

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



PARAOKSONAZ ENZİMİNİN HİDROFOBİK ETKİLEŞİM TEKNİĞİ
İLE SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI BİLEŞİKLERE KARŞI
AFİNİTESİNİN İNCELENMESİ

HATİCE YÜKSEL

DOKTORA TEZİ

Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Oktay ARSLAN (Tez Danışmanı)
Prof. Dr. Serap DOĞAN
Prof. Dr. Nahit GENÇER
Prof. Dr. Cahit AKGÜL
Dr. Öğr. Üyesi Nurcan DEDEOĞLU

BALIKESİR, Temmuz - 2023

ETİK BEYAN

Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak tarafımda hazırlanan “**Paraoksonaz Enziminin Hidrofobik Etkileşim Tekniği İle Saflaştırılması Ve Bazı Bileşiklere Karşı Afinitesinin İncelenmesi**” başlıklı tezde;

- Tüm bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Kullanılan veriler ve sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Tüm bilgi ve sonuçları bilimsel araştırma ve etik ilkelere uygun şekilde sunduğumu,
- Yararlandığım eserlere atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,

beyan eder, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Hatice YÜKSEL

ÖZET

**PARAOKSONAZ ENZİMİNİN HİDROFOBİK ETKİLEŞİM TEKNİĞİ İLE
SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI BİLEŞİKLERE KARŞI AFİNİTESİNİN
İNCELENMESİ
DOKTORA TEZİ
HATİCE YÜKSEL
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. OKTAY ARSLAN)
(EŞ DANIŞMAN: DOÇ. DR. ADEM ERGÜN)
BALIKESİR, TEMMUZ - 2023**

Paraoksonaz 1 (PON1), karaciğerde sentezlenen ve bazı lipoproteinlere bağlı olarak fonksiyon gösteren bir izoenzimidir. Tüm memelilerde bulunan bu enzim, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oksidasyonunu inhibe etme kabiliyeti nedeniyle anti aterosklerotik özellikler göstermektedir. Ayrıca organofosfat insektisitler ve homosistein tiyolaktonlar da dahil olmak üzere çeşitli bileşikler hidroliz etme özelliklerini sergiledikleri bilinmektedir. Bu nedenle, serum PON1 aktivitesini modüle edebilecek faktörler üzerinde çok yoğun araştırmalar yapılmıştır. Ancak başta koyun ve sığır olmak üzere hayvan PON1 enzimleri üzerine gerçekleştirilen çalışmaların son derece sınırlı olduğu yapılan literatür çalışmaları sonucunda tespit edilmiştir.

Doktora tezi kapsamında yapılan bu çalışmayı iki bölüme ayırmak mümkündür. İlk bölümde daha önce araştırma gurubumuz tarafından sentezlenen Sefaroz 4B-L-tirozin-naftilamin kimyasal yapısına sahip hidrofobik jel kullanılarak sığır serumundan PON1 (hsPON1) saflaştırılmıştır. Saf hsPON1 enzimi üzerinde Furosemid, Prednizolon, Metamizol, Enroflaksasin, Meloksikam, Symfos ve Bakteral ticari adları altında bilinen ilaçların etkisi incelenmiştir. Bu ilaçların tümünün hsPON1 enzimini farklı düzeylerde inhibe ettiği belirlenmiştir. Araştırma sonuçları, çalışılan ilaç molekülleri arasından hsPON1 enzimi için en güçlü inhibitörün enroflaksasin olduğunu göstermektedir.

İkinci bölümde ise farklı bir ligant (4-iyodoanilin) kullanılarak yeni bir hidrofobik jel sentezlenmiştir. Yeni sentezlenen jel ile koyun serumundan PON1 enziminin (kPON1) saflaştırılması, %88,3 verim ile 73,4 kat olarak gerçekleştirilmiştir. Ayrıca saf kPON1 enzimi üzerinde söz konusu ilaçların etkileri araştırılmıştır. Çalışılan bileşikler içinde kPON1 için en güçlü inhibitörünün Meloksikam olduğu belirlenmiştir ($IC_{50} = 1,56$ mM).

ANAHTAR KELİMELELER: PON1, koyun, sığır, hidrofobik etkileşim kromatografisi, inhibisyon, ilaç.

ABSTRACT

PURIFICATION OF PARAOXONASE ENZYME BY HYDROPHOBIC INTERACTION TECHNIQUE AND INVESTIGATION OF ITS AFFINITY TO CERTAIN COMPOUNDS

PH.D THESIS

HATICE YUKSEL

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

CHEMISTRY

(SUPERVISOR: PROF. DR. OKTAY ARSLAN)

(CO-SUPERVISOR: ASSOC. PROF. ADEM ERGÜN)

BALIKESİR, JULY - 2023

Paraoxonase 1 (PON1) is an isoenzyme synthesized in the liver and functions in association with certain lipoproteins. This enzyme, present in all mammals, exhibits antiatherosclerotic properties due to its ability to inhibit the oxidation of low-density lipoprotein (LDL). Additionally, it is known to exhibit hydrolytic properties towards various compounds, including organophosphate insecticides and homocysteine thiolactones. Therefore, extensive research has been conducted on factors that can modulate serum PON1 activity. However, literature research has revealed that studies on animal PON1 enzymes are extremely limited, particularly on sheep and cattle.

This study, conducted as a doctoral thesis, can be divided into two parts. In the first part, hsPON1 was purified from bovine serum using a hydrophobic gel with a chemical structure of Sepharose 4B-L-tyrosine-naphthylamine, previously synthesized by our research group. The effect of drugs, namely Furosemide, Prednisolone, Metamizole, Enrofloxacin, Meloxicam, Symphytum, and Bacterial, on pure hsPON1 enzyme was determined. All drugs were found to inhibit the hsPON1 enzyme at different levels, with Enrofloxacin identified as the strongest inhibitor.

In the second part, a new hydrophobic gel was synthesized using a different ligand (4-iodoaniline). Using this newly synthesized gel, kPON1 was purified from sheep serum at a yield of 88.3 % and 73.4-fold purification. Furthermore, the effects of the aforementioned drugs were investigated on pure kPON1 enzyme. Among the compounds tested, Meloxicam was identified as the strongest inhibitor of kPON1 ($IC_{50} = 1.56$ mM).

KEYWORDS: PON1, sheep, cattle, hydrophobic interaction chromatography, inhibition, drug.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİL LİSTESİ	vi
SEMBOL LİSTESİ	x
ÖNSÖZ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1 Paraoksonaz Enzimi (EC 3.1.8.1).....	4
1.1.1 Paraoksonaz Enziminin Tarihçesi	5
1.1.2 Paraoksonaz Enzimi Adlandırılması	6
1.1.3 Paraoksonaz Enziminin Gen Ailesi	8
1.1.4 PON1 Enziminin Biyolojik Fonksiyonu	9
1.1.5 Paraoksonaz Enzimi Yapısı	10
1.1.6 Paraoksonaz Enzimi Etki Mekanizması	13
1.1.7 Paraoksonaz Enziminin Substratları	13
1.1.7.1 Organofosfatlar (OP)	14
1.1.7.2 Aril Esterleri	14
1.1.7.3 Laktonlar.....	14
1.1.7.4 Araşidonik Asitin Biyoaktif Lipidleri	15
1.2 Enzim inhibisyonu	16
1.2.1 PON1 İzoenziminin İnhibisyonu	16
1.3 Araştırma Kapsamında Kullanılan İlaçlar	19
1.3.1 Furosemid	19
1.3.2 Prednisolon	20
1.3.3 Metajin (Metamizol).....	21
1.3.4 Enroflaxacin.....	24
1.3.5 Anaflex	25
1.3.6 Symfos	26
1.3.7 Bakteral.....	27
1.4 sPON Enzimi İle İlgili Literatür Çalışmalarının Özeti	28
1.5 kPON enzimi ile ilgili literatür çalışmalarının özeti.....	32
2. MATERYAL VE YÖNTEMLER	35
2.1 Materyaller	35
2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler	35
2.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar	35
2.1.3 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması	35
2.2 YÖNTEMLER.....	38
2.2.1 Sığır Paraoksonaz (sPON) Enziminin Saflaştırılması.....	38
2.2.1.1 Kan numunelerinin elde edilmesi.....	38
2.2.1.2 Amonyum Sülfatla Çöktürme	38

2.2.1.3	hsPON Enzimin Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (HEK) ile Saflaştırılması	39
2.2.2	Koyun Paraoksonaz (kPON1) Enziminin Saflaştırılması	39
2.2.3	Yeni Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (HEK) Jelinin Sentezi	40
2.2.3.1	Sefaroz 4B'nin Aktifleştirilmesi	40
2.2.3.2	L-tirozinin Bağlanması	40
2.2.3.3	4-İyodo-Anilin'in Bağlanması	41
2.2.4	Protein Tayini	42
2.2.4.1	Kalitatif Protein Tayini	42
2.2.4.2	Kantitatif Protein Tayini	42
2.2.5	Enzim Aktivite Tayini	43
2.2.6	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile Enzim Saflığının Kontrolü	43
2.2.7	Bazı ilaçların IC ₅₀ Değerlerinin Bulunması	44
3.	BULGULAR	45
3.1	Enzimin Saflaştırılması	45
3.1.1	Amonyum Sülfat Çöktürmesi	45
3.1.2	Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Enzimin Saflaştırılması	45
3.1.3	Kantitatif Protein Tayini için Hazırlanan Standart Eğri	47
3.1.4	Serum Paraoksonaz Enzimi İçin SDS Poliakrilamid jel Elektroforezi	48
3.1.5	Serum Paraoksonaz Enzimi Üzerinde İnhibisyon Etkisi Gösteren Hayvan Hastalıklarında Yaygın Kullanımı Olan İlaçların IC ₅₀ değerlerinin Saptanması	49
4.	TARTIŞMA VE SONUÇ	64
5.	KAYNAKLAR	75
	ÖZGEÇMİŞ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Paraoksonaz enziminin parathion metabolitini hidroliz reaksiyonu.....	8
Şekil 1.2: PON1 enziminin en popüler substratı olan paraoksanın kimyasal yapısı.....	8
Şekil 1.3: hPON1 enziminin genel yapısı..	12
Şekil 1.4: hPON1 enziminin detaylı yapısı	12
Şekil 1.5: Paraoksanaz enziminin katalitik bölgesi ve mekanizması.....	13
Şekil 1.6: Furosemid kimyasal yapısı.	19
Şekil 1.7: Prednisolon kimyasal yapısı	20
Şekil 1.8: Metamizole kimyasal yapısı.	21
Şekil 1.9: Metamizole'nin metabolizması.....	23
Şekil 1.10: Enroflaxacin kimyasal yapısı.....	24
Şekil 1.11: (a) Nalidixic Acid; (b) Ciprofloxacın and (c) Enrofloxacın yapıları.....	25
Şekil 1.12: Meloksikam kimyasal yapısı.	25
Şekil 1.13: Butafosfan kimyasal yapısı.....	26
Şekil 1.14: Siyanokobalamin kimyasal yapısı.	26
Şekil 1.15: Sülfadoksin genel yapısı.	27
Şekil 1.16: Trimetoprim kimyasal yapısı.	28
Şekil 2.1: Sefaroz 4B-L-tirozin-1-naftilaminin yapısı.	39
Şekil 2.2: Sefaroz 4B'nin aktifleştirilmesi.	40
Şekil 2.3: 4-iyodo anilin bileşiğinin bağlanması.....	41
Şekil 3.1: sPON1'in paraoksonaz aktivitesi.....	46
Şekil 3.2: kPON1'in paraoksonaz aktivitesi.	46
Şekil 3.3: Bradford Metodu için kullanılan standart grafik.	47
Şekil 3.4: Saf kPON ve hsPON enzimlerine ait SDS-PAGE görüntüsü.....	49
Şekil 3.5: 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda saflaştırılmış sığır serum PON enzimi için farklı Furosemid konsantrasyonlarına karşı % aktivite grafiği.....	50
Şekil 3.6: 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda saflaştırılmış sığır serum PON enzimi için farklı Prednisolon konsantrasyonlarına karşı % aktivite grafiği....	51
Şekil 3.7: 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda saflaştırılmış sığır serum PON enzimi için farklı Metamizol konsantrasyonlarına karşı % aktivite grafiği	52
Şekil 3.8: 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda saflaştırılmış sığır serum PON enzimi için farklı Enroflaksasin konsantrasyonlarına karşı % aktivite grafiği.	53
Şekil 3.9: 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda saflaştırılmış sığır serum PON enzimi için farklı Meloksikam konsantrasyonlarına karşı % aktivite grafiği... ..	54
Şekil 3.10: 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda saflaştırılmış sığır serum PON enzimi için farklı Butafosfan konsantrasyonlarına karşı % aktivite grafiği.	55
Şekil 3.11: 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda saflaştırılmış sığır serum PON enzimi için farklı Sülfadoksin/Trimetoprim konsantrasyonlarına karşı % aktivite grafiği.....	56
Şekil 3.12: 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda saflaştırılmış koyun serum PON enzimi için farklı Furosemid konsantrasyonlarına karşı % aktivite grafiği.....	57
Şekil 3.13: 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda saflaştırılmış koyun serum PON enzimi için farklı Prednisolon konsantrasyonlarına karşı % aktivite grafiği....	58
Şekil 3.14: 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda saflaştırılmış koyun serum PON enzimi için farklı Metamizol konsantrasyonlarına karşı % aktivite grafiği.	59

Şekil 3.15:	1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda saflaştırılmış koyun serum PON enzimi için farklı Enroflaksasin konsantrasyonlarına karşı % aktivite grafiği..	60
Şekil 3.16:	1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda saflaştırılmış koyun serum PON enzimi için farklı Meloksikam konsantrasyonlarına karşı % aktivite grafiği...	61
Şekil 3.17:	1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda saflaştırılmış koyun serum PON enzimi için farklı Butafosfan konsantrasyonlarına karşı % aktivite grafiği.	62
Şekil 3.18:	1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda saflaştırılmış koyun serum PON enzimi için farklı Sulfadoksin/Trimetoprim konsantrasyonlarına karşı % aktivite grafiği.....	63
Şekil 4.1 :	Tarafımızca sentezlenen (Sefaroz 4B-L-tirozin-4-iyodo-Anilin) hidrofobik etkileşim jelinin kimyasal yapısı.	72
Şekil 4.2 :	İyodobenzen molekülünün yapısı ve elektronların dağılımının şematik gösterilmi	72
Şekil 4.3 :	Sefaroz 4-B- 4-İyodo Anilin Hidrofobik Jel IR Spektrum Grafiği.....	72

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1.1: Hidrolaz sınıfına dahil edilen enzimlerin alt grupları.....	7
Tablo 3.1: Bradford Metodu için kullanılan veriler.....	47
Tablo 3.2: Sığır PON için saflaştırma tablosu.....	48
Tablo 3.3: Koyun PON için saflaştırma tablosu.....	48
Tablo 3.4: Furosemid ilaç etken maddesine ait bilgiler ve sPON enzimi için IC ₅₀ değeri.....	50
Tablo 3.5: Sığır PON enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Furosemid'in IC ₅₀ değerinin saptanmasında kullanılan çözelti miktarları ve ilaç konsantrasyonları ile elde edilen veriler.....	50
Tablo 3.6: Prednisolon ilaç etken maddesine ait bilgiler ve sPON enzimi için IC ₅₀ değeri.....	51
Tablo 3.7: Sığır PON enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Prednisolon'un IC ₅₀ değerinin saptanmasında kullanılan çözelti miktarları ve ilaç konsantrasyonları ile elde edilen veriler.....	51
Tablo 3.8: Metamizol ilaç etken maddesine ait bilgiler ve sPON enzimi için IC ₅₀ değeri.....	52
Tablo 3.9: Sığır PON enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Metamizol'ün IC ₅₀ değerinin saptanmasında kullanılan çözelti miktarları ve ilaç konsantrasyonları ile elde edilen veriler.....	52
Tablo 3.10: Enroflaksasin ilaç etken maddesine ait bilgiler ve sPON enzimi için IC ₅₀ değeri.....	53
Tablo 3.11: Sığır PON enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Enroflaksasin'in IC ₅₀ değerinin saptanmasında kullanılan çözelti miktarları ve ilaç konsantrasyonları ile elde edilen veriler.	53
Tablo 3.12: Meloksikam ilaç etken maddesine ait bilgiler ve sPON enzimi için IC ₅₀ değeri.....	54
Tablo 3.13: Sığır PON enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Meloksikam'ın IC ₅₀ değerinin saptanmasında kullanılan çözelti miktarları ve ilaç konsantrasyonları ile elde edilen veriler.....	54
Tablo 3.14: Butafosfan ilaç etken maddesine ait bilgiler ve sPON enzimi için IC ₅₀ değeri.....	55
Tablo 3.15: Sığır PON enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Butafosfan'ın IC ₅₀ değerinin saptanmasında kullanılan çözelti miktarları ve ilaç konsantrasyonları ile elde edilen veriler.....	55
Tablo 3.16: Sülfadoksin+Trimetoprim ilaç etken maddesine ait bilgiler ve sPON enzimi için IC ₅₀ değeri.....	56
Tablo 3.17: Sığır PON enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Sülfadoksin /Trimetoprim'in IC ₅₀ değerinin saptanmasında kullanılan çözelti miktarları ve ilaç konsantrasyonları ile elde edilen veriler.....	56
Tablo 3.18: Furosemid ilaç etken maddesine ait bilgiler ve kPON enzimi için IC ₅₀ değeri.....	57
Tablo 3.19: Koyun PON enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Furosemid'in IC ₅₀ değerinin saptanmasında kullanılan çözelti miktarları ve ilaç konsantrasyonları ile elde edilen veriler.....	57

Tablo 3.20:	Prednisolon ilaç etken maddesine ait bilgiler ve kPON enzimi için IC ₅₀ değeri.....	58
Tablo 3.21:	Koyun PON enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Prednisolon'un IC ₅₀ değerinin saptanmasında kullanılan çözelti miktarları ve ilaç konsantrasyonları ile elde edilen veriler.....	58
Tablo 3.22:	Metamizol ilaç etken maddesine ait bilgiler ve kPON enzimi için IC ₅₀ değeri.....	59
Tablo 3.23:	Koyun PON enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Metamizol'ün IC ₅₀ değerinin saptanmasında kullanılan çözelti miktarları ve ilaç konsantrasyonları ile elde edilen veriler.....	59
Tablo 3.24:	Enroflaksasin ilaç etken maddesine ait bilgiler ve kPON enzimi için IC ₅₀ değeri.....	60
Tablo 3.25:	Koyun PON enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Enroflaksasin'in IC ₅₀ değerinin saptanmasında kullanılan çözelti miktarları ve ilaç konsantrasyonları ile elde edilen veriler.....	60
Tablo 3.26:	Meloksikam ilaç etken maddesine ait bilgiler ve kPON enzimi için IC ₅₀ değeri.....	61
Tablo 3.27:	Koyun PON enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Meloksikam'ın IC ₅₀ değerinin saptanmasında kullanılan çözelti miktarları ve ilaç konsantrasyonları ile elde edilen veriler.....	61
Tablo 3.28:	Butafosfan ilaç etken maddesine ait bilgiler ve kPON enzimi için IC ₅₀ değeri.....	62
Tablo 3.29:	Koyun PON enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Butafosfan'ın IC ₅₀ değerinin saptanmasında kullanılan çözelti miktarları ve ilaç konsantrasyonları ile elde edilen veriler.....	62
Tablo 3.30:	Sülfadoksin+Trimetoprim ilaç etken maddesine ait bilgiler ve kPON enzimi için IC ₅₀ değeri.....	63
Tablo 3.31:	Koyun PON enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Sülfadoksin / Trimetoprim'in IC ₅₀ değerinin saptanmasında kullanılan çözelti miktarları ve ilaç konsantrasyonları ile elde edilen veriler.....	63

SEMBOL LİSTESİ

PON1	: Paraoksonaz1 enzimi
hPON1	: İnsan Paraoksonaz1 enzimi
sPON1	: Sığır Paraoksonaz1 enzimi
hsPON1	: Holstein Sığır Paraoksonaz1 enzimi
kPON1	: Koyun Paraoksonaz1 enzimi
CAT	: Katalaz enzimi
SOD	: Süperoksit dismutaz enzimi
GPx	: Glutasyon peroksidaz enzimi
HEK	: Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi
IC₅₀	: Enzimin aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
OP	: Organofosfat
HDL	: Yüksek yoğunluklu lipoprotein
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein

ÖNSÖZ

Bu çalışma sürecinde, danışman hocam Prof. Dr. Oktay ARSLAN ve eş danışman hocam Doç. Dr. Adem ERGÜN, her konuda verdikleri destek ve örnek tavırlarıyla benim için büyük bir değer taşımaktadırlar. Kendilerine en derin saygı ve minnetlerimi sunuyorum. Ayrıca, her zaman bana güvenen ve her konuda destek olan kıymetli kardeşim Mehmet YÜKSEL'e de sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Hayatta her zaman daha ileriye gitmem için ellerinden gelenin en iyisini yapan, bana destek olan ve güvenen çok kıymetli aileme de sonsuz saygı ve minnetlerimi sunmak istiyorum.

Balıkesir, 2023

Hatice YÜKSEL

1. GİRİŞ

Doktora Tezi kapsamında bu çalışmada koyun ve sığır serumundan hidrofobik etkileşim tekniği ile saflaştırılan PON1 enzimi üzerinde bazı ilaçların inhibisyon etkileri incelenmiştir.

Protein araştırmaları alanındaki birçok makalenin başlığı "Saflaştırma ve karakterize etme..." şeklinde-dir. Bu durum bize, "Saf olmayan protein üzerinde saf dűřüncelerini harcama" özdeyişinin ne kadar yerinde bir ifade olduğunu açıklamaktadır. Önceki yıllarda proteinleri saflaştırmak sadece akademik amaçlara yönelik eylemleri kapsamaktaydı. Ancak günümüzde başta enzimler olmak üzere birçok proteinin endüstride kullanılma potansiyellerinin ortaya çıkarılması saflaştırma işleminin önemini daha da artırmıştır.

Canlılığı ve yaşamı mümkün kılan tüm biyokimyasal olaylar, enzimlerin katalizledikleri reaksiyonlara bağlı olarak gerçekleşmektedir. Enzimlerin, aktif bölgelerinin, üç boyutlu yapının derinliklerinde olacak şekilde tasarlanması onları inanılmaz spesifik moleküller haline getirmektedir. Ayrıca katalitik güçlerinin çok yüksek olması ile yan ürün oluşumu engellenerek, hem oldukça ekonomik bir üretim gerçekleşmekte hem de yan ürünlerin hücreye vereceği olası toksik etkiler ortadan kaldırılmaktadır. Hücreye ihtiyaç duyulan maddenin anında karşılanması, enzimlerin katalitik özelliklerinin yüksek olmasının bir diğer sonucudur. Birçok enzim; ısı, pH ve iyonik şiddete duyarlı olacak şekilde tasarlanmıştır. Bu şekilde çevredeki değişiklikler enzimlerin aktivitelerini önemli ölçüde etkilemektedir. Son olarak, bazı enzimlerin üç boyutlu yapıları, aktif bölge dışında başka bir spesifik bölgeye sahip olacak şekilde tasarlanmıştır. Allosterik bölgede denilen bu spesifik yapı, modülatörlerden etkilenerek biyolojik reaksiyonların düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir.

Canlılığın devamı için gerekli olan kimyasal proseslerde rol oynayan enzimler hücre yenilenmesi, sinyal iletimi ve hücre ölümü gibi hayati metabolik süreçlerin düzenlenmesinde, meydana gelen reaksiyonların kontrolünün sağlanması ve biyolojik rollerin yerine getirilmesinde, rol oynayan, eşsiz özelliklere sahip olan biyolojik katalizörlerdir (Khersonsky ve Tawfik, 2010; Sousa, Ramos, Lim ve Fernandes, 2015; Türkeş, Beydemir ve Küfrevioğlu, 2019). Normal şartlarda milyon yılda meydana gelmesi mümkün reaksiyonların milisaniyede meydana gelmesini milyon tane hedef moleköl içerisinden uygun olanını seçerek ve basit ürünleri oluşturarak sağlayabilmeleri, enzimlerin

aktif bölgelerinin çevresindeki kimyasal ünitelerin konumlanmalarına bağlı olarak sahip oldukları katalitik güçlerinin bir sonucudur (Copley, 2003; Khersonsky ve Tawfik, 2010). Bu nedenle canlılığın moleküler düzeyde anlaşılması ancak enzim işlevinin anlaşılmasıyla mümkün olacaktır (Sousa ve diğerleri, 2015).

Doktora tezi kapsamında hedef enzim olan paraoksonaz (PON), hidrolaz sınıfına giren bir metaloproteindir. Hidrolaz enzimleri; protein, karbohidrat, lipit ve nükleik asitler gibi farklı boyutlarda ve kompleksitelerde olan değişik substratların parçalanma reaksiyonlarını katalizlemek üzere tasarlanmıştır (Sousa ve diğerleri, 2015). Protein yapısının nispeten küçük bir bölgesinde yer alan aktif bölge, katalitik işlevlerde merkezi konumdadır. Hidrolazların aktif bölgeleri, histidin, aspartat ve serin şeklinde katalitik üçlü denilen rezidüer olacak şekilde tasarlanmıştır (Nothling ve diğerleri, 2020).

İnsan genomunun 7. kromozomunda kodlanan, üç üyeden oluşan bir gen ailesi olan paraoksonaz, PON1, PON2 ve PON3 adlı üyeleri içermektedir. (Clement E. Furlong, Marsillach, Jarvik ve Costa, 2016). Bu izoenzimlerden en çok bilinen ve çalışılan paraoksonaz 1 (PON1), çeşitli aromatik karboksilik asit esterlerinin ve çeşitli organofosfatların hidrolizini katalize eden kalsiyum bağımlı bir esterazdır (Türkeş, Söyüt ve Beydemir, 2015). PON1, temel olarak karaciğer tarafından sentezlenen ve yüksek yoğunluklu lipoproteinler (HDL) ile etkileşerek salgılanan 43 kDa'lık bir metaloproteindir (Türkeş, Söyüt ve Beydemir, 2014).

PON1, organofosfatların hidrolizindeki rolüne ek olarak, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oksidasyonuna karşı korumasına önemli katkılar sağladığı saptanmıştır. Bu işlev, enzimin lipit peroksidi hidrolize etme yeteneği ile ilgili olduğu tahmin edilmektedir (Türkeş ve diğerleri, 2014). PON1 ayrıca oksidatif stres sırasında HDL fonksiyonunun korunmasına da katkıda bulunduğunu gösteren çalışmalara rastlamak mümkündür (Alici, Ekinci ve Beydemir, 2008).

Ayrıca detoksifikasyon ve antiaterojenik özellikleriyle bilinen bu enzim, ilk başlarda bir organofosfat hidrolizörü olarak karakterize edilmiş ve paraokson substratını hidroliz etmesinden dolayı paraoksonaz olarak isimlendirilmiştir (Renault ve diğerleri, 2006; Selma Sinan, Kockar ve Arslan, 2006).

Serum PON1 seviyelerindeki azalmaya bağlı olarak artan oksidatif stres ile kardiyovasküler hastalıklar, diabetes mellitus, hipertroidizm gibi dejenerasyonlar rapor edilmiştir. PON1, düşük yoğunluklu lipoproteinleri (LDLs) ve yüksek yoğunluklu lipoproteinleri (HDLs) oksidatif stresten koruyarak ateroskleroziside içeren birçok damar hastalığı ile ilişkili olduğu bilinen bir antioksidant enzim olarak fonksiyon gördüğü saptanmıştır (Türkeş ve diğerleri, 2014).

Buna ilaveten PON1 laktonaz aktivitesi ile çeşitli laktonların hidrolizini gerçekleştirmektedir (Alici ve diğerleri, 2008). Kısmen saflaştırılmış olan PON1'in alifatik laktonların açık formunun salınım reaksiyonlarını katalizlediği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Teiber, Draganov ve La Du, 2003). Ayrıca PON1, laktonaz aktivitesi ile homosistein tiyolaktonu hidrolize edebilmektedir. Tüm bu özellikleriyle enzim araştırmacıların dikkatini çekmektedir (Arslan, Gencer, Arslan ve Guler, 2012; Gordon, Hofmann, Askew ve Davidson, 2011).

PON1 eksikliği olan hayvanın birçok hastalığa karşı daha duyarlı olduğu saptanmıştır. Bu hayvanların tedavisinde PON1'in aşırı ekspresyonu veya saflaştırılmış PON1 verilerek söz konusu hastalıkların gelişiminin önlenildiği ya da geciktirildiği gösterilmiştir (Harel ve diğerleri, 2004; Koren-Gluzer, Aviram, Meilin ve Hayek, 2011; Rozenberg, Shiner, Aviram ve Hayek, 2008; Shih ve diğerleri, 1998; Tward ve diğerleri, 2002; Yamashita ve diğerleri, 2013).

Organofosfat (OP) zehirlenmesinde PON1 uygulamasının son derece yararlı olduğunu gösteren çalışmalara rastlamak mümkündür. PON1 eksikliği oluşturulmuş hayvanların vahşi tipteki muadillerine kıyasla OP zehirlenmesine karşı daha duyarlı olduğu bulunmuştur ve çeşitli hayvan modellerinde saflaştırılmış PON1 uygulamasının OP zehirlenmesine karşı koruma sağladığı gösterilmiştir (Cole ve diğerleri, 2010; Costa ve diğerleri, 1990; Duysen ve diğerleri, 2011; Gupta ve diğerleri, 2011; Shih ve diğerleri, 1998; Stevens ve diğerleri, 2008; Valiyaveettil, Alamneh, Biggemann, ve diğerleri, 2011; Valiyaveettil, Alamneh, Rezk, Biggemann, ve diğerleri, 2011; Valiyaveettil, Alamneh, Rezk, Perkins, ve diğerleri, 2011; Wang ve diğerleri, 2010). Bazı durumlarda, PON1'in mevcut OP zehirlenmesinde ilgili panzehirinden daha etkili olduğu gösterilmiştir (Gaidukov ve diğerleri, 2009).

PON1'in antimikrobiyal rolü de literatürde birçok çalışma ile belgelenmiştir. Bu nedenle PON1, insanlarda ve hayvanlarda çeşitli koşullara karşı terapötik müdahalenin

geliştirilmesi için güçlü bir aday olduğu belirtilmiştir (Camps, Pujol, Ballester, Joven ve Simó, 2011; Estin, Stoltz ve Zabner, 2010; Ozer ve diğerleri, 2005).

Memeli PON1 enzimi üzerinde yapılan tüm çalışmalar göz önüne alındığı zaman sığır ve koyun PON1 enzimleri ile doğrudan ilgili çalışmaların son derece sınırlı olduğu görülmektedir (Farid, Honkawa, Fath, Nonaka ve Horii, 2013). Bu nedenle bu çalışmada önemli fizyolojik fonksiyonlara sahip PON1 enzimi, koyun ve sığır serumlarından saflaştırılması planlanmıştır. Sığır PON1 enziminin saflaştırılması için şu anda araştırma grubumuz tarafından sentezlenmiş olan hidrofobik karakterli jel kullanılmıştır. Ayrıca tarafımızca farklı bir ligant kullanılarak yeni bir hidrofobik jel sentezlenmiştir. Bu jel kullanılarak, koyun serumundan PON1 enziminin saflaştırılması planlanmıştır. Son olarak saflaştırılacak sığır ve koyun PON1 izoenzimleri üzerine bazı ilaçların etkileri saptanmıştır. Bu ilaçların birçok hastalığın tedavisinde kullanılması, hayvan sağlığı için önemli olan bir enzimin aktivitesinin nasıl değiştirileceğinin bilinmesinin önemli olduğunu düşünüyoruz. Elde edilecek sonuçlar temel bilimler alanında yaygın etkiye sahip olacağı gibi özellikle koyun ve sığır yetiştiriciliği gibi alanlarda farkındalığı artıracaktır.

1.1 Paraoksonaz Enzimi (EC 3.1.8.1)

Paraoksonazlar, paraoksonaz-1 (PON1), paraoksonaz-2 (PON2) ve paraoksonaz-3 (PON3) şeklinde tanımlanmış üç proteinden oluşan bir grup enzim ailesidir. Bunlar arasında üzerinde en çok araştırma yapılanı PON1'dir. Ancak, bu durum bu enzimin diğerlerinden çok daha önemli olduğu anlamına gelmez (Aharoni ve diğerleri, 2004; Taler-Verčić, Goličnik ve Bavec, 2020). PON'lar amino asit dizilimleri açısından çok benzer olmalarına rağmen farklı işlevlere sahiptirler ve doğal olarak farklı yerlerde bulunurlar. PON1 ve PON3 izoenzimleri, kan sistemindeki yüksek yoğunluklu lipoproteinlere bağlı olarak bulunurlar (Primo-Parmo, Sorenson, Teiber ve La Du, 1996). Bu enzimler sırası ile organofosfatları ve hacimli statin laktonları hidrolize ederken (Harel ve diğerleri, 2004), PON2 birçok dokuda (Levy ve diğerleri, 2007) bulunur ve esas olarak oksidatif strese karşı hücre içi koruyucu görevi üstlenmiştir (Altenhöfer ve diğerleri, 2010; Giordano ve diğerleri, 2013; Rosenblat ve diğerleri, 2003). PON1 izoformları, ilaç metabolizmasında ve kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıkların önlenmesinde önemli bir rol oynamaktadırlar (B. Mackness, Mcelduff ve Mackness, 2005; Shi ve diğerleri, 2004). Söz konusu PON izoenzimleri, aynı aktif bölgede çeşitli substrat türlerine karşı geniş bir enzimatik aktivite yelpazesi

sergileyecek şekilde tasarlanmıştır (Ben-David ve diğerleri, 2013, 2015). PON2, laktonaz ve çok düşük arilesteraz aktivitesi sergilerken, PON3, yüksek laktonaz, zayıf arilesteraz ve neredeyse hiç paraoksonaz aktivitesi sergilemez. PON1'in ise farklı düzeylerde her üç aktiviteyi de sergilediği bulunmuştur (La Du ve diğerleri, 1999).

Diğer aktivitelere ek olarak paraoksonaz enziminin Quorum Sensing fonksiyonuna da sahip olduğu yani quorum sensing faktörünü inhibe ettiği bilinmektedir (Clement E. Furlong ve diğerleri, 2016). Quorum Sensing" (QS) terimi, birçok gram pozitif, gram negatif bakteri ve mantarın birbirleriyle farklı sinyal molekülleri aracılığıyla iletişim kurarak çevrelerindeki diğer mikroorganizmaların varlığını hissetmelerini sağlayan bir kavramdır. Bu sinyal moleküllerinin yoğunluğu ölçülebilir ve böylece mikroorganizmalar, çevrelerindeki diğer mikroorganizmaların miktarını tespit edebilirler. Üretilmiş olan bu sinyal molekülleri sayesinde mikroorganizmalar iyi koordine olmuş bir davranış sergileyerek konağın immün yanıtından kaçabilmekte ve başarılı bir enfeksiyon süreci gerçekleştirebilmektedirler (Saraçlı, 2006).

1.1.1 Paraoksonaz Enziminin Tarihçesi

PON1'in varlığı ilk defa 1940'larda memeli dokularında organofosfat pestisidleri hidrolizleme yeteneğine sahip enzim aktivitesi bulunarak rapor edilmiştir (Mazur, 1946). Nörotoksik organofosfat pestisit olan okson türevi parathion metabolitini hidrolizleme yeteneğine bağlı olarak paraoksonaz (PON) ismini almıştır (Shunmoogam, Naidoo ve Chilton, 2018). PON1'in saflaştırılması ilk defa 1946'da tavşan böbreğinden Mazur ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir (Mazur, 1946). 1961'de immün sistem göstergesi olarak varlığı ortaya atılmış olan PON1 daha sonra insan serumundan saflaştırılmış ve elektroforez ile görüntülenmiştir (Işgör ve Beydemir, 2010). Genetik temelli paraoksonaz polimorfizmi konusunda ilk defa 1976 yılında dikkate değer araştırmalar yapılmıştır. Eckerson ve arkadaşları uzun yıllar önce serum paraoksonaz ve serum arilesteraz fenotiplerinin belirlenmesi için uygulaması kolay oldukça duyarlı bir metod geliştirmişlerdir (Adkins, Gan, Mody ve La Du, 1993).

1991 yılında Gan ve arkadaşları tarafından insan serumundan oldukça yüksek saflıkta PON enzimi saflaştırılmış ve iki allozimik formu tanımlanmıştır (Adkins ve diğerleri, 1993). Son on yılda PON multigen ailesine ait çalışmalar çok büyük oranda artmıştır (Ekinci ve Beydemir, 2009). Paraoksonazların yapısal çalışmaları hakkında yıllar içerisinde birçok

makale yayımlanmıştır (Rochu, Chabrière ve Masson, 2007). Paraoksonazlar ile ilgili olarak yapılmış olan yapısal çalışma (Hasset et al. 1991) ile sinyal diziliminin araştırma sonuçları sonucu hidrofobik bölgesinin HDL'ye bağlı olduğu saptanmıştır (Sorenson ve diğerleri, 1999).

Detoksifikasyon enzimleri olan Serum paraoksonazların (PON) tüm memelilerde, belirli omurgalılarda ve nematodlarda bulunurken bakterilerde bulunmadığı saptanmıştır (Bar-Rogovsky, Hugematter ve Tawfik, 2013). Aynı şekilde PON1'in kuşlarda, balıklarda ve bazı sürüngenlerde kayda değer oranda bulunmadığı da yapılan çalışmalarla belgelenmiştir (Azarsız ve Sönmez, 2000). PON1 aktivite seviyeleri çok düşük olan bu türler; kuşlar ve balıklarda organofosfat toksisitesine karşı oldukça savunmasız olma söz konusu iken, proteinin seviyesi oldukça yüksek olan memeli ve diğer türlerde toksik bileşiklere karşı direncin oldukça fazla olduğu saptanmıştır (Monroy-Noyola A, Almenares-Lopez D, 2021).

90'lı yıllarda tanımlanmaya başlanmış olan serum PON1'in geliştirilen saflaştırma prosedürleri yardımıyla % 95 saflıkta elde edilmesi sağlanmıştır (Adkins ve diğerleri, 1993). Yapıda bağlı olan iki Ca^{2+} iyonunun varlığının belirlenmesi ile Ca^{2+} iyonlarından birinin yapısal diğerinin kataliz için gerekli olduğunun saptanmasına yol açmıştır (Josse ve diğerleri, 1999). Ayrıca diğer tamamlayıcı grupların, iki sistein rezidüsü ve C41 ve C352 disülfid köprüsünün varlığı da belirlenmiştir (Adkins ve diğerleri, 1993).

Biyomühendislik alanında rekombinant PON1'in organofosfat maruziyetinde kullanılabilir uygun bir molekül adayı olabileceğinin ortaya atılmış ve biyosensör tasarımında kullanılabilir enzimler olduğu söylenmektedir (Harel ve diğerleri, 2004; Rochu ve diğerleri, 2007).

1.1.2 Paraoksonaz Enzimi Adlandırılması

İnsan serum paraoksonaz enzimi, karaciğerde sentezlenen, Ca^{2+} bağımlı, HDL ile ilişkili ve 43- 45 kDa molekül ağırlıklı arildialkilfosfataz olarak da adlandırılan bir ester hidrolazdır (Donma, Orkide., H. Ekmekçi, 2004). Hidrolazlar, enzim komisyonu tarafından 3 numaralı grupta tanımlanmıştır. Bu grupta yer alan enzimler; farklı boyut ve kompleksitede olan substratların farklı kimyasal bağlarının parçalanma reaksiyonlarını

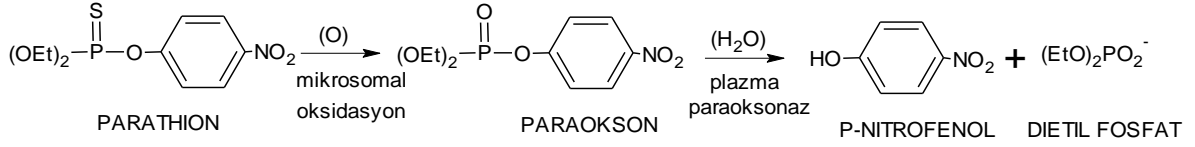
katalizlerler. Ayrıca bu enzimler, parçalanmış bağların özelliklerine göre 13 alt gruplara ayrılmıştır (Sousa ve diğerleri, 2015). Söz konusu alt gruplar Tablo 1.1 de verilmiştir.

Tablo 1.1: Hidrolaz sınıfına dahil edilen enzimlerin alt grupları (Sousa ve diğerleri, 2015).

Enzim numarası	Enzim alt sınıfları
(EC 3.1)	Esterazlar
(EC 3.2)	nükleazlar, fosfodiesterazlar, lipazlar ve glioksilazların ester bağlarını hidrolizleyen fosfatazlar
(EC 3.3)	şekerleri, eterleri, tiyoeterleri hidrolizleyen trialkilsülfonyum hidrolazlar
(EC 3.4)	fosfataz ve peptidazların bağlarını parçalayan hidrolazlar
(EC 3.5)	aminopeptidaz, karboksipeptidaz ve endopeptidazların peptidik C-N bağlarını amidlerin amidinlerin nitrillerin peptidik olmayan C-N bağlarının hidrolizini katalizleyenler
(EC 3.6)	asit anhidritler üzerindeki nükleosit di ve tri fosfatların ve sülfonil içeren anhidritlerin hidrolizini katalizleyenler
(EC 3.7)	C-C bağı üzerinde etkili olanlar
(EC 3.8)	C-halide bağında etkili olanlar
(EC 3.9)	P-N bağlarında etkili olanlar
(EC 3.10)	S-N bağında etkili olanlar
(EC 3.11)	C-P bağında etkili olanlar

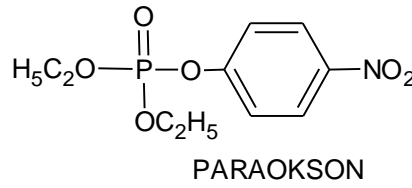
Farklı bağlar ve bağ kuvvetleri üzerinde etkili olan söz konusu enzimler, hidroliz reaksiyonlarını 25 °C aktivasyon enerjilerini 21 ile 44 kcal/mol aralığında düşürerek gerçekleştirdikleri bilinmektedir (Sousa ve diğerleri, 2015).

PON1, 1940'lı yıllarda memeli dokularında organofosfat pestisidleri hidrolizleme yeteneği ile Mazur tarafından rapor edilerek tanımlanmış ve Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği Enzim Komisyonu tarafından arildialkilfosfataz (EC 3.1.8.1) olarak sınıflandırılmıştır. PON organofosfatları hidrolizlediği için Noman Aldridge tarafından bir "A" esteraz olarak sınıflandırılmıştır (M. Mackness ve Mackness, 2015). Paraoksonaz (PON) [arildialkil fosfataz (EC 3.1.8.1)] ilk başlarda aromatik karboksilik esterler ve organofosfat bileşikleri ve sinir gazlarının hidrolizini sağlamasıyla belirlenmiş olan serum aril esterazdır (Cabana ve diğerleri, 2003). Klasik adımı ise paraoksan metabolitinin hidrolizini sağladığı için almıştır (Cabana ve diğerleri, 2003). İlgili reaksiyon şekil 1.1'de verilmiştir.



Şekil 1.1: Paraoksonaz enziminin parathion metabolitini hidroliz reaksiyonu. (C. E. Furlong, Richter, Seidel ve Motulsky, 1988).

Organofosfat hidrolizörü olarak da isimlendirilen PON1, özellikle bir organofosfat olan paraoksan substratını difüzyon sınırlarına yakın düzeyde hidroliz ettiği bilinmektedir (Lyagin ve Efremenko, 2021). İlgili molekülün yapısı şekil 1.2 de gösterilmiştir.



Şekil 1.2: PON1 enziminin en popüler substratı olan paraoksanın kimyasal yapısı. (Chambers, 2008).

1.1.3 Paraoksonaz Enziminin Gen Ailesi

İnsan PON-1, -2 ve -3 genleri, kromozom 7'nin (7q21.3-q22.1) uzun kolunda birbirine çok yakın şekilde lokalize olmuştur. Her biri dokuz ekson ve sekiz introndan oluşur. PON nükleotid ve amino asit dizilerinin karşılaştırılması yapılmış ve sırasıyla yaklaşık %70 ve %60 özdeşlik gösterdiği saptanmıştır. PON1, PON2 ve PON3 enzimlerinin amino asit benzerlikleri % 60-70 arasında olduğu saptanmıştır (Khersonsky ve Tawfik, 2005).

PON gen ailesinin üzerinde en fazla çalışılma yapılmış üyesi olan PON1 HDL ile ilişkili olan ve karaciğerden sentezlenen ve çok geniş substrat spesifikliğine sahip bir enzimdir (Clement E. Furlong ve diğerleri, 2016). PON2 lokalizasyonu açısından hücre içi olarak vurgulanan mitokondri ve endoplazmik retikulumda bulunduğu tespit edilmiş yaklaşık 43-kDa molekül ağırlığına sahip enzimdir. Karaciğer, akciğer, böbrek, kalp, pankreas, ince bağırsaklar, kaslar, testis, endotelial hücreler ve makrofajlarda bulunan yegane enzimdir (Clement E. Furlong ve diğerleri, 2016). PON3 karaciğerden ve az miktarda da böbreklerden sentezlenen PON1'e benzer şekilde kan dolaşımında HDL'ye bağlı olarak bulunan 40 kDa molekül ağırlığına sahip bir glikoproteindir. Ayrıca PON3'ün varlığı endoplazmik retikulumun intestinal hücrelerinde ve bazı dokuların mitokondrilerinde de tespit edilmiştir (Clement E. Furlong ve diğerleri, 2016).

Sığır PON1 geni, kromozom dört üzerinde bulunur ve 33.000 baz çiftine sahip olduğu saptanmıştır. Sığır PON1 genindeki polimorfizmler ve bunların sığırlardaki fonksiyonel sonuçları hakkında çok az şey bilinmektedir. Farklı genotiplerin tanımlanması, PON1 aktivitesi ile ilişkili olabilecek PON'in sığır sağlığı ve hastalığındaki rolünü anlamak için oldukça önemli olacaktır (Augusto ve diğerleri, 2021; Silveira ve diğerleri, 2015a).

1.1.4 PON1 Enziminin Biyolojik Fonksiyonu

PON1, PON ailesinin ilk ve üzerinde en çok araştırmanın yapıldığı üyesi olduğu görülmektedir. Daha önce belirtildiği gibi, A esteraz olarak adlandırıldı, ancak daha sonra, insektisit parathion'un okson formu olan paraokson'u hidrolize etme yeteneğinin keşfinden sonra PON olarak adlandırılmıştır (Aharoni ve diğerleri, 2004; Michael I. Mackness, 1989; Walker, 1993).

PON1 karaciğerde sentezlendikten sonra dolaşıma salınarak, esas olarak HDL, daha az oranda çok düşük yoğunluklu lipoproteinlerde ve şilomikronlara bağlanarak biyolojik fonksiyonlarını gösterirler (Taler-Verčič ve diğerleri, 2020). Serbest PON1, HDL'ye bağlı PON1'den daha düşük enzimatik aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır.

PON1, en önemli biyolojik fonksiyonu, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oksidasyonunu önleyerek ve inflamatuvar yanıtı bozduğu bilinmektedir (Navab ve diğerleri, 1991). Söz konusu enzimin, LDL içerisindeki fosfolipidlerin okside şeklini inaktive ettiği ve lipid peroksidlerinin aterojenik etkilerini nötralize ettiği saptanmıştır (Aharoni ve diğerleri, 2004).

Bir antioksidan savunma sistemi enzimi olan PON1'in hidrojen peroksidi de içeren serbest oksijen radikallerini nötralize ederek ve kolesterol linoleat hidroksiperoksitlerin hidrolizini gerçekleştirerek lipid peroksidasyonunu inhibe etmektedir (Aharoni ve diğerleri, 2004). Ayrıca Mackness ve arkadaşları tarafından 1991'de PON1'in LDL içerisindeki lipid peroksidlerin kümeleşmesini önlediğini gösterilmiştir (Taler-Verčič ve diğerleri, 2020).

PON1'in ikinci önemli rolü, spesifik OP maruziyetine karşı koruma sağlamaktır. Fareler üzerinde yapılan çalışmalar, PON1'in klorpirifos okson ve diazokson gibi organofosfatlara karşı önemli bir koruyucu olduğu gösterilmiştir (Shih ve diğerleri, 1998). Ayrıca yeni doğan insanlar yetişkinlerin ifade ettiği PON1 seviyelerinin sadece üçte birini ifade eder ve yetişkin PON1 konsantrasyonlarına ulaşmak için iki yıla kadar ihtiyaç

duyarlar. Bu durum küçük çocukların OP maruziyetine karşı artan duyarlılığının nedenini açıklamaktadır (Marsillach, Costa ve Furlong, 2016).

PON1'in diğer bir koruyucu rolü, homosistein tiolaktonun (HCTL) hidrolizidir. HCTL, lisin rezidüleri aracılığı ile bazı proteinlere bağlanarak onların denatürasyonuna ve işlev bozukluğuna yol açan toksik bir metabolittir. Yüksek kan HCTL konsantrasyonları, kanser, kardiyovasküler, nörolojik ve otoimmün hastalıkların gelişme riskinin artmasıyla ilişkilendirilmiştir (Bacchetti, Ferretti ve Sahebkar, 2019; Seshadri ve diğerleri, 2002; Undas ve diğerleri, 2004; Vos, 2008). Ancak, çok düşük spesifik enzim aktivitesi nedeniyle PON1'in HCTL ile fizyolojik ilişkisi sorgulanmaktadır (Billecke S, Draganov, Counsell R, 2000).

1.1.5 Paraoksonaz Enzimi Yapısı

PON'lar kalsiyum iyonları içeren metaloenzimlerdir (Kuo ve Du, 1998). Yapıda bulunan iki kalsiyum iyonunun farklı işlevleri olduğu bilinmektedir. Yapısal kalsiyum da denen ve proteine daha güçlü bağlanan kalsiyum iyonu (Ca^{2+}), enzimin stabilizasyonunda önemli işleve sahip olduğu yapılan çalışmalar ile saptanmıştır. Nitekim Ca^{2+} 'nin uzaklaştırılması, enzimin dönüşümsüz denatürasyonuna sebep olduğu bulunmuştur (Harel ve diğerleri, 2004). Katalitik kalsiyum adı verilen diğer iyon ise Ca^{2+} enzimin aktivitesi için gerekli olduğu gösterilmiştir. Bu iyonun enzimden uzaklaştırılması aktivite kaybına neden olurken tekrar ilave edilmesi ile aktivitenin geri kazanıldığı saptanmıştır (Kuo ve Du, 1998). Ca^{2+} , N224, N270, N168, D269 ve E53' ün yan zincirlerinde bulunan oksijen atomları ile etkileştiği gözlenmiştir. Bu yapı, enzim-substrat kompleksinin stabilize eden oksianyon olarak işlev görür.

Hemen hemen tüm PON1 türleri, HDL'ye bağlanmak için gerekli olan sinyal peptidlerine sahiptir (Draganov ve diğerleri, 2005). PON1 ayrıca yüksek oranda glikozillenmiştir, bu da rekombinant olarak üretilmesini zorlaştırır.

E.coli'de rekombinant PON1 üretmeye yönelik ilk girişimler, protein agregasyonu ile sonuçlanmıştır (Brushia, Forte, Oda, La Du ve Bielicki, 2001). PON1'in dört potansiyel glikosilasyon bölgesi vardır ve bunlardan sadece ikisi (N253 ve N324) protein yüzeyinde bulunur ve bu nedenle glikosidazlar tarafından N-glikosilasyon için erişilebilir durumdadır (Harel ve diğerleri, 2004; Josse ve diğerleri, 2002).

Çözünür rekombinant PON1'in üretimi, yapısal çalışmaları PON'ların aktif bölgesi hakkında ayrıntılı bilgilerin elde edilmesini sağlamıştır Kristal yapının elde edilmesi ile, enzimin benzersiz bir aktif bölge kapağına sahip, altı kanatlı bir β -pervaneyi andıran yapısı ortaya çıkarılmıştır (Harel ve diğerleri, 2004).

Dörtten fazla beta kanatlı pervanelerin, diğer enzimler arasında nadir görülmesine rağmen, hemen hemen tüm PON'larda görüldüğü saptanmıştır. Ayrıca her bir kanat spesifik dört şerit içermesi ile dikkat çekmektedir. Söz konusu yapıların planlı bir şekilde özel olarak kapanması, proteinin N- ve C-terminal uçlarını birbirine bağlayan Cys 42 ve Cys 385 sistein rezidüleri arasında disülfid köprülerinin oluşumuna neden olur. Söz konusu bu köprüler, enzimin üç boyutlu yapısının stabilizasyonunda son derece önemli olduğu saptanmıştır. Nitekim, bu sistein rezidülerinin değiştirilmesi ile enzimin tamamen inaktive olduğu gözlemlenmiştir (Josse ve diğerleri, 1999).

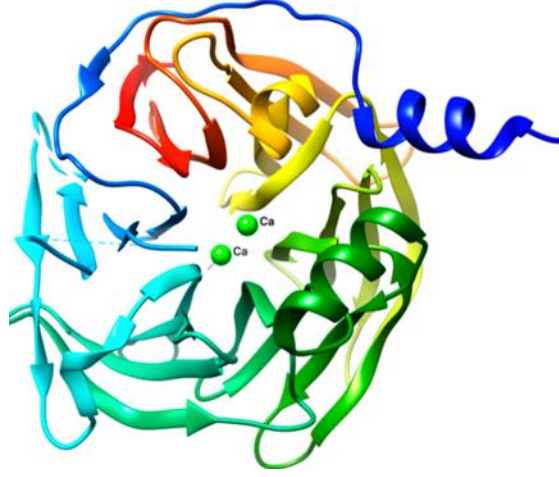
Ayrıca PON1'de ilave bir serbest sistein rezidüsü vardır (Cys284). Bu rezidünün, alanin ile yer değiştirmesi paraoksonaz ve arilesteraz aktivitelerinde orta derecede bir azalma ile sonuçlandığı saptanmıştır (Josse ve diğerleri, 1999). Buna ilaveten, Cys284, PON1'in LDL'leri oksidasyondan koruma işlevi için gerekli olduğunu gösteren çalışmaya rastlamak mümkündür (Aviram ve diğerleri, 1998).

Her iki kalsiyum iyonu da pervaneninin merkez tüneline birbirine yakın olacak şekilde konumlandığı Şekil 1.5'te görülmektedir. PON1'in paraoksonaz, arilesteraz ve laktonaz aktivitelerinin aynı aktif bölgede gerçekleştiği bulunmuştur (Harel ve diğerleri, 2004; Khersonsky ve Tawfik, 2006). His115, His 134, His155, His 243 ve His 285 rezidüleri, Trp281, Aspartat ve Glutamat rezidüleri (Asp 54, Asp 169, Asp 183, Asp 269, Asp 279, Glu53 ve Glu195) arilesteraz ve paraoksonaz aktivitelerinde önemli roller aldığı bulunmuştur (Estin ve diğerleri, 2010).

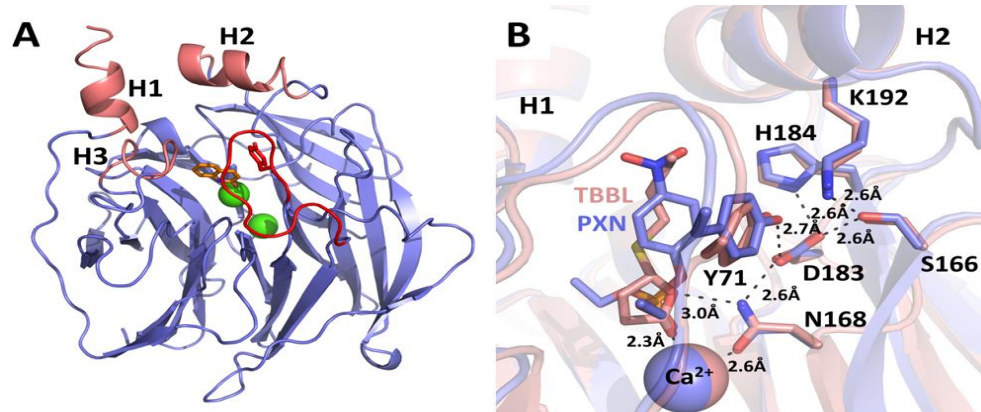
Ayrıca His115/His134 ikilisi, hem laktonaz hem de arilesteraz aktivitelerine aracılık eder. Bir veya her iki histidindeki mutasyonlar, her iki aktiviteyi de azalttığı veya tamamen ortadan kaldırdığı saptanmıştır (Tward ve diğerleri, 2002).

PON1'in stabilitesi ve katalitik aktiviteleri, enzim HDL'lerle etkileşmesi sonucu büyük oranda arttığı gözlenmiştir. Bu durum muhtemelen, HDL'ye bağlanma bölgesi ile aktif bölge arasında 15 Å daha uzak olmasına rağmen bu etkileşmenin aktif bölgede bir seri

hidrojen bağlarının oluşumunu tetiklediği tahmin edilmektedir. Bu hidrojen bağları ağı, lakton substratını Ca^{2+} ile aynı konuma getirdiği bildirilmektedir (Ben-David ve diğerleri, 2015).



Şekil 1.3: hPON1 enziminin genel yapısı (Taler-Verčič ve diğerleri, 2020).

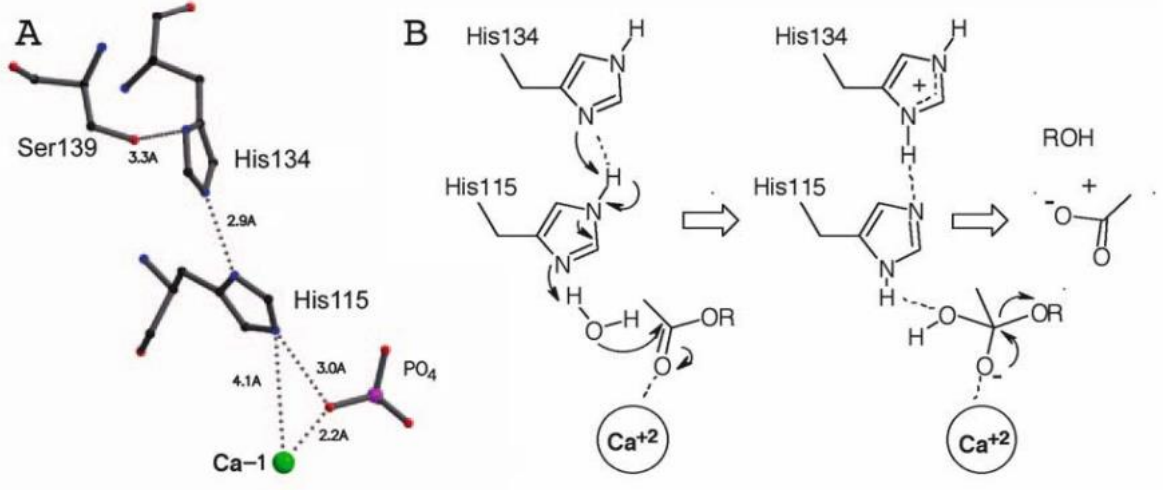


Şekil 1.4: hPON1 enziminin detaylı yapısı (Blaha-Nelson, Krüger, Szeler, Ben-David ve Kamerlin, 2017).

Şekil 1.4; A-Kırmızı renkler hidrofobik rezidüleri, yeşil renkler de Ca^{2+} iyonlarını temsil etmektedir. B- Yüzeyde bulunan hidrofobik rezidü H2 ve katalitik Ca^{2+} iyonu sayesinde aktif bölge spesifikliği sağlanmaktadır ve ayrıca kristal yapı içerisinde gösterilen anahtar rezidüler hidrojen bağlanma mesafesinden sorumludurlar (Blaha-Nelson ve diğerleri, 2017).

1.1.6 Paraoksonaz Enzimi Etki Mekanizması

Enzim yapısında bulunan His134- His115 çifti ve Ca^{2+} iyonu ile su molekülünün varlığı enzimin katalitik olarak esteraz aktivitesi göstermesinde oldukça önemlidir (Harel ve diğerleri, 2007).



Şekil 1.5: Paraoksonaz enziminin katalitik bölgesi ve mekanizması (Harel ve diğerleri, 2007).

Katalitik etkinliğe sahip olan Ca^{2+} iyonu, substrattaki fosfat iyonunun negatif yüklü oksijenine 2,2 Å uzaklıkta bulunmaktadır. Aktif bölgede bulunan His-His çifti, su molekülünden bir proton alarak molekülün nükleofilik gücünün artırılmasını sağlamaktadır.

Kataliz ortamında oluşan hidroksoniyum iyonu karbonil veya fosfat esterleri ile etkileşim meydana getirmektedir. Reaksiyon ortamında meydana gelen kompleksin oluşturduğu tetrahedral düzlem Ca^{2+} iyonu ile kararlı hale getirilmektedir. Son aşamada oluşan yapıdaki Ca^{2+} iyonu negatif yüklü oksijenden uzaklaşarak bağı tekrar fosfat veya karbonilin üzerine aktarılmasına sebep olur ve ester bağının kopması sağlanmış olur (Harel ve diğerleri, 2007).

1.1.7 Paraoksonaz Enziminin Substratları

PON'ların hidrolitik aktivitesi için substratlar genellikle moleküler yapılarına göre organofosfatlar, aril esterler ve laktonlar olmak üzere üç kategoride sınıflandırılır.

1.1.7.1 Organofosfatlar (OP)

OP'ler yaygın olarak kullanılan böcek öldürücülerdir. Bunlar, genel yapısı $O = P(OR)_3$ olan fosfat trieterlerdir. Bu bileşiklerin etki mekanizmaları, sinir sistemindeki asetilkolinesterazın inhibisyonu ile ilişkilidir (Senanayake ve Karalliedde, 1987).

Zayıf hidrolize olan paraokson dışında, PON3 ve PON2 neredeyse OP aktivitelerinden yoksundurlar (Draganov ve diğerleri, 2005). Bununla birlikte, PON1, birkaç OP insektisitinin (parathion, chlorpyrifos, malathion ve diazinon) (Khersonsky ve Tawfik, 2005) ve sinir ajanlarının (tabun, sarin, soman ve siklosarin) (Davies ve diğerleri, 1996; Kanamori-Kataoka ve Seto, 2009) aktif metabolitlerini güçlü bir şekilde hidrolize eder.

Paraokson, PON1 için en iyi bilinen substratlardan biridir ve PON1'in akut OP zehirlenmesi için bir panzehir olarak terapötik olarak kullanılması için büyük bir potansiyel olduğu düşünülmektedir.

1.1.7.2 Aril Esterleri

Yapısal olarak aril esterler, aromatik bir halkaya sahip esterlerdir. Her üç PON izoformu da arilesteraz aktivitesi sergilerken, PON2 çok düşük arilesteraz aktivitesine sahiptir (Draganov, 2010; Teiber, Billecke, La Du ve Draganov, 2007).

Fenil asetat, PON1 için en iyi bilinen aril ester substratlarından biridir ancak PON3 tarafından orta hızda ve PON2 tarafından çok yavaş hidrolize edilir (Draganov, Stetson, Watson, Billecke ve La Du, 2000); Draganov ve diğerleri, 2005).

PON'lar tarafından aromatik esterlerin hidroliz hızı şu şekildedir: $PON3 > PON1 > PON2$ (Teiber ve diğerleri, 2007). PON3'ün aktif bölgesi, statin lakton (siklik ester) ilaçları gibi hacimli substratlar için bir tercihe sahiptir, bu muhtemelen PON3'ün östrojen esterleri içeren hacimli steroid yapılarına karşı PON1'e kıyasla daha yüksek hidrolitik aktivite göstermesinin nedenidir.

1.1.7.3 Laktonlar

Laktonlar, bir ester bağı içeren siklik karboksilik esterlerdir. Filogenetik, yapısal ve biyokimyasal veriler, her üç izoenzimlerin farklı düzeylerde laktonaz aktivitelere sahip olduğunu ortaya koymaktadır (Ben-David ve diğerleri, 2012; Billecke S, Draganov D,

Counsell R, 2000; Draganov ve Teiber, 2008; Draganov, 2010; Draganov ve diğeri, 2005; Teiber ve diğeri, 2018).

Laktonlar, hücre sel büyüme yi, bilgi alışverişini ve farklılaşmayı etkileme yeteneğine sahip moleküllerdir. Bu nedenle, PON'ların muhtemel fizyolojik fonksiyonlarını, endojen ve eksojen laktonları hidroliz ederek ve dolayısıyla de ğiştirerek gösterdikleri düşünölmektedir (Draganov ve Teiber, 2008).

PON'lar laktonları ilgili siklik olmayan ester analoglarından çok daha hızlı hidrolize ederler (Khersonsky ve Tawfik, 2005). Diğeri yapı-aktivite çalışmaları, lipofilik beş ve altı üyeli lakton halkalarının üç PON'un tümü tarafından yüksek özgülökle hidrolize edildiğini göstermiştir. Bu nedenle bu bileşiklerin doğal substratları temsil ettiğini düşöndürmektedir (Ben-David ve diğeri, 2012; Billecke S, Draganov, Counsell R, 2000).

PON2'nin laktonaz aktivitesi çok daha sınırlı olduğu saptanmıştır (Draganov ve La Du, 2004; Teiber ve diğeri, 2018). PON1 ve PON3 ile karşılaştırıldığında, PON2, bakteriyel patojenlere karşı bir savunma mekanizması olarak görev yapan bakteriyel çekirdek algılayıcı moleküller olan N-açilhomoserin γ -laktonların (HSL'ler) hidrolizi ve inaktivasyonu için en yüksek spesifik aktiviteyi gösterir (Draganov ve La Du, 2004; Senanayake ve Karalliedde, 1987).

PON3'ün kristal yapısı henüz belirlenmemiş olsa da, saflaştırılmış rekombinant PON'ların kullanıldığı substrat özgülökle deneylerine dayanarak, PON3'ün aktif bölgesinin PON2 ve PON1'den daha büyük olduğu görölmektedir. Bu nedenle PON3, hacimli substratları tutma ve hidrolize etme konusunda daha büyük bir yeteneğe sahiptir, oysa PON1 ikame edilmemiş ve kısa zincirli ikame edilmiş laktonları katalize edebilir (Draganov, 2010; Draganov ve diğeri, 2000).

1.1.7.4 Araşidonik Asitin Biyoaktif Lipidleri

Lakto araşidonik asit ve aktif türevleri eikosanoidler, son yıllarda PON substratları olarak daha fazla ilgi görmüştür. Bu bileşikler, *in vivo* olarak bir dizi metabolik süreç aracılık eder ve çeşitli kardiyovasküler ve renal hastalıkların gelişiminde rol oynarlar (Stępniewska, Dołęgowska, Puchałowicz, Gołembiewska ve Ciechanowski, 2017).

Araşidonik asidin enzimatik ve enzimatik olmayan ürünleri olan 5-hidroksi-eikosatetraenoik asit 1,5-lakton (5-HETEL) ve 4-hidroksi-dokosaheksaenoik asit (4-HDoHE) bileşikleri her üç PON enzimlerinin yüksek özgüllükte substraları olduğu belirlenmiştir.

Özellikle, 5-HETEL'in şimdiki kadar tanımlanan üç PON'un tümü için en iyi substrat olduğu bulunmuştur (Teiber ve diğerleri, 2018). PON1 en yüksek aktiviteye sahiptir, onu bu substrata karşı çok az aktiviteye sahip olan PON3 ve PON2 takip eder. 5-HETE ve 5-HETEL'in, peritoneal makrofaj siklooksijenaz (COX) ile birlikte trombosit nötrofil fosfolipaz A2'yi (PLA2) inhibe ettiği bilinmektedir (Chang, Blazek, Kreft ve Lewis, 1985).

Paraoksonazın 5-HETEL'i hidrolize etme yeteneği, olası bir fizyolojik düzenleme mekanizmasını gösterir.

PON3, eikosanoidlere, 5,6-dihidroksi-eikosatrienoik asit laktona (5,6-DHETL) ve siklo-epoksisiklopentenona (siklo-EC) bileşiklerini oldukça yüksek düzeyde spesifik olarak hidroliz ettiği saptanmıştır.

1.2 Enzim inhibisyonu

Enzimlerin aktivitesinin azalması ya da tamamen durması olayına enzim inhibisyonu denilmektedir. İnhibisyona sebep olan maddeler ise inhibitör olarak adlandırılır. Enzim inhibisyonu konusu oldukça önemlidir ve bu konuda literatürde çok sayıda araştırmaya rastlamak mümkündür.

Enzim inhibisyonu konusunun bu kadar popüler olmasının genel olarak üç farklı sebebi vardır. İlk olarak, çoğu ilaçlar ve toksik maddeler etkilerini bu yolla gerçekleştirirler. İkincisi, enzimatik aktivitenin kontrolünde tasarlanmış mekanizmaların temelini enzim inhibisyonu oluşturur. Son olarak enzimlerin etki mekanizmalarının saptanmasında enzim inhibisyonu, önemli bir araç olarak kullanılmaktadır.

1.2.1 PON1 İzoenziminin İnhibisyonu

PON1'in birçok kritik fizyolojik fonksiyona sahip bir enzim olduğundan bahsetmiştik. Bu nedenle söz konusu enzimin aktivitesinin korunması çok önemlidir. Farmakolojik

uygulamalarda kullanılan biyoaktif moleküllerin bu kardiyο-koruyucu enzimin aktivitesi üzerindeki etkilerinin araştırılması yeni ilaçların geliştirilmesi için oldukça önemlidir.

Daha önce belirtildiği gibi PON1 aktivitesi ve yapısının stabilitesi tamamen kalsiyuma bağlı olacak şekilde tasarlanmıştır. Bu nedenle EDTA'nın, PON1 aktivitesini dönüşümsüz bir şekilde inhibe ettiği saptanmıştır. Bununla birlikte diğer birçok katyonların da PON1 aktivitesi üzerinde inhibitör etkisi olduğu gösterilmiştir. Baryum, lantan, bakır, çinko ve cıva katyonlarının sıçan veya insan karaciğerinden elde edilen PON1 aktivitesini inhibe ettiği saptanmıştır (Gonzalvo, Gil, Hernández, Villanueva ve Pla, 1997).

Magnezyum, kobalt, kadmiyum ve nikel iyonlarının da benzer şekilde PON1 üzerinde inhibitör etkilerinin olduğunu gösteren çalışmalar vardır (Debord, Bollinger, Merle ve Dantoine, 2003). Ayrıca cıva ve bakır iyonlarının Cys285 rezidüsü üzerindeki tiyol gruplarına bağlanarak inhibisyon etkisi gösterdiği ileri sürülmüştür (Debord ve diğerleri, 2003; Gonzalvo ve diğerleri, 1997).

PON1'i *in vitro* olarak güçlü bir şekilde inhibe eden kadmiyum, metil cıva veya diyet demirine maruz bırakılan farelerde *in vivo* olarak aynı etkinin görülmemesi oldukça dikkat çekicidir. Bu durum, plazmadaki bazı proteinlerin metalleri bağlayarak PON1 enzimini bu metallere karşı koruduğu şeklinde açıklanmıştır.

PON1'in farmasötik bileşikler tarafından modülasyonu üzerine yapılan çalışmaların çoğu lipid düşürücü bileşiklere odaklanılmıştır. Statinler ve fibratlarla yapılan bu tür çalışmalar çelişkili sonuçlar vermiştir. HuH7 insan hepatom hücreleri üzerinde pravastatin, simvastatin ve fluvastatine *in vitro* etkisi incelenmiş ve PON1 aktivitesinde %25-50 azalma ve PON1 mRNA'da ise benzer oranlarda düşüş gözlenmiştir. Aynı hücrelerde fenofibrik asit, PON1 aktivitesinde %50 ve mRNA'da sırasıyla %50 ve %30 artışa neden olmuştur (Gouédard, Koum-Besson, Barouki ve Morel, 2003).

PON ayrıca spironolakton, mevastatin, lovastatin, simvastatin, pravastatin ve prulifloksasin gibi diüretikler ve hipokolesterolemik ilaçların için önemli bir hedefdir. (James, 2000; Malin ve diğerleri, 2001; Tomás ve diğerleri, 2000). Yaygın olarak kullanılan intravenöz anesteziklerden olan etomidat, propofol ve ketaminin saflaştırılmış hPON1 aktivitesi üzerindeki etkileri incelenmiştir (Alici ve diğerleri, 2008).

Türkeş ve arkadaşları, çok sayıda geniş spektrumlu antimikrobiyal bileşikler saflaştırmış ve PON1 enzimi üzerindeki etkilerini detaylıca araştırmışlardır. Çalışılan bileşiklerden birinin yarışmalı diğerlerinin de yarışmasız olarak enzimi inhibe ettiği bulunmuştur (Türkeş ve diğerleri, 2019).

Tüm bunların dışında araştırma grubumuz tarafından geliştirilen bir yöntemle hPON1 enzimi saflaştırılmış ve saf enzim üzerinde birçok iyon ya da molekülün etkileri saptanmıştır. Bu moleküllerden birçoğunun klinikte yoğun bir şekilde kullanılan ilaçlar olması dikkat çekmektedir. Ayrıca inhibitör olarak kullanılan birçok bileşiğin laboratuvarımızda sentezlenen moleküller olması çalışmaların önemini artırmaktadır (Arslan ve diğerleri, 2012; Dedeoğlu, Arslan ve Erzenin, 2014; Ergun, 2022; Karataş ve diğerleri, 2019; Karataş, Uslu, Alici, ve diğerleri, 2016; Karataş, Uslu, Alici, ve diğerleri, 2016; Sayin, Çakir, Genç ve Arslan, 2012; S Sinan, Kockar, Gencer, Yildirim ve Arslan, 2006; Selma Sinan, Kockar ve Arslan, 2006; Selma Sinan, Kockar, Gencer, Yildirim ve Arslan, 2006).

Ancak koyun ve sığır PON enzimlerinin inhibisyonu konusundaki çalışmalar oldukça sınırlıdır. Merinos ve kıvrıcık koyunlarından PON enzimi saflaştırılmış ve bazı ağır metallerin bu enzimler üzerindeki etkileri saptanmıştır. Çalışmada kullanılan metal iyonlarının söz konusu enzimleri farklı düzeylerde inhibe ettiği bulunmuştur (Erol, Genç, Arslan ve Arslan, 2013).

Başka bir çalışmada ise sığır serumundan PON1 enzimi saflaştırılmış ve sığır hastalıklarında kullanılan birçok ilacın saf enzim üzerindeki modülasyon etkileri incelenmiştir. Hesaplanan IC₅₀ değerlerine göre bazı ilaçların söz konusu enzim üzerinde güçlü inhibisyon etkisine sahip olduğu görülmüştür (Arslan ve diğerleri, 2012).

Sığır PON enzimi üzerindeki sınırlı çalışmalardan başka bir eserde ise PON1 enzimi sığır spermelerinden saflaştırılmış ve ağır metallerin bu enzim üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Sperm PON enzimini güçlü bir şekilde inhibe eden Cu²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺ ve Pb²⁺ 'nın spermde oksidatif stres gelişimi ve ardından sperm kalitesinde düşüş riskini artırabilen ciddi toksik metaller olduğunu göstermiştir (Dedeoğlu ve diğerleri, 2014).

1.3 Araştırma Kapsamında Kullanılan İlaçlar

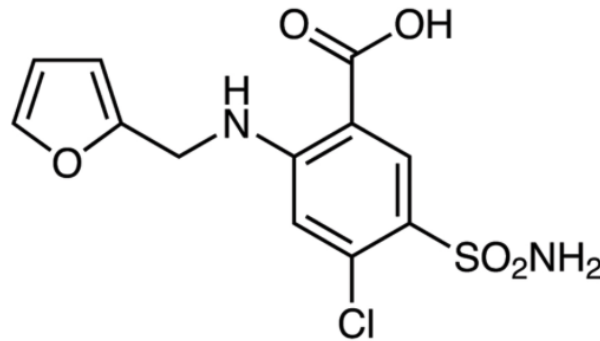
Sığır hastalıkları tedavisinde yaygın kullanılan Furosemid, Prednisolon, Metajin, Enroflaxacin, Anaflex, Symfos, Sülfonamid etken maddeli ilaçlar ile ilgili bilgiler aşağıdaki gibidir.

1.3.1 Furosemid

Furosemide, (4-kloro-N-(2-furilmetil)-5-sülfamoil antranilik asit), sığırlarda doğuma yakın meydana gelen ödem durumlarında kullanılmaktadır (Shaikh, O'Driscoll ve Cullison, 2002). Furosemid mekanizması oldukça tartışmalı olan kuvvetli bir diüretiktir. Henle kolu ve proksimal kıvrımda sodyumun geri emilimini inhibe etmektedir (Navon, Mishkinsky, Panigel ve Schoenberg, 1975).

Furosemid insan ve veteriner ilacı olarak çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan kuvvetli asidik bir diüretiktir. Nefronlarda (henle lobu üzerinde sodyumun geri emilimi ile ilaç etkileşimlerinin meydana geldiği yerde) fonksiyonlarından dolayı Loop diüretiği olarak sınıflandırılmaktadır. İyonların geri emilimi sadece sodyum ve klor ile sınırlı olmayıp potasyum, magnezyum, kalsiyum ve daha fazlasının emilimi söz konusudur. Klinik uygulamada Furosemid akciğer ile ilgili ödemlerde, kalp, karaciğer ve böbrek hastalıklarında ve yüksek tansiyona bağlı olarak gelişen sıvı tutulumu durumlarında tedavi amaçlı olarak kullanılmaktadır (Santini, Redigolo Pezza, Sequinel, Rufino ve Pezza, 2009a).

İlaç intramuskular ve intravenöz olarak her hayvan için günde 500 mg'lık dozlarda uygulanmalı ve 48 saati aşmamalıdır (Shaikh ve diğerleri, 2002).



Şekil 1.6: Furosemid kimyasal yapısı (Santini, Redigolo Pezza, Sequinel, Rufino ve Pezza, 2009b).

1.3.2 Prednisolon

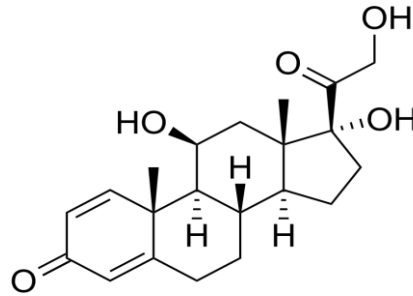
Prednisolon antienflamatuar ve glukogenetik etkileri olan bir kortikosteroiddir (Pompa ve diğeri, 2011a). Glukokortikoidler kortizol ve kortizon adrenal korteksten doğal olarak sentezlenen steroid hormonlardır. Glukokortikoidlerin çok iyi bilinen anti- inflammatuar özelliklerinin temelinde sentetik glukokortikoid analogları olan betamethazon, dekamethazon, metilprednisolon ve Prednisolon, (ön madde olan prednizon kullanımıyla) sentezlenmesi bulunmaktadır (De Clercq, Vanden Bussche, Croubels, Delahaut ve Vanhaecke, 2014a).

Prednisolon (prednisolone (pregna-1,4-diene-11b, 17a, 21-triol-3, 20 dione), yapısında olan kortizol (pregn-4-ene-11b, 17a, 21-triol-3, 20-dione) ile yakından ilişkilidir (Arioli, Casati, Fidani, Silvestri ve Pompa, 2012).

Kortikosteroidlerin çiftlik hayvanları için tedavi amaçlı kullanımı Avrupa Birliği tarafından düzenlenmiştir. Prednisolon maksimum rezidü limiti 4 mg/kg kas içi ve yağ dokusu, 10 mg/kg karaciğer ve böbrek ve 6 mg/kg sütte belirtilmiştir (Arioli ve diğeri, 2012).

Avrupa Birliği kortikosteroidlerin çiftlik hayvanlarında tedavi amaçlı kullanımını yasaklamıştır. Ancak Commission Regulation (EEC) N° 37/2010 tarafından betametazone, dexamethasone, metilprednisolon ve Prednisolon için maksimum rezidü sınırları konusunda yeni bir düzenleme gerçekleştirmiştir (Pompa ve diğeri, 2011b).

Prednizon prednizol'un inaktif ön materyalidir ve karaciğerde aktive edilir. Bu steroidlerin adrenokortik aktiviteleri kortizon ve kortizolde olduğu gibidir (Pompa ve diğeri, 2011b).



Şekil 1.7: Prednisolon kimyasal yapısı.

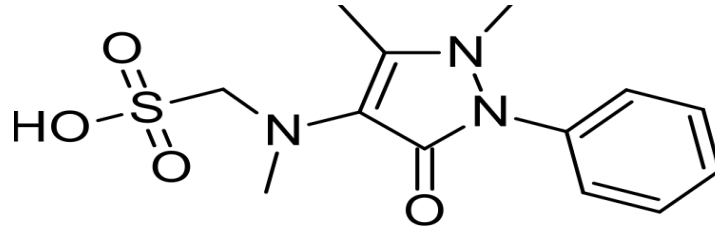
1.3.3 Metajin (Metamizol)

Metajin, 1 ml'de 500 mg metamizol = dipiron(phenyl-dimethyl pyrazolone-methylamino methane sülfonate sodium salt) içerir (Vetrehberi, 2022).

Opioid-olmayan analjezik grubu içinde olan asidik-olmayan pyrazole türevi olan metamizole (dipyrone, Novalgin) yüksek analjezik potansiyeline sahip bir maddedir (Feldmann, Zuehlke ve Heberer, 2008).

Metamizole (dipiron) bir piralozone türevi olduğu, tedavi edici bir ilaç olduğu 1922 yılında ortaya atıldı. İnsan ve veteriner ilacı olarak kullanılan en güçlü opioid-olmayan analjeziklerden biri olduğu öne sürüldü. Günümüzde metamizole opioid-olmayan analjezik olarak sınıflandırılırken yıllarca steroid olmayan anti inflamatuvar ilaç sınıfına ait olduğu iddia edilmişti (Jasiecka, Maślanka ve Jaroszewski, 2014).

Kimyasal olarak, metamizole sodyum N-(2,3-dimetil-5-okso-1-fenil-3-pirazolin-4-il)-N-metilaminometansülfonat adlandırılır. (Jasiecka ve diğerleri, 2014).



Şekil 1.8: Metamizole kimyasal yapısı.

Metamizole bir opioid-olmayan analjezik, antipretik, ve spazmolitik ön ilaçtır. Metamizole bağırsaklarda ve kan dolaşımında hızlıca aktif ilaç olan N-methyl-4-aminoantipyrine (N-metil-4-aminoantipirin) (MAA) enzimatik olmayan dönüşümü gerçekleşmektedir (Rudin ve diğerleri, 2019a).

Bu ilaç özellikle düz kaslardaki spazmlardan köken alan ağrıların giderilmesinde aktif olmasının yanında antipretik özelliklere ve antispazmotik aktivitelere sahiptir. Fakat nadiren de olsa kuvvetli yan etkilere; (agrenalotosis ve akyuvarların sayısında azalma (lökopenia) sebep olduğu için günümüzde bazı ülkelerde (USA, UK, Sweden) kullanımı yasaklanmıştır. Metamizole' nin kontrollü kullanımının ise oldukça güvenli olduğu düşünülmektedir. Eşsiz analjezik özelliklere sahip olan bu bileşiğin kullanımı Almanya'da oldukça popülerdir. Metamizole'nin insanlarda kullanımı bazı Avrupa ülkelerinde,

Afrika'da, Asya'da ve Kuzey Amerika'da, Japonya'da ve Avustralya'da Metamizole'nin insanlarda sınırlı olarak kullanımı mümkündür (Feldmann ve diğerleri, 2008).

Metamizole (sodyum N-[(2,3- dimetil-5-okso-1-fenil-3- pirazolin-4-yl)-N-metilamino] (MT), dipirone olarak bilinen bir pyralozone türevi tedavi edici ilaç olarak Almanya'da 1922 yılında tanıtılmıştır. Yüksek etkinliğe sahip opioid-olmayan analjezik ilaç olan Metamizole insan ve veteriner ilacı olarak şiddetli ağrıların tedavisinde kullanılmaktadır (Aupanun ve diğerleri, 2016a).

Polonya'da metamizole'nin insanlarda kullanımı için enjeksiyonluk çözeltisinin elde edilebilirliği (Sanitas, Lithuania), Pyralgin (Polpharma, Poland] ve verilen hayvan türlerinde; sığırlarda, koyunlarda, keçilerde, atlarda, domuzlarda ve köpeklerde [monopreparations: Biovetalgin (Biowet Drwalew, Poland), Injectio Pyralgini (Biowet Puławy, Poland), Pyralgivet (Vet-Agro, Poland), Vetalgin (Intervet International, Poland); metamizol sodyum ve hyosin bütülbromid içeren kompleksler hazırlanmıştır (Jasiecka ve diğerleri, 2014).

Metamizole birçok ülkede agregülotizosis endişesi nedeniyle yasaklanmasına rağmen bileşik Brezilya ve Almanya gibi ülkelere ameliyat sonrası ağrıların giderilmesinde kullanılmaktadır (Hoenicka, Gorki, Traeger ve Liebold, 2017).

Metamizol'ün Annex II of Council Regulation EEC 2377/90 belirlediği maksimum rezidü sınırı süt ineklerinde 50 kg canlı ağırlık için 1 g, eti için beslenen sığır türlerinde 100 kg için 1 g olarak kas içi ve yağ dokusu belirlenmiştir (Feldmann ve diğerleri, 2008).

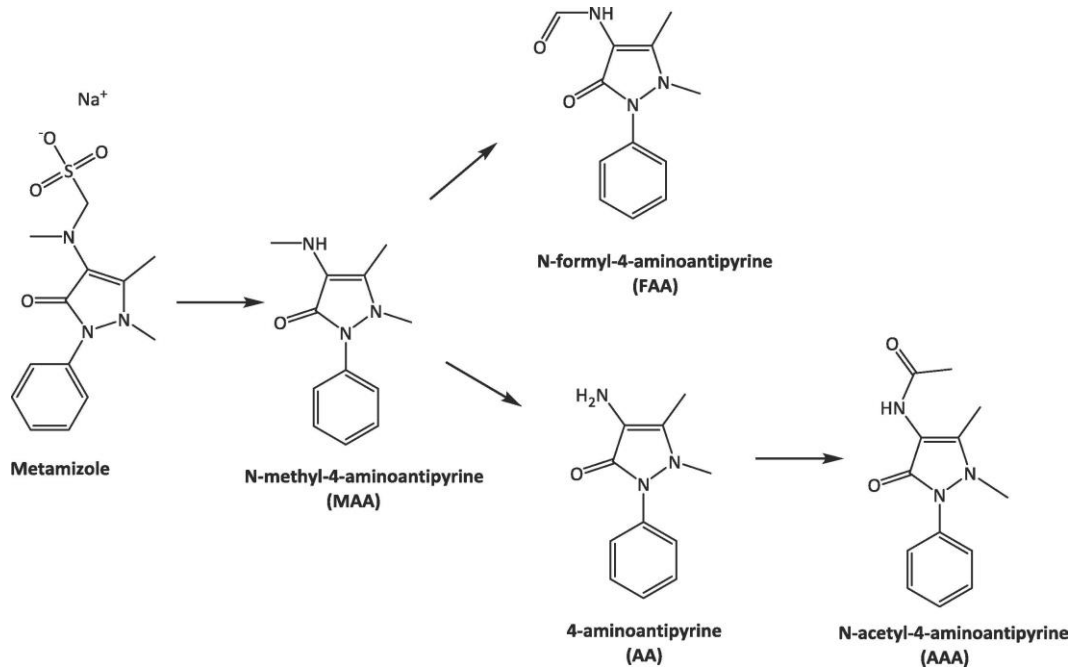
İnsanlarda metamizol'ün kullanımı oral yoldan günde dört kez 500 -1000 mg aralığındaki dozlarda yönlendirilmiştir. Avrupa'da metamizol'ün veteriner ilacı olarak kullanımı yasaklansa da birçok inflamatuvar durumda iskelet kasları ve lökomotor sistemin tedavilerinde atlarda, sığırlarda ve domuzlarda kullanıldığı gösterilmiştir (Feldmann ve diğerleri, 2008).

Pyrazolone ilaç olan metamizole geniş bir kullanımı olan analjeziktir. Metamizole ile tedavi edilmiş hastaların karaciğerlerinden alınan mikrozomlarının analizinde sitokromlar P450, CYP2B6 yüksek olduğu ortaya çıkarılmıştır (Saussele ve diğerleri, 2007).

İnsanlarda metamizol hızlıca birincil metaboliti olan 4-methylaminoantipyrine (MAA) hidrolize edilir. Daha sonra MAA 4-formylaminoantipyrine (FAA) ve 4-aminoantipyrine (AA) (Levy et al., 1995) metabolize edilir (Giorgi ve diğerleri, 2015).

Metamizol fizyolojik koşullar altında primer aktif analjeziklerine hızlıca hidrolizlenen bir ön ilaçtır. Bu reaksiyon karaciğerde ve muhtemelen diğer dokularda meydana gelen bu reaksiyon (Volz and Kellner 1980), birçoğu analjezik özelliklere sahip olan en azından yedi metabolitin oluşumuyla sonuçlanmaktadır (Hoenicka ve diğerleri, 2017).

Metamizol oral yol ile kullanımından sonra gastrointestinal sistemde temel metabolit olan 4-methylaminoanthypyrine (4-MAA) dönüşmektedir. Karaciğerde meydana gelen enzimatik olmayan reaksiyon sonucunda 4-MAA'nın diğer metabolitleri: 4-aminoanthypyrine (4-AA), 4-N-acetylaminoanthypyrine (4-AAA) and 4-N-formylaminoanthypyrine (4-FAA) 'dir (Bonfim ve diğerleri, 2021a).



Şekil 1.9: Metamizole'nin metabolizması (Rudin ve diğerleri, 2019b).

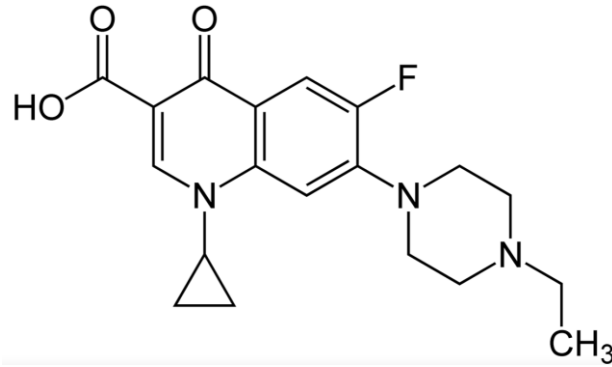
Metamizole enzimatik olmayan bir dönüşüm ile aktif metabolit olan N-methyl-4-aminoantipyrine (MAA) dönüşmektedir. MAA enzimatik olarak biyoyararlanım için enzimatik olarak 4-aminoantipyrine (AA) ya da N-formyl-4-aminoantipyrine (FAA) dönüşebilmektedir (Rudin ve diğerleri, 2019b).

1.3.4 Enroflaxacin

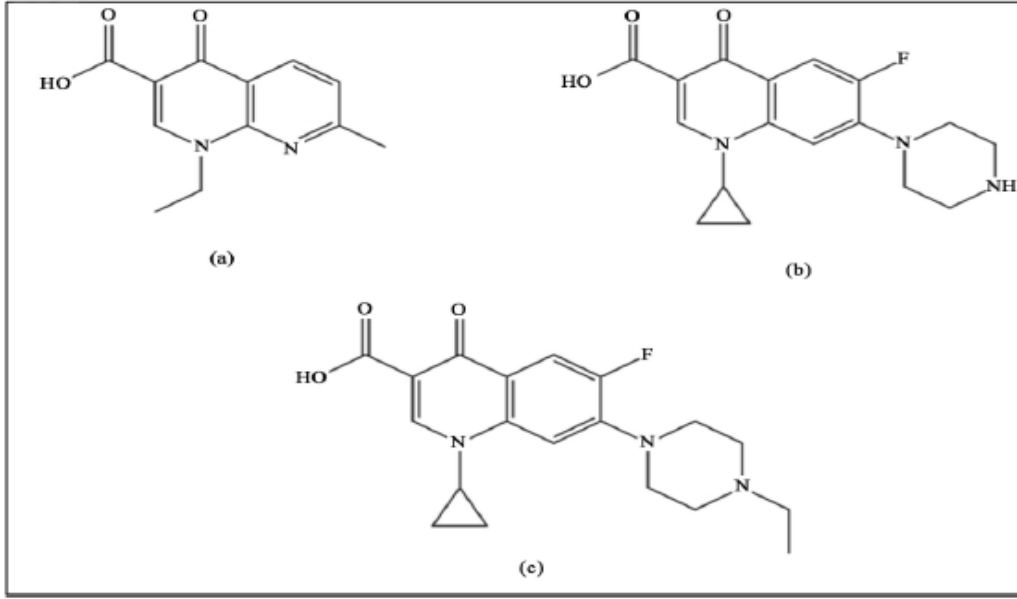
Enroflaxacin (1-Cyclopropyl-6-fluoro-7-(4-ethyl-1-piperazinyl)-1,4-dihydro-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acid (1-Siklopropil-6- floro-7-(4-etil-1-piperazinil)-1,4- dihidro -4-okso-3- kinolinkarboksilik asit florokinolin ailesine ait kinolinlerin bir alt sınıfıdır. Nalidixic acid 1980'lerde hayvanlarda kullanılmaya başlayan ilk fluorokinolindir. Enroflaxacin 1984 yılında patent almış olan ilk fluorokinolindir. Enroflaxacin pKa1 = [5,88 – 6,06] ve pKa2 = [7,70 – 7,74] değerlerine sahip bir zwitter iyonik moleküldür. Ciproflaxacin enroflaxacinin aktif metabolitidir (Trouchon ve Lefebvre, 2016).

Enroflaxacin (ENRO) ve onun aktif metaboliti olan (CIPRO) Floroquinol sınıfına ait geniş spektrumlu mikrobiyallerdir. Enroflaxacin veteriner kullanımı için bakteriyel kökenli hastalıkların tedavilerinde kullanılmak için geliştirilmiştir (Otero ve diğerleri, 2016).

Enroflaxacin hayvanlarda Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı geniş spektrumlu aktivite göstermektedir. Enroflaxacin'in bakteriyel aktivitesi konsantrasyona bağlıdır ve DNA süpersarmalını ve DNA sentezini önleme yoluyla bakteriyel DNA giraz'ın tip-II topoizomerez) inhibisyonuna sebep olmaktadır. Enroflaxacin (Bayer Animal Health GmbH) 0,1 M sodyum hidroksit (NaOH) konsantrasyonlarında 10 mg/ml stok çözeltileri halinde bulunmaktadır. Uygulamalarda 10 µg/ml enroflaxacin kullanılmaktadır (Jerjomiceva ve diğerleri, 2014).



Şekil 1.10: Enroflaxacin kimyasal yapısı.



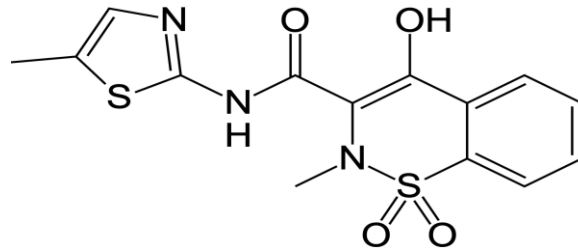
Şekil 1.11: (a) Nalidixic Acid; (b) Ciprofloxacin and (c) Enrofloxacin yapıları (Trouchon ve Lefebvre, 2016).

Enroflaxacin sığırlarda solunum yolu hastalıkları tedavisinde kullanılan fluorokinolindir. Kullanımı 2,5-5mg/kg oranlarında 3-5 gündür (Hamm ve diğerleri, 1999).

1.3.5 Anaflex

Anaflex ticari adıyla anılan ilacın etken maddesi meloksikam bileşiğidir. Söz konusu bileşik oksikam grubu antienflamatuar bir ilaç olarak kullanılır. Güçlü bir siklooksigenaz inhibitörü olarak bilinmektedir. Prostaglandin biyosentezini inhibe ederek antienflamatuar, analjezik ve antiromatizmal etkilerini göstermektedir. Polynoxylin vurgulanan ismi polyoxymethyleneurea ticari adı Anaflex' tir (Kennett ve Cohen, 1966).

Polynoxylin ve Noxythiolin (Anaflex and Noxyflex) belirli bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanımı önerilmektedir. Her iki bileşik için formaldehit açığa çıkardıkları gösterilmiştir (Kingston, 1965).

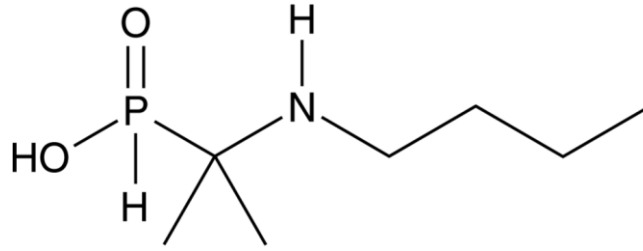


Şekil 1.12: Meloksikam kimyasal yapısı.

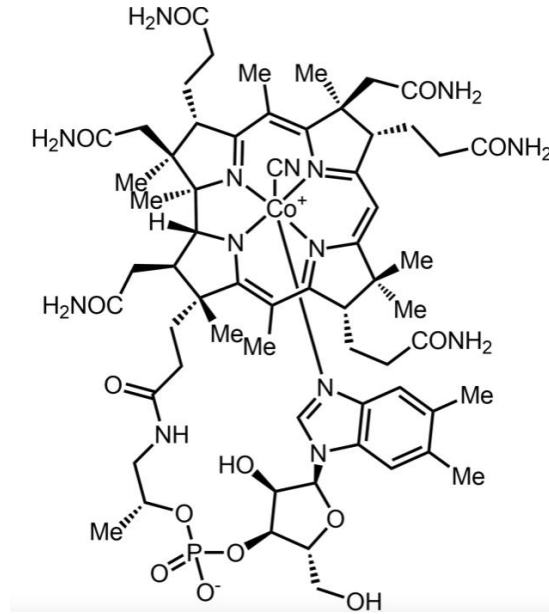
Kimyasal olarak polykondanse üre-formaldehit geniş spektrumlu bakteristatik özellikler ve ilaveten fungistatik özellikler göstermektedir. Polynoxylin aktivitesinin suyun varlığına bağlı olduğu rapor edilmiştir. Polynoxylin oral candidozis tedavisinde etkilidir (Kennett ve Cohen, 1966).

1.3.6 Symfos

Siyanokobalamin-symfos (butofosfan siyanokobalamin kombinasyonu) vitamin B12 ve butafosfan (alfa amino fosfonik asit) bileşimidir (Şahal ve diğerleri, 2017).



Şekil 1.13: Butafosfan kimyasal yapısı.



Şekil 1.14: Siyanokobalamin kimyasal yapısı.

Siyanokobalamin, vitamin B12'nin sentetik bir analogudur. Vitamin B12 (adenozilkobalamin) metilmalonil CoA'nın süksinil CoA'ya dönüşümünde kofaktör olarak kullanılmaktadır (Kennedy ve ark., 1990). Butafosfan ise enerji metabolizmasında rol oynayan organik bir fosfor bileşimidir (Yildiz, 2016).

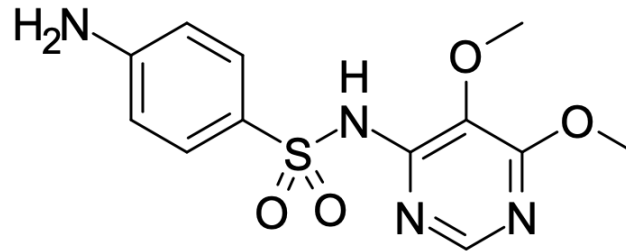
İneklerde yavru zararlarının atılamaması beslenmeye ve çevresel birçok etmene bağlı olarak gelişmektedir. İneklerde negatif enerji dengesi oluşumuna sebep olmaktadır. Butafosfan ve Vitamin B12 kombinasyonu, ineklerin negatif enerji dengesini minimize etmek için kullanılmıştır (Yildiz, 2016).

Butafosfan siyanokobalamin kombinasyonunun sığırlarda metabolizmayı destekleyici olduğu ve ketozis durumlarında kontrolü sağladığı araştırmalarla gösterilmiştir. Yapılmış olan başka bir çalışmada sadece B12 vitamini ya da butafosfan ile kombinasyonunun laktasyon verimini iyileştirdiği gösterilmiştir (Şahal ve diğerleri, 2017).

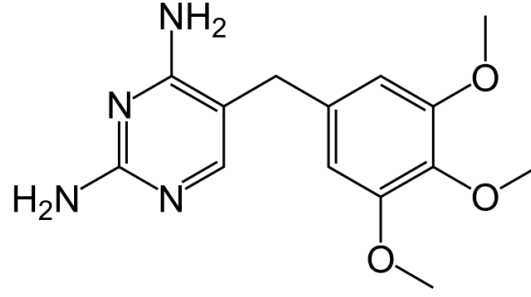
1.3.7 Bakteral

Sülfonamidler (SULs) ve Trimethoprim (TMP) sentetik antibakteriyel ajanlardır. İlk sülfonamid bileşiği kullanımı 1932 yılında gerçekleşmiş iken TMP kullanımı 1962 yılında gerçekleşmiştir. 1968'den beri TMP'nin SULs ile kombinasyonu TMP-SUL kombinasyonu *in vitro* olarak kullanılmaktadır. Ancak TMP-SUL kombinasyonunun canlılarda sinerjik etkileri tam olarak anlaşılamadığı için 1970'ten beri TMP'nin tek başına kullanımı gündeme gelmiştir (Huovinen, Sundström, Swedberg ve Sköld, 1995).

Sülfonamidler fonksiyonel grup olarak (sülfonil grubuna bağlı amin grubu) içerdikleri için sulfo ilaçlar olarak adlandırılan yüzyıllardır insan ve hayvanların tedavisinde kullanılan antimikrobiyal ilaçlardır. Antimikrobiyal özelliklerinin yanı sıra bu ilaçlar birçok biyolojik karakteristiklere; diüretik, antitiroid ajan, proteaz inhibitörü, hipoglisemik ajan, antibakteriyel, antifungal, antitumor, antibiyotikler, asit-baz indikatörü ve antihipertroidizm ajanları sahiptirler (Işık ve diğerleri, 2020).



Şekil 1.15: Sülfadoksin genel yapısı.



Şekil 1.16: Trimetoprim kimyasal yapısı.

Sülfonamidler para-aminobenzen-sulphonamide (sulfanilamid) türevleridir. Para-NH₂ grubu radikallerin serbest amino grupları ile yer değiştirmesi için gereklidir. Amid içindeki NH₂'nin sübtütasyonu antibakteriyel aktivite üzerinde çeşitli etkilere sahiptir (Campbell, 1999).

Avrupa Birliği'nin hayvan yetiştiriciliği ile ilgili önerdiği oldukça geniş kullanımı olan antibiyotikler; tetrasiklinler, makrolidler, penisilinler, aminoglikosidler ve sülfonamidler/trimetoprim'dir (Haller, Müller, McArdele, Alder ve Suter, 2002).

1.4 sPON Enzimi İle İlgili Literatür Çalışmalarının Özeti

sPON1 ile ilgili yapılan literatür araştırmalarında, ilk dönemlerde genelde klinik ağırlıklı çalışmaların yapıldığı görülmektedir. Literatürde sığır PON1 üzerindeki ilk çalışmada erken doğum sürecinde süt ineklerinde PON aktivitesinin nasıl değiştiği saptanmıştır. Bu süreçte hem enzim aktivitesinde hem de antioksidatif kapasitede önemli azalma gözlenmiştir (Turk ve diğerleri, 2004).

sPON1 üzerindeki bir diğer çalışmada ise Holstein ve Japon siyah sığır ırkları için PON1 aktivitesinin serum ve lipoproteinlerdeki dağılımı araştırılmıştır (Miyamoto, Takahashi, Oohashi, Sato ve Oikawa, 2005).

sPON1 enziminin gebelik dönemlerindeki serum aktivitelerinin nasıl değiştiği incelenmiştir. Normal dönem ile gebelik dönemi karşılaştırılmış ve sığırlarda normal dönem paraoksonaz aktivitesi laktasyon döneminden önemli derecede düşük olduğu tespit edilmiştir (Turk ve diğerleri, 2005).

Klinik ağırlıklı başka bir çalışmada ise geçiş dönemi süt ineklerinde sağlık durumlarının ve karaciğer fonksiyonlarının plazma paraoksonaz ile olan ilişkileri saptanmıştır (Bionaz ve diğerleri, 2007). Süt inekleri üzerinde yapılan bir diğer incelemede serum PON1 aktivitesinin problemlili doğum ile ilişkisi araştırılmıştır (Bademkiran, Yokus, Cakir, Durak ve Kurt, 2008).

sPON üzerinde gerçekleştirilen klinik ağırlıklı çalışmaların bir diğerinde ise süt ineklerinde granuloza hücreleri içindeki (PON) 1, 2 ve 3 dağılımı ve serum içindeki PON1 seviyeleri incelenmiştir. İlgili hücrelerdeki PON1 aktivitesinin çok daha yüksek olduğu saptanmıştır (de Campos ve diğerleri, 2017).

Süt ineklerindeki karaciğer yağlanmasının tanısında PON1 aktivitesinin bir belirteç olarak kullanılabilmesi konusunda Farid ve arkadaşlarının araştırması dikkat çekmektedir (Farid ve diğerleri, 2013).

Sığır serum paraoksonaz 1 (PON1) üzerinde ilk detaylı araştırmalar grubumuz tarafından gerçekleştirildiği görülmektedir. Bu araştırmalardan birisinde sPON1 enzimi hidrofobik etkileşim tekniği ile saflaştırılmış ve bazı ilaçların bu enzim üzerindeki etkileri saptanmıştır. Çalışılan ilaçların mM düzeyinde enzimi güçlü bir şekilde inhibe ettiği belirlenmiştir (Arslan ve diğerleri, 2012).

Bir başka kinetik çalışmada ise saflaştırılmış sığır PON1 enzim aktivitesi üzerine bazı ağır metallerin inhibisyon etkileri saptanmıştır. Hesaplanan IC_{50} değerlerinden çalışılan iyonların önemli ölçüde etkili olduğu belirtilmiştir (Bilen, Beyaztaş, Arslan ve Güler, 2013).

Araştırma ekibimizin tarafından gerçekleştirilen farklı bir çalışmada ise hidrofobik etkileşim kromatografisi ile ilk defa sığır sperminden PON saflaştırılarak ağır metallerin inhibisyon etkileri araştırılmıştır (Dedeoğlu ve diğerleri, 2014).

Erzengin ve arkadaşları tarafından farklı sığır PON enzimlerinin kinetik özellikleri araştırılmıştır. Bu amaçla ilgili enzimler saflaştırılarak K_m ve V_{max} değerleri saptanmış ve yaklaşık enzim etkinlikleri hesaplanmıştır (Erzengin, Demir, Arslan ve Sinan, 2014).

Sığır PON üzerinde yapılan bir başka çalışmada serumdan söz konusu enzim saflaştırılmış ve immobilize edilerek doğal enzime göre özelliklerinin nasıl değiştiği belirlenmiştir (Sayın ve Guler, 2015).

Kulka ve ark. Tarafından yapılan bir çalışmada Holstein-Fresian süt inekleri ile serum paraoksonaz aktivitesi arasındaki korelasyon saptanmıştır. Bu amaçla farklı laktasyon evrelerindeki PON1 aktiviteleri paraokson substratı için, kuru dönem 97,2 (\pm 22,5), doğum sonrası 83,2 (\pm 30,7) ve laktasyon piki 90,93 (\pm 29,40) olarak, fenil asetat substratı için ise sırası ile 207,56 (\pm 48,7), 168,26 (\pm 23,8) ve 184 (\pm 50) olarak saptanmıştır (Kulka ve diğerleri, 2014).

Sığır paraoksanaz enzimi üzerindeki bir diğer çalışmada PON1 promotör bölge nükleotit polimorfizmi belirlenmiş ve bu çalışmada süt inekleri için serum PON1 aktivitesi ($P < 0,05$) olarak tespit edilmiştir (Silveira ve diğerleri, 2015b).

Folnozc ve ark. Tarafından Holstein- Friesian süt inekleri ile geçiş dönemlerindeki metabolik göstergeler olan serum lipid mobilizasyonunu ve oksidatif stres arasındaki ilişki araştırılmıştır. Bu çalışmada PON1 seviyeleri ile toplam kolesterol ve HDL-C konsantrasyonları arasında önemli derecede pozitif bir ilişki saptanırken NEFA göstergeleri ile negatif bir ilişkinin olduğu tesbit edilmiştir (Silveira ve diğerleri, 2015b).

Rekombinant PON1 (rPON1)'in sığır oosit maturasyonunu üzerine olan etkilerinin saptanması amacıyla Rincon ve arkadaşları tarafından bir araştırma planlanmış ve *in vitro* olarak embriyo gelişimi sırasında IVM medium (Biotecnologia Animal, Brasilia, Brazil) 0,00, 0,02, 0,04 ve 0,08 mg ml⁻¹ uygulama sonrasında PON1 arilesteraz aktivitesi 2,2 (\pm 0,4), 15,5 (\pm 1,5), 30,2 (\pm 3,0) ve 57,9 (\pm 5,0) U ml⁻¹ saptanmıştır (Rincón ve diğerleri, 2016).

Sığır PON üzerinde başka bir çalışmada ise oksidatif strese sahip sığırlarda önemli derecede düşük enzim seviyeleri ve arilesteraz belirlenmiştir (Taha ve diğerleri, 2016).

Ayrıca sığır PON enziminin esteraz ve paraoksonaz aktiviteleri üzerine ibuprofen ve warfarin etkileri saptanmıştır. Klinik ağırlıklı bir diğer çalışmada ise farklı sığır ırklarının normal ve doğum sonrası dönemlerdeki paraoksan ve fenilasetat substratları kullanılarak serum PON aktiviteleri saptanmıştır (Kulka, Kołodziejaska-Lesisz ve Kluciński, 2016).

Sığır PON ile ilgili yapılan bir başka çalışmada süt ineklerinde paraoksonaz-1 aktivitesi ve lipid mobilizasyonu arasındaki ilişki araştırılmıştır. Bu çalışmada buzağılarda serum PON1 aktiviteleri düşük olarak tesbit edilmişken, 26-60 günlük doğum sonrası dönemi için önemli derecede arttığı saptanmıştır (Turk ve diğerleri, 2016).

Ayrıca geçiş dönemlerindeki düvelerde, metabolik adaptasyon prosesi olarak, lipid mobilizasyonunu ve oksidatif stresi araştırmak üzere yapılan çalışmada PON1 seviyeleri ile toplam kolesterol, HDL-C ve trigliseridler arasında pozitif bir ilişki saptanırken, FFA, BHB and bilirubin seviyeleri arasında ters bir ilişkinin olduğu saptanmıştır. PON1 seviyelerindeki değişimlerin lipid metabolizmasını ve negatif enerji dengesini etkilediği sonucuna ulaşılmıştır (Turk ve diğerleri, 2016).

Geçiş dönemdeki süt ineklerinde metabolik durumun belirlenmesi amacıyla PON1 enziminin belirteç olarak kullanılabilereğini göstermek amacıyla (Ercan, Yoku, Can ve Koçhan, 2017; Rohenkohl ve diğerleri, 2017) yapılmış olan bir çalışmada peripartum dönemlerinde serum PON1 aktivitesinin azaldığı tespit edilmiştir.

PON enziminin belirteç olarak kullanılabilereğini gösteren diğer bir çalışmada ise gebe sığırlarda erken dönem komplikasyonların tespiti için paraoksonaz seviyeleri saptanarak, klinik olarak komplikasyonların erken teşhisi için artmış PON1 seviyelerinin gösterge olabileceği vurgulanmıştır (Ercan ve diğerleri, 2017).

Park ve ark. tarafından konu ile ilgili yapılan bir çalışmada buzağılarda cinsiyet farklılıkları gözetilmeksizin et kalitesi ile serum PON1 seviyeleri arasındaki ilişki araştırılmış ve düşük PON seviyeleri ile düşük et kalitesi arasında paralellik saptanmıştır (Park ve diğerleri, 2019).

Bu konuda yapılan farklı bir çalışmada Holstein sığırlarda süperovulasyon ile serum PON1 seviyelerindeki artış arasındaki ilişki araştırılmıştır (Alkan, Satilmis, Karasahin, Dursun ve Erdem, 2021).

Klinik ağırlıklı çalışmada ise buzağılarda dexamethasone'un yasadışı olarak kullanımının serum paroksanaz / arilesteraz 1 aktivitesinin bir biyobelirteç olarak kullanılabilereği konusunda araştırma yapılmıştır. Bu amaçla tedavi amacıyla kullanılan diğer glukokortikoidlerin, PON1 üzerine olan etkileri araştırılmış ve PON1'in negatif sonuç oluşturan durumlar için biyomarker olarak kullanılabilereği ancak pozitif durum içeren sonuçlar için histolojik belirlemelere ihtiyaç duyulacağı saptanmıştır (Guglielmetti ve diğerleri, 2014).

1.5 kPON enzimi ile ilgili literatür çalışmalarının özeti

Yapılan literatür araştırması sonucu koyun PON enzimi ile ilgili çalışmaların son derece sınırlı olduğu görülmüştür. Tarafımızdan tespit edilen çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

Konu ile ilgili ilk rastlanan çalışmada kısmen saflaştırılan koyun PON enziminin bazı özellikleri incelenerek insan PON ile karşılaştırılması yapılmıştır (Mackness, Hallam, Peard, Warner ve Walker, 1985).

Koyun PON ile ilgili ilk kapsamlı araştırmalar grubumuz tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmaların birisinde Karacabey Merinos, Kıvırcık, Tahirova, Akkaraman ve Dağlıç ırkı koyun ırklarından saflaştırılan PON enziminin karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. PON1'in Km ve Vmax değerleri belirlenmiş ve yaklaşık katalitik etkinlikleri saptanmıştır. Kıvırcık PON1 en yüksek, Karacabey Merinos PON1 ise en düşük etkinliğe sahip olduğu tespit edilmiştir (M. Arslan, 2011).

Araştırma ekibimiz tarafından gerçekleştirilen bir diğer çalışmada ise Merinos ve Kıvırcık ırkı koyun kan serumlarından hidrofobik etkileşim tekniği ile saflaştırılmış olan PON enzimlerinin kinetik ve elektroforetik özellikleri aydınlatılarak ağır metallere karşı afiniteleri belirlenmiştir (M. Arslan, 2011).

Koyun PON enziminin inhibisyonuna yönelik başka bir çalışmada ise karaciğer mikrozom hücrelerinden PON1 enzimi jel filtrasyon tekniği kullanılarak saflaştırılmış ve saf enzim üzerinde bazı pestisitlerin etkileri araştırılmıştır. Kullanılan pestisitlerin μM düzeyinde enzimi inhibe ettiği saptanmıştır (Koncuk Cebeci, Alim ve Beydemir, 2014).

Russell ve ark. tarafından paraoksonaz enzimi çeşitli organofosfor metabolitlerini hidrolizini türler arasındaki farklılığa göre incelenmiş ve koyun PON1 için klorpirifosokson $66,806 \pm 0,451$ B, paraokson $3,843 (\pm 0,061)$ D, Metil paraokson $0,937 (\pm 0,080)$ olarak saptanmıştır (Carr, Dail, Chambers ve Chambers, 2015).

Koyun PON enzimi ile yapılan klinik ağırlıklı bir çalışmada ise paraoksonaz-1'in karaciğer, böbrek ve iştembedeki dağılımını incelenmiş ve PON1'in paraoksonaz aktivitesi, karaciğerde $1,74 (\pm 0,10)$, böbrekte $1,42 (\pm 0,04)$ tespit edilirken, iştembede varlığı

saptanamamıştır. PON1'in arilesteraz aktivitesi ise karaciğerde 0,26 ($\pm 0,01$), böbrekte 0,25 ($\pm 0,02$) olarak bulunmuştur (Sharaf, Taha, Mandour, Lebda ve Elmorshedy, 2016).

Deveci ve arkadaşları koyunlarda ayak ve ağız hastalıklarında paraoksonaz aktivitesini ve oksidatif stres ile olan ilişkisini araştırmış ve yapılmış olan bu çalışmada oksidatif strese karşı önemli antioksidant etkiye PON1 konsantrasyonlarının serum PON1 ($P < 0,001$) olduğu ve kontrol grupları ile karşılaştırıldığında oldukça düşük bir değerde olduğu saptanmıştır (Deveci ve diğerleri, 2018).

Aynı araştırma ekibinin yaptığı diğer bir çalışmada ise enfekte koyunlarda paraoksonaz aktivitesinin nasıl değiştiği araştırılmıştır. Sonuç olarak, sağlıklı koyunlarda PON1 218,54 ($\pm 17,93$) U/L, olarak belirlenirken, enfekte koyunlarda bu değer 174,92 ($\pm 18,68$) U/L olarak saptanmıştır (Deveci ve diğerleri, 2018).

Klinik ağırlıklı koyun PON enzimi ile ilgili farklı bir araştırmada ise koyunlarda doğum sonrası karaciğer yağlanması tanısı için kan paraoksonaz seviyelerinin ve diğer biyokimyasal göstergelerin kullanılabilmesini gösterilmiştir. Çalışmada karaciğer yağlanması tanısı olan koyunlar ve sağlıklı koyunlar olarak iki gruba ayrılarak serum PON1 seviyeleri ve diğer biyokimyasal göstergeler incelenmiş ve karaciğer yağlanması olan koyunlarda azalmış PON1 seviyeleri ($P < 0,05$) saptanırken kontrol grubundan 74,0 U/mL daha düşük seviyede saptanmıştır. Bu çalışma koyunlarda karaciğer yağlanması göstergesi olarak PON1 ve diğer biyokimyasal göstergelerin kullanılabilmesini doğrulamıştır (Cao ve diğerleri, 2017).

Pradieé, J. ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada koyunlarda foliküler sıvı ve seminal plazma paraoksonaz aktivitelerinin tespit edilmiştir. Koyunlarda standart PON1 aktiviteleri dişilerde 286,8 ($\pm 96,2$) U/mL ve erkeklerde 237,6 ($\pm 18,9$) U/mL olarak tesbit edilmişken dişilerde serum ve foliküler sıvı içindeki PON1 aktivitelerinde ($148,8 \pm 15,7$ U/mL) pozitif ilişki sonucunda iki kattan daha fazla bir artış ve erkeklerde seminal plazmada serumdan on kat daha düşük bir seviyede ($21,18 (\pm 14,2)$ U/mL) aktivite belirlenmiştir (Pradieé ve diğerleri, 2017).

Konu ile ilgili klinik bir çalışmada karaciğeri *Cysticercus tenuicollis* ile enfekte koyunlarda enfeksiyon süresince paraoksonaz aktivitesi değişimini incelemiştir. Bu amaçla sağlıklı ve enfekte koyunlardan elde edilen PON aktiviteleri saptanmıştır. Enfekte olan

koyunların oluşturduğu grupta PON seviyelerinde ($P < 0,01$) önemli derecelerde azalma tespit edilmiştir (Azimzadeh, Amniattalab ve Eslampanah, 2018).

Ayrıca farklı bir mikroorganizma ile enfekte koyunlarda benzer çalışmalar yapılmış ve sonuçta enfekte koyunlarda PON aktivitesinde azalma gözlemlenmiştir (Irak ve diğerleri, 2018).

Nadaroğlu ve arkadaşları tarafından Morkaraman ırkı normal ve emziren koyunlardan elde edilen başta PON olmak üzere bazı enzimlerin aktivitesi üzerine florfenikol bileşiminin etkisi araştırılmıştır. Sonuç olarak PON1 ve CAT enziminin aktivitelerinde artış gözlemlenirken, SOD ve GPX enzimleri, florfenikol tarafından inhibe edildiği saptanmıştır (Nadaroglu, Kucukoglu ve Koc, 2013).

Bu konu ile ilgili tespit edebildiğimiz son çalışmada ise gebelik süreci boyunca farklı dönemlerdeki oksidatif stresin varlığını tesbit etmek amacıyla bir araştıra yapılmıştır. Tashla ve ark. Tarafından gerçekleştirilen bu çalışmada, koyunlar; gebe olmayan kontrol grubu, erken dönem gebe, orta dönem gebe, son dönem gebe olarak gruplandırılmıştır. Gebe koyunlarda PON1 seviyeleri ve diğer biyokimyasal parametrelerin ($P < 0,05$) önemli derecede farklılık gösterdiği kaydedilmiştir. Gebelik sürecindeki koyunlarda diğer bazı biyokimyasal parametrelerde artış gözlemlenirken PON-1 seviyelerinde önemli derecelerde azalmalar kaydedilmiştir (Tashla, Ćosić, Kurćubić, Prodanović ve Puvaća, 2021).

2. MATERYAL VE YÖNTEMLER

2.1 Materyaller

2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Sefaroz 4B, L-Tirozin, 1-naftilamin, N,N,N,N' tetrametilendiamin (TEMED), standart serum albümin, paraokson, trihidroksi metil aminometan (Tris-Base), sodyum hidroksit, aseton, Tris-HCl, hidroklorik asit ve sodyum dihidrojen fosfat Sigma Aldrich firmasından temin edilmiştir. Etil alkol, amonyum sülfat, β-merkapt etanol, sodyum dodesil sülfat, akrilamid, N,N-metilen bis-akrilamid, amonyum persülfat, bromo fenol mavisi, gliserol, Coomassie brilliant blue G-250, fosforik asit, tetrahidrofuran ve 4-iyodo anilin Merck firmasından temin edilmiştir. Furosal / lasix (Furosemid), Cortal / Prednol (Prednisolon), Metazin (Metajin), Ennolen (Enroflaxacin), Enaflex (Anaflex), IPM İlaç (Symfos) ve Bakteral (Sülfonamid) piyasadan temin edilmiştir. Sığır ve koyun kan numuneleri veteriner hekim kontrolünde mezbahanedan atık kan olarak temin edilmiş ve aynı gün deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere bizlere ulaştırılmıştır.

2.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar

Soğutmalı santrifüj	:	Sigma 3-30K
pH metre	:	Orion- model 920A
UV-Spektrofotometre	:	Biotek Power Wave XS
Manyetik karıştırıcı	:	Torrey Pines Scientific
Terazi	:	Sartorius BL 210S
Otomatik pipetler	:	Eppendorf, Brand
Kromatografi Kolonu	:	Pharmacia Fine Chemicals
Gradient Mikser	:	Atta Magnetik Karıştırıcı ve Gradient Tüp
Vorteks	:	Fisons Whirli Mixer
Buz makinesi	:	Fiocchetti AF 10
Elektroforez Sistemi	:	Hoefler, HSI

2.1.3 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

0,1 M Sodyum bikarbonat (NaHCO₃) tamponu (pH: 10,0); 0,05 mol (4,2005 g) sodyum bikarbonat 450 mL saf suda çözülüp, sodyum hidroksit ile pH değeri 10'a ayarlanır. Daha sonra hazırlanan çözeltinin son hacmi saf su ile 500 mL'ye tamamlanır.

0,2 M Sodyum bikarbonat (NaHCO₃) tamponu (pH: 8,8); 0,05 mol (4,2005 g) sodyum bikarbonat 100 mL saf suda çözülüp 0,05 molar sodyum hidroksit ile pH değeri 8,8'e ayarlanır. Daha sonra hazırlanan çözeltinin son hacmi saf su ile 250 mL'ye tamamlanır.

0,01 M Di Sodyum Hidrojen Fosfat (Na₂HPO₄) tamponu (pH:6); 0,700g (0,005mol) Na₂HPO₄ 450mL saf suda çözülüp pH değeri 6'ya ayarlanır. Daha sonra hazırlanan çözeltinin son hacmi saf su ile 500 mL'ye tamamlanır.

Dengeleme tamponu: *1 M Amonyum sülfat (NH₄)₂SO₄ içeren, 0,1M Di Sodyum Hidrojen Fosfat(Na₂HPO₄) tamponu (pH: 8,0);* 7,1g (0,05 mol) Na₂HPO₄ ve 66,07g (0,5mol) (NH₄)₂SO₄ 450 ml saf suda çözülüp HCl ile pH değeri 8'e ayarlanır. Daha sonra hazırlanan çözeltinin hacmi saf su ile 500 mL'ye tamamlanır.

Elüsyon tamponu; *0,1 M Di Sodyum Hidrojen Fosfat (Na₂HPO₄) tamponu (pH: 8,0);* 7,1 g (0,05 mol) Na₂HPO₄ 450 ml saf suda çözüldükten sonra HCl ile pH değeri 8'e ayarlanır. Daha sonra hacmi saf su ile 500 ml'ye tamamlanır.

Bradford Çözeltisi; 50 mg Coomassie brillant blue G-250 25ml etanol içerisinde çözüldükten sonra çözeltiye 50 mL %95'lik fosforik asit ilave edilir. Daha sonra çözelti hacmi 500 ml'ye tamamlanır.

Amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda oluşan çökeleğin alınması için kullanılan tampon; 0,1 M Tris-Baz tamponu (pH: 8,0); 0,605g (0,005mol) Tris-Base 45 mL saf suda çözüldükten sonra 0,05 molar HCl ile pH değeri 8'e ayarlanır ve daha sonra hacmi saf su ile 50 mL'ye tamamlanır.

Bazal aktivite tamponu; 2 mM CaCl₂ içeren 100 mM Tris-HCl, (pH 8); 1,642 g (12,5 mmol) Tris 100 mLsaf suda çözüldükten HCl ile pH değeri 8'e ayarlanır. Daha sonra 0,0277 g (0,025 mmol) CaCl₂ ilave edilerek son hacim 125 ml'ye tamamlanır.

Substrat çözeltisi; 5,4 µl paraokson, 0,5 mL asetonda iyice çözülür ve daha sonra üzerine 0,5 mL bazal aktivite tamponu eklenir ve iyice karıştırıldıktan sonra kullanılır. Günlük taze olarak hazırlanmasına dikkat edilmelidir.

Akril amid/Bis çözeltisi; 15 g Akril amid, 0,4 g Bis alınarak son hacim saf su ile 50 mL'ye tamamlanır.

1,5 M Tris-HCl (pH 8.8) tamponu; 11,82 g Tris-HCl çok küçük bir hacim saf suda çözüldükten sonra 0,1 M NaOH ile pH değeri 8,8'e ayarlanır ve son hacim saf su ile 50 mL'ye tamamlanır.

0,5 M Tris-HCl (pH 6.8) tamponu; 3,94 g Tris-HCl çok küçük bir hacim saf suda çözüldükten sonra 0,1 M NaOH ile pH değeri 8,8'e ayarlanır ve son hacim saf su ile 50 mL'ye tamamlanır.

% 10 'luk SDS çözeltisi; SDS 1g alınır ve son hacim saf su ile 10 mL'ye tamamlanır.

% 10'luk amonyum persülfat çözeltisi; 1 gram amonyum persülfatın alınması ve son hacmin saf su ile 10 mL'ye tamamlanmasıyla hazırlanır.

Elektroforez numune tamponu; Uygun bir kapta, 0,5 M Tris-HCl (pH:6,8) solüsyonundan 2,5 mL, %10'luk SDS solüsyonundan 4,0 mL, gliserol solüsyonundan 2,0 mL, β -merkaptoetanol çözeltisinden 1,0 mL, 0,01 g bromfenol mavisi ve saf su çözeltisinden 0,5 mL alınarak karıştırılır.

Elektroforez tank tamponu; Tris-HCl'den 3 g, Glisin'den 14,4 g ve SDS'den 1,0 g alınır ve uygun bir kapta karıştırılır.

%10'luk ayırma jeli; Akril amid/Bis (16,65 mL), saf su (20,1 mL), 1,5 M tris-HCL (pH: 8,8) (12,5 mL) % 10 'luk SDS 0,5 μ L, TEMED 25 μ L ve 750 μ L %10'luk amonyum persülfat alınır ve uygun bir kapta karıştırılır.

%3'lük yığma jeli; Akril amid/Bis (2,6 mL), saf su (12,2 mL), 0,5 M Tris-HCL (pH: 6,8) (5 mL) % 10 'luk SDS 200 μ L, TEMED 20 μ L ve 400 μ L %10'luk amonyum persülfat alınır ve uygun bir kapta karıştırılarak elde edilir.

Renklendirme çözeltisi; 0,66 gram Coomassie brilliant blue G-250, 120 mL metanol içerisinde çözülür. Elde edilen çözeltiye 24 mL saf asetik asit ve 120 mL saf su ilave edilerek karıştırılır.

Renk açma çözeltisi; 75 mL asetik asit ve 50 mL metanol, 875 mL saf su ile karıştırılarak oluşturulan bu çözelti hacimce % 7,5 asetik asit, % 5 metanol ve % 87,5 mL saf su hacim oranlarına sahiptir.

2.2 YÖNTEMLER

2.2.1 Sığır Paraoksonaz (sPON) Enziminin Saflaştırılması

2.2.1.1 Kan numunelerinin elde edilmesi

Sığır kan numuneleri kuru kan tüpleri içerisine alındı. Daha sonra bu numuneler, 5000 rpm'de, 10 dakika santrifüj edilip serum kısımları ayrılarak bir mezür içerisinde toplandı ve hacmi belirlendi (Erol ve diğerleri, 2013).

2.2.1.2 Amonyum Sülfatla Çöktürme

Amonyum sülfat çöktürmesi ile sPON enziminin kısmen saflaştırılması hedeflenmektedir. Amonyum sülfat tuzunun tercih edilme sebepleri arasında; proteinlerin belirli doygunluk derecelerine göre çökmesini sağlama, protein yapısına zarar vermeme ve 2 değerlikli bir tuz olması gibi özellikleri bulunmaktadır.

Daha önceden yapılan çalışmalar doğrultusunda sPON enzimi için de çökme fraksiyonları % 60 - % 80 olarak gerçekleştirildi. Söz konusu işlemde kullanılacak olan amonyum sülfat miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

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

V: Serum hacmi

S1: Mevcut amonyum sülfat doygunluğu (1'in kesri şeklinde)

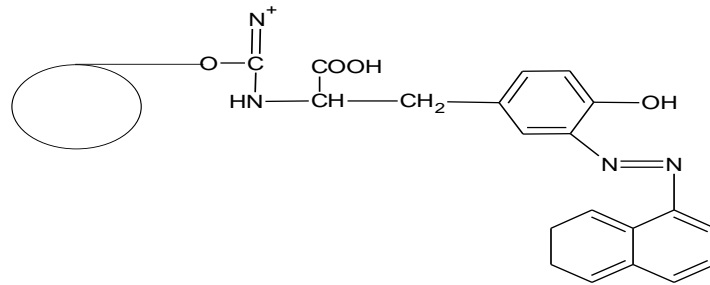
S2: İstenilen amonyum sülfat doygunluğu (1'in kesri şeklinde)

Elde edilen fraksiyonlar +4 °C'de (Türkeş, 2019), 45 dakika boyunca 15.000 rpm'de (Erol ve diğerleri, 2013) santrifüj edildi. Elde edilen çökeltiler daha sonraki saflaştırma basamaklarında kullanılmak üzere uygun tampon yardımıyla çözüldü.

2.2.1.3 hsPON Enzimin Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (HEK) ile Saflaştırılması

Grubumuz tarafından sentezlenmiş olan Sefaroz 4B-L-tirozin 1-naftilamin HEK jeli ile hsPON enzimi sığır serumundan saflaştırılmıştır. Bu amaçla uygun bir kolona paketlenmiş olan jel, 1M amonyum sülfat içeren 0,1 M pH'ı 8 olan Na₂HPO₄ tamponu ile dengeleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu tampon, jel seviyesine indiğinde amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda elde edilen serum çözeltisi kolona eklendi. 1 M (NH₄)₂SO₄ içeren 0,1 M di sodyum hidrojen fosfat (Na₂HPO₄) tamponu (pH: 8,0) ve 0,1 M Na₂HPO₄ tamponu (pH: 8,0) gradient mikser kullanılarak yüksek tuz derişiminden düşüğe doğru tuz gradienti oluşturuldu. 1,5 mL fraksiyonlar halinde elüatlar toplandı. Daha sonra kolon dengeleme tamponuyla yıkandı.

Toplanan elüatlarda, 280 nm'de kalitatif protein tayini, Bradford metoduyla kantitatif protein tayini ve son olarak da aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen bulgular Şekil 3.1 ve Şekil 3.2 'de verilmiştir.



Şekil 2.1: Sefaroz 4B-L-tirozin-1-naftilaminin yapısı.

2.2.2 Koyun Paraoksonaz (kPON1) Enziminin Saflaştırılması

Koyun kan numuneleri de 2.2.1.1'de bahsedilen işlemlerin ardından % 60 - % 80 aralığında amonyum sülfat çöktürmesi yapılarak kısmi olarak saflaştırıldı.

Daha sonra yeni sentezlediğimiz Sefaroz 4B-L-tirozin-4-iyodo-anilin kimyasal yapısına sahip HEK ile 2.2.1.3'deki gibi saflaştırma işlemi gerçekleştirilerek elüatlar toplandı. Toplanan elüatlarda, kalitatif protein tayini, kantitatif protein tayini ve aktivite ölçümleri yapıldı.

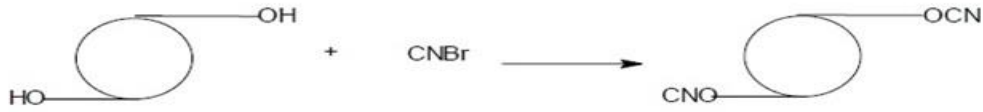
2.2.3 Yeni Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (HEK) Jelinin Sentezi

2.2.3.1 Sefaroz 4B'nin Aktifleştirilmesi

İlk olarak 10 mL Sefaroz 4B, saf su ile iyice yıkanarak dekante edildi. Daha sonra üzerine eşit hacimde saf su ilavesi gerçekleştirildikten sonra çeker ocak içerisine yerleştirildi. Manyetik karıştırıcı ile karıştırılmakta olan jel süspansiyonuna 4 g CNBr ilave edildi.

Süspansiyonun pH'ı 4 M NaOH ile 11'e çıkarıldı ve reaksiyon ortamının bu pH'da muhafaza edilmesi sağlandı. pH'ın sabitlendiğinden emin oluncaya kadar reaksiyona devam edildi. Reaksiyon ortamında sıcaklığında kontrolü gerektiği için bir miktar buz süspansiyon ortamına eklendi ve elde edilen karışım bir buhner hunisine alındı.

Daha sonra 250 mL soğutulmuş 0,1 M Sodyum bikarbonat (NaHCO_3) tamponu (pH:10) ile süspansiyonun yıkanması işlemi gerçekleştirildi.



Sefaroz 4B (matriks)

Aktifleştirilmiş Sefaroz 4B

Şekil 2.2: Sefaroz 4B'nin aktifleştirilmesi.

2.2.3.2 L-tirozinin Bağlanması

Sefarose -4B jeli CNBr ile aktive edildikten sonra L-tirozinin aktive edilmiş olan jele bağlanması gerçekleştirilir (Erol ve diğerleri, 2013). CNBr ile aktifleştirilmiş matriks üzerine, 15 mg L-tirozin ihtiva eden 0,1 M Sodyum bikarbonat (NaHCO_3) tamponundan (pH: 10) 20 ml eklendi ve karışım 90 dakika boyunca karıştırıldı.

Elde edilen süspansiyon 16 saat 4 °C'de bekletildi. Sürenin sonunda süspansiyon ortamında reaksiyona girmeden kalmış olan L-tirozini uzaklaştırmak amacı ile yaklaşık olarak 1,5 L saf su ile yıkandı. Yıkama işlemine 100 mL 0,2 M NaHCO_3 tamponu (pH: 8,8) ile devam edildi. L-tirozinle modifiye Sefaroz 4B, aynı tamponun (0,2 M NaHCO_3 , pH: 8,8) 40 mL'si içine alınarak uzantı kolunun bağlama işlemi tamamlandı.

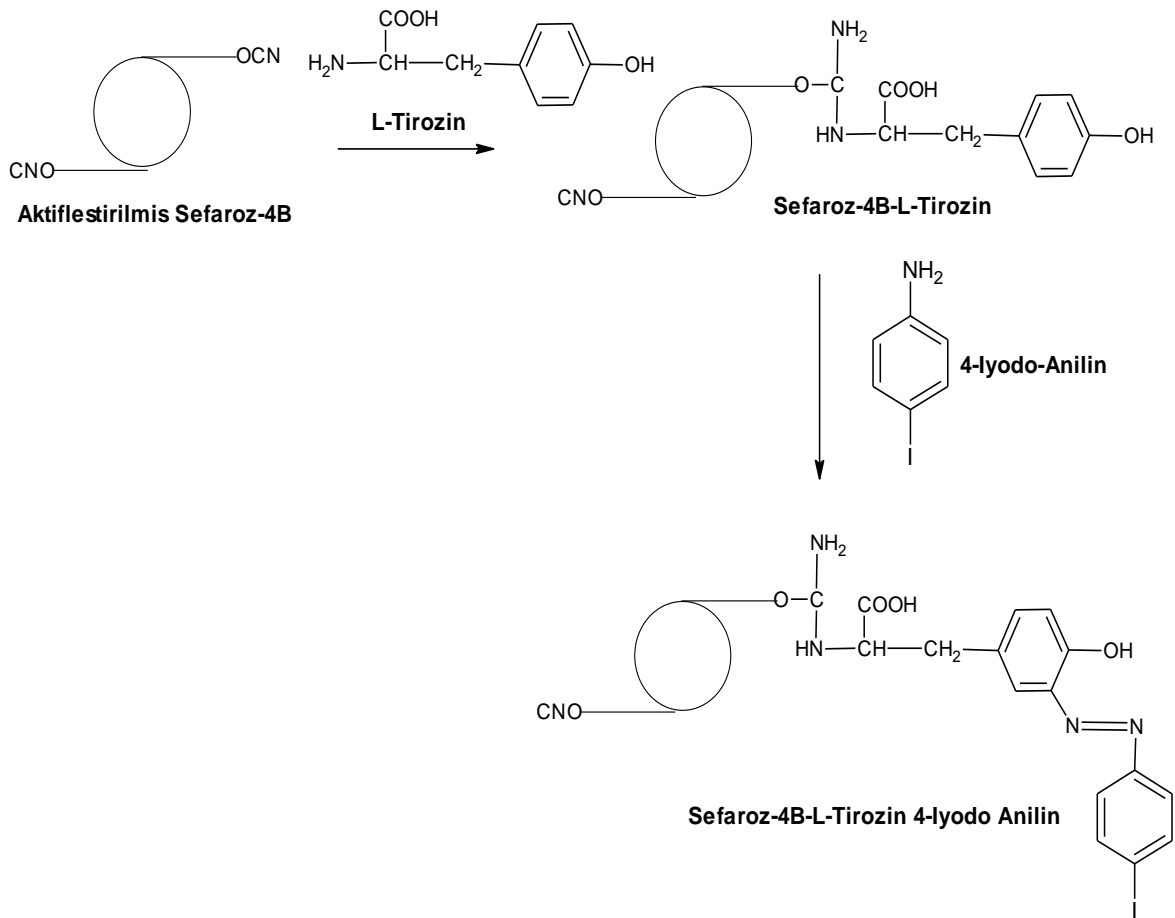
2.2.3.3 4-İyodo-Anilin'in Bağlanması

4-iyodo - anilin'in 0,04 mg'ı 0 °C civarında 10 ml tetrahidrofuran (THF) içerisinde çözüldü. 75 mg NaNO₂ ihtiva eden 0 °C'deki 5 mL 1 M HCl içinde hazırlanan çözelti, 4-iyodo-anilin çözeltisine damla damla eklendi. Reaksiyon'un gerçekleşmesi için 10 dakika beklendi ve böylece diazolama işleme gerçekleşmiş oldu.

Daha sonra diazolanmış 4-iyodo anilin, 40 mL Sefaroz 4B-L-tirozin süspansiyonuna ilave edildi. Ortamın pH değeri 9,5'a çıkarılarak sabit tutuldu ve 3 saat oda sıcaklığında karıştırıldı.

Daha sonra 1 L saf su ve ardından 200 mL 0,01 M di sodyum hidrojen fosfat (Na₂HPO₄) (pH 6,0) tamponu ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra aynı tamponda muhafaza edildi.

Bu süre sonunda menekşe renkli olan çıkış maddelerinden açık kahverengiyi andıran kiremit renginde bir jel elde edildi.



Şekil 2.3: 4-iyodo anilin bileşiğinin bağlanması.

2.2.4 Protein Tayini

2.2.4.1 Kalitatif Protein Tayini

HEK tekniğiyle saflaştırma işleminde topladığımız elüatların kalitatif protein tayinleri spektrofotometrik olarak yapıldı. Bunun için UV bölgede (280 nm) absorbans ölçümleri yapıldı. Ölçümler UV bölgede alındığı için kuvars küvetlerde yapıldı.

Temelde bu metot, yapısında aromatik halkaya sahip olan tirozin, triptofan ve fenilalanin gibi amino asitlerin 280 nm'de UV ışınları absorbe etmeleri ilkesine dayanmaktadır (Jaenicke, 1987). Ölçümlerde kör olarak proteinlerin içinde bulunduğu tampon çözelti kullanıldı.

2.2.4.2 Kantitatif Protein Tayini

Kantitatif protein tayini için, kolay uygulanabilen ve güvenilir bir analitik metot olan Bradford Metodu kullanıldı. Standart protein çözeltisi olarak sığır serum albümin kullanıldı. Spektrofotometrik yöntemle yapılan ölçümler 595 nm'de gerçekleştirildi (Türkeş, 2019). Bradford yöntemi, kısa sürede uygulanabiliyor olma, proteinlerin bozucu faktörlerden daha az etkilenmesi ve hassasiyetinin 1-100 µg/mL arasında olması sebebiyle tercih edildi.

1 mL'lik hacimde 1 mg protein bulunan standart sığır serum albümin çözeltisinden deney tüplerine sırasıyla 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µL alındı. Tüplerin hacimleri 100 mM Tris-HCl tamponu (pH:8) ile 0,1 mL'ye tamamlandı. Coomassie brilliant blue G-250 reaktifinden 5mL'lik hacimlerde tüm tüplere eklendi ve 10 dk. boyunca vorteks yardımıyla hızlıca karıştırıldı. Daha sonra tüm tüplerin köre karşı 595 nm'de absorbans değerleri ölçüldü. Ölçülen absorbans değerlerine karşılık µg/mL protein değerleri ile standart grafik hazırlandı (Şekil 3.3).

Protein miktarını tespit edeceğimiz enzim çözeltilerinden ikişer paralel çalışmak üzere tüplere 0,1 mL alındı ve üzerlerine 5 mL Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi eklendi. Vorteksle 10 dk. karıştırılan numunelerin 595 nm'de absorbans değerleri ölçüldü. Elde edilen iki absorbans değerinin ortalamasına karşılık gelen protein miktarı standart grafik yardımı ile tayin edildi.

2.2.5 Enzim Aktivite Tayini

PON1 enziminin aktivitesi spektrofotometrik şekilde ölçüldü (Gan, Smolen, Eckerson ve La Du, 1991). Aşağıdaki şekilde verilen reaksiyonda oluşan p-nitrofenolün miktarı, 37 °C'de 412 nm'de 1 dk.'daki absorbansta meydana gelen değişimle bulundu. Bunun için 50 µL enzim çözeltisi ve hazırlanmış olduğumuz substrat + bazal aktivite tamponundan 1 mL olacak şekilde karıştırılıp ölçüm işlemine geçildi (Renault ve diğerleri, 2006). Aynı işlem enzimsiz ortamda da yapılarak aradaki fark tespit edildi ve enzim aktivitesi hesaplandı.

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

SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi proteinleri boyutlarına göre ayırabilmek için tasarlanmış bir metoddur (Ossipow, Laemmler ve Schibler, 1993). Enzimin saflığı ve alt birimlerinin kompozisyonu Laemli'nin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi ile kontrol edildi (Türkeş, 2019).

SDS-PAGE, enzimin saflaştırma işlemlerinden sonra uygulandı. Yönteme göre, %10'luk ve % 3'lük akrilamid konsantrasyonlardaki yığılma ve ayırma jelleri ile şekillendirilmektedir. Elektroferez ortamına uygulanan numunelerin daha sonra Coomassie Brilliant Blue R-250, % 50 metanol ve %10 asetik asit ile görünür hale gelmesi sağlanır. Daha sonra elde edilen görüntü fotoğraflanmaktadır (Erol ve diğerleri, 2013).

Elektroferez sisteminde yürütme alanının oluşturulmasında kullanılan cam plakalar önce saf su ile daha sonra da etil alkol ile temizlendi ve iyice kurulandı. Cam plakalar uygun şekilde sızdırmazlık kontrolü yapılarak sistem üzerine sabitlendi. Daha önce hazırlanışı verilen ayırma jeli uygun bir şekilde hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek pipet yardımı ile üst kısımda 2-3 cm boşluk kalıncaya kadar plakaların arasına ilave edildi. Birkaç saat polimerizasyonun tamamlanması için beklendi.

Polimerizasyon gerçekleşikten sonra yığılma jelinin ilavesinde ayrıca sistemde numunelerin eklenebilmesi için gerekli olan kuyucukların oluşturulması amacı ile sistemin bir parçası olan tarak yerleştirilmesi gerçekleştirildi. Polimerizasyonun gerçekleştiğinden emin olunduğu anda sisteme yerleştirilen tarak sistemden çıkarıldı. Oluşan kuyucuklar önce saf su ile ardından tank tamponu ile yıkanarak temizlendi. Elde edilen bu jel sistemi elektroferez sistemi içerisine yerleştirildi ve yürütme tamponu tank sistemine yerleştirildi.

Hidrofobik etkileşim tekniği kullanılarak yüksek aktivite değerine sahip numuneler elde edildi. Bu numuneler, numune tamponu ile 1:1 oranında karıştırılarak bir çözelti oluşturuldu. Diğer standart numuneler de aynı oranda karıştırıldı ve 100°C'lik bir sıcak su banyosunda 3 dakika boyunca bekletildi. Ardından, numuneler soğutuldu ve elektroforez sistemindeki kuyucuklara yüklendi. Sistem güç kaynağına bağlandı ve akım 80 volt'a ayarlandı. Bu şekilde proteinlerin jeldeki hareketleri incelendi. Numune tamponuna ait bant, jel üzerinde belirginleştiğinde voltaj 120 volt'a yükseltildi ve yürütme işlemi jelin altında 1 cm kalıncaya kadar devam etti.

Son olarak, güç kaynağı kapatıldı ve cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı. Jelin yığma jeli içeren kuyucukların bulunduğu kısmı kesilerek protein bantlarının bulunduğu ayırma jeli kısmı kesilerek renklendirme çözeltisi içerisine yerleştirildi. 1-1,5 saat çalkalama işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra jel bu çözülden alınarak renksizleştirme çözeltisi içerisine yerleştirildi. Bu çözelti protein bantları belirgin hale gelinceye kadar aralıklı olarak değiştirildi. Bu işlemlerin ardından belirginleşmiş hale gelen bantlar jel görüntüleme sistemi ile dijital ortama alındı (Şekil 3.4).

2.2.7 Bazı ilaçların IC₅₀ Değerlerinin Bulunması

Veteriner hekimlikte hayvan hastalıklarının tedavisinde sıkça kullanılan bazı ilaçlar (Furosal / lasix (Furosemid), Cortal / Prednol (Prednisolon), Metazin (Metajin), Ennolen (Enroflaxacin), Enaflex (Anaflex), IPM İlaç (Symfos) ve Bakteral (Sülfonamid), sPON1 ve kPON1 enzimleri için inhibitör olarak kullanıldı ve IC₅₀ değerleri hesaplandı.

Bunun için, ilk olarak inhibitörsüz ortamda enzimlerin aktiviteleri belirlendi ve bu %100 aktivite olarak kullanıldı. Daha sonra değişik inhibitör derişimleriyle birlikte enzimlerin aktiviteleri ölçüldü ve inhibitörsüz aktiviteye göre % aktiviteleri belirlenerek, % Aktivite - [I] grafikleri çizildi (Şekil 3.4-18). Grafiklerden elde ettiğimiz denklemlerden yararlanarak % 100 aktiviteyi yarıya indiren inhibitör derişimleri (IC₅₀) belirlendi.

3. BULGULAR

3.1 Enzimin Saflaştırılması

3.1.1 Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Amonyum sülfat tuzu, proteinlerin belirli doygunluk derecelerine göre çökmesini sağlama, protein yapısına zarar vermeme ve 2 değerlikli bir tuz olma gibi özellikleri tercih edilme sebepleri arasında verilebilmektedir. Paraoksonaz için çökme fraksiyonları literatür araştırmalarına dayanılarak % 60 - % 80 olarak gerçekleştirildi ve elde edilen fraksiyonlar +4 °C'de, 20 dakika boyunca 15.000 rpm'de santrifüj edildi.

Amonyum sülfat çöktürmesi sırasında kullanılan tuz miktarları aşağıda verilen formül ile belirlendi.

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

V: Kan serumu hacmi (mL)

S1: Amonyum sülfatın doygunluğu, 1'e bölünmüş halde ifade edilmektedir.

S2: İstenen amonyum sülfatın doygunluğu, 1'e bölünmüş halde ifade edilmektedir.

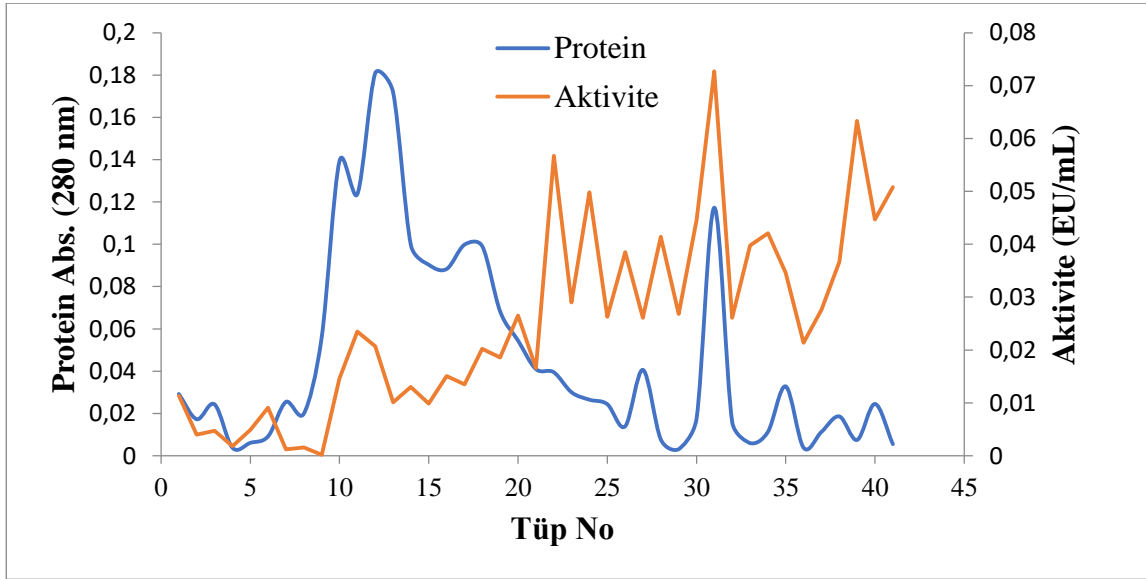
3.1.2 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Enzimin Saflaştırılması

Hidrofobik etkileşim kolonu daha öncede belirtildiği şekilde kolonun 1 M Amonyum sülfat $(NH_4)_2SO_4$ içeren, 0,1 M Di Sodyum Hidrojen Fosfat (Na_2HPO_4) tamponu (pH:8,0) ile dengelendi. Dengeleme işlemi tamamlanmış olan hidrofobik kolona amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen serum çözeltisi ilave edildi. Kolon ile bağlantı kurulan gradient mikserin hazneleri, 1 M Amonyum sülfat $(NH_4)_2SO_4$ içeren 0,1M Di Sodyum Hidrojen Fosfat (Na_2HPO_4) tamponu (pH:8,0) (Tuzlu) ve 0,1 M Di Sodyum Hidrojen Fosfat (Na_2HPO_4) (pH:8,0) (Tuzsuz) tamponları ile dolduruldu.

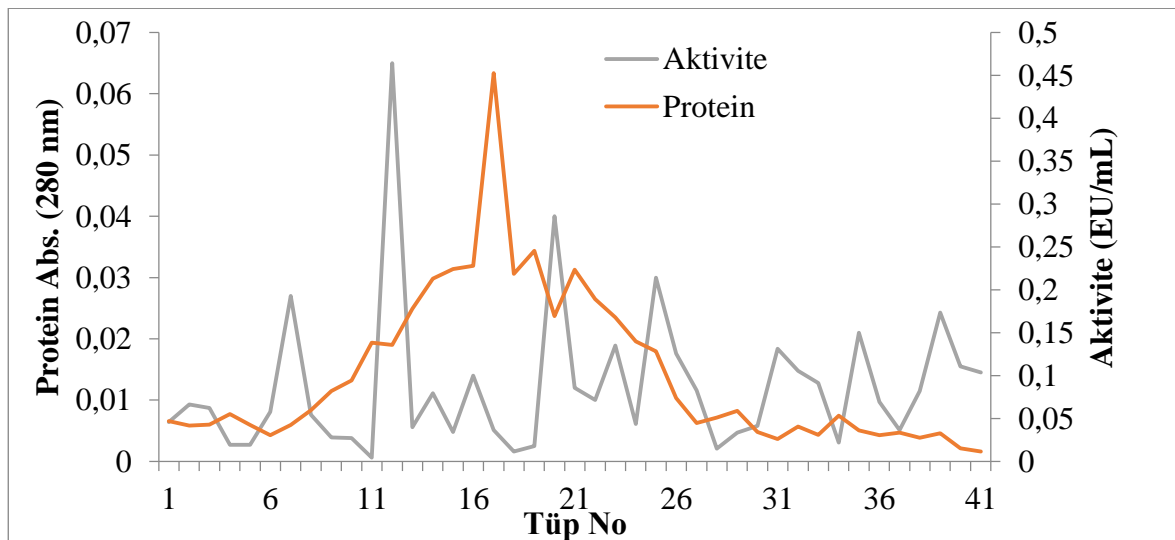
Gradient sisteminin kolon ile bağlantısı sağlandı. Gradient mikserdeki haznelere arası bağlantı sisteminin açılması ile tuzlu ve tuzsuz tamponların karışması sağlanarak elüsyon işlemi gerçekleştirildi. Elüantlar 1,5 ml'lik hacimlerde alınmaya başlandı. Numune alımı

elüsyon tamponunun kolondan geçişi sırasında da devam edildi. Yaklaşık olarak 41 tüplük numune alımı gerçekleştirildi.

Hidrofobik kolon ile saflaştırılması gerçekleştirilmiş olan sığır paraoksonaz ve koyun paraoksonaz enzimlerinin 280 nm’de kalitatif protein tayinleri ve 412 nm’de aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Elde edilen protein-aktivite verileri grafik edilerek Sığır Paraoksonaz, Koyun Paraoksonaz Elüsyon grafikleri çizildi (Şekil:3.1, Şekil:3.2).



Şekil 3.1: hsPON1'in paraoksonaz aktivitesi.



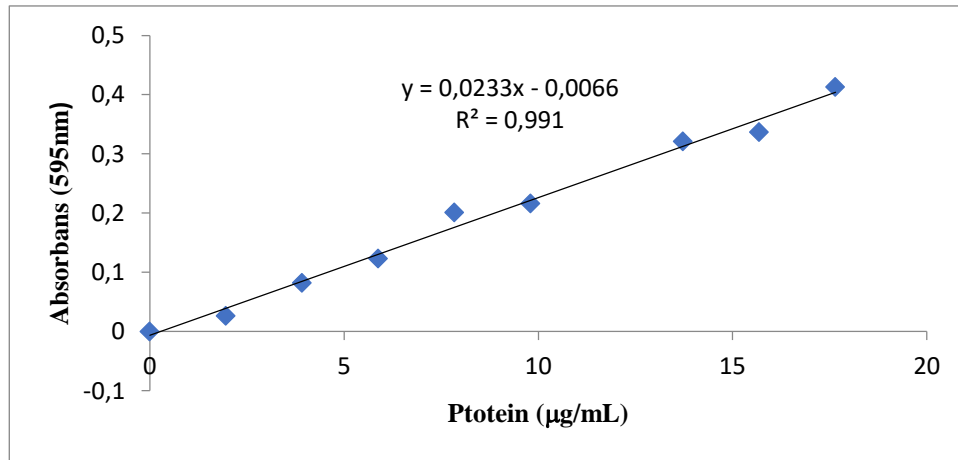
Şekil 3.2: kPON1'in paraoksonaz aktivitesi.

3.1.3 Kantitatif Protein Tayini için Hazırlanan Standart Eğri

Kantitatif protein tayinleri için kolay uygulanabilen ve güvenilir bir analitik metod olan Bradford Metodu tercih edildi. Tayinler sırasında standart olarak sığır serum albümin kullanıldı ve spektrofotometrik ölçümler 595 nm’de gerçekleştirildi (Türkeş, 2019).

Tablo 3. 1: Bradford Metodu için kullanılan veriler

Tüp no:	Standart BSA (µl)	Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi (µL)	Cson (mg/mL)	Cson(µg/mL)	Abs(595nm)
1	10	5100	0,00196	1,96	0,0264
2	20	5100	0,00392	3,92	0,0822
3	30	5100	0,00588	5,88	0,1233
4	40	5100	0,00784	7,84	0,2008
5	50	5100	0,00980	9,80	0,2162
6	70	5100	0,01373	13,73	0,3209
7	80	5100	0,01569	15,69	0,3367
8	90	5100	0,01765	17,65	0,4127



Şekil 3. 3: Bradford Metodu için kullanılan standart grafik.

Tablo 3. 2: hsPON için saflaştırma tablosu.

	Hacim (mL)	Aktivite (U/mL)	Toplam Aktivite (U/mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	% Verim	Saflaştırma Derecesi
Amonyum sülfat çöktürmesi	32ml	617,5	19760	1,16	37,12	532,3	-	-
Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi	2ml	1817,5	3635	0,015	0,03	121167,0	18,4	227,6

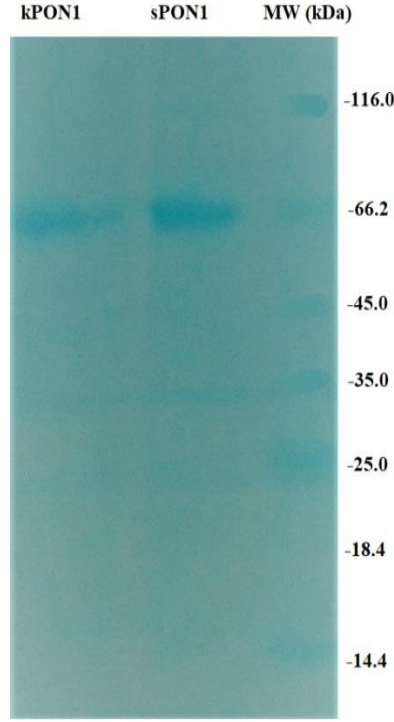
Tablo 3.3: Koyun PON için saflaştırma tablosu

	Hacim (mL)	Aktivite (U/mL)	Toplam Aktivite (U/mL)	Protein Miktarı (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	% Verim	Saflaştırma Derecesi
Amonyum sülfat çöktürmesi	4ml	480	1920	0,79	3,16	607,6	-	-
Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi	2ml	847,5	1965	0,019	0,038	44605,3	88,3	73,4

3.1.4 Serum Paraoksonaz Enzimi İçin SDS Poliakrilamid jel Elektroforezi

Kantitatif SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi ön saflaştırma basamakları ve Hidrofobik Etkileşim Kolonu ile saflaştırma işleminin sonrasında enzimin saflığının kontrolü amacıyla yapılmaktadır. Bölüm 2.2.6'da anlatılmış olan elektroforez sistemine saflaştırılmış olan paraoksonaz enzim numunesi tatbik edilerek enzimin saflık kontrolleri gerçekleştirildi.

Protein bantları jel görüntüleme sistemi ile bilgisayar ortamına aktarıldı ve elde edilen görüntüler Şekil 3.4'de verilmektedir.



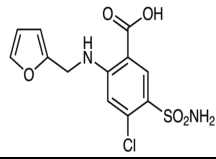
Şekil 3. 4: Saf kPON ve hsPON enzimlerine ait SDS-PAGE görüntüsü.

3.1.5 Serum Paraoksonaz Enzimi Üzerinde İnhibisyon Etkisi Gösteren Hayvan Hastalıklarında Yaygın Kullanımı Olan İlaçların IC₅₀ değerlerinin Saptanması

DeneySEL çalışmalarımızda saflaştırmış olduğumuz sığıR PON ve koyun PON enzimlerinin hayvan hastalıkları tedavisinde yaygın kullanımı olan ilaçların IC₅₀ değerlerinin saptanması gerçekleştirildi. Paraoksan substratının 1mM'lık konsantrasyonlarında aktivite tayinleri yapıldı.

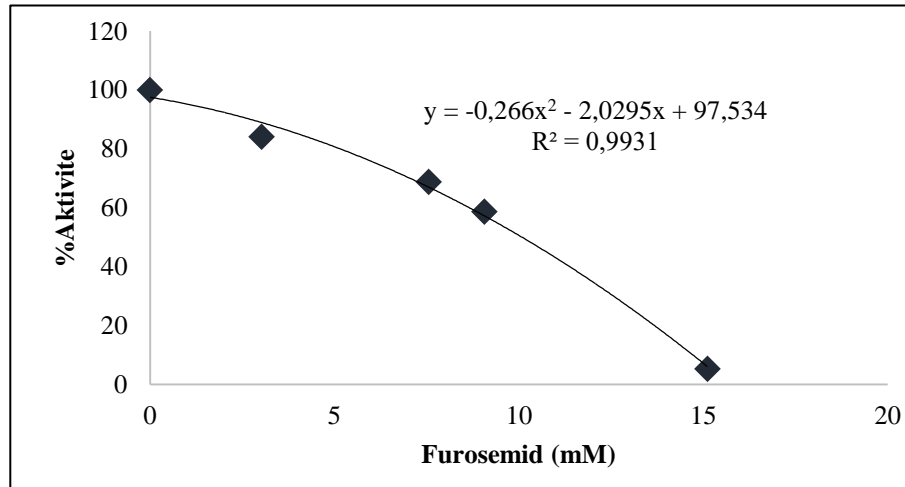
İnhibitör yokluğunda elde edilen aktivite ve inhibitör varlığında elde edilen aktivite değerleri birbirilerine oranlanarak 100 değeri ile çarpılması suretiyle yüzde aktivite değerleri saptandı. Elde edilen yüzde aktivite değerleri farklı ilaç konsantrasyonlarına karşı grafik edilerek % Aktivite-[I] çizildi. Elde edilmiş olan grafiklerin eğimlerinden ilaçların IC₅₀ değerleri tayin edildi (Çizelge 3.5-3.18).

Tablo 3.4: Furosemid ilaç etken maddesine ait bilgiler ve hsPON enzimi için IC₅₀ değeri

İlaç Etken Madde	Kimyasal Yapısı	MA (g/mol)	Miktarı (mg/mL)	IC ₅₀ (mM) (Sığır)
Furosemid		330,745	20	10,08

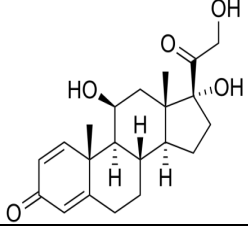
Tablo 3.5: hsSığır PON enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Furosemid'in IC₅₀ değerinin saptanmasında kullanılan çözelti miktarları ve ilaç konsantrasyonları ile elde edilen veriler.

Tampon(μL)	Substrat(μL)	İnhibitör(μL)	Enzim(μL)	Absorbans (412nm)	PON Aktivite Absorbans (U/mL dak)
800	100	50	50	0,0285	
725	100	125	50	0,0233	
700	100	150	50	0,0199	0,0339
600	100	250	50	0,0018	



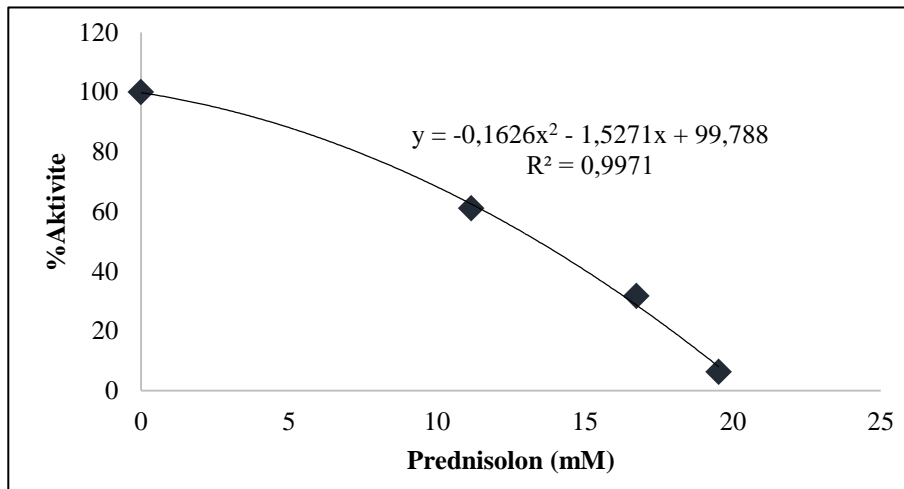
Şekil 3.5: 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda saflaştırılmış hsığır serum PON enzimi için farklı konsantrasyonlarına karşı % aktivite grafiği.

Tablo 3.6: Prednisolon ilaç etken maddesine ait bilgiler ve hsPON enzimi için IC₅₀ değeri.

İlaç Etken Madde	Kimyasal Yapısı	MA (g/mol)	Miktarı (mg/mL)	IC ₅₀ (mM) (Sığır)
Prednisolon		358,428	20	13,41

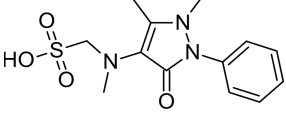
Tablo 3.7: hSığır PON enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Prednisolon'un IC₅₀ değerinin saptanmasında kullanılan çözelti miktarları ve ilaç konsantrasyonları ile elde edilen veriler.

Tampon(μL)	Substrat(μL)	İnhibitör(μL)	Enzim(μL)	Absorbans (412nm)	PON Aktivite Absorbans (U/mL dak)
650	100	200	50	0,0108	
550	100	300	50	0,0106	0,0335
500	100	350	50	0,0021	



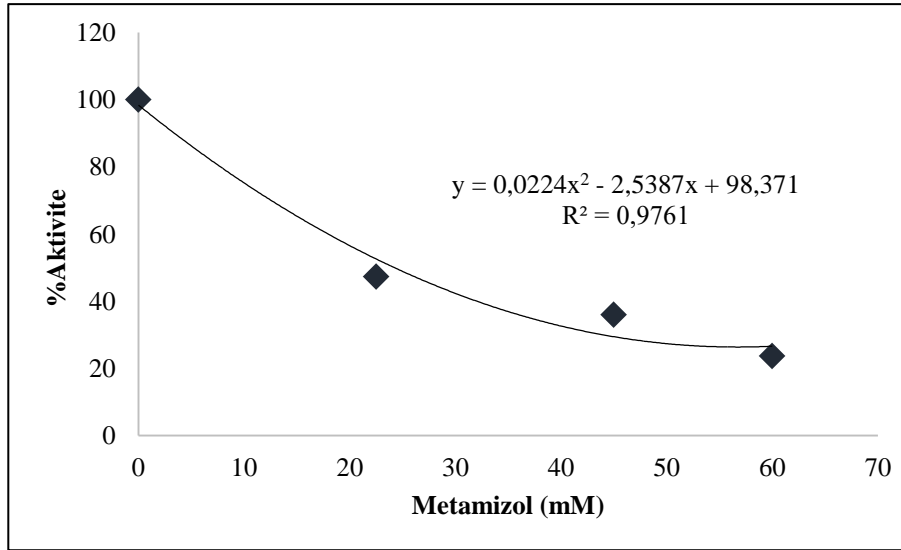
Şekil 3. 6: 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda saflaştırılmış hSığır serum PON enzimi için farklı Prednisolon konsantrasyonlarına karşı % aktivite grafiği.

Tablo 3. 8: Metamizol ilaç etken maddesine ait bilgiler ve hsPON enzimi için IC₅₀ değeri

İlaç Etken Madde	Kimyasal Yapısı	MA (g/mol)	Miktarı (mg/mL)	IC ₅₀ (mM) (Sığır)
Metamizol		333,341	500	24,2

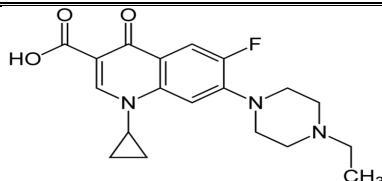
Tablo 3. 9: hSığır PON enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Metamizol'ün IC₅₀ değerinin saptanmasında kullanılan çözelti miktarları ve ilaç konsantrasyonları ile elde edilen veriler.

Tampon(μL)	Substrat(μL)	İnhibitör(μL)	Enzim(μL)	Absorbans (412nm)	PON Aktivite Absorbans (U/mL dak)
15	100	50	50	0,0054	
30	100	125	50	0,0041	0,0114
40	100	150	50	0,0027	



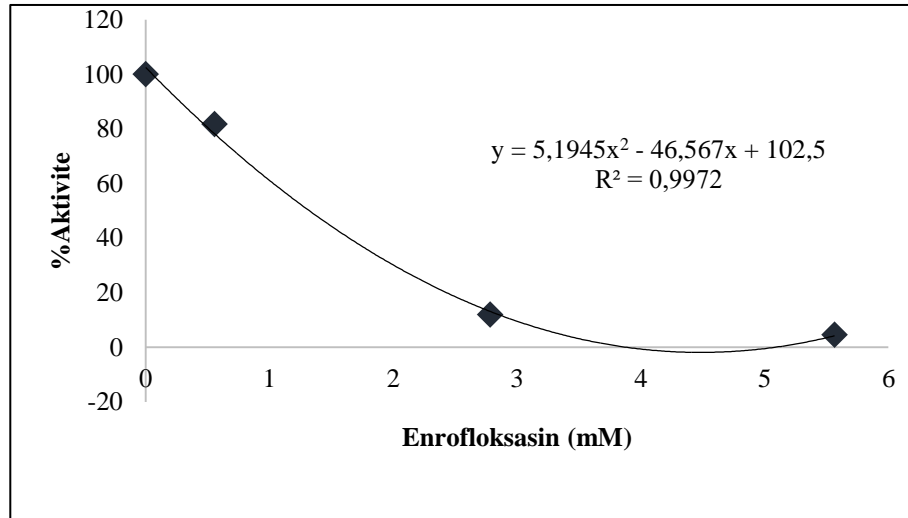
Şekil 3. 7: 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda saflaştırılmış hSığır serum PON enzimi için farklı Metamizol konsantrasyonlarına karşı % aktivite grafiği.

Tablo 3.10: Enroflaksasin ilaç etken maddesine ait bilgiler ve hsPON enzimi için IC₅₀ değeri.

İlaç Etken Madde	Kimyasal Yapısı	MA (g/mol)	Miktarı (mg/mL)	IC ₅₀ (mM) (Sığır)
Enroflaksasin		359,4	100	1,32

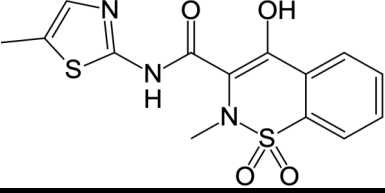
Tablo 3.11: hSığır PON enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Enroflaksasin'in IC₅₀ değerinin saptanmasında kullanılan çözelti miktarları ve ilaç konsantrasyonları ile elde edilen veriler.

Tampon(μL)	Substrat(μL)	İnhibitör(μL)	Enzim(μL)	Absorbans (412nm)	PON Aktivite Absorbans (U/mL dak)
848	100	2	50	0,0254	
840	100	10	50	0,0037	0,0311
830	100	20	50	0,0014	



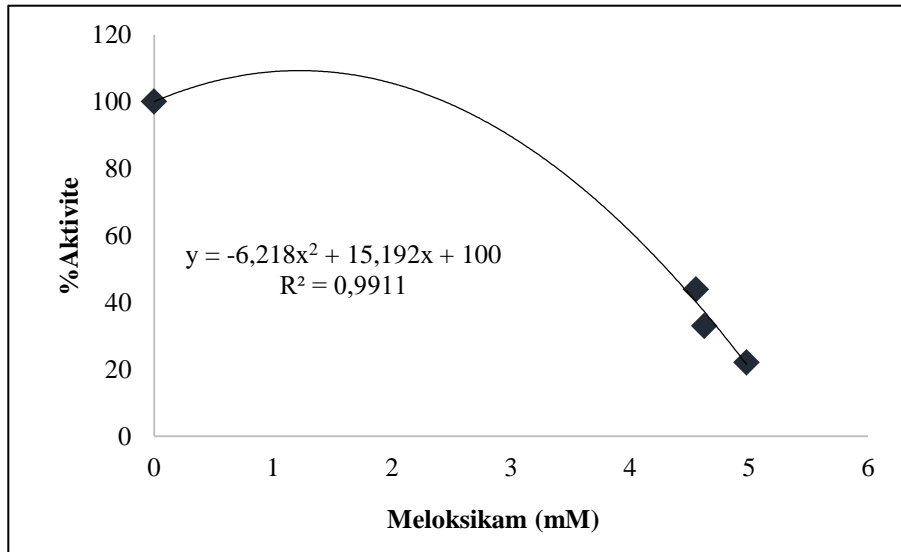
Şekil 3. 8: 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda saflaştırılmış hSığır serum PON enzimi için farklı Enroflaksasin konsantrasyonlarına karşı % aktivite grafiği.

Tablo 3.12: Meloksikam ilaç etken maddesine ait bilgiler ve hsPON enzimi için IC₅₀ değeri.

İlaç Etken Madde	Kimyasal Yapısı	MA (g/mol)	Miktarı (mg/mL)	IC ₅₀ (mM) (Sığır)
Meloksikam		351,403	5	4,31

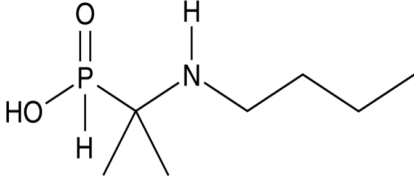
Tablo 3.13: hSığır PON enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Meloksikam'ın IC₅₀ değerinin saptanmasında kullanılan çözelti miktarları ve ilaç konsantrasyonları ile elde edilen veriler.

Tampon(μL)	Substrat(μL)	İnhibitör(μL)	Enzim(μL)	Absorbans (412nm)	PON Aktivite Absorbans (U/mL dak)
530	100	320	50	0,0133	
525	100	325	50	0,01	0,0339
500	100	350	50	0,0067	



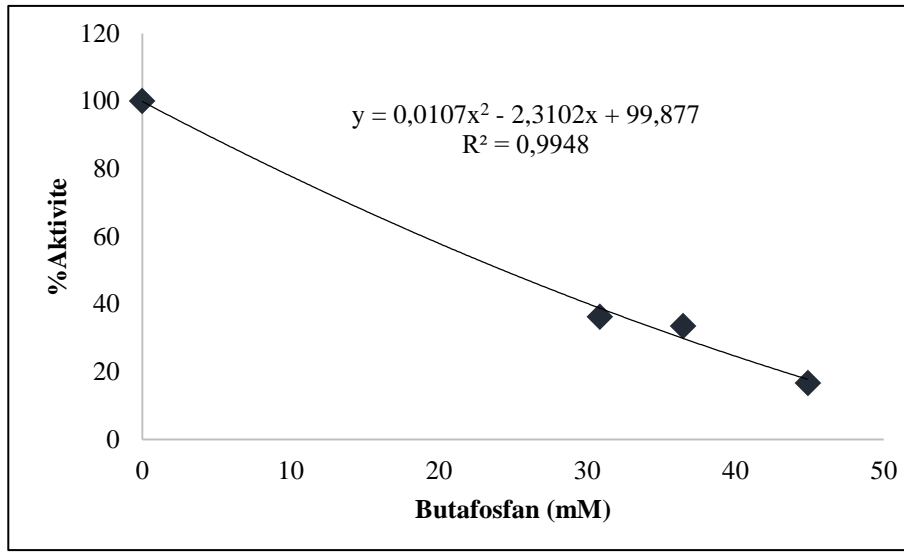
Şekil 3. 9: 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda saflaştırılmış hSığır serum PON enzimi için farklı Meloksikam konsantrasyonlarına karşı % aktivite grafiği.

Tablo 3.14: Butafosfan ilaç etken maddesine ait bilgiler ve hsPON enzimi için IC₅₀ değeri.

İlaç Etken Madde	Kimyasal Yapısı	MA (g/mol)	Miktarı (mg/mL)	IC ₅₀ (mM) (Sığır)
Butafosfan		178,19	100	24,3

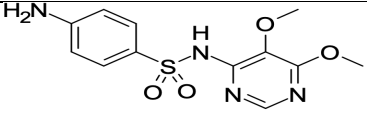
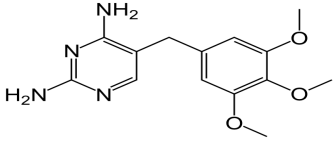
Tablo 3.15: hSığır PON enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Butafosfan'ın IC₅₀ değerinin saptanmasında kullanılan çözelti miktarları ve ilaç konsantrasyonları ile elde edilen veriler.

Tampon(μL)	Substrat(μL)	İnhibitör(μL)	Enzim(μL)	Absorbans (412nm)	PON Aktivite Absorbans (U/mL dak)
795	100	55	50	0,0105	
785	100	65	50	0,0097	0,029
770	100	80	50	0,0048	



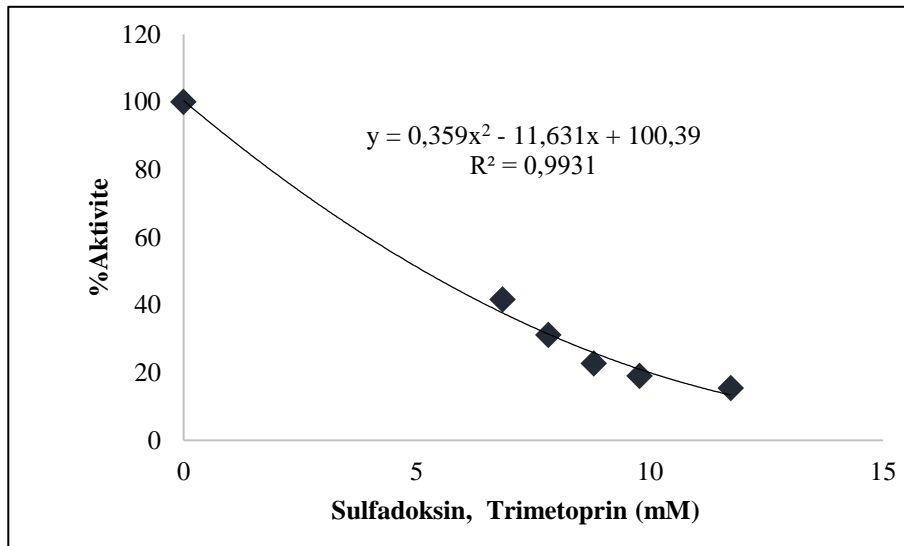
Şekil 3.10: 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda saflaştırılmış hSığır serum PON enzimi için farklı Butafosfan konsantrasyonlarına karşı % aktivite grafiği.

Tablo 3.16:Sülfadoksin+ Trimetoprim ilaç etken maddesine ait bilgiler ve sPON enzimi için IC₅₀ değeri.

İlaç Etken Madde	Kimyasal Yapısı	MA (g/mol)	Miktarı (mg/mL)	IC ₅₀ (mM) (Sığır)
Sulfadoksin		310,33	100	
Trimetoprim		290,32	20	5,15

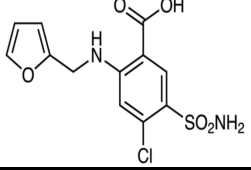
Tablo 3.17: hSığır PON enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Sülfadoksin/Trimetoprim'in IC₅₀ değerinin saptanmasında kullanılan çözelti miktarları ve ilaç konsantrasyonları ile elde edilen veriler.

Tampon(μl)	Substrat(μl)	İnhibitör(μl)	Enzim(μl)	Absorbans (412nm)	PON Aktivite Absorbans (U/ml dak)
815	100	35	50	0,0138	
810	100	40	50	0,0103	
805	100	45	50	0,075	0,0332
800	100	50	50	0,063	
790	100	60	50	0,0051	



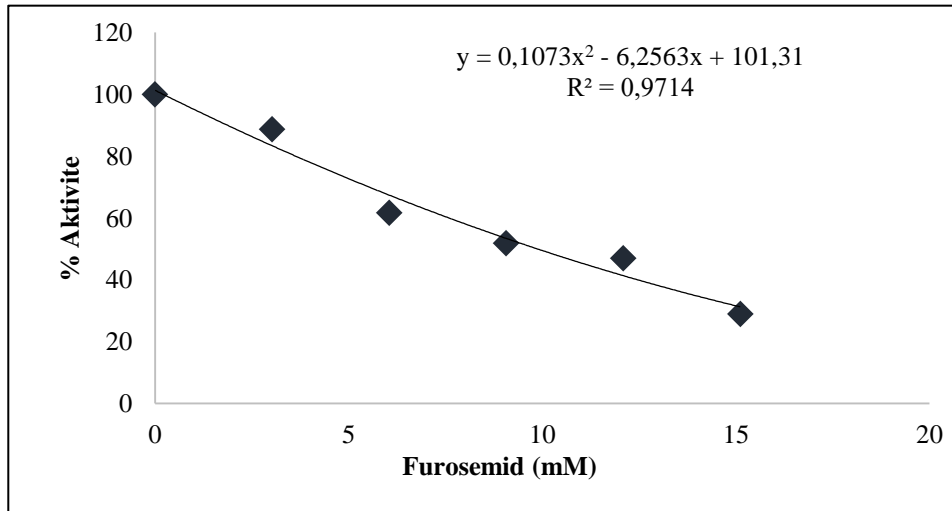
Şekil 3.11: 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda saflaştırılmış hSığır serum PON enzimi için farklı Sülfadoksin/Trimetoprim konsantrasyonlarına karşı % aktivite grafiği.

Tablo 3.18: Furosemid ilaç etken maddesine ait bilgiler ve kPON enzimi için IC₅₀ değeri.

İlaç Etken Madde	Kimyasal Yapısı	MA (g/mol)	Miktarı (mg/mL)	IC ₅₀ (mM) (Koyun)
Furosemid		330,745	20	9,87

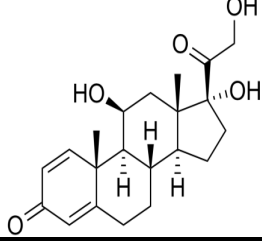
Tablo 3.19: Koyun PON enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Furosemid'in IC₅₀ değerinin saptanmasında kullanılan çözelti miktarları ve ilaç konsantrasyonları ile elde edilen veriler.

Tampon(μL)	Substrat(μL)	İnhibitör(μL)	Enzim(μL)	Absorbans (412nm)	PON Aktivite Absorbans (U/mL dak)
800	100	50	50	0,0368	
750	100	100	50	0,0256	
700	100	150	50	0,0215	0,0415
650	100	200	50	0,0195	
600	100	250	50	0,012	



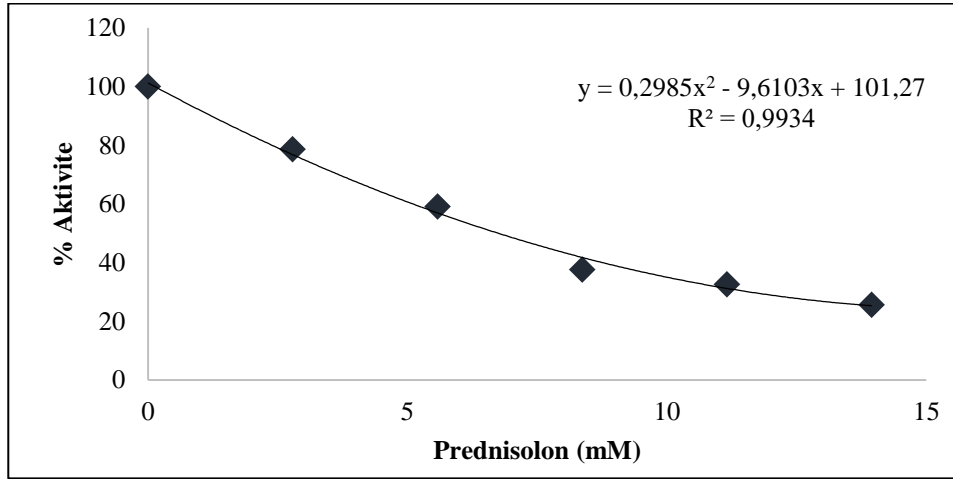
Şekil 3.12: 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda saflaştırılmış koyun serum PON enzimi için farklı Furosemid konsantrasyonlarına karşı % aktivite grafiği.

Tablo 3.20: Prednisolon ilaç etken maddesine ait bilgiler ve kPON enzimi için IC₅₀ değeri.

İlaç Etken Madde	Kimyasal Yapısı	MA (g/mol)	Miktarı (mg/mL)	IC ₅₀ (mM) (Koyun)
Prednisolon		358,428	20	6,75

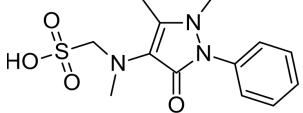
Tablo 3.21: Koyun PON enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Prednisolon'un IC₅₀ değerinin saptanmasında kullanılan çözelti miktarları ve ilaç konsantrasyonları ile elde edilen veriler.

Tampon(μL)	Substrat(μL)	İnhibitör(μL)	Enzim(μL)	Absorbans (412nm)	PON Aktivite Absorbans (U/mL dak)
800	100	50	50	0,0326	
750	100	100	50	0,0245	
700	100	150	50	0,0156	0,0415
650	100	200	50	0,0135	
600	100	250	50	0,0106	



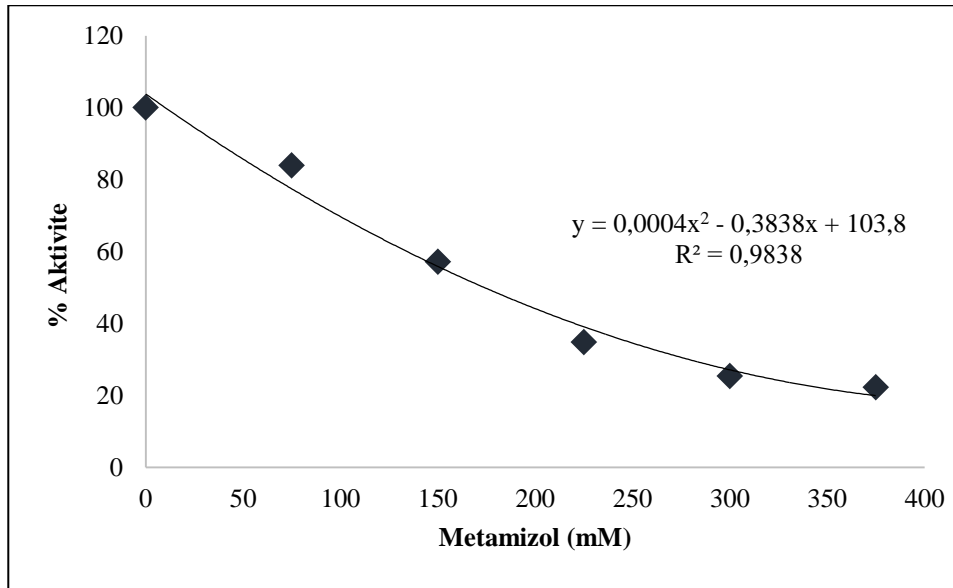
Şekil 3.13: 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda saflaştırılmış koyun serum PON enzimi için farklı Prednisolon konsantrasyonlarına karşı % aktivite grafiği.

Tablo 3.22: Metamizol ilaç etken maddesine ait bilgiler ve kPON enzimi için IC₅₀ değeri.

İlaç Etken Madde	Kimyasal Yapısı	MA (g/mol)	Miktarı (mg/mL)	IC ₅₀ (mM) (Koyun)
Metamizol		333,341	500	170,3

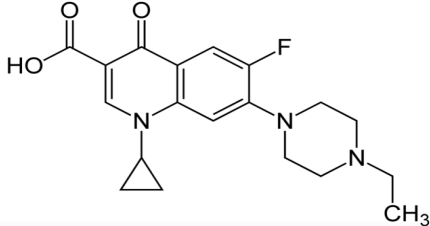
Tablo 3.23: Koyun PON enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Metamizol'un IC₅₀ değerinin saptanmasında kullanılan çözelti miktarları ve ilaç konsantrasyonları ile elde edilen veriler.

Tampon(μl)	Substrat(μl)	İnhibitör(μl)	Enzim(μl)	Absorbans (412nm)	PON Aktivite Absorbans (U/ml dak)
800	100	50	50	0,0348	
750	100	100	50	0,0237	
700	100	150	50	0,0144	0,0415
650	100	200	50	0,0105	
600	100	250	50	0,0092	



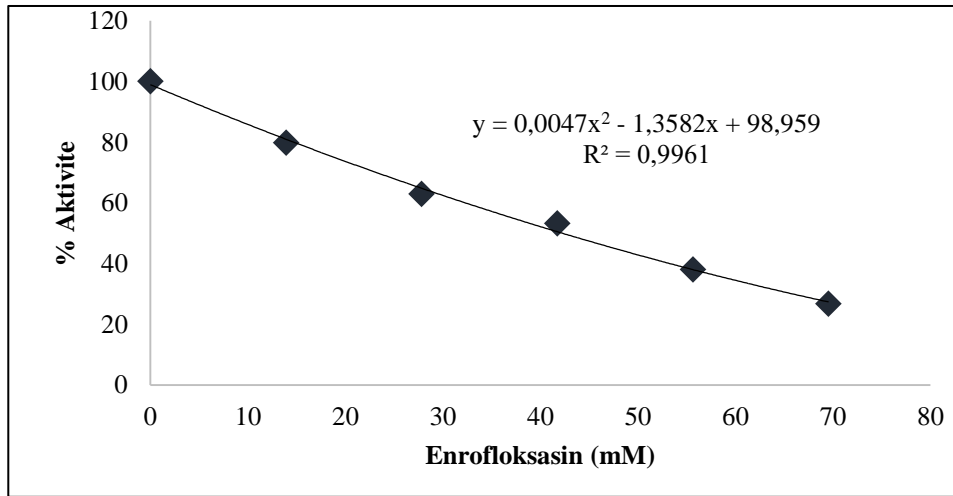
Şekil 3.14: 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda saflaştırılmış koyun serum PON enzimi için farklı Metamizol konsantrasyonlarına karşı % aktivite grafiği.

Tablo 3.24: Enroflaksasin ilaç etken maddesine ait bilgiler ve kPON enzimi için IC₅₀ değeri.

İlaç Etken Madde	Kimyasal Yapısı	MA (g/mol)	Miktarı (mg/mL)	IC ₅₀ (mM) (Koyun)
Enroflaksasin		359,4	100	42,21

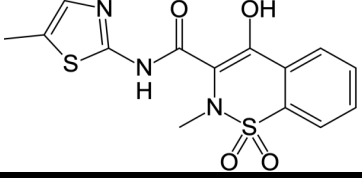
Tablo 3.25: Koyun PON enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Enroflaksasin'in IC₅₀ değerinin saptanmasında kullanılan çözelti miktarları ve ilaç konsantrasyonları ile elde edilen veriler.

Tampon(μL)	Substrat(μL)	İnhibitör(μL)	Enzim(μL)	Absorbans (412nm)	PON Aktivite Absorbans (U/mL dak)
800	100	50	50	0,0331	
750	100	100	50	0,0261	
700	100	150	50	0,0221	0,0415
650	100	200	50	0,0158	
600	100	250	50	0,0111	



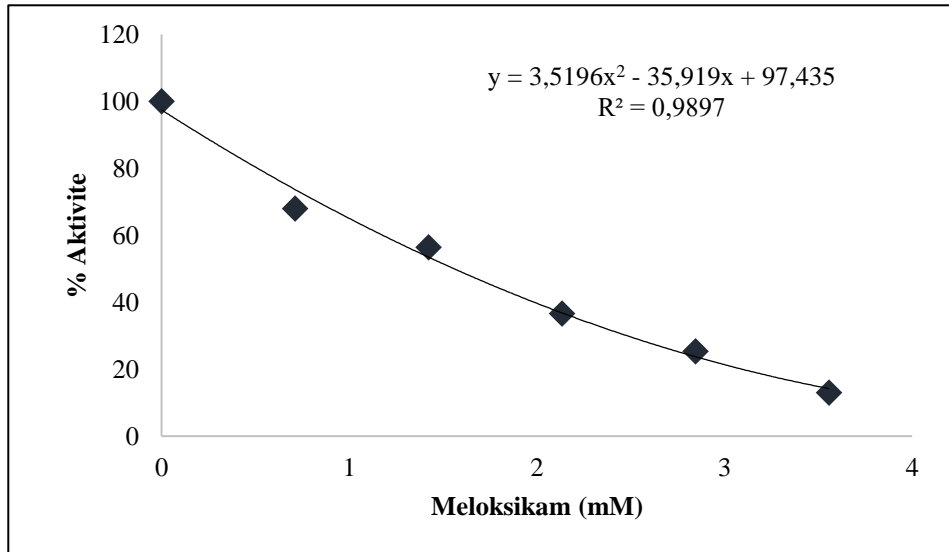
Şekil 3.15: 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda saflaştırılmış koyun serum PON enzimi için farklı Enroflaksasin konsantrasyonlarına karşı % aktivite grafiği.

Tablo 3.26: Meloksikam ilaç etken maddesine ait bilgiler ve kPON enzimi için IC₅₀ değeri.

İlaç Etken Madde	Kimyasal Yapısı	MA (g/mol)	Miktarı (mg/mL)	IC ₅₀ (mM) (Koyun)
Meloksikam		351,403	5	1,56

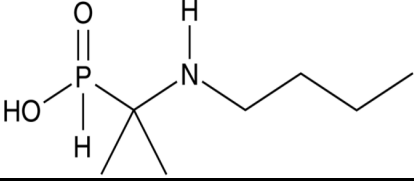
Tablo 3.27: Koyun PON enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Meloksikam'ın IC₅₀ değerinin saptanmasında kullanılan çözelti miktarları ve ilaç konsantrasyonları ile elde edilen veriler.

Tampon(μL)	Substrat(μL)	İnhibitör(μL)	Enzim(μL)	Absorbans (412nm)	PON Aktivite Absorbans (U/mL dak)
800	100	50	50	0,0282	
750	100	100	50	0,0234	
700	100	150	50	0,0152	0,0415
650	100	200	50	0,0105	
600	100	250	50	0,0054	



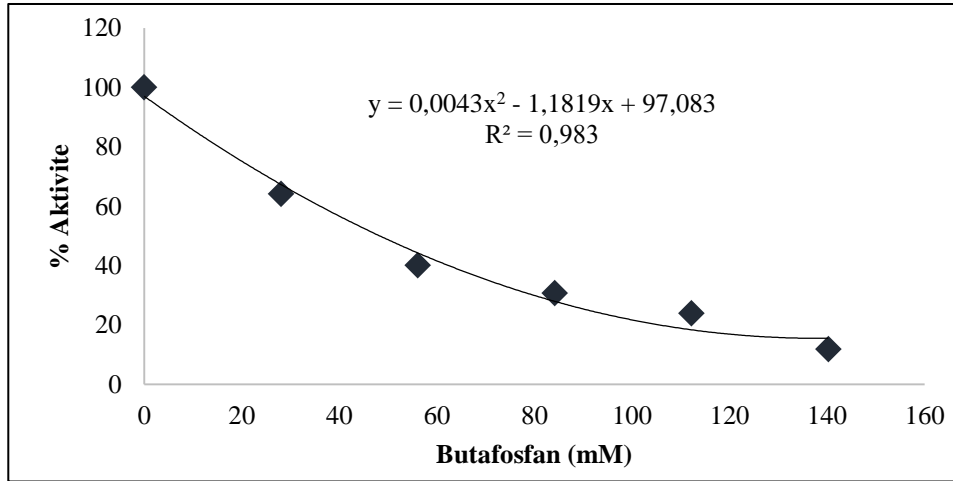
Şekil 3.16: 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda saflaştırılmış koyun serum PON enzimi için farklı Meloksikam konsantrasyonlarına karşı % aktivite grafiği.

Tablo 3.28: Butafosfan ilaç etken maddesine ait bilgiler ve kPON enzimi için IC₅₀ değeri.

İlaç Etken Madde	Kimyasal Yapısı	MA (g/mol)	Miktarı (mg/mL)	IC ₅₀ (mM) (Koyun)
Butafosfan		178,19	100	48,3

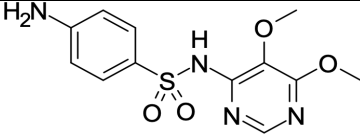
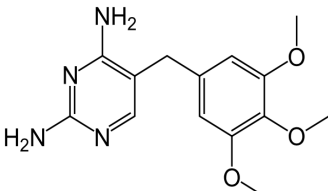
Tablo 3.29: Koyun PON enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Butafosfan'ın IC₅₀ değerinin saptanmasında kullanılan çözelti miktarları ve ilaç konsantrasyonları ile elde edilen veriler.

Tampon(μL)	Substrat(μL)	İnhibitör(μL)	Enzim(μL)	Absorbans (412nm)	PON Aktivite Absorbans (U/mL dak)
800	100	50	50	0,0266	
750	100	100	50	0,0116	
700	100	150	50	0,0127	0,0415
650	100	200	50	0,0099	
600	100	250	50	0,0049	



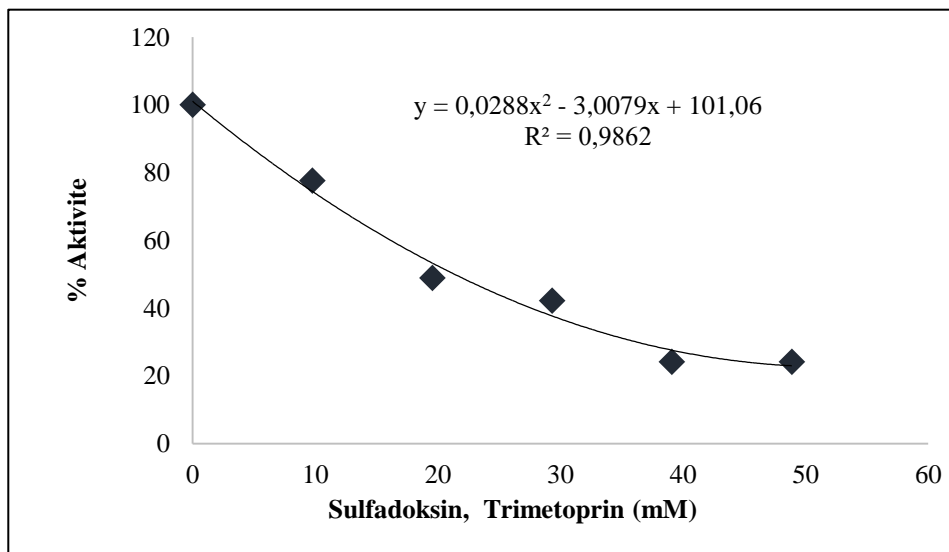
Şekil 3.17: 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda saflaştırılmış koyun serum PON enzimi için farklı Butafosfan konsantrasyonlarına karşı % aktivite grafiği.

Tablo 3.30: Sülfadoksin+ Trimetoprim ilaç etken maddesine ait bilgiler ve kPON enzimi için IC₅₀ değeri.

İlaç Etken Madde	Kimyasal Yapısı	MA (g/mol)	Miktarı (mg/mL)	IC ₅₀ (mM) (Koyun)
Sulfadoksin		310,33	100	
/	/	/	/	21,3
Trimetoprim		290,32	20	

Tablo 3.31: Koyun PON enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Sülfadoksin/Trimetoprim'in IC₅₀ değerinin saptanmasında kullanılan çözelti miktarları ve ilaç konsantrasyonları ile elde edilen veriler.

Tampon(μL)	Substrat(μL)	İnhibitör(μL)	Enzim(μL)	Absorbans (412nm)	PON Aktivite Absorbans (U/mL dak)
800	100	50	50	0,0322	
750	100	100	50	0,0203	
700	100	150	50	0,0175	0,0415
650	100	200	50	0,01	
600	100	250	50	0,01	



Şekil 3.18: 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda saflaştırılmış koyun serum PON enzimi için farklı Sülfadoksin/Trimetoprim konsantrasyonlarına karşı % aktivite grafiği.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Giriş bölümünde de detaylıca açıklandığı gibi PON1, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oksidasyonunu inhibe etme kabiliyeti nedeniyle anti-aterosklerotik özellikler gösteren bir enzimdir (Otocka-Kmiecik, 2022).

Ayrıca organofosfat insektisitler ve homosistein tiyolaktinler de dahil olmak üzere çeşitli bileşikler hidroliz etme özelliklerini sergiledikleri bilinmektedir (Taha ve diğerleri, 2016).

Bu nedenle, serum PON1 aktivitesini modüle edebilecek faktörler üzerinde çok yoğun araştırmalar yapılmış ve yapılmaya devam etmektedir. Ancak başta koyun ve sığır olmak üzere hayvan PON1 enzimleri üzerine yapılan çalışmaların son derece sınırlı olduğu yapılan literatür çalışması sonucu tespit edilmiştir. Bu nedenle çalışmamızdan elde edilen sonuçların bu konudaki eksikliğin giderilmesinde önemli katkılar sağlayacağı düşüncesindeyiz.

Doktora tezi kapsamındaki bu çalışmada koyun ve sığır serumundan hidrofobik etkileşim tekniği ile saflaştırılan PON1 enzimi üzerinde bazı ilaçların inhibisyon etkileri incelenmiştir. İlaçlar, hastalıkların kontrolü, önlenmesi ve iyileştirmesi için tasarlanmış moleküllerdir (Ronconi ve Sadler, 2007). Bu moleküller, canlı organizmadaki proteinler, nükleik asitler, reseptörler, enzimler, hormonlar gibi çeşitli bileşiklerle etkileşerek fonksiyonlarını gerçekleştirirler. Bir ilacın terapötik etkisinin yalnızca hedef bölgede düzenlenmesi ve hedef moleküle etkileşmesi istenmektedir (Grant, Hopper, Speight, MacRobert ve Bown, 1993; Kelleher ve diğerleri, 2009; March, 2022). Ancak canlı organizmanın toplam biyomolekül matrisinin, bilinenden çok daha karmaşık ve incelikli olarak tasarlandığı kabul edilmektedir (Harms ve Thornton, 2013; Weber, 2016). Bu nedenle kullanılan ilaçların hedef biyomolekül dışında diğer enzim ve biyomoleküller üzerindeki etkilerinin saptanmasının ve güvenli dozda ilaç kullanımının oldukça önemli olduğu kanaatindeyiz.

Araştırmamızı iki bölüme ayırmak mümkündür. İlk bölümde daha önce araştırma gurubumuz tarafından sentezlenen hidrofobik jel kullanılarak sığır serumundan sPON1 saflaştırılmış ve söz konusu ilaçlara karşı afiniteleri araştırılmıştır. İkinci bölümde ise farklı bir ligant kullanılarak yeni bir hidrofobik jel sentezlenmiştir. Yeni sentezlenen jel ile koyun

serumundan kPON1 enziminin saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Saf kPON1 enzimi üzerinde aynı ilaçların etkileri araştırılmıştır.

Araştırmamızda hsPON1 ve kPON1 üzerinde etkileri incelenen ilaçlar; Furosemid, Prednisolon, Metamizol, Enroflaxacin, Meloksikam, Symfos ve Bakteral olarak belirlenmiştir. Bu bileşiklerin seçiliş nedenleri aşağıda özetlenmiştir;

Furosemid, etki mekanizması oldukça tartışmalı olan kuvvetli bir diüretiktir (Navon ve diğerleri, 1975). Sığırlarda doğuma yakın meydana gelen ödem durumlarında kullanılmaktadır (Shaikh ve diğerleri, 2002). İlaç intramuskular ve intravenöz olarak her hayvan için günde 500 mg olacak dozlarda uygulanmaktadır (Shaikh ve diğerleri, 2002). Başta sığır ve koyun olmak üzere birçok hayvanda kullanılan oldukça popüler bir ilaçtır.

Prednisolon, adrenokortikal yetmezliği, inflamatuvar durumlar ve bazı kanser türlerini tedavi etmek için kullanılan bir glukokortikoiddir. Aynı zamanda Prednisolon, anti-inflamatuvar, immünosupresif, anti-neoplastik ve vazokonstriktif etkileri için kullanılan kortizole benzer bir glukokortikoiddir (De Clercq, Vanden Bussche, Croubels, Delahaut ve Vanhaecke, 2014b).

Metamizol, şiddetli ve kalıcı ateş ve ağrıyı gidermek için kullanılan ateş düşürücü ve analjezik bir ilaçtır (Aupanun ve diğerleri, 2016b). Metamizol (dipiron), asit olmayan nonopioidler grubuna ait bir pirazolon türevidir (Feldmann ve diğerleri, 2008). Olumlu gastrointestinal tolere edilebilirliğe sahip güçlü bir analjezik ve ateş düşürücü olarak kabul edilir (Bonfim ve diğerleri, 2021b).

Enroflaxacin hayvanlarda Gram (+) ve Gram (-) bakterilere karşı geniş spektrumlu aktivite göstermektedir. Enroflaxacin'in antibakteriyel aktivitesi onun konsantrasyonu ile yakından alakalıdır. Söz konusu bileşik, bakteriyel DNA giraz enzimini inhibe ederek, bakteride DNA sentezini önleme yoluyla antibakteriyel etkisini gösterdiği saptanmıştır. Enroflaxacin, 0,1 M sodyum hidroksit konsantrasyonlarında 10 mg/ml stok çözeltileri halinde bulunmaktadır. Uygulamalarda 10 µg/ml enrofloxacin kullanılmaktadır (Jerjomiceva ve diğerleri, 2014).

Kullanılan bileşiklerden Meloksikam Anaflex (Enaflex) ticari adı ile tanınan ve birçok bakteriyel enfeksiyon için kullanılan Polynoxylin etken maddesine sahip bir antibiyotiktir (Kingston, 1965).

Symfos ticari adı ile bilinen ilaç, butafosfan ve siyanokobalamin kombinasyonudur (Şahal ve diğerleri, 2017). Siyanokobalamin, vitamin B12'nin sentetik bir analogudur. Vitamin B12, metilmalonil CoA'nın süksinil CoA'ya dönüşümünde kofaktör olarak kullanılmaktadır.

Butafosfan ise enerji metabolizmasında rol oynayan organik bir fosfor bileşiğidir (Rollin ve ark., 2010) (Şahal ve diğerleri, 2017). Bu nedenle söz konusu formülasyon, sığır, at, koyun, keçi, kedi ve köpeklerde fosfor ve vitamin B12 (siyanokobalamin) yetersizliğinden kaynaklanan akut ve kronik metabolizma bozukluklarının korunma ve tedavisinde sıklıkla kullanılır (Yildiz, 2016).

Araştırmamızda inhibitör olarak kullanılan son ilaç bakteral ticari ismi ile anılan Trimetoprim 40 mg Sülfadoksin 200 mg içeren formülasyona sahiptir. Söz konusu ilaç başta sığır ve koyun olmak üzere birçok hayvan türünde sistemik enfeksiyonlarda kullanılmaktadır. Ayrıca viral enfeksiyonlarla komplike sekonder bakteri enfeksiyonlarında da oldukça sıklıkla kullanılır (Işık ve diğerleri, 2020).

Araştırmamızın birinci kısmını oluşturan çalışmalar için enzim kaynağı olarak Holstein ırkı sığırlar seçilmiştir. Bu ırk, ayırt edici renk işaretlerinin yanı sıra olağanüstü süt verimi ile dikkat çekmektedir (Chester-Jones ve DiCostanzo, 1996; Keller, Eng, Zhang, Li ve Aebersold, 2005). Holsteinler, hızlı büyüme, erken olgunlaşmanın yanı sıra iyi yönetilirse doğurganlık sorunu yaşamayacakları belirtilmektedir.

Bu nedenle bu ırk ülkemizde ve dünyada oldukça popülerdir. Ancak grubumuz tarafından daha önce yapılan bir çalışmada söz konusu ırktan elde edilen PON1 enzimin katalitik gücünün diğer ırklara göre çok yüksek olmadığı saptanmıştır. Bu durum, hsPON1 aktivitesini etkileyen maddelerin bilinmesinin çok daha önemli olacağını düşündürmektedir.

Holstein serumundan hsPON1 enzimi, hidrofobik etkileşim tekniği kullanılarak saflaştırılmıştır. Söz konusu enzimin hidrofobisitesinin diğer serum proteinlerine göre önemli derecede farklılık göstermesi bu tekniğin seçiminde etkili olmuştur. Nitekim giriş bölümünde de belirtildiği gibi PON1 enzimi, HDL bağlama bölgeleri nedeni ile yüzeyde hidrofobik gruplar içerecek şekilde tasarlanmışlardır. Diğer bir deyişle enzimin hidrofobisitesi tekniğin uygulanması için yeterli düzeydedir. Bu düşünce ile araştırma

grubumuz tarafından tasarlanan ve birçok kaynaktan PON1 enziminin saflaştırılmasında kullanılan jel, bu çalışmada hsPON1 saflaştırılmasında da başarı ile uygulanmıştır.

Söz konusu jel, Sefaroz 4B-L-tirozin-naftilamin kimyasal yapısına sahiptir. hsPON1, ilgili hidrofobik kolondan 224 kat ve %18 verim ile saflaştırılmıştır. Bu bölümde saflaştırma işleminde kullanılan jel, ilk defa Sinan ve ark. tarafından sentezlenmiş ve insan serumundan 227 kat ve % 72 verim ile insan serumundan hPON1 enzimi saflaştırılmıştır. Bu değerler tarafımızdan elde edilen saflaştırma derecesi ile uyum içerisinde olduğu görülmektedir. Aynı kolon kullanılarak bir başka çalışmada *Scyliorhinus canicula* (LİNNAEUS, 1758) organizmasından PON enzimi 7,93 ve %1 gibi düşük verim ve saflaştırma dereceleri ile izole edilmiştir. Erzen ve ark. farklı bir çalışmada, sPON1 enzimini söz konusu kolonu kullanarak 262 kat saflaştırdıkları görülmektedir.

Tüm bu çalışmalar dışında aynı kolon kullanılarak farklı sığır ırklarından değişik saflaştırma dereceleri ile PON1 enzimleri saflaştırılmıştır. Arslan ve ark. elde ettiği saflaştırma derecesi dışında tüm çalışmalardan elde edilen değerler göz önüne alındığı zaman bu çalışmada saflaştırma işlemini çok daha yüksek değerlerde gerçekleştirdiğimizi söylemek mümkündür.

Saf hsPON1 enziminin ilaçlara karşı afinitesinin farklı düzeylerde olduğu saptanmıştır. İnhibisyon gücünün tespit edilmesi amacı ile IC₅₀ değerleri belirlenmiştir. Bu amaçla literatürde inhibitör ve enzim arasındaki bağlanma sabiti olan Ki değerleri de kullanılmaktadır. Ancak IC₅₀ değerlerinin saptanması Ki değerlerine göre oldukça pratik bir işlemdir. IC₅₀ değeri, sabit enzim ve substrat konsantrasyonunda inhibitör konsantrasyonu değiştirilerek % aktivite değerlerinin belirlenmesini kapsamaktadır.

Ayrıca ilaçların enzimlerle etkileşmesini inceleyen araştırmacıların genel olarak IC₅₀ değerlerini tercih etmesi sonuçların karşılaştırılması amacı ile bizimde bu değeri tercih etmemizde etkili olmuştur.

hsPON1 üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Furosemid, Prednisolon, Metamizol, Enroflaksasin, Meloksikam, Butafosfan ve Sulfadoksin/Trimetoprim bileşikleri için IC₅₀ değerleri sırası ile 10,08, 13,41, 24,2, 1,32, 4,31, 24,3 ve 5,15 mM olarak bulunmuştur. Bu bulgulara göre hsPON1 enziminin en güçlü inhibitörünün Enroflaksasin olduğunu söylemek

mümkündür. Diğer bileşikler için saptanan IC_{50} değerlerin birbirlerine son derece yakın olduğu görülmektedir.

Literatürde sığır PON1 enziminin inhibisyonu konusunda son derece az çalışmaya rastlanmıştır. Bu çalışmaların büyük bir bölümünün ise araştırma grubumuz tarafından gerçekleştirildiği görülmektedir.

Örneğin Arslan ve ark. (2012) tarafından saflaştırılan hsPON1 üzerinde Oxytocin, Dexamethasone, Atropine sulphate, Gentamicin sulphate, Sulfadoxin + trimethoprim, Furosemid, Metamizole sodium, Toldimfos sodium bileşiklerinin inhibisyon etkisi incelenmiş ve ilgili bileşiklerin tamamı sPON1 enzimini inhibe ettiği bulunmuştur. En güçlü inhibitörün tarafımızdan da kullanılan Furosemid olduğu bulunmuştur. IC_{50} değerlerinin mg/mL olarak verilmesi sonuçların karşılaştırılmasını güçleştirmektedir.

Yine araştırma grubumuz tarafından gerçekleştirilen bir başka çalışmada sPON1 saflaştırılmış ve ağır metallerle karşı afinitesi incelenerek sonuçlar mM olarak verilmiştir (Bilen ve diğerleri, 2013). Çalışmadan elde edilen sonuçlar, bizim bulgularımıza yakın olduğu görülmektedir. Başka bir deyişle araştırmamızda kullanılan ilaçların ağır metaller kadar enzime zarar verdiğini söylemek mümkündür.

Dedeoğlu ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen benzer bir çalışmada ise farklı metal iyonlarının sPON1 üzerindeki etkisi incelenmiş ve hesaplanan IC_{50} değerleri tarafımızdan bulunan değerlerle uyum içerisinde olduğu görülmektedir (Dedeoğlu ve diğerleri, 2014).

Araştırmamızın ikinci bölümünde PON1 enziminin saflaştırılması için farklı bir ligant kullanılarak yeni bir jel sentezi gerçekleştirilmiştir.

Giriş bölümünde de vurgulandığı gibi önceki yıllarda proteinleri saflaştırmak sadece akademik amaçlara yönelik eylemleri kapsamaktaydı. Ancak günümüzde başta enzimler olmak üzere birçok proteinin endüstride kullanılma potansiyellerinin ortaya çıkarılması saflaştırma işleminin önemini daha da artırmıştır (Berthold ve Walter, 1994).

Saflaştırma senaryosu hazırlanırken, hedef proteinin özelliklerinin ayrıntılı olarak bilinmesinin önemi çok büyüktür. Hedef protein ham karışımdan ayırmak için diğer proteinler arasındaki yapısal ve işlevsel özelliklerindeki farklılıklarından yararlanır. Bu

özellikler arasında boyut, şekil, yük, izoelektrik nokta, yük dağılımı, hidrofobisite, çözünürlük, yoğunluk, ligand bağlama afinitesi, metal bağlama, tersinir birleşme, translayon sonrası modifikasyonlar ve spesifik diziler veya yapılar yer alır.

Sadece 20 aminoasitten tasarlanan proteinler arasındaki fiziksel ve kimyasal özelliklerdeki bu olağanüstü varyasyonlardan yararlanarak, uygulanabilir bir saflaştırma planı tasarlamak için genellikle birkaç farklı fraksiyonlama ve kromatografik basamaktan yararlanılabilir.

Protein saflaştırmasındaki zorluklar ve güçlükler, mevcut yöntemlerin en uygun şekilde seçilebilmesi ve uygulanabilmesi için protein saflaştırması hakkında doğru bilgi edinmeyi değerli kılmaktadır (Berthold ve Walter, 1994).

Proteinlerin saflaştırılması için birçok yöntem uygulanmasına rağmen, ılıman koşullarda gerçekleştirilmesi, hemen hemen tüm proteinlere uygulanması, işlem kolaylığı ve diğer metotların tamamlayıcısı olabilmesi gibi çeşitli avantajları nedeni ile Hidrofobik Etkileşim Tekniği dikkat çekmektedir. Bu nedenle kPON enzimini saflaştırmak için HEK tercih sebebimiz olmuştur.

Bu teknik, hidrofobik bağlanma, hidrofobik kromatografisi, hidrofobik afinite kromatografisi, iyonik olmayan adsorpsiyon kromatografisi, hidrofobik etkileşim kromatografisi ve tuz destekli adsorpsiyon kromatografisi gibi çok çeşitli isimlerle anılmaktadır. Tek bir kromatografik ayırma yöntemine bu kadar çok ismin verilmesi, proteinlerin bu adsorbanların etkileşme mekanizma konusunda çeşitli araştırmacılar arasındaki anlaşma eksikliğini yansıtıyor olabilir.

Hjertén tarafından ortaya atılan “hidrofobik etkileşim kromatografisi” (HIC) terimi genel kabul görmüş gibi görünse de günümüzde teknik hala farklı isimlerle anılmaktadır (Janson, 2012).

Giriş bölümünde detaylıca açıklandığı gibi saflaştırılmış PON1'e erişim, çeşitli faydalar sağlayacaktır. Yapısal ve fonksiyonel karakterizasyonlarını büyük ölçüde kolaylaştıracak ve diğer serum proteinlerinin tamamen ayrıldığı zaman daha doğru spesifik aktivite saptanacaktır. Bu enzim HDL'ye bağlı olduğu için saflaştırma işlemlerinde çeşitli problemler ortaya çıkmakta ve bu işlem için çok adımlı prosedürler gerekmektedir.

İnsan serumundan paraoksonaz saflaştırılması başlangıçta Gan ve diğerleri tarafından gerçekleştirilmiştir (Gan ve diğerleri, 1991). Bu enzimle ilgili ileri çalışmalar saflaştırma prosedürlerin gelişimine sebep olmuştur (C E Furlong ve diğerleri, 1993; Rodrigo ve diğerleri, 1997).

Bu saflaştırma prosedürlerinin çoğunda, spesifik olmayan afinite kromatografisi için mavi agaroz (Cibacron blue 3GA) kullanılmıştır. Günümüzde PON1 enziminin saflaştırılması konusunda da çok sayıda çalışmaya rastlamak mümkündür (C E Furlong ve diğerleri, 1993; Rodrigo ve diğerleri, 1997). Bu saflaştırma prosedürlerinin çoğunda, Jel filtrasyon, İyon Değişim ve Hidrofobik Etkileşim teknikleri kullanılmıştır. Bu prosedürler, birden fazla adım ve daha uzun saflaştırma süresi gerektirdiği bilinmektedir (C E Furlong ve diğerleri, 1993; Gan ve diğerleri, 1991; Golmanesh, Mehrani ve Tabei, 2008; Rodrigo ve diğerleri, 1997).

PON enzimin saflaştırılması için ilk hidrofobik adsorbanlar Yon (Yon, 1972) tarafından sentezlenmiştir. Sefaroz 6B, siyanojen bromür ile aktive edilmiş ve ardından 1,10-diaminodekan jele bağlanmıştır. Ancak elde edilen hem iyonik hem hidrofobik karakterdeki jeller, ilgili biyomolekülleri çok güçlü bir şekilde bağlayarak elüsyon koşullarında proteinlerin denatürasyonuna yol açtığı görülmüştür.

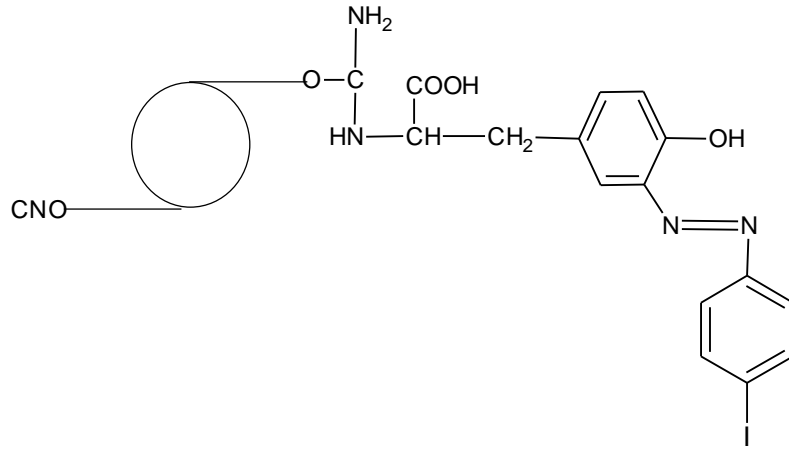
Aynı yıllarda Er-el, Zaidenzaig ve Shaltiel (Er-el, Zaidenzaig ve Shaltiel, 1972), pozitif yüklü gruplar içeren homolog bir dizi alkilamino-Sefaroz kimyasal yapısına sahip jeller sentezlenmiştir. Ayrıca, Hofstee (B. H. Hofstee, 1973; B. H. J. Hofstee, 1973), CNBr ile aktifleştirilmiş Sefaroz 4B üzerinde immobilize edilmiş aromatik aminlerin sentezini ve özelliklerini de bildirdi. Her durumda, "hidrokarbon kaplı Sefaroz" adsorpsiyon davranışı, bir dizi saflaştırılmış protein ve bazı ham biyolojik ekstraktlar kullanılarak belirlendi. Araştırmalarda aromatik yapıli ligantların kullanılması ile daha ılıman koşullarda elüsyon işlemleri gerçekleştirildiği için protein inaktivasyonun daha az gerçekleştiği saptanmıştır.

Grubumuz tarafından daha önceki çalışmalarda sentezlenmiş, kimyasal yapısı Sefaroz 4B L-tirozin 1-naftilamin olan HEK jelinin modifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Matriks olarak, iyi akış özelliği, kimyasal ve fiziksel stabilitesi gibi özellikler göz önüne alınarak Sefaroz 4B tercih edilmiştir. Yukarıda anlatılan nedenler ile ligant olarak aromatik yapıli bir molekül olan 4-iyodoanilin kullanılmıştır. Sefaroz 4B, siyanojen bromürle aktifleştirildikten sonra uzantı kolu olarak L-tirozin bağlanmıştır. Son olarak 4-iyodoanilin diazolanarak ilgili

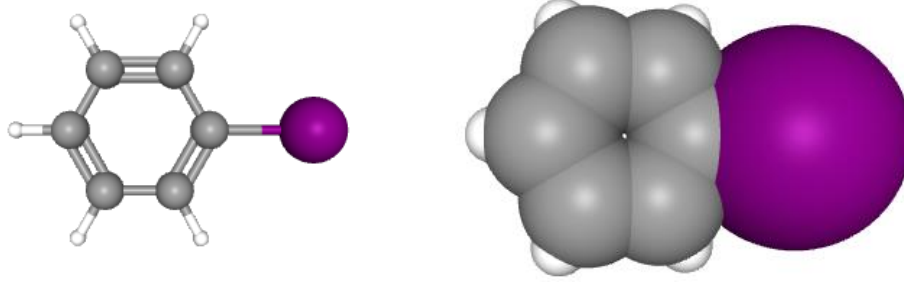
yapıya immobilize edilmiştir. Liganta mevcut iyot atomunun elektronik dağılımı, PON ile hidrofobik etkileşme sırasında liganta önemli farkındalık kazandıracığı düşüncesindeyiz.

Tarafımızca sentezlenen jelin kimyasal yapısı Şekil 4.1’de verilmiştir. Söz konusu yapıda görüleceği gibi diazo gruplarından dolayı, jel ortamın pH değerine bağlı olarak jel, farklı renklerde görülmektedir. Bu durumun gerek jelin deforme olup olmadığı gerekse ortamın pH değerini tahmin etmede büyük avantaj olduğu düşüncesindeyiz. Sentezlenen Jelin IR spektrumu Şekil 4.3’de verilmiştir.

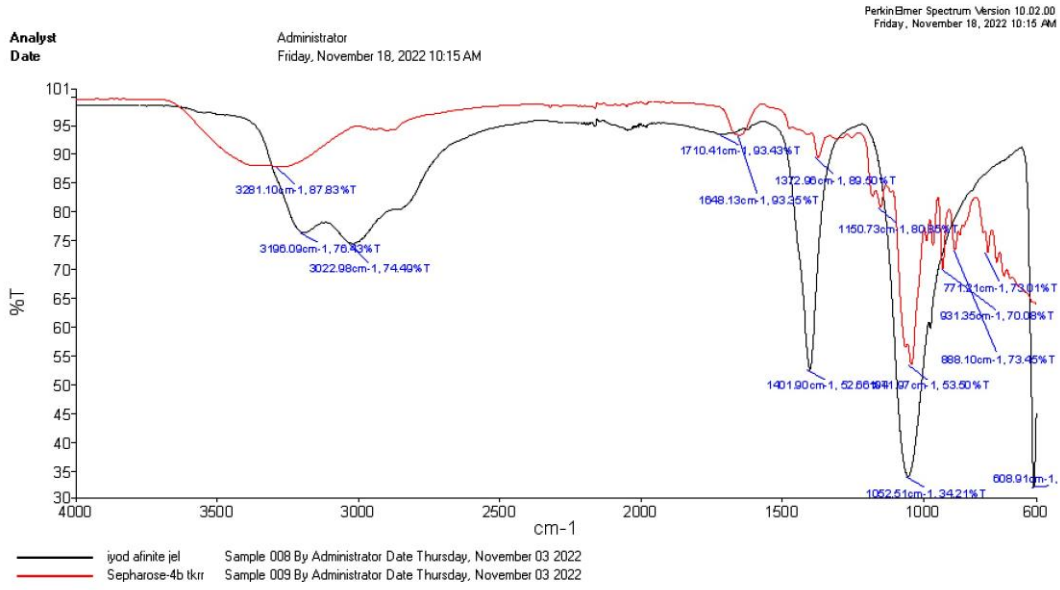
Referans materyali ve örnek materyal için elde edilen pikler karşılaştırıldığında özellikle örnek materyal için oluşan $1052,51\text{ cm}^{-1}$, $608,91\text{ cm}^{-1}$ piklerin amin grupları için karakteristik pikler olduğu saptanmıştır. Ayrıca örnek materyal yapısında bulunan L-tirozine ait karboksil grubu $\text{C}=\text{O}$ $1710,41\text{ cm}^{-1}$ gözlemlenen bir diğer ayırt edici pik olduğu söylenebilir.



Şekil 4.1: Tarafımızca sentezlenen (Sefaroz 4B-L-tirozin-4-iyodo-Anilin) hidrofobik etkileşim jelinin kimyasal yapısı.



Şekil 4.2: İyodobenzen molekülünün yapısı ve elektronların dağılımının şematik gösterimi.



Şekil 4.3: Sefaroz 4-B-4-İyodo Anilin Hidrofobik Jel IR Spektrum Grafiği.

Araştırmamızın ikinci bölümünde gerçekleştirdiğimiz çalışmada enzim kaynağı olarak Karacabey Merinosu tercih edilmiştir. Merinos koyun ırkı, et ve yapağı veriminin arzu edilir düzeyde (Atav, Ünal ve Soysal, 2022; Koyuncu ve Uzun, 2009; Yılmaz ve diğerleri, 2014) olması nedeni ile dünyanın çeşitli bölgelerinde (Ekiz, Özcan, Yılmaz ve Ceyhan, 2005; Özcan, Ekiz, Yılmaz ve Ceyhan, 2004; Soysal, Cibik, Aydın ve Ak, 2011) yetiştirilmektedir. Anelik içgüdü, hemen hemen yılın her mevsiminde kızgınlık gösterme yetenekleri (Köycü, Sezenler, Özder ve Karadağ, 2008) bu koyun ırkının popüler olmasının diğer nedenleri arasında sayılabilir.

Daha önce grubumuz tarafından yapılan bir çalışmada, Karacabey Merinos, Kıvırcık, Tahirova, Akkaraman ve Dağlıç koyun ırklarından serum PON aktiviteleri araştırılmıştır. Bu amaçla PON1 enzimlerinin Km ve Vmax değerleri Lineweaver-Burk yöntemi ile belirlenmiştir. Katalitik etkinliği en yüksek PON1, Kıvırcık ırkından gözlenmişken, en az

katalitik etkinlik Karacabey Merinos ırkında saptanmıştır. Bu durum Karacabey Merinos PON1 enziminin aktivitesinin önemini daha da artırmaktadır. Bu nedenle tedavide kullanılan ilaçların Karacabey Merinos PON1 aktivitesini ne ölçüde etkilediği diğer ırklara göre çok daha önemli olduğu kanısındayız.

kPON1, Sefaroz 4B-L-tirozin-4-iyodo-anilin kimyasal yapısına sahip jel kullanılarak koyun serumundan saflaştırılmıştır. 73,4 saflaştırma derecesi %88,3 verim ile işlem gerçekleştirilmiştir. Koyun PON enziminin saflaştırılması konusunda literatürde son derece az çalışmaya rastlanmaktadır.

Bu çalışmaların birçoğu araştırma grubumuz tarafından gerçekleştirildiği dikkat çekmektedir. Örneğin, Erol ve ark (2012) tarafından farklı koyun ırklarından Sefaroz 4B-L-tirozin-naftilamin jeli kullanılarak PON enzimleri saflaştırılmıştır. Bu çalışmada tarafımızca elde edilen değerlere göre daha yüksek saflaştırma dereceleri elde edilmesine rağmen verimlerinin düşük olduğu görülmektedir.

Bu konuda bir diğer çalışmada ise yine aynı jel kullanılarak koyun serumundan PON enzimi 473 kat ve %54 verimle saflaştırılmıştır (Şipal, 2011). Son olarak Cebeci ve ark. tarafından, kPON1 farklı teknikler uygulanarak 141 kat saflaştırma dereceleri elde edilmiştir (Koncuk Cebeci ve diğerleri, 2014).

Tarafımızca yeni sentezlenen hidrofobik jel kullanılarak elde ettiğimiz saflaştırma derecesi literatürle karşılaştırıldığında düşük olduğu görülmektedir. Ancak verimin çok daha yüksek olduğu görülmektedir. Kolonun farklı tuz, sıcaklık ve pH değerlerinde çalışılarak daha yüksek saflaştırma derecelerini elde edileceği düşüncesindeyiz.

Saflaştırılan kPON1 enzimi üzerinde Furosemid, Prednisolon, Metamizol, Enroflaksasin, Meloksikam, Butafosfan ve Sulfadoksin/Trimetoprim ilaçlarının etkileri incelenmiştir. Kullanılan ilaçlardan tamamı saf kPON1 izoenzimini değişik kuvvetlerde inhibe ettiği saptanmıştır. İnhibisyon gücünü tespit etmek için yukarıda açıklanan nedenle IC₅₀ değerleri belirlenmiştir. Çalışılan bileşikler içinde kPON1 için en güçlü inhibitörün Meloksikam olduğu görülmektedir (IC₅₀ = 1,56 mM). En zayıf inhibitör ise 170,3 mM Metamizol olarak saptanmıştır.

Başka bir çalışmada kPON enzimi üzerinde fenoxaprop-p-ethyl, lambda cyhalothrin, imidacloprid ve dichlorvos bileşiklerinin etkisi incelenmiş ve inhibisyon etkisi gösteren

pestisitler için IC₅₀ değerleri, 0,0103-0,2 µM aralığında bulunmuştur (Koncuk Cebeci ve diğerleri, 2014). Söz konusu bileşiklerin, tarafımızca çalışılan ilaçlardan kPON1 için çok daha gcl inhibitör olduğu görülmektedir.

Konu ile ilgili yapılan bir başka çalışmada ise Merinos ve Kıvırcık koyun ırkları için kPON1 üzerinde Mn²⁺, Hg²⁺, Co²⁺, Cd²⁺, Ni²⁺ ve Cu²⁺ metal iyonlarının inhibisyon etkisi incelenmiş ve elde edilen IC₅₀ değerleri çalışmamızda bulunan değerler ile uyum içerisinde olduğu görülmektedir. Yapılan bir başka çalışmada kPON1 üzerine inhibisyon etkisi gösteren Decis 2,5 EC™, Fosforin M™, Confidor SC 350™ , Gibber 20 SI™ bileşikleri için hesaplanan IC₅₀ değerleri çalışmamızda bulunan değerlere çok yakın olması ile dikkat çekmektedir (şipal, 2011).

Araştırmamızda hsPON1 ve kPON1 enzimleri üzerinde çalıştığımız ilaçların IC₅₀ değerlerine bakıldığı zaman orta derecede gcl inhibitörler olduğu söylenebilir. Bu nedenle özellikle düşük PON aktivitesine sahip sığır ve koyun ırklarında söz konusu ilaçların kullanım dozlarının çok daha dikkatli ayarlanması gerekli olduğunu dşnmekteyiz.

5. KAYNAKLAR

- Adkins, S., Gan, K. N., Mody, M. ve La Du, B. N. (1993). Molecular basis for the polymorphic forms of human serum paraoxonase/arylesterase: Glutamine or arginine at position 191, for the respective A or B allozymes. *American Journal of Human Genetics*, 52(3), 598–608.
- Aharoni, A., Gaidukov, L., Yagur, S., Toker, L., Silman, I. ve Tawfik, D. S. (2004). Directed evolution of mammalian paraoxonases PON1 and PON3 for bacterial expression and catalytic specialization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(2), 482–487. doi:10.1073/pnas.2536901100
- Alici, H. A., Ekinci, D. ve Beydemir, Ş. (2008). Intravenous anesthetics inhibit human paraoxonase-1 (PON1) activity in vitro and in vivo. *Clinical Biochemistry*, 41(16–17), 1384–1390. doi:10.1016/j.clinbiochem.2008.06.017
- Alkan, H., Satilmis, F., Karasahin, T., Dursun, S. ve Erdem, H. (2021). Evaluation of the relationship between serum paraoxonase-1 activity and superovulation response/embryo yield in Holstein cows. *The Journal of veterinary medical science*, 83(3), 535–541. doi:10.1292/jvms.20-0578
- Altenhöfer, S., Witte, I., Teiber, J. F., Wilgenbus, P., Pautz, A., Li, H., ... Horke, S. (2010). One enzyme, two functions: PON2 prevents mitochondrial superoxide formation and apoptosis independent from its lactonase activity. *Journal of Biological Chemistry*, 285(32), 24398–24403. doi:10.1074/jbc.M110.118604
- Arioli, F., Casati, A., Fidani, M., Silvestri, M. ve Pompa, G. (2012). Prednisolone and prednisone neo-formation in bovine urine after sampling. *Animal: an international journal of animal bioscience*, 6(6), 1023–1029. doi:10.1017/S1751731111002497
- Arslan, M., Gencer, N., Arslan, O. ve Guler, O. O. (2012). In vitro efficacy of some cattle drugs on bovine serum paraoxonase 1 (PON1) activity. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 27(5), 722–729. doi:10.3109/14756366.2011.611135
- Atav, R., Ünal, P. G. ve Soysal, M. İ. (2022). Investigation of the Quality Characteristics of Wool Obtained from Karacabey Merino Sheep Grown in Thrace Region-Turkey. *Journal of Natural Fibers*, 19(3), 1107–1114. doi:10.1080/15440478.2020.1795777
- Augusto, P., Silveira, S., Veterinária, D., Ciências, D., Rondônia, P. A. E. ve Schneider, A. (2021). Single nucleotide polymorphisms in the promoter region of the paraoxonase 1

- gene in *Bos indicus* cows Polimorfismos de nucleotídeo único na região promotora do gene da paraoxonase 1 em vacas *Bos indicus*, *I*, 48315–48322. doi:10.34117/bjdv7n5-301
- Aupanun, S., Laus, F., Poapolathep, A., Owen, H., Vullo, C., Faillace, V. ve Giorgi, M. (2016a). Pharmacokinetic Assessment of the Marker Active Metabolites 4-Methyl-amino-antipyrine and 4-Acetyl-amino-antipyrine After Intravenous and Intramuscular Injection of Metamizole (Dipyrone) in Healthy Donkeys. *Journal of Equine Veterinary Science*, *47*, 55–61. doi:https://doi.org/10.1016/j.jevs.2016.08.005
- Aupanun, S., Laus, F., Poapolathep, A., Owen, H., Vullo, C., Faillace, V. ve Giorgi, M. (2016b). Pharmacokinetic Assessment of the Marker Active Metabolites 4-Methyl-amino-antipyrine and 4-Acetyl-amino-antipyrine After Intravenous and Intramuscular Injection of Metamizole (Dipyrone) in Healthy Donkeys. *Journal of Equine Veterinary Science*, *47*, 55–61. doi:https://doi.org/10.1016/j.jevs.2016.08.005
- Aviram, M., Billecke, S., Sorenson, R., Bisgaier, C., Newton, R., Rosenblat, M., ... La Du, B. (1998). 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. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *18*(10), 1617–1624. doi:10.1161/01.ATV.18.10.1617
- Azarsız, E. ve Sönmez, E. Y. (2000). Paraoksonaz ve klinik önemi. *Türk Biyokimya Dergisi*, *25*(3), 109–119.
- Azimzadeh, K., Amniattalab, A. ve Eslampanah, M. (2018). Plasma Paraoxonase, Sphingosine-1-phosphate, Total Sialic Acid, and Heat Shock Protein-27 in the Liver of the Sheep Naturally Infected with *Cysticercus Tenuicollis*: Evidence on Pathological Changes. *Archives of Razi Institute*, *73*(1), 61–67. doi:10.22092/ARI.2018.114062
- Bacchetti, T., Ferretti, G. ve Sahebkar, A. (2019). The role of paraoxonase in cancer. *Seminars in Cancer Biology*, *56*(October), 72–86. doi:10.1016/j.semcancer.2017.11.013
- Bademkiran, S., Yokus, B., Cakir, D. U., Durak, M. H. ve Kurt, D. (2008). Serum Paraoxonase-1 activity in dairy cattle and its association with dystocia. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, *10*, 1184–1189.
- Bar-Rogovsky, H., Hugenmatter, A. ve Tawfik, D. S. (2013). The evolutionary origins of detoxifying enzymes: The mammalian serum paraoxonases (PONs) relate to bacterial homoserine lactonases. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(33), 23914–23927.

doi:10.1074/jbc.M112.427922

- Ben-David, M., Elias, M., Filippi, J. J., Duñach, E., Silman, I., Sussman, J. L. ve Tawfik, D. S. (2012). Catalytic versatility and backups in enzyme active sites: The case of serum paraoxonase 1. *Journal of Molecular Biology*, 418(3–4), 181–196. doi:10.1016/j.jmb.2012.02.042
- Ben-David, M., Sussman, J. L., Maxwell, C. I., Szeler, K., Kamerlin, S. C. L. ve Tawfik, D. S. (2015). Catalytic stimulation by restrained active-site floppiness - The case of high density lipoprotein-bound serum paraoxonase-1. *Journal of Molecular Biology*, 427(6), 1359–1374. doi:10.1016/j.jmb.2015.01.013
- Ben-David, M., Wieczorek, G., Elias, M., Silman, I., Sussman, J. L. ve Tawfik, D. S. (2013). Catalytic metal ion rearrangements underline promiscuity and evolvability of a metalloenzyme. *Journal of Molecular Biology*, 425(6), 1028–1038. doi:10.1016/j.jmb.2013.01.009
- Berthold, W. ve Walter, J. (1994). Protein purification: aspects of processes for pharmaceutical products. *Biologicals: journal of the International Association of Biological Standardization*, 22(2), 135–150. doi:10.1006/biol.1994.1020
- Bilen, Ç., Beyaztaş, S., Arslan, O. ve Güler, Ö. Ö. (2013). Investigation of heavy metal effects on immobilized paraoxanase by glutaraldehyde. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 28(3), 440–446. doi:10.3109/14756366.2011.647007
- Billecke S, Draganov D, Counsell R, et al. (2000). Human serum paraoxonase (PON1) isozymes Q and R hydrolyze lactones and cyclic carbonate esters.
- Bionaz, M., Trevisi, E., Calamari, L., Librandi, F., Ferrari, A. ve Bertoni, G. (2007). Plasma paraoxonase, health, inflammatory conditions, and liver function in transition dairy cows. *Journal of dairy science*, 90(4), 1740–1750. doi:10.3168/jds.2006-445
- Blaho-Nelson, D., Krüger, D. M., Szeler, K., Ben-David, M. ve Kamerlin, S. C. L. (2017). Active Site Hydrophobicity and the Convergent Evolution of Paraoxonase Activity in Structurally Divergent Enzymes: The Case of Serum Paraoxonase 1. *Journal of the American Chemical Society*, 139(3), 1155–1167. doi:10.1021/jacs.6b10801
- Bonfim, L. T., Mota, T. C., Gomes, J. J., da Silva, E., Gomes, L. M., Burbano, R. M. R. ve Bahia, M. O. (2021a). Assessment of the cytoprotective effect of the homeopathic compound Canova® on African green monkey kidney (VERO) cell line exposed to the drug dipyrone sodium. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 84(18), 761–768. doi:10.1080/15287394.2021.1942355
- Bonfim, L. T., Mota, T. C., Gomes, J. J., da Silva, E., Gomes, L. M., Burbano, R. M. R. ve

- Bahia, M. O. (2021b). Assessment of the cytoprotective effect of the homeopathic compound Canova® on African green monkey kidney (VERO) cell line exposed to the drug dipyrone sodium. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 84(18), 761–768. doi:10.1080/15287394.2021.1942355
- Brushia, R. J., Forte, T. M., Oda, M. N., La Du, B. N. ve Bielicki, J. K. (2001). Baculovirus-mediated expression and purification of human serum paraoxonase 1A. *Journal of Lipid Research*, 42(6), 951–958. doi:10.1016/s0022-2275(20)31619-9
- Cabana, V. G., Reardon, C. A., Feng, N., Neath, S., Lukens, J. ve Getz, G. S. (2003). Serum paraoxonase: Effect of the apolipoprotein composition of HDL and the acute phase response. *Journal of Lipid Research*, 44(4), 780–792. doi:10.1194/jlr.M200432-JLR200
- Campbell, K. L. (1999). Sulphonamides: updates on use in veterinary medicine. *Veterinary dermatology*, 10(3), 205–215. doi:10.1046/j.1365-3164.1999.00181.x
- Camps, J., Pujol, I., Ballester, F., Joven, J. ve Simó, J. M. (2011). Paraoxonases as potential antibiofilm agents: Their relationship with quorum-sensing signals in gram-negative bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(4), 1325–1331. doi:10.1128/AAC.01502-10
- Cao, Y., Zhang, J., Yang, W., Xia, C., Zhang, H. Y., Wang, Y. H. ve Xu, C. (2017). Serum paraoxonase as an indicator for fatty liver in sheep. *Journal of Veterinary Research (Poland)*, 61(1), 97–102. doi:10.1515/jvetres-2017-0012
- Carr, R. L., Dail, M. B., Chambers, H. W. ve Chambers, J. E. (2015). Species differences in paraoxonase mediated hydrolysis of several organophosphorus insecticide metabolites. *Journal of toxicology*, 2015, 470189. doi:10.1155/2015/470189
- Chambers, J. E. (2008). PON1 multitasks to protect health. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(35), 12639–12640. doi:10.1073/pnas.0807062105
- Chang, J., Blazek, E., Kreft, A. F. ve Lewis, A. J. (1985). Inhibition of platelet and neutrophil phospholipase A2 by hydroxyeicosatetraenoic acids (HETES). A novel pharmacological mechanism for regulating free fatty acid release. *Biochemical pharmacology*, 34(9), 1571–1575. doi:10.1016/0006-2952(85)90701-4
- Chester-Jones, H. ve DiCostanzo, A. (1996). Holstein feeding programs / Beef Cattle Management Update. *University of Minnesota Extension Service*, (35), 1–8.
- Cole, T. B., Jansen, K., Park, S., Li, W. F., Furlong, C. E. ve Costa, L. G. (2010). The toxicity of mixtures of specific organophosphate compounds is modulated by

- paraoxonase 1 status. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 660, 47–60. doi:10.1007/978-1-60761-350-3_6
- Copley, S. D. (2003). Enzymes with extra talents: Moonlighting functions and catalytic promiscuity. *Current Opinion in Chemical Biology*, 7(2), 265–272. doi:10.1016/S1367-5931(03)00032-2
- Costa, L. G., McDonald, B. E., Murphy, S. D., Omenn, G. S., Richter, R. J., Motulsky, A. G. ve Furlong, C. E. (1990). Serum paraoxonase and its influence on paraoxon and chlorpyrifos-oxon toxicity in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 103(1), 66–76. doi:10.1016/0041-008X(90)90263-T
- Davies, H. G., Richter, R. J., Keifer, M., Broomfield, C. A., Sowalla, J. ve Furlong, C. E. (1996). The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin. *Nature Genetics*, 14(3), 334–336. doi:10.1038/ng1196-334
- de Campos, F. T., Rincon, J. A. A., Acosta, D. A. V., Silveira, P. A. S., Pradié, J., Corrêa, M. N., ... Schneider, A. (2017). The acute effect of intravenous lipopolysaccharide injection on serum and intrafollicular HDL components and gene expression in granulosa cells of the bovine dominant follicle. *Theriogenology*, 89, 244–249. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.11.013
- De Clercq, N., Vanden Bussche, J., Croubels, S., Delahaut, P. ve Vanhaecke, L. (2014a). Development and validation of a high-resolution mass-spectrometry-based method to study the long-term stability of natural and synthetic glucocorticoids in faeces. *Journal of Chromatography A*, 1336, 76–86. doi:https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.02.033
- De Clercq, N., Vanden Bussche, J., Croubels, S., Delahaut, P. ve Vanhaecke, L. (2014b). Development and validation of a high-resolution mass-spectrometry-based method to study the long-term stability of natural and synthetic glucocorticoids in faeces. *Journal of Chromatography A*, 1336, 76–86. doi:https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.02.033
- Debord, J., Bollinger, J.-C., Merle, L. ve Dantoine, T. (2003). Inhibition of human serum arylesterase by metal chlorides. *Journal of inorganic biochemistry*, 94(1–2), 1–4. doi:10.1016/s0162-0134(02)00627-x
- Dedeoğlu, N., Arslan, M. ve Erzen, M. (2014). Purification of Holstein bull semen paraoxonase 1 (PON1) by hydrophobic interaction chromatography and investigation of its inhibition kinetics by heavy metals. *Biological Trace Element Research*, 158(1), 29–35. doi:10.1007/s12011-014-9916-8
- Deveci, H. A., Kükürt, A., Nur, G., Alpay, M., Merhan, O., Bozukluhan, K., ... Karapehlivan, M. (2018). Serum paraoxonase activity and total sialic acid in sheep with

- foot and mouth disease. *Med Weter*, 74(3), 199–202.
- Donma, Orkide., H. Ekmekçi, Ö. B. E. (2004). PARAOKSONAZ. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 35(17), 78–82.
- Draganov, D. I. ve La Du, B. N. (2004). Pharmacogenetics of paraoxonases: A brief review. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 369(1), 78–88. doi:10.1007/s00210-003-0833-1
- Draganov, D.I. ve Teiber, J. F. (2008). PONs' Natural Substrates – The Key for their Physiological Roles. *The Paraoxonases: Their Role in Disease Development and Xenobiotic Metabolism*, 297–305. doi:10.1007/978-1-4020-6561-3_20
- Draganov, Dragomir I. (2010). Lactonases with organophosphatase activity: Structural and evolutionary perspectives. *Chemico-Biological Interactions*, 187(1–3), 370–372. doi:10.1016/j.cbi.2010.01.039
- Draganov, Dragomir I., Stetson, P. L., Watson, C. E., Billecke, S. S. ve La Du, B. N. (2000). Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. *Journal of Biological Chemistry*, 275(43), 33435–33442. doi:10.1074/jbc.M004543200
- Draganov, Dragomir I, Teiber, J. F., Speelman, A., Osawa, Y., Sunahara, R. ve La Du, B. N. (2005). Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. *Journal of lipid research*, 46(6), 1239–1247. doi:10.1194/jlr.M400511-JLR200
- Duysen, E. G., Parikh, K., Aleti, V., Manne, V., Lockridge, O. ve Chilukuri, N. (2011). Adenovirus-mediated human paraoxonase1 gene transfer to provide protection against the toxicity of the organophosphorus pesticide toxicant diazoxon. *Gene Therapy*, 18(3), 250–257. doi:10.1038/gt.2010.136
- Ekinci, D. ve Beydemir, Ş. (2009). Evaluation of the impacts of antibiotic drugs on PON 1; a major bioscavenger against cardiovascular diseases. *European Journal of Pharmacology*, 617(1–3), 84–89. doi:10.1016/j.ejphar.2009.06.048
- Ekiz, B., Özcan, M., Yilmaz, A. ve Ceyhan, A. (2005). Estimates of phenotypic and genetic parameters for ewe productivity traits of Turkish Merino (Karacabey Merino) sheep. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 29(2), 557–564.
- Er-el, Z., Zaidenzaig, Y. ve Shaltiel, S. (1972). Hydrocarbon-coated Sepharoses. Use in the purification of glycogen phosphorylase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 49(2), 383–390. doi:https://doi.org/10.1016/0006-291X(72)90422-6
- Ercan, N., Yoku, B., Can, M. G. ve Koçhan, A. (2017). Paraoxonase activity an indicator of

- complications at early stage of complicated pregnant cows. *Indian Journal of Animal Research*, 51(5), 927–931. doi:10.18805/ijar.v0iOF.8459
- Ergun, A. (2022). EFFECTS OF SOME PESTICIDES ON PURIFIED HUMAN PARAOXONASE 1 ACTIVITY, IN VITRO. *FRESENIUS ENVIRONMENTAL BULLETIN*, 31(9), 9627–9633.
- Erol, K., Gençer, N., Arslan, M. ve Arslan, O. (2013). Purification, characterization, and investigation of in vitro inhibition by metals of paraoxonase from different sheep breeds. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 41(2), 125–130. doi:10.3109/10731199.2012.696065
- Erzengin, M., Demir, D., Arslan, M. ve Sinan, S. (2014). Purification and characterization of paraoxonase 1 (PON1) from Swiss Black, Holstein, and Montofon bovines. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 173(7), 1597–1606. doi:10.1007/s12010-014-0931-1
- Estin, M. L., Stoltz, D. A. ve Zabner, J. (2010). Paraoxonase 1, quorum sensing, and *P. aeruginosa* infection: A novel model. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 660, 183–193. doi:10.1007/978-1-60761-350-3_17
- Farid, A. S., Honkawa, K., Fath, E. M., Nonaka, N. ve Horii, Y. (2013). Serum paraoxonase-1 as biomarker for improved diagnosis of fatty liver in dairy cows. *BMC Veterinary Research*, 9(1), 1–11. doi:10.1186/1746-6148-9-73
- Feldmann, D. F., Zuehlke, S. ve Heberer, T. (2008). Occurrence, fate and assessment of polar metamizole (dipyrone) residues in hospital and municipal wastewater. *Chemosphere*, 71(9), 1754–1764. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.11.032
- Furlong, C. E., Richter, R. J., Seidel, S. L. ve Motulsky, A. G. (1988). Role of genetic polymorphism of human plasma paraoxonase/arylesterase in hydrolysis of the insecticide metabolites chlorpyrifos oxon and paraoxon. *American Journal of Human Genetics*, 43(3), 230–238.
- Furlong, C E, Costa, L. G., Hassett, C., Richter, R. J., Sundstrom, J. A., Adler, D. A., ... Crabb, J. W. (1993). Human and rabbit paraoxonases: purification, cloning, sequencing, mapping and role of polymorphism in organophosphate detoxification. *Chemico-biological interactions*, 87(1–3), 35–48. doi:10.1016/0009-2797(93)90023-r
- Furlong, Clement E., Marsillach, J., Jarvik, G. P. ve Costa, L. G. (2016). Paraoxonases-1, -2 and -3: What are their functions? *Chemico-Biological Interactions*, 259, 51–62. doi:10.1016/j.cbi.2016.05.036
- Gaidukov, L., Bar, D., Yacobson, S., Naftali, E., Kaufman, O., Tabakman, R., ... Levy-Nissenbaum, E. (2009). In vivo administration of BL-3050: Highly stable engineered

- PON1-HDL complexes. *BMC Clinical Pharmacology*, 9, 1–13. doi:10.1186/1472-6904-9-18
- Gan, K. N., Smolen, A., Eckerson, H. W. ve La Du, B. N. (1991). Purification of human serum paraoxonase/arylesterase. Evidence for one esterase catalyzing both activities. *Drug Metabolism and Disposition*, 19(1), 100–106.
- Giordano, G., Tait, L., Furlong, C. E., Cole, T. B., Kavanagh, T. J. ve Costa, L. G. (2013). Gender differences in brain susceptibility to oxidative stress are mediated by levels of paraoxonase-2 expression. *Free Radical Biology and Medicine*, 58, 98–108. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.019
- Giorgi, M., De Vito, V., Lee, H. K., Laus, F., Kowalski, C., Faillace, V., ... Vullo, C. (2015). Pharmacokinetic investigations of the marker active metabolite-4-methylamino-antipyrin after intravenous and intramuscular injection of metamizole in healthy sheep. *Small Ruminant Research*, 132, 143–146. doi:https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.10.005
- Golmanesh, L., Mehrani, H. ve Tabei, M. (2008). Simple procedures for purification and stabilization of human serum paraoxonase-1. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 70(6), 1037–1042. doi:10.1016/j.jbbm.2007.09.003
- Gonzalvo, M. C., Gil, F., Hernández, A. F., Villanueva, E. ve Pla, A. (1997). Inhibition of paraoxonase activity in human liver microsomes by exposure to EDTA, metals and mercurials. *Chemico-biological interactions*, 105(3), 169–179. doi:10.1016/s0009-2797(97)00046-x
- Gordon, S. M., Hofmann, S., Askew, D. S. ve Davidson, W. S. (2011). High density lipoprotein: It's not just about lipid transport anymore. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 22(1), 9–15. doi:10.1016/j.tem.2010.10.001
- Gouédard, C., Koum-Besson, N., Barouki, R. ve Morel, Y. (2003). Opposite regulation of the human paraoxonase-1 gene PON-1 by fenofibrate and statins. *Molecular pharmacology*, 63(4), 945–956. doi:10.1124/mol.63.4.945
- Grant, W. E., Hopper, C., Speight, P. M., Macrobert, A. J. ve Bown, S. G. (1993). Photodynamic therapy of malignant and premalignant lesions in patients with “field cancerization” of the oral cavity. *The Journal of laryngology and otology*, 107(12), 1140–1145. doi:10.1017/s0022215100125496
- Guglielmetti, C., Mazza, M., Pagano, M., Carrella, S., Sciuto, S., Nodari, S., ... Bozzetta, E. (2014). Identification by a proteomic approach of a plasma protein as a possible biomarker of illicit dexamethasone treatment in veal calves. *Food additives &*

- contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*, 31(5), 833–838. doi:10.1080/19440049.2014.900191
- Gupta, R. D., Goldsmith, M., Ashani, Y., Simo, Y., Mullokandov, G., Bar, H., ... Tawfik, D. S. (2011). Directed evolution of hydrolases for prevention of G-type nerve agent intoxication. *Nature Chemical Biology*, 7(2), 120–125. doi:10.1038/nchembio.510
- Haller, M. Y., Müller, S. R., McArdeell, C. S., Alder, A. C. ve Suter, M. J.-F. (2002). Quantification of veterinary antibiotics (sulfonamides and trimethoprim) in animal manure by liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 952(1), 111–120. doi:https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00083-3
- Hamm, M., Wollen, T., Highland, R., Davidson, J., TerHune, T., Lechtenberg, K., ... Copeland, D. (1999). Clinical efficacy of enrofloxacin against bovine respiratory disease comparing different treatment regimens. *The Bovine Practitioner*, 33(1), 56–59. doi:10.21423/bovine-vol33no1p56-59
- Harel, M., Aharoni, A., Gaidukov, L., Brumshtein, B., Khersonsky, O., Meged, R., ... Tawfik, D. S. (2004). Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nature Structural and Molecular Biology*, 11(5), 412–419. doi:10.1038/nsmb767
- Harel, M., Brumshtein, B., Meged, R., Dvir, H., Ravelli, R. B. G., McCarthy, A., ... Sussman, J. L. (2007). 3-D structure of serum paraoxonase 1 sheds light on its activity, stability, solubility and crystallizability. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju*, 58(3), 347–353. doi:10.2478/v10004-007-0028-0
- Harms, M. J. ve Thornton, J. W. (2013). Evolutionary biochemistry: revealing the historical and physical causes of protein properties. *Nature reviews. Genetics*, 14(8), 559–571. doi:10.1038/nrg3540
- Hoenicka, M., Gorki, H., Traeger, K. ve Liebold, A. (2017). Selective venous vasodilator properties of the analgesic metamizole (dipyrone) in a human ex vivo model—implications for postoperative pain management. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 390(5), 519–526. doi:10.1007/s00210-017-1347-6
- Hofstee, B. H. (1973). Protein binding by agarose carrying hydrophobic groups in conjunction with charges. *Biochemical and biophysical research communications*, 50(3), 751–757. doi:10.1016/0006-291x(73)91308-9
- Hofstee, B. H. J. (1973). Hydrophobic affinity chromatography of proteins. *Analytical Biochemistry*, 52(2), 430–448. doi:https://doi.org/10.1016/0003-2697(73)90046-8
- Huovinen, P., Sundström, L., Swedberg, G. ve Sköld, O. (1995). Trimethoprim and

- sulfonamide resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 39(2), 279–289. doi:10.1128/AAC.39.2.279
- Irak, K., Çelik, B. A., Karakoç, Z., Çelik, Ö. Y., Mert, H., Mert, N. ve Kaya, M. O. (2018). Oxidant/Antioxidant Status, PON1 and ARES Activities, Trace Element Levels, and Histological Alterations in Sheep with Cystic Echinococcosis. *Iranian journal of parasitology*, 13(3), 448–456.
- Işgör, M. M. ve Beydemir, Ş. (2010). Some cardiovascular therapeutics inhibit paraoxonase 1 (PON1) from human serum. *European Journal of Pharmacology*, 645(1–3), 135–142. doi:10.1016/j.ejphar.2010.07.030
- Işık, M., Beydemir, Ş., Demir, Y., Durgun, M., Türkeş, C., Nasır, A., ... Akkuş, M. (2020). Benzenesulfonamide derivatives containing imine and amine groups: Inhibition on human paraoxonase and molecular docking studies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 146, 1111–1123. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.09.237
- Jaenicke, R. (1987). Folding and association of proteins. *Progress in biophysics and molecular biology*, 49(2–3), 117–237. doi:10.1016/0079-6107(87)90011-3
- James, L. R. (2000). Simvastatin increases plasma levels of the anti-oxidant enzyme paraoxonase by PON1 gene activation. *Atherosclerosis*, 151(1), 41. doi:https://doi.org/10.1016/S0021-9150(00)80184-7
- Janson, J.-C. (2012). *Protein purification: principles, high resolution methods, and applications*. John Wiley & Sons.
- Jasiecka, A., Maślanka, T. ve Jaroszewski, J. J. (2014). Pharmacological characteristics of metamizole. *Polish journal of veterinary sciences*, 17(1), 207–214. doi:10.2478/pjvs-2014-0030
- Jerjomiceva, N., Seri, H., Völlger, L., Wang, Y., Zeitouni, N., Naim, H. Y. ve von Köckritz-Blickwede, M. (2014). Enrofloxacin enhances the formation of neutrophil extracellular traps in bovine granulocytes. *Journal of innate immunity*, 6(5), 706–712. doi:10.1159/000358881
- Josse, D., Ebel, C., Stroebel, D., Fontaine, A., Borges, F., Echalié, A., ... Masson, P. (2002). Oligomeric states of the detergent-solubilized human serum paraoxonase (PON1). *Journal of Biological Chemistry*, 277(36), 33386–33397. doi:10.1074/jbc.M200108200
- Josse, D., Xie, W., Renault, F., Rochu, D., Schopfer, L. M., Masson, P. ve Lockridge, O. (1999). Identification of residues essential for human paraoxonase (PON1) arylesterase/organophosphatase activities. *Biochemistry*, 38(9), 2816–2825.

doi:10.1021/bi982281h

- Kanamori-Kataoka, M. ve Seto, Y. (2009). Paraoxonase activity against nerve gases measured by capillary electrophoresis and characterization of human serum paraoxonase (PON1) polymorphism in the coding region (Q192R). *Analytical Biochemistry*, 385(1), 94–100. doi:10.1016/j.ab.2008.09.044
- Karataş, M. O., Çalgın, G., Alici, B., Gökçe, B., Gençer, N., Taşkın Tok, T., ... Özdemir, N. (2019). Inhibition of paraoxonase 1 by coumarin-substituted N-heterocyclic carbene silver(I), ruthenium(II) and palladium(II) complexes. *Applied Organometallic Chemistry*, 33(10). doi:10.1002/aoc.5130
- Karataş, M. O., Uslu, H., Alici, B., Gökçe, B., Gencer, N., Arslan, O., ... Özdemir, N. (2016). Functionalized imidazolium and benzimidazolium salts as paraoxonase 1 inhibitors: Synthesis, characterization and molecular docking studies. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 24(6), 1392–1401. doi:10.1016/j.bmc.2016.02.012
- Karataş, M. O., Uslu, H., Alici, B., Gökçe, B., Gencer, N. ve Arslan, O. (2016). Some coumarins and benzoxazinones as potent paraoxonase 1 inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(6), 1386–1391. doi:10.3109/14756366.2016.1142982
- Kelleher, M. T., Fruhwirth, G., Patel, G., Ofo, E., Festy, F., Barber, P. R., ... Ng, T. (2009). The potential of optical proteomic technologies to individualize prognosis and guide rational treatment for cancer patients. *Targeted oncology*, 4(3), 235–252. doi:10.1007/s11523-009-0116-y
- Keller, A., Eng, J., Zhang, N., Li, X. ve Aebersold, R. (2005). A uniform proteomics MS/MS analysis platform utilizing open XML file formats. *Molecular systems biology*, 1, 2005.0017. doi:10.1038/msb4100024
- Kennett, S. ve Cohen, L. (1966, Kasım). Polynoxylin in the Treatment of Oral Candidosis. *British Medical Journal*.
- Khersonsky, O. ve Tawfik, D. S. (2005). Structure-reactivity studies of serum paraoxonase PON1 suggest that its native activity is lactonase. *Biochemistry*, 44(16), 6371–6382. doi:10.1021/bi047440d
- Khersonsky, O. ve Tawfik, D. S. (2006). The histidine 115-histidine 134 dyad mediates the lactonase activity of mammalian serum paraoxonases. *Journal of Biological Chemistry*, 281(11), 7649–7656. doi:10.1074/jbc.M512594200
- Khersonsky, O. ve Tawfik, D. S. (2010). Enzyme promiscuity: A mechanistic and evolutionary perspective. *Annual Review of Biochemistry*, 79, 471–505.

doi:10.1146/annurev-biochem-030409-143718

- Kingston, D. (1965). Release of formaldehyde from polynoxylin and noxythiolin. *Journal of clinical pathology*, 18(5), 666–667. doi:10.1136/jcp.18.5.666
- Koncuk Cebeci, B., Alim, Z. ve Beydemir, Ş. (2014). In vitro effects of pesticide exposure on the activity of the paraoxonase-1 enzyme from sheep liver microsomes. *Turkish Journal of Chemistry*, 38(3), 512–520. doi:10.3906/kim-1308-20
- Koren-Gluzer, M., Aviram, M., Meilin, E. ve Hayek, T. (2011). The antioxidant HDL-associated paraoxonase-1 (PON1) attenuates diabetes development and stimulates β -cell insulin release. *Atherosclerosis*, 219(2), 510–518. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.07.119
- Köycü, E., Sezenler, T., Özder, M. ve Karadag, O. (2008). The relationship between Body Weight and Body Condition Score in Karacabey Merino ewes. *Journal of Tekirdag Agricultural Faculty*, 5, 61–65.
- Koyuncu, M. ve Uzun, S. K. (2009). Growth performance of Karacabey Merino and Kivircik lambs under semi-intensive management in Turkey. *Small Ruminant Research*, 83(1), 64–66. doi:https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.03.001
- Kulka, M., Beltowski, J., Kluciński, W., Orłowska, M., Kołodziejska, J. ve Kleczkowski, M. (2014). Serum paraoxonase-1 activity of dairy Holstein-Friesian cows in different lactation stages--preliminary study. *Polish journal of veterinary sciences*, 17(1), 143–147. doi:10.2478/pjvs-2014-0019
- Kulka, M., Kołodziejska-Lesisz, J. ve Kluciński, W. (2016). Serum paraoxonase 1 (PON1) activity and lipid metabolism parameters changes in different production cycle periods of Holstein-Friesian, Polish Red and Norwegian breeds. *Polish journal of veterinary sciences*, 19(1), 165–173. doi:10.1515/pjvs-2016-0021
- Kuo, C.-L. ve Du, B. N. La. (1998). Calcium Binding by Human and Rabbit Serum Paraoxonases. *Drug Metabolism and Disposition*, 26(7), 653 LP – 660. <http://dmd.aspetjournals.org/content/26/7/653.abstract> adresinden erişildi.
- La Du, B. N., Aviram, M., Billecke, S., Navab, M., Primo-Parmo, S., Sorenson, R. C. ve Standiford, T. J. (1999). On the physiological role(s) of the paraoxonases. *Chemico-Biological Interactions*, 119–120, 379–388. doi:10.1016/S0009-2797(99)00049-6
- Levy, E., Trudel, K., Bendayan, M., Seidman, E., Delvin, E., Elchebly, M., ... Sinnett, D. (2007). Biological role, protein expression, subcellular localization, and oxidative stress response of paraoxonase 2 in the intestine of humans and rats. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 293(6), 1252–1261.

doi:10.1152/ajpgi.00369.2007

- Lyagin, I. ve Efremenko, E. (2021). Enzymes, reacting with organophosphorus compounds as detoxifiers: Diversity and functions. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1–47. doi:10.3390/ijms22041761
- M. Arslan, M. E. and D. D. (2011). Comparison of serum paraoxonase 1 (PON1) activities among different sheep breeds in Turkey. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10(4), 489–494.
- Mackness, B., Mcelduff, P. ve Mackness, M. I. (2005). The paraoxonase-2-310 polymorphism is associated with the presence of microvascular complications in diabetes mellitus. *Journal of Internal Medicine*, 258(4), 363–368. doi:10.1111/j.1365-2796.2005.01554.x
- Mackness, M. ve Mackness, B. (2015). Human paraoxonase-1 (PON1): Gene structure and expression, promiscuous activities and multiple physiological roles. *Gene*, 567(1), 12–21. doi:10.1016/j.gene.2015.04.088
- Mackness, M I, Hallam, S. D., Peard, T., Warner, S. ve Walker, C. H. (1985). The separation of sheep and human serum “A”-esterase activity into the lipoprotein fraction by ultracentrifugation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 82(4), 675–677. doi:https://doi.org/10.1016/0305-0491(85)90506-1
- Mackness, Michael I. (1989). 'A'-esterases. Enzymes looking for a role? *Biochemical Pharmacology*, 38(3), 385–390. doi:10.1016/0006-2952(89)90376-6
- Malin, R., Laaksonen, R., Knuuti, J., Janatuinen, T., Vesalainen, R., Nuutila, P. ve Lehtimäki, T. (2001). Paraoxonase genotype modifies the effect of pravastatin on high-density lipoprotein cholesterol. *Pharmacogenetics*, 11(7), 625–633. doi:10.1097/00008571-200110000-00009
- March, V. I. (2022). Halalopathy: Revival of Miraculous Cure and Creation of Favourable Circumstances for Cancer Therapy. *Medicon Medical Sciences*, 2(3), 21–28. doi:10.55162/mcms.02.021
- Marsillach, J., Costa, L. G. ve Furlong, C. E. (2016). Paraoxonase-1 and Early-Life Environmental Exposures. *Annals of Global Health*, 82(1), 100–110. doi:10.1016/j.aogh.2016.01.009
- Mazur, A. (1946). An enzyme in animal tissues capable of hydrolysing the phosphorus-fluorine bond of alkyl fluorophosphates. *The Journal of biological chemistry*, 164(1), 271–289. doi:10.1016/s0021-9258(18)43068-2
- Miyamoto, T., Takahashi, Y., Oohashi, T., Sato, K. ve Oikawa, S. (2005). Bovine

- paraoxonase 1 activities in serum and distribution in lipoproteins. *The Journal of veterinary medical science*, 67(3), 243–248. doi:10.1292/jvms.67.243
- Monroy-Noyola A, Almenares-Lopez D, G. E. (2021). Hydrolysis of chiral organophosphorus compounds by phosphotriesterases and mammalian paraoxonase-1. *Frontiers in Bioscience*, 26(4), 744–770. doi:10.15797/concom.2019..23.009
- Nadaroglu, H., Kucukoglu, K. ve Koc, F. (2013). Investigation of in vivo effect of florfenicol on metabolic-antioxidant enzymes' activities on Morkaraman normal and lactating sheep . *Journal of Taibah University for Science*, 7(4), 189–194. doi:10.1016/j.jtusc.2013.04.009
- Navab, M., Imes, S. S., Hama, S. Y., Hough, G. P., Ross, L. A., Bork, R. W., ... Fogelman, A. M. (1991). Monocyte transmigration induced by modification of low density lipoprotein in cocultures of human aortic wall cells is due to induction of monocyte chemotactic protein 1 synthesis and is abolished by high density lipoprotein. *Journal of Clinical Investigation*, 88(6), 2039–2046. doi:10.1172/JCI115532
- Navon, G., Mishkinsky, J. S., Panigel, R. ve Schoenberg, S. (1975). Application of the carbonic anhydrase inhibitory effect of furosemide to the study of furosemide release from two of its diuretic derivatives. *Journal of medicinal chemistry*, 18(11), 1152–1154. doi:10.1021/jm00245a024
- Nothling, M. D., Xiao, Z., Hill, N. S., Blyth, M. T., Bhaskaran, A., Sani, M. A., ... Connal, L. A. (2020). A multifunctional surfactant catalyst inspired by hydrolases. *Science Advances*, 6(14), 1–12. doi:10.1126/sciadv.aaz0404
- Ossipow, V., Laemmli, U. K. ve Schibler, U. (1993). A simple method to renature DNA-binding proteins separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic acids research*, 21(25), 6040–6041. doi:10.1093/nar/21.25.6040
- Otero, J. A., García-Mateos, D., de la Fuente, A., Prieto, J. G., Álvarez, A. I. ve Merino, G. (2016). Effect of bovine ABCG2 Y581S polymorphism on concentrations in milk of enrofloxacin and its active metabolite ciprofloxacin. *Journal of Dairy Science*, 99(7), 5731–5738. doi:https://doi.org/10.3168/jds.2015-10593
- Otocka-Kmieciak, A. (2022). Effect of Carotenoids on Paraoxonase-1 Activity and Gene Expression. *Nutrients*, 14(14). doi:10.3390/nu14142842
- Özcan, M., Ekiz, B., Yılmaz, A. ve Ceyhan, A. (2004). The Effects of Some Environmental Factors Affecting on The Growth and Greasy Fleece Yield at First Shearing of Turkish Merino (Karacabey Merino) Lambs, 30(2), 159–167.
- Ozer, E. A., Pezzulo, A., Shih, D. M., Chun, C., Furlong, C., Lulis, A. J., ... Zabner, J.

- (2005). Human and murine paraoxonase 1 are host modulators of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing. *FEMS Microbiology Letters*, 253(1), 29–37. doi:10.1016/j.femsle.2005.09.023
- Park, J., Kim, J., Hwang, S., Chung, K. Y., Choi, I., Choi, C. B. ve Kim, J. (2019). Gender-dependent difference in serum paraoxonase 1 levels of Hanwoo, Korean native cattle, and a positive association with meat quality. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 32(3), 437–441. doi:10.5713/ajas.18.0138
- Pompa, G., Arioli, F., Casati, A., Fidani, M., Bertocchi, L. ve Dusi, G. (2011a). Investigation of the origin of prednisolone in cow urine. *Steroids*, 76(1), 104–110. doi:https://doi.org/10.1016/j.steroids.2010.09.005
- Pompa, G., Arioli, F., Casati, A., Fidani, M., Bertocchi, L. ve Dusi, G. (2011b). Investigation of the origin of prednisolone in cow urine. *Steroids*, 76(1), 104–110. doi:https://doi.org/10.1016/j.steroids.2010.09.005
- Pradié, J., de Campos, F. T., Rincon, J. A. A., Collares, L., Goularte, K., Silveira, P. A. S., ... Schneider, A. (2017). Paraoxonase 1 (PON1) activity in serum, follicular fluid and seminal plasma of sheep. *Reproduction in Domestic Animals*, 52(6), 1142–1144. doi:10.1111/rda.13015
- Primo-Parmo, S. L., Sorenson, R. C., Teiber, J. ve La Du, B. N. (1996). The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics*, 33(3), 498–507. doi:10.1006/geno.1996.0225
- Renault, F., Chabrière, E., Andrieu, J. P., Dublet, B., Masson, P. ve Rochu, D. (2006). Tandem purification of two HDL-associated partner proteins in human plasma, paraoxonase (PON1) and phosphate binding protein (HPBP) using hydroxyapatite chromatography. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 836(1–2), 15–21. doi:10.1016/j.jchromb.2006.03.029
- Rincón, J., Madeira, E. M., Campos, F. T., Mion, B., Silva, J. F., Absalón-Medina, V. A., ... Schneider, A. (2016). Exogenous paraoxonase-1 during oocyte maturation improves bovine embryo development in vitro. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 51(5), 827–830. doi:10.1111/rda.12730
- Rochu, D., Chabrière, E. ve Masson, P. (2007). Human paraoxonase: A promising approach for pre-treatment and therapy of organophosphorus poisoning. *Toxicology*, 233(1-3 SPEC. ISS.), 47–59. doi:10.1016/j.tox.2006.08.037
- Rodrigo, L., Gil, F., Hernandez, A. F., Marina, A., Vazquez, J. ve Pla, A. (1997). Purification and characterization of paraoxon hydrolase from rat liver. *Biochemical*

- Journal*, 321(3), 595–601. doi:10.1042/bj3210595
- Rohenkohl, M., Lopes, M., Barbosa, A., Krause, A., Montagner, P., Schwegler, E., ... Corrêa, M. (2017). Paraoxonase activity in the serum of peripartum dairy cows with different placental lactogen concentrations. *Semina: Ciências Agrárias*, 38, 3371. doi:10.5433/1679-0359.2017v38n5p3371
- Ronconi, L. ve Sadler, P. J. (2007). Using coordination chemistry to design new medicines. *Coordination Chemistry Reviews*, 251(13), 1633–1648. doi:https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.11.017
- Rosenblat, M., Draganov, D., Watson, C. E., Bisgaier, C. L., La Du, B. N. ve Aviram, M. (2003). Mouse macrophage paraoxonase 2 activity is increased whereas cellular paraoxonase 3 activity is decreased under oxidative stress. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(3), 468–474. doi:10.1161/01.ATV.0000059385.95664.4D
- Rozenberg, O., Shiner, M., Aviram, M. ve Hayek, T. (2008). Paraoxonase 1 (PON1) attenuates diabetes development in mice through its antioxidative properties. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(11), 1951–1959. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.02.012
- Rudin, D., Lanzilotto, A., Bachmann, F., Housecroft, C. E., Constable, E. C., Drewe, J., ... Krähenbühl, S. (2019a). Non-immunological toxicological mechanisms of metamizole-associated neutropenia in HL60 cells. *Biochemical Pharmacology*, 163, 345–356. doi:https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.01.011
- Rudin, D., Lanzilotto, A., Bachmann, F., Housecroft, C. E., Constable, E. C., Drewe, J., ... Krähenbühl, S. (2019b). Non-immunological toxicological mechanisms of metamizole-associated neutropenia in HL60 cells. *Biochemical Pharmacology*, 163, 345–356. doi:https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.01.011
- Şahal, M., Deniz, A., Vural, R., Küplülü, Ş., Polat, İ. M., Çolakoğlu, E. Ç., ... Ocak, M. (2017). Evaluation of the Effect of Different Doses of Butaphosphan and Cyanocobalamin Combination In Dairy Cattle With Subclinical Ketosis. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 23(3), 349–356. doi:10.9775/kvfd.2016.16651
- Santini, A., Redigolo Pezza, H., Sequinel, R., Rufino, J. ve Pezza, L. (2009a). Potentiometric sensor for furosemide determination in pharmaceuticals, urine, blood serum and bovine milk. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 20, 64–73. doi:10.1590/S0103-50532009000100012
- Santini, A., Redigolo Pezza, H., Sequinel, R., Rufino, J. ve Pezza, L. (2009b).

- Potentiometric sensor for furosemide determination in pharmaceuticals, urine, blood serum and bovine milk. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 20, 64–73. doi:10.1590/S0103-50532009000100012
- Saraçlı, M. A. (2006). “Quorum sensing”: Mikroorganizmalar iletişim mi kuruyor? *Gulhane Medical Journal*, 48(4), 244–250.
- Saussele, T., Burk, O., Blievernicht, J. K., Klein, K., Nussler, A., Nussler, N., ... Zanger, U. M. (2007). Selective induction of human hepatic cytochromes P450 2B6 and 3A4 by metamizole. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 82(3), 265–274. doi:10.1038/sj.clpt.6100138
- Sayın, D., Çakır, D. T., Gençer, N. ve Arslan, O. (2012). Effects of some metals on paraoxonase activity from shark *Scyliorhinus canicula*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 27(4), 595–598. doi:10.3109/14756366.2011.604320
- Sayın, M. ve Guler, O. O. (2015). Purification of bovine serum paraoxonase and its immobilization on Eupergit C 250 L by covalent attachment. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 30(1), 69–74. doi:10.3109/14756366.2013.879578
- Senanayake, N. ve Karalliedde, L. (1987). Neurotoxic Effects of Organophosphorus Insecticides. *New England Journal of Medicine*, 316(13), 761–763. doi:10.1056/nejm198703263161301
- Seshadri, S., Beiser, A., Selhub, J., Jacques, P. F., Rosenberg, I. H., D’Agostino, R. B., ... Wolf, P. A. (2002). Plasma Homocysteine as a Risk Factor for Dementia and Alzheimer’s Disease. *New England Journal of Medicine*, 346(7), 476–483. doi:10.1056/nejmoa011613
- Shaikh, B., O’Driscoll, J. L. ve Cullison, R. (2002). Depletion of residues of furosemide, a loop diuretic, in lactating dairy cows. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 25(5), 387–388. doi:10.1046/j.1365-2885.2002.00426.x
- Sharaf, A. A., Taha, N., Mandour, A. E. W. A., Lebda, M. A. ve Elmorshedy, A. M. (2016). Distribution of Paraoxonase-1 Enzyme Activity in Some Sheep Organs. *Alexandria Journal for Veterinary Sciences*, 51(2).
- Shi, J., Zhang, S., Tang, M., Liu, X., Li, T., Han, H., ... Ma, C. (2004). Possible association between Cys311Ser polymorphism of paraoxonase 2 gene and late-onset Alzheimer’s disease in Chinese. *Molecular Brain Research*, 120(2), 201–204. doi:10.1016/j.molbrainres.2003.10.018
- Shih, D. M., Gu, L., Xia, Y. R., Navab, M., Li, W. F., Hama, S., ... Lusic, A. J. (1998). Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and

- atherosclerosis. *Nature*, 394(6690), 284–287. doi:10.1038/28406
- Shunmoogam, N., Naidoo, P. ve Chilton, R. (2018). Paraoxonase (PON)-1: A brief overview on genetics, structure, polymorphisms and clinical relevance. *Vascular Health and Risk Management*, 14, 137–143. doi:10.2147/VHRM.S165173
- Silveira, P. A. S., Schwegler, E., Montagner, P., Krause, A. R. T., Acosta, D. A. V., Halfen, J., ... Schneider, A. (2015a). Characterization of single nucleotide polymorphisms in the promoter region of the bovine paraoxonase 1 (PON1) gene affecting serum enzyme activity in dairy cows. *Veterinary Journal*, 205(1), 101–103. doi:10.1016/j.tvjl.2015.04.028
- Silveira, P. A. S., Schwegler, E., Montagner, P., Krause, A. R. T., Acosta, D. A. V., Halfen, J., ... Schneider, A. (2015b). Characterization of single nucleotide polymorphisms in the promoter region of the bovine paraoxonase 1 (PON1) gene affecting serum enzyme activity in dairy cows. *Veterinary Journal*, 205(1), 101–103. doi:10.1016/j.tvjl.2015.04.028
- Sinan, S, Kockar, F., Gencer, N., Yildirim, H. ve Arslan, O. (2006). Amphenicol and macrolide derived antibiotics inhibit paraoxonase enzyme activity in human serum and human hepatoma cells (HepG2) in vitro. *Biochemistry. Biokhimiia*, 71(1), 46–50. doi:10.1134/s0006297906010068
- Sinan, Selma, Kockar, F. ve Arslan, O. (2006). Novel purification strategy for human PON1 and inhibition of the activity by cephalosporin and aminoglikozide derived antibiotics. *Biochimie*, 88(5), 565–574. doi:10.1016/j.biochi.2005.12.004
- Sinan, Selma, Kockar, F., Gencer, N., Yildirim, H. ve Arslan, O. (2006). Effects of some antibiotics on paraoxonase from human serum in vitro and from mouse serum and liver in vivo. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 29(8), 1559–1563. doi:10.1248/bpb.29.1559
- Şipal, B. (2011). *Koyun serum paraoksonaz enziminin bazı pestisitlere karşı ilgisinin araştırılması*. Balıkesir Üniversitesi.
- Sorenson, R. C., Aviram, M., Bisgaier, C. L., Billecke, S., Hsu, C. ve La Du, B. N. (1999). Properties of the retained N-terminal hydrophobic leader sequence in human serum paraoxonase/arylesterase. *Chemico-Biological Interactions*, 119–120, 243–249. doi:10.1016/S0009-2797(99)00033-2
- Sousa, S. F., Ramos, M. J., Lim, C. ve Fernandes, P. A. (2015). Relationship between Enzyme/Substrate Properties and Enzyme Efficiency in Hydrolases. *ACS Catalysis*, 5(10), 5877–5887. doi:10.1021/acscatal.5b00923

- Soysal, D., Cibik, R., Aydin, C. ve Ak, İ. (2011). Comparison of conventional and organic management conditions on growth performance, carcass characteristics and haematological parameters in Karacabey Merino and Kivircik breeds. *Tropical animal health and production*, 43(4), 817–823. doi:10.1007/s11250-010-9768-y
- Stępniewska, J., Dołęgowska, B., Puchałowicz, K., Gołembiewska, E. ve Ciechanowski, K. (2017). Bioactive lipids derived from arachidonic acid metabolism in different types of renal replacement therapy. *Chemistry and physics of lipids*, 206, 71–77. doi:10.1016/j.chemphyslip.2017.05.003
- Stevens, R. C., Suzuki, S. M., Cole, T. B., Park, S. S., Richter, R. J. ve Furlong, C. E. (2008). Engineered recombinant human paraoxonase 1 (rHuPON1) purified from *Escherichia coli* protects against organophosphate poisoning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(35), 12780–12784. doi:10.1073/pnas.0805865105
- Taha, N. M., El, A., Mandour, W. A., Lebda, M. A., Ghareeb, D. A. ve Elkady, A. A. (2016). Bovine Paraoxonase-1 Activity in Oxidative Stress, 51(November), 233–238. doi:10.5455/ajvs.229270
- Taler-Verčič, A., Goličnik, M. ve Bavec, A. (2020). The Structure and Function of Paraoxonase-1 and Its Comparison to Paraoxonase-2 and-3. *Molecules*, 25(24), 1–20. doi:10.3390/MOLECULES25245980
- Tashla, T., Ćosić, M., Kurćubić, V., Prodanović, R. ve Puvača, N. (2021). Occurrence of oxidative stress in sheep during different pregnancy periods. *Acta agriculturae Serbica*.
- Teiber, J. F., Billecke, S. S., La Du, B. N. ve Draganov, D. I. (2007). Estrogen esters as substrates for human paraoxonases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 461(1), 24–29. doi:10.1016/j.abb.2007.02.015
- Teiber, J. F., Draganov, D. I. ve La Du, B. N. (2003). Lactonase and lactonizing activities of human serum paraoxonase (PON1) and rabbit serum PON3. *Biochemical Pharmacology*, 66(6), 887–896. doi:10.1016/S0006-2952(03)00401-5
- Teiber, J. F., Xiao, J., Kramer, G. L., Ogawa, S., Ebner, C., Wolleb, H., ... Haley, R. W. (2018). Identification of biologically active δ -lactone eicosanoids as paraoxonase substrates. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 505(1), 87–92. doi:10.1016/j.bbrc.2018.09.083
- Tomás, M., Sentí, M., García-Faria, F., Vila, J., Torrents, A., Covas, M. ve Marrugat, J. (2000). Effect of simvastatin therapy on paraoxonase activity and related lipoproteins in familial hypercholesterolemic patients. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular*

- biology*, 20(9), 2113–2119. doi:10.1161/01.atv.20.9.2113
- Trouchon, T. ve Lefebvre, S. (2016). A Review of Enrofloxacin for Veterinary Use. *Open Journal of Veterinary Medicine*, 06(02), 40–58. doi:10.4236/ojvm.2016.62006
- Turk, R., Folnozic, I., Đuričić, D., Vince, S., Flegar, Z., Dobranic, T., ... Samardžija, M. (2016). Relationship between paraoxonase-1 activity and lipid mobilisation in transition dairy cows. *Veterinary Archives*, 86, 601–612.
- Turk, R., Juretic, D., Geres, D., Turk, N., Rekić, B., Simeon-Rudolf, V. ve Svetina, A. (2004). Serum paraoxonase activity and lipid parameters in the early postpartum period of dairy cows. *Research in veterinary science*, 76(1), 57–61. doi:10.1016/j.rvsc.2003.08.001
- Turk, R., Juretić, D., Geres, D., Turk, N., Rekić, B., Simeon-Rudolf, V., ... Svetina, A. (2005). Serum paraoxonase activity in dairy cows during pregnancy. *Research in veterinary science*, 79(1), 15–18. doi:10.1016/j.rvsc.2004.09.010
- Türkeş, C. (2019). A potential risk factor for paraoxonase 1: in silico and in-vitro analysis of the biological activity of proton-pump inhibitors. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 71(10), 1553–1564. doi:10.1111/jphp.13141
- Türkeş, C., Beydemir, Ş. ve Küfrevioğlu, Ö. İ. (2019). In Vitro and In Silico Studies on the Toxic Effects of Antibacterial Drugs as Human Serum Paraoxonase 1 Inhibitor. *ChemistrySelect*, 4(33), 9731–9736. doi:10.1002/slct.201902424
- Türkeş, C., Söyüt, H. ve Beydemir, Ş. (2014). Effect of calcium channel blockers on paraoxonase-1 (PON1) activity and oxidative stress. *Pharmacological Reports*, 66(1), 74–80. doi:10.1016/j.pharep.2013.08.007
- Türkeş, C., Söyüt, H. ve Beydemir, Ş. (2015). Human serum paraoxonase-1 (hPON1): In vitro inhibition effects of moxifloxacin hydrochloride, levofloxacin hemihidrate, cefepime hydrochloride, cefotaxime sodium and ceftizoxime sodium. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 30(4), 622–628. doi:10.3109/14756366.2014.959511
- Tward, A., Xia, Y. R., Wang, X. P., Shi, Y. S., Park, C., Castellani, L. W., ... Shih, D. M. (2002). Decreased atherosclerotic lesion formation in human serum paraoxonase transgenic mice. *Circulation*, 106(4), 484–490. doi:10.1161/01.CIR.0000023623.87083.4F
- Undas, A., Perła, J., Łacinski, M., Trzeciak, W., Kaźmierski, R. ve Jakubowski, H. (2004). Autoantibodies against N-homocysteinylated proteins in humans: Implications for atherosclerosis. *Stroke*, 35(6), 1299–1304. doi:10.1161/01.STR.0000128412.59768.6e

- Valiyaveettil, M., Alamneh, Y., Biggemann, L., Soojhawon, I., Farag, H. A., Agrawal, P., ... Nambiar, M. P. (2011). In vitro efficacy of paraoxonase 1 from multiple sources against various organophosphates. *Toxicology in Vitro*, 25(4), 905–913. doi:10.1016/j.tiv.2011.02.012
- Valiyaveettil, M., Alamneh, Y., Rezk, P., Biggemann, L., Perkins, M. W., Sciuto, A. M., ... Nambiar, M. P. (2011). Protective efficacy of catalytic bioscavenger, paraoxonase 1 against sarin and soman exposure in guinea pigs. *Biochemical Pharmacology*, 81(6), 800–809. doi:10.1016/j.bcp.2010.12.024
- Valiyaveettil, M., Alamneh, Y., Rezk, P., Perkins, M. W., Sciuto, A. M., Doctor, B. P. ve Nambiar, M. P. (2011). Recombinant paraoxonase 1 protects against sarin and soman toxicity following microinstillation inhalation exposure in guinea pigs. *Toxicology Letters*, 202(3), 203–208. doi:10.1016/j.toxlet.2011.02.007
- Vetrehberi. (2022). Veteriner İlaç Rehberi. 20 Şubat 2022 tarihinde <https://vetrehberi.com/metajin/> adresinden erişildi.
- Vos, E. (2008). Homocysteine levels, paraoxonase 1 (PON1) activity, and cardiovascular risk. *Jama*, 300(2), 168–169. doi:10.1001/jama.300.2.168
- Walker, C. H. (1993). The classification of esterases which hydrolyse organophosphates: Recent developments. *Chemico-Biological Interactions*, 87(1–3), 17–24. doi:10.1016/0009-2797(93)90021-P
- Wang, N. N., Dai, H., Yuan, L., Han, Z. K., Sun, J., Zhang, Z. ve Zhao, M. (2010). Study of paraoxonase-1 function on tissue damage of dichlorvos. *Toxicology Letters*, 196(2), 125–132. doi:10.1016/j.toxlet.2010.04.008
- Weber, G. F. (2016). Time and Circumstances: Cancer Cell Metabolism at Various Stages of Disease Progression. *Frontiers in oncology*, 6, 257. doi:10.3389/fonc.2016.00257
- Yamashita, J., Iwamura, C., Ito, T., Narita, M., Hara, Y., Sasaki, T., ... Nakayama, T. (2013). Paraoxonase-1 Suppresses Experimental Colitis via the Inhibition of IFN- γ Production from CD4 T Cells. *The Journal of Immunology*, 191(2), 949–960. doi:10.4049/jimmunol.1201828
- Yildiz, A. (2016). İneklerde Retensiyo Sekundinarum Proflaksisi Üzerine Butafosfan ve Vitamin B 12 ' nin Birlikte Uygulanmasının Etkisi Giriş Materyal ve Metot, 5(1), 29–33.
- Yilmaz, O., Sezenler, T., Alarslan, E., Ata, N., Karaca, O. ve Cemal, İ. (2014). Ultrasound measurements of backfat thickness and Musculus longissimus dorsi thoracis et lumborum (MLD) depth at the weaning on karacabey merino, Karya and kıvırcık

lambs. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 20(6), 829–834.
doi:10.9775/kvfd.2014.10859

Yon, R. J. (1972). Chromatography of lipophilic proteins on adsorbents containing mixed hydrophobic and ionic groups. *The Biochemical journal*, 126(3), 765–767.
doi:10.1042/bj1260765

