

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

***Scyliorhinus canicula*( LINNAEUS, 1758) PARAOKSONAZ  
ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, KİNETİK VE  
ELEKTROFORETİK ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DEMET SAYIN**

**Balıkesir, Ağustos-2010**

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

*Scylliorhinus canicula* ( LİNNAEUS, 1758) PARAOKSONAZ  
ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, KİNETİK VE  
ELEKTROFORETİK ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DEMET SAYIN

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Oktay ARSLAN  
Yrd. Doç. Dr. Dilek TÜRKER ÇAKIR (İkinci danışman)

Sınav Tarihi: 10/08/2010

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

Doç. Dr. Serap DOĞAN (BAÜ)

Yrd. Doç. Dr. Dilek TÜRKER ÇAKIR (BAÜ)

Yrd. Doç. Dr. Semra IŞIK (BAÜ)

Yrd. Doç. Dr. Nahit GENÇER (BAÜ)

Balıkesir, Ağustos-2010

“Bu alışma Balıkesir Üniversitesi Rektrlğ Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından BAP 2009/4 Kodlu Proje İle desteklenmiştir. Teşekkür ederiz.”

## ÖZET

# *Scyliorhinus canicula*( LİNNAEUS, 1758) PARAOKSONAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, KİNETİK VE ELEKTROFORETİK ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

**Demet SAYIN**

**Bahkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı**

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

**(Yardımcı Danışman: Yrd. Doç. Dr. Dilek TÜKER ÇAKIR)**

**Bahkesir, 2010**

Bu çalışmada, detoksifikasyon ve antioksidan aktivitesi ile metabolizmada önemli fizyolojik fonksiyona sahip paraoksonaz (PON) enzimi *Scyliorhinus canicula* (LİNNAEUS, 1758) serumundan saflaştırılıp, kinetik ve elektroforetik özellikleri araştırılmıştır.

Bu amaçla Sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin kimyasal yapısına sahip jel kullanılmıştır. Amonyum sülfat çöktürmesi ve hidrofobik etkileşim kromatografisi yöntemleri kullanılarak *S. canicula* serumundan PON enzimi saflaştırılmıştır. Saflaştırılan PON enzimi SDS poliakrilamid jel elektroforezine uygulanarak yaklaşık 66 kDa molekül ağırlığına sahip tek bant elde edilmiştir.

*S. canicula* serum PON enziminin paraokson substratına karşı  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri Lineweaver-Burk yöntemi ile sırasıyla 0.227 mM ve 454.545 U/mL'dak olarak bulunmuştur.

Saflaştırılan PON enzimi üzerine *in vitro* inhibisyon etkisi gösteren Ni<sup>+2</sup>, Cd<sup>+2</sup>, Cu<sup>+2</sup> ve Hg<sup>+2</sup> metal iyonları için IC<sub>50</sub> değerleri belirlenmiştir.

**ANAHTAR SÖZCÜKLER:** Paraoksonaz (PON), Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi, İnhibisyon, Metal İyonu.

## ABSTRACT

### THE INVESTIGATION OF KINETIC AND ELECTROPHORETIC PROPERTIES OF PURIFIED SERUM PARAOXONASE FROM *Scyliorhinus canicula*( LINNAEUS, 1758)

DEMET SAYIN

Balıkesir University , Institute of Science, Department of Chemistry

(PhD. Thesis / Supervisor: Prof. Dr. Oktay ARSLAN)

(Cosupervisor:Yrd. Doç. Dr. Dilek TÜRKER ÇAKIR)

Balıkesir, Turkey, 2010

In this study, paraoxonase (PON), which has an important physiological function in metabolism with detoxification and antioxidant activity was purified from *Scyliorhinus canicula*( LINNAEUS, 1758) and investigated its kinetic and electrophoretic properties.

For this aim the gel which has Sepharose-4B-L-tyrosine-1-naphthylamine in chemical structure, is used. *S. canicula* blood serum paraoxonase was purified with ammonium sulfate precipitation and hydrophobic interaction chromatography. On SDS-polyacrilamide gel electrophoresis, purified *S. canicula* blood serum paraoxonase to give a single band on SDS-PAGE with about weight of 66 kDa.

The  $K_M$  and  $V_{max}$  values were determined by the method of Lineweaver-Burk plots, using paraoxon as a substrate. The  $K_M$  and  $V_{max}$  is 0.227 mM and 454.545 U/mL respectively.

In vitro inhibitory effects of some metal ions, incorporating  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Cd}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$  and  $\text{Hg}^{+2}$  were evaluated.  $\text{IC}_{50}$  values of metal ions were calculated.

**KEY WORDS:** Paraoxonase (PON), Hydrophobic Interaction Chromatography, Inhibition, Metal Ion

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖZET, ANAHTAR SÖZCÜKLER</b>	ii
<b>ABSTRACT, KEY WORDS</b>	iv
<b>İÇİNDEKİLER</b>	vi
<b>SEMBOL LİSTESİ</b>	ix
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b>	x
<b>ÇİZELGE LİSTESİ</b>	xii
<b>ÖNSÖZ</b>	xiii
<b>1. GİRİŞ</b>	1
1.1. Paraoksonaz Enziminin Biyokimyası	2
1.1.1. Adlandırılması	2
1.1.2. Paraoksonaz Enziminin Yapısı	2
1.1.3. Paraoksonaz Enziminin Fonksiyonları	5
1.1.4 Enzimin Katalitik Mekanizması	6
1.1.5 Katalizlediği Reaksiyonlar ve Substratları	7
1.1.6 Paraoksonaz Enziminin Hastalıklar ile İlişkisi	10
1.2 <i>Scyliorhinus canicula</i> , (Linnaeus, 1758) (Kedi Balığı)	10
1.2.1 Araştırma Bölgesi ve Örnekleme Bilgileri	10
1.2.2 Genel Özellikler	12
1.2.2.1 Morfoloji	12
1.2.2.2 Biyoloji	13



1.3 Ağır Metaller ve Çevre Üzerine Etkileri	13
1.3.1 Nikel	15
1.3.2 Kadmiyum	15
1.3.3 Bakır	15
1.3.4 Civa	16
<b>2. MATERYAL VE YÖNTEMLER</b>	<b>17</b>
<b>2.1. Materyaller</b>	<b>17</b>
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	17
2.1.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar	17
2.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması	18
<b>2.2. Yöntemler</b>	<b>22</b>
2.2.1. Kan serumunun ayrılması	22
2.2.2. Enzim Aktivite Tayini	22
2.2.3. Bradford Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini	22
2.2.4. Enzimin Saflaştırılması	23
2.2.4.1. Amonyum Sülfat Çöktürme Aralığının Belirlenmesi	23
2.2.4.2. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Enzimin Saflaştırılması	24
2.2.4.2.1. Sepharose 4B' nin Aktifleştirilmesi	24
2.2.4.2.2 L-tirozinin Bağlanması	25
2.2.4.2.3 1-Naftilamin Bileşiğinin Bağlanması	25
2.2.4.3. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) ile Enzim Saflığının Kontrolü	26
2.2.5. Optimum Şartlarda $K_M$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Bulunması	28
2.2.6. Bazı Ağır Metallerin $IC_{50}$ Değerlerinin Bulunması	28
<b>3. BULGULAR</b>	<b>29</b>
3.1. Enzimin Saflaştırılması	29
3.1.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi	29

3.1.2. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile PON Enziminin Saflaştırılması	29
3.1.3. Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri	32
3.2. Serum Paraoksonaz Enziminin SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi	32
3.3. Optimum Şartlarda $K_M$ ve $V_{max}$ Değerlerinin Bulunması	33
3.4. İnhibisyona Sebep Olan Ağır Metallerin $IC_{50}$ Değerlerinin Bulunması	36
<b>4. TARTIŞMA VE SONUÇ</b>	<b>42</b>
<b>5. KAYNAKLAR</b>	<b>49</b>

## SEMBOL LİSTESİ

<b>Simge</b>	<b>Adı</b>
PON	Paraoksonaz enzimi
SDS	Sodyum dodesil sülfat
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
TEMED	N,N,N', N', -tetrametiletildiamin
U	Enzim ünitesi
EC	Enzim kodu
I	İnhibitör
IC <sub>50</sub>	Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
K <sub>I</sub>	Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil Numarası	Adı	Sayfa
Şekil 1.1	Paraoksonaz enziminin üç boyutlu görünümü.	4
Şekil 1.2	PON' un HDL' ye bağlanması	5
Şekil 1.3	Paraoksonazın katalitik mekanizması	6
Şekil 1.4	Lakton hidrolizi	7
Şekil 1.5	İnsektisitlerde yaygın olarak kullanılan okson metabolitlerinin hidrolizi	8
Şekil 1.6	Sinir gazlarının hidrolizi	8
Şekil 1.7	Aromatik esterlerin hidrolizi	9
Şekil 1.8	Paraoksonaz enzim mekanizması	9
Şekil 1.9	Araştırma bölgesi	11
Şekil 1.10	<i>S. canicula</i> türünün ağız ve burun yapısı	12
Şekil 1.11	<i>S. canicula</i> türünün genel görünüşü	12
Şekil 2.1	Sepharose 4B' nin aktifleştirilmesi	24
Şekil 2.2	L-tirozinin bağlanması	25
Şekil 2.3	1-Naftilamin bileşiğinin bağlanması	26
Şekil 3.1	Hidrofobik etkileşim kromatografisi kolonundan PON enziminin elüsyonu	30
Şekil 3.2	Bradford yöntemi ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan standart grafik	32
Şekil 3.3	Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılan paraoksonaz enziminin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi	33

Şekil 3.4	Saflaştırılmış <i>S. canicula</i> serum paraoksonaz enziminin paraoksan substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği	34
Şekil 3.5	Saflaştırılmış <i>S. canicula</i> serum paraoksonaz enzimi üzerine 2mM paraoksan substratı konsantrasyonunda $Ni^{+2}$ için % aktivite-[I] grafiği	38
Şekil 3.6	Saflaştırılmış <i>S. canicula</i> serum paraoksonaz enzimi üzerine 2mM paraoksan substratı konsantrasyonunda $Cd^{+2}$ için % aktivite-[I] grafiği	38
Şekil 3.7	Saflaştırılmış <i>S. canicula</i> serum paraoksonaz enzimi üzerine 2mM paraoksan substratı konsantrasyonunda $Cu^{+2}$ için % aktivite-[I] grafiği	40
Şekil 3.8	Saflaştırılmış <i>S. canicula</i> serum paraoksonaz enzimi üzerine 2mM paraoksan substratı konsantrasyonunda $Hg^{+2}$ için % aktivite-[I] grafiği	40
Şekil 4.1	PON enziminin HDL yüzeyine bağlanma modeli	44

## ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge Numarası	Adı	Sayfa
Çizelge 2.1	SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının miktarları	21
Çizelge 3.1	Saflaştırma tablosu	31
Çizelge 3.2	<i>S. canicula</i> serum paraoksonaz enziminin paraoksan substratı kullanılarak, $K_M$ ve $V_{max}$ değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$	35
Çizelge 3.3	Serum PON enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren $Ni^{+2}$ ve $Cd^{+2}$ , un $IC_{50}$ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, metal konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	37
Çizelge 3.4	Serum PON enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren $Cu^{+2}$ ve $Hg^{+2}$ , nın $IC_{50}$ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, metal konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	39
Çizelge 3.5	Ağır metallerin PON enzimi üzerindeki $IC_{50}$ değerleri	41

## ÖNSÖZ

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

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

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

Her türlü bilgi ve deneyimleri ile yanımda olan Arş. Gör. Dr. Serap BEYAZTAŞ'a teşekkür gönül borcumdur.

Çalışmalarımın örnekleme kısımlarında bana yardımcı olan, her zaman nazik ve güleryüzlü davranan Aylin YARMAZ'a ve Cansu BALABAN'a, deneylerim sırasında ve tezimin yazım aşamasında bana destek olan ve her zaman yardımına koşan çok sevgili arkadaşlarım Beste ŞİPAL'e ve Nurcan DEDEOĞLU'na çok teşekkür ederim.

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

Balıkesir, 2010

Demet SAYIN

## 1. GİRİŞ

İnsan sağlığına zarar verdiği ihmal edilerek, tarımda ürün verimini arttırmak için çeşitli zararlılara karşı yıllardır organofosfatlı kimyasallar kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılan ve bir insektisit olan parathion bileşiminin katabolik ürünü sonucu oluşan paraokson, başta sinir uyarılarının iletiminde önemli rol oynayan asetilkolin esteraz ve diğer bazı enzimleri inhibe etmektedir. Ancak organizma bu etkilerin birçoğuna karşı savunma sistemleri oluşturmuştur. Bunlardan bir tanesi de paraoksonaz (PON) enzimidir. Bu enzim paraoksani hidroliz ederek onun zararlı etkilerini ortadan kaldırmaktadır [1, 2]. Enzimin detoksifikasyon özelliğini ortaya koyan bu aktivitesinin çevresel faktörlerden kaynaklanan kansere karşı önemli olduğu bilinmektedir. Ayrıca söz konusu enzim antioksidan aktiviteye de sahiptir. PON'un bu özelliği ile LDL fosfolipidlerinin oksidasyonunu önlediği bilinmektedir. LDL' nin oksidasyonunun ateroskleroz sürecinin başlangıç evresini oluşturması, enzimin antioksidan özelliğinin önemini ortaya koymaktadır [3-6].

Paraoksonaz enziminin, organofosfat ajanları ve pestisitler gibi kanserojen maddeleri hidroliz ederek organizmayı kansere karşı belirli ölçüde koruduğu bilinmektedir. Son yıllarda köpekbalıklarının kansere karşı direncinin yüksek olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Yukarıda belirtildiği gibi PON enziminin detoksifikasyon aktivitesinin, kansere karşı etkili olması köpekbalığı PON enziminin aktivitesinin araştırılmasının önemini ortaya çıkarmıştır. Bu araştırma kapsamında Edremit Körfez bölgesinde sık rastlanan *S. canicula* serumundan PON enzimi, araştırma grubumuz tarafından sentezlenen Sepharose-4B-L-Tirozin-1-naftilamin kimyasal yapısına sahip hidrofobik jel kullanılarak saflaştırılacaktır. Saf enzimin bazı biyokimyasal özellikleri araştırılarak diğer türlerle karşılaştırılacaktır. Son olarak önemli çevre kirliliğine sebep olan bazı ağır metallerin saf enzim üzerindeki afinitesi araştırılacaktır.



## **1.1 Paraoksonaz Enziminin Biyokimyası**

### **1.1.1 Adlandırılması**

Paraoksonaz enzimi, bir ester hidrolazdır. İki farklı ester hidrolazı aktivitesine sahiptir. Bunlardan biri arilesteraz diğeri de fosforik ve fosfinik asit esterlerini hidroliz aktivitesidir. Bu aktivitelerden dolayı iki numaraya (EC 3.1.1.2. ve EC 3.1.8.1.) sahiptir. Bu numaralandırmada;

EC 3.	Hidrolazları,
EC 3.1.	Ester bağları üzerine etki eden hidrolazları,
EC 3.1.1.	Karboksilik ester hidrolazları,
EC 3.1.1.2.	Arilesterazı,
EC 3.1.8.	Fosforik triester hidrolazları,
EC 3.1.8.1.	Arildialkil fosfatı ifade etmektedir.

Enzim paraokson, metil paraokson, klor metil paraoksone yüksek derecede seçicilik gösterdiği için paraoksonaz olarak adlandırılmıştır. Paraoksonazın diğer isimleri; organofosfat hidrolaz, A-esteraz, organofosfat esteraz, paraokson esteraz, paraoksan hidrolaz, organofosforöz hidrolaz, fosfotriesteraz, organofosforöz asit anhidraz, pirimifosmetilokson esterazdır [7].

### **1.1.2 Paraoksonaz Enziminin Yapısı**

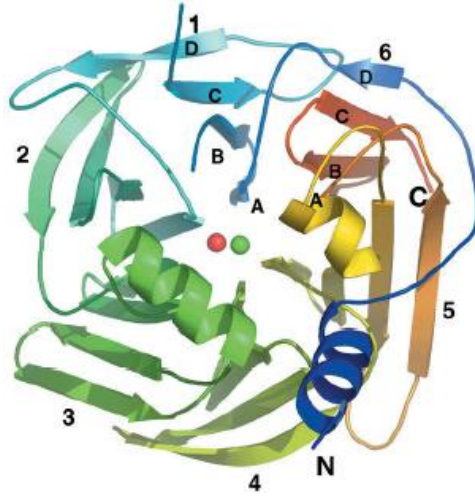
Paraoksonaz enzimi ilk olarak 1953 yılında Aldridge tarafından insan kan serumunda bulunmuştur [8, 9]. Ancak daha sonra yapılan çalışmalarda, paraoksonaz enziminin sadece insan serumunda değil hayvanlarda da farklı seviyelerde olduğu tespit edilmiştir. Özellikle tarımda kullanılan organofosfatlı pestisitlerden en kolay etkilenebilecek hayvanlarda yüksek seviyelerde bulunmuştur. Söz konusu enzim; balık, kurbağa, hindi, tavuk, tavşan, köpek, sıçan, koyun fare ve balık gibi organizmalarda araştırılmış ve enziminin yapısal ve kinetik özellikleri tespit edilmiştir [10-16].

1996 yılında, paraoksonaz aktivitesinden sorumlu genin bir multigen ailesinin üyesi olduğu tespit edilmiş ve sırasıyla PON1, PON2 ve PON3 olarak isimlendirilmiştir [14]. Çalışmalar daha çok PON1 üzerine yoğunlaşmıştır. PON1'in karaciğerden sentezlendiği daha sonra serumda HDL'ye bağlı olarak bulunduğu tespit edilmiştir [17-20]. Ayrıca karaciğerde, endoplazmik retikulum membranlarının parçacıklarının uçları kapanarak oluşan mikrozomlarda da bulunmaktadır [21, 22]. PON3 enzimi de PON1'e benzer şekilde büyük çoğunlukta karaciğerden sentezlenir ve serumda HDL'ye bağlı olarak bulunur. Ayrıca PON3 daha düşük seviyelerde böbrekte sentezlenmektedir ve PON3 geninin mRNA'sı ve proteinine insanlardan farklı olarak sıçanların makrofajlarında rastlanmıştır [23]. PON2 diğer üyelerden farklı olarak plazmada bulunmamaktadır. Ancak beyin, karaciğer, böbrek ve testis gibi pek çok dokuda sentezlenmektedir [24].

PON1 karaciğerde sentezlenen, 43-45 kilo-dalton molekül ağırlıklı, 354 aminoasit içeren glikoprotein yapıda,  $Ca^{+2}$  iyonuna bağımlı bir esteraz enzimdir [25,26].

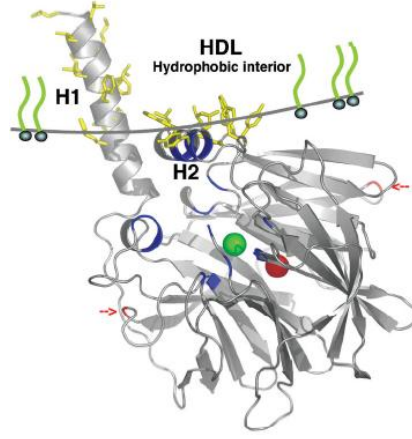
354 aminoasit içeren paraoksonazın yapısında yer alan üç sistein (Cys) rezidüsünden 284' teki serbest iken diğer ikisi arasında (Cys 42-352) tek disülfid bağı bulunur [9, 26, 27].

PON, 4 adet zincirden oluşmuş 6 adet  $\beta$ -kırmalı yapıdan meydana gelmiştir. Enzim 42. ve 353. sistein rezidüleri arasındaki disülfid köprüsü ile sonlanarak üç boyutlu yapısını kazanır (Şekil 1.1) [28].



**Şekil 1.1** Paraoksonaz enziminin üç boyutlu görünümü [29].

Üç boyutlu yapıda;  $\beta$ -kırmalı tabakaların merkezinde 7,4 Å aralıklı iki adet  $\text{Ca}^{+2}$  iyonu bulunmaktadır. Bunlardan bir tanesi yapısal kalsiyum olup, yapıdan uzaklaştırılması dönüşümsüz denatürasyona neden olmaktadır [30]. Diğeri ise katalitik etkinlikte görev alan kalsiyumdur. PON aktif bölgede diğere  $\beta$ -kırmalı yapılardan farklı olarak hidrofobik heliks ( $H_1$  ve  $H_2$ ) yapıları vardır (Şekil 1.2). Bunlar aynı zamanda sonlanma noktalarıdır. Bu yapı aktif bölgenin korunması ve enzimin HDL'ye bağlanması gibi kritik rollere sahiptir.



**Şekil 1.2** PON' un HDL' ye bağlanması [29].

Paraoksonaz enzimi insanlarda karaciğerde sentezlenir. Enzim aktivitesi fetüs karaciğeri/dalağı ve erişkin karaciğerinde görülmüştür. Akciğer, beyin, pankreas ve plasenta da bulunduğu yolunda kanıtlar varsa da henüz izole edilememiştir. Hayvanlarda özellikle karaciğer, böbrek, ince bağırsak ve plazmada bulunur [5].

### **1.1.3 Paraoksonaz Enziminin Fonksiyonları**

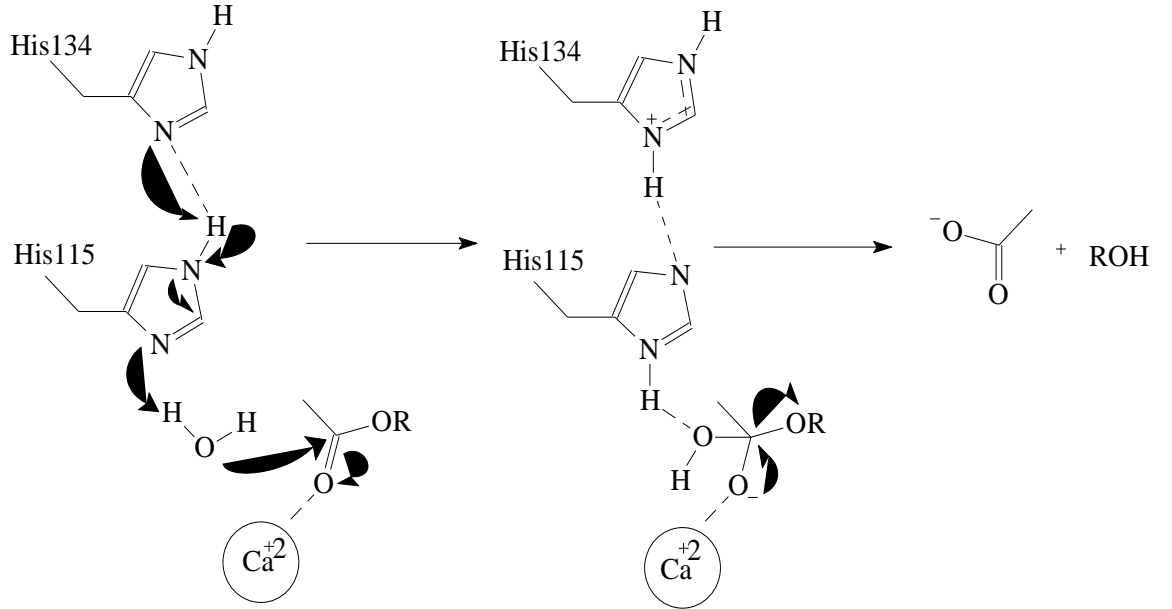
PON'un en iyi bilinen koruyucu fonksiyonu organofosfat nörotoksinleri, aromatik karboksilik asit esterlerini ve insektisitleri hidroliz etme yeteneğidir. Toksik organik molekülleri hidroliz etmesi, PON'un tanımlanan ilk fizyolojik fonksiyonudur. İlk olarak organofosfat bileşiklerini hidroliz etme özelliği nedeniyle toksikoloji alanında üzerinde çalışılmıştır [26].

PON'un belirlenen ikinci biyolojik fonksiyonu antiaterojenik aktiviteye sahip olmasıdır. Serum PON enzimi plazmada HDL ile birlikte bulunur ve plazma lipoproteinlerinin oksidasyonunu önlemede rolü olduğu düşünülmektedir. Peroksidasyona uğramış olan lipidler bu enzim tarafından metabolize edildiğinden, lipid peroksidlerin hem HDL'de hemde LDL'de birikimi önlenir. HDL'nin LDL'yi oksidasyona karşı koruyucu etkisi ile yani antioksidan özelliği ile A ve E vitaminlerinden daha etkilidir [5-31].

PON antioksidan enzim olması nedeni ile kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, sepsis, Alzheimer ve Parkinson gibi pek çok hastalığın gelişmesine karşı koruyucu rol oynayabileceği düşünülmektedir [15].

#### 1.1.4 Enzimin Katalitik Mekanizması

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



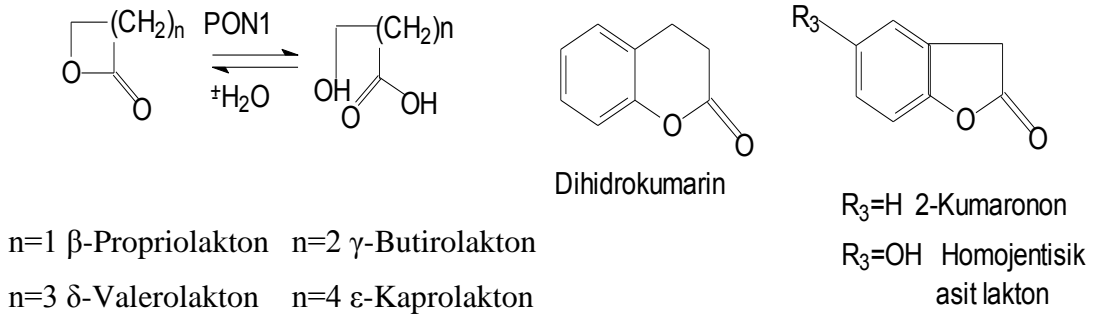
Şekil 1.3 Paraoksonazın katalitik mekanizması [29].

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

### 1.1.5 Katalizlediği Reaksiyonlar ve Substratları

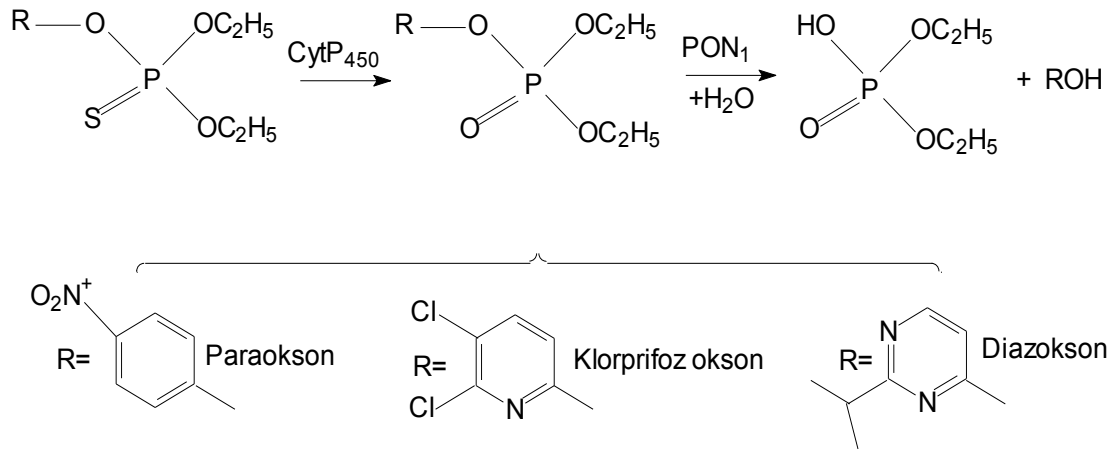
Paraoksonaz enzimi geniş bir substrat özgüllüğü gösterirken, fizyolojik substratı tam olarak belirlenmemiştir. Ancak arilesteraz, organofosfataz ve laktonaz aktivitelerine sahip olduğu tespit edilmiştir

Son yıllarda PON'un arterosiklozisin önlenmesinde ve ilaç metabolizmasında önemli rol oynadığı bilinmektedir [15, 32, 33]. PON özellikle LDL ve HDL lipitlerinin yükseltgenmesini önleyerek ve lipit peroksidlerini metabolize ederek arterosklozise karşı koruyuculuğuna sahip olduğu laktonaz aktivitesi ile göstermektedir [34-36]. Söz konusu enzim 4 atomdan 7 atoma kadar değişen lakton halkası ihtiva eden, en az 30 çeşit laktonu hidrolizleyebilmektedir. (Şekil 1.4).



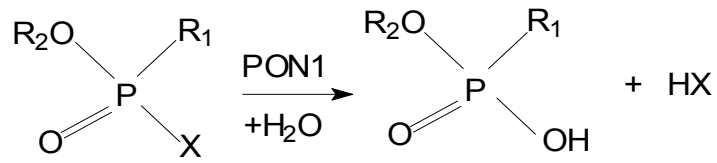
Şekil 1.4 Lakton hidrolizi [15]

İnsan serum PON enzimi ayrıca paration, diazinon ve klorpirifos gibi çok sayıda insektisit toksik okson metabolitlerini (Şekil 1.5)[37, 38] ve soman, sarin ve tabun gibi organofosfat sinir ajanlarını hidrolizleyebilmektedir [39-42]. İnsan sağlığı açısından organofosfatlı bileşikler ise terörizm tehdidi kadar bir çevresel risk oluşturur [29]. PON enziminin çok yönlü bir araştırma konusu olmasının en önemli nedenlerinden biri budur.



**Şekil 1.5** İnektisitlerde yaygın olarak kullanılan okson metabolitlerinin hidrolizi

[15]

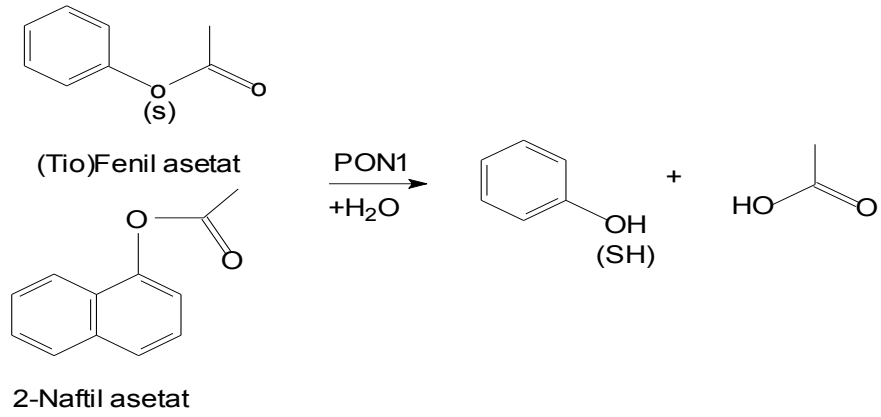


$\text{R}_1=\text{N}(\text{CH}_3)_2$      $\text{R}_2=\text{CH}_2\text{CH}_3$      $\text{X}=\text{CN}$     Etil N-dimetilfosforoamidosiyanid (Tabun)

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

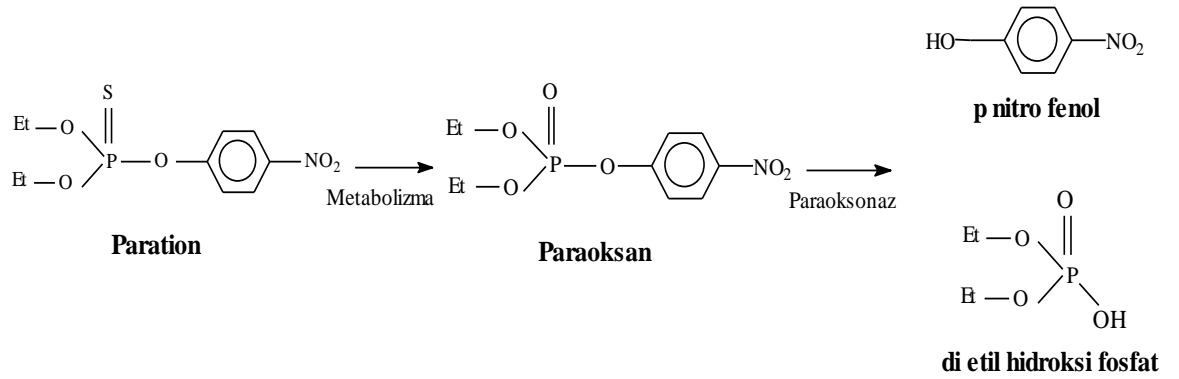
$\text{R}_1=\text{CH}_3$      $\text{R}_2=\text{CH}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{CH}_3)_3$      $\text{X}=\text{F}$     Pinakolil metilfosfonofluoridat (Soman)

**Şekil 1.6** Sinir gazlarının hidrolizi [15]



Şekil 1.7 Aromatik esterlerin hidrolizi [15]

İnsan serum paraoksonaz enzimi, parationun metabolik ürünü olan paraoksanı kataliz etme yeteneğindedir. Paraoksan organizmaya zararlı olup pestisit olarak kullanılmaktadır. Paraoksanın, paraoksonaz enzimi ile yıkımı sonucu paraoksana oranla göreceli olarak daha az zararlı p-nitro fenol ve dietil hidroksi fosfat bileşikleri oluşur [43].



Şekil 1.8 Paraoksonaz Enzim Mekanizması



### **1.1.6 Paraoksonaz Enziminin Hastalıklar ile İlişkisi**

PON'un enzim aktivitesi ve serumdaki seviyesi, bireyler arasında 13 kattan fazla oranda değişim gösterebilmektedir. Bu farklılık herhangi bir hastalık durumunda, beslenmeye bağlı olarak, yaşama biçimi ve çevresel faktörlerle ortaya çıkmaktadır [44, 45-47 ].

Paraoksonaz HDL'ye bağlı olup, kalp damar hastalıkları ile ilişkisinin yanı sıra, pek çok klinik yayınlarda gösterildiği gibi enzimin aktivitesinin diğer hastalıklarla da ilişkili olduğu tespit edilmiştir [44, 48, 49-51 ]. Diğer bir çalışmada, kalp krizi geçirmiş kişilerde, serumdaki PON aktivitesi ve konsantrasyonu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında son derece düşük olduğu tespit edilmiştir [52, 53]. İnsülin bağımlı şeker hastalarında ve yüksek kolesterolü olan hastalarda da serum paraoksonaz aktivitesinde azalma gözlenmiştir [47]. 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 [54]. Yüksek tansiyon ve tip 2 şeker hastalarında yapılan başka bir çalışmada, kontrol grubunun paraoksonaz aktivitesi ile hasta grubun enzim aktivitesi arasında önemli bir farklılık gözlenmemiştir [55]. Tip 1 şeker hastalarında da kontrol grubu ile karşılaştırıldığında paraoksonaz enzim aktivitesinde önemli bir farklılık gözlenmemiştir. Ancak aynı çalışmada tip 1 şeker hastalarında HDL seviyesi kontrol grubundan oldukça yüksek bulunmuştur [56].

## **1.2 *Scyliorhinus canicula*, (Linnaeus, 1758) (Kedi Balığı)**

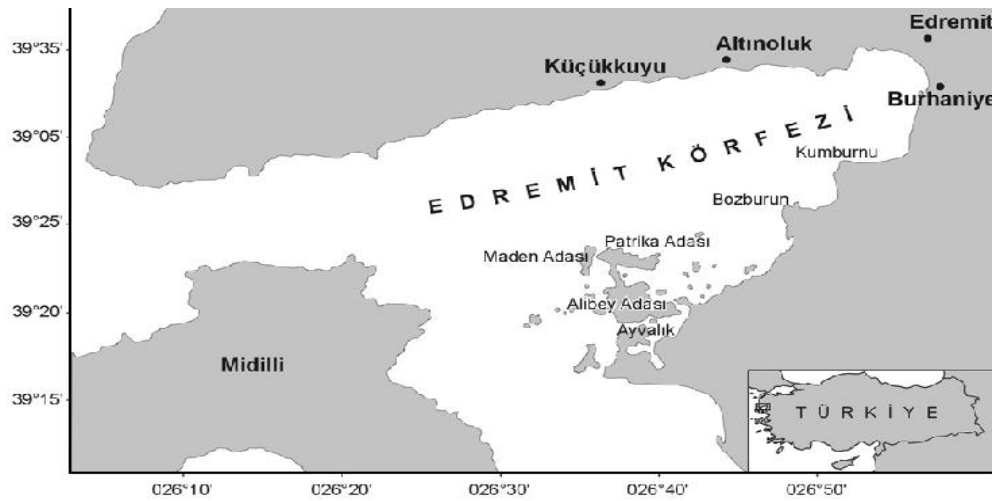
### **1.2.1 Araştırma Bölgesi ve Örnekleme Bilgileri**

Ege Denizi'nin en önemli balıkçılık alanlarından biri olan Edremit Körfezi, Akdeniz kökenli ve yaz aylarının başlamasıyla birlikte kuzey rüzgarlarının etkisi ile Karadeniz kökenli suların karışım bölgesinde bulunmaktadır. Aynı zamanda körfez

civarında erozyonla gelen besince zengin sularla beslenmektedirler ki bu durum balıklar için iyi bir biyotop oluşturur [57, 58].

Edremit Körfezi Kuzey Ege Denizi'nde iki akıntının karşılaştığı bir bölge olup zooplanktonca zengindir. Trol avcılığına uygun dip sahalarının bulunması ve bölgenin zaman zaman Karadeniz' den gelen besince zengin sularla beslenmesi, zengin balık topluluğunun yerleşmesini sağlamaktadır [59]. Balık topluluğunun zenginliği ve tür çeşitliliğinin fazlalığı bunların predatörü olan kıkırdaklı türleri için alanın uygunluğunu ortaya koymaktadır. Keza bölgede çok sayıda irili ufaklı adaların olması da bu türlerin kendilerine seçtikleri habitatlar için uygunluğunu daha da arttırmaktadır [60].

Edremit Körfezi'nde 40-60 m derinliklerde kumlu-çamurlu zemin üzerinde trata ve trol çekimleri tamamlanıp, ağ torbalar teknelere alındıktan sonra kıkırdaklı balıklar bir kenara ayrılmıştır [60].



**Şekil 1.9** Araştırma Bölgesi

Ayrılan kıkırdaklı balıklar arasında tür tayinleri yapılmıştır. *S. canicula* tür tayini için burun delikleri ile ağız arasındaki deri parçalarına bakılmıştır. Deri parçalar *S. canicula* da birbiri ile birleşmiş durumdadır (Şekil 1.10) [60].



**Şekil 1.10** Türün ağız ve burun yapısı

Kıkırdaklı balık türlerinin son listesi Ege Denizi'nin Türkiye kıyılarında toplam 28 tür içerir. Fakat *S. canicula*'lar Edremit Körfezi'nden en çok çıkan ve Türkiye'de köpek balıkları arasında en çok çalışılan türdür.

### 1.2.2 Genel Özellikler



**Şekil 1.11** Türün Genel Görünüşü

#### 1.2.2.1 Morfoloji

Vücut uzun ve baş üstten basıktır. Dişler birkaç sıra üzerine dizilmiş ve çok sayıda. Burun, ağız genişliğinden küçüktür. Burun delikleri kanallar vasıtasıyla ağızla birleşmiştir. Bu kanallar, üst çenenin önüne kadar uzanan geniş deri parçaları ile (nasal kapak) ile örtülmüştür. Her iki dorsal yüzgeçte oldukça küçüktür. Vücut

açık kahverengi renkte olup pek çok sayıda açık ve koyu esmer beneklerle kaplıdır. Bu benekler çoğunlukla göz bebeği kadar veya daha küçüktür. Ventralde benekler bulunmaz [59]. Elde edilen örneklerde maksimum vücut boyu 830 mm' olarak ölçülmüştür.

*S. canicula* ' ların karaciğerleri çok büyüktür. Total vücut ağırlığının yaklaşık 1/3 ini karaciğer oluşturur.

### **1.2.2.2 Biyoloji**

Sublitoral den bentiğe kadar, İngiliz Adaları civarında 3-110 m, Akdeniz' de 20-400 m arasında bulunmaktadırlar . Genel olarak besinlerini; bentik omurgasızlar (molluskler ve krustaseler), küçük sefalopodlar, poliketler ve küçük kemikli balıklar oluşturmaktadır [61, 63]. İlk tercihleri krustaseler; ikinci olarak balıklar ve sefalopodlardır, poliketleri ise zaman zaman tercih ederler [63]. Ovovivipar bir türdür; üreme tüm yıl boyunca gerçekleşebilir [64]. İlk cinsel olgunluk boyları 35-45 cm. civarındadır . Oldukça büyük olan yumurtalar dört köşeli kalın bir kapsül içinde, genellikle yaz ve sonbahar mevsimlerinde kıyılara yakın sularda çeşitli zeminlere tutturulurlar [65]. Özellikle kuzey Ege Denizi'nde trol ağlarıyla bol miktarda yakalanan bu türün Türkiye balıkçılığı açısından önemi yoktur.

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

Çevre insanla birlikte tüm canlı varlıklar, cansız varlıklar ve canlı varlıkların eylemlerini etkileyen ya da etkileyebilecek fiziksel, kimyasal, biyolojik ve toplumsal nitelikteki tüm etkenlerdir [66]. Ancak bu etkenlerin insanların nüfus artışı, teknolojik gelişmeler ve tüketim alışkanlıklarına bağlı olarak zarar görmesi ve bu zararın rahatsız edici seviyelere ulaşması sonucu kirlenmesi söz konusudur. Böylece çevre kirliliği ortaya çıkmaktadır. Çevre kirliliği geçici veya sürekli bir biçimde canlılara zarar veren gaz, sıvı ve katı maddeler ile radyasyonun; cisim, sistem ve çevre de meydana getirdiği olumsuz değişimlerdir. Bir başka deyişle hava, su ve toprağın fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerinde meydana gelen arzu edilmeyen

değişimlerdir [67]. Çevre kirliliğine neden olan ve gittikçe daha büyük boyutlarda tehlike oluşturan etmenlerin başında ağır metaller gelmektedir. Ağır metallerin (Ag, As, Cd, Cu, Fe, Ni, Pb, Zn, Mo, Co, Cr, gibi) toprak kirlenmesi ve çevreye yaptığı zararlar çok önemli güncel sorunlar haline gelmiştir. Hızlı şehirleşme, endüstrileşme, gübreleme ve pestisit kullanımı, toprak ve su kaynaklarında toksik metal kirliliği ile sonuçlanmaktadır. Toksik metallerin birikimindeki artma, ekosistemde dengesizliğe neden olmakta, toksik metallerin yüksek miktarlarda çoğu habitatın canlı gelişimi boyunca birikmektedir. Bu durum biyolojik büyüme sürecinde besin zinciri boyunca transfer edilmekte ve biriktirilmektedir. Ayrıca bu metallerin besin zincirindeki yüksek konsantrasyonu yaşayan insan ve hayvan sağlığını çeşitli şekillerde tehdit etmesiyle sonuçlanmaktadır. Esansiyel olsun veya olmasın ağır metallerin yüksek konsantrasyonları mikroorganizmalar, bitkiler, hayvanlar ve insanları içeren canlılar alemi için toksik etkisi bilinen bir gerçektir [67, 68]. Önemli bir kirlenici grubu oluşturdukları bilinen ağır metallerin; toksik ve kanserojen etkileri olduğu gibi, canlı organizmalarda birikmesi de söz konusudur. Krom, civa, kurşun, kadmiyum, mangan, kobalt, nikel, bakır ve çinko gibi metaller doğada genellikle sülfür, oksit, karbonat ve silikat mineralleri şeklinde bulunmaktadır. Bunların suda çözünürlükleri oldukça düşüktür. Çok küçük miktarlarda bile genellikle kuvvetli zehir etkisine sahip olan ağır metaller, kirlenmiş sularda metal, katyon, tuz ve kısmen anyon şeklinde bulunurlar [69]. Ağır metaller biyolojik döngü içinde en önemli zararlarını bitkilerde meydana getirmektedir. Tohum çimlenmesi, çıkış, fide büyüme ve gelişimi, bitkilerde büyüme ve gelişmede gerilikler, biyomas üretiminin düşmesi, çiçek ve meyve tutumunda azalma, verimde düşme ve ürün kalitesinde bozulma bu zararlardan bazılarıdır. Bundan başka ağır metallerin fotosentetik aktiviteyi sekteye uğratması, azot döngüsü ve bağlanmasını bozması, klorofil miktarını azaltması, enzim sistemlerinde bozulmalara yol açması; bitkilere yarayışlı diğer elementlerin alımını engellemesi gibi hücre içi mekanizmalarda da olumsuz etkileri bulunmaktadır [70].

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

### **1.3.1 Nikel**

Genelde doğrudan veya dolaylı yoldan atık sular yoluyla toprağa geçen nikel, normal olarak toprakta 50-500 ppm düzeyindedir. Nikel katkılı çelik ve ulaşım endüstrisinde boya ve kozmetik sanayi ile çeşitli elektrikli alet üretiminde kullanılan nikelin bitkilere faydası üzerine kesin bilgiler yoktur. Ancak bitkilerdeki birikme konsantrasyonu genellikle insan ve hayvanlara zararlı düzeye ulaşamaz. Nikel 600 ppm'in üzerinde konsantrasyonlara sahip topraklar içinde kuvvetli toksik etki yapar [71].

### **1.3.2 Kadmiyum**

Plastik endüstrisinde yaygın olarak kullanılan kadmiyum elementi bunun dışında boya sanayisinde, motor yağlarında ve taşıt lastiklerinde bulunur. Bu nedenle toprakta kadmiyum birikimi bu endüstrinin atık sularında, hurda plastiklerin çöp olarak depolandığı alanlarda ve özellikle yoğun trafik akımının bulunduğu otoyollarda yüksek düzeyde bulunabilir. Kadmiyum doğal çevre içinde çinko ile jeokimyasal bir ilişki içinde olduğundan aynı zamanda çinko ergitme tesisleri çevresindeki topraklarda yüksek kadmiyum konsantrasyonunun 'itai itai' adı verilen bir tür hastalığın yaygın olarak görüldüğü ve Minimata olayı adı verilen olay kadmiyum kirlenmesine en çarpıcı örnektir. Fosforlu gübrelerin bileşiminde eser element olarak bulunan kadmiyum bu nedenle tarım topraklarında yaygındır ve yüksek konsantrasyonlarda bulunabilir. Nitekim uzun yıllar süper fosfat gübresi uygulanmış topraklarda yetişen bazı çayır bitkilerinin bünyesinde yüksek oranda kadmiyum elementine rastlanmıştır [71].

### **1.3.3 Bakır**

Bitkiler için gerekli bir eser element olan bakır özellikle asit karakterli topraklarda yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Endüstride çok yaygın olarak

kullanılan bu madde toprağa havadan yağışla karışmak suretiyle geçer. Fakat bakırın toprakta ve bitkide asıl birikmesi bakır sülfat olarak bazı meyve bahçelerinde pestisid olarak kullanılmasıyla geçer. Halk dilinde ‘göz taşı’ olarak bilinen bakır sülfat gerek kuru toz halinde ve daha yaygın olarak suda erimiş halde bağlara ve narenciye bahçelerine spreyleme yoluyla püskürtölür. Daha sonra bu madde gerek püskürtölme anında doğrudan gerekse daha sonra yağmur sularıyla yıkanmak suretiyle toprağa geçer. Bakır sülfat topraktaki yararlı mikroorganizmalar içinde toksik etki yaptığından topraktaki humus oluşumunu kısıtlayarak toprağın organik bakımdan fakirleşmesine neden olabilir [71].

### **1.3.4 Civa**

Civa metalinin keşfi tam olarak bilinmemektedir. Bilinen en önemli minerali zencefre (HgS) dir. Civa çok uçucu bir element olduğundan oda sıcaklığında kolayca buharlaşır. Zehirli bir element olduğu için sıcaklık arttıkça buharlaşma hızı artacağı için tehlike boyutu da artar. Herhangi bir yüzeye civa dökölüğü zaman üzerine toz kükürt dökölmalıdır ve oluşan karışım temizlenirken dikkat edilmelidir. HgS mineralinin kavrulması ile HgO elde edilir. Bu oksit bileşiğinin ısıtılması ile de elementel civa elde edilir [72].

## 2. MATERYAL VE YÖNTEMLER

### 2.1. MATERYALLER

#### 2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

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

#### 2.1.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Bu çalışmada aşağıdaki alet ve cihazlardan yararlanılmıştır.

Buz Makinesi	Fiocchi AF10
Elektroforez Sistemi	Hoefer, HSI
Kromatografi Kolonu	Sigma (1.5 $\times$ 10 cm)
Manyetik Karıştırıcı- Isıtıcı	WiseStir MSH-20 A
Otomatik pipetler	Transferpette, Nichipet EX
pH metre	Hana pH 211 Microprocessor
Soğutmalı Santrifüj	Sigma 3K15
UV-Spektrofotometresi	CARY 1E, UV-Visible Spektrophotometer-VARIAN



Vorteks	Fisons Whirli Mixer
Terazi	Precisa XB 220A
Jel Görüntüleme Sistemi	Gel Doc-H Imaging System (UVP)
Gradient Mikser	Atta magnetik karıştırıcı ve gradient tüp

### 2.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

#### Hidrofobik jelin sentezinde kullanılan tamponlar

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

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

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

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

**Hidrofobik jele bağlanmış PON enziminin elüsyonu için kullanılan çözelti:** 1M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içeren, 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu (pH 8.0) ve 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu (pH 8.0) ile gradient mikser kullanılarak tuz gradienti oluşturuldu; 14.2g (0.1 mol) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 132.14g (1 mol) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 950 ml distile suda çözülerek, 1N HCl ile

pH'sı 8.0'e getirildi ve son hacim distile su ile 1L'ye tamamlandı. 14.2g (0.1 mol)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  950 ml distile suda çözülerek, 1N HCl ile pH'sı 8.0'e getirildi ve son hacim distile su ile 1L'ye tamamlandı.

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

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

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

**Paraoksonaz aktivite ölçümünde kullanılan bazal aktivite tamponu:** 2 mM  $\text{CaCl}_2$  içeren 100 mM Tris-HCl, pH=8; 3,0285 g (25mmol) Tris, 200 ml distile suda çözüldü. 1 N HCl ile pH'ı 8.0'e getirildi. 0,0555 g (0,5 mmol)  $\text{CaCl}_2$  katılarak son hacim 250 ml'ye tamamlandı.

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

0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	2.5 ml
% 10'luk SDS	4.0 ml
Gliserol	2.0 ml
$\beta$ -merkaptoetanol	1.0 ml
Bromfenol mavisi	0.01 gr
Distile su	0.5 ml

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

Tris-HCl	3 g
Glisin	14.4 g
SDS-	1.0 g

Distile su ile çözeltinin son hacmi 1 L' ye tamamlanır.

**SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan ayırma ve yığma jellerinin hazırlanışı;**

SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının hazırlanışı ve kullanılan miktarları Çizelge 2.1'de verilmektedir.

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

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

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

	<b>Ayırma Jeli</b>	<b>Yığılma Jeli</b>
	<b>% 10</b>	<b>% 3</b>
<p><b><u>Akril amid/Bis</u></b></p> <p>Akril amid            15 g</p> <p>Bis                      0,4 g</p> <p>Alınarak son hacim destile su ile 50 mL'ye tamamlanır.</p>	16.65mL	2.6 mL
<b><u>Destile su</u></b>	20.1 mL	12.2 mL
<p><b><u>1.5 M tris-HCL (pH 8.8)</u></b></p> <p>Tris-HCl            11.82</p> <p>Alınarak pH 8.8 oluncaya kadar 0.1 M NaOH ilave edilerek son hacim destile su ile 50 mL'ye tamamlanır.</p>	12.5 mL	–
<p><b><u>0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)</u></b></p> <p>Tris-HCl            3.94 g</p> <p>Alınarak pH 6.8 oluncaya kadar 0.1 M NaOH ilave edilerek son hacim destile su ile 50 mL'ye tamamlanır.</p>	–	5mL
<p><b><u>% 10 'luk SDS</u></b></p> <p>SDS                    1g</p> <p>Alınarak son hacim destile su ile 10 mL'ye tamamlanır.</p>	0.5µL	200µL
<b>TEMED</b>	25 µL	20µL
<p><b><u>%10'luk amonyum persülfat</u></b></p> <p>Amonyum persülfat    1g</p> <p>Alınarak son hacim destile su ile 10 mL'ye tamamlanır.</p>	750µL	400µL

## **2.2. Yöntemler**

### **2.2.1. Kan serumunun ayrılması**

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

### **2.2.2. Enzim Aktivite Tayini**

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

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

Amonyum sülfat çöktürmesi sırasında elde edilen çözeltilerdeki protein miktar tayinleri bu yöntemle belirlendi. Bu yöntem fosforik asitli ortamda proteinlerin, Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi ile kompleks oluşturması, oluşan kompleksin 595 nm'de maksimum absorban göstermesi esasına dayanır [73].

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

Protein tayini işleminde şu yol izlendi: 1ml'sinde 1mg protein ihtiva eden standart sığır albümin çözeltisinden tüplere 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µl alındı. 100mM Tris-HCl tamponu (pH:8.00) ile tüm tüplerin hacimleri 0.1ml'ye tamamlandı. 5ml Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi her bir tüpe ilave edildi. Tüpler vorteks ile karıştırılarak 10 dakika sonra 595nm'de 3ml'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak 0.1 ml'lik 100mM Tris-HCl (pH:8.00) tamponu olan 1. tüp kullanıldı. Okunan absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri ile standart grafik hazırlandı. (Şekil 3.2).

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

#### 2.2.4. Enzimin Saflaştırılması

##### 2.2.4.1. Amonyum sülfat Çöktürme Aralığının Belirlenmesi

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

$$g \text{ (NH}_4\text{)}_2\text{SO}_4 = \frac{1.77 \times V \times (S_2 - S_1)}{3.54 - S_2}$$

V : Serum hacmi

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

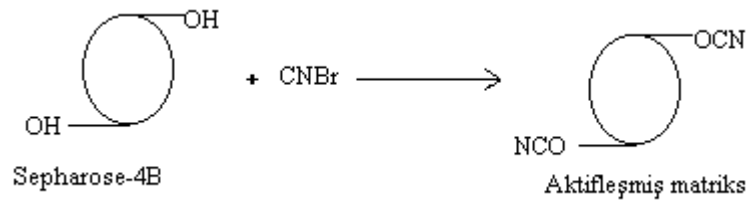
S<sub>2</sub> : 1'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğu

Paraoksonaz enzimi saflaştırılmak için ilk önce %60 doyunluğa getirildi ve 20 dakika boyunca 4 °C’ de 10000 rpm’de santrifüj edildi. Süpernatant kısmı alındı ve çöken kısmı atıldı. Süpernatant %80 doyunluğa getirildi 1 saat boyunca 10000 rpm’de 4 °C’de santrifüj edildi. Çöken kısım alındı [74].

## 2.2.4.2. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Enzimin Saflaştırılması

### 2.2.4.2.1. Sepharose 4B’nin Aktifleştirilmesi

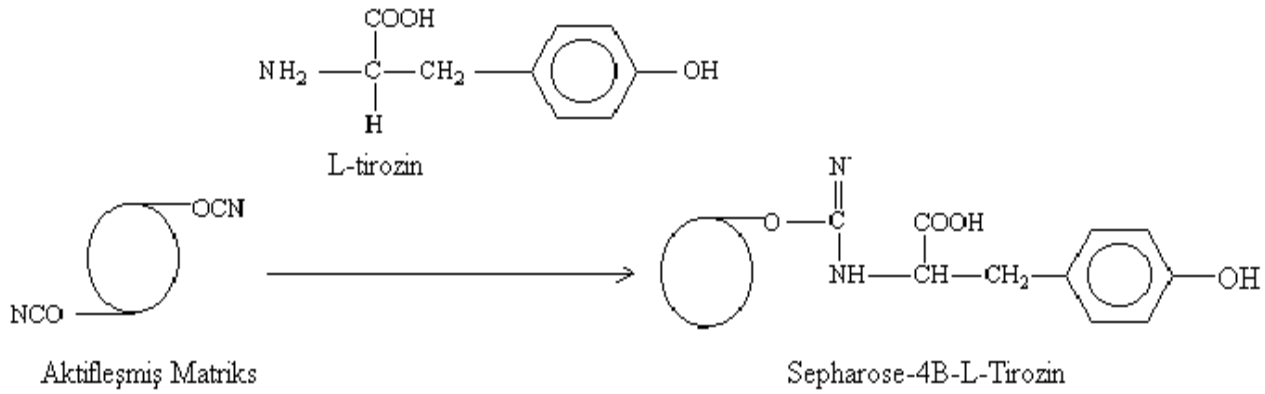
10mL Sepharose-4B jeli, saf su ile iyice yıkanarak dekante edildi. Eşit hacimde distile su ile birleştirildi. Karıştırılmakta olan jel süspansiyonuna 4g CNBr hepsi birden katıldı. pH metre kullanılarak süspansiyonun pH’sı 4M NaOH ile hemen 11’e çıkarıldı ve reaksiyon bu pH’da muhafaza edildi. Reaksiyona pH değişmeye kadar devam edildi (10-15dk). Çok miktarda buz süspansiyona katıldı ve karışım bir bunher hunisine nakledildi. Daha sonra 250mL soğuk 0.1M NaHCO<sub>3</sub> tamponu (pH 10.00) ile yıkandı [74].



şekil 2.1 Sepharose 4B’nin aktifleştirilmesi

#### 2.2.4.2.2. L-tirozinin Bağlanması

CNBr ile aktifleştirilmiş matriks üzerine, 20mL'sinde 15mg tirozin içeren 0.1M NaHCO<sub>3</sub> tamponunun (pH 10.00) soğuk çözeltisi ilave edilerek 90 dk karıştırıldı. Bundan sonra süspansiyon 16 saat 4 °C'de bekletildi. Bu sürenin bitiminde yıkama suyu 280nm'de absorbans vermeyinceye kadar bol su ile yıkandı. Böylece reaksiyona girmeyen tirozin tamamen uzaklaştırılmış oldu. Yıkama 100mL 0.2 M NaHCO<sub>3</sub> tamponu (pH: 8.8) ile tekrarlandı. Tirozinle modifiye sepharose-4B aynı tamponun 40mL'si içine alındı [74].



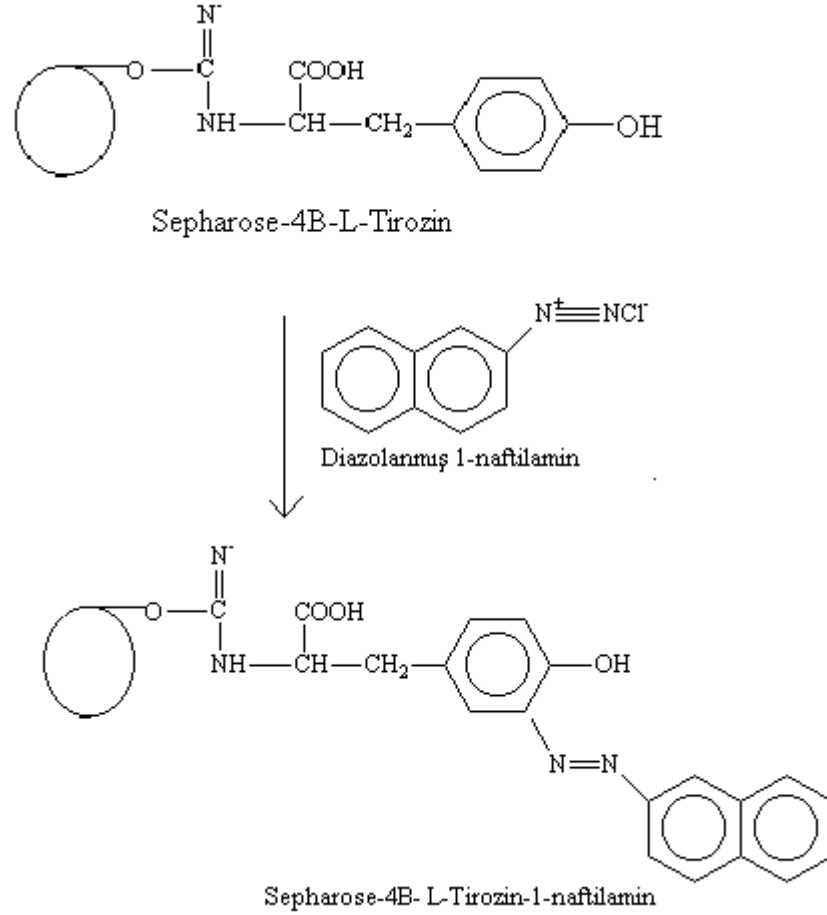
Şekil 2.2 L-tirozinin Bağlanması

#### 2.2.4.2.3. 1-Naftilamin Bileşiğinin Bağlanması

25mg 1-naftilamin 0 °C civarında 10mL 1M HCl içerisinde çözüldü. 75mg NaNO<sub>2</sub> ihtiva eden 0 °C'deki 5mL çözelti, 1-Naftilamin çözeltisine damla damla katıldı. (1-Naftilamin çözeltisi hazırlanırken etanol ilave ettik ve ısıttık) 10 dk reaksiyondan sonra diazolanmış bulunan 1-Naftilamin, 40mL Sepharose-4B-L-



tirozin süspansiyonuna ilave edildi. pH: 9.5'a çıkarılarak sabit tutuldu ve 3 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Daha sonra 1L saf su ve ardından 200mL 0.01M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH: 6.0) tamponu ile yıkandı ve aynı tamponda muhafaza edildi [74].



Şekil 2.3 1-Naftilamin Bileşiğinin Bağlanması [74]

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

Paraoksonaz enziminin hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılmasından sonra iki farklı akrilamid konsantrasyonunda; yığma jeli % 3, ayırma jeli % 10 konsantrasyonlarında olacak şekilde kesikli sodyum dodesil sülfat

jel elektroforezi (SDS-PAGE) Laemelli [75] tarafından belirtilen yöntemler yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi.

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

Hidrofobik etkileşim kromatografisi sonucunda elde edilen fraksiyonlardan yüksek aktivite gösterenler birleştirildi. Elde edilen çözelti toplam hacim 100µl olacak şekilde 1:1 oranında numune tamponuyla karıştırıldı. β-galaktosidaz (118.0kDa), sığır serum albumin (79.0kDa), yumurta albumini (47.0 kDa), laktat dehidrogenaz (35.0 kDa), β-laktoglobulin (25.0kDa) ve Lizozim (19.5 kDa) içeren standart protein çözeltisi 1:1 oranında numune tamponuyla karıştırıldı. Jele yüklenecek numuneler 3 dakika 100 °C’de termoblokta bekletildi. Numuneler soğutularak kuyucuklara yüklendi. Elektroforez güç kaynağına bağlanarak 80 volt’a ayarlandı. Proteinlerin jeldeki hareketini incelemeye yarayan numune tamponu içindeki boyaya ait bant ayırma jeline ulaştığında voltaj 150 volt’a yükseltildi. Yürütme işlemine proteinler, jelin altına 1cm kalana kadar devam edildi. Daha sonra akım kesilerek yürütme durduruldu. Cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı yığılma jeli kesilip ayrıldıktan sonra protein bantlarını içeren ayırma jeli renklendirme çözeltisi içine konuldu ve 1.5-2 saat kadar çalkalayıcı üzerine bırakıldı. Daha sonra

jel renklendirme çözeltisinden çıkartılarak renk açma çözeltisine kondu. Belirli aralıklarla değiştirmek suretiyle jelin zemin rengi açılıp protein bantları belirginleşinceye kadar bu çözelti içinde çalkalandı. Jel renk açma çözeltisinden çıkarıldıktan sonra jel görüntüleme sistemi (UVP) ile görüntü bilgisayara aktarıldı.

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

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

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

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

$Hg^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$  ve  $Cu^{+2}$ , ağır metallerinin  $IC_{50}$  değerlerini bulmak için, optimum şartlarda paraoksan substratının 2mM sabit konsantrasyonunda çalışıldı. Substrat çözeltisi her ölçümde 0.1 ml alındı, paraoksan ve ağır metal çözeltilerinden ise değişik hacimlerde alınarak toplam 1.05ml' lik bir reaksiyon hacmi oluşturuldu. Önce inhibitörsüz ortamda enzim aktivitesi bulundu. Bu değer %100 aktivite olarak kullanıldı. Daha sonra optimum pH ve sıcaklıkta 0.05ml enzim çözeltisi alınıp daha önceden hazırlanmış olan 1 ml tampon + substrat + ağır metal çözeltisine çabuk bir şekilde eklendikten sonra 412 nm' de bir dakikada absorbans da meydana gelen değişme okundu (Çizelge 3.3-3.4). Elde edilen absorbans değerlerinden % aktivite hesaplandı. % Aktivite  $-[I]$  grafikleri çizildi.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Enzimin Saflaştırılması

##### 3.1.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi

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

$$g \text{ (NH}_4\text{)}_2\text{SO}_4 = \frac{1.77 \times V \times (S_2 - S_1)}{3.54 - S_2}$$

V : Serum hacmi

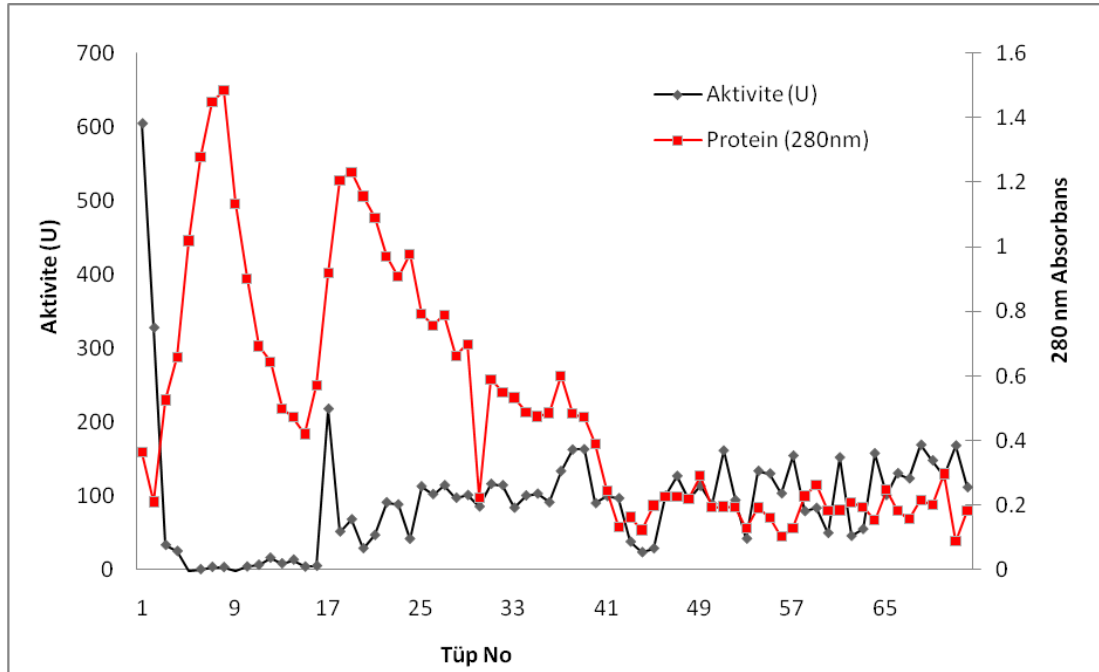
S<sub>1</sub> : 1'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu

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

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

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

doğunluğuna getirildikten sonra kolona tatbik edildi. Kolona 1M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içeren 0.1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH:8.0 tamponu ve 0.1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH:8.0 tamponu ile oluşturulan yüksek tuz konsantrasyonundan düşük tuz konsantrasyonuna doğru tuz gradienti uygulandı. Alttan gelen yıkama ve elüsyon çözeltisi 1.5mL halinde tüplere toplandı. Yıkama ve elüsyon işlemi 280nm'deki absorbans sıfır oluncaya kadar devam edildi. 0.1M Tris-HCl pH:8.0 tamponu kör olarak kullanılarak her bir tüpte 280nm'de kalitatif protein tayini ve 412nm'de aktivite tayini yapıldı. Elde edilen değerlerin tüp numarasına karşı aktivite ve protein miktarı grafiği çizildi (Şekil 3.1).



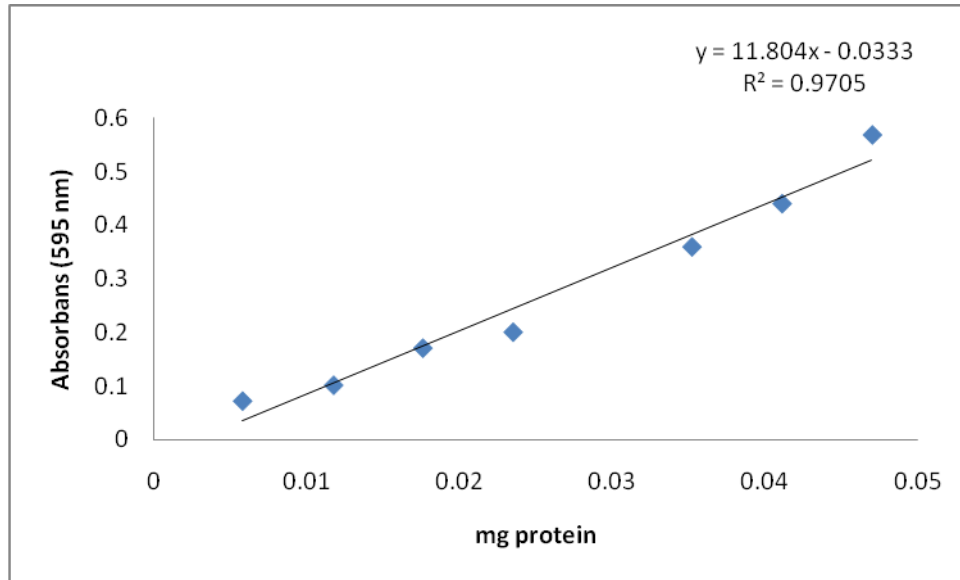
Şekil 3.1 Hidrofobik etkileşim kolonundan PON enziminin elüsyonu

Çizelge 3.1 Saflaştırma tablosu

Basamak	Hacim (ml)	Aktivite (U/ml)	Toplam Aktivite (U/ml)	Protein Miktarı (mg/ml)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	% Verim	Saflaştırma Derecesi
Serum	30	392.96	11788.8	1.14	34.2	344.701	100	-
Amonyum Sülfat Çöktürmesi	23	421.818	9701.81	0.2605	5.9915	1619.26	82.29	4.69
Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi	1.5	88.600	132.900	0.0069	0.01035	12840.6	1.127	7.93

### 3.1.3. Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri

Kantitatif protein tayininde bradford yöntemi kullanıldı. Standart grafik bölüm 2.2.3’de açıklandığı gibi hazırlandı. Serumdan elde edilen enzim çözeltisi ve saflaştırma basamakları sonundaki enzim çözeltilerinin protein miktarları bu standart grafiğe göre belirlendi. Standart çözeltideki µg proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 3.2’de gösterilmiştir.

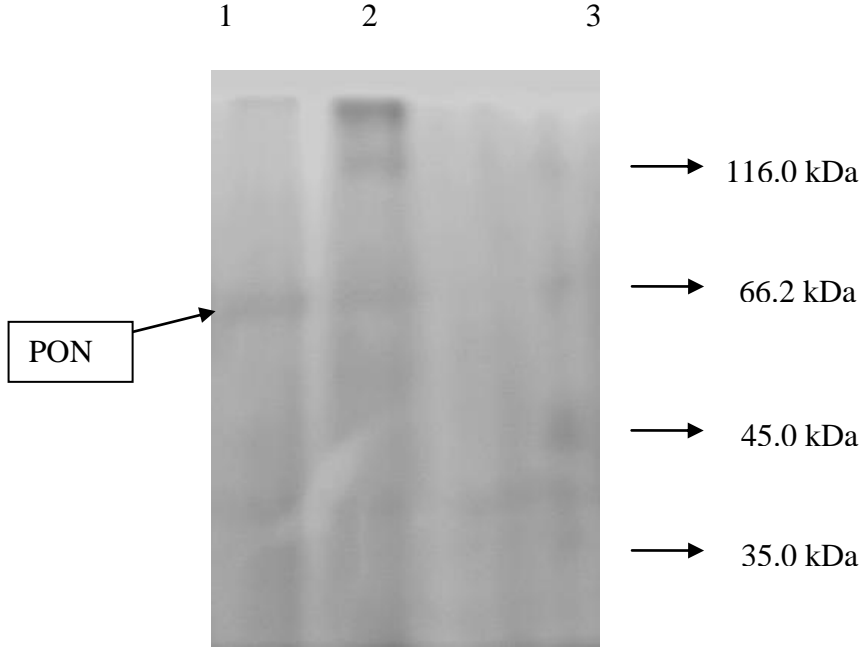


Şekil 3.2 Bradford yöntemi ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan standart grafik

### 3.2. Serum Paraoksonaz Enziminin SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Hidrofobik etkileşim kolonundan saflaştırılan serum paraoksonaz enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla bölüm 2.2.4.3’de anlatıldığı şekilde hazırlanan SDS poliakrilamid jel elektroforezine serumdan saflaştırılan paraoksonaz enzim numunesi

tatbik edildi. Protein bantları içeren jellerin görüntüleri jel görüntüleme sistemi ile bilgisayara aktarıldı (Şekil 3.3).

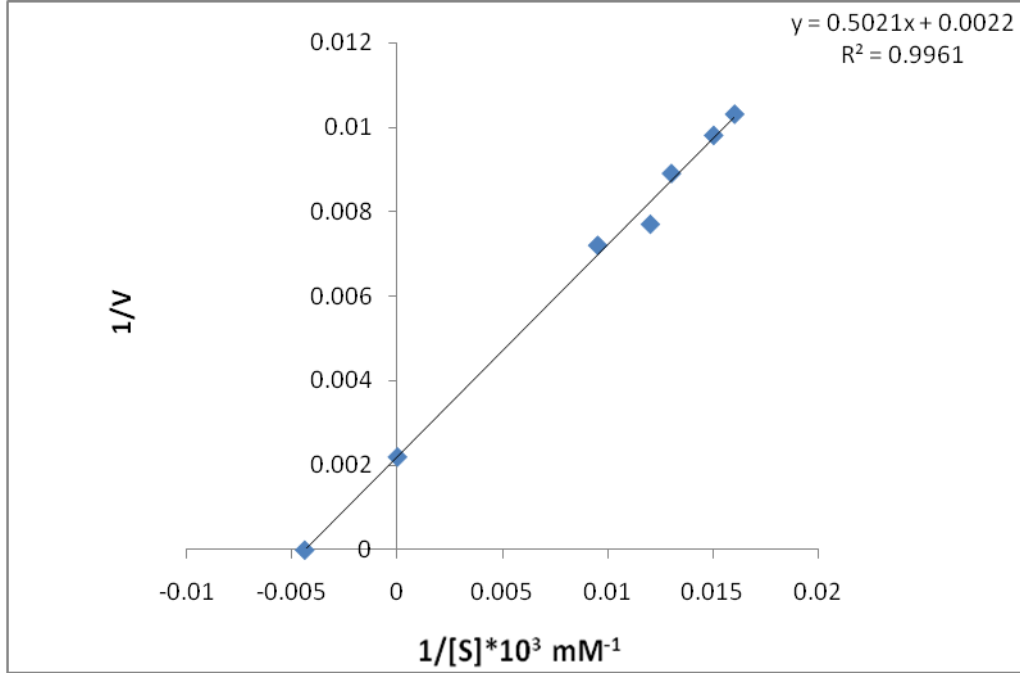


**Şekil 3.3** Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılan paraoksonaz enziminin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi. 1 ve 2 saflaştırılan PON, 3 marker.

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

$K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin bulunması amacıyla, optimum şartlarda paraoksan substratının değişen konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ölçümleri yapıldı. Her ölçüm iki defa yapılarak bulunan değerlerin ortalaması alındı. 412nm'de ölçülen aktivite değerleri reaksiyon hızı (U/ml dak) olarak alındı.  $1/V$  ve  $1/[S]$  değerleri bulunarak Lineweaver-Burk grafikleri çizildi (Şekil 3.4). Grafikten yararlanarak  $K_M$  değeri 0.227mM ve  $V_{max}$  değeri 454,545 U/ml dak olarak bulundu.





**Şekil 3.4** Saflaştırılmış *S. canicula* serum paraoksonaz enziminin paraoksan substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.

**Çizelge 3.2** *S. canicula* serum paraoksonaz enziminin paraoksan substratı kullanılarak,  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite,  $1/V$  ve  $1/[S]$

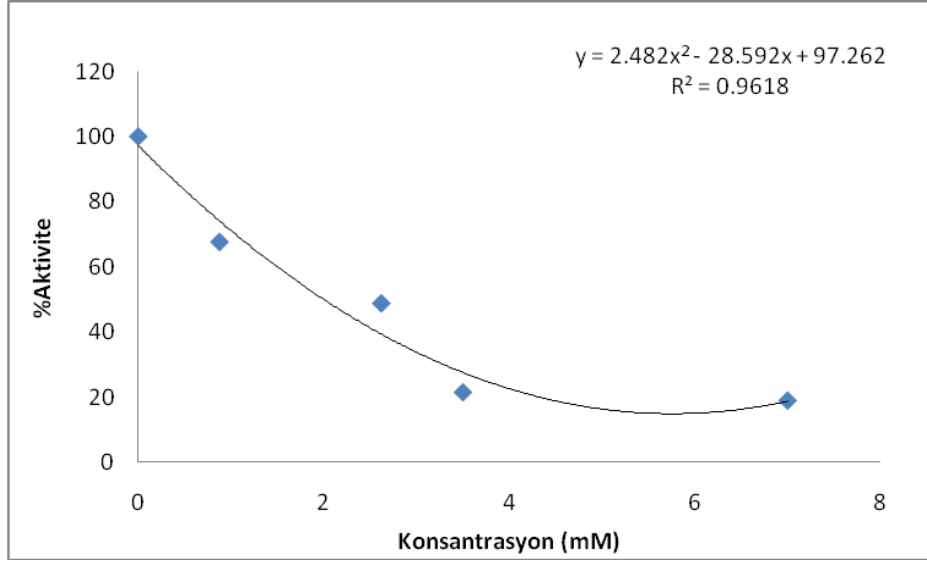
100mM Tris tamponu ( $\mu$ l)	Enzim Çözeltisinin Hacmi ( $\mu$ l)	Substrat çözeltisinin hacmi ( $\mu$ l)	Küvetteki toplam hacim. ( $\mu$ l)	Küvetteki Substrat Kons [S] (mM)	$\Delta$ OD (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	$1/V$	$1/[S] \times 10^3$
968	50	32	1050	0.06	0.078	96.643	0.0103	0.016
965		35		0.066	0.082	101.31	0.0098	0.015
960		40		0.07	0.092	11.878	0.0089	0.013
957		43		0.08	0.105	129.922	0.0077	0.012
945		55		0.1	0.112	138.641	0.0072	0.009

### **3.4. İnhibisyona Sebep Olan Ağır Metallerin IC<sub>50</sub> Değerlerinin Bulunması**

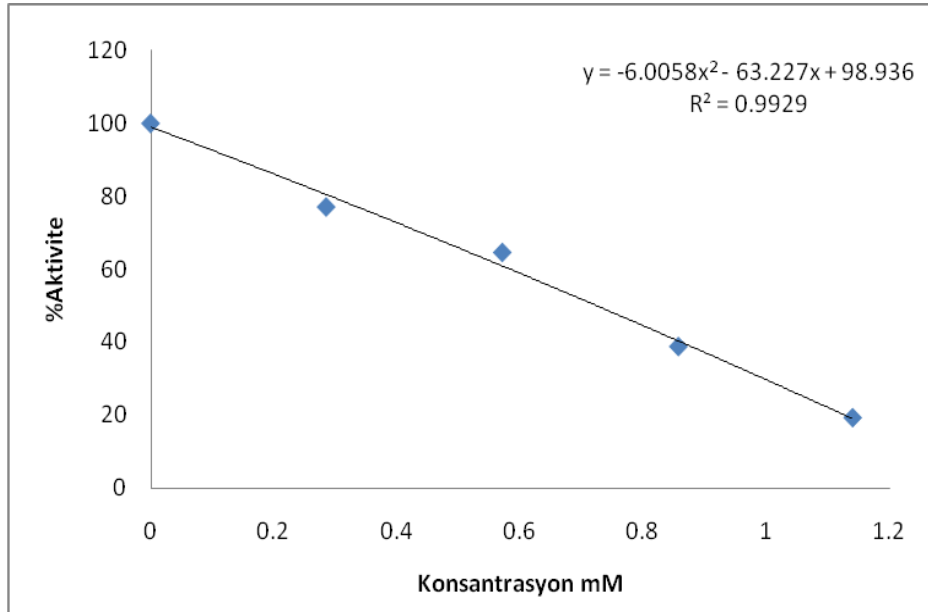
Bölüm 2’de anlatıldığı şekilde işlem yapıldı ve elde edilen absorbans değerlerinden % aktiviteler hesaplandı. % Aktivite –[I] grafikleri çizildi. (Şekil 3.5, 3.6, 3.7, 3.8). Bu grafiklerden yararlanarak her bir ağır metal için IC<sub>50</sub> değerleri hesaplandı. (Çizelge 3.5)

**Çizelge 3.3** Serum PON enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren  $\text{Ni}^{+2}$  ve  $\text{Cd}^{+2}$ , un  $\text{IC}_{50}$  değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, metal konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

100mM Tris tamponu ( $\mu\text{l}$ )	Ağır Metal	Enzim Çözeltisinin Hacmi ( $\mu\text{l}$ )	Substrat çözeltisinin hacmi ( $\mu\text{l}$ )	Metal Çözeltisinin Hacmi ( $\mu\text{l}$ )	Küvetteki Metal Kons. [I] (mM)	$\Delta\text{OD}$ (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite
850				-	-	0.2076	127.46	100
845				5	0.876	0.1405	86.267	67.68
835	Ni	100	100	15	2.62	0.1014	62.25	48.83
830				20	3.5	0.0448	27.50	21.57
810				40	7	0.0395	24.25	19.02
850				-	-	0.1409	86.51	100
840				10	0.285	0.1086	66.68	77.07
830	Cd	100	100	20	0.571	0.091	55.87	64.58
820				30	0.857	0.0546	33.52	38.75
810				40	1.14	0.0271	16.63	19.23



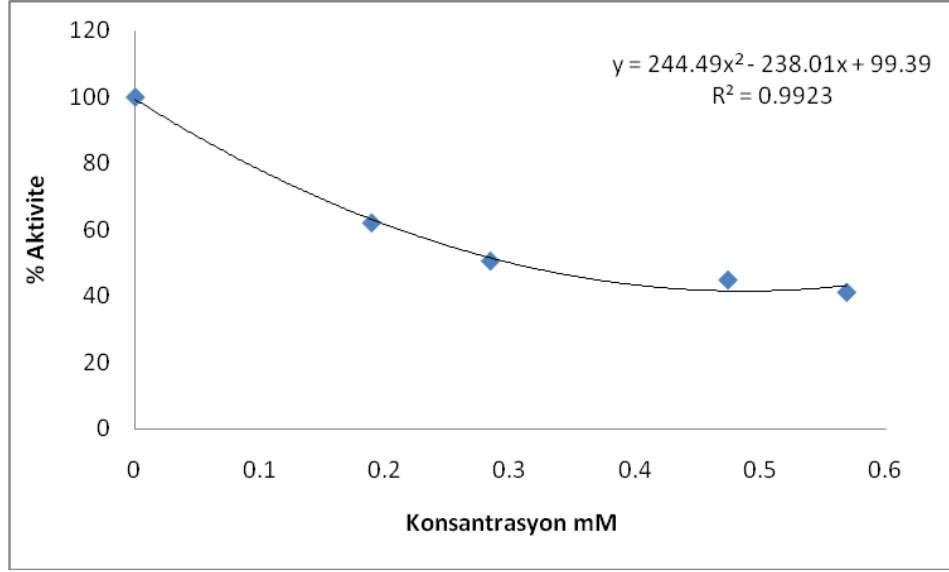
**Şekil 3.5** Saflaştırılmış *S. canicula* serum paraoksonaz enzimi üzerine 2mM paraoksan substratı konsantrasyonunda Ni<sup>+2</sup> için % aktivite-[I] grafiği



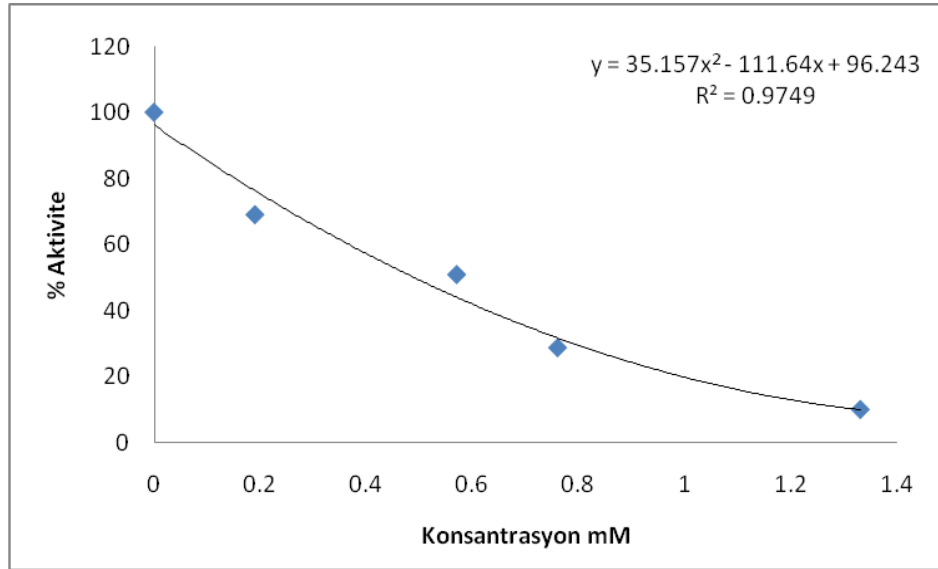
**Şekil 3.6** Saflaştırılmış *S. canicula* serum paraoksonaz enzimi üzerine 2mM paraoksan substratı konsantrasyonunda Cd<sup>+2</sup> için % aktivite-[I] grafiği

**Çizelge 3.4** Serum PON enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren  $\text{Cu}^{+2}$  ve  $\text{Hg}^{+2}$  nın  $\text{IC}_{50}$  değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, metal konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

100mM Tris tamponu ( $\mu\text{l}$ )	Ağır Metal	Enzim Çözeltisinin Hacmi ( $\mu\text{l}$ )	Substrat çözeltisinin hacmi ( $\mu\text{l}$ )	Metal Çözeltisinin Hacmi ( $\mu\text{l}$ )	Küvetteki Metal Kons. [I] (mM)	$\Delta\text{OD}$ (412 nm)	Aktivite (U/ml dak)	% Aktivite
850				-	-	0.1028	63.11	100
830				20	0.189	0.0638	39.17	62.08
820	Cu	100	100	30	0.284	0.052	31.92	50.59
800				50	0.474	0.0461	28.30	44.85
790				60	0.569	0.0428	26.27	41.14
850				-	-	0.1894	116.29	100
840				10	0.19	0.1306	80.188	68.95
820	Hg	100	100	30	0.57	0.0962	59.066	50.79
810				40	0.76	0.0542	33.278	28.61
780				70	1.33	0.0187	11.481	9.87



**Şekil 3.7** Saflaştırılmış *S. canicula* serum paraoksonaz enzimi üzerine 2mM paraoksan substratı konsantrasyonunda  $\text{Cu}^{+2}$  için % aktivite-[I] grafiği



**Şekil 3.8** Saflaştırılmış *S. canicula* serum paraoksonaz enzimi üzerine 2mM paraoksan substratı konsantrasyonunda  $\text{Hg}^{+2}$  için % aktivite-[I] grafiği

**Çizelge 3.5** Ağır metallerin PON enzimi üzerindeki IC<sub>50</sub> değerleri

<b>Ağır Metaller</b>	<b>IC<sub>50</sub> Değerleri (mM)</b>
Ni <sup>+2</sup>	2.00
Cd <sup>+2</sup>	0.73
Hg <sup>+2</sup>	0.49
Cu <sup>+2</sup>	0.29



#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada detoksifikasyon, antioksidan ve antibakteriyel aktivitelere sahip PON enzimi Edremit Körfezi'nde bulunan *S. canicula*' dan hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Saf enzimin bazı kinetik ve elektroforetik özellikleri incelenmiştir. Ayrıca  $Ni^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Hg^{+2}$  ve  $Cu^{+2}$  tuzlarının bu enzim üzerindeki etkileri saptanmıştır.

PON enziminin, detoksifikasyon aktivitesi ile birçok zehirli bileşikler hidroliz ederek çevresel faktörlerden kaynaklanan bazı kanser türlerine karşı etkili olduğu bulunmuştur [1-2]. Ayrıca antioksidan aktivitesi ile LDL'nin oksidasyonunu önleyerek arteroskleroz sürecini geciktirdiği bilinen bir gerçektir. Tüm bunların dışında antibakteriyel aktivitesi ile bazı laktonları hidroliz ederek, bakterilerin iletişimini bozduğu belirlenmiştir. PON enziminin fizyolojik öneminin organizma için bu denli vazgeçilmez olması, söz konusu enzimin farklı kaynaklardan saflaştırılarak detaylıca incelenmesine sebep olmuştur [Koyun, fare, insan, tavşan]. Ancak *S. canicula* türünden saflaştırılan PON enziminin aktivitesi hakkında literatürde hiçbir bilgiye rastlanmamıştır.

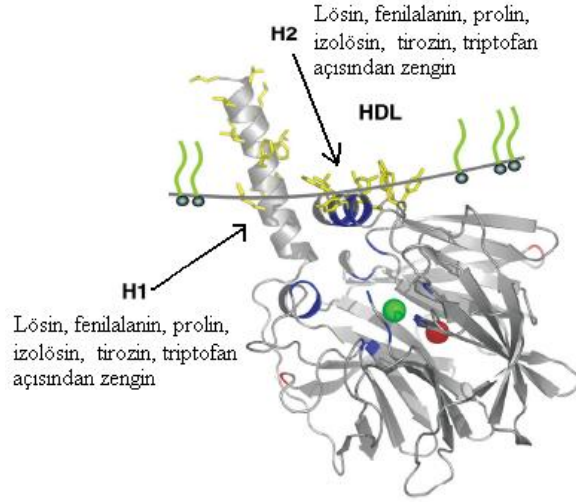
Araştırmamızda materyal olarak kullanılan *S.canicula* Edremit Körfezi'nde sıkça rastlanan ve Türkiye'deki köpekbalıkları arasında en çok çalışılan tür olduğu bilinmektedir [60]. Ortalama 44-47 cm boyunda ve 300 g ağırlığında bulunan bu türün vücutlarının büyük bir bölümünü karaciğerleri oluşturmaktadır. Aynı zamanda söz konusu balıkların kansere karşı dirençli olması, kaynak olarak seçilmesinin en temel nedenidir. Çünkü daha önce belirtildiği gibi PON enzimi karaciğerde sentezlenmekte ve organizmayı kansere karşı belirli oranda korumaktadır. Bu nedenle *S. canicula* 'dan saflaştırılan PON enziminin özelliklerinin ortaya çıkarılması ve diğer türlerle karşılaştırılmasının önemli olacağı düşüncesindeyiz.

Çalışmada enzimin saflaştırılması için öncelikle serum numunelerine ön saflaştırma yöntemi olarak amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı ve elde edilen numuneler için hidrofobik etkileşim kromatografisi tekniği kullanıldı. Amonyum sülfat çöktürmesi uzun zamandan beri çeşitli bilim adamları tarafından kullanılan kısmi saflaştırma metodudur. Bu metod vasıtasıyla numune içerisindeki birçok safsızlık elimine edilir ve proteinler daha derişik halde elde edilir. Kromatografik işlemlerden önce amonyum sülfat çöktürmesi işleminin yapılması, enzimin derişikleştirilmesi açısından da büyük bir öneme sahiptir.

Paraokson substratı kullanılarak PON enziminin amonyum sülfat çöktürme aralığı %60-80 bulunmuştur [74]. Ve seruma %60-80 aralığında amonyum sülfat çöktürmesi yapılarak birçok safsızlık uzaklaştırıldı ve enzim derişikleştirilmiş oldu.

Detoksifikasyon ve antioksidan aktivitesi ile metabolizmada önemli fizyolojik fonksiyona sahip PON enziminin hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılması için Sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin kimyasal yapısına sahip jel kullanılmıştır [74].

PON enziminin hidrofobik karakteri bu tekniğin seçilmesinde en önemli sebeplerden birisi olmuştur. Söz konusu enzim, N terminal bölgesinde bulunan H1 ve H2 heliks yapısı olarak isimlendirilen hidrofobik yapılar ile HDL'ye bağlanmaktadır (Şekil 4.1) [29, 76, 77]. N-terminal bölgesini lösin, fenil alanin, prolin, isolösin, tirozin, triptofan ve valin gibi aminoasitleri ihtiva eden 7-18 residüler arası H1 hidrofobik ucu, 185-202 residüler arası da H2 hidrofobik ucu oluşturmaktadır. Ayrıca PON'un hidrofobik yüzeyi ile HDL arasında triptofan, tirozin ve lizin aminoasitlerince zengin aromatik ve kısmen hidrofilik bölge bulunmaktadır [29, 78].



**Şekil. 4.1.** PON enziminin HDL yüzeyine bağlanma modeli [29]

Bu kromatografinin temel prensibi, yüksek tuz konsantrasyonunda saflaştırılacak biyomolekülde bulunan hidrofobik yüzey ile apolar ligand arasındaki hidrofobik etkileşmedir. Bu etkileşmenin gerekçesi artan entropi ile açıklanmaktadır. Bu teknikte ligand ve matriks yapısının son derece önemli olduğu bildirilmektedir [79]. Kullanılacak ligandın hidrofobik karakteri kritik bir öneme sahiptir. Düşük hidrofobik karaktere sahip ligandlar kullanıldığı zaman ayrılacak moleküllerin kolon da etkileşimini sağlayabilmek için yüksek tuz konsantrasyonu uygulama zorunluluğu vardır. Bu durumda proteinlerin kendi aralarında hidrofobik etkileşim riski daha fazladır. Yüksek hidrofobik karaktere sahip ligand tercih edildiği durumda ise saflaştırılacak molekül ile ligand arasındaki etkileşim artacağı için elüsyon sırasında problemler ortaya çıkabilir [79]. Genellikle ticari olarak bulunan hidrofobik etkileşim kromatografi jellerinde hidrofobik uç olarak düz zincirli alkil ligandları ve aril ligandları gibi moleküller kullanılmaktadır [80]. Bunlardan isopropil, butil, oktil ve fenil bileşikleri en çok tercih edilen ligandlardır. En popüler hidrofobik etkileşim jelinin fenil-sepharose olduğu literatürde görülmektedir [81]. Düz zincirli alkil ligandları saf hidrofobik karakter gösterirlerken, aril ligandlarında hem hidrofobik hem de aromatik etkileşimler gözlenir. Bu amaçla çalışmamızda ligand olarak 1-naftilamin bileşiği kullanılmıştır. PON enziminin H1 ve H2 bölgelerinde fenil alanin,

tirozin, triptofan gibi aromatik rezidülerin bulunması tarafımızdan seçilen ligandın ve immobilizasyon için kullanılan L-tirozinin söz konusu bölgelerle hem hidrofobik hem de aromatik etkileşim yapacağı göz önüne alınarak, oldukça uygun bileşik olduğu kanaatindeyiz [74].

Bu yöntemle *S. canicula* serumundan PON enzimi 7.93 kat saflaştırılmıştır. Furlong ve arkadaşları 4 basamaktan oluşan agarose blue, sephadex G-200, DEAE Trisakril M ve Sephadex G-75 yöntemlerini kullanarak tarafımızdan gözlenen saflaştırma katsayısından daha yüksek bir değer (62.1) elde etmişlerdir [10]. Ancak bir başka çalışmada sadece üç basamaktan oluşan blue agaroz, DEAE I ve DEAE II yöntemlerini kullanarak yaklaşık 600 kat saflaştırma derecesine ulaşmışlardır. Bu çalışmada ayrıca üç basamakta PON1 enziminin Q ve R polimorfik formları ayrı ayrı saflaştırılmıştır [82].

Enzim saflığını kontrol etmek için SDS-PAGE uygulanmıştır. Molekül ağırlığı yaklaşık 66 kDa olarak tahmin edilen PON enzimi tek bant olarak SDS-PAGE jelinde gözlenmiştir. Bu değerın literatürden farklı olduğu bulunmuştur. PON'un minimum molekül ağırlığını Gan ve arkadaşları 43kDa olarak belirlemişlerdir [82]. Çünkü enzimin yapısında, toplam molekül ağırlığının %15.8'i kadar karbonhidrat molekülü bulunmaktadır. Molekül ağırlığı taşıdığı karbohidrat zincirinin varlığına bağlı olarak değişmektedir [10]. İçerdiği bu karbonhidrat zinciri enzimin hidrolizleme reaksiyonu için gerekli değildir. Söz konusu molekülün PON'un çözünürlüğünü ve kararlılığını arttırmada ve zar yapısına bağlanmada görevi olduğu düşünülmektedir [83, 84]. Karbohidrat içermeyen PON enziminin molekül ağırlığı 37 kDa'dur [10]. Ayrıca PON serumda HDL'ye bağlı olduğu bölgelerin yakınında bulunan proteinler (Apo A1) ile bir arada da saflaştırılabilmektedir. Bu durumda molekül ağırlığı 47-54kDa olduğu rapor edilmiştir [85]. PON enziminin molekül ağırlığı türden türe değişmemekte ve insan PON enziminin molekül ağırlığı ile tavşan, sıçan ve koyunun PON enziminin molekül ağırlığı benzerlik göstermektedir [10-25].

Paraoksonaz enziminin aktivitesi Gan ve arkadaşlarının uyguladığı yöntem kullanılarak belirlenmiştir [86]. Bu amaçla literatür de Gil ve arkadaşlarının

uyguladığı yöntem de bilinmektedir. Her iki yöntem paraoksonun hidrolizi ile açığa çıkan 4-nitrofenolün 37 °C’ de, 412 nm’ de absorbans ölçümüne dayanmaktadır, ünite paraoksonaz, dakikada meydana gelen 4-nitrofenolün nmol’ ü olarak tayin edilmektedir [74].

Sepharose-4B-L-tirozin-1-Naftilamin yapıları jel kullanılarak saflaştırılan *S. canicula* serum paraoksonaz enziminin kinetik sabitleri ( $K_M$  ve  $V_{max}$ ) optimum pH ve sıcaklıkta [87] paraokson substratı kullanılarak belirlenmiştir. Lineweaver-Burk grafiklerinden elde edilen  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri sırasıyla 0.227mM ve 454.545 U/ml’de bulunmuştur. Literatürde farklı kaynaklardan elde edilen PON1 enzimlerinin paraokson substratı için farklı  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri bildirilmektedir. İnsan serum PON enziminin paraokson substratının  $K_M$  değeri 3.8 mM [88] ve 2.5 mM [41] olarak verilmiştir. Sıçanlarda  $K_M$  değeri 1.690 mM ve 7.5mM arasında değişmektedir [89, 90]. İnsan serum PON1 enziminin paraokson substratına karşı  $V_{max}$  değeri olarak 47.64 [91] ve 233.7 dir [92]. Bu değerlerden anlaşıldığı gibi ScPON için bulunan  $K_M$  değeri, literatürdeki değerlere göre oldukça düşüktür. Bu durum ScPON enziminin organofosfatlara karşı ilgisinin yüksek olduğunu göstermektedir. Başka bir ifadeyle; söz konusu enzim, organofosfatların çok düşük konsantrasyonlarında bile hidroliz kabiliyetine sahiptir. Ayrıca ScPON enziminin katalitik gücünü ortaya koyan  $V_{max}$  değeri de diğer türlere göre yüksek olması sebebi ile dikkat çekmektedir. Bu bulgulara göre söz konusu enzim immobilize edilerek detoksifikasyon amacı ile kullanılabilir. Ancak enzimin, çözelti ortamında aktivitesini kısa sürede kaybetmesi önemli dezavantaj olarak söylenebilir.

Çalışmamızda *S. canicula* serum PON enzimi üzerinde etkilerini araştırmak amacıyla dört farklı tuz kullanılmıştır. Genel olarak kimyasal maddelerin enzimler üzerindeki inhibisyon etkileri  $IC_{50}$  (enzimin aktivitesini %50 inhibe eden kimyasal konsantrasyonu) değeri olarak verilmektedir. Kinetik çalışmalar sırasında enzim aktivitesi inhibe eden metal iyonlarının  $IC_{50}$  değerleri de belirtilmiştir. ScPON enzimine karşı  $Cd^{+2}$ ,  $Hg^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$  ve  $Ni^{+2}$  için  $IC_{50}$  değerleri 0.73, 0.49, 0.29 ve 2.00 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre  $Cu^{+2}$  en güçlü inhibitör iken  $Ni^{+2}$  ‘nin en zayıf inhibitör olduğu saptanmıştır. Farklı metal iyonlarının  $IC_{50}$  değerlerini bulmak

için optimum şartlarda paraoksan substratının 2mM sabit konsantrasyonunda çalışıldı. Elde edilen sonuçlar şekil 3.5-3.8 ve çizelge 3.2-3.4' de verildi.

Bu sonuçlar literatürde insan serum paraoksonaz enzimi ile sıralama olarak aynı olmasına karşı IC<sub>50</sub> değerleri daha yüksektir. Bu durum ScPON enziminin ağır metallere karşı insan PON enzimine göre daha dirençli olduğunu göstermektedir [93].

A. Pla ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada rat karaciğerinde saflaştırılmış PON1 ve PON3 üzerine bazı metal iyonlarının inhibisyon etkisi incelenmiştir. Yapılan bu çalışmada Co<sup>+2</sup>, Cu<sup>+2</sup>, Mn<sup>+2</sup> ve Hg<sup>+2</sup> 'nın inhibisyon tipleri tespit edilmiş olup PON1 için Hg'nin PON3 için Cu'nun en kuvvetli inhibitör olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu inhibitörlere karşı duyarlılık açısından PON1 ve PON3 'ün kantitatif ve kalitatif farklar gösterdiği bulunmuştur. Saflaştırılan PON1 için, inhibisyon gücü kuvvetliden zayıfa doğru sıralandığında Hg<sup>+2</sup>>Co<sup>+2</sup>>Mn<sup>+2</sup>>Cu<sup>+2</sup> olarak hesaplanmıştır [94].

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

1. *S. canicula* serum PON enzimi Sepharose 4BL-tirozin 1-naftilamin kimyasal yapısına sahip jel kullanılarak saflaştırılmıştır.
2. Amonyum sülfat çöktürmesi ve hidrofobik etkileşim kromatografisi yöntemi ile saflaştırılan *S. canicula* serum PON enzimi için SDS-PAGE elektroforezinde tek bant elde edilmiştir.
3. *S. canicula* serumundan saflaştırılan PON enzimi üzerine bazı metal iyonlarının inhibisyon etkileri incelenmiştir. Bu amaçla Ni<sup>+2</sup>, Cd<sup>+2</sup>, Cu<sup>+2</sup> ve Hg<sup>+2</sup> metal iyonları ile çalışılmıştır. Çalışılan metal tuzlarının tamamının farklı düzeyde ScPON enzimini inhibe ettiği saptanmıştır.
4. ScPON enziminin katalitik etkinliğinin çok yüksek ve metal iyonlarına karşı daha dirençli olduğu bulunmuştur.

5. Bu enzim immobilize edildiğinde detoksifikasyon için kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

## 5. KAYNAKLAR

- [1] Costa, L.G., Li, W.F., Richter, R.J., Shih, D.M., Lusic, A. and Furlong, C.E., "The role of paraoxonase (PON 1) in the detoxication of organophosphates and its human polymorphism", *Chem. Biol. Interact.*, (1999) **119-120**, 429.
- [2] La Du, B.N., Aviram, M., Billecke, S., Navab, M., Primo-Parmo, S., Sorenson, R.C. and Standiford, T.J., "On the physiological role(s) of the paraoxonases", *Chemico-Biological Interaction*, (1999) **119-120**, 379.
- [3] Aviram, M., Rosenblat, M. and Billecke, S., "Human serum paraoxonase (PON1) is inactivated by oxidised low density lipoprotein and preserved by antioxidants", *Free Radicals Biol. Med.*, (1999) **26**, 892.
- [4] Mackness, M.I., Arrol, S., Abbott, C. and Durrington, P.N., "Protection of low density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase", *Atherosclerosis*, (1993) **104**, 129.
- [5] Mackness, M.I., Arrol, S. and Durrington, P.N., "Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low density lipoprotein", *FEBS Lett.*, (1991) **286**, 152.
- [6] Graham, A., David, G.H., Rafique, S. and Owen, J.S., "Evidence for a paraoxonase- independent inhibition of low density lipoprotein oxidation by high-density lipoprotein", *Atherosclerosis*, (1997) **135**, 193.
- [7] Erden İ., 2004, ST Elevasonlu Miyokard İnfarktöslü (stemi) hastalarda insane paraoxonaze geni met-leu/55 polimorfizmi, Uzmanlık Tezi Dr. Siyami Ersek Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Merkezi, 70s
- [8] Aldridge, W.N., "Serum esterases I: two types of esterases (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate propionate and butyrate and a method their determination", *Biochem J.*, (1953a) **53**, 110.
- [9] Aldridge, W.N., "Serum esterases II: an enzyme hydrolyzing diethyl p-nitrophenyl phosphate (E600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera", *Biochem. J.*, (1953b) **53**, 117.
- [10] Furlong, C.E., Richter, R.J., Chapline, C. and Crabb, J.W., "Purification of Rabbit and Human Serum Paraoxonase", *Biochemistry*, (1991) **30**, 10133.



- [11] Rodrigo, L., Gil, F., Hernandez, A.F. and Pla, A., "Identification of two rat liver proteins with paraoxonase activity: biochemical evidence for the identity of paraoxonase and arylesterase", *Chem. Biol. Interact.*, (1999) **263**, 119-120,.
- [12] Bastos, C., Rossini, A., Alves, M.V., Ceccarelli, P.S., Lima, J.A.F. and Bastos, J.C., "Paraoxonase activity in sera from *Piaractus mesopotamicus* holmberg (Characidae) and *Hypostomus punctatus* valenciennes (Siluridae)", *Revta bras. Zool.*, (1998) **15(3)**, 665.
- [13] Keizer, J., D'Agostina, G. and Vittozi, L., "The importance of biotransformation in the toxicity of xenobiotics to fish. I. Toxicity and bioaccumulation ox diazinon in guppy (*Poecilia reticulata*) and zebra fish (*Brachydanio rerio*)", *Aquatic toxic.*, (1991) **21**, 239.
- [14] Primo-Parmo, S.L., Sorenson, R.S., Teiber, J. and La Du, B.N., "The human serum paraoxonase/arylesterase gen (PON1) is one member of a multigene family", *Genomics*, (1996) **33**, 498.
- [15] Draganov, D.I. and La Du, B.N., "Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review", *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, (2004) **369**, 78.
- [16] Chemnitz, J.M., Losch, H., Losch, K. and Zech, R., "Organophosphate detoxicating hydrolases in different vertebrate species", *Comp. Biochem. Physiol.*, (1983) **76C**, 85.
- [17] Mackness, M.I., "Commentary. 'A' esterases, Enzymes looking for a role?", *Biochem Pharmacol*, (1989a) **38**, 385.
- [18] Mackness, M.I., (1989b) Possible medical significance of human serum 'A' esterases In: Reiner, E., Aldridge, W.N., Hoskin, F.C.G., Enzymes hydrolyzing organophosphorus compounds. Ellis Horwood, Chichester, 202-213.
- [19] Mackness, M.I., Mackness, B., Arrol, S., Wood, G., Bhatnagar, D. and Durrington, P.N., "Presence of paraoxonase in human interstitial fluid", *Febs Letter*, (1997) **416**, 377.
- [20] Hassett, C., Richter, R.J., Humbert, R., Chapline, C., Crabb, J.W., Omiecinski, C.J. and Furlong, C.E., "Characterization of cDNA clones encoding rabbit and human serum paraoxonase: the mature protein retains its signal sequence", *Biochemistry*, (1991) **30**, 10141.
- [21] La Du, B.N., "Structural and functional diversity of paraoxonases", *Nat. Med.*, (1996) **2**, 1186.
- [22] Klimov, A.N., Gurevich, V.S., Nikiforova, A.A., Shatilina, L.V., Kuzmin,

- A.A., Plavinsky, S.L. and Teryukova, N.P., "Antioxidative activity of high-density lipoproteins in vivo", *Atherosclerosis*, (1993) **100**, 13.
- [23] Rosenblat, M., Draganov, D., Watson, C.E., Bisgaier, C.L., La Du, B.N. and Aviram, M., "Mouse macrophage paraoxonase 2 activity is increased whereas cellular paraoxonase 3 activity is decreased under oxidative stress", *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.*, (2003) **23**, 468.
- [24] Mochizuki, H., Scherer, S.W., Xi, T., Nickle, D.C., Majer, M., Huizenga, J.J., Tsui, L.C. and Prochazka, M., "Human PON2 gene at 7q21.3: cloning, multiple mRNA forms, and missense polymorphisms in the coding sequence", *Gene*, (1998) **213**, 149.
- [25] Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du B.N., 1996, The human serum paraoxonase/atherosclerosis arylesterase gene (PON1) is one member of multigene family, *Genomics*, 33, 498-509
- [26] Mackness, M.I., Mackness, B., Durrington, P.N., Connelly, P.W., Hegele, R.A., 1996, Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins, *Curr Opin Lipidol*, 7, 69-76.
- [27] Augustinsson, K.B., Homologous enzymes and biochemical evolution, (eds) In: Van Thoai N., Roche J., Gordon and Breach, New York, (1968), 299.
- [28] Jawad, Z. and Paoli, M., "Novel sequences propel familiar folds", *Structure (Camb)*, (2002) **10(4)**, 447. Review.
- [29] Harel, M., Aharoni, A., Gaidukov, L., Brumshtein, B., Khersonsky, O., Meged, R., Dvir, H., Ravelli, R.B.G., McCarthy, A., Toker, L., Silman, I., Sussman, J.L. and Dan S. Tawfik, "Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes", *Nature Struct. Mol. Biol.* (2004) **11**, 412.
- [30] Kuo, C.L. and La Du, B.N., "Calcium binding by human and rabbit serum paraoxonases. Structural stability and enzymatic activity", *Drug Metab. Dispos.*, (1998) **26**, 653.
- [31] Rousselot, D.B., Therond, P., Beaudeau, J.L., Peynet, J., Legrant, A., Delatre, J., 1999, High density lipoproteins and the oxidative hypothesis of atherosclerosis, *Clin. Chem. Lab. Med.*, 37, 939-949.
- [32] Lusis, A.J., "Atherosclerosis", *Nature*, (2000) **407**, 233.
- [33] Mackness, B., Davies, G.K., Turkei, W., Lee, E., Roberts, D.H., Hill, E., Roberts, C., Durrington, P.N. and Mackness, M.I., "Paraoxonase Status in Coronary Heart Disease", *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* (2001) **21**, 1451.
- [34] Billecke, S., Draganov, D., Cuncell, R., Stetson, P., Watson, C., Hsu, C.

- and La Du, B.N., "Human serum paraoxonase (PON1) isozymes Q and R hydrolyse lactones and cyclic carbonate esters", *Drug Metab. Dispos.*, (2000) **28(11)**, 1335
- [35] Biggadike, K., Angell, R.M., Burgess, C.M., Farrell, R.M., Hancock, A.P., Harker, A.J., Irving, W.R., Ioannou, C., Panayiotis, A., Procopiou, P.A., Shaw, R.E., Solanke, Y.E., Singh, O.M.P., Snowden, M.A., Stubbs, R.J., Walton, S. and Weston, H.E., "Selective plasma hydrolysis of glucocorticoid  $\gamma$ -lactones and cyclic carbonates by the enzyme paraoxonase: An ideal plasma inactivation mechanism", *J. Med. Chem.* (2000) **43**, 19.
- [36] Teiber, J.F., Draganov, D.I., La Du, B.N., "Lactonase and Lactonizing of Human Serum Paraoxonase (PON1) and Rabbit Serum PON3", *Biochemical Pharmacology*, (2003) **66**, 887.
- [37] La Du, B.N., Human serum paraoxonase/arylesterase, In *Pharmacogenetics of Drug Metabolism*, ed. Kalow, W., Pergamon Pres, New York, (1992), p.51.
- [38] Costa, L.G., Li, W.F., Richter, R.J., "PON1 and organophosphate toxicity", pp. (2002) 165–83
- [39] Broomfield, C.A. and Ford, K.W., "Hydrolysis of nerve gasses by plasma enzymes", *Proceedings of the 3rd International Meeting on Cholinesterases, La Grande-Motte, France*, (1991), 167.
- [40] Davies, H.G., Richter, R.J., Keifer, M., Broomfield, C.A., Sowalla, J. and Furlong, C.E., "The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin", *Nature Genetics*, (1996) **14**, 334.
- [41] Reiner, E., Aldridge, W.N., Hoskin, F.C.G., *Enzymes Hydrolyzing Organophosphorus Compounds*, John Wiley & Sons, New York, (1989).
- [42] Baillie, T.A., Moldeus, P., Mason, R.P. Younes, M., *Enzymes Interacting with Organophosphorus Compounds*, Elsevier Scientific Publishers Ireland Ltd, Shannon, (1993).
- [43] JAMES, S.P.D.a.R.W., Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase 1. *Clinical Science*, 2004. 107: p. 435-447.
- [44] Costa, L.G., Cole, T.B., Jarvik, G.P. and Furlong, E.F., "Functional Genomics of the Paraoxonase (PON1) Polymorphisms: Effects on Pesticide Sensitivity, Cardiovascular Disease, and Drug Metabolism", *Annu. Rev. Med.*, (2003) **54**, 371.
- [45] Forte, T.M., Subbanagounder, G., Berliner, J.A., "Altered activities of anti-

- atherogenic enzymes LCAT, paraoxonase, and platelet-activating factor acetylhydrolase in atherosclerosis-susceptible mice”, *J. Lipid Res.*, (2002) **43**, 477.
- [46] Hedrick, C.C., Kholood, H. and Hough, G.P., “Short term feeding of atherogenic diet to mice results in reduction of HDL and paraoxonase that may be mediated by an immune response”, *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.*, (2000) **20**, 1946.
- [47] Mackness, M.I., Harty, D., Bhatnagar, D., Winocour, P.H., Arrol, S., Ishola, M. and Durrington, P.N., “Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolaemia and insulin-dependent diabetes mellitus”, *Atherosclerosis.*, (1991) **86**, 193.
- [48] Hegele, R.A., “Paraoxonase genes and disease”, *Ann. Med.*, (1999) **31**, 217.
- [49] Heinecke, J.W. and Lusis, A.J., “Paraoxonase-gene polymorphisms associated with coronary heart disease: support for the oxidative damage hypothesis?”, (Letter) *Am. J. Hum. Genet.*, (1998) **62**, 20.
- [50] Durrington, P.N., Mackness, B. and Mackness, M.I., “Paraoxonase and atherosclerosis”, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, (2001) **21**, 473.
- [51] Brophy, V.H., Jarvik, G.P., Furlong, C.E., PON1 polymorphisms. In: Costa LG, Furlong CE (eds) *Paraoxonase (PON1) in health and disease*. Kluwer, Norwell, (2002) pp 53–78.
- [52] McElveen, J., Mackness, M.I., Colley, C.M., Peard, T., Warner, S. and Walker, C.H., “Distribution of paraoxon hydrolytic activity in the serum of patients after myocardial infarction”, *Clin. Chem.*, (1986) **32(4)**, 671.
- [53] Ayub, A., Mackness, M.I., Arrol, S., Mackness, B., Patel, J. and Durrington, P.N., “Serum Paraoxonase After Myocardial Infarction”, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, (1999) **19**, 330.
- [54] 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.
- [55] Sozmen, B., Delen, Y., Girgin, F.K. and Sozmen, E.Y., “Catalase and paraoxonase in hypertensive type 2 diabetes mellitus: correlation with glycemic control”, *Clin. Biochem.*, (1999) **32(6)**, 423.
- [56] Valabhji, J., Mccoll, A.I., Schachter, M., Dhanjil, S., Richmond, W., and Elkeles, R.S., “High-density lipoprotein composition and paraoxonase activity in Type I diabetes”, *Clinical Science*, (2001) **101**, 659.
- [57] Artuz, M.İ., Korkmaz, K., Ege Denizi Balıkçılık Alanları ve Su Ürünleri Üretiminin Etüdü. İ.U. Fen Fak. Hidrobiyoloji Araştırma Enstitüsü

- Yayınları., 1976 **19**: p. 1-47
- [58] Kocataş, A., Bilecik, N., Ege Denizi Canlı Kaynakları. T.C. Tarım Ve Orman Bakanlığı Su Ürünleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Bodrum, 1992. Seri A(7): p. 7-42.
- [59] Whitehead, P.J.P., Bauchot, M.L., Hureau, J.C., Nielsen, J. And Tortonese E., Fishes of the North- eastern Atlantic and Mediterranean, Paris, UNESCO. 1986 **I**: p. 517-1007
- [60] Yarmaz, A., "Edremit Körfezi ve Civarında Yaşayan Kıkırdaklı Balıklar ve Bazı Türlerin Biyolojik Özellikleri" *Yüksek Lisans Tezi*, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı(2009).
- [61] Whitehead, P., J.P., Bauchot, M., L., Hureau, J., C., Nielsen, J., and Tortonese, E., Fishes of the North-eastern Atlantic and Mediterranean Unesco Paris, 1984 **1**: p. 72-214
- [62] Hureau, J., C., Monod, T., Check list of the Fishes of the North-Eastern Atlantic and Mediterranean (CLOFNAM I) Unesco, Paris, 1973: p. 436
- [63] Jardas, I., Morphological, Biological and Ecological Characteristic of the Lesser Spotted Dogfish, *Scyliorhinus canicula* (L., 1758), population in the Adriatic Sea. Report, 179. IV (2-3SPLIT):p. 104
- [64] Cihangir, B., Unluoğlu, A., ve Tıraşın, E., M., Kuzey Ege Denizi'nde Kedi balığı (*Chondrichthyes*, *Scyliorhinus canicula*, Linnaeus, 1758)'nın Dağılımı ve Bazı Biyolojik Özelliklerinin Akdeniz Balıkçılık Kongresi, 9-11 Nisan İzmir. 197 p. 585-603
- [65] Akşıray, F., Türkiye deniz balıkları tayin ahtarı [A key to marine fishes of Turkey] İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Hidrobiyoloji Araştırma Enstitüsü Yayınları, İstanbul, [in Turkish], 1954:p. 277
- [66] Topçu, S., 1998. Tarım Mühendisliğinde Çevre Sorunları. Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Genel Yayın No: 207 Ders Kitapları Yayın No: A-65. 269s
- [67] Çepel, N., 1997. Toprak Kirliliği Erozyon ve Çevreye Verdiği Zararlar. Türkiye Erozyonla Mücadele, Agaçlandırma ve Doğal Varlıkları Koruma Vakfı Yayın No: 14 3-35s.
- [68] Rai, U.N., Tripathi, R.D., Vajpayee, P., 2002. Bioaccumulation of Toxic Metals ( Cr, Cd, Pb and Cu) by Seeds of *Euryale Ferox* Salisb. (Makhana). *Chemosphere* 46: 267- 272.
- [69] Ceran, M., 2004. Kayseri \_l Çevre Durum Raporu S: 53-61.
- [70] Pandey, N., Sharma, C.P., 2002. Effect of Heavy Metals Co<sub>2</sub>, Ni<sub>2</sub> and Cd<sub>2</sub> on Growth and Metabolism of Cabbage. *Plant Science* 163: 753-758.

- [71] <http://www.sauforum.com/ekoloji-ders-notlari-toprak-kirliligi-t1783.html?t=1783>
- [72] [http://www.ebilge.com/10352/Civa\\_nadir?\\_Zararlari\\_nelerdir.html](http://www.ebilge.com/10352/Civa_nadir?_Zararlari_nelerdir.html)
- [73] Bradford M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, (1976), **72**, 248–251
- [74] Sinan, S., "İnsan Serum Paraoksonaz Enziminin Yeni Bir Yöntemle Saflaştırılması ve Bazı Antibiyotiklerin Enzim Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması *Doktora Tezi*, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı
- [75] Blatter-Garin, M.C., Kalix, B., De Pre, S. and James, R.W., "Aspirin use is associated with higher serum concentrations of the antioxidant enzyme, paraoxonase-1", *Diabetologia*, (2003) **46**, 593.
- [76] Sorenson, R.C., Bisgaier, C.L., Aviram, M., Hsu, C., Billecke, S. and La Du, B.N., "Human serum paraoxonase/arylesterase's retained hydrophobic N-terminal leader sequence associates with high density lipoproteins by binding phospholipids: apolipoprotein A-1 stabilizes activity", *Atheroscler Thromb Vasc Biol*, (1999) **19**, 2214.
- [77] Sorenson, RC., Aviram, M., Bisgaier, CL., Billecke, S., La Du BN., "Properties of the retained N-terminal hydrophobic leader sequence in human serum paraoxonase/arylesterase" *Chem. Biol. Interact.* (1999) **119-120**, 243-249.
- [78] Killian, J.A., Von Heijne, G., (2000), How proteins adapt to a membrane-water interface. *Trends Biochem. Sci.* 25, 429-434.
- [79] Robyt, JF., White, BJ., "Biochemical Techniques Theory and Practice", (1990), Waveland Pres, Inc.p:98.
- [80] <http://www.chromatography.amershambiosciences.com>
- [81] Jakoby, B., Wilchek, M., Coupling reaction of ligands and general methodology of affinity chromatography, in *Methods in Enzymology*, Academic Pres, New York, (1974).
- [82] Gan, K.N., Smolen, A., Eckerson, H.W., La Du, B.N., "Purification of human serum paraoxonase/arylesterase", *Drug Metab. Dispos.*, (1991) **19**, 100.
- [83] Aharoni, A., "Directed evolution of mammalian paraoxonases PON1 and PON3 for bacterial expression and catalytic specialization", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (2004) **101**, 482.

- [84] Josse, D., "Identification of residues essential for human paraoxonase (PON1) arylesterase/organophosphatase activities", *Biochemistry*, (1999) **38**, 2816.
- [85] Zimmerman, J.K., Grothusen, J.R., Bryson, P.K., Brown, T.M., Partial purification and characterization of paraoxonase from rabbit serum. In "Enzymes Hydrolyzing Organophosphorus Compounds", Ellis Horwood Ltd., Chichester, UK, (1989) 128-142.
- [86] Kitchen, B.J., Master, C.J., and Winzor, D.J., "Effects of lipid removal on the molecular size and kinetic properties of bovine plasma arylesterase" , *Biochem J.* (1973) 135, 93.
- [87] Gülcü, F., Gürsu, MF., "Paraoksonaz ve arilesteraz aktivite ölçümlerinin standardizasyonu", *Turkish Journal of Biochemistry*, (2003), **28(2)** 45-49.
- [88] Brushia, R.J., Forte, TM., Oda, MN., La Du BN., Bielicki, JK., "Baculovirus-mediated expression and purification of human serum paraoxonase 1A", *Journal of Lipid Research*, (2001), **42**, 951-958
- [89] Rodrigo, L., Gil, F., Hernández, A.F., Marina, A., Vázquez, J. and Pla, A., "Purification and characterization of paraoxon hydrolase from rat liver", *Biochem. J.*, (1997) **321**, 595.
- [90] Pellin, MC., Moretto, A., Lotti, M., Vilanova, E., Distribution and biochemical properties of rat paraoxonase activity *Neurotoxicol Teratol* (1990) 12, 611-614.
- [91] Gonzalvo, MC., Gil, F., Hernandez, F., Villanueva, E., Pla, A., "Inhibition of paraoxonase activity in human liver microsomes by exposura to EDTA, metals and mercurials"., *Chemico-Biological Interactions* (1997) **105**, 169-179.
- [92] Sorenson, R.C., Primo-Parmo, S.L., Kuo, C.L., Adkins, S., Lockridge, O. and La Du, B.N., "Reconsideration of the catalytic center and mechanism of mammalian paraoxonase/arylesterase", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1995) **92**, 7187.
- [93] Gençer.N., Arslan.O., "Purification human PON1<sub>Q192</sub> and PON1<sub>R192</sub> isoenzymes by hydrophobic interaction chromatography and investigation of the inhibition by metals" *Journal of Chomatography B*, (2009) 134-140, 877.
- [94] A. Pla , L. Rodrigo, A.F. Hern´andez, F. Gil, O. Lopez." Effect of metal ions and calcium on purified PON1 and PON3 from rat liver". *Chemico-Biological Interactions* **167** (2007) 63–70