

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

**PARAOKSONAZ Q VE R İZOENZİMLERİNİN
SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI ÇEVRE KİRLİTİCİLERE
KARŞI AFİNİTESİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

NAHİT GENÇER

Balıkesir, Kasım-2008

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

PARAOKSONAZ Q VE R İZOENZİMLERİNİN
SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI ÇEVRE KİRLETİCİLERE KARŞI
AFİNİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

NAHİT GENÇER

Tez Danışmanı: Prof.Dr. Oktay ARSLAN

Sınav Tarihi: 07.11.2008

Jüri Üyeleri: Prof.Dr. Leman TARHAN (DEÜ) 

Prof.Dr. Şule PEKYARDIMCI (AÜ) 

Prof.Dr. Oktay ARSLAN (BAÜ) 

Doç.Dr. Feray KÖÇKAR (BAÜ) 

Doç.Dr. Turgut KILIÇ (BAÜ) 

Balıkesir, Kasım-2008

“Bu alışma Balıkesir Üniversitesi Rektrlğ Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından BAP 2007/11 Kodlu Proje ile desteklenmiştir. Teşekkür ederiz.”

ÖZET

PARAOKSONAZ Q VE R İZOENZİMLERİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI ÇEVRE KİRLETİCİLERE KARŞI AFİNİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

Nahit GENÇER

Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı

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

Balıkesir, 2008

Bu çalışmada, detoksifikasyon ve antioksidan aktivitesi ile metabolizmada önemli fizyolojik fonksiyona sahip paraoksonaz (PON1) Q ve R izoenzimlerini saflaştırmak için yeni bir hidrofobik etkileşim kromatografisi jeli sentezlenmiştir. Hidrofobik etkileşim kromatografisi jeli, CNBr ile aktive edilmiş Sepharose-4B'ye uzantı kolu olarak L-tirozin bağlandıktan sonra ligand olarak hidrofobik bir molekül olan 9-aminofenantrenin L-tirozine kenetlenmesi sonucu sentezlenmiştir.

Sentezlenen hidrofobik etkileşim jeli ile uygulanan hidrofobik etkileşim kromatografisi ve amonyum sülfat çöktürmesi yöntemleri kullanılarak insan serumundan Q ve R izoenzimleri ayrı ayrı saflaştırılmıştır. Saflaştırılan PON1Q ve R izoenzimleri SDS poliakrilamid jel elektroforezine uygulanarak yaklaşık 43 kDa molekül ağırlığına sahip tek bant elde edilmiştir.

İnsan serum PON1 enziminin paraokson substratına karşı K_M ve V_{max} değerleri Lineweaver-Burk yöntemi ile Q izoenzimi için 0,599 mM ve 55 U/mL, R izoenzimi için 0,492 mM ve 50 U/mL olarak bulunmuştur.

Bu çalışmada Mn, Hg, Co, Cd, Ni ve Cu ile purtapyr, agroform, practucer ve roundup ticari isimleriyle kullanılan bazı çevre kirleticilerin saflaştırılmış PON1_{192Q} ve PON1_{192R} izoenzimleri üzerindeki in vitro etkisi belirlenmiştir. Söz konusu çevre kirleticilerinin bu izoenzimlerden R tipini daha fazla inhibe ettiği saptanmıştır.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: Paraoksonaz (PON1), Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi, Çevre kirleticiler, İnhibisyon.

ABSTRACT

PURIFICATION OF PARAOXONASE Q AND R ISOENZYMES AND THE INVESTIGATION OF THE AFFINITY TO SOME ENVIRONMENTAL POLLUTANTS

NAHİT GENÇER

Balikesir University, Institute of Science, Department of Chemistry

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

Balikesir, Turkey, 2008

In this study, a new gel of hydrophobic interaction chromatography for purification of paraoxonase (PON1) Q and R isoenzyme, which are of important physiological function in metabolism with detoxification and antioxidant activity, were synthesized. The gel was synthesized with Sepharose-4B-L-tyrosine and 9-aminophenanthrene as hydrophobic ligand. Sepharose-4B was activated with CNBr and than L-tyrosine was added as extension arm.

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

The K_M and V_{max} values were determined by the method of Lineweaver-Burk plots, using paraoxon as substrate. The K_M and V_{max} were 0.599 mM and 55 U/ml for Q isoenzyme, 0.492 mM and 50 U/ml for R isoenzyme respectively.

The effect of some environmental pollutants on purified human serum PON1_{192Q} and PON1_{192R} *in vitro* was determined. The pollutants were Mn, Hg, Co, Cd, Ni, Cu, purtapyr, agroform, practucer, roundup. All of them caused an inhibition effect on purified human serum paraoxonase *in vitro*. In addition, the inhibition of paraoxonase activity for R isoenzyme by these pollutants was more than that of Q isoenzyme.

KEY WORDS: Paraoxonase (PON1), Hydrophobic interaction chromatography, environmental pollutants, Inhibition

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET, ANAHTAR SÖZCÜKLER	ii
ABSTRACT, KEY WORDS	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SEMBOL LİSTESİ	vii
ŞEKİL LİSTESİ	viii
ÇİZELGE LİSTESİ	xiii
ÖNSÖZ	xvii
1. GİRİŞ	1
1.1. Paraoksonaz Enzimi	2
1.2. Adlandırılması	3
1.3. Paraoksonaz Gen Ailesi	4
1.3.1. PON1'in Biyokimyasal Yapısı	5
1.3.2. PON'in HDL'ye Bağlanması	7
1.3.3. PON1'in Sentezlenmesi ve Salgılanması	8
1.4. Enzimin Katalitik Mekanizması	8
1.5. Katalizlediği Reaksiyonlar ve Substratları	9
1.6. PON1 Polimorfizmi	13
1.7. Enzimin Saflaştırılması	16
1.8. Ağır Metaller ve Çevre Üzerine Etkileri	17

1.9. Pestisitlerin İnsan ve Çevre Üzerine Etkileri	21
1.10. Çalışmalarımızda Kullanılan Pestisitler ve Kullanım Yerleri	22
1.10.1.(RS)-5-etil-2-(4-izopropil-4-metil-5-okzo-2-imidazolin-2-yl) nikotinik asit	22
1.10.2. Glifosfat-Amin tuzu N-(fosfonometil) glisin	23
1.10.3. (2,4-Diolorofenoksi) asetik asit dimetil amin tuzu	24
1.10.4. Propil-3-(dimetilamino) propilkarbomat hidroklorid	25
2. MATERYAL VE YÖNTEMLER	26
2.1. MATERYALLER	26
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	26
2.1.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar	26
2.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması	27
2.2. YÖNTEMLER	30
2.2.1. Kan Serumunun Ayrılması	30
2.2.2. Enzim Aktivite Tayini	30
2.2.3. Q ve R türünün Belirlenmesi	30
2.2.4. Bradford Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini	31
2.2.5. Enzimin Saflaştırılması	32
2.2.5.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi	32
2.2.5.2. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Enzimin Saflaştırılması	32
2.2.5.2.1. Sepharose 4B'nin Aktifleştirilmesi	32
2.2.5.2.2. L-tirozinin Bağlanması	33
2.2.5.2.3. 9-Aminofenantren Bileşiğinin Bağlanması	34
2.2.6. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) İle Enzim Saflığının Kontrolü	36
2.2.7. Optimum Şartlarda K_M ve V_{max} Değerlerinin Bulunması	37

2.2.8. Bazı Ağır Metaller ve Pestisitlerin I50 Değerlerinin Bulunması	37
2.2.9. Ağır Metal ve Pestisitler İçin Ki Değerlerinin Bulunması	38
3. BULGULAR	39
3.1. Q ve R Fenotiplere Sahip Deneklerin Belirlenmesi	39
3.2. Enzimin Saflaştırılması	40
3.2.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi	40
3.2.2. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Enzimin Saflaştırılması	41
3.2.3. Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri	42
3.3. Serum Paraoksonaz Q ve R İzoenzimlerinin SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi	44
3.4. Optimum Şartlarda K_M ve V_{max} Değerlerinin Bulunması	45
3.5. İnhibisyona Sebep Olan Ağır Metallerin ve Bazı Pestisitlerin I50 ve K_i Değerlerinin Bulunması	49
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	102
5. KAYNAKLAR	111

SEMBOL LİSTESİ

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

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil Numarası	Adı	Sayfa
Şekil 1.1	Paraoksanın kimyasal yapısı (O,O-dietil-O-p-nitrofenil fosfat)	4
Şekil 1.2	Paraoksonaz Enzim Mekanizması	4
Şekil 1.3	PON1'in üç boyutlu yapısı	6
Şekil 1.4	PON1'in HDL'ye bağlanması	7
Şekil 1.5	Paraoksonazın katalitik mekanizması	9
Şekil 1.6	Lakton Hidrolizi	10
Şekil 1.7	İnsektisitlerde yaygın olarak kullanılan okson metabolitlerinin hidrolizi	12
Şekil 1.8	Sinir gazlarının hidrolizi	12
Şekil 1.9	Aromatik esterlerin hidrolizi	13
Şekil 1.10	PON1 enzimi gen polimorfizmleri	14
Şekil 1.11	(RS)-5-etil-2-(4-metil-5-okzo-2-imidazolin-2-yl)=nikotinik asit	23
Şekil 1.12	N-(fosfonometil)glisin	24
Şekil 1.13	(2,4-dikloropenoksi) asetik asit	25
Şekil 1.14	Propil 3-(dimetilamino) propilkarbamat hidroklorid	25

Şekil 2.1	Sepharose 4B'nin aktifleştirilmesi	33
Şekil 2.2	L-tirozinin bağlanması	33
Şekil 2.3	9-Aminofenantren bileşiğinin bağlanması	35
Şekil 3.1	Hidrofobik etkileşim kolonundan PON1 enziminin elüsyonu	41
Şekil 3.2	Bradford yöntemi ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan standart grafik	42
Şekil 3.3	Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılan paraoksonaz enziminin SDS-polakrilamid jel elektroforezi.	44
Şekil 3.4	Saflaştırılmış insan serum PON1Q izoenziminin paraokson substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği	48
Şekil 3.5	Saflaştırılmış insan serum PON1R izoenziminin paraokson substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği	48
Şekil 3.6	Saflaştırılmış insan serum PON1R izoenzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda Co için % aktivite-[I] grafiği	51
Şekil 3.7	Saflaştırılmış insan serum PON1R izoenzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda Mn için % aktivite-[I] grafiği	51
Şekil 3.8	Saflaştırılmış insan serum PON1R izoenzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda Cd için % aktivite-[I] grafiği	53
Şekil 3.9	Saflaştırılmış insan serum PON1R izoenzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda Ni için % aktivite-[I] grafiği	53
Şekil 3.10	Saflaştırılmış insan serum PON1R izoenzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda Cu için % aktivite-[I] grafiği	55

Şekil 3.11	Safılaştırılmış insan serum PON1R izoenzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda Hg için % aktivite-[I] grafiği	55
Şekil 3.12	Safılaştırılmış insan serum PON1Q izoenzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda Co için % aktivite-[I] grafiği	57
Şekil 3.13	Safılaştırılmış insan serum PON1Q izoenzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda Mn için % aktivite-[I] grafiği	57
Şekil 3.14	Safılaştırılmış insan serum PON1Q izoenzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda Cd için % aktivite-[I] grafiği	59
Şekil 3.15	Safılaştırılmış insan serum PON1Q izoenzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda Ni için % aktivite-[I] grafiği	59
Şekil 3.16	Safılaştırılmış insan serum PON1Q izoenzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda Cu için % aktivite-[I] grafiği	61
Şekil 3.17	Safılaştırılmış insan serum PON1Q izoenzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda Hg için % aktivite-[I] grafiği	61
Şekil 3.18	Safılaştırılmış insan serum PON1R izoenzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda Purtaıpyr için % aktivite-[I] grafiği	63
Şekil 3.19	Safılaştırılmış insan serum PON1R izoenzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda Practicur için % aktivite-[I] grafiği	63
Şekil 3.20	Safılaştırılmış insan serum PON1R izoenzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda Roundup için % aktivite-[I] grafiği	65

Şekil 3.21	Safılaştırılmış insan serum PON1R izoenzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda Agroform için % aktivite-[I] grafiği	65
Şekil 3.22	Safılaştırılmış insan serum PON1Q izoenzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda Practicur için % aktivite-[I] grafiği	67
Şekil 3.23	Safılaştırılmış insan serum PON1Q izoenzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda Purtaıpyr için % aktivite-[I] grafiği	67
Şekil 3.24	Safılaştırılmış insan serum PON1Q izoenzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda Roundup için % aktivite-[I] grafiği	69
Şekil 3.25	Safılaştırılmış insan serum PON1Q izoenzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda Agroform için % aktivite-[I] grafiği	69
Şekil 3.26	Safılaştırılmış insan serum PON1R izoenzimi üzerine Mn'ın inhibisyon etkisi $[I_1]=0,143$ mM, $[I_2]=0,191$ mM	72
Şekil 3.27	Safılaştırılmış insan serum PON1R izoenzimi aktivitesi üzerine Co inhibisyon etkisi $[I_1]=0.293$ mM, $[I_2]=0.367$ mM	74
Şekil 3.28	Safılaştırılmış insan serum PON1R izoenzimi aktivitesi üzerine Cd inhibisyon etkisi $[I_1]=0,1429$ mM, $[I_2]=0,1905$ mM	75
Şekil 3.29	Safılaştırılmış insan serum PON1R izoenzimi aktivitesi üzerine Ni inhibisyon etkisi $[I_1]=0,876$ mM, $[I_2]=1,095$ mM	75
Şekil 3.30	Safılaştırılmış insan serum PON1R izoenzimi aktivitesi üzerine Cu inhibisyon etkisi $[I_1]=0.095$ mM, $[I_2]=0.191$ mM	78
Şekil 3.31	Safılaştırılmış insan serum PON1R enzimi aktivitesi üzerine Hg inhibisyon etkisi $[I_1]=0.095$ mM, $[I_2]=0.191$ mM	78

Şekil 3.32	Saflaştırılmış insan serum PON1Q izoenzimi aktivitesi üzerine Mn inhibisyon etkisi $[I_1]=0.095$ mM, $[I_2]=0.191$ mM	81
Şekil 3.33	Saflaştırılmış insan serum PON1Q izoenzimi aktivitesi üzerine Co inhibisyon etkisi $[I_1]=4,00$ mM, $[I_2]=3,67$ mM	81
Şekil 3.34	Saflaştırılmış insan serum PON1Q izoenzimi aktivitesi üzerine Cd inhibisyon etkisi $[I_1]=0,191$ mM, $[I_2]=0.286$ mM	84
Şekil 3.35	Saflaştırılmış insan serum PON1Q izoenzimi aktivitesi üzerine Ni inhibisyon etkisi $[I_1]=0,219$ mM, $[I_2]=0.438$ mM	84
Şekil 3.36	Saflaştırılmış insan serum PON1Q izoenzimi aktivitesi üzerine Cu inhibisyon etkisi $[I_1]=0,191$ mM, $[I_2]=0.286$ mM	87
Şekil 3.37	Saflaştırılmış insan serum PON1Q izoenzimi aktivitesi üzerine Hg inhibisyon etkisi $[I_1]=0,762$ mM, $[I_2]=0.857$ mM	87
Şekil 3.38	Saflaştırılmış insan serum PON1Q izoenzimi üzerine practucer inhibisyon etkisi $[I_1]=30,90$ mM, $[I_2]=37,08$ mM	90
Şekil 3.39	Saflaştırılmış insan serum PON1Q izoenzimi üzerine purtapyr inhibisyon etkisi $[I_1]=0,146$ mM, $[I_2]=0.182$ mM	90
Şekil 3.40	Saflaştırılmış insan serum PON1Q izoenzimi aktivitesi üzerine agrofom inhibisyon etkisi $[I_1]=0,217$ mM, $[I_2]=0,430$ mM	93
Şekil 3.41	Saflaştırılmış insan serum PON1Q izoenzimi üzerine roundup inhibisyon etkisi $[I_1]=0,235$ mM, $[I_2]=0.464$ mM	93
Şekil 3.42	Saflaştırılmış insan serum PON1R izoenzimi üzerine purtapyr inhibisyon etkisi $[I_1]=0,166$ mM, $[I_2]=0,196$ mM	96
Şekil 3.43	Saflaştırılmış insan serum PON1R izoenzimi aktivitesi üzerine practucer inhibisyon etkisi $[I_1]=25$ mM, $[I_2]=35$ mM	96
Şekil 3.44	Saflaştırılmış insan serum PON1R izoenzimi üzerine	99

agroform inhibisyon etkisi $[I_1]=0,250$ mM, $[I_2]=0.400$ mM

Şekil 3.45 Saflaştırılmış insan serum PON1R izoenzimi üzerine roundup inhibisyon etkisi $[I_1]=1,867$ mM, $[I_2]=2,332$ mM 99

Şekil 4.1 PON1 enziminin HDL yüzeyine bağlanma modeli 104

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge Numarası	Adı	Sayfa
Çizelge 2.1	SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının miktarları	29
Çizelge 3.1	Sağlıklı bireylerin serum paraoksonaz bazal ve tuzlu enzim aktiviteleri	40
Çizelge 3.2	Q ve R Türü için saflaştırma tablosu	43
Çizelge 3.3	İnsan serum PON1Q izoenzimi için paraokson substratı kullanılarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri	46
Çizelge 3.4	İnsan serum PON1R izoenzimi için paraokson substratı kullanılarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri	47
Çizelge 3.5	Serum PON1R izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Co ve Mn 'ın I_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, metal konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	50
Çizelge 3.6	Serum PON1R izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Cd ve Ni 'in I_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, metal konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	52
Çizelge 3.7	Serum PON1R izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Cu ve Hg 'nın I_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, metal konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	54

Çizelge 3.8	Serum PON1Q izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Co ve Mn 'nin I_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, metal konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	56
Çizelge 3.9	Serum PON1Q izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Cd ve Ni 'in I_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, metal konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	58
Çizelge 3.10	Serum PON1Q izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Cu ve Hg 'nin I_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, metal konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	60
Çizelge 3.11	Serum PON1R izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Purtaapyr ve Practicur'in I_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, pestisit konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	62
Çizelge 3.12	Serum PON1R izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Roundup ve Agroform'in I_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, pestisit konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	64
Çizelge 3.13	Serum PON1Q izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Purtaapyr ve Practicur'in I_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, pestisit konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	66
Çizelge 3.14	Serum PON1Q izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Roundup ve Agroform'in I_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, pestisit konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	68

Çizelge 3.15	Serum PON1R izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Mn'in K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, Mn konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	70
Çizelge 3.16	Serum PON1R izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Co'in K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, Co konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	71
Çizelge 3.17	Serum PON1R izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Cd'un K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, Cd konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	73
Çizelge 3.18	Serum PON1R izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Ni'in K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, Ni konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	74
Çizelge 3.19	Serum PON1R izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Cu'nun K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, Cu konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	76
Çizelge 3.20	Serum PON1R izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Hg'nin K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, Hg konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	77
Çizelge 3.21	Serum PON1Q izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Mn'in K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, Mn konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	79
Çizelge 3.22	Serum PON1Q izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Co'nun K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, Co konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	80

Çizelge 3.23	Serum PON1Q izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Cd'nin K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, Cd konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	82
Çizelge 3.24	Serum PON1Q izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Ni'nin K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, Ni konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	83
Çizelge 3.25	Serum PON1Q izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Hg'nin K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, Hg konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	85
Çizelge 3.26	Serum PON1Q izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Cu'nin K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, Cu konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	86
Çizelge 3.27	Serum PON1Q izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren practucer'nin K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, practucer konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	88
Çizelge 3.28	Serum PON1Q izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren purtapyr'nin K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, purtapyr konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	89
Çizelge 3.29	Serum PON1Q izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren agroform'nin K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, agroform konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	91
Çizelge 3.30	Serum PON1Q izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren roundup'nin K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, roundup konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	92

Çizelge 3.31	Serum PON1R izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren purtapyr'ın K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, purtapyr konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	94
Çizelge 3.32	Serum PON1R izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren practucer'ın K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, practucer konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	95
Çizelge 3.33	Serum PON1R izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren agroform'ın K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, agroform konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	97
Çizelge 3.34	Serum PON1R izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren roundup'ın K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, roundup konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	98
Çizelge 3.35	İnsan serum PON1Q ve R izoenzimleri için 1mM paraokson substrat konsantrasyonunda %50 inhibisyona sebep olan ağır metallerin konsantrasyonları ve Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan inhibisyon tipleri ve K_i değerleri	100
Çizelge 3.36	İnsan serum PON1Q ve R izoenzimleri için 1mM paraokson substrat konsantrasyonunda %50 inhibisyona sebep olan pestisitlerin konsantrasyonları ve Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan inhibisyon tipleri ve K_i değerleri	101

ÖNSÖZ

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

Doktora tez izleme sınavları esnasında değerli bilgi ve yorumları ile bizleri yönlendiren çok kıymetli hocalarım sayın Prof. Dr. Leman TARHAN'a ve Doç. Dr. Turgut KILIÇ'a en derin saygılarımı sunarım.

Çalışmalarında yardımlarını gördüğüm ve her konuda desteklerini esirgemeyen değerli arkadaşım Yrd.Doç.Dr.Selma SİNAN'a teşekkür gönül borcumdur. Ayrıca Serap BEYAZTAŞ'a, Semra IŞIK'a, Murat SAYIN'a, Ferit KARANFİL'e ve Mehmet UÇKUN'a yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Bu çalışmanın yapılması sırasında Selma Sinan 3 kez (20 mL), Ersin Hopa 1 kez (5 mL), Nahit Gençer 14 kez (1155 mL), Sabriye Gençer 1 kez (400 mL), Murat Sayın 7 kez (480 mL), Tuna Gül 4 kez (245 mL), Ömer Kamış 2 kez (110 mL), Zafer Seferoğlu 3 kez (70 mL), Mesut Şentaburlar 3 kez (85 mL), Tahir Cirit 2 kez (80 mL), Sedat Karabulut 1 kez (5 mL), Seda Eryılmaz 2 kez (85 mL), Evrim Çelebi 1 kez (5 mL), Nalan Gençer 3 kez (175 mL), Osman Tümer 1 kez (100 mL), Serap Beyaztaş 3 kez (155 mL) ve Nizamettin Gençer 2 kez (510 mL) kan vermiştir. Kan veren bütün herkese çok çok teşekkür ederim.

Ayrıca bana her şeyin başarılabilir olduğuna inandıran ve her yönden desteklerini gördüğüm, her zaman arkamda olan babam Nizamettin GENÇER ve annem Sabriye GENÇER'e en derin teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca Uzman Dr.Nurhan Sarıoğlu ve Uzman Dr.Mengü Sarıoğlu'na da teşekkür etmek isterim.

Son olarak doktora çalışmalarım esnasında bana manevi desteğini esirgemeyen sevgili eşim Nalan GENÇER'e sonsuz teşekkürlerimi belirtmek ve bu tezi henüz dünyaya gelmemiş olan kızıma hediye etmek isterim.

Balıkesir, 2008

Nahit GENÇER

1. GİRİŞ

Paraoksonaz (PON1) organik fosforlu bir insektisit olan parationun aktif metaboliti paraoksonu hidroliz etme yeteneğine sahip A-esterazlar grubundan bir enzimdir [1]. PON1, HDL'ye bağlı, organofosfat ajanları (OP) ve sinir gazlarını hidrolizine, LDL'nin oksidasyonu ile lipit peroksidlerin oluşumuna ve bakteri endotoksinlerine karşı koruyucu rol oynayan önemli bir karaciğer enzimidir. LDL'nin oksidasyonu arteroskleroz sürecinin başlangıç evresini oluşturması, enzimin antioksidan özelliğinin önemini ortaya koymaktadır [2,3]. Arterosklerotik hastalıklara karşı vücuttaki savunma mekanizmalarından biri de paraoksonaz enzimidir.

Paraoksonaz gen ailesi, insanlarda kromozom 7'nin uzun kolunda bulunur. PON1, PON2 ve PON3 olmak üzere bilinen üç üyeye sahiptir. Yapısal yönden büyük benzerlikler gösteren bu genlerden PON1'e yönelik çok yoğun çalışmalar yapılmaktadır. PON1, fizyolojik substratlarının belirlenmesi ve arterosklerozis ile ilişkisinin ortaya konması nedeniyle, PON2 ve PON3'e göre nispeten daha iyi aydınlatılan genidir [4]. PON1 geni, Q/R 192 ve M/L 55 olmak üzere iki önemli polimorfizm göstermektedir. Bunlar içinde en yaygın Q/R 192 polimorfizmidir. Çünkü PON1 enzim aktivitesindeki bu polimorfizm substrat bağımlıdır ve farklı etnik kökenli popülasyonlara göre değişkenlik gösterdiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [5].

Son yıllarda artan çevre kirliliği, bazı bileşiklerin insan sağlığına etkilerinin daha fazla araştırılmasına sebep olmaktadır. Özellikle metabolizmada önemli

fizyolojik fonksiyonlara sahip enzimlerin aktivitelerinin bazı ağır metallerden ve tarım ilaçlarından ne ölçüde etkilendiği son derece önemlidir. Bu çalışmamızda Mn, Hg, Co, Cd, Ni ve Cu metallerinin ve purtapyr ((RS)-5-etil-2-(4-izopropil-4-metil-5-okzo-2-imidazolin-2-yl) nikotinik asit), practucer (Propil-3-(dimetilamino) propilkarbomat hidroklorid), agroform (2,4-Diolorofenoksi asetik asit dimetil amin tuzu) ve roundup (Glifosfat-Amin tuzu N-(fosfonometil) glisin) ticari isimleri ile satılan tarım ilaçlarının PON1_{192Q} ve PON1_{192R} izoenzimleri üzerine *in vitro* etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bunun için aşağıdaki çalışmalar planlanmıştır;

- Paraoksonaz enziminin aktivite metodunun laboratuvar şartlarında oturtulması
- Q ve R türlerinin tayin yöntemlerinin laboratuvar şartlarında optimizasyonu
- Yeni bir hidrofobik jel sentezi
- İnsan serumundan hidrofobik etkileşim kromatografisi ile paraoksonaz Q ve R izoenzimlerinin ayrı ayrı saflaştırılması
- SDS-PAGE elektroforezi ile saflığının kontrolü
- Optimum şartlarda Q ve R izoenzimlerinin substrata ilgisinin biyokimyasal ifadesi olan K_M ve V_{max} değerlerinin bulunması
- Önemli çevre kirleticilerinden olan 6 ağır metal ve 4 tarım ilacının saf Q ve R izoenzim aktivitesine *in vitro* etkisi
- İnhibisyona neden olan ağır metallerin ve tarım ilaçlarının, inhibisyon mekanizmasının belirlenmesi

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

Paraoksonaz, Aldridge sınıflama sistemine göre A grubu arildialkilfosfataz sınıfı ester hidrolaz enzimidir. Önceleri organofosfat bileşiklerini hidroliz etme özelliği nedeni ile toksikoloji alanında çalışılmış, son yıllarda ise antioksidan etkileri nedeni ile kronik kalp hastalığı riskinden korunulabileceği düşünülerek güncellik kazanmıştır [1].

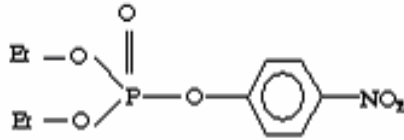
Paraoksonaz, ilk olarak 1953 yılında Aldridge W.N. tarafından p-nitrofenil asetat, propiyonat ve bütirat'ı hidroliz eden A-esteraz olarak teşhis edilmiştir. İnsan serumunda ilk kez 1961'de Uriel tarafından elektroforez sonrası HDL immunopresipitatlarında saptanmıştır [6]. Mackness ve ark, ilk olarak HDL-ayırımı için santrifüj yöntemini geliştirdikten sonra, koyunlarda paraoksonaz aktivitesinin çoğunlukla apo AI içeren partiküllerde HDL ile birlikte bulunduğunu ve insan serumunun ultra santrifüjlenmesi ile enzimin kanda HDL yapısında taşındığını ortaya koymuşlardır [7]. Safılaştırılmış sığır serum paraoksonazının lipidlerle ilişkili ve HDL ile aynı moleküler kütleyle sahip olduğunu göstermişlerdir. Safılaştırma sırasında apo A-I'in paraoksonazdan ayırımının zor olması, ikisinin sıkı ilişkili olduğunu düşündürmüş ve HDL kolesterol tayini sırasında lipoprotein fraksiyonunda aril-esteraz aktivitesine rastlamışlardır [6]. Enzim; paraokson, metil paraokson ve klormetil paraoksona yüksek derecede seçicilik gösterdiği için, paraoksonaz olarak adlandırılmıştır. Mackness ve ark., PON'un HDL üzerinde apo A-I'e bağımlı olarak aktivite gösterdiğini ve 1991 yılında LDL üzerindeki lipoperoksit birikimini azalttığını bulmuşlardır [7]. Aynı zamanda Macness ve ark, farklı populasyonlarda (Fransız, Sudanlı vs) polimorfizm analizleri yapılarak, allelik formları belirlenmiş ve populasyon çalışmaları enzim aktivitesiyle HDL, apo A-I, apo A-II arasında istatistiksel ilişki gösterilmiştir [7]. İmmunoafinite kromatografi çalışmaları insan

serum paraoksonazının gerçekte apolipoprotein A-I ve klusterin (apolipoprotein J) içeren HDL tipleri ile ilişkili olduğunu ve PON'un total HDL'nin çok küçük bir bölümünü oluşturduğunu göstermiştir [1,7].

Sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda, farklı kardiyovasküler hastalıklarda enzim aktiviteleri incelenmiş, lipoproteinlerle ve lipid peroksidasyonu arasındaki ilişkisi araştırılmış, enzimin aminoasit dizisi belirlenmiştir [8].

1.2. Adlandırılması

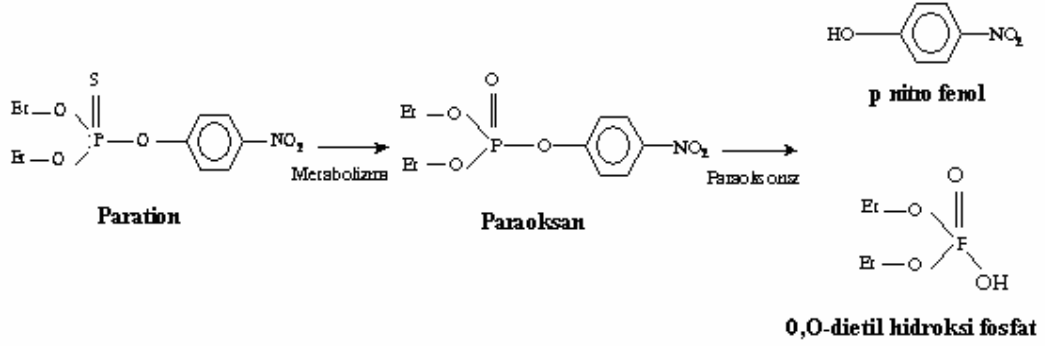
Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği'nin (IUBMB) enzim isimlendirmesinde paraoksonaz iki numaraya (EC 3.1.1.2 ve EC 3.1.8.1.) sahiptir. 1990'lı yıllardan sonra, paraoksonazın arilesterazdan farklı olarak yalnız fenolik esterleri değil, fosforik ve fosfinik asit esterlerini de hidroliz ettiği anlaşılmış ve EC 3.1.8.1 ile tanımlanmıştır [8]. Paraoksonaz enziminin, A grubu Arildialkilfosfataz sınıfı bir ester hidrolaz enzimi olması nedeniyle sistematik adı arildialkilfosfatazdır. A esteraz grubunda yer alan paraoksonaz enzimi, aktivitesinin ölçümünde ilk olarak paraokson substratı kullanıldığı için paraoksonaz adını almıştır [9].



Şekil 1.1 Paraoksanın kimyasal yapısı (O,O-dietil-O-p-nitrofenil fosfat)

Paraoksonaz enzimi geniş bir substrat özgüllüğü gösterirken, fizyolojik substratı tam olarak belirlenmemiştir. Ancak arilesteraz, organofosfataz ve laktonaz aktivitelerine sahip olduğu tespit edilmiştir. İnsan serum paraoksonaz enzimi,

parationun metabolik ürünü olan paraoksanı kataliz etme yeteneğindedir. Paraoksan organizmaya zararlı olup pestisit olarak kullanılmaktadır. Paraoksanın, paraoksonaz enzimi ile yıkımı sonucu paraoksana oranla göreceli olarak daha az zararlı p-nitro fenol ve dietil hidroksi fosfat bileşikleri oluşur (Şekil 1.2) [1].



Şekil 1.2 Paraoksonaz Enzim Mekanizması [1]

1.3. Paraoksonaz Gen Ailesi

Paraoksonaz gen ailesi, insanlarda kromozom 7'nin uzun kolunda q21.3 ve q22.1 arasında bulunmaktadır [4,10]. İlk olarak memelilerde tanımlanan PON ve PON ile ilişkili genler sonraları kümes hayvanları, zebra balığı ve omurgasızlardan *Caenorhabditis elegans*'ta bulunmuştur [11].

Paraoksonaz gen ailesi; PON1, PON2 ve PON3 olmak üzere bilinen üç üyeye sahiptir. Bu genler büyük yapısal benzerlikler göstermektedir ve ortak evrimsel öncüden gen dublikasyonlarının meydana gelmesiyle oluşur. Memeli türleri içerisinde PON1, PON2 ve PON3 aminoasit düzeyinde % 60, nükleotid düzeyinde % 70 benzerlik gösterir. Bununla birlikte memeli türleri arasında bu üç genin her biri aminoasit düzeyinde % 79-90, nükleotid düzeyinde % 81-91 benzerlik göstermektedir. PON1, PON2 ve PON3 ile karşılaştırıldığında 4. ekzonda kodlanan 105 aminoasit içinde üç nükleotid rezidüsüyle ayrılır [4, 12].

PON2 ve PON3, PON1 kadar aydınlatılamamıştır [4, 13]. PON2 diğer üyelerden farklı olarak plazmada bulunmamaktadır. Ancak beyin, karaciğer, böbrek ve testis gibi pek çok dokuda sentezlenmektedir. PON3, tavşan HDL'si üzerinde lokalize olan laktonaz aktivitesi ile tanımlanabilmiştir [4, 14]. PON3 enzimi de PON1'e benzer şekilde büyük çoğunlukta karaciğerden sentezlenir ve serumda HDL'ye bağlı olarak bulunur. Ayrıca PON3 daha düşük seviyelerde böbrekte sentezlenmektedir. PON3 geninin mRNA'sı ve proteinine insanlardan farklı olarak sıçanların makrofajlarında rastlanmıştır [13, 14].

1.3.1. PON1 Biyokimyasal Yapısı

PON1, 43-45 kDa molekül ağırlığına sahip 354 aminoasit içeren bir proteindir [12, 15]. Her molekül total ağırlığın %15.8'ini oluşturan üç karbonhidrat zinciri içermektedir. İzoelektrik noktası 5.1'dir. Aminoasit bileşimi yüksek lösin içeriği dışında bir özellik göstermez [16]. Yapısında yer alan 3 sistein (Cys) rezidüsünden 284'teki serbest iken 42 ve 352. sistein rezidüleri arasında disülfid bağı bulunur. *In situ* hibridizasyon çalışmaları ile PON1 geninin 7. kromozomun uzun kolu üzerinde q21-q22' de bulunduğu gösterilmiştir [1, 7].

PON1'in ince yapısı 4 adet zincirden oluşmuş 6 adet β -kırmalı yapıdan meydana gelmiştir (Şekil 1.3). Enzim 42. ve 353. sistein rezidüleri arasındaki disülfid köprüsü ile sonlanarak üç boyutlu yapısını kazanır [17]. N terminal ve C terminal uçlarının bu şekilde kovalent bağlanması β -kırmalı yapıli enzimlerde nadir görülür.

Üç boyutlu yapıda; β -kırmalı tabakaların merkezinde 7.4Å aralıklı iki adet Ca^{+2} iyonu bulunmaktadır. Bunlardan bir tanesi yapısal özellikli olup yapıdan

uzaklaştırılması dönüşümsüz denatürasyona neden olmaktadır [18]. Diğeri ise katalitik etkinlikte rol oynar. Bu kalsiyum iyonu 2.2-2.5Å uzaklıkta 5 adet aminoasit rezidüsü (Asn224, Asn270, Asn168, Asp269 ve Glu53) ile etkileşim halindedir. Aynı kalsiyum iyonu bir su molekülü ve fosfat iyonunun oksijeni ile etkileşmektedir. PON1'in yapısı 6 adet β -kırmalı tabaka ile merkezdeki Ca^{+2} iyonları açısından diisopropilfluorofosfataz (DFPase) enzimi ile benzerlik göstermektedir [19]. Ancak, PON1 esteraz, fosfotriesteraz ve laktonaz aktivitesi gösterirken, DFPase sadece fosfotriesterase aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. Bu iki enzimin aminoasit dizilerinde belirgin bir benzerlik yoktur [20]. PON1 aktif bölgesinde diğer β -kırmalı yapılardan farklı olarak hidrofobik heliks (H₂ ve H₃) yapıları vardır (Şekil 1.3). Bu yapılar aynı zamanda sonlanma noktaları olup, aktif bölgenin korunması ve enzimin HDL'ye bağlanması gibi kritik rollere sahiptir. PON1 sentezlendiğinde monomerik yapı şeklindedir. Enzim, HDL'ye bağlanmadığı zaman oligomerizasyon gerçekleştiği belirlenmiştir. Bu olay *in vitro* deterjanlı ortamda H₂ ve H₃ heliksleri ile deterjan misellerine bağlanarak gerçekleşir [21].

Şekil 1.3 PON1'in üç boyutlu yapısı [14]

PON1 üzerinde 4 tane potansiyel N-glikozillenme bölgesi vardır. İki tanesi (Asn 227 ve Asn 270) β -kırmalı tabakaların merkezinde, diğer ikisi ise yüzeye bakan bölgede (Asn 253 ve Asn 324) yer almaktadır. PON1 memeli hücrelerinde ekspres edildikten sonra bu noktalardan glikozillendiği gözlenmiştir [22]. PON ailesinin hidrolitik aktivitesi için, glikolizasyonun aktiviteyi önemli ölçüde etkilemediği saptanmıştır [23, 24]. Ancak enzimin yapısında bulunan bu karbohidrat molekülleri spesifik olmayan hücre membranlarına bağlanmada veya kararlılığı ve çözünürlüğü arttırmada etkili olabileceği açıktır [25, 26].

1.3.2. PON1'in HDL'ye Bağlanması

HDL yaklaşık 10nm çapında kompleks bir yapıdır. Bileşiminde öncelikle membran bileşenleri (fosfolipidler, kolesterol ve kolesterol esterleri), apolipoprotein A1 ve aromatik heliksler yer alır [27]. HDL'ye bağlı olan enzimlerden ilk kez üç boyutlu yapısı aydınlatılan PON1 enzimidir. PON1 hidrofobik N terminal ucuyla sonlanır, H₂ ve H₁ hidrofobik heliksler bir araya gelerek potansiyel membrana bağlanma yüzeyi oluştururlar (şekil 1.4). Heliks yapılar lizin, triptofan ve tirozin yan zincirleri ile oluşturdukları yapı karakteristiği ile HDL ara yüzeyine girebilmektedir [26].

Şekil 1.4 PON1'in HDL'ye bağlanması [14]

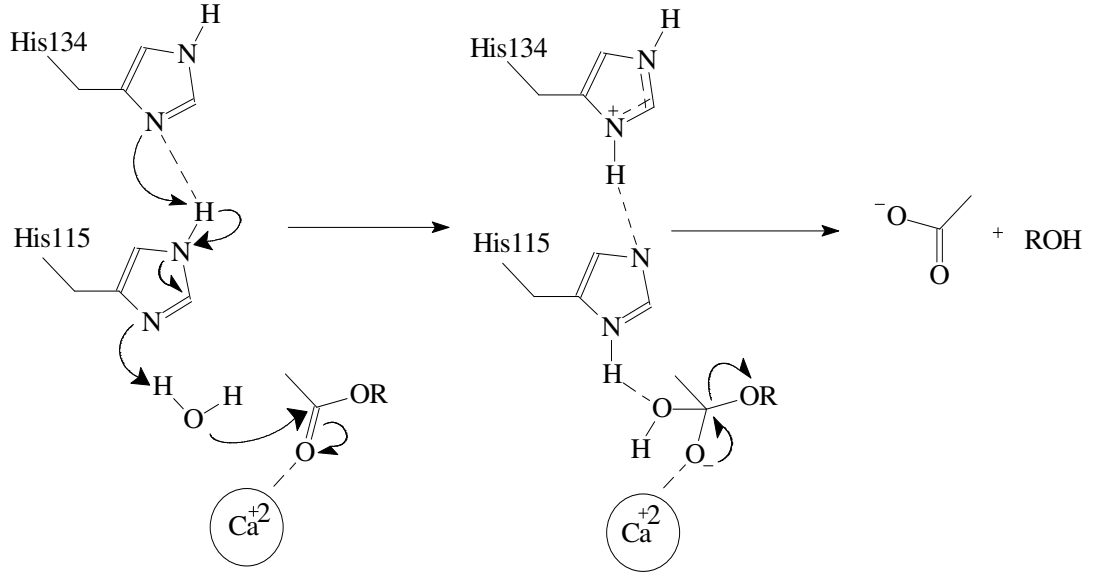
1.3.3. PON1 Sentezlenmesi ve Salgılanması

PON1 sentezi karaciğerde gerçekleştiğinden, serumdaki PON1 seviyesini belirleyen başlıca faktör karaciğer fonksiyonlarıdır. Serumdaki PON1 seviyesi ve aktivitesi bireyler arasında çok değişkendir [28]. Bunun nedeni enzim aktivitesini ve peptit konsantrasyonunu etkileyen PON1 geninin kodlanma ve promotor bölgesinde çok sayıda polimorfizm göstermesidir. PON1'in serumdaki aktivitesini ve konsantrasyonunu belirleyen promotor aktivitesi üzerinde en önemli polimorfizm -107 pozisyonundadır [29, 30]. PON1 sentezinde önemli olan bir diğer faktör karaciğer hücrelerindeki kolesterol dengesidir. Ayrıca PON1'in karaciğerden sentezini herhangi bir hastalık durumu da etkilemektedir [31-33].

PON1 karaciğerden sentezlendikten sonra serumda HDL'ye veya karaciğerde mikrozomlara bağlanabilmesi için sentez sırasında N-terminal hidrofobik bölgesi olması gerekmektedir. N-terminal hidrofobik bölgesi bağlanmada belirleyici olduğu kadar salgılanma prosedüründe de önemli role sahiptir [34, 35]. Yapılan çalışmalarda hamster ovaryum hücresi ve insan hepatosit hücresine transfekte edilen PON1'in, sentezlendikten sonra hücre zarının dış yüzeyine bağlandığı gösterilmiştir [36]. PON1'in karaciğerde sentezlendikten sonra da önce mikrozomlara, daha sonra hücrenin dış yüzeyine bağlandığı düşünülmektedir [37, 38]. Hücre zarının dış yüzeyinden salınması ve HDL'ye bağlanması tesadüf değildir. Bu bağlanmada fosfolipit kompleksi önemli rol oynamaktadır. PON1'in hücreden salınması ve HDL'ye bağlanması için HDL'deki fosfolipit içeriği yeterli değildir [26, 36, 37].

1.4. Enzimin Katalitik Mekanizması

Enzimin aktif bölgesinde bulunan His-His çifti, kalsiyum iyonu ve su molekülü, esteraz aktivitesinde önemli rollere sahiptir (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. Paraoksonazın katalitik mekanizması [39]

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

PON1'in mekanizmasını açıklamak amacıyla, esteraz aktivitesi için 2-naftilasetat ve fosfotriesteraz aktivitesi için ise paraoksan substratları kullanılmıştır.

Bu substratların optimum pH aralıkları saptanmış ve substratın yapısında bulunan yan zincirin katalizlenmeye direkt katılmadığı sonucu bulunmuştur [39].

1.5 Katalizlediği Reaksiyonlar ve Substratları

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

Son yıllarda PON1'in arterosklerozisin önlenmesinde ve ilaç metabolizmasında önemli rol oynadığı bilinmektedir [40, 41, 42]. PON1 özellikle LDL ve HDL lipitlerinin yükseltgenmesini önleyerek ve lipit peroksidlerini metabolize ederek arterosklerozise karşı koruyuculuğunu sahip olduğu laktonaz aktivitesi ile göstermektedir [43-45]. Söz konusu enzim 4 atomdan 7 atoma kadar değişen lakton halkası ihtiva eden en az 30 çeşit laktonu hidrolizleyebilmektedir. Alifatik lakton substratı olan δ -valerolakton (6 halkalı lakton), δ -butirolakton (5 halkalı lakton) ve ϵ -kaprolaktondan (7 halkalı lakton) daha hızlı hidrolizlenmektedir. PON1 enziminin aromatik laktonlar afinitesi alifatik laktonlara oranla daha fazladır ve daha kolay hidrolizlenirler. Ancak ilgi çekicidir ki, pek çok ilacın etken maddesinde bulunan kumarin bileşiğinin lakton halkasında α ve δ çift bağı olmasına rağmen PON1 tarafından hidrolizlenememektedir, fakat dihidrokumarin hidrolizlenmektedir [46-49] (Şekil 1.6).

$n=1$ β -Propiolakton $n=2$ γ -Butirolakton
 $n=3$ δ -Valerolakton $n=4$ ϵ -Kaproalakton

Şekil 1.6 Lakton hidrolizi [40]

Önceleri PON1'in yapısının ve substratlarla olan ilişkisinin belirlenmesinde yapı-aktivite analizi üzerine çalışmalar yapılmıştır. Bu konuda ilk olarak, Augustinson ve Ekedahl aromatik halkalı veya çift bağlı aromatik esterlerin PON1 tarafından hidrolizlendiklerini bulmuştur. Bu reaksiyonda PON1'in substrat olarak kullanacağı esterlerin karbon-karbon çift bağının birbirine çok yakın olması gerektiği tespit edilmiştir [50]. Ayrıca, yapılan bir başka çalışmada, vinil asetat ve Δ^2 -siklopentil asetatın PON1 tarafından hidrolizlenmesi fakat etil asetat ve siklopentan asetatın PON1 tarafından hidrolizlenememesi bu öneriyi desteklemektedir [43]. Lakton halkasının oluşturduğu uzaysal yapı, bu yapıyı içeren bazı substratların enzimin aktif merkezine girmesini sağlayarak etkileşmelerine ve hidrolizlenmelerine izin verir. Bu etkileşim benzer şekildeki içte bulunan ester formları için mümkün değildir. Örneğin etil asetat PON1 ile hidrolizlenmezken, aynı sayıda atom ve ester yapısı gösteren bütirolakton iyi hidrolizlenmektedir [40, 43].

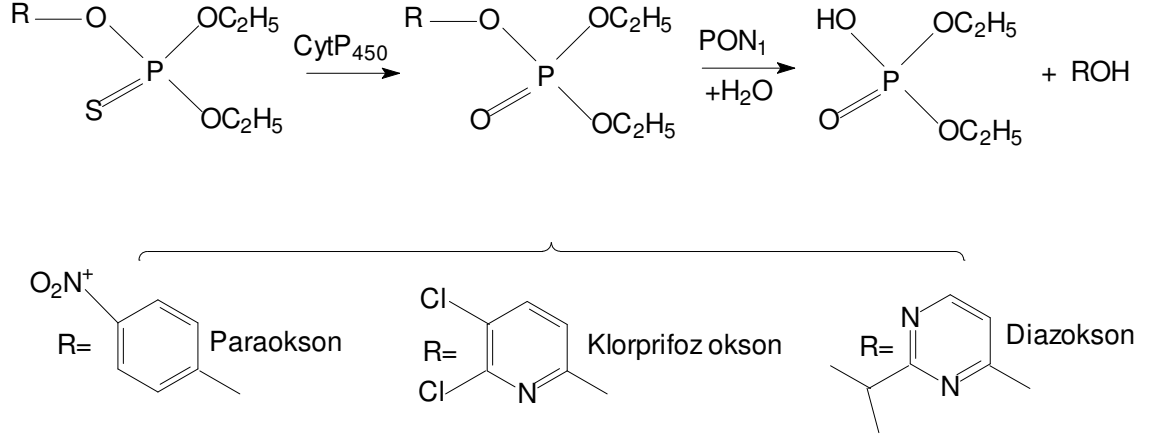
PON1 enziminin laktonaz aktivitesi için 284. rezidüde bulunan serbest sistein aminoasiti oldukça önemlidir. Bu serbest sistein rezidüsünün, söz konusu enzimin LDL'nin okside olmasını önlemesinde de rol alması; PON1'in sahip olduğu laktonaz aktivitesi aracılığıyla LDL ve HDL fosfolipitlerinin yükseltgenmeye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

düşünülmektedir [51, 52]. Sorenson ve arkadaşları 284. pozisyonda bulunan serbest sistein rezidüsünün arilesteraz ve paraoksonaz aktivitesinde gerekli olmadığını göstermişlerdir [53]. Ancak aktif merkezdeki histidin rezidülerinin paraoksonaz ve arilesteraz hidrolitik aktivitelerini göstermesinde çok gerekli olduğu gösterilmiştir. [54].

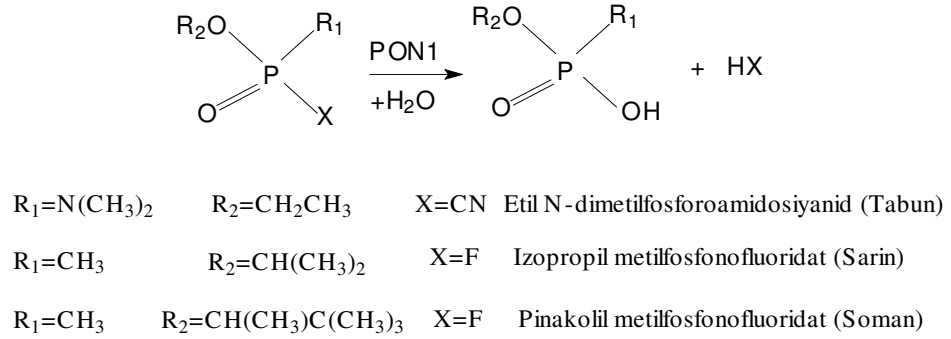
PON1 bazı lakton ve karbonat esterlerini içeren ilaçları ve ilaç ön maddelerini de hidrolizleyebilmektedir. Örneğin, diüretik bir ilaç olan spironolakton ve 3-hidroksimetilglutaril-CoA redüktaz inhibitörleri olan mevastatin, lovastatin ve simvastatin bu enzim tarafından hidrolizlenir. Önceleri yapılan çalışmalarda bu hidroksimetil glutaril-CoA redüktaz inhibitörlerinin hidrolizlenmesi söz konusu enzimin statinaz aktivitesi olarak tanımlanmıştır [55, 56]. Ayrıca PON1 *glukokortikoid* δ -laktonların [57] sistemik metabolize edilmesinde ve ön ilaç maddesi olan karbonat ester yapısındaki prulifloksasinin aktivasyonunda [58] rol oynamaktadır. Bunun gibi PON1'in laktonaz aktivitesinden başlıca yönetici ajanların metabolize edilmesinde ve bunların istenmeyen yan etkilerinin azaltılmasında yararlanılmaktadır [57]. Laktonların isosterik formları olan laktamlar oksijen halkası yerine azot halkası ihtiva ederler. Laktamlar PON1'in substratını oluşturmazlarken enzimi inhibe ederler. *In vitro* çalışmalarda δ -valerolaktam, ϵ -kaprolaktam ve 2-hidroksikinolin gibi laktamlar PON1 enziminin güçlü inhibitörleridir [43].

İnsan serum PON1 enzimi ayrıca paration, diazinon ve klorpirifos gibi çok sayıda insektisit toksik okson metabolitlerini (Şekil 1.7) [59, 60] ve soman, sarin ve tabun gibi organofosfat sinir ajanlarını hidrolizleyebilmektedir [61-64]. İnsan sağlığı açısından organofosfatlı bileşikler ise terörizm tehdidi kadar bir çevresel risk

oluşturur [39]. PON1 enziminin çok yönlü bir araştırma konusu olmasının en önemli nedenlerinden biri budur.

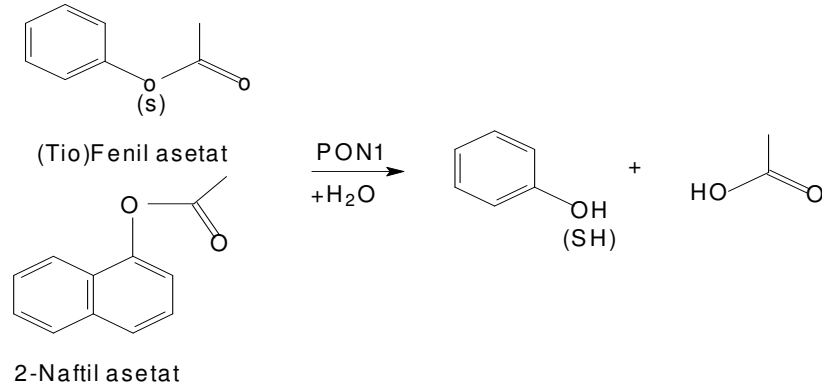


Şekil 1.7 İsektisitlerde yaygın olarak kullanılan okson metabolitlerinin hidrolizi [40]



Şekil 1.8 Sinir gazlarının hidrolizi [40]

Bu aktivitelerinin yanında PON1 enzimi sınıflandırılmada yer aldığı A-esteraz grubunda bulunması ile fenilasetat gibi ester substratlarını da hidrolizleyebilmektedir. Ayrıca, tiofenil asetat ve 2-naftil asetat PON1'in aromatik ester substratları arasındadır (Şekil 1.9) [65, 53, 59].



Şekil 1.9 Aromatik esterlerin hidrolizi [40]

1.6. PON1 Polimorfizmleri

Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda, bir kısmı PON1 geninin kodlanma bölgesinde, diğerleri intronlarda ve genin düzenleyici yani promoter bölgesinde olmak üzere 160'dan fazla polimorfizm tespit edilmiştir [66]. PON1 enzim aktivitesindeki polimorfizm substrat bağımlıdır ve farklı etnik kökenli populasyonlara göre değişkenlik gösterir [1]. İlk olarak 1973'de Von Mallinckrodt ve arkadaşları tarafından enzimin genetik polimorfizm gösterdiği ve enzim aktivitelerinin trimodal dağılıma sahip olduğu gösterilmiştir [67]. Daha sonra 1976'da Playfer ve arkadaşları PON1'in insanlar arasında düşük, orta ve yüksek aktiviteye sahip polimorfik dağılım gösterdiğini daha detaylı bulgularla açıklamıştır [68].

Paraoksonaz aktivite polimorfizminin moleküler temeli, PON1'in kodlanma bölgesindeki kendiliğinden olan mutasyonlar sonucu iki aminoasitin yer değiştirmesi ile ilişkilidir. Bu mutasyonlarda birincisi kodlanma bölgesindeki 192. kodonda glutaminden (Q) arjinine (R) olan değişimdir (şekil 1.10) [69]. Kodlanma

PON1'in kodlanma bölgesindeki PON1 M/L55 ve Q/R192 polimorfizmlerinden başka promoter bölgesinde de en az beş polimorfizm belirlenmiştir. Bu polimorfizmler -107/-108 (C/T), -126 (C/G), -160/-162 (A/G), -824/-832 (A/G) ve -907/-909 (C/G) bölgelerde bulunmaktadır [73, 74]. PON1 genindeki promoter polimorfizmlerinin, gen ekspresyonu ve enzimlerin serum düzeyleri üzerinde güçlü etkisinin olduğu bulunmuştur [12, 29]. Ayrıca promoter polimorfizmleri PON1 geninin 3' okunmayan bölgesi içerisinde de ortaya çıkarılmıştır, fakat bunların önemi henüz bilinmemektedir [73].

Paraoksonaz polimorfik dağılımı büyük interetnik değişim göstermektedir. Türk popülasyonunda RR allel oldukça düşük bir oranda bulunmuştur. Trimodal dağılım için QQ, QR ve RR allellerinin frekansı sırasıyla % 48.6, % 41.0 ve % 10.4 olarak tespit edilmiştir [71]. Düşük aktivite gösteren Q allel Avrupa, Kanada ve Amerika'da yüksek, Avustralya, Aborijin ve Zambiya'da düşüktür [1].

PON1'in kodlanma bölgesindeki diğer bir polimorfizm 102. kodonda izolösinden valine olan değişimdir. PON1'in promoter bölgesinde 5 tane polimorfizm tespit edilmiştir. Bunlardan plazma PON1 seviyesini etkileyen en önemli olanı C108T polimorfizmidir [75].

PON1 enziminin aktivitesi polimorfizme bağlı olarak oldukça değişim göstermektedir. Söz konusu enzimin organizmada fizyolojik fonksiyonu tam olarak açıklanamamasına rağmen, klinik yayınlarda PON1 enzim aktivitesi ile çeşitli hastalıklar arasında ilişkinin belirlenmesine yönelik pek çok çalışmaya rastlanmıştır. Ayrıca yapılan çalışmalarda özellikle incelenen hastalıklar ile PON1 polimorfizmi arasında bir bağlantı olup olmadığı araştırılmıştır. Öncelikle yapılan pek çok çalışmada kalp damar hastalıkları ile PON1 R/Q192 polimorfizmi arasında önemli

bir ilişki olduğu gösterilmiştir [76]. Ancak başka çalışmada PON1'in Arjinin 192 polimorfizmi ile kalp damar hastalık riski ile ilişkili olmadığı gösterilmiştir [77]. Benzer şekilde PON1'in M/L55 polimorfizmi ile kalp damar hastalıkları oluşma riski arasında bir grup çalışmada bağlantı var iken [77], diğer bir çalışma grubunda herhangi bir ilişki olmadığı gösterilmiştir [78]. Sonuç olarak, PON1 192. ve 55. polimorfizm genotipleri direkt enzim aktivitesini etkilemektedir. PON1 aktivitesi de geleneksel risk faktörleri dışında, kalp damar hastalıkları oluşma tehlikesini bize önceden haber vermektedir.

Yapılan bir çalışmada, Japon toplumunda tip 2 şeker hastalarında PON1 enziminin Q192R polimorfizmi ile hastalık arasında önemli bir bağlantı olmadığı tespit edilmiştir [79]. Paraoksonaz enziminin 192. kodonda Q alleli bulunduran kişilerde Parkinson hastalığı olma riskinin istatistiksel olarak ($p < 0.005$) yüksek olduğu tespit edilmiştir [80]. Alzheimer hastalarında yapılan bir çalışmada, PON1 geninin 192. polimorfizmi R allel görülme sıklığı kontrol grubuna göre oldukça düşük bulunmuştur [81].

1.7. Enzimin Saflaştırılması

Paraoksonaz enzimi karaciğerde, endoplazmik retikulum membranlarının parçacıklarının uçları kapanarak oluşan mikrozomlarda, serumda HDL'ye bağlı olarak bulunmaktadır [82]. Saflaştırma prosedürlerinde öncelikle söz konusu enzimin bağlı olarak bulunduğu yapılardan uzaklaştırılması gerekmektedir.

İlk olarak A-esterazları (diizopropil fosforidat hidrolaz) Mazur tarafından tavşan böbreğinden yaklaşık 13 kat [83] ve daha sonra Mounter tarafından 65-100 kat saflaştırılmıştır [84]. Ancak paraoksonaz ismi ile ilk saflştırma koyun

serumundan 330-385 kat etanol, pH ve iyonik çöktürme yöntemleri kullanılarak Main tarafından başarılmıştır [85]. Daha sonra Furlong ve arkadaşları tarafından insan ve tavşandan söz konusu enzim saflaştırılmış ve cDNA'sı karakterize edilmiştir [86].

Paraoksonaz enziminin saflaştırılması için, ulaşılmak istenen saflık derecesine ve enzimin serumda veya karaciğerde bulunuş durumuna göre değişen çok çeşitli metotlar tanımlanmıştır. Bu metotlardan sıklıkla uygulananları hidroksiapatit adsorbsiyonu, DEAE-Sepharose CL-6B iyon değiştirme kromatografisi, Cibacron Blue 3GA spesifik olmayan afinite kromatografisi, amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE anyon değiştirme kromatografisi, Concanavalin A-Sepharose afinite kromatografisi, mono Q HR 5/5 anyon değiştirme kromatografisi ve DEAE biojel kromatografisidir. Uygulanan metotların sırası enzim kaynağının serum veya karaciğer olmasına bağlı olarak değişebilir. Bazı durumlarda bir ya da diğer saflaştırma basamağı tekrar kullanılabilir. Örneğin; Gan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada insan serum paraoksonaz Q ve R izoenzimlerinin saflaştırma prosedürü için iki DEAE anyon değiştirme kromatografisi kullanılmıştır [16]. Furlong tavşan ve insan serumundan paraoksonaz enzimini Cibacron Blue 3GA-Agaroz, Sephadex G-75, DEAE Trisacril M ve tekrar Sephadex G-75 jel filtrasyon kromatografi yöntemlerini kullanarak saflaştırmıştır [87].

Paraoksonaz enzimi, karaciğerde mikrozomlara, serumda da HDL'ye bağlı olduğu için homojen bir saflık elde etmek oldukça zordur [88]. Söz konusu enzimin saflaştırılması sırasında bağlı olduğu yapılardan uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu amaçla, karaciğerde enzimi mikrozomlardan ayırmak için TritonX-100 kullanılırken [89] serumda HDL'den uzaklaştırılması için deterjan veya yüksek tuz konsantrasyonu kullanılması gerekmektedir [87].

1.8. Ağır Metaller ve Çevre Üzerine Etkileri

Çevre insanla birlikte tüm canlı varlıklar, cansız varlıklar ve canlı varlıkların eylemlerini etkileyen ya da etkileyebilecek fiziksel, kimyasal, biyolojik ve toplumsal nitelikteki tüm etkenlerdir [90]. Ancak bu etkenlerin insanların nüfus artışı, teknolojik gelişmeler ve tüketim alışkanlıklarına bağlı olarak zarar görmesi ve bu zararın rahatsız edici seviyelere ulaşması sonucu kirlenmesi söz konusudur. Böylece çevre kirliliği ortaya çıkmaktadır. Çevre kirliliği geçici veya sürekli bir biçimde canlılara zarar veren gaz, sıvı ve katı maddeler ile radyasyonun; cisim, sistem ve çevrede meydana getirdiği olumsuz değişimlerdir. Bir başka deyişle hava, su ve toprağın fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerinde meydana gelen arzu edilmeyen değişimlerdir [91]. Çevre kirliliğine neden olan ve gittikçe daha büyük boyutlarda tehlike oluşturan etmenlerin başında ağır metaller gelmektedir. Ağır metallerin (Ag, As, Cd, Cu, Fe, Ni, Pb, Zn, Mo, Co, Cr, gibi) toprak kirlenmesi ve çevreye yaptığı zararlar çok önemli güncel sorunlar haline gelmiştir. Hızlı şehirleşme, endüstrileşme, gübreleme ve pestisit kullanımı, toprak ve su kaynaklarında toksik metal kirliliği ile sonuçlanmaktadır. Toksik metallerin birikimindeki artma, ekosistemde dengesizliğe neden olmakta, toksik metallerin yüksek miktarlarda çoğu habitatın canlı gelişimi boyunca birikmektedir. Bu durum biyolojik büyüme sürecinde besin zinciri boyunca transfer edilmekte ve biriktirilmektedir. Ayrıca bu metallerin besin zincirindeki yüksek konsantrasyonu yaşayan insan ve hayvan sağlığını çeşitli şekillerde tehdit etmesiyle sonuçlanmaktadır. Esansiyel olsun veya olmasın ağır metallerin yüksek konsantrasyonları mikroorganizmalar, bitkiler, hayvanlar ve insanları içeren canlılar alemi için toksik etkisi bilinen bir gerçektir [91, 92]. Önemli bir kirletici grubu oluşturdukları bilinen ağır metallerin; toksik ve kanserojen etkileri olduğu gibi, canlı organizmalarda birikmesi de söz konusudur. Krom, cıva, kurşun, kadmiyum, mangan, kobalt, nikel, bakır ve çinko gibi metaller

doğada genellikle sülfür, oksit, karbonat ve silikat mineralleri şeklinde bulunmaktadır. Bunların suda çözünürlükleri oldukça düşüktür. Çok küçük miktarlarda bile genellikle kuvvetli zehir etkisine sahip olan ağır metaller, kirlenmiş sularda metal, katyon, tuz ve kısmen anyon şeklinde bulunurlar [93]. Ağır metaller biyolojik döngü içinde en önemli zararlarını bitkilerde meydana getirmektedir. Tohum çimlenmesi, çıkış, fide büyüme ve gelişimi, bitkilerde büyüme ve gelişmede gerilikler, biyomas üretiminin düşmesi, çiçek ve meyve tutumunda azalma, verimde düşme ve ürün kalitesinde bozulma bu zararlardan bazılarıdır. Bundan başka ağır metallerin fotosentetik aktiviteyi sekteye uğratması, azot döngüsü ve bağlanmasını bozması, klorofil miktarını azaltması, enzim sistemlerinde bozulmalara yol açması; bitkilere yarayışlı diğer elementlerin alımını engellemesi gibi hücre içi mekanizmalarda da olumsuz etkileri bulunmaktadır [94].

Genelde ağır metallerin çevre açısından yarattığı sorunlar; insan, hayvan ve bitki sağlığı ile su ekosistemleri üzerindeki etkileri açısından önemli olmaktadır.

Nikel (Ni); Genelde doğrudan veya dolaylı yoldan atık sular yoluyla toprağa geçen nikel, normal olarak toprakta 50-500 ppm düzeyindedir. Nikel katkılı çelik ve ulaşım endüstrisinde boya ve kozmetik sanayi ile çeşitli elektrikli alet üretiminde kullanılan nikelin bitkilere faydası üzerine kesin bilgiler yoktur. Ancak bitkilerdeki birikme konsantrasyonu genellikle insan ve hayvanlara zararlı düzeye ulaşamaz. Nikel 600 ppm'in üzerinde konsantrasyonlara sahip topraklar içinde kuvvetli toksit etki yapar [95].

Kadmiyum (Cd); Plastik endüstrisinde yaygın olarak kullanılan kadmiyum elementi bunun dışında boya sanayisinde, motor yağlarında ve taşıt lastiklerinde bulunur. Bu nedenle toprakta kadmiyum birikimi bu endüstrinin atık sularında, hurda plastiklerin

öp olarak depolandığı alanlarda ve özellikle yoğun trafik akımının bulunduğu otoyollarda yüksek düzeyde bulunabilir. Kadmiyum doğal evre içinde çinko ile jeokimyasal bir ilişki içinde olduğundan aynı zamanda çinko ergitme tesisleri çevresindeki topraklarda yüksek kadmiyum konsantrasyonunun ‘itai itai’ adı verilen bir tür hastalığın yaygın olarak görüldüğü ve Minimata olayı adı verilen olay Kadmiyum kirlenmesine en çarpıcı örnektir. Fosforlu gübrelere bileşiminde eser element olarak bulunan kadmiyum bu nedenle tarım topraklarında yaygındır ve yüksek konsantrasyonlarda bulunabilir. Nitekim uzun yıllar süper fosfat gübresi uygulanmış topraklarda yetişen bazı ayır bitkilerinin bünyesinde yüksek oranda kadmiyum elementine rastlanmıştır [95].

Kobalt (Co); İnsan ve hayvanlar için olduğu kadar bazı bitki mikroorganizmaları için önemli element olan kobalt (10- 20 ppm) 150 ppm’i aşarsa o zaman toprakta kuvvetli bir toksik etki yaratabilir. Toprağa kobalt çeşitli yollardan ve özellikle atık sular ve arıtma suyunda mevcut süspansiyon maddeleriyle girer. Toprağın tampon etkisinden ötürü biriken kobaltın üstünde yetişen bitkinin bünyesine geçmek suretiyle fitotoksik etki yaptığı saptanmıştır [95].

Bakır (Cu); Bitkiler için gerekli bir eser element olan bakır özellikle asit karakterli topraklarda yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Endüstride çok yaygın olarak kullanılan bu madde toprağa havadan yağışla karışmak suretiyle geçer. Fakat bakırın toprakta ve bitkide asıl birikmesi bakır sülfat olarak bazı meyve bahçelerinde pestisit olarak kullanılmasıyla geçer. Halk dilinde ‘göz taşı’ olarak bilinen bakır sülfat gerek kuru toz halinde ve daha yaygın olarak suda erimiş halde bağlara ve narenciye bahçelerine spreyleme yoluyla püskürtülür. Daha sonra bu madde gerek püskürtülme anında doğrudan gerekse daha sonra yağmur sularıyla yıkanmak suretiyle toprağa geçer. Bakır sülfat topraktaki yararlı mikroorganizmalar içinde toksik etki

yaptığından topraktaki humus oluşumunu kısıtlayarak toprağın organik bakımdan fakirleşmesine neden olabilir [95].

Civa (Hg); Civa metalinin keşfi tam olarak bilinmemektedir. Bilinen en önemli minerali zencefre (HgS) dir. Civa çok uçucu bir element olduğundan oda sıcaklığında kolayca buharlaşır. Zehirli bir element olduğu için sıcaklık arttıkça buharlaşma hızı artacağı için tehlike boyutu da artar. Herhangi bir yüzeye civa döküldüğü zaman üzerine toz kükürt dökülmelidir ve oluşan karışım temizlenirken dikkat edilmelidir. HgS mineralinin kavrulmasıyla ile HgO elde edilir. Bu oksit bileşiğinin ısıtılması ile de elementel civa elde edilir [96].

Manganez (Mn); Manganez, yeryüzünde her yerde bulunabilen çok yaygın bir bileşendir. Manganez, gerekli toksik üç iz element arasında yer almaz. İnsan vücudunda çok yüksek konsantrasyonlarda bulunursa toksiktir. İnsanlar tavsiye edilen günlük alım miktarları kadar almazlarsa sağlıkları bozular. Fakat aynı zamanda yüksek alımlarda, sağlık problemleri oluşacaktır [96].

İnsanlar tarafından manganezin yüksek alımları, ıspanak, çay ve baharatlar gibi gıdalardan kaynaklanmaktadır. En yüksek konsantrasyonlarda manganez içeren gıdalar tahıllar, pirinç, soya fasulyesi, yumurta, fındık, zeytinyağı, yeşil fasulye ve ıstiridyedir. Manganezin insan vücudundaki absorpsiyonundan sonra kan yolu ile karaciğer, böbrek, pankreas ve endokrin bezlerine taşınır. Manganez etkileri başlıca solunum sisteminde ve beyinde gözlenir. Manganez zehirlenmesinin belirtileri halüsinasyonlar, unutkanlık ve sinir hasarlarıdır. Manganez ayrıca Parkinson, akciğer ambolisi ve bronşite neden olabilir. Eğer bir erkek manganeze uzun süreler boyunca maruz kalırsa iktidarsızlık oluşabilir. Manganez tarafından neden olunan sendrom şizofrenilik, matite, kasların zayıflığı, baş ağrısı ve uykusuzluk gibi belirtilere sahiptir [96].

Manganez insan sağlığı için gerekli bir element olduğundan, manganez yokluğu da sağlık sorunlarına neden olabilir. Bu etkiler aşağıdadır:

- Őiřmanlık
- Glikoz intoleransı
- Kan pıhtılaşması
- Deri problemleri
- Düşük kolesterol sevipleri
- İskelet bozukları
- Doğum hataları
- Sa renginde değişiklikler
- Nörolojik semptomlar

Kronik manganez zehirlenmesi uzun süreli toz ve dumanın solunmasından kaynaklanır. Hastalıktan hasar gören başlıca bölge merkezi sinir sistemidir ve kalıcı sakatlık ile sonuçlanabilir. Belirtiler bitkinlik, uykusuzluk, güçsüzlük, duygusal bozukluk, spastik yürüyüş, tekrarlı bacak krampları ve felçtir. Manganez bileşikleri tozu veya dumanıyla çalışan işçilerde zatürree ve diğer üst solunum yolu enfeksiyonları sıklıkla gözlenmiştir. Manganez bileşikleri deneysel belirsiz tümörjenik ajanlardır [96].

1.9. Pestisitlerin İnsan Ve Çevre Üzerine Etkileri

Pestisit deyimi, insektisit (böcek öldürücü), herbisit (yabani ot öldürücü), fungusit (küf öldürücü), rodentisit (kemirgen öldürücü) vb. şeklinde sınıflandırılan kimyasal maddelerin tümünü kapsamaktadır. Pestisitler, etkili maddelerinin kökenlerine göre de gruplara ayrılabilir:

1. İnorganik maddeler
2. Doğal organik maddeler
 - a) Bitkisel maddeler
 - b) Petrol yağları vb.
3. Sentetik organik maddeler
 - a) Klorlu hidrokarbonlar
 - b) Organik fosforular
 - c) Diğer sentetik organik maddeler (azotlu bileşikler, piretroidler)

Pestisitlerin kullanımı çok eski tarihlere dayanmaktadır. M.Ö. 1500'lere ait bir papirüs üzerinde bit, pire ve eşek arılarına karşı insektisitlerin hazırlanışına dair kayıtlar bulunmuştur. 19.yy'da zararlılara karşı inorganik pestisitler kullanılmış, 1940'lardan sonra pestisit üretiminde organik kimyadan faydalanılmış, DDT ve diğer iyi bilinen insektisit ve herbisitler keşfedilmiştir. Bugüne kadar 6000 kadar sentetik bileşik patent almasına karşın, bunlardan 600 kadarı ticari kullanım olanağı bulmuştur. Ülkemizde tarımı yapılan kültür bitkileri, sayıları 200'ü aşan hastalık ve zararlıların tehdidi altında olup yeterli savaşım yapılmadığı için toplam ürünün yaklaşık 1/3'i kayba uğramaktadır. Bu kayıpların önlenmesi bakımından pestisitlerin daha uzun yıllar büyük bir kullanım potansiyeline sahip olacağı kuşkusuzdur. Formülasyon olarak 30 000 ton civarında olan pestisit kullanımımızda en yoğun kullanılan gruplar sırasıyla herbisitler, insektisitler, fungusitler ve yağlardır.

Bununla beraber, yoğun ve bilinçsiz pestisit kullanımının sonucunda gıdalarda, toprak, su ve havada kullanılan pestisit kendisi ya da dönüşüm ürünleri kalabilmektedir. Hedef olmayan diğer organizmalar ve insanlar üzerinde olumsuz etkileri görülmektedir. Pestisit kalıntılarının önemi ilk kez 1948 ve 1951 yıllarında insan vücudunda organik klorlu pestisitlerin kalıntılarının bulunmasıyla anlaşılmıştır.

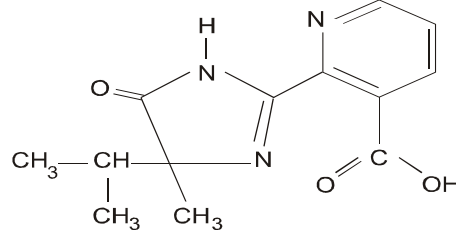
Pestisitlerin bazıları toksikolojik açıdan bir zarar oluşturmazken, bazılarının kanserojen, sinir sistemini etkileyici ve hatta mutasyon oluşturuvcu etkiler saptanmıştır. Pestisit kalıntılarının en önemli kaynağı gıdalardır. Bu nedenle 1960 yılında FAO ve WHO “Pestisit Kalıntıları Kodeks Komitesi”ni kurmuşlar ve bu komitenin çalışmaları sonucu konu ile ilgili tanımlamalar yapılmış, bilimsel araştırma verilerine dayanılarak gıdalarda bulunmasına izin verilen maksimum kalıntı değerleri saptanmıştır. Ülkemizde de tarımsal ürünlerde kullanılan pestisitlerin gıdalarda bulunması müsaade edilebilir maksimum miktarları ürün ve ilaç bazında belirlenmiştir. Bu bilgilere Tarım Bakanlığının Web sayfasından kolaylıkla ulaşmak mümkündür [97].

1.10. Çalışmalarımızda Kullanılan Pestisitler Ve Kullanım Yerleri

1.10.1.(RS)-5-etil-2-(4_metil-5-okzo-2-imidazolin-2-yl)=nikotirik asit

Genel adı Imazethapyr, kimyasal olarak ise (RS)-5-etil-2-(4_metil-5-okzo-2-imidazolin-2-yl)=nikotirik asit diye adlandırılır. Maddenin fiziksel hali renksiz kristaldir. Etki şekli, yeşil aksam ve kökler tarafından alınan seçici sistematik herbisittir. Akut oral olarak etkir. Zehirlilik derecesi çok yüksek değildir. Arılarda ve balıklarda zehirlidir. Türk Gıda Kodeksinde yer alan maksimum rezidü limiti(MRL) nohut için 0.05 ppm'dir. Toprak herbisitleri ile karıştırılabilir. Dar yapraklı yabancı ot ilaçları ve Sulphonylurea'lı ilaçlarla karışmaz. Kullanım Yerleri; Nohutta ekim sonrası çıkış öncesinde, yabancı hardal, horozibiği, köpek üzümü, farekulağı, labada, kazayağı, kırmızı mercimekte ise ekim öncesidir. Arap baklası, çobantarağı, tavşankulağı, sarı ipek çiçeği, yumrulu çam çiçeği, uzun süpürge otu, mor malkomya, yabancı hardal, çayır akça çiçeği, Suriye geyik otu, taşkesen otu, Trakya hardalı, lalemanti, pelemirde ekim sonrası çıkış öncesidir. Yabancı hardal,

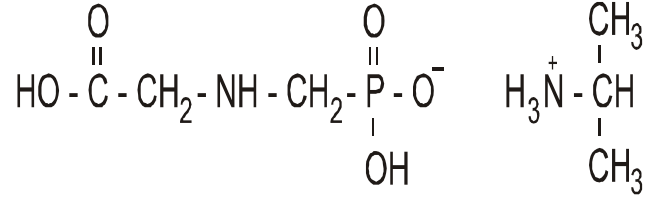
yumrulu çam çiçeği, uzun süpürge otu, Trakya hardalı, çayır akça çiçeği, yoncada çıkış sonrasıdır [98].



Şekil.1.11. (RS)-5-etil-2-(4_metil-5-okzo-2-imidazolin-2-yl)=nikotinik asit

1.10.2. N-(fosfometil)glisin

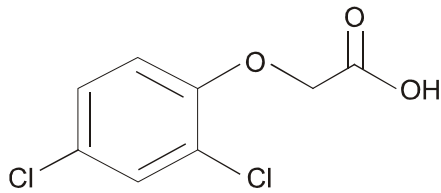
Genel adı Glyphosate, kimyasal adı (IUPAC) ise N-(fosfometil)glisin'dir. Maddenin fiziksel hali kokusuz beyaz tozudur. Etki şekli yapraklar tarafından alınan sistemik etkili seçici olmayan herbisittir. Akut oral olarak etkir. Zehirlilik derecesi çok fazla olmayıp arılar ve balıklarda etkilidir. Türk Gıda Kodeksinde yer alan maksimum rezidü limiti(MRL), sert çekirdekli meyveler, fındık, yumuşak çekirdekli meyveler, turunçgillerde 0.1 ppm'dir. Üzümde ise 0.02 ppm'dir. Kullanım Yerleri;Turunçgiller, bağ, fındık, meyve bahçeleri ve ekili olmayan alanlarda; yabani yulaf, yabani havuç, kısır brom, kuş yemi, mürdümük, ballıbaba, kanarya otu, tilki kuyruğu, yer fesleğeni, düğün çiçeği, turna gagası, yabani fiğ, kuş otu, yabani hardal, ebe gümece, yabani yonca, semiz otu, sütleğen, sirken, bambul otu, domuz pıtrağı, zincir pıtrağı, kırmızı köklü tilki kuyruğu, kirpi darı, darıcan., horoz ibiği, yeşil horoz ibiği, topalak, köpek dişi ayrığı, tarla sarmaşığı, ısırğan otu, pelin otu, kaynaştır [98].



Şekil.1.12. N-(fosfometil)glisin

1.10.3. (2,4-dikloropenoksi)asetik asit

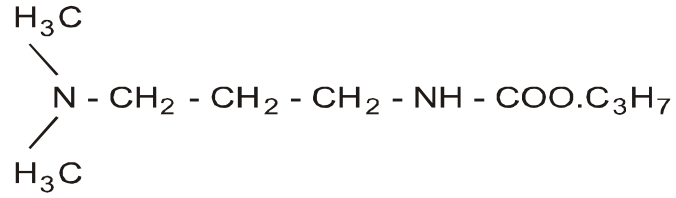
Genel adı 2,4-D, kimyasal adı (IUPAC); (2,4-dikloropenoksi)asetik asit'tir. Maddenin fiziksel hali renksiz tozudur. Tuz formülasyonlar kökler, ester formülasyonlar yapraklar tarafından daha iyi alınır. Akut oral olarak etkir. Imazethapyr ve Glyphosate göre daha zehirlidir. Arılarda ve balıklarda zehirlidir. Gıda Kodeksinde yer alan maksimum rezidü limiti (MRL); Hububatta 0.2 ppm, meyveler, çeltik ve mısırdaki 0.05 ppm'dir. Kullanım Yerleri; Hububatta akhindiba, arap baklası, atkuyruğu, çobançantası, çobandeğneği, dönüba, düğün çiçeği, köy göçürendir [98].



Şekil.1.13. (2,4-dikloropenoksi) asetik asit

1.10.4. Propil 3-(dimetilamino) propilkarbamat hidroklorid

Genel adı, propamokarb hidroklorid; kimyasal adı (IUPAC); Propil 3-(dimetilamino) propilkarbamat hidroklorid'dir. Maddenin fiziksel hali renksiz, aromatik, higroskopik kristaldir. Akut oral olarak etkir. Çok zehirlidir. Arılara ve balıklara zehirsiz olmakla beraber beraber sulara bulaştırılmaması gerekir. Türk Gıda Kodeksinde yer alan maksimum rezidü limiti(MRL); Tütün için 1,0 ppm, hıyar ve kabak için 0,2 ppm'dir. Kullanım Yerleri; Ayçiçeği ve Patateste Mildiyö, Kabakgillerde yalancı mildiyö ve tütündür [98].



Şekil.1.14. Propil 3-(dimetilamino) propilkarbamat hidroklorid

2. MATERYAL VE YÖNTEMLER

2.1. MATERYALLER

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneysel çalışmalarda kullanılan, Sepharose-4B, 9-aminofenantren, L-tirozin, standart serum albumin, N,N,N,N'tetrametiletilendiamin (TEMED), trihidroksimetil aminometan (Tris-Base), paraoksan, Tris-HCl, Triton X-100 Sigma Chemical'den; sodyum hidroksit, amonyum sülfat, glisin, fosforik asit, asetik asit, etil alkol, hidroklorik asit, sodyum dihidrojen fosfat, β -merkaptotanol, sodyum dodesil sülfat, akrilamid, N,N-metilen bis-akrilamid, amonyum persülfat, bromofenol mavisi, gliserol, Coomassie brilliant blue G-250, sodyum bikarbonat, sodyum fosfat, potasyum fosfat, kalsiyum klorür, Cd, Hg, Ni, Mn, Cu, Co Merk'den sağlanmıştır.

2.1.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Bu çalışmada aşağıdaki alet ve cihazlardan yararlanılmıştır.

Soğutmalı santrifüj	Sigma 3K15
pH metre	Hana pH 211 Microprocessor
UV-Spektrofotometre	Biotek Power Wave XS
Manyetik karıştırıcı	Torrey Pines Scientific
Terazi	Sartorius BL 210S
Otomatik pipetler	Hi-Tech ve Finipipette
Elektroforez Sistemi	Hofer, HSI
Kromatografi Kolonu	Sigma (1,5x10 cm)

Vorteks	Fisons Whirli Mixer
Gadient Mikser	Atta Magnetik Karıştırıcı ve Gadient Tüp
Buz makinesi	Fiocchetti AF 10
Jel Görüntüleme Sistemi	Gel Doc-H Imaging System (UVP)

2.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

Hidrofobik jelin sentezinde kullanılan tamponlar

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

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

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

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

Hidrofobik jele bağlanmış PON1 enziminin elüsyonu için kullanılan çözelti: *1M (NH₄)₂SO₄ içeren, 0.1 M Na₂HPO₄ tamponu (pH 8,0) ve 0.1 M Na₂HPO₄ tamponu (pH 8,0) ile gradient mikser kullanılarak tuz gradienti oluşturuldu;* 14,2g (0.1 mol)

Na_2HPO_4 ve 132,14 g (1 mol) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 950 mL distile suda çözülerek, 1N HCl ile pH'sı 8,0'e getirildi ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı. 14,2 g (0,1 mol) Na_2HPO_4 950 mL distile suda çözülerek, 1 N HCl ile pH'sı 8,0'e getirildi ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

Proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti: 100 mg Coomassie brilliant blue G-250, 50 mL etanol de çözüldü. Bu çözeltiye 100 mL %95'lik fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin son hacmi distile su ile 1L'ye tamamlandı.

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

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

Paraoksonaz aktivite ölçümünde kullanılan bazal aktivite tamponu: 2 mM CaCl_2 içeren 100 mM *tris-HCl*, pH=8; 3,0285 g (25mmol) Tris, 200 mL distile suda çözüldü. 1 N HCl ile pH'ı 8,0'e getirildi. 0,0555 g (0,5 mmol) CaCl_2 katılarak son hacim 250 mL'ye tamamlandı.

Tuzla uyarılmış aktivite tamponu (1 M NaCl içeren salt stimulate): 3,0285g (25mmol) Tris, 14,61g NaCl 200ml destile suda çözüldü. 1N HCl ile pH'ı 10,5'e getirildi. 0,0555g (0,5 mmol) CaCl_2 katılarak son hacim 250ml'ye tamamlandı.

SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan numune tamponu;

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

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

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

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

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

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

Çizelge 2.1. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının miktarları

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

2.2. YÖNTEMLER

2.2.1. Kan serumunun ayrılması

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

2.2.2. Enzim Aktivite Tayini

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

2.2.3. Q ve R Türünün Belirlenmesi

Aktivite ölçümü için 0.05 ml serum örneği alınıp daha önceden hazırlanmış olan 1ml tampon (100mM Tris-Base pH:10.5) ve substrat (1mM paraoksan) çözeltisine hızlı bir şekilde eklendikten sonra, 412nm'de 1 dakikadaki 37°C'de absorbansta meydana gelen bazal aktivite değeri okundu. Aynı solüsyonlara koenzim (1M NaCl) ilave edilerek de tuzla uyarılma (salt stimulate) aktivite değeri ölçüldü. Bu şekilde paraoksanın p-nitrofenole enzimatik dönüşüm hızı tespit edildi. Aynı işlem enzim olmadan tekrarlanarak aradaki fark enzim aktivitesi olarak belirlendi. 1 Unite Paraoksonaz dakikada meydana gelen p-nitrofenolün µmol'ü olarak tayin edildi.

Paraoksonaz enzimi bazal ve tuz aktiviteleri ölçümünden sonra aşağıda verilen formül kullanılarak fenotip belirlenmesi yapıldı [65].

$$\frac{\text{1M NaCl varlığında paraoksonaz aktivitesi} - \text{Bazal paraoksonaz aktivitesi}}{\text{Bazal paraoksonaz aktivitesi}} \times 100\%$$

Paraoksonun yüksek aktiviteli enzim ile hidrolizi, 1M NaCl ile stimüle edildiğinde düşük aktiviteli form inhibe olur. Bu analizde trimodal dağılım izlenir. %60 'a kadar homozigot Q (A), %60 ile %200 arası QR (AB) ve %200 üzeri homozigot R (B) bireyleri temsil eder.

2.2.4. Bradford Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini

Amonyum sülfat çöktürmesi sırasında elde edilen çözeltilerdeki protein miktar tayinleri bu yöntemle belirlendi. Bu yöntem, proteinlerin fosforik asitli ortamda, Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi ile kompleks oluşturması, oluşan kompleksin 595 nm'de maksimum absorbans göstermesi esasına dayanır [99]. Bu yöntemin diğer protein tayini yöntemlerinden üstün tarafı, çok kısa sürede uygulanması, bozucu faktörlerin az olması, protein boya kompleksinin çözeltilerde uzun süre kalmasıdır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır.

Protein tayini işleminde şu yol izlendi: 1 mL'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sıgır albümin çözeltisinden tüplere 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µl alındı. 100mM Tris-HCl tamponu (pH:8,00) ile tüm tüplerin hacimleri 0.1mL'ye tamamlandı. 5mL Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi her bir tüpe ilave edildi. Tüpler vorteks ile karıştırılarak 10 dakika sonra 595 nm'de 3 mL'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak 0,1 mL'lik 100 mM Tris-HCl (pH:8,00) tamponu olan 1. tüp kullanıldı. Okunan absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri ile standart grafik hazırlandı (Şekil 3.2).

Enzim örneklerinden 0,1'er mL 2 ayrı tüpe alınarak üzerlerine 5'er mL Coomassie reaktifi ilave edildi. Vorteksde karıştırıldıktan 10 dakika sonra 595

nm'de absorbansları ölçüldü. İki ölçümün ortalama absorbansına karşılık gelen protein miktarı standart grafik yardımıyla hesaplandı.

2.2.5. Enzimin Saflaştırılması

2.2.5.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Amonyum sülfat, belirli doygunluk derecelerine göre belirli proteinlerin çökmesini sağlayan 2 değerlikli, çok kullanılan bir tuzdur. Bu amaçla literatürden bakılarak %60-80 amonyum sülfat çöktürmesi [100] aşağıda verilen formülle belirlendi;

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

V : Serum hacmi

S₁ : 1'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu

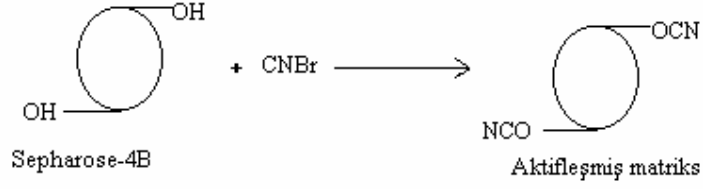
S₂ : 1'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğu

2.2.5.2. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Enzimin Saflaştırılması

2.2.5.2.1. Sepharose 4B'nin Aktifleştirilmesi

10 mL Sepharose-4B jeli, saf su ile iyice yıkanarak dekante edildi. Üzerine eşit hacimde distile su eklendi. Karıştırılmakta olan jel süspansiyonuna 4 g CNBr'in hepsi birden katıldı. pH metre kullanılarak süspansiyonun pH'sı 4 M NaOH ile

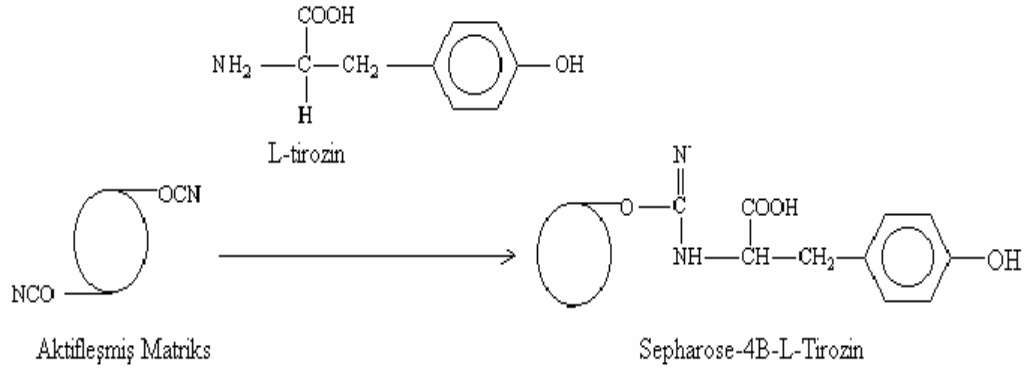
hemen 11'e çıkarıldı ve reaksiyon bu pH'da muhafaza edildi. Reaksiyona pH değışmeye kadar devam edildi. (10-15 dakika) Çok miktarda buz süspansiyona katıldı ve karışım bir buhner hunisine nakledildi. Daha sonra 250 mL soğutulmuş 0,1 M Na₂HCO₃ tamponu (pH 10,00) ile yıkandı (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Sepharose 4B'nin aktifleştirilmesi

2.2.5.2.2. L-tirozinin Bağlanması

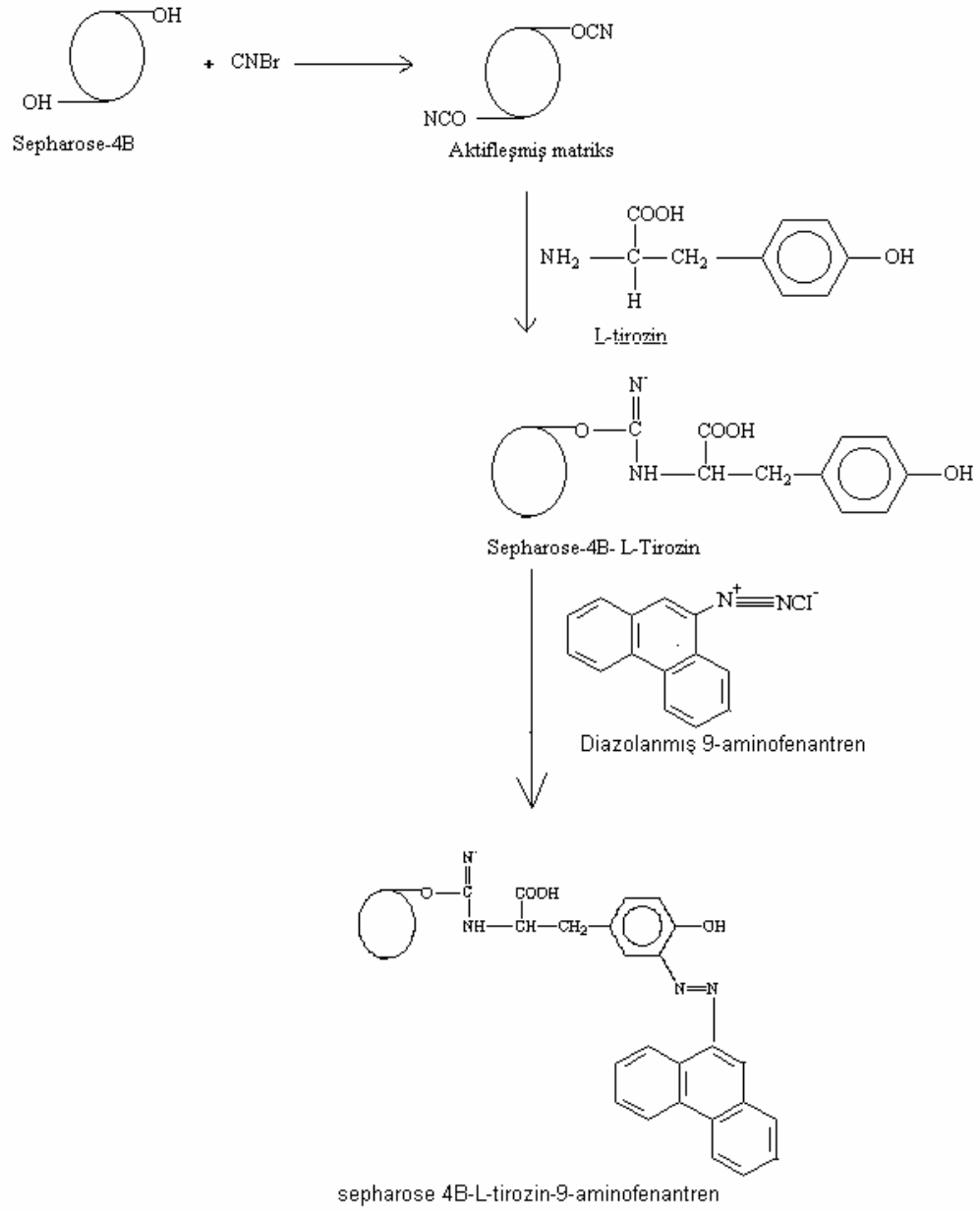
CNBr ile aktifleştirilmiş matriks üzerine, 20 mL'sinde 15 mg tirozin içeren 0,1 M NaHCO₃ tamponunun (pH 10,00) soğuk çözeltisi ilave edilerek 90 dk karıştırıldı. Bundan sonra süspansiyon 16 saat 4°C'de bekletildi. Bu sürenin bitiminde yıkama suyu 280 nm'de absorbans vermeyinceye kadar bol su ile yıkandı. Böylece reaksiyona girmeyen tirozin tamamen uzaklaştırılmış oldu. Yıkama 100 mL 0,2 M NaHCO₃ tamponu (pH: 8,8) ile tekrarlandı. Tirozinle modifiye sepharose-4B aynı tamponun 40 mL'si içine alındı (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. L-Tirozinin Bağlanması

2.2.5.2.3. 9-Aminofenantren Bileşiğinin Bağlanması

25 mg 9-Aminofenantren 0 °C civarında 10 mL THF içerisinde çözüldü. 75 mg NaNO₂ ihtiva eden 0 °C'deki 5 mL 1 M HCl içinde hazırlanan çözelti, 9-Aminofenantren çözeltisine damla damla katıldı. 10 dakika reaksiyondan sonra diazolanmış bulunan 9-Aminofenantren, 40 mL Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonuna ilave edildi. pH: 9,5'a çıkarılarak sabit tutuldu ve 3 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Daha sonra 1 L saf su ve ardından 200 mL 0,01M Na₂HPO₄ (pH: 6,0) tamponu ile yıkandı ve aynı tamponda muhafaza edildi (Şekil 2.3). Bu süre sonunda renksiz olan çıkış maddelerinden bordo renkli bir jel elde edildi.



Şekil 2.3. 9-Aminofenantren bileşiğinin bağlanması

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

Paraoksonaz enziminin hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılmasından sonra iki farklı akrilamid konsantrasyonunda; yığıma jeli % 3, ayırma jeli % 10 olacak şekilde kesikli sodyum dodesil sülfat jel elektrofrez (SDS-PAGE) Laemmli [101] tarafından belirtilen yöntemle yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi.

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

Hidrofobik etkileşim kromatografisi sonucunda elde edilen fraksiyonlardan yüksek aktivite gösterenler birleştirildi. Elde edilen çözelti toplam hacim 100 μ l

olacak şekilde 1:1 oranında numune tamponuyla karıştırıldı. β -galaktosidaz (116.0 kDa), sığır serum albumin (66.2.0 kDa), yumurta albumini (45.0 kDa), laktat dehidrogenaz (35.0 kDa), β -laktoglobulin (25.0 kDa) ve Lizozim (19.5 kDa) içeren standart protein çözeltisi 1:1 oranında numune tamponuyla karıştırıldı. Jele yüklenecek numuneler 3 dakika 100 °C'de termoblok da bekletildi. Numuneler soğutulurak kuyucuklara yüklendi. Elektroforez güç kaynağına bağlanarak 80 volt'a ayarlandı. Proteinlerin jeldeki hareketini incelemeye yarayan numune tamponu içindeki boyaya ait bant ayırma jeline ulaştığında voltaj 120 volt'a yükseltildi. Yürütme işlemine proteinler, jelin altına 1cm kalana kadar devam edildi. Daha sonra akım kesilerek yürütme durduruldu. Cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı yağma jeli kesilip ayrıldıktan sonra protein bantlarını içeren ayırma jeli renklendirme çözeltisi içine konuldu ve 1,5-2 saat kadar çalkalayıcı üzerine bırakıldı. Daha sonra jel renklendirme çözeltisinden çıkartılarak renksizleştirme çözeltisine kondu. Belirli aralıklarla değiştirmek suretiyle jelin zemin rengi açılıp protein bantları belirginleşinceye kadar bu çözelti içinde çalkalandı. Jel renksizleştirme çözeltisinden çıkarıldıktan sonra jel görüntüleme sistemi (UVP) ile görüntü bilgisayara aktarıldı.

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

K_M ve V_{max} değerlerinin tespit edilmesi amacıyla optimum şartlarda (37°C'de ve 0,1 M pH:8 tris-base tamponunda) paraokson substratının sekiz farklı konsantrasyonunda enzim aktivitesi ölçümü yapıldı. Her ölçüm iki defa tekrarlanarak, bulunan değerlerin ortalaması alındı.

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

2.2.8. Bazı Ağır Metaller ve Pestisitlerin I₅₀ değerlerinin bulunması

Hg, Co, Cd, Cu, Ni ve Mn ağır metallerinin ve 4 pestisit (Purtapyr: (RS)-5-etil-2-(4-izopropil-4-metil-5-okzo-2-imidazolin-2-yl) nikotinik asit; Practicur: Propil-3-(dimetilamino) propilkarbomat hidroklorid; Agroform: 2,4-Diolorofenoksi asetik asit dimetil amin tuzu; Roundup: Glifosfat-Amin tuzu N-(fosfometil) glisin) I₅₀ değerlerini bulmak için, optimum şartlarda paraoksan substratının 1 mM sabit konsantrasyonunda çalışıldı. Önce ağır metal ve tarım ilaçları ortamda enzim aktivitesi bulundu. Bu değer %100 aktivite olarak kullanıldı. Değişik ağır metal ve tarım ilaçları konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbanslar 412 nm'de köre karşı okundu. Elde edilen absorbans değerlerinden % aktivite hesaplandı. % Aktivite – [I] grafikleri çizildi. Bu grafiklerden yararlanarak her bir ağır metal ve tarım ilaçları için I₅₀ değerleri hesaplandı.

2.2.9. Ağır metaller ve pestisitler için K_i değerlerinin bulunması

Bazı ağır metaller ve tarım ilaçlarının K_i değerlerinin bulunması için önce inhibitörsüz ortamda optimum şartlarda paraokson substratının sekiz farklı konsantrasyonunda Q ve R izoenzimleri için aktivite bulundu. Daha sonra her bir ağır metal ve tarım ilacı için 2 değişik sabit konsantrasyonda optimum şartlarda aktivite tespit edildi. 1/V ve 1/[S] değerlerinden Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Bu grafiklerden yararlanarak inhibisyon türleri ve K_i değerleri yarışmalı (kompetitif) inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrisinde 1/[S] eksenini kestiği nokta olan $-1/K_M (1+[I]/K_i)$ ifadesinden, yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon için 1/V eksenini kestiği nokta olan $1/V_{max} (1+[I]/K_i)$ ifadesinden yararlanarak hesaplandı. Denklemlerde kullanılan K_M ve V_{max} değerleri inhibitörsüz ortamda Q ve R izoenzimleri için ayrı ayrı bulunan değerlerdir.

3. BULGULAR

3.1. Q ve R Fenotiplere Sahip Deneklerin Belirlenmesi

Çalışmamızda; 12 sağlıklı bireye ait kan örnekleri Balıkesir Atatürk Devlet Hastanesi laboratuvarında gönüllü deneklerden çalışma yapılacağı gün taze olarak alınmıştır.

Aktivite ölçümü için 0.05 ml enzim örnek çözeltisi (serum) daha önceden hazırlanmış olan 1ml tampon (100mM Tris-Base pH:10.5) ve substrat (1mM paraokson) çözeltisine hızla bir şekilde eklendikte sonra 412nm’de 1 dakikadaki 37°C’de absorbansta meydana gelen bazal aktivite değeri okundu. Aynı solüsyonlara koenzim (1M NaCl) ilave edilerek de tuzla uyarılmış aktivite değeri ölçüldü. Bu şekilde paraoksanın p-nitrofenole enzimatik dönüşüm hızı tespit edildi. Aynı işlem enzim olmadan tekrarlanarak aradaki fark enzim aktivitesi olarak belirlendi. 1 ünite paraoksonaz dakikada meydana gelen p-nitrofenolün $\mu\text{mol}'\text{ü}$ olarak tayin edildi.

Paraoksonaz enzimi bazal ve tuzlu aktiviteleri ölçümünden sonra aşağıda verilen formül kullanılarak fenotip belirlenmesi yapıldı [65].

$$\frac{\text{1M NaCl varlığında paraoksonaz aktivitesi} - \text{Bazal paraoksonaz aktivitesi}}{\text{Bazal paraoksonaz aktivitesi}} \times 100\%$$

Paraoksonun yüksek aktiviteli enzim ile hidrolizi 1M NaCl ile stimüle edildiğinde düşük aktiviteli form inhibe olur. Bu analizde trimodal dağılım izlenir. %60'a kadar homozigot Q (veya A), %60 ile %200 arası QR (AB) ve %200 üzeri homozigot R (veya B) bireyleri temsil eder.

No	İsim	Bazal Aktive (U)	Tuzla uyarılmış Aktivite (U)	Fenotip
1	1. Denek	79,8	397,9	R
2	2. Denek	103,2	503,5	R
3	3. Denek	201,4	644,7	R
4	4. Denek	57,7	73,7	Q
5	5. Denek	108,0	159,0	Q
6	6. Denek	122,8	294,7	QR
7	7. Denek	111,8	300,9	QR
8	8. Denek	112,0	372,0	R
9	9. Denek	89,7	113,0	Q
10	10. Denek	87,2	105,6	Q
11	11. Denek	165,8	530,5	R
12	12. Denek	129,0	400,4	R

Çizelge 3.1. Sağlıklı bireylerin serum paraoksonaz bazal ve tuzlu enzim aktiviteleri

3.2 Enzimin Saflaştırılması

3.2.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Amonyum sülfat, belirli doygunluk derecelerine göre belirli proteinlerin çökmesini sağlayan 2 değerlikli, çok kullanılan bir tuzdur. Bu amaçla %60-80 amonyum sülfat çöktürmesi [100] aşağıda verilen formülle tespit yapıldı:

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

V : Serum hacmi

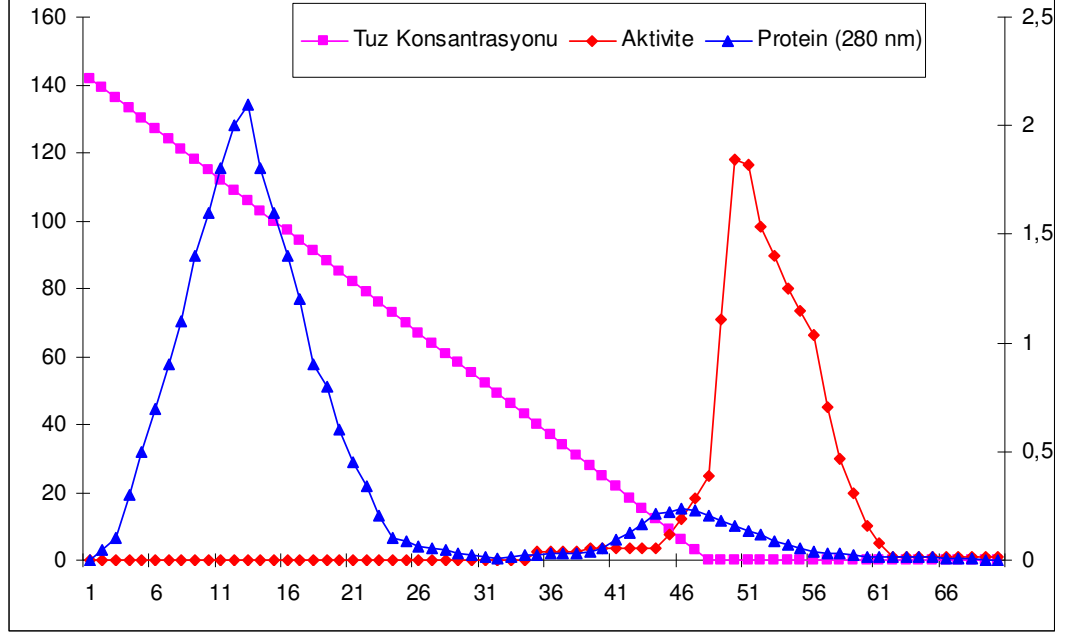
S₁ : 1'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu

S₂ : 1'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğu

3.2.2. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Enzimin Saflaştırılması

Bölüm 2.2.5.2.3'de belirtildiği şekilde hazırlanan hidrofobik etkileşim kolonu önce 1M (NH₄)₂SO₄ içeren 0,1 M Tris-HCl pH:8,0 tamponu ile dengelendi. Kolonun dengeleme işlemi bittikten sonra, jel üzerindeki tampon çözeltisi jel seviyesine kadar indirildi. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen serum enzim çözeltisi 1 M amonyum sülfat doygunluğuna getirildikten sonra kolona tatbik edildi. Kolona 1 M (NH₄)₂SO₄ içeren 0,1 M Tris-HCl pH:8,0 tamponu ve 0,1 M Tris-HCl pH:8,0 tamponu ile oluşturulan yüksek tuz konsantrasyonundan düşük tuz konsantrasyonuna doğru tuz gradienti uygulandı. Alttan gelen yıkama ve elüsyon çözeltisi 1,5 mL halinde tüplere toplandı. Yıkama ve elüsyon işlemi 280 nm'deki absorbanı sıfır oluncaya kadar devam edildi. 0,1 M Tris-HCl pH:8,0 tamponu kör olarak

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

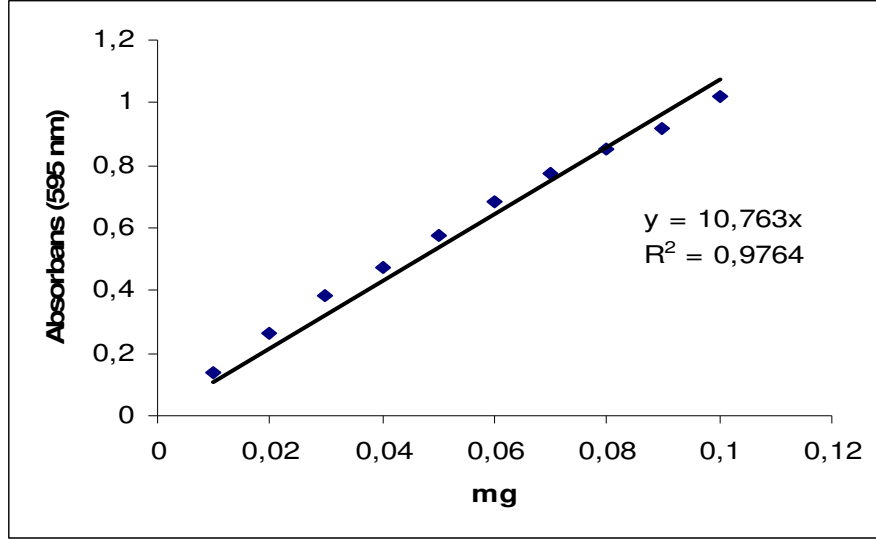


Şekil 3.1 Hidrofobik etkileşim kolonundan PON1 enziminin elüsyon grafiği (kolondaki jel yüksekliği 5 cm ve çap 1 cm)

3.2.3. Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri

Hidrofobik etkileşim kromatografisi sonunda enzim aktivitesine rastlanan tüpler birleştirildi. Kolona tatbik edilen numune ve birleştirilen elüat çözeltileri için Bradford metoduyla kantitatif protein tayini yapıldı. Daha sonra aktivite tayinleri yapılarak spesifik aktiviteler ve saflaştırma oranları tespit edildi. Sonuçlar çizelge 3.2’de verildi.

Serumdan elde edilen enzim çözeltisi ve saflaştırma basamakları sonundaki enzim çözeltilerinin protein miktarları bu standart grafiğe göre belirlendi. Standart çözeltideki mg proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



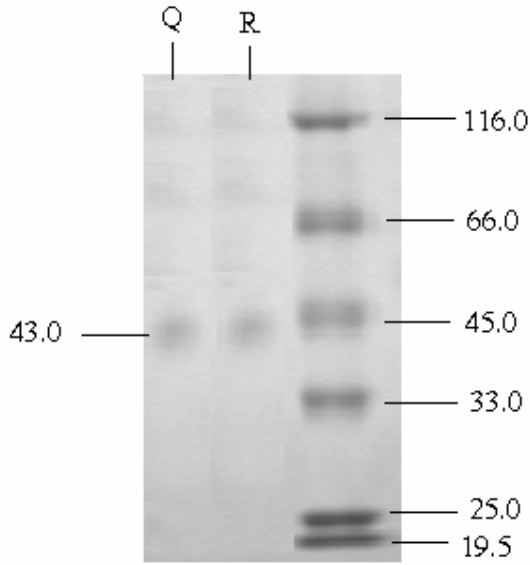
Şekil 3.2 Bradford yöntemi ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan standart grafik

Çizelge 3.2. Q ve R Türü için saflaştırma tablosu

Q Türü	Hacim (ml)	Aktivite (U/ml)	Toplam Aktivite (U/ml)	Protein Miktarı (mg/ml)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	% Verim	Saflaştırma Derecesi
Serum	36	12,9	464,4	7,5	262,5	1,76	100	-
Amonyum Sülfat Çöktürmesi	16	18,5	296,0	7,9	126,4	2,34	63,7	1,47
Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi	1,5	45	67,5	0,021	0,032	2109	14,5	901
R Türü	Hacim (ml)	Aktivite (U/ml)	Toplam Aktivite (U/ml)	Protein Miktarı (mg/ml)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	% Verim	Saflaştırma Derecesi
Serum	33	38,0	1254	7,3	240,00	5,21	100	-
Amonyum Sülfat Çöktürmesi	11	61,0	671	8,3	91,30	7,35	55,3	1,5
Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi	1,5	60,0	90	0,018	0,027	3333	6,9	453

3.3.3. Serum Paraoksonaz Q ve R İzoenzimlerinin SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Hidrofobik etkileşim kolonundan saflaştırılan serum paraoksonaz enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla bölüm 2.2.3.4’de anlatıldığı şekilde hazırlanan SDS poliakrilamid jel elektroforezine serumdan saflaştırılan paraoksonaz enzim numunesi tatbik edildi. Protein bantları içeren jellerin görüntüleri jel görüntüleme sistemi ile bilgisayara aktarıldı (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılan paraoksonaz enziminin SDS-polakrilamid jel elektroforezi. Molekül ağırlık standartları; (β -galaktosidaz (116.0 kDa), sığır serum albumin (66.0 kDa), yumurta albumini (45.0 kDa), karbonik anhidraz (33.0 kDa), β -laktoglobulin (25.0kDa) ve Lizozim (19.5 kDa), saf PON1 Qve R (43.0 kDa).

3.4 Optimum Şartlarda K_M ve V_{max} Değerlerinin Bulunması

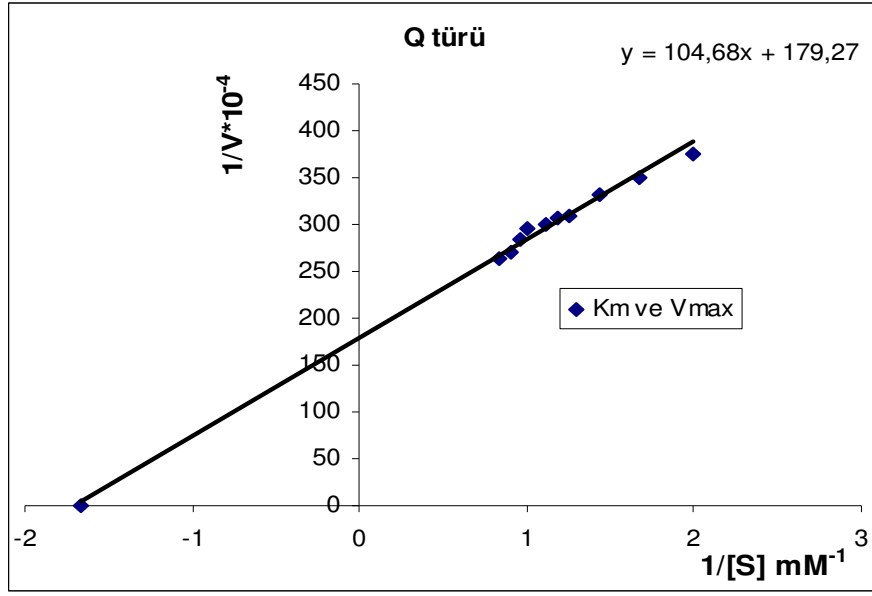
K_M ve V_{max} değerlerinin bulunması amacıyla, optimum şartlarda paraokson substratının değişen konsantrasyonlarında Q ve R izoenzimi için enzim aktivitesi ölçümleri yapıldı. Her ölçüm iki defa yapılarak bulunan değerlerin ortalaması alındı. 412 nm'de ölçülen aktivite değerleri reaksiyon hızı (U/ml dakika) olarak alındı. $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri bulunarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi (Şekil 3.4 ve şekil 3.5). Grafikten yararlanarak Q için K_M değeri 0.599 mM ve V_{max} değeri 55 U/ml dakika olarak bulunurken R için K_M değeri 0,492 mM V_{max} değeri 50 U/ml dakika tespit edildi.

Çizelge 3.3. İnsan serum **PON1Q** izoenzimi için paraokson substratı kullanılarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri

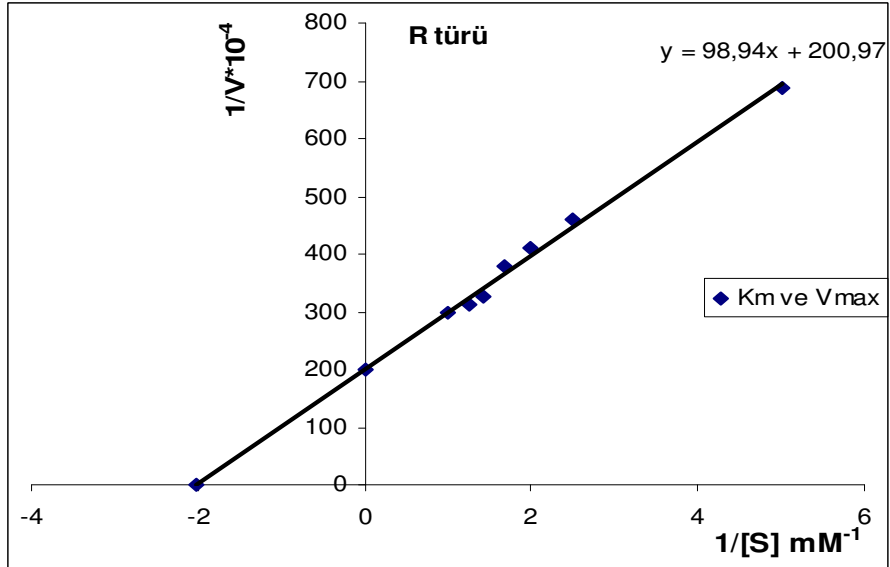
100mM Tris tamponu (μ l)	Enzim çözeltilisinin hacmi (μ l)	Substrat çözeltilisinin hacmi (μ l)	Küvetteki toplam hacim (μ l)	Küvetteki substrat konsantrasyonu [S] (mM)	Δ OD (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
990		10		0,2	0,021	25,3	396	2
980		20		0,4	0,023	27,8	360	1,67
975		25		0,5	0,024	29,4	340	1,43
970	50	30	1050	0,6	0,025	30,1	332	1,25
965		35		0,7	0,026	31,3	320	1,19
960		40		0,8	0,026	32,0	313	1,11
950		50		1	0,028	33,8	296	1
948		52		1,04	0,029	35,1	285	0,96
945		55		1,1	0,030	36,9	271	0,91
940		60		1,2	0,031	38,0	263	0,83

Çizelge 3.4. İnsan serum **PON1R** izoenzimi için paraokson substratı kullanılarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri

100mM Tris tamponu (μl)	Enzim çözeltilisinin hacmi (μl)	Substrat çözeltilisinin hacmi (μl)	Küvetteki toplam hacim (μl)	Küvetteki substrat konsantrasyonu [S] (mM)	ΔOD (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
975		25		0,50	0,012	14,5	688	5
970		30		0,60	0,018	21,7	461	2,5
965		35		0,70	0,020	24,3	412	2
960	50	40	1050	0,80	0,022	26,4	379	1,67
958		42		0,84	0,025	30,7	326	1,43
955		45		0,90	0,026	32,1	312	1,25
950		50		1	0,027	33,6	298	1



Şekil 3.4 Saflaştırılmış insan serum PON1 Q izoenziminin paraokson substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 3.5. Saflaştırılmış insan serum PON1R izoenziminin paraokson substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.

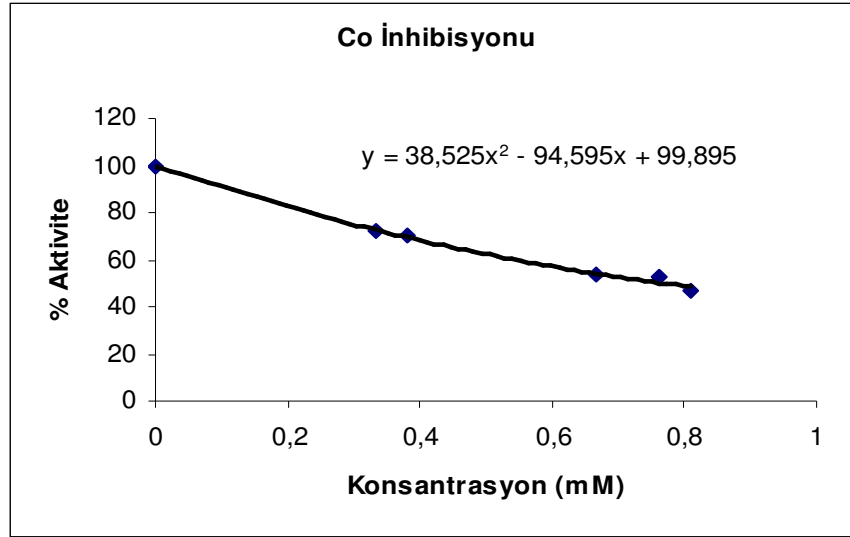
3.5. İnhibisyona Sebep Olan Ağır Metallerin ve Bazı Pestisitlerin I_{50} ve K_i Değerlerinin Bulunması

Çalışmamızda kullandığımız ağır metallerin ve bazı tarım ilaçlarının I_{50} değerlerini bulmak için, optimum şartlarda paraokson substratının 1 mM sabit konsantrasyonunda çalışıldı. Substrat çözeltisi her ölçümde 0,1ml paraokson alındı ve ağır metal ve bazı tarım ilaçları çözeltilerinden ise değişik hacimlerde alınarak toplam 1,05 mL'lik bir reaksiyon hacmi oluşturuldu. Önce inhibitörsüz ortamda enzim aktivitesi bulundu. Bu değer %100 aktivite olarak kullanıldı. Daha sonra optimum pH ve sıcaklıkta 0,05 mL enzim çözeltisi alınıp daha önceden hazırlanmış olan 1 mL tampon + substrat + ağır metallerin veya bazı tarım ilaçlarının çözeltisine çabuk bir şekilde eklendikten sonra 412 nm'de bir dakikada absorbansta meydana gelen değişme okundu. Elde edilen absorban değerlerinden % aktiviteler hesaplandı. % Aktivite-[I] grafikleri çizildi. (Şekil 3.8-3.28). Bu grafiklerden yararlanarak kullanılan her bir ağır metal ve tarım ilacı için I_{50} değerleri hesaplandı.

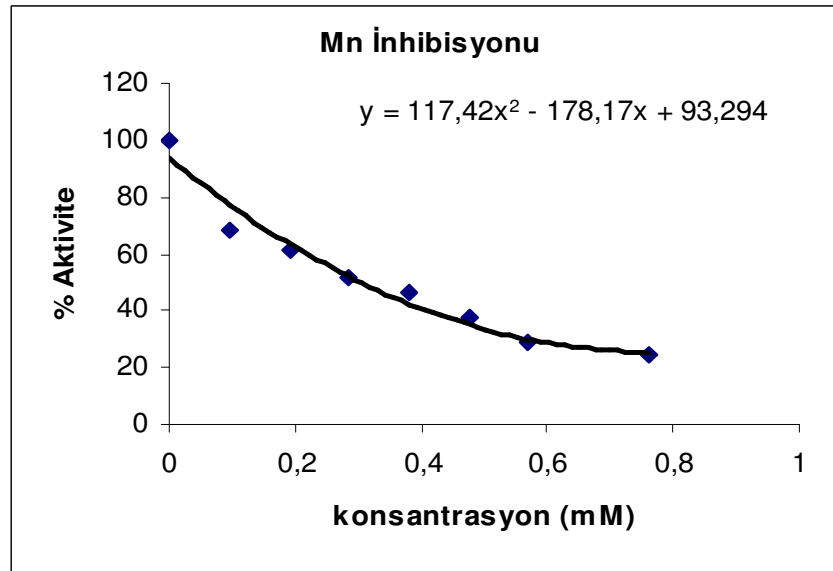
Farklı ağır metallerin ve tarım ilaçlarının K_i sabitlerinin bulunması amacıyla, önce inhibitörsüz ortamda, optimum şartlarda, 5-8 farklı paraokson substrat konsantrasyonuna bağlı olarak aktiviteler bulundu. Daha sonra çalışmada kullanılan her bir ağır metal ve tarım ilacı için 2 değişik sabit inhibitör konsantrasyonunda, standart aktivite ölçüm koşullarında, paraokson substratı kullanılarak aktiviteler belirlendi. $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri hesaplanarak, Lineweaver–Burk grafikleri çizildi (Şekil 3.29- 3.49). Bu grafiklerden yararlanarak K_i değerleri ve inhibisyon türleri tespit edildi. K_i değerleri bölüm 2.2.8'de anlatıldığı gibi bulundu.

Çizelge 3.5. Serum **PON1R** izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren **Co** ve **Mn**'ın I_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, metal konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

100 mM Tris tamponu (µl)	Ağır Metal	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µl)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µl)	Metal Çözeltisinin Hacmi (µl)	Küvetteki Metal Konsantrasyonu [I] (mM)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite
950	Co	50	50	-	-	0,086	52,804	100
600				350	0,333	0,062	38,068	72,1
550				400	0,381	0,06	36,84	69,8
250				700	0,667	0,046	28,244	53,5
150				800	0,762	0,045	27,63	52,3
100				850	0,810	0,04	24,56	47
950	Mn	50	50	-	-	0,077	94,6	100
940				10	0,095	0,053	65,1	68,7
930				20	0,191	0,047	57,7	61,1
920				30	0,286	0,040	49,1	52
910				40	0,381	0,036	44,2	46,7
900				50	0,476	0,029	35,6	37,6
890				60	0,571	0,022	27,0	28,6
870				80	0,762	0,019	23,3	24,7



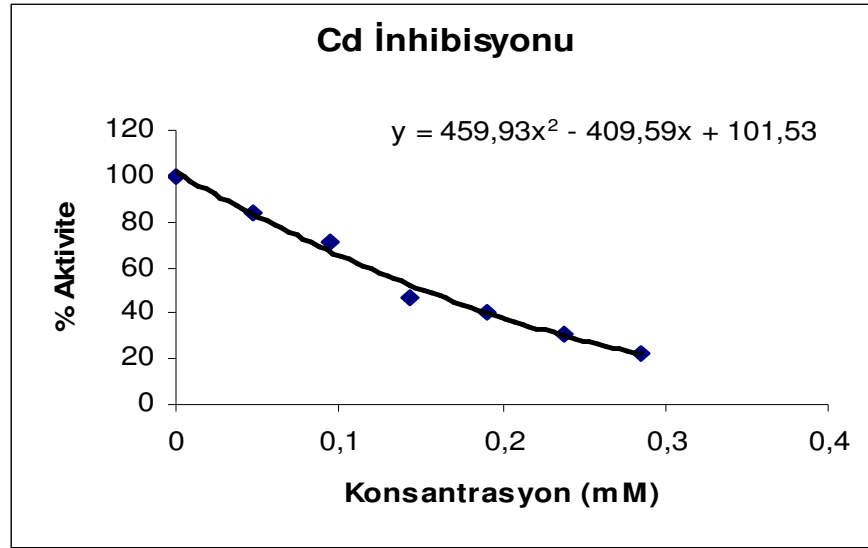
Şekil 3.6. Saflaştırılmış insan serum **PON1 R** izoenzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda Co için % aktivite-[I] grafiği



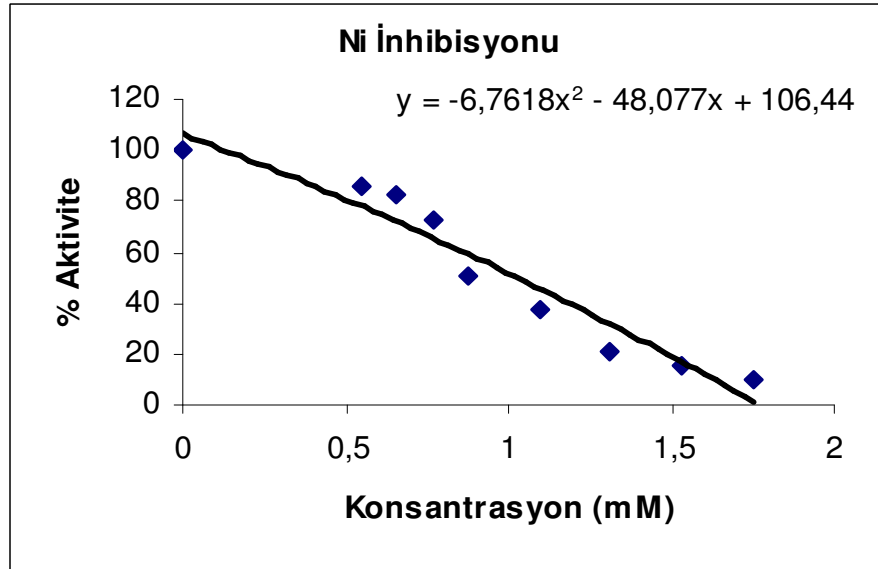
Şekil 3.7. Saflaştırılmış insan serum **PON1 R** izoenzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda Mn için % aktivite-[I] grafiği

Çizelge 3.6. Serum **PON1R** izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren **Cd** ve **Ni**'in I_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, metal konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

100mM Tris Tamponu (μ l)	Ağır Metal	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Metal Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Küvetteki Metal Konsantrasyonu [I] (mM)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite
950	Cd	50	50	-	-	0,096	117,9	100
900				50	0,048	0,081	99,5	84,4
850				100	0,095	0,068	83,5	70,8
800				150	0,143	0,045	55,3	46,9
750				200	0,191	0,039	47,9	40,6
700				250	0,238	0,030	36,8	31,2
650				300	0,286	0,021	25,8	21,9
950				Ni	50	50	-	-
900	50	0,548	0,089				109,3	86,4
890	60	0,657	0,085				104,4	82,5
880	70	0,767	0,075				92,1	72,8
870	80	0,876	0,052				63,9	50,5
850	100	1,095	0,039				47,9	37,9
830	120	1,314	0,022				27,0	21,3
810	140	1,533	0,016				19,7	15,6
790	160	1,752	0,010				12,3	9,7



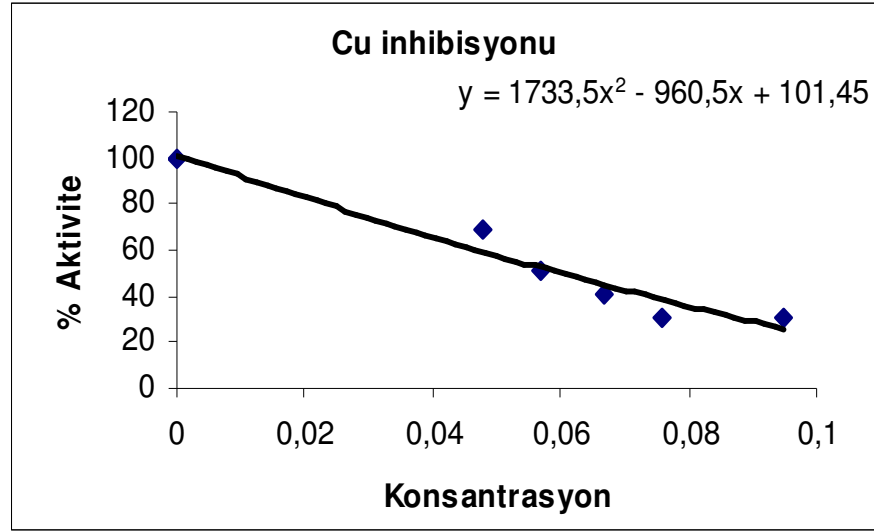
Şekil 3.8. Saflaştırılmış insan serum **PON1 R** izoenzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda Cd için % aktivite-[I] grafiği



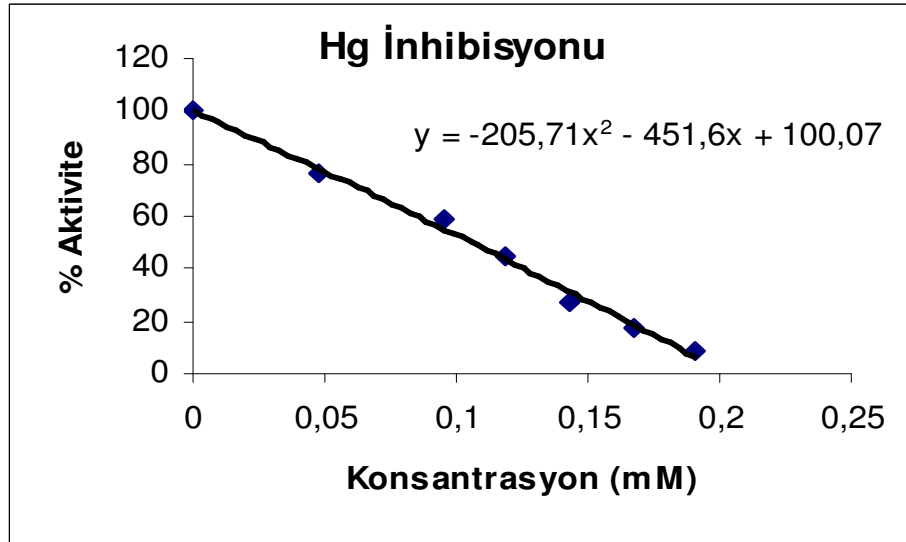
Şekil 3.9. Saflaştırılmış insan serum **PON1R** izoenzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda Ni için % aktivite-[I] grafiği

Çizelge 3.7. Serum **PON1R** izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren **Cu** ve **Hg**'nin I_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, metal konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

100mM Tris tamponu (μ l)	Ağır Metal	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Metal Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Küvetteki Metal Konsantrasyonu [I] (mM)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite
950	Cu	50	50	-	-	0,091	111,8	100
900				50	0,048	0,064	78,6	68,5
890				60	0,057	0,047	57,7	51,6
880				70	0,067	0,037	45,4	40,6
870				80	0,076	0,028	34,4	30,8
860				90	0,095	0,028	34,4	30,8
950				Hg	50	50	-	-
900	50	0,048	,062				76,1	76,5
850	100	0,095	0,048				59,0	59,3
825	125	0,119	0,036				44,2	44,4
800	150	0,143	,022				27,0	27,1
775	175	0,167	0,014				17,2	17,3
750	200	0,191	0,007				8,6	8,6



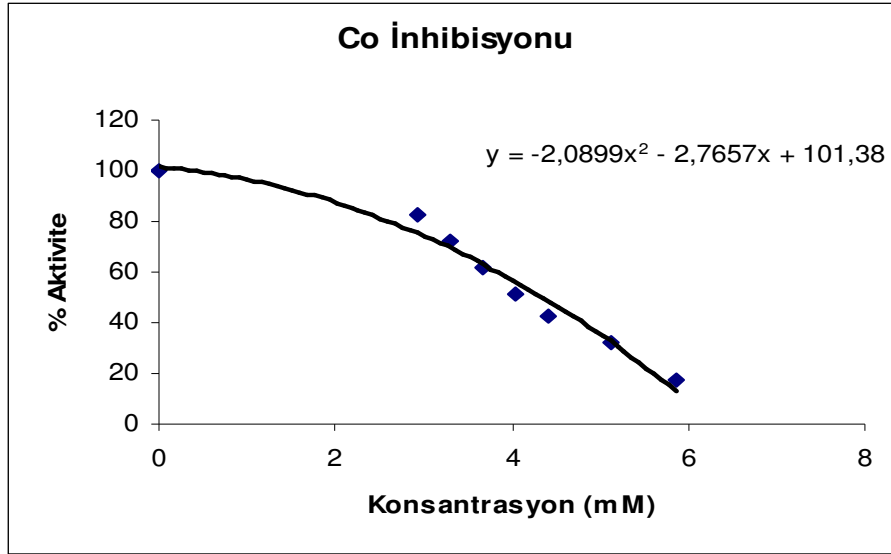
Şekil 3.10. Saflaştırılmış insan serum **PON1 R** izoenzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda Cu için % aktivite-[I] grafiği



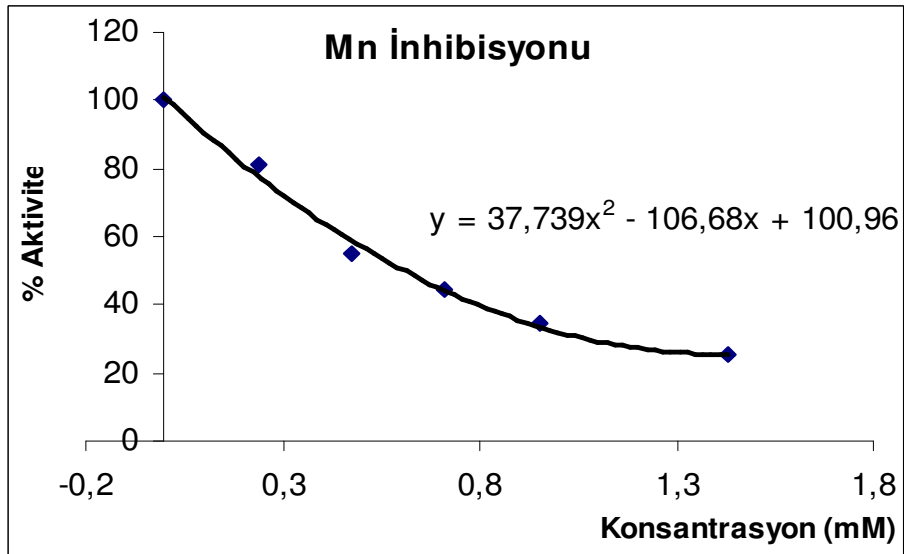
Şekil 3.11. Saflaştırılmış insan serum **PON1 R** izoenzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda Hg için % aktivite-[I] grafiği

Çizelge 3.8. Serum PON1Q izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Co ve Mn'nın I₅₀ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, metal konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

100mM Tris tamponu (µl)	Ağır Metal	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Metal Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Küvetteki Metal Konsantrasyonu [I] (mM)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite
950	Co	50	50	-	-	0,047	57,716	100
550				400	2,93	0,039	47,892	83,0
500				450	3,30	0,034	41,752	72,3
450				500	3,67	0,029	35,612	61,7
400				550	4,03	0,024	29,472	51,1
350				600	4,40	0,02	24,56	42,6
250				700	5,13	0,015	18,42	31,9
150				800	5,87	0,008	9,824	17,0
950				Mn	50	50	-	-
925	25	0,238	0,077				47,3	81,1
900	50	0,476	0,054				32,2	55,2
875	75	0,714	0,042				25,8	44,2
850	100	0,952	0,033				20,3	34,8
800	150	1,429	0,024				14,7	25,3



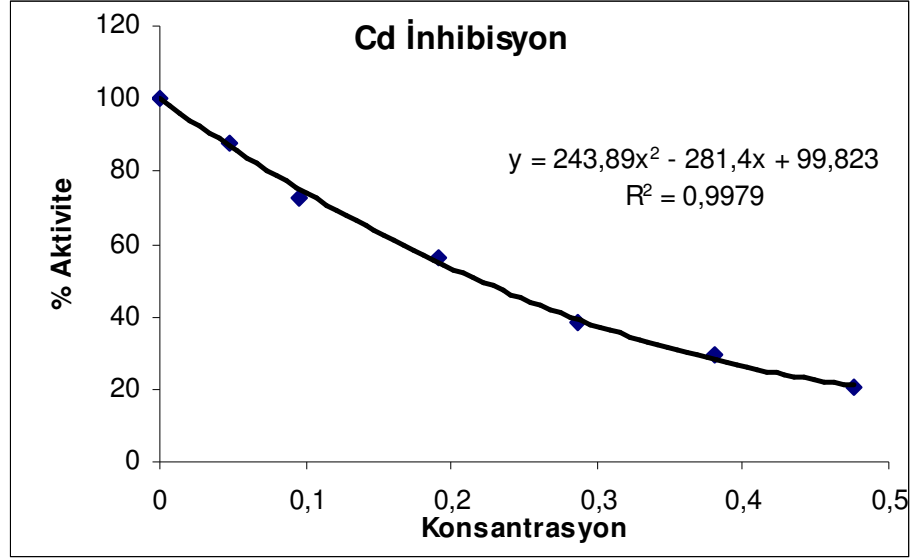
Şekil 3.12. Saflaştırılmış insan serum **PON1Q** izoenzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda Co için % aktivite-[I] grafiği



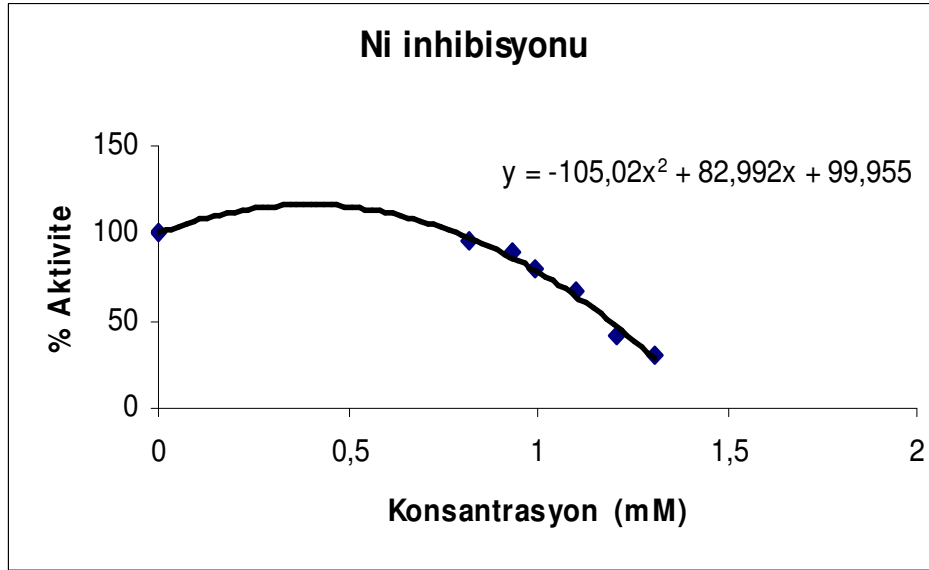
Şekil 3.13. Saflaştırılmış insan serum **PON1Q** izoenzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda Mn için % aktivite-[I] grafiği

Çizelge 3.9. Serum **PON1Q** izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren **Cd** ve **Ni**'in I_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, metal konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

100mM Tris Tamponu (μ l)	Ağır Metal	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Metal Çözeltisinin Hacmi (μ l)	Küvetteki Metal Konsantrasyonu [I] (mM)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite
950	Cd	50	50	-	-	0,113	138	100
945				5	0,048	0,099	121,6	88,1
940				10	0,095	0,082	100,7	73
930				20	0,191	0,063	77,4	56,1
920				30	0,286	0,043	52,8	38,3
910				40	0,381	,033	40,5	29,4
900				50	0,476	0,023	28,3	20,5
950				Ni	50	50	-	-
875	75	0,238	0,077				96,1	95
865	85	0,476	0,074				90,9	89,2
860	90	0,714	0,066				81,1	79,6
850	100	0,952	0,055				67,6	66,3
840	110	1,429	0,034				41,8	41
830	120	1,31	0,030				37,0	31



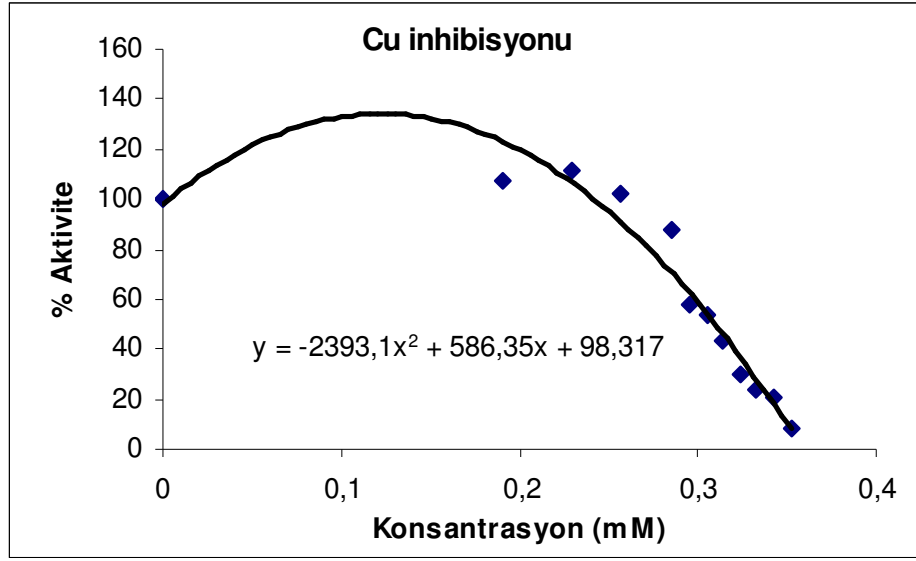
Şekil 3.14. Saflaştırılmış insan serum **PON1Q** izoenzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda Cd için % aktivite-[I] grafiği



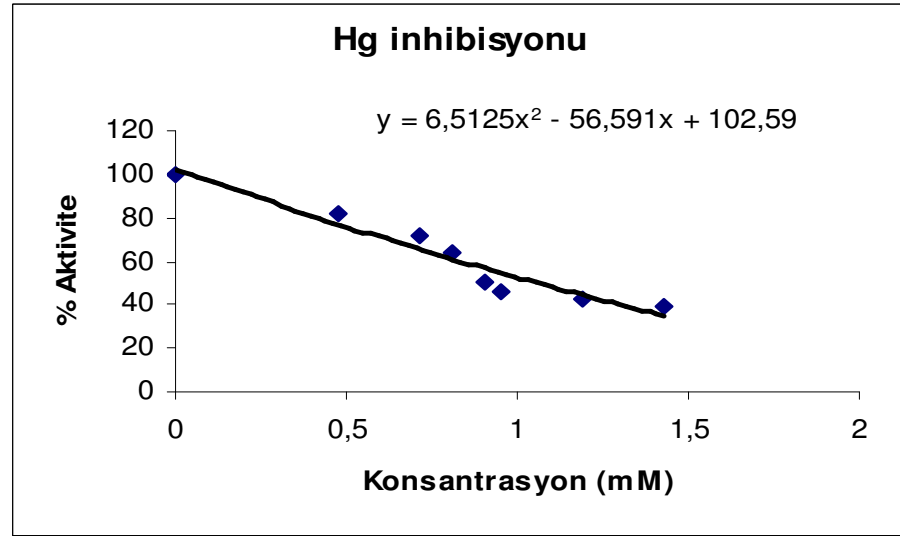
Şekil 3.15. Saflaştırılmış insan serum **PON1Q** izoenzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda Ni için % aktivite-[I] grafiği

Çizelge 3.10. Serum PON1Q izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Cu ve Hg'nın I₅₀ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, metal konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

100 mM Tris Tamponu (µl)	Ağır Metal	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µl)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µl)	Metal Çözeltisinin Hacmi (µl)	Küvetteki Metal Konsantrasyonu [I] (mM)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite			
950	Cu	50	50	-	-	0,092	54,7	100			
680				270	0,191	0,095	58,5	107			
670				280	0,229	0,099	60,7	111			
660				290	0,257	0,093	55,8	102			
650				300	0,286	0,082	50,4	88			
640				310	0,295	0,053	32,5	58			
630				320	0,305	0,050	30,7	54			
620				330	0,314	0,039	24,0	43			
610				340	0,324	0,028	17,5	30			
600				350	0,332	0,022	13,5	24			
590				360	0,343	0,019	11,7	21			
580				370	0,352	0,007	4,3	8			
950				Hg	50	50	-	-	0,122	74,9	100
900							50	0,476	0,100	61,4	82
875	75	0,714	0,088				54,0	72			
865	85	0,81	0,078				47,9	64			
855	95	0,905	0,062				38,1	51			
850	100	0,952	0,055				33,8	46			
775	125	1,191	0,050				30,7	43			
750	150	1,429	0,047				28,9	39			



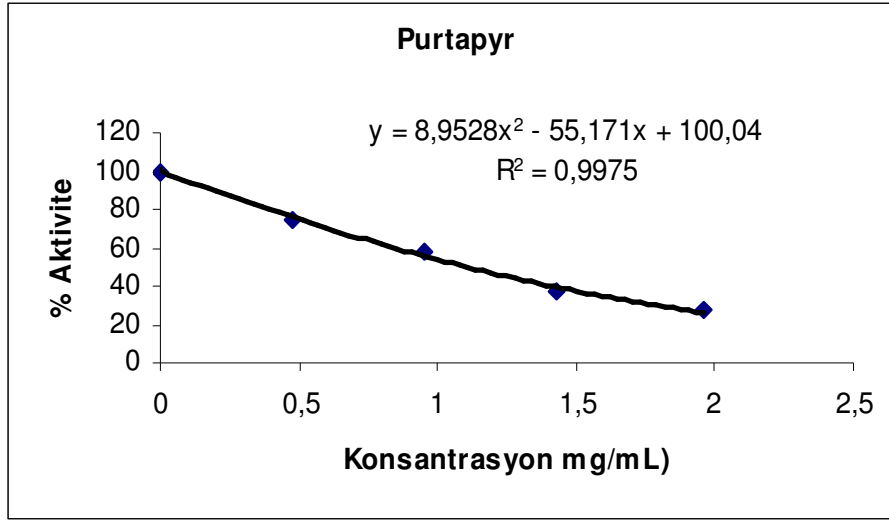
Şekil 3.16. Saflaştırılmış insan serum **PON1Q** izoenzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda Cu için % aktivite-[I] grafiği



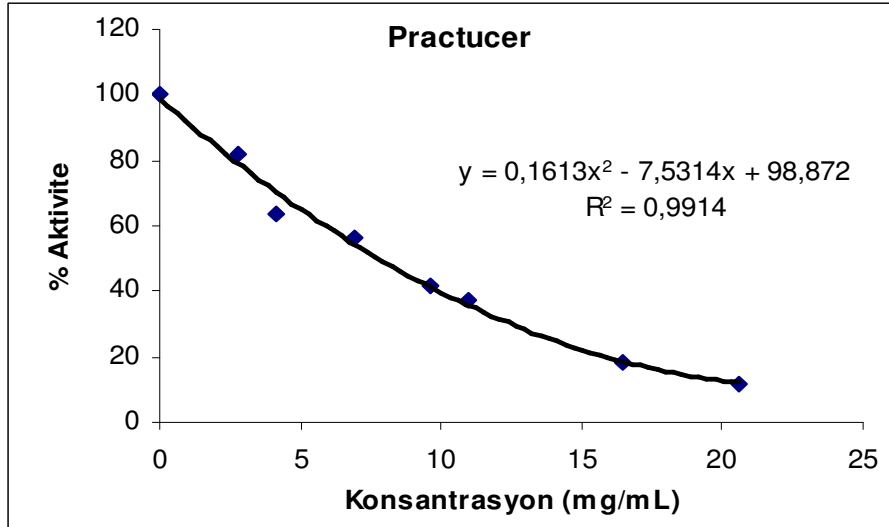
Şekil 3.17. Saflaştırılmış insan serum **PON1Q** izoenzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda Hg için % aktivite-[I] grafiği

Çizelge 3.11. Serum **PON1R** izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Purtapyr ve Practicur 'in I_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, pestisit konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

100mM Tris tamponu (μ l)	Pestisit	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Substrat çözeltilisinin hacmi (μ l)	Pestisit Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Küvetteki Pestisit Konsantrasyonu [I] (mg/ml)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite
950	Purtapyr	50	50	-	-	0,104	127,7	100
900				50	0,48	0,078	95,8	75
850				100	0,95	0,060	73,7	57,7
800				150	1,43	0,039	47,9	37,5
750				200	1,96	0,028	34,4	26,9
950	Practicur	50	50	-	-	0,078	95,8	100
930				20	2,75	0,064	78,6	82
920				30	4,13	0,050	61,4	64
900				50	6,88	0,044	54,0	56
880				70	9,63	0,033	40,5	42
870				80	11,00	0,029	35,6	37
830				120	16,50	0,014	17,2	18
800				150	20,63	0,009	11,1	12



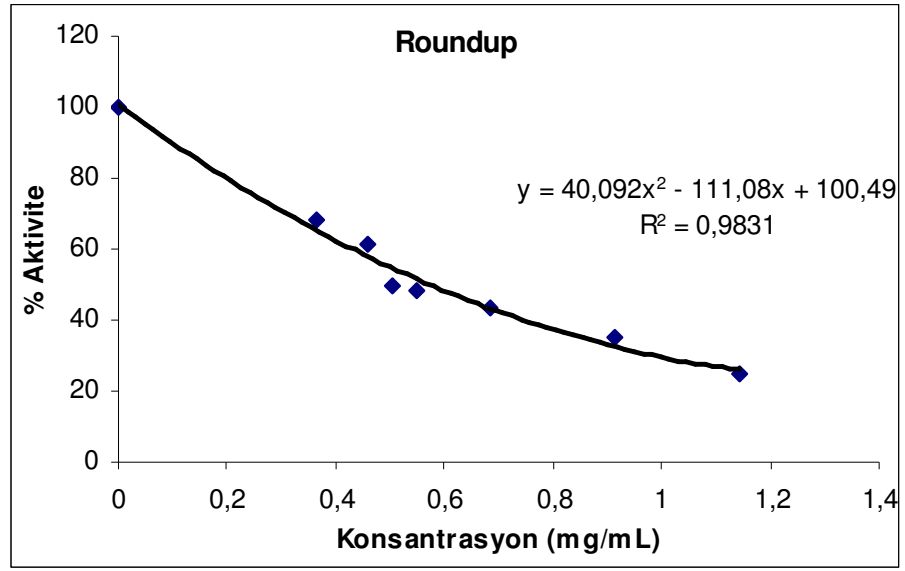
Şekil 3.18. Saflaştırılmış insan serum **PON1R** izoenzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda Purtapyr için % aktivite-[I] grafiği



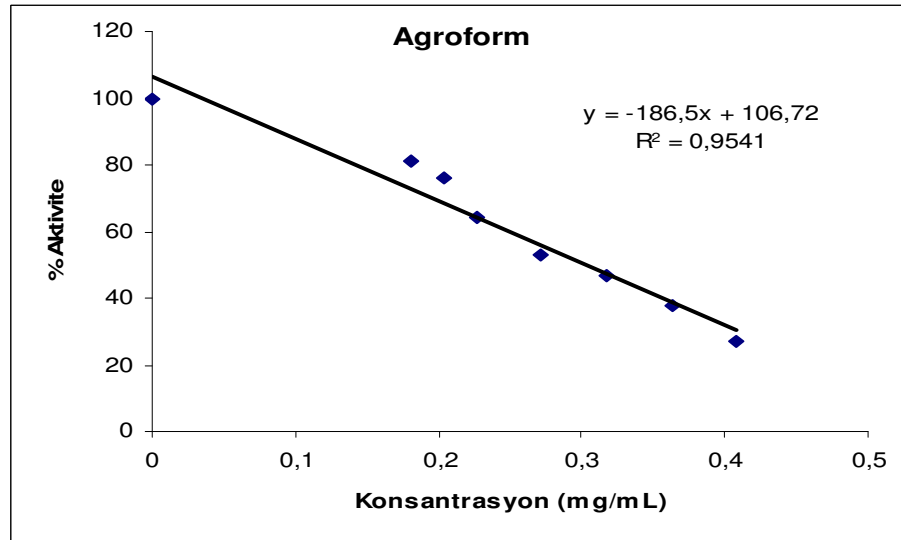
Şekil 3.19. Saflaştırılmış insan serum **PON1R** izoenzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda Practucer için % aktivite-[I] grafiği

Çizelge 3.12. Serum **PON1R** izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Roundup ve Agroform 'in I_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, pestisit konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

100mM Tris tamponu (μ l)	Pestisit	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Pestisit Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Küvetteki Pestisit Konsantrasyonu [I] (mg/ml)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite			
950	Roundup	50	50	-	-	0,06	36,8	100,0			
942				8	0,366	0,041	25,2	68,3			
940				10	0,457	0,037	22,7	61,7			
939				11	0,503	0,03	18,4	50,0			
938				12	0,549	0,029	17,8	48,3			
935				15	0,686	0,026	15,9	43,3			
930				20	0,914	0,021	12,9	35,0			
925				25	1,143	0,015	9,2	25,0			
950				Agroform	50	50	-	-	0,065	39,9	100
450							500	0,181	0,053	32,5	81
400	550	0,204	0,049				30,1	76			
350	600	0,227	0,041				25,2	64			
300	650	0,272	0,035				21,5	53			
250	700	0,317	0,030				18,4	47			
200	750	0,330	0,024				14,7	38			
150	800	0,408	0,018				11,1	27			



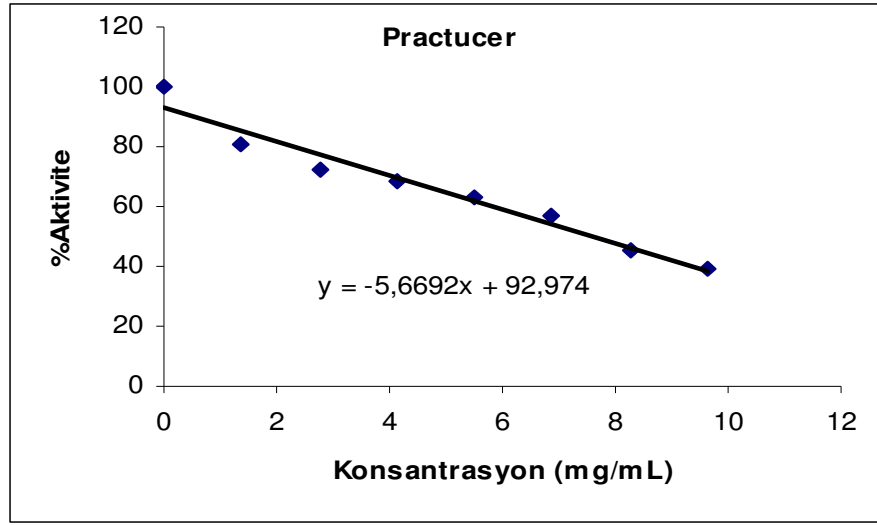
Şekil 3.20. Saflaştırılmış insan serum **PON1R** izoenzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda Roundup için % aktivite-[I] grafiği



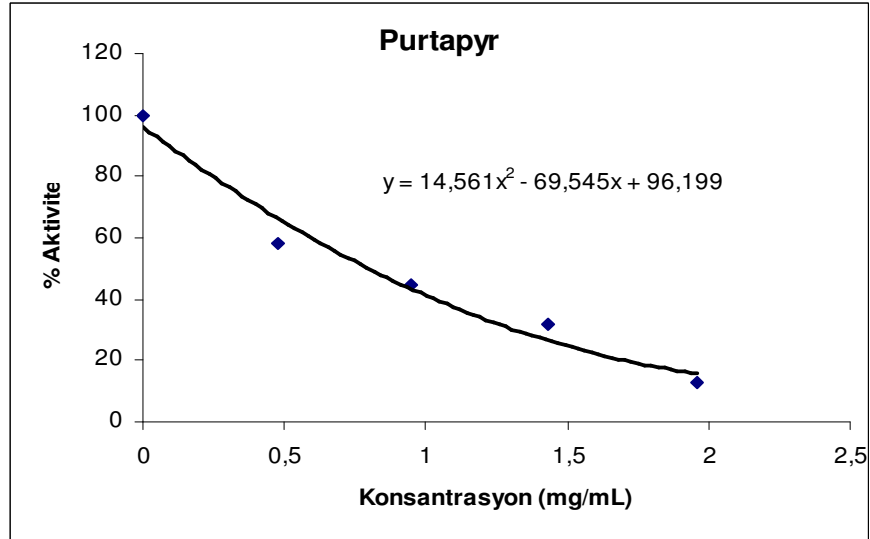
Şekil 3.21. Saflaştırılmış insan serum **PON1R** izoenzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda Agroform için % aktivite-[I] grafiği

Çizelge 3.13. Serum **PON1Q** izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Purta[®]pyr ve Practicur[®] 'in I₅₀ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, pestisit konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.

100mM Tris Tamponu (µl)	Pestisit	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Pestisit Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Küvetteki Pestisit Konsantrasyonu [I] (mg/ml)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite
950	Practicur	50	50	-	-	0.051	62.6	100
940				10	1.38	0.041	50.4	80
930				20	2.75	0.037	45.4	73
920				30	4.13	0.035	43.0	69
910				40	5.50	0.032	39.3	63
900				50	6.88	0.029	35.6	57
890				60	8.25	0.023	28.2	45
880				70	9.63	0.020	24.6	39
950				Purta [®] pyr	50	50	-	-
	20	0.48	0.044				53.4	58
880	30	0.95	0.034				41.4	45
850	40	1.43	0.024				29.4	32
825	50	1.96	0.010				11.9	13



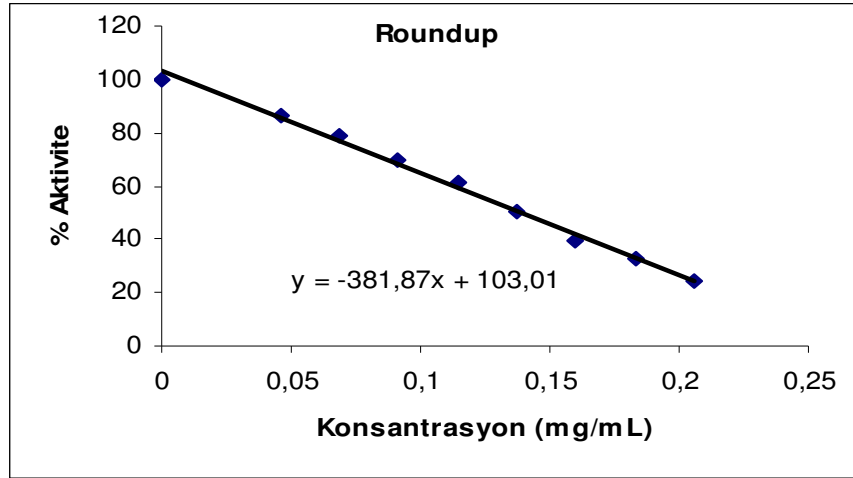
Şekil 3.22. Saflaştırılmış insan serum **PON1Q** izoenzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda Practicur için % aktivite-[I] grafiği



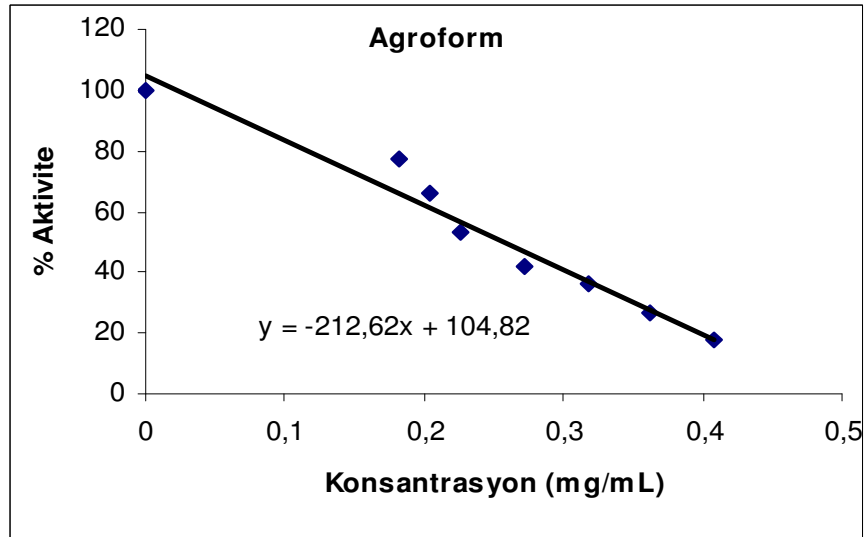
Şekil 3.23. Saflaştırılmış insan serum **PON1Q** izoenzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda Purtaapyr için % aktivite-[I] grafiği

Çizelge 3.14. Serum PON1Q izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Roundup ve Agroform 'in I₅₀ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, pestisit konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

100mM Tris Tamponu (µl)	Pestisit	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Pestisit Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Küvetteki Pestisit Konst. [I] (mg/ml)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite
950	Roundup	50	50	-	-	0.086	105.6	100
940				10	0.046	0.074	90.9	86.0
935				15	0.069	0.068	83.5	79.1
930				20	0.091	0.06	73.7	69.8
925				25	0.114	0.053	65.1	61.6
920				30	0.137	0.043	52.8	50.0
915				35	0.160	0.034	41.8	39.5
910				40	0.183	0.028	34.4	32.6
950				Agroform	50	50	-	-
910	40	0.181	0.064				78.6	77.1
905	45	0.204	0.055				67.5	66.3
900	50	0.226	0.044				54.0	53.0
890	60	0.272	0.035				42.9	42.2
880	70	0.317	0.03				36.8	36.2
870	80	0.363	0.022				27.0	26.5
860	90	0.408	0.015				18.4	18.1



Şekil 3.24. Saflaştırılmış insan serum **PON1Q** izoenzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda Roundup için % aktivite-[I] grafiği



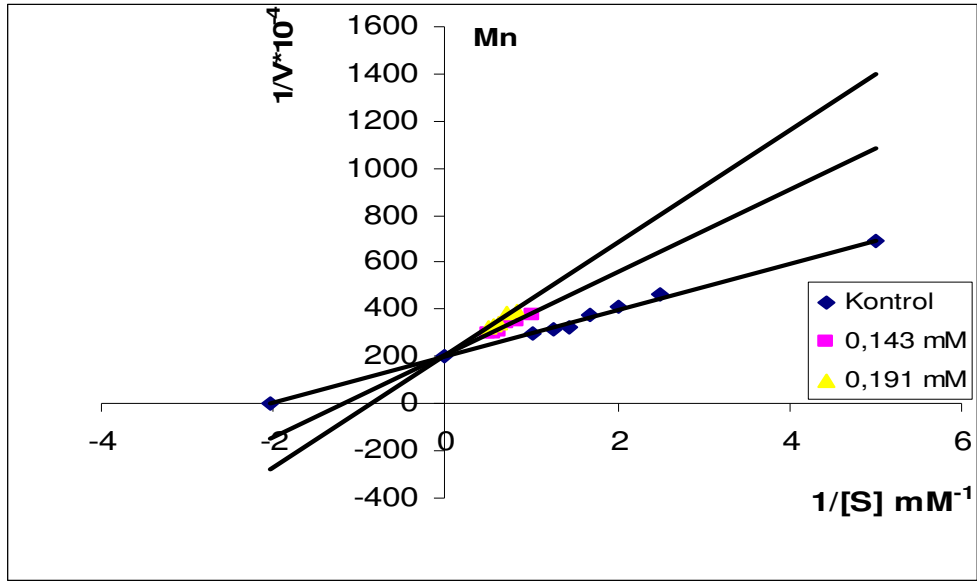
Şekil 3.25. Saflaştırılmış insan serum **PON1Q** izoenzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda Agroform için % aktivite-[I] grafiği

Çizelge 3.15. Serum **PON1R** izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Mn'nin K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, Mn konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

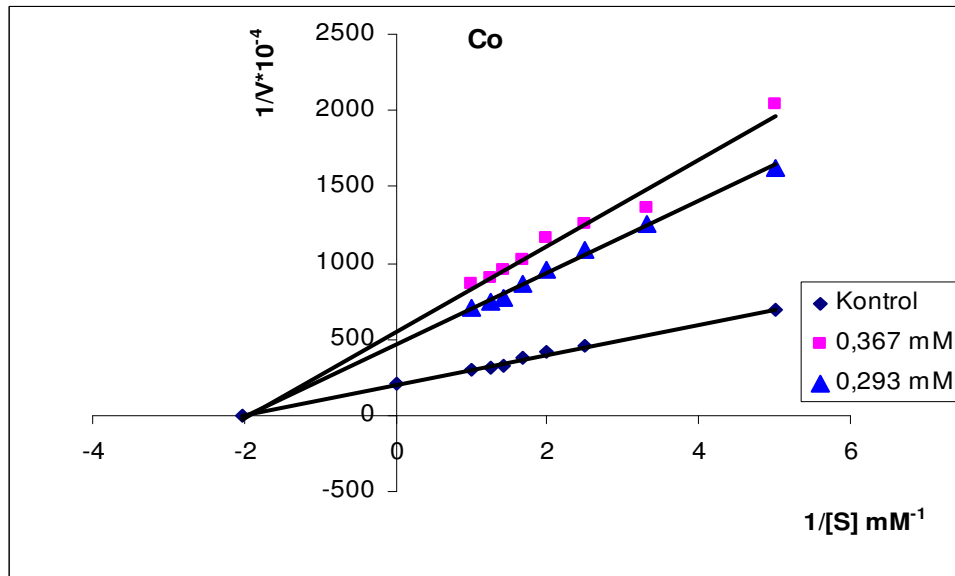
100mM Tris Tamponu (μ l)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Mn Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Küvetteki Toplam Hacim (μ l)	Küvetteki Substrat Konst. [S] (mM)	Küvetteki Mn Kons. [I] (mM)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
925	100	60	15	1050	1,2	0,191	0,041	25,2	397	0,83
915		70	15		1,4	0,191	0,042	25,8	388	0,71
905		80	15		1,6	0,191	0,047	28,9	347	0,63
895		90	15		1,8	0,191	0,049	30,1	332	0,56
885		100	15		2,0	0,191	0,05	30,7	326	0,50
930		50	20		1,0	0,143	0,043	26,4	379	1,00
920		60	20		1,2	0,143	0,046	28,2	354	0,83
910		70	20		1,4	0,143	0,047	28,9	347	0,71
900		80	20		1,6	0,143	0,053	32,5	307	0,63
890		90	20		1,8	0,143	0,054	33,2	302	0,56
880		100	20		2,0	0,143	0,055	33,8	296	0,5
870		110	20		2,2	0,143	0,058	35,6	281	0,46

Çizelge 3.16. Serum **PON1R** izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Co'in K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, Co konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

100mM Tris Tamponu (μ l)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Co Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Küvetteki Toplam Hacim (μ l)	Küvetteki Substrat Konst. [S] (mM)	Küvetteki Co Kons. [I] (mM)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
900	100	10	40	1050	0,2	0,293	0,01	6,1	1628	5,00
895		15	40		0,3	0,293	0,012	7,4	1357	3,33
890		20	40		0,4	0,293	0,015	9,2	1085	2,50
885		25	40		0,5	0,293	0,017	10,4	958	2,00
880		30	40		0,6	0,293	0,019	11,7	857	1,67
875		35	40		0,7	0,293	0,021	12,9	775	1,43
870		40	40		0,8	0,293	0,022	13,5	740	1,25
860		50	40		1	0,293	0,023	14,1	708	1,00
900		10	50		0,2	0,367	0,008	4,9	2035	5,00
895		15	50		0,3	0,367	0,012	7,4	1357	3,33
890		20	50		0,4	0,367	0,013	8,0	1252	2,50
885		25	50		0,5	0,367	0,014	8,6	1163	2,00
880		30	50		0,6	0,367	0,016	9,8	1017	1,67
875		35	50		0,7	0,367	0,017	10,4	958	1,43
870		40	50		0,8	0,367	0,018	11,1	904	1,25
860		50	50		1	0,367	0,019	11,7	857	1,00



Şekil 3.26. Saflaştırılmış insan serum PON1R izoenzimi aktivitesi üzerine Mn'in inhibisyon etkisi $[I_1]=0.143 \text{ mM}$, $[I_2]=0.191 \text{ mM}$



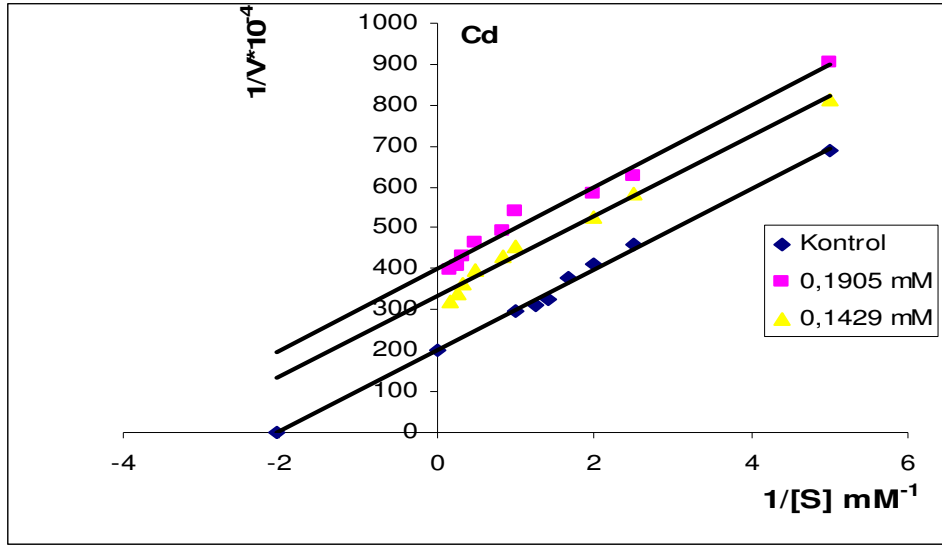
Şekil 3.27. Saflaştırılmış insan serum PON1R izoenzimi aktivitesi üzerine Co inhibisyon etkisi $[I_1]=0.293 \text{ mM}$, $[I_2]=0.367 \text{ mM}$

Çizelge 3.17. Serum PON1R izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Cd'un K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, Cd konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

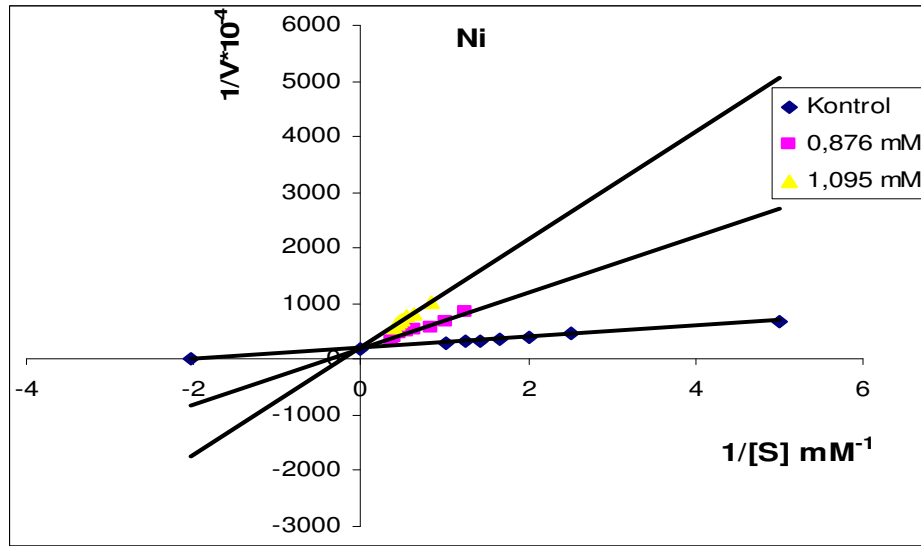
100mM Tris Tamponu (μ l)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Cd Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Küvetteki Toplam Hacim (μ l)	Küvetteki Substrat Kons. [S] (mM)	Küvetteki Cd Kons. [I] (mM)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
840	100	10	100	1050	0.2	0.1429	0.02	12.3	814	5
820		20	100		0.4	0.1429	0.028	17.2	581	2.5
815		25	100		0.5	0.1429	0.031	19.0	525	2
800		50	100		1	0.1429	0.036	22.1	452	1
790		60	100		1.2	0.1429	0.038	23.3	428	0.83
750		100	100		2	0.1429	0.041	25.2	397	0.5
700		150	100		3	0.1429	0.045	27.6	361	0.33
650		200	100		4	0.1429	0.048	29.5	339	0.25
550		300	100		6	0.1429	0.051	31.3	319	0.17
840		10	150		0.2	0.1905	0.018	11.1	904	5
820		20	150		0.4	0.1905	0.026	16.0	626	2.5
815		25	150		0.5	0.1905	0.028	17.2	581	2
800		50	150		1	0.1905	0.03	18.4	542	1
790		60	150		1.2	0.1905	0.033	20.3	493	0.83
750		100	150		2	0.1905	0.035	21.5	465	0.5
700		150	150		3	0.1905	0.038	23.3	428	0.33
650		200	150		4	0.1905	0.04	24.6	407	0.25
550		300	150		6	0.1905	0.041	25.2	397	0.17

Çizelge 3.18. Serum **PON1R** izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Ni'in K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, Ni konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

100mM Tris Tamponu (μ l)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Ni Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Küvetteki Toplam Hacim (μ l)	Küvetteki Substrat Kons. [S] (mM)	Küvetteki Ni Kons. [I] (mM)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
830	100	40	80	1050	0.8	0.876	0.019	11.7	857	1.25
820		50	80		1	0.876	0.024	14.7	679	1.00
810		60	80		1.2	0.876	0.028	17.2	582	0.83
790		80	80		1.6	0.876	0.03	18.4	543	0.63
780		90	80		1.8	0.876	0.032	19.7	508	0.56
760		110	80		2.2	0.876	0.034	20.9	479	0.46
740		130	80		2.6	0.876	0.042	25.8	387	0.39
730		140	80		2.8	0.876	0.048	29.5	339	0.36
790		60	100		1.2	1.095	0.016	9.8	1018	0.83
770		80	100		1.6	1.095	0.02	12.3	814	0.63
760		90	100		1.8	1.095	0.021	12.9	775	0.56
750		100	100		2	1.095	0.023	14.1	708	0.50
740		110	100		2.2	1.095	0.024	14.7	678	0.45
730		120	100		2.4	1.095	0.026	15.6	626	0.42
720		130	100		2.6	1.095	0.029	17.8	562	0.39



Şekil 3.28. Saflaştırılmış insan serum PON1R izoenzimi aktivitesi üzerine Cd inhibisyon etkisi $[I_1]=0,1429 \text{ mM}$, $[I_2]=0,1905 \text{ mM}$



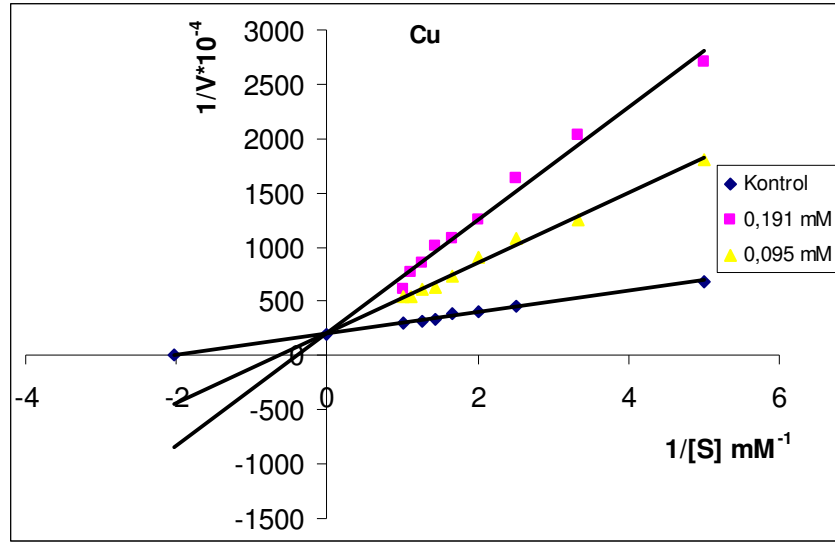
Şekil 3.29. Saflaştırılmış insan serum PON1R izoenzimi aktivitesi üzerine Ni inhibisyon etkisi $[I_1]=0,876 \text{ mM}$, $[I_2]=1,095 \text{ mM}$

Çizelge 3.19. Serum **PON1R** izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Cu'ın K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, Cu konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

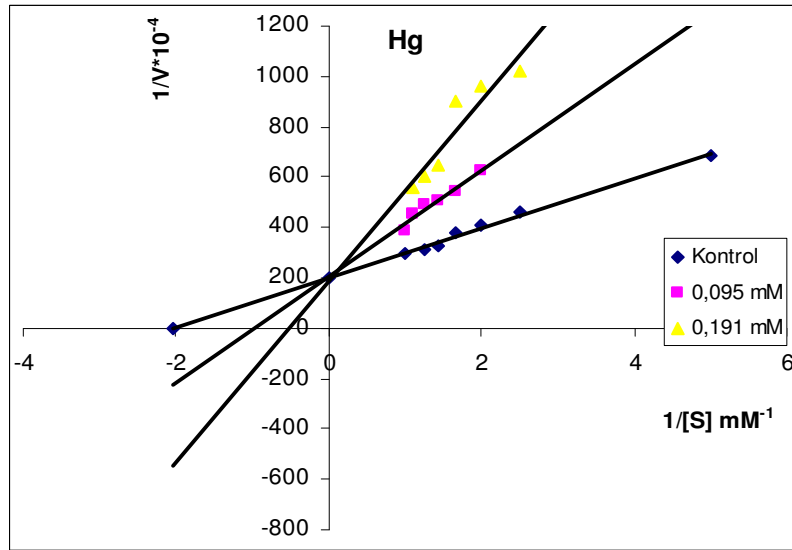
100mM Tris Tamponu (μ l)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Cu Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Küvetteki Toplam Hacim (μ l)	Küvetteki Substrat Kons. [S] (mM)	Küvetteki Cu Kons. [I] (mM)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
930	100	10	10	1050	0.2	0.095	0.006	3.7	2714	5.00
925		15	10		0.3	0.095	0.008	4.9	2035	3.33
920		20	10		0.4	0.095	0.010	6.1	1628	2.50
915		25	10		0.5	0.095	0.013	8.0	1252	2.00
910		30	10		0.6	0.095	0.015	9.2	1085	1.67
905		35	10		0.7	0.095	0.016	9.8	1017	1.43
900		40	10		0.8	0.095	0.019	11.7	857	1.25
895		45	10		0.9	0.095	0.021	12.9	775	1.11
890		50	10		1	0.095	0.027	16.6	603	1.00
930		10	20		0.2	0.191	0.009	5.5	1809	5.00
925		15	20		0.3	0.191	0.013	8.0	1252	3.33
920		20	20		0.4	0.191	0.015	9.2	1086	2.50
915		25	20		0.5	0.191	0.018	11.1	905	2.00
910		30	20		0.6	0.191	0.022	13.5	740	1.67
905		35	20		0.7	0.191	0.026	15.9	626	1.43
900		40	20		0.8	0.191	0.027	16.6	603	1.25
895		45	20		0.9	0.191	0.030	18.4	543	1.11
890		50	20		1	0.191	0.030	18.4	543	1.00

Çizelge 3.20. Serum **PON1R** izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Hg'ın K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, Hg konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

100mM Tris Tamponu (μ l)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Hg Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Küvetteki Toplam Hacim (μ l)	Küvetteki Substrat Kons. [S] (mM)	Küvetteki Hg Kons. [I] (mM)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
915	100	25	10	1050	0.5	0.095	0.026	15.9	626	2.00
910		30	10		0.6	0.095	0.03	18.4	543	1.67
905		35	10		0.7	0.095	0.032	19.6	509	1.43
900		40	10		0.8	0.095	0.033	20.3	494	1.25
895		45	10		0.9	0.095	0.036	22.1	452	1.11
890		50	10		1	0.095	0.042	25.8	387	1.00
910		20	20		0.4	0.191	0.016	9.824	1018	2.50
905		25	20		0.5	0.191	0.017	10.44	958	2.00
900		30	20		0.6	0.191	0.018	11.05	905	1.67
895		35	20		0.7	0.191	0.025	15.35	651	1.43
890		40	20		0.8	0.191	0.027	16.58	603	1.25
885		45	20		0.9	0.191	0.029	17.81	562	1.11
880		50	20		1	0.191	0.03	18.42	543	1.00



Şekil 3.30. Saflaştırılmış insan serum PON1R izoenzimi aktivitesi üzerine Cu inhibisyon etkisi $[I_1]=0.095 \text{ mM}$, $[I_2]=0.191 \text{ mM}$



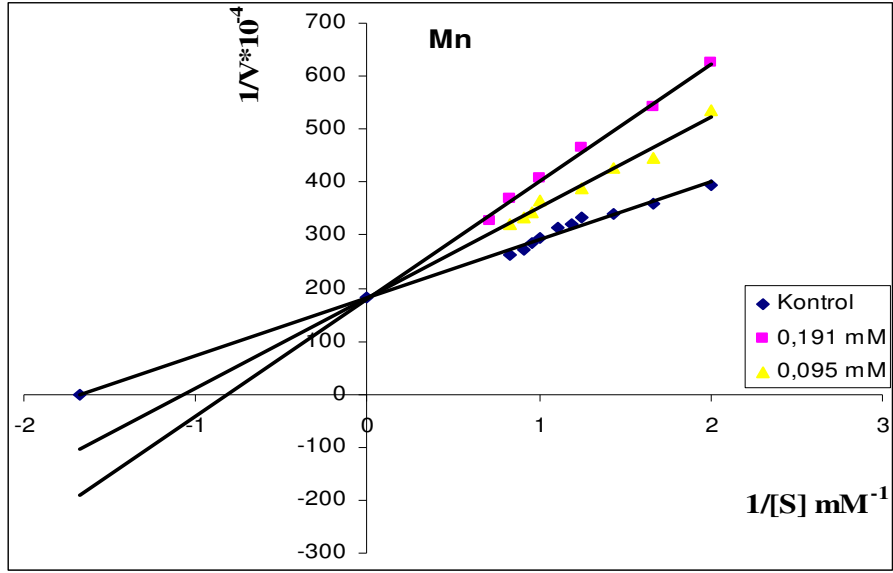
Şekil 3.31. Saflaştırılmış insan serum PON1R enzimi aktivitesi üzerine Hg inhibisyon etkisi $[I_1]=0.095 \text{ mM}$, $[I_2]=0.191 \text{ mM}$

Çizelge 3.21. Serum PON1Q izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Mn²⁺'ın K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, Mn konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

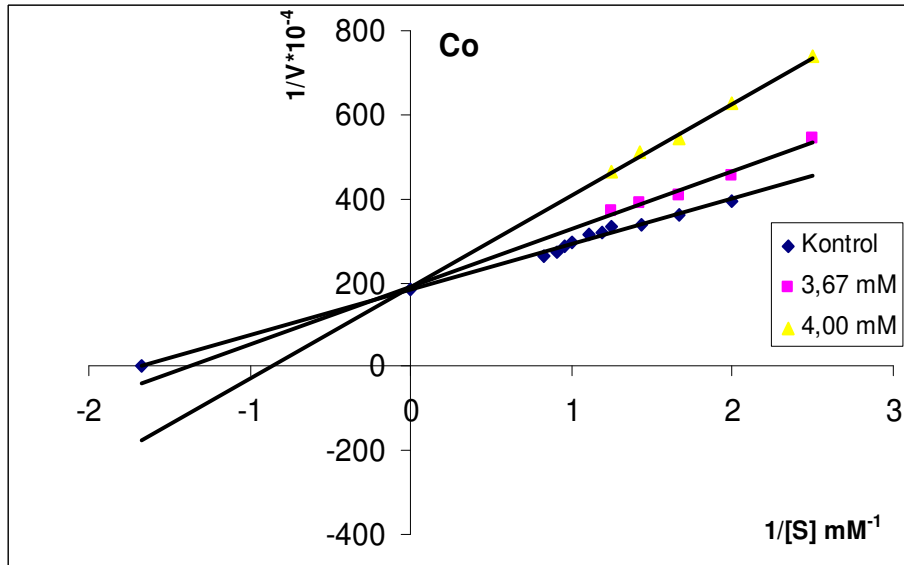
100mM Tris tamponu (µl)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Substrat çözeltilisinin hacmi (µl)	Mn Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Küvetteki Toplam Hacim (µl)	Küvetteki Substrat Kons. [S] (mM)	Küvetteki Mn Kons. [I] (mM)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	1/Vx10 ⁻⁴	1/[S]
915	100	25	10	1050	0.5	0.095	0.026	16.0	625	2
910		30	10		0.6	0.095	0.030	18.5	542	1.67
900		40	10		0.8	0.095	0.035	21.5	465	1.25
890		50	10		1	0.095	0.040	24.6	407	1
880		60	10		1.2	0.095	0.044	27.0	370	0.83
870		70	10		1.4	0.095	0.050	30.7	326	0.71
905		25	20		0.5	0.191	0.030	18.7	536	2
900		30	20		0.6	0.191	0.036	22.4	446	1.67
895		35	20		0.7	0.191	0.038	23.4	428	1.43
890		40	20		0.8	0.191	0.042	25.7	389	1.25
880		50	20		1	0.191	0.045	27.3	366	1
878		52	20		1.04	0.191	0.047	29.1	344	0.96
875		55	20		1.10	0.191	0.048	29.9	335	0.91
870		60	20		1.2	0.191	0.051	31.2	321	0.83

Çizelge 3.22. Serum **PON1Q** izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Co'ın K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, Co konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

100mM Tris tamponu (μ l)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Substrat çözeltilisinin hacmi (μ l)	Co Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Küvetteki Toplam Hacim (μ l)	Küvetteki Substrat Kons. [S] (mM)	Küvetteki Co Kons. [I] (mM)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
430	100	20	500	1050	0.4	3.67	0.030	18.4	543	2.50
425		25	500		0.5	3.67	0.036	22.1	452	2.00
420		30	500		0.6	3.67	0.040	24.6	407	1.67
415		35	500		0.7	3.67	0.042	25.8	387	1.43
410		40	500		0.8	3.67	0.044	27.0	370	1.25
430		20	600		0.4	4.00	0.022	13.5	740	2.50
425		25	600		0.5	4.00	0.026	15.9	626	2.00
420		30	600		0.6	4.00	0.030	18.4	543	1.67
415		35	600		0.7	4.00	0.032	19.6	509	1.43
410		40	600		0.8	4.00	0.035	21.5	465	1.25



Şekil 3.32. Saflaştırılmış insan serum PON1Q izoenzimi aktivitesi üzerine Mn inhibisyon etkisi $[I_1]=0.095$ mM, $[I_2]=0.191$ mM



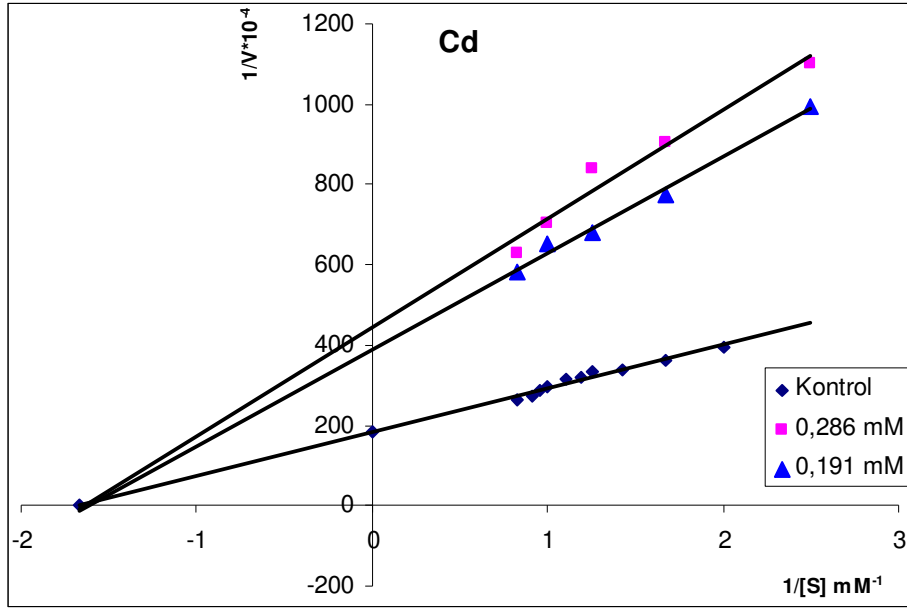
Şekil 3.33. Saflaştırılmış insan serum PON1Q izoenzimi aktivitesi üzerine Co inhibisyon etkisi $[I_1]=4,00$ mM, $[I_2]=3,67$ mM

Çizelge 3.23. Serum PON1Q izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Cd'ın K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, Cd konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

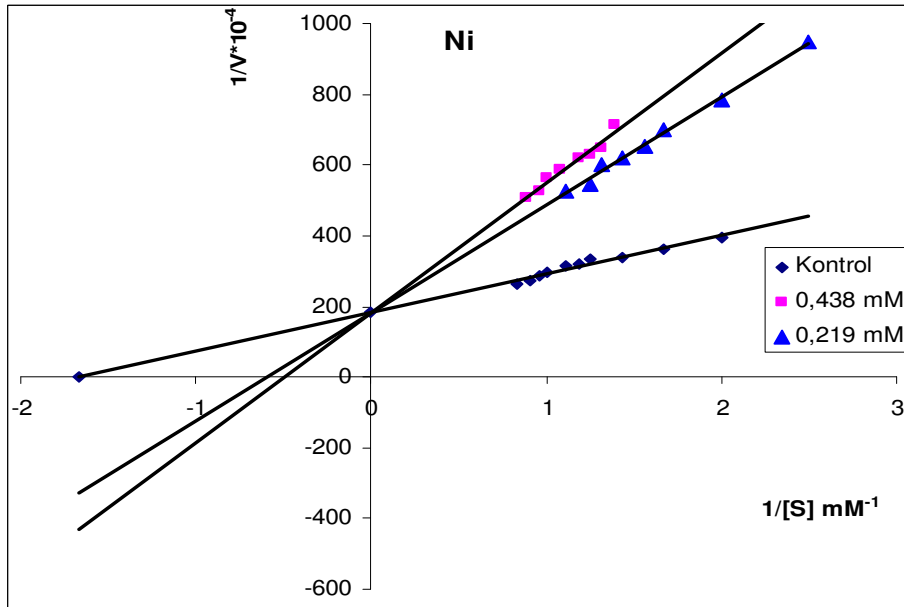
100mM Tris Tamponu (μ l)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Cd Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Küvetteki Toplam Hacim (μ l)	Küvetteki Substrat Kons. [S] (mM)	Küvetteki Cd Kons. [I] (mM)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
910	100	20	20	1050	0.4	0.191	0.015	9.1	1100	2.5
900		30	20		0.6	0.191	0.018	11.0	906	1.67
890		40	20		0.8	0.191	0.019	11.9	838	1.25
880		50	20		1.0	0.191	0.023	14.2	706	1
870		60	20		1.2	0.191	0.026	15.9	628	0.83
910		20	30		0.4	0.286	0.016	10.0	996	2.5
900		30	30		0.6	0.286	0.021	12.9	776	1.67
890		40	30		0.8	0.286	0.024	14.8	678	1.25
880		50	30		1.0	0.286	0.025	15.3	652	1
870		60	30		1.2	0.286	0.028	17.2	582	0.83

Çizelge 3.24. Serum PON1Q izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Ni²⁺'ın K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, Ni konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

100mM Tris Tamponu (µl)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Ni Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Küvetteki Toplam Hacim (µl)	Küvetteki Substrat Kons. [S] (mM)	Küvetteki Ni Kons. [I] (mM)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	1/Vx10 ⁻⁴	1/[S]
874	100	36	40	1050	0.72	0.219	0.023	14.0	712	1.39
872		38	40		0.76	0.219	0.025	15.4	650	1.32
870		40	40		0.80	0.219	0.026	15.9	630	1.25
868		42	40		0.84	0.219	0.027	16.2	618	1.19
864		46	40		0.93	0.219	0.028	17.0	589	1.08
860		50	40		1.00	0.219	0.029	17.8	562	1.00
858		52	40		1.04	0.219	0.031	19.0	525	0.96
854		56	40		1.12	0.219	0.032	19.7	509	0.89
874		36	50		0.40	0.438	0.017	10.5	949	2.50
872		38	50		0.50	0.438	0.021	12.7	782	2.00
870		40	50		0.60	0.438	0.023	14.3	698	1.67
868		42	50		0.64	0.438	0.025	15.3	654	1.56
864		46	50		0.70	0.438	0.026	16.1	621	1.43
860		50	50		0.76	0.438	0.027	16.6	603	1.32
858		52	50		0.80	0.438	0.030	18.4	543	1.25
854		56	50		0.90	0.438	0.031	19.0	526	1.11



Şekil 3.34. Safılaştırılmış insan serum PON1Q izoenzimi aktivitesi üzerine Cd inhibisyon etkisi $[I_1]=0,191$ mM, $[I_2]=0.286$ mM



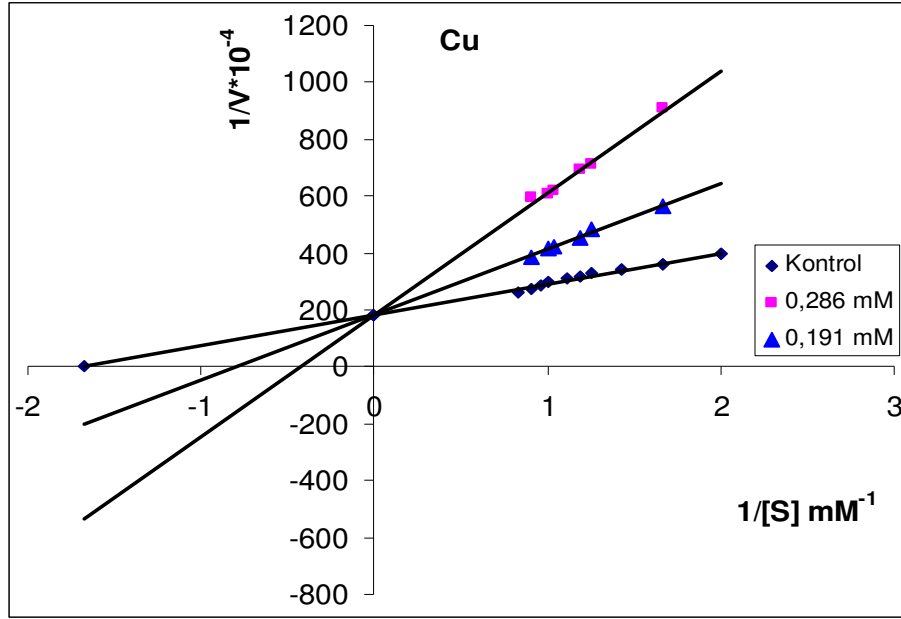
Şekil 3.35. Safılaştırılmış insan serum PON1Q izoenzimi aktivitesi üzerine Ni inhibisyon etkisi $[I_1]=0,219$ mM, $[I_2]=0.438$ mM

Çizelge 3.25. Serum **PON1Q** izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Hg'ın K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, Hg konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

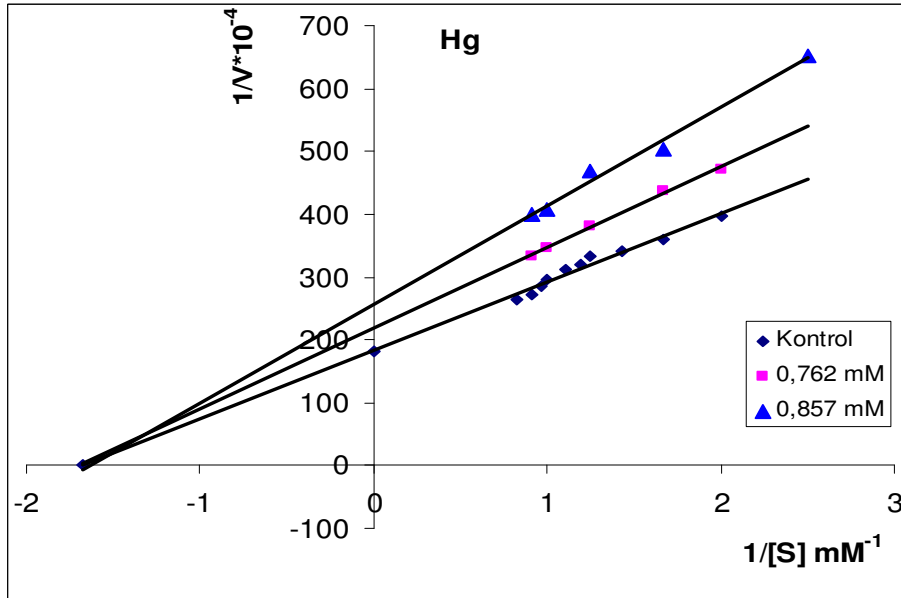
100mM Tris tamponu (μ l)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Substrat çözeltilisinin hacmi (μ l)	Hg Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Küvetteki Toplam Hacim (μ l)	Küvetteki Substrat Kons. [S] (mM)	Küvetteki Hg Kons. [I] (mM)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
915	100	25	10	1050	0.5	0.762	0.034	21.2	472	2.00
910		30	10		0.6	0.762	0.037	22.9	436	1.67
900		40	10		0.8	0.762	0.042	26.2	382	1.25
890		50	10		1.0	0.762	0.047	28.9	346	1.00
885		55	10		1.1	0.762	0.049	30.0	333	0.91
915		20	20		0.4	0.857	0.025	15.3	653	2.50
910		25	20		0.5	0.857	0.032	19.8	504	1.67
900		30	20		0.6	0.857	0.035	21.4	468	1.25
890		40	20		0.8	0.857	0.040	24.6	407	1.00
885		50	20		1.0	0.857	0.041	25.1	399	0.91

Çizelge 3.26. Serum PON1Q izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Cu'nun K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, Cu konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

100mM Tris tamponu (μ l)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Substrat çözeltilisinin hacmi (μ l)	Cu Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Küvetteki Toplam Hacim (μ l)	Küvetteki Substrat Kons. [S] (mM)	Küvetteki Cu Kons. [I] (mM)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
900	100	30	20	1050	0.60	0.191	0.018	11.0	908	1.67
890		40	20		0.80	0.191	0.023	14.1	712	1.25
882		42	20		0.84	0.191	0.024	14.5	691	1.19
876		48	20		0.96	0.191	0.026	16.1	622	1.04
874		50	20		1.00	0.191	0.027	16.5	608	1
869		55	20		1.10	0.191	0.028	16.9	593	0.91
900		30	30		0.60	0.286	0.029	17.8	563	1.67
890		40	30		0.80	0.286	0.034	20.6	486	1.25
882		42	30		0.84	0.286	0.036	22.2	451	1.19
876		48	30		0.96	0.286	0.038	23.6	424	1.04
874		50	30		1.00	0.286	0.039	23.9	418	1
869		55	30		1.10	0.286	0.043	26.1	383	0.91



Şekil 3.36. Saflaştırılmış insan serum PON1Q izoenzimi aktivitesi üzerine Cu inhibisyon etkisi $[I_1]=0,191$ mM, $[I_2]=0.286$ mM



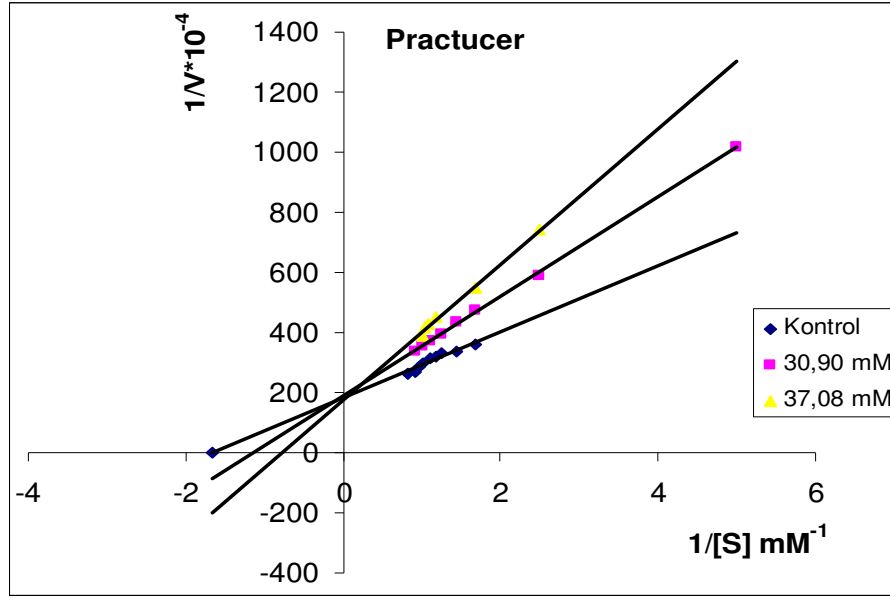
Şekil 3.37. Saflaştırılmış insan serum PON1Q izoenzimi aktivitesi üzerine Hg inhibisyon etkisi $[I_1]=0,762$ mM, $[I_2]=0.857$ mM

Çizelge 3.27. Serum **PON1Q** izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren practucer'ın K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, practucer konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

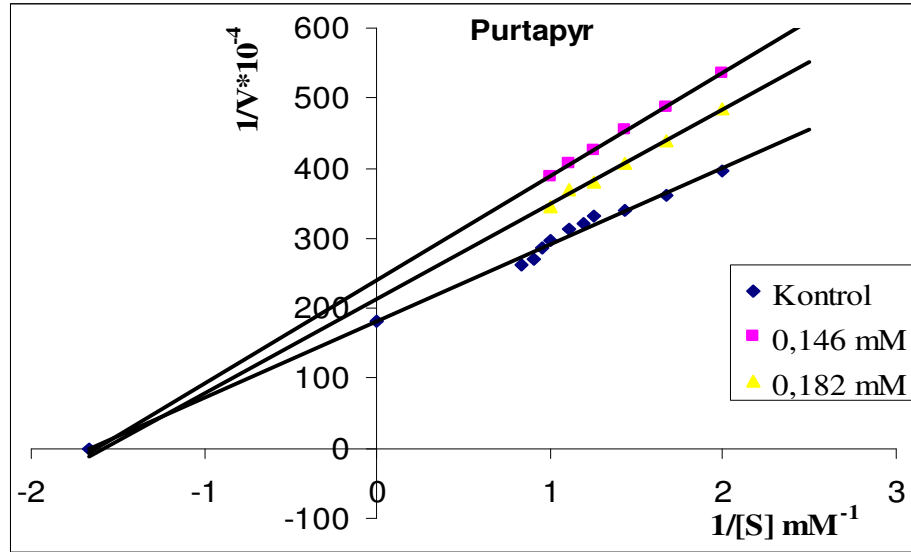
100mM Tris Tamponu (μ l)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Practucer Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Küvetteki Toplam Hacim (μ l)	Küvetteki Substrat Kons. [S] (mM)	Küvetteki Practucer Kons. [I] (mM)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
880	100	10	60	1050	0,2	30,90	0,016	9,8	1020	5
870		20	60		0,4	30,90	0,028	16,9	590	2,5
860		30	60		0,6	30,90	0,034	21,1	474	1,67
855		35	60		0,7	30,90	0,038	23,2	432	1,43
850		40	60		0,8	30,90	0,041	25,4	394	1,25
845		45	60		0,9	30,90	0,044	26,9	372	1,11
840		50	60		1	30,90	0,046	28,2	355	1
835		55	60		1,1	30,90	0,048	29,5	339	0,91
890		10	50		0,2	37,08	0,022	13,5	741	2,5
880		20	50		0,4	37,08	0,030	18,2	550	1,67
870		30	50		0,6	37,08	0,036	22,2	450	1,19
858		42	50		0,84	37,08	0,038	23,4	428	1,09
854		46	50		0,92	37,08	0,039	23,9	418	1,04
852		48	50		0,96	37,08	0,042	25,8	388	1

Çizelge 3.28. Serum PON1Q izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren purtapyr'ın K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, purtapyr konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

100mM Tris Tamponu (μ l)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Substrat çözeltilisinin hacmi (μ l)	Purtapyr Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Küvetteki Toplam Hacim (μ l)	Küvetteki Substrat Kons. [S] (mM)	Küvetteki Purtapyr Kons. [I] (mM)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
890	100	20	40	1050	0,4	0,146	0,027	16,3	612	2,5
885		25	40		0,5	0,146	0,030	18,7	536	2
880		30	40		0,6	0,146	0,033	20,5	487	1,67
875		35	40		0,7	0,146	0,036	22,0	454	1,43
870		40	40		0,8	0,146	0,038	23,5	425	1,25
865		45	40		0,9	0,146	0,040	24,6	407	1,11
860		50	40		1	0,146	0,042	25,8	388	1
875		25	50		0,5	0,182	0,034	20,7	484	2
870		30	50		0,6	0,182	0,037	22,7	440	1,67
865		35	50		0,7	0,182	0,040	24,6	407	1,43
860		40	50		0,8	0,182	0,043	26,3	380	1,25
855		45	50		0,9	0,182	0,044	27,0	370	1,11
850		50	50		1	0,182	0,047	28,9	346	1



Şekil 3.38. Saflaştırılmış insan serum PON1Q izoenzimi aktivitesi üzerine practucer inhibisyon etkisi $[I_1]=30,90 \text{ mM}$, $[I_2]=37,08 \text{ mM}$



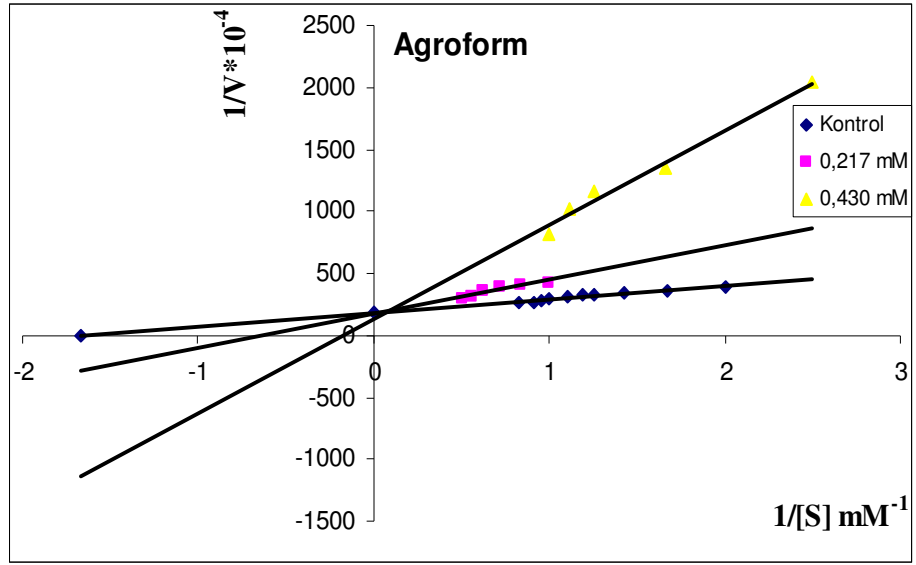
Şekil 3.39. Saflaştırılmış insan serum PON1Q izoenzimi aktivitesi üzerine pirtapyr inhibisyon etkisi $[I_1]=0,146 \text{ mM}$, $[I_2]=0,182 \text{ mM}$

Çizelge 3.29. Serum PON1Q izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren agroform'un K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, agroform konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

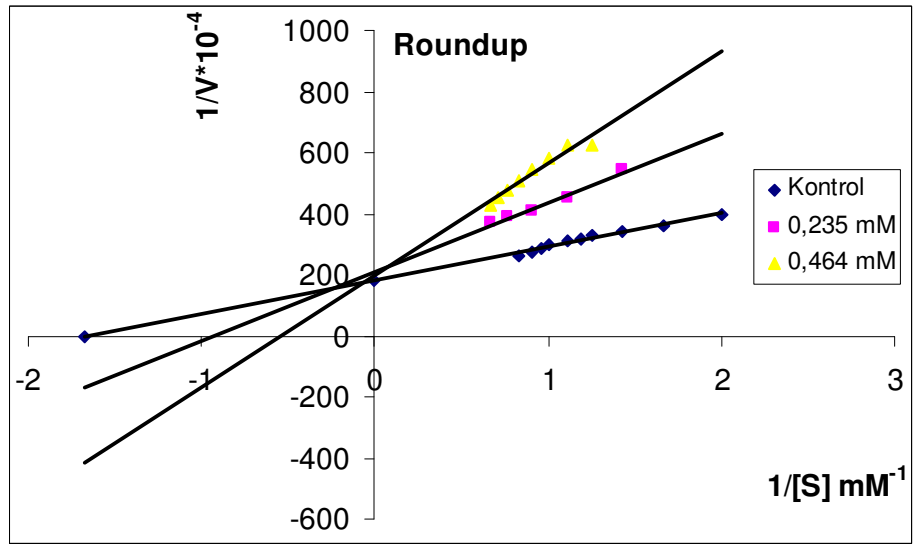
100mM Tris Tamponu (μ l)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Agroform Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Küvetteki Toplam Hacim (μ l)	Küvetteki Substrat Kons. [S] (mM)	Küvetteki Agroform Kons. [I] (mM)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
950	50	40	10	1050	0,8	0,217	0,019	23,3	428	1,00
940		50	10		1,0	0,217	0,020	24,6	407	0,83
930		60	10		1,2	0,217	0,021	25,8	387	0,71
920		70	10		1,4	0,217	0,023	28,2	354	0,63
910		80	10		1,6	0,217	0,026	31,9	313	0,56
900		90	10		1,8	0,217	0,028	34,4	290	0,50
960		20	20		0,4	0,430	0,004	4,9	2035	2,50
950		30	20		0,6	0,430	0,006	7,4	1357	1,67
940		40	20		0,8	0,430	0,007	8,6	1163	1,25
935		45	20		0,9	0,430	0,008	9,8	1017	1,11
930		50	20		1,0	0,430	0,010	12,3	814	1,00

Çizelge 3.30. Serum PON1Q izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren roundup'ın K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, roundup konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

100mM Tris Tamponu (μ l)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Roundup Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Küvetteki Toplam Hacim (μ l)	Küvetteki Substrat Kons. [S] (mM)	Küvetteki Roundup Kons. [I] (mM)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
955	50	35	10	1050	0,7	0,235	0,015	18,4	543	1,43
945		45	10		0,9	0,235	0,018	22,1	452	1,11
935		55	10		1,1	0,235	0,020	24,6	407	0,91
925		65	10		1,3	0,235	0,021	25,8	387	0,77
915		75	10		1,5	0,235	0,022	27,0	370	0,67
940		40	20		0,8	0,464	0,013	15,9	626	1,25
935		45	20		0,9	0,464	0,013	15,9	626	1,11
930		50	20		1	0,464	0,014	17,2	581	1,00
925		55	20		1,1	0,464	0,015	18,4	542	0,91
920		60	20		1,2	0,464	0,016	19,7	508	0,83
915		65	20		1,3	0,464	0,017	20,9	479	0,77
910		70	20		1,4	0,464	0,018	22,1	452	0,71
905		75	20		1,5	0,464	0,019	23,3	428	0,67



Şekil 3.40. Saflaştırılmış insan serum PON1Q izoenzimi aktivitesi üzerine agrofom inhibisyon etkisi $[I_1]=0,217 \text{ mM}$, $[I_2]=0,430 \text{ mM}$



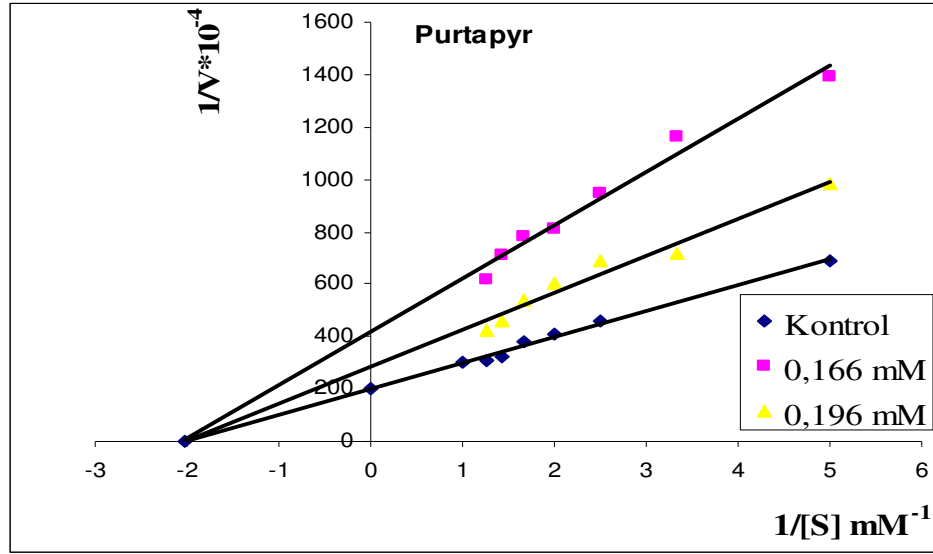
Şekil 3.41. Saflaştırılmış insan serum PON1Q izoenzimi aktivitesi üzerine roundup inhibisyon etkisi $[I_1]=0,235 \text{ mM}$, $[I_2]=0,464 \text{ mM}$

Çizelge 3.31. Serum PON1R izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren purtapyr'ın K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, purtapyr konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

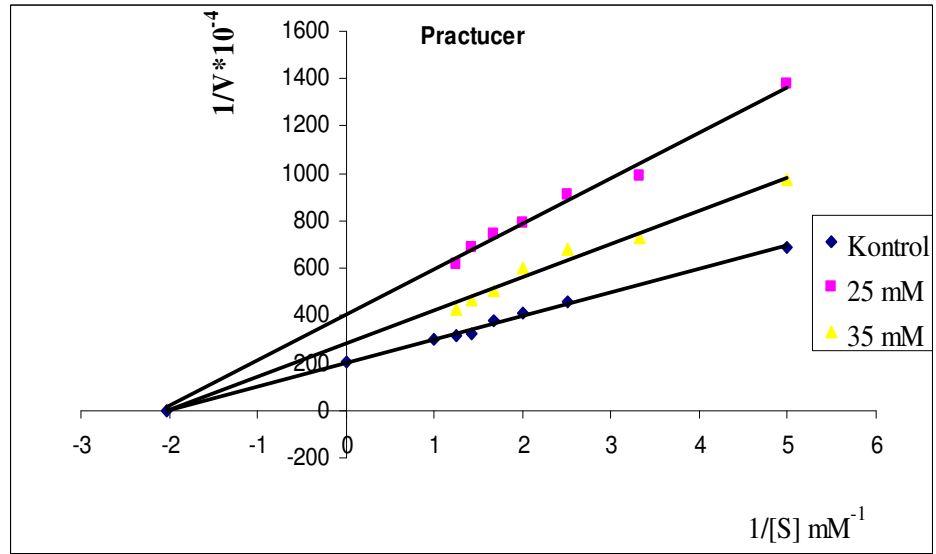
100mM Tris Tamponu (μ l)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Purtapyr Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Küvetteki Toplam Hacim (μ l)	Küvetteki Substrat Kons. [S] (mM)	Küvetteki Purtapyr Kons. [I] (mM)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
920	100	10	20	1050	0.2	0.166	0.012	7.1	1390	5
915		15	20		0.3	0.166	0.014	8.6	1160	3.33
910		20	20		0.4	0.166	0.017	10.5	950	2.5
905		25	20		0.5	0.166	0.020	12.3	810	2
900		30	20		0.6	0.166	0.021	12.8	780	1.67
895		35	20		0.7	0.166	0.023	14.0	712	1.43
890		40	20		0.8	0.166	0.026	16.1	620	1.25
920		10	30		0.2	0.196	0.016	10.2	980	5
915		15	30		0.3	0.196	0.022	13.8	720	3.33
910		20	30		0.4	0.196	0.024	14.4	690	2.5
905		25	30		0.5	0.196	0.027	16.6	602	2
900		30	30		0.6	0.196	0.030	18.5	540	1.67
895		35	30		0.7	0.196	0.035	21.7	460	1.43
890		40	30		0.8	0.196	0.039	23.7	422	1.25

Çizelge 3.32. Serum **PON1R** izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren practucer'ın K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, practucer konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

100mM Tris Tamponu (μ l)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Practucer Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Küvetteki Toplam Hacim (μ l)	Küvetteki Substrat Kons. [S] (mM)	Küvetteki Practucer Kons. [I] (mM)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
910	100	10	30	1050	0,2	25	0,011	7,2	1380	5
905		15	30		0,3	25	0,016	10,1	990	3,33
900		20	30		0,4	25	0,018	11,0	910	2,5
895		25	30		0,5	25	0,020	12,7	790	2
890		30	30		0,6	25	0,022	13,5	740	1,67
885		35	30		0,7	25	0,024	15,0	690	1,43
880		40	30		0,8	25	0,026	16,1	620	1,25
910		10	40		0,2	35	0,016	10,3	970	5
905		15	40		0,3	35	0,022	13,6	730	3,33
900		20	40		0,4	35	0,024	14,7	680	2,5
895		25	40		0,5	35	0,027	16,6	602	2
890		30	40		0,6	35	0,032	19,9	502	1,67
885		35	40		0,7	35	0,035	21,4	466	1,43
880		40	40		0,8	35	0,038	23,3	430	1,25



Şekil 3.42. Saflaştırılmış insan serum PON1R izoenzimi aktivitesi üzerine purtaapyr inhibisyon etkisi $[I_1]=0,166 \text{ mM}$, $[I_2]=0,196 \text{ mM}$



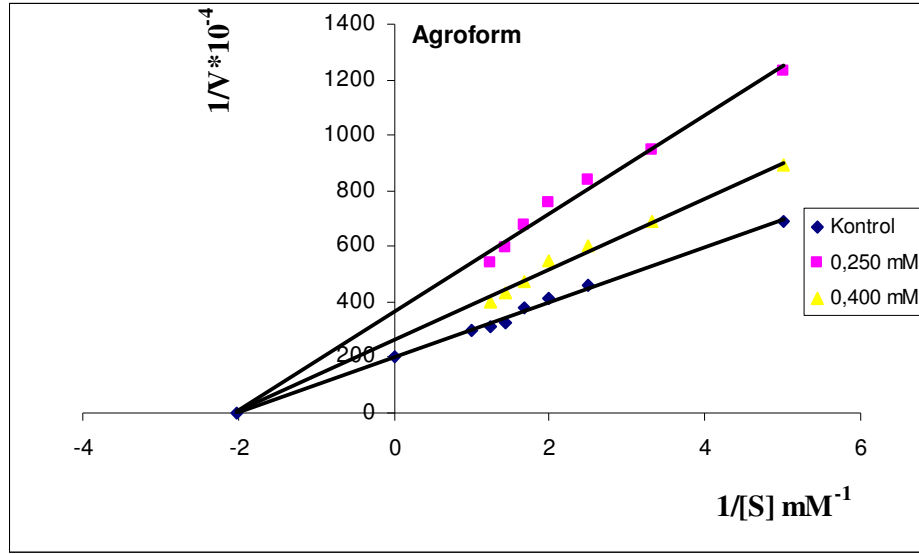
Şekil 3.43. Saflaştırılmış insan serum PON1R izoenzimi aktivitesi üzerine practucer inhibisyon etkisi $[I_1]=25 \text{ mM}$, $[I_2]=35 \text{ mM}$

Çizelge 3.33. Serum **PON1R** izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren agroform'ın K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, agroform konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

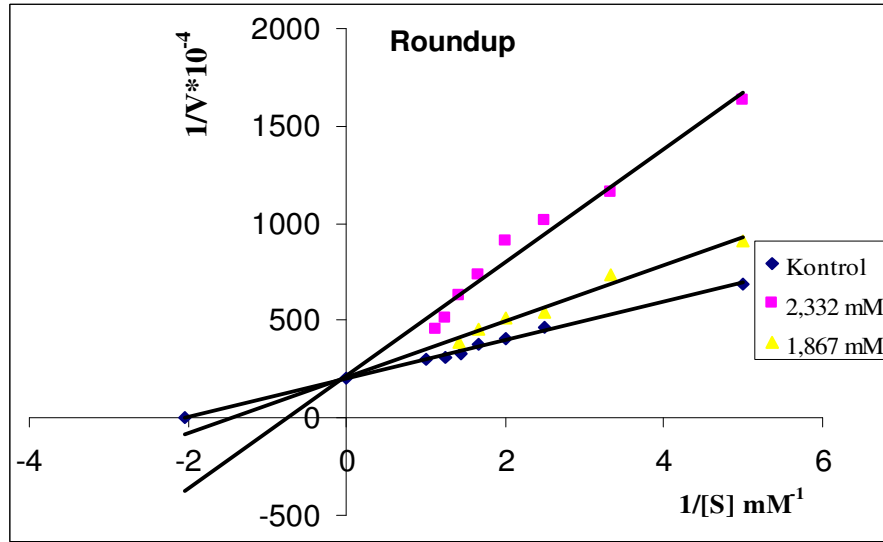
100mM Tris Tamponu (μ l)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Agroform Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Küvetteki Toplam Hacim (μ l)	Küvetteki Substrat Kons. [S] (mM)	Küvetteki Agroform Kons. [I] (mM)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
930	100	10	10	1050	0.2	0.250	0.013	8.1	1234	5
925		15	10		0.3	0.250	0.017	10.5	945	3.33
920		20	10		0.4	0.250	0.019	11.9	840	2.5
915		25	10		0.5	0.250	0.021	13.1	760	2
910		30	10		0.6	0.250	0.024	14.7	678	1.67
905		35	10		0.7	0.250	0.027	16.8	594	1.43
900		40	10		0.8	0.250	0.030	18.4	544	1.25
930		10	20		0.2	0.400	0.018	11.2	890	5
925		15	20		0.3	0.400	0.023	14.4	690	3.33
920		20	20		0.4	0.400	0.026	16.5	604	2.5
915		25	20		0.5	0.400	0.030	18.3	546	2
910		30	20		0.6	0.400	0.034	21.0	476	1.67
905		35	20		0.7	0.400	0.037	23.1	432	1.43
900		40	20		0.8	0.400	0.041	24.9	402	1.25

Çizelge 3.34. Serum **PON1R** izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren roundup'ın K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, roundup konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

100mM Tris Tamponu (μ l)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Roundup Çözeltilisinin Hacmi (μ l)	Küvetteki Toplam Hacim (μ l)	Küvetteki Substrat Kons. [S] (mM)	Küvetteki Roundup Kons. [I] (mM)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
932	100	10	8	1050	0.2	1.867	0.005	6.1	1628	5
927		15	8		0.3	1.867	0.007	8.6	1163	3.33
922		20	8		0.4	1.867	0.008	9.8	1017	2.5
917		25	8		0.5	1.867	0.009	11.1	904	2
912		30	8		0.6	1.867	0.011	13.5	740	1.67
907		35	8		0.7	1.867	0.013	16.	626	1.43
902		40	8		0.8	1.867	0.016	19.7	508	1.25
897		45	8		0.9	1.867	0.018	22.1	452	1.11
920		20	10		0.4	2.332	0.009	11.1	904	5
915		25	10		0.5	2.332	0.011	13.5	740	3.33
910		30	10		0.6	2.332	0.015	18.4	542	2.5
905		35	10		0.7	2.332	0.016	19.7	508	2
900		40	10		0.8	2.332	0.018	22.1	452	1.67
895		45	10		0.9	2.332	0.021	25.8	387	1.43



Şekil 3.44. Saflaştırılmış insan serum PON1R izoenzimi aktivitesi üzerine agrofom inhibisyon etkisi $[I_1]=0,250 \text{ mM}$, $[I_2]=0.400 \text{ mM}$



Şekil 3.45. Saflaştırılmış insan serum PON1R izoenzimi aktivitesi üzerine roundup inhibisyon etkisi $[I_1]=1,867 \text{ mM}$, $[I_2]=2,332 \text{ mM}$

Çizelge 3.35. İnsan serum PON1Q ve R izoenzimleri için 1mM paraokson substrat konsantrasyonunda %50 inhibisyona sebep olan ağır metallerin konsantrasyonları ve Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan inhibisyon tipleri ve K_i değerleri.

Fenotip	Ağır Metal	I_{50} (mM)	K_i (mM)	İnhibisyon Tipi
R	Cu	0,061	0,047±0,002	Yarışmalı
	Hg	0,106	0,075±0,011	Yarışmalı
	Ni	1,026	0,178±0,038	Yarışmalı
	Cd	0,152	0,195±0,028	Yarı Yarışmalı
	Co	0,781	0,216±0,006	Yarışmalı
	Mn	0,304	0,167±0,028	Yarışmalı
	Cu	0,310	0,135±0,036	Yarışmalı
Q	Hg	0,891	2,96±0,830	Yarışmasız
	Ni	1,144	0,155±0,032	Yarışmalı
	Cd	0,218	0,183±0,015	Yarışmasız
	Co	3,910	10,45±6,150	Yarışmalı
	Mn	0,609	0,173±0,008	Yarışmalı

Çizelge 3.36. İnsan serum PON1Q ve R izoenzimleri için 1mM paraokson substrat konsantrasyonunda %50 inhibisyona sebep olan pestisitlerin konsantrasyonları ve Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan inhibisyon tipleri ve K_i değerleri.

Fenotip	Pestisit	I₅₀ (mM)	K_i (mM)	İnhibisyon Tipi
R	Roundup	2,935	2,861±1,534	Yarışmalı
	Practucer	35,011	54,6±300	Yarışmalı
	Purtapyr	4,268	0,302±0,151	Yarışmalı
	Agroform	2,588	0,778±0,476	Yarı Yarışmalı
Q	Roundup	0,709	0,259±0,038	Yarışmalı
	Practucer	34,067	50,02±17,27	Yarışmasız
	Purtapyr	3,046	0,736±0,285	Yarışmalı
	Agroform	1,167	0,088±0,037	Yarışmasız

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Paraoksonaz, pestisit (klorpirifosoxon, diazooxon vs.) ve sinir gazı olarak kullanılan (soman, sarin vs.) organofosfat bileşiklerini hidroliz ederek detoksifikasyonda önemli rol oynar. Bu sayede hem çevresel kirlilik hem de terörist saldırılarında önemi ortaya çıkmaktadır. Ayrıca LDL'de oluşan okside olmuş doymamış yağ asitlerini de hidrolizleyebildiğinden antioksidan enzim olarak tanımlanmıştır [4, 42, 43]. PON1 Q formu yükseltgenmiş HDL ve LDL'nin metabolize edilmesinde R formundan daha etkilidir [70]. Leonid ve arkadaşları bunun sebebinin PON1'in HDL'ye 192. pozisyondan bağlanması ile ilişkili olduğunu ve Q ile R izoenzimlerinin HDL'ye farklı afinitelerde bağlandığını tespit etmişlerdir [102].

İnsan plazma PON1'i aromatik karboksilik esterleri ve laktonları da hidroliz etmektedir. Fizyolojik substratının henüz bilinmemesine rağmen Tawfik ve arkadaşları birçok laktonu diğer substratlarına göre yüksek oranda hidrolizlediği için bu enzimin fizyolojik aktivitesinin laktonaz olduğunu öne sürmüşlerdir. Son yıllarda çalışmalar lakton substratları üzerine yoğunlaşmıştır. Bunun sebebi quorum-sensing ile açıklanabilir. Bakteriler kendi aralarında iletişim kurmalarını sağlamak için çeşitli lakton yapısında olan sinyal moleküller üretmektedir. Bu molekülleri bakteriler, kendi popülasyonunu tanımak ve popülasyonundaki çoğalmayı düzenlemek için kullanır. Bu olaya quorum-sensing denilmiştir. Bu moleküllerin paraoksonaz enzimi ile hidrolizlenmesi sonucu bakterilerin çoğalmalarının önüne geçilmiş olur [103, 104]. Ancak; Q ve R izoenzimlerinin bu lakton hidrolizi ile ilgisinin olup olmadığı hakkında bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır.

PON1 192 pozisyonunda glutamin-arginin substratlarının yerdeğiştirmesi önemli substrat bağımlı polimorfizm nedenidir. PON1_{Q192} isoformu diazokson, soman ve sarin bileşiklerini in vitro ortamda daha yüksek oranda hidrolizlerken, PON1_{R192} isoformu ise paraoksan (8 kat) ve klorofirosoksan bileşiklerini daha yüksek oranda hidroliz etmektedir. PON1 genindeki bu polimorfizm, bireylerin çevresel toksite ve pestisitlere karşı duyarlılığını etkilemektedir [105, 106]. Bu yüzden Q ve R türünün bazı ağır metallere (Hg, Co, Cd, Cu, Ni ve Mn) ve pestisit olarak kullanılan bazı çevre kirleticilere (Purtapyr, Practicur, Agroform ve Roundup) etkisinin araştırılmasının önemli olduğu kanaatindeyiz.

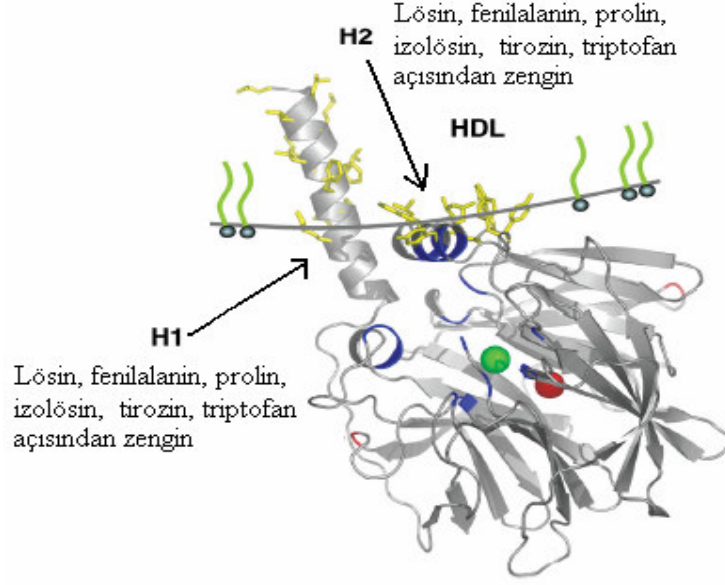
PON1 polimorfizminin organofosfatlara ve kalp hastalıklarına karşı koruma ile ilişkisini araştıran pek çok çalışma yapılmıştır. Richter R.J. ve arkadaşları yaptığı çalışmalar sonucunda bireylerin sadece Q ya da R olmalarının yanında bu enzimin plazmadaki protein seviyesinin de önemli olduğunu tespit etmişlerdir. Bu ikisine birden PON1 statüsü ismini vermişler ve bireyin PON1 statüsüne bakılarak karar verilmesinin daha doğu olduğunu bildirmişlerdir [107]. Çünkü yapılan bir çok çalışmada bir popülasyonda PON1 aktivitesinin kişiler arasında 40 kata kadar ve PON1 protein seviyesinin de 13 kata kadar değiştiği tespit edilmiştir [62, 65, 106, 108].

Bu çalışmada, detoksifikasyon ve antioksidan aktivitesi ile metabolizmada önemli fizyolojik fonksiyona sahip PON1 enziminin hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılması için yeni bir jel sentezlenmiştir. Sepharose-4B-L-tirozin-9-aminofenantren kimyasal yapısına sahip bu jel kullanılarak insan serumundan PON1_Q ve R izoenzimleri saflaştırılmış, kinetik ve elektroforetik özellikleri incelenmiştir.

PON1 enziminin hidrofobik karakteri bu tekniğin seçilmesinde en önemli sebeplerden birisi olmuştur. Söz konusu enzim, N terminal bölgesinde bulunan H1 ve H2 heliks yapısı olarak isimlendirilen hidrofobik yapılar ile HDL'ye bağlanmaktadır (Şekil 4.1) [37, 39, 108]. N-terminal bölgesini lösin, fenil alanin, prolin, isolösin, tirozin, triptofan ve valin gibi aminoasitleri ihtiva eden 7-18 residüler arası H1 hidrofobik ucu, 185-202 residüler arası da H2 hidrofobik ucu oluşturmaktadır. Ayrıca PON1'in hidrofobik yüzeyi ile HDL arasında triptofan, tirozin ve lizin aminoasitlerince zengin aromatik ve kısmen hidrofilik bölge bulunmaktadır [39, 109].

Hidrofobik etkileşim kromatografisinde kullanılan jel, ardışık üç basamakta sentezlenmiştir. Önce matriks olarak seçilen Sepharose-4B, CNBr ile aktifleştirildi ve buna uzantı kolu olarak L-tirozin bağlandıktan sonra, diazolanmış 9-aminofenantren bileşiği katıldı. Sepharose-4B'nin matriks olarak seçilmesinin başlıca sebebi çok iyi akış özelliğine sahip olması ve ayrıca serbest -OH grupları taşıdığından, CNBr ile çok kısa bir süre içerisinde aktifleştirilebilmesidir. Bu amaçla literatürde karbodiimid bileşiklerinin de kullanıldığı bildirilmektedir [110]. Karbodiimid ile aktifleştirilmiş matrikse primer amin grubunun bağlanması ile amid bağı oluşmaktadır. Bu bağ kromatografi işlemlerinde dayanıklıdır. Fakat aktifleştirilme sırasında jel, pH 4,5'da 24 saat süre ile karıştırılmaktadır. Bu işlem kromatografi sırasında jelin akış özelliklerini olumsuz yönde etkilemektedir [110]. Bir başka aktifleştirme işleminde epoksi bileşiklerinden yararlanılmıştır [111]. Kromatografi işlemlerinde gayet dayanıklı olan bu yapılar, 16 saat aktifleştirme ve 16 saat ligand bağlama süresi olmak üzere toplam 32 saatte gerçekleşmektedir. pH'nın 10 civarında olması, jelin kimyasal yapısını etkilememesine rağmen uzun süre karıştırma işlemleri, polisakkarit partiküllerinin fiziksel yapısının deformasyonuna sebep olabilir. Sonuç olarak, hazırlanacak hidrofobik jelin akış

özellikleri olumsuz yönde etkilenecektir. Çalışmamızda kullanılan CNBr ile aktifleştirme işlemi sadece 5 dakikada gerçekleştirilmektedir. Böylece jelin fiziksel yapısındaki deformasyon sakıncaları ortadan kaldırılmıştır.



Şekil. 4.1. PON1 enziminin HDL yüzeyine bağlanma modeli [39]

Araştırmamızda matriks olarak seçilen Sepharose-4B'ye hidrofofik ligand (9-Aminofenantren) L-tirozin bileşiği aracılığı ile immobilize edilmiştir. Burada L-tirozin uzantı kolu olarak da görev yapmaktadır. Uzantı kolunun hidrofofik etkileşim kromatografisindeki önemi afinite kromatografisinde olduğu gibi [112] açıkça belirtilmemesine rağmen, hidrofofik etkileşimde de L-tirozin bileşiğinin önemli olduğu kanaatindeyiz. Ayrıca ligantın matrikse bağlanmasında da son derece uygun bir adaptör molekül olduğu L-tirozinin bir başka kullanım sebebidir.

Bu kromatografinin temel prensibi, yüksek tuz konsantrasyonunda saflaştırılacak biyomolekülde bulunan hidrofobik yüzey ile apolar ligand arasındaki hidrofobik etkileşmedir. Bu etkileşmenin gerekçesi artan entropi ile açıklanmaktadır. Kullanılacak ligandın hidrofobik karakteri kritik bir öneme sahiptir. Düşük hidrofobik karaktere sahip ligandlar kullanıldığı zaman ayrılacak moleküllerin kolanda etkileşimini sağlayabilmek için yüksek tuz konsantrasyonu uygulama zorunluluğu vardır. Bu durumda proteinlerin kendi aralarında hidrofobik etkileşim riski daha fazladır. Yüksek hidrofobik karaktere sahip ligand tercih edildiği durumda ise saflaştırılacak molekül ile ligand arasındaki etkileşim artacağı için elüsyon sırasında problemler ortaya çıkabilir. Genellikle ticari olarak bulunan hidrofobik etkileşim kromatografi jellerinde hidrofobik uç olarak düz zincirli alkil ligandları ve aril ligandları gibi moleküller kullanılmaktadır. Bunlardan isopropil, butil, oktil ve fenil bileşikler en çok tercih edilen ligandlardır. En popüler hidrofobik etkileşim jelinin fenil-sepharose olduğu literatürde görülmektedir [112]. Düz zincirli alkil ligandları saf hidrofobik karakter gösterirken, aril ligandlarında hem hidrofobik hem de aromatik etkileşimler gözlenir. Bu amaçla çalışmamızda ligand olarak 9-aminofenantren bileşiği kullanılmıştır. PON1 enziminin H1 ve H2 bölgelerinde fenil alanin, tirozin, triptofan gibi aromatik rezidülerin bulunması tarafımızdan seçilen ligandın söz konusu bölgelerle hem hidrofobik hem de aromatik etkileşim yapacağı göz önüne alınarak, oldukça uygun bileşik olduğu kanaatindeyiz. Ayrıca yapılan bir çalışmada hidrofobik karaktere sahip Sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin bileşiği kullanılmış ve 227 kat saflaştırma elde edilmiştir [100]. Bu çalışmada ligand olarak kullanılan 1-naftilamin bileşiğinin hidrofobik karakteri bizim çalışmamızda kullandığımız 9-aminofenantren bileşiğinden daha zayıftır. Bu sebeple bizim saflaştırma oranımız daha fazla bulunmuştur.

Hidrofobik etkileşim kromatografisinde kullanılan tuzun tipi ve konsantrasyonu da oldukça önemlidir. Bu kromatografide yaygın olarak kullanılan tuzlar Na_2SO_4 , K_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl , NH_4Cl , NaBr , NaSCN olmasına rağmen amonyum sülfat en çok tercih edilendir [113].

Araştırmamızda PON1Q ve R izoenzimlerini insan serumundan saflaştırmak için hidrofobik etkileşim kromatografisi uygulanmadan önce bu kromatografi prosedürüne uygun ön saflaştırma yöntemi olarak amonyum sülfat çöktürmesi yapılmıştır. Amonyum sülfat çöktürme aralığı %60-80 olarak literatürdeki gibi gerçekleştirilmiştir [100].

Bu yöntemle insan serumundan PON1Q izoenzimi 453 kat, R izoenzimi ise 901 kat saflaştırılmıştır. Furlong ve arkadaşları 4 basamaktan oluşan agarose blue, sephadex G-200, DEAE Trisakril M ve Sephadex G-75 yöntemlerini kullanarak tarafımızdan gözlenen saflaştırma katsayısından daha düşük bir değer (62,1) elde etmişlerdir [87]. Ancak bir başka çalışmada sadece üç basamaktan oluşan blue agaroz, DEAE I ve DEAE II yöntemlerini kullanarak Q izoenzimi için 580 ve R izoenzimi için yaklaşık 563 kat saflaştırma derecesine ulaşmışlardır. Bu çalışmada da üç basamakta PON1 enziminin Q ve R polimorfik formları ayrı ayrı saflaştırılmıştır [16]. Yapılan bu çalışmalarda proteinlerin üzerindeki iyonik gruplardan faydalanılarak iyon değişim kromatografisi kullanılmıştır. Bizim çalışmamızda ise enzimin hidrofobik karakterinden dolayı hidrofobik etkileşim kromatografisi tercih edilmiştir.

Ayrıca PON1 enzimi sıçan karaciğer ve serumundan saflaştırılmıştır [87]. Enzimin serumdan ve karaciğerden saflaştırma basamaklarında kısmen farklılık bulunmaktadır. Serumdan HDL' ye bağlı olan PON1'in izolasyonunda, Cibacron

blue 3GA ve daha sonra değişik DEAE bio gel, DEAE Sepharose CL-6B, DEAE-selüloz, Sephadex G-75, DEAE Trisakril M gibi kromatografi yöntemleri kullanılmıştır [16, 87]. Bir başka çalışmada ise insan serum paraoksonazı sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin bileşiği kullanılarak 227 kat saflaştırılmıştır [100].

Araştırmamızda saflaştırılan enzim için SDS-PAGE uygulanmıştır. Molekül ağırlığı yaklaşık 43 kDa olarak tahmin edilen PON1Q ve R izoenzimleri tek bant olarak SDS-PAGE jelinde gözlenmiştir. Bu değer literatürle uygunluk göstermektedir. PON1'in minimum molekül ağırlığını Gan ve arkadaşları 43 kDa olarak belirlemişlerdir [16]. Çünkü enzimin yapısında, toplam molekül ağırlığının %15.8'i kadar karbohidrat molekülü bulunmaktadır. Molekül ağırlığı taşıdığı karbohidrat zincirinin varlığına bağlı olarak değişmektedir [87]. İhtiva ettiği bu karbohidrat zinciri enzimin hidrolizleme reaksiyonu için gerekli değildir. Söz konusu molekülün PON1'in çözünürlüğünü ve kararlılığını arttırmada ve zar yapısına bağlanmada görevi olduğu düşünülmektedir [23]. Karbonhidrat içermeyen PON1 enziminin molekül ağırlığı 37 kDa'dur [87]. Ayrıca PON1 serumda HDL'ye bağlı olduğu bölgelerin yakınında bulunan proteinler (Apo A1) ile bir arada da saflaştırılabilmektedir. Bu durumda molekül ağırlığı 47-54 kDa olduğu rapor edilmiştir [114]. PON1 enziminin molekül ağırlığı türden türe değişmemekte ve insan PON1 enziminin molekül ağırlığı ile tavşan, sıçan ve koyunun PON1 enziminin molekül ağırlığı benzerlik göstermektedir [87, 115].

Sepharose-4B-L-tirozin-9-aminofenantren yapılı jel kullanılarak saflaştırılan insan serum paraoksonaz Q ve R izoenziminin kinetik sabitleri (K_M ve V_{max}) optimum pH ve sıcaklıkta [116] paraokson substratı kullanılarak belirlenmiştir. Lineweaver-Burk grafiklerinden elde edilen K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla Q

izoenzimi için 0.599 mM ve 55 U/mL, R izoenzimi için ise 0.492 mM ve 50 U/mL olarak bulunmuştur. Literatürde farklı kaynaklardan elde edilen PON1Q ve R izoenzimlerinin paraokson substratı için farklı K_M ve V_{max} değerleri bildirilmektedir. Eckerson, H. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada insan serum PON1 R izoenziminin paraokson substratının K_M değeri 0,46 mM ve Q için 0,43 mM olarak verilmiştir [72]. Bir başka çalışmada R için K_M değeri 0.271 mM ve Q için 0.503 mM bulunmuştur [16]. PON1 için sıçanlarda K_M değeri 1,690 mM ve 7,5 mM arasında değişmektedir [117]. İnsan serum PON1 enziminin paraokson substratına karşı V_{max} değeri olarak 47,64 EU [118], PON1Q için 62.4 EU [37] olarak verilmiştir.

Çalışmamızda seçtiğimiz ağır metallerin ve bazı pestisitlerin insan serumundan saflaştırılan PON1Q ve R izoenzimleri üzerindeki *in vitro* etkisi araştırılmıştır. İnhibisyona neden olan metal ve pestisitlerin inhibisyon etkisi K_i ve I_{50} olmak üzere iki farklı değerle verilebilir. En uygun parametre K_i sabitleridir. Çünkü Materyal ve Yöntem’de belirtildiği gibi K_i sabitinin belirlenmesi için en az iki sabit inhibitör konsantrasyonunda çalışmalar yapılmakta ve her bir sabit inhibitör konsantrasyonunda beş farklı substrat konsantrasyonu için hız değerleri belirlenmektedir. Bunun sonucu olarak çok hassas sonuçlar elde edilmektedir [119]. Ayrıca bu yöntemle inhibisyon mekanizması saptanmaktadır. Fakat bazı araştırmacıların inhibisyon etkisini tespit etmek için I_{50} değerini de kullandıkları bilinmektedir. Bu amaçla substrat konsantrasyonları sabit tutularak, değişik inhibitör konsantrasyonlarında, yüzde aktivite belirlenmekte ve daha sonra grafik yolu ile % 50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonu hesaplanmaktadır. Bu yöntem, K_i sabitinin tespit edilmesine göre daha az hassas olmasına rağmen, uygulaması daha kolay olduğu için pratikte kullanılmaktadır. Yukarıdaki sebepler

göz önüne alınarak hem K_i hem de I_{50} değerleri insan serumundan saflaştırılan PON1Q ve R izoenzimleri için tespit edilmiştir.

Farklı metal ve pestisitlerin I_{50} değerlerini bulmak için optimum şartlarda paraokson substratının 1 mM sabit konsantrasyonunda çalışıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.6-3.25 ve çizelge 3.5-3.14'de verildi.

Uygulanan metaller içinde, 0,218 mM gibi çok düşük konsantrasyonda aktiviteyi % 50 azaltması ile Cd Q tipi için, Cu da 0,061 mM ile R tipi için en kuvvetli inhibitör olarak tespit edilmiştir. Literatürde bu ağır metallerin paraokson substratı kullanılarak Q ve R tipi için inhibisyon değerleri şimdiye kadar tespit edilmemiştir. Ancak fenil asetat substratı kullanılarak Q tipi için inhibisyon değerleri tespit edilmiş olup Cu en kuvvetli inhibitör olarak bulunmuştur [120]. Bu çalışmamızda Q tipinin R tipine göre kullanılan ağır metallere karşı daha dirençli olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 3.35).

Ağır metallere Ni'in *in vitro* enzim aktivitesi üzerinde diğerleri ile karşılaştırıldığında yüksek konsantrasyonda (Q tipi için; 1,144 mM ve R tipi için 1,026 mM) ancak % 50 inhibisyona neden olduğu bulunmuştur.

Çalışmamızda adı geçen pestisitlerin Q ve R izoenzimler üzerine etkileri ile ilgili çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Ancak bu pestisitlerin glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi üzerine etkileri araştırılmış ve (2,4-Diklorofenoksiasetik asit dimetilamin)'in en güçlü inhibitör olduğu tespit edilmiştir [97].

Kullanılan metallerin ve pestisitlerin inhibisyon mekanizmasını belirlemek amacıyla sabit inhibitör ve farklı substrat konsantrasyonunda PON1Q ve R izoenzim

aktiviteleri saptanmıştır. Lineweaver Burk grafiklerinden yararlanılarak inhibisyon mekanizmaları ve K_i değerleri bulunmuştur. İnhibisyon etkisi gösteren metallere Q tipi için Cu, Hg, Ni, Co ve Mn yarışmalı türü inhibisyon gösterirken Cd ise yarışmasız türü inhibisyon etkisi gösterdiği bulunmuştur. R tipi için ise Cu, Hg, Ni, Co ve Mn yarışmalı türü inhibisyon gösterirken Cd ise yarıyarışmalı türü inhibisyon etkisi gösterdiği bulunmuştur.

Yapılan pek çok çalışmada çeşitli maddelerin serum veya karaciğer PON1 enziminin inhibisyonuna neden olduğu bulunmuştur [118, 120, 121, 122]. Örneğin insan karaciğerinden saflaştırılan PON1 enzimi üzerinde EDTA bileşiğinin, Mg^{+2} , Co^{+2} , Ba^{-2} , La^{+3} , Zn^{+2} , Cu^{+2} , Hg^{+2} gibi metallere ve p-hidroksisüva benzoatın inhibisyon etkisi araştırılmıştır. EDTA, baryum, lantan, bakır ve p-hidroksisüva benzoat bileşiğinin yarışmalı bir inhibisyona neden olduğu ve çinkonun ise yarışmasız bir inhibisyon gösterdiği bildirilmektedir [123].

A. Pla ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada rat karaciğerinden saflaştırılmış PON1 ve PON3 üzerinde bazı metal iyonlarının inhibisyon etkisi incelenmiştir. Yapılan bu çalışmada Co, Cu, Mn, ve Hg'nin inhibisyon tipleri tespit edilmiş olup PON1 için Hg'nin PON3 için Cu'nun en kuvvetli inhibitör olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu inhibitörlere karşı duyarlılık açısından PON1 ve PON3'ün kantitatif ve kalitatif farklar gösterdiği bulunmuştur. Saflaştırılan PON1 için, inhibisyon gücü kuvvetliden zayıfa doğru sıralandığında $Hg^{2+} > Co^{2+} > Mn^{2+} > Cu^{2+}$ olarak hesaplanmıştır [124].

Bir başka çalışmada Hg, Cu ve Ni tuzlarının düşük konsantrasyonda PON1 aktivitesini inhibe etmesini, katalitik merkezdeki bir tiol grubu ile etkileşme sonucu olduğunu öne sürmüşlerdir [125].

Sonuç olarak yapılan çalışmalarda aşağıdaki bulgular elde edilmiştir;

- ✓ İnsan serum PON1 Q ve R izoenzimlerini saflaştırmak için Sepharose 4B-L-tirozin-9-aminofenantren kimyasal yapısına sahip yeni bir hidrofobik etkileşim kromatografisi jeli sentezlenmiştir.
- ✓ Sepharose-4B-L-tirozin-9-aminofenantren yapısına sahip hidrofobik jel kullanılarak insan serumundan PON1Q ve R izoenzimleri yüksek oranda saflaştırılmıştır.
- ✓ Amonyum sülfat çöktürmesi ve hidrofobik etkileşim kromatografisi yöntemi ile saflaştırılan insan serum PON1Q ve R izoenzimlerinin SDS-PAGE elektroforezinde yaklaşık 43 kDa molekül ağırlığında tek bant elde edilmiştir.
- ✓ Yaygın olarak kullanılan çevre kirleticilerden Hg, Cd, Co, Cu, Ni ve **Practicur** (Propil-3-(dimetilamino) propilkarbomat hidroklorit), **Purtapyr** ((RS)-5-etil-2-(4-izopropil-4-metil-5-okzo-2-imidazolin-2-yl) nikotinik asit), **Roundup** (N-(Fosfonometil) glisin) ve **Agroform** (2,4-Diklorofenoksiasetik asit dimetilamin) serum PON1Q ve PON1R izoenzim aktivitelerini *in vitro* olarak farklı düzeylerde etkilediği saptanmıştır.
- ✓ Hg, Co, Cd, Cu, Ni ve Mn ağır metallerinin ve 4 pestisitinin (**Purtapyr**, **Practicur**, **Agroform** ve **Roundup**) sepharose-4B-L-tirozin-9-aminofenantren yapısına sahip hidrofobik jel ile saflaştırılan serum PON1Q ve R izoenzim aktiviteleri üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu bileşiklerin hepsinin farklı derecede inhibisyon etkisi gösterdiği saptanmıştır.

- ✓ İnhibisyona sebep olan metaller ve pestisitlerin inhibisyon mekanizmaları saptanmıştır.

KAYNAKLAR

1. E. Azarsız, E.Y.S., "Paraoksonaz ve Klinik Önemi". *Türk Biyokimya Dergisi*, 25 (3), (2000), 109-119
2. P.N. Durrington, B.M., M.I. Mackness, "Paraoxonase and Atherosclerosis". *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 21, (2001), 473-480
3. Carey J. Ng, D.M.S., Susan Y. Hama, Natividad Villa, Mohamad Navab, Srinivasa T. Reddy, "The Paraoxonase Gene Family and Atherosclerosis". *Free Radical Biology & Medicine*, 38, (2005), 153– 163
4. Michael I. Mackness, B.M., Paul N. Durrington, "Paraoxonase and coronary heart disease". *Atherosclerosis Supplements*, 3, (2000), 49-55
5. M. Ferit Gürsu, M.Ö., Funda Gülcü, "Koroner Kalp Hastaları İle Etiyolojik Risk Faktörlerini Taşıyan Bireylerde Paraoksonaz Aktiviteleri ve Fenotiplerinin Araştırılması". *F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi*, 17(4) (2003) 237-244.
6. Uriel, A., "Characterisation des cholinesterases et d'autres esterases carboxylique apres electrophorese et immunoelectrophorese en gelose, I; applications a l'etude des esterases du serum humain normal". *Am Insit Pasteur*, (1961), 101-104
7. Michael I. Mackness, B., Paul N. Durrington, Philip W. Connelly and Robert A. Hegele, "Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins". *Current Opinion in Lipidology*, 7, (1996), 69-76
8. Erdem, M.S.T.İ. "ST Elevasyonlu Miyokard İnfarktüsü (Stemi) Hastalarda İnsan Paraoksonase Geni Met-Leu/55 Polimorfizmi." Dr. Siyami Ersek Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Merkezi, İstanbul, (2004)

9. Mackness B., D.P.N., Mackness M.I, "Human Serum Paraoxonase". *Gene Pharmacy*, 31(3) ,(1998), 329-36
10. Kirsty S. Robertson, Emma Hawe,1, George J. Miller, Philippa J. Talmud, Steve E. Humphries, "Human Paraoxonase Gene Cluster Polymorphisms As Predictors of Coronary Heart Disease Risk in The Prospective Northwick Park Heart Study II". *Biochimica et Biophysica Acta*, 1639, (2003), 203– 212
11. I. Draganov , B.N.L.D., "Pharmacogenetics of Paraoxonases: A Brief Review". *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 369, (2004), 78–88
12. Liang, H.-L.L.D.-P.L.C.-C., "Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress, and diseases." *J Mol Med*, 81, (2003), 766–779
13. Bert N. La Du, M.A., Scott Billecke, Mohamad Navab, Sergio Primo-Parmo, Robert C. Sorenson, Theodore J. Standiford, "On The Physiological Role(s) of The Paraoxonases". *Chemico-Biological Interactions*, (1999), 379–388
14. Michal Harel, A.A., Leonid Gaidukov, Boris Brumshtein, Olga Kherksonsky, Ran Megeed, Hay Dvir, Raimond B G Ravelli, Andrew McCarthy, Lilly Toker, Israel Silman, Joel L Susman, Dan S Tawfik, "Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes". *Nature Structural & Molecular Biology*, (2004), 412-419
15. Bharti Mackness, P.N.D., Michael I. Mackness, "The Paraoxonase Gene Family and Coronary Heart Disease". *Current Opinion in Lipidology*, 13, (2002), 357-362
16. Gan, K.N., Smolen A., Eckerson HW., La Du BN., "Purification of Human Serum Paraoksonase/Arylesterase, Evidence for One Esterase Catalyzing Both Activities". *Drug Metab. Dispos.*, 19 (1) , (1991), 100-6
17. Jawad, Z., Paoli, M., "Noval Sequences Propel Familiar Folds". *Structure*, 10, (2002), 447-454

18. Kuo C.L. & La Du, B.N., Calcium binding by human and rabbit serum paraoxonases. Structural stability and enzymatic activity. *Drug Metab. Dispos.*, 26, (1998), 653-60
19. Scharff, E.I., Koepke, J., Fritzch, G., Lucke, C. & Ruterjans, H., "Crystal structure of diisopropylfluorophosphatase from *Loligo vulgaris*". *Structure*, 9, (2001), 493-502
20. Fokine, A.e.a., "Direct Phasing at Low Resolution of A Protein Copurified With Human Paraoxonase (PON1)". *Acta Crystallogr. D.*, 59, (2003), 2083-87
21. Josse, D.e.a., "Oligometric States of The Detergent-Solubilized Human Serum Paraoxonase (PON1)". *J. Biol. Chem.*, 277, (2002), 33386-97
22. Du, I.D.B.N.L., "Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review." *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 369, (2004), 78-88
23. Ahoroni, A.e.a., "Directed Evolution of Mammalian Paraoxonases PON1 and PON3 for Bacterial Expression and Catalytic Specialization". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, (2004), 482-487
24. Josse, D.e.a., "Identification of Residues Essential For Human Paraoxonases (PON1) Arylesterase/Organophosphatase Activities". *Biochemistry*, 38, (1999), 2816-25
25. Jonas, A., "Lecithin cholestrol Acyltransferase". *Biochim. Biophys. Acta*, 1529, (2000), 245-256
26. Sinan, M.S.T.S., "İnsan Serum Paraoksonaz Enziminin (PON1) Expressiyonu, Saflaştırılması ve Bazı İlaçların Enzim Üzerine Etkilerinin Araştırılması." Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, (2005).
27. Borhani, D.W., Rogers, "Crystal Structure Oftruncated Human Apolipoprotein A-I Suggests A Lipid Bound Conformation". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, (1997), 12291-96

28. Blatter Garin, M.-C., Abbot, C., Messmer, S., Mackness, M. I., Durrington, P., Pometta, D., James, R. W., "Quantification of Human Serum Paraoxonase by Enzyme Linked Immunoassay: Population Differences in Protein Concentrations". *Biochem. J.*, 304, (1994), 549–554
29. Leviev, I., James, R. W., "Promoter Polymorphisms of the Human Paraoxonase PON1 Gene and Serum Paraoxonase Activities and Concentrations". *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 20, (2000), 516-521
30. Deakin, S., Leviev, I., Brulhart Meynet, M. C., James, R. W., "Paraoxonase-1 Promoter Haplotypes and Serum Paraoxonase: A Predominant Role in vivo for Polymorphic Position -107 Implicating The Transcription Factor Sp1". *Biochem. J.*, (2003), 377.
31. Feingold, K.R., Memon, R. A., Moser, A. H., Grunfeld, C., "Paraoxonase Activity in The Serum and Hepatic mRNA Levels Decrease During The Acute Phase Response". *Atherosclerosis*, 139, (1998), 307-315
32. Van Lenten, B.J., Wagner, A. C., Nayak, D. P., Hama, S, Navab, M., Fogelman, A. M., "High-density lipoprotein loses its anti-inflammatory properties during acute influenza A infection". *Circulation*, 103(2001), 2283-88
33. Cabana, V.G., Reardon, C. A., Feng, N., Neath, S., Lukens, J., Getz, G. S., "Serum Paraoxonase: Effect of The Apolipoprotein Composition of HDL and The Acute Phase Response". *J. Lipid Res.*, 44, (2003), 780-792
34. Martoglio, B.D., B., "Signal sequences: more than just greasy peptides". *Trends Cell Biol.*, 8, (1998), 41041–4104537.
35. Hassett, C., Richter, R. J., Humbert, R., Chapline, C., Crabb, J. J., Omiecinski, C. J., Furlong, C., "Characterisation of cDNA Clones Encoding Rabbit and Human Serum Paraoxonase: The Mature Protein Retains Its Signal Sequence". *Biochemistry*, 30, (1991), 10141– 10149
36. Deakin, S., Leviev, I., Gomasaschi, M., Calabresi, L., Franceschini, G., James, R. W., "Enzymatically Active Paraoxonase- 1 Is Located at The

External Membrane of Producing Cells and Released by A High Affinity, Saturable, Desorption Mechanism". *J. Biol. Chem.*, 277, (2002), 4301– 4308

37. Sorenson, R.C.B., C. L.; Aviram, M.; Hsu, C.; Billecke, S.; La Du, B. N., "Human serum paraoxonase/arylesterase's retained hydrophobic N-terminal leader sequence associates with HDLs by binding phospholipids: apolipoprotein A-I stabilizes activity". *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 19, (1999), 2214– 2225
38. Oda, M.N.B., J. K.; Berger, T.; Forte, T. M., "Cysteine substitutions in apolipoprotein A-I primary structure modulate paraoxonase activity". *Biochemistry*, 40, (2001), 1710– 1718
39. Harel, M., Aharoni, A., Gaidukov, L., Brumshtein, B., Khersonsky, O., Meged, R., Dvir, H., Ravelli, R.B.G., McCarthy, A., Toker, L., Silman, I., Sussman, J.L. and Dan S. Tawfik, "Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes", *Nature Struct. Mol. Biol.* (2004) **11**, 412.
40. Draganov, D.I. and La Du, B.N., "Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review", *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, (2004) **369**, 78
41. Lusis, A.J., "Atherosclerosis", *Nature*, (2000) **407**, 233.
42. Mackness, B., Davies, G.K., Turkei, W., Lee, E., Roberts, D.H., Hill, E., Roberts, C., Durrington, P.N. and Mackness, M.I., "Paraoxonase Status in Coronary Heart Disease", *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* (2001) **21**, 1451.
43. Billecke, S., Draganov, D., Councell, R., Stetson, P., Watson, C., Hsu, C. and La Du, B.N., "Human serum paraoxonase (PON1) isozymes Q and R hydrolyse lactones and cyclic carbonate esters", *Drug Metab. Dispos.*, (2000) **28(11)**, 1335
44. Biggadike, K., Angell, R.M., Burgess, C.M., Farrell, R.M., Hancock, A.P., Harker, A.J., Irving, W.R., Ioannou, C., Panayiotis, A., Procopiou, P.A., Shaw, R.E., Solanke, Y.E., Singh, O.M.P., Snowden, M.A., Stubbs, R.J., Walton, S. and Weston, H.E., "Selective plasma hydrolysis of glucocorticoid

lactones and cyclic carbonates by the enzyme paraoxonase: An ideal plasma inactivation mechanism”, *J. Med. Chem.* (2000) **43**, 19.

45. Teiber, J.F., Draganov, D.I., La Du, B.N., “Lactonase and Lactonizing of Human Serum Paraonase (PON1) and Rabbit Serum PON3”, *Biochemical Pharmacology*, (2003) **66**, 887.
46. Billecke, S., Draganov, D. and Rosenblat, M., “Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions: PON1 esterase and peroxidase-like activities”, *Circulation*, (2000) **101**, 2510.
47. Jakubowski, H., “Calcium-dependent human serum homocysteine thiolactone hydrolase. A protective mechanism against protein N-homocysteinylation”, *J. Biol. Chem.*, (2000) **275**, 3957.
48. Kearny, A.S, Crawford, L.F., Mehta, S.C. and Radebaugh, G.W., “The interconversion kinetics, equilibrium, and solubilities of the lactone and hydroxyacid forms of the HMG-CoA reductase inhibitor, CI-981”, *Pharm. Res.*, (1993) **10**, 1461.
49. Garrett, E.R., Lippold, B.C. and Mielck, J.B., “Kinetics and mechanisms of lactonization of coumarinic acids and hydrolysis of coumarins I”, *J. Pharm. Sci.*,(1971) **60**, 396.
50. Augustinsson, K.B., Homologous enzymes and biochemical evolution, (eds) In: Van ThoaiN., Roche J., Gordon and Breach, New York, (1968), 299-311
51. Aviram, M., Billecke, S., Sorenson, R., Bisgaier, C., Newton, R., Rosenblat, M., Erogul, J., Hsu, C., Dunlop, C. and La Du, B.N., “Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities. Selective action of human paraoxonase allozymes Q and R”, *Arterioscler. Thromb Vasc.Biol.*, (1998) **18**, 1617.
52. Aviram, M., Rosenblat, M., Bisgaier, C.L., Newton, R.S., Primo-Parmo, L.S. and La Du, B.N., “Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation

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

53. Sorenson, R.C., Primo-Parmo, S.L., Kuo, C.L., Adkins, S., Lockridge, O. and La Du, B.N., “Reconsideration of the catalytic center and mechanism of mammalian paraoxonase/arylesterase”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1995) **92**, 7187.
54. Doorn, J.A., Sorenson, R.C., Billecke, S.S., Hsu, C. and La Du, B.N., “Evidence that several conserved histidine residues are required for hydrolytic activity of human paraoxonase/arylesterase”, *Chemico-Biological Interaction*, (1999) **119-120**, 235.
55. Vickers, S., Duncan, C.A., Chen, I-W., Rosegay, A. and Duggan, D.E., “Metabolic disposition studies of simvastatin, a cholesterol-lowering prodrug”, *Drug Metab Dispos* (1990) **18**, 138.
56. Tang, B.K. and Kalow, W., “Variable activation of lovastatin by hydrolytic enzymes in human plasma and liver”, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* (1995) **47**, 449.
57. Biggadike, K., Angell, R.M., Burgess, C.M., Farrel, R.M., Hancock, A.P., Harker, A.J., Irving, W.R., Ioannou, C., Procopiou, P.A., Shaw, R.E., Solanke, Y.E., Singh, O.M., Snowden, M.A., Stubbs, R.J., Walton, S. and Weston, H.E., “Selective plasma hydrolysis of glucocorticoid gamma-lactones and cyclic carbonates by the enzyme paraoxonase:an ideal plasma inactivation mechanism”, *J. Med. Chem.*, (2000) **43**, 19.
58. Tougou, K., Nakamura, A., Watanabe, S., Okuyama, Y. and Morino, A., “Paraoxonase Has a Major Role in the Hydrolysis of Prulifloxacin (NM441), a Prodrug of a New Antibacterial Agent”, *Drug Metab. Dispos.*, (1998) **26**, (4), 355.
59. La Du, B.N., Human serum paraoxonase/arylesterase, In *Pharmacogenetics of Drug Metabolism*, ed. Kalow, W., Pergamon Pres, New York, (1992), p.51.

60. Costa, L.G., Li, W.F., Richter, R.J., "PON1 and organophosphate toxicity", pp. (2002) 165–83
61. Broomfield, C.A. and Ford, K.W., "Hydrolysis of nerve gasses by plasma enzymes", Proceedings of the 3rd International Meeting on Cholinesterases, La Grande-Motte, France, (1991), 167.
62. Davies, H.G., Richter, R.J., Keifer, M., Broomfield, C.A., Sowalla, J. and Furlong, C.E., "The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin", *Nature Genetics*, (1996) **14**, 334.
63. Reiner, E., Aldridge, W.N., Hoskin, F.C.G., *Enzymes Hydrolyzing Organophosphorus Compounds*, John Wiley & Sons, New York, (1989).
64. Baillie, T.A., Moldeus, P., Mason, R.P. Younes, M., *Enzymes Interacting with Organophosphorus Compounds*, Elsevier Scientific Publishers Ireland Ltd, Shannon, (1993).
65. Eckerson, H.W., Wyte, C.M. and La Du, B.N., "The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism", *Am. J. Hum. Genet.*, (1983) **35**, 1126.
66. Lucio G. Costa, T.B.C., Gail P. Jarvik, and and C.E. Furlong, "Functional Genomics of the paraoxonase (PON1) Polymorphisms: Effects on Pesticide Sensitivity, Cardiovascular Disease, and Drug Metabolism". *Annu. Rev. Med.*, **54**, (2003), 371-92
67. Geldmacher, M., Hommel, G., Dumbach, J., "On The Genetics of The Human Paraoxonase". *Hum. Genet.*, **50(3)**, (1979), 313-326
68. Playfer, J., Eze, LC., Bullen, MF., Evans, AP, "Genetic Polimorphism and interethnic variability of plasma paraoxonase activity". *J. Med. Genet.*, **13**, (1976), 337-342

69. Humbert, R., Adler, DA., Disteché, CM., Hasset, C., Omiecinski, CJ., Furlong, CE., "The Molecular Basis of The Human Serum Paraoxonase Activity Polymorphism". *Nat. Genet.*, **3(1)**, (1993), 73-76
70. Michael Aviram, E.H., Jacob Vaya, Saeed Mahmood, Simcha Milo, Aaron Hoffman, Scott Billicke, Dragomir Draganov, Mira Rosenblat, "Human Serum Paraoxonases (PON1) Q and R Selectively Decrease Lipid Peroxides in Human Coronary and Carotid Atherosclerotic Lesions". *Circulation*, **101**, (2000), 2510-2517
71. Aynacıoğlu, A., Cascorbi., Mrozikiewicz, PM., Nacak, M., Tapanyığıt, EE., Roots, I., "Paraoxonase 1 Mutations in A Turkish Population". *Toxicology and Applied Pharmacology*, **157**, (1999), 174-177
72. Eckerson, H., Romson, J., Wyte, C., La Du, BN., "The Human Serum Paraoxonase Polymorphism: Identification of Phenotypes by Their Response to Salts". *Am J Hum. Genet.*, **35(2)**, (1983), 214-227
73. Brophy VH, J.R., Clendenning JB, McKinsty LA, Jarvik GP, Furlong CE, "Effects of 5' Regulatory-Region Polymorphisms on Paraoxonase-Gene (PON1) Expression". *Am J Hum. Genet.*, **68**, (2001), 1428-1436
74. James, S.P.D.A.R.W, "Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase-1." *Clinical Science*, **107**, (2004), 435- 447
75. Sorenson RC, P.-P.S., Camper SA, La Du BN, "The genetic mapping and gene structure of mouse paraoxonase/arylesterase". *Genomics*, **30**, (1995a), 431-38
76. Osei-Hyiaman D, H.L., Mengbai F, Zhiyin R, Zhiming Z, Kano K, "Coronary artery disease risk in Chinese type 2 diabetics: is there a role for paraoxonase 1 gene (Q192R) polymorphism?" *Eur J Endocrinol*, **144**, (2001), 639-644
77. Hegele, R.A., "Paraoxonase Genes and Disease". *Ann. Med*, **31**, (1999), 217-224

78. Voetsch B, B.K., Damasceno BP, Siqueira LH, Loscalzo, J, "Paraoxonase 192 Gln/Arg polymorphism: an independent risk factor for nonfatal arterial ischemic stroke among young adults". *Stroke*, **33**, (2002), 1459-1464
79. Ikeda T, O.H., Hasegawa G, Nakamura N, Yoshikawa T, Imamura Y, Koizumi K, Kinoshita S, "Paraoxonase Gene Polymorphisms And Plasma Oxidized Low-Density Lipoprotein Level As Possible Risk Factors For Exudative Age-Related Macular Degeneration". *Am J Ophthalmol*, **132**, (2001), 191-195
80. Konda I, Y.M., "Genetic Polymorphism of Paraoxonase 1 (PON1) and Susceptibility to Parkinson's Disease". *Brain Res*, **806**, (1998), 271-273
81. Scacchi R, G.G., Martini MC, Broggio E, Vilardo T, Corbo RM, "Different pattern of association of paraoxonase Gln192-Arg polymorphism with sporadic late-onset Alzheimer's disease and coronary artery disease". *Neurosci Lett*, **339**, (1998), 17-20
82. Klimov, A.N., Gurevich, V.S., Nikiforova, A.A., Shatilina, L.V., Kuzmin, A.A., Plavinsky, S.L. and Teryukova, N.P., "Antioxidative activity of high-density lipoproteins in vivo", *Atherosclerosis*, (1993) **100**, 13.
83. Mazur, A., An Enzyme In Animal Tissues Capable of Hydrolyzing The Phosphorus-Fluorine Bond of Alkyl Fluorophosphates *J. Biol. Chem.* **164** (1946) 271-289
84. Mounter, L.A., Floyd, C.S. and Chanutin, A., Dialkylfluorophosphatase of Kidney I. Purification And Properties, *J. Biol. Chem.* (1953) **204**, 221-232
85. Main, A. R. *Can. J. Biochem. Physiol.* **34**, (1956) 197-216.
86. Furlong, C.E., Costa, L.G., Hassett, C., Richter, R.J., Sundstrom, J.A., Adler, D.A., Disteché, C.M., Omiecinski, C.J., Chapline, C., Crabb, J.W. and Humbert, R., "Human and rabbit paraoxonase: purification, cloning, sequencing, mapping and role of polymorphism in organophosphate detoxification", *Chem. Biol. Interact.*, (1993) **87**, 35.

87. Furlong, C.E., Richter, R.J., Chapline, C. and Crabb, J.W., "Purification of Rabbit and Human Serum Paraoxonase", *Biochemistry*, (1991) **30**, 10133.
88. Kitchen, B.J., Masters, C.J. and Winzor, D.J., "Effects of lipid removal on the molecular size and kinetic properties of bovine plasma arylesterase", *Biochem J*, (1973) **135**, 93.
89. Gil, F., Pla, A., Gonzalvo, M.C., Hernández, A.F. and Villanueva, E., "Partial purification of paraoxonase from rat liver", *Chem. Biol. Interact.*, (1993) **87**, 69.
90. Topçu, S., 1998. Tarım Mühendisliğinde Çevre Sorunları. Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Genel Yayın No: 207 Ders Kitapları Yayın No: A-65. 269s
91. Çepel, N., 1997. Toprak Kirliliği Erozyon ve Çevreye Verdiği Zararlar. Türkiye Erozyonla Mücadele, Ağaçlandırma ve Doğal Varlıkları Koruma Vakfı Yayın No: 14 3-35s.
92. Rai, U.N., Tripathi, R.D., Vajpayee, P., 2002. Bioaccumulation of Toxic Metals (Cr, Cd, Pb and Cu) by Seeds of *Euryale Ferox* Salisb. (Makhana). *Chemosphere* 46: 267- 272.
93. Ceran, M., 2004. Kayseri İl Çevre Durum Raporu S: 53-61.
94. Pandey, N., Sharma, C.P., 2002. Effect of Heavy Metals Co₂, Ni₂ and Cd₂ on Growth and Metabolism of Cabbage. *Plant Science* 163: 753-758.
95. <http://www.sauforum.com/ekoloji-ders-notlari-toprak-kirliligi-t1783.html?t=1783>
96. http://www.ebilge.com/10352/Civa_nadir?_Zararlari_nelerdir.html
97. Dilek CİCİ, "İnsan Eritrositlerinden Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Enziminin Saflaştırılması Ve Bazı Pestisitlerin Enzim Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması"Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir, Eylül-2007

98. Aksoy, K., "Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enziminin yapısı" Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları, (1997).
99. Bradford M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, (1976), **72**, 248–251
100. Selma Sinan, Feray Kockar, Oktay Arslan." Novel purification strategy for human PON1 and inhibition of the activity by cephalosporin and aminoglikozide derived antibiotics. *Biochimie*, Volume 88, Issue **5**, May (2006), Pages 565-574.
101. Laemmli, D. K., "Cleavage of Structural Proteins During in Assembly of the Head of Bacteriophage T₄. *Nature*, London, **227**, 680, (1970).
102. L. Gaidukov, M. Rosenblat, M. Aviram, and D.S. Tawfik. "The 192R/Q polymorphs of serum paraoxonase PON1 differ in HDL Binding, lipolactonase stimulation, and cholesterol efflux". *Journal of Lipid Research*. (2006) **47**, 2492.
103. B. Lin, M. Sedlacek, I. Manohanran, R. Boopathy, E.G. Duysen, P. Masson, O. Lockridge, *Biochem. Pharmacol.* **70** (2005) 1673.
104. O. Khersonsky, D.S. Tawfik. Structure-Reactivity Studies of Serum Paraoxonase PON1 Suggest that Its Native Activity Is Lactonase *Biochemistry* **44** (2005) 6371
105. Davis HG, Richter RJ, Keifer M, Broomfield CA, Sowalla J, and Furlong CE: The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman, and sarin. *Nat Genet*, **1**:334-336, 1996
106. Richter RJ, Jampsa RL, Jarvik GP, Costa LG, Furlong CE. Determination of paraoxonase 1 status and genotypes at specific polymorphic sites. In: Maines M, Costa LG, Reed DJ, Hodgson E, editors. *Current Protocols in Toxicology*. New York: John Wiley and Sons; (2004). p. 4.12.1– 4.12.19.

107. Mueller RF, Hornung S, Furlong CE, Anderson J, Giblett ER, Motulsky AG. Plasma paraoxonase polymorphism: a new enzyme assay, population, family biochemical and linkage studies. *Am J Hum Genet* (1983); **35**:393–408.
108. Sorenson, RC., Aviram, M., Bisgaier, CL., Billecke, S., La Du BN., “Properties of the retained N-terminal hydrophobic leader sequence in human serum paraoxonase/arylesterase” *Chem. Biol. Interact.* (1999) **119-120**, 243-249.
109. Killian, J.A., Von Heijne, G., "How proteins adapt to a membrane-water interface." *Trends Biochem. Sci.* **25**, (2000), 429-434.
110. Keha, E.E., Karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması için geliştirilmiş bir afinite kromatografisi metodu, Doçentlik Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Erzurum.
111. Wistrand, P.J., Lindahl, S. and Wahlstrand, T., “Human renal carbonic anhydrase. Purification and properties”, *Eur J. Biochem.*, (1975) **57**, 189.
112. Jakoby, B., Wilchek, M., Coupling reaction of ligands and general methodology of affinity chromatography, in *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, (1974).
113. Aguiar, J.A.K. and Michelacci, Y.M. “Preparation and purification of *Flavobacterium heparinum* chondroitinases AC and B by hydrophobic interaction chromatography”. *Braz J Med Biol Res*, May (1999), **32(5)** 545-550.
114. Zimmerman, J.K., Grothusen, J.R., Bryson, P.K., Brown, T.M., Partial purification and characterization of paraoxonase from rabbit serum. In “Enzymes Hydrolyzing Organophosphorus Compounds”, Ellis Horwood Ltd., Chichester, UK, (1989) 128-142.
115. Rodrigo, L., Gil, F., Hernandez, A.F. and Pla, A., “Identification of two rat liver proteins with paraoxonase activity: biochemical evidence for the identity of paraoxonase and arylesterase”, *Chem. Biol. Interact.*, (1999) **263**, 119-120,.

116. Gülcü, F., Gürsu, MF., "Paraoksonaz ve arilesteraz aktivite ölçümlerinin standardizasyonu", *Turkish Journal of Biochemistry*, (2003), **28(2)** 45-49.
117. Akhmedova, S., Anisimov, S., Yakimovsky, A. and Schwarz, E., "Gln→Arg 191 polymorphism of paraoxonase and Parkinson's disease", *Hum. Hered.*, (1999) **49**, 178.
118. Gonzalvo, MC., Gil, F., Hernandez, F., Villanueva, E., Pla, A., "Inhibition of paraoxonase activity in human liver microsomes by exposure to EDTA, metals and mercurials"., *Chemico-Biological Interactions* (1997) **105**, 169-179.
119. Ozensoy, O., Arslan, O. and Sinan, S.O., "A new method for purification of carbonic anhydrase Isozymes by affinity chromatography", *Biochemistry (Moscow)*, (2004) **69(2)**, 216
120. Jean Debord ., Jean-Claude Bollinger, Louis Merle, Thierry Dantoine." Inhibition of human serum arylesterase by metal chlorides". *Journal of Inorganic Biochemistry* **94**, (2003) 1-4
121. Çiftçi, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., Gündoğdu, M. and Özmen, İ., "Effects of Some Antibiotics on Enzyme Activity of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from Human Erythrocyte", *Pharmacol Res.*, (2000) **41**, 109.
122. Debord, J., Dantoine, T., Bollinger, JC., Abraham, MH., Verneuil, B., Merle, L. "Inhibition of arylesterase by aliphatic alcohols", *Chemico-Biological Interactions* (1998), **113**, 105-115.
123. Pellin, MC., Moretto, A., Lotti, M., Vilanova, E., Distribution and biochemical properties of rat paraoxonase activity Neurotoxicol Teratol (1990) **12**, 611-614.
124. A. Pla , L. Rodrigo, A.F. Hern´andez, F. Gil, O. Lopez." Effect of metal ions and calcium on purified PON1 and PON3 from rat liver". *Chemico-Biological Interactions* **167** (2007) 63-70

125. E.G. Erdős, C.R. Debye, M.P. Westerman, Arylesterases in blood: effect of calcium and inhibitors, *Biochem. Pharmacol.* **5** (1960) 173–186.