

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



**BAZI PESTİSİTLERİN KARBONİK ANHİDRAZ İZOENZİMLERİ
ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

AYBIKE BALTACI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Nahit GENÇER (Tez Danışmanı)
Prof. Dr. Oktay ARSLAN
Prof. Dr. Mahmut ERZENGİN**

BALIKESİR, ŞUBAT - 2021

ETİK BEYAN

Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak tarafımda hazırlanan **“BAZI PESTİSİTLERİN KARBONİK ANHİDRAZ İZOENZİMLERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI”** başlıklı tezde;

- Tüm bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Kullanılan veriler ve sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Tüm bilgi ve sonuçları bilimsel araştırma ve etik ilkelere uygun şekilde sunduğumu,
- Yararlandığım eserlere atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,

beyan eder, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Aybike BALTACI

Bu tez çalışması Balıkesir Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2020/081 nolu proje ile desteklenmiştir.

ÖZET

**BAZI PESTİSİTLERİN KARBONİK ANHİDRAZ İZOENZİMLERİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI
YÜKSEK LİSANS TEZİ
AYBIKE BALTACI
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI**

(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. NAHİT GENÇER)

BALIKESİR, ŞUBAT - 2021

Bu çalışmada insan eritrositlerinden karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA I ve II) saflaştırıldı ve bazı pestisitlerin bu izoenzimler üzerine inhibisyon etkileri araştırıldı. Bu izoenzimler Sepharose-4B-4-(6-Amino-heksiloksi)-benzensulfonamit kimyasal yapısına sahip afinite kolonu kullanılarak insan eritrositlerinden saflaştırıldı. İzoenzimlerin saflığı, Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) ile kontrol edildi. Bu çalışmada kullanılan pestisitlerin hCA-I ve hCA-II izoenzimlerini in vitro olarak farklı düzeylerde inhibe ettiği belirlendi. Bu pestisitlerin içerisinde hCA-I enzimi için en güçlü inhibitör Karbofuran (IC_{50} :6,52 μ M; K_i :3,58 μ M), en zayıf inhibitör ise 1-Naftol (IC_{50} :16,55 μ M; K_i :14,4 μ M) olduğu belirlendi. hCA-II için en güçlü inhibitör Koumatetralilin (IC_{50} :5,06 μ M; K_i :1,62 μ M), en zayıf inhibitör Dimetaklor (IC_{50} 14,6 μ M; K_i :8,44 μ M) olduğu tespit edildi.

ANAHTAR KELİMELER: Pestisit, karbonik anhidraz enzimi, inhibisyon.

Bilim Kod / Kodları : 20104

Sayfa Sayısı : 105

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF SOME PESTICIDES ON CARBONIC ANHYDRATE ISOENZYMES

MSC THESIS

AYBIKE BALTACI

BALIKESIR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

CHEMISTRY

(SUPERVISOR: PROF. DR. NAHİT GENÇER))

BALIKESİR, FEBRUARY - 2021

In this study, carbonic anhydrase isoenzymes (hCA I and II) were purified from human erythrocytes and the inhibition effects of some pesticides on these isoenzymes were investigated. The isoenzymes were purified from human erythrocytes by using an affinity column that has a chemical structure of Sepharose-4B-4- (6-Amino-hexyloxy) - benzenesulfonamide. The purity of the isoenzymes was checked by Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDSPAGE). It was determined that the pesticides used in this study inhibit hCA-I and hCA-II isoenzymes at different levels in vitro. It was determined that the strongest inhibitor for the hCA-I enzyme was Carbofuran (IC₅₀: 6.52 µM; Ki: 3.58 µM) and the weakest one was 1-Naphtol (IC₅₀: 16.55 µM; Ki: 14.4 µM) among these pesticides. It was also found that the strongest inhibitor for the hCA-II enzyme was Coumatetralil (IC₅₀: 5.06 µM; Ki: 1.62 µM) and the weakest one was Dimethachlor (IC₅₀ 14.6 µM; Ki: 8.44 µM).

KEYWORDS: Pesticide, carbonic anhydrase enzyme, inhibition.

Science Code / Codes : 20104

Page Number : 105

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ	v
TABLO LİSTESİ	viii
SEMBOL LİSTESİ	xii
ÖNSÖZ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1 Pestisit.....	1
1.1.1 Pestisitlerin Sınıflandırılması.....	2
1.1.2 Pestisitlerin Genel Özellikleri.....	2
1.1.3 Pestisitlerin Kullanım Alanları	3
1.1.4 Pestisitlerin Canlılar Üzerinde Etkileri	3
1.1.5 Pestisitlerin İnsanlar Üzerinde Etkileri	4
1.1.6 Pestisitlerin Zararları.....	4
1.2 Kullanılan Pestisitler.....	5
1.2.1 Propoksür	5
1.2.2 Alaklor.....	6
1.2.3 1-Naftol	6
1.2.4 Klorpirifos	7
1.2.5 Simazin.....	8
1.2.6 Diklofluanid.....	8
1.2.7 Klorpirifos - Metil.....	9
1.2.8 Azinfos – Etil.....	10
1.2.9 Dimeta Klor	10
1.2.10 Tebukonazol.....	11
1.2.11 Amitraz	12
1.2.12 Dazomet	12
1.2.13 Koumatetralil.....	13
1.2.14 Karbofuran	14
1.2.15 Karbaril	14
1.3 Karbonik Anhidraz Enzimi	15
1.3.1 Karbonik Anhidraz İzoenzimleri.....	16
1.3.2 Karbonik Anhidraz Enziminin Katalizlediği Reaksiyonlar	18
1.3.3 Karbonik Anhidraz Sınıflandırılması.....	19
1.3.4 Karbonik Anhidraz Enziminin Katalitik Mekanizması	20
1.3.5 Karbonik Anhidraz İnhibitörleri.....	21
1.3.6 Karbonik Anhidraz Enziminin Fizyolojik Fonksiyonları	22
2. MATERYAL VE METOD	23
2.1 Materyal	23

2.1.1 Kullanılan Kimyasallar	23
2.1.2 Kullanılan Kimyasal Çözeltiler ve Hazırlanması	24
2.2 Yöntemler	29
2.2.1 Afinite Jelinin Hazırlanması.....	29
2.2.2 Karbonik Anhidraz Enziminin Saflaştırılması	30
2.2.3 Karbonik Anhidraz Aktivitesi Tayin Yöntemleri	32
2.2.4 Protein Tayini	36
2.2.5 Sodyum Dedosilsülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS – Page) İle Enzim Saflığının Kontrolü	37
3. BULGULAR	39
3.1 Enzimin Saflaştırılması.....	39
3.1.1 Afinite Kromatografisi İle Karbonik Anhidraz Enziminin Saflaştırılması	39
3.1.2 Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik.....	40
3.1.3 CA İzoenzimlerinin Afinite Kromatografisi İle Saflaştırma Basamakları.....	41
3.1.4 İnsan Eritrosit Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi	42
3.2 hCA-I VE hCA-II İzoenzimlerinin Hidrataz Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon Etkileri .	42
3.3 DMSO'nun hCA-I ve hCA-II İzoenzimleri Üzerine Etkisi	42
3.4 hCA-I VE hCA-II İzoenzimlerinin Esteraz Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon Etkileri ...	44
3.5 hCA-I VE hCA-II İzoenzimlerinin Esteraz Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon Etkileri ...	59
3.6 p-Nitrofenilasetat Substratı İçin K_m Ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi	74
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	83
5. KAYNAKÇA	90
6. EKLER	102
7. ÖZGEÇMİŞ	105

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Propoksür'un kimyasal yapısı.	5
Şekil 1.2: Alaklor'un kimyasal yapısı.	6
Şekil 1.3: 1-Naftol'ün kimyasal yapısı.	7
Şekil 1.4: Klorpirifos'un kimyasal yapısı.	7
Şekil 1.5: Simazin'in kimyasal yapısı.	8
Şekil 1.6: Diklofluanid'in kimyasal yapısı.	9
Şekil 1.7: Klorpirifos – Metil'in kimyasal yapısı.	9
Şekil 1.8: Azinfos – Etil'in kimyasal yapısı.	10
Şekil 1.9: Dimetaklor'un kimyasal yapısı.	11
Şekil 1.10: Tebukonazol'un kimyasal yapısı.	11
Şekil 1.11: Amitraz'ın kimyasal yapısı.	12
Şekil 1.12: Dazomet'in kimyasal yapısı.	13
Şekil 1.13: Koumatetralil'in kimyasal özellikleri.	13
Şekil 1.14: Karbofuran'ın kimyasal yapısı.	14
Şekil 1.15: Karbaril'in kimyasal yapısı.	15
Şekil 1.16: CA izoenzimlerinin katalitik olarak aktif hücredeki yerleşimleri.	18
Şekil 1.17: Karbonik anhidraz enziminin CO ₂ -hidratasyon reaksiyonunun kataliz mekanizması.	20
Şekil 2.1: Afinite jelinin hazırlanması.	30
Şekil 2.2: Hemolizatin pH:8,7'ye Tris-Base ile ayarlanması.	31
Şekil 2.3: Karbonik Anhidraz enzimi saflaştırılması.	32
Şekil 2.4: p-Nitrofenilasetatin p-nitrofenole dönüşüm reaksiyonu.	33
Şekil 3.1: Kolona tutunmuş hCA-I izoenziminin Protein-Aktivite grafiği.	40
Şekil 3.2: Kolona tutunmuş hCA-II izoenziminin Protein-Aktivite grafiği.	40
Şekil 3.3: Bradford yöntemi ile protein tayini için hazırlanan standart grafik.	41
Şekil 3.4: Afinite kolonundan saflaştırılan hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin SDS-PAGE elektroforezi.	42
Şekil 3.5: DMSO'nun hCA-I izoenziminin aktivitesi üzerine etkisi.	43
Şekil 3.6: DMSO'nun hCA-II izoenziminin aktivitesi üzerine etkisi.	43
Şekil 3.7: Hidrataz aktivitesi metodu ile hCA-I ve hCA- II izoenzimlerinin farklı propoksür inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC ₅₀ değerinin bulunması için çizilen grafik.	44
Şekil 3.8: Hidrataz aktivitesi metodu ile HCA-I ve HCA- II izoenzimlerinin farklı Alaklor inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC ₅₀ değerinin bulunması için çizilen grafik.	45
Şekil 3.9: Hidrataz aktivitesi metodu ile hCA-I ve hCA- II izoenzimlerinin farklı 1- Naftol inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC ₅₀ değerinin bulunması için çizilen grafik.	46
Şekil 3.10: Hidrataz aktivitesi metodu ile HCA-I ve HCA- II izoenzimlerinin farklı Klorpirifos inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC ₅₀ değerinin bulunması için çizilen grafik.	47
Şekil 3.11: Hidrataz aktivitesi metodu ile hCA-I ve hCA- II izoenzimlerinin farklı Simazin inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC ₅₀ değerinin bulunması için çizilen grafik.	48

Şekil 3.12: Hidrataz aktivitesi metodu ile hCA-I ve hCA- II izoenzimlerinin farklı Diklofluanid inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC50 değerinin bulunması için çizilen grafik.	49
Şekil 3.13: Hidrataz aktivitesi metodu ile hCA-I ve hCA- II izoenzimlerinin farklı Klorpirifos – Metil inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC50 değerinin bulunması için çizilen grafik.	50
Şekil 3.14: Hidrataz aktivitesi metodu ile hCA-I ve hCA- II izoenzimlerinin farklı Azinfos – Etil inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC50 değerinin bulunması için çizilen grafik.	51
Şekil 3.15: Hidrataz aktivitesi metodu ile hCA-I ve hCA- II izoenzimlerinin farklı Dimetaklor inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC50 değerinin bulunması için çizilen grafik.	52
Şekil 3.16: Hidrataz aktivitesi metodu ile hCA-I ve hCA- II izoenzimlerinin farklı Tebukonazol inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC50 değerinin bulunması için çizilen grafik.	53
Şekil 3.17: Hidrataz aktivitesi metodu ile hCA-I ve hCA- II izoenzimlerinin farklı Amitraz inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC50 değerinin bulunması için çizilen grafik.	54
Şekil 3.18: Hidrataz aktivitesi metodu ile hCA-I ve hCA- II izoenzimlerinin farklı Dazomet inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC50 değerinin bulunması için çizilen grafik.	55
Şekil 3.19: Hidrataz aktivitesi metodu ile hCA-I ve hCA- II izoenzimlerinin farklı Koumatetralil inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC50 değerinin bulunması için çizilen grafik.	56
Şekil 3.20: Hidrataz aktivitesi metodu ile hCA-I ve hCA- II izoenzimlerinin farklı Karbofuran inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC50 değerinin bulunması için çizilen grafik.	57
Şekil 3.21: Hidrataz aktivitesi metodu ile hCA-I ve hCA- II izoenzimlerinin farklı Karbaril inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC50 değerinin bulunması için çizilen grafik.	58
Şekil 3.22: hCA-I ve hCA- II izoenzimlerinin farklı Karbaril inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC50 değerinin bulunması için çizilen grafik. ...	59
Şekil 3.23: hCA-I ve hCA- II izoenzimlerinin farklı Alaklor inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC50 değerinin bulunması için çizilen grafik. ...	60
Şekil 3.24: hCA-I ve hCA- II izoenzimlerinin farklı 1-Naftol inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC50 değerinin bulunması için çizilen grafik. ...	61
Şekil 3.25: hCA-I ve hCA- II izoenzimlerinin farklı Klorpirifos inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC50 değerinin bulunması için çizilen grafik. ...	62
Şekil 3.26: hCA-I ve hCA- II izoenzimlerinin farklı Simazin inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC50 değerinin bulunması için çizilen grafik. ...	63
Şekil 3.27: hCA-I ve hCA- II izoenzimlerinin farklı Diklofluanid inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC50 değerinin bulunması için çizilen grafik. ...	64
Şekil 3.28: hCA-I ve hCA- II izoenzimlerinin farklı Klorpirifos - Metil inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC50 değerinin bulunması için çizilen grafik. ...	65
Şekil 3.29: hCA-I ve hCA- II izoenzimlerinin farklı Azinfos - Etil inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC50 değerinin bulunması için çizilen grafik. ...	66
Şekil 3.30: hCA-I ve hCA- II izoenzimlerinin farklı Dimetaklor inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC50 değerinin bulunması için çizilen grafik. ...	67
Şekil 3.31: hCA-I ve hCA- II izoenzimlerinin farklı Tebukonazol inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC50 değerinin bulunması için çizilen grafik. ...	68

Şekil 3.32: hCA-I ve hCA- II izoenzimlerinin farklı Amitraz inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC50 değerinin bulunması için çizilen grafik. ..69	69
Şekil 3.33: hCA-I ve hCA- II izoenzimlerinin farklı Dazomet inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC50 değerinin bulunması için çizilen grafik. ..70	70
Şekil 3.34: hCA-I ve hCA- II izoenzimlerinin farklı Koumatetralil inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC50 değerinin bulunması için çizilen grafik. ..71	71
Şekil 3.35: hCA-I ve hCA- II izoenzimlerinin farklı Karbofuran inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC50 değerinin bulunması için çizilen grafik. ..72	72
Şekil 3.36: hCA-I ve hCA- II izoenzimlerinin farklı Karbaril inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC50 değerinin bulunması için çizilen grafik.. 73	73
Şekil 3.37: Karbonik Anhidraz enzimi üzerine Propoksür inhibitörünün p -nitrofenilasetat ile elde edilen Linewear- Burk grafiği.74	74
Şekil 3.38: Karbonik Anhidraz enzimi üzerine Alaklor inhibitörünün p -nitrofenilasetat ile elde edilen Linewear- Burk grafiği.74	74
Şekil 3.39: Karbonik Anhidraz enzimi üzerine 1- Naftol inhibitörünün p -nitrofenilasetat ile elde edilen Linewear- Burk grafiği.75	75
Şekil 3.40: Karbonik Anhidraz enzimi üzerine Klorpirifos inhibitörünün p -nitrofenilasetat ile elde edilen Linewear- Burk grafiği.75	75
Şekil 3.41: Karbonik Anhidraz enzimi üzerine Simazin inhibitörünün p -nitrofenilasetat ile elde edilen Linewear- Burk grafiği.76	76
Şekil 3.42: Karbonik Anhidraz enzimi üzerine Diklofluanid inhibitörünün p -nitrofenilasetat ile elde edilen Linewear- Burk grafiği.76	76
Şekil 3.43: Karbonik Anhidraz enzimi üzerine Klorpirifos - Metil inhibitörünün p -nitrofenilasetat ile elde edilen Linewear- Burk grafiği.77	77
Şekil 3.44: Karbonik Anhidraz enzimi üzerine Azinfos - Etil inhibitörünün p -nitrofenilasetat ile elde edilen Linewear- Burk grafiği.77	77
Şekil 3.45: Karbonik Anhidraz enzimi üzerine Dimetaklor inhibitörünün p -nitrofenilasetat ile elde edilen Linewear- Burk grafiği.78	78
Şekil 3.46: Karbonik Anhidraz enzimi üzerine Tebukonazol inhibitörünün p -nitrofenilasetat ile elde edilen Linewear- Burk grafiği.78	78
Şekil 3.47: Karbonik Anhidraz enzimi üzerine Amitraz inhibitörünün p -nitrofenilasetat ile elde edilen Linewear- Burk grafiği.79	79
Şekil 3.48: Karbonik Anhidraz izoenzimleri üzerine Dazomet inhibitörünün p -nitrofenilasetat ile elde edilen Linewear- Burk grafiği.79	79
Şekil 3.49: Karbonik Anhidraz izoenzimleri üzerine Koumatetralil inhibitörünün p -nitrofenilasetat ile elde edilen Linewear- Burk grafiği.80	80
Şekil 3.50: Karbonik Anhidraz izoenzimleri üzerine Karbaril inhibitörünün p -nitrofenilasetat ile elde edilen Linewear- Burk grafiği.80	80
Şekil 3.51: Karbonik Anhidraz izoenzimleri üzerine Karbofuran inhibitörünün p -nitrofenilasetat ile elde edilen Linewear- Burk grafiği.81	81

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1: Pestisitlerin sınıflandırılması.	2
Tablo 1.2: Propoksur'un kimyasal özellikleri.	5
Tablo 1.3: Alaklor'un kimyasal özellikleri.	6
Tablo 1.4: 1- Naftol'ün kimyasal özellikleri.	6
Tablo 1.5: Klorpirifos'un kimyasal özellikleri.	7
Tablo 1.6: Simazin'in kimyasal özellikleri.	8
Tablo 1.7: Diklofluanid'in kimyasal özellikleri.	8
Tablo 1.8: Klorpirifos – Metil'in kimyasal özellikleri.	9
Tablo 1.9: Azinfos – Etil kimyasal özellikleri.	10
Tablo 1.10: Dimetaklor'un kimyasal özellikleri.	10
Tablo 1.11: Tebukonazol'un kimyasal özellikleri.	11
Tablo 1.12: Amitraz'ın kimyasal özellikleri.	12
Tablo 1.13: Dazomet'in kimyasal özellikleri.	12
Tablo 1.14: Koumatetralil'in kimyasal özellikleri.	13
Tablo 1.15: Karbofuran'ın kimyasal özellikleri.	14
Tablo 1.16: Karbaril'in kimyasal özellikleri.	15
Tablo 1.17: Karbonik anhidraz izoenzimleri [81].	18
Tablo 1.18: Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyon türleri.	19
Tablo 2.1: Elektroferezde kullanılan çözeltiler ve miktarları.	26
Tablo 2.2: Elektroferezde kullanılan yürütme tamponu.	26
Tablo 2.3: Elektroferezde kullanılan renklendirme çözeltisi.	26
Tablo 2.4: Elektroferezde Yığılma Ve Ayırma Jelleri.	26
Tablo 2.5: Kullanılan pestisit inhibitörlerinin açık kimyasal yapıları.	35
Tablo 3.1: hCA-I ve hCA-II izoenzimleri için saflaştırma tablosu.	41
Tablo 3.2: Propoksur inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	44
Tablo 3.3: Propoksur inhibitörünün hCA – II enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	44
Tablo 3.4: Alaklor inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	45
Tablo 3.5: Alaklor inhibitörünün hCA – II enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	45
Tablo 3.6: 1- Naftol inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	46
Tablo 3.7: 1- Naftol inhibitörünün hCA – II enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	46
Tablo 3.8: Klorpirifos inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	47
Tablo 3.9: Klorpirifos inhibitörünün hCA – II enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	47
Tablo 3.10: Simazin inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	48
Tablo 3.11: Simazin inhibitörünün hCA – II enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	48

Tablo 3.12: Diklofluanid inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	49
Tablo 3.13: Diklofluanid inhibitörünün hCA – II enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	49
Tablo 3.14: Klorpirifos – Metil inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	50
Tablo 3.15: Klorpirifos – Metil inhibitörünün hCA – II enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	50
Tablo 3.16: Azinfos – Etil inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	51
Tablo 3.17: Azinfos – Etil inhibitörünün hCA – II enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	51
Tablo 3.18: Dimetaklor inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	52
Tablo 3.19: Dimetaklor inhibitörünün hCA – II enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	52
Tablo 3.20: Tebukonazol inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	53
Tablo 3.21: Tebukonazol inhibitörünün hCA – II enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	53
Tablo 3.22: Amitraz inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	54
Tablo 3.23: Amitraz inhibitörünün hCA – II enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	54
Tablo 3.24: Dazomet inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	55
Tablo 3.25: Dazomet inhibitörünün hCA – II enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	55
Tablo 3.26: Koumatetralil inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	56
Tablo 3.27: Koumatetralil inhibitörünün hCA – II enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	56
Tablo 3.28: Karbofuran inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	57
Tablo 3.29: Karbofuran inhibitörünün hCA –II enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	57
Tablo 3.30: Karbaril inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	58
Tablo 3.31: Karbaril inhibitörünün hCA – II enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	58
Tablo 3.32: Propoksür inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	59
Tablo 3.33: Propoksür inhibitörünün hCA – II enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	59
Tablo 3.34: Alaklor inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	60
Tablo 3.35: Alaklor inhibitörünün hCA – II enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	60
Tablo 3.36: 1-Naftol inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	61

Tablo 3.37: 1-Naftol inhibitörünün hCA – II enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	61
Tablo 3.38: Klorpirifos inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	62
Tablo 3.39: Klorpirifos inhibitörünün hCA – II enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	62
Tablo 3.40: Simazin inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	63
Tablo 3.41: Simazin inhibitörünün hCA – II enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	63
Tablo 3.42: Diklofluanid inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	64
Tablo 3.43: Diklofluanid inhibitörünün hCA – II enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	64
Tablo 3.44: Klorpirifos - Metil inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	65
Tablo 3.45: Klorpirifos - Metil inhibitörünün hCA – II enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	65
Tablo 3.46: Azinfos - Etil inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	66
Tablo 3.47: Azinfos - Etil inhibitörünün hCA – II enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	66
Tablo 3.48: Dimetaklor inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	67
Tablo 3.49: Dimetaklor inhibitörünün hCA – II enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	67
Tablo 3.50: Tebukonazol inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	68
Tablo 3.51: Tebukonazol inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	68
Tablo 3.52: Amitraz inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	69
Tablo 3.53: Amitraz inhibitörünün hCA – II enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	69
Tablo 3.54: Dazomet inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	70
Tablo 3.55: Dazomet inhibitörünün hCA – II enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	70
Tablo 3.56: Koumatetralil inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	71
Tablo 3.57: Koumatetralil inhibitörünün hCA – II enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	71
Tablo 3.58: Karbofuran inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	72
Tablo 3.59: Karbofuran inhibitörünün hCA – II enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	72
Tablo 3.60: Karbaril inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	73
Tablo 3.61: Karbaril inhibitörünün hCA – II enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.	73

Tablo 3.62: Kullanılan pestisitlerin V_{max} - K_M değerleri.....	81
Tablo 3.63: Kullanılan pestisitlerin genel inhibisyon tablosu.	82

SEMBOL LİSTESİ

CA	: Karbonik anhidraz
DMSO	: Dimetil Sulfoksit
E	: Enzim
E.C.	: Enzim kod numarası
EÜ	: Enzim Ünitesi
hCA – I	: İnsan karbonik anhidraz I izoenzimi
hCA – II	: İnsan karbonik anhidraz II izoenzimi
I	: İnhibitör
IC50	: Enzimin aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
K_i	: Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti
K_M	: Maksimum hızın yarısına neden olan substrat konsantrasyonu
M	: Molar
M_A	: Moleküler ağırlık
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
rpm	: Devir/ dakika
S	: Substrat
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
TEMED	: N,N,N',N'-Tetrametilendiamin
U	: Enzim ünitesi
V	: Enzimatik reaksiyon hızı
V_{max}	: Maksimum hız
ΔA	: Absorbans farkı

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve deneyimleriyle beni yönlendiren, çalışmalarım da yardımlarını esirgeyemeyen ilgi, anlayış ve hoş görüşü ile her konuda yol gösteren, kıymetli danışman hocam sayın Prof. Dr. Nahit GENÇER' e en derin saygı, minnet ve şükranlarımı sunarım.

Yüksek lisans çalışmam boyunca bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, desteğini her zaman gördüğüm değerli hocalarım Prof. Dr. Oktay ARSLAN, Doç. Dr. Semra IŞIK ve Uzm. Dr. Adem ERGÜN'e de saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen laboratuvar arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde bana desteğini esirgemeyen kıymetli babam Kadir BALTACI, kıymetli annem Aynur BALTACI ve kıymetli kardeşim Ayberk BALTACI'ya teşekkürlerimi ve minnetlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Balıkesir, 2021

Aybike Baltacı

1. GİRİŞ

1.1 Pestisit

Dünya nüfusundaki hızlı artış sebebiyle gelecek yıllarda dünyada sorun yaratacak olan, suscul, açlık ve karasal problemleri ekosistemlerde birim alandan daha fazla ve verimli ürün alınmasıyla giderilmeye çalışılmaktadır [1]. Bu amaçla, tohum kaybının yanında ürün kaybına neden olan tarımsal hastalıkların ve benzeri zararlı organizmaların etkilerinden korumak amacı ile tarım alanlarında çeşitli kimyasallar uygulanmaktadır. Bu kimyasallar, genel olarak pestisit olarak isimlendirilir [2,3].

Pestisitler; besin maddelerinin “üretimi, tüketimi ve depolanmaları” sırasında besinlerin ve zarar veren mikroorganizmalar değerini bozan zararlıları yok etmek, uzaklaştırmak ayrıca bitki büyümesini kontrol etmek amacıyla kullanılan biyolojik ya da kimyasal üründür diye de tanımlanabilir [4,5].

Pestisitler; kullanımı kolay ve maliyeti düşük olması sebebiyle fazla ve bilinçsiz şekilde kullanılmaktadır [6]. Hasılatındaki ürünleri; böceklerden, yabancı otlardan, hastalıklardan ve diğer olumsuz etkilerden koruyarak verim ve kaliteyi yükseltmesi sebebiyle tarımda oldukça önemli bir yere sahiptir [7].

Pestisitler ‘ etkili madde’ veya ‘ aktif madde ‘ olarak adlandırılabilir. Pestisitinin aktif kısmı etken madde olarak bilinir. Pestisitinin içinde bulunan etkili madde öldürücü etki gösteren ana maddedir [8,9]. Formülasyon ise zirai ilaç yapımında kullanılan aktif maddelerin bir takım yardımcı maddeler ile karıştırılması ve kullanılmasına denir. Formülasyon uygulanmasının sebebi çevre ve canlıların sağlığı açısından olabildiğince daha güvenli, az zararlı ve maliyeti daha düşük olmasını sağlamaktır [9]. Pestisitinin ve formülasyonunun tipine, uygulanma şekline ve tarımsal alanın yapısına göre zararlı etkilerin dozu ayarlanır. Tüm pestisitler sadece hedef organizmaları değil aynı zamanda omurgalı ve omurgasız diğer tüm organizmaların da yaşam faaliyetlerini etkilemektedir [10].

Pestisitler doğada kimyasal, fiziksel ve biyolojik süreçlerle parçalanıp yavaş bir şekilde yok edilmektedir, aynı zamanda içerdikleri kimyasal yapı özelliklerinden dolayı oldukça zor parçalanırlar. Bazı pestisitler ise parçalandıktan sonra ana bileşikleri çok daha tehlikeli

kimyasallara dönüşmektedir. Ayrıca yapay pestisitler çevrede oldukça yüksek düzeyde kalıcı bir etkiye sahiptir [3,11].

Pestisitler doğada buharlaşarak, başka alanlara sürüklenerek veya süzülerek yer değiştirmektedir. Bu sebeple pestisitler hedef alanın dışında da etki gösterirler [12].

1.1.1 Pestisitlerin Sınıflandırılması

Pestisitler; kullanım alanları, etki mekanizmaları, kullanıldıkları zararlı grubu, zararlının biyolojik ömrü, formülasyon şekli ve içeriğindeki aktif madde gruplarına göre sınıflandırılabilirler [13].

Bu sınıflandırma çeşitlerinden en çok tercih edileni zararlı grubuna göre yapılan sınıflandırmadır. Bu sınıflandırma da pestisitler sekiz alt gruba ayrılmaktadır [14,15].

Tablo 1.1: Pestisitlerin sınıflandırılması.

PESTİSİT TÜRÜ	SINIFLANDIRILMASI
İntektisitler	Böcek Öldürücüler
Akarisitler	Akar Öldürücüler
Herbisitler	Ot Öldürücüler
Fungusitler	Mantar Öldürücüler
Rodentisitler	Fare Öldürücüler
Mollusitler	Yumuşakça Öldürücüler
Nematisitler	Nematod Öldürücüler
Avisitler	Kuş Öldürücüler

1.1.2 Pestisitlerin Genel Özellikleri

Pestisitler canlı hücrelerde birikebilen ve uzun bir süre bozulmadan bitki, su veya toprakta kalabilen kimyasaldır. Toksik özelliğe sahip bir maddenin pestisit olarak kullanılabilmesi için bazı kriterlere sahip olması gerekir [16]. Bu özellikler aşağıdaki gibi sıralanmaktadır:

- Stabil olmalı
- Kolay uygulanabilir
- Hedef canlıya karşı zehirli olmalı
- Ucuz
- Güvenilir
- Çevre ve canlı organizmaya zarar vermeyen

- Toksik olmayan maddelere basit bir şekilde dönüştürülebilen
- Biyolojik olarak aktif olmalıdırlar [10].

Pestisitlerde aranılan en önemli özellik zararlı olan hayvan ve bitkilere karşı toksik ancak zararlı olmayan hayvan, bitki ve insanlara karşı antitoksik olmasıdır [17].

1.1.3 Pestisitlerin Kullanım Alanları

Pestisitlerin başlıca kullanım alanları şunlardır:

- Tarımsal üretim
- Gıda saklanması
- Böcek kontrolü
- Ormancılık
- İnşaat
- Ev ve bahçeler
- Hayvancılık
- Bahçecilik
- Toplum hijyeni
- Balık yetiştiriciliği [18].

1.1.4 Pestisitlerin Canlılar Üzerinde Etkileri

Pestisitlerin görevi istenmeyen organizmaları imha etmektir. Birçok pestisit sadece hedef olan organizmalara değil diğer canlılara karşı da tehlike yaratmaktadır. Pestisitlerin zehirlilik oranı içerdiği etken maddeler ve bu maddelerin oranlarına göre değişmektedir.

Canlılar pestisitleri organizmalarına üç farklı yolla almaktadır [10,19]. :

1. Ağız yoluyla; tüketilen pestisitler ağızda bulunan lipaz ve amilaz enzimleriyle etkileşime girerek bazı metabolitlere dönüşürler. Bu metabolitler alınan pestisitinin aktif maddesine oranla daha az veya daha fazla zehirli ürün oluşturabilmektedir.

2. Deri yoluyla; organizmaya alınan pestisit deri tabakalarından emilerek sinir sistemine ulaşır ve canlının ölümüne sebep olur.
3. Solunum yoluyla; organizmaya alınan pestisitler difüzyon ile damarlardan kana geçerek organlara ulaşır ve canlının ölümüne sebep olur. Ayrıca bu yolla pestisitler hızlı bir şekilde organizmaya girmektedir.

Pestisitler yüksek toksisiteye sahiptir. Belirli bir miktarda hedef hayvana uygulanan pestisit canlının ölümüne sebep olur ancak en önemli sorun bu miktar insanların tolerans limiti içerisinde olabilme ihtimalidir. Bu da insanın ciddi kronik hastalıklar yaşamasına sebep olmaktadır [12].

1.1.5 Pestisitlerin İnsanlar Üzerinde Etkileri

Pestisitlerin insan sağlığı üzerindeki etkileri şunlardır:

- Canlı ölümü
- Kanser
- Derinin üzerinde tahriş ve yaraların oluşumu
- Bağışıklık ve sinir sisteminin bozulması
- Mutasyon
- Yaraların iyileşmemesi ve hücre yenilenmesini engellemektedir.

Yüksek dozda pestisit bulunan gıdaların vücuda alınmasıyla akut ya da kronik zehirlenmeler meydana gelmektedir. Akut zehirlenmeler organizma hızlı bir şekilde ve şiddetli etki gösterdikleri için canlının direk ölümüne sebep olmaktadır [17]. Kronik zehirlenmeler ise organizma uzun bir sürede ve yavaş etki etmektedir. Canlının direk ölümüne değil de çeşitli ciddi hastalıklara (kanser, deride tahriş vb.) neden olmaktadır [17,20].

1.1.6 Pestisitlerin Zararları

Pestisitler toksik kimyasal madde olması sebebiyle canlılar ve ekosisteme zarar vermektedir. Pestisit kalıntılarının en sık rastlandığı yer gıda ürünleridir[21].

Bilinçsiz bir şekilde kullanılan pestisitler kullandığımız gıda maddeleri üzerinde kalarak canlı sağlığına oldukça tehlike sunmaktadır[22].

Teknik kullanım talimatına uyulmadan kullanılan pestisitler birçok alanda kalıntı oluşturmaktadır. Kalıntılar gıda maddelerinde, toprakta, suda ve havada gözlemlenebilir. Bu pestisitler bilinçsiz bir şekilde parçalanmasıyla kendilerinden daha zehirli maddeler üretmektedir. Bu zehirli bileşikler canlı organizmada bazı hastalıklara sebep olmaktadır. Bu hastalıklara örnek olarak: kanser, sinir sistemi bozukluğu verilebilir [23,24].

1.2 Kullanılan Pestisitler

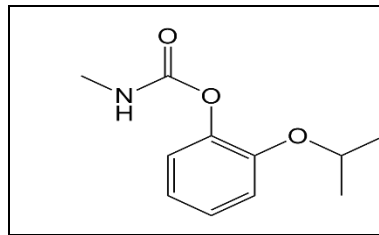
1.2.1 Propoksür

Propoksür karbamatlı insektisit olup tarım ilacı olarak kullanılan bir pestisittir. (Şekil 1.2.1). 1959 yılında piyasaya sunulan Propoksür Dünya Sağlık Teşkilatı (WHO) tarafından kabul edilmiş olup insan sağlığına uygun olarak kullanılan insektisittir. Propoksür'un toz, aerosol ve tanecik şeklinde farklı formülasyonlara sahip fiziksel özellikleri mevcuttur [25].

Tablo 1.2: Propoksür'un kimyasal özellikleri.

KİMYASAL FORMÜLÜ	C ₁₁ H ₁₅ NO ₃
IUPAC ADI	2-izoproksi fenil N-metil Karbamat
MOLEKÜL AĞIRLIĞI	209,25 g/mol
YOĞUNLUK	1,082 g/cm ³

Propoksür tarım alanlarında bit, pire, akarlar, karıncaları önlemek ve sıtma hastalığına karşı sivrisinek oluşumunu engellemek için kullanılır [25].



Şekil 1.1: Propoksür'un kimyasal yapısı.

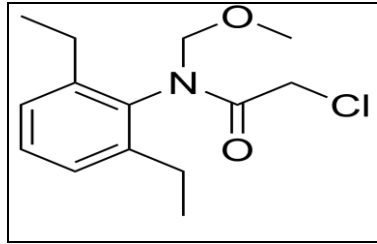
1.2.2 Alaklor

Alaklor birçok tarım alanında çim ve mahsullerdeki yıllık geniş yapraklı yabancı otların kontrolünde kullanılan kloroaseranilit grubundan olan herbisit türevli bir pestisitir (Şekil 1.2.2). Alaklor bitkilerin kök uzamasını engeller ve bitkinin protein üretme kabiliyetini azaltarak büyümesine engellemektedir. Alaklor kokusuz ve beyaz bir katı madde olması gibi fiziksel özelliklere sahiptir [26].

Tablo 1.3: Alaklor'un kimyasal özellikleri.

KİMYASAL FORMÜLÜ	C ₁₄ H ₂₀ ClNO ₂
IUPAC ADI	2-kloro-2,6-dietil-N-metoksimetilasetanilid
MOLEKÜL AĞIRLIĞI	269,77 g/mol
YOĞUNLUK	1,133 g/cm ³

Alaklor tümör hücrelerini aktive ederek kanser oluşumuna sebep olmaktadır. Bu nedenle Alaklor USEPA (United States Environmental Protection Agency) tarafından B2 grubu kanserojen madde olarak tanımlanmıştır [10,27] .



Şekil 1.2: Alaklor'un kimyasal yapısı.

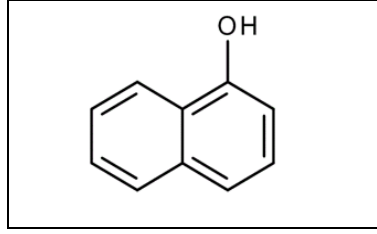
1.2.3 1-Naftol

Karbaril karbamat grubuna ait bir böcek ilacı olarak kullanılan bir pestisitir. Karbaril'in sulu ortamda bozunmasıyla 1- naftol oluşur. Bozunma sonucu oluşan 1- Naftol oldukça toksik flüoresan beyaz katı organik bileşiktir [28].

Tablo 1.4: 1- Naftol'ün kimyasal özellikleri.

KİMYASAL FORMÜLÜ	C ₁₀ H ₈ O
IUPAC ADI	Naftalen-1-ol
MOLEKÜL AĞIRLIĞI	144,17 g/mol
YOĞUNLUK	1,1 g/cm ³

1-Naftol Sitokrom P450 ile ksenobiyotiklerin metabolizmasında bir ara madde olan karbar ve naftalinin metabolitidir [29].



Şekil 1.3: 1-Naftol'ün kimyasal yapısı.

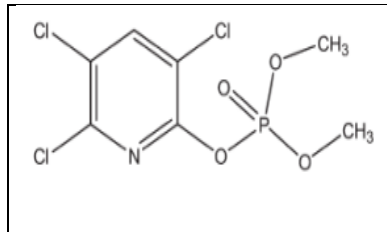
1.2.4 Klorpirifos

Klorpirifos organik fosforlu insektisit; böcek ve tarım ilacı olarak kullanılan bir pestisitir. Klorpirifos beyaz kristal şeklinde ve kükürt kokulu fiziksel forma sahiptir [30]. Apolar bir moleküldür ve sudaki çözünürlüğü oldukça düşüktür [31]. Klorpirifos'un aktif bölgesinde fosfor atomu bulunmaktadır. Bu Fosfor atomu kullanılan pestisit kimyasal yapısının, özelliğine bağlı olarak doğadaki kalıcılığını belirlemektedir. Aynı zamanda Fosfor atomu pestisit parçalanması sırasında kullanılan hidroliz ve oksidasyon reaksiyonlarını etkilemektedir [32].

Tablo 1.5: Klorpirifos'un kimyasal özellikleri.

KİMYASAL FORMÜLÜ	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS
IUPAC ADI	o, o-dietil o-3,5,6-trikloro-2-piridmonotio fosfat
MOLEKÜL AĞILIĞI	350,62 g/mol
YOĞUNLUK	1,4 g/cm ³

Klorpirifos Asetilkolin esteraz enzimini inhibe etmektedir. Böylece böceklerin sinir sistemlerini aktive ederek canlının ölümüne sebep olmaktadır. Klorpirifos solunum ve deri yoluyla vücuda alınarak orta derece zehirleyici olarak belirlenmiştir[33]. Ayrıca klorpirifos çocuklarda gelişme geriliği, davranış bozukluğuna sebep olmaktadır [34,35].



Şekil 1.4: Klorpirifos'un kimyasal yapısı.

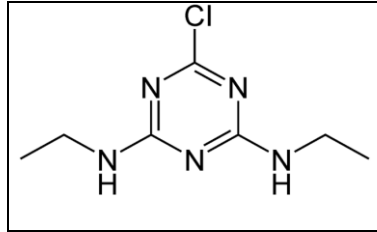
1.2.5 Simazin

Simazin tarım alanlarında kullanılan herbisit türevine ait bir pestisitir. Simazin tarım alanlarında geniş yapraklı yabancı otları ve yıllık otları fotosentetik elektron taşıma işlemi ile inhibe ederek onların kontrol altında tutulmasını sağlar [36]. Aynı zamanda su sistemlerinde yosun oluşumunu engellemek için kullanılan bir tarım ilacıdır. Simazin sıvı formda bulunan bir fiziksel yapıdadır [37].

Tablo 1.6: Simazin'in kimyasal özellikleri.

KİMYASAL FORMÜLÜ	C ₇ H ₁₂ ClN ₅
IUPAC ADI	6-kloro-N, N-dietyl1,3,5-triazin-2,4-diamin
MOLEKÜL AĞILIĞI	201.66 g/mol
YOĞUNLUK	1,3 g/cm ³

Şekil 1.5'de görüldüğü gibi Simazin pestisitinin yapısındaki Karbon/Azot halkası pestisit kararlılığını ve aromatikliğini sağlar. Bu özelliği ile pestisit zor parçalanmaktadır, bu sebeple doğada kalıcılık süresi artmaktadır [37].



Şekil 1.5: Simazin'in kimyasal yapısı.

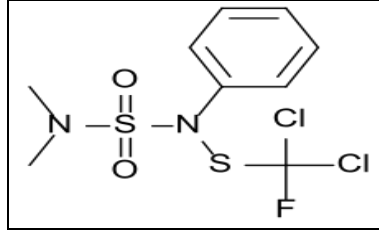
1.2.6 Diklofluanid

Diklofluanid tarım ilacı olarak kullanılan fungusit grubuna ait bir pestisitir [38].

Tablo 1.7: Diklofluanid'in kimyasal özellikleri.

KİMYASAL FORMÜLÜ	C ₉ H ₁₁ Cl ₂ FN ₂ O ₂ S ₂
IUPAC ADI	N-dikloroflorometiltio-N', N'-dimetil-N-fenilsülfamid
MOLEKÜL AĞILIĞI	333.2 g/mol
YOĞUNLUK	1,55 g/cm ³

Diklofluanid tarım alanlarında bitki ve meyveleri hastalıklardan (küf, çürük, mantar vb.) korumak için kullanılan bir pestisitir. Bunlara ilaveten meyve depolanmasında meyvenin uzun süre kalıcı olması, bozunmaması için kullanılmaktadır [37].



Şekil 1.6: Diklofluanid'in kimyasal yapısı.

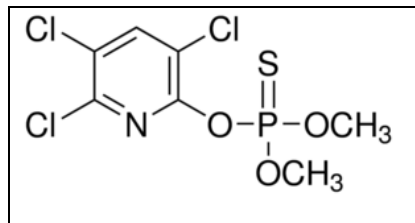
1.2.7 Klorpirifos - Metil

Klorpirifos – Metil; böcek ve tarım ilacı olarak kullanılan organofosfat grubunda yer alan bir insektisittir. Sebze ve meyvelerin depolanmasında oluşabilecek zararlı etkilerin önlenmesini sağlamaktadır. Ayrıca bitkilerde oluşabilecek hastalıklara karşı bitkileri korumaktadır. Tarım ilacı olarak ise ev böceklerine ve sivrisineklere karşı kullanılmaktadır [39].

Tablo 1.8: Klorpirifos – Metil'in kimyasal özellikleri.

KİMYASAL FORMÜLÜ	C ₇ H ₇ Cl ₃ NO ₃ PS
IUPAC ADI	O,O-dimetil O-3,5,6-trikloro-2-piridil fosforotiyoat
MOLEKÜL AĞILIĞI	322,5 g/mol
YOĞUNLUK	1,67 g/cm ³

Klorpirifos – Metil; WHO (World Health Organization) 'ne göre (IV) az zehirli ilaç grubuna girmektedir. Yine de az miktarda bile vücuda alınmasıyla canlılar üzerinde nörolojik sorunlara yol açmaktadır. Yani beyin, omurilik gelişimlerini olumsuz etkilemektedir [40].



Şekil 1.7: Klorpirifos – Metil'in kimyasal yapısı.

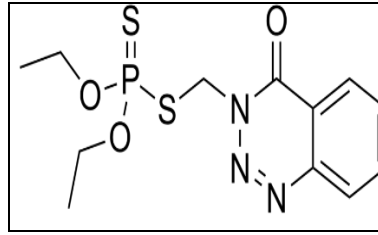
1.2.8 Azinfos – Etil

Azinfos– Etil; tarım ve böcek ilacı olarak kullanılan organofosfor grubuna ait insektisit ve akarisit olarak kullanılan bir pestisitir. Azinfos–etil renksiz kristal şekline sahip fiziksel bir formdadır [41]. Canlı metabolizmasında sistemik olarak etkili olmayıp vücutta birikmemektedir [42].

Tablo 1.9: Azinfos – Etil kimyasal özellikleri.

KİMYASAL FORMÜLÜ	C ₁₂ H ₁₆ N ₃ O ₃ PS ₂
IUPAC ADI	S-(3.4-Dihidro-4-Oksobenzo(D)- (1,2,3)- Triazin- 3-il Metil) O,O-Dietil Fosforotiyoat
MOLEKÜL AĞILIĞI	345,4 g/mol
YOĞUNLUK	1,284 g/cm ³

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından tehlike sınıfı IB olarak tanımlanan canlılar için oldukça zehirli ve tehlikeli olduğu ispatlanmıştır [43].



Şekil 1.8: Azinfos – Etil'in kimyasal yapısı.

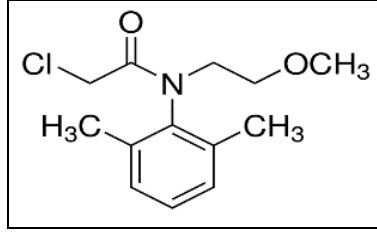
1.2.9 Dimeta Klor

Dimetaklor böcek ve tarım ilacı olarak kullanılan herbisit grubunda olan bir pestisitir. Yıllık ve yabancı otları kontrol etmek için kullanılmaktadır. Dimetaklor renksiz, kokusuz ve kristal fiziksel forma sahiptir [44].

Tablo 1.10: Dimetaklor'un kimyasal özellikleri.

KİMYASAL FORMÜLÜ	Cl ₁₃ H ₁₈ ClNO ₂
IUPAC ADI	(RS)-2-kloro- N- (2,6-dimetilfenil) -N- (2-metoksietil) asetamid
MOLEKÜL AĞILIĞI	255,74 g/mol
YOĞUNLUK	1,23 g/cm ³

Tarım alanında ise canlının hücre bölünmesini engellemektedir. Dimetaklor pestisit olmasının yanı sıra ksenobiyotik, çevre kirletici olarakta kullanılmaktadır [45].



Şekil 1.9: Dimetaklor'un kimyasal yapısı.

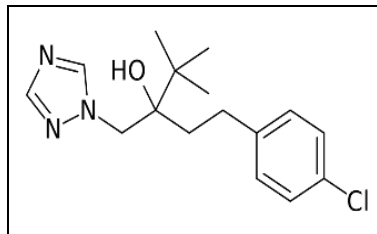
1.2.10 Tebukonazol

Tebukonazol tarım ilacı olarak kullanılan geniş etki alanına sahip fungusit grubuna ait bir pestisittir. Tebukonazol'un aktif maddesinde preparat triazole bulunmaktadır. Bu madde hayvan hücrelerinde hücre zarında bulunan ve kolesterolün hayvan hücrelerinde görev yaptığı fonksiyonları inhibe etmektedir. Tebukonazol'un fiziksel özellikleri renksiz veya beyaz renkte, kristal yapıda ve kendine has bir koku olmasıdır [46].

Tablo 1.11: Tebukonazol'un kimyasal özellikleri.

KİMYASAL FORMÜLÜ	C ₁₆ H ₂₂ ClN ₃ O
IUPAC ADI	1- (4-klorofenil) -4,4-dimetil-3- (1,2,4-triazol-1-ilmetil)pentan-3-ol
MOLEKÜL AĞILIĞI	307,82 g/mol
YOĞUNLUK	1,25 g/cm ³

Tebukonazol tarım alanlarında bitkileri hastalıklardan korumaktır. Ayrıca hastalık kapmış bitkilerde hastalığın yayılmasını önlemektedir[47].



Şekil 1.10: Tebukonazol'un kimyasal yapısı.

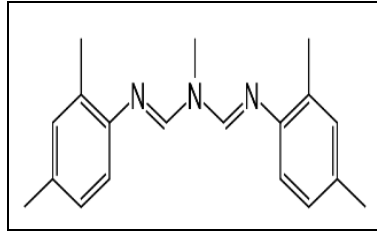
1.2.11 Amitraz

Amitraz böcek ve tarım ilacı olarak kullanılan sistemik olmayan akarasit ve insektisittir grubuna ait bir pestisitir. Organik fosforlu ve karbamat grubuna ait pestisitlere karşı dayanıklı türlere etkili olup onların bozunmasını sağlamaktadır [48].

Tablo 1.12: Amitraz'ın kimyasal özellikleri.

KİMYASAL FORMÜLÜ	C ₁₉ H ₂₃ N ₃
IUPAC ADI	N'-(2,4-dimetilfenil)-N-[(2,4-dimetilfenil)iminometil]-N-metilmetanimidamid
MOLEKÜL AĞILIĞI	293,41 g/mol
YOĞUNLUK	0,98 g/cm ³

Amitraz tarım ilacı olarak çeşitli bitkilerin gelişimlerini kontrol etmek için kullanılmaktadır. Böcek ilacı olarak ise canlının sinir sistemi aktivitesini azaltarak ölümüne sebep olmaktadır. Genellikle sokucu ve emici böceklere karşı kullanılmaktadır[48][49].



Şekil 1.11: Amitraz'ın kimyasal yapısı.

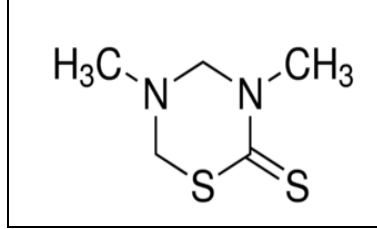
1.2.12 Dazomet

Dazomet; tarım ve böcek ilacı olarak kullanılan fumigant grubuna ait bir pestisitir. Dazomet bitki büyümesini engelleyen zararlı yapıları, yabancı ot oluşmasını engellemek için kullanılan bir pestisitir. Ayrıca toprak yapısına zarar veren canlıları (küf, mantar, bakteri) önlemek için kullanılmaktadır [50,51].

Tablo 1.13: Dazomet'in kimyasal özellikleri.

KİMYASAL FORMÜLÜ	C ₅ H ₁₀ N ₂ S ₂
IUPAC ADI	3,5-dimetil-1,3,5-tiyadiazinan-2-tion
MOLEKÜL AĞILIĞI	162,27 g/mol
YOĞUNLUK	1,29 g/cm ³

Dazomet'in parçalanmasıyla Metil İzotiyosiyanat oluşmaktadır. Bu kimyasal bitkilerin büyümesini engelleyen canlılara zarar vererek zehirli bir gaz açığa çıkarmaktadır. Dazometin çeşitli yollarda su kaynaklarına ulaşmasıyla su canlıları için oldukça zehirli etki oluşturmaktadır. Dazomet gözleri tahriş edici etkiye sahiptir aynı zamanda canlıyı akut olarak zehirlenmektedir[52].



Şekil 1.12: Dazomet'in kimyasal yapısı.

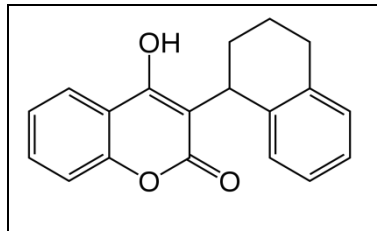
1.2.13 Koumatetralil

Koumatetralil; kemirgen öldürücü bir böcek ilacı olan bir pestisitir [53].

Tablo 1.14: Koumatetralil'in kimyasal özellikleri.

KİMYASAL FORMÜLÜ	C ₁₉ H ₁₆ O ₃
IUPAC ADI	4-hidroksi-3-kromen-2-on
MOLEKÜL AĞIRLIĞI	292,33 g/mol
YOĞUNLUK	1,19 g/cm ³

K vitamini antikogulanı olarak kullanılmaktadır. Bu özelliğiyle kanın pıhtılaşmasını önleyerek canlının ölümüne sebep olmaktadır. Kumarmetrolin aynı zamanda canlıların sekonder zehirlenmesine sebep olmaktadır; yani karaciğer de pestisit birikerek canlının yaşamını olumsuz etkilemektedir [54].



Şekil 1.13: Koumatetralil'in kimyasal özellikleri.

1.2.14 Karbofuran

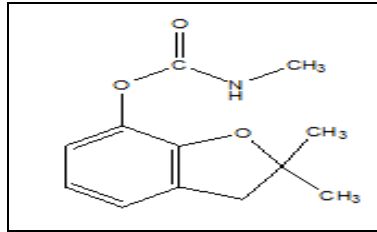
Karbofuran; karbamat grubuna ait böcek ilacı olarak kullanılan bir pestisittir. Karbofuran kimyasal özellikleri açısından sistematik etkili intektisit, akarisit ve nematositler arasında yer alan en toksik karbamatlı birleşiktir. Karbofuran beyaz renkte kristal bir formu ve kendine has kokusu olan fiziksel özelliklere sahiptir.

Karbofuran ısıya maruz kaldığında toksik azot oksiti meydana getirmektedir. Bu da canlı da akut toksisiteye neden olmaktadır [55,56] .

Tablo 1.15: Karbofuran'ın kimyasal özellikleri.

KİMYASAL FORMÜLÜ	C ₁₂ H ₁₅ NO ₃
IUPAC ADI	2,2-Dimetil-2,3-dihidro-1-enzofuran-7-il metilkarbamat
MOLEKÜL AĞILIĞI	221.105 g/mol
YOĞUNLUK	1,18 g/cm ³

Karbofuran tarım alanlarında istenmeyen böcekleri önlemek için kullanılmaktadır. Ayrıca karbofuran Asetilkolinesteraz enzimini inhibe ederek canlının sinir sistemini etkilemektedir [57][58].



Şekil 1.14: Karbofuran'ın kimyasal yapısı.

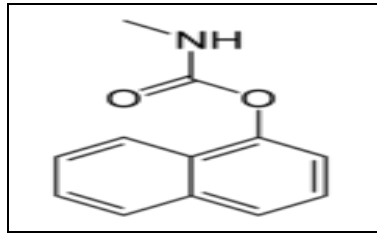
1.2.15 Karbaril

Karbaril; karbamat grubuna ait oldukça zehirli bir böcek ilacı olan bir pestisittir. Karbaril çeşitli şartlarda (yüksek sıcaklık, düşük pH) kolayca bozularak 1-Naftol'e dönüşmektedir. Oluşan ana ürün karbarilden daha zehirli bir birleşiktir. Karbaril beyaz renkte kristal katı forma sahip fiziksel özellikleri mevcuttur. Karbaril tarım alanlarında istenmeyen böceklerin kontrolünde kullanılmaktadır [55].

Tablo 1.16: Karbaril'in kimyasal özellikleri.

KİMYASAL FORMÜLÜ	C ₁₂ H ₁₁ NO ₂
IUPAC ADI	1-Naftil Metil Karbamat
MOLEKÜL AĞIRLIĞI	201,22 g/mol
YOĞUNLUK	1,2 g/cm ³

Karbaril Asetilkolin enzimini inhibe etmektedir. Bunun sonucunda canlının sinir sistemi zarar görmektedir. Karbaril canlı vücuduna alınırsa kaslarda olumsuz etkiler (titreme, çarpınma) ve felce sebep olup canlının ölümüne neden olmaktadır [10,59].



Şekil 1.15: Karbaril'in kimyasal yapısı.

1.3 Karbonik Anhidraz Enzimi

Karbonik Anhidraz (CA, Karbonat Hidroliyz, E.C.4.2.1.1), canlılarda birçok dokuda bulunmaktadır. CA'nın en önemli görevi; canlı hücrelerin yaşamının devam etmesi için canlı hücrede oluşan CO₂'in farklı hücrelere taşınması veya dışarı atılmasını sağlamaktır. Enzim 30 kDa molekül kütlesine sahip olduğu belirlenmiştir [60,61,62].



Denklemden meydana gelen H₂CO₃; Karbonik Anhidraz enziminin denge reaksiyonu ile hızlı bir şekilde HCO₃⁻ ve H⁺ iyonlarına ayrışmaktadır. Karbonik Anhidraz enziminin bir diğer görevi de CO₂ ve HCO₃⁻ arasındaki dengeyi katalizlemektir. Aynı zamanda oluşan H₂CO₃ kan ve hücreler arasında tampon oluşturmaktır [63,64].

Karbonik Anhidraz enzimi metalloenzim olup enzimin aktif bölgesinde Çinko (Zn⁺²) iyonu bulunmaktadır [65]. Enzimlerin içerdikleri metal iyonları kimyasal aktiviteyi arttıran

özelliklere sahiptirler. Bu özellikler pozitif yüklerin oluşması ve kinetik olarak bağların stabil kalabilmesini sağlamaktır [66].

Karbonik Anhidraz enzimi; önce omurgalılar ve memelilerde daha sonra da bitkilerde, alglerde ve bazı bakterilerde bulunmuştur [67]. Karbonik Anhidraz enzimi ilk olarak sığır eritrositlerinden saflaştırılmıştır. Karbonik Anhidraz enzimi, bitkilerde genellikle kloroplastlarda ve az miktarda sitozolde bulunmaktadır. Bu durumda Karbonik Anhidraz enzimi bitkilerde fotosentez esnasında elektron transportunu sağlayarak bikarbonat iyonunun oluşmasında görev alır [68]. Canlılarda HCO_3^- 'ın dehidratasyonu ve CO_2 'in hidratasyonunu katalizleyen enzimdir [69]

CA enziminin asıl görevi CO_2 'ın transportunu sağlamak olduğu için birçok dokularda (böbrek, göz lensi, eritrositler, beyin) H^+ ve HCO_3^- birikimini sağlamaktadır [60,70].

1.3.1 Karbonik Anhidraz İzoenzimleri

İnsanlardaki farklı gen yapısı ile karbonik anhidraz enziminin izoenzimleri belirlenmiştir ve bu izoenzimlerin fonksiyonları ile enzim karakterize edilmektedir ancak bulunduğu doku ve organlara göre farklılık göstermektedir. Bu dokulara örnek olarak; akciğer, böbrek, göz lensi, kaslar, pankreas verilebilir [71,72].

Canlılarda Karbonik Anhidraz enziminin 16 izoenzimi mevcuttur. Bunlardan beş tanesi sitoplazmik (CA-I, II, III, VII ve XIII), iki tanesi mitokondriyal (CA-VA, VB), bir tanesi salgısal (CA-VI), dört tanesi membrana bağlı (CA-IV, IX, XII ve XIV), üç tanesi nonkataliktir (CA-VIII, X, XI) [73,74].

hCA-I insan eritrosit hücrelerinde bulunan bir izoenzimdir. Bu izoenzim solunum olayında görev almaktadır [75].

hCA–II izoenzimi kemik, beyin ve böbrek dokuları için oldukça önemli bir enzimdir. hCA–I izoenzimine oranla insanda daha az miktarda bulunmaktadır. hCA–II izoenzimi böbrek korteksinde Na^+ ve suyun geri emilimini sağlamaktadır; bu sebeple eksikliğinde böbrek taşı, kemik ve beyinde kireçlenme meydana gelmektedir [76]. hCA-II enzimi çoğu hücrelerde bulunurken hCA-I eritrositlere karşı spesifiktir.

hCA–III izoenzimi iskelet kaslarında bulunan düşük aktiviteli bir izoenzimdir. Laktik asit – laktat dengesinde önemli bir göreve sahiptir. Kırmızı kas dokusunda zayıf bağlandığı için doku kapilerinde CO_2 'in difüzyonunu sağlamaktadır [53].

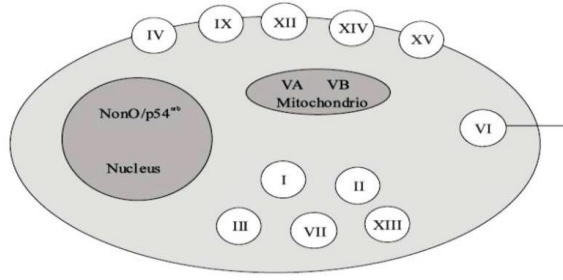
hCA–IV akciğer kapilerinde plazma yüzeylerinde bulunmaktadır. hCA–IV ve hCA–II göz lensi, kornea da bol miktarda bulunmaktadır. hCA–IV ve hCA–VI izoenzimleri sinyal izoenzimleridir ve sinyallerin hedef doku veya organlara ulaşmasını sağlamaktadır [77].

hCA–V izoenzimi bazı dokularda mitokondri matriksinde ve karaciğerde bulunmaktadır. hCA–V izoenzimi bikarbonat iyonunun oluşmasını sağlar ayrıca üre devri, glukoneogenez de görev almaktadır [78].

hCA–VI ve hCA-VII tükürük bezinde salgılanan izoenzimdir. İnsan tükürüğünün pH dengesini ayarlamakta görev almaktadır [79].hCA–VII izoenzimi tükürükte bulunan bikarbonatın salgılanmasında görev almaktadır [79].

hCA–VIII izoenzimi sıçan beyninde elde edilip cDNA keşfedilmesinde kullanılmıştır [80].

hCA–IX ve hCA–XII izoenzimlerinin tümör hücrelerini aktive ederek kanser oluşumunu sağladığı bulunmuştur [73].



Şekil 1.16 : CA izoenzimlerinin katalitik olarak aktif hücredeki yerleşimleri.

Tablo 1.17: Karbonik anhidraz izoenzimleri [81].

İZOENZİM	KATALİK AKTİVİTE	BULUNDUĞU BÖLGE
CA I	Düşük	Sitozol
CA II	Yüksek	Sitozol
CA III	Çok Düşük	Sitozol
CA IV	Yüksek	Membrana bağlı
CA V	Orta-yüksek	Mitokondri
CA VI	Orta	Tükürükte gizli
CA VII	Yüksek	Sitozol
CA-RP VIII	Akatalitik	Muhtemelen sitozolik
CA IX	Yüksek	Membrana bağlı
CA-RP X	Akatalitik	Bilinmiyor
CA-RP XI	Akatalitik	Membrana bağlı
CA XII	Düşük	Membrana bağlı
CA XIII	Muhtemelen yüksek	Bilinmiyor
CA XIV	Düşük	Membrana bağlı

1.3.2 Karbonik Anhidraz Enziminin Katalizlediği Reaksiyonlar

Karbonik anhidraz CO₂ molekülünün hidratasyonu reaksiyonunun yanı sıra, ürenin siyamide veya siyanatın karbamik aside reaksiyonlarını da katalizlemektedir.

Aynı zamanda CA enzimi Karboksilik, sülfonik ve fosforik asit esterlerinin hidrolizlerini katalizlenmektedir. Ancak CA enziminin hidrataz aktivitesi dışında, Tablo 1.18’de gösterildiği gibi elektrofilik bir merkeze, nükleofilik atakları içeren, aldehit, pirüvat ve alkil pirüvatların hidratasyonu, pirüvik sülfonik ve fosforik esterlerinin hidrolizi gibi reaksiyonlarını da katalizlemektedir. Karbonik anhidrazın esteraz aktivitesini ortaya koyan bu özelliği ile organizmada fizyolojik bir rolü olup olmadığı henüz bilinmemektedir [82,83].

Tablo 1.19: Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyon türleri.

(1)	$O=C=O + H_2O \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$
(2)	$O=C=NH + H_2O \rightleftharpoons H_2NCOOH$
(3)	$HN=C=NH + H_2O \rightleftharpoons H_2NCONH_2$
(4)	$RCHO + H_2O \rightleftharpoons RCH(OH)_2$
(5)	$RCOOAr + H_2O \rightleftharpoons RCOOH + ArOH$
(6)	$RSO_3Ar + H_2O \rightleftharpoons RSO_3H + ArOH$
(7)	$ArOPO_3^{2-} + H_2O \rightleftharpoons HPO_3^{2-} + ArOH$
(8)	$ArF + H_2O \rightleftharpoons HF + ArOH$ (Ar= 2,4 dinitrofenil)
(9)	$PhCH_2OCOC l + H_2O \rightleftharpoons PhCH_2OH + CO_2 + HCl$
(10)	$RSO_2Cl + H_2O \rightleftharpoons RSO_3H + HCl$ (R=Me;Ph)

1.3.3 Karbonik Anhidraz Sınıflandırılması

Karbonik anhidraz enzimi; aminoasitlerin farklı dizilişi, katlanmaları, ayrıca farklı yapıtaşlarından oluşmasıyla farklı gruplarda sınıflandırılmaktadır. Genel olarak “ α -, β -, γ -, δ - ve ϵ -“ olmak üzere beş gen ailesi ile sınıflandırılmaktadır [84,85].

α - Sınıfı CA enzimi bütün omurgalı dokularda, bakteriler, algler ve bitkilerin yapısında bulunan birçok izoformu olan monomer yapıda bulunan enzimdir. Hücre içerisinde farklı dokularda bulunan ve 16 farklı CA izoenzimi ve CA proteini (CARP) bulunmaktadır [86,87].

β -Sınıfı CA genellikle bakterilerde, alglerde, funguslar da bulunan dimer, tetramer, hekzamer ve oktomer yapıda bulunan bir enzimdir. β -CA’lar genellikle 25-30 kDa molekül ağırlığından oluşmuş oligomerlerdir [88].

γ -Sınıfı CA prokaryot hücrelerde bulunup ökaryot hücrelerde bulunmayan bir trimerik molekül yapısında olan bir enzimdir [89].

δ -Sınıfı CA; 27 kDa molekül ağırlığına sahip monomerik yapıda bulunan bir enzimdir. X – ışını araştırmaları ile enzim hakkında yapılan çalışmalara rağmen detaylı bir bilgi literatürlerde bulunmamaktadır [90].

ζ-Sınıfı CA; aktif bölgesinde Cd(II) veya Zn(II) iyonları bulunan çoklu metal bağlayıcı enzim olarak saflaştırılmaktadır. Yaklaşık 69 kDa molekül ağırlığına sahip tetrahedral geometri yapısında bulunan bir enzimdir [90,91].

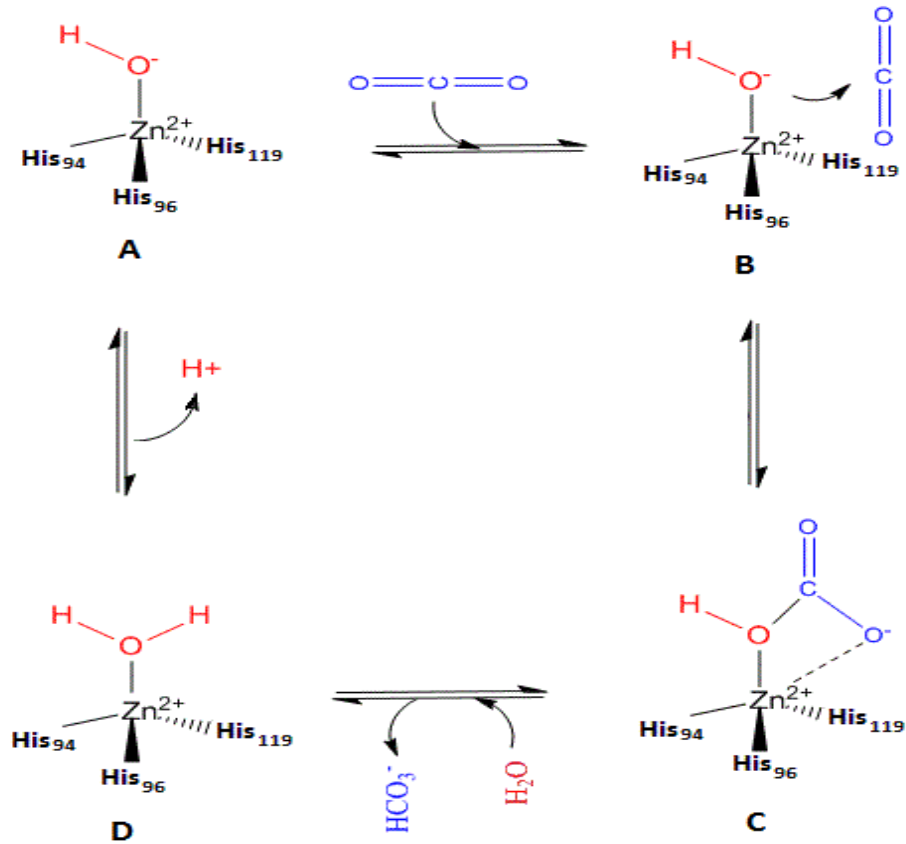
η-Sınıfı CA; aminoasit rezidüsü sayısı bakımından fazlalık gösteren α-, γ- ve δ- sınıfı gibi üç histidin rezidüsü bulunan bir enzimdir [92].

1.3.4 Karbonik Anhidraz Enziminin Katalitik Mekanizması

CA enziminin metabolizmada oldukça önemli olması, çözelti ortamında kararlı ve uygun şartlar altında aktivitesi kaybolmadan uzun süre bekletilebilmesi gibi avantajlı özelliklere sahip olduğu için CA enziminin katalitik mekanizması aydınlatılmaya çalışılmıştır.

Bu çalışmalar sonucunda, CA enziminin yapısal olarak iki önemli özelliğe sahip olduğu belirlenmiştir [93]:

- Aktif bölgede Zn^{2+} iyonu ve ona bağlı bir hidroksil grubu ihtiva etmektedir.
- Aktif bölge yakınındaki amino asitler proton gradienti ve proton verici oluşturacak şekilde koordine olmuşlardır.



Şekil 1.17: Karbonik anhidraz enziminin CO₂-hidratasyon reaksiyonunun kataliz mekanizması.

Enzimin aktif formu Zn^{+2} iyonuna OH^{-} iyonunun bağlanmasıyla meydana gelmektedir. Enzimin aktif formu güçlü nükleofilik yapısıyla CO_2 molekülüne atakta bulunur ve bunun sonucunda Zn^{+2} iyonuna bağlanmış HCO_3^{-} iyonu oluşur. Oluşan HCO_3^{-} iyonu bir H_2O molekülü ile yer değiştirir ve Zn^{+2} iyonuna su molekülü bağlanır. Bu da enzimin asit formuna dönüşmesini sağlar [94]. Enzimin tekrar bazik forma geçmesi için ortamdaki tampon bölgeler aktif bölgelerdeki protonları yakalar ve proton transferi gerçekleşir [95].

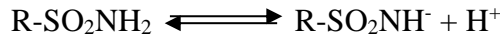
Aktif bölgede Zn^{+2} metal iyonu ile koordine bir şekilde bulunan su molekülü, Thr199'un hidroksil kısmıyla hidrojen bağı oluşturmaktadır. Aynı zamanda Glu106'nın karboksilat kısmı Thr99 ile bağlı bulunmaktadır. Su molekülünün Zn^{+2} iyonu ile etkileşimi sonucu su molekülünün nükleofil karakteri artmaktadır [96].

1.3.5 Karbonik Anhidraz İnhibitörleri

İki sınıfta Karbonik Anhidraz inhibitörleri incelenir ;

- Metallerle kompleks yapan inorganik anyonlar
- Sülfonamidler

Karbonik anhidraz enziminin en güçlü organik inhibitörleri; heteroaromatik sülfonamidler ve aromatiklerdir. Sülfonamidler kimyasal yapısı $R-SO_2NH_2$ şeklindedir. Burada R, genellikle heteroaromatik veya aromatik halka sistemleridir.



Sülfonamidlerin CA enzimi üzerine inhibisyon etkisi son derece önemlidir çünkü Sülfonamidler kolaylıkla iyonik yapı kazanabilmektedirler. Sülfonamidler içerdikleri bu hidrofilik bölgeye ek olarak, aromatik ve heteroaromatik hidrofobik bölgelere de sahiptirler. Sülfonamidler enzimle etkileşmesi, öncelikle $R-SO_2NH$ bileşiğindeki N atomunun CA enziminin aktif bölgesinde bulunan Zn^{+2} iyonuna iyonik bağlanmasıyla olur. Daha sonra hidrofobik etkileşimlerle inhibitörün enzime bağlanmasıyla tamamlanır [97,98].

İnorganik anyonlarda yalnızca hidrofilik bağlanma söz konusu olduğundan CA enzimi üzerine Sülfonamidler kadar güçlü inhibitör görevine sahip değildir.

Hastalıkların teşhisinde ve tedavisinde CA inhibitörlerinin ehemmiyeti, glukom hastalığı tedavisi için CA enzimi üzerine yapılan inhibisyon çalışmalarının neticesinde ortaya çıkarılmıştır. Bahsedilen konu çalışmalarda, CA enziminin kataliz mekanizmalarının aydınlatılmasının yanı sıra, bu enzimin dokulara dağılımı ve bu dokulardaki hayati

fonksiyonları anlaşılmış ve bunun sonucunda CA enziminin inhibitörleri ve aktivitelerinin sentezlenmesine hız verilmiştir [99].

Söz konusu çalışmalarda çok çeşitli CA enzimi inhibitörleri sentezlenmiş ve bu inhibitörler başta glukoma tedavisinde ilaç, epilepsi, ağrı kesici, antitümör, ve nörolojik rahatsızlıklarda ilaç, pozitron emisyon tomografisi (PET) ve manyetik rezonans belirlenmesinde (MRI) diagnostik teşhis materyali, antiülser, diüretik ilaçların gelişmesinde yol gösterici ve antibiyotik olarak halen kliniklerde kullanılmaktadır. Bu sebeple, CA enziminin inhibisyon mekanizmasının bilinmesi ve yeni bileşiklerin sentezlenmesi çok büyük ehemmiyet kazanmıştır [99].

1.3.6 Karbonik Anhidraz Enziminin Fizyolojik Fonksiyonları

1. Böbreklerde bikarbonat geri emilimini sağlayarak mide asitliğini azaltmaktadır.
2. Karbonik anhidraz enzimi gözde bulunan humor aköz üretimi için bikarbonat salımını sağlayarak görme olayında rol oynamaktadır.
3. Tükürük, gastrit asit, safra, pankreas özsuyu üretiminde rol oynamaktadır.
4. Birçok organ ve dokuda elektrolit salgılanmasında görev almaktadır.
5. Tat ve koku alma konusunda görev almaktadır.
6. Kas fonksiyonlarını düzenlemekte görev almaktadır.
7. Hücresel strese adaptasyonu sağlamaktadır.
8. Büyüme bozuklukları ve Sinyal iletiminde görev almaktadır.
9. Yağ asiti biyosentezinde görev almaktadır.
10. Tümör hücrelerini aktive ederek kanser oluşumunu tetiklemektedir[100].
11. Kemiklerin kireçlenmesini ve böbrek taşına sebep olmaktadır[101].
12. Otistik bozukluğa yol açmaktadır.

Bu çalışmanın amacı yukarıda bahsedilen pestisitlerin; çok önemli fizyolojik fonksiyonlara sahip olan karbonik anhidraz enzimi üzerine inhibisyon etkilerini araştırmaktır.

2. MATERYAL VE METOD

2.1 Materyal

2.1.1 Kullanılan Kimyasallar

Araştırmada kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıkta olup, Sigma veya Merck firmasından temin edilmiştir.

Akrilamid/Bis	Hidroklorik Asit	Propuksur
Amonyum Persülfat	Metanol	Alaklor
Asetik Asit	Metil Alkol	1- Naftol
Aseton	SDS	Klorpirifos
Bromfenol Mavisi	Sodyum Asetat	Simazin
CO ₂ Gazı	Sodyum Bikarbonat	Diklofluanid
Coomassie-Brilliant Blue R-250	Sodyum Hidroksit	Klorpirifos - Metil
Di Sodyum Fosfat	Sodyum Karbonat	Azinfos - Etil
Di Sodyum Hidrojen Fosfat Di Hidrat	Sodyum Karbonat	Dimetaklor
Distile Su	Sodyum Perklorat	Tebukonazol
DMSO	Sodyum Sülfat	Amitraz
Ester	Standart Serum Albümin	Dazomet
Fenol Red	Sülfürik Asit	Koumatetralil
Fosforik Asit	TEMED	Karbofuran
Glasiyal Asetik Asit	Tris – Baz	Karbaril
Gliserol	Tris – Sülfat	β -Merkapto Etanol

1.1.2 Kullanılan Alet Ve Cihazlar

Kullanılan Cihaz	Model
Çalkalayıcı	Clifon
Elektroforez sistemi	Hofer, HSI
Hassas terazi	Libror, AEG 220
Kromotografi Kolonu	Sigma (1cm çap)
Kronometre	Hanhard, Elektronisch Digital Stoppuhr
Manyetik Karıştırıcı	ARE magnetic
Otomatik Mikropipetler	Eppendorf Reserch Plus
pH metre	Orion model 920A
Soğutmalı Santrifüj	Sigma 3-18K
UV-Spektrofotometre	Biotek Power Wax XS
Vorteks	Fisons Whirli Mixer

2.1.2 Kullanılan Kimyasal Çözeltiler ve Hazırlanması

2.1.2.1 Afinite Jelinin Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltiler

- **1 M NaOH, 100 mL Çözeltisi:** 4 g NaOH tartılıp beher içerisinde saf su ile çözülür. Daha sonra çözelti 100 mL 'lik bir balon jøjeye aktarılarak saf su ile 100 mL tamamlanır.
- **4 M NaOH 100 mL Çözeltisi:** 16 g NaOH tartılıp beher içerisinde saf su ile çözülür. Daha sonra çözelti 100 mL'lik bir balon jøjeye aktarılarak saf su ile 100 mL tamamlanır.
- **1M HCl 100 mL Çözeltisi:** 100 mL'lik balon jöjenin içerisine az bir miktarda saf su konulur daha sonra üzerine % 37 'lik HCl'ten 8,3 mL HCl eklenir. 100 mL'lik balon jöje saf su ile tamamlanarak karıştırılır.
- **0,1 M NaHCO₃ pH:10 1L Tamponu:** 8,401 g NaHCO₃ tartılıp beher içerisinde 900 mL saf su ile çözülür. pH, 1M NaOH ile pH 10'a ayarlanır. Daha sonra çözelti 1L 'lik balon jøjeye aktarılarak saf su ile 1L'ye tamamlanır.
- **0,05 M Tris – SO₄ pH:7,5 250 mL tamponu:** 1,5143 g Tris – SO₄ tartılıp beher içerisinde 200 mL saf su ile çözülür. H₂SO₄ ile pH 7,5 'a ayarlanır. Daha sonra çözelti 250 mL'lik balon jøjeye aktarılarak saf su ile hacmi 250 ml'ye tamamlanır.

2.1.2.2 Enzim Saflaştırılmasında Kullanılan Çözeltiler

- **Afinite jelini dengeleme tamponu 1L pH: 8,7:** 3,124 g (25 mmol) Tris – Base ve 14.20 g (0,1mol) Na₂SO₄ tartılarak bir beher içerisinde 950 mL'lik saf su ile çözülür, 1 M HCl ile pH = 8,7 ye ayarlanır. Daha sonra çözelti 1L'lik balon jøjeye aktarılarak saf su ile hacmi 1L ' ye tamamlanır.
- **Hemolizat tatbikinden sonra afinite jeli yıkama tamponu 1L pH: 8,7:** 3,0275 g (25mmol) Tris – Base ve 3,124 g (22mmol) Na₂SO₄ tartılarak bir beher içerisinde 950 mL'lik saf su ile çözülür, 1M HCl ile pH= 8,7 ' ye ayarlanır. Daha sonra çözelti 1L'lik balon jøjeye aktarılarak saf su ile hacmi 1L'ye tamamlanır.

- **hCA I Elüsyon tamponu 500 mL pH: 6,3:** 3,55 g (25mmol) Na_2HPO_4 ve 29,25 g (0,5mol) NaCl tartılarak bir beher içerisinde 450 mL'lik saf su ile çözülür, 1M HCl ile pH: 6,3 'e ayarlanır. Daha sonra çözelti 1L'lik balon jøjeye aktarılarak saf su ile hacmi 1L'ye tamamlanır.
- **hCAII Elüsyon tamponu 250 mL pH: 5,6:** 2,04 g (0,15mol) NaCH_3COO ve 15,31 g (0,125mol) NaClO_4 tartılarak bir beher içerisinde 200 mL'lik saf su ile çözülür, 1 M HCl ile pH: 5.6 ' ya ayarlanır. Daha sonra çözelti 250 mL'lik balon jøjeye aktarılarak saf su ile hacmi 250 mL ' ye tamamlanır.

2.1.2.3 SDS –PAGE Elektroförezinde Kullanılan Tamponlar

- ***SDS – PAGE Elektroförezinde kullanılan boyama çözeltisi:*** 0,66 g Coomassie brillant blue R-250, 120 mL metil alkol içerisinde çözülür, 24 mL asetik asit ve 120 mL saf su eklenerek çözelti hazırlanır.
- ***SDS – PAGE Elektroförezinde kullanılan renk açma çözeltisi :*** %5'lik 50 mL Metil Alkol ve % 87.5'lik 875 mL saf su ve %7.5'lik 75 mL Asetik asit karıştırılarak çözelti hazırlanır.

Tablo 2.1: Elektroforezde kullanılan çözeltiler ve miktarları.

MADDE	MİKTAR
Distile su	1,0 mL
%10'luk SDS	8,0 mL
Gliserol	4,0 mL
0,5 M Tris-HCl	5,0 mL
β -merkapt etanol	2,0 mL
Bromfenol mavisi	0,01 g

Tablo 2.2: Elektroforezde kullanılan yürütme tamponu.

MADDE	MİKTAR
SDS	28,8 g
Glisin	14,4 g
Tris-HCl	6,0 g
Distile su ile hacim 2 L' ye tamamlandı.	

Tablo 2.3: Elektroforezde kullanılan renklendirme çözeltisi.

MADDE	MİKTAR
Coomassie-Brilliant blue R-250	1,32 g
Glasiyal asetik asit	48 mL
Metanol	240 mL
Distile su	240 mL

Tablo 2.4: Elektroforezde Yığıma Ve Ayırma Jelleri.

	Yığıma Jeli	Ayırma Jeli
	3%	10%
1,5 M Tris-HCl (pH: 8,8)	-	12,5 mL
Akrilamid/Bis (%30)	1,65 mL	2,6 mL
%10' luk SDS	400 μ L	1 mL
TEMED	20 μ L	25 μ L
%10' luk amonyum persülfat	400 μ L	750 μ L
0,5 M Tris-HCl (pH: 6,8)	5 mL	-

2.1.2.4 Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler

- **Coomassie Brilliant Blue G-250 Çözeltisi 1L:** 100 mg Coomassie brilliant blue G-250 tartılarak 50 mL etil alkolde çözülür. Hazırlanan bu çözeltiliye %95 ' lik 100 mL fosforik asit eklenir. Daha sonra çözelti 1 L 'lik balon jøjeye aktarılarak saf su ile hacmi 1L'ye tamamlanır.
- **Standart serum albümin çözeltisi (1 mg/mL) :** 25 mL saf su içerisinde 25mg standart serum albümin çözülerek çözelti hazırlanır.

2.1.2.5 CO₂ Hidrataz Aktivitesi İçin Kullanılan Çözeltiler

- **Fenol kırmızısı çözeltisi 1L :** 0,2184 g NaHCO₃ ve 0,011256 g Fenol Red tartılıp bir beher içerisinde saf su ile çözülür. Daha sonra bu çözelti 1L'lik balon jøjeye alınarak saf su ile 1L'ye tamamlanır.
- **CA Aktivite tamponu 1L pH = 10 :** 15,9 g (0,15mol) Na₂CO₃ ve 8,4 g (0,1 mol) NaHCO₃ tartılarak bir beher içerisinde 950mL saf su ile çözülür, 1M HCl ile pH : 10 'a ayarlanır. Daha sonra çözelti 1L'lik balon jøjeye aktarılarak saf su ile hacmi 1 L' ye tamamlanır.
- **CO₂ Çözeltisi :** 0°C saf su içerisinde CO₂ gazı geçirilerek hazırlanmaktadır.

2.1.2.6 Karbonik Anhidraz Enzimi Esteraz Tayininde Kullanılan Çözeltiler

- **Esteraz aktivite tamponu Tris – SO₄ 1L pH = 7,4 :** 6,055 g (0,05 M) Tris – Base tartılarak bir beher içerisinde 950 mL saf su ile çözülür. 1 N H₂SO₄ ile pH = 7,4 'e ayarlanır. Daha sonra çözelti 1L'lik balon jøjeye aktarılarak saf su ile hacmi 1L'ye tamamlanır.
- **p-Nitrofenol Asetat substrat çözeltisi 50 mL:** 0,0272 g ester tartılarak 1 mL Aseton içerisinde çözülür. Daha sonra 50 mL'lik balon jøjeye aktarılarak saf su ile hacmi 50 mL'ye tamamlanır.

2.1.2.7 Kullanılan Pestisitlerin Hazırlanması

- **0,01 M Propoksur** : 0,00418 g Propoksur tartılarak 2 mL DMSO içerisinde çözülür.
- **0,01M Alaklor** : 0,00539 g Alaklor tartılarak 2 mL DMSO içerisinde çözülür.
- **0,01 M 1- Naftol** : 0,002883 g 1- Naftol tartılarak 2 mL DMSO içerisinde çözülür .
- **0,01 M Klorpirifos** : 0,00701 g Klorpirifos tartılarak 2 mL DMSO içerisinde çözülür.
- **0,01 M Simazin** : 0,004 g Simazin tartılarak 2 mL DMSO içerisinde çözülür.
- **0,01 M Diklofluanid** : 0,00666 g Diklofluanid tartılarak 2 mL DMSO içerisinde çözülür.
- **0,01 M Klorpirifos – Metil** : 0,00645 g Klorpirifos - Metil tartılarak 2 mL DMSO içerisinde çözülür.
- **0,01 M Azinos –Etil** : 0,0069 g Azinfos – Etil 2 mL tartılarak DMSO içerisinde çözülür.
- **0,01 M Dimetaklor** : 0,00511 g Dimetaklor tartılarak 2 mL DMSO içerisinde çözülür.
- **0,01 M Tebukanaazol** : 0,00615 g Tebukanaazol tartılarak 2 mL DMSO içerisinde çözülür .
- **0,01 M Amitraz** : 0,01467 g Amitraz tartılarak 5 mL DMSO içerisinde çözülür.
- **0,01 M Dazomet** : 0,0081 g Dazomet tartılarak 5 mL DMSO içerisinde çözülür.
- **0,01 M Koumetralil** : 0,01461 g Koumetralil tartılarak 5 mL DMSO içerisinde çözülür .
- **0,01 M Karbofuran** : 0,01106 g Karbofuran tartılarak 5 mL DMSO içerisinde çözülür.
- **0,01 M Karbaril** : 0,01 g Karbaril tartılarak 5 mL DMSO içerisinde çözülür.

2.2 Yöntemler

2.2.1 Afinite Jelinin Hazırlanması

Enzim saflaştırma konusunda en çok kullanılan metot afinite kromatografisi metotudur. Afinite kolonundan saflaştırılması istenilen molekül karışımı geçirilirse sadece istenilen molekül ligand tarafından tutulmaktadır ve bu kromatografi bir çeşit adsorbsiyon kromatografisine girmektedir. Saflaştırılması istenen molekül ligand bileşiğine yani matriks adı verilen kolon maddesine kovalent olarak immobilize edilmiş birleşik spesifik veya tersinir olarak bağlanmasını sağlayan bir tekniktir. Matriks olarak “ Sephadex, Sepharose ve Biogel “ gibi çeşitli jeller kullanılabilir. Kullanılacak ligant saflaştırılması istenen moleküle karşı spesifik ve tersinir olarak bağlanma özelliğine sahip olması gerekir [102,103].

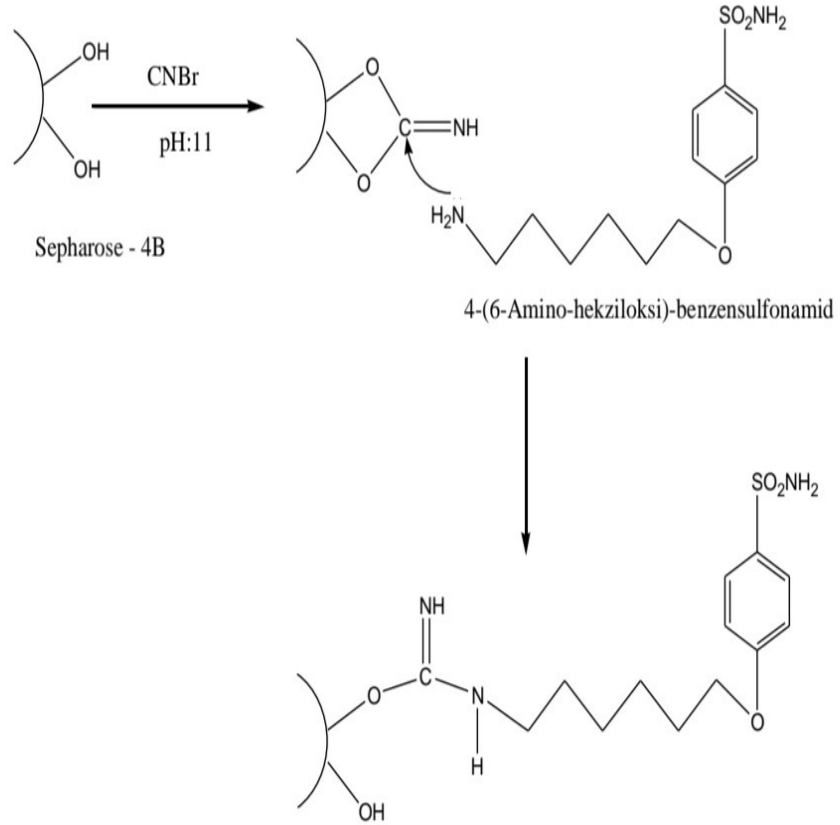
2.2.1.1 Sepharose – 4B Afinite Kolonunun Hazırlanması

Sepharose – 4B matriksi üzerinde afinite jeli hazırlanmıştır. Bu matriks ; CNBr ile aktifleştirildikten sonra, herhangi bir uzantı kolu kullanılmadan 4-(6-Amino-hekziloksi)-benzensülfonamid, Sepharose-4B'ye bağlanmıştır[104]. Jelin hazırlanma aşamaları aşağıdaki gibidir:

2.2.1.2 Sepharose – 4 B'nin Aktifleştirilmesi ve Sülfonamidin Bağlanması

20 mL Sepharose-4B alınıp, 20 mL saf su eklenerek iyice yıkanıp dekante edilir. Bu işlem birkaç defa yapılarak yapısı bozuk olan jellerin ortamdan uzaklaştırılması sağlanır. Jel süspansiyonu buz banyosu içerisine alınarak CNBr eklenir, magnetik karıştırıcı üzerinde karıştırılmaya devam edilir. pH-Metre kullanılarak süspansiyonun pH'ı 4 M NaOH ile 11'e çıkarılır, pH değişmeyinceye kadar bu işleme devam edilir. pH ayarlanırken süspansiyonun sıcaklığı yaklaşık 20°C'de tutulur. pH ayarlaması yapıldıktan sonra süspansiyon 24 saat buzdolabında bekletilir. Karışım buchner hunisine aktararak süzülür. Daha sonra pH'sı 10 olan 250 mL soğuk 0.1 M NaHCO₃ tamponu ile iyice yıkanarak jel bir behere alınır. Yıkanan jel 0.1 M NaHCO₃ tamponu ile muhafaza edilir. Aynı tampondan yaklaşık 20 mL alınarak içerisinde 100 mg 4-(6-Amino-Hekziloksi)-Benzensülfonamid çözülür ve tampon içerisindeki jel üzerine eklenerek yaklaşık 90 dk karıştırılır. Hazırlanan süspansiyon +4°C'de 16 saat bekletilir. 16 saat sonunda jel tekrar buchner hunisine alınır yeteri kadar (yaklaşık 2L) saf su ile yıkanır. Daha sonra pH: 8,7 CA dengeleme tamponu ile yıkanarak dengeleme işlemi yapılır. Bu tampon içerisinde jel muhafaza edilir. Bu işlemler sonunda

matriks olarak kullanılan Sepharose-4B aktifleştirilip hiçbir uzantı kolu kullanılmadan aktif olan jele doğrudan ligand bağlanmıştır. Reaksiyonun açık formülleri aşağıda gösterilmiştir:



Sepharose - 4B -4-(6-Amino-hekziloksi)-benzensulfonamid

Şekil 2.1 : Afinite jelinin hazırlanması.

2.2.2 Karbonik Anhidraz Enziminin Saflaştırılması

2.2.2.1 Hemolizatın Hazırlanması

Taze alınan yaklaşık 30 mL insan kanı teflon tüplere konularak +4 °C’de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işlemi tamamlanınca üst kısımda bulunan kan plazma ve lökosit tabakası alınarak atıldı. Altta çöken eritrositler % 0,9’luk NaCl ile 2 defa yıkandı. Bu işlemler sonucunda elde edilen eritrositler hacminin yaklaşık 3 katı kadar soğuk desitle su ile karıştırılır. Teflon tüplerin ağzı kapatıldı. Yaklaşık 10 dakika kadar köpürtmeden teflon tüpler çalkalandı.

Elde edilen hemolizat, hücre zarlarının ayrılması için 15000 rpm'de 45 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra, üstteki sıvı kısım alınır ve altta biriken hücre zarları atılır. Hemolizatın kolona tatbiki işlemi sırasında hemolizat içerisinde kalan hücre zarlarının kolonu tıkamaması için süzgeç kâğıdından yavaşça süzülür. Hemolizat buz dolu kabın içine yerleştirilip pH:8,7'ye Tris-Base ile ayarlandı.



Şekil 2.2: Hemolizatın pH:8,7'ye Tris-Base ile ayarlanması.

2.2.2.2 Hemolizatın Afinite Kolonuna Tatbiki ve Enzim Elüsyonu

Hazırlanan jel kolona paketlenir. Dengeleme tamponu (pH:8,7 Tris-HCl/Na₂SO₄) ile dengeleme işlemi yapıldı. 280 nm de 0,02 absarbansın altında pik verene kadar dengeleme işlemi yapılır. Dengelenme işlemi yapıldıktan sonra hazırlanmış olan hemolizatta bulunan CA enziminin jele bağlanması için kolona yavaş bir şekilde tatbik edilmelidir.

Hemolizat hepsi kolona yüklendikten sonra yıkama tamponu(pH:8,7 Tris HCl/Na₂SO₄) ile jel yıkaması işlemi yavaş bir şekilde yapıldı. Bu işlemin amacı insan eritrosit bulunan karbonik anhidraz izoenzimleri jelde tutunur ve kalan ortamdaki istenmeyen safsızlıkların uzaklaştırılmış olur.

hCA – I elüsyon işlemi için 6 adet falkon tüpler hazırlanır. Kolona hCA-I elüsyonu için hazırlanan hCA-I elüsyon tamponu (NaCl/Na₂HPO₄ pH:6,3) ilave edilir. Her elüat 4 mL'yi geçmeyecek şekilde elüatlar toplanır. Alınan elüatlar 280 nm de absorbans değerlerine göre protein miktarları belirlenir.

hCA –II elüsyon işlemi için 6 adet falkon tüpler hazırlanır. Kolona hCA-II elüsyonu için hazırlanan hCA-II elüsyon tamponu (CH₃COONa /NaClO₄ pH 5.6) ilave edilir. Her elüat 4 mL'yi geçmeyecek şekilde elüatlar toplanır. Alınan elüatlar 280 nm de absorbans değerlerine göre protein miktarları belirlenir.

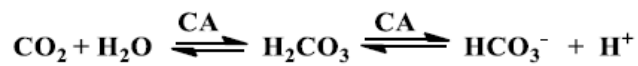


Şekil 2.3: Karbonik Anhidraz enzimi saflaştırılması.

2.2.3 Karbonik Anhidraz Aktivitesi Tayin Yöntemleri

2.2.3.1 CO₂ – Hidrataz Aktivitesi

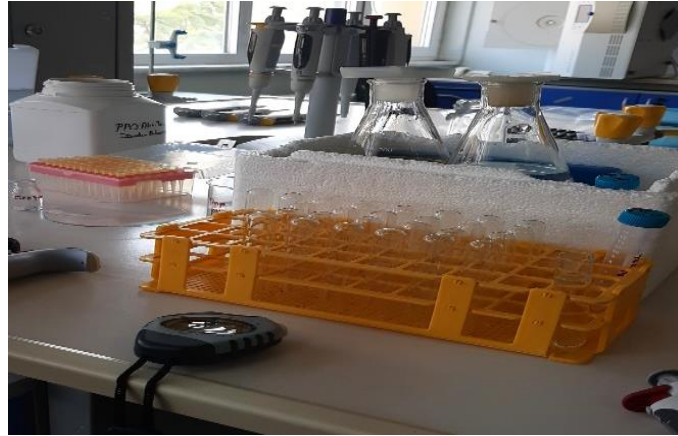
Karbonik Anhidraz enziminin hidrataz aktivitesi, enzimin CO₂ molekülünün hidrasyonundan, HCO₃⁻ iyonunun dehidratasyonundan ve bazı esterlerin hidrolizinden sorumlu olma özelliğinden yararlanılarak belirlenmektedir.



Maren ve arkadaşlarının geliştirmiş oldukları yöntem ile CO₂'nin hidrasyonu sonucu açığa çıkan H⁺ iyonu ile pH 10.0'dan 7.4 'e düşmesi için geçen sürenin ölçülmesi prensibine göre CO₂ hidrataz aktivitesi bulunmuştur. Tampon olarak pH = 10.0 karbonat tamponu(0.15 M Na₂CO₃ + 0.1 M NaHCO₃), indikatör olarak ise pH = 7.4 'de renk değiştiren fenol kırmızı kullanıldı[105].

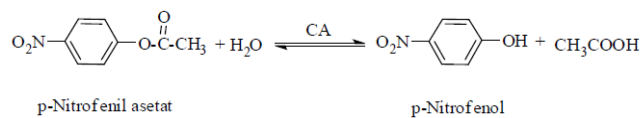
Deney işlemleri şu şekilde gerçekleşmektedir: Deneyde kullanılan “indikatör çözeltisi, enzim, saf su, tampon çözeltisi ve doymun CO₂ çözeltileri” buz bulunan bir kaba yerleştirilir. Reaksiyon tüpüne 1,9 mL fenol kırmızısı indikatörü çözeltisi, 1,3 mL doymun CO₂ çözeltisi, saflaştırılan enzim çözeltisinden 100 µL ve hızlı bir şekilde 400 µL karbonat tamponu katılarak, kırmızı rengin sarıya dönmesi için geçen süre kronometre ile ölçüldü(tc) . Aynı işlemler her örneğin çalışılmasından önce enzim çözeltisi yerine 100 µL destile su konularak tekrar yapıldı (t₀) . Bu metota göre, CA aktivitesi için enzim ünitesi (EU) , enzimsiz olarak meydana gelen CO₂ hidrasyonu süresini yarıya indiren enzim miktarı olarak tanımlanır. Aşağıda gösterilen formüle göre kullanılan enzim çözeltisi hacmi için enzim ünitesi hesaplanır.

$$\text{Enzim aktivitesi} = \frac{t_0 - t_c}{t_c}$$



2.2.3.2 Karbonik Anhidraz Enziminin Esteraz Aktivitesi

Karbonik anhidraz enzimi substrat olarak kullanılan p-nitrofenilasetatı 348 nm’de absorpsiyon veren p-nitrofenol veya p-nitrofenolata hidroliz etmektedir. Reaksiyon reaksiyonu Şekil 2.4 ‘ de verildiği gibidir. Bu yöntemden de anlaşıldığı gibi karbonik anhidrazın esteraz aktivitesine sahip olduğunu göstermektedir[106].



Şekil 2.4: p-Nitrofenilasetatın p-nitrofenole dönüşüm reaksiyonu.

348 nm 'de p – nitrofenol ve p- nitrofenolat'ın her ikisi aynı absorbansı göstermektedir. Bu sebeple fenol grubunun H⁺ iyonunun ayrışıp ayrışmaması ölçümü etkilememektedir. Bu dalga boyunda kör olarak p – nitrofenilasetat kullanılmaktadır[107].

Spektrofotometre Tris-SO₄ tampon çözeltisi ile sıfırlandı .800 µL Tris-SO₄ tamponu, 700 µL p-Nitrofenol Asetat substratı,100 µL Karbonik Anhidraz enzimi, gerekli inhibitör ve saf su ile çözelti hazırlandıktan sonra her 1 dakikada bir absorbans niktarı okundu ve 3 dakika sonundaki 25°C de 348 nm'de absorbansı okunarak absorbans farkı alındı. Yapılan deneylerde kullanılan substrat (p-Nitrofenol Asetat) günlük taze hazırlanır. Kinetik çalışmalar esnasındaki aktivite ölçümleri enzimin esteraz aktivitesi ile gerçekleştirildi.

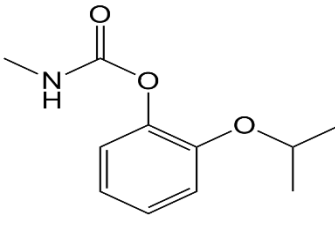
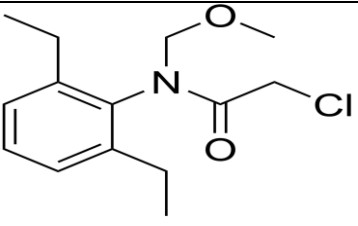
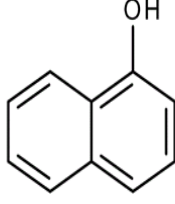
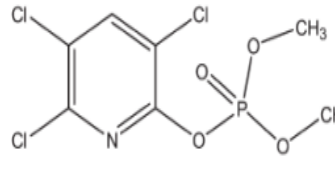
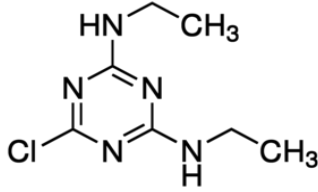
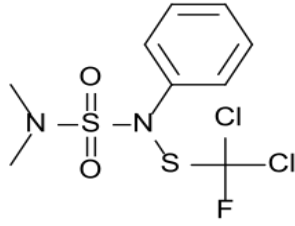
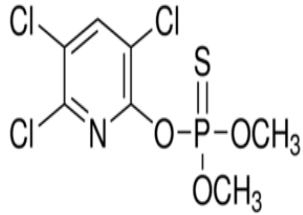
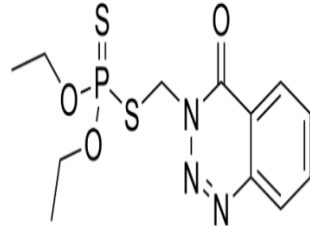
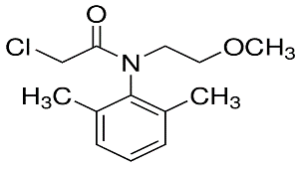
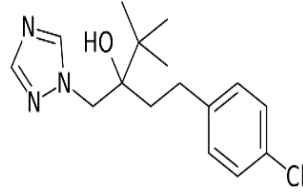
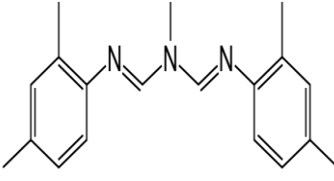
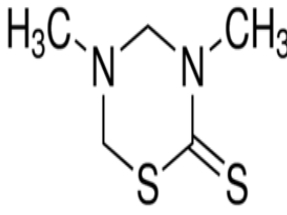
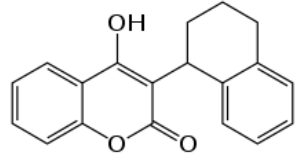
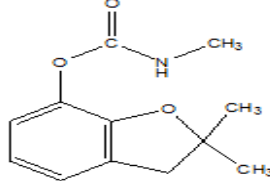
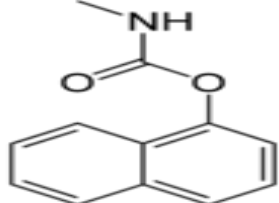
2.2.3.3 İnhibitörler için IC₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi

Bu çalışma kapsamında Karbonik anhidraz enzimi ile 15 farklı pestisit inhibitör olarak kullanıldı. İnhibitör çalışmasında farklı inhibitör konsantrasyonlarında aktivite ölçümleri yapıldı. Ölçülen aktivite değerlerine uygun olarak inhibitörlerin %Aktivite grafikleri çizilerek eğrinin denkleminde IC₅₀ değerleri saptandı. Aşağıdaki tabloda kullanılan pestisit inhibitörlerinin açık kimyasal yapıları gösterilmektedir.

2.2.3.4 Karbonik Anhidraz Enziminin K_m Ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi

İnsan kanından saflaştırılan hCA izoenziminin en az beş farklı fenil asetat substrat konsantrasyonu kullanılarak K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi için optimum şartlarda aktivite ölçümü yapıldı. Lineweaver-Burk grafiği çizildi ve bu grafikten K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı.

Tablo 2.5: Kullanılan pestisit inhibitörlerinin açık kimyasal yapıları.

		
PROPOKSUR	ALAKLOR	1-NAFTOL
		
KLORPİRİFOS	SİMAZİN	DİKLOFLUANİD
		
KLORPİRİFOS – METİL	AZİNFOS – ETİL	DİMETAKLOR
		
TEBUKONAZOL	AMİTRAZ	DAZOMET
		
KUMAR METİL	KARBOFURAN	KARBARİL

2.2.4 Protein Tayini

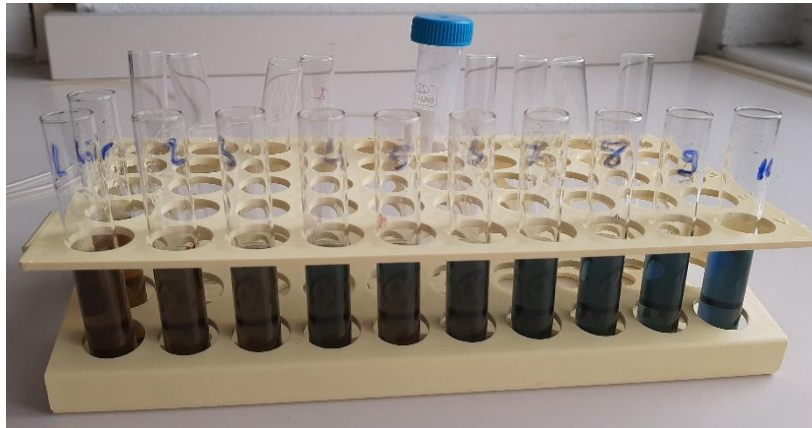
2.2.4.1 Kalitatif Protein Tayini

Kalitatif protein tayini, proteinlerin yapısında bulunan aromatik gruplara sahip tirozin ve triptofan aminoasitlerinin 280 nm’de maksimum absorbans göstermesi esasına dayanan Warburg metodu olarak bilinen yolla gerçekleştirilmektedir[108] Eluatlar eşit hacimde kuvars küvetlere alınarak, absorbansları UV-spektrofotometrede köre karşı okutulur.

2.2.4.2 Bradford Yöntemiyle Protein Tayini

Afinite kromatografisi tekniği ile saflaştırılan enzim çözeltileri ve hemolizatlardaki protein miktarlarını belirlemek için Bradford yöntemi kullanıldı. Bu yöntem, fosforik asitli ortamda Coomassie brilliant blue G-250’nin proteinlere bağlanması esasına dayanır. Oluşan kompleks, 595 nm dalga boyunda maksimum absorbans gösterir. Proteine boyanın bağlanması, 2 dakika gibi çok hızlı bir zamanda gerçekleşir. Bu yöntemin hassasiyeti, 1-100 µg arasındadır[109]. Protein miktarları tayin işlemlerinde; 1 mL’inde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albumin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 µL alınır ve saf su ile tüm tüplerin hacmi 0,1 mL’ye tamamlandı. 5 mL Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi her bir tüpe ilave edildi ve vorteks ile karıştırıldı. 10 dakika sonra 595 nm dalga boyunda Kör olarak 0,1 mL aynı tampon ve 5 mL Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifinden oluşan karışım ile 3 mL’lik kuvars küvetlerde absorbans değerleri okundu.

Absorbans değerlerine karşılık gelen mikrogram protein değerleri, standart grafik olarak elde edildi. Oluşturulan grafikteki denklem üzerinden enzimin protein değerleri mikrogram cinsinden hesaplandı.



2.2.5 Sodyum Dedosilsülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS – Page) İle Enzim

Saflığının Kontrolü

Karbonik Anhidraz enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılmasından sonra iki farklı akrilamid konsantrasyonunda; yağma jeli % 3, ayırma jeli % 10 olacak şekilde kesikli sodyum dodesil sülfat jel elektrofrez (SDS-PAGE) Laemmlı tarafından geliştirilen yöntemle yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi[110].Bu amaçla elektrofrez cam plakaları önce su, sonra etil alkol ile iyice temizlendi. Daha sonra plakalar arasına plastik aralık oluşturucusu yerleştirilerek iki cam plaka birbiri üzerine konuldu ve elektrofrezin dökme aparatına sabitlendi. Hazırlanan ayırma jeli plakalar arasına üstten 2-3 cm kalana kadar enjektörle döküldü. Jel içerisinde hava kabarcığı kalmamasına özenle dikkat edildi. Jel yüzeyinin düzgün olması için n-bütanol ile ince bir tabaka oluşturuldu. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra (1 gece) üst yüzeydeki n-bütanol döküldü. Daha sonra cam plakaların arasına tamamen doluncaya kadar polimerleşmiş ayırma jelinin üzerine yağma jeli ilave edildi. Jel kasetindeki yükleme jelinin üzerine tarak dikkatlice yerleştirilerek jelin polimerleşmesi 30 dakika beklendi. Yükleme jeli polimerleştikten sonra kuyucukların arasının bozulmamasına özenle dikkat edilerek tarak çıkarıldı. Kuyucuklar önce saf suyla sonra tank tamponuyla yıkandı. Polimerize jellerin bulunduğu kaset elektrofrez tankına yerleştirildi. Elektrofrez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konuldu.

Afinite kromatografisi sonucunda elde edilen elüatlerden 280 nm dalga boyunda yüksek absorban değeri gösterenler birleştirildi. Elde edilen çözelti toplam hacim 100 µl olacak şekilde 1:1 oranında numune tamponuyla karıştırıldı. Standart protein çözeltisi içeren Marker 1:1 oranında numune tamponuyla karıştırıldı. Jele yüklenecek numuneler 3 dakika 100°C’de termoblok da bekletildi. Numuneler soğutularak kuyucuklara dikkatlice yüklendi. Elektrofrez güç kaynağına bağlanarak 80 volt’a ayarlandı. Proteinlerin jeldeki hareketini incelemeye yarayan numune tamponu içindeki boyaya ait bant ayırma jeline ulaştığında voltaj 120 volt’a çıkarıldı. Yürütme işlemine proteinler, jelin altına 1cm kalana kadar devam edildi. Daha sonra akım kesilerek yürütme durduruldu. Bu işlem yaklaşık 1-1,5 saat sürdü. Cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı, yağma jeli kesilip ayrıldıktan sonra protein bantlarını içeren ayırma jeli renklendirme çözeltisi içine konuldu ve 1,5-2 saat kadar çalkalayıcı üzerine bırakıldı. Daha sonra jel renklendirme çözeltisinden çıkartılarak renk açma çözeltisine kondu. Belirli aralıklarla değiştirmek suretiyle jelin zemin rengi açılıp protein bantları belirginleşinceye kadar bu çözelti içinde çalkalandı.

Jel renksizleştirme çözeltilerinden çıkarıldıktan sonra jel görüntüleme sistemi (UVP) ile görüntü bilgisayara aktarıldı.



3. BULGULAR

3.1 Enzimin Saflaştırılması

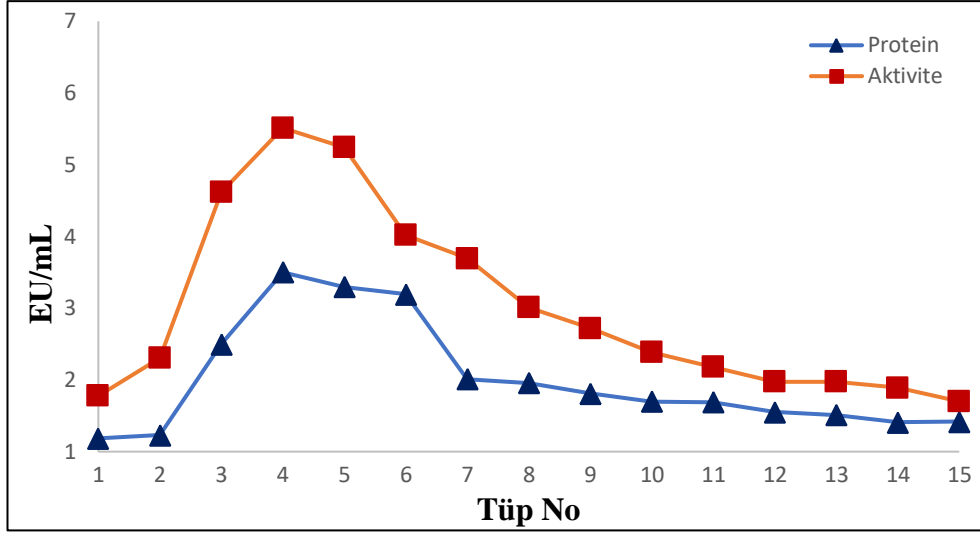
3.1.1 Afinite Kromatografisi İle Karbonik Anhidraz Enziminin Saflaştırılması

Bölüm 2.2.1 de de belirtildiği gibi hazırlanan jel kolona tatbik edildi. Kolona paketlenen jel, jel dengeleme tamponu olan pH:8,7 Tris-HCl/Na₂SO₄ ile dengeleme işlemi yapıldı. Dengeleme işlemi 280 nm de 0,02 absarbansın altında pik verene kadar devam edildi. Dengeleme işlemi tamamlandıktan sonra hazırlanmış olan hemolizat kolona yavaş yavaş tatbik edildi. Verimin artması için bu basamak dikkatlice yapıldı. Hemolizatın tamamı tükendikten sonra, kolon üzerinden yıkama tamponu olan pH:8,7 Tris-HCl/Na₂SO₄ ile jel yıkaması yapıldı. Bu şekilde ortamdaki istenmeyen safsızlıklar uzaklaştırılmış oldu. Bu basamak yavaş yapıldı. Yıkamanın tamamlandığını anlamak için 280 nm de absorbans değeri okundu. Bu değer 0,02 nin altına düştüğünde yıkama işlemine son verildi.

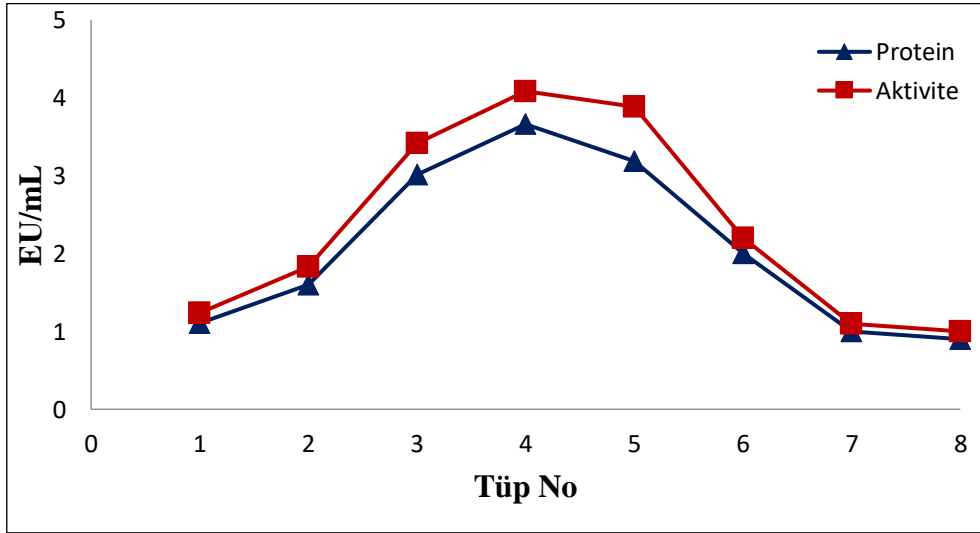
hCA-I elüsyon işlemi için 15 adet 2 mL'lik tüp hazır edildi. Bu işlem için kolona hCA-I elüsyon tamponu NaCl/Na₂HPO₄ pH:6,3 tamponu aktarıldı. Hemen kolon musluğu açıldı ve elüatlar toplandı. Her bir elüatın hacminin 2 mL'yi geçmemesine dikkat edildi.

hCA-II elüsyon işlemi için 10 adet 2 mL'lik tüp hazır edildi. Bu işlem için kolona hCA-II elüsyon tamponu CH₃COONa /NaClO₄ pH 5.6 tamponu aktarıldı. Hemen kolon musluğu açıldı ve elüatlar toplandı. Her bir elüatın hacminin 2 mL'yi geçmemesine dikkat edildi. Bu basamaklar hızlı yapılmalıdır.

Alınan elüatların 280 nm de protein miktarlarını belirlemek için absorbans değerleri okundu. Bu değerler hangi tüpte enzimin protein miktarının daha fazla olduğunu göstermektedir. Ayrıca her bir tüpte aktivite tayinleri yapıldı. Elde edilen değerlerin tüp numarasına karşı protein miktarı ve aktivite grafiği çizildi.



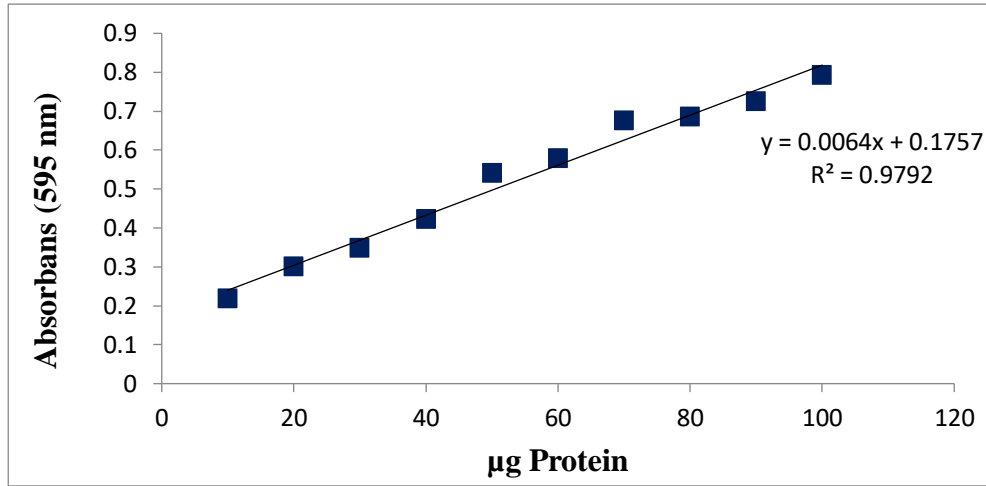
Şekil 3.1 : Kolona tutunmuş hCA-I izoenziminin Protein-Aktivite grafiği.



Şekil 3.2 : Kolona tutunmuş hCA-II izoenziminin Protein-Aktivite grafiği.

3.1.2 Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

Elde ettiğimiz enzim çözeltilisindeki kantitatif protein tayini Bradford yöntemiyle belirlenmiştir. İlk olarak standart bir eğri hazırlanmıştır. Hemolizat ve afinite kromatografisi sonucu elde edilen enzim çözeltililerindeki protein miktarları bu standart grafikten faydalanılarak bulunmuştur. Standart çözeltilerin $\mu\text{g/ml}$ proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 3.3’de gösterilmiştir.



Şekil 3.3 : Bradford yöntemi ile protein tayini için hazırlanan standart grafik.

3.1.3 CA İzoenzimlerinin Afinite Kromatografisi İle Saflaştırma Basamakları

Saflaştırma işlemi sonucunda elde edilen saf enzimden ve hemolizattan alınan 1'er mL numune ile, Esteraz aktivitesi ve Bradford yöntemi kullanılarak protein tayini yapılmıştır.

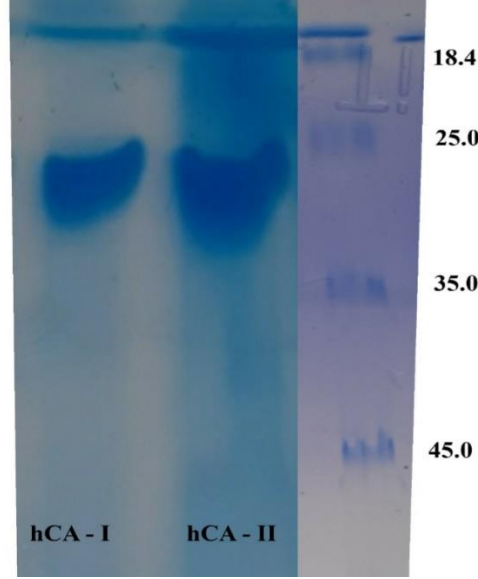
Elde edilen değerlere bakılarak hemolizatın Sepharose-4B-4-(6-Amino-hekziloksi)-benzensülfonamid afinite kolonuna uygulanması sonucunda saflaştırma işleminin kaç kat yapıldığı kaydedildi ve sonuçlar Tablo 3.1'de gösterildi.

Tablo 3.1 : hCA-I ve hCA-II izoenzimleri için saflaştırma tablosu.

Saflaştırma Basamağı	Hacim (mL)	Aktivite (U/mLdak)	Toplam Aktivite	Protein (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg protein)	Verim (%)	Saflaştırma Derecesi
Ham Ekstrakt	20	110	2200	14,82	296,40	7,42	-	-
Afinite kromatografisi hCA - I	10	156	1560	0,22	2,20	709,09	70,91	95,53
Afinite kromatografisi hCA - II	8	144	1152	0,09	0,72	1600	52,36	215,56

3.1.4 İnsan Eritrosit Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Afinite kolonundan en iyi elüsyon tamponları ile saflaştırılan karbonik anhidraz izoenzimlerinin (hCA-I, hCA-II) saflığını kontrol etmek için, bölüm 2.2.5’de anlatıldığı gibi hazırlanan slab jel SDS-PAGE elektroforezi ile, insan eritrositlerinden saflaştırılan enzim numunelerinin protein bantları elde edilmiştir. Elde edilen protein bantlarının fotoğrafı çekilmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4 : Afinite kolonundan saflaştırılan hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin SDS-PAGE elektroforezi.

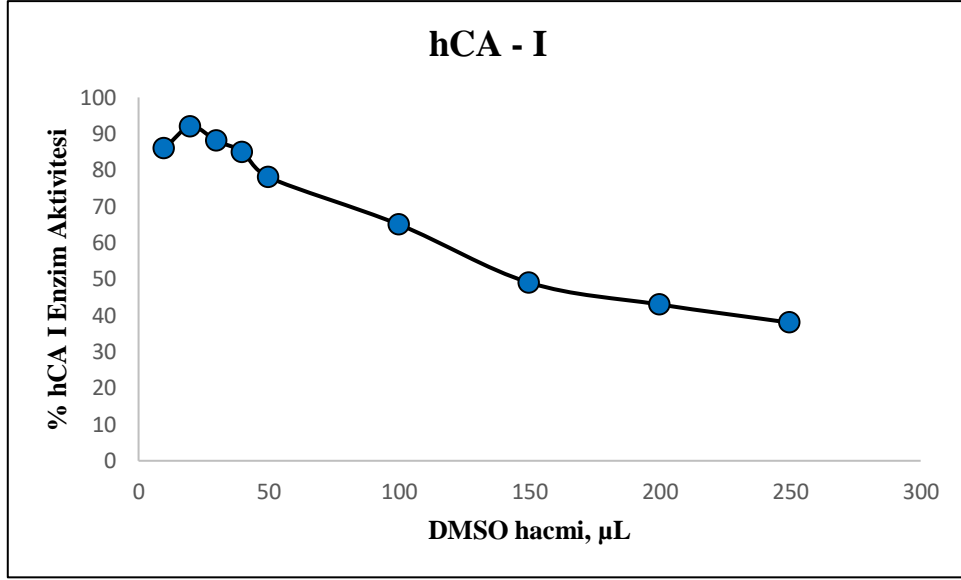
3.2 hCA-I VE hCA-II İzoenzimlerinin Hidrataz Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon Etkileri

İnsan eritrositlerinden saflaştırılan karbonik anhidraz izoenzimleri üzerinde 15 farklı pestisit'in inhibisyon etkisi çalışıldı. Ölçümler hidrataz aktivite tayin yöntemi ile yapıldı. % Aktivite'ye karşı hacim grafiği çizilerek IC₅₀ değerleri hesaplandı.

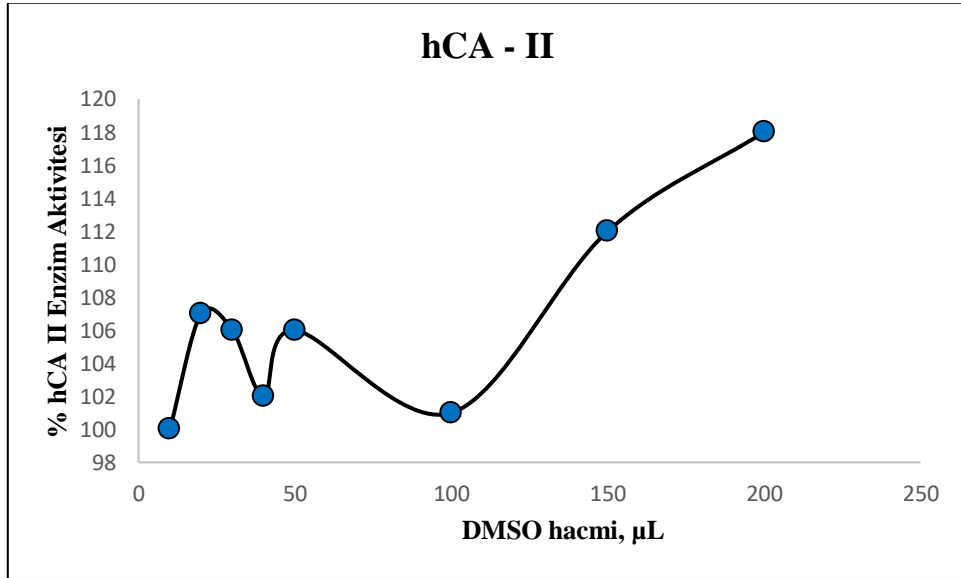
3.3 DMSO'nun hCA-I ve hCA-II İzoenzimleri Üzerine Etkisi

DMSO'nun hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin aktiviteleri üzerindeki etkisini incelemek için, CA enzim aktivite tayin yönteminde belirtilen koşullarda 800 µL 0,05 M Tris-SO₄ (pH 7,4) tamponu, 700 µL p-nitrofenil asetat substratı, 100 µL enzim ve reaksiyon hacmi 400 µL olacak şekilde değişen miktarlarda distile su ve saf DMSO kullanıldı.

Reaksiyon, hCA-I veya hCA-II izoenzimlerinin eklenmesi ile başlatıldı. 25 °C’de 348 nm’de ilk absorbansı ölçüldü ve absorbans farkı enzimin aktivite hesaplamasında kullanıldı.



Şekil 3.5 : DMSO’nun hCA-I izoenziminin aktivitesi üzerine etkisi.



Şekil 3.6: DMSO’nun hCA-II izoenziminin aktivitesi üzerine etkisi.

Yukarıdaki şekillerde görüldüğü gibi bizim çalıştığımız hacimlerde DMSO’nun enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi yoktur.

3.4 hCA-I VE hCA-II İzoenzimlerinin Esteraz Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon

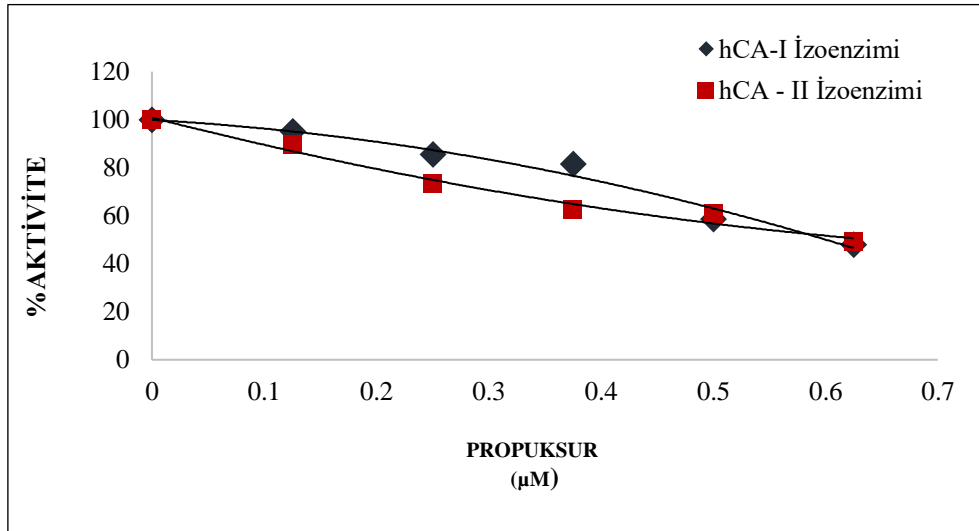
Etkileri

Tablo 3.2: Propoksür inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Fenol Kırmızısı Çözeltisi (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (µL)	Saf Su	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	pH=10 Tamponu (µL)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Enzim Ünitesi	% Aktivite
1900	1300	50	250	100	400	0,125	10,33	95,01
1900	1300	100	200	100	400	0,250	9,30	85,55
1900	1300	150	150	100	400	0,375	8,85	81,46
1900	1300	200	100	100	400	0,500	6,37	58,57
1900	1300	250	50	100	400	0,625	5,21	47,91

Tablo 3.3: Propoksür inhibitörünün hCA – II enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Fenol Kırmızısı Çözeltisi (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (µL)	Saf Su	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	pH=10 Tamponu (µL)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Enzim Ünitesi	% Aktivite
1900	1300	50	250	100	400	0,125	6,58	89,58
1900	1300	100	200	100	400	0,250	5,37	73,16
1900	1300	150	150	100	400	0,375	4,56	62,19
1900	1300	200	100	100	400	0,500	4,46	60,72
1900	1300	250	50	100	400	0,625	3,61	49,20



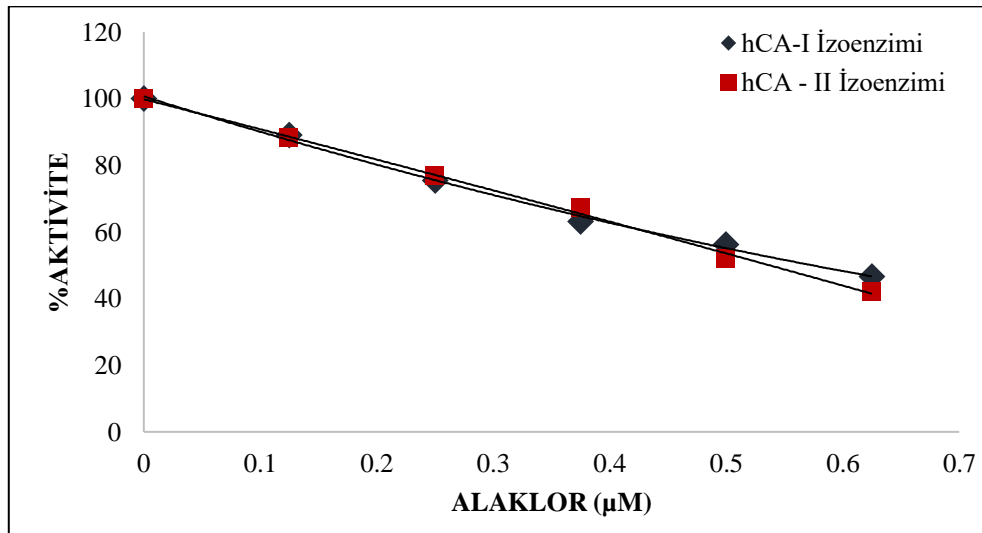
Şekil 3.7: Hidrataz aktivitesi metodu ile hCA-I ve hCA- II izoenzimlerinin farklı propoksür inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC50 değerinin bulunması için çizilen grafik.

Tablo 3.4: Alaklor inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Fenol Kırmızısı Çözeltisi (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (µL)	Saf Su	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	pH=10 Tamponu (µL)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Enzim Ünitesi	% Aktivite
1900	1300	50	250	100	400	0,125	10,87	88,96
1900	1300	100	200	100	400	0,250	9,22	75,43
1900	1300	150	150	100	400	0,375	7,72	63,19
1900	1300	200	100	100	400	0,500	6,87	56,21
1900	1300	250	50	100	400	0,625	5,68	46,49

Tablo 3.5: Alaklor inhibitörünün hCA – II enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Fenol Kırmızısı Çözeltisi (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (µL)	Saf Su	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	pH=10 Tamponu (µL)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Enzim Ünitesi	% Aktivite
1900	1300	50	250	100	400	0,125	4,73	88,10
1900	1300	100	200	100	400	0,250	4,13	76,86
1900	1300	150	150	100	400	0,375	3,61	67,18
1900	1300	200	100	100	400	0,500	2,78	51,81
1900	1300	250	50	100	400	0,625	2,26	42,02



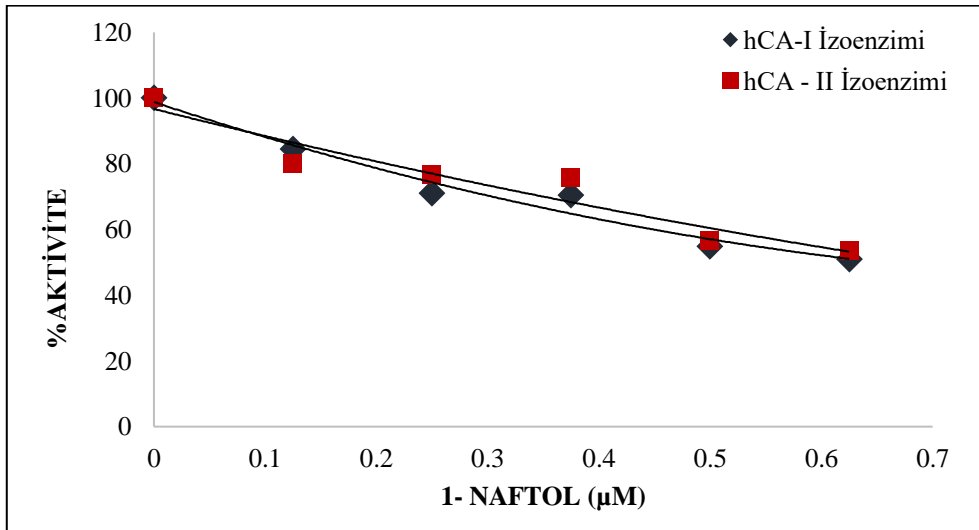
Şekil 3.8: Hidrataz aktivitesi metodu ile HCA-I ve HCA- II izoenzimlerinin farklı Alaklor inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC50 değerinin bulunması için çizilen grafik.

Tablo 3.6: 1- Naftol inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Fenol Kırmızısı Çözeltilisi (µL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µL)	İnhibitör Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Saf Su	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µL)	pH=10 Tamponu (µL)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Enzim Ünitesi	% Aktivite
1900	1300	50	250	100	400	0,125	16,25	84,37
1900	1300	100	200	100	400	0,250	13,67	71,00
1900	1300	150	150	100	400	0,375	13,57	70,46
1900	1300	200	100	100	400	0,500	10,58	54,93
1900	1300	250	50	100	400	0,625	9,83	51,01

Tablo 3.7: 1- Naftol inhibitörünün hCA – II enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Fenol Kırmızısı Çözeltilisi (µL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µL)	İnhibitör Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Saf Su	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µL)	pH=10 Tamponu (µL)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Enzim Ünitesi	% Aktivite
1900	1300	50	250	100	400	0,125	9,35	79,91
1900	1300	100	200	100	400	0,250	8,96	76,61
1900	1300	150	150	100	400	0,375	8,87	75,79
1900	1300	200	100	100	400	0,500	6,60	56,40
1900	1300	250	50	100	400	0,625	6,26	53,46



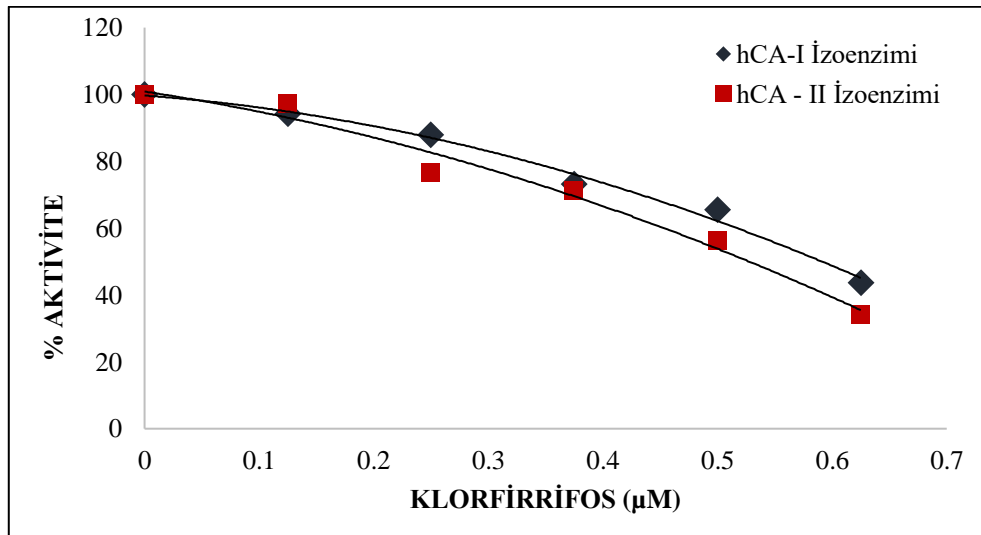
Şekil 3.9: Hidrataz aktivitesi metodu ile hCA-I ve hCA- II izoenzimlerinin farklı 1- Naftol inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC50 değerinin bulunması için çizilen grafik.

Tablo 3.8: Klorpirifos inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Fenol Kırmızısı Çözeltisi (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (µL)	Saf Su	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	pH=10 Tamponu (µL)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Enzim Ünitesi	% Aktivite
1900	1300	50	250	100	400	0,125	10,39	94,38
1900	1300	100	200	100	400	0,250	9,68	87,93
1900	1300	150	150	100	400	0,375	8,05	73,15
1900	1300	200	100	100	400	0,500	7,23	65,65
1900	1300	250	50	100	400	0,625	4,82	43,76

Tablo 3.9: Klorpirifos inhibitörünün hCA – II enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Fenol Kırmızısı Çözeltisi (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (µL)	Saf Su	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	pH=10 Tamponu (µL)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Enzim Ünitesi	% Aktivite
1900	1300	50	250	100	400	0,125	6,78	97,17
1900	1300	100	200	100	400	0,250	5,35	76,71
1900	1300	150	150	100	400	0,375	4,96	71,13
1900	1300	200	100	100	400	0,500	3,92	56,12
1900	1300	250	50	100	400	0,625	2,39	34,19



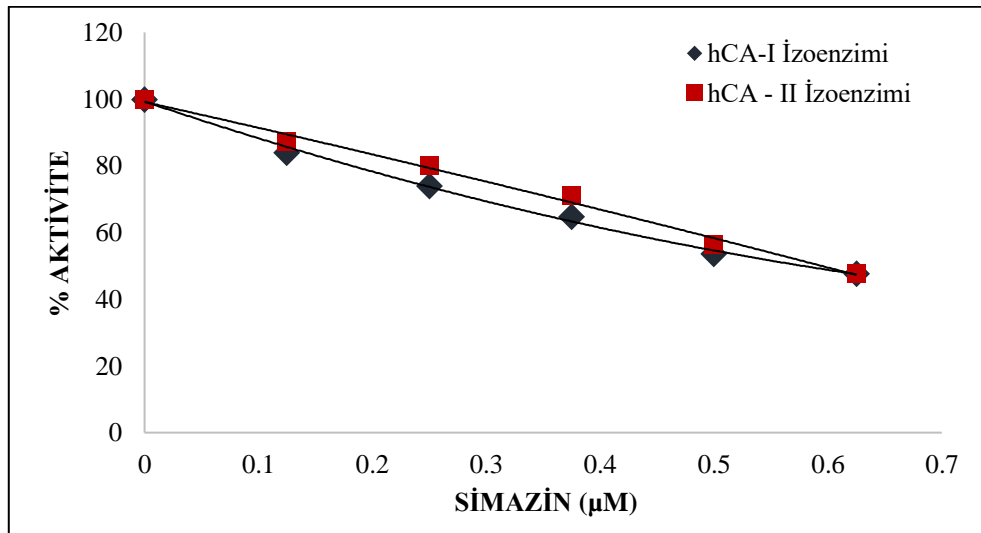
Şekil 3.10: Hidrataz aktivitesi metodu ile HCA-I ve HCA- II izoenzimlerinin farklı Klorpirifos inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC50 değerinin bulunması için çizilen grafik.

Tablo 3.10: Simazin inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Fenol Kırmızısı Çözeltisi (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (µL)	Saf Su	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	pH=10 Tamponu (µL)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Enzim Ünitesi	% Aktivite
1900	1300	50	250	100	400	0,125	8,81	84,04
1900	1300	100	200	100	400	0,250	7,76	74,05
1900	1300	150	150	100	400	0,375	6,78	64,68
1900	1300	200	100	100	400	0,500	5,62	53,63
1900	1300	250	50	100	400	0,625	4,99	47,64

Tablo 3.11: Simazin inhibitörünün hCA – II enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Fenol Kırmızısı Çözeltisi (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (µL)	Saf Su	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	pH=10 Tamponu (µL)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Enzim Ünitesi	% Aktivite
1900	1300	50	250	100	400	0,125	5,14	87,32
1900	1300	100	200	100	400	0,250	4,71	80,02
1900	1300	150	150	100	400	0,375	4,19	71,06
1900	1300	200	100	100	400	0,500	3,32	56,32
1900	1300	250	50	100	400	0,625	2,81	47,77



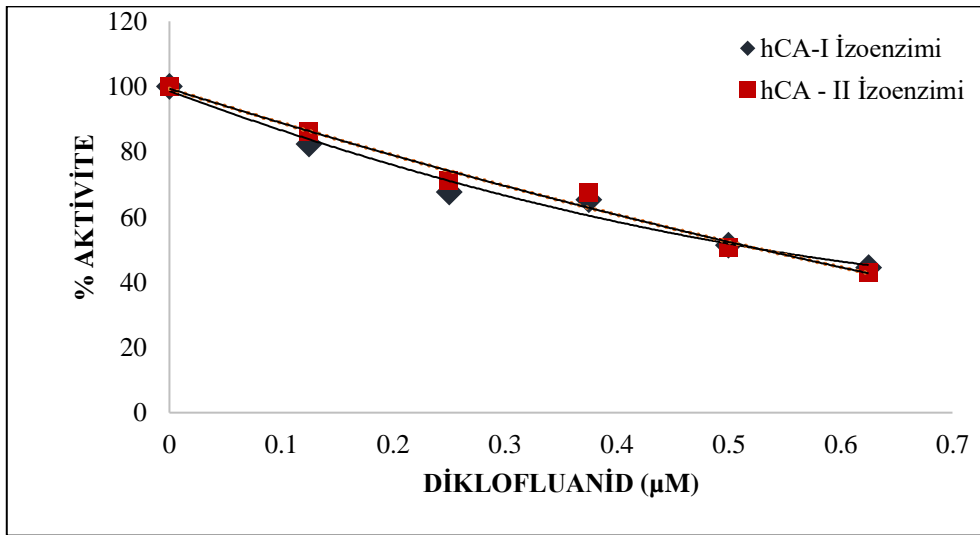
Şekil 3.11: Hidrataz aktivitesi metodu ile hCA-I ve hCA- II izoenzimlerinin farklı Simazin inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC50 değerinin bulunması için çizilen grafik.

Tablo 3.12: Diklofluand inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Fenol Kırmızısı Çözeltisi (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (µL)	Saf Su	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	pH=10 Tamponu (µL)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Enzim Ünitesi	% Aktivite
1900	1300	50	250	100	400	0,125	5,00	82,37
1900	1300	100	200	100	400	0,250	4,11	67,63
1900	1300	150	150	100	400	0,375	3,96	65,20
1900	1300	200	100	100	400	0,500	3,11	51,21
1900	1300	250	50	100	400	0,625	2,70	44,48

Tablo 3.13: Diklofluand inhibitörünün hCA – II enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Fenol Kırmızısı Çözeltisi (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (µL)	Saf Su	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	pH=10 Tamponu (µL)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Enzim Ünitesi	% Aktivite
1900	1300	50	250	100	400	0,125	5,02	86,02
1900	1300	100	200	100	400	0,250	4,15	71,03
1900	1300	150	150	100	400	0,375	3,94	67,44
1900	1300	200	100	100	400	0,500	2,94	50,41
1900	1300	250	50	100	400	0,625	2,50	42,84



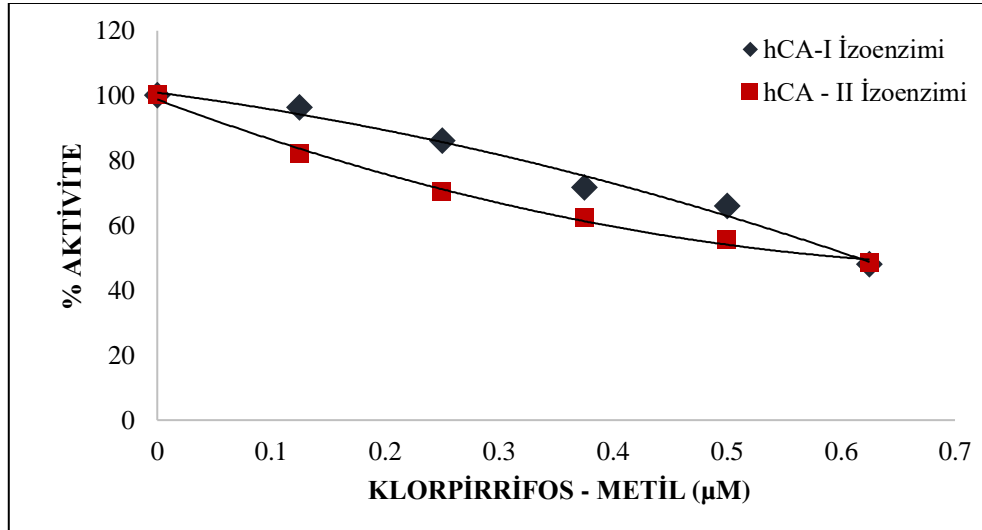
Şekil 3.12: Hidrataz aktivitesi metodu ile hCA-I ve hCA- II izoenzimlerinin farklı Diklofluand inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC50 değerinin bulunması için çizilen grafik.

Tablo 3.14: Klorpirifos – Metil inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Fenol Kırmızısı Çözeltisi (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (µL)	Saf Su	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	pH=10 Tamponu (µL)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Enzim Ünitesi	% Aktivite
1900	1300	50	250	100	400	0,125	8,27	96,31
1900	1300	100	200	100	400	0,250	7,38	85,96
1900	1300	150	150	100	400	0,375	6,15	71,58
1900	1300	200	100	100	400	0,500	5,67	66,00
1900	1300	250	50	100	400	0,625	4,12	47,97

Tablo 3.15: Klorpirifos – Metil inhibitörünün hCA – II enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Fenol Kırmızısı Çözeltisi (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (µL)	Saf Su	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	pH=10 Tamponu (µL)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Enzim Ünitesi	% Aktivite
1900	1300	50	250	100	400	0,125	4,73	81,98
1900	1300	100	200	100	400	0,250	4,05	70,20
1900	1300	150	150	100	400	0,375	3,60	62,42
1900	1300	200	100	100	400	0,500	3,20	55,51
1900	1300	250	50	100	400	0,625	2,79	48,41



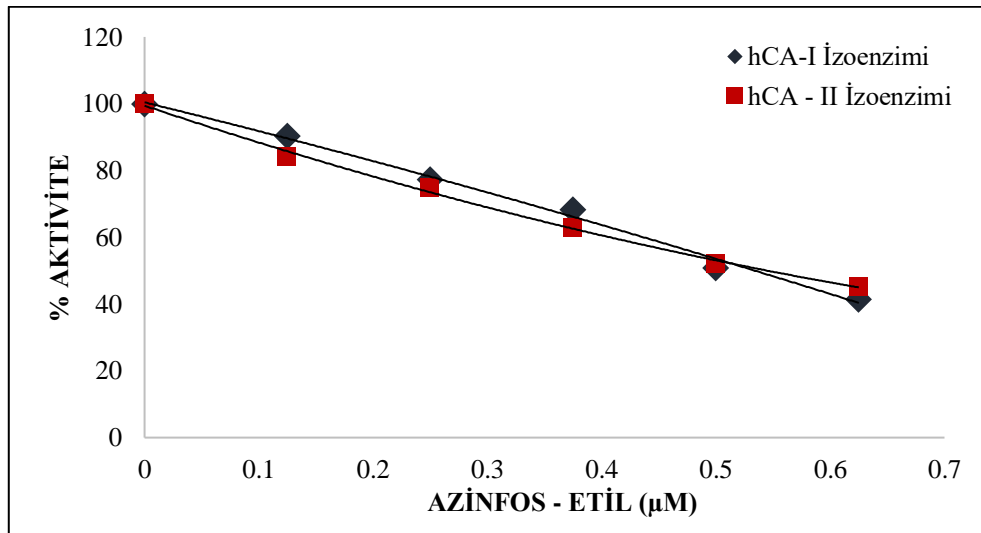
Şekil 3.13: Hidrataz aktivitesi metodu ile hCA-I ve hCA- II izoenzimlerinin farklı Klorpirifos – Metil inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC50 değerinin bulunması için çizilen grafik.

Tablo 3.16: Azinfos – Etil inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Fenol Kırmızı Çözeltisi (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (µL)	Saf Su	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	pH=10 Tamponu (µL)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Enzim Ünitesi	% Aktivite
1900	1300	50	250	100	400	0,125	5,57	90,32
1900	1300	100	200	100	400	0,250	4,77	77,31
1900	1300	150	150	100	400	0,375	4,22	68,34
1900	1300	200	100	100	400	0,500	3,13	50,79
1900	1300	250	50	100	400	0,625	2,55	41,40

Tablo 3.17: Azinfos – Etil inhibitörünün hCA – II enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Fenol Kırmızı Çözeltisi (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (µL)	Saf Su	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	pH=10 Tamponu (µL)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Enzim Ünitesi	% Aktivite
1900	1300	50	250	100	400	0,125	4,99	84,03
1900	1300	100	200	100	400	0,250	4,44	74,80
1900	1300	150	150	100	400	0,375	3,74	63,00
1900	1300	200	100	100	400	0,500	3,10	52,14
1900	1300	250	50	100	400	0,625	2,69	45,26



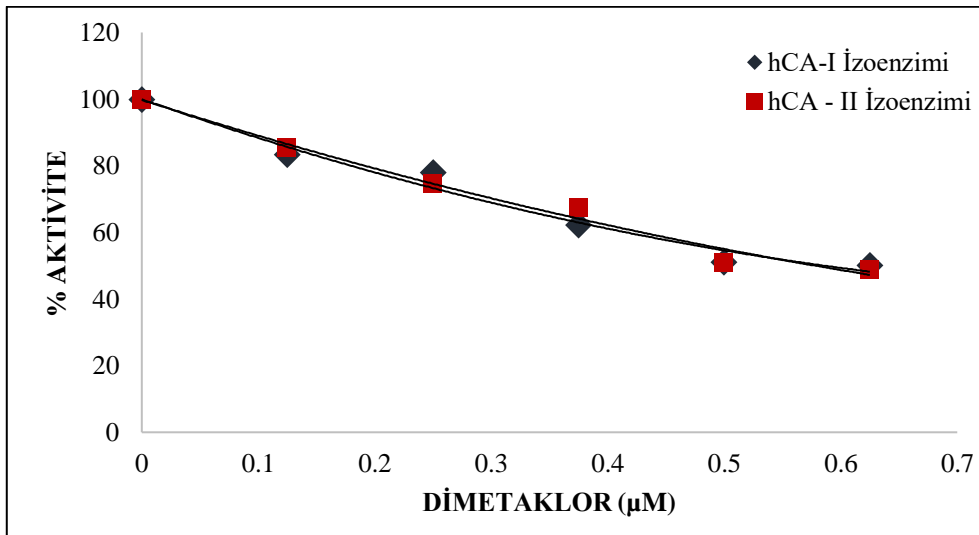
Şekil 3.14: Hidrataz aktivitesi metodu ile hCA-I ve hCA- II izoenzimlerinin farklı Azinfos – Etil inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC50 değerinin bulunması için çizilen grafik.

Tablo 3.18: Dimetaklor inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Fenol Kırmızısı Çözeltilisi (µL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µL)	İnhibitör Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Saf Su	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µL)	pH=10 Tamponu (µL)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Enzim Ünitesi	% Aktivite
1900	1300	50	250	100	400	0,125	4,65	83,40
1900	1300	100	200	100	400	0,250	4,34	77,91
1900	1300	150	150	100	400	0,375	3,46	62,16
1900	1300	200	100	100	400	0,500	2,84	51,06
1900	1300	250	50	100	400	0,625	2,79	50,10

Tablo 3.19: Dimetaklor inhibitörünün hCA – II enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Fenol Kırmızısı Çözeltilisi (µL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µL)	İnhibitör Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Saf Su	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µL)	pH=10 Tamponu (µL)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Enzim Ünitesi	% Aktivite
1900	1300	50	250	100	400	0,125	2,85	85,47
1900	1300	100	200	100	400	0,250	2,49	74,63
1900	1300	150	150	100	400	0,375	2,25	67,51
1900	1300	200	100	100	400	0,500	1,69	50,85
1900	1300	250	50	100	400	0,625	1,62	48,72



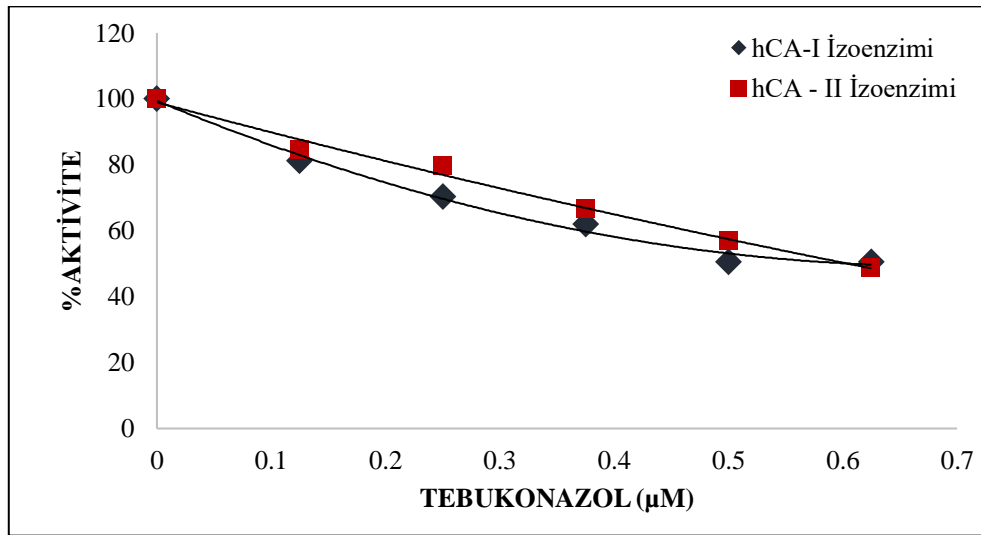
Şekil 3.15: Hidrataz aktivitesi metodu ile hCA-I ve hCA- II izoenzimlerinin farklı Dimetaklor inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC50 değerinin bulunması için çizilen grafik.

Tablo 3.20: Tebukonazol inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Fenol Kırmızısı Çözeltisi (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (µL)	Saf Su	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	pH=10 Tamponu (µL)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Enzim Ünitesi	% Aktivite
1900	1300	50	250	100	400	0,125	4,48	81,23
1900	1300	100	200	100	400	0,250	3,87	70,28
1900	1300	150	150	100	400	0,375	3,41	61,94
1900	1300	200	100	100	400	0,500	2,79	50,57
1900	1300	250	50	100	400	0,625	2,78	50,51

Tablo 3.21: Tebukonazol inhibitörünün hCA – II enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Fenol Kırmızısı Çözeltisi (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (µL)	Saf Su	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	pH=10 Tamponu (µL)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Enzim Ünitesi	% Aktivite
1900	1300	50	250	100	400	0,125	2,73	84,54
1900	1300	100	200	100	400	0,250	2,57	79,66
1900	1300	150	150	100	400	0,375	2,15	66,58
1900	1300	200	100	100	400	0,500	1,84	56,96
1900	1300	250	50	100	400	0,625	1,57	48,69



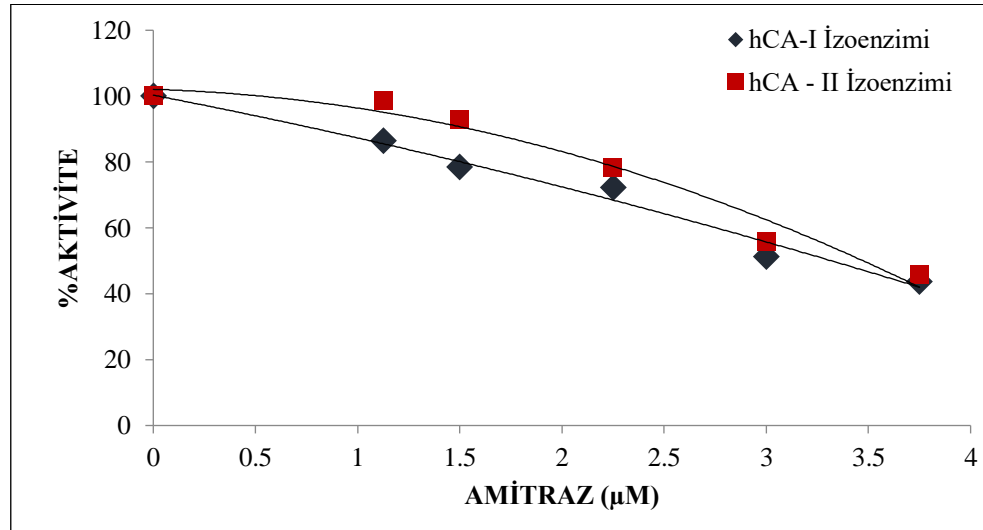
Şekil 3.16: Hidrataz aktivitesi metodu ile hCA-I ve hCA- II izoenzimlerinin farklı Tebukonazol inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC50 değerinin bulunması için çizilen grafik.

Tablo 3.22: Amitraz inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Fenol Kırmızı Çözeltisi (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (µL)	Saf Su	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	pH=10 Tamponu (µL)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Enzim Ünitesi	% Aktivite
1900	1300	50	250	100	400	0,125	4,93	86,41
1900	1300	100	200	100	400	0,250	4,48	78,54
1900	1300	150	150	100	400	0,375	4,12	72,29
1900	1300	200	100	100	400	0,500	2,92	51,17
1900	1300	250	50	100	400	0,625	2,49	43,68

Tablo 3.23: Amitraz inhibitörünün hCA – II enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Fenol Kırmızı Çözeltisi (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (µL)	Saf Su	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	pH=10 Tamponu (µL)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Enzim Ünitesi	% Aktivite
1900	1300	50	250	100	400	0,125	4,63	98,57
1900	1300	100	200	100	400	0,250	4,36	92,76
1900	1300	150	150	100	400	0,375	3,67	78,15
1900	1300	200	100	100	400	0,500	2,62	55,67
1900	1300	250	50	100	400	0,625	2,16	45,88



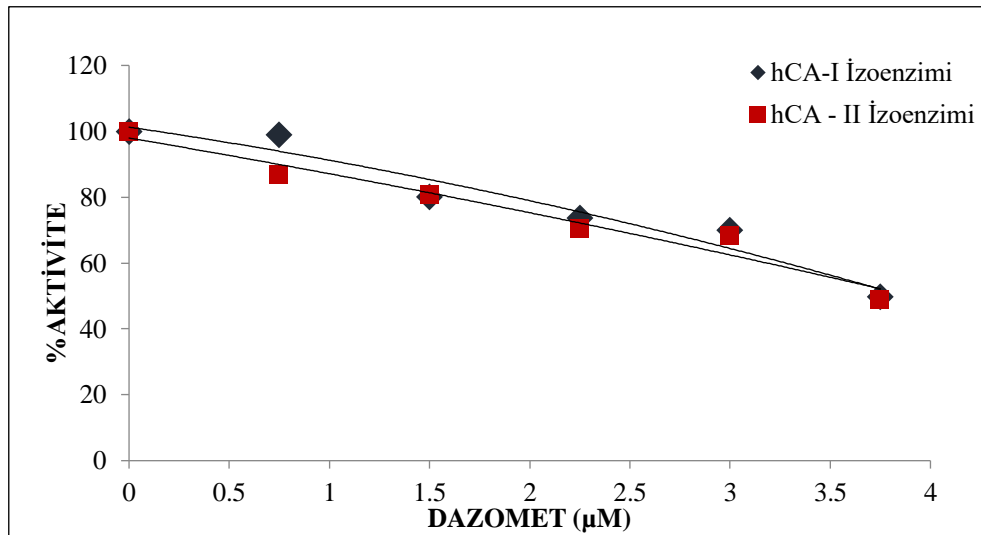
Şekil 3.17: Hidrat az aktivitesi metodu ile hCA-I ve hCA- II izoenzimlerinin farklı Amitraz inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC50 değerinin bulunması için çizilen grafik.

Tablo 3.24: Dazomet inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Fenol Kırmızısı Çözeltilisi (µL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µL)	İnhibitör Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Saf Su	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µL)	pH=10 Tamponu (µL)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Enzim Ünitesi	% Aktivite
1900	1300	50	250	100	400	0,125	5,01	98,94
1900	1300	100	200	100	400	0,250	4,06	80,16
1900	1300	150	150	100	400	0,375	3,73	73,69
1900	1300	200	100	100	400	0,500	3,54	69,93
1900	1300	250	50	100	400	0,625	2,52	49,82

Tablo 3.25: Dazomet inhibitörünün hCA – II enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Fenol Kırmızısı Çözeltilisi (µL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µL)	İnhibitör Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Saf Su	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µL)	pH=10 Tamponu (µL)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Enzim Ünitesi	% Aktivite
1900	1300	50	250	100	400	0,125	3,16	87,00
1900	1300	100	200	100	400	0,250	2,94	80,89
1900	1300	150	150	100	400	0,375	2,56	70,50
1900	1300	200	100	100	400	0,500	2,49	68,52
1900	1300	250	50	100	400	0,625	1,78	49,12



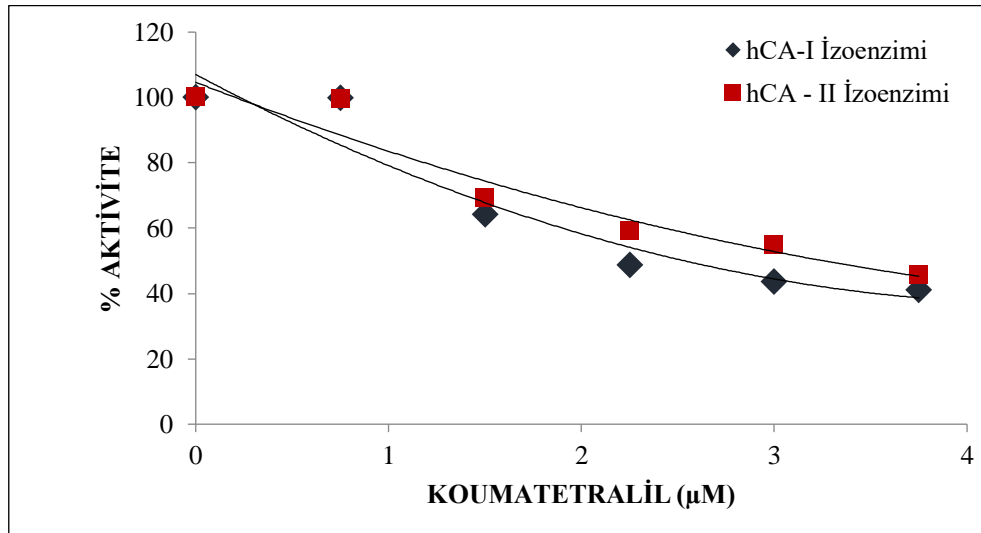
Şekil 3.18: Hidrataz aktivitesi metodu ile hCA-I ve hCA- II izoenzimlerinin farklı Dazomet inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC50 değerinin bulunması için çizilen grafik.

Tablo 3.26: Koumatetralil inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Fenol Kırmızısı Çözeltisi (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (µL)	Saf Su	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	pH=10 Tamponu (µL)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Enzim Ünitesi	% Aktivite
1900	1300	50	250	100	400	0,125	6,04	99,89
1900	1300	100	200	100	400	0,250	3,88	64,16
1900	1300	150	150	100	400	0,375	2,95	48,72
1900	1300	200	100	100	400	0,500	2,64	43,64
1900	1300	250	50	100	400	0,625	2,49	41,16

Tablo 3.27: Koumatetralil inhibitörünün hCA – II enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Fenol Kırmızısı Çözeltisi (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (µL)	Saf Su	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	pH=10 Tamponu (µL)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Enzim Ünitesi	% Aktivite
1900	1300	50	250	100	400	0,125	4,19	99,42
1900	1300	100	200	100	400	0,250	2,91	69,09
1900	1300	150	150	100	400	0,375	2,49	59,15
1900	1300	200	100	100	400	0,500	2,31	54,94
1900	1300	250	50	100	400	0,625	1,92	45,56



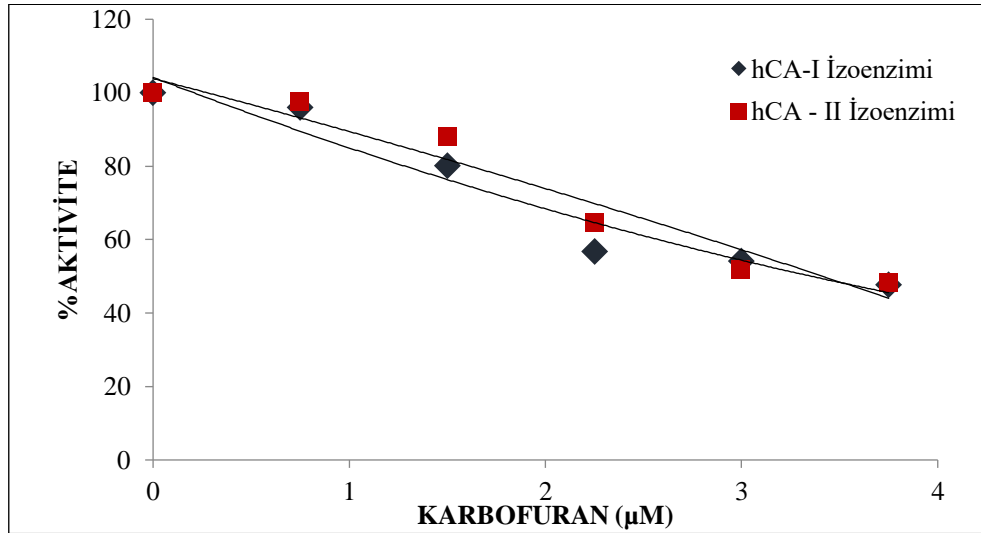
Şekil 3.19: Hidrataz aktivitesi metodu ile hCA-I ve hCA- II izoenzimlerinin farklı Koumatetralil inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC50 değerinin bulunması için çizilen grafik.

Tablo 3.28: Karbofuran inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Fenol Kırmızısı Çözeltisi (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (µL)	Saf Su	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	pH=10 Tamponu (µL)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Enzim Ünitesi	% Aktivite
1900	1300	50	250	100	400	0,125	5,06	95,90
1900	1300	100	200	100	400	0,250	4,23	80,08
1900	1300	150	150	100	400	0,375	3,00	56,82
1900	1300	200	100	100	400	0,500	2,86	54,16
1900	1300	250	50	100	400	0,625	2,52	47,68

Tablo 3.29: Karbofuran inhibitörünün hCA –II enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Fenol Kırmızısı Çözeltisi (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (µL)	Saf Su	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	pH=10 Tamponu (µL)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Enzim Ünitesi	% Aktivite
1900	1300	50	250	100	400	0,125	3,82	97,40
1900	1300	100	200	100	400	0,250	3,45	87,95
1900	1300	150	150	100	400	0,375	2,53	64,42
1900	1300	200	100	100	400	0,500	2,03	51,87
1900	1300	250	50	100	400	0,625	1,89	48,24



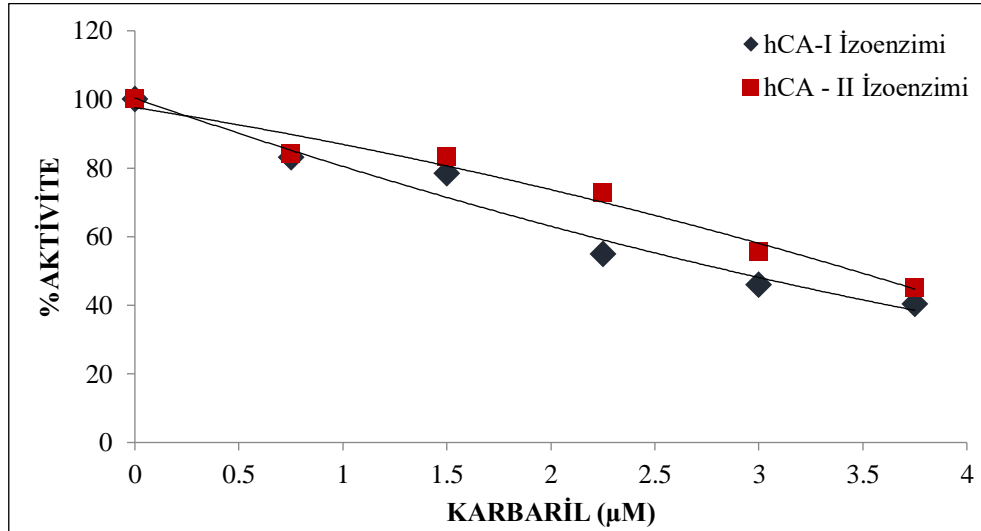
Şekil 3.20: Hidrataz aktivitesi metodu ile hCA-I ve hCA- II izoenzimlerinin farklı Karbofuran inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC50 değerinin bulunması için çizilen grafik.

Tablo 3.30: Karbaril inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Fenol Kırmızı Çözeltisi (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (µL)	Saf Su	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	pH=10 Tamponu (µL)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Enzim Ünitesi	% Aktivite
1900	1300	50	250	100	400	0,125	3,11	83,04
1900	1300	100	200	100	400	0,250	2,93	78,39
1900	1300	150	150	100	400	0,375	2,06	54,95
1900	1300	200	100	100	400	0,500	1,72	45,99
1900	1300	250	50	100	400	0,625	1,51	40,33

Tablo 3.31: Karbaril inhibitörünün hCA – II enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Fenol Kırmızı Çözeltisi (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	İnhibitör Çözeltisinin Hacmi (µL)	Saf Su	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	pH=10 Tamponu (µL)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Enzim Ünitesi	% Aktivite
1900	1300	50	250	100	400	0,125	3,61	84,10
1900	1300	100	200	100	400	0,250	3,57	83,18
1900	1300	150	150	100	400	0,375	3,12	72,76
1900	1300	200	100	100	400	0,500	2,39	55,76
1900	1300	250	50	100	400	0,625	1,93	45,01



Şekil 3.21: Hidrataz aktivitesi metodu ile hCA-I ve hCA- II izoenzimlerinin farklı Karbaril inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC50 değerinin bulunması için çizilen grafik.

3.5 hCA-I VE hCA-II İzoenzimlerinin Esteraz Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon Etkileri

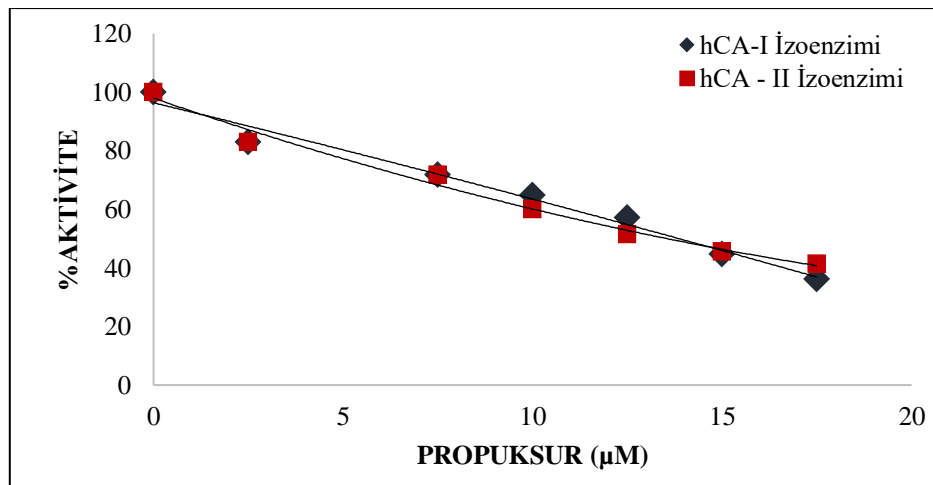
İnsan eritrositlerinden saflaştırılan karbonik anhidraz izoenzimleri üzerinde 15 farklı pestisit üzerinde inhibisyon etkisi çalışıldı. Ölçümler esteraz aktivite tayin yöntemi ile yapıldı. % Aktivite'ye karşı hacim grafiği çizilerek IC50 değerleri hesaplandı.

Tablo 3.32: Propoksür inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Tampon 1M Tris-Sülfat (pH=7,4)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µl)	Saf su (µl)	Enzim(µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Toplam hacim (ml)	ΔA (340nm)	% Aktivite
800	700	350	100	50	2,5	2	0,2871	82,98
800	700	250	100	150	7,5	2	0,2486	71,85
800	700	200	100	200	10,0	2	0,2246	64,91
800	700	150	100	250	12,5	2	0,198	57,23
800	700	100	100	300	15,0	2	0,155	44,80
800	700	50	100	350	17,5	2	0,125	36,13

Tablo 3.33: Propoksür inhibitörünün hCA – II enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Tampon 1M Tris-Sülfat (pH=7,4)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µl)	Saf su (µl)	Enzim(µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Toplam hacim (ml)	ΔA (340nm)	% Aktivite
800	700	350	100	50	2,5	2	0,0351	82,98
800	700	250	100	150	7,5	2	0,0304	71,87
800	700	200	100	200	10,0	2	0,0254	60,05
800	700	150	100	250	12,5	2	0,0218	51,54
800	700	100	100	300	15,0	2	0,0193	45,63
800	700	50	100	350	17,5	2	0,0175	41,37



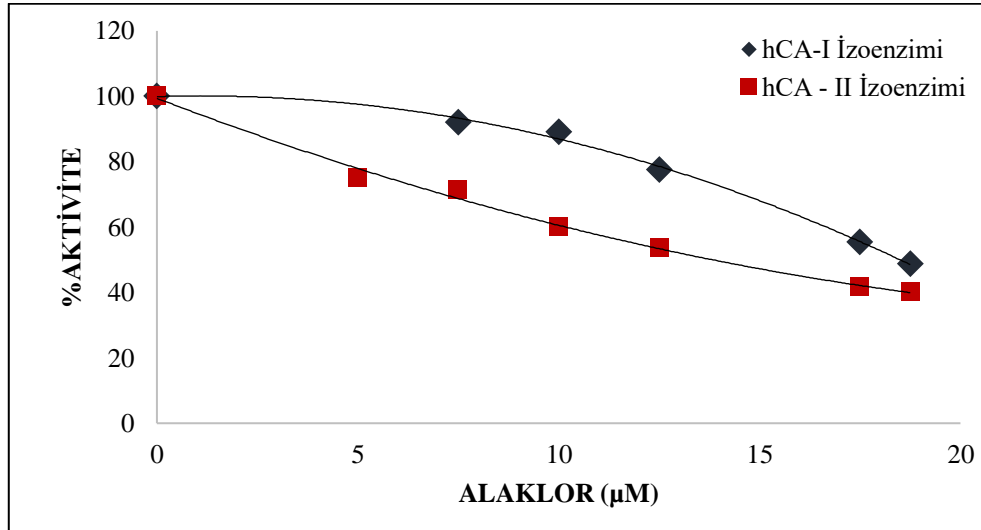
Şekil 3.22: hCA-I ve hCA- II izoenzimlerinin farklı Karbaril inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC50 değerinin bulunması için çizilen grafik.

Tablo 3.34: Alaklor inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Tampon 1M Tris-Sülfat (pH=7,4)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µl)	Saf su (µl)	Enzim(µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Toplam hacim (ml)	ΔA (340nm)	% Aktivite
800	700	250	100	150	7,50	2	0,2633	92,06
800	700	200	100	200	10,00	2	0,2548	89,09
800	700	150	100	250	12,50	2	0,2218	77,55
800	700	50	100	350	17,50	2	0,1584	55,38
800	700	25	100	375	18,75	2	0,1393	48,71

Tablo 3.35: Alaklor inhibitörünün hCA – II enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Tampon 1M Tris-Sülfat (pH=7,4)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µl)	Saf su (µl)	Enzim(µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Toplam hacim (ml)	ΔA (340nm)	% Aktivite
800	700	300	100	100	5,00	2	0,0277	75,07
800	700	250	100	150	7,50	2	0,0264	71,54
800	700	200	100	200	10,00	2	0,0221	59,89
800	700	150	100	250	12,50	2	0,0198	53,66
800	700	50	100	350	17,50	2	0,0154	41,73
800	700	25	100	375	18,75	2	0,0148	40,11



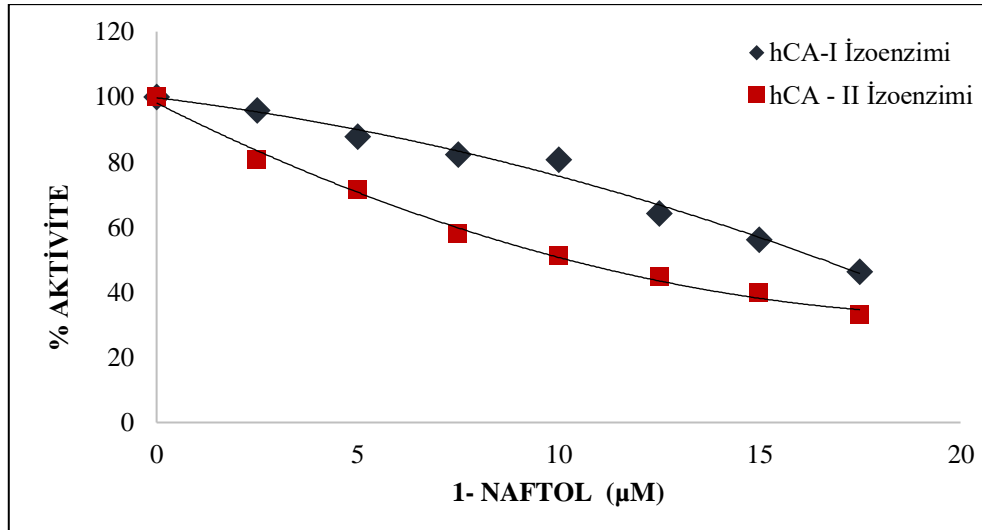
Şekil 3.23: hCA-I ve hCA- II izoenzimlerinin farklı Alaklor inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC50 değerinin bulunması için çizilen grafik.

Tablo 3.36: 1-Naftol inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Tampon 1M Tris-Sülfat (pH=7,4)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Saf su (µl)	Enzim(µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Toplam hacim (ml)	ΔA (340nm)	% Aktivite
800	700	350	100	50	2,50	2	0,3198	95,92
800	700	300	100	100	5,00	2	0,2928	87,82
800	700	250	100	150	7,50	2	0,2743	82,27
800	700	200	100	200	10,00	2	0,2688	80,62
800	700	150	100	250	12,50	2	0,2143	64,28
800	700	100	100	300	15,00	2	0,1869	56,06
800	700	50	100	350	17,50	2	0,1544	46,31

Tablo 3.37: 1-Naftol inhibitörünün hCA – II enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Tampon 1M Tris-Sülfat (pH=7,4)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Saf su (µl)	Enzim(µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Toplam hacim (ml)	ΔA (340nm)	% Aktivite
800	700	350	100	50	2,50	2	0,026	80,75
800	700	300	100	100	5,00	2	0,023	71,43
800	700	250	100	150	7,50	2	0,0187	58,07
800	700	200	100	200	10,00	2	0,0165	51,24
800	700	150	100	250	12,50	2	0,0144	44,72
800	700	100	100	300	15,00	2	0,0128	39,75
800	700	50	100	350	17,50	2	0,0106	32,92



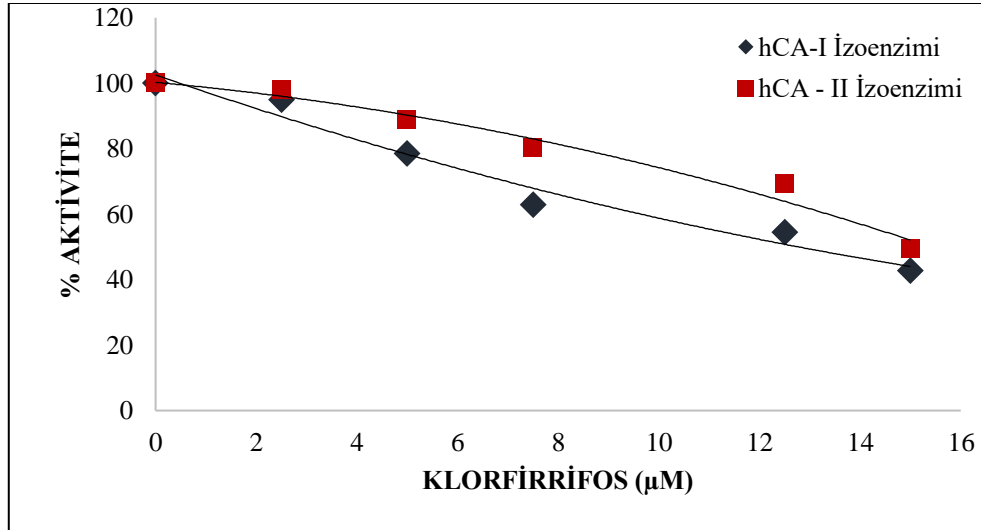
Şekil 3.24: hCA-I ve hCA- II izoenzimlerinin farklı 1-Naftol inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC50 değerinin bulunması için çizilen grafik.

Tablo 3.38: Klorpirifos inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Tampon 1M Tris-Sülfat (pH=7,4)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Saf su (µl)	Enzim(µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Toplam hacim (ml)	ΔA (340nm)	% Aktivite
800	700	350	100	50	2,50	2	0,115	94,96
800	700	300	100	100	5,00	2	0,0951	78,53
800	700	250	100	150	7,50	2	0,0761	62,84
800	700	150	100	250	12,50	2	0,0659	54,42
800	700	100	100	300	15,00	2	0,0516	42,61

Tablo 3.39: Klorpirifos inhibitörünün hCA – II enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Tampon 1M Tris-Sülfat (pH=7,4)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Saf su (µl)	Enzim(µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Toplam hacim (ml)	ΔA (340nm)	% Aktivite
800	700	350	100	50	2,50	2	0,0203	98,07
800	700	300	100	100	5,00	2	0,0184	88,89
800	700	250	100	150	7,50	2	0,0166	80,19
800	700	150	100	250	12,50	2	0,0143	69,08
800	700	100	100	300	15,00	2	0,0102	49,28



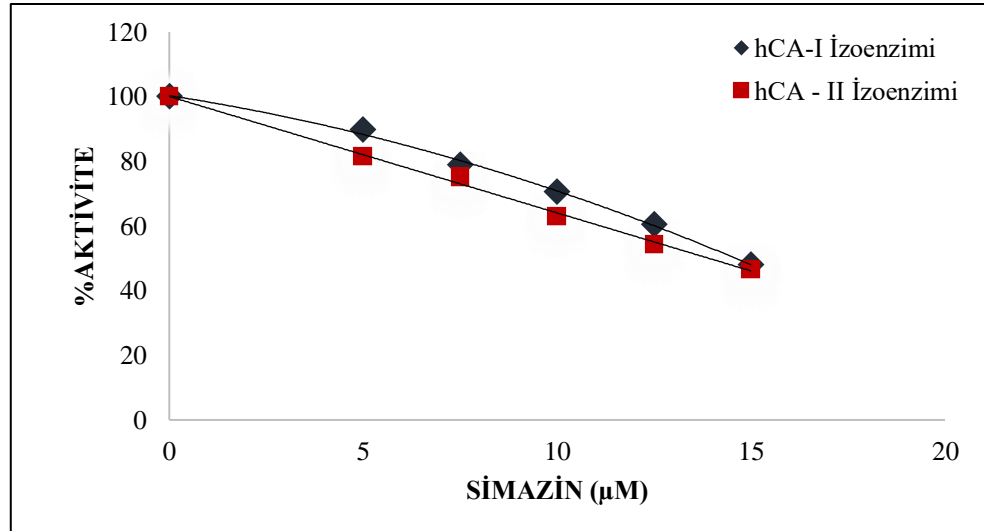
Şekil 3.25: hCA-I ve hCA- II izoenzimlerinin farklı Klorpirifos inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC50 değerinin bulunması için çizilen grafik.

Tablo 3.40: Simazin inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Tampon 1M Tris-Sülfat (pH=7,4)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µl)	Saf su (µl)	Enzim(µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Toplam hacim (ml)	ΔA (340nm)	% Aktivite
800	700	300	100	100	5,00	2	0,0769	89,84
800	700	250	100	150	7,50	2	0,0676	78,97
800	700	200	100	200	10,00	2	0,0604	70,56
800	700	150	100	250	12,50	2	0,0517	60,40
800	700	100	100	300	15,00	2	0,0411	48,01

Tablo 3.41: Simazin inhibitörünün hCA – II enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Tampon 1M Tris-Sülfat (pH=7,4)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µl)	Saf su (µl)	Enzim(µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Toplam hacim (ml)	ΔA (340nm)	% Aktivite
800	700	300	100	100	5,00	2	0,0232	81,40
800	700	250	100	150	7,50	2	0,0214	75,09
800	700	200	100	200	10,00	2	0,0179	62,81
800	700	150	100	250	12,50	2	0,0155	54,39
800	700	100	100	300	15,00	2	0,0133	46,67



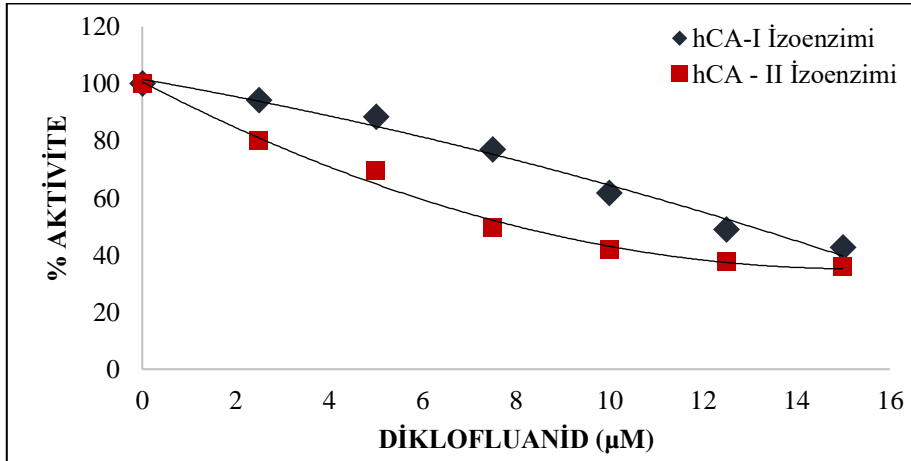
Şekil 3.26: hCA-I ve hCA- II izoenzimlerinin farklı Simazin inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC50 değerinin bulunması için çizilen grafik.

Tablo 3.42: Diklofluamid inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Tampon 1M Tris-Sülfat (pH=7,4)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µl)	Saf su (µl)	Enzim(µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Toplam hacim (ml)	ΔA (340nm)	% Aktivite
800	700	350	100	50	2,50	2	0,0877	94,10
800	700	300	100	100	5,00	2	0,0823	88,30
800	700	250	100	150	7,50	2	0,0717	76,93
800	700	200	100	200	10,00	2	0,0574	61,59
800	700	150	100	250	12,50	2	0,0456	48,93
800	700	100	100	300	15,00	2	0,0398	42,70

Tablo 3.43: Diklofluamid inhibitörünün hCA – II enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Tampon 1M Tris-Sülfat (pH=7,4)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µl)	Saf su (µl)	Enzim(µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Toplam hacim (ml)	ΔA (340nm)	% Aktivite
800	700	350	100	50	2,50	2	0,0221	80,07
800	700	300	100	100	5,00	2	0,0192	69,57
800	700	250	100	150	7,50	2	0,0137	49,64
800	700	200	100	200	10,00	2	0,0115	41,67
800	700	150	100	250	12,50	2	0,0104	37,68
800	700	100	100	300	15,00	2	0,00987	35,76



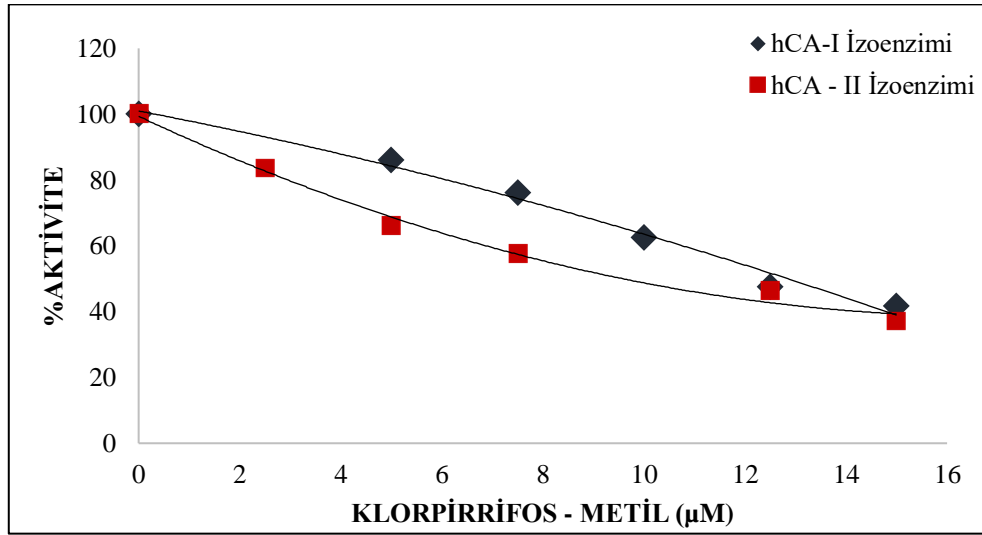
Şekil 3.27: hCA-I ve hCA- II izoenzimlerinin farklı Diklofluamid inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC50 değerinin bulunması için çizilen grafik.

Tablo 3.44: Klorpirifos - Metil inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Tampon 1M Tris-Sülfat (pH=7,4)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µl)	Saf su (µl)	Enzim(µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Toplam hacim (ml)	ΔA (340nm)	% Aktivite
800	700	300	100	100	5,00	2	0,0641	85,92
800	700	250	100	150	7,50	2	0,0568	76,14
800	700	200	100	200	10,00	2	0,0466	62,47
800	700	150	100	250	12,50	2	0,0354	47,45
800	700	100	100	300	15,00	2	0,0311	41,69

Tablo 3.45: Klorpirifos - Metil inhibitörünün hCA – II enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Tampon 1M Tris-Sülfat (pH=7,4)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µl)	Saf su (µl)	Enzim(µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Toplam hacim (ml)	ΔA (340nm)	% Aktivite
800	700	350	100	50	2,50	2	0,0367	83,41
800	700	300	100	100	5,00	2	0,029	65,91
800	700	250	100	150	7,50	2	0,0253	57,50
800	700	150	100	250	12,50	2	0,0204	46,36
800	700	100	100	300	15,00	2	0,0163	37,05



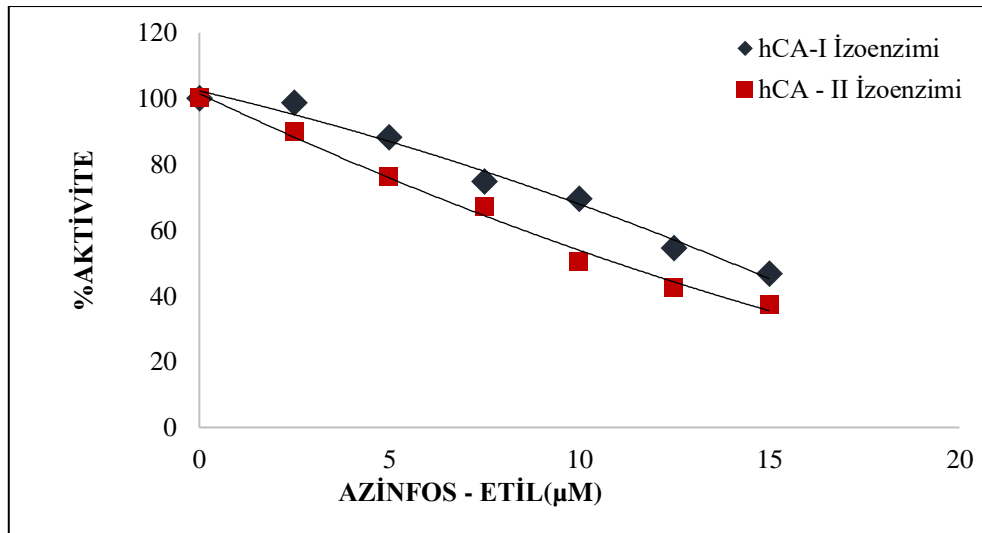
Şekil 3.28: hCA-I ve hCA- II izoenzimlerinin farklı Klorpirifos - Metil inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC50 değerinin bulunması için çizilen grafik.

Tablo 3.46: Azinfos - Etil inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Tampon 1M Tris-Sülfat (pH=7,4)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µl)	Saf su (µl)	Enzim(µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Toplam hacim (ml)	ΔA (340nm)	% Aktivite
800	700	350	100	50	2,50	2	0,0726	98,64
800	700	300	100	100	5,00	2	0,0649	88,18
800	700	250	100	150	7,50	2	0,0551	74,86
800	700	200	100	200	10,00	2	0,0511	69,43
800	700	150	100	250	12,50	2	0,0401	54,48
800	700	100	100	300	15,00	2	0,0344	46,74

Tablo 3.47: Azinfos - Etil inhibitörünün hCA – II enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Tampon 1M Tris-Sülfat (pH=7,4)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µl)	Saf su (µl)	Enzim(µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Toplam hacim (ml)	ΔA (340nm)	% Aktivite
800	700	350	100	50	2,50	2	0,0367	89,73
800	700	300	100	100	5,00	2	0,0312	76,28
800	700	250	100	150	7,50	2	0,0275	67,24
800	700	200	100	200	10,00	2	0,0206	50,37
800	700	150	100	250	12,50	2	0,0174	42,54
800	700	100	100	300	15,00	2	0,0153	37,41



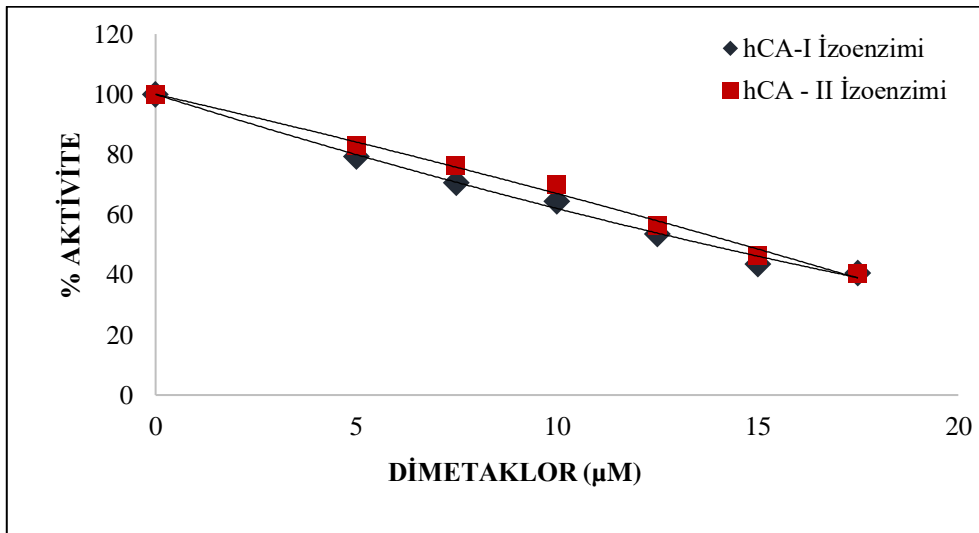
Şekil 3.29: hCA-I ve hCA- II izoenzimlerinin farklı Azinfos - Etil inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC50 değerinin bulunması için çizilen grafik.

Tablo 3.48: Dimetaklor inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Tampon 1M Tris- Sülfat (pH=7,4)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Saf su (µl)	Enzim(µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Toplam hacim (ml)	ΔA (340nm)	% Aktivite
800	700	300	100	100	5,00	2	0,0764	79,25
800	700	250	100	150	7,50	2	0,068	70,54
800	700	200	100	200	10,00	2	0,062	64,32
800	700	150	100	250	12,50	2	0,0516	53,53
800	700	100	100	300	15,00	2	0,042	43,57
800	700	50	100	350	17,50	2	0,039	40,46

Tablo 3.49: Dimetaklor inhibitörünün hCA – II enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Tampon 1M Tris- Sülfat (pH=7,4)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Saf su (µl)	Enzim(µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Toplam hacim (ml)	ΔA (340nm)	% Aktivite
800	700	300	100	100	5,00	2	0,0312	82,98
800	700	250	100	150	7,50	2	0,0287	76,33
800	700	200	100	200	10,00	2	0,0263	69,95
800	700	150	100	250	12,50	2	0,0211	56,12
800	700	100	100	300	15,00	2	0,0174	46,28
800	700	50	100	350	17,50	2	0,0152	40,43



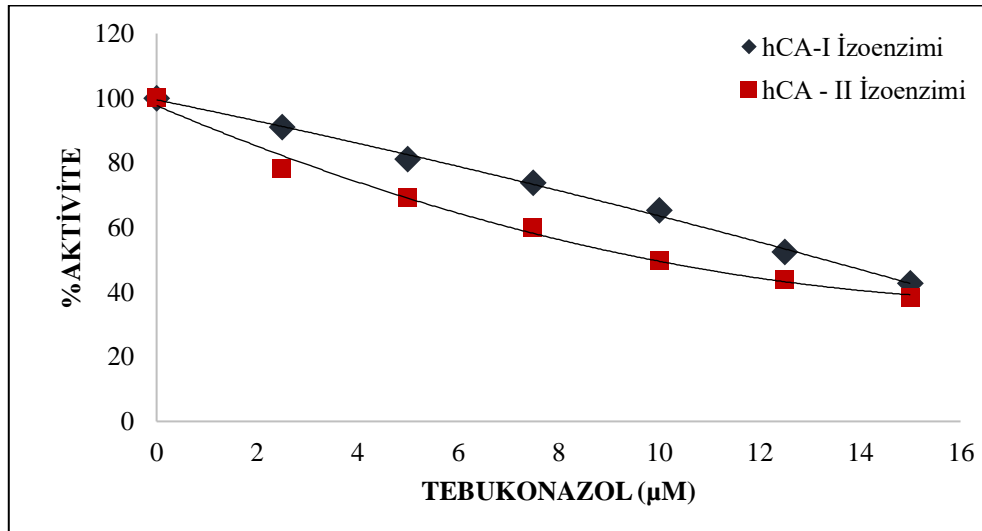
Şekil 3.30: hCA-I ve hCA- II izoenzimlerinin farklı Dimetaklor inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC50 değerinin bulunması için çizilen grafik.

Tablo 3.50: Tebukonazol inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Tampon 1M Tris- Sülfat (pH=7,4)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Saf su (µl)	Enzim(µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Toplam hacim (ml)	ΔA (340nm)	% Aktivite
800	700	300	100	50	2,50	2	0,0897	91,07
800	700	250	100	100	5,00	2	0,0798	81,02
800	700	200	100	150	7,50	2	0,0727	73,81
800	700	150	100	200	10,00	2	0,0643	65,28
800	700	100	100	250	12,50	2	0,0516	52,39
800	700	50	100	300	15,00	2	0,042	42,64

Tablo 3.51: Tebukonazol inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Tampon 1M Tris- Sülfat (pH=7,4)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Saf su (µl)	Enzim(µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Toplam hacim (ml)	ΔA (340nm)	% Aktivite
800	700	300	100	50	2,50	2	0,0312	78,20
800	700	250	100	100	5,00	2	0,0276	69,17
800	700	200	100	150	7,50	2	0,0239	59,90
800	700	150	100	200	10,00	2	0,0198	49,62
800	700	100	100	250	12,50	2	0,0175	43,86
800	700	50	100	300	15,00	2	0,0153	38,35



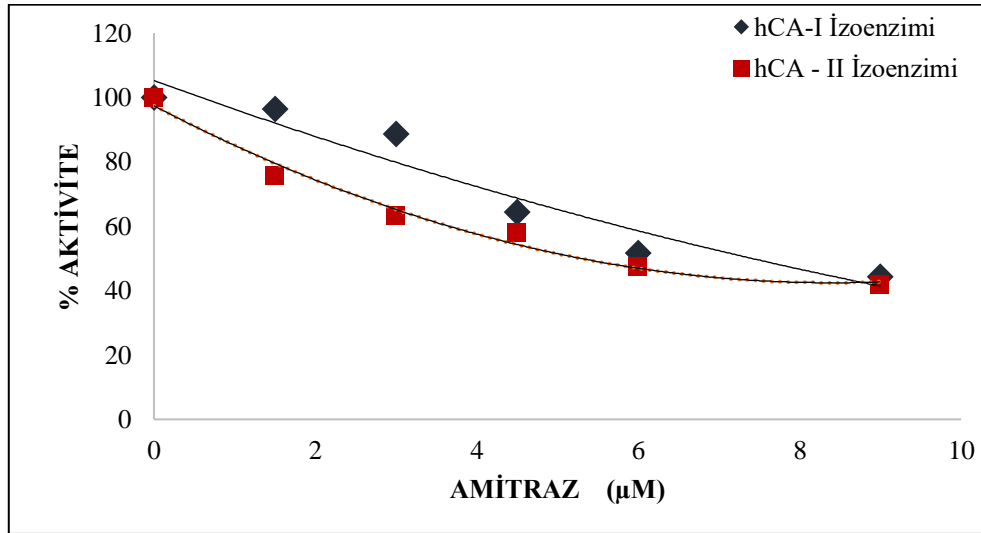
Şekil 3.31: hCA-I ve hCA- II izoenzimlerinin farklı Tebukonazol inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC50 değerinin bulunması için çizilen grafik.

Tablo 3.52: Amitraz inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Tampon 1M Tris-Sülfat (pH=7,4)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Saf su (µl)	Enzim(µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Toplam hacim (ml)	ΔA (340nm)	% Aktivite
800	700	350	100	50	1,50	2	0,0775	96,51
800	700	300	100	100	3,00	2	0,0712	88,67
800	700	250	100	150	4,50	2	0,0518	64,51
800	700	200	100	200	6,00	2	0,04145	51,62
800	700	100	100	300	9,00	2	0,03565	44,40

Tablo 3.53: Amitraz inhibitörünün hCA – II enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Tampon 1M Tris-Sülfat (pH=7,4)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Saf su (µl)	Enzim(µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Toplam hacim (ml)	ΔA (340nm)	% Aktivite
800	700	350	100	50	1,50	2	0,0184	75,72
800	700	300	100	100	3,00	2	0,01535	63,17
800	700	250	100	150	4,50	2	0,01405	57,82
800	700	200	100	200	6,00	2	0,0115	47,33
800	700	100	100	300	9,00	2	0,0102	41,98



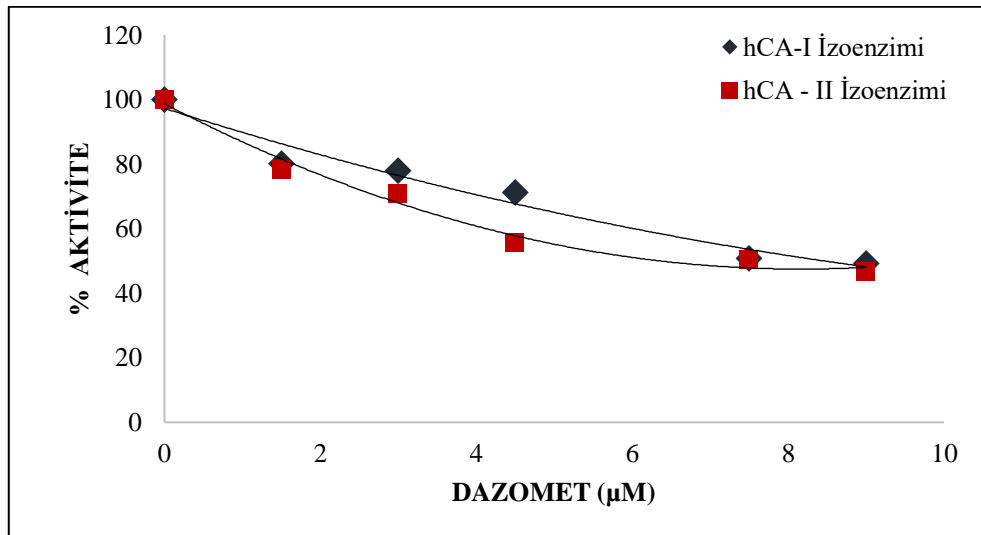
Şekil 3.32: hCA-I ve hCA- II izoenzimlerinin farklı Amitraz inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC50 değerinin bulunması için çizilen grafik.

Tablo 3.54: Dazomet inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Tampon 1M Tris-Sülfat (pH=7,4)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µl)	Saf su (µl)	Enzim(µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Toplam hacim (ml)	ΔA (340nm)	% Aktivite
800	700	350	100	50	1,50	2	0,0512	80,13
800	700	300	100	100	3,00	2	0,0499	78,09
800	700	250	100	150	4,50	2	0,0455	71,21
800	700	200	100	250	7,50	2	0,03247	50,81
800	700	100	100	300	9,00	2	0,03144	49,20

Tablo 3.55: Dazomet inhibitörünün hCA – II enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Tampon 1M Tris-Sülfat (pH=7,4)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µl)	Saf su (µl)	Enzim(µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Toplam hacim (ml)	ΔA (340nm)	% Aktivite
800	700	350	100	50	1,50	2	0,0175	78,48
800	700	300	100	100	3,00	2	0,0158	70,85
800	700	250	100	150	4,50	2	0,0124	55,61
800	700	200	100	250	7,50	2	0,0112	50,22
800	700	100	100	300	9,00	2	0,0104	46,64



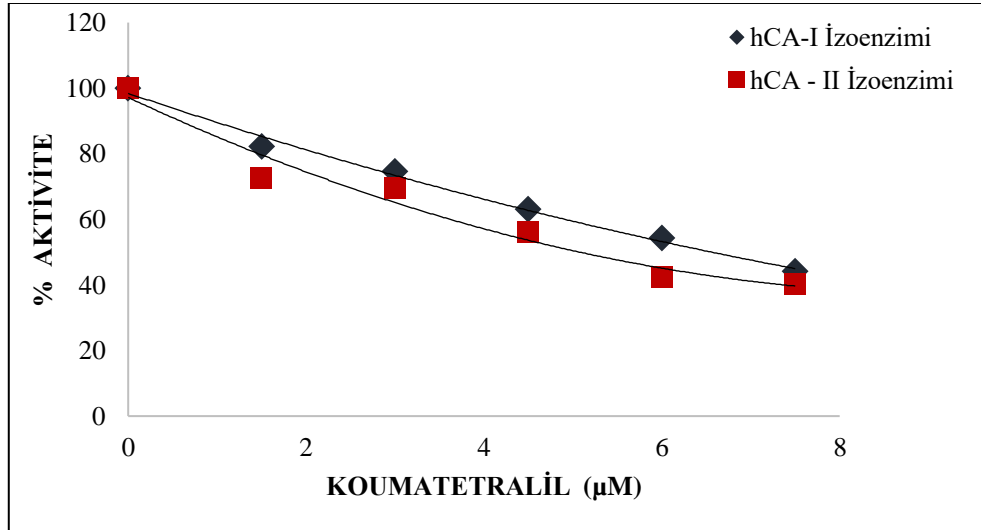
Şekil 3.33: hCA-I ve hCA- II izoenzimlerinin farklı Dazomet inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC50 değerinin bulunması için çizilen grafik.

Tablo 3.56: Koumatetralil inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Tampon 1M Tris-Sülfat (pH=7,4)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µl)	Saf su (µl)	Enzim(µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Toplam hacim (ml)	ΔA (340nm)	% Aktivite
800	700	350	100	50	1,50	2	0,0765	82,08
800	700	300	100	100	3,00	2	0,0694	74,46
800	700	250	100	150	4,50	2	0,0588	63,09
800	700	200	100	200	6,00	2	0,0506	54,29
800	700	150	100	250	7,50	2	0,0411	44,10

Tablo 3.57: Koumatetralil inhibitörünün hCA – II enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Tampon 1M Tris-Sülfat (pH=7,4)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µl)	Saf su (µl)	Enzim(µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Toplam hacim (ml)	ΔA (340nm)	% Aktivite
800	700	350	100	50	1,50	2	0,0265	72,40
800	700	300	100	100	3,00	2	0,0254	69,40
800	700	250	100	150	4,50	2	0,0205	56,01
800	700	200	100	200	6,00	2	0,0155	42,35
800	700	150	100	250	7,50	2	0,0147	40,16



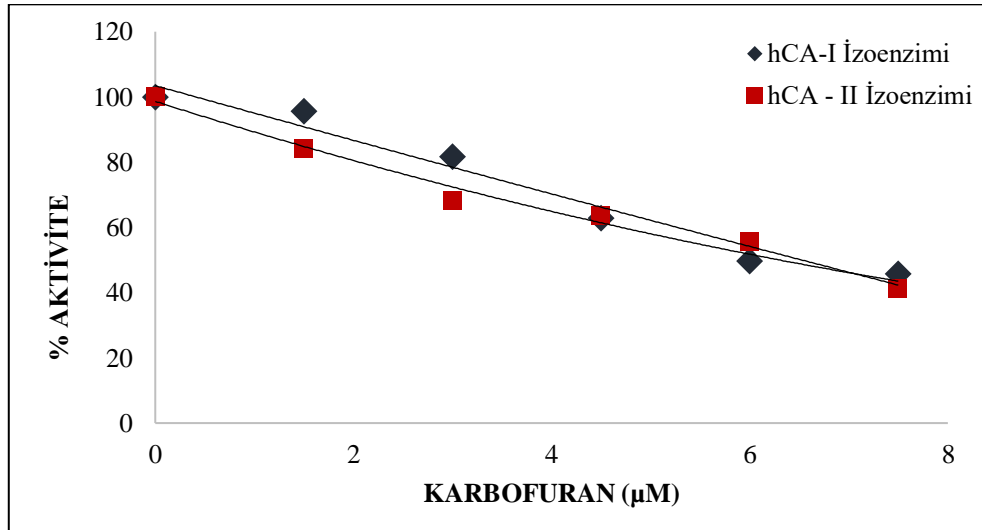
Şekil 3.34: hCA-I ve hCA- II izoenzimlerinin farklı Koumatetralil inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC50 değerinin bulunması için çizilen grafik.

Tablo 3.58: Karbofuran inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Tampon 1M Tris-Sülfat (pH=7,4)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Saf su (µl)	Enzim(µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Toplam hacim (ml)	ΔA (340nm)	% Aktivite
800	700	350	100	50	1,50	2	0,07902	95,55
800	700	300	100	100	3,00	2	0,0676	81,74
800	700	250	100	150	4,50	2	0,0519	62,75
800	700	200	100	200	6,00	2	0,0411	49,69
800	700	150	100	250	7,50	2	0,0378	45,70

Tablo 3.59: Karbofuran inhibitörünün hCA – II enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Tampon 1M Tris-Sülfat (pH=7,4)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µl)	Saf su (µl)	Enzim(µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Toplam hacim (ml)	ΔA (340nm)	% Aktivite
800	700	350	100	50	1,50	2	0,0263	84,29
800	700	300	100	100	3,00	2	0,02125	68,11
800	700	250	100	150	4,50	2	0,0198	63,46
800	700	200	100	200	6,00	2	0,01735	55,61
800	700	150	100	250	7,50	2	0,0128	41,03



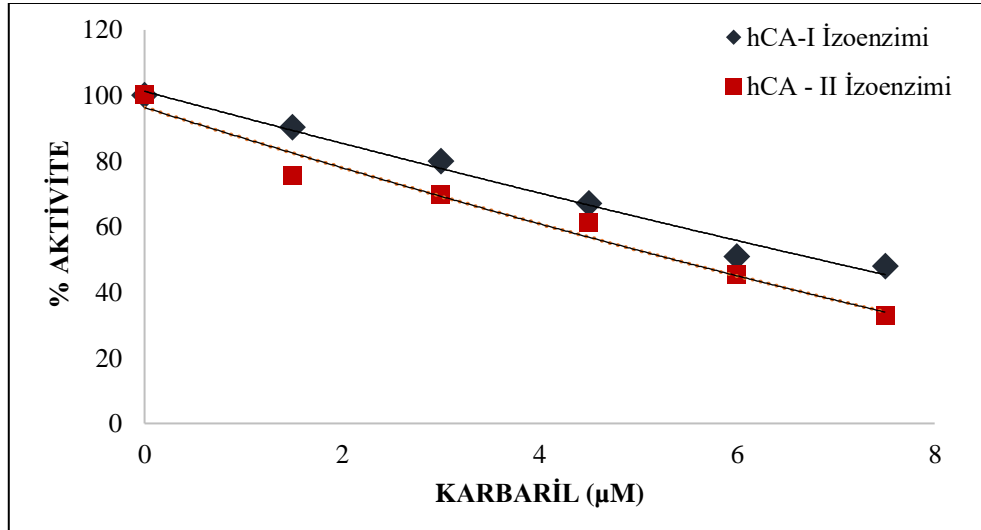
Şekil 3.35: hCA-I ve hCA- II izoenzimlerinin farklı Karbofuran inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC50 değerinin bulunması için çizilen grafik.

Tablo 3.60: Karbaril inhibitörünün hCA – I enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Tampon 1M Tris-Sülfat (pH=7,4)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µl)	Saf su (µl)	Enzim(µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Toplam hacim (ml)	ΔA (340nm)	% Aktivite
800	700	350	100	50	1,50	2	0,0505	90,34
800	700	300	100	100	3,00	2	0,04465	79,87
800	700	250	100	150	4,50	2	0,03347	67,03
800	700	200	100	200	6,00	2	0,02845	50,89
800	700	150	100	250	7,50	2	0,0268	47,94

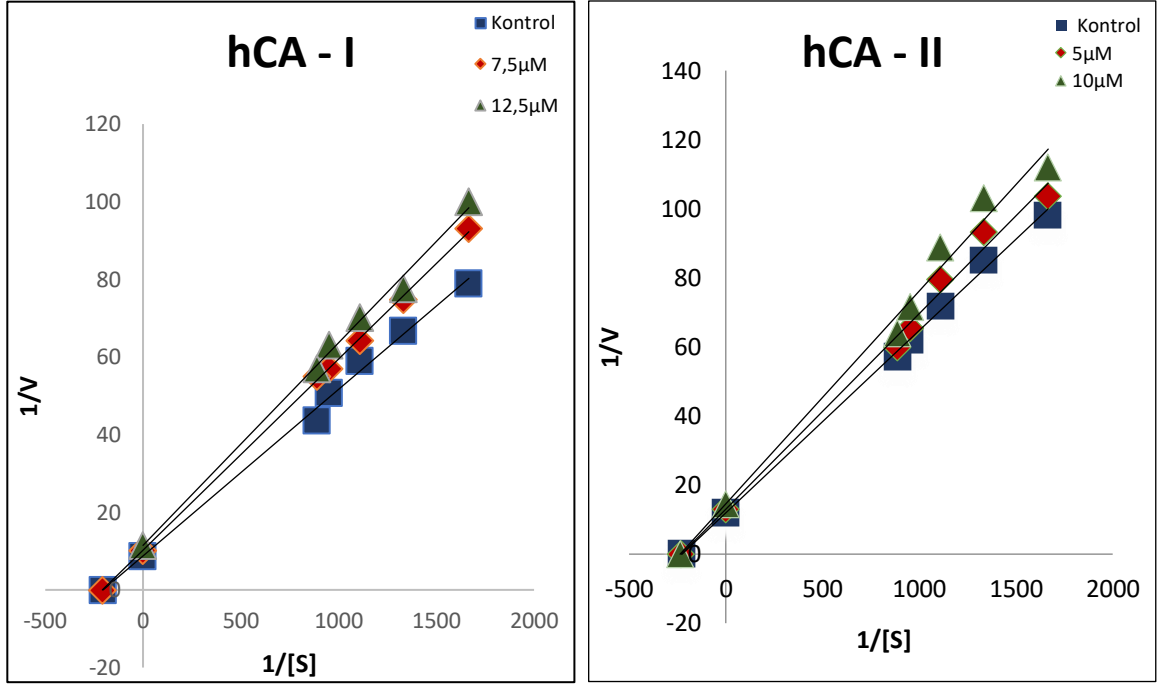
Tablo 3.61: Karbaril inhibitörünün hCA – II enzimi üzerinde etkilerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları.

Tampon 1M Tris-Sülfat (pH=7,4)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µl)	Saf su (µl)	Enzim(µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki pestisit konsantrasyonu (µM)	Toplam hacim (ml)	ΔA (340nm)	% Aktivite
800	700	350	100	50	1,50	2	0,0308	75,49
800	700	300	100	100	3,00	2	0,0284	69,60
800	700	250	100	150	4,50	2	0,0249	61,02
800	700	200	100	200	6,00	2	0,0184	45,09
800	700	150	100	250	7,50	2	0,0133	32,59

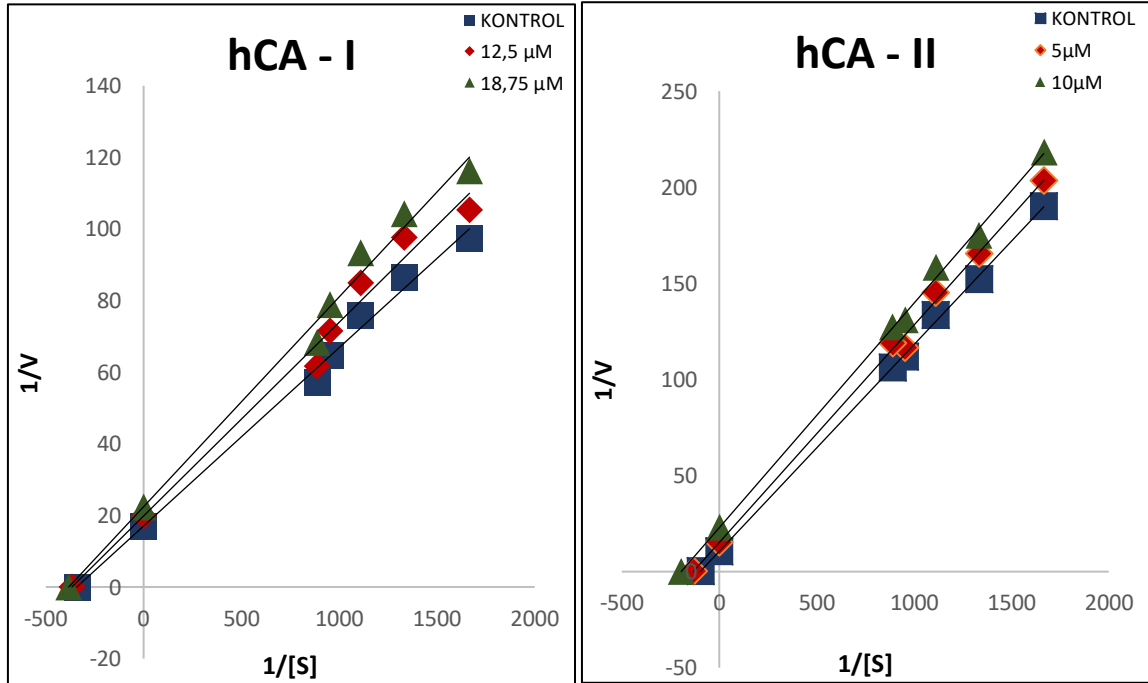


Şekil 3.36: hCA-I ve hCA- II izoenzimlerinin farklı Karbaril inhibitörü konsantrasyonlarıyla çalışılan IC50 değerinin bulunması için çizilen grafik.

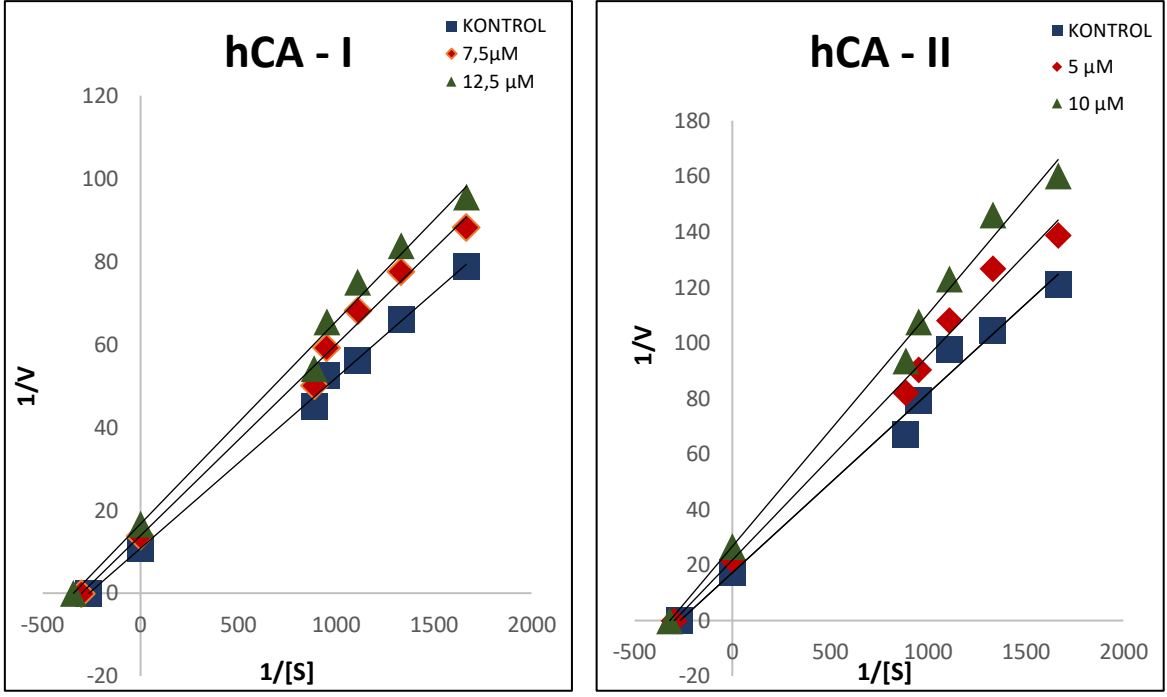
3.6 p-Nitrofenilasetat Substratı İçin K_m Ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi



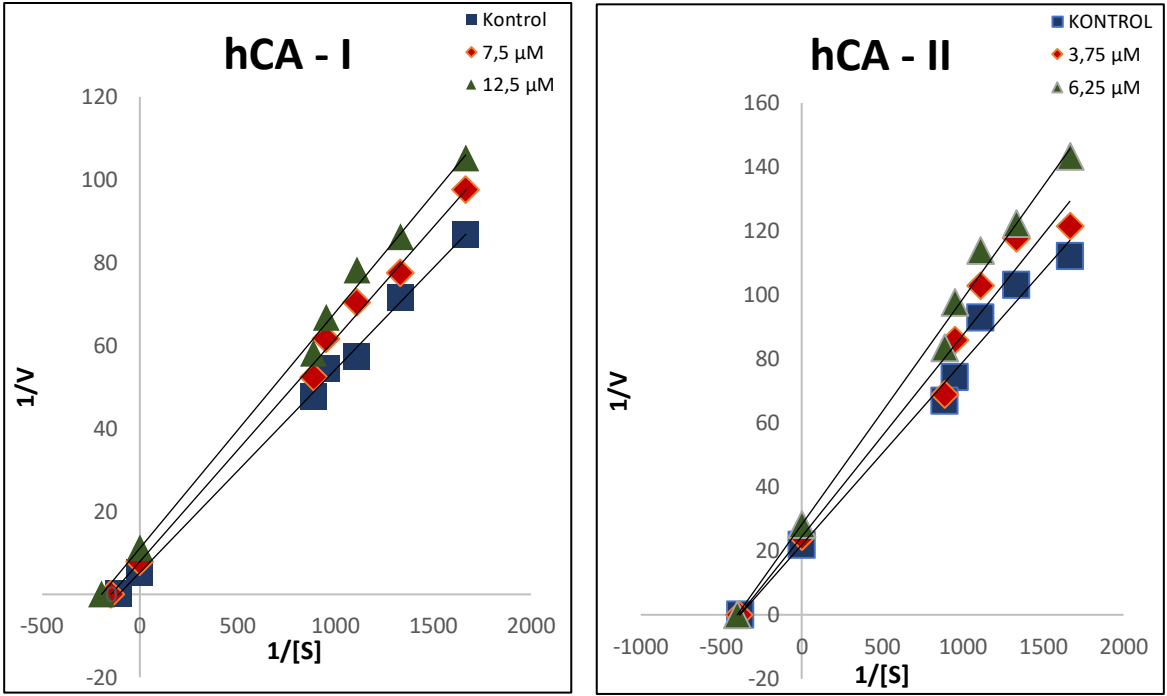
Şekil 3.37: Karbonik Anhidraz enzimi üzerine Propoksür inhibitörünün p - nitrofenilasetat ile elde edilen Lineweaver- Burk grafiği.



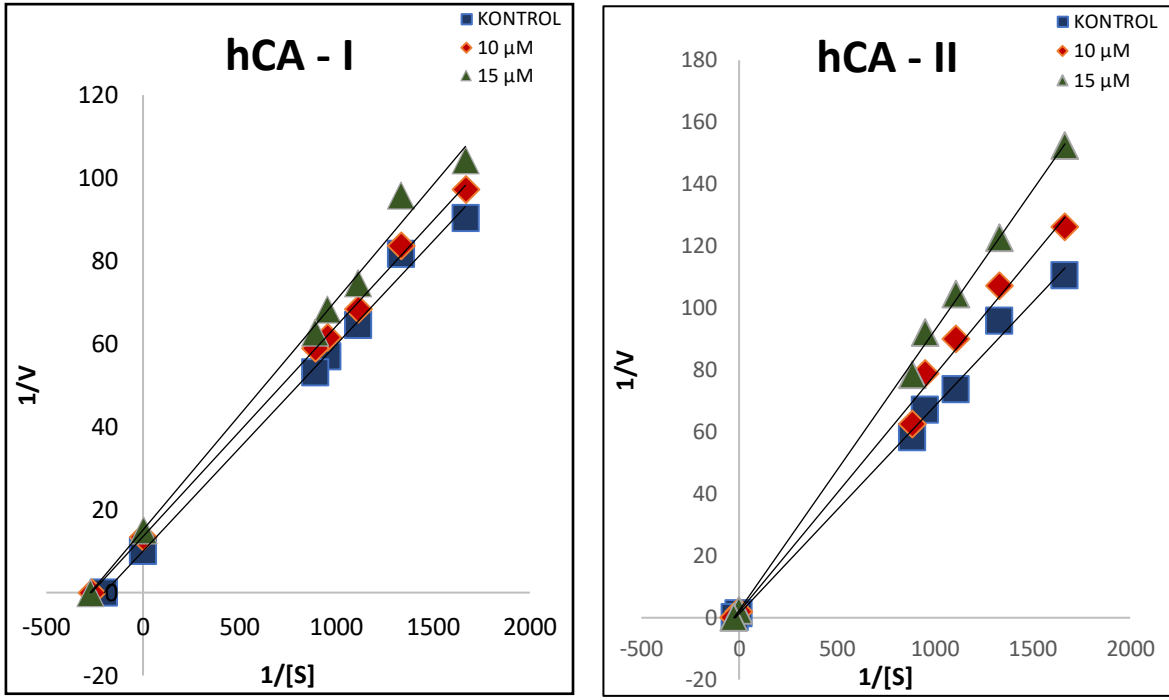
Şekil 3.38: Karbonik Anhidraz enzimi üzerine Alaklor inhibitörünün p - nitrofenilasetat ile elde edilen Lineweaver- Burk grafiği.



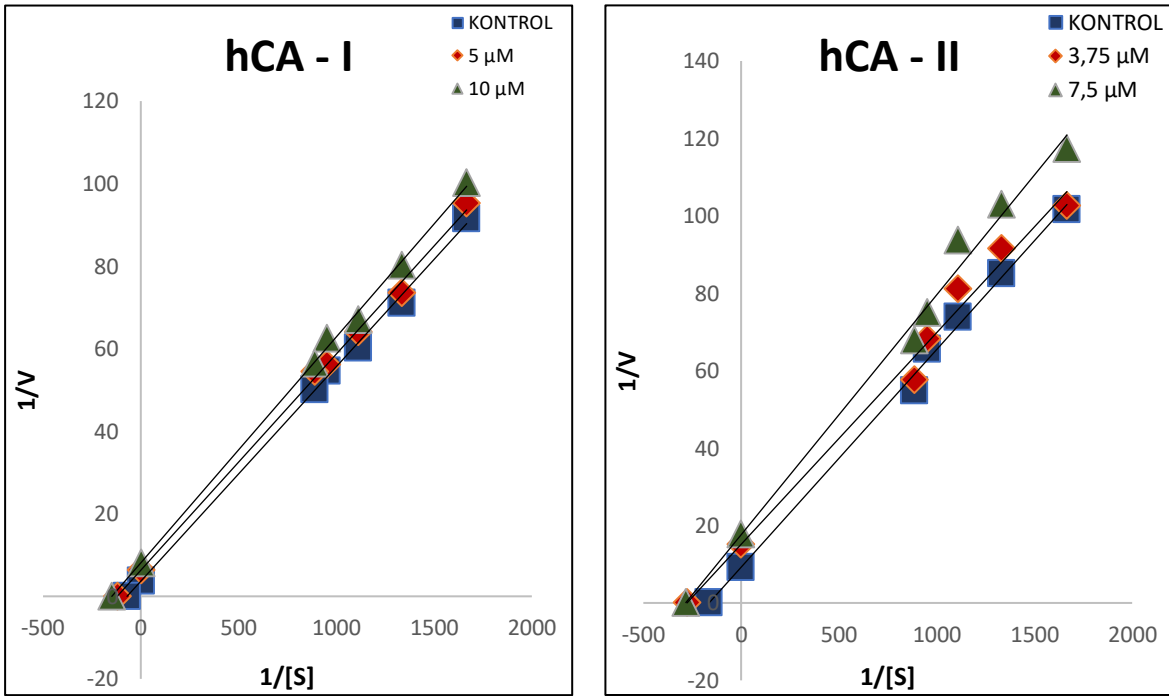
Şekil 3.39: Karbonik Anhidraz enzimi üzerine 1- Naftol inhibitörünün p -nitrofenilasetat ile elde edilen Lineweaver- Burk grafiği.



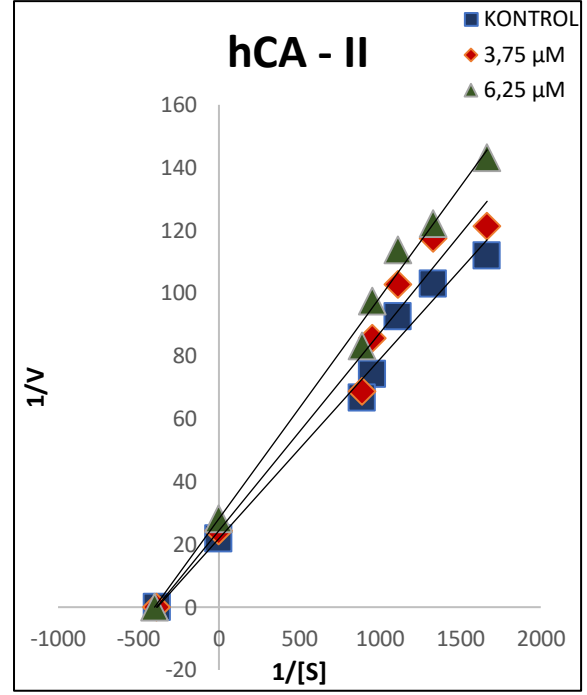
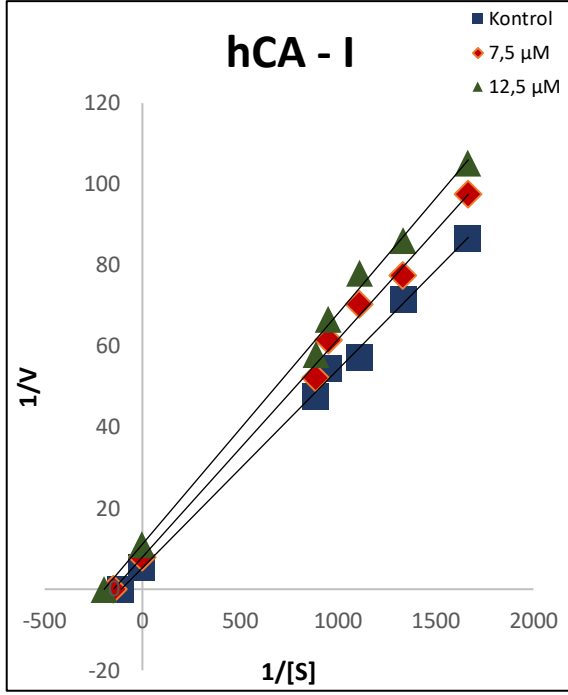
Şekil 3.40: Karbonik Anhidraz enzimi üzerine Klorpirifos inhibitörünün p -nitrofenilasetat ile elde edilen Lineweaver- Burk grafiği.



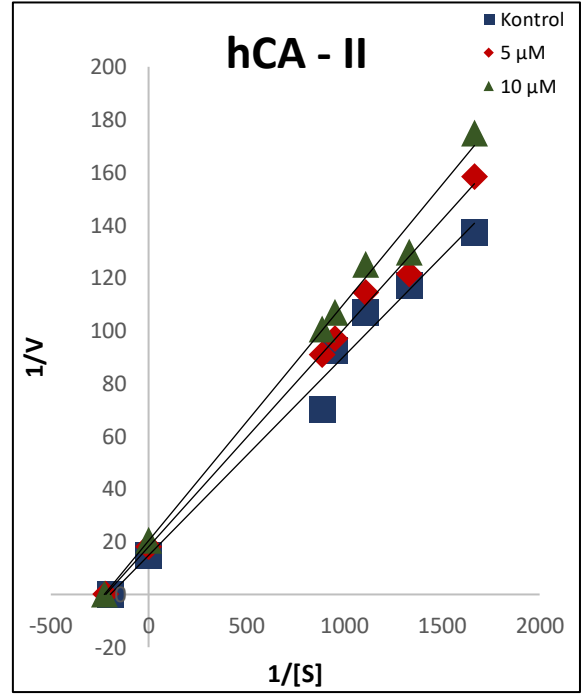
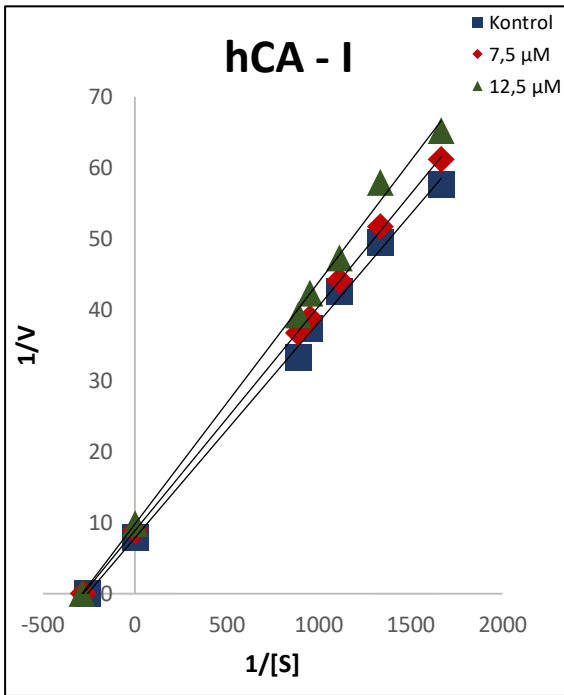
Şekil 3.41: Karbonik Anhidraz enzimi üzerine Simazin inhibitörünün p -nitrofenilasetat ile elde edilen Lineweaver- Burk grafiği.



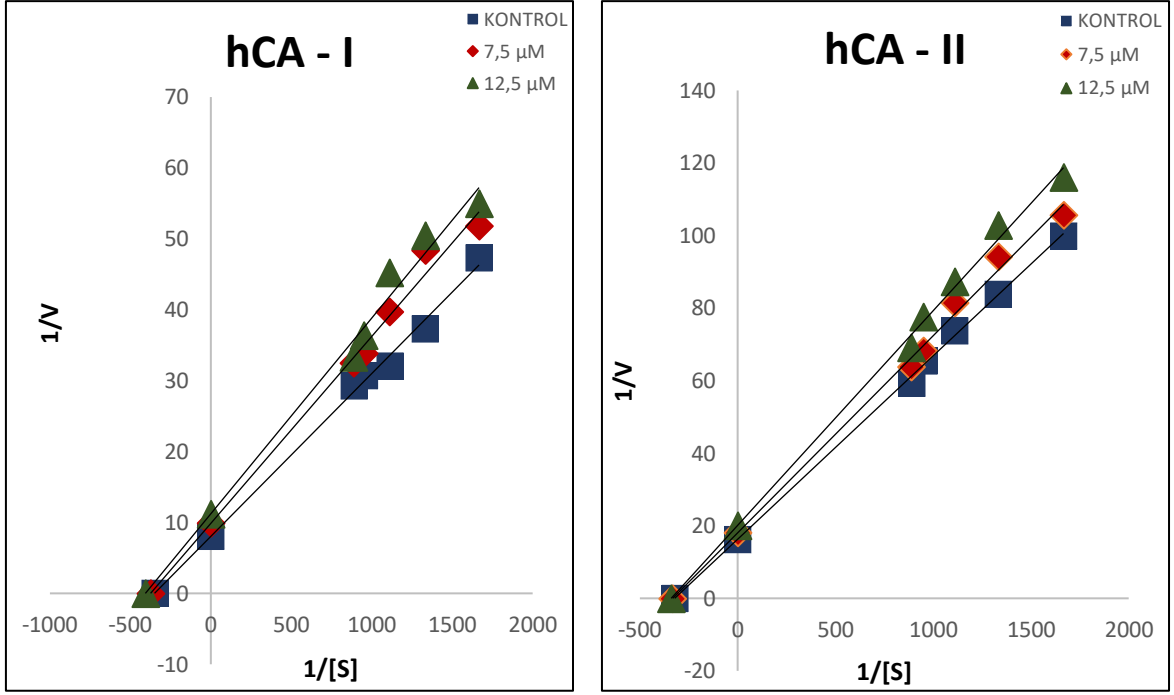
Şekil 3.42: Karbonik Anhidraz enzimi üzerine Diklofluanid inhibitörünün p -nitrofenilasetat ile elde edilen Lineweaver- Burk grafiği.



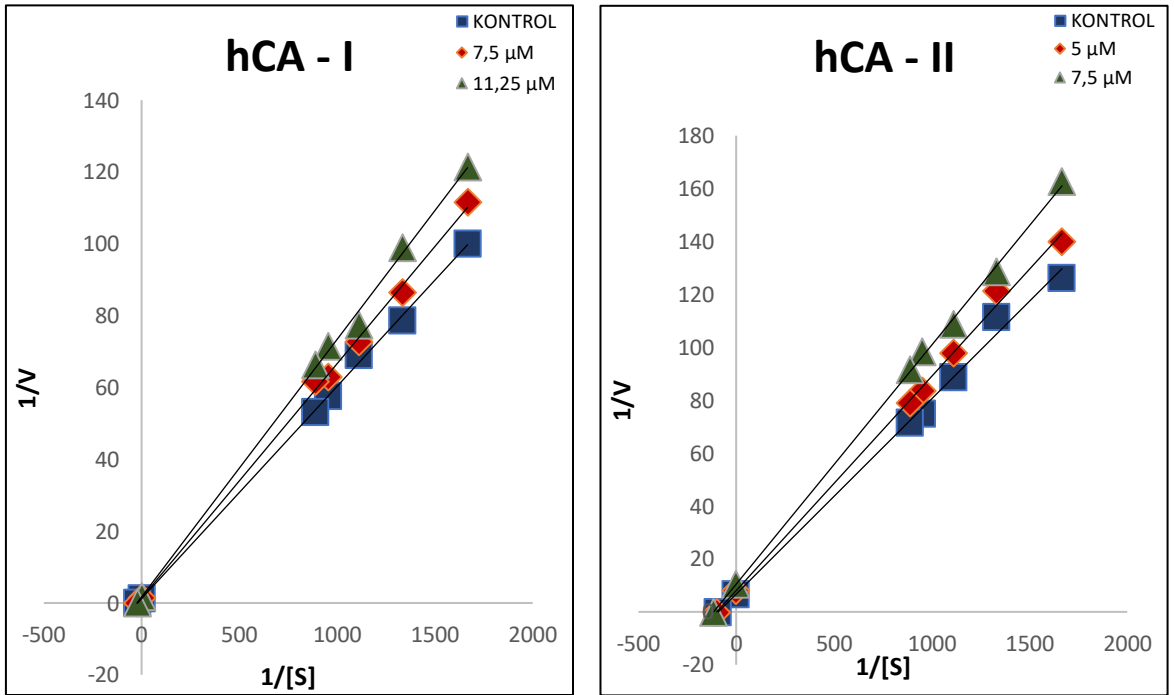
Şekil 3.43: Karbonik Anhidraz enzimi üzerine Klorpirifos - Metil inhibitörünün p -nitrofenilasetat ile elde edilen Lineweaver- Burk grafiği.



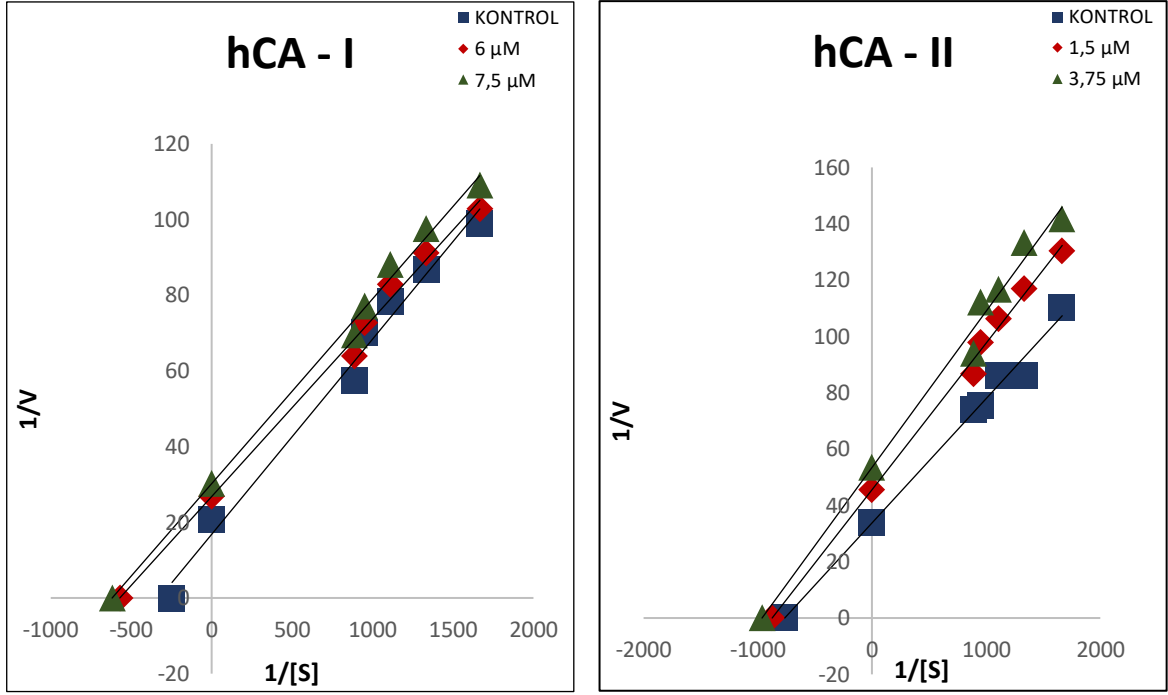
Şekil 3.44: Karbonik Anhidraz enzimi üzerine Azinfos - Etil inhibitörünün p -nitrofenilasetat ile elde edilen Lineweaver- Burk grafiği.



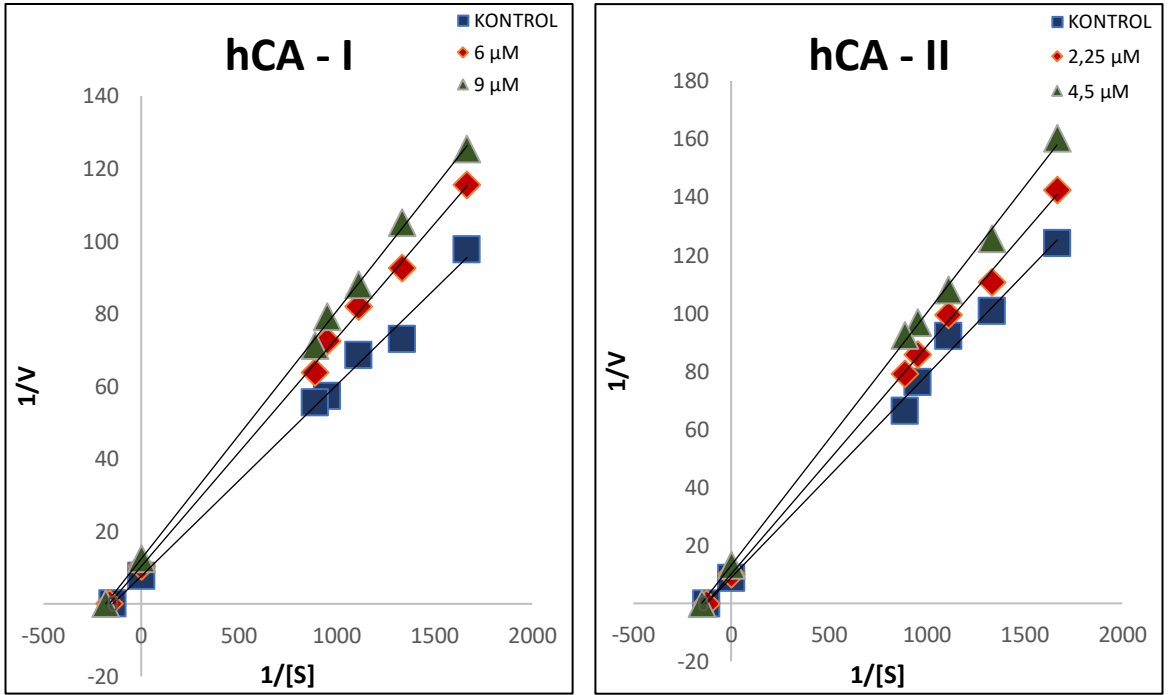
Şekil 3.45: Karbonik Anhidraz enzimi üzerine Dimetakor inhibitörünün p -nitrofenilasetat ile elde edilen Lineweaver- Burk grafiği.



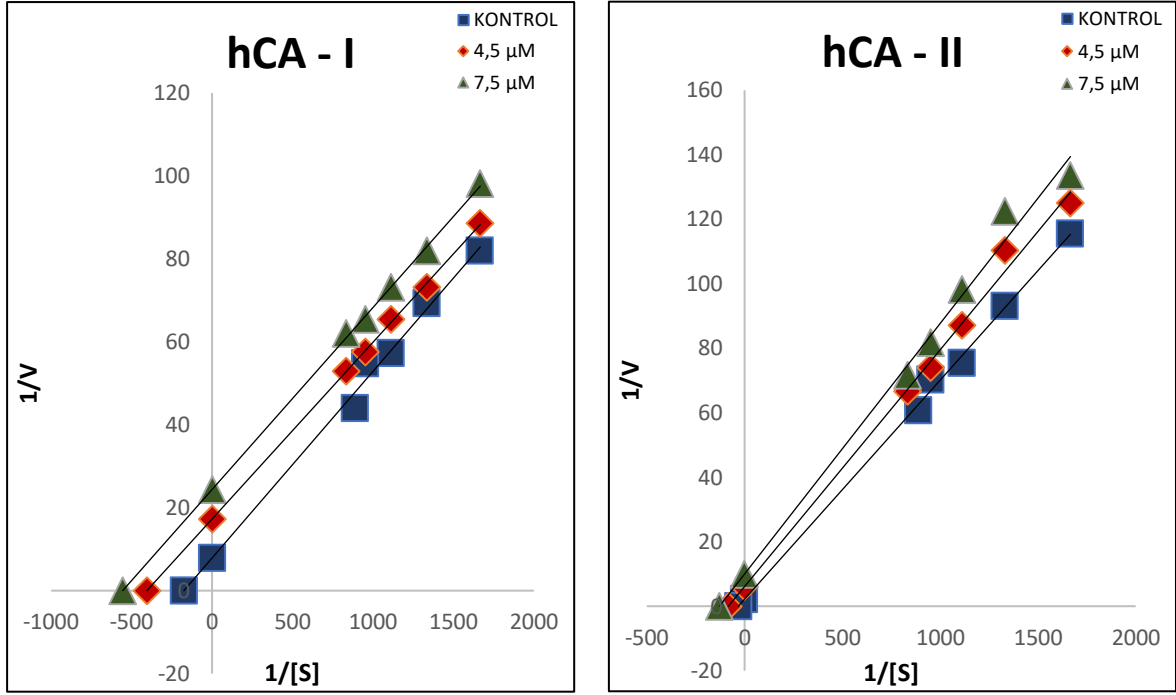
Şekil 3.46: Karbonik Anhidraz enzimi üzerine Tebukonazol inhibitörünün p -nitrofenilasetat ile elde edilen Lineweaver- Burk grafiği.



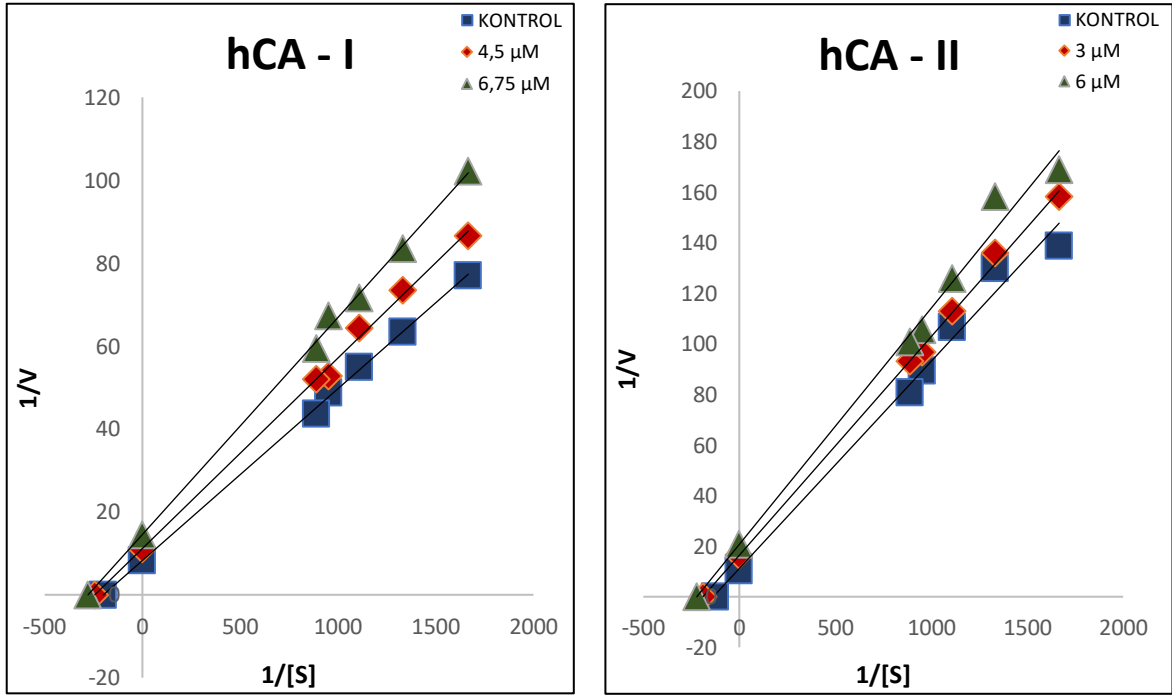
Şekil 3.47: Karbonik Anhidraz enzimi üzerine Amitraz inhibitörünün p -nitrofenilasetat ile elde edilen Lineweaver- Burk grafiği.



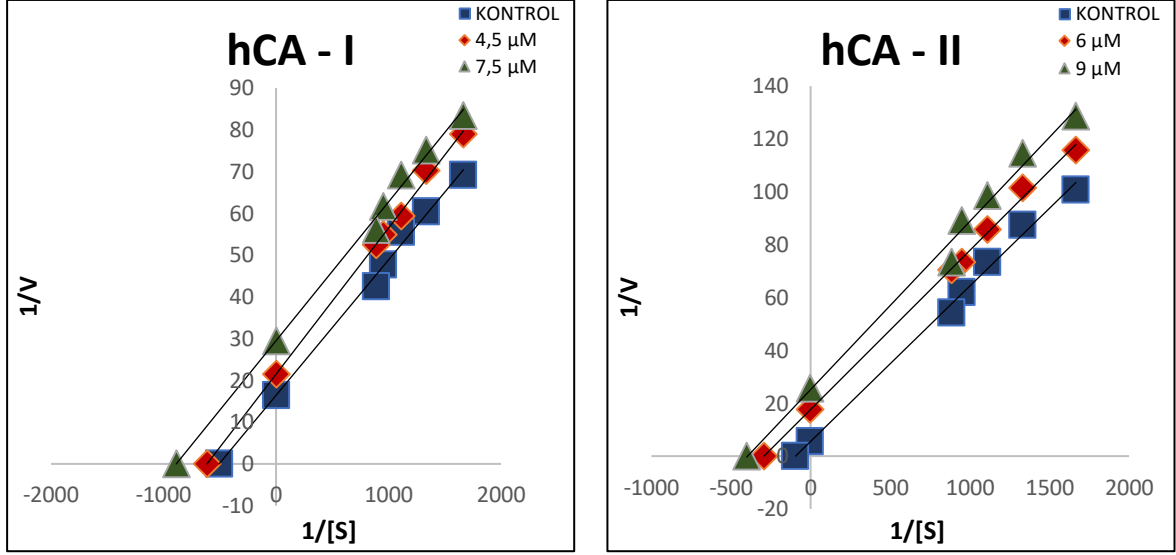
Şekil 3.48: Karbonik Anhidraz izoenzimleri üzerine Dazomet inhibitörünün p -nitrofenilasetat ile elde edilen Lineweaver- Burk grafiği.



Şekil 3.49: Karbonik Anhidraz izoenzimleri üzerine Koumatetralil inhibitörünün p -nitrofenilasetat ile elde edilen Lineweaver- Burk grafiği.



Şekil 3.50 : Karbonik Anhidraz izoenzimleri üzerine Karbaril inhibitörünün p -nitrofenilasetat ile elde edilen Lineweaver- Burk grafiği.



Şekil 3.51: Karbonik Anhidraz izoenzimleri üzerine Karbofuran inhibitörünün p -nitrofenilasetat ile elde edilen Lineweaver- Burk grafiği.

Tablo 3.62 :Kullanılan pestisitlerin V_{max} - K_M değerleri.

BİLEŞİKLER	V_{max} (EÜ/ml) hCA- I	V_{max} (EÜ/ml) hCA- II	K_M (μ M) hCA- I	K_M (μ M) hCA- II
1.Propuksur	0,114	0,083	0,004	0,004
2. Alaklor	0,058	0,094	2,927	0,010
3. 1- Naftol	0,092	0,058	0,003	0,003
4. Klorpirifos	0,101	0,051	0,002	0,004
5. Simazin	0,100	0,791	0,005	0,053
6. Diklofluanid	0,273	0,108	0,014	0,006
7. Klorpirifos - Metil	0,188	0,045	0,009	0,002
8. Azinfos - Etil	0,127	0,067	0,003	0,005
9. Dimetaklor	0,090	0,05	0,002	0,003
10. Tebukonazol	0,815	0,048	0,148	0,011
11.Amitraz	0,04	0,029	0,004	0,001
12. Dazomet	0,130	0,113	0,006	0,007
13. Koumatetralil	0,127	0,459	0,005	0,031
14. Karbofuran	0,121	0,097	0,005	0,008
15.Karbaril	0,061	0,179	0,002	0,010

Tablo 3.63: Kullanılan pestisitlerin genel inhibisyon tablosu.

BİLEŞİKLER	IC₅₀(µM) (Hidrataz) hCA-I	IC₅₀(µM) (Hidrataz) hCA-II	IC₅₀(µM) (Esteraz) hCA-I	IC₅₀(µM) (Esteraz) hCA-II	Ki (µM) hCA-I	Ki (µM) hCA-II	İNHİBİSYON TÜRÜ
1.Propuksur	0,600	1,280	13,85	13,520	7,970	6,400	Kompetitif İnhibitör
2. Alaklor	2,360	0,536	16,320	9,060	12,470	4,050	Unkompetitif İnhibitör
3. 1- Naftol	1,310	0,685	16,550	10,200	14,400	5,190	Unkompetitif İnhibitör
4. Klorpirifos	0,591	0,527	15,400	12,750	10,750	5,900	Nonkompetitif İnhibitör
5. Simazin	0,366	0,594	14,590	13,900	8,660	7,260	Kompetitif İnhibitör
6. Diklofluanid	1,395	0,529	13,000	8,010	5,560	3,090	Nonkompetitif İnhibitör
7. Klorpirifos - Metil	0,614	6,040	12,830	9,550	5,480	4,100	Unkompetitif İnhibitör
8. Azinfos - Etil	0,534	0,544	13,980	10,950	8,320	5,680	Nonkompetitif İnhibitör
9. Dimetaklor	0,585	0,578	13,700	14,600	7,530	8,440	Unkompetitif İnhibitör
10. Tebukonazol	0,602	0,603	13,300	9,850	7,350	4,500	Kompetitif İnhibitör
11.Amitraz	3,300	3,470	7,400	5,270	4,880	1,740	Unkompetitif İnhibitör
12. Dazomet	3,860	3,900	8,450	6,350	4,990	2,490	Nonkompetitif İnhibitör
13. Koumatetralil	6,410	8,740	6,550	5,060	3,660	1,620	Unkompetitif İnhibitör
14. Karbofuran	3,350	3,410	6,520	6,300	3,580	2,420	Unkompetitif İnhibitör
15.Karbaril	2,860	3,460	6,820	5,350	3,800	1,920	Unkompetitif İnhibitör

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada bazı pestisitlerin CA izoenzimleri üzerinde etkileri incelenmiştir. Bu amaçla Propuksur, Alaklor, 1- Naftol, Klorpirifos, Simazin, Diklofluanid, Klorpirrifos – Metil, Azinfos – Etil, Dimetaklor, Tebukonazol, Amitraz, Dazomet, Koumatetralil, Karbofuran, Karbaril pestisitleri kullanılmıştır. Bu pestisitlerin seçilmesinin en önemli nedeni ülkemizde kontrolsüz bir şekilde kullanılması sonucu, besin zinciri yolu ile insanlara kadar ulaşabilmesidir.

Araştırmamızda enzim olarak CA enzimini seçilmesinin nedeni ise, bu enzimin canlıların yapısında son derece önemli fizyolojik fonksiyona sahip olmasıdır. CA'nın CO₂ ile olan reaksiyonu sonucu H⁺ ve HCO₃⁻ iyonları oluşmaktadır. Bu katalitik reaksiyon böbrek, gastrik mukoza ve göz lensi gibi birçok önemli dokuda meydana gelmektedir.

Karbonik anhidrazın aktivitesi tayini iki metotla yapıldı. Bunlardan birincisi, CO₂-hidrataz aktivitesi adı verilen Maren ve arkadaşlarının modifiye ettikleri Wilbur- Anderson yöntemidir [111]. Bu yöntemle, CO₂ molekülünün su ile reaksiyona girmesi neticesinde meydana gelen H₂CO₃ molekülünün, H⁺ ve HCO₃⁻ iyonlarına ayrışarak, ortamın pH'sını değiştirme süresi ölçülmektedir.

Karbonik anhidraz enziminin diğer bir aktivite tayin metodu ise, esteraz aktivitesidir. Armstrong ve arkadaşları tarafından geliştirilen bu metot, karbonik anhidrazın ester bağımlı hidroliz etmesi (esteraz aktivitesi) esasına dayanmaktadır [112]. Karbonik anhidraz enzimi p-nitrofenilasetat'ı p-nitrofenol'e hidroliz etmekte ve bu da 348 nm'de absorpsiyon vermektedir.

Araştırmamızda kullanılan CA enzimi insan eritrositlerinden afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırılmıştır. Bu amaçla tarafımızdan Sepharose - 4B - 4-(6-Amino-hekziloksi)-benzensulfonamid kimyasal yapısına sahip jel sentezlenmiştir[113]

hCA-I ve hCA-II izoenzimlerin saflığı SDS-PAGE uygulanarak kontrol edilmiştir ve tek bantlar elde edilmiştir. Yaklaşık molekül ağırlıkları 30 kDa ağırlığında bulunmuştur. Bu değerlerin literatürle uyum halinde olduğu tespit edilmiştir [114].

Pestisitlerin CA enzimi üzerine inhibisyon etkisini belirlemede IC₅₀ değerleri bulunmuştur. CA I ve CA II enzimlerinin ilk önce hidrataz aktiviteleri üzerinde söz konusu pestisitlerin inhibisyon etkileri pestisitlerin belirli çözeltileri hazırlanarak, enzim üzerine tatbik edilmek suretiyle belirlendi. Bunun için insan kanından elde edilen CA I ve CA II enzimleri için beş farklı uygun inhibitör konsantrasyonunda hidrataz aktivite ölçümü yapıldı. İnhibisyon etkisi olan bileşiklerin %Aktivite-[I] grafikleri çizilerek, IC₅₀ değerleri hesaplandı.

Araştırmamızda kullanılan pestisitlerin hidrataz aktivitesi ile hCA I ve II izoenzimlerini önemli ölçüde inhibe ettiği saptanmıştır. hCA I için bu pestisitlerin IC₅₀ değerleri 0,366 µM ile 6,41 µM arasında tespit edilmiştir. Bunlar arasında en güçlü inhibitörün Simazin olduğu IC₅₀:0,366 µM değerinden anlaşılmaktadır. Koumatetralil ise 6,41 µM IC₅₀ değeri ile diğerlerine göre daha zayıf bir inhibitör olduğu bulunmuştur. Simazin pestisitinin literatürde hCA I üzerine etkisini içeren bir çalışma yoktur ancak başka bir enzim üzerinde etkisi rapor edilmiştir. Holovska ve arkadaşları domuz böbreğinden proliferatif enzimini saflaştırmış ve bu enzim üzerine Simazin pestisitinin inhibisyon etkisini bulmuştur (IC₅₀: 17 mM)[109]. Bir başka çalışmada ise Şentürk ve arkadaşları asetilkolinesteraz enzimini saflaştırmış ve bu enzim üzerine Simazin pestisitinin inhibisyon etkisini bulmuştur (IC₅₀: 10,38 µM) [115]. Aynı grubun bir başka çalışmasında bal arısından (*Apis mellifera*) karbonik anhidraz enzimini saflaştırmış ve esteraz aktivitesi ile bu enzim üzerine Simazin pestisitinin inhibisyon etkisini bulmuştur (IC₅₀:0,0273 µM)[116]. Literatür de Koumatetralil için ise herhangi bir enzim üzerine etkisi ile ilgili çalışmaya rastlanmamıştır.

Hidrataz aktivitesi ile hCA II izoenzimi için çalışılan pestisitlerin IC₅₀ değerleri 0,527 µM ile 8,74 µM arasında tespit edilmiştir. Bunlar arasında en güçlü inhibitörün Klorfirifos olduğu IC₅₀: 0,527 µM değerinden anlaşılmaktadır. Koumatetralil ise 8,74 µM IC₅₀ değeri ile diğerlerine göre daha zayıf bir inhibitör olduğu bulunmuştur.

Koumatetralil pestisitinin literatürde hCA I üzerine etkisini içeren bir çalışma yoktur ancak başka bir enzim üzerinde etkisi rapor edilmiştir. Topal ve arkadaşları gökkuşacağı alabalığı beyninden Asetilkolinesteraz enzimini saflaştırmış ve bu enzim üzerine Klorpirifos pestisitinin inhibisyon etkisini bulmuştur (IC50:30µg/L) [117].

Bir diğer çalışmada Assis ve arkadaşları *Crassostrea Rhizophora* Solungaçlarından Asetilkolinesteraz enzimini saflaştırmış ve bu enzim üzerine Klorpirifos pestisitinin inhibisyon etkisini bulmuştur (IC50: 7,55 mM) [111]. Küfrevioğlu ve arkadaşları gökkuşacağı alabalığı karaciğerinden mitokondrial tiyoredoksin redüktaz enzimini saflaştırmış ve bu enzim üzerine Klorpirifos pestisitinin inhibisyon etkisini bulmuştur (IC50: 0,38 µM) [112]. Ayrıca Küfrevioğlu ve arkadaşları Levrek karaciğerinden (*Dicentrarchus labrax*) karbonik anhidraz enzimini saflaştırmış ve bu enzim üzerine Klorpirifos pestisitinin inhibisyon etkisini esteraz aktivitesi ile bulmuştur (IC50:2,643 µM)[110]. Yine aynı hocanın grubu sığır eritrositlerinden karbonik anhidraz enzimini saflaştırmış ve bu enzim üzerine Klorpirifos pestisitinin inhibisyon etkisini esteraz aktivitesi ile bulmuştur (IC50:84,124 µM)[113]. Literatür de Koumatetralil için ise herhangi bir enzim üzerine etkisi ile ilgili çalışmaya rastlanmamıştır.

Esteraz aktivitesi ile pestisitlerin hCA I üzerine etkileri incelendiğinde 6,52 µM IC50 değeri ile Karbofuranın en güçlü inhibisyon gösterdiği buna karşın 1- Naftol'un 16.55µM IC50 değeri ile en zayıf inhibisyona sahip olduğu bulunmuştur. Karbofuran pestisitinin literatürde esteraz aktivitesi ile hCA I üzerine etkisini içeren bir çalışma yoktur ancak başka enzimler üzerinde etkisi rapor edilmiştir. Şentürk ve arkadaşları bal arısından (*Apis mellifera*) karbonik anhidraz enzimini saflaştırmış ve bu enzim üzerine Karbofuran pestisitinin inhibisyon etkisini bulmuştur (IC50:0,0087 µM)[109]. Bir başka çalışmada Assis ve arkadaşları *Crassostrea Rhizophora* solungaçlarından Asetilkolinesteraz enzimini saflaştırmış ve bu enzim üzerine Karbofuran pestisitinin inhibisyon etkisini bulmuştur (IC50: 0,17 mM)[111]. Aynı grubun bir başka çalışmasında ise gökkuşacağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) solungaçlarından karbonik anhidraz enzimini saflaştırmış ve bu enzim üzerine Karbofuran pestisitinin inhibisyon etkisini bulmuştur (IC50: 000,4 µM)[111].

Yine bir başka çalışmada Şentürk ve arkadaşları asetilkolinesteraz enzimini saflaştırmış ve bu enzim üzerine Karbofuran pestisitinin inhibisyon etkisini bulmuştur (IC₅₀: 0,544 µM)[115]. Bir diğer çalışmada ise Shukor ve arkadaşları Asetilkolinesteraz enzimini yürüyen kedi balığından (*Clarias Batrachus*), Elektrikli Yılan Balığından (*Electrophorus Electricus*) ve sığırdan (*Bos Taurus*) saflaştırmış ve bu enzimler üzerine Karbofuran pestisitinin inhibisyon etkisini bulmuştur (sırasıyla IC₅₀: 6,66 µg l⁻¹, IC₅₀: 6,20 µg/L, 20.94 µg l⁻¹)[116]. 1-Naftol pestisitinin literatürde hCA I üzerine etkisini içeren bir çalışma yoktur ancak başka bir enzim üzerinde etkisi rapor edilmiştir. Hiroshi ve arkadaşları insan karaciğerinden Üridin Difosfat-Glukuronosiltransferaz 1-6 enzimini saflaştırmış ve bu enzim üzerine 1- Naftol pestisitinin inhibisyon etkisini bulmuştur (IC₅₀:28 µM)[117].

Esteraz aktivitesi ile pestisitlerin hCA II üzerine etkileri incelendiğinde 5,06 µM IC₅₀ değeri ile Koumatetralilin en güçlü inhibisyon gösterdiği buna karşın Dimetaklor'un 14,6 µM IC₅₀ değeri ile en zayıf inhibisyona sahip olduğu bulunmuştur. Literatür de Koumatetralil ve Dimetaklor için ise herhangi bir enzim üzerine etkisi ile ilgili çalışmaya rastlanmamıştır.

Esteraz aktivitesi ile pestisitlerin hCA I üzerine etkileri incelendiğinde 3,58 µM Ki değeri ile Karbofuranın en güçlü inhibisyon gösterdiği buna karşın 1- Naftol'un 14,4 µM Ki değeri ile en zayıf inhibisyona sahip olduğu bulunmuştur. Esteraz aktivitesi ile pestisitlerin hCA II üzerine etkileri incelendiğinde 1,62 µM Ki değeri ile Koumatetralilin en güçlü inhibisyon gösterdiği buna karşın Dimetaklor'un 8,44 µM Ki değeri ile en zayıf inhibisyona sahip olduğu bulunmuştur.

Bir inhibitörün inhibisyon etkisini gösteren en iyi parametre K_i sabiti olmasına rağmen bir çok araştırmacı, bir inhibitörün inhibisyon etkisini tespit etmek için uygulanması oldukça kolay ve pratik yöntem olan IC₅₀ değerini kullanmaktadır. Ki sabiti sonucu; Kompetitif İnhibitör özelliğe sahip pestisitler: Propuksur, Tebukonazol ve Dazomet'tir . Unkompetitif İnhibitör Alaklor, 1- Naftol, Diklofluanid , Amitraz , Koumatetralil , Karbofuran ve Karbaril'dir. Nonkompetitif İnhibitör özelliğe sahip pestisitler ise Klorpirifos, Simazin, Klorpirifos – Metil , Azinfos – Etil , Dimetaklor'dur.

Çalışmamızda kullandığımız pestisitlerin insan karbonik anhidraz enzimi üzerine etkisi literatürde daha önce çalışılmamıştır. Ancak bazı araştırmacılar tarafından farklı tür karbonik anhidraz enzimleri veya başka enzimler üzerine etkileri rapor edilmiştir.

Örneğin Ceyhun ve arkadaşları gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) solungaçlarından karbonik anhidraz enzimini saflaştırmış ve bu enzim üzerine esteraz aktivitesi ile Propoksur pestisitinin inhibisyon etkisini bulmuştur (IC₅₀:0,420 µM)[108].

Şentürk ve arkadaşları gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) solungaçlarından Glukoz-6-Fosfat enzimini saflaştırmış ve bu enzim üzerine Propoksur pestisitinin inhibisyon etkisini bulmuştur (IC₅₀:12 µM)[108]. Aynı grubun bir başka çalışmasında bal arısından (*Apis mellifera*) karbonik anhidraz enzimini saflaştırmış ve bu enzim üzerine esteraz aktivitesi ile Propoksur pestisitinin inhibisyon etkisini bulmuştur (IC₅₀:0,0321 µM)[109].

Şentürk ve arkadaşları bal arısından (*Apis mellifera*) karbonik anhidraz enzimini saflaştırmış ve bu enzim üzerine esteraz aktivitesi ile Karbaril ve Tebukonazol pestisitinin inhibisyon etkisini bulmuştur (sırasıyla; IC₅₀:0,0031 µM ve IC₅₀:0,0030 µM)[109].

Holovska ve arkadaşları Madin-Darby Sığır Böbreğinden, tavşan böbreğinden, domuz böbreğinden ve sığır embriyonik pulmoner hücrelerinden proliferatifenzimini saflaştırmış ve bu enzim üzerine Diklofluanid pestisitinin inhibisyon etkisini bulmuştur (sırasıyla; IC₅₀: 0,000134 M; IC₅₀: 2,754228 M; IC₅₀: 0,000309 M; IC₅₀: 0,000147 M)[118]

Çelik ve arkadaşları insan kanından ve sığır kanından karbonik anhidraz enzimini saflaştırmış ve bu enzim üzerine hidrataz aktivitesi ile Klorpirrifos–Metil pestisitinin inhibisyon etkisini bulmuştur (sırasıyla; IC₅₀: 3,7x 10⁻² M; IC₅₀: 6,3 x 10⁻² M)[119].

Yoshio ve arkadaşları Koi sazanından (*Cyprinus carpio*) asetilkolinesteraz enzimini saflaştırmış ve bu enzim üzerine Klorpirrifos–Metil, Azinfos–Etil ve Amitraz pestisitinin inhibisyon etkisini bulmuştur (sırasıyla; IC50:4,45 µM; IC50:4,46 µM; IC50:25,77 mM)[120].

Assis ve arkadaşları *Crassostrea Rhizophora* Solungaçlarından ve iç organlarından Asetilkolinesteraz enzimini saflaştırmış ve bu enzim üzerine Karbaril pestisitinin inhibisyon etkisini bulmuştur (sırasıyla; IC50: 0.00013 mM; IC50: 0.0035 mM)[111].

Shukor ve arkadaşları Asetilkolinesteraz enzimini Yürüyen Kedi Balığından (*Clarias Batrachus*), Elektrikli Yılan Balığından (*Electrophorus Electricus*) ve Sığırdan (*Bos Taurus*) saflaştırmış; bu enzim üzerine Karbaril pestisitinin inhibisyon etkisini bulmuştur (sırasıyla; IC50: 130.00 µg/L; IC50: 133.01 µg/L; IC50: 418.80 µg/L)[116].

Anderson ve arkadaşları Asetilkolinesteraz enzimini Sineklerden (House fly), Amerikan köpek kenesinden (American dog tick), Amerikan hamam böceğinden (American cockroach), Sarı humma sivrisineğinden (Yellow fever mosquito) saflaştırmış ve bu enzim üzerine Karbaril pestisitinin inhibisyon etkisini bulmuştur (sırasıyla; IC50: 1.2 µM; IC50:1.8 µM; IC50: 0.4 µM; IC50: 1.2 µM)[104].

Cochon ve arkadaşları Kara kurttan (*Lumbriculus variegatus*) ve tatlı su salyangozundan (*Biomphalaria glabrata*) kolinesteraz enzimini saflaştırmış ve bu enzim üzerine Karbaril pestisitinin inhibisyon etkisini bulmuştur (sırasıyla; IC50:0,10 mg/L;IC50:1,77 mg/ L)[122].

Şentürk ve arkadaşları asetilkolinesteraz enzimini saflaştırmış ve bu enzim üzerine Karbaril pestisitinin inhibisyon etkisini bulmuştur (IC50: 11.27 µM)[123].

Ayrıca Alaklor, dimetaklor, dazomet, koumatetralil pestisitlerin literatürde herhangi bir enzim üzerine etkileri ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Yüksek lisans olarak sunulan bu çalışmada elde edilen bulgular aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

- ✓ İnsan eritrositlerinden hCA-I ve hCA-II izoenzimleri, Sepharose - 4B - 4-(6-Amino-hekziloksi)-benzensulfonamid kimyasal yapısına sahip afinite jeli ile saflaştırılmış ve saflığı SDS-PAGE ile kontrol edilmiştir.
- ✓ Araştırmamızda kullanılan pestisitlerin hCA- I ve hCA- II izoenzimlerini in vitro olarak inhibe ettiği saptanmıştır.
- ✓ Bu pestisitlerin IC₅₀ ve Ki değerleri çizilen grafiklerden hesaplanmıştır.
- ✓ Bunların içinde hCA-I için Karbofuran ve hCA-II için Koumatetralilin en güçlü inhibitör olduğu tespit edilmiştir.
- ✓ Bunların içinde hCA-I için 1- Naftol ve hCA-II için Dimetaklor ise en zayıf inhibitör olduğu tespit edilmiştir.

5. KAYNAKÇA

- [1] E. A. Vioque-Fernandez, E. A. De Almeida, & J. Lopez-Barea, “Biochemical And Proteomic Effects İn Procamburus Clarkii After Chlorpyrifos Or Carbaryl Exposure Under Sublethal Conditions” , Biomarkers, 14(5), 299-310, 2009.
- [2] M. Karakaya, & N. Boyraz, “Gıda Kirlenmesinde Pestisitler Ve Korunma Yolları”, Çevre Dergisi, 4, 11-15, 1992.
- [3] M. Yıldız, M. Gürkan, O. Urgut, C. Kaya, Ü. & G. Ünal , “Tarımsal Savaşımında Kullanılan Pestisitlerin Yol Açtığı Çevre Sorunları” .
- [4] S. Yorulmaz, & A. Y.Recep, “Akar Ve Böceklerde Pestisitlerin Detoksifikasyonunda Rol Oynayan Enzimler” , Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 24(2), 137-148, 2010.
- [5] N. T. Vural, “Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları” , Ankara 1996; 342, 373, 1984.
- [6] O. Hisar, Ş. Beydemir, M. Bülbül, M. Çiftçi, Ö. İ. Küfrevioğlu. “Gökkuşuğu Alabalık (Oncorhynchus Mykiss) Solungaçlarından Karbonik Anhidraz Enziminin Saflaştırılması Ve Bazı Kinetik Özelliklerinin Belirlenmesi” , XVII. Ulusal Kimya Kongresi, Bk-S17, İstanbul, 2003.
- [7] L. Huang, Z. Lin, X. Zhou, M. Zhu, R. Gehring, J. Riviere, E., & Z. Yuan , “Estimation Of Residue Depletion Of Cyadox And İts Marker Residue İn Edible Tissues Of Pigs Using Physiologically Based Pharmacokinetic Modelling” , Food Additives & Contaminants: Part A, 32(12), 2002-2017, 2015.
- [8] S.Türk, E. Karakaya, H. İnci , “Bingöl İlinde Organik Ürün Tüketimini Ve Tüketim Alışkanlıklarını Etkileyen Faktörler” , 9. Ulusal Zootekni Öğrenci Kongresi, 55-63, 2013. (Yayın No:1242533).
- [9] Ö. Teoman, P. Yaşar , “Türkiye’de 2003 Sonrası Buğday Ve Gübre Fiyatları İlişkisinin Piyasa Yapıları Bakımından Değerlendirilmesi”, Afyon Kocatepe Üniversitesi İktisadi Ve İdari Bilimler Fakültesi Dergisi, 2016.
- [10] B. Y. Erdoğan, “Samsun’da Yaygın Olarak Kullanılan Pestisitlerin Sağlığa Ve Çevreye Etkileri/The Health And Environmental Effects Of The Pesticides Commonly Used In Samsun” , Alnteri Zirai Bilimler Dergisi, 19(2), 28-35, 2010.
- [11] C. Bulut, & A. Kubilay “Eğirdir Gölü Su Kalitesinin Trofik Durum İndeksleriyle Belirlenmesi” , Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi, 14(4), 324-338, 2018.

- [12] X. Fan, L. Habib, J. Fleckenstein, S. Haneklaus, & E. Schnug, "In Situ Digestion A Concept To Manage Soil Phosphate In Organic Farming" , In Proceedings Of 13th International Fertilizer Symposium, Fertilizers In Context With Resource Management In Agriculture, Tokat, Turkey (Pp. 219-228), 2002.
- [13] S. Grimalt, Ó. J. Pozo, J. V. Sancho, & F. Hernández, "Use Of Liquid Chromatography Coupled To Quadrupole Time-Of-Flight Mass Spectrometry To Investigate Pesticide Residues In Fruits" , Analytical Chemistry, 79(7), 2833-2843, 2007.
- [14] M. Ünal, "Pestisit Kullanımı Ve Meydana Getirdiği Çevre Problemleri", Morfoloji Dergisi, 11-12 (1-2) 78-84. , 2004.
- [15] T. Generali, P. Stefanelli, S. Girolimetti, & D. A. Barbini, "Proficiency Tests On Olive Oil Organized By The Italian National Reference Laboratory For Pesticides: Long-Term Performance Of Laboratories" , Accreditation And Quality Assurance, 20(4), 247-253, 2015.
- [16] H. Kumbur, Z. Özer, & H. D. Özsoy, "Tarım İlaçlarının (Pestisitlerin) Çevresel Etkileri Ve Mersin İli'nde Kullanım Düzeyleri" , Gap, Iv. Tarım Kongresi, 21-23, 2005.
- [17] Np. Agnihotri , "Pesticide Safety Evaluation And Monitoring, All India Coordinated Research Project On Pesticide Residues" , Indian Agricultural Research Institute, New Delhi, P 173, 1999.
- [18] C. Tokatlı, E. Köse, A. Çiçek Ve Ö. Emiroğlu, "Pesticide Accumulation In Turkey's Meriç River Basinwater And Sediment", Polish J Environ Stud, C. 29, Sayı 1, ss. 1003–1008, 2019.
- [19] B Yıldırım, Silage Studies In Turkey: 2005-2014, Journal Of The Institute Of Science And Technology, 5 (2) , 79-88, 2015.
- [20] S. Kırış, & Y. S. Velioglu, "Reduction In Pesticide Residue Levels In Olives By Ozonated And Tap Water Treatments And Their Transfer Into Olive Oil Part A Chemistry" , Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment, 2016.
- [21] I. Stücker, J. Bouyer, L. Mandereau, & D. Hemon, "Retrospective Evaluation Of The Exposure To Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Comparative Assessments With A Job Exposure Matrix And By Experts In Industrial Hygiene" , International Journal Of Epidemiology, 22(Supplement_2), S106-S112, 1993.

- [22] Y. Zariç, “Glutasyon S-Transferaz Enziminin Van Gölü İnci Kefali Balığı (Chalcalburnus Tarichi) Solungacından Saflaştırılması, Karakterizasyonu, Bazı Metal Ve Pestisitlerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi” (Master's Thesis, Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü) , 2018.
- [23] Lu, L. A. Ma, Y. S. M. Kumar, & J. G. Lin, “Photo-Fenton Pretreatment Of Carbofuran—Analyses Via Experimental Design, Detoxification And Biodegradability Enhancement. Separation And Purification Technology” , 81(3), 325-331, 2011.
- [24] A. Altıkat, T. Turan, F. E. Torun, & Z. Bingül, “Türkiye’de Pestisit Kullanımı Ve Çevreye Olan Etkileri” , Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 40(2), 87-92, 2009.
- [25] R. J. Kuhr, & H. W. Dorough, “Carbamate İnsecticides: Chemistry, Biochemistry, And Toxicology” , Crc Press, Inc. , 1976.
- [26] W. F. Heydens, A. G. Wilson, L. D. Kier, H. Lau, D. C. Thake, & M. A. Martens, “An Evaluation Of The Carcinogenic Potential Of The Herbicide Alachlor4 To Man”, Human & Experimental Toxicology, 18(6), 363-391, 1999.
- [27] Ministry Of Health New Zealand, “Guidelines For Drinking-Water Quality Management For New Zealand”, 2013.
- [28] K. S. Tilak, D. M. Rao, A. P. Devi, & A. S. Murty, “Toxicity Of Carbaryl And 1-Naphthol To Four Species Of Freshwater Fish”, Journal Of Biosciences, 3(4), 457-461, 1981.
- [29] P. G. Wells, B. Wilson, & B. M. Lubek, “In Vivo Murine Studies On The Biochemical Mechanism Of Naphthalene Cataractogenesis” , Toxicology And Applied Pharmacology, 99(3), 466-473, 1989.
- [30] C. Tomlin, “The Pesticides Manual; A World Compendium”; Incorporating The Aquachemicals Handbook. British Crop Production Council, 1341 P. , 1994.
- [31] S. Patat, H. Akça, S. Kaleli, İ. Karakoyun, A. Koçak, & F. Gültekin, “Klorprifos-Etil'in Hepg2 Hücre Dizilerinde Hücre Canlılığına Etkisi Ve Melatoninin Koruyucu Etkisi” , Sdü Tıp Fakültesi Dergisi, 10(3) , 2003.
- [32] Ç. Aydın, & R. Mammadov, “ İnektisit Aktivite Gösteren Bitkisel Sekonder Metabolitler Ve Etki Mekanizması” , 2017.
- [33] M. D. Hurlimann, “Covariance Structure Analysis Title On Health-Related Indicators İn Home Elderly With A Focus On Subjective Health”, ss. 1–49, 2007.

- [34] K. D. Racke, “Environmental Fate Of Chlorpyrifos. In Reviews Of Environmental Contamination And Toxicology (Pp. 1-150)”, Springer, New York, Ny, 1993.
- [35] A. Nallapaneni, C. N. Pope, “Chlorpyrifos”, Encyclopedia Of Toxicology (Second Edition). Elsevier, 583-586, 2005.
- [36] G. W. Ware, “The Pesticide Book (No. Ed. 5)”, Thomson Publications, 2000.
- [37] M. S. Curren, & J. W. King, “Solubility Of Triazine Pesticides İn Pure And Modified Subcritical Water. Analytical Chemistry”, 73(4), 740-745, 2001.
- [38] X. Zhou, S. Cao, X. Li, C. Xi, X. Ding, F. Xu, & Z. Chen, “Rapid Determination Of Dichlofluanid Residues İn Vegetables Using Dispersive-Spe Sample Preparation Combined With Gas Chromatography–Mass Spectrometry. Journal Of Chromatographic Science”, 54(5), 858-863, 2016.
- [39] G. D. Okçu, H. E. Ökten, & A. Yalçuk, “Fotobiyokataliz Yöntemi Kullanılarak Pestisit Giderimi-Derleme Çalışması”, Ömer Halisdemir Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi, 8(2), 675-688.
- [40] H. F. Al-Rubaia'ay, & K. A. Shakir, “Production Of Xylose Using Acid Hydrolysis Of Wheat Straw”, The Iraqi Journal Of Agricultural Science, 49(2), 219-227, 2018.
- [41] World Health Organization, “Promotion Of Chemical Safety Unit & Food And Agriculture Organization Of The United Nations. Who/Fao Data Sheet On Pesticides”, No.72,Azinphos-Ethyl, WorldHealthOrganization. , 1994.
- [42] I. Bandara Gawarammana, D. M. Roberts, F. Mohamed, M. S. Roberts, G. Medley, S. Jayamanne, & A. Dawson, “Acute Human Self-Poisoning With Bispyribac-Containing Herbicide Nominee®: A Prospective Observational Study”, Clinical Toxicology, 48(3), 198-202, 2010.
- [43] H. J. Lewerenz, “Evaluations Of Some Pesticide Residues İn Food. Who Pesticide Residues Series”, No. 4. 545 Seiten. World Health Organization, Geneva, 1975. Preis: 48,—Sw. Fr. Food/Nahrung, 1976, 20.10: 929-929, 1974.
- [44] L. Scarponi, P. Perucci, & L. Martinetti, “Conjugation Of 2-Chloroacetanilide Herbicides With Glutathione: Role Of Molecular Structures And Of Glutathione S-Transferase Enzymes”, J Agric Food Chem, C. 39, Sayı 11, ss. 2010–2013, 1991.
- [45] J. Yakovleva, A. V. Zherdev, V. A. Popova, S. A. Eremin, & B. B. Dzantiev, “Production Of Antibodies And Development Of Enzyme-Linked İmmunosorbent Assays For The Herbicide Butachlor”, Anal Chim Acta, C. 491, Sayı 1, ss. 1–13, 2003.

- [46] B. Muñoz-Leoz, E. Ruiz-Romera, I. Antigüedad, & C. Garbisu, “Tebuconazole Application Decreases Soil Microbial Biomass And Activity”, *Soil Biol Biochem*, C. 43, Sayı 10, ss. 2176–2183, 2011.
- [47] C. Toni, D. Ferreira, L. C. Kreutz, V. L. Loro, & L. J. G. Barcellos, “Assessment Of Oxidative Stress And Metabolic Changes İn Common Carp (*Cyprinus Carpio*) Acutely Exposed To Different Concentrations Of The Fungicide Tebuconazole” , *Chemosphere*, C. 83, Sayı 4, ss. 579–584, 2011.
- [48] Y. Picó, M. La Farré, N. Tokman, & D. Barceló, “Rapid And Sensitive Ultra-High-Pressure Liquid Chromatography-Quadrupole Time-Of-Flight Mass Spectrometry For The Quantification Of Amitraz And İdentification Of İts Degradation Products İn Fruits”, *J Chromatogr A*, C. 1203, Sayı 1, Ss. 36–46, 2008.
- [49] A. M. İ. Traş Et Al. “Comparison Of Biochemical Findings Of Emergency Medicine Department And”, 2006.
- [50] A. L. Braun, & D. M. Supkoff, “Options To Methyl Bromide For The Control Of Soil-Borne Diseases And Pests İn California With Reference To The Netherlands” , 1994.
- [51] K. E. İ. Yon, V. E. Gaz, And K. İ. K. Methods, “Pest Heat Analysis For Food Samples With Solid-Phase Extraction And Gas Chromatography Methods”, 2007.
- [52] Us Environmental Protection Agency Office Of Pesticide Programs Red Fact Sheet : “Dazomet”,2008.
- [53] D. Kumbhar, R. Patil, D. Patil, A. Patravale, D. Chandam, S. Jadhav, & M. Deshmukh, “Target Oriented Selective Synthesis Of Antibacterial Active Tyrosinase Enzyme İhibitor Coumarin Core Derivatives” , *Asian Journal Of Research İn Chemistry*, 8(8), 511-520, 2015.
- [54] L. A. Walker, A. Turk, S. M. Long, C. L. Wienburg, J. Best Ve R. F. Shore, “Second Generation Anticoagulant Rodenticides İn Tawny Owls (*Strix Aluco*) From Great Britain”, *Sci Total Environ*, C. 392, Sayı 1, Ss. 93–98, 2008.
- [55] I. Hacking, “Covariance Structure Analysis Title On Health-Related Indicators İn Home Elderly People Focusing On Subjective Health”, C. 43, Sayı 10, ss. 8509–8515, 1991.
- [56] D. Regulation, "Environmental Fate Of Carbofuran", Dep Pestik Regulation, Number Sacramento, Ca 95814, 1991.
- [57] S. A. H. İ. Sar, “Fish Functions Of Carbonic Anhydrase I Zoenzymes İn Transport And Removal Of Blood Carbon Dioxide”, C. 34, Number 4, ss. 387--393, 2003.

- [58] L. Lu, Y. Ma, M. Kumar, Ve J. Lin, “Photo-Fenton Pretreatment Of Carbofuran – Analyses Via Experimental Design, Detoxification And Biodegradability Enhancement”, C. 81, ss. 325–331, 2011.
- [59] Who, “World Health Organization, Carbaryl”, Geneva, 35, 1994.
- [60] S. Beydemir & İ. Gülçin, “Effects Of Melatonin On Carbonic Anhydrase From Human Erythrocytes In Vitro And From Rat Erythrocytes In Vivo Effects Of Melatonin On Carbonic Anhydrase From Human Erythrocytes In Vitro And From Rat Erythrocytes In Vivo”, C. 6366, 2008.
- [61] M. Boztas, M. Topal, A. Menzek, M. Tanc, & C. T. Supuran, “Synthesis And Carbonic Anhydrase Isoenzymes I, II, IX, And XII Inhibitory Effects Of Dimethoxybromophenol Derivatives Incorporating Cyclopropane Moieties”, 2015.
- [62] Ş. Beydemir & I. Gülçin, “Effects Of Melatonin On Carbonic Anhydrase From Human Erythrocytes In Vitro And From Rat Erythrocytes In Vivo”, J Enzyme Inhib Med Chem, C. 19, Sayı 2, ss. 193–197, 2004.
- [63] G. Holló, Carbonic Anhydrase Inhibitors, “Glaucoma Second Ed”, C. 1, ss. 559–565, 2015.
- [64] A.L. Lehninger, D.L. Nelson, M.M. Cox, Principles Of Biochemistry, 2005.
- [65] C. T. Supuran, A. Scozzafava, & A. Casini, “Carbonic Anhydrase Inhibitors. Medicinal Research Reviews”, 23(2), 146-189, 2003.
- [66] I. Gülçin, S. Beydemir, & M. E. Büyükkokuroğlu, “In Vitro And In Vivo Effects Of Dantrolene On Carbonic Anhydrase Enzyme Activities”, Biol Pharm Bull, C. 27, Sayı 5, ss. 613–616, 2004.
- [67] L. Durmaz, “Bazı Kumarin Türevleri: Antioksidan Kapasiteleri ve İnsan Karbonik Anhidraz İzoenzimleri (hCA I ve II) ile Asetilkolinesteraz Enzimi Üzerine Etkileri”, (Doctoral dissertation, Doktora Tezi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü) , 2015.
- [68] S. R. Krungkrai, N. Suraveratum, S. Rochanakij, & J. Krungkrai, “Characterisation Of Carbonic Anhydrase In Plasmodium Falciparum”, Int J Parasitol, C. 31, Sayı 7, ss. 661–668, 2001.
- [69] Y. Akbaba, E. Bastem, & F. Topal, “Full Paper Synthesis And Carbonic Anhydrase Inhibitory Effects Of Novel Sulfamides Derived From 1-Aminoindanes And Anilines”, Ss. 950–957, 2014.

- [70] A. Akıncioğlu, H. Akıncioğlu, İ. Gülçin, S. Durdagi, C. T. Supuran, & S. Göksu, “Discovery Of Potent Carbonic Anhydrase And Acetylcholine Esterase Inhibitors: Novel Sulfamoylcarbamates And Sulfamides Derived From Acetophenones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*”, 23(13), 3592-3602, 2015.
- [71] B. Arabaci, I. Gulcin, & S. Alwasel, “Capsaicin: A Potent Inhibitor Of Carbonic Anhydrase Isoenzymes”, ss. 10103–10114, 2014.
- [72] D. Hewett-Emmett, “Evolution And Distribution Of The Carbonic Anhydrase Gene Families”, In *The Carbonic Anhydrases* (Pp. 29-76). Birkhäuser, Basel, 2000.
- [73] O. Hisar, Ş. Beydemir, I. Gülçin, Ö. I. Küfrevioğlu, & C. T. Supuran, “Effects Of Low Molecular Weight Plasma Inhibitors Of Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) On Human Erythrocyte Carbonic Anhydrase-I₁ Isozyme Activity In Vitro And Rat Erythrocytes In Vivo”, *J Enzyme Inhib Med Chem*, C. 20, Sayı 1, ss. 35–39, (2005).
- [74] T. A. Coban, Ş. Beydemir, İ. Gücin, D. Ekinçi, A. Innocenti, D. Vullo, & C. T. Supuran, “Sildenafil Is A Strong Activator Of Mammalian Carbonic Anhydrase Isoforms I–Xiv”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17(16), 5791-5795, 2009.
- [75] K. N. Christie, C. Thomson, L. Xue, J. M. Lucocq, & D. Hopwood, “Carbonic Anhydrase Isoenzymes I, I₁, I₁₁, And Iv Are Present In Human Esophageal Epithelium”, *J Histochem Cytochem*, C. 45, Sayı 1, ss. 35–40, 1997.
- [76] T. G. Burish, & W. H. Redd, “Symptom Control In Psychosocial Oncology”, *Cancer*, 74(S4), 1438-1444, 1994.
- [77] Ö. Akdeniz, “Asetilkolinesteraz Ve Butirilkolinesteraz Enzimleri Üzerinde Bazı Pestisitlerin Etkilerinin İncelenmesi” (Master's Thesis, Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü), 2019.
- [78] T. Okuyama, A. Waheed, W. Kusumoto, X. L. Zhu, & W. S. Sly, “Carbonic Anhydrase Iv: Role Of Removal Of C-Terminal Domain In Glycosylphosphatidylinositol Anchoring And Realization Of Enzyme Activity”, *Archives Of Biochemistry And Biophysics*, 320(2), 315-322, 1995.
- [79] S. A. Hazen, A. Waheed, W. S. Sly, K. F. Lanoue, & C. J. Lynch, “Differentiation-Dependent Expression Of Ca V And The Role Of Carbonic Anhydrase Isozymes In Pyruvate Carboxylation In Adipocytes”, *The FASEB Journal*, 10(4), 481-490, 1996.
- [80] M. M. Lakkis, N. C. Bergenheim, & R. E. Tashian, “Expression Of Mouse Carbonic Anhydrase V₁₁ İne. Coliand Demonstration Of Its Co₂hydrase Activity”, *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 226(1), 268-272, 1996.

- [81] B. Sjöblom, B. Elleby, K. Wallgren, B. H. Jonsson, & S. Lindskog, “Two Point Mutations Convert A Catalytically Inactive Carbonic Anhydrase-Related Protein (Carp) To An Active Enzyme” , *Febs Letters*, 398(2-3), 322-325, 1996.
- [82] T. Bayram, “Köpek Artritlerinden Afinitive Kromatografisi İle Saflaştırılan Karbonik Anhidraz Enziminin Sülfonamidlerle İnhibisyon Kinetiğinin İncelenmesi” , (Master's Thesis, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü) , 2005.
- [83] E. T. Kaiser, & K. W. Lo, “Carbonic Anhydrase Catalyzed Hydrolysis Of 2-Hydroxy-5-Nitro-. Alpha.-Toluenesulfonic Acid Sultone” ,*Journal Of The American Chemical Society*, 91(17), 4912-4918, 1969.
- [84] J.R. Jabusch, H.F. Deutsch, “Localization Of The Lysines Acetylated İn Ubiquitin Reacted With P-Nitrophenyl Acetat” , *Arch. Biochem. Biophys.*, 238, 170, 1989.
- [85] A. Kivela, “ Carbonic Anhydrase İn Normal And Neoplastic Gastrointestinal Tissues, With Special Emphasis On İsoenzymes I, II, IX, XI And XIV” , 2003.
- [86] J. V. Moroney, S. G. Bartlett, & G. Samuelsson, “ Carbonic Anhydrases İn Plants And Algae. *Plant, Cell & Environment*” , 24(2), 141-153, 2001.
- [87] S. Del Prete, D. Vullo, G. M. Fisher, K. T. Andrews, S. A. Poulsen, C. Capasso, & C. T. Supuran, “ Discovery Of A New Family Of Carbonic Anhydrases İn The Malaria Pathogen *Plasmodium Falciparum*—The H-Carbonic Anhydrases” , *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24(18), 4389-4396, 2014.
- [88] M. E. Mcdevitt & L. A. Lambert, “Biochimica Et Biophysica Acta Molecular Evolution And Selection Pressure İn Alpha-Class Carbonic Anhydrase Family Members” , *Bba - Proteins Proteomics*, C. 1814, Sayı 12, Ss. 1854–1861, 2011.
- [89] K. S. Smith, C. Jakubzick, T. S. Whittam, & J. G. Ferry, “Carbonic Anhydrase İs An Ancient Enzyme Widespread İn Prokaryotes” , *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 96(26), 15184-15189, 1999.
- [90] T. M. Iverson, B. E. Alber, C. Kisker, J. G. Ferry, & D. C. Rees, “A Closer Look At The Active Site Of Γ -Class Carbonic Anhydrases: High-Resolution Crystallographic Studies Of The Carbonic Anhydrase From *Methanosarcina Thermophila*” , *Biochemistry*, 39(31), 9222-9231, 2000.
- [91] S. Del Prete, D. Vullo, A. Scozzafava, C. Capasso, & C. T. Supuran, “ Cloning, Characterization And Anion İnhibition Study Of The Δ -Class Carbonic Anhydrase (Tweca) From The Marine Diatom *Thalassiosira Weissflogii*” , *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 22(1), 531-537, 2014.

- [92] V. Alterio, E. Langella, F. Viparelli, D. Vullo, G. Ascione, N. A. Dathan, & S. M. Monti, “Structural And Inhibition Insights Into Carbonic Anhydrase Cdc1 From The Marine Diatom *Thalassiosira weissflogii*”, *Biochimie*, 94(5), 1232-1241, 2012.
- [93] C. T. Supuran, & C. Capasso, “The H-Class Carbonic Anhydrases As Drug Targets For Antimalarial Agents”, *Expert Opinion On Therapeutic Targets*, 19(4), 551-563, 2015.
- [94] S. Lindskog, “Structure And Mechanism Of Carbonic Anhydrase”, *Pharmacol Ther*, C. 74, Sayı 1, ss. 1–20, 1997.
- [95] T. Stams, Y. Chen, D. W. Christianson, P. A. Boriack-Sjodin, J. D. Hurt, P. Laipis, T. Dean, “Structures Of Murine Carbonic Anhydrase Iv And Human Carbonic Anhydrase I1 Complexed With Brinzolamide: Molecular Basis Of Isozyme-Drug Discrimination”, *Protein Science*, 7(3), 556-563, 1998.
- [96] C. T. Supuran, A. Scozzafava, & A. Casini, “Carbonic Anhydrase Inhibitors. Medicinal Research Reviews”, 23(2), 146-189, 2003.
- [97] T.H. Maren, “Carbonic anhydrase: General perspectives and advances in glaucuma research”, *Drug dev. Res.* 10, 255, 1987.
- [98] O. Arslan, “Inhibition of Bovine Carbonic Anhydrase by New Sulfonamide Compounds”, *Turk J. Med. Sci.* 66 (9), 982, 2001.
- [99] T. H. Maren, Jankowska, L., Sanyal, G., and Edelhauser, H. F., “The transcorneal permeability of sulfonamide Carbonic anhydrase inhibitors and their effect on aqueous humor secretion”, *Exp. Eye. Res.* 36, 457, 1983.
- [100] Ö. Özensoy, “Kanser İlişkili Karbonik Anhidraz IX ve XII İzoenzimlerinin Ekspresyonu, Saflaştırılması ve Bazı Bileşiklere Karşı İlgisinin Araştırılması” Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir, 2006.
- [101] S. Lindskog, & D. N. Silverman, “The Carbonic Anhydrases: New Horizons”, Edited By W. R. Chegwidden, D. Carter & Y. H. Edwards, 2000.
- [102] Ö. Türeci, U. Sahin, E. Vollmar, S. Siemer, E. Göttert, G. Seitz, & W. S. Sly, “Human Carbonic Anhydrase X11: Cdna Cloning, Expression, And Chromosomal Localization Of A Carbonic Anhydrase Gene That Is Overexpressed In Some Renal Cell Cancers”, *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 95(13), 7608-7613, 1998.
- [103] C. Geers & G. Gros, “Carbon Dioxide Transport And Carbonic Anhydrase In Blood And Muscle”, *Physiol Rev*, C. 80, Sayı 2, ss. 681–715, 2000.

- [104] G.Ökemler, “Karbonik anhidraz izoenzimlerinin saflaştırılması için yeni bir afinite jelinin sentezlenmesi ”, (Master's thesis, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü), 2016.
- [105] C. H. Maren, “A simplified micromethod for the determination of carbonic anhydrase and its inhibitors”, *J. Pharmac. Exp. Ther.*, 26, 130, 1960.
- [106] F. Hilbrig, & R. Freitag, “Protein Purification By Affinity Precipitation ”, *Journal Of Chromatography B*, 790(1-2), 79-90, 2003.
- [107] E. E. Keha, “Karbonik Anhidraz Enziminin Saflaştırılması İçin Geliştirilmiş Bir Afinite Kromatografisi Metodu” , Doçentlik Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Erzurum, 1981.
- [108] M. S. Mohy Eldin, C. G. P. H. Schroën, A. E. M. Janssen, D. G. Mita, & J. Tramper, “Immobilization Of Penicillin G Acylase Onto Chemically Grafted Nylon Particles”, *Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, C. 10, Sayı 4, ss. 445–451, 2000.
- [109] J. Kohn, & M. Wilchek, “A Colorimetric Method For Monitoring Activation Of Sepharose By Cyanogen Bromide” , *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 84(1), 7-14, 1978.
- [110] Bradford, M. M., “A rapid and sensitive method for the quantitaion of microgram quantites of protein utilizing the principle of protein-dye binding”, *Anal. Biochem.* 72, 248, 1976.
- [111] Laemmli, D. K. “Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of bacteriophage T4”,*Nature.*, 227, 680 p., 1970.
- [112] Warburg, O., And Christian, W., “Isolierung Und Kristallization Des Gärungsferments Enolase”, *Biochem.*, 310, 384, 1941 .
- [113] J. M. Armstrong, D. V. Myers, J. A. Verpoorte, and J. T. Edsall, “Purification and properties of human erythrocyte carbonic anhydrases” , *J. Biol. Chem.*, vol. 241, no. 21, pp. 5137–5149, 1966.
- [114] P. Cuatrecasas, “Protein purification by affinity chromatography derivatizations of agarose and polyacrylamide beads”, *Journal of Biological Chemistry*, 245(12), 3059-3065, 1970.
- [115] V. Holovská, J. Pistl, & N. Kovalkovičová, “In Vitro Effect Of Pesticides (Dichlofluanid, Endosulfan, Simazine, Tolyfluanid And Triallate) On Proliferative Activity Of Animal Derived Cell Cultures ” , *Acta Biologica Hungarica*, 58(1), 61-74, 2007.

- [116] M. Şentürk, S. B. Ceyhun, O. Erdoğan, & Ö. I. Küfrevioğlu, “In Vitro And In Vivo Effects Of Some Pesticides On Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Enzyme Activity From Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Erythrocytes”, *Pesticide Biochemistry And Physiology*, C. 95, Sayı 2, ss. 95–99, 2009.
- [117] E. Soydan, A. Güler, S. Bıyık, M. Şentürk, C. T. Supuran, & D. Ekinci, “Carbonic Anhydrase From *Apis Mellifera*: Purification And İnhibition By Pesticides”, *J Enzyme Inhib Med Chem*, C. 32, Sayı 1, ss. 47–50, 2017.
- [118] A. Topal, M. Şişecioglu, M. Atamanalp, A. Işık, & B. Yılmaz, “The İn Vitro And İn Vivo Effects Of Chlorpyrifos On Acetylcholinesterase Activity Of Rainbow Trout Brain” , *Journal Of Applied Animal Research*, 44(1), 243-247, 2016.
- [119] P. R. De Souza, K. S. De Souza, C. R. D. De Assis, M. C. De Araújo, K. C. C. Silva, J. D. F. X. Da Silva, & R. De Souza Bezerra, “Acetylcholinesterase Of Mangrove Oyster *Crassostrea Rhizophorae*: A Highly Thermostable Enzyme With Promising Features For Estuarine Biomonitoring ”, *Aquatic Toxicology*, 197, 109-121, 2018.
- [120] İ. Özgençli, Y. Temel, M. Çiftçi, & Ö. Küfrevioğlu, “Bazı Pestisitlerin Gökkuşığı Alabalığı Karaciğerinden Saflaştırılan Mitokondrial Tiyoredoksin Redüktaz Enziminin Aktivitesi Üzerine İn Vitro Etkilerinin İncelenmesi” , *Muş Alparslan Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 1(2), 109-117, 2013.
- [121] R. Demirdağ, E. Yerlikaya, E. Aksakal, Ö. I. Küfrevioğlu, & D. Ekinci, “Influence Of Pesticides On The Ph Regulatory Enzyme, Carbonic Anhydrase, From European Seabass Liver And Bovine Erythrocytes”, *Environ Toxicol Pharmacol*, C. 34, Sayı 2, ss. 218–222, 2012.
- [122] E. Soydan, A. Güler, S. Bıyık, M. Şentürk, C. T. Supuran, & D. Ekinci, “Carbonic Anhydrase From *Apis Mellifera*: Purification And İnhibition By Pesticides”, *J Enzyme Inhib Med Chem*, C. 32, Sayı 1, ss. 47–50, 2017.
- [123] S. M. Janosik, “Anticipating Legal İssues İn Higher Education” , *Naspa Journal*, 42(4), 401-414, 2005.

EKLER

6. EKLER

EK A: Etik Kurul Karar Formu

Evrak Tarih ve Sayısı: 24/02/2020-E.11066



T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı



Sayı : 94025189-050.03-
Konu : Etik Kurul Karar Formu

Sayın Prof. Dr. Nahit GENÇER
Öğretim Üyesi

İlgi : 27.01.2020 tarihli dilekçeniz.

"Bazı Pestisitlerin Karbonik Anhidraz Enzimi Üzerine Etkisi" başlıklı çalışmanız hakkında Etik Kurulumuzun bilimsel ve etik yönden oluşturduğu görüş ekteki karar formunda belirtilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Fuat EREL
Başkan

Ek :
Karar Formu

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	“Bazı Pestisitlerin Karbonik Anhidraz Enzimi Üzerine Etkisi”
-----------------------	--

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
	AÇIK ADRESİ:	Çağış Yerleşkesi Uşak Yolu Üzeri, 10145 BALIKESİR
	TELEFON	266 612 14 61-6707
	FAKS	
	E-POSTA	etik.bautip@gmail.com

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Nahit GENCER			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Biyokimya Bölümü			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	BALIKESİR			
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI				
	DESTEKLEYİCİ				
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 4	<input type="checkbox"/>		
		Gözlemsel ilaç çalışması	<input type="checkbox"/>		
		Tıbbi cihaz klinik araştırması	<input type="checkbox"/>		
		İn vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları	<input type="checkbox"/>		
İlaç dışı klinik araştırma		<input type="checkbox"/>			
	Diğer ise belirtiniz				
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof.Dr.Fuat EREL
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	“Bazı Pestisitlerin Karbonik Anhidraz Enzimi Üzerine Etkisi”
-----------------------	--

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili			
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama					
	SIGORTA	<input type="checkbox"/>					
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input checked="" type="checkbox"/>					
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>					
	İLAN	<input type="checkbox"/>					
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>					
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>					
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>					
DİĞER:	<input type="checkbox"/>						
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2020/24	Tarih: 05.02.2020					
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gereke, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerden izin alınması şartıyla gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının oybirliği ile karar verilmiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.						

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof.Dr.Fuat EREL	Göğüs Hastalıkları AD	BAÜN Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Gülten ERKEN	Fizyoloji AD	BAÜN Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Akın USTA	Kadın Hastalıkları ve Doğum AD	BAÜN Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Eyüp AVCI	Kardiyoloji AD	BAÜN Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr.Öğr.Üyesi Oğuzhan KORKUT	Tıbbi Farmakoloji AD	BAÜN Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Uzm.Dr.Mehmet ÇALIŞKAN	Halk Sağlığı Bölümü	Balıkesir KEAS Organize Sanayi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Av.Erman ARDA	Avukat	Serbest	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Hüsnü KUNDAKÇI	Eczacı	Balıkesir Sağlık Uygulama ve Arş.Hast.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Serhat ALDEMİR	Emekli		E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı:Prof.Dr.Fuat EREL
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

7. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Aybike BALTACI

Doğum tarihi ve yeri : 14.10.1995 / Beyoğlu

e-posta : aybikebaltaci34@gmail.com

Öğrenim Bilgileri

Derece	Okul/Program	Yıl
Y. Lisans	Balıkesir Üniversitesi/Kimya	2018-2021
Lisans	Balıkesir Üniversitesi/Kimya	2014-2018
Lise	Lefkoşa Türk Lisesi	2009-2013