu etkilemediği gözlemlenmiştir. Mutant eNOS enziminin BH₄ ile aktivasyonunun kontrol eNOS'a

yakın bir değerde olduğu tespit edilmiştir (EC değerleri 0,24 ve 0,22 μM). Enzimlerin Ca^{+2} iyonu ile aktivasyonunun da çok farklı olmadıkları bulunmuştur.

Leishmania amazonensis mikroorganizmasından NOS enzimi, afinite kromatografisi kullanılarak (2',5'-ADP Agaroz) saflaştırılmış ve saflaştırılan enzimin SDS-PAGE'de 116kDa civarında tek bant verdiğini gözlemlenmiştir. Ayrıca, enzim aktivitesinin CaCl_2 yokluğunda önemli derecede azaldığı, fakat BH_4 , FAD veya FMN'den birinin yokluğunda ise enzim aktivitesinin en fazla %33'lük bir azalma gösterdiği bulunmuştur. NADPH yokluğunda ise enzim aktivitesinin tamamen kaybolduğu tespit edilmiştir (Genestra *et al.* 2006).

Yapılan bir çalışmada ise NOS enzimi rat makrofajlarından saflaştırılmıştır. Saflaştırma işlemi 2',5'-ADP-agaroz afinite kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılan enzimin molekül kütlesi jel filtrasyon kromatografisinde 300 kDa olarak hesaplanmıştır. SDS-PAGE'de ise enzimin 150 kDa civarında tek bant verdiği gözlemlenmiştir. Saflaştırılan enzimin renksiz olduğu ve 280nm'de maksimum absorpsiyon verdiği gözlemlenmiştir. Enzim aktivitesinin yarılanma ömrünün $+4^\circ\text{C}$, pH:7,4'te 6 saat olduğu ve enzim aktivitesi için NADPH, BH_4 ve ditiyotreitol (DTT)'ün gerekli olduğu bulunmuştur. Her ne kadar beyincik ve endotelial NOS enzimleri Ca^{+2} bağımlı olsa da, makrofaj NOS enzim aktivitesinin Ca^{+2} 'den bağımsız olduğu ifade edilmiştir (Yui *et al.* 1991).

Rat karaciğer dokusundan endotoksin uyarılması ile oluşturulan NOS enzimi iyon değişim ve afinite (2',5'-ADP-Sepharose) kromatografileri kullanılarak saflaştırılmıştır. Enzimin alt birim molekül kütlesi SDS-PAGE'de 135 kDa, enzimin maksimum spesifik aktivitesi 462 nmol/mg.dk ve arjinin için K_m değeri ise 11 μM olarak hesaplanmıştır. Ayrıca, enzimin kalmodülin ilavesi ile güçlü bir şekilde aktive olduğu (EC_{50} değeri 2 nM), oysa kalsiyumun ortamdan uzaklaştırılması ile enzim aktivitesinin sadece %15 oranında azaldığı gözlemlenmiştir. Kalmodülin inhibitörlerinin enzim aktivitesini güçlü bir şekilde inhibe ettiği ve BH_4 , FAD ve FMN'nin enzim aktivitesi için gerekli olduğu bulunmuştur (Evans *et al.* 1992).

Chen and Rosazza (1995) yaptıkları çalışmada *Nocardia* bakteri türlerinden NOS enzimini (NOSnoc) 2'5'-ADP agaroz afinite kromatografisi ve hidroksilapatit kromatografisi kullanarak 1,353 kat saflaştırmışlardır. Saflaştırılan NOSnoc enziminin SDS-PAGE'de 51,9 kDa civarında tek bant verdiği gözlemlenmiştir. Enzimin aktif formunun molekül kütlesinin ise 110,6 kDa olduğu ve enzimin homodimer yapıda olduğu bulunmuştur. NOSnoc enziminin N-Terminal ucundan 15 amino asitlik bir dizi belirlenmiş ve bu dizinin memeli NOS enzimlerinden farklı olduğu bulunmuştur. NADPH oksidasyonu ve NO oluşumu ile gerçekleşen enzimatik reaksiyonda NOHLA'nın arabileşik olduğu bilgisi doğrulanmıştır. NOSnoc enzim aktivitesinin N^G-metil-L-arjinin ve N^G-nitro-L-arjinin varlığında yarışmalı bir şekilde inhibe olduğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca, saflaştırılan enzim için optimum pH değerinin 7,0-7,5 civarında ve optimum sıcaklığın ise 30°C olduğu gözlemlenmiştir.

Yapılan bir diğer çalışmada ise, insülinle aktifleştirilen, membrana bağlı NOS enzimi insan eritrositlerinden saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimin (230 kDa) birbirlerine disülfid bağıyla bağlı bir ağır zincir (135 kDa) ve bir de hafif zincir (95 kDa) içerdiği gözlemlenmiştir. Saflaştırılan enzimin Lineweaver Burk grafiğinde, insülinle enzimin aktivasyonunun K_m'deki azalma ve V_{max}'taki artış ile ilişkili olduğu ifade edilmiştir. Saflaştırılan enzimin anti insülin reseptör antikorları ile etkileşimi sonucu enzim aktivasyonu ve proteine hormon bağlanması inhibisyona uğramıştır. Ayrıca, NO'nun kendisi, düşük konsantrasyonlarda (<0,4 mM) enzimi aktive ederken, yüksek konsantrasyonlarda ise aktivasyon üzerine bir etki göstermemiştir. Saflaştırılan enzimin insülinle inkübasyonu sonucu, preparatlarda bir tirozin kinaz inhibitörü olan genistein tarafından inhibe olan tirozin kinaz ve nitrik oksit sentaz enzim aktivitelerinin yeniden uyarılabileceği bildirilmiştir. Bu sonuçlar, insülinle aktifleştirilmiş nitrik oksit sentazın insülin reseptörünün kendisi olabileceğini ortaya koymuştur (Bhattacharya *et al.* 2001).

Sıçan görme korteksindeki nöronal ve endotelial nitrik oksit sentaz (nNOS ve eNOS) izoformlarının dağılımını belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada ise üç farklı protokol kullanılarak NOS izoformlarının immünohistokimyasal lokalizasyonları

belirlenmiştir. Sonuçlar, hem nöronal hem de endotelial NOS izoformlarının görme korteksinde mevcut olduğunu göstermektedir (Yousef *et al.* 2004).

Koyunlarda, NO'nun nöroendokrin işlevinin düzenlenmesindeki rolünü daha iyi anlamak amacıyla yapılan bir diğer çalışmada ise koyun nöronal NOS enzimi saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Enzim anyon değişim, afinite ve HPLC kromatografik metotları kullanılarak saflaştırılmıştır. SDS-PAGE'de denatüre olmuş koyun nNOS enzimi tıpkı rat, sığır ve domuz nNOS izoformları gibi 150 kDa civarında tek bant vermiştir. Enzimin aktif formunun molekül kütlesi HPLC metodu kullanılarak domuz ve rat nNOS izoformlarına benzer bir şekilde 200 kDa olarak hesaplanmıştır. Ayrıca, koyun nNOS izoformunun kofaktör bağımlılığı ve kinetik özellikleri bakımından rat ve sığır nNOS enzimlerine benzer özellikler gösterdiğini bulmuşlar ve L-arjinin için K_m değerini ortalama 2,4 μM olarak hesaplamışlardır. Yaptıkları immünohistokimyasal çalışmalarda ise koyunlarda nNOS'un korteks, beyincik, hipofiz ve hipotalamusta eksprese olduğunu bulmuşlardır (Crack *et al.* 1998).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Deneysel çalışmalarımızda kullandığımız standart serum albümin, N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin (TEMED), diyaliz torbaları sodyum hidroksit, trihidroksimetilaminometan (Tris), sodyum klorür, kalsiyum klorür, potasyum fosfat, hidroklorik asit, glisin, sodyum azotür, sodyum asetat, sodyum tiyosülfat, gümüş nitrat, sodyum karbonat, formaldehit, gliserin, potasyum fosfat, etanol, metanol, asetik asit, izopropanol, akrilamid, N,N'-metilen bisakrilamid, Coomassie brilliant blue G-250 ve R-250, brom timol mavisi, sodyum dodesil sülfat (SDS), Sephadex G-100, NADPH, FAD, FMN, NADH, NADP^+ , tetrahidrobiyopterin (BH_4), L-arjinin, sitokrom-c, ditiyotreitöl (DTT), etilendiamintetraasetikasit (EDTA), fenilmetilsulfonilflorid (PMSF), Triton X-100, β -merkaptöetanol ve diğer kimyasal maddeler Sigma Chemical Comp.'den ve E. Merk AG'den temin edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan alet ve cihazlar

Çalışmalar sırasında aşağıdaki alet ve cihazlardan faydalanılmıştır.

Masa santrifüjü	: MSE Mistral 2000
Soğutmalı santrifüj	: Heraeus Sepatech (Suprafuge 22)
Soğutmalı santrifüj	: Heraeus (Cryofuge 5500i)
Ultrasantrifüj	: Beckman Coulter (Optima LE-SOK Ultracentrifuge)
Soğutmalı santrifüj	: Hermle Z 323 K(Germany)
Spektrofotometre	: CHEBIOS s.r.l. (Optimum-one/UV-VIS)
pH metre	: Schott pH-Meter CG840

Elektroforez tankı	: BIO RAD (dikey)
Peristaltik pompa	: İsmatec
Kan torbası	: Polymed üçlü kan torbası (450ml)
Karıştırıcı (Shaker)	: GFL 3025
Karıştırıcı (Vorteks)	: Fisons whirlimixer
Hassas terazi	: Gec avery (UK)
Otomatik pipet	: Eppendorf
Çalkalayıcı	: Midi dual 14
Manyetik karıştırıcı	: Chiltern hotplate magnetic Stirrer HSBI
Saf su cihazı	: Barnstead easy pure UV/UF
Su banyosu	: Clifton
Kar makinesi	: Scotsman AF-20 (Automatic ice machines)
Güç kaynağı	: 1-Bio rad power pac 3000
Buzdolapları	: Arçelik
Derin dondurucu (-85°C'ye kadar)	: Sanyo ultra low
Derin dondurucu (-20°C'ye kadar)	: Sanyo medical freezer

3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler:

1. 200 mM KH_2PO_4 , pH:7,4 tampon çözeltisi: 1,36 g KH_2PO_4 alınarak 40 ml destile suda çözüldü. NaOH çözeltisi ile pH 7,4'e ayarlandı. Daha sonra toplam hacim su ile 50 ml'ye tamamlandı.
2. 50 mM CaCl_2 çözeltisi: 0,0554 g CaCl_2 alınarak 10 ml destile suda çözüldü.
3. 1 mM L-arjinin çözeltisi: 0,0175 g L-arjinin alınarak 100 ml destile suda çözüldü.
4. 1 mM FAD çözeltisi: 0,0083 g FAD alınarak 10 ml destile suda çözüldü.
5. 1 mM FMN çözeltisi: 0,0051 g FMN alınarak 10 ml destile suda çözüldü.
6. 1 mM NADPH çözeltisi: 0,0041 g NADPH alınarak 5 ml destile suda çözüldü.
7. 0,8 mM BH_4 çözeltisi: 0,0012 g BH_4 alınarak 5 ml destile suda çözüldü.

8. 0,4 mM FAD çözeltisi (Sitokrom-c redüktaz aktivitesi için): 0,0033 g FAD alınarak 10 ml destile suda çözöldü.
9. 0,4 mM FMN çözeltisi (Sitokrom-c redüktaz aktivitesi için): 0,0020 g FMN alınarak 10 ml destile suda çözöldü.
10. 0,4 mM sitokrom-c çözeltisi (Sitokrom-c redüktaz aktivitesi için): 0,025 g sitokrom-c alınarak 5 ml destile suda çözöldü.

Homojenat hazırlanırken kullanılan çözeltiler:

1. 1 mM EDTA, 1 mM DTT ve 1 mM PMSF içeren 50 mM Tris-HCl, pH:7,4 tampon çözeltisi: 0,0292 g EDTA, 0,0154 g DTT, 0,0174 g PMSF ve 0,6055 g Tris alınarak 90 ml destile suda çözöldü. HCl çözeltisi ile pH 7,4'e ayarlandı. Daha sonra toplam hacim 100 ml'ye tamamlandı.
2. 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF ve Triton X-100 içeren 50 mM Tris-HCl, pH:7,4 tampon çözeltisi (sığır trombosit homojenatı için): 0,0292 g EDTA, 0,0154 g DTT, 0,0174 g PMSF ve 0,6055 g Tris alınarak 90 ml destile suda çözöldü. İçerisine 50 µl Triton X-100 katıldı. HCl çözeltisi ile pH 7,4'e ayarlandı. Daha sonra toplam hacim 100 ml'ye tamamlandı.

2'5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi için kullanılan tampon çözeltiler:

1. 1 mM DTT içeren 50 mM Tris-HCl, pH=7,4 tampon çözeltisi (dengeleme tamponu): 0,154 g DTT ve 6,055 g Tris alınarak 900 ml destile suda çözöldü. Çözeltinin pH'sı NaOH ile 7,4'e ayarlandı. Daha sonra toplam hacim 1L'ye tamamlandı.
2. Kolonun yıkanması işleminde kullanılan çözeltiler:
 - a. 0,6 M NaCl çözeltisi: 0,702 g NaCl alınarak 20 ml dengeleme tampon çözeltisi içerisinde çözöldü.
 - b. 0,5 mM NADH çözeltisi: 0,0074 g NADH alınarak 20 ml dengeleme tampon çözeltisi içerisinde çözöldü.

c. 0,5 mM NADP^+ çözeltisi: 0,0076 g NADP^+ alınarak 20 ml dengeleme tampon çözeltisi içerisinde çözöldü.

3. 5 mM NADPH çözeltisi (elüsyon tamponu): 0,0416 g NADPH alınarak 10 ml dengeleme tampon çözeltisi içerisinde çözöldü.

Sephadex-G100 jel filtrasyon kromatografi kolonunda kullanılan tampon çözeltiler:

1. 50 mM KH_2PO_4 , pH:7,0 tampon çözeltisi (kolonun dengelenmesi için kullanılan çözelti): 6,8 g KH_2PO_4 alınıp 800 ml destile suda çözöldü. Çözeltinin pH'sı NaOH ile 7,0'a ayarlandı. Daha sonra toplam hacim 1L'ye tamamlandı.

Elektroforez için kullanılan çözeltiler:

1. 1M Tris-HCl (pH=8,8): 12,11 g Tris (0,1 mol) tartılarak 80 ml destile suda çözöldü, pH ayarı 1M HCl ile yapıldıktan sonra 100ml'ye tamamlandı.

2. 1M Tris-HCl (pH=6,8):12,11 g Tris (0,1 mol) tartılarak 80 ml destile suda çözöldü, pH ayarı 1M HCl yapıldıktan sonra 100 ml'ye tamamlandı.

3. %30 Akrilamid-%0,8 Bisakrilamid çözeltisi: 15 g akrilamid, 0,4 g bisakrilamid ve 34,6 g destile su karıştırılarak çözöldü.

4. %10'luk amonyum persölfat çözeltisi: 1 g amonyum persölfat tartılarak destile su ile 10 ml'ye tamamlandı.

5. %10'luk SDS: 1 g SDS, 9 g destile suda çözölerek elde edildi.

6. Yürütme tamponu: 1,51 g Tris (12,5 mmol) ve 7,51 g glisin (0,1 mol) tartılarak 450 ml destile suda çözöldü; %10'luk SDS'den 5 ml ilave edildi, pH:8,3'e ayarlandı ve toplam hacim 500 ml'ye tamamlandı.

7. Numune tamponu: 1M Tris-HCl (pH:8)'den 0,5 ml, %10'luk SDS'den 1 ml, %100'lük gliserinden 1 ml ve %0,1'lik bromtimol mavisinden 1 ml alınarak destile suyla 10 ml'ye tamamlandı. Bu tampona, kullanılmadan önce 950 µl numune tamponundan 50 µl olacak şekilde β -merkaptoetanol ilave edildi.

8. Sabitleştirme çözeltisi (jelde yürütülen proteinlerin sabitleştirilmesi için kullanılan çözelti): %50 izopropanol, %10 TCA ve %40 destile su olacak şekilde karıştırılarak hazırlandı.
9. Jel boyama çözeltisi: 50 ml metanol, 10 ml asetik asit ve 40 ml destile su içerisinde 0,1 g coomassie brilliant blue R-250 reaktifinin çözülmesiyle hazırlandı.
10. Jel yıkama çözeltisi: 50 ml metanol, 10 ml asetik asit ve 40 ml destile su karıştırılarak elde edildi.
11. Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi (proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti): 100 mg coomassie brilliant blue G-250, 50 ml %95'lik etanolde çözüldü. Bu çözeltiye %95'lik 100 ml fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin hacmi destile suyla 1 L'ye tamamlandı.
12. %0,04'lük brom timol mavisi çözeltisi: 0,1 g indikatör 16 ml 0,01M NaOH içerisinde çözüldü ve toplam hacim destile suyla 250ml'ye tamamlandı.

Gümüş boyamada kullanılan çözeltiler:

1. Tespit çözeltisi: 60 ml destile su, 30 ml etanol ve 10 ml asetik asit karıştırılarak hazırlandı.
2. Redüksiyon çözeltisi: 4,8 g sodyum asetat, 45 ml etanol ve 80 ml destile suda çözüldü. Asetik asitle pH'sı 6,0'ya ayarlandı. İçerisine 150 mg sodyum tiyosülfat ve 3 ml glutaraldehit eklendi. Toplam hacim destile su ile 150 ml'ye tamamlandı.
3. Boyama çözeltisi: Taze olarak hazırlanmalıdır. 100 mg gümüş nitrat 100 ml destile suda çözüldü. İçerisine 20 µl formaldehit eklenerek karıştırıldı.
4. 1.yıkama çözeltisi: 3,75 g sodyum karbonat 270 ml destile suda çözüldü ve içerisine 120 µl formaldehit ilave edildi.
5. 2.yıkama çözeltisi: 250 ml destile suya 1 ml gliserin ilave edildi ve içerisine suyun %5'i asetik asit olacak şekilde asetik asit katıldı.

Çalışmada kullanılan ilaçların stok çözeltileri:

1. Penisilin-G: 300 mg penisilin-G'nin 2 ml steril suda çözülmesiyle elde edildi (448 mM).
2. Gentamisin: 160 mg gentamisin'in 2 ml steril suda çözülmesiyle elde edildi (167 mM).
3. Amikasin: 500 mg amikasin'in 2 ml steril suda çözülmesiyle elde edildi (427 mM).
4. Tilozin: 200 mg tilozin'in 1 ml steril suda çözülmesiyle elde edildi (218 mM).
5. Enrofloksasin: 100 mg enrofloksasin'in 1 ml steril suda çözülmesiyle elde edildi (278 mM).
6. Ampisilin: 1 g ampisilin'in 4 ml steril suda çözülmesiyle elde edildi (715 mM).
7. Kloramfenikol: 1 g kloramfenikol'ün 5 ml steril suda çözülmesiyle elde edildi (619 mM).
8. Linkomisin: 600 mg linkomisin'in 2 ml steril suda çözülmesiyle elde edildi (738 mM).
9. Kanamisin: 250 mg kanamisin'in 20 ml steril suda çözülmesiyle elde edildi (26 mM).
10. Oksitetrasiklin: 200 mg oksitetrasiklin'in 50 ml steril suda çözülmesiyle elde edildi (9 mM).
11. Seftriakson: 1 g seftriakson'un 10 ml steril suda çözülmesiyle elde edildi (180 mM).
12. Streptomisin: 1 g streptomisin'in 5 ml steril suda çözülmesiyle elde edildi (344 mM).
13. Vankomisin: 1 g vankomisin'in 10 ml steril suda çözülmesiyle elde edildi (69 mM).
14. Sefotaksim: 1 g sefotaksim'in 10 ml steril suda çözülmesiyle elde edildi (219 mM).
15. Sefazolin: 1 g sefazolin'in 4 ml steril suda çözülmesiyle elde edildi (550 mM).
16. Sefuroksim: 250 mg sefuroksim'in 5 ml steril suda çözülmesiyle elde edildi (118 mM).
17. Ornidazol: 500 mg ornidazol'ün 3 ml steril suda çözülmesiyle elde edildi (759 mM).

3.2. Yöntem

3.2.1. NOS enziminin saflaştırılması ile ilgili yöntemler

3.2.1.a. Böbrek doku homojenatının hazırlanması

Çalışmada kullanılan böbrek dokuları taze temin edilerek, doku örnekleri kan ve diğer kirlilikleri elimine etmek için %0,9'luk NaCl çözeltisi ile üç defa yıkandı. Doku homojenatını hazırlamak için ilk olarak doku küçük parçalara ayrıldı ve daha sonra sıvı azot içinde parçalanarak, 3ml/g olacak şekilde 1 mM EDTA, 1 mM DTT ve 1 mM PMSF içeren 50 mM Tris/HCl (pH=7,4) tampon çözeltisi içerisinde homojenize edildi. Elde edilen homojenat süzgeç kâğıdı kullanılarak süzme işlemine tabi tutuldu. Bu işlemden sonra süspansiyon 100.000xg'de bir saat süre ile santrifüj edildi. Santrifüj sonrası çökelek kısmı atılarak süpernatant bir sonraki saflaştırma basamağında kullanıldı. Yukarıda anlatılan bütün işlemler +4°C'de gerçekleştirildi (Alim and Beydemir 2012).

3.2.1.b. Sığır trombositlerinin eldesi

İdeal şartlarda saf trombosit eldesi aferez cihazları ile yapılmaktadır. Bu cihaza bağlanan kişilerin kanlarından doğrudan trombosit ayrımı gerçekleştirilmektedir. Ancak bu metot, canlıyı 1,5-2 saatlik cihaza bağlı kalmayı zorunlu kıldığından bu tekniği kullanarak sığırdan trombosit eldesi mümkün olmamaktadır. Bu sebeple, klasik yöntemlerle trombosit eldesine gidilmiştir. Klasik yöntemde, üçlü trombosit ayırma kan torbası kullanılarak alınan sığır kan örneği (antikoagülanlı) 9000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Böylece şekilli elemanlar-plazma ayrışması sağlandı. İkinci aşamada, plazma örneği bir ekstraktör yardımıyla ikinci torbaya geçiş kanalı ile alındı ve 8000 rpm'de 7 dk santrifüj edilerek serum-trombosit ayrımı gerçekleştirildi. Santrifüjden sonra, üstte kalan plazma üçüncü torbaya kanal yoluyla aktarıldı. Böylece, ikinci torbada sadece trombosit kalmış oldu ve trombosit eldesi tamamlandı. Elde edilen trombositler derhal bir çalkalayıcıya konuldu.

3.2.1.c. 2'5'-ADP Sepharose 4B Afinite Kolonunun Hazırlanması ve NOS Enziminin Saflaştırılması

Afinite kromatografisi, spesifik ligand esasına dayanan ve proteinlerin ayrılması için kullanılan oldukça önemli bir kromatografi yöntemidir. Afinite kromatografisi yöntemiyle hedef proteinler sadece bir basamakta çok kompleks karışımlardan izole edilebilirler. Çalışmamızda NOS enzimini yüksek verimle ve tek basamakta izole edebilmek için 2'5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi yöntemi kullanıldı. Kolon hazırlanırken 10 ml'lik yatak hacmi için 2 g kuru 2'5'-ADP Sepharose 4B jeli tartılarak, 400 ml destile su ile katı maddelerin uzaklaştırılması için birkaç defa yıkandı. Yıkama işlemi esnasında jel şişirildi ve şişirilmiş jelin havası su trompu kullanılarak vakum ile alındıktan sonra jel dengeleme tampon çözeltisi (1 mM DTT içeren 50 mM Tris-HCl pH=7,4) ile süspanse edildi. Elde edilen kolon materyali 1x10cm'lik kolona paketlenip, 1 mM DTT içeren 50 mM Tris-HCl (pH=7,4) tampon çözeltisi ile dengeleme işlemi yapıldı. Böylece afinite kolonu dengelenmiş oldu. Uygun miktardaki doku homojenatı kolondan geçirildikten sonra sırasıyla 1 mM DTT içeren 50 mM Tris-HCl pH=7,4, 1 mM DTT, 0,6 M NaCl içeren 50 mM Tris-HCl pH=7,4, 1 mM DTT, 0,5 mM NADH içeren 50 mM Tris-HCl pH=7,4, 1 mM DTT ve 0,5 mM NADP⁺ içeren 50 mM Tris-HCl pH=7,4 ve 1 mM DTT içeren 50 mM Tris-HCl pH=7,4 tampon çözeltileri ile yıkama işlemi yapıldı. Böylece kolona bağlanmayan ve hedef protein dışında kolona bağlanan diğer protein ve safsızlıklar ortamdan uzaklaştırılmış oldu. Daha sonra NOS enzimi 1 mM DTT ve 5 mM NADPH içeren 50 mM Tris-HCl pH=7,4 çözeltisi kullanılarak kolondan elüe edildi ve aktivite gösteren fraksiyonlar toplanarak diğer çalışmalarda kullanılmak üzere -80°C'de muhafaza edildi.

3.2.1.d. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının belirlenmesi

Enzim saflaştırıldıktan sonra, Laemmli metoduna göre, %3-8 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi (Laemmli 1970).

Bunun için elektroforez plakaları önce su ile sonra alkol ile iyice yıkandı. Her iki kenarında aralık oluşturuca bir plaka ile düz bir plaka üst üste getirilerek kısıkaçlarla tutturuldu. Sabitleştirilen plakalar, içerisinde sızdırmayı önleyen sünger ihtiva eden jel hazırlama kabinine konuldu. Önce ayırma jeli hazırlandı ve enjektörle plakaların arasına üst kesimde 0,5cm kalıncaya kadar dolduruldu. İki saat jelin donması beklendi, ayırma jelinin katılaştığından emin olunduktan sonra yığıma jeli hazırlandı. Jelin üst kısmındaki boşluğa dolduruldu ve numune kuyucuklarının oluşması için tarak dikkatlice yerleştirildi. Yığıma jelinin katılaşması beklenirken ıslatılmış süzgeç kağıdı sistemin üzerine kapatıldı ve kuruması önlendi. Yığıma jeli katılaştıktan sonra tarak dikkatlice çıkartılarak numune kuyuları belirlendi. Önce saf su, sonra da yürütme tamponuyla yıkandı ve jel plakalarla birlikte elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu dolduruldu. Enzim örnekleri yaklaşık 20 µg protein olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim 50 µl olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu katıldı. Üç dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi. Elektroforez tankı kapatılarak alt tarafından (+) anot, üst taraftan ise (-) katot yerleştirildi. Önce 70 voltta 20 dakika yürütüldü ve örnek ayırma jeline kadar gelip yığıldı. Sonra akım 110 volt'a çıkartılarak numunelerin jelin alt sınırına gelmesine kadar yürütüldü. Numunelerin takip edilmesi, numune tamponuna katılan brom timol mavisi yardımıyla gerçekleştirildi.

Ayırma jeli şöyle hazırlandı: 5 ml 1M Tris-HCl (pH=8,8) tampon çözeltisi, 4,4 ml %30'luk akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,2 ml %0,1'lik SDS, 0,13 ml %5'lik TEMED (N,N,N',N'-Tetrametil etilen diamin) ve 3,13 ml destile su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine en son olarak 0,27 ml %5'lik PER eklendi.

Yığıma jeli şöyle hazırlandı: 0,41 ml 1M Tris-HCl (pH=6,8) tampon çözeltisi, 0,8 ml %30'luk akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,03 ml %0,1'lik SDS, 0,03 ml %5'lik TEMED ve 2,45 ml destile su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine en son olarak 0,07 ml %5'lik PER eklendi.

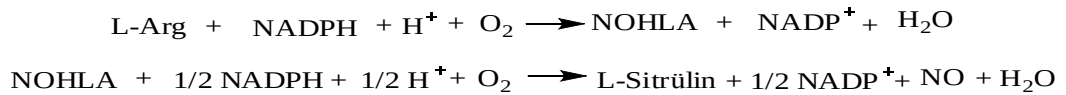
Yürütme işlemi bittikten sonra akım kesilerek plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı ve yürütülen proteinlerin belirginleşmesi amacıyla aşağıdaki boyama yöntemlerinden birisi kullanılarak işlem tamamlanmış oldu.

Coomassie blue R-250 ile boyama: Çıkarılan jel sabitleştirme çözeltisine konuldu. Sabitleştirme çözeltisinde 20 dakika bekletilen jel, çıkarılarak boyama çözeltisine konuldu ve çalkalayıcı üzerinde iki saat bekletildi. Jel boyandıktan sonra çıkarılarak yıkama çözeltisine konuldu. Rengi açılıp, protein bantları belirginleşinceye kadar çalkalayıcıda yıkanan jel çıkarılarak fotoğrafı çekildi.

Gümüş boyama: Çıkarılan jel öncelikle tespit çözeltisinde, daha sonra redüksiyon çözeltisinde yarım saat bekletildi. Akabinde, jel her seferinde 5'er dakika boyunca destile suyla 3 kez çalkalayıcıda yıkandı. Jel, taze hazırlanan boyama çözeltisinde 20dk bekletildikten sonra yıkama işlemi öncesi destile sudan geçirildi. Sonrasında jel 1.yıkama çözeltisine alındı, bantlar belirginleştikten sonra, jel kararmadan 1.yıkama çözeltisinden çıkarıldı. Jel, bantların görülmesi ve netleşmesi için yarım saat 2.yıkama çözeltisinde bekletildikten sonra da musluk suyu içine alınıp muhafaza edildi.

3.2.2. NOS enziminin aktivite tayini

3.2.2.a. NADPH oksidasyonu metodu



Reaksiyonuyla NADPH'ın yükseltgenmesi sonucu oluşan absorbans düşüşü 340 nm'de ölçüldü. Bu amaçla, 1 ml'lik kuvars küvet içerisinde 50 mM KH₂PO₄ tampon çözeltisi (pH=7,4), 1 mM CaCl₂, 0,1 mM NADPH, 80 µM BH₄, 10 µM FAD, 10 µM FMN, 0,1 mM L-arjinin ve enzim olacak şekilde reaksiyon ortamı hazırlandı ve 340 nm'de köre

karşı absorbans düşüşü ölçüldü. NOS enzim aktivitesinin üniteleri, dakika başına okside olan NADPH'nin mikromolünü verir (Genestra *et al.* 2006).

Enzim ünitesi hesaplanırken aşağıdaki formül kullanıldı:

$$\text{EÜ/ml} = \frac{\Delta\text{OD}}{6,22} \times \frac{V_T}{V_E} : 3/2$$

Bu formülde yer alan simgeler aşağıda açıklandı.

EU/ml : 1ml'deki enzim ünitesi

ΔOD : Bir dakikadaki absorbans değişimi

6,22 : NADPH'nin 340 nm'deki milimolar ekstinksiyon katsayısı

V_T : Ölçümün yapıldığı toplam küvet hacmi

V_E : Ölçümün yapıldığı küvete ilave edilen enzim numunesinin hacmi

3/2 : Stokiyometrik katsayı

3.2.2.b. Sitokrom-c redüktaz aktivite metodu

Nitrik oksit sentaz enzimi, tıpkı sitokrom P450 gibi sitokrom-c'yi indirgeme aktivitesine sahiptir. NOS'un sitokrom-c redüktaz aktivitesi, aktivite için gerekli reaktiflerin varlığında 550 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Bu amaçla, 1 ml'lik kuvars küvet içerisinde 50 mM Hepes tampon çözeltisi (pH=7,5), 1 mM CaCl_2 , 0,1 mM NADPH, 4 μM FAD, 4 μM FMN, 40 μM sitokrom-c ve enzim olacak şekilde reaksiyon ortamı hazırlandı ve 550 nm'de köre karşı absorbans artışı ölçüldü (Renodon *et al.* 1997).

Enzim ünitesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\text{EU/ml} = (\Delta\text{OD}/21) \times (V_t/V_e)$$

Burada;

EU/ml : 1ml'deki enzim ünitesi

ΔOD : Bir dakikadaki absorbands değişimi

21 : Sitokrom c'nin 550 nm'deki milimolar ekstinksiyon katsayısı

Vt : Ölçümün yapıldığı toplam küvet hacmi

Ve : Ölçümün yapıldığı küvete ilave edilen enzim numunesinin hacmi

3.2.3. Protein Tayini

3.2.3.a. Kalitatif protein tayini

Kalitatif protein tayini, proteinlerin yapısında bulunan aromatik yapıdaki triptofan ve tirozin amino asitlerinin 280 nm'de maksimum absorbands göstermesi esasına dayanmaktadır (Segel 1968). Bu metot yardımıyla kromatografi işlemlerinde fraksiyon toplayıcısı yardımıyla eşit hacimlerde alınmış bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Fraksiyonlar kuvars küvetlere alınarak, absorbandsları spektrofotometrede köre karşı okundu.

3.2.3.b. Bradford yöntemiyle kantitatif protein tayini

Enzim saflaştırma işlemlerinin her bir basamağından alınan numunelerin protein miktarları bu yöntemle belirlendi. Bu yöntem, proteine Coomassie brilliant blue G-250'nin bağlanması esasına dayanır. Oluşan kompleks 595 nm'de maksimum absorbands gösterir. Proteine boyanın bağlanması çok hızlı gelişir. Protein-boya kompleksi çözeltilerde uzun süre kalır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 μg arasındadır (Bradford 1976).

Tayin işlemlerinde şu prosedür takip edildi: 1 ml'sinde 1mg protein ihtiva eden standart sığır albümin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 μl alındı.

Saf su ile tüm tüplerin hacmi 0,1 ml'ye tamamlanıp ve 5 ml renklendirme reaktifi tüplere ilave edilip vorteks ile karıştırıldı. 10 dakika sonra 595 nm'de 3 ml'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak 0,1 ml aynı tampon çözelti ve 5 ml renklendirme reaktifinden oluşan karışım kullanıldı ve absorbans değerlerine karşılık gelen μg protein değerleri standart grafik haline getirildi. Protein tayini yapılacak numuneler için aynı yöntem uygulandı ve standart grafikten miktar tayini yapıldı.

3.2.4. NOS enziminin molekül kütlesi tayini

3.2.4.a. Sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzimin alt birim molekül kütlesi tayini

Laemmli (1970) metoduna göre molekül kütlesi tayini; molekül kütlesi bilinen standart proteinler kullanılarak elektroforez işlemi vasıtasıyla gerçekleştirildi. Bu işlem sonucunda standart proteinlerin R_f değerleri hesaplanarak log MK- R_f standart grafiği çizildi. Daha sonra sığır dokularından elde edilen NOS enzimleri için R_f değeri hesaplanıp standart grafikte yerine konularak NOS enzimlerinin log MK'sı belirlendi. Bu değerlerin anti logaritması alınarak numunelerin molekül kütleleri tayin edildi.

3.2.4.b. Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi metodu ile NOS enziminin aktif formunun molekül kütlelerinin tayini

NOS enziminin aktif formunun molekül kütlesi Andrews ve arkadaşlarının metoduna göre belirlendi (Whitaker 1963; Andrews 1965). Jel filtrasyon kromatografisi ile molekül kütlelerinin tayini için önceden 36 ml yatak hacmi elde etmek için 5 g Sephadex G-100, 150 ml saf su içine alındı. 90°C'de su banyosunda bekletilerek polimer materyal (Sephadex G-100) şişirildi. Şişirilmiş materyalin içindeki hava, su trompu kullanılarak vakumla uzaklaştırıldı. Şişirilmiş ve havası uzaklaştırılmış polimer materyali 50 mM KH_2PO_4 , pH:7,0 tampon çözeltisiyle dolu kolona, içinde hava kabarcığı kalmayacak şekilde paketlenerek aynı tampon çözelti ile dengeleme işlemi

yapıldı. Kolonun dengelendiğini tespit etmek için, üstten ilave edilen tampon çözelti ile alttan alınan tampon çözeltinin pH ve 280 nm’de absorbans değerleri aralıklarla ölçüldü ve bu değerler aynı oluncaya kadar dengeleme işlemine devam edildi. Kolonun akış hızı 10-15 ml/saat olarak ayarlandı.

Molekül kütlesi tayininde kullanılacak olan standart grafiği elde edebilmek için öncelikle kolondan standart proteinler geçirildi (Keha ve Küfrevioğlu 2005). Daha sonra sığır dokularından elde edilen enzim numuneleri jel filtrasyon kolonuna uygulandı ve elüsyon işlemleri gerçekleştirildi. Elüsyon işlemi sırasında, jel üzerindeki tampon çözelti jel seviyesine kadar indirildi. Kolona her bir protein çözeltisinden 2 ml tatbik edildi. Kolona uygulanan protein çözeltisi jel tarafından tamamen emildikten sonra kolonun üstü elüsyon tamponuyla (50mM KH₂PO₄ pH=7,0) doldurularak, elüatlar 1’er ml olacak şekilde tüplere alındı. Elüsyon tamponu kör olarak kullanıldı ve toplanan elüatların 280 nm’de absorbansları ölçülerek kaydedildi. Elüsyon işlemine 280 nm’deki absorbans değerleri sıfır oluncaya kadar devam edildi. 280 nm’de absorbans gösteren tüplerde aktivite ölçümleri yapıldı. 280 nm’de kalitatif ölçüm için alınan absorbans değerleri tüp sayısına karşı grafiğe geçirildi.

Enzimin molekül kütlesini belirlemek için her bir protein için ayrı ayrı K_{av} ve Log MK değerleri hesaplandı.

$$K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$$

V_e: Elüsyon hacmi

V_o: Void hacim

V_t: toplam hacim

Log MK-K_{av} grafiği bilgisayarda Excel programı yardımıyla çizildi. Son olarak NOS enzimleri için K_{av} değerleri belirlenerek grafik vasıtasıyla enzimlerin aktif formunun molekül kütleleri belirlendi.

3.2.5. NOS enziminin karakterizasyonu ve kinetik çalışmalar

3.2.5.a. Sığır dokularından saflaştırılan NOS enzimleri için optimum pH bulunmasına yönelik çalışmalar

NOS enzimlerinin optimum pH'sını belirlemek amacıyla pH:5,0 ile 8,0 arasında 0,5'er birimlik artışla potasyum fosfat, pH:7,5 ile 9,0 arasında 0,5'er birimlik artışla Tris-HCl, pH:9,0 ile 10,5 arasında 0,5'er birimlik artışla glisin-NaOH tampon çözeltileri hazırlandı. Uygun substrat çözeltisi ile her bir tampon çözeltide ayrı ayrı enzim aktivitelerine bakılarak optimum pH belirlendi.

3.2.5.b. Enzimin optimum iyonik şiddetinin belirlenmesine yönelik çalışmalar

NOS enziminin optimum aktivite sağlayan iyonik şiddetinin belirlenmesi amacıyla optimum pH belirlendikten sonra 10, 25, 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 mM konsantrasyonlarına sahip stok tampon çözeltileri hazırlanarak, enzimlerin aktiviteleri spektrofotometrik olarak ölçüldü. Maksimum absorbansın ölçüldüğü tampon çözeltinin iyonik şiddeti, optimum iyonik şiddet olarak belirlendi.

3.2.5.c. Enzimin optimum sıcaklığının ve Q_{10} değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar

Sığır dokularından elde edilen NOS enzimlerinin aktivitelerinin optimum olduğu sıcaklık ve Q_{10} değerlerinin belirlenmesi amacıyla dijital su banyosu kullanılarak 0°C - ile 60°C arasında 10'ar derecelik sıcaklık farkı oluşturularak, enzimin optimum pH değerinde ve optimum iyonik şiddetinde spektrofotometrik olarak aktivite ölçümü yapıldı ve enzimin optimum sıcaklık değeri belirlendi.

Daha sonra her bir enzim için, 10°C'lik sıcaklık değişiminin meydana getirdiği aktivite farklılığı olan Q_{10} değerleri, aralarında 10°C fark olan iki aktivite değerinden yüksek

olanın düşük olan aktivite değerine bölünmesi ile hesaplandı (Soyut ve Beydemir 2008; Keha ve Küfrevioğlu 2005).

3.2.5.d. Enzimin stabil pH değerinin bulunmasına yönelik çalışmalar

Enzimlerin stabil olduğu pH değerini tespit etmek için pH'ları 5,0-5,5-6,0-6,5-7,0-7,5-8,0 olan fosfat tampon çözeltileri, pH'ları 7,5-8,0-8,5-9,0 olan Tris-HCl tampon çözeltileri ve pH'ları 9,0-9,5-10,0-10,5 olan glisin-NaOH tampon çözeltileri hazırlandı. Belirtilen pH'lardaki tampon çözeltilerin 2ml'si ile 1ml enzim çözeltisi karıştırılarak +4°C'de muhafaza edildi ve 7 gün boyunca 24 saat arayla yapılan aktivite ölçümü sonucunda enzim aktivitesinin stabil olduğu pH değeri belirlendi.

3.2.5.e. Enzimin NADPH, L-arjinin ve sitokrom-c için K_m ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik çalışmalar

NOS enzimlerinin NADPH, L-arjinin ve Sitokrom-c için K_m ve V_{max} değerlerini belirlemek amacıyla, sabit L-arjinin konsantrasyonunda NADPH'nın 5 farklı konsantrasyonunda 340 nm'de absorbans azalışı ölçülerek enzim aktiviteleri belirlendi. Elde edilen değerlerle Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Bu grafikten yararlanarak NADPH için K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı. Aynı şekilde NADPH'nın sabit konsantrasyonunda L-arjinin'in 5 farklı konsantrasyonlarında aktivite ölçümleri yapılarak Lineweaver-Burk grafiği oluşturulmak istendi. Fakat NOS enziminin, L-arjinin'in varlığında ve yokluğunda aktivite göstermesi nedeniyle, L-arjinin için K_m ve V_{max} değerleri hesaplanamadı. Son olarak, sitokrom-c redüktaz aktivite metodu kullanılarak sabit NADPH konsantrasyonunda 5 farklı sitokrom-c konsantrasyonuyla aktivite ölçümleri yapıldı ve Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Bu grafikten yararlanılarak enzimin sitokrom-c için K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı. Aktivite ölçümleri optimal şartlarda gerçekleştirildi.

3.2.5.f. Enzim aktivitesi için gerekli Ca^{+2} , NADPH, FAD, FMN ve BH_4 maddelerinin enzim aktivitesine etkilerinin incelenmesine yönelik çalışmalar

NOS enziminin aktivitesine etki eden başlıca maddeler: NADPH, tetrahidrobiyopterin, FAD ve FMN'dir. Ayrıca NOS enzimi, aktivitesi için Ca^{+2} iyonuna da ihtiyaç duymaktadır. Enzimin maksimum aktivite gösterebilmesi için bu maddelere ihtiyacı vardır. Enzim aktivitesi üzerine bu maddelerin etkilerinin incelenmesi amacıyla bütün reaktiflerin varlığında enzim aktivitesi 340 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü ve bu aktivite %100 olarak ifade edildi. Daha sonra aktiviteye etki eden bu maddeler teker teker eksiltiilerek aktivite ölçümleri yapıldı ve böylece her bir madde eksikliğinde NOS enzim aktivitesinin nasıl etkilendiği belirlendi.

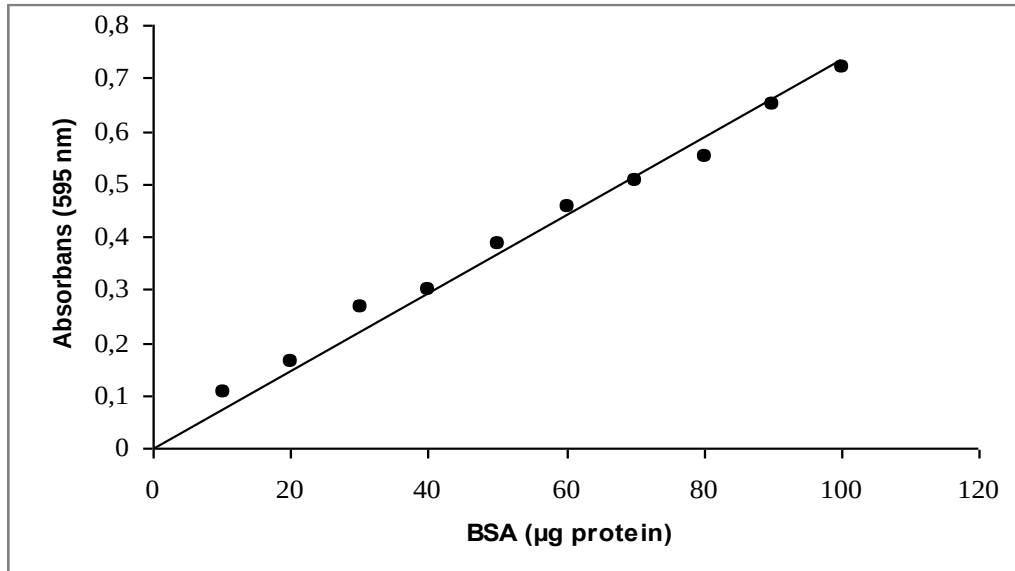
3.2.6. NOS enziminin aktivitesi üzerine bazı antibiyotiklerin *in vitro* etkilerinin incelenmesine yönelik çalışmalar

NOS enzim aktivitesi üzerine insanlarda ve veteriner hekimlikte kullanılan bazı antibiyotiklerin etkilerini belirlemek amacıyla küvetteki reaksiyon karışımına değişik konsantrasyonlarda ilaç katılarak NADPH oksidasyonu aktivite metoduna göre 340 nm'de absorbans azalışı spektrofotometrik olarak okunup enzim aktivitelerindeki değişimler ölçüldü. Kullanılan ilacın farklı konsantrasyonlarını oluşturmak amacıyla stok çözeltiler seyreltilti. İnhibisyon gösteren ilaçlar ve kimyasallar için % Aktivite-[I] grafikleri çizilerek, eğrinin denkleminde IC_{50} değerleri (enzimin aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu) hesaplandı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Kantitatif protein tayini için elde edilen standart grafik

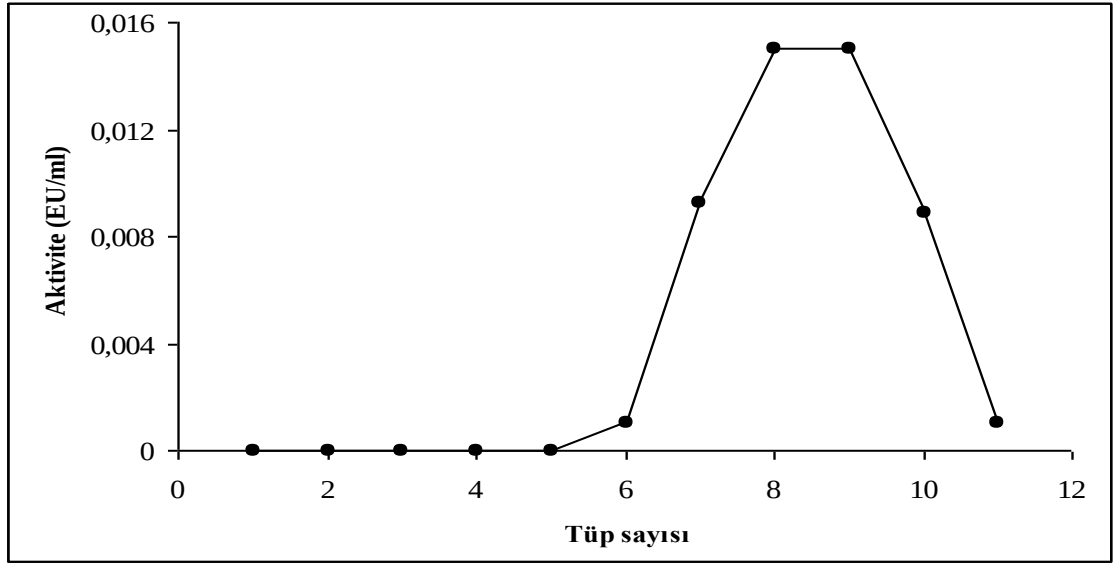
Elde ettiğimiz enzim çözeltilerindeki kantitatif protein tayini Bradford yöntemiyle belirlendi. Bu amaçla önce standart grafik hazırlandı. Elde edilen enzim çözeltilerindeki protein tayinleri Bradford yöntemiyle yapıldıktan sonra bu standart grafikten faydalanılarak protein miktarları hesaplandı.



Şekil 4.1. Bradford metoduyla hazırlanan proteinlerin kantitatif tayini için kullanılan standart grafik

4.2. NOS enzimi için saflaştırma sonuçları

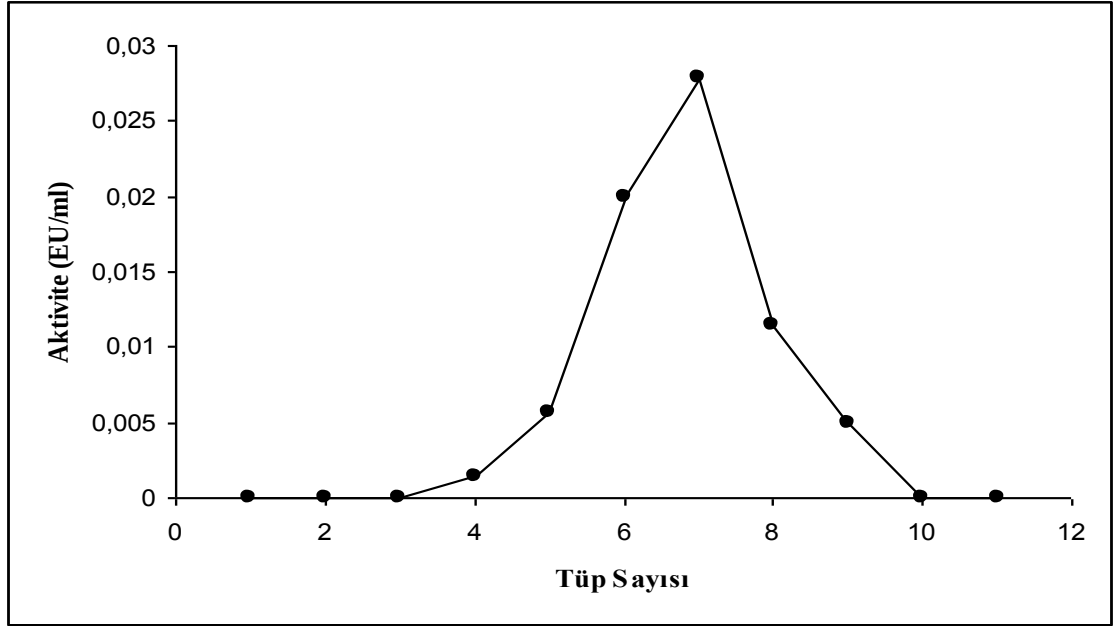
NOS enzimi, sıgır böbreğinden ve trombositlerinden 2'5'-ADP Sepharose 4B Afinite kromatografisi kullanılarak tek basamakta saflaştırıldı. Saflaştırılan NOS enzimine ait sonuçlar ve saflaştırma tablosu aşağıdaki gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Sığır böbreğinden 2'5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırılan NOS enziminin elüsyon grafiği

Çizelge 4.1. Sığır böbreğinden saflaştırılan NOS enzimi için elde edilen saflaştırma sonuçları

Saflaştırma basamağı	Aktivite (EU/ml)	Toplam hacim (ml)	Protein (mg/ml)	Toplam protein (mg)	Toplam aktivite (EU)	Spesifik aktivite (EU/mg)	Verim (%)	Saflaştırma katsayısı
Homojenat	0,0246	34	16,2	550,8	0,8364	0,00152	100	1
Afinite Kromatografisi	0,0150	2	0,0081	0,0162	0,0300	1,851	3,58	1217



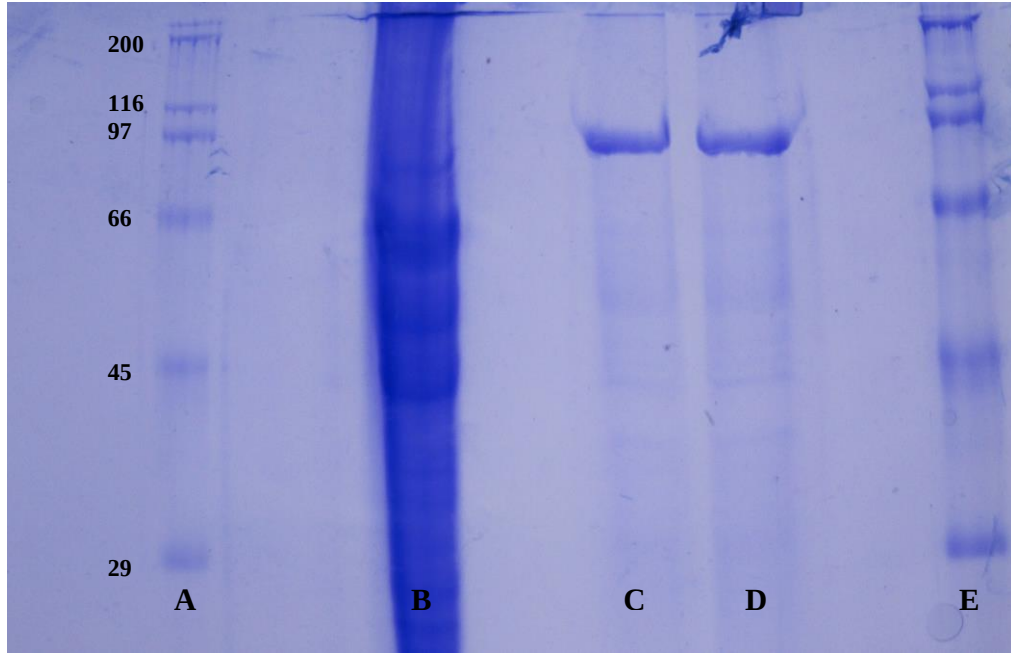
Şekil 4.3. Sığır trombositlerinden 2'5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırılan NOS enziminin elüsyon grafiği

Çizelge 4.2. Sığır trombositlerinden saflaştırılan NOS enzimi için elde edilen saflaştırma sonuçları

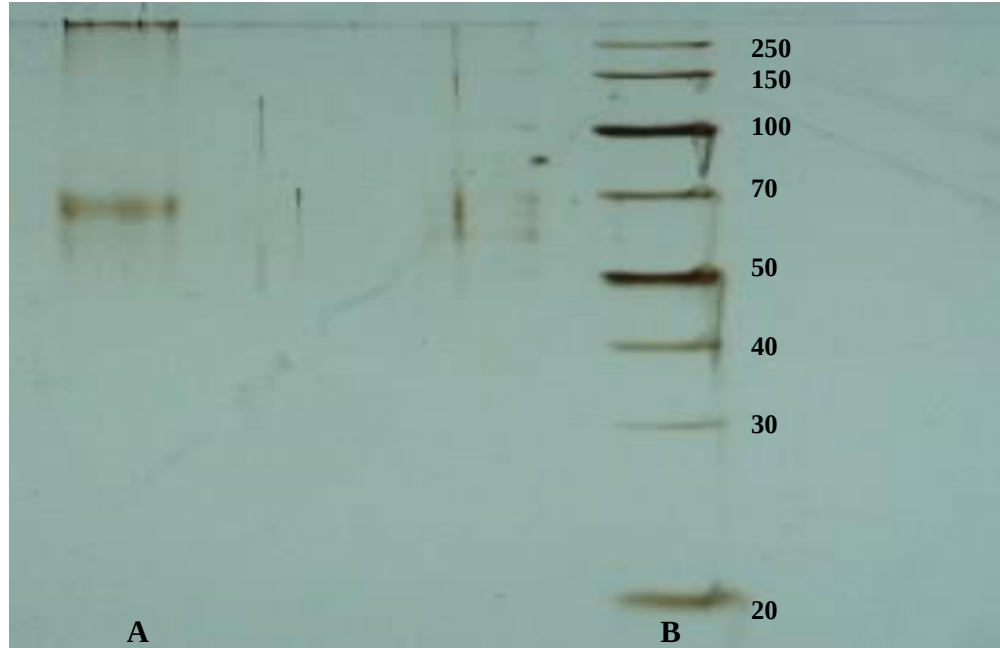
Saflaştırma basamağı	Aktivite (EU/ml)	Toplam hacim (ml)	Protein (mg/ml)	Toplam protein (mg)	Toplam aktivite (EU)	Spesifik aktivite (EU/mg)	Verim (%)	Saflaştırma katsayısı
Homojenat	0,0107	18	3,89	70,02	0,1926	0,00275	100	1
Afinite Kromatografisi	0,0139	1	0,0055	0,0055	0,0139	2,527	7,21	919

4.3. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının kontrolü

Sığır böbrek ve trombositlerinden afinite kromatografisi sonrası elde edilen NOS enzim numunelerinin saflığını kontrol etmek için kesikli SDS-PAGE yöntemi kullanıldı. Bu amaçla enzim numuneleri ve standart proteinler sırayla kuyulara uygulandı ve yürütüldü. Elde edilen bantları gösteren fotoğraflar aşağıdaki şekillerde verildi.



Şekil 4.4. SDS- PAGE fotoğrafı; A ve E standart proteinler (domuz myosin 200 kDa, β -galaktozidaz 116 kDa, fosforilaz 97,4 kDa, sığır serum albumini 66 kDa, ovalbumin 45 kDa, sığır eritrosit karbonik anhidrazı 29 kDa), B sığır böbreği homojenatı, C ve D sığır böbreğinden saflaştırılan NOS enzimi

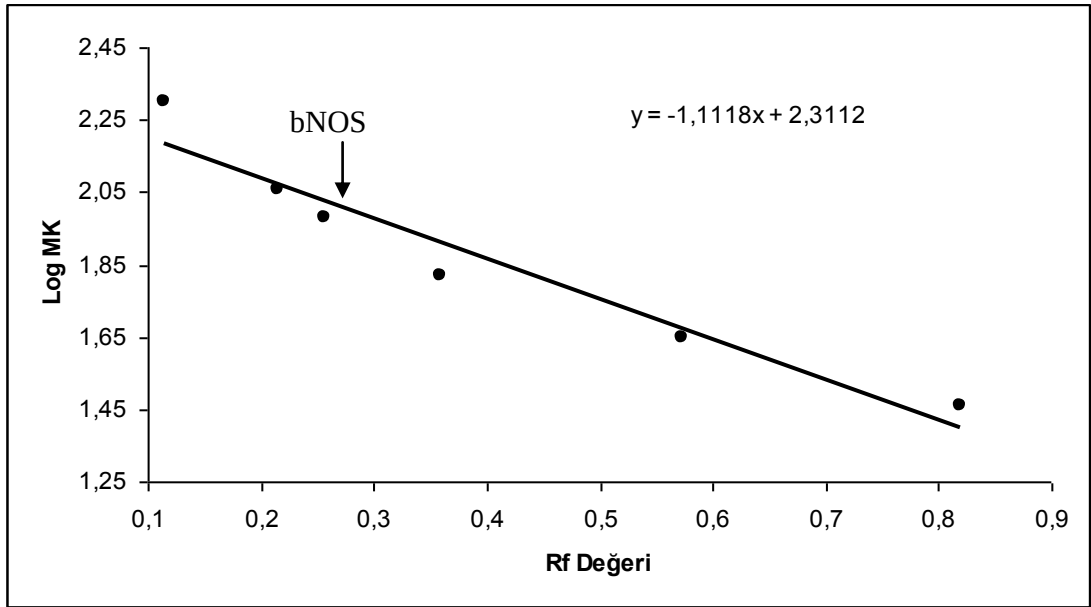


Şekil 4.5. Sığır trombositlerinden saflaştırılan NOS enzimi için SDS- PAGE fotoğrafı; A; afinite kromatografisi sonrası, B; standart proteinler; (250 kDa, 150 kDa, 100 kDa, 70 kDa, 50 kDa, 40 kDa, 30 kDa ve 20 kDa)

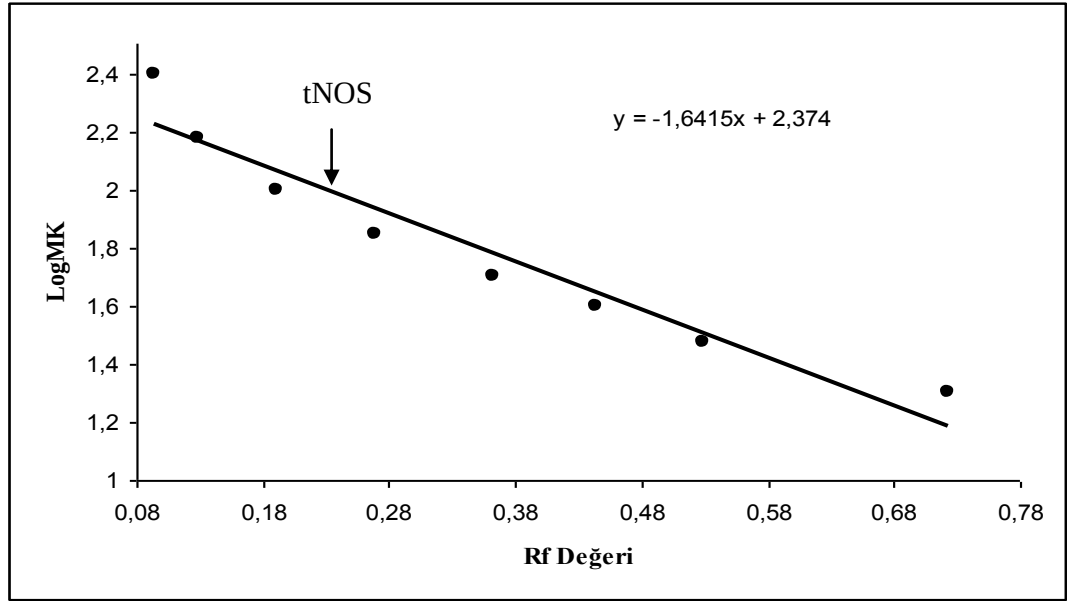
4.4. Nitrik Oksit Sentaz Enziminin Molekül Kütlesi Tayini ile İlgili Bulgular

4.4.1. SDS-PAGE ile alt birim molekül kütlesi tayini

Saflaştırılan enzimlerin alt birim molekül kütlerinin tayini için, Laemmli metoduna göre standart proteinlerin R_f değerleri hesaplanarak log MK- R_f standart grafikleri çizildi. Sığır böbrek ve trombositlerinden saflaştırılan NOS enzimleri için R_f değerleri hesaplandı ve standart grafikte yerine konularak enzimlerin alt birim molekül kütleleri hesaplandı.



Şekil 4.6. Sığır böbreğinden saflaştırılan NOS enziminin SDS-PAGE yöntemiyle molekül kütlesi tayininde kullanılan standart grafik (bNOS için $R_f=0,261$)

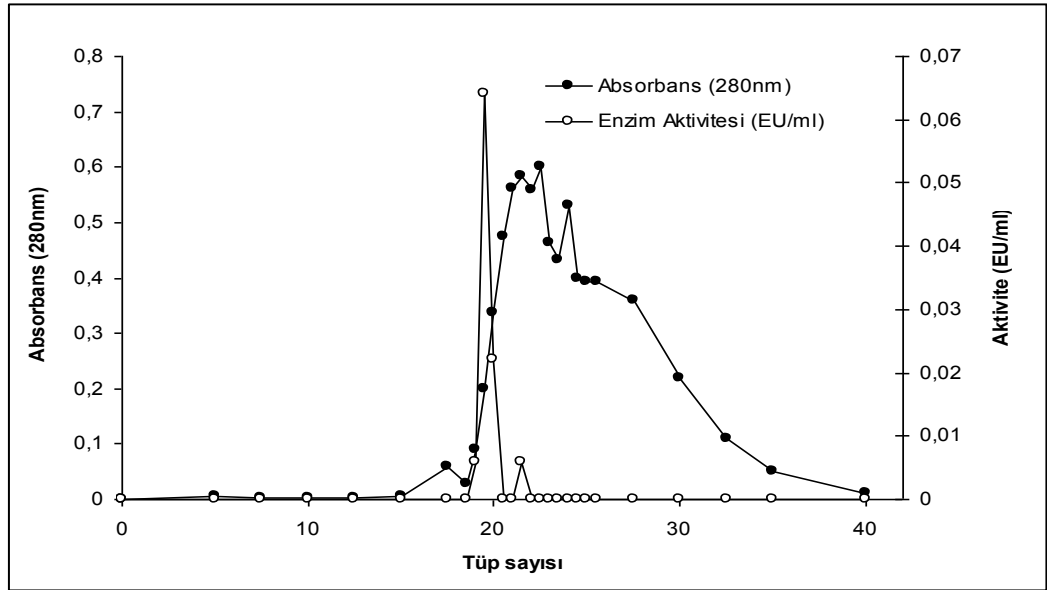


Şekil 4.7. Sığır trombositlerinden saflaştırılan NOS enziminin SDS-PAGE yöntemiyle molekül kütlesi tayininde kullanılan standart grafik (tNOS için $R_f=0,268$)

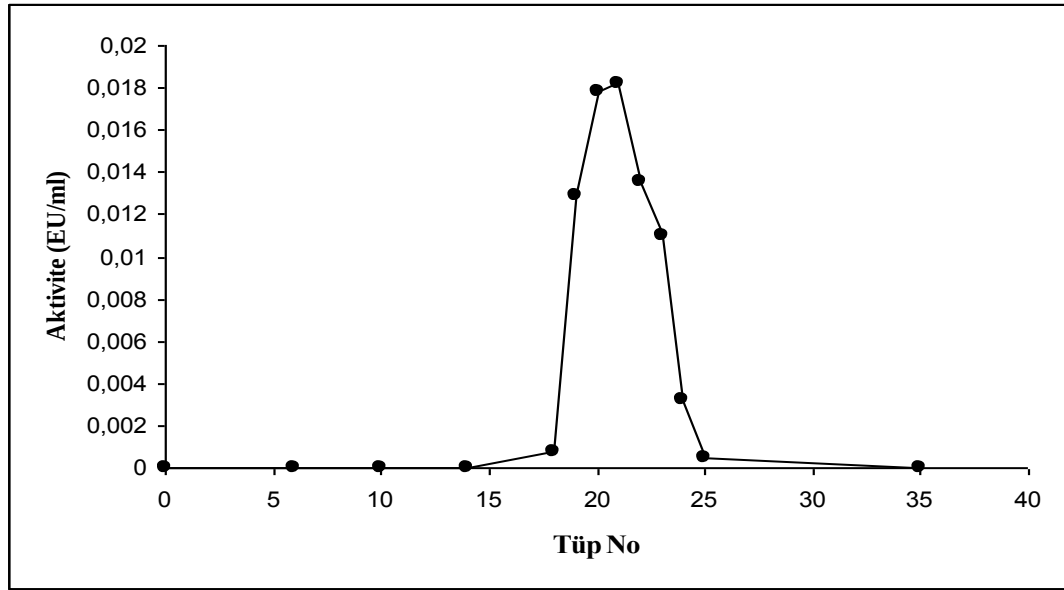
4.4.2. Jel filtrasyon kromatografisi metodu kullanılarak molekül kütlesi tayini

Saflaştırılan enzimlerin aktif formunun molekül kütleleri jel filtrasyon kromatografisi tekniği kullanılarak belirlendi. Bu işlem esnasında; kolonun void hacmini belirlemek için kolondan önce Blue dextran (2000 kDa) proteini geçirildi. Daha sonra Apoferritin (443 kDa), alkol dehidrogenaz (150 kDa), albumin (66 kDa) ve karbonik anhidraz (29 kDa) standart proteinleri sırasıyla kolona uygulandı. Her bir proteinin elüsyon hacmi 280 nm'de köre karşı absorbans değerleri okunarak belirlendi. Her bir protein için ayrı ayrı K_{av} değerleri ve Log MK değerleri hesaplandı.

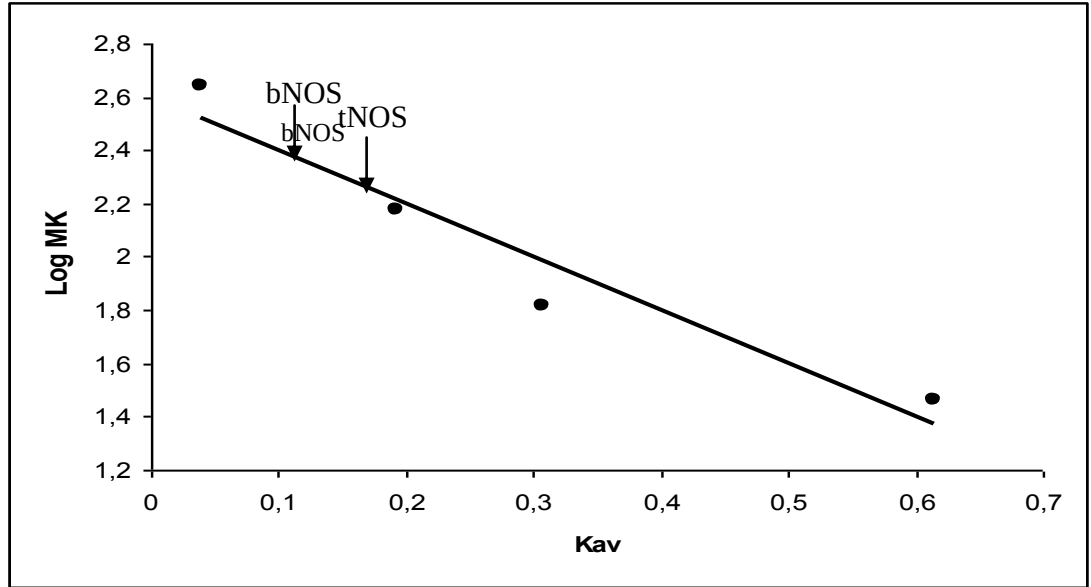
Bilgisayarda Excel programı kullanılarak Log MK- K_{av} grafikleri çizildi. NOS enzimleri için K_{av} değerleri belirlenerek grafik denklemlerinden enzimlerin molekül kütleleri belirlendi.



Şekil 4.8. Sığır böbreğinden saflaştırılan NOS enziminin molekül kütlesi tayini için kullanılan jel filtrasyon kromatografisi elüsyon grafiği



Şekil 4.9. Sığır trombositlerinden saflaştırılan NOS enziminin molekül kütlesinin tayininde kullanılan jel filtrasyon kromatografisi elüsyon grafiği



Şekil 4.10. Sığır böbrek ve trombositlerinden saflaştırılan NOS enzimlerinin molekül kütlelerinin tayininde kullanılan standart grafik

*böbrek NOS için Kav=0,135; trombosit NOS için Kav=0,192

Çizelge 4.3. Saflaştırılan NOS enzimleri için molekül kütlesi belirleme çalışmalarının sonuçları

Uygulanan Metot	Böbrek NOS (kDa)	Trombosit NOS (kDa)
SDS-PAGE	104,9	85,9
Jel Filtrasyon	215	165,4

4.5. NOS Enziminin Karakterizasyonu ve Kinetik Çalışmalarla İlgili Bulgular

4.5.1. Optimum pH belirlenmesine yönelik çalışmaların sonuçları

Saflaştırılan NOS enzimleri için optimum pH belirlenmesine yönelik çalışmalar kapsamında materyal metot kısmında anlatıldığı gibi pH:5,0 ile 8,0 arasında potasyum fosfat, pH:7,5 ile 9,0 arasında Tris-HCl, pH: 9,0 ile 10,5 arasında glisin-NaOH tampon çözeltileri kullanılarak enzim aktivitelerine bakıldı. En yüksek aktivitenin görüldüğü tampon çözelti enzimin optimum pH'sı olarak belirlendi.

Çizelge 4.4. Sığır böbreğinden saflaştırılan NOS enziminin 50 mM KH_2PO_4 tampon çözeltileri (pH 5,0-8,0 aralığında) kullanılarak elde edilen aktivite değerleri

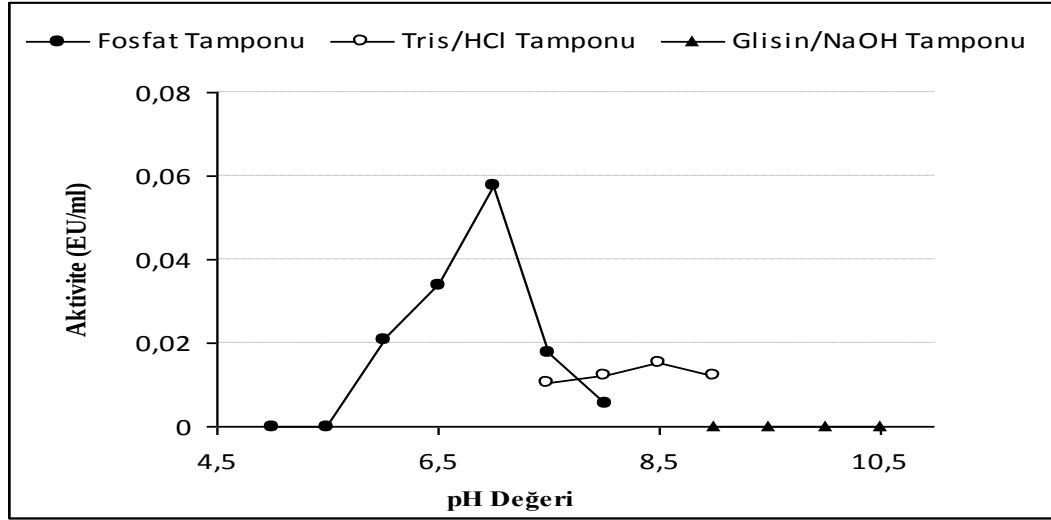
pH	Aktivite (EU/ml)
5,0	0,0
5,5	0,0
6,0	0,021
6,5	0,034
7,0	0,058
7,5	0,018
8,0	0,006

Çizelge 4.5. Sığır böbreğinden saflaştırılan NOS enziminin 50 mM Tris-HCl tampon çözeltileri (pH 7,5-9,0 aralığında) kullanılarak elde edilen aktivite değerleri

pH	Aktivite (EU/ml)
7,5	0,0105
8,0	0,0122
8,5	0,0154
9,0	0,0122

Çizelge 4.6. Sığır böbreğinden saflaştırılan NOS enziminin 50 mM glisin-NaOH tampon çözeltileri (pH 9,0-10,5 aralığında) kullanılarak elde edilen aktivite değerleri

pH	Aktivite (EU/ml)
9,0	0,0
9,5	0,0
10,0	0,0
10,5	0,0



Şekil 4.11. Sığır böbreğinden saflaştırılan NOS enziminin farklı tampon çözeltiler içerisinde gösterdiği aktivite değerlerinden elde edilen grafik

Çizelge 4.7. Trombosit NOS enziminin 50 mM KH_2PO_4 tampon çözeltileri (pH 5,0-8,0 aralığında) kullanılarak elde edilen aktivite değerleri

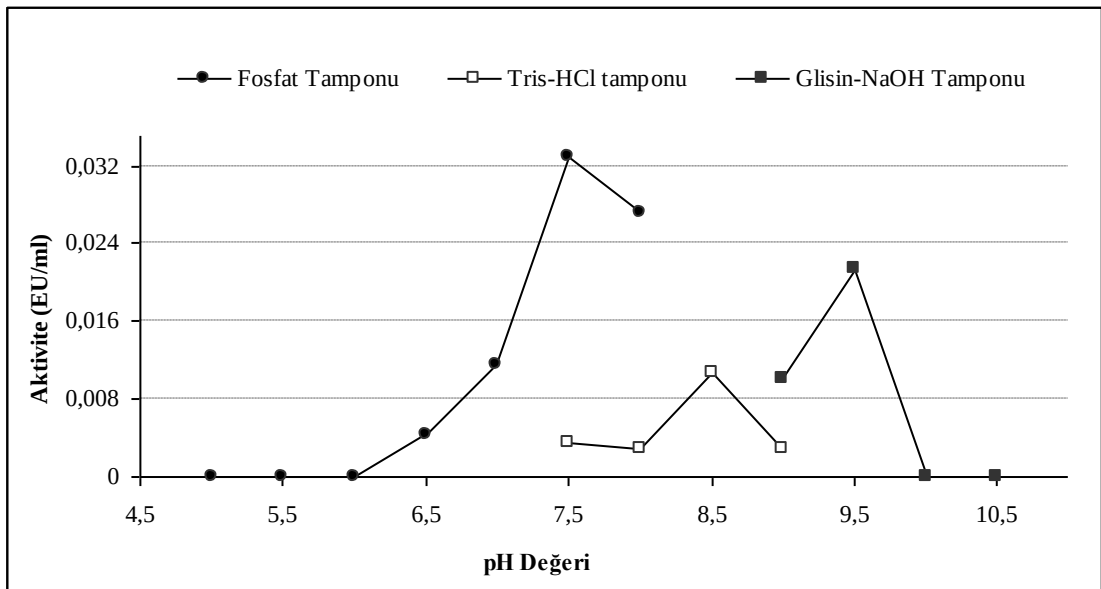
pH	Aktivite (EU/ml)
5,0	0,0
5,5	0,0
6,0	0,0
6,5	0,0043
7,0	0,0114
7,5	0,0329
8,0	0,0272

Çizelge 4.8. Trombosit NOS enziminin 50 mM Tris-HCl tampon çözeltileri (pH 7,5-9,0 aralığında) kullanılarak elde edilen aktivite değerleri

pH	Aktivite (EU/ml)
7,5	0,0036
8,0	0,0028
8,5	0,0107
9,0	0,0028

Çizelge 4.9. Trombosit NOS enziminin 50 mM glisin-NaOH tampon çözeltileri (pH 9,0-10,5 aralığında) kullanılarak elde edilen aktivite değerleri

pH	Aktivite (EU/ml)
9,0	0,0100
9,5	0,0214
10,0	0,0
10,5	0,0



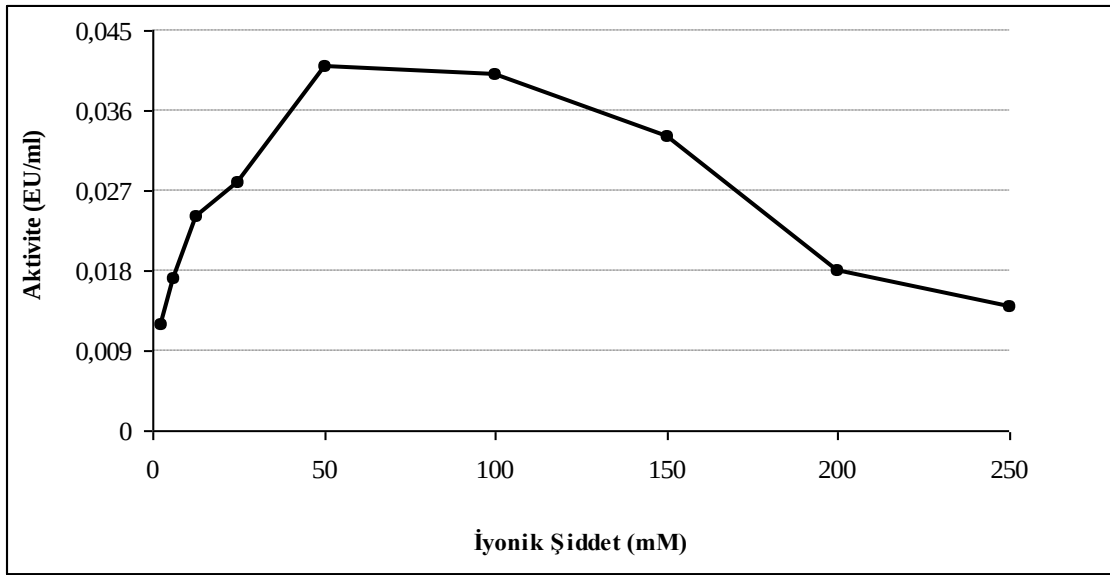
Şekil 4.12. Sığır trombositlerinden saflaştırılan NOS enziminin değişik tampon çözeltileri içerisinde gösterdiği aktivite değerlerinden elde edilen grafik

4.5.2. Optimum iyonik şiddet belirlenmesine yönelik çalışmaların sonuçları

Optimum pH belirlendikten sonra, enzimlerin optimum aktivite gösterdiği iyonik şiddet konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla 10-1000 mM konsantrasyonları aralığında KH_2PO_4 stok tampon çözeltileri (pH=7,4) hazırlandı. Enzimlerin bu tampon çözeltilerdeki aktivite değerleri ölçüldü. Stok çözeltilerin küvet içi konsantrasyonları hesaplanarak iyonik şiddet-aktivite grafikleri çizildi. Son olarak çizilen grafiklerden optimum iyonik şiddet değerleri belirlendi.

Çizelge 4.10. Sığır böbreğinden saflaştırılan NOS enziminin farklı iyonik şiddetlerde KH_2PO_4 tampon çözeltileri kullanılarak elde edilen aktivite değerleri

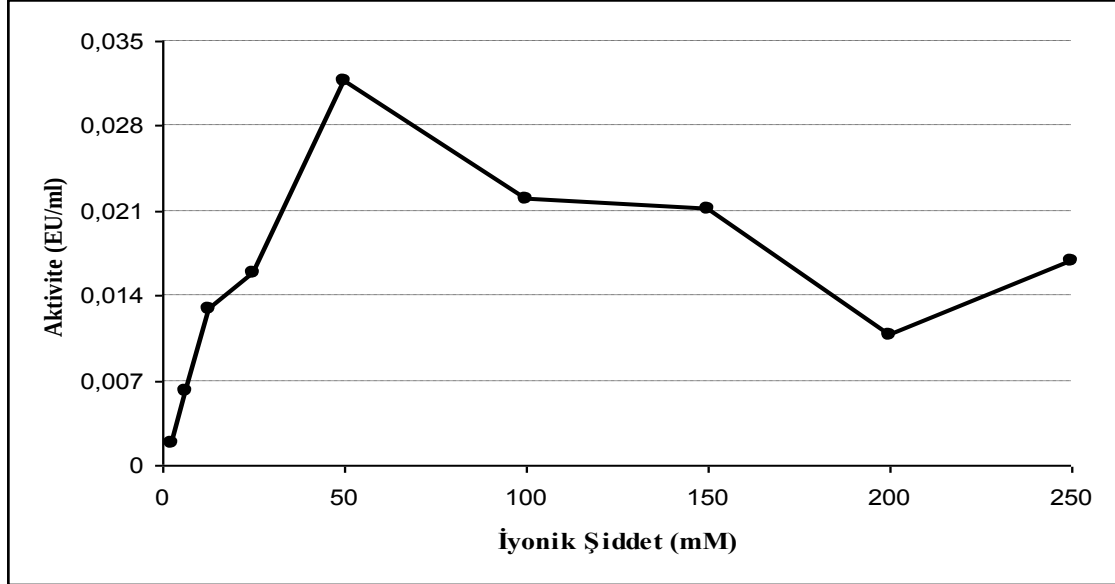
İyonik Şiddet (mM)	Aktivite (EU/ml)
2,5	0,012
6,25	0,017
12,5	0,024
25	0,028
50	0,041
100	0,040
150	0,033
200	0,018
250	0,014



Şekil 4.13. Sığır böbreğinden saflaştırılan NOS enzimi için farklı iyonik şiddetlerde elde edilen aktivite değerlerinin grafiği (Çizelge ve grafikte kuvvet içi iyonik şiddet konsantrasyonları kullanıldı)

Çizelge 4.11. Sığır trombositlerinden saflaştırılan NOS enziminin farklı iyonik şiddetlerde KH_2PO_4 tampon çözeltileri kullanılarak elde edilen aktivite değerleri

İyonik Şiddet (mM)	Aktivite (EU/ml)
2,5	0,0018
6,25	0,0061
12,5	0,0129
25	0,0158
50	0,0317
100	0,0220
150	0,0212
200	0,0108
250	0,0169



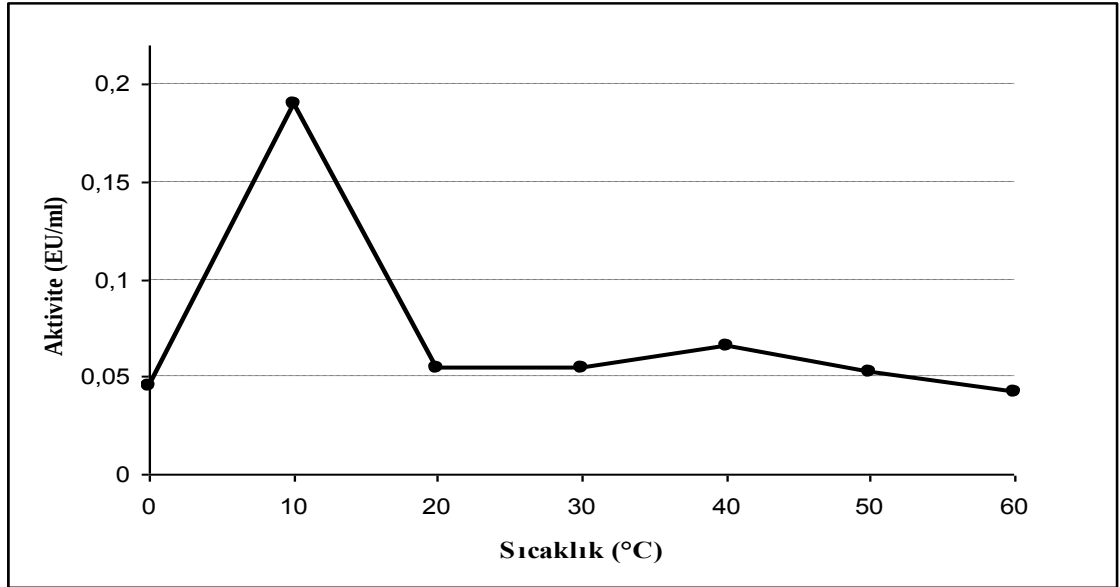
Şekil 4.14. Sığır trombositlerinden saflaştırılan NOS enzimi için farklı iyonik şiddetlerde elde edilen aktivite değerlerinin grafiği (Çizelge ve grafikte kuvvet içi iyonik şiddet konsantrasyonları kullanıldı)

4.5.3. Optimum sıcaklık ve Q_{10} değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışmaların sonuçları

Sığır böbrek ve trombositlerinden saflaştırılan NOS enzimi için optimum sıcaklık çalışmaları daha önce anlatıldığı gibi 0°C ile 60°C arasında yapıldı ve her 10°C’de bir enzimlerin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak belirlendi. Ölçülen sıcaklık değerlerine karşılık elde edilen aktivite değerlerinin grafiği çizildi. Bu grafikten faydalanılarak optimum sıcaklık (enzimin en iyi aktivite gösterdiği sıcaklık değeri) belirlendi ve Q_{10} değerleri hesaplandı.

Çizelge 4.12. Sığır böbreğinden saflaştırılan NOS enzimi için 0-60°C sıcaklık aralığında ölçülen enzim aktivite değerleri

Sıcaklık (°C)	Enzim Aktivitesi (EU/ml)
0°C	0,045
10°C	0,190
20°C	0,054
30°C	0,055
40°C	0,066
50°C	0,052
60°C	0,042



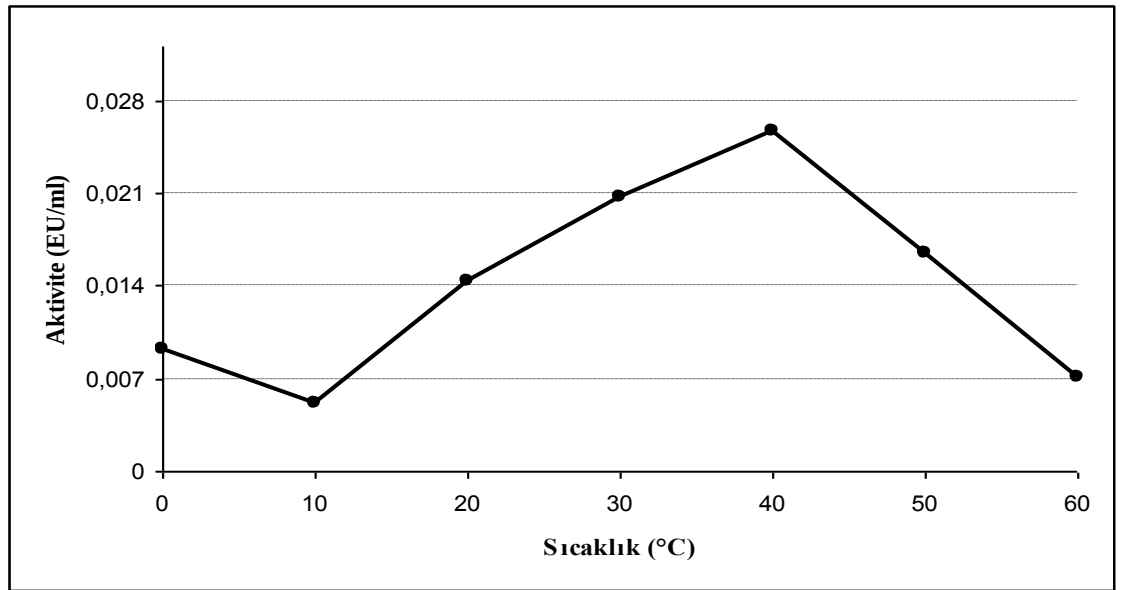
Şekil 4.15. Sığır böbreğinden saflaştırılan NOS enzimi için farklı sıcaklık değerlerinde elde edilen aktivite değerlerinin grafiği

Çizelge 4.13. Sığır böbreğinden saflaştırılan NOS enzimi için 0°C sıcaklık aralığında elde edilen Q_{10} değerleri

Sıcaklık Aralığı	Q_{10} Değerleri
0-10°C	4,22
10-20°C	0,28
20-30°C	1,02
30-40°C	1,20
40-50°C	0,78
50-60°C	0,81

Çizelge 4.14. Sığır trombositlerinden saflaştırılan NOS enzimi için 0-60°C sıcaklık aralığında ölçülen enzim aktivite değerleri

Sıcaklık (°C)	Enzim Aktivitesi (EU/ml)
0°C	0,0092
10°C	0,0051
20°C	0,0143
30°C	0,0207
40°C	0,0257
50°C	0,0164
60°C	0,0071



Şekil 4.16. Sığır trombositlerinden saflaştırılan NOS enzimi için farklı sıcaklık değerlerinde elde edilen aktivite değerlerinin grafiği

Çizelge 4.15. Sığır trombositlerinden saflaştırılan NOS enzimi için 0-60°C sıcaklık aralığında elde edilen Q_{10} değerleri

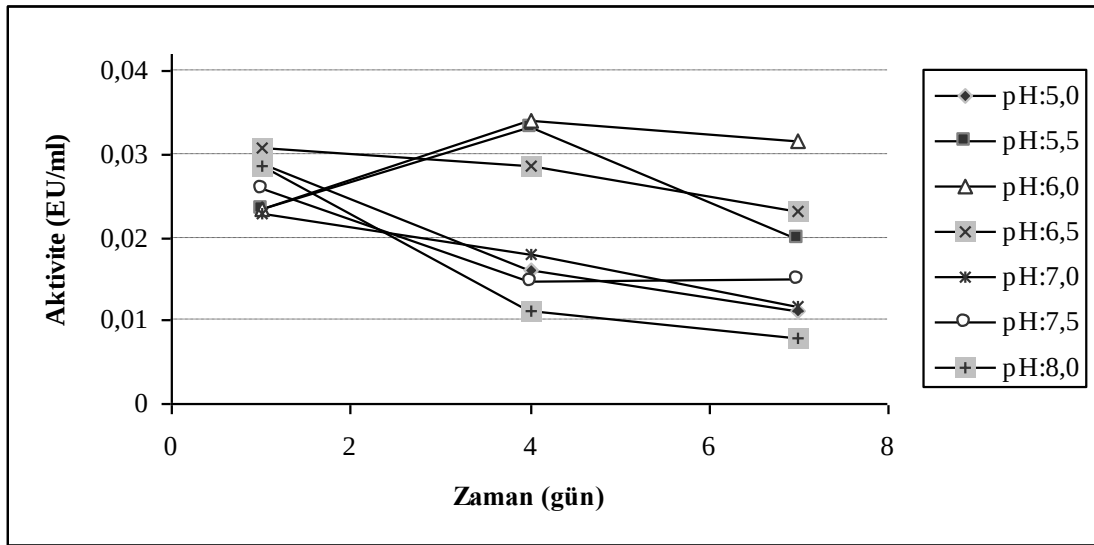
Sıcaklık Aralığı	Q_{10} Değerleri
0-10°C	0,55
10-20°C	2,80
20-30°C	1,45
30-40°C	1,24
40-50°C	0,64
50-60°C	0,43

4.5.4. Stabil pH bulunmasına yönelik çalışmaların sonuçları

Saflaştırılan NOS enzimlerinin stabil pH'sının belirlenmesi çalışmaları kapsamında değişik pH'lara sahip tampon çözeltilerde enzim nümunesi bir hafta boyunca saklandı ve her gün aktivitelerine bakıldı. Bu amaçla pH:5,0-8,0 arasında potasyum fosfat, pH:7,5-9,0 arasında Tris-HCl ve pH: 9,0-10,5 arasında Glisin-NaOH tampon çözeltileri kullanıldı. Elde edilen sonuçlar aşağıdaki çizelge ve tablolarda verilmiştir.

Çizelge 4.16. Sığır böbreğinden saflaştırılan NOS enziminin farklı pH'lardaki potasyum fosfat tampon çözeltileri içerisinde farklı zaman aralıklarında ölçülen aktivite değerleri

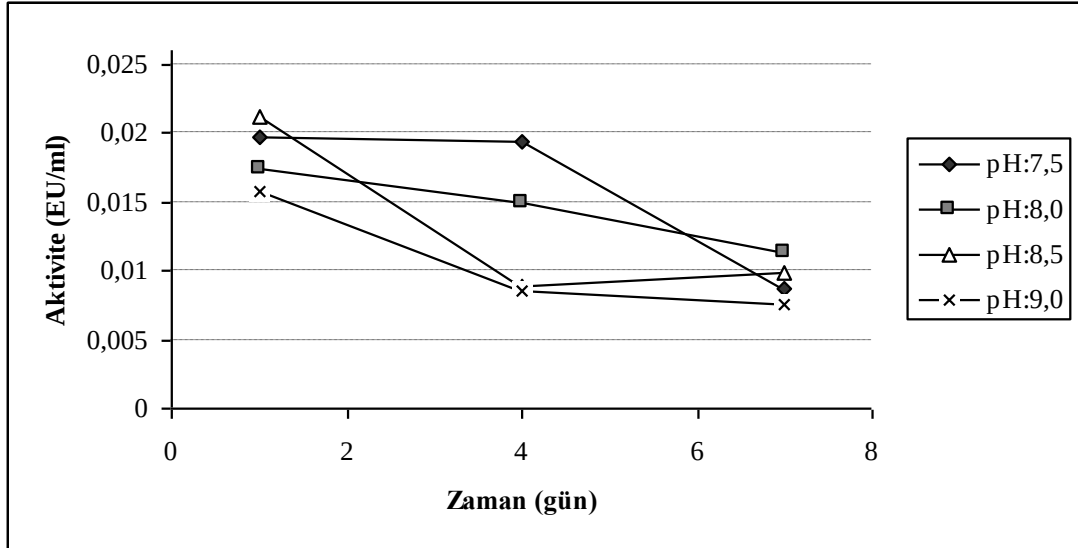
POTASYUM FOSFAT TAMPON ÇÖZELTİSİ							
	pH:5,0	pH:5,5	pH:6,0	pH:6,5	pH:7,0	pH:7,5	pH:8,0
1.gün	0,029	0,023	0,023	0,031	0,023	0,026	0,029
4.gün	0,016	0,033	0,034	0,029	0,018	0,014	0,011
7.gün	0,011	0,020	0,032	0,023	0,012	0,015	0,008



Şekil 4.17. Sığır böbreğinden saflaştırılan NOS enziminin farklı pH'lardaki potasyum fosfat tampon çözeltileri içerisindeki aktivitelerinin grafiği

Çizelge 4.17. Sığır böbreğinden saflaştırılan NOS enziminin farklı pH'lardaki Tris-HCl tampon çözeltileri içerisinde farklı zaman aralıklarında ölçülen aktivite değerleri

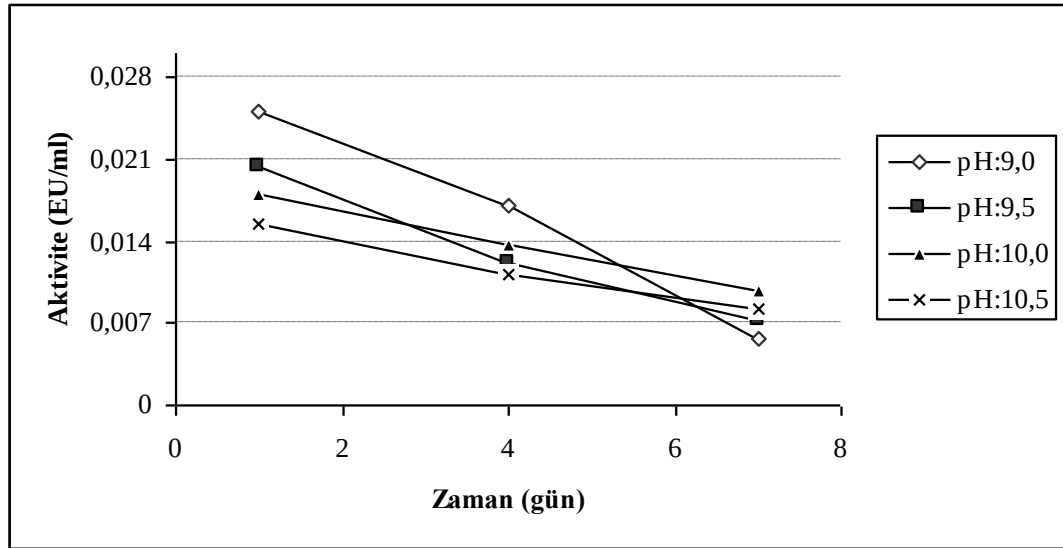
TRİS-HCl TAMPON ÇÖZELTİSİ				
	pH:7,5	pH:8,0	pH:8,5	pH:9,0
1.gün	0,020	0,017	0,021	0,016
4.gün	0,019	0,015	0,009	0,009
7.gün	0,009	0,011	0,010	0,008



Şekil 4.18. Sığır böbreğinden saflaştırılan NOS enziminin farklı pH'lardaki Tris-HCl tampon çözeltileri içerisindeki aktivitelerinin grafiği

Çizelge 4.18. Sığır böbreğinden saflaştırılan NOS enziminin farklı pH'lardaki glisin-NaOH tampon çözeltileri içerisinde farklı zaman aralıklarında ölçülen aktivite değerleri

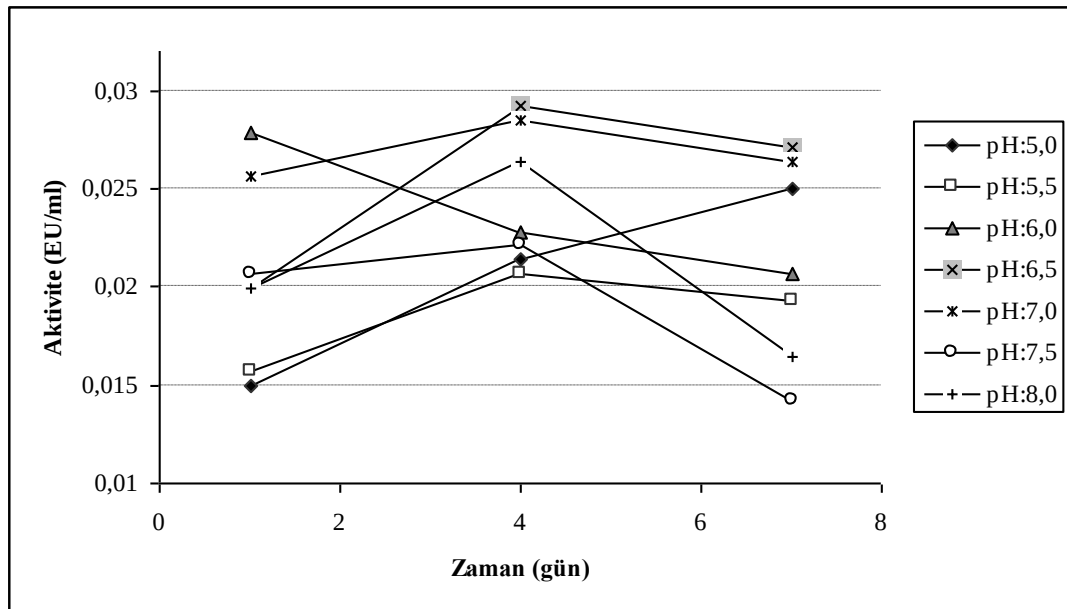
GLİSİN-NaOH TAMPON ÇÖZELTİSİ				
	pH:9,0	pH:9,5	pH:10,0	pH:10,5
1.gün	0,025	0,020	0,018	0,016
4.gün	0,017	0,012	0,014	0,011
7.gün	0,006	0,007	0,010	0,008



Şekil 4.19. Sığır böbreğinden saflaştırılan NOS enziminin farklı pH'lardaki glisin-NaOH tampon çözeltileri içerisindeki aktivitelerinin grafiği

Çizelge 4.19. Sığır trombositlerinden saflaştırılan NOS enziminin farklı pH'lardaki potasyum fosfat tampon çözeltileri içerisinde farklı zaman aralıklarında ölçülen aktivite değerleri

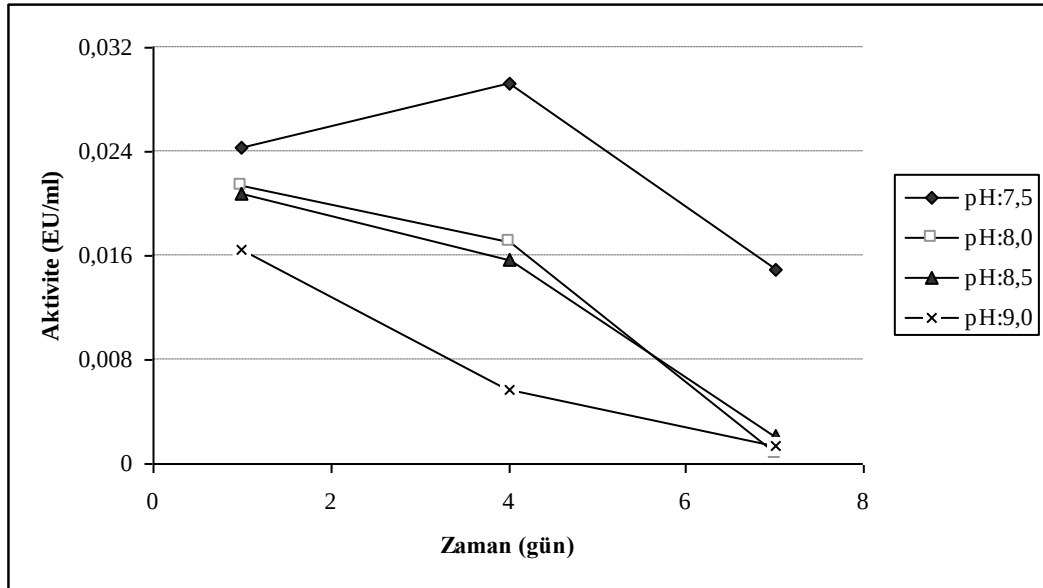
POTASYUM FOSFAT TAMPON ÇÖZELTİSİ							
	pH:5,0	pH:5,5	pH:6,0	pH:6,5	pH:7,0	pH:7,5	pH:8,0
1.gün	0,015	0,016	0,028	0,020	0,025	0,020	0,019
4.gün	0,021	0,021	0,023	0,029	0,028	0,022	0,026
7.gün	0,025	0,019	0,021	0,027	0,026	0,014	0,016



Şekil 4.20. Sığır trombositlerinden saflaştırılan NOS enziminin farklı pH'lardaki Potasyum fosfat tampon çözeltileri içerisindeki aktivitelerinin grafiği

Çizelge 4.20. Sığır trombositlerinden saflaştırılan NOS enziminin farklı pH'lardaki Tris-HCl tampon çözeltileri içerisinde farklı zaman aralıklarında ölçülen aktivite değerleri

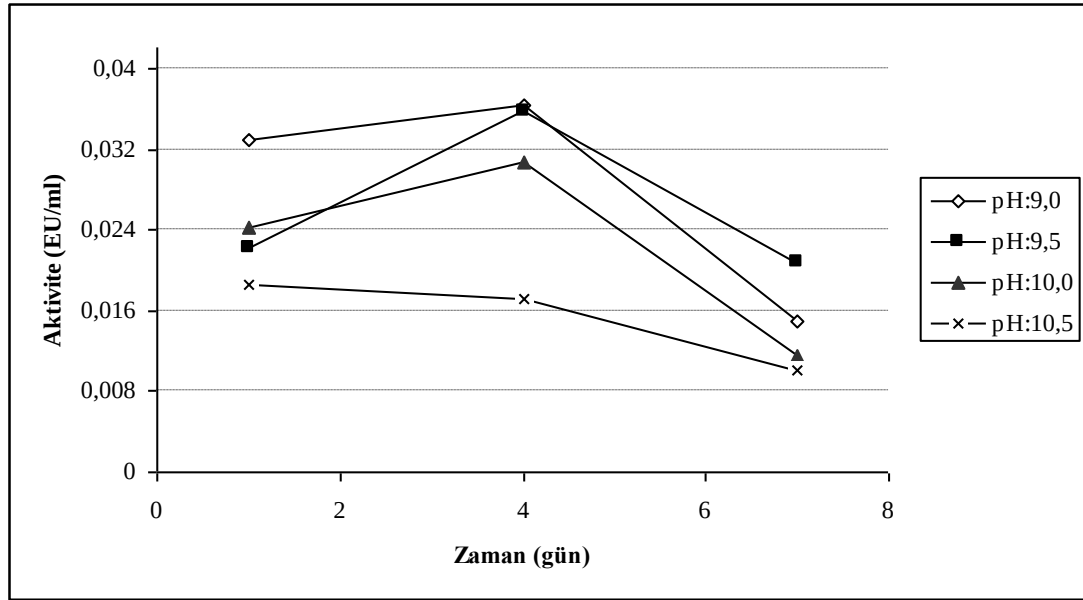
TRİS-HCl TAMPON ÇÖZELTİSİ				
	pH:7,5	pH:8,0	pH:8,5	pH:9,0
1.gün	0,024	0,021	0,020	0,016
4.gün	0,029	0,017	0,016	0,006
7.gün	0,015	0,001	0,002	0,001



Şekil 4.21. Sığır trombositlerinden saflaştırılan NOS enziminin farklı pH'lardaki Tris-HCl tampon çözeltileri içerisindeki aktivitelerinin grafiği

Çizelge 4.21. Sığır trombositlerinden saflaştırılan NOS enziminin farklı pH'lardaki glisin-NaOH tampon çözeltileri içerisinde farklı zaman aralıklarında ölçülen aktivite değerleri

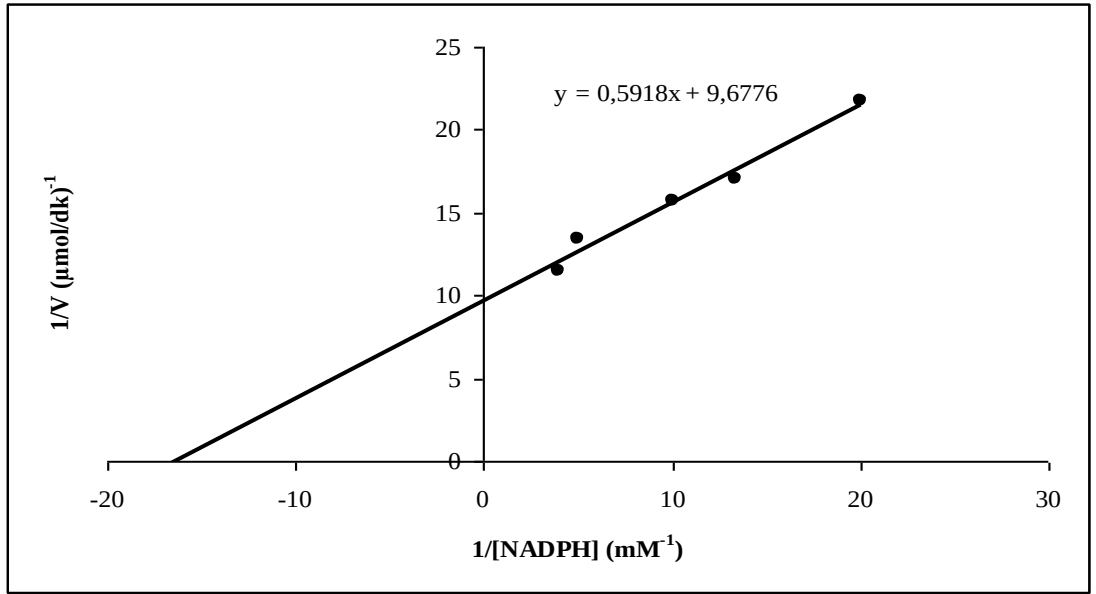
GLİSİN-NaOH TAMPON ÇÖZELTİSİ				
	pH:9,0	pH:9,5	pH:10,0	pH:10,5
1.gün	0,033	0,022	0,024	0,018
4.gün	0,036	0,035	0,031	0,017
7.gün	0,015	0,021	0,011	0,010



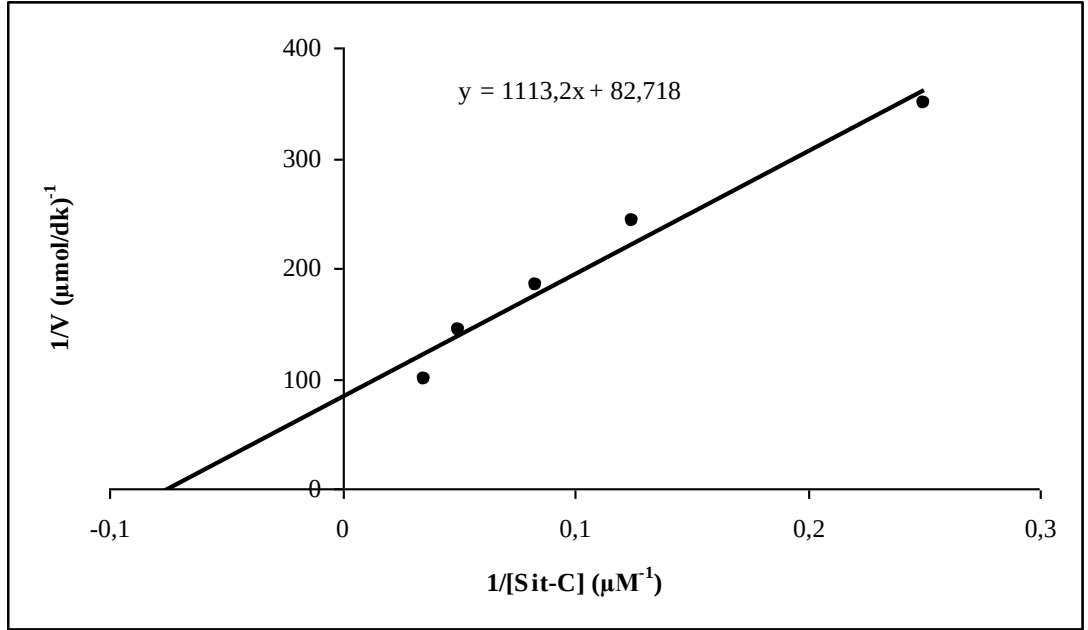
Şekil 4.22. Sığır trombositlerinden saflaştırılan NOS enziminin farklı pH'lardaki glisin-NaOH tampon çözeltileri içerisindeki aktivitelerinin grafiği

4.5.5. NOS enziminin NADPH, L-arjinin ve sitokrom-c için K_m ve V_{max} değerlerinin bulunması ile ilgili bulgular

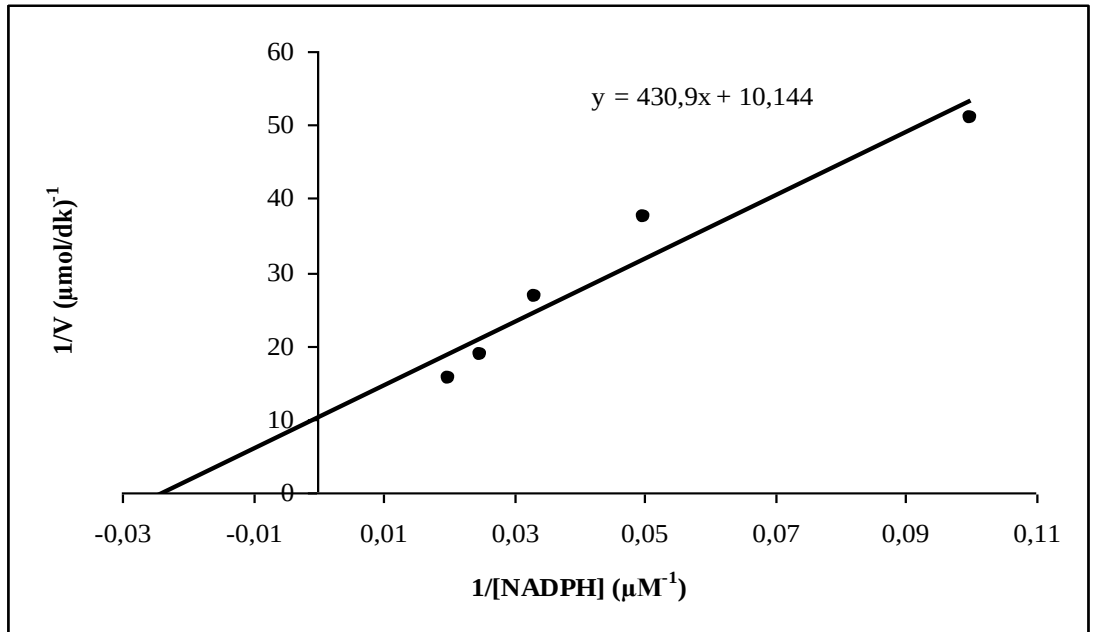
Saflaştırılan NOS enzimlerinin NADPH, L-arjinin ve sitokrom-c için K_m ve V_{max} değerleri materyal metot kısmında belirtildiği gibi 5 farklı substrat/kofaktör konsantrasyonuna karşılık aktivite değerleri bulunarak Lineweaver-Burk grafiklerinden elde edildi. Enzim, hem L-arjinin varlığında hem de yokluğunda aktivite gösterdiğinden bu substrat için Lineweaver-Burk grafikleri çizilemedi, dolayısıyla K_m ve V_{max} değerleri de belirlenemedi. NADPH ve sitokrom-c için elde edilen sonuçlar aşağıdaki şekil ve çizelgelerde sunulmuştur.



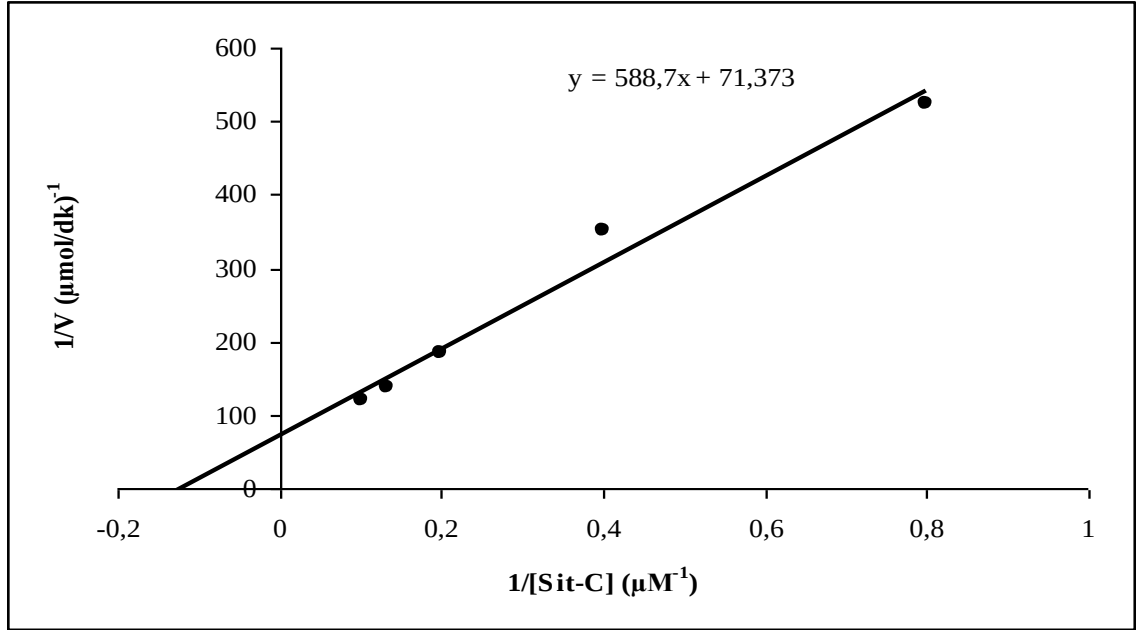
Şekil 4.23. Sığır böbreğinden saflaştırılan NOS enziminin NADPH kofaktörü için K_m ve V_{max} değerlerinin bulunması amacıyla çizilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.24. Sığır böbreğinden saflaştırılan NOS enziminin Sitokrom-c substratı için K_m ve $V_{\max}$ değerlerinin bulunması amacıyla çizilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.25. Sığır trombositlerinden saflaştırılan NOS enziminin NADPH kofaktörü için K_m ve $V_{\max}$ değerlerinin bulunması amacıyla çizilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.26. Sığır trombositlerinden saflaştırılan NOS enziminin sitokrom-c substratı için K_m ve V_{max} değerlerinin bulunması amacıyla çizilen Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.22. Saflaştırılan böbrek ve trombosit NOS enzimlerinin NADPH ve sitokrom-c için elde edilen K_m ve V_{max} değerleri

ENZİM	SUBSTRAT	K_m (μM)	V_{max} (EU/ml)
Böbrek NOS	NADPH	61,151	0,103
	Sitokrom-C	13,457	0,012
Trombosit NOS	NADPH	42,478	0,098
	Sitokrom-C	8,248	0,014

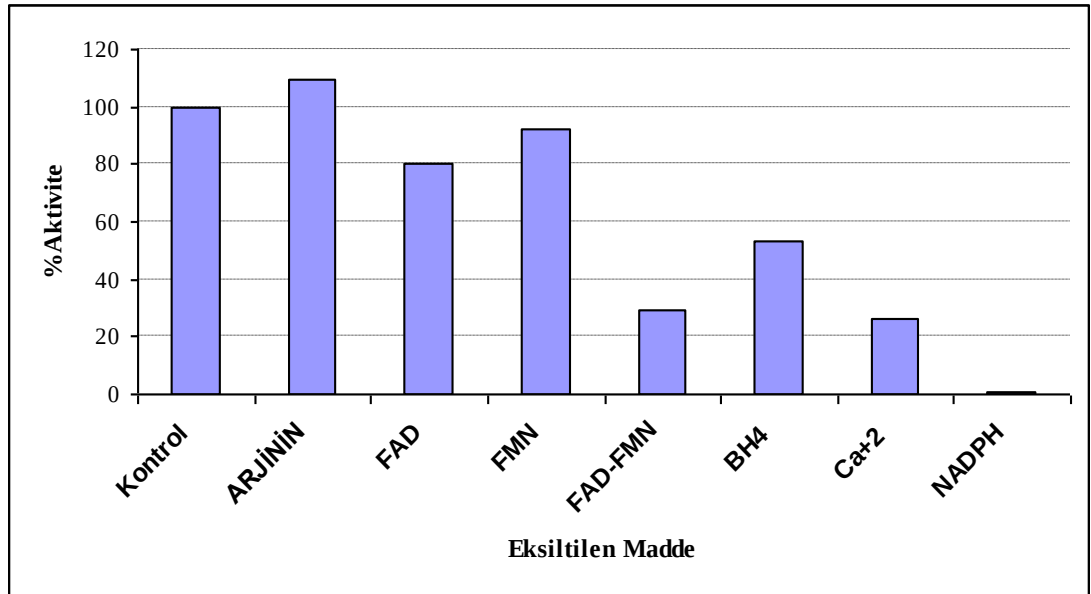
4.5.6. Enzim aktivitesi için gerekli Ca^{+2} iyonu, NADPH, FAD, FMN ve BH_4 maddelerinin enzim aktivitesine etkilerinin incelenmesi ile ilgili bulgular

NOS enzimi, aktivitesi için NADPH, BH_4 , FAD ve FMN gibi maddelere ve Ca^{+2} iyonuna ihtiyaç duyar. Bu bileşiklerin enzim aktivitesini nasıl etkilediğini belirlemek

amacıyla öncelikle tüm reaktiflerin varlığında enzim aktivitesi ölçüldü ve bu değer %100 olarak kabul edildi. Sonrasında reaktifler birer birer eksiltilip enzim aktivitesindeki kontrole oranla yüzde değişim incelendi ve bu değişimler aşağıdaki çizelge ve şekillerde gösterildi.

Çizelge 4.23. Sığır böbrek NOS enzim aktivitesine etki eden maddelerin yokluğunda enzim aktivitesindeki değişimler

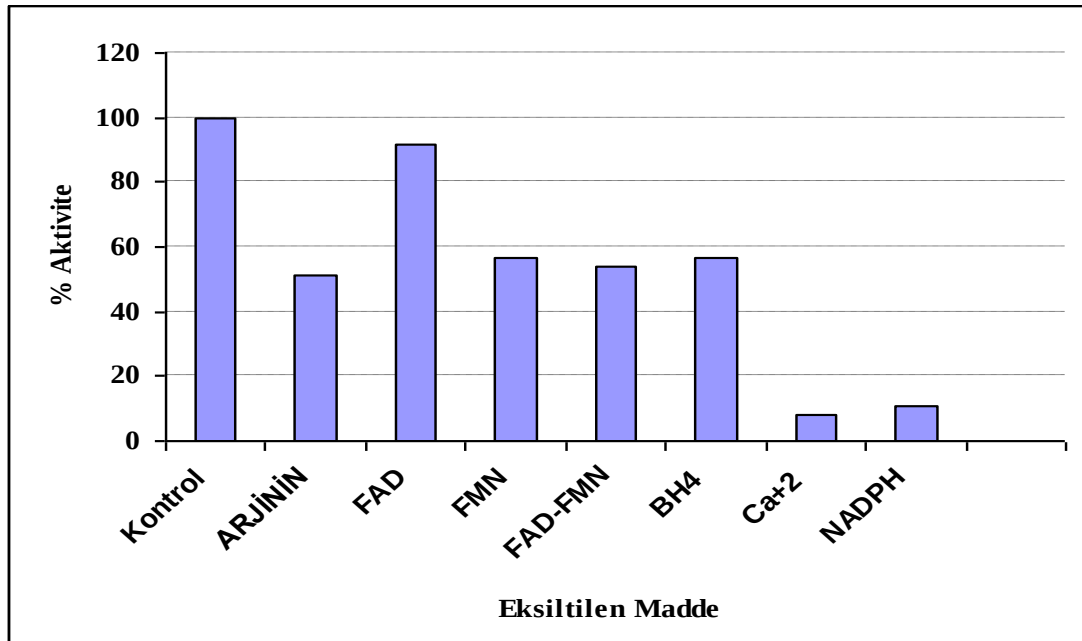
Eksiltilen Madde	% Aktivite
Kontrol	100
Arjinin	109,8
FAD	80,3
FMN	91,9
FAD-FMN	29,4
BH ₄	53,6
Ca ⁺²	25,9
NADPH	0,89



Şekil 4.27. Sığır böbrek NOS enzim aktivitesine etki eden maddelerin yokluğunda enzim aktivitesindeki değişimlerin grafiksel gösterimi

Çizelge 4.24. Sığır trombosit NOS enzim aktivitesine etki eden maddelerin yokluğunda enzim aktivitesindeki değişimler

Eksiltelen Madde	% Aktivite
Kontrol	100
Arjinin	51,3
FAD	91,9
FMN	56,7
FAD-FMN	54,1
BH₄	56,7
Ca⁺²	8,10
NADPH	10,8



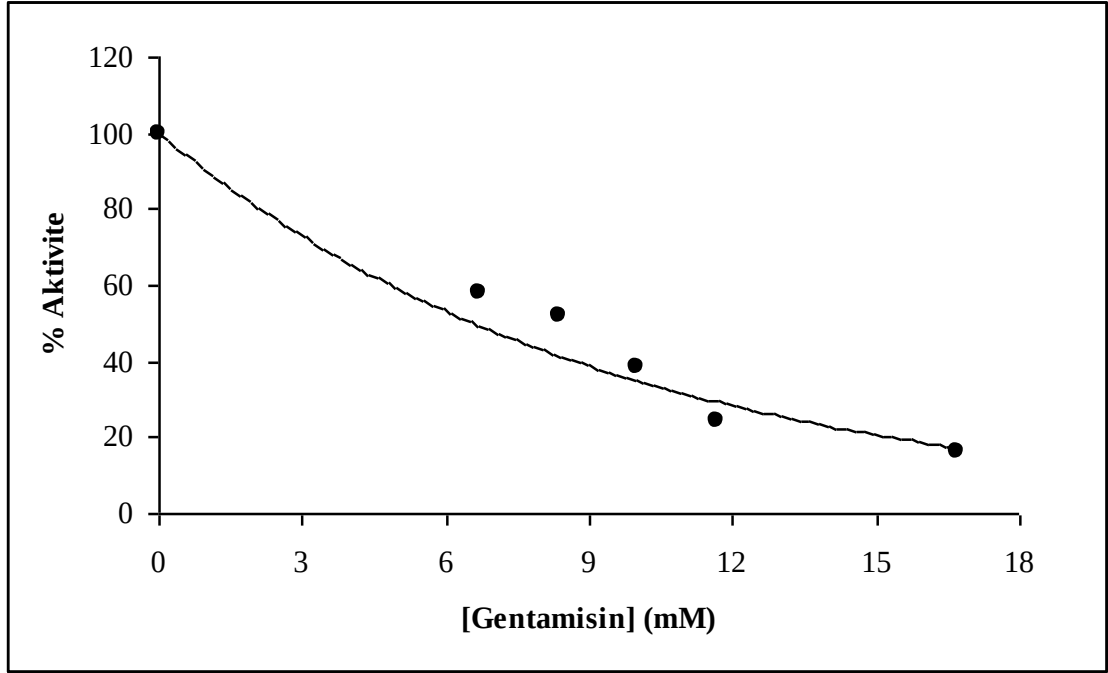
Şekil 4.28. Sığır trombosit NOS enzim aktivitesine etki eden maddelerin yokluğunda NOS enzim aktivitesindeki değişimlerin grafiksel gösterimi

4.6. Enzim aktivitesi üzerine bazı antibiyotiklerin *in vitro* etkilerinin incelenmesi ile ilgili çalışmaların sonuçları

Sığır böbrek ve trombositlerinden saflaştırılan nitrik oksit sentaz enzimlerinin aktivitesi üzerine bazı ilaçların *in vitro* etkileri daha önce materyal metot bölümünde anlatıldığı şekilde yapıldı. Enzim aktivitesi üzerine, insanlarda ve veteriner hekimlikte kullanılan bazı antibiyotiklerin etkileri incelendi. Çalışmada kullanılan antibiyotik ilaçların etken maddeleri ise şunlardır: Penislin-G, Gentamisin, Amikasin, Tilozin, Enrofloksasin, Ampisilin, Kloramfenikol, Linkomisin, Kanamisin, Oksitetrasiklin, Seftriakson, Streptomisin, Vankomisin, Sefotaksim, Sefazolin, Sefuroksim ve Ornidazol. İnhibisyon etkisi gösteren ilaçlar için sabit substrat konsantrasyonunda beş farklı inhibitör konsantrasyonu kullanılarak % Aktivite-[I] grafikleri çizildi ve bu grafiklerden de IC_{50} değerleri (enzimin aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu) hesaplandı.

Çizelge 4.25. Gentamisin ilacının sığır böbreğinden saflaştırılan NOS enzim aktivitesi üzerine etkisi

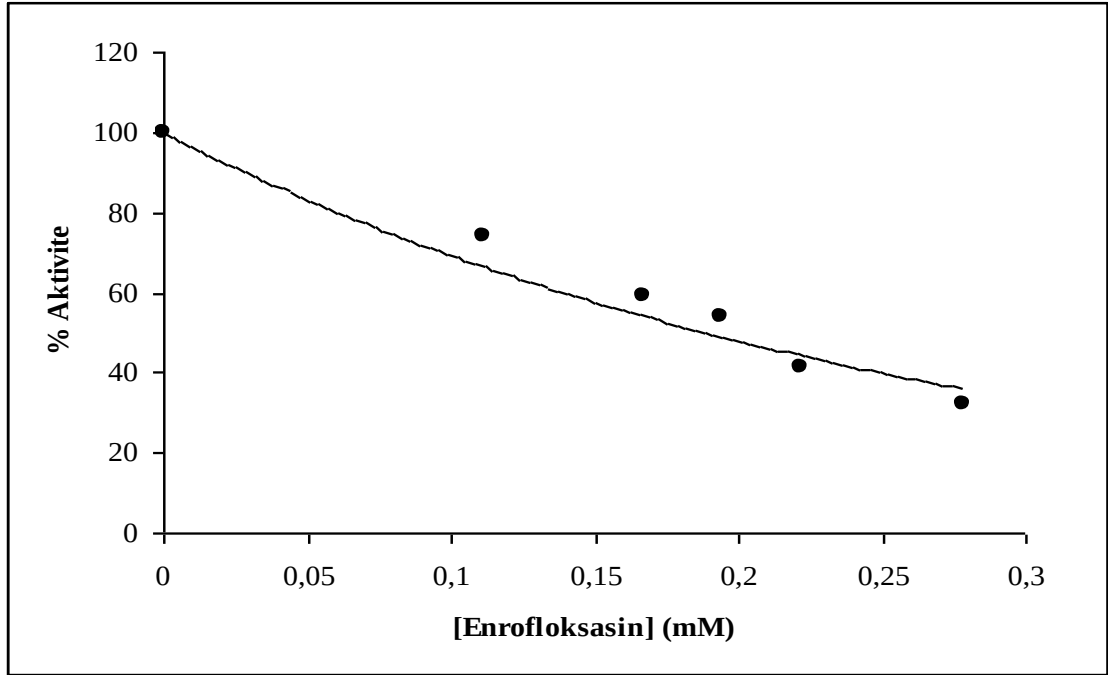
Konsantrasyon (mM)	% Aktivite
0	100,0
6,7	58,0
8,4	52,0
10,0	38,2
11,7	24,0
16,7	16,0



Şekil 4.29. Sığır böbreğinden saflaştırılan nitrik oksit sentaz enzim aktivitesi üzerine Gentamisin ilacının etkisini gösteren IC_{50} grafiği

Çizelge 4.26. Enrofloksasin ilacının sığır böbreğinden saflaştırılan NOS enzim aktivitesi üzerine etkisi

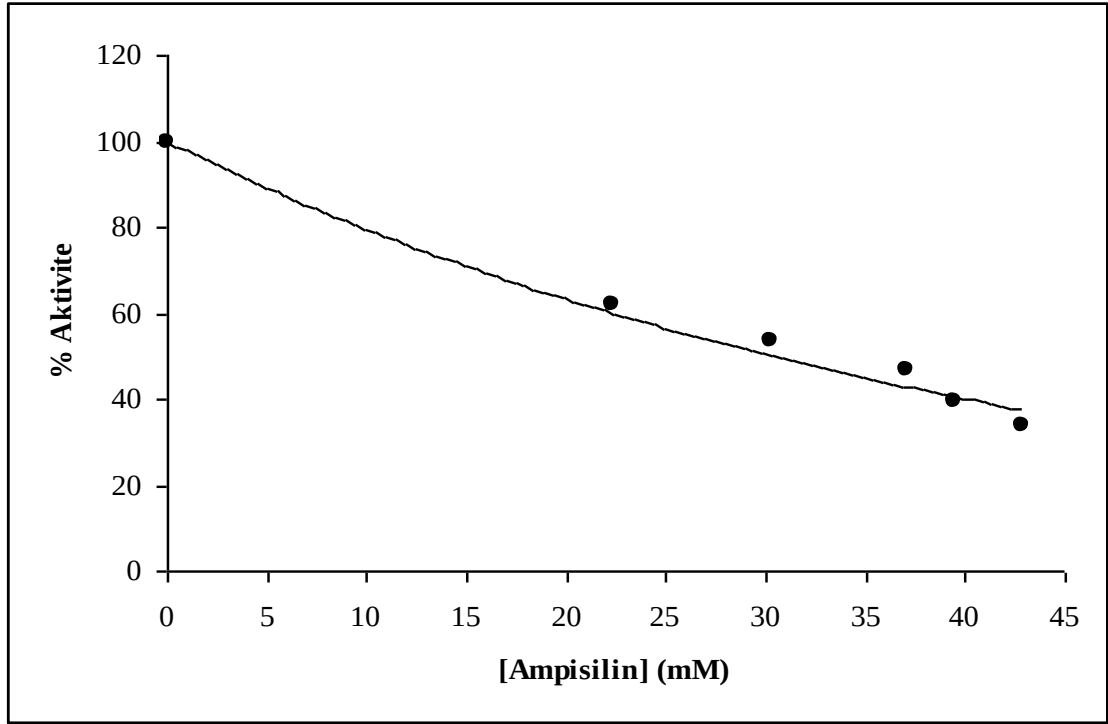
Konsantrasyon (mM)	% Aktivite
0	100,0
0,111	74,0
0,167	59,2
0,194	53,7
0,222	41,6
0,278	32,4



Şekil 4.30. Sığır böbreğinden saflaştırılan nitrik oksit sentaz enzim aktivitesi üzerine Enrofloksasin ilacının etkisini gösteren IC₅₀ grafiği

Çizelge 4.27. Ampisilin ilacının sığır böbreğinden saflaştırılan NOS enzim aktivitesi üzerine etkisi

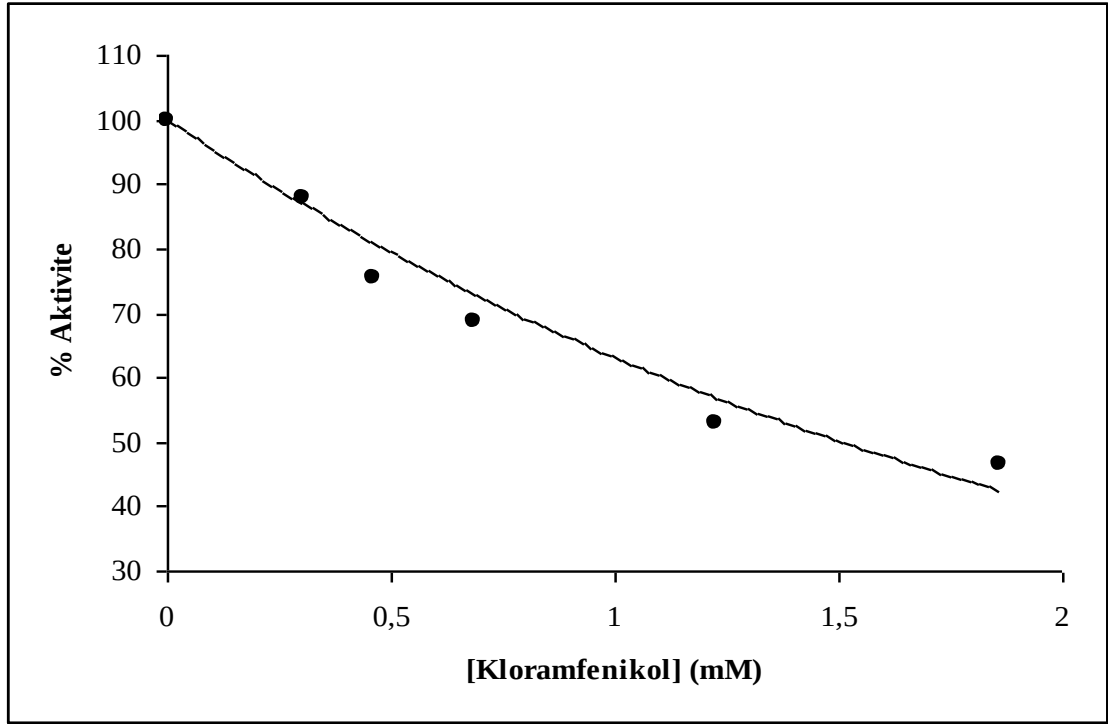
Konsantrasyon (mM)	% Aktivite
0	100,0
22,3	61,8
30,3	53,6
37,0	46,5
39,4	39,6
42,9	33,7



Şekil 4.31. Sığır böbreğinden saflaştırılan nitrik oksit sentaz enzim aktivitesi üzerine Ampisilin ilacının etkisini gösteren IC_{50} grafiği

Çizelge 4.28. Kloramfenikol ilacının sığır böbreğinden saflaştırılan NOS enzim aktivitesi üzerine etkisi

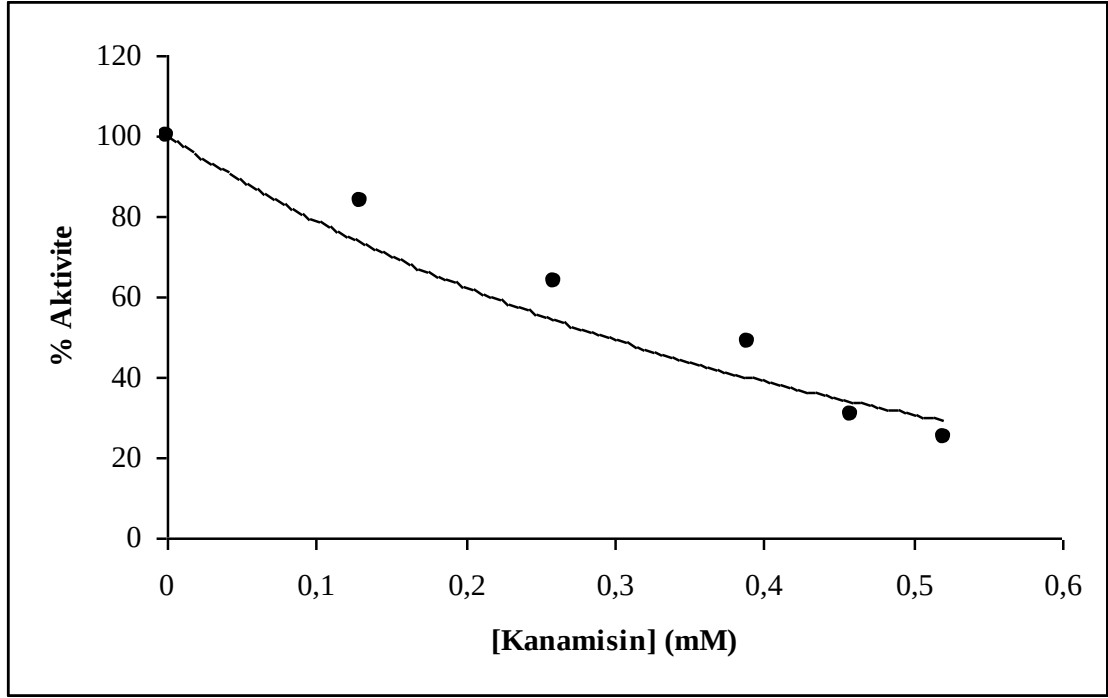
Konsantrasyon (mM)	% Aktivite
0	100,0
0,306	88,0
0,462	75,5
0,685	68,5
1,226	52,8
1,860	46,5



Şekil 4.32. Sığır böbreğinden saflaştırılan nitrik oksit sentaz enzim aktivitesi üzerine Kloramfenikol ilacının etkisini gösteren IC_{50} grafiği

Çizelge 4.29. Kanamisin ilacının sığır böbreğinden saflaştırılan NOS enzim aktivitesi üzerine etkisi

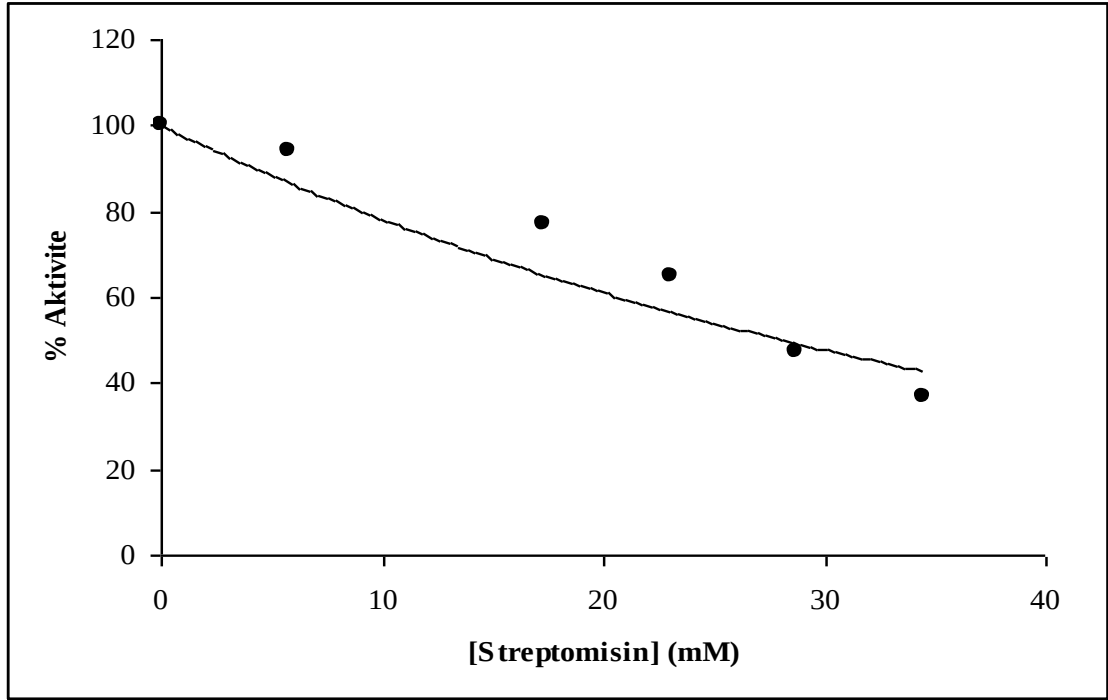
Konsantrasyon (mM)	% Aktivite
0	100,0
0,130	83,5
0,260	64,0
0,390	48,7
0,458	30,5
0,520	25,0



Şekil 4.33. Sığır böbreğinden saflaştırılan nitrik oksit sentaz enzim aktivitesi üzerine Kanamisin ilacının etkisini gösteren IC_{50} grafiği

Çizelge 4.30. Streptomisin ilacının sığır böbreğinden saflaştırılan NOS enzim aktivitesi üzerine etkisi

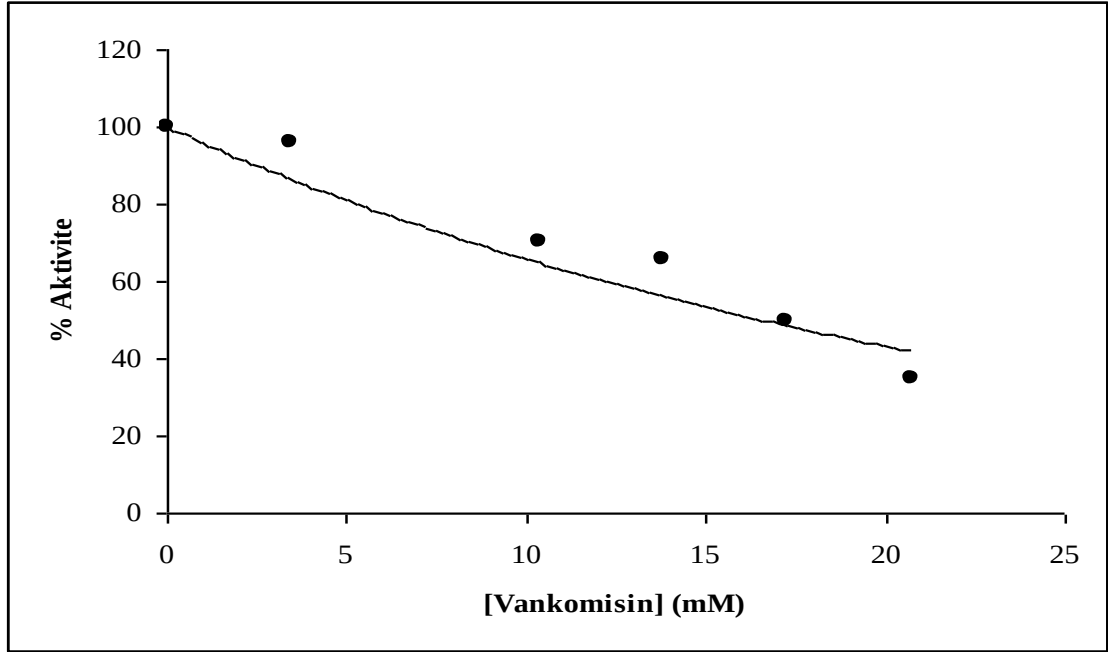
Konsantrasyon (mM)	% Aktivite
0,0	100,0
5,75	94,2
17,3	77,1
23,0	64,7
28,8	47,6
34,5	36,8



Şekil 4.34. Sığır böbreğinden saflaştırılan nitrik oksit sentaz enzim aktivitesi üzerine Streptomisin ilacının etkisini gösteren IC_{50} grafiği

Çizelge 4.31. Vankomisin ilacının sığır böbreğinden saflaştırılan NOS enzim aktivitesi üzerine etkisi

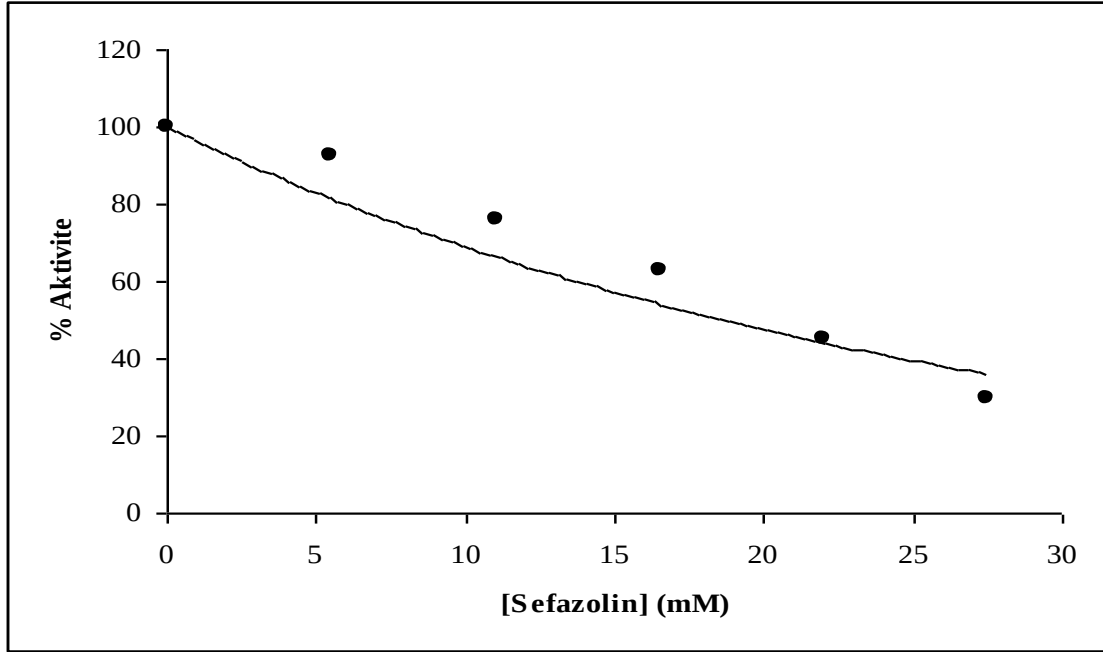
Konsantrasyon (mM)	% Aktivite
0,0	100,0
3,45	96,0
10,35	70,5
13,80	65,7
17,25	50,0
20,70	34,9



Şekil 4.35. Sığır böbreğinden saflaştırılan nitrik oksit sentaz enzim aktivitesi üzerine Vankomisin ilacının etkisini gösteren IC₅₀ grafiği

Çizelge 4.32. Sefazolin ilacının sığır böbreğinden saflaştırılan NOS enzim aktivitesi üzerine etkisi

Konsantrasyon (mM)	% Aktivite
0,0	100,0
5,50	92,6
11,0	75,8
16,5	62,6
22,0	45,3
27,5	30,0



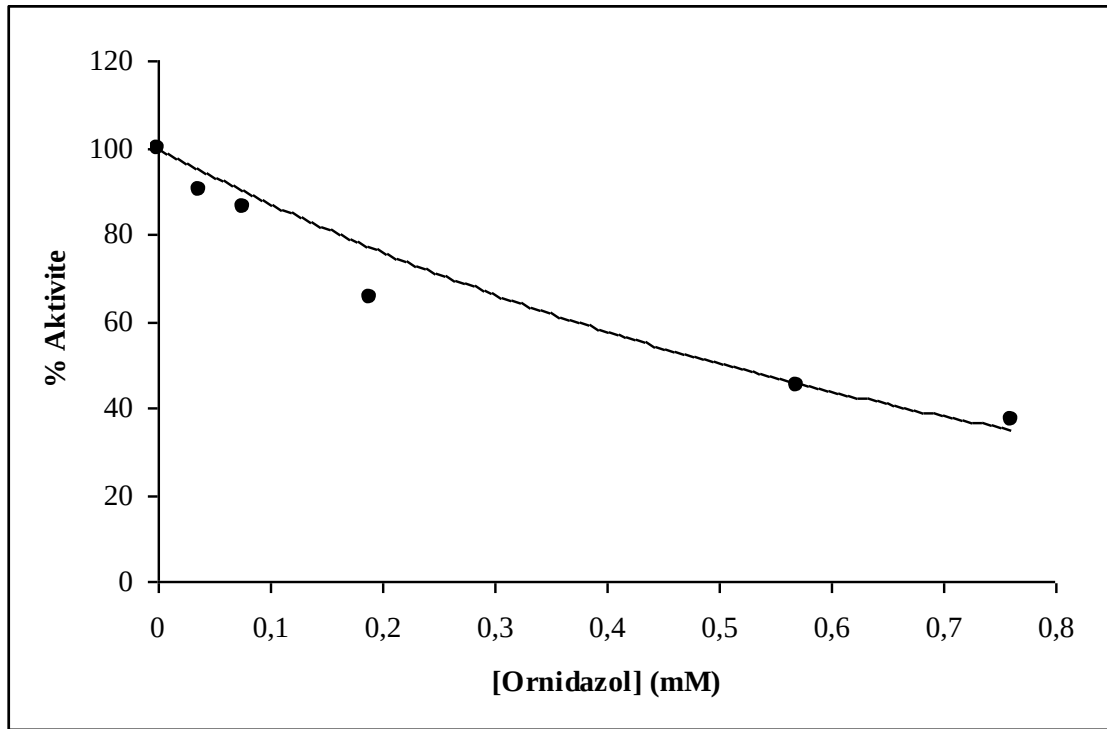
Şekil 4.36. Sığır böbreğinden saflaştırılan nitrik oksit sentaz enzim aktivitesi üzerine Sefazolin ilacının etkisini gösteren IC_{50} grafiği

Çizelge 4.33 Sığır böbreğinden saflaştırılan nitrik oksit sentaz enzim aktivitesi üzerine bazı antibiyotiklerin etkileri

İlaç etken maddesi	IC_{50} Değeri (mM)
Penisilin-G	-
Gentamisin	6,6140
Amikasin	-
Tilozin	-
Enrofloksasin	0,1890
Ampisilin	30,394
Kloramfenikol	1,5090
Linkomisin	-
Kanamisin	0,2950
Oksitetrasiklin	-
Seftriakson	-
Streptomisin	28,171
Vankomisin	16,579
Sefotaksim	-
Sefazolin	18,679
Sefuroksim	-

Çizelge 4.34. Ornidazol ilacının sığır trombositlerinden saflaştırılan NOS enzim aktivitesi üzerine etkisi

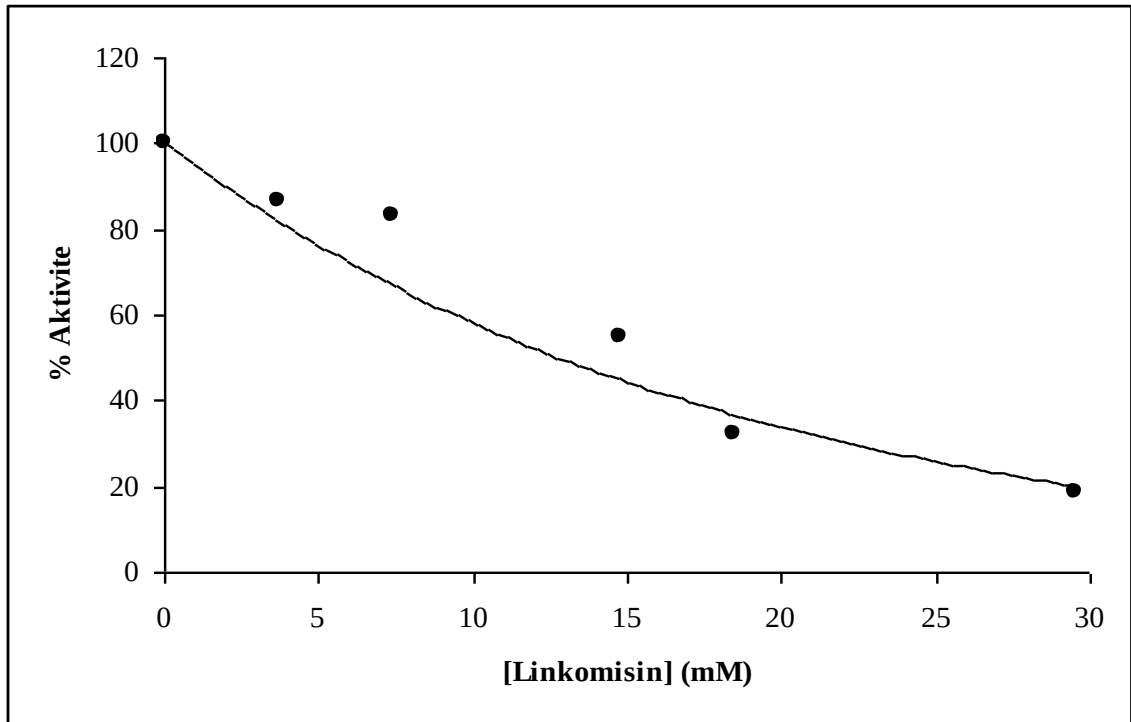
Konsantrasyon (mM)	% Aktivite
0	100,0
0,038	90,1
0,076	86,3
0,190	65,4
0,570	45,1
0,760	37,3



Şekil 4.37. Sığır trombositlerinden saflaştırılan nitrik oksit sentaz enzim aktivitesi üzerine Ornidazol ilacının etkisini gösteren IC_{50} grafiği

Çizelge 4.35. Linkomisin ilacının sığır trombositlerinden saflaştırılan NOS enzim aktivitesi üzerine etkisi

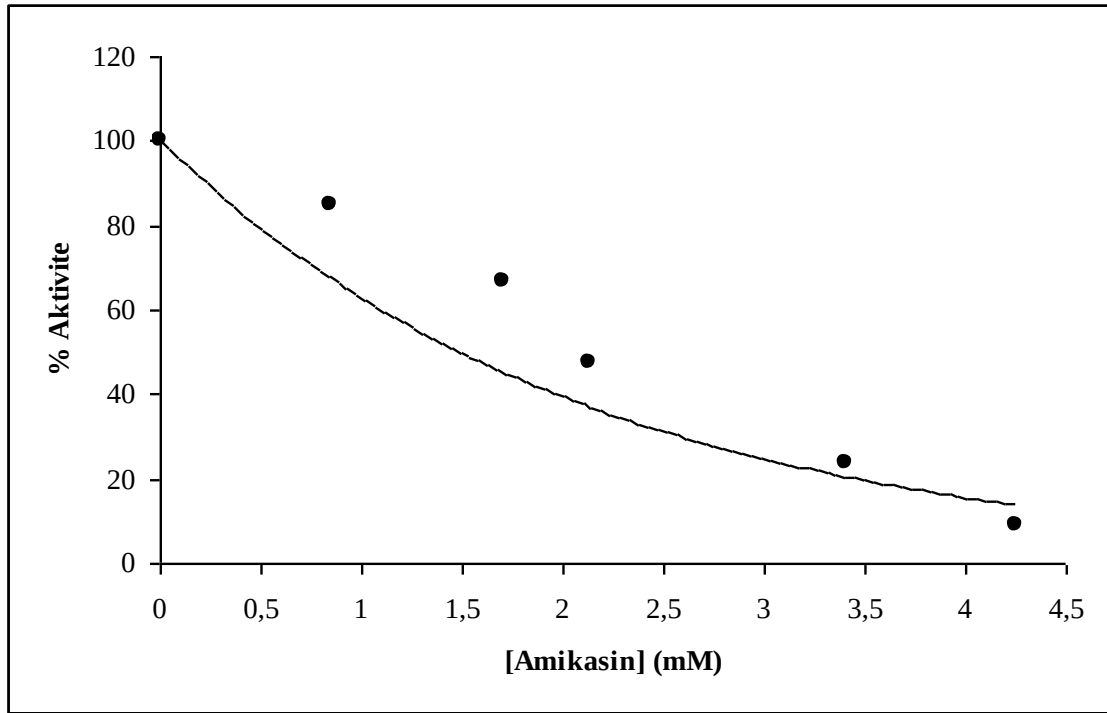
Konsantrasyon (mM)	% Aktivite
0,0	100,0
3,690	86,8
7,380	83,0
14,76	54,7
18,45	32,1
29,52	18,9



Şekil 4.38. Sığır trombositlerinden saflaştırılan nitrik oksit sentaz enzim aktivitesi üzerine Linkomisin ilacının etkisini gösteren IC₅₀ grafiği

Çizelge 4.36. Amikasin ilacının sığır trombositlerinden saflaştırılan NOS enzim aktivitesi üzerine etkisi

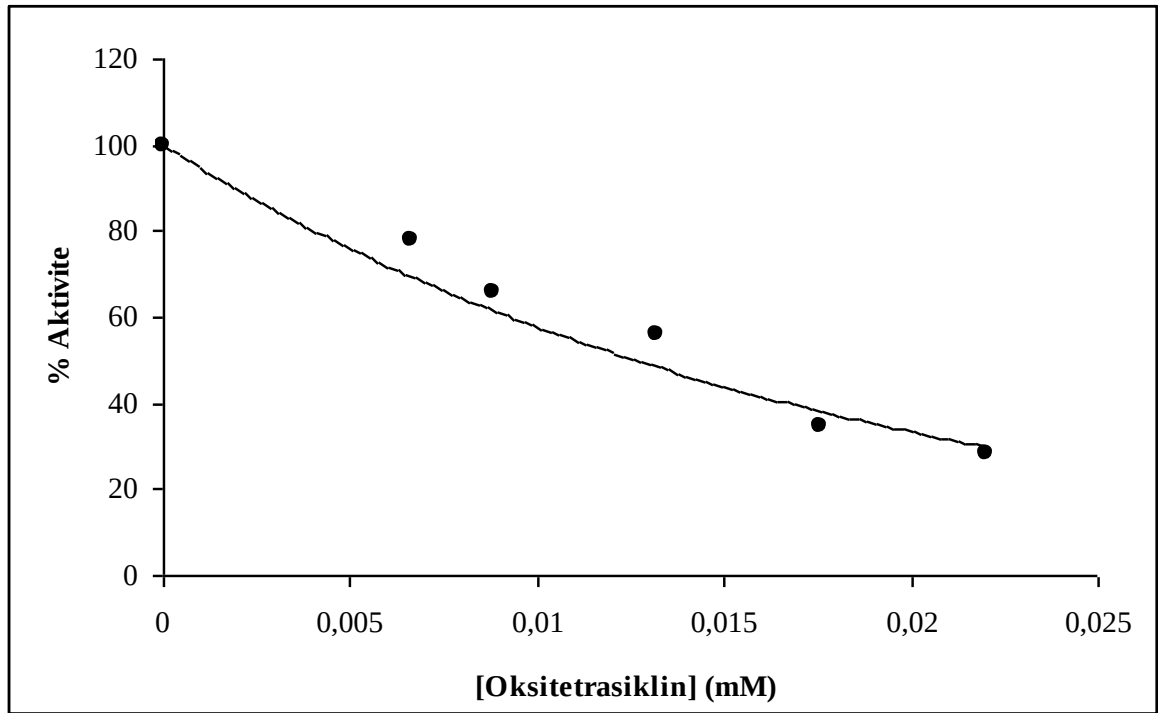
Konsantrasyon (mM)	% Aktivite
0	100,0
0,85	85,0
1,70	67,0
2,13	47,5
3,40	23,7
4,25	9,0



Şekil 4.39. Sığır trombositlerinden saflaştırılan nitrik oksit sentaz enzim aktivitesi üzerine Amikasin ilacının etkisini gösteren IC₅₀ grafiği

Çizelge 4.37. Oksitetrasiklin ilacının sığır trombositlerinden saflaştırılan NOS enzim aktivitesi üzerine etkisi

Konsantrasyon (mM)	% Aktivite
0	100,0
0,0066	78,1
0,0088	65,6
0,0132	56,2
0,0176	34,4
0,0220	28,1



Şekil 4.40. Sığır trombositlerinden saflaştırılan nitrik oksit sentaz enzim aktivitesi üzerine Oksitetrasiklin ilacının etkisini gösteren IC_{50} grafiği

Çizelge 4.38. Sığır trombositlerinden saflaştırılan nitrik oksit sentaz enzim aktivitesi üzerine bazı antibiyotiklerin etkileri

İlaç etken maddesi	IC₅₀ Değeri (mM)
Penisilin-G	-
Gentamisin	-
Amikasin	1,4930
Tilozin	-
Enrofloksasin	-
Ampisilin	-
Kloramfenikol	-
Linkomisin	12,833
Kanamisin	-
Oksitetrasiklin	0,0130
Seftriakson	-
Streptomisin	-
Vankomisin	-
Sefotaksim	-
Sefazolin	-
Sefuroksim	-
Ornidazol	0,5050

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Nitrik oksit, vücudumuzdaki en önemli sinyal moleküllerinden birisidir. Nitrik Oksit veya azot monoksit olarak ta adlandırılan bu kimyasal bileşik kısaca NO formülü ile gösterilmektedir. NO, memelilerde pek çok fizyolojik ve patolojik süreçlerde yer alan önemli bir haberci moleküldür (Murad 2006). Vücudumuzda endojen sinyal molekülü olarak görev yapan böyle bir molekülün üretildiğinin keşfi bilim ve tıp dünyasında devrim niteliğinde bir buluş olmuştur. Nöroloji, fizyoloji ve immünoloji alanlarında oldukça önemli rollere sahip bu molekül 1992 yılında Science tarafından "Yılın Molekülü" ilan edilmiştir (Culotta and Kochland 1992). Önceleri endotelial bağımlı gevşetici faktör (EDRF) olarak bilinen molekülün önemi, 1987 yılında endotel hücrelerden sentezlenen EDRF ile aynı özellikleri taşıdığı ve EDRF'nin aslında NO'nun kendisi olduğunun keşfi ile daha iyi anlaşılmıştır. Furchgott ve arkadaşları ise 1998 yılında, kardiyovasküler sistemde sinyal molekülü NO'nun rolünü aydınlatmalarından dolayı Nobel Fizyoloji ödülünü almışlardır (Ignarro *et al.* 1987; Sorelle 1998).

Nitrik oksit (NO), nitrik oksit sentaz (NOS) adı verilen enzimler tarafından L-arjinin aminoasidinden sentezlenmektedir. Vasküler endotel hücrelerde NO üretimi, damarlarda gevşemenin sağlanmasının başlıca biyolojik etmenidir. NO, ayrıca trombositlerde de üretilerek onların agregasyonunu modüle eder. Merkezi sinir sisteminde ise NO, uyarıcı amino asitlerin etkilerini dengeler. Tüm bu dokularda L-arjinin-NO metabolik yolu, NO'nun endojen uyarıcılığı vasıtasıyla guanilat siklaz dönüşüm mekanizmasında rol alır. NO, makrofajlarda, nötrofillerde ve diğer hücrelerde immünolojik uyarılma yoluyla açığa çıkar. Böylelikle NO, vücut içi savunma mekanizmasında ve toksinlere karşı immünolojik tepkide önemli rol alır. Sonuç olarak, L-arjinin-NO metabolik yolunun keşfi biyolojik süreçlerin aydınlatılmasında ve bazı hastalıkların tedavisinde kritik bir öneme sahiptir (Moncada *et al.* 1991b).

NO'nun enzimatik sentezi üç farklı NOS izoformu tarafından gerçekleştirilmektedir: nöronal NOS (nNOS), endotelial NOS (eNOS) ve indüklenebilir NOS (iNOS). İlk iki izoformun aktivasyonu kalsiyum iyonuna bağımlı iken, iNOS aktivasyonu ise kalsiyum

iyonundan bağımsızdır. Ayrıca, nNOS ve eNOS vücutta esas olarak (konstitütif) sentezlenirken, iNOS sentezi sadece bir uyarıcıya immünolojik tepki olarak meydana gelmektedir (Moncada 1999; Tsutsui *et al.* 2006; Tsutsui *et al.* 2009).

Fizyolojik süreçlerde son derece önemli böyle bir bileşiğin sentezi reaksiyonunu katalizleyen NOS enzimleri ile ilgili çalışmalar son yıllarda hız kazanmıştır. Günümüzde enzimin saflaştırılması ve karakterizasyonu, klonlanması, gen ekspresyonu çalışmaları, enzimin inhibitörlerinin sentezi ve izoformların spesifik inhibitörlerinin bulunması gibi pek çok farklı alanlarda çalışmalar devam etmektedir.

NOS enziminin farklı dokulardan saflaştırılması ile ilgili çalışmalar 90'lı yılların başından itibaren artmıştır. Enzim izoformları değişik metotlar kullanılarak birçok dokudan saflaştırılmıştır. Örneğin; NOS enzimi sıgır pankreas dokusundan 2'5'-ADP agaroz ve kalmodülin agaroz afinite kromatografileri kullanılarak iki basamakta %7,6 verimle 5595 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılan pankreas NOS enziminin SDS-PAGE'de 160kDa civarında tek bant verdiğini gözlemlenmiştir. Ayrıca, jel filtrasyon kromatografisi yardımıyla enzimin molekül kütlesi 320 kDa olarak tespit edilmiş, bu da enzimin homodimer yapıda olduğunu göstermektedir (Nam *et al.* 1998).

1998 yılında yapılan bir çalışmada ise, koyun beyninden nNOS enzimi anyon değişim, afinite ve HPLC boyut dışarlama kromatografileri kullanılarak 3 basamakta %4 verimle 9125 kat saflaştırılmıştır. Yapılan çalışmada, afinite kromatografisinde NADPH elüsyonu sonunda SDS-PAGE'de farklı bantlar da gözlemlenmiş ve bu bantların tıpkı NOS enzimi gibi, kofaktör olarak NADPH'a ihtiyaç duyan malik enzim ve glutatyon redüktaz enzimleri olabileceği ileri sürülmüştür. Bunun üzerine üçüncü basamakta HPLC boyut dışarlama kromatografisi kullanarak enzim, oldukça yüksek bir saflaştırma katsayısı ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimin molekül kütlesini SDS-PAGE'de 150kDa olarak belirlenmiş ve bu sonucun farklı türlerden saflaştırılan nNOS izoformlarıyla uyduğu belirtilmiştir (Crack *et al.* 1998).

Hevel ve arkadaşlarının (1991) yapmış oldukları bir çalışmada iNOS enzimi murin makrofajlarından saflaştırılmıştır. Saflaştırma işlemi 2'5'-ADP Sepharose 4B ve DEAE Biogel A kromatografileri kullanılarak iki basamakta gerçekleştirilmiştir. Saflaştırma çalışmaları sırasında, yapılan iki kromatografi basamağı sonunda enzimin malik enzimle birlikte geldiği görülmüş, 3 mM L-malat yıkamasının malat enzimini elimine etmek için yeterli olmadığı, fakat L-malat ve NADP⁺ yıkamaları birlikte yapıldığında NOS enziminin saflaştırılabilindiği ifade etmişlerdir. Ayrıca, saflaştırılan NOS enziminin molekül kütesinin SDS-PAGE'de 130 kDa olduğu belirlenmiş ve jel filtrasyon kromatografisinde enzimin dimer yapıda olduğu ve enzimin aktif formunun molekül kütesinin 260±30 kDa olduğu tespit edilmiştir.

Daha öncede belirtildiği gibi NOS izoformlarından iNOS'un organizmada sentezlenmesi bir uyarıcıya tepki olarak gerçekleşmektedir. Evans ve arkadaşları (1992) yaptıkları çalışmada endotoksin enjekte edilen ratların karaciğer dokularından iNOS enzimini iki basamakta, DEAE-selüloz anyon değişim ve 2'5'-ADP Sepharose afinite kromatografi teknikleri kullanarak, %3,7 verimle 4870 kat saflaştırmışlardır. Afinite kromatografisinde enzim, 10 mM NADPH kullanılarak elüe edilmiş, fakat bu durumda NOS enzimi ile birlikte bazı proteinlerin de elüe olduğunu ve enzimin saf olarak elde edilemediği gözlemlenmiştir. Bu sorunu çözmek amacıyla, afinite kromatografisinde enzimin NADPH ile elüsyonu öncesi, kolona bağlanmış diğer proteinleri elimine etmek için, NADH ve 1 mM NADPH yıkamaları yapıldıktan sonra elüsyon işlemi gerçekleştirilmiş ve böylelikle enzim saf olarak elde edilebilmiştir. Afinite kromatografisi sonrası SDS-PAGE'de yürütülen enzim nümunesinin 135 kDa civarında tek bant verdiği gözlemlenmiştir.

Chen and Rosazza (1995), Nocardia türü bakterilerden NOS enzimini saflaştırarak enzimin bazı özelliklerini incelemişlerdir. Enzim, 2'5'-ADP agaroz ve hidroksilapatit kromatografileri kullanılarak iki basamakta %39,2 verimle 1353 kat saflaştırılmıştır. ADP-agaroz afinite kromatografisinde enzim 10 mM NADPH ile elüe edildikten sonra elüatta mevcut diğer proteinlerin uzaklaştırılması için hidroksilapatit kromatografi tekniği kullanılmıştır. Bu kromatografide elüsyon işlemi potasyum fosfat tampon

çözültisinin lineer gradyenti uygulanarak gerçekleştirilmiş ve enzim %98 saflıkta elde edilmiştir. Dimer yapıdaki enzimin alt birim ve aktif formunun molekül kütleleri sırasıyla 51,9 kDa ve 110,6 kDa olarak belirlenmiştir.

Enzimin izoformlarından biri olan eNOS'un organizmadaki varlığı sadece endotelial hücrelerle sınırlı kalmayıp, aynı zamanda beyin hipokampusu, karaciğer, akciğer, mide bağırsak yolu, üreme organları, kalp kası hücreleri ve trombositlerde de bulunduğu gözlemlenmiştir. Trombositlerdeki NOS izoformunun karakterizasyonuna 1990 yılında kollajen-indüklenmiş agregasyon düzenlenmesini sağlayan L-arjinin/NO metabolik yolunun varlığını anlatan bir rapor sonrasında başlanılmıştır (Radomski *et al.* 1990). O zamandan bu yana, pek çok çalışma, doğrudan ya da dolaylı olarak bir trombosit NOS izoformunun varlığını göstermiştir (Pollock *et al.* 1991). Hatta insan trombositlerinden oluşturulan sitozolik fraksiyonlarda yapılan bir çalışmada, trombositlerde farklı bir konstitütif NOS izoformunun olduğu rapor edilmiştir. Bu izoenzimin denatüre koşullar altında 80 kDa civarında tek bant verdiği, enzimin aktif formunun dimer yapıda olduğu ve jel filtrasyon tekniğiyle molekül kütlelerinin yaklaşık olarak 150 kDa olduğu gözlemlenmiştir (Muruganandam and Mutus 1994).

Çalışmamızda, nitrik oksit sentaz enzimi sığır böbrek dokusundan ve trombositlerinden saflaştırılmış ve enzim karakterize edilmiştir. Enzimin saflaştırılması ile ilgili literatürde yapılan çalışmalardan yararlanılarak, sığır böbrek ve trombosit NOS enzimleri 2'5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi kullanılarak tek basamakta saflaştırılmıştır. Enzimin saflaştırılması işleminde kullanılan 2'5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi, bir grup afinite kromatografisidir ve bu kolona NADPH ve NADP⁺ bileşiklerini koenzim olarak kullanan enzimlerin ilgisi oldukça yüksektir. Dolayısıyla, glutatyon redüktaz (GR), Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD), 6-fosfoglukonat dehidrogenaz ve malik enzim gibi enzimler de bu afinite kolonuna bağlanacaktır. Kolondan bu proteinlerin elimine edilmesi amacıyla yukarıda saydığımız çalışmalardan da faydalanılarak NOS enziminin saflaştırılması için modifiye bir metot geliştirilmiştir. Kolondan diğer proteinlerin uzaklaştırılması için sırasıyla NaCl, NADH ve NADP⁺ yıkamaları yapılmış, enzim nümunesinin elüsyonu 5 mM NADPH ile gerçekleştirilmiş

ve enzim saf olarak elde edilmiştir. Böylelikle, sığır böbrek ve trombosit NOS enzimleri 2'5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi tekniği kullanılarak tek basamakta sırasıyla; %3,58 verimle 1217 kat ve %7,21 verimle 919 kat saflaştırılmıştır. Sığır böbrek dokusundan ve trombositlerinden saflaştırılan NOS enzimlerinin alt birim molekül kütleleri SDS-PAGE'de sırasıyla 104,9 kDa ve 85,9 kDa olarak hesaplanmıştır. Ayrıca, saflaştırılan enzimlerin aktif formunun molekül kütleleri jel filtrasyon kromatografisi tekniği kullanılarak sığır böbrek ve trombosit NOS enzimleri için sırasıyla 215 kDa ve 165,4 kDa olarak hesaplanmıştır.

Bulunan sonuçlara bakıldığında sığır böbrek NOS enziminin alt birim molekül kütesinin literatürde yapılan diğer çalışmalarda bulunan sonuçlarla uyduğu görülmektedir. Ayrıca, sığır böbrek NOS enziminin, farklı türlerden ve dokulardan saflaştırılan diğer NOS enzimleri gibi dimerik yapıda olduğu gözlemlenmiştir. Muruganandam ve Mutus'un (1994) insan trombositlerinden NOS izoformları ile ilgili yapmış oldukları çalışmada, insan trombosit NOS izoformunun farklı bir konstitütif NOS izoformu olduğu ve 80 kDa civarında tek bant verdiği, enzimin dimer yapıda olduğu ve jel filtrasyon tekniğiyle molekül kütesinin yaklaşık olarak 150 kDa olduğu bulunmuştur. Benzer bir şekilde çalışmamızda, sığır trombosit NOS enziminin alt birim molekül kütesinin 85,9 kDa olduğu, enzimin dimerik yapı içerdiği ve aktif formunun molekül kütesinin ise 165,4 kDa olduğu belirlenmiştir. Bütün bu verilere bakıldığında, saflaştırılan sığır böbrek ve trombosit NOS enzimleri ile ilgili elde edilen sonuçların literatürde yapılan çalışmalarla uyumlu olduğu görülmektedir.

L-arjinin'den NO biyosentezi; karaciğer, beyin, kalp gibi birçok dokularda ve makrofaj, endotel, mikroglia gibi pek çok hücrelerde NOS izoformları tarafından gerçekleştirilir (Stuehr ve Griffith 1992). Bugüne kadar tanımlanan üç NOS izoformunun hepsi enzim aktivitesi için birtakım kofaktörlere ya da prostetik gruplara gereksinim duymaktadır. NOS, katalizlediği reaksiyonda oksijen ve NADPH kullanan (Palmer ve Moncada 1989; Stuehr ve Griffith 1992), hem grubu içeren bir protein olup (White ve Marletta 1992), aktivitesi için flavin nükleotid redüktazlara ve tetrahidrobiopterin (BH₄)'e ihtiyaç

duymaktadır (Hevel *et al.* 1991). NOS izoformlarının yapısal benzerliği, NO sentezi mekanizmalarının da muhtemelen benzer olduğunu göstermektedir.

NOS enzimleri, kalmodülin (CaM) ile birbirine bağlı, hem, BH₄ ve L-arjinin için bağlanma bölgeleri bulunduran bir N-terminal oksijenaz bölgesi ile birlikte FAD, FMN ve NADPH için bağlanma bölgeleri bulunduran bir C-terminal redüktaz bölgesi içeren çift-bölgeli bir yapıya sahiptirler. Ca⁺²/CaM bağlanmasıyla redüktaz bölgesindeki NADPH'tan aktarılan elektronların FAD ve FMN aracılığıyla oksijenaz bölgesine akışı (NADPH→FAD→FMN→Hem) kolaylıkla sağlanabilmektedir (Hemmens *et al.* 2000).

NOS enzim aktivitesi için gerekli NADPH, Ca⁺² iyonu, FAD, FMN ve BH₄ gibi maddelerin enzim aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi ile ilgili çalışmalar literatürde mevcuttur. Yapılan bir çalışmada sığır pankreas dokusundan NOS enzimi saflaştırılmış ve enzim aktivitesi üzerine bu bileşiklerin etkileri araştırılmıştır. Aktiviteye etki eden maddeler birer birer eksiltilerek aktivitedeki değişimler incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara bakıldığında saflaştırılan enzim aktivitesinin NADPH ve Ca⁺² iyonuna bağlı olduğu, enzim aktivitesi için FAD ve FMN'nin gerekli olduğu ve BH₄'ün enzim aktivitesi üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir (Nam *et al.* 1998).

L.Amazonensis'ten saflaştırılan NOS enzimi için de benzer bir çalışma yapılmış, aktiviteye etki eden maddelerin yokluğunda enzim aktivitelerinin nasıl etkilendiği araştırılmıştır. Sonuçlara bakıldığında, NADPH yokluğunda enzim aktivitesinin görülmediği, Ca⁺² iyonu yokluğunda ise aktivitenin %83 azaldığı gözlemlenmiştir. Ayrıca, enzimatik reaksiyonda BH₄'ün eksikliği aktivitede %33 azalmaya sebep olmuştur. FAD ve FMN'nin eksikliğinde ise enzim aktivitesinin sırasıyla %6 ve %16 oranında azaldığı görülmüştür (Genestra *et al.* 2006).

Evans ve arkadaşları (1992), rat karaciğer dokusundan saflaştırdıkları iNOS enzim aktivitesi üzerine, enzim aktivitesi için gerekli kofaktör ve koenzimlerin etkilerini incelemiştir. Her seferinde bir madde eksiltilerek enzim aktivitesinin nasıl etkilendiği

araştırılmıştır. Sonuçta, BH₄'ün enzim aktivitesi için gerekli olduğu (yokluğunda enzim aktivitesi %4), FAD veya FMN'nin yokluğunda ise enzim aktivitesinin pek azalmadığı görülmüştür. Ancak, FAD ve FMN'nin her ikisinin eksikliğinde enzim aktivitesinin hemen hemen yarıya düştüğü gözlemlenmiştir.

Çalışmamızda ise, saflaştırılan sığır böbrek ve trombosit NOS enzimleri için enzim aktivite ölçümünde kullanılan maddelerin enzim aktivitesini nasıl etkiledikleri araştırılmıştır. Bu bağlamda, tüm reaktiflerin varlığında enzim aktivitesi %100 kabul edilmiş ve her bir reaktifin yokluğunda enzim aktivitesindeki değişimler incelenmiştir. NADPH eksikliğinde böbrek ve trombosit NOS enzim aktiviteleri sırasıyla %0,89 ve %10,8'e düşmüştür. Ca⁺² iyonu yokluğunda ise böbrek NOS enzim aktivitesi %25,9'a, trombosit NOS enzim aktivitesi ise %8,1'e kadar düşmüştür. Bu sonuçlara bakıldığında, NADPH ve Ca⁺² iyonunun böbrek ve trombosit NOS enzim aktiviteleri için çok önemli olduğu anlaşılmaktadır. BH₄ eksikliğinde ise enzim aktivitelerinin yaklaşık olarak yarıya düştüğü görülmektedir (böbrek NOS: %53,6, trombosit NOS: %56,7). Bu sonuçlar, BH₄'ün enzim aktivitesinde gerekli bir bileşen olduğunu ortaya koymaktadır. FAD veya FMN'nin eksikliğinde ise enzim aktivitesindeki azalmalar diğer reaktiflerinkine nazaran çok düşük oranlarda gerçekleşmiştir. FAD veya FMN yokluğunda, böbrek NOS enzim aktivitesinin %80'nin üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Fakat reaksiyon ortamına FAD ve FMN'nin her ikisi de katılmadığında enzim aktivitesinin %29,4'e düştüğü görülmüştür. Enzim aktivitesindeki bu denli düşüşün, FAD-FMN yokluğunda NADPH'tan gelen elektron akışının ciddi oranda etkilenmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Trombosit NOS enzim aktivitesi ise FAD eksikliğinde pek azalmazken (%91,9) FMN yokluğunda ise hemen hemen yarıya (%56,7) düşmektedir. Her ikisinin yokluğunda ise enzim aktivitesi %54,1 olarak ölçülmüştür. Bu durumda, FMN'nin trombosit NOS enzim aktivitesinde FAD'den daha baskın bir rol oynadığı düşünülebilir. Saflaştırılan enzimlerin substratı olan L-arjinin yokluğunda da enzimlerin aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir. Benzer bir sonuç, Renodon ve arkadaşlarının (1997) yaptıkları çalışmada da karşımıza çıkmaktadır. Saflaştırılmış nNOS enzim aktivitesi üzerine tamoksifen ilacının etkilerinin araştırıldığı çalışmada, nNOS enziminin hem L-arjinin varlığında (dakikada tüketilen NADPH

475±70 nmol) ve hem de yokluğunda (dakikada tüketilen NADPH 1020±110 nmol) aktivite gösterdiği bulunmuştur. Bu durumun, NOS enziminin L-arjinin varlığında ve yokluğunda NADPH oksidasyonunu katalizleme özelliğinden kaynaklandığı belirtilmektedir.

Enzimler, pH değişimlerinden çabuk etkilenirler. Çok yüksek ve çok düşük pH değerlerinde enzimler genellikle aktivitesinin büyük bir kısmını veya tamamını kaybederler. Her enzimin aktivitesinin maksimum olduğu bir pH değeri vardır ve enzim bu pH değerinde en etkili şekilde işlev görür. Enzimlerin en aktif olduğu bu pH değerine optimum pH değeri denir. Her enzim optimum pH değeri farklı farklıdır. Örneğin; bu değer pepsin için 1,5, tripsin için 7,7 ve arginaz için 9,7'dir (Keha ve Küfrevioğlu 2005). Çalışmamızda, sığır böbrek ve trombositlerinden saflaştırılan NOS enzimleri için optimum pH belirlenmesine yönelik çalışmalar kapsamında, saflaştırılan enzimlerin farklı pH değerlerinde potasyum fosfat (pH:5,0-8,0), Tris/HCl (pH:7,5-9,0) ve Glisin/NaOH (pH:9,0-10,5) tampon çözeltileri içerisinde aktivite değerleri spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Elde edilen değerlere bakıldığında böbrek NOS enzimi için optimum pH değeri, potasyum fosfat tampon çözeltisi içerisinde 7,0 olarak belirlenmiştir. pH 6,0-8,0 aralığında enzim aktivitesinin önemli oranda arttığı ve pH 7,0 civarında maksimum aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir. Ayrıca, böbrek NOS enziminin düşük pH (<5,0) ve yüksek pH (>9,0) değerlerinde aktivitesini tamamen kaybettiği gözlemlenmiştir. Sığır trombositlerinden saflaştırılan NOS enzimi için bu değer pH:7,5 (potasyum fosfat tampon çözeltisi içerisinde) olarak hesaplanmıştır. Enzim, Tris/HCl tampon çözeltilerinde (pH:7,5-9,0 aralığında) daha düşük seviyede aktivite göstermekte ve pH<6,0 ve pH>10,0 olduğu bölgelerde ise aktivitesinin sıfıra düştüğü görülmektedir. Sonuç olarak, sığır böbrek ve trombosit NOS enzimlerinin optimum pH değerleri sırasıyla potasyum fosfat tampon çözeltileri içerisinde 7,0 ve 7,5 olarak gözlemlenmiştir. Konuyla ilgili Gorren ve arkadaşlarının (1998) yaptıkları bir çalışmada, pH değerinin rat beyin nNOS fonksiyonları ve yapısını nasıl etkilediği araştırılmıştır. pH 4,5-10,0 aralığında nNOS enzim aktivitesinin değerlendirildiği çalışmada, enzim aktivitesinin pH 7,0-7,5 arasında optimum olduğu, pH<6,5 ve pH>8,0 değerlerinde enzim aktivitesinde keskin düşüşler olduğu gözlemlenmiştir. Farklı bir

çalışmada ise, sığır pankreas dokusundan saflaştırılan NOS enzimi için optimum pH değeri 7,4 olarak hesaplanmıştır (Nam *et al.* 1998). Çalışmamızda farklı pH değerlerinde elde ettiğimiz enzim aktivite değerlerinin ve belirlenen optimum pH değerlerinin literatürde elde edilen sonuçlarla uyumlu olduğu görülmektedir.

Enzimlerin stabilitesinin korunmasında pH değeri önemli bir faktördür. Her enzim için stabilitesinin korunduğu belirli bir pH değeri vardır ve bu pH değerine stabil pH denir. Bizim çalışmamızda saflaştırılan NOS enzimlerinin stabil pH değerlerinin belirlenmesi için enzimler farklı pH değerlerinde değişik tampon çözeltilerde (Potasyum fosfat pH:5,0-8,0 aralığı, Tris/HCl pH:7,5-9,0 aralığı ve Glisin/NaOH pH:9,0-10,5 aralığı) bir hafta boyunca saklanmış ve her gün enzimlerin aktivitelerine bakılarak hangi pH aralığında enzimlerin stabil oldukları belirlenmeye çalışılmıştır. Sonuçta, böbrek NOS enzim aktivitesinin pH:5,5-6,5 aralığında daha iyi korunduğu ve trombosit NOS enzimi için stabil pH değerinin pH:6,5-7,0 aralığı olduğu gözlemlenmiştir.

Sığır böbrek ve trombosit dokularından saflaştırılan NOS enzimleri için optimum iyonik şiddet değerleri (enzim aktivitesinin maksimum olduğu iyon konsantrasyonu) belirlenmesine yönelik çalışmalar kapsamında, değişik iyonik şiddet değerlerine sahip potasyum fosfat tampon çözeltilerinde enzim aktivitelerine bakılmış ve enzim aktivitesinin maksimum olduğu iyonik şiddet değeri optimum iyonik şiddet olarak belirlenmiştir. Sığır böbrek ve trombosit NOS enzimlerinin her ikisi için bu değerler 50 mM (potasyum fosfat tampon çözeltisi) olarak belirlenmiştir.

Enzimlerin maksimum aktivite gösterdiği bir optimum sıcaklık değeri vardır. Genellikle, bu sıcaklık değerinin üzerinde enzimin üç boyutlu yapısı değişir ve enzim aktivitesi düşmeye başlar. Çalışmamızda, saflaştırılan enzimlerin optimum pH değerlerini belirlemek amacıyla 0-60°C arasında 10°C arayla enzim aktivitelerine bakıldı. Maksimum aktivitenin gözlemlendiği sıcaklık değeri optimum sıcaklık olarak belirlendi. Sığır böbrek ve trombosit NOS enzimleri için bu değerler sırasıyla 10°C ve 40°C olarak tespit edildi. Optimum sıcaklık belirlendikten sonra 10°C'lik sıcaklık değişiminin meydana getirdiği aktivite farklılığı olan Q_{10} değerleri, aralarında 10°C fark

olan iki aktivite değerinden yüksek olanın düşük olan aktivite değerine bölünmesi ile hesaplandı. Yapılan araştırmalar sonucunda literatürde sığır pankreas NOS enzimi için optimum sıcaklık değeri 37°C olarak bulunmuştur (Nam *et al.* 1998). Bu değer sığır trombosit NOS enzimi için elde edilen optimum sıcaklık değerine (40°C) oldukça yakın olduğu görülmektedir.

K_m ve V_{max} değerleri, enzim aktivitelerini karşılaştırmak için kullanılan kinetik parametrelerdir. Bu parametrelerden K_m , enzimin substrata olan ilgisinin bir ifadesidir. Düşük K_m enzimin substrata kuvvetli, yüksek K_m zayıf bağlandığını ifade eder. V_{max} değeri ise enzimin katalitik aktivitesinin bir ifadesidir (Keha ve Küfrevioğlu 2005). Çalışma kapsamında, saflaştırılan enzimlerin NADPH, L-arjinin ve sitokrom-c için, 5 farklı substrat/kofaktör konsantrasyonuna karşılık aktivite değerleri bulunarak Lineweaver-Burk grafiklerinden K_m ve V_{max} değerleri hesaplanmıştır. NOS enziminin NADPH oksidasyonu metoduna göre aktivite ölçümünde, enzim L-arjinin'in hem varlığında hem de yokluğunda aktivite gösterdiğinden bu substrat için Lineweaver-Burk grafikleri çizilememiş, dolayısıyla K_m ve V_{max} değerleri de hesaplanamamıştır. Literatürde ise farklı aktivite ölçüm metotları kullanılarak L-arjinin substratı için NOS enzimlerinin K_m ve V_{max} değerlerinin hesaplandığı çalışmalar mevcuttur. Sığır pankreas NOS enzimi için K_m :15,72 μM ve V_{max} :7.82 nmol/mg protein dakika (Nam *et al.* 1998), murin makrofaj NOS enzimi için K_m :16 μM (Hevel *et al.* 1991), rat makrofaj NOS enzimi için K_m :32,3 μM and V_{max} :1052 nmol/mg protein dakika (Yui *et al.* 1991) ve rat karaciğer NOS enzimi için ise K_m :11 μM (Evans *et al.* 1992) olarak hesaplanmıştır.

Çalışmamızda, NOS enzimlerinin NADPH kofaktörü için K_m ve V_{max} değerleri böbrek NOS enzimi için sırasıyla 61,151 μM ve 0,103 $\mu mol/mg$ protein dakika, trombosit NOS enzimi için ise 42,478 μM ve 0,098 $\mu mol/mg$ protein dakika olarak hesaplanmıştır. Sitokrom-c substratı için K_m ve V_{max} değerleri böbrek NOS enzimi için 13,457 μM ve 0,012 $\mu mol/mg$ protein dakika, trombosit NOS enzimi için ise 8,248 μM ve 0,014 $\mu mol/mg$ protein dakika olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara bakıldığında saflaştırılan böbrek ve trombosit NOS enzimlerinin NADPH kofaktörü için birbirine yakın V_{max} değerlerine sahip olduğu, trombosit NOS enziminin K_m değerinin böbrek

NOS enzimininkinden biraz daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. Yani, trombosit NOS enziminin NADPH kofaktörüne olan ilgisinin böbrek NOS enzimininkinden biraz daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Enzimlerin sitokrom-c için elde edilen K_m ve V_{max} değerlerine bakıldığında ise her iki enzimin de yaklaşık aynı V_{max} değerlerine sahip olduğu ve daha düşük K_m değerine sahip olan trombosit NOS enziminin sitokrom-c substratına olan ilgisinin böbrek NOS enzimininkinden daha fazla olduğu söylenebilir. Sonuç olarak saflaştırılan her iki enzim de NADPH ve sitokrom-c için elde edilen K_m ve V_{max} değerlerinin birbirine paralel sonuçlar verdiği görülmüştür.

Biyolojik sistemlerde enzimatik aktivitenin inhibisyonu başlı başına bir kontrol mekanizması oluşturduğundan, oldukça önemli bir olaydır. Pek çok ilaç ve zehirli bileşikler etkilerini enzimleri inhibisyona uğratarak gösterirler. Bu sebeple, biyokimyacılar için enzimlerin inhibisyon çalışmaları, gerek enzim etki mekanizmalarının, gerekse metabolik yolların aydınlatılması bakımından büyük önem taşımaktadır (Keha ve Küfrevioğlu 2005).

Çalışmamızın son aşamasında, saflaştırılan böbrek ve trombosit NOS enzimlerinin aktiviteleri üzerine birtakım antibiyotiklerin *in vitro* etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla, penislin-G, gentamisin, amikasin, tilozin, enrofloksasin, ampisilin, kloramfenikol, linkomisin, kanamisin, oksitetrasiklin, seftriakson, streptomisin, vankomisin, sefotaksim, sefazolin, sefuroksim ve ornidazol olmak üzere toplam 17 adet antibiyotiğin saflaştırılan böbrek ve trombosit NOS enzimlerinin aktiviteleri üzerine *in vitro* inhibisyon etkileri araştırılmıştır. Bu ilaçlardan inhibisyon etkisi gösterenler için Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek, grafikten bu bileşiklerin IC_{50} değerleri (enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu) hesaplanmıştır. İlaçlardan enrofloksasin, kanamisin, kloramfenikol, gentamisin, vankomisin, sefazolin, streptomisin ve ampisilin olmak üzere toplam 8 tanesinin saflaştırılan böbrek NOS enzimini inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Diğer ilaçların ise enzim aktivitesi üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı görülmüştür. İnhibisyon etkisi gösteren bu ilaçlar için IC_{50} değerleri küçükten büyüğe sırasıyla; 0,189 mM, 0,295 mM, 1,509 mM, 6,614 mM, 16,579 mM, 18,679 mM, 28,171 mM, ve 30,394 mM olarak hesaplanmıştır. Elde edilen

değerlere bakıldığında en küçük IC_{50} değerlerine sahip bileşiklerin enrofloksasin ve kanamisin olduğu görülmektedir. Bu iki madde, sığır böbrek NOS enzim aktivitesini submilimolar seviyelerinde yarıya düşürmektedir. İnhibisyon etkisi incelenen on yedi antibiyotik ilaçtan, dört aminoglikozid grubu ilaçtan üç tanesinin (streptomisin, gentamisin ve kanamisin) ve dört sefalosforin grubu ilaçtan bir tanesinin (sefazolin) böbrek NOS enzimini inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Bu sonuçlara göre, aminoglikozid grubu antibiyotik ilaçların böbrek NOS enzim aktivitesini daha iyi inhibe ettiği söylenebilir. Trombosit NOS enzimi için ise, enzim aktivitesini inhibe eden toplam dört ilaç bulunmuştur: oksitetrasiklin, ornidazol, amikasin ve linkomisin. Bu ilaçlar için IC_{50} değerleri küçükten büyüğe doğru sırasıyla: 0,013 mM, 0,505 mM, 1,493 mM ve 12,833 mM olarak hesaplanmıştır. Burada, en küçük IC_{50} değerine, yani en güçlü inhibitör etkiye sahip olan oksitetrasiklinin, enzimi mikromolar seviyesinde (13 μ M) inhibisyona uğrattığı belirlenmiştir. İnhibisyon etkisi gösteren ilaçlardan ornidazol submilimolar, amikasin ve linkomisin ise milimolar seviyesinde enzimi inhibe etmişlerdir.

Sonuç olarak, çalışma kapsamında;

1. Sığır böbrek dokusu ve trombositlerinden NOS enzimi saflaştırılmış ve enzimin SDS-PAGE'de enzim saflığı doğrulanmıştır.
2. Saflaştırılan enzimlerin SDS-PAGE ile alt birim molekül kütleleri ve jel filtrasyon kromatografisi ile aktif formunun molekül kütleleri hesaplanmıştır.
3. Saflaştırılan enzimlerin karakterizasyonu çalışmaları kapsamında enzimlerin optimum pH, optimum iyonik şiddet, stabil pH, optimum sıcaklık ve Q_{10} değerleri belirlenmiştir.
4. Ayrıca, NADPH ve sitokrom-c için saflaştırılan enzimlerin K_m ve V_{max} değerleri hesaplanmıştır.
5. Enzim aktivitesi ölçümünde kullanılan reaktiflerin enzim aktivitesi üzerine etkileri incelenmiştir.
6. Son olarak tıpta ve veteriner hekimlikte sık kullanılan birtakım antibiyotiklerin enzim aktivitesi üzerine *in vitro* etkileri araştırılmıştır.

Elde edilen sonuçlar Çizelge 5.1 ve 5.2’de özetlenmiştir.

Çizelge 5.1. Sığır böbrek dokusundan saflaştırılan NOS enzimi için yapılan çalışmaların toplu sonuçları

Sığır böbrek NOS enziminin saflaştırılması ile ilgili sonuçlar		
KARAKTERİZASYON		
Spesifik Aktivite (EU/mg protein)	1,851	
Saflaştırma Katsayısı	1217	
Verim (%)	3,58	
Molekül kütlesi tayini (kDa)		
SDS-PAGE metodu ile	104,9	
Jel filtrasyon kromatografisi ile	215	
Optimum pH	7,0	
Optimum iyonik şiddet (mM)	50	
Optimum sıcaklık(°C)	10	
Stabil pH	5,5-6,5	
KİNETİK ÇALIŞMALAR		
ANTİBİYOTİKLER	IC ₅₀ (mM)	
Enrofloksasin	0,189	
Kanamisin	0,295	
Kloramfenikol	1,509	
Gentamisin	6,614	
Vankomisin	16,579	
Sefazolin	18,679	
Streptomisin	28,171	
Ampisilin	30,394	
	NADPH	Sitokrom-c
K _m (μM)	61,151	13,457
V _{max} (μmol/mg dk)	0,103	0,012

Çizelge 5.2. Sığır trombositlerinden saflaştırılan NOS enzimi için yapılan çalışmaların toplu sonuçları

Sığır trombosit NOS enziminin saflaştırılması ile ilgili sonuçlar		
KARAKTERİZASYON		
Spesifik Aktivite (EU/mg protein)	2,527	
Saflaştırma Katsayısı	919	
Verim (%)	7,21	
Molekül kütlesi tayini (kDa)		
SDS-PAGE metodu ile	85,9	
Jel filtrasyon kromatografisi ile	165,4	
Optimum pH	7,5	
Optimum iyonik şiddet (mM)	50	
Optimum sıcaklık(°C)	40	
Stabil pH	6,5-7,0	
KİNETİK ÇALIŞMALAR		
ANTİBİYOTİKLER		IC ₅₀ (mM)
Oksitetrasiklin		0,013
Ornidazol		0,505
Amikasin		1,493
Linkomisin		12,833
	NADPH	Sitokrom-c
K _m (μM)	42,478	8,248
V _{max} (μmol/mg dk)	0,098	0,014

KAYNAKLAR

- Alim, Z., Beydemir S., 2012. Effects of some anti-neoplastic drugs on sheep liver sorbitol dehydrogenase. *Arch Physiol Biochem*, 118 (5), 244-252.
- Alderton, W.K., Cooper C.E., Knowles R.G., 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*, 357, 593-615.
- Andrews, P., 1965. The gel-filtration behaviour of proteins related to their molecular weights over a wide range. *Biochem J*, 96(3), 595-606.
- Benjamin, N., Datton J.A.E., Ruter J.M., 1991. Human vascular smooth muscle cells inhibit platelet aggregation when incubated with glyceryl trinitrate: evidence for generation of nitric oxide. *Br J Pharmacol*, 102, 847-850.
- Bhattacharya, S., Patra S.C., Roy S.B., Kahn N.N., and Sinha A.K., 2001. Purification and Properties of Insulin-Activated Nitric Oxide Synthase from Human Erythrocyte Membranes. *Arch Physiol Biochem*, 109(5), 441-449.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248.
- Bredt, D.S. and Snyder S.H., 1990. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Nad Acad Set USA*, 87, 682-685.
- Bredt, D.S., Hwang P.M., Glatt C.E., Lowenstein C., Reed R.R., and Snyder S.H., 1991. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature*, 351(6329), 714-718.
- Bredt, D.S., Ferris C.D., Snyder S.H., 1992. Nitric oxide synthase regulatory sites. Phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase, protein kinase C, and calcium/calmodulin protein kinase: identification of flavin and calmodulin binding sites. *J Biol Chem*, 267, 10976-10981.
- Bredt, D.S. and Synder S.H., 1994. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Ann Rev Physiol*, 63, 174-195.
- Busse, R., and Mulsch A., 1990. Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin. *FEBS Lett*, 265, 133-136.
- Campbell, M.K., and Farrell S.O., 2009. *Biochemistry*. Cengage Learning, sixth edition 143 p, Belmont, USA.
- Cannon, R.O., 1998. Role of nitric oxide in cardiovascular disease: Focus on the endothelium. *Clin Chem*, 44, 1809-1819.
- Champe, P.C., Harvey R.A., and Ferrier D.R., Çeviri editörü: Ulukaya E., 2007. *Lippincott's illustrated review's serisinden: Biyokimya*, 3.baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul.
- Chen, Y., and Rosazza J.P.N., 1995. Purification and Characterization of Nitric Oxide Synthase (NOSNoc) from a Nocardia Species. *J Bacteriol*, 177(17), 5122-5128.
- Condino-Neto, A., Muscara M.N., Grumach A.S., Carneiro-Sampaio M.M. and De Nucci G., 1993. Neutrophils and mononuclear cells from patients with chronic granulomatous disease release nitric oxide. *Br J Clin Pharmacol*, 35(5), 485-490.
- Crack, P.J., Tetaz T., Smith A.I., 1998. Purification, characterisation and distribution of ovine neuronal nitric oxide synthase. *Comp Biochem Physiol Part B*, 120, 727-

733.

- Crane, B.R., Arvai A.S., Gachhui R., Wu C., Ghosh D.K., Getzoff E.D., Stuehr D.J., Tainer J.A., 1997. The structure of nitric oxide synthase oxygenase domain and inhibitor complexes. *Science*, 278(5337), 425–431.
- Culotta, E., and Kochland D.E.J., 1992. NO news is good news (Molecule of the Year). *Science*, 258, 1862–1864.
- Curran, R.D., Billiar T.R., Stuehr D.J., Hofmann K. and Simmons R.L., 1989. Hepatocytes produce nitrogen oxides from L-arginine in response to inflammatory products of Kupffer cells. *J Exp Med*, 170, 1769-1774.
- Eissa, N.T., Yuan J.W., Haggerty C.M., Choo E.K., Palmer C.D., and Moss J., 1998. Cloning and characterization of human inducible nitric oxide synthase splice variants: A domain, encoded by exons 8 and 9, is critical for dimerization. *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol, 95, 7625–7630.
- Evans, T., Carpenter A. and Cohen J., 1992. Purification of a distinctive form of endotoxin-induced nitric oxide synthase from rat liver. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89, 5361-5365.
- Förstermann, U., Pollock J.S., Schmidt H.H., Heller M., Murad F., 1991. Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88, 1788-1792.
- Förstermann, U., Kleinert H., Gath I., Schwarz P., Closs E.I., Dun N.J., 1995. Expression and expressional control of nitric oxide synthases in various cell types. *Adv Pharmacol*, 34, 171-186.
- Friebe, A. and Koesling D., 2003. Regulation of Nitric Oxide-Sensitive Guanylyl Cyclase. *Circ Res*, 93, 96-105.
- Furchgott, R.F. and Vanhoutte P.M., 1989. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J*, 3(9),2007-2018.
- Genestra, M., Silva D.G., Souza W.J.S., Finkelstein L.C., Bezerra R.J.S., Monteiro F.P., and Leona L.L., 2006. Nitric Oxide Synthase (NOS) Characterization in *Leishmania amazonensis* Axenic Amastigotes. *Arch Med Res*, 37, 328–333.
- Golser, R., Gorren A.C.F., Mayer B, and Schmidt K., 2003. Functional characterization of Glu298Asp mutant human endothelial nitric oxide synthase purified from a yeast expression system. *Nitric Oxide*, 8, 7–14.
- Gorren, A.C.F., Schrammel A., Schmidt K., and Mayer B., 1998. Effects of pH on the structure and function of neuronal nitric oxide synthase. *Biochem J*, 331, 801-807.
- Govers, R., and Rabelink T.J., 2001. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol*, 280, F193–F206.
- Green, L.C., Tannenbaum S.R., Goldmann P., 1981. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. *Science*, 212, 56-58.
- Griffith O.W. and Stuehr D.J., 1995. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism, *Annu Rev Physiol*, 57, 707–736.
- Gross, S.S., and Wolin M.S., 1995. Nitric oxide: pathophysiologic mechanism. *Ann Rev Physiol*, 57, 737-769.
- Hemmens, B., Goessler W., Schmidt K., Mayer B., 2000. Role of bound zinc in dimer stabilization but not enzyme activity of neuronal nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*, 275; 35786–35791.

- Hevel, J.M., White K.A., Marletta M.A., 1991. Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein. *J Biol Chem*, 266(34), 22789–22791.
- Hibbs, J.B., Taintor R.R., Vavrin Z., 1987. Macrophage cytotoxicity: role of L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science*, 235(4787), 473-476.
- Hurshman A.R. and Marletta M.A., 2002. Reactions catalyzed by the heme domain of inducible nitric oxide synthase: evidence for the involvement of tetrahydrobiopterin in electron transfer. *Biochemistry*, 41(10), 3439–3456.
- Ignarro, L.J., Buga G.M., Wood K.S., Byrns R.E. and Chaudhuri G., 1987. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84, 9265-9269.
- Ignarro, L.J., 1991. *Biochem. Signal transduction mechanisms involving nitric oxide. Pharmacology*, 41, 485-490.
- Iyengar, R., Stuehr D.J., Marletta M.A., 1987. Macrophage synthesis of nitrite, nitrate, and N-nitrosamines: precursors and role of the respiratory burst. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84 (18), 6369-6373.
- Kayaalp, S.O., 2002. Rasyonel tedavi yönünden Tıbbi Farmakoloji. Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd. Şti. 10. Baskı, Ankara, Türkiye.
- Keha, E.E., ve Küfrevioğlu Ö.İ., 2005. *Biyokimya. Aktif Yayınevi, İstanbul.*
- Kılınç, A. ve Kılınç K., 2003. Nitrik Oksit. *Palme Yayıncılık, Ankara*, 975-8624-56-3.
- Klatt, P., Heinzel B., John M., Kastner M., Bohme E. and Mayer B., 1992. Ca^{2+} /calmodulin-dependent cytochrome c reductase activity of brain nitric oxide synthase. *J Biol Chem*, 267, 11374–11378.
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-683.
- Lamas, S., Marsdent P.A, Li G.K., Tempst P., and Michel T., 1992. Endothelial nitric oxide synthase: Molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89, 6348-6352.
- Li, H. and Förstermann U., 2000. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular diseases. *J Pathol*, 190, 244-254.
- Lincoln, T.M., and Cornwell T.L., 1993. Intracellular cGMP receptor proteins. *FASEB J*, 7328-338.
- Marletta, M.A., Yoon P.S., Iyengar R., Leaf C.D., Wishnok J.S., 1988. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry*, 27(24), 8706-8711.
- Mayer, B., Schmidt K., Humbert P. and Bohme E., 1989. Biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: a cytosolic enzyme in porcine aortic endothelial cells Ca^{2+} -dependently converts L-arginine into an activator of soluble guanylyl cyclase. *Biochem Biophys Res Commun*, 164, 678-685.
- Mayer, B., John M., Bohme E., 1990. Purification of a calcium/calmodulin dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum: cofactor role of tetrahydrobiopterin. *FEBS Lett*, 277, 215-219.
- Mayer, B. and Hemmens B., 1997. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends Biochem Sci*, 22, 477–481.
- Michel, T. and Feron O., 1997. Nitric Oxide synthases: Which, where, how, and why? *J Clin Invest*, 100(9), 2146-2152.
- Mohan, R.M., Golding S., Heaton D.A., Danson E.J., Paterson D.J. 2004. Targetting

- neuronal nitric oxide synthase with gene transfer to modulate cardiac autonomic function. *Prog Biophys Mol Biol*, 84, 321-344.
- Moncada, S., Palmer R.M.J. and Higgs E.A., 1991a. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev*, 43(2), 109-142.
- Moncada, S., Higgs E.A., Hodson H.F., Knowles R.G., Lopez-Jaramillo P., McCall T., Palmer R.M.J., Radomski M.W., Rees D.D., Schulz R., 1991b. The L-Arginine: Nitric Oxide Pathway, *J Cardiovasc Pharmacol*, Volume 17; p 1-9.
- Moncada, S., 1999. Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine. *J R Soc Med*, 92; 164-169.
- Murad, F., 2006. Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development. *N Engl J Med*, 355, 2003-2011.
- Muruganandam, A. and Mutus B., 1994. Isolation of nitric oxide synthase from human platelets. *Biochim Biophys Acta*; 1200, 1-6.
- Nam, S.W, Dong D.W., Sung D.S., Han J.W., Sung Youl Hong S.Y. and Lee H.L., 1998. Nitric Oxide Synthase from Bovine Pancreas: Purification and Characterization. *Arch Pharm Res*, 21(2) 128-134.
- Nathan, C. and Xie Q.W., 1994. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell*, 78(6), 915-8.
- Nelson, D.L. and Cox M.M., 2004. *Lehninger Principles of Biochemistry*. W.H. Freeman and Company, fourth edition, New York, USA.
- Oswald, I.P., Wynn T.A., Sher A., James S.L., 1994. NO as an effector molecule of parasite killing: modulation of its synthesis by cytokines. *Comp Biochem Physiol Pharmacol Toxicol Endocrinol*, 108, 11-18.
- Palmer, R.M.J., Ferridge A.G. and Moncada S., 1987. Nitric oxide accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327, 524-526.
- Palmer, R.M. and Moncada, S., 1989. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 158, 348-352.
- Pfeiffer S., Mayer B., Hemmens B., 1999. Nitric oxide: Chemical puzzles posed by a biological messenger. *Angew Chem Int Ed Engl*, 38, 1715-1731.
- Pollock, J.S., Förstermann U., Mitchell J.A., Warner T.D., Schmidt H.W., Nakane M., Murad F., 1991. Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial-cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88, 10480-10484.
- Radomski, M.W., Palmer R.M.J., Moncada S., 1990. An L-arginine nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87; 5193-5197.
- Renodon, A., Boucher J.L., Sari M.A., Delaforge M., Ouazzani J., and Mansuy D., 1997. Strong Inhibition of Neuronal Nitric Oxide Synthase by the Calmodulin Antagonist and Anti-Estrogen Drug Tamoxifen. *Biochem Pharmacol*, 54, 1109-1114.
- Saito, K., and Kohno M., 2006. Application of electron spin resonance spin-trapping technique for evaluation of substrates and inhibitors of nitric oxide synthase. *Anal Biochem*, 349, 16-24.
- Schmidt, H.H.H.W., Pollock J.S., Nakane M., Gorsky L.D., Förstermann U., Murad F., 1991. Purification of a soluble isoform of guanylyl cyclase-activating-factor synthase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88, 365-369.

- Schmidt, P.P., Lange R., Gorren A.C.F., Werner E.R., Mayer B., Andersson K.K., 2001. Formation of a protonated trihydrobiopterin radical cation in the first reaction cycle of neuronal and endothelial nitric oxide synthase detected by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *J Biol Inorg Chem*, 6 (2), 151–158.
- Segel, I.H., 1968. *Biochemical Calculations*. Wiley & Sons, Incorporated, John, New York, p: 403.
- Sorelle, R., 1998. Nobel Prize Awarded to Scientists for Nitric Oxide Discoveries. *Circulation*, 98, 2365-2366.
- Sørli, M., Gorren A.C.F., Marchal S., Shimizu T., Lange R., Andersson K.K., Mayer B., 2003. Single-turnover of nitric-oxide synthase in the presence of 4-amino-tetrahydrobiopterin proposed role for tetrahydrobiopterin as a proton donor. *J Biol Chem*, 278 (49), 48602–48610.
- Soyut, H., Beydemir Ş., Hisar O., 2008. Effects of some metals on carbonic anhydrase from brains of rainbow trout. *Biol Trace Elem Res*, 123, 179-190.
- Stuehr, D.J., Marletta M.A., 1985. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82, 7738-7742.
- Stuehr, D.J., Cho H.J., Kwon N.S., Weise M.F., Nathan C.F., 1991a. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88, 7773-7777.
- Stuehr, D.J., Kwon N.S., Nathan C.F., Griffith O.W., Feldman P.L. and Wiseman J., 1991b. N-Hydroxy-L-arginine is an Intermediate in the Biosynthesis of Nitric Oxide from L-Arginine. *J Biol Chem*, 266, 6259-6263.
- Stuehr, D.J. and Griffith, O.W., 1992. Mammalian nitric oxide synthases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 65; 287–346.
- Stuehr, D.J., 1997. Structure–function aspects in the nitric oxide synthases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 37, 339–359.
- Torreilles, J., 2001. Nitric oxide: one of the more conserved and widespread signaling molecules. *Front Biosci*, 6, 1161-1172.
- Tsutsui, M., Shimokawa H., Morishita T., Nakashima Y., Yanagihara N., 2006. Development of genetically engineered mice lacking all three nitric oxide synthases. *J Pharmacol Sci*, 102, 147–154.
- Tsutsui, M., Shimokawa H., Otsuji Y., Ueta Y., Sasaguri Y., Yanagihara N., 2009. Nitric oxide synthases and cardiovascular diseases insights from genetically modified mice. *Circ J*, 73, 986–993.
- Whitaker, J.R., 1963. Determination of Molecular Weights of Proteins by Gel Filtration of Sephadex. *Anal Chem.*, 35(12), 1950–1953.
- White, K.A., Marletta, M.A., 1992. Nitric oxide synthase is a cytochrome P-450 type hemoprotein. *Biochemistry*, 31, 6627–6631.
- Yousef, T., Neubacher U., Eysel U.T., and Volgushev M., 2004. Nitric oxide synthase in rat visual cortex: an immunohistochemical study. *Brain Res Protocol*, 13(1), 57– 67.
- Yui, Y., Hattori R., Kosuga K, Eizawa H., Hiki K., and Kawai C., 1991. Purification of Nitric Oxide Synthase from Rat Macrophages. *J Biol Chem*, 266(19), 12544-12547.
- Zakariassen, H.F., Cederkvist H., Harbitz E., Shimizu T., Lange R., Mayer B., Antonius

- C.F. Gorren K., Andersson K., Sørle M., 2008. Thermodynamic analysis of L-arjinine and N^o-hydroxy-L-arjinine binding to nitric oxide synthase. *Biochim Biophys Acta*, 1784, 806–810.
- Zhou, L., and Zhu D.Y., 2009. Neuronal nitric oxide synthase: Structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide*, 20, 223–230.

ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Hatay’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Hatay’da tamamladı. 1996 yılında Orta Doğu Teknik Üniversitesi Eğitim Fakültesi Kimya Öğretmenliği bölümünü kazandı. 2001 yılında lisans eğitimini başarıyla tamamladı. Aynı yıl Milli Eğitim Bakanlığı’nda İngilizce Öğretmeni olarak göreve başladı. 2006 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2009 yılında yüksek lisans eğitimini başarıyla tamamladı. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalı’nda doktora eğitimine başladı. Halen Milli Eğitim Bakanlığına bağlı Erzurum Lisesi’nde İngilizce öğretmeni olarak görev yapmaktadır.