

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

BİTKİ GELİŞİM DÜZENLEYİCİLERİNİN
ANTİOKSİDAN ENZİMLER ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İlknur PEKTAŞ

Balıkesir, Temmuz 2009

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

BİTKİ GELİŞİM DÜZENLEYİCİLERİNİN ANTIOKSİDAN
ENZİMLER ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İlknur PEKTAŞ

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Serap DOĞAN

Sınav Tarihi : 03.08.2009

Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Gülendamar TÜMEN

Doç. Dr. Turgut KILIÇ

Doç. Dr. Serap DOĞAN (Danışman)

Balıkesir, Temmuz 2009

ÖZET

BİTKİ GELİŞİM DÜZENLEYİCİLERİNİN ANTIOKSİDAN ENZİMLER ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

İlknur PEKTAŞ

Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı

(Yüksek Lisans Tezi/ Tez Danışmanı: Doç. Dr. Serap DOĞAN)

Balıkesir 2009

Bu çalışmada bitki gelişim düzenleyicisi olan mepiquat klorür, β -naftalooksiasetik asit ve giberellik asitin glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, glutatyon s-transferaz, katalaz ve süperoksit dismutaz enzim aktiviteleri üzerine etkiler araştırılmıştır. Deneysel spektrofotometrik olarak gerçekleştirildi. Çalışma sonucunda: i. bitki gelişim düzenleyici maddelerin antioksidan enzimler üzerinde inhibitör olarak hareket ettiği, ii. inhibitörlerin inhibisyon gücünün enzimler için farklılık gösterdiği, iii. glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, glutatyon S-transferaz, katalaz ve süperoksit dismutaz antioksidan enzimleri için en etkin inhibitörlerin sırasıyla giberellik asit, giberellik asit, β -naftalooksiasetik asit, giberellik asit, β -naftalooksiasetik asit ve β -naftalooksiasetik asit olduğu, ve iv. bu çalışmada elde edilen değerler literatürde metal iyonları için elde edilmiş I_{50} değerleri ile kıyaslandığında BGD'lerin oldukça güçlü inhibitörler oldukları bulundu.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: Bitki Gelişim Düzenleyicileri / Antioksidan enzimler

ABSTRACT

INVESTIGATION OF EFFECTS OF THE PLANT GROWTH REGULATORS ON THE ANTIOXIDANT ENZYMES

İlknur PEKTAŞ

Balıkesir University, Institute of Science, Department of Biology

(Master Thesis/ Supervisor: Associate.Prof. Dr. Serap DOĞAN)

Balıkesir, 2009

In this study, the effects of plant growth regulators such as mepiquat chloride, β -naphthoxyacetic acid and giberellic acid on the antioxidant enzyme activities of glucose-6-phosphate dehydrogenase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione s-transferase, cakahase and superoxide dismutase were investigated. The experiments were made spectrophotometrically. From the results, it was obtained that i. the plant growth regulators behaved as an inhibitor on the antioxidant enzymes; ii. the inhibition power of plant growth regulators was different from enzyme to enzyme; iii. the most power inhibitor for glucose-6-phosphate dehydrogenase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione s-transferase, cakahase and superoxide dismutase antioxidant enzymes were giberellic acid, giberellic acid, β -naphthoxyacetic acid, giberellic acid, β -naphthoxyacetic acid and β -naphthoxyacetic acid, respectively; and iv. when our I_{50} values compared with the results of metal ions in literature, plant growth regulators were more inhibitors than the metal ions.

KEY WORDS: Plant growth regulators / Antioxidant Enzymes

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET, ANAHTAR SÖZCÜKLER	ii
ABSTRACT, KEY WORDS	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SEMBOL LİSTESİ	vii
ŞEKİL LİSTESİ	viii
ÇİZELGE LİSTESİ	x
ÖNSÖZ	xii
1.GİRİŞ	1
1.1 Bitki Gelişim Düzenleyicileri (BGD)	1
1.2 Bitki Gelişim Düzenleyicilerinin Gruplandırılması ve Genel Özellikleri	1
1.2.1 Oksinler	2
1.2.2 Giberellinler	2
1.2.3 Sitokininler	3
1.2.4 Etilen	4
1.2.5 Absisik Asit (ABA) (Dorminler)	5
1.3 Türkiye ve Dünyada BGD Kullanımı	5
1.4 Enzimler	6
1.5 Enzimatik Antioksidanlar	7
1.5.1 Gukoz 6-fosfat Dehidrogenaz	7
1.5.2 Glutatyon peroksidaz (GSH-Px)	8
1.5.3 Glutatyon Redüktaz (GR)	9
1.5.4 Glutatyon S-Transferazlar (GST)	10
1.5.5 Katalaz (CAT)	10
1.5.6 Süperoksit dismutaz (SOD)	11
1.6 Literatür Özeti	11

1.7 Çalışmanın Amacı	14
2. MATERYAL ve METOT	16
2.1 Materyal	16
2.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler	16
2.1.3 Çalışmada Kullanılan Cihazlar	17
2.2 Çalışmada Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları	17
2.3 Hemolizat Hazırlanışı	19
2.4 Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi	19
2.4.1 Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz Enzim Aktivitesinin Ölçümü	19
2.4.2 Glutasyon Peroksidaz Enzim Aktivitesinin Ölçümü	19
2.4.3 Glutasyon Redüktaz Enzim Aktivitesinin Ölçümü	20
2.4.4 Glutasyon S-Transferaz Enzim Aktivitesinin Ölçümü	21
2.4.5 Katalaz Enzim Aktivitesinin Ölçümü	21
2.4.6 Süperoksit Dismutaz Enzim Aktivitesinin Ölçümü	22
3. BULGULAR	23
3.1 BGD'lerin Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz Enzim Aktivitesine Etkileri	23
3.2 BGD'lerin Glutasyon Peroksidaz Enzim Aktivitesine Etkileri	27
3.3 BGD'lerin Glutasyon Redüktaz Enzim Aktivitesine Etkileri	31
3.4 BGD'lerin Glutasyon S-transferaz Enzim Aktivitesine Etkileri	35
3.5 BGD'lerin Katalaz Enzim Aktivitesine Etkileri	39
3.6 BGD'lerin Süperoksit Dismutaz Enzim Aktivitesine Etkileri	43
4. SONUÇ VE TARTIŞMA	48
4.1 Antioksidan Enzim Aktivitelerine Mepiquat Klorürün Etkisi	48
4.2 Antioksidan Enzim Aktivitelerine BNOA'nın Etkisi	49
4.3 Antioksidan Enzim Aktivitelerine Giberellik Asitin Etkisi	49
4.4 I ₅₀ Değerleri	50
4.4.1 G6PD'nin İnhibisyonu İçin Hesaplanmış I ₅₀ Değerleri	50
4.4.2 Glutasyon Peroksidazın İnhibisyonu İçin Hesaplanmış I ₅₀ Değerleri	52
4.4.3 Glutasyon Redüktazın İnhibisyonu İçin Hesaplanmış I ₅₀ Değerleri	52
4.4.4 Glutasyon S-transferazın İnhibisyonu İçin Hesaplanmış I ₅₀ Değerleri	53
4.4.5 Katalazın İnhibisyonu İçin Hesaplanmış I ₅₀ Değerleri	54
4.4.6 Süperoksit Dismutazın İnhibisyonu İçin Hesaplanmış I ₅₀ Değerleri	55
4.5 Sonuçlar	56

SEMBOL LİSTESİ

<u>Simge</u>	<u>Adı</u>	<u>Birim</u>
[inh]	inhibitör konsantrasyonu	mol/L
E.C	enzim kod numarası	
I ₅₀	%50 inhibisyonuna sebep olan inhibitör konsantrasyonu	E.Ü
BGD	Bitki Gelişim Düzenleyicileri	
BNOA	β-naftioksiasetik asit	
CAT	Katalaz	
C ₂ H ₄	Etilen	
CDNB	1-kloro-2,4-dinitrobenzen	
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetat	
GA3	Giberellik Asit	
G6P	Glukoz-6- Fosfat	
G6PD	Glukoz-6- Fosfat Dehidrogenaz	
GPx	Glutasyon Peroksidaz	
GR	Glutasyon Redüktaz	
GSH	Redükte glutasyon	
GSSG	Okside glutasyon	
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit	
NADP ⁺	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat, yükseltgenmiş hal	
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat, indirgenmiş hal	
ROS	Reaktif Oksijen Türevleri	
SOD	Süperoksit Dismutaz	

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil No</u>	<u>Adı</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1	Oksinin yapısı	2
Şekil 1.2	Giberellinin yapısı	3
Şekil 1.3	Sitokininin yapısı	4
Şekil 1.4	Etilenin yapısı	4
Şekil 1.5	Absissik asidin yapısı	5
Şekil 1.6	HMP ve Glutasyon yolağı	9
Şekil 3.1	G6PD enziminin mepiquat klorüd ile % aktivite değerleri	25
Şekil 3.2	G6PD enziminin BNOA ile % aktivite değerleri	25
Şekil 3.3	G6PD enziminin GA ile % aktivite değerleri	27
Şekil 3.4	Glutasyon peroksidaz enziminin Mepiquat klorid ile % aktivite değerleri	29
Şekil 3.5	Glutasyon peroksidaz enziminin BNOA ile % aktivite değerler	29
Şekil 3.6	Glutasyon peroksidaz enziminin GA ile % aktivite değerleri	31
Şekil 3.7	Glutasyon Redüktaz enziminin mepiquat klorüd ile % aktivite değerleri	33
Şekil 3.8	Glutasyon Redüktaz enziminin BNOA ile % aktivite değerleri	33
Şekil 3.9	Glutasyon Redüktaz enziminin GA ile % aktivite değerleri	35
Şekil 3.10	Glutasyon S Transferaz enziminin Mepiquat klorid ile % aktivite değerleri	37
Şekil 3.11	Glutasyon S Transferaz enziminin BNOA ile % aktivite değerleri	37
Şekil 3.12	Glutasyon S Transferaz enziminin GA ile % aktivite değerleri	39
Şekil 3.13	Katalaz enziminin mepiquat klorüd ile % aktivite değerleri	41
Şekil 3.14	Katalaz enziminin BNOA ile % aktivite değerleri	41
Şekil 3.15	Katalaz enziminin GA ile % aktivite değerleri	41
Şekil 3.16	Süperoksit Dismutaz enziminin Mepiquat klorid ile % aktivite değerleri	45

Şekil 3.17	Süperoksit Dismutaz enziminin BNOA ile % aktivite değerleri	45
Şekil 3.18	Süperoksit Dismutaz enziminin GA ile % aktivite değerleri	47

ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge No</u>	<u>Adı</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1	Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz aktivitesi ölçümü için kullanılan maddelerin hacimleri	19
Çizelge 2.2	Glutasyon Peroksidaz aktivitesi ölçümü için kullanılan maddelerin hacimleri	20
Çizelge 2.3	Glutasyon Redüktaz aktivitesi ölçümü için kullanılan maddelerin hacimleri	20
Çizelge 2.4	Glutasyon S Transferaz aktivitesi ölçümü için kullanılan maddelerin hacimleri	21
Çizelge 2.5	Katalaz aktivitesi ölçümü için kullanılan maddelerin hacimleri	21
Çizelge 2.6	SOD aktivitesi ölçümü için kullanılan maddelerin hacimleri	22
Çizelge 3.1	Glukoz 6- fosfat dehidrogenaz enziminin aktivitesi üzerine Mepiquat kloridin etkisi	24
Çizelge 3.2	Glukoz 6- fosfat dehidrogenaz enziminin aktivitesi üzerine BNOA'in etkisi	24
Çizelge 3.3	Glukoz 6- fosfat dehidrogenaz enziminin aktivitesi üzerine GA'in etkisi	26
Çizelge 3.4	Glutasyon peroksidaz enziminin aktivitesi üzerine Mepiquat kloridin etkisi	28
Çizelge 3.5	Glutasyon peroksidaz enziminin aktivitesi üzerine BNOA'nın etkisi	28
Çizelge 3.6	Glutasyon peroksidaz enziminin aktivitesi üzerine GA'nın etkisi	30
Çizelge 3.7	Glutasyon Redüktaz enziminin aktivitesi üzerine mepiquat kloridin etkisi	32
Çizelge 3.8	Glutasyon Redüktaz enziminin aktivitesi üzerine	32

	BNOA'nın etkisi	
Çizelge 3.9	Glutatyon Redüktaz enziminin aktivitesi üzerine GA'nın etkisi	34
Çizelge 3.10	Glutatyon S Transferaz enziminin aktivitesi üzerine Mepiquat kloridin etkisi	36
Çizelge 3.11	Glutatyon S Transferaz enziminin aktivitesi üzerine BNOA'nın etkisi	36
Çizelge 3.12	Glutatyon S Transferaz enziminin aktivitesi üzerine GA'nın etkisi	38
Çizelge 3.13	Katalaz enziminin aktivitesi üzerine mepiquat kloridin etkisi	40
Çizelge 3.14	Katalaz enziminin aktivitesi üzerine BNOA'nın etkisi	40
Çizelge 3.15	Katalaz enziminin aktivitesi üzerine GA'nın etkisi	42
Çizelge 3.16	Süperoksit Dismutaz enziminin aktivitesi üzerine Mepiquat kloridin etkisi	44
Çizelge 3.17	Süperoksit Dismutaz enziminin aktivitesi üzerine BNOA'nın etkisi	44
Çizelge 3.18	Süperoksit Dismutaz enziminin aktivitesi üzerine GA'nın etkisi	46
Çizelge 4.1	G6PD'nin inhibisyonuna ait I ₅₀ değerleri	51
Çizelge 4.2	Glutatyon peroksidazın inhibisyonuna ait I ₅₀ değerleri	52
Çizelge 4.3	Glutatyon redüktazın inhibisyonuna ait I ₅₀ değerleri	53
Çizelge 4.4	Glutatyon S-transferazın inhibisyonuna ait I ₅₀ değerleri	54
Çizelge 4.5	Katalazın inhibisyonuna ait I ₅₀ değerleri	55
Çizelge 4.6	Süperoksit dismutazın inhibisyonuna ait I ₅₀ değerleri	55

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans Tez çalışmalarım sırasında her zaman bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Sayın Doç. Dr. Serap DOĞAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca çalışmalar sırasında deneyimlerinden faydalandığım saygıdeğer hocam Sayın Doç. Dr. Mehmet DOĞAN'a; ve ihtiyacım olan kan numunelerini temin etmemde yardımcı olan arkadaşlarım A. Tuğşen AYDEMİR ve M. Emin DİKEN'e teşekkür ederim.

Hayatım boyunca sabır ve desteğini benden esirgemeyen canım annem ve babam Nezaket PEKTAŞ ve Nuri PEKTAŞ'a beni yalnız bırakmadıkları için hayatım boyunca minnettarım. Bu tez onlara ithafımdır.

Balıkesir, 2009

İlknur PEKTAŞ

1. GİRİŞ

1.1 Bitki Gelişim Düzenleyicileri (BGD)

Doğal olarak bitkiler tarafından oluşturulan ya da bitkiye dışarıdan verilen, büyüme ile buna bağlı diğer fizyolojik hareketleri kontrol eden ve oluştukları yerden bitkinin başka yerlerine taşınabilen, çok az miktarda bile etkilerini gösterebilen organik maddelere “Bitki Gelişim Düzenleyicileri (BGD)” adı verilir. BGD’ler, bitki bünyesinde üretildikleri gibi, sentetik olarak da elde edilebilirler. Bir kısmı, bitkilerde uyarıcı veya teşvik edici etki gösteren BGD’lerin, bir kısmı da, büyümeyi kısıtlayıcı veya yavaşlatıcı hatta durdurucu etki gösterirler. Gelişmeyi teşvik edici ve engelleyici maddeleri birbirinden kesin sınırlarla ayırmak pek mümkün değildir. Çünkü BGD’ler bitki büyümesinin değişik devrelerinde ve değişik bitki organlarına değişik konsantrasyonlarda uygulandıklarında farklı etkiler gösterebilmektedirler [1,2].

1.2 Bitki Gelişim Düzenleyicilerinin Gruplandırılması ve Genel Özellikleri

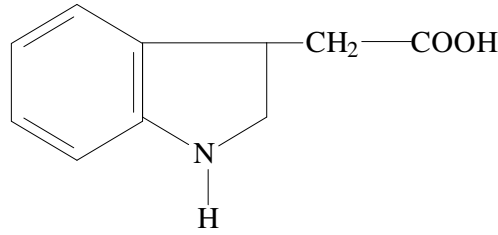
Doğal BGD’ler genel olarak 5 grupta incelenebilir. Bunlar:

- Oksinler,
- Sitokininler,
- Gibberellinler,
- Dorminler (Absissik asit) ve
- Etilen grubudur.

Bunlardan oksinler, sitokininler ve gibberellinler teşvik ediciler; dorminler ve etilen ise engelleyiciler olarak gruplandırılabilir [3].

1.2.1 Oksinler

Bitkilerde büyüme ve gelişmeyi etkileyen en önemli gruptur. Oksinin yapısı Şekil 1.1'de verilmektedir. Bitkinin gelişmesini diğer BGD'lerle birlikte gerçekleştirir. Bitki kökünde doğal olarak az bulunur. Bitkinin boyca büyümesini ve güneşe yönelmesini sağlar. Hücre bölünmesi, büyümesi, hücre ve doku farklılaşmasını düzenler. Çok fazla salgılandığında veya suni olanların fazla uygulanması halinde büyümeyi durdurur. Az salgılandığında yapraklar dökülmeye başlar. Meyve vermede etkindir. Dölllenmiş çiçeğin dökülmesini engeller. Ovaryumun gelişmesini ve çekirdeksiz meyve oluşumunu sağlar. İlbaharda kambiyum gelişimini düzenler. Suni elde edilen oksinler genelde yabancı otların yok edilmesinde kullanılır [1,4].



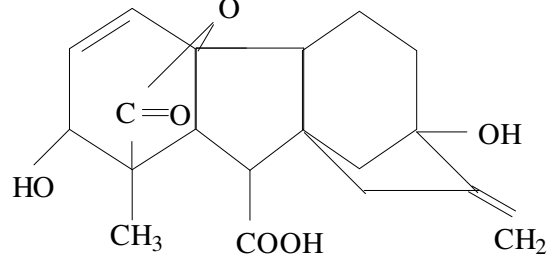
Şekil 1.1 Oksinin yapısı

Oksinler, doğal ve sentetik kaynaklı olmak üzere iki genel sınıfa ayrılırlar. Doğal oksinler, indol-3-asetik asit (IAA), 4-kloro-indol asetik asit ve fenil asetik asittir. Sentetik oksinler ise naftalen asetik asit ((NAA), β -naftoksiasetik asit (β NOA), indolbutirik asit (IBA), 3-klorofenoksipropionamit (3-CPA), 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D), 2,4,5-triklorofenoksiasetik asit (2,4,5-T) ve 2-(2,4,5-triklorofenoksi)propionik asit (2,4,5-TP)'dir [3-5].

1.2.2 Giberellinler

Giberellinler de oksinler gibi hücre büyüme ve bölünmelerini arttırarak boy uzamasını sağlarlar. Giberellinlerin yapısı aşağıda Şekil 1.2'de verilmektedir. Giberellinlerce zengin bitkilerin boğum araları uzundur. Giberellinler, oksinlere

göre ışığa daha az duyarlı olup yüksek dozlardaki uygulamalarda daha az depresif etki gösterirler.

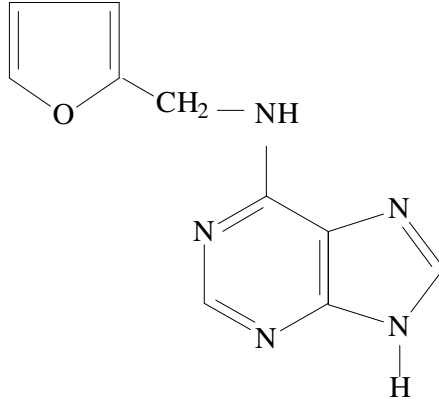


Şekil 1.2 Gibberellinin yapısı

Gibberellinlerin, tohumların dinlenme veya uyku halini yani dormansiyi kırarak çimlenmeyi teşvik ettikleri bilinmektedir. Bitkisel organlardaki dormansinin sona ermesi, gibberellin miktarındaki artış ile orantılı olmaktadır. Gibberellinlerin oksinler gibi partenokarpik meyve oluşumunu artırdıkları hatta bazen daha etkin oldukları bilinmektedir. Gibberellinler meyve gelişiminin ilk safhasında etkili olup tüm meyve ile değil, organ gelişimi ile daha iyi bir ilişki gösterirler [3,5].

1.2.3 Sitokininler

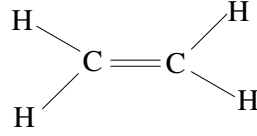
Sitokininler, diğer hormonların aksine, hem bitkilerde hem de hayvanlarda bulunur. Sitokininin yapısı Şekil 1.3'de gösterilmektedir. Hücre bölünmesini teşvik eder ve doku kültüründen bitki geliştirmek için kullanılan steril ortamlarda yer alır. Tomurcuk gelişmesi ve yaprakların geç dökülmesinde etkili olurlar. Bazı doğal ve sentetik sitokininler: zeatin, kinetin, benziladenindir [1].



Şekil 1.3 Sitokininin yapısı

1.2.4 Etilen

Basit bir bileşik olan etilenin (C₂H₄) bitkinin kendisi tarafından üretilen gaz formunda yüksek etkili bir BGD olduğu 50 yıldan beri bilinmektedir. Etilenin yapısı Şekil 1.4’de verilmektedir. Etilen tüm dokularda üretilmektedir. Etilen sentezi birçok çevre faktörüne bağlı olarak artabilir [3].

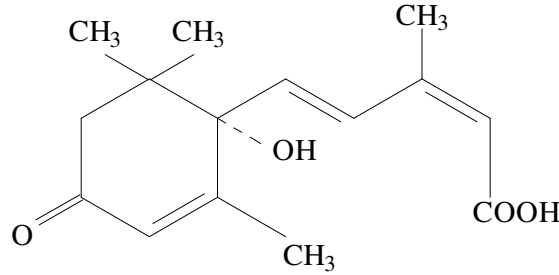


Şekil 1.4 Etilenin yapısı

Etilen bitkilerde tohumun çimlenmesini, tomurcuk gelişmesini ve meyvenin olgunlaşmasını sağlar. Olgunlaşmayı iletir, yaprak dökümüne neden olur. Bitki stres durumunda etilen oluşumunu artırır ve bitkide en çok etilen, bitki ömrünün son aşamasında bulunur. Sonbaharda yaprak dokularında saptanan etilen artışı yaprak dökümünün bir nedenidir [1].

1.2.5 Absisik Asit (ABA) (Dorminler)

Bitki gelişiminin düzenlenmesinde doğal büyüme düzenleyici maddelerinin yanında zıt yönde etki eden engelleyici doğal maddelerde bulunmaktadır. Bunların en önemlisi absisik asittir. Absisik asidin yapısı Şekil 1.5’de verilmektedir. Büyüme ve gelişme ancak büyümeyi teşvik edicilerle ABA’nın uygun oranlarda bulunmaları ile belli boyutlara ulaşabilir. Büyüme ve gelişme döneminde büyümeyi teşvik eden maddeler, bitkide hakim iken olgunlaşma veya büyümenin sonuna doğru absisik asit hakim duruma geçmekte ve büyüme kontrol altına alınmaktadır [2,4].



Şekil 1.5 Absisik asidin yapısı

Absisik asit bitkinin dinlenme fazına girişinden sorumlu bir düzenleyici olup, uyku halini (dormansi) teşvik eder ve tohumun çimlenmesini engeller. Yaprak, çiçek ve meyve dökülmesini geciktirir ve stomaların kapanmasına neden olur. Yüksek konsantrasyonda bu özelliği ile ABA kurak dönemlerde hücreleri korur. Malahit hidrazad (MH) uygulamaları ile patates ve soğanda sürgün verme engellenir [1,5,6].

1.3 Türkiye ve Dünyada BGD Kullanımı

Bitki Gelişim Düzenleyicilerinin varlığına ilişkin ilk bilgiler 19. yüzyılın sonlarına dayanmaktadır. Bu dönemde 40-50 yıllık süre içinde, bitki fizyolojisi konularında yapılan çalışmalar, BGD'lerin bitki büyüme ve gelişmesindeki rollerini ortaya koymuştur. Bu çalışmaların sonuçlarına göre, BGD'lerin bitkisel üretimde kullanılması verimi arttırmakta, üründe kaliteyi yükseltmekte, bitkilerin hastalık ve zararlılara karşı dayanıklılığını arttırmakta ve daha iyi depolama imkanları

sağlayarak, ürünlerin ihracat şansını artırmaktadır. Bu nedenle BGD'ler ülkemizde ve tüm dünya ülkelerinde kullanılmaktadır [1,2,7].

Ülkemizde BGD kullanımını çeşitli sorunlardan dolayı yeterince yaygın değildir. Ancak belli alanlarda yine de başarıyla kullanılmaktadır. Bu alanların başında örtü altı sebzeçiliği gelmektedir. Özellikle domates ve patlıcanda partenokarpik meyve tutumunu sağlamak amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu amaçla eskiden 2,4-D kullanılmaktaydı. Ancak bu BGD'nin insan sağlığına zararlı olduğu iddiaları sebebiyle yasaklanmış ve yerine 4-CPA ve BNOA kullanılması tavsiye edilmiştir. BGD'lerinden bir diğeri olan etilende muz, limon gibi meyvelerin sarartılması ve diğeri birçok meyvenin erken olgunlaştırılması amacıyla kullanılmaktadır. Gelişen pazar isteklerine bağlı olarak hızlı bir şekilde olgunlaştırılan ve piyasaya sürülen meyve ve sebzeler bugün oldukça yaygındır. Ülkemizde hemen hemen en yaygın kullanılan bir diğeri BGD ise giberellik asit (GA)'tir. Zira kirazdan üzüme, elmadan süs bitkilerine kadar geniş bir biçimde kullanım alanı bulmuştur. Genellikle üzümde, çekirdeksizliği teşvik ve meyve ve salkım büyüklüğünü artırmak amacıyla; kirazda, büyük ve sert meyve elde etmek için; diğeri bazı meyvelerde (elma, armut vs.) daha iri meyve elde etmek için ve süs bitkilerinde daha erken ve homojen çiçek açmasını sağlamak amacıyla giberellik asit kullanılmaktadır. Kullanım alanlarından biri de özellikle fidan üretimi ile ilgilenen yetiştiriciler tarafından çelikle köklendirmeyi sağlamak amacıyla IBA kullanılmasıdır. Birçok meyvenin çelikleri IBA muamelesine tabi tutulduklarında daha hızlı köklenmektedir. Bunların yanında küçük çaplı çeşitli uygulamaların da olduğu muhakkaktır [3,7,8].

1.4 Enzimler

Enzimler, metabolizma reaksiyonlarının pek çoğunu hızlandıran protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir. Her katalizör gibi enzimler de bir tepkimenin aktivasyon enerjisini (E_a veya ΔG^\ddagger) azaltarak çalışır ve böylece tepkime hızını çarpıcı şekilde artırır. Çoğu enzim tepkimesi, ona karşılık gelen ve katalizlenmeyen tepkimeden milyonlarca kere daha hızlıdır. Diğeri katalizörler gibi enzimler de katalizledikleri tepkime sonucunda tükenmez ve bu tepkimelerin dengesini

değiştirmez. Ancak, diğer çoğu katalizörden farklı olarak enzimler çok daha özgüdür (spesifiktir). Enzimlerin 4000'den fazla biyokimyasal tepkimeyi katalizlediği bilinmektedir.

1.5 Enzimatik Antioksidanlar

Aerobik organizmalarda, aerobik solunum ve substrat oksidasyonu sonucu oluşan Reaktif Oksijen Türleri (ROT), antioksidan enzim sistemleri ile detoksifiye edilirler. Hidroksi radikalleri (HO^\cdot), superoksit anyonları (O_2^\cdot) ve hidrojen peroksit (H_2O_2)'in dahil olduğu ROT'un küçük miktarları aerobik organizmalarda iç ve dış stimuluslara karşı sabit olarak üretilirler. Düşük konsantrasyonlarda ROT, hücre farklılaşmasında rol oynayan hücre içi sinyal iletimi, hücre büyümesinin durması, apoptozis, bağışıklık sistemi ve mikroorganizmalara karşı antibakteriyel etkiler gibi bir çok biyokimyasal işlemde rol oynamasına rağmen, yüksek konsantrasyonlarda yada yetersiz detoksifikasyonlarında ciddi metabolik fonksiyon bozukluğuna ve biyolojik makromoleküllerin hasarına yol açan oksidatif strese neden olur [9-11].

Antioksidanlar, enzimatik ve non-enzimatik olmak üzere iki grup altında toplanırlar. Enzimatik antioksidanlar; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon S-transferaz (GST) ve glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (G6PD); non-enzimatik antioksidanlar ise vitamin E (tokoferoller), vitamin C (askorbik asit), vitamin A (β -karoten), selenyum, transferin, laktoferrin, ürik asit, glukoz, askorbat, albumin, bilirubin ve seruloplazmindir. Antioksidanlar sıklıkla intrasellüler bazen de ekstrasellüler olabilirler.[10,12-14].

1.5.1 Glukoz 6-fosfat Dehidrogenaz

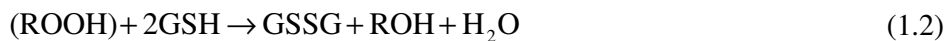
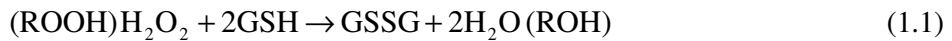
Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (D-glucose 6-phosphate: NADP^+ oxidoreductase, EC 1.1.1.49; G6PD), heksoz mono fosfat yolunun ilk basamağını katalizleyen kilit bir enzimdir. G6PD'nin iki alt monomeri olup, her biri 515 aminoasit içerir. Her bir monomerin molekül ağırlığı yaklaşık olarak 59 000 daltondur. Aktif enzim, dimer şeklinde olup NADP^+ 'ye sıkıca bağlıdır. NADP^+ 'ye

bağlı tetramer veya hegzamer yapıların da olduğu ve tetramer yapıdakilerin de enzimatik olarak aktif olduğu görülmüştür.

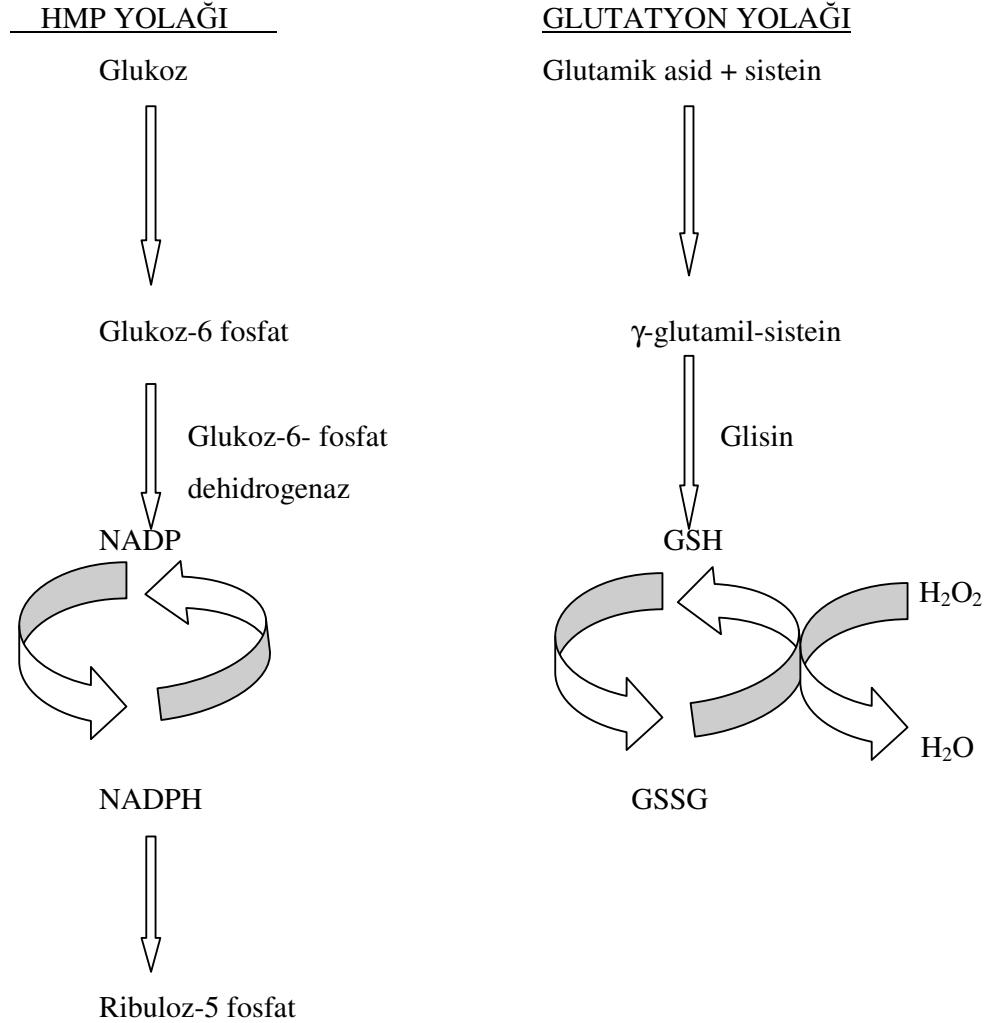
Normal eritrositte, sürekli olarak glukozun %90'ı aerobik glikolizle yıkılırken, %10'u heksoz monofosfat (HMP) yolu ile metabolize edilir ve NADPH elde edilmiş olur. HMP yolunun aktivitesi oksidatif stres durumunda belirgin bir şekilde artmaktadır. Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz, heksoz monofosfat (HMP) yolunun ilk basamağını katalizleyen kilit bir enzimdir. Eritrositlerde NADPH oluşumu için tek kaynak heksoz monofosfat metabolik yolu olup, G6PD eksikliğinde NADPH üretimi önemli ölçüde azalır. NADPH'nın eritrositlerdeki en önemli rolü oksitlenmiş glutasyonu (GSSG) indirgenmiş glutasyon (GSH) haline dönüştürmektir. Bu reaksiyon glutasyon redüktaz tarafından katalizlenir. Reaksiyon basamakları Şekil 1.6'da görülmektedir. Glutasyonun indirgenmiş formu (GSH), serbest tiol grubu içeren bir tripeptittir (g-glutamil sisteinil glisin). Serbest tiol grubu, hemoglobin ve eritrosit proteinlerini indirgenmiş halde tutarak sülfhidril tamponu görevi görür; aynı zamanda H₂O₂ ve organik peroksitlerle reaksiyona girerek detoksifikasyon olaylarında rol alır [15].

1.5.2 Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)

Glutasyon peroksidazın, selenyum (Se)-bağımlı (GSH-Px, EC 1.11.1.19) ve Se-bağımsız (glutasyon-S-transferaz, GST, EC 2.5.1.18) olmak üzere iki izoformu vardır. Bu iki enzimin alt ünite sayıları ve katalitik mekanizmaları farklıdır. Glutasyon mekanizması çok önemli antioksidatif savunma mekanizmalarından biridir. GSH-Px karaciğerde en yüksek; kalp, akciğer ve beyinde orta; kasta ise düşük düzeyde aktivite gösterir. Aşırı düzeylerde H₂O₂ varlığında redükte glutasyonun (GSH) okside glutasyona (GSSG, glutasyon disülfid) dönüşümünü katalize eder. Bu arada H₂O₂ (hidrojen peroksit) de suya dönüştürülerek detoksifiye olur.



GST, glutatyonun tiyol (-SH) grupları ile alkilasyon ajanlarının reaksiyonunu kataliz ederek onların elektrofilik alanlarını yok eder. Başta araşidonik asit ve linoleat hidroksiperoksitleri olmak üzere lipit hidroksiperoksitlere (ROOH) karşı GST'lar bağımsız glutatyon peroksidaz aktivitesi gösterirler [16,17].



Şekil 1.6 HMP ve Glutasyon yolağı

1.5.3 Glutasyon Redüktaz (GR)

Glutasyon redüktaz, GSH-Px vasıtasıyla hidroperoksitlerin indirgenmesi sonucu oluşan okside glutatyonun (GSSG) tekrar indirgenmiş glutatyon (GSH) dönüşümünü katalize eder [18].



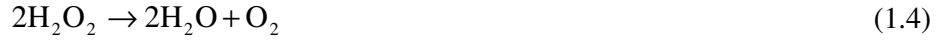
Glutasyon redüktazın kalıtımı, otozomal dominanttır ve 8. kromozom üzerindedir. Glutasyon peroksidaz ile benzer doku dağılımı gösterir. Glutasyon redüktaz, flavin adenin dinükleotid (FAD) içerir; NADPH'tan bir elektronun GSSG'nin disülfüd bağlarına aktarılmasını katalizler. Bu nedenle NADPH serbest radikal hasarına karşı gereklidir ve ana kaynağı pentoz fosfat yoludur [19].

1.5.4 Glutasyon S-Transferazlar (GST)

Glutasyon S-transferazlar (GST), EC 2.5.1.18 kodlu ve her biri iki alt birimden oluşmuş bir enzim ailesidir. GST, başta araşidonik asit ve lineolat hidroperoksitleri olmak üzere lipid peroksitlerine karşı selenyum-bağımsız GSH-Px aktivitesi göstererek bir antioksidan savunma mekanizması oluştururlar. GST'lar katalitik ve katalitik olmayan çok sayıda fonksiyona sahiptirler. Bunlar hem detoksifikasyon yaparlar hem de hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcı rolleri vardır. GST'lar, karaciğerde sitokrom P450 enzim sistemi tarafından reaktif ara ürünlere dönüştürülen yabancı maddelerin daha az reaktif konjugatlara dönüşümünü katalizlerler. Serum GST konsantrasyon tayininin, aminotransferazlardan (AST ve ALT) daha duyarlı bir hepatosellüler hasar indeksi sağladığı gösterilmiştir [18].

1.5.5 Katalaz (CAT)

Katalaz (EC 1.11.1.6) bitki, hayvan ve aerobik bakterilerde bulunan ve hidrojen peroksitin (H_2O_2), su ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir. Esas olarak peroksizomlarda lokalizedir ve yapısında 4 adet *hem* molekülü bulunan bir hemoproteindir. Karaciğer ve eritrositler, katalazın en yüksek aktiviteye sahip olduğu organlardır. Katalaz, hücreyi respiratuvar patlamalara karşı da koruyucu olarak hizmet eder. Katalazın indirgeyici aktivitesi, hidrojen peroksitin yanı sıra metil-, etil- hidroksiperoksitler gibi küçük moleküllu lipid hidroperoksitlerininide içine alır [16, 20].



1.5.6 Süperoksit dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz (EC 1.15.1.1, EC-SOD) süperoksit serbest radikalinin (O_2^-) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimdir.



İnsanda süperoksit dismutazın iki izomer tipi bulunmaktadır. Cu-Zn SOD, sitozolde bulunur; Cu ve Zn içerir; dimerik yapıdadır ve siyanidle inhibe edilir. Mn SOD, mitokondride bulunur; Mn içerir, tetramerik yapıdadır ve siyanidle inhibe olmaz. Genel olarak hücrede en bol bulunan izomer sitozolik Cu-Zn SOD'dır.

SOD'ın fizyolojik fonksiyonu, oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikalinin (O_2^-) lipid peroksidasyonu gibi zararlı etkilerine karşı korumaktır. SOD, fagosite edilmiş bakterilerin intrasellüler öldürülmesinde de rol oynar. SOD aktivitesi, yüksek oksijen kullanımı olan dokularda fazladır ve doku pO_2 artışıyla artar. SOD'nin ekstrasellüler aktivitesi çok düşüktür. Cu-Zn SOD'nin spesifik aktivitesi Down sendromlu hastaların eritrositlerinde yüksek, prematürelere ve yaşlıların eritrositlerinde ve psöriyazisli hastaların lökositlerinde düşük bulunmuştur [18].

1.6 Literatür Özeti

Karakuş ve Köker, Bitki gelişim düzenleyicilerinin (BGD) tarımda kullanımı ve hormonların riskini araştırmışlardır [1]. Yılmaz ve arkadaşı, indol-3-asetik asitin üçüncül nesil farelerin kemik iliği hücrelerinde mitotik indeks üzerinde etkilerini araştırmışlar ve IAA'nın mitotik indeksi aktive ettiğini tespit etmişlerdir [2]. Akgül, Bitki gelişim düzenleyicilerinin özelliklerini ve kullanım alanlarını araştırmıştır [3]. Can ve Hatipoğlu, besi ortamı, oksin çeşidi ve konsantrasyonunun sarı sakal otu

(*Bothriochloa ischaemum* (L.) Keng) bitkisinin genç salkımlarından kallus oluşumu ve bitki rejenerasyonuna etkisini belirlemişlerdir [4]. Ünyayar, tuz stresine maruz bırakılan *Funalia trogii* (Berk.) Bondartsev & Singer ve *Phanerochaete chrysosporium* Burds. ME446'daki absisik asit ve indol-3-asetik asit konsantrasyonlarındaki değişimleri incelemişlerdir [5]. Kireççi, bazı sentetik hormonların (giberillik asit, spermin, spermidin, putresin) fesleğen (*Ocimum basilicum*) bitkisinde morfolojik yapı ve uçucu yağ kalitesine etkisini araştırmışlar ve farklı hormon gruplarının bitki morfolojisine etkilerinin farklı olduğunu bulmuşlardır [6]. Yılmaz ve Yüksel, IAA'nın F2 nesil farelerde böbrek katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz enzim aktivitelerine etkisini araştırmışlardır [7]. Çelik ve arkadaşları, indolasetik asit ve kinetinin sıçanların çeşitli dokularındaki lipid peroksidasyon düzeyi üzerine etkisini incelemişlerdir [8]. Canbay ve arkadaşları, tiroid kanseri olan hastalarda antioksidan enzimlerden glutatyon peroksidaz aktivitesi ve lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehid (MDA) düzeylerini belirlemişlerdir [9]. Yarıktaş ve arkadaşları, baş-boyun malign tümörlerinde malondialdehit düzeyleri ve antioksidan enzim aktivitelerin araştırmışlar, çalışma grubundaki hastaların eritrosit malondialdehit düzeyleri ve süperoksit dismutaz aktivitelerinin kontrol grubuna göre daha yüksek, katalaz aktivitelerinin azaldığını ($p<0.05$) belirlemişlerdir [10]. Gürgöze ve arkadaşları, memelilerde ortalama yaşam süresi ve yaşlanma sürecinde serbest radikallerin rolünü araştırmışlardır [11]. Tosun ve Karadeniz, çayın fenolik madde içeriği, antioksidan özelliği ve çaydaki fenolik maddelerin sağlık üzerine etkisini araştırmışlardır [12]. Kızıl ve Gül, şap aşısı uygulanan besi tosunlarında aşılama öncesi ve sonrasında klinik ve hematolojik parametreler ile antioksidan enzimler ve lipid peroksidasyon düzeylerine antioksidan vitaminlerin etkisini araştırmışlardır [13]. Yüce ve Aksakal, sağlıklı ratların karaciğer ve testis dokularındaki antioksidan aktivite üzerine nar suyunun etkilerini araştırmışlardır [14]. Büyükokuroğlu ve Süleyman, glukoz 6-fosfat dehidrogenaz eksikliğini araştırmıştır [15]. Rencüzoğulları, ratlarda deneysel olarak oluşturulan kadmiyum toksikasyonu üzerine likopenin etkilerini araştırmıştır. Bu araştırmada, önemli bir çevre kirleticisi olan kadmiyumun böbreklerde oluşturduğu toksikasyon üzerine antioksidan etkili beta-karotenlerden likopenin olası faydalı etkileri deneysel olarak ratlarda araştırmıştır [16]. Fadıllıoğlu ve arkadaşları, depresyonlu olgularda egzersiz sonrası plazma glutatyon peroksidaz ve ksantin oksidaz aktiviteleri ile

plazma NO seviyesinde meydana gelen değişimleri incelemişlerdir [17]. Serbest oksijen radikallerin ve antioksidanların etki mekanizmaları belirtilmiştir [18]. Antmen, Beta talasemide oksidatif stresi araştırmıştır [19]. Ezberci ve arkadaşları, sıçanlarda karın içi yapışıklıkları önlemede intraperitoneal katalazın etkisini belirlemeye çalışmışlardır [20]. elik ve arkadaşları, bazı bitki büyüme düzenleyicilerinin subkronik uygulanmasının sıçanların serum enzim düzeyleri üzerine etkilerini araştırmışlardır [21]. Siliğ ve arkadaşları, LD10(3 mg/ml) ve LD30(9 mg/ml) dozlarında daminozid (süksinik asit, 2,2- dimetilhidrazid) uygulanmış Ross Pm-3 ırkı döletli tavuk yumurtalarından çıkarılan civcivlerin karaciğer mikrozomal nitrozodimetilamin demetilaz (NDMAd) ve sitoplazmik glutatyon-S-transferaz (GST) aktivitelerini incelemiştir [22]. Yeşilada, *Drosophila melanogaster*'in somatik mutasyon ve rekombinasyon testi kullanılarak Etil metansülfonat ile indüklenmiş mutant kanat benekleri üzerine bitki büyüme hormonlarının (kinetin, gibberellic asit (GA3) ve indol asetik asit (IAA)) etkisi araştırmıştır [23]. Küfrevioğlu ve arkadaşı, antiemetik ilaçların glukoz-6- fosfat dehidrogenaz ve bazı antioksidan enzimler üzerindeki etkilerini araştırmıştır [24]. Erdoğan ve arkadaşları, sublethal üre ve amonyak konsatrasyonun *Oncorhynchus mykiss* eritrosit glukoz-6 fosfat dehidrogenaz üzerine inhibisyonunu araştırmıştır [25]. Çiftçi ve arkadaşları, bazı ilaçların *Chalcalburnus Tarischii* balığının hepatik glukoz-6- fosfat dehidrogenaz enzimi üzerindeki etkilerini araştırmıştır [26]. Küfrevioğlu ve arkadaşları, insan ve fare eritrositindeki glukoz-6- fosfat dehidrogenaz enzimi üzerinde metamizol ve magnezyum sülfatın etkilerini araştırmışlardır [27]. Özmen, glukoz 6-fosfat dehidrogenaz üzerine bazı sitotoksik kimyasalların etkisini araştırmıştır [28]. Bosch-Morell ve arkadaşları 4-hidroksinonenalın glutatyon peroksidaz üzerindeki inhibisyonunu araştırmıştır [29]. şentürk, glutatyon redüktaz enziminin insan eritrositlerinden Saflaştırmış ve bazı ilaçların enzim aktivitesi üzerine etkilerinin araştırmışlardır [30]. Küfrevioğlu ve arkadaşları, bazı metallerin insan eritrositlerinden saflaştırılan glutatyon redüktaz enzimi üzerine *in vitro* etkilerini İncelenmiştir [31]. Cho ve arkadaşları, bir tau pirinç klonundan elde edilen glutatyon S transferaz izoenzimlerini ve substrat spesifiklerini karaterize etmişlerdir [32]. Dou ve arkadaşları, Liposcelisin üç ırkından saflaştırılan GST enziminin böcek ilaçlarına karşı dirençlerini araştırmışlardır [33]. Rangel ve arkadaşları, *Neurospora crassa*'nın katalaz-1

enziminin moleküler ve kinetiğini çalışmıştır [34] Lanza ve arkadaşı, siklodestrinle uyumlu süperoksit dismutaz ve katalazın yeni bileşiklerini araştırmışlardır [35]. Puglisi ve arkadaşları, manganez salen liganlı siklodekstrin biobileşiği ile süperoksit dismutazın aktivitesini araştırmışlardır [36]. Kostyuk ve arkadaşları, Süperoksit dismutaz enziminin flavanoid metal bileşikleriyle uyumunu araştırmıştır [37].

1.7 Çalışmanın Amacı

Biyolojik sistemlerde endojen ve ekzojen kökenli stres faktörleri nedeniyle sürekli olarak serbest radikaller ve diğer oksijen kökenli türler üretildiğinden, hücre bu stres faktörlerine maruz kalmayı sınırlamak için güçlü ve kompleks enzimatik ve moleküler antioksidan savunma sistemleri geliştirmiştir. Bu savunma mekanizmalarını, serbest radikal tutucuları (non enzimatik moleküller) ve antioksidan enzimler oluşturmaktadır. BGD'ler başlangıçta yalnız tohumların çimlenmesinde, meyve, fidan ve çeliklerin köklendirilmesinde kullanılmıştır. Daha sonra tohumdan hasada kadar geçen devrede verim artışı, ürün kalitesinin yükseltilmesi ve bitkilerin hastalık ve zararlılara karşı dayanıklılığın artırılması amacıyla ülkemizde ve tüm dünya ülkelerinde kullanılmaya başlanmıştır. Bugüne kadar bazı üreticileri bu düşünceden caydırmak mümkün olmamıştır. Oysa bu fazla uygulamaların insan sağlığına verdiği zararlar yanında, meyve kalitesini bozduğu, verimi arttırmak yerine azalttığı da bir gerçektir. BGD'ler, standartlar gözetilmeden, teknik elemanlara danışılmadan, yüksek dozda kullanıldığında insan metabolizmasını olumsuz yönde etkilemekte, ekolojik dengenin bozulmasına sebep olmaktadır. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda BGD'lerden özellikle 2,4-D'nin davranış, şekil, genetik yapı ve sinir sistemi bozukluklarına neden olduğu bilinmektedir. Bugün bu maddenin yerine 4-CPA ve BNOA'nın kullanılmasına izin verilmiştir. Ancak yapılan literatür taramalarında BGD'lerin insan kanındaki antioksidan enzimler üzerindeki etkileriyle ilgili herhangi bir araştırmaya rastlanmamıştır. Bu nedende; bu çalışmada BGD'lerin insan kanındaki glukoz-6- fosfat dehidrogenaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, glutatyon-S-transferaz, katalaz ve süperoksit dismutaz enzimleri üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışmada

elde edilecek veriler ile BGD'lerin antioksidan enzim aktiviteleri üzerindeki etkileri belirlenecektir.

2. MATERYAL VE METOT

2.1 Materyal

Bu çalışmada kullanılan kan numuneleri sağlıklı bireylerden EDTA'lı tüplere her deney öncesi taze olarak alındı. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler Merck ve Sigma'dan satın alındı. Enzim aktiviteleri ise Perkin Elmer Lamda 25 UV-Visible spektrofotometre kullanılarak belirlendi.

2.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4)
2. Hidrojen peroksit (H_2O_2)
3. Giberellik asit
4. Mepiquat klorür
5. β -naftoloksiasetik asit (BNOA)
6. Ksantin
7. Ksantin oksidaz
8. Tris base
9. Etilendiamin tetraasetikasit (EDTA)
10. INT (2-[4-iyodofenil]-3-[4-nitrofenil]-5-feniltetrazolyum klorür)
11. Okside glutatyon (GSSG)
12. Redükte glutatyon (GSH)
13. Nikotinamidadeninükleotidfosfat (NADPH)
14. Nikotinamidadeninükleotidfosfat (NADP^+)
15. Glukoz-6 fosfat
16. Magnezyum klorür (MgCl_2)
17. Glutatyon redüktaz
18. t- bütül hidroperoksit
19. 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB)

2.1.3 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

1. Lamda 25 UV-Visible : Perkin Elmer
2. pH-metre : Orian 920A
3. Otomatik pipetler : Brand
4. Terazi : Denver
5. Etüv : Memmert
6. Soğutmalı santrifüj : Sigma 3K 30
7. Manyetik karıştırıcı : Heildolp

2.2 Çalışmada Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları

1. 0,05 M fosfat tamponu (pH:7.0): 3,549 gr potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) alınarak bir miktar saf suda çözülür ve pH 7'ye ayarlandıktan sonra toplam hacim saf su ile 500 mL'ye tamamlanır.
2. 0,019 M H_2O_2 : 0,1 mL hidrojen peroksit (H_2O_2) alınır bir miktar saf suda çözülür ve toplam hacim 50 mL'ye tamamlanır.
3. 0,05 M giberellik asit (MA: 424 g/mol) : %10'luk giberellik asitten 0,018 gr alınır bir miktar saf suda çözüldükten sonra toplam hacim 100 mL'ye tamamlanır.
4. 0,05 M mepiquat klorür (MA: 149,5 g/mol) : 5 mL mepiquat klorür alınır, bir miktar saf suda çözüldükten sonra toplam hacim 100 mL'ye tamamlanır.
5. BNOA (MA; 202 g/mol): 5 mL BNOA alınır, bir miktar saf suda çözüldükten sonra toplam hacim 100 mL'ye tamamlanır.
6. 1.10^{-4} M ksantin stok çözeltisi: 0,0015 gr ksantin bir miktar saf suda çözüldükten sonra toplam hacim 100 mL'ye tamamlanır.
7. Ksantin oksidaz: 10 mg ksantin oksidaz 10 mL fosfat tamponunda çözülür.
8. 1.10^{-4} INT: 0,0025 gr INT alınır, bir miktar saf suda çözüldükten sonra toplam hacim 50 mL'ye tamamlanır.
9. 1 M Tris-EDTA/5mM EDTA (pH:8): 6,05 gr Tris ve 0,073 gr EDTA bir miktar saf suda çözüldükten sonra pH 8'e ayarlanır ve daha sonra toplam hacim 50 mL'ye tamamlanır.

10. 0,033 M okside glutasyon (GSSG): 0,2 gr GSSG alınır, bir miktar saf suda çözüldükten sonra toplam hacim 10 mL'ye tamamlanır.
11. 2 mM NADPH (nikotinamid adenin dinükleotidfosfat, indirgenmiş hal): 0,0167 gr NADPH alınır, bir miktar saf suda çözüldükten sonra toplam hacim 10 mL'ye tamamlanır.
12. 2 mM NADP (nikodinamid adenin dinükleotidfosfat, yükseltgenmiş hal): 0,0513 gr NADP⁺ alınır, bir miktar saf suda çözüldükten sonra toplam hacim 10 mL'ye tamamlanır.
13. 6 mM G6P (glukoz-6-fosfat): 0,055 gr G6P alınır, bir miktar saf suda çözüldükten sonra toplam hacim 30 mL'ye tamamlanır.
14. 0,1 M MgCl₂ (magnezyum klorür): 0,285 gr MgCl₂ alınır, bir miktar saf suda çözüldükten sonra toplam hacim 30 mL'ye tamamlanır.
15. 0,1 M redükte glutasyon (GSH): 0,155 gr GSH alınır, bir miktar saf suda çözüldükten sonra toplam hacim 5 mL'ye tamamlanır.
16. 0,01 M glutasyon redüktaz: 0,1 gr glutasyon redüktaz alınır, bir miktar Tris-EDTA içerisinde çözülüp sonra toplam hacim 10 mL'ye tamamlanır.
17. 7 mM t-bütül hidroperoksit: 1 mL t-bütül hidroperoksit alınır ve 1143 mL saf su ile karıştırılır.
18. 30 mM CDNB: 0,03 gr CDNB (1-kloro-2,4- dinitrobenzen) tartıldıktan sonra 5 mL saf etanolde çözülür.

2.3 Hemolizat Hazırlanışı

Eritrosit antioksidan enzim aktivite ölçümleri için sağlıklı genç bireylerden steril vakum enjektörlerle 2 mL civarında venöz kan alınmıştır. Kanlar eppendorf tüplere aktarıldıktan sonra +4° C'de 15 dk 2500 rpm'de santrifüj edilmiştir. Ardından üst kısımda kalan plazma atılıp eritrositlerde 0,16 M'lık KCl ile +4 °C'de 5 dk 2500 rpm'de 3 kez yıkandıktan sonra soğuk saf su ile 1/5 oranında seyreltilerek +4°C'de 10000 rpm'de 30 dk santrifüj edilerek eritrositler parçalanmıştır [38].

2.4 Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

2.4.1 Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz Enzim Aktivitesinin Ölçümü

Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak 340 nm dalga boyunda reaksiyon sonunda oluşan NADPH'ın absorpsiyon artışı sonucu ölçülmüştür. G6P hariç yukarıdaki kimyasallar küvete konduktan sonra 37°'de 10 dk inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra numune ve köre 300 µL G6P ilave edilmiş ve ardından 340 nm'de 2 dk süreyle absorbans kaydedilmiştir. Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz aktivitesi Çizelge 2.1'de verilen içerik kullanılarak ölçülmüştür [39,40].

Çizelge 2.1 Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz aktivite ölçümü için kullanılan maddelerin hacimleri

Küvet içeriği	Numune (µL)	Kör (µL)
Distile su	1650	1800
Tris-EDTA	300	300
MgCl ₂	300	300
NADP ⁺	300	300
Hemolizat	150	----
G6P	300	300

2.4.2 Glutasyon Peroksidaz Enzim Aktivitesinin Ölçümü

GSH-Px ile t-bütil hidroperoksit varlığında GSH'nin GSSG'ye oksidasyonu gerçekleşir. Yöntem, bu oksidasyon sonucu oluşan GSSG'nin glutasyon redüktaz (GSHRd) enzimi ile tekrar GSH'ye indirgenmesi tepkimesinde NADP'ye oksitlenen NADPH'nin 340 nm dalga boyundaki absorbans değeri farkının zamana karşı okunması prensibine dayanır. Glutasyon peroksidaz aktivitesi Çizelge 2.2'de verilen içerik kullanılarak ölçülmüştür.

Köre ve küvete yukarıdaki kimyasallar eklendikten sonra 37° C’de 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Ardından numune küvetine t-bütilhidroperoksit ilave edilmiş ve köre karşı aktivite ölçülmüştür [39,40].

Çizelge 2.2 Glutasyon peroksidaz aktivite ölçümü için kullanılan maddelerin hacimleri

Küvet içeriği	Numune (µL)	Kör (µL)
Tris-EDTA	300	300
GSH	60	60
Glutasyon redüktaz	300	300
NADPH	300	300
Hemolizat	30	-----
Distile su	1980	2010
t-butilhidroperoksit	30	30

2.4.3 Glutasyon Redüktaz Enzim Aktivitesinin Ölçümü

Glutasyon redüktaz, GSSG’nin NADPH tarafından GSH’a indirgenmesini katalize eder. Enzim aktivitesi, tepkime sırasında yükseltgenen NAD(P)H’nin 37 °C’de 340 nm dalga boyunda absorbans farkı ölçülerek belirlenir. Glutasyon redüktaz aktivitesi Çizelge 2.3’de verilen içerik kullanılarak ölçülmüştür [39,40].

Çizelge 2.3 Glutasyon redüktaz aktivite ölçümü için kullanılan maddelerin hacimleri

Küvet içeriği	Numune (µL)	Kör (µL)
Distile su	2370	2400
Tris-EDTA	150	150
NADPH	150	150
GSSG	300	300
Hemolizat	30	-----

2.4.4 Glutasyon S-Transferaz Enzim Aktivitesinin Ölçümü

Glutasyon s-transferaz, 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) ile glutasyonun –SH grubu arasındaki tepkimeyi katalizler. Enzim aktivitesi 340 nm’de 37 °C’de GSH ve CDNB kullanılarak dakikada oluşan S-2,4-dinitrofenilglutasyonun 1 mikro molunu katalizleyen enzim miktarının ölçülmesiyle belirlenir. Glutasyon s-transferaz aktivitesi Çizelge 2.4’de verilen içerik kullanılarak ölçülmüştür [40,41].

Çizelge 2.4 Glutasyon S-transferaz aktivite ölçümü için kullanılan maddelerin hacimleri

Küvet içeriği	Numune (µL)	Kör (µL)
Fosfat tamponu	2650	2800
CDNB	60	60
GSH	150	150
Hemolizat	150	-----

2.4.5 Katalaz Enzim Aktivitesinin Ölçümü

Katalaz, H₂O₂’nin su ve moleküler oksijene yıkımını katalizler. H₂O₂’nin ışığı absorbe etmesinden yararlanılarak 240 nm’de enzimin yıkım hızı spektrofotometrik olarak ölçülür. Katalaz aktivitesi Çizelge 2.5’de verilen içerik kullanılarak ölçülmüştür.

Çizelge 2.5 Katalaz aktivite ölçümü için kullanılan maddelerin hacimleri

Küvet İçeriği	Numune (µL)	Kör (µL)
Fosfat tamponu	2400	2500
H ₂ O ₂	500	500
Hemolizat	100	-----

Köre ve numune küvetine yukarıdaki kimyasallar eklendikten sonra 240 nm’de 5 dk boyunca köre karşı aktivite ölçülmüş ve absorbanstaki düşüş 1’er dakika aralıklarla kaydedilmiştir. Daha sonra farklı konsantrasyonlarda bitki gelişim düzenleyicilerinin katalaz enzim aktivitesi üzerine etkileri ölçülmüştür [42,43]

2.4.6 Süperoksit Dismutaz Enzim Aktivitesinin Ölçümü

Süperoksit dismutaz enzimi, oksidatif enerji üretimi sırasında oluşan toksik süperoksit radikallerinin, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) dismutasyonunu hızlandırır. Yöntemde ksantin ve ksantin oksidaz (XOD) kullanılarak 2-[4-iyodofenil]-3-[4-nitrofenol]-5-feniltetrazolium klorür (INT) ile tepkimeye giren ve kırmızı renkli formazon boyası oluşturan süperoksit radikalleri üretilmektedir. Enzim aktivitesi ölçümü ise reaksiyonun 505 nm’de ortamda bulunan SOD enzimi ile inhibisyonuna dayanır. SOD aktivitesi Çizelge 2.6’da verilen içerik kullanılarak ölçülmüştür [44]

Çizelge 2.6 SOD aktivite ölçümü için kullanılan maddelerin hacimleri

Küvet içeriği	Numune (μL)	Kör (μL)
Fosfat tamponu	1525	1650
Ksantin oksidaz	250	250
Ksantin	500	500
INT	600	600
Hemolizat	125	-----

3. BULGULAR

Bitki gelişim düzenleyici maddelerin antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkileri araştırılmış ve elde edilen deneysel bulgular aşağıda verilmektedir.

3.1 BGD'lerin Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz Enzim Aktivitesine Etkileri

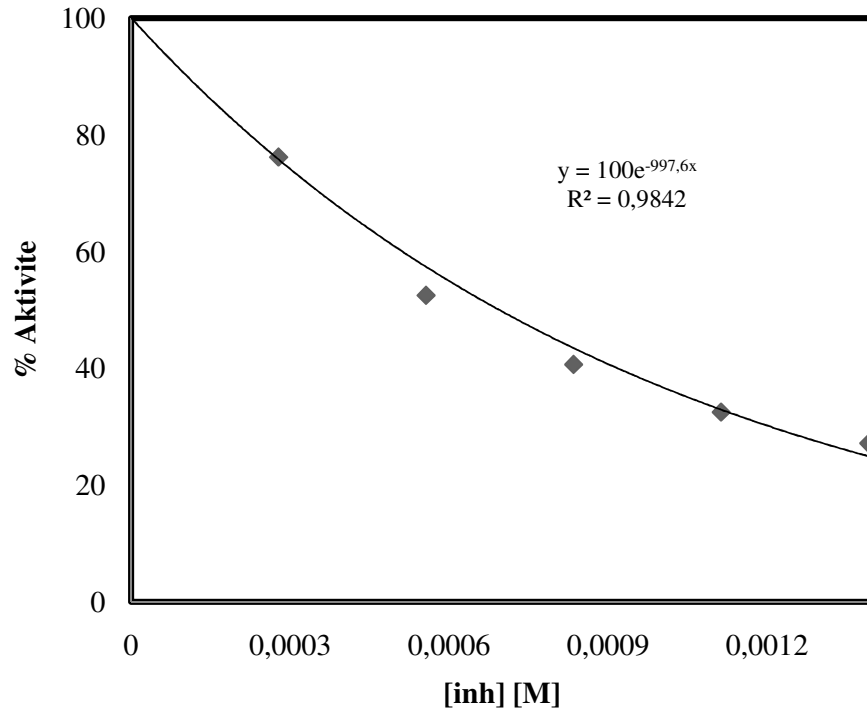
Mepiquat klorür, BNOA ve giberellik asitin glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine etkileri spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve elde edilen deneysel veriler Çizelge 3.1-3.3'de verilerek sırasıyla Şekil 3.1-3.3'de grafik edilmiştir. Şekillerden görüldüğü gibi bitki gelişim düzenleyici maddelerin konsantrasyonlarının artması ile enzim aktivitelerinin azaldığı bulunmuştur.

Çizelge 3.1 Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine mepiquat klorürün etkisine ait deneysel veriler ([İnh]=0,0167 M; [MgCl₂]=0,1 M; [Tris-EDTA]=1 M; [NADP]=2 mM; [G6P]=6 mM)

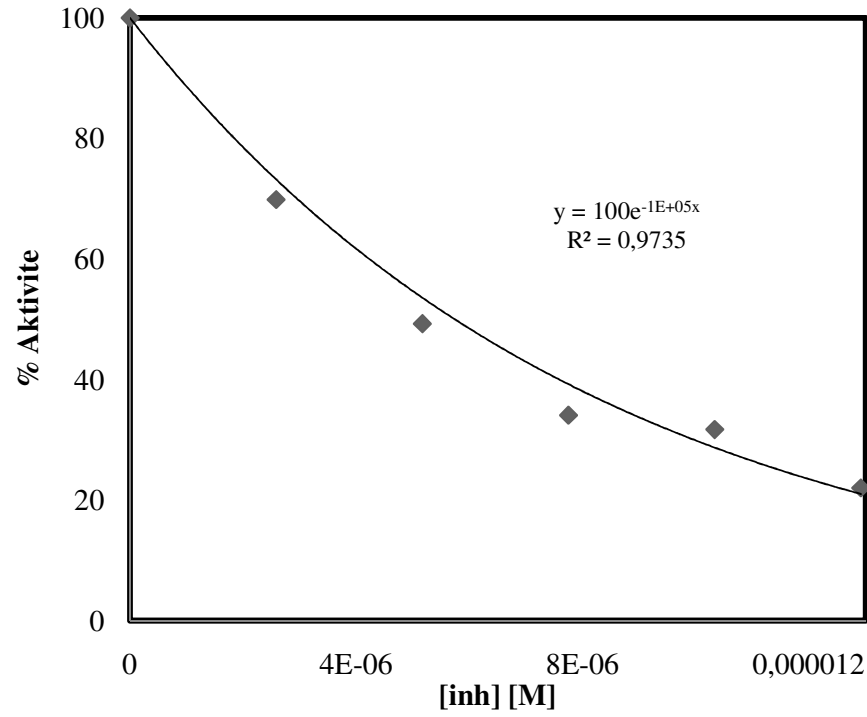
Deney No	Aktivite ölçümü							Aktivite	% Aktivite	[İnh]x10 ⁺⁴
	Tris-EDTA (µL)	NADP (µL)	MgCl ₂ (µL)	G6P (µL)	Su (µL)	Hemolizat (µL)	İnhibitör (µL)			
1	300	300	300	300	1650	150	0	0,193	100	0
2	300	300	300	300	1600	150	50	0,147	76,2	2,78
3	300	300	300	300	1550	150	100	0,101	52,5	5,57
4	300	300	300	300	1500	150	150	0,078	40,7	8,85
5	300	300	300	300	1450	150	200	0,063	32,5	11,13
6	300	300	300	300	1400	150	250	0,052	27,2	13,92

Çizelge 3.2 Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine BNOA'nın etkisine ait deneysel veriler ([İnh]=0,00155 M; [MgCl₂]=0,1 M; [Tris-EDTA]=1 M; [NADP]=2 mM; [G6P]=6 mM)

Deney No	Aktivite ölçümü							Aktivite	% Aktivite	[İnh]x10 ⁺⁵
	Tris-EDTA (µL)	NADP (µL)	MgCl ₂ (µL)	G6P (µL)	Su (µL)	Hemolizat (µL)	İnhibitör (µL)			
1	300	300	300	300	1650	150	0	0,245	100	0
2	300	300	300	300	1600	150	50	0,171	69,9	3
3	300	300	300	300	1550	150	100	0,121	49,3	5
4	300	300	300	300	1500	150	150	0,083	34,1	8
5	300	300	300	300	1450	150	200	0,077	31,7	10
6	300	300	300	300	1400	150	250	0,054	22,0	13



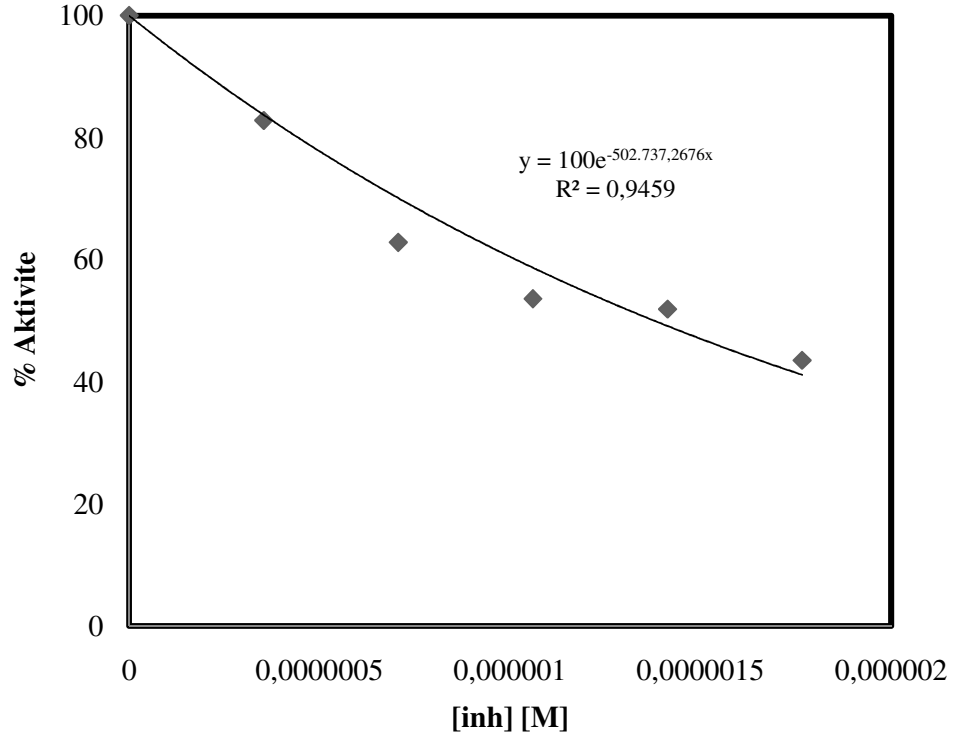
Şekil 3.1 G6PD enzim aktivitesi üzerine mepiquat klorürün etkisi



Şekil 3.2 G6PD enzim aktivitesi üzerine BNOA'nın etkisi

Çizelge 3.3 Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine giberellik asitin etkisine ait deneysel veriler ([İnh]=0,0000212 M; [MgCl₂]=0,1 M; [Tris-EDTA]=1 M; [NADP]=2 mM; [G6P]=6 mM)

Deney No	Aktivite ölçümü							Aktivite	% Aktivite	[İnh]x10 ⁺⁶
	Tris-EDTA (µL)	NADP (µL)	MgCl ₂ (µL)	G6P (µL)	Su (µL)	Hemolizat (µL)	İnhibitör (µL)			
1	300	300	300	300	1650	150	0	0,303	100	0
2	300	300	300	300	1600	150	50	0,251	82,8	4
3	300	300	300	300	1550	150	100	0,190	62,9	7
4	300	300	300	300	1500	150	150	0,162	53,6	11
5	300	300	300	300	1450	150	200	0,157	51,9	14
6	300	300	300	300	1400	150	250	0,132	43,4	18



Şekil 3.3 G6PD enzim aktivitesi üzerine giberellik asitin etkisi

3.2 BGD'lerin Glutatyon Peroksidaz Enzim Aktivitesine Etkileri

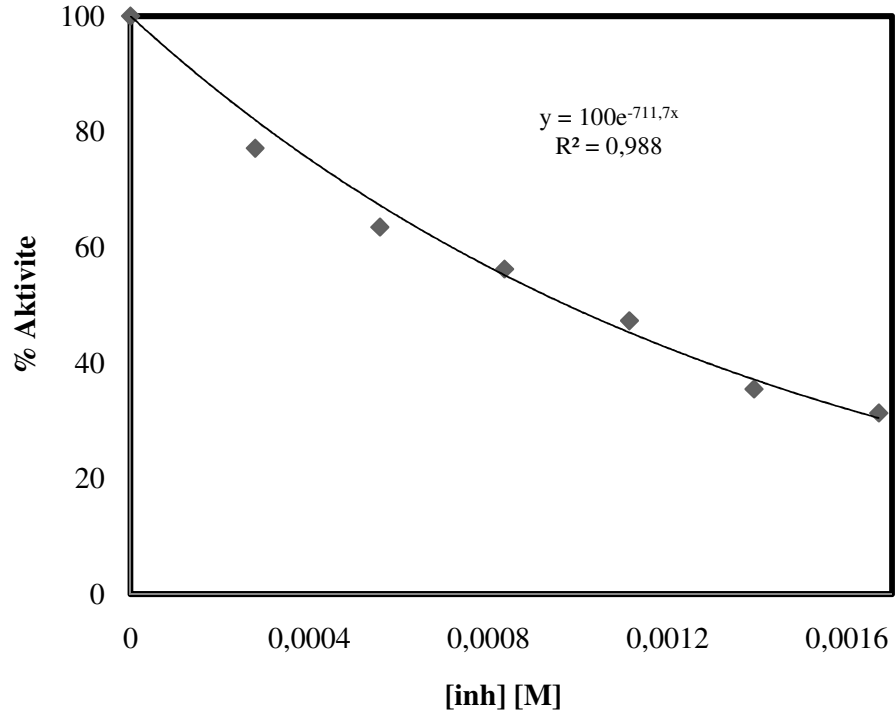
Mepiquat klorür, BNOA ve giberellik asitin glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine etkileri spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve elde edilen deneysel veriler Çizelge 3.4-3.6'da verilerek sırasıyla Şekil 3.4-3.6'da grafik edilmiştir. Şekillerden görüldüğü gibi bitki gelişim düzenleyici maddelerin konsantrasyonlarının artması ile enzim aktivitesinin azaldığı bulunmuştur.

Çizelge 3.4 Glutasyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine mepiquat klorürün etkisine ait deneysel veriler ([İnh]=0,0167 M; [GR]=0,01 M; [Tris-EDTA]=1 M; [NADPH]=2 mM; [GSH]=0,1M; [t-bütil hidroperoksit]=7 mM)

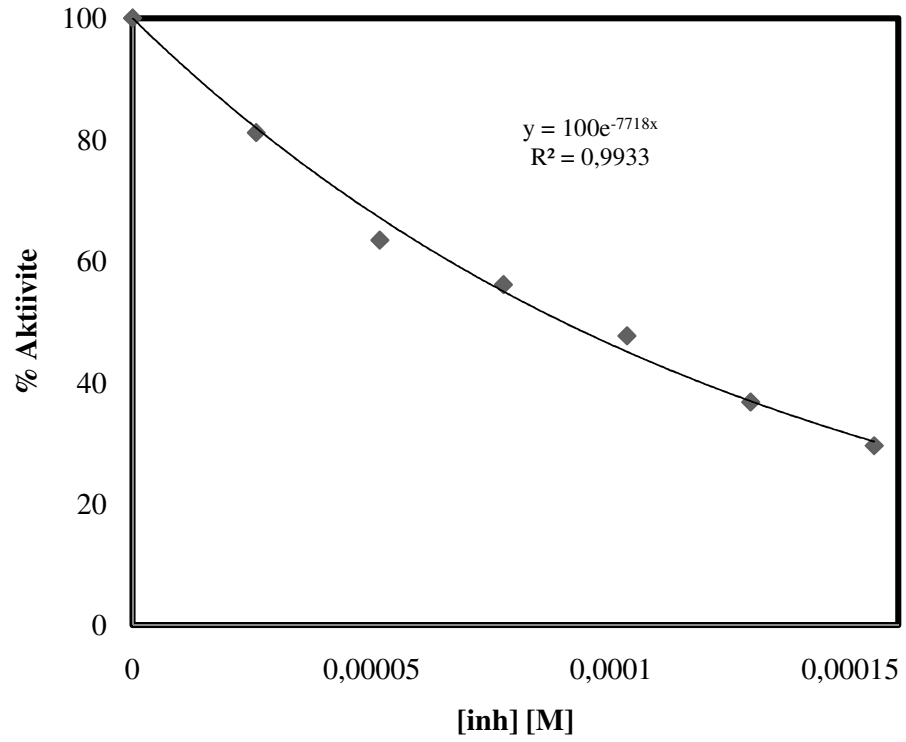
Deney No	Aktivite ölçümü								Aktivite	% Aktivite	[İnh]x10 ⁺⁴
	Tris-EDTA (µL)	NADPH (µL)	t-butil (µL)	GSH (µL)	GR (µL)	Su (µL)	Hemolizat (µL)	İnhibitör (µL)			
1	300	300	30	300	60	2000	30	0	82,17	100	0
2	300	300	30	300	60	1950	30	50	63,38	77,1	2,78
3	300	300	30	300	60	1900	30	100	52,18	63,5	5,57
4	300	300	30	300	60	1850	30	150	46,21	56,2	8,85
5	300	300	30	300	60	1800	30	200	38,87	47,3	11,13
6	300	300	30	300	60	1750	30	250	29,17	35,5	13,92
7	300	300	30	30	60	1700	30	300	25,75	31,3	16,70

Çizelge 3.5 Glutasyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine BNOA'nın etkisine ait deneysel veriler ([İnh]=0,00155 M; [GR]=0,01 M; [Tris-EDTA]=1 M; [NADPH]=2 mM; [GSH]=0,1M; [t-bütil hidroperoksit]=7 mM)

Deney No	Aktivite ölçümü								Aktivite	% Aktivite	[İnh]x10 ⁺⁵
	Tris-EDTA (µL)	NADPH (µL)	t-butil (µL)	GSH (µL)	GR (µL)	Su (µL)	Hemolizat (µL)	İnhibitör (µL)			
1	300	300	30	300	60	2000	30	0	80,42	100	0
2	300	300	30	300	60	1950	30	50	65,25	81,1	0,3
3	300	300	30	300	60	1900	30	100	51,00	63,4	0,5
4	300	300	30	300	60	1850	30	150	45,09	56,1	0,8
5	300	300	30	300	60	1800	30	200	38,32	47,6	1,0
6	300	300	30	300	60	1750	30	250	29,55	36,7	1,3
7	300	300	30	30	60	1700	30	300	23,76	29,5	1,6



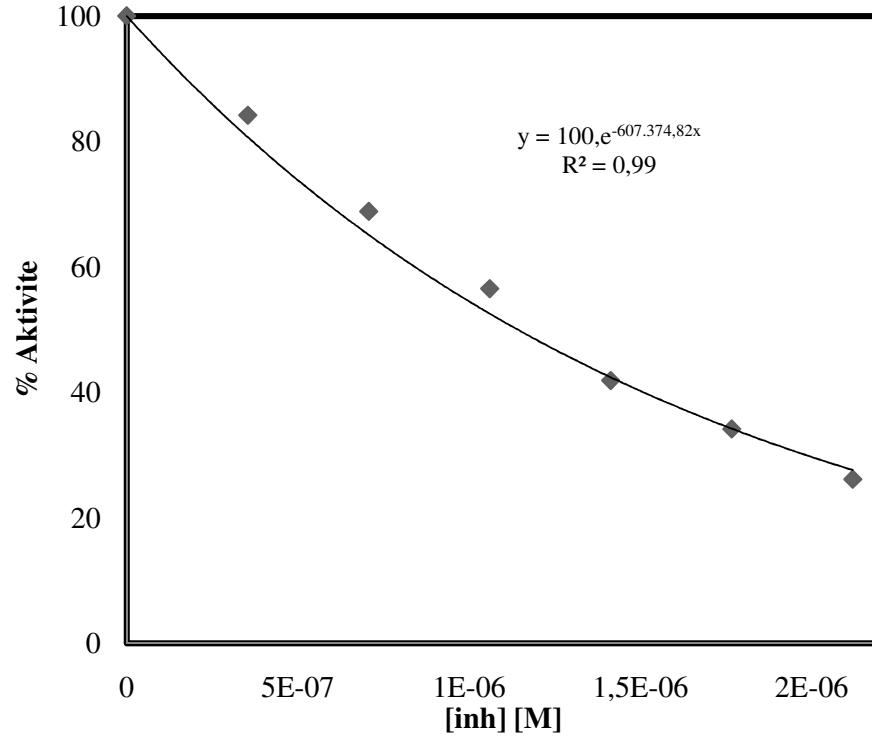
Şekil 3.4 Glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine mepiquat klorürün etkisi



Şekil 3.5 Glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine BNOA'nın etkisi

Çizelge 3.6 Glutasyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine giberellik asitin etkisine ait deneysel veriler ([İnh]=0,0000212 M; [GR]=0,01 M; [Tris-EDTA]=1 M; [NADPH]=2 mM; [GSH]=0,1M; [t-bütül hidroperoksit]=7 mM)

Deney No	Aktivite ölçümü						Su (µL)	Hemolizat (µL)	İnhibitör (µL)	Aktivite	% Aktivite	[İnh]x10 ⁺⁶
	Tris-EDTA (µL)	NADPH (µL)	t-butil (µL)	GSH (µL)	GR (µL)							
1	300	300	30	300	60	2000	30	0	62,07	100	0	
2	300	300	30	300	60	1950	30	50	52,24	84,2	0,4	
3	300	300	30	300	60	1900	30	100	42,73	68,8	0,7	
4	300	300	30	300	60	1850	30	150	35,08	56,5	1,1	
5	300	300	30	300	60	1800	30	200	25,99	41,9	1,4	
6	300	300	30	300	60	1750	30	250	21,21	34,2	1,8	
7	300	300	30	30	60	1700	30	300	16,23	26,2	2,1	



Şekil 3.6 Glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine giberellik asitin etkisi

3.3 BGD'lerin Glutatyon Redüktaz Enzim Aktivitesine Etkileri

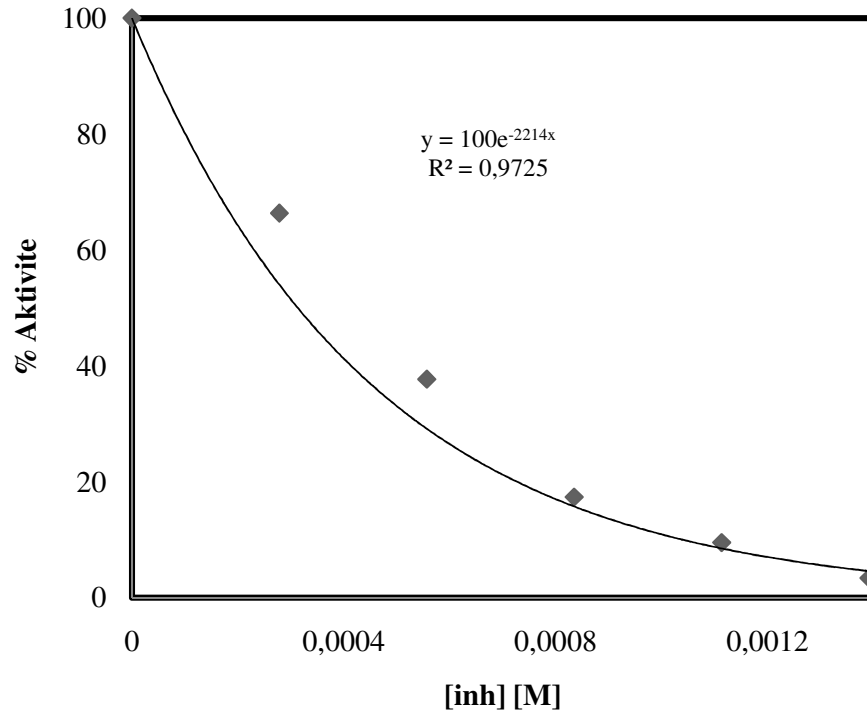
Mepiquat klorür, BNOA ve giberellik asitin glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine etkileri spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve elde edilen deneysel veriler Çizelge 3.7-3.9'da verilerek sırasıyla Şekil 3.7-3.9'da grafik edilmiştir. Şekillerden görüldüğü gibi bitki gelişim düzenleyici maddelerin konsantrasyonlarının artması ile enzim aktivitelerinin azaldığı bulunmuştur.

Çizelge 3.7 Glutatyon redüktaz enzim aktivitesi üzerine mepiquat klorürün etkisine ait deneysel veriler ([İnh]=0,0167 M; [Tris-EDTA]=1 M; [NADPH]=2 mM; [GSSH]=0,033 M)

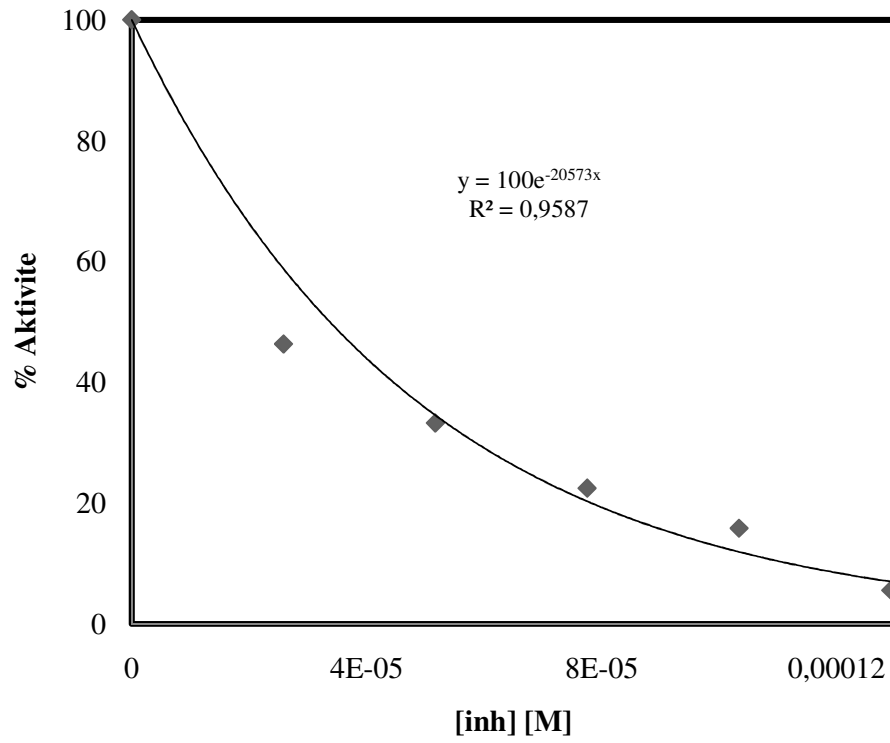
Deney No	Aktivite ölçümü						Aktivite	% Aktivite	[İnh]x10 ⁺⁴
	Tris-EDTA (µL)	NADPH (µL)	GSSG (µL)	Su (µL)	Hemolizat (µL)	İnhibitör (µL)			
1	150	150	300	2350	30	0	1,414	100	0
2	150	150	300	2300	30	50	0,938	66,4	2,78
3	150	150	300	2250	30	100	0,533	37,7	5,57
4	150	150	300	2200	30	150	0,245	17,4	8,85
5	150	150	300	2150	30	200	0,135	9,6	11,13
6	150	150	300	2100	30	250	0,048	3,4	13,92

Çizelge 3.8 Glutatyon redüktaz enzim aktivitesi üzerine BNOA'nın etkisine ait deneysel veriler ([İnh]=0,00155 M; [Tris-EDTA]=1 M; [NADPH]=2 mM; [GSSH]=0,033 M)

Deney No	Aktivite ölçümü						Aktivite	% Aktivite	[İnh]x10 ⁺⁵
	Tris-EDTA (µL)	NADPH (µL)	GSSG (µL)	Su (µL)	Hemolizat (µL)	İnhibitör (µL)			
1	150	150	300	2350	30	0	72,21	100	0
2	150	150	300	2300	30	50	33,46	46,3	0,3
3	150	150	300	2250	30	100	24,00	33,3	0,5
4	150	150	300	2200	30	150	16,23	22,5	0,8
5	150	150	300	2150	30	200	11,44	15,9	1,0
6	150	150	300	2100	30	250	4,043	6,0	1,3



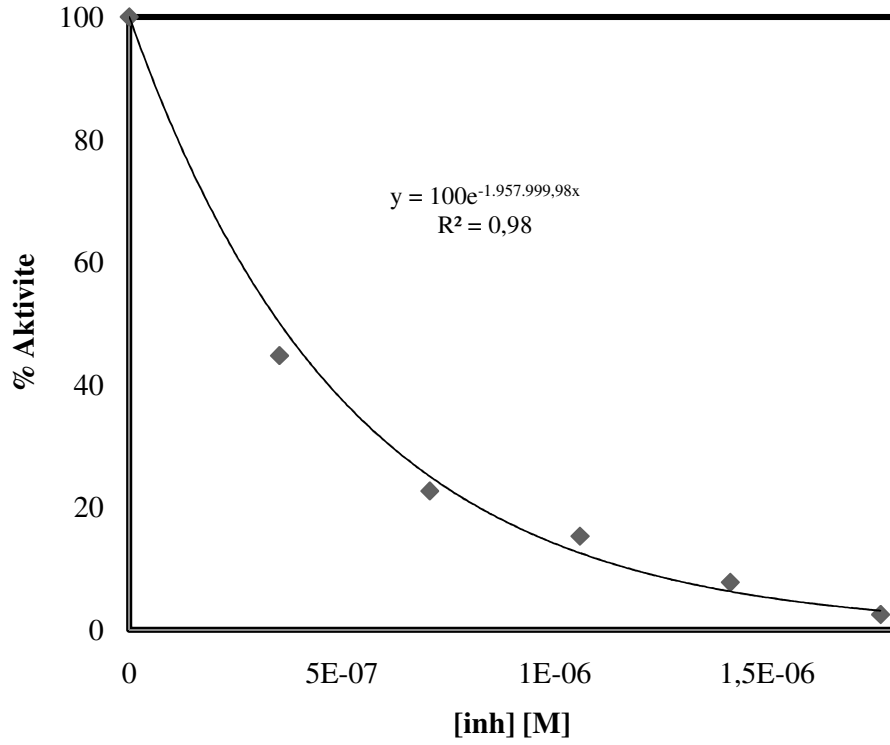
Şekil 3.7 Glutasyon redüktaz enzim aktivitesi üzerine mepiquat klorürün etkisi



Şekil 3.8 Glutasyon redüktaz enzim aktivitesi üzerine BNOA'nın etkisi

Çizelge 3.9 Glutatyon redüktaz enzim aktivitesi üzerine giberellik asitin etkisine ait deneysel veriler ([İnh]=0,0000212 M; [Tris-EDTA]=1 M; [NADPH]=2 mM; [GSSH]=0,033 M)

Deney No	Aktivite ölçümü				Hemolizat (µL)	İnhibitör (µL)	Aktivite	% Aktivite	[İnh]x10 ⁺⁶
	Tris-EDTA (µL)	NADPH (µL)	GSSG (µL)	Su (µL)					
1	150	150	300	2350	30	0	116,30	100	0
2	150	150	300	2300	30	50	52,06	44,8	0,4
3	150	150	300	2250	30	100	26,37	22,7	0,7
4	150	150	300	2200	30	150	17,79	15,3	1,1
5	150	150	300	2150	30	200	9,02	7,8	1,4
6	150	150	300	2100	30	250	2,92	2,5	1,8



Şekil 3.9 Glutatyon redüktaz enzim aktivitesi üzerine giberellik asitin etkisi

3.4 BGD'lerin Glutatyon S-transferaz Enzim Aktivitesine Etkileri

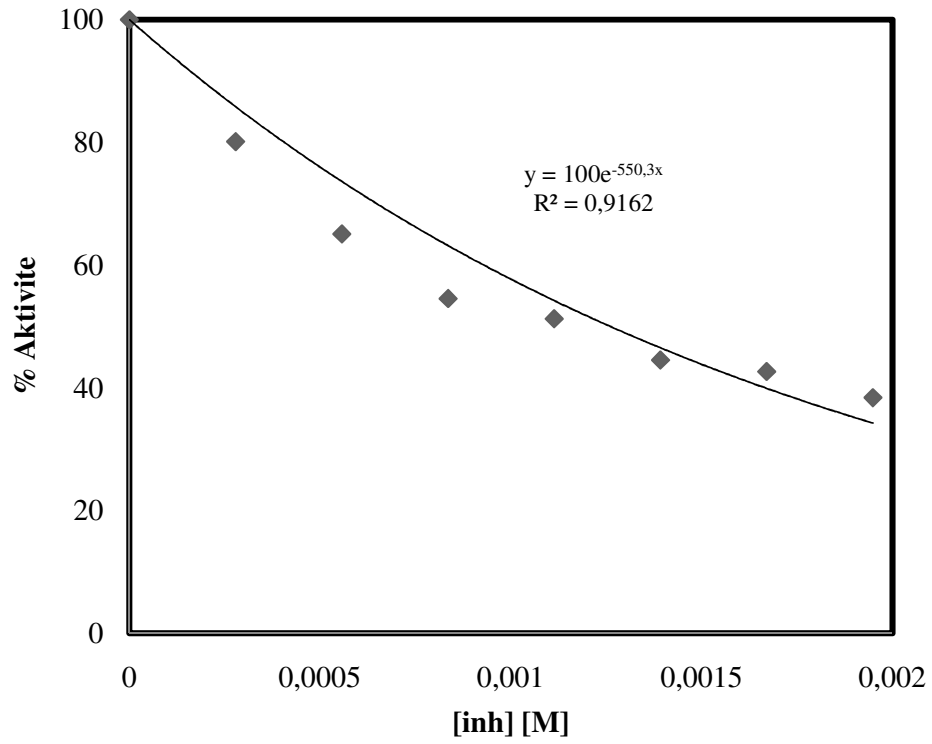
Mepiquat klorür, BNOA ve giberellik asitin glutatyon S-transferaz enzim aktivitesi üzerine etkileri spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve elde edilen deneysel veriler Çizelge 3.10-3.12'de verilerek sırasıyla Şekil 3.10-3.12'de grafik edilmiştir. Şekillerden görüldüğü gibi bitki gelişim düzenleyici maddelerin konsantrasyonlarının artması ile enzim aktivitesinin azaldığı bulunmuştur.

Çizelge 3.10 Glutasyon S-transferaz enzim aktivitesi üzerine mepiquat klorürün etkisine ait deneysel veriler ([İnh]=0,0167; [fosfat tamponu]=0,05 M; [GSH]=0,1 M; [CDNB]=30 mM)

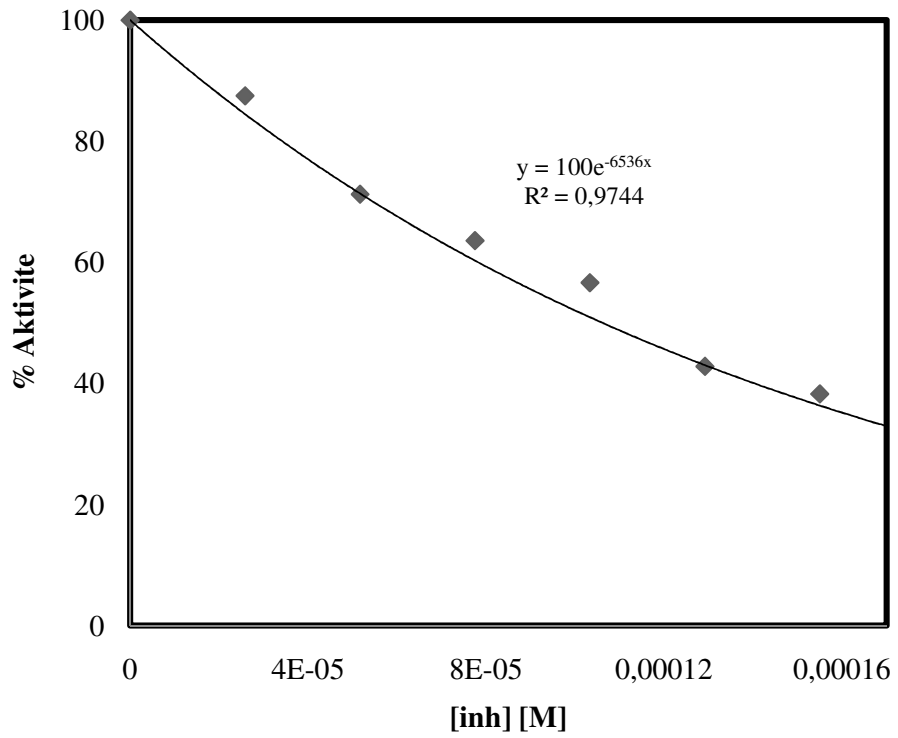
Deney No	Aktivite ölçümü					Aktivite	% Aktivite	[İnh]x10 ⁺⁴
	Tampon (µL)	CDNB (µL)	GSH (µL)	Hemolizat (µL)	İnhibitör (µL)			
1	2650	60	150	150	0	25,67	100	0
2	2600	60	150	150	50	20,56	80,1	2,78
3	2550	60	150	150	100	16,70	65,1	5,57
4	2500	60	150	150	150	13,99	54,5	8,85
5	2450	60	150	150	200	13,15	51,2	11,13
6	2400	60	150	150	250	11,42	44,5	13,92
7	2350	60	150	150	300	10,94	42,6	16,70
8	2300	60	150	150	350	9,85	38,4	19,48

Çizelge 3.11 Glutasyon S-transferaz enzim aktivitesi üzerine BNOA'nın etkisine ait deneysel veriler ([İnh]=0,00155; [fosfat tamponu]=0,05 M; [GSH]=0,1 M; [CDNB]=30 mM)

Deney No	Aktivite ölçümü					Aktivite	% Aktivite	[İnh]x10 ⁺⁵
	Tampon (µL)	CDNB (µL)	GSH (µL)	Hemolizat (µL)	İnhibitör (µL)			
1	2650	60	150	150	0	25,67	100	0
2	2600	60	150	150	50	20,56	80,1	2,78
3	2550	60	150	150	100	16,70	65,1	5,57
4	2500	60	150	150	150	13,99	54,5	8,85
5	2450	60	150	150	200	13,15	51,2	11,13
6	2400	60	150	150	250	11,42	44,5	13,92
7	2350	60	150	150	300	10,94	42,6	16,70
8	2300	60	150	150	350	9,85	38,4	19,48



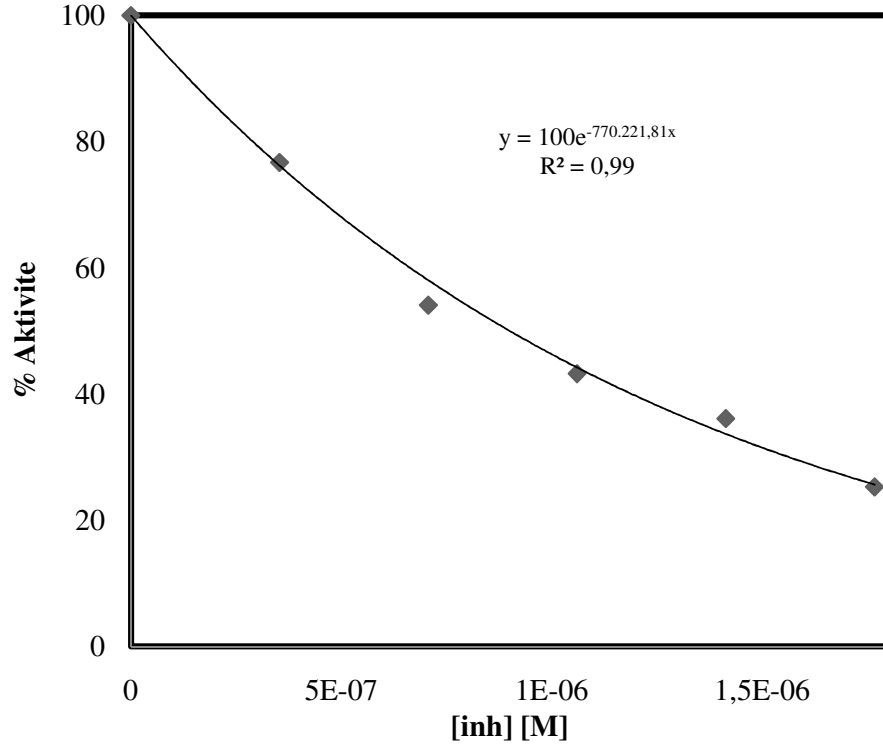
Şekil 3.10 Glutatyon S-transferaz enzim aktivitesine mepiquat klorürün etkisi



Şekil 3.11 Glutatyon S-transferaz enzim aktivitesine BNOA'nın etkisi

Çizelge 3.12 Glutatyon S-transferaz enzim aktivitesi üzerine giberellik asitin etkisine ait deneysel veriler ([İnh]=0,0000212; [fosfat tamponu]=0,05 M; [GSH]=0,1 M; [CDNB]=30 mM)

Deney No	Aktivite ölçümü					Aktivite	% Aktivite	[İnh]x10 ⁺⁶
	Tampon (µL)	CDNB (µL)	GSH (µL)	Hemolizat (µL)	İnhibitör (µL)			
1	2650	60	150	150	0	22,65	100	0
2	2600	60	150	150	50	17,37	76,7	0,4
3	2550	60	150	150	100	12,24	54,1	0,7
4	2500	60	150	150	150	9,792	43,2	1,1
5	2450	60	150	150	200	8,179	36,1	1,4
6	2400	60	150	150	250	5,721	25,3	1,8



Şekil 3.12 Glutatyon S-transferaz enzim aktivitesine giberellik asitin etkisi

3.5 BGD'lerin Katalaz Enzim Aktivitesine Etkileri

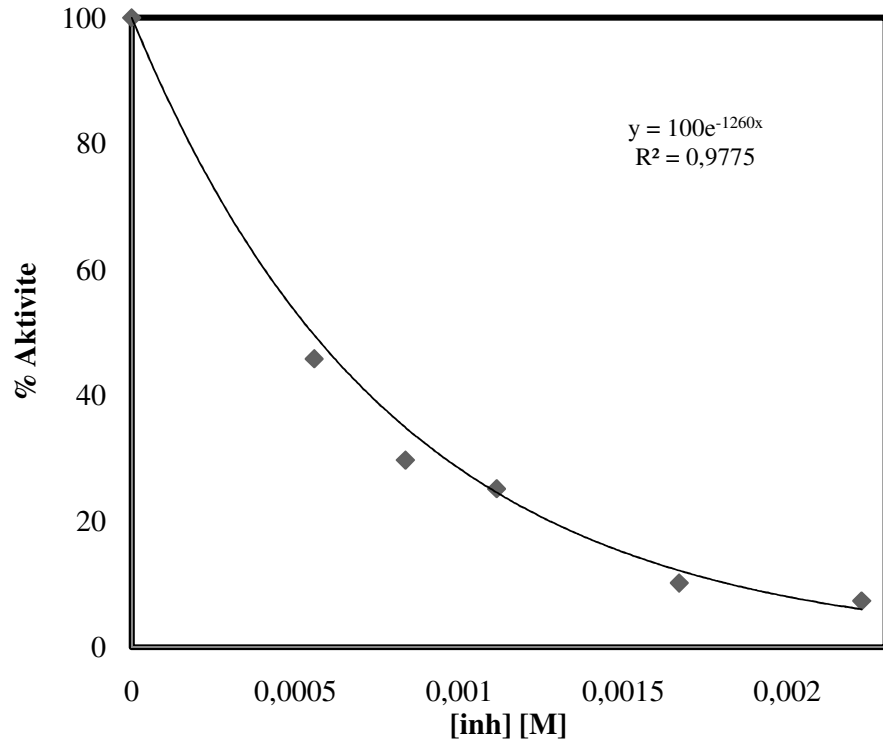
Mepiquat klorür, BNOA ve giberellik asitin katalaz enzim aktivitesi üzerine etkileri spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve elde edilen deneysel veriler Çizelge 3.13-3.15'de verilerek sırasıyla Şekil 3.13-3.15'de grafik edilmiştir. Şekillerden görüldüğü gibi bitki gelişim düzenleyici maddelerin konsantrasyonlarının artması ile enzim aktivitesinin azaldığı bulunmuştur.

Çizelge 3.13 Katalaz enzim aktivitesi üzerine mepiquat klorürün etkisine ait deneysel veriler ([İnh]=0,0167 M; [fosfat tamponu]=0,05 M; [H₂O₂]=0,019 M)

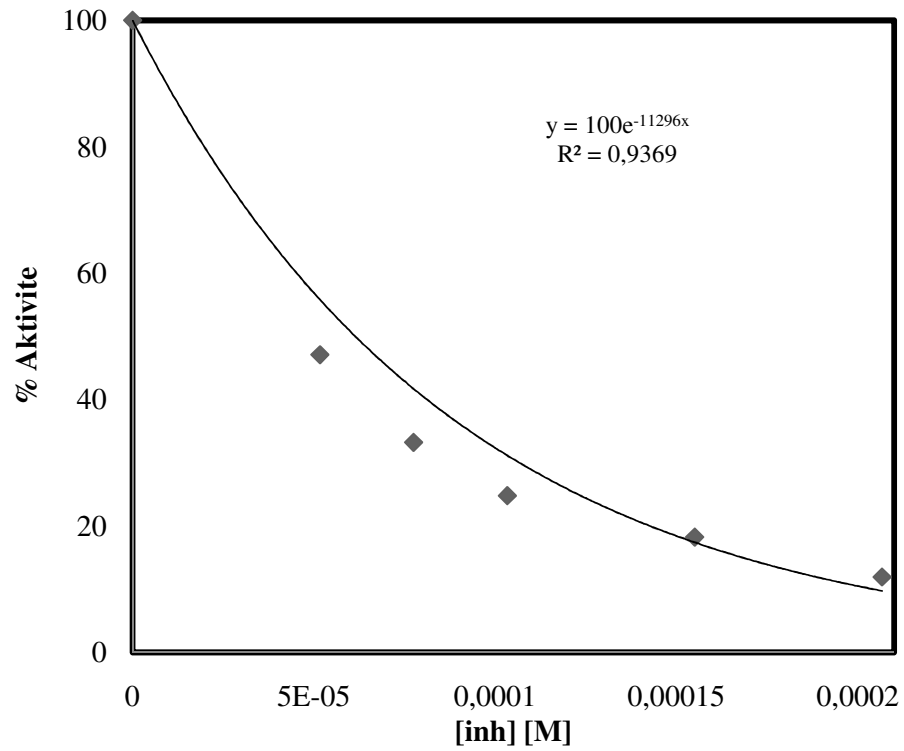
Deney No	Aktivite ölçümü				Aktivite	% Aktivite	[İnh]x10 ⁺⁴
	Tampon (µL)	H ₂ O ₂ (µL)	Hemolizat (µL)	İnhibitör (µL)			
1	2400	500	100	0	22,31	100	0
2	2300	500	100	100	10,23	45,8	2,78
3	2250	500	100	150	6,63	29,7	5,57
4	2200	500	100	200	5,62	25,2	8,85
5	2100	500	100	300	2,28	10,2	11,13
6	2000	500	100	400	1,65	7,4	13,92

Çizelge 3.14 Katalaz enzim aktivitesi üzerine BNOA'nın etkisine ait deneysel veriler etkisi ([İnh]=0,0167 M; [fosfat tamponu]=0,05 M; [H₂O₂]=0,019 M)

Deney No	Aktivite ölçümü				Aktivite	% Aktivite	[İnh]x10 ⁺⁵
	Tampon (µL)	H ₂ O ₂ (µL)	Hemolizat (µL)	İnhibitör (µL)			
1	2400	500	100	0	22,31	100	0
2	2300	500	100	100	10,23	45,8	2,78
3	2250	500	100	150	6,63	29,7	5,57
4	2200	500	100	200	5,62	25,2	8,85
5	2100	500	100	300	2,28	10,2	11,13
6	2000	500	100	400	1,65	7,4	13,92



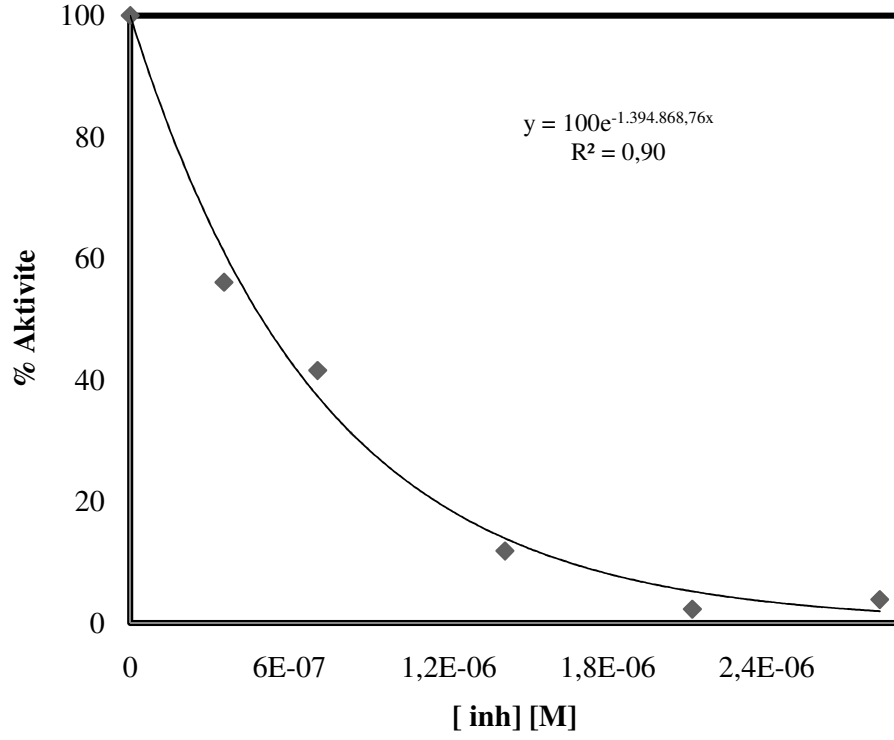
Şekil 3.13 Katalaz enzim aktivitesine mepiquat klorürün etkisi



Şekil 3.14 Katalaz enzim aktivitesine BNOA'nın etkisi

Çizelge 3.15 Katalaz enzim aktivitesi üzerine giberellik asitin etkisine ait deneysel veriler ([İnh]=0,0167 M; [fosfat tamponu]=0,05 M; [H₂O₂]=0,019 M)

Deney No	Aktivite ölçümü				Aktivite	% Aktivite	[İnh]x10 ⁺⁶
	Tampon (µL)	H ₂ O ₂ (µL)	Hemolizat (µL)	İnhibitör (µL)			
1	2400	500	100	0	42,80	100	0
2	2300	500	100	100	24,00	56,1	0,4
3	2250	500	100	150	17,79	41,6	0,7
4	2200	500	100	200	5,07	11,9	1,1
5	2100	500	100	300	0,97	2,3	2,1
6	2000	500	100	400	1,65	3,8	2,8



Şekil 3.15 Katalaz enzim aktivitesine giberellik asitin etkisi

3.6 BGD'lerin Süperoksit Dismutaz Enzim Aktivitesine Etkileri

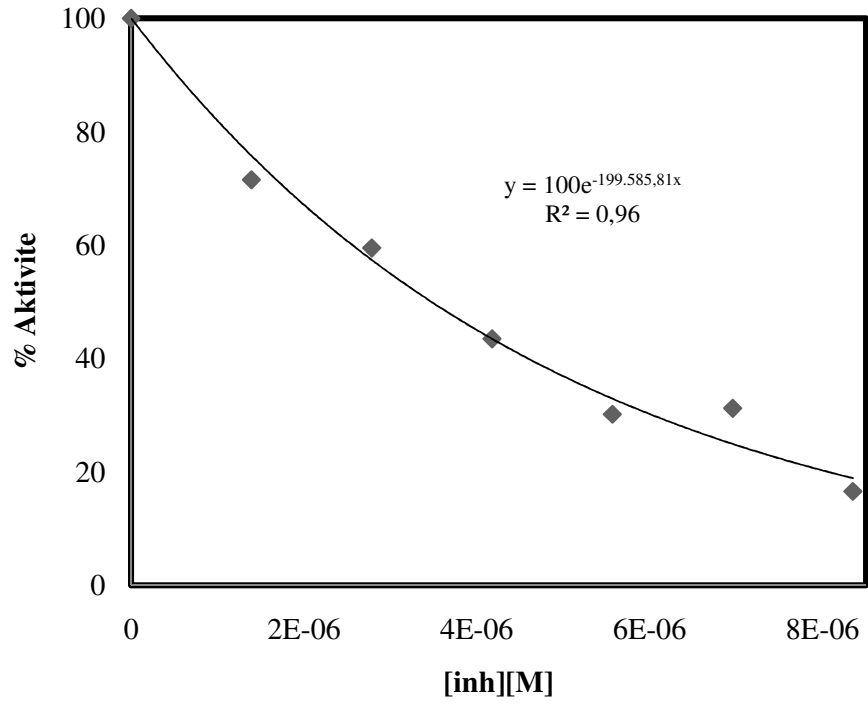
Mepiquat klorür, BNOA ve giberillik asitin süperoksit dismutaz enzim aktivitesi üzerine etkileri spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve elde edilen deneysel veriler Çizelge 3.16-3.18'de verilerek sırasıyla Şekil 3.16-3.18'de grafik edilmiştir. Şekillerden görüldüğü gibi bitki gelişim düzenleyici maddelerin konsantrasyonlarının artması ile enzim aktivitelerinin azaldığı bulunmuştur.

Çizelge 3.16 Süperoksit dismutaz enzim aktivitesine mepiquat klorürün etkisine ait deneysel veriler ([İnh]=0,0167 M; [Tampon]=0,05 M; [INT]= 1×10^{-4} M; [Ksantin]= 1×10^{-4} M)

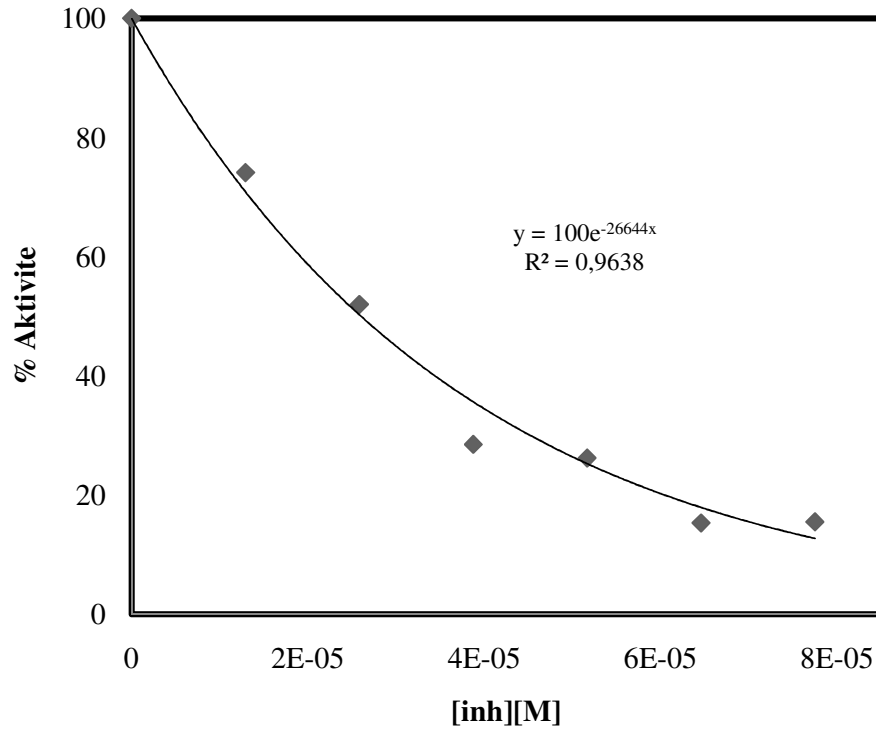
Deney No	Aktivite ölçümü						Aktivite	% Aktivite	[İnh] $\times 10^5$
	Tampon (µL)	INT (µL)	Ksantik oksidaz (µL)	Ksantin (µL)	Hemolizat (µL)	İnhibitör (µL)			
1	1500	600	250	500	125	0	758,4	100	0
2	1250	600	250	500	125	25	542,4	71,52	0,1
3	1000	600	250	500	125	50	451,2	59,49	0,3
4	750	600	250	500	125	75	329,6	43,46	0,4
5	500	600	250	500	125	100	228,8	30,17	0,6
6	250	600	250	500	125	125	236,8	31,22	0,7
7	0	600	250	500	125	150	125,6	16,56	0,8

Çizelge 3.17 Süperoksit dismutaz enzim aktivitesine BNOA'nın etkisine ait deneysel veriler ([İnh]=0,00155M; [Tampon]=0,05 M; [INT]= 1×10^{-4} M; [Ksantin]= 1×10^{-4} M)

Deney No	Aktivite ölçümü						Aktivite	% Aktivite	[İnh] $\times 10^4$
	Tampon (µL)	INT (µL)	Ksantik oksidaz (µL)	Ksantin (µL)	Hemolizat (µL)	İnhibitör (µL)			
1	1500	600	250	500	125	0	769,6	100	0
2	1250	600	250	500	125	25	570,4	74,1	0,1
3	1000	600	250	500	125	50	400	51,9	0,3
4	750	600	250	500	125	75	219,2	28,5	0,4
5	500	600	250	500	125	100	201,6	26,2	0,5
6	250	600	250	500	125	125	117,6	15,3	0,6
7	0	600	250	500	125	150	119,2	15,5	0,8



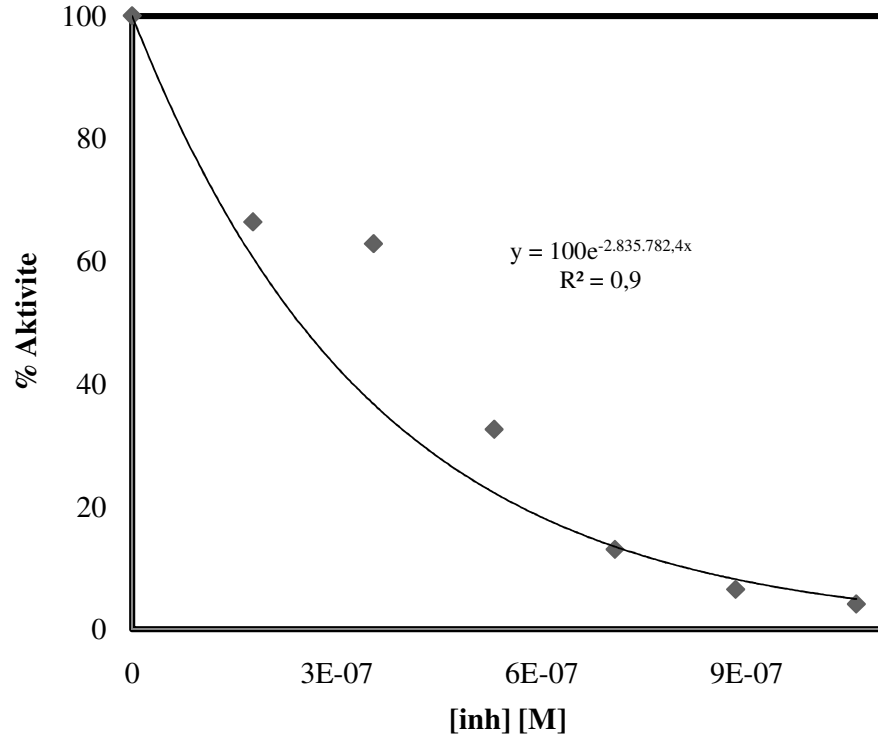
Şekil 3.16 Süperoksit dismutaz enzim aktivitesine mepiquat klorürün etkisi



Şekil 3.17 Süperoksit dismutaz enzim aktivitesine BNOA'nın etkisi

Çizelge 3.18 Süperoksit dismutaz enzim aktivitesine giberellik asitin etkisine ait deneysel veriler etkisi ([İnh]=0,0000212 M; [Tampon]=0,05 M; [INT]=1x10⁻⁴ M; [Ksantin]=1x10⁻⁴ M)

Deney No	Aktivite ölçümü						Aktivite	% Aktivite	[İnh]x10 ⁺⁶
	Tampon (µL)	INT (µL)	Ksantik oksidaz (µL)	Ksantin (µL)	Hemolizat (µL)	İnhibitör (µL)			
1	1500	600	250	500	125	0	404,8	100	0
2	1250	600	250	500	125	25	268,8	66,40	0,2
3	1000	600	250	500	125	50	254,4	62,84	0,4
4	750	600	250	500	125	75	132	32,60	0,5
5	500	600	250	500	125	100	52,8	13,04	0,7
6	250	600	250	500	125	125	26,4	6,52	0,9
7	0	600	250	500	125	150	16,8	4,15	1,1



Şekil 3.18 Süperoksit dismutaz enzim aktivitesine giberellik asitin etkisi

4. SONUÇ VE TARTIŞMA

Aşağıda bitki büyüme hormonlarından olan mepiquat klorür, BNOA ve giberellik asitin glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, glutatyon S-transferaz, katalaz ve süperoksit dismutaz antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkileri tartışılmaktadır.

4.1 Antioksidan Enzim Aktivitelerine Mepiquat Klorürün Etkisi

Mepiquat klorürün glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, glutatyon S-transferaz, katalaz ve süperoksit dismutaz enzim aktiviteleri üzerine etkileri sırasıyla Şekil 3.1, 3.4, 3.7, 3.10, 3.13 ve 3.16'da verilmektedir. Genel anlamda tüm şekillerden görüleceği gibi artan mepiquat klorür konsantrasyonu ile antioksidan enzimlerin aktivitelerinin azaldığı görülmektedir. Antioksidan enzimlerin aktivitelerinin mepiquat klorür konsantrasyonu ile değişimlerinin farklı olduğu bulundu. Örneğin Çizelge 3.1, 3.4, 3.7, 3.10, 3.13 ve 3.16'dan görüldüğü gibi glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, glutatyon S-transferaz, katalaz ve süperoksit dismutaz enzim aktiviteleri üzerine mepiquat klorürün etkisinin incelendiği deneylerde kullanılan en yüksek konsantrasyonlar sırasıyla $13,92 \times 10^{-4}$, $16,70 \times 10^{-4}$, $13,92 \times 10^{-4}$, $19,48 \times 10^{-4}$, $13,92 \times 10^{-4}$ ve 8×10^{-6} M iken geriye kalan enzim aktivitelerinin 27,2; 31,3; 3,4; 38,4; 7,4; 16,56 olduğu görülmektedir. Bu sonuç mepiquat klorürün antioksidan enzimler üzerinde farklı etkilere sahip olduğunu göstermektedir. Literatürde bitki gelişim düzenleyicilerinin antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkisini araştıran oldukça sınırlı sayıda kaynak bulunmaktadır. Yılmaz ve arkadaşları, bitki gelişim düzenleyicilerinden olan indol-3-asetik asitin (IAA) F2 nesil farelerin böbreklerinden elde edilen katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz enzim aktivitelerine etkisini araştırmışlar ve IAA'nın katalaz aktivitesini azalttığını ve süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz aktivitesinde belirgin bir değişme meydana getirmediğini bulmuşlardır [7]. Çelik ve arkadaşları IAA'nın sıçanların

çeşitli dokularındaki lipit peroksidasyon düzeyleri üzerindeki etkilerini araştırmışlar ve IAA'nın karaciğer ve böbrek malondialdehit düzeylerini arttırdığını bulmuşlardır [21]. Çelik ve arkadaşları başka bir çalışmalarında bazı bitki büyüme düzenleyicilerinin sıçanların serum enzim düzeyleri üzerine etkilerini araştırmışlar ve 1. IBA'nın laktat dehidrogenaz ve kreatin fosfokinaz aktivitelerini; ve 2. IAA'nın aspartat aminotransferaz, laktat dehidrogenaz ve kreatin fosfokinaz aktivitelerini arttırdığını bulunmuşlardır [8]. Siliğ ve arkadaşları, diaminozid'in civcivlerin karaciğer sitoplazmik glutatyon S-transferaz ve mikrozomal nitrozodimetilamin demetilaz aktiviteleri üzerine etkilerini araştırmışlar ve diaminozid'in doza bağlı olarak mikrozomal nitrozodimetilamin demetilaz enzimini aktive ederken, sitoplazmik glutatyon S-transferaz enzimlerini inhibe ettiğini belirlemişlerdir [22].

4.2 Antioksidan Enzim Aktivitelerine BNOA'nın Etkisi

Literatürde organik ve/veya inorganik bileşiklerin farklı biyokimyasal reaksiyonlar üzerindeki etkilerinin farklı olduğu bulunmuştur. Bazı durumlarda bir reaksiyon için aktivatör olan bir madde başka bir reaksiyon için inhibitör olarak hareket edebilmektedir. Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, glutatyon S-transferaz, katalaz ve süperoksit dismutaz antioksidan enzim sistemi üzerine BNOA'nın etkisine ait deneysel veriler daha önce Çizelge 3.2, 3.5, 3.8, 3.11, 3.14 ve 3.17'de verilerek sırasıyla Şekil 3.2, 3.5, 3.8, 3.11, 3.14 ve 3.17'de grafik edilmişti. Çizelgeler ve Şekiller incelendiğinde artan BNOA konsantrasyonu ile tüm enzimlerin aktivitelerinin azaldığı ve BNOA'nın antioksidan enzimler üzerinde inhibitör etkisi meydana getirdiği bulundu. Yine şekillerden BNOA'nın antioksidan enzimler üzerindeki inhibisyon gücünün farklı olduğu da görülmektedir.

4.3 Antioksidan Enzim Aktivitelerine Giberellik Asitin Etkisi

Bitkilerde gövde uzamasını sağlayan giberellik asitin glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, glutatyon S-transferaz, katalaz ve süperoksit dismutaz antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkilerine ait deneysel veriler bulgular kısmında verilmişti. Bu verilerin kullanılmasıyla çizilen

grafikler, Şekil 3.3, 3.6, 3.9, 3.12, 3.15 ve 3.18’de verildi. Grafikler incelendiğinde tüm enzimler için giberelik asitin bir inhibitör görevi gördüğü söylenebilir. Yine giberelik asitin artan konsantrasyonu ile tüm enzim aktivitelerinin azaldığı görülmektedir. Ancak bu azalma oranı giberelik asitin aynı konsantrasyonu için enzimden enzime farklılık göstermektedir. Yeşilada, mutant kanat benekleri üzerine kinetin, giberellik asit ve indol asetik asit etkisini araştırdı ve 1. giberellik asitin Etil metansülfonat(EMS) ile indüklenen bütün kanat beneklerini azatlığını; 2. 1×10^{-3} M kinetin Etil metansülfonat ile indüklenen ikili beneklerin sayısını azatlığını; 3. 1×10^{-4} M konsantrasyonunun beneklerin bütün tiplerinin sayısında artışa neden olduğunu ve aynı konsantrasyondaki IAA’nın ise değişken sonuçlar verdiğini buldu [23]. Sonuçlarımızla literatürdeki sonuçlar kıyaslandığında giberellik asitin kullanım amacına bağlı olarak biyokimyasal reaksiyonlarda farklı görevler üstlendiği söylenebilir.

4.4 I₅₀ Değerleri

I₅₀, bir enzimin aktivitesini yarıya düşürmek veya % 50 azaltmak için ortama ilave edilmesi gereken inhibitör konsantrasyonu olarak tanımlanır. Bu değer enzimin türüne ve inhibitörlere bağlı olarak farklılıklar gösterir. Bu çalışmada kullanılan enzimler üzerine BGDlerin etkisi için hesaplanmış I₅₀ değerleri aşağıda tartışılmaktadır.

4.4.1 G6PD’nin İnhibisyonu İçin Hesaplanmış I₅₀ Değerleri

Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine mepiquat klorür, BNOA ve giberellik asitin etkisi için Şekil 3.1-3.3’deki eğrilerin denklemlerinden hesaplanmış I₅₀ değerleri Çizelge 4.1’de verilmektedir. Bir inhibitörün inhibisyon gücünün yüksek olabilmesi için çok düşük konsantrasyonlarda enzim aktivitesi üzerinde önemli değişimler meydana getirmesi gereklidir. Çizelge 4.1’den görüldüğü gibi bu çalışmada kullanılan BGD’ler için en düşük I₅₀ değeri giberellik asit için bulunmuştur. Bu sonuç glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesini en fazla giberellik asitin azalttığını ve bunu sırasıyla BNOA ve mepiquat klorürün izlediğini göstermektedir. Literatürde glukoz-6-fosfat dehidrogenazın aktivitesini azaltan çeşitli

maddeler bulunmaktadır. Bu maddeler ve bu maddelere ait I_{50} değerleri izelge 4.1’de verilmektedir. Bu çizelgeden görüldüğü gibi glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesini en fazla azaltan inhibitörün $KMnO_4$ olduğu söylenbilir.

Çizelge 4.1 G6PD’nin inhibisyonuna ait I_{50} değerleri

İnhibitörler	I_{50} (mM)	Referanslar
Granisetron hidroklorür	3,9	[24]
Ondansetron hidroklorür	$3,6 \times 10^{-2}$	[24]
Amonyak	$2,9 \times 10^{-3}$	[25]
Üre	$2,4 \times 10^{-2}$	[25]
$KMnO_4$	$2,0 \times 10^{-4}$	[25]
Slfanilasetamid	$3,2 \times 10^{-2}$	[26]
Sülfanilamid	$3,7 \times 10^{-2}$	[26]
Nidazol	1,2	[26]
Vankomisin	1,9	[26]
Siproflaksosin	2,3	[26]
Amoksilin	643,5	[26]
Metamizol	17	[27]
Magnezyum sülfat	50	[27]
2,4-dihidroksi-5-floropirimidin	43	[28]
Sodyum-2-sülfanil etanslfonat	180	[28]
BNOA	$5,7 \times 10^{-3}$	Bu alışmada
Mepiquat klorür	0,695	Bu alışmada
Giberellik asit	1.4×10^{-3}	Bu alışmada

4.4.2 Glutasyon Peroksidazın İnhibisyonu İçin Hesaplanmış I₅₀ Değerleri

Glutasyon peroksidaz aktivitesi üzerine mepiquat klorür, BNOA ve giberellik asitin inhibisyonu için hesaplanmış I₅₀ değerleri sırasıyla $9,7 \times 10^{-1}$, $8,9 \times 10^{-2}$ ve $1,14 \times 10^{-3}$ mM olarak hesaplandı ve bu değerler Çizelge 4.2’de verilmektedir. Literatürde glutasyon peroksidaz aktivitesi üzerine organik ve inorganik bileşiklerin etkisi için I₅₀ değerinin hesapladığını gösteren oldukça sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (Çizelge 4.2). Literatür taramaları sonucunda elde edilen I₅₀ değeriyle bu çalışmada kullanılan BDG’ler için hesaplanan I₅₀ değerleri karşılaştırıldığında glutasyon peroksidaz aktivitesini en fazla inhibe eden maddenin giberellik asit olduğu ve bunu sırasıyla BNOA, 4-hidroksi-2,3-transnoneral ve mepiquat klorürün izlediği bulundu.

Çizelge 4.2 Glutasyon peroksidazın inhibisyonuna ait I₅₀ değerleri

İnhibitörler	I₅₀ (mM)	Referanslar
4-hidroksi-2,3-transnoneral	0,12	[29]
BNOA	0,09	Bu çalışmada
Mepiquat klorür	0,97	Bu çalışmada
Giberellik asit	$1,14 \times 10^{-3}$	Bu çalışmada

4.4.3 Glutasyon Redüktazın İnhibisyonu İçin Hesaplanmış I₅₀ Değerleri

Çizelge 4.3, bu çalışmada ve literatürde glutasyon redüktaz enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren çeşitli organik ve inorganik bileşiklere ait I₅₀ değerlerini göstermektedir. Çizelgeden görüldüğü gibi farklı maddelerin glutasyon redüktaz aktivitesi üzerindeki inhibisyon güçlerinin farklı olduğu görülmektedir. Metal iyonları için elde edilen I₅₀ değerleri organik bileşikler için elde edilen değerlerle kıyaslandığında metal iyonlarının glutasyon redüktaz aktivitesi üzerindeki inhibisyon güçlerinin oldukça düşük olduğu söylenebilir. Çizelgedeki I₅₀ değerlerinden en güçlü inhibitörün bu çalışmada kullanılan BNOA’nın olduğu bulundu.

Çizelge 4.3 Glutatyon redüktazın inhibisyonuna ait I₅₀ değerleri

İnhibitörler	I₅₀ (mM)	Referanslar
Sülfanil asetamin	0,59	[30]
Seftriakson sodyum	2,88	[30]
İmipenem	4,54x10 ⁻²	[30]
Seftazidim	2,71	[30]
Ornidazol	22,44	[30]
Ketoprofen	7,42	[30]
Lornosikam	0,35	[30]
Dikloferak sodyum	7,27	[30]
Teroksikam	15,11	[30]
Rifamisin SV sülfat	0,21	[30]
Vankomisin	6,62	[30]
Kloromfenikol	2,75	[30]
Sefuroksim sodyum	19,88	[30]
Pb ⁺²	1,1x10 ⁻²	[31]
Hg ⁺²	20	[31]
Cu ⁺²	25,2	[31]
Cd ⁺²	37,3	[31]
Fe ⁺²	209	[31]
Al ⁺³	229	[31]
BNOA	3,53x10 ⁻⁴	Bu çalışmada
Mepiquat klorür	3,13x10 ⁻¹	Bu çalışmada
Giberellik asit	3,36x10 ⁻¹	Bu çalışmada

4.4.4 Glutatyon S-transferazın İnhibisyonu İçin Hesaplanmış I₅₀ Değerleri

Glutatyon S-transferaz aktivitesi üzerine mepiquat klorür, BNOA ve giberellik asitin inhibisyonu için hesaplanmış I₅₀ değerleri Çizelge 4.4'de verilmektedir. Çizelgeden görüldüğü gibi kullanılan BGD'ler içinde en güçlü inhibitörün giberellik asitin olduğu ve bunu sırasıyla BNOA ve mepiquat klorürün izlediği bulundu. Literatür taraması sonucu glutatyon S-transferaz enzim aktivitesi

üzerinde inhibitör etkisi gösteren maddeler için hesaplanmış I_{50} değerleri de Çizelge 4.4'de verilmektedir. Bu çizelgedeki tüm verilerin karşılaştırılması sonucunda glutatyon S-transferazın en etkin inhibitörünün hematin olduğu ve bunu giberellik asit ve etakrinik asitin izlediği bulundu.

Çizelge 4.4 Glutatyon S-transferazın inhibisyonuna ait I_{50} değerleri

İnhibitörler	I_{50} (mM)	Referanslar
Etakrinik asit	$1,9 \times 10^{-3}$	[32]
Hematin	$3,0 \times 10^{-4}$	[32]
S-heksilglutatyon	$2,5 \times 10^{-1}$	[32]
Indol-3-asetik asit	$9,7 \times 10^{-1}$	[32]
S-metil glutatyon	$8,6 \times 10^{-1}$	[32]
PH ₃ -R	$1,0 \times 10^{-2}$	[33]
BNOA	$1,1 \times 10^{-1}$	Bu çalışmada
Mepiquat klorür	1,26	Bu çalışmada
Giberellik asit	$8,9 \times 10^{-4}$	Bu çalışmada

4.4.5 Katalazın İnhibisyonu İçin Hesaplanmış I_{50} Değerleri

Mepiquat klorür, BNOA ve giberellik asitin katalaz aktivitesi üzerine etkisi için ve literatürde katalaz inhibitörler için hesaplanmış I_{50} değerleri Çizelge 4.5 verilmektedir. Çizelgeden görüldüğü gibi incelenen tüm inhibitörler içerisinde en etkin inhibitörün BNOA olduğu bulundu.

Çizelge 4.5 Katalazın inhibisyonuna ait I₅₀ değerleri

İnhibitörler	I₅₀ (mM)	Referanslar
KCN	71	[34]
Azit	0,33	[34]
Hidroksilamin	0,19	[34]
BNOA	4,96x10 ⁻³	Bu çalışmada
Mepiquat klorür	5,5x10 ⁻¹	Bu çalışmada
Giberellik asit	6,13x10 ⁻¹	Bu çalışmada

4.4.6 Süperoksit Dismutazın İnhibisyonu İçin Hesaplanmış I₅₀ Değerleri

Çizelge 4.6'daki I₅₀ değerleri incelendiğinde maddelerin inhibisyon güçlerinin farklı olduğu görülmektedir. Bu çalışmada ve literatürde elde edilen sonuçlar kıyaslandığında süperoksit dismutaz enzimi için en etkin inhibitörün ligand olduğu ve bunu BNOA'nın izlediği bulundu.

Çizelge 4.6 Süperoksit dismutazın inhibisyonuna ait I₅₀ değerleri

İnhibitörler	I₅₀ (mM)	Referanslar
Fenol-2,20-[(1R,2R)-1,2-sikloheksanediyilbis[(E)-nitrilometilidin]]bis[6-(1,1dimetiletıl)-4-metoksi	3,2x10 ⁻⁴	[35]
Ökarion 108 (EUK108)	2,1x10 ⁻³	[35]
Ökarion 113 (EUK 113)	1,9x10 ⁻³	[35]
[Mn(ABCDSA)Cl]	1,9x10 ⁻³	[36]
[Mn(Salen)Cl]	2,5x10 ⁻³	[36]
Ligand	1,5x10 ⁻⁷	[37]
BNOA	2,4x10 ⁻⁴	Bu çalışmada
Mepiquat klorür	3,5x10 ⁻³	Bu çalışmada
Giberellik asit	2,6x10 ⁻²	Bu çalışmada

4.5 Sonuçlar

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler halinde verilmektedir:

1. Bitki gelişim düzenleyici maddelerin antioksidan enzimler üzerinde inhibitör olarak hareket ettiği,
2. İnhibitörlerin inhibisyon gücünün enzimler için farklılık gösterdiği,
3. Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, glutatyon S-transferaz, katalaz ve süperoksit dismutaz antioksidan enzimleri için en etkin inhibitörlerin sırasıyla giberellik asit, giberellik asit, BNOA, giberellik asit, BNOA ve BNOA olduğu;
4. Bu çalışmada elde edilen değerler literatürde metal iyonları için elde edilmiş I_{50} değerleri ile kıyaslandığında BGD'lerin oldukça güçlü inhibitörler oldukları bulundu.

Sonuç olarak tarımda bitki gelişim düzenleyiciler olarak kullanılan mepiquat klorür, BNOA ve giberellik asit gibi maddeler ilalamının yapıldığı bölgede yaşayan veya bu bitkileri farklı yollarla bünyelerine alan canlıların glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, glutatyon S-transferaz, katalaz ve süperoksit dismutaz gibi antioksidan enzim aktiviteleri üzerinde olumsuz etkiler göstermektedir. Tarımda ve seracılıkta yaygın bir şekilde kullanılan bu bitki gelişim düzenleyicileri bitkilerde özellikle de sebze ve meyvelerde tam yıkıma uğramadan depolanmakta, böylece bu besinlerin hayvanlar ve insanlar tarafından alınmasıyla da bitki büyüme düzenleyicileri canlı dokularda birikmektedirler. Bu veya benzer şekillerde vücuda alınan BGDler, vücutta farklı yollarla oluşan serbest radikallere karşı vücudun kendisinin savunma direncinin azalmasına neden olacaktır.

5. KAYNAKLAR

- [1] Karakuş, C., Köker, R., “Tarımda Bitki Gelişim Düzenleyicilerin (BGD) Kullanımı ve Hormon Riski”, <http://cevre.club.fatih.edu.tr/webyeni/konfreweb/konu25.pdf>
- [2] Yılmaz, H.R., Yüksel, E., “ İndol-3- Asetik Asit’in Üçüncül Nesil Farelerin Kemik İliği Hücrelerinde Mitotik İndeks Üzerinde Etkileri”, S.D.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi, 12(5), 46-49 (2005).
- [3] Akgül, H., “Büyüme ve Gelişim Düzenleyicileri”, Eğirdir Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü, 12, 1-50 (2008).
- [4] Can, E., Hatipoğlu, R., “Besi Ortamı, Oksin Çeşidi ve Konsantrasyonunun Sarı Sakal otu (*Bothriochloa ischaemum* (L.) Keng) Bitkisinin Genç Salkımlarından Kallus Oluşumu ve Bitki Rejenerasyonuna Etkisi”, Turk J Agric For, 24: 221–230 (2000).
- [5] Ünyayar, S., “Changes in Abscisic Acid and Indole-3-Acetic Acid Concentrations in *Funalia trogii* (Berk.) Bondartsev & Singer and *Phanerochaete chrysosporium* Burds. ME446 Subjected to Salt Stress”. Turk J Bot, 26: 1-4 (2002).
- [6] Kireççi, O.A., “ Bazı Sentetik Hormonların (Giberillik asit, Spermin, Spermidin, Putresin) Fesleğen (*Ocimum basilicum*) Bitkisi Üzerinde Morfolojik Yapı ve Uçucu Yağ Kalitesine Etkisi”, Yüksek Lisans Tezi, Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Kahramanmaraş, 2006: 68.
- [7] Yılmaz, H.R., Yüksel, E., Türköz, Y., “F2 Nesil Farelerde Indol-3-Asetik Asitin Böbrek Katalaz, Süperoksit Dismutaz ve Glutasyon Peroksidaz Aktiviteleri Üzerine Olan Etkisi”, Van Tıp Dergisi, 11 (3):64-68 (2004).
- [8] Çelik, İ., Tülüce, Y., Özok, N., “Effects of Indoleacetic Acid and Kinetin on Lipid Peroxidation Levels in Various Rat Tissues”, Turk J Biol, 26: 193-196 (2002).
- [9] Canbay, E., Çelik, K., Dökmetaş, S., Karadayı, K., Turan, M., Keleştemur, F., Şen, M., “Tiroid Kanserli Hastalarda Değişen Antioksidan Enzim Aktivitesi ve Lipid Peroksidasyonu”, C. Ü. Tıp Fakültesi Dergisi, 25 (4):151 – 156 (2003).
- [10] Yarıktaş, M., Döner, F., Doğru, H., Aynalı, G., Yönden, Z., Delibaş, N., “Baş-Boyun Maling Tümörlerinde Malondialdehit Düzeyleri ve Antioksidan Enzim Aktiviteleri”, S.D.Ü Tıp Fakültesi Dergisi, 10-(4) / 65-67 (2003).
- [11] Gürgöze, S., Şahin, T., Durak, M.H., “Memelilerde Ortalama Yaşam Süresi ve Yaşlanma Sürecinde Serbest Radikallerin Rolü”, İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg, 33 (1), 43-49 (2007).

- [12] Tosun, İ., Karadeniz, B., “Çay ve Çay Fenoliklerinin Antioksidan Aktivitesi”, OMÜ Zir. Fak. Dergisi, 20(1):78-83 (2005).
- [13] Kızıllı, Ö., Gül, Y., “Şap aşısı uygulanan besi sığırlarında antioksidan vitaminlerin klinik ve bazı hematolojik parametreler ile antioksidan enzim ve lipit peroksidasyon düzeylerine etkileri”. F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi, 18(2), 97-106 (2004).
- [14] Yüce, A., Aksakal, M., “Ratların Karaciğer ve Testis Dokusundaki Antioksidan Aktivite Üzerine Nar Suyunun Etkisi”, F.Ü. Sağlık Bilimleri Dergisi, 21 (6): 253 – 256 (2007).
- [15] Büyükkuroğlu, M.E., Süleyman, H., “Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz sikliği”, T Klin Tıp Bilimleri, 21:415-419 (2001).
- [16] Rencüzoğulları, N., “Ratlarda deneysel olarak oluşturulan kadmiyum toksikasyonu üzerine likopenin etkilerinin araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya (vet) Anabilim Dalı, Hatay (2006).
- [17] Fadılloğlu, E., Kaya, B., Erdoğan, H., Emre, M.H., Ünal, S., “Depresyonda plazma ksantin oksidaz, glutatyon peroksidaz Aktiviteleri ve plazma nitrik oksit seviyesi üzerine egzersizin etkisi”, Anadolu Psikiyatri Dergisi, 2(2):99-105 (2001).
- [18] Serbest oksijen radikalleri ve antioksidanlar, <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01.pdf>
- [19] Antmen, Ş.E., “Beta Talasemide Oksidatif Stres”, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı, Adana (2005).
- [20] Ezberci, F., İmrek, E., Bülbüloğlu, E., Kurutaş, E.B., İmrek, S., “Sıçanlarda Karıncı Yapışıklıkları Önlemede İntraperitoneal Katalaz'ın Etkisi”, Vakıf Gureba Eğitim ve Araştırma Hastanesi Dergisi, 4 (2): 50-54 (2006).
- [21] Çelik, İ., Özbek, H., Tülüce, Y., “Effects of Subchronic Treatment of Some Plant Growth Regulators on Serum Enzyme Levels in Rats”, Turk J Biol, 26: 73-76 (2002).
- [22] Siliğ, Y., Çelik, K., Atalay, A., “Daminozid Uygulamasından Sonra Elde Edilen Civcivlerde Karaciğer Sitoplazmik Glutatyon-S Transferaz ve Mikrozomal Nitrozodimetilamin Demetilaz Aktivitelerindeki Değişiklikler”, Turk J Biol, 24: 119–126 (2000).
- [23] Yeşilada, E. “The Effect of Kinetin, Gibberellic Acid and Indole Acetic Acid on EMS-Induced Somatic Mutation and Recombination in Drosophila melanogaster”, Turk J Biol, 24: 279–284 (2000).

- [24] Küfrevioğlu, İ., Ö., Özmen, İ., “Effects of antiemetic drugs on glucose 6-phosphate dehydrogenase and some antioxidant enzymes”, *Pharmacological Research*, 50: 499–504 (2004).
- [25] Erdoğan, O., Hisar, O., Köroğlu, G., Çiltaş, A., “Sublethal ammonia and urea concentrations inhibit rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) erythrocyte glucose-6 phosphate dehydrogenase”, *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 141: 145 – 150 (2005).
- [26] Çiftci, M., Türkoğlu, V., Çoban, T.A., “Effects of some drugs on hepatic glucose 6-phosphate dehydrogenase activity in Lake Van Fish (*Chalcalburnus Tarischii* Pallas, 1811)”, *Journal of Hazardous Materials*, 143: 415–418 (2007).
- [27] Küfrevioğlu, İ.Ö., Özmen, İ., Çiftci, M., Pençe, S., Büyükokuroğlu, M.E., “Effects of metamizol and magnesium sulfate on enzyme activity of glucose 6-phosphate dehydrogenase from human erythrocyte *in vitro* and rat erythrocyte *in vivo*”, *Clinical Biochemistry* 34: 297–302 (2001).
- [28] Özmen, İ., “Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz üzerine bazı sitotoksik kimyasalların etkisi” *SDÜ Fen Dergisi (e-dergi)*, 4 (1) 112-119 (2009).
- [29] Bosch-Morell, F., Floh´e, L., Mar´ın, N., Romero, F.J., “4-Hydroxynonenal Inhibits Glutathione Peroxidase: Protection by Glutathione” *Free Radical Biology & Medicine*, 1383–1387 (1999).
- [30] Şentürk, M., “Glutasyon redüktaz enziminin insan eritrositlerinden Saflaştırılması ve bazı ilaçların enzim aktivitesi üzerine etkilerinin araştırılması” Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Erzurum,
- [31] Küfrevioğlu, İ.Ö., Çiftci, M., Çoban, K., A., Şentük, M., “Bazı metallerin insan eritrositlerinden saflaştırılan Glutasyon redüktaz enzimi üzerine *in vitro* etkilerinin İncelenmesi”.21.Ulusal Kimya Kongresi, 21-23 Ağustos 2007, İnönü üniversitesi, Malatya
- [32] Cho,H., Yoo, S., Kong, K., “Cloning of a rice tau class GST isozyme and characterization of its substrate specificity” *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 86: 110–115 (2006).
- [33] Dou, W., Wu, S., Hassan, M., W., Wang, J., “Purification and biochemical characterization of glutathione S-transferases from three strains of *Liposcelis bostrychophila* Badonnel (Psocoptera: Liposcelididae): Implication of insecticide resistance”, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 94: 10–14 (2009).
- [34] Rangel, A.D.P., Oca, Y.M., Lledı´as, F., Hansberg, W., “Molecular and kinetic study of catalase-1, a durable large catalase of *neurospora crassa*”, *Free Radical Biology & Medicine*, 1323–1333 (2001).

- [35] Lanza, V., Vecchio, G., “New conjugates of superoxide dismutase/catalase mimetics with cyclodextrins”, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 103: 381–388 (2009).
- [36] Puglisi, A., Tabbi, G., Vecchio, G., “Bioconjugates of cyclodextrins of manganese salen-type ligand with superoxide dismutase activity”, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 98: 969–976 (2004).
- [37] Kostyuk, V.A., Potapovich, A.I., Strigunova, E.N., Kostyuk, T.V., Afanas’ev, I.B., “Experimental evidence that flavonoid metal complexes may act as mimics of superoxide dismutase”, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 428: 204–208 (2004).
- [38] Doğan, S., “The in vitro effects of some pesticides on carbonic anhydrase activity of *Oncorhynchus mykiss* and *Cyprinus carpio carpio* fish”, *Journal of Hazardous Materials*, A132: 171–176 (2006).
- [39] Beutler, E., 1984. *Red Cell Metabolism*. Grune & Stratton, Inc. Orlando, 3rd ed, USA.
- [40] Bayır, A., “Hınıs çayı (Murat havzası)’nda yaşayan siraz balığı (*Capoeta capoeta umbla*)’nın antioksidan enzim aktiviteleri, serum lipitleri, lipoproteinleri ve hematolojik parametrelerin mevsimsel değişimlerinin incelenmesi”, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Anabilim Dalı, Erzurum (2005).
- [41] Habig, W., Pabst, M. J and Jakoby, W. B., 1974. Glutathione S- Transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 249 (22), 7130-7139.
- [42] Çuvaç, M., “Apoplastik antioksidatif enzim aktiviteleri Üzerine B, Cu, Zn, Al, Pb ve Cd’nin etkilerinin incelenmesi”, Yüksek lisans tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Erzurum (2007).
- [43] Karabulut, B A., Özerol, E., Temel, İ., Gözükara, E M., Akyol, Ö., “Yaş ve Sigara İçiminin Eritrosit Katalaz Aktivitesi ve Bazı Hematolojik Parametreler Üzerine Etkisi”, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 9(2) 85-88 (2002).
- [44] Habdous, M., Herbeth, B., Vincent-Viry, M., Lamont, J.V., Fitzgerald, P. S., Visvikis, S. ve Siest, G., “Serum total antioxidant status, erythrocyte superoxide dismutase and whole-blood glutathione peroxidase activities in the stanislas cohort:influencing factors and reference”, *Clin. Chem. Lab. Med*, 41(2), 209-215 (2003).