

**T.C.  
SİİRT ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SERYUM VANADAT ( $CeVO_4$ ) TÜREVLERİNİN PARAOKSONAZ (PON1)  
ENZİMİ ÜZERİNE *IN VITRO* ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Yasin ONAY  
(12803004)**

**Kimya Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Mustafa Oğuzhan KAYA**

**Mayıs-2017  
SİİRT**

## TEZ KABUL VE ONAYI

Yasin ONAY tarafından hazırlanan "SERYUM VANADAT ( $CeVO_4$ ) TÜREVLERİNİN PARAOKSONAZ (PON1) ENZİMİ ÜZERİNE *IN VITRO* ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI" adlı tez çalışması 12/05/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile Siirt Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

### Jüri Üyeleri

#### Başkan

Yrd.Doç.Dr. Kadir EROL

#### Danışman

Yrd.Doç.Dr. Mustafa Oğuzhan KAYA

#### Üye

Yrd.Doç.Dr. Kıvanç İRAK

### İmza

.....

.....

.....

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

.....

Doç. Dr. Koray ÖZRENK  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışması Siirt Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (SIÜBAP) Koordinatörlüğü tarafından 2016-SIUFEB-06 nolu proje ile desteklenmiştir.

## TEZ BİLDİRİMİ

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içeriği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının, bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

Yasin ONAY

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

## ÖNSÖZ

Yüksek Lisans Tez çalışmalarımın her safhasında her türlü desteğini gördüğüm, çalışmalar esnasında yol gösterici bir hoca olmanın ötesinde dostane tavır ve yaklaşımları ile inanılmaz bir rehberlik yapan çok kıymetli danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Mustafa Oğuzhan KAYA'ya öncelikle en derin minnet ve şükranlarımı arz ederim.

Uzakta olmasına rağmen her daim yanımızdaymışçasına destek ve motivasyonlarını eksik etmeyerek, bizleri sürekli bilim camiasına kazandırmaya çalışan Sayın Prof. Dr. Özen ÖZENSOY GÜLER Hocamıza en kalbi duygularıyla şükran ve hürmetlerimi sunarım.

Çalışmalarımnda her türlü desteği ve hamiliği esirgemeyen Fen Bilimleri Enstitü Müdürü Doç. Dr. Koray ÖZRENK hocama teşekkürü bir borç bilirim.

Yüksek Lisans Tez çalışmalarım esnasında Laboratuvarlarımı ve imkanlarımı benden esirgemeyen Doç Dr. Sadin ÖZDEMİR ile tüm Biyoloji bölümü hocalarına ve maddi desteklerinden dolayı BAP birimine teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımnda kullandığım çeşitli konsantrasyonlardaki Be, Mg, Ca, Sr ve Ba'un seryum vanadat ( $CeVO_4$ ) türevlerine dope edilmiş numuneleri hazırlayan Balıkesir Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Anorganik Kimya Anabilim dalında görev yapmakta olan; Prof.Dr. Figen KURTULUŞ, Uzm.Dr. Gülşah ÇELİK GÜL ve Laboratuvar grubuna değerli katkılarından dolayı teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarımnda bana her türlü desteği veren Yüksek Lisans arkadaşlarım; Abdulkaki EYBEK ve Ercan ALPINAR'a teşekkürlerimi sunarım.

Kendilerinden çaldığım zamanlara rağmen sevgilerini ve desteklerini her zaman fazlası ile hissettiren çok kıymetli aile fertlerim; annem Farica ONAY, eşim Fatma ONAY, çocuklarım Ömer Yasir, Ferice Nisa ve Musab Eymen'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımızda kullandığımız atık kanları temin etmemizde bize desteklerini sunan Siirt Halk Sağlığı Laboratuvarı, Siirt Devlet Hastanesi ve Özel Asema Hastanesi çalışanlarına ve özellikle Uzm. Dr. Muzaffer ARSLAN ve Laboratuvar Teknikeri Azad ERENSAYIN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Son olarak bu tezi, eğitim hayatım boyunca her türlü desteğini esirgemeyen rahmetli babam Nurettin ONAY'ın anısına hediye etmek isterim.

Yasin ONAY  
SİİRT-2017

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

ÖN SÖZ .....	iii
İÇİNDEKİLER .....	iv
TABLolar LİSTESİ .....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	viii
KISALTMALAR VE SİMGELERLİSTESİ.....	xi
ÖZET .....	xii
ABSTRACT.....	xiii
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
1.1. 2A Grubu Elementleri.....	1
1.1.1. Toprak Alkali Metaller .....	1
1.1.2. Genel Özellikleri.....	1
1.2. Enzimler.....	2
1.2.1. Enzimlerin Sınıflandırılması.....	2
1.3. Kalp Damar Hastalıkları .....	4
1.3.1. Kalp Damarlarının Daralmasına Ne Sebep Olur?.....	4
<b>2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI .....</b>	<b>5</b>
2.1. Paraoksonaz Enzimi (PON) (EC. 3.1.8.1) .....	6
2.1.1. Adlandırılması .....	7
2.1.2. Paraoksonaz Gen Ailesi .....	8
2.1.3. PON1'in Biyokimyasal Yapısı .....	9
2.1.4. Enzimin Katalitik Mekanizması .....	10
2.1.5. Katalizlediği Reaksiyonlar ve Substratları .....	11
2.1.6. PON1'in HDL'ye Bağlanması.....	15
2.1.7. PON1'in Sentezlenmesi ve Salgılanması .....	15
2.2. Ateroskleroz.....	16
2.2.1. Koroner arter hastalığı gelişiminde PON1.....	17
2.2.2. Koroner arter hastalığı risk faktörleri ve PON1.....	18
<b>3. MATERYAL VE METOT.....</b>	<b>19</b>
3.1. Materyaller.....	19
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	19
3.1.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar .....	19
3.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması.....	20

3.2. Yöntemler .....	21
3.2.1. Kan Serumunun Ayrılması .....	21
3.2.2. Enzim Aktivite Tayini .....	21
3.2.3 Enzimin Saflaştırılması.....	22
3.2.3.1 Amonyum Sülfat Çöktürme Aralığının Belirlenmesi.....	22
3.2.3.2 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi İle Enzimin Saflaştırılması .....	22
3.2.3.2.1. Sepharose 4B'nin Aktifleştirilmesi.....	22
3.2.3.2.2. L-tirozinin Bağlanması .....	23
3.2.3.2.3. 1-naftilamin Bileşiğinin Bağlanması .....	23
<b>4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....</b>	<b>25</b>
4.1. Enzimin Saflaştırılması.....	25
4.1.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi .....	25
4.2. Laboratuvar Çalışmalarının Verileri.....	27
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>74</b>
5.1. Sonuçlar .....	74
<b>6. KAYNAKLAR .....</b>	<b>81</b>
<b>EKLER .....</b>	<b>90</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>91</b>

## TABLolar LİSTESİ

### Sayfa

Tablo 4. 1. Serum PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren %0.1 Be-CeVO <sub>4</sub> - %0.5 Be-CeVO <sub>4</sub> IC <sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ile bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	27
Tablo 4. 2. Serum PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren %1 Be-CeVO <sub>4</sub> - %2 Be-CeVO <sub>4</sub> IC <sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ile bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar .....	28
Tablo 4. 3. Serum PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren %4 Be-CeVO <sub>4</sub> - %6 Be-CeVO <sub>4</sub> IC <sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ile bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar .....	29
Tablo 4. 4. Serum PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren %8 Be-CeVO <sub>4</sub> - %10 Be-CeVO <sub>4</sub> IC <sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ile bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	30
Tablo 4. 5. Serum PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren %0,1 Mg-CeVO <sub>4</sub> - %0,5 Mg-CeVO <sub>4</sub> IC <sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ile bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	36
Tablo 4. 6. Serum PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren %1 Mg-CeVO <sub>4</sub> - %2 Mg-CeVO <sub>4</sub> IC <sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ile bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar .....	37
Tablo 4. 7. Serum PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren %4 Mg-CeVO <sub>4</sub> - %6 Mg-CeVO <sub>4</sub> IC <sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ile bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar .....	38
Tablo 4. 8. Serum PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren %8 Mg-CeVO <sub>4</sub> - %10 Mg-CeVO <sub>4</sub> IC <sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ile bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	39
Tablo 4. 9. Serum PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren %0,1 Ba-CeVO <sub>4</sub> - %0,5 Ba-CeVO <sub>4</sub> IC <sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ile bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	45
Tablo 4. 10. Serum PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren %1 Ba-CeVO <sub>4</sub> - %2 Ba-CeVO <sub>4</sub> IC <sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ile bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar .....	46
Tablo 4. 11. Serum PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren %4 Ba-CeVO <sub>4</sub> - %6 Ba-CeVO <sub>4</sub> IC <sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ile bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar .....	47

Tablo 4. 12. Serum PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren %8 Ba-CeVO <sub>4</sub> - %10 Ba-CeVO <sub>4</sub> IC <sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ile bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	48
Tablo 4. 13. Serum PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren %0.1 Ca-CeVO <sub>4</sub> - %0.5 Ca-CeVO <sub>4</sub> IC <sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ile bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	55
Tablo 4. 14. Serum PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren %1 Ca-CeVO <sub>4</sub> - %2 Ca-CeVO <sub>4</sub> IC <sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ile bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	56
Tablo 4. 15. Serum PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren %4 Ca-CeVO <sub>4</sub> - %6 Ca-CeVO <sub>4</sub> IC <sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ile bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	57
Tablo 4. 16. Serum PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren %8 Ca-CeVO <sub>4</sub> - %10 Ca-CeVO <sub>4</sub> IC <sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ile bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	58
Tablo 4. 17. Serum PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren %0.1 Sr-CeVO <sub>4</sub> - %0.5 Sr-CeVO <sub>4</sub> IC <sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ile bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	64
Tablo 4. 18. Serum PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren %1 Sr-CeVO <sub>4</sub> - %2 Sr-CeVO <sub>4</sub> IC <sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ile bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	65
Tablo 4. 19. Serum PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren %4 Sr-CeVO <sub>4</sub> - %6 Sr-CeVO <sub>4</sub> IC <sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ile bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	66
Tablo 4. 20. Serum PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren %8 Sr-CeVO <sub>4</sub> - %10 Sr-CeVO <sub>4</sub> IC <sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ile bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.....	67
Tablo 4. 21. Serum PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren CeVO <sub>4</sub> türevli bileşiklerin IC <sub>50</sub> değerleri.....	73



## ŞEKİLLER LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 2. 1 Paraoksanın kimyasal yapısı (O,O-dietil-O-p-nitrofenil fosfat).....	7
Şekil 2. 2 Paraoksonaz enzim mekanizması .....	8
Şekil 2. 3. Paraoksonaz enziminin üç boyutlu görünümü. (a) $\beta$ -kırmalı tabakalar ve (b) hidrofobik bölgelerin (H1, H2, H3) $\beta$ -kırmalı tabakalara göre durumu [18] .....	10
Şekil 2. 4. Paraoksonazın katalitik mekanizması [35] .....	11
Şekil 2. 5 Lakton hidrolizi [19].....	12
Şekil 2. 6 İnsektisitlerde yaygın kullanılan okson metabolitlerinin hidrolizi [39] .....	14
Şekil 2. 7 Sinir gazlarının hidrolizi [39] .....	14
Şekil 2. 8 Aromatik esterlerin hidrolizi [39].....	15
Şekil 3.1 Aktifleştirme reaksiyonu (Sepharose 4B).....	22
Şekil 3. 2 L-Tirozinin bağlanması .....	23
Şekil 3. 3 1-Naftilamin bileşiğinin bağlanması .....	24
Şekil 4. 1. Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %0.1 Be-CeVO <sub>4</sub> için % aktivite-[%0.1 Be-CeVO <sub>4</sub> ] grafiği.....	31
Şekil 4. 2. Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %0.5 Be-CeVO <sub>4</sub> için % aktivite-[%0.5 Be-CeVO <sub>4</sub> ] grafiği.....	31
Şekil 4. 3. Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %1 Be-CeVO <sub>4</sub> için % aktivite-[%1 Be-CeVO <sub>4</sub> ] grafiği.....	32
Şekil 4. 4. Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %2 Be-CeVO <sub>4</sub> için % aktivite-[%2 Be-CeVO <sub>4</sub> ] grafiği .....	32
Şekil 4. 5. Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %4 Be-CeVO <sub>4</sub> için % aktivite-[%4 Be-CeVO <sub>4</sub> ] grafiği .....	33
Şekil 4. 6. Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %6 Be-CeVO <sub>4</sub> için % aktivite-[%6 Be-CeVO <sub>4</sub> ] grafiği .....	33
Şekil 4. 7. Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %8 Be-CeVO <sub>4</sub> için % aktivite-[%8 Be-CeVO <sub>4</sub> ] grafiği .....	34
Şekil 4. 8. Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %10 Be-CeVO <sub>4</sub> için % aktivite-[%10 Be-CeVO <sub>4</sub> ] grafiği.....	34
Şekil 4. 9. Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda Be-CeVO <sub>4</sub> için % aktivite-[%4 Be-CeVO <sub>4</sub> ] grafiği .....	35
Şekil 4. 10. Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %0.1 Mg-CeVO <sub>4</sub> için % aktivite-[%0.1 Mg-CeVO <sub>4</sub> ] grafiği.....	40
Şekil 4. 11. Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %0.5 Mg-CeVO <sub>4</sub> için % aktivite-[% 0.5 Mg-CeVO <sub>4</sub> ] grafiği .....	40
Şekil 4. 12. Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %1 Mg-CeVO <sub>4</sub> için % aktivite-[%1 Mg-CeVO <sub>4</sub> ] grafiği .....	41
Şekil 4. 13. Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %2 Mg-CeVO <sub>4</sub> için % aktivite-[%2 Mg-CeVO <sub>4</sub> ] grafiği .....	41
Şekil 4. 14. Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %4 Mg-CeVO <sub>4</sub> için % aktivite-[%4 Mg-CeVO <sub>4</sub> ] grafiği .....	42
Şekil 4. 15. Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %6 Mg-CeVO <sub>4</sub> için % aktivite-[%6 Mg-CeVO <sub>4</sub> ] grafiği .....	42
Şekil 4. 16. Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %8 Mg-CeVO <sub>4</sub> için % aktivite-[%8 Mg-CeVO <sub>4</sub> ] grafiği .....	43

Şekil 4. 17. Safılaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda % 10 Mg-CeVO <sub>4</sub> için % aktivite-[% 10 Mg-CeVO <sub>4</sub> ] grafiği .....	43
Şekil 4. 18. Safılaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda % Mg-CeVO <sub>4</sub> için % aktivite-[% Mg-CeVO <sub>4</sub> ] grafiği .....	44
Şekil 4. 19. Safılaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %0.1 Ba-CeVO <sub>4</sub> için % aktivite-[%0.1 Ba-CeVO <sub>4</sub> ] grafiği .....	50
Şekil 4. 20. Safılaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %0.5 Ba-CeVO <sub>4</sub> için % aktivite-[%0.5 Ba-CeVO <sub>4</sub> ] grafiği .....	50
Şekil 4. 21. . Safılaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda % 1 Ba-CeVO <sub>4</sub> için % aktivite-[% 1 Ba-CeVO <sub>4</sub> ] grafiği .....	51
Şekil 4. 22. Safılaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %2 Ba-CeVO <sub>4</sub> için % aktivite-[%2 Ba-CeVO <sub>4</sub> ] grafiği .....	51
Şekil 4. 23. Safılaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %4 Ba-CeVO <sub>4</sub> için % aktivite-[%4 Ba-CeVO <sub>4</sub> ] grafiği .....	52
Şekil 4. 24. Safılaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %6 Ba-CeVO <sub>4</sub> için % aktivite-[%6 Ba-CeVO <sub>4</sub> ] grafiği .....	52
Şekil 4. 25. Safılaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %8 Ba-CeVO <sub>4</sub> için % aktivite-[%8 Ba-CeVO <sub>4</sub> ] grafiği .....	53
Şekil 4. 26. Safılaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda % 10 Ba-CeVO <sub>4</sub> için % aktivite-[% 10 Ba-CeVO <sub>4</sub> ] grafiği .....	53
Şekil 4. 27. Safılaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda % Ba-CeVO <sub>4</sub> için % aktivite-[% Ba-CeVO <sub>4</sub> ] grafiği .....	54
Şekil 4. 28. Safılaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %0.1 Ca-CeVO <sub>4</sub> için % aktivite-[%0.1 Ca-CeVO <sub>4</sub> ] grafiği .....	59
Şekil 4. 29. Safılaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %0.5 Ca-CeVO <sub>4</sub> için % aktivite-[%0.5 Ca-CeVO <sub>4</sub> ] grafiği .....	59
Şekil 4. 30. Safılaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda % 1 Ca-CeVO <sub>4</sub> için % aktivite-[% 1 Ca-CeVO <sub>4</sub> ] grafiği .....	60
Şekil 4. 31. Safılaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %2 Ca-CeVO <sub>4</sub> için % aktivite-[%2 Ca-CeVO <sub>4</sub> ] grafiği .....	60
Şekil 4. 32. Safılaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %4 Ca-CeVO <sub>4</sub> için % aktivite-[%4 Ca-CeVO <sub>4</sub> ] grafiği .....	61
Şekil 4. 33. Safılaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %6 Ca-CeVO <sub>4</sub> için % aktivite-[%6 Ca-CeVO <sub>4</sub> ] grafiği .....	61
Şekil 4. 34. Safılaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %8 Ca-CeVO <sub>4</sub> için % aktivite-[%8 Ca-CeVO <sub>4</sub> ] grafiği .....	62
Şekil 4. 35. Safılaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda % 10 Ca-CeVO <sub>4</sub> için % aktivite-[% 10 Ca-CeVO <sub>4</sub> ] grafiği .....	62
Şekil 4. 36. Safılaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda % Ca-CeVO <sub>4</sub> için % aktivite-[% Ca-CeVO <sub>4</sub> ] grafiği .....	63
Şekil 4. 37. Safılaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %0.1 Sr-CeVO <sub>4</sub> için % aktivite-[%0.1 Sr-CeVO <sub>4</sub> ] grafiği.....	68
Şekil 4. 38. Safılaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %0.5 Sr-CeVO <sub>4</sub> için % aktivite-[%0.5 Sr-CeVO <sub>4</sub> ] grafiği .....	68
Şekil 4. 39. Safılaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda % 1 Sr-CeVO <sub>4</sub> için % aktivite-[% 1 Sr-CeVO <sub>4</sub> ] grafiği .....	69
Şekil 4. 40. Safılaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %2 Sr-CeVO <sub>4</sub> için % aktivite-[% 2 Sr-CeVO <sub>4</sub> ] grafiği .....	69
Şekil 4. 41. Safılaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %4 Sr-CeVO <sub>4</sub> için % aktivite-[%4 Sr-CeVO <sub>4</sub> ] grafiği .....	70

Şekil 4. 42. Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %6 Sr-CeVO <sub>4</sub> için % aktivite-[%6 Sr-CeVO <sub>4</sub> ] grafiği .....	70
Şekil 4. 43. Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %8 Sr-CeVO <sub>4</sub> için % aktivite-[%8 Sr-CeVO <sub>4</sub> ] grafiği .....	71
Şekil 4. 44. Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %10 Sr-CeVO <sub>4</sub> için % aktivite-[%10 Sr-CeVO <sub>4</sub> ] grafiği .....	71
Şekil 4. 45. Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda % Sr-CeVO <sub>4</sub> için % aktivite-[% Sr-CeVO <sub>4</sub> ] grafiği .....	72
Şekil 5. 1. PON1 enziminin HDL yüzeyine bağlanma modeli .....	75



## KISALTMALAR VE SİMGELERLİSTESİ

<u>Kısaltma</u>	<u>Açıklama</u>
PON	: Paraoksonaz Enzimi
IC <sub>50</sub>	: Enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsatrasyonu
M	: Molarite
mM	: Milimolar
UV	: Ultraviyole
Ce	: Seryum
V	: Vanadyum
HDL	: Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein (High density lipoprotein)
LDL	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein (Low density lipoprotein)
VLDL	: Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein (Very low density lipoprotein)
CeVO <sub>4</sub>	: Seryum Vanadat

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

#### SERYUM VANADAT ( $CeVO_4$ ) TÜREVLERİNİN PARAOKSONAZ (PON1) ENZİMİ ÜZERİNE *İN VİTRO* ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Yasin ONAY

Siirt Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Mustafa Oğuzhan KAYA

2017, 101 Sayfa

Bu çalışmada, detoksifikasyon ve antioksidan aktivitesi ile kalp damar hastalıklarının yanı sıra metabolizmada önemli fizyolojik fonksiyona sahip Paraoksonaz (PON1) enzimini saflaştırmak için hidrofobik etkileşim kromatografisi jeli sentezlenmiştir.

Hidrofobik etkileşim kromatografisi jeli, CNBr ile aktive edilmiş Sepharose-4B'ye uzantı kolu olarak L-tirozin bağlandıktan sonra ligand olarak hidrofobik bir molekül olan 1-naftilamin L-tirozine kenetlenmesi sonucu sentezlenmiştir.

Siirt ilinde hizmet vermekte olan Sağlık kuruluşlarından alınan atık kan örnekleri kullanılarak İnsan Paraoksonaz enzimi sentezlenen hidrofobik etkileşim jeli ile uygulanan hidrofobik etkileşim kromatografisi ve amonyum sülfat çöktürmesi yöntemleri kullanılarak saflaştırılmıştır.

Çeşitli konsantrasyonlardaki Be, Mg, Ca, Sr ve Ba'un seryum vanadat ( $CeVO_4$ ) türevlerine dope edilmiş yapıları çeşitli konsantrasyonlarda kullanılarak saflaştırılan Paraoksonaz (PON1) enzimi üzerine *in vitro* etkileri araştırılmıştır. Söz konusu seryum vanadat türevleri içerisinde %10 Mg konsantrasyona sahip  $CeVO_4$  yapısının (%10 Mg-  $CeVO_4$ )  $1.17 \times 10^{-4}$  M ile PON1 enzimini en güçlü inhibe eden yapı olduğu tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** PON1, Seryum Vanadat, *In vitro*, İnhibisyon,  $IC_{50}$

## ABSTRACT

## MS THESIS

### INVESTIGATION OF CERIUM VANADATE ( $CeVO_4$ ) DERIVATIVES *IN VITRO* EFFECTS ON PARAOXONASE ( PON1)

Yasin ONAY

The Graduate School of Natural and Applied Science of Siirt University  
The Degree of Master of Science / Doctor of Philosophy  
In Electrical-Electronics Engineering

Supervisor : Asst. Prof. Dr. Mustafa Oğuzhan KAYA

2017, 101 Pages

In this study, a gel of hydrophobic interaction chromatography for purification of Paraoxonase (PON1) enzyme, which are important physiological function in metabolism with detoxification, antioxidant activity and related with cardiovascular diseases were synthesized.

The hydrophobic interaction chromatography gel was synthesized with Sepharose-4B-L-tyrosine and 1-naftilamin as hydrophobic ligand. Sepharose-4B was activated with CNBr and than L-tyrosine was added as extension arm.

Human serum paraoxonase (PON1) was purified from waste blood samples, which taken from Siirt health organization services, by ammonium sulfate precipitation and synthesized hydrophobic interaction chromatographic gel.

The *in vitro* effects of different concentrations of Be, Mg, Ca, Sr and Ba which doped on cerium vanadate ( $CeVO_4$ ) derivatives, on purified Paraoxonase (PON1) were researched. The structure of %10 Mg  $CeVO_4$  (%10 Mg-  $CeVO_4$ ) in the mentioned cerium vanadate derivatives was determined as the best inhibitory effect on PON1 with  $1.17 \times 10^{-4}$  M concentration.

**Keywords:** PON1, cerium vanadate, *In vitro*, inhibition,  $IC_{50}$

# 1. GİRİŞ

## 1.1. 2A Grubu Elementleri

### 1.1.1. Toprak Alkali Metaller

Berilyum (Be), magnezyum (Mg), kalsiyum (Ca), stronsiyum (Sr), baryum (Ba) ve radyum (Ra) elementlerinden oluşan gruba 2A grubu denir.

Periyodik çizelgenin 2A grubunda yer alan elementleri belirten bu grup Toprak Alkali metalleri olarak isimlendirilir. Berilyum, magnezyum, kalsiyum, stronsiyum, baryum ve radyumu içeren toprak alkali metallerin tepkimeye girme eğilimi, alkali metaller kadar olmasa da yüksektir. (Bu güç element ağırlaştıkça artar; örneğin baryum güvenlik açısından yağ içinde muhafaza edilir.). Asitler ve ametaller ile hemen tepkimeye girerek, metalin +2 değerliğine dönüştüğü iyonik bileşikler verir. Berilyum, II. grubun en üstünde yer almasına rağmen grubun öbür üyelerinden önemli ölçüde farklı olduğundan toprak alkali metallerden sayılmaz. Radyum elementi ise grubun doğal radyoaktif üyesi olarak bulunur. Bu özelliği ile radyum grubun diğer üyelerinden ayrılır[MEB, 2012].

### 1.1.2. Genel Özellikleri

Periyodik cetvelde S bloğunun 2. sırasında yer alan 2A grubu elementleri, grup komşusu olan 1A grubundan daha az aktifken 3A grubundan daha aktif olduğu tespit edilmiştir. 2A grup elementlerinin son yörüngelerinde  $2(nS^2)$  elektron bulunur. Bundan dolayı 2 elektron vererek kolayca soy gaz elektron düzenine ulaşabilir ve +2 değerlikli kararlı bileşikler oluşturur. Berilyum dışındaki grup elementleri bileşiklerinde iyonik yapıli bileşikler oluştururken berilyum daha çok kovalent yapıli bileşikler oluşturur. Bu da berilyumun diğer toprak alkali metallerinden farklılık göstermesine sebep olur.

Grup elementlerinden berilyum ve bir ölçüde magnezyum grubun diğer elementlerinden farklılık gösterirken; kalsiyum, stronsiyum ve baryum birbirine benzer ve periyodik cetveldeki yerlerinden beklenen özellikleri gösterdiği görülür. Benzer bir ilişki berilyum, magnezyum ve kalsiyum içinde söylenebilir. Berilyum grupta atom yarıçapı en küçük olan atomdur. Berilyum atomu +2 değerlikte iken çok küçük iyon yarıçaplı olması yine oksit ve hidroksitlerinin spesifik amfoter özellik göstermesi ve metalin kovalent bağ yapabilmesini açıklar [MEB, 2012].

## 1.2. Enzimler

Canlıların yaşamlarını devam ettirebilmeleri için iki temel koşul vardır. Bir, canlı kendi kopyasını yapma kabiliyetinde olmalıdır; iki, organizma yeterince ve seçici olarak kimyasal reaksiyonları katalizleyebilme kabiliyetinde olmalıdır. Canlı sistemler çevrelerindeki enerjiyi kullanırlar. İnsanlar, örneğin, tatlı yiyecek ve içecekleri veya şekerin kendisini yakıt şeklinde kullanarak önemli miktarda sukroz tüketir. Oksijenin varlığında sukrozun CO<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>O'ya dönüşümü oldukça ekzotermik bir süreçtir, ortaya çıkan serbest enerji görme, tatma, hareket ve düşünmede kullanılabilir. Bununla birlikte, bir çuval şeker, CO<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>O'ya hiçbir dönüşüm olmaksızın yıllarca saklanabilir. Bu kimyasal reaksiyon termodinamik olarak tercih edilir olmasına rağmen, çok yavaştır. Lakin sukroz insanlar tarafından tüketildiğinde saniyeler içerisinde kimyasal enerjiyi salar. İki durum arasındaki fark kataliz olayıdır. Organizmalarda kataliz olmasaydı, hayatın devam edebilmesi için gerekli olan kimyasal reaksiyonlar uygun zaman aralığında meydana gelemezdi.

Enzimler çoğunlukla yapay ve inorganik katalizörlerden çok daha önemli olağanüstü katalitik güce sahiptir. Substratları için yüksek özgüllüğe sahiptir, kimyasal reaksiyonları yüksek seviyede hızlandırır ve pH ile sıcaklığın optimum koşulları altındaki sıvı çözeltilerde işlev görür. Biyolojik olmayan katalizörlerin pek azı bu özelliklerin tümüne sahiptir.

Enzim çalışması oldukça pratik öneme sahiptir. Bazı hastalıklarda, özellikle kalıtsal genetik anomalilerde bir veya daha çok enzimin noksanlığı ya da tamamen yokluğu mevzu bahis olabilir. Farklı bir grup hastalığa da enzimin aşırı aktivitesi sebep olabilir. Enzimlerin aktivitelerinin kan plazmasında, kanın şekilli elemanlarında veya doku sıvılarında ölçümü belli hastalıkların tanısında önemlidir. Birçok ilacın biyolojik etkisi enzimlerle etkileşme seviyelerine göre ortaya çıkar.

Enzimler katalizledikleri özgül reaksiyona göre sınıflandırılır [Lehninger, 2005].

### 1.2.1. Enzimlerin Sınıflandırılması

Enzimler, evvelden katalitik etkileri üzerinde gösterdikleri ve “substrat” adı verilen bileşiklerinin adlarının sonuna, “az” eki getirilmek sureti ile adlandırılmıştır. Örneğin, üreyi Karbonmonoksit ve Amonyaga parçalayan enzime üreaz, arginini ornitin ve üreye indirgeyen enzime arginaz, fosfat esterlerinin hidrolizlenmesini sağlayan



enzimlere de fosfataz denilmiştir. Bu isimler en azından substratlara dair bilgi verirlerken, bu konuda hiçbir bilgi vermeyen bazı enzim isimleri de bilim insanları tarafından kullanılmıştır. Örneğin pepsin, tripsin ve katalaz enzimleri. Zamanla birçok farklı enzimin ortaya çıkarılması ile, sistematik bir adlandırma ihtiyacı hasıl oldu. Bu vesile ile enzimler, uluslararası enzim komisyonu tarafından, katalizledikleri tepkime tipleri ve tepkime mekanizmaları gözetilerek bir sınıflandırma yöntemi geliştirildi. Ancak günümüzde, çoğu biyokimyacı tarafından ilk konulan isimler hala kullanılmakta, sistematik isimleri de çoğunlukla parantez içinde verilmektedir.

Sistematik adlandırmanın başlıca özellikleri şunlardır:

a. Tepkimeler ve onları katalizleyen enzimler 6 gruba bölünmüştür. Herbir grup da kendi içinde 4 ile 13 arasında alt gruba ayrılmıştır. Ve bu 6 grup çeşitli örnekleriyle izah edilecektir..

b. Enzim ismi iki bölümde verilir. İsmi ilk kısmı substrat veya substratlarıdır. İkincisi ise katalizlenen tepkimenin tipinin sonuna “-az” eki getirilmiş hali, yani grup veya alt grup adıdır. Substratlar aralarına iki nokta konulmak suretiyle yazılırlar.

c. Tepkimenin doğasını izah edecek ifadeler gerekiyorsa, parantez içinde ismin sonunda yazılabilir.

d. Her enzime sistematik bir kod verilmiştir. Bu numara E.C. (Enzyme Code) harflerinden sonra artarda gelen dört rakamdan oluşur. Birinci rakam enzimin bağlı olduğu grubu gösterirken, ikincisi alt grubu, üçüncüsü alt alt grubu belirtir. Dördüncü rakam ise, enzimin aynı üç rakama sahip enzimler arasındaki sıralamasını verir. Mesela E.C.2.7.1.1. kod numarasında 2, bu enzimin bir transferaz enzimi olduğunu; 7, bir fosfat transfer edildiğini; 1, fosfat transferinin alkol grubuna olduğunu ve son 1 rakamı da bu enzimin alkol grubuna fosfat transferi sağlayan enzimler arasında ki sırasını göstermektedir. Örnekte ki enzim hekzokinaz geleneksel adıyla bilinen, ATP:D-heksoz 6-fosfotransferaz enzimidir.

Enzimlerin altı ana grubu;

1. Oksidoredüktazlar: İki substrat arasında redoks tepkimelerini katalizleyen enzimlerdir.

2. Transferazlar: İki substrat arasında hidrojen (H) harici grupların transferini katalizleyen enzimlerdir.

3. Hidrolazlar: Ester, eter, peptid, glikozid, anhidrit, C-Halajenür yada P-N bağlarının bir H<sub>2</sub>O molekülünün katılımıyla hidrolizini katalizleyen enzimlerdir.
4. Liyazlar: Hidrolizden farklı bir mekanizma ile substratlardan grupların uzaklaştırılarak, çift bağların oluşturulduğu tepkimeleri katalizleyen enzimlerdir.
5. İzomerazlar: Geometrik, optik veya yapısal izomerlerin birbirine dönüşümünü katalizleyen enzimlerdir.
6. Ligazlar: ATP ve GTP gibi yüksek enerjili fosfat bileşiklerinden fosfat bağının koparılması sonucu ortaya çıkan enerji yardımıyla iki molekülün bağlanması tepkimelerini katalizleyen enzimlerdir [Keha, 2005].

### **1.3. Kalp Damar Hastalıkları**

Kalp kaslardan oluşan güçlü bir pompadır. Günlük ortalama Binbeşyüz litre kanı pompalar. Kalp kasının'da görevini tam olarak yapabilmesi için, uygun miktarda kan almaya ihtiyacı vardır. Kalp ihtiyacı olan kanı, kalp damarlarından (koroner damarlar) alır. Kalp damar hastalığı (koroner arter hastalığı), kalp damarlarının kısmen daralması yada tıkanması sonucu oluşur. Tıkanma sonucunda kalp yeteri kadar beslenemez, O<sub>2</sub>'siz ve besinsiz kalır. Bu nedenle gerektiği gibi çalışamaz. Sonuçta, anjina diye adlandırılan göğüs ağrısı ortaya çıkar. Kalp damarlarından birinin veya birkaçının tamamen tıkanması ile kalp krizi görülebilir. Kalp krizi kalp kaslarının ve diğer organların zarar görmesine sebep olur.

#### **1.3.1. Kalp Damarlarının Daralmasına Ne Sebep Olur?**

Kalp damarları kanın rahatlıkla akabileceği tüplere benzer. Damarların çeperleri düz kastan oluşmuştur ve esnek yapıdadır. Kalpteki koroner damarlar gençlik yıllarından itibaren yavaş yavaş yağlanır. Zamanla yağ damar duvarlarında birikir ve hasara sebep olur. Damarlar tıkanıklığı gidermek için bazı maddeler salgılar. Böylece damarlar daha da kalınlaşır. Kanın içinde bulunan protein, kalsiyum gibi yapılar ve bazı hücreler gelip bu bölgeye yapışırlar. Bu maddeler ve yağ birikintileri plakları meydana getirir. Plaklar genişleyerek, damarları daraltır. Bu olaya ateroskleroz denir. [Url-1]

## 2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

Paraoksonaz (PON); karaciğerde sentezlenen ve organik fosforlu bir insektisit olan parationun aktif metaboliti paraoksonu hidroliz etme kabiliyetine sahip A-esterazlar grubundan bir serum esterazdır [Juretic ve ark., 2001; Li ve ark., 1993]. Enzim, paration dışında diizopropil florofosfat (DFP) gibi organik fosforlu insektisitlerle, yine aynı kimyasal gruba mensup sarin, tabun gibi sinir gazlarının; çeşitli karbamatların; fenilasetat, 4-nitrofenil asetat, 2-naftil asetat gibi birçok aromatik karboksilik asit esterlerinin hidrolizini de katalize etmektedir. PON1, HDL'ye bağlı, organofosfat ajanları (OP) ve LDL'nin oksidasyonu ile lipit peroksidlerin oluşumuna ve bakteri endotoksinlerine karşı koruyucu rol oynayan önemli bir enzimdir. LDL'nin oksidasyonu arteroskleroz sürecinin başlangıç evresini oluşturması, paraoksonaz (PON) enzimin antioksidan özelliğinin önemini ortaya koymaktadır [Durrington ve ark., 2001; Carey ve ark., 2005].

Memeli canlı türünde geniş bir yelpazeye sahip olan PON proteinleri; balıklarda, kuşlarda ve eklembacaklılarda tespit edilmemiştir. [Durrington ve ark., 2001]. Memelilerde, özellikle yapılan incelemelerde insanlarda ve farelerde, aynı kromozomda birbirine komşu üç farklı PON geni (PON1, 2, 3) bulunmaktadır. PON genleri; farelerde 6. kromozom üzerine yerleşirken, insanlarda 7. kromozomun uzun kolunda, q 21.3 ile q 21.1 bölgesinde yoğunlaştıkları bildirilmektedir [Hegel, 1999]. Yapısal yönden büyük benzerlikler gösteren bu genlerden PON1'e yönelik çok yoğun çalışılmalar yapılmaktadır. PON1, fizyolojik substratlarının belirlenmesi ve arterosklerozis ile ilişkisinin anlaşılması ile, PON2 ve PON3'e göre nispeten daha iyi aydınlatılan genidir [Carey ve ark., 2005]. PON1 geni, Q/R 192 ve M/L 55 olmak üzere iki önemli polimorfizm göstermektedir. Bunlardan en yaygın Q/R 192 polimorfizmidir. Çünkü PON1 enzim aktivitesindeki bu polimorfizm substrat bağımlıdır ve farklı etnik kökenli popülasyonlara göre değişkenlik gösterdiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [Gürsu ve ark., 2003].

Paraoksonaz enzimlerinin amino asit dizinleri arasında %60 civarında benzerlik tespit edildiği bildirilmektedir. Bununla beraber, Paraoksonaz enzimlerinin dokulardaki ekspresyonlarına ve dağılımlarına göre, birbirinden farklılaşmaktadırlar. PON1'e ait mRNA'nın karaciğer dışında beyin, kalp, böbrek, akciğer ve ince bağırsak dokularında da bulunduğu gösterilmiş ve PON1'in, bu dokuların tümünde endotelial tabakada

konumlandığı, immunohistokimyasal tekniklerle tespit edilmiştir. Nerdeyse bütün dokularda görülen ve PON1 mRNA'ya kıyasla, dokular arasında daha geniş bir dağılım gösteren PON2 geninin protein ürünleri şimdilik bilinmemektedir. Son yıllarda tavşan Karaciğeri ve serumundan ayrıştırılan ve bir laktonaz olan PON3 gen ürününün; en çok plazma ve HDL bünyesinde olduğu bildirilmektedir [Draganov ve ark., 2000; Azarsız, 2000].

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

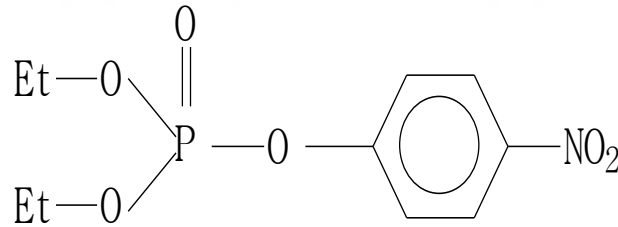
PON, Aldridge sınıflandırma sistematğine göre A grubu arildialkilfosfataz sınıfına mensup ester hidrolaz enzimidir. Evvela toksolojide organofosfat bileşiklerini hidroliz edebilmesi nedeni ile kullanılmış, Daha sonraları ise antioksidan etkileri nedeni ile kronik kalp hastalığı riskinden koruyabileceği düşüncesi ile güncellik kazanmıştır [Azarsız, 2000]. Paraoksonazı ilk defa 1953 yılında Aldridge W.N., p-nitrofenil asetat, propiyonat ve bütiratı hidroliz eden A-esteraz olarak tespit etmiştir. Uriel tarafından ise ilk defa 1961'de insan serumunda elektroforez sonrası HDL immunopresipitatlarında tanımlanmıştır[Uriel, 1961]. Mackness ve arkadaşları ilk kez HDL tasnifi için santrifüjleme metodunu kullandıktan sonra, koyunlarda PON aktivitesinin ekseriyetle Apo AI içeren partiküllerde HDL ile beraber bulunduğunu ve insan serumunun ultra santrifüjlenmesi sonrası enzimin kanda HDL bünyesinde taşındığını tespit etmişlerdir. [Michael ve ark., 1996]. Safılaştırdıkları sığır serum PON'un lipidlerle ilgili ve HDL ile aynı moleküler kütleyle sahip olduğunu gözlemlemişlerdir. Safılaştırma sırasında apo A-I'in PON'dan ayrılmasının güç olması, bu ikisinin arasında sıkı bir ilişki olduğunu düşündürmüş ve HDL kolesterol analizi esnasında lipoprotein bandında aril-esteraz aktivitesine rastlamışlardır[Uriel, 1961]. Enzim; paraokson, metil paraokson ve klormetil paraoksone yüksek düzeyde seçicilik gösterdiği için, paraoksonaz olarak adlandırılmıştır. Mackness ve arkadaşları, Paraoksonaz'ın HDL üzerinde Apo A-I'e bağımlı olarak etki gösterdiğini ve 1991 yılında LDL üzerindeki lipoperoksit birikimini azalttığını keşfetmişlerdir [Michael ve ark., 1996]. Aynı zamanda Macness ve arkadaşları tarafından farklı ırklarda (Fransız, Sudanlı vs) polimorfizm analizleri yapılarak, allelik formları belirlenmiş ve populasyon çalışmaları enzim aktivitesiyle HDL, Apo A-I, Apo A-II arasındaki istatistiki bağlantı ortaya konmuştur[Michael ve ark., 1996]. İmmunoafinite kromatografi analizleri insan serum PON'unun gerçekte

Apolipoprotein A-I ve Klusterin (apolipoprotein J) içeren HDL tipleri ile bağlantılı olduğunu ve Paraoksonaz'ının tüm HDL'nin çok az bir kısmını oluşturduğunu göstermiştir [Azarsız, 2000; Michael ve ark., 1996].

Daha sonra yapılan analizlerde, farklı kalp hastalıklarında enzim aktiviteleri incelenmiş, lipoproteinler ve lipid peroksidasyonu arasındaki ilişki araştırılarak enzimin aminoasit dizisi belirlenmiştir [Erdem, 2004].

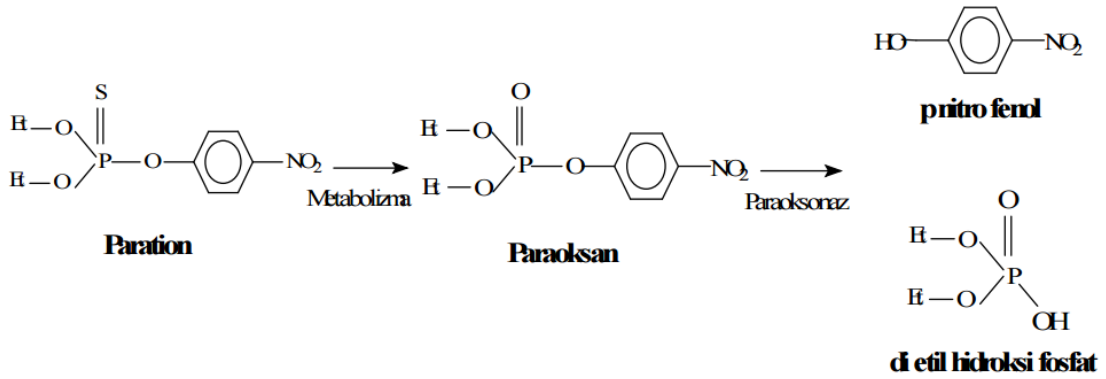
### 2.1.1. Adlandırılması

Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği'nin (IUBMB) enzim adlandırmasında paraoksonazın iki farklı numarası (EC 3.1.1.2 ve EC 3.1.8.1.) vardır. 1990'lı yıllardan sonra, paraoksonazın fenolik esterler dışında fosforik ve fosfinik asit esterlerini de hidroliz ettiği görülmüş ve EC 3.1.8.1 ile tanımlanmıştır [Erdem, 2004]. Paraoksonaz enzimi, A grubu arildialkilfosfataz sınıfı bir ester hidrolaz enzimi olduğu için sistematik adı arildialkilfosfatazdır. A esteraz grubunda yer alan paraoksonaz enzimi, aktivitesinin ilk ölçümünde paraokson substratı kullanıldığından paraoksonaz olarak adlandırılmıştır. (Şekil 2.1) [Mackness ve ark., 1998].



Şekil 2. 1 Paraoksanın kimyasal yapısı (O,O-dietil-O-p-nitrofenil fosfat)

Paraoksonaz enzimi geniş bir substrat özgüllüğü gösterirken, fizyolojik substratı kesin olarak belirlenmemiştir. Fakat laktonaz, arilesteraz ve organofosfataz özelliklerine sahip olduğu tespit edilmiştir. İnsan serum paraoksonaz enzimi, parationun metabolik ürünü olan paraoksanı kataliz etme yeteneğine sahiptir. 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 2.2) [Azarsız, 2000].



Şekil 2. 2 Paraoksonaz enzim mekanizması

### 2.1.2. Paraoksonaz Gen Ailesi

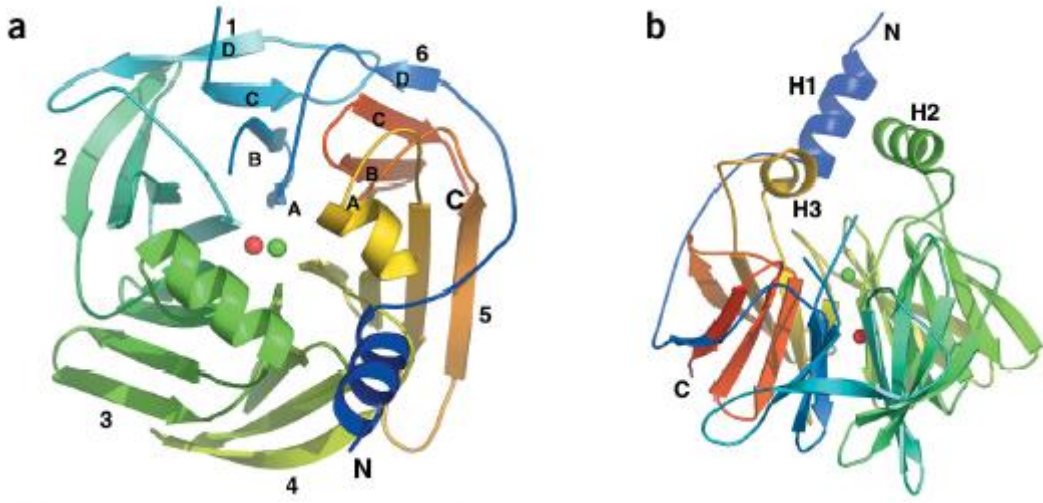
PON gen ailesi, insanlarda 7. kromozom'un uzun kolunda q21.3 ve q22.1 arasında bulunmaktadır [Michael ve ark.,1996; Kirsty ve ark., 2003]. İlk olarak memelilerde tanımlanan PON ve PON ile ilişkili genler, sonraları kümes hayvanları, zebra balığı ve omurgasızlardan *Caenorhabditis elegans*'ta bulunmuştur [Uriel, 1961]. Paraoksonaz gen ailesi; PON1, PON2 ve PON3 olarak 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 [Michael ve ark., 1996; Liang, 2003]. PON2 ve PON3, PON1 kadar aydınlatılamamıştır [Carey ve ark., 2005 ; Erdem, 2004]. 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 [Carey ve ark., 2005; Mackness, 1998]. 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 [Bert ve ark., 1999; Michal ve ark., 2004].

### 2.1.3. PON1'in Biyokimyasal Yapısı

PON1, 43-45 kDa molekül ağırlığına sahip 354 aminoasitten oluşan bir proteindir [Liang, 2003; Bharti ve ark., 2002]. Her molekülün total ağırlığının %15.8'i üç karbonhidrat zinciri içermektedir. İzoelektrik noktası 5.1'dir. Aminoasit bileşimi yüksek lösin içeriği dışında bir özellik göstermez [Liang, 2003]. Yapısında yer alan 3 sistein (Cys) rezidüsünden 284'teki serbest iken 42 ve 352. sistein rezidüleri arasında disülfid bağı bulunur. *In situ* hibridizasyon çalışmaları ile PON1 geninin, 7. kromozomun uzun kolu üzerinde q21-q22' de bulunduğu gösterilmiştir [Azarsız, 2000 ;Michael ve ark.,1996].

PON1'in ince yapısı dört tane zincirden oluşmuş 6 adet  $\beta$ -kırmalı yapıdan meydana gelmiştir (Şekil 2.3). Enzimin 42. ve 353. sistein rezidüleri arasındaki disülfid köprüsü ile tamamlanarak üç boyutlu yapısını kazanır [Jawad , 2002]. N terminal ve C terminal uçlarının böyle kovalent bağ yapması  $\beta$ -kırmalı yapıli enzimlerde nadiren görülür.

Üç boyutlu yapıda;  $\beta$ -kırmalı tabakaların merkezinde  $7.4\text{\AA}$  aralıklı iki adet  $\text{Ca}^{+2}$  iyonu mevcuttur. Bunlardan bir tanesi yapısal özelliğe sahip olup yapıdan uzaklaştırılması dönüşümsüz denatürasyonlara neden olur. [Kuo ve ark., 1998]. Diğeri ise katalitik etkinlikte rol oynar. Bu kalsiyum iyonu  $2.2-2.5\text{\AA}$  uzaklıkta 5 adet aminoasit rezidüsü (Asn224, Asn270, Asn168, Asp269 ve Glu53) ile etkileşim halindedir. Aynı  $\text{Ca}^{+2}$  iyonu bir su molekülü ve fosfat iyonunun oksijeni ile etkileşmektedir. PON1'in yapısı 6 adet  $\beta$ -kırmalı tabaka ile merkezdeki  $\text{Ca}^{+2}$  iyonları açısından diisopropilfluorofosfataz (DFPase) enzimi ile benzerlik göstermektedir [Scharff ve ark., 2001]. Ancak, PON1 esteraz, fosfotriesteraz ve laktonaz aktivitesi gösterirken, DFPase sadece fosfotriesterase aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. Bu iki enzimin aminoasit dizilerinde belirgin bir benzerlik yoktur [Fokine, 2003]. PON1'in aktif bölgesinde diğeri  $\beta$ -kırmalı yapılardan farklı olarak hidrofobik heliks ( $\text{H}_2$  ve  $\text{H}_3$ ) yapıları vardır (Şekil 1.3). Bu yapılar aynı zamanda sonlanma noktaları olup, aktif bölgenin korunması ve enzimin HDL'ye bağlanması gibi kritik rollere sahiptir. PON1 sentezlendiğinde monomerik yapı şeklindedir. Enzim, HDL'ye bağlanamadığı zaman oligomerizasyon gerçekleştiği belirlenmiştir. Bu olay *in vitro* deterjanlı ortamda  $\text{H}_2$  ve  $\text{H}_3$  heliksleri ile deterjan misellerine bağlanarak gerçekleşir [Josse, 2002].



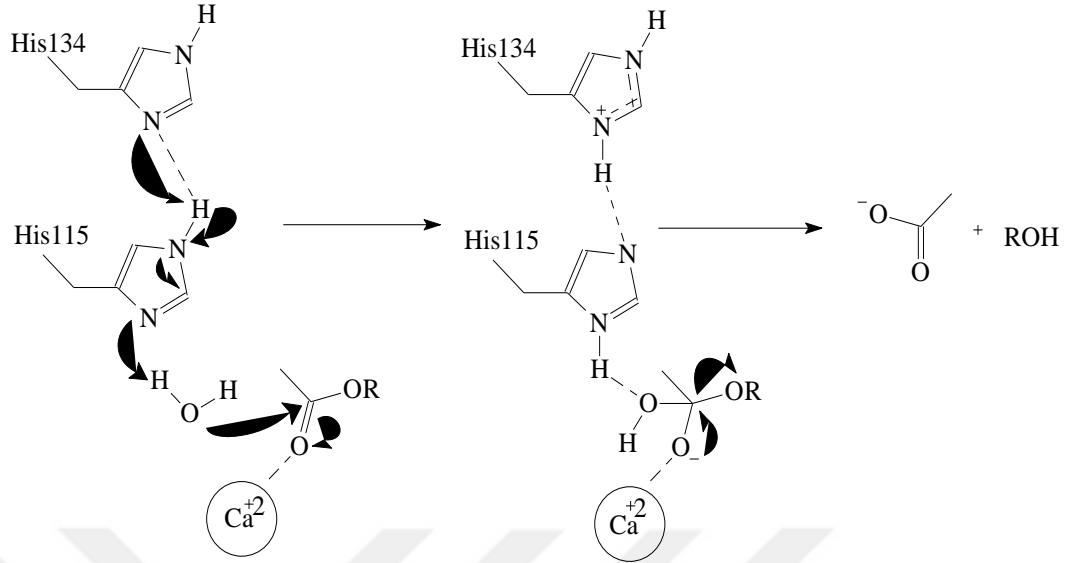
Şekil 2. 3. PON enziminin üç boyutlu görünümü. (a) β-kırmalı tabakalar, (b) hidrofobik bölgelerin (H1, H2, H3) β-kırmalı tabakalara kıyasla durumu [Michal ve ark., 2004]

PON1 üzerinde 4 tane potansiyel N-glikozillenme bölgesi vardır. İki tanesi (Asn 227 ve Asn 270) β-kırmalı tabakaların merkezinde, diğer ikisi ise yüzeye bakan bölgede (Asn 253 ve Asn 324) yer almaktadır. PON1 memeli hücrelerinde ekspre edildikten sonra bu noktalardan glikozillendiği gözlenmiştir [Josse, 2002]. PON ailesinin hidrolitik aktivitesi için, glikolizasyonun aktiviteyi önemli ölçüde etkilemediği saptanmıştır [Ahoroni, 2004; Josse, 1999]. Ancak enzimin yapısında bulunan bu karbohidrat molekülleri spesifik olmayan hücre membranlarına bağlanmada veya kararlılığı ve çözünürlüğü arttırmada etkili olabileceği açıktır [Jonas, 2000; Sinan, 2005].

#### 2.1.4. Enzimin Katalitik Mekanizması

Paraoksonaz enziminin aktif bölgesinde bulunan His-His çifti, kalsiyum iyonu ve su molekülü, esteraz aktivitesinde önemli rollere sahiptir (Şekil 2.4).





Şekil 2. 4. Paraoksonazın katalitik mekanizması [35]

Katalitik etkinlik gösteren Kalsiyum iyonu, substrattaki fosfat iyonunun eksi yüklü oksijenine 2,2 Å mesafededir. Aktif bölgedeki His-His çifti, H<sub>2</sub>O molekülünün bir protonunu alarak su molekülünün nükleofilik kuvvetini artırır. Oluşan OH<sup>-</sup> iyonu karbonil yada fosfat esterine yönelir. Bu anda oluşan kompleks tetrahedral bir düzlem sonucu Ca<sup>+2</sup> iyonu ile kararlı kılınır. Oluşan yapıdaki Ca<sup>+2</sup> iyonu eksi yüklü oksijen (O<sup>-</sup>)'den uzaklaşarak bağ tekrar fosfat veya karbonilin üzerine yıkılır ve ester bağı kopar.

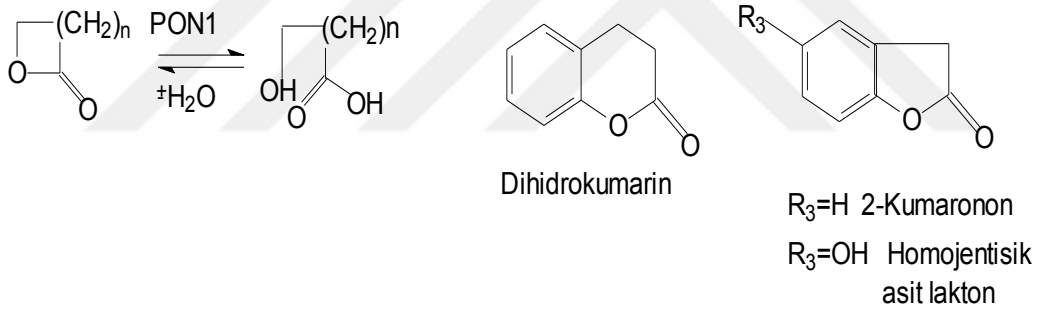
PON1'in mekanizmasını izah etmek niyetiyle, esteraz aktivitesi için 2-naftilasetat ve fosfotriesteraz aktivitesi için paraoksan substratları kullanılmıştır. Bu substratların optimum pH aralıkları tespit edilmiş ve substratın yapısında bulunan yan zincirin katalizlenmeye direkt katılmadığı sonucuna varılmıştır[Harel ve ark., 2004].

### 2.1.5. Katalizlediği Reaksiyonlar ve Substratları

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

Son yıllarda PON1'in aterosklerozisin oluşumunu önlemede ve ilaç aktivitesinde önemli etkinliği olduğu bilinmektedir [Draganov ve ark., 2004; Lusic, 2000; Mackness

ve ark., 2001]. PON1 özellikle LDL ve HDL lipitlerinin yükseltgenmesinin önüne geçerek lipit peroksidlerini metabolize ederek aterosklerozise karşı koruyuculuğunu, sahip olduğu laktonaz aktivitesi ile göstermektedir [Billecke ve ark., 2000; Teiber, 2003]. Söz konusu enzim 4 ila 7 atom arası değişen lakton halkası ihtiva eden en az 30 çeşit laktonu hidrolizleyebilmektedir. Alifatik lakton substratı olan  $\delta$ -valerolakton (6 halkalı lakton),  $\gamma$ -butirolakton (5 halkalı lakton) ve  $\epsilon$ -kaprolaktondan(7 halkalı lakton) daha çabuk hidrolizlenmektedir. PON1 enziminin aromatik laktonlar afinitesi, alifatik laktonlara kıyasla daha fazladır ve daha kolay hidrolizlenirler. Fakat ilginç bir şekilde, pek çok ilacın etken maddesinde bulunan kumarin bileşiğinin lakton halkası  $\alpha$  ve  $\beta$  çift bağı içerdiği halde PON1 tarafından hidrolizlenememektedir, fakat dihidrokumarin hidrolizlenmektedir [Billecke ve ark., 2000; Garrett ve ark., 1971] (Şekil 2.5).



**Şekil 2. 5 Lakton hidrolizi [19]**

Önceleri PON1'in yapısının ve substratlarla olan ilişkisinin belirlenmesinde yapı-aktivite analizi üzerine çalışmalar yapılmıştır. Bu konuda ilk olarak, Augustinsson ve Ekedahl aromatik halkalı veya çift bağa sahip aromatik esterlerin PON1 tarafından hidrolizlendiklerini bulmuştur. Bu tepkimede PON1'in substrat olarak kullanacağı esterlerin karbon-karbon çift bağının birbirine çok yakın olması gerektiği tespit edilmiştir [Augustinsson, 1968]. Ayrıca, yapılan bir başka çalışmada, vinil asetat ve  $\Delta^2$ -siklopentil asetatın PON1 tarafından hidrolizlenmesi fakat etil asetat ve siklopentan asetatın PON1 tarafından hidrolizlenememesi bu öneriyi desteklemektedir [Billecke ve ark., 2000]. Lakton halkasının oluşturduğu uzaysal yapı, bu yapıyı içeren bazı substratların enzimin aktif merkezine girmesini sağlayarak etkileşmelerine ve

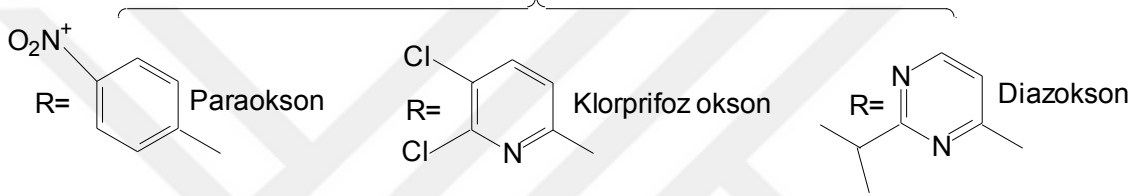
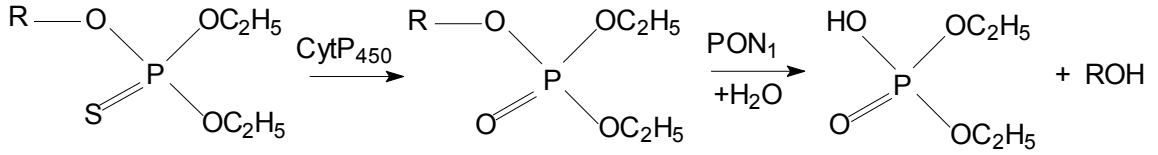
hidrolizlenmelerine izin verir. Bu etkileşim benzer şekildeki içte bulunan ester formları için mümkün değildir. Örneğin etil asetat PON1 ile hidrolizlenmezken, aynı sayıda atom ve ester yapısına sahip  $\gamma$ -bütürolakton iyi hidrolizlenmektedir [Billecke ve ark., 2000; Draganov ve ark., 2004].

PON1 enziminin laktonaz aktivitesi için 284. rezidüde bulunan serbest sistein aminoasiti oldukça önemlidir. Bu serbest sistein rezidüsünün, söz konusu enzimin LDL'nin okside olmasını önlemesinde de rol alması; PON1'in sahip olduğu laktonaz aktivitesi aracılığıyla LDL ve HDL fosfolipitlerinin yükseltgenmeye karşı koruduğu düşünülmektedir [Aviram ve ark., 1998; Aviram]. Sorenson ve arkadaşları 284. pozisyonda bulunan serbest sistein rezidüsünün arilesteraz ve paraoksonaz aktivitesinde gerekli olmadığını göstermişlerdir [Sorenson ve ark., 1995]. Ancak aktif merkezdeki histidin rezidülerinin paraoksonaz ve arilesteraz hidrolitik aktivitelerini göstermesinde çok gerekli olduğu gösterilmiştir [Doorn ve ark., 1999].

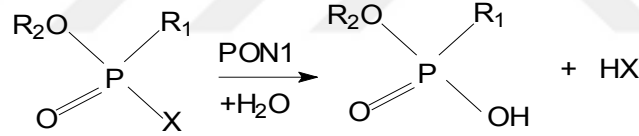
PON1 bazı lakton ve karbonat esterlerini içeren ilaçları ile ilaç ön maddelerini de hidrolizleyebilmektedir. Mesela, diüretik bir ilaç olan spironolakton ve 3-hidroksimetilglutaril-CoA redüktaz inhibitörleri olan mevastatin, lovastatin ve simvastatin bu enzim tarafından hidrolizlenir. Önceleri yapılan çalışmalarda bu hidroksimetil glutaril-CoA redüktaz inhibitörlerinin hidrolizlenmesi söz konusu enzimin statinaz aktivitesi olarak tanımlanmıştır [Vickers ve ark., 1990; Tang ve ark., 1995]. Ayrıca PON1 glukokortikoid  $\delta$ -laktonların [Biggadike ve ark., 1990] sistemik metabolize edilmesinde ve ön ilaç maddesi olan karbonat ester yapısındaki prulifloksasinin aktivasyonunda rol oynamaktadır [Tougou ve ark., 1998]. Bunun gibi PON1'in laktonaz aktivitesinden başlıca yönetici ajanların metabolize edilmesinde ve bunların istenmeyen yan etkilerinin azaltılmasında yararlanılmaktadır [Biggadike ve ark., 1990]. Laktonların isosterik formları olan laktamlar oksijen halkası yerine azot halkası ihtiva ederler. Laktamlar PON1'in substratını oluşturmazlarken enzimi inhibe ederler. *In vitro* çalışmalarda  $\delta$ -valerolaktam,  $\epsilon$ -kaprolaktam ve 2-hidroksikinolin gibi laktamlar PON1 enziminin güçlü inhibitörleridir [Billecke ve ark., 2000].

İnsan serum PON1 enzimi ayrıca paration, diazinon ve klorpirifos gibi çok sayıda insektisit toksik okson metabolitlerini (Şekil 2.6) [La Du, 1992; Costa ve ark., 2002] ve soman, sarin ve tabun gibi organofosfat sinir ajanlarını hidrolizleyebilmektedir

(Şekil 2.7) [Broomfield ve ark., 1991; Baillie ve ark., 1993]. İnsan sağlığı açısından organofosfatlı bileşikler, terör tehdidi kadar bir çevresel risk oluşturur [Harel ve ark., 2004]. PON1 enziminin farklı araştırmalara konu olmasının en önemli sebeplerinden biri budur.



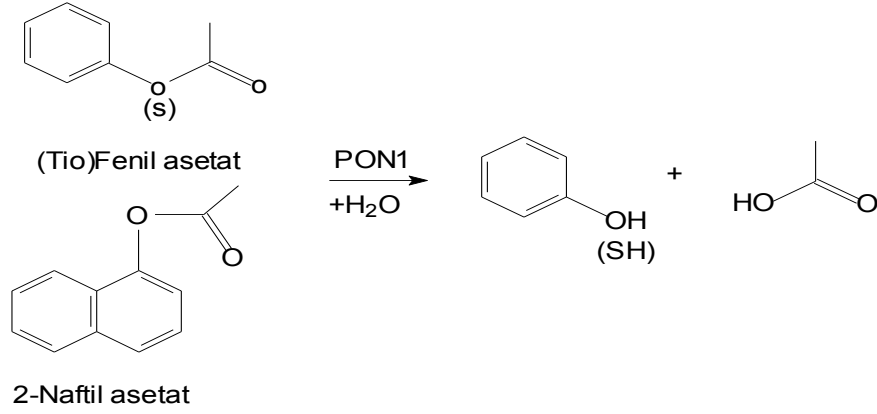
Şekil 2. 6 İnektisitlerde yaygın kullanılan okson metabolitlerinin hidrolizi [Draganov ve ark., 2004]



- |  |  |                        |   |
|--|--|------------------------|---|
| $\text{R}_1 = \text{N}(\text{CH}_3)_2$ | $\text{R}_2 = \text{CH}_2\text{CH}_3$                        | $\text{X} = \text{CN}$ | Etil N-dimetilfosforoamidosiyanid (Tabun) |
| $\text{R}_1 = \text{CH}_3$             | $\text{R}_2 = \text{CH}(\text{CH}_3)_2$                      | $\text{X} = \text{F}$  | Izopropil metilfosfonofluoridat (Sarin)   |
| $\text{R}_1 = \text{CH}_3$             | $\text{R}_2 = \text{CH}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{CH}_3)_3$ | $\text{X} = \text{F}$  | Pinakolil metilfosfonofluoridat (Soman)   |

Şekil 2. 7 Sinir gazlarının hidrolizi [Draganov ve ark., 2004]

Bu aktivitelerinin yanında PON1 enzimi sınıflandırılmada yer aldığı A-esteraz grubunda bulunması ile fenilasetat gibi ester substratlarını da hidrolizleyebilmektedir. Ayrıca, tiofenil asetat ve 2-naftil asetat PON1'in aromatik ester substratları arasındadır (Şekil 2.8) [Eckerson ve ark., 1983; Sorenson ve ark., 1995; La Du, 1992].



**Şekil 2. 8 Aromatik esterlerin hidrolizi [Draganov ve ark., 2004]**

### 2.1.6. PON1'in HDL'ye bağlanması

PON1 ve PON3 K<sub>c</sub>'de üretilerek kana salınır, orada spesifik olarak HDL'ye bağlanır. HDL periferel hücrelerden kolesterolün taşınmasını sağlayan ve kendisine bağlı platelet aktive eden faktör, PON1, LCAT ve PON3 gibi enzimler ile LDL'nin yükseltgenmesini önler [La Du, 1992; Lund-Katz ve ark., 2003].

HDL yaklaşık 10 nm çapında kompleks bir yapıdır. Bileşiminde öncelikle membran bileşenleri (fosfolipidler, kolesterol ve kolesterol esterleri), apolipoprotein A1 ve aromatik heliksler yer alır [Borhani ve ark., 1997]. HDL'ye bağlı olan enzimlerden ilk kez üç boyutlu yapısı aydınlatılan PON1 enzimidir [Blatter ve ark., 1993; Kelso ve ark., 1994]. PON1 hidrofobik N terminal ucuyla sonlanır, H<sub>2</sub> ve H<sub>1</sub> hidrofobik heliksler bir araya gelerek potansiyel membrana bağlanma yüzeyi oluşturular [Deakin ve ark., 2002; Killian ve ark., 2000]. Heliks yapılar lizin, triptofan ve tirozin yan zincirleri ile oluşturdukları yapı karakteristiği ile HDL ara yüzeyine girebilmektedir [James ve ark., 1998].

### 2.1.7. PON1'in Sentezlenmesi ve Salgılanması

PON1 sentezi karaciğerde gerçekleştiğinden dolayı, serumdaki PON1 seviyesini belirleyen başlıca faktör karaciğer fonksiyonlarıdır. Serumdaki Paraoksonaz seviyesi ve etkinliği bireyler arasında çok değişkendir [Blatter ve ark., 1994]. 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 [Leviev ve ark., 1997; Deakin ve ark., 2003]. PON1 sentezinde

önemli olan bir diğer faktör karaciğer hücrelerindeki kolesterol dengesidir. Ayrıca PON1'in karaciğerden sentezini herhangi bir hastalık durumu da etkilemektedir [Feingold ve ark., 1998; Cabana ve ark.; 2003].

PON1 karaciğerde üretildikten sonra serumda HDL'ye yada karaciğerde mikrozoamlara tutunabilmesi için sentez sırasında N-terminal hidrofobik bölgesi olması gereklidir. N-terminal hidrofobik bölgesi bağlamada belirleyici olduğu kadar salgılanma mekanizmasında da önemli bir role sahiptir [Martoglio ve ar., 1998; Hassett ve ark., 1991]. Yapılan çalışmalarda hamster ovaryum hücresi ve insan hepatosit hücresine katılarak PON1 sentezlendikten sonra hücre zarının dış yüzeyine bağlandığı gösterilmiştir [Deakin ve ark., 2002]. PON1 karaciğerde üretildikten sonra ilk olarak mikrozoamlara, akabinde hücrenin dış yüzeyine bağlandığı düşünülmektedir [Sorenson ve ark., 1999; Oda ve ark., 2001]. 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 [Deakin ve ark., 2002; Sorenson ve ark., 1999].

## **2.2. Ateroskleroz**

Ateroskleroz, Dünya Sağlık Örgütü tarafından arterlerin intimasının lipitler, karbonhidrat temelli makromoleküller, kan ve kan ürünleri, farklılaşmış fibröz doku ve kalsiyum bileşiklerinin bölgesel birikimlerinin bir kombinasyonu olarak tanımlanmaktadır. Ateroskleroz aterom adı verilen plaklarla karakterizedir. Ateromlar endotelinin medya tabakasını zayıflatan ve trombüs oluşumu açısından risk oluşturan lezyonlardır. Aterosklerotik lezyonlar hemen hemen tüm doku ve organ sistemlerinde tutulumu yol açabilmektedir. Bunlar arasında en çok etkilenen grup, koroner arterler, aorta ve serebral arterlerdir. Koroner arterlerde meydana gelen aterosklerotik lezyonlar miyokard enfarktüsü gelişiminde rol oynamaktadır. Miyokard enfarktüsü Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre mortalite açısından ilk sıralarda yer almaktadır. Serebral arterdeki tutulumlar sıklıkla beyin enfarktalarına yol açarak ağır klinik tablolara yol açmaktadır. Bunların dışında renal sistem, gastrointestinal sistem ve alt ekstremitelerdeki aterosklerotik tutulumlar iskemik tablolara sebep olmaktadır [Global atlas, 2011].

Koroner kalp hastalıkları üzerine günümüze kadar yapılan çalışmalar hastalık patogenezi üzerinde genetik ve çevresel faktörlerin birlikte etki ettiğini ortaya

koymaktadır. Lipoprotein metabolizması, endotel disfonksiyonu, vasküler doku düzenlenmesi, hücre döngüsü kontrolü, oksidatif sistem ve enflamasyon koroner arter hastalıkları açısından oldukça önemli faktörlerdir. Bu faktörler üzerine günümüze kadar yapılan çalışmalar birçok genin sürece katkısını göstermektedir. Genetik etmenlerin yanı sıra sigara kullanımı, alkol tüketimi, düzensiz ve fazla kalorili beslenme alışkanlıkları ve azalmış fiziksel aktivite hastalıkta rol oynayan çevresel faktörlerin arasında sayılabilir [Cem, 2012].

### **2.2.1. Koroner arter hastalığı gelişiminde PON1**

Rozenberg ve arkadaşlarının PON1(0) knock-out fareler üzerine yaptığı bir çalışmada, PON1(0)+ApoE(0) knock-out farelerde yalnızca ApoE(0) knock-out olanlara kıyasla aterosklerotik lezyonlarda % 42 civarında artış olduğu gözlenmiştir[Rozenberg ve ark., 2003]. Ayrıca PON1(0) farelerin makrofajlarında oksidatif stresin kontrol grubuna göre yüksek olduğu rapor edilmiştir. Sonuç olarak PON1 enziminin oksidatif stresi hem serum hem makrofajlara direkt etki ederek azalattığı ve bu sebep ile PON1 enzimi eksik olan farelerde ateroskleroz gelişiminde artış gözlendiği bildirilmiştir. İnsanlarda ilk kez 1997 yılında yapılan vaka-kontrollü incelemede, serum PON1 enzim düzeyi ve aktivitesi, koroner arter hastalarında diğer nedenlerden bağımsız şekilde düşük bulunmuş ve PON1 enzim aktivitesinin koroner arter hastalığı için bir risk habercisi olabileceğini düşündürmüştür.[Navab ve ark., 1997]. Daha sonra yapılan klinik çalışmalarda da, koroner arter hastalarında sağlam kontrollere kıyasla PON1, HDL ve apoA-I seviyelerinde düşüklük görülmüştür[Sing ve ark., 2007; Jayakumari ve ark., 2007]. Kabaroğlu ve arkadaşlarının yaptığı kontrollü çalışmada, akut koroner sendrom (38 akut miyokart enfarktüsü + 33 unstabil anjina pektoris) ile başvuran vakalar sağlıklı kontrol grubu (n=32) ile karşılaştırıldığında, oksidatif stresin hasta grubunda anlamlı olarak artmış, PON1 seviyelerinin ise azalmış olduğu bildirilmiştir[Kabaroğlu ve ark., 2004](p<0.01).

Düşük PON1 seviyesinin koroner arter hastalığı ile ilişkisi tespit edildikten sonra, çalışmalar PON1 polimorfizmi ile ilişkisini araştırmaya yönelmiştir. PON geninde 160'dan fazla polimorfizm tespit edilmiştir. Bu polimorfizimler içinde en sık görülenler; 55.kodonda leucin(L)/methionine(M) ve 192.kodonda glutamine(Q)/arginine(R) polimorfizimleridir [Aviram ve ark., 2005]. Koroner arter

hastalığı tanısı olanlarda KAH gelişimi ile PON1 polimorfizmi arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalar birbiriyle uyumsuz sonuçlar ortaya koymaktadır. Bunun sebebi PON1 polimorfizminin etnisiteye göre farklılıklar göstermesi ve farklı ülkelerde yapılmış olan araştırmalarda farklı sonuçlar elde edilmiş olması olabilir. Japonlarda ve Finlandiya’da yapılan çalışmalarda PON1 polimorfizmi ile KAH arasında bir bağlantı ortaya koyulamamıştır[Suehiro ve ark., 1996; Antikainen ve ark., 1996]. Yakın bir zamanda yayınlanan “Nurses’ Health and Health Professionals Follow-up Study” çalışmasında da Q192R polimorfizmi ile KAH arasında bir ilişki tespit edilememiştir.[Mukamal ve ark., 2009]. Fakat ABD, İsviçre ve Brezilya’da yapılan çalışmalarda, farklı polimorfizmlerle KAH arasında ilişki olduğu bildirilmiştir. Brezilyalılarda yapılan bir araştırmada, L55M polimorfizminin özellikle beyaz ırktaki kadın popülasyonda KAH ile yüksek seviyede ilişkili olduğu rapor edilmiştir[Rios ve ark., 2007]. Anjiyografi ile koroner hastalığı tanılanmış olan Hint ve Çin kökenli vakalarda ise Q192R polimorfizmi daha sık bulunmuş[Sanghera ve ark., 1997]. İsviçre’de yapılmış bir araştırmada da, tip 2 diyabetli koroner kalp hastalarında Q192R polimorfizmi ile KAH sıklığı arasında pozitif korelasyon gözlenmiştir[Ruiz ve ark., 1995]. Türkiye’de yapılan araştırmalarda ise hem Q192R polimorfizmi hem de L55M polimorfizminin koroner arter hastalığı gelişimi açısından risk faktörü olduğunu rapor eden çalışmalar vardır[Kaman ve ark., 2009; Özkök ve ark., 2008; Aynacıoğlu ve ark., 2000]. Wheeler ve arkadaşlarının, 2004 yılında PON gen polimorfizmi ve koroner arter hastalığının ilişkisini araştıran 43 çalışmayı inceleyerek hazırladığı meta-analizde[Wheeler ve ark., 2004], KAH gelişimi ile L55M polimorfizmi arasında herhangi bir ilişki görülemedi, Q192R polimorfizmi ile arasındaki ilişkinin ise zayıf olduğu bildirilmiştir.

### **2.2.2. Koroner arter hastalığı risk faktörleri ve PON1**

KAH çoğunlukla bazı risk faktörlerine ikincil olarak ortaya çıkmaktadır. Hipertansiyon, hiperlipidemi, diyabet ve sigara kullanımı koroner arter hastalığı riskini artıran en önemli faktörlerdir. Söz konusu hastalıkların tamamında, tıpkı koroner arter hastalığında görüldüğü gibi olayın çıkış noktası oksidatif stres artışı ve buna bağlı oluşan endotel hasarıdır. Yapılan çalışmalar, antioksidan bir enzim olan PON1 enzim düzeyi ve aktivitesi, koroner arter hastalığı ile ilişkili olan diyabet, hipertansiyon,



hiperlipidemi ve sigara kullanımı ile azaldığını göstermektedir. Ayrıca literatürde rapor edilen diğer çalışmalar, anjiyografi ile koroner arter hastalığı kesin tanısı olan hastalarda PON1 düzeyinin düştüğünü bildirmektedir. Ancak polimorfizm açısından net olarak tek bir polimorfizm ile ilişkisi gösterilememiştir. Bu bilgilerin ışığında PON1 enzim düzeyi, KAH gelişimi açısından belirleyici bir gösterge olabilir. Fakat bunun klinik olarak kanıtlanması için prospektif ve kontrollü geniş çaplı çalışmalara ihtiyaç vardır [Özlem, 2011].

### **3. MATERYAL VE METOT**

#### **3.1. Materyaller**

##### **3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler**

Deneyisel çalışmalarda kullanılan, Sepharose-4B, 1-naftilamin, L-tirozin, standart serum albumin, trihidroksimetil aminometan (Tris-Base), paraoksan, Tris-HCl, Sigma'dan, sodyum hidroksit, amonyum sülfat, glisin, fosforik asit, asetik asit, etil alkol, hidroklorik asit, sodyum dihidrojen fosfat, amonyum persülfat, sodyum bikarbonat, sodyum fosfat, potasyum fosfat, kalsiyum klorür Merc'den temin edilmiştir. Ayrıca deneysel çalışmalarda kullanılan vakumlu tüpler (Aysel, ClotActivator & Gel (ZS) 16x100mm, 8,5 ml) AYSET A.Ş.'den karşılanmıştır.

Çalışmalarında kullandığım çeşitli konsantrasyonlardaki Be, Mg, Ca, Sr ve Ba'un seryum vanadat ( $CeVO_4$ ) türevlerine dope edilmiş numuneleri Balıkesir Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Anorganik Kimya Anabilim dalında görev yapmakta olan; Prof.Dr. Figen KURTULUŞ, Uzm.Dr. Gülşah ÇELİK GÜL ve Laboratuvar grubunca hazırlanmıştır.

Araştırmada kullanılan Paraoksonaz enzimini saflaştırma amaçlı insan kanı Siirt ilinde hizmet veren çeşitli sağlık kuruluşlarından temin edilmiştir.

##### **3.1.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar**

Bu çalışmada aşağıdaki alet ve cihazlardan yararlanılmıştır.

Soğutmalı santrifüj

Sigma 3K15

Soğutmalı Ultrasantrifüj

Hettich EBA 12R

Multi Santrifüj (Falkon santrifüjü)	Thermo IEC
pH metre	Hanna pH 211 Microprocessor
UV-Spektrofotometre (Plaka okuyucu)	Biotek Power Wave XS
Manyetik karıştırıcı	Torrey Pines Scientific
Terazi	Sartorius BL 210S
Otomatik pipetler	Hi-Tech ve Finipipette
Kromatogafi Kolonu	Sigma (1 cm çap ve 20 cm uzunluk)
Derin Dondurucu (-80 °C)	CFC Free
Vorteks	Fisons Whirli Mixer
Gadient Mikser	Atta Magnetik Karıştırıcı ve Gadient Tüp
Otoklav	Hirayama HV 85
Buz makinesi	Fiocchetti AF 10
Su Banyosu	Elektro-mag

### 3.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

#### Hidrofobik jelin sentezinde kullanılan tamponlar

**0.1 M NaHCO<sub>3</sub> tamponu (pH 10.0);** 8,401g (0.1 mol) NaHCO<sub>3</sub> 950 mL distile suda çözülüp, 1N NaOH ile pH'sı 10,0'a getirilerek ve son hacim 1 L'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 çözülüp, 1 N NaOH ile pH'ı 8,8'e getirilip ve son hacim distile su ile 500 mL'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 çözülüp, 1 N NaOH ile pH'sı 6.0'a getirilip ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

**Hidrofobik jelin dengelenmesi için kullanılan tampon:** 1 M (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 132,14 g (1 mol) NH<sub>4</sub>(SO)<sub>2</sub> 950 mL distile suda çözülüp, 1 N HCl ile pH'sı 8,0'e getirilip ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

**Hidrofobik jele bağlanmış PON1 enziminin elüsyonu için kullanılan çözelti:** *1M NH<sub>4</sub>(SO)<sub>2</sub> içeren, 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu (pH 8,0) ve 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu (pH 8,0) ile gradient mikser kullanılarak tuz gradienti oluşturuldu;* 14,2g (0.1 mol) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 132,14 g (1 mol) NH<sub>4</sub>(SO)<sub>2</sub> 950 mL distile suda çözülüp, 1N HCl ile pH'sı 8.0'e getirildi ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı. 14,2 g (0.1 mol) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 950 mL distile suda çözülüp, 1 N HCl ile pH'sı 8,0'e getirildi ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

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

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

**Paraoksonaz aktivite ölçümünde kullanılan bazal aktivite tamponu:** *2 mM CaCl<sub>2</sub> içeren 100 mM tris-HCl, pH=8;* 3,0285 g (25 mmol) 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.

## **3.2. Yöntemler**

### **3.2.1. Kan Serumunun Ayrılması**

Kan numuneleri, kuru santrifüj tüpüne alınarak 5000 rpm'de, +4°C'de ve 10 dakika santrifüj edilmiş ve serumlarının ayrılması sağlanmıştır. Ayrılan serum aktivite ölçümüne kadar -70°C'de muhafaza edilmiştir. Daha sonra enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

### **3.2.2. Enzim Aktivite Tayini**

PON1 enziminin aktivitesi spektrofotometrik olarak analiz edildi. Aktivite ölçümü için 0,05 mL enzim çözeltisi (serum) alınarak daha evvel hazırlanmış olan 1 mL tampon (100 mM tris-baz pH:8,00) + substrat (2 mM paraokson) + koenzim (2 mM CaCl<sub>2</sub>) çözeltisine hızlı bir şekilde ilave edildikten sonra 412 nm'de 37 °C'de 1 dakikada absorbans düzeyinde ki değişim okundu. Bu şekilde paraoksonun p-nitrofenole enzimatik dönüşüm hızı belirlendi. Aynı işlem enzim eklenmeden

tekrarlanarak aradaki fark enzim aktivitesi olarak tespit edildi. 1 ünite paraoksonaz aktivitesi dakikada meydana gelen p-nitrofenolün nmol'ü olarak tayin edildi.

### 3.2.3 Enzimin Saflaştırılması

#### 3.2.3.1 Amonyum Sülfat Çöktürme Aralığının Belirlenmesi

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 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:

$$g_{(NH_4)_2SO_4} = \frac{1.77 \times Vx(S_2 - S_1)}{3.54 - S_2}$$

V : Serum volümü

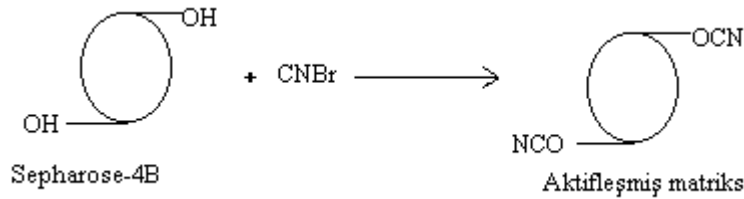
S<sub>1</sub> : 1'in kesri şeklinde mevcut (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> doygunluğu

S<sub>2</sub> : 1'in kesri şeklinde istenilen (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> doygunluğu

#### 3.2.3.2 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi İle Enzimin Saflaştırılması

##### 3.2.3.2.1. Sepharose 4B'nin Aktifleştirilmesi

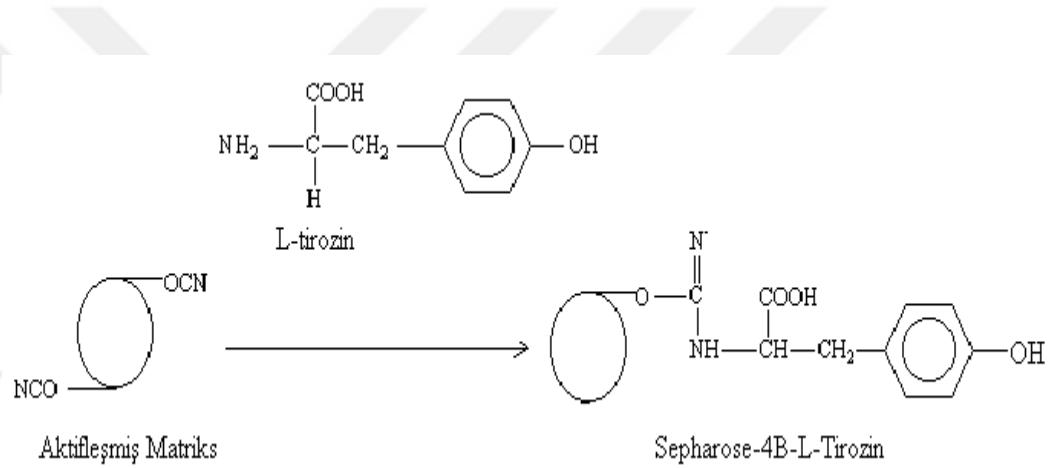
10 mL Sepharose-4B jeli, saf su ile iyice yıkanarak dekante edildi. Eşit hacimde distile su ile birleştirildi. Karıştırılmakta olan jel süspansiyonuna 4 g CNBr'in tamamı birden katıldı. pH metre yardımıyla süspansiyonun pH'sı 4 M NaOH ile kullanılarak 11'e çıkarıldı ve tepkime bu pH'da muhafaza edildi. Reaksiyon pH değişmeyene kadar sürdürüldü (10-15 dakika). Çok miktarda buz süspansiyona eklenerek ve karışım bir buhner hunisine aktarıldı. Akabinde 250 mL soğutulmuş 0,1 M Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub> tamponu (pH 10,00) ile yıkandı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Aktifleştirme reaksiyonu (Sepharose 4B)

### 3.2.3.2.2. L-tirozinin Bağlanması

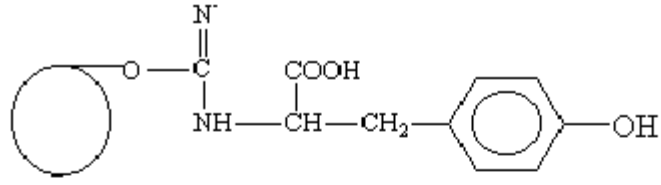
CNBr ile aktifleştirilmiş matrikse, 15 mg tirozin ihtiva eden 20 mL 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> tamponunun (pH 10,00) soğuk çözeltisi eklenerek 90 dk karıştırıldı. Bundan sonra süspansiyon 4°C’de 16 saat dinlendirildi. Bu sürenin sonunda yıkama suyu 280 nm’de absorbans vermeyinceye değin saf su ile yıkandı. Böylelikle tepkimeye girmeyen tirozin tamamen uzaklaştırılmış oldu. Yıkama işlemi 100 mL’lik 0,2 M NaHCO<sub>3</sub> tamponu (pH: 8,8) ile tekrarlandı. Tirozinle modifiye sepharose-4B aynı tamponun 40 mL’si içine konuldu (Şekil 3.2).



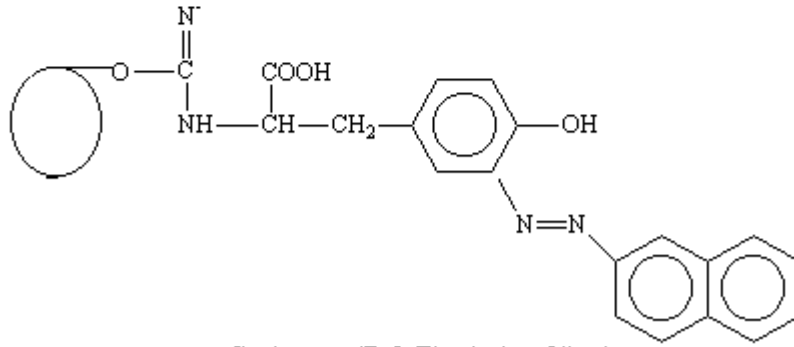
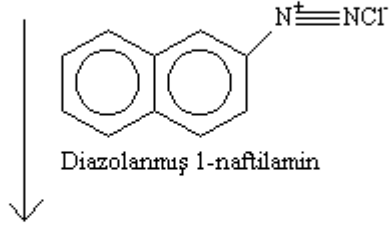
Şekil 3. 2 L-Tirozinin bağlanması

### 3.2.3.2.3. 1-naftilamin Bileşiğinin Bağlanması

25 mg 1-naftilamin 0 C<sup>0</sup> civarında 10 mL THF içerisinde çözüldü. 75 mg NaNO<sub>2</sub> ihtiva eden C<sup>0</sup>’deki 5 mL 1 M HCl içinde hazırlanan çözelti, 1-naftilamin çözeltisine damla damla katıldı. 10 dakika reaksiyondan sonra diazolanmış bulunan 1-naftilamin, 40 mL Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonuna ilave edildi. pH: 9,5’a çıkarılarak sabit tutuldu ve 3 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Daha sonra 1 L saf su ve ardından 200 mL 0,01M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH: 6,0) tamponu ile yıkandı ve aynı tamponda muhafaza edildi (Şekil 3.3).



Sepharose-4B-L-Tirozin



Sepharose-4B- L-Tirozin-1-naftilamin

Şekil 3. 3 1-Naftilamin bileşiminin bağlanması

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1. Enzimin Saflaştırılması

#### 4.1.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi

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

$$g_{(NH_4)_2SO_4} = \frac{1.77 \times V \times (S_2 - S_1)}{3.54 - S_2}$$

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

#### 4.2. Laboratuvar Çalışmalarının Verileri

Tablo 4. 1. Serum PONI enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren %0.1 Be-CeVO<sub>4</sub> - %0.5 Be-CeVO<sub>4</sub> IC<sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ile bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

100 mM Tris tampon (µL)	Metal-CeVO <sub>4</sub>	Enzim Çözeltisinin Hacmi(µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi(µL)	Metal-CeVO <sub>4</sub> Çözeltisinin Hacmi(µL)	Küvetteki Metal-CeVO <sub>4</sub> Kons. [I] (mg/mL)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
850	%0.1 Be-CeVO <sub>4</sub>	50	100	-	-	0,043	52,834	100
825				25	0,025	0,038	46,690	88,372
800				50	0,050	0,031	38,089	72,093
750				100	0,1	0,027	33,174	62,790
700				150	0,15	0,019	23,345	44,186
650				200	0,2	0,01	12,287	23,255
600	250	0,25	0,005	6,1435	11,627			
850	%0.5 Be-CeVO <sub>4</sub>	50	100	-	-	0,043	52,834	100
825				25	0,025	0,036	44,233	83,720
800				50	0,050	0,029	35,632	67,441
750				100	0,1	0,025	30,717	58,139
700				150	0,15	0,016	19,659	37,209
650				200	0,2	0,011	13,515	25,581
600	250	0,25	0,005	6,143	11,627			



**Tablo 4. 2. Serum PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren %1 Be-CeVO<sub>4</sub> - %2 Be-CeVO<sub>4</sub> IC<sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ile bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar**

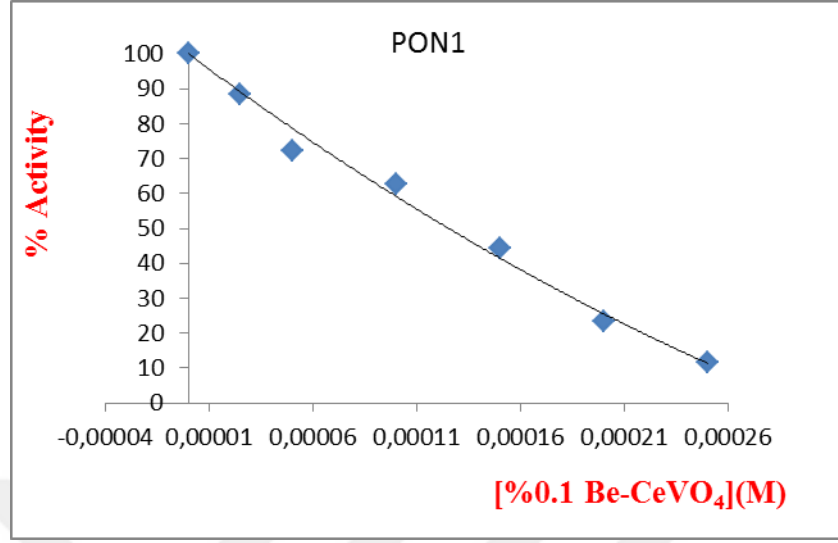
100 mM Tris tampon (µL)	Metal-CeVO <sub>4</sub>	Enzim Çözeltisinin Hacmi(µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi(µL)	Metal-CeVO <sub>4</sub> Çözeltisinin Hacmi(µL)	Küvetteki Metal-CeVO <sub>4</sub> Kons. [I] (mg/mL)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
850	%1			-	-	0,043	52,834	100
825	Be-CeVO <sub>4</sub>			25	0,025	0,037	45,461	86,046
800				50	0,050	0,028	34,403	65,116
750		50	100	100	0,1	0,02	24,574	46,511
700				150	0,15	0,015	18,430	34,883
650				200	0,2	0,009	11,058	20,930
600				250	0,25	0,005	6,1435	11,627
850	%2			-	-	0,043	52,834	100
825	Be-CeVO <sub>4</sub>			25	0,025	0,035	43,004	81,395
800				50	0,050	0,027	33,174	62,790
750		50	100	100	0,1	0,023	28,260	53,488
700				150	0,15	0,014	17,201	32,558
650				200	0,2	0,009	11,058	20,930
600				250	0,25	0,004	4,914	9,3023

**Tablo 4. 3. Serum PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren %4 Be-CeVO<sub>4</sub> - %6 Be-CeVO<sub>4</sub> IC<sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ile bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar**

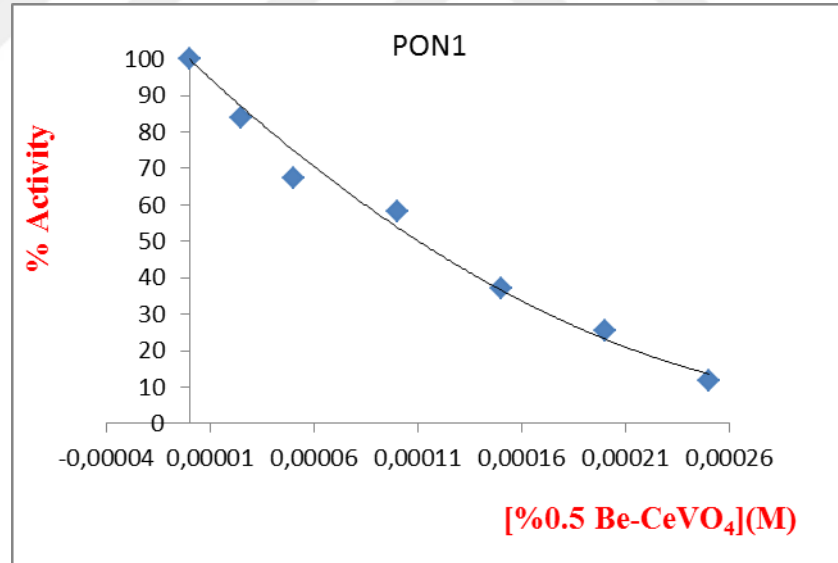
100 mM Tris tampon (µL)	Metal-CeVO <sub>4</sub>	Enzim Çözeltisinin Hacmi(µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi(µL)	Metal-CeVO <sub>4</sub> Çözeltisinin Hacmi(µL)	Küvetteki Metal-CeVO <sub>4</sub> Kons. [I] (mg/mL)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
850	%4			-	-	0,043	52,834	100
825	Be-CeVO <sub>4</sub>			25	0,025	0,035	43,005	81,395
800				50	0,050	0,026	31,946	60,465
750			50	100	0,1	0,024	29,489	55,813
700				150	0,15	0,013	15,973	30,232
650			200	0,2	0,008	0,008	9,829	18,604
600			250	0,25	0,004	0,004	4,914	9,3023
850	%6			-	-	0,043	52,83	100
825	Be-CeVO <sub>4</sub>			25	0,025	0,037	45,46	86,046
800				50	0,050	0,028	34,40	65,116
750			50	100	0,1	0,022	27,03	51,162
700				150	0,15	0,011	13,51	25,581
650			200	0,2	0,009	0,009	11,05	20,930
600			250	0,25	0,004	0,004	4,914	9,3023

**Tablo 4. 4. Serum PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren %8 Be-CeVO<sub>4</sub> - %10 Be-CeVO<sub>4</sub> IC<sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ile bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar**

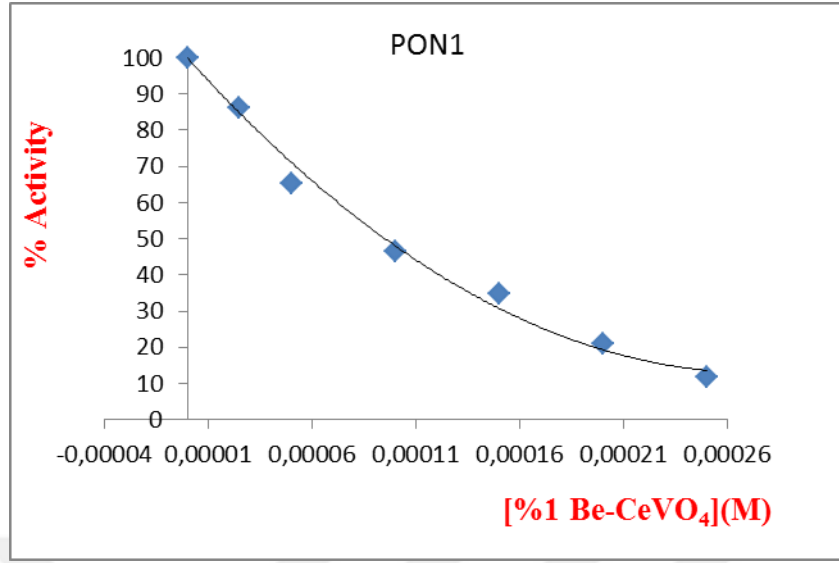
100 mM Tris tampon (µL)	Metal-CeVO <sub>4</sub>	Enzim Çözeltisinin Hacmi(µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi(µL)	Metal-CeVO <sub>4</sub> Çözeltisinin Hacmi(µL)	Küvetteki Metal-CeVO <sub>4</sub> Kons. [I] (mg/mL)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
850	%8			-	-	0,043	52,834	100
825	Be-CeVO <sub>4</sub>			25	0,025	0,036	44,233	83,720
800				50	0,050	0,027	33,174	62,790
750		50	100	100	0,1	0,022	27,031	51,162
700				150	0,15	0,012	14,744	27,906
650				200	0,2	0,007	8,600	16,279
600				250	0,25	0,004	4,914	9,3023
850	%10			-	-	0,043	52,83	100
825	Be-CeVO <sub>4</sub>			25	0,025	0,035	43,00	81,395
800				50	0,050	0,026	31,94	60,465
750		50	100	100	0,1	0,022	27,03	51,162
700				150	0,15	0,012	14,74	27,906
650				200	0,2	0,006	7,372	13,953
600				250	0,25	0,004	4,914	9,3023



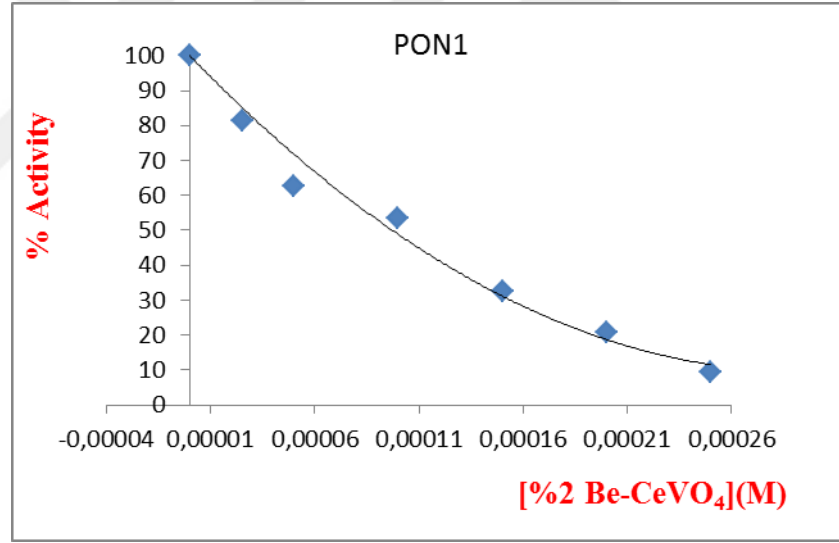
Şekil 4. 1. Saflastırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %0.1 Be-CeVO<sub>4</sub> için % aktivite-[%0.1 Be-CeVO<sub>4</sub>] grafiği



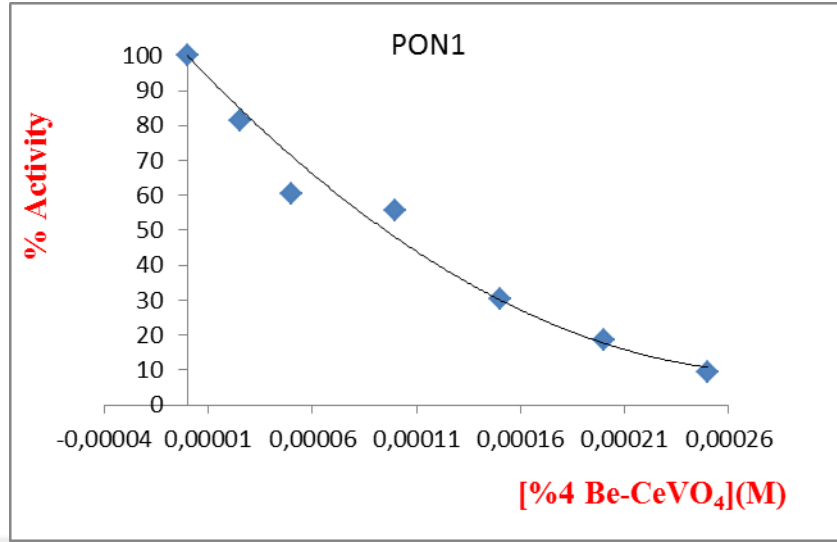
Şekil 4. 213. Saflastırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %0.5 Be-CeVO<sub>4</sub> için % aktivite-[%0.5 Be-CeVO<sub>4</sub>] grafiği



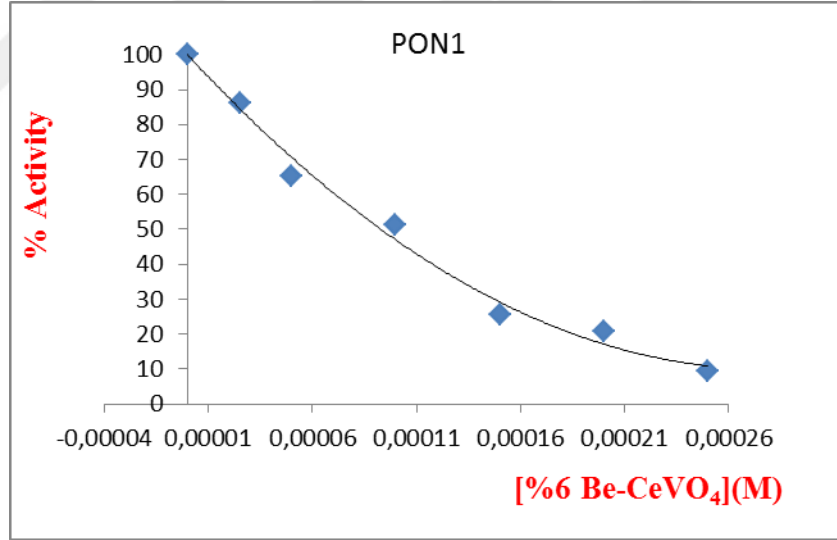
Şekil 4. 3. Saflastırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %1 Be-CeVO<sub>4</sub> için % aktivite-[%1 Be-CeVO<sub>4</sub>] grafiği



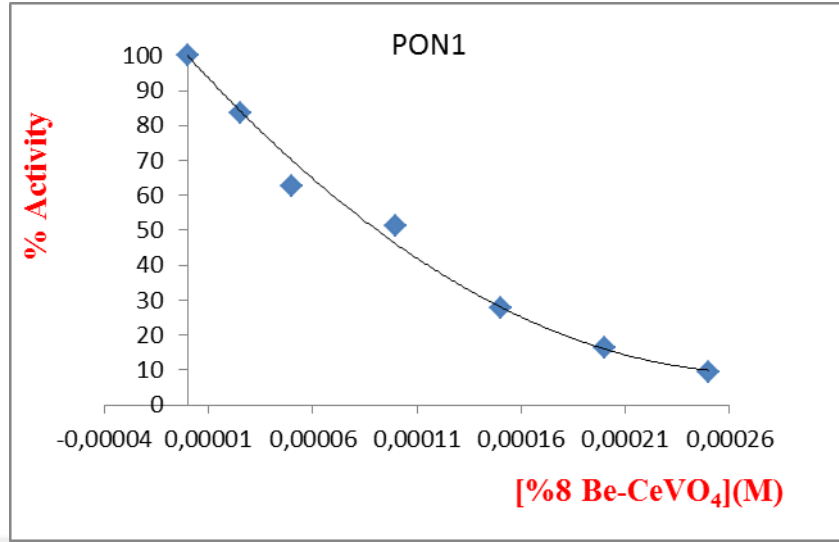
Şekil 4. 4. Saflastırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %2 Be-CeVO<sub>4</sub> için % aktivite-[%2 Be-CeVO<sub>4</sub>] grafiği



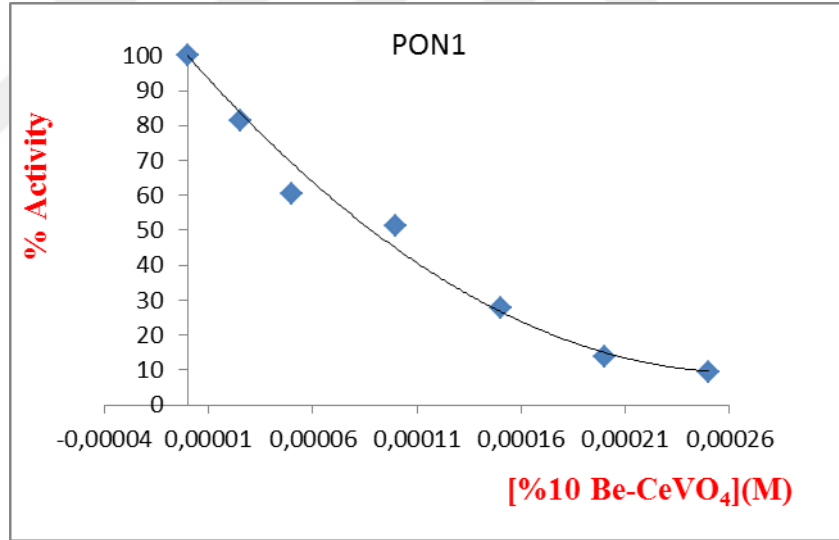
Şekil 4. 14. Safleştirilmiş insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %4 Be-CeVO<sub>4</sub> için % aktivite-[4% Be-CeVO<sub>4</sub>] grafiği



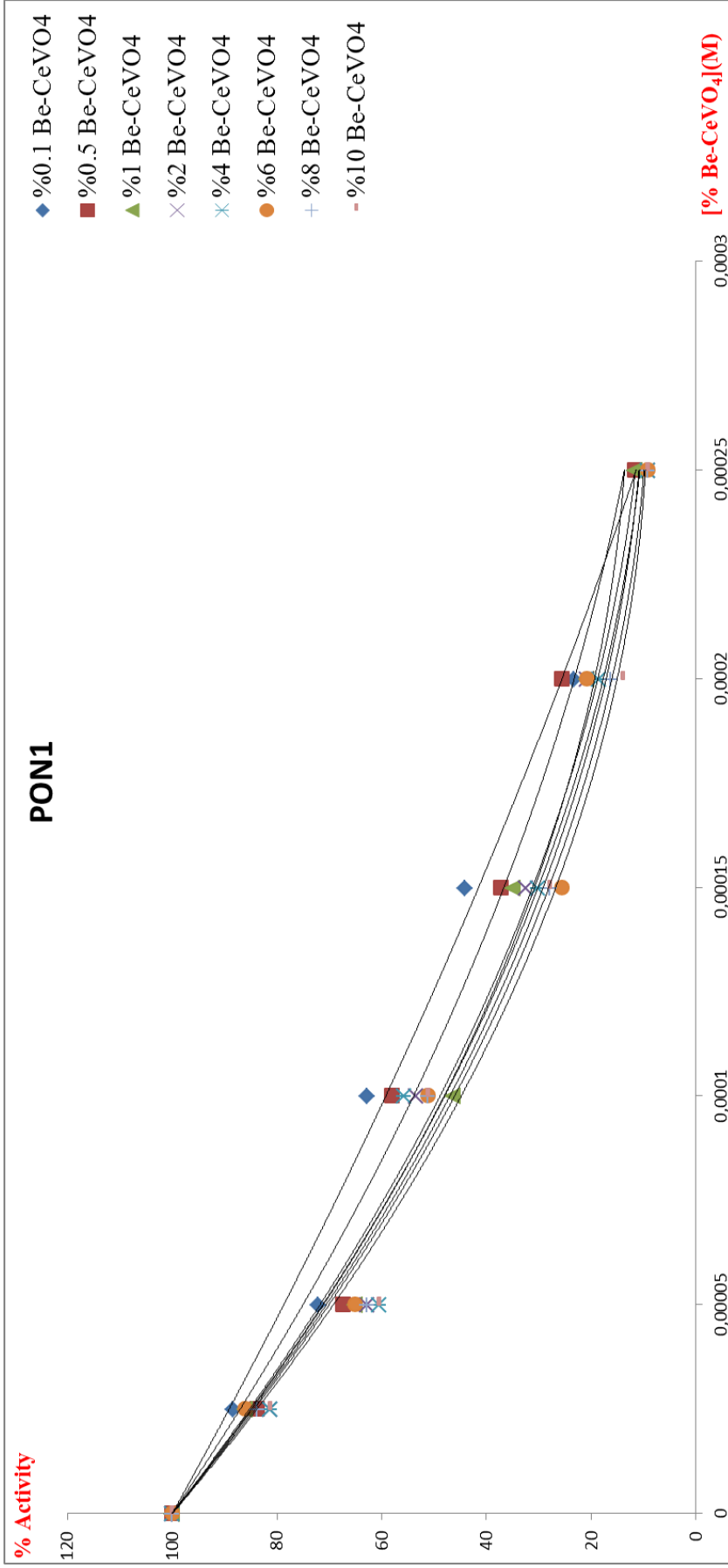
Şekil 4. 6. Safleştirilmiş insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %6 Be-CeVO<sub>4</sub> için % aktivite-[6% Be-CeVO<sub>4</sub>] grafiği



Şekil 4. 715. Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %8 Be-CeVO<sub>4</sub> için % aktivite-[8 Be-CeVO<sub>4</sub>] grafiği



Şekil 4. 8. Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %10 Be-CeVO<sub>4</sub> için % aktivite-[10 Be-CeVO<sub>4</sub>] grafiği



Şekil 4. 9. Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda % Be-CeVO<sub>4</sub> için % aktivite-[Be-CeVO<sub>4</sub>] grafiği



**Tablo 4. 5. Serum PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren %0,1 Mg-CeVO<sub>4</sub> - %0,5 Mg-CeVO<sub>4</sub> IC<sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ile bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar**

100 mM Tris tampon (µL)	Metal-CeVO <sub>4</sub>	Enzim Çözeltisinin Hacmi(µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi(µL)	Metal-CeVO <sub>4</sub> Çözeltisinin Hacmi(µL)	Küvetteki Metal-CeVO <sub>4</sub> Kons. [I] (mg/mL)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
850	%0.1			-	-	0,043	52,834	100
825	Mg-CeVO <sub>4</sub>			25	0,025	0,038	46,690	88,372
800				50	0,050	0,032	39,318	74,418
750		50	100	100	0,1	0,025	30,717	58,139
700				150	0,15	0,02	24,574	46,511
650				200	0,2	0,015	18,430	34,883
600				250	0,25	0,009	11,058	20,930
850	%0.5			-	-	0,043	52,834	100
825	Mg-CeVO <sub>4</sub>			25	0,025	0,038	46,690	88,372
800				50	0,050	0,031	38,089	72,093
750		50	100	100	0,1	0,026	31,946	60,465
700				150	0,15	0,02	24,574	46,511
650				200	0,2	0,014	17,201	32,558
600				250	0,25	0,009	11,058	20,930

**Tablo 4. 6. Serum PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren %1 Mg-CeVO<sub>4</sub> - %2 Mg-CeVO<sub>4</sub> IC<sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ile bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar**

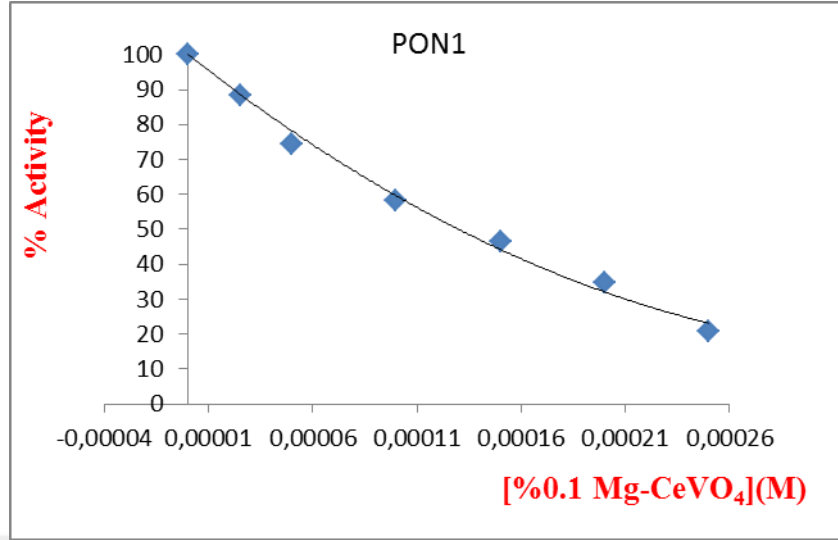
100 mM Tris tampon (µL)	Metal-CeVO <sub>4</sub>	Enzim Çözeltisinin Hacmi(µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi(µL)	Metal-CeVO <sub>4</sub> Çözeltisinin Hacmi(µL)	Küvetteki Metal-CeVO <sub>4</sub> Kons. [I] (mg/mL)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
850	%1 Mg-CeVO <sub>4</sub>	50	100	-	-	0,043	52,834	100
825				25	0,025	0,037	45,461	86,046
800				50	0,050	0,029	35,632	67,441
750				100	0,1	0,024	29,488	55,813
700				150	0,15	0,019	23,345	44,186
650				200	0,2	0,011	13,515	25,581
600	250	0,25	0,009	11,058	20,930			
850	%2 Mg-CeVO <sub>4</sub>	50	100	-	-	0,043	52,834	100
825				25	0,025	0,036	44,233	83,720
800				50	0,050	0,029	35,632	67,441
750				100	0,1	0,022	27,031	51,162
700				150	0,15	0,017	20,887	39,534
650				200	0,2	0,01	12,287	23,255
600	250	0,25	0,008	9,829	18,604			

**Tablo 4. 7. Serum PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren %4 Mg-CeVO<sub>4</sub> - %6 Mg-CeVO<sub>4</sub> IC<sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ile bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar**

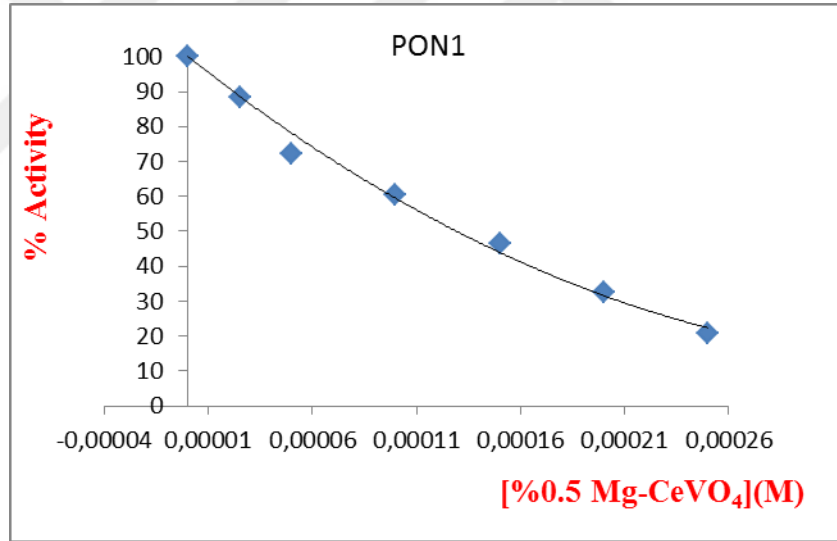
100 mM Tris tampon (µL)	Metal-CeVO <sub>4</sub>	Enzim Çözeltisinin Hacmi(µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi(µL)	Metal-CeVO <sub>4</sub> Çözeltisinin Hacmi(µL)	Küvetteki Metal-CeVO <sub>4</sub> Kons. [I] (mg/mL)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
850	%4 Mg-CeVO <sub>4</sub>	50	100	-	-	0,043	52,834	100
825				25	0,025	40,547	76,744	
800				50	0,050	33,174	62,790	
750				100	0,1	27,031	51,162	
700				150	0,15	19,659	37,209	
650				200	0,2	11,058	20,930	
600	250	0,25	7,372	13,953				
850	%6 Mg-CeVO <sub>4</sub>	50	100	-	-	0,043	52,834	100
825				25	0,025	39,318	74,418	
800				50	0,050	31,946	60,465	
750				100	0,1	27,031	51,162	
700				150	0,15	18,430	34,883	
650				200	0,2	11,058	20,930	
600	250	0,25	6,143	11,627				

**Tablo 4. 8. Serum PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren %8 Mg-CeVO<sub>4</sub> - %10 Mg-CeVO<sub>4</sub> IC<sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ile bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar**

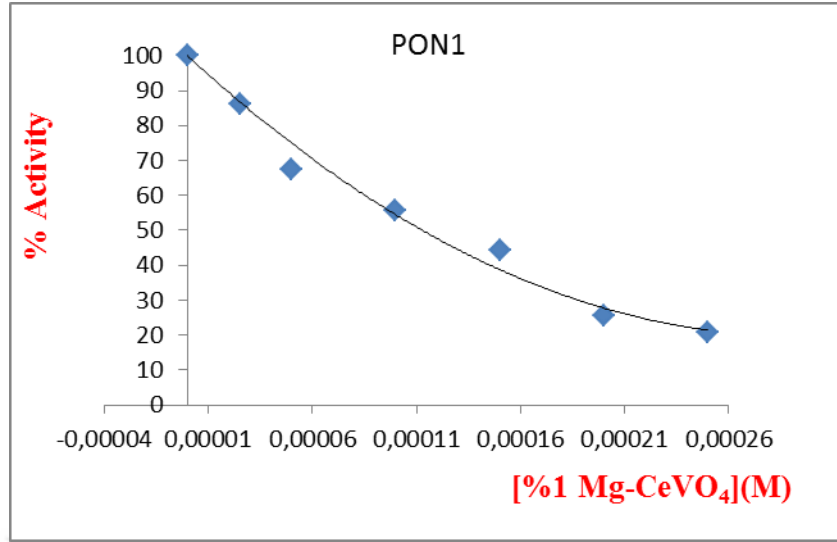
100 mM Tris tampon (µL)	Metal-CeVO <sub>4</sub>	Enzim Çözeltisinin Hacmi(µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi(µL)	Metal-CeVO <sub>4</sub> Çözeltisinin Hacmi(µL)	Küvetteki Metal-CeVO <sub>4</sub> Kons. [I] (mg/mL)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
850	%8			-	-	0,043	52,834	100
825	Mg-CeVO <sub>4</sub>			25	0,025	0,033	40,547	76,744
800				50	0,050	0,025	30,717	58,139
750		50	100	100	0,1	0,022	27,031	51,162
700				150	0,15	0,014	17,201	32,558
650				200	0,2	0,008	9,829	18,604
600				250	0,25	0,004	4,914	9,3023
850	%10			-	-	0,043	52,834	100
825	Mg-CeVO <sub>4</sub>			25	0,025	0,033	40,547	76,744
800				50	0,050	0,024	29,488	55,813
750		50	100	100	0,1	0,022	27,031	51,162
700				150	0,15	0,012	14,744	27,906
650				200	0,2	0,006	7,372	13,953
600				250	0,25	0,003	3,686	6,9767



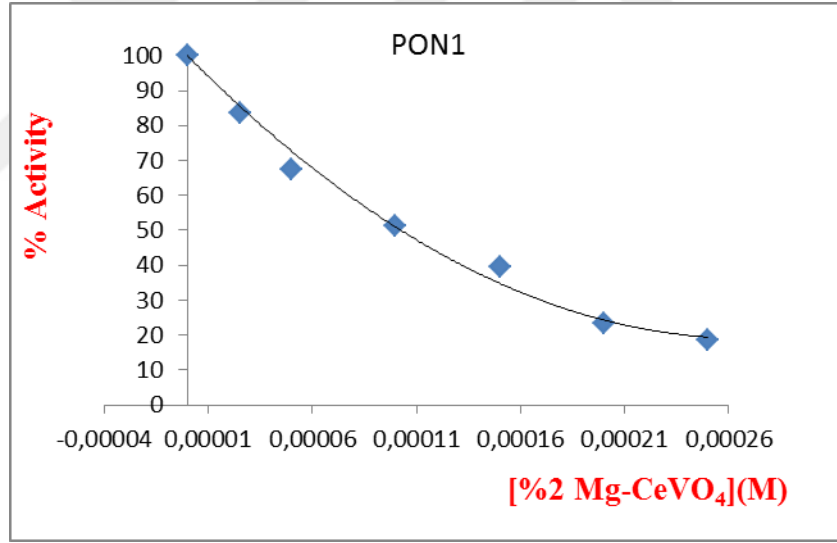
Şekil 4. 10. Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %0.1 Mg-CeVO<sub>4</sub> için % aktivite-[%0.1 Mg-CeVO<sub>4</sub>] grafiği



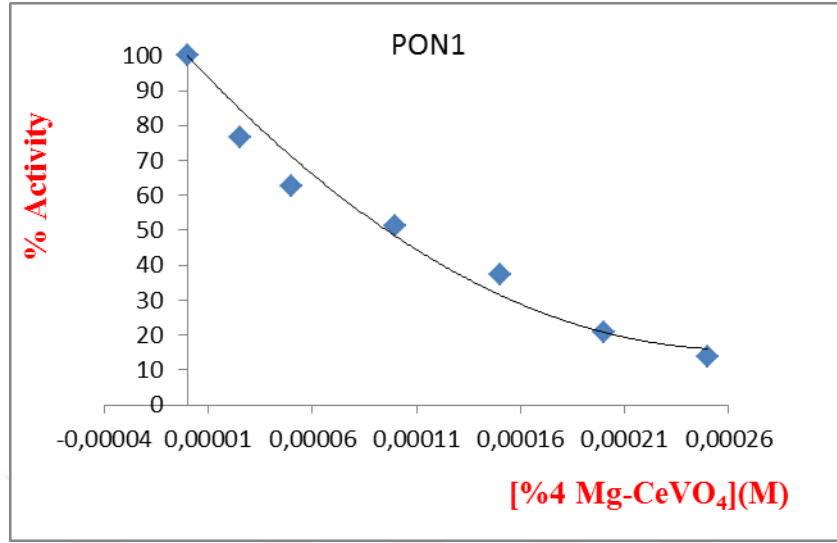
Şekil 4. 11. Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %0.5 Mg-CeVO<sub>4</sub> için % aktivite-[% 0.5 Mg-CeVO<sub>4</sub>] grafiği



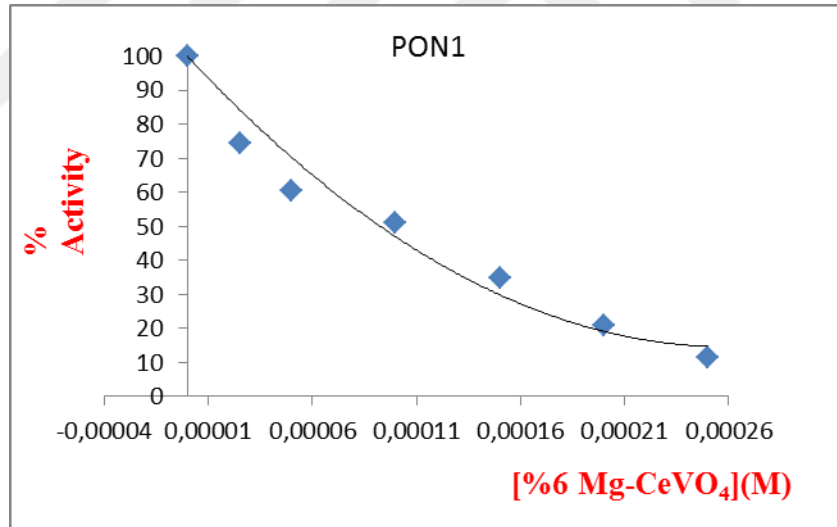
Şekil 4. 12. Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %1 Mg-CeVO<sub>4</sub> için % aktivite-[%1 Mg-CeVO<sub>4</sub>] grafiği



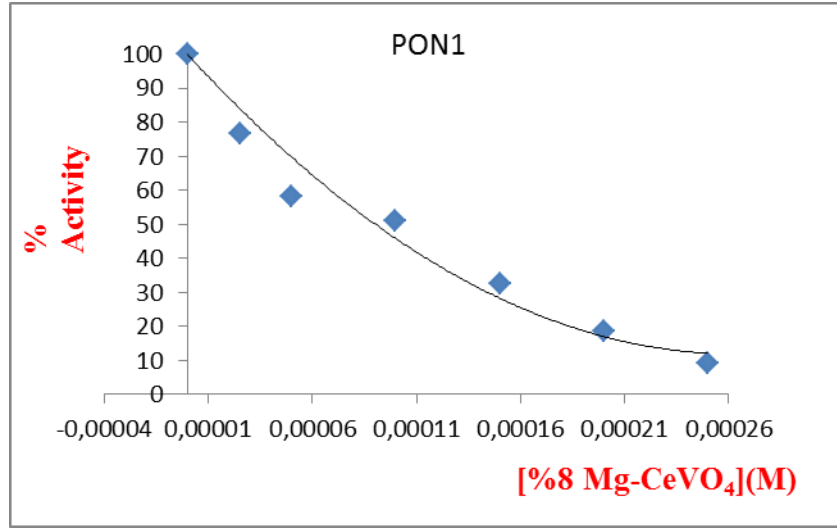
Şekil 4. 13. Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %2 Mg-CeVO<sub>4</sub> için % aktivite-[%2 Mg-CeVO<sub>4</sub>] grafiği



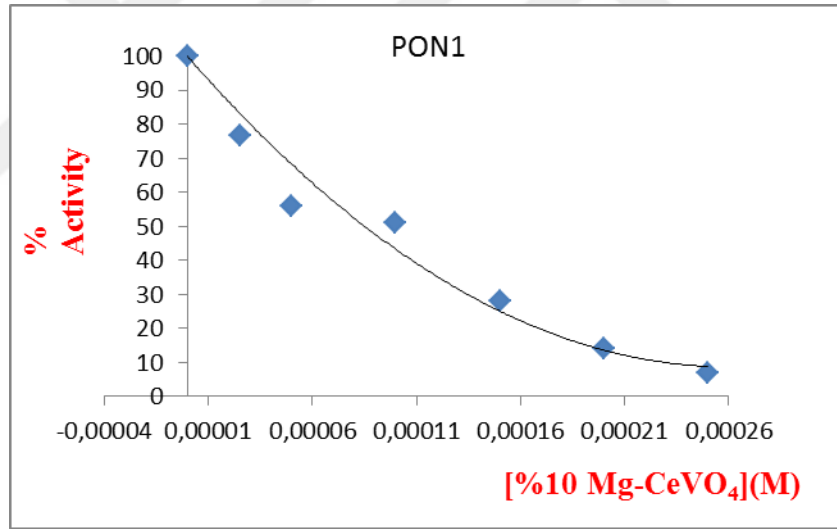
Şekil 4. 14. Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %4 Mg-CeVO<sub>4</sub> için % aktivite-[%4 Mg-CeVO<sub>4</sub>] grafiği



Şekil 4. 15. Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %6 Mg-CeVO<sub>4</sub> için % aktivite-[%6 Mg-CeVO<sub>4</sub>] grafiği

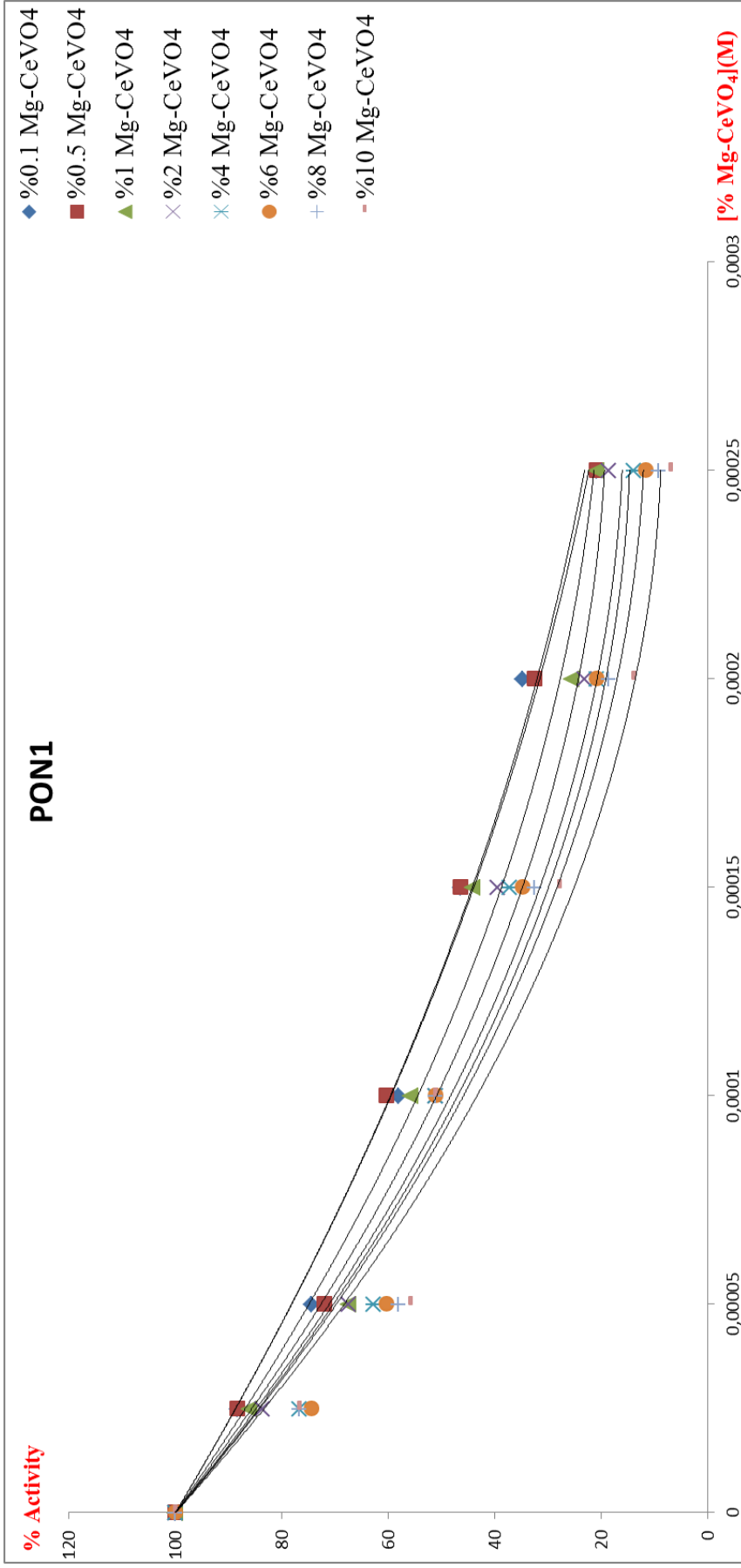


Şekil 4. 16. Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %8 Mg-CeVO<sub>4</sub> için % aktivite-[%8 Mg-CeVO<sub>4</sub>] grafiği



Şekil 4. 17. Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %10 Mg-CeVO<sub>4</sub> için % aktivite-[%10 Mg-CeVO<sub>4</sub>] grafiği





Şekil 4. 18. Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda % Mg-CeVO<sub>4</sub> için % aktivite-[% Mg-CeVO<sub>4</sub>] grafiği

**Tablo 4. 9. Serum PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren %0,1 Ba-CeVO<sub>4</sub> - %0,5 Ba-CeVO<sub>4</sub> IC<sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ile bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar**

100 mM Tris tampon (µL)	Metal-CeVO <sub>4</sub>	Enzim Çözeltisinin Hacmi(µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi(µL)	Metal-CeVO <sub>4</sub> Çözeltisinin Hacmi(µL)	Küvetteki Metal-CeVO <sub>4</sub> Kons. [I] (mg/mL)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
850	%0.1 Ba-CeVO <sub>4</sub>	50	100	-	-	0,043	52,834	100
825				25	0,025	45,461	86,046	
800				50	0,050	39,318	74,418	
750				100	0,1	35,632	67,441	
700				150	0,15	28,260	53,488	
650				200	0,2	22,116	41,860	
600	250	0,25	18,430	34,883				
850	%0.5 Ba-CeVO <sub>4</sub>	50	100	-	-	0,043	52,834	100
825				25	0,025	44,233	83,720	
800				50	0,050	38,089	72,093	
750				100	0,1	33,174	62,790	
700				150	0,15	25,802	48,837	
650				200	0,2	19,659	37,209	
600	250	0,25	15,973	30,232				

**Tablo 4. 10. Serum PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren %1 Ba-CeVO<sub>4</sub> - %2 Ba-CeVO<sub>4</sub> IC<sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ile bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar**

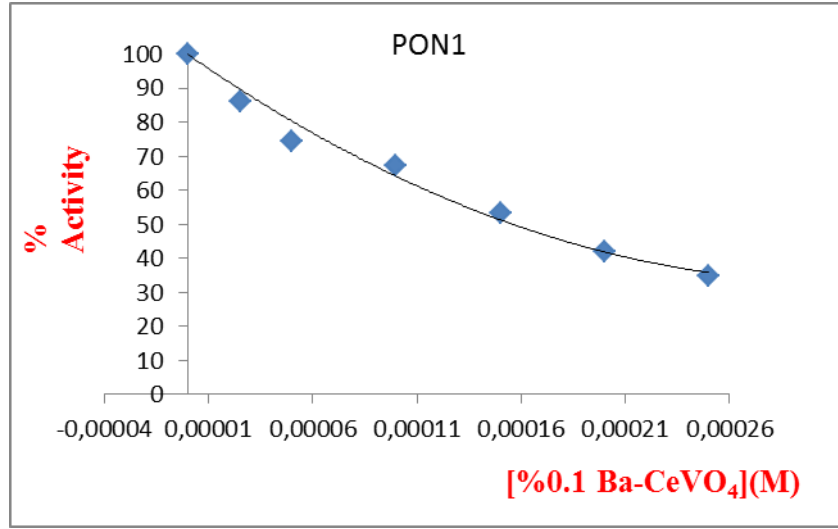
100 mM Tris tampon (µL)	Metal-CeVO <sub>4</sub>	Enzim Çözeltisinin Hacmi(µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi(µL)	Metal-CeVO <sub>4</sub> Çözeltisinin Hacmi(µL)	Küvetteki Metal-CeVO <sub>4</sub> Kons. [I] (mg/mL)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
850	%1			-	-	0,043	52,834	100
825	Ba-CeVO <sub>4</sub>			25	0,025	0,034	41,775	79,069
800				50	0,050	0,029	35,632	67,441
750		50	100	100	0,1	0,026	31,946	60,465
700				150	0,15	0,019	23,345	44,186
650				200	0,2	0,014	17,201	32,558
600				250	0,25	0,011	13,515	25,581
850	%2			-	-	0,043	52,834	100
825	Ba-CeVO <sub>4</sub>			25	0,025	0,034	41,775	79,069
800				50	0,050	0,028	34,403	65,116
750		50	100	100	0,1	0,025	30,717	58,139
700				150	0,15	0,017	20,887	39,534
650				200	0,2	0,013	15,973	30,232
600				250	0,25	0,01	12,287	23,255

**Tablo 4. 11. Serum PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren %4 Ba-CeVO<sub>4</sub> - %6 Ba-CeVO<sub>4</sub> IC<sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ile bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar**

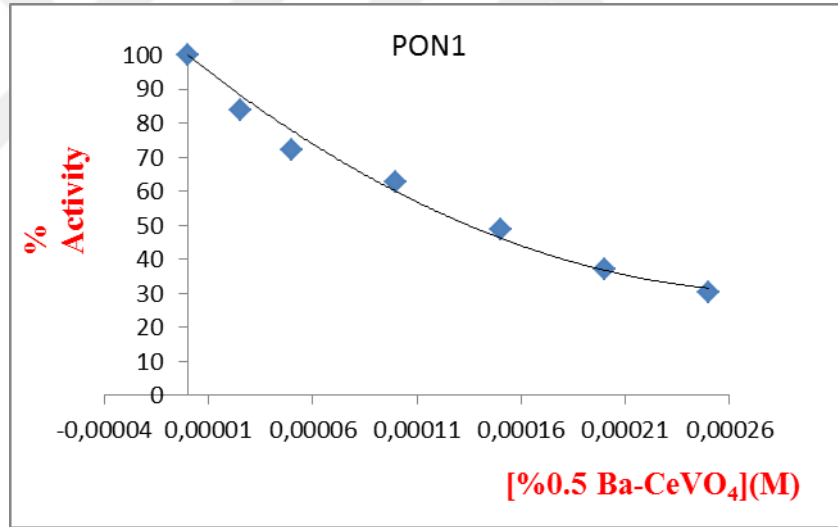
100 mM Tris tampon (µL)	Metal-CeVO <sub>4</sub>	Enzim Çözeltisinin Hacmi(µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi(µL)	Metal-CeVO <sub>4</sub> Çözeltisinin Hacmi(µL)	Küvetteki Metal-CeVO <sub>4</sub> Kons. [I] (mg/mL)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
850	%4			-	-	0,043	52,834	100
825	Ba-CeVO <sub>4</sub>			25	0,025	0,033	40,547	76,744
800				50	0,050	0,027	33,174	62,790
750		50	100	100	0,1	0,025	30,717	58,139
700				150	0,15	0,015	18,430	34,883
650				200	0,2	0,011	13,515	25,581
600				250	0,25	0,008	9,829	18,604
850	%6			-	-	0,043	52,834	100
825	Ba-CeVO <sub>4</sub>			25	0,025	0,032	39,318	74,418
800				50	0,050	0,025	30,717	58,139
750		50	100	100	0,1	0,022	27,031	51,162
700				150	0,15	0,012	14,744	27,906
650				200	0,2	0,009	11,058	20,930
600				250	0,25	0,006	7,372	13,953

**Tablo 4. 12. Serum PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren %8 Ba-CeVO<sub>4</sub> - %10 Ba-CeVO<sub>4</sub> IC<sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ile bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar**

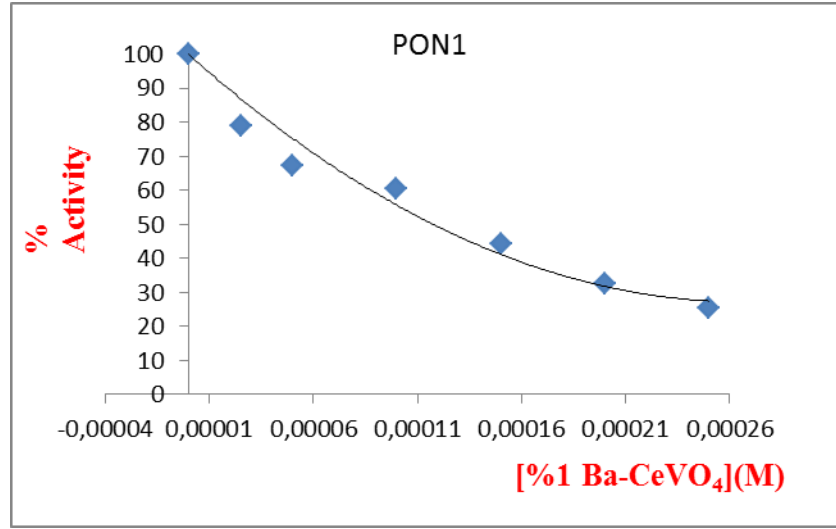
100 mM Tris tampon (µL)	Metal-CeVO <sub>4</sub>	Enzim Çözeltisinin Hacmi(µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi(µL)	Metal-CeVO <sub>4</sub> Çözeltisinin Hacmi(µL)	Küvetteki Metal-CeVO <sub>4</sub> Kons. [I] (mg/mL)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
850	%8			-	-	0,043	52,834	100
825	Ba-CeVO <sub>4</sub>			25	0,025	0,032	39,318	74,418
800				50	0,050	0,026	31,946	60,465
750		50	100	100	0,1	0,022	27,031	51,162
700				150	0,15	0,011	13,515	25,581
650				200	0,2	0,007	8,600	16,279
600				250	0,25	0,005	6,143	11,627
850	%10			-	-	0,043	52,834	100
825	Ba-CeVO <sub>4</sub>			25	0,025	0,03	36,861	69,767
800				50	0,050	0,026	31,946	60,465
750		50	100	100	0,1	0,022	27,031	51,162
700				150	0,15	0,011	13,515	25,581
650				200	0,2	0,006	7,372	13,953
600				250	0,25	0,004	4,914	9,3023



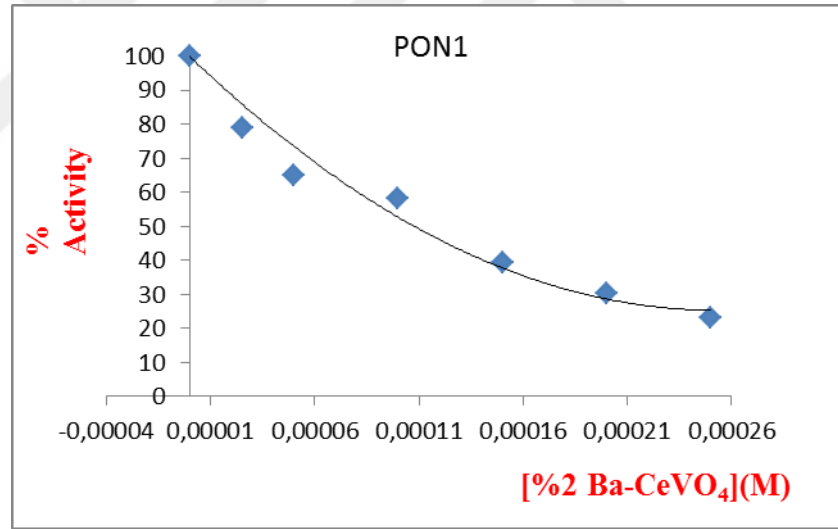
Şekil 4. 19. Safılaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %0.1 Ba-CeVO<sub>4</sub> için % aktivite-[%0.1 Ba-CeVO<sub>4</sub>] grafiği



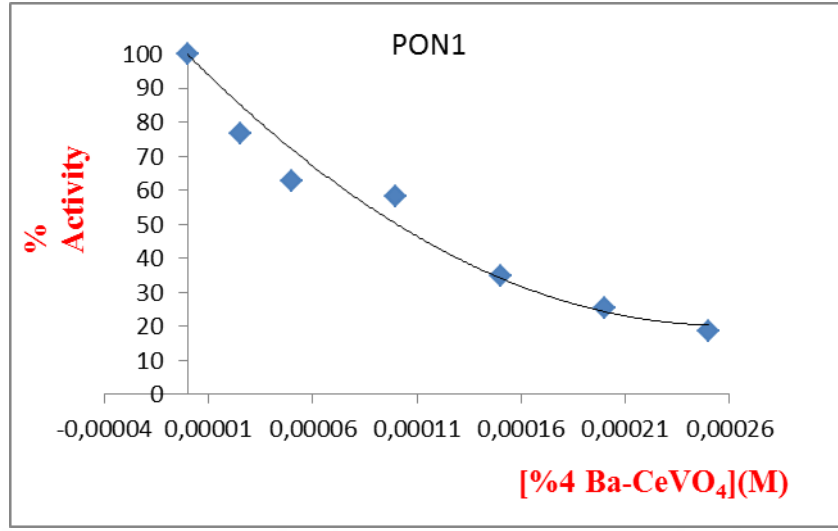
Şekil 4. 20. Safılaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %0.5 Ba-CeVO<sub>4</sub> için % aktivite-[%0.5 Ba-CeVO<sub>4</sub>] grafiği



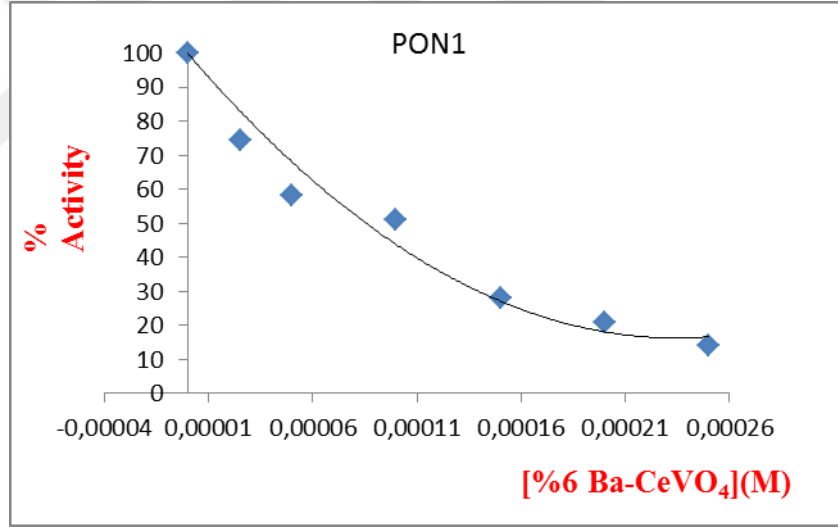
Şekil 4. 21 . Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %1 Ba-CeVO<sub>4</sub> için % aktivite-[%1 Ba-CeVO<sub>4</sub>] grafiği



Şekil 4. 22. Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %2 Ba-CeVO<sub>4</sub> için % aktivite-[%2 Ba-CeVO<sub>4</sub>] grafiği

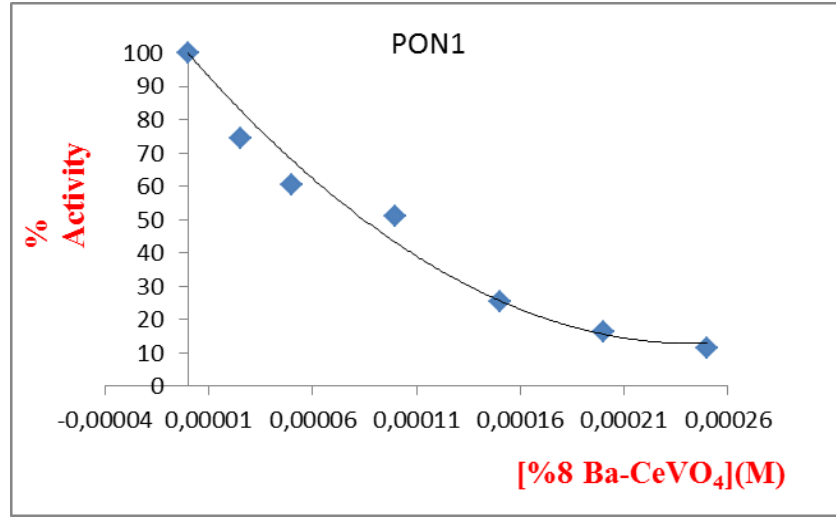


Şekil 4. 23. Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %4 Ba-CeVO<sub>4</sub> için % aktivite-[4% Ba-CeVO<sub>4</sub>] grafiği

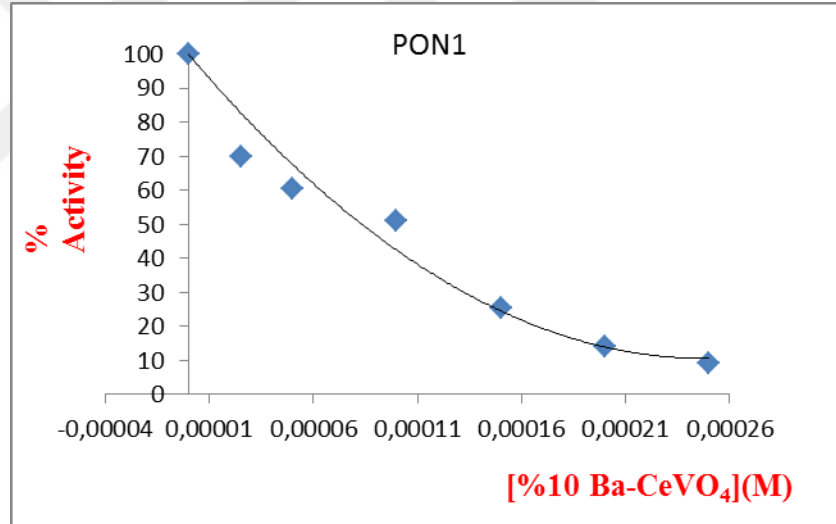


Şekil 4. 24. Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %6 Ba-CeVO<sub>4</sub> için % aktivite-[6% Ba-CeVO<sub>4</sub>] grafiği

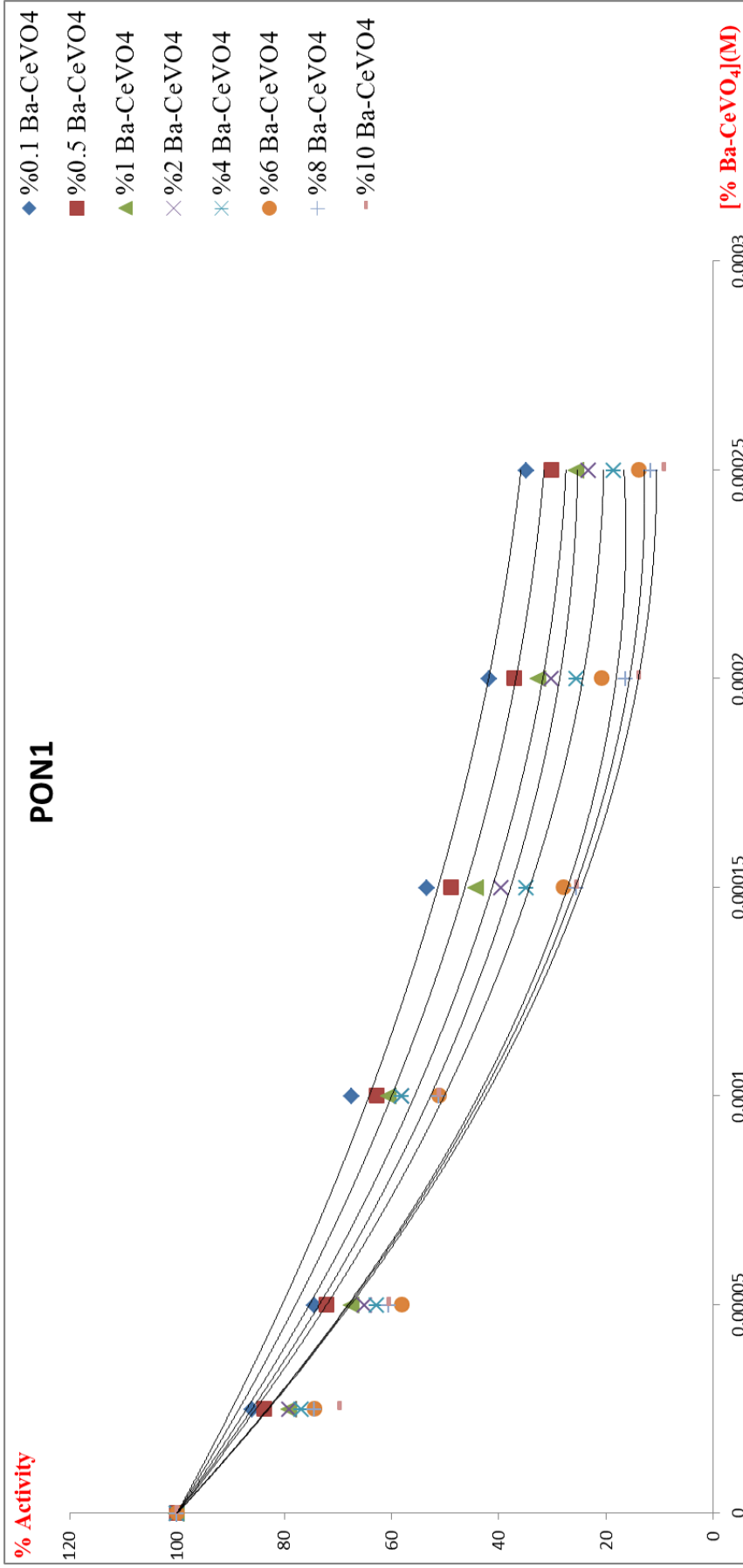




Şekil 4. 25. Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %8 Ba-CeVO<sub>4</sub> için % aktivite-[%8 Ba-CeVO<sub>4</sub>] grafiği



Şekil 4. 26. Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %10 Ba-CeVO<sub>4</sub> için % aktivite-[%10 Ba-CeVO<sub>4</sub>] grafiği



Şekil 4. 27. Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda % Ba-CeVO<sub>4</sub> için % aktivite-[% Ba-CeVO<sub>4</sub>] grafiği

**Tablo 4. 13. Serum PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren %0.1 Ca-CeVO<sub>4</sub> - %0.5 Ca-CeVO<sub>4</sub> IC<sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ile bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar**

100 mM Tris tampon (µL)	Metal-CeVO <sub>4</sub>	Enzim Çözeltilisinin Hacmi(µL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi(µL)	Metal-CeVO <sub>4</sub> Çözeltilisinin Hacmi(µL)	Küvetteki Metal-CeVO <sub>4</sub> Kons. [I] (mg/mL)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
850	%0.1 Ca-CeVO <sub>4</sub>	50	100	-	-	0,043	52,834	100
825				25	0,025	0,033	40,547	76,744
800				50	0,050	0,028	34,403	65,116
750				100	0,1	0,024	29,488	55,813
700				150	0,15	0,016	19,659	37,209
650				200	0,2	0,01	12,287	23,255
600	250	0,25	0,007	8,600	16,279			
850	%0.5 Ca-CeVO <sub>4</sub>	50	100	-	-	0,043	52,834	100
825				25	0,025	0,036	44,233	83,720
800				50	0,050	0,032	39,318	74,418
750				100	0,1	0,028	34,403	65,116
700				150	0,15	0,018	22,116	41,860
650				200	0,2	0,014	17,201	32,558
600	250	0,25	0,011	13,515	25,581			

**Tablo 4. 14. Serum PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren %1 Ca-CeVO<sub>4</sub> - %2 Ca-CeVO<sub>4</sub> IC<sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ile bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar**

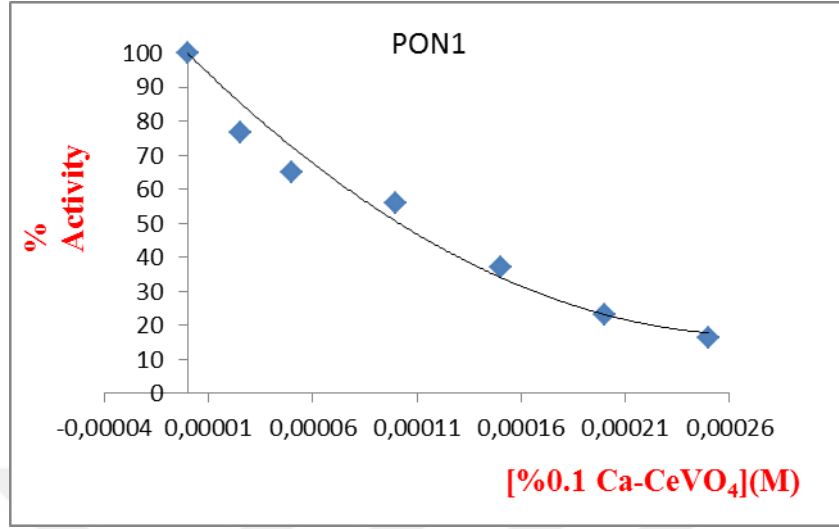
100 mM Tris tampon (µL)	Metal-CeVO <sub>4</sub>	Enzim Çözeltisinin Hacmi(µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi(µL)	Metal-CeVO <sub>4</sub> Çözeltisinin Hacmi(µL)	Küvetteki Metal-CeVO <sub>4</sub> Kons. [I] (mg/mL)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
850	%1 Ca-CeVO <sub>4</sub>	50	100	-	-	0,043	52,834	100
825				25	0,025	0,037	45,461	86,046
800				50	0,050	0,034	41,775	79,069
750				100	0,1	0,03	36,861	69,767
700				150	0,15	0,019	23,345	44,186
650				200	0,2	0,015	18,430	34,883
600	250	0,25	0,012	14,744	27,906			
850	%2 Ca-CeVO <sub>4</sub>	50	100	-	-	0,043	52,834	100
825				25	0,025	0,037	45,461	86,046
800				50	0,050	0,034	41,775	79,069
750				100	0,1	0,031	38,089	72,093
700				150	0,15	0,02	24,574	46,511
650				200	0,2	0,016	19,659	37,209
600	250	0,25	0,013	15,973	30,232			

**Tablo 4. 15. Serum PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren %4 Ca-CeVO<sub>4</sub> - %6 Ca-CeVO<sub>4</sub> IC<sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ile bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar**

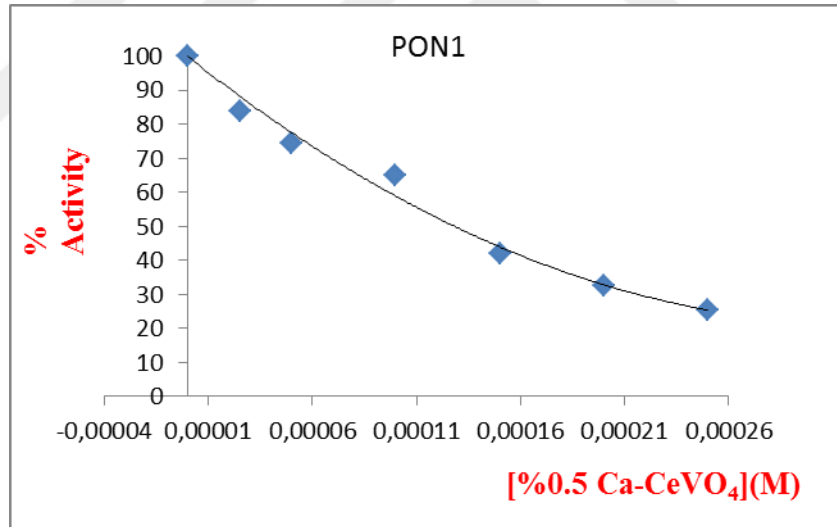
100 mM Tris tampon (µL)	Metal-CeVO <sub>4</sub>	Enzim Çözeltisinin Hacmi(µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi(µL)	Metal-CeVO <sub>4</sub> Çözeltisinin Hacmi(µL)	Küvetteki Metal-CeVO <sub>4</sub> Kons. [I] (mg/mL)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
850	%4 Ca-CeVO <sub>4</sub>	50	100	-	-	0,043	52,834	100
825				0,025	46,690	88,372		
800				0,050	43,004	81,395		
750				0,1	38,089	72,093		
700				0,15	27,031	51,162		
650				0,2	20,887	39,534		
600	0,25	17,201	32,558					
850	%6 Ca-CeVO <sub>4</sub>	50	100	-	-	0,043	52,834	100
825				0,025	46,690	88,372		
800				0,050	44,233	83,720		
750				0,1	39,318	74,418		
700				0,15	29,488	55,813		
650				0,2	24,574	46,511		
600	0,25	19,659	37,209					

**Tablo 4. 16. Serum PONI enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren %8 Ca-CeVO<sub>4</sub> - %10 Ca-CeVO<sub>4</sub> IC<sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ile bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar**

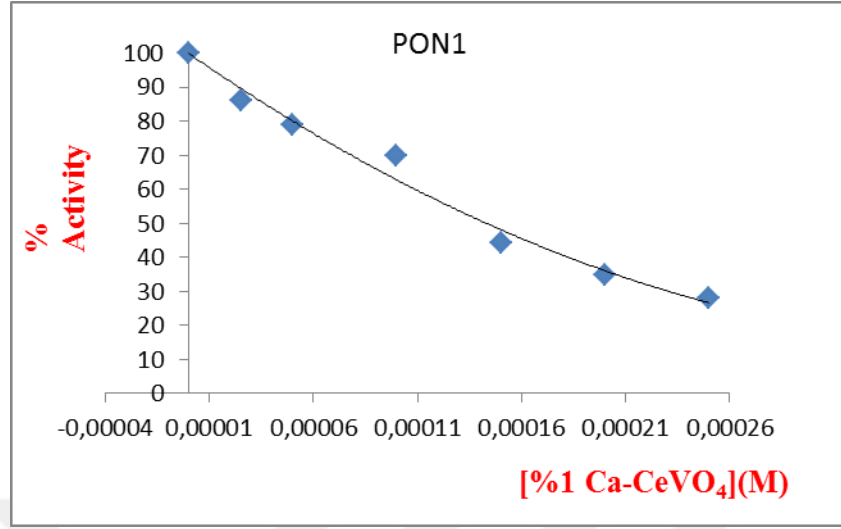
100 mM Tris tampon (µL)	Metal-CeVO <sub>4</sub>	Enzim Çözeltisinin Hacmi(µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi(µL)	Metal-CeVO <sub>4</sub> Çözeltisinin Hacmi(µL)	Küvetteki Metal-CeVO <sub>4</sub> Kons. [I] (mg/mL)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
850	%8 Ca-CeVO <sub>4</sub>	50	100	-	-	0,043	52,834	100
825				25	0,025	47,919	90,697	
800				50	0,050	45,461	86,046	
750				100	0,1	39,318	74,418	
700				150	0,15	30,717	58,139	
650				200	0,2	25,802	48,837	
600	250	0,25	20,887	39,534				
850	%10 Ca-CeVO <sub>4</sub>	50	100	-	-	0,043	52,834	100
825				25	0,025	49,148	93,023	
800				50	0,050	46,690	88,372	
750				100	0,1	40,547	76,744	
700				150	0,15	33,174	62,790	
650				200	0,2	27,031	51,162	
600	250	0,25	23,345	44,186				



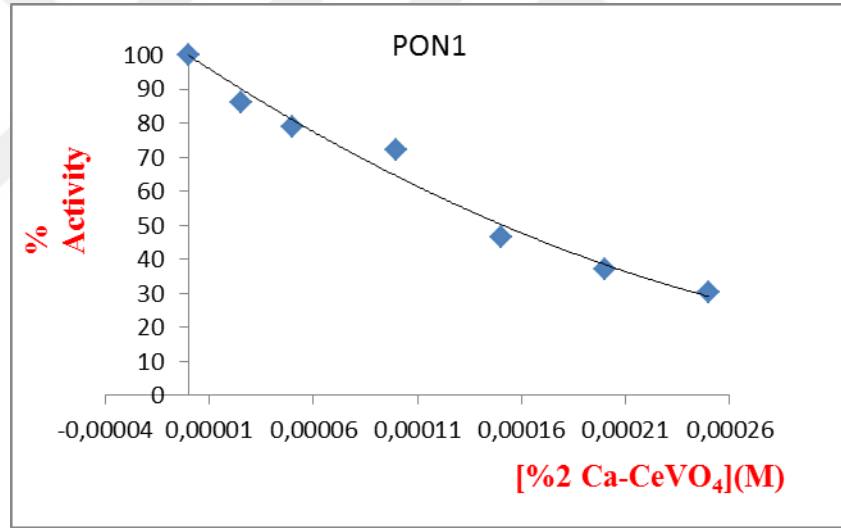
Şekil 4. 28. Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %0.1 Ca-CeVO<sub>4</sub> için % aktivite-[%0.1 Ca-CeVO<sub>4</sub>] grafiği



Şekil 4. 29. Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %0.5 Ca-CeVO<sub>4</sub> için % aktivite-[%0.5 Ca-CeVO<sub>4</sub>] grafiği

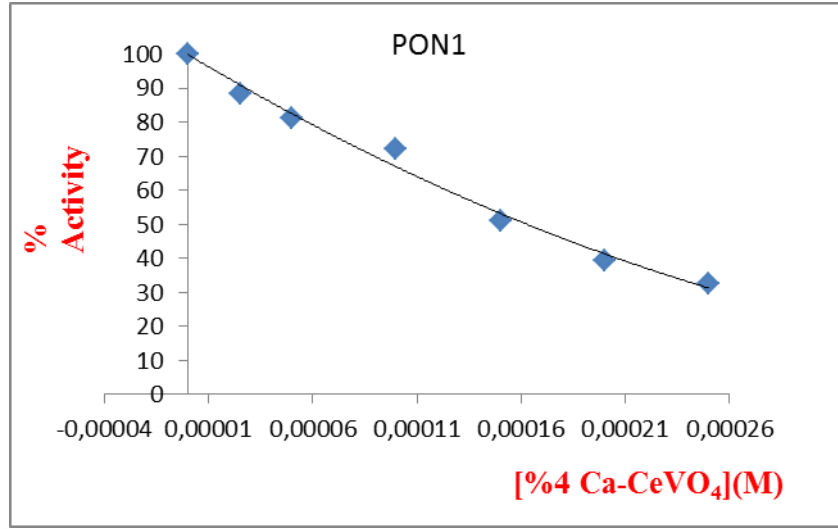


Şekil 4. 30. Safılaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %1 Ca-CeVO<sub>4</sub> için % aktivite-[%1 Ca-CeVO<sub>4</sub>] grafiği

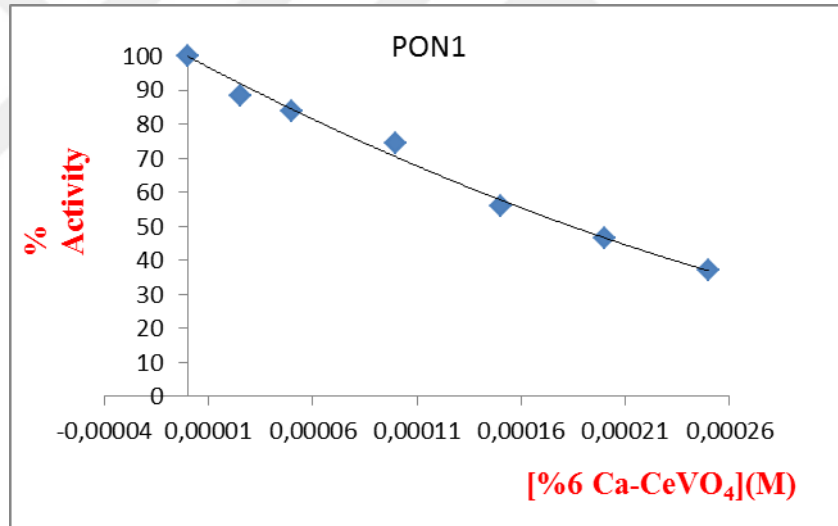


Şekil 4. 31. Safılaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %2 Ca-CeVO<sub>4</sub> için % aktivite-[%2 Ca-CeVO<sub>4</sub>] grafiği

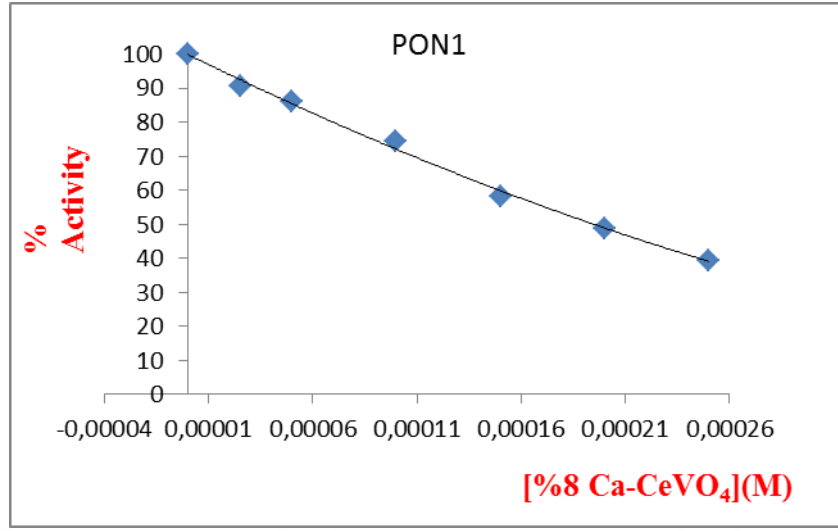




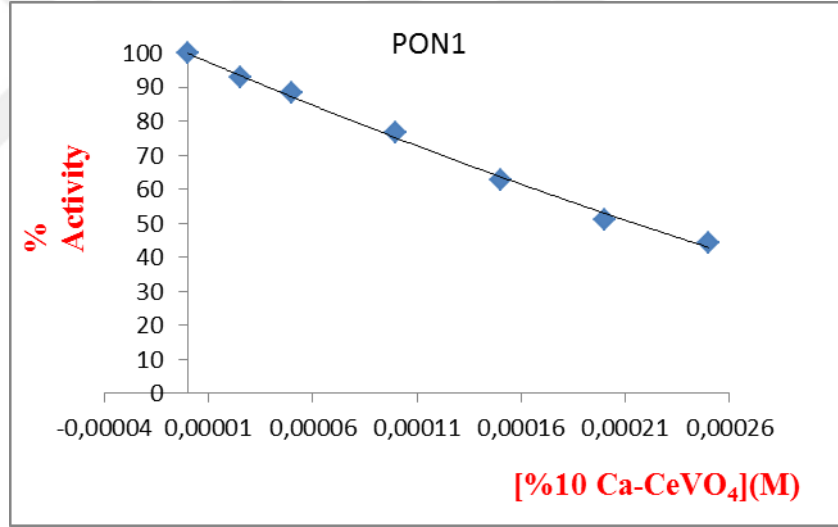
Şekil 4. 32. Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %4 Ca-CeVO<sub>4</sub> için % aktivite-[4% Ca-CeVO<sub>4</sub>] grafiği



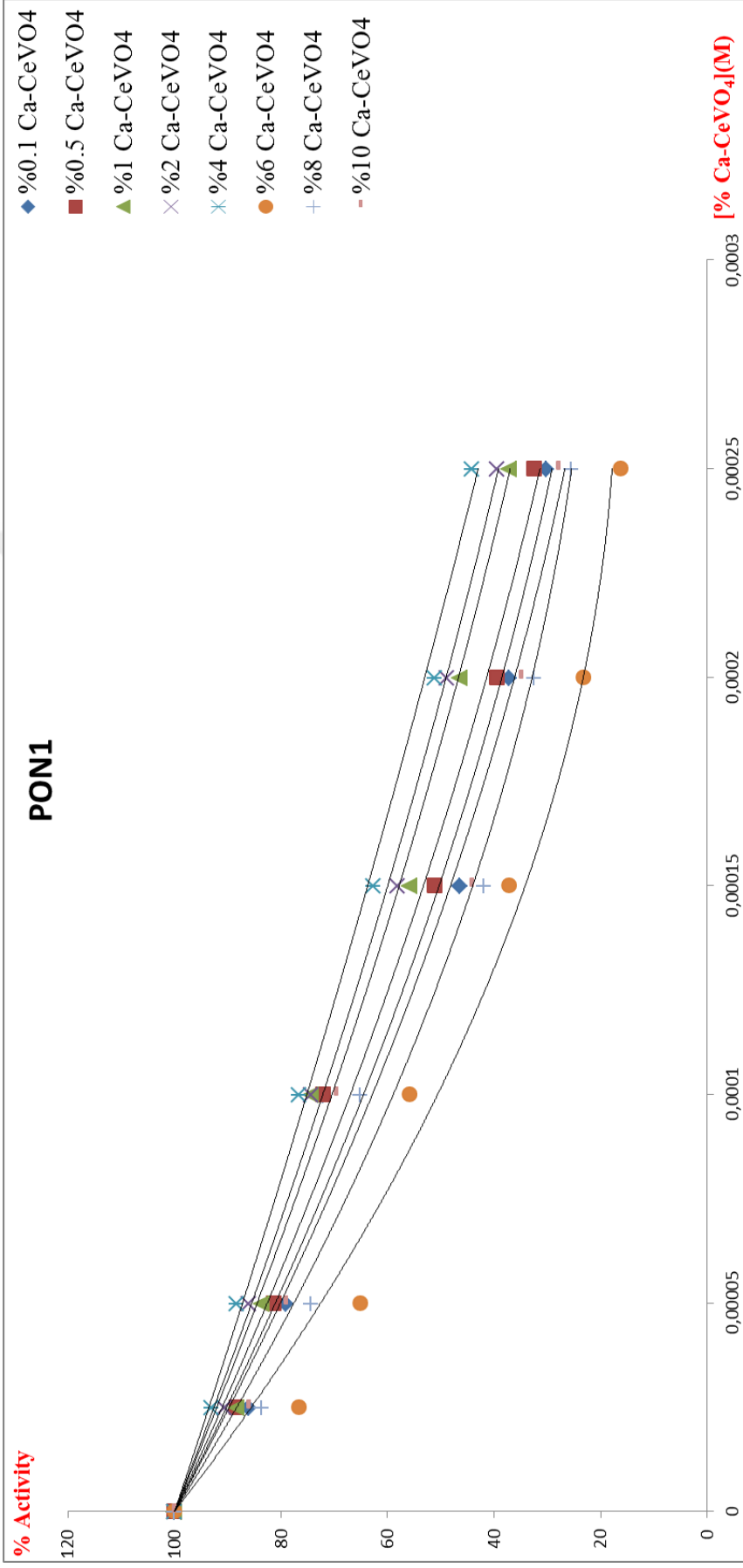
Şekil 4. 33. Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %6 Ca-CeVO<sub>4</sub> için % aktivite-[6% Ca-CeVO<sub>4</sub>] grafiği



Şekil 4. 34. Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %8 Ca-CeVO<sub>4</sub> için % aktivite-[%8 Ca-CeVO<sub>4</sub>] grafiği



Şekil 4. 35. Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %10 Ca-CeVO<sub>4</sub> için % aktivite-[%10 Ca-CeVO<sub>4</sub>] grafiği



Şekil 4. 36. Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda % Ca-CeVO<sub>4</sub> için % aktivite-[% Ca-CeVO<sub>4</sub>] grafiği

**Tablo 4. 17. Serum PONI enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren %0.1 Sr-CeVO<sub>4</sub> - %0.5 Sr-CeVO<sub>4</sub> IC<sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ile bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar**

100 mM Tris tampon (µL)	Metal-CeVO <sub>4</sub>	Enzim Çözeltisinin Hacmi(µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi(µL)	Metal-CeVO <sub>4</sub> Çözeltisinin Hacmi(µL)	Küvetteki Metal-CeVO <sub>4</sub> Kons. [I] (mg/mL)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
850	%0.1 Sr-CeVO <sub>4</sub>			-	-	0,043	52,834	100
825				25	0,025	0,038	46,690	88,372
800				50	0,050	0,034	41,775	79,069
750		50	100	100	0,1	0,029	35,632	67,441
700				150	0,15	0,022	27,031	51,162
650				200	0,2	0,014	17,201	32,558
600				250	0,25	0,01	12,287	23,255
850	%0.5 Sr-CeVO <sub>4</sub>			-	-	0,043	52,834	100
825				25	0,025	0,038	46,690	88,372
800				50	0,050	0,033	40,547	76,744
750		50	100	100	0,1	0,028	34,403	65,116
700				150	0,15	0,022	27,031	51,162
650				200	0,2	0,013	15,973	30,232
600				250	0,25	0,01	12,287	23,255

**Tablo 4. 18. Serum PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren %1 Sr-CeVO<sub>4</sub> - %2 Sr-CeVO<sub>4</sub> IC<sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ile bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar**

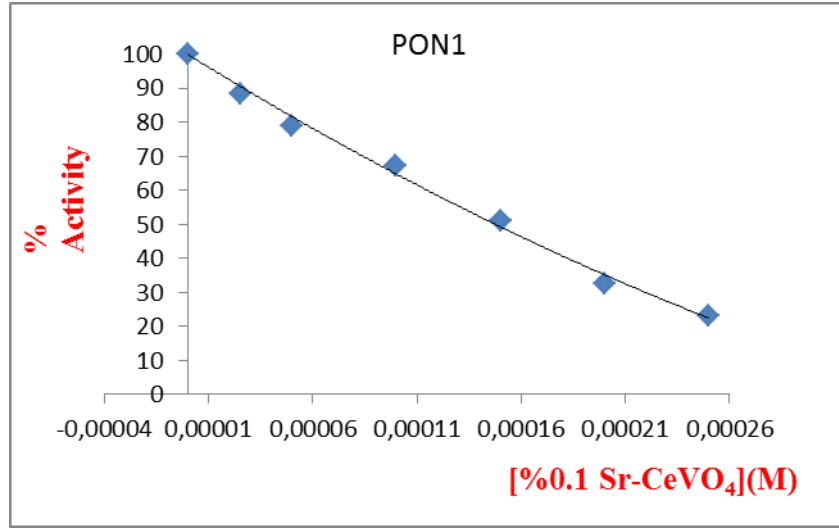
100 mM Tris tampon (µL)	Metal-CeVO <sub>4</sub>	Enzim Çözeltisinin Hacmi(µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi(µL)	Metal-CeVO <sub>4</sub> Çözeltisinin Hacmi(µL)	Küvetteki Metal-CeVO <sub>4</sub> Kons. [I] (mg/mL)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
850	%1 Sr-CeVO <sub>4</sub>	50	100	-	-	0,043	52,834	100
825				25	0,025	0,037	45,461	86,046
800				50	0,050	0,033	40,547	76,744
750				100	0,1	0,027	33,174	62,790
700				150	0,15	0,022	27,031	51,162
650				200	0,2	0,013	15,973	30,232
600	250	0,25	0,01	12,287	23,255			
850	%2 Sr-CeVO <sub>4</sub>	50	100	-	-	0,043	52,834	100
825				25	0,025	0,037	45,461	86,047
800				50	0,050	0,033	40,547	76,744
750				100	0,1	0,025	30,717	58,14
700				150	0,15	0,021	25,802	48,837
650				200	0,2	0,012	14,744	27,907
600	250	0,25	0,009	11,058	20,93			

**Tablo 4. 19. Serum PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren %4 Sr-CeVO<sub>4</sub> - %6 Sr-CeVO<sub>4</sub> IC<sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ile bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar**

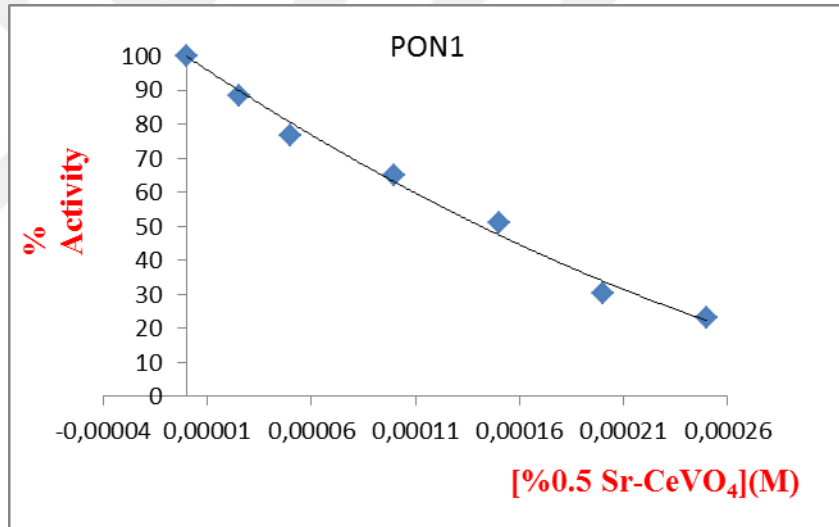
100 mM Tris tampon (µL)	Metal-CeVO <sub>4</sub>	Enzim Çözeltisinin Hacmi(µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi(µL)	Metal-CeVO <sub>4</sub> Çözeltisinin Hacmi(µL)	Küvetteki Metal-CeVO <sub>4</sub> Kons. [I] (mg/mL)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
850	%4 Sr-CeVO <sub>4</sub>			-	-	0,043	52,834	100
825				25	0,025	0,036	44,233	83,720
800				50	0,050	0,032	39,318	74,418
750		50	100	100	0,1	0,024	29,488	55,813
700				150	0,15	0,02	24,574	46,511
650				200	0,2	0,01	12,287	23,255
600				250	0,25	0,008	9,829	18,604
850	%6 Sr-CeVO <sub>4</sub>			-	-	0,043	52,834	100
825				25	0,025	0,035	43,004	81,395
800				50	0,050	0,031	38,089	72,093
750		50	100	100	0,1	0,024	29,488	55,813
700				150	0,15	0,018	22,116	41,860
650				200	0,2	0,01	12,287	23,255
600				250	0,25	0,007	8,600	16,279

**Tablo 4. 20. Serum PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren %8 Sr-CeVO<sub>4</sub> - %10 Sr-CeVO<sub>4</sub> IC<sub>50</sub> değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ile bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar**

100 mM Tris tampon (µL)	Metal-CeVO <sub>4</sub>	Enzim Çözeltisinin Hacmi(µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi(µL)	Metal-CeVO <sub>4</sub> Çözeltisinin Hacmi(µL)	Küvetteki Metal-CeVO <sub>4</sub> Kons. [I] (mg/mL)	ΔA (412 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
850	%8			-	-	0,043	52,834	100
825	Sr-CeVO <sub>4</sub>			25	0,025	0,033	40,547	76,744
800				50	0,050	0,028	34,403	65,116
750			100	100	0,1	0,022	27,031	51,162
700				150	0,15	0,017	20,887	39,534
650				200	0,2	0,011	13,515	25,581
600			250	0,25	0,008	9,829	18,604	
850	%10			-	-	0,043	52,834	100
825	Sr-CeVO <sub>4</sub>			25	0,025	0,033	40,547	76,744
800				50	0,050	0,027	33,174	62,790
750			100	100	0,1	0,022	27,031	51,162
700				150	0,15	0,016	19,659	37,209
650				200	0,2	0,01	12,287	23,255
600			250	0,25	0,007	8,600	16,279	

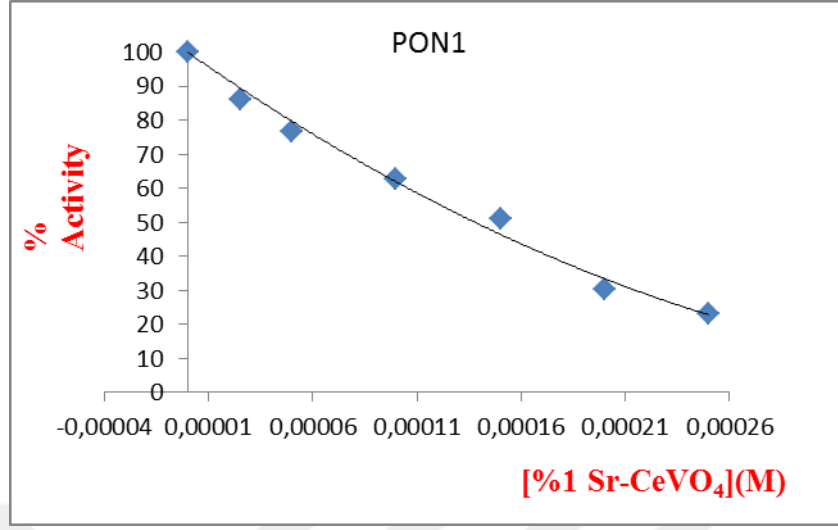


Şekil 4. 37. Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %0.1 Sr-CeVO<sub>4</sub> için % aktivite-[%0.1 Sr-CeVO<sub>4</sub>] grafiği

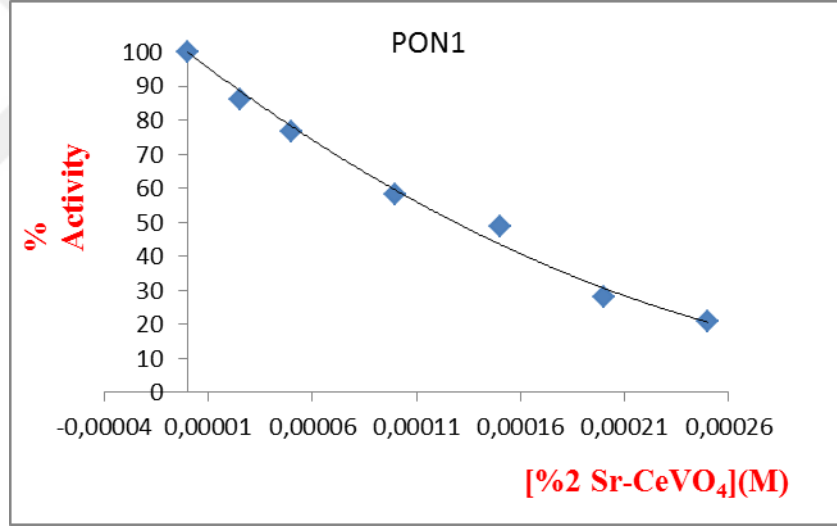


Şekil 4. 38. Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %0.5 Sr-CeVO<sub>4</sub> için % aktivite-[%0.5 Sr-CeVO<sub>4</sub>] grafiği

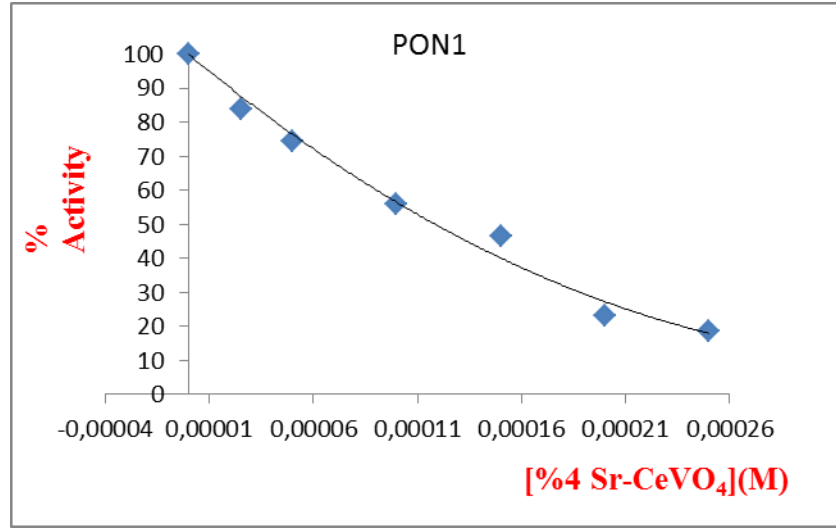




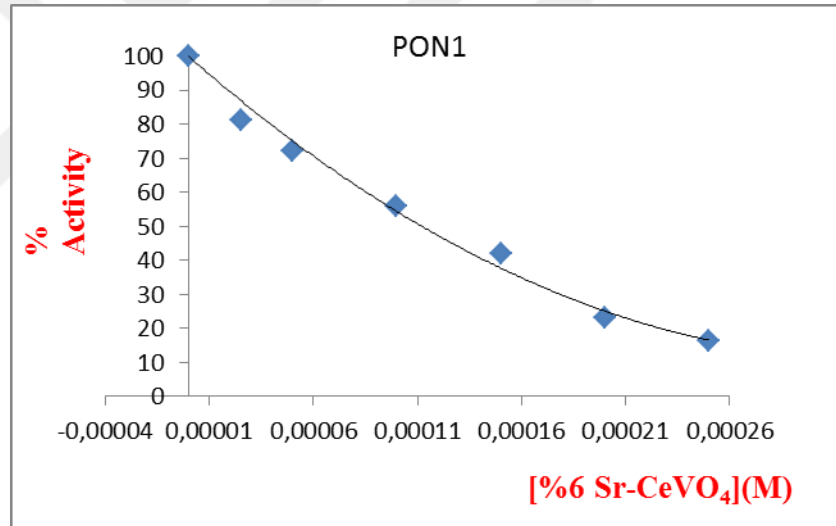
Şekil 4. 39. Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %1 Sr-CeVO<sub>4</sub> için % aktivite-[%1 Sr-CeVO<sub>4</sub>] grafiği



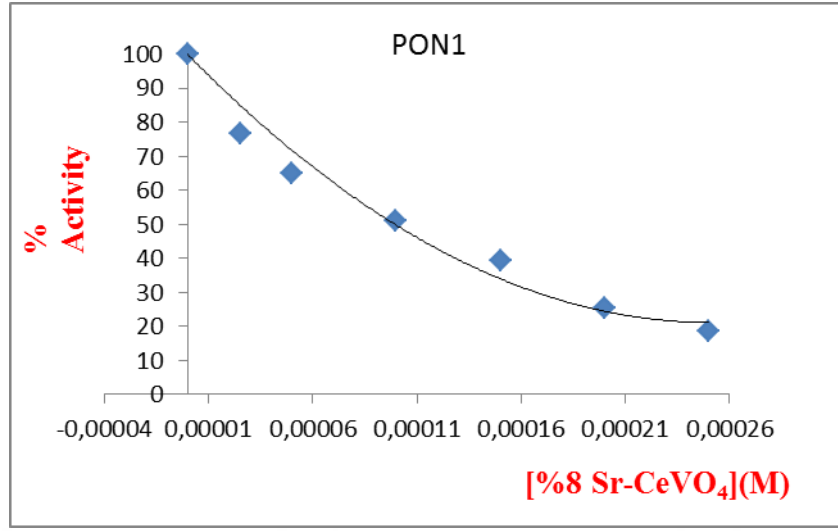
Şekil 4. 40. Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %2 Sr-CeVO<sub>4</sub> için % aktivite-[%2 Sr-CeVO<sub>4</sub>] grafiği



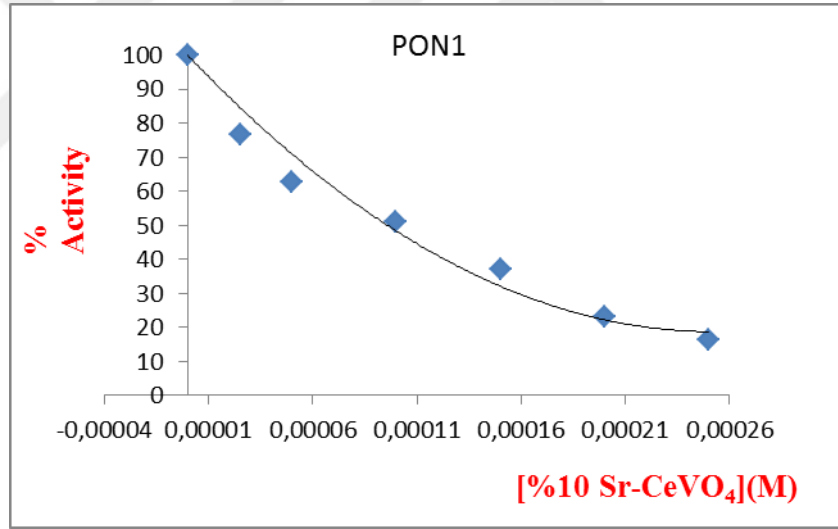
Şekil 4. 41. Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %4 Sr-CeVO<sub>4</sub> için % aktivite-[4 Sr-CeVO<sub>4</sub>] grafiği



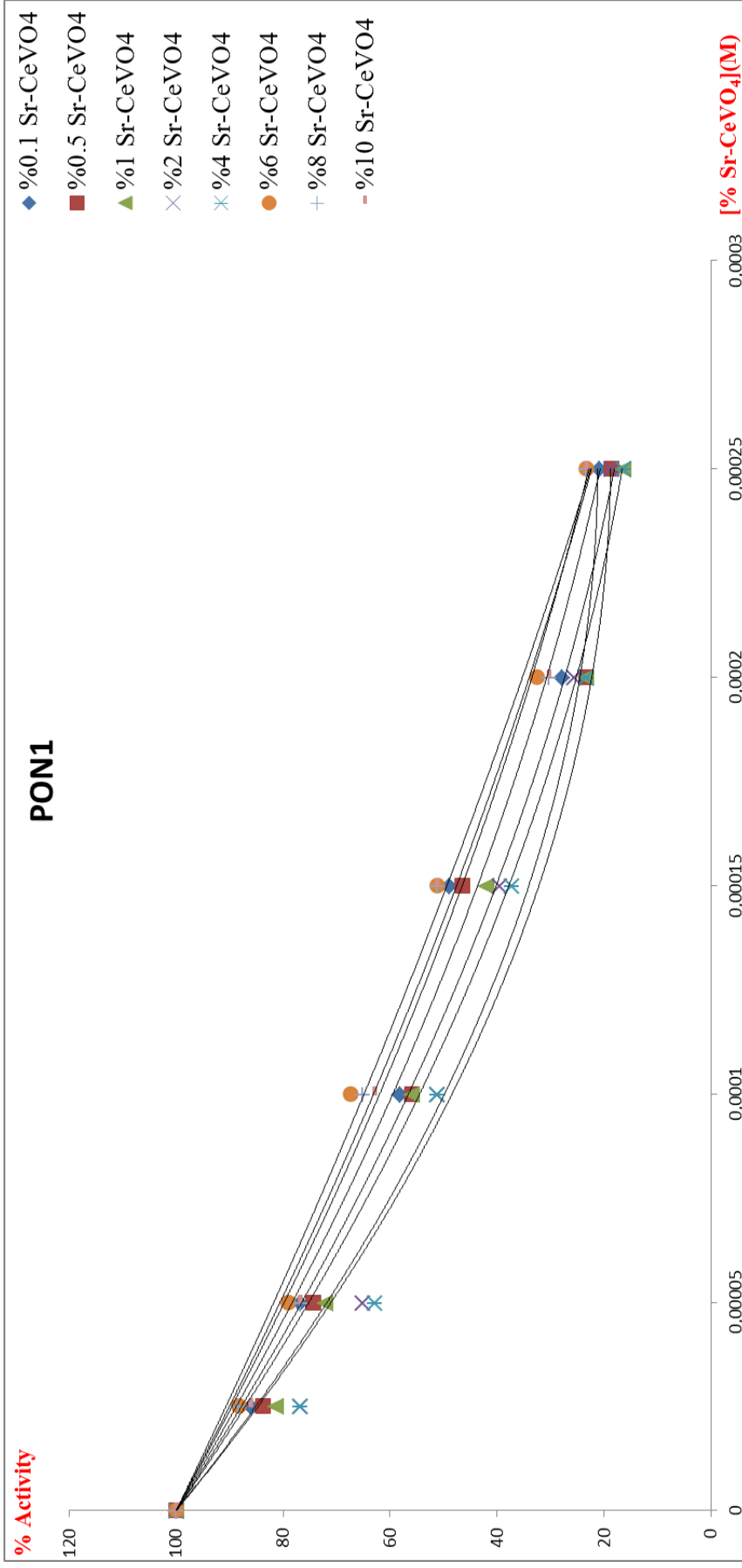
Şekil 4. 42. Saflaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %6 Sr-CeVO<sub>4</sub> için % aktivite-[6 Sr-CeVO<sub>4</sub>] grafiği



Şekil 4. 43. Safılaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %8 Sr-CeVO<sub>4</sub> için % aktivite-[8 Sr-CeVO<sub>4</sub>] grafiği



Şekil 4. 44. Safılaştırılmış insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda %10 Sr-CeVO<sub>4</sub> için % aktivite-[10 Sr-CeVO<sub>4</sub>] grafiği



Şekil 4. 45. Safleştirilmiş insan serum PON1 enzimi üzerine 1 mM paraokson substratı konsantrasyonunda % Sr-CeVO<sub>4</sub> için % aktivite-[% Sr-CeVO<sub>4</sub>] grafiği

**Tablo 4. 21. Serum PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren CeVO<sub>4</sub> türevli bileşiklerin IC<sub>50</sub> değerleri**

Bileşik	% Metal Konsantrasyonu	IC <sub>50</sub> Values (10 <sup>-4</sup> M)
Be-CeVO <sub>4</sub>	0.1	1.35
Be-CeVO <sub>4</sub>	0.5	1.31
Be-CeVO <sub>4</sub>	1	1.25
Be-CeVO <sub>4</sub>	2	1.24
Be-CeVO <sub>4</sub>	4	1.23
Be-CeVO <sub>4</sub>	6	1.22
Be-CeVO <sub>4</sub>	8	1.20
Be-CeVO <sub>4</sub>	10	1.19
Mg-CeVO <sub>4</sub>	0.1	1.48
Mg-CeVO <sub>4</sub>	0.5	1.47
Mg-CeVO <sub>4</sub>	1	1.40
Mg-CeVO <sub>4</sub>	2	1.34
Mg-CeVO <sub>4</sub>	4	1.28
Mg-CeVO <sub>4</sub>	6	1.25
Mg-CeVO <sub>4</sub>	8	1.22
Mg-CeVO <sub>4</sub>	10	1.17
Ca-CeVO <sub>4</sub>	0.1	1.32
Ca-CeVO <sub>4</sub>	0.5	1.50
Ca-CeVO <sub>4</sub>	1	1.58
Ca-CeVO <sub>4</sub>	2	1.64
Ca-CeVO <sub>4</sub>	4	1.71
Ca-CeVO <sub>4</sub>	6	1.88
Ca-CeVO <sub>4</sub>	8	1.97
Ca-CeVO <sub>4</sub>	10	2.13
Sr-CeVO <sub>4</sub>	0.1	1.55
Sr-CeVO <sub>4</sub>	0.5	1.52
Sr-CeVO <sub>4</sub>	1	1.51
Sr-CeVO <sub>4</sub>	2	1.45
Sr-CeVO <sub>4</sub>	4	1.39
Sr-CeVO <sub>4</sub>	6	1.35
Sr-CeVO <sub>4</sub>	8	1.34
Sr-CeVO <sub>4</sub>	10	1.30
Ba-CeVO <sub>4</sub>	0.1	1.74
Ba-CeVO <sub>4</sub>	0.5	1.60
Ba-CeVO <sub>4</sub>	1	1.48
Ba-CeVO <sub>4</sub>	2	1.42
Ba-CeVO <sub>4</sub>	4	1.34
Ba-CeVO <sub>4</sub>	6	1.24
Ba-CeVO <sub>4</sub>	8	1.20
Ba-CeVO <sub>4</sub>	10	1.18



## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

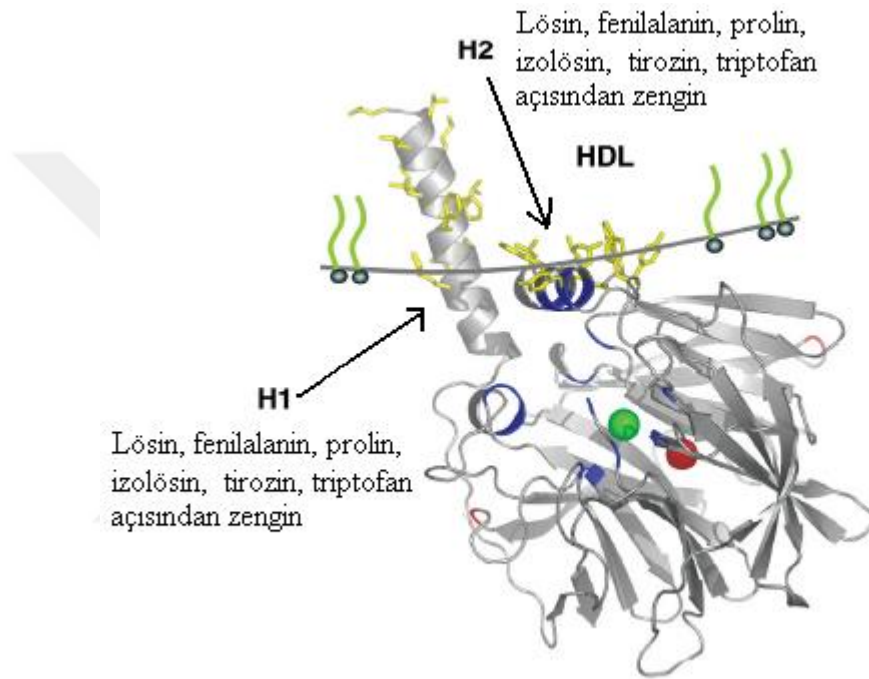
### 5.1. Sonuçlar

Bu tez çalışmasında, antioksidan ve detoksifikasyon aktivitesi ile metabolizmada önemli fizyolojik fonksiyona sahip PON1 enziminin hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırma için ilk kez Sinan ve arkadaşları tarafından sentezlenen Sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin kimyasal yapısına sahip jel sentezlenmiştir [Sinan, 2005]. İnsan serumundan PON1 enzimi saflaştırılmış, Be, Mg, Ba, Ca ve Sr'un farklı yüzdelerde dope edildiği  $CeVO_4$  türevli bileşiklerin inhibisyon etkileri incelenmiştir.

Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırma tekniği seçilmesinin en önemli sebeplerinden birisi PON1 enziminin sahip olduğu hidrofobik karakterdir. PON1 enzimi, N terminal bölgesinde bulunan  $H_1$  ve  $H_2$  heliks yapısı olarak isimlendirilen hidrofobik yapılar ile HDL'ye bağlanmaktadır. (Şekil 5.1) [Billecke ve ark., 2000; Sorenson ve ark., 1999; Sorenson ve ark., 1999]. N-terminal bölgesini lösin, fenil alanin, prolin, isolösin, tirozin, triptofan ve valin gibi aminoasitleri ihtiva eden 7-18 residüler arası  $H_1$  hidrofobik ucu, 185-202 residüler arası da  $H_2$  hidrofobik ucu oluşturmaktadır. Ayrıca PON1'in hidrofobik yüzeyi ile HDL arasında triptofan, tirozin ve lizin aminoasitlerince zengin aromatik ve kısmen hidrofilik bölge bulunmaktadır [Harel ve ark., 2004; Killian ve ark., 2000].

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 aktifleşebilmesidir. Bu amaçla literatürde karbodiimid bileşiklerinin de kullanıldığı bildirilmektedir [Keha, 1982]. Karbodiimid ile aktifleştirilmiş matrikse primer amin grubunun bağlanması ile amid bağı oluşmaktadır. Bu bağ kromatografi işlemlerinde dayanıklıdır. Fakat aktifleştirme sırasında jel, pH 4,5'da 24 saat süre ile karıştırılmaktadır. Bu işlem kromatografi sırasında jelin akış özelliklerini olumsuz etkilemektedir [Keha, 1982]. Bir başka aktifleştirme işleminde epoksi bileşiklerinden yararlanılmıştır [Wistrand ve ark., 1975]. Kromatografi işlemlerinde gayet dayanıklı olan bu yapılar, 16 saat aktifleştirme ve 16 saat ligand bağlama süresi olmak üzere

toplam 32 saatte gerçekleşmektedir. pH'nın 10 civarında olması, jelin kimyasal yapısını etkilememesine rağmen uzun süre karıştırma işlemleri, polisakkarit partiküllerinin fiziksel yapısının deformasyonuna sebep olabilir. Sonuç olarak, hazırlanacak hidrofobik jelin akış özellikleri olumsuz yönde etkilenecektir. Çalışmamızda kullanılan CNBr ile aktifleştirme işlemi sadece 5 dakikada gerçekleşmektedir. Böylece jelin fiziksel yapısındaki deformasyon riskleri ortadan kaldırılmıştır.



**Şekil 5. 1. PON1 enziminin HDL yüzeyine bağlanma modeli**

Literatürde kromatografik matriks olarak kullanılan bir başka bileşik EUPERGIT C-250L ticari ismi ile temin edilen ve oksiran grupları içeren jeller de kullanılmıştır. Söz konusu bileşik bağlamada spesifik olmamasına rağmen, üzerinde taşıdığı oksiran grupları ile çeşitli proteinlerin saflaştırılmasında kromatografik matriks olarak seçilmiştir [Canales ve ark., 1990]. Ayrıca bu jel herhangi bir aktivasyona gerek duyulmadan ligand immobilize edilmektedir. Bunun yanında uzun süre kullanılabilir olması, mekanik etkilere karşı dayanıklı olması ve akış özelliğinin iyi olması sebebiyle de oldukça kullanışlıdır. Fakat yapılan bir çalışmada sepharose-4B ile sentezlenen afinite jeli ile Eupergit ile hazırlanan afinite jeli karşılaştırıldığında Sepharose-4B ile daha iyi akışkanlık ve saflık elde edilmiştir [Ozensoy ve ark., 2004].



Araştırmamızda matriks olarak seçilen Sepharose-4B'ye hidrofobik ligand (1-Naftilamin) L-tirozin bileşiği aracılığı ile immobilize edilmiştir. Burada L-tirozin uzantı kolu olarak görev yapmaktadır. Uzantı kolunun hidrofobik etkileşim kromatografisindeki önemi afinite kromatografisinde olduğu gibi [Arslan ve ark., 1997; Jakoby ve ark., 1974] açıkça belirtilmemesine rağmen, hidrofobik etkileşimde de L-tirozin bileşiğinin önemli olduğu kanaati yaygındır.

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. Bu teknikte ligand ve matriks yapısının son derece önemli olduğu bilinmektedir [Robyt ve ark., 1990]. 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 ligandın tercih edildiği durumda ise saflaştırılacak molekül ile ligand arasındaki etkileşim artacağı için elüsyon sırasında problemler ortaya çıkabilir [Robyt ve ark., 1990]. Genellikle ticari olarak bulunan hidrofobik etkileşim kromatografi jellerinde hidrofobik uç olarak düz zincirli alkil ligandları ve aril ligandları gibi moleküller kullanılmaktadır [Url-3]. Bunlardan isopropil, butil, oktil ve fenil bileşikler en çok tercih edilen ligandlardır. En popüler hidrofobik etkileşim jelinin fenil-sepharose olduğu literatürde görülmektedir [Jakoby ve ark., 1974]. Düz zincirli alkil ligandları saf hidrofobik karakter gösterirken, aril ligandlarında hem hidrofobik hem de aromatik etkileşimler gözlenir. Bu amaçla çalışmamızda ligand olarak 1-naftilamin bileşiği kullanılmıştır. PON1 enziminin H<sub>1</sub> ve H<sub>2</sub> 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.

Hidrofobik etkileşim kromatografisinde kullanılan tuzun tipi ve konsantrasyonu da oldukça önemlidir. Bu kromatografide yaygın olarak kullanılan tuzlar Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaCl, NH<sub>4</sub>Cl, NaBr, NaSCN olmasına rağmen amonyum sülfat en çok tercih edilendir [Aquiar ve ark., 1999; Kmünkova ve ark., 1998].

Araştırmamızda PON1 enzimini insan serumundan saflaştırmak için hidrofobik etkileşim kromatografisi uygulanmadan önce bu kromatografi prosedürüne uygun ön saflaştırma yöntemi olarak amonyum sülfat çöktürmesi yapılmıştır. Paraoksan subsuratu kullanılarak PON1 enziminin amonyum sülfat çöktürme aralığı %60-80 olarak literatürde verilmiştir [Sinan, 2005]. Serum proteinlerinin organik çözücüler ile çöktürülmesi yöntemi amonyum sülfat çöktürme yönteminden daha çok tercih edildiği bildirilmektedir[Mounter ve ark., 1953]. Ancak çalışmamızda saflaştırma yönteminin ikinci basamağı olan hidrofobik etkileşim kromatografisi için amonyum sülfat çöktürmesi uygun olduğu için seçilmiştir. Literatürde yer alan insan serumundan PON1 enziminin izolasyon yöntemlerinde genellikle saflaştırmanın ilk basamağı bir çeşit hidrofobik jel olan Cibacron Blue 3GA'dır. Ancak jel ticari olarak alınmaktadır ve içeriği tam olarak bilinmemektedir.

Bu yöntemle insan serumdan PON1 enzimi 227 kat saflaştırılmıştır. Furlong ve arkadaşları 4 basamaktan oluşan agarose blue, sephadex G-200, DEAE Trisakril M ve Sephadex G-75 yöntemlerini kullanarak tarafımızdan gözlenen saflaştırma katsayısından daha düşük bir değer (62,1) elde etmişlerdir [110]. Ancak bir başka çalışmada sadece üç basamaktan oluşan blue agaroz, DEAE I ve DEAE II yöntemlerini kullanarak yaklaşık 600 kat saflaştırma derecesine ulaşmışlardır. Bu çalışmada ayrıca üç basamakta PON1 enziminin Q ve R polimorfik formları ayrı ayrı saflaştırılmıştır[Gan ve ark., 1991].

Ayrıca PON1 enzimi sıçan ve tavşan karaciğer ve serumdan saflaştırılmıştır [Rodrigo ve ark., 1997; Furlong ve ark., 1991; Pond ve ark., 1998; Drangov ve ark., 2000]. Enzimin serumdan ve karaciğerden saflaştırma basamaklarında kısmen farklılık bulunmaktadır. Serumdan HDL'ye bağlı olan PON1'in izolasyonunda, Cibacron blue 3GA ve daha sonra değişik DEAE bio gel, DEAE Sepharose CL-6B, DEAE-selüloz, Sephadex G-75, DEAE Trisakril M gibi kromatografi yöntemleri kullanılmıştır [Furlong ve ark., 1991; Rodrigo ve ark., 1999; Gan ve ark., 1991; Rodrigo ve ark., 1997].

Araştırmamızda saflaştırılan enzim için Sinan ve ark. tarafından SDS-PAGE uygulanmıştır. Molekül ağırlığı yaklaşık 43 kDa olarak tahmin edilen PON1 enzimi tek bant olarak SDS-PAGE jelinde gözlenmiştir. Bu değer literatürle uygunluk göstermektedir. PON1'in minimum molekül ağırlığını Gan ve arkadaşları 43 kDa olarak

belirlemişlerdir[Gan ve ark., 1991]. Çünkü enzimin yapısında, toplam molekül ağırlığının %15.8'i kadar karbonhidrat molekülü bulunmaktadır. Molekül ağırlığı taşıdığı karbonhidrat zincirinin varlığına bağlı olarak değişmektedir[Furlong ve ark., 1991]. İhtiva ettiği bu karbonhidrat zinciri enzimin hidrolizleme reaksiyonu için gerekli değildir. Söz konusu molekülün PON1'in çözünürlüğünün ve kararlılığını arttırmada ve zar yapısına bağlanmada görevi olduğu düşünülmektedir[Aharoni, 2004; Josse, 1999]. Karbonhidrat içermeyen PON1 enziminin molekül ağırlığı 37 kDa'dur[Furlong ve ark., 1991]. Ayrıca PON1 serumda HDL'ye bağlı olduğu bölgelerin yakınında bulunan proteinler (Apo A1) ile bir arada da saflaştırılabilmektedir. Bu durumda molekül ağırlığı 47-54 kDa olduğu literatürde belirtilmiştir [Zimmerman ve ark., 1989].

Çalışmamızda seçtiğimiz Be, Mg, Ba, Ca ve Sr'un farklı yüzdelerde dope edildiği  $CeVO_4$  türevli bileşiklerin insan serumundan saflaştırılan PON1 enzimi üzerindeki *in vitro* etkileri araştırılmıştır. İnhibisyona sebep olan metal ve pestisitlerin inhibisyon etkisi  $K_i$  ve  $IC_{50}$  olmak üzere iki farklı değerle verilebilir. En uygun parametre  $K_i$  sabitleridir. Çünkü  $K_i$  sabitinin belirlenmesi için en az iki sabit inhibitör konsantrasyonunda çalışmalar yapılmakta ve her bir sabit inhibitör konsantrasyonunda beş farklı substrat konsantrasyonu için hız değerleri belirlenmektedir. Bunun sonucu olarak çok hassas sonuçlar elde edilmektedir [Ozensoy ve ark., 2004]. Ayrıca bu yöntemle inhibisyon mekanizması saptanmaktadır. Fakat bazı araştırmacıların inhibisyon etkisini tespit etmek için  $IC_{50}$  değerini de kullandıkları bilinmektedir. Bu amaçla substrat konsantrasyonları sabit tutularak, değişik inhibitör konsantrasyonlarında, yüzde aktiviteler belirlenmekte ve daha sonra grafik yolu ile % 50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonu hesaplanmaktadır. Bu yöntem,  $K_i$  sabitinin tespit edilmesine göre daha az hassas olmasına rağmen, uygulaması daha kolay olduğu için pratikte kullanılmaktadır. Yukarıdaki sebepler göz önüne alınarak Be, Mg, Ba, Ca ve Sr'un farklı yüzdelerde dope edildiği  $CeVO_4$  türevli bileşiklerin  $IC_{50}$  değerleri insan serumundan saflaştırılan PON1 enzimi için tespit edilmiştir. Farklı metaller ve bu metallerin farklı yüzdelerde (%) dope edilmiş  $CeVO_4$  türevli bileşiklerin  $IC_{50}$  değerlerini bulmak amacıyla optimum şartlarda paraokson substratının 1 mM sabit konsantrasyonunda çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar şekil 4.1 - şekil 4.45 ve tablo 4.1 – tablo 4.21'de verilmiştir. Uygulanan  $CeVO_4$  türevli bileşikler içinde 0,117 mM gibi çok düşük konsantrasyonda aktiviteyi % 50 azaltması ile %10 Mg konsantrasyonuna sahip

Mg-CeVO<sub>4</sub> en kuvvetli inhibitör olarak tespit edilmiştir. Literatürde bu yapı için paraokson substratı kullanılarak inhibisyon değeri şimdiye kadar tespit edilmemiştir. Ayrıca çalışmada kullanılan diğer tüm Be, Mg, Ba, Ca ve Sr'un farklı yüzdelerde dope edildiği CeVO<sub>4</sub> türevli bileşikler için literatürde PON1 enzimi dahil olmak üzere hiçbir enzim için herhangi bir IC<sub>50</sub> değerine rastlanmaması çalışmanın orjinalliğini daha iyi yansıttığı düşünülmektedir.

Yapılan literatür taraması sonucunda, insan karacigerinden saflaştırılan PON1 enzimi üzerinde EDTA bileşiminin, Mg<sup>+2</sup>, Co<sup>+2</sup>, Ba<sup>+2</sup>, La<sup>+3</sup>, Zn<sup>+2</sup>, Cu<sup>+2</sup>, Hg<sup>+2</sup> gibi metallerin ve p-hidroksiciva benzoatın inhibisyon etkisi araştırıldığı görülmüştür. EDTA, baryum, lantan, bakır ve p-hidroksiciva benzoat bileşiğinin yarışmalı bir inhibisyona neden olduğu ve çinkonun ise yarışmasız bir inhibisyon gösterdiği bildirilmektedir [Pellin verk., 1990]. A. Pla ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada rat karaciğerinden saflaştırılmış PON1 ve PON3 üzerinde bazı metal iyonlarının inhibisyon etkisi incelenmiş ve Co, Cu, Mn, ve Hg'nin inhibisyon tipleri tespit edilmiş, PON1 için Hg'nin PON3 için Cu'nun en kuvvetli inhibitör olduğu A. Pla ve arkadaşları tarafından tespit edilmiştir. Ayrıca bu inhibitörlere karşı duyarlılık açısından PON1 ve PON3'ün kantitatif ve kalitatif farklar gösterdiği gösterilmiştir. Saflaştırılan PON1 için, inhibisyon gücü kuvvetliden zayıfa doğru sıralandığında Hg<sup>2+</sup>>Co<sup>2+</sup>>Mn<sup>2+</sup>>Cu<sup>2+</sup> olarak hesaplanmıştır [A.pla ve ark., 2007]. Bir başka çalışmada Hg, Cu ve Ni tuzlarının düşük konsantrasyonda PON1 aktivitesini inhibe etmesini, katalitik merkezdeki bir tiol grubu ile etkileşme sonucu olduğu öne sürülmüştür [E.G. ve ark., 1960].

Sonuç olarak yapılan çalışmada aşağıdaki bulgular elde edilmiş; insan serum PON1 enzimini saflaştırmak için Sepharose 4B-Ltirozin-1-naftilamin kimyasal yapısına sahip hidrofobik etkileşim kromatografisi jeli sentezlenmiştir.

Be, Mg, Ba, Ca ve Sr'un farklı yüzdelerde dope edildiği CeVO<sub>4</sub> türevli bileşiklerin PON1 enzim aktivitesini *in vitro* olarak farklı düzeylerde etkilediği ve hepsinin farklı derecede inhibisyon etkisi gösterdiği saptanmıştır.

Be, Mg, Ba, Ca ve Sr'un farklı yüzdelerde dope edildiği CeVO<sub>4</sub> türevli bileşiklerin tespit edilen IC<sub>50</sub> değerlerinden de anlaşılacağı üzere, farklı inhibisyon sabitleri elde edilmiştir. Değerler arasındaki farklılığın sebebi olarak Be, Mg, Ba, Ca ve Sr'un iyon çaplarının farklılığı yanında enzimin aktif bölgesiyle uygun etkileşimleri de

söylenbilir. Ancak Be, Mg, Ba, Ca ve Sr gruplarının içinde, Ca grubunun IC<sub>50</sub> değerlerinin yüksek olduğu tespit edilmiştir.

PON1'in üç boyutlu yapısında;  $\beta$  kırılmaları tabakaların merkezinde 7.4 Å aralıklı iki adet Ca<sup>+2</sup> iyonu mevcuttur. Bunlardan bir tanesi yapısal özelliğe sahip olup yapıdan uzaklaştırılması dönüşümsüz denatürasyonlara neden olur[Kuo ve ark., 1998]. Diğeri ise katalitik etkinlikte rol oynar. Bu kalsiyum iyonu 2.2-2.5 Å uzaklıkta 5 adet aminoasit rezidüsü (Asn224, Asn270, Asn168, Asp269 ve Glu53) ile etkileşim halindedir. Aynı Ca<sup>+2</sup> iyonu bir su molekülü ve fosfat iyonunun oksijeni ile etkileşmektedir. Ayrıca PON1'in aktif bölgesinde bulunan His-His çifti, kalsiyum iyonu ve su molekülü, esteraz aktivitesinde önemli rollere sahiptir. Katalitik etkinlik gösteren kalsiyum iyonu, subsurattaki fosfat iyonunun eksi yüklü oksijenine 2,2 Å mesafededir. Aktif bölgesindeki His-His çifti, H<sub>2</sub>O molekülünün bir protonunu alarak su molekülünün nükleofilik kuvvetini artırır. Oluşan OH<sup>-</sup> iyonu karbonil yada fosfat esterine yönelir. Bu anda oluşan kompleks tetrahedral bir düzlem sonucu Ca<sup>+2</sup> iyonu ile kararlı kılınır. Oluşan yapıdaki Ca<sup>+2</sup> iyonu eksi yüklü O<sub>2</sub>'den uzaklaşarak bağ tekrar fosfat veya karbonilin üzerine yıkılır ve ester bağı kopar.

Yukarıda da belirtildiği üzere ve çalışmamızda da kullanılan Ca<sup>+2</sup> iyonu PON1 aktivitesini arttırmaktadır. Ca dope edilmiş grubun IC<sub>50</sub> değerlerinin diğere gruplara göre yüksek olmasının sebebi bu olduğu düşünülmektedir. Ca dope edildiği grup da dahil olmak üzere bütün grupların IC<sub>50</sub> değerlerinin birbirine yakın olduğu görülmektedir. Farklılıkların Be, Mg, Ca, ve Sr'un iyon çaplarından kaynaklandığını düşünmekle birlikte, asıl inhibisyona sebep olan grubun CeVO<sub>4</sub> gruplarının olduğu söylenebilir.



## 6. KAYNAKLAR

- A. Pla , L. Rodrigo, A.F. Hern´andez, F. Gil, O. Lopez." Effect of metal ions and calcium on purified PON1 and PON3 from rat liver". *Chemico-Biological Interactions* 167 (2007) 63–70
- Aharoni, A., “Directed evolution of mammalian paraoxonases PON1 and PON3 for bacterial expression and catalytic specialization”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (2004) 101, 482
- 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
- Antikainen M, Mutomaki S, Syvanne M, Pahlman R, Tanvanainen E, Jauhianen M, et al. The Gln Arg 191 polymorphism of human paraoxonase gene (HUMPONA) is not associated with the risk of coronary artery disease in Finns. *J Clin Invest* 1996;98:883-885.
- Aquiar, J.A.K. and Michelacci, Y.M. “Preparation and purification of *Flavobacterium heparinum* chondroitinases AC and B by hydrophobic interaction chromatography”. *Braz J Med Biol Res*, May (1999), 32(5) 545-550
- Arslan, O., Nalbantoğlu, B., Küfrevioğlu, O.I.,. Synthesis and investigation of inhibition effects of new carbonic anhydrase inhibitors. *Bioorganic and Medicinal chemistry* (1997) 5 (3): 515-518
- Augustinsson, K.B., *Homologous enzymes and biochemical evolution*, (eds) In:Van ThoaiN., Roche J., Gordon and Breach, New York, (1968), 299-311
- Aviram M, Rosenbalt M. Paraoxonases and cardiovascular diseases: pharmacological and nutritional influences. *Curr Opin Lipidol* 2005;16:393-399.
- Aviram, M., Billecke, S., Sorenson, R., Bisgaier, C., Newton, R., Rosenblat, M., Erogul, J., Hsu, C., Dunlop, C. and La Du, B.N., “Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities. Selective action of human paraoxonase allozymes Q and R”, *Arterioscler. Thromb Vasc. Biol.*, (1998) 18, 1617
- Aviram, M., Rosenblat, M., Bisgaier, C.L., Newton, R.S., Primo-Parmo, L.S. and La Du, B.N., “Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase”, *J. Clin. Invest.*, (1998) 101(81), 1581
- Aynacıoğlu AS, Kepekçi Y. The human paraoxonase Gln-Arg 192(Q/R) polymorphism in Turkish patients with coronary artery disease. *Int J Cardiol* 2000;12:33-37. doi: 10.1016.S0167-5273(00)00242-4
- Baillie, T.A., Moldeus, P., Mason, R.P. Younes, M., *Enzymes Interacting with Organophosphorus Compounds*, Elsevier Scientific Publishers Ireland Ltd, Shannon, (1993).

- 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
- Bharti Mackness, P.N.D., Michael I. Mackness, "The Paraoxonase Gene Family and Coronary Heart Disease". *Current Opinion in Lipidology*, 13, (2002), 357-362
- Biggadike, K., Angell, R.M., Burgess, C.M., Farrel, R.M., Hancock, A.P., Harker, A.J., Irving, W.R., Ioannou, C., Procopiou, P.A., Shaw, R.E., Solanke, Y.E., Singh, O.M., Snowden, M.A., Stubbs, R.J., Walton, S. and Weston, H.E., "Selective plasma hydrolysis of glucocorticoid gamma-lactones and cyclic carbonates by the enzyme paraoxonase: an ideal plasma inactivation mechanism", *J. Med. Chem.*, (2000) 43, 19
- Billecke, S., Draganov, D. and Rosenblat, M., "Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions: PON1 esterase and peroxidase-like activities", *Circulation*, (2000) 101, 2510
- Billecke, S., Draganov, D., Councell, R., Stetson, P., Watson, C., Hsu, C. and La Du, B.N., "Human serum paraoxonase (PON1) isozymes Q and R hydrolyse lactones and cyclic carbonate esters", *Drug Metab. Dispos.*, (2000) 28(11), 1335
- Billecke, S., Draganov, D., Councell, R., Stetson, P., Watson, C., Hsu, C. and La Du, B.N., "Human serum paraoxonase (PON1) isozymes Q and R hydrolyse lactones and cyclic carbonate esters", *Drug Metab. Dispos.*, (2000) 28(11), 1335
- Blatter, G, M.C., Abbott, C., Messmer, S., Mackness, M., Durrington, P.N., Pometta, D. and James, R.W., "Quantification of human serum paraoxonase by enzyme-linked immunoassay: population differences in protein concentrations", *Biochem. J.*, (1994) 304, 549
- Blatter, M.C., James, R.W., Messmer, S., Barja, F. and Pometta, D., "Identification of a distinct human high-density lipoprotein subspecies defined by a lipoprotein-associated protein, K-45: identity of K-45 with paraoxonase", *Eur. J. Biochem.*, (1993) 211, 871
- Borhani, D.W., Rogers, D.P., Engler, J.A. and Brouillette, C.G., "Crystal structure of truncated human apolipoprotein A-1 suggests a lipid-bound conformation", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1997) 94, 12291
- 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
- Cabana, VG., Reardon, C.A, Feng, N., Neath, S.X., Lukens, J.R. and Getz, G.S., "Serum paraoxonase: effect of the apoproteins of HDL and the acute phase response", *J. of Lipid Research*, (2003) 44(4), 780
- Canales, I., Manjon, A. And Iborra, J.L., "Immobilization of  $\beta$ -glucuronidases on an epoxy-activated polyacrylic matrix", *Biotechnol. Tech.*, (1990) 4,205
- 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



- Cem Horozoğlu, "Ateroskleroz patogenezinde rol oynadığı düşünölen iki aday genin gen ifadelerinin incelenmesi" 2012
- Costa, L.G., Li, W.F., Richter, R.J., "PON1 and organophosphate toxicity", pp. (2002) 165–83
- Deakin, S., Leviev, I., Gomasaschi, M., Calabresi, L., Franceschini, G. and 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.*, (2002) 277, 4301
- 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.*, (2003) 23, 2083
- Deakin, S., Leviev, I., Nicaud, V., Brulhart Meynet, M. C., Tiret, L. and James, R. W. (2002) Paraoxonase-1 L55M polymorphism is associated with an abnormal oral glucose tolerance test and differentiates high risk coronary disease families. *J. Clin. Endocrinol.Metab.* 87, 1268–1273
- Doorn, J.A., Sorenson, R.C., Billecke, S.S., Hsu, C. and La Du, B.N., "Evidence that several conserved histidine residues are required for hydrolytic activity of human paraoxonase/arylesterase", *Chemico-Biological Interaction*, (1999) 119-120, 235
- Draganov DI, Stetson PL, Wateon Ce, Billecke SS, La Du BN. Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoproteinassociated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. *J Biol Chem* 2000; 275: 33435-33442
- Draganov, D.I. and La Du, B.N., "Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review", *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, (2004) 369, 78
- Draganov, D.I. and La Du, B.N., "Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review", *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, (2004) 369, 78
- Draganov, DI., Stetson, PL., Watson, CE., Billecke, SS., La Du BN., "Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation", *J. Biol. Chem.* (2000) 275, 33435-33442.
- Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 473-480.
- E. Azarsız, E.Y.S., "Paraoksonaz ve Klinik Önemi". *Türk Biyokimya Dergisi.*, 25 (3) , (2000), 109-119
- E.G. Erd'os, C.R. Debay,M.P.Westerman, Arylesterases in blood: effect of calcium and inhibitors, *Biochem. Pharmacol.* 5 (1960) 173–186.
- Eckerson, H.W., Wyte, C.M. and La Du, B.N., "The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism", *Am. J. Hum. Genet.*, (1983) 35
- Erdem, M.S.T. "ST Elevasyonlu Miyokard infarktöslü (Stemi) Hastalarda insan Paraoxonase Geni Met-Leu/55 Polimorfizmi." Dr. Siyami Ersek Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Merkezi, İstanbul, (2004)

- Feingold, K-R., Memon, R-A., Moser, A-H. and Grunfeld, C., "Paraoxonase activity in the serum and hepatic mRNA levels decrease during the acute phase response", *Atherosclerosis*, (1998) 139, 307
- Fokine, A.e.a., "Direct Phasing at Low Resolution of A Protein Copurified With Human Paraoxonase (PON1)". *Acta Crystallogr. D.*, 59, (2003), 2083-87
- Furlong, C.E., Richter, R.J., Chapline, C. and Crabb, J.W., "Purification of Rabbit and Human Serum Paraoxonase", *Biochemistry*, (1991) 30, 10133
- 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
- Garrett, E.R., Lippold, B.C. and Mielck, J.B., "Kinetics and mechanisms of lactonization of coumarinic acids and hydrolysis of coumarins I", *J. Pharm. Sci.*, (1971) 60, 396
- Harel, M., Aharoni, A., Gaidukov, L., Brumshtein, B., Khersonsky, O., Meged, R., Dvir, H., Ravelli, R.B.G., McCarthy, A., Toker, L., Silman, I., Sussman, J.L. and Dan S. Tawfik, "Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes", *Nature Struct. Mol. Biol.* (2004) 11, 412
- Harel, M., Aharoni, A., Gaidukov, L., Brumshtein, B., Khersonsky, O., Meged, R., Dvir, H., Ravelli, R.B.G., McCarthy, A., Toker, L., Silman, I., Sussman, J.L. and Dan S. Tawfik, "Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes", *Nature Struct. Mol. Biol.* 11, 412 (2004).
- Hassett, C., Richter, R.J., Humbert, R., Chapline, C., Crabb, J.W., Omiecinski, C.J. and Furlong, C.E., "Characterization of cDNA clones encoding rabbit and human serum paraoxonase: the mature protein retains its signal sequence", *Biochemistry*, (1991) 30, 10141
- Hegele RA. Paraoxonase genes and disease. *Ann Med* 1999; 31: 217-224
- Jakoby, B., Wilchek, M., Coupling reaction of ligands and general methodology of affinity chromatography, in *Methods in Enzymology*, Academic Pres, New York, (1974).
- James, R. W., Blatter Garin, M. C., Calabresi, L. et al. (1998) Modulated serum activities and concentrations of paraoxonase in high density lipoprotein deficiency states. *Atherosclerosis* 139, 77–82
- Jawad, Z., Paoli, M., "Noval Sequences Propel Familiar Folds". *Structure*, 10, (2002), 447-454
- Jayakumari N, Thejaseebai G. High prevalence of low serum paraoxonase1 in subjects with coronary artery disease. *J Clin Biochem Nutr* 2009;45(3):278-284. doi: 10.3164/jcfn.08-255
- Jonas, A., "Lecithin cholestrol Acyltransferase". *Biochim. Biophys. Acta*, 1529, (2000), 245-256

- Josse, D.e.a., "Identification of Residues Essential For Human Paraoxonases (PON1) Arylesterase/Organophosphatase Activities". *Biochemistry*, 38, (1999), 2816-25
- Josse, D.e.a., "Oligometric States of The Detergent-Solubilized Human Serum Paraoxonase (PON1)". *J. Biol. Chem.*, 277, (2002), 33386-97
- Juretic, D, Tadijanovic, M, Rekić, B, Simean-Rudolf, V, Reiner, E, Baricic, M. (2001) Serum paraoxonase activities in hemodialyzed uremic patients: cohort study. *Clin Sci.* 42, 146-150.
- Kabaroğlu C, Mutaf I, Boydak B, et al. Association between serum paraoxonase activity and oxidative stress in acute coronary syndromes. *Acta Cardiol* 2004;59:606-611.
- Kaman D, İlhan N, Metin K, Akbulut M, Üstündağ B. A preliminary study of human paraoxonase and PON1 L/M55-PON1 Q/R192 polymorphisms in Turkish patients with coronary artery disease. *Cell Biochem Funct* 2009;27:88-92. doi: 10.1002/cbf.1539
- Keha, E.E., Karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması için geliştirilmiş bir afinite kromatografisi metodu, Doçentlik tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Erzurum. 1982
- Kelso, G.J., Stuart, W.D., Richter, R.J., Furlong, C.E., Jordan-Starck, T.C. and Harmony, J.A.K., "Apolipoprotein J is associated with paraoxonase in human plasma", *Biochemistry*, (1994) 33, 832
- Killian, J.A., Von Heijne, G., (2000), How proteins adapt to a membrane-water interface. *Trends Biochem. Sci.* 25, 429-434
- Kirsty S. Robertson, Emma Hawe,<sup>1</sup> George J. Miller, Philippa J. Talmud, Steve E. Humphries, "Human Paraoxonase Gene Cluster Polymorphisms As Predictors of Coronary Heart Disease Risk in The Prospective Northwick Park Heart Study II". *Biochimica et Biophysica Acta*, 1639, (2003), 203– 212
- Kminkova, M.and Jiri Kucera, J. "Single-Step Separation Of Lactate Dehydrogenase Using Thiophilic Chromatography", *Czechoslovak Chemical Communications*, (1998) 63(6), 851-856.
- 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
- La Du, B. N., Human serum paraoxonase/arylesterase, In *Pharmacogenetics of Drug Metabolism*, ed. Kalow, W., Pergamon Pres, New York, (1992), p.51
- La Du, B.N., Human serum paraoxonase/arylesterase, In *Pharmacogenetics of Drug Metabolism*, ed. Kalow, W., Pergamon Pres, New York, (1992), p.51
- Lehninger, Biyokimyanın İlkeleri, 3. Baskı, Palme yayıncılık, Ankara-2005, 243-244
- Leviev, I., Negro, F. and James, R.W., "Two alleles of the human paraoxonase gene produce different amounts of mRNA: an explanation for differences in serum concentrations of paraoxonase associated with the (Leu-Met54) polymorphism", *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, (1997) 17, 3935

- Li, W.F, Costa, L.G, Furlong, C.E. (1993) Serum paraoxonase status: a major factor in determining resistance to organophosphates. *J Toxicol and Environ Health.* 40, 337-346.
- Liang, H.-L.L.D.-P.L.C.-C., "Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress, and diseases." *J Mol Med*, 81, (2003), 766–779
- Lund-Katz, S., Liu, L.J., Thuahnai, S.T. and Philips, M.C., "High density lipoprotein structure", *Front. Biosci.*, (2003) 8, D1044
- Lusis, A.J., "Atherosclerosis", *Nature*, (2000) 407, 233
- M. Ferit Gürsu, M.Ö., Funda Gülcü, "Koroner Kalp Hastaları ile Etiyolojik Risk Faktörlerini Taşıyan Bireylerde Paraoksonaz Aktiviteleri ve Fenotiplerinin Araştırılması". *F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi*, 17(4) (2003) 237-244.
- Mackness B., D.P.N., Mackness M.I, "Human Serum Paraoxonase". *Gene Pharmacy*, 31(3) ,(1998), 329-36
- Mackness, B., Davies, G.K., Turkei, W., Lee, E., Roberts, D.H., Hill, E., Roberts, C., Durrington, P.N. and Mackness, M.I., "Paraoxonase Status in Coronary Heart Disease", *Arterosccler Thromb. Vasc. Biol.* (2001) 21, 1451
- Main, A. R. (1956) *Can. J. Biochem. Physiol.* 34, 197-216
- Martoglio, B. and Dobberstein, B., "Signal sequences - more than just greasy peptides", *Trends Cell Biol.*, (1998) 8, 410
- MEB, 2A Grubu elementleri, Kimya Teknolojisi, Ankara-2012;3-4
- 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
- Michal Harel, A.A., Leonid Gaidukov, Boris Brumshtein, Olga Kherksonsky, Ran Megeed, Hay Dvir, Raimond B G Ravelli, Andrew McCarthy, Lilly Toker, Israel Silman, Joel L Susman, Dan S Tawfik, "Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and antiatherosclerotic enzymes". *Nature Structural & Molecular Biology*, (2004), 412-419
- Mounter, L.A., Floyd, C.S. and Chanutin, A., Dialkylfluorophosphatase of Kidney I.Purification And Properties, *J. Biol. Chem.* (1953) 204 221-232
- Mukamal KJ, Pai JK, Jensen MK, Rimm EB. Paraoxonase 1 polymorphisms and risk of myocardial infarction in women and men. *Circ J* 2009;73(7):1302-1307. doi: 10.1253/circj.CJ-08-0912
- Navab M, Hama-Levy S, Van Lenten BJ, Fonarow GC, Carlinez CJ, Castellani LW. Mildly oxidised LDL induces an increased apolipoprotein J/paraoxonase ratio. *J Clin Invest* 1997;99:2005-2019. doi: 10.1172/JCI119369
- Oda, M.N., Bielicki, J.K., Berger, T. and Forte, T.M., "Cysteine substitutions in apolipoprotein a-I primary structure modulate paraoxonase activity", *Biochem*, (2001) 40, 1710

- Ozensoy, O., Arslan, O. And Sinan, S.O., "A new method for purification of carbonic anhydrase Isozymes by affinity chromatography". *Biochemistry (Moscow)*, (2004) 69(2), 216
- Özök E, Aydın M, Babalık E, Özbek Z, İnce N, Kara İ. Combined impact of matrix metalloproteinase-3 and paraoxonase 1 55/192 gene variants on coronary artery disease in Turkish Patients. *Med Sci Monit* 2008;14(19):536-542.
- Özlem Tarçın, Paraoxonase-1 and Coronary Heart Diseases 2011 <http://www.marmaramedicaljournal.org/text.php?id=584>
- P.N. Durrington, B.M., M.I. Mackness, "Paraoxonase and Atherosclerosis". *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 21, ( 2001), 473-480
- Pellin, M.C., Moretto, A., Lotti, M., Vilanova, E., Distribution and biochemical properties of rat paraoxonase activity *Neurotoxicol Teratol* (1990) 12, 611-614.
- Pond, AL., Chambers, HW., Coyne, CP., Chambers, JE., Purification of two rat hepatic proteins with a-esterase activity toward chlorpyrifos-oxon and paraoxon, *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*, (1998) 63(6), 851-856
- Primo-Parmo SL, RC, Teiber J, LaDu BN. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON 1) is one member of a multigene family. *Genomics* 1996; 33:498-507
- Prof.Dr.KEHA E.Edip, Prof.Dr.KÜFREVİOĞLU Ö.İrfan, *Biyokimya, Aktif Yayınevi, Erzurum-2005,92-95*
- Rios DL, D'Onofrio LO, Cerqueira CC, Bonfim-Silva R, Carvalho HG, Santos-Filho A, et al. Paraoxonase 1 gene polymorphisms in angiographically assessed coronary artery disease: evidence for gender interaction among Brazilians. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:874-878. doi: 10.1515/CCLM.2007.136
- Robyt, JF., White, BJ., "Biochemical Techniques Theory and Practice", (1990), Waveland Pres, Inc.p:98.
- Rodrigo, L., Gil, F., Hernández, A.F. and Pla, A., "Identification of two rat liver proteins with paraoxonase activity: biochemical evidence for the identity of paraoxonase and arylestrase", *Chem. Biol. Interact.*, (1999) 263, 119-120
- Rodrigo, L., Gil, F., Hernández, A.F., Marina, A., Vázquez, J. and Pla, A., "Purification and characterization of paraoxon hydrolase from rat liver", *Biochem. J.*, (1997) 321, 595
- Rozenberg O, Rosenblat M, Coelman R, et al. Paraoxonase (PON1) deficiency is associated with increased macrophage oxidative stress: studies in PON1-knockout mice. *Free Radic Biol Med* 2003;34:774-784. doi: 10.1016/S0891-5849(02)01429-6
- Ruiz J, Blanche H, James RW, Garin MC, Vaisse C, Charpentier G, Cohen N, Morabia A, Passa P, Froguel P. Gln-Arg 192 polymorphism of paraoxonase and coronary heart disease in type 2 diabetes. *Lancet* 1995;346(8979):869-872. doi:10.1016/S0140-6736(95)92709-3
- Sanghera DK, Saha N, Aston CE, Kamboh MI. Genetic polymorphism of paraoxonase and the risk of coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:1067-1073.

- Scharff, E.I., Koepke, J., Fritzch, G., Lucke, C.&Ruterjans, H., "Crystal structure of diisopropylfluorophosphatase from *Loligo vulgaris*". *Structure*, 9, (2001), 493-502
- Sinan, M.S.T.S., "İnsan Serum Paraoksonaz Enziminin (PON1) Expressiyonu, Saflastırılması ve Bazı İlaçların Enzim Üzerine Etkilerinin Araştırılması." Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, (2005)
- Singh S, Venkatesh S, Verma JS, Verma M, Lellama CO, Goel RC. Paraoxonase(PON1) activity in North west Indian Punjabis with coronary artery disease. *Indian J Med Res* 2007;125:783-787.
- Sorenson, R.C., Bisgaier, C.L., Aviram, M., Hsu, C., Billecke, S. and La Du, B.N., "Human serum paraoxonase/arylesterase's retained hydrophobic N-terminal leader sequence associates with high density lipoproteins by binding phospholipids: apolipoprotein A-1 stabilizes activity", *Atheroscler Thromb Vasc Biol*, (1999) 19, 2214
- Sorenson, R.C., Primo-Parmo, S.L., Kuo, C.L., Adkins, S., Lockridge, O. and La Du, B.N., "Reconsideration of the catalytic center and mechanism of mammalian paraoxonase/arylesterase", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1995) 92, 7187
- Sorenson, R.C., Primo-Parmo, S.L., Kuo, C.L., Adkins, S., Lockridge, O. and La Du, B.N., "Reconsideration of the catalytic center and mechanism of mammalian paraoxonase/arylesterase", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1995) 92, 7187
- Sorenson, R.C., Aviram, M., Bisgaier, C.L., Billecke, S., La Du B.N., "Properties of the retained N-terminal hydrophobic leader sequence in human serum paraoxonase/arylesterase" *Chem. Biol. Interact.* (1999) 119-120, 243-249.
- Suehiro T, Nakanchi Y, Yammamoto M, Arie K, Itoh H, Hamashige N, et al. Paraoxonase gene polymorphism in Japanese subjects with coronary heart disease. *Br J Pharmacol* 1996;57:69-73. doi: 10.1016/S0167-5273(96)02779-9
- Tang, B.K. and Kalow, W., "Variable activation of lovastatin by hydrolytic enzymes in human plasma and liver", *Eur. J. Clin. Pharmacol.* (1995) 47, 449
- Teiber, J.F., Draganov, D.I., La Du, B.N., "Lactonase and Lactonizing of Human Serum Paraoxonase (PON1) and Rabbit Serum PON3", *Biochemical Pharmacology*, (2003) 66, 887
- Tougou, K., Nakamura, A., Watanabe, S., Okuyama, Y. and Morino, A., "Paraoxonase Has a Major Role in the Hydrolysis of Prulifloxacin (NM441), a Prodrug of a New Antibacterial Agent", *Drug Metab. Dispos.*, (1998) 26, (4), 355
- Uriel, A., "Characterisation des cholinesterases et d'autres esterases carboxylique apres electrophorese et immunoelectrophorese en gelose, I;applications a l'etude des esterases du serum humain normal". *Am Insit Pasteur*, (1961), 101-104
- Url-1<<http://www.chromatography.amershambiosciences.com/>>, [Ziyaret Tarihi: 12 Haziran 2016].
- Vickers, S., Duncan, C.A., Chen, I-W., Rosegay, A. and Duggan, D.E., "Metabolic disposition studies of simvastatin, a cholesterol-lowering prodrug", *Drug Metab Dispos* (1990) 18, 138

Wheeler JG, Keavney BD, Watkins H, Collins R, Danesh J. Four paraoxonase gene polymorphism in 11212 cases of coronary heart diseases and 12786 controls: meta-analysis of 43 studies. *Lancet* 2004;363(9410):689-695. doi: 10.1016/S0140-6736(04)15642-0

Wistrand, P.J., Lindahl, S. And Wahlstrand, T., "Human renal carbonic anhydrase. Purification and properties", *Eur J. Biochem.*, (1975) 57, 189.

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) 128-1428

Url-1<<http://diyabet.gov.tr/>> , [Ziyaret Tarihi: 10 Haziran 2016].

Url-2<<http://whqlibdoc.who.int/>>, [Ziyaret Tarihi: 12 Haziran 2016]. (Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. World Health Organization, 2011, Erişim: 1.06.2012,)

Url-3<<http://www.chromatography.amershambiosciences.com/>>, [Ziyaret Tarihi: 15 Haziran 2016].

## EKLER

## EK-1

T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI SİİRT DEVLET HASTANESİ ETİK KURULU ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI

Yazın: 7281  
 Türü: Bilimsel çalışma

Tarih: 28.12.2015

Sayın Yard. Doç. Dr. M. Oğuzhan KAYA'nın Siirt'te çeşitli Sağlık kuruluşlarından alınacak atık kanlarda "Seryum Vanadat (CeVO<sub>4</sub>) türevlerinin Paraoksanaz (PON1) enzimi üzerine invitro etkilerinin araştırılması" başlıklı çalışma ile kurulumuza yaptığı başvuru değerlendirilmiş ve anılan çalışmanın yürütülmesi için Etik kurulumuzca onay verilmesine karar verilmiştir.

SİİRT DEVLET HASTANESİ ETİK KURULU

BAŞVURU BİLGİLERİ	BAŞVURU TARİHİ	25.12.2015	
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI/ADI	Yard. Doç. Dr. M. Oğuzhan KAYA	
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	Siirt Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi	
	DESTEKLEYİCİ FİRMA	---	
DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	FAZİ	---	
	BELGE ADI	TARİHİ/DÖŞÜKLÜK NO.SU	DİLİ
	BAŞVURU FORMU		T
	PON1 ENZİMİ HAKKINDA GENEL BİLGİ		T
	İYİ KLİNİK UYGULAMALAR TAAHÜTNAMESİ		T
	DÜNYA TIP BİRLİĞİ HELSİNKİ BİLDİRGESİ		T
	ÇALIŞMANIN YAPILACAĞI MERKEZE DAİR BİLGİ		T
ARAŞTIRMACININ ÖZGEÇMİŞİ		T	
ÇALIŞMA ESASI	İYİ KLİNİK UYGULAMALAR KALVUZU		
	KARAR NO: 1	TARİH: 28.12.2015	
KARAR BİLGİLERİ	Siirt Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Öğretim Üyelerinden Yard. Doç. Dr. Mustafa Oğuzhan KAYA'nın Siirt ilinde faaliyet gösteren çeşitli sağlık kuruluşlarından alınacak atık kanlarda "Seryum Vanadat (CeVO <sub>4</sub> ) türevlerinin Paraoksanaz (PON1) enzimi üzerine invitro etkilerinin araştırılması" başlıklı çalışma ile kurulumuza yaptığı başvuru değerlendirilmiş ve anılan Bilimsel çalışmanın yapılması için izin verilmesine karar verilmiştir.		

## ETİK KURUL ÜYELERİ VE ONAYLARI

ÜNVANI / ADI-SOYADI / EK ÜYELİĞİ	UZMANLIK DALI	KURUMU	CİNSİYETİ	(ÜşK)	KATILIM	İMZA
UZM. DR. MUHSİN YALSIZ	BIYOKİMYA	SİİRT DEVLET HASTANESİ	E+ K	E H*	E** H	
UZM. DR. ÜMİT SİNAN ÖZDEMİR	BEYİN CERRAHİSİ	SİİRT DEVLET HASTANESİ	E+ K	E H*	E** H	
UZM. DR. ÇAĞDAŞ KAYNAK	KARDİYOLOJİ	SİİRT DEVLET HASTANESİ	E+ K	E H*	E** H	
UZM. DR. BARIŞ SARIPINAR	GENEL CERRAHİ	SİİRT DEVLET HASTANESİ	E+ K	E H*	E** H	
UZM. DR. ADEM YOLDAŞ	KADIN DOĞUM	SİİRT DEVLET HASTANESİ	E+ K	E H*	E** H	

Araştırma ile ilgili (E: evet H: hayır)

\* Toplamda bulunan (E: evet H: hayır)

Türkçe

İngilizce





## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

**Adı Soyadı** : Yasin ONAY  
**Doğum Yeri ve Tarihi** : SİİRT – 17.04.1979  
**Telefon** : 05065427605  
**E-posta** : kmygr79@hotmail.com

### EĞİTİM

<b>Derece</b>	<b>Adı, İlçe, İl</b>	<b>Bitirme Yılı</b>
Lise	: Siirt Lisesi – Merkez - SİİRT	1996
Üniversite	: Harran Üniv. – Merkez – ŞANLIURFA	2002
Yüksek Lisans	:	
Doktora	:	

### İŞ DENEYİMLERİ

<b>Yıl</b>	<b>Kurum</b>	<b>Görevi</b>
2001-2006	Sağlık Bakanlığı	Laborant
2006-2012	Sağlık Bakanlığı	Kimyager
2012-2015	Sağlık Bakanlığı	Şube Müd.
2015-	Sağlık Bakanlığı	İş Güv. Uzm.

**UZMANLIK ALANI** : A Sınıfı İş Güvenliği Uzmanlığı

**YABANCI DİLLER** : İngilizce

**BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER**

**YAYINLAR**