

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

**KOYUN SERUM PARAOKSONAZ ENZİMİNİN BAZI PESTİSİTLERE  
KARŞI İLGİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Beste ŞİPAL**

**Balıkesir, Temmuz-2011**

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

KOYUN SERUM PARAOKSONAZ ENZİMİNİN BAZI PESTİSİTLERE  
KARŞI İLGİSİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Beste ŞİPAL

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Semra IŞIK

Sınav Tarihi: 12.07.2011

Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Feray KÖÇKAR (BAÜ)

Yrd. Doç. Nahit GENÇER (BAÜ)

Yrd. Doç. Dr. Semra IŞIK (Danışman-BAÜ)

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

Balıkesir, Temmuz-2011

“Bu çalışma Balıkesir Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından BAP 2011/28 Kodlu Proje ile desteklenmiştir. Teşekkür ederiz.

## ÖZET

### KOYUN SERUM PARAOKSANAZ ENZİMİNİN BAZI PESTİSİTLERE KARŞI İLGİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Beste ŞİPAL  
Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,  
Kimya Anabilim Dalı

(Yüksek Lisans Tezi / Tez Danışmanı :  
Yrd. Doç. Dr. Semra IŞIK)

Balıkesir, 2011

Bu çalışmada, detoksifikasyon ve antioksidan aktivitesi ile metabolizmada önemli fizyolojik fonksiyona sahip paraoksonaz (PON) enzimi Merinos ve Kıvrıcık koyunu kan serumlarından saflaştırılmıştır. Saflaştırmada Sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin hidrofobik etkileşim kromatografisi jeli kullanılmıştır. Sepharose-4B, CNBr ile aktifleştirilmiş ve uzantı kolu olarak L-tirozin bağlanmıştır. Uzantı koluna 1-naftilaminin kenetlenerek hidrofobik etkileşim kromatografisi jeli sentezlenmiştir.

Merinos ve Kıvrıcık koyunu kan serumlarından PON enzimi önce amonyum sülfat ile çöktürülmüştür. Daha sonra sentezlenen Sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin hidrofobik etkileşim kromatografisi jeli ile saflaştırılmıştır. Enzim saflığı SDS-PAGE ile kontrol edilmiştir. Her iki koyun türü için de 66 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 belirlenmiştir. Merinos PON enzimi için  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri 0,482 mM ve 41,348 U/mL'dir, Kıvrıcık PON enzimi için  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri 0,153 mM ve 70,289 U/mL'dir olarak bulunmuştur.

Bu çalışmada, Decis 2,5 EC™, Fosforin M™, Confidor SC 350™, Gibber 20 SI™ bileşiklerinin Merinos ve Kıvrıcık koyunlarının kan serumundan saflaştırılan PON enzimi üzerindeki *in vitro* etkisi belirlenmiştir.

Kıvrıcık koyunundan elde edilen PON enziminin aktivitesi üzerinde % 50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonları sırasıyla Decis 2,5 EC™ için 1.0019 mM, Fosforin M™ için 21.3591 mM, Confidor SC 350™ için 18.4029 mM ve Gibber 20 SI™ için 2.7217 mM olarak bulunmuştur.

Merinos koyunundan elde edilen PON enziminin aktivitesi üzerinde % 50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonları sırasıyla Decis 2,5 EC™ için 1.6552mM, Fosforin M™ için 21.9900 mM, Confidor SC 350™ için 57.5900 mM ve Gibber 20 SI™ için 1.9800 mM olarak bulunmuştur.

**ANAHTAR SÖZCÜKLER:** Paraoksonaz / Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi / İnhibisyon / Pestisit.

## ABSTRACT

### INVESTIGATING THE INTEREST OF SOME PESTICIDES ON SHEEP SERUM PARAOXONASE ENZYME

Beste ŞİPAL

Balikesir University , Institute of Science, Department of Chemistry

(MSc. Thesis / Supervisor : Assist. Prof. Dr. Semra IŞIK)

Balikesir-Turkey, 2011

In this study, paraoxonase enzyme which has an important physiological function in metabolism were purified from Merinos and Kıvırcık blood serum. For purification Sepharose-4B-L-Tyrosine-1-Naphthylamine hydrophobic interaction chromatography gel was used. Sepharose-4B was activated by CNBr and L-Tyrosine was used as a spacer arm. The Hydrophobic Interaction Chromatography Gel was synthesized by coupling 1-Naphthylamine to the spacer arm.

PON enzyme from Kıvırcık and Merinos blood serum was firstly precipitated by ammonium sulfate. Later, it was purified by Sepharose-4B-L-Tyrosine-1-Naphthylamine hydrophobic interaction chromatography gel. Enzyme purity was checked by SDS-PAGE. Molecular weight of the enzyme for both sheep species was found to be approximately 66 kDa with a single band.

$K_m$  and  $V_{max}$  values of Merinos and Kıvırcık PON enzyme against paraoxon substrate were determined by Lineweaver-Burk method.  $K_m$  and  $V_{max}$  values were 0,482 mM and 41,348 U/mLmin for Merinos PON enzyme, 0,153 mM and 70,289 U/mLmin for Kıvırcık PON.

In this study, the *in vitro* effects of Decis 2,5 EC™, Fosforin M™, Confidor SC 350™, Gibber 20 SI™ compounds were determined on purified PON enzyme of Merinos and Kıvırcık sheep species.

Inhibitor concentrations caused 50% inhibition on PON enzyme obtained from Kıvırcık sheep were 1.0019 mM for Decis 2,5 EC™, 21.3591 mM for Fosforin M™, 18.4029 mM for Confidor SC 350™, 2.7217 mM for Gibber 20 SI™.

Inhibitor concentrations caused 50% inhibition on PON enzyme obtained from Merinos sheep were 1.6552 mM for Decis 2,5 EC™, 21.9900 mM for Fosforin M™, 57.5900 mM for Confidor SC 350™, 1.9800 mM for Gibber 20 SI™.

**KEY WORDS:** Paraoxonase / Hydrophobic interaction chromatography / Inhibition / Pesticide.

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
ÖZET, ANAHTAR SÖZCÜKLER	II
ABSTRACT, KEY WORDS	IV
İÇİNDEKİLER	V
SEMBOL LİSTESİ	VII
ŞEKİL LİSTESİ	VIII
ÇİZELGE LİSTESİ	XI
ÖNSÖZ	XIII
1. GİRİŞ	1
1.1 Paraoksonaz Enzimi (PON) (EC. 3.1.8.1)	2
1.1.1 Adlandırılması	3
1.1.2 Paraoksanaz Gen Ailesi	4
1.1.3 PON1 Biyokimyasal Yapısı	5
1.1.4 PON1'in HDL'ye Bağlanması	7
1.1.5 PON1 Sentezlenmesi ve Salgılanması	8
1.1.6 Enzimin Katalitik Mekanizması	9
1.1.7 PON1 Polimorfizmleri	10
1.1.8 PON1'in Fonksiyonel Önemi	15
1.1.9 Hidrolitik Aktivite; Organofosfatlara Karşı Koruma	15
1.1.10 Lipopolisakkarid inaktivasyonu; Bakteriye endotoksinlere karşı Koruma	18
1.1.11 Oksidatif veya Peroksidatif Aktivite; LDL Oksidasyonunun Önlenmesi	19
1.1.12 Enzimin Saflaştırılması	20
1.2 Pestisitler	22
1.2.1 Araştırmada Kullanılan Pestisitler	25
1.2.1.1 Decis 2,5 EC™	25
1.2.1.2 Fosforin M™	26
1.2.1.3 Confidor SC 350™	27

1.2.1.4 Gibber 20 SI™	28
1.2.2 Pestisitlerle İlgili Yapılan Bazı Çalışmalar	29
1.3 Araştırmamızda Kullanılan Koyun Türleri	32
1.4 Araştırmanın Amacı	35
<b>2. MATERYAL VE YÖNTEMLER</b>	<b>36</b>
2.1 Materyaller	36
2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler	36
2.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar	36
2.1.3 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması	37
2.2 Yöntemler	41
2.2.1 Kan serumunun ayrılması	41
2.2.2 Enzim Aktivite Tayini	41
2.2.3 Bradford Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini	41
2.2.4 Enzimin Saflaştırılması	42
2.2.4.1 Amonyum sülfat Çöktürme Aralığının Belirlenmesi	42
2.2.4.2 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Enzimin Saflaştırılması	43
2.2.4.2.1 Sepharose 4B'nin Aktifleştirilmesi	43
2.2.4.2.2 L-tirozinin Bağlanması	43
2.2.4.2.3 1-Naftilamin Bileşiğinin Bağlanması	44
2.2.4.3 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) İle Enzim Saflığının Kontrolü	45
2.2.5 Optimum şartlarda $K_M$ ve $V_{max}$ değerlerinin bulunması	47
2.2.6 Bazı Pestisitlerin $IC_{50}$ Değerlerini Bulunması	47
<b>3. BULGULAR</b>	<b>48</b>
3.1 Enzimin Saflaştırılması	48
3.1.1 Amonyum Sülfat Çöktürmesi	48
3.1.2. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile PON Enziminin Saflaştırılması	48
3.1.3 Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri	50
3.2 Serum Paraoksonaz Enziminin SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi	54
3.3 Optimum şartlarda $K_M$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Bulunması	55
3.4 İnhibisyona Sebep Olan Pestisitlerin $IC_{50}$ Değerlerinin Bulunması	59
<b>4. TARTIŞMA VE SONUÇ</b>	<b>69</b>
<b>5. KAYNAKLAR</b>	<b>77</b>



## SEMBOL LİSTESİ

### Simge

### Adı

---

PON1	Paraoksonaz 1 enzimi
PON2	Paraoksonaz 2 enzimi
PON3	Paraoksonaz 3.enzimi
SDS	Sodyum dodesil sülfat
U	Enzim Ünitesi
$\Delta A$	Absorbans Farkı
HDL	High density lipoprotein
LDL	Low density lipoprotein
E	Enzim
S	Substrat
EC	Enzim kod numarası
IC <sub>50</sub>	%50 İnhibisyona neden olan inhibitör konsantrasyonu
OP	Organo fosfat bileşiği
TEMED	N,N,N', N', -tetrametiletildiamin

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil Numarası	Şekil Adı	Sayfa No.
Şekil 1.1	Paraoksanın kimyasal yapısı	4
Şekil 1.2	Paraoksonaz enzim mekanizması	4
Şekil 1.3	PON1'in üç boyutlu yapısı	7
Şekil 1.4	PON1'in HDL'ye bağlanması	8
Şekil 1.5	Paraoksonazın katalitik mekanizması	10
Şekil 1.6	PON1 enzimi gen polimorfizmleri	12
Şekil 1.7	PON1 enzimi promoter bölgesi polimorfizmleri	14
Şekil 1.8	OP bileşiği genel formülü	16
Şekil 1.9	Sinir gazlarının hidrolizi	17
Şekil 1.10	İnsektisitlerde yaygın olarak kullanılan okson metabolitlerinin hidrolizi	17
Şekil 1.11	Aromatik esterlerin hidrolizi	18
Şekil 1.12	Kıvırcık koyunu	32
Şekil 1.13	Alman Merinos koçları	33
Şekil 1.14	Karacabey Merinos koyunu	33
Şekil 1.15	Türk Merinos Koyunu	34
Şekil 2.1	Sepharose 4B'nin aktiveştirilmesi	43
Şekil 2.2	L-tirozinin Bağlanması	44
Şekil 2.3	1-Naftilamin Bileşiğinin Bağlanması	45

Şekil 3.1	Hidrofobik etkileşim kolonundan Kıvırcık koyun türüne ait PON enziminin elüsyonu	49
Şekil 3.2	Hidrofobik etkileşim kolonundan Merinos koyun türüne ait PON enziminin elüsyonu	50
Şekil 3.3	Kıvırcık koyun türüne ait Bradford yöntemi ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan standart grafik	51
Şekil 3.4	Merinos koyun türüne ait Bradford yöntemi ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan standart grafik	51
Şekil 3.5	Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile Kıvırcık koyun serumundan saflaştırılan paraoksonaz enziminin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi. 2,3 ve 6 saflaştırılan PON.	54
Şekil 3.6	Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile Kıvırcık koyun serumundan saflaştırılan paraoksonaz enziminin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi. 4,5 ve 6 saflaştırılan PON.	54
Şekil 3.7	Saflaştırılmış Merinos serum paraoksonaz enziminin paraoksan substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.	55
Şekil 3.8	Saflaştırılmış Kıvırcık serum paraoksonaz enziminin paraoksan substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği	56
Şekil 3.9	Saflaştırılmış Kıvırcık koyun serum paraoksonaz enzimi üzerine 2mM paraoksan substratı konsantrasyonunda Decis 2,5 EC™ için % aktivite-[I] grafiği	61
Şekil 3.10	Saflaştırılmış Kıvırcık koyun serum paraoksonaz enzimi üzerine 2mM paraoksan substratı konsantrasyonunda Fosforin M™ için % aktivite-[I] grafiği	61
Şekil 3.11	Saflaştırılmış Kıvırcık koyun serum paraoksonaz enzimi üzerine 2mM paraoksan substratı konsantrasyonunda Confidor SC 350™ için % aktivite-[I] grafiği	63

Şekil 3.12	Safılaştırılmış Kıvırcık koyun serum paraoksonaz enzimi üzerine 2mM paraoksan substratı konsantrasyonunda Gibber 20 SI™ için % aktivite-[I] grafiği	63
Şekil 3.13	Safılaştırılmış Merinos koyun serum paraoksonaz enzimi üzerine 2mM paraoksan substratı konsantrasyonunda Decis 2,5 EC™ için % aktivite-[I] grafiği	65
Şekil 3.14	Safılaştırılmış Merinos koyun serum paraoksonaz enzimi üzerine 2mM paraoksan substratı konsantrasyonunda Fosforin M™ için % aktivite-[I] grafiği	65
Şekil 3.15	Safılaştırılmış Merinos koyun serum paraoksonaz enzimi üzerine 2mM paraoksan substratı konsantrasyonunda Confidor için SC 350'nin % aktivite-[I] grafiği	67
Şekil 3.16	Safılaştırılmış Merinos koyun serum paraoksonaz enzimi üzerine 2mM paraoksan substratı konsantrasyonunda Gibber 20 SI™'nin % aktivite-[I] grafiği	67
Şekil 4.1	PON1 enziminin HDL yüzeyine bağlanma modeli	70

## ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge No.	Çizelge Adı	Sayfa No.
Çizelge 1.1	Bazı Pestisitlerin İnsan Sağlığına Etkileri	23
Çizelge 2.1	SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının miktarları	40
Çizelge 3.1	Kıvırcık koyunu için saflaştırma tablosu	52
Çizelge 3.2	Merinos koyun için saflaştırma tablosu	53
Çizelge 3.3	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	57
Çizelge 3.4	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	58
Çizelge 3.5	Kıvırcık koyun Serumundaki PON enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Decis 2,5 EC <sup>TM</sup> ve Fosforin M <sup>TM</sup> IC <sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, pestisit konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	60
Çizelge 3.6	Kıvırcık koyun Serumundaki PON enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Confidor SC 350 <sup>TM</sup> ve Gibber 20 SI <sup>TM</sup> IC <sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, pestisit konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	62
Çizelge 3.7	Merinos koyun Serumundaki PON enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Decis 2,5 EC <sup>TM</sup> ve Fosforin M <sup>TM</sup> IC <sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, pestisit konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	64

Çizelge 3.8	Merinos koyun Serumundaki PON enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Confidor SC 350™ ve Gibber 20 SI™ IC <sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, pestisit konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	66
Çizelge 3.9	Pestisitlerin Kıvrıcık koyunu serumundan elde edilen PON enzimi üzerindeki IC <sub>50</sub> değerleri	68
Çizelge 3.10	Pestisitlerin Merinos koyunu serumundan elde edilen PON enzimi üzerindeki IC <sub>50</sub> değerleri	68

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans çalışmalarım süresince hiçbir zaman yardımlarını ve desteğini esirgemeyen; fikirlerinden ve tecrübelerinden yararlandığım, bilimsel yönlerini kendime örnek aldığım çok kıymetli hocam sayın Prof. Dr. Oktay ARSLAN'a öncelikle en derin minnet ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarım boyunca bilgi ve deneyimleri ile bana yardımcı olan, tavsiyeleri ve cesaretlendirmeleri ile her zaman yanımda olduğunu hissettiğim çok değerli danışman hocam Yrd. Doç. Dr. SEMRA IŞIK'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımda yardımlarını gördüğüm ve her konuda desteğini esirgemeyen sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Nahit GENÇER'e ve Arş. Gör. Dr. Serap BEYAZTAŞ'a yol göstericiliği, arkadaşlığı ve ilgisi için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımın örnekleme kısımlarında bana yardımcı olan, her zaman nazik ve güler yüzlü davranan Nurcan DEDEOĞLU'na , Başak GÖKÇE'ye, Çiğdem BİLEN'e , Murat BOZDAĞ'a çok teşekkür ederim.

Eğitimimin her aşamasında her zaman yanımda olup bana her türlü desteği sağlayan ve bu günlere gelmemi sağlayan aileme en içten sevgilerimi sunarım.

En içten saygı ve sevgilerimle sonsuz teşekkürlerimi sunarım, iyi ki varsınız.

## 1 GİRİŞ

Çevre insanla birlikte tüm canlı varlıklar, cansız varlıklar ve canlı varlıkların eylemlerini etkileyen ya da etkileyebilecek fiziksel, kimyasal, biyolojik ve toplumsal nitelikteki tüm etkenlerdir [1]. 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 [2]. Özellikle tarımda zirai ilaçlama faaliyetlerinin artması ve bu ilaçların bilinçsizce kullanılması çevre kirliliği açısından en önemli sorunlardan birisidir.

Çok toksik yapıda olan ve parçalanıp bozulma ihtimali olmayan, bazı klorlu yapıdaki pestisitlerin dışındaki tarım ilaçlarının taşınması, depolanması, kullanılması hatta sentezlenmesi bile büyük bir çevre kirliliğine sebep olmaktadır. Tarım ilaçlarının yalnızca zararlı canlılara karşı etkili olmasının istenmesine rağmen, bu ilaçların büyük çoğunluğunun hem kontrol ettikleri canlılara karşı hem de insan ve diğer memelilere çok toksik etki yapabildiği belirtilmektedir [3]. Pestisitler kullanıldıktan sonra, uzun süre parçalanmayıp besin zinciri yoluyla insan ve hayvan vücuduna alınmakta ve daha sonra olumsuz etkileri ortaya çıkmaktadır. Diğer yandan tarımsal alanlarda kullanılan pestisitler çeşitli yollarla akarsu, göl, ve denizlere karışması sonucu, bu suları kullanan hayvanların vücutlarında birikerek gıda zinciri yoluyla insana kadar ulaştığı bilinmektedir.

Paraoksonaz HDL'ye bağlı olarak bulunan, organofosfat ajanları (OP) ve sinir gazlarını hidroliz ederek LDL'nin oksidasyonu ile lipit peroksitlerin oluşumuna ve bakteri endotoksinlerine karşı koruyucu etkisi olan önemli bir karaciğer enzimidir. LDL'nin oksidasyonu ateroskleroz sürecinin başlangıç evresini oluşturması, enzimin antioksidant özelliğinin önemini ortaya koymaktadır [4,5].



Paraoksonaz insan serumunda ilk olarak 1961'de Uriel tarafından elektroforezden sonra HDL immunopresipitatlarında saptanmıştır [6]. PON1 organik fosforlu bir insektisit olan parationun aktif metaboliti olan paraoksonu hidroliz etme yeteneğine sahip A-esterazlar grubundan bir enzimdir. PON enzim aktivitesi kalsiyuma bağımlıdır. Kalsiyum direkt katalitik reaksiyonda yer alarak veya aktif alanın uygun konformasyonda tutulmasını sağlayarak aktif alanın korunmasında görev alır. Ayrıca paraoksonun P=O bağıını polarize ederek fosforun nükleofilik saldırıya yatkınlığını sağlar ve dietilfosfatın aktif alandan ayrılmasını kolaylaştırır [7]. Paraoksonaz gen ailesi, insanlarda kromozom 7'nin uzun kolunda bulunur. PON1, PON2 ve PON3 olmak üzere bilinen üç üyeye sahiptir. Yapısal yönden büyük benzerlikler gösteren bu genlerden PON1 ortaya çıkarıldığı süreden beri yıllardır çalışılmaktadır. PON1, fizyolojik substratları ortaya çıkarılması ve aterosklerozis ile ilişkisi ortaya konulması nedeniyle PON2 ve PON3'e göre nispeten daha iyi aydınlatılan genlerdir [8].

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

Paraoksonaz, Aldridge sınıflama sistemine göre A grubu arildialkilfosfataz sınıfı ester hidrolaz enzimidir. Önceleri organofosfat bileşiklerini hidroliz etme özelliği nedeni ile toksikoloji alanında çalışılmış, son yıllarda ise antioksidan etkileri nedeni ile koroner kalp hastalığı riskinden korunulabileceği düşünülerek güncellik kazanmıştır [6].

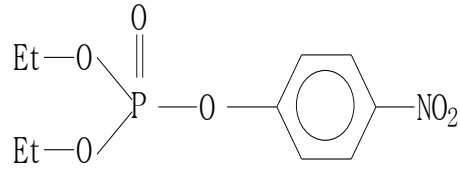
Paraoksonaz, ilk olarak 1953 yılında Aldridge W.N. tarafından p-nitrofenil asetat, propiyonat ve bütirat'ı hidroliz eden A-esteraz olarak teşhis edilmiştir. İnsan serumunda ilk kez 1961'de Uriel tarafından elektroforez sonrası HDL immunopresipitatlarında saptanmıştır [9]. Mackness ve ark, ilk olarak HDL-ayırımı için santrifüj yöntemini geliştirdikten sonra, koyunlarda paraoksonaz aktivitesinin çoğunlukla apo AI içeren partiküllerde HDL ile birlikte bulunduğunu ve insan serumunun ultra santrifüjlenmesi ile enzimin kanda HDL yapısında tasındığını ortaya koymuşlardır [10]. Saflaştırılmış sığır serum paraoksonazının lipidlerle ilişkili ve HDL ile aynı moleküler kütleyle sahip olduğunu göstermişlerdir.

Saflaştırma sırasında apo A-I'in paraoksonazdan ayırımının zor olması, ikisinin sıkı ilişkili olduğunu düşündürmüş ve HDL kolesterol tayini sırasında lipoprotein fraksiyonunda aril-esteraz aktivitesine rastlamışlardır [9]. Enzim; paraokson, metil paraokson ve klormetil paraoksona yüksek derecede seçicilik gösterdiği için, paraoksonaz olarak adlandırılmıştır. Mackness ve ark., PON'un HDL üzerinde apo A-I'e bağımlı olarak aktivite gösterdiğini ve 1991 yılında LDL üzerindeki lipoperoksit birikimini azalttığını bulmuşlardır [10]. Aynı zamanda Macness ve ark, farklı populasyonlarda (Fransız, Sudanlı vs) polimorfizm analizleri yaparak, allellik formları belirlemiş ve populasyon çalışmaları enzim aktivitesiyle HDL, apo A-I, apo A-II arasında istatistiksel ilişki olduğunu göstermişlerdir [10]. İmmunoafinite kromatografi çalışmaları insan serum paraoksonazının gerçekte apolipoprotein A-I ve klusterin (apolipoprotein J) içeren HDL tipleri ile ilişkili olduğunu ve PON'un total HDL'nin çok küçük bir bölümünü oluşturduğunu göstermiştir [6,10].

Sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda, farklı kardiyovasküler hastalıklarda enzim aktiviteleri incelenmiş, lipoproteinlerle ve lipid peroksidasyonu arasındaki ilişki araştırılmış, enzimin aminoasit dizisi belirlenmiştir [11].

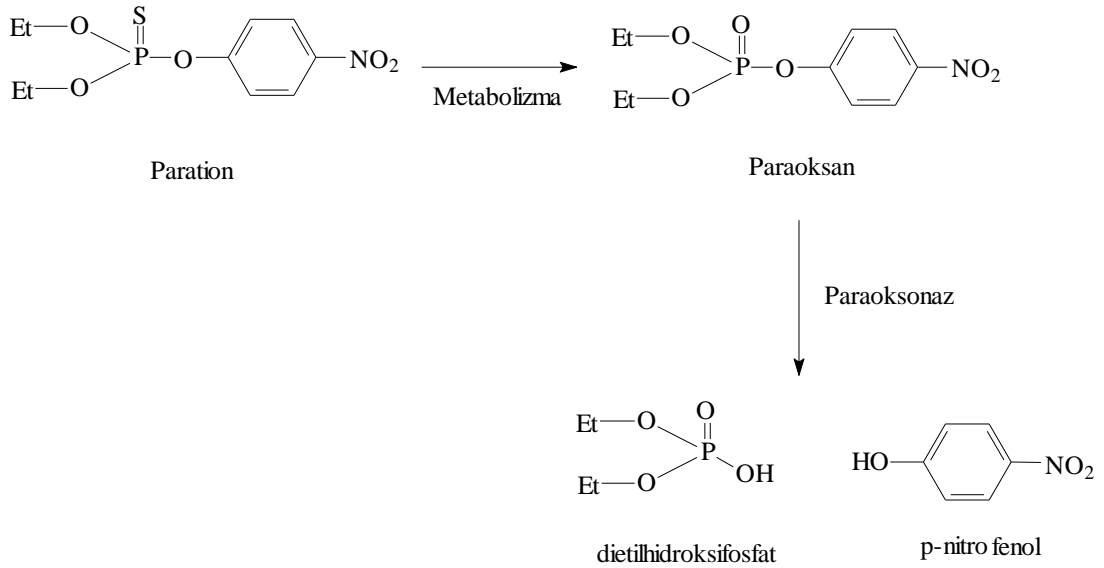
### **1.1.1 Adlandırılması**

Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği'nin (IUBMB) enzim isimlendirmesinde paraoksonaz iki numaraya (EC 3.1.1.2 ve EC 3.1.8.1.) sahiptir. 1990'lı yıllardan sonra, paraoksonazın arilesterazdan farklı olarak yalnız fenolikesterleri değil, fosforik ve fosfinik asit esterlerini de hidroliz ettiği anlaşılmış ve EC 3.1.8.1 ile tanımlanmıştır [11]. Paraoksonaz enziminin, A grubu Arildialkilfosfataz sınıfı bir ester hidrolaz enzimi olması nedeniyle sistematik adı arildialkilfosfatazdır. A esteraz grubunda yer alan paraoksonaz enzimi, aktivitesinin ölçümünde ilk olarak paraokson substratı kullanıldığı için paraoksonaz adını almıştır [12].



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

Paraoksonaz enzimi geniş bir substrat özgüllüğü gösterirken, fizyolojik substratı tam olarak belirlenmemiştir. Ancak arilesteraz, organofosfataz ve laktonaz aktivitelerine sahip olduğu tespit edilmiştir. İnsan serum paraoksonaz enzimi, parationun metabolik ürünü olan paraoksanı kataliz etme yeteneğindedir. Paraoksan organizmaya zararlı olup pestisit olarak kullanılmaktadır. Paraoksanın, paraoksonaz enzimi ile yıkımı sonucu paraoksana oranla göreceli olarak daha az zararlı p-nitro fenol ve dietil hidroksi fosfat bileşikleri oluşur (Şekil 1.2) [6].



**Şekil 1.2** Paraoksonaz Enzim Mekanizması [4]

### 1.1.2 Paraoksanaz Gen Ailesi

Paraoksonaz gen ailesi, insanlarda kromozom 7'nin uzun kolunda q21.3 ve q22.1 arasında bulunmaktadır [8,13].

İlk olarak memelilerde tanımlanan PON ve PON ile ilişkili genler sonraları kümes hayvanları, zebra balığı ve omurgasızlardan *Caenorhabditis elegans*'ta bulunmuştur [14]. Paraoksonaz gen ailesi; PON1, PON2 ve PON3 olmak üzere bilinen üç üyeye sahiptir. Bu genler büyük yapısal benzerlikler göstermektedir ve ortak evrimsel öncüden gen dublikasyonlarının meydana gelmesiyle oluşur. Memeli türleri içerisinde PON1, PON2 ve PON3 aminoasit düzeyinde % 60, nükleotid düzeyinde % 70 benzerlik gösterir. Bununla birlikte memeli türleri arasında bu üç genin her biri aminoasit düzeyinde % 79-90, nükleotid düzeyinde % 81-91 benzerlik göstermektedir. PON1, PON2 ve PON3 ile karşılaştırıldığında 4. ekzonda kodlanan 105 aminoasit içinde üç nükleotid rezidüsüyle ayrılır [8,15].

PON2 ve PON3, PON1 kadar aydınlatılamamıştır[8,16]. PON2 diğer üyelerden farklı olarak plazmada bulunmamaktadır. Ancak beyin, karaciğer, böbrek ve testis gibi pek çok dokuda sentezlenmektedir. PON3, tavşan HDL'si üzerinde lokalize olan laktonaz aktivitesi ile tanımlanabilmiştir [8,15].

PON3 enzimi de PON1'e benzer şekilde büyük çoğunlukta karaciğerden sentezlenir ve serumda HDL'ye bağlı olarak bulunur. Ayrıca PON3 daha düşük seviyelerde böbrekte sentezlenmektedir. PON3 geninin mRNA'sı ve proteinine insanlardan farklı olarak sıçanların makrofajlarında rastlanmıştır [15,16].

### **1.1.3 PON1 Biyokimyasal Yapısı**

PON gen ailesi içerisinde PON1 yıllardır çalışılan ve PON2 ve PON3'e göre en iyi aydınlatılan enzimdir. Serum PON1, organofosfatların hidrolizini katalizlediği bilinen kalsiyum bağımlı bir esterazdır. Karaciğer, böbrek, bağırsak gibi dokulara geniş çapta yayılmıştır. PON1 serumda HDL'ye bağlı olarak bulunur ve PON1'in kararlılığı ve bağlanma ilgisindeki etki HDL içerisinde şekil ve büyüklük değişimine neden olur [17].

PON1, 43-45 kDa molekül ağırlığına sahip 354 aminoasit içeren bir proteindir [17,18]. Her molekül total ağırlığın %15.8'ini oluşturan üç karbonhidrat zinciri içermektedir. İzoelektrik noktası 5.1'dir. Aminoasit bileşimi yüksek lösin içeriği dışında bir özellik göstermez [19].

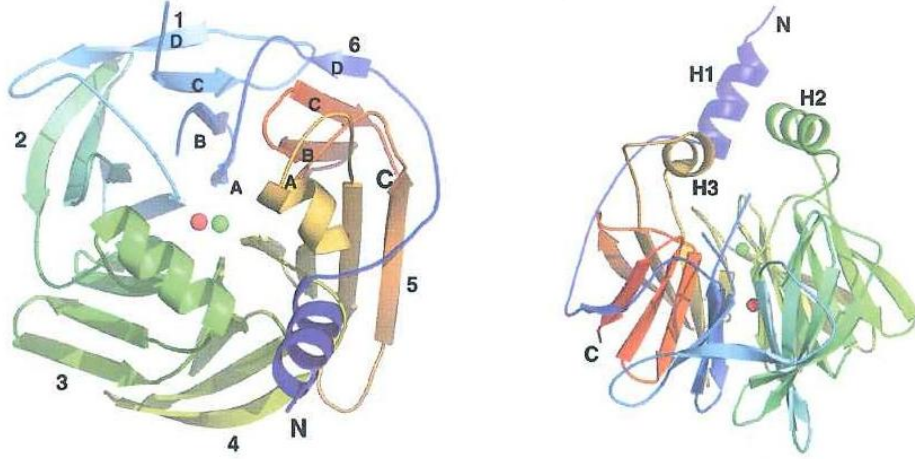
Yapısında yer alan 3 sistein (Cys) rezidüsünden 284'teki serbest, 42 ve 352. sistein rezidüleri arasında tek disülfid bağı bulunur. İn sitü hibridizasyon çalışmaları ile PON1 geninin 7. kromozomun uzun kolu üzerinde q21-q22' de bulunduğu gösterilmiştir [6,10].

PON1'in ince yapısı 4 adet zincirden oluşmuş 6 adet  $\beta$ -kırmalı yapıdan meydana gelmiştir (Şekil 1.3). Enzim 42. ve 353. sistein rezidüleri arasındaki disülfid köprüsü ile sonlanarak üç boyutlu yapısını kazanır [20]. N terminal ve C terminal uçlarının bu şekilde kovalent bağlanması  $\beta$ -kırmalı yapıları enzimlerde nadir görülür.

Üç boyutlu yapıda,  $\beta$ -kırmalı tabakaların merkezinde  $7.4\text{\AA}$  aralıklı iki adet  $\text{Ca}^{+2}$  iyonu bulunmaktadır. Bunlardan bir tanesi yapısal kalsiyum olup yapıdan uzaklaştırılması dönüşümsüz denatürasyona neden olmaktadır [21]. Diğer ise katalitik etkinlikte görev alan kalsiyumdur. Bu kalsiyum iyonu  $2.2-2.5\text{\AA}$  uzaklıkta 5 adet aminoasit rezidüsü (Asn224, Asn270, Asn168, Asp269 ve Glu 53) 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 diizopropilfluorofosfataz (DFPase) enzimi ile benzerlik göstermektedir [21]. Ancak PON1 esteraz, fosfotriesteraz ve laktonaz aktivitesi gösterirken, DFPase sadece fosfotriesteraz aktivitesi gösterir. Fakat bu iki enzimin aminoasit dizilerinde belirgin bir benzerlik yoktur [21]. PON1 aktif bölgede diğer  $\beta$ -kırmalı yapılardan farklı olarak hidrofobik heliks (H2 ve H3) yapıları vardır (Şekil 1.3). Bunlar aynı zamanda sonlanma noktalarıdır. Bu yapı aktif bölgenin korunması ve enzimin HDL'ye bağlanması gibi kritik rollere sahiptir. PON1 sentezlendiğinde monomerik yapı şeklindedir.

Eğer HDL'ye bağlanmazsa oligomerizasyon yapabilir. Bu olay *in vitro* deterjanlı ortamda H2 ve H3 heliksleri ile deterjan misellerine bağlanarak gerçekleşir [22].



**Şekil 1.3** PON1'in üç boyutlu yapısı [15]

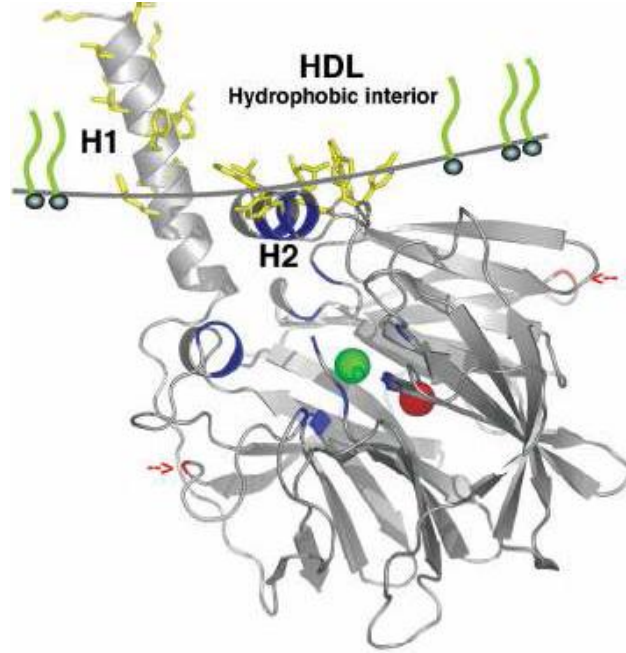
PON1 üzerinde 4 tane potansiyel N-glikozillenme bölgesi vardır. İki tanesi (Asn 227 ve Asn 270)  $\beta$ -kırmalı tabakaların merkezinde, diğer ikisi ise yüzeye bakan bölgede (Asn 253 ve Asn 324) yer almaktadır. PON1 memeli hücrelerinde ekspres edildikten sonra bu noktalardan glikozillenir [23]. PON ailesinin hidrolitik aktivitesi için glikozilasyon önemli değildir [24,25]. Ancak enzimin yapısında bulunan bu karbohidrat molekülleri spesifik olmayan hücre membranlarına bağlanmada veya kararlılığı ve çözünürlüğü arttırmada etkili olabilir [26,27].

#### **1.1.4. PON1'in HDL'ye Bağlanması**

PON1 ve PON3 karaciğerde sentezlendikten sonra kana salınır, orada spesifik olarak HDL'ye bağlanır. HDL periferik hücrelerden kolesterolün taşınmasını sağlayan ve kendisine bağlı platelet aktive eden faktör, PON1 ve PON3 gibi enzimlerle LDL'nin oksidasyonunu önler [28,29].

HDL yaklaşık 10nm çapında kompleks bir yapıdır. Bileşiminde öncelikle membran bileşenleri (fosfolipidler, kolesterol ve kolesterol esterleri), apolipoprotein A1 ve aromatik heliksler yer alır [30]. HDL'ye bağlı olan enzimlerden ilk kez üç boyutlu yapısı aydınlatılan PON1 enzimidir. PON1 hidrofobik N terminal ucuyla sonlanır, H2 ve H1 hidrofobik heliksler bir araya gelerek potansiyel membrana bağlanma yüzeyi oluştururlar (Şekil 1.4).

Heliks yapılar lizin, triptofan ve tirozin yan zincirleri ile oluşturdukları yapı karakteristiği sayesinde HDL ara yüzeyine girebilmektedir [26].



Şekil 1.4 PON1'in HDL'ye bağlanması [31].

### 1.1.5 PON1 Sentezlenmesi ve Salgılanması

PON1 sentezi karaciğerde gerçekleştiğinden dolayı, serumdaki PON1 seviyesini belirleyen başlıca faktör karaciğer fonksiyonlarıdır. Serumdaki PON1 seviyesi ve aktivitesi bireyler arasında çok değişkendir [32].

Bunun nedeni enzim aktivitesini ve peptit konsantrasyonunu etkileyen PON1 geninin kodlanma ve promoter bölgesinde çok sayıda polimorfizm göstermesidir. PON1'in serumdaki aktivitesini ve konsantrasyonunu belirleyen promoter aktivitesi üzerinde en önemli polimorfizm -107 pozisyonundadır [33,34].

PON1 sentezinde önemli olan bir diğer faktör karaciğer hücrelerindeki kolesterol dengesidir. Ayrıca PON1'in karaciğerden sentezini herhangi bir hastalık durumu da etkilemektedir [35,36].

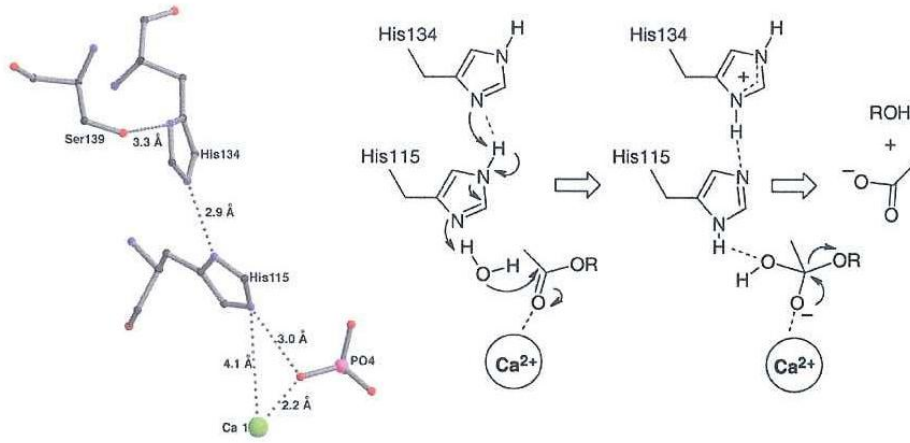
PON1 karaciğerden sentezlendikten sonra serumda HDL'ye veya karaciğerde mikrozomlara bağlanabilmesi için sentez sırasında N-terminal hidrofobik bölgesi olması gerekmektedir. N-terminal hidrofobik bölgesi bağlamada belirleyici olduğu kadar salgılanma prosedüründe de önemli role sahiptir [37,38]. Yapılan çalışmalarda hamster ovaryum hücresi ve insan hepatosit hücresine transfekte edilen PON1 sentezlendikten sonra hücre zarının dış yüzeyine bağlandığı gösterilmiştir [39].

PON1 karaciğerde sentezlendikten sonra önce mikrozomlara bağlandığı, daha sonra da hücrenin dış yüzeyine bağlandığı düşünülmektedir [40,41]. Hücrenin zarının dış yüzeyinden salınması ve HDL'ye bağlanması tesadüf değildir, bu bağlanmada fosfolipit kompleksi önemli rol oynamaktadır ve LDL PON1'in hücreden salınmasına ve kendisine bağlanması için fosfolipit içeriği yeterli değildir [26,39,40].

### **1.1.6 Enzimin Katalitik Mekanizması**

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





**Şekil 1.5** Paraoksonazın katalitik mekanizması [15]

Katalitik etkinlik gösteren  $\text{Ca}^{+2}$  iyonu, substrattaki fosfat iyonunun negatif yüklü oksijenine 2,2 Å uzaklıktadır.

Aktif bölgedeki His-His çifti, su molekülünün bir protonunu alarak bu molekülün nükleofilik gücünü artırır. Oluşan hidroksil iyonu karbonil veya fosfat esterine saldırır. Bu esnada meydana gelen kompleks tetrahedral bir düzlem sonucu  $\text{Ca}^{+2}$  iyonu ile kararlı kılınır. Oluşan yapıdaki  $\text{Ca}^{+2}$  iyonu negatif yüklü oksijenden uzaklaşarak bağ tekrar fosfat veya karbonilin üzerine yıkılır ve ester bağı kopar. PON1'in mekanizmasını açıklamak amacıyla, esteraz aktivitesi için 2-naftilasetat ve fosfotriesteraz aktivitesi için ise paraoksan substratları kullanılmıştır. Bu substratların optimum pH aralıkları saptanmış ve substratın yapısında bulunan yan zincirin katalizlenmeye direkt katılmadığı sonucu bulunmuştur [15].

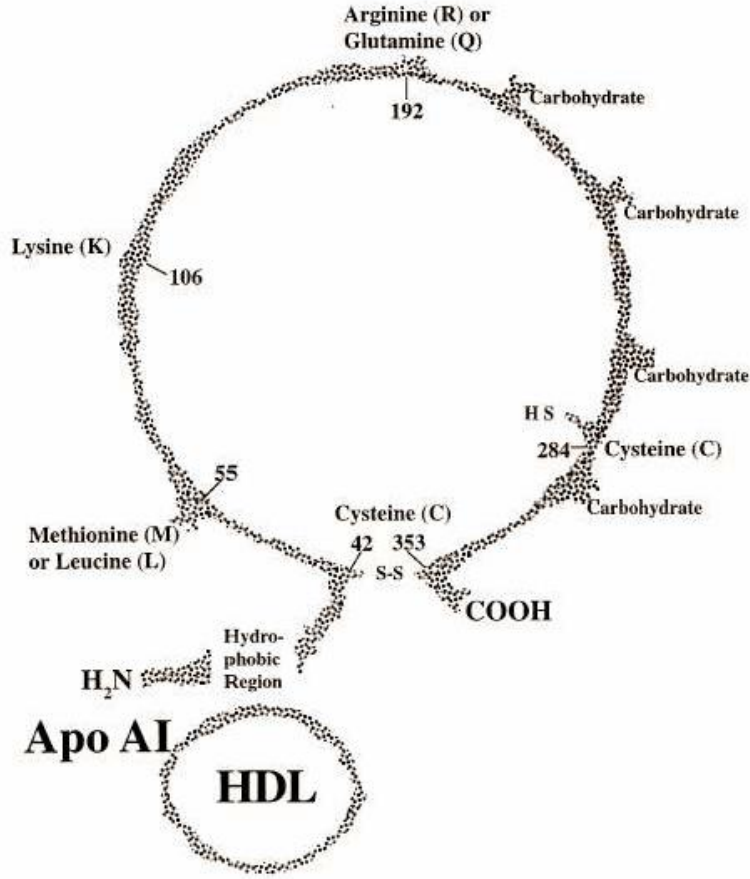
### 1.1.7 PON1 Polimorfizmleri

Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda, bir kısmı PON1 geninin kodlanma bölgesinde, diğerleri intronlarda ve genin düzenleyici yani promoter bölgesinde olmak üzere 160'dan fazla polimorfizm tespit edilmiştir [42]. PON1 enzim aktivitesindeki polimorfizm substrat bağımlıdır ve farklı etnik kökenli popülasyonlara göre değişkenlik gösterir [6].

İlk olarak 1973'de Von Mallinckrodt ve arkadaşları tarafından enzimin genetik polimorfizm gösterdiği ve enzim aktivitelerinin trimodal dağılıma sahip olduğu gösterilmiştir [43]. Daha sonra 1976'da Playfer ve arkadaşları PON1'in insanlar arasında düşük, orta ve yüksek aktiviteye sahip polimorfik dağılım gösterdiğini daha detaylı bulgularla açıklamıştır [44].

Paraoksonaz aktivite polimorfizminin moleküler temeli, PON1'in kodlanma bölgesindeki kendiliğinden olan mutasyonlar sonucu iki aminoasitin yer değiştirmesi ile ilişkilidir. Bu mutasyonlarda birincisi kodlanma bölgesindeki 192. kodonda glutaminden (Q) arjinine (R) olan değişimdir (Şekil 1.6) [45]. Kodlanma bölgesindeki ikinci değişim 55. pozisyonda lösinden (L), metiyonine (M) olan değişimdir. Bu mutasyonun PON1'in aktivitesi üzerinde etkisi çok az iken, serumdaki protein seviyesini etkilediği tespit edilmiştir. PON1'in R allelinin kodlandığı proteinin paraoksan hidroliz aktivitesi Q allele göre sekiz kat daha yüksektir [6].

Ayrıca PON1 Q formu yükseltgenmiş HDL ve LDL'nin metabolize edilmesinde R formundan daha etkilidir [46]. Bu genetik polimorfizm serum protein konsantrasyonunu da etkiler. Homozigot R bireyler homozigot Q'ya göre daha yüksek enzim konsantrasyonuna sahiptir [10]. Farklı populasyonlardaki polimorfik dağılım bireyler arasında varyasyona neden olur [47]. PON1 allozimlerinin kalitatif ve kantitatif olarak farklı olduklarının keşfi ile fenotipleme metodları geliştirilmiştir. İlk olarak 1983'te Eckerson tarafından iki izoenzimin tuz ve pH'a farklı yanıtlarını temel alarak iki fenotip tanımlanmıştır [48]. Tuz (NaCl) varlığında homozigot R allozim (RR) paraoksana karşı daha yüksek enzim aktivitesine sahiptir.



Şekil 1.6 PON1 enzimi gen polimorfizmleri [6].

PON1'in kodlanma bölgesindeki PON1 M/L55 ve Q/R192 polimorfizmlerinden başka promoter bölgesinde de en az bes polimorfizm belirlenmiştir. Bu polimorfizmler -107/-108 (C/T), -126 (C/G), -160/-162 (A/G), -824/-832 (A/G) ve -907/-909 (C/G) bölgelerde bulunmaktadır (Şekil 1.6) [49,50].

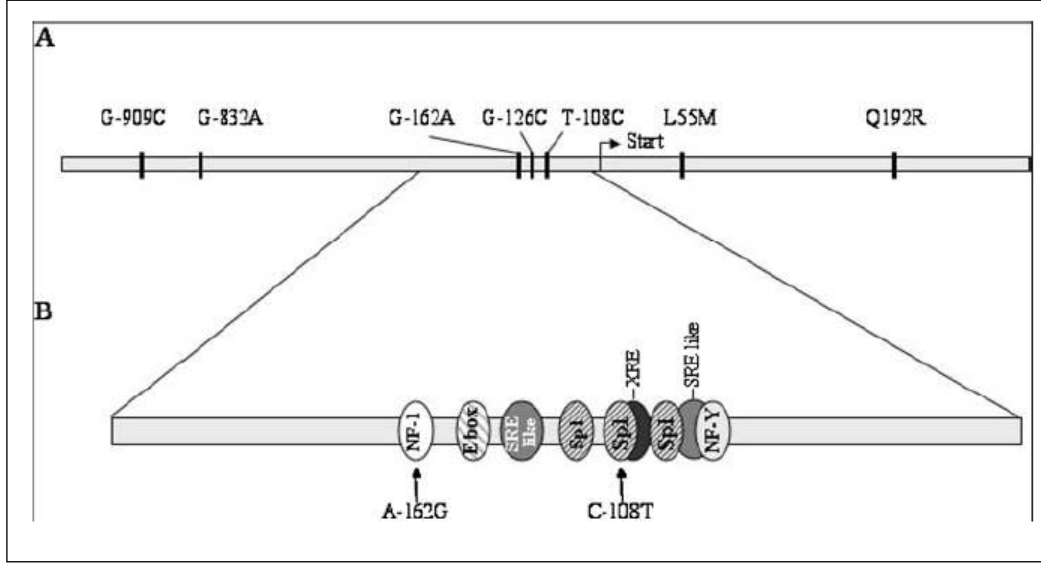
PON1 genindeki promoter polimorfizmlerinin, gen ekspresyonu ve enzimlerin serum düzeyleri üzerinde güçlü etkisinin olduğu bulunmuştur [17,33]. HepG2 hücrelerindeki lusiferaz geninde yapılan çalışmalarda; promoter içerisindeki GACC polimorfizmleri -909, -832, -162, ve -108 pozisyonlarında CGGT'ye göre iki kat daha aktiftir [33]. -107T, -824G ve -907G polimorfizmleri en yüksek konsantrasyon ve aktivite gösteren polimorfizmlerdir ve -107T polimorfizmi, PON1 gen ekspresyonu üzerinde baskın etkiye sahiptir [17,33]. Promoter aktivitesi içerisindeki bu varyasyonlar, serum PON1 konsantrasyonu ve aktivitesi içerisindeki anlamlı farklılıklarla ilişki halindedir [33].

Ayrıca promotör polimorfizmleri PON1 14 geninin 3' okunmayan bölgesi içerisinde de ortaya çıkarılmıştır, fakat bunların önemi henüz bilinmemektedir [51].

İki popülasyonun haplotip analizi göstermiştir ki; C(108)T polimorfizminin serum PON1 varyasyonunda %23-24 oranında esas katılımcıdır. Ayrıca az da olsa A(-162)G polimorfizmi de %1,1 oranında etki etmektedir. -909 ve -832. bölgelerdeki polimorfizmlerin ise serum PON1 düzeyindeki farklılıklarla ilişkisi bulunmamaktadır [51,34].

-108 ve -162 polimorfizmlerini kapsayan yaklaşık 200 bp'lik alan, PON1 geninin transkripsiyonu için gereklidir[51-53]. -108. bölgede meydana gelen polimorfizm PON1 serum varyasyonunun en önemli katılımcısıdır. Bu polimorfizm Sp1 ve Sp3 transkripsiyon faktörlerinin bağlanması için konsensusun ortasında lokalize olmuştur. Bu konsensus alanı -108T varyasyonu varlığında engellenir [51,33]. Sp1'in bağlanmasında polimorfizmlerin etkisi ile ilgili olarak yapılan araştırmalara göre -108. bölgeye Sp1'in bağlanmasında T'nin varlığının C'den daha zayıf olduğu bulunmuştur [34]. -162. bölgede bulunan polimorfizm, NF-1 (nuclear factor-1) bağlanma alanının üzerinde bulunur. -162A varyasyonu NF-1'in bağlanmasında G varyasyonuna göre daha yüksek aktivite göstermektedir. -62'deki bu değişim gen ekspresyonu üzerinde açıklanabilir [49,51].

PON1 promotör polimorfizmleri ve kodlama bölgesinde oluşan polimorfizmler arasında ilişki bulunmaktadır. -108C ve 192R polimorfizmleri kardiyovasküler hastalıklara karşı daha düşük seviyede koruma gösterir. Bununla birlikte PON1-192 (Q/R) polimorfizmi enzim aktivitesi bakımından düşünüldüğünde bağımsız olarak hareket eder [51].



Şekil 1.7 PON1 enzimi promoter bölgesi polimorfizmleri [51].

Paraoksonaz polimorfik dağılımı büyük interetnik değişim göstermektedir. Türk populasyonunda RR allel oldukça düşük bir oranda bulunmuştur. Trimodal dağılım için QQ, QR ve RR allellerinin frekansı sırasıyla % 48.6, % 41.0 ve % 10.4 olarak tespit edilmiştir[51]. Düşük aktivite gösteren Q allel Avrupa, Kanada ve Amerika'da yüksek, Avusturalya'daki Aborijinlerde ve Zambiya'da düşüktür [6].

PON1'in kodlanma bölgesindeki diğer bir polimorfizm 102. kodonda izolösinden valine olan değişimdir [54]. PON1'in promoter bölgesinde 5 tane polimorfizm tespit edilmiştir. Bunlardan plazma PON1 seviyesini etkileyen en önemli olanı C108T polimorfizmidir [51].

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

Öncelikle yapılan pek çok çalışmada kalp damar hastalıkları ile PON1 R/Q192 polimorfizmi arasında önemli bir ilişki olduğu gösterilmiştir [55,56].

Ancak başka çalışmada PON1'in Arjinin 192 polimorfizmi ile kalp damar hastalık riski ile ilişkili olmadığı gösterilmiştir [57,58]. Benzer şekilde PON1'in M/L55 polimorfizmi ile kalp damar hastalıkları oluşma riski arasında bir grup çalışmada bağlantı var iken [42,58], diğer bir çalışma grubunda herhangi bir ilişki olmadığı gösterilmiştir [59,60]. Sonuç olarak, PON1 192. ve 55. polimorfizm genotipleri direkt enzim aktivitesini etkilemektedir. PON1 aktivitesi de geleneksel risk faktörleri dışında, kalp damar hastalıkları oluşma tehlikesini bize önceden haber vermektedir.

Yapılan bir çalışmada, PON1'in 192R ve 55M polimorfizmlerinin erkeklerde prostat kanseri riski ile istatistiksel olarak herhangi ilişkisi olmadığı gösterilmiştir [54]. Japon toplumunda tip 2 şeker hastalarında yapılan bir çalışmada, PON1 enziminin Q192R polimorfizmi ile hastalık arasında önemli bir bağlantı olmadığı tespit edilmiştir[61]. Paraoksonaz enziminin 192. kodonda Q alleli bulunduran kişilerde Parkinson hastalığı olma riskinin istatistiksel olarak ( $p<0.005$ ) yüksek olduğu tespit edilmiştir [62]. Alzheimer hastalarında yapılan bir çalışmada, PON1 geninin 192. polimorfizmi R allel görülme sıklığı kontrol grubuna göre oldukça düşük bulunmuştur [63].

### **1.1.8 PON1'in Fonksiyonel Önemi**

PON1 ve bazı memeli paraoksonazları toksik ajanların hücresel zararlarına, plazmadaki LDL'nin lipitleri oksitlemesine ve bakteri endotoksinlerine karşı koruyucu olarak hareket eder. Ayrıca LDL'nin lipit bileşenlerinin oksidasyonundan oluşan toksik ürünleri de inaktive edebilir [64].

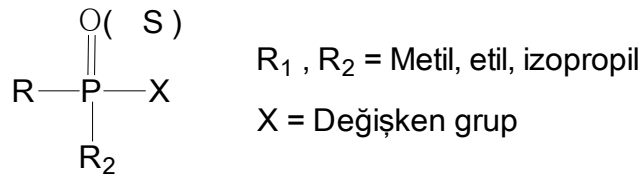
### **1.1.9 Hidrolitik Aktivite; Organofosfatlara Karşı Koruma**

Paraoksonazın arterosklerozisin önlenmesindeki önemli fonksiyonlarından biri organofosfatlara karşı koruma sağlamasıdır [6].

OP bileşikleri, tarımda pestisit olarak ürün verimini artırma ve veteriner ilaçları yapımında kullanılan fosforik asitlerin triesterleridir. OP'lerin etki mekanizması sinir sistemi içersindeki asetilkolinesteraz (AChE) inhibisyonu ile ilişkilidir.

Asetilkolinesteraz merkezi, somatik ve parasempatik sinir sistemindeki asetilkolinleri ve önemli nörotransmitterleri hidroliz eden bir enzimdir. Paraokson da asetil kolinleri yıkan kolinesterazların kuvvetli inhibitörüdür, ardışık nöron uyarılması ile sinaptik bileşkelerde asetilkolin birikimine yol açar. Memelilerde karaciğerdeki detoksifikasyondan kaçan herhangi bir okson organofosfat etki alanına ulaşmadan önce kanda serum PON1 enzimiyle hidroliz edilebilir. Bu enzimin inhibisyonu ile OP zehirlenmeleri ve sinir sisteminde bozukluklar meydana gelir [31].

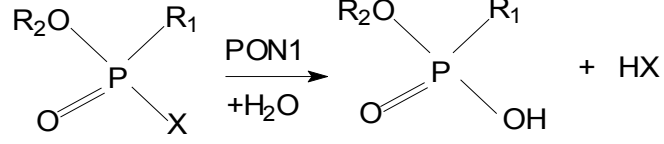
Organofosfatlar, tüm bileşiklerinde organik molekülünün bir parçasında fosfat grubu veya fosfat türevlerini içerirler. OP'lerin genel formülü büyük çoğunluğunda aynıdır. Merkezde fosfat atomu bulunur ve fosfat atomunun oksijen veya kükürtle çift bağ yapmasına göre farklı adlandırılır (Şekil 1.8). OP, P=O formunda iken yalnızca asetilkolinesterazları etkileyebilir. Genel olarak kullanıldığı insektisitlerde P=S formun oksijen analoglarına dönüşmesi gereklidir. R<sub>1</sub> ve R<sub>2</sub> grupları genelde alkil veya aril gruplarıdır. X grubu geniş bir değişkenlik göstermekle birlikte genelde alifatik, aromatik ve heterosiklik grupları tanımlamaktadır [42,65].



**Şekil 1.8** OP bileşiği genel formülü [71].

Organofosfatlar tarımdaki faydalarının yanı sıra insanların hayatını önemli ölçüde tehdit eden toksik kimyasallardır. Paraoksonaz enzimi savunma sistemi oluşturarak OP'lerin zararlı etkilerini ortadan kaldırmaktadır.

Soman, sarin ve tabun gibi organofosfat sinir gazlarını hidroliz ederek bunları daha az zararlı bileşiklere dönüştürmektedir (Şekil 1.9) [42].



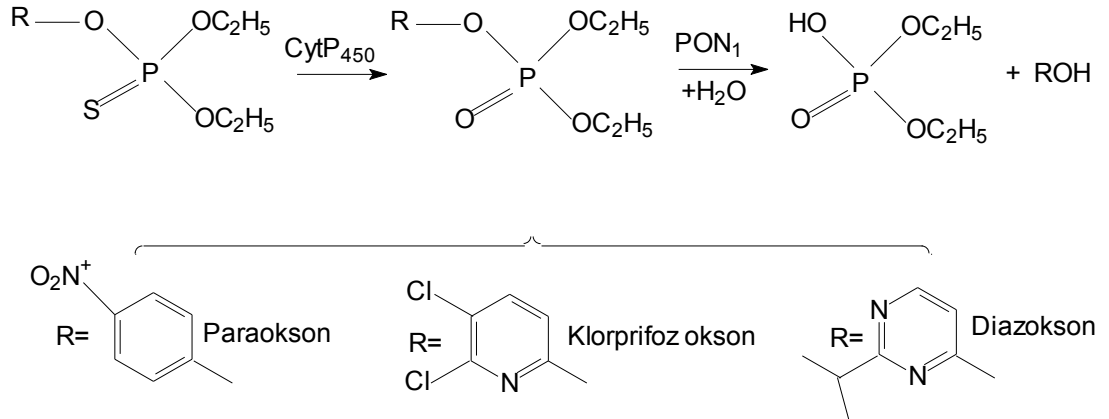
$\text{R}_1=\text{N}(\text{CH}_3)_2$      $\text{R}_2=\text{CH}_2\text{CH}_3$      $\text{X}=\text{CN}$  Etil N-dimetilfosforoamidosiyanid (Tabun)

$\text{R}_1=\text{CH}_3$      $\text{R}_2=\text{CH}(\text{CH}_3)_2$      $\text{X}=\text{F}$  İzopropil 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 1.9** Sinir gazlarının hidrolizi [66].

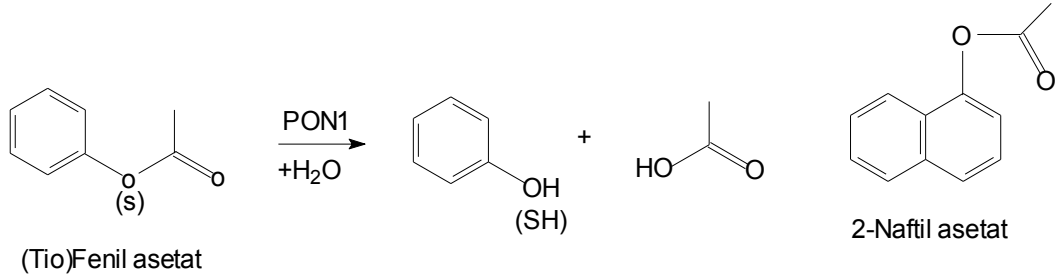
İnsan serum PON1 enzimi ayrıca paration, diazinon ve klorprifoz gibi çok sayıda insektisit toksik okson metabolitlerini (Şekil 1.9) [67,68] ve soman, sarin ve tabun gibi organofosfat sinir ajanlarını hidrolizleyebilmektedir [69,70]. İnsan sağlığı açısından organofosfatlı bileşikler ise terörizm tehdidi kadar bir çevresel risk oluşturur [15]. PON1 enziminin çok yönlü bir araştırma konusu olmasının en önemli nedenlerinden biri budur.



**Şekil 1.10** İsektisitlerde yaygın olarak kullanılan okson metabolitlerinin hidrolizi[66].



Bu aktivitelerinin yanında PON1 enzimi sınıflandırılmada yer aldığı A-esteraz grubunda bulunması ile fenilasetat gibi ester substratlarını da hidrolizleyebilmektedir (Şekil 1.10).[26,48].



**Şekil 1.11** Aromatik esterlerin hidrolizi [66].

PON1 eksikliği gösteren böcekler organofosfat için hedef organizmadır. Memelilere kıyasla kuşlarda organofosfat zehirlenmesine yatkınlık daha yüksek bulunmuştur, bu da kuşlarda serum PON1 enziminin yokluğuna bağlıdır. Benzer durum sürüngenler ve balıkların zehirlenmeye yatkınlığını da açıklar.

Organofosfatlara karşı koruma sadece enzimin kan ve dokuda bulunan düzeylerine bağlı değildir, izoenzimlere de bağlıdır. B tip (R izozim) paraoksonu hidroliz etmede A tipten (Q izozim) daha etkilidir.

Fakat birçok organofosfat B'ye göre A izozimi ile daha iyi hidroliz edilebilir. Bu nedenle PON1'in koruyucu rolü değerlendirilirken PON1'in düzeyinin yanısıra tipi de dikkate alınmalıdır [6].

#### **1.1.10 Lipopolisakkarid inaktivasyonu; Bakteriyel endotoksinlere karşı koruma**

İnsan serumunda HDL'de bulunan bir proteinin bakteriyel lipopolisakkaritleri inaktive ederek toksik semptomları önlediği saptanmıştır. Lipopolisakkarit inaktivasyonu immunolojik olmaktan çok enzimatik bir reaksiyondur. Bu reaksiyondan sorumlu enzimin PON1 olduğu saptanmıştır.

PON1, bakteriyel lipopolisakariti lipit A molekülündeki 4' fosfat üzerine fosfataz etkisi ile hidroliz eder. HDL'nin bir subfraksiyonu olan Tripanolitik faktör (TLF) *Trypanosoma brucei*'e sitotoksiktir ve apo AI, PON, haptoglobulin ile ilişkili bir proteindir.

Lizozomal pH'ta aktive olan PON'un peroksidaz aktivitesi olduğu düşünülmektedir. HDL kompleksinin endotoksin toksisitesine karşı koruyucu olduğu bilinmektedir. Gram (-) bakteriyel enfeksiyon sırasında endotoksemi gelişimine karşı korumayı bir ölçüde sağlar.

PON, makrofaj hücre yüzeyindeki CD14 spesifik bağlayıcı proteinle, bakteri yüzeyinden köken alan lipoprotein polisakaritin etkileşimini önler. Aksi takdirde TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 gibi sitokin başlıklarının salınımını başlatır, bu sitokinler değişik semptomlara neden olur [6].

Dr Standiford'un yaptığı çalışmada; farelere, lipopolisakarit (LPS) enjeksiyonundan iki saat önce saflaştırılmış PON1 enjekte edilmiştir ve hayvanların %60'ı hayatta kalmıştır. Buna karşılık farelere LPS enjeksiyonundan 2 saat sonra PON1 verildiğinde farelerin % 30'u yaşamıştır. PON1 enjeksiyonu hiç yapılmadan LPS verildiğinde bütün fareler ölmüştür. Bu ve diğer çalışmaların sonucu olarak PON1'in hücreleri LPS'den koruma yeteneğine sahip olduğu anlaşılmaktadır. Fakat PON1'in tip ve düzeyinin bireylerin endotoksinlerine karşı duyarlılığı fark yaratıp yaratmadığı tartışmalıdır [64].

#### **1.1.11 Oksidatif veya Peroksidatif Aktivite; LDL Oksidasyonunun Önlenmesi**

PON1, LDL oksidasyonu üzerinde HDL'nin koruyucu etkisinden sorumlu HDL ana bileşenidir. HDL, antioksidant ve antiemflamatur özelliklere sahiptir ve LDL oksidasyonunu buna bağlı olarak da arterosklerozisi geciktirir. Paraoksonaz arterosklerozise karşı koruyuculuğunu sahip olduğu laktonaz aktivitesi ile göstermektedir. Enzim dört atomdan yedi atoma kadar değişen lakton halkası ihtiva eden en az otuz çeşit laktonu hidrolizleyebilmektedir [6].

PON1'in koruyucu etkisini ölçebilen uygun metodlar hala bulunamamıştır. Analiz yapılırken inkübasyon süresince enzimin dereceli inaktivasyonu, stabilizasyonu etkileyen faktörler, metallerin etkileri, sülfirid ayıraçlar ve indirgen ajanlar dikkate alınmalıdır.

Bu tartışmalı limitler açıkça gösterir ki; PON1 çok düşük düzeylerde oksitlenmiş LDL'lerin oksidatif zararlarından hücreleri koruyucu etkiye sahiptir ve PON1'in bu özelliği bu proteinin önemli fizyolojik özelliği olarak kendini gösterir [64].

### **1.1.12 Enzimin Saflaştırılması**

Paraoksonaz enzimi karaciğerde, endoplazmik retikulum membranlarının parçacıklarının uçları kapanarak oluşan mikrozomlarda, serumda HDL'ye bağlı olarak bulunmaktadır [71]. Saflaştırma prosedürlerinde öncelikle söz konusu enzimin bağlı olarak bulunduğu yapılardan uzaklaştırılması gerekmektedir.

İlk olarak A-esterazları (diizopropil fosforidat hidrolaz) Mazur tarafından tavşan böbreğinden yaklaşık 13 kat [72] ve daha sonra Mounter tarafından 65-100 kat saflaştırılmıştır [73]. Ancak paraoksonaz ismi ile ilk saflaştırma koyun serumundan 330-385 kat etanol, pH ve iyonik çöktürme yöntemleri kullanılarak Main tarafından başarılmıştır [74]. Daha sonra Furlong ve arkadaşları tarafından insan ve tavşandan söz konusu enzim saflaştırılmış ve cDNA'sı karakterize edilmiştir [75].

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

Uygulanan metotların sırası enzim kaynağının serum veya karaciğer olmasına bağlı olarak değişebilir. Bazı durumlarda bir yada diğer saflaştırma basamağı tekrar kullanılabilir. Örneğin; Gan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada insan serum paraoksonazının saflaştırma prosedürü için iki DEAE anyon değiştirme kromatografisi adımı bildirilmektedir [19].

Furlong tavşan ve insan serumundan paraoksonaz enzimini Cibacron Blue 3GA-Agaroz, Sephadex G-75, DEAE Trisacril M ve tekrar Sephadex G-75 jel filtrasyon kromatografi yöntemlerini kullanarak saflatmıştır [76].

Paraoksonaz enzimi karaciğerde mikrozomlara, serumda da HDL'ye bağlı olmasından dolayı homojen bir saflık elde etmek oldukça zordur [77]. Söz konusu enzimin saflaştırılması sırasında bağlı olduğu yapılardan uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu amaçla, karaciğerde enzimi mikrozomlardan ayırmak için TritonX-100 kullanılırken [78] serumda HDL'den uzaklaştırılması için deterjan veya yüksek tuz konsantrasyonu kullanılması gerekmektedir [76].

## 1.2 Pestisitler

Pestisitler, insan ve hayvan vücudu ile bitki ve cansız cisimlerin üzerinde ya da çevresinde bulunan veya yaşayan; ayrıca besin maddelerinin üretimi, hazırlanması, depolanması ve tüketimi sırasında onların besin değerlerini azaltan veya hasara uğratan zararlıları (böcek, kemirici, yabancı ot, mantar, toprak kurdu vb.) öldürmek için kullanılan maddelerdir [1].

Pestisitler, öldürdükleri hedef organizmaya göre aşağıdaki şekilde gruplandırılmaktadır:

- İnsektisitler ⇒ Böcek öldürücüler.
- Herbisitler ⇒ Zararlı ot öldürücüler.
- Fungisitler ⇒ Küf ve mantar öldürücüler.
- Nematisitler ⇒ Nematod öldürücüler.
- Rodentisitler ⇒ Sıçanları ve diğer kemirgen öldürücüler[80].

Pestisitlerin kullanımı çok eski tarihlere dayanmaktadır. M.Ö. 1500'lere ait bir papirüs üzerinde bit, pire ve eşek arılarına karşı insektisitlerin hazırlanışına dair kayıtlar bulunmuştur. 19.yy'da zararlılara karşı inorganik pestisitler kullanılmış, 1940'lardan sonra pestisit üretiminde organik kimyadan faydalanılmış, DDT ve diğer iyi bilinen insektisit ve herbisitler keşfedilmiştir.

Bugüne kadar 6000 kadar sentetik bileşik patent almasına karşın, bunlardan 600 kadarı ticari kullanım olanağı bulmuştur [81].

Vücuda giren pestisitlerin belirli bir kısmı idrarla dışarı atılırken, birçoğu ise özellikle yağ dokusunda depolanmaktadır. Kadınlar daha fazla yağ dokusu içerdiği için pestisit birikimi erkeklere oranla daha fazladır. Bazı pestisitlerin insan sağlığı üzerindeki etkileri Çizelge 1.1'de gösterilmiştir [80].

<b><i>Akut Etkiler</i></b>	Baş dönmesi
	Kırmızı, yaşlı, yanan gözler
	Uykusuzluk
	Yorgunluk
	Aşırı terleme
	Bulanık görme
	Baş ağrısı
	Kas ağrısı
	Kusma
	Mide krampları
	Cilt kızarıklıkları
<b><i>Şiddetli Akut Etkiler</i></b>	Çok küçük gözbebekleri
	İshal
	Solunum zorluğu
	Felç
	Çırpınmalar
	Ağız, burundan akıntılar
	Koma veya bilinçsizlik
	Ölüm
<b><i>Uzun Vadeli Etkiler</i></b>	Beyin hasarı
	Bağışıklık sisteminde hasar
	Karaciğerde hasar
	Kanser
	Kısırlık
	Genetik hasar
	Sinir sisteminde hasar
	Böbreklerde hasar
	Deri hastalıkları
	Çocuk düşürme
	Ceninde hasar

**Çizelge 1.1** Bazı Pestisitlerin İnsan Sağlığına Etkileri [80].

Pestlerin (zararlı canlı) kontrolünde vazgeçilmez kimyasal mücadele aracı olan pestisitlerin çoğunluğu, esas hedefleri olan zararlılara karşı spesifik olmadıkları için insan ve hayvanlarda da zehirleyici olmaktadır. Organik klorlu pestisitler kalıcı özellikleri dolayısıyla çevrede birikerek ve besin zincirine girerek toplum ve çevre sağlığı için önemli bir risk taşırlar. Böylece, dinamik bir denge halinde kalmaya çalışan çevrede ekolojik denge bozukluklarına sebep olurlar. Pestisitler hava, su, toprak, besin yoluyla ve ayrıca barınaklar, çevre ve alan ilaçlamaları sonucunda kalan artıkları ile besin kirlenmesine yol açarlar. Kalıcı pestisitlerin uygulanması sonucu ortaya çıkan en önemli kronik zehirlenme riski çevre kirliliği sonucu besin zincirine giren ve sonuçta nihai tüketici olan insana kadar her kademedeki gittikçe yoğunlaşarak ulaşan pestisit kalıntılarıdır [82].

Pestisit kalıntıları, çevre kirlenmesinin yanında toprağın mikrobiyal aktivitesi ve bu nedenle de toprağın verimliliği açısından da önem taşımaktadır. Bu bileşikler, toprak ve sudaki yararlı mikro florayı ve bunların enzimatik faaliyetlerini olumsuz yönde etkilemektedir [83]. Tarımsal ilaçlar bu sistemin en önemli düşmanlarından. Pestisitler toprağa uygulandıktan sonra yağmur sularıyla yıkanarak drenaj kanallarına oradan da sulak ortamlara ulaşmaktadır. Sulak ortama ulaşan pestisitler, bu ekosistemde uzun süre bozulmadan kalabilmektedir [84].

Tarım ilaçlarının yalnızca zararlı canlılara karşı etkili olmasının istenmesine rağmen, bu ilaçların büyük çoğunluğunun hem kontrol ettikleri canlılara karşı hem de insan ve diğer memelilere çok toksik etki yapabildiği belirtilmektedir. Tarımsal ve tarımsal olmayan amaçlar için günümüzde milyonlarca tarım ilacı, milyonlarca dönüm araziye uygulanmaktadır. Bunların bir kısmı, yarılanma süresinin uzun olması nedeniyle, uzun süre toprakta parçalanmadan kalabilmekte, yerüstü ve yer altı sularına karışabilmektedir [85].

Su, en büyük kaynaklarımızdan biri ve yaşamın temelidir. İnsanoğlu içmek, pişirmek ve yıkanmak için temiz suya ihtiyaç duyar. Temiz su çiftçilerin ürünlerini sulamak ve çiftlik hayvanlarını beslemek için esastır. Yer altı suları dünyanın temel taze su kaynağıdır. Belirli koşullar altında pestisitler yer altı sularına geçebilirler.

Pestisitler, yer altı sularına ulaştıktan sonra parçalanmaya devam ederler. Fakat, daha az ışık, sıcaklık ve oksijen nedeniyle daha düşük oranda parçalanırlar. Yer altı suyu kirlendiği zaman kirli su akıntıları, nehirler ve göllerde de bulaşmaya neden olur. Bulaşma kaynakları durdurulmuş olsa bile, bir yeraltı su havzasının doğal işlemlerle kendi kendisini saflaştırması zaman gerektirir. Bu kaynaklardaki su yıllarca kullanılamaz [86].

Sulardaki insektisit kalıntıları genellikle çözünmez, süspansiyon şeklinde organik maddelerde, sedimentlerde, çamurda, çürüme artıklarında ve planktonlarda tutunur. Bu yolla besin zincirine girerek, suda yaşayan omurgasızlarda, balıklarda kolaylıkla birikebilirler. Balıklardaki insektisit yoğunluğu sudakinin 1.000-10.000 katını bulabilir. Sularda bakteriler ve planktonlarda tutunan insektisit, balıklara kadar olan besin zincirinde; balıklarda en yüksek yoğunluğu bulur. Balıklarla beslenen canlılarda ise daha yüksek düzeye ulaşır. Birçok balığın yaşam devresinde bu noktada canlı kalma gücü çok az olduğundan tarım ilaçlarının etkisi bu gibi türlerin azalmasına neden olabilir [86].

Hava, içerisinde yer alan partikülleri uzun mesafelere götürme özelliğine sahiptir. Bu nedenle, pestisit uygulamaları sırasında sürüklenmeler meydana gelir. Havadaki pestisitler kontrol edilemeyip sürüklenirse; su yollarına, evlere ve yeşil alanlara ulaşırlar. Böylece insanlara, evcil hayvanlara, yaban hayatına ve hassas bitkilere zarar verebilirler. Bir çok ülkede, sürüklenme kontrolünün güçlüğü nedeniyle, havadan ilaçlamalar önerilmemekte ya da kısıtlanmaktadır [86].

## **1.2.1 Araştırmada Kullanılan Pestisitler**

### **1.2.1.1 Decis 2,5 EC™**

Yaygın Adı : Deltamethrin

IUPAC Adı : [cyano-(3-phenoxyphenyl)-methyl] 3-(2,2-dibromoethenyl)-2,2-dimethyl-cyclopropane-1-carboxylate

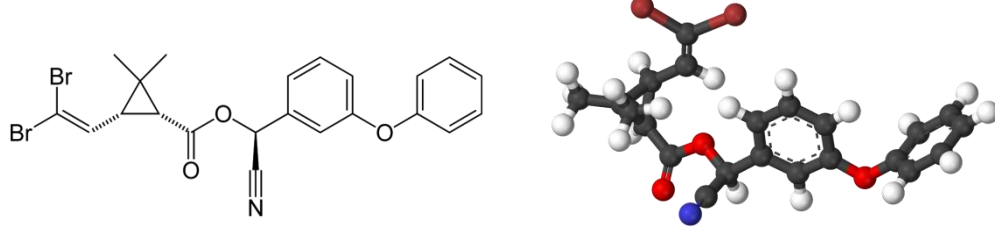
Kullanım Amacı : İsektisit

Molekül Formülü : C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>Br<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>



Molekül Ağırlığı : 505.21 g mol<sup>-1</sup>

Kimyasal Yapısı :



Görünüş : Açık sarı kristaller

Erime Noktası : 98 °C

Çözünürlük : Su ile her oranda karışabilir.

Stabilitesi : Ekstrem sıcaklık değerlerine ve doğrudan güneş ışığına maruz kaldığında bozunabilir.

Uygulamalar : Decis , temas ve mide zehiri olarak etki gösteren bir insektisittir. Tahıllar, meyveler, bağlar, sebzeler, süs bitkileri, pamuk ve ot ürünleri gibi ürünlerin çok geniş bir alanında çiğneyici emici böceklerin kontrolü için kullanılır. Tavsiye edildiği gibi kullanıldığı zaman fitotoksik değildir.

Toksikoloji Bilgi :

*Ani oral toksisite* : LD<sub>50</sub> (sıçan) 431 mg/kg. *Ani solunum toksisite* : LD<sub>50</sub> (sıçan) 2,69 mg/kg. *Ani dermal toksisite* : LD<sub>50</sub> (sıçan) >2.000 mg/kg. *Ciltde tahriş* : Cildi tahriş eder (tavşan). *Gözde tahriş* : Ciddi göz hasarları tehlikesi (tavşan).

*İlave bilgiler* : Yüzde veya mukozalarda yanma veya batma ortaya çıkabilir bunlar geçicidir maksimum 24 saat içinde geçer. Yüksek konsantrasyondaki buharlarının solunması narkoz etkisi yapar [87].

### 1.2.1.2 Fosforin M™

Yaygın Adı : Metil -Parathion

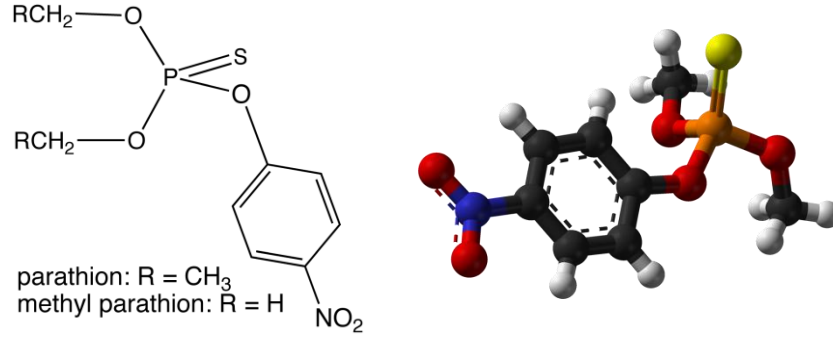
IUPAC Adı : O,O-dimetil O-4-nitrofenil fosforotioat

Kullanım Amacı : İnsektisit

Molekül Formülü : C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>NO<sub>5</sub>PS

Molekül Ağırlığı : 291.3 g/mol

Yapısal Formülü :



Görünüşü : Renksiz kristaller

Erime Noktası : 35-36°C

Çözünürlüğü : Suda, 55 mg / L (20°C). Çoğu organik çözücülerde iyi çözünür.

Örneğin: diklormetanda ve toluende > 200 g/l (20°C), hekzanda 10-20 g / L (20°C).

Stabilitesi : Bazik veya asidik çözeltilerde belirli şartlarda hidroliz olur.

Uygulamalar : Temas, mide zehiri ve solunumda etkilidir. Tahıllar, meyveler, bağlar, sebzeler, süs bitkileri, pamuk ve ot ürünleri gibi ürünlerin çok geniş bir alanında çok sayıdaki emici ve çiğneyici böcekleri kontrol eden organik fosforlu bir insektisittir. Tavsiye edildiği gibi kullanıldığı zaman fitotoksik değildir.

Toksikoloji Bilgi:

*Ani oral toksisite* : LD<sub>50</sub> (sıçan) 3 mg/kg, LD<sub>50</sub> (erkek fare) 30 mg/kg, LD<sub>50</sub> (erkek ve dişi tavşanlar) 19 mg/kg, LC<sub>50</sub> (96 h) (Gökkuşluğu alabalığı) 2,7 mg/L [88].

### 1.2.1.3 Confidor SC 350™

Yaygın Adı : Imidacloprid

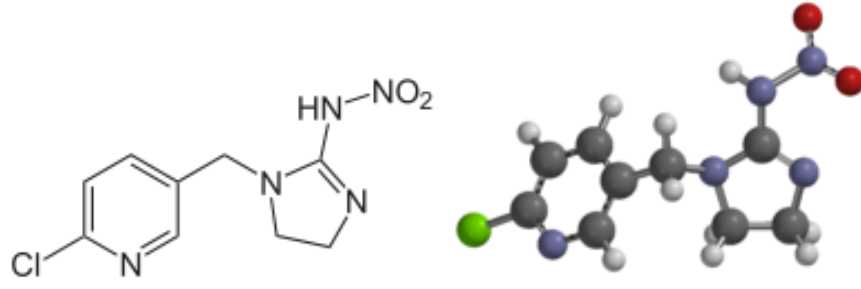
IUPAC Adı : *N*-[1-[(6-Chloro-3-pyridyl)methyl]-4,5-dihydroimidazol-2-yl]nitramide

Kullanım Amacı : İnsektisit

Molekül Formülü : C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>2</sub>

Molekül Ağırlığı : 255.661 g / mol

Yapısal Formülü :



Görünüşü : Renksiz kristaller

Erime Noktası : 136.4-143.8 °C

Çözünürlüğü : Suda, 51 mg / L (20°C)

Stabilitesi : 40 °C'den sonra ısıya duyarlı. -10 °C'den sonra donmaya karşı hassas.

Uygulamalar : Mide ve temas yolu ile etki eder ve etki süresi oldukça uzundur. Damlama sulama ya da sulama suyu ile kullanıldığında , topraktan kökler yoluyla alınır , sürgün ve yapraklara ulaşarak emici ve ısırıcı böceklere karşı uzun süreli koruma sağlar.

Toksikoloji Bilgi :

*Ani oral toksisite* : LD<sub>50</sub> (Sıçan erkek) : 768 mg/kg, LD<sub>50</sub> (Sıçan dişi) : 1042 mg/kg

*Ani dermal toksisite* : LD<sub>50</sub> (Sıçan) : > 5000 mg/kg, *Ani solunum toksisite* : LD<sub>50</sub> (Sıçan) : > 1,752 mg/l [87].

#### 1.2.1.4 Gibber 20 SI™

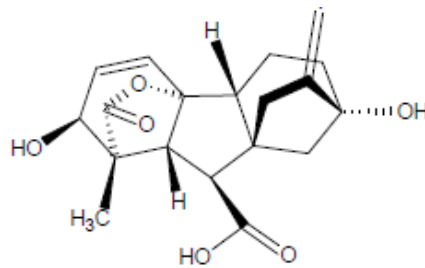
Yaygın Adı : Gibberelik asit (GA3)

Kullanım Amacı : Bitki gelişim düzenleyici (BGD)

Molekül Formülü : C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>O<sub>6</sub>

Molekül Ağırlığı : 346.37 g/mol

Yapısal Formülü :



Görünüşü : Renksiz kristaller

Erime Noktası : 136.4-143.8 °C

Çözünürlüğü : Suda, 50 mg / L (20°C)

Stabilitesi : Ekstrem koşullar haricinde bozunmaya karşı dayanıklı.

Uygulamalar : Gibberelik asit (GA3) birçok kültür bitkisinde değişik amaçlarla kullanılan bir bitki gelişim düzenleyicisidir(BGD). Gibberelik asit, gibberellin grubundan ve bitkilerin bünyesinde doğal olarak bulunan bir hormondur. Bitki hücrelerinde hücrelerin uzamasını sağlar ve büyümeyi teşvik eder, tohumların çimlenme kabiliyetini artırır, bazı bitkilerde döl tutumunu artırır, bazılarında (çekirdeksiz üzüm gibi) dane irileştirici etki yapar.

Toksikoloji Bilgi :

*Ani oral toksisite* : LD<sub>50</sub> (Tavşan) : 6300 mg/kg

*Ani dermal toksisite* : LD<sub>50</sub> (Tavşan) : 2001 mg/kg [89].

### 1.2.2 Pestisitlerle İlgili Yapılan Bazı Çalışmalar

İnsanoğlunun, artan dünya nüfusuna karşılık, yaşamını sürdürebilmek için gıda, hammadde ve enerji kaynağı olarak her zaman ihtiyaç duyduğu tarım bitkilerine olan bağımlılığı da artmıştır. Bu nedenle tarım alanlarından maksimum düzeyde ürün elde etmeyi sağlamak ve ürün kaybını en aza indirmek amacıyla, bitki zararlılarına karşın zirai mücadele ilaçlarının çeşidi ve kullanım sahası yaygınlaşmıştır.

Zararlılara karşı geniş çaplı kullanım alanına sahip olan pestisitlerin meydana getirdiği olumsuz etkiler ve bu etkilerin özellikle memeli hayvanların normal yaşamlarında ne gibi değişiklikler meydana getirdikleri bilim adamları tarafından belirlenmeye çalışılmıştır. Yapılan bu araştırmalardan bazıları aşağıda verilmiştir.

200 ppm DDE ve 100 ppm DDT içeren diyetlerle beslenen Japon bıldırcınlarında (*Coturnix japonica*) yumurta bezi karbonik anhidraz aktivitelerinde % 12-15 azalma olduğu bildirilmiştir [90].

Yayın balığı (*Ictalurus punctatus*) eritrositlerinden elde edilen karbonik anhidraz enziminin 56 önemli su kirleticilerine karşı fiziko-kimyasal özelliklerini araştırılmasında; pestisitlerin şiddetli inhibisyon etkisi tespit edilmiştir [91].

Suda çözünerek akuatik ekosisteme girebilen organik fosfatlı bir pestisit olan Acephate'ın, alabalıkların solungaç ve kan eritrositlerindeki karbonik anhidraz (CA) enzimi üzerine in vitro etkisinin araştırılmasında bu insektisit CA aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir [92].

Herbisit divron (DCMU = Spesifik fotosentez inhibitörü) 'un CA aktivitesini yarı yarıya inhibe ettiği [33] ; divron ve siklohegzimitin CA aktivitesini inhibe ettiği [34]; ethoksazolamid, asetazolamid ve sulfanilamidin CA aktivitesinin inhibitörleri olduğu tespit edilmiştir [93].

Tandon ve Dubey, organik fosforlu bileşiklerden Malathion'un , tatlı su balıkları üzerindeki etkisinin tespitinde, karaciğer ve böbrek fruktoz-1,6-difosfat aldolaz seviyesinin artmasıyla birlikte ölümlere sebep olduğunu rapor etmişlerdir [94].

Çelik ve arkadaşları., Penncozeb Dithane, Cupravit, Bayleton, Baythroid, Mavrik, Talstar ve Endosülfan pestisitlerinin, insan eritrosit CA izoenzimleri (HCA-I ve HCA-II) ve sığır eritrosit CA (BCA) enzimi üzerine etkisini araştırmışlardır.

Baythroid, Talstar ve Mavrik'in, sığır CA ve insan CA izoenzimlerine inhibitör etkisi görülmüştür. Dithane sadece BCA' yı inhibe etmiştir [95].

Ceron ve arkadaşları, organik fosforlu pestisit olan Diazinon'un 0,42 mg / L (96) saat konsantrasyonuna deneysel olarak maruz bırakılan yılan balığının (*Anguilla anguilla*) beyin ve plazmadaki kolinesteraz aktivitesini belirlemişlerdir. Diazinon'un inhibitör etkisini beyin dokusundaki kolinesteraz için % 70 ve plazma örneklerindeki kolinesteraz için % 90 olarak saptamışlardır [96].

Şekeroğlu ve arkadaşları, yedi serum enzimi aktivitesi üzerine bazı pestisitlerin *in vitro* etkilerini araştırmışlar ve bu çalışmalarında enzimlerden serum amilaz, kreatin kinaz, aspartat amino transferaz, alanin amino transferaz, alkalın fosfataz, gama glutamil transferaz ve laktat dehidrogenazı Endosulfan, Mavrik, 2,4-D ve Neoran pestisitlerinin inhibe ettiğini bildirmişlerdir [97].

Arslan ve arkadaşları, alkalın fosfataz, amilaz, kreatin kinaz, gama glutamil transferaz ve laktat dehidrogenaz üzerine Baythroid, Imperator, Meothrin, Somicidin, TCA ve Talstar pestisitlerinin etkilerini araştırmışlar ve bu kimyasalların inhibisyon etkileri olduğunu rapor etmişlerdir [98].

Türkoğlu ve arkadaşları, bazı ticari pestisitlerin sığır serumundan saflaştırılan asetil kolin esteraz üzerine *in vitro* inhibisyon etkisini araştırmışlardır. Bu pestisitlerden Endosulfan, 2,4-D, Methyl Parathion, Malathion, Meothrin, Baythroid, TCA ve Linuron'un bu enzim üzerinde inhibitör etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir [99].

Turan ve arkadaşları, Folidol, Amin'a, Trimidal, Fusilade, Rubigan, Fenarimol gibi, bazı pestisitlerin insan eritrosit karbonik anhidraz enzimi aktivitesi (*in vitro*) üzerine inhibisyon etkilerini incelemişlerdir [100].

Başka bir çalışmada ise, bazı herbisitlerin iki farklı balık türündeki asetil kolin esteraz enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi incelenmiştir [101].

Literatürdeki farklı diğer bir çalışma da ise Oktay Arslan ve çalışma grubu Rubigan [2,4'-dikloro- $\alpha$ -(pirimidin-5-yl) benzhidril alkol], Metidol [O,O-dimetil O-4-nitrofenil fosfortioat ], Super amin'a [(2,4-diklorfenoksi) asetik asit dimetil amonyum] ve Trimidal [2-kloro-4'-fluoro- $\alpha$ -(pirimidin-5-yl) benzhidril alkol] bileşiklerinin, *Cyprinus carpio*, *Diplodus vulgaris*, *Scorpaena porcus*, *Salmo gairdnerii* ve *Barbus barbus* eritrositlerinden elde edilen karbonik anhidraz enzimleri üzerinde inhibisyon etkilerini inlemişlerdir [102].

### 1.3 Araştırmamızda Kullanılan Koyun Türleri

37,5 milyona ulaşan sayısıyla Türkiye deki koyun popülasyonu toplam hayvan popülasyonu içinde önemli bir yere sahiptir. Bu koyun popülasyonu sayesinde Türkiye dünyadaki koyun yetiştiren ülkeler arasında 7. sıradadır. Türkiye'nin toplam süt üretiminin %10.1 ( 1047000 ton ) ve toplam et üretiminin %26.1 ( 112800 ton ) koyun yetiştiriciliğinden sağlanmaktadır.

Türkiye de koyun yetiştiriciliğinin tercih edilmesindeki en önemli nedenler coğrafi yapı ve hava koşullarıdır. Tarım için kullanılmayan geniş alanlar koyun yetiştiriciliği için uygun ortam sağlamaktadır. Türkiye'nin Orta ve Doğu Anadolu bölgelerindeki otlaklarda bulunan bitki örtüsü sert hava koşulları yüzünden zayıf ve düşük bir kaliteye sahiptir. Ancak Türkiye'nin Marmara ve Ege bölgeleri gibi batı kısımları hava şartlarının daha yumuşak ve otlak kalitesinin daha iyi olmasından dolayı koyun yetiştiriciliği için daha uygundur. Marmara bölgesindeki yaygın koyun ırkları Kıvırcık ve Türk Merinos Koyun ırklarıdır. Marmara bölgesinde 2,5 milyon Kıvırcık Koyunu ve 0,3 milyon Türk Merinos Koyun türü bulunmaktadır.

Kıvırcık koyunu et kalitesi iyi bir sertliğe sahip olmasından dolayı yöresel ve önemli koyun türleri arasında en iyi olarak bilinir. Türkiye'ye ek olarak Kıvırcık Koyunu Bulgaristan ve Yunanistan da yetiştirilir. Özellikle Trakya'nın batı kısımlarında Trakya Koyunu olarak anılır.



Şekil 1.12 Kıvırcık Koyunu [103].

Yerli Kıvırcık Koyununu yetiştirme çalışmaları Türkiye Cumhuriyetinin kuruluşundan itibaren devam etmektedir. 1934'den sonra Kıvırcık Koyununun vücut performansını ve yün kalitesini artırmak amacı ile Alman Merinos koçları Türkiye'ye getirildi. Getirilen bu koçlarla yerli Kıvırcık koyunları çiftleştirildi.



**Şekil 1.13** Alman Merinos Koçları [103].

Bu çiftleştirme işleminden 4-5 jenerasyon sonra istenen vücut performansında ve yün kalitesinde koyunlar elde edildi. Melezleştirme işlemi yapay dölleme vasıtasıyla gerçekleştirildi ve bunun sonucunda yeni bir koyun türü elde edildi. Bu elde edilen ilk Türk Merinos koyun türüne Karacabey Merinos koyunu adı verildi.



**Şekil 1.14** Karacabey Merinos Koyunu [103].

1935'ten sonra bu melezleştirme çalışmaları Bursa ve Balıkesir illeri civarındaki özel yetiştiriciler tarafından Karacabey (Bursa) Eyalet Çiftliğinde kıvırcık koyunları üzerinden devam ettirildi.



1935-1940 yılları arasında 620.000 Kıvırcık koyunu Alman Merinos koçlarının spermelerinden yapay dölleme vasıtasıyla elde edildi. Bu yıllarda Türkiye yapay dölleme yolu ile koyun elde eden ülkeler arasında dünyada ikinci sırayı almıştır.

1952'den sonra Alman Merinos Koçu ile melezleştirme çalışmaları Konya'da yerli Ak-Karaman koyun türü kullanılarak devam ettirilmiştir. Bu çalışmalar genotip olarak %80 Alman Merinos Koçu ve %20 Ak-Karaman koyunu elde edilene kadar sürdürülmüştür. Bu elde edilen yeni tür Orta Anadolu Merinos Koyunu olarak adlandırılmıştır.

Daha sonra hem Karacabey Merinos Koyunu hem de Orta Anadolu Merinos Koyunu Türk Merinos Koyun Türü adı altında tek bir isimle anılmaya başlanmıştır [103].



**Şekil 1.15** Türk Merinos Koyunu [103].

#### **1.4 Araştırmanın Amacı**

Et, süt, yn gibi özelliklerinden yararlanılan koyunlardan sağlıklı ürünler elde edebilmek için bu hayvanların sağlıklı yaşam alanlarında yetiştirilmesi gerekmektedir.

Günümüz dünyasında artan evre kirliliği özellikle kırsal kesimlerde yetiştirilen koyunların sağlığını tehdit eden önemli sorunlardan birini oluşturmaktadır. Bu önemli soruna çözüm bulunabilmesi amacıyla bazı bileşiklerin araştırılmasına gerek duyulmaktadır.

Bu nedenle ülkemizde ve dünyanın bazı bölgelerinde ürün veriminin arttırılması amacıyla çok sık kullanılan Decis 2,5 EC™, Confidor SC 350™ , Fosforin M™, Gibber 20 SL bileşiklerinin metabolizmada fizyolojik öneme sahip paraoksanaz enzimi üzerine etkilerinin araştırılmasının önemli olacağı kanatindeyiz.

Bu alışmamızda, Kıvırcık ve Merinos koyun serumlarından hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılan paraoksanaz enziminin kinetik ve elektroforetik özelliklerinin araştırılması planlanmıştır.

## 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'tetrametiletildiamin (TEMED), trihidroksimetil aminometan (Tris-Base), paraoksan, 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 brilliant blue G-250, sodyum bikarbonat, 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	Hoefer, 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	Gel Doc-H Imaging System (UVP)
Gradient Mikser	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 g (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 g (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 g (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); 14.2g (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 PON enziminin elüsyonu için kullanılan tamponu:** 14.2g (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 etanol de çözüldü. Bu çözeltiye 100 ml %95'lik fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin son hacmi distile su ile 1L'ye tamamlandı.

**Amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda oluşan çökeleğin alındığı tampon:** 0.1 M (pH 8.0); 1.211 g (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 paraoksan 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 gr
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 g Coomassie brilliant blue G-250, 120 ml metanolde çözüldü. Bu çözeltiye 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.

	<b>Ayırma Jeli</b>	<b>Yığılma Jeli</b>
	<b>%10</b>	<b>%3</b>
<p><b><u>Akril amid/Bis</u></b></p> <p>Akril amid            15 g  Bis                        0,4 g  Alınarak son hacim destile su ile 50 mL'ye tamamlanır.</p>	16.65mL	1.6 mL
Destile su	20.1 mL	12.2 mL
<p><b><u>1.5 M tris-HCL (pH 8.8)</u></b></p> <p>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.</p>	12.5 mL	–
<p><b><u>0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)</u></b></p> <p>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.</p>	–	5mL
<p><b><u>% 10 'luk SDS</u></b></p> <p>SDS                    1g  Alınarak son hacim destile su ile 10 mL'ye tamamlanır.</p>	0.5µL	200µL
<b>TEMED</b>	25 µL	20µL
<p><b><u>%10'luk amonyum persülfat</u></b></p> <p>Amonyum persülfat    1g  Alınarak son hacim destile su ile 10 mL'ye tamamlanır.</p>	750µL	400µL

## **2.2 Yöntemler**

### **2.2.1 Kan Serumunun Ayrılması**

Kan numuneleri, kuru santrifüj tüpüne alındıktan sonra 5000 rpm'de, +4 °C'de ve 10 dk 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 0.05 ml 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 paraoksanın p-nitrofenole enzimatik dönüşüm hızı tespit edildi. Aynı işlem enzim olmadan tekrarlanarak aradaki fark enzim aktivitesi olarak belirlendi. 1 ünite paraoksonaz dakikada meydana gelen p-nitrofenolün mmol'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 595 nm'de maksimum absorban göstermesi esasına dayanır [112].

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'sinde 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 µg protein değerleri ile standart grafik hazırlandı. (Şekil 3.2).

Enzim çözeltilerinden 0.1'er ml 2 ayrı tüpe alınarak üzerlerine 5'er ml Coomassie reaktifi ilave edildi. Vorteks de 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 Çöktürme Aralığının Belirlenmesi**

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

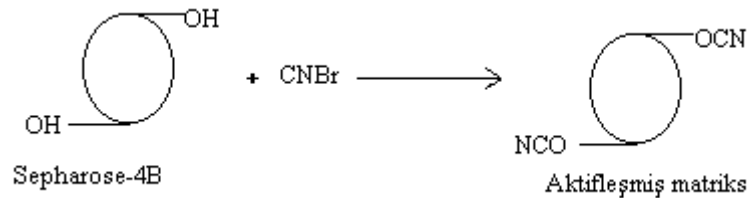
S<sub>2</sub> : 1'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğu

Paraoksonaz enzimi saflaştırılmak için ilk önce %60 doyumluğa getirildi ve 20 dakika boyunca 4 °C’ de 10000 rpm’de santrifüj edildi. Süpernatant kısmı alındı ve çöken kısmı atıldı. Süpernatant %80 doyumluğa getirildi 1 saat boyunca 10000 rpm’de 4 °C’de santrifüj edildi. Çöken kısım alındı [26].

## 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 değişmeye kadar devam edildi (10-15dk). Çok miktarda buz süspansiyona katıldı ve karışım bir bunher hunisine nakledildi. Daha sonra 250mL soğuk 0.1M NaHCO<sub>3</sub> tamponu (pH 10.00) ile yıkandı [26].

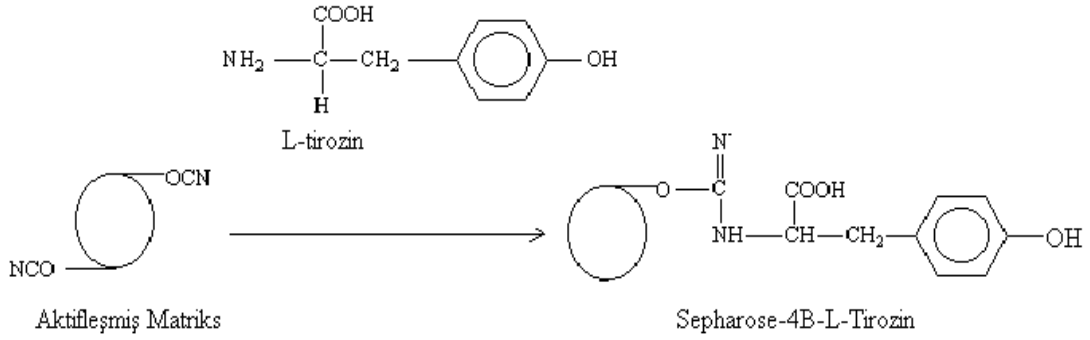


Şekil 2.1 Sepharose 4B’nin aktifleştirilmesi

### 2.2.4.2.2 L-tirozinin Bağlanması

CNBr ile aktifleştirilmiş matriks üzerine, 20mL’inde 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.

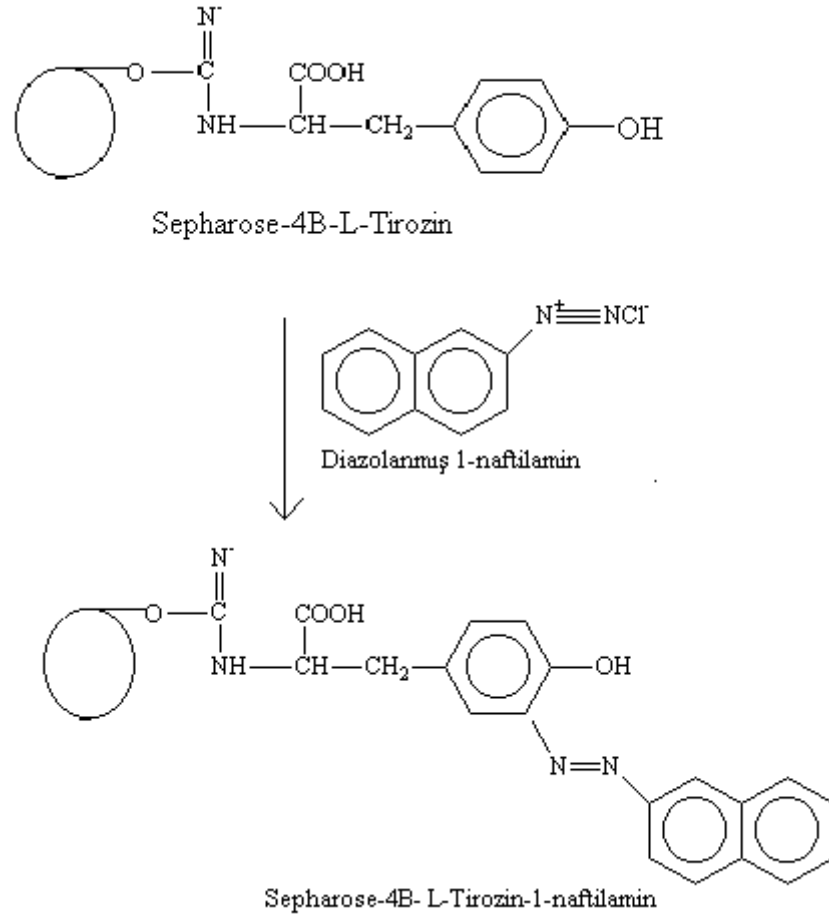
Bu sürenin bitiminde yıkama suyu 280nm’de absorbans vermeyinceye kadar bol su ile yıkandı. Böylece reaksiyona girmeyen tirozin tamamen uzaklaştırılmış oldu. Yıkama 100mL 0.2 M NaHCO<sub>3</sub> tamponu (pH: 8.8) ile tekrarlandı. Tirozinle modifiye sepharose-4B aynı tamponun 40mL’si içine alındı [26].



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 ettik ve ısıttık) 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 [26].



**Şekil 2.3** 1-Naftilamin Bileşiğinin Bağlanması [26]

#### 2.2.4.3 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (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 elektrofrez (SDS-PAGE) Laemelli [124] tarafından belirtilen yöntemler yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi.

Bu amaçla elektrofrez cam plakaları önce su, sonra etil alkol ile iyice temizlendi. Daha sonra plakalar arasına plastik aralık oluşturucusu yerleştirilerek iki cam plaka birbiri üzerine konuldu ve elektrofrezin dökme aparatına sabitlendi.

Çizelge 2.1’de belirtildiği şekilde hazırlanan ayırma jeli plakalar arasında 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 arasında tamamen doluncaya kadar polimerleşmiş ayırma jelinin üzerine yığılma 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. Jele yüklenecek numuneler 3 dakika 100 °C’de termoblokta bekletildi. Numuneler soğutulularak 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 yığılma 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 renk açma çözeltisine kondu. Belirli aralıklarla değiştirmek suretiyle jelin zemin rengi açılıp protein bantları belirginleşinceye kadar bu çözelti içinde çalkalandı. Jel renk açma çözeltisinden çıkarıldıktan sonra jel görüntüleme sistemi (UVP) ile görüntü bilgisayara aktarıldı.

### 2.2.5 Optimum şartlarda $K_M$ ve $V_{max}$ degerlerinin bulunması

$K_M$  ve  $V_{max}$  degerlerinin tespit edilmesi amacıyla optimum şartlarda ( $37^{\circ}C$ 'de ve 0,1 M pH:8 Tris-Base tamponunda) paraokson substratının sekiz farklı konsantrasyonunda enzim aktivitesi ölçümü yapıldı. Her ölçüm iki defa tekrarlanarak, bulunan degerlerin ortalaması alındı.

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

### 2.2.6 Bazı Pestisitlerin $IC_{50}$ Değerlerinin Bulunması

Decis 2,5 EC<sup>TM</sup>, Fosforin M, Confidor SC 350<sup>TM</sup> ve Gibber 20 SI<sup>TM</sup> bileşiklerinin  $IC_{50}$  degerlerini bulmak için, optimum şartlarda paraoksan substratının 2mM sabit konsantrasyonunda çalışıldı. Substrat çözeltisi her ölçümde 0.1 ml alındı, paraoksan ve pestisit 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 + pestisit çözeltisine çabuk bir şekilde eklendikten sonra 412 nm' de bir dakikada absorbans da meydana gelen değişme okundu (Çizelge 3.5, 3.6, 3.7, 3.8). Elde edilen absorbans değerlerinden % aktivite hesaplandı. % Aktivite  $-[I]$  grafikleri çizildi.

### 3. BULGULAR

#### 3.1 Enzimin Saflaştırılması

##### 3.1.1 Amonyum Sülfat Çöktürmesi

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

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

V : Serum hacmi

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

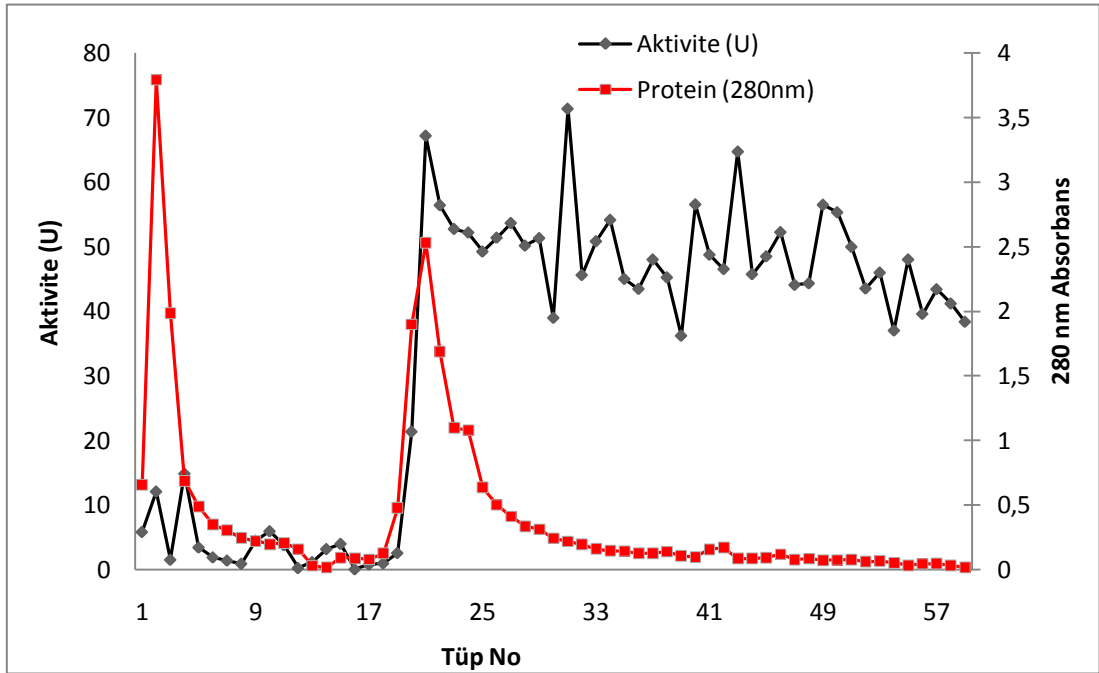
S<sub>2</sub> : 1'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğu

##### 3.1.2. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile PON Enziminin Saflaştırılması

Hazırlanan hidrofobik etkileşim kolonu önce 1M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içeren 0.1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH:8.0 tamponu ile dengelendi. Kolonun dengeleme işlemi bittikten sonra, jel üzerindeki tampon çözeltisi jel seviyesine kadar indirildi.

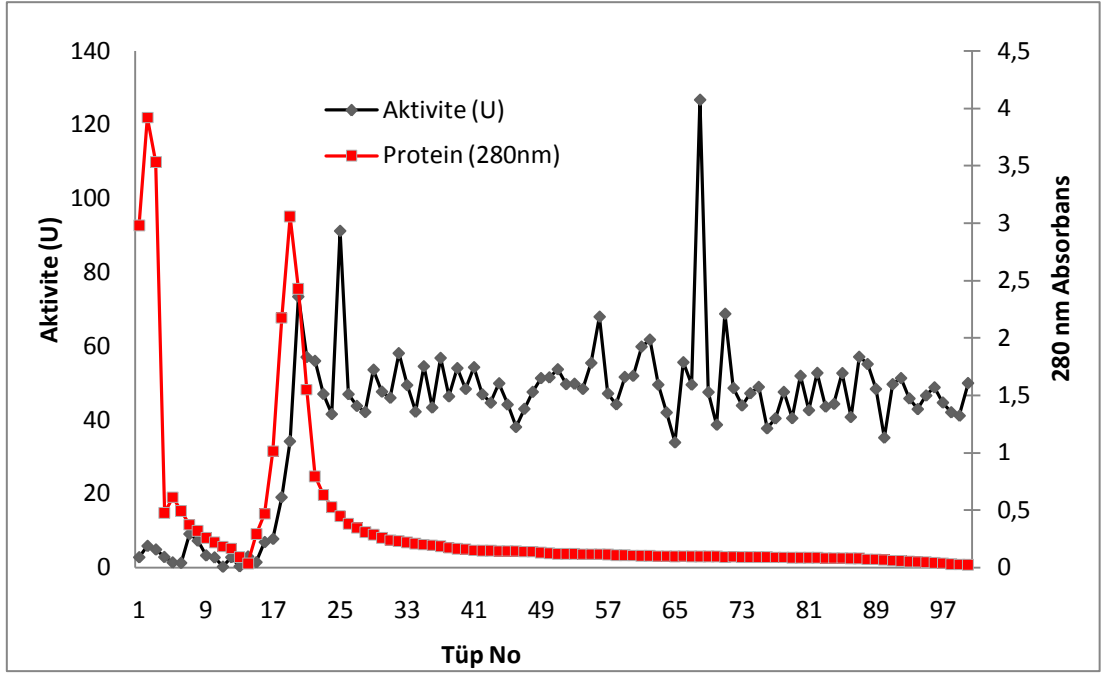
Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen serum enzim çözeltisi 1M amonyum sülfat doygunluğuna getirildikten sonra kolona tatbik edildi.

Kolona 1M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  içeren 0.1M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  pH:8.0 tamponu ve 0.1M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  pH:8.0 tamponu ile oluşturulan yüksek tuz konsantrasyonundan düşük tuz konsantrasyonuna doğru tuz gradienti uygulandı. Altan 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. Kıvrıcık ve Merinos koyun türlerinden elde edilen değerlerin tüp numaralarına karşılık gelen aktivite ve protein miktarları grafiği çizildi.



Şekil 3.1 Hidrofobik etkileşim kolonundan Kıvrıcık koyun türüne ait PON enziminin elüsyonu



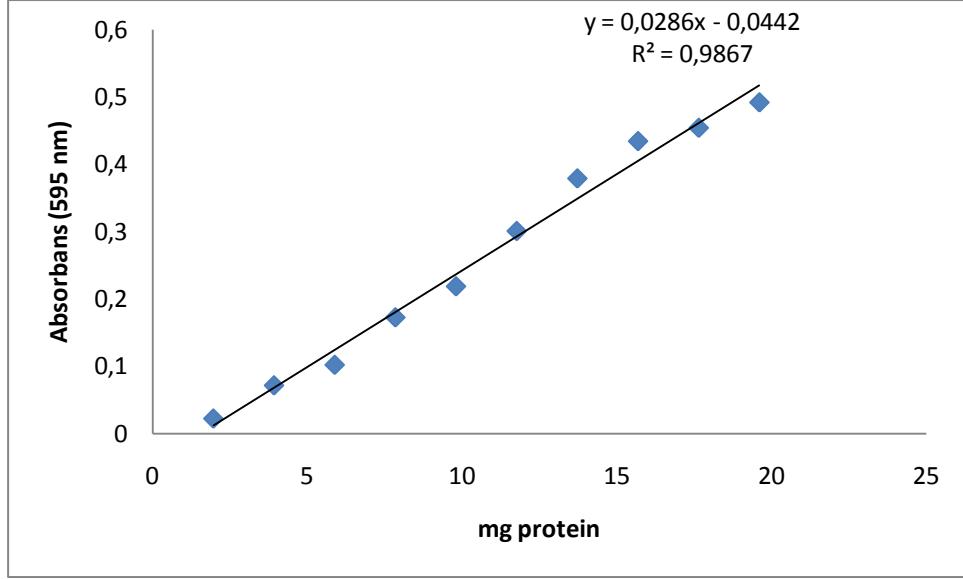


Şekil 3.2 Hidrofobik etkileşim kolonundan Merinos koyun türüne ait PON enziminin elüsyonu

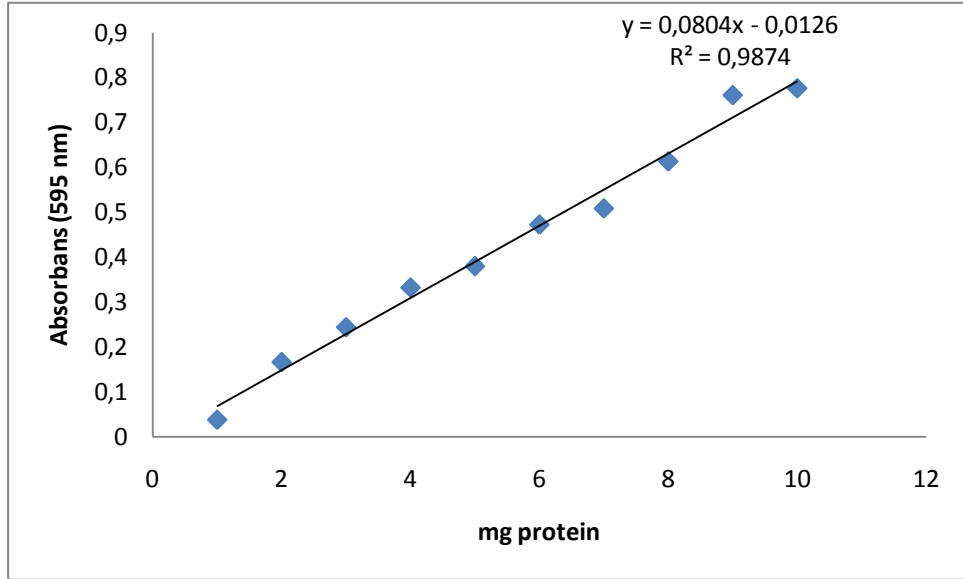
### 3.1.3 Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri

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 absorbans değerleri Şekil 3.1’de gösterilmiştir



**Şekil 3.3** Kıvrıkcık koyun türüne ait Bradford yöntemi ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan standart grafik



**Şekil 3.4** Merinos koyun türüne ait Bradford yöntemi ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan standart grafik

**Çizelge 3.1** Kıvırcık koyunu için saflaştırma tablosu

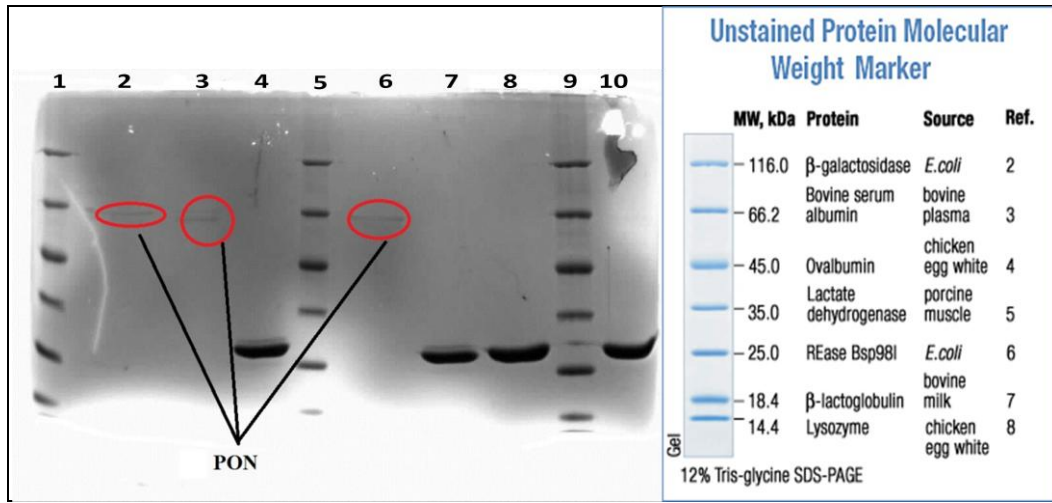
<b>Basamak</b>	<b>Hacim (ml)</b>	<b>Aktivite (U)</b>	<b>Toplam Aktivite (U)</b>	<b>Protein Miktarı (mg/ml)</b>	<b>Toplam Protein (mg)</b>	<b>Spesifik Aktivite (U)</b>	<b>% Verim</b>	<b>Saflaştırma Derecesi</b>
<b>Serum</b>	25	77.978	1949.45	1389.9	34747.5	0.056	100	-
<b>Amonyum Sülfat Çöktürmesi</b>	17	64.716	1100.172	1472.4	25030.8	0.044	56.43	0.79
<b>Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi</b>	15	71.347	1070.205	2.689	40.335	26.53	54.90	473.75

**Çizelge 3.2** Merinos koyun için saflaştırma tablosu

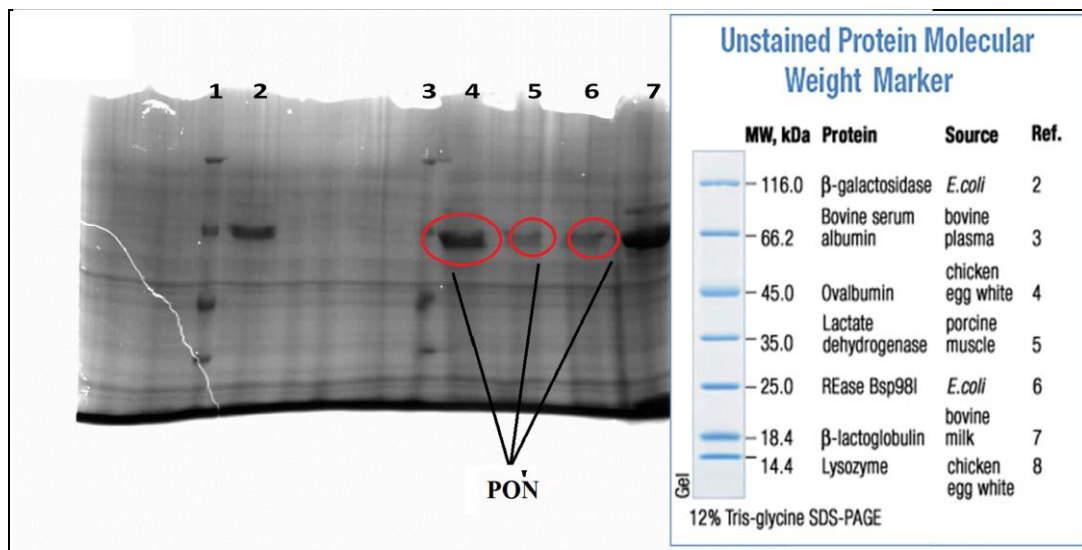
<b>Basamak</b>	<b>Hacim (ml)</b>	<b>Aktivite (U)</b>	<b>Toplam Aktivite (U)</b>	<b>Protein Miktarı (mg/ml)</b>	<b>Toplam (mg)</b>	<b>Spesifik Aktivite (U)</b>	<b>% Verim</b>	<b>Saflaştırma Derecesi</b>
<b>Serum</b>	25	71.224	1780.6	3449	86225	0.021	100	-
<b>Amonyum Sülfat Çöktürmesi</b>	17	63.917	1086.589	3271	55607	0.019	61.02	0.90
<b>Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi</b>	15	68.829	1032.435	2.223	33.345	30.96	57.98	1474.29

### 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 3.6).



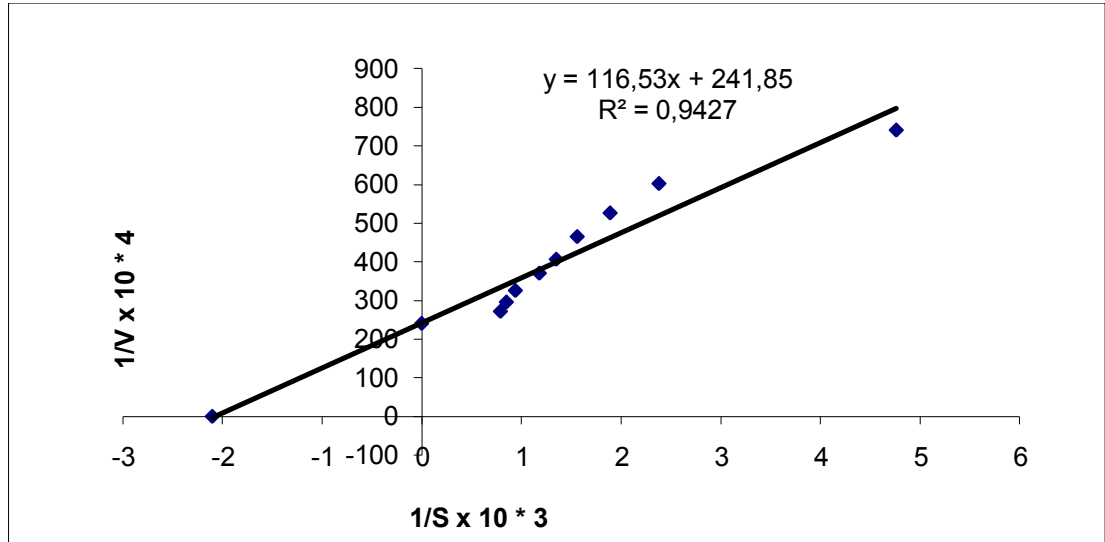
**Şekil 3.5** Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile Kıvrıcık koyun serumundan saflaştırılan paraoksonaz enziminin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi. 2,3 ve 6 saflaştırılan PON.



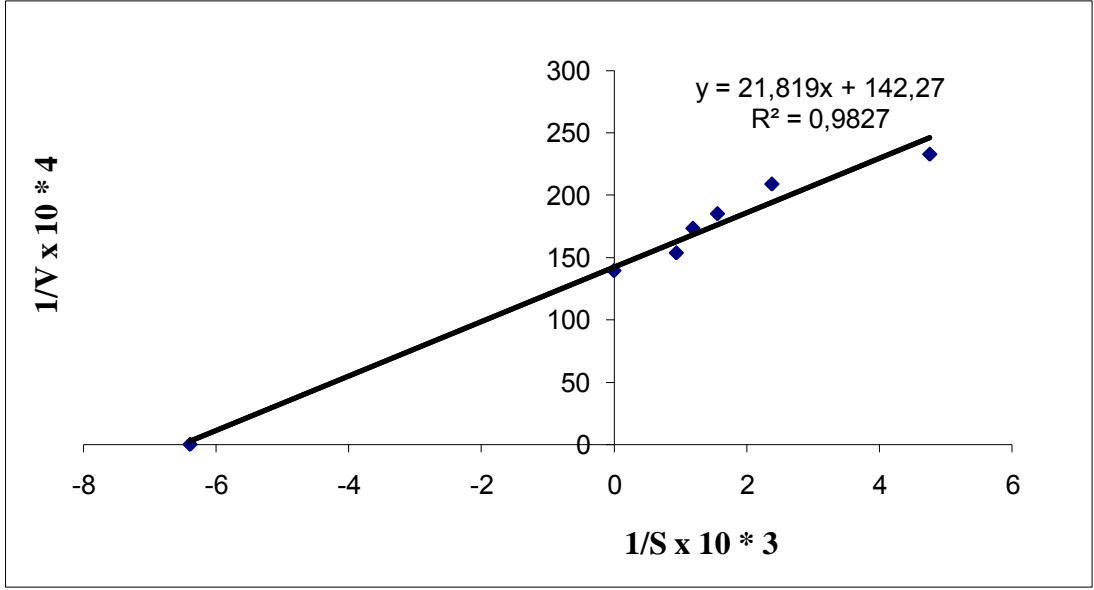
**Şekil 3.6** Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile Merinos koyun serumundan saflaştırılan paraoksonaz enziminin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi. 4,5 ve 6 saflaştırılan PON.

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

$K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin bulunması amacıyla, optimum şartlarda paraoksan 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 PON enzimi için  $K_M$  değeri 0,482 mM ve  $V_{max}$  değeri 41,348 U/mL'dak, Kıvırcık PON enzimi için de  $K_M$  değeri 0,153 mM ve  $V_{max}$  değeri 70,289 U/mL'dak olarak bulundu.



Şekil 3.7 Saflaştırılmış merinos serum paraoksonaz enziminin paraoksan substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.



**Şekil 3.8** Saflaştırılmış kıvrıcık serum paraoksonaz enziminin paraoksan substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.

**Çizelge 3.3** 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 Çözeltilisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Substrat Çözeltilisinin 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 3.4** 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

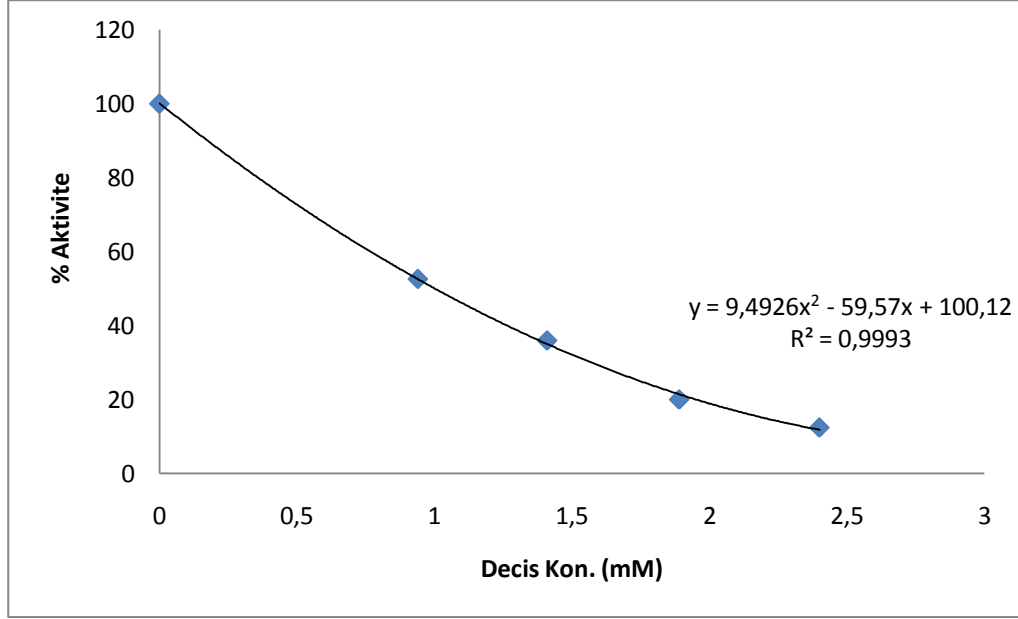
100 mM Tris Tamponu ( $\mu$ l)	Enzim Çözeltisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Substrat Çözeltisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Küvetteki Toplam Hacim ( $\mu$ l)	Küvetteki Substrat Konsantrasyonu (mM)	$\Delta OD$ (412nm)	Aktivite (U/ml dak)	$(1/V) \times 10^4$	$1/[S]$
990	50	10	1050	0,21	0,035	43,0	232,7	4,76
980		20		0,42	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 Pestisitlerin IC<sub>50</sub> Değerlerinin Bulunması

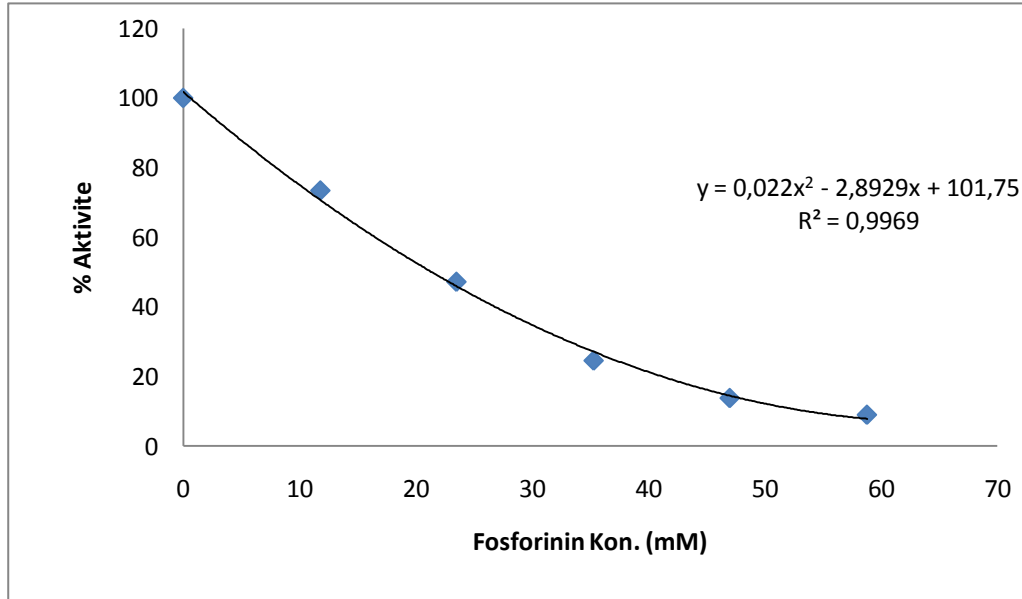
Çalışmamızda kullandığımız pestisitlerin IC<sub>50</sub> değerlerini bulmak için, optimum şartlarda paraokson substratının 2 mM sabit konsantrasyonunda çalışıldı. Substrat çözeltisi her ölçümde 0,1ml paraokson alındı ve pestisitlerden ise değişik hacimlerde alınarak toplam 1,05 mL'lik bir reaksiyon hacmi oluşturuldu. Önce inhibitörsüz ortamda enzim aktivitesi bulundu. Bu değer %100 aktivite olarak kullanıldı. Daha sonra optimum pH ve sıcaklıkta 0,1 mL enzim çözeltisi alınıp daha önceden hazırlanmış olan 1 mL tampon + substrat + pestisit çözeltisine çabuk bir şekilde eklendikten sonra 412 nm'de bir dakikada absorbansta meydana gelen değişme okundu. Elde edilen absorbans değerlerinden % aktiviteler hesaplandı. % Aktivite-[I] grafikleri çizildi. (Şekil 3.9, 3.10, 3.11, 3.12, 3.13, 3.14, 3.15, 3.16). Bu grafiklerden yararlanarak kullanılan her bir pestisit için IC<sub>50</sub> değerleri hesaplandı.

**Çizelge 3.5** Kıvrırcık koyun Serumundaki PON enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Decis 2,5 EC™ ve Fosforin M™ IC<sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, pestisit konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

100mM Tris tamponu (µl)	Pestisit	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Substrat çözeltilisinin Hacmi (µl)	Pestisit Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Küvetteki Pestisit Kons. [I] (mg/ml)	ΔOD (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite
850	Decis 2,5 EC™	100	100	-	-	0.0871	53.4794	100
830				20	0.94	0.0458	28.1212	52.58
820				30	1.41	0.0313	19.2182	35.94
810				40	1.89	0.0174	10.6836	19.98
800				50	2.4	0.0108	6.6312	12.4
850	Fosforin M™	100	100	-	-	0.1060	65.084	100
840				10	11.8	0.0774	67.5236	73.01
830				20	23.5	0.0500	30.7000	47.17
820				30	35.3	0.0260	15.964	24.53
810				40	47.0	0.0146	8.9644	13.77
800				50	58.8	0.0095	5.8330	8.96



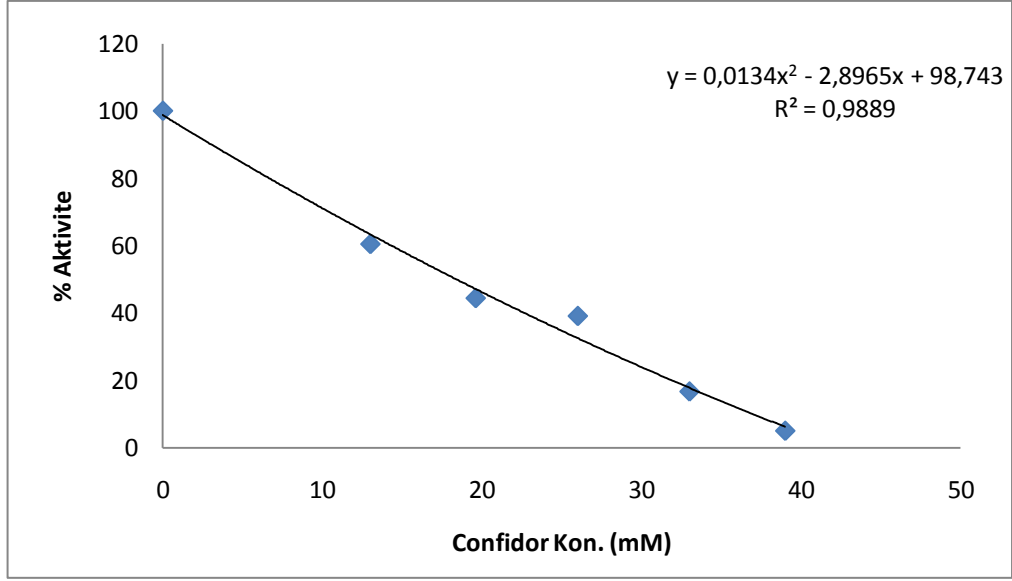
**Şekil 3.9** Saflaştırılmış Kıvırcık koyun serum paraoksonaz enzimi üzerine 2mM paraoksan substratı konsantrasyonunda Decis 2,5 EC™ için % aktivite-[I] grafiği



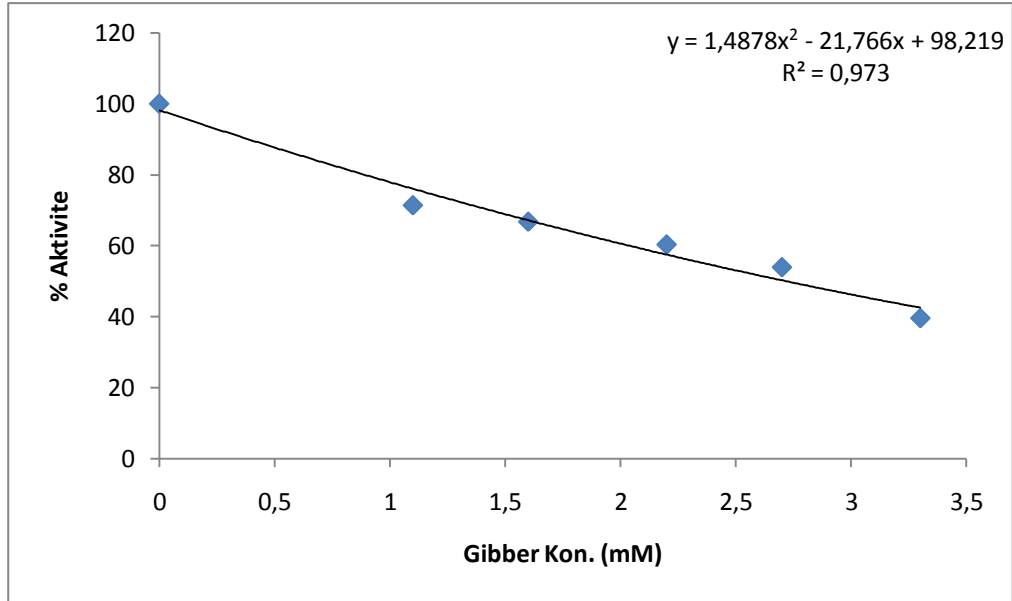
**Şekil 3.10** Saflaştırılmış Kıvırcık koyun serum paraoksonaz enzimi üzerine 2mM paraoksan substratı konsantrasyonunda Fosforin M™ için % aktivite-[I] grafiği

**Çizelge 3.6** Kıvrıcık koyun Serumundaki PON enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Confidor SC 350<sup>TM</sup>ve Gibber 20 SI<sup>TM</sup> IC<sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, pestisit konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

100mM Tris tamponu (µl)	Pestisit	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Substrat çözeltilisinin Hacmi (µl)	Pestisit Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Küvetteki Pestisit Kons. [I] (mg/ml)	ΔOD (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite
850	Confidor SC 350 <sup>TM</sup>	100	100	-	-	0.1320	81.0480	100
840				10	13.00	0.0798	48.9972	60.45
835				15	19.60	0.0586	35.9804	44.39
830				20	26.00	0.0516	31.6824	39.09
825				25	33.00	0.0220	13.5080	16.67
820				30	39.00	0.0066	4.0524	5.00
850	Gibber 20 SI <sup>TM</sup>	100	100	-	-	0.0905	55.567	100
830				20	1.100	0.0646	39.664	71.38
820				30	1.600	0.0604	37.085	66.74
810				40	2.200	0.0546	33.524	60.33
800				50	2.700	0.0488	29.963	53.92
790				60	3.300	0.0358	21.981	39.56



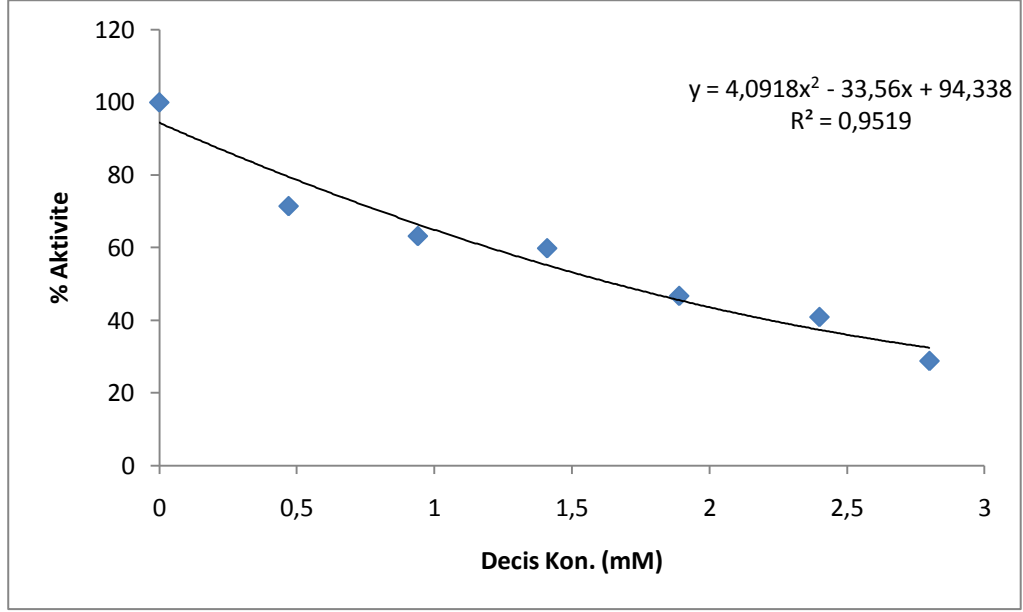
**Şekil 3.11** Saflaştırılmış Kıvırcık koyun serum paraoksonaz enzimi üzerine 2mM paraoksan substratı konsantrasyonunda Confidor SC 350™ için % aktivite-[I] grafiği



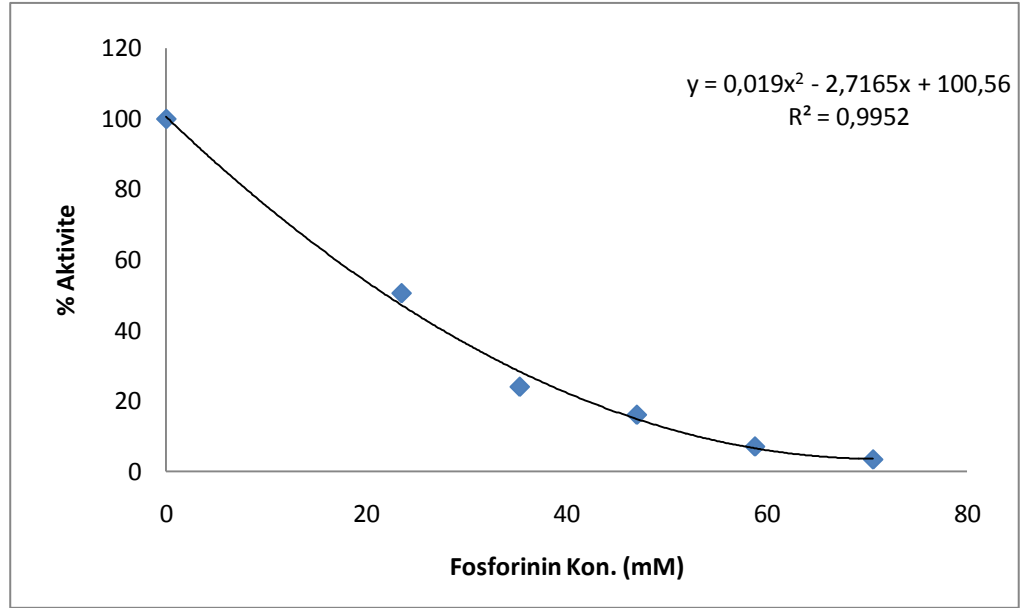
**Şekil 3.12** Saflaştırılmış Kıvırcık koyun serum paraoksonaz enzimi üzerine 2mM paraoksan substratı konsantrasyonunda Gibber 20 SI™ için % aktivite-[I] grafiği

**Çizelge 3.7** Merinos koyun Serumundaki PON enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Decis 2,5 EC™ ve Fosforin M™ IC<sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, pestisit konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

100mM Tris tamponu (µl)	Pestisit	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Substrat çözeltilisinin Hacmi (µl)	Pestisit Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Küvetteki Pestisit Kons. [I] (mg/ml)	ΔOD (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite
850	Decis 2,5 EC™	100	100	-	-	0.0861	52.87	100
840				10	0.47	0.0615	37.761	71.42
830				20	0.94	0.0544	33.40	63.17
820				30	1.41	0.0515	31.62	59.81
810				40	1.89	0.0402	24.68	46.68
800				50	2.4	0.0352	21.61	40.87
790				60	2.8	0.0246	15.10	28.56
850	Fosforin M™	100	100	-	-	0.0844	51.8216	100
840				10	11.8	0.0510	31.3140	60.43
830				20	23.5	0.0427	26.2178	50.59
820				30	35.3	0.0203	12.4642	24.05
810				40	47.0	0.0136	8.3504	16.11
800				50	58.8	0.0060	3.6840	7.11
790				60	70.6	0.0029	1.7806	3.44



**Şekil 3.13** Saflaştırılmış Merinos koyun serum paraoksonaz enzimi üzerine 2mM paraoksan substratı konsantrasyonunda Decis 2,5 EC™ için % aktivite-[I] grafiği

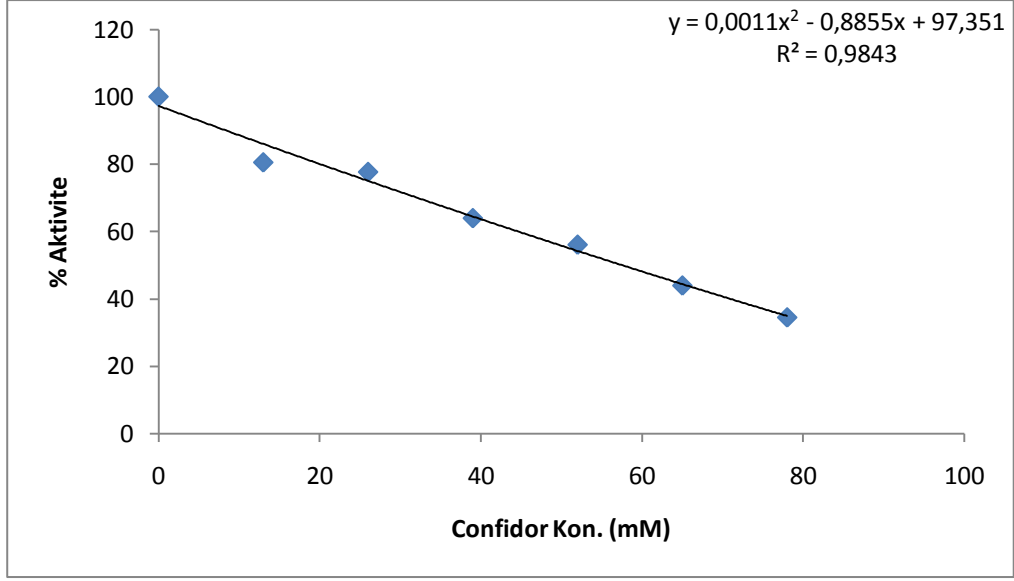


**Şekil 3.14** Saflaştırılmış Merinos koyun serum paraoksonaz enzimi üzerine 2mM paraoksan substratı konsantrasyonunda Fosforin M™ için % aktivite-[I] grafiği

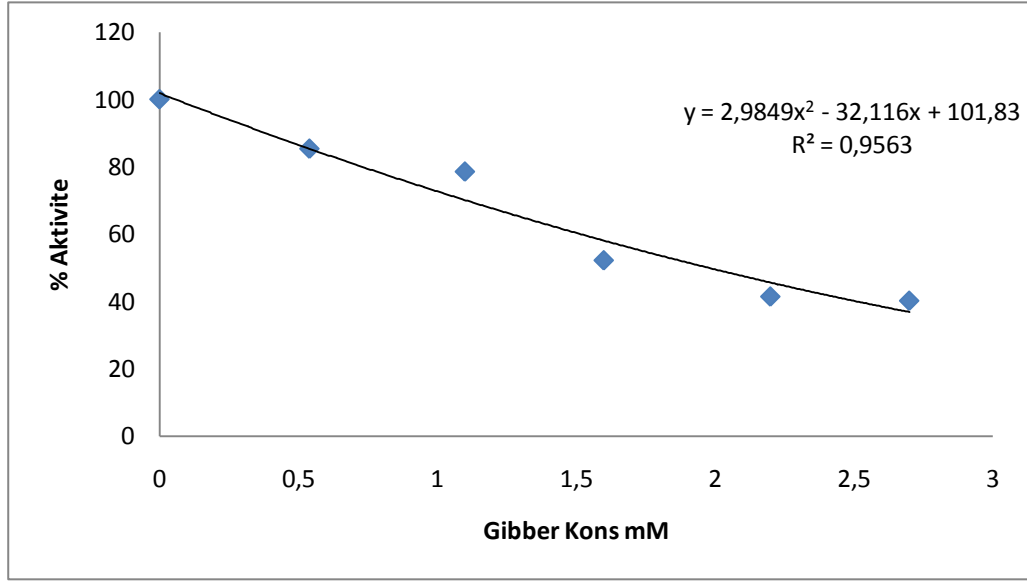


**Çizelge 3.8** Merinos koyun Serumundaki PON enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Confidor SC 350<sup>TM</sup>ve Gibber 20 SI<sup>TM</sup> IC<sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, pestisit konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

100mM Tris tamponu (µl)	Pestisit	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Substrat çözeltilisinin hacmi (µl)	Pestisit Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Küvetteki Pestisit Kons. [I] (mg/ml)	ΔOD (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite
850	Confidor SC 350 <sup>TM</sup>	100	100	-	-	0.1015	62.321	100
840				10	13.00	0.0817	50.1638	80.49
830				20	26.00	0.0788	48.3832	77.64
820				30	39.00	0.0649	39.8486	63.94
810				40	52.00	0.0569	34.9366	56.06
800				50	65.00	0.0446	27.3844	43.94
790				60	78.00	0.0350	21.4900	34.48
850	Gibber 20 SI <sup>TM</sup>	100	100	-	-	0.0648	39.7872	100
840				10	0.540	0.0553	33.9542	85.34
830				20	1.100	0.0509	31.2526	78.55
820				30	1.600	0.0358	21.9812	55.25
810				40	2.200	0.0269	16.5166	41.51
800				50	2.700	0.0261	16.0254	40.27



**Şekil 3.15** Saflaştırılmış Merinos koyun serum paraoksonaz enzimi üzerine 2mM paraoksan substratı konsantrasyonunda Confidor SC 350™ için % aktivite-[I] grafiği



**Şekil 3.16** Saflaştırılmış Merinos koyun serum paraoksonaz enzimi üzerine 2mM paraoksan substratı konsantrasyonunda Gibber 20 SI™ için % aktivite-[I] grafiği

**Çizelge 3.9** Pestisitlerin Kıvrıcık koyunu serumundan elde edilen PON enzimi üzerindeki IC<sub>50</sub> değerleri

<b>Pestisitler</b>	<b>IC<sub>50</sub> Değerleri (mM)</b>
Decis 2,5 EC <sup>TM</sup>	1.0019
Fosforin M <sup>TM</sup>	21.3591
Confidor SC 350 <sup>TM</sup>	18.4029
Gibber 20 SI <sup>TM</sup>	2.7217

**Çizelge 3.10** Pestisitlerin Merinos koyunu serumundan elde edilen PON enzimi üzerindeki IC<sub>50</sub> değerleri

<b>Pestisitler</b>	<b>IC<sub>50</sub> Değerleri (mM)</b>
Decis 2,5 EC <sup>TM</sup>	1.6552
Fosforin M <sup>TM</sup>	21.9900
Confidor SC 350 <sup>TM</sup>	57.5900
Gibber 20 SI <sup>TM</sup>	1.9800

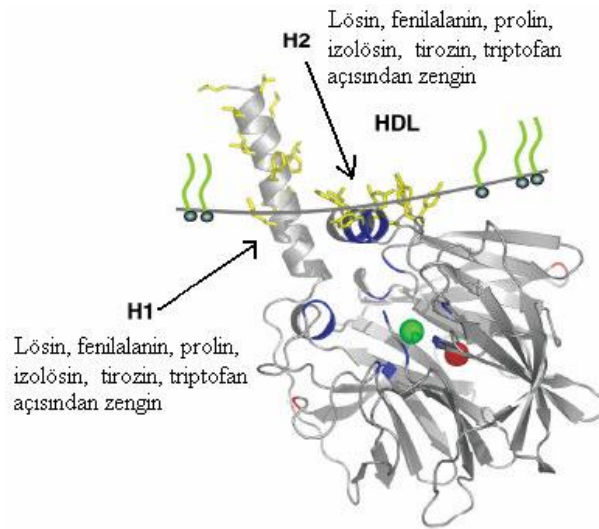
#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada detoksifikasyon, antioksidan ve antibakteriyel aktivitelere sahip PON enzimi farklı koyun türlerinden hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Elde edilen saf enzimin bazı kinetik ve elektroforetik özellikleri incelenmiş ve ayrıca Decis 2,5 EC™, Fosforin M™, Confidor SC 350™ pestisitleri ve Gibber 20 SI™ bitki gelişim düzenleyicisinin bu enzim üzerindeki inhibisyon etkileri saptanmıştır.

Araştırmamızda materyal olarak kullanılan Kıvırcık ve Merinos koyun türleri Marmara ve Ege bölgelerinde sıkça rastlanan ve et kaliteleri iyi bir sertliğe sahip olmalarından dolayı Türkiye’de yöresel ve önemli koyun türleri arasında en iyi olarak bilinirler [104]. Bu iki koyun türü en iyi et ve yün kalitesi elde etmek amacıyla çeşitli melezleştirme çalışmalarına maruz bırakılmıştır. Bu nedenden dolayı bu iki koyun türünden de elde edilen PON enziminin biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesinin önem taşıdığı düşünülerek bu çalışma gerçekleştirilmiştir.

PON enziminin hidrofobik karakteri bu tekniğin seçilmesinde en önemli sebeplerden birisi olmuştur. Söz konusu enzim, N terminal bölgesinde bulunan H1 ve H2 heliks yapısı olarak isimlendirilen hidrofobik yapılar ile HDL’ye bağlanmaktadır (Şekil 4.1) [15,40,104]. N-terminal bölgesini lösin, fenil alanin, prolin, isolösin, tirozin, triptofan ve valin gibi aminoasitleri ihtiva eden 7-18 residüler arası H1 hidrofobik ucu, 185-202 residüler arası da H2 hidrofobik ucu oluşturmaktadır. Ayrıca PON1’in hidrofobik yüzeyi ile HDL arasında triptofan, tirozin ve lizin aminoasitlerince zengin aromatik ve kısmen hidrofilik bölge bulunmaktadır [40,106].

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 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 [107]. Karbodiimid ile aktifleştirilmiş matrikse primer amin grubunun bağlanması ile amid bağı oluşmaktadır. Bu bağ kromatografi işlemlerinde dayanıklıdır. Fakat aktifleştirilme sırasında jel, pH 4,5'da 24 saat süre ile karıştırılmaktadır. Bu işlem kromatografi sırasında jelin akış özelliklerini olumsuz yönde etkilemektedir [107]. Bir başka aktifleştirme işleminde epoksi bileşiklerinden yararlanılmıştır [108]. Kromatografi işlemlerinde gayet dayanıklı olan bu yapılar, 16 saat aktifleştirme ve 16 saat ligand bağlama süresi olmak üzere toplam 32 saatte gerçekleşmektedir. pH'nın 10 civarında olması, jelin kimyasal yapısını etkilememesine rağmen uzun süre karıştırma işlemleri, polisakkarit partiküllerinin fiziksel yapısının deformasyonuna sebep olabilir. Sonuç olarak, hazırlanacak hidrofobik jelin akış özellikleri olumsuz yönde etkilenecektir. Çalışmamızda kullanılan CNBr ile aktifleştirme işlemi sadece 30 dakikada gerçekleştirilmektedir. Böylece jelin fiziksel yapısındaki deformasyon sakıncaları ortadan kaldırılmıştır.



**Şekil 4.1** PON1 enziminin HDL yüzeyine bağlanma modeli [40]

Araştırmamızda matriks olarak seçilen Sepharose-4B'ye hidrofobik ligand (1-Naftilamin) L-tirozin bileşiği aracılığı ile bağlanmıştır. Burada tirozin uzantı kolu olarak da görev yapmaktadır. Uzantı kolunun hidrofobik etkileşim kromatografisindeki önemi afinite kromatografisinde olduğu gibi [113] açıkça belirtilmemesine rağmen, hidrofobik etkileşimde de L-tirozin bileşiğinin önemli olduğu kanaatindeyiz. Ayrıca ligantın matrikse bağlanmasında da son derece uygun bir adaptör molekül olduğu L-tirozinin bir başka kullanım sebebidir.

Bu kromatografinin temel prensibi, yüksek tuz konsantrasyonunda saflaştırılacak biyomolekülde bulunan hidrofobik yüzey ile apolar ligand arasındaki hidrofobik etkileşimdir. Bu etkileşimin gerekçesi artan entropi ile açıklanmaktadır. Kullanılacak ligandın hidrofobik karakteri kritik bir öneme sahiptir. Düşük hidrofobik karaktere sahip ligandlar kullanıldığı zaman ayrılacak moleküllerin kolanda etkileşimini sağlayabilmek için yüksek tuz konsantrasyonu uygulama zorunluluğu vardır. Bu durumda proteinlerin kendi aralarında hidrofobik etkileşim riski daha fazladır. Yüksek hidrofobik karaktere sahip ligand tercih edildiği durumda ise saflaştırılacak molekül ile ligand arasındaki etkileşim artacağı için elüsyon sırasında problemler ortaya çıkabilir. Genellikle ticari olarak bulunan hidrofobik etkileşim kromatografi jellerinde hidrofobik uç olarak düz zincirli alkil ligandları ve aril ligandları gibi moleküller kullanılmaktadır. Bunlardan isopropil, butil, oktil ve fenil bileşikleri en çok tercih edilen ligandlardır. En popüler hidrofobik etkileşim jelinin fenil-sepharose olduğu literatürde görülmektedir [109]. Düz zincirli alkil ligandları saf hidrofobik karakter gösterirlerken, aril ligandlarında hem hidrofobik hem de aromatik etkileşimler gözlenir. Bu amaçla çalışmamızda ligand olarak 1- Naftilamin bileşiği kullanılmıştır. PON enziminin H1 ve H2 bölgelerinde fenil alanin, tirozin, triptofan gibi aromatik rezidülerin bulunması tarafımızdan seçilen ligandın söz konusu bölgelerle hem hidrofobik hem de aromatik etkileşim yapacağı göz önüne alınarak, oldukça uygun bileşik olduğu kanaatindeyiz. Ayrıca yapılan bir çalışmada hidrofobik karaktere sahip Sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin bileşiği kullanılmış ve 227 kat saflaştırma elde edilmiştir [109].

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 [111].

Çalışmamızda Kıvırcık ve Merinos koyun serumundan PON enzimini saflaştırmak için hidrofobik etkileşim kromatografisi uygulanmadan önce bu kromatografi prosedürüne uygun ön saflaştırma yöntemi olarak amonyum sülfat çöktürmesi yapılmıştır. Amonyum sülfat çöktürme aralığı %60-80 olarak literatürdeki gibi gerçekleştirilmiştir [110].

Araştırmamız esnasında, kantitatif protein tayini için, Bradford yöntemi kullanılmıştır. Protein miktarının belirlenmesinde bu yöntemin seçilmesinin sebebi, çok kısa sürede uygulanması, bozucu faktörlerin az olması, protein boya kompleksini çözeltilerde uzun süre stabil kalması ve enzim çözeltilerinin  $\mu\text{g}$  seviyesinde protein bulundurmasıdır. Kullanılan bu metodun diğer metotlara üstün tarafı ise, az reaktif gerektirmesi ve her çalışmada ayrı bir standart hazırlamaya ihtiyaç duyulmamasıdır. Ancak bu yöntemde, standart eğriyi elde etmek biraz zordur, bunun da sebebi geniş bir konsantrasyon aralığında lineer olmasından kaynaklanmaktadır [112].

Bu yöntemle Kıvırcık ve Merinos koyunlarının serumundan PON enzimi 473.75 ve 1474.29 kat saflaştırılmıştır. Furlong ve arkadaşları 4 basamaktan oluşan Agarose Blue, Sephadex G-200, DEAE Trisakril M ve Sephadex G-75 yöntemlerini kullanarak tarafımızdan gözlenen saflaştırma katsayısından daha yüksek bir değer (62.1) elde etmişlerdir [76]. Ancak bir başka çalışmada sadece üç basamaktan oluşan Blue Agaroz, DEAE I ve DEAE II yöntemlerini kullanarak yaklaşık 600 kat saflaştırma derecesine ulaşmışlardır. Bir başka çalışmada da ise insan serum paraoksonazı sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin bileşiği kullanılarak 227 kat saflaştırılmıştır [110].

Enzim saflığını kontrol etmek için SDS-PAGE uygulanmıştır. Molekül ağırlığı yaklaşık 66 kDa olarak tahmin edilen PON enzimi tek bant olarak SDS-PAGE jeline gözlendi. Bu değerin literatürden farklı olduğu bulunmuştur. Gerçekleştirilen bir çalışmada PON enziminin minimum molekül ağırlığını Gan ve arkadaşları 43kDa olarak belirlemişlerdir [19]. Bir diğer çalışmada ise Şükrü Beydemir ve çalışma arkadaşları insan serumundan saflaştırılan PON enziminin molekül ağırlığını 43kDa olarak saptamışlardır [125]. Bu farklılık enzimin yapısında, toplam molekül ağırlığının %15.8'i kadar karbonhidrat molekülü bulundurmasıyla ilişkilendirilebilir. PON enziminin molekül ağırlığı taşıdığı karbonhidrat zincirinin varlığına bağlı olarak değişmektedir [76]. İçerdiği bu karbonhidrat zinciri enzimin hidrolizleme reaksiyonu için gerekli değildir. Söz konusu molekülün PON'un çözünürlüğünü ve kararlılığını arttırmada ve zar yapısına bağlanmada görevi olduğu düşünülmektedir [24,25]. Karbonhidrat içermeyen PON enziminin molekül ağırlığı 37 kDa'dur [76]. Ayrıca PON serumda HDL'ye bağlı olduğu bölgelerin yakınında bulunan proteinler (Apo A1) ile bir arada da saflaştırılabilmektedir. Bu durumda molekül ağırlığı 47-54kDa olduğu rapor edilmiştir [113]. PON enziminin molekül ağırlığı türden türe değişmemekte ve insan PON enziminin molekül ağırlığı ile tavşan, sıçan ve koyunun PON enziminin molekül ağırlığı benzerlik göstermektedir [76,114].

Paraoksonaz enziminin aktivitesi Gan ve arkadaşlarının uyguladığı yöntem kullanılarak belirlenmiştir [77]. Bu amaçla literatürde Gil ve arkadaşlarının uyguladığı yöntem de bilinmektedir. Her iki yöntem paraoksonun hidrolizi ile açığa çıkan 4-nitrofenolün 37 °C' de, 412 nm' de absorbans ölçümüne dayanmaktadır. Ünite paraoksonaz, dakikada meydana gelen 4-nitrofenolün mmol' ü olarak tayin edilmektedir [26].

Sepharose-4B-L-tirozin-1-Naftilamin yapıları jel kullanılarak saflaştırılan Kıvrıcık ve Merinos koyun serum paraoksonaz enziminin kinetik sabitleri ( $K_M$  ve  $V_{max}$ ) optimum pH ve sıcaklıkta [115] paraokson substratı kullanılarak belirlenmiştir.



Lineweaver-Burk grafiklerinden elde edilen Kıvırcık koyunu için  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri sırasıyla 0.153 mM ve 70.289 U/ml'dak, Merinos koyunu için  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri sırasıyla 0.482 mM ve 41.348 U/ml'dak olarak bulunmuştur. Literatürde farklı kaynaklardan elde edilen PON enzimlerinin paraokson substratı için farklı  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri bildirilmektedir. İnsan serum PON enziminin paraokson substratının  $K_M$  değeri 3.8 mM [116] ve 2.5 mM [117] olarak verilmiştir. Sıçanlarda  $K_M$  değeri 1.690 mM ve 7.5mM arasında değişmektedir [118,119]. İnsan serum PON1 enziminin paraokson substratına karşı  $V_{max}$  değeri olarak 47.64 [120] ve 233.7 dir [121]. Bu değerlerden anlaşıldığı gibi koyundaki PON için bulunan  $K_M$  değeri, literatürdeki değerlere göre oldukça düşüktür. Bu durum koyun PON enziminin organofosfatlara karşı ilgisinin yüksek olduğunu göstermektedir. Başka bir ifadeyle; söz konusu enzim, organofosfatların çok düşük konsantrasyonların da bile hidroliz kabiliyetine sahiptir.

Araştırmamızda inhibitör olarak, Decis 2,5 EC<sup>TM</sup> : [ Deltamethrin ], Fosforin M<sup>TM</sup>: [Metil-Parathion], Confidor SC 350<sup>TM</sup> : [Imidacloprid] ve Gibber 20 SI<sup>TM</sup>: [Giberelik asit (GA3)] bileşikleri kullanılmıştır. Bu bileşikler, birçok ülkede ürün verimini artırma adına çok sık ve bilinçsizce kullanılmaktadır [86]. Tarımsal alanlarda kullanılan bu pestisitler, çeşitli yollarla akarsu, göl ve denizlere ulaşmaktadır. Birçok balık türünde pestisit kalıntıları saptanmıştır [122].

Bir inhibitörün inhibisyon etkisini gösteren en iyi parametre  $K_i$  sabiti olmasına rağmen bir çok araştırmacı, bir inhibitörün inhibisyon etkisini tespit etmek için  $IC_{50}$  değerini kullandıkları literatürlerden anlaşılmaktadır [97,98]. Çünkü bu yöntem oldukça pratik ve uygulanması oldukça kolaydır. Araştırmamızda kullanılan pestisitlerin inhibisyon etkileri  $IC_{50}$  değerleri ile verilmiştir. Bu şekilde, literatürlerde verilenler ile daha sağlıklı karşılaştırma olanağı sağlanmıştır.

Kıvırcık koyunundan elde edilen PON enziminin aktivitesi üzerinde % 50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonları sırasıyla Decis 2,5 EC<sup>TM</sup> için 1.0019 mM, Fosforin M<sup>TM</sup> için 21.3591 mM, Confidor SC 350<sup>TM</sup> için 18.4029 mM ve Gibber 20 SI<sup>TM</sup> için 2.7217 mM olarak bulunmuştur.

Bu sonuçlara göre Kıvırcık koyunu PON enzimi üzerinde en yüksek inhibisyon etkisi gösteren pestisit, Decis 2,5 EC<sup>TM</sup> olduğu görülmektedir. Fosforin M<sup>TM</sup> bu enzim için en zayıf inhibitör olmasına rağmen, 21.3591 mM konsantrasyonunda bile PON enziminin aktivitesini % 50 inhibe etmesi son derece önemlidir.

Merinos koyunundan elde edilen PON enziminin aktivitesi üzerinde % 50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonları sırasıyla Decis 2,5 EC<sup>TM</sup> için 1.6552mM, Fosforin M<sup>TM</sup> için 21.9900 mM, Confidor SC 350<sup>TM</sup> için 57.5900 mM ve Gibber 20 SI<sup>TM</sup> için 1.9800 mM olarak bulunmuştur. Decis 2,5 EC<sup>TM</sup> , Kıvırcık koyununda olduğu gibi bu enzim üzerinde de en etkili inhibitör olarak saptanmıştır. En az inhibisyon etkisine sahip olan pestisit ise, Confidor SC 350<sup>TM</sup> olarak bulunmuştur. Fakat Kıvırcık koyununda PON enzimini en zayıf inhibe eden Fosforin M<sup>TM</sup>, Merinos koyununda PON enzimini en zayıf inhibe eden Confidor SC 350<sup>TM</sup>'den daha güçlü etki ettiği açıkça görülmektedir.

Kıvırcık ve Merinos koyun türlerinden elde edilen PON enzimleri üzerinde inhibisyon etkisi gösteren pestisitlerin IC<sub>50</sub> değerleri, Şekil 4.1' de grafik halinde sunulmuştur.

Çalışmamızda adı geçen pestisitlerin Kıvırcık ve Merinos koyun türlerinden elde edilen PON enzimi üzerine etkileri ile ilgili çalışmaya literatürte rastlanmamıştır. Bu sonuçlar literatürde insan serum paraoksonaz enzimi ile sıralama olarak aynı olmasına karşı IC<sub>50</sub> değerleri daha yüksektir. Bu durum Kıvırcık ve Merinos'dan elde edilen PON enziminin pestisitlere karşı ilgisinin insan PON enzimine göre daha dirençli olduğunu göstermektedir [123].

**Yüksek lisans tezi olarak sunulan bu çalışmada elde edilen bulgular aşağıdaki şekilde özetlenebilir;**

1. Koyun serum PON enzimini saflaştırmak için Sepharose 4BL-tirozin 1-naftilamin kimyasal yapına sahip bir hidrofobik etkileşim kromatografisi jeli sentezlenmiştir.

2. Sepharose-4B-L-tirozin-1-Naftilamin yapısına sahip hidrofobik jel kullanılarak koyun serumundan PON enzimi saflaştırılmıştır.

3. Amonyum sülfat çöktürmesi ve hidrofobik etkileşim kromatografisi yöntemi ile saflaştırılan koyun serum PON enzimi SDS-PAGE elektroforezinde yaklaşık 66 kDa molekül ağırlığında tek bant elde edilmiştir.

4. Kıvırcık ve Merinos serumundan saflaştırılan PON enzimi üzerine bazı bileşiklerin inhibisyon etkileri incelenmiştir. Bu amaçla pestisit olarak Decis 2,5 EC™, Fosforin M™, Confidor SC 350™ ve bitki gelişim düzenleyicisi olarak Gibber 20 SI™ ile çalışılmıştır. Çalışılan bileşiklerin tamamının farklı düzeyde Kıvırcık ve Merinos koyun enzimini inhibe ettiği saptanmıştır.

5. Kıvırcık ve Merinos koyun PON enziminin katalitik etkinliğinin çok yüksek ve Decis 2,5 EC™, Fosforin M™, Confidor SC 350™ ve Gibber 20 SI™ bileşiklerine karşı daha dirençli olduğu bulunmuştur.

## 5. KAYNAKLAR

- [1] Topçu, S., Tarım Mühendisliğinde Çevre Sorunları, 207, Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Genel Yayın Ders Kitapları, (2008), 269.
- [2] Çepel, N., Toprak Kirliliği Erozyon ve Çevreye Verdiği Zararlar, 14, Türkiye Erozyonla Mücadele, Ağaçlandırma ve Doğal Varlıkları Koruma Vakfı Yayınları, (1997), 3-35
- [3] Öztürk, S., "Tarım İlaçları", Renk Ofset, İstanbul, (1990).
- [4] P.N. Durrington, B.M., M.I. Mackness, "Paraoxonase and Atherosclerosis", *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, **21**, (2001) 473-480.
- [5] Carey J. Ng, D.M.S., Susan Y. Hama, Natividad Villa, Mohamad Navab, Srinivasa T. Reddy, "The Paraoxonase Gene Family and Atherosclerosis", *Free Radical Biology & Medicine*, **38**, (2005) 153– 163.
- [6] E. Azarsız, E.Y.S., "Paraoksonaz ve Klinik Önemi", *Türk Biyokimya Dergisi*, **25 (3)**, (2000) 109-119.
- [7] M. Ferit Gürsu, M.Ö., Funda Gülcü, "Koroner Kalp Hastaları İle Etiyolojik Risk Faktörlerini Taşıyan Bireylerde Paraoksonaz Aktiviteleri ve Fenotiplerinin Araştırılması", *F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi*, **17(4)**, (2003) 237-244.
- [8] Michael I. Mackness, B.M., Paul N. Durrington, "Paraoxonase and coronary heart disease", *Atherosclerosis Supplements*, **3**, (2002) 49-55.
- [9] Uriel, A., "Characterisation des cholinesterases et d'autres esterases arboxylique apres electrophorese et immunoelectrophorese en gelose, I; applications a l'etude des esterases du serum humain normal". *Am Insit Pasteur*, (1961), 101-104.
- [10] Michael I. Mackness, B., Paul N. Durrington, Philip W. Connelly and Robert A. Hegele, "Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins". *Current Opinion in Lipidology*, **7**, (1996), 69-76.
- [11] Erdem, M.S.T. "ST Elevasyonlu Miyokard İnfarktüsü (Stemi) Hastalarda insan Paraoxonase Geni Met-Leu/55 Polimorfizmi." Dr. Siyami Ersek Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Merkezi, İstanbul, (2004)
- [12] Mackness B., D.P.N., Mackness M.I, "Human Serum Paraoxonase". *Gene Pharmacy*, **31(3)**, (1998) 329-36.

- [13] Kirsty S. Robertson, Emma Hawe,1, George J. Miller, Philippa J. Talmud, teve E. Humphries, "Human Paraoxonase Gene Cluster Polymorphisms As Predictors of Coronary Heart Disease Risk in The Prospective Northwick Park Heart Study II". *Biochimica et Biophysica Acta*, **1639**, (2003) 203–212.
- [14] I. Draganov , B.N.L.D., "Pharmacogenetics of Paraoxonases: A Brief Review". *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, **369**, (2004) 78–88.
- [15] Michal Harel, A.A., Leonid Gaidukov, Boris Brumshtein, Olga Kherkxonsky, Ran Megeed, Hay Dvir, Raimond B G Ravelli, Andrew McCarthy, Lilly Toker, Israel Silman, Joel L Susman, Dan S Tawfik, "Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and antiatherosclerotic enzymes". *Nature Structural & Molecular Biology*, (2004) 412-419.
- [16] Bert N. La Du, M.A., Scott Billecke, Mohamad Navab, Sergio Primo-Parmo, Robert C. Sorenson, Theodore J. Standiford, "On The Physiological Role(s) of The Paraoxonases". *Chemico-Biological Interactions*, (1999) 379–388.
- [17] Liang, H.-L.L.D.-P.L.C.-C., "Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress, and diseases", *J. Mol. Med.*, **81**, (2003) 766–779.
- [18] Bharti Mackness, P.N.D., Michael I. Mackness, "The Paraoxonase Gene Family and Coronary Heart Disease". *Current Opinion in Lipidology*, **13**, (2002) 357-362.
- [19] Gan, K.N., Smolen A., Eckerson HW., La Du BN., "Purification of Human Serum Paraoksonase/Arylesterase, Evidence for One Esterase Catalyzing Both Activities", *Drug Metab. Dispos.*, **19** (1), (1991) 100-6.
- [20] Jawad, Z., Paoli, M., "Noval Sequences Propel Familiar Folds", *Structure*, **10**, (2002) 447-454.
- [21] 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.
- [22] Josse, D.e.a., "Oligometric States of The Detergent-Solubilized Human Serum Paraoxonase (PON1)", *J. Biol. Chem.*, **277**, (2002) 86-97.
- [23] Du, I.D.B.N.L., "Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review" *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, **369**, (2004) 78–88.
- [24] 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.

- [25] Josse, D.e.a., "Identification of Residues Essential For Human Paraoxonases (PON1) Arylesterase/Organophosphatase Activities", *Biochemistry*, **38** (1999) 2816-25.
- [26] Sinan, M.S.T.S., İnsan Serum Paraoksonaz Enziminin (PON1) Expressiyonu, Saflaştırılması ve Bazı İlaçların Enzim Üzerine Etkilerinin Araştırılması, Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir, (2005).
- [27] Jonas, A., "Lecithin cholestrol Acyltransferase", *Biochim. Biophys. Acta*, **1529**, (2000) 245-256.
- [28] Lund-Katz, S., Liu, L.J., Thuahnai, S.T.& Philips, M.C., "High Density Lipoprotein Structure", *Front. Biosci.*, **8**, (2003) 1044-1054.
- [29] Navab, M.e.a., "High density associated enzymes:their role in vascular biology", *Curr. Opin. Lipidol*, **9**, (1998) 449-456.
- [30] Borhani, D.W., Rogers, "Crystal Structure Oftruncated Human Apolipoprotein A-I Suggests A Lipid Bound Conformation" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, (1997) 12291-96.
- [31] Lucio G. Costaa, T.B.C., Annabella Vitalone, Clement E. Furlong, "Measurement of paraoxonase (PON1) status as a potential biomarker of susceptibility to organophosphate toxicity", *Clinica Chimica Acta*, **352**, (2005) 37-47.
- [32] Blatter Garin, M.-C., Abbot, C., Messmer, S., Mackness, M. I., Durrington, P., Pometta, D., James, R. W., "Quantification of Human Serum Paraoxonase by Enzyme Linked Immunoassay: Population Differences in Protein Concentrations", *Biochem. J.*, **304**, (1994) 549-554.
- [33] Leviev, I., James, R. W., "Promoter Polymorphisms of the Human Paraoxonase PON1 Gene and Serum Paraoxonase Activities and Concentrations", *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, **20**, (2000) 516-521.
- [34] Deakin, S., Leviev, I., Brulhart Meynet, M. C., James, R. W., "Paraoxonase-1 Promoter Haplotypes and Serum Paraoxonase: A Predominant Role in vivo for Polymorphic Position -107 Implicating The Transcription Factor Sp1". *Biochem. J.*, (2003) 377.
- [35] Feingold, K.R., Memon, R. A., Moser, A. H., Grunfeld, C., "Paraoxonase Activity in The Serum and Hepatic mRNA Levels Decrease During The Acute Phase Response", *Atherosclerosis*, **139**, (1998) 307-315
- [36] Cabana, V.G., Reardon, C. A., Feng, N., Neath, S., Lukens, J., Getz, G. S., "Serum Paraoxonase: Effect of The Apolipoprotein Composition of HDL and The Acute Phase Response", *J. Lipid Res.*, **44**, (2003) 780-792.

- [37] Martoglio, B.D., B., "Signal sequences: more than just greasy peptides", *Trends Cell Biol.*, **8**, (1998) 41041–41045.
- [38] Hassett, C., Richter, R. J., Humbert, R., Chapline, C., Crabb, J. J., Omiecinski, C. J., Furlong, C., "Characterisation of cDNA Clones Encoding Rabbit and Human Serum Paraoxonase: The Mature Protein Retains Its Signal Sequence" *Biochemistry*, **30**, (1991) 10141– 10149.
- [39] Deakin, S., Leviev, I., Gomaraschi, M., Calabresi, L., Franceschini, G., James, R. W., "Enzymatically Active Paraoxonase- 1 Is Located at The External Membrane of Producing Cells and Released by A High Affinity, Saturable, Desorption Mechanism", *J. Biol. Chem.*, **277**, (2002) 4301–4308.
- [40] Sorenson, R.C.B., C. L.; Aviram, M.; Hsu, C.; Billecke, S.; La Du, B. N., "Human serum paraoxonase/arylesterase's retained hydrophobic N-terminal leader sequence associates with HDLs by binding phospholipids: apolipoprotein A-I stabilizes activity", *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.*, **19**, (1999) 2214– 2225
- [41] Oda, M.N.B., J. K.; Berger, T.; Forte, T. M., "Cysteine substitutions in apolipoprotein A-I primary structure modulate paraoxonase activity", *Biochemistry*, **40**, (2001) 1710– 1718.
- [42] Lucio G. Costa, T.B.C., Gail P. Jarvik, and and C.E. Furlong, "Functional Genomics of the paraoxonase (PON1) Polymorphisms: Effects on Pesticide Sensitivity, Cardiovascular Disease, and Drug Metabolism", *Annu. Rev. Med.*, **54**, (2003) 371–92.
- [43] Geldmacher, M., Hommel, G., Dumbach, J., "On The Genetics of The Human Paraoxonase", *Hum. Genet.*, **50(3)**, (1979) 313-326.
- [44] Playfer, J., Eze, LC., Bullen, MF., Evans, AP, "Genetic Polimorphism and interethnic variability of plasma paraoxonase activity", *J. Med. Genet.*, **13**, (1976) 337-342.
- [45] Humbert, R., Adler, DA., Disteché, CM., Hasset, C., Omiecinski, CJ., Furlong, CE., "The Molecular Basis of The Human Serum Paraoxonase Activity Polymorphism", *Nat. Genet.*, **3(1)**, (1993) 73-76.
- [46] Michael Aviram, E.H., Jacob Vaya, Saeed Mahmood, Simcha Milo, Aaron Hoffman, Scott Billicke, Dragomir Draganov, Mira Rosenblat, "Human Serum Paraoxonases (PON1) Q and R Selectively Decrease Lipid Peroxides in Human Coronary and Carotid Atherosclerotic Lesions". *Circulation*, **101**, (2000) 2510-2517.
- [47] Aynacıoğlu, A., Cascorbi, Mrozkiewicz, PM., Nacak, M., Tapanyığıt, EE., Roots, I., "Paraoxonase 1 Mutations in A Turkish Population", *Toxicology and Applied Pharmacology*, **157**, (1999) 174-177.

- [48] Eckerson, H., Romson, J., Wyte, C., La Du, B.N., "The Human Serum Paraoxonase Polymorphism: Identification of Phenotypes by Their Response to Salts", *Am J Hum. Genet.*, **35**(2), (1983) 214-227.
- [49] JAMES, S.P.D.a.R.W., "Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase-1. Clinical Science", **107**, (2004) 435-447.
- [50] Brophy VH, J.R., Clendenning JB, McKinstry LA, Jarvik GP, Furlong CE, "Effects of 5' Regulatory-Region Polymorphisms on Paraoxonase-Gene (PON1) Expression", *Am J Hum. Genet.*, **68**, (2001) 1428-1436.
- [51] Brophy VH, J.R., Clendenning JB, McKinstry LA, Jarvik GP, Furlong CE, "Effects of 5' Regulatory-Region Polymorphisms on Paraoxonase-Gene (PON1) Expression", *Am J Hum. Genet.*, **68**, (2001) 1428-1436.
- [52] Deakin, S., Leviev, I., Guernier, S. and James, R. W., "Simvastatin Modulates Expression of The PON1 Gene and Increases Serum Paraoxonase: A Role for Sterol Regulatory Element-Binding Protein-2", *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.*, **23**, (2003) 2083-2089.
- [53] Gou'edard, C., Koum-Besson, N., Barouki, R., Morel, Y., "Opposite Regulation of The Human Paraoxonase-1 Gene PON-1 by Fenofibrate and Statins", *Mol. Pharmacol.*, **63**, (2003) 945-956.
- [54] Marja Marchesani, A.H., Tomi-Pekka Tuomainen, Jari Kaikkonen, Eero Pukkala, Pekka Uimari, Eija Seppä-la, Mika Matikainen, Olli-P. Kallioniemi, Johanna Schleutker, Terho Lehtimäki, Jukka T. Salonen, "New Paraoxonase 1 Polymorphism I102V and the Risk of Prostate Cancer in Finnish Men", *Journal of the National Cancer Institute*, **95**(11), (2003) 812-818.
- [55] Osei-Hyiaman D, H.L., Mengbai F, Zhiyin R, Zhiming Z, Kano K, "Coronary artery disease risk in Chinese type 2 diabetics: is there a role for paraoxonase 1 gene (Q192R) polymorphism", *Eur J Endocrinol*, **144**, (2001) 639-644.
- [56] Allebrandt KV, S.R., Chautard-Freire-Maia EA, "Variability of The Paraoxonase Gene (PON1) in Euro- and Afro-Brazilians", *Toxicology and Applied Pharmacology*, **180**, (2002) 151-156.
- [57] Hegele, R.A., "Paraoxonase Genes and Disease", *Ann. Med.*, **31**, (1999) 217-224.
- [58] Leus FR, Z.M., Kastelein JJ, Voorbij HA, "PON2 Gene Variants Are Associated With Clinical Manifestations of Cardiovascular Disease in Familial Hypercholesterolemia Patients", *Atherosclerosis*, **154**, (2001) 641-49.



- [59] Voetsch B, B.K., Damasceno B.P., Siqueira L.H., Loscalzo, J., "Paraoxonase 192 Gln!Arg polymorphism: an independent risk factor for nonfatal arterial ischemic stroke among young adults", *Stroke*, **33**, (2002) 1459-1464.
- [60] Malin R, K.J., Janatuinen T, Laaksonen R, Vesalainen R, Nuutila P, Jokela H, Laakso J, Jaakkola O, Solakivi T, Lehtimaki T, "Paraoxonase gene polymorphisms and coronary reactivity in young healthy men". *J Mol Med*, 2001. 79: p. 449-458.
- [61] Ikeda T, O.H., Hasegawa G, Nakamura N, Yoshikawa T, Imamura Y, Koizumi K, Kinoshita S, "Paraoxonase Gene Polymorphisms And PlasmaOoxidized Low-Density Lipoprotein Level As Possible Risk Factors For Exudative Age-Related Macular Degeneration", *Am. J. Ophthalmol*, **132**, (2001) 191–195.
- [62] Konda I, Y.M., "Genetic Polymorphism of Paraoxonase 1 (PON1) and Susceptibility to Parkinson's Disease", *Brain Res.*, **806**, (1998) 271-273.
- [63] Scacchi R, G.G., Martini MC, Broggio E, Vilardo T, Corbo RM, "Different pattern of association of paraoxonase Gln192-Arg polymorphism with sporadic late-onset Alzheimer's disease and coronary artery disease", *Neurosci Lett.*, **339**, (2003) 17-20.
- [64] La Du B. N., A.M., Billecke S.,Navab M.,Primo Parmo S.,Sorenson R.C.,Standiford T.J, "On the Physiological Role(s) of The Paraoxonase", *Chemice-Biological Interactions*, **119-120**, (1999) 379-388.
- [65] Joanne Hughes, A.C., Carol Courage, "A Review of The Effects of Low-Level Exposure to Organophosphate Pesticides on Fetal and Childhood Health", *Institute for Environment and Health*, (2002) 1-72.
- [66] Draganov, D.I. and La Du, B.N., "Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review", *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **369**, (2004) 78.
- [67] La Du, B.N., Human serum paraoxonase/arylesterase, In *Pharmacogenetics of Drug Metabolism*, ed. Kalow, W., Pergamon Pres, New York, (1992) 51.
- [68] Costa, L.G., Li, W.F., Richter, R.J., "PON1 and organophosphate toxicity", (2002) 165–83
- [69] 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.
- [70] Baillie, T.A., Moldeus, P., Mason, R.P. Younes, M., *Enzymes Interacting with Organophosphorus Compounds*, Elsevier Scientific Publishers Ireland Ltd, Shannon, (1993).

- [71] Klimov, A.N., Gurevich, V.S., Nikiforova, A.A., Shatilina, L.V., Kuzmin, A.A., Plavinsky, S.L. and Teryukova, N.P., "Antioxidative activity of highdensity lipoproteins in vivo", *Atherosclerosis*, **100**, (1993) 13.
- [72] Mazur, A., "An Enzyme In Animal Tissues Capable of Hydrolyzing The Phosphorus-Fluorine Bond of Alkyl Fluorophosphates", *J. Biol. Chem.*, **164**, (1946) 271-289.
- [73] Mounter, L.A., Floyd, C.S. and Chanutin, A., "Dialkylfluorophosphatase of Kidney I. Purification And Properties", *J. Biol. Chem.*, **204**, (1953) 221-232.
- [74] Main, A. R., *Can. J. , Biochem. Physiol*, **34**, (1956) 197-216.
- [75] Furlong, C.E., Costa, L.G., Hassett, C., Richter, R.J., Sundstrom, J.A., Adler, D.A., Isteche, C.M., Omiecinski, C.J., Chapline, C., Crabb, J.W. and Humbert, R., "Human and rabbit paraoxonase: purification, cloning, sequencing, mapping and role of polymorphism in organophosphate detoxification", *Chem. Biol. Interact.*, **87**, (1993) 35.
- [76] Furlong, C.E., Richter, R.J., Chapline, C. and Crabb, J.W., "Purification of Rabbit and Human Serum Paraoxonase", *Biochemistry*, **30**, (1991) 10133.
- [77] Kitchen, B.J., Masters, C.J. and Winzor, D.J., "Effects of lipid removal on the molecular size and kinetic properties of bovine plasma arylesterase", *Biochem J.*, **135**, (1973) 93.
- [78] Gil, F., Pla, A., Gonzalvo, M.C., Hernández, A.F. and Villanueva, E., "Partial purification of paraoxonase from rat liver", *Chem. Biol. Interact.*, **87**, (1993) 69.
- [79] [www.temel.saglik.gov.tr/Yayinlar/yayin1.htm](http://www.temel.saglik.gov.tr/Yayinlar/yayin1.htm) (10.06.2011)
- [80] [www.un.org.kh/fao/pdfs/section3/chapterxx8/28.pdf](http://www.un.org.kh/fao/pdfs/section3/chapterxx8/28.pdf) (14.06.2011)
- [81] Dilek C.C., "İnsan Eritrositlerinden Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Enziminin Saflastırılması Ve Bazı Pestisitlerin Enzim Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması", Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir, (Eylül-2007).
- [82] Şanlı, Y., Kaya, S., "Veteriner Klinik Toksikoloji", Medisan Yayınevi, Yay. No:5, Ankara, (1992) 204-205.
- [83] Gür, K., Akınerdem, F., "Biositlerin Toprak ve Su Canlıları üzerine Etkileri", *Tarımda Kaynak*, **2**, (1991) 5.
- [84] Miles, C.J., Delfino, J.J., "Fate of aldicarb, aldicarbsulfoxide and aldicarb sutone in Floridan ground water", *J.Agric.Food chem.*, **33**, (1985) 455-460.

- [85] Öztürk, S., “Tarım İlaçları”, Renk Ofset, İstanbul, (1990).
- [86] Kaya, Ü., “Toksikoloji, Pestisit Kalıntıları ve Çevre”, Seminer notları, İzmir, (2002).
- [87] www.bayercropscience.com (22.06.2011)
- [88] www.wikipedia.com (22.06.2011)
- [89] www.sciencelap.com (22.06.2011)
- [90] Chang, E.S., Stockstad, E.L.R., “Effects of chlorinated hydrocarbons on shell gland carbonic anhydrase and egg shell thickness in Japanese quail”, *Poult.Sci.Jan.*, **54**, (1975) 3-10.
- [91] Christensen, G.M., Tucker, J.H., “Effects of selected water toxicants on the in vitro activity of fish carbonic anhydrase”, *Rocz.Panstw.Zakl.High*, **28**, (1977) 595-600.
- [92] Watson, T.A., Tilley, P.A., Mekeown, B.A., Geen, G.H., “In vitro effects of acephate on activity in blood and gills of rainbow trout, *salmo gairdnerii*”, *J.Environ.Sci.Health*, **17**, (1982) 63-65.
- [93] Yagawa, Y., Shiraiwa, Y., Miyachi, S., “Carbonic anhydrase from blue green alga (Cyanobacterium) *Anabaena variabilis*”, *Plant Physiol.*, **103**, (1984) 943-948.
- [94] Tandon, R.S., Dubey, A., “The effects of two organophosphorus pesticides on fructose-1,6-diphosphate aldolase activity of liver, brain and gills of the fresh water fish *Clarias batrachus*”, *Environ.Poll.*, **A31**, (1983) 1-7.
- [95] Çelik, İ., Çamaş, H., Arslan, O., Yeğin, E., Küfrevioğlu, O., “The effects of some pesticides on human and bovine erythrocyte carbonic anhydrase enzyme activities in vitro”, *J.Environ.Sci.Health*, **A31**, (1996) 2651-2657.
- [96] Ceron, J.J., Ferrando, M.D., Sancho, E., Gutierrez, C., Andreu-Molnier, E., “Effects of diazinon exposure on cholinesterase activity in different tissues of European eel (*Anguilla anguilla*)”, *Ecotoxicol.EnvironSaf.Dec.*, **35**, (1996) 222-225.
- [97] Şekeroğlu, M.R., Çelik, F., Arslan, O., “Influence of some pesticides on activity of seven serum enzymes (in vitro)”, *J.Environ.Sci.Health*, **A32**, (1997) 1975-1980.
- [98] Arslan, O., Şekeroğlu, R., Çelik, İ., Tarakçı, M., “The inhibition effects of some pesticides on the in vitro activity of five serum enzymes”, *J.Environ.Sci.Health*, **A32**, (1997) 361-365.

- [99] Türkoğlu, V., Çamaş, H., Çelik, İ., “In vitro inhibition of acetylcholinesterase purified from bovine serum by some commercial pesticides”, *Bulletin of Pure and Applied Sciences*, **18A**, (1999) 31-35.
- [100] Turan, Y., Arslan, O., Kockar, F., “The inhibitory effects of some pesticides on human erythrocyte carbonic anhydrase activity (in vitro)”, *Fresenius Environmental Bulletin*, **11**, (2002).
- [101] Hassanein, H.M.A., “Toxicological effects of the herbicide oxyfluorfen on acetylcholinesterase in two fish species: *Oreochromis niloticus* and *Gambusia affinis*”, *Journal of Environmental Science and Health Part A-Toxic/Hazardous Substances&Environmental Engineering*, **37**, (2002) 521-527.
- [102] Semra IŞIK. , “Değişik Balık Türlerinden Saflaştırılan Karbonik Anhidraz Enzimi Üzerine Bazı Pestisidlerin Etkilerinin Araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir, (Eylül-2002).
- [103] [www.veteriner.cc](http://www.veteriner.cc) (22.07.2011)
- [104] Altinel A., Güneş H., Yılmaz A., Kırmızıbayrak T., Akgündüz V., “Comparison of the important production traits of turkish merino and indigenous kivircik sheep breeds”, İ.Ü. Veteriner Fakültesi Zooteknik Anabilim Dalı, 34851, Avcılar/İstanbul. Marmara Hayvancılık Araştırma Enstitüsü, Bandırma, (2000).
- [105] Sorenson, RC., Aviram, M., Bisgaier, CL., Billecke, S., La Du BN., “Properties of the retained N-terminal hydrophobic leader sequence in human serum paraoxonase/arylesterase”, *Chem. Biol. Interact.*, **119-120**, (1999) 243- 249.
- [106] Killian, J.A., Von Heijne, G., "How proteins adapt to a membranewater interface", *Trends Biochem. Sci.*, **25**, (2000) 429-434.
- [107] Keha, E.E., Karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması için geliştirilmiş bir afinite kromatografisi metodu, Doçentlik Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Erzurum.
- [108] Wistrand, P.J., Lindahl, S. and Wahlstrand, T., “Human renal carbonic anhydrase. Purification and properties”, *Eur J. Biochem.*, **57**, (1975) 189.
- [109] Jakoby, B., Wilchek, M., Coupling reaction of ligands and general methodology of affinity chromatography, in *Methods in Enzymology*, Academic Pres, New York, (1974).
- [110] Selma Sinan, Feray Kockar, Oktay Arslan." Novel purification strategy for human PON1 and inhibition of the activity by cephalosporin and aminoglikozide derived antibiotics”, *Biochimie*, **88(5)**, (2006) 565-574.

- [111] Aguiar, J.A.K. and Michelacci, Y.M. "Preparation and purification of *Flavobacterium heparinum* chondroitinases AC and B by hydrophobic interaction chromatography", *Braz J Med Biol Res*, **32(5)**, (1999) 545-550.
- [112] 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.
- [113] 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.
- [114] Primo-Parmo S.L., Sorenson R.C., Teiber J., La Du B.N., "The human serum paraoxonase/aterosklerozun arylesterase gene (PON1) is one member of multigene family", *Genomics*, **33**, (1996) 498-509.
- [115] Gülcü, F., Gürsu, MF., "Paraoksonaz ve arilesteraz aktivite ölçümlerinin standardizasyonu", *Turkish Journal of Biochemistry*, **28(2)**, (2003) 45-49.
- [116] Brushia, R.J., Forte, TM., Oda, MN., La Du BN., Bielicki, JK., "Baculovirus-mediated expression and purification of human serum paraoxonase 1A", *Journal of Lipid Research*, **42**, (2001) 951-958.
- [117] Reiner, E., Aldridge, W.N., Hoskin, F.C.G., *Enzymes Hydrolyzing Organophosphorus Compounds*, John Wiley & Sons, New York, (1989).
- [118] Rodrigo, L., Gil, F., Hernández, A.F., Marina, A., Vazquez, J. and Pla, A., "Purification and characterization of paraoxon hydrolase from rat liver", *Biochem. J.*, **321**, (1997) 595.
- [119] Pellin, MC., Moretto, A., Lotti, M., Vilanova, E., "Distribution and biochemical properties of rat paraoxonase activity", *Neurotoxicol Teratol* **12**, (1990) 611-614.
- [120] 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.
- [121] Sorenson, R.C., Primo-Parmo, S.L., Kuo, C.L., Adkins, S., Lockridge, O. and La Du, B.N., "Reconsideration of the catalytic center and mechanism of mammalian paraoxonase/arylesterase", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92** (1995) 7187.
- [122] Berksoy, N., "Tarım İlaçlarının Kullanılması", *Çevre Araştırmaları*, Gaziantep, (26- 7 Kasım 1976).

- [123] Gençer.N., Arslan.O., "Purification human PON1Q192 and PON1R192 isoenzymes by hydrophobic interaction chromatography and investigation of the inhibition by metals", *Journal of Chromatography B*, **134-140**, (2009) 877.
- [124] Blatter-Garin, M.C., Kalix, B., De Pre, S. and James, R.W., "Aspirin use is associated with higher serum concentrations of the antioxidant enzyme, paraoxonase-1", *Diabetologia*, **46**, (2003) 593.
- [125] Alici, H.A., Ekinci, D., Beydemir, Ş., "Intravenous anesthetics inhibit human paraoxonase-1 (PON1) activity in vitro and in vivo", *Clinical Biochemistry*, **41**, (2008) 1384-1390.