

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

**FARKLI KOYUN IRKLARINDAN SAFLAŞTIRILAN PARAOKSONAZ  
ENZİMİNİN AĞIR METALLERLE İNHİBİSYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Kadir EROL**

**Balıkesir, Haziran-2011**

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

**FARKLI KOYUN IRKLARINDAN SAFLAŞTIRILAN PARAOKSONAZ  
ENZİMİNİN AĞIR METALLERLE İNHİBİSYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Kadir EROL**

**Balıkesir, Haziran-2011**

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

FARKLI KOYUN IRKLARINDAN SAFLAŞTIRILAN PARAOKSONAZ  
ENZİMİNİN AĞIR METALLERLE İNİHİBSİYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kadir EROL

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Oktay ARSLAN

Sınav Tarihi: 23.06.2011

Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Oktay ARSLAN (BAÜ)

Doç. Dr. Serap DOĞAN (BAÜ)

Yrd. Doç. Dr. Nahit GENÇER (BAÜ)

Enstitü Yönetim Kurulunun ..... tarih ..... sayılı oturumunun .....  
nolu kararı ile ..... Mezun olmuştur.

Balıkesir, Haziran-2011

## ÖZET

### FARKLI KOYUN IRKLARINDAN SAFLAŞTIRILAN PARAOKSONAZ ENZİMİNİN AĞIR METALLERLE İNHİBİSYONU

Kadir EROL

Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı

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

Balıkesir, 2011

Bu çalışmada, detoksifikasyon ve antioksidan aktivitesi ile metabolizmada önemli fizyolojik fonksiyona sahip paraoksonaz (PON) enzimini merinos ve kıvrıcık koyunu kan serumlarından saflaştırmak için Sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin bileşiği hidrofobik etkileşim kromatografisi jeli kullanılmıştır. Söz konusu jel, CNBr ile aktive edilmiş Sepharose-4B'ye uzantı kolu olarak L-tirozin bağlandıktan sonra ligand olarak hidrofobik bir molekül olan 1-naftilaminin L-tirozine kenetlenmesi sonucu sentezlenmiştir.

Sentezlenen hidrofobik etkileşim jeli ile uygulanan hidrofobik etkileşim kromatografisi ve amonyum sülfat çöktürmesi yöntemleri kullanılarak merinos ve kıvrıcık koyunu kan serumlarından PON enzimi saflaştırılmıştır. Saflaştırılan PON enzimi SDS poliakrilamid jel elektroforezine uygulanarak yaklaşık 43 kDa molekül ağırlığına sahip tek bant elde edilmiştir.

Merinos ve kıvrıcık PON enziminin paraokson substratına karşı  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri Lineweaver-Burk yöntemi ile merinos PON enzimi için 0,482 mM ve 41,348 U/mL'de ve kıvrıcık PON enzimi için 0,153 mM ve 70,289 U/mL'de olarak bulunmuştur.

Bu çalışmada  $Mn^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  ve  $Cu^{2+}$  ağır metallerinin merinos ve kıvrıcık koyunlarının kan serumundan saflaştırılan PON enzimi üzerindeki in vitro etkisi belirlenmiştir. Söz konusu ağır metaller içinde Cu'ın hem merinos hem de kıvrıcık PON enzimi için en güçlü inhibitör olduğu saptanmıştır.

**ANAHTAR SÖZCÜKLER:** Paraoksonaz, Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi, Ağır Metaller, İnhibisyon.

## **ABSTRACT**

### **INHIBITION OF HEAVY METALS IN DIFFERENT SHEEP BREEDS PURIFIED ENZYME PARAOXONASE**

**Kadir EROL**

**Balikesir University, Institute of Science, Department of Chemistry**

**(Msc. Thesis/Supervisor: Prof. Dr. Oktay ARSLAN)**

**Balikesir, Turkey, 2011**

In this study, the important physiological function in metabolism with detoxification and antioxidant activity of paraoxonase (PON) enzyme, to purify from merino and kivircik sheep's blood serums, Sepharose-4B-L-tyrosine-1-naphthylamine compound was used a gel, hydrophobic interaction chromatography. The gel was synthesized with Sepharose-4B-L-tyrosine and 1-naphthylamine as hydrophobic ligand. Sepharose-4B was activated with CNBr and than L-tyrosine was added as extension arm.

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

The  $K_M$  ve  $V_{max}$  values were determined by the method of Lineweaver-Burk plots, using paraoxon as substrate. The  $K_M$  ve  $V_{max}$  were 0,482 mM and 41,348 U/mLdak for merino PON enzyme, 0,153 mM and 70,289 U/mLdak for kivircik PON respectively.

In this study, the effect of  $Mn^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  and  $Cu^{2+}$  heavy metals on purified merino and kivircik serum PON in vitro was determined. The heavy metals in both merino and kivircik PON enzyme was found to be the most powerful inhibitory.

**KEY WORDS:** Paraoxonase, Hydrophobic Interaction Chromatography, Heavy Metals, Inhibition.

<b>İÇİNDEKİLER</b>	
<b>ÖZET, ANAHTAR SÖZCÜKLER</b>	<u>Sayfa</u> ii
<b>ABSTRACT, KEY WORDS</b>	iii
<b>İÇİNDEKİLER</b>	iv
<b>SEMBOL LİSTESİ</b>	vi
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b>	vii
<b>ÇİZELGE LİSTESİ</b>	x
<b>ÖNSÖZ</b>	xiii
<b>1.GİRİŞ</b>	1
1.1 Paraoksonaz Enziminin Biyokimyası	2
1.1.1 Adlandırılması	2
1.1.2 Paraoksonaz Enziminin Biyokimyasal Yapısı	2
1.1.3 Enzimin Katalitik Mekanizması	5
1.1.4 Katalizlediği Reaksiyonlar ve Substratları	6
1.2 Türk Merinosu ve Kıvırcık Koyunlarının Verim Özellikleri	9
1.3 Ağır Metaller ve Çevre Üzerine Etkileri	11
<b>2. MATERYAL VE YÖNTEMLER</b>	16
<b>2.1 MATERYALLER</b>	16
2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler	16
2.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar	16
2.1.3 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması	17
<b>2.2 YÖNTEMLER</b>	21
2.2.1 Kan Serumunun Ayrılması	21
2.2.2 Enzim Aktivite Tayini	21
2.2.3 Bradford Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini	21
2.2.4 Enzimin Saflaştırılması	22
2.2.4.1 Amonyum Sülfat Çöktürmesi	22
2.2.4.2 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Enzimin Saflaştırılması	23
2.2.4.2.1 Sepharose 4B'nin Aktifleştirilmesi	23
2.2.4.2.2 L-tirozinin Bağlanması	23
2.2.4.2.3 1-Naftilamin Bileşiğinin Bağlanması	24
2.2.4.3 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) İle Enzim Saflığının Kontrolü	25
2.2.5 Optimum Şartlarda $K_M$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Bulunması	27

2.2.6 Bazı Ağır Metallerin IC <sub>50</sub> Değerlerinin Bulunması	27
2.2.7 Ağır Metaller İçin K <sub>i</sub> Değerlerinin Bulunması	27
<b>3. BULGULAR</b>	<b>29</b>
3.1. Enzimin Saflaştırılması	29
3.1.1 Amonyum Sülfat Çöktürmesi	29
3.1.2 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi İle Enzimin Saflaştırılması	29
3.1.3 Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri	31
3.2 Serum Paraoksonaz Enziminin SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi	34
3.3 Optimum Şartlarda K <sub>M</sub> ve V <sub>max</sub> Değerlerinin Bulunması	35
3.4 İnhibisyona Sebep Olan Ağır Metallerin I <sub>50</sub> ve K <sub>i</sub> Değerlerinin Bulunması	39
<b>4. TARTIŞMA ve SONUÇ</b>	<b>71</b>
<b>5. KAYNAKLAR</b>	<b>78</b>

## SEMBOL LİSTESİ

### Simge

PON1

SDS

PAGE

U

$\Delta A$

TEMED

### Adı

Paraoksonaz 1 Enzimi

Sodyum Dodesil Sülfat

Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Enzim Ünitesi

Absorbans Farkı

N,N,N',N', -tetrametiletildiamin



## ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil Numarası</u>	<u>Adı</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1	Paraoksonaz Enziminin Üç Boyutlu Görünümü	3
Şekil 1.2	PON1' in HDL' ye bağlanması	4
Şekil 1.3	Paraoksonazın katalitik mekanizması	5
Şekil 1.4	Paraoksonaz Enzim Mekanizması	6
Şekil 1.5	Lakton Hidrolizi	7
Şekil 1.6	İnsektisitlerde Yaygın Olarak Kullanılan Okson Metabolitlerinin Hidrolizi	7
Şekil 1.7	Sinir Gazlarının Hidrolizi	8
Şekil 1.8	Aromatik Esterlerin Hidrolizi	8
Şekil 1.9	Alman Merinosu, Kıvrırcık ve Karacabey Merinos Koyun Türleri	10
Şekil 2.1	Sepharose 4B'nin Aktifleştirilmesi	23
Şekil 2.2	L-tirozinin Bağlanması	24
Şekil 2.3	1-Naftilamin Bileşiğinin Bağlanması	25
Şekil 3.1	Hidrofobik Etkileşim Kolonundan Merinos PON1 Enziminin Elüsyon Grafiği	30
Şekil 3.2	Hidrofobik Etkileşim Kolonundan Kıvrırcık PON1 Enziminin Elüsyon Grafiği	31
Şekil 3.3	Bradford Yöntemi ile Protein ( <i>merinos</i> ) Miktarının Tayin Edilmesinde Kullanılan Standart Grafik	32
Şekil 3.4	Bradford Yöntemi ile Protein ( <i>kıvrırcık</i> ) Miktarının Tayin Edilmesinde Kullanılan Standart Grafik	32
Şekil 3.5	Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Saflaştırılan Paraoksonaz Enziminin SDS-poliakrilamid Jel Elektroforezi	34

Şekil 3.6	Safılaştırılmış <i>Merinos</i> Paraoksonaz Enziminin Paraokson Substratı ile Elde Edilen Lineweaver-Burk Grafiği	35
Şekil 3.7	Safılaştırılmış <i>Merinos</i> Paraoksonaz Enziminin Paraokson Substratı ile Elde Edilen Lineweaver-Burk Grafiği	36
Şekil 3.8	Safılaştırılmış <i>Merinos</i> Serum PON1 Enzimi Üzerine 2 mM Paraokson Substratı Konsantrasyonunda Co için % Aktivite-[I] Grafiği	41
Şekil 3.9	Safılaştırılmış <i>Merinos</i> Serum PON1 Enzimi Üzerine 2 mM Paraokson Substratı Konsantrasyonunda Mn için % Aktivite-[I] Grafiği	41
Şekil 3.10	Safılaştırılmış <i>Merinos</i> Serum PON1 Enzimi Üzerine 2 mM Paraokson Substratı Konsantrasyonunda Cd için % Aktivite-[I] Grafiği	43
Şekil 3.11	Safılaştırılmış <i>Merinos</i> Serum PON1 Enzimi Üzerine 2 mM Paraokson Substratı Konsantrasyonunda Ni için % Aktivite-[I] Grafiği	43
Şekil 3.12	Safılaştırılmış <i>Merinos</i> Serum PON1 Enzimi Üzerine 2 mM Paraokson Substratı Konsantrasyonunda Cu için % Aktivite-[I] Grafiği	45
Şekil 3.13	Safılaştırılmış <i>Merinos</i> Serum PON1 Enzimi Üzerine 2 mM Paraokson Substratı Konsantrasyonunda Hg için % Aktivite-[I] Grafiği	45
Şekil 3.14	Safılaştırılmış Kıvırcık Serum PON1 Enzimi Üzerine 2 mM Paraokson Substratı Konsantrasyonunda Co için % Aktivite-[I] Grafiği	47
Şekil 3.15	Safılaştırılmış Kıvırcık Serum PON1 Enzimi Üzerine 2 mM Paraokson Substratı Konsantrasyonunda Mn için % Aktivite-[I] Grafiği	47
Şekil 3.16	Safılaştırılmış Kıvırcık Serum PON1 Enzimi Üzerine 2 mM Paraokson Substratı Konsantrasyonunda Cd için % Aktivite-[I] Grafiği	49
Şekil 3.17	Safılaştırılmış Kıvırcık Serum PON1 Enzimi Üzerine 2 mM Paraokson Substratı Konsantrasyonunda Ni için % Aktivite-[I] Grafiği	49
Şekil 3.18	Safılaştırılmış Kıvırcık Serum PON1 Enzimi Üzerine 2 mM Paraokson Substratı Konsantrasyonunda Cu için % Aktivite-[I] Grafiği	51

Şekil 3.19	Safılaştırılmış Kıvırcık Serum PON1 Enzimi Üzerine 2 mM Paraokson Substratı Konsantrasyonunda Hg için % Aktivite-[I] Grafiği	51
Şekil 3.20	Safılaştırılmış Merinos Serum PON1 Aktivitesi Üzerine Mn'in İnhibisyon Etkisi [I <sub>1</sub> ] = 3,27 mM, [I <sub>2</sub> ] = 6,18 mM	54
Şekil 3.21	Safılaştırılmış Merinos Serum PON1 Aktivitesi Üzerine Co'nun İnhibisyon Etkisi [I <sub>1</sub> ] = 1,67 mM, [I <sub>2</sub> ] = 2,56 mM	54
Şekil 3.22	Safılaştırılmış Merinos Serum PON1 Aktivitesi Üzerine Cd'un İnhibisyon Etkisi [I <sub>1</sub> ] = 2,12 mM, [I <sub>2</sub> ] = 3,79 mM	57
Şekil 3.23	Safılaştırılmış Merinos Serum PON1 Aktivitesi Üzerine Ni'in İnhibisyon Etkisi [I <sub>1</sub> ] = 3,10 mM, [I <sub>2</sub> ] = 4,19 mM	57
Şekil 3.24	Safılaştırılmış Merinos Serum PON1 Aktivitesi Üzerine Cu'nun İnhibisyon Etkisi [I <sub>1</sub> ] = 0,462 mM, [I <sub>2</sub> ] = 0,914 mM	60
Şekil 3.25	Safılaştırılmış Merinos Serum PON1 Aktivitesi Üzerine Hg'nun İnhibisyon Etkisi [I <sub>1</sub> ] = 1,60 mM, [I <sub>2</sub> ] = 2,15 mM	60
Şekil 3.26	Safılaştırılmış Kıvırcık Serum PON1 Aktivitesi Üzerine Mn'in İnhibisyon Etkisi [I <sub>1</sub> ] = 1,35 mM, [I <sub>2</sub> ] = 2,96 mM	63
Şekil 3.27	Safılaştırılmış Kıvırcık Serum PON1 Aktivitesi Üzerine Co'nun İnhibisyon Etkisi [I <sub>1</sub> ] = 1,24 mM, [I <sub>2</sub> ] = 3,19 mM	63
Şekil 3.28	Safılaştırılmış Kıvırcık Serum PON1 Aktivitesi Üzerine Cd'un İnhibisyon Etkisi [I <sub>1</sub> ] = 0,45 mM, [I <sub>2</sub> ] = 1,74 mM	66
Şekil 3.29	Safılaştırılmış Kıvırcık Serum PON1 Aktivitesi Üzerine Ni'in İnhibisyon Etkisi [I <sub>1</sub> ] = 3,28 mM, [I <sub>2</sub> ] = 5,81 mM	66
Şekil 3.30	Safılaştırılmış Kıvırcık Serum PON1 Aktivitesi Üzerine Cu'nun İnhibisyon Etkisi [I <sub>1</sub> ] = 0,35 mM, [I <sub>2</sub> ] = 0,92 mM	69
Şekil 3.31	Safılaştırılmış Kıvırcık Serum PON1 Aktivitesi Üzerine Hg'nun İnhibisyon Etkisi [I <sub>1</sub> ] = 1,56 mM, [I <sub>2</sub> ] = 2,49 mM	69
Şekil 4.1	PON1 Enziminin HDL Yüzeyine Bağlanma Modeli	72

## ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge Numarası</u>	<u>Adı</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1	SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının miktarları	20
Çizelge 3.1	Merinos ve kıvrıcık türü için saflaştırma tablosu	33
Çizelge 3.2	Merinos serum PON1 enzimi için paraokson substratı kullanılarak, $K_M$ ve $V_{max}$ değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri	37
Çizelge 3.3	Kıvrıcık serum PON1 enzimi için paraokson substratı kullanılarak, $K_M$ ve $V_{max}$ değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri	38
Çizelge 3.4	Serum merinos PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Co ve Mn'in $I_{50}$ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, metal konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	40
Çizelge 3.5	Serum merinos PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Cd ve Ni'in $I_{50}$ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, metal konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	42
Çizelge 3.6	Serum merinos PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Cu ve Hg'nin $I_{50}$ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, metal konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	44
Çizelge 3.7	Serum kıvrıcık PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Co ve Mn'in $I_{50}$ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, metal konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	46
Çizelge 3.8	Serum kıvrıcık PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Cd ve Ni'in $I_{50}$ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, metal konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	48

Çizelge 3.9	Serum merinos PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Cu ve Hg'nin $I_{50}$ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, metal konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	50
Çizelge 3.10	Merinos serum PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Mn'in $K_i$ değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve buna karşılık gelen substrat, Mn konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	52
Çizelge 3.11	Merinos serum PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Co'nun $K_i$ değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve buna karşılık gelen substrat, Co konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	53
Çizelge 3.12	Merinos serum PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Cd'un $K_i$ değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve buna karşılık gelen substrat, Cd konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	55
Çizelge 3.13	Merinos serum PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Ni'nin $K_i$ değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve buna karşılık gelen substrat, Ni konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	56
Çizelge 3.14	Merinos serum PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Cu'nun $K_i$ değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve buna karşılık gelen substrat, Cu konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	58
Çizelge 3.15	Merinos serum PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Hg'nin $K_i$ değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve buna karşılık gelen substrat, Hg konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	59
Çizelge 3.16	Kıvırcık serum PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Mn'in $K_i$ değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve buna karşılık gelen substrat, Mn konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	61
Çizelge 3.17	Kıvırcık serum PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Co'nun $K_i$ değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve buna karşılık gelen substrat, Co konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	62
Çizelge 3.18	Kıvırcık serum PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Cd'un $K_i$ değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve buna karşılık gelen substrat,	64

## Cd konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

Çizelge 3.19	Kıvırcık serum PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Ni'in $K_i$ değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve buna karşılık gelen substrat, Ni konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	65
Çizelge 3.20	Kıvırcık serum PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Cu'ın $K_i$ değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve buna karşılık gelen substrat, Cu konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	67
Çizelge 3.21	Kıvırcık serum PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Hg'nin $K_i$ değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve buna karşılık gelen substrat, Hg konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	68
Çizelge 3.22	Merinos ve kıvırcık serum PON1 enzimleri için 2mM paraokson substrat konsantrasyonunda %50 inhibisyona sebep olan ağır metallerin konsantrasyonları ve Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan inhibisyon tipleri ve $K_i$ değerleri	70

## ÖNSÖZ

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

Yüksek lisans çalışmalarım esnasında değerli bilgi ve yorumları ile beni yönlendiren çok kıymetli hocalarım Yrd. Doç. Dr. Semra IŞIK ve Yrd. Doç. Dr. Nahit GENÇER'e en derin saygılarımı sunarım.

Çalışmalarımda yardımlarını gördüğüm ve her konuda desteklerini esirgemeyen değerli arkadaşlarım Beste ŞİPAL'e, Başak GÖKÇE'ye ve Dudu DEMİR'e yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Ayrıca bana yüksek lisans bursiyeri olarak destek veren TÜBİTAK'a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Son olarak bana hayatta her zaman destek veren ve beni bugünlere getiren annem Sevim EROL'a ve babam Bayram EROL'a sossuz minnet ve şükranlarımı sunmak ve bu tezi onlara hediye etmek isterim.

Balıkesir, 2011

Kadir EROL

## 1. GİRİŞ

Paraoksonaz (PON1), temel görevi LDL'yi oksidatif modifikasyondan korumak olan, HDL'ye bağılı bir serum enzimidir. PON1, insektisitlerin içinde yaygın olarak kullanılan organofosfat ajanlarını ve sinir gazlarını hidroliz etme yeteneğine sahiptir [1]. Bu enzim A-esterazlar grubuna dahildir ve başlıca sentezlendiği organ karaciğerdir [2,3]. Yapısına bağılı bulunan HDL sayesinde LDL'lerdeki lipit oksidasyonunu sınırlandırır ve antioksidant bir özellik gösterir [2]. LDL'nin oksidasyonu arteroskleroz hastalığının başlangıç evresini oluşturmaktadır [4,5]. PON1 bu özelliği ile arterosklerotik hastalıklara karşı vücuttaki savunma mekanizmalarından birini oluşturmaktadır.

Türkiye'deki koyun yetiştiriciliği özellikle kırsal bölgede yaşayan insanlar için ekonomik ve kültürel bir öneme sahiptir. Bu faaliyet doğal çim alanlarının, anızların ve ekilmemiş otlakların kullanımı ile sürdürülmektedir [6]. Et, süt, yün gibi özelliklerinden yararlanan bu hayvanlardan sağlıklı ürünler elde edebilmek için bu hayvanların sağlıklı yaşam alanlarında yetiştirilmesi gerekmektedir.

Günümüz dünyasında artan çevre kirliliği özellikle kırsal kesimlerde yetiştirilen hayvanların sağlığını tehdit eden önemli sorunlardan birini oluşturmaktadır. Bu önemli soruna çözüm bulunabilmesi amacıyla bazı bileşiklerin daha fazla araştırılmasına gerek duyulmaktadır. Metabolizmada önemli fizyolojik fonksiyona sahip PON enziminin aktivitesinin bazı ağır metallerden nasıl etkilendiği bu hayvanların sağlığı kadar insan sağlığı açısından da son derece önemlidir. Bu çalışmamızda Ni<sup>+2</sup>, Co<sup>+2</sup>, Cu<sup>+2</sup>, Cd<sup>+2</sup>, Mn<sup>+2</sup>, Hg<sup>+2</sup> ağır metallerinin Merinos ve Kıvırcık serum PON1 enzimi üzerine *in vitro* etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.



## 1.1 Paraoksonaz Enziminin Biyokimyası

### 1.1.1 Adlandırılması

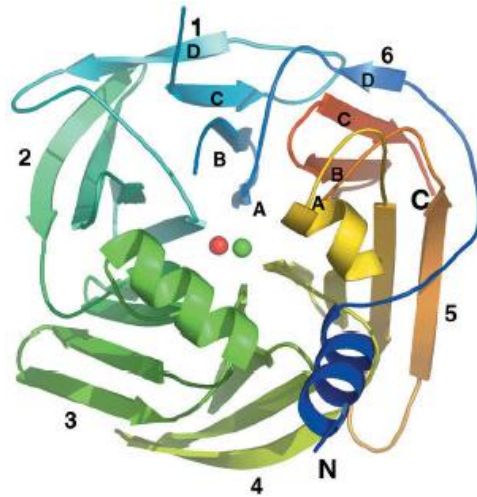
Paraoksonaz enzimi, Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) tarafından yapılan adlandırmaya göre iki numaraya (EC 3.1.1.2. ve EC 3.1.8.1.) sahiptir. 1990'lı yıllardan sonra yapılan çalışmalarda, paraoksonazın arilesterazlar gibi sadece fenolik esterleri değil, aynı zamanda fosforik ve fosfinik asit esterlerini de hidroliz ettiği anlaşılmış ve EC 3.1.8.1. olarak tanımlanmıştır [7]. Paraoksonaz enzimi, bir A grubu Arildialkilfosfotaz sınıfı bir ester hidrolaz enzimidir. Bu yüzden sistematik olarak arildialkilfosfotaz diye adlandırılır. A esteraz grubunda yer alan paraoksonaz enziminin aktivitesinin ilk kez ölçümünde paraokson molekülü substrat olarak kullanılmıştır. Bu sebepten dolayı bu enzim paraoksonaz adını almıştır [8].

### 1.1.2 Paraoksonaz Enziminin Biyokimyasal Yapısı

PON1, 43-45 kDa molekül ağırlığına sahip 354 aminoasit içeren bir proteindir [9,10]. Herbir molekül toplam ağırlığının %15.8'ini oluşturan üç karbohidrat zinciri içermektedir. İzoelektrik noktası 5.1'dir. Aminoasit bileşimi yüksek lösin içeriği dışında bir özellik göstermez [11]. Yapısında yer alan 3 sistein (Cys) rezidüsünden 284'teki serbest durumdadır. 42 ve 352. sistein rezidüleri arasında disülfid bağı bulunur. *In situ* hibridizasyon çalışmaları ile PON1 geninin 7. kromozomun uzun kolu üzerinde q21-q22'de bulunduğu gösterilmiştir [3,12].

PON1'in ince yapısı 4 adet zincirden oluşmuş 6 adet  $\beta$ -kırmalı yapıdan meydana gelmiştir (şekil 1.1). Enzim 42. ve 353. sistein rezidüleri arasındaki disülfid köprüsü ile sonlanarak üç boyutlu yapısını kazanır [13]. N terminal ve C terminal uçlarının bu şekilde kovalent bağlanması  $\beta$ -kırmalı yapılı enzimlerde nadir görülür.

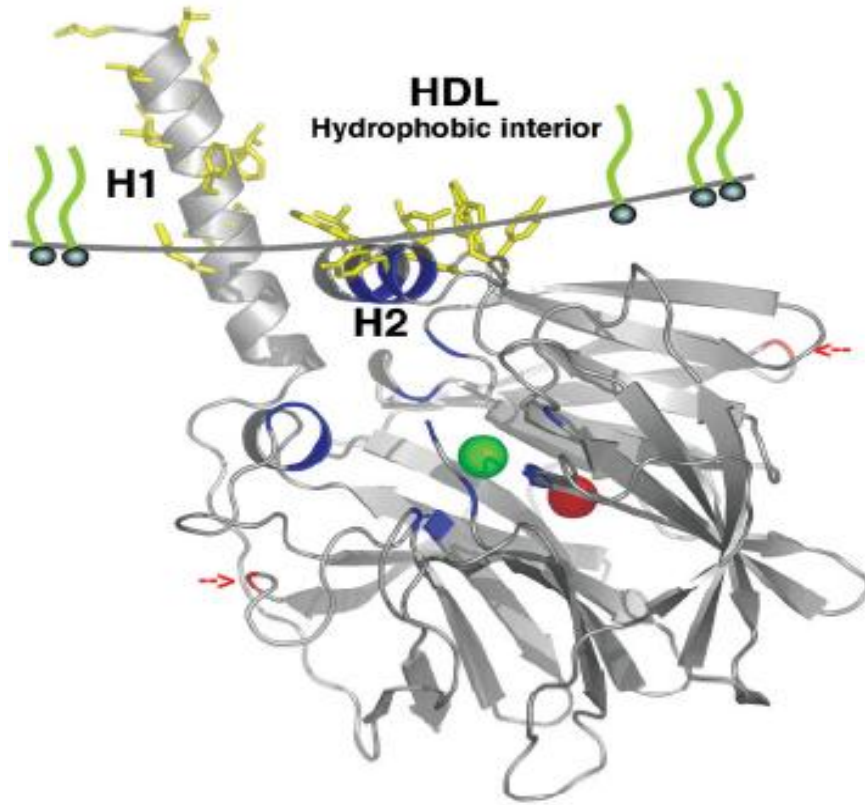
Üç boyutlu yapıda;  $\beta$ -kırmalı tabakaların merkezinde 7.4Å aralıklı iki adet  $\text{Ca}^{+2}$  iyonu bulunmaktadır. Bunlardan bir tanesi yapısal özellikli olup yapıdan uzaklaştırılması dönüşümsüz denatürasyona neden olmaktadır [14]. Diğeri ise katalitik etkinlikte rol oynar. Bu kalsiyum iyonu 2.2-2.5Å uzaklıkta 5 adet aminoasit rezidüsü (Asn224, Asn270, Asn168, Asp269 ve Glu53) ile etkileşim halindedir. Aynı kalsiyum iyonu bir su molekülü ve fosfat iyonunun oksijeni ile etkileşmektedir. PON1'in yapısı 6 adet  $\beta$ -kırmalı tabaka ile merkezdeki  $\text{Ca}^{+2}$  iyonları açısından diisopropilfluorofosfataz (DFPase) enzimi ile benzerlik göstermektedir [15]. Ancak, PON1 esteraz, fosfotriesteraz ve laktonaz aktivitesi gösterirken, diisopropilfluorofosfatazın sadece fosfotriesteraz aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. Bu iki enzimin aminoasit dizilerinde belirgin bir benzerlik yoktur [16]. PON1 aktif bölgesinde diğeri  $\beta$ -kırmalı yapılardan farklı olarak hidrofobik heliks ( $\text{H}_2$  ve  $\text{H}_3$ ) yapıları vardır (Şekil 1.2). Bu yapılar aynı zamanda sonlanma noktaları olup, aktif bölgenin korunması ve enzimin HDL'ye bağlanması gibi kritik rollere sahiptir. PON1 sentezlendiğinde monomerik yapı şeklindedir. Enzim, HDL'ye bağlanmadığı zaman oligomerizasyon gerçekleştiği belirlenmiştir. Bu olay *in vitro* deterjanlı ortamda  $\text{H}_2$  ve  $\text{H}_3$  heliksleri ile deterjan misellerine bağlanarak gerçekleşir [17].



Şekil 1.1 Paraoksonaz Enziminin Üç Boyutlu Görünümü [18]

PON1 üzerinde 4 tane potansiyel N-glikozilleme bölgesi vardır. İki tanesi (Asn 227 ve Asn 270)  $\beta$ -kırmalı tabakaların merkezinde, diğeri ikisi ise yüzeye bakan bölgelerde (Asn 253 ve Asn 324) yer almaktadır. PON1 memeli hücrelerinde ifade edildikten sonra bu noktalardan glikozillendiği gözlenmiştir [19].

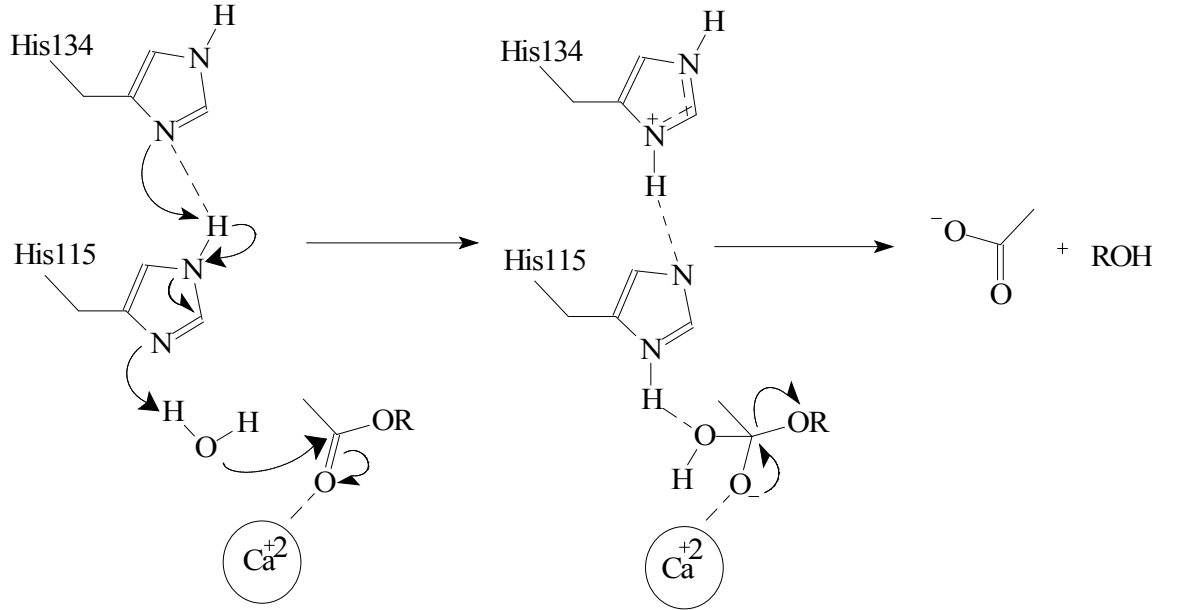
PON1 enzimi N terminal bir uçla sonlanmaktadır. Bu yüzden sonlandığı bölgede hidrofobik bölgeler bulunmaktadır. Bu bölgede bulunan H<sub>1</sub> ve H<sub>2</sub> hidrofobik heliksleri bir araya gelme eğilimi göstererek potansiyel membrana bağlanma yüzeyi oluştururlar (Şekil 1.2).



Şekil 1.2 PON1' in HDL' ye bağlanması [18]

### 1.1.3 Enzimin Katalitik Mekanizması

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

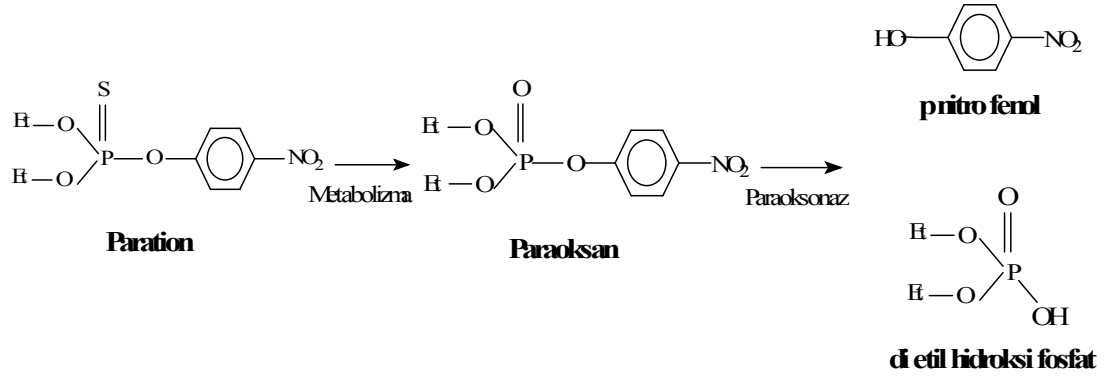


Şekil 1.3 Paraoksonazın katalitik mekanizması [20]

Katalitik etkinlik gösteren Ca<sup>+2</sup> iyonu, substrattaki fosfat iyonunun negatif yüklü oksijenine 2,2 Å uzaklıktadır. Aktif bölgedeki His-His çifti, su molekülünün bir protonunu alarak bu molekülün nükleofilik gücünü artırır. Oluşan hidroksil iyonu karbonil veya fosfat esterine saldırır. Bu esnada meydana gelen kompleks tetrahedral bir düzlem sonucu Ca<sup>+2</sup> iyonu ile kararlı kılır. Oluşan yapıdaki Ca<sup>+2</sup> iyonu negatif yüklü oksijenden uzaklaşarak bağ tekrar fosfat veya karbonilin üzerine yıkılır ve ester bağı kopar [20].

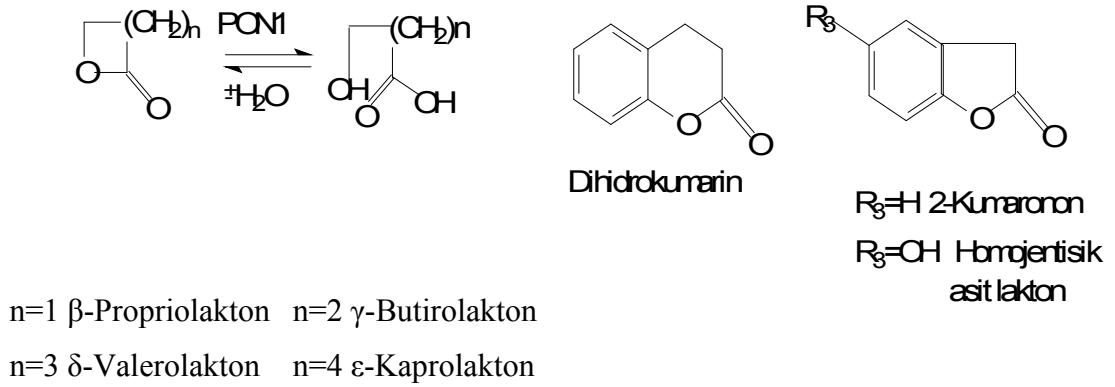
### 1.1.4 Katalizlediği Reaksiyonlar ve Substratları

Paraoksonaz enzimi geniş bir substrat özgüllüğü gösterirken, fizyolojik substratı tam olarak belirlenmemiştir. Ancak arilesteraz, organofosfataz ve laktonaz aktivitelerine sahip olduğu tespit edilmiştir. İnsan serum paraoksonaz enzimi, parationun metabolik ürünü olan paraoksonu kataliz etme yeteneğindedir. Paraokson organizmaya zararlı olup pestisit olarak kullanılmaktadır. Paraoksonun, paraoksonaz enzimi ile yıkımı sonucu paraoksana oranla göreceli olarak daha az zararlı p-nitro fenol ve dietil hidroksi fosfat bileşikleri oluşur (Şekil 1.4) [3].



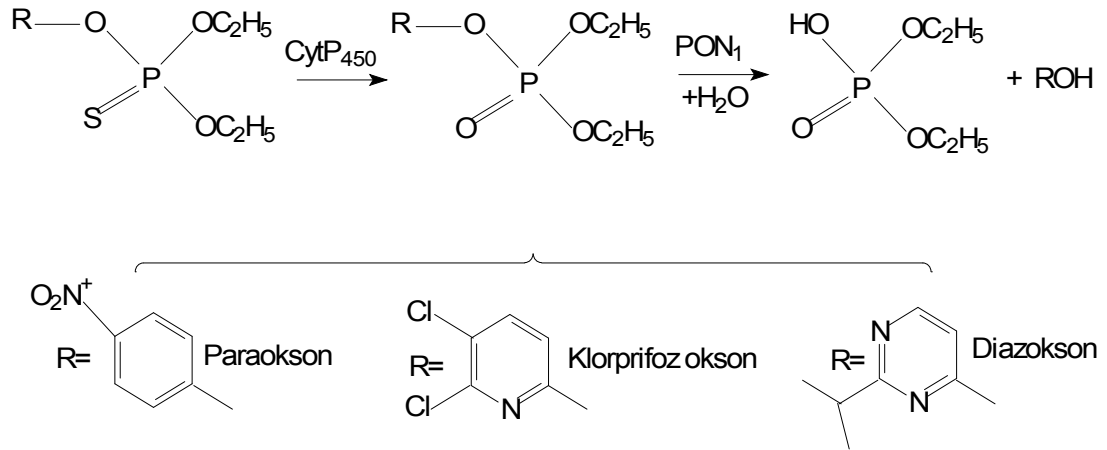
Şekil 1.4 Paraoksonaz Enzim Mekanizması [3]

Son yıllarda PON1'in arterosklerozisin önlenmesinde ve ilaç metabolizmasında önemli rol oynadığı bilinmektedir [21, 22, 23]. PON1 özellikle LDL ve HDL lipitlerinin yükseltgenmesini önleyerek ve lipit peroksitlerini metabolize ederek arterosklerozise karşı koruyuculuğunu, sahip olduğu laktonaz aktivitesi ile göstermektedir [24-26]. Söz konusu enzim 4 atomdan 7 atoma kadar değişen lakton halkası ihtiva eden en az 30 çeşit laktonu hidrolizleyebilmektedir. Alifatik lakton substratı olan  $\delta$ -valerolakton (6 halkalı lakton),  $\delta$ -butirolakton (5 halkalı lakton) ve  $\epsilon$ -kaprolaktondan (7 halkalı lakton) daha hızlı hidrolizlenmektedir. PON1 enziminin aromatik laktonlara karşı afinitesi alifatik laktonlara oranla daha fazladır ve daha kolay hidrolizlenirler.

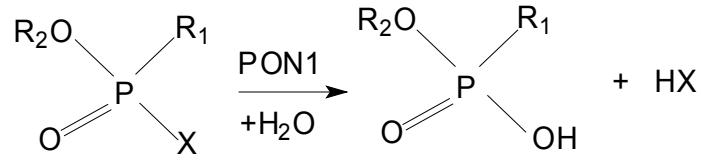


**Şekil 1.5** Lakton Hidrolizi [21]

İnsan serum PON1 enzimi ayrıca paration, diazinon ve klorpirifos gibi çok sayıda insektisitlerin toksik okson metabolitlerini (Şekil 1.6) [27, 28] ve soman, sarin ve tabun gibi organofosfat sinir ajanlarını hidrolizleyebilmektedir [29-32]. İnsan sağlığı açısından organofosfatlı bileşikler ise terörizm tehdidi kadar bir çevresel risk oluşturur [20]. PON1 enziminin çok yönlü bir araştırma konusu olmasının en önemli nedenlerinden biri budur.



**Şekil 1.6** İsektisitlerde Yaygın Olarak Kullanılan Okson Metabolitlerinin Hidrolizi [21]



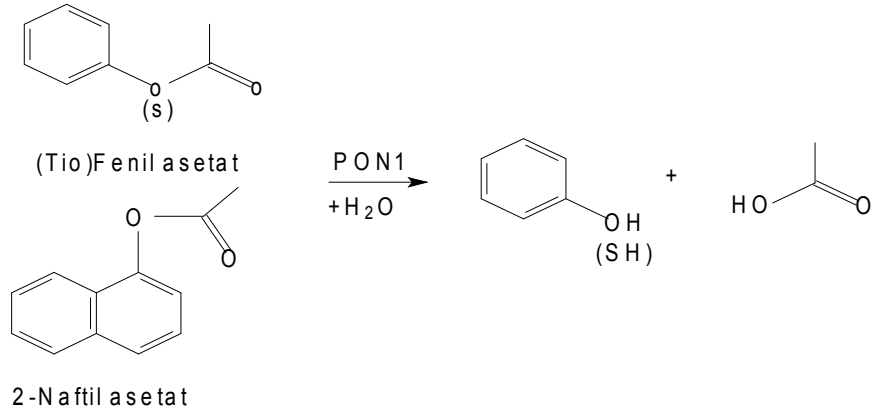
$\text{R}_1=\text{N}(\text{CH}_3)_2$      $\text{R}_2=\text{CH}_2\text{CH}_3$      $\text{X}=\text{CN}$     Etil N-dimetilfosforoamidosiyanid (Tabun)

$\text{R}_1=\text{CH}_3$      $\text{R}_2=\text{CH}(\text{CH}_3)_2$      $\text{X}=\text{F}$     Izopropil metilfosfonofluoridat (Sarin)

$\text{R}_1=\text{CH}_3$      $\text{R}_2=\text{CH}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{CH}_3)_3$      $\text{X}=\text{F}$     Pinakolil metilfosfonofluoridat (Soman)

**Şekil 1.7** Sinir Gazlarının Hidrolizi [21]

Bu aktivitelerinin yanında PON1 enzimi sınıflandırmada yer aldığı A-esteraz grubunda bulunması ile fenilasetat gibi ester substratlarını da hidrolizleyebilmektedir. Ayrıca, tiofenil asetat ve 2-naftil asetat PON1'in aromatik ester substratları arasındadır (Şekil 1.7) [27, 33, 34].



**Şekil 1.8** Aromatik Esterlerin Hidrolizi [21]

## 1.2 Türk Merinosu ve Kıvırcık Koyunlarının Verim Özellikleri

37,5 milyona ulaşan sayısı ile Türkiye'deki koyun popülasyonu, toplam hayvan popülasyonu içinde önemli bir yere sahiptir. Bu koyun popülasyonu ile Türkiye, dünyadaki koyun yetiştiren ülkeler arasında yedinci sıradadır. Türkiye'nin süt üretiminin %10,1'i (1047000 ton) ve et üretiminin %26,1'i (1128000 ton) koyun yetiştiriciliği sektöründen gelmektedir. Türkiye'deki coğrafi koşullar ve hava şartları koyun yetiştiriciliğinin tercih edilmesindeki en önemli faktörlerdir. Tarım için kullanılmayan geniş alanlar en verimli biçimde koyun yetiştiriciliğinde kullanılmaktadır.

Türkiye'nin Orta ve Doğu Anadolu Bölgelerinde bulunan yeşillik, sert hava koşulları yüzünden yetersiz ve düşük bir kaliteye sahiptir. Ancak Türkiye'nin Marmara ve Ege Bölgeleri gibi batı kısımları, hava şartlarının daha yumuşak ve yeşillik kalitesinin daha iyi olmasından dolayı koyun yetiştiriciliği için daha uygundur. Marmara Bölgesi'ndeki yaygın koyun türleri Kıvırcık Koyunu ve Türk Merinos Koyunu türleridir. Bu bölgede 2,5 milyon Kıvırcık Koyunu ve 300.000 Merinos Koyunu bulunur.





Alman Merinos Koyunu



Kıvrıcık Koyunu



Karacabey (Türk) Merinos Koyunu

**Şekil 1.9** Alman Merinosu, Kıvrıcık ve Karacabey Merinos Koyun Türleri

Yerli Kıvrıcık Koyununun üretim özelliklerini iyileştirme çalışmaları Türkiye Cumhuriyeti'nin kuruluşundan beri devam etmektedir. 1934 yılından sonra, Kıvrıcık Koyununun vücut performansını ve yün kalitesini iyileştirmek amacıyla Alman Merinos Koyunu Türkiye'ye getirilmiştir. Bu çalışmalar kapsamında, Kıvrıcık Koyunu ve Alman Merinos Koçları çiftleştirilmiştir. Çiftleştirme işlemi yapay dölleme ile yapılmıştır. Çiftleştirme sonucu doğan yavrular Karacabey (Bursa) Merinos Koyun Türü olarak adlandırılan ilk Merinos Koyun Türüdür. Bu çiftleştirme çalışmaları 1935 yılından sonra Karacabey Eyalet Çiftliği'nde Kıvrıcık Koyunları kullanılarak özel üreticiler tarafından devam ettirilmiştir. Çalışmalar Bursa ve Balıkesir illeri çevresinde sürdürülmüştür.

1935-1940 yılları arasında 620.000 Kıvırcık Koyunu, Alman Merinos Koyun Türü ile yapay dölleme vasıtasıyla çiftleştirilmiştir. Bu yıllarda Türkiye, yapay dölleme yoluyla koyun üreten ülkeler arasında dünyada ikinci sırayı almıştır. 1952 yılından sonra Alman Merinos Koyunu ile çiftleştirme çalışmaları Konya’da yerli Akkaraman Koyun Türü üzerine uygulanmıştır. Bu çalışmalar genotip olarak %80 Alman Merinos Koyunu ve %20 Akkaraman Koyunu olan bir koyun türü elde edilene kadar devam ettirilmiştir. Elde edilen bu tür Orta Anadolu Merinos Koyunu olarak adlandırılmıştır. Daha sonra Karacabey Merinos ve Orta Anadolu Merinos Koyun Türleri, Türk Merinos Koyun Türü adı altında tek bir isimle anılmaya başlanmıştır [35].

### **1.3 Ağır Metaller ve Çevre Üzerine Etkileri**

Çevre insanla birlikte tüm canlı varlıklar, cansız varlıklar ve canlı varlıkların eylemlerini etkileyen ya da etkileyebilecek fiziksel, kimyasal, biyolojik ve toplumsal nitelikteki tüm etkenlerdir [36]. Ancak bu etkenlerin insanların nüfus artışı, teknolojik gelişmeler ve tüketim alışkanlıklarına bağlı olarak zarar görmesi ve bu zararın rahatsız edici seviyelere ulaşması sonucu kirlenmesi söz konusudur. Böylece çevre kirliliği ortaya çıkmaktadır. Çevre kirliliği geçici veya sürekli bir biçimde canlılara zarar veren gaz, sıvı ve katı maddeler ile radyasyonun; cisim, sistem ve çevrede meydana getirdiği olumsuz değişimlerdir. Bir başka deyişle hava, su ve toprağın fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerinde meydana gelen arzu edilmeyen değişimlerdir [37]. Çevre kirliliğine neden olan ve gittikçe daha büyük boyutlarda tehlike oluşturan etmenlerin basında ağır metaller gelmektedir. Ağır metallerin (Ag, As, Cd, Cu, Fe, Ni, Pb, Zn, Mo, Co, Cr, gibi) toprak kirlenmesi ve çevreye yaptığı zararlar çok önemli güncel sorunlar haline gelmiştir. Hızlı şehirleşme, endüstrileşme, gübreleme ve pestisit kullanımı, toprak ve su kaynaklarında toksik metal kirliliği ile sonuçlanmaktadır. Toksik metallerin birikimindeki artma, ekosistemde dengesizliğe neden olmakta, toksik metaller yüksek miktarlarda çoğu habitatın canlı gelişimi boyunca birikmektedir. Bu durum biyolojik büyüme sürecinde besin zinciri boyunca transfer edilmekte ve biriktirilmektedir. Ayrıca bu metallerin besin zincirindeki yüksek konsantrasyonu yaşayan insan ve hayvan

sağlığını çeşitli şekillerde tehdit etmesiyle sonuçlanmaktadır. Esansiyal olsun veya olmasın ağır metallerin yüksek konsantrasyonları mikroorganizmalar, bitkiler, hayvanlar ve insanları içeren canlılar alemi için toksik etkisi bilinen bir gerçektir [37, 38]. Önemli bir kirletici grubu oluşturdukları bilinen ağır metallerin; toksik ve kanserojen etkileri olduğu gibi, canlı organizmalarda birikmesi de söz konusudur. Krom, cıva, kurşun, kadmiyum, mangan, kobalt, nikel, bakır ve çinko gibi metaller doğada genellikle sülfür, oksit, karbonat ve silikat mineralleri şeklinde bulunmaktadır. Bunların suda çözünürlükleri oldukça düşüktür. Çok küçük miktarlarda bile genellikle kuvvetli zehir etkisine sahip olan ağır metaller, kirlenmiş sularda metal, katyon, tuz ve kısmen anyon şeklinde bulunurlar [39]. Ağır metaller biyolojik döngü içinde en önemli zararlarını bitkilerde meydana getirmektedir. Tohum çimlenmesi, çıkış, fide büyüme ve gelişimi, bitkilerde büyüme ve gelişmede gerilikler, biyomas üretiminin düşmesi, çiçek ve meyve tutumunda azalma, verimde düşme ve ürün kalitesinde bozulma bu zararlardan bazılarıdır. Bundan başka ağır metallerin fotosentetik aktiviteyi sekteye uğratması, azot döngüsü ve bağlanması bozması, klorofil miktarını azaltması, enzim sistemlerinde bozulmalara yol açması; bitkilere yarayışlı diğer elementlerin alımını engellemesi gibi hücre içi mekanizmalarda da olumsuz etkileri bulunmaktadır [40].

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

**Nikel;** Genelde doğrudan veya dolaylı yoldan atık sular yoluyla toprağa geçen nikel, normal olarak toprakta 50-500 ppm düzeyindedir. Nikel katkılı çelik ve ulaşım endüstrisinde boya ve kozmetik sanayi ile çeşitli elektrikli alet üretiminde kullanılan nikelin bitkilere faydası üzerine kesin bilgiler yoktur. Ancak bitkilerdeki birikme konsantrasyonu genellikle insan ve hayvanlara zararlı düzeye ulaşamaz. Nikel 600 ppm'in üzerinde konsantrasyonlara sahip topraklar içinde kuvvetli toksit etki yapar [41].

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

öp olarak depolandığı alanlarda ve özellikle yoğun trafik akımının bulunduğu otoyollarda yüksek düzeyde bulunabilir. Kadmiyum doğal çevre içinde çinko ile jeokimyasal bir ilişki içinde olduğundan aynı zamanda çinko ergitme tesisleri çevresindeki topraklarda yüksek kadmiyum konsantrasyonunun ‘itai itai’ adı verilen bir tür hastalığın yaygın olarak görüldüğü ve Minimata olayı adı verilen olay kadmiyum kirlenmesine en çarpıcı örnektir. Fosforlu gübrelere bileşiminde eser element olarak bulunan kadmiyum bu nedenle tarım topraklarında yaygındır ve yüksek konsantrasyonlarda bulunabilir. Nitekim uzun yıllar süper fosfat gübresi uygulanmış topraklarda yetişen bazı çayır bitkilerinin bünyesinde yüksek oranda kadmiyum elementine rastlanmıştır [41].

**Kobalt;** İnsan ve hayvanlar için olduğu kadar bazı bitki mikroorganizmaları için önemli element olan kobalt (10-20 ppm) 150 ppm’i aşarsa o zaman toprakta kuvvetli bir toksik etki yaratabilir. Toprağı kobalt çeşitli yollardan ve özellikle atık sular ve arıtma suyunda mevcut süspanse maddelerle girer. Toprağın tampon etkisinden ötürü biriken kobaltın üstünde yetişen bitkinin bünyesine geçmek suretiyle fitotoksik etki yaptığı saptanmıştır [41].

**Bakır;** Bitkiler için gerekli bir eser element olan bakır özellikle asit karakterli topraklarda yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Endüstride çok yaygın olarak kullanılan bu madde toprağı havadan yağışla karışmak suretiyle geçer. Fakat bakırın toprakta ve bitkide asıl birikmesi bakır sülfat olarak bazı meyve bahçelerinde pestisid olarak kullanılmasıyla geçer. Halk dilinde ‘göz taşı’ olarak bilinen bakır sülfat gerek kuru toz halinde ve daha yaygın olarak suda erimiş halde bağlara ve narenciye bahçelerine spreyleme yoluyla püskürtülür. Daha sonra bu madde gerek püskürtülme anında doğrudan gerekse daha sonra yağmur sularıyla yıkanmak suretiyle toprağı geçer. Bakır sülfat topraktaki yararlı mikroorganizmalar içinde toksik etki yaptığından topraktaki humus oluşumunu kısıtlayarak toprağın organik bakımdan fakirleşmesine neden olabilir [41].

**Civa;** Civa metalinin keşfi tam olarak bilinmemektedir. Bilinen en önemli minerali zencefre (HgS) dir. Civa çok uçucu bir element olduğundan oda sıcaklığında kolayca buharlaşır. Zehirli bir element olduğu için sıcaklık arttıkça buharlaşma hızı

artacağı için tehlike boyutu da artar. Herhangi bir yüzeye civa döküldüğü zaman üzerine toz kükürt dökülmelidir ve oluşan karışım temizlenirken dikkat edilmelidir. HgS mineralinin kavrulmasıyla HgO elde edilir. Bu oksit bileşiğinin ısıtılması ile de elementel civa elde edilir [42].

**Manganez;** Manganez, yeryüzünde her yerde bulunabilen çok yaygın bir bileşendir. Manganez, gerekli toksik üç iz element arasında yer almaz. İnsan vücudunda çok yüksek konsantrasyonlarda bulunursa toksiktir. İnsanlar tavsiye edilen günlük alım miktarları kadar alamazlarsa sağlıkları bozulur. Fakat aynı zamanda yüksek alımlarda, sağlık problemleri oluşacaktır [42].

İnsanlar tarafından manganezin yüksek alımları, ıspanak, çay ve baharatlar gibi gıdalardan kaynaklanmaktadır. En yüksek konsantrasyonlarda manganez içeren gıdalar tahıllar, pirinç, soya fasulyesi, yumurta, fındık, zeytinyağı, yeşil fasulye ve ıstiridyedir. Manganezin insan vücudundaki absorpsiyonundan sonra kan yolu ile karaciğer, böbrek, pankreas ve endokrin bezlerine taşınır. Manganez etkileri başlıca solunum sistemi ve beyinde gözlenir. Manganez zehirlenmesinin belirtileri halüsinasyonlar, unutkanlık ve sinir hasarlarıdır. Manganez ayrıca Parkinson, akciğer ambolisi ve bronşite neden olabilir. Manganez tarafından neden olunan sendrom şizofrenilik, matite, kasların zayıflığı, baş ağrısı ve uykusuzluk gibi belirtilere sahiptir [42].

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

- Şişmanlık
- Glikoz intoleransı
- Kan pıhtılaşması
- Deri problemleri
- Düşük kolesterol seviyeleri
- İskelet bozuklukları
- Doğum hataları
- Saç renginde değişiklikler
- Nörolojik semptomlar

Kronik manganez zehirlenmesi uzun süreli toz ve dumanın solunmasından kaynaklanır. Hastalıktan hasar gören başlıca bölge, merkezi sinir sistemidir ve kalıcı sakatlık ile sonuçlanabilir. Belirtiler; bitkinlik, uykusuzluk, güçsüzlük, duygusal bozukluk, spatik yürüyüş, tekrarlı bacak krampları ve felçtir. Manganez bileşikleri tozu veya dumanıyla çalışan işçilerde zatürre ve diğer üst solunum yolu enfeksiyonları sıklıkla gözlenmiştir. Manganez bileşikleri deneysel olarak belirsiz tümörjenik ajanlardır [42].

## 2. MATERYAL VE YÖNTEMLER

### 2.1 MATERYALLER

#### 2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneysel çalışmalarda kullanılan, Sepharose-4B, 1-Naftilamin, L-tirozin, standart serum albumin, N,N,N,N'tetrametiletilediamin (TEMED), trihidroksimetil aminometan (Tris-Base), paraokson, Tris-HCl, Sigma Chemical Comp'den; sodyum hidroksit, amonyum sülfat, fosforik asit, etil alkol, hidroklorik asit, sodyum dihidrojen fosfat,  $\beta$ -merkaptotanol, sodyum dodesil sülfat, akrilamid, N,N, metilen bis akrilamid, amonyum persülfat, brom fenol mavisi, gliserol, Coomassie brillant blue G-250, sodyum bi karbonat, sodyum fosfat, potasyum fosfat, kalsiyum klorür, aseton, ağır metaller Merc Chemical'dan sağlandı.

#### 2.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar

Bu çalışmada aşağıdaki alet ve cihazlardan yararlanılmıştır.

Buz Makinesi	Fiocchetti AF10
Elektroforez Sistemi	Hofer, HSI
Kromotografi Kolonu	Sigma (1.5 ×10 cm)
Manyetik Karıştırıcı- Isıtıcı	WiseStir MSH-20 A
Otomatik pipetler	Transferpette, Nichipet EX
pH metre	Hana pH 211 Microprocessor
Soğutmalı Santrifüj	Sigma 3K15
UV-Spektrofotometresi	CARY 1E, UV-Visible Spektrophotometer-VARIAN
Vorteks	Fisons Whirli Mixer
Terazi	Precisa XB 220A

Jel Görüntüleme Sistemi  
Gradient Mikser

Gel Doc-H Imaging System (UVP)  
Atta magnetik karıştırıcı ve  
gradient tüp

### 2.1.3 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

#### Hidrofobik jelin sentezinde kullanılan tamponlar

**0.1 M NaHCO<sub>3</sub> Tamponu (pH 10.0);** 8.401 gr (0.1 mol) NaHCO<sub>3</sub> 950 ml distile suda çözülerek, 1 N NaOH ile pH' sı 10.0' a getirildi ve son hacim distile su ile 1L' ye tamamlandı.

**0.2 M NaHCO<sub>3</sub> Tamponu (pH 8.8);** 8.401 gr (0.1 mol) NaHCO<sub>3</sub> 450 ml distile suda çözülerek, 1N NaOH ile pH' sı 8.8' e getirildi ve son hacim distile su ile 500ml' ye tamamlandı.

**0.01 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> Tamponu (pH 6.0);** 1.42 gr (0.01 mol) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 950 ml distile suda çözülerek, 1N NaOH ile pH 'sı 6.0 'a getirildi ve son hacim distile su ile 1 L' ye tamamlandı.

**Hidrofobik jelin dengelenmesi için kullanılan tampon:** 1M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içeren, 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu (pH 8.0); 14.2gr (0.1 mol) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 132.14gr (1 mol) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 950 mL distile suda çözülerek, 1N HCl ile pH'sı 8.0'e getirildi ve son hacim distile su ile 1L'ye tamamlandı.

**Hidrofobik jele bağlanmış PON1 enziminin elüsyonu için kullanılan çözelti:** 1M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içeren, 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu (pH 8.0) ve 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu (pH 8.0) ile gradient mikser kullanılarak tuz gradienti oluşturuldu; 14.2gr (0.1 mol) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 132.14gr (1 mol) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 950 mL distile suda çözülerek, 1N HCl ile pH'sı 8.0'e getirildi ve son hacim distile su ile 1L'ye tamamlandı. 14.2gr (0.1 mol) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 950 mL distile suda çözülerek, 1N HCl ile pH'sı 8.0'e getirildi ve son hacim distile su ile 1L'ye tamamlandı.



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

**Amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda oluşan çökeleğin alındığı tampon:** 0.1 M (pH 8.0) Tris Baz; 1.211 gr (0.01 mol) Tris-Baz 95 ml distile suda çözümlenerek, 1N HCl ile pH'ı 8.0'a getirildi ve son hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

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

**Paraoksonaz aktivite ölçümünde kullanılan bazal aktivite tamponu:** 2 mM CaCl<sub>2</sub> içeren 100 mM Tris-HCl, pH=8; 3,0285 g (25mmol) Tris, 200 ml distile suda çözüldü. 1 N HCl ile pH'ı 8.0'e getirildi. 0,0555 g (0,5 mmol) CaCl<sub>2</sub> katılarak son hacim 250 ml'ye tamamlandı.

**SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan numune tamponu;**

0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	2.5 mL
% 10'luk SDS	4.0 mL
Gliserol	2.0 mL
β-merkaptoetanol	1.0 mL
Bromfenol mavisi	0.01 g
Distile su	0.5 mL

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

Tris-HCl	3 g
Glisin	14.4 g
SDS-	1.0 g
Distile su ile çözeltinin son hacmi 1 L' ye tamamlanır.	

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

**SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renklendirme çözeltisi;** 0.66 gr Coomassie brillant blue G-250, 120 ml metanolde çözüldü. Bu çözeltiliye 24 ml saf asetik asit ve 120 ml distile su ilave edildi.

**SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renk açma çözeltisi;** % 7.5 asetik asit, % 5 metanol ve % 87.5 ml distile su içermektedir. Bu amaçla 75 ml asetik asit ve 50 ml metanol, 875 ml saf su ile karıştırıldı.

**Çizelge 2.1** SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının miktarları

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

## **2.2 YÖNTEMLER**

### **2.2.1 Kan serumunun ayrılması**

Kan numuneleri, kuru santrifüj tüpüne alındıktan sonra 5000rpm'de, +4 °C'de ve 10dk santrifüj edilerek serumlarının ayrılması sağlanmıştır. Ayrılan serum aktivite ölçümüne kadar -70 °C'de bekletilmiştir. Daha sonra enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

### **2.2.2 Enzim Aktivite Tayini**

Paraoksonaz enziminin aktivitesi spektrofotometrik olarak tayin edildi. Aktivite ölçümü için 0.05mL enzim çözeltisi (serum) alınıp daha önceden hazırlanmış olan 1mL tampon ( 100mM Tris-Base pH:8.00) + substrat ( 2mM paraokson ) + koenzim ( 2mM CaCl<sub>2</sub>) çözeltisine çabuk bir şekilde eklendikten sonra 412 nm'de 1 dakikadaki 37 °C'de absorbansta meydana gelen değişme okundu. Bu şekilde paraoksonun p-nitrofenole enzimatik dönüşüm hızı tespit edildi. Aynı işlem enzim olmadan tekrarlanarak aradaki fark enzim aktivitesi olarak belirlendi. 1 ünite paraoksonaz dakikada meydana gelen p-nitrofenolün nmol'ü olarak tayin edildi.

### **2.2.3 Bradford Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini**

Amonyum sülfat çöktürmesi sırasında elde edilen çözeltilerdeki protein miktar tayinleri bu yöntemle belirlendi. Bu yöntem fosforik asitli ortamda proteinlerin, Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi ile kompleks oluşturması, oluşan kompleksin 595nm'de maksimum absorban göstermesi esasına dayanır [43].

Bu yöntemin diğer protein tayini yöntemlerinden üstün tarafı, çok kısa sürede uygulanması, bozucu faktörlerin az olması, protein boya kompleksinin çözeltilerde uzun süre kalmasıdır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100µg arasındadır.

Protein tayini işleminde şu yol izlendi: 1mL’inde 1mg protein ihtiva eden standart sığır albümin çözeltisinden tüplere 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µL alındı. 100mM Tris-HCl tamponu (pH:8.00) ile tüm tüplerin hacimleri 0.1ml’ye tamamlandı. 5mL Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi her bir tüpe ilave edildi. Tüpler vorteks ile karıştırılarak 10 dakika sonra 595nm’de 3ml’lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak 0.1 mL’lik 100mM Tris-HCl (pH:8.00) tamponu olan 1. tüp kullanıldı. Okunan absorbans değerlerine karşılık gelen mg protein değerleri ile standart grafik hazırlandı (Şekil 3.3-3.4).

Enzim çözeltilerinden 0.1’er mL 2 ayrı tüpe alınarak üzerlerine 5’er mL Coomassie reaktifi ilave edildi. Vorteksde karıştırıldıktan 10 dakika sonra 595 nm’de absorbansları ölçüldü. İki ölçümün ortalama absorbansına karşılık gelen protein miktarı standart grafik yardımıyla hesaplandı.

## 2.2.4 Enzimin Saflaştırılması

### 2.2.4.1 Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Amonyum sülfat, belirli doygunluk derecelerine göre belirli proteinlerin çökmesini sağlayan 2 değerlikli, çok kullanılan bir tuzdur. Öncelikle, kullanılacak uygun amonyum sülfat konsantrasyonu aşağıda verilen formülle tespit edildi:

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

V : Serum hacmi

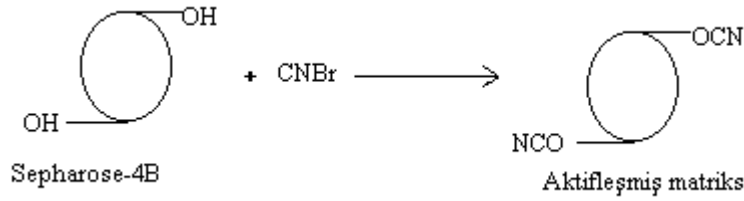
S<sub>1</sub> : 1’in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu

S<sub>2</sub> : 1’in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğu

## 2.2.4.2 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Enzimin Saflaştırılması

### 2.2.4.2.1 Sepharose 4B'nin Aktifleştirilmesi

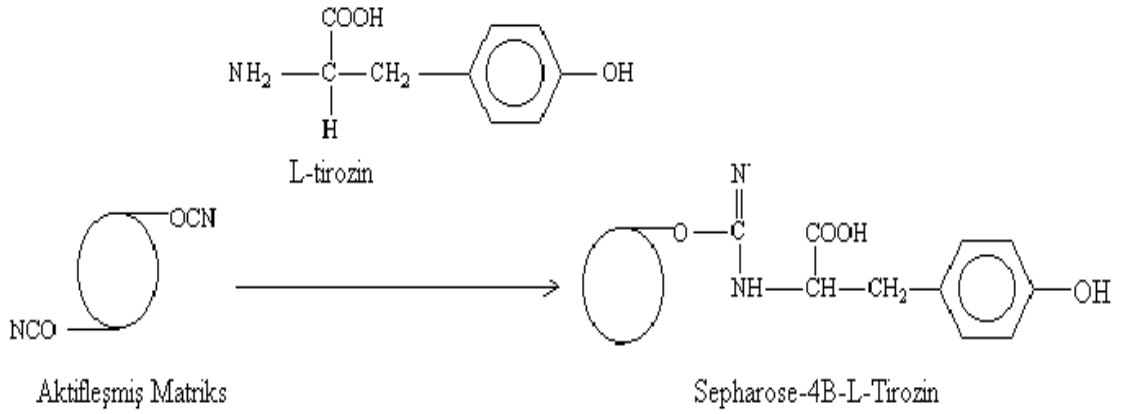
10mL Sepharose-4B jeli, saf su ile iyice yıkanarak dekante edildi. Eşit hacimde distile su ile birleştirildi. Karıştırılmakta olan jel süspansiyonuna 4g CNBr hepsi birden katıldı. pH metre kullanılarak süspansiyonun pH'sı 4M NaOH ile hemen 11'e çıkarıldı ve reaksiyon bu pH'da muhafaza edildi. Reaksiyona pH değişmeyene kadar devam edildi. (10-15dk) Çok miktarda buz süspansiyona katıldı ve karışım bir buhner hunisine nakledildi. Daha sonra 250mL soğuk 0.1M NaHCO<sub>3</sub> tamponu (pH 10.00) ile yıkandı (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Sepharose 4B'nin Aktifleştirilmesi

### 2.2.4.2.2 L-tirozinin Bağlanması

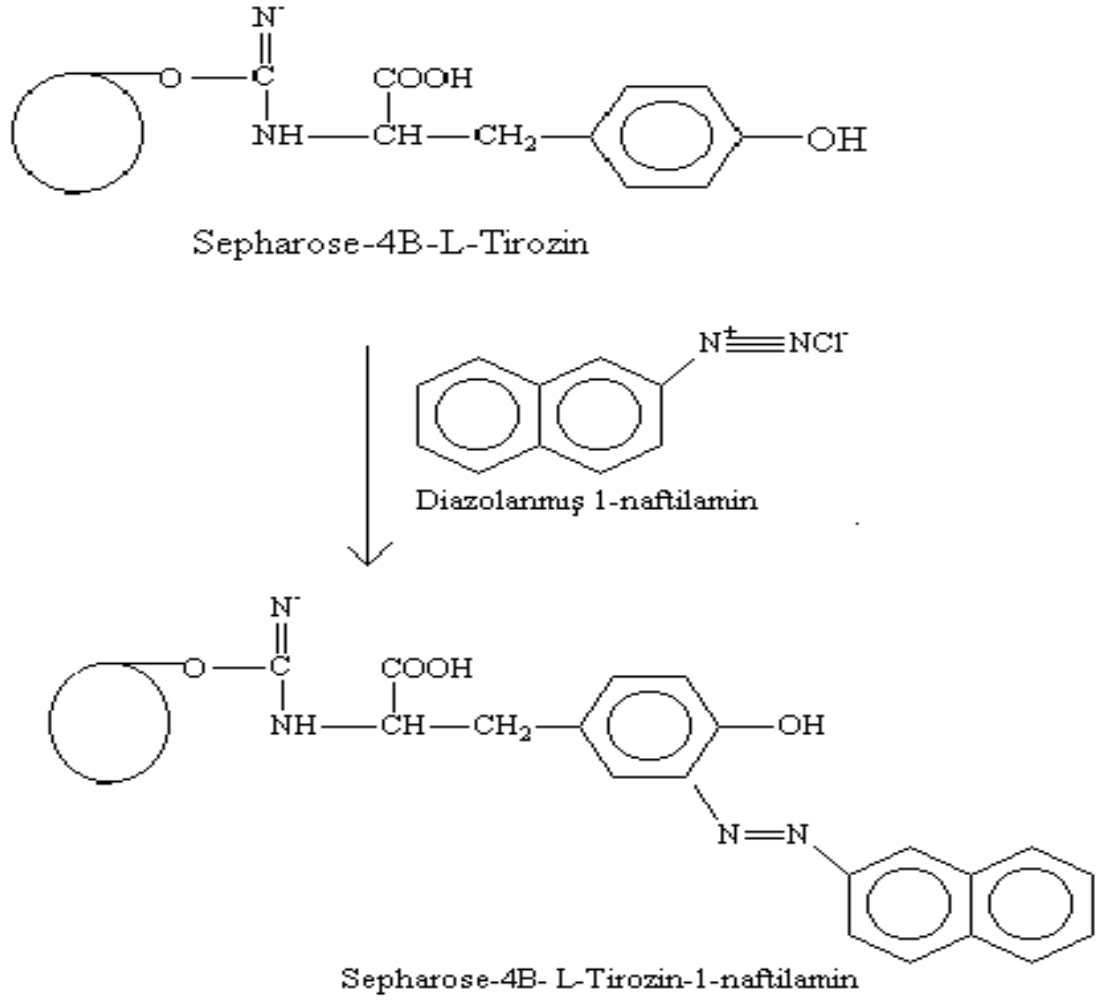
CNBr ile aktifleştirilmiş matriks üzerine, 20mL'sinde 15mg tirozin içeren 0.1M NaHCO<sub>3</sub> tamponunun (pH 10.00) soğuk çözeltisi ilave edilerek 90 dk karıştırıldı. Bundan sonra süspansiyon 16 saat 4 °C'de bekletildi. Bu sürenin bitiminde yıkama suyu 280nm'de absorbans vermeyinceye kadar bol su ile yıkandı. Böylece reaksiyona girmeyen tirozin tamamen uzaklaştırılmış oldu. Yıkama 100mL 0.2 M NaHCO<sub>3</sub> tamponu (pH: 8.8) ile tekrarlandı. Tirozinle modifiye sepharose-4B aynı tamponun 40mL'si içine alındı (Şekil 2.2)



**Şekil 2.2** L-tirozinin Bağlanması

#### 2.2.4.2.3 1-Naftilamin Bileşiğinin Bağlanması

25mg 1-naftilamin 0 °C civarında 10mL 1M HCl içerisinde çözüldü. 75mg NaNO<sub>2</sub> ihtiva eden 0 °C'deki 5mL çözelti, 1-Naftilamin çözeltisine damla damla katıldı. (1-Naftilamin çözeltisi hazırlanırken etanol ilave edildi ve ısıtıldı) 10 dk reaksiyondan sonra diazolanmış bulunan 1-Naftilamin, 40mL Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonuna ilave edildi. pH: 9.5'a çıkarılarak sabit tutuldu ve 3 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Daha sonra 1L saf su ve ardından 200mL 0.01M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH: 6.0) tamponu ile yıkandı ve aynı tamponda muhafaza edildi (Şekil 2.3)



**Şekil 2.3** 1-Naftilamin Bileşiğinin Bağlanması

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

Paraoksonaz enziminin hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılmasından sonra iki farklı akrilamid konsantrasyonunda; yığıma jeli % 3, ayırma jeli % 10 konsantrasyonlarında olacak şekilde kesikli sodyum dodesil sülfat jel elektrofrezisi (SDS-PAGE) Laemelli [44] tarafından belirtilen yöntemler yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi.



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

Hidrofobik etkileşim kromatografisi sonucunda elde edilen fraksiyonlardan yüksek aktivite gösterenler birleştirildi. Elde edilen çözelti toplam hacim 100µl olacak şekilde 1:1 oranında numune tamponuyla karıştırıldı. β-galaktozidaz (118.0kDa), sığır serum albumin (79.0kDa), yumurta albumini (47.0 kDa), laktat dehidrogenaz (33.0 kDa), β-laktoglobulin (25.0kDa) ve Lizozim (19.5 kDa) içeren standart protein çözeltisi 1:1 oranında numune tamponuyla karıştırıldı. Jele yüklenecek numuneler 3 dakika 100 °C’de termoblokta bekletildi. Numuneler soğutularak kuyucuklara yüklendi. Elektroforez güç kaynağına bağlanarak 80 volt’a ayarlandı. Proteinlerin jeldeki hareketini incelemeye yarayan numune tamponu içindeki boyaya ait bant ayırma jeline ulaştığında voltaj 150 volt’a yükseltildi. Yürütme işlemine proteinler, jelin altına 1cm kalana kadar devam edildi. Daha sonra akım kesilerek yürütme durduruldu. Cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı ve yığma jeli kesilip ayrıldıktan sonra protein bantlarını içeren ayırma jeli renklendirme çözeltisi içine konuldu ve 1.5-2 saat kadar çalkalayıcı üzerine bırakıldı. Daha sonra jel renklendirme çözeltisinden çıkartılarak renksizleştirme çözeltisine kondu. Belirli aralıklarla değiştirmek suretiyle jelin zemin rengi açılıp protein bantları belirginleşinceye kadar bu çözelti içinde çalkalandı. Jel renksizleştirme

çözeltisinden çıkarıldıktan sonra jel görüntüleme sistemi (UVP) ile görüntü bilgisayara aktarıldı.

### **2.2.5 Optimum şartlarda $K_M$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Bulunması**

$K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin tespit edilmesi amacıyla optimum şartlarda paraokson substratının farklı konsantrasyonlarda enzim aktivitesi ölçümü yapıldı. Her ölçüm iki defa tekrarlanarak, bulunan değerlerin ortalaması alındı.

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

### **2.2.6 Bazı Ağır Metallerin $IC_{50}$ Değerlerinin Bulunması**

$Hg^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$  ağır metallerinin  $IC_{50}$  değerlerini bulmak için, optimum şartlarda paraokson substratının 2mM sabit konsantrasyonunda çalışıldı. Substrat çözeltisi her ölçümde 0.1 mL alındı, paraokson ve ağır metal çözeltilerinden ise değişik hacimlerde alınarak toplam 1.05mL' lik bir reaksiyon hacmi oluşturuldu. Önce inhibitörsüz ortamda enzim aktivitesi bulundu. Bu değer %100 aktivite olarak kullanıldı. Daha sonra optimum pH ve sıcaklıkta 0.05ml enzim çözeltisi alınıp daha önceden hazırlanmış olan 1 mL tampon + substrat + ağır metal çözeltisine çabuk bir şekilde eklendikten sonra 412 nm' de bir dakikada absorbans da meydana gelen değişme okundu. Elde edilen absorbans değerlerinden % aktivite hesaplandı. % Aktivite  $-[I]$  grafikleri çizildi.

### **2.2.7 Ağır Metaller İçin $K_i$ Değerlerinin Bulunması**

$Hg^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$  ağır metallerinin  $K_i$  değerlerinin bulunması için önce inhibitörsüz ortamda optimum şartlarda paraokson substratının farklı konsantrasyonlarında PON1 enzimi için aktivite bulunmuştu. Daha sonra her

bir ağır metal için 2 değişik sabit konsantrasyonda optimum şartlarda aktiviteler tespit edildi.  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerlerinden Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Bu grafiklerden yararlanarak inhibisyon türleri ve  $K_i$  değerleri yarışmalı (kompetetif) inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrisinde  $1/[S]$  eksenini kestiği nokta olan  $-1/K_M$   $(1+[I]/K_i)$  ifadesinden, yarışmasız (nonkompetetif) inhibisyon için  $1/V$  eksenini kestiği nokta olan  $1/V_{max} (1+[I]/K_i)$  ifadesinden yararlanarak hesaplandı. Denklemlerde kullanılan  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri inhibitörsüz ortamda bulunan değerlerdir.

### 3. BULGULAR

#### 3.1 Enzimin Saflaştırılması

##### 3.1.1 Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Amonyum sülfat, belirli doyunlu derecelerine göre belirli proteinlerin çökmesi sağlayan 2 değerlikli, çok kullanılan bir tuzdur. Bu amaçla aşağıdaki formül ile belirlenen amonyum sülfat miktarları uygulanarak %60-80 amonyum sülfat çöktürmesi işlemi yapıldı [1].

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

V : Serum hacmi

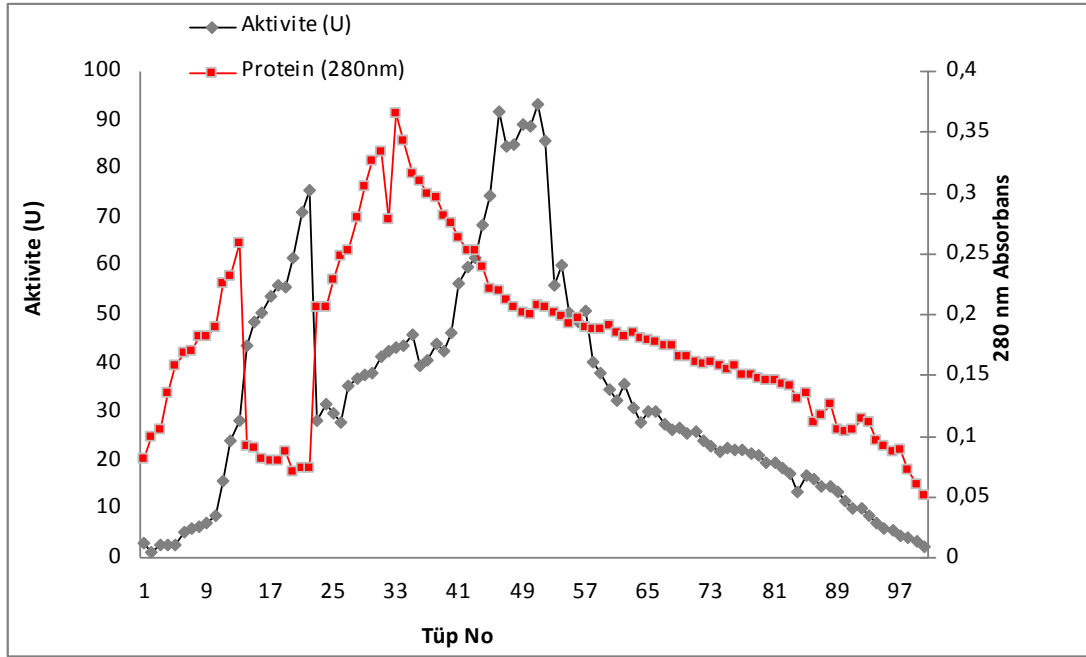
S<sub>1</sub> : 1'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doyunluğu

S<sub>2</sub> : 1'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doyunluğu

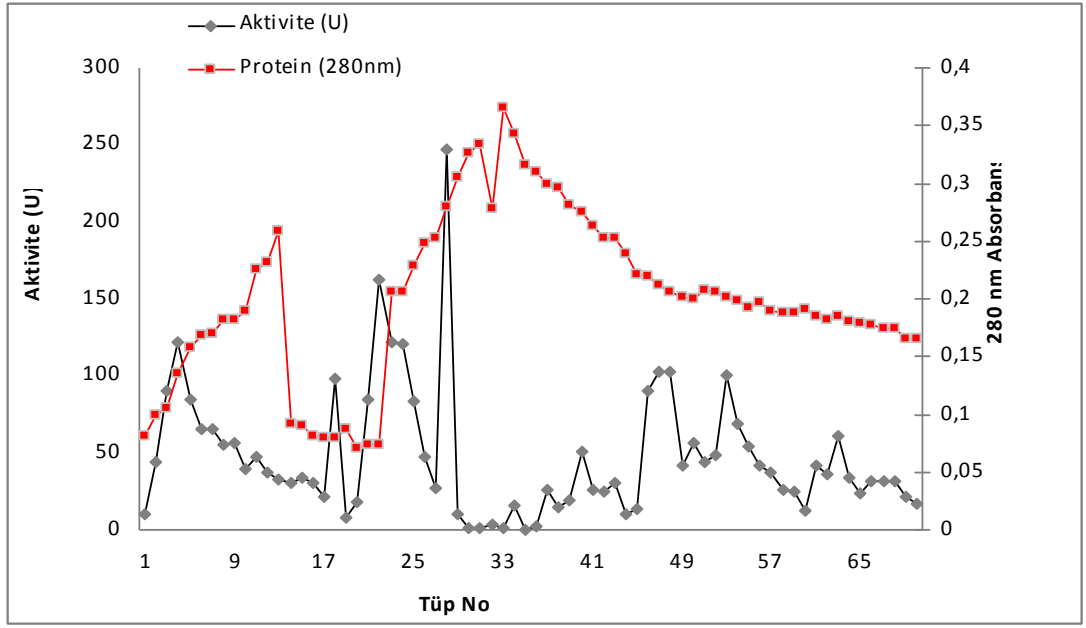
##### 3.1.2 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Enzimin Saflaştırılması

Hazırlanan hidrofobik etkileşim kolonu önce 1M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içeren 0.1M Tris-HCl pH:8.0 tamponu ile dengelendi. Kolonun dengeleme işlemi bittikten sonra, jel üzerindeki tampon çözeltisi jel seviyesine kadar indirildi. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen serum enzim çözeltisi 1M amonyum sülfat doyunluğuna getirildikten sonra kolona tatbik edildi. Kolona 1M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içeren 0.1M Tris-HCl pH:8.0 tamponu ve 0.1M Tris-HCl pH:8.0 tamponu ile oluşturulan yüksek tuz konsantrasyonundan düşük tuz konsantrasyonuna doğru tuz gradienti

uygulandı. Alttan gelen yıkama ve elüsyon çözeltisi 1.5mL halinde tüplere toplandı. Yıkama ve elüsyon işlemi 280nm'deki absorbans sıfır oluncaya kadar devam edildi. 0.1M Tris-HCl pH:8.0 tamponu kör olarak kullanılarak her bir tüpte 280nm'de kalitatif protein tayini ve 412nm'de aktivite tayini yapıldı. Elde edilen değerlerin tüp numarasına karşı aktivite ve protein miktarı grafiği çizildi (Şekil 3.1) ve (Şekil 3.2).



**Şekil 3.1** Hidrofobik Etkileşim Kolonundan Merinos PON1 Enziminin Elüsyon Grafiği

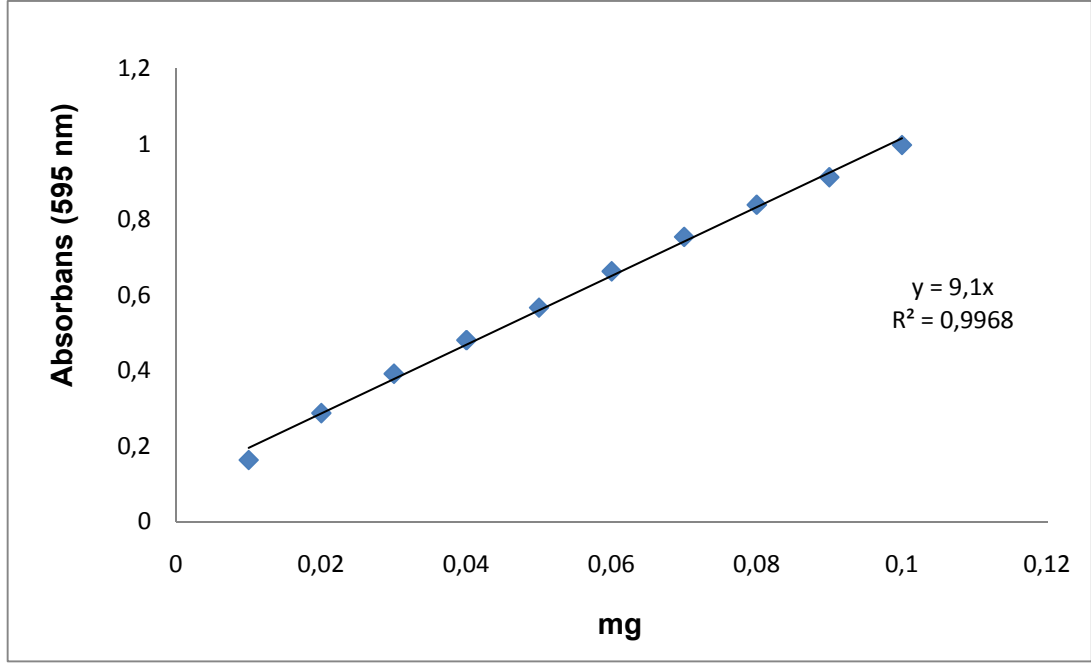


**Şekil 3.2** Hidrofobik Etkileşim Kolonundan Kıvrıkcık PON1 Enziminin Elüsyon Grafiği

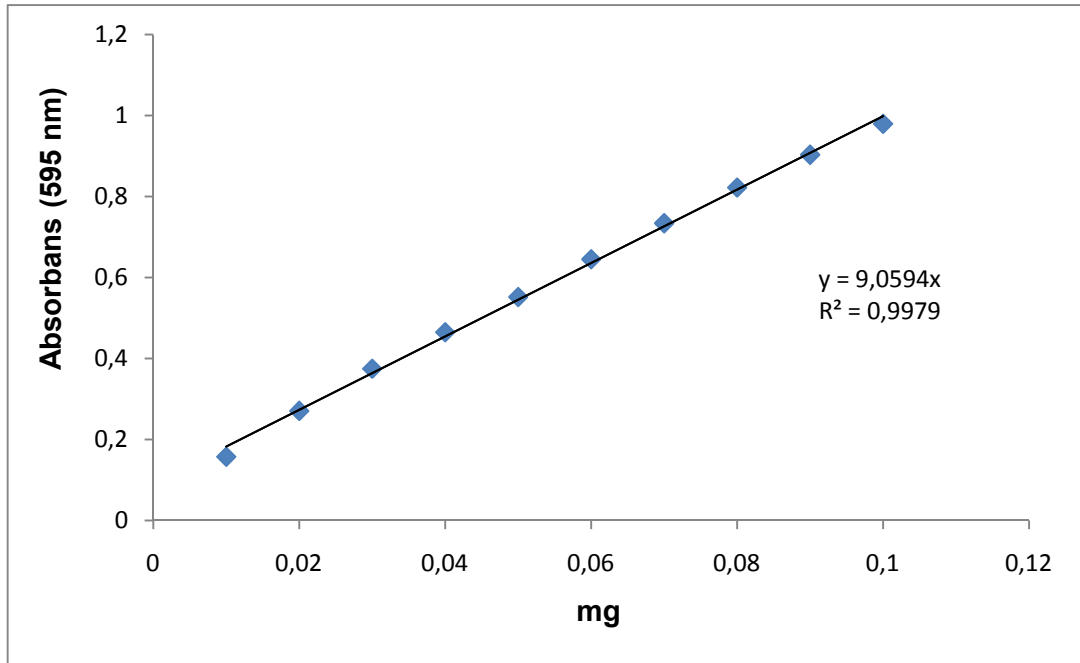
### 3.1.3 Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri

Hidrofobik etkileşim kromatografisi sonunda enzim aktivitesine rastlanan tüpler birleştirildi. Kolona tatbik edilen numune ve birleştirilen elüat çözeltileri için Bradford metoduyla kantitatif protein tayini yapıldı. Daha sonra aktivite tayinleri yapılarak spesifik aktiviteler ve saflaştırma oranları tespit edildi. Sonuçlar çizelge 3.1'de verildi.

Serumdan elde edilen enzim çözeltisi ve saflaştırma basamakları sonundaki enzim çözeltilerinin protein miktarları bu standart grafiğe göre belirlendi. Standart çözeltideki mg proteine karşılık gelen absorban değerleri Şekil 3.3 ve Şekil 3.4'de gösterilmiştir.



Şekil 3.3 Bradford Yöntemi ile Protein (*merinos*) Miktarının Tayin Edilmesinde Kullanılan Standart Grafik



Şekil 3.4 Bradford Yöntemi ile Protein (*kıvrıcık*) Miktarının Tayin Edilmesinde Kullanılan Standart Grafik

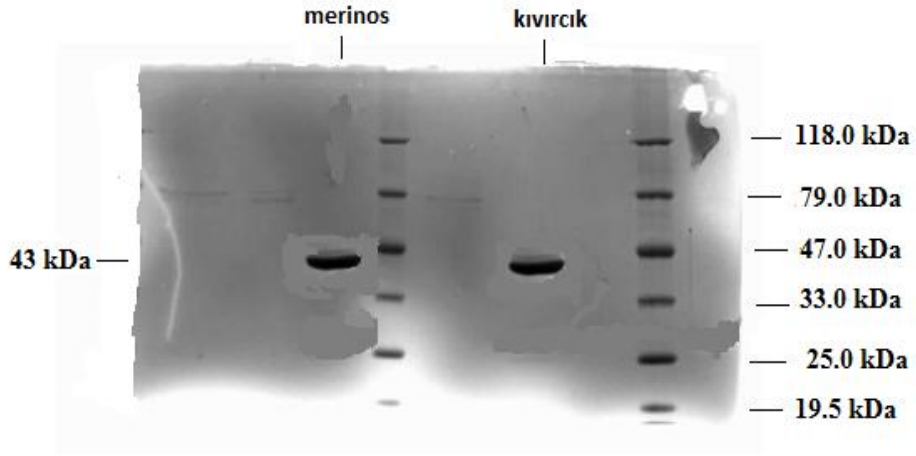
**Çizelge 3.1** Merinos ve kıvrıcık türü için saflaştırma tablosu

<b>Merinos Türü</b>	<b>Hacim (ml)</b>	<b>Aktivite (U/ml)</b>	<b>Toplam Aktivite (U/ml)</b>	<b>Protein Miktarı (mg/ml)</b>	<b>Toplam Protein (mg)</b>	<b>Spesifik Aktivite (U/mg)</b>	<b>% Verim</b>	<b>Saflaştırma Derecesi</b>
<b>Serum</b>	82	75,3	6174,6	7,6	623,2	9,91	100	-
<b>Amonyum Sülfat Çöktürmesi</b>	32	77,1	2467,2	7,7	246,4	10,01	40,0	1,01
<b>Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi</b>	4,5	88,5	398,3	0,019	0,086	4631,4	6,5	462,7
<b>Kıvrıcık Türü</b>	<b>Hacim (ml)</b>	<b>Aktivite (U/ml)</b>	<b>Toplam Aktivite (U/ml)</b>	<b>Protein Miktarı (mg/ml)</b>	<b>Toplam Protein (mg)</b>	<b>Spesifik Aktivite (U/mg)</b>	<b>% Verim</b>	<b>Saflaştırma Derecesi</b>
<b>Serum</b>	50	64,4	3220,0	7,5	375,0	8,59	100	-
<b>Amonyum Sülfat Çöktürmesi</b>	18	67,8	1220,4	7,8	140,4	8,69	37,9	1,01
<b>Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi</b>	3	68,2	204,6	0,017	0,051	4011,8	6,4	461,7



### 3.2 Serum Paraoksonaz Enziminin SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi

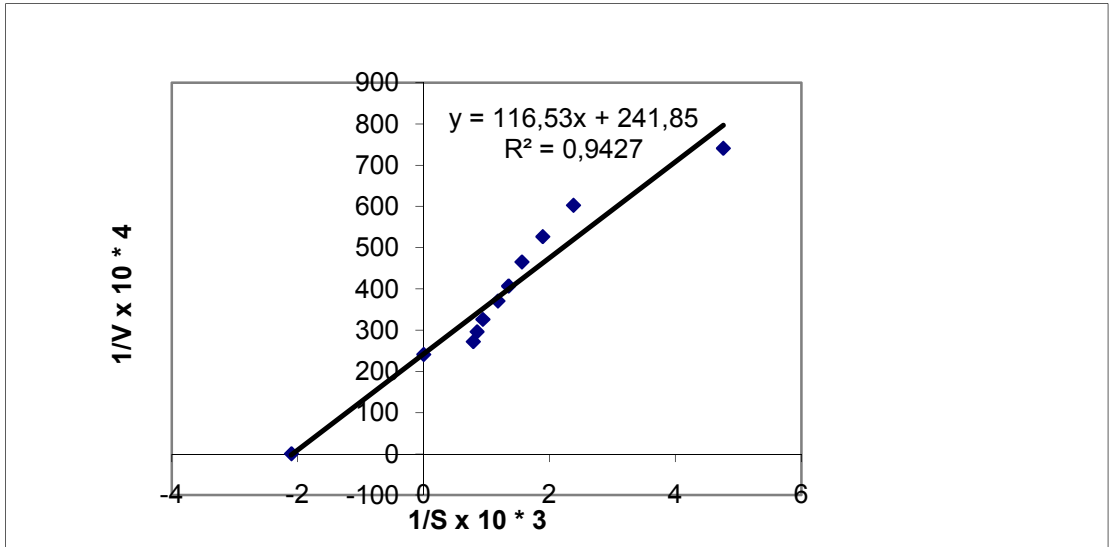
Hidrofobik etkileşim kolonundan saflaştırılan serum paraoksonaz enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla bölüm 2.2.4.3’de anlatıldığı şekilde hazırlanan SDS poliakrilamid jel elektroforezine serumdan saflaştırılan paraoksonaz enzim numunesi tatbik edildi. Protein bantları içeren jellerin görüntüleri jel görüntüleme sistemi ile bilgisayara aktarıldı (Şekil 3.5).



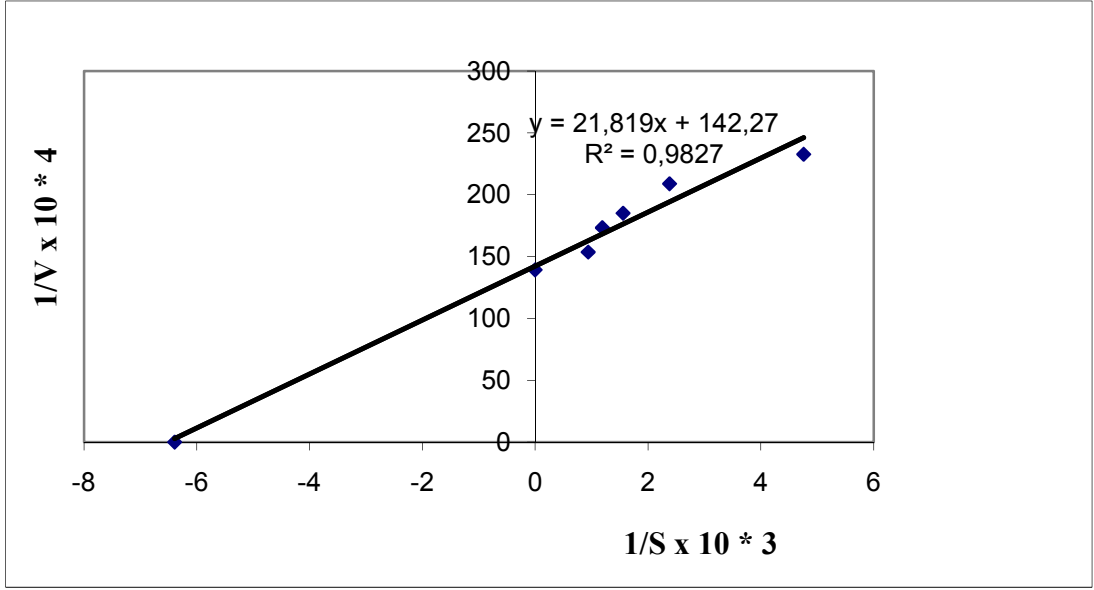
**Şekil 3.5** Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Saflaştırılan Paraoksonaz Enziminin SDS-poliakrilamid Jel Elektroforezi

### 3.3 Optimum şartlarda $K_m$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Bulunması

$K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin bulunması amacıyla, optimum şartlarda paraokson substratının değişen konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ölçümleri yapıldı. Her ölçüm iki defa yapılarak bulunan değerlerin ortalaması alındı. 412nm'de ölçülen aktivite değerleri reaksiyon hızı (U/ml dak) olarak alındı.  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri bulunarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi (Şekil 3.6 ve şekil 3.7). Grafikten yararlanarak merinos için  $K_M$  değeri 0,482 mM ve  $V_{max}$  değeri 41,348 U/mL'dak, kıvrıcık için de  $K_M$  değeri 0,153 mM ve  $V_{max}$  değeri 70,289 U/mL'dak olarak bulundu.



**Şekil 3.6** Saflaştırılmış *Merinos* Serum Paraoksonaz Enziminin Paraokson Substratı ile Elde Edilen Lineweaver-Burk Grafiği



**Şekil 3.7** Saflaştırılmış *Kıvırcık* Serum Paraoksonaz Enziminin Paraokson Substratı ile Elde Edilen Lineweaver-Burk Grafiği

**Çizelge 3.2** Merinos serum PON1 enzimi için paraokson substratı kullanılarak,  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite,  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri

100 mM Tris Tamponu ( $\mu$ l)	Enzim Çözeltisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Substrat Çözeltisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Küvetteki Toplam Hacim ( $\mu$ l)	Küvetteki Substrat Konsantrasyonu (mM)	$\Delta$ OD (412nm)	Aktivite (U/ml dak)	$(1/V) \times 10^4$	$1/[S]$
940	100	10	1050	0,21	0,022	13,5	740,7	4,76
930		20		0,42	0,027	16,6	602,4	2,38
925		25		0,53	0,031	19,0	526,3	1,89
920		30		0,64	0,035	21,5	465,1	1,56
915		35		0,74	0,040	24,6	406,5	1,35
910		40		0,85	0,044	27,0	370,4	1,18
900		50		1,06	0,050	30,7	325,7	0,94
895		55		1,17	0,055	33,8	295,9	0,85
890		60		1,27	0,060	36,8	271,7	0,79

**Çizelge 3.3** Kıvırcık serum PON1 enzimi için paraokson substratı kullanılarak,  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite,  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri

100 mM Tris Tamponu ( $\mu$ l)	Enzim Çözeltisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Substrat Çözeltisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Küvetteki Toplam Hacim ( $\mu$ l)	Küvetteki Substrat Konsantrasyonu (mM)	$\Delta$ OD (412nm)	Aktivite (U/ml dak)	$(1/V) \times 10^4$	$1/[S]$
990	50	10	1050	0,21	0,035	43,0	232,7	4,76
980		20		0,42	0,039	47,9	208,8	2,38
970		30		0,64	0,044	54,0	185,0	1,56
960		40		0,85	0,047	57,7	173,3	1,19
950		50		1,06	0,053	65,1	153,6	0,94

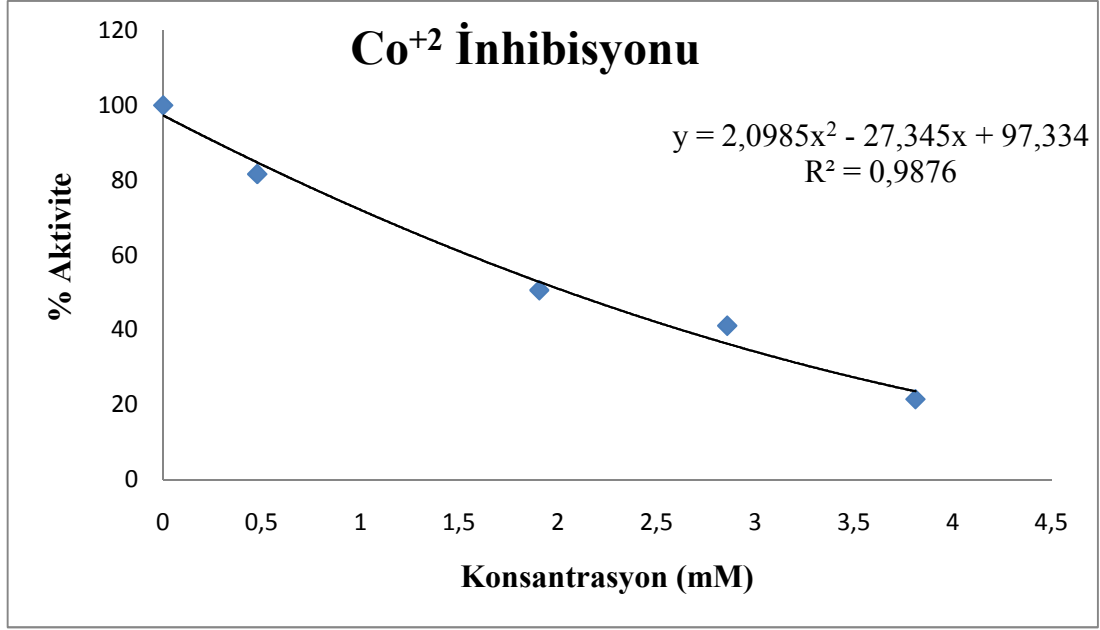
### 3.4 İnhibisyona Sebep Olan Ağır Metallerin $I_{50}$ ve $K_i$ Değerlerinin Bulunması

Çalışmamızda kullandığımız ağır metallerin  $I_{50}$  değerlerini bulmak için, optimum şartlarda paraokson substratının 2mM sabit konsantrasyonunda çalışıldı. Substrat çözeltisi her ölçümde 0,1ml alındı, paraokson ve ağır metal çözeltilerinden ise değişik hacimlerde alınarak toplam 1,05ml'lik bir reaksiyon hacmi oluşturuldu. Önce inhibitörsüz ortamda enzim aktivitesi bulundu. Bu değer %100 aktivite olarak kullanıldı. Daha sonra optimum pH ve sıcaklıkta 0,05ml enzim çözeltisi alınıp daha önceden hazırlanmış olan 1ml tampon + substrat + ağır metal çözeltisine çabuk bir şekilde eklendikten sonra 412 nm'de bir dakikada absorbansta meydana gelen değişme okundu. Elde edilen absorban değerlerinden % aktivite hesaplandı. % Aktivite-[I] grafikleri çizildi (Şekil 3.8-3.19). Bu grafiklerden yararlanarak her bir ağır metal için  $I_{50}$  değerleri hesaplandı.

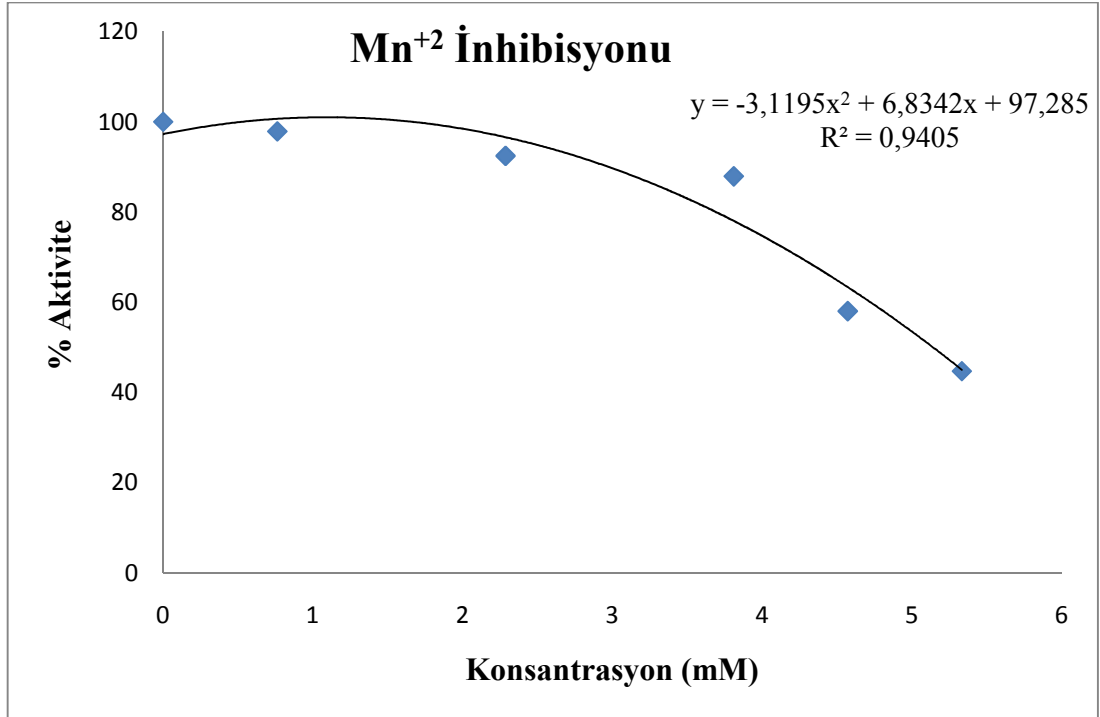
Farklı ağır metallerin  $K_i$  sabitlerinin bulunması amacıyla, önce inhibitörsüz ortamda, optimum şartlarda, 5-8 farklı paraokson substrat konsantrasyonuna bağlı olarak aktivite bulundu. Daha sonra kullanılan her bir ağır metal için 2 değişik sabit ağır metal konsantrasyonunda, standart aktivite ölçüm koşullarında, paraokson substratı kullanılarak aktivite belirlendi.  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri hesaplanarak, Lineweaver–Burk grafikleri çizildi (Şekil 3.20-3.31). Bu grafiklerden yararlanarak  $K_i$  değerleri ve inhibisyon türleri tespit edildi.  $K_i$  değerleri daha önce anlatıldığı gibi bulundu.

**Çizelge 3.4** Serum merinos PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Co ve Mn'nin I<sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, metal konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

100 mM Tris Tamponu (µl)	Ağır Metal	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Metal Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Metal Konsantrasyonu [I] (mM)	ΔOD (412nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite
850	Co	100	100	-	-	0,158	97,018	100
845				5	0,476	0,129	79,206	81,646
830				20	1,905	0,080	49,120	50,633
820				30	2,857	0,065	39,910	41,139
810				40	3,810	0,034	20,876	21,519
850	Mn	100	100	-	-	0,331	203,234	100
840				10	0,762	0,324	198,936	97,885
820				30	2,286	0,306	187,884	92,447
800				50	3,810	0,291	178,674	87,915
790				60	4,571	0,192	117,888	58,006
780				70	5,333	0,148	90,872	44,713



**Şekil 3.8** Saflaştırılmış Merinos Serum PON1 Enzimi Üzerine 2 mM Paraokson Substratı Konsantrasyonunda Co için % Aktivite-[I] Grafiği

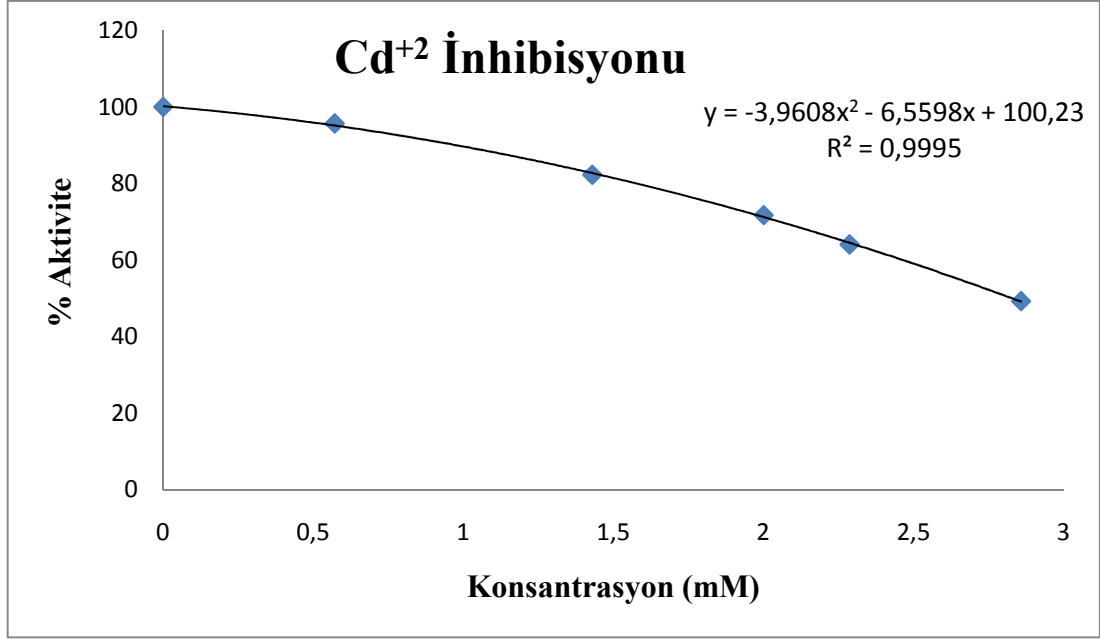


**Şekil 3.9** Saflaştırılmış Merinos Serum PON1 Enzimi Üzerine 2 mM Paraokson Substratı Konsantrasyonunda Mn için % Aktivite-[I] Grafiği

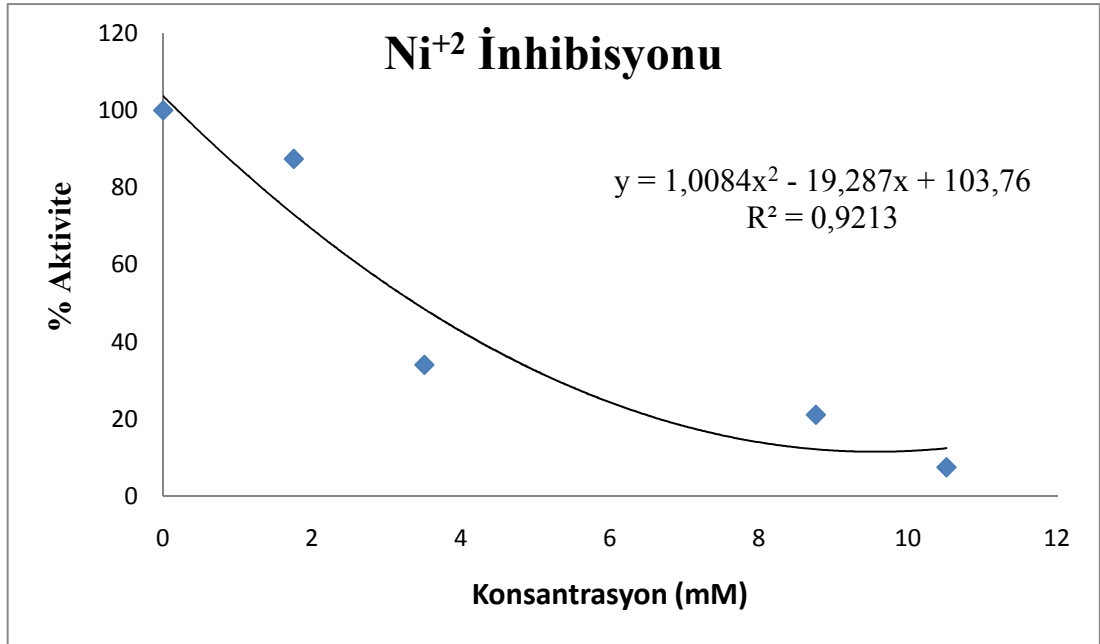


**Çizelge 3.5** Serum merinos PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Cd ve Ni'in I<sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, metal konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

100 mM Tris Tamponu (µl)	Ağır Metal	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Metal Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Metal Konsantrasyonu [I] (mM)	ΔOD (412nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite
850	Cd	100	100	-	-	0,209	128,326	100
830				20	0,571	0,200	122,800	95,694
800				50	1,429	0,172	105,608	82,297
780				70	2,000	0,150	92,100	71,770
770				80	2,286	0,134	82,276	64,115
750				100	2,857	0,103	63,242	49,282
850	Ni	100	100	-	-	0,294	180,615	100
840				10	1,752	0,257	157,798	87,415
830				20	3,505	0,100	61,400	34,014
800				50	8,762	0,062	38,068	21,088
790				60	10,514	0,022	13,508	7,483



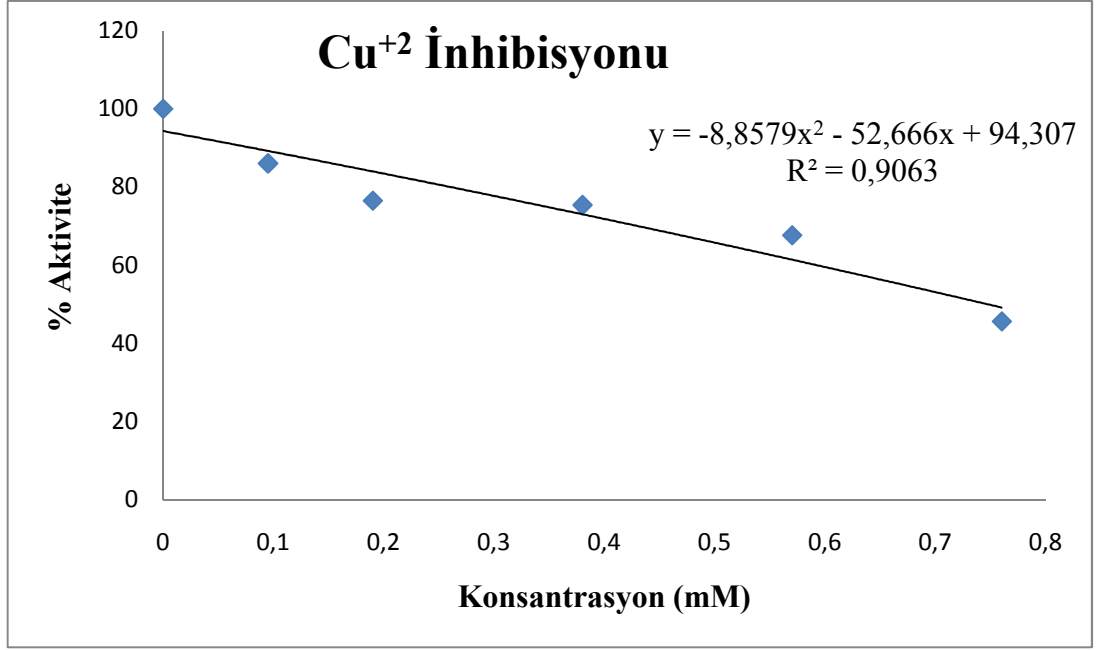
**Şekil 3.10** Saflaştırılmış Merinos Serum PON1 Enzimi Üzerine 2 mM Paraokson Substratı Konsantrasyonunda Cd için % Aktivite-[I] Grafiği



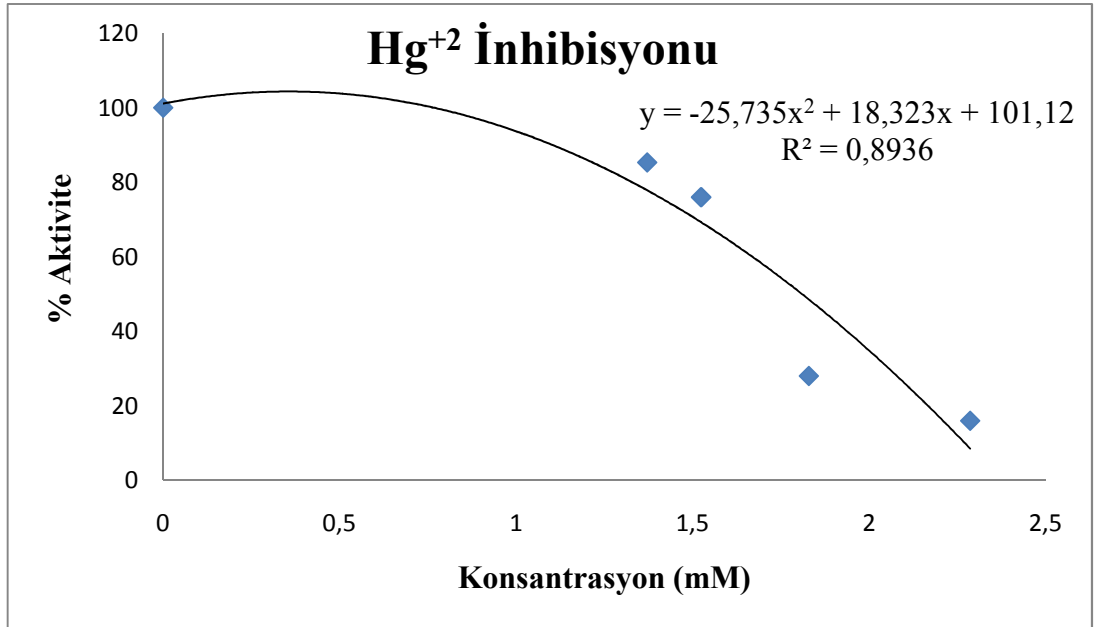
**Şekil 3.11** Saflaştırılmış Merinos Serum PON1 Enzimi Üzerine 2 mM Paraokson Substratı Konsantrasyonunda Ni için % Aktivite-[I] Grafiği

**Çizelge 3.6** Serum merinos PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Cu ve Hg'nın I<sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, metal konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

100 mM Tris Tamponu (µl)	Ağır Metal	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µl)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µl)	Metal Çözeltisinin Hacmi (µl)	Metal Konsantrasyonu [I] (mM)	ΔOD (412nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite
850	Cu	100	100	-	-	0,272	167,008	100
840				10	0,095	0,234	143,676	86,029
830				20	0,190	0,208	127,712	76,471
810				40	0,380	0,205	125,870	75,368
790				60	0,570	0,184	112,976	67,647
770				80	0,760	0,124	76,136	45,588
850	Hg	100	100	-	-	0,075	46,050	100
760				90	1,371	0,064	39,296	85,333
750				100	1,524	0,057	34,998	76,000
730				120	1,829	0,021	12,894	28,000
700				150	2,286	0,012	7,368	16,000



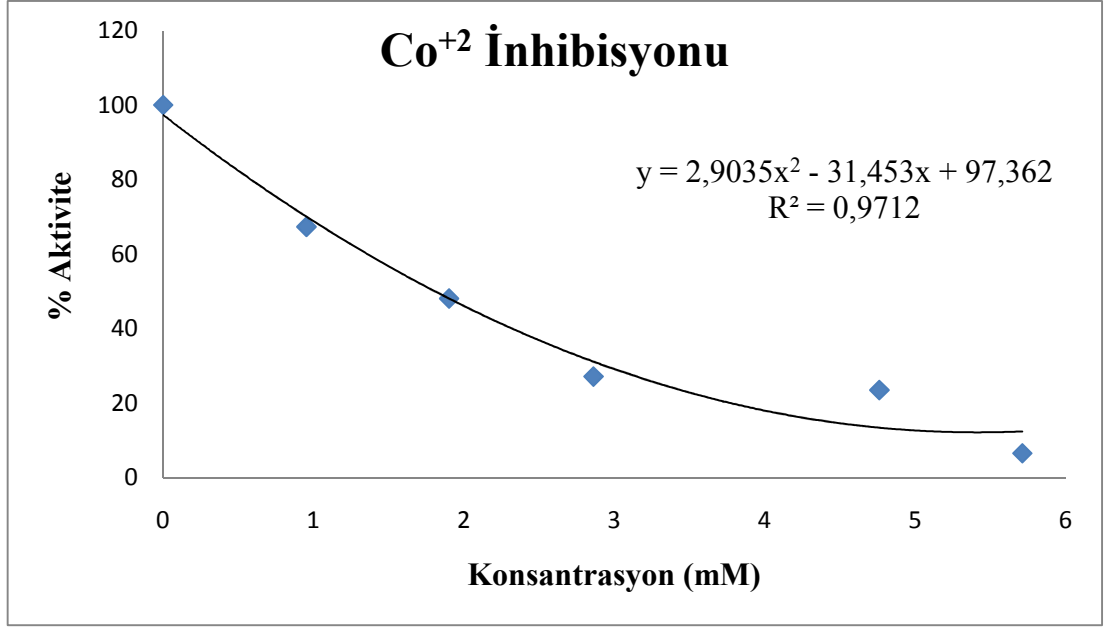
**Şekil 3.12** Saflaştırılmış Merinos Serum PON1 Enzimi Üzerine 2 mM Paraokson Substratı Konsantrasyonunda Cu için % Aktivite-[I] Grafiği



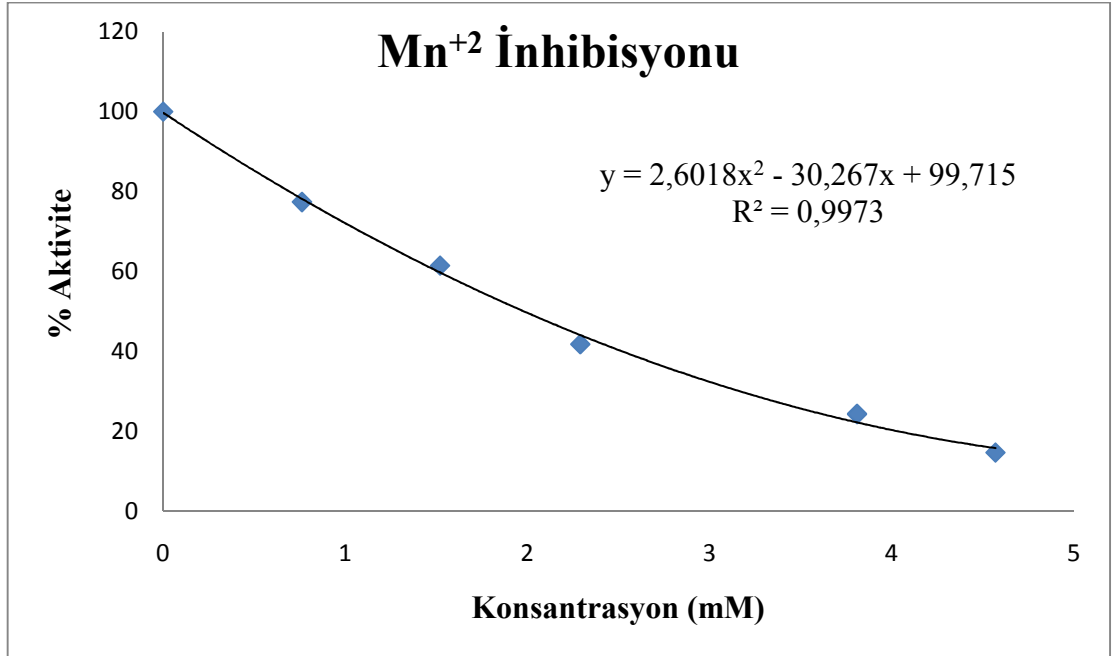
**Şekil 3.13** Saflaştırılmış Merinos Serum PON1 Enzimi Üzerine 2 mM Paraokson Substratı Konsantrasyonunda Hg için % Aktivite-[I] Grafiği

**Çizelge 3.7** Serum kıvrıcık PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Co ve Mn'nin I<sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, metal konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

100 mM Tris Tamponu (µl)	Ağır Metal	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Metal Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Metal Konsantrasyonu [I] (mM)	ΔOD (412nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite
850	Co	100	100	-	-	0,0826	50,716	100
840				10	0,952	0,0556	34,138	67,312
830				20	1,900	0,0397	24,376	48,063
820				30	2,860	0,0224	13,754	27,119
800				50	4,760	0,0194	11,912	23,487
790				60	5,710	0,0054	3,316	6,538
850	Mn	100	100	-	-	0,0778	47,769	100
840				10	0,762	0,0602	36,963	77,378
830				20	1,520	0,0478	29,349	61,440
820				30	2,290	0,0325	19,955	41,774
800				50	3,810	0,0189	11,605	24,293
790				60	4,570	0,0114	7,000	14,653



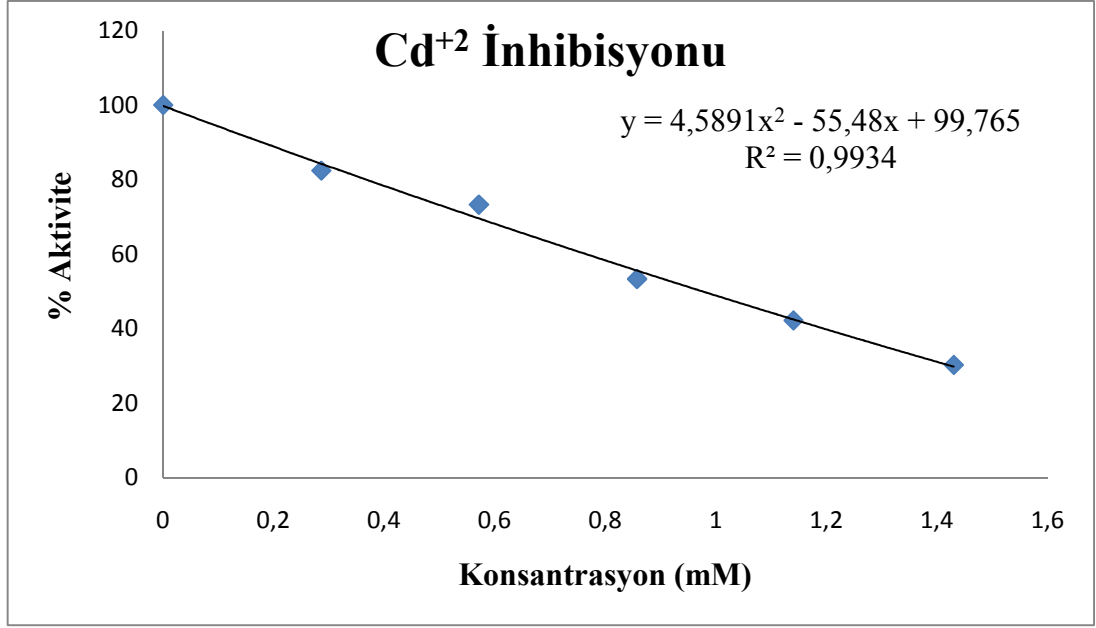
**Şekil 3.14** Saflaştırılmış Kıvırcık Serum PON1 Enzimi Üzerine 2 mM Paraokson Substratı Konsantrasyonunda Co için % Aktivite-[I] Grafiği



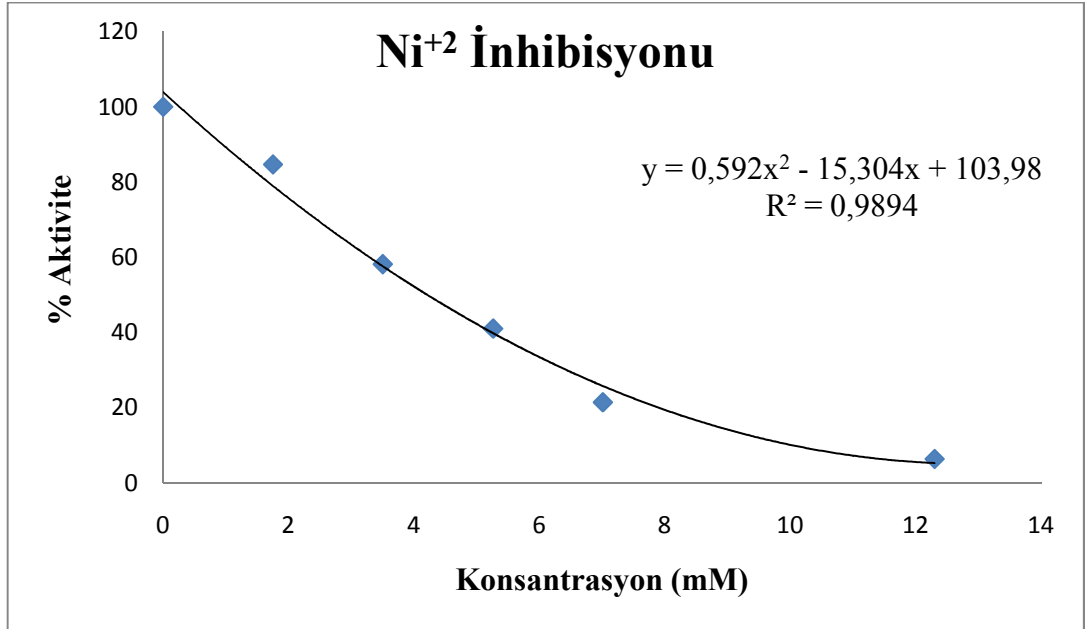
**Şekil 3.15** Saflaştırılmış Kıvırcık Serum PON1 Enzimi Üzerine 2 mM Paraokson Substratı Konsantrasyonunda Mn İçin % Aktivite-[I] Grafiği

**Çizelge 3.8** Serum kıvrıcık PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Cd ve Ni'in I<sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, metal konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

100 mM Tris Tamponu (µl)	Ağır Metal	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Metal Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Metal Konsantrasyonu [I] (mM)	ΔOD (412nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite
850	Cd	100	100	-	-	0,0756	46,418	100
840				10	0,286	0,0623	38,252	82,407
830				20	0,571	0,0554	34,016	73,280
820				30	0,857	0,0403	24,744	53,333
810				40	1,140	0,0319	19,587	42,196
800				50	1,430	0,0229	14,061	30,291
850				Ni	100	100	-	-
840	10	1,750	0,0613				37,638	84,669
830	20	3,500	0,0421				25,849	58,149
820	30	5,260	0,0297				18,236	41,022
810	40	7,010	0,0155				9,517	21,409
780	70	12,300	0,0046				2,824	6,354



**Şekil 3.16** Saflaştırılmış Kıvırcık Serum PON1 Enzimi Üzerine 2 mM Paraokson Substratı Konsantrasyonunda Cd için % Aktivite-[I] Grafiği

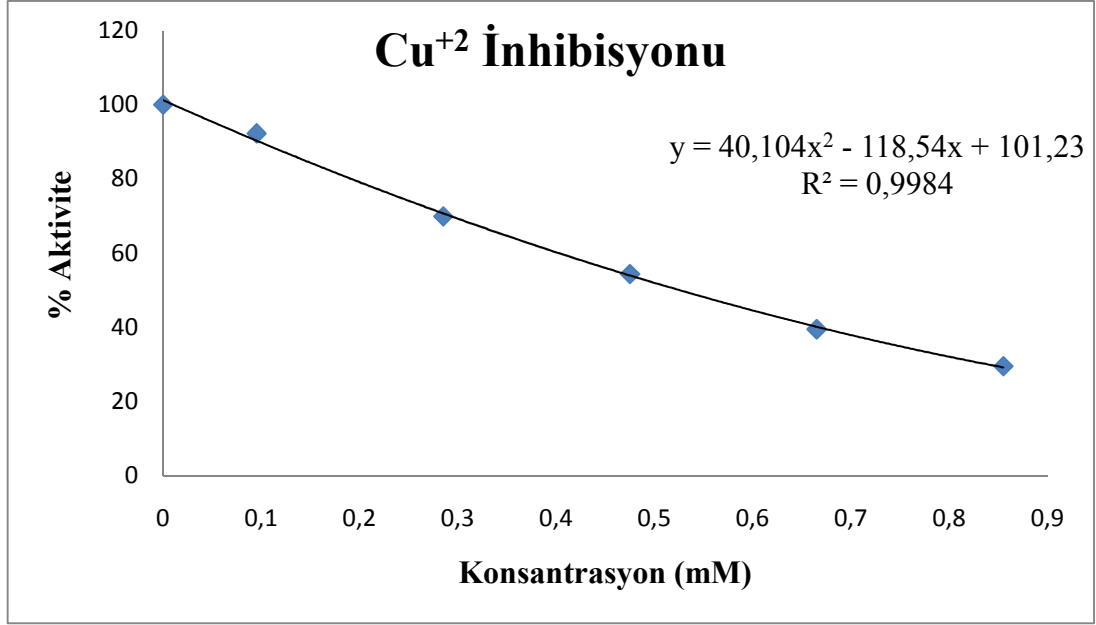


**Şekil 3.17** Saflaştırılmış Kıvırcık Serum PON1 Enzimi Üzerine 2 mM Paraokson Substratı Konsantrasyonunda Ni için % Aktivite-[I] Grafiği

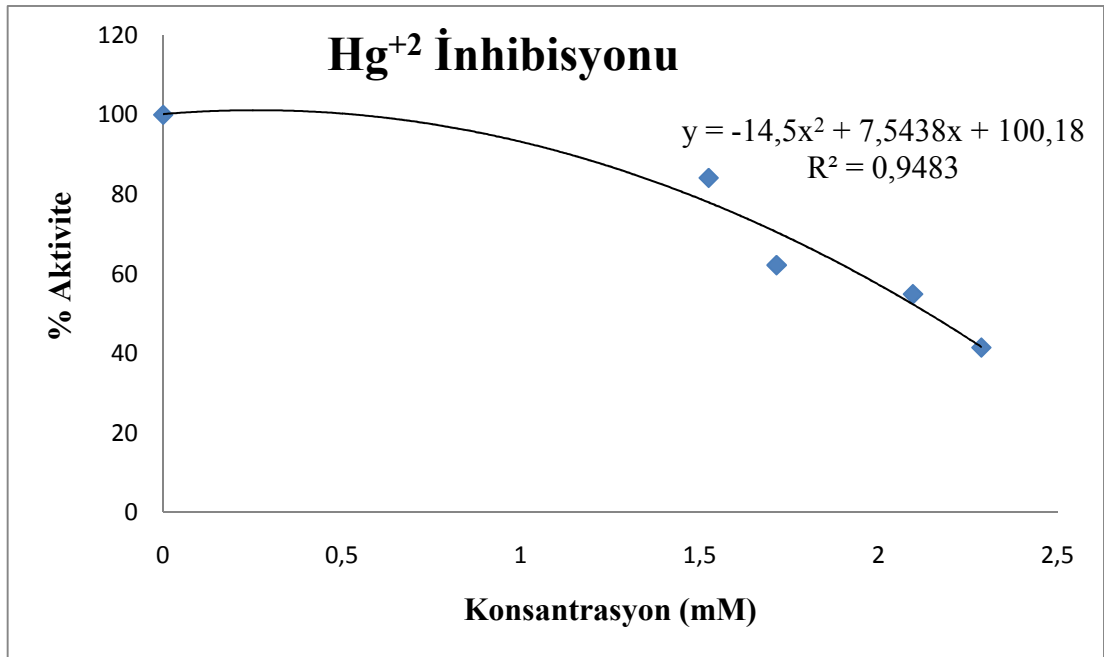


**Çizelge 3.9** Serum kıvrıcık PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Cu ve Hg'nın I<sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, metal konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

100 mM Tris Tamponu (µl)	Ağır Metal	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Metal Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Metal Konsantrasyonu [I] (mM)	ΔOD (412nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite
850	Cu	100	100	-	-	0,0738	45,313	100
840				10	0,095	0,0681	41,813	92,276
820				30	0,285	0,0516	31,682	69,919
800				50	0,475	0,0401	24,621	54,363
780				70	0,665	0,0291	17,867	39,485
760				90	0,855	0,0218	13,385	29,539
850	Hg	100	100	-	-	0,082	50,348	100
770				80	1,524	0,069	42,366	84,146
760				90	1,714	0,051	31,314	62,195
740				110	2,095	0,045	27,630	54,878
730				120	2,286	0,034	20,876	41,463



**Şekil 3.18** Saflaştırılmış Kıvırcık Serum PON1 Enzimi Üzerine 2 mM Paraokson Substratı Konsantrasyonunda Cu için % Aktivite-[I] Grafiği



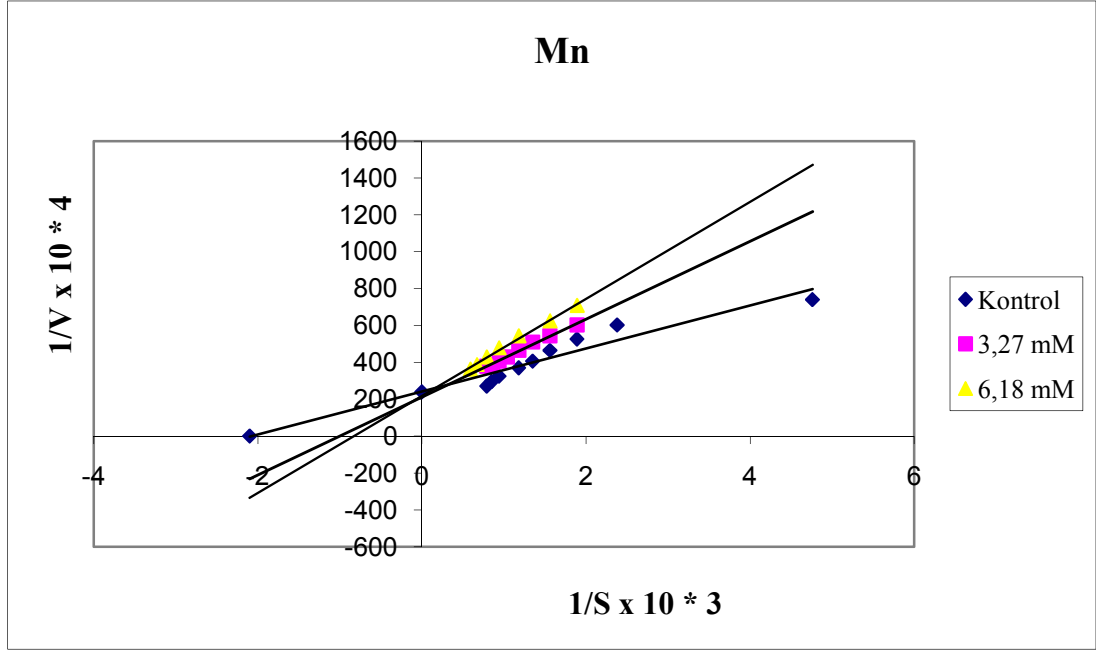
**Şekil 3.19** Saflaştırılmış Kıvırcık Serum PON1 Enzimi Üzerine 2 mM Paraokson Substratı Konsantrasyonunda Hg için % Aktivite-[I] Grafiği

**Çizelge 3.10** Merinos serum PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Mn'nin  $K_i$  değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve buna karşılık gelen substrat, Mn konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

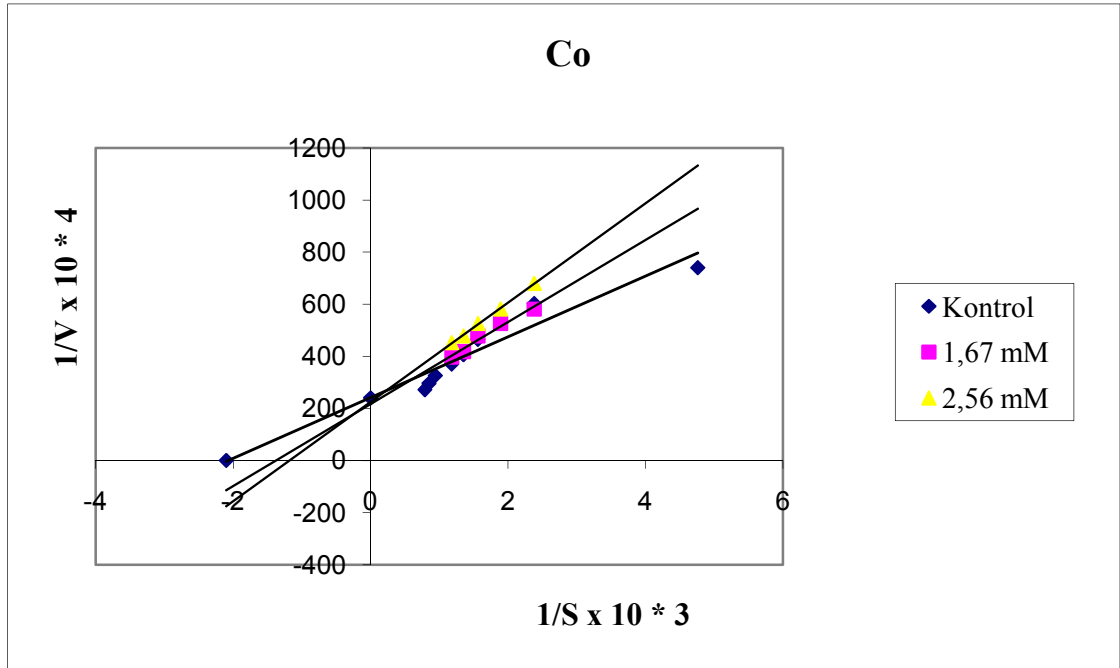
100 mM Tris Tamponu ( $\mu$ l)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Mn Çözeltilisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Küvetteki Toplam Hacim ( $\mu$ l)	Küvetteki Substrat Kons. (mM)	Küvetteki Mn Kons. (mM)	$\Delta$ OD (412nm)	Aktivite (U/ml dak)	(1/V) x 10 <sup>4</sup>	1/[S]
915	100	25	10	1050	0,53	3,27	0,027	16,6	602,4	1,89
910		30	10		0,64	3,27	0,030	18,4	543,5	1,56
905		35	10		0,74	3,27	0,032	19,6	510,2	1,35
900		40	10		0,85	3,27	0,035	21,5	465,1	1,18
895		45	10		0,96	3,27	0,038	23,3	429,2	1,04
890		50	10		1,06	3,27	0,040	24,6	406,5	0,94
885		55	10		1,16	3,27	0,042	25,8	387,6	0,86
880		60	10		1,27	3,27	0,043	26,4	378,8	0,79
905		25	20		0,53	6,18	0,023	14,1	709,2	1,89
900		30	20		0,64	6,18	0,026	16,0	625,0	1,56
890		40	20		0,85	6,18	0,030	18,4	543,5	1,18
880		50	20		1,06	6,18	0,034	20,9	478,5	0,94
870		60	20		1,27	6,18	0,038	23,3	429,2	0,79
860		70	20		1,49	6,18	0,042	25,8	387,6	0,67
850		80	20		1,70	6,18	0,045	27,6	362,3	0,59

**Çizelge 3.11** Merinos serum PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Co'ın  $K_i$  değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve buna karşılık gelen substrat, Co konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

100 mM Tris Tamponu (µl)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Co Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Küvetteki Toplam Hacim (µl)	Küvetteki Substrat Kons. (mM)	Küvetteki Co Kons. (mM)	$\Delta OD$ (412nm)	Aktivite (U/ml dak)	$(1/V) \times 10^4$	1/[S]
880	100	20	50	1050	0,42	1,67	0,028	17,2	581,4	2,38
875		25	50		0,53	1,67	0,031	19,0	526,3	1,89
870		30	50		0,64	1,67	0,034	20,9	478,5	1,56
865		35	50		0,74	1,67	0,039	23,9	418,4	1,35
860		40	50		0,85	1,67	0,041	25,2	396,8	1,18
860		20	70		0,42	2,56	0,024	14,7	680,3	2,38
855		25	70		0,53	2,56	0,028	17,2	581,4	1,89
850		30	70		0,64	2,56	0,031	19,0	526,3	1,56
845		35	70		0,74	2,56	0,034	20,9	478,5	1,35
840		40	70		0,85	2,56	0,036	22,1	452,5	1,18



**Şekil 3.20** Safleştirilmiş Merinos Serum PON1 Enzimi Aktivitesi Üzerine Mn'in İnhibisyon Etkisi  $[I_1] = 3,27 \text{ mM}$ ,  $[I_2] = 6,18 \text{ mM}$



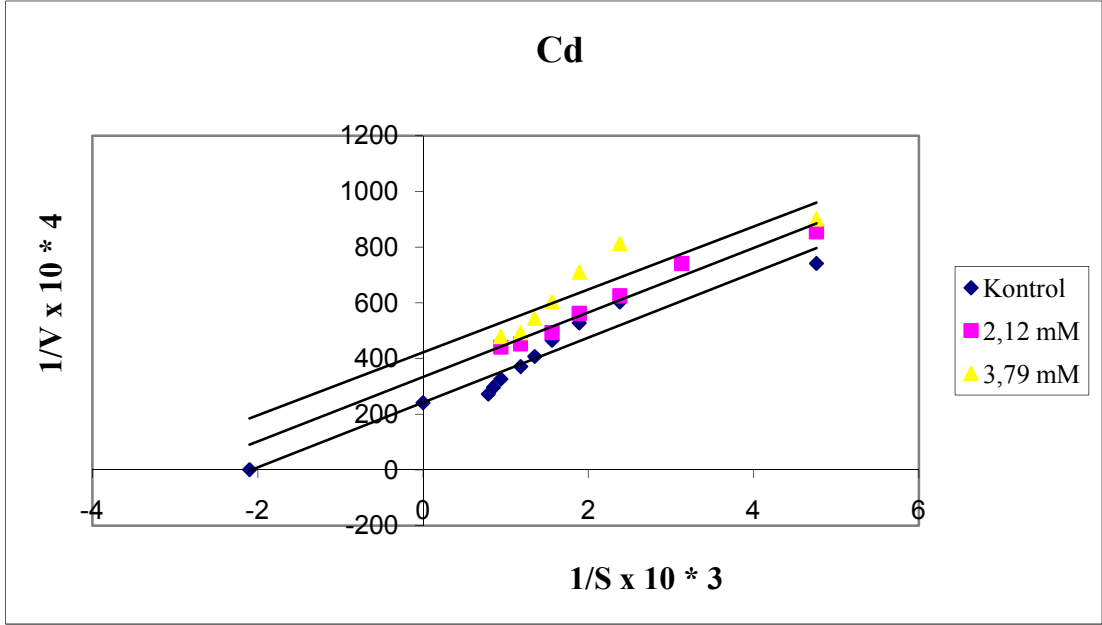
**Şekil 3.21** Safleştirilmiş Merinos Serum PON1 Enzimi Aktivitesi Üzerine Co'nın İnhibisyon Etkisi  $[I_1] = 1,67 \text{ mM}$ ,  $[I_2] = 2,56 \text{ mM}$

**Çizelge 3.12** Merinos serum PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Cd'un  $K_i$  değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve buna karşılık gelen substrat, Cd konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

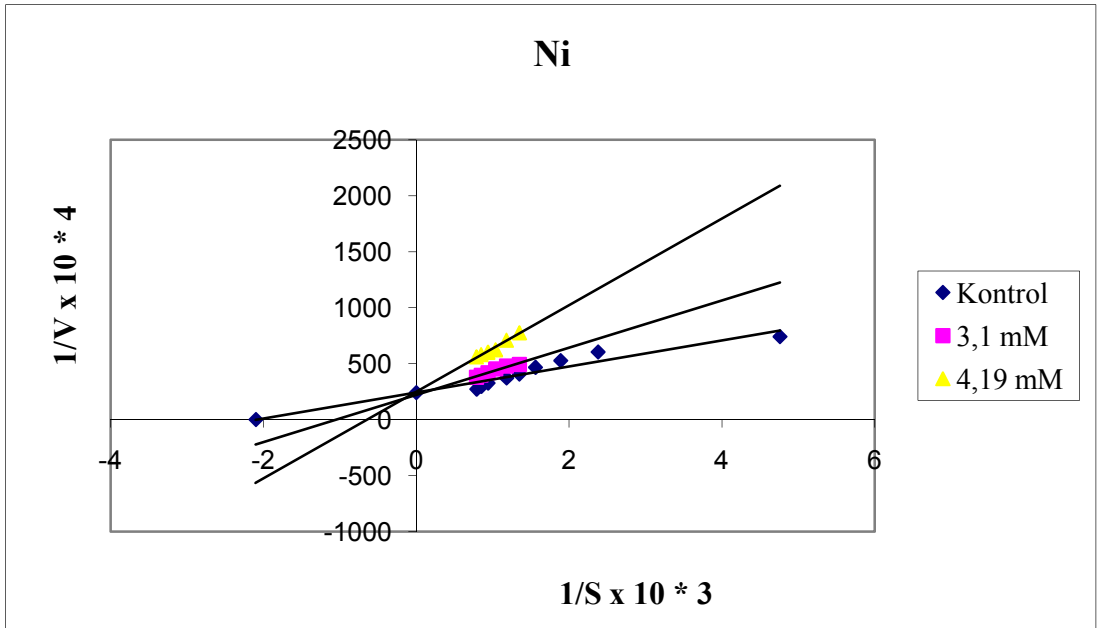
100 mM Tris Tamponu ( $\mu$ l)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Cd Çözeltilisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Küvetteki Toplam Hacim ( $\mu$ l)	Küvetteki Substrat Kons. (mM)	Küvetteki Cd Kons. (mM)	$\Delta$ OD (412nm)	Aktivite (U/ml dak)	(1/V) x 10 <sup>4</sup>	1/[S]
860	100	10	80	1050	0,21	2,12	0,017	10,4	961,5	4,76
850		20	80		0,42	2,12	0,020	12,3	813,0	2,38
845		25	80		0,53	2,12	0,024	14,7	680,3	1,89
840		30	80		0,64	2,12	0,029	17,8	561,8	1,56
835		35	80		0,74	2,12	0,033	20,3	492,6	1,35
830		40	80		0,85	2,12	0,038	23,3	429,2	1,18
820		50	80		1,06	2,12	0,039	24,0	417,7	0,94
820		10	120		0,21	3,79	0,018	11,1	900,9	4,76
815		15	120		0,32	3,79	0,020	12,3	813,0	3,13
810		20	120		0,42	3,79	0,023	14,1	709,2	2,38
805		25	120		0,53	3,79	0,027	16,6	602,4	1,89
800		30	120		0,64	3,79	0,030	18,4	543,5	1,56
790		40	120		0,85	3,79	0,033	20,3	492,6	1,18
780		50	120		1,06	3,79	0,034	20,9	478,5	0,94

**Çizelge 3.13** Merinos serum PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Ni'in  $K_i$  değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve buna karşılık gelen substrat, Ni konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

100 mM Tris Tamponu ( $\mu$ l)	Enzim Çözeltisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Substrat Çözeltisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Ni Çözeltisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Küvetteki Toplam Hacim ( $\mu$ l)	Küvetteki Substrat Kons. (mM)	Küvetteki Ni Kons. (mM)	$\Delta$ OD (412nm)	Aktivite (U/ml dak)	(1/V) x 10 <sup>4</sup>	1/[S]
875	100	35	40	1050	0,74	3,10	0,033	20,3	492,6	1,35
870		40	40		0,85	3,10	0,034	20,9	478,5	1,18
865		45	40		0,96	3,10	0,036	22,1	452,5	1,04
860		50	40		1,06	3,10	0,039	23,9	418,4	0,94
855		55	40		1,17	3,10	0,041	25,2	396,8	0,85
850		60	40		1,27	3,10	0,043	26,4	378,8	0,79
865		35	50		0,74	4,19	0,021	12,9	775,2	1,35
860		40	50		0,85	4,19	0,023	14,1	709,2	1,18
855		45	50		0,96	4,19	0,026	16,0	625,0	1,04
850		50	50		1,06	4,19	0,027	16,6	602,4	0,94
845		55	50		1,17	4,19	0,028	17,2	581,4	0,85
840		60	50		1,27	4,19	0,029	17,8	561,8	0,79



**Şekil 3.22** Saflaştırılmış Merinos Serum PON1 Enzimi Aktivitesi Üzerine Cd'un İnhibisyon Etkisi [ $I_1$ ] = 2,12 mM, [ $I_2$ ] = 3,79 mM



**Şekil 3.23** Saflaştırılmış Merinos Serum PON1 Enzimi Aktivitesi Üzerine Ni'in İnhibisyon Etkisi [ $I_1$ ] = 3,10 mM, [ $I_2$ ] = 4,19 mM

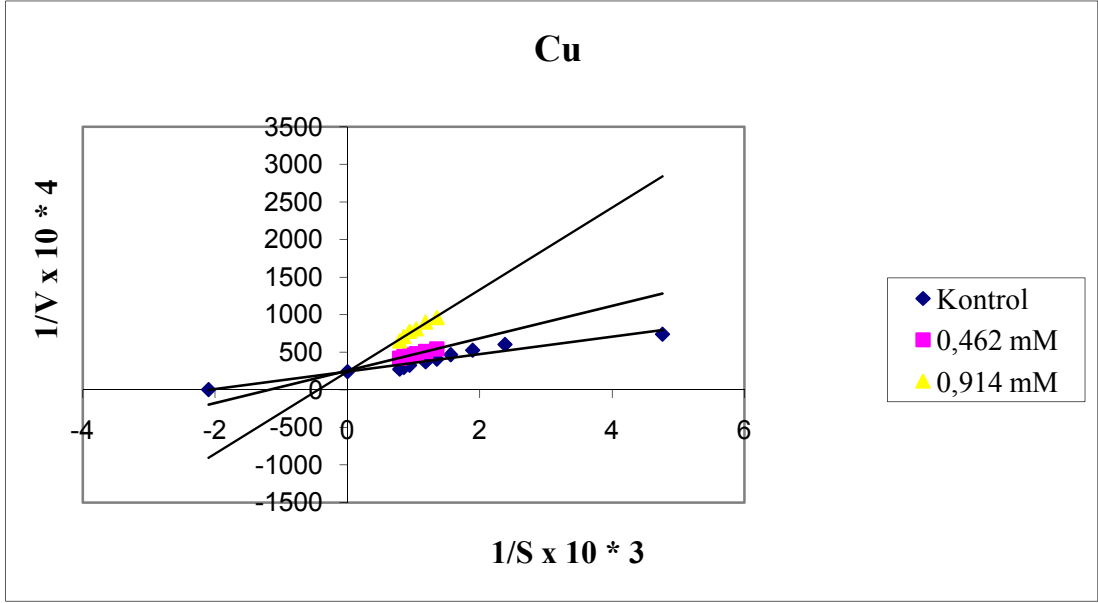


**Çizelge 3.14** Merinos serum PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Cu'nun  $K_i$  değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve buna karşılık gelen substrat, Cu konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

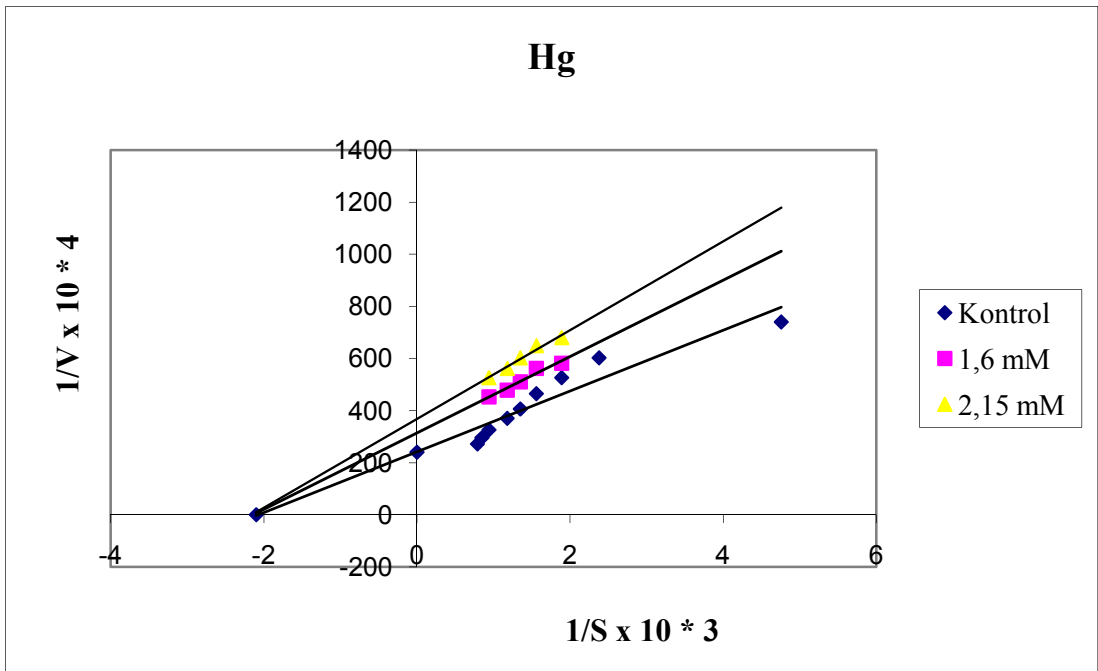
100 mM Tris Tamponu ( $\mu$ l)	Enzim Çözeltisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Substrat Çözeltisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Cu Çözeltisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Küvetteki Toplam Hacim ( $\mu$ l)	Küvetteki Substrat Kons. (mM)	Küvetteki Cu Kons. (mM)	$\Delta$ OD (412nm)	Aktivite (U/ml dak)	(1/V) x 10 <sup>4</sup>	1/[S]
895	100	35	20	1050	0,74	0,462	0,030	18,4	543,5	1,35
890		40	20		0,85	0,462	0,032	19,6	510,2	1,18
885		45	20		0,96	0,462	0,034	20,9	478,5	1,04
880		50	20		1,06	0,462	0,035	21,5	465,1	0,94
875		55	20		1,17	0,462	0,037	22,7	440,5	0,85
870		60	20		1,27	0,462	0,039	23,9	418,4	0,79
885		35	30		0,74	0,914	0,017	10,4	961,5	1,35
880		40	30		0,85	0,914	0,018	11,1	900,9	1,18
875		45	30		0,96	0,914	0,020	12,3	813,0	1,04
870		50	30		1,06	0,914	0,021	12,9	775,2	0,94
865		55	30		1,17	0,914	0,023	14,1	709,2	0,85
860		60	30		1,27	0,914	0,025	15,4	649,4	0,79

**Çizelge 3.15** Merinos serum PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Hg'nın  $K_i$  değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve buna karşılık gelen substrat, Hg konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

100 mM Tris Tamponu ( $\mu$ l)	Enzim Çözeltisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Substrat Çözeltisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Hg Çözeltisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Küvetteki Toplam Hacim ( $\mu$ l)	Küvetteki Substrat Kons. (mM)	Küvetteki Hg Kons. (mM)	$\Delta$ OD (412nm)	Aktivite (U/ml dak)	(1/V) x 10 <sup>4</sup>	1/[S]
915	100	25	10	1050	0,53	1,60	0,028	17,2	581,4	1,89
910		30	10		0,64	1,60	0,029	17,8	561,8	1,56
905		35	10		0,74	1,60	0,032	19,6	510,2	1,35
900		40	10		0,85	1,60	0,034	20,9	478,5	1,18
890		50	10		1,06	1,60	0,036	22,1	452,5	0,94
905		25	20		0,53	2,15	0,024	14,7	680,3	1,89
900		30	20		0,64	2,15	0,025	15,4	649,4	1,56
895		35	20		0,74	2,15	0,027	16,6	602,4	1,35
890		40	20		0,85	2,15	0,029	17,8	561,8	1,18
880		50	20		1,06	2,15	0,031	19,0	526,3	0,94



**Şekil 3.24** Saflaştırılmış Merinos Serum PON1 Enzimi Aktivitesi Üzerine Cu'nun İnhibisyon Etkisi  $[I_1] = 0,462 \text{ mM}$ ,  $[I_2] = 0,914 \text{ mM}$



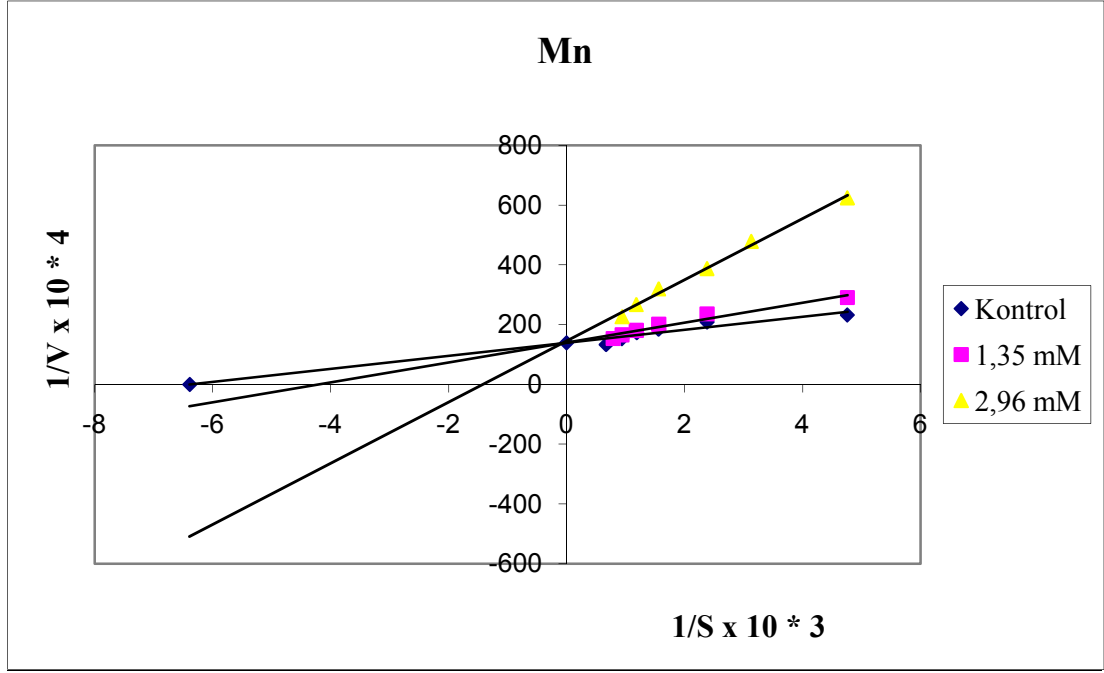
**Şekil 3.25** Saflaştırılmış Merinos Serum PON1 Enzimi Aktivitesi Üzerine Hg'nin İnhibisyon Etkisi  $[I_1] = 1,60 \text{ mM}$ ,  $[I_2] = 2,15 \text{ mM}$

**Çizelge 3.16** Kıvırcık serum PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Mn'nin  $K_i$  değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve buna karşılık gelen substrat, Mn konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

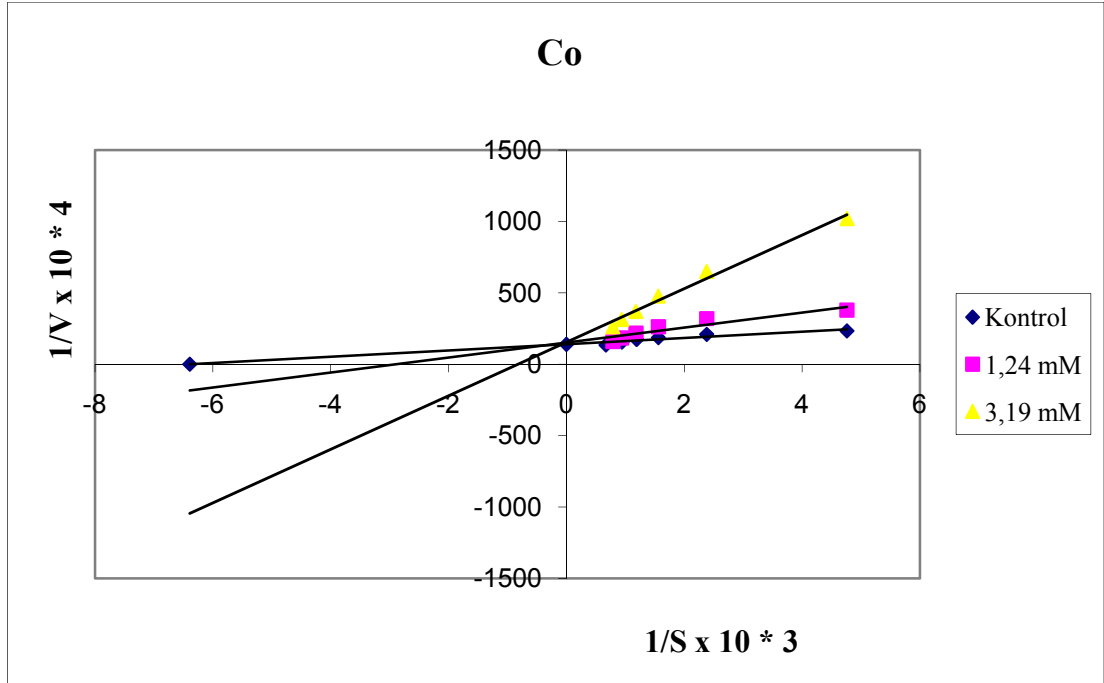
100 mM Tris Tamponu ( $\mu$ l)	Enzim Çözeltisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Substrat Çözeltisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Mn Çözeltisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Küvetteki Toplam Hacim ( $\mu$ l)	Küvetteki Substrat Kons. (mM)	Küvetteki Mn Kons. (mM)	$\Delta$ OD (412nm)	Aktivite (U/ml dak)	(1/V) x 10 <sup>4</sup>	1/[S]
930	100	10	10	1050	0,21	1,35	0,056	34,4	290,7	4,76
920		20	10		0,42	1,35	0,069	42,4	235,8	2,38
910		30	10		0,64	1,35	0,081	49,7	201,2	1,56
900		40	10		0,85	1,35	0,090	55,3	180,8	1,18
890		50	10		1,06	1,35	0,098	60,2	166,1	0,94
880		60	10		1,27	1,35	0,106	65,1	153,6	0,79
920		10	20		0,21	2,96	0,026	16,0	625,0	4,76
915		15	20		0,32	2,96	0,034	20,9	478,5	3,13
910		20	20		0,42	2,96	0,042	25,8	387,6	2,38
900		30	20		0,64	2,96	0,051	31,3	319,5	1,56
890		40	20		0,85	2,96	0,061	37,5	266,7	1,18
880		50	20		1,06	2,96	0,072	44,2	226,2	0,94

**Çizelge 3.17** Kıvırcık serum PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Co'nun  $K_i$  değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve buna karşılık gelen substrat, Co konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

100 mM Tris Tamponu ( $\mu$ l)	Enzim Çözeltisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Substrat Çözeltisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Co Çözeltisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Küvetteki Toplam Hacim ( $\mu$ l)	Küvetteki Substrat Kons. (mM)	Küvetteki Co Kons. (mM)	$\Delta$ OD (412nm)	Aktivite (U/ml dak)	(1/V) x 10 <sup>4</sup>	1/[S]
900	100	10	40	1050	0,21	1,24	0,043	26,4	378,8	4,76
890		20	40		0,42	1,24	0,051	31,3	319,5	2,38
880		30	40		0,64	1,24	0,062	38,1	262,5	1,56
870		40	40		0,85	1,24	0,075	46,1	216,9	1,18
860		50	40		1,06	1,24	0,089	54,6	183,2	0,94
850		60	40		1,27	1,24	0,104	63,9	157,7	0,79
890		10	50		0,21	3,19	0,016	9,8	1020,4	4,76
880		20	50		0,42	3,19	0,025	15,4	649,4	2,38
870		30	50		0,64	3,19	0,034	20,9	478,5	1,56
860		40	50		0,85	3,19	0,044	27,0	370,4	1,18
850		50	50		1,06	3,19	0,052	31,9	313,5	0,94
840		60	50		1,27	3,19	0,062	38,1	262,5	0,79



**Şekil 3.26** Saflaştırılmış Kıvırcık Serum PON1 Enzimi Aktivitesi Üzerine Mn'in İnhibisyon Etkisi [ $I_1$ ] = 1,35 mM, [ $I_2$ ] = 2,96 mM



**Şekil 3.27** Saflaştırılmış Kıvırcık Serum PON1 Enzimi Aktivitesi Üzerine Co'nun İnhibisyon Etkisi [ $I_1$ ] = 1,24 mM, [ $I_2$ ] = 3,19 mM

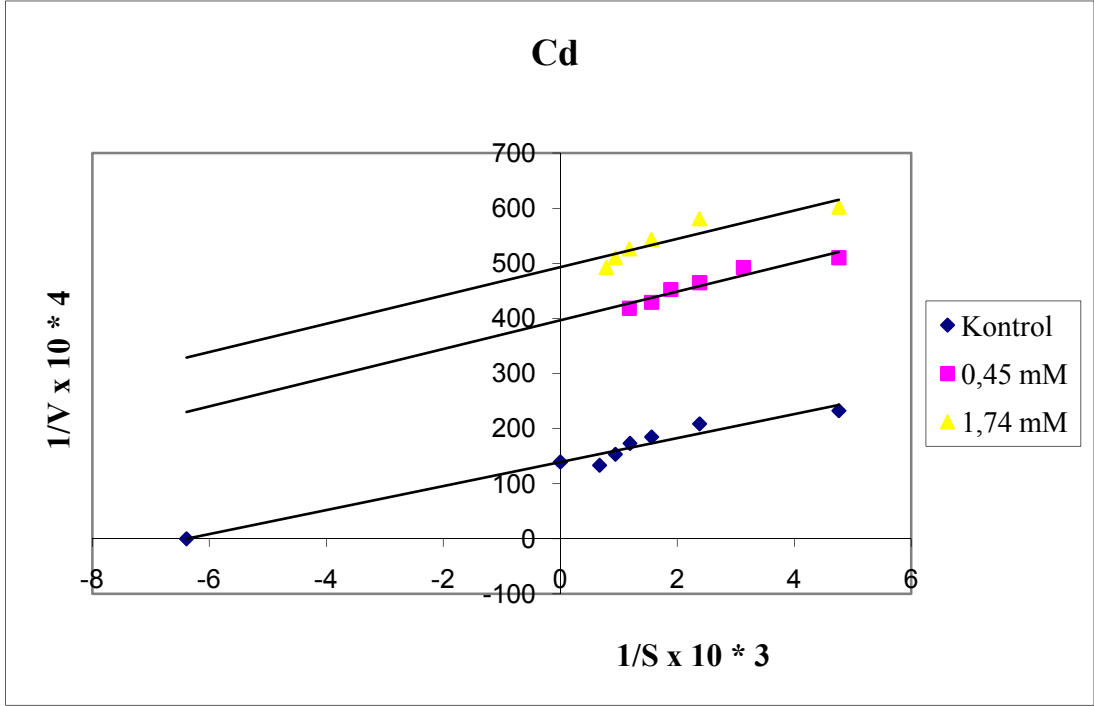
**Çizelge 3.18** Kıvırcık serum PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Cd'un  $K_i$  değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve buna karşılık gelen substrat, Cd konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

100 mM Tris Tamponu ( $\mu$ l)	Enzim Çözeltisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Substrat Çözeltisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Cd Çözeltisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Küvetteki Toplam Hacim ( $\mu$ l)	Küvetteki Substrat Kons. (mM)	Küvetteki Cd Kons. (mM)	$\Delta$ OD (412nm)	Aktivite (U/ml dak)	(1/V) x 10 <sup>4</sup>	1/[S]
860	100	10	80	1050	0,21	0,45	0,032	19,6	510,2	4,76
855		15	80		0,32	0,45	0,033	20,3	492,6	3,13
850		20	80		0,42	0,45	0,035	21,5	465,1	2,38
845		25	80		0,53	0,45	0,036	22,1	452,5	1,89
840		30	80		0,64	0,45	0,038	23,3	429,2	1,56
830		40	80		0,85	0,45	0,039	23,9	418,4	1,18
820		10	120		0,21	1,74	0,027	16,6	602,4	4,76
810		20	120		0,42	1,74	0,028	17,2	581,4	2,38
800		30	120		0,64	1,74	0,030	18,4	543,5	1,56
790		40	120		0,85	1,74	0,031	19,0	526,3	1,18
780		50	120		1,06	1,74	0,032	19,6	510,2	0,94
770		60	120		1,27	1,74	0,033	20,3	492,6	0,79

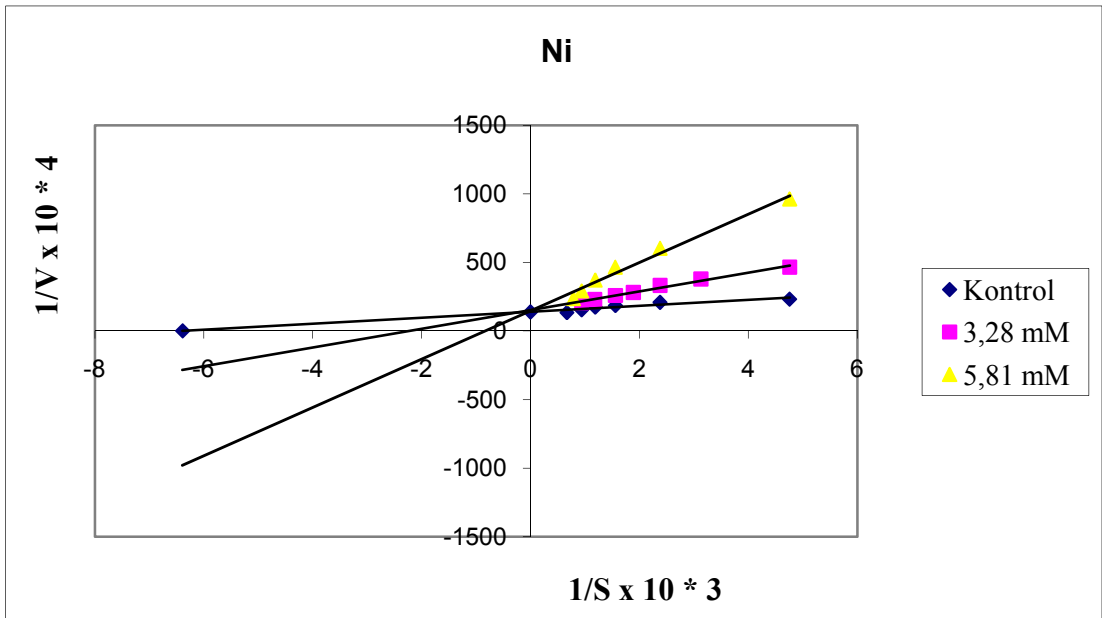
**Çizelge 3.19** Kıvırcık serum PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Ni'in  $K_i$  değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve buna karşılık gelen substrat, Ni konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

100 mM Tris Tamponu ( $\mu$ l)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Ni Çözeltilisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Küvetteki Toplam Hacim ( $\mu$ l)	Küvetteki Substrat Kons. (mM)	Küvetteki Ni Kons. (mM)	$\Delta$ OD (412nm)	Aktivite (U/ml dak)	(1/V) x 10 <sup>4</sup>	1/[S]
900	100	10	40	1050	0,21	3,28	0,035	21,5	465,1	4,76
895		15	40		0,32	3,28	0,043	26,4	378,8	3,13
890		20	40		0,42	3,28	0,049	30,1	332,2	2,38
885		25	40		0,53	3,28	0,058	35,6	280,9	1,89
880		30	40		0,64	3,28	0,063	38,7	258,4	1,56
870		40	40		0,85	3,28	0,071	43,6	229,4	1,18
860		50	40		1,06	3,28	0,079	48,5	206,2	0,94
890		10	50		0,21	5,81	0,017	10,4	961,5	4,76
880		20	50		0,42	5,81	0,027	16,6	602,4	2,38
870		30	50		0,64	5,81	0,035	21,5	465,1	1,56
860		40	50		0,85	5,81	0,044	27,0	370,4	1,18
850		50	50		1,06	5,81	0,056	34,4	290,7	0,94
840		60	50		1,27	5,81	0,069	42,4	235,8	0,79





**Şekil 3.28** Saflaştırılmış Kıvrıcık Serum PON1 Enzimi Aktivitesi Üzerine Cd'un İnhibisyon Etkisi  $[I_1] = 0,45 \text{ mM}$ ,  $[I_2] = 1,74 \text{ mM}$



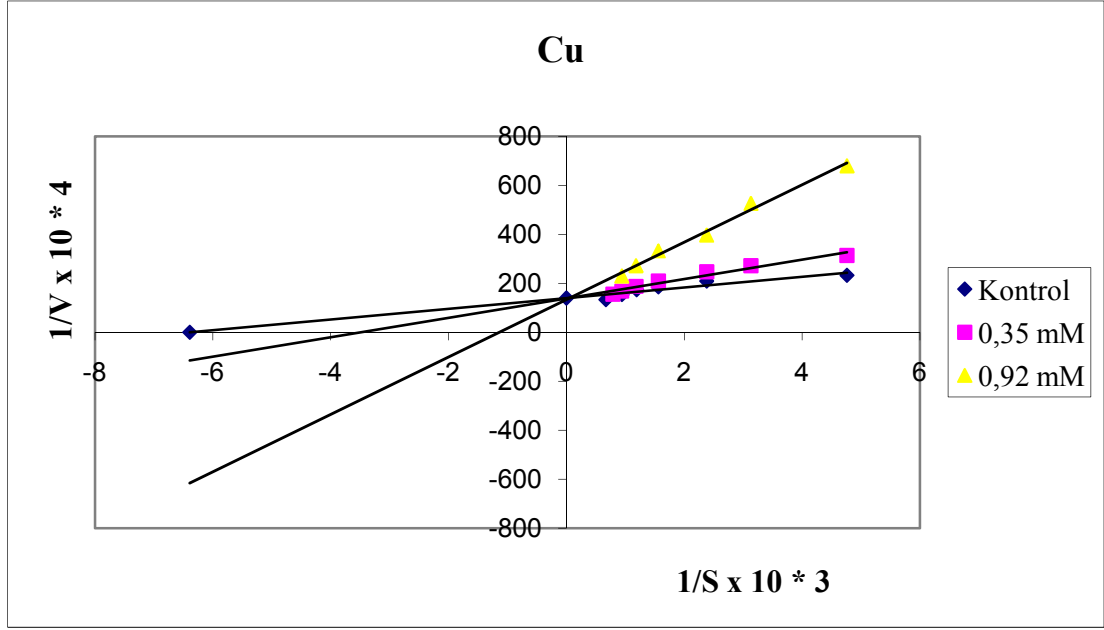
**Şekil 3.29** Saflaştırılmış Kıvrıcık Serum PON1 Enzimi Aktivitesi Üzerine Ni'in İnhibisyon Etkisi  $[I_1] = 3,28 \text{ mM}$ ,  $[I_2] = 5,81 \text{ mM}$

**Çizelge 3.20** Kıvırcık serum PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Cu'ın  $K_i$  değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve buna karşılık gelen substrat, Cu konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

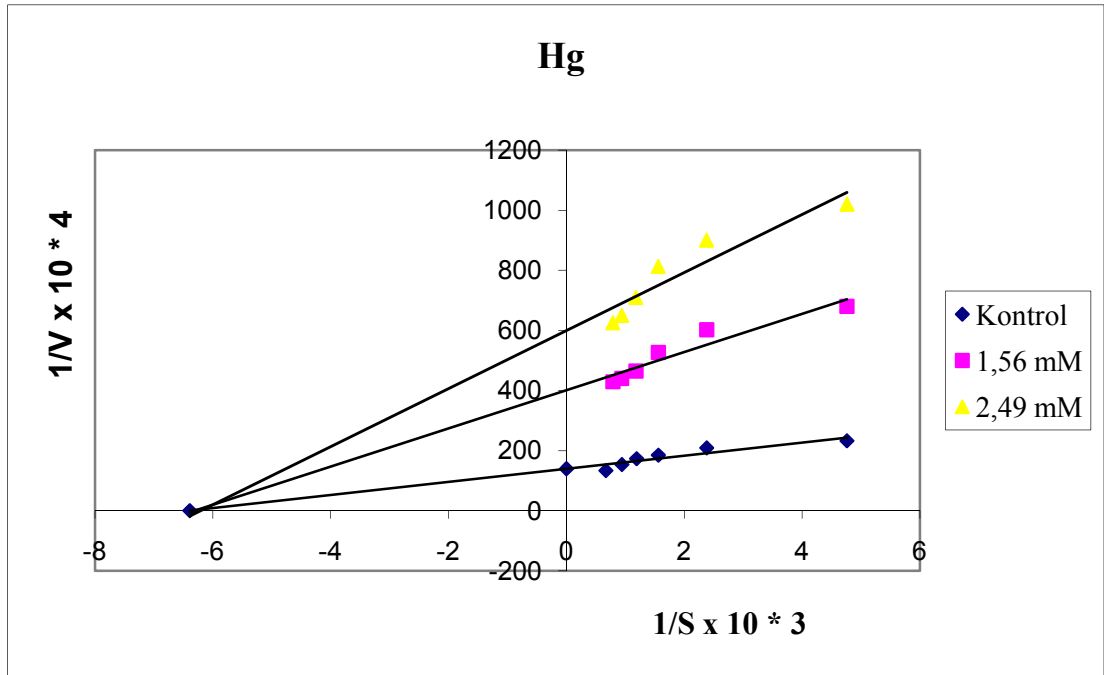
100 mM Tris Tamponu ( $\mu$ l)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Cu Çözeltilisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Küvetteki Toplam Hacim ( $\mu$ l)	Küvetteki Substrat Kons. (mM)	Küvetteki Cu Kons. (mM)	$\Delta$ OD (412nm)	Aktivite (U/ml dak)	(1/V) x 10 <sup>4</sup>	1/[S]
920	100	10	20	1050	0,21	0,35	0,052	31,9	313,5	4,76
915		15	20		0,32	0,35	0,060	36,8	271,7	3,13
910		20	20		0,42	0,35	0,066	40,5	246,9	2,38
900		30	20		0,64	0,35	0,078	47,9	208,8	1,56
890		40	20		0,85	0,35	0,087	53,4	187,3	1,18
880		50	20		1,06	0,35	0,097	59,6	167,8	0,94
870		60	20		1,27	0,35	0,105	64,5	155,0	0,79
910		10	30		0,21	0,92	0,024	14,7	680,3	4,76
905		15	30		0,32	0,92	0,031	19,0	526,3	3,13
900		20	30		0,42	0,92	0,041	25,2	396,8	2,38
890		30	30		0,64	0,92	0,049	30,1	332,2	1,56
880		40	30		0,85	0,92	0,060	36,8	271,7	1,18
870		50	30		1,06	0,92	0,071	43,6	229,4	0,94

**Çizelge 3.21** Kıvırcık serum PON1 enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Hg'nın  $K_i$  değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve buna karşılık gelen substrat, Hg konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

100 mM Tris Tamponu ( $\mu$ l)	Enzim Çözeltisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Substrat Çözeltisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Hg Çözeltisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Küvetteki Toplam Hacim ( $\mu$ l)	Küvetteki Substrat Kons. (mM)	Küvetteki Hg Kons. (mM)	$\Delta$ OD (412nm)	Aktivite (U/ml dak)	(1/V) x 10 <sup>4</sup>	1/[S]
930	100	10	10	1050	0,21	1,56	0,024	14,7	680,3	4,76
920		20	10		0,42	1,56	0,027	16,6	602,4	2,38
910		30	10		0,64	1,56	0,031	19,0	526,3	1,56
900		40	10		0,85	1,56	0,035	21,5	465,1	1,18
890		50	10		1,06	1,56	0,037	22,7	440,5	0,94
880		60	10		1,27	1,56	0,038	23,3	429,2	0,79
920		10	20		0,21	2,49	0,016	9,8	1020,4	4,76
910		20	20		0,42	2,49	0,018	11,1	900,9	2,38
900		30	20		0,64	2,49	0,020	12,3	813,0	1,56
890		40	20		0,85	2,49	0,023	14,1	709,2	1,18
880		50	20		1,06	2,49	0,025	15,4	649,4	0,94
870		60	20		1,27	2,49	0,026	16,0	625,0	0,79



**Şekil 3.30** Saflaştırılmış Kıvırcık Serum PON1 Enzimi Aktivitesi Üzerine Cu'ın İnhibisyon Etkisi [ $I_1$ ] = 0,35 mM, [ $I_2$ ] = 0,92 mM



**Şekil 3.31** Saflaştırılmış Kıvırcık Serum PON1 Enzimi Aktivitesi Üzerine Hg'nin İnhibisyon Etkisi [ $I_1$ ] = 1,56 mM, [ $I_2$ ] = 2,49 mM

**Çizelge 3.22** Merinos ve kıvırcık serum PON1 enzimleri için 2mM paraokson substrat konsantrasyonunda %50 inhibisyona sebep olan ağır metallerin konsantrasyonları ve Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan inhibisyon tipleri ve  $K_i$  değerleri

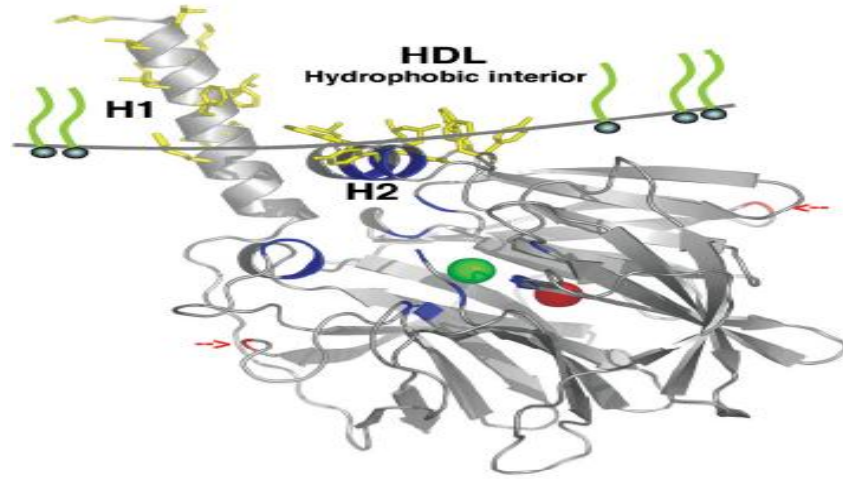
	<b>Ağır Metal</b>	<b><math>I_{50}</math> (mM)</b>	<b><math>K_i</math> (mM)</b>	<b>İnhibisyon Türü</b>
<b>Merinos</b>	Cu	0,747	0,397	Yarışmalı
	Hg	1,810	5,445	Yarışmasız
	Ni	3,390	2,820	Yarışmalı
	Cd	2,840	4,015	Yarı Yarışmalı
	Co	2,050	4,440	Yarışmalı
	Mn	5,140	4,469	Yarışmalı
<b>Kıvırcık</b>	Cu	0,530	0,319	Yarışmalı
	Hg	2,140	0,768	Yarışmasız
	Ni	4,220	1,200	Yarışmalı
	Cd	0,980	0,479	Yarı Yarışmalı
	Co	1,810	0,649	Yarışmalı
	Mn	1,980	1,668	Yarışmalı

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Paraoksonaz enziminin aktivitesi ağır metaller (Ni, Co vs.) tarafından olumsuz bir şekilde etkilenmektedir. Bu nedenle çevresel kirlilik, hem insan hem de hayvan sağlığı açısından önem arz etmektedir.

Bu çalışmada, detoksifikasyon ve antioksidan aktivitesi ile metabolizmada önemli fizyolojik fonksiyona sahip PON1 enziminin hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılması için Sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin kimyasal yapısına sahip bir jel kullanılmıştır. Merinos ve kıvırcık koyun serumundan saflaştırılan PON1 enziminin kinetik ve elektroforetik özellikleri incelenmiştir.

PON1 enziminin hidrofobik karakteri bu tekniğin seçilmesinde en önemli sebeplerden biri olmuştur. Söz konusu enzim, N-terminal bölgesinde bulunan H<sub>1</sub> ve H<sub>2</sub> heliks yapısı olarak isimlendirilen hidrofobik yapılar ile HDL'ye bağlanmaktadır (Şekil 4.1) [45, 20, 46]. N-terminal bölgesini, lösin, fenil alanin, prolin, izolösin, tirozin, triptofan ve valin gibi aminoasitleri ihtiva eden 7-18 rezidüler arası H<sub>1</sub> hidrofobik ucu, 185-202 rezidüler arası da H<sub>2</sub> hidrofobik ucu oluşturmaktadır. Ayrıca PON1'in hidrofobik yüzeyi ile HDL arasında triptofan, tirozin ve lisin aminoasitlerince zengin aromatik ve kısmen hidrofilik bölge bulunmaktadır [39, 47 ].



**Şekil 4.1** PON1 Enziminin HDL Yüzeyine Bağlanma Modeli [18]

Hidrofobik etkileşim kromatografisinde kullanılan jel, ardışık üç basamakta sentezlenmiştir. Önce matriks olarak seçilen Sepharose-4B, CNBr ile aktifleştirildi ve buna uzantı kolu olarak L-tirozin bağlandıktan sonra, diazolanmış 1-naftilamin bileşiği katıldı. Sepharose-4B'nin matriks olarak seçilmesinin başlıca sebebi, çok iyi bir akış özelliğine sahip olması ve ayrıca serbest -OH grupları taşıdığından, CNBr ile çok kısa bir süre içerisinde aktifleştirilebilmesidir. Bu amaçla literatürde karbodiimid bileşiklerinin de kullanıldığı bildirilmektedir [48]. Karbodiimid ile aktifleştirilmiş matrikse primer amin grubunun bağlanması ile amid bağı oluşmaktadır. Bu bağ kromatografi işlemlerinde dayanıklı bir bağıdır. Fakat aktifleştirilme sırasında jel, pH 4,5'de 24 saat süre ile karıştırılmaktadır. Bu işlem kromatografi sırasında jelin akış özelliklerini olumsuz yönde etkilemektedir [48]. Bir başka aktifleştirme işleminde epoksi bileşiklerinden yararlanılmıştır [49]. Kromatografi işlemlerinde gayet dayanıklı olan bu yapılar, 16 saat aktifleştirme ve 16 saat ligand bağlanma süresi olmak üzere toplam 32 saatte gerçekleşmektedir. pH'nın 10 civarında olması, jelin kimyasal yapısını etkilememesine rağmen uzun süren karıştırma işlemleri, polisakkarit partiküllerinin fiziksel yapısının deformasyonuna sebep olabilir. Sonuç olarak, hazırlanacak hidrofobik jelin akış özellikleri olumsuz yönde etkilenecektir. Çalışmamızda kullanılan CNBr ile aktifleştirme işlemi sadece 5 dakikada gerçekleşmektedir. Böylece jelin fiziksel yapısındaki deformasyon sakıncaları ortadan kaldırılmıştır.

Araştırmamızda matriks olarak seçilen Sepharose-4B'ye hidrofobik ligand (1-Naftilamin) L-tirozin bileşiği aracılığı ile immobilize edilmiştir. Burada L-tirozin uzantı kolu olarak da görev yapmaktadır. Uzantı kolunun hidrofobik etkileşim kromatografisindeki önemi afinite kromatografisinde olduğu gibi [50] açıkça belirtilmemesine rağmen, hidrofobik etkileşimde de L-tirozin bileşiğinin önemli olduğu kanaatindeyiz. Ayrıca ligantın matrikse bağlanmasında da son derece uygun bir adaptör molekül olması, L-tirozinin bir başka kullanım sebebidir.

Bu kromatografinin temel prensibi, yüksek tuz konsantrasyonunda saflaştırılacak biyomolekülde bulunan hidrofobik yüzey ile apolar ligand arasındaki hidrofobik etkileşimdir. Bu etkileşimin gerekçesi artan entropi ile açıklanmaktadır. Kullanılacak ligantın hidrofobik karakteri kritik bir öneme sahiptir. Düşük hidrofobik karaktere sahip ligandlar kullanıldığı zaman ayrılacak moleküllerin kolonda etkileşimini sağlayabilmek için yüksek tuz konsantrasyonu uygulama zorunluluğu vardır. Bu durumda proteinlerin kendi aralarında hidrofobik etkileşim riski daha fazladır. Yüksek hidrofobik karaktere sahip ligand tercih edildiği durumda ise saflaştırılacak molekül ile ligand arasındaki etkileşim artacağı için elüsyon sırasında problemler ortaya çıkabilir. Genellikle ticari olarak bulunan hidrofobik etkileşim kromatografi jellerinde hidrofobik uç olarak düz zincirli alkil ligandları ve aril ligandları gibi moleküller kullanılmaktadır. Bunlardan izopropil, bütül, oktil ve fenil bileşikler en çok tercih edilen ligandlardır. En popüler hidrofobik etkileşim jelinin fenil-sepharose olduğu literatürde görülmektedir [50]. Düz zincirli alkil ligandları saf hidrofobik karakter gösterirken, aril ligandlarında hem hidrofobik hem de aromatik etkileşimler gözlenir. Bu amaçla çalışmamızda ligand olarak 1-Naftilamin bileşiği kullanılmıştır. PON1 enziminin H1 ve H2 bölgelerinde fenil alanin, tirozin, triptofan gibi aromatik rezidülerin bulunması tarafımızdan seçilen ligandın söz konusu bölgelerle hem hidrofobik hem de aromatik etkileşim yapacağı göz önüne alınmış ve daha önceden yapılan çalışmalar ve literatür bilgisiyle bu düşünce desteklenmiştir.

Hidrofobik etkileşim kromatografisinde kullanılan tuzun tipi ve konsantrasyonu da oldukça önemlidir. Bu kromatografide yaygın olarak kullanılan



tuzlar  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NaBr}$ ,  $\text{NaSCN}$  olmasına rağmen amonyum sülfat en çok tercih edilendir [51].

Araştırmamızda PON1 enzimini merinos ve kıvırcık serumundan saflaştırmak için hidrofobik etkileşim kromatografisi uygulamadan önce bu kromatografi prosedürüne uygun ön saflaştırma yöntemi olarak amonyum sülfat çöktürmesi yapılmıştır. Amonyum sülfat çöktürme aralığı %60-80 olarak literatürdeki gibi gerçekleştirilmiştir [1]. Bu yöntemle PON1 enzimi merinos koyun serumundan 462,7 kat, kıvırcık koyun serumundan ise 461,7 kat saflaştırılmıştır.

Ayrıca PON1 enzimi sıçan karaciğer ve serumundan saflaştırılmıştır [52]. Enzimin serumdan ve karaciğerden saflaştırma basamaklarında kısmen farklılık bulunmaktadır. Serumdan HDL'ye bağlı olan PON1'in izolasyonunda, Cibacron blue 3GA ve daha sonra değişik DEAE bio gel, DEAE Sepharose CL-6B, DEAE-selüloz, Sephadex G-75, DEAE Trisakril M gibi kromatografi yöntemleri kullanılmıştır [11, 52].

Araştırmamızda saflaştırılan enzim için SDS-PAGE uygulanmıştır. Molekül ağırlığı yaklaşık 43 kDa olarak tahmin edilen merinos ve kıvırcık PON1 enzimleri tek bant olarak SDS-PAGE jelinde gözlenmiştir. Bu değer literatürle uygunluk göstermektedir. PON1'in minimum molekül ağırlığını Gan ve arkadaşları 43 kDa olarak belirlemişlerdir [11]. Çünkü enzimin yapısında, toplam molekül ağırlığının %15.8'i kadar karbohidrat molekülü bulunmaktadır. Molekül ağırlığı taşıdığı karbohidrat zincirinin varlığına bağlı olarak değişmektedir [52]. İhtiva ettiği bu karbohidrat zinciri enzimin hidrolizleme reaksiyonu için gerekli değildir. Söz konusu molekülün PON1'in çözünürlüğünü ve kararlılığını arttırmada ve zar yapısına bağlanmada görevi olduğu düşünülmektedir [53]. Karbohidrat içermeyen PON1 enziminin molekül ağırlığı 37 kDa'dur [52]. Ayrıca PON1 serumda HDL'ye bağlı olduğu bölgelerin yakınında bulunan proteinler (Apo A1) ile bir arada saflaştırabilmektedir. Bu durumda molekül ağırlığının 47-54 kDa olduğu rapor edilmiştir [54]. PON1 enziminin molekül ağırlığı türden türe değişmemekte ve insan PON1 enziminin molekül ağırlığı ile tavşan, sıçan ve koyunun PON1 enziminin molekül ağırlığı benzerlik göstermektedir [52, 55].

Sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin yapılı jel kullanılarak saflaştırılan merinos ve kıvrıcık serum paraoksonaz enzimlerinin kinetik sabitleri ( $K_M$  ve  $V_{max}$ ) optimum pH ve sıcaklıkta [56] paraokson substratı kullanılarak belirlenmiştir. Lineweaver-Burk grafiklerinden elde edilen  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri sırasıyla merinos PON1 enzimi için 0,482 mM ve 41,348 U/mL'de, kıvrıcık PON1 enzimi için 0,153 mM ve 70,289 U/mL'de olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda seçtiğimiz ağır metallerin, merinos ve kıvrıcık serumundan saflaştırılan PON1 enzimi üzerindeki *in vitro* etkisi araştırılmıştır. İnhibisyona neden olan ağır metallerin inhibisyon etkisi  $K_i$  ve  $I_{50}$  olmak üzere iki farklı değerle verilebilir. En uygun parametre  $K_i$  sabitleridir. Çünkü Materyal ve Yöntem'de belirtildiği gibi  $K_i$  sabitinin belirlenmesi için en az iki sabit inhibitör konsantrasyonunda çalışmalar yapılmakta ve her bir sabit inhibitör konsantrasyonunda farklı substrat konsantrasyonları için hız değerleri belirlenmektedir. Bunun sonucu olarak çok hassas sonuçlar elde edilmektedir [57]. Ayrıca bu yöntemle inhibisyon mekanizması saptanmaktadır. Fakat bazı araştırmacıların inhibisyon etkisini tespit etmek için  $I_{50}$  değerini de kullandıkları bilinmektedir. Bu amaçla substrat konsantrasyonları sabit tutularak, değişik inhibitör konsantrasyonlarında, yüzde aktiviteler belirlenmekte ve daha sonra grafik yolu ile %50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonu hesaplanmaktadır. Bu yöntem,  $K_i$  sabitinin tespit edilmesine göre daha az hassas olmasına rağmen, uygulaması daha kolay olduğu için pratikte kullanılmaktadır. Yukarıdaki sebepler göz önüne alınarak hem  $K_i$  hem de  $I_{50}$  değerleri merinos ve kıvrıcık serumundan saflaştırılan PON1 enzimleri için tespit edilmiştir.

Farklı ağır metallerin  $I_{50}$  değerlerini bulmak için optimum şartlarda paraokson substratının 2 mM sabit konsantrasyonunda çalışıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.8-3.19 ve Çizelge 3.5-3.10'da verildi.

Uygulanan ağır metaller içinde, 0,747 mM gibi çok düşük bir konsantrasyonda aktiviteyi %50 azaltması nedeniyle merinos koyun ırkı için ve 0,530 mM gibi çok düşük bir konsantrasyonda aktiviteyi %50 azaltması nedeniyle kıvrıcık koyun ırkı için Cu metali en güçlü inhibitör olarak tespit edilmiştir.

Ağır metallerden Mn'n merinos koyun ırkı için yüksek konsantrasyonda (5,140 mM) ancak %50 inhibisyona neden olduğu bulunmuştur. Yine çalışılan ağır metallere içinde Ni'n kıvrıcık koyun ırkı için yüksek konsantrasyonda (4,220 mM) %50 inhibisyon etkisine ulaştığı saptanmıştır.

Kullanılan ağır metallere inhibisyon mekanizmasını belirlemek amacı ile sabit inhibitör ve farklı substrat konsantrasyonunda PON1 enzim aktivitesi hesaplanmıştır. Lineweaver-Burk grafiklerinden yararlanılarak inhibisyon mekanizmaları ve  $K_i$  değerleri bulunmuştur. İnhibisyon etkisi gösteren ağır metallere merinos ve kıvrıcık ırkları için Co, Mn, Ni ve Cu yarışmalı türü inhibisyon, Cd yarı yarışmalı türü inhibisyon ve Hg da yarışmasız türü inhibisyon etkisi göstermiştir.

Yapılan pek çok çalışmada çeşitli maddelerin serum ve karaciğer PON1 enziminin inhibisyonuna neden olduğu bulunmuştur [58, 59, 60, 61]. Örneğin insan karaciğerinden saflaştırılan PON1 enzimi üzerinde EDTA bileşiğinin,  $Mg^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Ba^{+2}$ ,  $La^{+3}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Hg^{+2}$  gibi metallere ve p-hidroksiciva benzoatın inhibisyon etkisi araştırılmıştır. EDTA, baryum, lantan, bakır ve p-hidroksiciva benzoat bileşiğinin yarışmalı bir inhibisyona neden olduğu ve çinkonun ise yarışmasız bir inhibisyon etkisi gösterdiği bulunmuştur [62].

A.Pla ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada rat karaciğerinden saflaştırılmış PON1 ve PON3 üzerinde bazı ağır metal iyonlarının inhibisyon etkisi incelenmiştir. Yapılan bu çalışmada Co, Cu, Mn ve Hg'nin inhibisyon tipleri tespit edilmiş olup PON1 için Hg'nin PON3 için Cu'n en kuvvetli inhibitör olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu inhibitörlere karşı duyarlılık açısından PON1 ve PON3'ün kantitatif ve kalitatif farklar gösterdiği bulunmuştur. Saflaştırılan PON1 için, inhibisyon gücü kuvvetliden zayıfa doğru sıralandığında  $Hg^{+2} > Co^{+2} > Mn^{+2} > Cu^{+2}$  olarak hesaplanmıştır [63].

Bir başka çalışmada Hg, Cu ve Ni tuzlarının düşük konsantrasyonda PON1 aktivitesini inhibe etmesini, katalitik merkezdeki bir tiol grubu ile etkileşme sonucu olduğunu öne sürmüşlerdir [64].

Sonuç olarak yapılan çalışmalarda aşağıdaki bulgular elde edilmiştir:

- ✓ Merinos ve kıvrıcık serum PON1 enzimlerini saflaştırmak için Sepharose-4B-L-Tirozin-1-naftilamin kimyasal yapısına sahip bir hidrofobik etkileşim kromatografisi jeli sentezlenmiştir.
- ✓ Sepharose-4B-L-Tirozin-1-naftilamin yapısına sahip hidrofobik jel kullanılarak merinos ve kıvrıcık koyun serumundan PON1 enzimleri yüksek oranda saflaştırılmıştır.
- ✓ Amonyum sülfat çöktürmesi ve hidrofobik etkileşim kromatografisi yöntemi ile saflaştırılan merinos ve kıvrıcık serum PON1 enzimlerinin SDS-PAGE elektroforezinde yaklaşık olarak 43 kDa molekül ağırlığında tek bant elde edilmiştir.
- ✓ Yaygın olarak kullanılan ağır metallere  $Hg^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$  ve  $Ni^{+2}$  merinos ve kıvrıcık serum PON1 enzim aktivitesini *in vitro* olarak farklı düzeyde etkilediği saptanmıştır.
- ✓  $Hg^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$  ve  $Ni^{+2}$  ağır metallerinin Sepharose-4B-L-Tirozin-1-naftilamin yapısına sahip hidrofobik jel ile saflaştırılan merinos ve kıvrıcık serum PON1 enzim aktiviteleri üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu bileşiklerin hepsinin farklı derecede inhibisyon etkisi gösterdiği saptanmıştır.
- ✓ İnhibisyona sebep olan ağır metallerin inhibisyon mekanizmaları saptanmıştır. Elde edilen veriler ışığında kıvrıcık koyun ırkının ağır metallere karşı daha dirençli bir ırk olduğu düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

- [1] Sinan, S., Kockar, F., Arslan O. "Novel purification strategy for human PON1 and inhibition of the activity by cephalosporin and aminoglikozide derived antibiotics", *Biochimie*, Volume 88, Issue 5, May (2006), 565-574.
- [2] Elana, T., Elana, M., Magdalena G., Isabel L., Ana M. P. "Effects of caloric restriction and gender on rat serum paraoxonase 1 activity", *Journal of Nutritional Biochemistry*, 17, (2006), 197-203.
- [3] E. Azarsız, E.Y.S., Paraoksonaz ve Klinik Önemi, *Türk Biyokimya Dergisi*, 25(3), (2000), 109-119.
- [4] Durrington, P.N., Mackness, B., Mackness M.I., "Paraoxonase and Atherosclerosis", *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 21, (2001), 473-480.
- [5] Carey J. Ng, D.M.S., Y. Hama, S., Villa, N., Navab, M, Reddy, S.T., "The Paraoxonase Gene Family and Atherosclerosis". *Free Radical Biology & Medicine*, 38, (2005), 153-163.
- [6] Ekiz B., Yilmaz A., Ozcan M., Kaptan C., Hanoglu H., Erdogan I., Yalcintan H., "Carcass measurements and meat quality of Turkish Merino, Ramlic, Kivircik, Chios and Imroz lambs raised under an intensive production system", *Meat Science*, 82, (2009), 64-70.
- [7] Erden, M.S.T.İ., ST Elevasyonlu Miyokard İnfarktüsü (Stemi) Hastalarda İnsan Paraoxonase Geni Met-Leu/55 Polimorfizmi, Dr. Siyami Ersek Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Merkezi, İstanbul, (2004).
- [8] Mackness, B., Durrington, P.N., Mackness M.I, "Human Serum Paraoxonase". *Gene Pharmacy*, 31(3) , (1998), 329-36.
- [9] Liang, H.-L.L.D.-P.L.C.C., "Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress and diseases", *J Mol Med*, 81, (2003), 766-779.
- [10] Mackness, B., Durrington, P.N., Mackness M.I., "The Paraoxonase Gene Family And Coronary Heart Disease", *Current Opinion in Lipidology*, 13, (2002), 357-362.
- [11] Gan, K.N., Smolen A., Eckerson HW, La Du BN., "Purification of Human Paraoxonase/Arylesterase, Evidence for One Esterase Catalyzing Both Activities", *Drug Metab. Dispos.*, 19(1), (1991), 100-6.
- [12] Mackness M.I., Mackness, B., Paul N.Durrington, W.Connelly, P., Hegele, R.A., "Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma

- lipoproteins". *Current Opinion in Lipidology*, 7, (1996), 69-76.
- [13] Jawad, Z., Paoli M., "Noval Sequences Propel Familiar Folds", *Structure*, 10, (2002), 447-454.
- [14] Kuo, C.L., La Du, B.N., "Calcium binding by human and rabbit serum paraoxonases. Structural stability and enzymatic activity", *Drug Metab. Dispos.*, 26, (1998), 653-60.
- [15] Scharff, E.I., Koepke, J., Fritzch, G., Lucke, C.&Ruterjans, H., "Crystal structure of diisopropylfluorophosphatase from *Loligo vulgaris*", *Structure*, 9, (2001), 493-502.
- [16] Fokine, A.e.a., "Direct Phasing at Low Resolution of A Protein Copurified With Human Paraoxonase (PON1)", *Acta Crystallogr. D.*, 59, (2003), 2083-87.
- [17] Josse, D.e.a., "Oligometric States of The Detergent-Solubilized Human Serum Paraoxonase (PON1)", *J. Biol. Chem.*, 277, (2002), 33386-97.
- [18] Harel, M., Aharoni, A., Gaidukov, L., Brumshtein, B., Khersonsky, O., Meged, R., Dvir, H., Ravelli, R.B.G., McCarthy, A., Toker, L., Silman, I., Sussman, J.L. and Dan S. Tawfik,, "Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and antiatherosclerotic enzymes", *Nature Structural & Molecular Biology*, (2004), 412-419.
- [19] Du, I.D.B.N.L., "Pharmacogenetics of paraoxonase: a brief review", *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 369, (2004), 78-88.
- [20] Harel, M., Aharoni, A., Gaidukov, L., Brumshtein, B., Khersonsky, O., Meged, R., Dvir, H., Ravelli, R.B.G., McCarthy, A., Toker, L., Silman, I., Sussman, J.L. and Dan S. Tawfik, "Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes", *Nature Struct. Mol. Biol.*, 11, (2004), 412.
- [21] Draganov, D.I., La Du, B.N., "Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review", *Nauyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 369, (2004), 78.
- [22] Lusis, A.J., "Atherosclerosis", *Nature*, 407, (2000), 233.
- [23] Mackness, B., Davies, G.K., Turkei, W., Lee, E., Roberts, D.H., Hill, E., Roberts, C., Durrington, P.N. and Mackness, M.I., "Paraoxonase Status in Coronary Heart Disease", *Arteroscler Thromb. Vasc. Biol.*, 21, (2001), 1451.
- [24] Billecke, S., Draganov, D., Councell, R., Stetson, P., Watson, C., Hsu, C., La Du, B.N., "Human serum paraoxonase (PON1) isozymes Q and R hydrolyse lactones and cyclic carbonate esters", *Drug Metab. Dispos.*, 28(11), (2000), 1335.

- [25] Biggadike, K., Angell, R.M., Burgess, C.M., Farrell, R.M., Hancock, A.P., Harker, A.J., Irving, W.R., Ioannou, C., Panayiotis, A., Procopiou, P.A., Shaw, R.E., Solanke, Y.E., Singh, O.M.P., Snowden, M.A., Stubbs, R.J., Walton, S., Weston, H.E., "Selective plasma hydrolysis of glucocorticoid lactones and cyclic carbonates by the enzyme paraoxonase: An ideal plasma inactivation mechanism", *J.Med.Chem.*, 43, (2000), 19.
- [26] Teiber, J.F., Draganov, D.I., La Du, B.N., "Lactonase and Lactonizing of Human Serum Paraoxonase (PON1) and Rabbit Serum PON3", *Biochemical Pharmacology*, 66, (2003), 887.
- [27] La Du, B.N., Human serum paraoxonase/arylesterase, In *Pharmacogenetics of Drug Metabolism*, ed. Kalow, W., Pergamon Pres, New York, (1992), 51.
- [28] Costa, L.G., Li, W.F., Richter, R.J., "PON1 and organophosphate toxicity", (2002), 165-83.
- [29] Broomfield, C.A., and Ford, K.W., "Hydrolysis of nerve gasses by plasma enzymes", *Proceedings of the 3rd International Meeting on Cholinesterases*, La Grande-Motte, France, (1991), 167.
- [30] Davies, H.G., Richter, R.J., Keifer, M., Broomfield, C.A., Sowalla, J. Furlong, C.E., "The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin", *Nature Genetics*, 14, (1996), 334.
- [31] Reiner, E., Aldridge, W.N., Hoskin, F.C.G., *Enzymes Hydrolyzing Organophosphorus Compounds*, John Wiley & Sons, New York, (1989).
- [32] Baillie, T.A., Moldeus, P., Mason, R.P. Younes, M., *Enzymes Interacting with Organophosphorus Compounds*, Elsevier Scientific Publishers Ireland Ltd, Shannon, (1993).
- [33] Eckerson, H.W., Wyte, C.M., La Du, B.N., "The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism", *Am. J. Hum. Genet.*, 35, (1983), 1126.
- [34] Sorenson, R.C., Primo-Parmo, S.L., Kuo, C.L., Adkins, S., Lockridge, O., La Du, B.N., "Reconsideration of the catalytic center and mechanism of mammalian paraoxonase/arylesterase", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, (1995), 7187.
- [35] Altinel A., Güneş H., Yılmaz A., Kırmızıbayrak T., Akgündüz V., "Comparison of the important production traits of turkish merino and indigenous kivrık sheep breeds", *İ.Ü. Veteriner Fakültesi Zooteknik Anabilim Dalı*, 34851, Avcılar/İstanbul. Marmara Hayvancılık Araştırma Enstitüsü, Bandırma, (2000)
- [36] Topçu, S., *Tarım Mühendisliğinde Çevre Sorunları*. Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Genel Yayın No: 207 Ders Kitapları Yayın No: A-65, (1998), 269.

- [37] Çepel, N., Toprak kirliliği Erozyon ve Çevreye Verdiği Zararlar. Türkiye Erozyonla Mücadele, Ağaçlandırma ve Doğal Varlıkları Koruma Vakfı Yayın 14, (1997), 3-35.
- [38] Rai, U.N., Tripathi, R.D., Vajpayee, P., Bioaccumulation of Toxic Metals (Cr, Cd, Pb and Cu) by Seeds of *Euryale Ferox* Salisb. (Makhana). *Chemosphere* 46, (2002), 267-272.
- [39] Ceran, M., Kayseri İl Çevre Durum Raporu, (2004), 53-61.
- [40] Pandey, N., Sharma, C.P., Effect of Heavy Metals  $Co_2$ ,  $Ni_2$  and  $Cd_2$  on Growth and Metabolism of Cabbage. *Plant Science* 163, (2002), 753-758.
- [41] <http://www.sauforum.com/ekoloji-ders-notlari-toprak-kirliligi-t1783.html?t=1783>, (2008)
- [42] [http://www.ebilge.com/10352/Civa\\_nedir?\\_Zararlari\\_nelerdir.html](http://www.ebilge.com/10352/Civa_nedir?_Zararlari_nelerdir.html), (2008)
- [43] Bradford, M.M., "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Anal. Biochem.*, 72, (1976), 248-251.
- [44] Laemmli, D.K., "Cleavage of Structural Proteins During in Assembly of the Head of Bacteriophage T<sub>4</sub> Nature", London, 227,(1970), 680.
- [45] Sorensen, R.C.B., C.L. Aviram., M., Hsu, C., Billecke, S., La Du, B. N., "Human serum paraoxonase/arylesterase's retained hydrophobic N-terminal leader sequence associates with HDLs by binding phospholipids: apolipoprotein A-I stabilizes activity", *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 19, (1999), 2214-2225.
- [46] Sorensen, RC., Aviram, M., Bisgaier, CL., Bilicke, S., La Du BN., "Properties of the retained N-terminal hydrophobic leader sequence in human serum paraoxonase/arylesterase", *Chem. Biol. Interact.* 119-120, (1999), 243-249.
- [47] Killian, J.A., Von Heijne, G., "How proteins adapt to a membrane-water interface", *Trends Biochem. Sci.* 25, (2000), 429-434.
- [48] Keha, E.E., Karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması için geliştirilmiş bir afinite kromatografisi metodu, Doçentlik Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Erzurum, (1981).
- [49] Wistrand, P.J., Lindahl, S., Wahlstrand, T., "Human renal carbonic anhydrase. Purification and properties", *Eur J. Biochem.*, 57, (1975), 189.
- [50] Jakoby, B., Wilchek, M., Coupling reaction of ligands and general methodology of affinity chromatography, in *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, (1974).



- [51] Aguiar, J.A.K., Michelacci, Y.M., "Preparation and purification of Flavobacterium heparinum chondroitinases AC and B by hydrophobic interaction chromatography", *Braz J Med Biol Res*, 32(5), (1999), 545-550.
- [52] Furlong, C.E., Richter, R.J., Chapline, C., Crabb, J.W., "Purification of Rabbit and Human Serum Paraoxonase", *Biochemistry*, 30, (1991), 10133.
- [53] Ahoroni, A.e.a., "Directed Evolution of Mammalian Paraoxonases PON1 and PON3 for Bacterial Expression and Catalytic Specialization", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, (2004), 482-487.
- [54] Zimmerman, J.K., Grothusen, J.R., Bryson, P.K., Brown, T.M., Partial purification and characterization of paraoxonase from rabbit serum. In "Enzymes Hydrolyzing Organophosphorus Compounds", Ellis Horwood Ltd., Chichester, UK, (1989), 128-142.
- [55] Rodrigo, L., Gil, F., Hernandez, A.F., Pla, A., "Identification of two rat liver proteins with paraoxonase activity: biochemical evidence for identity of paraoxonase and arylesterase", *Chem. Biol. Interact.*, 263, (1999), 119-120.
- [56] Gülcü, F., Gürsu, MF., "Paraoksonaz ve arilesteraz aktivite ölçümlerinin standardizasyonu", *Turkish Journal of Biochemistry*, 28(2), (2003), 45-49.
- [57] Ozensoy, O., Arslan, O., Sinan, S., "A new method for purification of carbonic anhydrase Isozymes by affinity chromatography", *Biochemistry (Moscow)*, 69(2), (2004), 216.
- [58] Gonzalvo, MC., Gil, F., Hernandez, F., Villanueva, E., Pla, A., "Inhibition of paraoxonase activity in human liver microsomes by exposure to EDTA, metals and mercurials", *Chemico-Biological Interactions*, 105, (1997), 169-179.
- [59] Debord, J., Bollinger, J.C., Merle, L., Dantoine, T., "Inhibition of human serum arylesterase by metal chlorides", *Journal of Inorganic Biochemistry* 94, (2003), 1-4.
- [60] Çiftçi, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., Gündoğdu, M., Özmen, İ., "Effects of Some Antibiotics on Enzyme Activity of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from Human Erythrocyte", *Pharmacol Res.*, (2000), 41, 109.
- [61] Debord, J., Dantoine, T., Bollinger, J.C., Abraham, M.H., Verneuil, B., Merle, L. "Inhibition of arylesterase by aliphatic alcohols", *Chemico-Biological Interactions* 113, (1998), 105-115.
- [62] Pellin, MC., Moretto, A., Lotti, M., Vilanova, E., "Distribution and biochemical properties of rat paraoxonase activity Neurotoxicol Teratol", 12, (1990), 611-614.

[63] Pla, A., Rodrigo, L., Hern'andez, A.F., Gil, F., Lopez, O., "Effect of metal ions and calcium on purified PON1 and PON3 from rat liver", *Chemico-Biological Interactions*, 167, (2007), 63-70.

[64] Erd'os, E.G., Debay, C.R., Westerman, M.P., "Arylesterases in blood: effect of calcium and inhibitors", *Biochem. Pharmacol.*, 5, (1960), 173-186.