

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



**FARKLI KOYUN IRKLARINDAN KARBONİK ANHİDRAZ  
ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI PESTİSİTLERİN ENZİM  
ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**YILDIZ YALÇIN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Jüri Üyeleri :** Doç. Dr. SEMRA IŞIK (Tez Danışmanı)  
Prof. Dr. SERAP BEYAZTAŞ UZUNOĞLU  
Dr. Öğr. Üyesi BAŞAK GÖKÇE

**BALIKESİR, TEMMUZ - 2022**

## **ETİK BEYAN**

Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak tarafımda hazırlanan “**Farklı Koyun Irklarından Karbonik Anhidraz Enziminin Saflaştırılması ve Bazı Pestisitlerin Enzim Üzerine Etkilerinin Araştırılması**” 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.

**Yıldız YALÇIN**

## ÖZET

**FARKLI KOYUN IRKLARINDAN KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİNİN  
SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI PESTİSİTLERİN ENZİM ÜZERİNE  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
YILDIZ YALÇIN  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI**

**(TEZ DANIŞMANI: DOÇ. DR. SEMRA IŞIK)**

**BALIKESİR, TEMMUZ - 2022**

Bu çalışmada, canlıların yapısında son derece önemli fizyolojik role sahip karbonik anhidraz (CA, E.C.4.2.1.1) enziminin Dorset Down, Merinos, Kıvırcık koyun kan eritrositlerinden saflaştırılmıştır ve bazı pestisitlerin enzim üzerine inhibisyon etkileri araştırılmıştır. Karbonik anhidraz enzimi, Sepharose - 4B - etilendiamin - 4-izotiyosiyanat benzen sülfonamid jeli kullanılarak afinite kromatografisi tekniği ile saflaştırılmıştır. Enzim için %verim ve saflaştırma dereceleri sırasıyla Dorset down ırkı için %22.48 verim ve 320.5 kat, Kıvırcık ırkı için % 28.3 verim ve 182.66 kat ve Merinos ırkı için %16.79 verim ve 69.1 kat saflaştırıldığı bulunmuştur. Enzim saflığı kontrolü Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) ile kontrol edilerek üç koyun türü için de enzimin moleküler ağırlığı yaklaşık 29 kDa olarak tespit edilmiştir. Dorset down, Kıvırcık ve Merinos CA enziminin fenil asetat substratına karşı  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri belirlenmiştir. Dorset Down, Merinos, Kıvırcık CA enzimi  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri sırasıyla 0.007  $\mu M$ , 0.116 U/mLdk, 0.015  $\mu M$ , 0.443 U/mLdk, 0.015  $\mu M$ , 0.443 U/mLdk olarak bulunmuştur. Bu çalışmada kullanılan pestisitler karbonik anhidraz enzimini *in vitro* olarak farklı düzeylerde inhibe ettiği tespit edilmiştir. Dorset Down CA enzimi için en güçlü inhibitör Karbofuran ( $IC_{50}$ : 4.90  $\mu M$ ) ve en zayıf inhibitör Klorpirifos – Metil'dir ( $IC_{50}$ : 126.42  $\mu M$ ). Kıvırcık CA enzimi için en güçlü inhibitör Amitraz ( $IC_{50}$ : 26.23  $\mu M$ ) ve en zayıf inhibitör Koumatetralil ( $IC_{50}$ : 61.45  $\mu M$ ) iken Merinos CA enzimi için en güçlü inhibitör Karbofuran ( $IC_{50}$ : 5.78  $\mu M$ ) ve en zayıf inhibitör ise Diklofluanid'dir ( $IC_{50}$ : 62.05  $\mu M$ ).

**ANAHTAR KELİMELER:** koyun, kan, afinite kromatografisi, karbonik anhidraz, pestisit

## ABSTRACT

### PURIFICATION OF CARBONIC ANHYDRASE ENZYME FROM DIFFERENT SHEEP BREEDS AND INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF SOME PESTICIDES ON ENZYME

MSC THESIS

YILDIZ YALÇIN

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE  
CHEMISTRY

(SUPERVISOR: ASSOC. PROF. DR. SEMRA IŞIK )

BALIKESİR, JULY - 2022

In this study, carbonic anhydrase (CA, E.C.4.2.1.1) enzyme, which has an extremely important physiological role in the structure of living things, was purified from Dorset Down, Merino, and Kivircik sheep blood erythrocytes and the inhibition effects of some pesticides on the enzyme were investigated. Carbonic anhydrase enzyme was purified by affinity chromatography technique using Sepharose – 4B – ethylenediamine – 4 – isothiocyanate benzene sulfonamide gel. The yield and purification degrees for the enzyme were found to be 22.48% yield and 320.5 times for the Dorset down breed, 28.3% yield and 182.66 times for the Kivircik breed, and 16.79% yield and 69.1 times for the Merino breed, respectively. Enzyme purity was checked by Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE), and the molecular weight of the enzyme was determined to be approximately 29 kDa for all three sheep breeds.  $K_m$  and  $V_{max}$  values of Dorset down, Kivircik and Merino CA enzymes were determined against phenyl acetate substrate. Dorset Down, Merino, Kivircik CA enzyme  $K_m$  and  $V_{max}$  values were found as 0.007  $\mu\text{M}$ , 0.116 U/mL.min, 0.015  $\mu\text{M}$ , 0.443 U/mL.min, 0.015  $\mu\text{M}$ , 0.443 U/mL.min, respectively. The pesticides used in this study were found to inhibit the carbonic anhydrase enzyme at different levels *in vitro*. The strongest inhibitor for Dorset Down CA enzyme is Carbofuran ( $IC_{50}$ : 4.90  $\mu\text{M}$ ) and the weakest inhibitor is Chlorpyrifos-Methyl ( $IC_{50}$ : 126.42  $\mu\text{M}$ ). For the Kivircik CA enzyme, the strongest inhibitor is Amitraz ( $IC_{50}$ : 26.23  $\mu\text{M}$ ) and the weakest inhibitor is Coumatetralil ( $IC_{50}$ : 61.45  $\mu\text{M}$ ), while the strongest inhibitor for Merino CA enzyme is Carbofuran ( $IC_{50}$ : 5.78  $\mu\text{M}$ ) and the weakest inhibitor is Diclofluanid ( $IC_{50}$ : 62.05  $\mu\text{M}$ ).

**KEYWORDS:** sheep, blood, affinity chromatography, carbonic anhydrase, pesticide

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

<b>ÖZET</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iii</b>
<b>TABLO LİSTESİ</b> .....	<b>viii</b>
<b>SEMBOL LİSTESİ</b> .....	<b>xi</b>
<b>ÖNSÖZ</b> .....	<b>xii</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1 Çalışmamızda Kullanılan Enzim; Karbonik Anhidraz .....	2
1.1.1 Karbonik Anhidraz İzoenzimleri.....	3
1.1.2 Karbonik Anhidraz Enziminin Bulunduğu Reaksiyonlar .....	5
1.1.3 Karbonik Anhidraz'ın Katıldığı Reaksiyonların Mekanizması .....	5
1.1.4 Karbonik Anhidraz Enziminin Fizyolojik Fonksiyonları .....	6
1.2 Pestisit .....	7
1.2.1 Pestisitlerin Kullanım Alanları.....	9
1.3 Araştırmamızda İnhibisyon Etkisine Bakılacak Pestisitler.....	10
1.3.1 Propoksur .....	10
1.3.2 Alaklor .....	10
1.3.3 1 – Naftol .....	11
1.3.4 Klorpirifos .....	11
1.3.5 Simazin.....	12
1.3.6 Diklofluanid .....	12
1.3.7 Klorpirifos – Metil .....	13
1.3.8 Azinfos – Etil .....	13
1.3.9 Dimetaklor.....	14
1.3.10 Tebukonazol .....	14
1.3.11 Amitraz .....	15
1.3.12 Dazomet.....	16
1.3.13 Koumatetralil .....	16
1.3.14 Karbofuran.....	17
1.3.15 Karbaril .....	17
1.4 Araştırmamızda Kullanılan Koyun Türleri.....	18
1.5 Araştırmanın Amacı.....	20
<b>2. MATERYAL VE METOD</b> .....	<b>21</b>
2.1 Materyal .....	21
2.1.1 Kullanılan Kimyasallar .....	21
2.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar.....	22
2.1.3 Kullanılan Çözeltiler .....	22
2.1.3.1 Afinite Kromatografisinde Kullanılan Jelin Sentezlenmesi İçin Gereken Çözeltiler 22	
2.1.3.2 Afinite Jeline Enzimin Tutunması ve Saflaştırılması İçin Gereken Çözeltiler .....	23
2.1.3.3 SDS-PAGE’te Kullanılan Tamponlar .....	23
2.1.3.4 Proteinleri Tayin Etmek İçin Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması .....	24

2.1.3.5	CO <sub>2</sub> -Hidrataz Aktivite Ölçümü İçin Hazırlanacak Çözeltiler.....	24
2.1.3.6	Esteraz Aktivitesi Tayini İçin Hazırlanacak Çözeltiler.....	25
2.1.3.7	Kullandığımız Pestisit Çözeltilerinin Hazırlanması.....	25
2.2	Yöntemler.....	26
2.2.1	Afinite Jelinin Sentezlenmesi.....	26
2.2.2	Karbonik Anhidrazın Afinite Jeli Kullanılarak Saflaştırılması.....	26
2.2.2.1	Hemolizat Hazırlanması.....	26
2.2.2.2	Hazırlanan Hemolizatın Kolona Tatbiki ve CA'nın Elüe Edilmesi.....	27
2.2.3	Aktivite Tayininde Kullanılan Yöntemler.....	27
2.2.3.1	CO <sub>2</sub> – Hidrataz Aktivitesi.....	27
2.2.3.2	Esteraz Aktivitesi Yöntemi ile Aktivite Ölçümü.....	28
2.2.3.3	Pestisitlerin İnhibisyon Etkileri ve IC <sub>50</sub> Değerlerinin Belirlenmesi.....	28
2.2.3.4	K <sub>m</sub> ve V <sub>max</sub> Değerlerinin Belirlenmesi.....	28
2.2.4	Protein Tayini.....	28
2.2.4.1	Kalitatif Protein Tayini.....	28
2.2.4.2	Bradford Yöntemiyle Protein Tayini.....	28
2.2.5	SDS – PAGE ile Enzimin Saflığının Kontrolü ve Molekül Ağırlığı Belirlenmesi....	29
<b>3.</b>	<b>BULGULAR.....</b>	<b>30</b>
3.1	Enzim Saflaştırılması.....	30
3.1.1	Afinite Kromatografisi Yöntemi ile Saflaştırma.....	30
3.1.2	Protein Derişiminin Belirlenmesi İçin Hazırlanan Standart Eğri Grafiği.....	31
3.1.3	Afinite Kromatografisi Yöntemi Kullanılarak Yapılan Saflaştırmanın Basamakları	32
3.1.4	Koyun Irklarındaki Eritrositlerinde Bulunan Karbonik Anhidraz Enziminin SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi.....	33
3.2	Dorset Down, Kıvrıkcık ve Merinos Koyun Irklarının Eritrositlerinden Saflaştırılan CA Enzimlerinin Hidrataz Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon Etkileri.....	33
3.2.1	Karbonik Anhidraz Enzimi Hidrataz Aktivitesi IC <sub>50</sub> Değerleri.....	64
3.3	4 – Nitrofenilasetat Kullanılarak K <sub>m</sub> ve V <sub>max</sub> Saptanması.....	65
<b>4.</b>	<b>TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>	<b>67</b>
<b>5.</b>	<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>72</b>
	<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>81</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 1.1: Mide çeperi hücrelerinde CA enziminin rolü [20].	3
Şekil 1.2: Karbonik anhidraz enzimi hidrataz aktivitesinin reaksiyonu [30].	6
Şekil 1.3: Propoksür pestisitinin formülünün açık gösterimi.	10
Şekil 1.4: Alaklor pestisitinin formülünün açık gösterimi.	11
Şekil 1.5: 1 – Naftol pestisitinin formülünün açık gösterimi.	11
Şekil 1.6: Klorpirifos’un kimyasal formülünün açık yapısı.	12
Şekil 1.7: Simazin pestisitinin formülünün açık gösterimi.	12
Şekil 1.8: Diklofluanid pestisitinin formülünün açık gösterimi.	13
Şekil 1.9: Klorpirifos – Metil’in kimyasal formülünün açık yapısı.	13
Şekil 1.10: Azinfos – Etil pestisitinin formülünün açık gösterimi.	14
Şekil 1.11: Dimetaklor pestisitinin formülünün açık gösterimi.	14
Şekil 1.12: Tebukonazol’un kimyasal formülünün açık yapısı.	15
Şekil 1.13: Amitraz pestisitinin formülünün açık gösterimi.	16
Şekil 1.14: Dazomet pestisitinin formülünün açık gösterimi.	16
Şekil 1.15: Koumatetralil pestisitinin formülünün açık gösterimi.	17
Şekil 1.16: Karbofuran pestisitinin formülünün açık gösterimi.	17
Şekil 1.17: Karbaril’in kimyasal formülünün açık yapısı.	18
Şekil 1.18: Kıvırcık Koyun [83].	19
Şekil 1.19: Merinos Koyunu [83].	19
Şekil 1.20: Dorset Down Koyunu [84].	19
Şekil 3.1: Dorset Down koyun ırkından saflaştırılan CA enziminin Absorbans (280 nm) – Aktivite (EU/mL) grafiği.	30
Şekil 3.2: Kıvırcık koyun ırkından saflaştırılan CA enziminin Absorbans (280 nm) – Aktivite (EU/mL) grafiği.	31
Şekil 3.3: Merinos koyun ırkından saflaştırılan CA enziminin Absorbans (280 nm) – Aktivite (EU/mL) grafiği.	31
Şekil 3.4: Bradford yöntemi kullanılarak protein tayini için hazırlanan standart grafik. ..	32
Şekil 3.5: Afinite kolonundan saflaştırılan CA enzimi için SDS-PAGE elektroforezi. 1. Marker, 2. Dorset Down CA enzimi, 3. Kıvırcık CA enzimi, 4. Merinos CA enzimi.	33
Şekil 3.6: Dorset Down CA enziminin farklı propoksür derişimleriyle IC <sub>50</sub> ’nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.	34
Şekil 3.7: Kıvırcık CA enziminin farklı propoksür derişimleriyle çalışılan IC <sub>50</sub> ’nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.	35
Şekil 3.8: Merinos CA enziminin farklı propoksür derişimleriyle IC <sub>50</sub> ’nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.	35
Şekil 3.9: Dorset Down CA enziminin farklı alaklor derişimleriyle IC <sub>50</sub> ’nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.	36
Şekil 3.10: Kıvırcık CA enziminin farklı alaklor derişimleriyle IC <sub>50</sub> ’nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.	37
Şekil 3.11: Merinos CA enziminin farklı alaklor derişimleriyle IC <sub>50</sub> ’nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.	37
Şekil 3.12: Dorset Down CA enziminin farklı 1-Naftol derişimleriyle IC <sub>50</sub> ’nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.	38
Şekil 3.13: Kıvırcık CA enziminin farklı 1-Naftol derişimleriyle IC <sub>50</sub> ’nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.	39

<b>Şekil 3.14:</b> Merinos CA enziminin farklı 1-Naftol derişimleriyle IC <sub>50</sub> 'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.....	39
<b>Şekil 3.15:</b> Dorset Down CA enziminin farklı Klorpirifos derişimleriyle IC <sub>50</sub> 'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.....	40
<b>Şekil 3.16:</b> Kıvırcık CA enziminin farklı Klorpirifos derişimleriyle IC <sub>50</sub> 'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.....	41
<b>Şekil 3.17:</b> Merinos CA enziminin farklı Klorpirifos derişimleriyle IC <sub>50</sub> 'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.....	41
<b>Şekil 3.18:</b> Dorset Down CA enziminin farklı Simazin derişimleriyle IC <sub>50</sub> 'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.....	42
<b>Şekil 3.19:</b> Kıvırcık CA enziminin farklı Simazin derişimleriyle IC <sub>50</sub> 'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.....	43
<b>Şekil 3.20:</b> Merinos CA enziminin farklı Simazin derişimleriyle IC <sub>50</sub> 'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.....	43
<b>Şekil 3.21:</b> Dorset Down CA enziminin farklı Diklofluanid derişimleriyle IC <sub>50</sub> 'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.....	44
<b>Şekil 3.22:</b> Kıvırcık CA enziminin farklı Diklofluanid derişimleriyle IC <sub>50</sub> 'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.....	45
<b>Şekil 3.23:</b> Merinos CA enziminin farklı Diklofluanid derişimleriyle IC <sub>50</sub> 'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.....	45
<b>Şekil 3.24:</b> Dorset Down CA enziminin farklı Klorpirifos – Metil derişimleriyle IC <sub>50</sub> 'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.....	46
<b>Şekil 3.25:</b> Kıvırcık CA enziminin farklı Klorpirifos – Metil derişimleriyle IC <sub>50</sub> 'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.....	47
<b>Şekil 3.26:</b> Merinos CA enziminin farklı Klorpirifos – Metil derişimleriyle IC <sub>50</sub> 'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.....	47
<b>Şekil 3.27:</b> Dorset Down CA enziminin farklı Azinfos – Etil derişimleriyle IC <sub>50</sub> 'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.....	48
<b>Şekil 3.28:</b> Kıvırcık CA enziminin farklı Azinfos – Etil derişimleriyle IC <sub>50</sub> 'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.....	49
<b>Şekil 3.29:</b> Merinos CA enziminin farklı Azinfos – Etil derişimleriyle IC <sub>50</sub> 'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.....	49
<b>Şekil 3.30:</b> Dorset Down CA enziminin farklı Dimetaklor derişimleriyle IC <sub>50</sub> 'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.....	50
<b>Şekil 3.31:</b> Kıvırcık CA enziminin farklı Dimetaklor derişimleriyle IC <sub>50</sub> 'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.....	51
<b>Şekil 3.32:</b> Merinos CA enziminin farklı Dimetaklor derişimleriyle IC <sub>50</sub> 'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.....	51
<b>Şekil 3.33:</b> Dorset Down CA enziminin farklı Tebukonazol derişimleriyle IC <sub>50</sub> 'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.....	52
<b>Şekil 3.34:</b> Kıvırcık CA enziminin farklı Tebukonazol derişimleriyle IC <sub>50</sub> 'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.....	53
<b>Şekil 3.35:</b> Merinos CA enziminin farklı Tebukonazol derişimleriyle IC <sub>50</sub> 'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.....	53
<b>Şekil 3.36:</b> Dorset Down CA enziminin farklı Amitraz derişimleriyle IC <sub>50</sub> 'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.....	54
<b>Şekil 3.37:</b> Kıvırcık CA enziminin farklı Amitraz derişimleriyle IC <sub>50</sub> 'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.....	55
<b>Şekil 3.38:</b> Merinos CA enziminin farklı Amitraz derişimleriyle IC <sub>50</sub> 'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.....	55



<b>Şekil 3.39:</b> Dorset Down CA enziminin farklı Dazomet derişimleriyle IC <sub>50</sub> 'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.....	56
<b>Şekil 3.40:</b> Kıvırcık CA enziminin farklı Dazomet derişimleriyle IC <sub>50</sub> 'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.....	57
<b>Şekil 3.41:</b> Merinos CA enziminin farklı Dazomet derişimleriyle IC <sub>50</sub> 'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.....	57
<b>Şekil 3.42:</b> Dorset Down CA enziminin farklı Koumatetralil derişimleriyle IC <sub>50</sub> 'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.....	58
<b>Şekil 3.43:</b> Kıvırcık CA enziminin farklı Koumatetralil derişimleriyle IC <sub>50</sub> 'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.....	59
<b>Şekil 3.44:</b> Merinos CA enziminin farklı Koumatetralil derişimleriyle IC <sub>50</sub> 'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.....	59
<b>Şekil 3.45:</b> Dorset Down CA enziminin farklı Karbofuran derişimleriyle IC <sub>50</sub> 'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.....	60
<b>Şekil 3.46:</b> Kıvırcık CA enziminin farklı Karbofuran derişimleriyle IC <sub>50</sub> 'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.....	61
<b>Şekil 3.47:</b> Merinos CA enziminin farklı Karbofuran derişimleriyle IC <sub>50</sub> 'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.....	61
<b>Şekil 3.48:</b> Dorset Down CA enziminin farklı Karbaril derişimleriyle IC <sub>50</sub> 'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.....	62
<b>Şekil 3.49:</b> Kıvırcık CA enziminin farklı Karbaril derişimleriyle IC <sub>50</sub> 'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.....	63
<b>Şekil 3.50:</b> Merinos CA enziminin farklı Karbaril derişimleriyle IC <sub>50</sub> 'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.....	63
<b>Şekil 3.51:</b> Dorset Down koyun ırkının kan eritrositlerinden saflaştırılan CA enziminin 4-nitrofenilasetat substratı ile çizilen grafik.....	65
<b>Şekil 3.52:</b> Kıvırcık Koyun ırkının kan eritrositlerinden saflaştırılan CA enziminin 4-nitrofenilasetat substratı ile çizilen grafik.....	65
<b>Şekil 3.53:</b> Merinos Koyun ırkının kan eritrositlerinden saflaştırılan CA enziminin 4-nitrofenilasetat substratı ile çizilen grafik.....	65

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

<b>Tablo 1.1:</b> İnsanlarda karbonik anhidraz enzimi izoenzimleri, görevleri ve bulunduğu bölge [26].	4
<b>Tablo 1.2:</b> İnsanlarda pestisit birikimi etkileri [43].	8
<b>Tablo 2.1:</b> Kullanılan kimyasal maddeler.	21
<b>Tablo 2.2:</b> Kullanılan cihaz ve model isimleri.	22
<b>Tablo 2.3:</b> Elektroforez’de kullanılan jellerin içinde kullanılan madde miktarları.	24
<b>Tablo 2.4:</b> Kullanılan pestisitlerin hazırlanması.	25
<b>Tablo 3.1:</b> Koyun ırklarındaki CA enzimleri için oluşturulan saflaştırma tablosu.	32
<b>Tablo 3.2:</b> İnhibitör olarak kullanılan Propoksur’un Dorset Down CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.	34
<b>Tablo 3.3:</b> İnhibitör olarak kullanılan Propoksur’un Kıvrıcık CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.	34
<b>Tablo 3.4:</b> İnhibitör olarak kullanılan Propoksur’un Merinos CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.	35
<b>Tablo 3.5:</b> İnhibitör olarak kullanılan Alaklor’un Dorset Down CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.	36
<b>Tablo 3.6:</b> İnhibitör olarak kullanılan Alaklor’un Kıvrıcık CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.	36
<b>Tablo 3.7:</b> İnhibitör olarak kullanılan Alaklor’un Merinos CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.	37
<b>Tablo 3.8:</b> İnhibitör olarak kullanılan 1-Naftol’un Dorset Down CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.	38
<b>Tablo 3.9:</b> İnhibitör olarak kullanılan 1-Naftol’un Kıvrıcık CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.	38
<b>Tablo 3.10:</b> İnhibitör olarak kullanılan 1-Naftol’un Merinos CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.	39
<b>Tablo 3.11:</b> İnhibitör olarak kullanılan Klorpirifos’un Dorset Down CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.	40
<b>Tablo 3.12:</b> İnhibitör olarak kullanılan Klorpirifos’un Kıvrıcık CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.	40
<b>Tablo 3.13:</b> İnhibitör olarak kullanılan Klorpirifos’un Merinos CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.	41
<b>Tablo 3.14:</b> İnhibitör olarak kullanılan Simazin’in Dorset Down CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.	42
<b>Tablo 3.15:</b> İnhibitör olarak kullanılan Simazin’in Kıvrıcık CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.	42
<b>Tablo 3.16:</b> İnhibitör olarak kullanılan Simazin’in Merinos CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.	43
<b>Tablo 3.17:</b> İnhibitör olarak kullanılan Diklofluanid’in Dorset Down CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.	44
<b>Tablo 3.18:</b> İnhibitör olarak kullanılan Diklofluanid’in Kıvrıcık CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.	44
<b>Tablo 3.19:</b> İnhibitör olarak kullanılan Diklofluanid’in Merinos CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.	45

<b>Tablo 3.20:</b> İnhibitör olarak kullanılan Klorpirifos – Metil’in Dorset Down CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.....	46
<b>Tablo 3.21:</b> İnhibitör olarak kullanılan Klorpirifos – Metil’in Kıvrıcık CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.....	46
<b>Tablo 3.22:</b> İnhibitör olarak kullanılan Klorpirifos – Metil’in Merinos CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.....	47
<b>Tablo 3.23:</b> İnhibitör olarak kullanılan Azinfos – Etil’in Dorset Down CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.....	48
<b>Tablo 3.24:</b> İnhibitör olarak kullanılan Azinfos – Etil’in Kıvrıcık CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri. ....	48
<b>Tablo 3.25:</b> İnhibitör olarak kullanılan Azinfos – Etil’in Merinos CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri. ....	49
<b>Tablo 3.26:</b> İnhibitör olarak kullanılan Dimetaklor’un Dorset Down CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.....	50
<b>Tablo 3.27:</b> İnhibitör olarak kullanılan Dimetaklor’un Kıvrıcık CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri. ....	50
<b>Tablo 3.28:</b> İnhibitör olarak kullanılan Dimetaklor’un Merinos CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri. ....	51
<b>Tablo 3.29:</b> İnhibitör olarak kullanılan Tebukonazol’un Dorset Down CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.....	52
<b>Tablo 3.30:</b> İnhibitör olarak kullanılan Tebukonazol’un Kıvrıcık CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri. ....	52
<b>Tablo 3.31:</b> İnhibitör olarak kullanılan Tebukonazol’un Merinos CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri. ....	53
<b>Tablo 3.32:</b> İnhibitör olarak kullanılan Amitraz’ın Dorset Down CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri. ....	54
<b>Tablo 3.33:</b> İnhibitör olarak kullanılan Amitraz’ın Kıvrıcık CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri. ....	54
<b>Tablo 3.34:</b> İnhibitör olarak kullanılan Amitraz’ın Merinos CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri. ....	55
<b>Tablo 3.35:</b> İnhibitör olarak kullanılan Dazomet’in Dorset Down CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.....	56
<b>Tablo 3.36:</b> İnhibitör olarak kullanılan Dazomet’in Kıvrıcık CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri. ....	56
<b>Tablo 3.37:</b> İnhibitör olarak kullanılan Dazomet’in Merinos CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri. ....	57
<b>Tablo 3.38:</b> İnhibitör olarak kullanılan Koumatetralil’in Dorset Down CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.....	58
<b>Tablo 3.39:</b> İnhibitör olarak kullanılan Koumatetralil’in Kıvrıcık CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri. ....	58
<b>Tablo 3.40:</b> İnhibitör olarak kullanılan Koumatetralil’in Merinos CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri. ....	59
<b>Tablo 3.41:</b> İnhibitör olarak kullanılan Karbofuran’ın Dorset Down CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.....	60
<b>Tablo 3.42:</b> İnhibitör olarak kullanılan Karbofuran’ın Kıvrıcık CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri. ....	60
<b>Tablo 3.43:</b> İnhibitör olarak kullanılan Karbofuran’ın Merinos CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri. ....	61
<b>Tablo 3.44:</b> İnhibitör olarak kullanılan Karbaril’in Dorset Down CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri. ....	62

<b>Tablo 3.45:</b> İnhibitör olarak kullanılan Karbaril'in Kıvrıcık CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri. ....	62
<b>Tablo 3.46:</b> İnhibitör olarak kullanılan Karbaril'in Merinos CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri. ....	63
<b>Tablo 3.47:</b> Karbonik Anhidraz Enzimi Hidrataz IC <sub>50</sub> Değerleri.....	64
<b>Tablo 3.48:</b> CA enzimleri için bulunan V <sub>max</sub> - K <sub>m</sub> değerleri.....	66
<b>Tablo 4.1:</b> İnsan kanından saflaştırılan hCA-I ve hCA-II enzimleri [33] ile üç farklı koyun kanından saflaştırılan CA enzimleri üzerine pestisitlerin IC <sub>50</sub> değerleri karşılaştırılması.....	70

## SEMBOL LİSTESİ

<b>CA</b>	: Karbonik anhidraz
<b>DMSO</b>	: Dimetil Sulfoksit
<b>E</b>	: Enzim
<b>E.C.</b>	: Enzim kod numarası
<b>EU</b>	: Enzim Ünitesi
<b>hCA</b>	: İnsan karbonik anhidraz enzimi
<b>I</b>	: İnhibitör
<b>IC<sub>50</sub></b>	: Enzimin aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
<b>K<sub>m</sub></b>	: Michaelis sabiti
<b>M</b>	: Molarite
<b>M<sub>A</sub></b>	: Molekül ağırlığı
<b>PAGE</b>	: Poliakrilamid jel elektroforezi
<b>rpm</b>	: Bir dakikadaki devir
<b>S</b>	: Substrat
<b>SDS</b>	: Sodyum Dodesil Sülfat
<b>TEMED</b>	: N,N,N',N'-Tetrametilendiamin
<b>V</b>	: Reaksiyon hızı
<b>V<sub>max</sub></b>	: Reaksiyonun maksimum hızı

## ÖNSÖZ

Yüksek Lisans eğitimimin her adımında bana bilgi ve tecrübesiyle yol gösteren, sonsuz sabır ve sevgisiyle her zaman yanımda olan Danışman hocam Sayın Doç. Dr. Semra IŞIK'a,

Araştırma ve deneysel süreçlerimde her zaman bana destek olan, bilgisini ve tecrübesini benimle paylaşan, çalışmalarım boyunca yardımlarını gördüğüm ve her zaman bana güler yüzlü olan Kübra ÇIKRIKCI'ya,

Çalışmalarımda yardımlarını gördüğüm ve desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Nahit GENÇER ve Prof. Dr. Serap BEYAZTAŞ UZUNOĞLU'na,

Eğitimimin her aşamasında her zaman yanımda olan, her türlü desteği sunan ve bu günlere gelmemi sağlayan aileme teşekkürlerimi sunarım.

**Balıkesir, 2022**

**Yıldız YALÇIN**



# 1. GİRİŞ

Karbonik anhidraz (CA, karbonat hidrolizaz E.C.4.2.1.1), basit fakat fizyolojik olarak çok önemli bir tersinir reaksiyon olan karboksioksitin hidrasyonu ile bir karbonat ve proton üretimini katalizler. CA'lar  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\zeta$ -,  $\eta$ -,  $\theta$ - ve  $\iota$ -CA'lar olarak adlandırılan, farklı katlanmalara ve yapıya sahip olmalarına rağmen ortak CO<sub>2</sub> hidrataz aktivitesine sahip, düşük sekans benzerliğine bağlı sekiz farklı ailede gruplanır [1]. Karbonik anhidraz metaloenzimdir ve bu sebeple yapısında metal iyonu bulundurmaktadır. İzoenzimleri; Memelilerde CA enzimlerinden  $\alpha$ -CA ailesi olarak bilinen gen dizilimine bağlı 16 adet farklı izoenzimi, farklı dokularda dağılım gösterir. Ayrıca CA gen ailesine bağlantılı olan ve proteinlerde etkili olan protein (CARP) tanımlanmıştır. Hücre içerisinde buldukları konum da farklılık gösterir. CA I, CA-II, CA-III ve CA VII'nin buldukları konum itibari ile sitozoliktir. CA IV, CA IX, CA XII ve CA XIV membran yüzeyine bağlıdır. CA-VA ve CA-VB mitokondride, CA VI salgılarda (anne sütü ve tükürükte) bulunduğu bilinmektedir [2, 3, 4].

Karbonik anhidraz enzimi genellikle metabolik CO<sub>2</sub> transportunu ve dokuların genelinde H<sup>+</sup> ve HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> iyonlarının oluşumunda ve bu iyonların birikiminde önemli rol oynamaktadır [5]. Bu şekilde vücut sıvılarının dengelerinin kurulmasında önemlidir. Örneğin; böbrek, gastrik mukoza ve göz lensi dokularından saflaştırılan CA enzimlerinin biyokimyasal özellikleri incelenmiştir. Bazı bakterilerde, balık solungaçlarında ve salgı yapan organlarında, kabuk yapımına ihtiyaç duyan kabuklu hayvanlarda bu yapıyı sağlar ve alglerde bulunan bu enzimin farklı rollerde olduğu ayrıca ispatlanmıştır [6, 7, 8].

Pestisitler, genellikle tarımda kullanılmaktadır. Nüfus artışı sebebiyle, tarım ürünlerinin zarar görmeden üretilmesi gerekmektedir. Bu ürünlerin üretimi, depolanması ve tüketiminde, besin maddelerinin doğada bulunan birçok mikroorganizmadan korunması için pestisitler kullanılmaktadır. Ancak pestisitler çok toksik yapıdadır. Sadece zararlı mikroorganizmaların hedeflenmesi istense de, üretilen besinler üzerinde, dolaylı yollarla suya karışarak, hayvanların yediği otlarla vücutta birikmektedir. İnsanlar ve hayvanlar besin zincirinden dolayı birçok pestisiti vücuduna alır. Bu pestisitlerin etkileri vücutta biriktikçe ortaya çıkmaktadır [9].



Pestisitlerin birçok çeşidi bulunmaktadır. Yüksek düzeyde toksik yapısı olan ve parçalanması, bozulması gerçekleşmeyen, bazı klorlu pestisitler dışındaki tarım ilaçlarının sentezlenmesi bile çok fazla çevre kirliliğine sebep olmaktadır [9].

Ülkemizde koyun yetiştiriciliği büyük öneme sahiptir. Özellikle Marmara ve Ege bölgeleri coğrafi yapısı ve iklimsel koşullarından dolayı daha elverişlidir. Türkiye’de bulunan koyun miktarı 42.7 milyona ulaşarak, dünyada 9. sırada yerini almıştır. Koyunların et, süt ve yünü kullanılmaktadır. Türkiye’de süt üretiminin %10’u, et üretiminin ise %26’sı koyunlardan karşılanmaktadır [10].

### 1.1 Çalışmamızda Kullanılan Enzim; Karbonik Anhidraz

Karbonik anhidraz (CA) enzimi, birçok dokuda  $H^+$  ve  $HCO_3^-$  birikiminde rol almasının yanı sıra, genel olarak metabolik  $CO_2$  transportunu sağlamaktadır [11, 12].

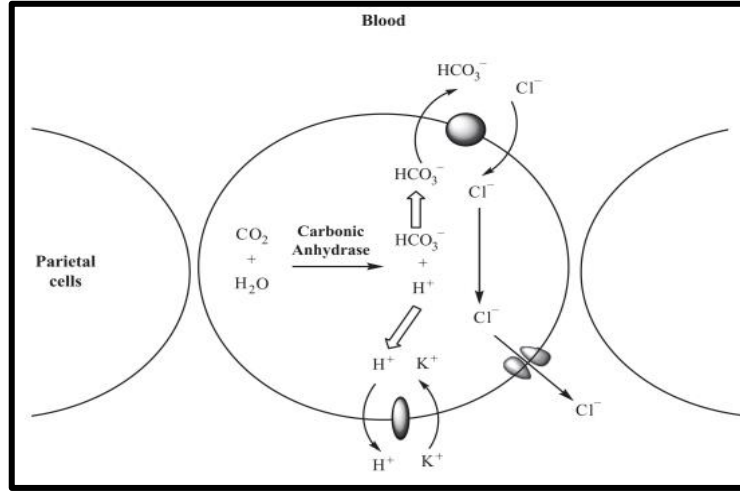


Ökaryotlarda, CA'lar  $CO_2$  veya  $HCO_3^-$ , pH homeostazının, elektrolitlerin salgılanmasının, biyosentetik süreçlerin ve fotosentezin taşınması ve sağlanmasında rol oynar [13, 14]. CA hidrataz/dehidrataz aktivitesi, çözülmüş inorganik karbon içeren çok sayıda fizyolojik fonksiyona katkıda bulunduğundan, CA'lar her tür organizmada birçok fizyolojik ve patolojik koşulda çok önemli biyomoleküllerdir [15-17]. Son yıllarda ve özellikle dünya çapında meydana gelen bakteriyel antibiyotik direncinin hızla ortaya çıkmasıyla, bakteriyel CA'ların işlevinin anlaşılması önemli ölçüde artmıştır. CA'lar, mikropların hayatta kalması, patojeniteleri ve virülansı için gereklidir [1, 18, 19].

CA turnover sayısı en yüksek olan enzimlerden biridir. Yapısında aktif bölge adı verilen cepler bulunur. Bu aktif bölgede bulunan su molekülünden  $H^+$  ayrılarak  $OH^-$  iyonunu meydana getirir. ( $H^+$ )’deki proton burada koparılarak oksijen atomunda pozitif yük sağlanır. Diğer taraftan  $OH^-$  iyonu merkezde bulunan  $CO_2$  ile reaksiyona girerek bikarbonat ( $HCO_3^-$ ) meydana getirilir [18].

Karbonik anhidraz enziminin sentezlendiği canlıların bazılarında farklı olsa da genellikle 29 kDa civarında molekül kütlesine sahip olduğu belirlenmiştir [20]. Karbonik anhidraz metaloenzimidir. Enzimin aktif bölgesinde Çinko ( $Zn^{+2}$ ) iyonu bulunur [11, 21]. Metaloenzimlerde aktif bölgede bulunan bu iyonların kimyasal aktiviteyi arttırdığı bilinmektedir. Bu özellik pozitif yüklü iyonların oluşmasını ve kinetik bağların kararlılığını korumasını sağlamaktadır [22].

CA; ilk sıgır eritrositlerinden saflaştırılmıştır ve sırasıyla; memelilerde, omurgalılarda, bitkilerde, alglerde ve bazı bakterilerde bulunmuştur [23].  $\text{CO}_2$ 'in hidrasyonunu ve  $\text{HCO}_3^-$ 'in dehidrasyonunu katalizleyen enzimdir [24].



Şekil 1.1: Mide çeperi hücrelerinde CA enziminin rolü [20].

### 1.1.1 Karbonik Anhidraz İzoenzimleri

Karbonik anhidrazlar, prokaryot ve ökaryotlarda yüksek miktarlarda bulunmaktadır. CA'lar  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\zeta$ -,  $\eta$ -,  $\theta$ - ve  $\iota$ -CA'lar olarak adlandırılan, farklı katlanmalara ve yapılaraya sahip olmalarına rağmen ortak  $\text{CO}_2$  hidrataz aktivitesine sahip, düşük sekans benzerliğine bağlı sekiz farklı ailede gruplanır [1]. Sekiz farklı CA sınıfı ortak bir atadan gelse de filogenetik olarak farklıdır. Her CA sınıfının temsili amino asit dizileri, farklı bir sınıfa ait diğer CA'ların polipeptit zinciri ile karşılaştırıldığında düşük dizi benzerliği, farklı kıvrımlar ve yapılar gösterir [25].

$\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\delta$ -,  $\eta$ - ve belki  $\theta$ -CA'lar katalitik metal iyonu olarak  $\text{Zn}^{+2}$  iyonunu kullanmaktadır.  $\gamma$ -CA  $\text{Fe}^{+2}$  iyonunu kullanmaktadır ancak  $\text{Zn}^{+2}$  ve  $\text{Co}^{+2}$  iyonlarıyla da aktiftirler [1].  $\zeta$ -CA, hem  $\text{Cd}^{+2}$  hem de  $\text{Zn}^{+2}$  ile aktif olan kambyalistik enzimlerdir [1, 25]. En son tanımlanan  $\iota$ -CA ise  $\text{Mn}^{+2}$  ve  $\text{Zn}^{+2}$  iyonlarını tercih ederek aktifleşmektedir [1].

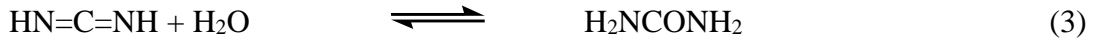
**Tablo 1.1:** İnsanlarda karbonik anhidraz enzimi izoenzimleri, görevleri ve bulunduğu bölge [26].

İzoenzim	Görevi	Katalitik Aktivite	Bulunduğu Bölge
hCA-I	İnsanların kanlarında bulunan eritrosit hücrelerindeki bir izoenzimdir. Solunum olayında görev almaktadır.	Düşük	Sitozol
hCA-II	Böbrek dokularında ki eksikliğinde böbrek taşı ve kireçlenme gibi sorunlar oluşur. Ayrıca kemik ve beyinde de önemlidir.	Yüksek	Sitozol
hCA-III	Bu izoenzim iskelet kaslarında bulunarak laktik asit-laktat dengesinde önemli rol oynamaktadır.	Çok yüksek	Sitozol
hCA-IV	Akciğer kapillerinde plazma yüzeylerinde bulunmaktadır. Sinyal izoenzimleridir.	Yüksek	Membrana bağlı
hCA-V	Dokuların bazılarında bulunur. Özellikle mitokondri matriksinde görev alır. Ayrıca karaciğerde bulunarak bikarbonat iyonu oluşumunda, üre devrinde ve glukoneogenezde görev aldığı bilinmektedir.	Orta-yüksek	Mitokondri
hCA-VI hCA-VII	İnsan tükürüğünün pH dengesini ayarlamakla görevlidir.	Orta-Yüksek	Tükürükte Sitozol
hCA-RP VIII	Sıçan beyinde elde edilmiştir. cDNA keşfedilmesinde kullanılmıştır.	Akatalitik	Muhtemelen Sitozolit
hCA-IX	Aktive ettiği tümör hücreleri ile kanser oluşumunda görev aldığı bulunmuştur.	Yüksek	Membrana bağlı
hCA-XII		Düşük	
hCA-RP X		Akatalitik	Bilinmiyor
hCA-RP XI		Akatalitik	Membrana bağlı
hCA-XIII		Muhtemelen yüksek	Bilinmiyor
hCA-XIV	-	Düşük	Membrana bağlı

### 1.1.2 Karbonik Anhidraz Enziminin Bulunduğu Reaksiyonlar

CA enzimi karboksilik, sülfonik ve fosforik asit esterlerini de hidroliz etmektedir. Bunun dışında, birçok reaksiyon katalizlemektedir. Ancak esteraz için organizmada fizyolojik olarak aktivitesi olup olmadığı henüz bilinmemektedir [27].

Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyonlar [28];

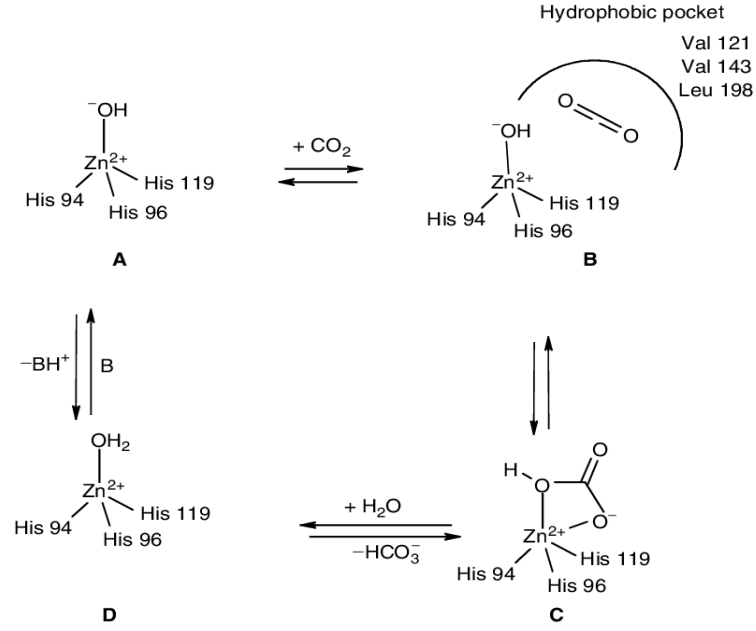


### 1.1.3 Karbonik Anhidraz'ın Katıldığı Reaksiyonların Mekanizması

CA'nın bulunduğu önemli rollerden biri metabolizmadadır. CA enzimi çözelti ortamında, optimum şartlarda bekletildiğinde daha fazla süre aktivitesi kaybolmamaktadır. Bu özellikler CA enzime avantaj sağladığı için bulunduğu reaksiyonların mekanizmaları araştırılarak çözümlenmeye çalışılmıştır.

CA enziminin, yapılan araştırmalar sonucunda, genellikle yapılarıyla ilgili iki özelliklerinin olduğu bulunmuştur [29].

- Aktif bölgesinde genellikle  $\text{Zn}^{+2}$  ve bu iyonla bağlı olan hidroksil grubu vardır.
- Aktif bölge etrafındaki aminoasitler proton gradienti oluşturacak ve proton verici olarak görev alacak şekilde yerleşim gösterirler.



**Şekil 1.2:** Karbonik anhidraz enzimi hidrataz aktivitesinin reaksiyonu [30].

Enzimin aktif formunun meydana gelmesi için Zn<sup>+2</sup> iyonuna OH<sup>-</sup> iyonunun bağlanması gerekir. Bu form güçlü bir nükleofilik yapıdadır. Bu sayede CO<sub>2</sub>'ye saldırıda bulunur ve Zn<sup>+2</sup> bağlanmış HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> oluşmaktadır. Zn<sup>+2</sup> iyonuna H<sub>2</sub>O molekülü bağlanarak HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ile yer değiştirir. Bu değişimle enzim asit formuna dönüşmektedir [31, 32]. Ortamdaki tampon oldukça önemlidir. Bunun nedeni ise aktif bölgelerdeki protonları yakalar ve proton transferini gerçekleştirerek enzimi tekrar bazik forma dönüştürür.

#### 1.1.4 Karbonik Anhidraz Enziminin Fizyolojik Fonksiyonları

- Böbreklerde mide asitliğini azaltmak için bikarbonat geri emilimini sağlamaktadır.
- Gözde bulunan humor aköz üretimi için bikarbonat salınımını sağlar.
- Pankreas özsuyu üretiminde, gastrit asit, safra, tükürük bezinde görevlidir.
- Elektrolit salgılanmasında rol oynamaktadır.
- Tat ve koku almada rol oynamaktadır.
- Kas fonksiyonlarını düzenlemede rol oynar.
- Hücrelerin stresine karşı adaptasyonu sağlamaktadır.
- Sinyal iletiminde görev alarak büyüme bozukluklarında da etkilidir.
- Yağ asitlerinin biyosentezinde etkilidir.
- Kanser oluşumuna neden olan tümör hücrelerini aktifleştirir.
- Böbreklerde taş oluşumuna ve kemiklerin kireçlenmesine sebep olmaktadır.
- Otistik bozukluklara yol açmaktadır [33,34,35].

## 1.2 Pestisit

Pestisitler, herhangi bir zararlıya karşı biyolojik ajan, antimikrobiyal, dezenfektan veya cihaz olarak kullanılan kimyasal maddelerdir. Özellikle zararlı istilacı yabancı otların büyümesini engelleyerek doğanın ve ağaçların korunmasını sağlar. Aynı zamanda üretilen besin maddelerinin verimliliğinde, bu besinlerin hazırlanma sürecinde, depolanma esnasında ve besinlerin kullanımı anında bu besinlerin değerlerinin korunmasını sağlayan maddelerdir [36].

Bazı pestisitler kalıcı olan organik kirleticilerdir. Genellikle pestisitler, akarsu, nehirler, sulama suyu, yağmur suyu ile bitkilere bulaşabilmektedir. Bu şekilde bazı enzimler için sorun oluşturabilirler [37].

Pestisitler, kullanılan alana göre gruplandırılır. Bu gruplar İnsektisitler, Herbisitler, Fungisitler, Nematisitler, Rodentisitler'dir [38].

İnsektisitler, böcek öldürücü olarak bilinmektedir. İnsektisitlerin *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda; lipit peroksidasyonunu dolayısıyla malondialdehit ve benzerlerinin üretimini artırdığını ayrıca doku hasarı ve hücre toksisitesi varlığının tespitinde kullanılan laktat dehidrogenaz salınımını artırdığını ve organizmayı oksidatif hasardan koruyan glutatyon peroksidaz aktivitesini azalttığı rapor edilmiştir. Serbest oksijen radikallerinin hücre hasarına aracılık edebileceği ve tümör oluşumuna ve kanser gelişimine yol açabileceği kanıtlarla desteklenmiştir [39].

Herbisitler, zararlı ot öldürücülerdir. Asetolaktat sentaz inhibitörü herbisitler bitkide valin, lösin ve izolösin amino asitlerinde eksikliğe sebep olarak bitkinin ölmesine neden olurlar. Asetil-CoA karboksilaz enzimi inhibitörü herbisitler ise plastidlerin stroma içerisinde bulunan proteinlerin biyotinile edilmesiyle oluşmuş, çok fonksiyonlu bir yapıdır ve bu yapı ATP (Adenizintrifosfat) sentezini katalize ederek asetil CoA'yı malonil CoA'ya dönüştürmektedir. Malonil CoA yağ asitlerinin oluşmasını sağlamaktadır [40].

Fungisitler, küf ve mantar öldürücü olarak bilinmektedir. Mantarların hücresel işleyişlerini bozar. Spesifik olarak enzimlere bağlanarak mantarların metabolik yollarını kapatmaktadır. Hücre duvarının geçirgenliğini bozmaktadır ve bu şekilde mitokondriyal fonksiyonlara, protein ve enzim süreçlerine etki etmektedir [38].

Nematisitler, nematod öldürücüdür. Bitki köklerinde bulunan mikroskopik kurtçukların ölümüne sebep olur. Toprak veya suda yaşayan mikroskopik parazitik kurtları öldürmek için kullanılan kimyasal böcek ilacıdır [38].

Rodentisitler, sıçan ve diğer kemirgen öldürücüdür. Kemirgen mücadelesinde kullanılan bu maddeleri içeren yemlerin hayvanlar tarafından kazara yenilmesi, pıhtılaşma bozuklukları veya sinir, solunum ve dolaşım sistemleri ile ilgili klinik problemlere neden olur [38].

Besin ve hava yolu ile insan vücuduna ulaşan pestisitlerin bazılarının bir kısmı idrar yolu kullanılarak dışarı atılmakta, çoğu ise genellikle yağ dokularında birikmektedir. Kadınlar, erkeklere göre daha fazla yağ dokusuna sahip olmasından dolayı pestisit birikiminde daha fazla olduğu bilinmektedir. İnsanlarda bazı pestisitlerin birikiminin etkileri Tablo 1.3'de gösterilmiştir [38, 41].

Pestisitlerin kalıntıları, toprağın verimliliği açısından önemli etkileri vardır. Bu pestisitlerin oluşturduğu bileşikler, su ve toprakta bulunan yararlı mikro florayı olumsuz yönde etkilemektedir [41]. Bazı pestisitler kalıcıdır ve bu kalıcı olan maddelerin kullanılması ile kronik olarak zehirlenme riski, oluşan çevre kirliliğinden dolayı besin zincirine dahil olarak insanlara ulaşan ve yoğunlaşan pestisit kalıntılarıdır [42].

**Tablo 1.2:** İnsanlarda pestisit birikimi etkileri [43].

Akut Etkiler	Şiddetli Akut Etkiler	Uzun Vadeli Etkiler
Ciltte oluşan kızarıklık	Gözbebeği küçülmesi	Beyin oluşan hasar
Mide de ağrı	Bağırsak sorunu	Bağışıklık sisteminde hasar
Bulantı ve kusma	Nefes almada güçlük	Karaciğer hasarı
Kaslarda ağrı oluşumu	Felç	Kanser
Baş ağrısı	Çarpıntı	Doğurganlıkta oluşan sorun
Görmede zorluk	Burun ve ağızdan akıntı	Genlerde oluşan hasar
Terleme artışı	Bilinç kaybı veya koma	Sinir sistemi bozukluğu
Halsizlik	Ölüm	Böbreklerde kalıcı sorun
Uyku sorunu	-	Deride hastalık oluşumu
Kızaran, acıyan gözler	-	Hamilelikte düşük sorunu
Baş dönmesi	-	Hamilelikte kalıcı hasar

Pestisitlerden bazıları organik klorludur. Bu pestisitler kalıcı özelliktedir. Bu özellikleri dolayısıyla kullanıldığı alanlarda ve farklı yollarla depolanarak ve besin zincirinden dolayı canlıların sağlığı için yüksek derecede sorun teşkil etmektedir [44]. Toprak üzerinde tarım için kullanılan pestisitler bozulmadan kaldıklarından dolayı yağın yağmur ile zamanla dere, nehir, baraj gibi sulak yerlere ulaşabilmektedir [45].

Tarımsal veya tarımsal olmayan nedenler için kullanılan milyonlarca ilaç vardır. Kullanılan bu ilaçların bir kısmı yarılanma süreleri uzundur. Bu nedenle toprakta kalıcıdır. Yeraltı ve yerüstü sularına karışır [46]. Yeraltı sularına karışan pestisitler parçalanmaya devam etse de, toprak üzerinde olana göre kısık ışık, ısı farklılığı ve oksijen nedeniyle daha az parçalanır. Yeraltında bulunan suyun doğal yoldan işlemlerle pestisitleri kendi kendine ayrıştırması zaman alır. Bu kaynaklardaki su yıllarca kullanılamamaktadır [47].

Sularda bulunan birçok mikroorganizma ve canlılara pestisitler etki etmektedir. Suya oranla balıklarda biriken pestisitler 1.000-10.000 katını bulabilir. En yoğun pestisit balıklarda bulunduğu bilinmektedir. Besin zincirinden dolayı balıkla beslenen canlılarda pestisit yoğunluğu daha fazladır [47, 48].

Pestisitler canlıların vücuduna üç farklı yolla girmektedir [43, 49];

- 1- Tüketilen besinler üzerinde bulunan pestisitler ağızda bulunan enzimlerle reaksiyona girerek farklı formlara dönüşür. Bu maddeler pestisitinin aktif haline göre farklı olarak az veya daha çok zehir etkisi yaratabilmektedir.
- 2- Deri üzerinden emilerek organizmaya alınan pestisitler sinirsel dokulara ulaşarak bulunduğu organizmanın ölümüyle sonuçlanır.
- 3- Havaya bulaşan pestisitler nefes yolu ile difüze olarak damarlardan kana geçer. Kanda bulunan pestisit organlara ulaşır.

### **1.2.1 Pestisitlerin Kullanım Alanları**

- Tarımsal alanlarda üretim
- Gıdaların depolanması
- Böceklerin kontrolü
- Ormancılık
- İnşaat
- Ev ve bahçeler
- Hayvancılık
- Bahçeler
- Toplumsal hijyen
- Balıkların yetiştirilmesi [50].

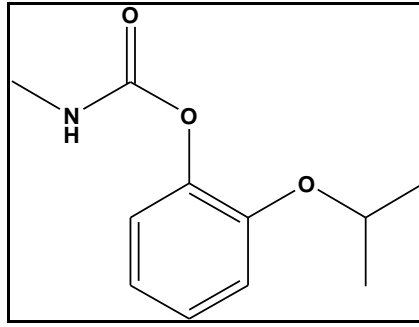


### 1.3 Araştırmamızda İnhibisyon Etkisine Bakılacak Pestisitler

#### 1.3.1 Propoksur

Propoksur tarım alanlarında bitkiler için kullanılan bir pestisittir. Bu pestisit karbamatlı insektisittir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından kabul edilen Propoksur 1959 yılında piyasaya sunulmuştur. İnsan sağlığını tehdit etmeyecek şekilde kullanılır. Toz, aerosol, tanecik şeklinde farklı özelliklere sahip yapısı vardır [50].

Propoksur'un kimyasal formülü  $C_{11}H_{15}NO_3$ 'tür. Molekül ağırlığı 209.25 g/mol, yoğunluğu ise 1.082 g/cm<sup>3</sup>'tür. IUPAC adı; 2-izoproksi fenil N-metil Karbamat'tır. Propoksur'un amacı bit, pire, karıncaları engellemektir [50].



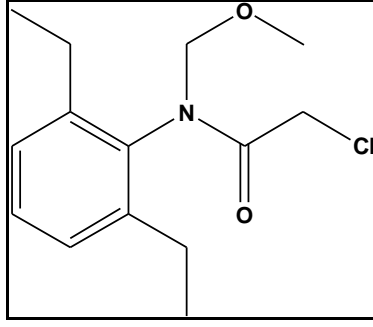
Şekil 1.3: Propoksur pestisitinin formülünün açık gösterimi.

#### 1.3.2 Alaklor

Alaklor, kloroaseranilit grubunda dahil olan herbisit türevli bir pestisittir. Tarım alanlarında kullanılan bu pestisit yabancı geniş yapraklı otları kontrol etmekte kullanılır. Kokusuz ve katı bir maddedir. Bitkilerin köklerindeki uzamayı ve proteinlerin üretilmesini yavaşlatarak büyümeleri engellenir [51].

Alaklor'un kimyasal formülü  $C_{14}H_{20}ClNO_2$ 'dur. Molekül ağırlığı 269.77 g/mol, yoğunluğu 1.133 g/cm<sup>3</sup>'tür. IUPAC adı; 2-kloro-2,6-dietil-N-metoksimetilasettanilid'tir.

Alaklor, USEPA (United States Environmental Protection Agency) tarafından, tümör hücrelerini tetiklediği ve kanser başlangıcına sebep olduğundan dolayı, H2 grubu kanserojen madde olarak tanımlanmıştır [52, 53].

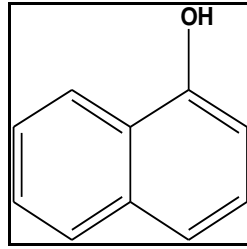


**Şekil 1.4:** Alaklor pestisitinin formülünün açık gösterimi.

### 1.3.3 1 – Naftol

1-Naftol böcek ilacı olarak kullanılmaktadır. Bu pestisit Karbaril karbamat grubuna aittir. 1-Naftol, sulu ortama giren Karbaril'den oluşmaktadır. Çok toksik, floresan, katı, organik, beyaz bileşiktir [54, 55]. 1-Naftol'un kimyasal formülü  $C_{10}H_8O$ 'dur. Molekül ağırlığı 144.17 g/mol, yoğunluğu  $1.1 \text{ g/cm}^3$ 'tür. IUPAC adı; Naftalen-1-ol'dur.

1-Naftol, ksenobiyotiklerin metabolizması ve Sitokrom P450'nin ara ürünü olan karbar ve naftalinin metabolitidir [56].



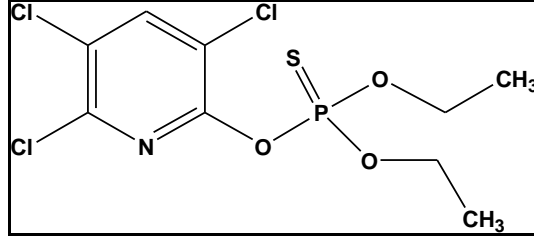
**Şekil 1.5:** 1 – Naftol pestisitinin formülünün açık gösterimi.

### 1.3.4 Klorpirifos

Böcek ve tarım ilacı olarak kullanılan pestisittir. Organik fosforlu insektisittir. Kükürt kokuludur. Beyaz kristal şekilde bir fiziksel forma sahiptir [50]. Sudaki çözünürlüğü düşüktür ve apolardır [57]. Aktif bölgesinde fosfor atomu bulunur. Klorpirifos'un kalıcılık özelliği bu fosfor atomundan gelmektedir. Ayrıca bu fosfor atomu Klorpirifos pestisitinin parçalanması sırasında oluşan reaksiyonlara katkı sağlamaktadır ve bu reaksiyonlar hidroliz ve oksidasyondur [50].

Klorpirifos'un kimyasal formülü  $C_{10}H_{11}Cl_3NO_3PS$ 'dir. Molekül ağırlığı 350.62 g/mol, yoğunluğu  $1.4 \text{ g/cm}^3$ 'tür. IUPAC adı; o,o-dietil o-3,5,6-trikloro-2-piridmonotio fosfat'tır.

Asetilkolinesteraz enzimi sinir sisteminde görev almakta ve Klorpirifos bu enzimi inhibe etmektedir. Bu pestisit böceklerin sinir sistemlerinin çalışmasına engel olarak ölümüne sebep olmaktadır. Vücuda solunum ve deri üzerinden alınmaktadır. Zehirlenme düzeyi orta derecededir [58]. Çocuklarda gelişme geriliği, davranış bozukluğuna sebep olmaktadır [59].



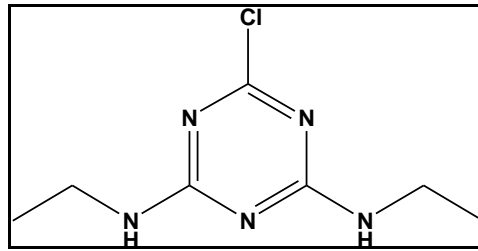
Şekil 1.6: Klorpirifos'un kimyasal formülünün açık yapısı.

### 1.3.5 Simazin

Simazin, triazin sınıfından bir herbisittir. Bileşik, geniş yapraklı yabancı otları ve yıllık otları kontrol etmek için kullanılır. Suda az çözünür, kirli beyaz kristal bir bileşiktir. Sulu ortamlarda yosun oluşumuna etki ederek bu oluşumu engellemek için kullanılan bir tarım ilacıdır [60, 61].

Simazin'in kimyasal formülü  $C_7H_{12}ClN_5$ 'tir. Molekül ağırlığı 201.66 g/mol, yoğunluğu 1.3 g/cm<sup>3</sup>'tür. IUPAC adı; 6-kloro-N, N-dietil 1,3,5-triazin-2,4-diamin'dir.

Doğada kalıcılık özelliği; Simazin formülünde bulunan Karbon/Azot halkası bu molekülün stabilitesini ve aromatikliğini sağlamaktadır. Bu sayede zor parçalanır ve kalıcılığı artar [62].

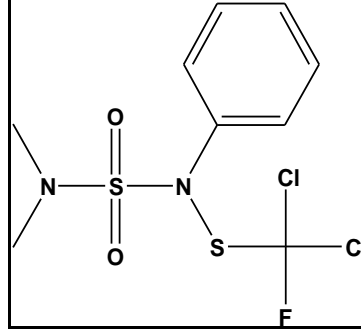


Şekil 1.7: Simazin pestisitinin formülünün açık gösterimi.

### 1.3.6 Diklofluanid

Diklofluanid ilk olarak 1964 yılında bitkilerde mantar ilacı olarak kullanılmaya başlandı. Özellikle meyvelerin depolanmasında mantarların neden olduğu hastalıkları engellemek için kullanılmaktadır [63, 64].

Diklofluanid'in kimyasal formülü  $C_9H_{11}Cl_2FN_2O_2S_2$ 'tir. Molekül ağırlığı 333.2 g/mol, yoğunluğu  $1.55 \text{ g/cm}^3$ 'tür. IUPAC adı; N-dikloroflorometiltio-N', N'-dimetil-N-fenilsülfamid'dir.



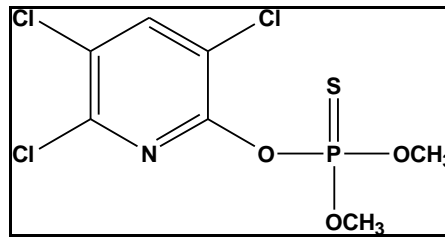
Şekil 1.8: Diklofluanid pestisitinin formülünün açık gösterimi.

### 1.3.7 Klorpirifos – Metil

Klorpirifos-metil, çeşitli mahsullerde böcek zararlılarını kontrol etmek için kullanılan insektisitlerdir. Organofosfat grubunda yer alır. Depolama sırasında sebze ve meyvelerde oluşabilecek zararlılardan korunmasını sağlamaktadır. Aynı zamanda bitkileri sorunlara karşı korumak için kullanılır. Günlük hayatımızda da kullanılan klorpirifos-metil evlerde böceklere ve sivrisineklere karşı kullanılmaktadır [65].

Klorpirifos-metil'in kimyasal formülü  $C_7H_7Cl_3NO_3PS$ 'tir. Molekül ağırlığı 322.5 g/mol, yoğunluğu  $1.67 \text{ g/cm}^3$ 'tür. IUPAC adı; O,O-dimetil O-3,5,6-trikloro-2-piridil fosfotiyat'dir [43, 65].

Klorpirifos-metil, WHO (World Health Organization)'a göre (IV) zehir içeriği bakımından düşük olan ilaç grubuna girmektedir. Canlılar üzerinde nörolojik sorunlara yol açabilir [65].



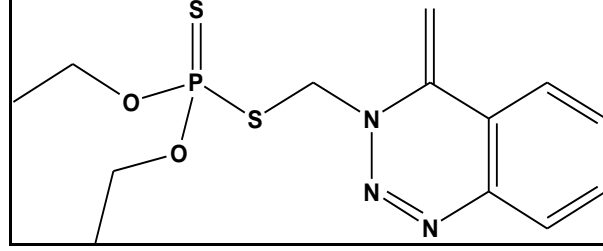
Şekil 1.9: Klorpirifos – Metil'in kimyasal formülünün açık yapısı

### 1.3.8 Azinfos – Etil

Tarımsal alanlarda ve böcekler üzerinde etki eden organofosfor grubundadır. İnsektisit ve akarisit pestisitidir. Kristaldir ve renksiz görünümüne sahiptir [66].

Dünya Sağlık Örgütü'nün IB tehlike sınıflandırmasına sahip ve son derece tehlikelidir. Ayrıca memeliler için çok zehirlidir [67].

Azinfos-etil'in kimyasal formülü  $C_{12}H_{16}N_3O_3PS_2$ 'dir. Molekül ağırlığı 345.4 g/mol, yoğunluğu  $1.284 \text{ g/cm}^3$ 'tür. IUPAC adı; S-(3,4-Dihidro-4-Oksobenzo(D)-(1,2,3)-Triazin-3-il Metil) O,O-Dietil Fosforotiyoat'tır.

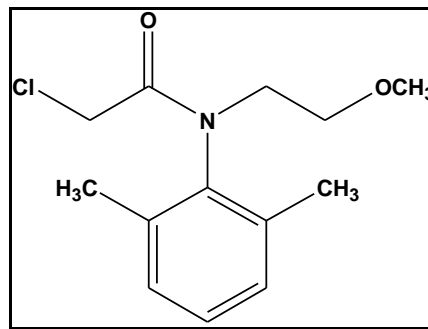


Şekil 1.10: Azinfos – Etıl pestisitinin formülünün açık gösterimi.

### 1.3.9 Dimetaklor

Yabani otlar üzerinde kullanılan bu pestisit kristal forma sahiptir. Renksiz ve kokusuzdur [68]. Tarım ilacı olarak kullanılmaktadır. Ayrıca böcekler üzerinde de etkisi bilinmekte ve herbisit grubunda olan bir pestisit türüdür. Canlının hücre bölünmesini engellediği için tarım alanındaki önemi büyüktür [68].

Dimetaklor'un kimyasal formülü  $Cl_{13}H_{18}ClNO_2$ 'dir. Molekül ağırlığı 255.74 g/mol, yoğunluğu  $1.23 \text{ g/cm}^3$ 'dür. IUPAC adı;(RS)-2-kloro-N-(2,6-dimetilfenil)-N-(2-metoksietil) aseramid'dir.



Şekil 1.11: Dimetaklor pestisitinin formülünün açık gösterimi.

### 1.3.10 Tebukonazol

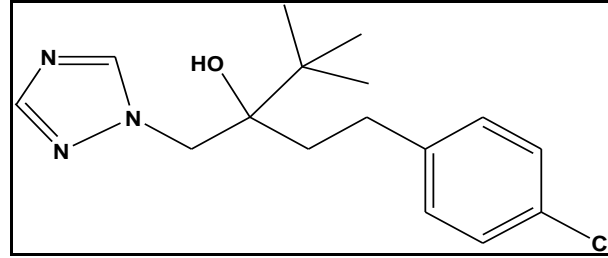
Bitki patojenik mantarları tedavi etmek için tarımsal olarak kullanılan bir triazol mantar ilacıdır. Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı Pestisit Programları Ofisi;

kanserojen listesinde C (olası kanserojen) derecesiyle listelenmiştir. Dünya Sağlık Örgütü ise toksisite sınıflandırmasında hafif tehlikeli anlamına gelen III olarak listelemiştir [69].

Tebukonazol pestisitinde aktif olarak rol alan bölgede bulunan preparat triazole, hücre zarındaki kolesterolün görev yaptığı fraksiyonları inhibe etmektedir [70].

Tebukonazol'un kimyasal formülü  $C_{16}H_{22}ClN_3O$  'tür. Molekül ağırlığı 307.82 g/mol, yoğunluğu  $1.25 \text{ g/cm}^3$ 'tür. IUPAC adı; 1-(4-klorofenil)-4,4dimetil-3-(1,2,4-triazol-1-ilmetil) pentan-3-ol'dur.

Tebukonazol pestisiti fiziksel olarak renksiz veya beyaz renkte görünür, kristal şeklinde ve özel bir kokudur [70]. Bitkileri hastalıklardan koruyan bu pestisit, ayrıca hastalık kapmış bitkilerde hastalığının yayılmasını önlemektedir [70].



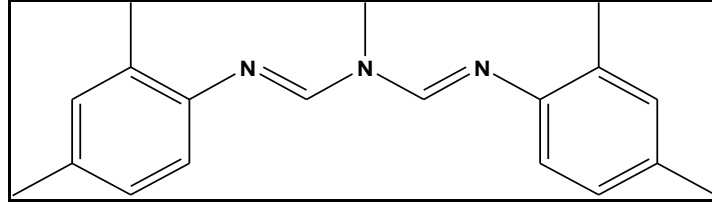
Şekil 1.12: Tebukonazol'un kimyasal formülünün açık yapısı.

### 1.3.11 Amitraz

Tarım ve böcek ilacı olan amitraz pestisiti sistemik olmadığı ve insektisit olduğu bilinmektedir. Karbamat grubuna ait ve organik fosforlu bir pestisittir. Diğer pestisitlere dirençli olan türlere karşı etki ederek onların bozunmasını sağlamaktadır [71].

Amitraz'ın kimyasal formülü  $C_{19}H_{22}N_3$ 'tür. Amitraz'ın molekül ağırlığı 293.41 g/mol, yoğunluğu  $0.98 \text{ g/cm}^3$ 'tür. IUPAC adı; N'-(2,4-dimetilfenil)-N-[(2,4-dimetilfenil)iminometil]-N-metilmetanimidamid'dir.

Amitraz bitkilerde kontrollü büyümeyi sağlamak için kullanılmaktadır. Böceklerde ise canlıların sinir sistemlerinin aktivitesini azaltarak böceklerin ölümlerine sebep olmaktadır [72].



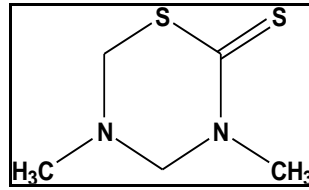
**Şekil 1.13:** Amitraz pestisitinin formülünün açık gösterimi.

### 1.3.12 Dazomet

Gazlı bozunma yoluyla bitki büyümesini engelleyen zararlıları öldürmek için kullanılan bir kimyasaldır. Dazomet, golf sahaları, fidanlıklar, çim alanları ve saksı toprağı gibi çeşitli alanlarda toprak sterilizatörü olarak kullanılır. Dazomet, renksiz kristaller şeklindedir. Hafif keskin bir kokuya sahiptir [73-75].

Dazomet'in kimyasal formülü  $C_5H_{10}N_2S_2$ 'dir. Molekül ağırlığı 162.27 g/mol, yoğunluğu 1.29 g/cm<sup>3</sup>'tür. IUPAC adı; 3,5-dimetil-1,3,5-tiyadiazinan-2-tion'dur.

Dazomet pestisitinin parçalanması sonucu oluşan Metil İzotiyosiyanat, zehirli gaz açığa çıkararak bitkilerin gelişmesini ve büyümesini engelleyen canlılara zarar verir [76, 77].



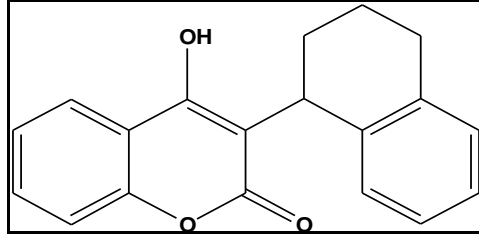
**Şekil 1.14:** Dazomet pestisitinin formülünün açık gösterimi.

### 1.3.13 Koumatetralil

Böcek ilacı olarak kullanılan bir pestisit olan Koumatetralil, genellikle kemirgenler için kullanılmaktadır [78].

Koumatetralil'in kimyasal formülü  $C_{19}H_{16}O_3$ 'tür. Molekül ağırlığı 292.33 g/mol, yoğunluğu 1.19 g/cm<sup>3</sup>'tür. IUPAC adı; 4-hidroksi-3-kromen-2-on'dur.

Koumatetralil'in antidotu K vitaminidir. Kan pıhtılaşmasını engelleyerek canlının ölümüne sebep olmaktadır. Koumatetralil'in ikinci zararı ise karaciğerde birikerek olumsuz etkilemektedir [78].



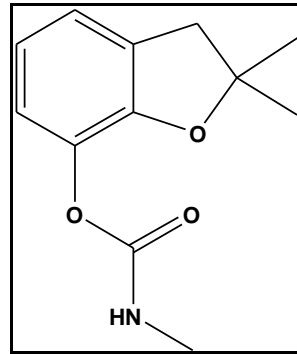
**Şekil 1.15:** Koumatetralil pestisitinin formülünün açık gösterimi.

### 1.3.14 Karbofuran

Karbamat grubunda olan bu pestisit, böcek ilacı olarak kullanılmakta ve beyaz renkte, kristal bir forma sahip, özel bir kokusu olan fiziksel özellikleri bilinmektedir. Patates, mısır ve soya fasülyesi dahil olmak üzere tarla ürünlerinde böcekleri kontrol etmek için kullanılır. Diğer insektisitler arasında insanlar için en yüksek akut toksisiteden birine sahiptir [79, 80].

Karbofuran'ın kimyasal yapısı  $C_{12}H_{15}NO_3$ 'tür. Molekül ağırlığı 221.105 g/mol, yoğunluğu 1.18 g/cm<sup>3</sup>'tür. IUPAC adı; 2,2-Dimetil-2,3-dihidro-1-enzofuran-7-il metilkarbamat'tır.

Karbofuran tarım alanlarında istenmeyen böceklerde kullanılarak, canlıların sinir sisteminde etkili olmasının bilinmesiyle birlikte Asetilkolinesteraz enzimini inhibe etmektedir [79].



**Şekil 1.16:** Karbofuran pestisitinin formülünün açık gösterimi.

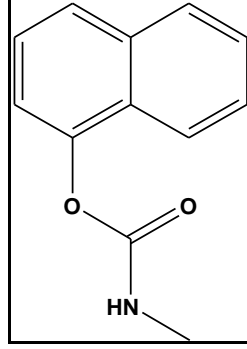
### 1.3.15 Karbaril

Karbamat ailesinden olan karbaril, başlıca insektisit olarak kullanılan kimyasaldır. En çok kullanılan böcek ilaçları arasında üçüncü sıradadır. Karbaril beyaz renkte, kristal katı formdadır. Ticari tarım, ormancılık ve mera korumada da kullanılmaktadır. Asetilkolinesteraz enziminin yavaş geri dönüşümlü inhibitörüdür. Sinir sistemine müdahale ederek ölüme neden olmaktadır [81].



Klorlu pestisitlere göre daha az kalıcılığı vardır. Omurgalılarda detoksifiye edilen Karbaril, hızla elimine edilir. Genellikle bitlerle savaşmak için kullanılan şampuanlarda aktif bileşen olarak kullanılır [81, 82].

Karbaril'in kimyasal formülü  $C_{12}H_{11}NO_2$ 'dir. Molekül ağırlığı 201.22 g/mol, yoğunluğu 1.2 g/cm<sup>3</sup>'tür. IUPAC adı; 1-Naftil Metil Karbamat'tır.



Şekil 1.17: Karbaril'in kimyasal formülünün açık yapısı.

#### 1.4 Araştırmamızda Kullanılan Koyun Türleri

Türkiye'deki koyun miktarı 42.7 milyona ulaşmıştır. Koyun popülasyonunun ülkemizdeki yeri büyüktür. Dünya'daki küçükbaş hayvan varlığının yaklaşık %2'si ülkemizde bulunmaktadır. Özellikle Avrupa'da birinci sırada yer almaktadır. Türkiye koyun sayısında dünyada 9. sırada yer almaktadır [43, 83].

Koyun yetiştiriciliği Türkiye'de çok tercih edilmektedir. Bunun en önemli sebebi coğrafi yapı ve iklimsel koşullardır. Tarımsal faaliyetler için kullanılmayan geniş bölgeler koyun yetiştiriciliği için uygundur. Özellikle hava koşulları sert olmayan Marmara ve Ege bölgelerinde koyunların yetiştirilmesi daha kolaydır.

Kıvırcık koyunu, Türkiye'de Trakya ve Marmara bölgesinde yetiştirilmektedir [43, 83]. Et kalitesi iyi bir sertliğe sahiptir. Yöresel koyunlarda en önemli türler arasında en iyisi olarak bilinmektedir.



**Şekil 1.18:** Kivircik Koyun [83].

Yerli Kivircik Koyunu ile Alman Merinos koçları melezlenerek daha iyi bir yün kalitesi elde etmeye çalışıldı. Bu çiftleştirme işleminden 4-5 jenerasyon sonrasında istenilen yün kalitesi elde edilmiştir.



**Şekil 1.19:** Merinos Koyunu [83].

Melezleme çalışmalarında kullanılmak üzere Türkiye'ye birçok kültür ırkı getirilmiş olup, bunlardan biri de Dorset Down ırkıdır. İngiltere'nin güneyindeki Dorset bölgesindeki yerli ırkların Hampshire ile melezlenmesi sonucu elde edilen bu ırk döl verimi yüksek çeşitli ırklar ile melezlenerek orta canlı ağırlıkta kesim kuzusu elde etmek için kullanılmıştır [84].



**Şekil 1.20:** Dorset Down Koyunu [84].

### 1.5 Araştırmanın Amacı

Koyun yetiştiriciliği Türkiye’de oldukça yüksektir. Et, süt ve yönünden yararlanılan koyunlar, daha verimli ve istenilen kalitede besin ve ürünlerin oluşması için bu hayvanların yetiştiği ortamların uygun olması gerekmektedir.

evre kirliliğinin artmasıyla koyun sağlığı önemli ölçüde etkilenmektedir. Özellikle pestisitlerin bitkiler ve canlılar üzerinde ölçüsüz kullanılması evre kirliliğinde önemli rol oynamaktadır.

Araştırmamızda kullanılan pestisitler, yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu pestisitlerin bazıları doğada uzun süre bozulmadan kalır. Besin zinciri ile insanlara kadar ulaşabilmektedir.

Bu alışmamızda Dorset Down, Kıvırcık ve Merinos koyun ırklarının kanlarından karbonik anhidraz enzimini afinite kromatografisi ile saflaştırılması planlanmıştır. Bu saflaştırılan enzimin  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerinin tespit edilmesi, *in vitro* ortamda bazı pestisitlerin enzim üzerine etkilerinin araştırılarak  $IC_{50}$  değerlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 2. MATERYAL VE METOD

### 2.1 Materyal

#### 2.1.1 Kullanılan Kimyasallar

Çalışmalarımızda kullanılan kimyasallar Sigma veya Merck firmalarından alınmıştır.

**Tablo 2.1:** Kullanılan kimyasal maddeler.

Kimyasallar		
Sülfürik Asit	Hidroklorik Asit	Propoksur
Metil Alkol	$\beta$ -Merkapto Etanol	Destile Su
Asetik Asit	Amonyum Persülfat	Sodyum Hidroksit
Aseton	Sodyum Dodesil Sülfat	Klorpirifos
Bromfenol Mavisi	Gliserol	Simazin
Sodyum Asetat	Sodyum Bikarbonat	Diklofluanid
Coomassie-Brilliant Blue R-250	1-Nafthol	TEMED
Di Sodyum Fosfat	Sodyum Karbonat	Azinfos-etil
Di Sodyum Hidrojen Fosfat Di Hidrat	Koumatetralil	Sodyum Sülfat
Alaklor	Dimetaklor	Tebukonazol
Sodyum Perklorat	Standart Serum Albümin	Tris-HCl
DMSO	Akrilamid/Bis	Dazomet
Fenol Red	Klorpirifos -metil	Etil Alkol
Fosforik Asit	Tris-Base	Karbofuran
CO <sub>2</sub> Gazı	Amitraz	Karbaril

## 2.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar

**Tablo 2.2:** Kullanılan cihaz ve model isimleri.

Kullanılan Cihaz	Model
UV-Spektrometresi	Perkin Elmer, Lambda – 25 – UV Spektrometre
Soğutmalı santrifüj	Sigma Laborzentrifugen 3K 15 – 10706 – 10707
pH-metre	Orion- model 920A
Elektroforez sistemi	Bio-Rad
Hassas terazi	Libror – AEG – 220 (Shimadzu)
Kromatografi kolonu	Pharmacia Fine Chemicals
Kronometre	Hanhard - Elektronisch Digital Stoppuhr
Otomatik pipetler	Eppendorf, Medisis
Magnetik karıştırıcı	ARE magnetic, heating stirrer IKA Combimag RCO
Vorteks	Fisons Whirli Mixer

## 2.1.3 Kullanılan Çözeltiler

### 2.1.3.1 Afinite Kromatografisinde Kullanılan Jelin Sentezlenmesi İçin Gereken Çözeltiler

**1 M NaOH Çözeltisi;** 4 g NaOH destile suda çözülür ve 100 mL'ye tamamlanır.

**4 M NaOH Çözeltisi;** 16 g NaOH destile suda çözülür ve 100 mL'ye tamamlanır.

**1 M HCl Çözeltisi;** 8.3 mL %37'lik HCl'ten bir miktar destile su içerisine alınarak daha sonra balon joje ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanır.

**0.1 M NaHCO<sub>3</sub> Tamponu (pH:10.0);** 4.20 g NaHCO<sub>3</sub> (0.1 mol) 450 mL destile suda çözülmesi için karıştırıcıya alınarak ve 0.5 M NaOH çözeltisi ile pH:10.0'a ayarlandı. Son hacim destile su ile 500 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

### 2.1.3.2 Afinite Jeline Enzimin Tutunması ve Saflaştırılması İçin Gereken Çözeltiler

**Kanın alındığı sitrat çözeltisi;** 22 g sodyum sitrat dihidrat, 8 gram sitrik asit, 24 g dekstroz (D-glukoz) 1 L olacak şekilde hazırlanır. 100 mL kan için 15 mL sitrat çözeltisi kullanılır.

**Koyun karbonik anhidraz enzimi elüsyon tamponu pH 5.6;** 4.08 g (0.15 mol)  $\text{NaCH}_3\text{COO}$  ve 30,62 g (0,125 mol)  $\text{NaClO}_4$  tartılarak 200 mL destile suda çözüldü. pH 5.6'ya ayarlandı ve son hacim 500 mL'ye tamamlandı.

**Kullanılan jelin dengelendiği tampon pH 8.5;** 3.124 g (25 mmol) Tris-Base ve 14.20 g (0.1 mol)  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  tartılarak 950 mL destile suda çözüldü ve pH:8.5'e ayarlandı. Son hacim 1L'ye tamamlandı.

**Kullanılan hemolizatın kolona yüklenmesi sonrası yıkama tamponu pH 8.5;** 3.0275 g (25 mmol) Tris-Base ve 3.124 g (22 mmol)  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  tartılarak 950 mL destile suda çözüldü. pH 8.5'e ayarlandı ve destile su ile 1L'ye tamamlandı.

### 2.1.3.3 SDS-PAGE'te Kullanılan Tamponlar

**Numunelerin ilerlemesi için kullanılan tank tamponu;** 3 g Tris-Base ve 14.4 g glisin, 100 mL destile suda çözüldü. 10 mL % 0.1'lik SDS eklendi. Son hacim 1 L'ye tamamlandı.

#### **Yürütülecek numunelerin üzerine eklenen tampon içeriği;**

Destile Su	0.5 mL
Bromfenol Mavisi	0.01 g
$\beta$ -Merkapto Etanol	1 mL
Gliserol	2 mL
%10'luk SDS	4 mL
0.5 M Tris-HCl (pH: 6.8)	2.5 mL

**Yürütme sonunda jelin alındığı boyama çözeltisi;** 120 mL metil alkol içerisinde 0.66 g Coomassie brilliant blue R-250 çözümlenerek, 24 mL asetik asit, 120 mL destile su eklendi ve çözelti hazırlandı.

**Boyama sonrası kullanılan renk açıcı çözelti;** 2200 mL destile su, 125 mL Metil alkol ve 175 mL glasiyel Asetik asit birleştirilerek hazırlandı.

**Numunelerin yüklendiği %10'luk ayırma ve %5'lik yükleme jellerinin hazırlanışı;**

Elektroforezde kullanılan jellerin hazırlanması ve bu maddelerin hacimleri Tablo 2.1'de verilmiştir.

**Tablo 2.3:** Elektroforez'de kullanılan jellerin içinde kullanılan madde miktarları.

	Ayırma jeli %10	Yükleme jeli %5
Akrilamid/Bis	9.975 mL	1.6 mL
Tampon	7.5 mL (pH 8.8)	2.5 mL (pH 6.8)
%10 SDS	0.3 mL	0.1 mL
H <sub>2</sub> O	11.925 mL	5.63 mL
TEMED	15 µL	5 µL
Amonyum persülfat	300 µL	100 µL

#### 2.1.3.4 Proteinleri Tayin Etmek İçin Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

**Sığır serum albümin çözeltisi (1 mg/mL):** 25 mL saf su içerisinde 25 mg sığır serum albümini çözülür.

**Coomassie Brilliant Blue G-250 Çözeltisi:** 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 mL alkolde çözülerek %95'lik 100 mL fosforik asit hazırlanan çözeltiye eklenir. 1 L'ye destile su ile tamamlanır.

#### 2.1.3.5 CO<sub>2</sub>-Hidrataz Aktivite Ölçümü İçin Hazırlanacak Çözeltiler

**Fenol Kırmızısı Solüsyonu;** 0.011256 g Fenol kırmızısı ve 0.2184 g NaHCO<sub>3</sub> tartılarak saf su içerisinde çözülür. Balon jojeye alınarak 1 L'ye tamamlanır.

**Enzimin aktivitesi için gereken aktivite tamponu pH:10.0;** 15.9 g (0.15 mol) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ve 8.4 g (0.1 mol) NaHCO<sub>3</sub> tartılır. 1 M HCl ile pH:10.0'a ayarlanır. Balon jojeye aktarılarak 1 L'ye tamamlanır.

### 2.1.3.6 Esteraz Aktivitesi Tayini İçin Hazırlanacak Çözeltiler

**Enzimin aktivite gösterdiği esteraz aktivitesi tamponu Tris – SO<sub>4</sub> pH:7.4;** 6.055 g (0.05 M) Trizma Base destile su içinde çözülür. 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile pH:7.4'e getirilir. Balon joje içine alınır ve 1 L'ye tamamlanır.

**p-Nitrofenol Asetat substrat çözeltisi;** 0.0272 g p-nitofenil asetat tartılır ve asetonun 1 mL'sinde çözülür. 50 mL'lik balon joje içerisine saf su eklenir ve aseton çözeltisi bu saf suyun içine alınarak hacim tamamlanır.

### 2.1.3.7 Kullandığımız Pestisit Çözeltilerinin Hazırlanması

**Tablo 2.4:** Kullanılan pestisitlerin hazırlanması.

Pestisit (M)	Gram	Çözücü
0.001 M Propoksur	0.0020	10 mL DMSO
0.001 M Alaklor	0.0026	10 mL DMSO
0.001 M 1-Naftol	0.0014	10 mL DMSO
0.001 M Klorpirifos	0.0035	10 mL DMSO
0.001 M Simazin	0.0020	10 mL DMSO
0.001 M Diklofluanid	0.0033	10 mL DMSO
0.001 M Klorofil-Metil	0.0032	10 mL DMSO
0.001 M Azinos-Etil	0.0034	10 mL DMSO
0.001 M Dimetaklor	0.0025	10 mL DMSO
0.001 M Tebukanzol	0.0030	10 mL DMSO
0.001 M Amitraz	0.0029	10 mL DMSO
0.001 M Dazomet	0.0016	10 mL DMSO
0.001 M Koumatetralil	0.0029	10 mL DMSO
0.0001 M Karbofuran	0.0011	50 mL DMSO
0.0001 M Karbaril	0.0010	50 mL DMSO



## 2.2 Yöntemler

### 2.2.1 Afinite Jelinin Sentezlenmesi

Afinite kromatografisi tekniği, kullanılan metotlar arasında enzimi saflaştırma konusu üzerine en yaygın yöntemdir. Güçlü bir protein saflaştırma tekniği olan bu yöntem biyolojik bir ligand veya sentetik olan analogu kullanılmaktadır. Saflaştırılacak olan molekül ile ligandın komplementer bağlanma bölgesi arasındaki spesifik etkileşime bağlı bir yöntemdir [85]. Substrat, koenzim, hormon, antikor, nükleik asit gibi yapılar biyolojik ligandlara örnek olarak gösterilebilir [86]. Afinite kromatografisinde matriks olarak “Sephadex, Sepharose ve Biogel” gibi çeşitli jeller kullanılmaktadır [87].

30 mL Sepharose – 4B jeli, saf su ile 3 kez yıkandı. Yıkama işleminde, jel üzerine eşit hacimde saf su eklenir ve dekante edilir. Destile su tekrar eklenerek karıştırıcıya alındı. 4 g toz halindeki CNBr’ün tek seferde katıldı. Buz içerisinde karışan jel, pH metre kullanılarak 4 M NaOH ile pH:11’de tutuldu. Reaksiyon pH değişmeyene kadar devam etmektedir. Süspansiyon Buchner hunisinde süzülde ve 500 mL 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> (pH 10.0) çözeltisi ile yıkandı [88].

0.1 M NaHCO<sub>3</sub> pH:10.0 çözeltisinin içerisinde alınan karışıma 10 mL etilendiamin damla damla eklendi. İki saat karıştırıcıda bekletildi. Hazırlanan süspansiyon 16 saat boyunca 4°C’de bekletildi. Buchner hunisine aktarılarak saf sudan geçirildi. En son 100 mL 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> pH 10.0 tamponu jelden geçirildi. Aynı tamponun 20 mL’si içerisinde alındı [88].

100 mg 4-izotiyosiyanat benzen sülfonamid çözmek için 5 mL DMSO içerisinde alındı ve hazırlanan süspansiyona eklendi. Karışım 3 saat manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Bu süre sonunda destile su kullanılarak yıkandı. 0.05 M Tris-SO<sub>4</sub> pH:8.5 ile 200 mL kullanılarak tekrar yıkandı ve son kullanılan tampon çözeltisi içerisinde alınarak +4 derecede dolaba kaldırıldı [88].

### 2.2.2 Karbonik Anhidrazın Afinite Jeli Kullanılarak Saflaştırılması

#### 2.2.2.1 Hemolizat Hazırlanması

Kıvırcık, Merinos ve Dorset Down koyun ırklarından 20’şer mL kan, sitrat çözeltisi bulunan tüplere alınmıştır. Kanlar santrifüj tüplerine alınarak +4°C’de 20 dakika 5000 rpm’de santrifüj edildi. Sonrasında üstte bulunan kan plazması atıldı. Tüplerin alt kısmına

çöken eritrositler serum fizyolojik ile iki kez yıkandı. Santrifüj sonunda, eritrositler üzerine hacminin 3 katı kadar soğuk su ilave edildi ve karıştırıldı. Hücrelerden ayırmak için 45 dakika boyunca 15000 rpm’de santrifüj edildi. Üstte kalan sıvı kısım beher içine alındı. Altta çöken hücre zarları atıldı. Beher buz dolu kap içerisine alındı ve karıştırıcıya konuldu. pH ayarlamak için Tris-Base kullanıldı. Hemolizatın pH’sı 8.5’e getirildi.

### **2.2.2.2 Hazırlanan Hemolizatın Kolona Tatbiki ve CA’nın Elüe Edilmesi**

Dengeleme tamponunda bekletilen jel, afinite kolonuna paketlenildi. 280 nm’de absorbansı ölçülerek dengeleme işlemi yapıldı. Dengeleme işleminden sonra tampon çözelti jel sınırına getirildi. Hemolizat, kolona yavaşça tatbik edildi.

Hemolizat tamamen tatbik edildikten sonra jel sınıra getirilir. CA liganda bağlanır ve diğer proteinlerin uzaklaştırılması için yıkama tamponu ile yavaşça yıkandı. 280 nm’de sıfır absorbans verinceye kadar yıkandı.

Elüsyon tamponu ile elüe edildi ve tüplere 3’er mL toplandı. Absorbans değerleri 280 nm’de ölçülerek sıfırlanana kadar toplandı.

### **2.2.3 Aktivite Tayininde Kullanılan Yöntemler**

#### **2.2.3.1 CO<sub>2</sub> – Hidrataz Aktivitesi**

CA’nın hidrataz aktivitesi; bu aktivitenin prensibi karbondioksitin su ile reaksiyonu sonucu oluşan H<sup>+</sup> iyonunun pH’sı 10.0’dan 7.4’e düşme süresinin ölçülmesine dayanır. Bu yöntemi geliştiren Maren ve arkadaşları; pH 10.0 karbonat tamponu ve indikatör olarak pH 7.4’de renk değişimi gösteren fenol kırmızısı kullanmıştır [89].

Deney prosedürü, şu şekilde gerçekleştirilmiştir; Reaksiyon tüpüne önce 2 mL indikatör ve 1.5 mL doymuş CO<sub>2</sub> çözeltileri konuldu. Bu karışımın üzerine, kolondan toplanan enzim çözeltisinden 0.1 mL ilave edildikten hemen sonra aynı anda 0.4 mL karbonat tamponu ilave edilir. Kronometre ile renk izlenerek kırmıdan sarıya dönme süresi belirlenmiştir (tc). Her numune çalışılması için önce enzim yerine destile su kullanılmakta ve kör ölçülmektedir (to). CA’nın enzim ünitesi (EU) aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$EU = \frac{(to - tc)}{tc}$$

### **2.2.3.2 Esteraz Aktivitesi Yöntemi ile Aktivite Ölçümü**

Esteraz aktivitesi için substrat olarak p-nitrofenilasetat kullanılır. 348 nm’de absorbans gösteren p-nitrofenol veya p-nitrofenolata hidroliz olur. İkisi de aynı nm’de absorbans vermektedir [90].

Esteraz aktivite tamponu ile absorbans sıfırlandı. 1300 µL tampon, 600 µL p-Nitrofenil Asetat çözeltisi, 100 µL enzim çözeltisi ve 1 mL destile su alınarak aktivite ölçümü yapıldı. 3. dakikadaki absorbans değerinden 0. dakikadaki absorbans değeri çıkartılarak ölçüldü. Substrat günlük olarak hazırlanır ve taze kullanılır.

### **2.2.3.3 Pestisitlerin İnhibisyon Etkileri ve IC<sub>50</sub> Değerlerinin Belirlenmesi**

İnhibitör olarak pestisit kullanılan bu çalışmada, 15 adet pestisit etkisi incelenmiştir. Farklı inhibitör konsantrasyonlarında aktivite ölçümleri yapıldı. Bu ölçümlere göre %Aktivite grafikleri hazırlandı. Eğri denklemi kullanılarak IC<sub>50</sub> değerleri bulundu [89].

### **2.2.3.4 K<sub>m</sub> ve V<sub>max</sub> Değerlerinin Belirlenmesi**

Kıvırcık, Merinos ve Dorset Down koyun ırklarının kanlarından saflaştırılan CA enziminin K<sub>m</sub> ve V<sub>max</sub> değerlerinin belirlemek için en az beş farklı substrat (fenilasetat) konsantrasyonu kullanılarak aktivite ölçümü yapıldı. Sonuçlar Lineweaver-Burk grafiğine uygulanarak değerler hesaplandı [90-92].

## **2.2.4 Protein Tayini**

### **2.2.4.1 Kalitatif Protein Tayini**

Kalitatif protein tayini, proteinlerin yapısında bulunan tirozindeki fenolik gruplar ve tripfondaki indolik gruplar nedeniyle 280 nm’de maksimum absorbans gösterirler. Bu özellikten yararlanılarak örnekteki protein miktarının yaklaşık olarak bulunması için hızlı bir yöntem geliştirilmiştir. Warburg – Christian metodu olarak bilinir [93]. Elüatlar kuvars küvetlere alınarak köre karşı okutulur ve absorbansı ölçülür.

### **2.2.4.2 Bradford Yöntemiyle Protein Tayini**

Saflaştırılan karbonik anhidraz enziminin çözeltilerindeki ve hemolizatlardaki proteinlerin miktarlarının tayini için Bradford yönteminden yararlanıldı. Bu yöntem, fosforik asitli ortamda Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının farklı konsantrasyonlardaki protein çözeltilerinde değişik şiddette mavi renk ortaya koymasından yararlanılarak geliştirilmiştir. 595 nm’de maksimum absorbans göstermektedir. Boya ve protein arasında kompleks bir yapı oluşur ve 5 dakika gibi çok kısa sürede gerçekleşir [94].

Protein miktarı belirlemede; 1 mL'sinde 1 mg protein içeren standart sığır albümin çözeltisinden tüplere 10'ar  $\mu\text{L}$  arttırarak 10  $\mu\text{L}$ 'den 100  $\mu\text{L}$ 'ye kadar 10 örnek hazırlanır ve gerekli sulandırma işlemleri ile tüm tüpler 0,1 mL'ye tamamlandı. 5 mL Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifinden oluşan çözelti her tüpe eklendi [93, 94]. 3 mL'lik kuvars küvetlerde absorbans değerleri ölçüldü. Elde edilen sonuçlar ile  $\mu\text{g}$  proteine karşılık gelen standart eğri grafiği çizildi.

### **2.2.5 SDS – PAGE ile Enzimin Saflığının Kontrolü ve Molekül Ağırlığı Belirlenmesi**

SDS-PAGE, 2 adet farklı akrilamid konsantrasyonuna sahip %5'lik yükleme jeli ve %10'luk ayırma jeli olarak hazırlandı. Laemmli tarafından geliştirilen bu yöntemle afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzimlerin saflık kontrolleri yapıldı [92].

Cam plakalar önce saf su ve etanol ile temizlendi. Cam plakalar elektroforez çözeltisini dökmek için sabitleme aparatına takıldı. Önce ayırma jeli plakalar arasına yükleme jeline yer bırakacak kadar döküldü. Herhangi bir kabarcık oluşmamasına dikkat edildi. Jelin üzerine saf su dökerek yüzeyinin düzgün olması sağlandı. Jel polimerleşmeye bırakıldı. Polimerleşme sonunda saf su döküldü ve yükleme jeli üzerine eklendi. Yükleme jeli üzerine taraklar yerleştirildi. Polimerizasyon için beklendi. Tamamen polimerleşen jelden taraklar dikkatli ve yavaşça çıkarıldı. Oluşan kuyucuklar destile su ile yıkandı. Daha sonra tank tamponu ile tekrar yıkanarak hazır hale getirildi. Jel tanka yerleştirildi. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu döküldü.

Elüsyonları alınan her bir ırkın enzimlerinin yüksek absorbans gösteren tüpleri birleştirildi. Birleştirilen enzim çözeltileri ile numune tamponu 1:1 oranında 100  $\mu\text{L}$  olacak şekilde birleştirildi. Hazırlanan numuneler 3 dakika boyunca 100°C'de bekletildi. Numuneler kuyucuklara dikkatlice yüklendi. Yığma jelinde tamamen yürüyene kadar 100 Volt'a ayarlandı. Ayırma jelinin sınırına gelindiğinde 150 Volt'a çıkarıldı. Jel boyunca yürüyen protein numuneleri, jelin bitimine 1 cm kala durduruldu. Bu işlem yaklaşık 40-45 dakika kadar sürmektedir.

Jele dikkat ederek cam plakalar arasından çıkarıldı ve yığma jeli ile ayırma jeli ayrıldı. Ayırma jeli, renklendirme çözeltisine alınarak 20-30 dakika kadar çalkalayıcıya konuldu. Boyanan jeldeki fazla boyayı uzaklaştırmak için renk açma çözeltisine alındı. Jelin rengi açılana kadar belirli aralıklarla çözelti değiştirildi. Renk açıldığında protein bantları belirginleşti ve jelin fotoğrafı çekildi.

### 3. BULGULAR

#### 3.1 Enzim Saflaştırılması

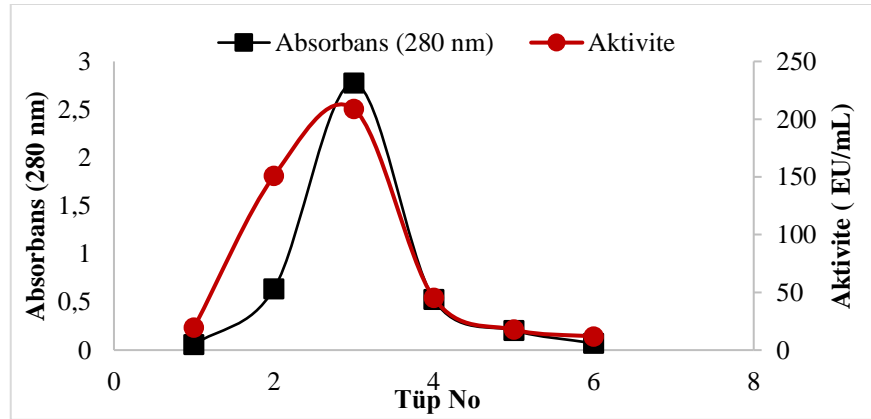
##### 3.1.1 Afinite Kromatografisi Yöntemi ile Saflaştırma

Kolona paketlenen jelden dengeleme tamponu geçirildi. 280 nm’de absorbans ölçümü yapılarak sıfırlanana kadar devam edildi. Dengeleme işleminden sonra hazırlanan hemolizat kolona yüklendi. Hemolizat tamamen kolondan geçirildiğinde, yıkama tamponu ile jel yavaşça yıkandı. Yıkama işlemi ile kolonda bulunan safsızlıklar uzaklaştırıldı. Yıkama işlemi 280 nm’de sıfırlandığında bitirilir.

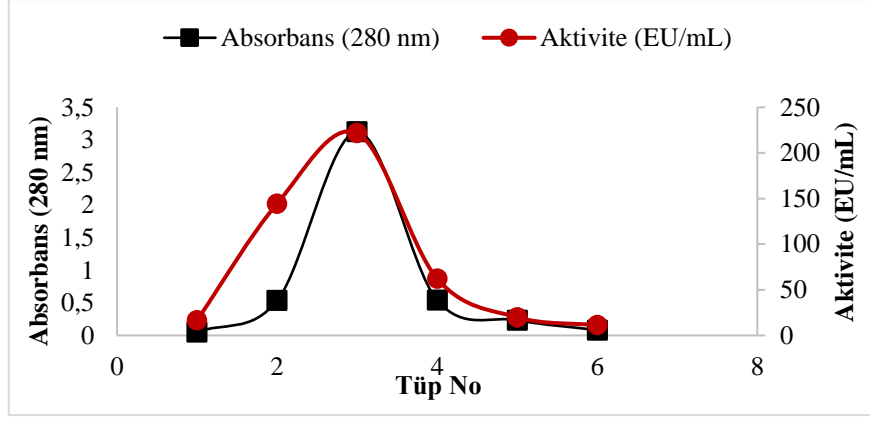
Karbonik anhidraz enziminin elüsyonu için hazırlanan elüsyon tamponu jele yavaşça tatbik edildi. Elüatlar, tüplere 3’er mL olacak şekilde toplandı.

Alınan elüatlar 280 nm’de köre karşı okutularak absorbansları belirlendi. Her tüp için aktivite tayini yapıldı. Ölçülen absorbanslar ve aktivite sonuçları tüp numarasına karşı grafiği hazırlandı.

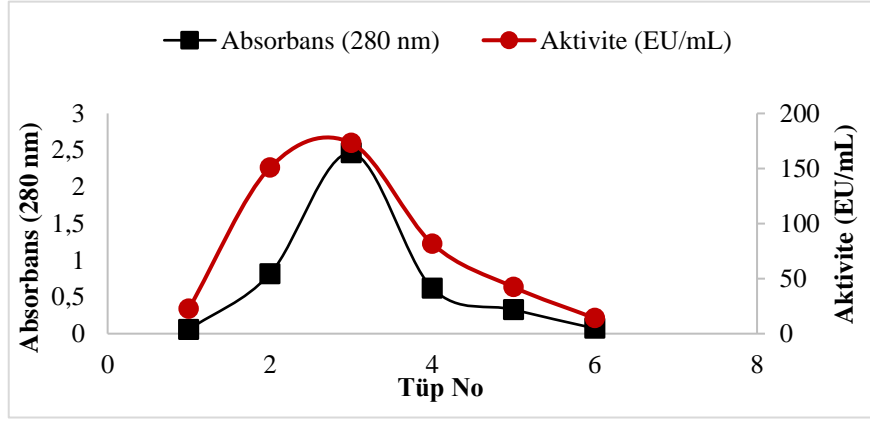
Her koyun ırkı için jel tekrar dengelendi. Hazırlanan hemolizatlar tatbik edildi. Yıkandı ve elüatlar toplandı. Hidrataz aktiviteleri ölçüldü.



Şekil 3.1: Dorset Down koyun ırkından saflaştırılan CA enziminin Absorbans (280 nm) – Aktivite (EU/mL) grafiği.



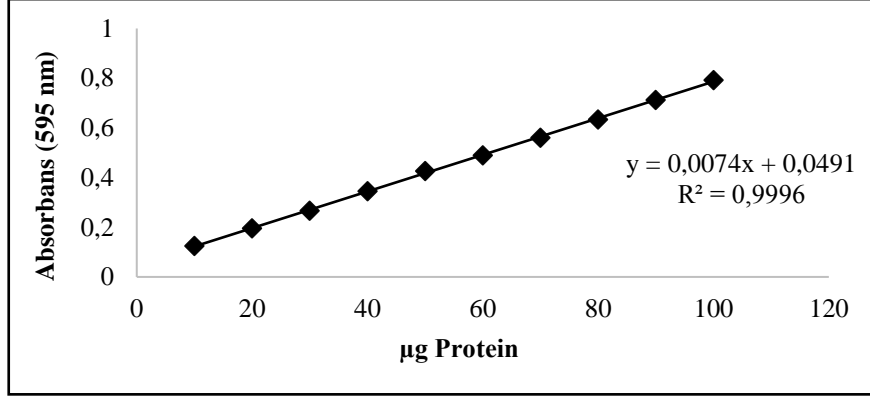
Şekil 3.2: Kıvırcık koyun ırkından saflaştırılan CA enziminin Absorbans (280 nm) – Aktivite (EU/mL) grafiği.



Şekil 3.3: Merinos koyun ırkından saflaştırılan CA enziminin Absorbans (280 nm) – Aktivite (EU/mL) grafiği.

### 3.1.2 Protein Derişiminin Belirlenmesi İçin Hazırlanan Standart Eğri Grafiği

Bradford yöntemi kullanılarak saflaştırılan enzim çözeltilisindeki protein tayini yapıldı. Standart eğri hazırlanarak, hemolizat ve saflaştırılan enzim çözeltililerindeki protein miktarları bulunmuştur. Hazırlanan standart eğri Şekil 3.4'te verilmiştir.



**Şekil 3.4:** Bradford yöntemi kullanılarak protein tayini için hazırlanan standart grafik.

### 3.1.3 Afinite Kromatografisi Yöntemi Kullanılarak Yapılan Safılaştırmanın

#### Basamakları

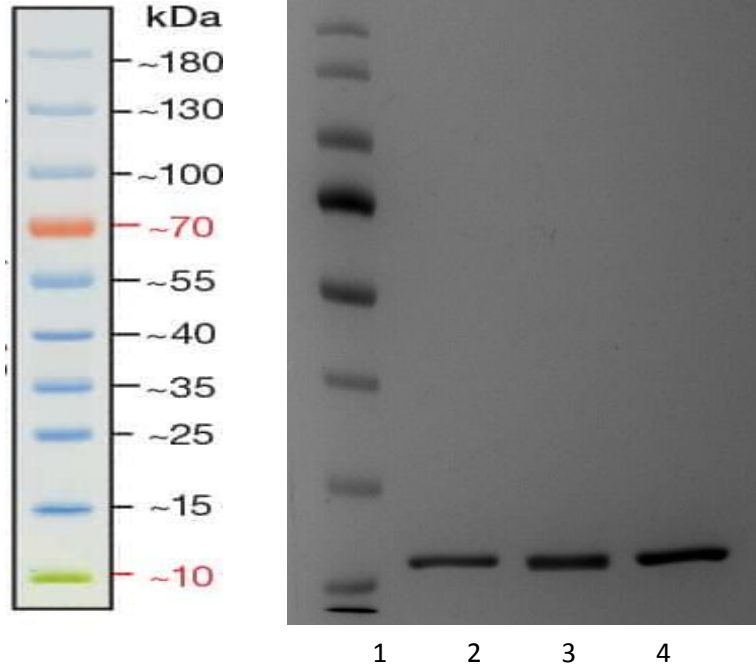
Koyun ırklarından afinite kromatografisi ile safılaştırılan CA enzimlerine ve hemolizattan alınan örneklere Hidrataz aktivitesi ve protein miktarı tayini yapılmıştır.

**Tablo 3.1:** Koyun ırklarındaki CA enzimleri için oluşturulan safılaştırma tablosu.

Basamak	Miktar (ml)	Aktivite (EU/ml)	Total Aktivite (EU/ml)	Protein Miktarı (mg/ml)	Total Protein (mg)	Özgül Aktivite (EU/mg)	% Verim	Safılaştırma Derecesi
Kıvrıkcık Hemolizat	20	117.5	2350	8620.270	172405.4	0.01363	100	-
Afinite Kromatografisi Kıvrıkcık	3	221.7	665.1	89.04054	267.1216	2.48987	28.30	182.6673
Merinos Hemolizat	20	154.7	3094	5295.945	105918.9	0.02921	100	-
Afinite Kromatografisi Merinos	3	173.2	519.6	85.79729	257.3918	2.01871	16.79	69.10787
Dorset Down Hemolizat	20	139.3	2786	9160.810	183216.2	0.01520	100	-
Afinite Kromatografisi Dorset Down	3	208.8	626.4	45.39189	136.1756	4.59994	22.48	302.5067

### 3.1.4 Koyun Irklarındaki Eritrositlerinde Bulunan Karbonik Anhidraz Enziminin SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Afinite kromatografisi ile saflaştırılan koyun ırklarındaki CA enzimlerinin saflığını ve molekül ağırlığını kontrol etmek için SDS-PAGE'den yararlanılmıştır. Saflaştırılan Dorset Down CA, Kıvırcık CA ve Merinos CA örnekleri için yaklaşık 29 kDa civarında hepsinde tek bant elde edilmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5: Afinite kolonundan saflaştırılan CA enzimi için SDS-PAGE elektrotorezi. 1. Marker, 2. Dorset Down CA enzimi, 3. Kıvırcık CA enzimi, 4. Merinos CA enzimi.

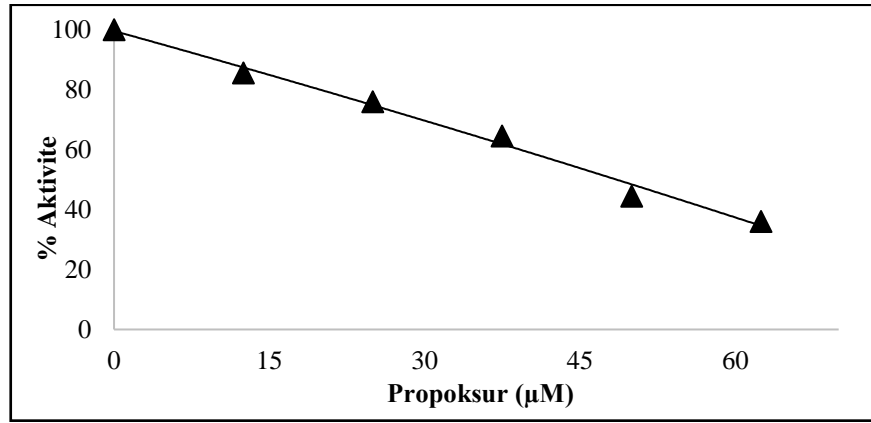
### 3.2 Dorset Down, Kıvırcık ve Merinos Koyun Irklarının Eritrositlerinden Saflaştırılan CA Enzimlerinin Hidrataz Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon Etkileri

Çalışmamızda kullanılan koyun ırkları; Dorset Down, Kıvırcık ve Merinos eritrositlerinden saflaştırılan CA enzimleri üzerine onbeş değişik pestisit'in inhibisyon etkisine bakılmıştır. Ölçümler hidrataz aktivitesi yöntemi ile yapılmıştır. %Aktivite/İnhibitör konsantrasyonuna karşı grafiği çizilmiş ve  $IC_{50}$  değerleri hesaplanmıştır.



**Tablo 3.2:** İnhibitör olarak kullanılan Propoksur'un Dorset Down CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.

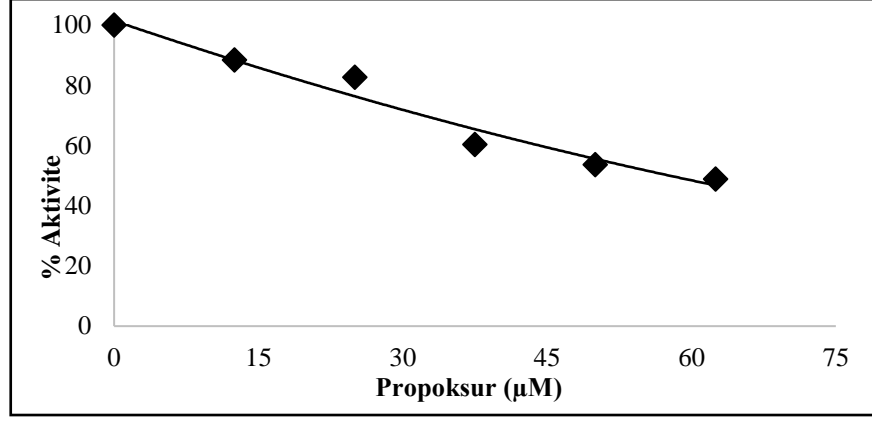
İnhibitör Solüsyon Hacmi (µL)	Fenol Kırmızısı Solüsyonu (µL)	Substrat Solüsyon Hacmi (µL)	Enzim Hacmi (µL)	Saf Su (µL)	Aktivite Tamponu (µL)	Küvetteki İnhibitör Derişimi (µM)	% Aktivite	EU
50	1900	1300	100	250	400	12.5	85.59	19.30
100	1900	1300	100	200	400	25	75.93	17.12
150	1900	1300	100	150	400	37.5	64.48	14.54
200	1900	1300	100	100	400	50	44.45	10.02
250	1900	1300	100	50	400	62.5	36.03	8.12



**Şekil 3.6:** Dorset Down CA enziminin farklı propoksur derişimleriyle IC<sub>50</sub>'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.

**Tablo 3.3:** İnhibitör olarak kullanılan Propoksur'un Kıvrıcık CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.

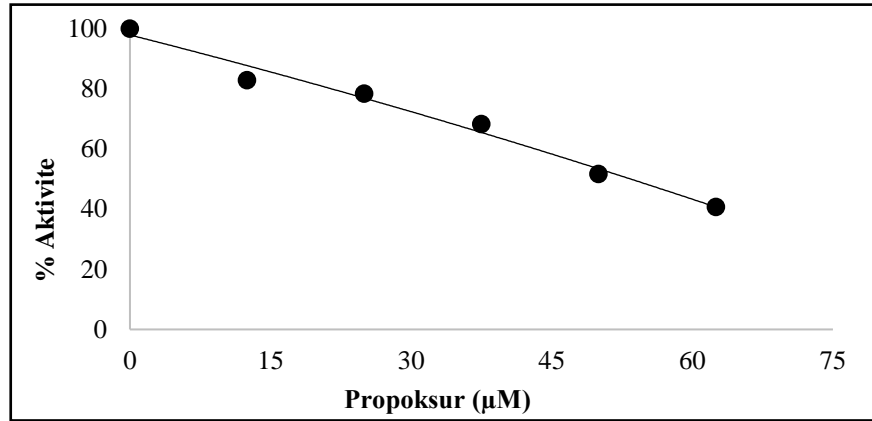
İnhibitör Solüsyon Hacmi (µL)	Fenol Kırmızısı Solüsyonu (µL)	Substrat Solüsyon Hacmi (µL)	Enzim Hacmi (µL)	Saf Su (µL)	Aktivite Tamponu (µL)	Küvetteki İnhibitör Derişimi (µM)	% Aktivite	EU
50	1900	1300	100	250	400	12.5	96.65	12.48
100	1900	1300	100	200	400	25	87.93	11.35
150	1900	1300	100	150	400	37.5	60.28	7.78
200	1900	1300	100	100	400	50	53.63	6.92
250	1900	1300	100	50	400	62.5	48.82	6.30



**Şekil 3.7:** Kıvırcık CA enziminin farklı propoksür derişimleriyle çalışılan  $IC_{50}$ 'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.

**Tablo 3.4:** İnhibitör olarak kullanılan Propoksür'un Merinos CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.

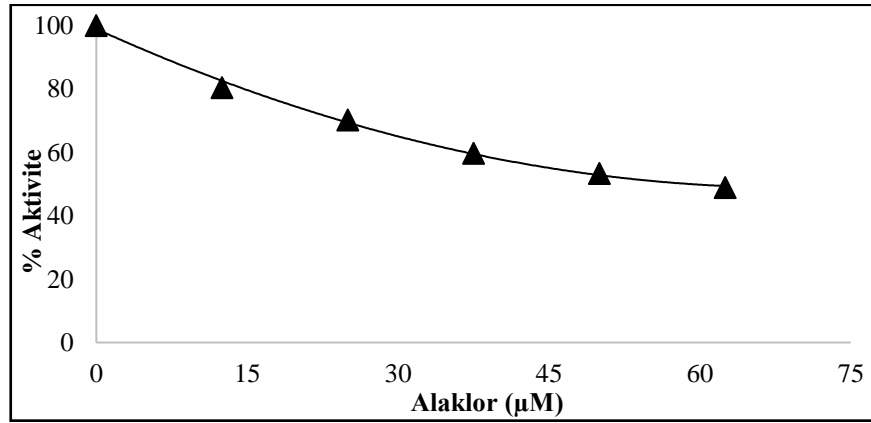
İnhibitör Solüsyon Hacmi (µL)	Fenol Kırmızısı Solüsyonu (µL)	Substrat Solüsyon Hacmi (µL)	Enzim Hacmi (µL)	Saf Su (µL)	Aktivite Tamponu (µL)	Küvetteki İnhibitör Derişimi (µM)	% Aktivite	EU
50	1900	1300	100	250	400	12.5	82.78	14.93
100	1900	1300	100	200	400	25	78.35	14.14
150	1900	1300	100	150	400	37.5	68.31	12.32
200	1900	1300	100	100	400	50	51.65	9.32
250	1900	1300	100	50	400	62.5	40.69	7.34



**Şekil 3.8:** Merinos CA enziminin farklı propoksür derişimleriyle  $IC_{50}$ 'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.

**Tablo 3.5:** İnhibitör olarak kullanılan Alaklor'un Dorset Down CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.

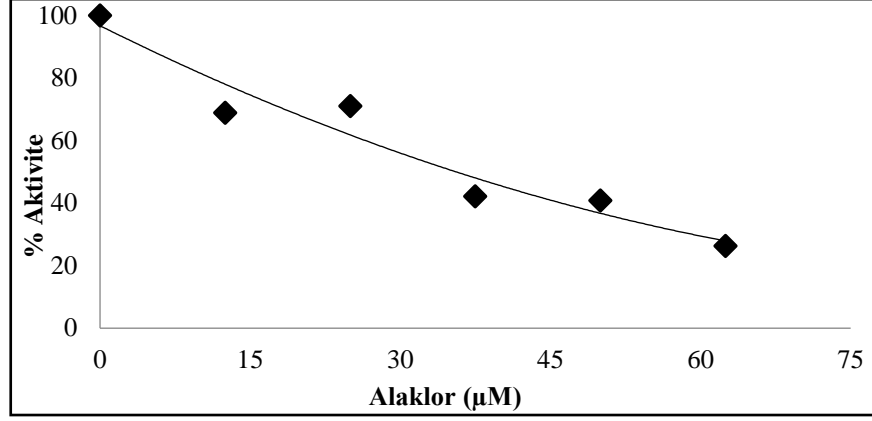
İnhibitör Solüsyon Hacmi (µL)	Fenol Kırmızısı Solüsyonu (µL)	Substrat Solüsyon Hacmi (µL)	Enzim Hacmi (µL)	Saf Su (µL)	Aktivite Tamponu (µL)	Küvetteki İnhibitör Derişimi (µM)	% Aktivite	EU
50	1900	1300	100	250	400	12.5	80.44	21.13
100	1900	1300	100	200	400	25	70.26	18.45
150	1900	1300	100	150	400	37.5	59.71	15.68
200	1900	1300	100	100	400	50	53.40	14.03
250	1900	1300	100	50	400	62.5	48.91	12.85



**Şekil 3.9:** Dorset Down CA enziminin farklı alaklor derişimleriyle IC<sub>50</sub>'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.

**Tablo 3.6:** İnhibitör olarak kullanılan Alaklor'un Kıvrıcık CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.

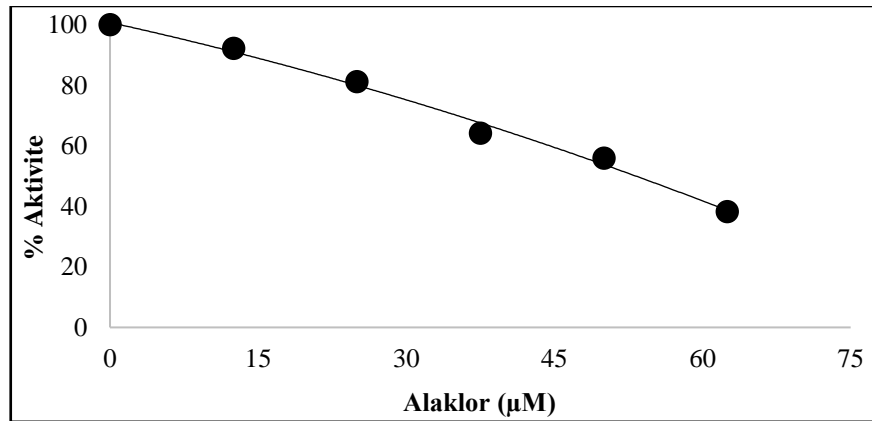
İnhibitör Solüsyon Hacmi (µL)	Fenol Kırmızısı Solüsyonu (µL)	Substrat Solüsyon Hacmi (µL)	Enzim Hacmi (µL)	Saf Su (µL)	Aktivite Tamponu (µL)	Küvetteki İnhibitör Derişimi (µM)	% Aktivite	EU
50	1900	1300	100	250	400	12.5	68.86	11.33
100	1900	1300	100	200	400	25	71.04	11.69
150	1900	1300	100	150	400	37.5	42.14	6.93
200	1900	1300	100	100	400	50	40.83	6.72
250	1900	1300	100	50	400	62.5	26.28	4.32



**Şekil 3.10:** Kıvrıkcık CA enziminin farklı alaklor derişimleriyle IC<sub>50</sub>'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.

**Tablo 3.7:** İnhibitör olarak kullanılan Alaklor'un Merinos CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.

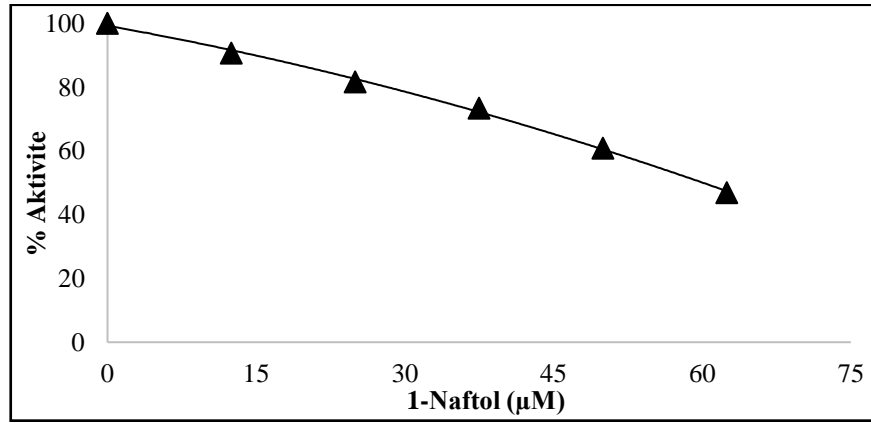
İnhibitör Solüsyon Hacmi (µL)	Fenol Kırmızısı Solüsyonu (µL)	Substrat Solüsyon Hacmi (µL)	Enzim Hacmi (µL)	Saf Su (µL)	Aktivite Tamponu (µL)	Küvetteki İnhibitör Derişimi (µM)	% Aktivite	EU
50	1900	1300	100	250	400	12.5	97.38	19.44
100	1900	1300	100	200	400	25	81.14	16.20
150	1900	1300	100	150	400	37.5	64.18	12.81
200	1900	1300	100	100	400	50	55.88	11.15
250	1900	1300	100	50	400	62.5	38.29	7.64



**Şekil 3.11:** Merinos CA enziminin farklı alaklor derişimleriyle IC<sub>50</sub>'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.

**Tablo 3.8:** İnhibitör olarak kullanılan 1-Naftol'un Dorset Down CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.

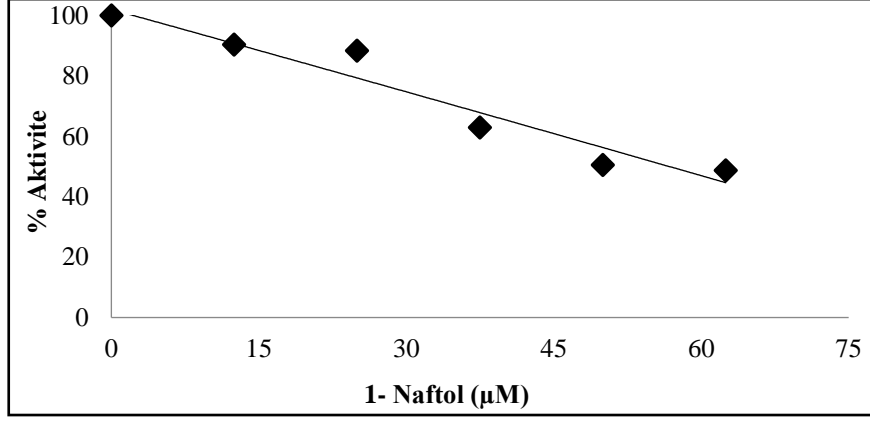
İnhibitör Solüsyon Hacmi (µL)	Fenol Kırmızısı Solüsyonu (µL)	Substrat Çözeltisi Hacmi (µL)	Enzim Hacmi (µL)	Saf Su (µL)	Aktivite Tamponu (µL)	Küvetteki İnhibitör Derişimi (µM)	% Aktivite	EU
50	1900	1300	100	250	400	12.5	90.70	9.93
100	1900	1300	100	200	400	25	81.69	8.95
150	1900	1300	100	150	400	37.5	73.47	8.05
200	1900	1300	100	100	400	50	60.85	6.66
250	1900	1300	100	50	400	62.5	46.86	5.13



**Şekil 3.12:** Dorset Down CA enziminin farklı 1-Naftol derişimleriyle IC<sub>50</sub>'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.

**Tablo 3.9:** İnhibitör olarak kullanılan 1-Naftol'un Kıvrıcık CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.

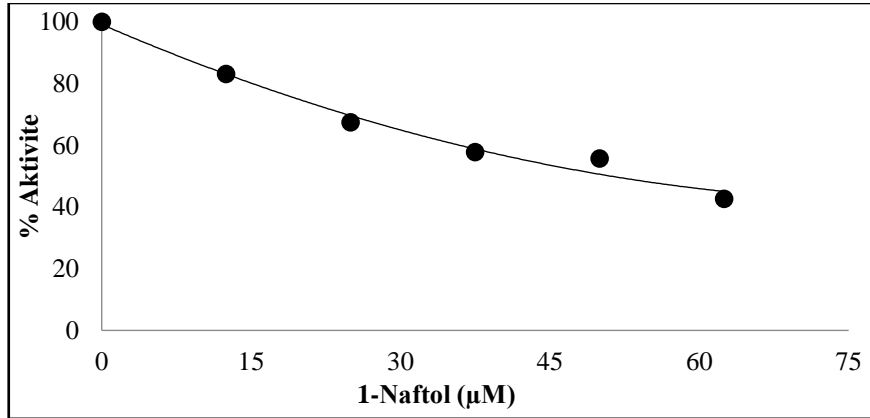
İnhibitör Solüsyon Hacmi (µL)	Fenol Kırmızısı Solüsyonu (µL)	Substrat Çözeltisi Hacmi (µL)	Enzim Hacmi (µL)	Saf Su (µL)	Aktivite Tamponu (µL)	Küvetteki İnhibitör Derişimi (µM)	% Aktivite	EU
50	1900	1300	100	250	400	12.5	90.29	15.96
100	1900	1300	100	200	400	25	88.34	15.62
150	1900	1300	100	150	400	37.5	62.88	11.12
200	1900	1300	100	100	400	50	50.47	8.92
250	1900	1300	100	50	400	62.5	48.66	8.60



**Şekil 3.13:** Kıvrıcık CA enziminin farklı 1-Naftol derişimleriyle IC<sub>50</sub>'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.

**Tablo 3.10:** İnhibitör olarak kullanılan 1-Naftol'un Merinos CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.

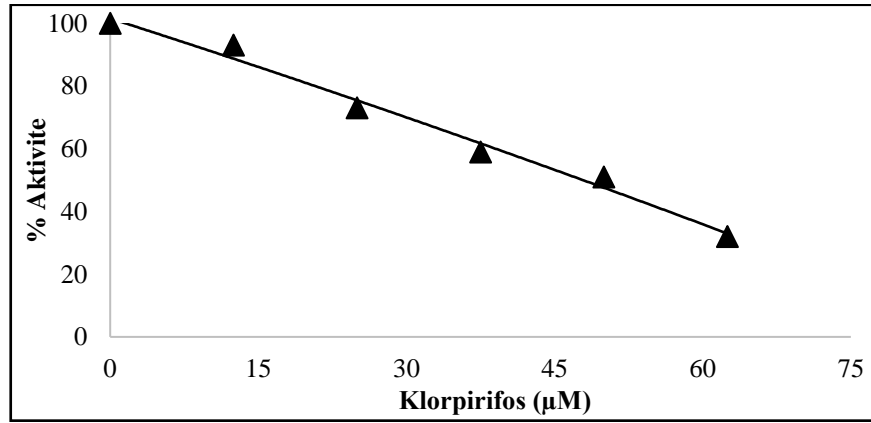
İnhibitör Solüsyon Hacmi (µL)	Fenol Kırmızısı Solüsyonu (µL)	Substrat Solüsyon Hacmi (µL)	Enzim Hacmi (µL)	Saf Su (µL)	Aktivite Tamponu (µL)	Küvetteki İnhibitör Derişimi (µM)	% Aktivite	EU
50	1900	1300	100	250	400	12.5	97.69	24.61
100	1900	1300	100	200	400	25	86.70	21.84
150	1900	1300	100	150	400	37.5	73.10	18.41
200	1900	1300	100	100	400	50	63.00	15.87
250	1900	1300	100	50	400	62.5	49.00	12.34



**Şekil 3.14:** Merinos CA enziminin farklı 1-Naftol derişimleriyle IC<sub>50</sub>'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.

**Tablo 3.11:** İnhibitör olarak kullanılan Klorpirifos'un Dorset Down CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.

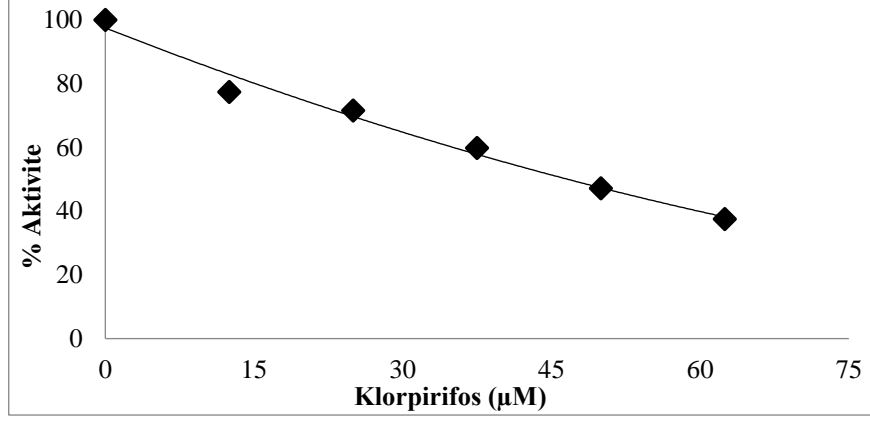
İnhibitör Solüsyonu Hacmi (µL)	Fenol Kırmızısı Solüsyonu (µL)	Substrat Solüsyonu Hacmi (µL)	Enzim Hacmi (µL)	Saf Su (µL)	Aktivite Tamponu (µL)	Küvetteki İnhibitör Derişimi (µM)	% Aktivite	EU
50	1900	1300	100	250	400	12.5	93.07	11.27
100	1900	1300	100	200	400	25	73.06	8.85
150	1900	1300	100	150	400	37.5	58.98	7.14
200	1900	1300	100	100	400	50	50.99	6.17
250	1900	1300	100	50	400	62.5	32.01	3.88



**Şekil 3.15:** Dorset Down CA enziminin farklı Klorpirifos derişimleriyle IC<sub>50</sub>'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.

**Tablo 3.12:** İnhibitör olarak kullanılan Klorpirifos'un Kıvrıcık CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.

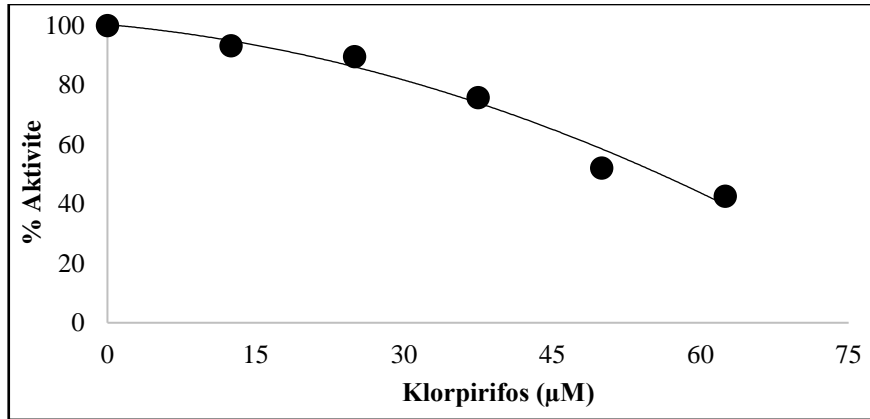
İnhibitör Solüsyon Hacmi (µL)	Fenol Kırmızısı Solüsyonu (µL)	Substrat Solüsyon Hacmi (µL)	Enzim Hacmi (µL)	Saf Su (µL)	Aktivite Tamponu (µL)	Küvetteki İnhibitör Derişimi (µM)	% Aktivite	EU
50	1900	1300	100	250	400	12.5	77.38	11.39
100	1900	1300	100	200	400	25	71.49	10.52
150	1900	1300	100	150	400	37.5	59.77	8.80
200	1900	1300	100	100	400	50	47.09	6.93
250	1900	1300	100	50	400	62.5	37.49	5.52



**Şekil 3.16:** Kıvrırcık CA enziminin farklı Klorpirifos derişimleri ile IC<sub>50</sub>'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.

**Tablo 3.13:** İnhibitör olarak kullanılan Klorpirifos'un Merinos CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.

İnhibitör Solüsyon Hacmi (µL)	Fenol Kırmızısı Solüsyonu (µL)	Substrat Solüsyon Hacmi (µL)	Enzim Hacmi (µL)	Saf Su (µL)	Aktivite Tamponu (µL)	Küvetteki İnhibitör Derişimi (µM)	% Aktivite	EU
50	1900	1300	100	250	400	12.5	98.73	11.58
100	1900	1300	100	200	400	25	89.54	10.50
150	1900	1300	100	150	400	37.5	75.76	8.89
200	1900	1300	100	100	400	50	52.08	6.11
250	1900	1300	100	50	400	62.5	42.63	5.00

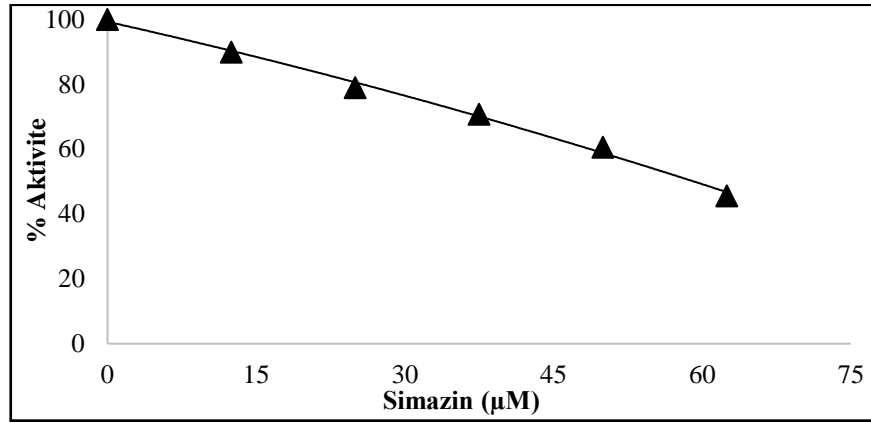


**Şekil 3.17:** Merinos CA enziminin farklı Klorpirifos derişimleri ile IC<sub>50</sub>'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.



**Tablo 3.14:** İnhibitör olarak kullanılan Simazin'in Dorset Down CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.

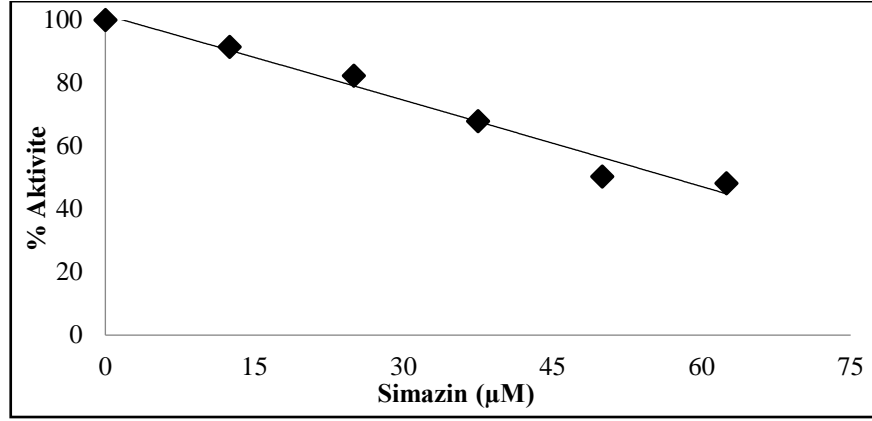
İnhibitör Solüsyon Hacmi (µL)	Fenol Kırmızısı Solüsyonu (µL)	Substrat Solüsyon Hacmi (µL)	Enzim Hacmi (µL)	Saf Su (µL)	Aktivite Tamponu (µL)	Küvetteki İnhibitör Derişimi (µM)	% Aktivite	EU
50	1900	1300	100	250	400	12.5	89.92	13.90
100	1900	1300	100	200	400	25	78.98	12.21
150	1900	1300	100	150	400	37.5	70.81	10.95
200	1900	1300	100	100	400	50	60.64	9.38
250	1900	1300	100	50	400	62.5	45.58	7.05



**Şekil 3.18:** Dorset Down CA enziminin farklı Simazin derişimleriyle IC<sub>50</sub>'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.

**Tablo 3.15:** İnhibitör olarak kullanılan Simazin'in Kıvırcık CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.

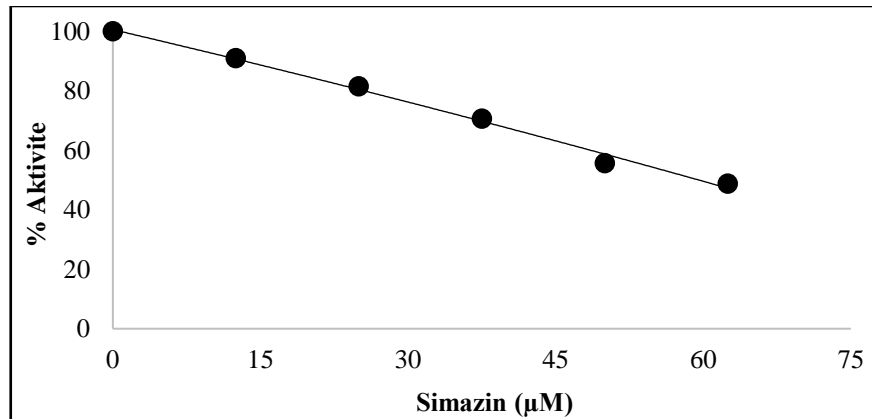
İnhibitör Solüsyon Hacmi (µL)	Fenol Kırmızısı Solüsyonu (µL)	Substrat Solüsyon Hacmi (µL)	Enzim Hacmi (µL)	Saf Su (µL)	Aktivite Tamponu (µL)	Küvetteki İnhibitör Derişimi (µM)	% Aktivite	EU
50	1900	1300	100	250	400	12.5	91.48	18.95
100	1900	1300	100	200	400	25	82.33	17.06
150	1900	1300	100	150	400	37.5	67.88	14.06
200	1900	1300	100	100	400	50	50.33	10.43
250	1900	1300	100	50	400	62.5	48.13	9.97



**Şekil 3.19:** Kıvrıcık CA enziminin farklı Simazin derişimleriyle IC<sub>50</sub>'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.

**Tablo 3.16:** İnhibitör olarak kullanılan Simazin'in Merinos CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.

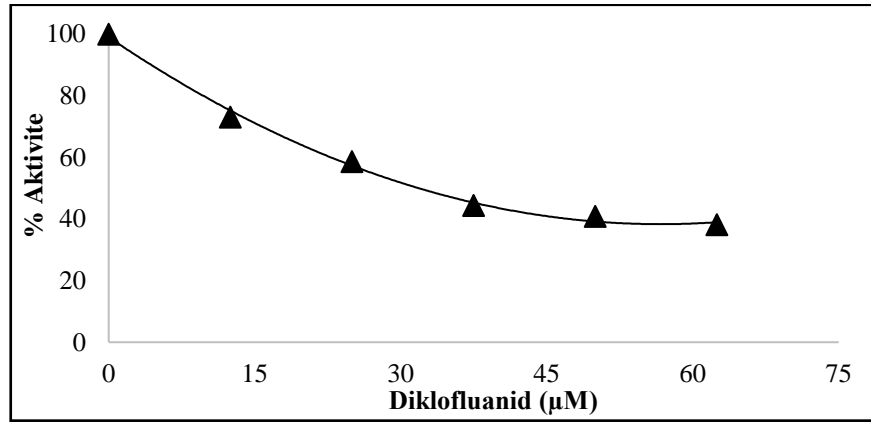
İnhibitör Solüsyon Hacmi (µL)	Fenol Kırmızısı Solüsyonu (µL)	Substrat Solüsyon Hacmi (µL)	Enzim Hacmi (µL)	Saf Su (µL)	Aktivite Tamponu (µL)	Küvetteki İnhibitör Derişimi (µM)	% Aktivite	EU
50	1900	1300	100	250	400	12.5	95.09	6.78
100	1900	1300	100	200	400	25	81.48	5.81
150	1900	1300	100	150	400	37.5	70.62	5.04
200	1900	1300	100	100	400	50	55.58	3.96
250	1900	1300	100	50	400	62.5	48.76	3.48



**Şekil 3.20:** Merinos CA enziminin farklı Simazin derişimleriyle IC<sub>50</sub>'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.

**Tablo 3.17:** İnhibitör olarak kullanılan Diklofluamid'in Dorset Down CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.

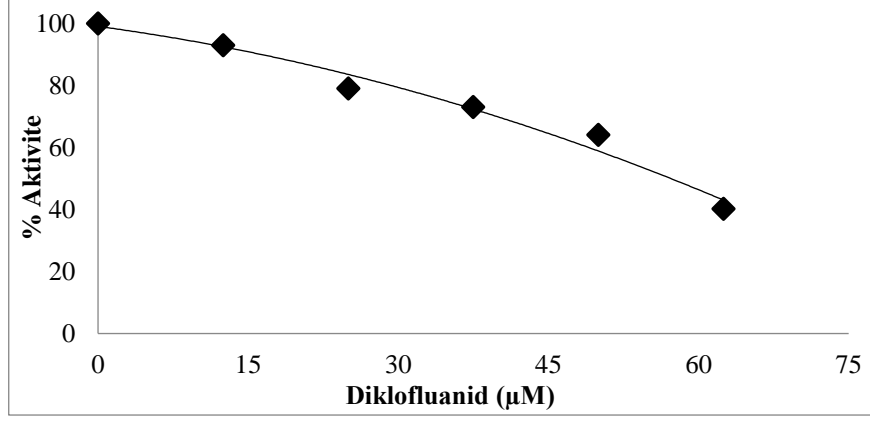
İnhibitör Solüsyon Hacmi (µL)	Fenol Kırmızısı Solüsyonu (µL)	Substrat Solüsyon Hacmi (µL)	Enzim Hacmi (µL)	Saf Su (µL)	Aktivite Tamponu (µL)	Küvetteki İnhibitör Derişimi (µM)	% Aktivite	EU
50	1900	1300	100	250	400	12.5	73.01	11.75
100	1900	1300	100	200	400	25	58.60	9.43
150	1900	1300	100	150	400	37.5	44.34	7.14
200	1900	1300	100	100	400	50	40.82	6.57
250	1900	1300	100	50	400	62.5	38.12	6.14



**Şekil 3.21:** Dorset Down CA enziminin farklı Diklofluamid derişimleriyle IC<sub>50</sub>'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.

**Tablo 3.18:** İnhibitör olarak kullanılan Diklofluamid'in Kıvrıcık CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.

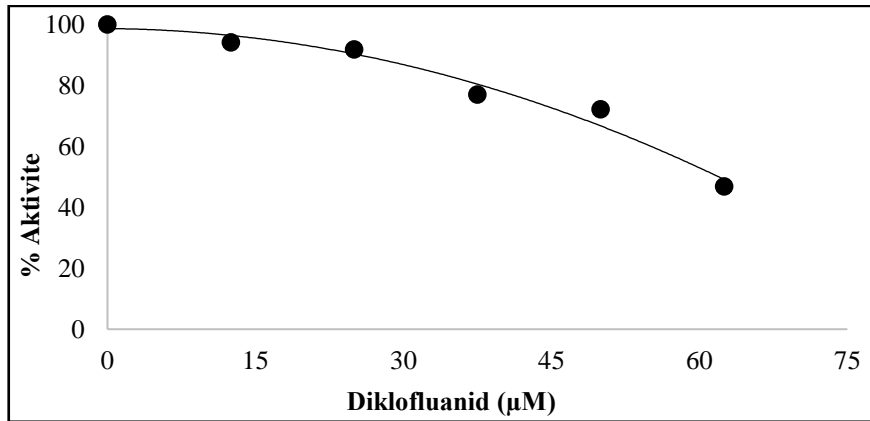
İnhibitör Solüsyon Hacmi (µL)	Fenol Kırmızısı Solüsyonu (µL)	Substrat Solüsyon Hacmi (µL)	Enzim Hacmi (µL)	Saf Su (µL)	Aktivite Tamponu (µL)	Küvetteki İnhibitör Derişimi (µM)	% Aktivite	EU
50	1900	1300	100	250	400	12.5	92.99	19.50
100	1900	1300	100	200	400	25	79.03	16.57
150	1900	1300	100	150	400	37.5	73.06	15.32
200	1900	1300	100	100	400	50	64.03	13.43
250	1900	1300	100	50	400	62.5	40.15	8.42



**Şekil 3.22:** Kıvrıcık CA enziminin farklı Diklofluanid derişimleriyle  $IC_{50}$ 'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.

**Tablo 3.19:** İnhibitör olarak kullanılan Diklofluanid'in Merinos CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.

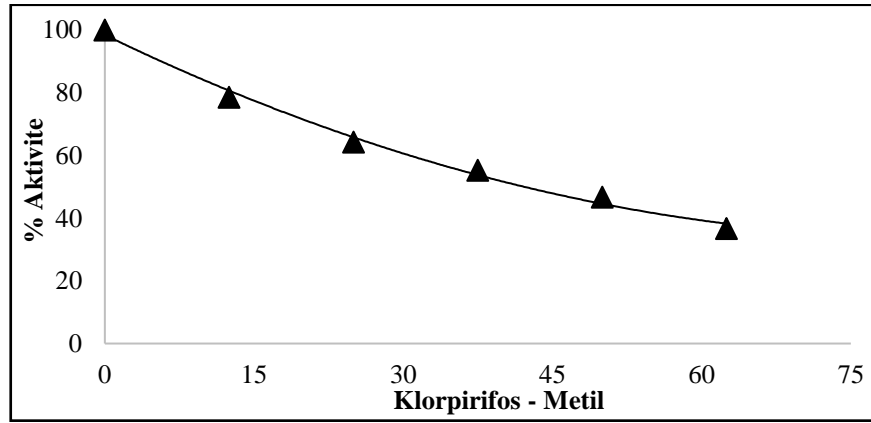
İnhibitör Solüsyon Hacmi (µL)	Fenol Kırmızısı Solüsyonu (µL)	Substrat Solüsyon Hacmi (µL)	Enzim Hacmi (µL)	Saf Su (µL)	Aktivite Tamponu (µL)	Küvetteki İnhibitör Derişimi (µM)	% Aktivite	EU
50	1900	1300	100	250	400	12.5	94.11	10.33
100	1900	1300	100	200	400	25	91.78	10.08
150	1900	1300	100	150	400	37.5	76.96	8.45
200	1900	1300	100	100	400	50	72.14	7.92
250	1900	1300	100	50	400	62.5	46.83	5.14



**Şekil 3.23:** Merinos CA enziminin farklı Diklofluanid derişimleriyle  $IC_{50}$ 'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.

**Tablo 3.20:** İnhibitör olarak kullanılan Klorpirifos – Metil’in Dorset Down CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.

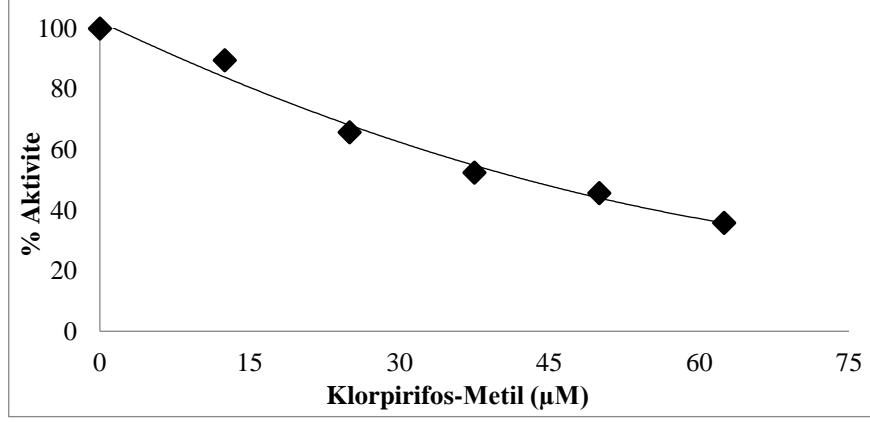
İnhibitör Solüsyon Hacmi (µL)	Fenol Kırmızısı Solüsyonu (µL)	Substrat Solüsyon Hacmi (µL)	Enzim Hacmi (µL)	Saf Su (µL)	Aktivite Tamponu (µL)	Küvetteki İnhibitör Derişimi (µM)	% Aktivite	EU
50	1900	1300	100	250	400	12.5	78.56	12.65
100	1900	1300	100	200	400	25	64.28	10.35
150	1900	1300	100	150	400	37.5	55.29	8.90
200	1900	1300	100	100	400	50	46.68	7.52
250	1900	1300	100	50	400	62.5	36.68	5.91



**Şekil 3.24:** Dorset Down CA enziminin farklı Klorpirifos – Metil derişimleriyle IC<sub>50</sub>'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.

**Tablo 3.21:** İnhibitör olarak kullanılan Klorpirifos – Metil’in Kıvrıcık CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.

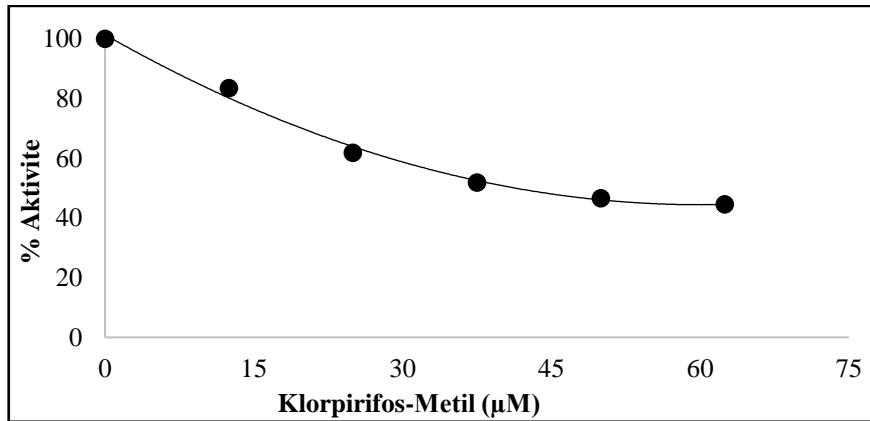
İnhibitör Solüsyon Hacmi (µL)	Fenol Kırmızısı Solüsyonu (µL)	Substrat Solüsyon Hacmi (µL)	Enzim Hacmi (µL)	Saf Su (µL)	Aktivite Tamponu (µL)	Küvetteki İnhibitör Derişimi (µM)	% Aktivite	EU
50	1900	1300	100	250	400	12.5	89.52	21.44
100	1900	1300	100	200	400	25	65.76	15.75
150	1900	1300	100	150	400	37.5	52.45	12.56
200	1900	1300	100	100	400	50	45.65	10.93
250	1900	1300	100	50	400	62.5	35.79	8.57



**Şekil 3.25:** Kıvrırcık CA enziminin farklı Klorpirifos – Metil derişimleriyle  $IC_{50}$ 'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.

**Tablo 3.22:** İnhibitör olarak kullanılan Klorpirifos – Metil'in Merinos CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.

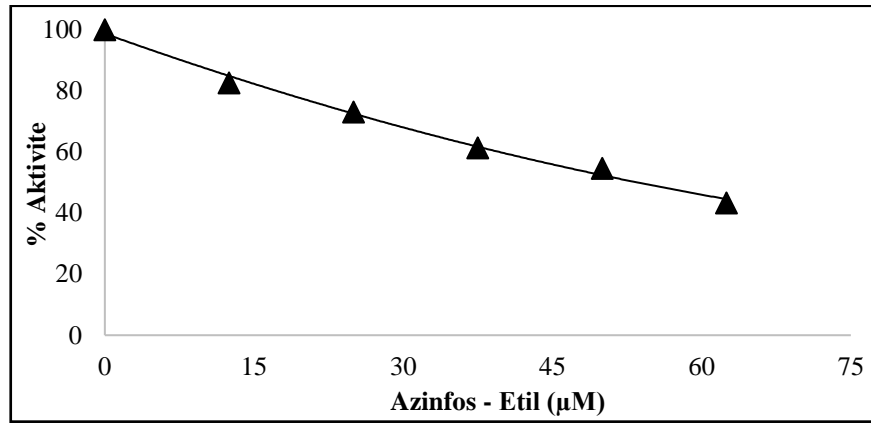
İnhibitör Solüsyon Hacmi (µL)	Fenol Kırmızısı Solüsyonu (µL)	Substrat Solüsyon Hacmi (µL)	Enzim Hacmi (µL)	Saf Su (µL)	Aktivite Tamponu (µL)	Küvetteki İnhibitör Derişimi (µM)	% Aktivite	EU
50	1900	1300	100	250	400	12.5	83.51	12.02
100	1900	1300	100	200	400	25	61.87	8.90
150	1900	1300	100	150	400	37.5	51.91	7.47
200	1900	1300	100	100	400	50	46.61	6.71
250	1900	1300	100	50	400	62.5	44.54	6.41



**Şekil 3.26:** Merinos CA enziminin farklı Klorpirifos – Metil derişimleriyle  $IC_{50}$ 'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.

**Tablo 3.23:** İnhibitör olarak kullanılan Azinfos – Etil’in Dorset Down CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.

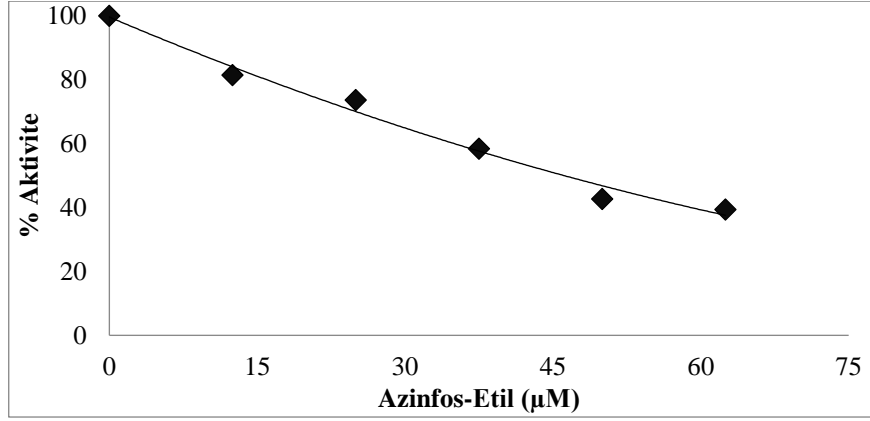
İnhibitör Çözeltisi Hacmi (µL)	Fenol Kırmızısı Solüsyonu (µL)	Substrat Solüsyon Hacmi (µL)	Enzim Hacmi (µL)	Saf Su (µL)	Aktivite Tamponu (µL)	Küvetteki İnhibitör Derişimi (µM)	% Aktivite	EU
50	1900	1300	100	250	400	12.5	82.58	10.00
100	1900	1300	100	200	400	25	73.03	8.84
150	1900	1300	100	150	400	37.5	61.29	7.42
200	1900	1300	100	100	400	50	54.58	6.61
250	1900	1300	100	50	400	62.5	43.32	5.25



**Şekil 3.27:** Dorset Down CA enziminin farklı Azinfos – Etil derişimleriyle IC<sub>50</sub>'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.

**Tablo 3.24:** İnhibitör olarak kullanılan Azinfos – Etil'in Kıvrıcık CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.

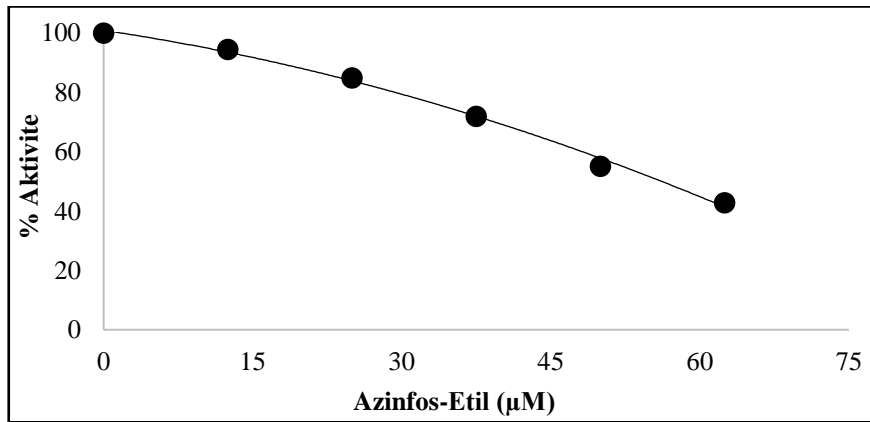
İnhibitör Solüsyon Hacmi (µL)	Fenol Kırmızısı Solüsyonu (µL)	Substrat Solüsyon Hacmi (µL)	Enzim Hacmi (µL)	Saf Su (µL)	Aktivite Tamponu (µL)	Küvetteki İnhibitör Derişimi (µM)	% Aktivite	EU
50	1900	1300	100	250	400	12.5	88.53	21.20
100	1900	1300	100	200	400	25	73.67	17.65
150	1900	1300	100	150	400	37.5	58.49	14.01
200	1900	1300	100	100	400	50	42.76	10.24
250	1900	1300	100	50	400	62.5	39.43	9.44



**Şekil 3.28:** Kivircik CA enziminin farklı Azinfos – Etil derişimleriyle IC<sub>50</sub>'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.

**Tablo 3.25:** İnhibitör olarak kullanılan Azinfos – Etil'in Merinos CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.

İnhibitör Solüsyon Hacmi (µL)	Fenol Kırmızısı Solüsyonu (µL)	Substrat Solüsyon Hacmi (µL)	Enzim Hacmi (µL)	Saf Su (µL)	Aktivite Tamponu (µL)	Küvetteki İnhibitör Derişimi (µM)	% Aktivite	EU
50	1900	1300	100	250	400	12.5	94.58	13.61
100	1900	1300	100	200	400	25	84.93	12.22
150	1900	1300	100	150	400	37.5	71.98	10.36
200	1900	1300	100	100	400	50	55.20	7.94
250	1900	1300	100	50	400	62.5	42.87	6.17

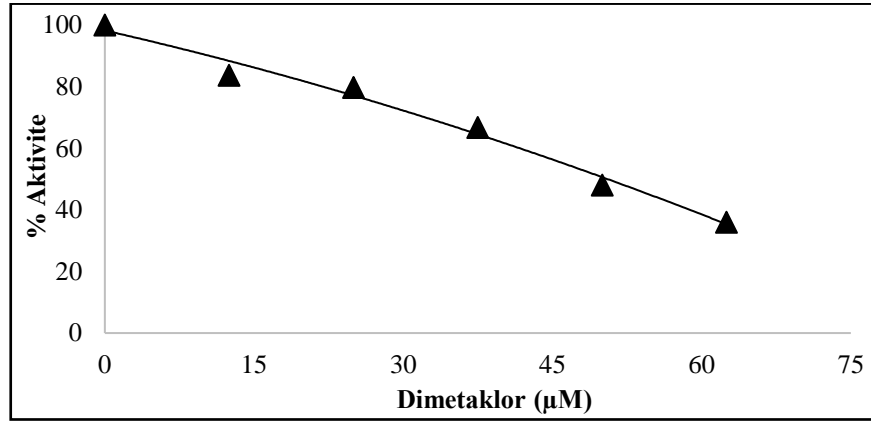


**Şekil 3.29:** Merinos CA enziminin farklı Azinfos – Etil derişimleriyle IC<sub>50</sub>'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.



**Tablo 3.26:** İnhibitör olarak kullanılan Dimetaklor'un Dorset Down CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.

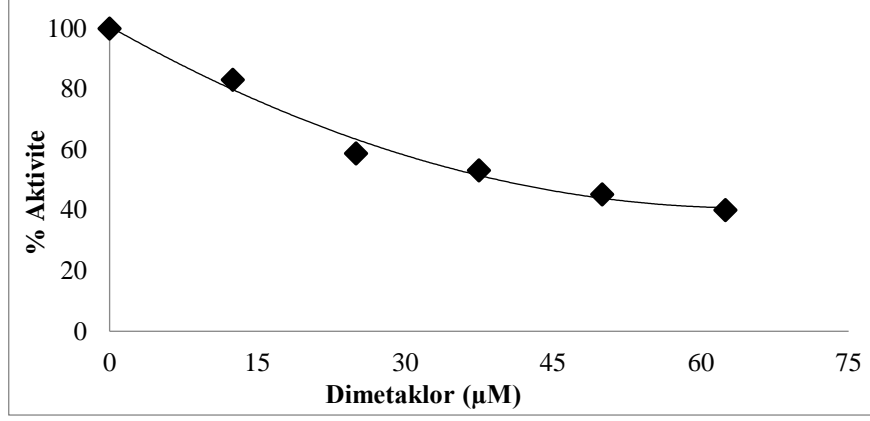
İnhibitör Solüsyon Hacmi (µL)	Fenol Kırmızısı Solüsyonu (µL)	Substrat Solüsyon Hacmi (µL)	Enzim Hacmi (µL)	Saf Su (µL)	Aktivite Tamponu (µL)	Küvetteki İnhibitör Derişimi (µM)	% Aktivite	EU
50	1900	1300	100	250	400	12.5	83.64	10.13
100	1900	1300	100	200	400	25	79.71	9.65
150	1900	1300	100	150	400	37.5	66.73	8.08
200	1900	1300	100	100	400	50	47.99	5.81
250	1900	1300	100	50	400	62.5	35.97	4.36



**Şekil 3.30:** Dorset Down CA enziminin farklı Dimetaklor derişimleriyle IC<sub>50</sub>'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.

**Tablo 3.27:** İnhibitör olarak kullanılan Dimetaklor'un Kıvırcık CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.

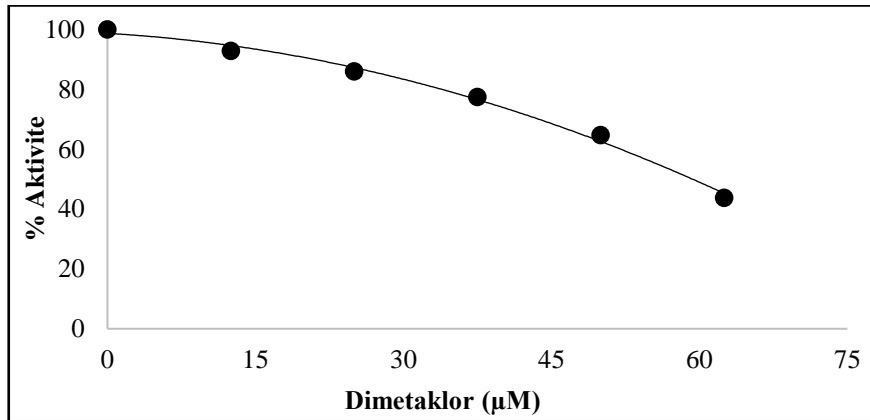
İnhibitör Solüsyon Hacmi (µL)	Fenol Kırmızısı Solüsyonu (µL)	Substrat Solüsyon Hacmi (µL)	Enzim Hacmi (µL)	Saf Su (µL)	Aktivite Tamponu (µL)	Küvetteki İnhibitör Derişimi (µM)	% Aktivite	EU
50	1900	1300	100	250	400	12.5	83.09	12.23
100	1900	1300	100	200	400	25	58.75	8.64
150	1900	1300	100	150	400	37.5	53.16	7.82
200	1900	1300	100	100	400	50	45.25	6.66
250	1900	1300	100	50	400	62.5	40.02	5.89



**Şekil 3.31:** Kıvrırcık CA enziminin farklı Dimetaklor derişimleriyle IC<sub>50</sub>'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.

**Tablo 3.28:** İnhibitör olarak kullanılan Dimetaklor'un Merinos CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.

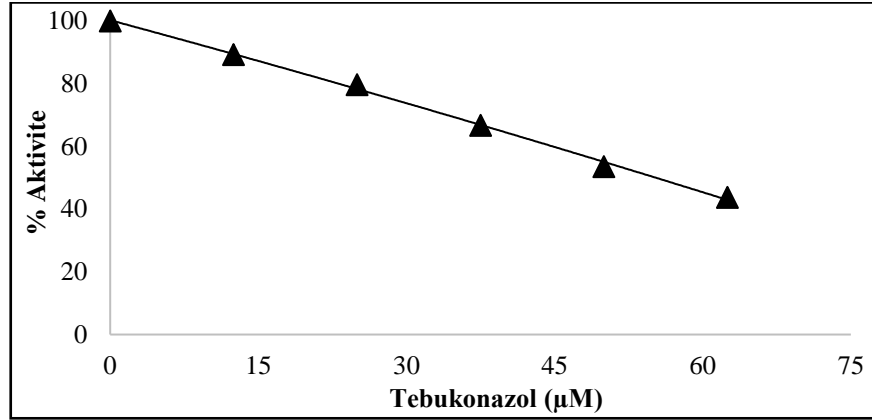
İnhibitör Solüsyon Hacmi (µL)	Fenol Kırmızısı Solüsyonu (µL)	Substrat Solüsyon Hacmi (µL)	Enzim Hacmi (µL)	Saf Su (µL)	Aktivite Tamponu (µL)	Küvetteki İnhibitör Derişimi (µM)	% Aktivite	EU
50	1900	1300	100	250	400	12.5	92.91	10.90
100	1900	1300	100	200	400	25	86.03	10.09
150	1900	1300	100	150	400	37.5	77.45	9.08
200	1900	1300	100	100	400	50	64.76	7.60
250	1900	1300	100	50	400	62.5	43.78	5.13



**Şekil 3.32:** Merinos CA enziminin farklı Dimetaklor derişimleriyle IC<sub>50</sub>'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.

**Tablo 3.29:** İnhibitör olarak kullanılan Tebukonazol'un Dorset Down CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.

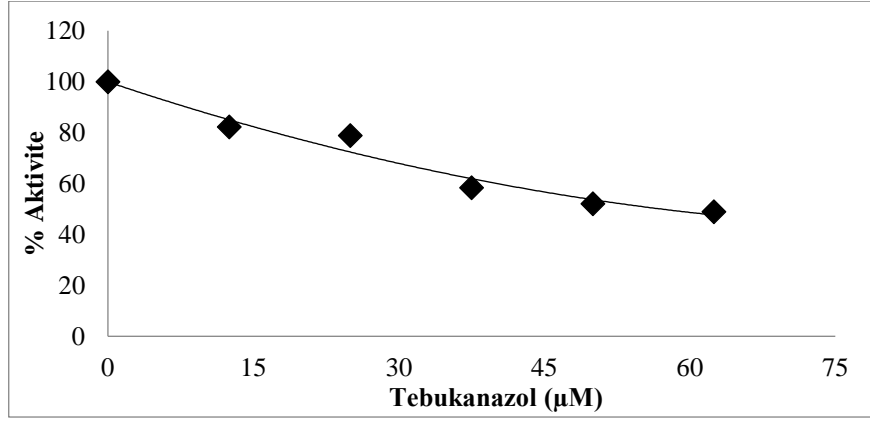
İnhibitör Solüsyon Hacmi (µL)	Fenol Kırmızısı Solüsyonu (µL)	Substrat Solüsyon Hacmi (µL)	Enzim Hacmi (µL)	Saf Su (µL)	Aktivite Tamponu (µL)	Küvetteki İnhibitör Derişimi (µM)	% Aktivite	EU
50	1900	1300	100	250	400	12.5	89.33	9.78
100	1900	1300	100	200	400	25	79.64	8.72
150	1900	1300	100	150	400	37.5	66.68	7.30
200	1900	1300	100	100	400	50	53.59	5.87
250	1900	1300	100	50	400	62.5	43.78	4.79



**Şekil 3.33:** Dorset Down CA enziminin farklı Tebukonazol derişimleriyle IC<sub>50</sub>'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.

**Tablo 3.30:** İnhibitör olarak kullanılan Tebukonazol'un Kıvrıcık CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.

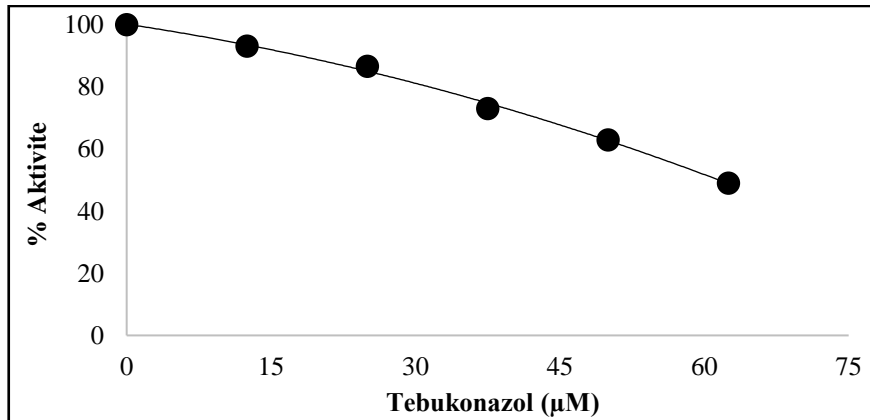
İnhibitör Solüsyon Hacmi (µL)	Fenol Kırmızısı Solüsyonu (µL)	Substrat Solüsyon Hacmi (µL)	Enzim Hacmi (µL)	Saf Su (µL)	Aktivite Tamponu (µL)	Küvetteki İnhibitör Derişimi (µM)	% Aktivite	EU
50	1900	1300	100	250	400	12.5	82.24	15.69
100	1900	1300	100	200	400	25	78.82	15.04
150	1900	1300	100	150	400	37.5	58.34	11.13
200	1900	1300	100	100	400	50	52.08	9.94
250	1900	1300	100	50	400	62.5	49.00	9.35



**Şekil 3.34:** Kivircik CA enziminin farklı Tebukonazol derişimleriyle  $IC_{50}$ 'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.

**Tablo 3.31:** İnhibitör olarak kullanılan Tebukonazol'un Merinos CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.

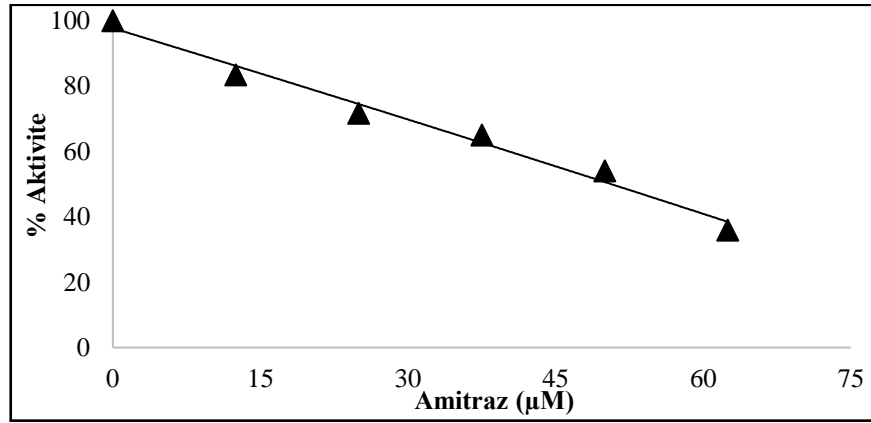
İnhibitör Solüsyon Hacmi (µL)	Fenol Kırmızısı Solüsyonu (µL)	Substrat Solüsyon Hacmi (µL)	Enzim Hacmi (µL)	Saf Su (µL)	Aktivite Tamponu (µL)	Küvetteki İnhibitör Derişimi (µM)	% Aktivite	EU
50	1900	1300	100	250	400	12.5	97.69	24.61
100	1900	1300	100	200	400	25	86.70	21.84
150	1900	1300	100	150	400	37.5	73.10	18.41
200	1900	1300	100	100	400	50	63.00	15.87
250	1900	1300	100	50	400	62.5	49.00	12.34



**Şekil 3.35:** Merinos CA enziminin farklı Tebukonazol derişimleriyle  $IC_{50}$ 'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.

**Tablo 3.32:** İnhibitör olarak kullanılan Amitraz’ın Dorset Down CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.

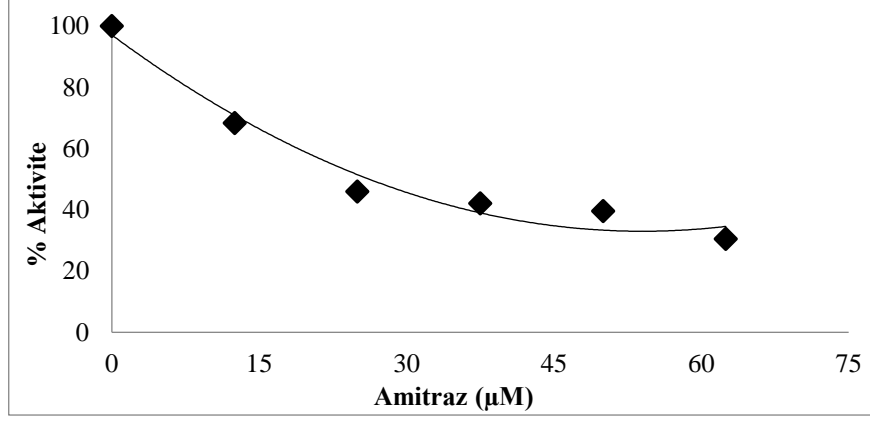
İnhibitör Solüsyon Hacmi (µL)	Fenol Kırmızısı Solüsyonu (µL)	Substrat Solüsyon Hacmi (µL)	Enzim Hacmi (µL)	Saf Su (µL)	Aktivite Tamponu (µL)	Küvetteki İnhibitör Derişimi (µM)	% Aktivite	EU
50	1900	1300	100	250	400	12.5	83.42	14.82
100	1900	1300	100	200	400	25	71.66	12.73
150	1900	1300	100	150	400	37.5	65.06	11.56
200	1900	1300	100	100	400	50	54.08	9.61
250	1900	1300	100	50	400	62.5	35.97	6.39



**Şekil 3.36:** Dorset Down CA enziminin farklı Amitraz derişimleriyle IC<sub>50</sub>'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.

**Tablo 3.33:** İnhibitör olarak kullanılan Amitraz’ın Kıvırcık CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.

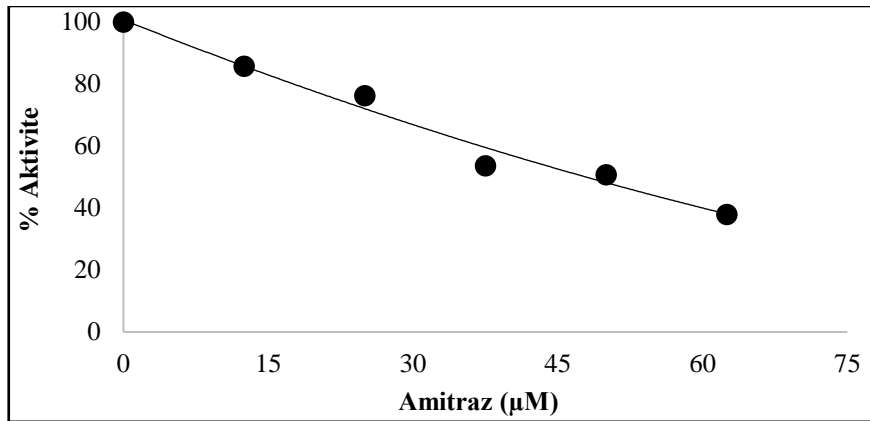
İnhibitör Solüsyon Hacmi (µL)	Fenol Kırmızısı Solüsyonu (µL)	Substrat Solüsyon Hacmi (µL)	Enzim Hacmi (µL)	Saf Su (µL)	Aktivite Tamponu (µL)	Küvetteki İnhibitör Derişimi (µM)	% Aktivite	EU
50	1900	1300	100	250	400	12.5	68.31	6.73
100	1900	1300	100	200	400	25	45.98	4.53
150	1900	1300	100	150	400	37.5	42.11	4.15
200	1900	1300	100	100	400	50	39.59	3.90
250	1900	1300	100	50	400	62.5	30.49	3.00



**Şekil 3.37:** Kıvrıcık CA enziminin farklı Amitraz derişimleriyle IC<sub>50</sub>'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.

**Tablo 3.34:** İnhibitör olarak kullanılan Amitraz'ın Merinos CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.

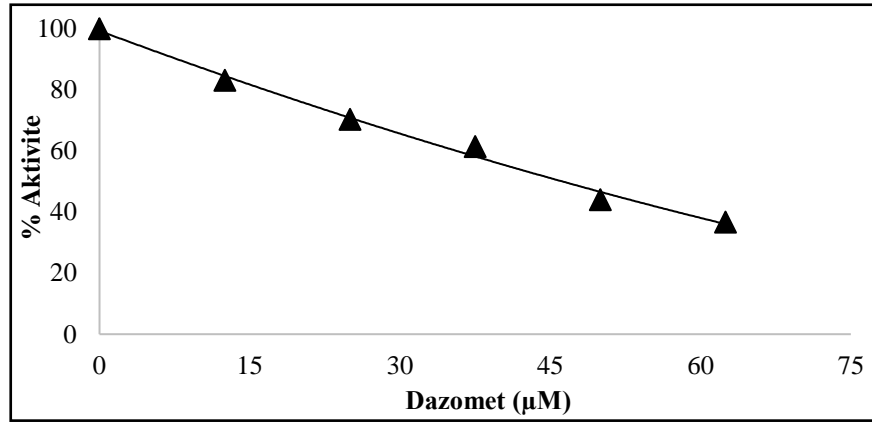
İnhibitör Solüsyon Hacmi (µL)	Fenol Kırmızısı Solüsyonu (µL)	Substrat Solüsyon Hacmi (µL)	Enzim Hacmi (µL)	Saf Su (µL)	Aktivite Tamponu (µL)	Küvetteki İnhibitör Derişimi (µM)	% Aktivite	EU
50	1900	1300	100	250	400	12.5	85.72	13.83
100	1900	1300	100	200	400	25	76.23	12.30
150	1900	1300	100	150	400	37.5	53.64	8.65
200	1900	1300	100	100	400	50	50.71	8.18
250	1900	1300	100	50	400	62.5	37.88	6.11



**Şekil 3.38:** Merinos CA enziminin farklı Amitraz derişimleriyle IC<sub>50</sub>'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.

**Tablo 3.35:** İnhibitör olarak kullanılan Dazomet'in Dorset Down CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.

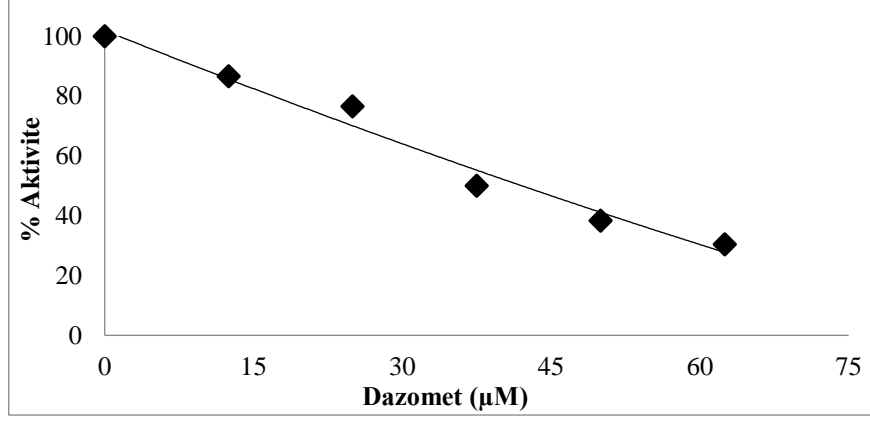
İnhibitör Solüsyon Hacmi (µL)	Fenol Kırmızısı Solüsyonu (µL)	Substrat Solüsyon Hacmi (µL)	Enzim Hacmi (µL)	Saf Su (µL)	Aktivite Tamponu (µL)	Küvetteki İnhibitör Derişimi (µM)	% Aktivite	EU
50	1900	1300	100	250	400	12.5	83.12	19.79
100	1900	1300	100	200	400	25	70.36	16.76
150	1900	1300	100	150	400	37.5	61.39	14.62
200	1900	1300	100	100	400	50	43.96	10.47
250	1900	1300	100	50	400	62.5	36.71	8.74



**Şekil 3.39:** Dorset Down CA enziminin farklı Dazomet derişimleriyle IC<sub>50</sub>'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.

**Tablo 3.36:** İnhibitör olarak kullanılan Dazomet'in Kıvrıcık CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.

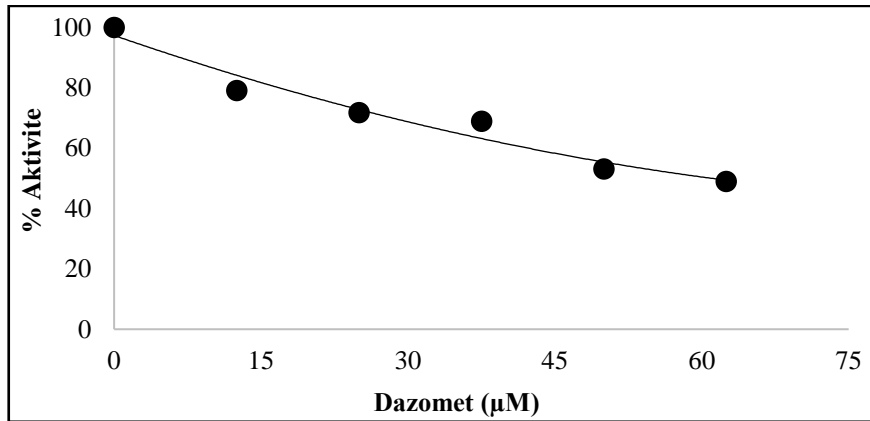
İnhibitör Solüsyon Hacmi (µL)	Fenol Kırmızısı Solüsyonu (µL)	Substrat Solüsyon Hacmi (µL)	Enzim Hacmi (µL)	Saf Su (µL)	Aktivite Tamponu (µL)	Küvetteki İnhibitör Derişimi (µM)	% Aktivite	EU
50	1900	1300	100	250	400	12.5	86.69	20.00
100	1900	1300	100	200	400	25	76.55	17.66
150	1900	1300	100	150	400	37.5	50.03	11.54
200	1900	1300	100	100	400	50	38.35	8.85
250	1900	1300	100	50	400	62.5	30.38	7.01



**Şekil 3.40:** Kıvrıkcık CA enziminin farklı Dazomet derişimleriyle  $IC_{50}$ 'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.

**Tablo 3.37:** İnhibitör olarak kullanılan Dazomet'in Merinos CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.

İnhibitör Solüsyon Hacmi (µL)	Fenol Kırmızısı Solüsyonu (µL)	Substrat Solüsyon Hacmi (µL)	Enzim Hacmi (µL)	Saf Su (µL)	Aktivite Tamponu (µL)	Küvetteki İnhibitör Derişimi (µM)	% Aktivite	EU
50	1900	1300	100	250	400	12.5	79.08	14.04
100	1900	1300	100	200	400	25	71.78	12.74
150	1900	1300	100	150	400	37.5	68.91	12.23
200	1900	1300	100	100	400	50	53.17	9.44
250	1900	1300	100	50	400	62.5	49.03	8.70

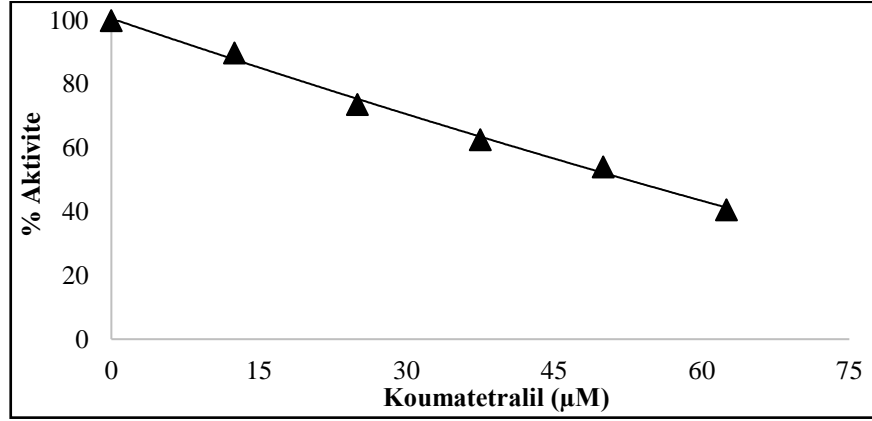


**Şekil 3.41:** Merinos CA enziminin farklı Dazomet derişimleriyle  $IC_{50}$ 'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.



**Tablo 3.38:** İnhibitör olarak kullanılan Koumatetralil'in Dorset Down CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.

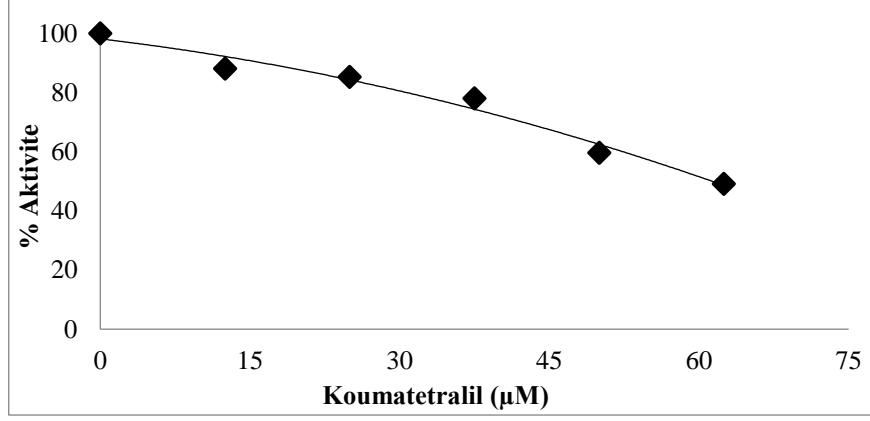
İnhibitör Solüsyon Hacmi (µL)	Fenol Kırmızısı Solüsyonu (µL)	Substrat Solüsyon Hacmi (µL)	Enzim Hacmi (µL)	Saf Su (µL)	Aktivite Tamponu (µL)	Küvetteki İnhibitör Derişimi (µM)	% Aktivite	EU
50	1900	1300	100	250	400	12.5	89.76	18.01
100	1900	1300	100	200	400	25	73.65	14.78
150	1900	1300	100	150	400	37.5	62.64	12.57
200	1900	1300	100	100	400	50	54.09	10.86
250	1900	1300	100	50	400	62.5	40.58	8.14



**Şekil 3.42:** Dorset Down CA enziminin farklı Koumatetralil derişimleriyle IC<sub>50</sub>'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.

**Tablo 3.39:** İnhibitör olarak kullanılan Koumatetralil'in Kıvırcık CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.

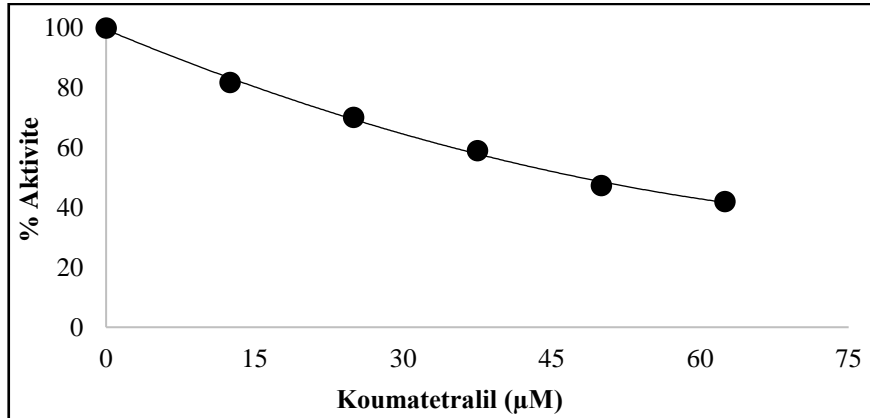
İnhibitör Solüsyon Hacmi (µL)	Fenol Kırmızısı Solüsyonu (µL)	Substrat Solüsyon Hacmi (µL)	Enzim Hacmi (µL)	Saf Su (µL)	Aktivite Tamponu (µL)	Küvetteki İnhibitör Derişimi (µM)	% Aktivite	EU
50	1900	1300	100	250	400	12.5	88.13	12.55
100	1900	1300	100	200	400	25	85.28	12.14
150	1900	1300	100	150	400	37.5	78.07	11.12
200	1900	1300	100	100	400	50	59.67	8.50
250	1900	1300	100	50	400	62.5	49.16	7.00



**Şekil 3.43:** Kırırcık CA enziminin farklı Koumatetralil derişimleriyle  $IC_{50}$ 'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.

**Tablo 3.40:** İnhibitör olarak kullanılan Koumatetralil'in Merinos CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.

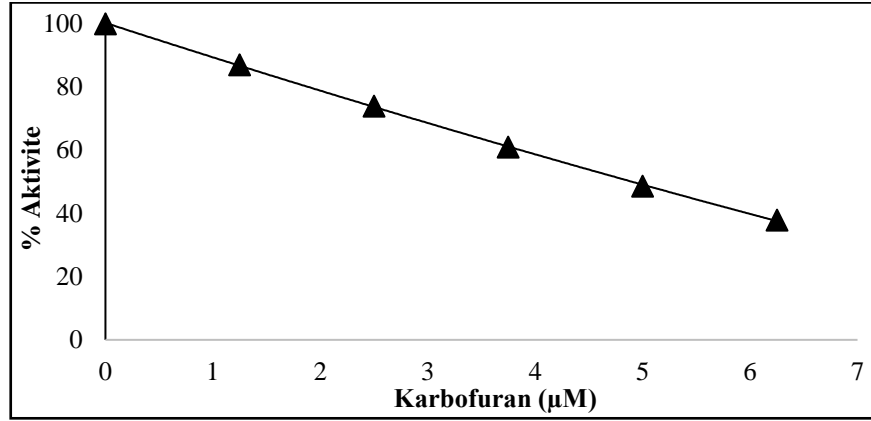
İnhibitör Solüsyon Hacmi (µL)	Fenol Kırmızısı Solüsyonu (µL)	Substrat Solüsyon Hacmi (µL)	Enzim Hacmi (µL)	Saf Su (µL)	Aktivite Tamponu (µL)	Küvetteki İnhibitör Derişimi (µM)	% Aktivite	EU
50	1900	1300	100	250	400	12.5	81.76	14.51
100	1900	1300	100	200	400	25	70.16	12.45
150	1900	1300	100	150	400	37.5	59.05	10.48
200	1900	1300	100	100	400	50	47.30	8.40
250	1900	1300	100	50	400	62.5	42.05	7.46



**Şekil 3.44:** Merinos CA enziminin farklı Koumatetralil derişimleriyle  $IC_{50}$ 'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.

**Tablo 3.41:** İnhibitör olarak kullanılan Karbofuran'ın Dorset Down CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.

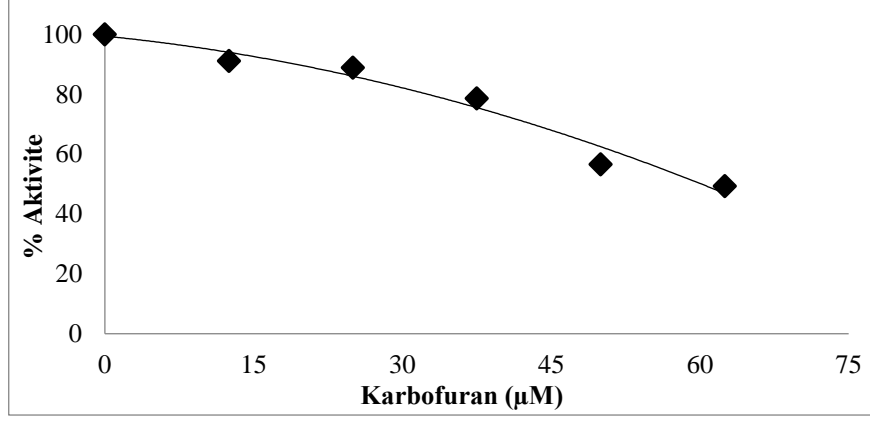
İnhibitör Solüsyon Hacmi (µL)	Fenol Kırmızısı Solüsyonu (µL)	Substrat Solüsyon Hacmi (µL)	Enzim Hacmi (µL)	Saf Su (µL)	Aktivite Tamponu (µL)	Küvetteki İnhibitör Derişimi (µM)	% Aktivite	EU
50	1900	1300	100	250	400	1.25	87.02	16.06
100	1900	1300	100	200	400	2.5	73.97	13.65
150	1900	1300	100	150	400	3.75	60.98	11.25
200	1900	1300	100	100	400	5	48.58	8.96
250	1900	1300	100	50	400	6.25	37.88	6.99



**Şekil 3.45:** Dorset Down CA enziminin farklı Karbofuran derişimleriyle IC<sub>50</sub>'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.

**Tablo 3.42:** İnhibitör olarak kullanılan Karbofuran'ın Kıvrıcık CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.

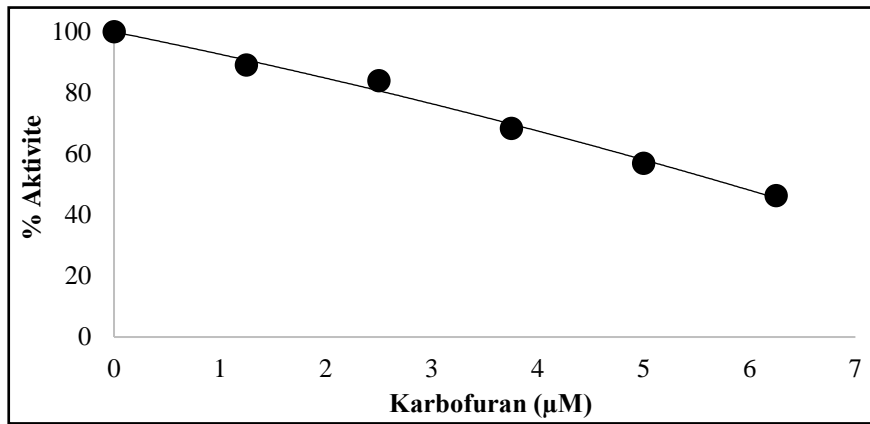
İnhibitör Solüsyon Hacmi (µL)	Fenol Kırmızısı Solüsyonu (µL)	Substrat Solüsyon Hacmi (µL)	Enzim Hacmi (µL)	Saf Su (µL)	Aktivite Tamponu (µL)	Küvetteki İnhibitör Derişimi (µM)	% Aktivite	EU
50	1900	1300	100	250	400	12.5	91.16	11.80
100	1900	1300	100	200	400	25	88.87	11.50
150	1900	1300	100	150	400	37.5	78.58	10.17
200	1900	1300	100	100	400	50	56.55	7.32
250	1900	1300	100	50	400	62.5	49.26	6.37



**Şekil 3.46:** Kivircik CA enziminin farklı Karbofuran derişimleriyle IC<sub>50</sub>'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.

**Tablo 3.43:** İnhibitör olarak kullanılan Karbofuran'ın Merinos CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.

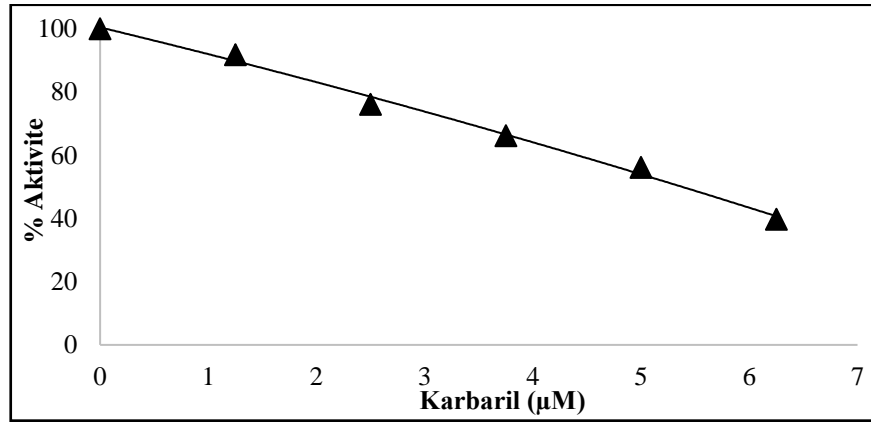
İnhibitör Solüsyon Hacmi (µL)	Fenol Kırmızısı Solüsyonu (µL)	Substrat Solüsyon Hacmi (µL)	Enzim Hacmi (µL)	Saf Su (µL)	Aktivite Tamponu (µL)	Küvetteki İnhibitör Derişimi (µM)	% Aktivite	EU
50	1900	1300	100	250	400	1.25	93.85	18.73
100	1900	1300	100	200	400	2.5	88.67	17.70
150	1900	1300	100	150	400	3.75	68.27	13.63
200	1900	1300	100	100	400	5	56.83	11.34
250	1900	1300	100	50	400	6.25	46.32	9.25



**Şekil 3.47:** Merinos CA enziminin farklı Karbofuran derişimleriyle IC<sub>50</sub>'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.

**Tablo 3.44:** İnhibitör olarak kullanılan Karbaril'in Dorset Down CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.

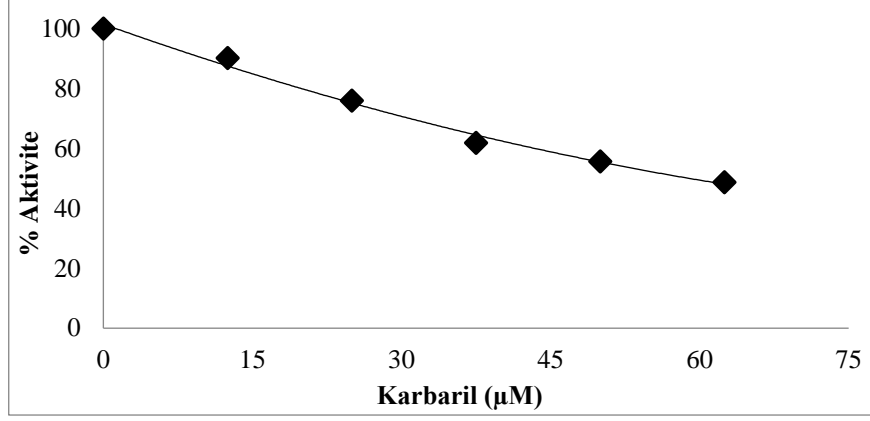
İnhibitör Solüsyon Hacmi (µL)	Fenol Kırmızısı Solüsyonu (µL)	Substrat Solüsyon Hacmi (µL)	Enzim Hacmi (µL)	Saf Su (µL)	Aktivite Tamponu (µL)	Küvetteki İnhibitör Derişimi (µM)	% Aktivite	EU
50	1900	1300	100	250	400	1.25	91.78	20.69
100	1900	1300	100	200	400	2.5	76.13	17.16
150	1900	1300	100	150	400	3.75	66.18	14.92
200	1900	1300	100	100	400	5	56.10	12.65
250	1900	1300	100	50	400	6.25	39.76	8.97



**Şekil 3.48:** Dorset Down CA enziminin farklı Karbaril derişimleriyle IC<sub>50</sub>'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.

**Tablo 3.45:** İnhibitör olarak kullanılan Karbaril'in Kıvrıcık CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.

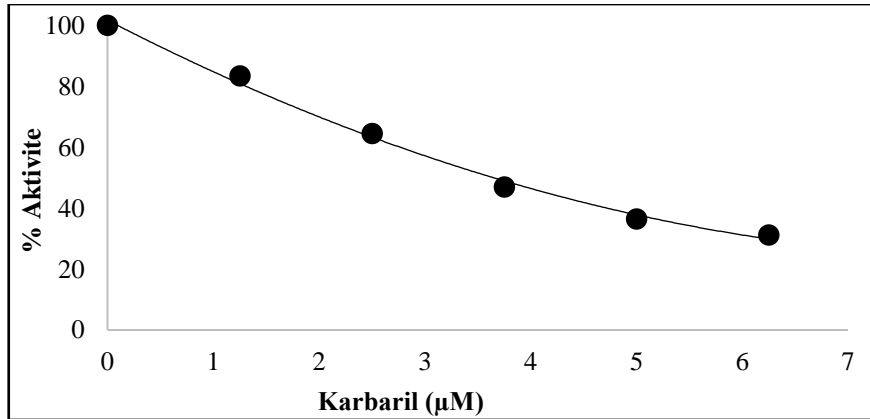
İnhibitör Solüsyon Hacmi (µL)	Fenol Kırmızısı Solüsyonu (µL)	Substrat Solüsyon Hacmi (µL)	Enzim Hacmi (µL)	Saf Su (µL)	Aktivite Tamponu (µL)	Küvetteki İnhibitör Derişimi (µM)	% Aktivite	EU
50	1900	1300	100	250	400	12.5	90.17	13.40
100	1900	1300	100	200	400	25	76.03	11.30
150	1900	1300	100	150	400	37.5	61.83	9.19
200	1900	1300	100	100	400	50	55.67	8.27
250	1900	1300	100	50	400	62.5	48.71	7.24



**Şekil 3.49:** Kivircik CA enziminin farklı Karbaril derişimleriyle IC<sub>50</sub>'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.

**Tablo 3.46:** İnhibitör olarak kullanılan Karbaril'in Merinos CA üzerindeki etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan çözeltilerin hacimleri.

İnhibitör Solüsyon Hacmi (µL)	Fenol Kırmızısı Solüsyonu (µL)	Substrat Solüsyon Hacmi (µL)	Enzim Hacmi (µL)	Saf Su (µL)	Aktivite Tamponu (µL)	Küvetteki İnhibitör Derişimi (µM)	% Aktivite	EU
50	1900	1300	100	250	400	1.25	93.85	18.73
100	1900	1300	100	200	400	2.5	88.67	17.70
150	1900	1300	100	150	400	3.75	68.27	13.63
200	1900	1300	100	100	400	5	56.83	11.34
250	1900	1300	100	50	400	6.25	46.32	9.25



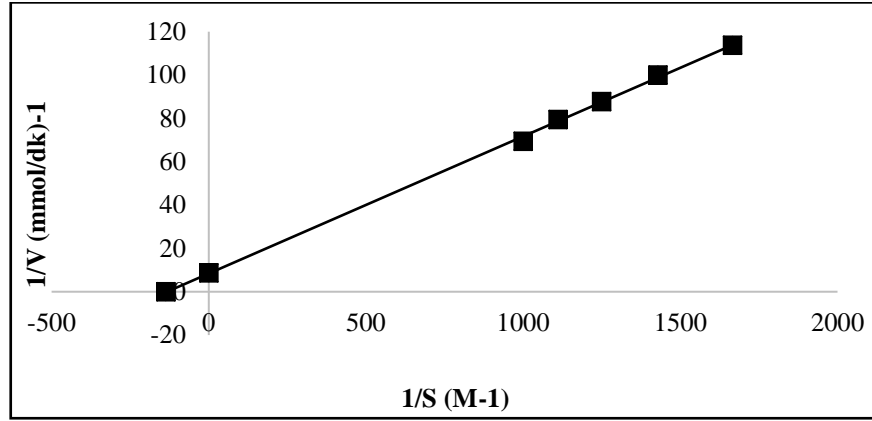
**Şekil 3.50:** Merinos CA enziminin farklı Karbaril derişimleriyle IC<sub>50</sub>'nin belirlenmesi için hazırlanan % Aktivite – İnhibitör grafiği.

### 3.2.1 Karbonik Anhidraz Enzimi Hidrataz Aktivitesi IC<sub>50</sub> Değerleri

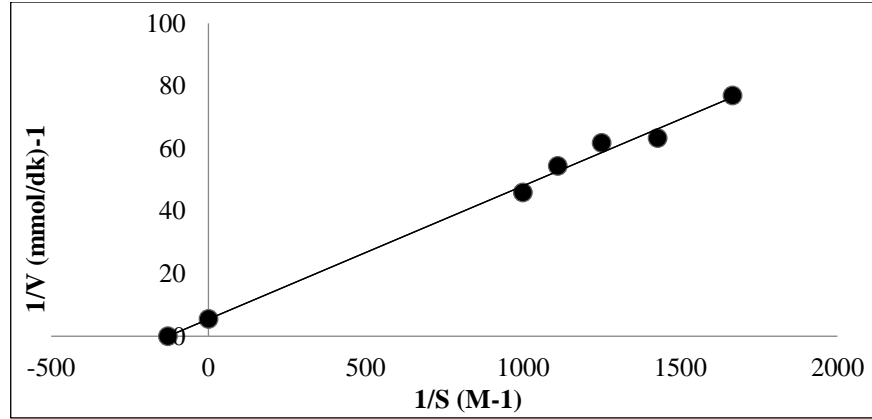
**Tablo 3.47:** Karbonik Anhidraz Enzimi Hidrataz IC<sub>50</sub> Değerleri

Pestisit	Kıvırcık Hidrataz IC <sub>50</sub> (µM)	Merinos Hidrataz IC <sub>50</sub> (µM)	Dorset Down Hidrataz IC <sub>50</sub> (µM)
Propoksür	57.25	53.39	48.56
Klorpirifos	46.46	55.84	47.82
Dimetaklor	39.45	59.27	50.48
Azinfos-Etil	46.97	56.19	53.45
Klorpirifos-Metil	42.73	41.28	126.42
Diklofluanid	57.15	62.05	81.29
Simazin	57.02	59.52	59.16
Tebukonazol	57	61.08	55.16
1-Naftol	56.65	51.07	60.18
Alaklor	37	53.3	59.43
Amitraz	26.23	47.77	50.69
Karbofuran	60.27	5.78	4.90
Karbaril	59.02	13.77	5.37
Koumatetralil	61.45	48.09	52.47
Dazomet	42.15	60.66	46.28

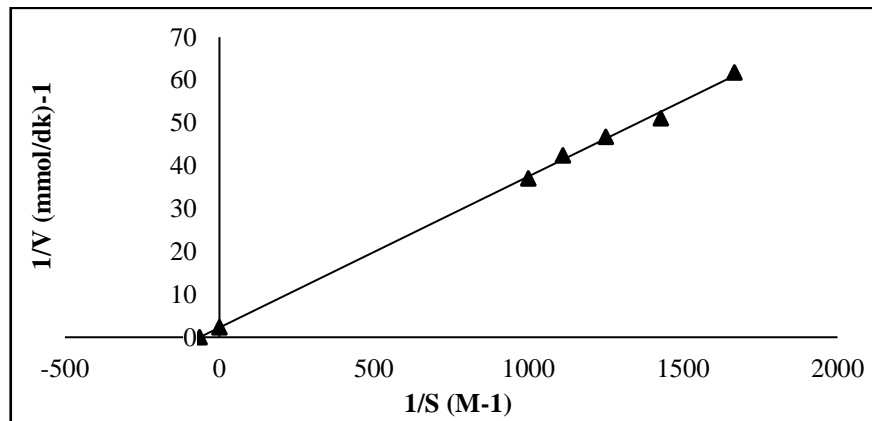
### 3.3 4 – Nitrofenilasetat Kullanılarak $K_m$ ve $V_{max}$ Saptanması



Şekil 3.51: Dorset Down koyun ırkının kan eritrositlerinden saflaştırılan CA enziminin 4-nitrofenilasetat substratı ile çizilen grafik.



Şekil 3.52: Kıvrıcık Koyun ırkının kan eritrositlerinden saflaştırılan CA enziminin 4-nitrofenilasetat substratı ile çizilen grafik.



Şekil 3.53: Merinos Koyun ırkının kan eritrositlerinden saflaştırılan CA enziminin 4-nitrofenilasetat substratı ile çizilen grafik.



**Tablo 3.48:** CA enzimleri için bulunan  $V_{max}$  -  $K_m$  değerleri.

Koyun Irkları	$V_{max}$ (EU/mLdk)	$K_m$ ( $\mu$ M)
Dorset Down	0.116	0.007
Kıvırcık	0.182	0.007
Merinos	0.443	0.015

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada üç farklı koyun (Dorset Down, Kıvırcık, Merinos) türünden karbonik anhidraz enzim afinite kromatografisi ile saflaştırılarak, bazı pestisitlerin enzim üzerinde *in vitro* etkileri çalışılmıştır. Bu pestisitler; Karbaril, Klorpirifos, Simazin, Diklofluanid, Alaklor, Klorpirifos-Metil, Azinfos-Etil, Dimetaklor, Propoksür, Tebukonazol, Amitraz, Dazomet, Karbofuran, 1-Naftol, Koumatetralil'dir.

Temiz içme suyuna erişim, Birleşmiş Milletler tarafından insan haklarından biri olarak kabul edilmektedir. Suyu salınan bilinmeyen, hafif veya ağır kronik sağlık etkileri olan bazı yeni endüstriyel kimyasallar gözden kaçabilmektedir. Devam eden nüfus artışı ile birlikte, evsel, tarımsal ve endüstriyel tüketimde ve farmasötikler, ağır metaller ve pestisitler gibi kimyasal kirleticilerin su sistemlerine salınmasında bir artış görülmektedir [95]. Su sistemlerinde bulunan en ilgili kimyasal gruplarından biri, tarımda yabancı otları, zararlıları ve bitki hastalıklarını yönetmek için kullanılan pestisitlerdir [95].

Pestisitler, geçim kaynağımızı hasardan korumada olumlu rol oynarlar, ancak aşırı kullanıldığında ciddi çevresel risklere de neden olurlar. Pestisitler, bitki koruma ürünleri olarak hizmet etmek için tasarlanmıştır. Ayrıca, pestisitler, kentsel peyzaj, tekne dipleri ve inşaat malzemeleri gibi tarım dışı alanlarda da kullanılmaktadır. Öte yandan, pestisit toksisitesi çevreye zarar vererek hedef dışı organizmaları tehdit eder [96]. Dolayısıyla pestisitler, insan, hayvan ve çevre sağlığı bakımından sorun teşkil etmektedir. Bazı pestisitlerin doğada çözünme süreleri uzundur ve canlıların vücudunda birikmesi daha kolaydır. Bu birikimden dolayı kontrolsüz kullanılan söz konusu pestisitler, besin zinciri yolu ile insanlara ulaşarak, moleküler, hücresel veya dokularda olumsuz etkilere sebep olmaktadır. Bu sebeplerden dolayı, araştırmamızda, canlılardaki önemli fizyolojik fonksiyona sahip olan karbonik anhidraz enzimini tercih ettik. Karbonik anhidraz CO<sub>2</sub> molekülünün H<sub>2</sub>O ile H<sup>+</sup> ve HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> iyonlarına dönüşümünü katalizlemektedir. Gastrik mukoza, böbrek ve göz lensi gibi dokularda bu reaksiyon cereyan etmektedir.

Araştırmamızda üç farklı koyun türünden afinite kromatografisi ile CA enzimi saflaştırılmış ve Sepharose - 4B – etilendiamin – 4 – izotiyosiyonat benzen sülfonamid yapıları afinite jeli sentezlenmiştir [88]. Karbonik anhidraz'ın aktivitesinin belirlenmesinde Wilbur-Anderson yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde karbondioksit molekülünün su ile

reaksiyonu sonucunda oluşan karbonikasit molekülünün  $H^+$  ve  $HCO_3^-$  iyonlarını oluşturarak ortamın pH'sının düşme süresi belirlenmektedir [89].

Çalışmamızda kullanılan Dorset Down, Kıvırcık ve Merinos koyun eritrositlerinden, literatürde, karbonik anhidraz enzimi saflaştırılmasında kullanılmamıştır. Söz konusu saflaştırma afinite kromatografisi kullanılarak tek basamakta gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemle yüksek saflaştırma katsayısı elde edilmiştir. Araştırmamızda kullandığımız pestisitler, koyunların eritrositleri üzerinde kullanılmamış ve eritrosit CA enzimi üzerindeki etkileri incelenmemiştir.

Bradford yöntemi ile kantitatif protein tayini yapıldıktan sonra oluşturulan saflaştırma tablosu sonucunda sırasıyla Dorset Down CA 302.507 kat ve %22.48 verimle, Kıvırcık CA 182.667 kat ve %28.30 verimle ve Merinos CA 69.107 kat ve %16.79 verimle saflaştırılmıştır.

Oktay Arslan ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada Eupergit C250L – p-amino benzensülfonamid afinite jeli ile sığır eritrositi CA saflaştırmışlardır. Sığır CA ve hCA enzimleri sırasıyla 181 kat, 184 kat saflaştırılmıştır [97]. Bizim çalışmamızda ise, Dorset Down CA'sı daha fazla saflaştırma katsayısına sahiptir. Kıvırcık CA'sı aynı seviyede olup, Merinos CA'sı ise daha düşük katsayıya sahiptir.

Literatürde, yapılan bir diğer çalışmada Sepharose-4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite jeli kullanılarak koyun böbreğinden CA-II ve CA-IV enzimlerini saflaştırmışlardır ve sırasıyla 227.61 ve 139.45 kat olarak tespit etmişlerdir. Verim ise sırasıyla %60.75 ve %30.83 olarak bulunmuştur [98]. Buna göre çalışmamızla kıyasladığımızda; saflaştırma katsayıları arasında Dorset Down CA'sı en yüksek katsayıya sahiptir. Kıvırcık ve Dorset Down CA'ları bu çalışmadaki CA-IV verimine yakın elde edilmiştir.

Yapılan başka bir çalışmada afinite jeli olarak yine Sepharose – 4B – L – tirozin – sülfonamid kullanılmıştır ve Kangal Akkaraman koyunundan CA saflaştırılmıştır. Bu çalışmada 242.76 saflaştırma katsayısı ve %14.40 verim bulunmuştur [99].

Esteraz aktivitesinden yararlanarak Lineweaver-Burk grafiklerinden elde edilen  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri sırasıyla Dorset Down koyun eritrosit CA için; 0.007  $\mu M$  ve 0.116 EU/mLdk, Kıvırcık koyun eritrosit CA için; 0.007  $\mu M$  ve 0.182 EU/mLdk, Merinos koyun eritrosit CA için; 0.015  $\mu M$  ve 0.443 EU/mLdk olarak belirlenmiştir.

Esen Taşgın ve arkadaşları çalışmalarında afinite kromatografisi yöntemiyle Sepharose-4B-L-tirozin-Sülfonamid jeli kullanılarak sığır kemik iliğinden CA enzimi saflaştırmışlar.  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri sırasıyla;  $2.409 \times 10^{-3}$  mM ve 120.418  $\mu\text{mol/L}$  bulunmuştur [100].

Enzim molekül büyüklüğünü ve saflığını kontrol etmek için SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi uygulanmıştır. Üç koyun türünde de molekül ağırlığı yaklaşık 29kDa ağırlığında bulunmuştur ve CA enzimi tek bant olarak gözlemlenmiştir. Bu sonuç NCBI protein veri bankasındaki koyun CAI enziminin hesaplanan molekül ağırlığı ile benzerlik göstermektedir [101].

15 tane farklı pestisit hazırlanarak farklı konsantrasyonlarda inhibitör etkisi hidrataz aktivitesi ile incelenerek, inhibe edici bileşiklerin %Aktivite-[I] Grafikleri çizilmiştir ve  $IC_{50}$  değerleri belirlenmiştir.

Çalışmamızda kullandığımız pestisitlerin karbonik anhidraz enzimini önemli ölçüde inhibe ettiği belirlenmiştir. Bilindiği üzere  $IC_{50}$  değeri küçük olan inhibitörün inhibisyon etkisi daha yüksektir. Dorset Down koyun kan eritrosit CA enzimi üzerine hidrataz aktivitesiyle inhibisyon etkisi en güçlü olan pestisitlerin  $IC_{50}$  değerleri; Karbofuran 4.90  $\mu\text{M}$ , Karbaril 5.37  $\mu\text{M}$ , Dazomet 46.28  $\mu\text{M}$  olarak belirlenmiştir. Kıvırcık koyun kan eritrosit CA enzimi üzerine hidrataz aktivitesiyle inhibisyon etkisi en güçlü olan pestisitlerin  $IC_{50}$  değerleri; Amitraz 26.23  $\mu\text{M}$ , Alaklor 37  $\mu\text{M}$ , Dimetaklor 39.45  $\mu\text{M}$  olarak belirlenmiştir. Merinos koyun kan eritrosit CA enzimi üzerine hidrataz aktivitesiyle inhibisyon etkisi en güçlü olan pestisitlerin  $IC_{50}$  değerleri; Karbofuran 5.78  $\mu\text{M}$ , Karbaril 13.77  $\mu\text{M}$ , Klorpirifos-Metil 41.28  $\mu\text{M}$  olarak belirlenmiştir. Bu farklı koyun ırklarından saflaştırılan CA enzimini inhibe eden pestisitlerin  $IC_{50}$  değerleri, Tablo 3.47 ve Tablo 4.1’de sunulmuştur. Bu sonuçlara göre, bu pestisitler üç koyun ırkı CA’sı üzerine benzer inhibisyon etkisi göstermektedirler. Bunlardan Klorpirifos – Metil pestisiti Dorset Down CA’sı üzerine daha zayıf bir inhibisyon etkisi var iken, Karbofuran ve Karbaril pestisitleri, Kıvırcık CA’sını daha az inhibe etmektedir. Amitraz ve Alaklor pestisitleri Merinos ve Dorset Down CA’larına kıyasla Kıvırcık CA’sı üzerine daha etkilidirler.

Ercan Soydan ve arkadaşları tarafından bal arılarının (*Apis mellifera*) üzerinde yapılan çalışmada, çalışmamızda kullandığımız Simazin ve Tebukonazol pestisitlerinin etkisi incelenmiş ve Simazin pestisitinin  $IC_{50}$  değeri; 0.0273  $\mu\text{M}$  olarak bulunmuştur. Tebukonazol pestisitinin de  $IC_{50}$  değeri; 0.003  $\mu\text{M}$  bulunmuştur [47]. Simazin ve Tebukonazol pestisitlerinin koyun CA’ları için  $IC_{50}$  değerleri sırasıyla; Kıvırcık için 57.02

$\mu\text{M}$  ve  $57 \mu\text{M}$ , Merinos için  $59.52 \mu\text{M}$  ve  $61.08 \mu\text{M}$ , Dorset Down için  $59.16 \mu\text{M}$  ve  $55.16 \mu\text{M}$  olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre *Apis mellifera* CA'sının bu iki pestisite karşı koyun CA'larından çok daha fazla duyarlı olduğunu ve nanomolar düzeyinde inhibe oldukları gözlenmiştir.

Literatürde, insan eritrosit CA enzimi üzerinde hidrataz aktivitesi ile yapılan pestisit çalışması bulunmaktadır. Bu pestisitlerin etkileri incelenmiş ve  $\text{IC}_{50}$  değerleri bulunmuştur [33]. Tablo 4.1'de görülen değerlere göre; bu pestisitlerin hCA – I ve hCA – II üzerine inhibisyon etkileri koyun CA'larına kıyasla çok daha fazladır. Karbofuran ve Karbaril pestisitleri için bulunan değerlerde Merinos ve Dorset Down CA'ları inhibisyon değerleri hCA – I ve hCA – II değerlerine yakın bulunmuştur. Pestisitlerin, koyun türlerinden saflaştırılan CA'ların üzerindeki inhibisyon etkisi insan CA'larının üzerindeki etkisine göre daha az olduğu görülmektedir.

**Tablo 4.1:** İnsan kanından saflaştırılan hCA-I ve hCA-II enzimleri [33] ile üç farklı koyun kanından saflaştırılan CA enzimleri üzerine pestisitlerin  $\text{IC}_{50}$  değerleri karşılaştırılması.

Pestisitler	hCA - I Hidrataz $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	hCA - II Hidrataz $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	Kıvırcık Hidrataz $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	Merinos Hidrataz $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	Dorset Down Hidrataz $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
Propoksür	0.600	1.280	57.25	53.39	48.56
Alaklor	2.36	0.536	37	53.3	59.43
1-Naftol	1.31	0.685	56.65	51.07	60.18
Klorpirifos	0.591	0.527	46.46	55.84	47.82
Simazin	0.366	0.594	57.02	59.52	59.16
Diklofluanid	1.395	0.529	57.15	62.05	81.29
Klorpirifos-Metil	0.614	6.040	42.73	41.28	126.42
Azinfos-Etil	0.534	0.544	46.97	56.19	53.45
Dimetaklor	0.585	0.578	39.45	59.27	50.48
Tebukonazol	0.602	0.603	57	61.08	55.16
Amitraz	3.3	3.470	26.23	47.77	50.69
Dazomet	3.86	3.900	42.15	60.66	46.28
Koumatetralil	6.41	8.740	61.45	48.09	52.47
Karbofuran	3.35	3.410	60.27	5.78	4.9
Karbaril	2.86	3.460	59.02	13.77	5.37

Literatürde, Kocabaş Sazan balığından saflaştırılan CA enzimi üzerine bazı pestisitlerin etkileri incelenmiştir ve  $\text{IC}_{50}$  değerleri bulunmuştur. Karbaril pestisitinin  $\text{IC}_{50}$  değeri  $126.43 \mu\text{M}$ , Karbofuran pestisitinin ise  $253.35 \text{ mM}$  olarak bulunmuştur [102].

Yapılan başka bir çalışmada, gökkuşuğu alabalığı solungaç CA'sı üzerine bazı pestisitlerin etkileri incelenmiş ve IC<sub>50</sub> değerleri bulunmuştur. Çalışmada kullanılan Propoksur pestisitinin IC<sub>50</sub> değeri 0.420 µM olduğu görülmüştür [103]. Yaptığımız çalışma sonuçlarına göre Propoksur pestisiti koyun türlerinden saflaştırılan CA'ları daha az inhibe ettiği görülmektedir.

**Sonuç olarak bu çalışmamızda elde edilen bulgular aşağıdaki gibi özetlenebilir:**

- Dorset Down koyun eritrositleri, Kıvrıkcık koyun eritrositleri ve Merinos koyun eritrositlerinden CA enzimi saflaştırmak için Sepharose-4B-Etilendiamin-4-izotiyosiyonat benzen sülfonamid afinite jeli sentezlenmiştir.
- Sentezlenen jel kullanılarak, söz konusu koyunların kanlarından CA enzimi saflaştırılmıştır.
- SDS-PAGE ile enzim saflığı kontrol edilerek ~ 29kDa molekül ağırlığında tek bant elde edilmiştir.
- Esteraz aktivitesi yöntemi ile K<sub>m</sub> ve V<sub>max</sub> değerleri belirlenmiştir.
- Çalışılan pestisitler CA-hidrataz aktivitesi yöntemi ile üç farklı koyun için de inhibisyon etkisi gösterdiği saptanmış.
- Bu pestisitlerin CA enzimi üzerindeki IC<sub>50</sub> değerleri belirlenmiştir.

## 5. KAYNAKLAR

- [1] Del Prete, Sonia, et al. "Bacterial  $\alpha$ -carbonic anhydrase: a new active class of carbonic anhydrase identified in the genome of the Gram-negative bacterium *Burkholderia territorii*." *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 35.1 (2020): 1060-1068.
- [2] Breton, S., "The Cellular Physiology of Carbonic Anhydrases", *JOP. J. Pancreas*, (2001), 2, (4), 159.
- [3] Vullo, D., Nishimori, I., Innocenti, A., Scozzafava, A., Supuran, C.T., "Carbonic Anhydrase Activators: An Activation Study of the Human Mitochondrial Isoforms VA and VB with Amino Acids and Amines", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, (2007), 17, 1336.
- [4] Maren, T. H., Conroy, C.W., Wynns, G.C., and Godman, D.R. "Renal and Cerebrospinal fluid formation pharmacology of high molecular weight Carbonic Anhydrase Inhibitor", *J. of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 280, (1997), 98-104.
- [5] Doğanay, Selim, and Penpe Gül Firat. "Karbonik Anhidraz İnhibitörleri." *Glokom-Katarakt/Journal of Glaucoma-Cataract* 2.3 (2007).
- [6] Hisar, Olcay, et al. "The effects of melatonin hormone on carbonic anhydrase enzyme activity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) erythrocytes *in vitro* and *in vivo*." *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences* 29.3 (2005): 841-845.
- [7] Şen, Selen. "Karbonik anhidraz inhibitörü metilenaminobenzen sülfonamid türevlerinin genotoksik profillerinin belirlenmesi." (2018).
- [8] Aktaş, Deniz. Sığır karbonik anhidraz enziminin alginat üzerine immobilizasyon koşullarının incelenmesi. Diss. Adnan Menderes Üniversitesi, 2004.
- [9] Öztürk, S., "Tarım İlaçları", Renk Ofset, İstanbul, (1990).
- [10] Şipal, Beste. Koyun serum paraoksonaz enziminin bazı pestisitlere karşı ilgisinin araştırılması. MS thesis. Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, (2011).
- [11] Supuran, C. T., and Scozzafava, A., "Carbonic Anhydrase Inhibitors", *Curr.Med.Chem.*, 1, (2001), 61-97.
- [12] Maren, T.H., "Carbonic anhydrase; chemistry, physiology and inhibition", *Physiol.Rev.*, 47, (1967) 595.

- [13] Nishimori I, Onishi S, Takeuchi H, Supuran CT. The alpha and beta classes carbonic anhydrases from *Helicobacter pylori* as novel drug targets. *Curr Pharm Des* (2008);14:622–30.
- [14] Morishita S, Nishimori I, Minakuchi T, et al. Cloning, polymorphism, and inhibition of beta-carbonic anhydrase of *Helicobacter pylori*. *J Gastroenterol* 2008;43:849–57.
- [15] Neri D, Supuran CT. Interfering with pH regulation in tumours as a therapeutic strategy. *Nat Rev Drug Discov* (2011);10:767–77.
- [16] Capasso C, Supuran CT. An overview of the alpha-, beta and gamma-carbonic anhydrases from Bacteria: can bacterial carbonic anhydrases shed new light on evolution of bacteria? *J Enzyme Inhib Med Chem* (2015);30:325–32.
- [17] Supuran CT, Capasso C. New light on bacterial carbonic anhydrases phylogeny based on the analysis of signal peptide sequences. *J Enzyme Inhib Med Chem* (2016);31:1254–60.
- [18] Supuran CT, Capasso C. An overview of the bacterial carbonic anhydrases. *Metabolites* (2017);7:56.
- [19] Vullo D, Del Prete S, Di Fonzo P, et al. Comparison of the sulfonamide inhibition profiles of the beta- and gamma-carbonic anhydrases from the pathogenic bacterium *Burkholderia pseudomallei*. *Molecules* (2017);22:421.
- [20] Nuti, E., Orlandini, E., Nencetti, S., Rossello, A., Innocenti, A., Scozzafava, A., Supuran, C.T., "Carbonic Anhydrase and Matrix Metalloproteinase Inhibitors. Inhibition of Human Tumor-Associated Isozymes IX and Cytosolic Isozyme I and II with Sulfonylated Hydroxamates", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, (2007), 15, 2298.
- [21] I. Gülçin, S. Beydemir, & M. E. Büyükkuroğlu, "In Vitro And In Vivo Effects of Dantrolene on Carbonic Anhydrase Enzyme Activities", *Biol Pharm Bull*, (2004), C. 27, Sayı 5, ss. 613–616.
- [22] 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).
- [23] Supuran CT, Capasso C. An Overview of the Bacterial Carbonic Anhydrases. *Metabolites*. (2017) Nov 11;7(4).
- [24] Capasso C, Supuran CT. An overview of the alpha-, beta- and gamma-carbonic anhydrases from Bacteria: can bacterial carbonic anhydrases shed new light on



- evolution of bacteria? *J Enzyme Inhib Med Chem.* (2015) Apr;30(2):325-32. (\*) This review describes the bacterial CAs and their evolution.
- [25] Del Prete S, De Luca V, Nocentini A, et al. Anion Inhibition Studies of the Beta-Carbonic Anhydrase from *Escherichia coli*. *Molecules.* 2020 May 31;25(11).
- [26] Claudiu T. Supuran: “Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators” *Rev.7*, February (2008), 1-14.
- [27] Y. Akbaba, E. Bastem, & F. Topal, “Full Paper Synthesis and Carbonic Anhydrase Inhibitory Effects of Novel Sulfamides Derived From 1-Aminoindanes And Anilines”, (2014), Ss. 950–957.
- [28] Kılınç, Namık, et al. "Influence of pesticide exposure on carbonic anhydrase II from sheep stomach." *Toxicology and industrial health* 31.9 (2015): 823-830.
- [29] C. T. Supuran, & C. Capasso, “The H-Class Carbonic Anhydrases As Drug Targets For Antimalarial Agents”, *Expert Opinion On Therapeutic Targets*, 19(4), (2015),551-563.
- [30] C. Supuran, A. Scozzafava, J. Conway, *Carbonic Anhydrases: Catalytic and Inhibition Mechanisms, Distribution and Physiological Roles, Chemistry, Biology*, (2007), ss. 6.
- [31] T. A. Coban, Ş. Beydemir, İ. Gücin, D. Ekinci, A. Innocenti, D. Vullo, & C. T. Supuran, “Sildenafil İs A Strong Activator Of Mammalian Carbonic Anhydrase İsoforms I–Xiv”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, (2009),17(16), 5791-5795.
- [32] O. Hisar, Ş. Beydemir, I. Gülçin, Ö. I. Küfrevioğlu, & C. T. Supuran, “Effects Of Low Molecular Weight Plasma İnhibitors Of Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) On Human Erythrocyte Carbonic Anhydrase-Iı İsozyme Activity İn Vitro And Rat Erythrocytes İn Vivo”, *J Enzyme Inhib Med Chem*, (2005), C. 20, Sayı 1, ss. 35– 39.
- [33] Baltacı, Aybike. Bazı pestisitlerin karbonik anhidraz izoenzimleri üzerine etkilerinin araştırılması. MS thesis. Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, (2021).
- [34] Ö. Özensoy, “Kanser İlişkili Karbonik Anhidraz IX ve XII İzoenzimlerinin Expresyonu, Saflaştırılması ve Bazı Bileşiklere Karşı İlgisinin Araştırılması” Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir, (2006).
- [35] S. Lindskog, & D. N. Silverman, “ The Carbonic Anhydrases: New Horizons”, Edited By Wı Chegwidden, Nd Carter & Yh Edwards, (2000).
- [36] Us Environmental Protection Agency Office Of Pesticide Programs Red Fact Sheet: “Dazomet”, (2008).

- [37] D. Kumbhar, R. Patil, D. Patil, A. Patravale, D. Chandam, S. Jadhav, & M. Deshmukh, "Target Oriented Selective Synthesis Of Antibacterial Active Tyrosinase Enzyme İnhibitor Coumarin Core Derivatives", Asian Journal Of Research İn Chemistry, (2015), 8(8), 511-520.
- [38] M. Ünal, "Pestisit Kullanımı Ve Meydana Getirdiği Çevre Problemleri", Morfoloji Dergisi, (2004),11-12 (1-2) 78-84.
- [39] Generali, Tiziana, et al. "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 (2015): 247-253.
- [40] H. Kumbur, Z. Özer, & H. D. Özsoy, "Tarım İlaçlarının (Pestisitlerin) Çevresel Etkileri Ve Mersin İli'nde Kullanım Düzeyleri", Gap, Iv. Tarım Kongresi, (2005), 21-23.
- [41] Np. Agnihotri, "Pesticide Safety Evaluation and Monitoring, All İndia Coo, Rdinated Research Project On Pesticide Residues", Indian Agricultural Research Institute, (1999), New Delhi, P 173.
- [42] [www.un.org/kh/fao/pdfs/section3/chapterxx8/28.pdf](http://www.un.org/kh/fao/pdfs/section3/chapterxx8/28.pdf) (25.06.2022)
- [43] Şipal, Beste. Koyun serum paraoksonaz enziminin bazı pestisitlere karşı ilgisinin araştırılması. MS thesis. Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, (2011).
- [44] Topçu, S., Tarım Mühendisliğinde Çevre Sorunları, 207, Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Genel Yayın Ders Kitapları, (2008), 269
- [45] Gür, K., Akınerdem, F., "Biositlerin Toprak ve Su Canlıları Üzerine Etkileri", Tarımda Kaynak, 2, (1991), 5.
- [46] Şanlı, Y., Kaya, S., "Veteriner Klinik Toksikoloji", Medisan Yayınevi, Yay. No:5, Ankara, (1992) 204-205.
- [47] Soydan, E., Güler, A., Bıyık, S., Şentürk, M., Supuran, T., C., Ekinci, D., "Carbonic Anhydrase From Apis Mellifera: Purification And İnhibition By Pesticides" Journal of Enzyme İnhibition and Medicinal Chemistry, 16 Haziran (2017), 32:1 47-50.
- [48] Gür, K., Akınerdem, F., "Biositlerin Toprak ve Su Canlıları üzerine Etkileri", Tarımda Kaynak, 2, (1991) 5.
- [49] Sin, Bahadır, and İzzet Kadioğlu. "Trp-574-Leu mutation in wild mustard (Sinapis arvensis L.) as a result of als inhibiting herbicide applications." PeerJ 9 (2021): e11385.
- [50] R. J. Kuhr, & H. W. Dorough, "Carbamate İnsecticides: Chemistry, Biochemistry, And Toxicology", (1976), Crc Press, Inc.

- [51] 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 Alachlor<sub>4</sub> To Man”, *Human & Experimental Toxicology*, (1999), 18(6), 363-391.
- [52] Miles, C.J., Delfino, J.J., “Fate of aldicarb, aldicarbsulfoxide and aldicarb suture in Floridan ground water”, *J.Agric.Food chem.*, 33, (1985) 455-460.
- [53] Ministry Of Health New Zealand, “Guidelines For Drinking-Water Quality Management For New Zealand”, (2013).
- [54] P. G. Wells, B. Wilson, & B. M. Lubek, “In Vivo Murine Studies On The Biochemical Mechanism Of Naphthalene Cataractogenesis” , *Toxicology And Applied Pharmacology*, (1989), 99(3), 466-473.
- [55] 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*, (1981), 3(4), 457- 461.
- [56] C. Tomlin, “The Pesticides Manual; A World Compendium”; Incorporating The Aquachemicals Handbook. British Crop Production Council, (1994), 1341 P.
- [57] Ç. Aydın, & R. Mammadov, “ İnektisit Aktivite Gösteren Bitkisel Sekonder Metabolitler Ve Etki Mekanizması” , (2017).
- [58] A. Nallapaneni, C. N. Pope, “Chlorpyrifos”, *Encyclopedia Of Toxicology (Second Edition)*. Elsevier, (2005), 583-586.
- [59] M. D. Hurlimann, “Covariance Structure Analysis Title On Health-Related Indicators In Home Elderly With A Focus On Subjective Health”, ss. 1–49, (2007). 93.
- [60] G. W. Ware, “The Pesticide Book (No. Ed. 5)”, Thomson Publications, (2000).
- [61] M. S. Curren, & J. W. King, “ Solubility Of Triazine Pesticides In Pure And Modified Subcritical Water. *Analytical Chemistry*”, 73(4), 740-745, (2001).
- [62] X. Zhou, S. Cao, X. Li, C. Xi, X. Ding, F. Xu, & Z. Chen, “Rapid Determination Of Dichlofluanid Residues In Vegetables Using Dispersive-Spe Sample Preparation Combined With Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Journal Of Chromatographic Science*”, 54(5), 858-863, (2016).
- [63] 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.
- [64] 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).

- [65] S. Patat, H. Akça, S. Kaleli, İ. Karakoyun, A. Koçak, & F. Gültekin, “KlorprifosEtil'in Hepg2 Hücre Dizilerinde Hücre Canlılığına Etkisi Ve Melatoninin Koruyucu Etkisi” , Sdü Tıp Fakültesi Dergisi, 10(3) , (2003).
- [66] 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).
- [67] I. Bandara Gawarammana, D. M. Roberts, F. Mohamed, M. S. Roberts, G. Medley, S. Jayamanne, & A. Dawson, “Acute Human Self-Poisoning With BispyribacContaining Herbicide Nominee®: A Prospective Observational Study”, Clinical Toxicology, 48(3), 198-202, (2010).
- [68] L. Scarponi, P. Perucci, & L. Martinetti, “Conjugation Of 2-Chloroacetanilide Herbicides With Glutathione: Role Of Molecular Structures And Of Glutathione STransferase Enzymes”, J Agric Food Chem, C. 39, (1991), Sayı 11, ss. 2010–2013.
- [69] B. Muñoz-Leoz, E. Ruiz-Romera, I. Antigüedad, & C. Garbisu, “Tebuconazole Application Decreases Soil Microbial Biomass And Activity”, Soil Biol Biochem, C. 43, (2011), Sayı 10, ss. 2176–2183.
- [70] 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, (2011), Sayı 4, ss. 579–584.
- [71] Y. Picó, M. La Farré, N. Tokman, & D. Barceló, “Rapid And Sensitive Ultra-HighPressure Liquid Chromatography-Quadrupole Time-Of-Flight Mass Spectrometry For The Quantification Of Amitraz And İdentification Of Its Degradation Products İn Fruits”, J Chromatogr A, C. 1203, (2008), Sayı 1, Ss. 36–46.
- [72] A. M. İ. Traş Et Al. “Comparison Of Biochemical Findings Of Emergency Medicine Department And”, (2006).
- [73] Us Environmental Protection Agency Office Of Pesticide Programs Red Fact Sheet: “Dazomet”, (2008).
- [74] 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).
- [75] 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).

- [76] H. J. Lewerenz, "Evaluations Of Some Pesticide Residues In 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).
- [77] J. Yakovleva, A. V. Zherdev, V. A. Popova, S. A. Eremin, & B. B. Dzantiev, "Production Of Antibodies And Development Of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays For The Herbicide Butachlor", *Anal Chim Acta*, C. 491, Sayı 1, ss. 1–13, (2003). 94
- [78] L. A. Walker, A. Turk, S. M. Long, C. L. Wienburg, J. Best Ve R. F. Shore, "Second Generation Anticoagulant Rodenticides In Tawny Owls (*Strix Aluco*) From Great Britain", *Sci Total Environ*, (2008), C. 392, Sayı 1, Ss. 93–98.
- [79] D. Regulation, "Environmental Fate Of Carbofuran", Dep Pestik Regulation, Number Sacramento, Ca 95814, (1991).
- [80] 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).
- [81] Who, "World Health Organization, Carbaryl", Geneva, 35, (1994)
- [82] Relyea, Rick A., and Nathan Mills. "Predator-induced stress makes the pesticide carbaryl more deadly to gray treefrog tadpoles (*Hyla versicolor*)."  
*Proceedings of the National Academy of Sciences* 98.5 (2001): 2491-2496.
- [83] [www.veteriner.cc](http://www.veteriner.cc) (25.06.2022).
- [84] ATEŞ, CAFER TAYYAR, MİKAİL ARSLAN, and ORHAN YILMAZ. "Morkaraman ve dorset down x morkaraman (F1) kuzularının doğum ağırlığı ve yaşama gücü ile doğuran koyun başına doğan kuzu sayısı ve gebelik süresine bazı faktörlerin etkisi." *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 27.6 (2003): 1311-1318.
- [85] Bollog, D. M., Rozycki, M. D., and Edelstein, S. J., "Protein Purification Methods", Second Edition, Wiley-Liss, Inc. New-York, (1996).
- [86] 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).
- [87] Scopes, R. K., "Protein Purification-Principles and Practice", 3rd Edition Springer-Verlag New-York, (1982).

- [88] Bozdog, M., Isik, S., Beyaztas, S., Arslan, O., & Supuran, C. T. (2014). Synthesis of a novel affinity gel for the purification of carbonic anhydrases. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 30(2), 240–244.
- [89] C. Geers Ve G. Gros, “Carbon Dioxide Transport And Carbonic Anhydrase İn Blood And Muscle”, *Physiol Rev*, C. 80, (2000), Sayı 2, ss. 681–715.
- [90] Ö. Türeci, U. Sahin, E. Vollmar, S. Siemer, E. Göttert, G. Seitz, & W. S. Sly, “Human Carbonic Anhydrase XI: Cdna Cloning, Expression, And Chromosomal LocalizationOf A Carbonic Anhydrase Gene That İs Overexpressed İn Some Renal Cell Cancers”, *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, (1998), 95(13), 7608- 7613.
- [91] C. H. Maren, “A simplified micromethod for the determination of carbonic anhydrase and its inhibitors”, *J. Pharmac. Exp. Ther.* (1960), 26, 130.
- [92] E. E. Keha, “Karbonik Anhidraz Enziminin Saflaştırılması İçin Geliştirilmiş Bir Afinite Kromatografisi Metodu” , Doçentlik Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Erzurum, (1981).
- [93] Temizkan, Güler, ve Nazlı Arda. "Temel ve İleri Moleküler Biyoloji Yöntemleri." Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul (2021).
- [94] 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).
- [95] Dara, Delaram, and Andrei P. Drabovich. "Assessment of risks, implications, and opportunities of waterborne neurotoxic pesticides." *Journal of Environmental Sciences* (2022).
- [96] Mei, Long-Can, et al. "Pesticide Informatics Platform (PIP): An International Platform for Pesticide Discovery, Residue, and Risk Evaluation." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2022).
- [97] Ozensoy, O., Oktay Arslan, and S. Oznur Sinan. "A new method for purification of carbonic anhydrase isozymes by affinity chromatography." *Biochemistry (Moscow)* 69.2 (2004): 216-219.
- [98] Demirdağ, Ramazan. "Karbonik anhidraz II ve IV izoenzimlerinin koyun böbrek dokusundan saflaştırılması karakterizasyonu ve bazı kimyasalların etkilerinin araştırılması." (2012).

- [99] Koçyiğit, Ümit M., et al. "Inhibitory effects of some drugs on carbonic anhydrase enzyme purified from Kangal Akkaraman sheep in Sivas, Turkey." *Journal of biochemical and molecular toxicology* 32.1 (2018): e22000.
- [100] Tasgin, Esen, et al. "Purification and properties of carbonic anhydrase from bone marrow." *Asian Journal of Chemistry* 21.7 (2009): 5117.
- [101] [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/XP\\_027829054.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/XP_027829054.1), (2022).
- [102] Kirici, Muammer. "Toxicological Effects of Metal Ions and Some Pesticides on Carbonic Anhydrase Activity Purified from Bighead Carp (*hypophthalmichthys Nobilis*) Gill Tissue." *Carpathian Journal of Earth and Environmental Sciences* 16.1 (2021): 1-59.
- [103] Ceyhun, Saltuk Buğrahan, et al. "In vitro and in vivo effects of some pesticides on carbonic anhydrase enzyme from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gills." *Pesticide biochemistry and physiology* 97.3 (2010): 177-181.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Yıldız Yalçın

Doğum tarihi ve yeri : 29/06/1995

e-posta : yldzylcn4@gmail.com

### Öğrenim Bilgileri

Derece	Okul/Program	Yıl
Y. Lisans	Balıkesir Üniversitesi/Kimya Bölümü	2019-
Lisans	Balıkesir Üniversitesi/ Moleküler Biyoloji ve Genetik	2013-2017

### Yayın Listesi

1. Uzunoğlu, S. B., Yalçın, Y., Uzunoğlu, T., Karadeniz, Ş., & Kurt, H. "Preparing and optimizing a newly affinity gel for purification of carbonic anhydrase isoenzymes" *Fresenius Environmental Bulletin*, Vol.29 No:05/2020, p.3798-3803, (2020).