

**KABAK ÇEKİRDEĞİNDEN (*Cucurbitae peponis*  
*semen*) VE FINDIKTAN (*Corylus avellana*)  
PARAOKSONAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI  
VE BAZI PESTİSİTLERİN ETKİSİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Elife KAYA**

**Doktora Tezi  
Kimya Anabilim Dalı  
Prof. Dr. Nazan DEMİR  
2011  
Her hakkı saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

KABAK ÇEKİRDEĞİNDEN (*Cucurbitae peponis semen*) ve  
FINDIKTAN (*Corylus avellana*) PARAOKSONAZ ENZİMİNİN  
SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI PESTİSİTLERİN ETKİSİNİN  
ARAŞTIRILMASI

Elife KAYA

KİMYA ANABİLİM DALI

ERZURUM

2011

Her hakkı saklıdır



T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

Kabak çekirdeğinden (*Cucurbitae peponis semen*) ve fındıktan (*Corylus avellana*) paraoksonaz enziminin saflaştırılması ve bazı pestisitlerin etkisinin araştırılması

Prof.Dr. Nazan Demir danışmanlığında, Elife KAYA tarafından hazırlanan bu çalışma 18/08/2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak **oybirliği/oy çokluğu** (.....) ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof.Dr. Nazan DEMİR

İmza :

Üye : Prof.Dr. Münir OKTAY

İmza :

Üye : Prof.Dr. Yaşar DEMİR

İmza :

Üye : Doç.Dr. Çetin DOĞAR

İmza :

Üye : Yrd.Doç.Dr. Halis ŞAKİROĞLU

İmza :

(imza)

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum  
**Prof.Dr. Ömer AKBULUT**  
Enstitü Müdürü

**Not:** Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

## ÖZET

Doktora Tezi

### KABAK ÇEKİRDEĞİNDEN (*Cucurbitae peponis semen*) VE FINDIKTAN (*Corylus avellana*) PARAOKSONAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI PESTİSİTLERİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Elife KAYA

Atatürk Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nazan DEMİR

Paraoksonaz; HDL ile ilişkili, öncelikli olarak LDL'yi oksidasyondan koruma gibi fizyolojik role sahip organofosfat parçalayıcı bir enzimdir. Bu çalışmada kabak çekirdeğinden ve fındıktan paraoksonaz enzimi saflaştırıldı ve karakterize edildi. Paraoksonaz enziminin saflaştırılmasında afinite kromatografisinden faydalanıldı. Kabak çekirdeğinden ve fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enziminin saflığını kontrol etmek için SDS-PAGE elektroforezi uygulandı. Kabak çekirdeğinden saflaştırılan paraoksonaz enziminin molekül ağırlığı 12942 Da ve 20421 Da olarak belirlendi. Fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enziminin molekül ağırlığı ise 30892 Da olarak belirlendi. Enzimin optimum pH ve sıcaklık değerleri tespit edilerek paraokson ve fenilasetat substratları için  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri belirlendi. Kabak çekirdeği ile ilgili çalışmada, paraokson substratı için  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri 3,475 mM ve 2,935  $\mu\text{mol/ L.dak}$ ; fenil asetat substratı için 3,067 mM and 2,647  $\mu\text{mol/ L.dak}$  olarak hesaplandı. Fındık ile ilgili çalışmada, paraokson substratı için  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri 3,210 mM and 1,995  $\mu\text{mol/ L.dak}$ ; fenil asetat substratı için 2,732 mM and 2,413  $\mu\text{mol/ L.dak}$  olarak hesaplandı. Enzim aktivitesi üzerine  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  ve  $\text{Fe}^{3+}$  katyonlarının, EDTA, askorbik asit,  $\beta$ -merkaptolanol ve SDS bileşiklerinin, metil paratyon, dimetoat, diklorvos, diazinon, metamidofos, etil paratyon, fention ve asetamiprid pestisitlerinin etkisi araştırıldı.

**2011, 127 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Paraoksonaz, kabak çekirdeği, fındık, saflaştırma, karakterizasyon, pestisitler

## ABSTRACT

Ph.D. Thesis

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PARAOXONASE ENZYME FROM THE CUCURBITA SEEDS (*Cucurbitae peponis semen*) AND HAZELNUT (*Corylus avellana*) RESEARCH THE EFFECTS OF SOME PESTICIDES ON ENZYME ACTIVITY

Elife KAYA

Atatürk University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Nazan DEMİR

Paraoxonase is a high-density lipoprotein (HDL)-associated enzyme which can hydrolyze organophosphates and protect LDL against oxidation. In this study; the paraoxonase enzyme was purified and characterized from the cucurbita seeds and hazelnut. Affinity chromatography was used for purification of the paraoxonase. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis was applied for control of the paraoxonase enzyme purified from the cucurbita seeds and hazelnut. Molecular weight of the paraoxonase enzyme purified from cucurbitae seeds was determined as 12942 Da and 20421 Da. Molecular weight of the paraoxonase enzyme purified from hazelnut was determined as 30892 Da.  $K_m$  and  $V_{max}$  values for paraoxon and phenyl acetate substrates were determined after setting optimal pH and temperature conditions of paraoxonase enzyme. In the study with cucurbitae seeds,  $K_m$  and  $V_{max}$  values for paraoxon were calculated as 3,475mM and 2,935 $\mu$ mol/ L.dak; for phenyl acetate substrates were calculated as 3,067 mM and 2,647 $\mu$ mol/ L.dak. In the study with hazelnut,  $K_M$  and  $V_{max}$  values for paraoxon were calculated as 3,210 mM and 1,995  $\mu$ mol/ L.dak; for phenyl acetate substrates were calculated as 2,732 mM and 2,413 $\mu$ mol/ L.dak. Effects of  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  cations; EDTA, ascorbic acid,  $\beta$ -merkaptoethanol, SDS compounds and methyl-parathion, dichlorvos, dimethoate, diazinon, methamidophos, ethyl-parathion, fenthion and acetamiprid pesticides were researched on enzyme activity.

**2011, 127 pages**

**Keywords:** Paraoxonase, cucurbitae seeds, hazelnut, purification, characterization, pesticides

## TEŞEKKÜR

Doktora çalıőmamda en büyük paya sahip olan, çalıőmamın her aőamasında bilgi ve tecrübeleriyle bana her türlü olanağı sağlayan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Nazan DEMİR'e,

Doktora dönemi boyunca deneyimlerinden ve bilgilerinden yararlandığım Sayın Prof. Dr. Yaşar DEMİR'e,

Bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Sayın Doç. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU'na,

Laboratuvarda alıőtıđım grup arkadaőlarıma ve her zaman yanımda olan aileme, eőime ve oğluma sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Elife KAYA

Ağustos 2011

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xvi
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
1.1. Enzimler .....	1
1.2. Paraoksonaz enzimi .....	8
1.2.1. Paraoksonaz enzimi ve yapısı .....	8
1.3. Pestisitler.....	16
1.3.1. PON1 enzimi üzerine etkileri incelenen pestisitler ve özellikleri.....	17
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ .....</b>	<b>23</b>
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM.....</b>	<b>32</b>
3.1. Materyal .....	32
3.1.1. Kullanılan kimyasal madde ve malzemeler .....	32
3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar.....	32
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanmaları .....	33
3.2. Yöntem.....	38
3.2.1. Protein tayini .....	38
3.2.1.a. Kalitatif protein tayini.....	38
3.2.1.b. Coomassie brilliant blue yöntemi ile protein tayini.....	38
3.2.1.c. Paraoksonaz (PON1) aktivitesi.....	39
3.2.2. Kabak çekirdeğinden ( <i>Cucurbitae peponis semen</i> ) ve fındıktan ( <i>Corylus avellana</i> ) paraoksonaz enziminin saflaştırılması.....	39
3.2.2.a. Homejenatların hazırlanması .....	39
3.2.2.b. Afinite jelinin hazırlanması.....	39
3.2.2.c. Kolona homejenatın tatbiki.....	41

3.2.3. SDS poliakrilamid jel elektroforezi ile enzimin saflığının ve alt birimlerinin var olup olmadığının kontrolü.....	41
3.2.4. Kabak çekirdeğinden ( <i>Cucurbitae peponis semen</i> ) ve fındıktan ( <i>Corylus avellana</i> ) saflaştırılan paraoksonaz enzimi üzerinde kinetik çalışmalar.....	43
3.2.4.a. Optimum pH'ın belirlenmesi.....	43
3.2.4.b. Optimum sıcaklığın belirlenmesi.....	44
3.2.4.c. Jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığı tayini.....	44
3.2.4.d. $V_{max}$ ve $K_m$ değerlerinin belirlenmesi.....	45
3.2.4.e. Kabak çekirdeğinden ( <i>Cucurbitae peponis semen</i> ) ve fındıktan ( <i>Corylus avellana</i> ) saflaştırılan paraoksonaz enziminin substrat spesifikliğinin belirlenmesi.....	46
3.2.5. Kabak çekirdeğinden ( <i>Cucurbitae peponis semen</i> ) ve fındıktan ( <i>Corylus avellana</i> ) saflaştırılan paraoksonaz enzim aktivitesi üzerine bazı katyonların etkisinin belirlenmesi.....	47
3.2.6. Kabak çekirdeğinden ( <i>Cucurbitae peponis semen</i> ) ve fındıktan ( <i>Corylus avellana</i> ) saflaştırılan paraoksonaz enzim aktivitesi üzerine bazı bileşiklerin etkisinin belirlenmesi.....	47
3.2.7. Kabak çekirdeğinden ( <i>Cucurbitae peponis semen</i> ) ve fındıktan ( <i>Corylus avellana</i> ) saflaştırılan paraoksonaz enzim aktivitesi üzerine bazı pestisitlerin etkisinin belirlenmesi.....	48
3.2.8. Kabak çekirdeğinden ( <i>Cucurbitae peponis semen</i> ) ve fındıktan ( <i>Corylus avellana</i> ) saflaştırılan paraoksonaz enzim aktivitesi üzerine inhibitör etkisi gösteren metaller, bileşikler ve pestisitler için $I_{50}$ değerlerinin belirlenmesine ait çalışmalar.....	49
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</b>	<b>50</b>
4.1. Kantitatif protein tayini için hazırlanan standart grafik.....	50
4.2. Kabak çekirdeğinden ( <i>Cucurbitae peponis semen</i> ) paraoksonaz enzimi saflaştırılması sonuçları.....	51
4.2.1. Kabak çekirdeğinden paraoksonaz enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılması sonuçları.....	51
4.3. SDS poliakrilamid jel elektroforezi sonuçları.....	52



4.4. Kabak çekirdeğinden ( <i>Cucurbitae peponis semen</i> ) saflaştırılan paraoksonaz enzimi üzerine kinetik çalışmaların sonuçları .....	54
4.4.1. Paraoksonaz enziminin optimum pH sonuçları .....	54
4.4.2. Paraoksonaz enziminin optimum sıcaklık sonuçları .....	54
4.4.3. Jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığı tayini sonuçları .....	55
4.4.4. $V_{max}$ ve $K_m$ değerlerinin sonuçları.....	57
4.4.5. Kabak çekirdeğinden saflaştırılan paraoksonaz enziminin substrat spesifikliğinin sonuçları .....	58
4.5. Kabak çekirdeğinden saflaştırılan paraoksonaz enzim aktivitesi üzerine bazı katyonların etkisinin sonuçları .....	59
4.6. Kabak çekirdeğinden saflaştırılan paraoksonaz enzim aktivitesi üzerine bazı bileşiklerin etkisinin sonuçları .....	63
4.7. Kabak çekirdeğinden saflaştırılan paraoksonaz enzim aktivitesi üzerine bazı pestisitlerin etkisinin sonuçları .....	65
4.8. Kabak çekirdeğinden saflaştırılan paraoksonaz enziminin aktivitesi üzerine inhibitör etkisi gösteren bazı metaller, bileşikler ve pestisitler için $I_{50}$ değerlerinin belirlenmesine ait çalışmaların sonuçları .....	70
4.9. Fındık ( <i>Corylus avellana</i> ) paraoksonaz enzimi saflaştırılması sonuçları .....	79
4.9.1. Fındık paraoksonaz enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılması sonuçları .....	79
4.10. SDS poliakrilamid jel elektroforezi sonuçları.....	81
4.11.Fındıktan ( <i>Corylus avellana</i> ) saflaştırılan paraoksonaz enzimi üzerine kinetik çalışmaların sonuçları.....	83
4.11.1. Paraoksonaz enziminin optimum pH sonuçları .....	83
4.11.2. Paraoksonaz enziminin optimum sıcaklık sonuçları .....	83
4.11.3. Jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığı tayini sonuçları.....	84
4.11.4. $V_{max}$ ve $K_m$ değerlerinin sonuçları.....	86
4.11.5. Fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enziminin substrat spesifikliğinin sonuçları .....	87
4.12. Fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enzim aktivitesi üzerine bazı katyonların etkisinin sonuçları .....	88

4.13. Fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enzim aktivitesi üzerine bazı bileşiklerin etkisinin sonuçları .....	92
4.14. Fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enzim aktivitesi üzerine bazı pestisitlerin etkisinin sonuçları.....	94
4.15. Fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enziminin aktivitesi üzerine inhibitör etkisi gösteren bazı metaller, bileşikler ve pestisitler için I <sub>50</sub> değerlerinin belirlenmesine ait çalışmaların sonuçları.....	99
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....</b>	<b>109</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>120</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	

## SİMGELER DİZİNİ

Apo A1	Apolipoprotein A1
ARE	Arilesteraz
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Aspartik asit
CNBr	Siyanojen bromür
Cys	Sistein
Dak	Dakika
DTH	Ditihioerythreitol
E	Enzim
E.C.	Enzim kod numarası
EDTA	Etilendiamin tetraasetikasit
EPA	Enviromental Protection Agency
EP	Enzim-Ürün kompleksi
ES	Enzim-Substrat kompleksi
ESI	Enzim-Substrat-İnhibitör kompleksi
E.Ü.	Enzim ünitesi
g.	Gram
Glu	Glutamik asit
Gln	Glutamin
HDL	High density lipoprotein
I	İnhibitör
I <sub>50</sub>	Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
K <sub>m</sub>	Michaelis-Menten sabiti
LDL	Low density lipoprotein
Leu	Lösin
Lys	Lisin
mM	Milimolar
mL	Mililitre

$\mu\text{L}$	Mikrolitre
OP	Organofosfat
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PER	Amonyum persülfat
PON1	Paraoksonaz 1
PON2	Paraoksonaz 2
PON3	Paraoksonaz 3
RNA	Ribonükleik asit
S	Substrat
SDS	Sodyum dodesilsülfat
$V_{\text{max}}$	Maksimum hız
TCA	Triklor asetik asit
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin
Tris	Trihidroksimetil aminometan

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Anahtar Kilit Modeli .....	5
Şekil 1.2.	Paraoksonun kimyasal yapısı (O,O-dietil-O-p-nitrofenil fosfat) .....	8
Şekil 1.3.	PON1'in yapısı.....	9
Şekil 1.4.	Paraoksonaz enziminin üç boyutlu görünümü (Harel et al.2004).....	10
Şekil 1.5.	İnsektisitlerde yaygın olarak kullanılan okson metabolitlerinin hidrolizi ...	13
Şekil 1.6.	Sinir gazlarının hidrolizi .....	13
Şekil 1.7.	Aromatik esterlerin hidrolizi.....	13
Şekil 1.8.	Lakton hidrolizi.....	14
Şekil 1.9.	HDL partikülü ve paraoksonaz enzimi (Renault 2006) .....	15
Şekil 1.10.	Metil paratyon molekülünün yapısal formülü.....	18
Şekil 1.11.	Dimetoat molekülünün yapısal formülü .....	19
Şekil 1.12.	Diklorvos molekülünün yapısal formülü .....	19
Şekil 1.13.	Diazinon molekülünün yapısal formülü.....	20
Şekil 1.14.	Metamidofos molekülünün yapısal formülü.....	20
Şekil 1.15.	Etil paratyon molekülünün yapısal formülü .....	21
Şekil 1.16.	Fention molekülünün yapısal formülü .....	22
Şekil 1.17.	Asetamiprid molekülünün yapısal formülü.....	22
Şekil 2.1.	Kabak çekirdeği ( <i>Cucurbitae peponis semen</i> )'nin görünümü .....	28
Şekil 2.2.	Fındık ( <i>Corylus avellana</i> )'in görünümü .....	29
Şekil 4.1.	Standart sığır serum albumin çözeltisi kullanılarak coomassie brilliant blue yöntemi ile hazırlanan ve protein tayini için kullanılan standart grafik.....	50
Şekil 4.2.	Afinite kolonundan kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enziminin pH'ı 6,8 olan 0,1 M Tris-HCl/ 2mM CaCl <sub>2</sub> tamponuyla elüsyonu.....	51
Şekil 4.3.	Afinite kromatografisi ile kabak çekirdeğinden saflaştırılan paraoksonaz enziminin SDS-poliakrilamid jel elektroforez fotoğrafı .....	53
Şekil 4.4.	Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enzimi üzerine pH'ın etkisi .....	54
Şekil 4.5.	Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enzimi üzerine sıcaklığın etkisi ....	55

<b>Şekil 4.6.</b>	Jel filtrasyon kromatografisi standart grafiği (Ve: elüsyon hacmi Vo: kolonun boşluk hacmi).....	56
<b>Şekil 4.7.</b>	Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enziminin jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığı tayini için hazırlanan absorban grafığı.....	56
<b>Şekil 4.8.</b>	Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enziminin paraokson substratıyla elde edilen Linewear-Burk grafiği .....	57
<b>Şekil 4.9.</b>	Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enziminin fenilasetat substratına karşı substrat spetikliği grafiği.....	58
<b>Şekil 4.10.</b>	Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine Mg <sup>2+</sup> ,nin etkisi .....	59
<b>Şekil 4.11.</b>	Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine Ca <sup>2+</sup> ,nin etkisi .....	60
<b>Şekil 4.12.</b>	Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine Cu <sup>2+</sup> ,nin etkisi .....	60
<b>Şekil 4.13.</b>	Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine Mn <sup>2+</sup> ,nin etkisi .....	61
<b>Şekil 4.14.</b>	Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine Zn <sup>2+</sup> ,nin etkisi .....	61
<b>Şekil 4.15.</b>	Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine Fe <sup>3+</sup> ,ün etkisi .....	62
<b>Şekil 4.16.</b>	Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine Fe <sup>2+</sup> ,nin etkisi .....	62
<b>Şekil 4.17.</b>	Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine EDTA'nın etkisi .....	63
<b>Şekil 4.18.</b>	Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine askorbik asit'in etkisi .....	64
<b>Şekil 4.19.</b>	Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine β-merkaptolanol'ün etkisi .....	64
<b>Şekil 4.20.</b>	Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine SDS'nin etkisi .....	65

<b>Şekil 4.21.</b> Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine metil paratyon'un etkisi .....	66
<b>Şekil 4.22.</b> Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine diklorvos'un etkisi .....	66
<b>Şekil 4.23.</b> Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine dimetoat'ın etkisi .....	67
<b>Şekil 4.24.</b> Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine diazinon'un etkisi.....	67
<b>Şekil 4.25.</b> Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine metamidofos'un etkisi.....	68
<b>Şekil 4.26.</b> Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine etil paratyon'un etkisi .....	68
<b>Şekil 4.27.</b> Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine fention'un etkisi .....	69
<b>Şekil 4.28.</b> Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine asetamiprid'in etkisi.....	69
<b>Şekil 4.29.</b> Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enzimi üzerine $Mg^{2+}$ 'nin etkisi.....	70
<b>Şekil 4.30.</b> Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enzimi üzerine $Cu^{2+}$ 'nin etkisi.....	71
<b>Şekil 4.31.</b> Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enzimi üzerine $Mn^{2+}$ 'nin etkisi.....	71
<b>Şekil 4.32.</b> Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enzimi üzerine $Fe^{3+}$ 'ün etkisi .....	72
<b>Şekil 4.33.</b> Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enzimi üzerine EDTA'nın etkisi.....	72
<b>Şekil 4.34.</b> Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enzimi üzerine askorbik asit'in etkisi.....	73
<b>Şekil 4.35.</b> Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enzimi üzerine üzerine $\beta$ -merkaptotanol'ün etkisi.....	73
<b>Şekil 4.36.</b> Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enzimi üzerine SDS'nin etkisi.....	74
<b>Şekil 4.37.</b> Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enzimi üzerine metil paratyon'un etkisi .....	74
<b>Şekil 4.38.</b> Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enzimi üzerine diklorvos'un etkisi.....	75

<b>Şekil 4.39.</b> Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enzimi üzerine dimetoat'ın etkisi.....	75
<b>Şekil 4.40.</b> Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enzimi üzerine diazinon'un etkisi.....	76
<b>Şekil 4.41.</b> Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enzimi üzerine metamidofos'un etkisi.....	76
<b>Şekil 4.42.</b> Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enzimi üzerine etil paratiyon'un etkisi .....	77
<b>Şekil 4.43.</b> Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enzimi üzerine fention'un etkisi .....	77
<b>Şekil 4.44.</b> Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enzimi üzerine asetamiprid'in etkisi .....	78
<b>Şekil 4.45.</b> Afinite kolonundan fındıktan saflaştırılan PON enziminin pH'ı 6,8 olan 0,1 M Tris-HCl/ 2 mM CaCl <sub>2</sub> tamponuyla elüsyonu .....	80
<b>Şekil 4.46.</b> Afinite kromatografisi ile fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enziminin SDS-poliakrilamid jel elektroforez fotoğrafı .....	82
<b>Şekil 4.47.</b> Fındıktan saflaştırılan PON enzimi üzerine pH'ın etkisi.....	83
<b>Şekil 4.48.</b> Fındıktan saflaştırılan PON enzimi üzerine sıcaklığın etkisi.....	84
<b>Şekil 4.49.</b> Jel filtrasyon kromatografisi standart grafiği (Ve: elüsyon hacmi Vo: kolonun boşluk hacmi).....	85
<b>Şekil 4.50.</b> Fındıktan saflaştırılan PON enziminin jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığı tayini için hazırlanan absorbans grafiği.....	85
<b>Şekil 4.51.</b> Fındıktan saflaştırılan PON enziminin paraokson substratıyla elde edilen Linewear-Burk grafiği.....	86
<b>Şekil 4.52.</b> Fındıktan saflaştırılan PON enziminin fenilasetat substratına karşı substrat spetikliği grafiği .....	87
<b>Şekil 4.53.</b> Fındıktan saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine Mg <sup>2+</sup> 'nin etkisi..	88
<b>Şekil 4.54.</b> Fındıktan saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine Ca <sup>2+</sup> 'nin etkisi....	89
<b>Şekil 4.55.</b> Fındıktan saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine Cu <sup>2+</sup> 'nin etkisi....	89
<b>Şekil 4.56.</b> Fındıktan saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine Mn <sup>2+</sup> 'nin etkisi... 90	90
<b>Şekil 4.57.</b> Fındıktan saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine Zn <sup>2+</sup> 'nin etkisi....	90
<b>Şekil 4.58.</b> Fındıktan saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine Fe <sup>3+</sup> 'ün etkisi ....	91



<b>Şekil 4.59.</b> Fındıktan saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine $Fe^{2+}$ 'nin etkisi ...	91
<b>Şekil 4.60.</b> Fındıktan saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine EDTA'nın etkisi.....	92
<b>Şekil 4.61.</b> Fındıktan saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine askorbik asit'in etkisi .....	93
<b>Şekil 4.62.</b> Fındıktan saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine $\beta$ -merkaptolanol'ün etkisi .....	93
<b>Şekil 4.63.</b> Fındıktan saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine SDS'nin etkisi....	94
<b>Şekil 4.64.</b> Fındıktan saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine metil paratyon'un etkisi .....	95
<b>Şekil 4.65.</b> Fındıktan saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine diklorvos'un etkisi... ..	95
<b>Şekil 4.66.</b> Fındıktan saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine dimetoat'ın etkisi .....	96
<b>Şekil 4.67.</b> Fındıktan saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine diazinon'un etkisi.....	96
<b>Şekil 4.68.</b> Fındıktan saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine metamidofos'un etkisi.....	97
<b>Şekil 4.69.</b> Fındıktan saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine etil paratyon'un etkisi .....	97
<b>Şekil 4.70.</b> Fındıktan saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine fention'un etkisi .....	98
<b>Şekil 4.71.</b> Fındıktan saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine asetamiprid'in etkisi.....	98
<b>Şekil 4.72.</b> Fındıktan saflaştırılan PON enzimi üzerine $Mg^{2+}$ 'nin etkisi .....	99
<b>Şekil 4.73.</b> Fındıktan saflaştırılan PON enzimi üzerine $Cu^{2+}$ 'nin etkisi. ....	100
<b>Şekil 4.74.</b> Fındıktan saflaştırılan PON enzimi üzerine $Mn^{2+}$ 'nin etkisi .....	100
<b>Şekil 4.75.</b> Fındıktan saflaştırılan PON enzimi üzerine $Zn^{2+}$ 'nin etkisi.....	101
<b>Şekil 4.76.</b> Fındıktan saflaştırılan PON enzimi üzerine EDTA'nın etkisi.....	101
<b>Şekil 4.77.</b> Fındıktan saflaştırılan PON enzimi üzerine askorbik asit'in etkisi.....	102
<b>Şekil 4.78.</b> Fındıktan saflaştırılan PON enzimi üzerine $\beta$ -merkaptolanol'ün etkisi .....	102

<b>Şekil 4.79.</b> Fındıktan saflaştırılan PON enzimi üzerine SDS'nin etkisi .....	103
<b>Şekil 4.80.</b> Fındıktan saflaştırılan PON enzimi üzerine metil paratyon'un etkisi.....	103
<b>Şekil 4.81.</b> Fındıktan saflaştırılan PON enzimi üzerine diklorvos'un etkisi.....	104
<b>Şekil 4.82.</b> Fındıktan saflaştırılan PON enzimi üzerine dimetoat'ın etkisi.....	104
<b>Şekil 4.83.</b> Fındıktan saflaştırılan PON enzimi üzerine diazinon'un etkisi .....	105
<b>Şekil 4.84.</b> Fındıktan saflaştırılan PON enzimi üzerine metamidofos'un etkisi .....	105
<b>Şekil 4.85.</b> Fındıktan saflaştırılan PON enzimi üzerine etil paratyon'un etkisi.....	106
<b>Şekil 4.86.</b> Fındıktan saflaştırılan PON enzimi üzerine fention'un etkisi.....	106
<b>Şekil 4.87.</b> Fındıktan saflaştırılan PON enzimi üzerine asetamiprid'in etkisi .....	107

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 2.1.</b> Kabak çekirdeğinin mineral içerikleri (mg/100g) .....	29
<b>Çizelge 2.2.</b> Fındığın mineral içerikleri (mg/100g) .....	30
<b>Çizelge 4.1.</b> Kabak çekirdeğinden paraoksonaz enziminin saflaştırma basamakları .....	52
<b>Çizelge 4.2.</b> Kabak çekirdeğinden saflaştırılan paraoksonaz enzimi için metallere ait I <sub>50</sub> değerleri .....	78
<b>Çizelge 4.3.</b> Kabak çekirdeğinden saflaştırılan paraoksonaz enzimi için bileşiklere ait I <sub>50</sub> değerleri.....	78
<b>Çizelge 4.4.</b> Kabak çekirdeğinden saflaştırılan paraoksonaz enzimi için pestisitlere ait I <sub>50</sub> değerleri.....	79
<b>Çizelge 4.5.</b> Fındıktan paraoksonaz enziminin saflaştırma basamakları .....	81
<b>Çizelge 4.6.</b> Fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enzimi için metallere ait I <sub>50</sub> değerleri .....	107
<b>Çizelge 4.7.</b> Fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enzimi için bileşiklere ait I <sub>50</sub> değerleri .....	107
<b>Çizelge 4.8.</b> Fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enzimi için pestisitlere ait I <sub>50</sub> değerleri .....	108

## 1. GİRİŞ

### 1.1. Enzimler

Enzimler canlı organizmadaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürün oluşturmamasına fırsat vermeden %100'lük bir ürün verimi sağlayan, protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir (Smitt *et al.* 1997; Garrett and Grisham 1999).

Bu katalizörlerin en önemli özellikleri, katalizleme güçleri ve spesifiklikleridir. Enerji açısından mümkün kullanışlı yollara kanalizasyon eder. Böylece enzimler bütün metabolik olayları yönlendirirler (Gözükara 1997).

Enzim araştırmaları biyokimya tarihinin büyük bir kısmını oluşturmaktadır. Biyolojik kataliz ilk olarak, 1700'lü yılların sonlarında, mide salgılarıyla etin sindirilmesi üzerine yapılan araştırmalar neticesinde keşfedildi ve tanımlandı. Sonraki çalışmalar, 1800'lü yıllarda tükürük ve çeşitli bitki özütleriyle, nişastanın şekere dönüşümü araştırmalarıyla devam ettirildi. 1850'lerde Louis Pasteur, şekerin mayayla alkole fermentleşmesinde, şekerin fermentler tarafından katalizlendiği sonucuna vardı. Pasteur, bu fermentlerin, canlı maya hücrelerinin yapılarından ayrılamaz olduğunu ileri sürdü. Daha sonra 1897'de Eduard Buchner, maya özütlerinin şekeri alkole fermentlediğini, bunun da fermentasyonun hücreden uzaklaştırıldığında, işlevini devam eden moleküller tarafından sağlandığını keşfetti. Frederic W. Kühne ise bu molekülleri, enzimler olarak adlandırdı. 1926'da James Sumner'ın üreaz enzimini saf kristal halde izole etmesiyle enzim çalışmalarını hız kazanmıştır. Daha sonra yeni enzimlerin izolasyonu ve özelliklerinin araştırılması biyokimya bilimini geliştirdi (Lehninger 2005; Gürdöl ve Ademoğlu 2010).

Katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu hariç bütün enzimler protein yapısındadır. Katalitik aktiviteleri, doğal protein konformasyonunun sağlamlığına bağlıdır. Eğer enzim denatüre olursa veya alt birimlerine ayrılırsa katalitik aktivitesi genellikle kaybolur. Enzim, bileşeni olan amino asitlerine dönüştürülürse, katalitik aktivitesi yok olur. Bu nedenle protein enzimlerinin, birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapısı katalitik aktivite için esastır (Lehninger 2005). Enzim katalizörlüğünde gerçekleşen reaksiyonlarda reaksiyon hızı enzimsiz olan reaksiyona göre yaklaşık  $10^8$ - $10^{20}$  kat hızlanabilir. Katalizsiz olarak yarılanma zamanı 300 yıl olan bir reaksiyon, enzim tarafından  $10^{10}$  kat hızlandırılırsa yarılanma zamanı sadece 1 s olur. Sonuç olarak hücredeki birçok reaksiyonun ancak enzimler sayesinde mümkün olacağı söylenebilir (Lehninger 1982).

Katalitik aktivite gösterebilmeleri için bazı enzimlerin protein yapısında olmaları yeterli olmaktadır. Ancak bazı enzimler aktivite gösterebilmek için kofaktör olarak bilinen ve protein yapısında olmayan moleküllere gereksinim duymaktadırlar. Kofaktör bir metal iyonu ( $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  vd.) veya koenzim olarak adlandırılan bir organik molekül ( $NAD^+$ , FAD, koenzim A) olabilir. Enzimlerin bir kısmı aktivite gösterebilmek için koenzime ve metal iyonuna birlikte ihtiyaç duymaktadır. Proteinlerin denatürasyonuna neden olan koşullardan koenzimler etkilenmemektedirler (Voet and Voet 1995). Enzimler kimyasal bakımdan protein ana yapısındaki moleküllerdir. Enzimin sadece proteinden oluşmuş ve kofaktörleri içermeyen inaktif kısmına apoenzim, tüm kofaktörleri ve koenzimleri içeren katalitik aktif haline ise haloenzim denir (Yıldırım vd 2010). Enzimlerin aktivitelerini pozitif yönde etkileyen bileşiklere aktivatör adı verilir. Genellikle enzim aktivatörleri küçük iyonlar veya fazla büyük olmayan moleküllerdir. Bunlar kofaktörlerin aksine kataliz olayına her zaman katılmazlar (Gözükara 1989).

Enzimlerin en önemli özelliklerinden birisi de katalizledikleri reaksiyon tiplerine ve ürüne dönüştürdükleri substratlara karşı son derece spesifik olmalarıdır. Bundan dolayı enzimler hücre içi reaksiyonlarda hiçbir yan ürün oluşturmaksızın etkilerini gösterirler. Hücre içi reaksiyonlar enzimler sayesinde birkaç saniye gibi kısa bir süre içerisinde gerçekleşmektedir. Birim zamanda bir mol enzimin ürüne dönüştürdüğü substratın mol

sayısına turnover sayısı denir. Turnover sayısı enzimlerin katalizleme güçlerini gösteren bir ifadedir. Enzimlerin miktarı, aktiviteleri esas alınarak belirlenir ve enzim ünitesi (E.Ü) cinsinden verilir. Geniş bir enzim ünitesi tarifi olmamasına rağmen genelde, 25°C'de ve optimal şartlarda 1 mikromol substratı 1 dakikada ürüne dönüştüren enzim miktarı, 1 enzim ünitesi olarak kabul edilmiştir. Spesifik aktivite, 1 mg protein başına düşen enzim ünitesi olarak tanımlanır ve bu da enzimin saflığının bir ölçüsüdür (Lehninger 1982; Bingöl 1983).

Enzimler sınıflandırılırken hem reaksiyon özgülüklerini, hem de substrat özgülüklerini dikkate alan bir sınıflandırma geliştirilmiştir (Koolman and Röhm 2003).

Tüm enzimler katalizledikleri reaksiyon tipine göre altı ana sınıfa ayrılmış ve bu sınıflarda yer alan her enzim 4 rakamdan oluşan bir enzim kod numarası (EC) ile ifade edilmiştir. EC numarasının ilk rakamı enzimin altı ana sınıftan hangisinde yer aldığını, ikinci rakam etki ettiği kimyasala yapı ve fonksiyonel grubu, üçüncü rakam alıcı grubu ve dördüncü rakam ise o serideki sıra numarasını ifade eder (Yıldırım vd 2010).

Enzimler 6 ana grupta sınıflandırılır.

**1.Oksidoredüktazlar:** İndirgenme ve yükseltgenme (redoks) tepkimelerini katalizleyen enzimlerdir. Bu grup önceden dehidrogenazlar, oksidazlar, redüktazlar, oksijenazlar, peroksidazlar olarakta anılan enzimlerdir.

**2.Transferazlar:** İki substrat arasında hidrojen dışındaki grupların transferini gerçekleştiren enzimlerdir. Fosforil grubu transferini sağlayan kinaz enzimleri bu gruptandır.

**3.Hidrolazlar:** Ester, eter, peptid, glikozit, anhidrit, C-halojenür veya P-N bağlarının bir su molekülünün katılması suretiyle bağların parçalandığı hidroliz reaksiyonlarını katalize eden enzimlerdir. Bütün proteolitik enzimler ve lipaz, esteraz, fosfataz,

glikozidaz ve nükleaz gibi enzimler bu gruba dahildir.

**4.Liyazlar:** Oksidasyon veya hidrolizden farklı bir mekanizma ile substratlardan bazı grupların uzaklaştırıldığı ve çift bağların oluşturulduğu tepkimeleri katalizleyen enzimlerdir. Hidratasyon ve dehidratasyon reaksiyonlarını katalizleyen enzimler bu gruptandır.

**5.İzomerazlar:** Geometrik, optik veya yapısal izomerlerin birbirine dönüştürülmesini katalizleyen enzimlerdir. Molekül içinde oksidasyon-redüksiyonu, grup transferini ve çifte bağ oluşumunu gerçekleştirirler. Mutaz, rasemaz ve epimeraz özel adlarıyla anılan enzimler bu gruptandır.

**6.Ligazlar:** ATP'nin hidrolizi yardımıyla açığa çıkan enerjiden yararlanarak iki molekülü bağlayıp sentez yapan enzimlerdir (Yıldırım vd 2010).

Mesela çalışmamızda yer alan paraoksonaz enzimine uluslar arası enzim komisyonu tarafından E.C. 3.1.8.1 kod numarası verilmiştir. Bu kod numarası aşağıdaki gibi açıklanabilir,

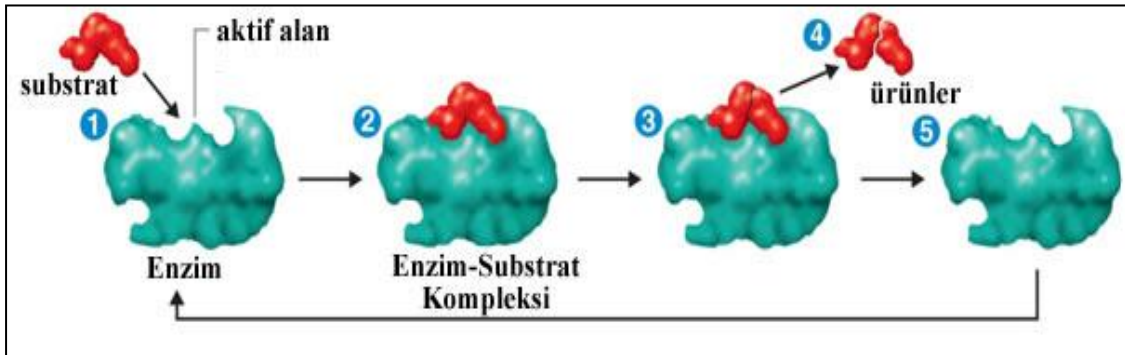
- hidrolaz sınıfı (3),
- ester bağlarına etki eden (3.1),
- fosforik triesterleri hidroliz eden (3.1.8),
- bir arildialkil fosfatazdır (3.1.8.1).

Canlı sistemlerdeki reaksiyonlarda enzimatik kataliz şarttır. Biyolojik olarak uygun koşullarda katalizlenmeyen tepkimeler, yavaş gerçekleşme eğilimindedirler. Çoğunlukla biyolojik moleküller, nötral pH, orta derecede sıcaklık ve hücre içi sıvı ortamında çok kararlıdır. Ayrıca biyokimyasal birçok tepkime, reaksiyon için gerekli olan iki veya daha fazla molekülün çarpışması ya da kararlı olmayan yüklü aracılardan geçici oluşumu

gibi hücre ortamında olanaksız veya tercih edilmeyen kimyasal olayları gerektirirler (Lehninger 2005).

Enzimle katalizlenen bir tepkimenin ayırıcı özelliği; aktif bölge olarak adlandırılan enzim üzerindeki sınırlandırılmış özel bir cep ya da bir bölgenin içinde meydana gelmesidir. Aktif bölgeye bağlanan ve enzimin üzerinde aktivite gösterdiği molekül, substrat olarak adlandırılır. Aktif bölge yüzeyi, yan grupları substrata bağlanan ve bunun kimyasal transformasyonunu katalizleyen amino asit kalıntılarıyla oluşturulmuştur (Lehninger 2005).

ilk olarak 1880’de Adolphe Wurtz tarafından varlığı gösterilmiş olan enzim-substrat kompleksi; enzim aktivitesinde merkezi bir rol oynar. E-S kompleksi, aynı zamanda enzim mekanizmalarının teorik tanımlanması ve enzimle katalizlenen tepkimelerin kinetik davranışını açıklayan matematiksel işlemler için başlama noktasıdır (Lehninger 2005).



**Şekil 1.1.** Anahtar Kilit Modeli

Kinetikler, enzim mekanizmalarının çalışması için önemli bir yöntemdir. Birçok enzim ortak bazı kinetik özelliklere sahiptir. Substrat değişimi artarken sabit değişimdeki bir enzimin katalitik aktivitesi, ES kompleksi oluşturan bütün enzimlerde esansiyel olan karakteristik maksimum hız olan  $V_{max}$ 'a yaklaşmak için hiperbolik bir biçimde artar.



Yarı hız  $V_{max}$ 'ı veren substrat değişimi bir substratı etkileyen her bir enzim için karakteristik olan Michaelis Menten sabiti  $K_m$ 'dir. Michaelis Menten eşitliği şudur:

$$V = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

Bu eşitlik, bir enzimatik tepkimenin ilk hızının substrat değişimi ve  $K_m$  (enzimin substrata ilgisini gösteren sabit) sabiti üzerinden  $V_{max}$  ile ilişkili olduğunu anlatır.  $K_m$  ve  $V_{max}$ 'ın her biri ölçülebilir. Bu sabitler farklı enzimler için farklı anlamlara sahiptir (Lehninger 2005).

Enzimatik reaksiyonların hızı yani aktivitesi ise; pH, sıcaklık, enzim ve substrat konsantrasyonu, iyonik şiddet, inhibitör ve aktivatörlerin varlığı gibi pek çok faktörlerden etkilenmektedir (Yıldırım vd 2010). Enzimatik reaksiyonların hızını azaltan veya enzimlerin kataliz görevlerini yerine getirmelerinin tamamen engelleyen maddelere inhibitör denir. Enzimlere bağlanabildikleri halde, substrat gibi hareket etmeyen ve ürün oluşturmayan bu maddeler, enzimin katalitik görevini yerine getirmesini engeller. Bu olaya da inhibisyon denir (Gürdöl ve Ademoğlu 2010). Enzimatik aktivitenin inhibisyonu biyolojik sistemlerde başlı başına bir kontrol mekanizmasını oluşturur. Birçok ilaçlar ve zehirli bileşikler fonksiyonlarını bu yolla gerçekleştirirler. İnhibisyon olayından aynı zamanda enzim etki mekanizmalarının incelenmesinde de faydalanılır.

Enzimatik inhibisyon dönüşümlü ve dönüşümsüz olmak üzere iki şekilde sınıflandırılır. Dönüşümsüz inhibisyonda, inhibitör enzime ya kovalent olarak bağlanır veya zor ayrışabilen bir kompleks oluşturur. Dönüşümsüz inhibisyonda  $V_{max}$  (enzimatik reaksiyonda ulaşılacak maksimum hız) azalır,  $K_m$  (enzimin substrata ilgisini gösteren sabit) değişmeden kalır.

Dönüşümlü inhibisyonda ise enzim-inhibitör kompleksi hızla ayrışabilir özellikle bir denge hali söz konusudur. Dönüşümlü inhibisyon; yarışmalı (kompetitif), yarışmasız

(nonkompetitif), yarı yarışmalı (unkompetitif) ve lineer karışık tip (mixed) inhibisyon olmak üzere dört kısma ayrılır.

Yarışmalı inhibitör, yapı itibariyle substrata benzer ve enzim aktif bölgesine bağlanır. Böylece enzimin substrata bağlanması engellenmiş olur. Fakat substrat konsantrasyonunu artırmakla inhibisyon etkisi kaldırılabilir. Yani enzimin  $V_{max}$  değeri değişmezken  $K_m$  değeri artar.

Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyonda, inhibitör ve substrat enzim molekülüne aynı anda bağlanabilir. Bu durum bağlanmanın enzimin aynı bölgesine olmadığını gösterir. Yarışmasız bir inhibitör, etkisini; bir enzimin turnover sayısını, yani katalitik aktivitesini düşürerek gösterir. Burada substrat ve inhibitör arasında yarışma söz konusu değildir. Substrat konsantrasyonunu arttırmakla inhibisyon ortadan kaldırılamaz. Enzimin  $V_{max}$  değeri azalırken  $K_m$  sabit kalır. Substrat ve inhibitör, farklı bölgelere bağlanabildiğinden enzimin iki çeşit inaktif kompleksi meydana gelir.

Yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyon çeşidinde ise inhibitör serbest enzime bağlanamaz. Sadece (ES) kompleksine bağlanır. Tek substratlı sistemlerde yarı yarışmalı inhibisyona nadir rastlanır. Daha çok birden fazla substratlı enzimler için geçerlidir. Enzim-substrat-inhibitör (ESI) kompleksi ortamda bulunacağından yarı yarışmalı inhibitörün varlığında  $V_{max}$  azalır. ESI kompleksinin oluşumunun vasıtasıyla ESI kompleksi ortamdan sürekli çekildiğinden enzim substratta ES kompleksinin oluşum dengesini daha fazla sağa kaydırır ve  $K_m$  değeri küçülür.

Lineer karışık tip inhibisyon yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyonunun özel bir türü olup dönüşümlü inhibisyon sınıfına girer. Bu tür inhibisyonda enzim, substrat ve inhibitörün bağlanma denge sabitleri farklılaşmaktadır. Birçok multienzim sistemi net reaksiyon hızlarını kendileri düzenleme kapasitesine sahiptir. Bu sistemlerin çoğunda seri reaksiyonların son ürünü belirli bir konsantrasyona eriştiğinde sistemin ilk enzimini veya dallanma noktasındaki enzimi inhibe eder. Bu enzimlere “allosterik enzimler” denir ve bu olaya da “feed-back” inhibisyonu adı verilir. Birden fazla polipeptit zinciri

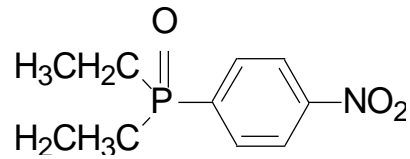
ihtiva eden allosterik enzimlerde inhibitörlerin enzime bağlanmasıyla değişik alt birimlerin bağlanma merkezleri arasındaki etkileşimlerle allosterik inhibisyon olayı meydana gelir. Allosterik enzimleri etkileyen bileşiklere “modülâtör” denir (Lehninger *et al.* 2005).

## 1.2. Paraoksonaz enzimi

### 1.2.1. Paraoksonaz enzimi ve yapısı

Biyokimya ve Moleküler Biyolojinin Uluslararası Nomenklatür Komitesi'nin (IUBMB) enzim isimlendirmesinde paraoksanaz iki numaraya (EC 3.1.1.2 ve EC 3.1.8.1.) sahiptir. 1990'lı yıllardan sonra, paraoksonazın arilesterazdan farklı olarak yalnız fenolik esterleri değil, fosforik ve fosfinik asit esterlerini de hidroliz ettiği anlaşılmış ve EC 3.1.8.1 ile tanımlanmıştır (Erdem 2004).

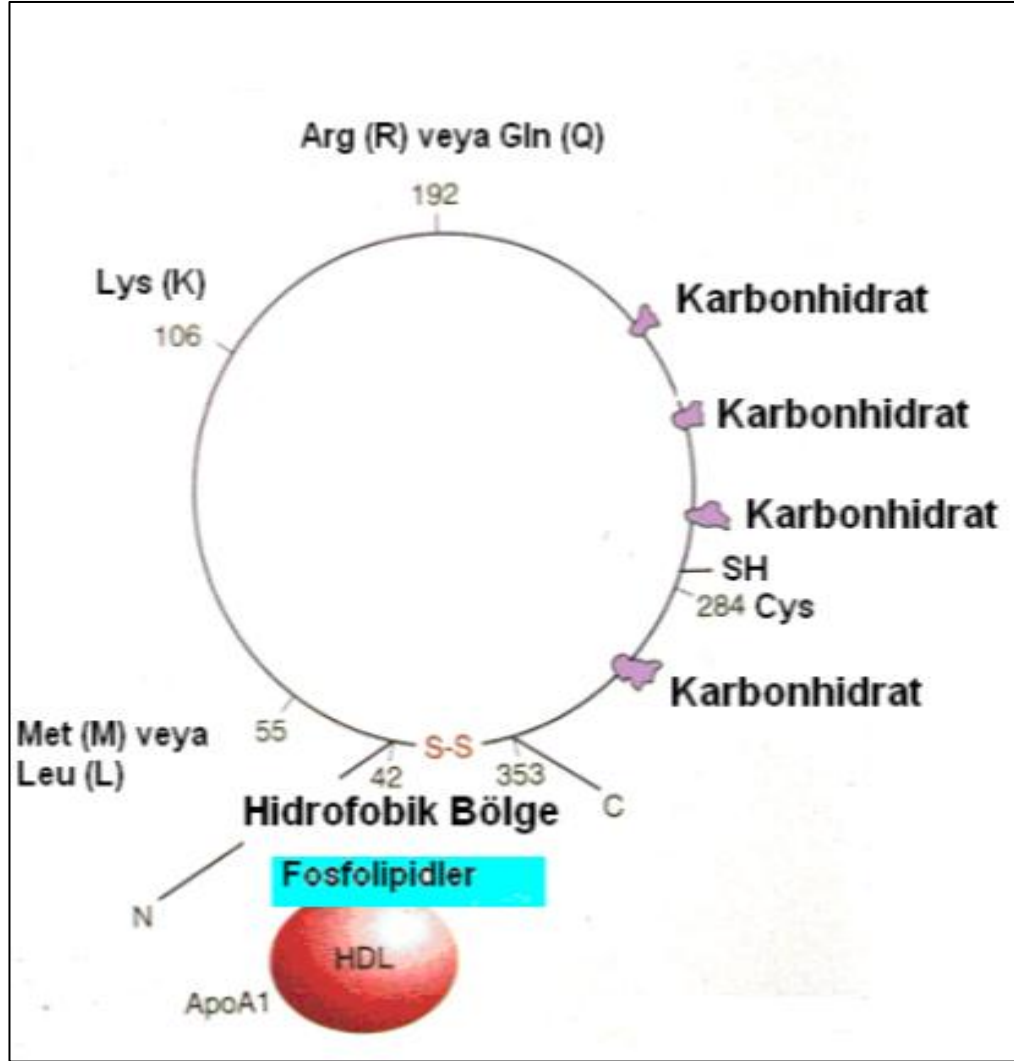
Paraoksonaz enziminin, A grubu Arildialkilfosfataz sınıfı bir ester hidrolaz enzimi olması nedeniyle sistematik adı arildialkilfosfatazdır. A esteraz grubunda yer alan paraoksonaz enzimi, aktivitesinin ölçümünde ilk olarak paraokson substratı kullanıldığı için paraoksonaz adını almıştır (Mackness 1998b).



**Şekil 1.2.** Paraoksonun kimyasal yapısı (O,O-dietil-O-p-nitrofenil fosfat)

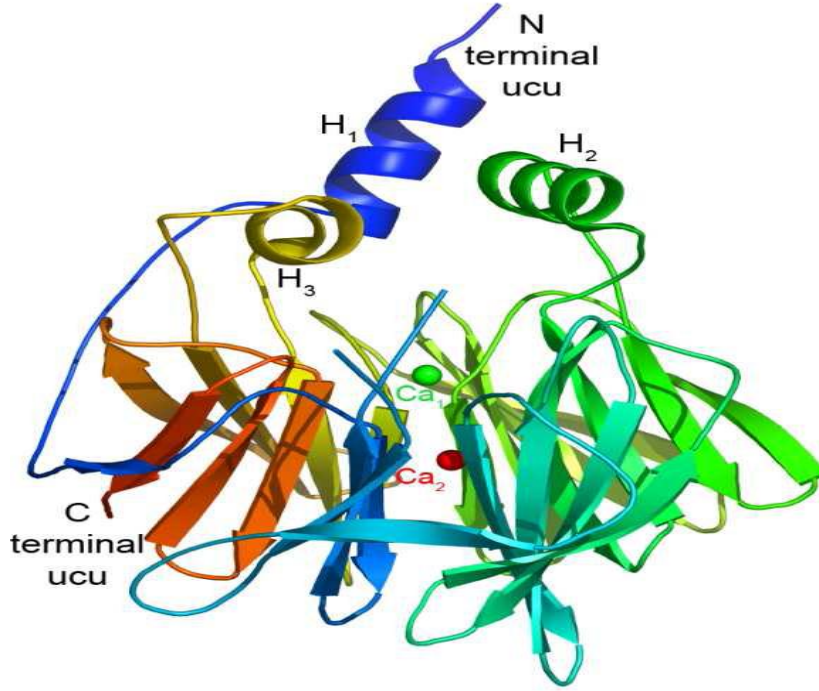
Her molekül toplam ağırlığın %15,8'ini oluşturan üç karbonhidrat zinciri içermektedir (Gan *et al.* 1991; Holuoet *et al.* 1995). PON ailesinin hidrolitik aktivitesi için glikolizasyon önemli değildir (Aharoni 2004; Josse *et al.* 1999). Ancak enzimin yapısında bulunan bu karbonhidrat molekülleri spesifik olmayan hücre membranlarına

bağlanmada veya kararlılığı ve çözünürlüğü arttırmada etkili olabilir (Jonas 2000; Sinan 2005; Harel *et al.* 2004).



**Şekil 1.3.** PON1'in yapısı

Paraoksonaz, aktivitesi ve kararlılığı için  $\text{Ca}^{2+}$  iyonuna bağımlı 43-45 kDa molekül ağırlığına sahip bir enzimdir. İzoelektrik noktası 5.1'dir. 354 amino asit içeren serum PON1 enziminin amino asit bileşimi yüksek lösin içeriği dışında bir özellik göstermez (Gan *et al.* 1991). Yapısında yer alan 3 sistein rezidüsünden 284'deki serbest iken 42. ve 353. sistein rezidüleri arasında tek disülfid bağı bulunur (Şekil 1.3).



**Şekil 1.4.** Paraoksonaz enziminin üç boyutlu görünümü (Harel *et al.* 2004).

Enzimin üç boyutlu yapısında  $\beta$ -kırmalı tabakaların merkezinde birbirlerine  $7,4 \text{ \AA}$  uzaklıkta 2 tane  $\text{Ca}^{2+}$  iyonu bulunmaktadır. Farklı afiniteye sahip olan bu kalsiyum iyonlarından birisi ( $\text{Ca}_1$ ) üstte, diğeri ( $\text{Ca}_2$ ) ise merkezde bulunmaktadır.  $\text{Ca}_1$  yapısal özellikli olup yapıdan uzaklaştırılması dönüşümsüz denatürasyona neden olmaktadır (Kuo *et al.* 1998).

Katalitik etkinlikte rol oynayan diğeri ( $\text{Ca}_2$ ) kalsiyum iyonu ise  $2,2\text{-}2,5 \text{ \AA}$  uzaklığında bulunan 5 adet amino asit rezidüsü (Asn224, Asn270, Asn168, Asp269, Glu53) bir su molekülü ve fosfat iyonunun oksijeniyle etkileşim halindedir.

PON1 enzimi, pervane şeklinde yerleşmiş ve her biri 4 sıradan oluşan 6 adet  $\beta$ -kırmalı tabakadan meydana gelmiştir. Enzim, amino terminaline yakın 6D tabakasında bulunan Cys42 kalıntısı ile 6C tabakasında bulunan Cys353 kalıntısı arasında disülfid bağıyla bağlanarak üç boyutlu yapısını kazanmaktadır (Jawad *et al.* 2002).

PON üzerinde 4 tane potansiyel N-glikozillenme bölgesi vardır. iki tanesi (Asn227 ve Asn270)  $\beta$ -tabakaların merkezinde, diğer ikisi yüzeye bakan bölgede (Asn253 ve Asn324) yer almaktadır. PON1 memeli hücrelerinde sentezlendikten sonra bu noktalardan glikozillenir (Harel *et al.* 2004).

Son birkaç yıl içerisinde, memelilerde PON gen ailesinin PON1, PON2 ve PON3 olmak üzere 3 üyesi olduğu belirlenmiştir (Primo-Parmo 1996; La Du 1999). PON1 ve PON3 karaciğerden sentezlenirken, PON2 beyin, karaciğer, böbrek ve testisler gibi birçok organdan sentezlenmektedir (La Du 1999). PON2 enzimi insanda hemen hemen tüm dokularda bulunmasına rağmen, serumda bu enzime rastlanamamıştır (Ng *et al.* 2001).

PON1 enzimine benzerlik gösteren PON3 enzimi de karaciğerde sentezlendikten sonra kana salınır ve daha sonra spesifik olarak HDL'ye bağlanarak, LDL'nin oksidasyonunu önlemektedir (Campo *et al.* 2004). PON1 ve PON3 enzimleri aterosklerozun önlenmesinde farklı rollere sahiptirler ve PON3 enzimi ateroskleroza karşı bazal koruma fonksiyonu sağlarken, PON1 enziminin koruyucu etkisi daha farklıdır (Srinivasa *et al.* 2001).

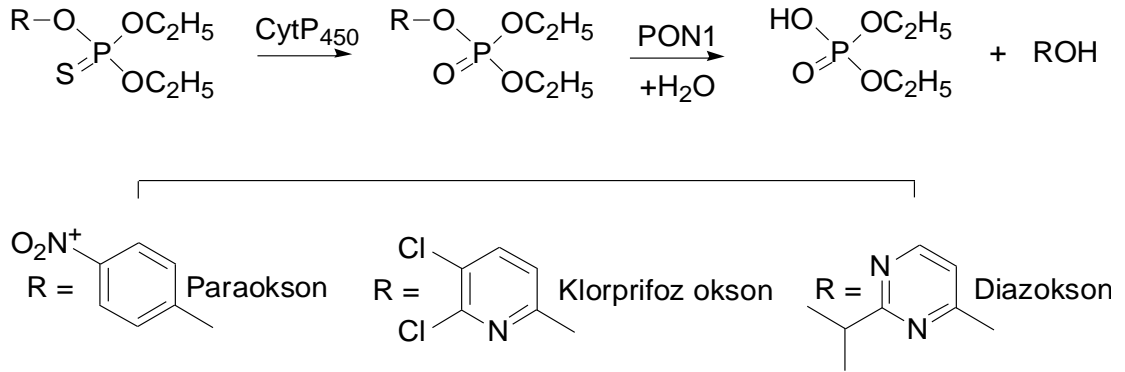
Paraoksonaz'ın sentezi karaciğer tarafından gerçekleştiği için, serumdaki paraoksonaz seviyesini belirleyen başlıca faktör karaciğer fonksiyonlarıdır. Serumdaki paraoksonaz aktivitesi kişiden kişiye farklılıklar gösterebilir (Blatter *et al.* 1994). Bunun nedenleri arasında peptid konsantrasyonu ve enzim aktivitesini etkileyen paraoksonaz geninin kodlanma ve promoter bölgesinde çok sayıda polimorfizm göstermesidir (Leviev *et al.* 2000).

Paraoksonaz enziminin; balık, kurbağa, hindi, tavuk, tavşan, köpek, sıçan, koyun, farede ve birçok diğer memeli türünde bulunduğu tespit edilmiştir (Draganov and La Du 2004). Paraoksonaz enzim aktivitesi fetüs karaciğeri, dalağı ve erişkin karaciğerinde de gösterilmiştir. Sıçanlarda ise özellikle karaciğer, akciğer, kalp, böbrek, ince bağırsak ve plazmada bulunmaktadır (Mackness *et al.* 1996; Primo-Parmo *et al.* 1996).

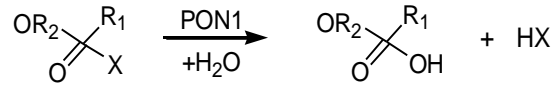
Paraoksonaz sentezinde önemli olan faktörlerden birisi karaciğer hücrelerindeki kolesterol dengesidir (Van Lenten *et al.* 2001; Jawad *et al.* 2002). Ayrıca PON1'in karaciğerden sentezini, herhangi bir hastalık durumu da etkilemektedir (Feingold *et al.* 1998; Van Lenten *et al.* 2001).

PON 1' in en iyi bilinen koruyucu fonksiyonu; sinir ajanları, aromatik karboksilik asit esterleri ve insektisitler gibi organofosfatlara ters bağlanıp hidroliz ederek, dolaşıma giren organofosfatların nörotoksitesini engellemektir. Organofosfat bileşiklerinden parationun aktif katabolik metaboliti olan paraokson (o,o-dietil-o-p-nitrofenil fosfat) asetilkolini yıkan kolinesterazların güçlü inhibitörüdür. PON1' in paraoksona etkisi ile oluşan hidrolitik ürünler paraoksonun kendisine göre daha az zararlıdır (Costa *et al.* 2003).

Güçlü bir asetilkolin esteraz inhibitörü olan paraokson, bir böcek öldürücü olan paratiyonun sitokrom P-450 enzim sisteminde mitokondriyal oksidasyonu ile oluşmaktadır. İnsan serum PON1 enzimi paratiyon, diazion ve kloropirifos gibi çok sayıda insektisin toksik okson metabolitlerini ve soman, sarin ve tabun gibi organofosfat sinir ajanlarını hidroliz edebilmektedir. Ancak memelilerde bulunan PON1'in bu substratlara karşı afinitesi düşük olduğundan, tarımsal alanda çalışanlarda organofosfat (OP) zehirlenmelerine sık rastlanır. Bununla beraber kronik olarak düşük dozda OP türevlerine maruz kalanlarda, PON1'in daha etkili olduğu bildirilmektedir (Başkol ve Köse 2004). İnsan sağlığı açısından organofosfatlı bileşikler terörizm tehdidi kadar bir çevresel risk oluşturur. PON1 enziminin çok yönlü bir araştırma konusu olmasının en önemli nedenlerinden biri de budur (Draganov and La Du 2004).



**Şekil 1.5.** İnsektisitlerde yaygın olarak kullanılan okson metabolitlerinin hidrolizi



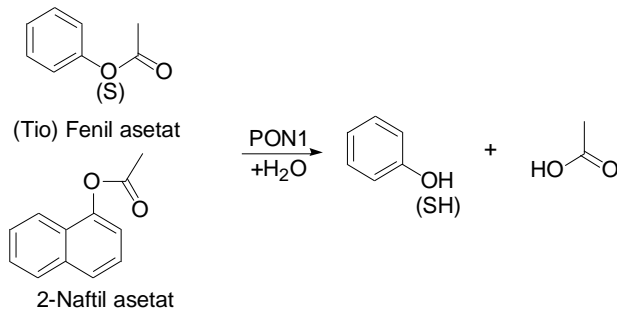
$\text{R}_1 = \text{N}(\text{CH}_3)_2$      $\text{R}_2 = \text{CH}_2\text{CH}_3$      $\text{X} = \text{CN}$     Etil N-dimetilfosforoamidosiyanid (Tabun)

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

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

**Şekil 1.6.** Sinir gazlarının hidrolizi

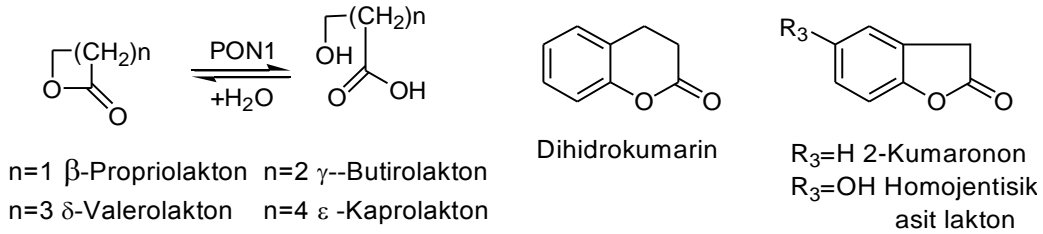
PON1 enzimi bu aktivitelerinin yanısıra sistematik sınıflandırmada yer aldığı A esterazlar grubunun özelliği nedeniyle fenilasetat gibi ester substratlarını da hidrolizleyebilmektedir. Ayrıca, tiyofenilasetat ve 2-naftilasetat da PON1 enziminin aromatik ester substratları arasında bulunmaktadır (Şekil 1.7) (Eckerson *et al.* 1983; Du 1992; Sorenson *et al.* 1995).



**Şekil 1.7.** Aromatik esterlerin hidrolizi



Siklik karbonatlar gibi aromatik ve alifatik lakton türleri de PON1 tarafından hidroliz edilmektedir (Jakubowski 2000; Kitchen *et al.* 1973).

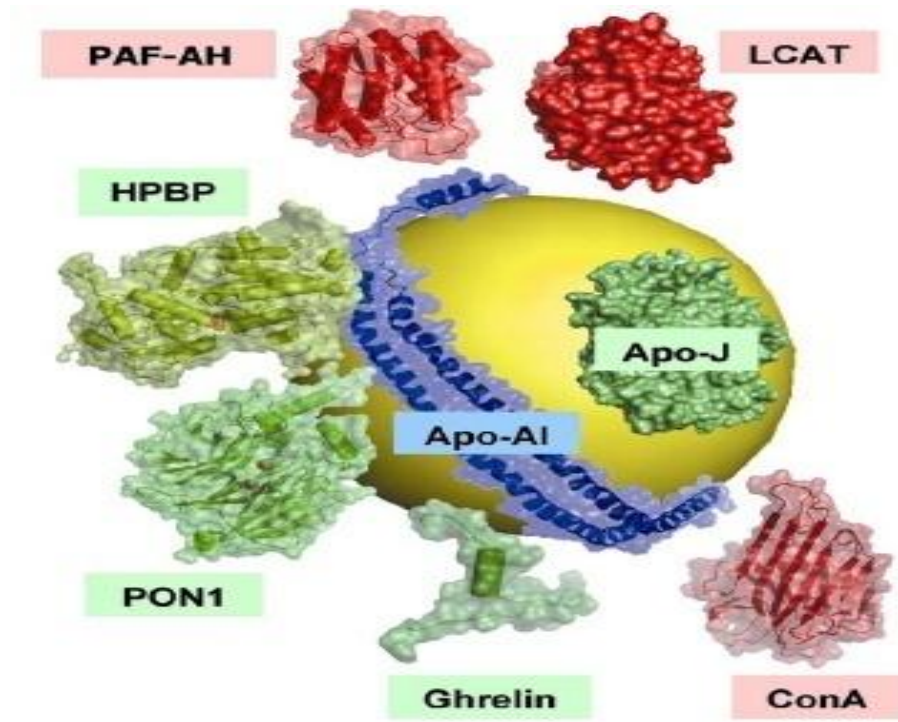


### Şekil 1.8. Lakton hidrolizi

PON1'in belirlenen ikinci biyolojik fonksiyonu antiaterojenik aktiviteye sahip olmasıdır. Serum PON1 enzimi plazmada HDL ile birlikte bulunur ve plazma lipoproteinlerinin oksidasyonunu önlemede rolü olduğu düşünülmektedir. Peroksidasyona uğramış olan lipidler bu enzim tarafından metabolize edildiğinden, lipid peroksitlerin hem HDL'de hem de LDL'de birikimi önlenir. HDL'nin LDL'yi oksidasyona karşı koruyucu etkisi ile yani antioksidan özelliğiyle A ve E vitaminlerinden daha etkilidir (Mackness *et al.* 1991; Rousseolt *et al.* 1999).

Karaciğerde sentezlenen ve dolaşıma verilen PON1'in HDL yapısında yer aldığı bilinmektedir. PON1, hidrofobik N-terminal bölgesi aracılığıyla HDL lipidlerine kolayca bağlanabilmektedir (Deakin and James 2004).

HDL yaklaşık 10 nm çapında kompleks bir yapıdır. Bileşiminde öncelikle membran bileşenleri (fosfolipidler, kolesterol ve kolesterol esterleri), Apo A1 ve aromatik heliksler yer almaktadır (Borhani *et al.* 1997). Yapılan immunoafinite kromatografi çalışmaları insan serum paraoksonazın gerçekte apolipoprotein A-1 ve Apolipoprotein J içeren HDL tipleri ile ilişkili olduğunu ve PON'un toplam HDL'nin çok küçük bir bölümünü oluşturduğunu göstermiştir (Şekil 1.9) (Mackness *et al.* 1996). Apo A-1, PON1'in HDL ile birleşmesi için gerekli olmamasına rağmen PON1-HDL kompleksinin stabilizasyonunu sağlar (Sorenson 1999; Oda 2001).



**Şekil 1.9.** HDL partikülü ve paraoksonaz enzimi (Renault 2006).

İnsan PON1'nın iki genetik polimorfizmi vardır. Bu iki polimorfizm 55. ve 192. pozisyonlardaki aminoasitlerin değişimi ile ortaya çıkar. 192. pozisyondaki glutamin (A veya Q genotipi) ve arginin (B veya R genotipi) yer değiştirmesi ile birinci polimorfizm; pozisyon 55'deki lösin (L genotipi) ve metionin (M genotipi) değişmesiyle 2. polimorfizm oluşur. 192. pozisyonda glutamin varlığında PON1, A Tipi; 192. pozisyonda arginin varlığında ise, B Tipi şeklinde ifade edilir (Adkins *et al.* 1993). Serum PON1 aktivitesi bireysel farklılıklar gösterir ve bu farklılıklar paraoksonaz geninin 192. pozisyondaki polimorfizm ile ilişkilidir. PON1 A-fenotipi düşük paraoksonaz aktivitesine sahip iken PON1 B-fenotipi yüksek paraoksonaz aktivitesine sahiptir (Smolen *et al.* 1991). Bu iki pozisyondaki polimorfizmlere ek olarak PON1 promotor alanında beş polimorfizm daha rapor edilmiştir. Bu genetik polimorfizmlerden dolayı PON1 aktivitesi bireyler arasında 10-40 kat kadar farklılıklar göstermektedir (Durrington *et al.* 2001).

Mackness ve arkadaşları yaptıkları bir araştırmada obezite, dislipidemi, hipertansiyon, insülin direnci ve bozulmuş glukoz toleransı geliştirilen, kombine leptin ve LDL reseptör eksikliği olan farelerde, düşük PON1 enzimi aktivitesini saptamışlardır. Bu farelere insan PON1 genini adenovirüs aracılığıyla enjeksiyon ederek aktarmışlar ve PON1 enzimi ekspresyonunun artışının ateroskleroz gelişimine olan etkisini araştırmışlardır. Böylece PON1 ekspresyonunun, ateroskleroz gelişimini inhibe ettiğini, total plak hacmini ve plazma okside LDL'yi azalttığını bulmuşlardır. Ayrıca PON1 ekspresyonunun, plazma total kolesterol, trigliserid düzeylerini ve HDL profilini etkilemediğini, bu nedenle PON1 enziminin antiaterosklerotik etkisinin lipid ve lipoproteinleri azaltarak değil de LDL oksidasyonunu azaltarak gösterdiği sonucuna varmışlardır (Mackness *et al.* 2006).

PON1 enzimi, lipid peroksidlerinin yanısıra hidrojen peroksidlerin üzerine de etkilidir. Aterojenez sırasında arter duvarı hücrelerince üretilen majör toksik oksijen metaboliti olan hidrojen peroksid, oksidatif koşullarda daha potent ürünlere dönüşerek LDL oksidasyonuna neden olmaktadır. PON1 enziminin okside LDL'deki kolesterol linoleat hidroperoksidlerini ve hidroksitleri indirgemesi nedeni ile peroksidaz benzeri aktivitesi olduğu düşünülmektedir. Ayrıca lipopolisakkarid inaktivasyonu yolu ile bakteriyel endotoksinlere karşı koruma sağlamaktadır (Aviram *et al.* 1998).

### **1.3. Pestisitler**

Pestisitler insan ve hayvan vücudu ile tarımda besinlerin üretimi, tüketimi, depolanması sırasında onları bozan ve yok eden haşereleri, mikroorganizmaları ve diğer zararlıları (pestleri) yok etmek için kullanılan fiziksel, kimyasal ve biyolojik savaş maddeleri olarak tanımlanmaktadır. Birleşik Devletler Çevre Koruma Ajansı (EPA) pestisitleri zararlı, yıkıcı veya sorun teşkil eden hayvan, bitki veya mikroorganizmaları uzaklaştırmak, parçalamak, veya azaltmak için kullanılan herhangi bir madde veya madde karışımı olarak tanımlamaktadır (Marrs and Balantyne 2002).

Pestisitler etkiledikleri organizma grubuna göre kendi aralarında insektisitler (böcek öldürücüler), fungusitler (mantar öldürücüler), akarisitler (akar öldürücüler), bakterisitler (bakteri öldürücüler), herbisitler (yabani ot öldürücüleri) gibi farklı isimlerle, birbirlerinden oldukça farklı kimyasal yapı ve özelliklere sahip yüzlerce bileşikten meydana gelmiştir (Karakaya 1992).

Pestisitler, etkili maddelerinin kökenlerine göre de gruplarına ayrılabilir:

**1-İnorganik maddeler**

**2-Doğal organik maddeler**

a)Bitkisel maddeler

b) Petrol yağları vb.

**3- Sentetik organik maddeler**

-Klorlu hidrokarbonlar

-Organik fosforular

-Diğer sentetik organik maddeler (azotlu bileşikler, piretroidler)

Türkiye’de tarım ilaçları kullanımına, pestisit gruplarına göre bakıldığında; en önemli grubun %47 ile insektisit olduğu, bunu %24 ile herbisitlerin izlediği, fungusitlerin ise %16 payı olduğu görülmektedir. Pestisit satışlarında organik fosforular en büyük pazara sahiptir. Başlıca organik fosforlu aktif maddeler klorprifos, diazinon, diklorvos, dimetoat, malation, metamidofos, metidatyon, metil paratyon ve karbamatlardır. Bunların sadece %3’ü insan sağlığı üzerine etkisi açısından test edilmiştir (Delen vd 1995).

### **1.3.1. PON1 enzimi üzerine etkileri incelenen pestisitler ve özellikleri**

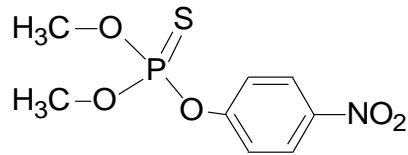
Kabak çekirdeği ve fındıktan saflaştırılan PON1 enzimi üzerine etkileri incelenen pestisitlerin bazı özellikleri aşağıda anlatılmaktadır.

## Metil paratyon

Metil paratyon (O,O-dimetil O-4-nitrofenil fosforodithioat) ziraatte kullanılan geniş spektrumlu organofosfatlı bir insektisit ve akarisitir (Ma *et al.* 2003). Metil paratyon “pamuk zehiri” olarak bilinmektedir. Pamuk, mısır, elma, fasulye, pirinç, buğday, şeftali, yonca, ayçiçeği gibi mahsullere uygulanmaktadır (Ruckart *et al.* 2004).

Metil paratyon saf maddesi oda sıcaklığında renksiz kristaller şeklindedir ve birçok organik çözücüde hızlı bir şekilde çözülebilmektedir. Erime noktası 35-36°C’dir. Alkali ortamlarda hızla hidroliz olmakta ve sıcaklıkla çeşitli izomerlerine parçalanmaktadır. Metil paratyon, emilsüyon haline geçebilen konsantratlar, suda çözülebilir tozlar ve sıvı formüller halinde bulunmaktadır.

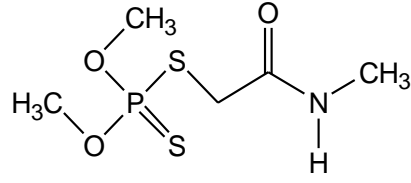
Karaciğer metil paratyonun metabolize ve detoksifiye edildiği ilk organdır. Zehirlenme sonucunda görülen semptomlar çarpıntı, baş dönmesi, baş ağrısı, kalp durması ve sonunda ölümdür (WHO 1993).



**Şekil 1.10.** Metil paratyon molekülünün yapısal formülü

## Dimetoat

Gri-beyaz kristalize bir katıdır. Alkaliler karşısında hızla yıkımlanan fosforodithioat türevi bir maddedir (Kaya 2002; Moffat *et al.* 2004). Dimetoat memeliler tarafından hızla biyotransformasyona uğratılır ve atılır. Dimetoat kalıntısına dokularda rastlanmaz; kalıcı değildir.

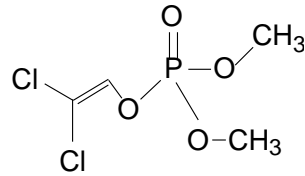


**Şekil 1.11.** Dimetoat molekülünün yapısal formülü

### Diklorvos

Diklorvos (2,2 diklorovinil dimetil fosfat, DDVP), renksiz amber renkte, aromatik kokulu bir organofosfattır. Toprakta parçalanma yarı ömrü 1 günden azdır. Suda az çözünür. Organik çözücülerin çoğuyla karışabilir. Isıya dayanıklıdır; ancak su, kuvvetli asit ve alkalilerde parçalanır. Diklorvos toprakta kalıcılığı az olan bir maddedir. Alkali toprak ve sularda parçalanması hızlıdır (Kaya 2002).

Diklorvos, ambarlanmış hububat ve mamullerinde buğday biti, pirinç biti vb. gibi zararlılar için kullanılır (Aydınoglu vd 2002).

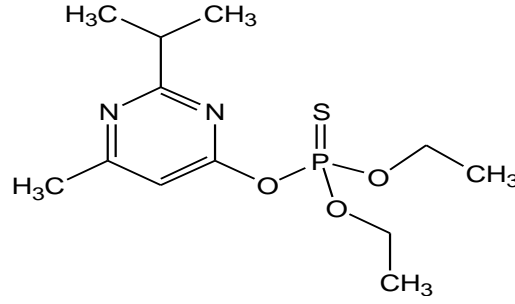


**Şekil 1.12.** Diklorvos molekülünün yapısal formülü

### Diazinon

Kırmızı kahverengi sıvıdır. Suda pratik olarak çözünmeyen, eter, alkoller, benzen, hekzan gibi çözücülerle karışabilen fosforothionat türevi bir maddedir. Sulu alkali çözeltileri oldukça dayanıklıdır (Blagburn and Lindsay 1995; Kaya 2002).

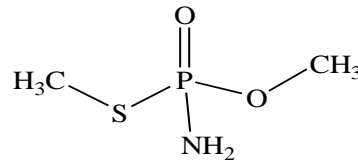
Diazinon vücutta hızla biyotransformasyona uğrar ve atılır. Önemli bir kısmı (%70) metabolitleri halinde idrar ve dışkıyla vücudu terk eder. Toprakta %75-100 kaybolması için gereken süre 3 ay dolayındadır (Kaya 2002).



**Şekil 1.13.** Diazinon molekülünün yapısal formülü

### Metamidofos

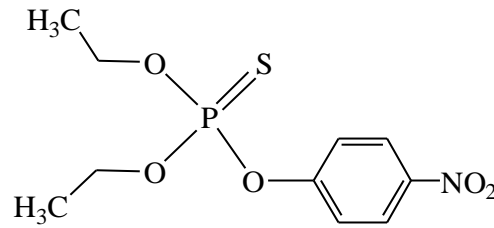
Metamidofos ülkemizde yalnızca pamukta ve tütünde kullanım iznine sahip olmasına rağmen Türkiye’de en yoğun tüketilen insektisitlerden biridir (Aydınoglu vd 2002; Yüceer 2003). Tarım ve Köyişleri Bakanlığı verilerine göre metamidofos, 1999-2002 yıllarında yurdumuzda en çok tüketilen insektisit arasına girmiştir. Toplam insektisit tüketimi içindeki payı da söz konusu yıllarda %13 ila 19 arasında değişmiştir (Delen vd 2005). Metamidofos, böcek ve akarlarla kontak ve mide zehiri olarak etkilidir. Sistemik olup, bitkinin kök ve yapraklarından alınır (Aydınoglu vd 2002).



**Şekil 1.14.** Metamidofos molekülünün yapısal formülü

### Etil Paratyon

Organofosfat bir bileşik olup, güçlü bir insektisit ve akarisitir. Paration sarımsak kokulu sarı yağlı bir sıvıdır. Benzen, aseton, etanol ve diğer birçok organik çözücülerde kolay çözünür, nötr veya zayıf asidik ortamda istikrarlıdır, ancak alkali varlığında hidrolize olur.



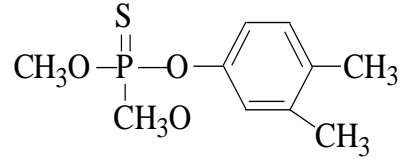
**Şekil 1.15.** Etil paratyon molekülünün yapısal formülü

### Fention

Fention (O,O Dimetil (3-metil-4-metilyo fenil) fosforodithioat) molekül ağırlığı, 278.33 g/mol olan lipofilik karakterde bir bileşik olup Çevre Koruma Kurumu (Environmental Protection Agency, EPA) zehirlilik sınıfının ikinci grubunda yer alan, orta derecede toksik bir insektisitir (EPA 2001). Teknik materyal %95–98 saflıktadır, hafif sarımsak kokulu, kahverengi ve yağlı bir sıvıdır. 20°C suda 54-56 ppm'de çözünürlüğe sahiptir. Gliserid yağları ve birçok organik çözücüde çözünebilmektedir. 20°C'de  $4 \times 10^{-5}$  mmHg, düşük buhar basıncına sahip olmasına karşın az miktarda uçucudur (WHO 1976).

Fention kolaylıkla okson formuna dönüşmeyecek nispeten güvenli bir pestisid olarak geliştirilmiş (Roberts and Hutson 1999), ancak balıklarda ve sığanlarda yapılan çalışmalar fentionun fenoksona dönüşerek bu canlılara yüksek derecede toksik etkili olduğunu göstermiştir (Kitamura *et al.* 2000; Kitamura *et al.* 2003).

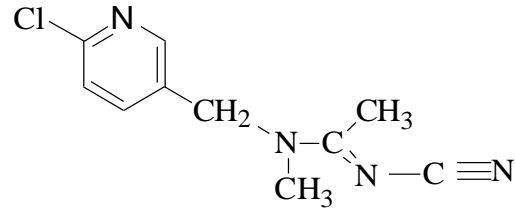




**Şekil 1.16.** Fention molekülünün yapısal formülü

### Asetamiprid

Yapraklı sebzelerde, meyveli sebzelerde, lahana türlerinde, turunçgillerde, taneli meyvelerde, üzümelerde, pamukta ve süs bitkileri ve çiçeklerindeki emici tip insektlerin kontrolünde kullanılır. Çay ağacı, meyve ağaçları, sebzelerdeki zararlıların kontrolünde kullanılır. Asetamiprid bir siyanoamidin ve bir 6-kloro-3-piridilmetil kısmından ibarettir. Mospilan ticari adı ile Japonya' da satışa sunulmuştur (Yamamoto 1999; Ambrose 2003). Aseton, metanol, etanol, diklormetan, kloroform, asetonitril, tetrahidrofuran içinde çözünür. Çevre Koruma Dairesi (EPA) tarafından kanserojen etkisi muhtemel olmayan pestisit olarak sınıflandırılmıştır.



**Şekil 1.17.** Asetamiprid molekülünün yapısal formülü

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

İnsan serum paraoksonaz enzimi; karaciğerde sentezlenen, arildialkil fosfataz olarak da adlandırılan  $Ca^{2+}$  bağımlı, HDL ile ilişkili ve 43-45 kDa molekül kütleli bir ester hidrolazdır (Mackness *et al.* 1997; Mackness *et al.* 1998a; Aviram *et al.* 1999).

Paraoksonaz-1 enzim aktivitesine ilk olarak 1961 yılında Uriel tarafından insan serumunun elektroforezi sonrası HDL'lerin immuno çökeleklerinde rastlanmıştır (Uriel 1961). Kısmi saflaştırılmış sığır PON1 enziminin lipitlerle ilişkili olduğu ve HDL partikülleriyle yaklaşık aynı moleküler kütleyle sahip olduğu bulunmuştur (Don *et al.* 1975; Kitchen *et al.* 1973). Koyunlarda, PON1 aktivitesinin çoğunluğunun apolipoprotein A1 (Apo A1) içeren HDL partikülleriyle sıkı ilişkili olduğu belirlenmiştir (Mackness and Walker 1988). İnsan serumundan saflaştırılması esnasında apolipoprotein A1'i paraoksonazdan ayırmanın çok güç olması, Apo A1 ve PON1'in birbirleriyle sıkı ilişkili olduğunu düşündürmüştür (La Du and Novais 1989; Blatter *et al.* 1993; Kelso *et al.* 1994).

PON1'in insan serumunda HDL kompleksindeki özel yerleşimi ve organik fosfatlar ile fosfolipidlerdeki bağların yapısal benzerliği nedeniyle Mackness, PON1'in lipid metabolizmasında önemli rol oynayabileceği fikrini öne sürmüştür (Mackness 1989a; Mackness 1989b).

Serum PON1'in ateroskleroz sürecinin başlangıç evresinde LDL fosfolipidlerini oksidasyona karşı korumada önemli olduğu ilk olarak 1991 yılında Mackness tarafından yapılan çalışmada gösterilmiştir. Bu çalışmada, HDL'nin bakırla inkübe edilen LDL'de lipid peroksit oluşumunu %90 oranında inhibe ettiğini; HDL'den saflaştırılan PON1'in tiyobarbitürik asit ile reaksiyona giren maddelerin düzeylerini ve lipoperoksit oluşumunu önlediğini göstermişlerdir (Mackness *et al.* 1991).

Josse ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, Asp52 ve Glu53'ün kalsiyumu bağladığını, histidin ve triptofan başta olmak üzere en az 15 amino asit ile disülfid bağının arilesteraz ve paraoksonaz aktivitesi için esansiyel olduğunu ortaya koymuştur (Josse *et al.* 1999).

Körfez savaş sendromu olarak bilinen hastalık, körfez savaşında görev alan askerlerde gözlenmiştir. Askerlerin bir kısmında yorgunluk, halsizlik ve nörolojik hasarlar görülürken, diğer askerlerde hiç bir belirti görülmemiştir. Irak tarafından kimyasal silah olarak sarin, diazokson gibi organofosfatlı bileşiklerin kullanılmış olması nedeniyle bu askerlerde PON1 aktivitesi araştırılmış ve körfez savaş sendromu görülen askerlerin PON1 aktivitesi ve konsantrasyonu polimorfizmden bağımsız olarak düşük bulunmuştur. Düşük PON1 aktivitesi nedeniyle organofosfatlı bileşiklerin detoksifikasyonunda azalma sonucu Körfez savaş sendromunun geliştiği düşünülmektedir (Mackness *et al.* 2000).

Yapılan araştırmalar PON1 aktivitesinin yaşlılıkta azaldığını göstermektedir (Milochevitch and Khalil 2001).

Ülkemizde PON1 aktivitesi ile sigara içimi arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışmada, aşırı sigara içen bireylerde serum PON aktivite ve konsantrasyonunun düştüğü tespit edilmiş ve bu düşüşün lipit peroksidasyonunun düzeylerinin yükselmesi ile kardiyovasküler kaynaklı hastalık insidansının artmasının nedeni olabileceği ileri sürülmüştür (Gürsu ve Özdin 2002).

Yapılan bir çalışmada akut organofosfat zehirlenmesi yaşayan hastalarda paraoksonaz aktivitesi, kontrollerden %30 düşük bulunmuştur. Her iki grupta da PON1 konsantrasyonu benzer bulunduğu için, PON1 aktivitesinin zehirlenenlerde düşük çıkmasına neden olarak organofosfatların PON1'i direk olarak inaktive ettiği veya zehirlenmeye neden olan organofosfatların enzimin aktivitesinin ölçülmesinde kullanılan substrat ile yarışması öne sürülmüştür (Sözmen *et al.* 2002).

Yavuz ve arkadaşlarının hipertiroidli kişiler üzerinde yaptığı çalışmada kontrol grubuna göre hipertiroidli bireylerde PON1 enzimi aktivitesinin düştüğü gözlemlenmiştir (Yavuz vd 2003).

Az miktarda alkol kullanımı %39 plazma PON1 aktivitesinde artışa sebep olurken çok miktarda alınan alkol sonucunda PON1 aktivitesinde %45 düşüş gözlenmiştir (Rao *et al* 2003).

Paraoksonaz aktivitesinin romatizmal kireçlenme ile bir ilişkisi tespit edilmiştir. Kireçlenme görülen romatizma hastalarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında serum paraoksonaz aktivitesinde önemli bir azalma olduğu belirlenmiştir (Tanimoto *et al.* 2003).

Son zamanlarda çıkan bir çalışmada, tip 1 diyabetik hastalarda sağlıklı bireylere nazaran yüksek seviyede lipid hidroperoksit ve düşük PON1 aktivitesi olduğu kanıtlanmıştır. Bunun yanı sıra bu hastaların HDL'leri, normal bireylere göre eritrosit membranlarını oksidatif hasara karşı daha etkisiz bir şekilde korumuştur (Ferretti *et al.* 2004).

Çelik ve arkadaşlarının organik solventlere maruz kalan işçiler üzerinde yaptıkları bir araştırmada, organik solventlere maruz kalan işçilerden sigara içenler ile 15 yıldan daha fazla çalışanların, antioksidan PON1 enzimi aktivitesinde istatistiksel olarak önemli olmayan bir azalma tespit etmişlerdir. Bu gibi işyerlerinde çalışan işçilerin sigara kullanımının önlenmesi ve işçilerin periyodik muayenelerini yaptırmaları konusunda eğitilmeleri gerektiğini belirtmişlerdir (Çelik vd 2005).

PON1 eksikliğinin serum ve makrofajdaki oksidatif stresi artırdığını ve bunun aksine makrofajlara PON1 ilavesinin oksidatif stresi azalttığını kanıtlamışlardır. Bu sebepten dolayı PON1'in hücrelerin dış membranında bulunduğu ve bu yüzden makrofajlardaki lipid peroksidleri hidroliz edebildiği ve bunun da hücrel oksidatif stresi azalttığı önerilmiştir (Rozenberg *et al.* 2005).

Koyunların ilaçlanmasında diazokson metaboliti veren organofosfatları kullanan çiftçilerin PON1 aktiviteleri düşük ise ciddi bir şekilde hastalandıkları görülmüştür (Cherry *et al.* 2002). PON 1 antioksidan aktivitesindeki düşüşün Alzheimer hastalığının gelişiminde az da olsa katkıda bulunabileceği, ve 192. konumda R allel varlığının Alzheimer hastalık riskini düşürdüğü bildirilmiştir (He *et al.* 2006).

Sarkar ve arkadaşları genç hastalarda kronik kalp hastalığı ile PON1 enzimi arasındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla yapmış oldukları çalışmalarda, enzimin, kronik kalp hastalarında fenil asetata karşı daha düşük aktivite gösterdiğini gözlemlemişlerdir (Sarkar *et al.* 2006).

Anti- diyabetik ilaç olarak kullanılan glimepiridinin insan serum paraoksonaz aktivitesi üzerine *in vitro* etkileri araştırılmış ve enzim aktivitesini inhibe ettiği belirtilmiştir. Ayrıca glimepiridinin fare karaciğer, kalp ve serum paraoksonaz enzim aktivitesi üzerine *in vivo* etkileri araştırılmış ve enzim aktivitesini önemli ölçüde inhibe ettiği belirtilmiştir (Demir *et al.* 2006).

Elkıran ve arkadaşları akciğer kanserli hastalar üzerinde yaptıkları bir çalışmada PON1 ve arilesteraz aktivite sonuçlarını sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde düşük bulmuşlardır (Elkıran *et al.* 2007).

Bir çalışmada hiperkolesterolemik postmenapozal kadınlarda serum lipoprotein konsantrasyonu ve PON1 aktivitesi üzerine soya fasulyesinin etkilerini araştırmışlardır. Sonuç olarak soya fasulyesinin serum lipoproteinlerindeki azalmayı ılımlı hale getirmesi ve PON1 aktivitesini artırması nedeniyle kardiyovasküler hastalık riskini azalttığını belirtmişlerdir (Shidfar *et al.* 2008).

İnsan serumundan saflaştırılan paraoksonaz enzim aktivitesi üzerine asetilsalisilik asitin *in vitro* etkileri araştırılmış ve enzim aktivitesini inhibe ettiği belirtilmiştir. Ayrıca fare serum, kalp ve karaciğer paraoksonaz enzim aktivitesi üzerine asetilsalisilik asitin *in*

*vivo* etkileri araştırılmış ve asetilsalisilik asitin serum paraoksonaz enzimini aktive ederken kalp ve karaciğer paraoksonaz enzimi aktivitesini önemli ölçüde inhibe ettiği belirtilmiştir (Demir *et al.* 2008).

Atamer ve arkadaşları, karaciğer yağlanması olan hastalarda lipid peroksidasyonu, nitrik oksit seviyesi ve paraoksonaz aktivitesi bakımından oksidatif durumdaki değişimleri değerlendirmişlerdir. Çalışma 49 hasta ve 25 sağlıklı birey ile gerçekleştirilmiştir. Hastalarda PON1 aktivitesinin ve nitrik oksit seviyelerinin önemli derecede azaldığını gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak oksidatif stresin bu hastalarda PON1 sentezini baskıladığını belirtmişlerdir (Atamer *et al.* 2008).

Taşkıran ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, koroner arter hastalığı ile PON1 55L/M polimorfizmi arasında ilişki bulunurken; PON1 192 Q/R polimorfizmi ile ilişki bulunamamıştır (Taşkiran vd 2009).

Son yıllarda yapılan çalışmalar da PON1'in homosistein tiyolaktonu homosisteine hidroliz ettiği gözlenmiştir (Billecke *et al.* 2000; Jakubowski 2000). Tavşan karaciğerinden saflaştırılan PON1 enziminin fenilasetat ve homosistein tiyolakton substratlarına karşı kinetik davranışları incelenmiştir. Tavşan PON1'inin fenilasetat substratına afinitesinin insan PON1'ine göre yaklaşık 2 kat daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir (Bayrak 2010).

İran toplumunda yapılan çalışmada, 88 romatoid artrit hastası ile 78 sağlıklı kişiler üzerinde romatoid artrit ile PON1'in Q192R polimorfizmi arasındaki ilişki incelenmiştir. Çalışma sonucunda romatoid hastalar ve kontrol grubu arasında PON1 Q192R polimorfizm ile romatoid artrit arasında önemli bir fark bulunamamıştır (Hashemi 2010).

Yapılan bir çalışmada, zeytin bitkisinden saflaştırılan paraoksonaz enzim aktivitesine  $Hg^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $\beta$ -merkaptotanol, ditiyoeritrol ve SDS gibi bazı kimyasalların *in vitro*

etkileri araştırılmış ve  $Hg^{2+}$  ve  $Fe^{3+}$ 'ün enzimi inhibe ettiği,  $Cu^{2+}$ ,  $\beta$ -merkaptotanol, ditiyoeritrol ve SDS'nin ise enzimi aktive ettiği belirtilmiştir (Demir *et al.* 2011).

Dünyanın birçok bölgesinde tarımsal amaçlı, ticari ve süs bitkisi olarak yetiştirilen *Cucurbitaceae* familyasına ait olan kabakgil türlerinin genel isimleri *C.pepo*, *C. moschata*, *C. mixta* ve *C.maxima*'dır. Yetiştirilmekte olan çekirdek kabakları, çoğunlukla *Cucurbita pepo L.* türüne dâhil olmakla birlikte az miktarda da *Cucurbita moschata* türüne giren bal kabağı tohumları da kullanılmaktadır (Düzeltir ve Yanmaz 2004).



**Şekil 2.1.** Kabak çekirdeği (*Cucurbitae peponis semen*)'nin görünümü

Kabak çekirdeği (*Cucurbitae peponis semen*) minerallerin mükemmel bir kaynağıdır (Çizelge 2.1) (Baysal vd1991; Bebis 2004). Bir bardağın  $\frac{1}{4}$  ünü dolduracak kabak çekirdeği çinkonun tavsiye edilen günlük alımının %20 sini, magnezyum ve manganezin ise %50 sini sağlamaktadır. Bazı B vitaminlerini içerdiği gibi kemik sağlığı ve kan pıhtılaşması için ihtiyaç olan K vitaminini önemli bir miktarda da içermektedir (Wagner *et al.* 2001).

Kabak tohumlarından elde edilen yağlar, sterol ve vitamin E yönünden zengin olduğundan dolayı, cilt problemlerinin tedavisinde kullanılmaktadır. Kabak tohumları çinko yönünden de zengin kabul edilmektedir. Çinko vücutta pek çok enzim aktivitesinde rol oynar ve çinkonun sitrat formu ve kabak tohum yağlarını

birleşmesinden elde edilen kremler; kozmetik endüstrisinde, yanıkların ve ağrıyan yaraların iyileştirilmesinde, yüzdeki aknelerin ve tıkanmış gözeneklerin temizlenmesinde kullanılmaktadır. Bu yağlar, cilt yaşlanmasını engellemekte, cildin nem dengesini sağlamakta ve masaj yağı olarak da kullanılmaktadır (Düzeltir ve Yanmaz 2004).

**Çizelge 2.1.** Kabak çekirdeğinin mineral içerikleri (mg/100g)

Kalsiyum	40
Fosfor	1144
Demir	10.0
Çinko	7.0
Magnezyum	402
Manganez	1.0
Bakır	1.5

Yağ içeriğine gelince, kabak çekirdeği, hormon dengesi, beyin fonksiyonu ve cilt sağlığı için ihtiyaç olan omega-3 ve omega-6 esansiyel yağlarını birlikte almak için iyi bir kaynaktır.



**Şekil 2.2.** Fındık (*Corylus Avellana*)'ın görünümü



Kışın yaprağını döken, 1-7 m boyunda bir çalıdır. Züruflarının boyu meyvenin boyundan daha kısa veya biraz daha uzundur. Zürufları mızrak veya üçgen şeklinde parçalı olup, parçacıkların uçları dişlidir. Meyvenin şekli genellikle yuvarlağımsı oval olup, uzunlukları 12-18 mm civarındadır. Yaprakları kalp biçimine yakın, yuvarlak-oval veya geniş-oval şekillidir. Yapraklarının üst yüzleri tüysüz, alt yüzlerinde ise damarların üzerleri tüylüdür, kenarları da çift dişlidir (Bayrak 2008).

Bu tür, ülkemizde Doğu Karadeniz, Batı Karadeniz, Marmara ve Trakya Bölgeleri'nin daha ziyade dağlık kısımlarında yaygındır. Ayrıca, Doğu Anadolu'da Van, Bitlis ve Siirt civarında da bulunur (Bayrak 2008).

Fındık oldukça besleyici bir çerezdir. Fındık vitamin ve mineraller bakımından önemli bir kaynaktır (Çizelge 2.2) (Baysal vd 1991; Bebis 2004). Enerji değeri 639 kcal/100g olan fındığın protein içeriği (%16) oldukça yüksektir. Fındıkta çok yüksek düzeylerde bulunan tek derecede doymamış yağ asidi oleik asit, kanda yağları taşıyan yüksek yoğunlukta lipoprotein (HDL)'yi artırmaktadır. HDL kanda kolesterolün yükselmesini önlemekte, atardamarlardaki kan pıhtılaşması riskini önemli düzeyde azaltmaktadır. Böylece oleik asit, kan kolesterol düzeyinin düşmesini sağlayarak, vücudumuzu kalp damar hastalıklarına karşı koruyucu etki göstermektedir (Çöteli 2007).

**Çizelge 2.2.** Fındığın mineral içerikleri (mg/100g)

Kalsiyum	209
Fosfor	337
Demir	3.4
Çinko	1.9
Magnezyum	155
Manganez	5.7
Bakır	1.3
Potasyum	704
Sodyum	2

Fındık vücutta karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasında düzenleyici olarak görev yapan bazı B grubu vitaminler için önemli bir kaynaktır. Fındık, bitkisel yağlardan sonra, E vitamininin bilinen en iyi kaynağıdır. Alyuvarların parçalanmasını önleyerek, yine Ülkemizde yaygın olan kansızlığa karşı koruyucu etki yapar (Çöteli 2007).

Sağlıklı ve kaliteli bir ömür sürmenin önemi tartışılmaz. İnsan diyetinde kalp damar hastalıklarının oluşmaması için omega yağ asitleri içeren diyetlerin tüketilmesi önem taşımaktadır. Çalışmamızda insan beslenmesinde büyük öneme sahip olan kabak çekirdeğinden ve fındıktan paraoksonaz enziminin saflaştırılması, karakterize edilmesi ve enzim aktivitesi üzerine bazı pestisitlerin etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışmanın bitkisel kaynaklı PON enzimi ile ilgili çalışmalara yön vereceği düşünülmektedir.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Kullanılan kimyasal madde ve malzemeler

Çalışmalarımızda kullanılan Tris (trihidroksimetilaminometan), Sepharose-4B, CNBr, Sephadex G-100, standart serum albümin, N,N'-metilen bisakrikamid, akrilamid,  $\beta$ -merkaptoetanol, amonyum persülfat (PER), TEMED (N,N,N',N'-Tetrametil etilen diamin), izopropil alkol, fosforik asit, SDS (sodyumdodesilsülfat), DTH (ditihiioerythritol), glisin, asetik asit, gliserin, coomassie brillant blue G-250 ve R-250, bromtimol mavisi, sodyum klorür, sodyum bikarbonat, sodyum hidroksit, sodyum fosfat, sodyum nitrit, askorbik asit, paraokson, CaCl<sub>2</sub>, protein standartları, hidroklorik asit, sülfürik asit, etanol, metanol, aseton, EDTA (etilen diamin tetra asetik asit) ve TCA (trikloroasetik asit) Sigma, Merck ve Fluka firmasından sağlanmıştır.

##### 3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

Peristaltik Pompa	:	Masterflex L/S™
pH metre	:	Selectra
Masa Santrifüjü	:	Hettich EBA 20
Derin Dondurucu	:	IL Shim
Spektrofotometre	:	Spekol 1300
Güç Kaynağı	:	Consort EV 231
Hassas Terazi	:	Denver APX 153
Buzdolabı	:	Arçelik ve Bosch
Elektroforez Tankı	:	Max Fill
Kromatografi Kolonu	:	Sigma
Otomatik Pipetler	:	Volac, Jencons, Sigma
Çalkalayıcı	:	Ika

Magnetik Karıştırıcı	:	Ika
Su Banyosu	:	Memmert
Karıştırıcı	:	Heidolph

### 3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanmaları

Araştırma süresince kullanılan tampon ve çözeltilerin hazırlanış şekilleri ve kullanıldıkları yerler aşağıdaki gibidir.

#### **Coomassie brilliant blue G–250 renk reaktifi;**

0,1 g Coomassie brilliant blue G 250, 50 mL %95'lik etanolde çözüldü. Bu çözeltiliye 100 mL %95'lik fosforik asit ilave edildi. Çözelti hacmi saf su ile 1 litreye tamamlandı.

#### **Aktivite tayini için kullanılan tampon çözeltisi;**

Aktivite tayini için kullanılan tampon (pH'ı 6,8 olan 0,1 M Tris HCl/2 mM CaCl<sub>2</sub> tamponu); 12,114 g Tris, 0,22 g CaCl<sub>2</sub> yaklaşık 900 mL saf su içerisinde çözüldü. pH metre kullanılarak pH'sı 6,8'e ayarlandı. Son olarak hacim saf su ile 1 L'ye tamamlandı.

#### **Kullanılan substrat çözeltisi (2 mM paraokson);**

26 µl paraokson 1 mL aseton içerisinde çözüldü ve ardından karışmakta olan 19 mL tampon (pH'ı 6,8 olan 0,1 M Tris HCl/2 mM CaCl<sub>2</sub>) içersine, damla damla ilave edildi.

**Jel filtrasyon kromotografisinde kullanılan tampon çözeltinin hazırlanması;**

0,05 M'lık  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  içinde 1 mM ditiyoeritrol, (pH: 7,0); 8,2 g  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  ve 0,1542 g ditiyoeritrol magnetik karıştırıcı yardımı ile 950 mL saf suda çözüldü. pH metre kullanılarak 0,5 N HCl ile pH: 7'e kadar titre edildi. Son hacim 1 L'ye tamamlandı.

**SDS poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılan ayırma jelinin hazırlanması:**

15 mL 1 M Tris HCl (pH: 8,8), 13,2 mL %30'luk akrilamid-%0,8'lik bisakrilamid, 0,6 mL %1'lik SDS, 0,4 mL %5'lik TEMED (N,N,N',N'-tetra metil etilen diamin) ve 9,4 mL su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine en son olarak 0,8 mL %1,5'luk amonyum persülfat  $[(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8]$ : (PER)] ilave edildi.

**SDS poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılan yığma jelinin hazırlanması:**

1 M'lık Tris HCl (pH: 6,8)'den 1,24 mL, %30'luk akrilamid-%0,8'lik bisakrilamid'den 1 mL, %1'lik SDS'den 0,1 mL, %5'lik TEMED'den 0,1 mL ve sudan 7,80 mL alınarak karıştırıldı. Son olarak yine günlük hazırlanmış %1,5'lik PER'den 0,20 mL ilave edildi.

**SDS poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılan numune tamponu:**

0,65 mL 1M'lık Tris HCl (pH: 6,8), 1 mL %1'luk SDS, 1mL %100'lük gliserin ve 1 mL %0,1 lik brom timol mavisi karıştırılarak hacimlerinin saf su ile 10 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı. Bu tampon kullanılmadan hemen önce 1 mL numune tamponuna 50  $\mu\text{L}$  olacak şekilde  $\beta$ -merkaptolanol ilave edildi.

**SDS poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılan yürütme tamponu:**

1,5 g Tris ve 7,2 g glisin 50 mL suda çözüldü ve üzerine 5 mL %1'lik SDS'den ilave edilerek son hacim 500 mL'ye tamamlandı.

**SDS poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılan boyama çözeltisi;**

0,6 g Coomassie brilant blue G-250, 6 mL fosforik asit ile magnetik karıştırıcı üzerinde karıştırıldı. 10 g TCA, 58 mL su, 15 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ve 15 mL izopropilalkol karışımı çok yavaş bir şekilde üzerine ilave edildi.

**Elektroforezde kullanılan renksizleştirme çözeltisi:**

%7,5 asetik asit, %5 metanol ve %87,5 saf su karışımıyla hazırlandı.

**Optimum pH çalışması için kullanılan pH'sı 4-9 arasında olan tampon çözeltiler:**

pH: 4-6 aralığında 0,1 M asetat tamponu kullanıldı. Bu çözelti 1,36 g  $\text{CH}_3\text{COONa}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  80 mL saf suda çözülerek, 1 M HCl ile istenen pH'ya ayarlandıktan sonra saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

pH: 6-7 aralığında 0,1 M fosfat tamponu kullanıldı. Bu çözelti 1,74 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  80 mL saf suda çözülerek, 1 M HCl ile istenen pH'ya ayarlandıktan sonra saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

pH: 7-9 aralığında 0,1 M Tris tamponu kullanıldı. Bu çözelti 1,21 g tris (trihidroksi metil amino metan) 80 mL saf suda çözülerek, 1 M HCl ile istenen pH'ya ayarlandıktan sonra saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

**Afinite kromatografisi için kullanılan çözeltiler:**

**Dengeleme tamponu:** pH'ı 8,0 olan 0,1 M Tris HCl/2 mM CaCl<sub>2</sub>/0,5 M NaCl tamponu; 12,114 g Tris, 0,22 g CaCl<sub>2</sub> ve 29,22 g NaCl yaklaşık 900 mL saf su içerisinde çözüldü. pH metre kullanılarak pH: 8,0 olarak ayarlandı. Son olarak hacim saf su ile 1 L'ye tamamlandı.

**Yıkama tamponu:** pH'ı 8,0 olan 0,1 M Tris HCl/2 mM CaCl<sub>2</sub>/0,5 M NaCl tamponu; 12,114 g Tris, 0,22 g CaCl<sub>2</sub> ve 29,22 g NaCl yaklaşık 900 mL saf su içerisinde çözüldü. pH metre kullanılarak pH: 8,0 olarak ayarlandı. Son olarak hacim saf su ile 1 L'ye tamamlandı.

**Elüsyon tamponu:** pH'ı 6,8 olan 0,1 M Tris HCl/2 mM CaCl<sub>2</sub> tamponu; 12,114 g Tris, 0,22 g CaCl<sub>2</sub> yaklaşık 900 mL saf su içerisinde çözüldü. pH metre kullanılarak pH: 6,8 olarak ayarlandı. Son olarak hacim saf su ile 1 L'ye tamamlandı.

**Paraoksonaz enzim aktivitesi üzerine bazı katyonların ve bileşiklerin etkisinin belirlenmesi için kullanılan çözeltiler:**

10 mM'lık MgCl<sub>2</sub>\*7H<sub>2</sub>O: 0,110 g MgCl<sub>2</sub>\*7H<sub>2</sub>O saf su ile 50 mL'ye tamamlandı.

10 mM'lık CaCl<sub>2</sub>: 0,055 g CaCl<sub>2</sub> saf su ile 50 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

10 mM'lık Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>: 0,093 g Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> su ile 50 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

10 mM'lık MnSO<sub>4</sub>: 0,076 g MnSO<sub>4</sub> saf su ile 50 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

10 mM'lık ZnCl<sub>2</sub>: 0,068 g ZnCl<sub>2</sub> saf su ile 50 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

10 mM'lık  $\text{Fe}_2\text{SO}_4$ : 0,104 g  $\text{Fe}_2\text{SO}_4$  saf su ile 50 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

10 mM'lık  $\text{FeCl}_3$ : 0,081 g  $\text{FeCl}_3$  saf su ile 50 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

10 mM'lık Askorbik Asit: 0,088 g Askorbik Asit saf su ile 50 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

10 mM'lık EDTA (Etilen diamin tetra asetik asit): 0,093 g EDTA tartıldı ve 25 mL saf suda çözülerek hazırlandı.

10 mM'lık SDS (Sodyum dodesil sülfat): 0,072 g SDS tartıldı ve 25 mL saf suda çözülerek hazırlandı.

10 mM'lık  $\beta$ -merkaptolanol: 0,0195 g  $\beta$ -merkaptolanol tartıldı ve 25 mL saf suda çözülerek hazırlandı.

Çalışmalar esnasında kullanılan tüm çözeltiler: 1 mM'lık çözeltileri için; 10 mM'lık stok çözeltiden 1 mL alınıp 10 mL'ye saf su ile tamamlanarak hazırlandı. 0,1 mM'lık çözeltileri için 1 mM'lık çözeltilisinden 1 mL alınarak 10 mL'ye saf su ile tamamlanarak hazırlandı.



## **3.2. Yöntem**

### **3.2.1. Protein Tayini**

#### **3.2.1.a. Kalitatif protein tayini**

Kromatografi işlemleri sonunda kolondan eşit hacimde alınan elüsyonların içerdiği protein miktarı 280 nm’de absorbans okunarak belirlendi. Bu metodun esası 280 nm’de proteinlerin yapısında bulunan fenilalanin, triptofan ve tirozinin maksimum absorbans göstermesi esasına dayanmaktadır (Mc Intosh 1969). Fraksiyonlar kuartz küvetlere alındı ve absorbansları spektrofotometrede köre karşı okundu.

#### **3.2.1.b. Coomassie brilliant blue yöntemi ile protein tayini**

Bu yöntem, Coomassie brilliant blue G-250 boyasının farklı konsantrasyonlardaki protein çözeltilerinde değişik şiddette mavi renk ortaya çıkarmasından yararlanılarak geliştirilmiştir. Boyanın özellikle arginin gibi bazik amino asitlerle, tirozin ve triptofan gibi bazı aromatik amino asitlere bağlanma eğiliminde olduğu gözlenmiştir. Coomassie brilliant blue G-250 fosforik asitli ortamda proteinlere bağlanır ve oluşan kompleks 595 nm’de maksimum absorbans gösterir. Yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır (Bradford 1976).

Bu yöntemde standart protein olarak sığır serum albumini kullanıldı. Tayin işlemleri şöyle yapıldı 1 mL’inde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albumin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µL alınarak saf su ile 0,1 mL’ye tamamlandı. Her bir tüpe 5 mL coomassie blue reaktifi ilave edildi ve karıştırıldı. Kör olarak 0,1 mL aynı tampon ve 5 mL Coomassie blue reaktifinden oluşan karışım kullanıldı. 10 dak sonra 595 nm’de 3 mL’lik küvetlerde köre karşı absorbans değeri okundu. Absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri standart grafik halinde gösterildi (Şekil 4.1).

**3.2.1.c. Paraoksonaz (PON1) aktivitesi :** Paraoksonaz aktivitesi için substrat olarak O,O-dietil-O-p-nitrofenilfosfat kullanıldı ve p-nitrofenol'ün 412 nm'de absorpsiyonundaki artış izlenerek ölçüldü. 25°C' de 1 mM CaCl<sub>2</sub> içeren 50 mM Tris-HCl (pH:8,0) tamponu içerisinde 1mM paraoksonun substrat olarak kullanılmasıyla belirlendi. Enzimatik aktivite molar ekstinksiyon katsayısı ( $\epsilon=18000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  pH 8,0) aktivitenin hesaplanması için kullanıldı. Paraoksonazın enzim ünitesi, 1 dakikada hidroliz olan paraokson'un mikromol sayısıdır (Renault *et al.* 2006).

### **3.2.2. Kabak çekirdeğinden (*Cucurbitae peponis semen*) ve fındıktan (*Corylus avellana*) paraoksonaz enziminin saflaştırılması**

#### **3.2.2.a. Homojenatların hazırlanması**

Bu tez kapsamında paraoksonaz enzimi, kabak çekirdeğinden ve fındıktan saflaştırıldı. Kabak çekirdeği (*Cucurbitae peponis semen*) Erzurum yöresinden toplanmış olup, fındık (*Corylus avellana*) ise Karadeniz yöresinden toplanmıştır. Kabak çekirdeği ve fındık kabuklarından ayrılıp, yenilebilir iç kısımlarıyla çalışılmıştır.

10 g kabak çekirdeği alınarak ilk önce sıvı azot kullanılarak mekanik olarak birkaç basamakta parçalandı. Daha sonra 50 mL tampon (pH'ı 8,0 olan 0,1 M Tris-HCl /2 mM CaCl<sub>2</sub>/ 0,5 M NaCl tamponu) içerisine alınarak ve manyetik karıştırıcı kullanılarak 30 dak. oda sıcaklığında karıştırıldı. Homojenatlar 30 dak +4°C'de 5000 rpm'de santrifüjlendi. Böylece kabak çekirdeğindeki katı parçacıkların protein çözeltisinden uzaklaştırılması sağlandı. Aynı prosedür fındık içinde uygulandı.

#### **3.2.2.b. Afinite jelinin hazırlanması**

Afinite jeli Sepharose-4B matriksi üzerinde hazırlandı. Sepharose-4B'nin CNBr ile aktifleştirilmesinden sonra, L-tirozin kovalent olarak takıldı. Daha sonra 1-naftilamin ile diazolanarak tirozine kenetlendi. Burada tirozin afinite jelinin uzantı kolunu

oluştururken 1-naftilamin ise enzime spesifik olarak bağlanacak kısmı oluşturmaktadır.

### **Sepharose-4B nin aktifleştirilmesi ve tirozin takılması**

20 mL kadar sepharose-4B jeli destile su ile iyice yıkanarak dekante edildi. Eşit hacimdeki destile su ile birleştirildi. Karıştırılmakta olan jel süspansiyonuna 4 g toz haline getirilmiş CNBr'ün tamamı katıldı. pH metre kullanılarak süspansiyonun pH'sı NaOH ile 11'e çıkarıldı ve reaksiyon boyunca bu pH korundu. Sıcaklık buz katılımı ile 20°C civarında tutuldu. Reaksiyona pH değişmeyinceye kadar devam edildi (15 dak). Karışım bir buchner hunisine nakledildi. 250 mL soğuk 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> tamponu pH; 10 ile yıkandı ve bir behere aktarıldı. Aynı tamponun 20 mL'sinde 80 mg tirozin çözülmüş soğuk çözelti behere ilave edildi ve karıştırıldı. Yıkama, tirozin çözeltisi ilavesi ve bagele karıştırma, 90 saniyeden az bir sürede tamamlandı. Bundan sonra süspansiyon 4°C'de 2 saat süre ile magnetik karıştırıcıda karıştırıldı ve 16 saat 4°C'de bekletildi. Bu sürenin bitiminde yıkama suyu 280 nm'de absorbans vermeyinceye kadar bol su ile yıkandı. Böylece reaksiyona girmeyen tirozin tamamen uzaklaştırılmış oldu. Yıkama, 100 mL 0,2 M NaHCO<sub>3</sub> tamponu ile (pH: 8,8) tekrarlandı ve tirozin takılı jel aynı tamponun 40 mL'si içine alındı.

### **Naftilamin kenetlenmesi**

25 mg 1-naftilamin, 0°C civarında 10 mL 1 M HCl içinde çözüldü. 75 mg NaNO<sub>2</sub> ihtiva eden 0°C'daki 5 mL çözelti, 1-naftilamin çözeltisine damla damla katıldı. 10 dakikalık reaksiyondan sonra diazolanmış bulunan naftilamin 40 mL Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonuna ilave edildi. pH'sı 1 M NaOH ile 9,5'a çıkartılarak sabit tutuldu ve 3 saat süreyle oda sıcaklığında yavaş yavaş karıştırıldı, daha sonra 1 L saf su ve 200 mL 0,05 M Tris-SO<sub>4</sub> (pH:7,4) tamponuyla yıkandı. Yıkandıktan sonra bu tampon içerisinde muhafaza edildi.

### 3.2.2.c. Kolona homojenatın tatbiki

Yukarıda hazırlanan afinite jeli, kabak çekirdeğinden ve fındıktan hazırlanan homojenattan paraoksonaz enziminin saflaştırılmasında kullanıldı. Bu amaçla önce afinite kolonu hazırlandı. 1,5 cm<sup>2</sup>x30 cm boyutunda olan kolona jel bir huni vasıtasıyla dolduruldu ve jel çöktükten sonra pH'sı 8,0 olan 0,1 M Tris-HCl / 2 mM CaCl<sub>2</sub>/ 0,5 M NaCl tamponu ile dengelendi. Hazırlanan homojenat afinite kolonuna tatbik edildi. Kolon pH'sı 8,0 olan 0,1 M Tris-HCl / 2 mM CaCl<sub>2</sub>/ 0,5 M NaCl tamponu ile yıkandı. Böylece paraoksonaz enziminin büyük kısmı kolona tutulmuş ve diğer safsızlıklar uzaklaştırılmış oldu. Daha sonra pH'sı 6,8 olan 0,1 M Tris-HCl / 2 mM CaCl<sub>2</sub> çözeltisi kolona tatbik edilip paraoksonaz enzimi elüe edildi. Elüatlar 5'er mL halinde tüplere alındı. Peristaltik pompa vasıtasıyla kolonun akış hızı 20 mL/saat'e ayarlandı. Enzimin elüsyonu sırasındaki protein miktarına 280 nm'deki absorbanslarına bakılarak karar verildi. Anlatılan bu işlemler kabak çekirdeği ve fındık için ayrı ayrı uygulandı.

### 3.2.3. SDS poliakrilamid jel elektroforezi ile enzimin saflığının ve alt birimlerinin var olup olmadığının kontrolü

Enzimin saflaştırılmasından sonra kesikli SDS-PAGE elektroforezi uygulanarak enzimin saflık derecesi ve alt birimlerinin olup olmadığı kontrol edildi (Laemmli 1970).

Bunun için elektroforez plakaları önce saf su ile iyice yıkandı. Plakaları birleştiren mikalara ince tabaka halinde vazelin sürüldü. İki cam plaka birbiri üzerine kondu ve parafin kullanılarak jel hazırlama cihazına konularak sıkıştırıldı. Ayırma jeli hazırlanarak plakalar arasına enjektör yardımı ile döküldü. Jel içinde hava kabarcıkları olmamasına dikkat edildi. Jel yüzeylerinin düzgün olması için %0,1'lik SDS ile ince bir tabaka oluşturuldu.

Katılmaşncaya kadar (yaklaşık 30 dak.) beklendi. Katılmaşınca üst kısmındaki %0,1'lik SDS döküldü. Daha sonra yığma jeli üst kısma kadar ilave edildi. Üzerine dikkatli bir

şekilde tarak yerleştirildi. Yığıma jeli katılaştıktan sonra tarak dikkatlice çıkarılarak plakalar elektroforez tankına yerleştirildi. Oluşan boşluklar işaretlenerek jelin üstü saf su ve yürütme tamponu ile yıkandı. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına akım geçecek şekilde yürütme tamponu konuldu.

Numuneler her birinde 20 µg olacak şekilde hazırlandı ve toplam hacim 100 µL olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu katıldı ve 3 dakika sıcak su banyosunda inkübe edildi. Numuneler soğutulmuş enjektör yardımı ile yuvalara ekildi. Tank kapağı kapatılarak alt taraftan anot (+) ve üst taraftan katot (-) bağlantıları yapıldı. Önce 100 voltta 1 saat kadar bekletildi. Daha sonra 150 voltta elektroforez bitene kadar yürütüldü. Elektroforez tankı su ile soğutuldu.

Elektroforez bittikten sonra akım kesilerek cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı. Jel özel kabına konularak renklendirme çözeltisi üstünü örtünceye kadar dolduruldu ve 1,5-2 saat kadar çalkalayıcı üzerinde bırakıldı. Boyama çözeltisinden çıkarılarak jel renk açma çözeltisine konuldu. Belirli aralıklarla değiştirilmek sureti ile jelin zemin rengi açılarak protein bantları belirginleşinceye kadar (yaklaşık 24 saat) çözelti içinde çalkalandı. Jel renksizleştirme çözeltisinden çıkartıldı ve fotoğrafı çekilerek bilgisayara aktarıldı (Laemmli 1970).

**Ayrırma jelinin hazırlanması:** 15 mL Tris-HCl (pH: 8,8), 13,2 mL %30'luk akrilamid %0,8'lik bisakrilamid, 0,6 mL %1'lik SDS, 0,4 mL %5'lik TEMED (N,N,N',N'-tetra metil etilen diamin) ve 9,4 mL su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine en son olarak 0,8 mL %1,5'lük amonyum persülfat [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>: (PER)] ilave edildi.

**Yığıma jelinin hazırlanması:** 1 M'lık Tris-HCl (pH: 6,8)'den 1.24 mL, %30'luk akrilamid-%0,8'lik bisakrilamid'den 1 mL, %1'lik SDS'den 0,1 mL, %5'lik TEMED'den 0,1 mL ve sudan 7,80 mL alınarak karıştırıldı. Son olarak yine günlük hazırlanmış %1,5'lik PER'den 0,20 mL ilave edildi.

### 3.2.4. Kabak çekirdeğinden (*Cucurbitae peponis semen*) ve fındıktan (*Corylus avellana*) saflaştırılan paraoksonaz enzimi üzerinde kinetik çalışmalar

Kabak çekirdeğinden ve fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enziminin kinetik özelliklerini araştırmak üzere optimum pH ve optimum sıcaklık değerleri bulundu. Enzimin molekül ağırlıkları belirlendi ve daha sonra paraokson substratı için  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri tayin edildi. Ayrıca enzim aktivitesi üzerine bazı katyonların ve kimyasalların etkisi araştırıldı.

#### 3.2.4.a. Optimum pH'ın belirlenmesi

Kabak çekirdeğinden ve fındıktan afinite kromatografisi ile saflaştırılan paraoksonaz enziminin optimum pH çalışması enzimin substratı olan paraokson ile yapıldı. Optimum pH'nın belirlenmesi amacıyla altı farklı pH'da tampon çözelti hazırlandı. Bunlar; pH: 4-6 için asetat tamponu, pH: 6-7 için fosfat tamponu ve pH: 7-9 için Tris-HCl tamponu kullanıldı. Tampon çözeltilerin pH'sı 0,1 N HCl veya 0,1 N NaOH kullanılarak ayarlandı. pH:4-9 aralığında uygun tampon çözeltilerinde enzimin gösterdiği hidrolaz aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçüldü ve sonuçlar grafik halinde verildi.

Paraoksonaz enzim aktivitesi tayin işlemlerinde şu prosedür takip edildi:

Her pH denemesi için bir numune ve bir kör olmak üzere iki tüp hazırlandı. Enzimli deneme için her bir tüpe 500  $\mu$ L paraokson çözeltisi, 500  $\mu$ L belirli pH'da ki tampon çözeltisi ve 500  $\mu$ L saf enzim konuldu. Kör tüplere ise 500  $\mu$ L paraokson çözeltisi ve 1 mL belirli pH'da ki tampon çözeltisi ilave edildi. 412 nm'de absorbansları ölçüldü. Bu ölçümün ardından tüpler 15 dak 37°C'de su banyosunda bekletildi ve 412 nm'de yeniden ölçüm yapıldı. İki ölçüm arasındaki fark hesaplanarak enzimatik aktivite molar ekstinksiyon katsayısı 18000  $M^{-1}cm^{-1}$ 'dan faydalanılarak hesaplandı. Paraoksanazın 1

EU'si, optimum şartlarda 1 dakikada oluşan p-nitrofenolün 1 nmol'ü olarak tanımlanabilir.

#### **3.2.4.b. Optimum sıcaklığın belirlenmesi**

Kabak çekirdeğinden ve fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesinde substrat olarak paraokson kullanıldı. Su banyosu kullanılarak enzim çözeltisinin sıcaklığı 0-100°C arasında değiştirildi ve her 10°C'lık artış için aktivite ölçümü yapıldı.

Tayin işleminde kullanılan prosedür şöyledir:

Bir numune ve bir kör tüp olmak üzere her sıcaklık ölçümü için ikişer tüp hazırlandı. Enzimli deneme için her bir tüpe 500 µL paraokson çözeltisi, 500 µL belirli pH'da ki tampon çözeltisi ve 500 µL saf enzim konuldu. Kör tüplere ise 500 µL paraokson çözeltisi ve 1 ml belirli pH'da ki tampon çözeltisi ilave edildi. 412 nm'de absorbansları ölçüldü. Farklı sıcaklık değerlerinde 15 dak bekletildi ve 412 nm'de yeniden ölçüm yapıldı. İki ölçüm arasındaki fark hesaplanarak enzimatik aktivite molar ekstinksiyon katsayısı  $18000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 'dan faydalanılarak hesaplandı. Sonuçlar grafik halinde verildi.

#### **3.2.4.c. Jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığı tayini**

Kabak çekirdeğinden ve fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak molekül ağırlığı tayin edildi. Bu amaçla 3 gram kuru Sephadex G-100, 200 mL tampon çözelti içerisine alındı. 5 saat 90°C'de bekletildi. Su trompu kullanılarak hava kabarcıklarından temizlendi. 1,3x30 cm ebatlarındaki kromatografi kolonu tampon çözelti ile dolduruldu. Jel materyali hava kabarcığı olmayacak şekilde bu kolona dolduruldu ve kolon paketlenildi ve 24 saat süre ile aynı tamponla (0.05 M  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ /1 mM ditiyoeritrol, pH:7,0) dengelendi. Dengeleme işlemine kolonun altından alınan çözelti 280 nm'de absorbans vermeyinceye kadar devam edildi.

Dengelenmiş Sephadex G–100 kolonuna öncelikle konsantrasyonu 0,2 mg/mL olacak şekilde standart protein çözeltisi ( sığır albumin 66000 Da, yumurta albumin 44287 Da, karbonik anhidraz 29000 Da,  $\alpha$ -laktalbumin 14200 Da içeren çözelti) yüklendi. Daha sonra 0.05 M  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ /1 mM ditiyoeritrol (pH: 7.0) tamponu ile elüe edildi ve standart grafik oluşturuldu. Fraksiyon toplayıcı yardımıyla, elüatlar her tüpte 5'er mL olacak şekilde alındı. Spektrofotometrede 280 nm dalga boyunda absorbans vermeyinceye kadar elüsyona devam edildi. Alınan sonuçlar grafik halinde verildi.

Standart protein çözeltisi kolondan geçirildikten sonra, aynı şartlarda dengelenmiş kolona ayrı ayrı saf enzimler yüklendi. Elüatlar 5 mL'lik tüplerde toplandı. Elüatların 280 nm dalga boyunda absorbans değerleri belirlendi ve alınan sonuçlar grafik halinde verildi.

Sonuçlar standart protein çözeltisinden alınan sonuçlarla kıyaslandı (Whitaker 1963).

#### **3.2.4.d. $V_{\max}$ ve $K_m$ değerlerinin belirlenmesi**

Kabak çekirdeğinden ve fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enziminin hız sabiti ( $K_m$ ) ve maximum hızı ( $V_{\max}$ )'ın belirlenmesi için substrat olarak paraokson kullanıldı. Yükselen substrat konsantrasyonuna karşı aktiviteyi bulmak amacıyla altı farklı substrat konsantrasyonunda aktivite ölçümleri yapıldı.

Tayin işleminde aşağıdaki prosedür kullanıldı:

Altı farklı tüp alınarak her tüpe 50  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$ , 200  $\mu\text{L}$ , 300  $\mu\text{L}$ , 400  $\mu\text{L}$ , 500  $\mu\text{L}$  substrat çözeltisinden ilave edildi. Kör olarak da aynı substrat konsantrasyonları hazırlandı. Numune tüpü içerisine 500  $\mu\text{L}$  saf enzim ve bu enzim substrat karışımının son hacmi 1,5 mL olacak şekilde tampon çözelti ilave edildi. Kör için ise enzim çözeltisi yerine tampon çözelti konularak son hacim 1,5 mL'ye tamamlandı. 412 nm'de absorbansları ölçüldü. Bu ölçümün ardından tüpler 15 dak 37°C'de su banyosunda



bekletildi ve 412 nm’de yeniden ölçüm yapıldı. İki ölçüm arasındaki fark hesaplanarak enzimatik aktivite molar ekstinksiyon katsayısından faydalanılarak ( $18000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) hesaplandı. Bu işlemler kabak çekirdeğinden ve fındıktan saflaştırdığımız enzim için ayrı ayrı uygulandı.

$1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri bulunarak Lineweaver Burk eğrileri çizildi.  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri grafik ve doğru denklemleri yardımıyla hesaplandı.

#### **3.2.4.e. Kabak çekirdeğinden (*Cucurbitae peponis semen*) ve fındıktan (*Corylus avellana*) saflaştırılan paraoksonaz enziminin substrat spesifikliğinin belirlenmesi**

Kabak çekirdeğinden ve fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enzimi için fenilasetat kullanılarak substrat spesifikliğı belirlendi. Bu amaçla aktivite fenilasetat’ın 270 nm’de absorpsiyonundaki artış izlenerek ölçüldü.

Tayin işleminde kullanılan prosedür şöyledir:

Altı farklı tüp alınarak her bir tüpe 50  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$ , 200  $\mu\text{L}$ , 300  $\mu\text{L}$ , 400  $\mu\text{L}$ , 500  $\mu\text{L}$  substrat çözeltisinden ilave edildi. Kör olarak da aynı substrat konsantrasyonları hazırlandı. Numune tüpü içerisine 500  $\mu\text{L}$  saf enzim ve bu enzim substrat karışımının son hacmi 1,5 mL olacak şekilde tampon çözelti ilave edildi. Kör için ise enzim çözeltisi yerine tampon çözelti konularak son hacim 1,5 mL’ye tamamlandı. 270 nm’de absorbansları ölçüldü. Bu ölçümün ardından tüpler 15 dak  $37^\circ\text{C}$ ’de su banyosunda bekletildi ve 270 nm’de yeniden ölçüm yapıldı. İki ölçüm arasındaki fark hesaplanarak enzimatik aktivite molar ekstinksiyon katsayısı  $1310 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  faydalanılarak hesaplandı. 1 enzim ünitesi optimum şartlarda hidrolizlenen fenilasetatın 1  $\mu\text{mol}$ ’ü olarak tanımlanmaktadır. Bu işlemler kabak çekirdeğinden ve fındıktan saflaştırdığımız enzim için ayrı ayrı uygulandı.

1/V ve 1/[S] değerleri bulunarak Lineweaver Burk eğrileri çizildi.  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri grafik ve doğru denklemleri yardımıyla hesaplandı. Sonuçlar grafik halinde verildi.

### **3.2.5. Kabak ęekirdeęinden (*Cucurbitae peponis semen*) ve fındıktan (*Corylus avellana*) saflaştırılan paraoksonaz enzim aktivitesi üzerine bazı katyonların etkisinin belirlenmesi**

Kabak ęekirdeęinden ve fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enzim aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM ve 0,1 mM  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  ve  $Fe^{2+}$  katyonlarının etkisi belirlendi. Bunun için aktivite paraokson varlığında belirlendi.

Aktivite tayini için 500  $\mu L$  enzim çözeltisi, 500  $\mu L$  paraokson çözeltisi, 100  $\mu L$ , 200  $\mu L$ , 300  $\mu L$ , 400  $\mu L$ , 500  $\mu L$  10 mM katyon çözeltisinin toplam hacmi 500  $\mu L$ 'ye tamamlanacak şekilde ilave edildi, 412 nm'de absorbanları ölüdü. Bu ölümün ardından tüpler 15 dak 37°C'de su banyosunda bekletildi ve 412 nm'de yeniden ölüm yapıldı. İki ölüm arasındaki fark hesaplanarak enzimatik aktivite molar ekstinksiyon katsayısı  $18000 M^{-1}cm^{-1}$ 'den hesaplandı. Paraoksanazın 1 EU, optimum şartlarda 1 dakikada oluşan p-nitrofenolün 1 nmol'ü olarak tanımlanabilir. Kr tüp enzim yerine 500  $\mu L$  tampon konarak hazırlandı. Diğer 1 mM ve 0,1 mM katyon çözeltileri için işlem tekrarlandı. Bu işlemler kabak ęekirdeęinden ve fındıktan saflaştırdığımız enzim için ayrı ayrı uygulandı.

### **3.2.6. Kabak ęekirdeęinden (*Cucurbitae peponis semen*) ve fındıktan (*Corylus avellana*) saflaştırılan paraoksonaz enzim aktivitesi üzerine bazı bileşiklerin etkisinin belirlenmesi**

Kabak ęekirdeęinden ve fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enzim aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM ve 0,1 mM EDTA, askorbik asit,  $\beta$ -merkaptolanol ve SDS bileşiklerinin etkisi belirlendi. Bunun için aktivite paraokson varlığında belirlendi.

Aktivite tayini için 500 µL enzim çözeltisi, 500 µL paraokson çözeltisi, 100 µL, 200 µL, 300 µL, 400 µL, 500 µL 10 mM kation çözeltisinin toplam hacmi 500 µL'ye tamamlanacak şekilde ilave edildi, 412 nm'de absorbanları ölçüldü. Bu ölçümün ardından tüpler 15 dak 37°C'de su banyosunda bekletildi ve 412 nm'de yeniden ölçüm yapıldı. Enzimatik aktivite hesaplandı. Kör tüp enzim yerine 500 µL tampon konarak hazırlandı. Diğer 1 mM ve 0,1 mM bileşik çözeltileri için işlem tekrarlandı. Bu işlemler kabak çekirdeğinden ve fındıktan saflaştırdığımız PON izoenzimleri için ayrı ayrı uygulandı.

### **3.2.7. Kabak çekirdeğinden (*Cucurbitae peponis semen*) ve fındıktan (*Corylus avellana*) saflaştırılan paraoksonaz enzim aktivitesi üzerine bazı pestisitlerin etkisinin belirlenmesi**

Kabak çekirdeğinden ve fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enzim aktivitesi üzerine 100 ppm, 10 ppm ve 1 ppm metil paratyon, diklorvos, dimetoat, diazinon, metamifopos, etil paratyon, fention ve asetamiprid etkisi araştırıldı. Bunun için aktivite paraokson varlığında belirlendi.

Aktivite tayini için 500 µL enzim çözeltisi, 500 µL paraokson çözeltisi, 50 µL, 100 µL, 200 µL, 300 µL, 400 µL, 500µL, 600µL 100 ppm pestisit çözeltisinin toplam hacmi 500 µL'ye tamamlanacak şekilde ilave edildi, 412 nm'de absorbanları ölçüldü. Bu ölçümün ardından tüpler 15 dak 37°C'de su banyosunda bekletildi ve 412 nm'de yeniden ölçüm yapıldı. Enzimatik aktivite hesaplandı. Kör tüp enzim yerine 500 µL tampon konarak hazırlandı. Diğer 10 ppm ve 1 ppm pestisit çözeltileri için işlem tekrarlandı.

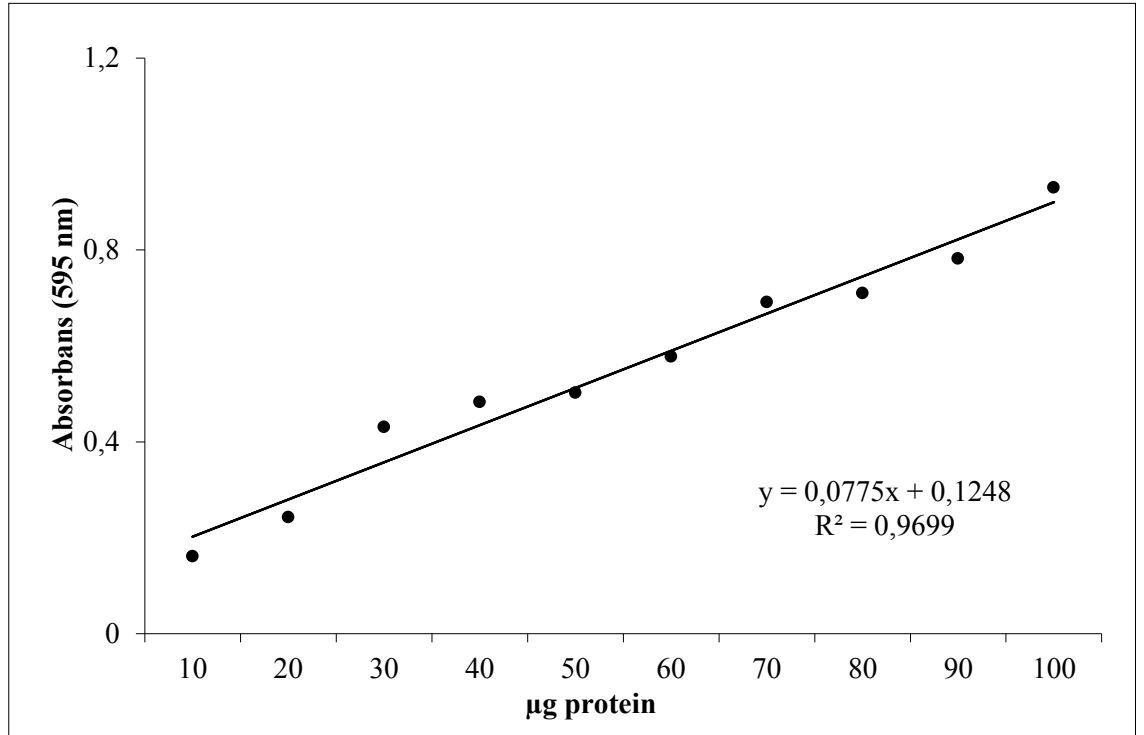
**3.2.8. Kabak çekirdeğinden (*Cucurbitae peponis semen*) ve fındıktan (*Corylus avellana*) saflaştırılan paraoksonaz enzim aktivitesi üzerine inhibitör etkisi gösteren metaller, bileşikler ve pestisitler için  $I_{50}$  değerlerinin belirlenmesine ait çalışmalar**

İnhibitör çalışmalarıyla ilgili farklı inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapılarak, kabak çekirdeğinden ve fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enzimi üzerinde inhibitör etkisi gösteren metaller, bileşikler ve pestisitler belirlendi. Bu maddelerden inhibisyon etkisi yüksek olanların %Aktivite-[I] grafikleri çizildi, eğri denkleminde  $I_{50}$  değerleri hesaplandı.

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

##### 4.1. Kantitatif protein tayini için hazırlanan standart grafik

Kantitatif protein tayininde coomassie brilliant blue yöntemi kullanıldı (Bradford 1976). Coomassie brilliant blue yöntemi için önce bir standart eğri hazırlandı. Standart serum albumin çözeltileri ile hazırlanan homojenatlarda ve saflaştırılan enzim çözeltilerindeki protein miktarı bu eğriye göre belirlendi. Standart çözeltideki mikrogram proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 4.1’de gösterilmiştir.

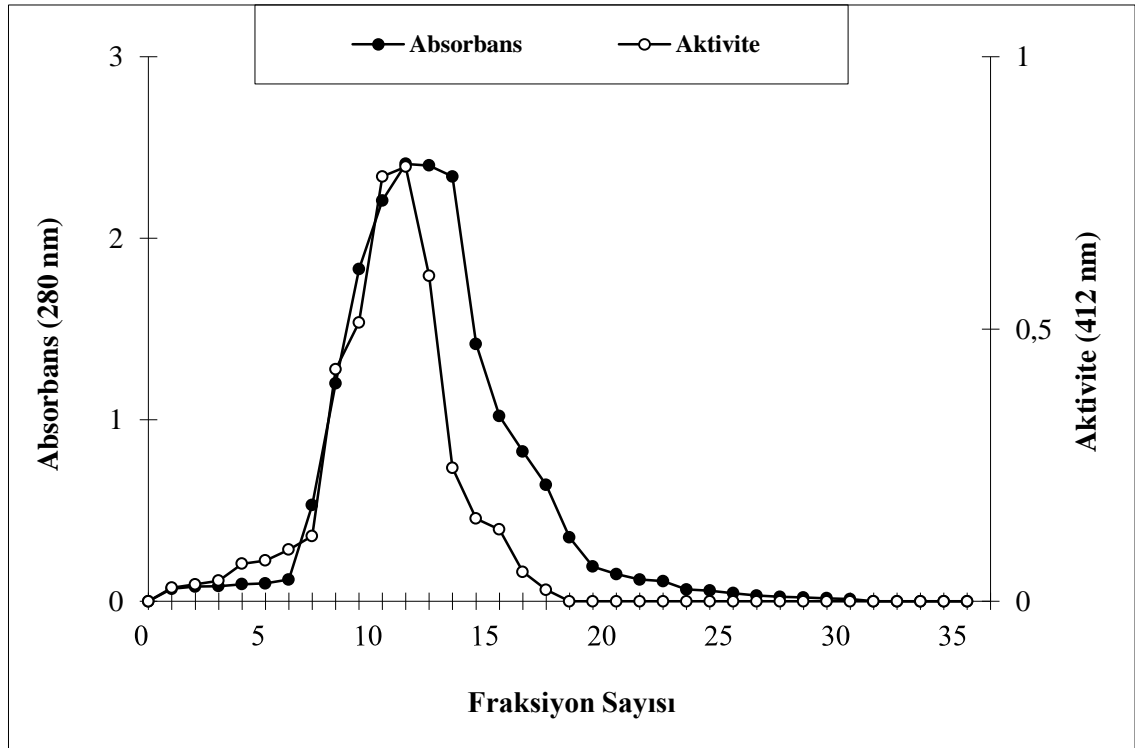


Şekil 4.1. Standart sığır serum albumin çözeltisi kullanılarak coomassie brilliant blue yöntemi ile hazırlanan ve protein tayini için kullanılan standart grafik

## 4.2. Kabak çekirdeğinden (*Cucurbitae peponis semen*) paraoksonaz enzimi saflaştırılması sonuçları

### 4.2.1. Kabak çekirdeğinden paraoksonaz enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılması sonuçları

Enzimi saflaştırmak amacıyla bölüm 3.2.2.a'da anlatıldığı gibi hazırlanan homojenat sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin afinite kolonuna tatbik edildi. Jelin kolona paketlenmesi, tampon ile dengelenmesi ve yıkama işlemlerinin ardından pH'ı 6,8 olan 0,1 M Tris HCl/2 mM CaCl<sub>2</sub> tamponuyla enzimler kolondan elüe edildi. Elüatlar 5 mL'lik fraksiyonlar halinde toplanarak her tüpdeki numune için 280 nm'de kalitatif protein miktarı tayini yapıldı. Absorbans gösteren fraksiyonlar için paraoksonaz aktivitesi tayini yapıldı. Sonuçları grafik halinde Şekil 4.2'de gösterildi.



Şekil 4.2. Afinitye kolonundan kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enziminin pH'ı 6,8 olan 0,1 M Tris-HCl/ 2 mM CaCl<sub>2</sub> tamponuyla elüsyonu

\*Kolon çapı 1,5 cm ve boyu 30 cm, elüsyon hızı 20 mL/saat ve fraksiyon hacmi 5 mL

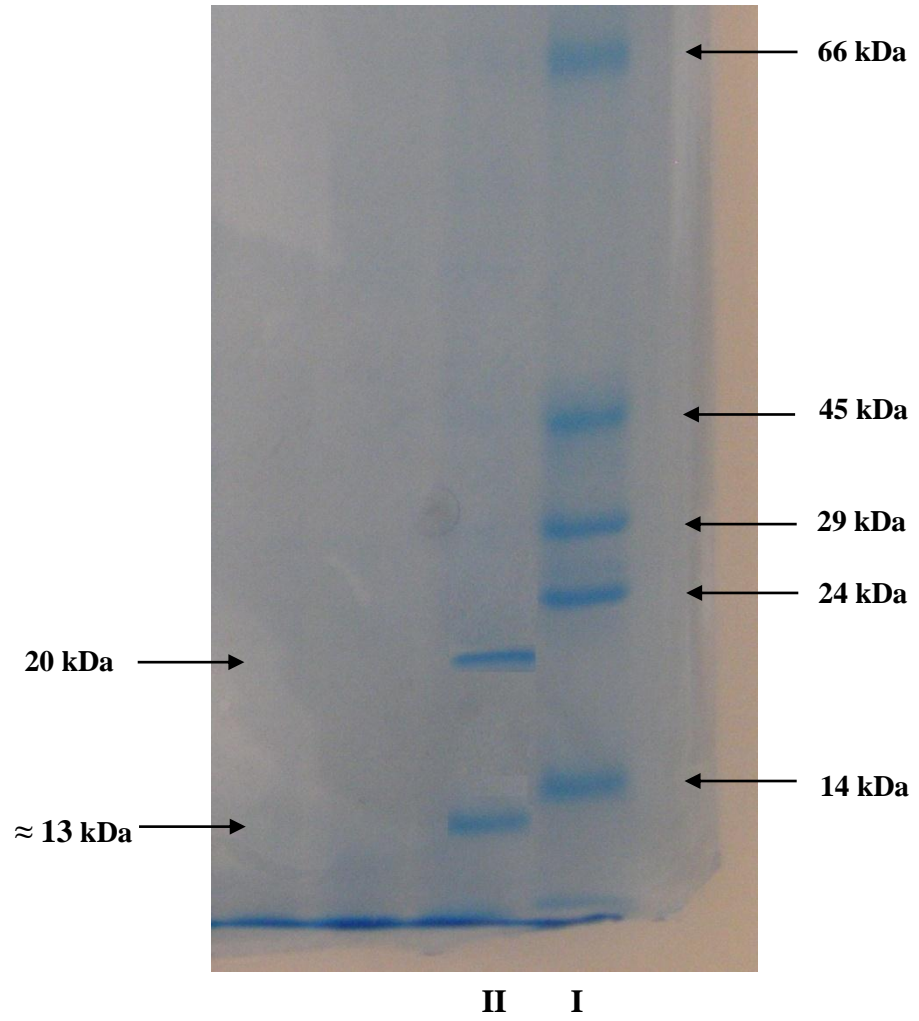
Kabak çekirdeğinden paraoksonaz enzim homojenatı elde edildi. Elde edilen homojenattan ve saf enzimden 1'er mL numune alınarak paraoksonaz aktivitesi ve coomassie brilliant blue yöntemi ile protein tayini yapıldı. Bulunan değerlere göre homojenatın Sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin afinite kolonuna uygulanması sonucu kaç kat saflaştırma yapıldığı hesaplandı ve sonuçlar Çizelge 4.1'de gösterildi.

**Çizelge 4.1.** Kabak çekirdeğinden paraoksonaz enziminin saflaştırma basamakları

Saflaştırma Basamakları	Aktivite (EU/ml)	Toplam Hacim (ml)	Protein (mg/ml)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (EU)	Spesifik Aktivite (EU/mg protein)	Verim (%)	Saflaştırma Katsayısı
<b>Ham Ekstrakt</b>	1,926	20	26,04	520	38,52	0,074	100	-
<b>Sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin Kolonu</b>	2,134	14	0,182	2,551	29,87	11,72	77,55	158,09

### 4.3. SDS poliakrilamid jel elektroforezi sonuçları

Kromatografik işlemler sonucu kabak çekirdeğinden saflaştırılan paraoksonaz enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla SDS Poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı. Enzimin saf olduğu belirlendi ve jelin fotoğrafı çekildi. Şekil 4.3'te gösterildi.



**Şekil 4.3.** Afinite kromatografisi ile kabak çekirdeğinden saflaştırılan paraoksonaz enziminin SDS-poliakrilamid jel elektroforez fotoğrafı

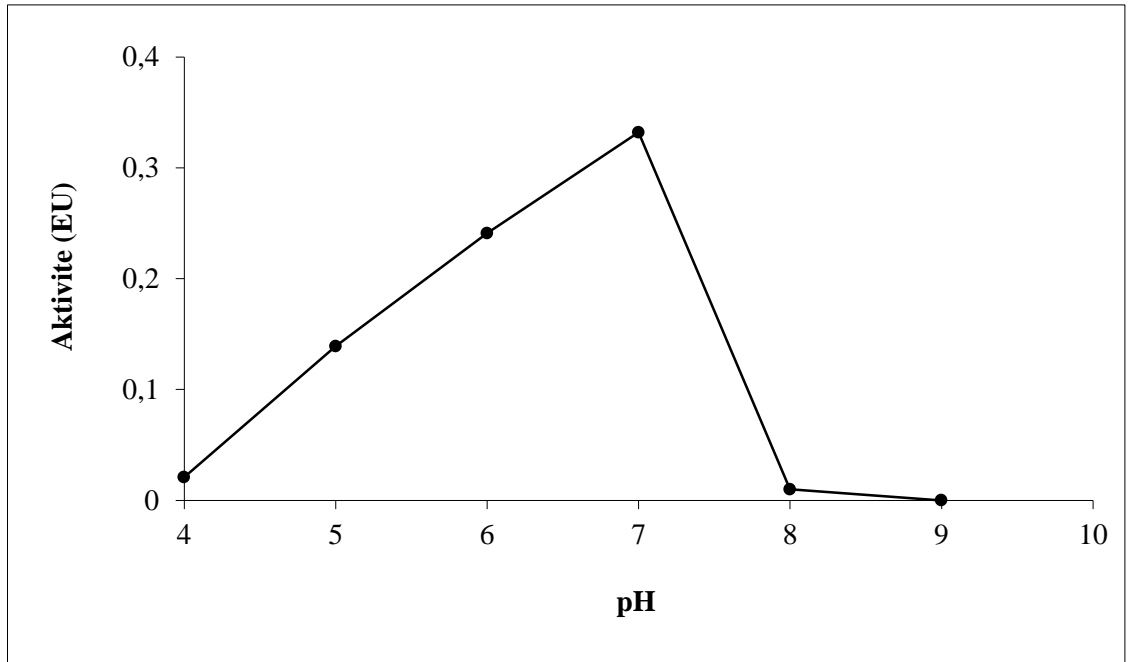
\*I: standart protein;  $\alpha$ -laktalbumin (14 kDa), tripsinojen inhibitör (24 kDa), karbonik anhidraz (29 kDa), yumurta albumin (45 kDa), sığır albumin (66 kDa) II: Kabak çekirdeğinden saflaştırılan paraoksonaz enzimi



#### 4.4. Kabak çekirdeğinden (*Cucurbitae peponis semen*) saflaştırılan paraoksonaz enzimi üzerine kinetik çalışmaların sonuçları

##### 4.4.1. Paraoksonaz enziminin optimum pH sonuçları

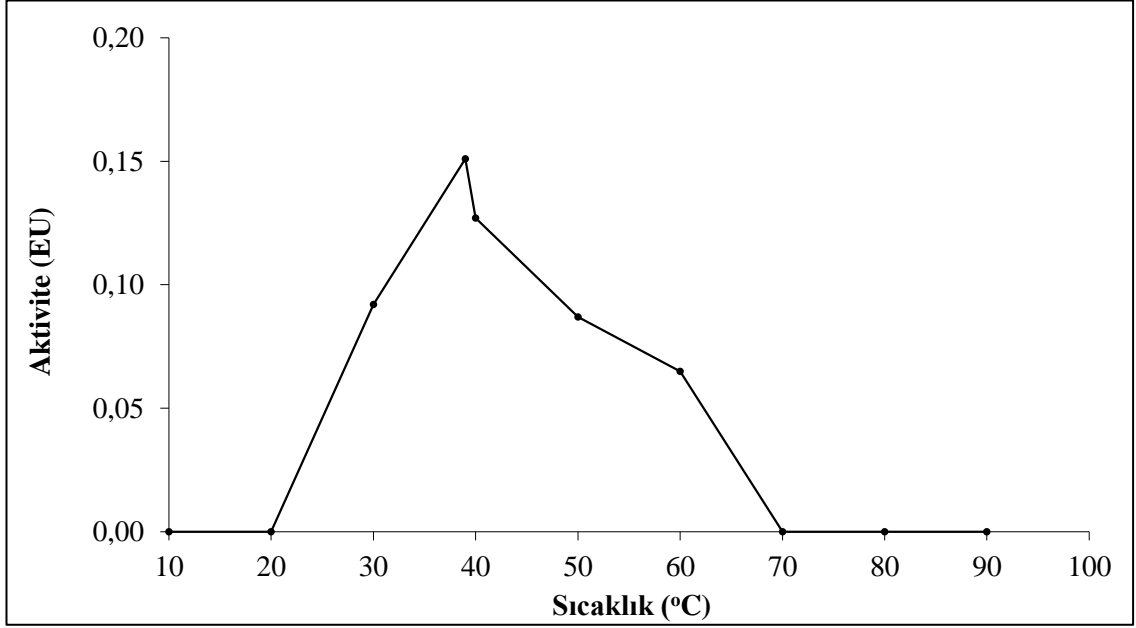
Kabak çekirdeğinden saflaştırılan paraoksonaz enziminin optimum pH değerini belirlemek üzere yapılan deneylerden elde edilen sonuçlarla aktivite hesaplandı ve aktivite - pH grafiği çizildi (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enzimi üzerine pH'ın etkisi

##### 4.4.2. Paraoksonaz enziminin optimum sıcaklık sonuçları

Kabak çekirdeğinden saflaştırılan paraoksonaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek üzere yapılan deneylerden elde edilen sonuçlarla aktivite hesaplandı ve aktivite-sıcaklık grafiği çizildi. Bu grafik Şekil 4.5'te gösterildi.

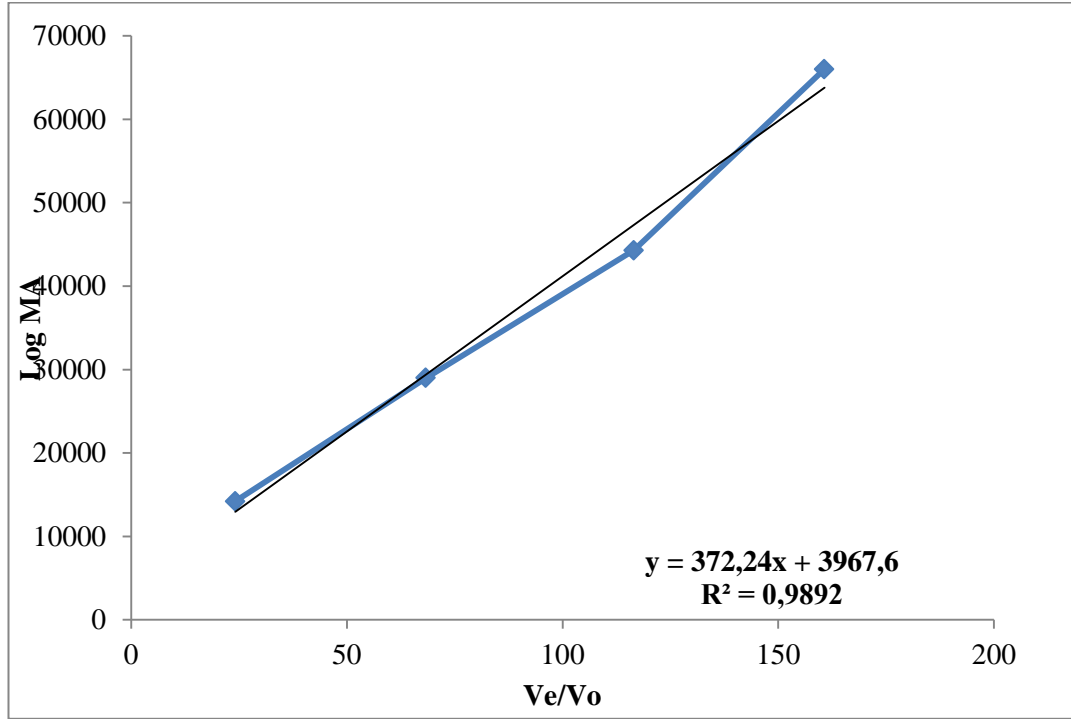


**Şekil 4.5.** Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enzimi üzerine sıcaklığın etkisi

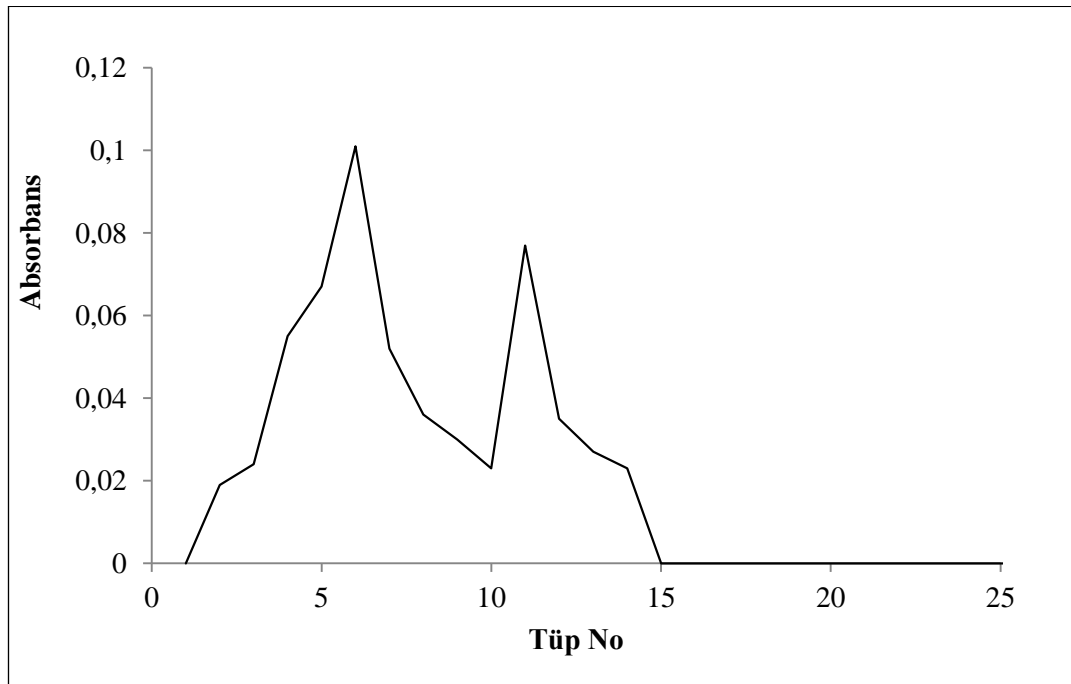
#### 4.4.3. Jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığı tayini sonuçları

Kabak çekirdeğinden saflaştırılan paraoksonaz enziminin molekül ağırlığı, jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak tayin edildi. Dengelenmiş kolona önce, sığır albumin 66000 Da, yumurta albumin 44287 Da, karbonik anhidraz 29000 Da,  $\alpha$ -laktalbumin 14200 Da içeren standart protein çözeltileri yüklenerek 0,05 M  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ /1 mM ditiyoeritrol (pH: 7,0) tamponu ile elüe edildi ve standart grafik oluşturuldu. Daha sonra aynı koşullarda molekül ağırlığı tayin edilecek olan saflaştırılmış paraoksonaz enzimi kolondan geçirildi ve 0,05 M  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ /1 mM ditiyoeritrol (pH: 7,0) tamponu ile elüe edildi. Sonuçlar grafik edildi ve standart proteinlerle karşılaştırıldı.

Kabak çekirdeğinden saflaştırılan paraoksonaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığı 12942 Da ( $\approx$ 13000 Da) ve 20421 Da olarak bulundu. Enzim için jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığı tayini için hazırlanan standart grafik ve absorbans grafiği Şekil 4.6 ve Şekil 4.7’de verilmiştir.



**Şekil 4.6.** Jel filtrasyon kromatografisi standart grafiği (Ve: elüsyon hacmi Vo: kolonun boşluk hacmi)

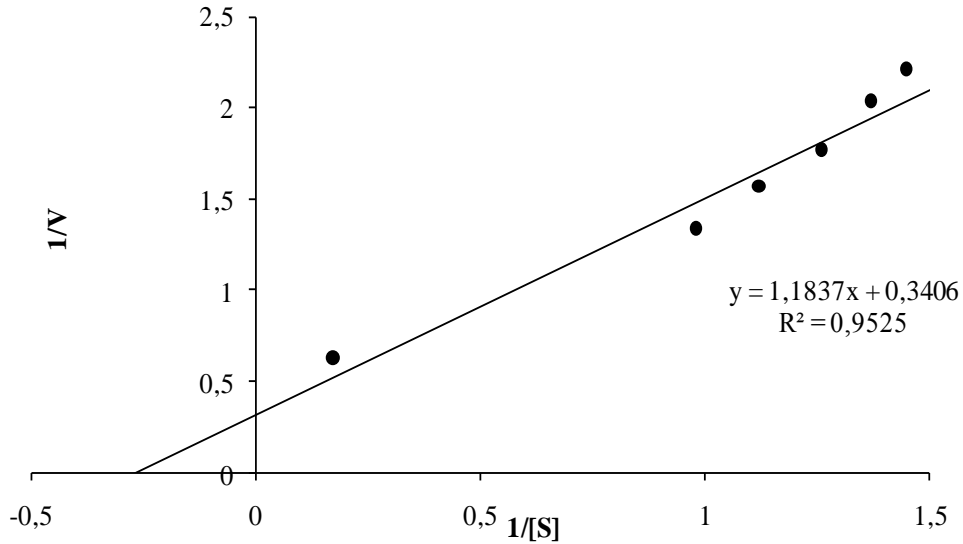


**Şekil 4.7.** Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enziminin jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığı tayini için hazırlanan absorbands grafiği

#### 4.4.4. $V_{\max}$ ve $K_m$ değerlerinin sonuçları

Kabak çekirdeğinden saflaştırılan paraoksonaz enziminin  $V_{\max}$  ve  $K_m$  değerlerini belirlemek amacıyla artan substrat konsantrasyona karşı altı farklı substrat konsantrasyonunda aktiviteler belirlendi. Bu amaçla altı farklı tüp alınarak her bir tüpe 50  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$ , 200  $\mu\text{L}$ , 300  $\mu\text{L}$ , 400  $\mu\text{L}$ , 500 $\mu\text{L}$  substrat çözeltisinden ilave edildi. Kör olarak da aynı substrat konsantrasyonları hazırlandı. Numune tüpü içerisine 500  $\mu\text{L}$  saf enzim ve bu enzim substrat karışımının son hacmi 1,5 mL olacak şekilde tampon çözelti (pH'ı 6,8 olan 0,1 M Tris HCl/2 mM CaCl<sub>2</sub>) ilave edildi. Kör için ise enzim çözeltisi yerine tampon çözelti konularak son hacim 1,5 mL'ye tamamlandı. 412 nm'de absorbansları ölçüldü. Bu ölçümün ardından tüpler 15 dak 37°C'de su banyosunda bekletildi ve 412 nm'de yeniden ölçüm yapıldı. İki ölçüm arasındaki fark hesaplanarak enzimatik aktivite hesaplandı.

1/V ve 1/[S] değerleri bulunarak Lineweaver-Burk eğrileri çizildi ve  $K_m$  ve  $V_{\max}$  değerleri hesaplandı. Elde edilen sonuçlardan  $V_{\max}$  ve  $K_m$  değerleri ise sırasıyla 2,935  $\mu\text{mol/L.dak}$  ve 3,475 mM olarak belirlendi.

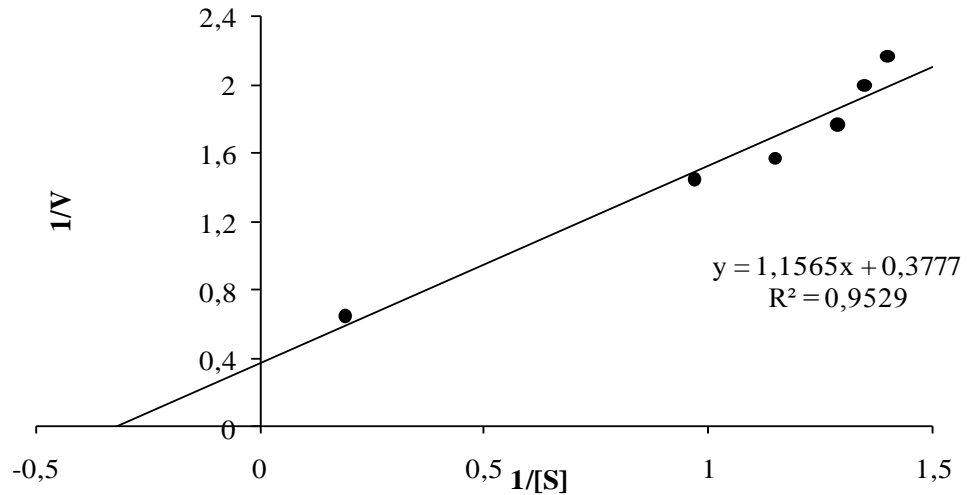


**Şekil 4.8.** Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enziminin paraokson substratıyla elde edilen Lineweaver-Burk grafiği

#### 4.4.5. Kabak çekirdeğinden saflaştırılan paraoksonaz enziminin substrat spesifikliğinin sonuçları

Kabak çekirdeğinden saflaştırılan paraoksonaz enzim aktivitesinin fenilasetat kullanılarak substrat spesifikliğı belirlendi. Bu amaçla aktivite fenilasetat'ın 270 nm'de absorpsiyonundaki artış izlenerek ölçüldü. Aktivite tayini için altı farklı tüp alınarak her bir tüpe 50 µL, 100 µL, 200 µL, 300 µL, 400 µL, 500 µL substrat çözeltisinden ilave edildi. Kör olarak da aynı substrat konsantrasyonları hazırlandı. Numune tüpü içerisine 500 µL saf enzim ve bu enzim substrat karışımının son hacmi 1,5 mL olacak şekilde tampon çözelti ilave edildi. Kör için ise enzim çözeltisi yerine tampon çözelti konularak son hacim 1,5 mL'ye tamamlandı. 270 nm'de absorbansları ölçüldü. Bu ölçümün ardından tüpler 15 dak 37°C'de su banyosunda bekletildi ve 270 nm'de yeniden ölçüm yapıldı. İki ölçüm arasındaki fark hesaplanarak enzimatik aktivite molar ekstinksiyon katsayısı  $1310 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  kullanılarak hesaplandı. 1 enzim ünitesi optimum şartlarda hidrolizlenen fenilasetatın 1 µmol'ü olarak tanımlanmaktadır.

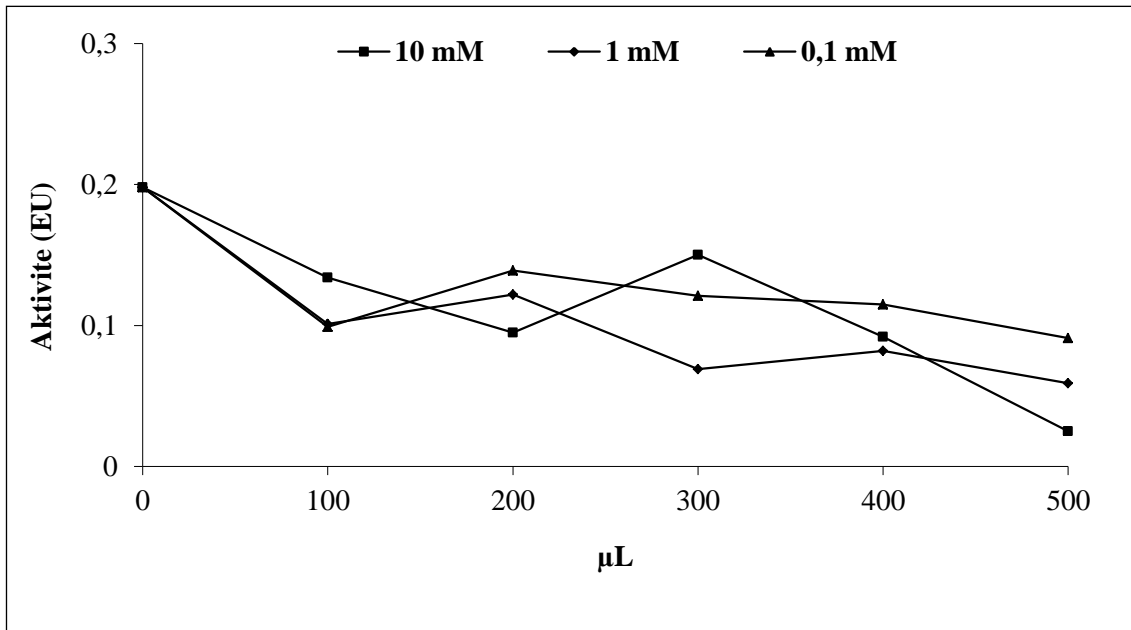
$1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri bulunarak Lineweaver-Burk eğrileri çizildi ve  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri hesaplandı. Elde edilen sonuçlardan  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerleri ise sırasıyla 2,647 µmol /L.dak ve 3,0674 mM olarak belirlendi.



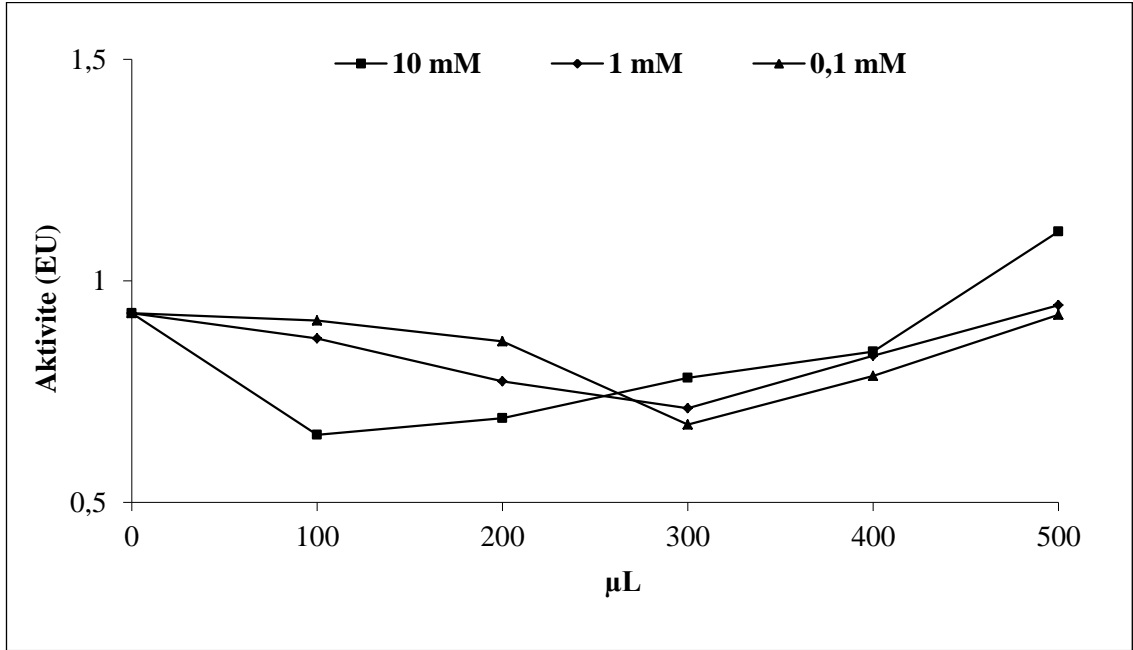
**Şekil 4.9.** Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enziminin fenilasetat substratına karşı substrat spesifikliğı grafiğı

#### 4.5. Kabak çekirdeğinden saflaştırılan paraoksonaz enzim aktivitesi üzerine bazı katyonların etkisinin sonuçları

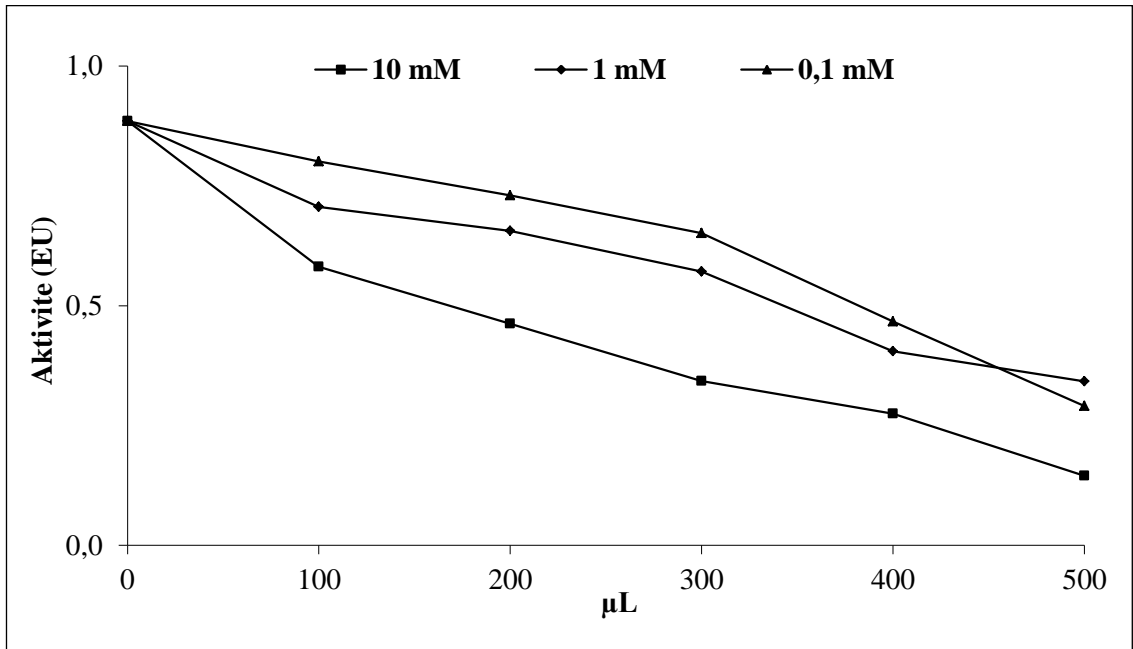
Kabak çekirdeğinden saflaştırılan paraoksonaz enzim aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM ve 0,1 mM  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  ve  $Fe^{2+}$  katyonlarının etkisi belirlendi. Bunun için aktivite paraokson varlığında belirlendi. Sonuçlar Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15 ve Şekil 4.16'da gösterilmektedir.



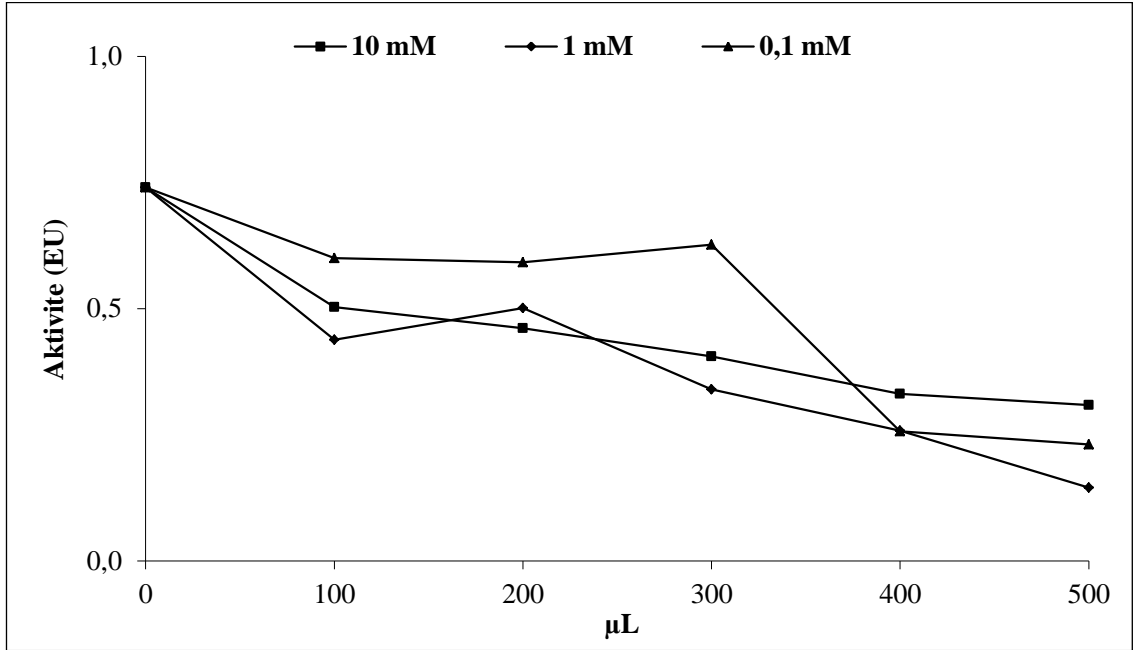
**Şekil 4.10.** Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine  $Mg^{2+}$ 'nin etkisi



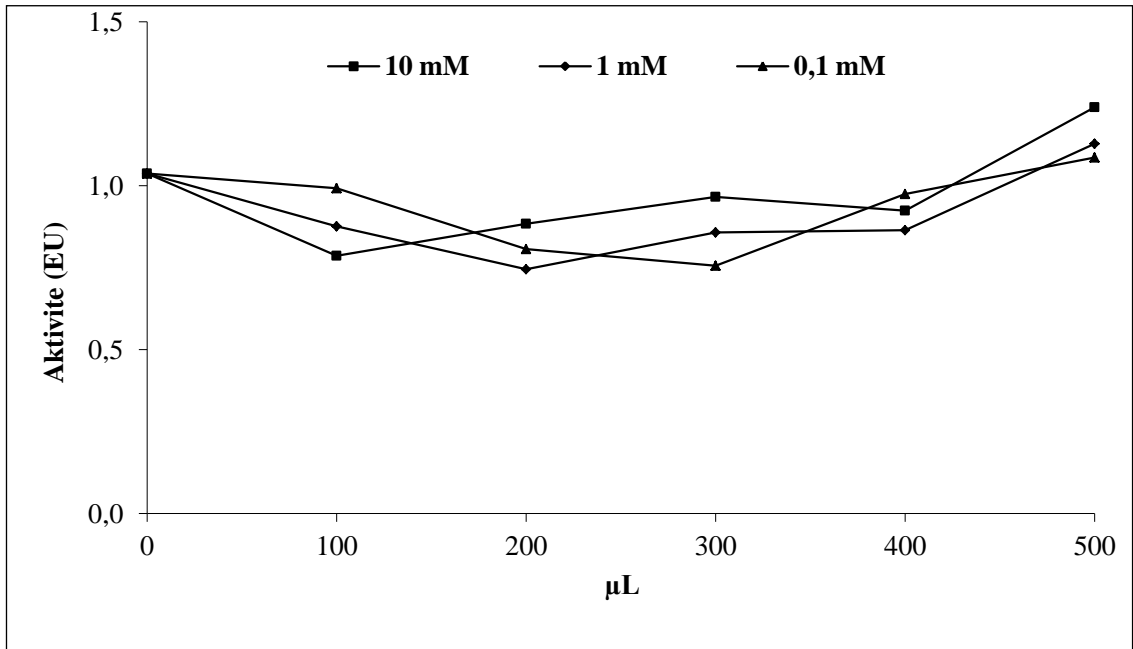
**Şekil 4.11.** Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine  $\text{Ca}^{2+}$ 'nin etkisi



**Şekil 4.12.** Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine  $\text{Cu}^{2+}$ 'nin etkisi

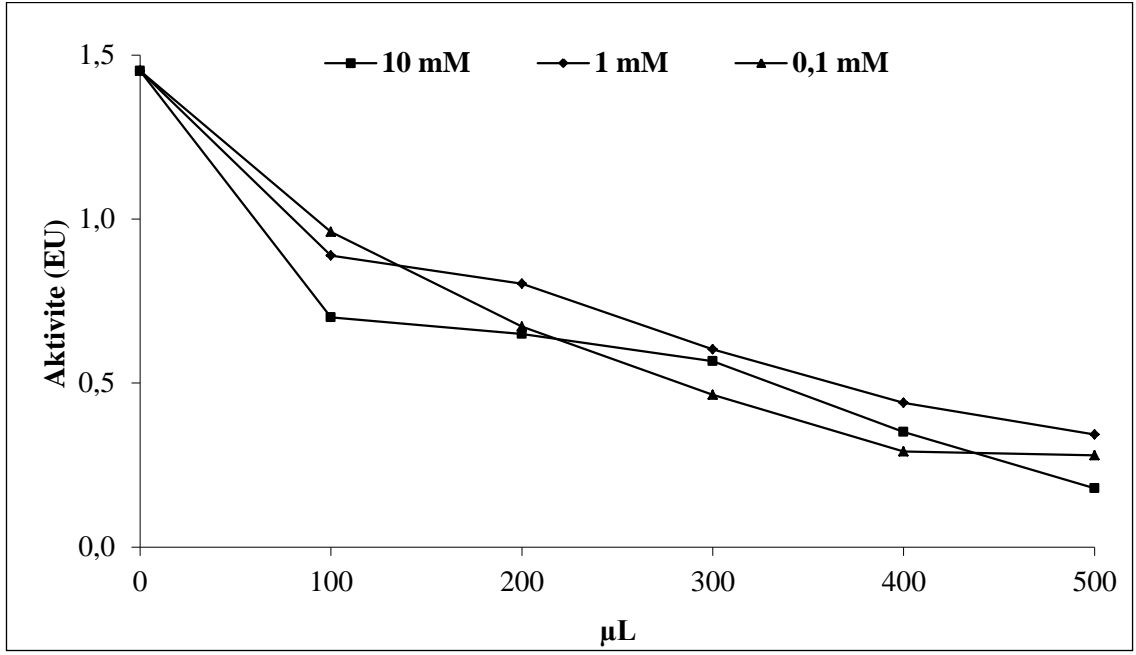


**Şekil 4.13.** Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine  $Mn^{2+}$ 'nin etkisi

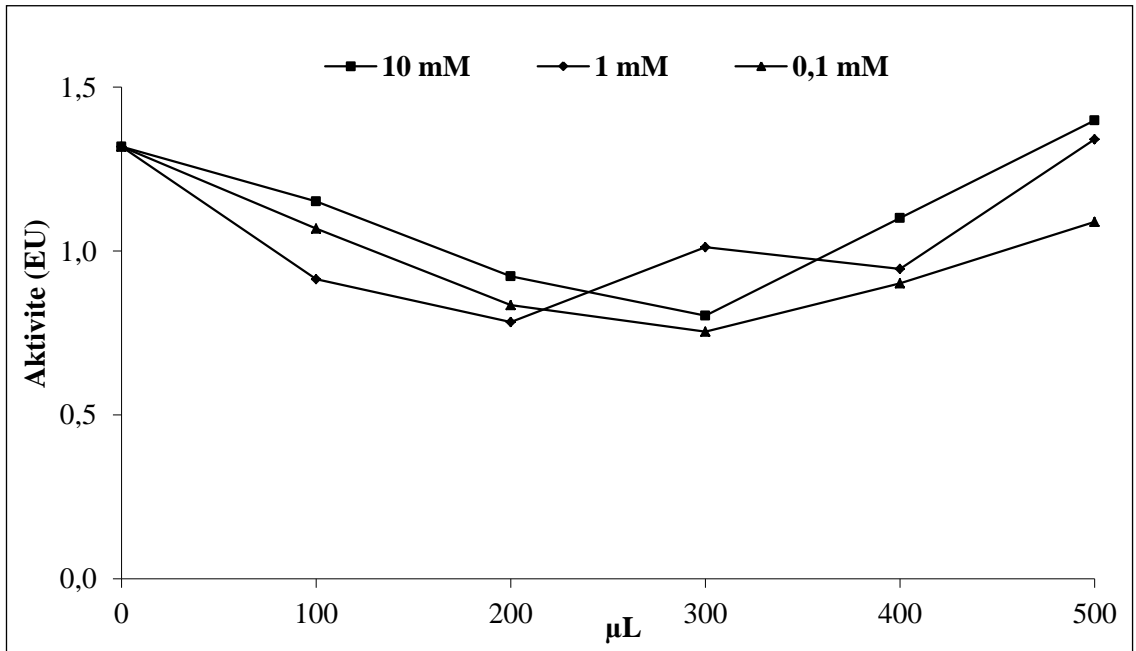


**Şekil 4.14.** Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine  $Zn^{2+}$ 'nin etkisi





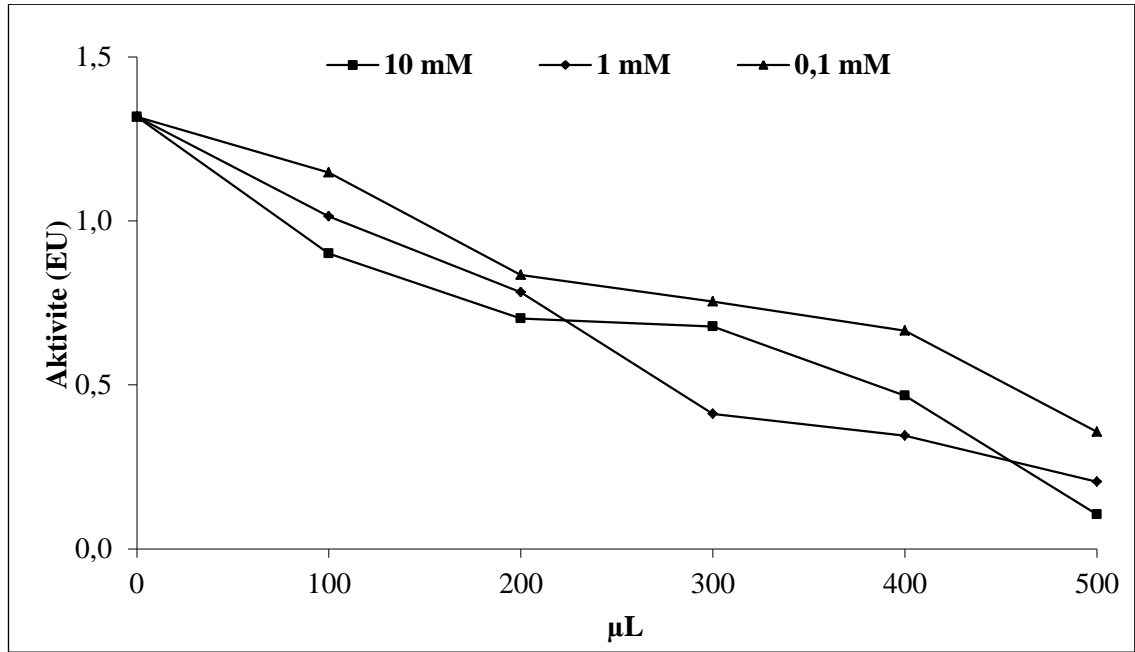
**Şekil 4.15.** Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine  $Fe^{3+}$ 'ün etkisi



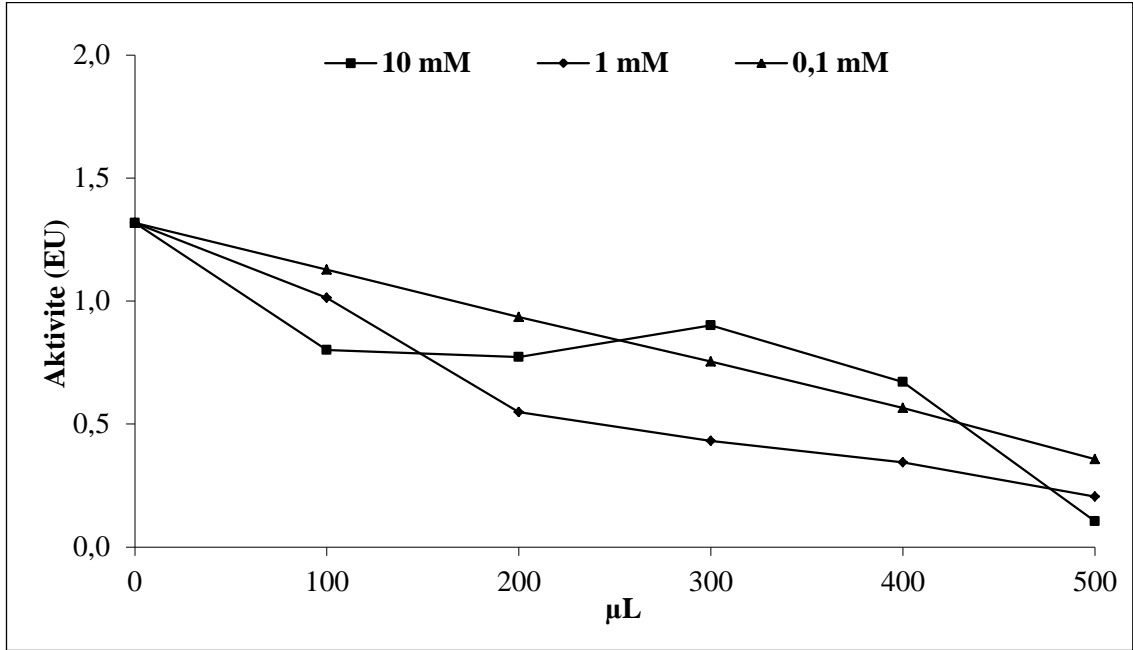
**Şekil 4.16.** Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine  $Fe^{2+}$ 'nin etkisi

#### 4.6. Kabak çekirdeğinden saflaştırılan paraoksonaz enzim aktivitesi üzerine bazı bileşiklerin etkisinin sonuçları

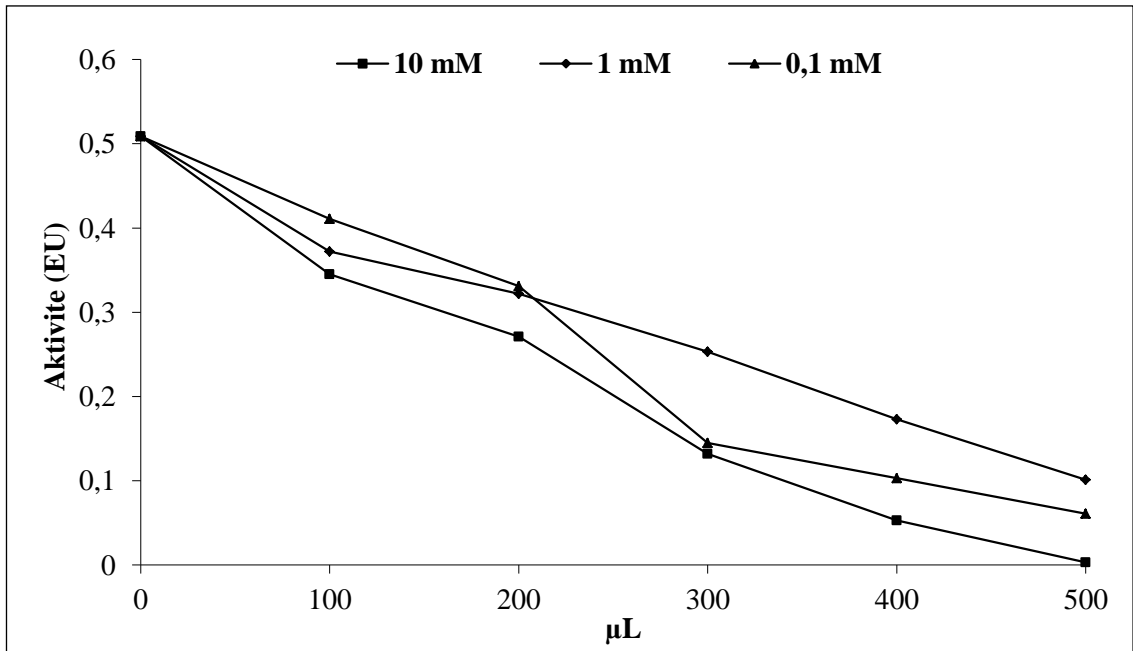
Kabak çekirdeğinden saflaştırılan paraoksonaz enzim aktivitesi üzerine 10, 1 ve 0,1 mM EDTA, askorbik asit,  $\beta$ -merkaptotanol ve SDS bileşiklerinin etkisi belirlendi. Bunun için aktivite paraokson varlığında belirlendi. Sonuçlar Şekil 4.17, Şekil 4.18, Şekil 4.19 ve Şekil 4.20’de gösterilmektedir.



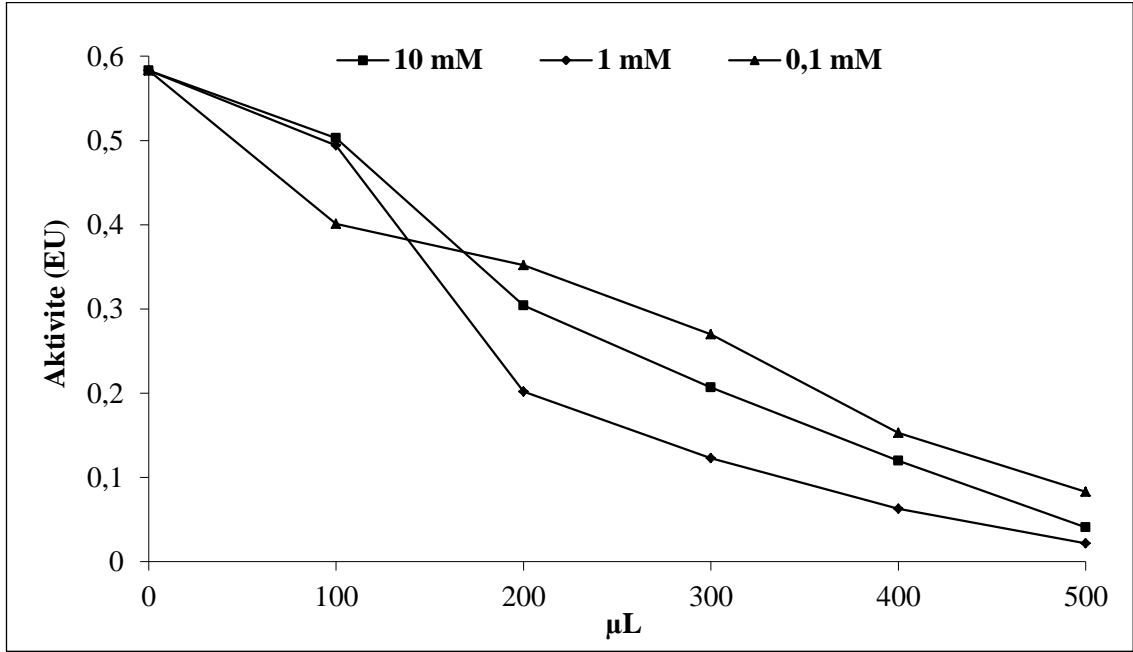
Şekil 4.17. Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine EDTA'nın etkisi



**Şekil 4.18.** Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine askorbik asit'in etkisi



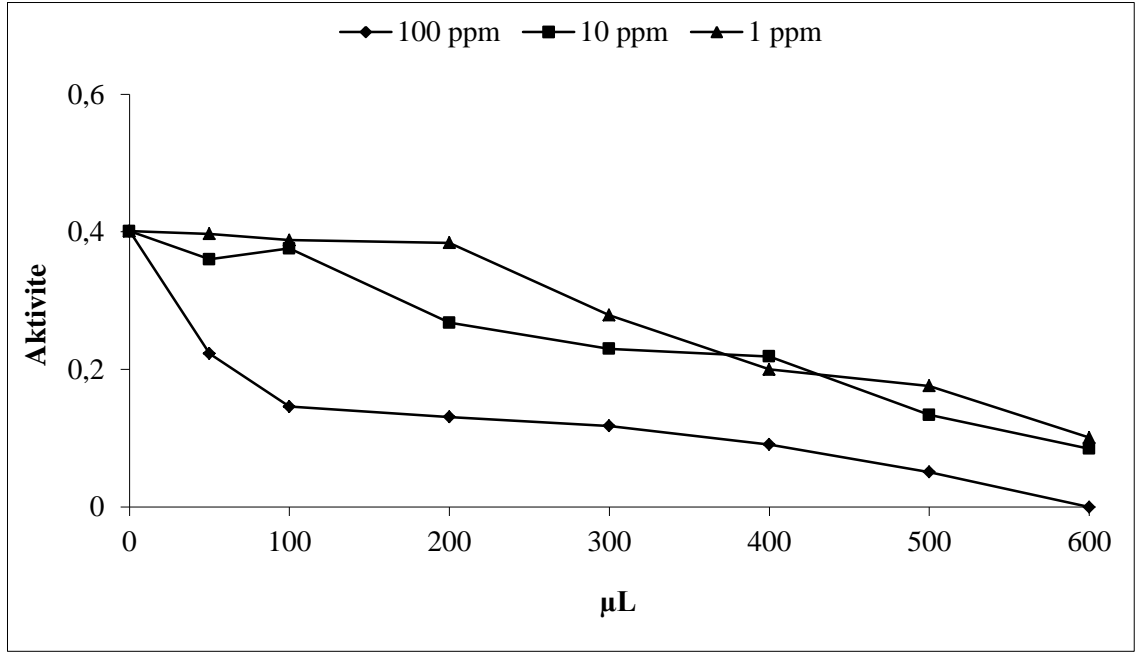
**Şekil 4.19.** Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine  $\beta$ -merkaptetanol'ün etkisi



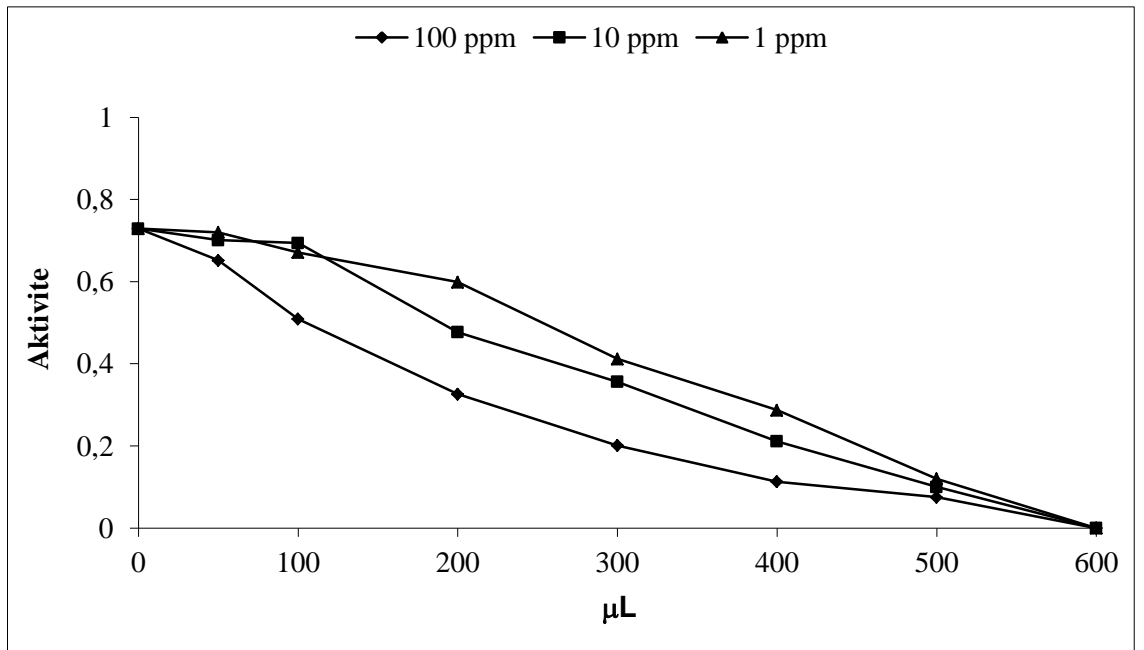
**Şekil 4.20.** Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine SDS'nin etkisi

#### **4.7. Kabak çekirdeğinden saflaştırılan paraoksonaz enzim aktivitesi üzerine bazı pestisitlerin etkisinin sonuçları**

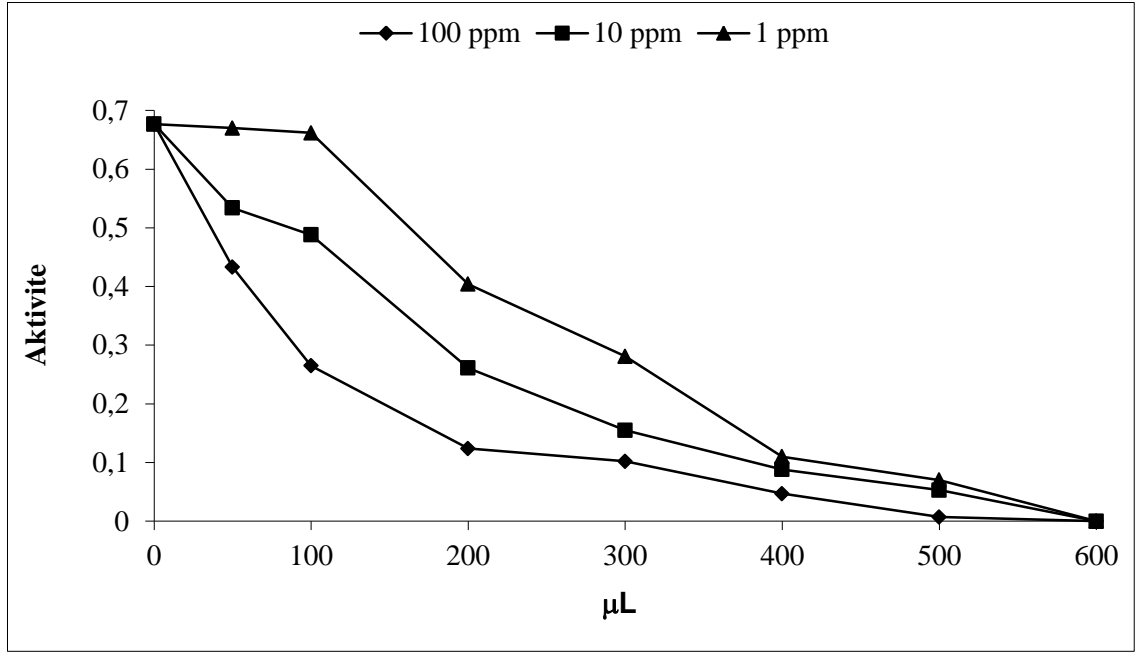
Kabak çekirdeğinden saflaştırılan paraoksonaz enzim aktivitesi üzerine 100 ppm, 10 ppm ve 1 ppm metil paratyon, diklorvos, dimetoat, diazinon, metamidofos, etil paratyon, fention ve asetamiprid pestisitlerinin etkisi araştırıldı. Bunun için aktivite paraokson varlığında belirlendi. Sonuçlar Şekil 4.21, Şekil 4.22, Şekil 4.23, Şekil 4.24, Şekil 4.25, Şekil 4.26, Şekil 4.27 ve Şekil 4.28'de gösterilmektedir.



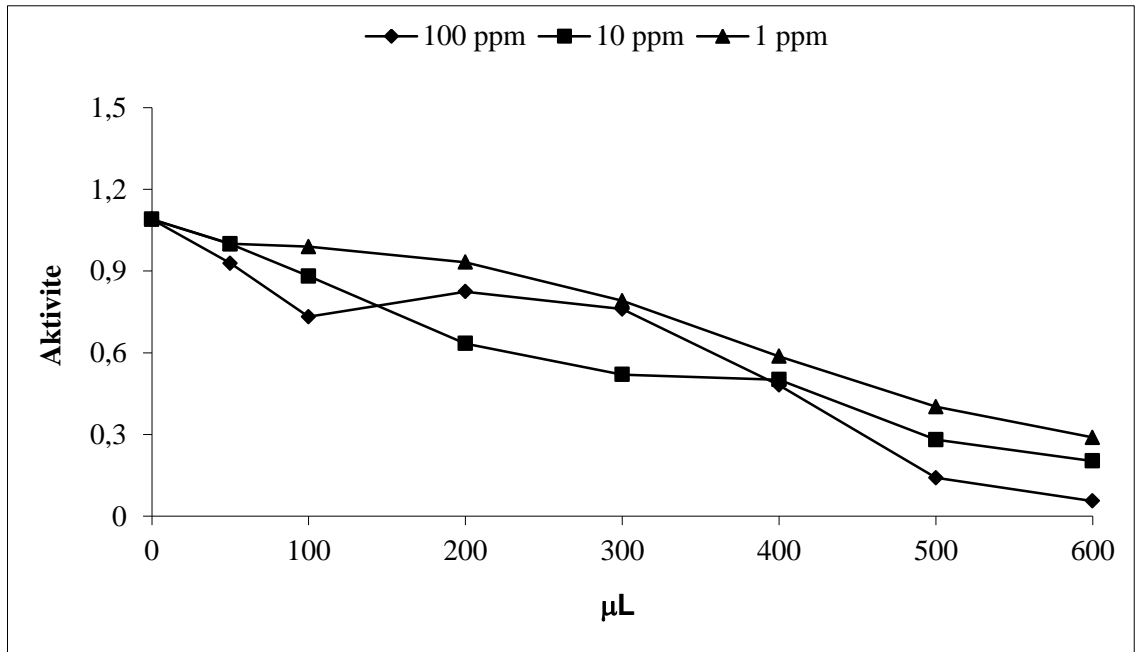
**Şekil 4.21.** Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine metil paratyon'un etkisi



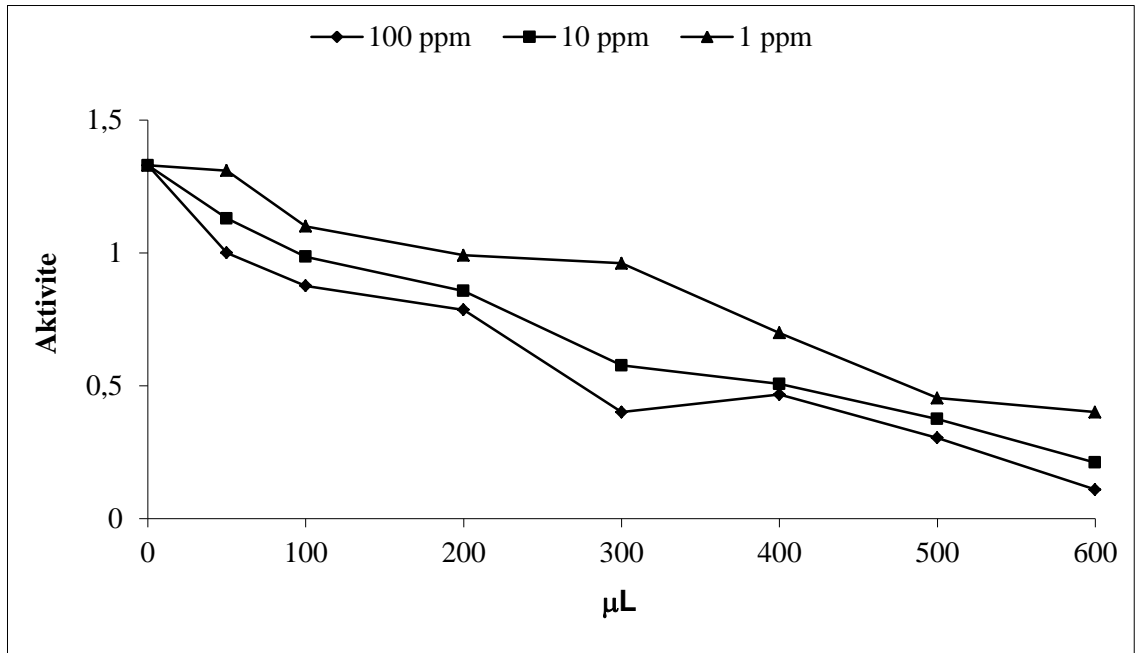
**Şekil 4.22.** Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine diklorvos'un etkisi



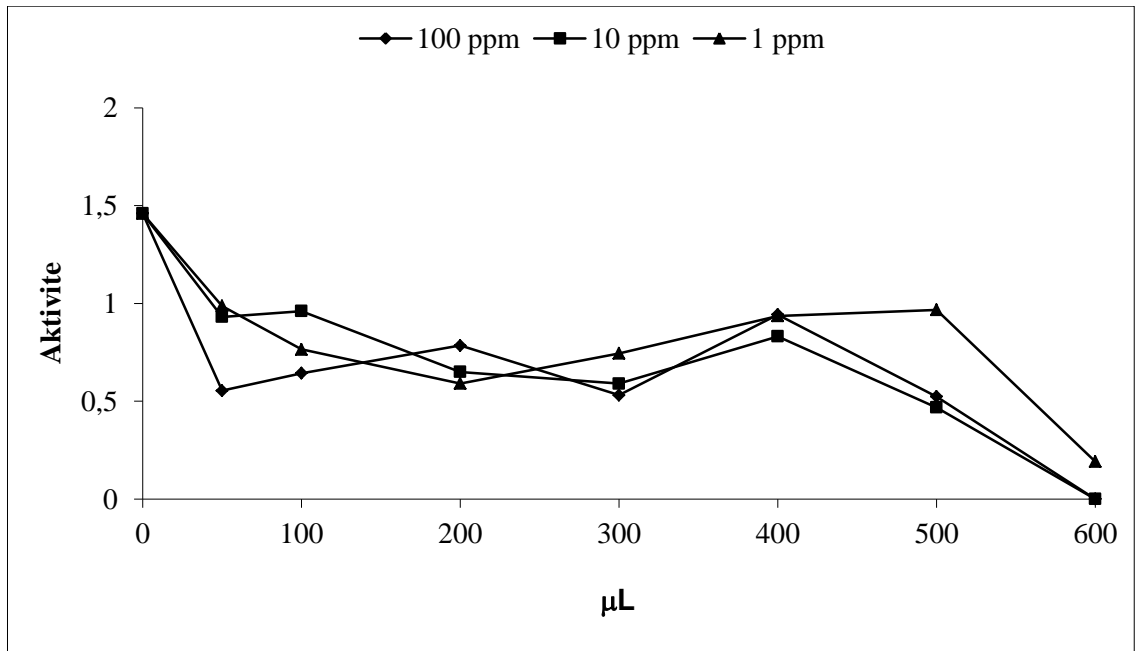
**Şekil 4.23.** Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine dimetoat'ın etkisi



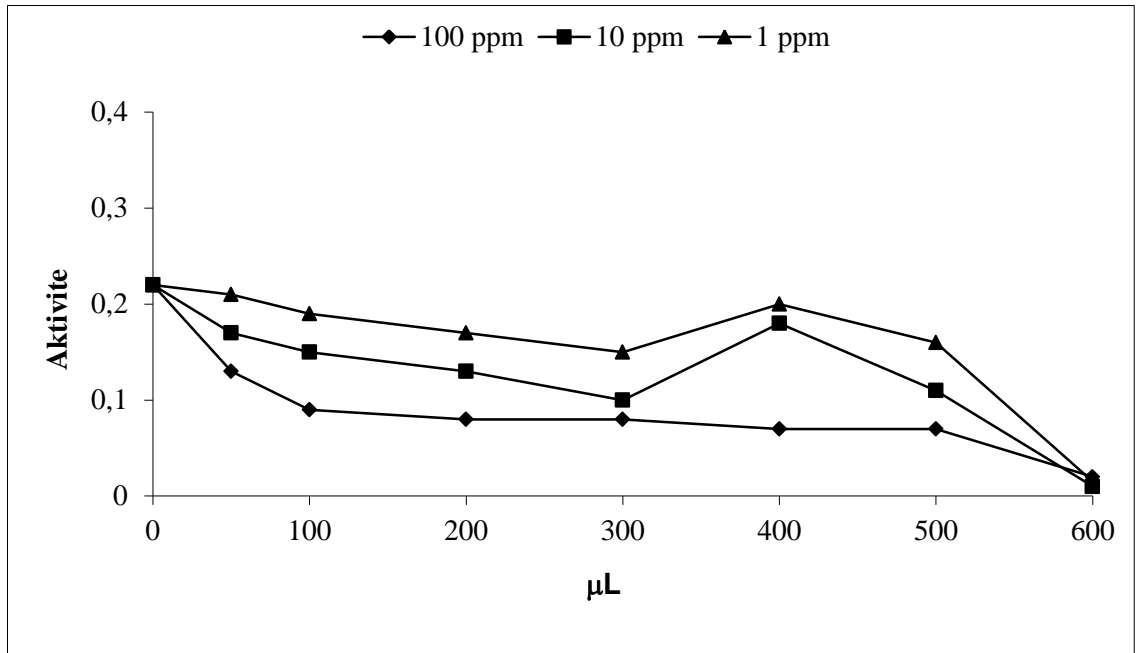
**Şekil 4.24.** Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine diazinon'un etkisi



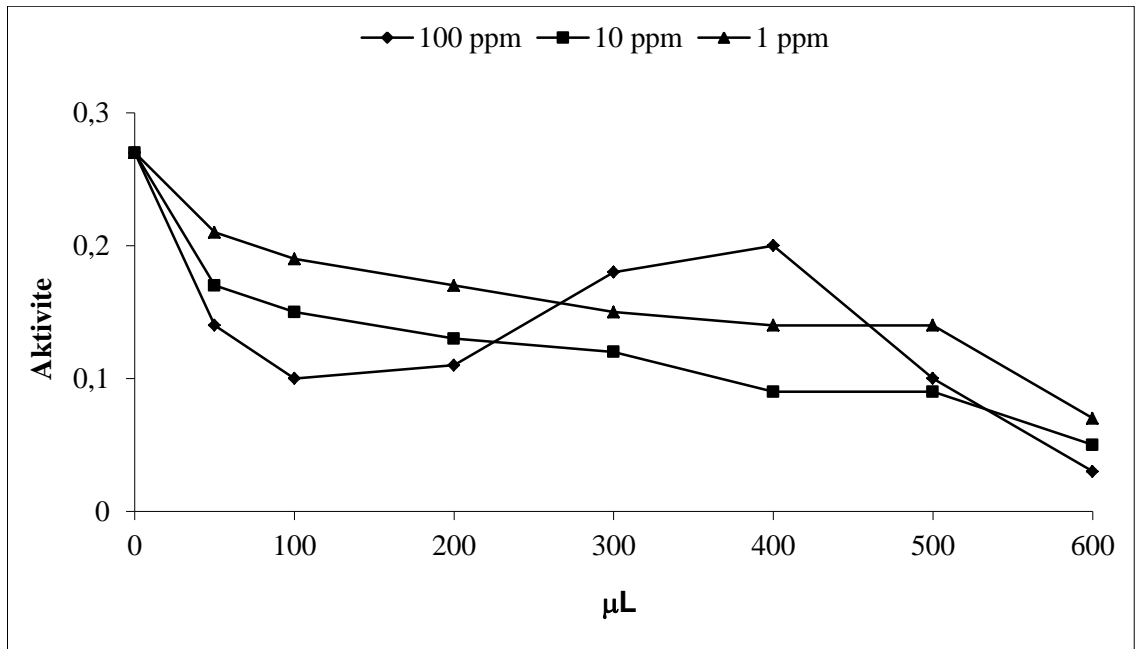
**Şekil 4.25.** Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine metamidofos'un etkisi



**Şekil 4.26.** Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine etil paratyon'un etkisi



**Şekil 4.27.** Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine fenton'un etkisi

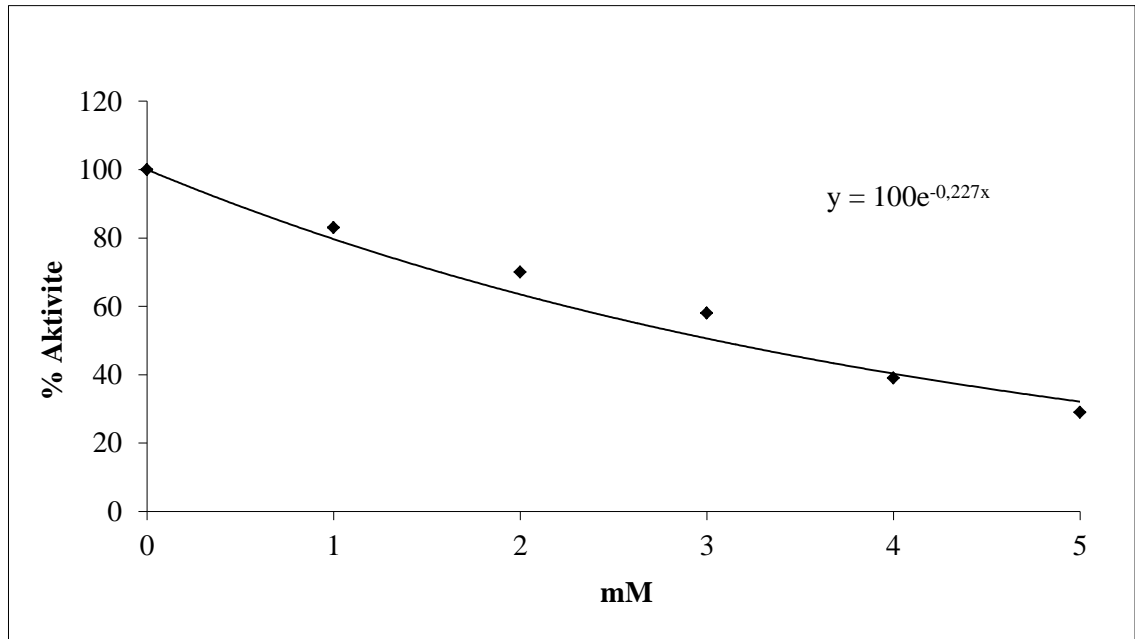


**Şekil 4.28.** Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine asetamiprid'in etkisi

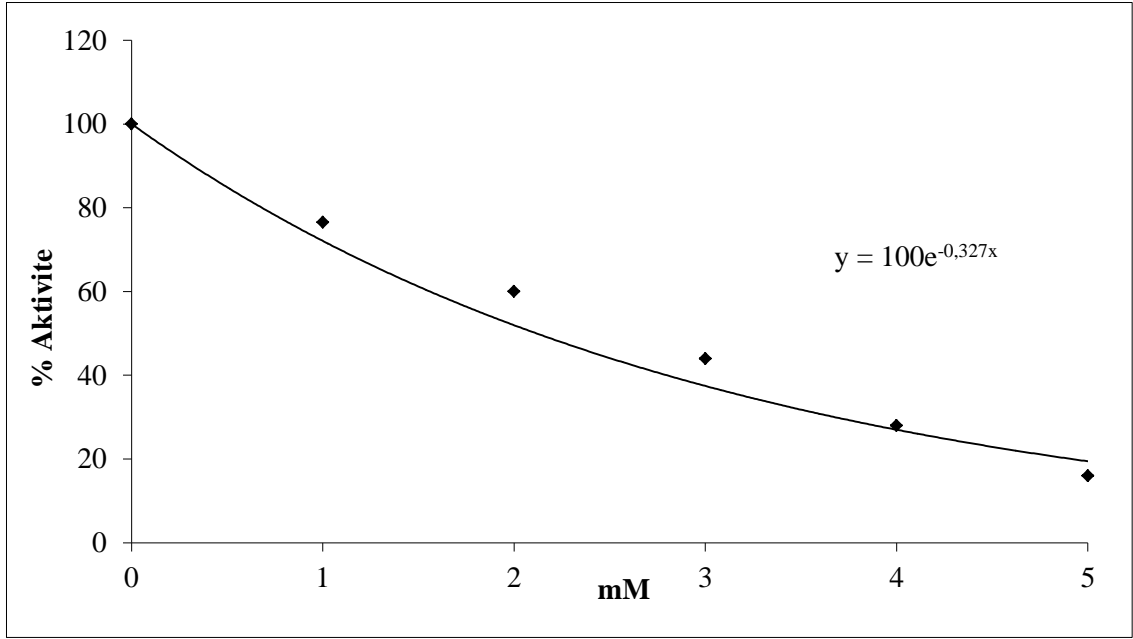


#### 4.8. Kabak çekirdeğinden saflaştırılan paraoksonaz enzim aktivitesi üzerine inhibitör etkisi gösteren bazı metaller, bileşikler ve pestisitler için $I_{50}$ değerlerinin belirlenmesine ait çalışmaların sonuçları

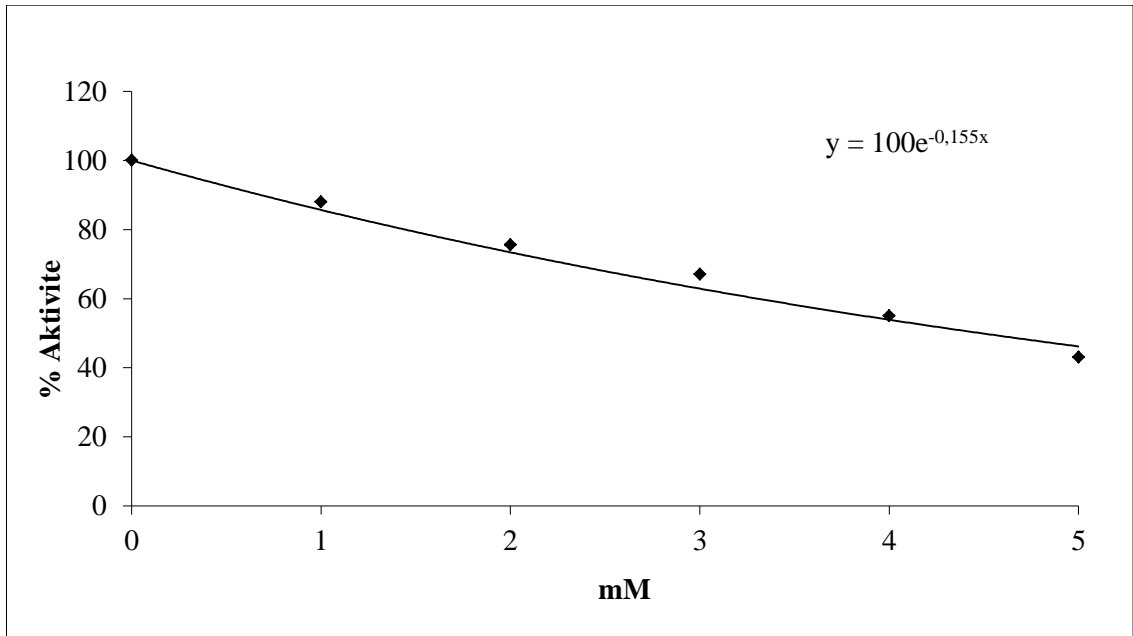
Kabak çekirdeğinden saflaştırılan paraoksonaz enzim aktivitesi üzerine metallerin, bileşiklerin ve pestisitlerin etkilerini belirlemek amacıyla bu bileşiklerin stok çözeltileri hazırlandı ve paraoksonaz enzim aktivitesi üzerine etkileri araştırıldı. Elde edilen aktivite değerleri kullanılarak; % Aktivite-[I] değerleri bulundu. %Aktivite-[I] grafikleri çizilerek  $I_{50}$  değerleri bulundu. Grafikler Şekil 4.29, Şekil 4.30, Şekil 4.31, Şekil 4.32, Şekil 4.33, Şekil 4.34, Şekil 4.35, Şekil 4.36, Şekil 4.37, Şekil 4.38, Şekil 4.39, Şekil 4.40, Şekil 4.40 Şekil 4.41, Şekil 4.42, Şekil 4.43 ve Şekil 4.44'te gösterildi. Ayrıca inhibisyon etkileri Çizelge 4.2, 4.3 ve 4.4'te gösterildi.



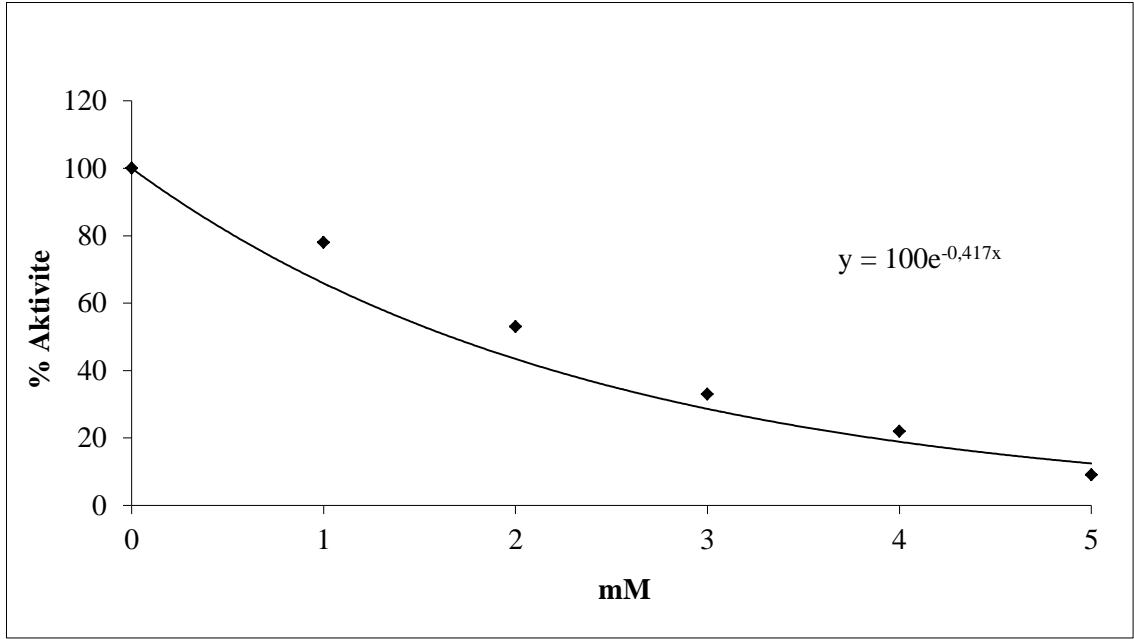
Şekil 4.29. Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enzimi üzerine  $Mg^{2+}$ 'nin etkisi



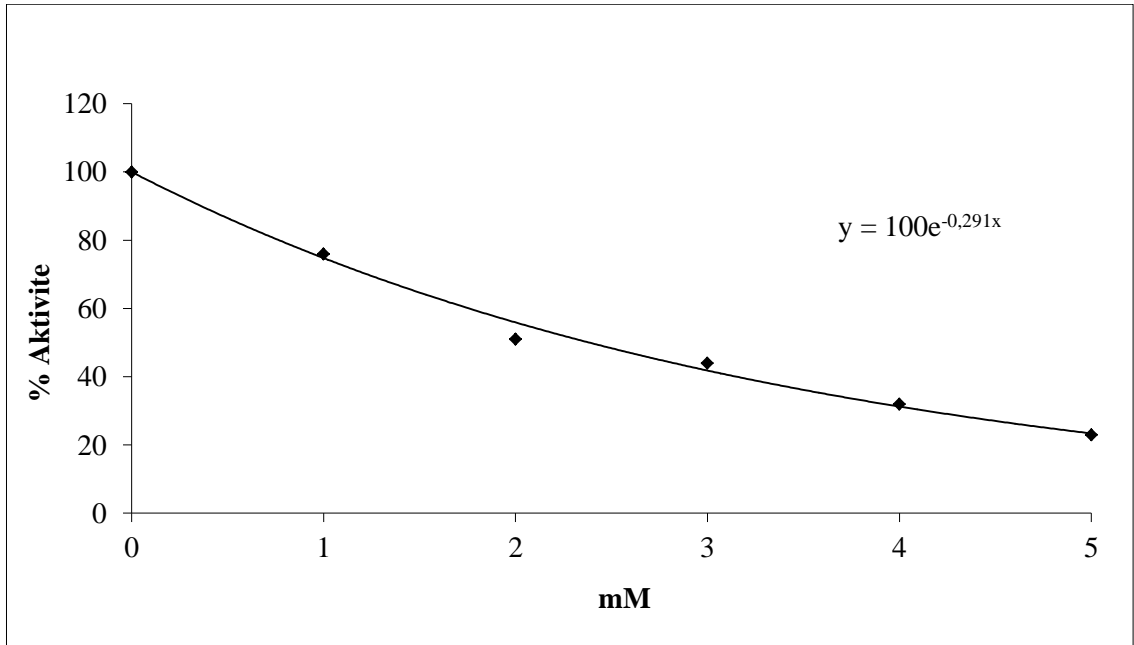
Şekil 4.30. Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enzimi üzerine  $\text{Cu}^{2+}$ 'nin etkisi



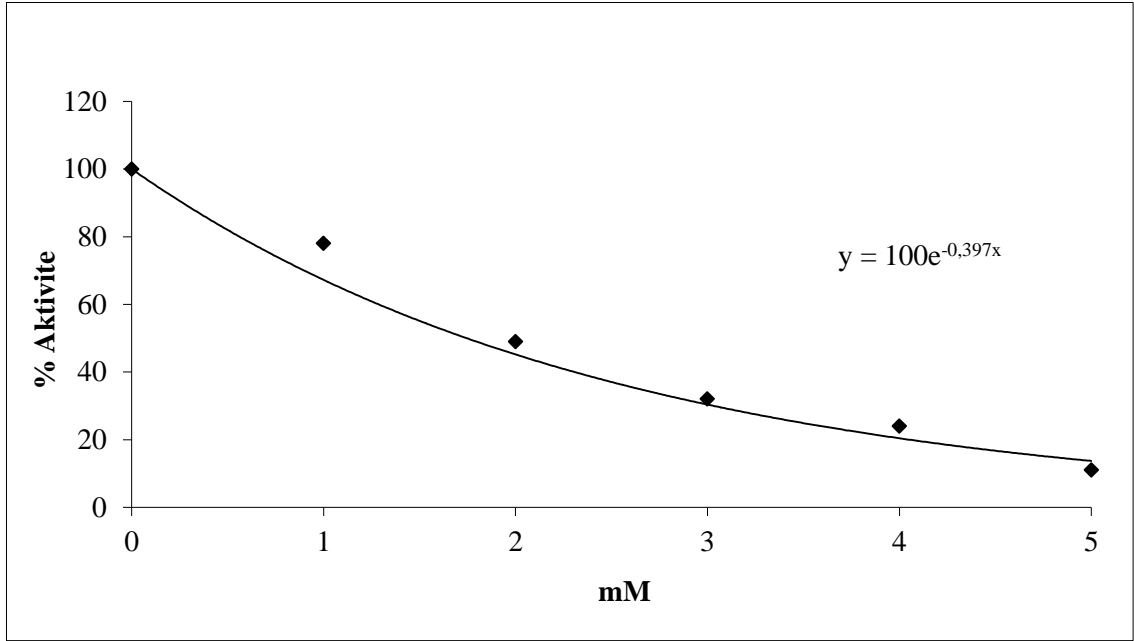
Şekil 4.31. Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enzimi üzerine  $\text{Mn}^{2+}$ 'nin etkisi



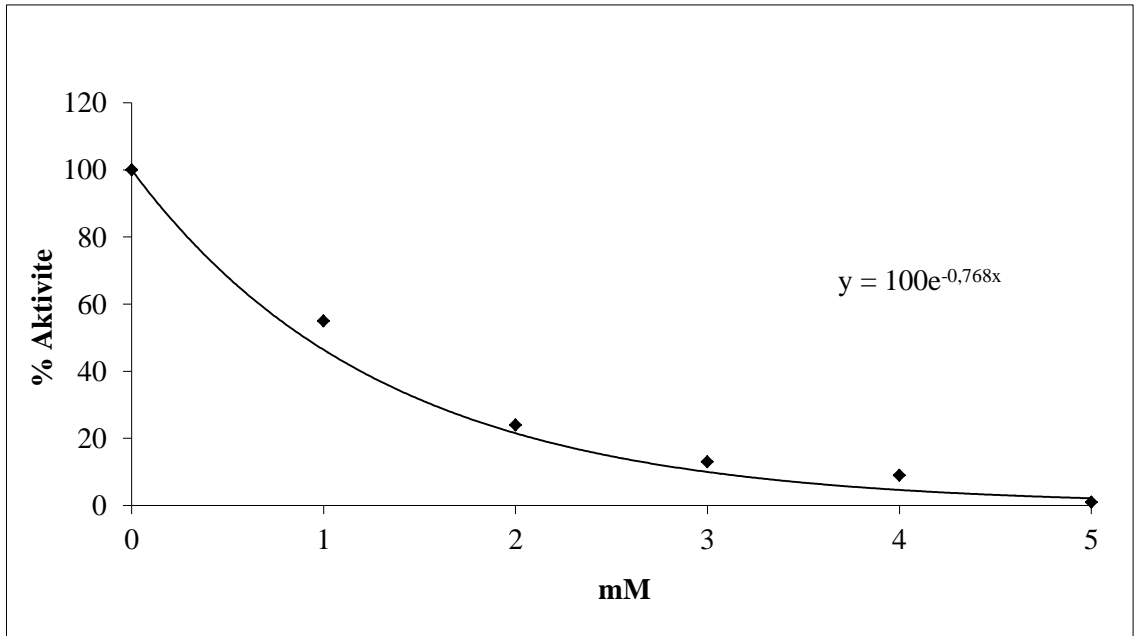
Şekil 4.32. Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enzimi üzerine Fe<sup>3+</sup>'ün etkisi



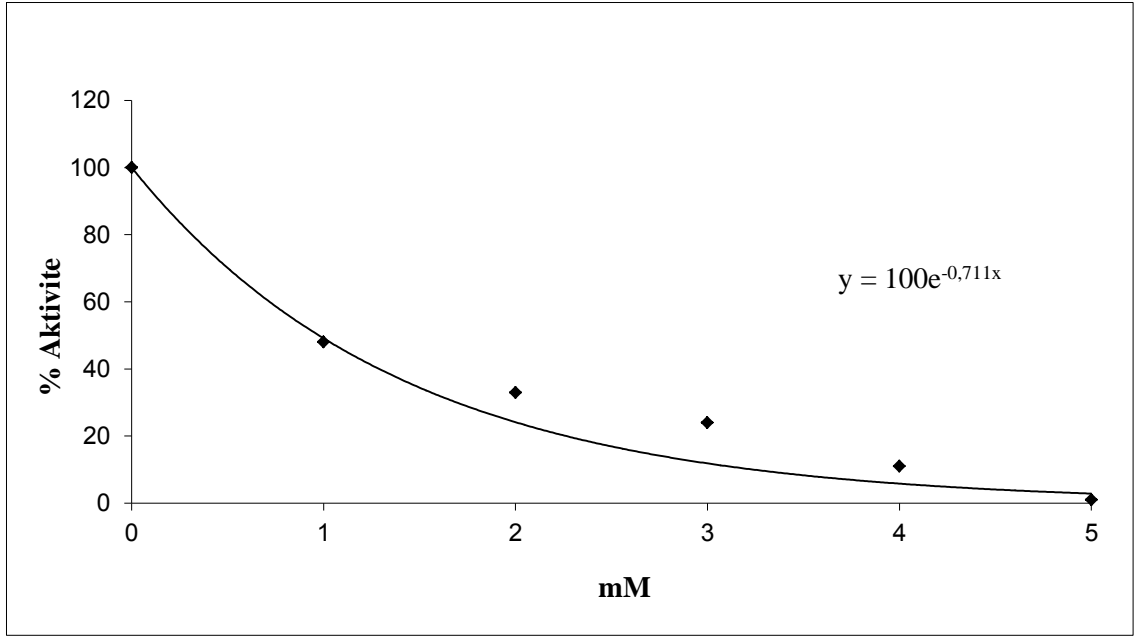
Şekil 4.33. Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enzimi üzerine EDTA'nın etkisi



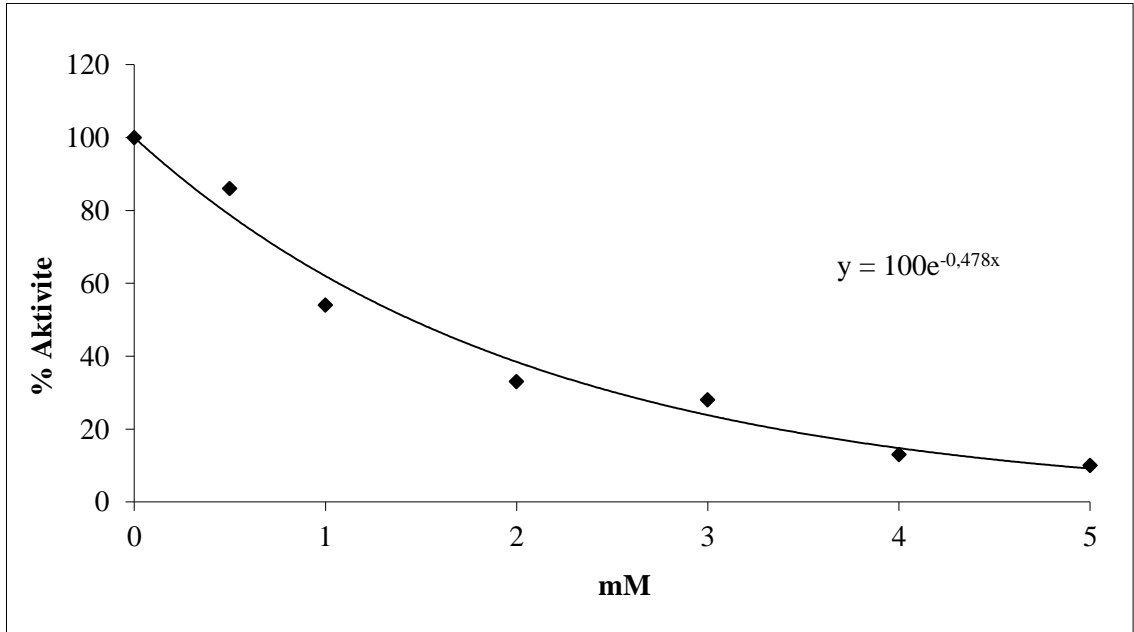
Şekil 4.34. Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enzimi üzerine askorbik asit'in etkisi



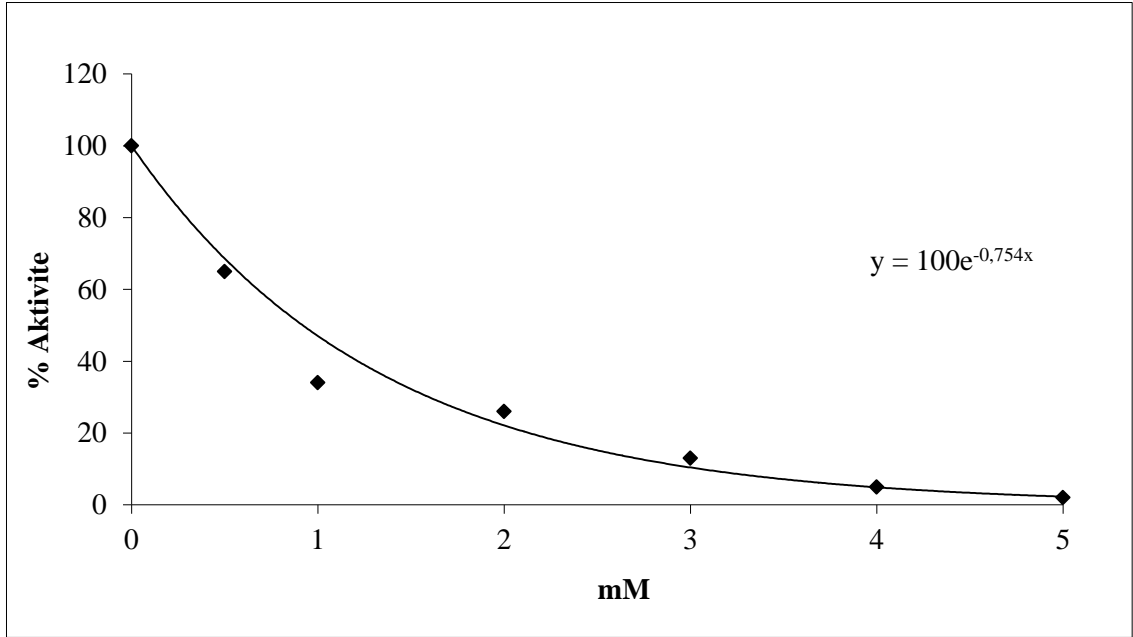
Şekil 4.35. Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enzimi üzerine  $\beta$ -merkaptotanol'ün etkisi



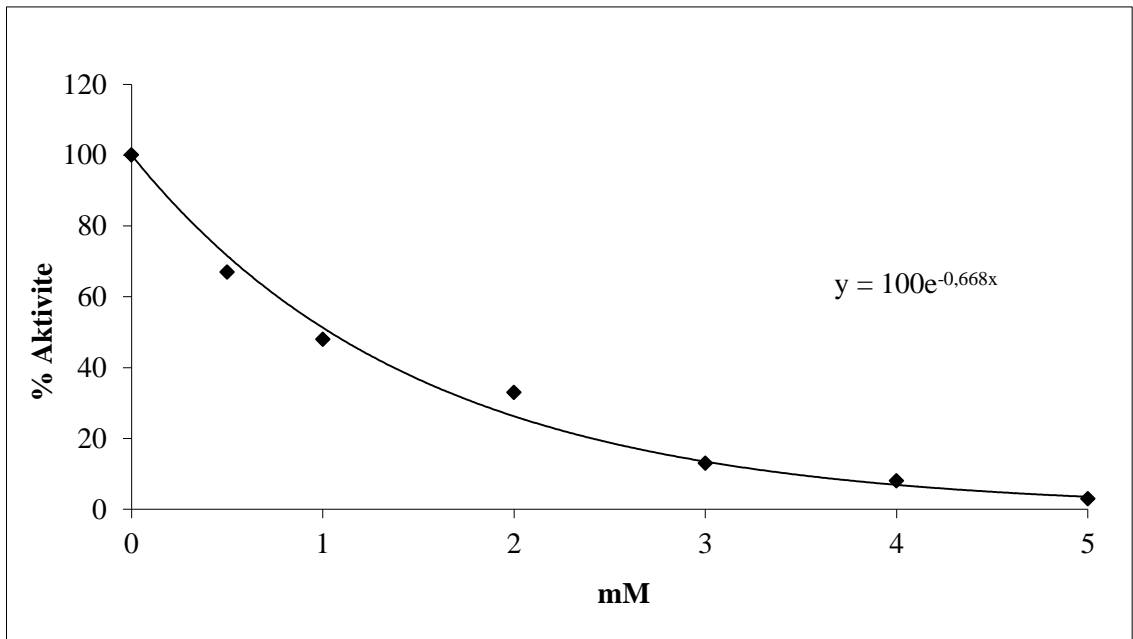
Şekil 4.36. Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enzimi üzerine SDS'nin etkisi



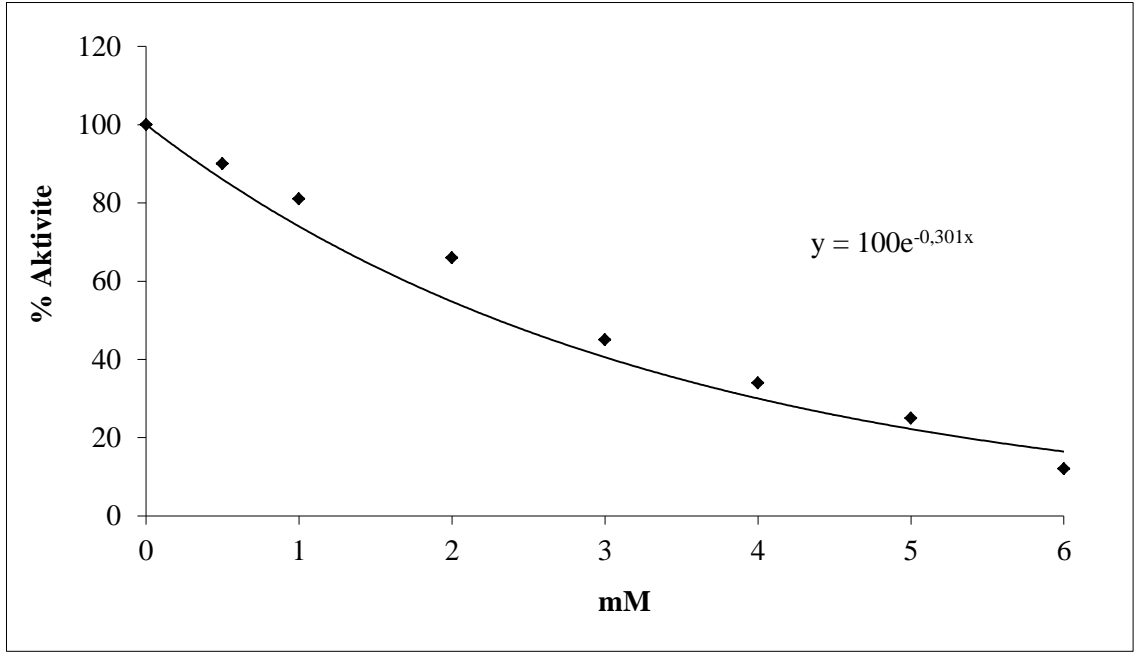
Şekil 4.37. Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enzimi üzerine metil paratiyon'un etkisi



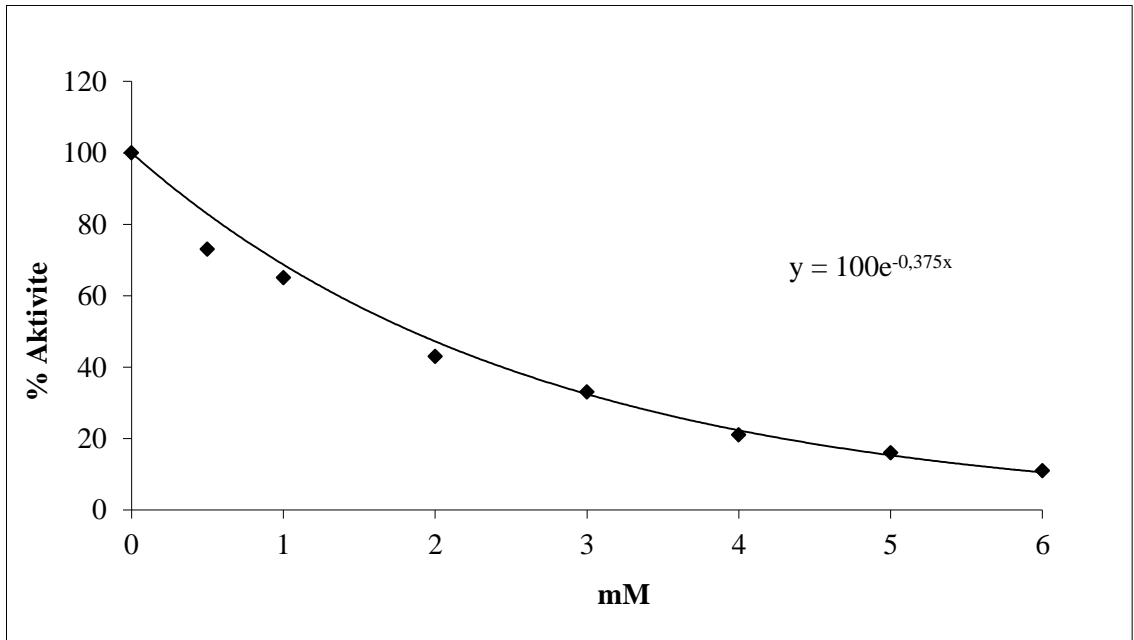
Şekil 4.38. Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enzimi üzerine diklorvos'un etkisi



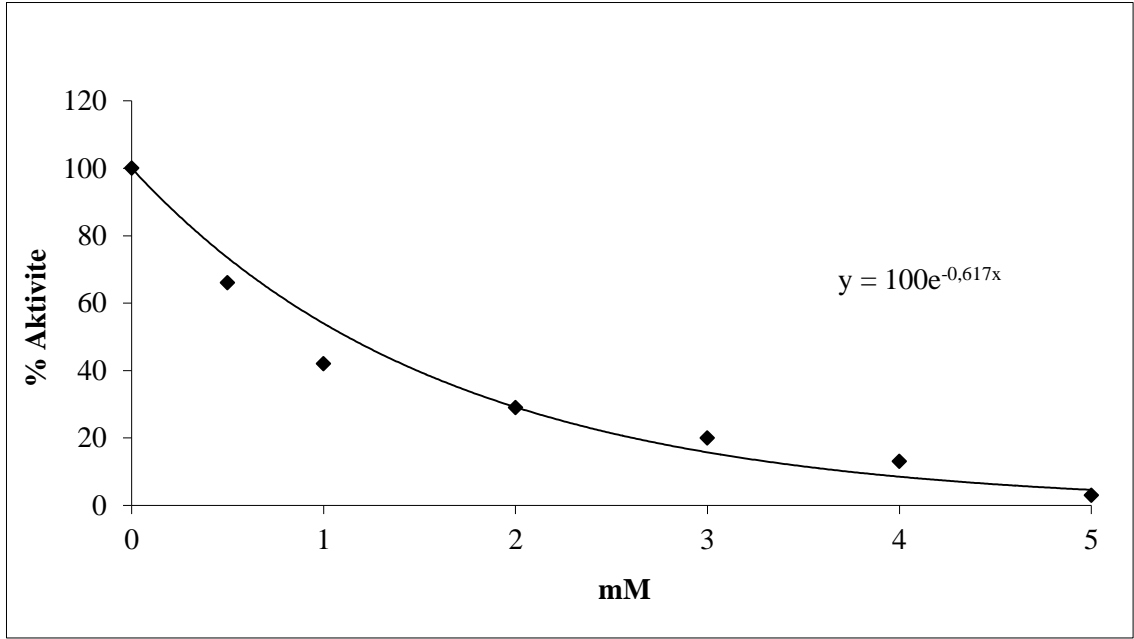
Şekil 4.39. Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enzimi üzerine dimetoat'ın etkisi



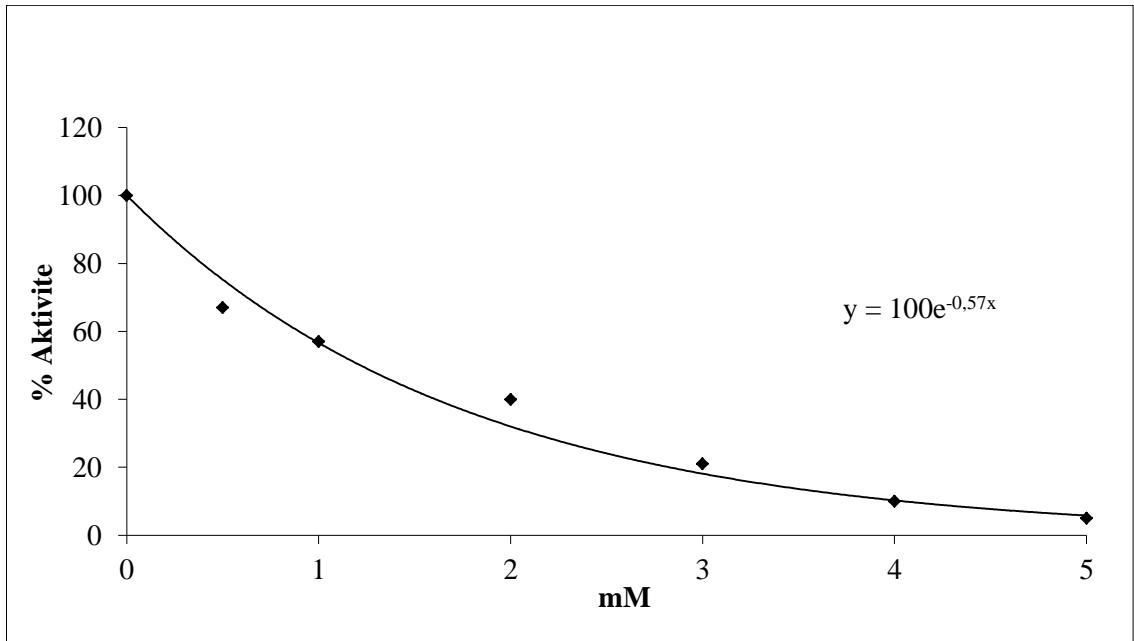
Şekil 4.40. Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enzimi üzerine diazinon'un etkisi



Şekil 4.41. Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enzimi üzerine metamidofos'un etkisi

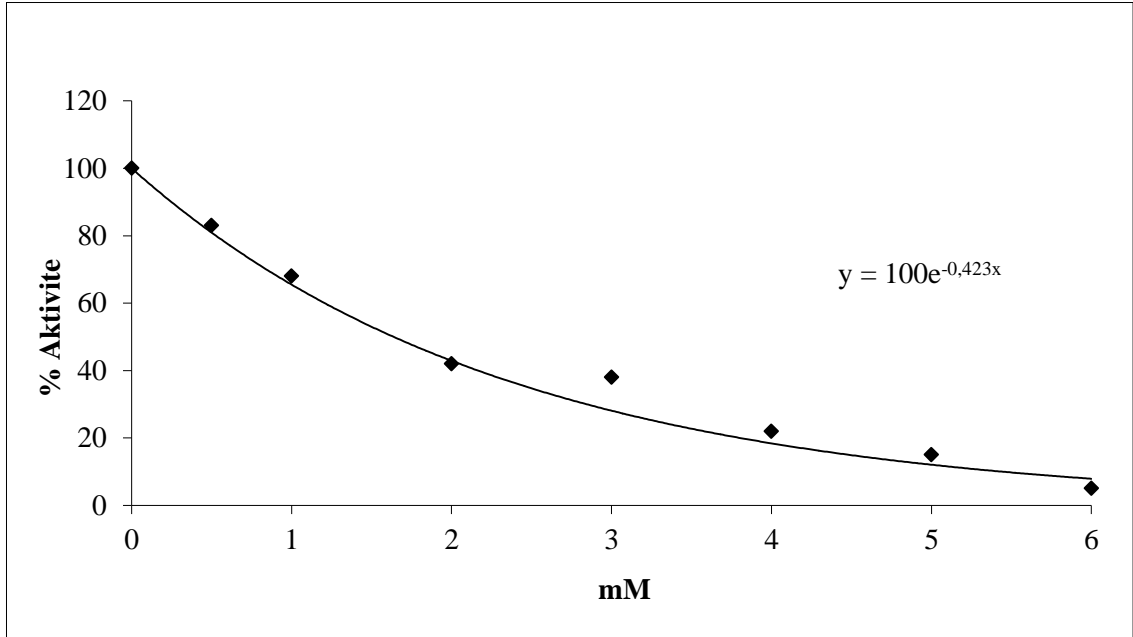


Şekil 4.42. Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enzimi üzerine etil paratyon'un etkisi



Şekil 4.43. Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enzimi üzerine fention'un etkisi





**Şekil 4.44.** Kabak çekirdeğinden saflaştırılan PON enzimi üzerine asetamiprid'in etkisi

**Çizelge 4.2.** Kabak çekirdeğinden saflaştırılan paraoksonaz enzimi için metallere ait  $I_{50}$  değerleri

İnhibitör	$I_{50}$ (mM)
$Mg^{2+}$	3,05
$Cu^{2+}$	2,11
$Mn^{2+}$	4,47
$Fe^{3+}$	1,66

**Çizelge 4.3.** Kabak çekirdeğinden saflaştırılan paraoksonaz enzimi için bileşiklere ait  $I_{50}$  değerleri

İnhibitör	$I_{50}$ (mM)
EDTA	2,38
Askorbik asit	1,74
$\beta$ -merkaptotanol	0,90
SDS	0,97

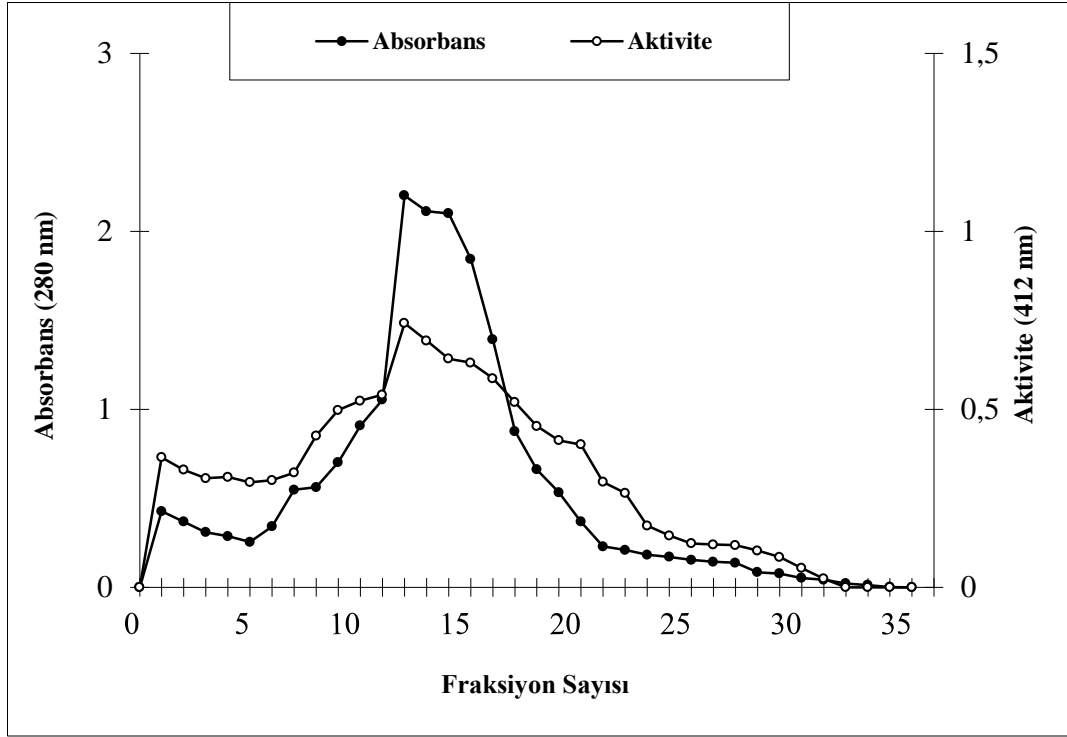
**Çizelge 4.4.** Kabak çekirdeğinden saflaştırılan paraoksonaz enzimi için pestisitlere ait  $I_{50}$  değerleri

<b>İnhibitör</b>	<b><math>I_{50}</math> (mM)</b>
Metil paratyon	1,44
Diklorvos	0,91
Dimetoat	1,03
Diazinon	2,30
Metamidopos	1,84
Etil paratyon	1,12
Fention	1,21
Asetamiprid	1,63

#### **4.9. Fındıktan (*Corylus avellana*) paraoksonaz enzimi saflaştırılması sonuçları**

##### **4.9.1. Fındıktan paraoksonaz enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılması sonuçları**

Enzimi saflaştırmak amacıyla bölüm 3.2.2.a'da anlatıldığı gibi hazırlanan homojenat sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin afinite kolonuna tatbik edildi. Jelin kolona paketlenmesi, tampon ile dengelenmesi ve yıkama işlemlerinin ardından pH'ı 6,8 olan 0,1 M Tris-HCl/2 mM CaCl<sub>2</sub> tamponuyla enzimler kolondan elüe edildi. Elüatlar 5 mL'lik fraksiyonlar halinde toplanarak her tüpdeki numune için 280 nm'de kalitatif protein miktarı tayini yapıldı. Absorbans gösteren fraksiyonlar için paraoksonaz aktivitesi tayini yapıldı. Sonuçları grafik halinde Şekil 4.45'te gösterildi.



**Şekil 4.45.** Afinite kolonundan fındıktan saflaştırılan PON enziminin pH'ı 6,8 olan 0,1 M Tris-HCl/ 2 mM CaCl<sub>2</sub> tamponuyla elüsyonu

\*Kolon çapı 1.5 cm ve boyu 30 cm, elüsyon hızı 20 mL/saat ve fraksiyon hacmi 5 mL

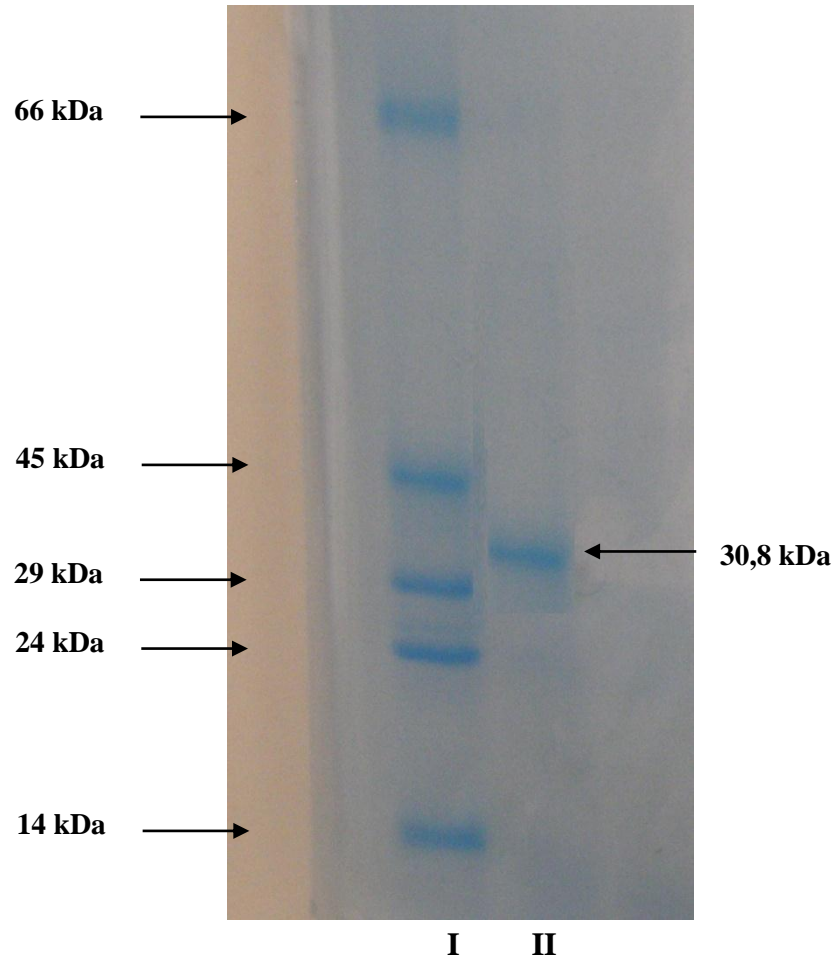
Fındıktan paraoksonaz enzim homojenatı elde edildi. Elde edilen homojenattan ve saf enzimden 1'er mL numune alınarak paraoksonaz aktivitesi ve coomassie brilliant blue yöntemi ile protein tayini yapıldı. Bulunan değerlere göre homojenatın Sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin afinite kolonuna uygulanması sonucu kaç kat saflaştırma yapıldığı hesaplandı ve sonuçlar Çizelge 4.5'te gösterildi.

**Çizelge 4.5.** Fındıktan paraoksonaz enziminin saflaştırma basamakları

Saflaştırma Basamakları	Aktivite (EU/ml)	Toplam Hacim (ml)	Protein (mg/ml)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (EU)	Spesifik Aktivite (EU/mg protein)	Verim (%)	Saflaştırma Katsayısı
<b>Ham Ekstrakt</b>	0,78	25	56,42	1410,5	19,5	0,014	100	-
<b>Sepharose-4B-L-1-tirozin-naftilamin afinite Kolonu</b>	1,29	13	0,44	5,72	16,77	2,93	86	209,28

#### 4.10. SDS poliakrilamid jel elektroforezi sonuçları

Kromatografik işlemler sonucu fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla SDS Poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı. Enzimin saf olduğu belirlendi ve jelin fotoğrafı çekildi. Şekil 4.46'da gösterildi.



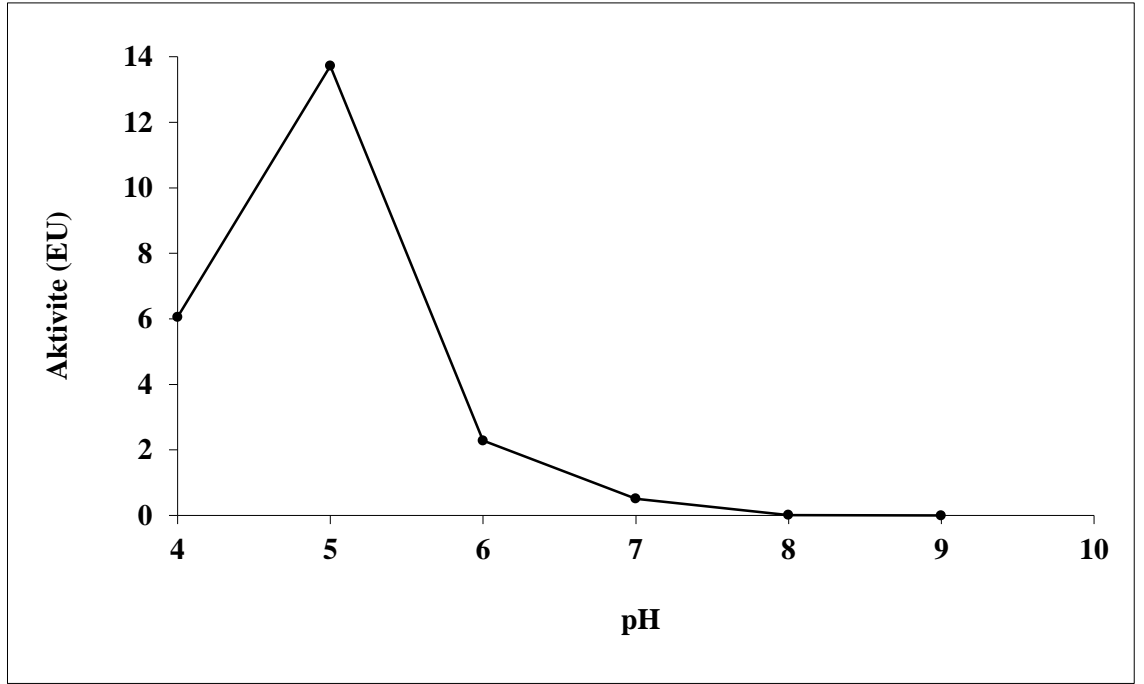
**Şekil 4.46.** Afinite kromatografisi ile fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enziminin SDS-poliakrilamid jel elektroforez fotoğrafı

\*I: standart protein;  $\alpha$ -laktalbumin (14 kDa), tripsinojen inhibitör (24 kDa), karbonik anhidraz (29 kDa), yumurta albumin (45 kDa), sığır albumin (66 kDa) II: Fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enzimi.

#### 4.11. Fındıktan (*Corylus avellana*) saflaştırılan paraoksonaz enzimi üzerine kinetik çalışmaların sonuçları

##### 4.11.1. Paraoksonaz enziminin optimum pH sonuçları

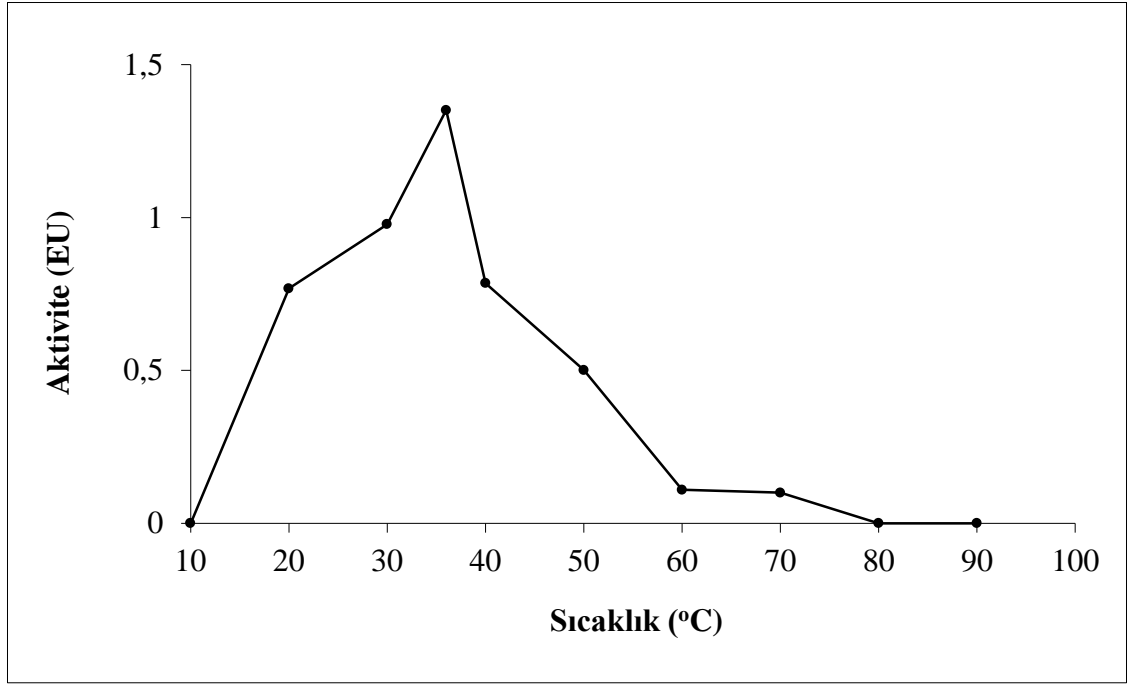
Fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enziminin optimum pH değerini belirlemek üzere yapılan deneylerden elde edilen sonuçlarla aktivite hesaplandı ve aktivite - pH grafiği çizildi (Şekil 4.47).



Şekil 4.47. Fındıktan saflaştırılan PON enzimi üzerine pH'nın etkisi

##### 4.11.2. Paraoksonaz enziminin optimum sıcaklık sonuçları

Fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek üzere yapılan deneylerden elde edilen sonuçlarla aktivite hesaplandı ve aktivite-sıcaklık grafiği çizildi. Bu grafik Şekil 4.48'de gösterildi.

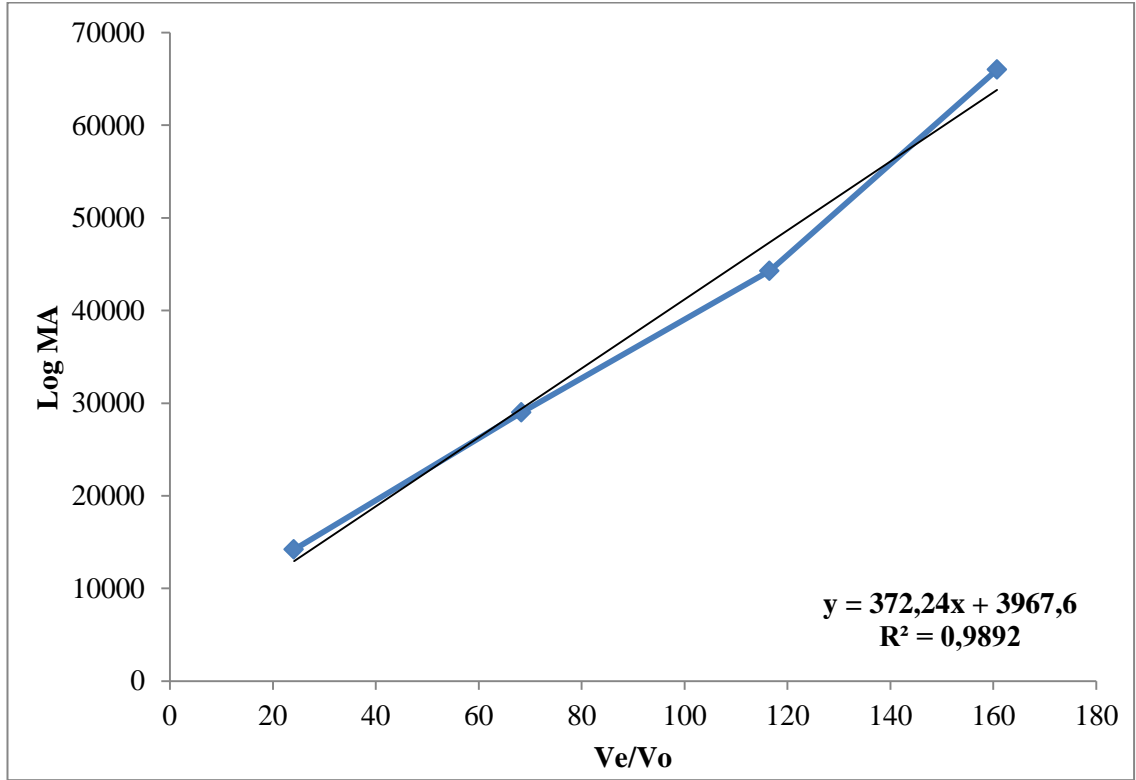


**Şekil 4.48.** Fındıktan saflaştırılan PON enzimi üzerine sıcaklığın etkisi

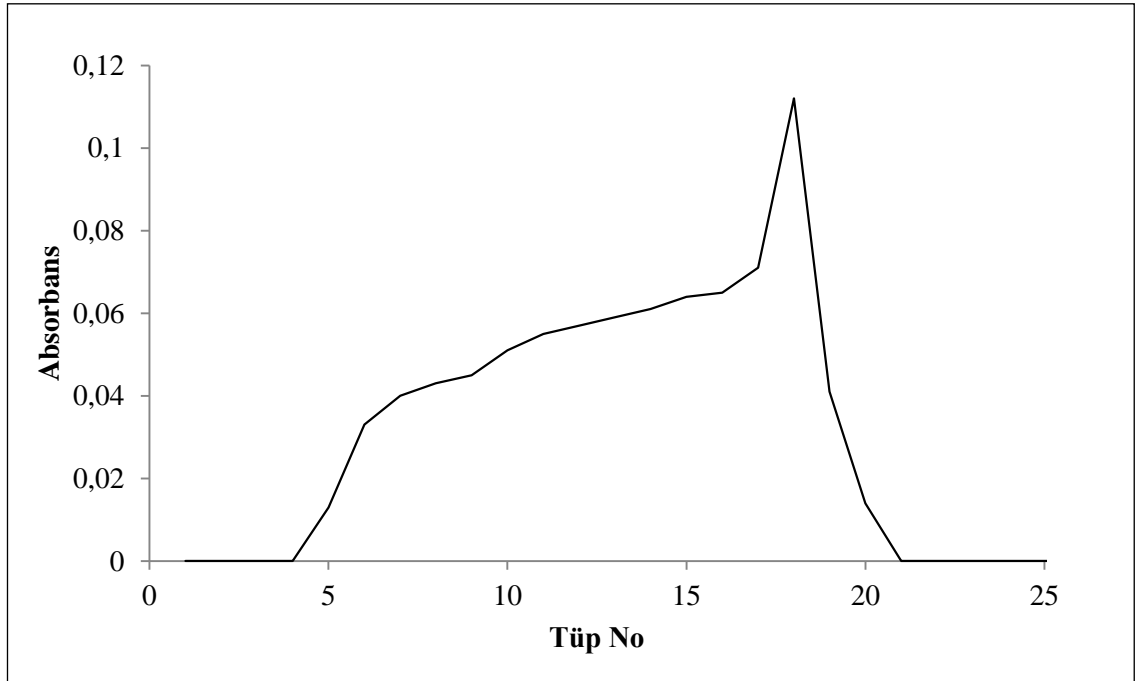
#### 4.11.3. Jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığı tayini sonuçları

Fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enziminin molekül ağırlığı, jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak tayin edildi. Dengelenmiş kolona önce, sığır albumin 66000 Da, yumurta albumin 44287 Da, karbonik anhidraz 29000 Da,  $\alpha$ -laktalbumin 14200 Da içeren standart protein çözeltileri yüklenerek 0,05 M  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ /1 mM ditiyoeritrol (pH: 7,0) tamponu ile elüe edildi ve standart grafik oluşturuldu. Daha sonra aynı koşullarda molekül ağırlığı tayin edilecek olan saflaştırılmış paraoksonaz enzimi kolondan geçirildi ve 0,05 M  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ /1 mM ditiyoeritrol (pH: 7,0) tamponu ile elüe edildi. Sonuçlar grafik edildi ve standart proteinlerle karşılaştırıldı.

Fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığı 30892 Da olarak bulundu. Enzim için jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığı tayini için hazırlanan standart grafik ve absorbans grafiği Şekil 4.49 ve Şekil 4.50'de verilmiştir.



**Şekil 4.49.** Jel filtrasyon kromatografisi standart grafiği (Ve: Elüsyon hacmi Vo: Kolonun boşluk hacmi)

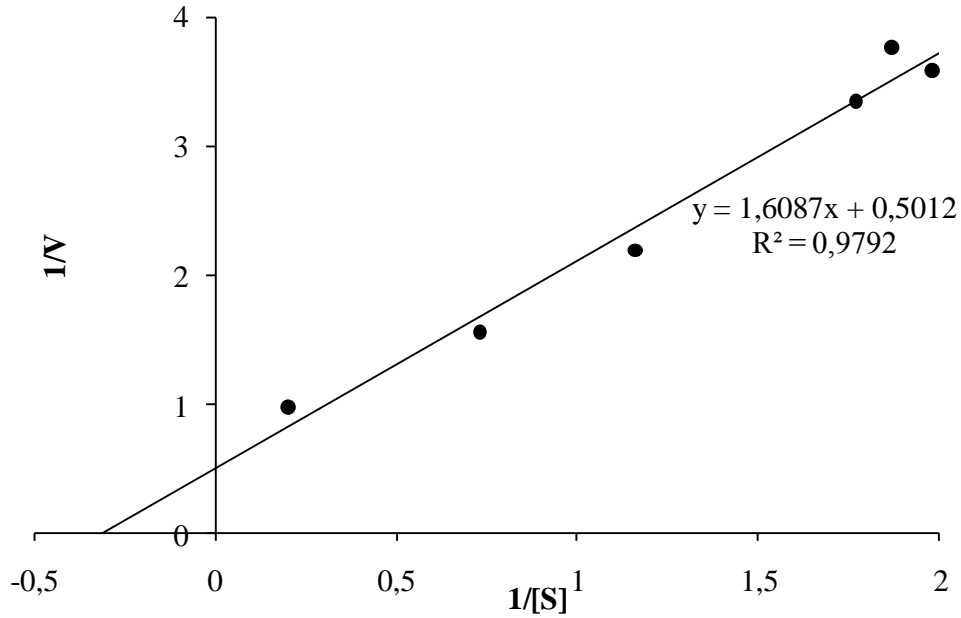


**Şekil 4.50.** Fındıktan saflaştırılan PON enziminin jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığı tayini için hazırlanan absorbans grafiği



#### 4.11.4. $V_{\max}$ ve $K_m$ değerlerinin sonuçları

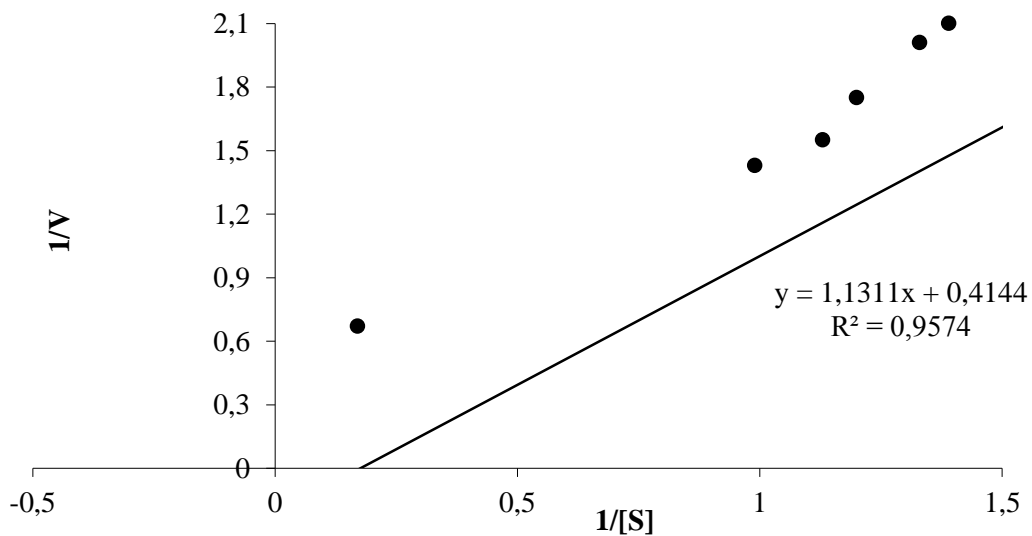
Fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enziminin  $V_{\max}$  ve  $K_m$  değerlerini belirlemek amacıyla artan substrat konsantrasyonuna karşı altı farklı paraokson substrat konsantrasyonunda aktiviteler belirlendi. Bu amaçla altı farklı tüp alınarak her bir tüpe 50  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$ , 200  $\mu\text{L}$ , 300  $\mu\text{L}$ , 400  $\mu\text{L}$  ve 500  $\mu\text{L}$  substrat çözeltisinden ilave edildi. Kör olarak da aynı substrat konsantrasyonları hazırlandı. Numune tüpü içerisine 500  $\mu\text{L}$  saf enzim ve bu enzim substrat karışımının son hacmi 1,5 mL olacak şekilde tampon çözelti ilave edildi. Kör için ise enzim çözeltisi yerine tampon çözelti konularak son hacim 1,5 mL'ye tamamlandı. 412 nm'de absorbanları ölçüldü. Bu ölçümün ardından tüpler 15 dak 37°C'de su banyosunda bekletildi ve 412 nm'de yeniden ölçüm yapıldı. İki ölçüm arasındaki fark hesaplanarak enzimatik aktivite hesaplandı.  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri bulunarak Lineweaver-Burk eğrileri çizildi ve  $K_m$  ve  $V_{\max}$  değerleri hesaplandı. Elde edilen sonuçlardan  $V_{\max}$  ve  $K_m$  değerleri ise sırasıyla 1,995  $\mu\text{mol/L.dak}$  ve 3,210 mM olarak belirlendi.



**Şekil 4.51.** Fındıktan saflaştırılan PON enziminin paraokson substratıyla elde edilen Lineweaver Burk grafiği

#### 4.11.5. Fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enziminin substrat spesifikliğinin sonuçları

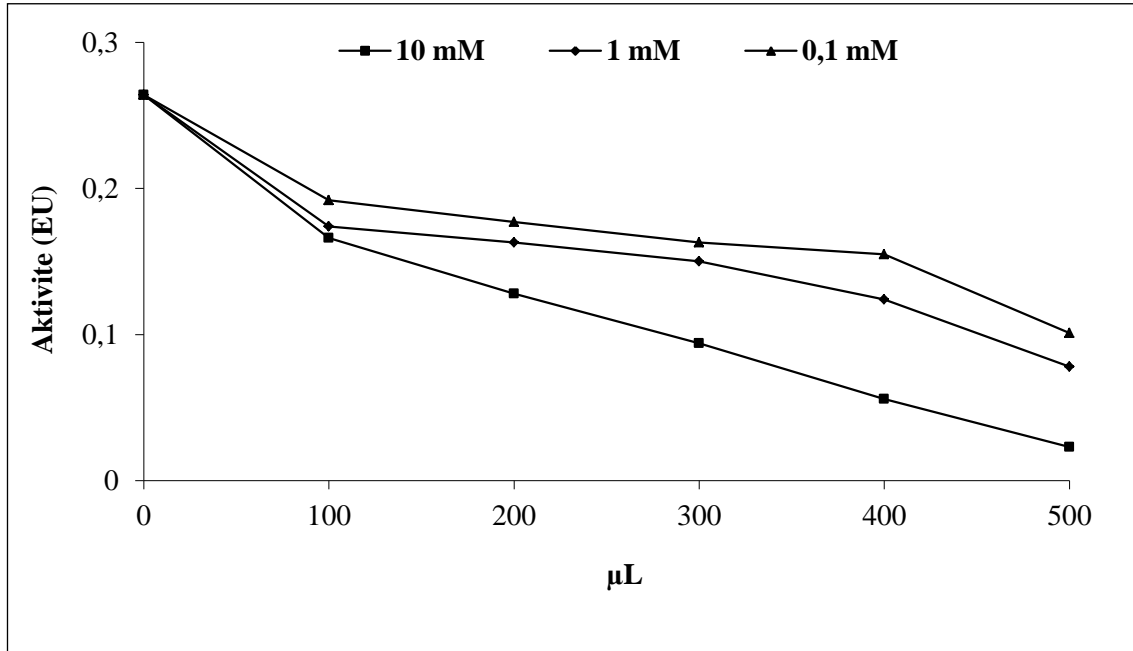
Fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enzim aktivitesinin fenilasetat kullanılarak substrat spesifikliği belirlendi. Bu amaçla aktivite fenilasetat'ın 270 nm'de absorpsiyonundaki artış izlenerek ölçüldü. Aktivite tayini için altı farklı tüp alınarak her bir tüpe 50  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$ , 200  $\mu\text{L}$ , 300  $\mu\text{L}$ , 400  $\mu\text{L}$  ve 500  $\mu\text{L}$  substrat çözeltisinden ilave edildi. Kör olarak da aynı substrat konsantrasyonları hazırlandı. Numune tüpü içerisine 500  $\mu\text{L}$  saf enzim ve bu enzim substrat karışımının son hacmi 1,5 mL olacak şekilde tampon çözelti ilave edildi. Kör için ise enzim çözeltisi yerine tampon çözelti konularak son hacim 1,5 mL'ye tamamlandı. 270 nm'de absorbansları ölçüldü. Bu ölçümün ardından tüpler 15 dak 37°C'de su banyosunda bekletildi ve 270 nm'de yeniden ölçüm yapıldı. İki ölçüm arasındaki fark hesaplanarak enzimatik aktivite molar ekstinksiyon katsayısı 1310  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  kullanılarak hesaplandı. 1 enzim ünitesi optimum şartlarda hidrolizlenen fenilasetatın 1  $\mu\text{mol}$ 'ü olarak tanımlanmaktadır.  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri bulunarak Lineweaver-Burk eğrileri çizildi ve  $K_m$  ve  $V_{\max}$  değerleri hesaplandı. Elde edilen sonuçlardan  $V_{\max}$  ve  $K_m$  değerleri ise sırasıyla 2,413  $\mu\text{mol/L.dak}$  ve 2,732 mM olarak belirlendi.



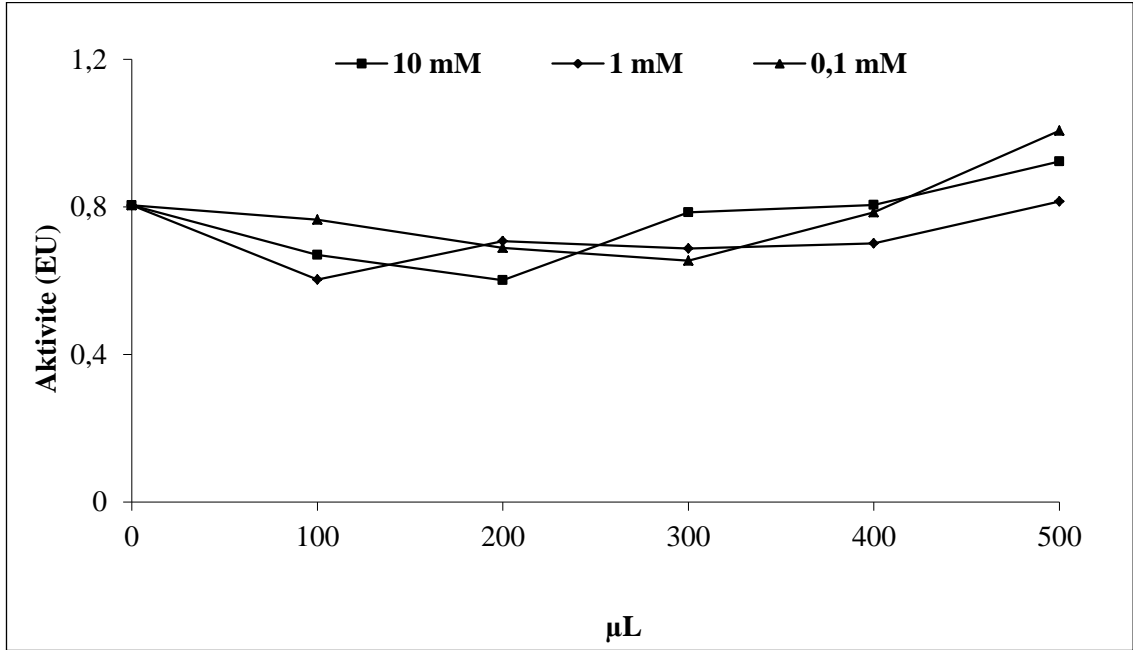
**Şekil 4.52.** Fındıktan saflaştırılan PON enziminin fenilasetat substratına karşı substrat spesifikliği grafiği

#### 4.12. Fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enzim aktivitesi üzerine bazı katyonların etkisinin sonuçları

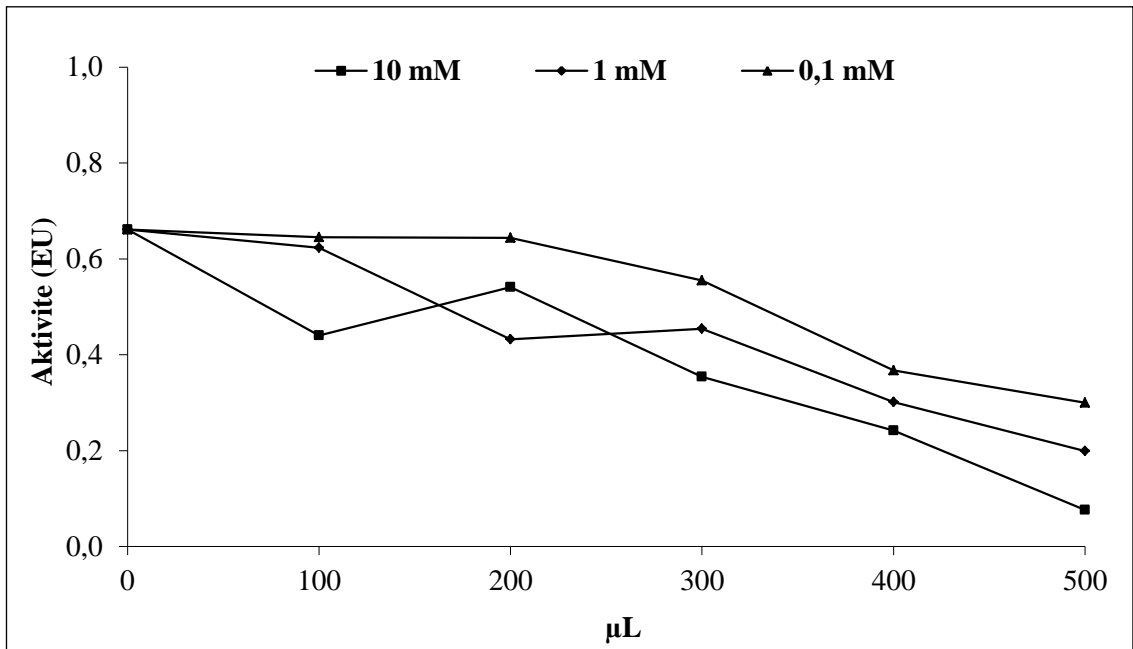
Fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enzim aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM ve 0,1 mM  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  ve  $Fe^{2+}$  katyonlarının etkisi belirlendi. Bunun için aktivite paraokson varlığında belirlendi. Yapılan ölçümlerden enzimatik aktivite hesaplandı. Sonuçlar Şekil 4.53, Şekil 4.54, Şekil 4.55, Şekil 4.56, Şekil 4.57, Şekil 4.58 ve Şekil 4.59'da görülmektedir.



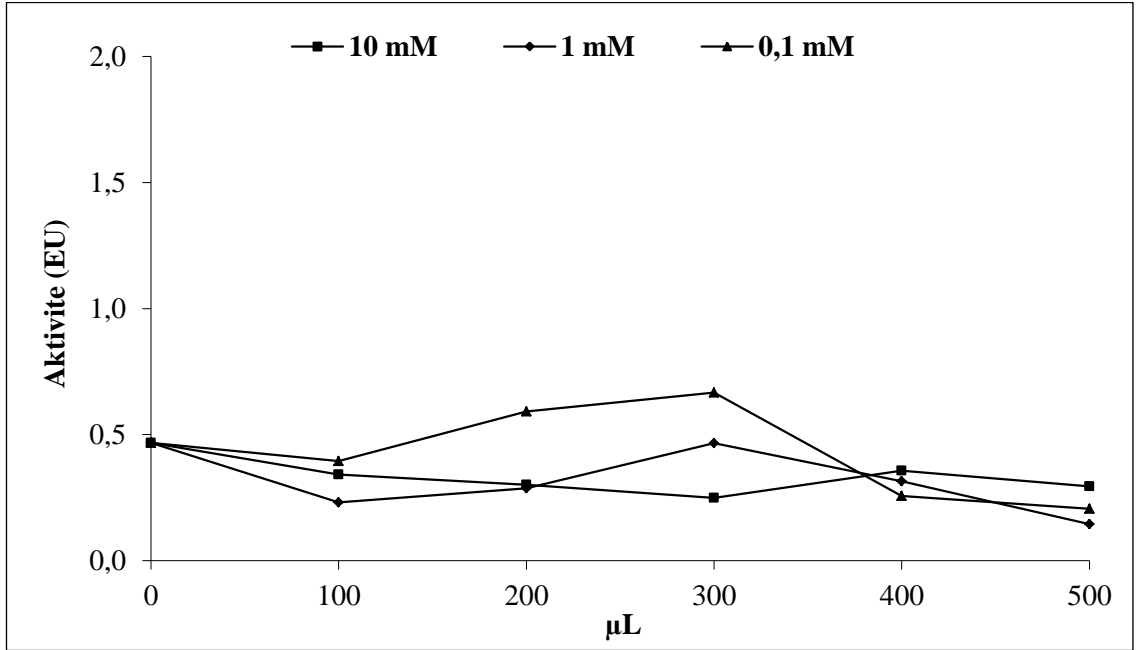
Şekil 4.53. Fındıktan saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine  $Mg^{2+}$ 'nin etkisi



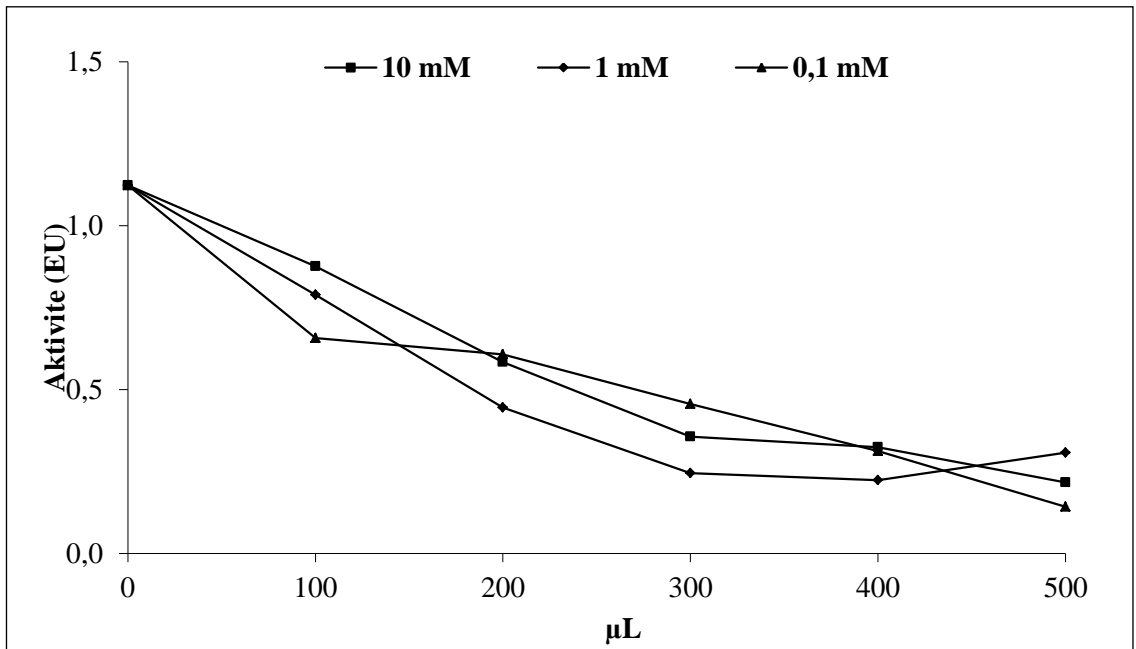
Şekil 4.54. Fındıktan saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine  $\text{Ca}^{2+}$ 'nin etkisi



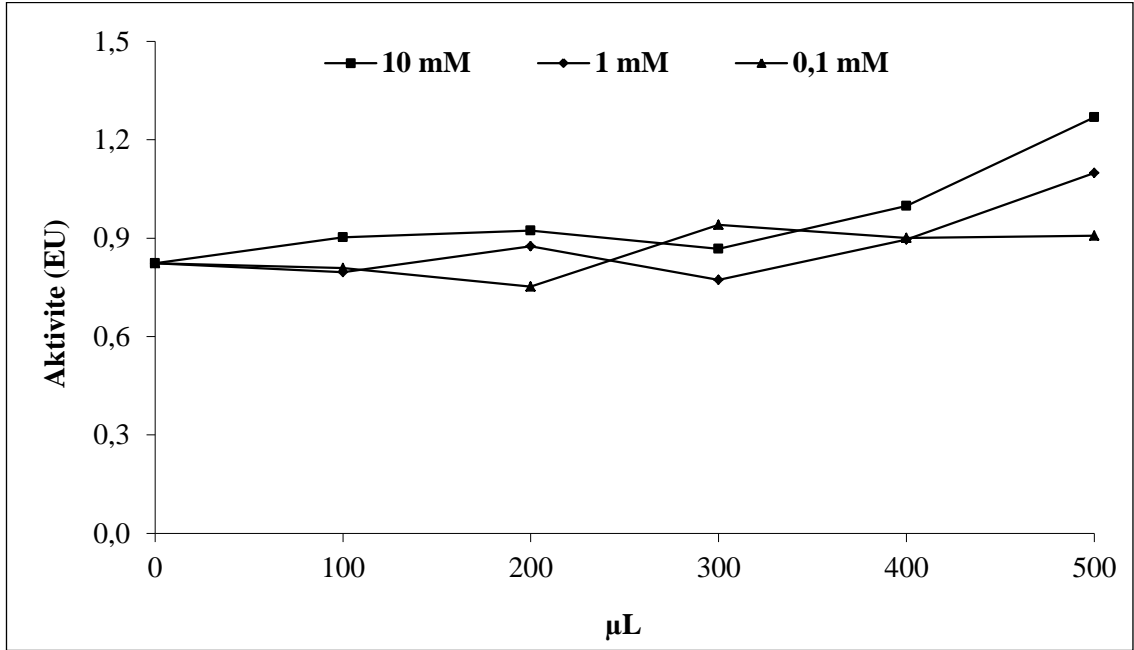
Şekil 4.55. Fındıktan saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine  $\text{Cu}^{2+}$ 'nin etkisi



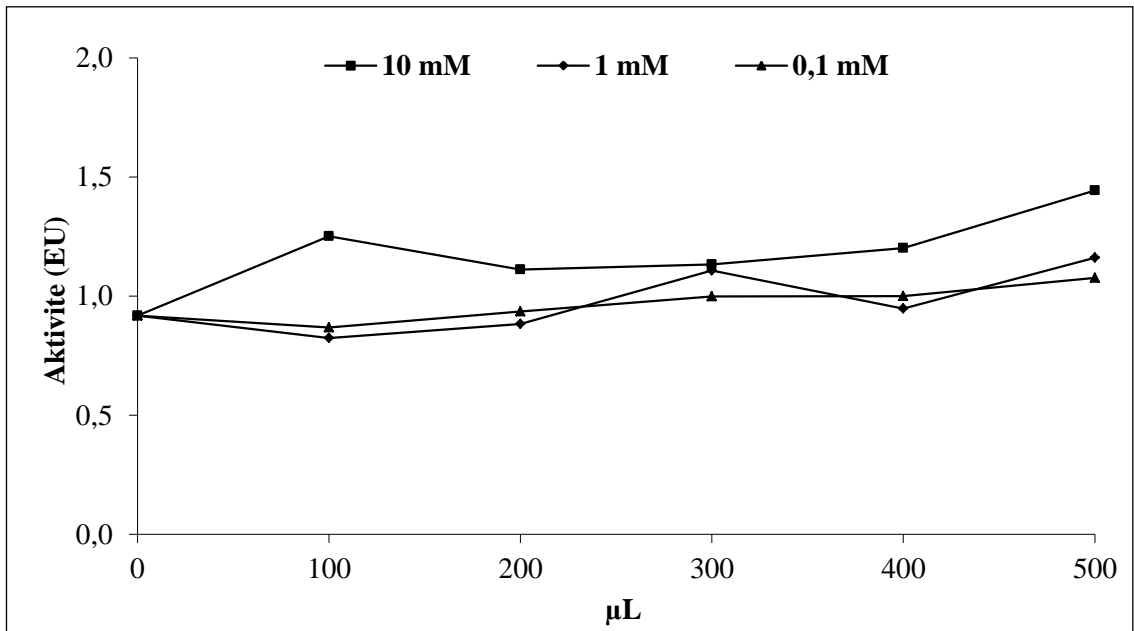
Şekil 4.56. Fındıktan saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine  $Mn^{2+}$ 'nin etkisi



Şekil 4.57. Fındıktan saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine  $Zn^{2+}$ 'nin etkisi



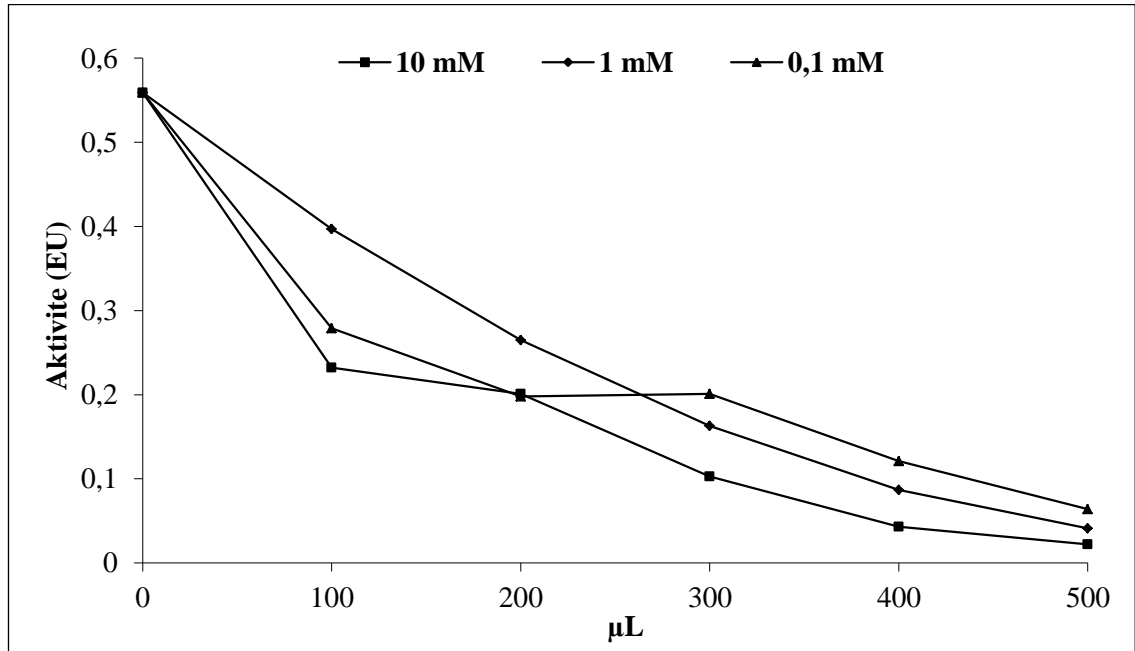
Şekil 4.58. Fındıktan saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine Fe<sup>3+</sup>'ün etkisi



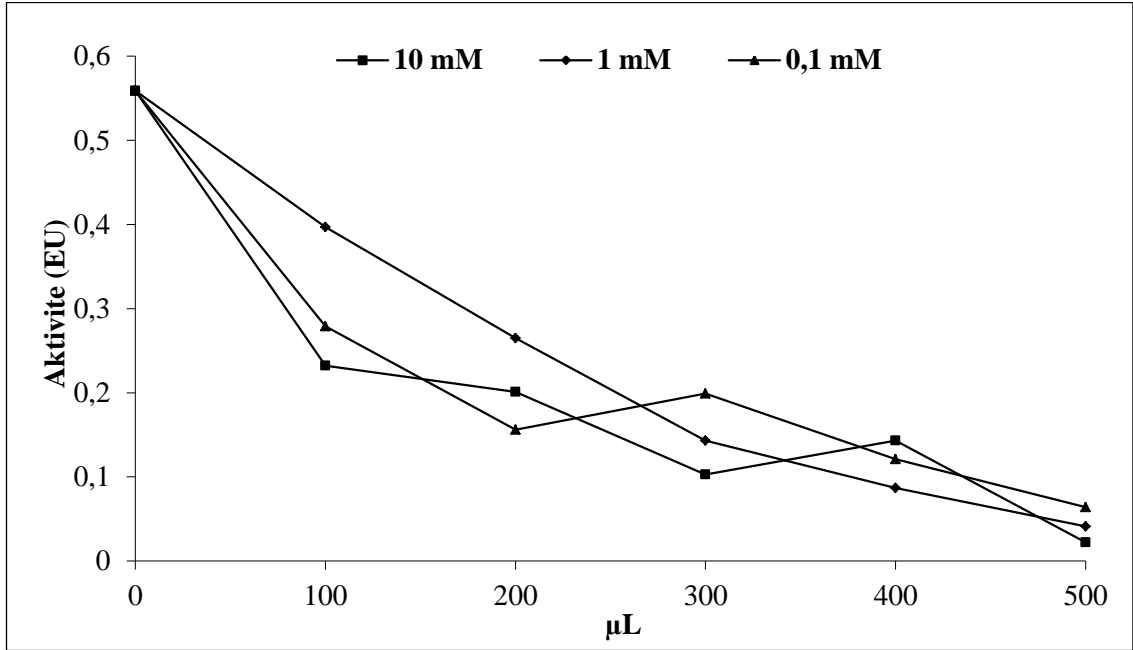
Şekil 4.59. Fındıktan saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine Fe<sup>2+</sup>'nin etkisi

#### 4.13. Fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enzim aktivitesi üzerine bazı bileşiklerin etkisinin sonuçları

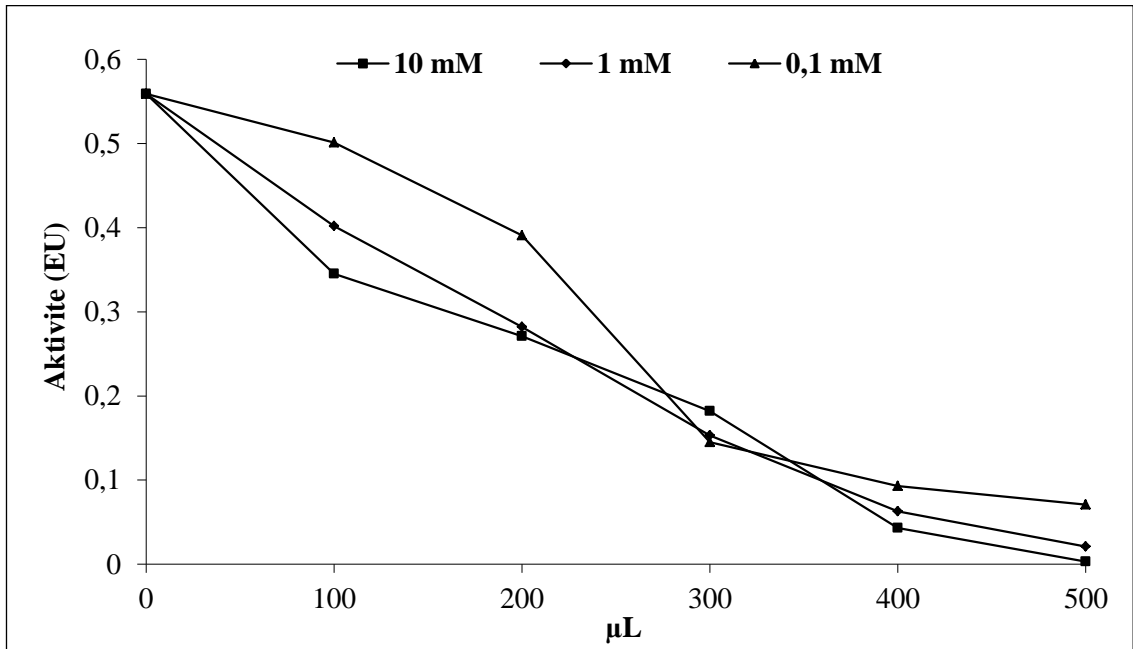
Fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enzim aktivitesi üzerine 10, 1 ve 0,1 mM EDTA, askorbik asit,  $\beta$ -merkaptotanol ve SDS bileşiklerinin etkisi belirlendi. Bunun için aktivite paraokson varlığında belirlendi. Sonuçlar Şekil 4.60, Şekil 4.61, Şekil 4.62 ve Şekil 4.63'te görülmektedir.



Şekil 4.60. Fındıktan saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine EDTA'nın etkisi

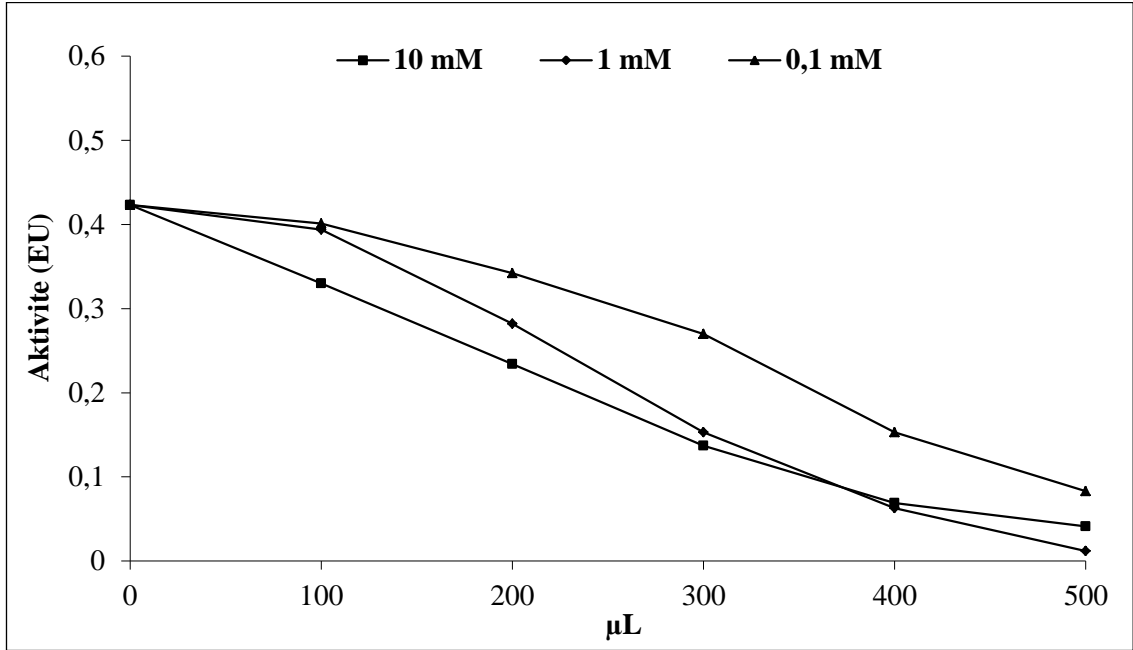


**Şekil 4.61.** Fındıktan saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine askorbik asit'in etkisi



**Şekil 4.62.** Fındıktan saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine  $\beta$ -merkaptoetanol'ün etkisi

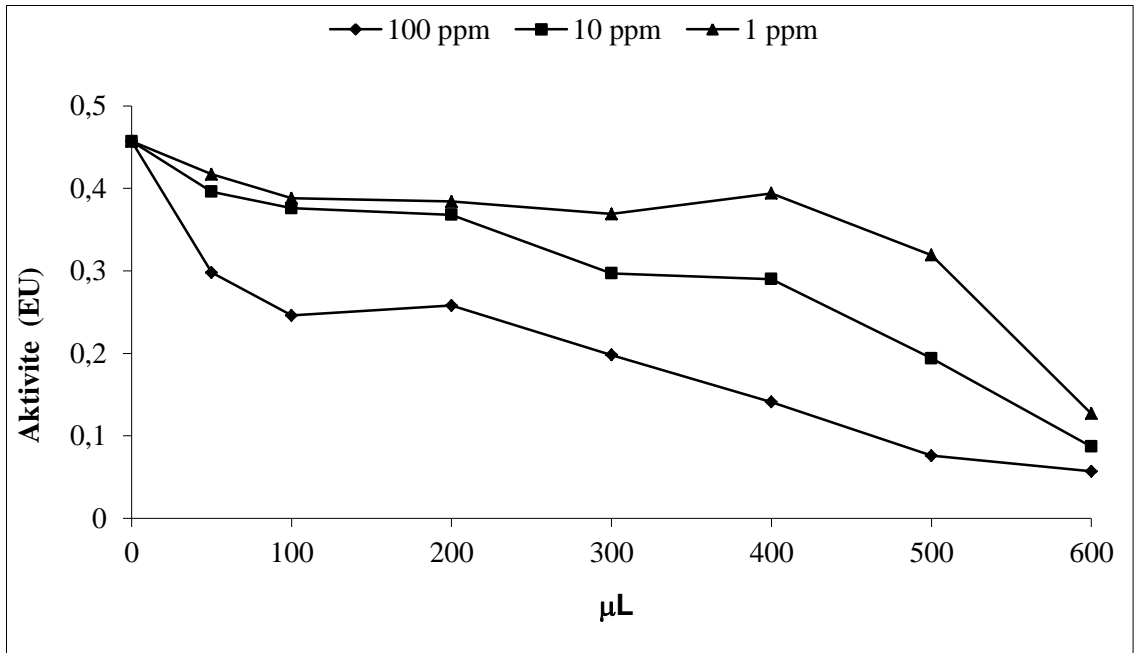




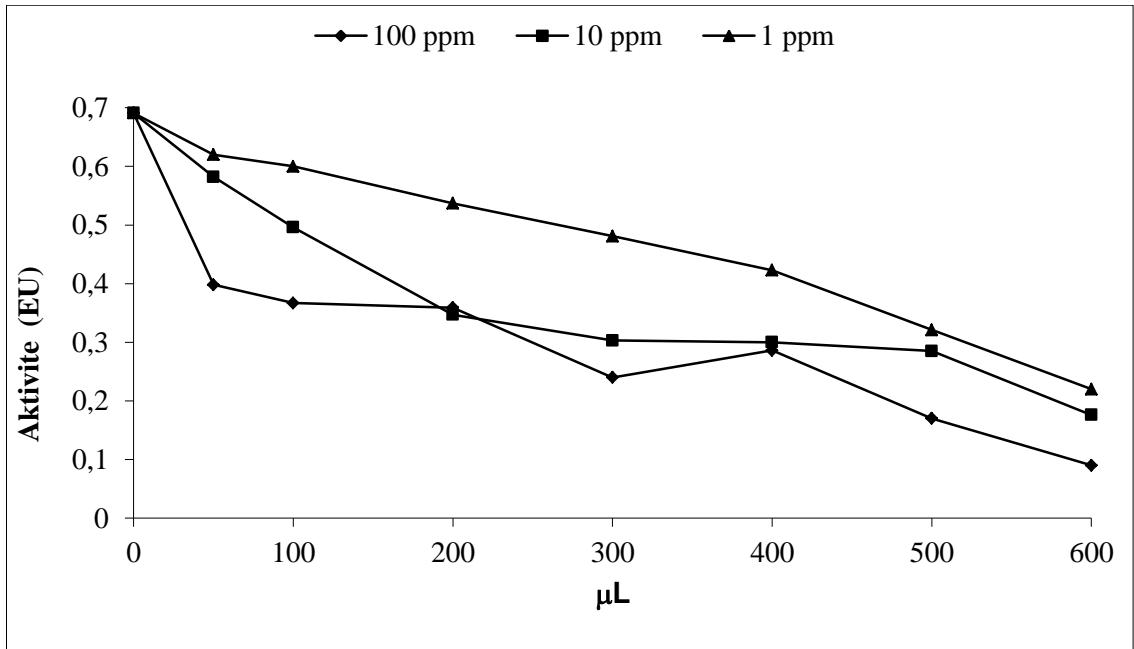
**Şekil 4.63.** Fındıktan saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine SDS'nin etkisi

#### 4.14. Fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enzim aktivitesi üzerine bazı pestisitlerin etkisinin sonuçları

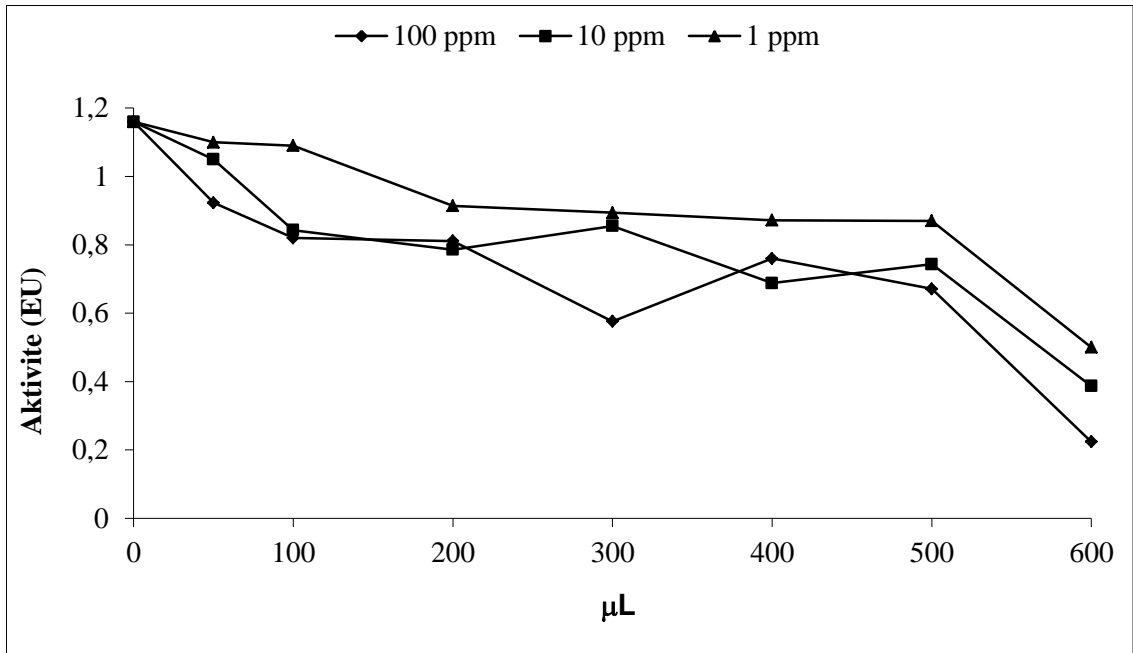
Fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enzim aktivitesi üzerine 100 ppm, 10 ppm ve 1 ppm metil paratyon, diklorvos, dimetoat, diazinon, metamidofos, etil paratyon, fention ve asetamiprid pestisitlerinin etkisi araştırıldı. Bunun için aktivite paraokson varlığında belirlendi. Sonuçlar Şekil 4.64, Şekil 4.65, Şekil 4.66, Şekil 4.67, Şekil 4.68, Şekil 4.69, Şekil 4.70 ve Şekil 4.71'de görülmektedir.



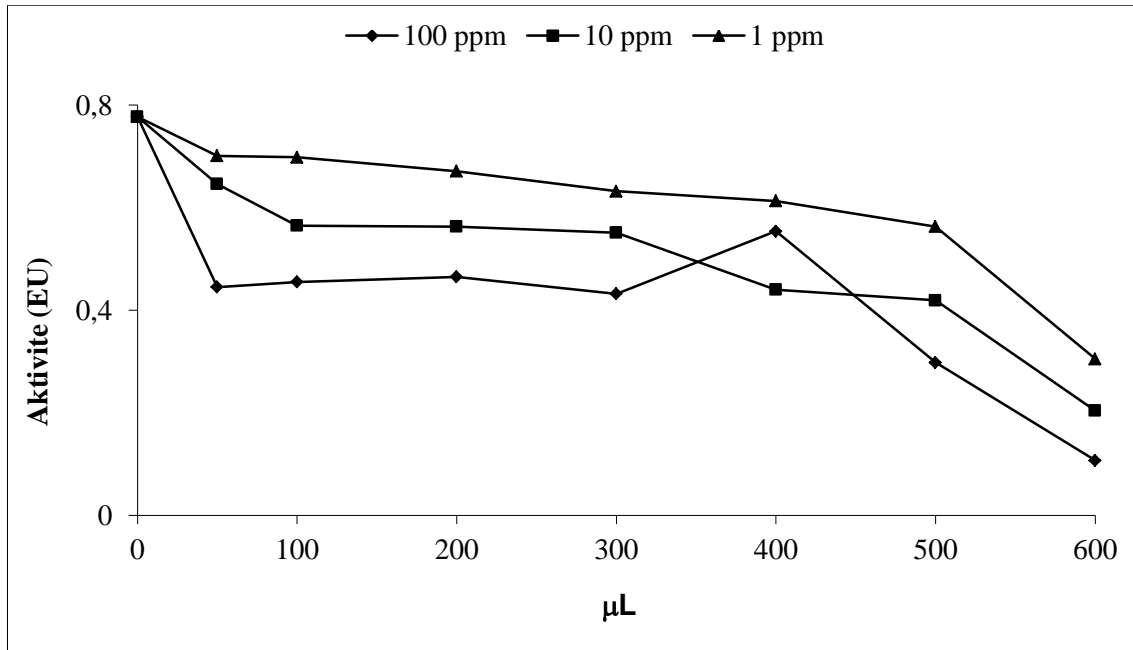
**Şekil 4.64.** Fındıktan saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine metil paratyon'un etkisi



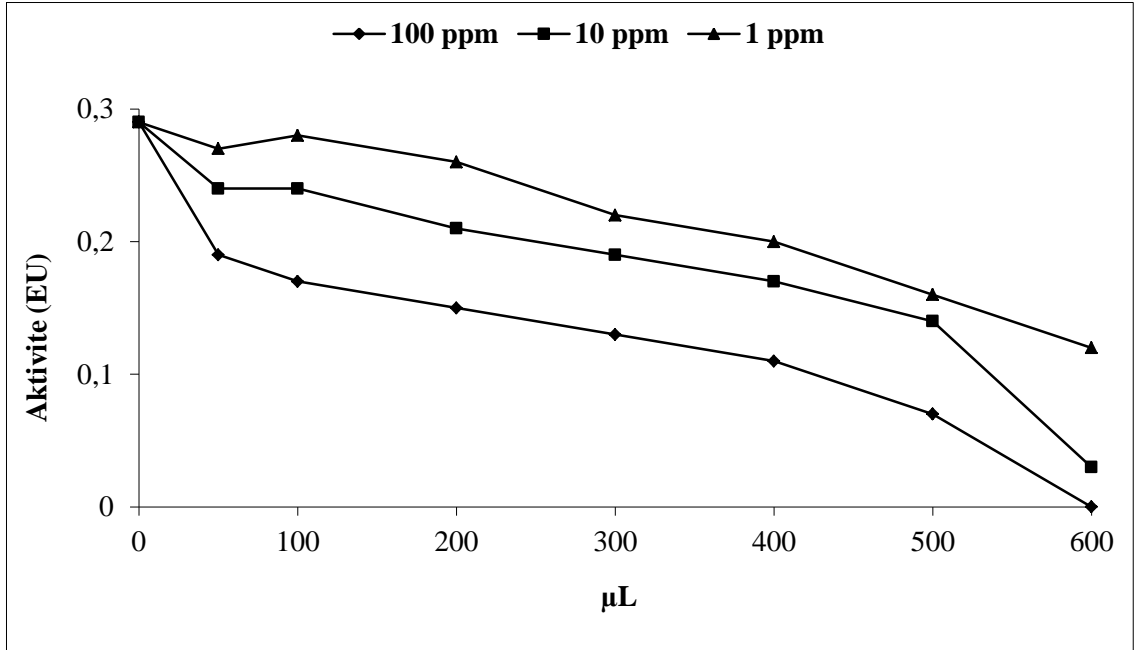
**Şekil 4.65.** Fındıktan saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine diklorvos'un etkisi



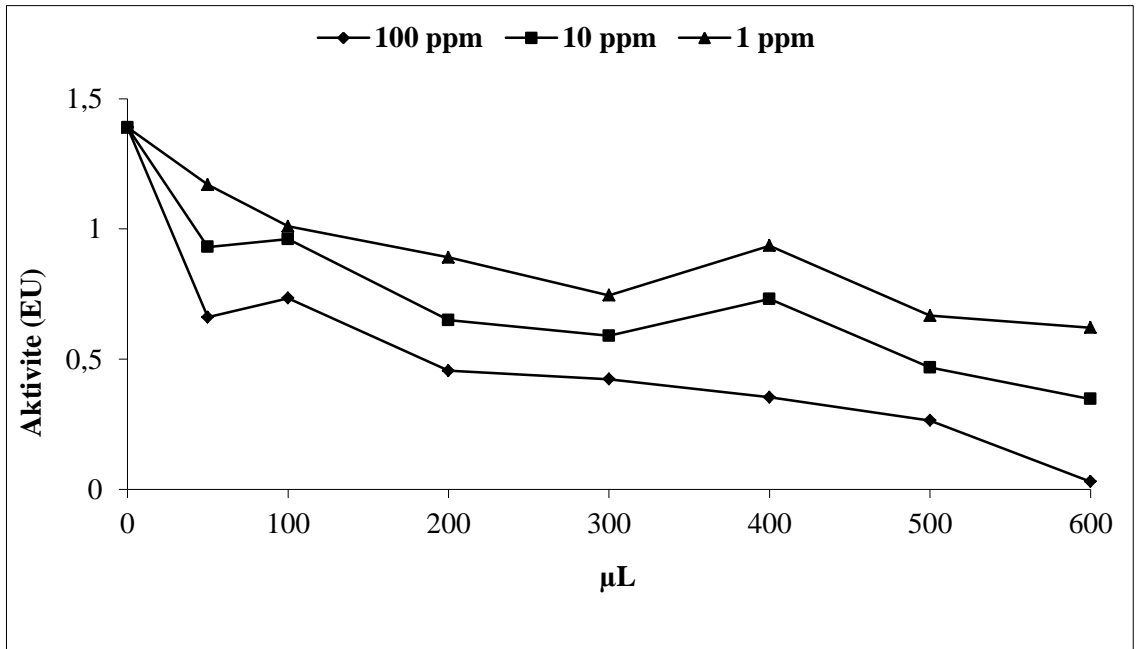
Şekil 4.66. Fındıktan saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine dimetoat'ın etkisi



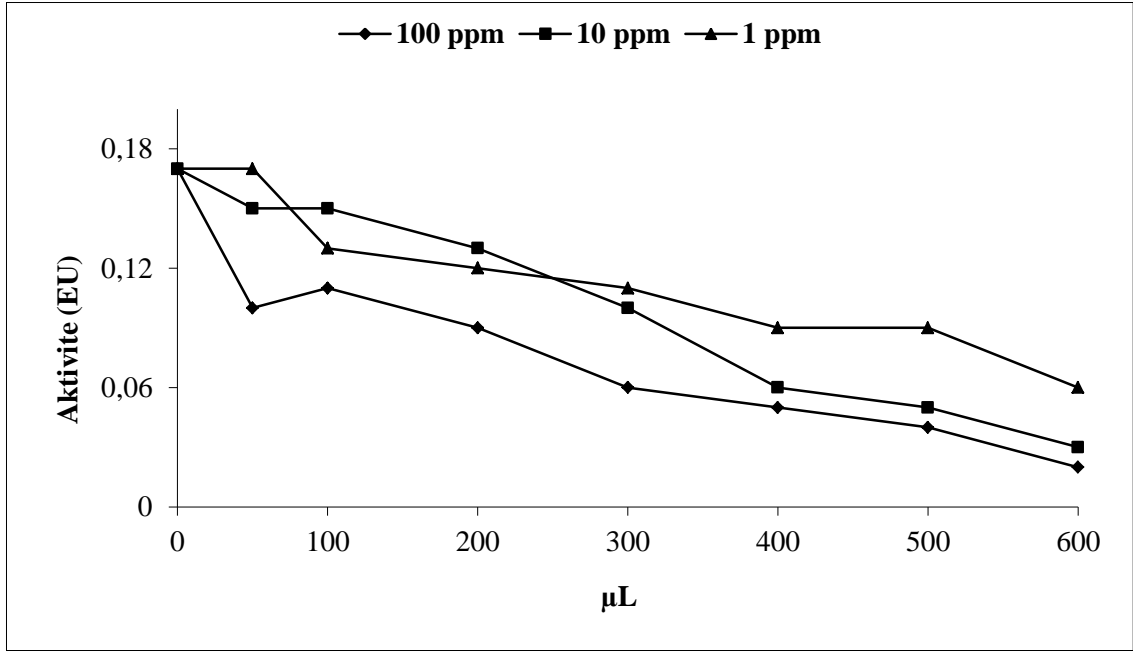
Şekil 4.67. Fındıktan saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine diazinon'un etkisi



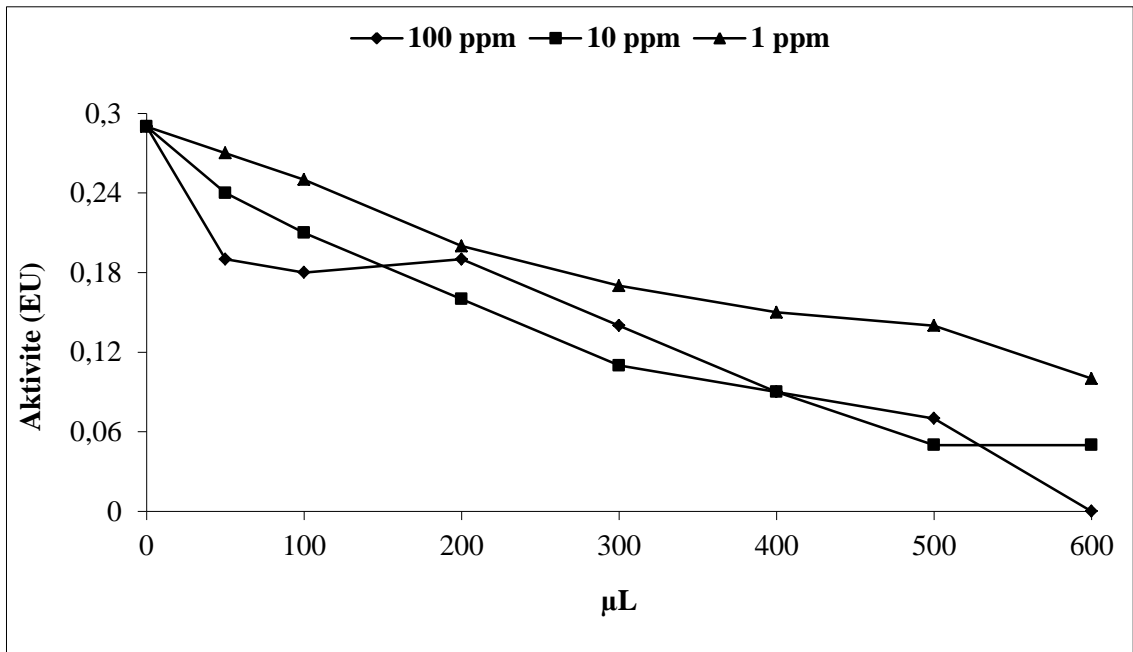
**Şekil 4.68.** Fındıktan saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine metamidofos'un etkisi



**Şekil 4.69.** Fındıktan saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine etil paratyon'un etkisi



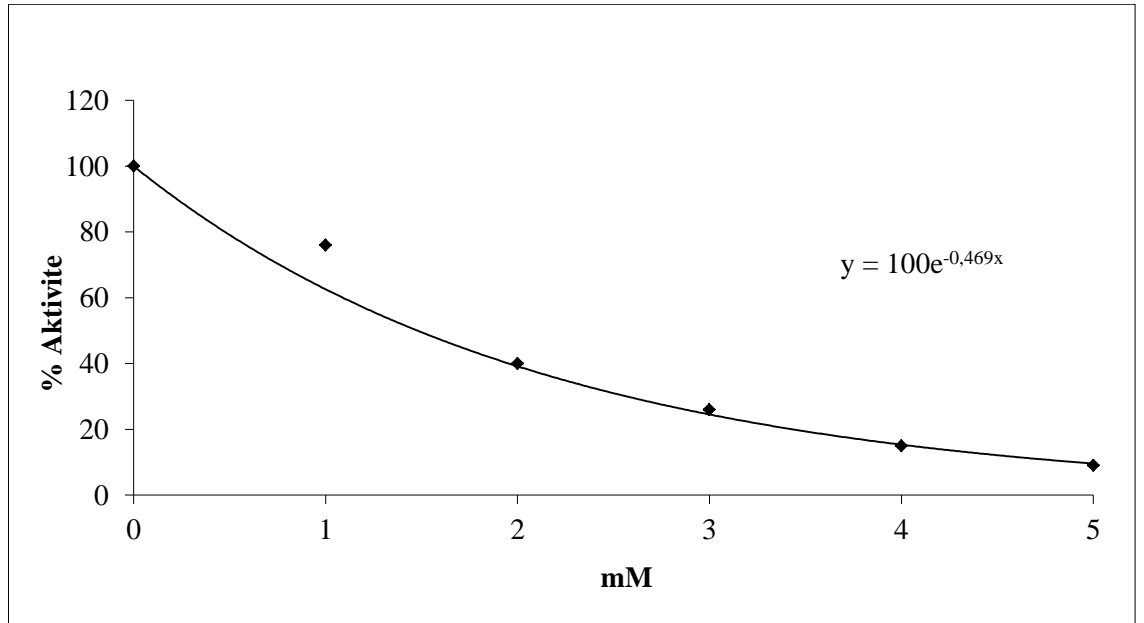
Şekil 4.70. Fındıktan saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine fention'un etkisi



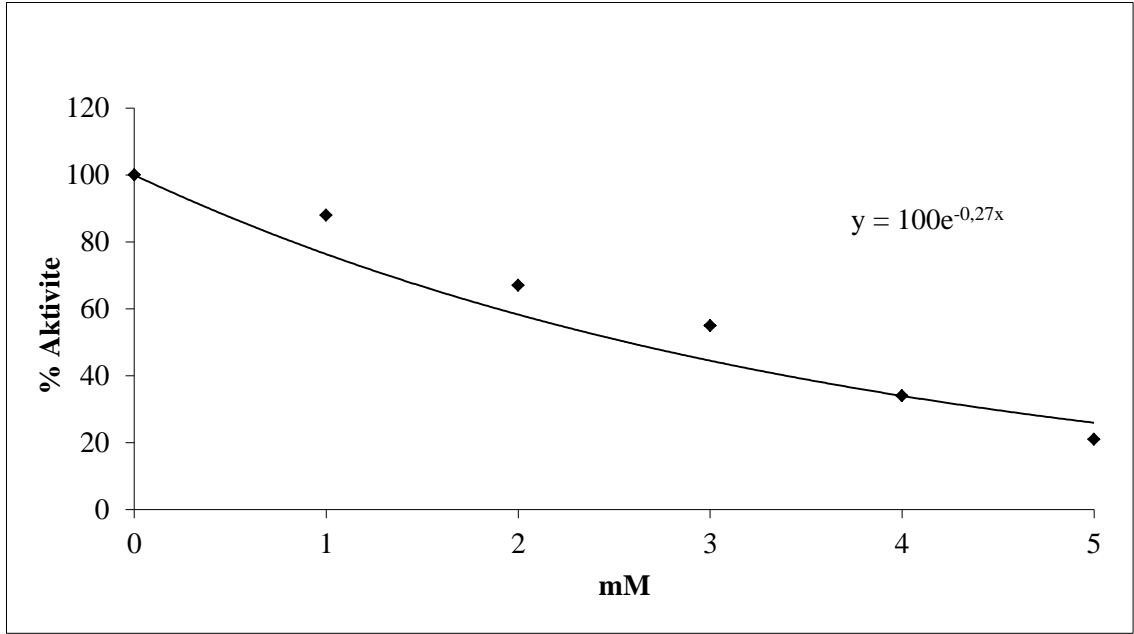
Şekil 4.71. Fındıktan saflaştırılan PON enziminin aktivitesi üzerine asetamiprid'in etkisi

#### 4.15. Fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enzim aktivitesi üzerine inhibitör etkisi gösteren bazı metaller, bileşikler ve pestisitler için $I_{50}$ değerlerinin belirlenmesine ait çalışmaların sonuçları

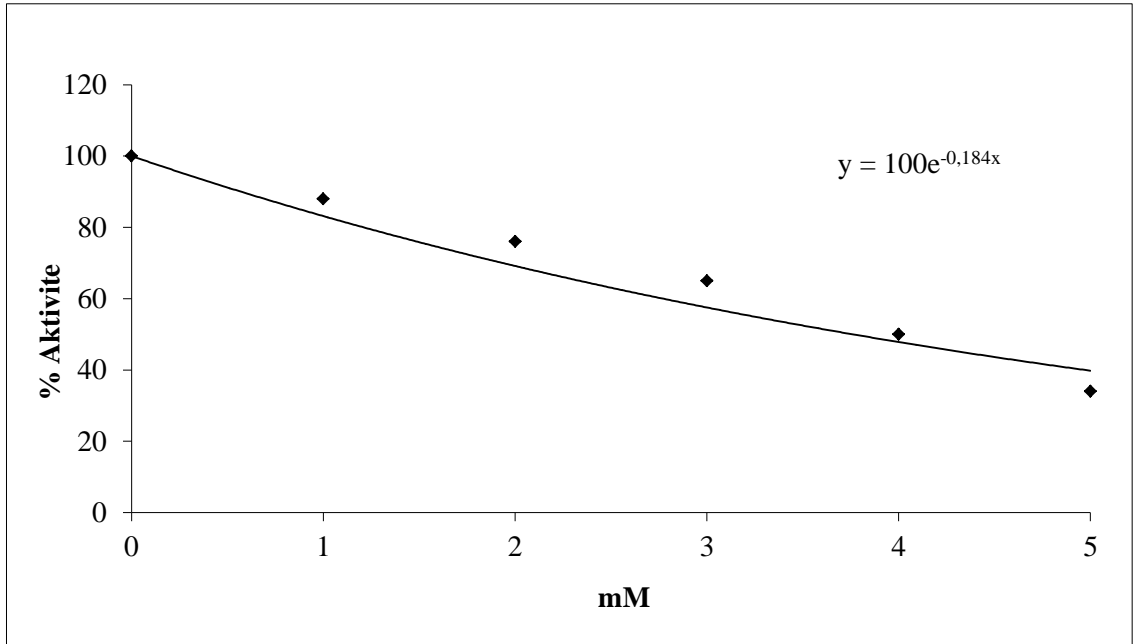
Fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enzim aktivitesi üzerine metallerin, bileşiklerin ve pestisitlerin etkilerini belirlemek amacıyla bu bileşiklerin stok çözeltileri hazırlandı ve paraoksonaz enzim aktivitesi üzerine etkileri araştırıldı. Elde edilen aktivite değerleri kullanılarak; %Aktivite-[I] değerleri bulundu. %Aktivite-[I] grafikleri çizilerek  $I_{50}$  değerleri bulundu. Grafikler Şekil 4.72, Şekil 4.73, Şekil 4.74, Şekil 4.75, Şekil 4.76, Şekil 4.77, Şekil 4.78, Şekil 4.79, Şekil 4.80, Şekil 4.81, Şekil 4.82, Şekil 4.83, Şekil 4.84, Şekil 4.85 Şekil 4.86 ve Şekil 4.87’de gösterildi. Ayrıca inhibisyon etkileri Çizelge 4.6, 4.7 ve 4.8’de gösterildi.



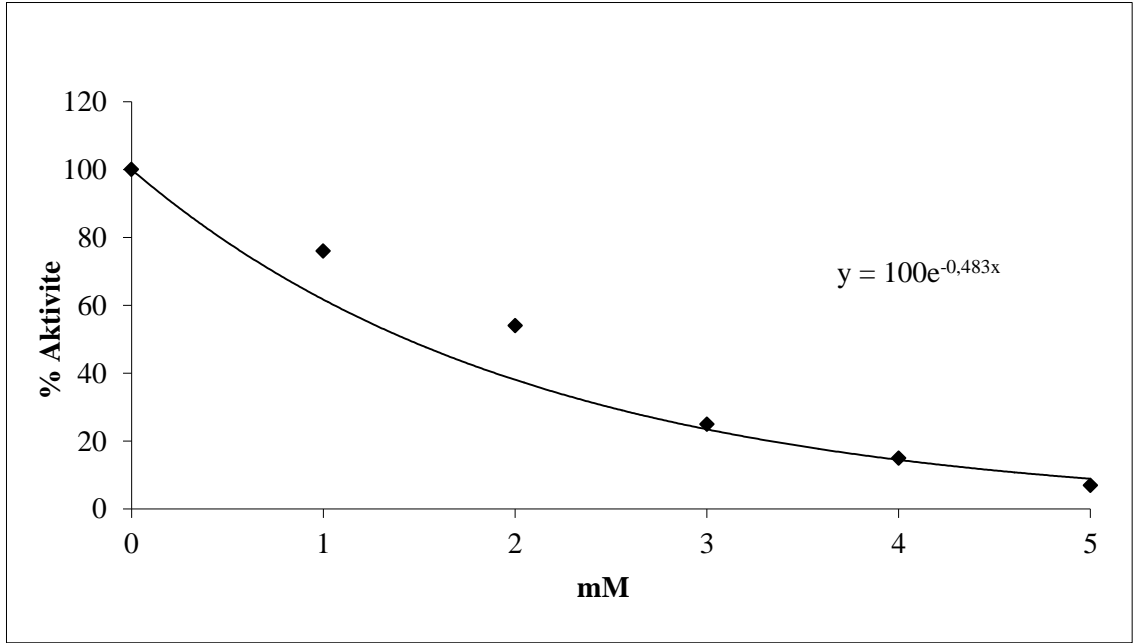
Şekil 4.72. Fındıktan saflaştırılan PON enzimi üzerine  $Mg^{2+}$  nin etkisi



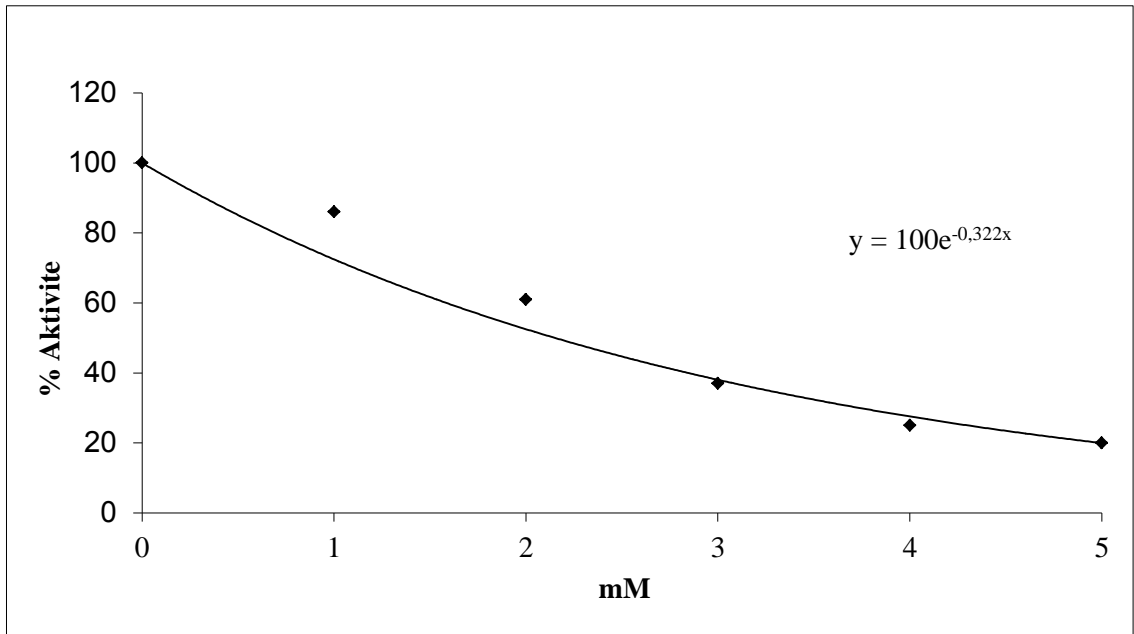
Şekil 4.73. Fındıktan saflaştırılan PON enzimi üzerine  $\text{Cu}^{2+}$ 'nin etkisi



Şekil 4.74. Fındıktan saflaştırılan PON enzimi üzerine  $\text{Mn}^{2+}$ 'nin etkisi

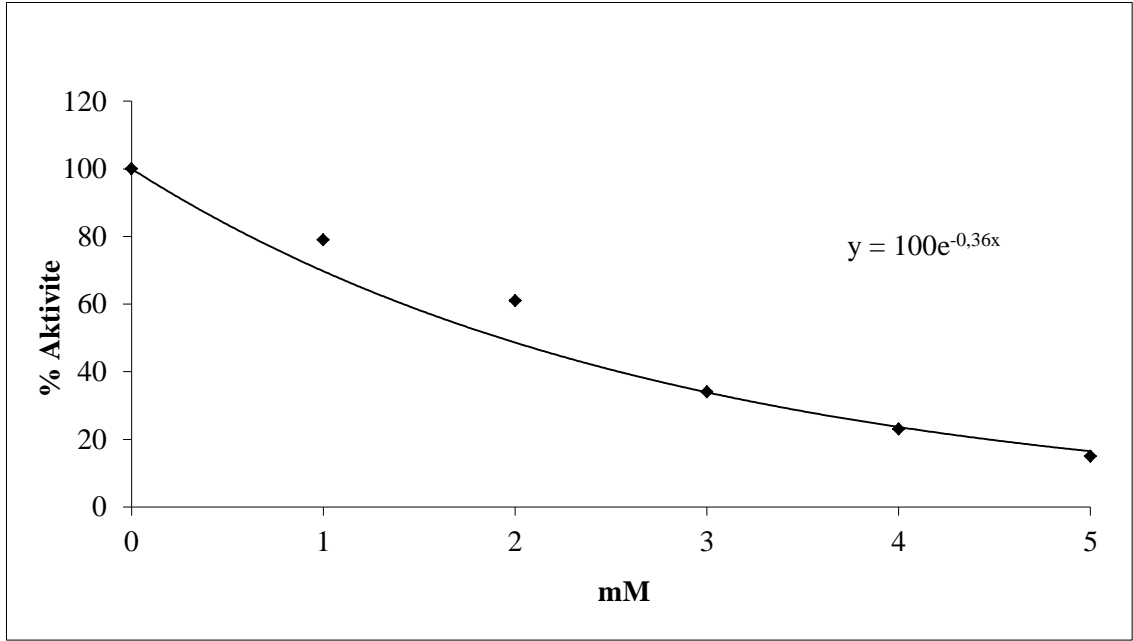


Şekil 4.75. Fındıktan saflaştırılan PON enzimi üzerine  $Zn^{2+}$ 'nin etkisi

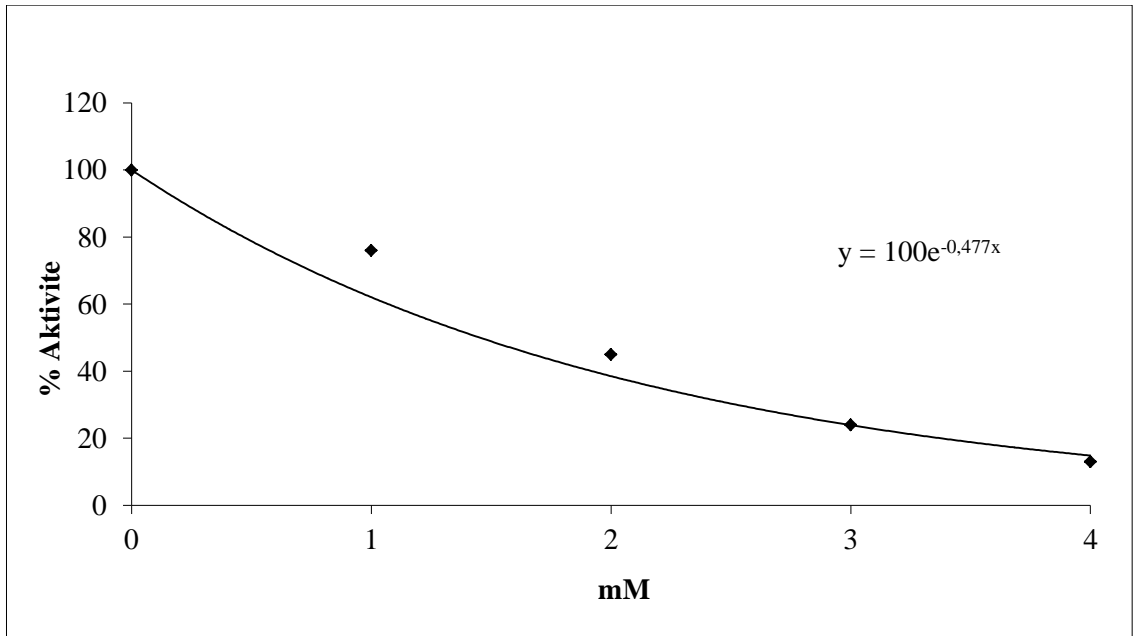


Şekil 4.76. Fındıktan saflaştırılan PON enzimi üzerine EDTA'nın etkisi

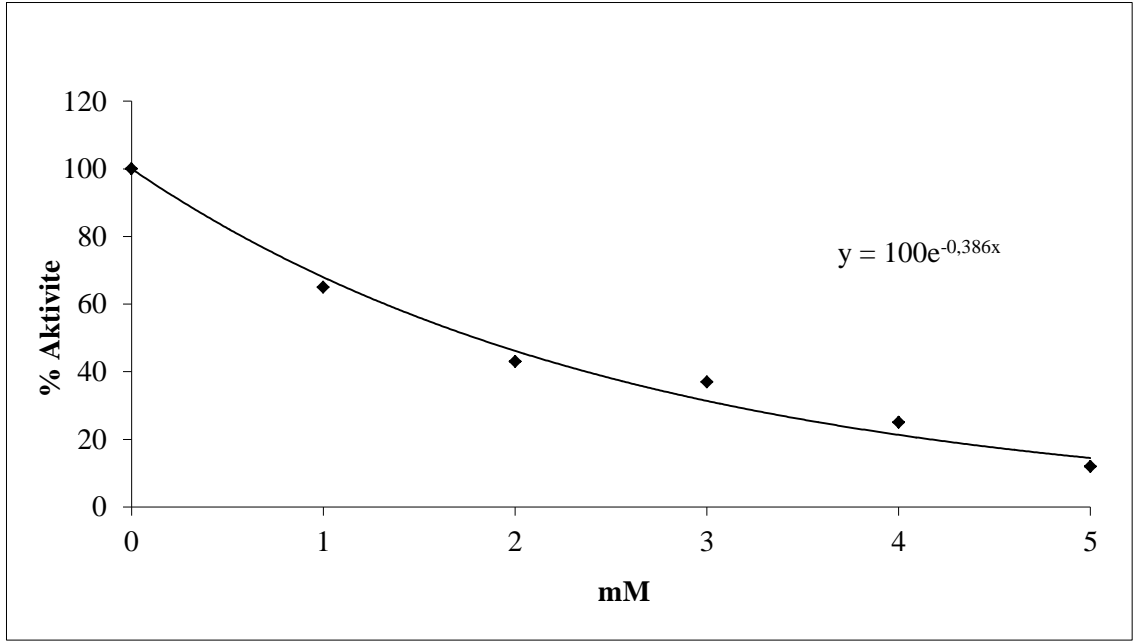




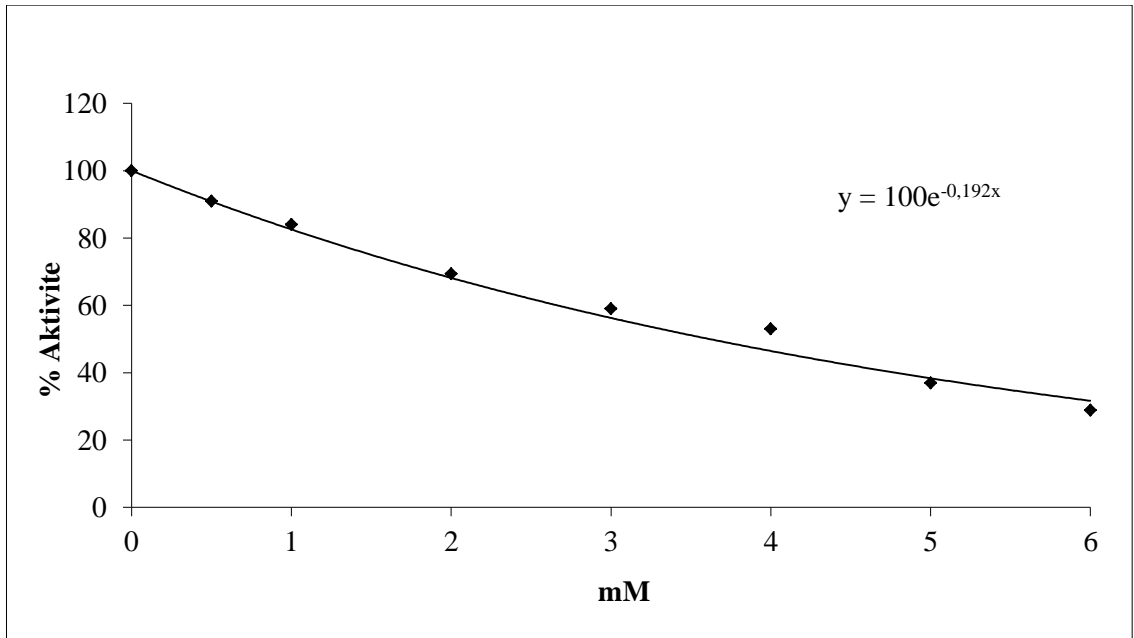
Şekil 4.77. Fındıktan saflaştırılan PON enzimi üzerine askorbik asit'in etkisi



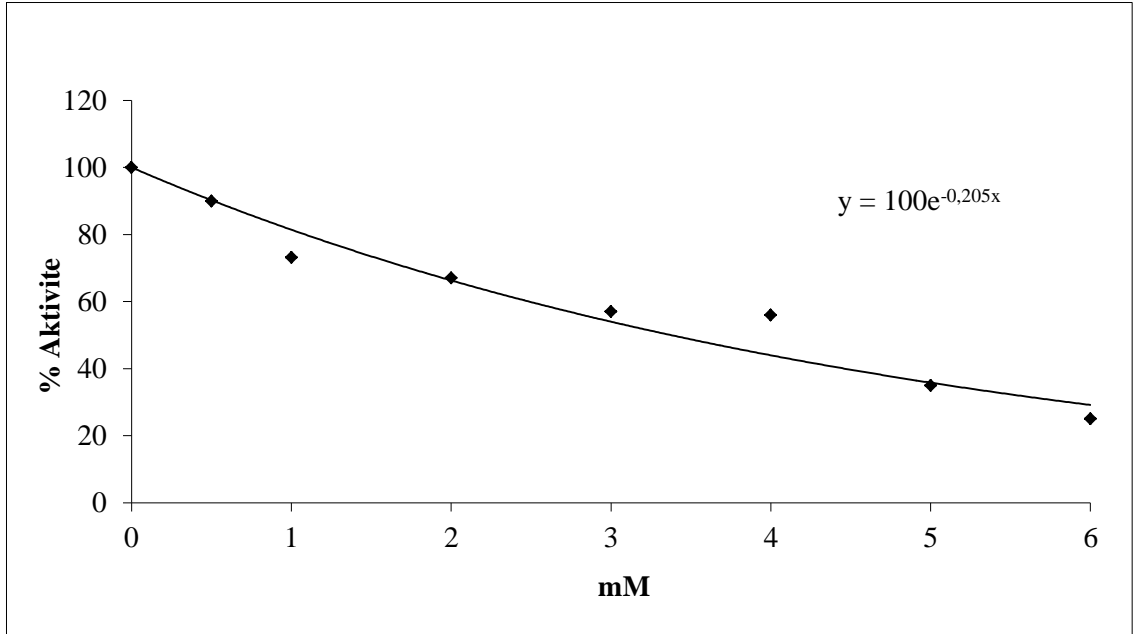
Şekil 4.78. Fındıktan saflaştırılan PON enzimi üzerine  $\beta$ -merkaptetanol'ün etkisi



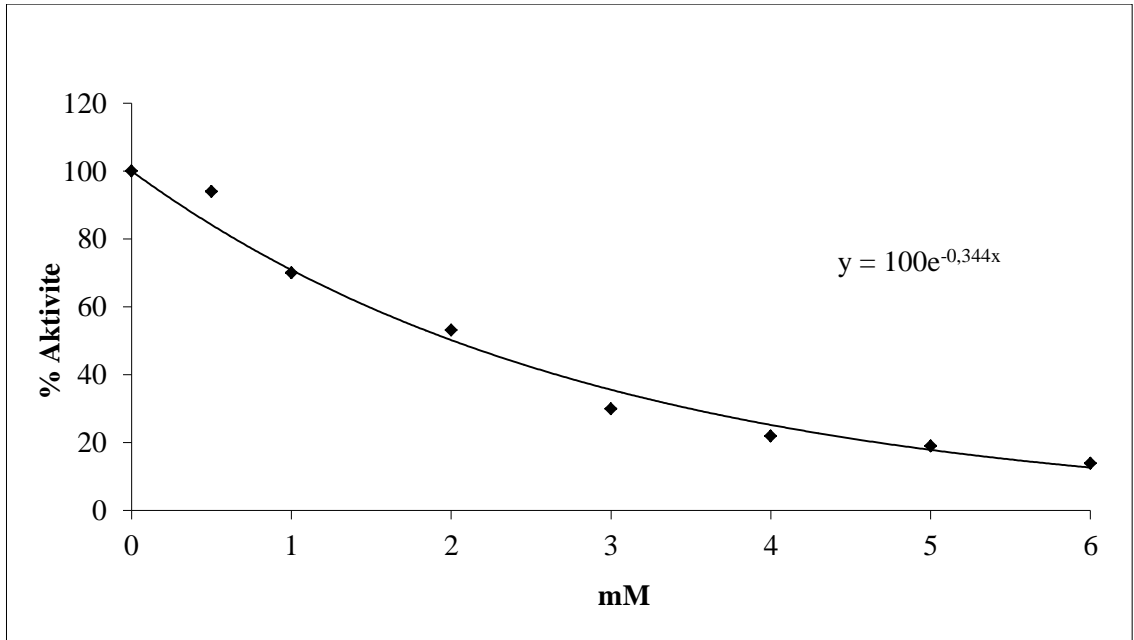
Şekil 4.79. Fındıktan saflaştırılan PON enzimi üzerine SDS'nin etkisi



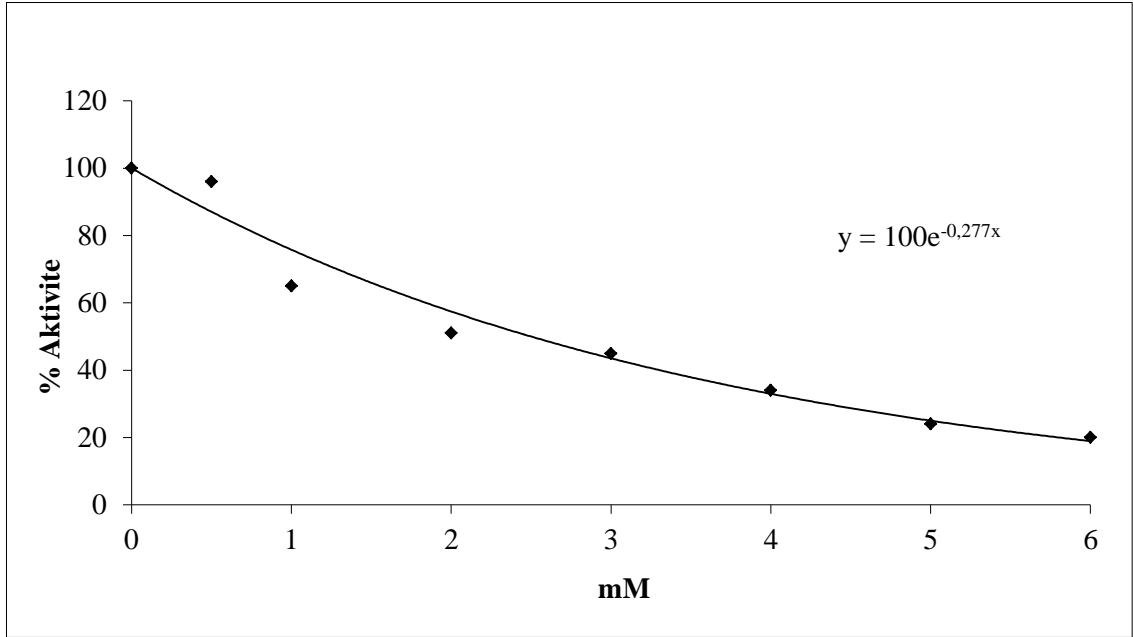
Şekil 4.80. Fındıktan saflaştırılan PON enzimi üzerine metil paratyon'un etkisi



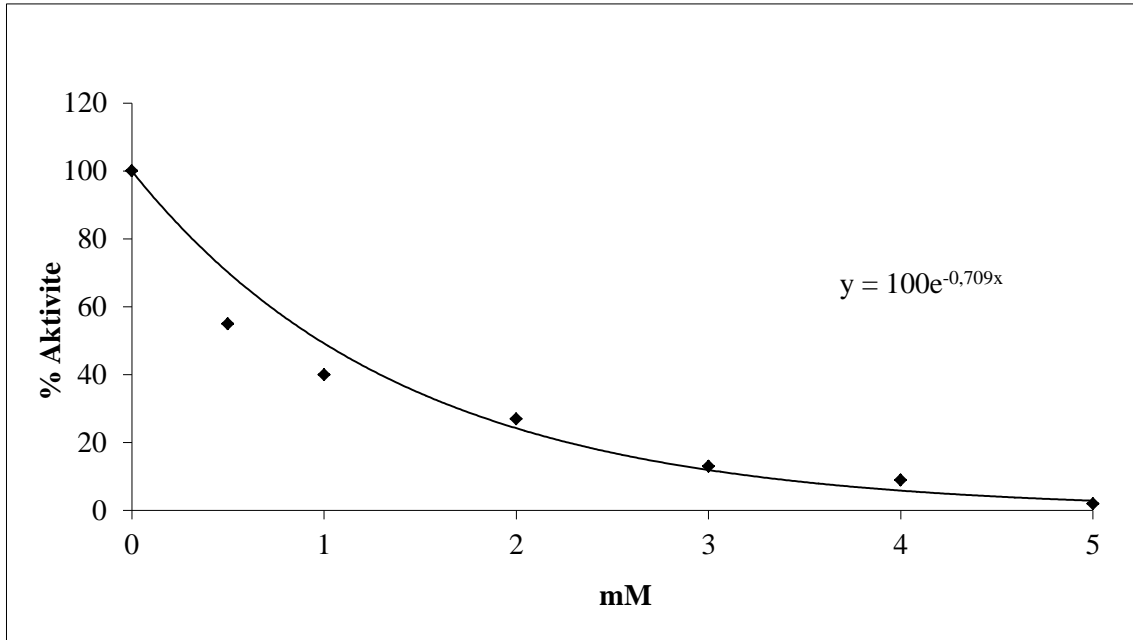
Şekil 4.81. Fındıktan saflaştırılan PON enzimi üzerine diklorvos'un etkisi



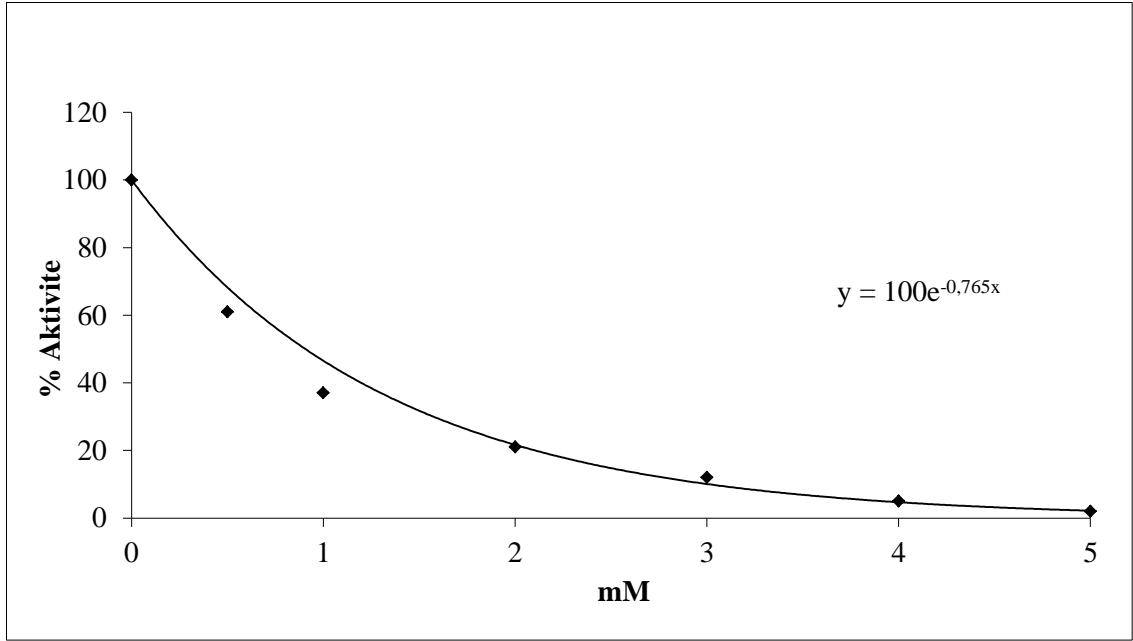
Şekil 4.82. Fındıktan saflaştırılan PON enzimi üzerine dimetoat'ın etkisi



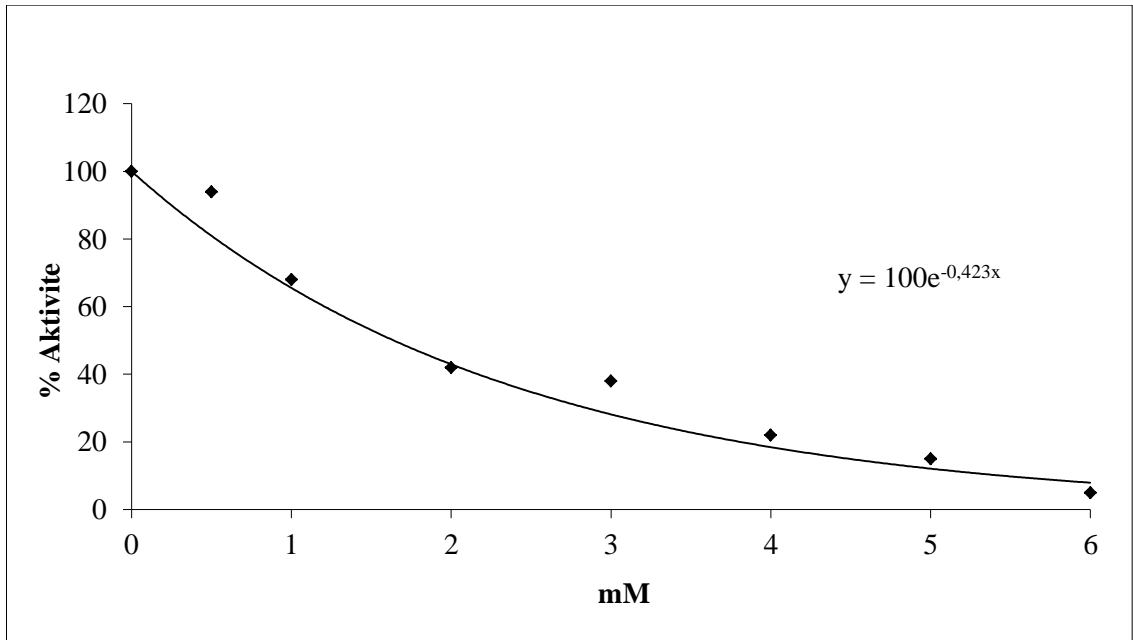
Şekil 4.83. Fındıktan saflaştırılan PON enzimi üzerine diazinon'un etkisi



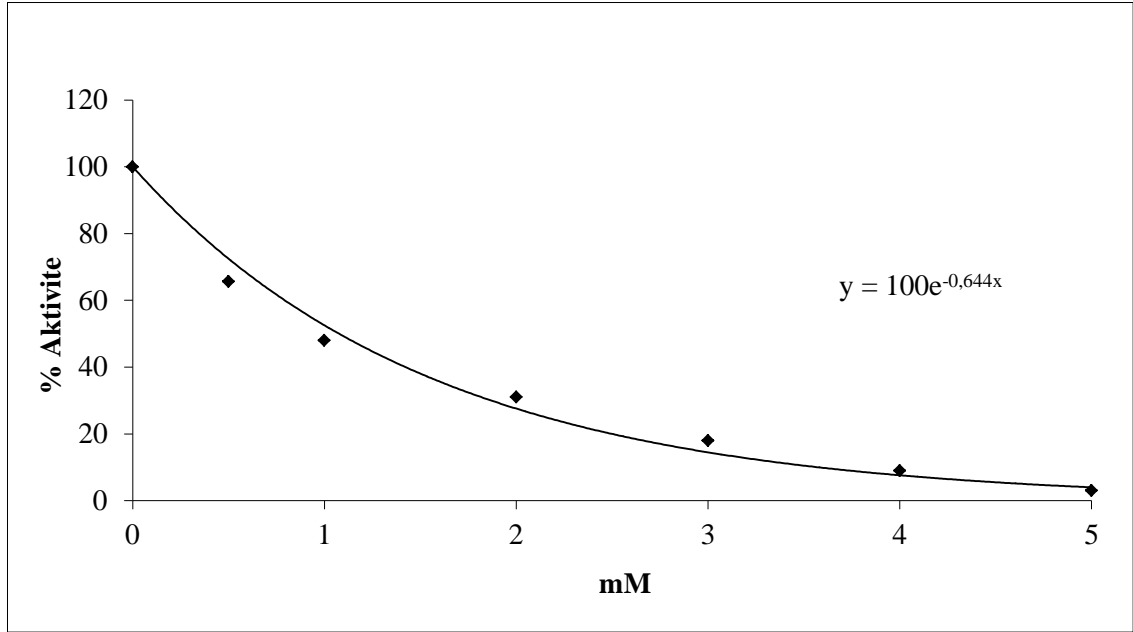
Şekil 4.84. Fındıktan saflaştırılan PON enzimi üzerine metamidofos'un etkisi



Şekil 4.85. Fındıktan saflaştırılan PON enzimi üzerine etil paratyon'un etkisi



Şekil 4.86. Fındıktan saflaştırılan PON enzimi üzerine fenitron'un etkisi



Şekil 4.87. Fındıktan saflaştırılan PON enzimi üzerine asetamiprid'in etkisi

Çizelge 4.6. Fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enzimi için metallere ait  $I_{50}$  değerleri

İnhibitör	$I_{50}$ (mM)
$Mg^{2+}$	1,47
$Cu^{2+}$	2,56
$Mn^{2+}$	3,76
$Zn^{2+}$	1,43

Çizelge 4.7. Fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enzimi için bileşiklere ait  $I_{50}$  değerleri

İnhibitör	$I_{50}$ (mM)
EDTA	2,15
Askorbik asit	1,92
$\beta$ -merkaptolanol	1,45
SDS	1,79

**Çizelge 4.8.** Fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enzimi için pestisitlere ait I<sub>50</sub> değerleri

<b>İnhibitör</b>	<b>I<sub>50</sub> (mM)</b>
Metil paratyon	3,60
Diklorvos	3,38
Dimetoat	2,01
Diazinon	2,50
Metamidofos	0,97
Etil paratyon	0,90
Fention	1,63
Asetamiprid	1,07

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Paraoksonaz (PON1; E.C.3.1.8.1), organik fosforlu bir insektisit olan paratyon'un aktif metaboliti paraoksonu hidroliz etme yeteneğine sahip A-esterazlar grubundan bir enzimdir (Azarsız 2000). PON1, HDL'ye bağlı organofosfat ajanlarının ve sinir gazlarının hidrolizine, LDL'nin oksidasyonu ile lipit peroksidlerinin oluşumuna ve bakteri endotoksinlerine karşı koruyucu rol oynayan önemli bir karaciğer enzimidir.

LDL'nin oksidasyonunun ateroskleroz sürecinin başlangıç evresini oluşturması, enzimin antioksidan özelliğinin önemini ortaya koymaktadır (Durrington *et al.* 2001; Carey *et al.* 2005).

HDL ile olan sıkı ilişkisinden dolayı PON1'i saflaştırmak oldukça güç olmuştur. Birkaç farklı araştırmacı grubu tarafından gerçekleştirilen ilk girişimlerde değişik kaynaklardan PON1'in saflaştırılması esnasında arilesteraz ve paraoksonaz aktivitesi kullanılmıştır (Choi and Forster 1967; Don *et al.* 1975; Kitchen *et al.* 1973; Mackness *et al.* 1988; Main, 1960; Wilde and Kekwick 1964; Zimmerman *et al.* 1989). Sonunda 1991 yılında tavşan ve insan PON1'lerinin saflaştırıldığı rapor edilmiştir. Her iki raporda PON1'in hem paraokson hem de fenilasetatı hidroliz ettiğini belirtmiştir.

Main (1956) ve Li *et al.* (1993, 1995) tarafından gerçekleştirilen ilk deneylerde, saflaştırılmış tavşan PON1 enjeksiyonunun, paraokson, klorprifos ve klorprifos oksona karşı koruma sağladığı gözlenmiştir. Shih, Lusi ve arkadaşları tarafından yapılan ve genetik olarak modifiye edilmiş farelerin kullanıldığı deneyler farede PON1 yokluğunun fareyi klorprifoz oksona karşı aşırı derecede hassas hale getirdiğini kanıtlamıştır (Shih *et al.* 1998). Yine PON1'den yoksun fareler diazokson ve diazinona karşı artan hassasiyet göstermiştir.

Organofosfatlar kolinesterazı inhibe edebilen ve böcek öldürücü olarak kullanılan bileşiklerdir. Bu bileşikler zehirlenmelere ve hatta ölümlere dahi yol açabilirler.



Biyolojik temizlikçiler olarak adlandırılan bazı enzimler toksik bileşikleri (organofosfatları) biyolojik hedeflerine ulaşmadan önce etkisizleştirirler. İnsan serum PON1 enzimi de metabolizmada antoksidan bir enzim, yani *in vivo* şartlarda biyolojik temizlikçi olarak rol oynamaktadır (Abdollahi *et al.* 1995; Ashani *et al.* 2004; Shadnia *et al.* 2005).

Tüm dünyada yaygın olarak pestisit şeklinde kullanılan; ticari olarak yerel ve endüstriyel amaçlarla piyasada yerini alan (organofosfat) OP'lular, dünya çapında yaklaşık 39 milyon insanın akut zehirlenmesine yol açmaktadır. Uyarı niteliğindeki bu istatistiğe rağmen, günümüzde pestisit kullanımına bağlı zehirlenmeleri ve hastalıkları takip edecek global nitelikte bir sistem mevcut değildir. Dünya çapında pestisit üretiminin 1970-1985 arasında %20 lerden %40'lara çıkması, OP zehirlenmelerini kaygı uyandıran bir fenomen haline getirmiştir (Mohammed Ali and Chia 2008). 1995'te, sarin kullanılarak Tokyo metrosunda gerçekleştirilen bir saldırı 10 Japon'un ölümüne yol açmış ve 5000'in üzerinde insan zarar görmüştür (Suzuki *et al.* 1995).

Ayrıca körfez savaşı malüllerinin sarin/siklosarin maruziyetlerinin araştırılması sırasında tespit edilen bulgular, sarin ve siklosarine düşük seviyeli maruziyet ile maruziyetten 4-5 yıl sonra spesifik fonksiyonel merkezi sinir sistemine etkileri arasında doz-tepki ilişkisi olduğunu ortaya çıkarmıştır (Proctor *et al.* 2006)

Son yıllarda yapılan çalışmalar, PON enzimlerinin fizyolojik önemini aydınlatmaya yönelik çalışmaların önümüzdeki yıllarda artarak devam edeceğinin sinyalini vermektedir. PON1'in bilinen aktiviteleri gerçekten fizyolojik öneme sahiptir. Spesifik organofosfatların PON1 tarafından hidrolizi fizyolojik olarak çok önemlidir. Bir A-oksonaz ailesi üyesi olan paraoksonaz, asetil kolin esteraz inhibitörlerini kolin esterazlara bağlanmadan önce parçalarlar ve bu sebeple insanları düşük dozlardaki organofosfat pestisitlerin zararlarından korur. Bugün dünya çapında her yıl 220 000 insanın bu tür maruz kalmalardan dolayı hayatını kaybettiği tahmin edilmektedir. Pestisitlerin kullanıldığı çevrelerdeki insanlar daha yüksek risk altındadırlar. Ayrıca lipid metabolizmasındaki rolü ne olursa olsun düşük PON1 seviyeleri vasküler

hastalıklar için önemli bir risk faktörüdür (James and Deakin 2004; Jarvik *et al.* 2000; Mackness and Mackness 2004; Mackness *et al.* 2001).

Bu çalışmada kabak çekirdeğinden ve fındıktan PON1 enziminin saflaştırılması, bazı bileşiklerin ve pestisitlerin bu enzim üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Tez çalışmamızda paraoksonaz enzimi kabak çekirdeği ve fındıktan afinite kromatografisi ile tek basamakta saflaştırıldı ve karakterizasyonu yapıldı. Çalışmamızın sonuçları tartışılmadan önce kullanılan yöntemlerin seçiliş sebepleri şöyledir:

Paraoksonaz enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılması esnasında eluatlardaki nispi protein miktarları 280 nm'de absorbansları ölçülerek belirlenmiştir. Kullanılan bu metot protein yapısında bulunan tirozin ve triptofan aminoasitlerinin 280 nm'de maksimum absorbans vermesi esasına dayanmaktadır (McIntosh 1969). Bu metot da protein çözeltisine herhangi bir reaktif katılmadan direkt köre karşı absorbans okutularak yapıldığı için protein çözeltisi ziyan olmamakta ve tekrar kullanılabilir. Saflaştırılan enzim çözeltilerinde  $\mu\text{g}$  seviyesinde protein tayini yapılması gerektiğinden hassasiyeti 1-100  $\mu\text{g}$  olan Bradford metodu kullanılmıştır (Bradford 1976). Bozucu faktörlerin az olması, kısa zaman alması ve hassasiyetinin yüksek olması bu yöntemin kullanılmasının nedenidir.

Paraoksonaz enzimini saflaştırmak üzere afinite kromatografisi tekniği kullanılmıştır. Yapılan literatür araştırmaları sonucunda paraoksonaz enziminin saflaştırılması için önerilen saflaştırma teknikleri denenmiş enzimi saf olarak en yüksek verimle elde etmek için bu metod kullanılmıştır.

Enzimi saflaştırmak amacıyla kabak çekirdeği ve fındıktan hazırlanan homojenatlar afinite kolonuna tatbik edildi. Jelin kolona paketlenmesi, tampon ile dengelenmesi ve yıkama işlemlerinin ardından pH'ı 6,8 olan 0,1 M Tris HCl / 2 mM CaCl<sub>2</sub> tamponuyla enzimler kolondan elüe edildi. Elüatlar 5 mL'lik fraksiyonlar halinde toplanarak her

tüpdeki numune için 280 nm’de kalitatif protein miktarı tayini yapıldı. Absorbans gösteren fraksiyonlar için paraoksonaz aktivitesi tayini yapıldı. Kabak çekirdeğinden fındıktan saflaştırılan PON enziminin elüsyon sonuçları grafik halinde Şekil 4.2 ve Şekil 4.45’te gösterilmiştir.

Paraoksanaz aktivitesi substrat olarak O,O-dietil-O-p-nitrofenilfosfat kullanılarak ve p-nitrofenol’ün 412 nm’de absorpsiyonundaki artış izlenerek ölçülmüştür. Aktivite tayini için 500 µL enzim çözeltisi, 500 µL paraokson çözeltisi, 500 µL tampon (pH’ı 6,8 olan 0,1 M Tris HCl / 2 mM CaCl<sub>2</sub> ) ilave edilerek ölçülmüştür. Enzimatik aktivite molar ekstinksiyon katsayısı 18000 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>’den hesaplandı. Paraoksanazın 1 EU, optimum şartlarda 1 dakikada oluşan p-nitrofenolün 1 nmol’ü olarak tanımlanmaktadır.

Kabak çekirdeğinden ve fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla SDS poliakrilamid jel elektroforezi yapılmıştır. Enzimin saf olduğu belirlenmiş, jellerin fotoğrafları çekilmiş Şekil 4.3’te ve şekil 4.46’da gösterilmiştir.

Kabak çekirdeğinden ve fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enziminin optimum pH değerini belirlemek üzere deneyler bölüm 3.2.4.a’da belirtildiği şekilde yapıldı. Elde edilen sonuçlarla aktivite hesaplandı ve aktivite-pH grafikleri çizildi (Şekil 4.4, 4.47).

Kabak çekirdeğinden saflaştırılan paraoksonaz enziminin optimum pH’sı 7 ve 4-8 pH aralığında ise aktivitesini koruduğu belirlenmiştir.

Fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enziminin optimum pH’sı 5 ve 4-7 pH aralığında ise aktivitesini koruduğu belirlenmiştir.

Kabak çekirdeğinden ve fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek üzere deneyler bölüm 3.2.4.b’de belirtildiği şekilde yapıldı. Elde edilen sonuçlarla aktivite hesaplandı ve aktivite-sıcaklık grafikleri çizildi (Şekil 4.5, 4.48)

Kabak çekirdeğinden saflaştırılan paraoksonaz enziminin optimum sıcaklığı 39°C ve aktivite gösterdiği sıcaklık aralığı 20-60°C olarak belirlenmiştir.

Fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enziminin optimum sıcaklığı 36°C ve aktivite gösterdiği sıcaklık aralığı 20-70°C olarak belirlenmiştir.

Kabak çekirdeğinden saflaştırılan paraoksonaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığı 12942 Da ( $\approx$ 13000 Da) ve 20421 Da olarak bulundu. Enzim için jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığı tayini için hazırlanan standart grafik ve absorbans grafiği Şekil 4.6 ve Şekil 4.7'de verilmiştir.

Fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığı 30892 Da olarak bulundu. Enzim için jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığı tayini için hazırlanan standart grafik ve absorbans grafiği Şekil 4.49 ve Şekil 4.50'de verilmiştir.

Kabak çekirdeğinden saflaştırılan enziminin maksimum hızı  $V_{max}$  ve hız sabiti  $K_M$ 'yi belirlemek amacıyla artan substrat konsantrasyonuna karşı aktivite bulmak için altı farklı substrat (paraokson) konsantrasyonunda aktiviteler belirlendi.  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri bulunarak Lineweaver-Burk eğrileri çizildi.  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri grafik ve doğru denklemleri yardımıyla hesaplandı. Elde edilen sonuçlardan  $1/V$  g/L.min ve  $1/[S]$  ise birimleri cinsinden hesaplandı ve Linewear Burk grafiği çizildi. Bu grafiklerden  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri hesaplandı. Grafiklerden yararlanılarak hesaplanan  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri ise sırasıyla 3,475 mM ve 2,935  $\mu$ mol/L.dak olarak belirlendi.

Fındıktan saflaştırılan enziminin maksimum hızı  $V_{max}$  ve hız sabiti  $K_M$ 'yi belirlemek amacıyla artan substrat konsantrasyonuna karşı aktivite bulmak için altı farklı substrat (paraokson) konsantrasyonunda aktiviteler belirlendi.  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri bulunarak Lineweaver-Burk eğrileri çizildi.  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri grafik ve doğru denklemleri yardımıyla hesaplandı. Elde edilen sonuçlardan  $1/V$  g/L.min ve  $1/[S]$  ise birimleri

cinsinden hesaplandı ve Linewear Burk grafiği çizildi. Bu grafiklerden  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri hesaplandı. Grafiklerden yararlanılarak hesaplanan  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri ise sırasıyla 3,210 mM ve 1,995  $\mu\text{g/L.dak}$  olarak belirlendi.

Kabak çekirdeğinden saflaştırılan paraoksonaz enzimi için fenilasetat kullanılarak substrat spesifikliği belirlendi. Bu amaçla aktivite fenilasetat'ın 270 nm'de absorpsiyonundaki artış izlenerek ölçüldü. Enzimatik aktivite molar ekstinksiyon katsayısı  $1310 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  kullanılarak hesaplandı. 1 enzim ünitesi optimum şartlarda hidrolizlenen fenilasetatın 1  $\mu\text{mol}'ü$  olarak tanımlanmış ve sonuçlar Şekil 4.9'da gösterilmiştir.  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri bulunarak Lineweaver-Burk eğrileri çizildi.  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri grafik ve doğru denklemleri yardımıyla hesaplandı. Bu grafiklerden  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri hesaplandı. Grafiklerden yararlanılarak hesaplanan  $V_{max}$  ve  $K_M$  değerleri ise sırasıyla 2,647  $\mu\text{mol/L.dak}$  ve 3,0674 mM olarak belirlendi.

Fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enzimi için fenilasetat kullanılarak substrat spesifikliği belirlendi. Bu amaçla aktivite fenilasetat'ın 270 nm'de absorpsiyonundaki artış izlenerek ölçüldü. Enzimatik aktivite molar ekstinksiyon katsayısı  $1310 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  kullanılarak hesaplandı. 1 enzim ünitesi optimum şartlarda hidrolizlenen fenilasetatın 1  $\mu\text{mol}'ü$  olarak tanımlanmış ve sonuçlar Şekil 4.52'de gösterilmiştir.  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri bulunarak Lineweaver-Burk eğrileri çizildi.  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri grafik ve doğru denklemleri yardımıyla hesaplandı. Bu grafiklerden  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri hesaplandı. Grafiklerden yararlanılarak hesaplanan  $V_{max}$  ve  $K_M$  değerleri ise sırasıyla 2,413  $\mu\text{mol/L.dak}$  ve 2,732 mM olarak belirlendi.

PON1 enzimi ile metal etkileşimine dair çalışmalar da mevcuttur. Örneğin karaciğer mikrozomal PON1 enziminin mangan, kobalt, çinko, baryum, bakır, civa ve magnezyum tarafından inhibe edildiği belirtilmiştir (Cornish-Browden 2004). Yine magnezyum, kobalt, bakır ve civanın fare karaciğerinden saflaştırılan PON1 ve PON3 enzimlerini önemli ölçüde inhibe ettiği açıklanmıştır (Pla *et. al.* 2006).

Kabak çekirdeğinden saflaştırılan paraoksonaz enzim aktivitesi üzerine 10mM, 1mM ve 0,1 mM  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  ve  $Fe^{2+}$  katyonlarının etkisi belirlendi. Bunun için aktivite paraokson varlığında belirlendi. Sonuçlar Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15 ve Şekil 4.16'da görülmektedir. Yapılan deneyler sonucunda,  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  ve  $Fe^{2+}$ 'nin paraoksonaz enzim aktivitesini arttırdığı görülmüştür.  $Mg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  ve  $Fe^{3+}$ 'ün tüm konsantrasyonlarında enzim aktivitesini kısmen inhibe ettiği belirlenmiştir.

Fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enzim aktivitesi üzerine 10mM, 1mM ve 0,1 mM  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  ve  $Fe^{2+}$  katyonlarının etkisi belirlendi. Bunun için aktivite paraokson varlığında belirlendi. Sonuçlar Şekil 4.53, Şekil 4.54, Şekil 4.55, Şekil 4.56, Şekil 4.57, Şekil 4.58 ve Şekil 4.59'da görülmektedir. Yapılan deneyler sonucunda  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  ve  $Ca^{2+}$ 'nin paraoksonaz enzim aktivitesini arttırdığı görülmüştür.  $Mg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  ve  $Zn^{2+}$ 'nin tüm konsantrasyonlarda enzim aktivitesini kısmen inhibe ettiği belirlenmiştir.

Kabak çekirdeğinden saflaştırılan paraoksonaz enzim aktivitesi üzerine 10, 1 ve 0,1 mM EDTA, askorbik asit,  $\beta$ -merkaptotanol ve SDS bileşiklerinin etkisi belirlendi. Bunun için aktivite paraokson varlığında belirlendi. Sonuçlar Şekil 4.17, Şekil 4.18, Şekil 4.19 ve Şekil 4.20'de görülmektedir. Yapılan deneyler sonucunda EDTA, askorbik asit,  $\beta$ -merkaptotanol ve SDS'nin tüm konsantrasyonlarda enzimi inhibe ettiği belirlenmiştir.

Fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enzim aktivitesi üzerine 10, 1 ve 0,1 mM EDTA, askorbik asit,  $\beta$ -merkaptotanol, ve SDS bileşiklerinin etkisi belirlendi. Bunun için aktivite paraokson varlığında belirlendi. Sonuçlar Şekil 4.60, Şekil 4.61, Şekil 4.62 ve Şekil 4.63'te görülmektedir. Yapılan deneyler sonucunda EDTA, askorbik asit,  $\beta$ -merkaptotanol ve SDS'nin tüm konsantrasyonlarda enzimi inhibe ettiği belirlenmiştir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda paraoksonaz ve pestisitler arasındaki etkileşimleri içeren çalışmalar yapılmaktadır. Türkiye'de yapılan bir çalışmada akut organofosfat zehirlenmesi yaşayan hastalarda paraoksonaz aktivitesi, kontrollerden %30 düşük

bulunmuştur. Her iki grupta da PON1 konsantrasyonu benzer bulunduğu için, PON1 aktivitesinin zehirlenenlerde düşük çıkmasına neden olarak organofosfatların PON1'i direk olarak inaktive ettiği veya zehirlenmeye neden olan organofosfatların enzimin aktivitesinin ölçülmesinde kullanılan substrat ile yarışması öne sürülmüştür (Sözmen *et al.* 2002). İnsan sağlığı açısından organofosfatlı bileşikler terörizm tehdidi kadar bir çevresel risk oluşturur. PON1 enziminin çok yönlü bir araştırma konusu olmasının en önemli nedenlerinden biri budur (Draganov and La Du 2004).

Kabak çekirdeğinden ve fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enzim aktivitesi üzerine 100 ppm, 10 ppm, 1 ppm metil paratyon, diklorvos, dimetoat, diazinon, metamidofos, etil paratyon, fention ve asetamiprid pestisitlerinin etkisi belirlendi. Sonuçlar Şekil 4.21, Şekil 4.22, Şekil 4.23, Şekil 4.24, Şekil 4.25, Şekil 4.26, Şekil 4.27, Şekil 4.28, Şekil 4.64, Şekil 4.65, Şekil 4.66, Şekil 4.67, Şekil 4.68, Şekil 4.69, Şekil 4.70 ve Şekil 4.71'de görülmektedir. Pestisitlerle yapılan deneyler sonucunda kabak çekirdeğinden ve fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enzim aktivitesini inhibe ettiği gözlenmiştir. Yapılan çalışmanın literatür araştırmaları sonucuyla uyumlu olduğu görülmüştür.

Genel olarak kimyasal maddelerin enzimler üzerindeki inhibisyon etkileri  $I_{50}$  (enzimin aktivitesini %50 inhibe eden konsantrasyonu) değeri olarak verilmektedir. Kinetik çalışmalarımız sırasında enzim aktivitesini inhibe eden metallerin, bileşiklerin ve pestisitlerin  $I_{50}$  değerleri de belirtilmiştir. Bilindiği gibi  $I_{50}$  değeri küçük olan inhibitörün inhibisyon etkisi daha yüksektir. Bu sonuçlara göre;

Kabak çekirdeğinden saflaştırılan paraoksonaz enzimi için kullanılan metallerin enzim üzerindeki inhibisyon etkilerinin Çizelge 4.2'de verilen  $I_{50}$  değerlerine göre büyükten küçüğe doğru sıralanması;  $Fe^{3+} > Cu^{2+} > Mg^{2+} > Mn^{2+}$  şeklindedir. Bileşikler için Çizelge 4.3'te verilen  $I_{50}$  değerlerine göre sıralama;  $\beta$ -merkaptotanol > SDS > askorbik asit > EDTA şeklindedir. Pestisitler için çizelge 4.4'te verilen  $I_{50}$  değerlerine göre sıralama: diklorvos > dimetoat > etil paratyon > fention > metil paratyon > asetamiprid > metamidofos > diazinon şeklindedir.

Fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enzimi için kullanılan metallerin enzim üzerindeki inhibisyon etkilerinin Çizelge 4.6'da verilen  $I_{50}$  değerlerine göre büyükten küçüğe doğru sıralanması;  $Zn^{2+} > Mg^{2+} > Cu^{2+} > Mn^{2+}$  şeklindedir. Bileşikler için Çizelge 4.7'de verilen  $I_{50}$  değerlerine göre sıralama;  $\beta$ -merkaptotanol > SDS > askorbik asit > EDTA şeklindedir. Pestisitler için Çizelge 4.8'de verilen  $I_{50}$  değerlerine göre ise sıralama: etil paratyon > metamidofos > asetamiprid > fention > dimetoat > diazinon > diklorvos > metil paratyon şeklindedir.

Sonuç olarak bu tez kapsamında;

**1-** Paraoksonaz enzimi kabak çekirdeğinden ve fındıktan afinite kromatografisi tekniği kullanılarak saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Çalışma sonucunda kabak çekirdeğinden paraoksonaz enzimi 158,09 kat saflaştırılabildiği görülmüştür. Aynı şekilde fındıktan paraoksonaz enzimi 209,28 kat saflaştırılabildiği görülmüştür.

**2-**Enzimin saflığını kontrol etmek amacıyla SDS poliakrilamid jel elektroforezi yapılmıştır.

**3-** Kabak çekirdeğinden saflaştırılan paraoksonaz enziminin optimum pH'nın 7 olduğu ve pH: 4-8 aralığında aktivitesini koruduğu belirlenmiştir.

**4-** Fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enziminin optimum pH'nın 5 olduğu ve pH: 4-7 aralığında aktivitesini koruduğu belirlenmiştir.

**5-** Kabak çekirdeğinden saflaştırılan paraoksonaz enziminin optimum sıcaklığının  $39^{\circ}C$  ve aktivite gösterdiği sıcaklık aralığının  $20-60^{\circ}C$  olduğu belirlenmiştir.

**6-** Fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enziminin optimum sıcaklığının  $36^{\circ}C$  ve aktivite gösterdiği sıcaklık aralığının  $20-70^{\circ}C$  olduğu belirlenmiştir.



**7-** Kabak çekirdeğinden saflaştırılan paraoksonaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlıklarının 12942 Da ( $\approx$ 13000 Da) ve 20421 Da olduğu görülmüştür.

**8-** Fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlıklarının 30892 Da olduğu görülmüştür.

**9-**Kabak çekirdeğinde yapılan çalışmada, paraokson substratı için  $V_{max}$  ve  $K_M$  değerleri sırasıyla 2,935  $\mu$ mol/L.dak ve 3,475 mM olarak, fenilasetat substratı için ise  $V_{max}$  ve  $K_M$  değerleri yine sırasıyla 2,647  $\mu$ mol/L.dak ve 3,0674 mM olarak belirlenmiştir.

**10-**Fındıkta yapılan çalışmada, paraokson substratı için  $V_{max}$  ve  $K_M$  değerleri sırasıyla 1,995  $\mu$ mol/L.dak ve 3,210 mM olarak, fenilasetat substratı için ise  $V_{max}$  ve  $K_M$  değerleri yine sırasıyla 2,413  $\mu$ mol/L.dak ve 2,732 mM olarak belirlenmiştir.

**11-** Kabak çekirdeğinde saflaştırılan paraoksonaz enzimi üzerinde katyonların etkisi ile ilgili yapılan çalışmada,  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  ve  $Fe^{2+}$ 'nin paraoksonaz enzim aktivitesini arttırdığı görülmüştür.  $Mg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  ve  $Fe^{3+}$ 'ün tüm konsantrasyonlarda enzim aktivitesini kısmen inhibe ettiği belirlenmiştir.

**12-** Fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enzimi üzerinde katyonların etkisi ile ilgili yapılan çalışmada,  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  ve  $Ca^{2+}$ 'nin paraoksonaz enzim aktivitesini arttırdığı görülmüştür.  $Mg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  ve  $Zn^{2+}$ 'nin tüm konsantrasyonlarda enzim aktivitesini kısmen inhibe ettiği belirlenmiştir.

**13-** Kabak çekirdeğinden saflaştırılan paraoksonaz enzimi üzerinde bileşiklerin etkisi ile ilgili yapılan çalışmada,  $\beta$ -Merkaptoetanol, EDTA, askorbik asit ve SDS'nin tüm konsantrasyonlarda enzimi inhibe ettiği belirlenmiştir.

**14-** Fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enzimi üzerinde bileşiklerin etkisi ile ilgili yapılan çalışmada,  $\beta$ -Merkaptoetanol, EDTA, askorbik asit ve SDS'nin tüm konsantrasyonlarda enzimi inhibe ettiği belirlenmiştir.

**15-**Tez çalışması için kullanılan organofosfatlı pestisitlerden metil paratyon, diklorvos, dimetoat, diazinon, metamidofos, etil paratyon, fention ve asetamiprid pestisitlerinin kabak çekirdeğinden ve fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enzim aktivitesini inhibe ettiği gözlenmiştir.

**16-** Kabak çekirdeğinden ve fındıktan saflaştırılan paraoksonaz enzimi üzerinde çalışılan metaller, bileşikler ve pestisitler için  $I_{50}$  değerleri hesaplanmıştır. İnhibisyon çalışmaları sonucunda çalışılan kimyasalların paraoksonaz enzimini inhibe ettiği gözlenmiştir. PON1 enziminin aktivitesinin azalması bazı durumlarda hayati tehlike doğuran sonuçlara neden olabilir. Özellikle organofosfatların çevresindeki insanlarda ve vasküler hastalık riski olan insanlarda bu enzimin aktivitesinin değişmemesi gerekmektedir. Bu nedenle bu enzimin hangi maddeler tarafından inhibe edildiğinin araştırılması önemlidir.

Son olarak bu çalışma ile literatürdeki PON çalışmaları karşılaştırılmış ve kabak çekirdeğinden ve fındıktan saflaştırılan PON enzimine ait optimum pH, optimum sıcaklık ve molekül ağırlığı gibi değerlerin insan serumundan saflaştırılan PON enzimi değerlerine benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

**KAYNAKLAR**

- Abdollahi, M., Jalali N., Jafari A.A., Nikfar S., 1995. A new approach to the efficacy of oximes in the management of acute organophosphate poisoning. *Iranian Journal of Medical Sciences*, 20, 105–109.
- Adkins S, Gan KN, Mody M, La Du BN. Molecular basis for the polymorphic forms of human serum paraoxonase/arylesterase: glutamine or arginine at position 191, for the respective A or B allozymes. *Am J Hum Genet* 1993; 52: 598-608.
- Aharoni, A., “Directed evolution of mammalian paraoxonases PON1 and PON3 for bacterial expression and catalytic specialization”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (2004) 101, 482.
- Ambrose, M. Lee: “Characterization of the insecticidal properties of acetamiprid under field and laboratory conditions”, Master Thesis, Graduate Faculty of North Carolina State University, Department of Entomology, Raleigh, 2003,9.
- Ashani, Y., Pistinner S., 2004. Estimation of the upper limit of human butyrylcholinesterase dose required for protection against organophosphates toxicity: a mathematically based toxicokinetic model. *Toxicol Sci*, 77, 358–67.
- Atamer, A., Bilici, A., Yenice, N., Selek, S., Ilhan, N., Atamer, Y., 2008. The importance of paraoxonase 1 activity, nitric oxide and lipid peroxidation in hepatosteatosis. *J Int Med Res*. 36(4):771-6.
- Aviram, M., Rosenblat, M., Bisgaier, C.L., Newton, R.S., Primo- Parmo, S.L., La Du, B.N., 1998. Paraoxonase inhibits high density lipoprotein (HDL) oxidation and preserves its functions: a possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest*. 101:1581–1590.
- Aviram, M., Rosenblat M., Billecke S., Eroglu J., Sorenson R., Bisgaier C.L., Newton R.S., La Du B.N., 1999. Human serum paraoxonase (PON1) is inactivated by oxidised low density lipoprotein and reserved by antioxidants. *Free Radic Biol Med*. 26, 892–904.
- Aydinoğlu, H., Dursun, H.Y. ve Bayraktar L., “Bitki Koruma Ürünleri”, TİSİT(Tarım ilaçları Sanayi, İhaleatçı ve Temsilciler Derneği), İstanbul, 11 (2002).
- Azarsız, E., Sönmez E.Y., 2000. Paraoksonaz ve klinik önemi. *Türk Biyokimya Dergisi*, 25, 109-119.
- Bayrak, B.B., 2008. Fındıktan (*Corylus maxima* Miller) Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenazın saflaştırılması ve Bazı Özelliklerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Bayrak, T., Bayrak, A., Demirpençe, E., Kılınç, K., 2010. Purification and kinetic properties of rabbit liver paraoxonase. *Journal of chromatography B*, 878 (2010) 1791-1795.
- Baysal A, Keçecioğlu S, Arslan P, Yücecian S ve ark. Besinlerin Bileşimleri, Türkiye Diyetisyenler Derneği Yayını, 3.Baskı, Ankara,1991.
- Başkol G., Köse K. (2004). Paraoksonaz: Biyokimyasal özellikleri, fonksiyonları ve klinik önemi. *Erciyes Tıp Dergisi (Erciyes Medical Journal)*, 26 (2): 75-80.
- Bebis (Beslenme Bilgi Sistemi) Nutrition Data Base Software İstanbul, 2004. Data Base: The German Food Code and Nutrient Data Base (BLS II.3, 1999) with additions from USDA-sr and other sources.

- Billecke S, Dragonov D, Counsell R, Stetson P, Watson C, Hsu C, La Du BN. Human serum paraoxonases isozymes Q and R hydrolyze lactones and cyclic carbonate esters. *Drug Met Dispos* 2000; 28:1335-1342.
- Bingöl, G., 1983, *Biyokimya. Güven matbaası, Ankara*,s. 169-174.
- Blagburn, B. L., Lindsay, D. S. (1995). Ectoparasiticides. In: *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, Ed.: H. R. Adams, 7 th Ed., Iowa State University Press, Iowa, Section 11, Chapter 48, p.: 993-996.
- Blatter, M.C., James, R.W., Messmer, S., et al. 1993. Identification of a distinct human high-density lipoprotein subspecies defined by a lipoprotein associated protein, K-45. Identity of K-45 with paraoxonase. *European Journal of Biochemistry*, 211, 871-9.
- Blatter Garin, M.-C., Abbot, C., Messmer, S., Mackness, M. I., Durrington, P., Pometta, D., James, R. W., 1994. Quantification of Human Serum Paraoxonase by Enzyme Linked İmunoassay: Population Differences in Protein Concentrations. *Biochem. J.*, 304, 549-554.
- Borhani, D.W., Rogers, 1997. Crystal Structure Oftruncated Human Apolipoprotein A-I Suggests A Lipid Bound Conformation". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 12291-96.
- Bradford, H. P., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation. of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, 72, 248-54.
- Campo, S., Sardo, A. M., Campo, G. M., Avenoso, A., Castaldo, M., D. Ascola, A., Giunta, E., Calatroni, A., Saitta, A., 2004. Identification of Paraoxonase 3 Gene (PON3) Missense Mutations in A Population of Southern Italy. *Mutat. Res.*, 546,75-80.
- Carey J. Ng, D.M.S., Susan Y. Hama, Natividad Villa, Mohamad Navab, Srinivasa T. Reddy, 2005. The Paraoxonase Gene Family and Atherosclerosis. *Free Radical Biology & Medicine*, 38, 153- 163.
- Cherry N, Mackness M, Durrington P, Povey A, Dippnall M, Smith T, Mackness B. (2002). Paraoxonase (PON1) polymorphisms in farmers attributing ill health to sheep dip. *Lancet*. 359(9308):763-764.
- Choi, S.S., and Forster, T.L., 1967, Triton X-155 as a stabilizer of bovine plasma arylesterase activity. *J. Dairy Sci.*, 50, 1088-1091.
- Cornish-Bowden, A., 2004. *Fundamentals of Enzyme Kinetics*, Portland Press, London.
- Costa TG, Cole LG, Furlong CE, Polymorphisms of paraoxonase (PON1) and their significance in clinical toxicology of organophosphates. *J Toxicol Clin Toxicol*. 2003;41(1):37-45. Review.
- Çelik, M., Gülcü F., Ozan G., Gürsu M.F., 2005. Organik Solventler ile Çalışan İşçilerde Paraoksonaz 1 ve Arilesteraz Aktivite Düzeyleri. *Türk Biyokimya Dergisi [Turkish Journal of Biochemistry - Turk J Biochem*, 30 (2), 194-199.
- Çöteli Aslan, B., 2007. Fındık Kabuklarından Tek Kademeli Özütleme Sistemde Furfural Üretimi için Uygun Koşulların Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Deakin, SP. and James, RW. (2004). Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase-1. *Clin Sci*. 107, 435-47.

- Delen N., N.Tosun, S.Toros., S.Öztürk., A.Yücel., S.Çalı.,1995. Tarım İlaçları Kullanımı ve Üretimi.Türkiye Ziraat Mühendisliği IV. Teknik Kongresi.T.C.Ziraat Bankası Kültür Yayınları No:26,1015-1028.
- Delen, N., E. Durmuşoğlu, A. Güncan, N. Güngör, C. Turgut ve A. Burçak, 2005. Türkiye’de pestisit kullanımı, kalıntı ve organizmalarda duyarlılık azalışı sorunları. 6. Türkiye Ziraat Mühendisliği Teknik Kongresi, 3-7 Ocak 2005, Ankara, Cilt II, 629-648.
- Demir,Y., Nadaroğlu, H., Demir, N., “Effect of Glimepride on Human Serum Paraoxonase Activity in Vitro and Rat Serum, Liver and Heart In Vivo,” Pharm. Biol.,44(5),396-399,(2006).
- Demir, N., Nadaroğlu, H., Demir, Y., “Purification of Paraoxonase Human Serum and Effect of Acetylsalicylic Acid on Paraoxonase Activity In Vitro and Rat Serum Liver, and Heart In Vivo,” Pharm Biol., 46 (6) 393-399, (2008).
- Demir, N., Nadaroglu, H., Demir, Y., Purification of Paraoxonase (PON1) from Olive (*Olea europaea* L.) and Effect of Some Chemicals on Paraoxonase Activity in Vitro. *Asian J. Chem.*, 23 (6), 2584-2588 (2011).
- Don, M.M., Masters, C.J., Winzor, D.J., 1975, Further evidence for the concept of bovine plasma arylesterase as a lipoprotein. *Biochem. J.*, 151, 625–630.
- Dragonov, DI. ve La Du, NB. (2004) Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Naunyn-Schmiedeberg’ s Arch Pharmacol.* 369, 78-88.
- Du, B.N., 1992. Human serum paraoxonase/arylesterase, In *Pharmacogenetics of Drug Metabolism*, ed. Kalow, W., Pergamon Pres, New York, p.51.
- Durrington, P.N., Mackness, B., Mackness, M.J., 2001. Paraoxonase and atherosclerosis, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21, 473–480.
- Düzeltir, B., Yanmaz, R., 2004. Kabak Çekirdeğinin (*Cucurbita Pepo* L.) Besin Değeri ve Sanayide Kullanım Olanakları. *Popüler Bilim Dergisi* 11(125), 19- 24.
- Eckerson, H.W., Wyte, C.M. and La Du, B.N., 1983. The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism, *Am. J. Hum. Genet.*, 35, 1126.
- Elkıran E.T., Mar N., Aygen B., Gürsu F., Karaoğlu A., Koca S. (2007). Serum paraoxonase and arylesterase activities in patients with lung cancer in a Turkish population. *BMC Cancer.*,15;7: 48.
- Erdem, M.S.T.i. "ST Elevasyonlu Miyokard İnfarktüsü (Stemi) Hastalarda İnsan 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., Grunfeld, C., 1998. Paraoxonase Activity in The Serum and Hepatic mRNA Levels Decrease During The Acute Phase Response. *Atherosclerosis*, 139, 307-315.
- Ferretti, G., Bacchetti, T., Busni, D., Rabini, R.A., Curatola, G., 2004. Protective effect of paraoxonase activity in high-density lipoproteins against erythrocyte membranes peroxidation: a comparison between healthy subjects and type 1 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 89:2957–2962.
- Gan, K.N., Smolen, A., Eckerson, H.W., La Du, B.N., “Purification of human serum paraoxonase / arylesterase. Evidence for one esterase catalyzing both activities”, *Drug Metab. Dispos.* (1991) 19: 100-106.
- Garrett R.H., Grisham C.M., 1999. *Biochemistry*, Second Edition Saunders College Publishing. 426-427. ISBN 0-03-022318-0.
- Gözükara, E., 1989. *Enzimler. Biyokimya. Ofset Repromat Ltd.Şti*, 572-576 s, Ankara.

- Gözükara, M.E., 1997. Enzimler, 13. Biyokimya Z 3. Nobel tıp Kitabevleri, İstanbul. 1225s.
- Gürdöl, F., Ademoğlu, E., 2010. Biyokimya. Nobel Tıp Kitabevleri 2.Baskı, İstanbul.
- Gürsu M.F., Özdin M. (2002). Sigara içenlerde serum paraoksonaz (PON1) aktiviteleri ile malondialdehit düzeylerinin araştırılması. *Fırat Tıp Dergisi*, 7(2): 732-37.
- Harel, M., Aharoni A., Gaidukov L., Brumshtein B., Khersonsky O., Meged R., Dvir H., Ravelli R.B., McCarthy A., Toker L., Silman I., Susman J.L., Tawfik D.S., 2004. Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and antiatherosclerotic enzymes. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 11, 412-419.
- Hashemi, M., Moazeni Roodi, A.K., Fazaeli, A., Sandoughi, M., Bardestani, G.R., Kordi-Tamandani, D.M. and S. Ghavami., 2010. Lack of association between paraoxonase-1 Q192R polymorphism and rheumatoid arthritis in southeast Iran. *Genetics and Molecular Research* 9 (1): 333-339 (2010).
- He XM, Zhang ZX, Zhang JW, Zhou YT, Tang MN, Wu CB, Hong Z. (2006). Gln192Arg polymorphism in paraoxonase 1 gene is associated with Alzheimer disease in a Chinese Han ethnic population. *Chin Med J (Engl)*. 119(14):1204-1209.
- Holuot, P., Perez, G., Zhao, Z., Brouwers, E., Bernar, H., Collen, D., "Malondialdehyde modified low density lipoproteins in patients with atherosclerotic disease", *J. Clin. Invest.* (1995) 95,2611.
- Jakubowski H. Calcium-dependent Human Serum Homocysteine Thiolactone Hydrolase. *J Biol Chem* 2000;275:3957-3962.
- James, R.W., Deakin S.P., 2004. The importance of high-density lipoproteins for paraoxonase-1 secretion, stability, and activity. *Free Radic. Biol. Med.*, 37, 1986– 1994.
- Jarvik, G.P., Rozek, L.S., Brophy, V.H., Hatsukami, T.S., Richter, R.J., Schellenberg, G.D. Furlong, C.E., 2000. Paraoxonase (PON1) phenotype is a better predictor of vascular disease than is PON1192 or PON155 genotype. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* 20: 2441–2447.
- Jawad, Z., Paoli, M., 2002. Noval Sequences Propel Familiar Folds. *Structure*, 10, 447-454.
- Jonas, A., "Lecithin cholesterol acyltransferase", *Biochim. Biophys. Acta*, (2000) 152-153.
- Jakubowski, H., "Calcium-dependent human serum homocysteine thiolactone hydrolase. A protective mechanism against protein N-homocysteinylation" *J. Biol. Chem.* (2000) 275,3957. 9, 245.
- Josse, D, Xie W, Renault, F., Rochu, D., Schopfer LM, Masson P, Lockridge O. Identification of residues essential for human paraoxonase (PON1) arylesterase/organophosphatase activities. *Biochemistry*. 1999; 38(9):2816-2825.
- Karakaya, M. ve Boyraz, N., 1992, Gıda Kirlenmesinde Pestisitler ve Korunma Yolları, *Ekoloji Çevre Dergisi*, Sayı 4, 11-15.
- Kaya, S. (2002). Pestisidler, Gıda kirliliği, Kimyasal ve biyolojik silahlar. *Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji*; Baskı 2, Medisan Yayınevi, Ankara. Ed.: S. Kaya, Pirinççi, A. Bilgili, s.: 385-536, 777-842, 869-902.
- Kelso, G.J., Stuart W.D., Richter R.J., Furlong C.E., Jordan-Starck T.C., and Harmony J. A.K., 1994. Apolipoprotein J is associated with paraoxonase in human plasma. *Biochemistry*, 33, 832–839.

- Kitamura, S., Katoda, T., Yoshida, M., Jinno, N., Ohta, S., 2000. Whole-body metabolism of the organophosphorus pesticide, fenthion, in goldfish, *Carassius auratus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 126: 259-266.
- Kitamura, S., Suzuki, T., Katoda, T., Yoshida, M., Ohashi, K., Ohta, S., 2003. In vitro metabolism of fenthion and fenthion sulfoxide by liver preparations of sea bream, goldfish, and rats. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 31: 179-186.
- Kitchen, B.J., Masters C.J., and Winzor D.J., 1973. Effects of lipid removal on the molecular size and kinetic properties of bovine plasma arylesterase. *Biochem. J.*, 135, 93–99.
- Koolman, Jan., Röhm Klaus-Heinrich., 2003, *Renkli Biyokimya Atlası. Tavashlı matbacılık savaş ciltevi. İstanbul.*
- Kuo C.L. & La Du, B.N., 1998. Calcium binding by human and rabbit serum paraoxonases. Structural stability and enzymatic activity. *Drug Metab. Dispos.*, 26, 653-60.
- La Du, B.N., and Novais J., 1989. Human serum organophosphatase: biochemical characteristics and polymorphic inheritance in *Enzymes hydrolysing organophosphorus compounds* (Edited by Reiner E., Aldrige W. N. and Hoskin F. C. G.), 41–52 p, Ellis Horwood, Chichester.
- La Du, B., Aviram, N., Billecke, S., Navab, M., Primo-Parmo, S., Sorenson, R.C., Standiford, T.J., 1999. On the physiological role(s) of the paraoxonases. *Chem. Biol. Interact*, 119–120, 379–388.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–85.
- Lehninger, A.L., 1982. *Principle of Biochem.* Worth Publishers Inc., New York, 207-244.
- Lehninger, *Principles of Biochemistry*, 2005. Worth Publishers Inc., New York, 1152 p.
- Levieu, I., James, R. W., 2000. Promoter Polymorphisms of the Human Paraoxonase PON1 Gene and Serum Paraoxonase Activities and Concentrations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 20, 516-521.
- Li, W.-F., Costa, L.G., and Furlong, C.E., 1993. Serum paraoxonase status: a major factor in determining resistance to organophosphates. *J. Toxicol. Environ. Health*, 40, 337–346.
- Li, W.F., Furlong C.E., Costa L.G., 1995. Paraoxonase protects against chlorpyrifos toxicity in mice. *Toxicol Lett.*, 76, 219-226.
- Ma, T., Kramer, R.E., Baker, R.C., Fan, L.W. And Ho, I.K., “Effects of chronic dermal exposure to nonlethal doses of methyl parathion on brain regional acetylcholinesterase and muscarinic cholinergic receptors in female rats”, *J. Neurosci. Res.*, 71: 138-145 (2003).
- Mackness, M.I., and Walker C.H., 1988. Multiple forms of sheep serum A-esterase activity associated with the high-density lipoprotein. *Biochem. J.*, 250, 539–545.
- Mackness, M.I. Commentary. ‘A-esterase, Enzymes looking for a role?’. *Biochem. Pharmacol*, 1989a :38; 385-390.
- Mackness M.I. Possible medical significance of human serum ‘A-’esterase. In: Rainer E, Aldridge WN, Hoskin FCG (eds) *Enzymes hydrolysing organophosphorus compounds*. Ellis Horwood, Chichester, 1989b :pp 202-213.

- Mackness, M.I., Arrol, S., Durrington, P.N., 1991, Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low density lipoprotein, *FEBS Lett* , 286, 152-154.
- Mackness, M.I., Mackness B., Durrington P.N., Connely P.W., Hegele R.A., 1996. Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Cur Opin Lipit.*, 7, 69-76.
- Mackness, M.I., Arrol S.I., Mackness B., Durrington P.N., 1997. Alloenzymes of paraoxonase and effectiveness of high density lipoproteins in protecting low density lipoprotein against lipid peroxidation. *The Lancet.*, 349, 22.
- Mackness, B., Mackness M.I., Arrol S., Turkie W., Durrington P.N., 1998a. Effect of the human serum paraoxonase 55 and 192 genetic polymorphisms on the protection by high density lipoprotein against low density lipoprotein oxidative modification. *FEBS Lett.*, 423, 57-60.
- Mackness B., D.P.N., Mackness M.I, "Human Serum Paraoxonase". *Gene Pharmacy*, 31(3) ,(1998b), 329-36.
- Mackness, B., Durrington, P.N. ve Mackness, M.I. (2000). Low Paraoxonase in Persian Gulf War Veterans Self-Reporting Gulf War Syndrome. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 276, 729-733.
- Mackness, B., Davies, G.K., Turkie, W., Lee, E., Roberts, D.H., Hill, E., Roberts, C., Durrington, P.N., Mackness, M.I., 2001. Paraoxonase status in coronary heart disease. Are activity and concentration more important than genotype? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21: 1451-1457.
- Mackness, M., Mackness B., 2004. Paraoxonase 1 and atherosclerosis: is the gene or the protein more important? *Free Radic Biol Med.*, 37, 1317-1323.
- Main, A.R., 1956. The role of A-esterase in the acute toxicity of paraoxon, TEEP and parathion. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 34, 197-216.
- Main, A.R., 1960. The purification of the enzyme hydrolysing diethyl-p-nitrophenyl phosphate (paraoxon) in sheep serum. *Biochem. J.*, 74,10-20.
- Marrs T.C., Balantyne B., (2002). *Pesticide toxicology*, New York: Wiley.
- Mc Intosh, J.E.A., 1969. Carbonic anhydrase isoenzymes in the erythrocytes and Dorsdaratal prostate of rat. *Biochem. J.*, 114, 463.
- Milochevitch, C., Khalil, A. (2001) Study of the paraoxonase and plateletactivating factor acetylhydrolase activities with aging. *Prostagl Leukot Essent Fatty Acids.*, 65:241-6.
- Moffat, A. C., Osselton, M. D., Widdop, B. (2004). Monographs. In: *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in Pharmaceuticals, Body Fluids and Postmortem Material*, Ed.: A. C. Moffat, M. D. Osselton, B. Widdop, L. Y. Galichet, Volume 2, 3rd Ed., London, Part 2, p.: 904-1196.
- Mohammed Ali, Chia S.E. (2008). Interethnic variability of plasma paraoxonase (PON1) activity towards organophosphates and PON1 polymorphisms among Asian populations. *Ind. Health*, 46(4): 309-17.
- Ng, C.J., Wadleigh, D.J., Gangopadhyay, A., et al. 2001. PON2 is ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *J Biol. Chem*, 276, 44444-44449.
- Oda, M.N., Bielicki, J.K., Berger, T., et al. 2001. Cystein substitutions in apolipoprotein A-I primary structure modulate paraoxonase activity. *Biochemistry*, 40, 1710-8.



- Pla A, Rodrigo L, Hernandez AF, et al. Effect of metal ions and calcium on purified PON1 and PON3 from rat liver. *Chem-Biol Interact* 2007;167:63–70.
- Primo-Parmo, S.L., Sorenson, R.C., Teiber, J., et al. 1996. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics*, 33, 498-507.
- Proctor S.P., Heaton K.J., Heeren T., White R.F. (2006). Effects of sarin and cyclosarin exposure during the 1991 Gulf War on neurobehavioral functioning in US army veterans. *Neurotoxicol.*, 27(6): 931–39.
- Rao, M. N., Marmillot, P., Gong, M., Palmer, D. A., Seeff, L. B., Strader, D. B. (2003). Light, but not heavy alcohol drinking, stimulates paraoxonase by upregulating liver mRNA in rats and humans. *Metabolism.*, 52:1287–94.
- Renault, F., Chabriere, E., Andrieu, J.P., Dublet, B., Masson, P., Rochu, D. 2006. Tandem purification of two HDL-associated partner proteins in human plasma, paraoxonase (PON1) and phosphate binding protein (HPBP) using hydroxyapatite chromatography. *Journal of Chromatography B*, 836, 15–21.
- Roberts, T.R., Hutson, D.H., 1999. *Metabolic Pathways of Agrochemicals: Part 2: Insecticides and Fungicides*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 326-331.
- Rousselot, D.B., Therond, P., Beaudoux, J.L., Peynet, J., Legrand, A., Delatre, J., 1999. High density lipoproteins and the oxidative hypothesis of atherosclerosis, *Clin. Chem. Lab. Med.*, 37, 939-949.
- Rozenberg, O., Shih, S.D., Aviram, M., 2005. Paraoxonase 1 (PON1) attenuates macrophage oxidative status: studies in PON1 transfected cells and in PON1 transgenic mice. *Atherosclerosis*. 181:9–1818.
- Ruckart, P.Z., Kakolewski, K., Bove, F.J. And Kaye, W.E., “Long-term neurobehavioral health effects of methyl parathion exposure in children in Mississippi and Ohio”, *Environmental Health Perspectives*, 112(1): 46-51 (2004).
- Sarkar, P.D., Shivaprakash T.M., Madhusudhan B., 2006. Association between paraoxonase activity and lipid levels in patients with premature coronary artery disease. *Clinica Chimica Acta*, 373, 77–81.
- Shidfar, F., Eshramphosh, E., Heydari, I., Haghghi, L., Hosseini, S., Shidfar, S., 2008. Effects of soy bean on serum paraoxonase 1 activity and lipoproteins in hyperlipidemic postmenopausal women. *Int J Food Sci Nutr*. (In press).
- Sinan, M.S.T.S., 2005. İnsan Serum Paraoksonaz Enziminin (PON1) Expressiyonu, Saflaştırılması ve Bazı İlaçların Enzim Üzerine Etkilerinin Araştırılması. Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı.
- Smith A.D ((Ed) et al. (1997)) *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology* Oxford University Press. ISBN 0-19-854768-4.
- Smolen A, Eckerson HW, Gan KN, Hailat N, La Du BN. Characteristics of the genetically determined allozymic forms of human serum paraoxonase/arylesterase. *Drug Metab Dispos* 1991; 19: 107-112.
- Sorenson, R.C., Primo-Parmo S.L., Kuo C.L., 1995. Reconsideration of the catalytic center and mechanism of mammalian paraoxonase/arylesterase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92, 7187–191.
- Sorenson, R.C., Bisgaier, C.L., Aviram, M., et al. 1999. Human serum paraoxonase/arylesterase's retained hydrophobic N-terminal leader sequence

- associates with HDLs by binding phospholipids: apolipoprotein A-I stabilizes activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19, 2214-25.
- Sözmen EY, Mackness B, Sözmen B, et al. Effect of organophosphate intoxication on human serum paraoxonase. *Hum Exp Toxicol*, 2002; 21: 247-52.
- Srinivasa T. Reddy, D.J.W., Victor Grijalva, Carey Ng, Susan Hama, Aditya Gangopadhyay, Diana M. Shih, Aldons J. Lulis, Mohamad Navab, Alan M. Fogelman, 2001. Human Paraoxonase-3 Is an HDL-Associated Enzyme With Biological Activity Similar to Paraoxonase-1 Protein but Is Not Regulated by Oxidized Lipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 21, 542-547.
- Tanimoto, N., Kumon, Y., Suehiro, T., Ohkubo, S., Ikeda, Y., Nishiya, K. And Hashimoto, K., "Serum paraoxonase activity decreases in rheumatoid arthritis", *Life Sciences*, (2003) 72, 2877.
- Taşkıran P., Çam S.F., Şekuri C., Tüzün N., Alioğlu E., Altıntaş N., Berdeli A. (2009). Paraoksonaz geninde Leu-Met (55) ve Gln-Arg (192) polimorfizmleri ile koroner arter hastalığı arasındaki ilişki. *Türk Kardiyol Dern. Arş. – Arch. Turk Soc. Cardiol.*, 37(7): 473-78.
- Uriel, J., 1961, Characterization of cholinesterase and other carboxylic esterases after electrophoresis and immunoelectrophoresis on agar. I. Application to the study of esterases of normal human serum. *Ann Inst Pasteur (Paris)*, 101, 104–119.
- Van Lenten, B.J., Wagner, A. C., Nayak, D. P., Hama, S, Navab, M., Fogelman, A. M., 2001. High-density lipoprotein loses its anti-inflammatory properties during acute influenza A infection. *Circulation*, 103, 2283-88.
- Voet, D., Voet, J.G., 1995, *Biochemistry*, (second edition), New York, p. 346-350.
- Wagner, K.-H., R. Tomasch and I. Elmadfa. 2001. Impact of diets containing corn oil or olive /sunflower oil mixture on the human plasma and lipoprotein lipid metabolism. *Eur J Nutr*, 40 : 161–167.
- Whitaker, J. R., 1963. Determination of molecular weights of proteins by gel filtration on Sephadex. *Anal. Chem.*, 35, 1950-3.
- Wilde, C.E., and Kekwick, R.G.O. 1964. The arylesterases of human serum. *Biochem. J.*, 91, 297–307.
- WHO, 1976. World Health Organization, Food and Agriculture Organization, VBC/DS/77.23, Fenthion, Data Sheets on Pesticides, No: 23.
- WHO, "Environmental Health Criteria: Methyl parathion", *IPCS*, Geneva, 244 (1993).
- Yamamoto, I; Casida J.E. "Nicotinoid Insecticides and the Nicotinic Acetylcholine Receptor", Springer Verlag, Tokyo, Japonya,(1999),(149-176).
- Yavuz, D., Y.i.A., Yüksel, M., Aydın, H., Deyneli, O., Akalın, S., 2003. S002-Hipertiroidide Serum Paraoksonaz Aktivitesi Azalmaktadır. *Turkish Journal of Endocrinology and Metabolism.*, 7(1).
- Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M., Tanyolaç, B.,2010. Moleküler Biyoloji.Nobel Bilim ve Araştırma Merkezi Yayın No:2.
- Yüceer, M.M., 2003. *Tarım İlaçları*. Hasad Yayıncılık Limitet Şirketi, İstanbul, 280 s.
- Zimmerman, J.K., Grothusen, J.R., Bryson, P.K., and Brown, T.M. 1989. Partial purification and characterization of paraoxonase from rabbit serum, In: *Enzymes Hydrolysing Organophosphorus Compounds*. E.Reiner, W.N.Aldridge, F.C.G. Haskin, eds., Ellis Horwood Ltd., Chichester: pp. 128–142.

## ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Kahramanmaraş'ta doğdu. İlköğretimini, Ortaöğretimini, Liseyi Kahramanmaraş'ta tamamladı. 2000 yılında kazandığı Atatürk Üniversitesi Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi Kimya Öğretmenliği Bölümünden 2005 yılında mezun oldu. 2006 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Bilim Dalı'nda başladığı doktora eğitimini 2011 yılında tamamladı. Evli ve bir çocuk annesidir.