



**İNSAN PONI ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, MANYETİK
KİTOSAN NANOPARTİKÜLLERİ ÜZERİNE İMMOBİLİZE
EDİLMESİ, METAL HİBRİT NANO YAPILARININ
HAZIRLANMASI VE BAZI İLAÇLARIN ENZİM
SİSTEMLERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
IN VİTRO OLARAK ARAŞTIRILMASI**

Farzad GHEBLEH

Doktora Tezi

Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı

Nano Tıp Bilim Dalı

Prof. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU

2017

Her hakkı saklıdır

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**İNSAN PON1 ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, MANYETİK
KİTOSAN NANOPARTİKÜLLERİ ÜZERİNE İMMOBİLİZE
EDİLMESİ, METAL HİBRİT NANO YAPILARININ
HAZIRLANMASI VE BAZI İLAÇLARIN ENZİM SİSTEMLERİ
ÜZERİNE ETKİLERİNİN *IN VITRO* OLARAK ARAŞTIRILMASI**

Farzad GHEBLEH

**NANOBİLİM ve NANOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI
Nano Tıp Bilim Dalı**

**ERZURUM
2017**

Her hakkı saklıdır



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



TEZ ONAY FORMU

**İNSAN PONI ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, MANYETİK KİTOSAN
NANOPARTİKÜLLERİ ÜZERİNE İMMOBİLİZE EDİLMESİ, METAL
HİBRİT NANO YAPILARININ HAZIRLANMASI VE BAZI İLAÇLARIN
ENZİM SİSTEMLERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN IN VİTRO OLARAK
ARAŞTIRILMASI**

Prof. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU danışmanlığında, Farzad GHEBLEH tarafından hazırlanan bu çalışma, 19/12/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı Nanotıp Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU

İmza :

Üye : Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

İmza :

Üye : Prof. Dr. Azize ALAYLI GÜNGÖR

İmza :

Üye : Prof. Dr. Hatice ÖĞÜTCÜ

İmza :

Üye : Doç. Dr. Güldem DÖNEL AKGÜL

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu'nun **28.12/2017** tarih ve **51/.../21** nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cavit KAZAZ
Enstitü Müdürü

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

ÖZET

Doktora Tezi

İNSAN PON1 ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, MANYETİK KİTOSAN NANOPARTİKÜLLERİ ÜZERİNE İMMOBİLİZE EDİLMESİ, METAL HİBRİT NANO YAPILARININ HAZIRLANMASI VE BAZI İLAÇLARIN ENZİM SİSTEMLERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN *IN VITRO* OLARAK ARAŞTIRILMASI

Farzad GHEBLEH

Atatürk Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı

Nanotıp Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU

Yaptığımız çalışmada; Paraoksonaz enzimi üçlü faz ayırma tekniğine (ÜFA) göre insan serumundan saflaştırıldı. Saflaştırma işlemi üç aşamada gerçekleştirildi. İlk olarak insan serumu, %60-80 amonyum sülfat doygunluğuna maruz bırakıldı. İkinci aşamada, elde edilen çökelek 3 mM Gilisin tamponunda (pH: 8.0) çözöldükten sonra sabit n-bütanol konsantrasyonunda 1.0:0.5, 1.0:1.0, 1.0:1.5, 1.0:2 oranlarında muamele edildi ve en yüksek aktivite 1.0:0.5 oranında tespit edildi. Üçüncü aşamada ise; birinci basamaktan elde edilen çökelek aynı tamponla çözöldükten sonra belirlenen n-bütanol oranı ile amonyum sülfatın %20, %25, %30, %35, %40, %45, %50 konsantrasyonlarında tekrar çöktürme işlemi yapıldı ve en yüksek aktivite %20 amonyum sülfat konsantrasyonunda belirlendi.

Paraoksonaz (PON1) enzimi insan serumundan %76.4 verimle, 304.5 kat saflaştırıldı. Sonra, demir-manyetik kitosan nanopartikülleri hazırlandı ve paraoksonaz enzimini bu nanopartiküller üzerine kovalent olarak immobilize edildi. Bu yöntemde ilk olarak, kitosanın yüzeyi Fe_3O_4 nanopartikülleri ile kaplanarak manyetik hale getirildi. Daha sonra, glutaraldehit ara kolu bağlantısı ve kitosan moleküllerine kovalent olarak bağlandı.

En son aşamada ise; Fe_3O_4 -kitosan NP'leri üzerine PON1 enzimi L-glutaraldehit ara kolu üzerinden immobilize edildi. Immobilize enzimin bağlanma yüzdesi %82.9 ve katalitik etkinliğinin artması ise %2.30 oranında olduğu belirlendi. Ardından, nano çiçek PON1- Ca^{2+} hibrit yapısı sentezlendi. Hibrit PON1 nano çiçeği tek adımlık bir yöntemle hazırlandı. Hibrit enzimin bağlanma yüzdesi ise %77.19 ve katalitik etkinliğin artması %26.4 olarak belirlendi. Elde edilen nano çiçek hibrit yapılarının toksisitesinin belirlenmesi amacıyla zebra balığı kullanıldı ve hibrit yapının herhangi bir toksisite göstermediği belirlendi. Ayrıca immobilize ve nano çiçek PON1 hibrit yapılarının karakterizasyonu için SEM, TEM, EDX, FT-IR ve XRD analizleri ayrı ayrı yapıldı. Daha sonra serbest, immobilize ve hibrit insan PON1 enziminin karakterizasyon (optimum pH, stabil pH, optimum sıcaklık, stabilize sıcaklık, V_{max} , K_M vd.) çalışmaları yapıldı ve katalitik etkinlikleri birbiriyle karşılaştırıldı. Çalışmanın son aşamasında ise; immobilize ve hibrit PON1 enzimlerinin aktiviteleri üzerine bazı ticari antilipit ilaçlarının (Valerik asit, Fenoksi – izobutirik asit, N-desmetil rosuvastatin) ve bazı antioksidan bileşiklerinin (Gallik asit, kuersetin, pirogallol, askorbik asit) etkileri araştırıldı. İnhibisyon kinetikleri (IC_{50} ve K_i değerleri) belirlendi.

2017, 119 sayfa

Anahtar Kelimeler: PON1, Immobilizasyon, Fe_3O_4 -Kitosan NP'leri, Nano çiçek PON1, Antioksidan, Antilipid ilaç, Zebra balığı, Toksisite

ABSTRACT

Doctoral Thesis

PURIFICATION OF PON1 ENZYME, IMMOBILIZATION OF PON1 ENZYME ON MAGNETIC CHITOSAN NANOPARTICLES, PREPARATION OF METAL HYBRID NANO STRUCTURES AND INVESTIGATION OF EFFECTS OF SOME DRUGS ON ENZYME SYSTEMS AS *IN VITRO*

Farzad GHEBLEH

Atatürk University

Natural Sciences Institute

Department of Nanomedicine Science

Department of Nanomedicine

Supervisor: Prof. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU

In our work; the paraoxonase enzyme was purified from human serum according to the triple phase separation technique (TPP). Purification was carried out in three steps: Firstly, the human serum was exposed to 60-80% ammonium sulfate saturation. Secondly, the obtained precipitate was treated with 1.0: 0.5, 1.0: 1.0, 1.0: 1.5, 1.0: 2 ratio at constant n-butanol concentration after dissolving in 3 mM glycine buffer (pH: 8.0) and the highest activity detected at 1.0: 0.5 serum:N-butanol. In the third phase; after the precipitate obtained from the previous step was dissolved in the same buffer, it was precipitated again at 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% of the ammonium sulfate ratios with the determined N-butanol ratio, and the highest activity was determined at 20% ammonium sulphate concentration. The paraoxonase (PON1) enzyme was purified 304.5 fold with 76.4% yield from human serum. Then, Iron-Magnetic Chitosan nanoparticles were prepared and the enzyme paraoxonase was covalently immobilized on these nanoparticles. In this method, first, the surface of chitosan was magnetized by coating with Fe₃O₄ nanoparticles. Then, the glutaraldehyde intermediate was covalently bound to the magnetic chitosan molecules.

In the last stage; PON1 were immobilized on the Fe₃O₄-chitosan NPs through the PON1 enzyme L-glutaraldehyde intermediate. The percent binding of the immobilized enzyme was determined to be 82.68% and the increase in catalytic activity to be 2.30%.

Subsequently, the nano flower PON1-Ca²⁺ hybrid structure was synthesized. The hybrid PON1 nanoflower was prepared in a one-step procedure. The binding percentage of hybrid enzyme was determined as 88.49% and the increase of catalytic activity as 26.4%. The Zebrafish was used to determine the toxicity of the obtained nano-flower hybrid structure and it was determined that the hybrid construct did not exhibit any toxicity against zebra fish.

In addition, SEM, TEM, EDX, FT-IR ve XRD analyzes were performed separately for the characterization of immobilized and nano-flower PON1 hybrid structures. Then, the characterization of free, immobilized and hybrid human PON1 enzymes (optimum pH, stable pH, optimum temperature, stable temperature, V_{max}, K_M etc) were carried out and their catalytic activities were compared with each other.

In the last stage of the study; the effects of some antilipid drugs (Valeric acid, phenoxy – isobutyric acid, N-desmethyl rosuvastatin) and some antioxidant compounds (Gallic acid, Quercetin, Pyrogallol, Ascorbic acid) on the activities of immobilized and nano flower hybrid PON1 enzymes were investigated. Inhibition kinetics (IC₅₀ and K_i values) were determined.

2017, 119 pages

Keywords: TPP, Fe₃O₄-chitosan NPs, Hybrid PON1, Nanoflower, Antioxidant, Antilipid drug, Zebrafish, Toxicity

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu deneysel çalışmamda ve çalışmanın tamamlanmasında bilgilerinden faydalandığım ve her türlü desteği ile yanımda olan Sayın danışman hocam Prof. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU'na en derin saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarında bana yardımlarını esirgemeyen Sayın hocam Prof. Dr. Azize ALAYLI GÜNGÖR'e teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarında desteklerini esirgemeyen arkadaşlarım Dok. Öğr. Aynur BABAGİL ve Dok. Öğr. Hicran ÖNEM'e teşekkür ederim.

Çalışmamızın toksisite testlerinin yapılmasında yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN ve ekibine teşekkür ederim.

SEM, TEM, FT-IR ve XRD analizlerinin yapılmasında yardım aldığımız Prof.Dr. Ümit DEMİR, Doç. Dr. Tuba ÖZNÜLÜER ve Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürlüğü (DAYTAM)'ne teşekkür ederim.

Ayrıca, hayatım boyunca manevi yardım ve desteklerinin esirgemeyen değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım.

Farzad GHEBLEH

Aralık, 2017

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Nanotıp ve Nanoteknoloji	1
1.2. Enzimler ve Tarihçesi.....	1
1.3. Enzim.....	2
1.4. Enzimlerin Karakterizasyonu	3
1.5. Paraoksonaz Enzimi (PON1).....	3
1.6. Enzim İmmobilizasyonu.....	6
1.6.1. Enzimlerin İmmobilizasyonunun Avantajları	7
1.6.2. Enzim İmmobilizasyonunun Dezavantajları	7
1.7. Nano Hibrit Yapılar.....	7
1.7.1. Organik-İnorganik Hibrit Nano Çiçeklerin Özellikleri	10
1.8. Serbest ve Hibrit PON1 Enziminin Toksisite Testi.....	11
1.9. Antioksidanlar	13
1.10. Antilipit İlaçlar	14
1.11. Lipitler	14
1.12. Kitosan.....	16
2. KAYNAK ÖZETLERİ	20
2.1. Paraoksonaz Enzimi	20
2.1.1. İnsan PON1 enziminin yaşlanma ile olan ilişkisi.....	21
2.1.2. İnsan PON1 enziminin kanser ile olan ilişkisi	21
2.2. Enzimin Saflaştırılması.....	22
2.3. Hibrit PON1 Enzim	23
2.4. Zebra Balığı	24

3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	27
3.1. Materyal.....	27
3.1.1. Kullanılan cihazlar	27
3.2. Kullanılan Kimyasallar.....	27
3.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması	28
3.3.1. Tampon çözeltilerin hazırlanması	28
3.3.2. Sodyum asetat tamponu.....	28
3.3.3. Sodyum fosfat tamponu.....	28
3.3.4. Gilisin tamponu	29
3.3.5. Karbonat tamponu	29
3.3.6. Fenil asetat çözeltisinin hazırlanması.....	29
3.3.7. Paraoksan çözeltisinin hazırlanması.....	29
3.3.8. Elektroforezde kullanılan çözeltilerin hazırlanması.....	29
3.3.8.a. Yürütme tamponu	29
3.3.8.b. Numune tamponu	30
3.3.8.c. Ayırma jeli	30
3.3.8.d. Yığma Jeli.....	30
3.3.8.e. Protein standardı	30
3.3.9. Proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan Coomassie brilliant blue G-250 çözeltinin hazırlanması	30
3.4. Yöntem	31
3.4.1. PON1 enziminin saflaştırılması.....	31
3.4.1.a. İnsan serumlarının toplanması.....	31
3.4.1.b. PON 1 Enziminin saflaştırılması aşaması	31
3.4.2. Protein tayini	33
3.4.3. Enzim Aktivite Tayini	33
3.4.3.a. Paraoksanaz aktivitesi.....	33
3.4.3.b. Aril Esteraz Aktivitesi	34
3.4.4. SDS-PAGE yöntemi ile enzimin moleküler ağırlığının saptanması	35
3.4.4.a. SDS-PAGE ayırma jeli.....	35
3.4.4.b. SDS-PAGE yığma jeli.....	35
3.4.4.c. Örneğin ve standardın hazırlanması	36

3.4.4.d. Enzim örneklerinin SDS-PAGE jeline yüklenmesi ve yürütülmesi.....	36
3.4.4.e. SDS-PAGE jelinin boyanması ve görüntülenmesi.....	36
3.4.5. Demir-Manyetik kitosan nanopartiküllerin hazırlanması.....	36
3.4.6. PON1 enziminin Fe ₃ O ₄ -kitosan NP'leri üzerine bağlanması.....	38
3.4.7. PON1-Ca ²⁺ hibrit nano çiçek yapılarının sentezi	40
3.4.8. Serbest, manyetik ve hibrit PON1 enzimlerin optimum ve stabil pH değerlerinin incelenmesi	40
3.4.9. Serbest, Manyetik ve hibrit PON1 enzim optimum ve stabil sıcaklık değerlerinin belirlenmesi	40
3.4.10. Zebra balığı kullanılarak yapılan <i>in vivo</i> toksisite çalışmaları	41
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	42
4.1. PON1 Enzim Saflaştırılma Basamakları	42
4.2. Serum Paraoksonaz SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi.....	45
4.3. Serbest, İmmobilize ve Nano Çiçek PON1 Enziminin Optimum pH, Optimum Sıcaklık, Stabil pH ve Stabil Sıcaklık Çalışmalarının Sonuçları	46
4.4. PON1 Enzimin V _{max} ve K _M Sonuçları	49
4.5. İmmobilize ve Hibrit PON1 Yapılarının SEM, EDX, TEM ve FT-IR Karakterizasyonu.....	51
4.6. XRD Analizi Sonuçları	64
4.7. FT-IR Analizi Sonuçları	65
4.8. İmmobilize PON 1 ve PON1 Nano Çiçek Hibrit Yapısının Tekrar Kullanılabilirliğinin Analizi	66
4.9. Zebra Balığı İle İlgili Sonuçlar.....	68
4.10. PON1 Enzim Aktivitesi Üzerine Antilipit İlaçların ve Bazı Antioksidanların Etkilerinin <i>In Vitro</i> Olarak İncelenmesi	72
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	104
KAYNAKLAR	114
ÖZGEÇMİŞ	120

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

CBB	Coomassie Brilliant Blue
CS	Chitosan (Kitosan)
Dpf	Days post fertilization
EDX	enerji dağılım spektrometre (Energy Dispersive X-Ray)
EU	Enzim ünitesi
FT-IR	Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi
HPf	Hours post fertilization
kDa	Kilodalton
mM	Milimolar
mU/ml	Mililitredeki mili ünite
nm	Nanometre
PON	Paraoksonaz Enzimi
Rpm	Dakikada devir sayısı
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning electron microscopy)
TEM	Geçirmeli elektron mikroskobu (Transmission Electron Microscope)
TPP	Tripolifosfat
Tris	2-Amino-2-Hidroksimetilpropan-1,3-diol
U/mg	Ünite/miligram(Ünite/miligram)
U/mL	Mililitredeki ünite
v/v	Hacim/Hacim (volume/volume)
V _{max}	Maksimum hız
w/v	Ağırlık/Hacim (weight/volume)
XRD	X ışını kırınım(X-ray diffraction)
μM	Mikromolar
μmol	Mikromol

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Zebra balığının yaşam döngüsünün diyagramı.....	12
Şekil 1.2. Selüloz yapısı.....	17
Şekil 1.3. Kitin yapısı	17
Şekil 1.4. Kitosan yapısı	17
Şekil 3.1. Diyaliz aşaması.....	32
Şekil 3.2. Serum üçlü faz ayırım (ÜFA) görüntüsü	33
Şekil 3.3. PON1enzimin paraoksanaz aktivitesi reaksiyonu	34
Şekil 3.4. PON1enzimin aril esteraz aktivitesi reaksiyonu.....	35
Şekil 3.5. Kitosanın yüzeyi Fe ₃ O ₄ nanopartikülü ile kaplanması	37
Şekil 3.6. Magnetik Fe ₃ O ₄ kitosan NP moleküllerine L-glutaraldehit bağlanma reaksiyonu.....	38
Şekil 3.7. İnsan PON1 enziminin Fe ₃ O ₄ - kitosan NP'ler üzerine immobilize edilmesi .	39
Şekil 4.1. N-bütanol optimizasyonu.....	43
Şekil 4.2. Amonyum sülfat optimizasyonu.....	44
Şekil 4.3. Amonyum sülfat optimizasyonu.....	44
Şekil 4.4. Paraoksanaz enziminin SDS-page jel elektroforezi fotoğrafı.....	45
Şekil 4.5. Serbest, İmmobilize ve Hibrit PON1 pH optimizasyonu	46
Şekil 4.6. Serbest, immobilize ve nano çiçek PON1 enzimlerinin stabil pH grafiği	48
Şekil 4.7. Serbest, immobilize ve nano çiçek PON1 hibrit aktiviteleri üzerine sıcaklığın etkisi	48
Şekil 4.8. Serbest, İmmobilize ve Hibrit PON1 nano çiçek aktiviteleri üzerine zamana bağlı olarak sıcaklığın etkisi (Stabil Sıcaklık).....	49
Şekil 4.9. Serbest İmmobilize ve Hibrit PON1 enzimin Fenil asetat substrat ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği	50
Şekil 4.10. Serbest, İmmobilize ve Hibrit PON1 enzimin Paraokson substrat ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği	50
Şekil 4.11. Fe ₃ O ₄ - kitosan NP yapısının SEM görüntüleri	52
Şekil 4.12. PON1enzimi immobilize Fe ₃ O ₄ - kitosan NP'lerin yapısının SEM görüntüleri	52

Şekil 4.13. pH 11’de PON1 enzimi kullanılarak elde edilen nanoçiçek hibrit yapısının SEM görüntüleri	53
Şekil 4.14. pH 10’de PON1 enzimi kullanılarak elde edilen nanoçiçek hibrit yapısının SEM görüntüleri	54
Şekil 4.15. pH 9’da PON1 enzimi kullanılarak elde edilen nanoçiçek hibrit yapısının SEM görüntüleri	55
Şekil 4.16. pH 8’de PON1 enzimi kullanılarak elde edilen nanoçiçek hibrit yapısının SEM görüntüleri	56
Şekil 4.17. pH 6’da PON1 enzimi kullanılarak elde edilen nanoçiçek hibrit yapısının SEM görüntüleri	57
Şekil 4.18. pH 4’te PON1 enzimi kullanılarak elde edilen nanoçiçek hibrit yapısının SEM görüntüleri	58
Şekil 4.19. pH 9’da PON1 enzimi kullanılarak elde edilen nano çiçek hibrit yapısının EDX grafiği	59
Şekil 4.20. pH 10’da PON1 enzimi kullanılarak elde edilen nano çiçek hibrit yapısının EDX grafiği	60
Şekil 4.21. pH 11’da PON1 enzimi kullanılarak elde edilen nano çiçek hibrit yapısının EDX grafiği	61
Şekil 4.22. Fe ₃ O ₄ - kitosan NP yapısının EDX (Enerji Dağılımı X-ışını) analizleri yapılmış elde edilen EDX grafiği	62
Şekil 4.23. PON1enzimi immobilize Fe ₃ O ₄ - kitosan NP’lerin yapıların EDX (Enerji Dağılımı X-ışını) analizleri yapılmış elde edilen EDX grafiği	63
Şekil 4.24. Manyetik kitosan NP’leri, immobilize PON1 ve Hibrit nano çiçek PON1enzimlerine ait XRD desenleri	65
Şekil 4.25. Demir kitosan, immobilize ve Hibrit PON1enzimine ait FT-IR desenleri...	66
Şekil 4.26. Fe ₃ O ₄ –Kitosan NP’leri üzerine immobilize paraoksonaz enziminin tekrar kullanılabilirlik stabilite grafiği	67
Şekil 4.27. Hibrit nano çiçek paraoksonaz enziminin tekrar kullanılabilirlik stabilite grafiği	67
Şekil 4.28. Mantardan ölmüş Zebra balığı embriyo görüntüsü	70
Şekil 4.29. 24’üncü saat Zebra balığı embriyosu gelişim görüntüsü	70
Şekil 4.30. 48’üncü saat Zebra balığı embriyosu gelişim görüntüsü	71

Şekil 4.31. 72'inci saat Zebra balığı embriyosu gelişim görüntüsü.....	71
Şekil 4.32. 96'ıncı saat Zebra balığı embriyosu gelişim görüntüsü.....	72
Şekil 4.33. Valerik asit ilacının Serbest, İmmobilize ve Hibrit PON1 enziminin aktivitesi üzerine etkisi.....	73
Şekil 4.34. N-desmetil Rosuvastatin ilacının Serbest, İmmobilize ve Hibrit PON1 enzimin aktivitesi üzerine etkisi	74
Şekil 4.35. Fenoksi-izobutirik asit ilacının Serbest, İmmobilize ve Hibrit PON1 enzimin aktivitesi üzerinde etkisi	74
Şekil 4.36. Gallik asit'in PON1 enzim aktivitesi üzerinde inhibitör etkisi grafiği	75
Şekil 4.37. Kuersetin'in PON1 enzim aktivitesi üzerinde inhibitör etkisi grafiği	75
Şekil 4.38. Pirogallol'un PON1 enzim aktivitesi üzerinde inhibitör etkisi grafiği	76
Şekil 4.39. Askorbik asit PON1 enzim aktivitesi üzerinde inhibitör etkisi grafiği.....	76
Şekil 4.40. Valerik asit antilipit ilacının serbest PON1 enzimi üzerine inhibisyonunu gösteren Lineweaver-Burk grafiği	79
Şekil 4.41. Valeric asit antilipit ilacının immobilize PON1 enzimi üzerine inhibisyonunu gösteren Lineweaver-Burk grafiği	80
Şekil 4.42. Valerik asit antilipit ilacının Hibrit PON1 enzimi üzerine inhibisyonunu gösteren Lineweaver-Burk grafiği	81
Şekil 4.43. Fenoksi- izobutirik asit antilipit ilacının serbest PON1 enzimi üzerine inhibisyonunu gösteren Lineweaver-Burk grafiği	83
Şekil 4.44. Fenoksi- izobutirik asit antilipit ilacının İmmobilize PON1 enzimi üzerine inhibisyonunu gösteren Lineweaver-Burk grafiği	84
Şekil 4.45. Fenoksi- izobutirik asit antilipit ilacının Hibrit PON1 enzimi üzerine inhibisyonunu gösteren Lineweaver-Burk grafiği	85
Şekil 4.46. N-desmetil Rosuvastatin antilipit ilacının serbest PON1 enzimi üzerine inhibisyonunu gösteren Lineweaver-Burk grafiği	86
Şekil 4.47. N-desmetil Rosuvastatin antilipit ilacının immobilize PON1 enzimi üzerine inhibisyonunu gösteren Lineweaver-Burk grafiği	87
Şekil 4.48. N-Desmetil Rosuvastatin antilipit ilacının hibrit PON1 enzimi üzerine inhibisyonunu gösteren Lineweaver-Burk grafiği	88
Şekil 4.49. Serbest PON1 enzimi ve Gallik asit inhibisyon gösteren Lineweaver-Burk grafiği	90

Şekil 4.50. İmmobilize PON1 enzimi ve Gallik asit inhibisyon gösteren Lineweaver-Burk grafiği	91
Şekil 4.51. Hibrit PON1 enzimi ve Gallik asit inhibisyon gösteren Lineweaver-Burk grafiği	92
Şekil 4.52. Serbest PON1 enzimi ve Kuersitin inhibisyon gösteren Lineweaver-Burk grafiği	93
Şekil 4.53. İmmobilize PON1 enzimi ve Kuersitin inhibisyon gösteren Lineweaver- Burk grafiği	94
Şekil 4.54. Hibrit PON1 enzimi ve Kuersitin inhibisyon gösteren Lineweaver-Burk grafiği	95
Şekil 4.55. Serbest PON1 enzimi ve Pirogallol inhibisyon gösteren Lineweaver-Burk grafiği	97
Şekil 4.56. İmmobilize PON1 enzimi ve Pirogallol inhibisyon gösteren Lineweaver- Burk grafiği	98
Şekil 4.57. Hibrit PON1 enzimi ve Pirogallol inhibisyon gösteren Lineweaver-Burk grafiği	99
Şekil 4.58. Serbest PON1 enzimi ve Askorbik asit inhibisyon gösteren Lineweaver- Burk grafiği	100
Şekil 4.59. İmmobilize PON1 enzimi ve Askorbik asit inhibisyon gösteren Lineweaver-Burk grafiği	101
Şekil 4.60. Hibrit PON1 enzimi ve Askorbik asit inhibisyon gösteren Lineweaver-Burk grafiği	102

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Saflaştırılan PON1 enzimine ait saflaştırma profili.....	43
Çizelge 4.2. Serbest İmmobilize ve Hibrit PON1 enzimin fenil asetat ve Paraokson substratları için V_{max} ve K_M değerleri	51
Çizelge 4.3. pH 9’da PON1 enzimi kullanılarak elde edilen nano çiçek hibrit yapısının EDX analizi sonuçları	59
Çizelge 4.4. pH 10’da PON1 enzimi kullanılarak elde edilen nano çiçek hibrit yapısının EDX analizi sonuçları	60
Çizelge 4.5. pH 11’da PON1 enzimi kullanılarak elde edilen nano çiçek hibrit yapısının EDX analizi sonuçları	61
Çizelge 4.6. Fe ₃ O ₄ - kitosan NP yapısının EDX (Enerji Dağılımı X-ışını) analizinin sonuçları	63
Çizelge 4.7. PON1enzimi immobilize Fe ₃ O ₄ - kitosan NP’lerin yapıların EDX (Enerji Dağılımı X-ışını) analizinin sonuçları	63
Çizelge 4.8. Nano çiçek PON1 hibrit yapılarının Zebra balıkları üzerinde 24 saat toksisite incelemelerine ait sonuçlar.....	68
Çizelge 4.9. Nano çiçek PON1 hibrit yapılarının Zebra balıkları üzerinde 48 saat toksisite incelemelerine ait sonuçlar.....	69
Çizelge 4.10. Nano çiçek PON1 hibrit yapılarının Zebra balıkları üzerinde 72 saat toksisite incelemelerine ait sonuçlar (Hepsi yumurtadan çıkmışlardır) ..	69
Çizelge 4.11. PON1 enzimin üzerinde Valerik asit, fenoksi – izobutirik asit, N-desmetil rosuvastatin ve Gallik Asit, Kuercetin Hydrate, Pyrogallol, Askorbik asit etkilerinin incelenmesi, IC ₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları	73
Çizelge 4.12. Serbest, immobilize ve hibrit PON1 enzimleri için IC ₅₀ değerleri.....	77
Çizelge 4.13. PON1 enzimin üzerinde, Valerik asit, Fenoksi- izobutirik asit, N-desmetil Rosuvastatin, Gallik Asit, kuersetin Hidrate, Pirogallol ve Askorbik asit Ki değerlerinin belirlenmesi için kullanılan çözeltilerin miktarları	78

Çizelge 4.14. Valerik asit ilacının serbest PON1 enzimi üzerine inhibisyon sonuçları (1/S ve 1/V değerleri)	79
Çizelge 4.15. Valerik asit ilacının immobilize PON1 enzimi üzerine inhibisyon sonuçları (1/S ve 1/V değerleri)	80
Çizelge 4.16. Valeric asit ilacının Hibrit PON1 enzimi üzerine inhibisyon sonuçları (1/S ve 1/V değerleri)	81
Çizelge 4.17. Fenoksi- izobutirik asit ilacının Hibrit PON1 enzimi üzerine inhibisyon sonuçları (1/S ve 1/V değerleri)	82
Çizelge 4.18. Fenoksi- izobutirik asit ilacının İmmobilize PON1 enzimi üzerine inhibisyon sonuçları (1/S ve 1/V değerleri).....	83
Çizelge 4.19. Fenoksi- izobutirik asit ilacının Hibrit PON1 enzimi üzerine inhibisyon sonuçları (1/S ve 1/V değerleri)	84
Çizelge 4.20. N-desmetil Rosuvastatin ilacının Serbest PON1 enzimi üzerine inhibisyon sonuçları (1/S ve 1/V değerleri).....	86
Çizelge 4.21. N-desmetil Rosuvastatin ilacının İmmobilize PON1 enzimi üzerine inhibisyon sonuçları (1/S ve 1/V değerleri).....	87
Çizelge 4.22. N-Desmetil Rosuvastatin ilacının Hibrit PON1 enzimi üzerine inhibisyon sonuçları (1/S ve 1/V değerleri).....	88
Çizelge 4.23. Serbest PON1 enzim ve Gallik asit inhibisyonunun 1/S ve 1/V değerlerinin belirlenmesi	89
Çizelge 4.24. İmmobilize PON1 enzim ve Gallik asit inhibisyonunun 1/S ve 1/V değerlerinin belirlenmesi	90
Çizelge 4.25. Hibrit PON1 enzim ve Gallik asit inhibisyonunun 1/S ve 1/V değerlerinin belirlenmesi	91
Çizelge 4.26. Serbest PON1 enzim ve Kuersitin hidrat inhibisyonunun 1/S ve 1/V değerlerinin belirlenmesi	93
Çizelge 4.27. İmmobilize PON1 enzim ve Kuersitin hidrat inhibisyonunun 1/S ve 1/V değerlerinin belirlenmesi	94
Çizelge 4.28. Hibrit PON1 enzim ve Kuersitin hidrat inhibisyonunun 1/S ve 1/V değerlerinin belirlenmesi	95
Çizelge 4.29. Serbest PON1 enzim ve pirogallol inhibisyonunun 1/S ve 1/V değerlerinin belirlenmesi	96

Çizelge 4.30. İmmobilize PON1 enzim ve pirogallol inhibisyonunun 1/S ve 1/V değerlerinin belirlenmesi	97
Çizelge 4.31. Hibrit PON1 enzim ve pirogallol inhibisyonunun 1/S ve 1/V değerlerinin belirlenmesi	98
Çizelge 4.32. Serbest PON1 enzim ve Askorbik asit inhibisyonunun 1/S ve 1/V değerlerinin belirlenmesi	100
Çizelge 4.33. İmmobilize PON1 enzim ve Askorbik asit inhibisyonunun 1/S ve 1/V değerlerinin belirlenmesi	101
Çizelge 4.34. Hibrit PON1 enzim ve Askorbik asit inhibisyonunun 1/S ve 1/V değerlerinin belirlenmesi	102
Çizelge 4.35. Antilipit ilaçların hesaplanan IC_{50} ve K_i değerleri ve inhibisyon türleri	103
Çizelge 4.36. Antioksidan bileşiklerin hesaplanan IC_{50} ve K_i değerleri ve inhibisyon türleri	103

1. GİRİŞ

1.1. Nanotıp ve Nanoteknoloji

Nano kelimesi Latince olan “nanus” kelimesinden türetilmiştir. Bilim alanında ise metrenin milyarda birini ölçen birim olarak kullanılmaktadır. Nanoteknoloji ise, nano boyuttaki sistemlerin, cihazların tasarımı ve üretimi ile ilgilenen teknolojidir. Nano teknolojinin en önemli kullanım alanlarından biri tıp’dır. Nanoteknolojinin tıpta kullanım alanı oldukça geniştir. Nanobiyosensörler ile hastalıkların teşhis edilmesi, görüntülenmesi, nano-fototermoliz edilmesi (insan vücudunun herhangi bir yerindeki kanserli dokunun belirli bir sıcaklıkta patlayan nano bombalar ile yok edilmesi) gibi tüm alanlarda kullanılabilmektedir. Nanotıp tanımı ise; insanın biyolojik sistemleri moleküler boyutta izleme ve tedavi etmesidir (Yula *et al.* 2010).

1.2. Enzimler ve Tarihçesi

Canlı hücrelerde sürekli olarak gerçekleşen binlerce biyokimyasal tepkime farklı hızlara sahiptir. Bazı reaksiyonlar hızlıdır, bazıları ise çok yavaştır. Yavaş reaksiyonların hızını arzu edilen seviyeye çıkarmak için, bu reaksiyonların gerçekleştirilmesinde katalizör kullanımı gereklidir. Reaksiyon hızındaki bu değişiklik, enzimler adı verilen biyokatalizörler aracılığıyla yapılır. Enzimler, genel proseste değişmeden biyokimyasal reaksiyonların hızını arttıran protein katalizörlerdir. Enzimolojinin başlangıcı on dokuzuncu yüzyıldan başlamaktadır, ancak biyokatalizörler ekmek yapmak ve alkol üretmek için binlerce yıldır kullanılmaktadır. Enzimin ilk tanımlanması, 1833’de Payen ve Persoz tarafından yapıldı. Nişastanın şeker haline dönüşmesinden sorumlu “aktif maddeyi” pratik olarak izole ettiler ve ona diastaz (şimdi amilaz diye adlandırılır) adını verdiler. 1834 yılında Schwann hayvan mide duvarı asit ekstraksiyonu ile bir hayvansal kaynaktan ilk enzimi izole etti, günümüzde bu enzim pepsin olarak bilinmektedir. On dokuzuncu yüzyılın ikinci yarısında Liebig fermantasyon olayının kimyasal maddelerin etkisinden kaynaklandığını keşfetti. Ancak daha sonra Pasteur fermantasyonun nedenini

canlı mikroorganizmalar olarak açıkladı ve 1879'da Kuhne bu kimyasal maddelere enzim adını verdi (Copeland 2000).

1.3. Enzim

Enzimler canlılarda hücre içinde sentezlenirler ve görevleri kimyasal reaksiyonları katalizlemektir. Peptid bağlarıyla birbirine bağlı aminoasit zincirlerinden oluşmaktadırlar. Molekül ağırlıkları genel olarak 14.000 ila 400.000 Da arasında değişmektedir. Enzimler çoğunlukla suda çözünen kolloidlerdir, ancak bazı enzimler hücre zarlarına sıkıca bağlı bulunmaktadırlar. Bir enzim, spesifik bir reaksiyonu hızlandıran ve bunu yaparken reaksiyonun sonunda kimyasal olarak değişmeden kalan ve aktivite kaybı olmayan bir katalizördür. Bir enzim, katalizli reaksiyonun kimyasal yapısı değiştirmemekte ve sadece bu denge yaklaşımını hızlandırmaktadır. Bu nedenle enzimler, hücrelerdeki reaksiyon hızlarını, 10^{16} kat kadar arttırabilmektedirler. Katalizörler (enzimler dahil), aktivasyon enerjisini düşürerek ve reaksiyon hızını arttırarak işlev görmektedirler. Hem ileri hem de geri dönüşümlü katalizli reaksiyon oranı yönü aynı kalır, çünkü her iki oran da aynı geçiş halinden geçmektedir. Enzim katalizli reaksiyonlar, (ES) kompleksi oluşturmak için, enzimde aktif bölge olarak adlandırılan spesifik bölgede substrat bağlanmasını sağlar. Bu etkileşim, aktivasyon enerjisini düşürür ve yeni geçiş halinin oluşumunu kolaylaştırır. Enzime bağlı iken substrat ürüne dönüştürülür ve sonra ürün enzimden ayrılır. Bazı enzimler aktivite gösterebilmeleri için kofaktör denilen Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} gibi iyonlara ve bazıları da koenzim denilen kompleks organik moleküllere gereksinim duymaktadırlar. Enzimler biyolojik aktivitelerini ancak belirli pH ve sıcaklık sınırlarında gösterebilirler. Enzimlerin en önemli özelliklerinden biride spesifik reaksiyonları katalize edebilmeleridir. Bu özelliklerinden dolayı onların teşhis ve araştırmalarında kullanılmaları çok önemlidir. Bir enzim yalnızca belirli bir reaksiyonu kataliz etmektedir. Her bir enzim belirli bir kimyasal bağ veya işlevsel grup türü için spesifiktir. Yani bir enzim, substratın girebileceği çeşitli reaksiyonlardan sadece birini katalizleyebilir. Geleneksel olarak enzimlerin isimlendirilmesinde Pepsin, Rennin ve Tripsin gibi bazı enzimlerin haricinde enzim isimleri "-az" ile biter. Uluslararası

Biyokimya Birliđi (I.U.B.B) standart olarak, enzim isimlendirmesinde hem substrat aktifleşmesi ve hem de reaksiyonun katalize edilen türü esas alınarak yapılmaktadır (Simon *et al.* 1959).

1.4. Enzimlerin Karakterizasyonu

Her enzim tipi, katalitik aktivitesi için gerekli olan belirli bir "aktif bölge konformasyonu" na sahiptir. "Aktif bölge yapısı", proteinin üç boyutlu yapısının yanı sıra aktif bölgede bazı spesifik aminoasitlerin varlığını da içerir. Bu aminoasitler, substratın bağlanması ve reaksiyonun katalizi ile ilgilidir. Kataliz işlemi sırasında, enzim (E) substrat (S)'ı bağlar ve enzim-substrat (ES) kompleksi oluşturur. Enzim proteinleri büyük moleküllerdir ve enzim proteininin çok küçük bir bölgesi, substrat bağlama ve ardından reaksiyonun katalizinde görev alır. Bu bölgeye "aktif bölge" veya "aktif merkez" denir. Aktif bölgedeki kofaktörler veya koenzimler, ES-kompleksinin oluşmasını ve katalizi kolaylaştırmasına yardımcı olurlar. Tamamen işlevsel bir enzime holoenzim denir ve çoğu zaman bir protein parçası veya bir protein olmayan kısımdan oluşur. Enzimin protein kısmı ise apoenzim olarak adlandırılır ve yukarıda belirtildiği gibi, protein olmayan (organik) kısım koenzimdir (Simon *et al.* 1959).

1.5. Paraoksonaz Enzimi (PON1)

Paraoksonaz enzimi (PON) hem arilesteraz (E.C. 3.1.1.2), hem de paraoksonaz (E.C.3.1.8.1) aktivitesine sahip, Ca^{2+} -bağımlı serum esterazlarıdır. Paraoksonaz (PON) gen ailesinin üç farklı üyesi (PON1, PON2 ve PON3) vardır (Yurttaş vd 2017). İlk olarak insan serumunda PON1 enzimini HDL üzerinde olduğunu ortaya koymuşlardır (Mackness *et al.* 1996).

Mazur ve arkadaşları tarafından ilk olarak 1946 yılının başlarında, PON1 enziminin HDL lipoprotein ile ilişkisi (organofosfor bileşikleri hidrolizi) keşfedilmiştir.

PON1 enzimi, 354 aminoasitli bir glikoproteindir. Moleküler kütlesi derecesine bağlı olarak (yaklaşık 45 kDa) karaciğerde sentezlenmektedir. Enzim kan dolaşımında HDL lipoproteine bağlıdır, bu nedenle HDL'nin antiaterojenik özellikleri PON1'e atfedilmiştir. Bu enzim makrofajların hücresel oksidatif stresini, kolesterol-biyosentez oranını azaltırken HDL aracılığı ile makrofaj kolesterol akışını uyarmaktadır. Böylece köpük hücresi oluşumuna ve aterogeneze karşı koruma sağlamaktadır. PON1 enzim homosistein tiyolaktonu hidroliz ederek bazı proteinlerin homosisteinasyon zararlarını önlemektedir. PON1'in tek serbest sülfidril grubu Cys284'te mevcuttur ve bu aminoasit enziminin aktivitesinde önemli rol oynamaktadır (Naik *et al.* 2015).

Paraoksonaz enziminin aktivite ölçümünde en çok kullanılan substratlar:

- 1- Paraoksan (o-o dietil-o-p-nitrofenil fosfat)
- 2- Fenil asetat'dır.

Paraoksanaz enziminin aktivitesi ortamda oluşan fenol miktarının spektrofotometrik olarak ölçülmesi prensibine dayanmaktadır (Gan *et al.* 2004).

PON1 enzimi spektrofotometrik testlerle aktivitesi ölçülebilmekte ve ayrıca spesifik antikorları kullanarak immünolojik yöntemlerle doğrudan incelenebilmektedir. Spektrofotometrik ölçümler, PON1 enziminin substratlarını hidrolize etme esasına dayanmaktadır. PON1 enzimi, paraokson substratını hidrolizlediği için paraoksonaz olarak adlandırılmıştır (Yurttaş vd. 2017).

Ateroskleroz hastalığının gelişimi, serumda HDL lipoprotein ile ters orantılıdır. Literatürlerde birçok araştırmacı bu hastalığın ilk noktasını LDL lipoprotein oksidasyonuna sebep olarak belirtmişlerdir. PON1 enzim düzeyi ve aktivitesinin kardiyovasküler hastalıklarda, hiperkolesterolemi hastalarında, ileri yaştaki insanlarda, obezitede, menopoz döneminde, şeker hastalığında, parkinson hastalığında ve böbrek yetmezliği hastalarında azaldığı belirlenmiştir. Yapılan bir *in vitro* çalışmada; sigarada bulunan toksik maddelerin PON1 enzimin aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir. PON1

enziminin, organofosfat bileşiklerin detoksifikasyonuna katılma ve lipid peroksitlerini hidrolize ederek düşük yoğunluklu lipoproteini (LDL) (kötü kolesterol) oksidasyondan koruma fonksiyonu olduğu belirlenmiştir (Mackness *et al.* 1995).

PON1 enzimi, organofosfat (OP) metabolitlere (OP böcek ilaçları), vasküler hastalıkların yanı sıra biyolojik belirteci olarak oksidatif strese bağlı hastalıklar, inflamasyon ve karaciğer hastalıklarına karşı spesifik koruyucu olarak kullanılmaktadır (Yurttaş vd 2017).

Bir başka çalışmada ise; insan serumunda lipid hidroperoksit (LOOH) seviyesi, akciğer, göğüs ve kolorektal kanser hastalarında enzimin paraoksonaz (PON1) ve arilesteraz (ARE) aktivitesi ölçülerek araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre; normal halde, LOOH seviyesi, PON1 enzimi ve arilesteraz aktivitesi artarken, kanser hastalarında düşmektedir (kolorektal kanser hastaları hariç). PON1 enzim konsantrasyonu ve aktivitesi oldukça değişkendir. İnsan popülasyonlarında enzimin serumdaki miktar ve kalitesi bir kişinin OP zehirlenmesi veya vasküler hastalıkların gelişme riskini etkilemektedir. Bu nedenle, PON1 enzimini anlamak hayati önem taşımaktadır (Balci *et al.* 2012).

PON1 enziminin kanda seviyesinin azalması, kardiyovasküler, diyabet mellitus ve kronik hastalıklarda, böbrek yetmezliği, romatoid artrit, hipertiroidi ve insanlarda yaşlanma gibi birçok metabolik bozukluklarda büyük bir risk oluşturmaktadır. Bu nedenle, PON1 enzim inhibitörleri ve aktivatörlerinin iyi karakterize edilmesi, ilaç çalışmaları için iyi bir başlangıç noktasını oluşturmaktadır. Paraoksonaz (PON1) multigen ailesi üzerine yapılan araştırmalar son on yılda hız kazanmıştır. Önceden yalnızca PON1 enzimi tanınıyor ve araştırmacılar sadece PON1 enziminin toksikolojik özelliği araştırılıyordu. Zaman ilerledikçe iki yeni üye; PON2 ve PON3 enzimleri ile de çalışmalar artmıştır (Aviram and Rosenblat 2008).

Lipid peroksidasyonu, oksidatif strese önemli bir örnektir. Tüm lipid içeren yapılar örneğin: hücre membranı, bu olaydan dolayı hasar görebilmektedir. Peroksit türevleri

doymamış fosfolipidler, glikolipidler ve kolestrole etki ederek serbest radikal türevlerinin oluşumuna sebep olmaktadır. Örneğin: oksijen, peroksit ve hidroksil bileşiklerinin lipid peroksidasyonunu aşırı üretmesi ve antioksidan önleme sisteminin deformasyonunu sağlayarak kanser türlerinin oluşmasında önemli rolleri vardır (Balcı vd 2012).

1.6. Enzim İmmobilizasyonu

Enzim immobilizasyonu, enzimlerin fiziksel olarak belirli bir yere yerleştirilmesi veya hapsedilmesinin yanında katalitik aktivitelerinin de korunması, bu sayede de tekrarlanabilir ve sürekli uygulanabilir olmasını sağlamak amacıyla yapılmaktadır.

Genel anlamda üç tür enzim immobilizasyon yöntemi vardır. Bunlar; tutuklama, çapraz bağlama ve taşıyıcıya bağlama yöntemleridir.

Enzimlerin immobilize edilmelerinin avantajları ise; immobilize enzimlerin kullanım kolaylığı, reaksiyon karışımından enzimlerin kolayca ayrılmasının kolaylığı, tekrar kullanılabilirlik, düşük maliyetli, sıcaklık ve pH stabilitesidir. Bu avantajlarından dolayı immobilize enzimler ticari ürün olarak değerlendirilmektedirler. Protein immobilizasyonunun en önemli özelliklerinden bazıları, matrisin biyolojik olarak uyumlu ve inert bir ortam sağlaması, yani proteinin matris yapısı ile reaksiyona girmemesinin sağlanmasıdır.

Nanokristaller ve nanoporoz metal oksit yüzeyleri, enzim immobilizasyon için yeni matrisler olarak tanımlanmıştır. Son zamanlarda, nanopartiküller, küçük boyutları ve yüksek yüzey alanlarına sahip olmalarından dolayı enzim immobilizasyonu için çok kullanılmaktadırlar. Nanopartiküller, mekanik özellikleri, yüksek sertlik ve esneklik gibi özelliklerinden dolayı enzim immobilizasyonu için biyouyumlu ortamları sağlamaktadırlar. Biyosensörlerin gelişimi için bir başka önemli faktör ise saf enzimlerin immobilize edilmeleri sonucunda aktif formda sabitleştirilerek biyokatalizör görevinin etkili bir şekilde yapılmasını sağlamaktır. Dahası, enzim immobilizasyonu,

reaksiyon ortamının kirlenmesini önlemekte ve enzimin ortamdan uzaklaştırılması ile ilgili olarak, yüksek maliyet ve enzim inaktivasyonu gibi problemlerin üstesinden gelmek için uygun bir çözüm ve son derece seçici bir metoddur (Ansari *et al.* 2012).

1.6.1. Enzimlerin İmmobilizasyonunun Avantajları

1-Enzimler suda çözünen spesifik katalizörlerdir ve bir taşıyıcıya fiziksel, kimyasal yöntemlerle bağlanarak suda çözünmez hale gelirler.

2-İmmobilize enzim reaksiyon ortamından istenilen anda uzaklaştırılır ve reaksiyon istenilen anda durdurulur. (Genellikle serbest enzimlerde reaksiyonun durdurulması için ortama inhibitör katılır, bunun sonucu olarak ortamda bulunan inhibitörün arıtılması gereklidir, buda çok maliyetlidir).

3-Enzimlerin sanayi çapında tekrar kullanılması amacı ile immobilizasyon yöntemleri kullanılmıştır.

4-Enzimler çevre koşullarına (pH, sıcaklık, v.b) karşı daha dayanıklı ve daha kararlı hale getirilmiş olur (Enzimin parçalanması ve inhibisyonu azalır) (Palmer 2007).

1.6.2. Enzim İmmobilizasyonunun Dezavantajları

İmmobilize enzimlerin aktivitesi serbest enzimlere göre azalabilir ve reaksiyon sürecinde enzim aktivitesini kaybedebilir. Bu durumda biyo-sistemlerde immobilize enzimlerin kullanmasını sınırlamaktadır. İmmobilize enzimlerin aktivitesini sabit tutmak için yeni yöntemlere ihtiyaç vardır. Bu amaçla bazı literatürlerde enzim ve metal iyonlarının inkübasyonu rapor edilmiştir. Bu konu ile ilgili ilk araştırma Stanford Üniversitesi'nden önerilmiştir (Zare *et al.* 2012).

1.7. Nano Hibrit Yapılar

Hibrit nano çiçek yapısı yeni geliştirilmiş bir çeşit immobilizasyondur. Nano çiçek sentez mekanizması üç aşamadan oluşmaktadır. Erken büyüme aşamasında, metal Ca^{2+} birincil kristalleri oluşturulmaktadır. Bu aşamada, organik moleküller (protein), esas

olarak protein amid grupları aracılığıyla koordinasyon yoluyla metal ile kompleks yapılar oluşturulur. Bu kompleksler primer kristallerin çekirdeklenmesi için bir alan oluşturmaktadır. İkinci büyüme aşamasında, metal-protein kristalleri, protein moleküllerinin geniş agglomerler oluşturarak toplanmasıyla birincil yapraklar oluşur. Metal Ca^{2+} kristallerinin kinetik olarak büyümesiyle bu agglomerasyonların (Ca^{2+}) bağlanma bölgelerine sahip yüzeylerinde çiçek benzeri yapraklar oluşur. Son aşamada, anizotropik büyüme dallı bir çiçek benzeri yapının oluşumunu sağlamaktadır. Bu büyüme sürecinde, proteinler nano çiçeğin yaprakları için iskelet oluşturmakta ve yaprakları birbirine bağlamak için bir "tutkal" görevi yapmaktadır. Kararlılığı ve aktivitesi serbest enzimlere göre fazladır ve mikrometre boyutta olmalarına rağmen nano çiçek olarak adlandırılmışlardır. Enzimin stabilitesi ve verimi yüksektir. Nano hibrit yapılarının başlıca türleri bakır, kalsiyum ve mangan protein ve kapsül hibrit yapılarıdır. Enzimlerin protein gibi metal iyonlarına karşı kuvvetli bir affinitesi vardır. Bu şekilde enzimler genellikle metal yüzeyi üzerine immobilize edilmişlerdir (Wang *et al.* 2015).

Zare ve arkadaşları 2012'de immobilize enzim hazırlanması için yeni bir yöntem önermişlerdir. Bu yöntemde, enzimlerin faaliyetleri büyük ölçüde arttırılmıştır. Hibrit nanoçiçekler çeşitli enzimler ve metal yönleri kullanılarak kolay bir yöntemle sentezlenmişlerdir.

Başka bir araştırmada ise; Sun ve arkadaşları 2014'de, peroksidaz enzimini kullanarak (HRP)-organik hibrit nano çiçek yapılarını sentezlemişler ve ortamdaki hidrojen peroksit ve fenol miktarını belirlemek amacıyla kullanmışlardır. Çoklu enzim kullanılarak immobilize ve organik-inorganik hibrit nano çiçek yapılmış ve bir kolorimetrik sensör sentezlenmesi için kullanılmıştır. Enzim-inorganik hibrit nano çiçeklerin tüm avantajları belirlenmemiştir. Bu sebepten dolayı bu tip hibritlerin tüm avantajlarının belirlenebilmesi için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır (Wang *et al.* 2015).

Şimdiye kadar beş büyük hibrit nano çiçek türü sentezlenmiştir. Bu hibrit nano çiçekler; Bakır-protein, kalsiyum-protein, mangan-protein, bakır-DNA hibrit ve kapsüler hibrit nano çiçekleridir. Bu nano çiçeklerin yapısal özellikleri, örneğin boyut, şekil ve protein oranı, uygulamaları araştırılmıştır. Hibrit nano çiçek türleri, parçacıkların yapısına ve kullanılan metal ve organik materyalin türüne göre sınıflandırılmaktadır. Bunlar:

1- Bakır (II) iyonlar ile protein yapısından oluşan nanoçiçeklerdir. Bu kapsamda; Ge ve arkadaşları 2008'de bakır iyonlar ile protein etkileşim yoluyla yeni bir parçacık türü oluşturmuşlardır. Hidrojen peroksit ve fenolün, görsel tespiti için bakır ve HRP enzim ile, bir hibrit nano çiçek sentezlemişlerdir.

2- Li ve arkadaşları 2010'da tripsin hibrit nano çiçekleri sentezlemişlerdir. Tripsin hibrit nano çiçekleri yüksek proteolitik performans, iyi enzim kararlılığı, yeniden kullanılabilirlik gibi özellikleri göstermiştir.

3-Wang ve arkadaşları 2013'de kalsiyum iyonları ile hibrit nano çiçek yapılarını sentezlemişlerdir. Bakır nano çiçek sentezi için kullanılan aynı yöntemi kullanmışlardır. Bu yöntemin önceki sentez yöntemlerinden farkı ise iyonik bağ ile jel biçimli bir kompozit sentezlemek için kitosan ve tripolifosfat (TPP) kullanılmasıdır. Kalsiyum iyonları ve TPP, kalsiyum fosfat kristallerini oluşturur ve nano çiçek yapısı bu kristaller ile CS-TPP jel kompleksinin reaksiyonuyla elde edilmektedir. Bu yöntemde katalizör, CS-TPP jel kompleksin de kitosan ile elektrostatik etkileşim yoluyla birleştirilmiştir. Bu nedenle, her tür katalizör bu deneyde kullanılabilir. Bu yöntemde kalsiyum fosfat oluşumu çekirdeklenme bölgelerinde azaldığından, nano çiçek oluşumu için maksimum katalizör (0.5mg) ilavesi gerekmektedir. Nano çiçek sentezi için bu teknik, çeşitli organik maddelerin kullanması ile nanoçiçek üretimini kolaylaştıran yeni bir yaklaşım sağlanmıştır.

4- Zhang ve arkadaşları 2015'de Manganez (II) iyonları ile hibrit nano çiçekler sentezlemişlerdir. Mangan fosfat hibrit nano çiçekler, insanlarda akut zehirlenmeye neden olabilen Raktopamin'in ($C_{18}H_{23}NO_3$) saptanması için yeni bir elektrokimyasal biyosensör olarak kullanılmışlardır. Sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi, gaz kromatografisi-kütle spektrometresi, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve biyolojik sıvılarda raktopamin'in saptanması için birçok analitik yöntem geliştirilmiş

olmasına rağmen en iyi sonuç Zhang ve arkadaşlarının geliştirdiği biyosensör'den alınmıştır. Yapılan bu çalışmada, hibrit nano çiçeklerin kullanıldığı elektrokimyasal yöntemlerin daha hassas sonuç verdiği ortaya konulmuştur.

5- Hu ve arkadaşları 2014'de bakır (II) iyonlarını DNA nano çiçek sentezinde kullanmışlardır. DNA kullanma nedeni ise; DNA sulu ortamda oldukça yüksek çözünürlüğe sahip ve yapısında protein gibi yüksek bir azot atomu içerdiğinden metal iyonlarına bağlanarak hibrit nano çiçek sentezinde kullanılabilir olmasıdır. DNA hibrit nanoçiçek morfolojisi ve hücrelerin çözünürlüğü yüksek görüntülerini elde etmek için floresans rezonans enerji transferini (FRET) kullanmışlardır. Kısacası, araştırmacılar DNA şablonunda bir ilacın ve floresan boyaların eşzamanlı olarak eklenmesi için bir merkez oluşturmuşlar ve daha sonra, DNA'yı bir metal iyonuna bağlamışlardır. Sonuç olarak, hücreleri etkilemeyen uzun dalga boyundaki ışığı kullanarak boyalar arasında FRET temelli bir görüntü elde etmişlerdir. Böylece canlı hücrelerdeki ilaçların metabolitleri tarafından yayılan ışığı izlemeyi başarmışlardır.

6- Li Jiang ve arkadaşları 2010'da yaptıkları çalışmada; bakır (II) iyonları ve proteini kullanarak nano çiçekleri sentezlediler.

1.7.1. Organik-İnorganik Hibrit Nano Çiçeklerin Özellikleri

Hibrit nano çiçeklerin boyutu ve protein konsantrasyonu değişmektedir. Varyasyon aralığı yaklaşık $\pm 3 \mu\text{m}$ 'dir. Optimize edilmiş verilerin ortalama boyutu temel alınarak nano çiçeklerin boyutunun 2 ila 30 μm arasında değiştiği ve gözenek boyutunun (yapraklar arasındaki deliğin çapıdır) yaklaşık 0.1 μm olduğu belirlenmiştir. Hibrit nano çiçeklerin şekli, yuvarlak çiçeklerin şekline benzerdir. Termogravimetrik analiz (TGA) ile ölçülen toplam parçacık ağırlığına karşı protein ağırlığı oranı, proteinin toplam ağırlığının %10-66'ını oluşturduğunu göstermektedir. Ayrıca, daha fazla protein kullanıldıkça protein yüzdesi artmaktadır. Sabit bir inorganik bileşen ağırlığına proteinin aşırı eklenmesi ise, kapsülleme verimliliğinde dramatik bir düşüşe neden olduğu belirlenmiştir. Bu sebepten dolayı; iyi bir morfoloji ve yüksek bir ağırlık yüzdesi elde etmek için uygun miktarda protein seçilmelidir. Son olarak, hibrit nano çiçeklerin

enzim etkinliği serbest enzim çözeltileri ile karşılaştırıldığında, hibrit nano çiçeklerin enzim etkinliğinin %85 ila %100'in üzerine çıktığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar hibrit nano çiçeklerin yapraklarındaki protein hareketsizliğine rağmen karşılık gelen serbest enzim solüsyonlarına göre daha yüksek aktivite ve stabiliteye neden olduğunu düşündürmektedir. Dahası, hibrit nanoçiçeklerin daha önce karşılaşılan kütle transferi kısıtlamasının üstesinden geldiğine dair çeşitli araştırmalar yapılmıştır (Lee *et al.* 2015). Başka bir araştırmada da immobilize enzim, serbest enzime kıyasla yaklaşık %85 katalitik etkinliği muhafaza ettiği belirlenmiştir (Wang *et al.* 2014).

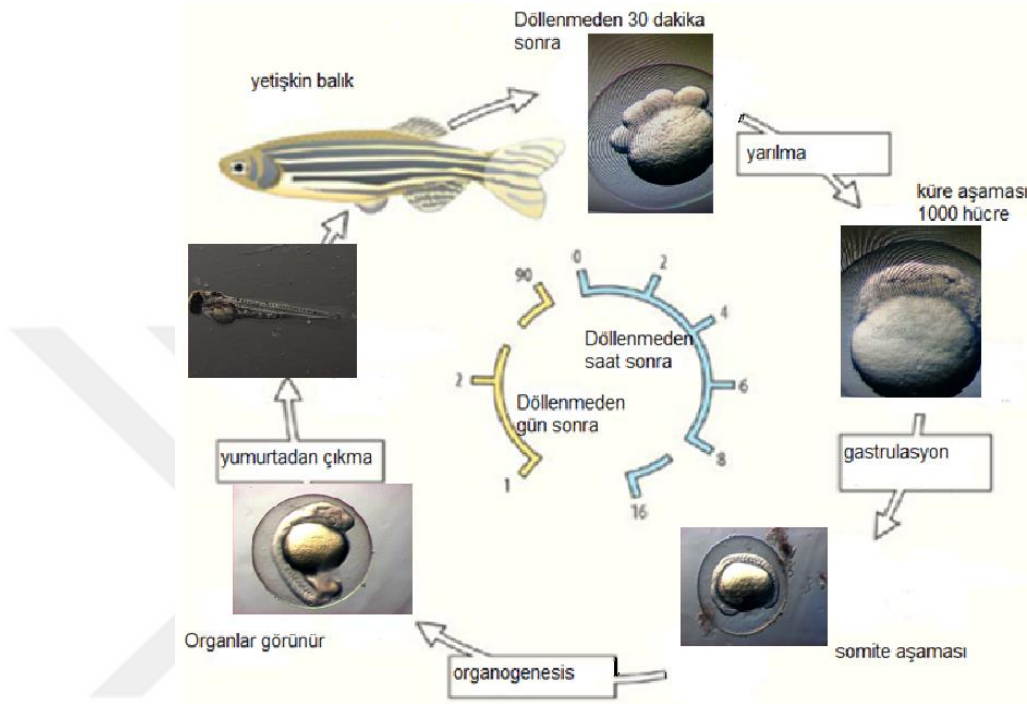
1.8. Serbest ve Hibrit PON1 Enziminin Toksisite Testi

Zebra balığı (*Danio rerio*), Cyprinidae ailesine ait olup genel olarak Hint kıtasında yaşayan küçük ve omurgalı balıktır. Zebrafish modelinin ortaya çıkışının sebebi bu hayvanın diğer omurgalı modellere kıyasla bazı avantajlı özelliklerinden kaynaklanmaktadır (Lewis and Eisen 2003; McGrath and Li 2008a).

Bu avantajları sıralayacak olursak;

- Boyutlarının küçük ve maliyetlerinin düşük olması
- Yüksek doğurganlığa sahip olması (yaklaşık 200-300 yumurta / haftada)
- Yaklaşık 3-4 ay süresinde, yetişkin zebra balığı olması
- Embriyonun şeffaflığı
- Genetik, anatomik, fizyolojik, hücresel ve moleküler seviyelerde insanlarla %85 oranında benzerliğe sahip olması
- 36 saat içinde gelişen tüm büyük organların öncüleri ile hızlı embriyonik gelişme ve döllenmeden 48 - 72 saat sonra tam gelişmiş larva (hpf) elde edilebilmesi
- Tamamlanmış dizi genomunun tanımlanmış olması
- Transgenik ve mutant zebra balıklarının nispeten kolay bir şekilde üretilmesini sağlayan güçlü genetik araçların artan kullanılabilirliği
- Bakım kolaylığı

- Zebra balığı larvası kendi yumurta sarısının içerisinde mevcut olan besin ögeleri ile 7 gün süreyle yaşayabilir.



Şekil 1.1. Zebra balığının yaşam döngüsünün diyagramı

(Balık yumurtalarının döllenmesinden yaklaşık 6 saat sonra gastrulasyon başlar, ardından 2-3 gün arasında kuluçka yapılır ve serbest larva oluşur. Zebra balığı yaklaşık 3 aylıkken cinsel olgunluğa erişir ve 5 yıla kadar yaşayabilir).

Bu özelliklere ek olarak, embriyoların şeffaflığı, morfolojik değişiklikleri (Hill *et al.* 2005), boyalarla ve antikorların (McGrath and Li 2008b) doku kesitine gerek duymadan mikroskop altında doğrudan ve gerçek zamanlı olarak gözlenmesine olanak tanır. Bu modelin diğer deneysel avantajları, gerekli olan küçük miktarda ilacın, esasen cilt ve solungaçlar yoluyla küçük moleküllerin çabuk emilme kabiliyetini içermektedir. Klasik olarak yavrular, 48 ila 72 hpf arasında yumurtadan çıkana kadar embriyo olarak kabul edilir. Daha sonra, larva dönemi sarısı emilimiyle başlar ve sarısı bitince balık oluşmuş olur (Rubinstein 2006).

1.9. Antioksidanlar

Gallik asit: Bitkilerde fenolik asitler hidroksi benzoik ve hidroksi sinamik asitler olarak iki gruba ayrılırlar. Gallik asit 3, 4, 5- trihidroksibenzoik asit olarak bilinen organik bir asittir. Sumak, çay yaprağı ve diğer bitkilerde bulunur. Gallik asit antimantar, antioksidan ve antiviral etkilere sahiptir. Normal hücrelere zarar vermeden, kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösterir (Nizamlioğlu vd 2010).

Quercetin, bir flavonol olarak kategorize edilmiştir. Altı alt sınıf flavonoid bileşiklerden birisidir. Flavonoller çok çeşitli meyveler ve sebzeler de bulunurlar. Birçok bitkinin kabuklarında yaygın olarak bulunan kimyasal bir pigmenttir. Diyetlerdeki önemli bir flavonoid olan bu madde, elma kabuğu, soğan ve çayda bulunur. Hücre kültüründe yapılan çalışmalar, kuersetinin belli tipteki kanser hücrelerine karşı çalıştığını göstermiştir (Gregory *et al.* 2011).

Pirogallol, gallik asit'in ısıtılmasıyla hazırlanabilen bir trihidroksi benzen veya dihidroksi fenoldür. Polifenoller meyveler, sebzeler, fındıklar, tohumlar, çiçekler ve kabuklarda doğal yaygın olarak bulunan bitki metabolitleridir. Reaktif oksijen türleri (ROS) ile kolayca reaksiyona girerek güçlü antioksidan aktiviteye neden olurlar (Mitsuhashi *et al.* 2008).

C-Vitamiini aynı zamanda askorbik asit olarak da bilinir. C vitamini, kimyasal formülü $C_6H_8O_6$ ve molekül ağırlığı 176,12'dir. Bazı gıdalarda bulunur ve suda çözünen bir vitamindir. Bu suda çözünür vitamin; kemik, kıkırdak, kas ve kan damarlarına yapısal özellikler kazandıran bir protein olan kollajenin oluşturulmasında önemlidir. Ayrıca demir emilimi ile, kılcal damar, kemik ve dişlerin korunmasına yardımcı olur (Sies *et al.* 1995).

Askorbik asit güçlü bir antioksidandır. Çünkü bir hidrojen atomu bağışlayabilir ve nispeten stabil bir askorbil serbest radikal oluşturabilir (Weber *et al.* 1996).

Askorbik asit doğada yaygın olarak bulunur; çoğunlukla taze meyveler, hardal yaprağı ve ıspanak gibi yapraklı sebzeler C vitamininin en iyi kaynaklarıdır (Tee *et al.* 1997).

1.10. Antilipit İlaçlar

Kolesterolü düşürmek için birkaç çeşit ilaç kullanılmaktadır. Bunlar içerisinde statin olarak adlandırılan ilaçlar, en çok kullanılan ve kanda LDL lipoprotein seviyesini düşüren ilaçlardır. Bu ilaçlar karaciğerde kolesterol yapımını azaltarak etki gösterirler.

Fibrik asit türevleri Fibratlar; VLDL kolesterol düzeyinde azalma ve trigliseridlerin %50 azaltılmasını sağladıkları için özellikle hipertrigliseridemi tedavisinde önemlidir.

Gemfibrozil, klofibrat, fenofibrat ve bezofibrat bu grubun önemli ilaçlarıdır. Fenofibratın, LDL kolesterol düzeyini klofibrat ve gemfibrozilden daha etkili bir şekilde düşürebildiği ve HDL kolesterol düzeyini de % 25'e kadar artırabildiği tespit edilmiştir (Kılıçarslan vd 2003).

Bu çalışmada üç antilipit ilacının etken maddesi seçilerek analiz edildi. Bunlar;

1. Valerik asit
2. Fenoksi –izobütirik asit
3. N- desmetil Rosuvastatin

1.11. Lipitler

Canlılarda lipidler kan dolaşımında lipoproteinler halinde taşınmaktadır. Lipoproteinler 5 farklı sınıfa ayrılmaktadır:

1. Şilomikronlar
2. Çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL)

3. Orta yoğunluklu lipoprotein (IDL)
4. Düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL)
5. Yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL)

Karaciğerde karbonhidratlar ve yağ asitleri fazla miktarda ise, endojen trigliserid (VLDL) haline dönüştürülür ve kana verilirler. Zaman içinde VLDL'lerden salınan serbest yağ asitleri ayrılınca lipit VLDL'lerde azalır ve ara yoğunluklu lipoprotein (IDL) ve düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) haline dönüştürülür. LDL'ler kolesterolü karaciğerden başka dokulara taşınmasında rol oynar. HDL'ler ise karaciğerde ve ince bağırsak duvarlarında sentezlenir. HDL'lerin en önemli görevi kolesterolü ve fosfolipidleri karaciğere taşımaktır. Normal bir lipit metabolizmasında sentez, depolama ve parçalanma olayları biyolojik bir denge içinde gerçekleşmektedir. Bu dengelerin bozulması halinde lipit metabolizması bozulur. Lipid metabolizması bozuklukları şişmanlık, arteroskleroz gibi bazı hastalıklara neden olmaktadır (Boder *et al.* 2010).

Lipidler karbon, hidrojen, oksijen atomlarından ve uzun hidrokarbon zincirlerinden oluşmaktadır ((CH₂O)_n).

Lipidler şu şekilde sınıflandırılabilir;

1. Basit Lipidler
2. Bileşik Lipidler (Fosfolipidler, lipoproteinler)
3. Türemiş Lipidler (Kolesterol)'dir.

Yağlar genelde iki farklı bileşenden oluşmuştur. Bu bileşenler gliserol ve yağ asitleridir. Yağlar iki formda bulunabilirler. Bunlar;

1. Doymuş yağlar
2. Doymamış yağlar

Hayvansal gıdalar fazla miktarda tüketildiğinde kanda kolesterol seviyesi yükselmekte ve öylece kalp, damar hastalıkları, kanser ve şişmanlığa neden olmaktadır. Doymuş yağlar vücutta hem kolesterol, hem de LDL seviyesinin (kötü kolesterol) (düşük yoğunluklu lipoprotein) yükselmesine neden olmaktadır. Doymamış yağlar hem HDL seviyesini yükseltir, hem de LDL seviyesini düşürürler. LDL'ler kolesterolü karaciğerden başka dokulara taşınmasında rol oynarken; HDL kolesterolü ve fosfolipidleri karaciğere taşımakla görevlidir (Boder *et al.* 2010).

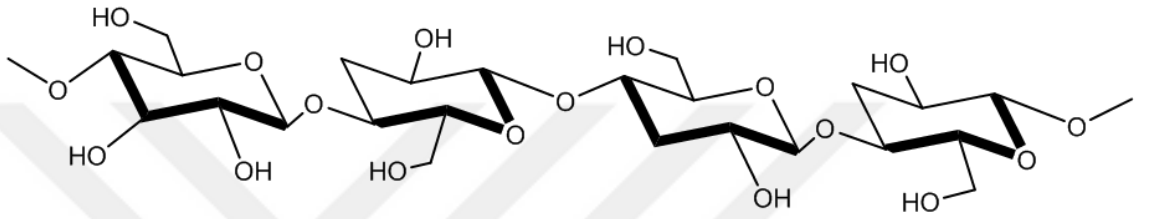
1.12. Kitosan

Kitin doğal olarak oluşan selülozdan sonra ikinci doğal polimerdir. Kabuklu hayvanların dış iskeletinde, mantar hücre duvarlarında ve diğer biyolojik materyallerde bulunmaktadır. Heksoz biriminin tekrarı ve ikinci karbon atomundaki hidroksilin bir asetamid grubuyla değiştirilmesi haricinde selüloz ile yapısal olarak aynı olan poli (β -(1-4)-2-asetamid-D-glukoz) yapısındadır. Kitosan, alkali varlığında deasetilasyonu ile kitinden türetilmektedir. Bu nedenle kitosan, (β -(1-4)-2-amino-D-glukoz ünitelerinden oluşan ve genellikle %80'i aşan bir kopolimerdir. Kitosan, deasetilasyon derecesi ve ortalama molekül ağırlığına göre türlere ayrılır. Kitosanın önemli özellikleri; katyonik, antimikrobiyal, antifungal ve insektisidal olmasıdır (Bourtoom 2008).

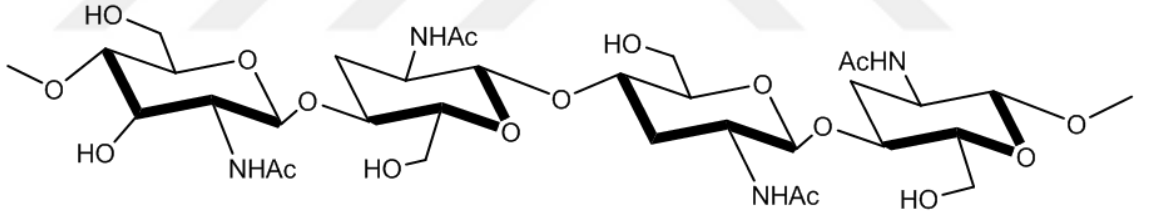
Kitosan beyaz renkte, kokusuz, tatsız, suda çözünmeyen, ancak asidik çözücülerde çözünebilen, toz şeklinde bir maddedir. Kitosan çöktürme, nem tutma ve film oluşturma özeliğine sahiptir. Bu özelliklerinden dolayı kitosan birçok farklı alanda (örn: gıda, endüstri, ziraat, medikal, kozmetik, biyoteknoloji, su arıtma, vb) kullanılabilmektedir (Bostan vd 2007).

Kitosan iki yüzyıl önce kullanılmaya başlanmıştır ve bir polisakkarit polimer malzemesidir. Ana malzemesi olan kitin de doğal bir polisakkarittir ve kabuklu deniz hayvanlarının kabuklarında bol miktarda bulunmaktadır. En zengin kitin kaynakları ise: Yengeç, karides, ıstakoz ve kerevitdir (Mehdizade 2013).

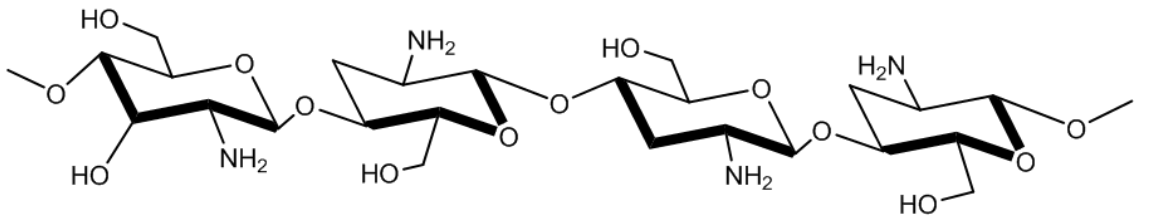
Roget, 1859 yılında, 180°C'deki KOH çözeltisine kitin ilave ederek onu kitosana dönüştürdü. Kitin esas olarak (poli- β -(1,4)-2-asetamid-2-deoksi- β -D-glukopiranoz) monomerlerinden oluşmaktadır. Kitosanın ise, kimyasal yapısı, poli-(β -(1,4)-2-amino-2-deoksi- β -D-glukopiranoz) şeklindedir. Bu glikozitler yan zinciri olmayan doğrusal polimerdirler. Selüloz, kitin ve kitosan moleküllerinin yapısı Şekil 1.1-2.4'de verilmiştir.



Şekil 1.2. Selüloz yapısı



Şekil 1.3. Kitin yapısı



Şekil 1.4. Kitosan yapısı

Kitin molekülü yapısal olarak selülozdaki gibi dallanmamıştır. Ancak selüloz yapısının ikinci karbon atomuna bağlı hidroksil grubunda, kitin molekülünde asetamid

(-NHCOCH₃) grubu ve kitosan molekülünde ise amin (-NH₂) grubu bulunmaktadır. Kitosanın ikinci karbonunun pozitif yüklü olması ile polimer polikasyonik özellik kazanmaktadır. Bu özelliğinden dolayı polianyonik bileşikler ile (proteinler, DNA, hücre zarı) birleşebilmektedir. Kitin ve kitosan non-toksik ve non-alerjik olduklarından dolayı vücutta ateşe neden olmazlar, yani vücutta hiçbir sorun ve hiçbir uyumsuzluk göstermezler. Kitosan; laboratuvar ve endüstriyel ölçüde kabuklu deniz ürünlerinin kabuklarından hazırlanmaktadır. Bu kabukların kitinin %50 oranında deasetilasyonu sonucunda kitosan elde edilmektedir. Elde edilen kitosan yüzde bir asetik asit veya laktik asit içeren çözücülerde çözünmektedir (Mehdizade 2012).

Kitosan 1990'lerden beri ticari olarak satılmaktadır ve piyasada farklı türleri mevcuttur. Kitosan hazırlanmasına göre farklı özelliklere sahiptir. Kitosan kimyasal, enzimatik ya da kombine yöntemlerle hazırlanabilmektedir (Moradi *et al.* 2010).

Kitosan sağlık sektöründe, su arıtmada, tarım ve gıda gibi çeşitli sektörlerde kullanımı mevcuttur. Kitosanın %10'u gıda endüstrisinde kullanılmaktadır (No *et al.* 2007).

Kitosan non-toksik bileşik olmasına rağmen uzun süre kullanımı, bağırsak florasının kompozisyonunda değişikliklere neden olabildiği belirlenmiştir. Yapılan bir çalışmada; %10 oranında kitosan verilen farelerde herhangi bir sorun görülmediği belirlenmiştir. Aynı şekilde, 12 hafta boyunca kitosan tüketen insanlarda ise önemli yan etkilere neden olmadığı belirlenmiştir (Raafat *et al.* 2009).

Kitosanın diğer biyolojik özelliklerinden biri de ilaç salınım araçları olarak kullanılmalarıdır. Kitosanın etki mekanizmasını şöyle sıralayabiliriz:

1. Kitosan antibakteriyel özelliğe sahiptir ve aynı zamanda katyonik özelliği vardır. Böylece bakterilerin membranında kalsiyum iyonları ile rekabet içinde bulunur ve bakteri membranlarını geçirgen yapmaktadır.
2. Kitosan oligomerleri mikroorganizma membranından geçerek transkripsiyonda DNA'nın RNA'ya dönüşümünü engellemektedir.

3. Kitosan bazı metaller ile şelat oluşturarak bakteriler tarafından toksin üretimini engellemektedir.
4. Kitosan su emme kapasitesine sahiptir, böylece mikroorganizmaların önemli enzimlerinin inhibe olmasına neden olmaktadır.
5. Kitosan bakteriler gibi aktif maddelerin transferini engeller. Kitosan molekülü katı formda olduğu için, kitosanla doğrudan temasta olan mikroorganizmalar tutulmaktadır. Kitosan MIC (minimum inhibitör konsantrasyon) yukarıda belirtilen faktörler tarafından etkilenmektedir. Farklı çalışmalarda, kitosan için farklı MIC'lar kaydedilmiştir (Moradi *et al.* 2010).

Kitosan U.S.FDA tarafından GRAS (Generally Recognized As Safe) olarak sınıflandırılmıştır. EU, kitosan günlük 3 g konsantrasyonu güvenli gıda katkı maddesi olarak kabul etmiştir (Commission Regulation (EU) No 432/2012) (Khanjari *et al.* 2013).

Bu çalışmada;

İnsan popülasyonlarında Paraoksonaz (PON1) enzimin serumdaki miktar ve kalitesi bir kişinin OP zehirlenmesi veya vasküler hastalıkların gelişme riskini etkilemektedir. PON1 enzimini anlamak hayati önem taşımaktadır. Bu nedenle PON1 enziminin insan serumundan saflaştırılması ve magnetik kitosan nanopartiküller üzerine kovalent olarak immobilize edilmesi, nanoçiçek hibrit PON1 enzim yapıları sentezlenmesi, karakterizasyonu ve bazı ilaçların bu enzim sistemlerinin aktiviteleri üzerine *in vitro* olarak etkilerinin araştırılması ve saflaştırılan serbest enzim ve nano çiçek hibrit yapılarının zebra balığı modeli üzerinde toksik etkileri *in vivo* olarak incelenmesi amaçlanmaktadır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Paraoksonaz Enzimi

İnsan plazması, bütirikolin esteraz (EC 3.1.1.8), paraoksonaz (EC 3.1.8.1), asetilkolin esteraz (EC 3.1.1.7) 3 esteraz içermektedir.

İnsan paraoksonazı (PON1) 43-45 kDa ağırlığındaki ve fiziksel olarak HDL ile ilişkili ve kalsiyum bağlı bir enzimdir ve HDL'nin ateroprotektif etkisine katkıda bulunduğu düşünülmektedir. PON1 enzimini ile ilgili ateroskleroz obliteranslı yapılan çalışmada PON1 durumunun, aktivitesi ve fenotip dağılımı açısından iskemi etkisi olduğu belirlenmiştir (Magdalena *et al.* 2014).

PON1, yüksek yoğunluklu lipoproteinlerin (HDL) önemli bir bileşenidir ve HDL'nin antioksidan/ateroprotektif özelliklerinden kısmen sorumludur. PON1, kardiyovasküler hastalıklar, Parkinson hastalığı ve kanser gibi çok sayıda hastalıkla ilişkilidir. Ek olarak, PON1 enziminin toksik organofosfor, glukokortikoidler, muhtemel aterojenik L-homosistein tiolakton gibi bileşiklerin hidrolizde etkili olduğu belirlenmiştir.

PON1'in HDL işlevinde olan önemi ve çeşitli insan hastalıklarıyla bireysel olarak ilişkisi nedeniyle, PON1 enziminin ekspresyonunu ve aktivitesini değiştiren çeşitli faktörler arasındaki farmakogenomik etkileşimler, gelecekteki araştırmalar için önemli bir terapötik hedef oluşturacaktır (Daniel *et al.* 2013).

Paraoksonaz-1 (PON1), metabolizmada antioksidan özelliklere sahip organofosfatları hidrolizleyen bir enzimdir. Çok önemli işlevleri nedeniyle, PON1 enzim aktivitesinin her durumda etkilenmemesi önemlidir. Bu nedenle bu enzim aktivitesini etkileyen faktörlerin araştırılmasına yönelik çalışmalar büyük önem arz etmektedir. Enzimlerin metal toksikolojisi son yıllarda popüler hale gelmiştir. Burada, Pb (+2), Cr (+2), Fe (+2) ve Zn (+2) dahil olmak üzere bazı metal iyonlarının *in vitro* inhibitör etkilerini insan

serum PON1 (EC 3.1.8.1.) enzimi üzerinde incelenmiştir. Bu amaçla PON1 enzimi insan serumundan saflaştırılmış ve bazı metal iyonların enzim aktivitesindeki değişiklikleri analiz edilmiştir. Sonuçlar, metal iyonlarının düşük konsantrasyonlarda PON1 enziminin üzerinde önleyici etkiler gösterdiğini ve IC (50) değerleri 0.838 ila 7.410 mM arasında değiştiği belirlenmiştir (Aviram and Rosenblat 2008).

2.1.1. İnsan PON1 enziminin yaşlanma ile olan ilişkisi

Birçok çalışma, yaş ilerledikçe insan serum PON1 aktivitesinde meydana gelen azalmanın sonucunda HDL'nin koruyucu fonksiyonlarını kaybedildiğini göstermiştir. Öte yandan, PON1 genindeki polimorfizm yaşlanmayla ilişkili olup, PON1'in uzun ömürlü bir protein olduğu öne sürülmüştür. Bununla birlikte, büyük bir meta-analiz, PON1-192 SNP ve insan ömrü arasında bir ilişki bulunamamıştır. Yapılan bir çalışmada, PON1 enzim aktivitesi yaşla azalırsa, PON1 aktivite ölçümlerinin önemli olabilir. Fakat elde edilen bulgular PON1'in hücresel yaşlanmada işlevsel bir role sahip olduğunu ve aynı zamanda yaşlanmaya bağlı bir protein olarak işlev gördüğünü ortaya koymaktadır. Yaşlanan bir dünya nüfusuyla sağlıklı yaşlanma önemli bir hedeftir, bu nedenle PON1'in bu yeni ve potansiyel olarak heyecan verici fonksiyonu üzerinde daha fazla çalışma yapılması faydalı olacaktır (Mackness *et al.* 2016).

2.1.2. İnsan PON1 enziminin kanser ile olan ilişkisi

Düşük PON1 aktivitesi çok çeşitli kanser gelişimiyle bağlantılı olduğu yapılan çalışmalara vurgulanmaktadır. Dowling ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada; tahrip edici kemik hastalığı mevcut olan 111 multiple miyelomalı hastaları incelediler ve serum PON1 konsantrasyonunun kemik hastalığı derecesine göre pozitif olarak bağlı olduğu belirlediler. Ayrıca, multiple miyelomalı hastalarının tanılanmasında PON1 enziminin tanısal bir marker olabileceğini belirttiler (Mackness *et al.* 2016).

2.2. Enzimin Saflaştırılması

Paraoksonaz enzimi karaciğerde, mikrozomlarda ve serumda HDL ile bağlı olarak bulunmaktadır (Klimov *et al.* 1993).

PON1 enziminin saflaştırılması için, çok çeşitli metotlar tanımlanmıştır. Sıklıkla uygulananları metotlar şunlar: hidroksiapatit adsorbsiyonu, DEAE anyon değiştirme, amonyum sülfat çöktürmesi, Sepharose 4B-L-Tirozin-1-naftilamin afinite kromatografisidir (Demir vd 2006; Demir vd 2008; Gan *et al.* 2004).

Paraoksonaz enziminden homojen ve yüksek bir saflık elde etmek oldukça zordur. Serumda PON1 enzimi HDL'den uzaklaştırılması için yüksek tuz konsantrasyonu kullanılması gerekmektedir (Demir ve ark. 2006; Demir ve ark 2008; Demir ve ark 2011; Demir ve ark 2015; Gan *et al.*1991; Furlong *et al.*1991).

Kromatografik teknikler çok pahalı ve zaman alıcı basamaklardan oluşur. Üç fazlı ayırma işlemi (TPP), karışımlardan proteinlerin ayrılması ve saflaştırılması için basit, hızlı, verimli ve genellikle tek basamaklı işlemidir. Bu hızlı ayırma yönteminin prensibi, üç aşamada elde etmek için amonyum sülfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) ve organik bir çözücü (genellikle n-bütanol) ile karıştırılmasından oluşur. Bu yöntemde enzimler veya proteinler, santrifüj işleminden sonra üç faza ayrılır. Üst faz organik bileşiklerden (Lipidler), orta faz enzim ve alt faz sudan oluşur. Amonyum sülfat kullanılımasının bir çok avantajı vardır. Bu avantajlar; ucuz olması, kolaylıkla bulunması ve yüksek çözünürlüğüdür. Salting mekanizmasının verimliliği amonyum Sülfat miktarına ve çözeltinin iyonik kuvvetine bağlı olmaktadır. Örneğin, daha yüksek tuz konsantrasyonlarında, su molekülleri tuz iyonları tarafından çekilir; daha güçlü protein-protein etkileşimleri ortaya çıkar ve protein molekülleri, hidrofobik etkileşimler yoluyla çökeler (Gagaoua *et al.* 2016).

2.3. Hibrit PON1 Enzim

Enzimlerin nanoyapılı materyallere dahil edildiği nanobiyokataliz, proteomik analiz ve biyolojik sensörler ile ilgili potansiyel uygulamaları nedeniyle yapılır. Nanoporoz silis, nano tabakalar, nanotüpler ve nanopartiküller de dahil olmak üzere nanoyapılar, enzimin nanoküre ortamının manipülasyonunda büyük verimlilik sergilemektedir. Nanoçiçekleri sentezlemek için çeşitli yaklaşımlar geliştirilmiş olmasına rağmen, bugüne kadar yapılan girişimlerin çoğu elemental metallerin oksidasyonu, metal tuzlarının indirgenmesi, nispeten kararsız bileşiklerin termal ayrışması ve elektrokimyasal yollarla yoğunlaşmıştır. Bunların arasında, sert koşullarda (yüksek sıcaklık, basınç ve toksik organik çözücülerin kullanılması), kontrolsüz büyümeden veya morfolojik deformasyonlardan kaçınmak için özel tedbirler alınmalıdır. Bu nedenle, kontrollü ve iyi düzenlenmiş hiyerarşik nanoçiçekler için düşük maliyetli ve kolay sentetik bir yöntem Ge ve arkadaşları (2008) tarafından elde edilmiştir. Bu tür hibrit nanotüplerin yeni avantajlarını keşfetmek için daha fazla çalışma yapmak gerekmektedir (Zian *et al.* 2014).

Bir çalışmada; yeni geliştirilen çiçek benzeri hibrid nanopartikül tiplerini, yapısal özelliklerini, oluşum mekanizmalarını ve biyolojik olarak ilişkili uygulamalarını detaylı olarak incelenmiştir. Hibrid nano çiçek yapılarının yüksek verimlilik ve enzim kararlılığı, ile kolayca elde edilmesi ve organik-inorganik hibrid nano çiçeğin biyoteknoloji endüstrilerinin hızla gelişmesine yol açacağı ilan edilmiştir (Seung *et al.* 2015).

Başka bir çalışmada, soya fasulyesinden elde edilen peroksidaz enzimi için, organik-inorganik yapılı nano çiçek yapısını oluşturmuşlardır. Yüzlerce nanopartikül içeren hiyerarşik bir çiçek benzeri küresel yapı, organik bileşen olarak soya fasulyesi peroksidazı (SFP) ve inorganik bileşen olarak $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ kullanılarak oluşturulmuştur. Hibrid nano çiçeklerin yapısı, FT-IR (Fourier dönüşümü infrared spektroskopisi), XRD (X-ray diffraction) ve EDX (enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi) ile teyit edilmiş ve hibrid nanoçiçeklerde gömülü SFP'nin enzimatik aktivitesi substrat

olarak gualikol (guaiacol) kullanılarak değerlendirilmiştir. Çözeltilerdeki serbest saf SFP ile karıştırıldığında, hibrid nanoçiçekler içine gömülmüş ve enzimatik aktivitesinde serbest enzime göre artmıştır (~%446). Hibrid nanoçiçekler ayrıca, çevrim analizi sırasında mükemmel tekrar kullanılabilirlik ve tekrarlanabilirlik sergilemişlerdir. Bu sonuçlar, hibrid nanoçiçek sentezinin etkili bir enzim immobilizasyon stratejisi olduğunu göstermiştir (Yu *et al.* 2015).

Nanoteknolojinin tıpta ve daha özel olarak ilaç dağıtımında kullanımı hızla yayılmaya başlamıştır. Halen bu alanda anestezi amaçlı ve özellikle kanser tedavisi için birçok madde araştırılmaktadır. Özellikle kullanılan ilaçların toksisitesini ve yan etkilerini azaltmak için nanopartiküller kullanılmaktadır. Parçacık madde toksikolojisi, kimyasalların biyolojik matriste çözünüp çözünmemesine göre çeşitli iç organların potansiyel maruziyetini etkilediğinden maddelerin toksikolojisinden farklıdır. Bununla birlikte, emilen türler, solunan parçacıkların potansiyel toksikliğini de etkileyebilir. Nanopartiküller için durum, boyutları vücudun içindeki çeşitli biyolojik engelleri ve olumlu bir bakış açısından, özellikle kan beyin bariyerini geçme potansiyeli, morfini beyne götürmek için yeni yollar açabilir. Buna ek olarak, nano boyut hücreye ve çekirdek de dâhil olmak üzere çeşitli hücre bölmelerine erişim sağlamaktadır. Lipozomlar için albümin, jelatin ve fosfolipidler gibi biyolojik maddelerden ve çeşitli polimerler ile katı metal içeren nanoparçacıklar gibi daha kimyasal maddelerden ilaç verimi için nanoparçacıkların hazırlanması için halen çok sayıda madde araştırılmaktadır. Nanopartikül toksikolojisinin tüm yönlerinin saptanması için, daha spesifik testlere ihtiyaç duyulmaktadır (Wim *et al.* 2008).

2.4. Zebra Balığı

Zebra balığı popüler bir akvaryum balığıdır ve 60'lı yılların sonunda George Streisinger tarafından bir deney hayvan modeli olarak tanıtılmış olup biyomedikal araştırmalarında kullanımı son yıllarda yaygınlaşmıştır. Zebra balığı, toksikolojik araştırmalarda belirgin bir model organizma olarak, ilaç toksisitesi güvenlik ve ekotoksikolojik taramayı

değerlendirmek için bir *in vivo* model olarak gittikçe artan bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır (Parng *et al.* 2002).

Zebra balığı embriyo ve larvalarının küçüklüğü (1-4 mm), hücre kültürü plakalarında veya petri kaplarında test edilmesini sağlamaktadır. Aynı sayıda yavrunun aynı anda birkaç kopyanın yürütülmesine izin vermektedir. Ayrıca, bütün hayvanı kullanmak toksisite araştırmaları açısından son derece avantajlıdır, çünkü insanlara kolaylıkla çıkarılabilen korelasyon bilgileri sağlamaktadırlar (Shaukat *et al.* 2011).

Zebra balığı modelinin toksikolojideki yararlılığını birçok çalışma zaten kanıtlamıştır. Dahası, insanlar da dahil olmak üzere zebrabalığı ve memeliler arasında organ toksisitesi ile çok iyi bir korelasyon vardır (McGrath *et al.* 2008) .

Daha önce belirtildiği gibi, zebra balığı ile yapılan deneyler genellikle yumurta sarısı beslenmenin başlıca kaynağı olan erken yaşam evresi sırasında oluşur ve tamamlayıcı beslenme ihtiyacı yoktur. Zebra balığı organları, tamamen gelişmemiş olsalar bile, tamamen işlevsel oldukları zaman, gelişimin embriyonik ve larval evrelerini içermektedir (Pickart and Klee 2014).

Zebra balığı, genetik ve gelişme gibi pek çok biyolojik kavramın öğrenilmesinin geliştirilmesi için bir öğretim aracı olarak giderek daha fazla kullanılmaktadır. Geleneksel olarak, hem araştırma hem de öğretimde, zebra balığı eseri embriyonik aşamalara odaklanmıştır. Bununla birlikte, larvadan yetişkinliğe kadar geçen aşamalar da incelenebilmektedir. Zebra balığı için çeşitli evreleme serileri bulunurken, burada hem eğitim hem de araştırma kullanımına uygun post-embriyonik olgunlaşmanın basitleştirilmiş bir normalizasyon tablosu sunulmaktadır. Spesifik olarak, üç larva aşamasını, gençlik dönemini ve yetişkin aşaması tanımlamak için balık boyutunu ve kolaylıkla tanımlanmış dört dış morfolojik özellik (pigment görüntüsü, kuyruk yüzgeci, anal yüzgeç ve dorsal yüzgeç morfolojisi) kullanılmaktadır. Bu basitleştirilmiş olgunlaşma standartları hem eğitim hem de araştırma protokolleri için yararlı bir araç olacaktır (Singleman *et al.* 2014).

Amerika Birleşik Devletleri'nde Sevin markalı insektisit en çok kullanılan böcek ilacı maddelerinden biridir. Sevin'deki aktif bileşen, karbaril (1-naftil-N-metilkarbamat), asetilkolinin asetata ve kolin'e sinapsda parçalanmasını önleyen bilinen bir asetilkolinesteraz (AChE) inhibitörüdür. Karbaril, böceklerin felce uğramasıyla başarıyla ölümüne neden olmakla birlikte, çeşitli hedef dışı türlerin gelişimi üzerinde olumsuz etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Karbaril bileşiğinin toksisitesini incelemek için, zebra balığı (*Danio rerio*) kullanılmıştır. Çünkü bunlar hem toksikoloji hem de geliştirme çalışmaları için iyi bir modeldir (Shock *et al.* 2012).

Bu çalışmada, insan (HGNC: 9204) ve zebra balığı (Zgc: 91887) enzimleri arasındaki büyük benzerlik olduğu belirlenmiştir.

Zebra balığı pronefro'nun insan böbreği ile benzerliğinden dolayı nefrotoksisite araştırmaları için iyi bir model olacağı varsayılmaktadır. PON1, böbrek hastalığının potansiyel bir biyolojik belirteçi olarak incelendiğinde, üçüncü objektif tutma, PON1 aktiviteleri ile nefrotoksisite arasındaki ilişki incelenerek uyuşturucular arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. Yapılan bu çalışmada, zebra balığı ve insan üzerindeki nefrotoksisite arasında bağlantı olduğu kanıtlanmış ilaçlar olan Tenofovir disoproksil fumarat (TDF) ve parasetamol (PCM) iki konsantrasyonda test edilmiştir. Elde edilen bulgulardan her iki ilaç için de balık AREase aktivitesinde belirgin bir düşüş olduğu gözlenmiştir (Andreia Pires Afonso 2015).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan cihazlar

Buzdolabı	(Bosch KAN62V70NE-Ever Med Medical refrigeration)
Derin dondurucu	(Bosch)
Distile su cihazı	(GFL 2004)
Elektroforez	(BioRad)
Etüv	(P Selecta Cod:2001248)
E3	(E3: Embryo medium)
Hassas Terazi	(KERN ABS)
Manyetik karıştırıcı	(Wise Stir MSH-20D, Stuart SB162-Are)
Otoklav	(P Selecta)
pH Metre	(Crison Basic 20)
Santrifüj	(J.P. Selecta Centrifriger-BL)
Soğutmalı santrifüj	(centrifriger-BL II) (P selecta)
Su Banyosu	(P Selecta)
UV-VIS Spektrofotometre	(PG Instrument T80 UV/VIS Spektrofotometer)
Ultrasonikatör	(P Selecta)
Vorteks	(Heidolp)
Nanodrop Epoch	UV/VIS Spektrofotometer
Mikroskop (Stereo)	Zeiss

3.2. Kullanılan Kimyasallar

İnsan serumu, Paraoksan ($C_{10}H_{14}NO_6P$), N-bütanol, Amonyum sülfat ($(NH_4)_2SO_4$), $CaCl_2$, Tripolifosfat (TPP), Fenil asetat, L-Glutaraldehit, Merck (Darmstadt, Almanya), Sodyum asetat ($C_2H_3NaO_2$), Sodyum karbonat (Na_2CO_3), Sodyum Fosfat (Na_3PO_4),

Sodyum hidroksit (NaOH), Hidroklorik asit (HCl), Coomassie Blue R250 ($C_{45}H_{44}N_3NaO_7S_2$), Glisin ($C_2H_5NO_2$), Demir(III)oksit (Fe_3O_4), Kitosan($C_{12}H_{24}N_2O_9$), Gemfibrozil ($C_{15}H_{22}O_3$), Trirole ($C_2OH_{21}ClO$), Ropixon ($C_{22}H_{28}FN_3O_6S$), Dimetil sülfoksit (DMSO), Fosfork asit(H_3PO_4).

Tüm kimyasallar analitik saflıkta kullanılmıştır.

3.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

3.3.1. Tampon çözeltilerin hazırlanması

Paraoksanaz enziminin optimum pH değerinin tayininde, farklı tamponlar kullanıldı. pH (3.0, 4.0, 5.0) değerleri için sodyum asetat tamponu ve pH (6.0, 7.0) değerleri için sodyum fosfat tamponu, pH (8.0 ve 9.0) değerleri için glisin tamponu ve pH (10.0) değeri için karbonat tamponu kullanıldı.

3.3.2. Sodyum asetat tamponu

10 mM asetat tamponu için; 0.82 g sodyum asetat 80 mL saf suda çözülüp, pH değerleri 3-4-5 için 0,1 M'lık NaOH ve/veya HCl çözeltisi ile ayarlandıktan sonra son hacim 100 mL'ye saf su ile tamamlandı.

3.3.3. Sodyum fosfat tamponu

10 mM sodyum fosfat tamponu için 7,3 g sodyum fosfat 80 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı (8.0 ve 9.0) ayarlamak için 0.1 M'lık NaOH ve/veya HCl çözeltisi kullanıldı. Son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

3.3.4. Glisin tamponu

10 mM glisin tampon hazırlaması için; 0.075 g glisin 80 mL saf suda çözüldü, sonra pH değerlerinin (pH: 10.0) ayarlanması için 0.1 M'lık NaOH ve/veya HCl çözeltiler kullanıldı ve son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

3.3.5. Karbonat tamponu

10 mM karbonat tampon hazırlaması için; 0.0106 sodyum karbonat 80 mL saf su'da çözüldü, sonra pH değerlerinin (pH: 10.0) ayarlanması için 0.1 M'lık NaOH ve/veya HCl çözeltiler kullanıldı ve son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

3.3.6. Fenil asetat çözeltisinin hazırlaması

1 mM fenil asetat substratı hazırlaması için 0.014 gr fenil asetat 1 mL asetonda çözüldükten sonra, 49 mL saf suya ilave edildi ve son hacim 50 mL'ye tamamlandı.

3.3.7. Paraoksan çözeltisinin hazırlanması

1 mM paraoksan substratı hazırlanması için 0.014 gr paraoksan 1 mL asetonda çözüldükten sonra, 49 mL saf suya ilave edilerek son hacim 50 mL'ye tamamlandı.

3.3.8. Elektroforezde kullanılan çözeltilerin hazırlanması

3.3.8.a. Yürütme tamponu

1.5 gr Tris, 7.2gr glisin, 5mL (%10) SDS son hacim 500 mL tamamlandı.

3.3.8.b. Numune tamponu

0.65 mL 1M Tris-HCl (pH - 6.8), 3mL %1'lik SDS, 1mL %100 gliserol, 1mL/ 10mL %0.1'lik brom timol (1mL numune tamponu, 50 μ L- β – merkapttoethanol ilave edildi).

3.3.8.c. Ayırma jeli

15mL 1M Tris-HCl (pH - 8.8), 13.2 mL %30'luk Akrilamid, 0.6 mL %1 SDS, 7 damla TEMED, 9.4 mL su, 0.15 amonyum persülfat.

3.3.8.d. Yığıma Jeli

0.65 mL 1M Tris-HCl (pH - 6.8), 1mL Akrilamid, 0.1mL SDS, 5 damla TEMED, 7.80mL su, 0.025mL amonyum persülfat.

3.3.8.e. Protein standardı

Miyozin (200 kDa), β -galaktosidaz(125 kDa), sığır serum albümini (BSA), (66 kDa), Ovalbümin (45 kDa), Karbonik anhidraz (29 kDa), Lizozim (14.3 kDa)

3.3.9. Proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan Coomassie brilliant blue G-250 çözeltinin hazırlanması

0.1g Coomassie brilliant blue G-250 alınarak, 50 mL %95'lik etanol içerisinde çözüldü. Ardından 100 mL %95'lik fosforik asit ilave edildi ve son hacmi saf su ile 1 L'ye tamamlandı.

3.4. Yöntem

3.4.1. PON1 enziminin saflaştırılması

3.4.1.a. İnsan serumlarının toplaması

İnsan kanı (200 mL) Atatürk üniversitesi kan merkezinden alındı. Kan numuneleri kullanılmaya kadar +4°C’de muhafaza edildi. Kan numuneleri 4000 *xg*’de 10 dak süre ile santrifüj edilerek serum ayrıldı. Elde edilen serum PON1 enziminin üç fazlı ayırma yöntemine göre saflaştırılması için kullanıldı (Demir *et al.* 2006; Demir *et al.* 2008).

3.4.1.b. PON 1 Enziminin saflaştırılması aşaması

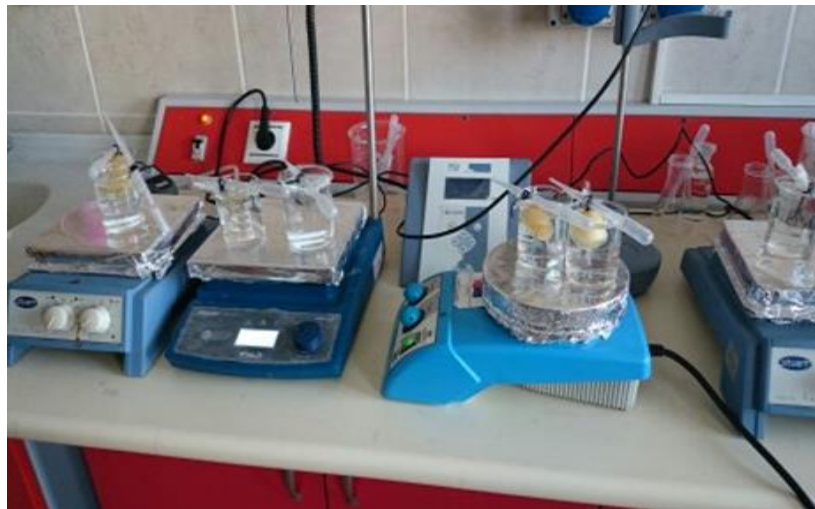
Paraoksanaz enzimi üçlü faz ayrımı tekniğine göre serumdan saflaştırıldı (Gagaoua *et al.* 2016). Bu amaçla, ilk aşamada kısmi saflaştırma yapılarak çöktürme işlemi yapıldı. Belirlenen aralıktaki çökelek Tris HCl tamponunda çözüldü. İkinci aşamada n-bütanol oranı belirlendikten sonra, üçüncü aşamada ise amonyum sülfat optimizasyonu yapılarak en yüksek aktivite değeri belirlendi. n-bütanol oranını belirlemek için 4 adet beher içerisine 15 mL’lik serum ilave edildi ve bu serumlar üzerine 1: 0.5, 1:1, 1:1.5 ve 1:2.0 oranlarında n-bütanol eklendi. Daha sonra her bir reaksiyon karışımı ortamına 4 gr amonyum sülfat (NH₄SO₄) ilave edildi. Ardından, karışım 30 dak boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra 10 dak süreyle 5000 *xg*’de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra tüplerde net olarak üç faz ayrıldı. Üst faz alkol, orta faz çökelek ve alt faz su fazıdır. Orta faz Tris/HCl tamponunda çözündürüldü ve aynı tamponda 3 saat diyaliz edildi. Sonunda diyaliz torbası içindeki numunesinde enzim aktivitesi ve protein tayini yapıldı. Böylece n-bütanol optimizasyonu yapılmış ve n-bütanol’un uygun konsantrasyonu belirlenmiş oldu. Üçüncü basamakta ise; belirlenen n-bütanol’un uygun konsantrasyonu kullanılarak amonyum sülfat optimizasyonu yapıldı. Buna göre, 10 mL serum ve 5 mL n-bütanol, 4 farklı behere ilave edildi. Amonyum sülfat miktarı, serum ve n-bütanol hacmine göre %20, %40, %60, %80 (w/v) oranlarda beherlere eklendi. Sonra manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırıldı. Daha sonra 10 dak süreyle reaksiyon

karışımı 5000 xg 'de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra tüplerde üç faz ayrıldı ve tekrar orta faz Tris/HCl tamponunda çözündürülüp su fazı ve çökelek fazı aynı tamponda 3 saat boyunca diyaliz edildi. Ardından her bir reaksiyon ortamından alınan numunelerde enzim aktivitesi ve protein tayini yapıldı. İkinci amonyum sülfat çöktürmesi %25, %30, %35, %40, %45 ve %50 oranlarında tekrarlandı (Nadaroglu vd 2016; Onem vd 2016).

Belirlenen optimizasyon miktarlarındaki n-bütanol ve amonyum sülfat kullanarak enzim saflaştırıldı. 50 mL serum 25 mL n-bütanol ve 15 gr amonyum sülfat (%20) ile karıştırıldı, sonra manyetik karıştırıcı üzerinde 150 xg 'de 30 dak karıştırıldı. Daha sonra 10 dak 5000 xg 'de santrifüj yapıldı. Santrifüjden sonra tüplerde üç faz ayrıldı. Şekil (3.2) göre üç faz görüldü. Sadece orta faz enzim olarak kullanıldı. Orta ve alt fazların ayrı ayrı 3 mL alınarak, enzim aktivitesi ve protein miktarı belirlendi. Orta fazı Tris HCl pH:8 taponunda çözdükten sonra 3 saat boyunca diyaliz edildi.

Bu işlem için kullanılacak uygun amonyum sülfat miktarları aşağıda verilen formüle göre hesaplandı:

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



Şekil 3.1. Diyaliz aşaması



Şekil 3.2. Serum üçlü faz ayırım (ÜFA) görüntüsü

3.4.2. Protein tayini

Enziminin protein miktarı tayini, Bradford yöntemi kullanılarak belirlendi. Bu yöntemde, 5 mL Coomassie brilliant çözeltisi içine 100 μ L enzim ilave edilip, 10 dak süre ile oda sıcaklığında inkübe edildi. Karışım vortekslendikten sonra ortamın absorbanslarındaki değişim 595 nm’de spektrofotometrede okundu. Grafik çizilip değerlendirildi (Bradford 1976).

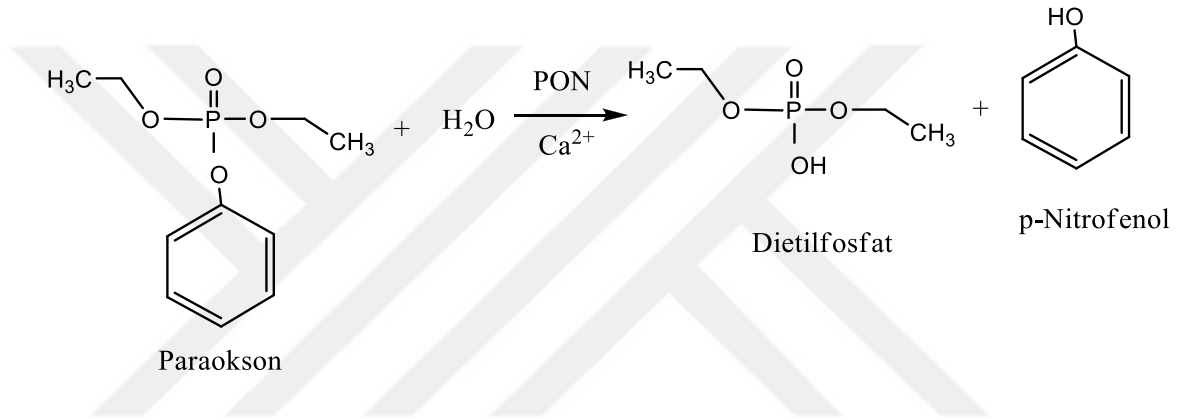
3.4.3. Enzim Aktivite Tayini

3.4.3.a. Paraoksanaz aktivitesi

Paraoksonaz aktivitesi için paraokson ve arilesteraz aktivitesi için aril esterlerin hidrolizi amacıyla fenil asetat substrat olarak kullanılır(Thomas et al 2004).

Paraoksonaz enziminin aktivitesi spektrofotometrik olarak tayin edildi. Aktivite ölçümü için 0.1 mL enzim alınıp daha önceden hazırlanmış olan 0.4 mL tampon (10 mM Glisin,

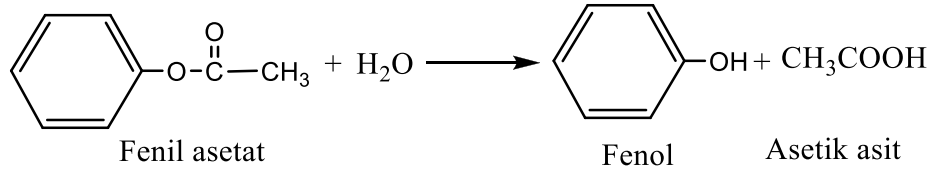
pH:8.0) ve 0.5 mL paraoksan (1 mM) substratı ortama ilave edilip 10 dak 37°C’de inkübe ettikten sonra ortamın absorbans değişimi 412 nm’de spektrofotometrede okundu. Bu reaksiyonun mekanizması; paraoksonaz enziminin reaksiyon ortamındaki paraoksan substratını hidroliz etmesi ardından p-nitrofenole dönüşmesi sonucu ortamın absorbansının değişimine neden olmaktadır. PON1 enzim aktivitesi, bir dakikada bir mikromolar substratın hidrolizine eşit olan EU/ml cinsinden ürün miktarı olarak ifade edilir (Renealt *et al.* 2006).



Şekil 3.3. PON1enzimin paraoksanaz aktivitesi reaksiyonu

3.4.3.b. Aril Esteraz Aktivitesi

Paraoksanaz enzim numunelerinin aril esteraz aktivite tayini fenil asetat substratı kullanılarak belirlendi. Bu amaçla 1 mM fenil asetatın çözeltisi 10 mM Glisin, pH:8.0 tamponu içerisinde hazırlandı. Enzim numunesi substrat ortamına ilave edildi ve 37 °C’deki su banyosundaki 15 dak inkübasyonun ardından 270 nm’de absorbans değişimi kaydedildi. Kör numune enzim numunesi yerine saf su kullanılarak hazırlandı. Aril esteraz aktivitesi hesaplanırken reaksiyon için molar ekstinksiyon kat sayısı 1310 M⁻¹ cm⁻¹ olarak alındı ve enzimin 1 EU/mL’si 1 µmol fenil asetat substratını optimum koşullar altında hidroliz eden enzim miktarı olarak tanımlandı (Demir *et al.* 2008).



Şekil 3.4. PON1enzimin aril esteraz aktivitesi reaksiyonu

3.4.4. SDS-PAGE yöntemi ile enzimin moleküler ağırlığının saptanması

Saflaştırılan PON1 enziminin moleküler ağırlığını ve büyüklüğünü belirlemek için %10'luk SDS-PAGE poliakrilamid jel elektroforezi kullanılmıştır.

3.4.4.a. SDS-PAGE ayırma jeli

22.5mL 1M Tris-HCl (pH 8.8), 19.8 mL %30'luk Akrilamid, 0.9mL %1 SDS, 0.4 mL TEMED, 14.1 su, 0.15 amonyum persülfat çözeltileri karıştırılarak jel kasetine enjektör yardımıyla yeterli miktarda doldurulur. Hazırladığımız jelin polimerizasyonu için oda sıcaklığında yaklaşık 1 saat beklenir.

3.4.4.b. SDS-PAGE yığma jeli

1.24 mL 1M Tris-HCl (pH - 6.8), 1mL Akrilamid, 0.1mL SDS, 0.1 mL TEMED, 7.80 mL su, 0.025 mL amonyum persülfat çözeltileri karıştırılarak yığma jeli hazırlanır ve örnek kuyucuklarının oluşması için bir tarak yerleştirilerek bir enjektör yardımıyla ayırma jelinin üzerine doldurulur. Tarak yerleştirilirken hava kabarcığının olmamasına dikkat edilir. Çünkü bu hava kabarcıkları polimerizasyonu inhibe etmektedir. Polimerizasyon işlemi tamamlanıncaya kadar oda sıcaklığında bekletilmiştir. Polimerizasyon işlemi tamamlandıktan sonra tarak kuyucukların bozulmamasına dikkat ederek çıkarılmıştır.

3.4.4.c. Örneğin ve standardın hazırlanması

SDS-PAGE için örnekleri numune tamponu ve enzim çözeltisi deney tüplerinde hazırlanmıştır. Hazırlanan örnekler 3 dakika 95 °C’de kaynar su banyosunda bekletilmiştir.

3.4.4.d. Enzim örneklerinin SDS-PAGE jeline yüklenmesi ve yürütülmesi

Saflaştırılan PON1 enzim çözeltisi 20 µL, standart protein ise 4 µL konsantrasyonunda jele yüklenmiştir. Örnekler jele yüklendikten sonra üst yüzey saf su ile yıkanmıştır. Daha sonra yürütme tamponu elektroforez sisteminin alt bölmesine doldurulmuştur ve jel elektroferizi içerisine yerleştirilerek jelin üzeri de yürütme tamponu ile doldurulmuştur. Sistem güç kaynağına bağlanarak 20 mA akımda yaklaşık 4 saat süresince elektroforez işlemi devam etmiştir.

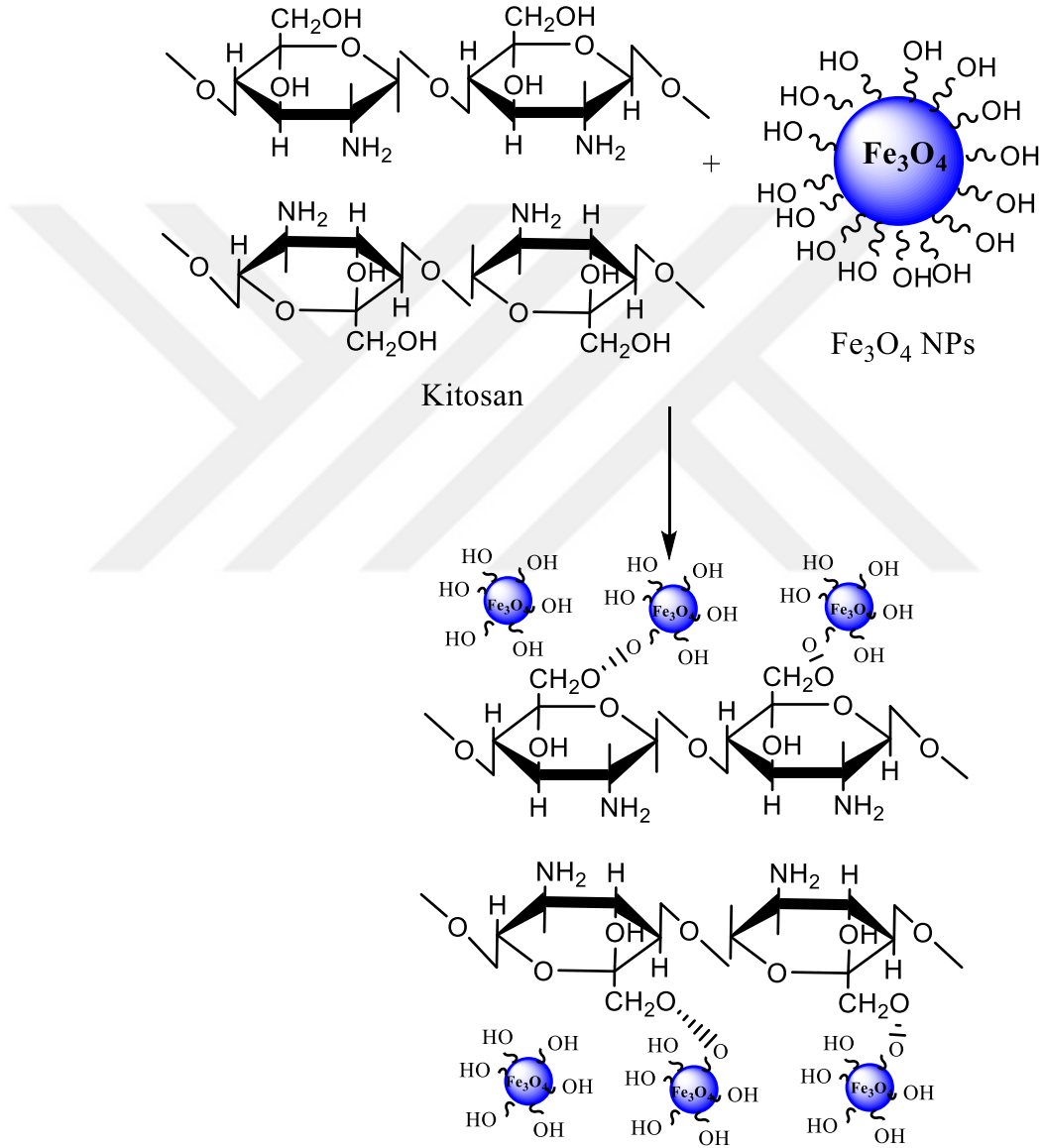
3.4.4.e. SDS-PAGE jelinin boyanması ve görüntülenmesi

SDS-PAGE elektroforez yürütme işlemi tamamlandıktan sonra cam plakalat dikkatli bir şekilde çıkarılarak tamamlandıktan sonra Coomassie Blue R-250 boyama çözeltisi ile oda sıcaklığında (çalkalayıcı üstünde) 2 saat boyanmıştır. Boyama işleminden sonra geri kalan boyayı uzaklaştırmak için hazırlanan yıkama çözeltisi ile birkaç kez yıkanmıştır. Daha net bant görüntüleri elde etmek için 1 gece yıkama çözeltisinde bekletilmiştir. Belirgenleşen bantların görüntüsü kamera görüntüsü ile kaydedilmiştir.

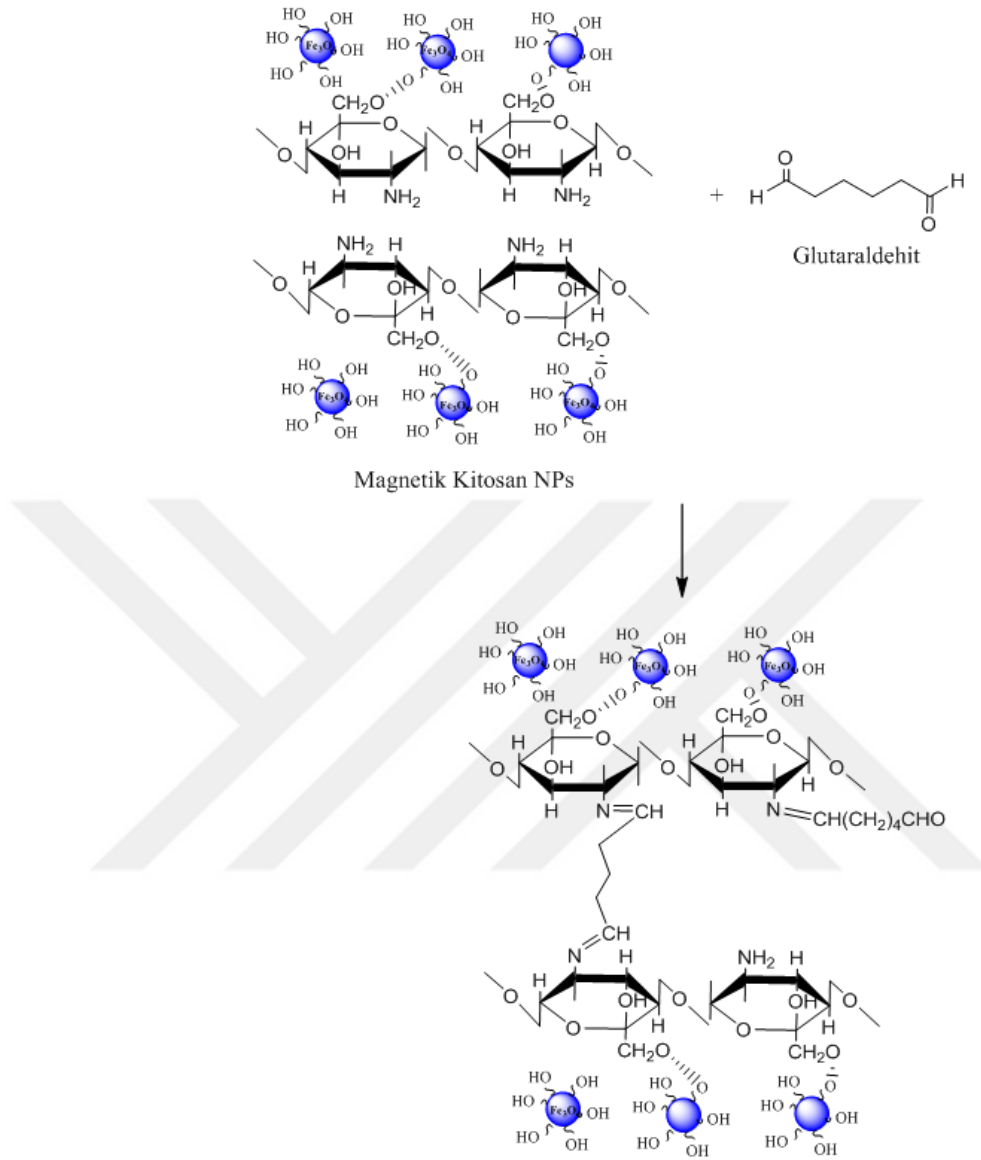
3.4.5. Demir-Manyetik kitosan nanopartiküllerin hazırlanması

2 g kitosan (2mg/mL) asetik asit (1%, v/v) çözeltisinde tamamen çözülmüştür, 1.54 g Fe₂O₃ nanopartiküller (Fe₂O₃ NP’ler nano toz halinde), 100 mL saf suda, karıştırıcı üzerinde 200 xg’de 24 saat süre ile karıştırıldı. Daha sonra bu karışıma 5 mL 1 M NaOH çözeltisi ilave edildi. Ardından 5 mL L-glutaraldehit (1%) ortama ilave edildi.

Reaksiyondan sonra manyetik kitosan NP'leri saf su ile yıkandıktan sonra 35 °C'de kurutuldu (Colak *et al.* 2012; Nadaroglu vd 2014; Onem *et al.* 2016; Soleymeni *et al.* 2017). İlgili tüm reaksiyonlar Şekil 3.5-3.7'de verildi. Sonra elde edilen bu manyetik nanopartillerin SEM ve TEM görüntüleri alındı.



Şekil 3.5. Kitosanın yüzeyi Fe_3O_4 nanopartikülü ile kaplanması

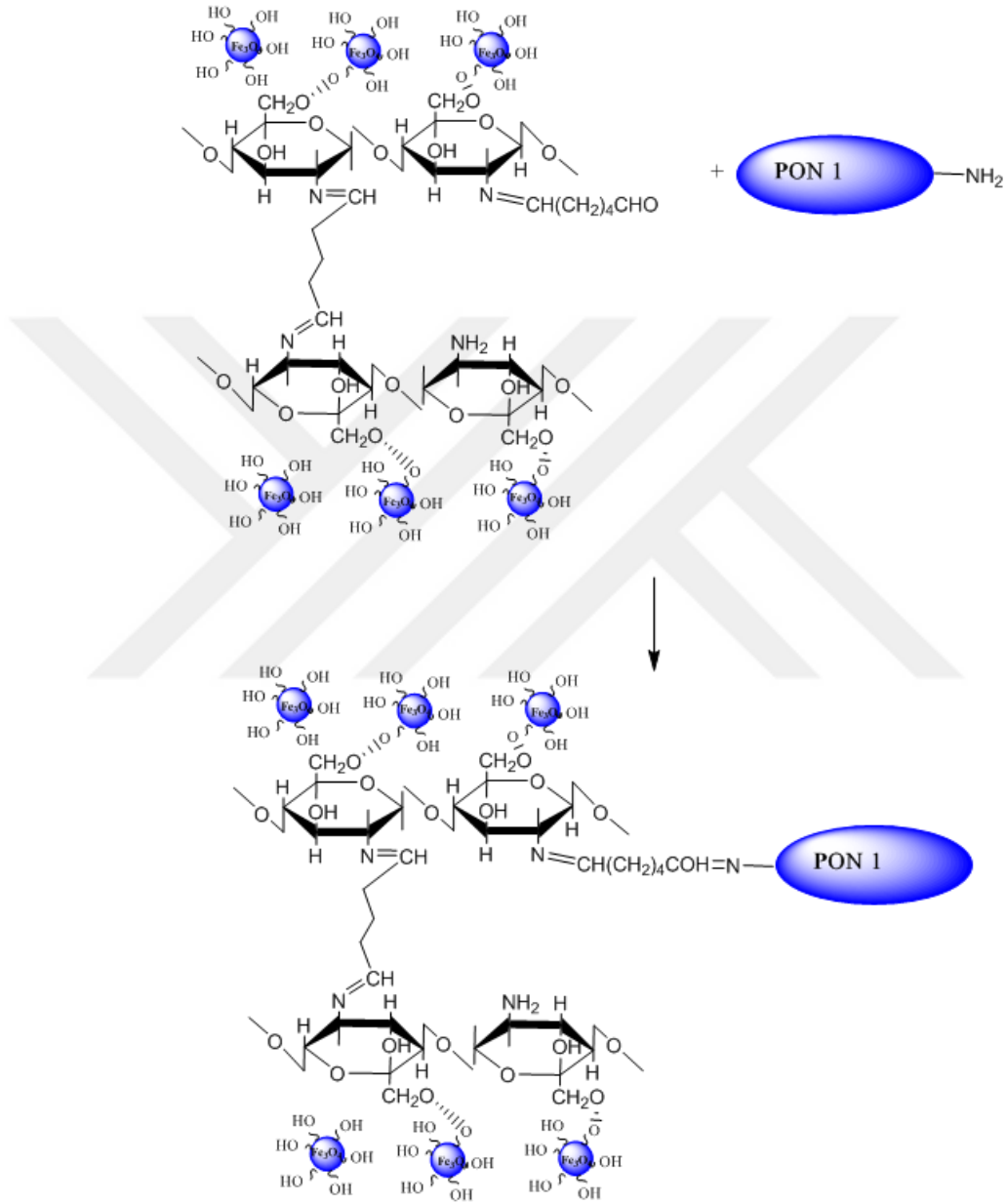


Şekil 3.6. Magnetik Fe₃O₄-kitosan NP moleküllerine L-glutaraldehit bağlanma reaksiyonu

3.4.6. PON1 enziminin Fe₃O₄-kitosan NP'leri üzerine bağlanması

İki tüpe (kör ve enzim), her tüpe 0.05 g Fe₃O₄ - kitosan NP ve 1mL enzim ve 1mL tampon (Glisin tamponu pH: 10.0) ilave edildi. Sonra ultrasonik su banyosunda 30 °C 1 saat bekletildi. Enzim Demir-kitosana üzerine kovalent olarak bağladıktan sonra optimum pH, sıcaklık ve zaman değerleri belirlendi (Nadaroglu ve Onem 2014; Onem

et al. 2016; Nadaroglu ve Sonmez 2016; Onem ve Nadaroglu 2017; Soleymani *et al.* 2017).



Şekil 3.7. İnsan PON1 enziminin Fe₃O₄- kitosan NP'ler üzerine immobilize edilmesi

3.4.7. PON1-Ca²⁺ hibrit nano çiçek yapılarının sentezi

Kitosan %1 asetik asit solüsyonu (2 mg/mL) içinde çözülür. Ardından 3 mL kitosan çözeltisine, 1.2 mL (Tripolyphosphate) TPP çözeltisi eklendi. Bu çözelti, 10 dakika karıştırıldı. Daha sonra, 4.2 mL (0.1 M) CaCl₂ yukarıdaki karışıma eklenerek oda sıcaklığında 10 dakika karıştırıldı. Ortama 2.5 EU/ml insan serumundan saflaştırılmış olan PON1 enzimi eklendi. Bir gün oda sıcaklığında bekletildikten sonra, süpernatant kısmında protein tayini yapıldı. Ardından üç kere saf su ile yıkandı ve bağlanmayan proteinler ortamdan uzaklaştırıldı. Bu aşamadan sonra çökelek 37°C kurutuldu. Kurutulmuş nano çiçek yapılarının SEM, EDX, FT-IR ve TEM analizleri kullanılarak karakterizasyonu yapıldı (Zare *et al.* 2012).

3.4.8. Serbest, manyetik ve hibrit PON1 enzimlerin optimum ve stabil pH değerlerinin incelenmesi

Serbest, manyetik ve hibrit PON1 enziminin optimum pH değerinin tespiti için, farklı tamponlarda (pH 3-10) 37°C sıcaklıkta 15 dk. bekletilip sonra (279 nm) enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Yapılan ölçümlerde pH (3.0, 4.0, 5.0) değerleri için sodyum Na-asetat tamponu ve pH (6.0, 7.0) değerleri için Na-fosfat tamponu, pH (8.0 ve 9.0) değerleri için glisin tamponu ve pH (10.0) değeri için karbonat tamponu kullanıldı. Stabil pH için, farklı tamponlar ile ayarlanan farklı pH'larda: 3-10 enzim bir hafta süresinde 4°C saklandı. Sonra her gün aktivite ölçümü yapıldı Manyetik ve hibrit PON1 enzim, optimum ve stabil pH belirlenmesi için bu nano yapılar yaptıktan sonra optimum pH ve stabil pH ölçümleri yapıldı.

3.4.9. Serbest, Manyetik ve hibrit PON1 enzim optimum ve stabil sıcaklık değerlerinin belirlenmesi

Serbest, manyetik ve hibrit PON1 enziminin optimum sıcaklık için farklı sıcaklıklarda enzim çözeltileri (20°C-90°C için) 15 dak bekledikten sonra aktivite ölçümleri yapıldı. Stabil sıcaklık için PON1 enzim bir saat 37°C sıcaklık da bekletildi. İlk bir saat de her

15 dk ve ikinci saat de her 30 dk sonunda 279 nm’de spektrofotometrik olarak aktivite ölçümü yapıldı. İmmobilize ve hibrit PON1 enzimlerinin, optimum ve stabil sıcaklık belirlenmesi için bu nano yapılar sentezlendikten sonra analizler gerçekleştirildi.

3.4.10. Zebra balığı kullanılarak yapılan *in vivo* toksisite çalışmaları

Bu çalışmada önce, balık yumurtaları toplandı. Yumurta almak için, bir gece öncesinde dişi ve erkek balıklar alındı. Dişi balık sayısı, erkek balığın yarısı kadar olarak ayarlandı. En uygun saat akşam saat olarak 16.00- 17.00 arası seçildi balıklar bir akvaryuma alındı. Ardından, ertesi sabah saat 9.00- 10.00 arası zebra balıklarına ait yumurtalar alındı. Sonra, balıklar için besin maddeleri hazırlandı (E3: Embriyo medium). Sonra zebra balığına uygulanacak serbest ve hibrit PON1 enzimin dozları (kullanılan dozlar 50 mg/L, 100mg/L, 250mg/L, 500mg/L, 1000mg/L, 2000mg/L) belirlendi. Zebra balıklarına yapılan uygulamaların ardından, balıklar sonra ilk 24 saat boyunca izlenerek ortamda mantar oluşan embriyoları temizlemek için her saat balıklar kontrol edildi. Çalışma boyunca her gün görüntüleme yapıldı ve hazırlanan dilüsyonlar olacak şekilde tekrar uygulandı. Bu görüntüleme işlemleri 24, 48, 72, 96, 120 saatlerinde yapıldı. Her görüntüleme ölüm oranı-haç (yumurtadan çıkma) oranı-anormallik oranı belirlendi ve 120 saatin sonunda deneye son verildi.

Bu çalışmada, Zebra balıklarının yumurtaları üç gruba ayrıldı. Birinci grup Kontrol grubu-altı adet İkinci grup; Serbest enzim grubu- altı adet Üçüncü grup; Hibrit enzim grubu-altı adet (Her grupta altı farklı dozda uygulama yapıldı). Toplam 13 petri kabı kullanıldı ve her petri ortamına 30’ar tane yumurta konuldu.

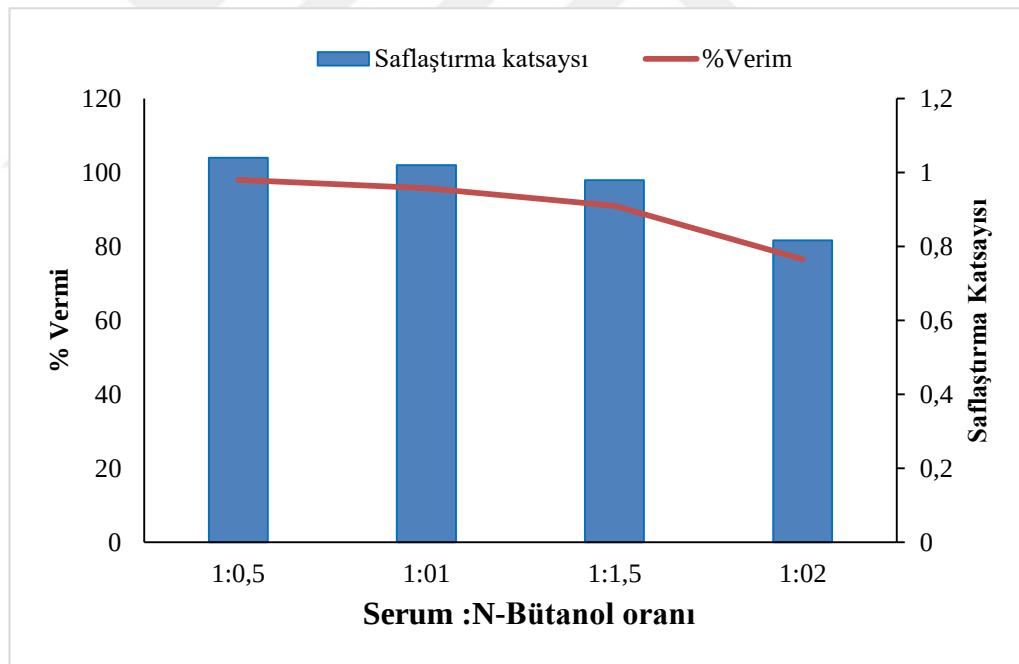
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. PON1 Enzim Saflaştırılma Basamakları

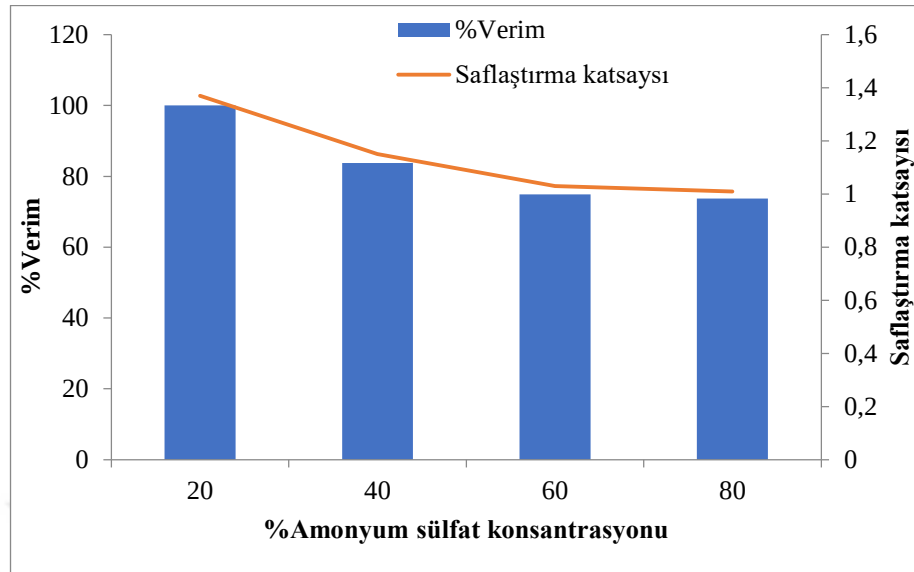
PON1 enzimi amonyum sülfat çöktürmesi (%60-80) ve üçlü faz ayırım yöntemi kullanılarak insan serumundan saflaştırıldı. Bu maksatla amonyum sülfat çöktürmesi (%60-80) yapılarak ön saflaştırmaya tabi tutulan insan serumu daha sonra sabit amonyum sülfat konsantrasyonunda 1:0,5, 1:1, 1:1.5, 1:2 oranlarında n-bütanol kullanılarak PON1 enzimi ara fazda elde edildi. Ardından yapılan aktivite ölçümlerine göre, 1:0.5 serum, n-bütanol konsantrasyonunda maksimum PON1 aktivite değeri belirlendi (Çizelge 4.1). Elde edilen çökelek 10 mM glisin (pH:10.0) tamponunda çözüldükten sonra yukarıda belirlenen n-bütanol konsantrasyonunda amonyum sülfat optimizasyonuna tabi tutuldu. Bu amaçla, enziminin saflaştırılmasında %20, %40, %60, %80'lik birinci amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı ve en iyi çöktürme PON1 enzimi için %20'lik amonyum sülfat konsantrasyonunda elde edildi (Şekil 4.2). İkinci amonyum sülfat çöktürmesinde ise, yine aynı bütanol konsantrasyonu uygulanarak %25, %30, %35, %40, %45, %50'lik amonyum sülfat oranlarında çöktürme yapıldı ve en iyi PON1 enzimi için ayrılmanın %25'lik amonyum sülfat konsantrasyonunda olduğu görüldü (Şekil 4.3). Yapılan ölçüm göre, elde edilen sonuçlar ile aktivite, yüzde verim, spesifik aktivite, saflaştırma kat sayısı değerleri hesaplandı ve elde edilen bulgular Çizelge 4.1'de verildi.

Çizelge 4.1. Saflaştırılan PON1 enzimine ait saflaştırma profili

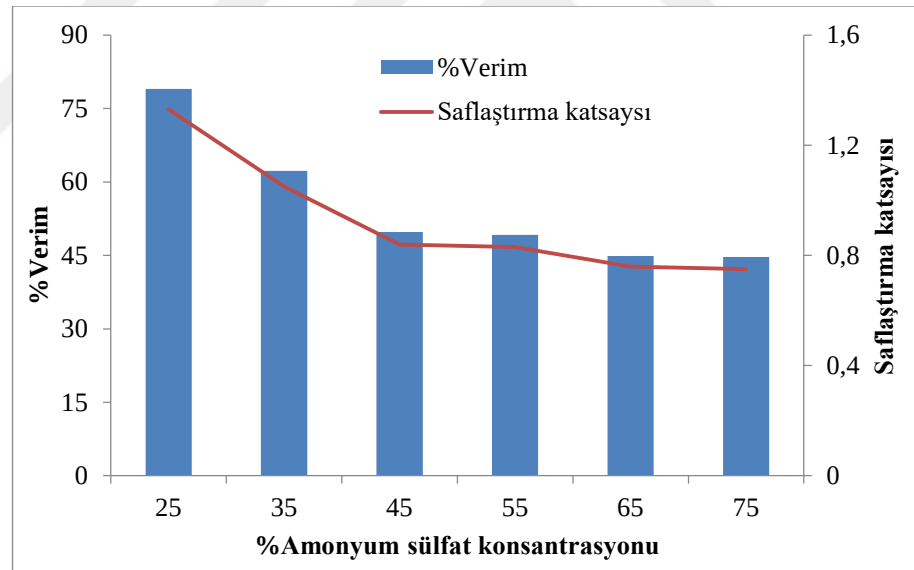
Aşamalar	Hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Toplam Aktivite	%	Protein (mg protein /mL)	Spesifik Aktivite (EU/mL)	Saflaştırma Katsayısı
Serum	50	379.9	18999	100	1318	0.288	---
Amonyum sülfat(%60-%80)	15	329.6	4944	86.7	568	0.58	2.01
n-Bütanol(1:0,5)	15	320.3	4804.5	84.3	236	1.35	4.68
1.Amonyum sülfat(20%)	15	307.8	4617	81	41.8	7.36	25.56
1.Amonyum sülfat(25%)	15	290.31	4354.6	76.4	3.31	87.7	304.5



Şekil 4.1. N-bütanol optimizasyonu



Şekil 4.2. Amonyum sülfat optimizasyonu



Şekil 4.3. Amonyum sülfat optimizasyonu

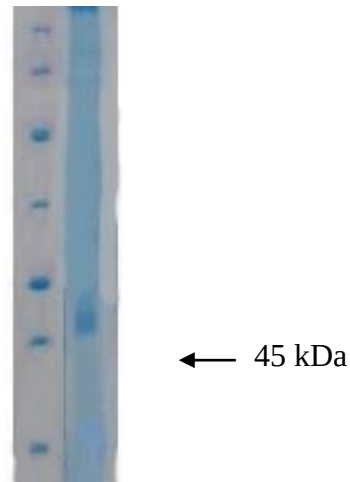
Şekil 4.1'de görüldüğü gibi en yüksek aktivite (372.32 EU/mL) 1:0.5 serum: bütanol oranında görülür. En düşük aktivite değeri 1:2 serum: bütanol oranında (290.86 EU/mL) görüldü. Şekil 4.2 ve 4.3 karşılaştırıldığında en yüksek PON1 aktivitesinin %20 (313.82 EU/mL) amonyum sülfat doygunluğunda belirlendi. En düşük aktivite değeri %75 (170 EU/mL) amonyum sülfat doygunluğnda elde edildi.

Yapılan bir çalışmada enzim için dietilaminoetil-Sephadex anyon değişim kromatografisi ve Sepharose 4B-4-fenil-2-naftalinamin hidrofobik etkileşim gibi doğrudan kromatografik yöntemler kullanarak insan serumdan paraoksanaz (hPON1) elde etmesi için yeni bir arıtma tekniği sundular. Yapılan bu çalışmada PON1enzimini, 4775 U/mg enzim aktivitesi ve %32'lik bir verimle 302 kat saflaştırdıkları belirlenmiştir (Demir vd 2006; Demir vd 2008).

Robert ve arkadaşları (2017) antioksidatif/antiaterojenik özelliklerinden dolayı insan paraoksanaz 1 enzimini büyük miktarlarda üretmek için bir rekombinant bakulovirüs (BV) ürettirler. Yaptıkları çalışmada insan PON1 enzimini saflaştırmak için üç basit kromatografi tekniğini kullandılar (DEAE-Sepharose, Sephacryl S-200 ve Concanavalin A) (Robert *et al.* 2017).

4.2. Serum Paraoksanaz SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi

ÜFA metoduyla insan serumundan saflaştırılan PON1 enziminin alt birim sayısını belirlemek amacıyla SDS poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı ve elde edilen jel fotoğrafı Şekil 4.4'de verildi. Ayrıca jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılan PON1 enziminin molekül ağırlığı 45 kDa olarak belirlendi.

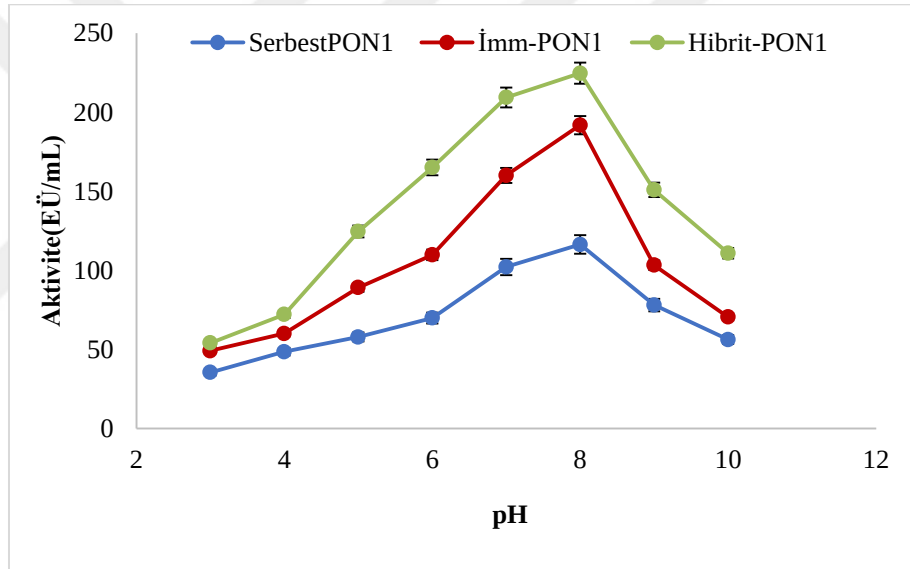


Şekil 4.4. Paraoksanaz enziminin SDS-page jel elektroforezi fotoğrafı

(I: Standart protein : 30kDa, 40kDa, 50kDa, 100kDa, 130kDa, 150kDa, 250kDa : Karbonik anhidraz; 40 kDa: II: İnsan serumundan saflaştırılan PON1 enzimi

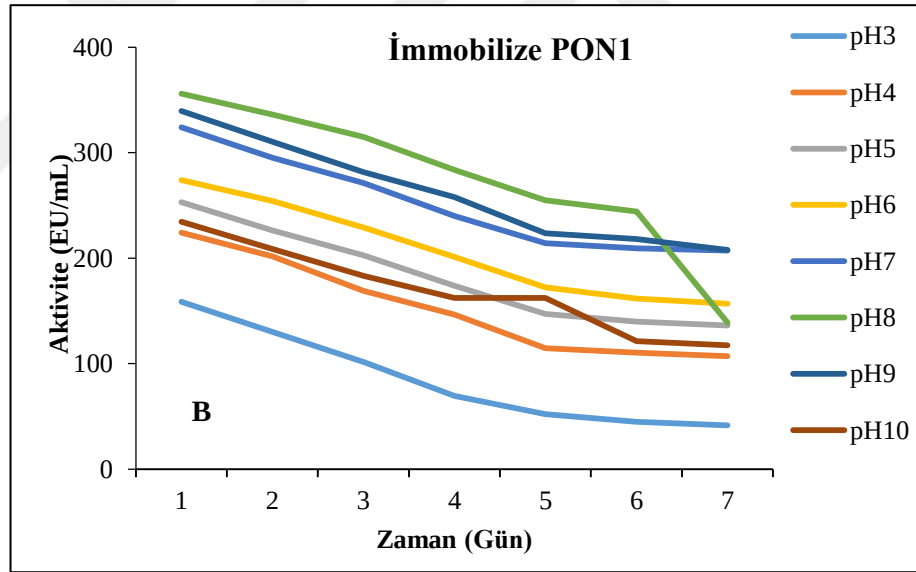
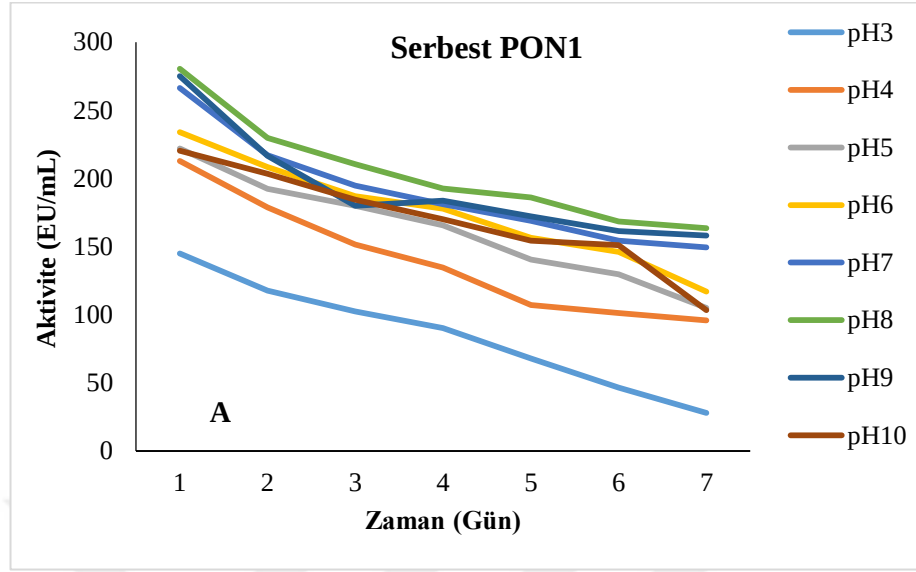
4.3. Serbest, İmmobilize ve Nano Çiçek PON1 Enziminin Optimum pH, Optimum Sıcaklık, Stabil pH ve Stabil Sıcaklık Çalışmalarının Sonuçları

Serbest, immobilize ve nano çiçek PON1 hibrit enzimleri için optimum pH değerleri farklı tampon sistemleri kullanılarak pH 3-10 aralığında belirlendi ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.5’de verildi. Elde edilen bulgulardan pH değeri 4.0’nin altında ve 10.00’un üzerine çıktığı zaman serbest, immobilize ve nano çiçek PON1 hibrit enzimleri keskin bir aktivite kaybı göstermişlerdir. Ancak pH:8.0’de tüm PON1 enzim sistemleri için maksimum aktivite görülmektedir (Şekil 4.5).

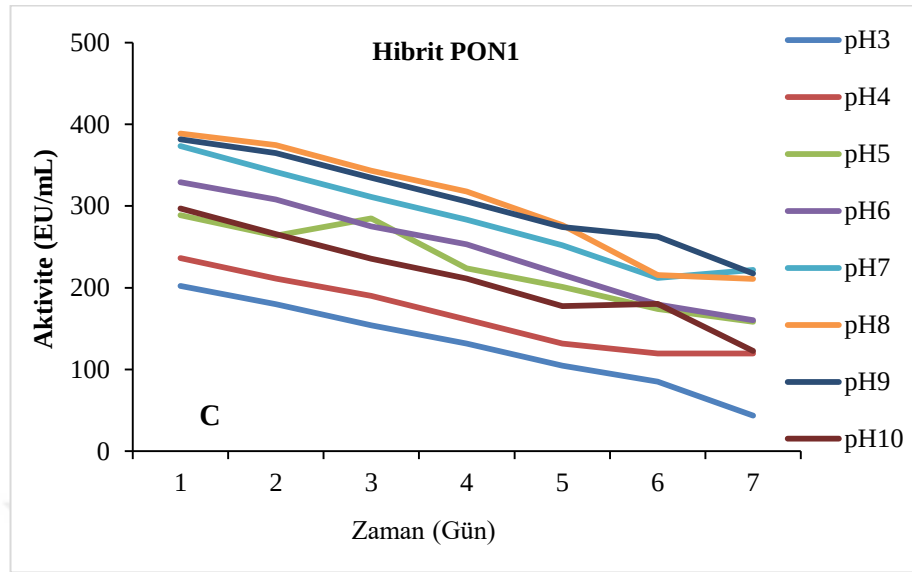


Şekil 4.5. Serbest, İmmobilize ve Hibrit PON1 pH optimizasyonu

Stabile pH’da uygun (pH (3.0, 4.0, 5.0) değerleri için sodyum Na-asetat tamponu ve pH (6.0, 7.0) değerleri için Na-fosfat tamponu, pH (8.0 ve 9.0) değerleri için glisin tamponu ve pH (10.0) değeri için karbonat tamponu) seçilen tampon sistemlerinde 4°C’de bekletilen enzim sistemleri kullanılarak serbest, immobilize ve hibrit PON1 enzimlerinin aktiviteleri 7 gün süreyle belirlendi. Elde edilen sonuçlara göre pH:8.0 de 7 gün boyunca aktivite miktarı sabit kaldığı ve 7 günlük sürenin sonunda tüm enzim sistemlerinde en yüksek aktivitenin pH:8.0 de olduğu görüldü (Şekil 4.6A-C.).

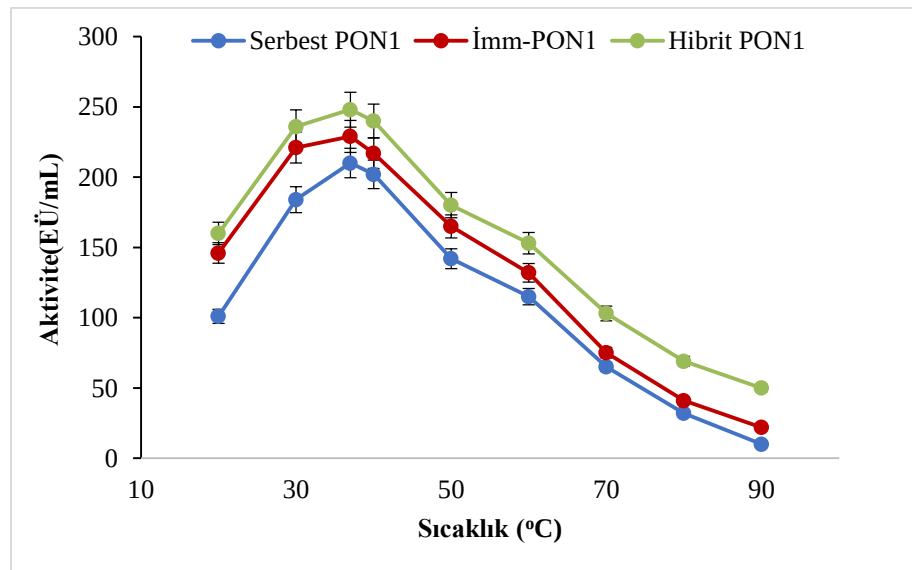


Şekil 4.6. (devam)



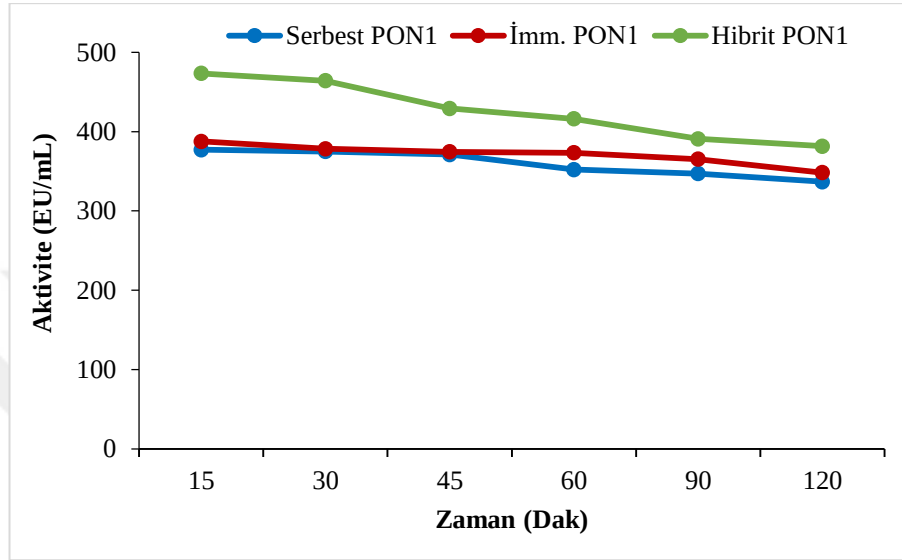
Şekil 4.6. Serbest, immobilize ve nano çiçek PON1 enzimlerinin stabil pH grafiği

Serbest, immobilize ve nano çiçek PON1 hibrit enzimleri üzerine sıcaklığın etkisi de araştırıldı. Optimum sıcaklık belirlenmesi için, 20 ile 90°C sıcaklık aralıklarında 10°C'lik birimlerde sıcaklık artırılarak aktivite değeri ölçüldü. Elde edilen sonuçlara göre optimum sıcaklık tüm enzim sistemleri için 37°C olarak belirlendi (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Serbest, immobilize ve nano çiçek PON1 hibrit aktiviteleri üzerine sıcaklığın etkisi

Stabil sıcaklık belirlenmesinde ise 2 saat sürenin sonunda serbest, immobilize ve hibrit PON1 enzim sistemleri için maksimum aktivite stabilitesinin 37°C’de olduğu belirlendi (Şekil 4.8).

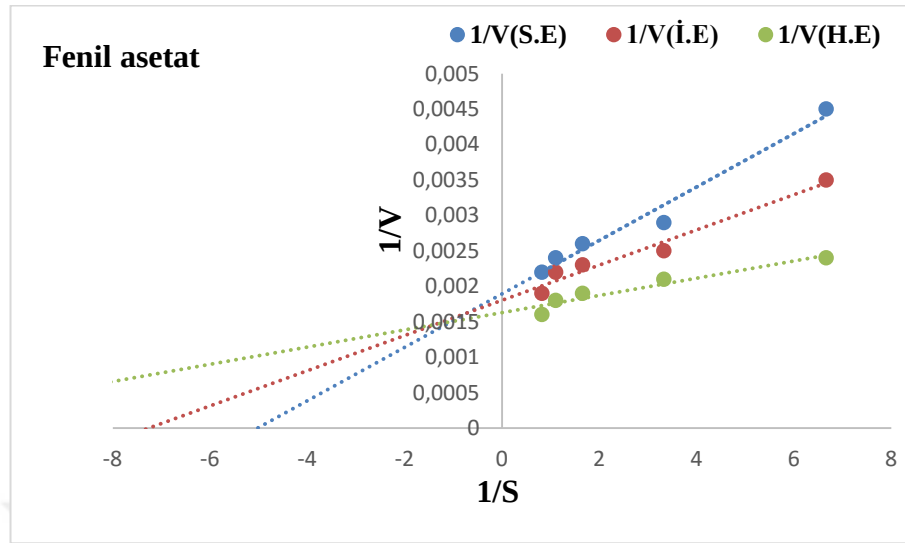


Şekil 4.8. Serbest, İmmobilize ve Hibrit PON1 nano çiçek aktiviteleri üzerine zamana bağlı olarak sıcaklığın etkisi (Stabil Sıcaklık)

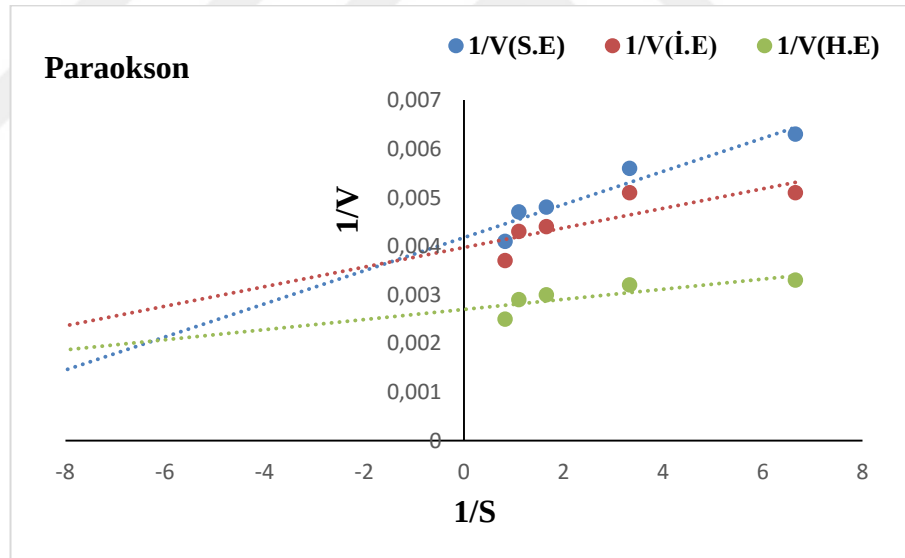
4.4. PON1 Enzimin V_{max} ve K_M Sonuçları

K_M ve V_{max} değerlerinin bulunması amacıyla serbest, Fe_3O_4 -kitosan NP'lere immobilize ve nano çiçek hibrit PON1 enzimlerine ait paraokson ve finil asetat substratları için Lineweaver burk grafikleri çizilmiş ve Şekil 4.31 ve 4.32’de verilmiştir.

Serbest, immobilize ve nano çiçek hibrit PON1 enzimlerinin V_{max} ve K_M değerlerinin bulunması amacıyla paraokson ve fenil asetat substratları kullanıldı. Bu amaçla 5 farklı substrat konsantrasyonunda aktivite ölçümleri yapıldı ve elde edilen değerler $1/V$ 'ye karşı $1/S$ çizilerek Lineweaver-Burk grafikler çizildi (Şekil 4.9-10). Grafiklerden yararlanarak K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı.



Şekil 4.9. Serbest İmmobilize ve Hibrit PON1 enzimin Fenil asetat substrat ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.10. Serbest, İmmobilize ve Hibrit PON1 enzimin Paraokson substrat ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği

Hibrit PON1 enzimi, hem Paraokson hemde fenil asetat substratlara karşı daha yüksek aktivite serbest ve immobilize PON1 enzime göre gösterdiği belirlenmiştir. Hibrit PON1 enzimin, fenil asetat substrat ile V_{max} ve K_M değerleri sırasıyla 625 $\mu\text{mol/L}$ dak ve 0.062 mM belirlendi. Hibrit PON1 enzimin, Paraokson substrat ile V_{max} ve K_M

değerleri sırasıyla 370 $\mu\text{mol/L}$ dak ve 0.037 mM olarak belirlendi. Çizelge 4.2’de görülmektedir.

Çizelge 4.2. Serbest İmmobilize ve Hibrit PON1 enzimin fenil asetat ve Paraokson substratları için V_{max} ve K_M değerleri

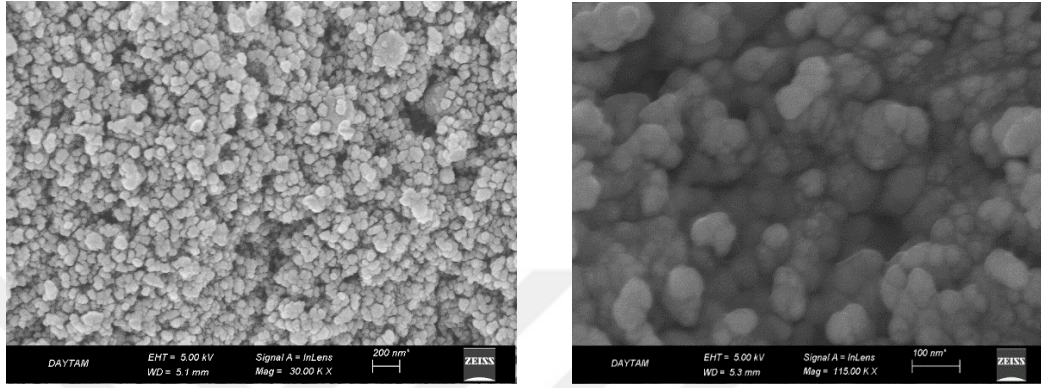
	Fenil asetat		Paraokson	
	V_{max} ($\mu\text{mol/L}$ dak)	K_M (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol/L}$ dak)	K_M (mM)
Serbest PON1	526.3	0.210	238.1	0.071
İmmobilize PON1	555.5	0.111	250	0.051
Hibrit PON1	625	0.062	370	0.037

Çizelge 4.2’den görüldüğü gibi, serbest PON1 enzimi ve manyetik kitosan NP’lerine immobilize PON1 enzimi ve çiçek hibrit yapısındaki PON1 enziminin V_{max} değeri artarken K_M değerinde düşüş olduğu belirlenmiştir. Buradan enzimin hem paraoksan hemde fenil asetat substratlarına karşı ilgisinin arttığı açıkça görülmektedir. V_{max} değerindeki artışın nano çiçek hibrit PON1 enziminin diğer yapıya göre daha kararlı bir hal aldığı şeklinde yorumlamak mümkündür.

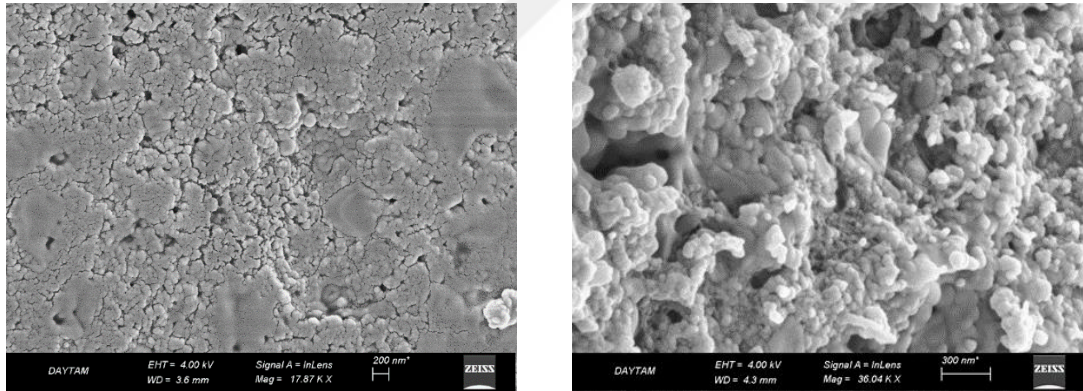
4.5. İmmobilize ve Hibrit PON1 Yapılarının SEM, EDX, TEM ve FT-IR Karakterizasyonu

İmmobilize PON1 ve nano çiçek hibrit PON1 enzim morfolojisinin görüntülenmesinde SEM analizi için Zeiss marka Sigma 300 model Taramalı Elektron Mikroskobu, TEM analizi için Stem modlu Hitachi marka 7700 geçirimli elektron mikroskobu (TEM), X-ışını kırınım (XRD) analizi için PANalytical Empyrean X-Ray Difraktometresi(UK) ve FT-IR analizi için ise Bruker VERTEX 70v cihazı kullanılmıştır. Tüm yapılan analizler ile nanopartiküllerin yüzey topografisi ile ilgili bilgi elde edilmiştir.

PON1 enziminin insan serumundan ÜFA yöntemine göre saflaştırılmasının ardından manyetik kitosan nanopartikülleri üzerine immobilizasyonuna ilişkin numunelere ait SEM görüntüleri Şekil 4.11- 4.12’da verilmiştir.

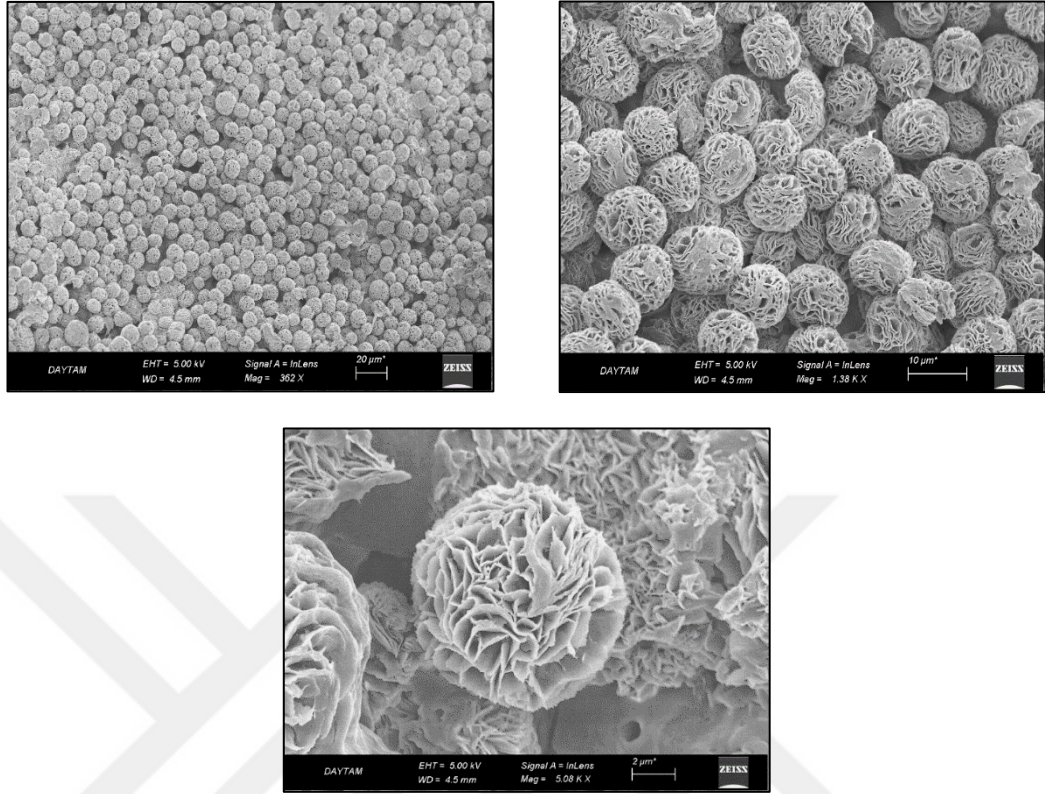


Şekil 4.11. Fe_3O_4 - kitosan NP yapısının SEM görüntüleri

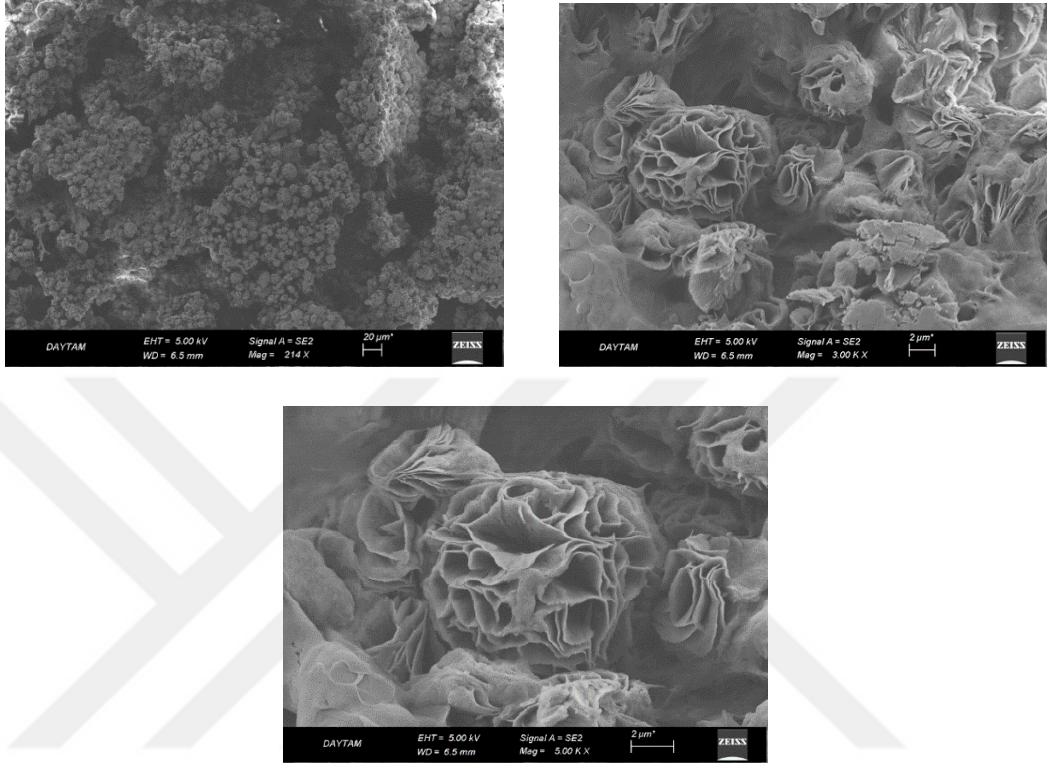


Şekil 4.12. PON1enzimi immobilize Fe_3O_4 - kitosan NP’lerin yapısının SEM görüntüleri

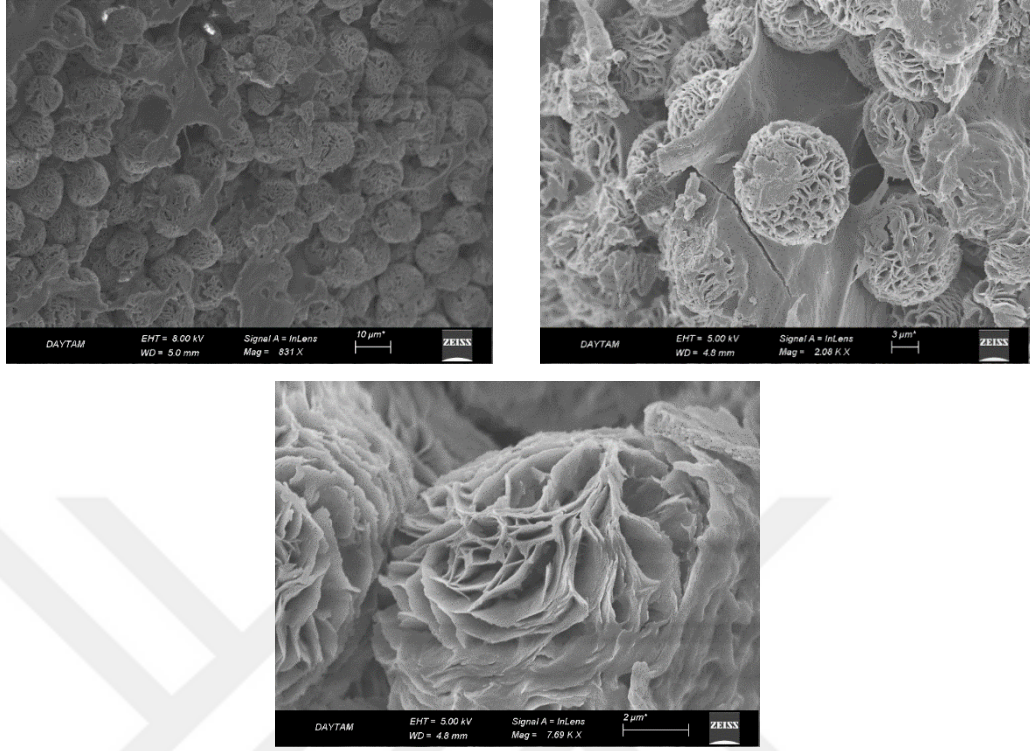
Çalışmanın immobilizasyonu ile ilgili ikinci aşamasında ÜFA yöntemiyle saflaştırılan PON1 enzimi nano çiçek yapıları içerisinde immobilize edildi. Elde edilen yapıların SEM analizleri yapıldı. Hibrit yapılarının pH11 ile pH 4 arasındaki tüm yapıları ile ilgili SEM görüntüleri ayrı ayrı Şekil 4.13- 4.18 arasında verildi.



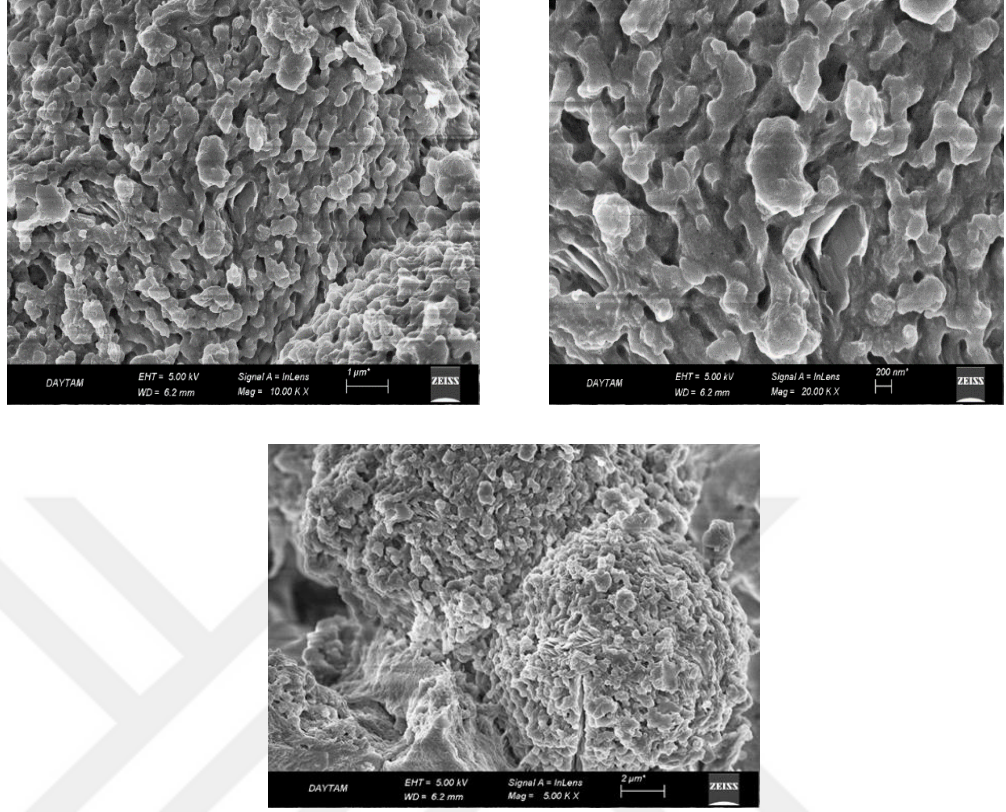
Şekil 4.13. pH 11’de PON1 enzimi kullanılarak elde edilen nanoçiçek hibrit yapısının SEM görüntüleri



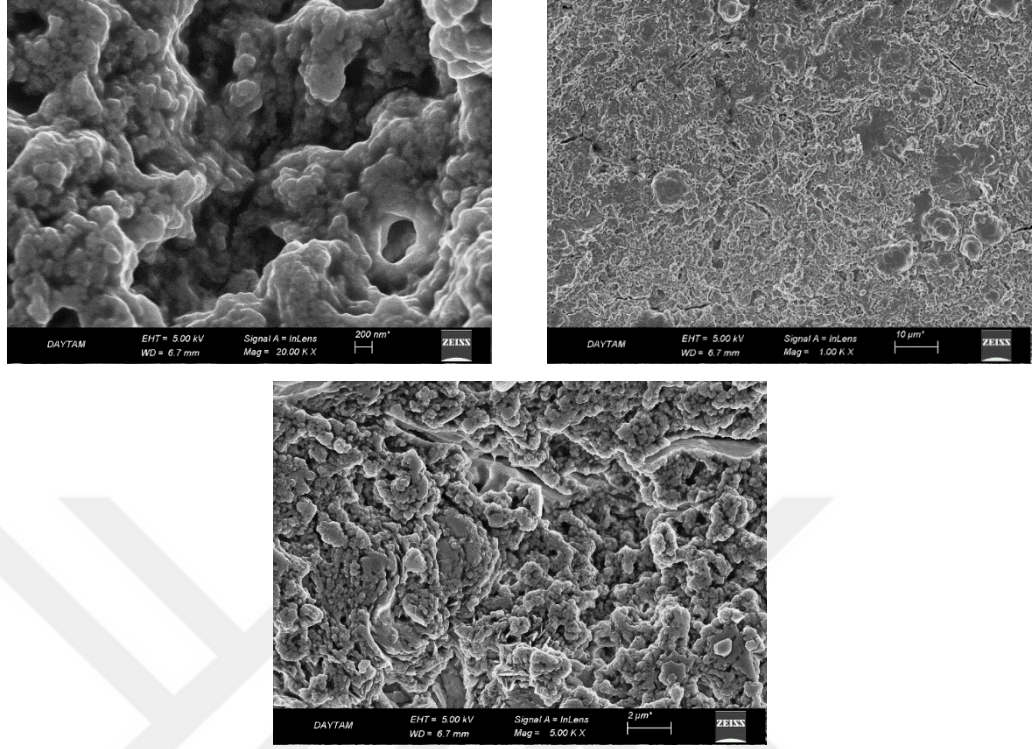
Şekil 4.14. pH 10’de PON1 enzimi kullanılarak elde edilen nanoçiçek hibrit yapısının SEM görüntüleri



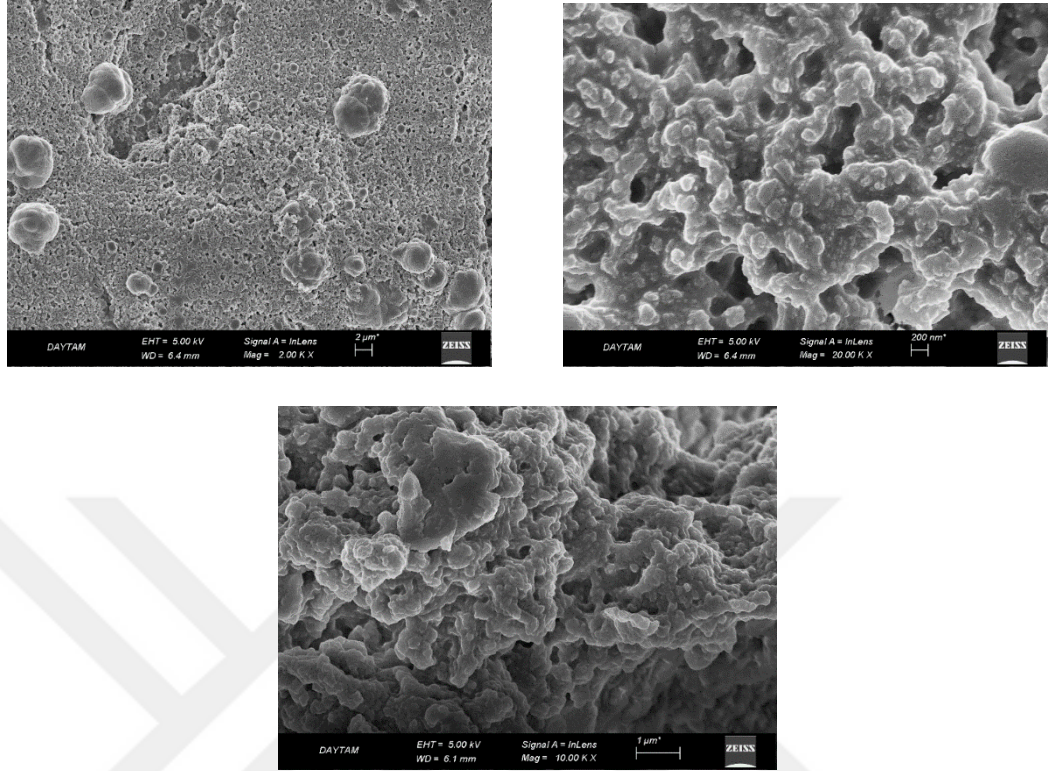
Şekil 4.15. pH 9'da PON1 enzimi kullanılarak elde edilen nanoçiçek hibrit yapısının SEM görüntüleri



Şekil 4.16. pH 8’de PON1 enzimi kullanılarak elde edilen nanoçiçek hibrit yapısının SEM görüntüleri



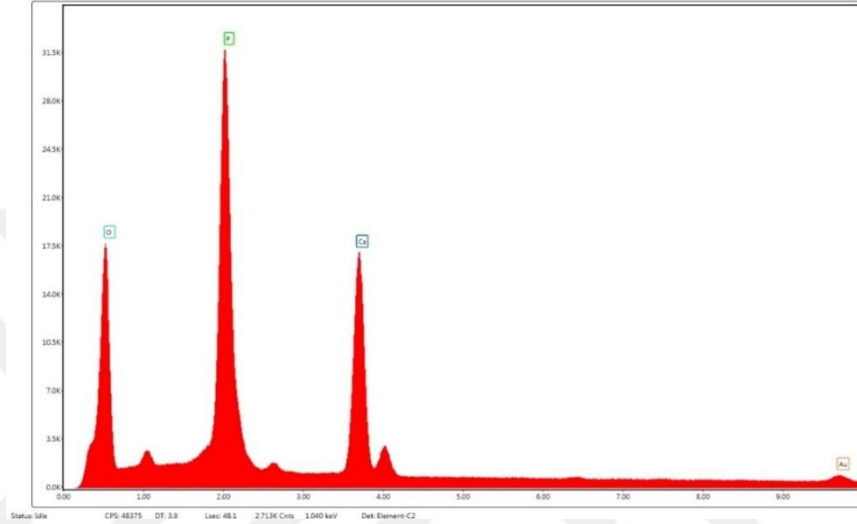
Şekil 4.17. pH 6'da PON1 enzimi kullanılarak elde edilen nanoçiçek hibrit yapısının SEM görüntüleri



Şekil 4.18. pH 4'te PON1 enzimi kullanılarak elde edilen nanoçiçek hibrit yapısının SEM görüntüleri

pH:8.0 Glisin tamponu içerisinde bulunan ÜFA yöntemiyle insan serumundan saflaştırılan PON1 enziminin Fe_3O_4 NP'leri ile modifiye edilen kitosan üzerine L-glutaraldehit ara kolu üzerinden immobilizasyonundan sonra alınan numunelerde SEM görüntülerine bakıldığında demir kitosan NP'lerinin başlangıçtaki yüzey pürüzlülüğünün azaldığı ve PON1 enziminin yüzeye immobilize olduğu net bir şekilde görülmektedir. PON1 nano çiçek hibrit yapısının SEM görüntülerine bakıldığında ise enzim immobilize nano çiçek yapısının en iyi pH11'de olduğu belirlendi. Ancak pH 9 ve 10'da da nano çiçek yapıları net bir şekilde görülürken pH daha aşağıya düşürüldüğünde (pH: 4 ile pH: 8 aralığında) çiçek yapılarının bozulduğu ve oluşmadığı belirlendi.

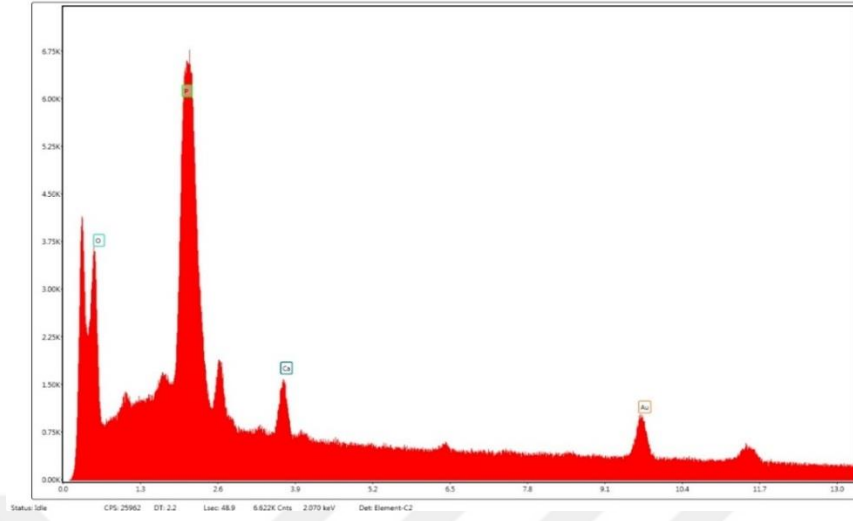
En iyi PON1 nano çiçek hibrit yapısı elde edilen pH'lardaki EDX (Enerji Dağılımı X-ışını analizi) analizleri de yapılmış ve elde edilen bulgular Şekil 4.19- 4.21'de verildi. Her bir pH'daki (pH: 9, 10 ve 11) hibrit yapısına ait olan yapı içeriği de Çizelge 4.3- 4.5'da verildi.



Şekil 4.19. pH 9'da PON1 enzimi kullanılarak elde edilen nano çiçek hibrit yapısının EDX grafiği

Çizelge 4.3. pH 9'da PON1 enzimi kullanılarak elde edilen nano çiçek hibrit yapısının EDX analizi sonuçları

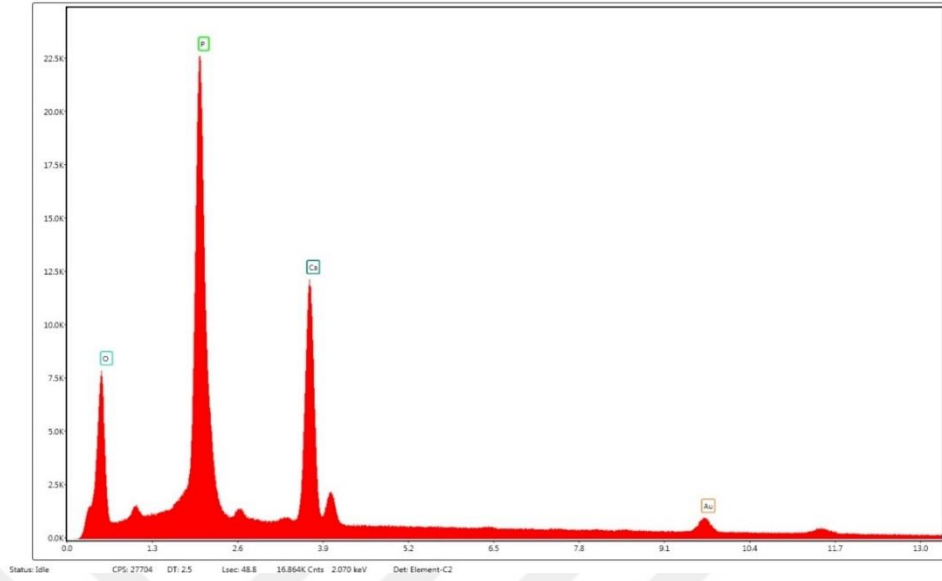
Element	Weight %	Atomic %	Error %	Net Int.	K Ratio	Z	R	A	F
O K	48.9	71.1	9.3	5005.8	0,1013	1,0962	0,9404	0,1891	1
P K	21.5	16.2	2.9	9208.6	0,1743	0,9634	0,9997	0,8334	1,0091
Ca K	19.9	11.5	2.4	5393.3	0,1727	0,9496	1,0301	0,8996	1,0181
Au L	9.8	1.2	15.8	207.7	0,0684	0,5708	1,1355	1,0397	1,1817



Şekil 4.20. pH 10'da PON1 enzimi kullanılarak elde edilen nano çiçek hibrit yapısının EDX grafiği

Çizelge 4.4. pH 10'da PON1 enzimi kullanılarak elde edilen nano çiçek hibrit yapısının EDX analizi sonuçları

Element	Weight %	Atomic %	Error %	Net Int.	K Ratio	Z	R	A	F
O K	25,6	70,8	10,3	637,1	0,0753	1,3515	0,7937	0,2174	1
P K	9	12,8	5,3	715	0,0804	1,1991	0,8606	0,7441	1,0052
Ca K	2	2,2	13,6	88,9	0,017	1,1917	0,9014	0,6864	1,0308
Au L	63,4	14,2	11,8	281,1	0,5519	0,7588	1,0755	1,0207	1,1245



Şekil 4.21. pH 11’da PON1 enzimi kullanılarak elde edilen nano çiçek hibrit yapısının EDX grafığı

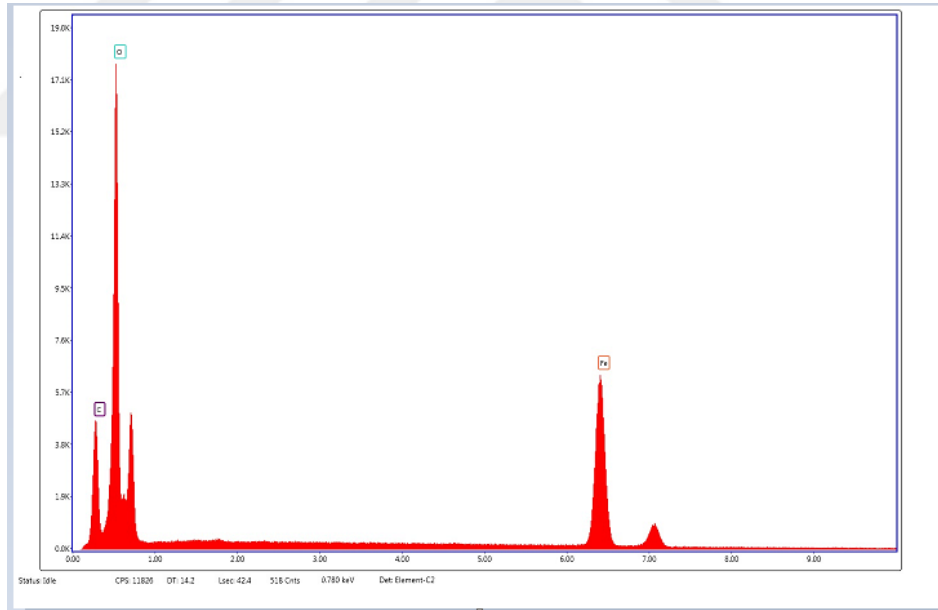
Çizelge 4.5. pH 11’da PON1 enzimi kullanılarak elde edilen nano çiçek hibrit yapısının EDX analizi sonuçları

Element	Weight %	Atomic %	Error %	Net Int.	K Ratio	Z	R	A	F
O K	30,2	56,4	10,1	1618,8	0,0551	1,1703	0,8954	0,1557	1
P K	23,6	22,7	3,1	6237,8	0,2016	1,0334	0,9599	0,8216	1,008
Ca K	23,4	17,4	3,1	3705,5	0,2032	1,0215	0,9947	0,8333	1,0202
Au L	22,8	3,5	11,3	296,2	0,1672	0,6227	1,1204	1,0316	1,1414

Enerji Dağılımı X-ışını analizi spektroskopisinde (EDX), PON1 hibrit nano çiçek yapılarının O, P ve Ca elementlerinin varlığını ortaya koymuştur (Şekil 4.19-21) ve (Çizelge 4.3-4.5).

EDX analizine göre en iyi PON 1 nano çiçek hibrit yapısının elde edildiği pH'11daki numunelerin EDX analizine bakıldığında diğer pH'lara göre daha yüksek yüzdede O (%30.2), P (%23.6) ve Ca (%23.4) elementi içerdiği belirlenmiştir. Bu nano çiçek yapısının muntazam olarak elde edilmesinde yapı elemanlarının daha fazla yüzede olduklarını göstermektedir. Alınan numunelerin SEM analizinin yapılabilmesi için numunelerin hazırlanma aşamasında numune yüzeyleri altın NP'ler ile kaplandığından dolayı EDX sonuçları arasında altın elementi de görülmüştür.

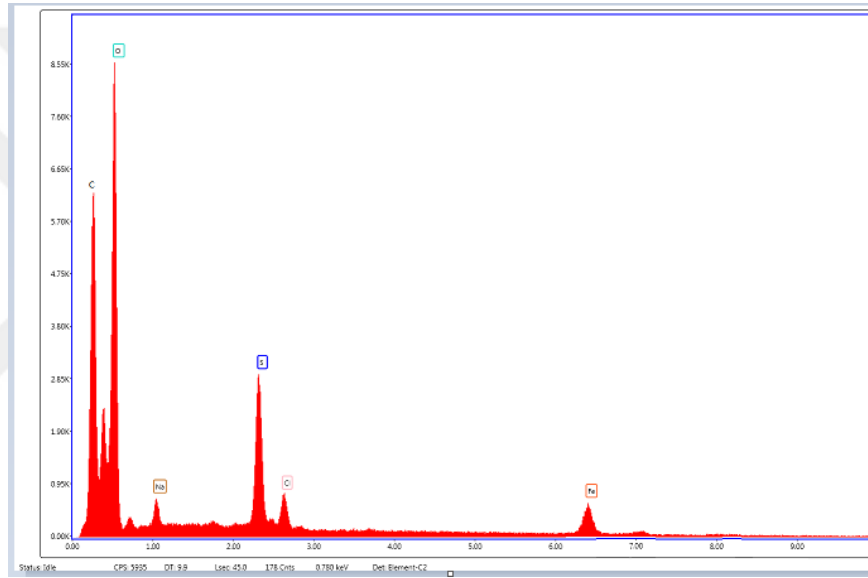
Fe₃O₄- kitosan NP ve PON1enzimi immobilize Fe₃O₄- kitosan NP'lerin yapıların EDX (Enerji Dağılımı X-ışını analizi) analizleri de yapılmış ve elde edilen bulgular Şekil 4.22- 4.23'de verildi. Fe₃O₄- kitosan NP ve PON1enzimi immobilize Fe₃O₄- kitosan NP'lerin yapısına ait olan yapı içeriği de Çizelge 4.6-4.7'da verildi.



Şekil 4.22. Fe₃O₄- kitosan NP yapısının EDX (Enerji Dağılımı X-ışını) analizleri yapılmış elde edilen EDX grafiği

Çizelge 4.6. Fe₃O₄- kitosan NP yapısının EDX (Enerji Dağılımı X-ışını) analizinin sonuçları

Element	Weight %	Atomic %	Error %	Net Int.	K Ratio	Z	R	A	F
C	13.4	30.2	8.9	729.5	0.0492	1.2125	0.8949	0.3029	1
O	23.2	39.1	6.8	2892.1	0.1270	1.1592	0.9192	0.4731	1
Fe	63.4	30.7	2.8	2074.3	0.5768	0.8796	1.0331	1.0059	1.0277



Şekil 4.23. PON1enzimi immobilize Fe₃O₄- kitosan NP'lerin yapıların EDX (Enerji Dağılımı X-ışını) analizleri yapılmış elde edilen EDX grafiği

Çizelge 4.7. PON1enzimi immobilize Fe₃O₄- kitosan NP'lerin yapıların EDX (Enerji Dağılımı X-ışını) analizinin sonuçları

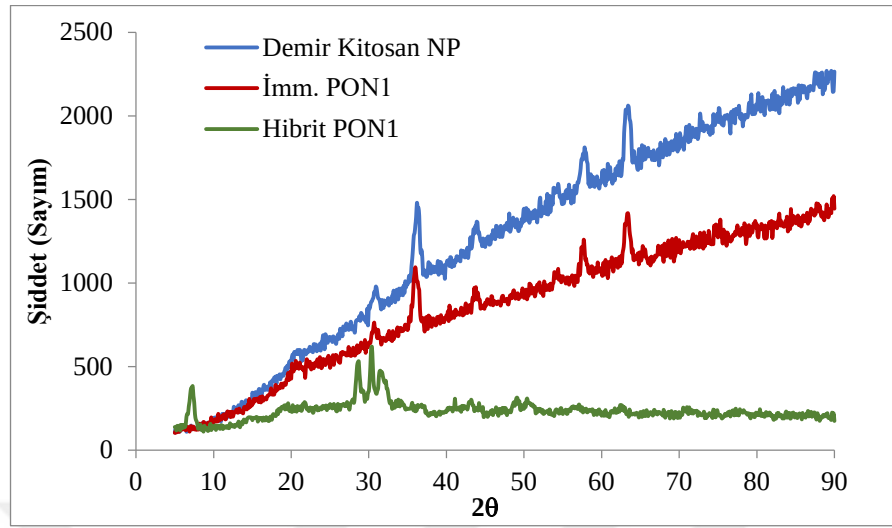
Element	Weight %	Atomic %	Error %	Net Int.	K Ratio	Z	R	A	F
O	52.1	72.6	6.8	1416	0.2721	1.0891	0.956	0.4799	1
Na	4	3.9	12.1	67.6	0.0143	0.9856	0.9829	0.3603	1.0024
S	16.5	11.5	3.3	560.5	0.1449	0.9618	1.0173	0.9003	1.0133
Cl	4.4	2.8	7.4	122.6	0.0356	0.9142	1.0229	0.8673	1.015
Fe	23	9.2	4.8	161.1	0.1962	0.8162	1.0512	1.0023	1.0435

Enerji Dağılımı X-ışını analizi spektroskopisinde (EDX), Fe_3O_4 - kitosan NP ve PON1enzimi immobilize Fe_3O_4 - kitosan NP'lerin yapılarının sırasıyla C, O, Fe ve O, Na, S, Cl , Fe elementlerinin varlığını ortaya koymuştur (Şekil 4.22-23) ve (Çizelge 4.6-4-7).

Fe_3O_4 - kitosan NP numunelerin EDX analizine bakıldığında daha yüksek yüzdede Fe (%63.4), O (%23.2) ve C (%13.4) elementi içerdiği belirlenmiştir. PON1enzimi immobilize Fe_3O_4 - kitosan NP'lerin numunelerin EDX analizine bakıldığında daha yüksek yüzeyde O(% 52.1), Fe(%23), S(%16.5) elementi içerdiği belirlenmiştir

4.6. XRD Analizi Sonuçları

XRD analizi atomlar arası uzaklığı, kristalin yapısı, düzlemler arası mesafeyi, kompozisyonu, mineralin hangi mineral olduğu konusunda bilgi vermektedir. Fe_3O_4 - kitosan NP'leri, PON1enzimi immobilize Fe_3O_4 -kitosan NP'lerin ve hibrit nano çiçek PON1 enzim yapılarının XRD analizlerine ait spektrum Şekil 5.50'de verilmiştir. Mavi renkle gösterilen grafik incelendiğinde; 30.6° , 36.2° , 43.4° , 57.3° ve 63.4° 'de yer alan pikler Fe_3O_4 yapısına ait olan piklerdir. 11.4° ve 20.1° 'lerde yer alan pikler ise kitosan molekülünün tipik parmak izi bölgesini oluşturmaktadır (Cao *et al.* 2014). Kırmızı renkte gösterilen grafikte immobilize PON1 enzim yapısı grafiğinin manyetik kitosan NP'lerine ait XRD grafikleri karşılaştırıldığında PON1 enzim yapısındaki karbohidrat birimlerinin ekstra pik verdiği görülmektedir. Buradan enzimin manyetik kitosan NP'lerine immobilize olduğu net olarak görülmektedir. Şekil 4.24'de yeşil renkle gösterilen hibrit yapısına ait grafikte ise; 7.1° ve 18.9° 'de yer alan pikler kitosan yapısını gösterirken, 28.5° , 30.2° , 31.7° , 49.1° , 50.4° , 62.5° ve 70.5° 'lerdeki pikler ise hibrit nano çiçek yapısı içerisinde yer alan tripolifosfat, Ca yapısı ve PON enziminde yer alan karbohidrat birimlerine aittir (Wang *et al.* 2014). Elde edile bulgulardan PON1enziminin nano çiçek hibrit yapısının başarıyla oluşturulduğu görülmektedir.



Şekil 4.24. Manyetik kitosan NP'leri, immobilize PON1 ve Hibrit nano çiçek PON1enzimlerine ait XRD desenleri

4.7. FT-IR Analizi Sonuçları

Fourier dönüşümlü infrared spektrofotometre (FT-IR) ile $4000 - 623 \text{ cm}^{-1}$ IR (kızılötesi infrared) alanında ölçüm yapılarak numunelerde moleküllerin çeşitli titreşim frekanslarını belirlenmesi ile fonksiyonel gruplar hakkında bilgi elde edildi.

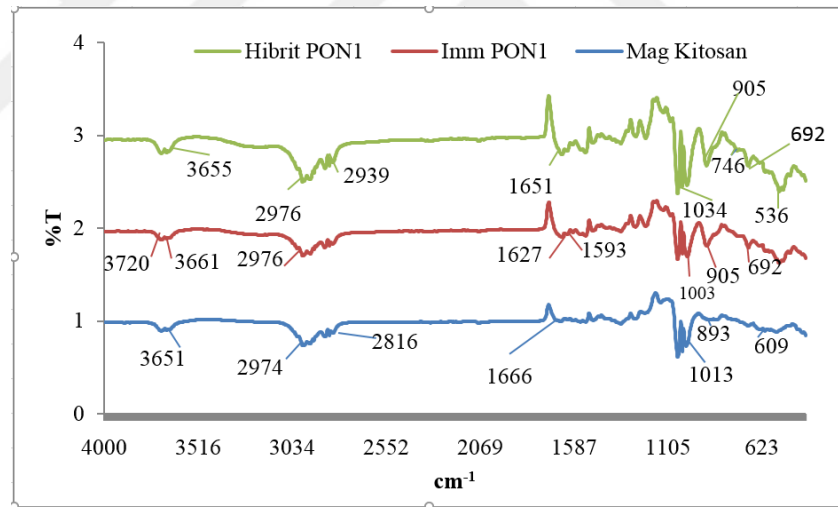
Manyetik-kitosan NP'lerin ve immobilize ve hibrit PON1enzim yapılarına ait FT-IR spektrumları Şekil 4.25'de verilmiştir.[Açıklamalar]

Manyetik-Kitosan FT-IR spektrumlarından ait spektrumunda 2974 cm^{-1} ve 2816 cm^{-1} 'de yer alan titreşimler kitosan yapısındaki $-\text{CH}_3$ ve $-\text{CH}_2$ gruplarına, $1666-1013 \text{ cm}^{-1}$ 'de ise amid ve sekonder amid yapısında yer alan $-\text{C}=\text{O}$ ve $-\text{N}-\text{H}$ bağlarının gerilme titreşimlerine aittir. Amid yapısında yer alan $-\text{C}-\text{H}$ bağına ait titreşim ise 893 cm^{-1} ve 609 cm^{-1} 'de yer aldığı spektrumdan görülmektedir.

Şekil 4.23’de yer alan 1593 cm^{-1} ’de ki pikler kitosan yapısına ait (O-H, hidroksil ve serbest amino gruplarının -NH gerilme titreşimlerinden) piklerdir. Magnetik kitosan immobilize PON1 enzimi ve hibrit PON1 enzimi kıyaslandığında 1593 cm^{-1} ’de magnetik kitosan NP’lerinin piki enzim immobilize magnetik kitosan NP’lerin pikine göre keskinliği azalmaktadır. Hibrit PON1 enzimi ise immobilize PON1 enzimine göre daha keskin pik göstermektedir.

İmmobilize PON1 enzimin FT-IR spektrumlarından yer alan 1627 cm^{-1} ’de yeni keskin bir pik görülmektedir ve -N-H pikine aittir (Guo *et al.* 2005).

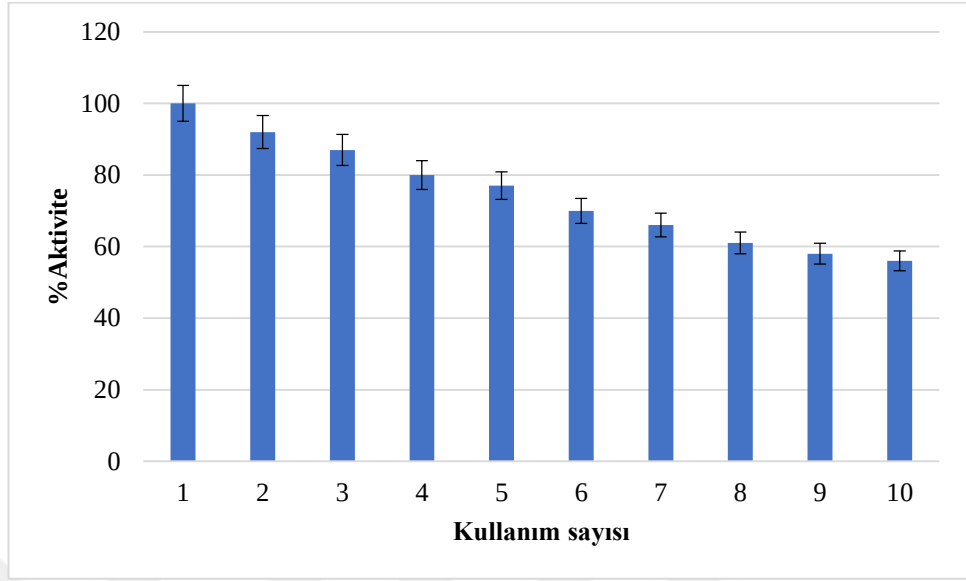
Hibrit PON1 enzimin FT-IR spektrumlarında yer alan 536 cm^{-1} pik $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ iyonuna aittir. 746 cm^{-1} yer alan pik $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ iyonuna aittir. $905, 692\text{ cm}^{-1}$ alanlarındaki pikler POP yapısına aittir. $3655\text{-}1651\text{ cm}^{-1}$ alanında pikler (O-H)(HOH) aittir (Wang *et al.* 2014).



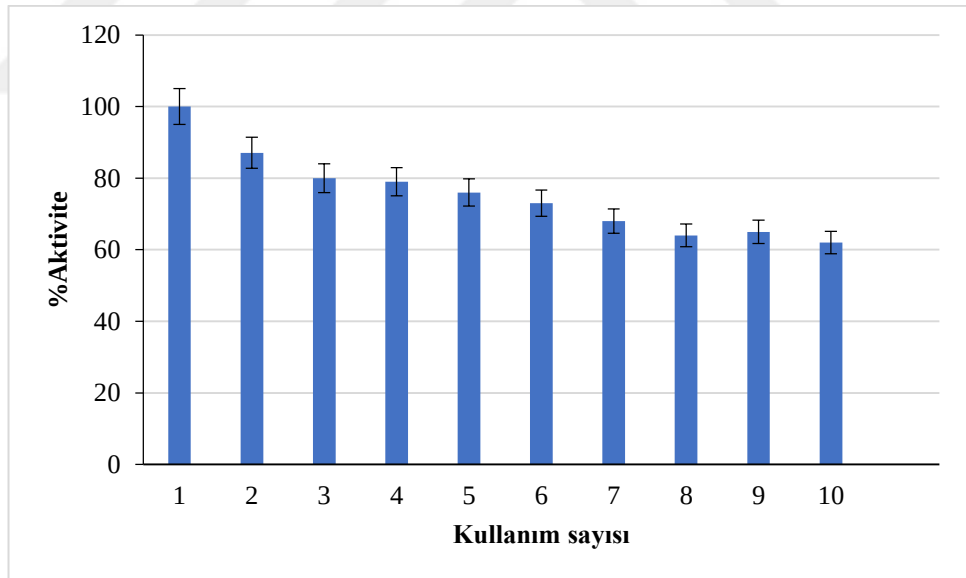
Şekil 4.25. Demir kitosan, immobilize ve Hibrit PON1enzimine ait FT-IR desenleri

4.8. İmmobilize PON 1 ve PON1 Nano Çiçek Hibrit Yapısının Tekrar Kullanılabilirliğinin Analizi

Manyetik kitosan NP’leri üzerine ve nano çiçek hibrit yapılarına immobilize edilen PON1 enzimlerinin tekrar kullanılabilirlikleri araştırıldı ve sonuçlar Şekil 4.26; 4.27’de verildi.



Şekil 4.26. Fe_3O_4 –Kitosan NP’leri üzerine immobilize paraoksonaz enziminin tekrar kullanılabilirlik stabilite grafiği



Şekil 4.27. Hibrit nano çiçek paraoksonaz enziminin tekrar kullanılabilirlik stabilite grafiği

Şekil 4.27'a bakıldığında Fe_3O_4 –Kitosan NP'leri üzerine immobilize paraoksonaz enziminin 10 kere tekrar kullanılmasının ardından aktivitesinin %56'sını halen koruduğu görülmektedir. Hibrit nano çiçek paraoksonaz enziminin ise 10 kere arka arkaya aktivitesi ölçüldüğünde enzimin aktivitesini %62 oranında koruduğu belirlenmiştir. Elde edilen bulgulardan hibrit nano çiçek yapısındaki PON1 enziminin daha stabil olduğu belirlenmiştir.

4.9. Zebra Balığı İle İlgili Sonuçlar

İnsan serumundan ÜFA metodu kullanılarak elde edilen PON1'den elde edilen nano çiçek PON1 hibrit yapılarının toksisitesi Zebra balıkları üzerinde araştırıldı. Yapılan deneyde zebra balıkları 3 ana gruba ayrıldı. 1. grup herhangi bir etmenle muamele edilmeyen kontrol grubu, 2. grup serbest enzimle muamele edilen grup ve 3. grup ise nano çiçek PON1 hibrit yapısı ile muamele edilen grup olarak sınıflandırıldı. Her bir grupta 30 zebra balığı yumurtası kullanıldı ve 3 tekrür olarak çalışıldı. Denemeler esnasında Zebra balıklarının yumurtalarının ilk 24 saat boyunca ölümlerin nedeni mantarlaşma olduğu için bu süre zarfındaki ölümler dikkate alınmadı. Elde edilen sonuçlar 24 saat, 48 saat, 72 saat ve 96. saatlerde izlendi ve sonuçlar Çizelge 4.8-10'da verildi.

Çizelge 4.8. Nano çiçek PON1 hibrit yapılarının Zebra balıkları üzerinde 24 saat toksisite incelemelerine ait sonuçlar

Kontrol	Sonuç	Serbest Enzim	Sonuç	Hibrit Enzim	Sonuç
-	6 ölü	50 mg/L	7 ölü	50 mg/L	10 ölü
-		100 mg/L	9 ölü	100 mg/L	6 ölü
-		250 mg/L	4 ölü	250 mg/L	7 ölü
-		500 mg/L	8 ölü	500 mg/L	3 ölü
-		1000 mg/L	5 ölü	1000 mg/L	3 ölü
-		2000 mg/L	5 ölü	2000 mg/L	5 ölü

Çizelge 4.9. Nano çiçek PON1 hibrit yapılarının Zebra balıkları üzerinde 48 saat toksisite incelemelerine ait sonuçlar

Kontrol	Sonuç	Serbest Enzim	Sonuç	Hibrit Enzim	Sonuç
-	Ö.Y	50 mg/L	Ö.Y – 1 tane Y.Ç	50 mg/L	Ö.Y – 9tane Y.Ç
-	Y.Ç.Y	100 mg/L	Ö.Y – 5 tane Y.Ç	100 mg/L	Ö.Y – 16tane Y.Ç
-	A.Y	250 mg/L	Ö.Y – Y.Ç.Y	250 mg/L	Ö.Y – 10tane Y.Ç
-		500 mg/L	Ö.Y- 1 tane Y.Ç	500 mg/L	Ö.Y – 14tane Y.Ç – 1tane A
-		1000 mg/L	1 taneÖ – 3 tane Y.Ç	1000 mg/L	Ö-Y – 8tane Y.Ç
-		2000 mg/L	Ö.Y-1tane Y.Ç- 1 tane	2000 mg/L	Ö-Y – 6tane Y.Ç

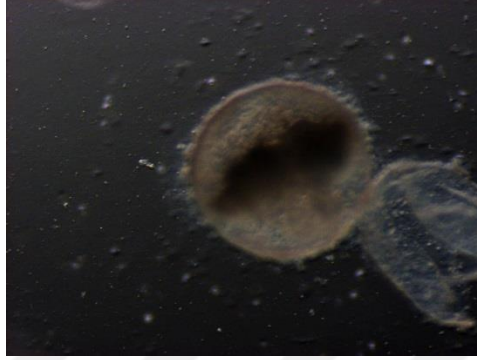
Çizelge 4.10. Nano çiçek PON1 hibrit yapılarının Zebra balıkları üzerinde 72 saat toksisite incelemelerine ait sonuçlar (Hepsi yumurtadan çıkmışlardır)

Kontrol	Sonuç	Serbest Enzim	Sonuç	Hibrit Enzim	Sonuç
-	Ö. Y	50 mg/L	1tane Ö –1tane Y.Ç.M	50 mg/L	Ö.Y – 1tane Y.Ç.M
-	Y.Ç.Y	100 mg/L	Ö.Y – 2 tane Y.Ç.M	100 mg/L	Ö.Y – H. Y.Ç
-	A.Y	250 mg/L	Ö.Y – 2 tane Y.Ç.M	250 mg/L	Ö-Y – H.Y.Ç
-		500 mg/L	Ö.Y- 1tane Y.Ç.M	500 mg/L	Ö-Y – H.Y.Ç – 1tane A
-		1000 mg/L	Ö.Y-1taneY.Ç.M	1000 mg/L	Ö-Y – 1tane Y.Ç.M
-		2000 mg/L	Ö.Y-2tane Y.Ç.M	2000 mg/L	Ö-Y – 1tane Y.Ç.M

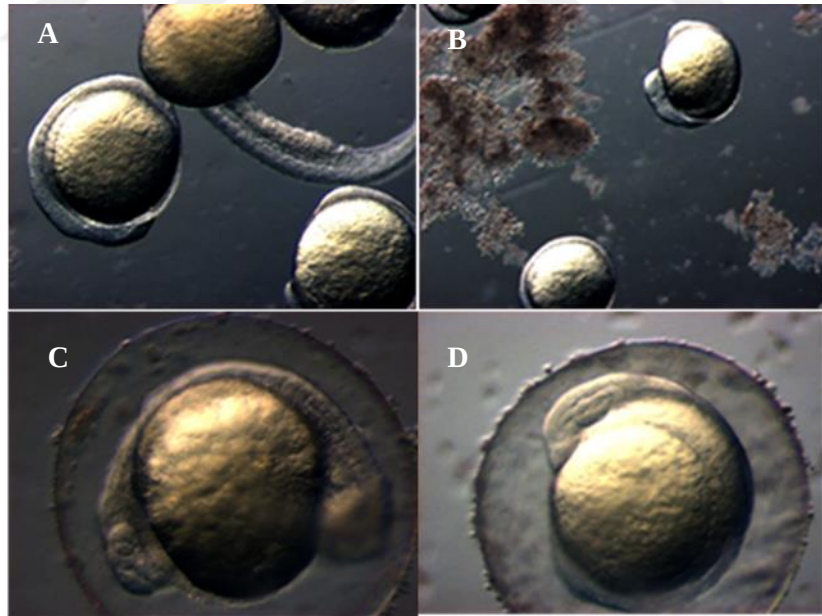
Ö.Y (ÖlüYok) Y.Ç (Yumurtadan Çıkmamış) A.Y (Anormal Yok) H.Y.Ç (Hepsi Yumurtadan Çıkmış)Y.ÇY (Yumurtadan Çıkmayan yok)

Normal koşullarda 48 saatini tamamlayan zebra balığı embriyolarının hepsinin yumurtadan çıkmış olması gerekmektedir. 72 saatini tamamlayan zebra balıklarının düz bir segmentli yapıda ve yumurta çıkışlarının çoktan tamamlanmış olması lazımdır. Yine de biraz gecikme görülebilir. Ancak elde ettiğimiz verilerden serbest PON1 ve nano çiçek PON1 hibrit yapılarının embriyolar üzerinde olumsuz etkilerinin olmadığını

göstermiştir. Bu nedenle etkisini araştırdığımız serbest ve hibrit PON1 enzim numunelerinin Zebra balığı embriyo gelişimi üzerinde hiç bir toksisitesi olmadığı belirlenmiştir.

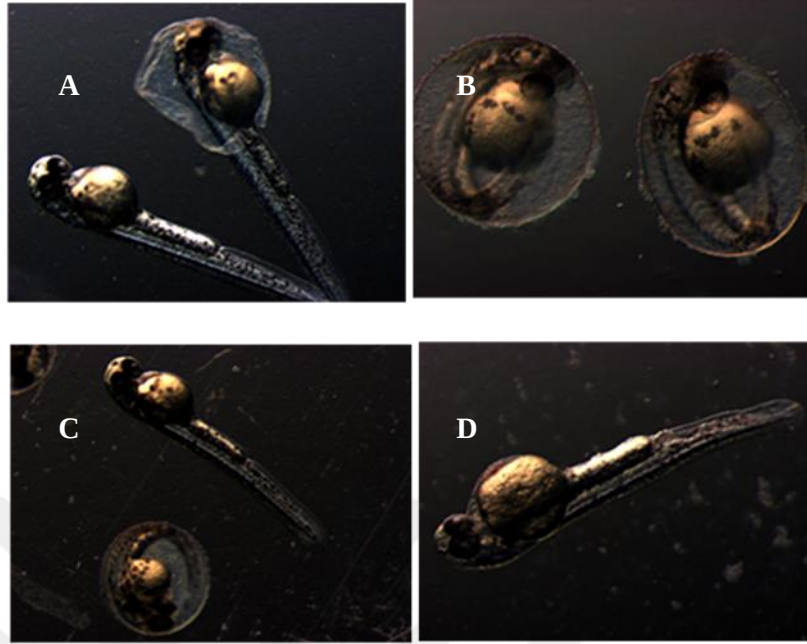


Şekil 4.28. Mantardan ölmüş Zebra balığı embriyo görüntüsü



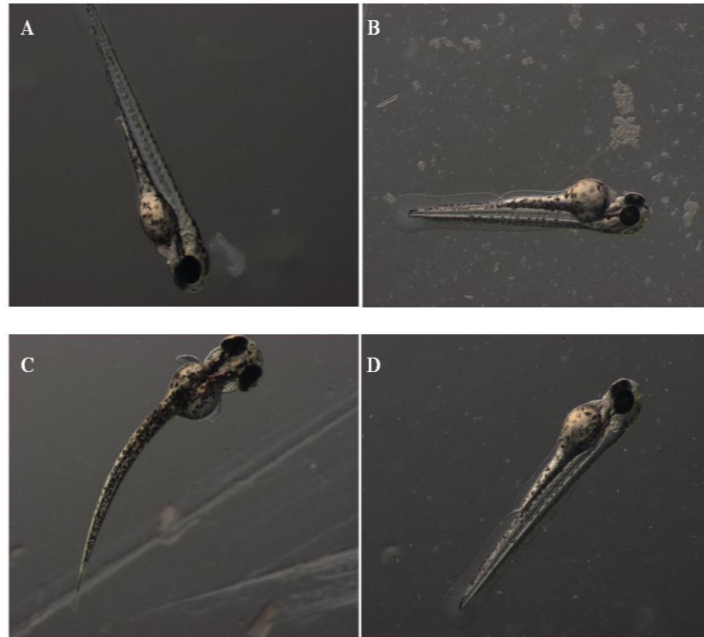
Şekil 4.29. 24'üncü saat Zebra balığı embriyosu gelişim görüntüsü

[(A: Nano çiçek PON1 Hibrit enzim (50 mg/L), B: Nano çiçek PON1 Hibrit enzim (2000 mg/L), C: Serbest enzim (50 mg/L), D: Serbest enzim (2000 mg/L)]



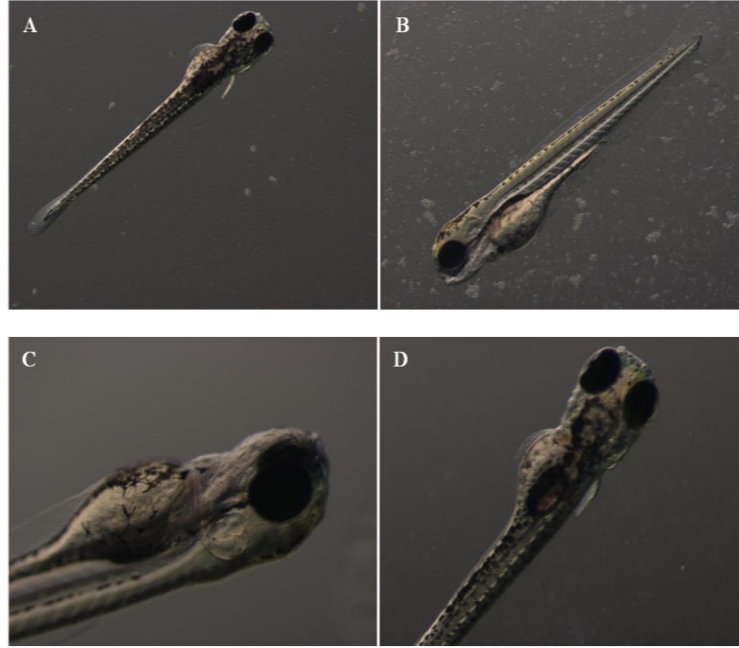
Şekil 4.30. 48'üncü saat Zebra balığı embriyosu gelişim görüntüsü

[(A: Nano çiçek PON1 Hibrit enzim (50 mg/L), B: Nano çiçek PON1 Hibrit enzim (2000 mg/L), C: Serbest enzim (50 mg/L), D: Serbest enzim (2000 mg/L)]



Şekil 4.31. 72'inci saat Zebra balığı embriyosu gelişim görüntüsü

[(A: Nano çiçek PON1 Hibrit enzim (50 mg/L), B: Nano çiçek PON1 Hibrit enzim (2000 mg/L), C: Serbest enzim (50 mg/L), D: Serbest enzim (2000 mg/L)]



Şekil 4.32. 96'ıncı saat Zebra balığı embriyosu gelişim görüntüsü

[(A: Nano çiçek PON1 Hibrit enzim (50 mg/L), B: Nano çiçek PON1 Hibrit enzim (2000 mg/L), C: Serbest enzim (50 mg/L), D: Serbest enzim (2000 mg/)

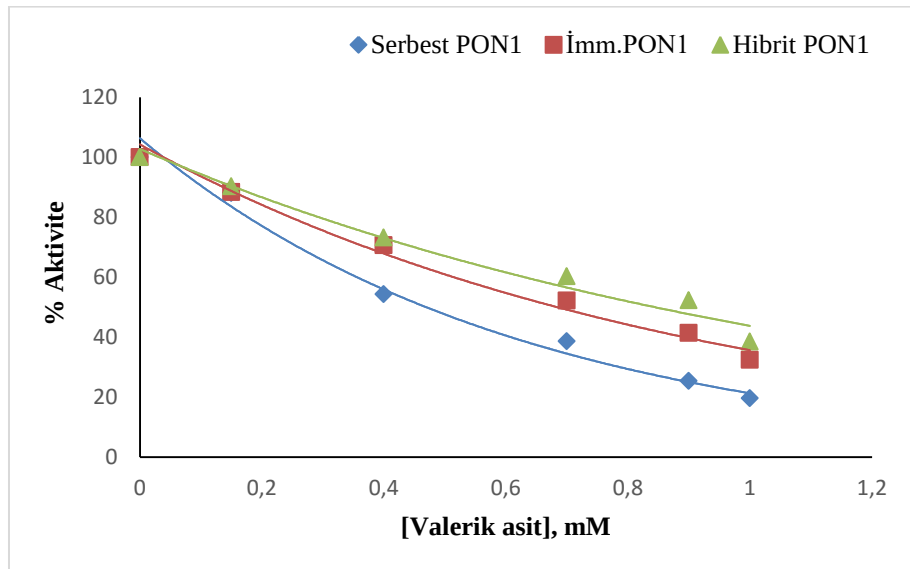
4.10. PON1 Enzim Aktivitesi Üzerine Antilipit İlaçların ve Bazı Antioksidanların Etkilerinin *In Vitro* Olarak İncelenmesi

Bu çalışmada, Valerik asit, Fenoksi – izobutirik asit, N-desmetil rosuvastatin anti lipit ilaçları ve Gallik Asit, Kuersetin, Pirogallol ve Askorbik asit gibi bazı antioksidan bileşiklerin Serbest, immobilize ve nano çiçek PON1 hibrit enzim aktiviteleri üzerine etkileri *in vitro* olarak incelendi. Belirlenen ilaçların ve antioksidanların derişik stok çözeltileri hazırlandı. Tüm reaksiyon ortamlarına ilave edilen maddelerin miktarları Çizelge4.11'da verildi. Buna göre 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda reaksiyonlar oluşturuldu. İnhibitör içermeyen kontrol reaksiyonuna göre aktiviteler hesaplandı. Kör deney ise; enzim yerine saf su eklenerek hazırlandı. Reaksiyonlar 15 dak, 37°C'de inkübe edilmelerinin ardından absorbans değışimleri 412 nm'de kaydedilerek aktivite belirlendi. Elde edilen verilere göre, % Aktivite-İnhibitör konsantrasyonu grafikleri her üç ilaç ve dört antioksidana göre çizildi (Şekil 4.33-4.39) ve grafiklerdeki eğri denkleminde IC_{50} değerleri hesaplandı (Demir vd 2011).

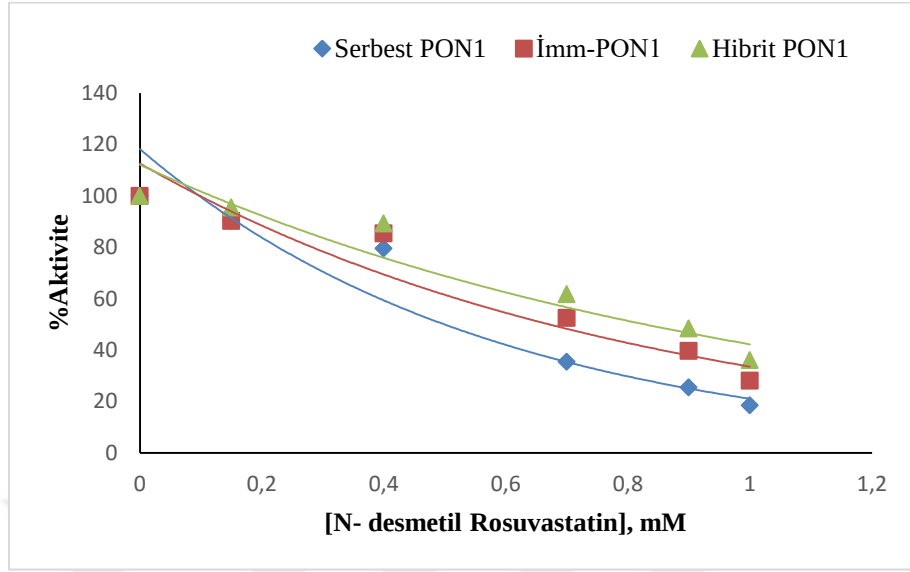
Çizelge 4.11. PON1 enzimin üzerinde Valerik asit, fenoksi – izobutirik asit, N-desmetil rosuvastatin ve Gallik Asit, Kuercetin Hydrate, Pyrogallol, Askorbik asit etkilerinin incelenmesi, IC50 değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

	Glisin (5mM) (μ L)	Paraoxan (3mM) (μ L)	(Saf-Enzim) (Immobilize-E) (Hibrit-E)	Antilipid ilaç ve Antioksidan (10mM) (μ L)	Saf su (μ L)	Toplam (mL)
Kontrol	500 μ L	300 μ L	50 μ L	---	150 μ L	1 mL
Kör	500 μ L	300 μ L	---	15, 30, 50 70, 100	185, 170, 150, 130, 100	1 mL
1	500 μ L	300 μ L	50 μ L	15 μ L	135 μ L	1mL
2	500 μ L	300 μ L	50 μ L	30 μ L	120 μ L	1 mL
3	500 μ L	300 μ L	50 μ L	50 μ L	100 μ L	1 mL
4	500 μ L	300 μ L	50 μ L	70 μ L	80 μ L	1 mL
5	500 μ L	300 μ L	50 μ L	100 μ L	50 μ L	1 mL

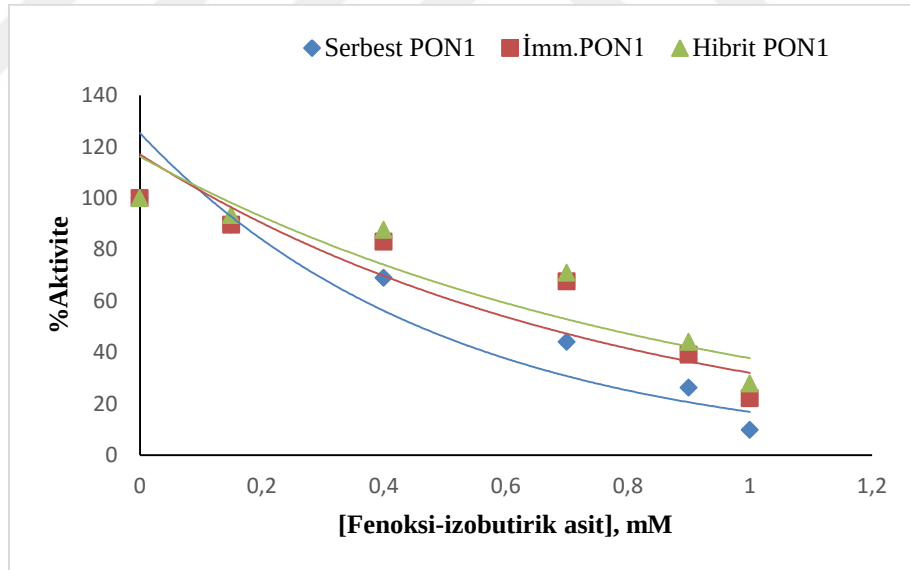
Yukarıdaki çizelgeye göre hazırlanan reaksiyonlar yapıldı ve elde edilen sonuçlara göre grafikler çizildi.



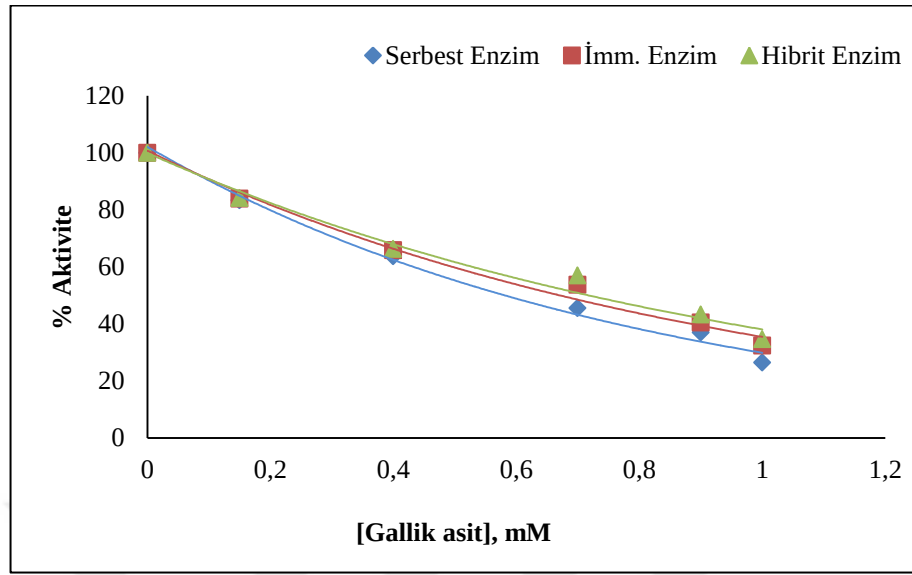
Şekil 4.33. Valerik asit ilacının Serbest, İmmobilize ve Hibrit PON1 enziminin aktivitesi üzerine etkisi



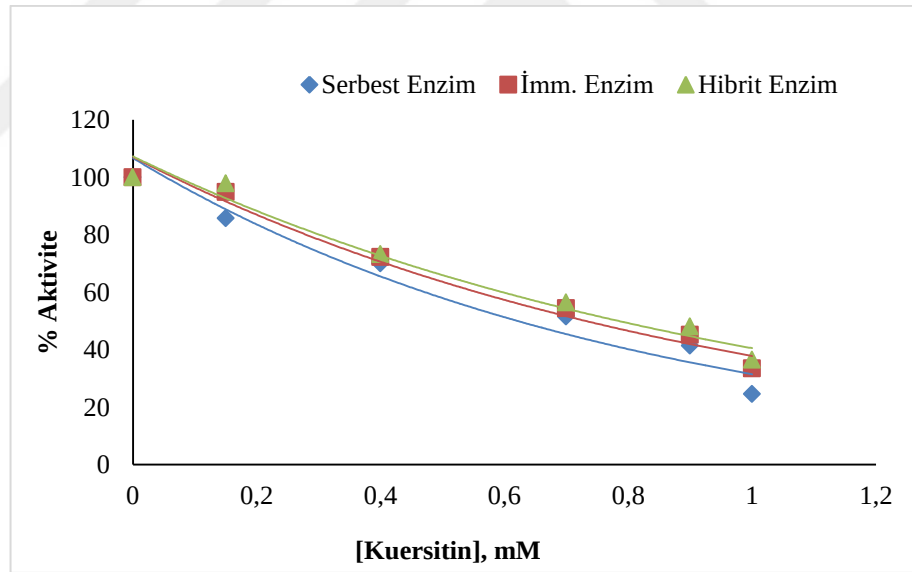
Şekil 4.34. N-desmetil Rosuvastatin ilacının Serbest, İmmobilize ve Hibrit PON1 enzimin aktivitesi üzerine etkisi



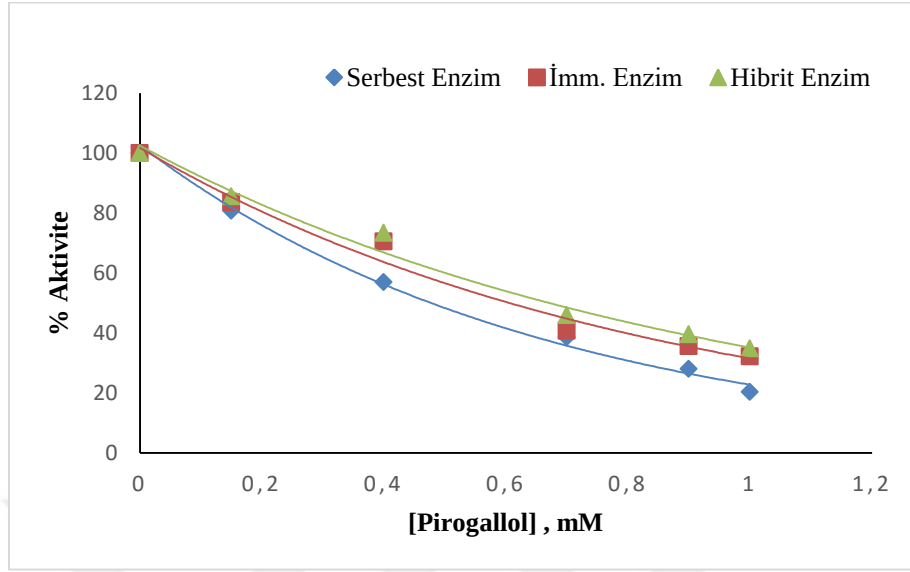
Şekil 4.35. Fenoksi-izobutirik asit ilacının Serbest, İmmobilize ve Hibrit PON1 enzimin aktivitesi üzerinde etkisi



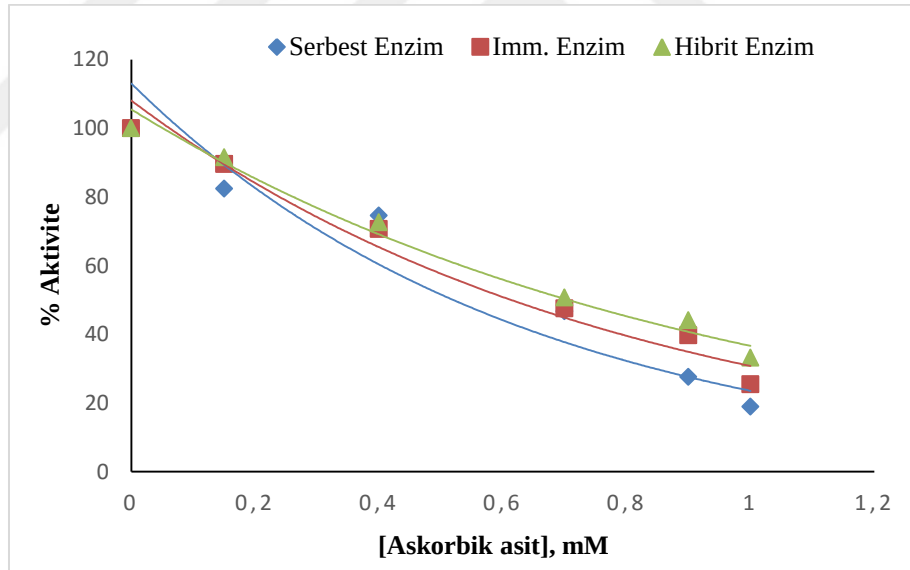
Şekil 4.36. Gallik asit'in PON1 enzim aktivitesi üzerinde inhibitor etkisi grafiği



Şekil 4.37. Kuersetin'in PON1 enzim aktivitesi üzerinde inhibitor etkisi grafiği



Şekil 4.38. Pirogallol'un PON1 enzim aktivitesi üzerinde inhibitör etkisi grafiği



Şekil 4.39. Askorbik asit PON1 enzim aktivitesi üzerinde inhibitör etkisi grafiği

Serbest, immobilize ve hibrit PON1 enzim aktiviteleri üzerine Valerik asit, Fenoksi-izobutirik asit, N-desmetil Rosuvastatin gibi bazı antilipit ilaçlarının ve Gallik Asit, Kuersetin, Pirogallol, Askorbik asit gibi antioksidan bileşiklerinin inhibitör etkisini gösteren bileşikler için çizilen % Aktivite – İnhibitör konsantrasyonu grafiklerinin eğri denklemleri kullanılarak IC_{50} değerleri hesaplandı ve Çizelge 4.12’de verildi.

Çizelge 4.12. Serbest, immobilize ve hibrit PON1 enzimleri için IC_{50} değerleri

IC_{50} , mM			
Antilipit İlaçlar	Serbest PON1	İmmobilize PON1	Hibrit PON1
Valerik asit	0.469	0.685	0.845
Fenoksi- izobutirik asit	0.457	0.656	0.750
N-desmetil Rosuvastatin	0.51	0.671	0.827
IC_{50} , mM			
Antioksidan Bileşikler	Serbest PON1	İmmobilize PON1	Hibrit PON1
Gallik Asit	0.582	0.671	0.718
Kuersetin	0.622	0.730	0.812
Pirogallol	0.477	0.606	0.672
Askorbik asit	0.523	0.614	0.707

Serbest, immobilize ve hibrit PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Valerik asit, Fenoksi- izobutirik asit, N-desmetil Rosuvastatin gibi bazı antilipit ilaçlarının ve Gallik Asit, Kuersetin, Pirogallol, Askorbik asit gibi antioksidan bileşikleri için K_I değerlerini belirlemek amacıyla üç farklı konsantrasyon seçerek serbest, Immobilize ve hibrit PON1 enzimleri için, beş farklı substrat konsantrasyonu ile (50, 100, 200, 300, 400 μ L) aktivite ölçümleri yapıldı (Çizelge 4.13). Elde edilen değerlerle her bir inhibitör için Lineweaver-Burk grafikleri çizildi ve K_I değerleri belirlendi.

Çizelge 4.13. PON1 enzimin üzerinde, Valerik asit, Fenoxi- izobutirik asit, N-desmetil Rosuvastatin, Gallik Asit, kuersetin Hidrate, Pirogallol ve Askorbik asit Ki değerlerinin belirlenmesi için kullanılan çözeltilerin miktarları

	İnhibitör IC_{50} Miktarları (μL)	Glisin (pH10, μL)	Paraoksan (3Mm, μL)	Serbest İmmobilize (0.004g) Hibrit (0.004g) PON1Enzimler (μL)	Saf su (μL)	Toplam Hacim (mL)
Kontrol	-----	500	50 100 200 300 400	100	350 310 260 210 170	1
Kör	100 (μ L)	500	50 100 200 300 400	-----	350 310 260 210 170	1
Antilipid ilaçlar	100 (μ L)	500	50 100 200 300 400	100	350 310 260 210 170	1
Antioksidanlar	100 (μ L)					

Serbest, immobilize ve hibrit PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Valerik asit, Fenoxi- izobutirik asit, N-desmetil Rosuvastatin gibi bazı antilipit ilaçları kullanılarak yapılan ölçümler sonucunda elde edilen Linewear burk eğrileri Şekil 4.40-4.48'de verildi.

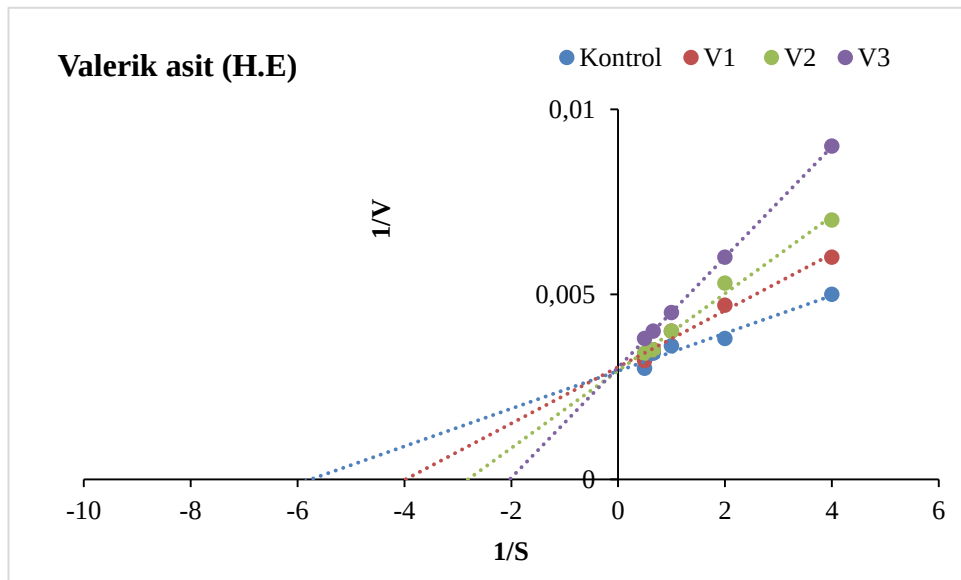
Serbest, immobilize ve hibrit PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Valerik asit eğri denkleminde IC_{50} değerleri hesaplandı. Serbest enzim IC_{50} değeri 0.469 mM, immobilize enzim IC_{50} değeri 0.685 mM ve hibrit enzim IC_{50} değeri 0.845 mM olarak hesaplandı.

Ki değerleri için, PON1 enzimin aktivitesini yarıya düşüren antioksidan konsantrasyonunun, üç konsantrasyon seçerek (serbest enzim için 0.569, 0.469, 0.369 mM), (immobilize enzim için 0.785, 0.685, 0.585 mM) ve (hibrit enzim için 0.945,

0.845, 0.745mM), substratın beş farklı konsantrasyonu ile (50, 100, 200, 300, 400 μ L) aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen değerlerle Valerik asit için Lineweaver-Burk grafiği çizildi.

Çizelge 4.14. Valerik asit ilacının serbest PON1 enzimi üzerine inhibisyon sonuçları (1/S ve 1/V değerleri)

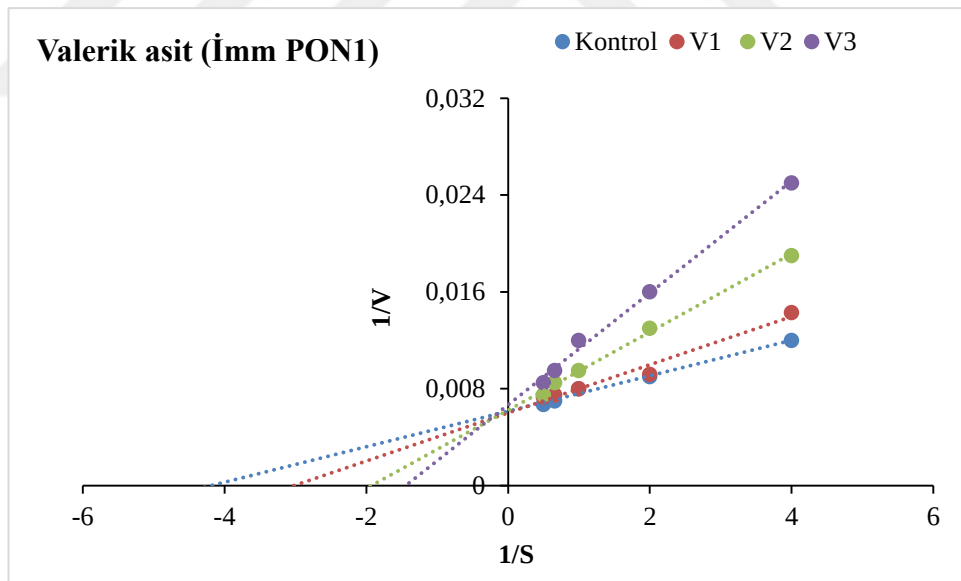
Valerik asit (Serbest Enzim)				
Substrat Konsantrasyonu	Kontrol	V1(mM)	V2(mM)	V3(mM)
1/S	1/V1	1/V2	1/V3	1/V4
4	0.011	0.015	0.02	0.025
2	0.0085	0.01	0.014	0.016
1	0.0066	0.008	0.01	0.01
0.66	0.0065	0.007	0.008	0.009
0.5	0.006	0.0065	0.007	0.0084



Şekil 4.40. Valerik asit antilipit ilacının serbest PON1 enzimi üzerine inhibisyonunu gösteren Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.15. Valerik asit ilacının immobilize PON1 enzimi üzerine inhibisyon sonuçları ($1/S$ ve $1/V$ değerleri)

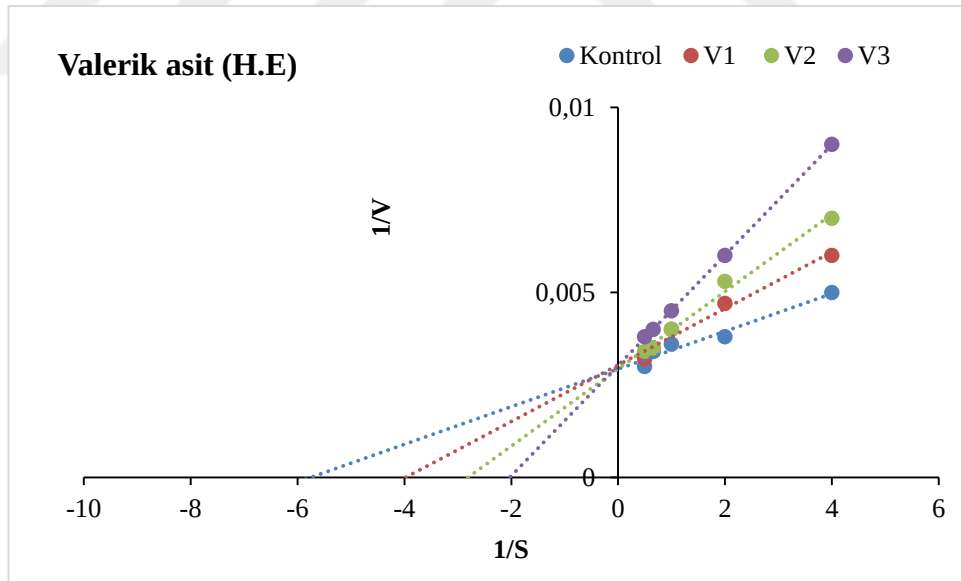
Valerik asit (İmmobilize Enzim)				
Substrat Konsantrasyonu	Kontrol	V1(mM)	V2(mM)	V3(mM)
$1/S$	$1/V1$	$1/V2$	$1/V3$	$1/V4$
4	0.012	0.0143	0.019	0.025
2	0.009	0.0092	0.013	0.016
1	0.008	0.008	0.0095	0.012
0.66	0.007	0.0075	0.0085	0.0095
0.5	0.0067	0.0073	0.0075	0.0085



Şekil 4.41. Valeric asit antilipit ilacının immobilize PON1 enzimi üzerine inhibisyonunu gösteren Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.16. Valeric asit ilacının Hibrit PON1 enzimi üzerine inhibisyon sonuçları (1/S ve 1/V değerleri)

Valeric asit (Hibrit Enzim)				
Substrat Konsantrasyonu	Kontrol	V1(mM)	V2(mM)	V3(mM)
1/S	1/V1	1/V2	1/V3	1/V4
4	0.005	0.006	0.007	0.009
2	0.0038	0.0047	0.0053	0.006
1	0.0036	0.004	0.004	0.0045
0.66	0.0034	0.0035	0.0035	0.004
0.5	0.003	0.0032	0.0034	0.0038



Şekil 4.42. Valerik asit antilipit ilacının Hibrit PON1 enzimi üzerine inhibisyonunu gösteren Lineweaver-Burk grafiği

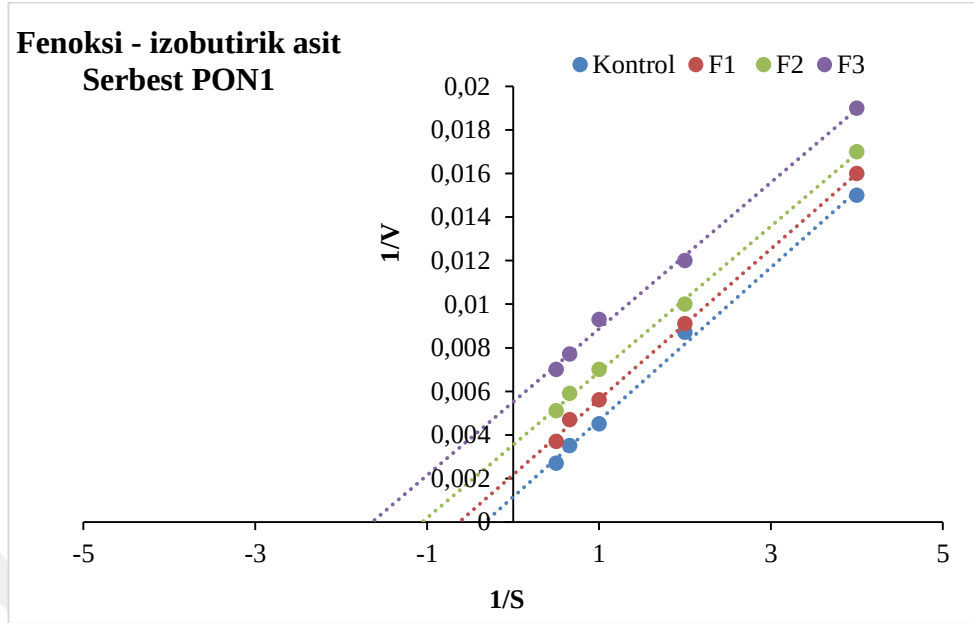
Serbest, immobilize ve hibrit PON1 enzimleri Valerik asit için çizilen Lineweaver-Burk grafikleri incelendiğinde inhibisyonun türünün yarışmalı inhibisyon gösterdiği

görülmektedir (Şekil 4.40-4.42). İnhibisyonun K_i değerinin tespit edilmesi için eğri denkleminde yararlanıldı ve sonuçlar Çizelge 4.35’de verildi.

Fenoksi- izobutirik asit ilacın K_i değerini belirlenmesi için, PON1 enzimin aktivitesini yarıya düşüren antioksidan konsantrasyonunda üç farklı konsantrasyon seçerek (serbest enzim için 0.369, 0.469, 0.569 mM), (immobilize enzim için 0.585, 0.685, 0.785 mM) ve (hibrit enzim için 0.745, 0.845, 0.945 mM) ve beş farklı substrat konsantrasyonu ile (50, 100, 200, 300, 400 μ L) aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen değerlerle Fenofibrat için Lineweaver-Burk grafiği çizildi.

Çizelge 4.17. Fenoksi- izobutirik asit ilacının Hibrit PON1 enzimi üzerine inhibisyon sonuçları (1/S ve 1/V değerleri)

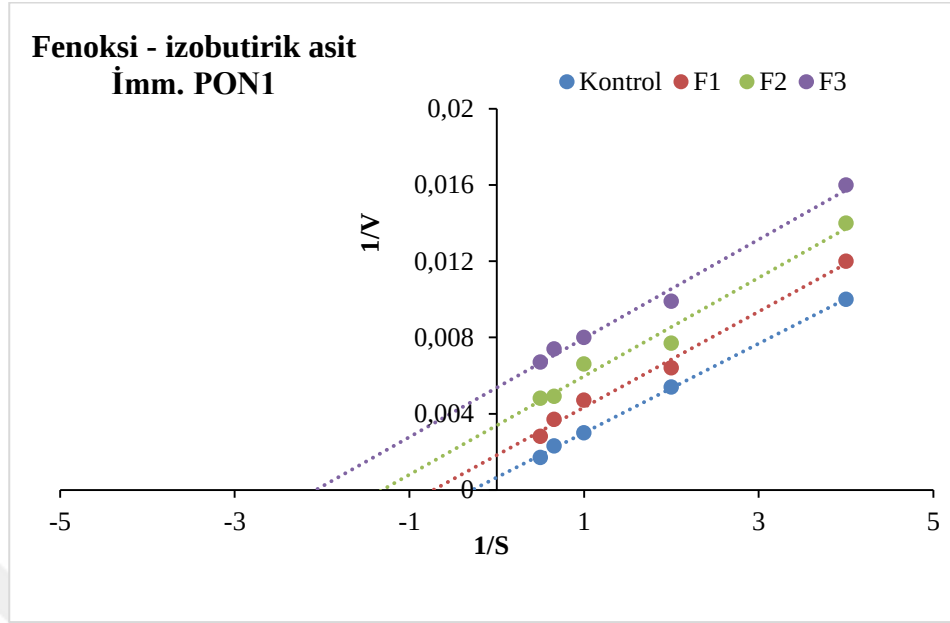
Fenoksi- izobutirik asit (Serbest PON1 Enzim)				
Substrat Konsantrasyonu	Kontrol	F1(mM)	F2(mM)	F3(mM)
1/S	1/V1	1/V2	1/V3	1/V4
4	0.015	0.016	0.017	0.019
2	0.0087	0.0091	0.01	0.012
1	0.0045	0.0056	0.007	0.0093
0.66	0.0035	0.0047	0.0059	0.0077
0.5	0.0027	0.0037	0.0051	0.007



Şekil 4.43. Fenoksi- izobutirik asit antilipit ilacının serbest PON1 enzimi üzerine inhibisyonunu gösteren Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.18. Fenoksi- izobutirik asit ilacının İmmobilize PON1 enzimi üzerine inhibisyon sonuçları (1/S ve 1/V değerleri)

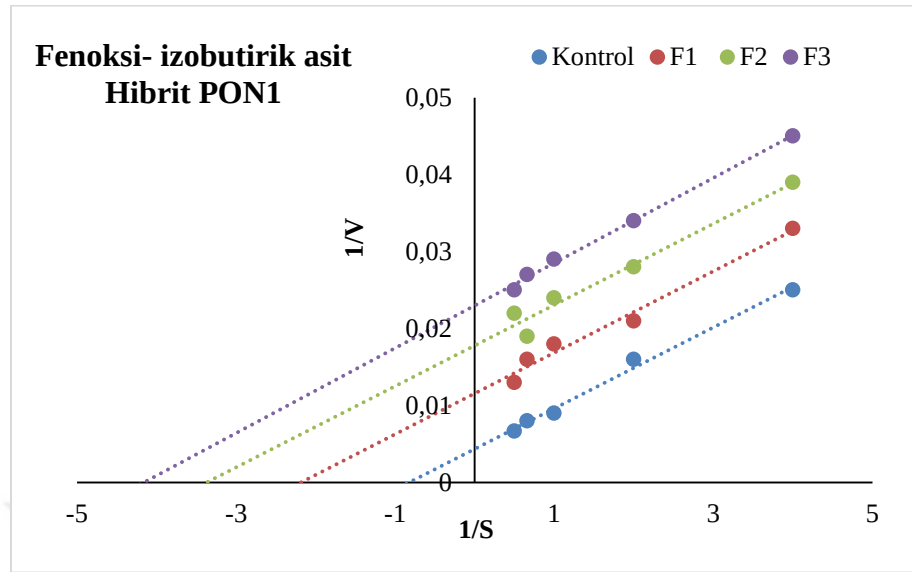
Fenoksi- izobutirik asit (İmmobilize Enzim)				
Substrat Konsantrasyonu	Kontrol	F1(mM)	F2(mM)	F3(mM)
1/S	1/V1	1/V2	1/V3	1/V4
4	0.01	0.012	0.014	0.016
2	0.0054	0.0064	0.0077	0.0099
1	0.003	0.0047	0.0066	0.008
0.66	0.0023	0.0037	0.0049	0.0074
0.5	0.0017	0.0028	0.0048	0.0067



Şekil 4.44. Fenoksi- izobutirik asit antilipit ilacının İmmobilize PON1 enzimi üzerine inhibisyonunu gösteren Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.19. Fenoksi- izobutirik asit ilacının Hibrit PON1 enzimi üzerine inhibisyon sonuçları (1/S ve 1/V değerleri)

Fenoksi- izobutirik asit (Hibrit PON1 Enzim)				
Substrat Konsantrasyonu	Kontrol	F1(mM)	F2(mM)	F3(mM)
1/S	1/V1	1/V2	1/V3	1/V4
4	0.025	0.033	0.039	0.045
2	0.016	0.021	0.028	0.034
1	0.009	0.018	0.024	0.029
0.66	0.008	0.016	0.019	0.027
0.5	0.0067	0.013	0.022	0.025



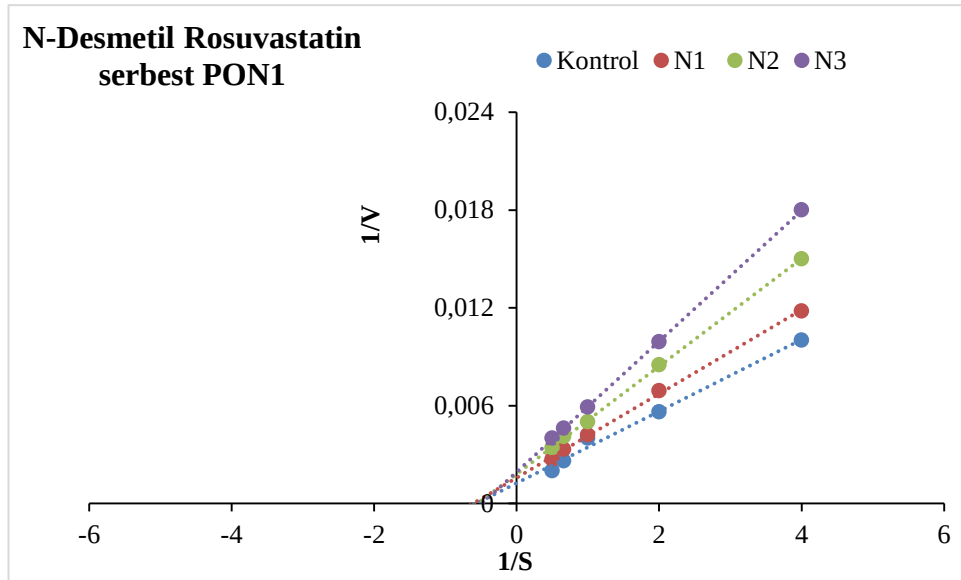
Şekil 4.45. Fenoksi- izobutirik asit antilipit ilacının Hibrit PON1 enzimi üzerine inhibisyonunu gösteren Lineweaver-Burk grafiği

Serbest, immobilize ve hibrit PON1 enzimleri Fenoksi- izobutirik asit için çizilen Lineweaver-Burk grafikleri incelendiğinde inhibisyonun türünün yarı yarışmalı inhibisyon gösterdiği görülmektedir (Şekil 4.43-4.45). İnhibisyonun K_i değerinin tespit edilmesi için eğri denkleminde yararlanıldı ve sonuçlar Çizelge 4.35’de verildi.

N-desmetil Rosuvastatin antilipit ilacının PON1 enzim aktivitesi üzerine inhibisyonuna ilişki K_i değerlerinin belirlenmesi için, PON1 enzimin aktivitesini yarıya düşüren ilaç konsantrasyonunda üç farklı konsantrasyon seçilerek (serbest enzim için 0.41, 0.51, 0.61mM), (immobilize enzim için (0.572, 0.672, 0.772 mM) ve (hibrit enzim için 0.728, 0.828, 0.928 mM), substratın beş farklı konsantrasyonu ile (50, 100, 200, 300, 400 μ L) aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen değerlerle N-desmetil Rosuvastatin için Lineweaver-Burk grafiği çizildi.

Çizelge 4.20. N-desmetil Rosuvastatin ilacının Serbest PON1 enzimi üzerine inhibisyon sonuçları (1/S ve 1/V değerleri)

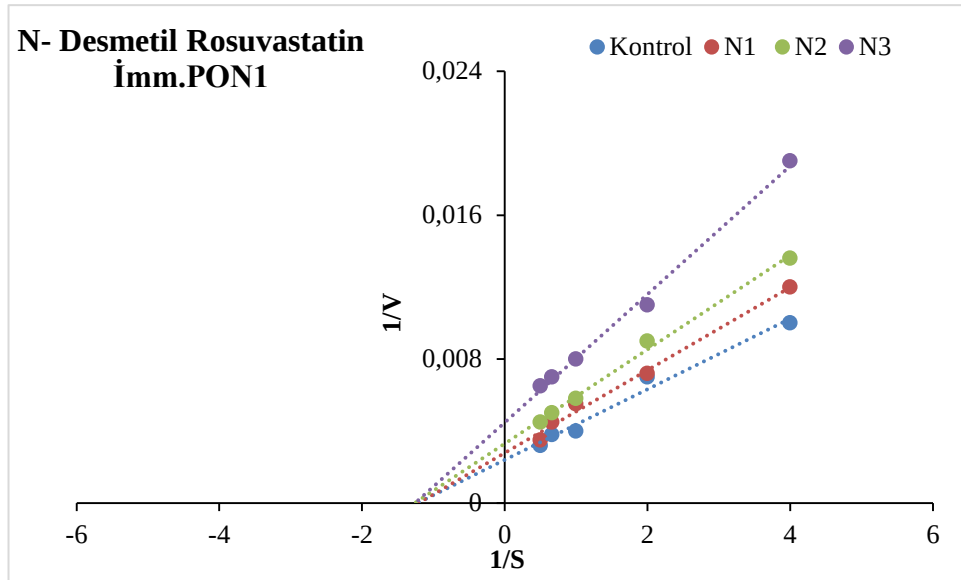
N-Desmetil Rosuvastatin (Serbest Enzim)				
Substrat Konsantrasyonu	Kontrol	N1(mM)	N2(mM)	N3(mM)
1/S	1/V1	1/V2	1/V3	1/V4
4	0.01	0.0118	0.015	0.018
2	0.0056	0.0069	0.0085	0.0099
1	0.004	0.0042	0.005	0.0059
0.66	0.0026	0.0033	0.0041	0.0046
0.5	0.002	0.0027	0.0034	0.004



Şekil 4.46. N-desmetil Rosuvastatin antilipit ilacının serbest PON1 enzimi üzerine inhibisyonunu gösteren Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.21. N-desmetil Rosuvastatin ilacının İmmobilize PON1 enzimi üzerine inhibisyon sonuçları (1/S ve 1/V değerleri)

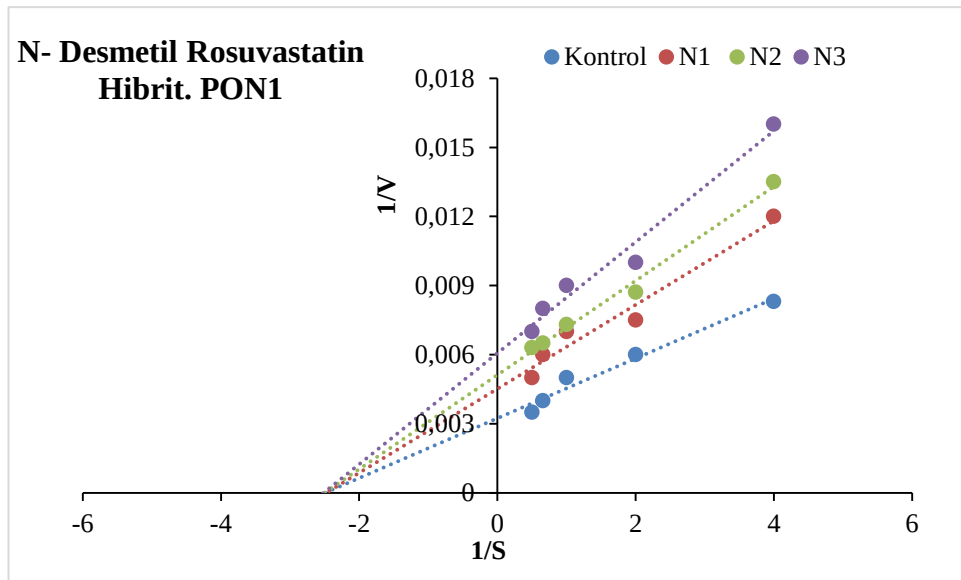
N-Desmetil Rosuvastatin (İmmobilize Enzim)				
Substrat Konsantrasyonu	Kontrol	N1(mM)	N2(mM)	N3(mM)
1/S	1/V1	1/V2	1/V3	1/V4
4	0.01	0.012	0.0136	0.019
2	0.007	0.0072	0.009	0.011
1	0.004	0.0055	0.0058	0.008
0.66	0.0038	0.0045	0.005	0.007
0.5	0.0032	0.0035	0.0045	0.0065



Şekil 4.47. N-desmetil Rosuvastatin antilipit ilacının immobilize PON1 enzimi üzerine inhibisyonunu gösteren Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.22. N-Desmetil Rosuvastatin ilacının Hibrit PON1 enzimi üzerine inhibisyon sonuçları (1/S ve 1/V değerleri)

N-desmetil Rosuvastatin (Hibrit Enzim)				
Substrat Konsantrasyonu	Kontrol	N1(mM)	N2(mM)	N3(mM)
1/S	1/V1	1/V2	1/V3	1/V4
4	0.0083	0.012	0.0135	0.016
2	0.006	0.0075	0.0087	0.01
1	0.005	0.007	0.0073	0.009
0.66	0.004	0.006	0.0065	0.008
0.5	0.0035	0.005	0.0063	0.007



Şekil 4.48. N-Desmetil Rosuvastatin antilipit ilacının hibrit PON1 enzimi üzerine inhibisyonunu gösteren Lineweaver-Burk grafiği

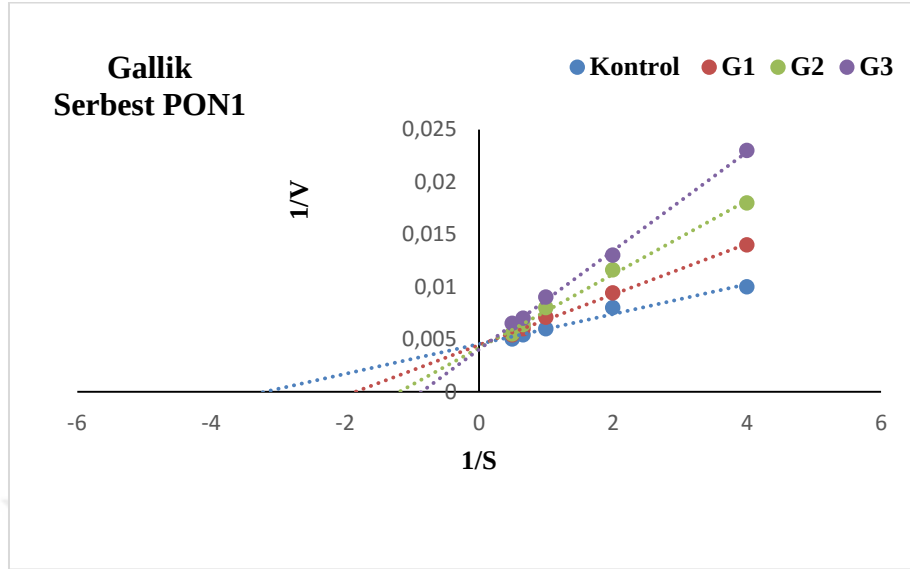
Serbest, immobilize ve hibrit PON1 enzimleri N-desmetil Rosuvastatin için çizilen Lineweaver-Burk grafikleri incelendiğinde inhibisyonun türünün yarışmasız inhibisyon gösterdiği görülmektedir (Şekil 4.46-4.48). İnhibisyonun K_i değerinin tespit edilmesi için eğri denkleminde yararlanıldı ve sonuçlar Çizelge 4.35’de verildi.

Serbest, immobilize ve hibrit PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Gallik Asit, Kuersetin, Pirogallol, Askorbik asit gibi bazı antioksidan kullanılarak yapılan ölçümler sonucunda elde edilen Lineweaver-Burk eğrileri Şekil 4.49-4.60’de verildi.

Gallik asit K_i değeri için, PON1 enzimin aktivitesini yarıya düşüren antioksidan konsantrasyonun, üç konsantrasyon seçerek (serbest enzim için 0.482, 0.582, 0.682 mM),(immobilize enzim için 0.571, 0.671, 0.771 mM) ve (hibrit enzim için 0.618, 0.718, 0.818 mM), substratın beş farklı konsantrasyonu ile (50, 100, 200, 300, 400 μ L) aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen değerlerle Gallik asit için Lineweaver-Burk grafiği çizildi.

Çizelge 4.23. Serbest PON1 enzim ve Gallik asit inhibisyonunun $1/S$ ve $1/V$ değerlerinin belirlenmesi

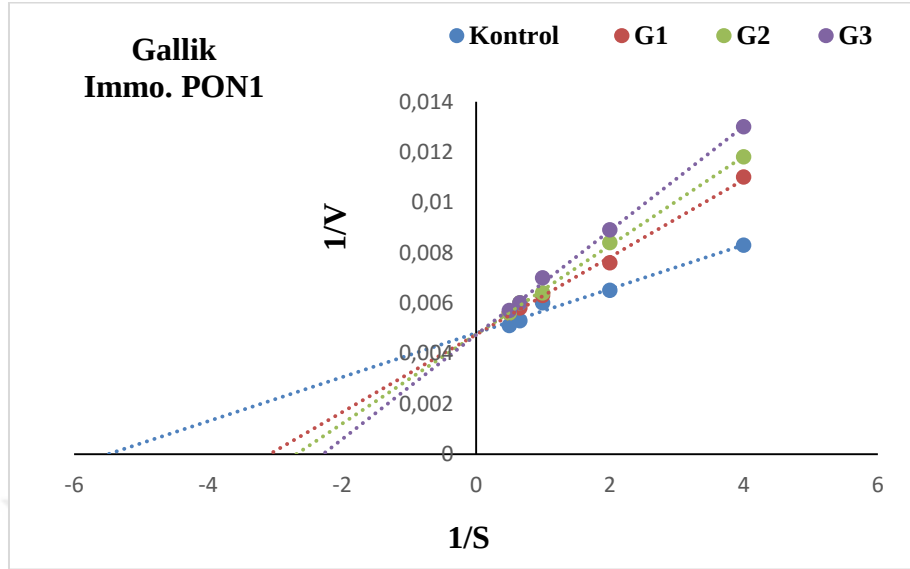
GallikAsit (Serbest Enzim)				
Substrat Konsantrasyonu	Kontrol	G1(mM)	G2(mM)	G3(mM)
$1/S$	$1/V_1$	$1/V_2$	$1/V_3$	$1/V_4$
4	0.01	0.014	0.018	0.023
2	0.008	0.0094	0.0116	0.013
1	0.006	0.0071	0.008	0.009
0.66	0.0054	0.006	0.0064	0.007
0.5	0.005	0.0054	0.0055	0.0065



Şekil 4.49. Serbest PON1 enzimi ve Gallik asit inhibisyon gösteren Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.24. İmmobilize PON1 enzim ve Gallik asit inhibisyonunun 1/S ve 1/V değerlerinin belirlenmesi

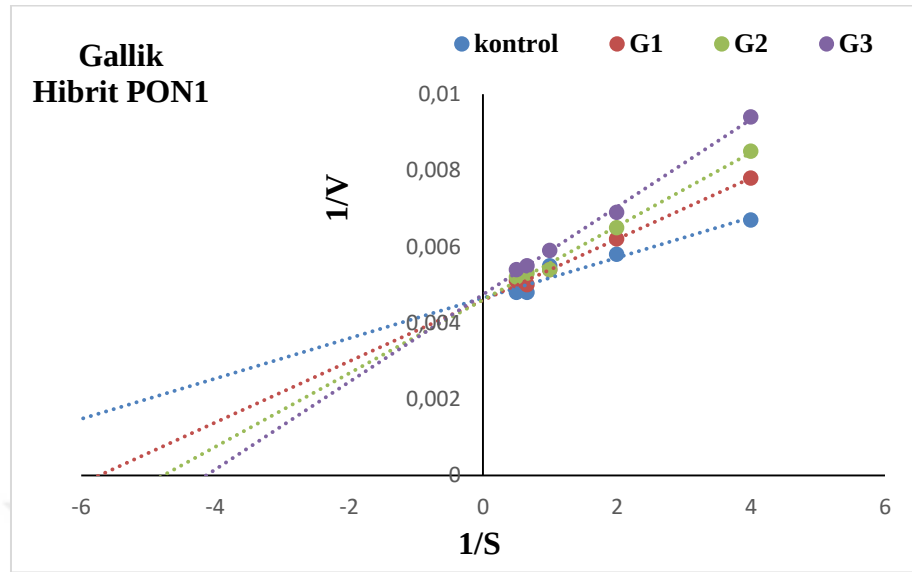
GallikAsit (İmmobilize Enzim)				
Substrat konsantrasyonu	Kontrol	G1(mM)	G2(mM)	G3(mM)
1/S	1/V1	1/V2	1/V3	1/V4
4	0.0083	0.011	0.0118	0.013
2	0.0065	0.0076	0.0084	0.0089
1	0.006	0.0063	0.0064	0.007
0.66	0.0053	0.0058	0.006	0.006
0.5	0.0051	0.0056	0.0056	0.0057



Şekil 4.50. İmmobilize PON1 enzimi ve Gallik asit inhibisyon gösteren Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.25. Hibrit PON1 enzim ve Gallik asit inhibisyonun $1/S$ ve $1/V$ değerlerinin belirlenmesi

GallikAsit (Hibrit Enzim)				
Substrat konsantrasyonu	Kontrol	G1(mM)	G2(mM)	G3(mM)
$1/S$	$1/V1$	$1/V2$	$1/V3$	$1/V4$
4	0.0067	0.0078	0.0085	0.0094
2	0.0058	0.0062	0.0065	0.0069
1	0.0055	0.0054	0.0054	0.0059
0.66	0.0048	0.005	0.0053	0.0055
0.5	0.0048	0.0051	0.0052	0.0054



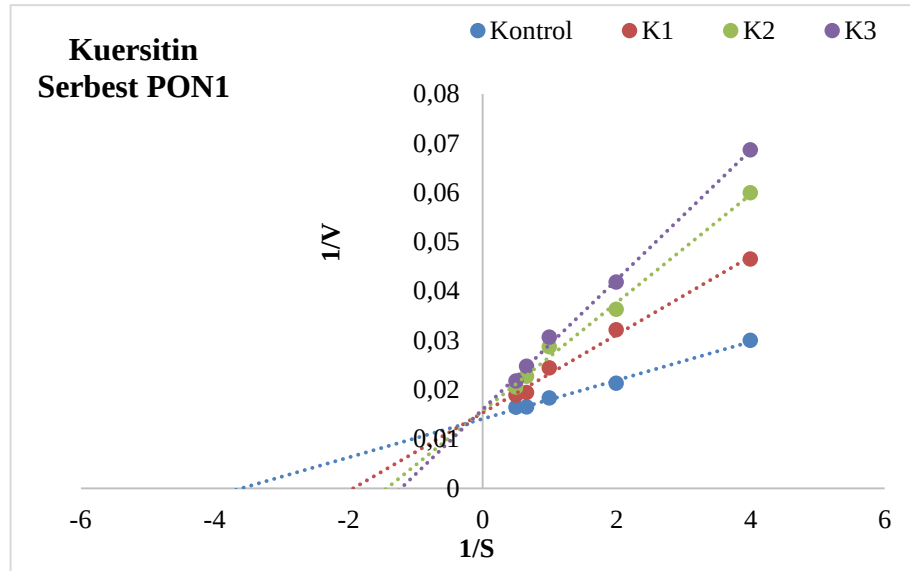
Şekil 4.51. Hibrat PON1 enzimi ve Gallik asit inhibisyon gösteren Lineweaver-Burk grafiği

Serbest, immobilize ve hibrat PON1 enzimleri Gallik asit için çizilen Lineweaver-Burk grafikleri incelendiğinde inhibisyonun türünün yarışmalı inhibisyon gösterdiği görülmektedir (Şekil 4.49-4.51). İnhibisyonun K_i değerinin tespit edilmesi için eğri denkleminde yararlanıldı ve sonuçlar Çizelge 4.36’de verildi.

Kuersitin hidrat K_i değerleri için, PON1 enzimin aktivitesini yarıya düşüren antioksidan konsantrasyonun, üç konsantrasyon seçerek (serbest enzim için 0.522, 0.622, 0.722mM), (Immobilize enzim için 0.631, 0.731, 0.831 mM) ve (hibrit enzim için 0.682, 0.782, 0.882mM), substratın beş farklı konsantrasyonu ile (50, 100, 200, 300, 400 μ L) aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen değerlerle Kuersitin için Lineweaver-Burk grafiği çizildi.

Çizelge 4.26. Serbest PON1 enzim ve Kuersitin hidrat inhibisyonunun 1/S ve 1/V değerlerinin belirlenmesi

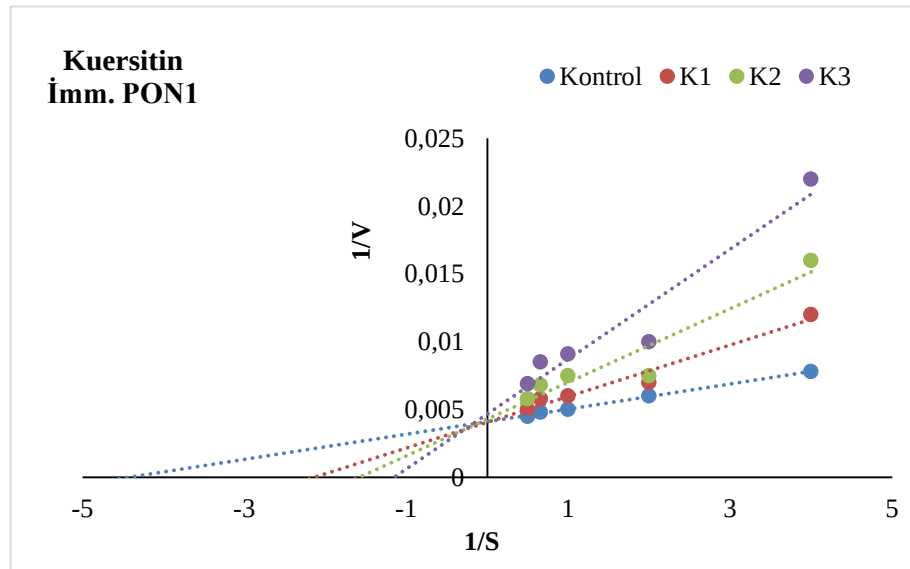
Kuersitin hydrate (Serbest Enzim)				
Substrat Konsantrasyonu	Kontrol	K1(mM)	K2(mM)	K3(mM)
1/S	1/V1	1/V2	1/V3	1/V4
4	0.03	0.0465	0.0599	0.0686
2	0.0213	0.0321	0.0363	0.0418
1	0.0183	0.0244	0.0287	0.0306
0.66	0.0165	0.0194	0.0227	0.0247
0.5	0.0164	0.0189	0.0205	0.0217



Şekil 4.52. Serbest PON1 enzimi ve Kuersitin inhibisyon gösteren Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.27. İmmobilize PON1 enzim ve Kuersitin hidrat inhibisyonunun $1/S$ ve $1/V$ değerlerinin belirlenmesi

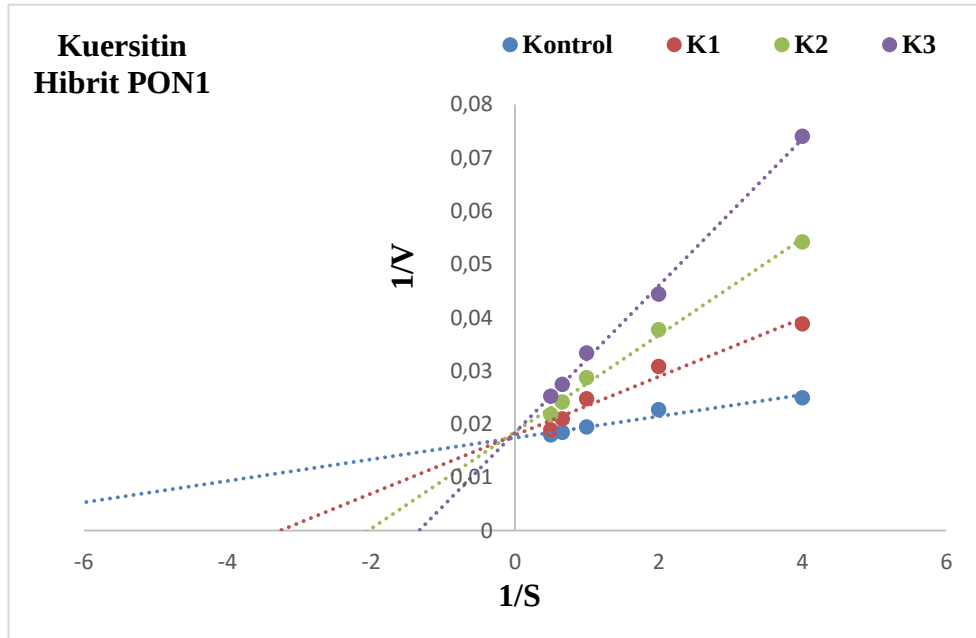
Kuersitin hydrate (İmmobilize Enzim)				
Substrat Konsantrasyonu	Kontrol	K1(mM)	K2(mM)	K3(mM)
$1/S$	$1/V1$	$1/V2$	$1/V3$	$1/V4$
4	0.0078	0.012	0.016	0.022
2	0.006	0.007	0.0075	0.01
1	0.005	0.006	0.0075	0.0091
0.66	0.0048	0.0058	0.0068	0.0085
0.5	0.0045	0.005	0.0058	0.0069



Şekil 4.53. İmmobilize PON1 enzimi ve Kuersitin inhibisyon gösteren Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.28. Hibrit PON1 enzim ve Kuersitin hidrat inhibisyonunun 1/S ve 1/V değerlerinin belirlenmesi

Kuersitin (Hibrit Enzim)				
Substrat Konsantrasyonu	Kontrol	K1(mM)	K2(mM)	K3(mM)
1/S	1/V1	1/V2	1/V3	1/V4
4	0.0249	0.0388	0.0542	0.074
2	0.0227	0.0308	0.0377	0.0444
1	0.0194	0.0247	0.0287	0.0333
0.66	0.0184	0.0209	0.0241	0.0274
0.5	0.0179	0.0189	0.0218	0.0252



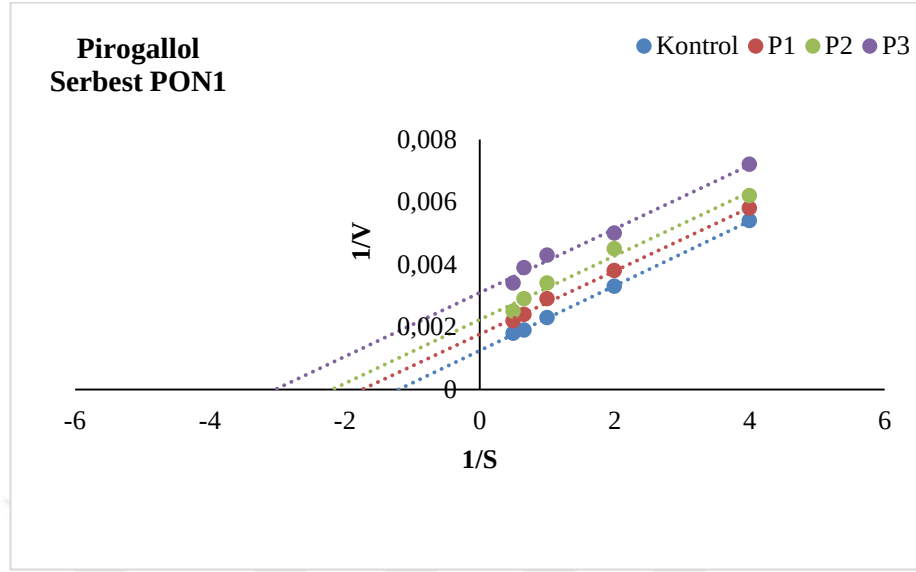
Şekil 4.54. Hibrit PON1 enzimi ve Kuersitin inhibisyon gösteren Lineweaver-Burk grafiği

Serbest, İmmobilize ve Hibrit PON1 enzimleri ve kuersitin için çizilen Lineweaver-Burk grafikleri incelendiğinde inhibisyonun türünün yarışmalı inhibisyon gösterdiği görülmektedir (Şekil 4.52-4.54). İnhibisyonun K_i değerinin tespit edilmesi için eğri denkleminde yararlanıldı ve sonuçlar Çizelge 4.36’de verildi.

Pirogallol K_i değeri için, PON1 enzimin aktivitesini yarıya düşüren antioksidan konsantrasyonun, üç konsantrasyon seçerek (serbest enzim için 0.377, 0.477, 0.577 mM), (İmmobilize enzim için 0.506, 0.606, 0.706) ve (hibrit enzim için 0.572, 0.672, 0.772mM), substratın beş farklı konsantrasyonu ile (50, 100, 200, 300, 400 μ L) aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen değerlerle Pirogallol için Lineweaver-Burk grafiği çizildi.

Çizelge 4.29. Serbest PON1 enzim ve pirogallol inhibisyonunun 1/S ve 1/V değerlerinin belirlenmesi

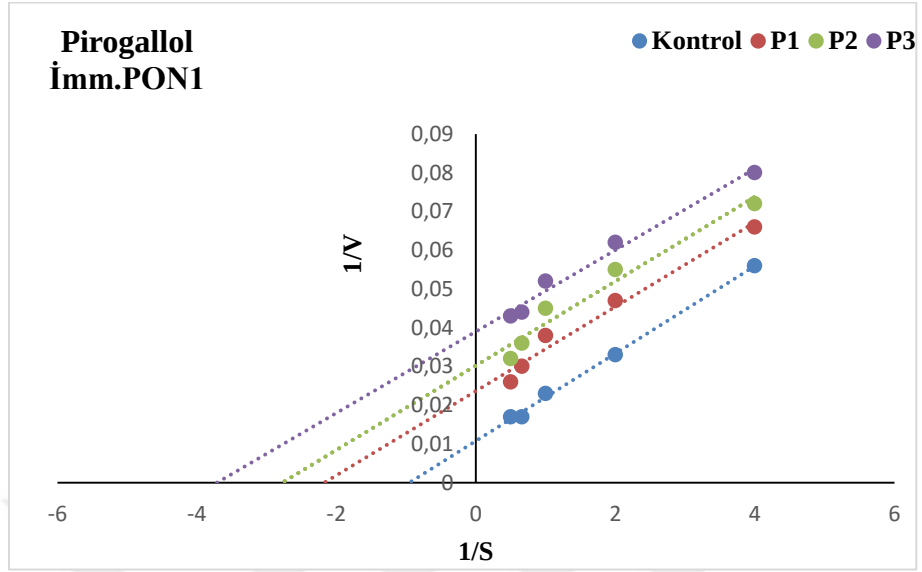
Pirogallol (Serbest Enzim)				
Substrat Konsantrasyonu	Kontrol	P1(mM)	P2(mM)	P3(mM)
1/S	1/V1	1/V2	1/V3	1/V4
4	0.0054	0.0058	0.0062	0.0072
2	0.0033	0.0038	0.0045	0.005
1	0.0023	0.0029	0.0034	0.0043
0.66	0.0019	0.0024	0.0029	0.0039
0.5	0.0018	0.0022	0.0025	0.0034



Şekil 4.55. Serbest PON1 enzimi ve Pirogallol inhibisyon gösteren Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.30. İmmobilize PON1 enzim ve pirogallol inhibisyonunun 1/S ve 1/V değerlerinin belirlenmesi

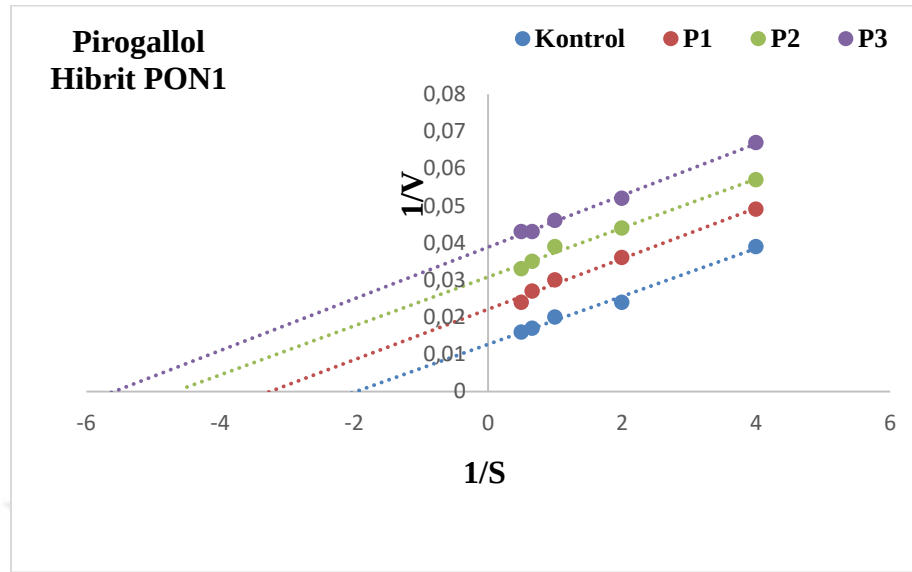
Pirogallol (İmmobilize Enzim)				
Substrat Konsantrasyonu	Kontrol	P1(mM)	P2(mM)	P3(mM)
1/S	1/V1	1/V2	1/V3	1/V4
4	0.056	0.066	0.072	0.08
2	0.033	0.047	0.055	0.062
1	0.023	0.038	0.045	0.052
0.66	0.017	0.03	0.036	0.044
0.5	0.017	0.026	0.032	0.043



Şekil 4.56. İmmobilize PON1 enzimi ve Pirogallol inhibisyon gösteren Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.31. Hibrit PON1 enzim ve pirogallol inhibisyonunun 1/S ve 1/V değerlerinin belirlenmesi

Pirogallol (Hibrit Enzim)				
Substrat Konsantrasyonu	Kontrol	P1(mM)	P2(mM)	P3(mM)
1/S	1/V1	1/V2	1/V3	1/V4
4	0.039	0.049	0.057	0.067
2	0.024	0.036	0.044	0.052
1	0.02	0.03	0.039	0.046
0.66	0.017	0.027	0.035	0.043
0.5	0.016	0.024	0.033	0.043



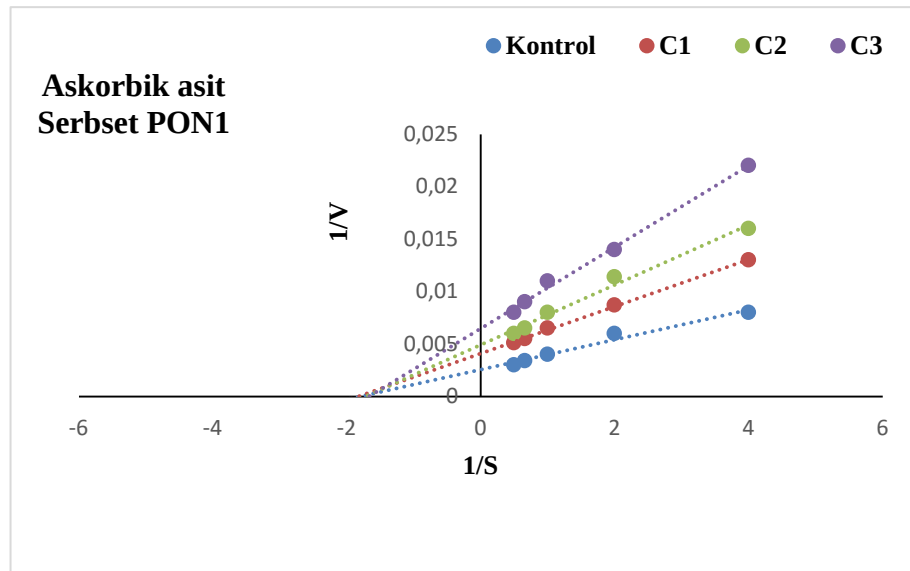
Şekil 4.57. Hibrit PON1 enzimi ve Pirogallol inhibisyon gösteren Lineweaver-Burk grafiği

Serbest, immobilize ve hibrit PON1 enzimleri ve pirogallol için çizilen Lineweaver-Burk grafikleri incelendiğinde inhibisyonun türünün yarı yarışmalı inhibisyon gösterdiği görülmektedir (Şekil 4.55-4.57). İnhibisyonun K_i değerinin tespit edilmesi için eğri denkleminde yararlanıldı ve sonuçlar Çizelge 4.36'de verildi.

Askorbik asit K_i değeri için, PON1 enzimin aktivitesini yarıya düşüren antioksidan konsantrasyonun, üç konsantrasyon seçerek (serbest enzim için 0.423, 0.523, 0.623 mM), (immobilize enzim için 0.514, 0.614, 0.714) ve (hibrit enzim için 0.607, 0.707, 0.807mM), substratın beş farklı konsantrasyonu ile (50, 100, 200, 300, 400 μ L) aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen değerlerle Askorbik asit için Lineweaver-Burk grafiği çizildi.

Çizelge 4.32. Serbest PON1 enzim ve Askorbik asit inhibisyonunun $1/S$ ve $1/V$ değerlerinin belirlenmesi

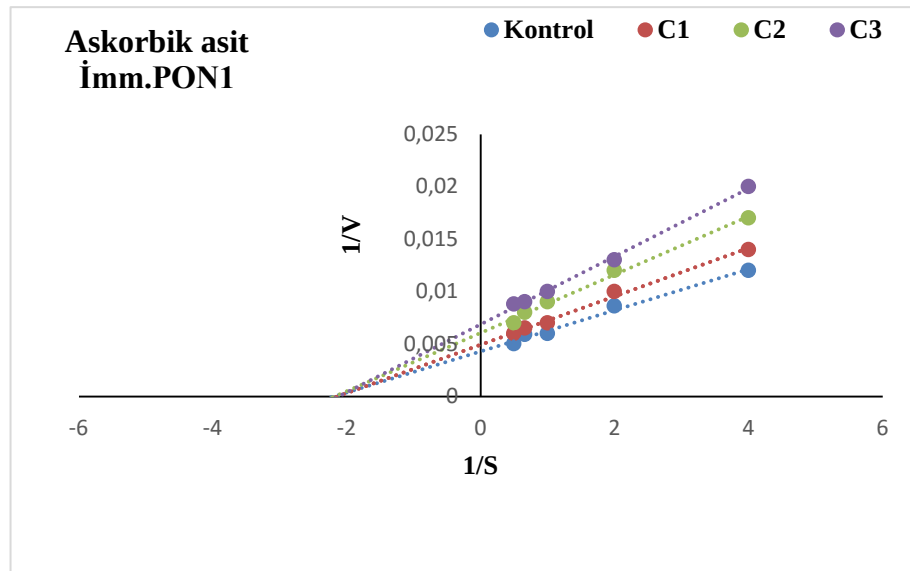
Askorbik asit (Serbest Enzim)				
Substrat Konsantrasyonu	Kontrol	C1(mM)	C2(mM)	C3(mM)
$1/S$	$1/V1$	$1/V2$	$1/V3$	$1/V4$
4	0.008	0.013	0.016	0.022
2	0.006	0.0087	0.0114	0.014
1	0.004	0.0065	0.008	0.011
0.66	0.0034	0.0055	0.0065	0.009
0.5	0.003	0.0051	0.006	0.008



Şekil 4.58. Serbest PON1 enzimi ve Askorbik asit inhibisyon gösteren Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.33. İmmobilize PON1 enzim ve Askorbik asit inhibisyonunun $1/S$ ve $1/V$ değerlerinin belirlenmesi

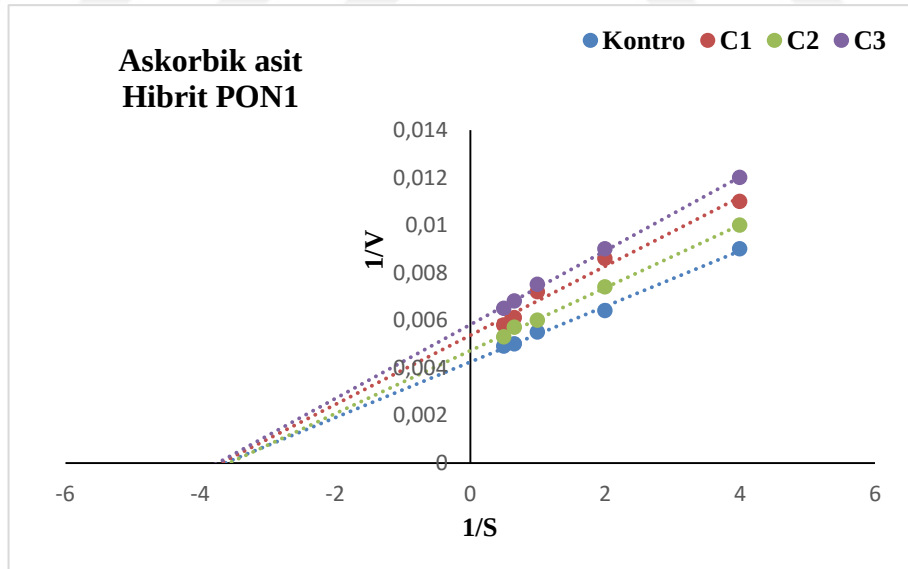
Askorbik asit (İmmobilize Enzim)				
Substrat Konsantrasyonu	Kontrol	C1(mM)	C2(mM)	C3(mM)
$1/S$	$1/V1$	$1/V2$	$1/V3$	$1/V4$
4	0.012	0.014	0.017	0.02
2	0.0086	0.01	0.012	0.013
1	0.006	0.007	0.009	0.01
0.66	0.0059	0.0065	0.008	0.009
0.5	0.005	0.006	0.007	0.0088



Şekil 4.59. İmmobilize PON1 enzimi ve Askorbik asit inhibisyon gösteren Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.34. Hibrit PON1 enzim ve Askorbik asit inhibisyonunun $1/S$ ve $1/V$ değerlerinin belirlenmesi

Askorbik asit (Hibrit Enzim)				
Substrat Konsantrasyonu	Kontrol	C1(mM)	C2(mM)	C3(mM)
$1/S$	$1/V1$	$1/V2$	$1/V3$	$1/V4$
4	0.009	0.011	0.01	0.012
2	0.0064	0.0086	0.0074	0.009
1	0.0055	0.0072	0.006	0.0075
0.66	0.005	0.0061	0.0057	0.0068
0.5	0.0049	0.0058	0.0053	0.0065



Şekil 4.60. Hibrit PON1 enzimi ve Askorbik asit inhibisyon gösteren Lineweaver-Burk grafiği

Serbest, İmmobilize ve Hibrit PON1 enzimleri için Askorbik asit için çizilen Lineweaver-Burk grafikleri incelendiğinde inhibisyonun türünün yarışmasız inhibisyon

gösterdiği görülmektedir (Şekil 4.58-4.60). İnhibisyonun K_i değerinin tespit edilmesi için eğri denkleminde yararlanıldı ve sonuçlar Çizelge 4.36’de verildi.

Çizelge 4.35. Antilipit ilaçların hesaplanan IC_{50} ve K_i değerleri ve inhibisyon türleri

Antilipid İlaçlar	IC_{50} (mM)			K_i			K_i Ortalama			İnhibisyon Türü
	S.E	I.E	H.E	S.E	I.E	H.E	S.E	I.E	H.E	
Valerik asit	0.569	0.785	0.945	0.256	0.441	0.497	0.318	0.913	0.917	Yarışmalı
	0.469	0.685	0.845	0.341	0.628	0.874				
	0.369	0.585	0.745	0.359	1.67	1.38				
Fenoksi-izobutirik asit	0.558	0.756	0.85	0.686	1.41	1.53	0.583	1.61	1.86	Yarı Yarışmalı
	0.458	0.656	0.75	0.598	1.43	1.72				
	0.358	0.556	0.65	0.467	1.99	2.35				
N-desmetil Rosuvastatin	0.61	0.872	0.928	1.65	1,61	1.94	0.983	1.79	2.22	Yarışmasız
	0.51	0.772	0.828	0.76	1,79	2.21				
	0.41	0.672	0.728	0.54	1,97	2.51				

Çizelge 4.36. Antioksidan bileşiklerin hesaplanan IC_{50} ve K_i değerleri ve inhibisyon türleri

Antioksidan Bileşikler	IC_{50} (mM)			K_i			K_i Ortalama			İnhibisyon Türü
	S.E	I.E	H.E	S.E	I.E	H.E	S.E	I.E	H.E	
Gallik asit	0.682	0.771	0.818	0.278	0.558	0.681	0.407	0.516	0.778	Yarışmalı
	0.582	0.671	0.718	0.334	0.671	0.69				
	0.482	0.571	0.618	0.61	0.319	0.965				
Kuersetin	0.722	0.831	0.882	0.16	0.278	0.368	0.143	0.22	0.266	Yarışmalı
	0.622	0.731	0.782	0.214	0.393	0.406				
	0.522	0.631	0.682	0.408	0.568	1.87				
Pirogallol	0.577	0.706	0.772	0.297	0.950	0.988	0.444	1	1.17	Yarı yarışmalı
	0.477	0.606	0.672	0.925	1.16	1.17				
	0.377	0.506	0.572	0.111	0.9	1.35				
Askorbik asit	0.623	0.714	0.807	0.769	1.89	3.11	0.454	2.71	4.53	Yarışmasız
	0.523	0.614	0.707	0.371	2.08	3.44				
	0.423	0.514	0.607	0.222	4.17	7.04				

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

İnsan serum paraoksonaz enzimi 1950'lerin başından itibaren bilinen organofosfat grubu bileşiklerin hidrolizini katalizleyen Ca^{2+} iyonu içeren bir esterazdır. Paraoksonaz enziminin ayrıca fenilasetat bileşiğinin de (Aril esteraz; E.C. 3.1.1.2) hidroliz edebilme yeteneği belirlenince aril esteraz tanımı yapılmıştır. Memeli türlerinde insanlarda aynı kromozom üzerinde üç farklı PON geni PON1, PON2 ve PON3) belirlenmiştir (Van Himbergen *et al.*2006).

Bu çalışmada insan serum PON1 enziminin üç fazlı saflaştırma tekniği kullanılarak saflaştırılması, immobilize edilmesi, nano çiçek hibrit yapısının üretilmesi ve bazı antibiyotik ve antioksidan maddelerin etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

İnsan serumundan izole edilen PON1 enziminin saflaştırılmasında kullanılan üçlü faz ayırımı metodunda organik çözücü olarak n-bütanol ve tuz olarak amonyum sülfat kullanıldı. Optimizasyon çalışmalarından sonra serum PON1 enzimi yapılan aktivite ve protein miktarı ölçümlerine göre, 1:0.5 serum:n-bütanol ve %20 amonyum sülfat konsantrasyonunda maksimum PON1 enziminin saflaştırıldığı belirlendi. Yapılan ölçümler sonucunda 290.31 EU/mg protein enzim aktivitesi, %76.4 verim ve 87.7 spesifik aktivite ve 304.5 kat saflaştırma yapıldığı belirlendi.

Demir ve arkadaşları tarafından 2011 yılında yapılan bir çalışmada Paraoksonaz enziminin Sefaroz 4B-L-tirozin-1-naftilamin afinite kromatografisi kullanılarak zeytinden (*Olea europaea* L.) saflaştırıldı. Yapılan bu çalışmada PON1 enzimi enzimi afinite kromatografisi kullanılarak 173.4 kat saflaştırıldığı belirtildi.

Yaptığımız çalışmada; insan serumundan saflaştırılan PON1 enziminin SDS poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) yöntemi kullanılarak alt birim sayıları belirlendi. Jel görüntüsünde molekül ağırlığının belirlenmesinde standart protein (Page Ruler™ Broad Range Unstained Protein Ladder) kullanıldı. Jel görüntüsü

standart proteinle karşılaştırıldığında serum PON1 enziminin 45 kDa olarak tek bir protein bandı gözlemlendi. Enzimin molekül ağırlığı belirlenmesinde jel filtrasyon kromatografisi ile de 45 kDa molekül ağırlığına sahip olduğu tesbit edildi.

Nadaroglu ve arkadaşları 2011 yılında yaptıkları bir çalışmada insan serumundan saflaştırdıkları paraoksonaz enzimini sefaroze 4B-L-tirozin-1-naftilamin afinite kromatografisi kullanarak saflaştırmışlar, enzimin SDS-poliakrilamid elektroforezi jelinde belirgin 45 kDa ile tek bir protein bandı belirlenmiştir.

Serbest, immobilize ve hibrit nano çiçek PON1 enzimi için optimum pH değerleri farklı tampon sistemleri kullanılarak çalışıldığında pH 4.0 değerinin altında ve pH 10.00 değerinin üzerine çıktığı zaman serbest, immobilize ve hibrit nano çiçek PON1 enzimi için keskin bir aktivite kaybı görüldü. Ancak pH:8.0'de tüm PON1 enzim sistemleri için maksimum aktivite gösterdikleri görüldü.

Stabil pH çalışmasında ise serbest, immobilize ve hibrit nano çiçek PON1 enzimlerinin aktiviteleri 7 gün boyunca ölçüldü. Yapılan deneyler sonucunda pH 8.0 değerinde 7 gün sonunda aktivitenin sabit kaldığı ve en yüksek aktivitenin pH 8.0 değerinde olduğu görüldü.

Serbest, immobilize ve hibrit nano çiçek PON1 enzimleri üzerine sıcaklık etkisi araştırıldığında optimum sıcaklık 38°C olarak belirlendi.

Stabil sıcaklık çalışmasında ise serbest immobilize ve hibrit nano çiçek enzimleri 2 saat süreyle belirlenen sıcaklıkta inkübe edildiğinde maksimum aktivite stabilitesinin 38°C'de olduğu belirlendi.

Aşkın ve arkadaşları tarafından 2012'de yapılan çalışmada sığır karaciğerinden saflaştırılan Paraoksonaz-1 enziminin pH 7.1 ve 37°C'de optimum aktivite gösterdiğini saptamışlardır.

Colak ve arkadaşları 2012’de bir çalışmada PON1 enzimini kitosan üzerinde immobilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Bu araştırmada serbest ve immobilize PON1 enzimin üzerinde pH, sıcaklık ve kinetik parametreleri araştırmışlardır. Spesifik aktivite ve protein konsantrasyonu immobilize enzim için sırasıyla 2.93 EU / mg protein ve 32 mg protein olarak hesaplamışlardır. En yüksek aktivite, pH 8.5'te serbest ve immobilize PON1 enzimi için en yüksek aktivite pH 8.5'ta gözlemlenmiştir. Maksimum katalitik aktiviteyi serbest ve immobilize enzimler için 37°C'de elde etmişlerdir. Serbest ve immobilize PON1 enzimler, 50°C'de optimum değerinin sırasıyla %30 ve %25’ünü koruduğunu gözlemlenmişler ve 70°C'de aktivitelerini kaybettiklerini görmüşlerdir. Stabil sıcaklık çalışmasında, 200 dakika inkübasyon periyodu boyunca, 37°C serbest ve immobilize enzimler sırasıyla %50 ve %70 oranında aktivitelerini koruduğunu hesaplamışlardır. Serbest enzimin V_{max} ve K_m değeri 125 $\mu\text{mol} / \text{L} \cdot \text{dak}$, 1.067 mM ve immobilize enziminin 181 $\mu\text{mol} / \text{L} \cdot \text{dak}$, 1.755 mM olarak hesaplamışlardır.

pH:8.0 glisin tamponu içerisinde bulunan ÜFA yöntemiyle insan serumundan saflaştırılan PON1 enziminin Fe_3O_4 NP’leri ile modifiye edilen kitosan üzerine L-glutaraldehit ara kolu üzerinden immobilizasyonundan sonra alınan numunelerde SEM görüntülerine bakıldığında demir kitosan NP’lerinin başlangıçtaki yüzey pürüzlülüğünün azaldığı ve PON1 enziminin yüzeye immobilize olduğu net bir şekilde görülmektedir. PON1 nano çiçek hibrit yapısının SEM görüntülerine bakıldığında ise nano çiçek yapısının en iyi pH11’de olduğu belirlendi. Ancak pH 9 ve 10’da da nano çiçek yapıları net bir şekilde görülürken pH daha aşağıya düşürüldüğünde (pH: 4.0 ile pH: 8.0 aralığında) çiçek yapılarının bozulduğu ve oluşmadığı belirlendi.

K_M ve V_{max} değerlerinin bulunması amacıyla serbest, immobilize ve hibrit PON1 enzimlerine ait paraokson ve fenil asetat substratları kullanıldı. Serbest, immobilize ve nano çiçek hibrit PON1 enzime göre fenil asetat daha yüksek aktivite gösterdiği belirlendi. Serbest PON1 enzimin, fenil asetat substrat ile V_{max} ve K_M değerleri sırasıyla 526.3 $\mu\text{mol} / \text{L} \cdot \text{dak}$ ve 0.210mM olarak belirlendi. Immobilize PON1

enzimin, fenil asetat substrat ile V_{max} ve K_M değerleri sırasıyla 555.5 $\mu\text{mol/L.dak}$ ve 0.111 mM olarak belirlendi. Hibrit PON1 enzimin, fenil asetat substrat ile V_{max} ve K_M değerleri sırasıyla 625 $\mu\text{mol/L.dak}$ ve 0.062 mM olarak belirlendi. Serbest PON1 enzimin, paraokson substrat ile V_{max} ve K_M değerleri sırasıyla 238.1 $\mu\text{mol/L.dak}$ ve 0.071 mM olarak belirlendi. İmmobilize PON1 enzimin, paraokson substrat ile V_{max} ve K_M değerleri sırasıyla 250 $\mu\text{mol/L.dak}$ ve 0.05 mM olarak belirlendi.

Hibrit PON1 enzimin, paraokson substrat ile V_{max} ve K_M değerleri sırasıyla 370 $\mu\text{mol/L.dak}$ ve 0.037 mM olarak belirlendi. Hibrit PON1 enziminin paraokson substrat ile V_{max} ve K_M değerleri sırasıyla 0.302 $\mu\text{mol/L.dak}$ ve 0.195 mM olarak belirlendi. Serbest ve immobilize PON1 enziminin ve hibrit nano çiçek yapısındaki PON1 enziminin V_{max} değeri artmış ve K_M değerinde düşüş olduğu görülmüştür. Buradan enzimin hem paraoksan hemde fenil asetat substratlarına karşı ilgisinin arttığı açıkça görülmüştür. V_{max} değerindeki artışın nano çiçek hibrit PON1 enziminin diğer yapıya göre daha kararlı bir hal aldığı şeklinde yorumlamak mümkündür.

Aşkın ve arkadaşları 2012 yılında yaptıkları bir çalışmada paraoksonaz enziminin paraoksan substratı için farklı K_M ve V_{max} değerlerini çalışmışlardır. Substrat olarak fenil asetat kullanıldığında K_M değeri 0.074 mM ve V_{max} değeri 36.42 U/mg olarak hesaplanmıştır.

Bilen ve arkadaşları 2009 yılında yaptıkları bir çalışmada paraoksonaz enzimini (sığır serumdan) glutaraldehit ile immobilize etmişler ve sonra paraoksonaz enziminin K_M ve V_{max} kinetik sabitlerini PON1 enzim aktivitesi üzerinde belirlemişler. Bu çalışmada paraoksan substratı kullanılarak, K_M ve V_{max} değerleri serbest enzim için sırasıyla $0,294 \times 10^{-3}$ ve 36,76 EU/mL, immobilize enzim için ise bu değerler sırasıyla $0,775 \times 10^{-3}$ ve 38,76 EÜ/mL olarak hesaplamışlardır.

Demir ve arkadaşları 2011 yılında yaptıkları bir çalışmada paraoksanaz enziminin paraoksan substratı kullanılarak saflaştırılmış enzim için K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 3.76 mM ve 131.5 $\mu\text{mol L}^{-1} \text{dak}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır.

Bizim yaptığımız çalışmada immobilize PON1 enziminin 10 kere tekrar kullanılmasının ardından enzimin aktivitesini %56 oranında koruduğu, hibrit nano çiçek paraoksonaz enziminin ise 10 kere arka arkaya aktivitesi ölçüldüğünde enzimin aktivitesinin %62 oranında korunduğu belirlendi. Elde edilen bulgulardan, hibrid nano çiçek yapısındaki PON1 enziminin daha stabil olduğu belirlendi.

Yaptığımız bu çalışmada hibrit PON1 enzimi SEM görüntüsünde nano çiçek çapını 7 μm olarak görülmüştür. EDX analizinde ise en iyi PON1 nano çiçek hibrit yapısında C, O, P ve Ca elementlerinin varlığını tespit edildi. Ayrıca hibrit yapısının elde edildiği pH'daki numunelerin EDX analizine bakıldığında diğer pH'lara göre daha yüksek yüzdede O (%30.2), P (%23.6) ve Ca (%23.4) elementi içerdiği belirlendi.

Wang ve arkadaşları 2015 yılında yaptıkları bir çalışmada, hibrit nano çiçek yapısını kitosan ve kalsiyum pirofosfat bileşiklerinden oluşturmuşlardır. SEM görüntüsünde nano çiçek çapını 3- 5 μm olarak belirlemişlerdir. EDX analizinde ise C, O, P ve Ca elementlerin varlığını ortaya koymuşlardır. P'nin Ca'ya atom oranı 1.448 olarak elde etmişler. Kristalin karakterize edilmesi için XRD kullanılmıştır. XRD analizinde, mineralize mikrofloraların kalsiyum olduğunu kanıtlamışlardır. Elde edilen bu bulgular bizim çalışmamızı desteklemektedir.

Çalışmamızda elde edilen nano çiçek hibrit yapılarının toksisitesinin belirlenmesi amacıyla zebra balığı kullanıldı ve hibrit yapının herhangi bir toksisite göstermediği belirlendi. Normal koşullarda 48 saatini tamamlayan zebra balığı embriyolarının hepsinin yumurtadan çıkmış olması gerekmektedir. 72 saatini tamamlayan zebra balıklarının düz bir segmentli yapıda ve yumurta çıkışlarının çoktan tamamlanmış olması gerekir veya çok az gecikme görülebilir. Ancak elde ettiğimiz verilerden

serbest PON1 ve nano çiçek PON1 hibrit yapılarının embriyolar üzerinde olumsuz etkilerinin olmadığı görülmüştür. Bu nedenle; etkisini araştırdığımız serbest ve hibrit PON1 enzim numunelerinin zebra balığı embriyo gelişimi üzerinde hiç bir toksisitesi olmadığı belirlendi.

Clemente ve arkadaşları 2014 yılında TiO_2 nanopartikülünün toksisitesini zebra balığı embriyosu üzerinde incelemişlerdir. Sonikasyondan hemen sonra, balık embriyoları seyreltilmiş 1, 10 ve 100 mg / L nano- TiO_2 süspansiyonlarına maruz bırakılmışlardır. TiO_2 NP'lerin, zebra balık embriyolarına ve larvalarına düşük akut toksisite gösterdiğini, 100 mg / L konsantrasyonuna maruz kalan larvalarda ise %5 ölüm gözlemlendiğini rapor etmişlerdir.

Muller ve arkadaşları 2015 yılında CuO NP'lerinin toksisitesini zebra balık embriyosu üzerinde incelemişler ve CuO NP'lerin balıkların proteolitik aktivitesini inhibe ettiğini belirlemişlerdir. Sonuçlara göre 1.88 μM çözünmüş CuO NP'lerine maruz kalma, kuluçka miktarını ve enzim aktivitesini %50 azalttığını gözlenlemişlerdir .

Krystle ve arkadaşları 2013 yılında paraoksan toksisitesini zebra balığı embriyosu üzerinde incelemişler ve 5 ila 96 hpf 31.2-500 nM paraoksone maruz kalan balık yumurtalarının AChE inhibisyonu sebep olduğunu belirlemişlerdir.

İnsan serumundan saflaştırdığımız serbest PON1 enziminin toksisitesi zebra balıkları üzerinde araştırıldı. Denemeler esnasında zebra balıklarının yumurtalarının ilk 24 saat boyunca ölümlerin nedeni mantarlaşma olduğu için bu süre zarfındaki ölümler dikkate alınmadı. 48 saat boyunca kontrol grubunda ölü olmadığı kaydedildi. Serbest enzim grubunda 1000 mg /L konsantrasyonda 1 ölü olduğu hibrit grubunda ise ölü olmadığı kaydedildi. 96 saat boyunca kontrol grubunda ölü yoktu. Serbest enzim grubunda 50 mg/L konsantrasyonda 1 ölü ve hibrit grubunda ise ölü olmadığı kaydedilmiştir.

Çalışmamızda paraoksanaz enziminin sistemleri üzerinde üç antilipid ilaç (Valerik asit, Fenoksi-izobutirik asit, N-desmetil rosvastatin) ve dört antioksidan (Gemfibrozil, kuersitin, pirogallol, askorbik asit) inhibisyon etkileri araştırıldı ve immobilize ve hibrit PON1 enzim aktiviteleri üzerine etkileri *in vitro* olarak incelendi. Serbest, immobilize ve hibrit PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren gemfibrozil ilacı için çizilen Lineweaver burk grafiği eğri denkleminde IC_{50} değerleri hesaplandı. Serbest enzim IC_{50} değeri 0.469 mM ve K_i değeri 0.341, immobilize enzim IC_{50} değeri 0.685 mM ve K_i değeri 0.628, hibrit enzim IC_{50} değeri 0.845 mM ve K_i değeri 0.874 olarak hesaplandı. Serbest, immobilize ve hibrit PON1 enzimleri için çizilen Lineweaver-Burk grafikleri incelendiğinde Gemfibrozil ilacının yarışmalı inhibisyon gösterdiği görüldü.

Serbest, immobilize ve hibrit PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren fenofibrat eğri denkleminde IC_{50} değerleri hesaplandı. Serbest enzim IC_{50} değeri 0.458 mM ve K_i değeri 0.583, immobilize enzim IC_{50} değeri 0.656 mM ve K_i değeri 1.61, hibrit enzim IC_{50} değeri 0.75 mM ve K_i değeri 1.86 olarak hesaplandı. Serbest, immobilize ve hibrit PON1 enzimleri için çizilen Lineweaver-Burk grafikleri incelendiğinde fenofibrat ilacının yarı yarışmalı inhibisyon gösterdiği görüldü. Serbest, immobilize ve hibrit PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren ropikson ilacı eğri denkleminde IC_{50} değerleri hesaplandı. Serbest enzim IC_{50} değeri 0.51 mM ve K_i değeri 0.76, immobilize enzim IC_{50} değeri 0.772 mM ve K_i değeri 1.79, hibrit enzim IC_{50} değeri 0.828 mM ve K_i değeri 2.21 olarak hesaplandı. Serbest, immobilize ve hibrit PON1 enzimleri için çizilen Lineweaver-Burk grafikleri incelendiğinde Ropikson ilacının yarışmasız inhibisyon gösterdiği görüldü.

Serbest, immobilize ve hibrit PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren gallik asit eğri denkleminde IC_{50} değerleri hesaplandı. Serbest enzim IC_{50} değeri 0.582 mM ve K_i değeri 0.334, immobilize enzim IC_{50} değeri 0.671 mM ve K_i değeri 0.671, hibrit enzim IC_{50} değeri 0.718 mM ve K_i değeri 0.69 olarak hesaplandı.

Serbest, immobilize ve hibrit PON1 enzimleri için çizilen Lineweaver-Burk grafikleri incelendiğinde gallik asit ilacının yarışmalı inhibisyon gösterdiği görüldü.

Serbest, immobilize ve hibrit PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren kuersitin eğri denkleminde IC_{50} değerleri hesaplandı. Serbest enzim IC_{50} değeri 0.622 mM ve K_i değeri 0.214, immobilize enzim IC_{50} değeri 0.731 mM ve K_i değeri 0.393, hibrit enzim IC_{50} değeri 0.782 mM ve K_i değeri 0.406 olarak hesaplandı. Serbest, immobilize ve hibrit PON1 enzimleri için çizilen Lineweaver-Burk grafikleri incelendiğinde kuersitin ilacının yarışmalı inhibisyon gösterdiği görüldü.

Serbest, immobilize ve hibrit PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren pirogallol eğri denkleminde IC_{50} değerleri hesaplandı. Serbest enzim IC_{50} değeri 0.477 mM ve K_i değeri 0.925, immobilize enzim IC_{50} değeri 0.606 mM ve K_i değeri 1.16, hibrit enzim IC_{50} değeri 0.672 mM ve K_i değeri 1.17 olarak hesaplandı. Serbest, immobilize ve hibrit PON1 enzimleri için çizilen Lineweaver-Burk grafikleri incelendiğinde Pirogallol ilacının yarı yarışmalı inhibisyon gösterdiği görüldü.

Serbest, immobilize ve hibrit PON1 enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren askorbik asit eğri denkleminde IC_{50} değerleri hesaplandı. Serbest enzim IC_{50} değeri 0.523 mM ve K_i değeri 0.371, immobilize enzim IC_{50} değeri 0.614 mM ve K_i değeri 2.08, hibrit enzim IC_{50} değeri 0.707 mM ve K_i değeri 3.44 olarak hesaplandı. Serbest, immobilize ve hibrit PON1 enzimleri için çizilen Lineweaver-Burk grafikleri incelendiğinde askorbik asit ilacının yarışmasız inhibisyon gösterdiği görüldü.

Sonuçlara göre bu antilipid ilaçları serbest, immobilize ve nano çiçek hibrit PON1 enzimleri üzerinde inhibitör etkisi vardır. PON1 enzimin antioksidatif ve antiaterojenik özellikleri nedeniyle, bu enzimi inaktive eden materyalleri tanımlamak önemlidir. Dolayısıyla bu ilaçları doğru dozda kullanılmaları çok önemlidir.

Beltowski ve arkadaşları tarafından 2002 yılında yapılan bir çalışmada fenofibrat ilacının PON1 enziminin aktivitesini fare serumunda çalışmışlardır. Çalışmadan elde edilen sonuçlardan PON1 enziminin aktivitesinin önemli miktarda azaldığı belirlenmiştir.

Macan ve arkadaşları 2010 yılında yaptıkları bir çalışmada gemfibrozil ilacının PON1 enziminin aktivitesi üzerine etkisini fare serumunda çalışmışlardır. Sonuçlara göre PON1 enzim aktivitesinin önemli miktarda azalmıştır.

Sonuç olarak yapılan bu çalışmada aşağıdaki bulgular elde edilmiştir.

1. PON1 enzimi insan serumundan ilk kez ÜFA metodu kullanılarak 304.5 kat ve %86.7 verimle saflaştırıldı.
2. Saflaştırılan PON1 enzimi hazırlanmış olan Fe_3O_4 nanopartikülleri ile modifiye edilen kitosan üzerine L-glutaraldehit ara kolu kullanılarak kovalent olarak immobilize edildi.
3. Manyetik kitosan nanopartikülleri (MK NP'leri) sentezlendi ve karakterizasyonu yapıldı (UV-VIS, SEM, EDX, XRD, FT-IR).
4. ÜFA tekniği kullanılarak elde edilen PON1 enzimi nano çiçek PON1- Ca^{2+} hibrit yapısı içerisine immobilize edildi. elde edilen nano çiçek hibrit yapılarının toksisitesi zebra balığı kullanılarak belirlendi.
5. PON1 nanoçiçek hibrit yapıları sentezlendi ve karakterizasyonu (SEM, EDX, FTIR ve XRD analizleri) yapıldı.
6. Enzimin karakterizasyonunda Serbest, İmmobilize ve Nanoçiçek PON1 enzimin optimum pH:8.0 ve optimum sıcaklığı $37^{\circ}C$ olarak bulundu.
7. Tüm enzim sistemleri pH:8.0'de ve $37^{\circ}C$ 'de daha stabil oldukları belirlendi.
8. Saflaştırılan PON1 enzimi MK NP'leri yüzeyine L-glutaraldehit arakolu üzerinden %82.68 oranında Schiff bazı üzerinden kovalent olarak bağlandı.
9. PON 1 enziminin nanoçiçek yapısı içerisinde %88.49 oranında bağlandığı belirlendi.

10. K_M ve V_{max} değerlerinin bulunması amacıyla serbest, immobilize ve nanoçiçek hibrit PON1 enzimlerine ait paraokson ve fenil asetat substratları kullanıldı. Serbest, immobilize ve nano iek Hibrit PON1 enzime göre fenil asetat daha yüksek aktivite gösterdiği belirlendi.
11. Nano iek hibrit PON1 enzimin, fenil asetat substrat ile V_{max} ve K_M değerleri sırasıyla 625 $\mu\text{mol/L.dak}$ ve 0.062 mM olarak belirlendi.
12. PON1 nano iek hibrit yapılarının zebra balıkları üzerinde toksisite testleri yapıldı ve nano iek 50-2000 mg/L konsantrasyon aralığında herhangi bir toksik etki göstermediği tam tersine balık embroyoları üzerine koruyucu bir etkisinin olduğu belirlendi.
13. Serbest, immobilize ve nano iek hibrit PON1 enzim sistemlerinin aktivitesi üzerine bazı antioksidan bileşiklerin (Gallik aşı, Kuasetin, pirogallol, askorbik asit) etkileri *in vitro olarak* incelendi.
14. Serbest, immobilize ve nano iek hibrit PON1 enzim sistemlerinin aktivitesi üzerine bazı anti lipit ilaçlarının (Valerik asit, Fenoksi- izobutirik asit, N-desmetil rosuvastatin etkileri *in vitro olarak* incelendi.
15. Hem antioksidan bileşiklerin hemde antilipit ilaçlarının serbest enzim üzerine en yüksek inhibisyon etkisi gösterdikleri belirlendi.

KAYNAKLAR

- Afonso, LAP., 2015. Zebrafish as a model for toxicological studies: is there a role for paraoxonase? Nova Medical School UNL. Departamento de biologia animal
- Ansari, S.A. and Husain, Q., 2012. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. 30, 512–523.
- Aşkın, U., Karataş, F., Türköz, Y., Aydın, S., 2012. Paraoksonaz-1 enziminin bazı kinetik özelliklerinin incelenmesi ve ghrelin hormonu ile ilişkisi. İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi; 1: 21-8.
- Aviram, M. and Rosenblat, M., 2008. Paraoxanases (PON1, PON2, PON3) analyses in vitro and in vivo in relation to cardiovascular diseases. *Methods Mol. Biol.* 477:259-76.
- Balci, H., Genc, H., Papila, C., Can, G., Papila, B., Yanardag, H., Uzun, H., 2012. Serum lipid hydroperoxide levels and paraoxonase activity in patients with lung, breast, and colorectal cancer. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 26: 155–160.
- Beltowski, J., Wojcicka, G., Mydlarczyk, M., Jamroz, A., 2002. The effect of peroxisome proliferator-activated receptors alpha (pparalpha) agonist, fenofibrate, on lipid peroxidation, total antioxidant capacity, and plasma paraoxonase 1 (pon1) activity. *Journal of physiology and pharmacology*. 53,3, 463.475.
- Bilen, Ç., Özensoy, Ö., 2009. Paraoksonaz enziminin glutaraldehit ile immobilizasyonu ve bazı ağır metallerle karşı afinitesinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi Balıkesir.
- Boder, E. and Demirpençe, E., 2010. Kodlamayan RNA lar ve gen susturumu. *Hacettepe Tıp dergisi*. 41: 82-89.
- Bostan, K., Aldemir, T., Aydın, A., 2007. Kitosan ve antimikrobiyal aktivitesi. *Türk Mikrobiyol. Cem Derg.* 37(2):118-127.
- Bourtoom, T., Chinnan, M.S., 2008. Preparation and properties of rice starch–chitosan blend biodegradable film. *LWT - Food Science and Technology* 41 (9): 1633-1641.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein –dye binding. *Analytical Bio chemistry*. 72,284-254.
- Cao, C., Xiao, I., Chen, C., Shi, X., Cao, Q. and Gao, L., 2014. In situ preparation of magnetic Fe₃O₄-chitosan nanoparticles via novel reduction-precipitation method and their application in adsorption of reactive azo dye. *Powder Technology*. 260:90-97.
- Clementea, Z., Castroa, V., Mourac, M., Jonssona, C., Fracetob, L., 2014. Toxicity assessment of TiO₂ nanoparticles in zebrafish embryos under different exposure conditions. *Aquatic Toxicology* 147 (2014) 129– 139.
- Colak, U. and Gençer, N., 2012. Immobilization of paraoxonase onto chitosan and its characterization. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*. 40: 290–295.

- Copeland, R.A., 2000. Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis. Second edition book. A John Wiley & Sons, Inc., publication.
- Demir, N., Nadaroglu, H., Demir, Y., 2015. Purification of paraoxonase (PON1) from sunflower (*Helianthus annuus*) and effects of some chemicals on paraoxonase activity *in vitro*. Annual Review & Research in Biology, 5(1): 25-33.
- Demir, N., Nadaroglu, H., Demir, Y., 2008. Purification of human serum paraoxonase and effect of acetylsalicylic acid on paraoxonase activity. Pharm. Biol., 46, 6, 393-399.
- Demir, Y., Nadaroglu, H., Demir, N., 2006. Effect of glimepiride on paraoxonase activity. Pharm. Biol., 44 (5), 396-399.
- Demir, N., Nadaroglu, H., Demir, Y., 2011. 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.
- Furlong, CE., Richter, RJ., Chapline, C., Crabb, JW., 1991. Purification of Rabbit and Human Serum Paraoxonase. Biochemistry, 30, 10133.
- Gagaoua, M., Kahina, H., 2016. Three Phase Partitioning System, an Emerging Non Chromatographic tool for Proteolytic Enzymes Recovery and Purification. Biosensors Journal, 5:1.
- Gan, N., Smolen, A., Eckerson, W., La, D., 2004. Purification of human serum paraoxonase arylesterase. Evidence for one esterase catalyzing both activities. Drug Metab Dispos. 19: 100-6.
- Ge, J., Lu, D., Wang, J., Yan, M., Lu, Y., Liu, Z., 2008. Molecular fundamentals of enzyme nanogels. J Phys Chem B. 112(45):14319-14324.
- Gregory, S. and Kelly, ND., 2011. Quercetin. Alternative Medicine Review. 16:2
- Guo, M., Diao, P., Cai, S., 2005. Hydrothermal growth of well aligned ZnO nanorod arrays: Dependence of morphology and alignment ordering upon preparing conditions. Journal of Solid State Chemistry, 178(6), 1864–1873.
- Hu, R., Zhang, X., Zhao, Z., Zhu, G., Chen, T., Fu, T., Tan, W., 2014. DNA nanoflowers for multiplexed cellular imaging and traceable targeted drug delivery. Angew. Chem. Int. Ed. 53, 5821–5826.
- Khanjari, A., Karabagias, A., Kontominas, M., 2013. Combined effect of N, O-carboxymethyl chitosan and oregano essential oil to extend shelf life and control *Listeria monocytogenes* in raw chicken meat fillets. LWT - Food Science and Technology. 53, 94.
- Kim, DS., Marsillach, J., Furlong, CE., Jarvik, GP., 2013. Pharmacogenetics of paraoxonase activity: elucidating the role of high-density lipoprotein in disease. Pharmacogenomics. 14:12:1495-515
- Kılıçarslan, A. and Öz GŞ., 2003. Hiperlipidemiye Güncel Bakış. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Genel Dahiliye Ünitesi, Ankara.
- Klimov, AN., Gurevich, VS., Nikiforova, AA., Shatilina, LV., Kuzmin, AA., Plavinsky, SL., Teryukova, NP., 1993. Antioxidative activity of high-density lipoproteins *in vivo*. Atherosclerosis, 100, 13.
- Krystle, L., Sean, Y., McGee, P., Volz, D., 2013. Adverse outcome pathways during zebrafish embryogenesis: A case study with paraoxon. Aquatic Toxicology 126, 346–354.

- Lee, S.W., Cheon, S.A., Kim, M.I., Park, T.J., 2015. Organic–inorganic hybrid nanoflowers: types, characteristics, and future prospects. *Journal of Nanobiotechnology*, 13: 54.
- Lewis, K. and Eisen, J., 2003. From cells to circuits: development of the zebrafish spinal cord. *Progress in Neurobiology* 69 (2003) 419–449.
- Li, J., Jiang, ZY., Wu, H., Zhang, L., Long, LH., Jiang, YJ., 2010. Constructing inorganic shell onto LBL microcapsule through biomimetic mineralization: a novel and facile method for fabrication of microbioreactors. *Soft Matter*. 6(3):542-550.
- Macan, M. and Konjevoda, P., 2010. The influence of gemfibrozil on malondialdehyde level and paraoxonase 1 activity in wister and fisher rats. *Basic&Clinical Pharmacology &Toxicology*, vol 108, Issue6.
- Macan, M., Vrkić, N., Vrdoljak, A., Radić, B. and Bradamante, V., 2010. Effects of high sucrose diet, gemfibrozil, and their combination on plasma paraoxonase 1 activity and lipid levels in rats. *Acta APB, Biochemica Polonica journals*, (57) 3, 321–326.
- Mackness, B., Mackness, M.I. and Durrington, P.N., 1996. Paraoxonase biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Curr. Opin. Lipidol*, (7), 69-76.
- Mackness, M.I. and Durrington, P.N., 1995. HDL its enzymes and its potential to influence lipid peroxidation. *Atherosclerosis*, 115(2), 243-253.
- Mackness, M. and Mackness, B., 2016. Human paraoxonase-1 (Pon1): gene structure and expression, promiscuous activities and multiple physiological roles. *journal HHS public access*.1: 567(1)12-21.
- Magdalena, P., Kasprzak, M. I., Waclaw, M., Magdalena, B.N., Bogna, G., Krzysztof, S. and Jakub, K., 2014. PON1 status evaluation in patients with chronic arterial occlusion of lower limbs due to atherosclerosis obliterans. *Arch Med Sci*, 10 (6), 1101–1108.
- McGrath, P. and Li, Q.C., 2008. Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity. *Drug Discovery Today*, 13 (9-10), 394-401.
- Mehdizadeh, T., 2012. Antibacterial, antioxidant and optical properties of edible starch-chitosan composite film. *VRF. Journal. ISI*. 3 (3), 167–173.
- Mitsuhashi, S., Saito, A., Nakajima, N., Shima, H. and Ubukata, M., 2008. Pyrogallol structure in polyphenols is involved in apoptosis-induction on HEK293T and K562 cells. *Molecules, Journal*, (13), 2998-3006; DOI:10. 3390 molecules13122998.
- Moradi, M., Tajik, H., No, H.K., Razavi Rohani, S.M., Oromiehie, A. and Ghasemi, S., 2010. Potential inherent properties of chitosan and its applications in preserving muscle food. *Journal of Chitin and Chitosan*, (15), 35-45.
- Muller, E., Lin, S. and Nisbet, R., 2015. Quantitative adverse outcome pathway analysis of hatching in Zebrafish with CuO nanoparticles. *American Chemical Society. Environ. Sci. Technol*, (49), 11817–11824.
- Nadaroglu, H. and Onem, H., 2014. Preparation and properties of purified phytase from oakbug milkcap (*Lactarius quietus*) immobilised on coated chitosan with iron nano particles and investigation of its usability in food industry, *Journal of Food and Nutrition Research*, 2(12), 938-945.

- Nadaroglu, H., Demir, N., Demir, Y. and Güngör, A., 2011. An in vitro, study of some pesticides on the activity of human serum paraoxonase (PON1), Jordan J. Chem., 6 (4), 439-451.
- Nadaroglu, H. and Sonmez, Z., 2016. Purification of an endo-beta 1,4-Mannanase from *Clitocybe geotropa* and immobilization on chitosan-coated magnetite nanoparticles: Application for fruit juices. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures, 11(2), 685-697 .
- Naik, R. and Sankarshana, T., 2015. Purification of human serum paraoxonase-1. International Journal of Advanced Biotechnology and Research (IJBR), 6 (1), 80-85.
- Nizamlioğlu, N.M., Nas, S., 2010. Meyve ve sebzelerde bulunan fenolik bileşikler; yapıları ve önemler. Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi, 5 (1), 20-35.
- No, H.K., Meyers, S.P., Prinyawiwatukul, W. and Xu, Z., 2007. Applications of chitosan for improvement of quality and shelf life of foods. A review. Journal of Food Science, (72), 87-100.
- Onem, H., Cicek, S. and Nadaroglu, H., 2016. Immobilization of a thermostable phytase from *Lactarius piperatus* onto magnetic Fe₃O₄-chitosan nanoparticle. Journal of Food, 50(5), 1158-1165.
- Onem, H., Nadaroglu, H., 2016. Immobilization of purified phytase enzyme from *tirmit* (*Lactarius volemus*) on coated chitosan with iron nanoparticles and Investigation of Its Usability in Cereal Industry. Iran J Sci Technol Trans Sci. 1-13.
- Palmer, T., 2007. Enzymes. (Book) Horwood Publishing, England, 361-370.
- Parng, C., Seng, W.L., Semino, C. and McGrath, P., 2002. Zebrafish: a preclinical model for drug screening. Assay Drug Dev. Technol, 1(1), 41-8.
- Pickart, M.A. and Klee, E.W., 2014. Zebrafish approaches enhance the translational research tackle box. Vol 163, Issue 2, Pages 65-78.
- Raafat, D. and Sahl, H-G., 2009. Chitosan and its antimicrobial potential- a critical literaturesurvey. Microbial Biotechnology, (2), 186-201.
- Renault, F., Chabriere, E., Andrieu, J.P., Dublet, B., Masson, P. and Rochu, D.J., 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, (836), 15-21.
- Robert, J. Brushia., Trudy, M. Forte., Michael, N Oda., Bert, N. La Du, and John K. Bielicki., 2017. Baculovirus-mediated expression and purification of human serum paraoxonase 1A. Journal of Lipid Research Volume 42, 951-958.
- Rubinstein, A., 2006. Zebrafish assays for drug toxicity screening. Journal Expert Opinion on Drug Methabolism and Toxicology, 2(2), 231-240.
- Seung, W.L., Seon, A.C., Moon, L.K. and Tae, J. P., 2015. Organic–inorganic hybrid nanoflowers: types, characteristics, and future prospects. Journal of Nanobiotechnol, 13, 2-10.
- Shaukat, A., Van Mil, G, J, H. and Richardson, M, K., 2011. Large-Scale Assessment of the zebrafish embryo as a possible predictive model in toxicity testing. Published. Plos ONE, (6)1-11.
- Schock, EN., Ford, WC., Midgley, KJ., Fader, JG., Giavasis, MN., McWhorter, ML., 2012. The Effects of Carbaryl on the Development of Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos. Zebrafish. 9:4:169-78.

- Sies, H. and Stahl, W., 1995. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am J Clin Nutr*, (62), 1315-1321.
- Simon, N., Schuster, N. Y., 1959. 'Enzymes, the Physics and Chemistry of Life. Pfeiffer Journal, 171-173.
- Singleman, C. and Holtzman, NG., 2014. Growth and Maturation in the Zebrafish, Danio Rerio A Staging Tool for Teaching and Research. *Zebrafish*. 11:396-406
- Soleymani, S. Kesmen, Z. Nadaroglu, H., 2017. *Lactobacillus brevis* Lipase: purification, immobilization onto magnetic florosil NPs, characterization and application as a detergent additive. *Tenside Surfactants Detergents*, 54, 3, 194-205.
- Tee, E.S., Mohd Ismail N, Mohd Nasir, A. Kahtijah, I., 1997. Nutrient composition of Malayisan foods, 4th Edition, Malaysian Food Composition Database Programme, Institute for Medical Research, Kuala Lumpur; 310 p.
- Tomás, M., Latorre, G., Sentí, M. and Marrugata, J., 2004. The Antioxidant Function of High Density Lipoproteins: A New Paradigm in Atherosclerosis', *Rev. Esp. Cardiol*, 57(6), 557-69.
- Van Himbergen, T. M., van Tits, L.J, Roest, M. and Stalenhoef, A. F., 2006. The story of PON1: how an organophosphate hydrolysing enzyme is becoming a player in cardiovascular medicine. *The Netherlands Journal of Medicine*, 64 (2) 34-8.
- Wang, L.B., Wang, Y.C., He, R., Zhuang, A., Wang, X. and Zeng J., 2013. A new nanobiocatalytic system based on allosteric effect with dramatically enhanced enzymatic performance. *J Am Chem Soc*, 135(4), 1272-1275.
- Wang, X., Shi, J., Li, Z., Zhang, S., Wu, H. and Jiang, Z., 2014. Facile one-pot preparation of chitosan/calcium pyrophosphate hybrid microflowers. *American Chemical Society*, 6(16), 14522-14532.
- Wang, Yi., Tian, J. and Wang, X., 2015. Self-assembled enzyme-inorganic hybrid nanoflowers and their application to enzyme purification. *Colloids and Surfaces B, Biointerfaces*, (130) 299-304.
- Weber, P., Bendich, A. and Schalch, W., 1996. Ascorbic acid and human health – A review of recent data relevant to human requirements. *Int J Vit Nutr Res*, (66), 19-30.
- Wim, H., De, J. and Paul, J.A.B., 2008. Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. *Int J Nanomedicine*, 3(2), 133-149.
- Yu, Y.B., Xu, F., Jing, T., Longquan, X., Xiuying, W. and Yi, W., 2015. Self-assembled enzyme-inorganic hybrid nanoflowers and their application to enzyme purification. *Journal Elsevier*, 130, 299-304.
- Yula, E. ve Deveci, Ö., 2010. Nanotıp, mikro dizilimler ve klinik mikrobiyolojide kullanımları. *Dicle Tıp Dergisi*, 37(4), 422-428.
- Yurttaş, L. Kuçukoğlu, K. Nadaroglu, H. Kaplancikli, Z, A., 2017. Synthesis and evaluation of novel 2-[(1,2,4-triazol-3-yl)thio]acetamide derivatives as potential serum paraoxonase-1 (PON1) activators *Marmara Pharmaceutical Journal* 21/4: 967-977.
- Zare, Jun, Ge. Jiandu, Lei. Richard, N., 2012. Protein-inorganic hybrid nanoflowers. *Nature Nanotechnology*, 10. 1038.
- Zian, L., Yun, X., Ling, W., Yuqing, Y., Jiangnan, Z. and Huanghao, Y., 2014. Facile synthesis of enzyme-inorganic hybrid nanoflowers and their application as an

immobilized trypsin reactor for highly efficient protein digestion journal. The Royal Society of Chemistry, (4)13888–13891.

Zhang, Z., Zhang, Y., Song, R., Wong, M., Yan, F., He, L., Feng, X., Fang, S., Zhao, J. and Zhang, H., 2015. Manganese(II) phosphate nanoflowers as electrochemical biosensors for the high-sensitivity detection of ractopamine. *Sensors and Actuators B: Chemical* (211)310-317.



ÖZGEÇMİŞ

1966 yılında İran'ın Oroumieh kentinde doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Oroumieh'de tamamladı. 1994 yılında Oroumieh İslami Azad Üniversitesi'nden Veterinerlik Fakültesi Veterinerlik bölümünden mezun oldu. 2012 yılında başladığı Atatürk Üniversitesi Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı Nanotıp bilim dalı Bölümü'nde doktora eğitimine devam etmektedir.

