



T.C.

ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK BİYOKİMYASI ANABİLİM DALI

**PALAMUT (*Sarda sarda*) BALIĞINDA PARAOKSONAZ
ENZİM AKTİVİTESİNE (E.C.3.1.8.1.) BAZI GEÇİŞ METAL
İYONLARININ (Mn^{+2} , Co^{+2} , Fe^{+2}) ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Çiğdem KIRSÜLEYMANOĞLU

Samsun

Haziran-2020





T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK BİYOKİMYASI ANABİLİM DALI

**PALAMUT (*Sarda sarda*) BALIĞINDA PARAOKSONAZ
ENZİM AKTİVİTESİNE (E.C.3.1.8.1.) BAZI GEÇİŞ METAL
İYONLARININ (Mn^{+2} , Co^{+2} , Fe^{+2}) ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Çiğdem KIRSÜLEYMANOĞLU

Danışman
Doç. Dr. DİLEK ÇELİKLER

Samsun
Haziran-2020

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĒİTİM ENSTİTÜSÜ

iĒdem KİRSLEYMANOĒLU tarafından DoĒ.Dr.Dilek ÇELİKLER Danışmanlığında hazırlanan Palamut (*Sarda sarda*) balığında paraoksonaz (PON) enzimi aktivitesi üzerine demir, mangan ve kobaltın etkisi başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 15/06/2020 tarihinde yapılan sınav ile Veterinerlik biyokimyası Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Sena ÇENESİZ
Ondokuz Mayıs niversitesi

ye : DoĒ. Dr. Dilek ÇELİKLER
Ondokuz Mayıs niversitesi

ye : Dr. Ēr. Üyesi Evrim SÖNMEZ
Sinop Üniversitesi

ONAY

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri yeleri tarafından uygun görülmüştür.

.... / /

Prof. Dr. Ali BOLAT
Lisansüstü EĒitim Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca, benden ilgisini ve zamanını esirgemeyen, bana inanan, bilgi ve deneyimleriyle yol gösteren ve beni her zaman motive eden saygıdeğer hocam ve danışmanım Doç. Dr. Dilek ÇELİKLER'e teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım boyunca olumlu eleştirileriyle katkı sağlayan, akademik bilgi birikimlerini benimle paylaşan, görüş ve düşüncelerinden yararlandığım Biyokimya Anabilim Dalı Sayın Prof. Dr. Ali ERTEKİN, Prof. Dr. Sena ÇENESİZ, Prof. Dr. Fatma Gül YARIM, Prof. Dr. Cevat NİSPET ve Prof. Dr. Gülay ÇİFTÇİ hocalarıma teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım boyunca benden yardımlarını esirgemeyen, bilgilerinden ve görüşlerinden yararlandığım değerli arkadaşlarım, Cerengül DEMİRARSLAN, Mahmut Eray ÖZKAN, Berat ULUAD ve Muhammed KÜÇÜK'e teşekkür ederim.

Ayrıca, bugünlere gelmemi sağlayan, tüm hayatım boyunca her zaman yanımda olan ve benim bugünlere başarılı bir şekilde gelmemi sağlayan, en değerli varlıklarım aileme sonsuz teşekkürler.

Bu çalışma, PYO.EGF.1904.19.006 proje numarası ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

PALAMUT (*Sarda sarda*) BALIĞINDA PARAOKSONAZ ENZİM AKTİVİTESİNE (E.C.3.1.8.1.) BAZI GEÇİŞ METAL İYONLARININ (Mn^{+2} , Co^{+2} , Fe^{+2}) ETKİSİ

Amaç: Paraoksonaz (PON) enzimi HDL ile ilişkili, detoksifikasyon ve antioksidan aktiviteye sahip olan metabolizma için önemli bir karaciğer enzimidir. Su kirliliğine sebep olan geçiş metallerinin beslenme ile su ortamından balıklara geçerek kas ve karaciğerlerinde birikmesi enzim aktivitelerini olumsuz etkilemektedir. Bu bağlamda yapılan bu araştırma ile palamut (*Sarda sarda*) balığının kas dokusunda PON enzimine mangan (Mn^{+2}), kobalt (Co^{+2}) ve demir (Fe^{+2}) geçiş metal iyonlarının etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: Araştırmada palamut (*S. sarda*) balığının sezon mevsimi olan ekim ayında Samsun bölgesi denizinden temin edilen 25 adet palamut balığı soğuk zincir ile labortuvar ortamına getirilerek palamut balıklarının kas dokuları kullanılmıştır. Mn, Co ve Fe geçiş metallerinin $MnCl_2$, $CoCl_2$ ve $FeCl_2$ olarak çözeltileri hazırlanmıştır. Ölçüm yapılırken geçiş metal iyonlarının çözeltilerinden farklı hacimlerde alınarak PON enzim aktivitesi tayin edilmiştir.

Bulgular: Elde edilen veriler sonucunda mangan, kobalt ve demir geçiş metal iyonlarının enzim aktiviteleri hesaplanarak yüzde aktivite grafikleri çizilmiştir. Mn^{+2} , Co^{+2} ve Fe^{+2} geçiş metal iyonlarının palamut (*S. sarda*) balığındaki PON enzim aktivitesini azalttığı belirlenmiştir. Bunun yanı sıra $MnCl_2$, $CoCl_2$ ve $FeCl_2$ çözeltilerinin 10 μL , 20 μL , 30 μL , 40 μL ve 50 μL içeren farklı derişimlerinin PON enzim aktivitesi üzerinde etkisinin istatistiksel olarak ortaya konması için tek yönlü varyans analizi (One-Way Anova) yapılmıştır. Her bir çözeltinin farklı derişimlerinin PON enzim aktivitesi üzerine etkilerinin istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği sonucuna ulaşılmıştır ($p>0,05$).

Sonuç: Mn^{+2} , Co^{+2} ve Fe^{+2} geçiş metal iyonlarının PON enzim aktivitesini azalttığı tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Demir (Fe); Geçiş metal iyonu; Kobalt (Co); Mangan (Mn); Palamut (*Sarda sarda*); Paraoksonaz (PON)

**Çiğdem KIRSÜLEYMANOĞLU, Yüksek Lisans Tezi
Ondokuz Mayıs Üniversitesi- Samsun, Haziran-2020**

ABSTRACT

THE EFFECT of SOME TRANSITION METAL IONS (Mn^{+2} , Co^{+2} , Fe^{+2}) on THE PARAOXONASE ENZYM ACTIVITY (E.C.3.1.8.1.) in PALAMUT (*Sarda sarda*) FISH

Aim: The paraoxonase (PON) enzyme is an important liver enzyme for metabolism associated with HDL, with detoxification and antioxidant activity. The transition metals that cause water pollution passes from the aquatic environment to the fish and accumulate in the muscles and livers negatively affect the enzyme activities. In this context, it was aimed to determine the effects of metal ion (Mn^{+2}), cobalt (Co^{+2}) and iron (Fe^{+2}) transition to PON enzyme in muscle tissue of bonito (*Sarda sarda*) fish.

Material and Method: In the research, 25 bonito fish obtained from the Samsun region sea in October, which is the season season of bonito (*S. sarda*) fish, were brought to the laboratory environment and the muscle tissues of bonito fish were used. Solutions of Mn, Co and Fe transition metals as $MnCl_2$, $CoCl_2$ and $FeCl_2$ were prepared. While measuring, PON enzyme activity was determined by taking different volumes of transition metal ions from solutions.

Results: As a result of the data obtained, enzyme activities of manganese, cobalt and iron transition metal ions were calculated and percentage activity graphs were drawn. When the graphs were examined, it was determined that Mn^{+2} , Co^{+2} and Fe^{+2} transition metal ions reduce the PON enzyme activity in bonito (*S. sarda*) fish. In addition, one-way analysis of variance (One-Way Anova) was performed to statistically demonstrate the effect of different concentrations of $MnCl_2$, $CoCl_2$ and $FeCl_2$ solutions on PON enzyme activity, including 10 μL , 20 μL , 30 μL , 40 μL and 50 μL . It was concluded that the effects of different concentrations of each solution on PON enzyme activity did not show a statistically significant difference ($p > 0,05$).

Conclusion: It has been determined that Mn^{+2} , Co^{+2} and Fe^{+2} transition metal ions reduce paraoxonase enzyme activity.

Keywords: Bonito (*Sarda sarda*); Cobalt (Co); İron (Fe); Mangan (Mn); Paraoxonase (PON); Transition metal ion

Çiğdem KIRSÜLEYMANOĞLU, Master Thesis
Ondokuz Mayıs University - Samsun, June-2020

SİMGELER VE KISALTMALAR

AChE	: Asetilkolinesteraz
Apo A1	: Apolipoprotein
Apo J	: Klusterin
Å	: Ångstrom
A	: Adenin
ARE	: Arilesteraz
Ba	: Baryum
Ca	: Kalsiyum
Cd	: Kadminyum
Co	: Kobalt
Cu	: Bakır
Cr	: Krom
C	: Sitozin
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
ETDA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
E.C.	: Enzim kod numarası
Fe	: Demir
GPx	: Glutasyon peroksidaz
GR	: Glutasyon Redüktaz
G	: Gunin
Hg	: Civa
HDL	: Yüksek yoğunluklu lipoprotein
HCl	: Hidroklorik Asit
KAT	: Katalaz
kDa	: Atomik kütle birimi
La	: Lantan
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
LPS	: Lipopolisakkarit
Mo	: Molibden
Mn	: Mangan
Mg	: Magnezyum

Ni	: Nikel
NaCl	: Tuz
NADPH	: Nükotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
PON	: Paraoksonaz enzimi
pH	: Power of hydrogen
ppm	:Parts per million
RR	: Allozim
ROS	: Reaktif Oksijen Tür
RNA	: Ribonükleik Asit
SOD	: Süperoksit dismutaz
OP	: Organofosfat ajanları
TAK	: Toplam Antioksidan Kapasite
TOK	: Toplam Oksidan Kapasite
T	: Timin
Zn	: Çinko

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vi
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Paraoksonaz Enzimi	3
2.1.1. Paraoksonaz Enziminin Tarihçesi	3
2.1.2. Paraoksonaz Enziminin Yapısı.....	4
2.1.3. Paraoksonaz Gen Polimorfizmi	7
2.1.4. Paraoksonaz Sentezlenmesi ve Salgılanması	9
2.1.5. Paraoksonazın Fonksiyonel Önemi	10
2.2. Oksidan ve Antioksidan	12
2.3. Palamut Balığı (<i>Sarda sarda</i>).....	16
2.4. Çevre Kirliliği ve Ağır Metaller.....	17
2.4.1. Demir (Fe)	19
2.4.2. Mangan (Mn).....	21
2.4.3. Kobalt (Co).....	22
3. MATERYAL VE METOT.....	24
3.1. Materyal	24
3.1.1. Hayvan Materyali	24
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	24
3.1.3. Kullanılan Alet ve Cihazlar	24
3.1.4. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması	24
3.2. Metot	25
3.2.1. Doku Homejenizasyonu	25
3.2.2. Geçiş Metallerinin Paraoksonaz Enzimi Üzerindeki Aktivite Tayini	25
3.2.3. Toplam Oksidan Kapasite (TOK)	26
3.2.4. Toplam Antioksidan Kapasite (TAK)	26
3.2.5. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) tayini	27
3.2.6. Verilerin Analizi.....	27

4. BULGULAR.....	28
4.1.Geçiş Metallerin Paraoksonaz Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	28
4.2. Toplam Oksidan Kapasite ve Toplam Antioksidan Kapasite Ölçümü	32
5. TARTIŞMA.....	33
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	36
KAYNAKLAR	38
ÖZGEÇMİŞ	50



1.GİRİŞ

Glikoprotein yapısında olan paraoksonaz (PON), hem arilesteraz (E.C.3.1.1.2) hem de paraoksonaz (E.C.3.1.8.1) aktivitesine sahip, kalsiyum (Ca^{+2}) bağımlı bir ester hidrolazdır (Durrington ve ark., 2001). Parathion bileşiğinin katabolik ürünü sonucu oluşan paraokson, başta sinir uyarılarının iletiminde önemli rol oynayan asetilkolin esteraz ve bazı enzimleri inhibe etmektedir. Ancak organizma bu etkilerin bir çoğuna karşı savunma sistemleri oluşturmuştur. Bunlardan bir tanesi de PON enzimidir. Bu enzim paraoksanı hidroliz ederek onun zararlı etkilerini ortadan kaldırmaktadır (Costa ve ark., 1999; La Du ve ark., 1999). PON enzimi yapısına bağlı bulunan HDL sayesinde LDL'lerdeki lipid oksidasyonunu sınırlandırarak antioksidan bir özellik gösterir. Bu sebeple paraoksonaz enzim hücreleri oksidatif strese karşı korur ve hücresel antioksidan olarak görev yapar (Elena ve ark., 2006). Ayrıca PON bazı aktif, nörotoksik organofosfat (OP) insektisidlerinin ve kimyasal gazlarının detoksifikasyonu için insan ve hayvan serumunda bulunan kritik bir enzimdir (Brophy ve ark., 2001). PON'un primer fizyolojik rolü henüz tam olarak belirlenememesine karşı böcek ilacı ve sinir gazı yapımında kullanılan OP bileşiklerinin hidrolizini katalizlemektedir. Bu sebeple de toksikolojik çalışmalar ve *in vivo* ksenobiyotik metabolizması açısından önem taşımaktadır (Başkol ve Köse, 2004). Özellikle tarımda kullanılan OP'lı pestisitler kolay etkilenebilecek hayvanlarda yüksek seviyelerde bulunmuştur. Söz konusu enzim; balık, kurbağa, köpek, sığır, koyun, fare gibi organizmalarda araştırılmış ve enziminin yapısal, kinetik özellikleri tespit edilmiştir (Furlong ve ark., 1991; Chemnitus ve ark., 1983).

Çevre sorunları insan ve hayvan sağlığını tehdit eden tehlikelerin başında gelmektedir. Sucul ortamların kirlenerek tükenmesi ekonomik, ekolojik ve sosyolojik açıdan ciddi sorunların oluşmasına sebep olmaktadır. Bu sorunlar, besin maddesi üretiminin azalması ve sucul ortamlardaki ekolojik dengenin bozularak hastalıkların artması şeklinde sıralanabilmektedir (Köse ve Uysal, 2008). Endüstriyel atıklar ve bazı pestisitler içerisinde yer alan ve suları kirleten en önemli inorganik faktörlerin başında ağır metaller gelmektedir. Bu metaller deşarj edildikleri ortamda uzun süre kalabilmeleri, sucul canlılarda zehirli etkiler meydana getirmeleri ve besin zincirinde birikim yaparak insan sağlığını tehdit etmeleri sebebiyle önem taşımaktadır. Normal şartlarda sucul ortamlarda belli derişimlerde denge halinde bulunan ağır metaller, kentsel ve endüstriyel bölgelerde daha yoğun olmak üzere sedimentte birikerek biota tarafından absorbe

edilmektedir. Bu kirleticileri sedimentler uzun süre bünyesinde muhafaza eder (Wildi ve ark., 2004). Çoğu organik kirleticiler gibi ağır metaller biyolojik olarak indirgenemez. Bu nedenle organik ve inorganik maddelerle kimyasal bileşikler, kompleks yapılar şeklinde absorbe edilerek zamanla deniz diplerinde birikmekte ve uzun yıllar deniz diplerinde bağlı kalmaktadır (Shrivastava ve ark., 2003). Sedimentler ağır metallerle kirlenerek sucul ekosistemlerin sağlığını tehdit etmekte ve büyük bir stres kaynağına sebep olmaktadır. Biriken bu metaller sedimentin içinde ve üzerinde yer alan su canlıları için büyük bir risk faktörü oluşturmaktadır (Delvalls ve ark., 1998).

Canlılarda besin zincirinde alt basamaktaki biriken metaller, bir üst basamaktaki canlılara geçebilir ve zehirli etkilerini ortaya çıkarabilir. Balıklar da besin zinciri yoluyla alt basamaktaki canlılarda bulunan bu ağır metalleri bünyelerine almaktadır (Aksun, 1986). Ağır metal kirliliği sadece sucul canlılar için değil, insan sağlığını da olumsuz etkilemektedir. Esansiyel elementlerden olan demir, bakır, çinko ve mangan gibi metaller canlılarda önemli rol oynarlar. Ayrıca esansiyel elementler de aşırı miktarlarda alındığında canlılarda zehirli etki oluşturabilmektedir (Türkmen ve Ciminli, 2007).

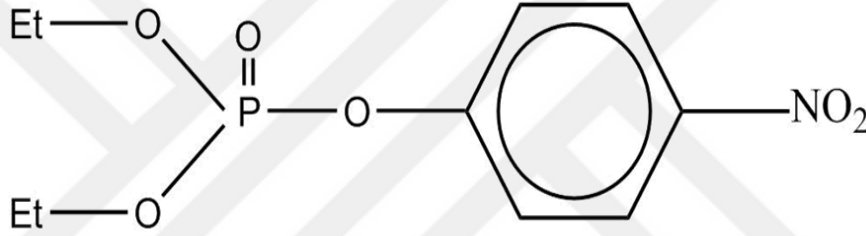
Demir (Fe), molibden (Mo), kobalt (Co), mangan (Mn), çinko (Zn), bakır (Cu) ve krom (Cr) gibi elementler düşük derişimlerde esansiyel ancak yüksek derişimlerde zehirli etki gösterirler (Ağcasulu, 2007). Bu zehirliliği etkileyen faktörler, canlının üreme zamanına, türüne ve su ortamına bağlıdır. Aynı zamanda ışık, ısı, tuzluluk gibi fiziksel değişkenleri ve metalin cinsine göre de değişim göstermektedir (Bryan, 1976).

Ağır metal birikiminin araştırılması son zamanlarda hız kazanmıştır. Balıkların, sağlıklı ve dengeli beslenmesi, insan açısından önemlidir. Bu nedenle sucul ortamlardaki balıklarda artan ağır metal kirliliklerinin ne derece arttığının ve artışa neden olan etkenlerin araştırılması, hem balık hem de insan sağlığı için çok önemli görülmektedir (Ağcasulu, 2007). Bunun bir sonucu olarak da balıkların içinde bulunduğu sucul organizmalar metallerin artan derişimlerinin etkisinde kalır. Protein kaynağı olarak tüketilen balıkların doku ve organlarında artan metal birikimi zehirli etki yaparak insan sağlığını ve paraoksonaz enziminin aktivitesini olumsuz etkiler. Bu araştırmada da palamut (*S. sarda*) balığı kas dokusu üzerindeki paraoksonaz enzimi aktivitesine demir (Fe^{+2}), mangan (Mn^{+2}) ve kobalt (Co^{+2}) geçiş metal iyonlarının etkisi araştırılmış ve enzimin yapmış olduğu antioksidan seviyesinin tespit edilebilmesi için kas dokusu üzerindeki toplam oksidan ve toplam antioksidan kapasite seviyeleri belirlenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Paraoksonaz Enzimi

PON enzimi, bir ester hidrolazdır ve iki farklı ester hidrolaz aktivitesine sahiptir. Bunlardan biri arilesteraz diğeri de fosfinik asit ve fosforik esterlerini hidroliz aktivitesidir. Bu aktivitelerden dolayı iki numaraya (E.C.3.1.1.2. ve E.C.3.1.8.1.) sahiptir ve enzim paraokson, metil paraokson, klor metil paraoksone yüksek derecede seçicilik göstermesi sebebi ile paraoksonaz olarak isimlendirilmiştir. Paraoksonazın diğeri isimleri; organofosforöz hidrolaz, fosfotriesteraz, organofosfat hidrolaz, A-esteraz, organofosfat esteraz, paraokson esteraz, paraoksan hidrolaz, organofosforöz asit anhidraz ve pirimifosmetilokson esterazdır (Erdem, 2004). Paraoksonun kimyasal yapısı Şekil 1’de verilmiştir.



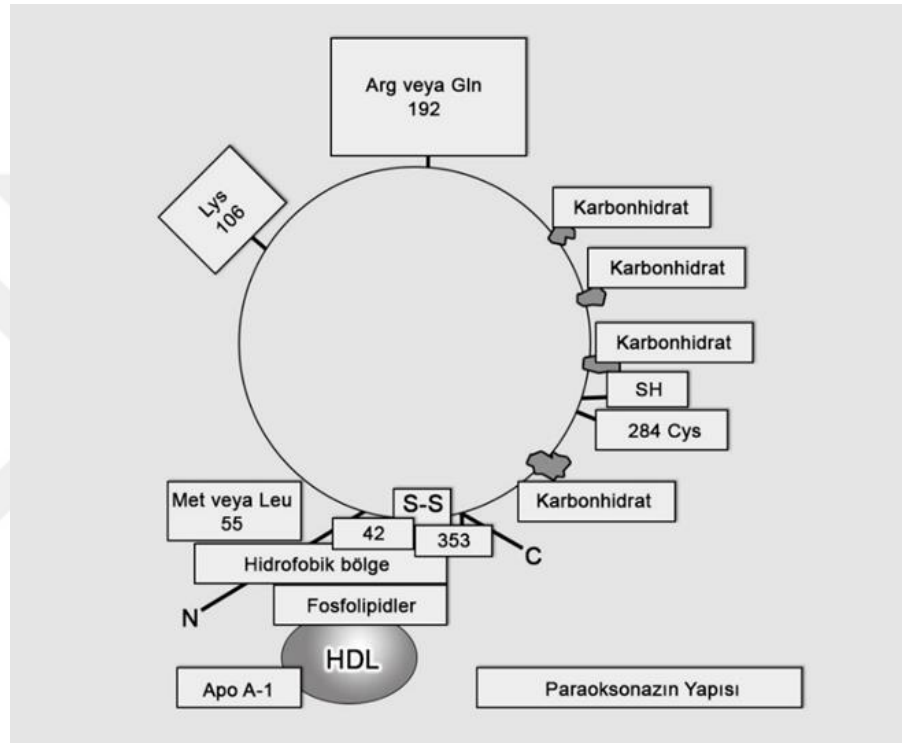
Şekil 1. Paraoksonun kimyasal yapısı (O, O-dietil-O-p-nitrofenil fosfat) (Mackness ve ark., 1998)

2.1.1. Paraoksonaz Enziminin Tarihçesi

PON, 1953 yılında ilk olarak Aldridge W.N. tarafından propiyonat, butirat ve p-nitrofenil asetatı hidroliz eden A-esteraz olarak tespit edilmiştir. Uriel tarafından insan serumunda PON enzimi, 1961 yılında ilk kez elektroforez sonrası HDL immunopresipitatlarında saptanmıştır (Uriel, 1961). PON aktivitesinden sorumlu genin bir multigen ailesinin üyesi olduğu ise 1996 yılında tespit edilmiştir ve PON enzimi sırasıyla PON1, PON2 ve PON3 olarak adlandırılmıştır (Main, 1956). PON1 enzimi böbrek, karaciğer, bağırsak gibi dokulara geniş çapta yayılmıştır (Liang ve ark., 2003). Serumda HDL’ye bağlı olarak bulunan PON3 enzimi, PON1’e benzer şekilde çoğunlukta karaciğerden sentezlenmektedir (Rodrigo ve ark., 1999). Diğeri üyelerden farklı olarak PON2 ise plazmada bulunmamaktadır. Ancak testis, böbrek, beyin ve karaciğer gibi pekçok dokuda sentezlenmektedir (Bastos, 1998). Daha sonra yapılan çalışmalarda, PON enziminin sadece insan serumunda değil hayvanlarda da farklı oranlarda olduğu belirlenmiştir (Furlong ve ark., 1991; Chemnitus ve ark., 1983).

2.1.2. Paraoksonaz Enziminin Yapısı

Amino asit bileşimi incelenen PON enziminin, lösin içeriği yüksek olmasına rağmen, “kringle” yapısına sahip olacak kadar sistein içermediği görülmektedir. Bununla birlikte, 42, 284 ve 353. konumlarında bulunan sistein artıklarının, PON’un fonksiyonel ve yapısal özelliklerine katkı sağladığı söylenmektedir. Tek disülfid bağı, protein yapısında bulurak polipeptid zincirinin siklik yapıda olmasına sebep olmaktadır (Başkol ve Köse, 2004). İnsan serum paraoksonaz enziminin yapısı Şekil 2’de verilmiştir.

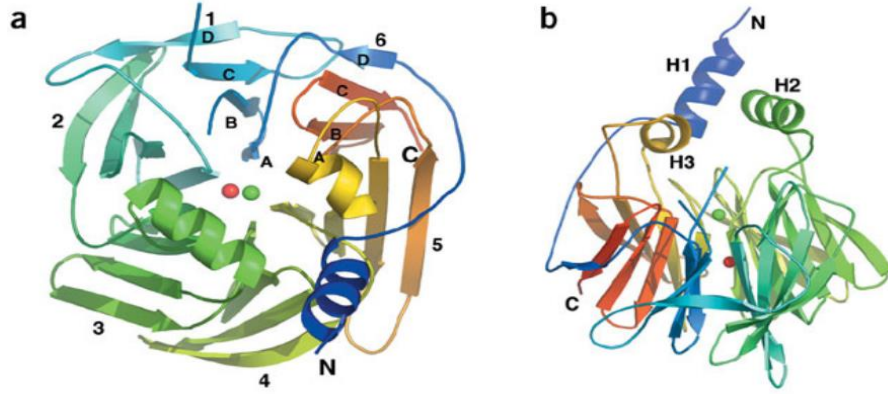


Şekil 2. İnsan serum paraoksonaz enziminin yapısı (Aviram ve ark., 1996)

Karaciğerde sentezlendikten sonra dolaşıma verilen PON’un HDL’nin yapısında bulunduğu bilinmektedir. PON enzimi, hidrofobik N-terminal bölgesi yardımıyla, HDL lipidlerine kolaylıkla bağlanabilmektedir. PON enzimini bağlayan HDL’nin alt birimleri, klusterin (Apo J) ve Apolipoprotein A1 (Apo A1) proteinlerini de içerdiğinden, Apo J ve Apo A1’nin bağlanmasında önemli rol aldığı düşünülmektedir (Başkol ve Köse, 2004).

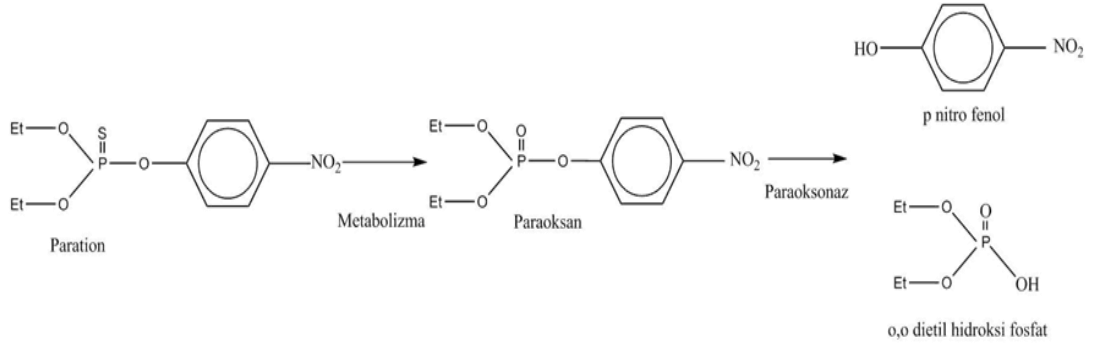
PON enzim yapısı 6 yapraklı beta tabakası içermektedir. Her bir yaprak 4 beta tabakası içerir. Yapı ve katalitik aktivitesinin korunması sebebiyle gerekli olan iki kalsiyum (Ca) atomu PON enziminin merkez kısmında bulunur. Ca atomlarından biri yapısal olup yapıdan uzaklaştırılması denatürasyona sebep olurken diğeri ise katalitik

etkinlikte görev alan Ca^{+2} atomudur (Harel ve ark., 2004). Paraoksonaz enziminin üç boyutlu yapısının görünümü Şekil 3'te verilmiştir.



Şekil 3. Paraoksonaz enziminin üç boyutlu görüntüsü (a) β-kırmalı tabakalar ve (b) H1, H2, H3 ile gösterilen hidrofobik bölgelerin β-kırmalı tabakalara göre konumu (Harel ve ark., 2004)

PON'un genel yapısına bakıldığında ise 4 adet zincirden meydana geldiği ve 6 adet β-kırmalı yapısında olduğu görülmektedir. 42. ve 353. sistein rezidüleri arasındaki disülfid köprüsü sonlanarak üç boyutlu yapısını oluşturmaktadır. Enzimin yapısında görülen C terminal ile N terminal uçlarının kovalent bağlarla bağlanması, β-kırmalı yapıya sahip olan enzimlerde son derece nadir görülen bir durumdur (Jawad ve Paoli, 2002). Şekil 3'te de görüldüğü gibi; 7,4 Å aralıklarla β-kırmalı yapıların ortasında iki (Ca^{+2}) iyonu bulunmaktadır. Bu Ca^{+2} iyonlarından biri yapısaldır ve uzaklaştırılması dönüşümsüz denatürasyona neden olmaktadır. Diğer Ca^{+2} iyonu ise katalitik etkinlikle görev almaktadır. Ayrıca 2,1-2,5 Å mesafesinde bu Ca^{+2} iyonu Asn168, Asn224, Asp269, Asn270 ve Glu 53' den oluşan 5 adet aminoasit ile etkileşim halindedir (Schaff ve ark., 2001). PON enzimi protein yapısı bulunmuş olmasına rağmen PON'u saflaştırmak halen zor olmaktadır. Bunun sebebi PON'un HDL (ApoA1) ile sıkı ilişkisidir (Marie ve ark., 1994). Paraoksonazın enzim mekanizması Şekil 4'te verilmiştir.



Şekil 4. Paraoksonaz enzim mekanizması (Azarsız ve Sönmez, 2000)

PON enzimi, bir insektisit olan parathionun oksidatif desülfürilasyonu ile oluşan paraoksonu hidroliz etmektedir ve bunun sonucunda p-nitrofenol ve dietil hidroksi fosfat oluşumuna sebep olmaktadır. Mikrozomal sitokrom p-450 sistemi, enzim paraokson oluşumunu karaciğer ile diğer dokularda kataliz etmektedir (Mackness ve ark., 1998; Lee ve ark., 2001).

355 aminoasit içeren PON enzimi yüksek oranda lösin aminoasiti içermektedir ve enzimin izoelektrik noktası 5,1'dir. Yapısındaki 284. sıradaki 3 sistein aminoasiti serbest durumdayken, tek disülfid bağı 42 ve 353. sıradaki sistein rezidüleri yapmıştır (Mackness ve ark., 1996; Sarenson ve ark., 1995).

PON enziminin PON1, PON2 ve PON3 olmak üzere üç formu vardır. PON proteinleri dokulardaki ekspresyonlarına ve dağılımlarına göre, birbirleri arasında farklılık göstermişlerdir (Carey ve ark., 2005).

PON1, 7. kromozomun uzun kolu üzerindeki q21.3-q22.1 bölgesine belirlenmiş, üzerinde en çok çalışılan, yapısı ve fonksiyonları PON2 ve PON3'e göre en iyi aydınlatılan izoenzimdir. 354 aminoasit içeren enzim, 43-45 kDa molekül kütlelerinde olan bir glikoproteindir (Clendenning, 1996). 4 Farklı konumda proteine bağlı olarak bulunan PON1 enzimi ağırlığının %15,8'ini oluşturarak karbohidrat üniteleri bulundurmaktadır (La Du ve ark.,1999). PON1 enzimi böbrek, bağırsak, karaciğer gibi dokulara geniş olarak yayılmıştır (Liang ve ark., 2003). Sistein artıkları PON1'in 42, 284 ve 353. konumlarda yer alarak yapısal ve fonksiyonel özelliklere katkı sağlamaktadır. Polipeptid zincirinin siklik yapıda olmasına protein yapısında bulunan tek disülfid bağı sebep olmaktadır (La Du ve ark.,1999).

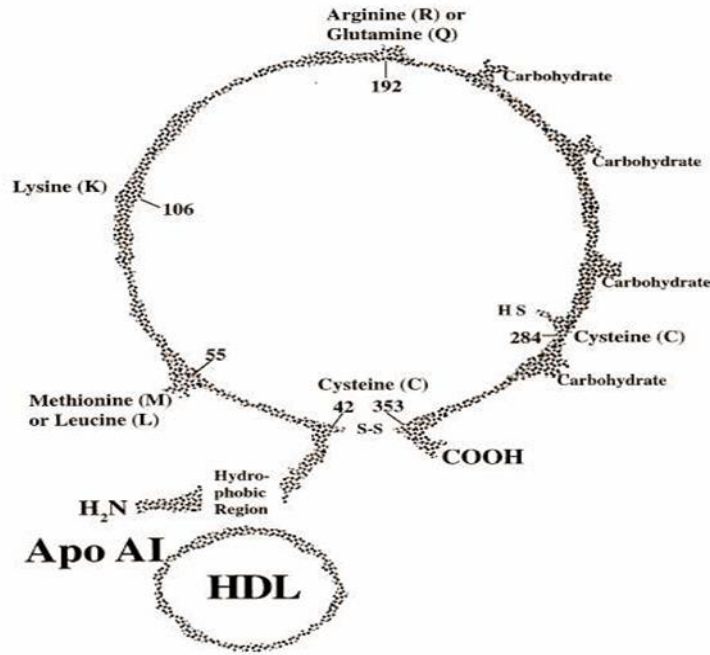
PON2, kromozom 7 q21.3-22.1 üzerinde bulunan PON gen ailesinin ikinci üyesidir. Enzim yaklaşık 44 kDa molekül kütleinde, hücre içi yerleşimli büyük bir proteindir (Roest, 2008). PON2 serumda bulunmaz; atar damar makrofaj hücreleri, çeşitli doku ve hücrelerde bulunmaktadır (Shiner ve ark., 2006; Fuhrman ve ark., 2008). Böbrek, plasenta, testis, karaciğer ve kalpte yüksek oranda eksprese olur. Lipit metabolizmasındaki bazı önemli enzimlerin (lipoprotein lipaz, hepatik lipaz gibi) aktiviteleri üzerine etkilidir (Roest, 2008). PON2'nin fizyolojik fonksiyonları az bilinmesine rağmen, hücresel düzeyde antioksidan etkisi olduğu ileri sürülmektedir (Draganov ve Teilber, 2008; Deakin ve James, 2004). İntrasellüler oksidatif strese PON2'nin, süper oksit anyonunun birikimini engellemesiyle birlikte koruyucu etki gösterdiği düşünülmektedir (Ateş ve ark; 2009; Aviram ve Rosenblat., 2004). PON2, hücreleri oksidatif stresten korur ve hücresel antioksidant olarak görev yapar. Bununla birlikte PON2 nin mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır (Liang ve ark., 2003). Fizyolojik ve patofizyolojik rolü ile ilgili henüz çok az bilgi bulunan PON2 enziminin son dönemde özellikle antioksidan özellikleriyle ilgili yayınlar bulunmaktadır (Rosenblat ve ark., 2003).

PON3, 7. kromozom üzerinde, PON1 ve PON2'nin arasında yerleşim gösteren, molekül kütlesi yaklaşık 40 kDa olan bir proteindir. Diğer izoenzimlere göre PON3, son zamanlarda tanımlanmış olup özellikleri en az bilinen proteindir. PON3 de PON1 gibi karaciğerde sentezlendikten sonra kana salınıp ve HDL'ye bağlanır. PON3 de diğer izoenzimler gibi antioksidan özelliklere sahip bir enzimdir ve okside LDL'nin sebep olduğu monosit kemotaksisini inhibe etmektedir (Janka ve ark, 2002; Mackness ve ark, 2004). PON3 çok az arilesteraz aktivitesi gösterirken paraoksonaz aktivitesine sahip olmadığı ileri sürülmektedir (La Du, 2001; Sanghera ve ark, 2008).

2.1.3. Paraoksonaz Gen Polimorfizmi

PON aktivite polimorfizminin moleküler temeli, PON'un kodlanma bölgesindeki iki amino asitin kendiliğinden meydana gelen mutasyonlarla yer değiştirmesi ile doğrudan ilişkilidir. Kodlanma bölgesinin 192. kodonunda glutaminden (Q) arjinine (R) olan değişim bu mutasyonlardan birincisidir (Humbert ve ark.,1993). Kodlanma bölgesindeki ikinci değişim ise 55. pozisyonda lösinden (L) metiyonine (M) meydana gelen değişimdir. PON'un aktivitesi üzerinde serumdaki protein seviyesi daha çok etkili olurken mutasyonun etkisinin daha az olduğu tespit edilmiştir. PON enziminin

Q alleleline göre paraoksan hidroliz aktivitesi R allelinin kodlandığı bölgedeki proteininden sekiz kat daha yüksektir (Azarsız ve Sönmez, 2000). Ayrıca PON, yükseltgenmiş HDL ve LDL'nin metabolize edilmesinde Q formu R formundan daha etkili olmuştur (Avıram ve ark., 2000). Serum protein derişimlerini bu genetik polimorfizm de etkilemektedir. Homozigot Q bireylere göre homozigot R bireyler daha yüksek enzim derişimlerine sahiptir (Mackness ve ark., 1996). Farklı popölasyonlardaki polimorfik dağılım, bireyler arasında tür içi çeşitliliğe neden olmaktadır (Aynacıoğlu ve ark., 1999). Kalitatif ve kantitatif olarak PON allozimlerinin farklı olduklarının keşfiyle fenotipleme metodları geliştirilmiştir. 1983'te Eckerson tarafından ilk kez iki izoenzimin tuz ve pH'a farklı cevaplarını temel alarak iki fenotip tanımlanmıştır (Eckerson ve ark., 1983). Paraoksana karşı homozigot R allozim (RR), tuz (NaCl) varlığında daha yüksek enzim aktivitesi göstermektedir (Brophy ve ark., 2001; James ve Deakin, 2004). Paraoksonaz enzimi gen polimorfizmleri Şekil 5'te verilmiştir.



Şekil 5. Paraoksonaz enzimi gen polimorfizmleri (Azarsız ve Sönmez, 2000)

PON'un kodlanma bölgesinde PONQ/R192 ve M/L55 polimorfizmleri bulunmaktadır. Bu polimorfizmlerin yanısıra promoter bölgesinde de en az beş adet daha belirlenmiştir. Bunlar -107/-108 (C/T), -126 (C/G), -160/-162 (A/G), -824/-832 (A/G) ve -907/-909 (C/G) promoter bölgelerinde bulunmaktadır (Şekil 5.) (Brophy ve ark., 2001;

James ve Deakin, 2004). PON genindeki promoter polimorfizmlerinin, enzimlerin serum düzeyleri ve gen ekspresyonu üzerinde güçlü bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur (Leviev ve James, 2000; Liang ve ark.,2003). Hep G2 hücrelerindeki lusiferaz geninde yapılan çalışmalarda; promoter içersindeki GACC polimorfizmleri -909, -832, -162, ve -108 pozisyonlarında CG GT'ye göre iki kat daha aktiftir (Leviev ve James, 2000). -107T, -824G ve -907G polimorfizmleri en yüksek derişim ve aktivite gösteren polimorfizmlerdir ve -107T polimorfizmi, PON gen ekspresyonu üzerinde dominant etkiye sahiptir (Leviev, 2000; Liang ve ark., 2003). Promoter aktivitesi içersindeki bu varyasyonlar, serum PON derişimi ve aktivitesi içersindeki anlamlı farklılıklarla ilişki halindedir (Leviev ve James, 2000). Aynı zamanda promoter polimorfizmleri, PON 14 geninin 3 okunmayan bölgesinde ortaya çıkarılmıştır ancak bunların önemi tam olarak bilinmemektedir (Bropy ve ark., 2001). İki popülasyonun haplotip analizi göstermiştir ki C (108) T polimorfizminin serum PON varyasyonunda %23-24 oranında esas katılımcıdır. Ayrıca, az da olsa A (-162) G polimorfizmi de %1,1 oranında etki etmektedir (Bropy ve ark., 2001; Deakin ve ark., 2003).

2.1.4. Paraoksonaz Sentezlenmesi ve Salgılanması

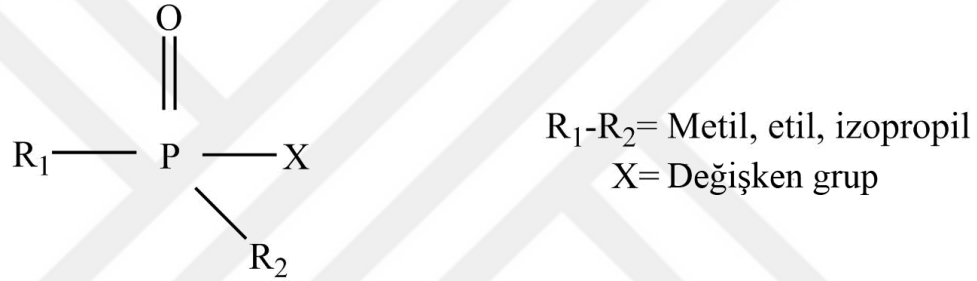
Serumdaki PON seviyesini belirleyen en temel faktör karaciğer fonksiyonlarıdır ve PON sentezi karaciğer tarafından gerçekleşmektedir. Serumdaki PON aktivitesi kişiden kişiye farklılıklar gösterebilmektedir (Blatter ve ark., 1994). Bu farklılığın sebebi enzim aktivitesini ve peptit derişimlerini etkileyen PON geninin kodlanma ve promotor bölgesinde çok fazla oranda polimorfizm göstermesi olmuştur. PON'un en önemli polimorfizmi serumdaki aktivitesini ve derişimini belirleyen promotor aktivitesi üzerinde -107 pozisyonundadır (Deakin ve ark., 2003). Karaciğer hücrelerindeki kolesterol dengesi, PON sentezinde önemli olan bir diğer faktördür. Herhangi bir hastalık durumu karaciğerden PON'un sentezlenmesini de etkilemektedir (Feingold ve ark., 1998; Cabana ve ark., 2003).

PON'nun serumda HDL'ye ya da karaciğerde mikrozomlara bağlanabilmesi için karaciğerden sentezlendikten sonra, sentez sırasında N-terminal hidrofobik bölgesi olması gerekmektedir. Bağlanmada ve salgılanmada N-terminal hidrofobik bölgesi önemli bir role sahiptir (Hassett ve ark., 1991). Yapılan çalışmalarda insan hepatosit hücresi ve hamster ovaryum hücresine transfer edilen PON'nun, hücre zarının dış yüzeyine sentezlendikten sonra bağlandığı gösterilmiştir (Deakin ve ark., 2002).

Karaciğerde PON'nun sentezlenmesinden sonra ilk olarak mikrozomlara, sonrasında ise hücrenin dış yüzeyine bağlandığı düşünülmektedir (Kuo ve La Du, 1998). Hücre zarının dış yüzeyinden salınan PON'nun HDL'ye bağlanması tesadüf değildir. Fosfolipit kompleksi HDL'ye bağlanmada önemli rol oynamaktadır. HDL'deki fosfolipit içeriği PON'un hücreden salınması ve HDL'ye bağlanması için yeterli değildir (Sinan, 2005; Sorenson ve ark., 1999; Deakin ve ark., 2002).

2.1.5. Paraoksonazın Fonksiyonel Önemi

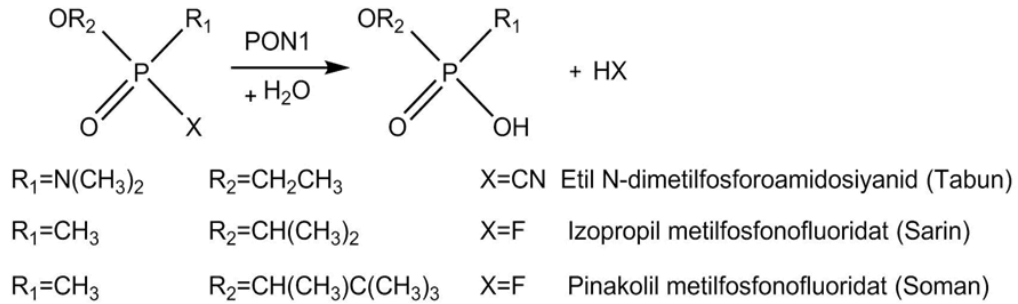
Paraoksonaz enziminin en iyi bilinen koruyucu fonksiyonu aromatik karboksilik asit esterleri, OP nörotoksinleri ve insektisitleri hidroliz edebilme yeteneğidir (Mackness ve ark., 1996). Organofosfat bileşiği genel formülü Şekil 6'da verilmiştir.



Şekil 6. Organofosfat bileşiği genel formülü (Hughes ve Courage, 2002)

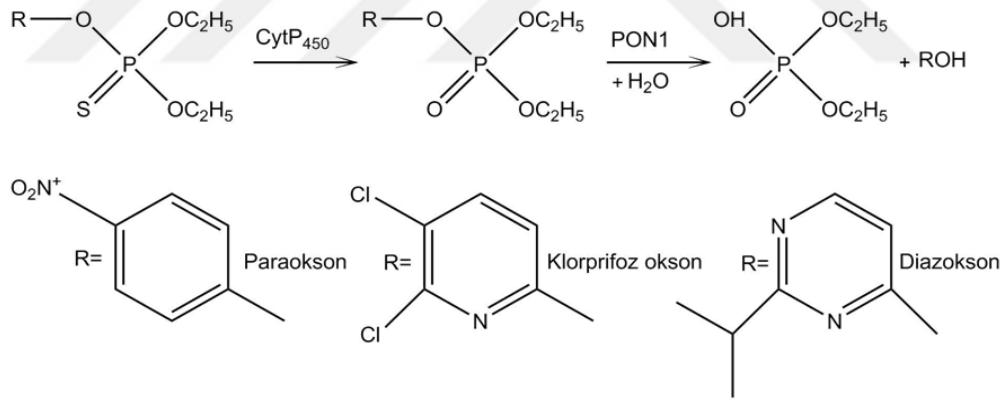
Organofosfat bileşikleri, tarımda pestisit olarak ürün verimini artırma ve veteriner ilaçları yapımında kullanılan fosforik asitlerin triesterleridir. OP'ların etki mekanizması sinir sistemi içersindeki asetilkolinesteraz (AChE) inhibisyonu ile ilişkilidir. Asetilkolinesteraz merkezi, somatik ve parasempatik sinir sistemindeki asetilkolinleri ve önemli nörotransmitterleri hidroliz eden bir enzimdir. Asetil kolinleri yıkan kolinesterazlar paraoksonda potent inhibitörüdür ve ardışık olarak nöronlarla uyarılması sinaptik bileşkelerde asetilkolin birikimine yol açmaktadır. Memelilerde karaciğerdeki detoksifikasyondan kaçan herhangi bir okson, OP etki alanına girmeden önce kanda serum PON enzimiyle hidroliz edilebilmektedir. Bu enzimin inhibisyonu ile OP zehirlenmeleri ve sinir sisteminde bozukluklar meydana gelir (Lucio ve ark., 2005). OP, tarımdaki faydalarının yanı sıra insanların hayatını önemli derecede tehdit eden toksik kimyasallar arasında yer alır. PON enzimi savunma sistemi oluşturarak OP'ların zararlı etkilerini ortadan kaldırmaktadır. Soman, sarin ve tabun gibi organofosfat sinir

gazlarını hidroliz ederek bunları daha az zararlı bileşiklere dönüşmesini sağlamaktadır (Hughes ve Courage, 2002). Sinir gazlarının hidrolizi Şekil 7’de verilmiştir.



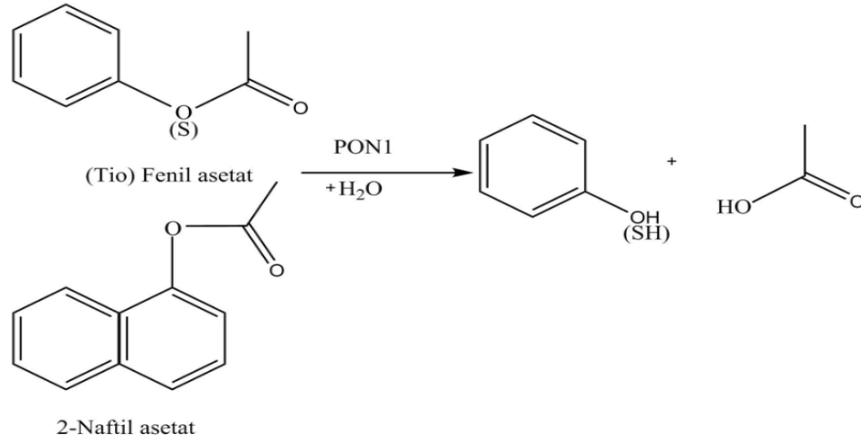
Şekil 7. Sinir gazlarının hidrolizi (Draganov ve La Du, 2004)

Klorpirifos, parationve diazinon gibi çok fazla sayıda insektisit zehirli okson metabolitlerini hidrolizleyebilen, insan serum PON enzimidir (La Du, 1992; Costa ve ark., 2002). PON akut seviyede nörotoksik olarak bilinen OP pestisidlerin zehirli okson türevlerini metabolize edebilmektedir (La Du ve ark., 1999). Organofosforus insektisitlerin detoksifikasyonu Şekil 8’de verilmiştir.



Şekil 8. Organofosforus insektisitlerin detoksifikasyonu (Draganov ve La Du, 2004)

Fenilasetat gibi ester substratlarını da hidrolizleyebilen PON enzimi bunun yanısıra PON enzimi sınıflandırılmada yer alır ve Aesteraz grubunda bulunmaktadır (Sinan, 2005). Aromatik esterlerin hidrolizi Şekil 9’de verilmiştir.



Şekil 9. Aromatik esterlerin hidrolizi (Draganov ve La Du, 2004)

HDL'nin LDL'yi oksidasyona karşı koruyucu etkisi ile yani antioksidan özelliği ile A ve E vitaminlerinden daha etkilidir (Rousselot ve ark., 1999; Mackness ve ark., 1991). LDL oksidasyonunun önlenmesinde PON, LDL oksidasyonu üzerinde HDL'nin koruyucu etkisinden sorumlu HDL ana bileşenidir. HDL, antioksidant ve antiemflamatur özelliklere sahiptir ve LDL oksidasyonunu buna bağlı olarak da arterosklerozisi geciktirir. Sahip olduğu laktonaz aktivitesi ile PON, arterosklerozise karşı koruyuculuğunu göstermektedir. Enzim 4 tane atomdan 7 tane atoma kadar değişen lakton halkasını içine alarak en az 30 tür laktonu hidrolizleyebilmektedir (Jakubowski, 2000). PON enzimi içerisinde bazı lakton ve siklik karbonatları bulunduran ilaçları ve ilaçların ön maddelerini de hidroliz edebilmektedir. Örneğin, siklik karbonat olan prulifloksasini aktif kinolon antibiyotiği NM394'e hidroliz ederek diüretik bir ilaç olan 3-hidroksimetilglutaril-KoA ve spironolakton redüktaz inhibitörleri olan lovastatin, simvastatin ve mevastatin PON enzimi tarafından hidrolizlenir. Söz konusu enzimin statinaz aktivitesi olarak tanımlanmasının nedeni önceleri yapılan çalışmalarda hidroksimetil glutaril-KoA redüktaz inhibitörlerinin hidroliz edilmesinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca, istenmeyen sistemik etkilerin metabolize edilmesinde PON glukokortikoid δ -laktonları da rol oynamaktadır (Draganov ve La Du, 2004).

2.2. Oksidan ve Antioksidan

Oksijen insan yaşamı için vazgeçilmezdir. Bazı reaktif oksijen türleri normal metabolizma sırasında üretilmiş olsada insan vücudun yüksek derecede zarar verme ihtimaline sahiptir (Diplock, 1998). Reaktif oksijen türlerinin birçoğunu da serbest radikaller oluşturur (Nawar, 1996). Stabil olmayan dış atomik orbitallerinde bir ya da

daha fazla çift oluşturmamış elektron içeren serbest radikaller, yüksek enerjili bileşiklerdir. Serbest radikaller büyük bir reaktiflik kazandıran bu çiftlenmemiş elektron; protein, lipid, DNA ve nükleotid koenzimler gibi birçok biyolojik maddeye zarar vermelerine sebep olmaktadır (Diplock, 1998). Canlı hücrelerde oksijen türevi serbest radikallerin oluşmasında; oksijen metabolizması, çevre kirleticileri, radyasyon, pestisitler, farklı tıbbi tedavi yöntemleri ve kontamine sular etkilidir. Bu radikallerin önde gelenleri peroksi ($\text{ROO}\cdot$), tekli oksijen ($^1\text{O}_2$), alkoksi ($\text{RO}\cdot$), süperoksit anyonu ($\cdot\text{O}^{2-}$) ve hidroksi ($\cdot\text{OH}$) radikalleridir (Kaur ve Kapoor, 2001). Vücuttaki farklı doğal savunma sistemleri reaktif oksijen türlerinin zararlarına karşılık serbest radikalleri kontrol altında tutmaktadır. Farklı hücrelerde ve farklı serbest radikaller üzerinde bu doğal savunma sistemleri rol oynadıklarından dolayı birbirlerini tamamlayıcı nitelikte olmaktadır (Diplock, 1998). Tablo 1’de oksidan faktörler ve antioksidan savunma sistemleri arasındaki denge gösterilmektedir.

Tablo 1. Oksidan kaynakları ve antioksidan savunma sistemleri (Diplock, 1998)

Oksidan	Antioksidan Savunma
Karsinojenler	E vitamini
Ateşli hastalıklar	C vitamini
Sigara dumanı	Glutatiyon Ubikinon
Egzersiz	Selenyum
Çevre	Süperoksit dismutaz
İskemi	Katalaz
Kirleticiler	Glutatiyon peroksidaz
Radyasyon	Ürik asit

Antioksidan, serbest radikallerin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarları azaltmak için etki gösteren moleküllere denir. Biyolojik sistemler çok fazla antioksidan savunma sistemleri geliştirmiştir. Canlı hücrelerinde bulunan DNA, lipid, karbonhidrat ve protein gibi okside olma ihtimali olan maddelerin oksidasyonunu engelleyen ya da geciktirebilen maddelere antioksidan, gerçekleşen olaya da antioksidan savunma denir. Güçlü savunma sistemlerinin varlığı ile bütün hücreler oksidatif strese karşı savaşmaktadırlar. Bu savunma sistemleri serbest radikal tutucuları ve bazı enzimleri meydana getirmektedir ve savunma sisteminde ilk olarak enzim sistemleri etkili olmaktadır. Ömürleri çok kısa olmasına rağmen içerdikleri paylaşılmamış elektronlar sebebiyle serbest radikaller protein, nükleik asitler, lipid ve karbonhidrat gibi

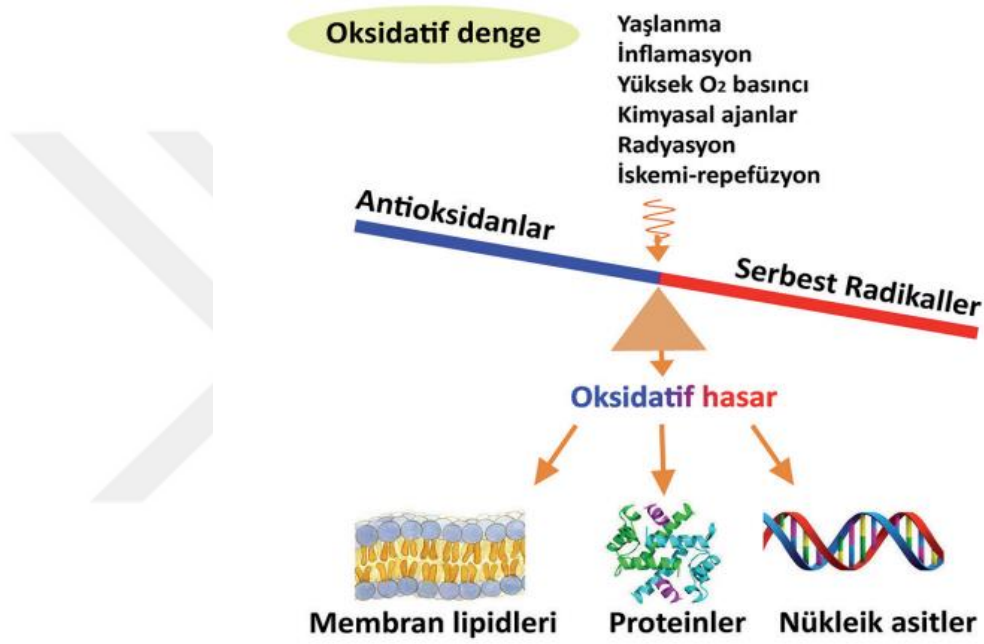
makromoleküllerle etkileşmektedir. Serbest radikaller hücre yapı ve organellerinde ve fonksiyonlarında önemli hasarlara yol açabilmektedir (Akkuş, 1995; Aydılek ve Aksakal, 2003; Yıldırım, 2003).

Fenoller, aromatik aminler ve en yaygın olan α - tokoferoller zincir kırıcı antioksidanlar arasında yer alırlar. Balıklarda hücre içi enzim yapısına sahip antioksidanlar glutatyon redüktaz (GR), glutatyon-S-transferaz, glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz (KAT) ve süperoksit dismutaz (SOD) enzimleridir (Heiske, 2005; Filho, 2007).

Antioksidan bir enzim olan süperoksit dismutaz, süperoksit serbest radikalının hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü gerçekleştirir. SOD'un fizyolojik fonksiyonu, oksijeni metabolize eden hücreleri ve süperoksit serbest radikalının lipid peroksidasyonu gibi zararlı etkilere karşı korumaktır. SOD'un insanda iki izomer tipi bulunmaktadır. Mitokondride bulunan mangan (Mn) SOD, tetramerik yapıdadır ve siyanitle inhibe olmamaktadır. Sitozilde bulunan bakır ve çinko (Cu ve Zn) SOD ise Cu ve Zn içerir, dimerik yapıda olup siyanitle inhibe edilebilmektedir. Genellikle hücrede en çok bulunan izomer sitozolik yapıda olan Cu-Zn SOD'dur. Glutatyon peroksidaz, hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir. Organik hidroperoksitlerin ve hidrojen peroksitin uzaklaştırılmasından sorumludur. GPx ve GR sitoplazma, mitokondri ve nükleusta bulunan enzimlerdir. GPx, indirgenmiş glutatyonu hidrojen donörü olarak kullanarak hidrojen peroksiti suya metabolize eder. Glukoz 6 fosfat dehidrogenaz ile oluşturulan NADPH kofaktörünü kullanarak GR glutatyon disülfiti glutatyona geri çevirir. Katalaz, hidrojen peroksidi oksijen ve suya parçalayarak etki gösterir (Gutteridge, 1995). Katalaz birçok dokuda peroksizomlarda bulunan ve demir içeren bir enzimdir. Katalaz eritrositlerde yüksek oranda, kalp kası ve endotelde ise düşük oranda bulunur (Şimşek, 1999).

Hücre içi enzim olmayan lipid faz antioksidanlar; β -karoten (vitamin A'nın ön maddesi) ve vitamin E (α - tokoferol formu)'dir. Hücre içi sıvı faz nonenzim antioksidanları; albumin, transferrin, vitamin C (askorbik asit), sistein, bilirubin, flavanoidler, urat, glutatyondur (Quiles ve ark., 2002). Askorbik asit en çok çalışılan güçlü antioksidanlardan biridir. Askorbik asit; süperoksit, hidroksil radikali ve singlet oksijeni uzaklaştırarak ve askorbat peroksidaz reaksiyonu ile hidrojen peroksiti suya indirgeyerek etki gösterir (Blokhina ve ark., 2003). Antioksidan korumasındaki azalış

reaktif oksijen türlerinde (ROS) artışa sebep olur. Bunun sonucunda serbest radikaller birikir. Bunların birikimi de anahtar organik substratların (çoklu doymamış yağ asitleri, proteinler ve DNA) oksitlenmesiyle zehirli etki gösterir. Bu süreç, oksidatif stres olarak tanımlanır. Vücuttaki normal fonksiyonlara zarar verir. Kanser, ateroskleroz, kistik fibrozis, alzheimer ve parkinson gibi geniş bir spektrumda patolojik sonuçlar doğurur (Levy ve ark., 2007). Oksidatif denge Şekil 10'da verilmiştir.



Şekil 10. Oksidatif denge (Özcan ve ark., 2015)

Reaktif oksijen türleri hücrel defansı etkileyerek DNA zincir kırıklarına, zar iyon transport sisteminde, enzimlerde, proteinlerde lipidlerde yeniden düzenlenmelere ve hasara yol açabilir. Prooksidan ve antioksidan dengesindeki bozukluk nedeniyle artmış oksidatif stres hipertansiyon, ateroskleroz, diyabet ve kronik böbrek hastalıkları gibi çeşitli patolojilerle ilişkilidir. Yeterli antioksidan miktarı aşırı ROS üretiminin etkilerini ortadan kaldırır. PON enzimi önceleri sadece OP bileşiklerini hidrolize eden bir enzim olarak bilinmekteyken daha sonraki yıllarda antioksidan ve antiinflamatuvar etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Precourt ve ark., 2009). Oksidatif hasar ile uyarılmış zararı önlemek için antioksidanlar serbest radikalleri nötralize ederek önemli rol oynarlar. Enzimatik olmayan oksidanlar (α tokoferol, c vitamini ve retinoit) oksijen ve peroksitleri

uzaklaştırmaya izin veren kimyasal bir yapıya sahiplerdir. İnsanlar, süperoksitlerin oksijen ve hidrojen peroksitlere dönüşümünü sağlayan ve organik moleküllere göre daha az reaktif olan hidrojen peroksitin su ve oksijene dismutasyonuna izin veren süperoksit dismutaz, hem grubu içeren katalaz ve hidrojen peroksit redüksiyonunun katalizi ile aktif oksijenleri detoksifiye eden glutatyon peroksidaz gibi endojen enzimatik antioksidanlara sahiptir (Levy ve ark., 2007).

Antioksidan maddeler organizmada meydana gelen anabolik ve katabolik olayları ve tüm metabolizmayı etkilemektedir (McCarthy ve ark., 2001). Serbest radikalleri nötralize eden antioksidan vitaminler, organizmayı koruyan önemli maddelerdir. Antioksidan savunma sistemi organizmada tek bir antioksidan madde ya da enzimle olabileceği gibi birçok antioksidan madde ve enzimin bir araya gelmesiyle de oluşabilmektedir (Brauner, 1999). Son zamanlarda yapılan araştırmalar, antioksidan katılan yemlerin canlı gelişimi için birçok yararının olduğunu tespit etmişlerdir (Choi ve ark., 2004).

2.3. Palamut Balığı (*Sarda sarda*)

Palamut balığı (*Sarda sarda*) Scombridae familyasının üyesi olan epipelajik bir türdür. Akdeniz, Karadeniz ve Atlantik kıyılarında sürüler halinde dağılım göstermektedir (Collette ve Nauen, 1983). Ekonomik açıdan ülkemizde önemli olan bu tür Çanakkale ve İstanbul Boğazları aracılığıyla Ege Denizi ve Karadeniz arasında üreme ve beslenme amaçlı göçerler (Nümann, 1955). Karadeniz ve Marmara'nın en yaygın türü palamut (*S. sarda*) balığıdır. Protein ihtiyacımızın karşılanmasında önemli bir yeri olan bahar aylarında beslenmek ve gonadlarını olgunlaştırarak yumurtlamak amacıyla Karadeniz'e giriş yapar. Obur ve yırtıcı olan bu balıklar ve yavruları her iki yönlü göçler sırasında bol miktarda av verirler. Sürüler halindeki hamsi, kolyoz, uskumru, istavrit, sardalya gibi balıklarla beslenir (Polat ve Ergün, 2008). Boyları 1 m, ağırlıkları 12 kg kadar olabilmektedir. Genellikle büyük sürüler halinde çok uzun mesafelere göç ederler. Çok hızlı şekilde yüzerler. Vücutları tipik olarak fusiform şekildedir. Vücutları çıplaktır ve iki yaşından sonra eşeyssel olgunluğa erişir. İlkbaharda Karadeniz'e yumurta bırakırlar ve ağustos sonunda tekrar Marmara Denizine döner. Yumurta verimi 450.000-1.000.000 civarında olmaktadır (Kuru, 1994). Araştırmada kullanılan Palamut (*S. sarda*) balığının genel görünüşü Şekil 11'de verilmiştir.



Şekil 11. Palamut (*Sarda sarda*) balığı genel görünüşü

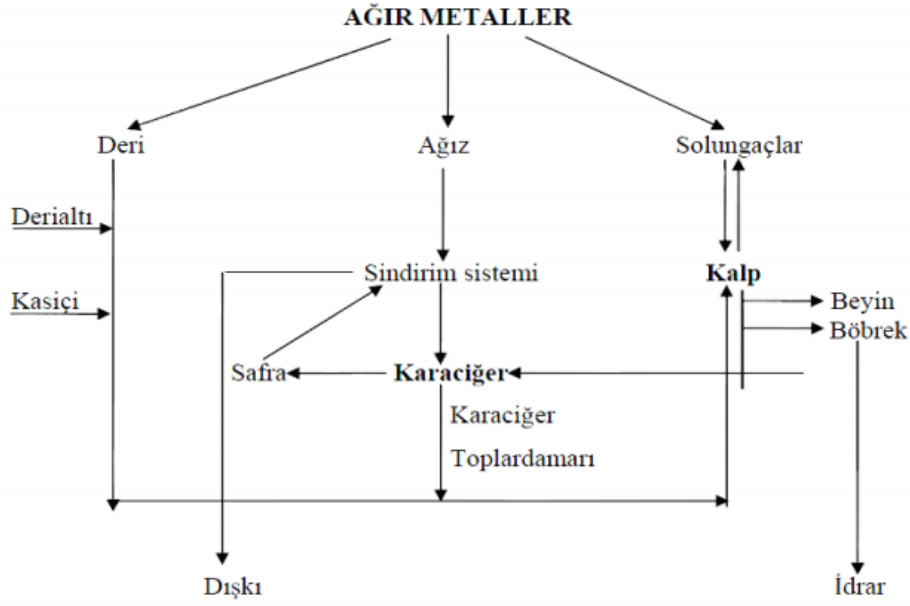
2.4. Çevre Kirliliği ve Ağır Metaller

Doğaya zarar veren tarımsal uygulamalar, orman alanlarına zarar verilmesi, madencilik sektörünün yarattığı kirlilik ve toprağın erozyonu sucul ortamların kirlenmesine sebep olmaktadır. Su ekosistemine zarar veren bu kirlenmeler, su kalitesini bozmakta ve suyun sürdürülebilirliğini de olumsuz etkilemektedir. Bu kirleticiler arasında kanalizasyondan dışarı atılan organik maddeler, tarımsal gübreler ve tarım ilaçları, hava kirliliği sonucu oluşan asit yağmurları, madenciliğin ve sanayi uygulamalarının yarattığı zararlar bulunmaktadır. Bu kirleticiler sadece suyun kirlenmesine sebep olmamakla beraber su döngüsünde etkilemektedir. Aynı zamanda suyun kirlenmesiyle suda yaşayan canlılar zarar görmekte, sucul ortamlardan elde edilen su ürünlerinin azalması gibi sorunlar oluşmaktadır. Kirli suların kullanılması, insan sağlığında da tehdit oluşturmaktadır (Aküzüm ve ark, 2010).

Sucul ortamlarda bulunan ağır metaller, bölgenin jeolojik yapısına bağlı olarak farklı oranlarda bulunabilmektedir. Bununla birlikte yeraltı sularının çıkarılması, sanayi uygulamaları, tarımsal aktiviteler ve madencilik gibi insanın meydana getirdiği etkiler bu derişimi daha da artırmaktadır. Suda yaşayan canlılar ise ağır metallerin sudaki yoğunluğuna oranla vücutlarında, daha yüksek ölçülerde biriktirmektedirler. Besin piramidine birikim yoluyla giren metaller, besin zincirinin en alt basamağından en üst basamağına kadar birikip zehirli sonuçlar doğururlar (Tekeli ve ark., 2016). Bu ağır metallerin balıklardaki derişimi, balığın dokuları ve organları arasında farklı olduğu kadar balık türünün beslenme alışkanlığı ile de ilgilidir (Kır ve Tumantozlu, 2012). Ağır metallerin alım ve mekanizmasında, sucul ortamdaki ağır metallerin balıklar tarafından vücutlarına alınması en fazla sindirim sistemi, solungaçlar ve deri ile olmaktadır. Bunun

sebebi solungaç lamelleri ile ağır metal içeren solunum suyunun en geniş yüzey alanının etkileşmesidir. Çevresel kirlenmeyle solungaç epitelinde fizyolojik tepki olarak görülebilecek organ ve dokuda mukoz hücrelerin fazla aktif olması, ihtiyacını karşılamak amacıyla bölünebilme yeteneği olan hücre sayısındaki artma ve primer lamellerin ayrılması gibi defektler biyolojik cevapların sadece bazılarını oluşturmaktadır (Kargın ve Erdem, 1991). Balık tarafından ağır metallerin bünyelerine alınması, suyun ve sedimentin sahip olduğu fiziksel ve kimyasal özelliklere bağlıdır. Vücut yüzeyinden absorpsiyon oldukça azdır ve en fazla ağır metal emilimi solungaçlarla gerçekleşmektedir (Amundsen ve ark., 1997). Deriden emilim de ise deri genellikle zehirli maddelerle daha çok temas halindedir. Vücut yüzeyinin ağır metallerle karşı fazla geçirgen olmaması balıkların daha az seviyede zehirlenmelerini sağlamaktadır. Bunun sebebi epidermik bir bariyer olarak görev yaparak birçok kimyasal maddenin deriden geçişini önleyen, deride epidermis bölgesinde bulunan stratum corneum (üst derinin sürekli aşınan, boynuzlaşmış en üst katmanı) tabakasının varlığıdır (Carpene ve Vasak, 1989; Carpene ve ark., 1990). Bağırsaklardan ve solungaçlardan kana transfer edilerek emilen iz elementler vücudun diğer kısımlarına dağıtılır (Hogstrand ve Hanx, 1991).

İnsanlarda önemli bir protein kaynağı olarak tüketilen ve biyolojik döngünün bir halkasını oluşturan balıkların bünyelerinde giderek artan metal birikimi balıklarda zehirli etki oluşturmaktadır ve dolaylı yoldan insan sağlığını da olumsuz etkilemektedir (Dural ve ark., 2007). Çeşitli metabolik yollarla canlıların vücuduna giren ağır metallerin, vücut dışına atılabilecekleri arasından fizyolojik öneme sahip olanları vücutta depolanır. Eğer bu metaller zehirli etkiye sahipse enzimlerin yapısını bozabilmektedir (Yazkan ve ark., 2004). Zehirli maddelerin eritrositlerin membran yapılarını, iyon geçirgenliğini ve hücre metabolizmasını doğrudan ya da dolaylı olarak bozduğu da tespit edilmiştir. Araştırmacılar, kirliliği saptamada kullanılabilecek herhangi bir fizyolojik cevap için, araştırılan canlının üreme döneminin göz önüne alınması, bu çalışmaların mevsimsel dönemler halinde gerçekleştirilmesi gerektiğini önermektedir (Nikinma, 1992; Widdows, 1985). Ağır metallerin vücuda alımı ve dağılımı Şekil 12’de verilmiştir.



Şekil 12. Ağır metallerin vücuda alınması ve dağılımı (Dökmeci, 1988)

2.4.1. Demir (Fe)

Yer kabuğunda yaygın olarak bulunan Fe elementinin yoğunluğu $7,874 \text{ g/cm}^3$ tür. Latince karşılığı ferrum olan Fe elementinin atom numarası 26 ve atom kütlesi $55,85 \text{ g/mol}$ 'dür. Fe'nin kaynama noktası $2750 \text{ }^\circ\text{C}$ 'dir ve $1535 \text{ }^\circ\text{C}$ sıcaklıkta erimeye başlar (Tuncel ve ark., 2017). Elektron alıp verme özelliği göstermesi sebebi ile Fe, metabolizmada RNA, DNA, protein sentezinde, enerji üretimi ve oksijen taşınması görev almaktadır. Birçok enzimin yapısına katılıp hücre fonksiyonunun gerçekleşmesinde etkin rol alan Fe metali, canlı organizmalar için metabolik olaylarda temel fonksiyonlara sahip önemli bir elementtir (Uysal, 2007). Fe hemoglobin, katalaz, peroksidaz, myoglobin ve sitokrom gibi demir-protein bileşiklerinin çeşitli oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonlarının meydana gelmesinde görev alır (Çakır, 2009). Fe, çeşitli hücre fonksiyonları için gerekli bir metaldir. Fe alımı, taşınması, depolanması ve kullanımı arasında sabit bir dengenin oluşması için Fe homeostazisini korumak gerekmektedir (Nadadur ve ark, 2008). Vücuda yetersiz Fe alımı oksijenin hücrelere iletilmesini güçleştirmekte ve oksijene bağlı olarak enerji metabolizmasında aksamalar meydana getirmektedir (Özkan, 2009; Tanıdır ve ark, 2012).

Fe, doğada elemental olarak nadir bulunurken daha çok oksitler şeklinde bulunur. Çünkü hidroksitleri, karbonatları ve sülfürleri oluşturmak için demir iyonları Fe^{+2} ve Fe^{+3} ,

kükürt ve oksijen içeren bileşiklerle kolayca birleşerek oksitlenmektedir (Knepper, 1981). Atmosferdeki Fe oranı ise şehir içi bölgelerde yaklaşık $1,3 \mu\text{g}/\text{m}^3$ iken şehir dışı alanlarda yaklaşık bu oran $50\text{-}90 \mu\text{g}/\text{m}^3$ seviyelerinde olmaktadır (NRC, 1979). Nehirlerin Fe derişimleri ise yaklaşık olarak $0,7 \text{ mg}/\text{L}$ olmaktadır. Fe derişimi içme suyunda normalde $0,3 \text{ mg}/\text{L}$ 'den düşük seviyededir. Fakat çökeltme ajanı olarak su arıtma tesislerinde çeşitli Fe tuzlarının kullanılması, su iletimi için kullanılan boruların galvanizli demir, dökme demir ve çelikten yapılması içme suyundaki bu düzeyi daha da yükseltebilmektedir (WHO, 2003).

Toprakta doğal olarak bulunan Fe; nehirler, akarsuluryoluyla deniz ve göllere taşınmaktadır (Tuncay, 2007). Doğal ve insan aktiviteleri sonucu sucul ortama giren Fekirli olmayan açık denizlerdeki derişimi $2,8$ ile $2,9 \text{ ng}/\text{L}$ seviyeler arasında olmaktadır. Suda asılı sediment partikülleri ise $50\ 000 \text{ ppm}$ 'e kadar Fe içerebilmektedirler. Bu durum da suyu filtre eden ve sediment yiyen canlıların yüksek düzeyde Fe biriktirmelerine sebep olmaktadır. Fe'nin zehirli etkisi deniz organizmaları üzerinde oldukça yüksektir. Örneğin, balıklarda en yüksek Fe derişimi kan hücrelerinde 564 ppm ve en düşük olarak ise ette 6 ppm bulunmuştur. Ülkemizdeki balıklarda ise, Fe derişimi 50 ppm 'in altında bulunmuştur (Topcuoğlu ve ark., 1995). Yapılan araştırmalarda da Fe metalinin sediment ve balık dokularında en çok biriktiğini bildirilmiştir (Mendil ve Uluözü, 2007). Su ortamındaki kollaidal Fe çok yoğun olduğunda solungaçlarda birikerek balıkların ölümüne sebep olabilir (Tekin-Özan ve ark., 2004).

Fe hayvanlarda fizyolojik devinimler için elzem olmasına rağmen canlı organizmalarda optimum koşullardan ileri seviyede yüksek derişim durumlarında zararlı olabilmektedir (Davies, 1991; Misra ve Mani, 1992). $1,0 \text{ mg}/\text{L}$ 'den fazla olan Fe derişiminin yavru balıkların beslenmesini etkilediği, uzun süreli strese ve büyümenin azalmasına neden olduğu gözlemlendi (Smith ve ark, 1973). Ayrıca demir maruziyetinden sonra mrigal (*Chirrhinus mrigala*), catla (*Catla catla*) ve roho labeo (*Labeo rohita*) larvalarında davranışsal değişikliklerin, beslenme hızında düşüşün ve büyümenin azaldığını öne sürmüşlerdir. Bunun yanı sıra bu tür derişimlerin solungaçlardaki Fe nedeniyle gerçekleşeceğini ve bu sebeple de osmogülasyon ve solunumun bozulduğunu ileri sürmüştür (Debnath ve ark., 2012). Ayrıca balıkların dokularında fazla miktarda Fe birikmesiyle birlikte besin olarak tüketilen balıklar, insan sağlığını olumsuz olarak etkileyebilmektedir (Tekin-Özan ve ark., 2004).

2.4.2. Mangan (Mn)

Doğal olarak su, toprak, kaya ve gıdalarda bulunan Mn, canlıların ihtiyaç duyduğu önemli bir elementtir (Santamaria, 2008). Periyodik tablonun 4. periyot 7B grubunda yer alan Mn elementinin atom numarası 25'tir. Yer kabuğunda en çok bulunan on ikinci elementtir. Atom kütlesi 54,93 g/mol olan Mn elementi gümüş metalik renge sahiptir ve sıvı haldeki yoğunluğu 5,95 g/cm³ tür (De Vos ve ark., 2006).

Organizmada çok düşük düzeylerde bulunan Mn metabolizmada çeşitli işlevlerin yerine getirilmesi bakımından gerekli olan bir elementtir. Piruvat karboksilaz ve izositrat glukoneojenik enzimlerdir. Mn dehidrojenazın aktivatörü ve mitokondriyal zarların süperoksit dismutaz yoluyla korunmasında önemli rol oynamaktadır. Glikosil transferazı aktive eden Mn mukopolisakkarit sentezinde de görev yapar (Takeda, 2003). Fe kemik ve bağ dokusunun büyümesinde, hücresel enerjinin düzenlenmesinde ve kanın pıhtılaşmasında önemli rol oynamaktadır. Aynı zamanda Fe nörotransmitter sentezi ve metabolizmasında çeşitli enzimler için kofaktör olarak görev alır (Erikson ve Aschner, 2003). İçme sularında Mn bulunması kalp ve damar hastalıklarında ölüme engel olmak için önerilmektedir (Gürbüz, 2005). Canlılarda bulunan enzimlerin yapısal bütünlüğü bakımından Mn gerekli bir elementtir. Mn eksikliği kemiklerde bükülme, kısırılık ve boy kısalığına sebep olmaktadır (Yolaçan, 2005). Yüksek düzeyde mangana maruz kalmak oral, parenteral veya inhalasyon yoluyla doku seviyelerinde artışa ve sinirsel etkilere sebep olabilmektedir (Avila ve ark, 2013).

Mn doğada saf halde bulunmayan bir elementtir. Yapılan araştırmalar Mn minerallerinin genellikle oksitlerden ibaret olduğunu ortaya koymuştur. Bu oksitlerinde psilomelan, piroluzit, wad ve manganit olduğu ortaya konulmuştur. Mn genellikle kimya, metalürji ve batarya sanayisinde, çelik yapımında kullanılan yardımcı metallerin en önemlisidir (Ateşok, 1979).

Türkiye'de Mn kullanım alanları dünyadaki kullanım alanlarıyla paralellik göstermektedir. Kimya sanayinde kullanılan Mn değişik alanlarda ve miktarlarda olmak üzere; oto boyası, refrakter, çimento, suni gübre, cam, pil, seramik, ilaç, fotoğrafçılık, elektronik ve petrokimya endüstrisinde kullanılmaktadır (Gürbüz, 2005). Minerallerden geçmiş Mn elementine toprakta rastlanır. Toprak ya da tortul kütlelerdeki Mn atmosferik olayların etkisiyle çözünerek suya geçmektedir. Yüzeysel sularda bulunan Mn, genellikle göl ve barajların dip çökeltisi olan çamurların içinden indirgeyici ortamlarda, çamurdan suya geçer. Mn'nın sudaki miktarının artmasının zararı sanayi sularında hemen hemen Fe

etkisinin aynısıdır. Bu etki manganın sulara bazı bakterilerin miktarının artmasına neden olduğu gibi boruların tıkanmasına Fe daha fazla sebep olmaktadır. Yiyeceklerde Mn miktarı önemli oranda farklılık göstermektedir. Süt ürünlerinde Mn düşük derişimlerde bulunmaktadır. Etlerde 0–0,8 mg/kg, balıkta ise 0–0,1 mg/kg Mn bulunmaktadır. Ağır metaller, organizmalar için gerekli olsun ya da olmasın yüksek derişimlerde zehirli olabilmektedir (Ağcasulu, 2007). Yapılan bir araştırmada en yüksek Mn derişimi Erdemli istasyonundan elde edilen *M. barbatus* türünün kas dokularında tespit edilmiştir (Ersoysal ve ark., 2018).

Manganın Vantuz balığı üzerine etkileri için yapılan bir araştırmada, Mn ile tedavi edilen balıkların toplam eritrosit sayısını, hemoglobinin ve hemostiti azalttığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda Mn toksitesinin hematopoietik organların etkilenmesine neden olduğunu ve bu nedenle de genel kan dolaşımına uygun kırmızı kan hücrelerini serbest bırakamayacağını belirlemiştir (Sharma ve Langer, 2014).

2.4.3. Kobalt (Co)

Çeşitli kullanım alanları olan kobalt (Co), gri bir metaldir (Slack ve ark, 2017). Tunç Çağı'ndan bu yana genellikle cam ve seramiklere mavi bir renk vermek amacıyla kullanılmıştır. Co Georg Brandt tarafından 1735 yılında keşfedilmiştir. 4. Periyot 8B grubunda yer alan Co elementinin atom numarası 27'dir ve 58.93 g/mol atom kütlesine sahiptir (LANL, 2001). Kararlı olan tek izotopu ⁵⁹Co olan Co, doğal olarak oluşan bir metaldir ve 26 radyoaktif izotopu bulunmaktadır. Co'nun üç oksidasyon hali vardır ve bunlar: Co⁰, Co⁺² ve Co⁺³ dur. Suyu okside edebilen ve oksijeni serbest bırakabilen güçlü oksitleyici özellik gösteren bir ajandır. Co⁺², Co⁺³ e göre daha kararlı yapıya sahiptir. Oda sıcaklığında yoğunluğu 8.9 g/cm³ olan Co'nun erime noktası 1493 °C'dir (Kim ve ark, 2006). Yeryüzünde en az sıklıkla bulunan geçiş elementleri grubunda yer alan Co, ortalama 25 mg/ton'dur. Okyanus diplerindeki Mn yumruları (%0,25 Co) dışında, tahmini rezerv 5,7x10⁶ ton olduğu ileri sürülmektedir (Rether, 2002). Co metali denizde 0,1 µg/L miktarında ve başlıca Co⁺² iyonu şeklinde bulunmaktadır (Güven, 2005).

Co metali ve inorganik Co bileşikleri uçucu olmadıklarından dolayı partikül formda atmosfere salınmaktadırlar. Co derişimleri, havadaki Co kaynağına yakın bölgelerde 10 ng/m³ ü geçebilmektedir. En yüksek ortalama atmosferik Co metal derişimi 48 ng/m³ olarak Galler'deki nikel rafinerisinde ölçülmüştür (Carson ve Smith, 1981). Elemental Co, toz halinde alınarak akciğerlerde çözünür kana ve idrara karışmaktadır.

Bunun sonucu olarak da Co tozu partiküllerine uzun süre maruz kalındığında alerjik tepkiler oluşmaktadır (Kahvecioğlu ve ark, 2004; NTP, 2014). Vücutta B₁₂ vitaminin temel bileşeni olan Co, yaşam için esasansiyel bir element niteliğindedir (Pribilla, 1962). Co zehir etkisi farklı formlarına göre değişim göstermektedir. Örneğin; alüminyum-kobalt alaşımasının kanser riski bulunmazken tungsten-kobalt akciğer kanseri riski taşımaktadır (Kim ve ark, 2006).

Co derişimi fosil yakıtların tüketimi sonucu çevrede artmaktadır. Bu sebeple besinlerle insan metabolizmasına vücuduna Co alınması da anlamlılık içermektedir. Vücuda alınan Co düzeyinin havadan, toprak ile temastan ve içilen sudan anlamsız olduğu belirtilmiş, besinle alınan miktarın ise önemli olduğuna değinilmiştir. En yüksek Co derişimi makroalg türlerinde 8,7; midyede 5,4; deniz salyangozunda 1,5 iken balıkta 1,7 µg/g kuru ağırlıkta bulunmuştur (Güven, 2005). Suda çözünen Co bileşikleri oral yolla alındığında %75' i tekrar dışarı atılmaktadır. Geriye kalan Co ise akciğer, böbrek, kan, karaciğer, testisler ve bağırsaklarda toplanmaktadır (Rether, 2002). Besin piramidinde, dışarı atılamayan geçiş metallerin birikimi üreticilerden tüketicilere doğru gidildikçe artmaktadır. Canlılar belirli miktarda birikici etki göstermeye başlayan metalleri uzaklaştırmak isterler fakat alt sıralarındaki canlılarda biriken metaller, besin zinciriyle beraber üst sıradaki canlılara geçer ve zehirlenmeye sebep olurlar (Üşenmez, 1985). Co'ın çevresel derişimleri çoğu zaman birçok tatlı su teleostu için ölümcül seviyenin altındadır. Salmonidlerde, toksik dozların chinook somonu (*Oncorhynchus tshawytscha*) için 0,02 mg/L ve gökkuşağı alabalığı için 0,2 mg/L (*Oncorhynchus mykiss*) olarak rapor edilmiştir (Hansen ve ark., 1999). 96 saatlik LC50 değeri, gökkuşağı alabalığı için genel olarak 0,4-1,4 mg/L aralığında olduğu bildirilmiştir (Marr ve ark., 1998). Bunun yanı sıra bazı metabolik işlemler için düşük dozda Co gerekmektedir (Mohammed ve ark., 2014). Co'ın, yem veya suya kobalt klorid ya da kobalt nitrat ilave edildiğinde sazan balıklarında büyümeyi hızlandırdığı ve hemogloblin teşekkülünün arttığı belirtilmektedir (Akyurt, 1994).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Hayvan Materyali

Araştırmanın materyalini ortalama ağırlıkları 600-800 g arası boyu 40-45 cm olan 25 adet palamut (*S. sarda*) balığı oluşturmaktadır. Araştırmada palamut (*S. sarda*) balığının sezon mevsimi olan ekim ayında Samsun bölgesi denizinden alınıp soğuk zincir ile laboratuvar ortamına getirilen palamut balıklarının kas dokusu kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Araştırmada kullanılan kimyasal maddeler;

Paraoksan; ($C_{10}H_{14}NO_6P$); (Sigma)

Tris; ($C_4H_{11}NO_3$); (Sigma)

Demir II klorür (Fe_2Cl); (Merc)

Kobalt II klorür (Co_2Cl); (Merc)

Mangan II klorür (Mn_2Cl); (Merc)

Hidroklorik asit (HCl); (Sigma)

Total antioksidan kiti (Rel Assay Diagnostics)

Kalsiyum klorür ($CaCl_2$); (Merc)

Aseton; (C_3H_6O); (Merc)

Total oksidan kiti (Rel Assay Diagnostics).

3.1.3. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Araştırmada kullanılan alet ve cihazlar;

Homojenizatör (Bio-Gen PRO200),

-20 °C derin dondurucu (Nüve DF 290/490/590),

Distile su cihazı (Nüve NS 112),

pH metre (Mettler Toledo),

Hassas terazi (Explorer EP214C),

Soğutmalı santrifüj,

ELİSA cihazı (Tecan infinite F50) kullanıldı.

3.1.4. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

Araştırmada kullanılan çözeltiler aşağıda belirtildiği gibi hazırlandı.

HCl çözeltisi (0,1M): 10 mL'lik 1 M HCl çözeltisinin hacmi, distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

Tris çözeltisi (0,1M): 1,21 g tris, distile suda çözüldü ve hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

Tris-HCl tamponu (20 mM, pH: 8): 29 mL 0,1M HCl çözeltisi ile 50 mL 0,1M tris çözeltisi karıştırıldı, pH'sı 8'e ayarlandı ve pH'sı 8 ayarlanan karışımın hacmi distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

Çalışma ayıracı [kalsiyum klorür (2 mM)-paraokson (2 mM)]: 29,4 mg kalsiyum klorür ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), bir miktar tris-HCl tamponunda çözüldü, üzerine 1,5 mL asetonda çözünen, 44 µL paraokson eklenerek tris-HCl tamponu ile hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

Demir II Klorür (FeCl_2) çözeltisi: 0,001 M FeCl_2 çözeltisi hazırlamak için 0,019 g FeCl_2 alınarak distile su ile hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

Kobalt II Klorür (CoCl_2) çözeltisi: 0,001 M CoCl_2 çözeltisi hazırlamak için 0,0271 g CoCl_2 alınarak distile su ile hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

Mangan II Klorür (MnCl_2) çözeltisi: 0,001 M MnCl_2 çözeltisi hazırlamak için 0,0136 g MnCl_2 alınarak distile su ile hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

3.2. Metot

3.2.1. Doku Homejenizasyonu

Palamut (*S. sarda*) balığından alınan doku numuları 0,3 g tartılarak kuru santrifüj tüpüne alındıktan sonra üzerine 1,5 mL HCl-Tris tamponu eklendi ve homojenizatörde tamamen parçalanıncaya kadar homojenize edildi. Soğutmalı santrifüjde +4 °C'de ve 3000 rmp devirde 30 dk santrifüj edilerek süpernantların ayrılması sağlandı. Ayrılan süpernatantlar aynı gün içerisinde kullanıldı.

3.2.2. Geçiş Metallerinin Paraoksonaz Enzimi Üzerindeki Aktivite Tayini

Paraoksonaz enzim aktivite tayini için Gülcü ve Gürsu (2003), paraoksonaz enzim aktivite tayin metodu kullanılmıştır.

Demir II Klorür (FeCl_2) Bileşiğinin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Paraoksonaz enzim aktivite tayininde 50 µL Tris-HCl tamponu, 50 µL kalsiyum klorür+paraokson ve 50 µL enzim çözeltisi küvete ilave edilerek ELİSA'da 37 °C ve 405 nm absorbanstaki değeri 30 saniyede okundu. Daha sonra ölçümü yapılan küvetin üzerine farklı hacimlerde (10 µL, 20 µL, 30 µL, 40 µL ve 50 µL) 0,001 M FeCl_2 çözeltisi ilave

edildi ve son durumda enzim aktivitesinde meydana gelen değişim gözlemlendi. İnhibitörsüz ortamda tayin edilen enzim aktivitesi ise %100 aktivite olarak kullanıldı.

Kobalt II Klorür (CoCl₂) Bileşiminin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Paraoksonaz enzim aktivite tayininde 50 µL Tris-HCl tamponu, 50 µL kalsiyum klorür+paraokson ve 50 µL enzim çözeltisi küvete ilave edilerek ELİSA'da 37 °C ve 405 nm absorbanstaki değeri 30 saniyede okundu. Daha sonra ölçümü yapılan küvetin üzerine farklı hacimlerde (10 µL, 20 µL, 30 µL, 40 µL ve 50 µL) 0,001 M CoCl₂ çözeltisi ilave edildi ve son durumda enzim aktivitesinde meydana gelen değişim gözlemlendi. İnhibitörsüz ortamda tayin edilen enzim aktivitesi ise %100 aktivite olarak kullanıldı.

Mangan II Klorür (MnCl₂) Bileşiminin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Paraoksonaz enzim aktivite tayininde 50 µL Tris-HCl tamponu, 50 µL kalsiyum klorür+paraokson ve 50 µL enzim çözeltisi küvete ilave edilerek ELİSA'da 37 °C ve 405 nm absorbanstaki değeri 30 saniyede okundu. Daha sonra ölçümü yapılan küvetin üzerine farklı hacimlerde (10 µL, 20 µL, 30 µL, 40 µL ve 50 µL) 0,001 M MnCl₂ çözeltisi ilave edildi ve son durumda enzim aktivitesinde meydana gelen değişim gözlemlendi. İnhibitörsüz ortamda tayin edilen enzim aktivitesi ise %100 aktivite olarak kullanıldı.

3.2.3. Toplam Oksidan Kapasite (TOK)

Toplam oksidan seviyesi ölçümü, süpernatantların içerdęi oksidan moleküllerin ferröz iyonunu ferrik iyon akümülatif olarak oksitlemesine dayanmakta kalorimetrik bir yöntemdir. Kalibratör olarak hidrojen peroksit kullanılır. Kalibratör olarak Hidrojen Peroksit kullanılır. Sonuçlar µmol H₂O₂Equiv/Lolarak ifade edilir.

Standart ve örnekler 15 µL pipetlendi.

Üzerine Reagent 1'den 100 µL eklendi ve 530 nm de okundu (A1).

Üzerine Reagent 2'den 5 µL eklendi ve 37 °C'de 5 dakika inkübe edildikten sonra 530 nm de okundu (A2).

Prosedürde yer alan formüle göre hesaplamalar yapıldı.

TOK Hesaplama: A2-A1= Δabs

Sonuç = Δabs örnek x 10 / Δabs Standart

3.2.4. Toplam Antioksidan Kapasite (TAK)

Toplam antioksidan seviye ölçümü, süpernatant da bulunan tüm antioksidan moleküllerin koyu mavi yeşil rengindeki ABTS katyonik radikalini redüklemesi sonucu

renkli radikali antioksidan moleküllerin toplam derişimleri ile orantılı olarak dekolorize olması esasına dayanır. Kalibratör olarak E vitamininin suda çözünür bir analogu olan Trolox kullanılır. Sonuçlar mmol TroloxEquiv/L olarak ifade edilir.

Standart, su ve örnekler 6 µL pipetlendi.

Üzerine 100 µL Regant 1'den eklendikten sonra 620 nm de okundu (A1).

Üzerine 15 µL Regant 2'den eklenerek 37 °C'de 5 dakika inkübe edildikten sonra 620 nm de okundu (A2).

Prosedürde yer alan formüle göre hesaplamalar yapıldı.

TAS Hesaplama: $A2 - A1 = \Delta abs$

Sonuç= $(\Delta abs \text{ Su} - \Delta abs \text{ örnek}) / (\Delta abs \text{ Su} - \Delta abs \text{ Standart})$

3.2.5. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) tayini

Toplam oksidan kapasite (µmol H₂O₂Equiv/L) / Toplam antioksidan kapasite (mmol TroloxEquiv/L) x10 formülasyonu üzerinden hesaplanarak elde edildi.

3.2.6. Verilerin Analizi

Verilerin analizi için SPSS istatistik paket programı kullanılarak varyans analizi yapılmıştır. Varyans analizi, üç ya da daha fazla grup ortalaması arasında istatistiksel olarak farklılık olup olmadığını test etmek için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemin amacı ise deneyi etkileyen faktör veya faktörlerin etkisinin belirlenmesidir (Çelik, 2012).

Bu araştırmada CoCl₂, MnCl₂ ve FeCl₂ çözeltilerinin farklı derişimlerine (10 µL, 20 µL, 30 µL, 40 µL ve 50 µL) karşılık gelen enzim aktivite üzerine etkisini belirlemek için verilerin dağılımına bakılmıştır. Veriler normal dağılım gösterdiğinden Tek Yönlü Varyans Analizi (One-Way Anova) ile yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Geçiş Metallerin Paraoksonaz Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

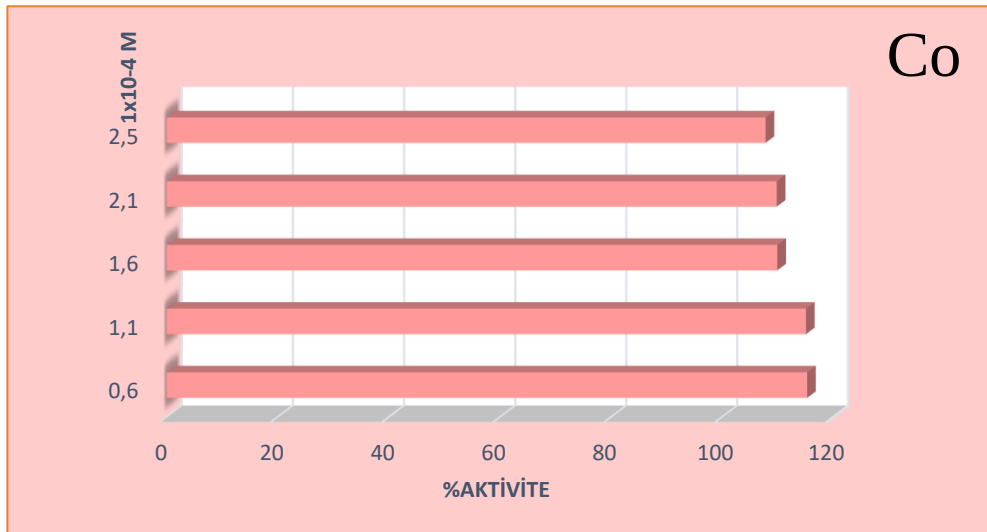
Paraoksonaz enzim aktivitesi için reaksiyon ortamına enzim çözeltisi ve hazırlanan çözeltiler (FeCl_2 , CoCl_2 ve MnCl_2) ilave edilerek son durumda enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler gözlemlenmiştir. FeCl_2 , CoCl_2 ve MnCl_2 farklı hacimlerde alınarak yapılan ölçümleri tekrarlanıp, bulunan sonuçların ortalaması hesaplanarak enzim aktivite tayin çizelgesi ve grafiği çizilmiştir.

Farklı derişimlerdeki (10 μL , 20 μL , 30 μL , 40 μL ve 50 μL) CoCl_2 çözeltileri kullanılarak elde edilen paraoksonaz enzim % aktivite değerleri Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Paraoksonaz enziminin CoCl_2 ’li ortamda belirlenen % aktivite değerleri

Geçiş Metali	Tris-HCl Tamponu (μL)	Enzim Çözelti Hacmi (μL)	Substrat Çözelti Hacmi (μL)	Metal Çözelti Hacmi (μL)	Metal Derişimi ($1 \times 10^{-4}\text{M}$)	ΔOD (405nm)	Aktivite (U/mLda k)	% Aktivite
Co	50	50	50	---	---	1,3206	21,6610	100,00
				10	0,6	1,5230	24,9809	115,33
				20	1,1	1,5201	24,9332	115,11
				30	1,6	1,4521	23,8175	109,95
				40	2,1	1,4506	23,7933	109,84
				50	2,5	1,4239	23,3562	107,83

Paraoksonaz enzimi için CoCl_2 ’li ortamda Tablo 2’de belirtilen inhibitör derişimleri ve % aktivite grafiği Şekil 13’te verilmiştir.



Şekil 13. CoCl₂'li ortamda paraoksonaz enzim için aktivite tayin grafiği

Şekil 13 incelendiğinde reaksiyon ortamına 10 µL CoCl₂ çözeltisi eklendikten sonra enzim aktivitesi %115,33 olarak belirlenirken artan CoCl₂ derişimleri sonucu enzim aktivitesinin düştüğü ve 50 µL'de %107,83'e ulaştığı görülmektedir. Yapılan ölçümler sonucunda Co⁺² geçiş metal iyonunun paraoksonaz enzim aktivitesini azalttığı belirlenmiştir.

CoCl₂ çözeltisinin farklı derişimleri (10 µL, 20 µL, 30 µL, 40 µL ve 50 µL) arasında istatistiksel bir fark olup olmadığını belirlemek için Tek Yönlü Anova analizine ilişkin veriler Tablo 3'te gösterilmiştir.

Tablo 3. CoCl₂ çözeltisinin farklı derişimlerine ait tek yönlü anova analiz sonuçları

	Toplam kareler	SD	Ortalama kare	F	P
Gruplar arası	1406,7360	4	351,684	0,449	0,773
Grup içi	74334,052	95			
Toplam	75740,788	99			

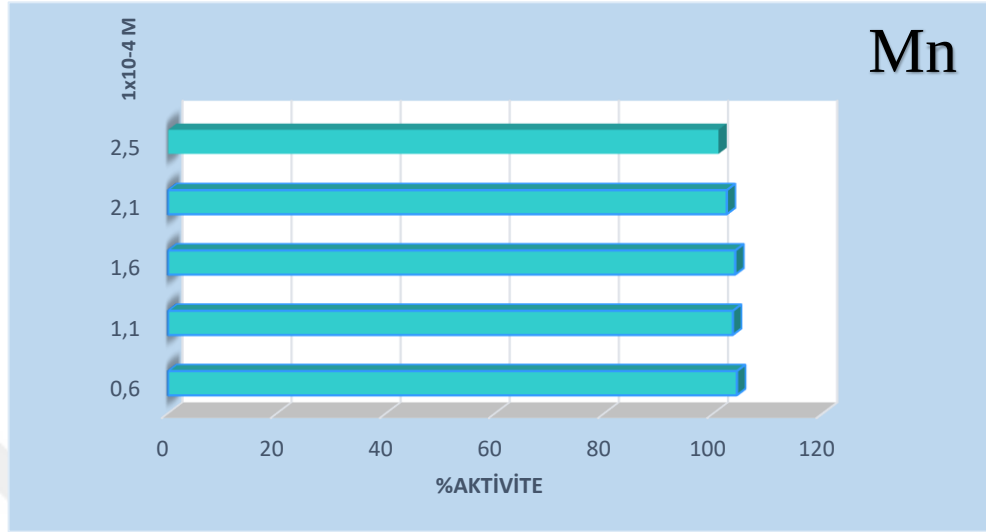
Tablo 3'te görüldüğü gibi, CoCl çözeltisinin kullanılan farklı derişimleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmektedir (p> 0,05).

Farklı derişimlerdeki (10 µL, 20 µL, 30 µL, 40 µL ve 50 µL) MnCl₂ çözeltileri kullanılarak elde edilen paraoksonaz enzim % aktivite değerleri Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4. Paraoksonaz enziminin MnCl₂'li ortamda belirlenen % aktivite değerleri

Geçiş Metali	Tris-HCl Tamponu (µL)	Enzim Çözeltisi Hacmi (µL)	Subsrat Çözeltisi Hacmi (µL)	Metal Çözeltisi Hacmi (µL)	Metal Derişimi (1x10 ⁻⁴ M)	ΔOD (405nm)	Aktivite (U/mL dak)	% Aktivite
Mn	50	50	50	---	---	1,1549	18,9435	100,00
				10	0,6	1,2040	19,7497	104,25
				20	1,1	1,1955	19,6089	103,51
				30	1,6	1,2005	19,6918	103,95
				40	2,1	1,1826	19,3975	102,40
				50	2,5	1,1651	19,1110	100,88

MnCl₂'li ortamda paraoksonaz enzim için Tablo 4'te belirtilen inhibitör derişimleri ve % aktivite grafiği Şekil 14'de verilmiştir.



Şekil 14. MnCl₂'li ortamda paraoksonaz enzim için aktivite tayin grafiği

Şekil 14 incelendiğinde reaksiyon ortamına 10 µL MnCl₂ çözeltisi eklendikten sonra enzim aktivitesi %104,25 olarak belirlenirken artan MnCl₂ derişimleri sonucu enzim aktivitesinin düştüğü ve 50 µL'de %100,88'e ulaştığı görülmektedir. Yapılan ölçümler sonucunda Mn⁺² geğış metal iyonunun paraoksonaz enzim aktivitesini azalttığı belirlenmiştir.

MnCl₂ çözeltisinin farklı derişimleri (10 µL, 20 µL, 30 µL, 40 µL ve 50 µL) arasında istatistiksel bir fark olup olmadığını belirlemek için Tek Yönlü Anova analizine ilişkin veriler Tablo 5'te gösterilmiştir.

Tablo 5. MnCl₂ çözeltisinin farklı derişimlerine ait tek yönlü anova analiz sonuçları

	Toplam kareler	SD	Ortalama kare	F	P
Gruplar arası	506,7070	4	126,677	0,421	0,793
Grup içi	28590,277	95	300,950		
Toplam	29096,984	99			

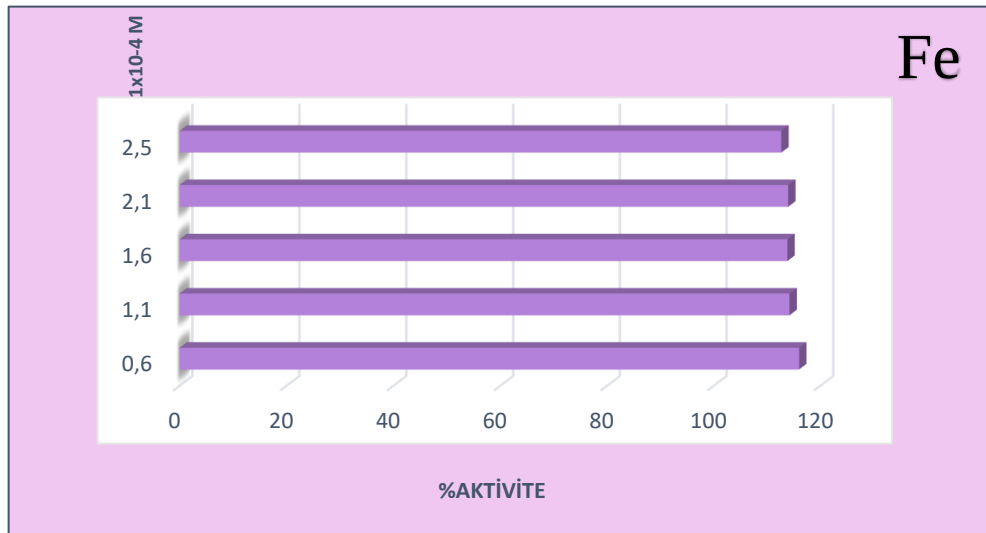
Tablo 5'te görüldüğü gibi, kullanılan farklı derişimler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı ancak artan derişimlerine bağı olarak enzim aktivitesinde azalma olduğu belirlenmiştir ($p > 0,05$).

Farklı derişimlerdeki (10 μL , 20 μL , 30 μL , 40 μL ve 50 μL) FeCl_2 çözeltileri kullanılarak elde edilen paraoksonaz enzim % aktivite değerleri Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. Paraoksonaz enziminin FeCl_2 'li ortamda belirlenen %aktivite değerleri.

Geçiş Metali	Tris-HCl Tamponu (μL)	Enzim Çözeltilisi Hacmi (μL)	Substrat Çözeltilisi Hacmi (μL)	Metal Çözeltilisi Hacmi (μL)	Metal Derişimi ($1 \times 10^{-4}\text{M}$)	ΔOD (405nm)	Aktivite (U/mL dak)	% Aktivite
Fe	50	50	50	---	---	0,9949	16,3186	100,00
				10	0,6	1,1542	18,9319	116,01
				20	1,1	1,1361	18,6350	114,20
				30	1,6	1,1322	18,5714	113,81
				40	2,1	1,1338	18,5969	113,96
				50	2,5	1,1211	18,3882	112,68

FeCl_2 'li ortamda paraoksonaz enzim için Tablo 6'da belirtilen inhibitör derişimleri ve % aktivite grafiğı Şekil 15'te verilmiştir.



Şekil 15. FeCl_2 'li ortamda paraoksonaz enzim için aktivite tayin grafiğı

Şekil 15 incelendiğinde reaksiyon ortamına 10 µL FeCl₂ çözeltisi eklendikten sonra enzim aktivitesi %116,01 olarak belirlenirken artan FeCl₂ derişimleri sonucu enzim aktivitesinin düştüğü ve 50 µL’de %112,68’e ulaştığı görülmektedir. Yapılan ölçümler sonucunda Fe⁺² geçiş metal iyonunun paraoksonaz enzim aktivitesinde azalmaya (p>0,05) neden olduğu belirlenmiştir.

FeCl₂ çözeltisinin farklı derişimleri (10 µL, 20 µL, 30 µL, 40 µL ve 50 µL) arasında istatistiksel bir fark olup olmadığını belirlemek için Tek Yönlü Anova analizine ilişkin veriler Tablo 7’de gösterilmiştir.

Tablo 7. FeCl₂ çözeltisinin farklı derişimlerine ait tek yönlü anova analiz sonuçları

	Toplam kareler	SD	Ortalama kare	F	P
Gruplar arası	46338,3940	4	11584,599	0,596	0,666
Grup içi	1846411,61	95	19435,912		
Toplam	1892750,00	99			

Tablo 7’de görüldüğü gibi, kullanılan farklı derişimler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı ancak artan derişimlerine bağlı olarak enzim aktivitesinde azalma olduğu belirlenmiştir (p> 0,05).

4.2. Toplam Oksidan Kapasite ve Toplam Antioksidan Kapasite Ölçümü

Analizler sonucunda elde edilen verilerin ortalama ve standart sapmaları hesaplanmıştır. Tablo 8’de verilen TOK ve TAK düzeyleri kullanılarak OSİ değeri bulunmuştur.

Tablo 8. Toplam antioksidan kapasite, toplam oksidan kapasiteleri ile oksidatif stres indeksinin ortalama standart sapma değerleri

		Ort ± Std
TAK	(mmol TroloxEquiv/L)	0,69 ± 0,32
TOK	(µmol H ₂ O ₂ Equiv/L)	10,79 ± 4,51
OSİ	(AU)	1,88 ± 1,59

5. TARTIŞMA

Bu araştırmada insektisit ve sinir gazı olarak yaygın kullanım sahasına sahip olan organofosfat bileşiklerinin hidrolizinde, palamut (*S. sarda*) balığı kas dokusunda bulunan, antioksidan ve antibakteriyel aktiviteye sahip paraoksonaz enzimi üzerine demir (Fe^{+2}), mangan (Mn^{+2}) ve kobalt (Co^{+2}) geçiş metal iyonlarının etkisi incelenmiştir.

Paraoksonaz enzimi, organofosfat bileşiklerini hidroliz edebilen önemli bir antioksidan enzimdir. Çevresel kirlilik nedeniyle sularda biriken geçiş metallerinin balıklardaki PON enzimini etkilemesi, enzim aktivasyonlarını kan parametrelerini büyüme ve gelişmeye etkileyerek olumsuz sonuçlara yol açmaktadır. Fe, Co ve Mn geçiş metallerinin hazırlanan çözeltileri, (FeCl_2 , CoCl_2 ve MnCl_2) palamut (*S. sarda*) balığındaki PON enzim aktivitesi üzerine etkileri araştırılmıştır.

Co^{+2} ve Mn^{+2} geçiş metal iyonlarının paraoksonaz enzim aktivitesi üzerindeki etkisine bakıldığında kullanılan farklı hacimler sonucunda elde edilen aktiviteler arasında anlamlı bir farklılık olmadığı tespit edilerek istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$). Fakat istatistiksel olarak anlamlı olmasada Co^{+2} ve Mn^{+2} geçiş metal iyonlarının artan derişimleri paraoksonaz enzim aktivitesinde azalma göstermiştir. Yapılan bir araştırmada rat karaciğerinde saflaştırılmış PON enzimi üzerine Co^{+2} , Cu^{+2} , Mn^{+2} ve Hg^{+2} inhibisyon tipleri belirlenerek PON için Hg en kuvvetli inhibitör olduğu tespit edilmiştir. Saflaştırılan PON için, inhibisyon gücü kuvvetliden zayıfa doğru $\text{Hg}^{+2}>\text{Co}^{+2}>\text{Mn}^{+2}>\text{Cu}^{+2}$ şeklinde sıralanmıştır (Pla ve ark., 2007). Yapılan bu araştırmada Co^{+2} geçiş metal iyonunun PON enzim aktivitesinde Mn^{+2} geçiş metal iyonundan daha fazla azalmaya sebep olduğu saptanmıştır.

Yapılan diğer bir araştırmada ise yaygın olarak kullanılan ağır metallerden Co^{+2} , Mn^{+2} , Hg^{+2} , Cd^{+2} , Cu^{+2} ve Ni^{+2} merinos ve kıvrıcık ırkı koyunlarda serum PON enzim aktivitesini *in vitro* olarak etkilediği tespit edilmiştir (Erol, 2011). PON enzim aktivitesinde yapılan bu araştırmada da palamut (*S. sarda*) balığındaki Fe^{+2} , Co^{+2} ve Mn^{+2} geçiş metal iyonlarının, merinos ve kıvrıcık koyun ırklarındaki enzim aktivitesindeki azalmaya benzer şekilde etki gösterdiği görülmektedir.

Sazan balıklarında yapılan bir araştırmada Fe metalinin paraoksonaz enzim aktivitesini inhibe ettiği tespit edilmiştir (Beyaztaş ve ark., 2007). Bu araştırmada da palamut (*S. sarda*) balığındaki Fe^{+2} geçiş metal iyonunun paraoksonaz enzim aktivitesi üzerindeki etkisine bakıldığında artan derişimler sonucunda elde edilen aktiviteler

arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$). Fakat Fe^{+2} geçiş metal iyonunun artan derişimleri paraoksonaz enzim aktivitesinde azalma göstermiştir.

Scyliorhinus canicula türü balıklarda yapılan bir araştırmada PON enzim aktivitesi saflaştırılmıştır. PON enzim aktivitesine Cu^{+2} , Ni^{+2} , Cd^{+2} ve Hg^{+2} metal iyonlarının inhibitör etkisi *in vitro* olarak araştırılmıştır. Sonuç olarak PON enzim aktivitesine Hg^{+2} , Ni^{+2} , Cd^{+2} ve Cu^{+2} metal iyonlarının hepsinin inhibitör etki gösterdiğini, bunun yanında en güçlü inhibitör etkiyi Cu^{+2} metal iyonunun oluşturduğu belirlenmiştir (Sayın, 2012).

Capoeta capoeta balıklarında çinko sülfat ($ZnSO_4$) formundaki Zn metali kullanılarak yapılan bir araştırmada 5 ve 10 mg/L derişimlerde 10 gün boyunca Zn uygulanmıştır. Zn'nun *C. capoeta* balıklarında plazma PON aktivitesini kontrol grubuna göre azalttığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak PON aktivitesinin metallere karşı çok duyarlı olduğu saptanmıştır (Deveci ve ark., 2015).

Sazanlarda (*C. carpio*) yapılan bir araştırmada ise 28 gün boyunca balıklara 15, 30 ve 60 ppb derişimlerinde krom oksit (CrO_3) formundaki krom (Cr) kullanıldığında Fe^{+2} , Co^{+2} ve Mn^{+2} geçiş metal serum PON ve ARE aktivitesinin düştüğü belirlenmiştir (Yonar ve ark., 2012). Yapılan başka bir çalışmada da *C. carpio* balıklar için ağır metaller kadar zehirli olduğu bilinen malathionun uygulanmasıyla PON enzim aktivitesinin azaldığı görülmüştür (Kılıç, 2016).

Neotropikal dört balık türünden olan *Hypostomus punctatus*, *Piaractus mesopotamicus*, *Brycon cephalus*, *Salminus brasiliensis*' in serumunda ise PON enzim aktiviteleri sırasıyla 6,1, 6,6, 1,5 ve 35,2 nmol x dk⁻¹ x mL⁻¹ olarak belirlenmiştir (Bastos ve ark., 2004). Bunun yanı sıra PON aktivitesi ile ilgili son zamanlarda yapılan araştırmaların hemen hemen tamamında, balıklarda bazı pestisitlerin (Altınok ve ark., 2012) ve ağır metallerin (Beyaztaş ve ark., 2007; Deveci ve ark., 2015; Yonar ve ark., 2012) PON enzim üzerine etkileri araştırılmıştır.

Balıklarda yapılan araştırmaların çeşitli maddelerin serum ve karaciğer PON enziminde inhibisyona sebep olduğu tespit edilmiştir (Ganzalvo ve ark., 1997; Debord ve ark., 2003; Çiftçi ve ark., 2000; Debord ve ark., 1998). Örneğin insan karaciğerinden saflaştırılan PON enzimi üzerinde EDTA bileşiğinin, Mg^{+2} , Co^{+2} , La^{+3} , Zn^{+2} , Cu^{+2} , Ba^{+2} , Hg^{+2} gibi metallerin ve p-hidroksiciva benzoatın inhibisyon etkisi araştırılmıştır. EDTA,

bakır, baryum, lantan ve p-hidroksiciva benzoat bileşığının yarışmalı bir inhibisyona sebep olduğu ve çinkonun ise yarışmasız bir inhibisyon etkisi gösterdiğı bulunmuştur (Pellin ve ark., 1990).



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Paraoksonaz enzim aktivitesi CoCl_2 'li ortamda, Co^{+2} geçiş metal iyonunun 10 μL -0,6 M'ında %115,33 olarak belirlenirken artan derişimler sonucunda 50 μL -2,5 M'ında %107,83 olarak belirlenmiş ve paraoksonaz enzim aktivitesinde azalma olduğu belirlenmiştir.

Paraoksonaz enzim aktivitesi FeCl_2 'li ortamda, Fe^{+2} geçiş metal iyonunun 10 μL -0,6 M'ında %116,01 olarak belirken artan derişimler sonucunda 50 μL -2,5 M'ında %112,68 olarak belirlenmiş ve paraoksonaz enzim aktivitesinde azalma olduğu belirlenmiştir.

Paraoksonaz enzim aktivitesi MnCl_2 'li ortamda, Mn^{+2} geçiş metal iyonunun 10 μL -0,6 M'ında %104,25 olarak belirken artan derişimler sonucunda 50 μL -2,5 M'ında %100,88 olarak belirlenmiş ve paraoksonaz enzim aktivitesinde azalma olduğu belirlenmiştir.

Yaygın olarak kullanılan Fe^{+2} , Co^{+2} ve Mn^{+2} geçiş metal iyonlarının PON enzim aktivitesini azalttığı saptanmıştır.

Palamut (*S. sarda*) kas dokusunda MnCl_2 , CoCl_2 ve FeCl_2 çözeltilerinin 10 μL , 20 μL , 30 μL , 40 μL ve 50 μL içeren farklı derişimlerinin paraoksonaz enzim aktivitesi üzerinde etkisinin istatistiksel olarak ortaya konması için tek yönlü varyans analizi (One-Way Anova) yapılmıştır. Her bir çözeltinin farklı derişimlerinin paraoksonaz enzim aktivitesi üzerine etkilerinin istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği belirlenmiştir ($p>0,05$).

Palamut (*S. sarda*) kas dokusunda bulunan toplam oksidan ve toplam antioksidan seviyeleri belirlenmiştir. TOK değeri 10,79 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2\text{Equiv/L}$ ve TAK değeri 0,69 $\text{mmol TroloxEquiv/L}$ olarak hesaplanmıştır. TOK ve TAK düzeyleri kullanılarak OSI değeri 1,88 AU hesaplanmıştır.

Yapılan literatür taramalarında palamut balığında bulunan antioksidan enzimler üzerine sınırlı sayıda araştırma olduğu görülmüştür. Bu nedenle çeşitli geçiş metallerinin farklı dokulardaki PON enzimini nasıl etkileneceği belirlenebilir.

Araştırmada palamut (*S. sarda*) balığındaki antioksidan bir enzim olan paraoksonaz enzim aktivitesi üzerine geçiş metal iyonlarının etkisi araştırılabilir. Bu geçiş metallerinin palamut balığında bulunan farklı antioksidan enzimler üzerindeki etkileri belirlenebilir.

Araştırmada kullanılan Fe^{+2} , Mn^{+2} ve Co^{+2} geçiş metal iyonlarının farklı balık türlerindeki PON enzim aktivitesi üzerine etkileri araştırılabilir.



KAYNAKLAR

- Ağcasulu Ö. Sakarya nehri çeltikçe çayı'nda yaşayan *Capoeta Tinca* (Heckel, 1843)'nın dokularında ağır metal birikiminin incelenmesi. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Yüksek Lisans Tezi, 2007; 54.
- Akkuş I. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. 1. Baskı, Konya, Mimoza Yayınları. 1995; 13-19.
- Aksun FY. Karamık Gölü'nde yaşayan turna balıklarında (*Esox lucius*, 1758) ağır metal birikimi. VIII. Ulusal Biyoloji Kongresi, İzmir, 1986;2:454-461.
- Aküzüm T, Çakmak B, Gökalp Z. Türkiye'de su kaynakları yönetiminin değerlendirilmesi. YYÜ Tar Bil Derg 2010;29(1):67-74.
- Akyurt İ. Balık beslemede mineraller. Atatürk Üniv Ziraat Fak Derg 1994;25(3):445-453.
- Altinok I, Capkın E ve Boran H. Mutagenic, genotoxic and enzyme inhibitory effects of carbosulfan in rainbow trout *orconhynchus mykiss*. Pestic Biochem Physiol 2012;102:61-67.
- Amundsen P, Staldvik FJ, Lukin AA, Kashulin NA, Popova OA, Reshetnikov YS. Heavy metal contamination in freshwater fish from the border region between norway and Russia. Sci Total Environ 1997;201(3):211.
- Ateş O, Azizi S, Alp HH, Kızıltunç A, Beydemir S, Cinici E, Koçer I, Baykal O. Decreased serum paraoxonase1 activity and increases serum homocysteine and malondialdehyde Levels in Age Related Macular Degeneration. Tohoku J Exp Med 2009;217:17-22.
- Ateşok G. Trakya-Binkılıç yöresi düşük tenörlü manganez cevherlerinin zenginleştirilmesi, İstanbul Teknik Üniversitesi Maden Fakültesi, İstanbul, PhD Tezi, 1979.
- Avila DS, Puntel RL, Aschner M. Manganese in health and disease. In Interrelations Between Essential Metal Ions and Human Diseases, Springer, Dordrecht 2013, 13;199-227.
- Aviram M, Hardak E, Vaya J, Mahmood S, Milo S, Hoffman A, Billicke S, Draganov D, Rosenblat M. Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesion. Circ 2000;101:2510-17.
- Aviram M, Levy Y, Kaplan M, Ben Amotz A. The effect of dietary supplementantion of β -carotene on Human monocyte-macrophage-mediated oxidation of low density lipoprotein. Int J Disabil Hum Dev 1996;32(6):473-478.

- Aviram M, Rosenblat M. Paraoxonases 1, 2, and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. *Redox Biol* 2004;37(9):1304-1316.
- Aydilek N, Aksakal M. Testesteronun tavşanlarda karaciğer antioksidan sistemi üzerine etkisi. *Vet Fak Derg* 2003;14(2):22-25.
- Aynacıoğlu A, Cascorbi, Mrozikiewicz PM, Nacak M, Tapanyığıt EE, Roots I. Paraoxonase1 mutations in a Turkish population. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999;157:174-177.
- Azarsız E, Sönmez EY. Paraoksonaz ve klinik önemi. *Türk Biyokim Derg* 2000;25(3):109-119.
- Bastos VLFC, Alves MV, Bernardino G, Ceccarelli PS and Bastos JC. Paraoxonase activity in sera of four neotropical fish. *Bull Environ Contam Toxicol* 2004;72:798–805.
- Başkol G, Köse K. Paraoksonaz biyokimyasal özellikleri, fonksiyonları ve klinik önemi. *Erciyes Tıp Derg* 2004;26(2):75-80.
- Beyaztaş S, Türker D, Sinan S ve Arslan O. Cyprinus carpio paraoksonaz enziminin bazı ağır metallerle inhibisyon etkisinin incelenmesi, 21. Ulusal Kimya Kongresi, Malatya, 2007;23-27.
- Blatter Garin MC, Abbot C, Messmer S, Mackness MI, Durrington P, Pometta D, James RW. Quantification of human serum paraoxonase by enzyme linked immunoassay: population differences in protein concentrations. *Biochem J* 1994;304:549–554
- Blokhina O, Virolainen E. & Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a Review. *Ann Bot* 2003;91:179-194.
- Brauner JC. The Effect of diet and short hyperoxia exposure on seawater transfer in coho salmon smolts (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquac* 1999;177(1/4):257-265.
- Brophy VH, JR, Clendenning JB, McKinstry LA, Jarvik GP, Furlong CE. Effects of 5 regulatory-region polymorphisms on paraoxonase-gene (PON1) expression. *Am J Med Genet A* 2001;68:1428–1436.
- Bryan G. Heavy metal contamination in the sea in: R. Johnston Mar. Poll. Academic Press mc. London, 1976;3(1):185-302.
- Cabana VG, Reardon CA, Feng N, Neath S, Lukens J, Getz GS. Serum paraoxonase: effect of the apolipoprotein composition of HDL and the acute phase response. *J Lipid Res* 2003;44:780-792.
- Carey J, Diana M, Shih S, Hama Y, Villa N, Navab M, Srinivasa T. The paraoxonase gene family and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med* 2005;38(2):153–163.

- Carpene E, Cattani O. Zn and Cu in Fish from natural waters and rearing ponds in northern Italy. *Egypt J Aquat Biol Fish* 1990;37:293-299.
- Carpene E, Vasak M. Hepatic metallothionein from goldfish (*Carassius auratus* L.). *Comp Biochem Physiol* 1989;92B:463-468.
- Chemnitz JM, Losch H, Losch K, Zech R. Organophosphate detoxicating hydrolases in different vertebrate species. *Comp Biochem Physiol* 1983;6C:85.
- Choi W, Benzic F, Collins A, Hannigan M, Strain JE. Vitamin C and E: Acute interactive effects on biomarkers of antioxidant defence and oxidative stress. *Mutat Res* 2004;551:109-117.
- Clendenning JB, Humbert R, Green ED, Wood C, Traver D, Furlong CE. Structural organization of the human PON1 gene. *Genom* 1996;35:586.
- Collette BB, Nauen CE. FAO species catalogue. Scombrids of the world. An annotated and illustrated Catalogue of Tunas, Mackerels, Bonitos and Related Species Known to Date. FAO Fisheries Synopsis no. 125, Rome, 1983;137.
- Costa LG, Li WF and Richter RJ. PON1 and organophosphate toxicity. 2002;165–83.
- Costa LG, Li WF, Richter RJ, Shih DM, Lusk A, Furlong CE. The role of paraoxonase (PON 1) in the detoxication of organophosphates and its human polymorphism. *Chem Biol Int* 1999;119-120:429.
- Çakır EO. Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanan süt örneklerinde bazı metal düzeyleri, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Doktora Tezi (basılmamış), 2009; 64.
- Çelik N. Anova modellerinde çarpık dağılımlar kullanılarak dayanıklı istatistiksel sonuç çıkarımı ve uygulamaları, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Yüksek Lisans Tezi, 2012.
- Çiftçi M, Küfrevioğlu Öİ, Gündoğdu M, Özmen İ. Effects of some antibiotics on enzyme activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocyte. *Pharmacol Res* 2000;41:109.
- Davies FG. A hand book of environmental health and pollution hazards. University of California Press, Oxford.1991.
- De Vos W, Tarvainen T, Salminen R, Reeder S, De Vivo B, Demetriades A, O'connor PJ, et al. Geochemical atlas of Europe: Part 2: Interpretation of geochemical maps, additional tables, Figures, Maps, and Related Publications, Geological Survey of Finland 2006;225.
- Deakin S, James RW. Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase-I. *Clin Sci* 2004;107:435-447.

- Deakin S, Leviev I, Brulhart Meynet, MC, James RW. Paraoxonase1 promoter haplotypes and serum paraoxonase: A predominant role in vivo for polymorphic position -107 implicating the transcription factor Sp. *Biochem* 2003;377.
- Deakin S, Leviev I, Gomaraschi M, Calabresi L, Franceschini G, James RW. Enzymatically active paraoxonase-1 is located at the external membrane of producing cells and released by a high affinity, Saturable, Desorption Mechanism. *J Biol Chem* 2002;277:4301-4308.
- Debnath M, Saha RK, Kamilya D, Saikia D, Saha H. Effects of water borne iron on Spawn of indian major carps (*Catla catla* (Ham.), *Labeo Rohita* (Ham.) and *Cirrhinus Mrigala* (Ham.)). *Bull Environ Contam Toxicol* 2012;89:1170–1174.
- Debord J, Bollinger JC, Merle L, Dantoine T. Inhibition of human serumarylesterase by metal chlorides. *J Inorg Biochem* 2003;94:1-4.
- Debord J, Dantoine T, Bollinger JC, Abraham MH, Verneuil B, Merle L. Inhibition of aryesterase by aliphatic alcohols. *Chem Biol Int* 1998;113:105-115.
- Del Valls TA, Blasco J, Sarasquete MC, Forja JM ve Gomez-Parra A. Evaluation of heavy metal sediment toxicity in littoral ecosystems using juveniles of the fish *sparus aurata*. *Ecotoxicol Environ Saf* 1998;41:157-167.
- Deveci HA, Kaya İ, Yılmaz M and Karapehlivan M. Effect of zinc sulphate on the levels of plasma paraoxonase activity, total oxidant and high density lipoprotein of transcaucasian barb (*Capoeta capoeta* Guldenstaedt, 1773). *Fresen Environ Bull* 2015;24(9):2732-2735.
- Diplock A. Healty lifestyles nutrition and physical activity: antioxidant nutrients. ILSI Europe Concise Monograph Series, Belgium 1998;59.
- Dökmeci İ. Zehirler ve zehirlenmeler. Dökmeci İ, Editör, Toksikoloji, 3. Baskı, İstanbul Nobel Tıp Kitabevi. 1988;56-60, 488-489.
- Draganov DI, Teiber JF. PONs natural substrates – the key for their physiological roles. In: Mackness B, Mackness M, Aviram M, Paragh G editors. *The paraoxonase: their role in disease development and xenobiotic metabolism*. Netherlands, Springer Inc. 2008.
- Dragonov DI, La Du BN. Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2004;369:78-88.
- Dural M, Göksu MZ, Özak AA. Investigation of heavy metal levels in economically important fish species captured from the tuzla lagoon. *Food Chem* 2007;102:415-421.

- Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:473-80.
- Eckerson H, Romson J, Wyte C, La Du BN. The Human serum paraoxonase polymorphism: identification of phenotypes by their response to salts. *Am J Human Genet* 1983;35(2):214-227.
- Elana T, Elana M, Magdalena G, Isabel L, Ana MP. Effects of caloric restriction and gender on rat serum paraoxonase1 activity. *J Exerc Nutr Biochem* 2006;17:197-203.
- Erdem MST. ST Elevasyonlu miyokard enfarktüs (Stemi) hastalarda insan paraoxonase geni met-leu/55 polimorfizmi. Dr. Siyami Ersek Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Merkezi, İstanbul, Uzmanlık Tezi 2004; 70.
- Erikson KM, Aschner M. Manganese neurotoxicity. *Neurochem Int* 2003;43, 475-480.
- Erol K. Farklı koyun ırklarından saflaştırılan paraoksonaz enziminin ağır metallerle inhibisyonu, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir, Yüksek Lisans Tezi, 2011.
- Ersoysal Y, Ay Ö, Korkmaz C, Köroğlu MA, Erdem C. Doğu Akdeniz'den avlanan bazı balık türlerinde ağır metal düzeylerinin insan sağlığı açısından değerlendirilmesi Mersin Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, Mersin, 2018.
- Feingold KR, Memon RA, Moser AH, Grunfeld C. Paraoxonase activity in the serum and hepatic mRNA levels decrease during the acute phase response. *Atheroscler* 1998;139:307-315.
- Filho DW. Reactive oxygen species, antioxidants and fish mitochondria. *Front Biosci* 2007;12(1):1229-1237.
- Fuhrman B, Khateeb J, Nitzan O, Karry R, Volkova N, Aviram M. Urokinase plasminogen activator upregulates paraoxonase2 expression in macrophages via an NADPH oxidase-dependent mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;1361-1367.
- Furlong CE, Richter RJ, Chapline C, Crabb JW. Purification of rabbit and human serum paraoxonase. *Biochem* 1991;30:10133.
- Gonzalvo MC, Gil F, Hernandez F, Villanueva E, Pla A. Inhibition of paraoxonase activity in human liver microsomes by exposure to EDTA, metals and mercurials. *Chem Biol Interact* 1997;105:169-179.
- Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995;41(12):1819-28.

- Gülcü F, Gürsu MF. Paraoksonaz ve arilesteraz aktivite ölçümlerinin standardizasyonu. *J Biochem* 2003;28(2):45-49.
- Gürbüz B. Çıldır Gölü'nde avlanan tatlı su kefali (*Leuciscus Cephalus* Linnaeus,1758) ve bıyıklı balıklarda (*Barbus plebejus lacerta* Bonaparte, 1832) bazı ağır metallerin derişim düzeylerinin incelenmesi. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kars, Yüksek lisans tezi, 2005.
- Güven KC, Öztürk B. Deniz kirliliği analiz yöntemleri ilgili uluslararası sözleşmeler, 2005.
- Hansen JA, Marr JCA, Lipton J, Cacela D. and Bergman HL. Differences in neurobehavioral responses of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to copper and cobalt: behavioral avoidance. *Environ Toxicol Chem* 1999;18(9):1972–1978.
- Harel M, Aharoni A, Gaidukov L, Brumshtein B, Khersonsky O, Meged R, Dvir H, Ravelli RBG, McCarthy A, Toker L, Silman I, Sussman JL, Dan S. Tawfik. Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat Struct Mol Biol* 2004;11:412.
- Hassett C, Richter RJ, Humbert R, Chapline C, Crabb JJ, Omiecinski CJ, Furlong C. Characterisation of cdna clones encoding rabbit and human serum paraoxonase: the mature protein retains its ignal sequence. *Biochem* 1991;30:10141–0149.
- Heiske K. Interaction of oxygen supply, oxidative stress and molecular defence system during temperature stress in fish. *Dem Fachbereich Biologie Der Universität Brama* 2005;1-223.
- Hogstrand O, Haux C. Mini review binding and detoxification of heavy metals in lower vertebrates with reference to metallothionein. *Comp Biochem Physiol* 1991;100C (1/2):137-141.
- Humbert R, Adler DA, Disteché CM, Hasset C, Omiecinski CJ, Furlong CE. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nat Genet* 1993;3(1):73-76.
- Jakubowski H. Calcium-dependent human serum homocysteine thiolactone hydrolase. A protective mechanism against protein N-homocysteinylation. *J Biochem Chem* 2000;275(6):3957-3962.
- James RW, Deakin SP. Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase1. *Clin Sci* 2004;107:435–447.

- Janka Z, Juhász A, Rimanóczy AA, Boda K, Márki-Zay J, Kálmán J. Codon 311 polymorphism of paraoxonase2 gene is associated with apolipoprotein E4 allele in both alzheimer's and vascular dementias. *Mol Psychiatry* 2002;7(1):110-2.
- Jawad Z, Paoli M. Novel sequences propel familiar folds. *Struct Rev* 2002;10(4):447.
- Joanne Hughes AC, Carol Courage. A Review of the effects of low level exposure to organophosphate pesticides on fetal and childhood health. *Inst Environ Health* 2002;1-72.
- Kahvecioğlu Ö, Kartal G, Güven A, Timur S. Metallerin çevresel etkileri-III. *Metallurji Derg* 2004;138:64-71.
- Kargin E, Erdem C. Accumulation of copper in liver, Spleen, Stomach, Intestine, Gill and Muscle of Cyprinus Carpio. *Turk Zool Derg* 1991;15:306-314.
- Kaur C, Kapoor HC. Antioxidants in fruits and vegetables-the millennium's health. *Int J Food Sci Technol* 2001;36:703-725.
- Kılınç K, Kılınç A. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Derg* 2002;33(2):110-118.
- Kır İ, Tumantozlu H. Karacaören-2 Baraj Gölü'ndeki su, sediment ve sazan (Cyprinus carpio) örneklerinde bazı ağır metal birikiminin incelenmesi. *Ekoloji* 2012; 21(82):65-70.
- Kim JH, Gibb HJ, Howe PD. Cobalt and inorganic cobalt compounds, WHO, 2006.
- Knepper WA. Iron. in: *kirk-othmer encyclopedia of chemical technology*, New York, Wiley Interscience 1981;13(5):735-753.
- Köse E, Uysal K. Cinsi olgunluğa erişmemiş pullu sazan (Cyprinus carpio L., 1758)'ların kas, deri ve solungaçlarındaki ağır metal akümülyasyon oranlarının karşılaştırılması. *Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü, Kütahya, Yüksek Lisans Tezi*, 2008.
- Kuo CL, La Du BN. Calcium binding by human and rabbit serum paraoxonases. *Structural Stability and Enzymatic Citivity. Drug Metab Dispos* 1998;26:653-60
- Kuru M. Omurgalı Hayvanlar. Ankara, Gazi Üniversitesi Yayınları. 1994.
- La Du BN, Aviram M, Billecke S, Navab M, Primo-Parma S, Sorenson RC, Standiford TJ. On the physioogical role(s) of the paraoxonases. *Chem Biol Int* 1999;379:119-120.
- La Du BN. Is paraoxonase3 another HDL-associated protein protective against atherosclerosis? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21(4):467-8.

- LANL A. Periodic table of the elements, los alamos national laboratory's chemistry division Presents. <https://depts.washington.edu/eoopic/linkfiles/The%20Elements.pdf>, 2001. Erişim tarihi: 25.04.2020.
- Lee J, Prohaska JR, Thiele DJ. Essential role for mammalian copper transporter Ctr 1 in copper homeostasis and embryonic development. *Proceed Nat Acad Sci* 2001;98: 6842-47.
- Levie I, James RW. Promoter polymorphisms of the human paraoxonase PON1 gene and serum paraoxonase activities and concentrations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:516-521.
- Levy S, Ihmels J, Miri C, Weinberger A, Friedlander, Barkai N. Strategy of transcription regulation in the budding yeast. *PLoS One* 2007;2(2):250
- Li HL, Liu DP, Liang CC. Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress and diseases. *J Mol Med* 2003;81:766-779.
- Lucio G, Costa TBC, Annabella V, Furlong CE. Measurement of paraoxonase (PON1) status as a potential biomarker of susceptibility to organophosphate toxicity. *Clin Chim Acta* 2005;352:37-47.
- Mackness B, Durrington PN, Mackness MI. Human serum paraoxonase. *Gen Pharma* 1998;3:329-36.
- Mackness B, Mackness M. Paraoxonase 1: biochemistry and contribution to atherosclerosis. *University International Congress Series* 2004;1262:91- 94.
- Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low density lipoprotein. *Febs Lett* 1991;286:152.
- Mackness MI, Durrington BPN, Connelly PW, Hegele AR. Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 1996;7:69-76.
- Main AR. The role of an esterase in the acute toxicity of paraoxon, TEPP and parathion. *Can J Biochem* 1956;34:197.
- Marie-Claude Garin B, Abbott C, Messmer TS, Mackness M, Durrington P, Pometta TD, James RW. Quantification of human serum paraoxonase by enzyme-linked immunoassay: population differences in protein concentrations. *Biochem J* 1994; 304:549-554.
- Marr JCA, Hansen JA, Meyer JS, Cacela D, Podrabsky T, Lipton J and Bergman HL. Toxicity of cobalt and copper to rainbow trout: application of a mechanistic model for predicting survival. *Aquat Toxicol* 1998;43(4):225-238.

- McCarthy T, Kery JP, Kery JF, Lynch PB, Buckley DJ. Evaluation of the antioxidant potential of natural food/plant extracts as compared with synthate antioxidants and vitamin e in raw and cooked pork patties. *Meat Sci* 2001;57:4552.
- Mendil D, Uluözlü ÖD. Determination of trace metal levels in sediment and five fish species from lakes in Tokat, Turkey. *Food Chem* 2007;101:739-745.
- Misra SG, Mani DM. (eds.) *Metallic pollution*. 1st ed. Asish publishing inc, New Delhi. 1992;161.
- Mohammed SA, Bakery HH, Abuo Salem ME, Nabila AM, Elham AE. Toxicological effect of copper sulphate and cobalt chloride as feed additives on fertility in male albino rats. *Benha Vet Med J* 2014;27(1):135-145.
- Tuncel S, Arı N, Yoleri B, Şahiner M. Dünya’da ve Türkiye’de demir. *Fizibilite Etütleri Daire Başkanlığı, Eylül, MTA Derg* 2017.
- Nadadur SS, Srirama K, Mudipalli A. Iron transport and homeostasis mechanisms: their role in health and disease, *Indian J Med Res* 2008;128(4):533-545.
- Nawar WW. Lipids. In food chemistry. In: Fennema OR, editor. New York, Marcel Dekker Inc. 1996;225-319.
- Nikinma M. How does environmental pollution effect red cell function in fish? *Aquatic Toxicol* 1992;22:227-238.
- NRC (National Research Council). *Iron*. Baltimore, MD, University Park Press. 1979.
- NTP. Toxicology studies of cobalt metal (CAS No. 7440-48-4) in F344/N rats and B6C3F1 mice (inhalation studies). U.S Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health. North Carolina: NIH Publication, Technical Report Series 2014;581.
- Nümann W. Die pelamiden (Sarda sarda) des schwarzen meeres, des bosporus, der Marmara und der Dardanellen. *Hidrobiology*.1955;3:75-127.
- Özcan O, Erdal H, Çakırca G ve Yönden Z. Oksidatif stres ve hücre içi lipit, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. *Mustafa Kemal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya AD, Hatay*, 2015;6 (3):331-336.
- Özkan G. Endüstriyel bölge komşuluğunda kıyısız kırsal alandaki hava kalitesi; Muallimköy’de partikül maddede ve topraktaki ağır metal kirliliği, *Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gebze, Yüksek Lisans Tezi*, 2009.
- Pellin MC, Moretto A, Lotti M, Vilanova E. Distribution and biochemical properties of rat paraoxonase activity. *Neurotoxicol Teratol* 1990;12,611614.

- Pla L, Rodrigo AF, Hernandez F, Gil O. Lopez. Effect of metal ions and calcium on purified PON1 and PON3 from rat liver. *Chem Biol Interact* 2007;167 63–70.
- Polat H, Ergün H. Karadeniz'in pelajik balıkları. <http://www.denizce.com/ysarsospalamut.asp>, 2008. Erişim tarihi : 20.02.2020.
- Precourt LP, Seidman E, Delvin E, et al. Comparative expression analysis reveals differences in the regulation of intestinal paraoxonase family members. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41:1628-1637.
- Pribilla, W. Der vitaminB 12-stoffwechsel und seine störungen, *Blut* 1962;8(1):487-501.
- Quiles J, Huertas J, Batine M, Mataix J, Tortosa C. Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity. *Toxicol* 2002;180:7995;13.
- Rether A. Entwicklung und charakterisierung wasserlöslicher benzoylthioharnstofffunktionalisierter polymere zur selektiven abtrennung von schwermetallionen aus abwässern und prozesslösungen. Technical University Munich, Doctoral Thesis, 2002.
- Rodrigo L, Gil F, Hernandez AF and Pla A. Identification of two rat liver proteins with paraoxonase activity: biochemical evidence for the identity of paraoxonase and arylesterase. *Chem Biol Interact* 1999;263:119-120.
- Roest M. PON1 Genotypes and Coronary Heart Disease. Laboratory for Clinical Chemistry and Haematology. In: Mackness B, Mackness M, Aviram M, Paragh G (Eds.). *The Paraoxonases: their role in disease development and xenobiotic metabolism*. Netherlands: Springer. 2008;139-147.
- Rosenblat M, Draganov D, Watson CE, Bisgaier CL, La Du BN, Aviram M. Mouse macrophage paraoxonase2 activity is increased whereas cellular paraoxonase3 activity is decreased under oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:468.
- Rousselot DB, Therond P, Beaudeau JL, Peynet J, Legrant A, Delatre J. High density lipoproteins and the oxidative hypothesis of atherosclerosis. *Clin Chem Lab Med* 1999;37:939-949.
- Sanghera DK, Manzi S, Minster RL, Shaw P, Kao A, Bontempo F, Kamboh MI. Genetic variation in the paraoxonase3 (PON3) gene is associated with serum PON1 activity. *Ann Human Genet* 2008;72(Pt1):72-81.
- Santamaria AB. Manganese exposure, essentiality & toxicity, *Indian J Med Res* 2008;128(4):484.
- Sayın D, Türker Çakır D, Gençer N, Arslan O. Effects of some metals on paraoxonase activity from shark (*Scyliorhinus canicula*). *J Enzyme Inhib Med Chem* 2012;27(4):595-598.

- Scharff EI, Koepke J, Fritzsche G, Lücke C, Rüterjans H. Crystal structure of disopropylfluoro phosphatase from *Loligo vulgaris*. *Struct* 2001;9:493.
- Sharma J, Langer S. Effect of Manganese on haematological parameters of fish, *Garra gotyla gotyla*. *J Entomol Zool Stud* 2014;2(3):77-81.
- Shiner M, Fuhrman B, Aviram M. A biphasic U-shape effect of cellular oxidative stress on the macrophage antioxidant paraoxonase2 (PON2) enzymatic activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;349:1094-1099.
- Shrivastava P, Saxena A, Swarup A. Heavy metal pollution in a sewage-fed lake of Bhopal. *Lakes & Reservoirs: Res Manag* 2003;8:1-4.
- Sinan S. İnsan serum paraoksonaz enziminin (PON1) ekspresyonu, saflaştırılması ve bazı ilaçların enzim üzerine etkilerinin araştırılması. Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir, Doktora Tezi, 2005.
- Slack JF, Kimball BE, Shedd KB. Cobalt (No. 1802-F), US. Geological Survey, 2017.
- Smith EJ, Sykora JL, Shapiro MA. Effect of lime neutralized iron hydroxide suspensions on survival, growth and reproduction of the rathead minnow (*Pimephales promelas*). *Can J Fish Aquat Sci* 1973;30:1147-1153.
- Smith IC and Carson BL. Trace metals in the environment. Ann Arbor, MI, Ann Arbor Science Publishers. 1981
- Sorenson RC, Aviram M, Bisgaier CL, Billecke S, La Du BN. Properties of the retained N-terminal hydrophobic leader sequence in human serum paraoxonase/arylesterase. *Chem Biol Interact* 1999;119-120:243-249.
- Sorenson RC, Primo-Parmo SL, Kuo CL, Adkins S, Lockridge O, La Du BN. Reconsideration of the catalytic center and mechanism of mammalian paraoxonase/arylesterase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:7187.
- Şimşek F. Serbest oksijen radikalleri, antioksidanlar ve lipid peroksidasyonu. *Türkiye Klinikleri J Pediatric* 1999;8:42-47.
- Takeda A. Brain research. *Brain Research Review* 2003;41:79-87.
- Tanıdır IC, Silfeler I, Acar Y, Kaçar A, Pekun F. Iron poisoning in lethal dose: case report/ölümcül dozda demir zehirlenmesi: olgu sunumu. *The Journal of Kartal Training and Research Hospital*. 2012;23(2):99-103.
- Tekeli İO, Yipel M, Sakin F. Balıklarda ağır metal biyobirikimi. *Türkiye Klinikleri J Vet Sci Pharmacol Toxicol* 2016;2(3):38-42.

- Tekin-Özan S, Kır İ, Barlas M. Kovada Gölü (Isparta) suyunda ve sudak balığı (*Stizostedion lucioperca* L, 1758)'nda bazı ağır metal birikiminin araştırılması I. Ulusal Limnoloji Çalıştayı, İstanbul Üniversitesi, 2004;16-19.
- Topcuoğlu S, Kırbaçoğlu Ç, Güngör N. Heavy metals in organisms and sediments from Turkish coast of the black sea, 1997-1998. *Environment International* 2002; 1069:1-8. Toxicity. *Toxicol* 2002;180:7995;13
- Tuncay Y. Kovada Gölü'nde yaşayan ıstakozlarda (*Astacus leptodactylus* Eschscholtz, 1823) ağır metal birikiminin incelenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta, Yüksek Lisans Tezi, 2007; 51.
- Türkmen M, Ciminli C. Determination of metals in fish and mussel species by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. *Food Chem* 2007;103:670-675.
- Uriel A. Characterisation des cholinesterases et d'autres esterase carboxylique apres electrophorese et immunoelectrophorese en gelose, I; applications a l'etude des esterase du serum humain normal. *Am Insit Pasteur* 1961;101-104.
- Uysal Z. Demir metabolizması ve demir eksikliği anemisi. Ankara Tıp Fakültesi, 2007.
- Üşenmez Ş. Sedimentoloji ve sedimenter kayalar. Ankara, Gazi Üniversitesi Basın Yayın Yüksekokulu Yayınevi.1985;247.
- WHO. Iron in drinking-water, background document for development of WHO guidelines for drinking-water quality, Geneva, 2003.
- Widdows J. Physiological responses to pollution. *Marine Pollut Bull* 1985;16: 129134.
- Wildi W, Domink J, Thomas, RL, Favarger P, Haller L, Perroud A. ve Peytremann C. River, reservoir and lake sediment contamination by heavy metals downstream from urban areas of switzerland. *Lakes & Reservoirs: Res Manag* 2004;9:75-87.
- Yazkan M, Özdemir F, Gölükçü M. Cu, Zn, Pb and Cd contents in some molluscs and crustacean in the gulf of Antalya. *Turk J Vet Animal Sci* 2004;28:95-100.
- Yıldırım A. İntakt ve adrenaletomili sıçanların eritrosit ve mide dokularında oksidan ve antioksidan parametrelerin araştırılması. Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Erzurum, Uzmanlık Tezi, 2003.
- Yolaçan E. Kars Çayı'ndaki *Capoeta capoeta* (Guldenstaedt, 1772)'nın büyüme ve üreme özelliklerinin incelenmesi. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kars, Yüksek Lisans Tezi, 2005.
- Yonar ME, Mişe Yonar S, Çoban MZ, Eroğlu M. The Effect of propolis on serum paraoxonase and arylesterase enzyme activities in cyprinus carpio during chromium exposure. *Fresen Environ Bull* 2012;21(6):1399-1402.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Çiğdem KIRSÜLEYMANOĞLU

Doğum Yeri: Samsun / Çarşamba

Doğum Tarihi: 07.08.1993

Medeni Hali: Bekar

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl): Ondokuz Mayıs Üniversitesi Eğitim Bilimleri
Enstitüsü Fen Bilgisi Öğretmenliği / 2016

E-posta: kirsuleymanoglucigdem@gmail.com