

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PESTİSİTLERİN VÜCUT SAVUNMA SİSTEMİ ENZİMLERİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN *İN VİTRO* İNCELENMESİ

Doktora Tezi

Hazırlayan

Hatice PALÜZAR

Biyokimya Anabilim Dalı

Danışman

Prof. Dr. Ayten SAĞIROĞLU

EDİRNE-2013

**PESTİSİTLERİN VÜCUT SAVUNMA SİSTEMİ ENZİMLERİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN *İN VİTRO* İNCELENMESİ**

TEZİ YAPAN ÖĞRENCİNİN ADI VE SOYADI

Hatice PALÜZAR

DOKTORA TEZİ

BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI

2013

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

T.Ü.FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA DOKTORA PROGRAMI
DOĞRULUK BEYANI

İlgili tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını beyan ederim.

Hatice PALÜZAR

17 / 12 / 2013

Doktora Tezi

Pestisitlerin Vücut Savunma Sistemi Enzimleri Üzerine Etkilerinin *In Vitro* İncelenmesi

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

ÖZET

Tarımda zararlılara karşı yaygın olarak kullanılan pestisitlerin, canlılar üzerinde birçok olumsuz etki yarattığı bilinmektedir. Bu çalışmada, yaygın olarak kullanılan bazı pestisitlerin antioksidan savunma sistemi enzimlerinden katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz enzim aktiviteleri üzerine etkileri ve bu etkinin 2-PAM ile rejenere edilebilirliği incelendi.

Katalaz enzim aktivitesi üzerine pestisitlerin etkisinin ve bu etkinin 2-PAM ile rejenerasyonunun incelenmesi için yapılan denemeler sonucunda pestisitlerden lambda cyhaloetrin için 0.25-2.47 mM konsantrasyon aralığında katalaz enzim aktivitesi üzerine % 25-90 inhibisyon belirlenirken; bu inhibisyon 2-PAM ile % 13-30 rejenerasyon gösterdi. Malation 0.049-0.393 mM konsantrasyon aralığında % 1-88 inhibisyon ve 2-PAM ile % 2-12 rejenerasyon gösterdi. Deltametrin 0.002-0.021 mM konsantrasyon aralığında % 8-90 inhibisyon ve 2-PAM % 8-40 rejenerasyon gösterdi. Diklorvos 0.098-0.980 mM konsantrasyon aralığında % 50-92 inhibisyon ve 2-PAM ile rejenerasyon göstermedi.

Süperoksit dismutaz enzim aktivitesi üzerine pestisitlerin etkisinin ve bu etkinin 2-PAM ile rejenerasyonunun incelenmesi için denemeler yapıldı. Pestisitlerden lambda cyhaloetrin 0.25-2.47 mM konsantrasyon aralığında süperoksit dismutaz enzim aktivitesi üzerine % 7-82 inhibisyon gösterdi. Malation 0.049-0.393 mM konsantrasyon aralığında % 17-93 inhibisyon gösterdi. Deltametrin 0.002-0.021 mM konsantrasyon aralığında % 35-9 inhibisyon gösterdi. Diklorvos 0.098-0.980 mM konsantrasyon aralığında % 10-50 inhibisyon gösterdi. 2-PAM ile yapılan rejenerasyon denemelerinde, çalışılan pestisitlerle muamele edildiğinde süperoksit dismutaz enziminin aktivitesindeki inhibisyonların rejenere olmadığı görüldü.

Glutasyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine pestisitlerin etkisinin ve bu etkinin 2-PAM ile rejenerasyonu incelendi. Denemeler sonucunda, lambda cyhaloetrin 0.25-2.47 mM konsantrasyon aralığında glutasyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine % 2-45 inhibisyon gösterdi. Malation sadece 0.393 mM konsantrasyonda % 18 inhibisyon gösterdi. Deltametrin 0.002-0.021 mM konsantrasyon aralığında % 82-94 inhibisyon gösterdi. Diklorvos 0.098-0.980 mM konsantrasyon aralığında % 95-97 inhibisyon gösterdi. Çalışılan pestisitlerle inhibe olan glutasyon peroksidaz enziminin 2-PAM ile yapılan rejenerasyon denemelerinde rejenere olmadığı görüldü.

Denemeler sonucunda, çalışılan üç enzim arasından, sadece katalaz enzimi tüm pestisitlerin artan konsantrasyonlarıyla doğru orantılı inhibisyon ve 2-PAM ile rejenerasyon gösterdi.

Bu yüzden, tezin amaçlarından biri olan bazı pestisitlerin tayini için biyosensör geliştirilmesinde, çalışılan dört pestisit için de katalaz enzimi ile hazırlanan biyosensörün pestisitlerin tayininde kullanılabilirliği incelendi. Bunun için Pt elektrot üzerine anilin elektropolimerizasyonu yöntemi kullanılmasıyla katalaz immobilize edilerek biyosensör hazırlandı. Biyosensörün ön çalışmalarla katalaz aktivitesi kontrolleri yapıldıktan sonra dört pestisit ile inhibisyonları ve 2-PAM ile rejenerasyon denemeleri yapıldı. Sonuç olarak deltametrin ve diklorvos pestisitlerinin tayini için hazırlanan katalaz biyosensörünün kullanılabilir olduğu görüldü.

Yıl : 2013

Sayfa Sayısı : 142

Anahtar kelimeler : Katalaz, Süperoksit dismutaz, Glutasyon peroksidaz, pestisit, 2-PAM

Doctorate Thesis

In Vitro Investigation of the Effects of Pesticides on Body Immune System Enzymes

Trakya University Institute of Natural Sciences

Chemistry

ABSTRACT

Pesticides used commonly in agriculture against pests, known to cause many adverse effects on organisms. In this study, the effects of some pesticides used commonly on antioxidant defense system enzymes including catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase and availability of regeneration of the effect with 2-PAM were investigated.

As a result of assays carried out for investigation of the effects of pesticides on catalase activity and regeneration of these effects with 2-PAM, 0.25 – 2.47 mM concentration range for the lambda cyhalothrin showed 25 – 90 % inhibition and 13 – 30 % regeneration, respectively. 0.049 – 0.393 mM concentration range for malation showed 1 – 88 % inhibition and 12 – 2 % regeneration, respectively. 0.002 – 0.021 mM concentration range for deltamethrin, showed 8 – 90 % inhibition and 8 – 6 % regeneration, respectively. 0.098 – 0.980 mM concentration range for dichlorvos, showed 50 – 92 % inhibition, respectively and not to be regenerated with 2-PAM.

As a result of assays for investigation of the effects of pesticides on superoxide dismutase and regeneration of these effects with 2-PAM, 0.25 – 2.47 mM concentration range for the lambda cyhalothrin showed 7 – 82 % inhibition, respectively. 0.049 – 0.393 mM concentration range for malation showed 17 – 93 % inhibition, respectively. 0.002 – 0.021 mM concentration range for deltamethrin, showed 35 – 9 % inhibition, respectively. 0.098 – 0.980 mM concentration range for dichlorvos, showed 10 – 50 % inhibition, respectively. The regeneration operation of the superoxide dismutase treated with pesticide seems not to be regenerated with 2-PAM.

As a result of assays for investigation of the effects of pesticides on superoxide dismutase and regeneration of these effects with 2-PAM, 0.25 – 2.47 mM concentration range for the lambda cyhalothrin showed 2 – 45 % inhibition, respectively. Only 0.393

mM concentration for malation showed 18 % inhibition. 0.002 – 0.021 mM concentration range for deltamethrin, showed 82 – 94 % inhibition, respectively. 0.098 – 0.980 mM concentration range for dichlorvos, showed 95 – 97 % inhibition, respectively. From the regeneration operation of the superoxide dismutase treated with pesticide, were seen not to be regenerated with 2-PAM.

As a result of assays, between the three enzymes, only catalase enzyme showed linear inhibition with increasing concentration of all pesticides and regeneration with 2-PAM.

One of the aims of the thesis that for the investigation of a biosensor for determination of some pesticides, for studied four pesticides prepared biosensor by the catalase enzyme was investigated for determination of pesticides. For this; the biosensor was prepared by using aniline electropolymerization on Pt electrode and immobilization of catalase.

With preliminary studies of biosensor, after controlling catalase activity, the inhibition with four pesticides and regeneration with 2-PAM were performed. As a result, catalase biosensor prepared for the determination of pesticides were found to be available for determination of deltamethrin and dichlorvos.

Year : 2013

Number of pages : 142

Keywords : Catalase, Superoxide dismutase, Glutathione peroxidase, pesticide, 2-PAM

SİMGELER DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
CAT	Katalaz
SOD	Süperoksit dismutaz
GSH-Px	Glutasyon peroksidaz
GSH	Glutasyon
GSSG	Okside glutasyon
2-PAM	2 aldoksim metiyodür
DDT	Diklorodinitrofeniltrikloreten
ROS	Reaktif oksijen türleri
LPO	Lipid peroksidasyonu
TBARS	Tribarbitürik asit reaktif substansları
G6PDH	Glukoz 6 fosfat dehidrojenaz
GSH-Rd	Glutasyon redüktaz
OP	Organofosfat
LD50	Letal doz
MRL	Maksimum kalıntı limiti
AchE	Asetilkolin esteraz
INT	İyodonitrotetrazolyum klorür [2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5 fenil tetrazlyum klorür
PME	Pestisitle muamele edilmiş
GC	Gaz kromatografisi
HPLC	Yüksek basınç sıvı kromatografisi
GC-MS	Gaz kromatografisi-Kütle spektroskopisi

TEŞEKÜRLER

Doktora eğitimim süresince tecrübesiyle beni yönlendiren, tezimin her aşamasında sorularımı yanıtsız bırakmayan tez danışmanım Prof. Dr. Ayten SAĞIROĞLU'na, tezim süresince yardımlarını esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi hocalarıma, Doç. Dr. Hülya YAĞAR'a, Arş. Gör. Dr. Şebnem Selen İŞBİLİR'e, Arş. Gör. Dr. Hakkı Mevlüt ÖZCAN'a, Öğr. Gör. Engin ASAV'a, Yrd. Doç. Dr. Ünal GEÇGEL'e, Tezim süresince çalışmalarımı sürdürebilmem için desteklerini gördüğüm Arda Meslek Yüksek Okulu Müdürüm Doç. Dr. Yüksel BAYRAK'a ve Kimya Bölümü öğretim üyelerinden Doç. Dr. Mesut KAÇAN'a,

Tez çalışmam boyunca yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Gülçin AKAGÜN'e, Yrd. Doç. Dr. Şafak YILDIRIM'a, Öğr. Gör. Gülce ÖZCAN'a, Öğr. Gör. Gizem Çağla DÜLGER'e, Gökhan UÇAR'a, Güney GÖKARA'ya,

Hayatımın her döneminde bana gösterdikleri sabırları ve bu süreçte de yanımda oldukları için AİLEME teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışma, TÜBAP 2012/122 nolu proje kapsamında gerçekleştirilmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
SİMGELER DİZİNİ	v
TEŞEKÜRLER.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
BÖLÜM 1	1
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2	3
KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1. Antioksidan Savunma Sistemleri ve Önemi	3
2.2. Antioksidan Enzimler	4
2.2.1. Katalaz	5
2.2.2. Süperoksit Dismutaz	7
2.2.3. Glutasyon Peroksidaz	8
2.3. Serbest Radikaller	9
2.4. Serbest Radikal Türleri.....	10
2.4.1. Süperoksit Radikali	10
2.4.2. Hidrojen Peroksit	11
2.4.3. Hidroksil Radikali	12
2.4.4. Nitrik Oksit	12
2.4.5. Singlet Oksijen.....	13
2.5. Serbest Radikallerin Etkisi	13
2.6. Enzim İnhibisyonu ve Rejenerasyonu	14
2.6.1. Enzim İnhibisyonu	14
2.6.2. Enzim Rejenerasyonu (Renatürasyon)	19
2.6.3. 2-PAM (2-aldoksim metiyodür)	20
2.7. Pestisitler	20
2.7.1. Pestisitlerin Sınıflandırılması.....	21
2.7.1.1. Kimyasal Yapısına Göre Pestisitlerin Sınıflandırılması.....	23

2.7.1.1.1.	Organoklorinler	23
2.7.1.1.2.	Organofosfatlar	24
2.7.1.1.3.	Karbamatlar	26
2.7.1.1.4.	Pretrinler ve Sentetik Pretroitler	27
2.8.	Pestisitlerin Genel Etkileri	28
2.9.	Pestisitler ile Oksidatif Stres	30
2.10.	Çalışmada Kullanılan Pestisitlerin Genel Özellikleri	32
2.10.1.	Malation	33
2.10.2.	Diklorvos	33
2.10.3.	Deltametrin	35
2.10.4.	Lambda Cyhaloetrin	36
2.11.	Ölümcül Pestisit Dozları: LD50 ve MRL	36
2.12.	Pestisit Tayin Yöntemleri	37
2.13.	Biyosensörler	39
2.13.1.	Biyosensörlerin Sınıflandırılması	40
2.13.1.1.	İletim ve Ölçüm Sistemlerine Göre Biyosensörlerin Sınıflandırılması	40
2.13.1.2.	Biyobileşenin Türüne Göre Biyosensörlerin Sınıflandırılması	40
2.13.2.	Biyosensörlerde İmmobilizasyon Yöntemleri	41
2.13.3.	Biyotabaka Oluşturma Yöntemleri	45
2.13.3.1.1.	Elektrokimyasal Yöntemle İletken Polimerlerin Üretilmesi	45
2.13.3.2.	Anilinin Elektrokimyasal Polimerleşme Mekanizması	47
2.13.4.	Elektrokimya Esaslı Biyosensörler	49
2.13.4.1.	Amperometrik Esaslı Enzim Biyosensörleri	50
2.13.4.2.	Döngüsel Voltametri (Cyclic-Voltamery, Cv)	51
2.13.4.3.	Kronoamperometri (CA)	53
2.13.4.4.	Potansiyometri	54
BÖLÜM 3		55
MATERYAL VE METOD		55
3.1.	Materyal	55

3.1.1.	Çalışmada Kullanılan Kimyasallar	55
3.1.2.	Çalışmada Kullanılan Cihazlar	56
3.1.3.	Çalışmada Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı	56
3.2.	Metodlar.....	58
3.2.1.	Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	58
3.2.1.1.	Katalaz Enzim Aktivitesinin Ölçümü	58
3.2.1.2.	Süperoksit Dismutaz Enzim Aktivitesinin Ölçümü	59
3.2.1.3.	Glutasyon Peroksidaz Enzim Aktivitesinin Ölçümü	61
3.2.2.	Antioksidan Enzim Aktivitelerine Pestisitlerin Etkisinin İncelenmesi	62
3.2.3.	PME Enzimlerin 2-PAM İle Rejenerasyonları	63
3.2.4.	Pestisit Tayini İçin Biyosensör Hazırlanmasında Uygun Enzimin Belirlenmesi.....	64
3.2.4.1.	Katalaz Biyosensörünün Hazırlanması	65
3.2.4.2.	Katalaz Biyosensörünün Çalışma İlkesi.....	65
3.2.4.3.	Katalaz Biyosensörünün Ölçüm Düzeneği.....	67
3.2.4.4.	Pestisitlerin Katalaz Biyosensörü Cevabına Etkisi	68
BÖLÜM 4		70
DENEYLER VE SONUÇLAR		70
4.1.	Katalaz Enzimi Aktivite Tayini	70
4.1.1.	Katalaz Enzim Aktivitesine Pestisitlerin Etkisi	72
4.1.1.1.	Malation'un CAT Aktivitesine Etkisi	72
4.1.1.2.	Diklorvos'un CAT Aktivitesine Etkisi.....	73
4.1.1.3.	Deltametrin'in CAT Aktivitesine Etkisi.....	73
4.1.1.4.	Lambda Cyhaloetrin'in CAT Aktivitesine Etkisi	74
4.1.2.	PME Katalazın 2-PAM İle Rejenerasyonları	75
4.1.2.1.	Malation'un CAT'a Etkisinin Rejenerasyonu	75
4.1.2.2.	Diklorvos'un CAT'a Etkisinin Rejenerasyonu.....	76
4.1.2.3.	Deltametrin'in CAT'a Etkisinin Rejenerasyonu.....	77
4.1.2.4.	Lambda Cyhaloetrin'in CAT'a Etkisinin Rejenerasyonu	78

4.2.	Süperoksit Dismutaz Enzimi Aktivite Tayini	79
4.2.1.	Süperoksit Dismutaz Enzim Aktivitesi Üzerine Pestisitlerin Etkisi	79
4.2.1.1.	Malation'un SOD Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	79
4.2.1.2.	Diklorvos'un SOD Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	80
4.2.1.3.	Deltametrin'in SOD Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	81
4.2.1.4.	Lambda Cyhaloetrin'in SOD Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	81
4.2.2.	PME Süperoksit Dismutazın 2-PAM İle Rejenerasyonları	82
4.2.2.1.	Malation'un Süperoksit Dismutaz'a Etkisinin Rejenerasyonu	82
4.2.2.2.	Diklorvos'un SOD'a Etkisinin Rejenerasyonu	83
4.2.2.3.	Deltametrin'in SOD'a Etkisinin Rejenerasyonu	84
4.2.2.4.	Lambda Cyhaloetrin'in SOD'a Etkisinin Rejenerasyonu	85
4.3.	Glutasyon Peroksidaz Enzimi Aktivite Tayini	86
4.3.1.	GSH-Px Enzim Aktivitesi Üzerine Pestisitlerin Etkisi	87
4.3.1.1.	Malation'un GSH-Px Aktivitesine Etkisi	87
4.3.1.2.	Diklorvos'un GSH-Px Aktivitesi Üzerine Etkisi	87
4.3.1.3.	Deltametrin'in GSH-Px Aktivitesi Üzerine Etkisi	88
4.3.1.4.	Lambda Cyhaloetrin'in GSH-Px Aktivitesine Etkisi	89
4.3.2.	PME Glutasyon Peroksidazın 2-PAM İle Rejenerasyonları	89
4.3.2.1.	Malation'un GSH-Px'a Etkisi	89
4.3.2.2.	Diklorvos'un GSH-PX'a Etkisinin Rejenerasyonu	91
4.3.2.3.	Deltametrin'in GSH-Px'a Etkisinin Rejenerasyonu	92
4.3.2.4.	Lambda Cyhaloetrin'in GSH-Px'a Etkisinin Rejenerasyonu	93
4.4.	Katalaz Biyosensörüne Ait Bulgular	94
4.4.1.	Anilin Elektropolimerizasyonu	94
4.4.2.	Biyosensörün H ₂ O ₂ Tayini İçin Uygulanabilirliği	95
4.4.3.	Biyosensörün H ₂ O ₂ İçin Doğrusal Tayin Aralığı	96
4.4.4.	Biyosensörün 2-PAM İle Rejenerasyonu	97
4.4.5.	Pestisitlerin Katalaz Biyosensörü Aktivitesine Etkileri	98

BÖLÜM 5	102
TARTIŞMA.....	102
BÖLÜM 6	112
KAYNAKLAR.....	112
ÖZGEÇMİŞ.....	123

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. Katalaz enziminin Hem b ve Hem d grupları	6
Şekil 2. 2. Katalazın etki mekanizması	7
Şekil 2. 3. Yarışmalı enzim inhibisyonu	15
Şekil 2. 4. Yarışmalı enzim inhibisyonu Lineweaver-Burk ve Michaelis-Menten Grafiği	15
Şekil 2. 5. Yarışmasız enzim inhibisyonu	16
Şekil 2. 6. Yarışmasız enzim inhibisyonu Lineweaver-Burk ve Michaelis-Menten Grafiği	17
Şekil 2. 7. Yarıyarışmalı enzim inhibisyonu	18
Şekil 2. 8. Yarıyarışmalı enzim inhibisyonu Lineweaver-Burk ve Michaelis-Menten Grafiği	18
Şekil 2. 9. Organofosfatla inhibe olan AChE'nin Pralidoxime ile rejenerasyon mekanizması	19
Şekil 2. 10. 2-PAM	20
Şekil 2. 11. Ticari olarak satılan Pestisit örnekleri	21
Şekil 2. 12. DDT'nin kimyasal yapısı	24
Şekil 2. 13. Organofosfatların (a) ve Tiyo fosfatların (b) kimyasal yapısı	25
Şekil 2. 14. Karbamatların kimyasal yapısı	26
Şekil 2. 15. Krizantem çiçeği ve piretrinlerin kimyasal yapısı	27
Şekil 2. 16. Sentetik piretroidlerin kimyasal yapısı	28
Şekil 2. 17. Pestisitlerin bulaşma yolları	30
Şekil 2. 18. Biyosensörün bileşenleri	40
Şekil 2. 19. Enzim immobilizasyon yöntemleri	42
Şekil 2. 20. Kovalent Bağ Oluşumu	45
Şekil 2. 21. Anilin radikal katyonu oluşumu	47
Şekil 2. 22. Anilin radikal katyonunun rezonans formları	48

Şekil 2. 23. Dimer oluşumu	48
Şekil 2. 24. Radikal katyon dimerinin oluşumu	49
Şekil 2. 25. Enzim biyosensörünün genel çalışma ilkesi	50
Şekil 2. 26. İkizkenar üçgen dalgası şeklinde uygulanan potansiyel	51
Şekil 2. 27. Üçgen dalga potansiyel uygulandığında elde edilen voltamogram	52
Şekil 2. 28. Kronoamperometride elektroda uygulanan potansiyelin zamanla değişimi	53
Şekil 3. 1. Enzimlerin İnhibisyon ve rejenerasyon işleminin şematik gösterimi	64
Şekil 3. 2. Pt elektrodun polianilin film ile modifikasyonu ve glutaraldehit çapraz bağlayıcısı kullanılarak gerçekleştirilen enzim immobilizasyonu.....	66
Şekil 3. 3. Ölçüm sisteminin detayları: a) Polianilin tabakasına immobilize edilen CATın bulunduğu platin elektrot, b) Ag/AgCl referans elektrot, c) Platin yardımcı elektrot, d) Enjeksiyon haznesi, e) Manyetik bar, f) Manyetik karıştırıcı, g) Palm Sense potansiyostat, h) Bilgisayar, J) Termostat	67
Şekil 4. 1. H ₂ O ₂ için standart grafik.....	71
Şekil 4. 2. H ₂ O ₂ 'nin Katalaz için lineer aralığı	72
Şekil 4. 3. Malation için inhibisyon ve rejenerasyon.....	75
Şekil 4. 4. Diklorvos için inhibisyon ve rejenerasyon	76
Şekil 4. 5. Deltametrin için inhibisyon ve rejenerasyon	77
Şekil 4. 6. Lambda Cyhaloetrin için inhibisyon ve rejenerasyon.....	78
Şekil 4. 7. SOD için lineer aralık belirlenmesi	79
Şekil 4. 8. Malation için inhibisyon ve rejenerasyon.....	83
Şekil 4. 9. Diklorvos için inhibisyon ve rejenerasyon	84
Şekil 4. 10. Deltametrin için inhibisyon ve rejenerasyon	85
Şekil 4. 11. Lambda Cyhaloetrin için inhibisyon ve rejenerasyon	86
Şekil 4. 12. GSH-Px lineer aralık	86
Şekil 4. 13. Malation için inhibisyon ve rejenerasyon.....	90

Şekil 4. 14. Diklorvos için inhibisyon ve rejenerasyon	91
Şekil 4. 15. Deltametrin için inhibisyon ve rejenerasyon	92
Şekil 4. 16. Lambda Cyhaloetrin için inhibisyon ve rejenerasyon	93
Şekil 4. 17. Anilinin 20 döngüyle -0.2 & 0.9 V arası alınan döngüsel voltammogram ile elektropolimerizasyonu sonucunda elde edilen polianilin grafiği	94
Şekil 4. 18. 2.5 mM, 3.75 mM, 6.25 mM H ₂ O ₂ için alınan biyosensör cevabı.....	95
Şekil 4. 19. Katalaz biyosensörünün H ₂ O ₂ için doğrusal tayin aralığı	96
Şekil 4. 20. Diklorvos için rejenerasyon grafiği.....	97
Şekil 4. 21. Deltametrin için rejenerasyon grafiği.....	98
Şekil 4. 22. Diklorvos inhibisyonuna ait biyosensör cevabı.....	99
Şekil 4. 23. Diklorvos için lineer inhibisyon grafiği.....	99
Şekil 4. 24. Deltametrin inhibisyonuna ait biyosensör cevabı	100
Şekil 4. 25. Deltametrin için lineer inhibisyon grafiği.....	100
Şekil 4. 26. Malation inhibisyonuna ait biyosensör cevabı.....	101
Şekil 4. 27. Lambda Cyhaloetrin inhibisyonuna ait biyosensör cevabı.....	101

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 2. 1. Hücre içi antioksidanlar.....	4
Tablo 2. 2. Membran antioksidanlar	4
Tablo 2. 3. Pestisitlerin sınıflandırılması	22
Tablo 3. 1. Katalaz aktivite ölçümü için kullanılan maddelerin hacimleri	59
Tablo 3. 2. SOD aktivite ölçümü için kullanılan maddelerin hacimleri	60
Tablo 3. 3. Glutasyon Peroksidaz aktivite ölçümü için kullanılan maddelerin hacimleri	62
Tablo 3. 4. Antioksidan savunma sistemi enzimlerinin aktivitesi üzerine etkilerinin incelendiği pestisitler ve kullanılan derişimleri.....	63
Tablo 3. 5. Katalaz biyosensörü üzerine etkisinin incelendiği pestisit konsantrasyonları	69
Tablo 4. 1. H ₂ O ₂ için okunan Absorbans değerleri	70
Tablo 4. 2. CAT aktivitesine malation'un etkisi	72
Tablo 4. 3. CAT aktivitesine dikorvos'un etkisi	73
Tablo 4. 4. CAT aktivitesine deltametrin'in etkisi	74
Tablo 4. 5. CAT aktivitesine Lambda Cyhaloetrin'in etkisi	74
Tablo 4. 6. CAT aktivitesine malation'un etkisinin 2-PAM ile rejenerasyonu.....	75
Tablo 4. 7. CAT aktivitesine diklorvos'un etkisinin 2-PAM ile rejenerasyonu.....	76
Tablo 4. 8. CAT aktivitesine deltametrin'in etkisinin 2-PAM ile rejenerasyonu	77
Tablo 4. 9. CAT aktivitesine Lambda Cyhaloetrin'in etkisinin 2-PAM ile rejenerasyonu	78
Tablo 4. 10. SOD enzim aktivitesi üzerine malation'un etkisi	80
Tablo 4. 11. SOD enzim aktivitesi üzerine Diklorvos'un etkisi.....	80
Tablo 4. 12. SOD enzim aktivitesi üzerine Deltametrin'in etkisi	81
Tablo 4. 13. SOD enzim aktivitesi üzerine Lambda Cyhaloetrin'in etkisi	82

Tablo 4. 14. SOD aktivitesine malation'un etkisinin 2-PAM ile rejenerasyonu.....	82
Tablo 4. 15. SOD aktivitesine Diklorvos'un etkisinin 2-PAM ile rejenerasyonu.....	83
Tablo 4. 16. SOD aktivitesine deltametrin'in etkisinin 2-PAM ile rejenerasyonu	84
Tablo 4. 17. SOD aktivitesine Lambda Cyhaloetrin'in etkisinin 2-PAM ile rejenerasyonu.....	85
Tablo 4. 18. GSH-Px aktivitesine malation'un etkisi	87
Tablo 4. 19. GSH-Px aktivitesine dikorvos'un etkisi	88
Tablo 4. 20. GSH-Px aktivitesine Deltametrin'in etkisi	88
Tablo 4. 21. GSH-Px aktivitesi üzerine Lambda cyhaloetrin'in etkisi	89
Tablo 4. 22. GSH-Px aktivitesine malation'un etkisinin 2-PAM ile rejenerasyonu	90
Tablo 4. 23. GSH-Px aktivitesine Diklorvos'un etkisinin 2-PAM ile rejenerasyonu	91
Tablo 4. 24. GSH-Px aktivitesine Deltametrin'in etkisinin 2-PAM ile rejenerasyonu ..	92
Tablo 4. 25. GSH-Px aktivitesine Lambda Cyhaloetrin'in etkisinin 2-PAM ile rejenerasyonu.....	93

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Günümüzde, bilinçli toplumlar sağlıklı beslenmede bitkisel kaynaklı besinlerin öneminin farkındadırlar. Bunun yanında dünya nüfusunun hızlı artışı ile bitkisel besin ihtiyacının artması, her mevsim taze meyve sebze olan yoğun talep dolayısıyla seracılığın gelişmesi, küresel ısınmaya bağlı iklim değişimleri ve diğer ekolojik değişimler, polikültür tarımında bazı hastalık ve zararlıların gelişmesine, çeşitlenmesine uygun ortam sağlamaktadır. Bunlarla mücadelenin en önemli yöntemi, tarım ilaçlarının kullanımudur. Sık kullanılan tarım ilaçları arasında olan pestisitlerden organik fosforlu insektisitler kullanımda ilk sıralardadırlar.

İnsanlar pestisitlerle çeşitli şekillerde karşılaşılır. Tarım ilaçlarını üretenler, pazarlayanlar, uygulayanlar ve nihayet pestisitli tarımsal ürünleri tüketenler olmak üzere geniş bir kitle pestisitlere farklı derecelerde akut ya da kronik olarak maruz kalırlar. Organizmaya çeşitli yollarla giren pestisitler, sinir sistemi, endokrin sistem, immun koruma sistemi, karaciğer, kalp ve kas gibi sistemleri olumsuz etkilemektedirler. Etkilenen sistemler içinde önemli bir sistem de insanların savunma sistemi yani antioksidan sistemdir.

Pestisit zararları konusunda bazı çalışmalar bulunmaktadır. Çevresel olarak pestisitlerin önemi ve kullanımı, ilk çalışmalardandır [1]. Tarım işçilerinin pestisitlerle ilişkili sağlık problemleri araştırılmıştır [2]. Pestisitlerin karsinojenik etkileri de incelenmiştir [3]. Diğer bir çalışma ile insan lipid peroksidasyonu üzerine fosfoamidon insektisidinin etkisi incelenmiştir [4]. Türkiye-İçel'de kronik olarak pestisitlere maruz kalan tarım işçilerinin kan enzimlerindeki aktivite değişimleri incelenmiştir [5]. Literatürde taramalarından anlaşıldığı üzere bu alandaki çalışmalar oldukça sınırlıdır.

Ülkemizde çok sağlıklı bir denetim sağlanamadığı için kısmen bilinçsiz ve yeterli önlem alınmadan kullanılan pestisitlere bir şekilde hepimiz maruz kalmaktayız. Pestisit alındığında; vücutta serbest zehir etkili radikallerin oluşumu ve bunların zehirsizleştirilmesi arasındaki dengeyi sağlayan savunma antioksidan sistemi enzimlerinin nasıl etkilendiği ve aktivitelerinin nasıl değiştiği ilgili enzimlerin tümü için tam olarak belirlenmemiştir. Bu çalışma ile pestisit cinsine ve miktarına bağlı olarak, antioksidan sistemi enzimlerinin, aktivite değişimlerinin incelenmesi ve hangi enzimlerin ne kadar etkileneceği *in vitro*'da araştırılmıştır. Çalışma alınacak sonuçların pestisitlerin savunma sistemine etkilerinin anlaşılmasında önemli katkı sağlayacaktır. Bu sonuçlar doğrultusunda sağlığın daha bilinçli korunması için yeni özel önlemler alınması gündeme gelecektir.

Pestisit tayininde kullanıma uygun biyosensörlerin geliştirilmesi için, kaynak enzim belirlenmesi de tezden beklentiler arasındadır. Ayrıca bu tip biyosensörlerin kolay ve ekonomik olarak hazırlanması yanında, biyolojik sistemin spesifitesi ve duyarlılığından yararlanılarak pestisit tayininde kullanılabilir bir biyosensör geliştirilmesi önemlidir.

BÖLÜM 2

KURAMSAL TEMELLER

2.1. Antioksidan Savunma Sistemleri ve Önemi

Reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve bu türler sebebiyle ortaya çıkan hasarın önlenmesi için vücutta çeşitli savunma mekanizmaları bulunur. ‘Antioksidan savunma sistemleri’ ve ‘antioksidanlar’ diye bilinen bu sınıflar; serbest radikalleri nötralize edip, sebep oldukları hasarı tamir etmeye yardımcı olur ve vücudun onlardan etkilenmesini en aza indirir veya vücudun yenilenmesini sağlarlar [6].

Antioksidanları anlamak için, nötralize ettikleri serbest radikallerin kaynağı ve neler yapabileceği bilinmelidir. Mikro besin maddeleri olan antioksidanlar, yiyecekleri, özellikle yağları oksidasyon ve bozulmaktan korurlar. İsimlerinden de anlaşılacağı gibi oksijenin diğer maddelerle birleşmesini engelleyerek canlıdaki maddelerin oksidasyonunu engellerler. Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunun devam etmesini engelleyerek ve/veya reaktif oksijen türlerini toplayarak lipid peroksidasyonunu inhibe ederler. Temelde, antioksidan sistem bütün bunları; serbest radikaller, hücre zarına, nükleik asitlere (DNA) ve hücre bileşenlerine saldırmadan önce kendine çeker ve bağlar. Antioksidan özelliği ile bilinen birçok madde vardır. Vücut, bu maddelerin bir kısmını kendi üretirken, bir kısmını özellikle bitkilerden alır. Endojen kaynaklı (doğal) ve eksojen kaynaklı olmak üzere başlıca iki ana gruba ayrılabilen antioksidanları, aynı zamanda serbest radikal oluşumunu önleyenler ve mevcut olanları etkisiz hale getirenler şeklinde ikiye, enzim olanlar ve enzim olmayanlar olarak da yine ikiye ayırmak mümkündür. Hücrelerde hem sıvı hem membran kısımlarda bulunabilirler.

(a) Endojen (Doğal) antioksidanlar:

-Enzimler: Katalaz (CAT), Süperoksit Dismutaz (SOD), Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)

-Enzim olmayanlar: β -karoten, E vitamini, Askorbik asit, sistein, albumin, bilirubin, hemoglobin v.s.

(b) Eksojen antioksidanlar: Ksantin oksidaz inhibitörleri, NADPH oksidaz inhibitörleri [7].

Tablo 2. 1. Hücre içi antioksidanlar [7,8]

CAT	H ₂ O ₂ 'in uzaklaştırılması
SOD (Cu, Zn, Mn)	Süperoksit radikalının katalitik olarak uzaklaştırılması
GSH-Px	H ₂ O ₂ 'in ve lipit hidroperoksitlerinin uzaklaştırılması

Tablo 2. 2. Membran antioksidanlar [7, 8]

Koenzim-Q	Başlıca görevi enerji metabolizmasındadır. İndirgenmiş hali ile antioksidan olarak görev yapabilir.
Vitamin E	Yağda eriyen zincir kırıcı antioksidandır. Plazmadaki lipoprotein lipitlerini korur.
β -Karoten	Yağda eriyen radikal temizleyicisidir ve Singlet oksijeni ortadan kaldırır.

2.2. Antioksidan Enzimler

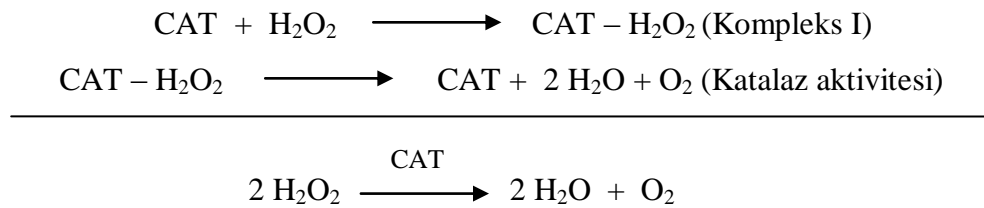
Biyokatalizör de denilen enzimlerin çok yüksek katalizleme gücü vardır. Organizmadaki sentez ve yıkım tepkimelerinin hepsi enzim katalizörlüğünde gerçekleşmektedir. Bu durumda enzimler, canlılık oluşumunun ve devamının olmazsa

olmazdır. Enzimler organizma dışında da aktivite gösterebildiklerinden önemleri daha da artmaktadır. İlgili gen kontrolü ile üretilen enzimler kendilerine özgü pH, basınç ve sıcaklık gibi şartlara sahiptirler. Günümüzde kimya, ilaç, gıda, boya, dericilik ve temizleme sanayiinde enzimler yaygın olarak kullanılmaktadır. Tıp, veterinerlik, tekstil ve tarım endüstrilerinde, biyoteknoloji ve biyoloji bilim dallarında da kullanılmaktadır. En önemli antioksidan enzimler; süperoksit anyonunu H_2O_2 'e dönüştüren SOD, organik peroksitleri detoksifiye eden GSH-Px ve H_2O_2 'i suya indirgeyen CAT'dır ve bu endojen antioksidan enzimler serbest radikalleri etkisiz hale getirirler. Bu durumda organizma serbest radikaller ve aktif oksijenden etkilenmez [9].

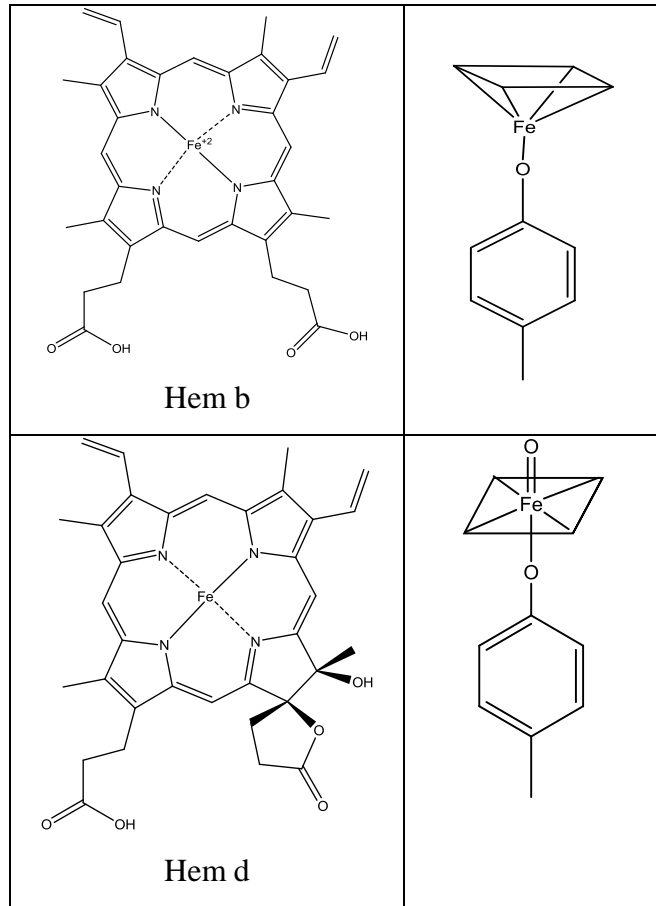
2.2.1. Katalaz

CAT enzimi (E.C. 1.11.1.6) doğada yaygın olarak bulunmaktadır. İndirgenme-yükseltgenme tepkimelerinde görev yapan enzimlere oksidoredüktazlar denir ve CAT enzimi oksidoredüktazların hidroperoksidazlar sınıfındadır. Hidroperoksidazlar, hidrojen peroksit veya diğer organik peroksitleri substrat olarak kullanırlar, bununla beraber zararlı peroksitlere karşı organizmayı korur. Peroksitlerin birikmesi ile ortaya çıkan serbest radikaller membran yapısının bozulmasına, ve bunun sonucu olarak kanser oluşumuna neden olur [10, 11, 12].

CAT, hem elektron verici hem de alıcı substrat olarak H_2O_2 kullanır. CAT enzimi H_2O_2 'in hücrenel bileşiklere zarar vermesini engeller. H_2O_2 , CAT ile parçalanmazsa canlıda kalıcı hasarlara neden olan serbest radikali oluşturur bu da hidroksil radikalinin öncülü olarak davranır.



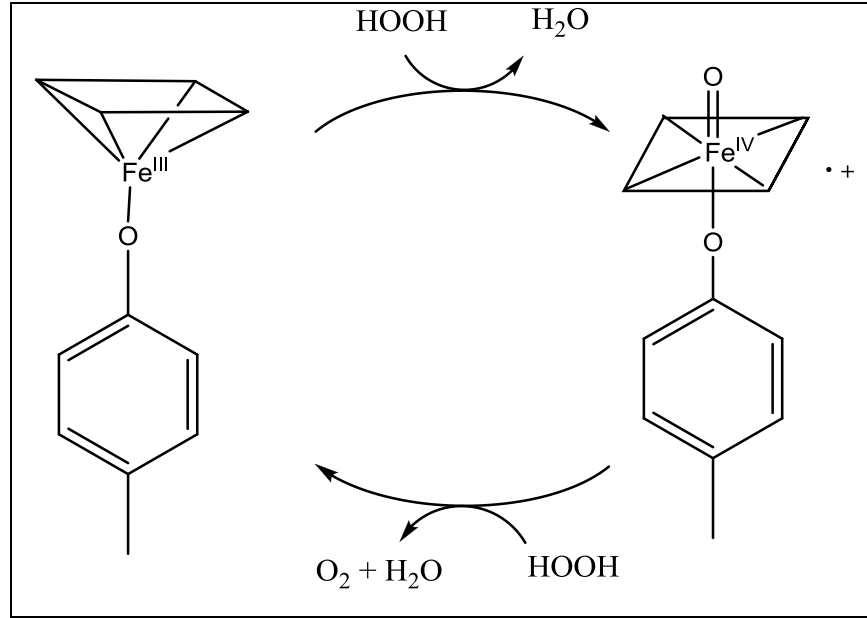
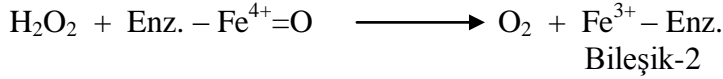
Yukarıdaki tepkimelerde görüldüğü gibi CAT, H₂O₂'i substrat olarak, elektron alıcısı ve elektron vericisi olarak kullanmaktadır [12, 13, 14, 15]. CAT, in vivo ortamlarda genellikle peroksidaz olarak tercih edilmektedir. Kanda, mukoz membranlarda, kemik iliğinde, böbrek ve karaciğerde CAT bulunur. Asıl fonksiyonu oksidazlar tarafından ortaya çıkan H₂O₂'i bertaraf etmektir. Katalaz aktif merkezinde Hem B veya Hem D grupları içerir (Şekil 2.1.).



Şekil 2. 1. Katalaz enziminin Hem b ve Hem d grupları

CAT ve oksidaz aktivitesi birçok dokuda birlikte çalışır. Katalitik reaksiyonda iki basamak vardır (Şekil 2.2.). Birinci basamakta katalaz Ferrik (Fe³⁺) içerir, bileşik-1 (Porfirin Katyon Radikali oluştururken peroksit molekülü ile reaksiyon verir ve peroksit indirgenir. İkinci basamakta başka bir H₂O₂ molekülü yükseltgenerek bileşik-1 doğal

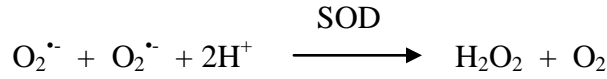
haline gelir. Bu tepkimede H₂O₂ hem elektron alıcısı hem de vericisi olarak görev yapar [16, 17, 18].



Şekil 2. 2. Katalazın etki mekanizması [19]

2.2.2. Süperoksit Dismutaz

SOD enzimi (E.C. 1.15.1.1) oksijen zehirlenmesine karşı önemli bir koruyucudur ve oksijeni metabolize eden tüm hücrelerde bulunur. SOD'un görevi süperoksitin zararlı etkisinden aerobik organizmaları korumaktır. Süperoksit radikallerinin ($\text{O}_2^{\cdot-}$), H₂O₂ ve oksijene hızlıca dismutasyonunu katalizler. SOD'un enzimatik aktivitesi çok yüksektir. [20, 21, 22, 23].



Kofaktör olarak içerdiği metal iyonuna göre üç sınıf dismutaz enzimi vardır:

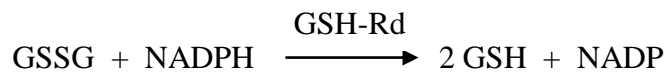
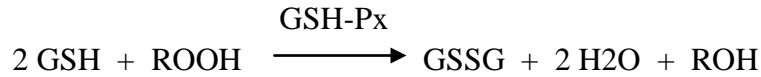
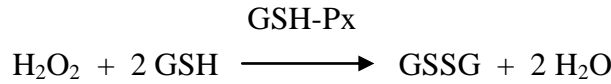
(a) Cu ve Zn içeren dismutazlar genel olarak ökaryotik hücrelerin kloroplastlarında ve sitozolünde bulunur. Tek disülfit bağı ile birbirine bağlı iki aynı alt birimden oluşur ve alt birim başına birer Zn ile Cu içerirler. Enzimin etkinliği için Cu mutlaka gerekli iken Zn; Ca^{2+} , Co^{2+} , Hg^{2+} ile yer değiştirebilir. Dismutasyon Cu ile süperoksit radikali arasındaki etkileşimle başarılıdır.

(b) Mn içeren dismutazlar prokaryotlarda ve mitokondri matriksinde bulunur. Birbiri ile aynı iki alt birimden oluşan ve her alt birimde bir atom Mn içeren dismutazlardır.

(c) Fe içeren dismutazlar prokaryotlarda ve bazı bitkilerde bulunur. Yapısı Mn SODa benzerdir.

2.2.3. Glutatyon Peroksidaz

GSH-Px enzimi (E.C. 1.11.1.9) H_2O_2 ve lipid peroksidasyonunda zincir kırıcı etkiyi katalizler. GSH-Px enzimi reaksiyon sırasında indirgenmiş glutatyonu (GSH) elektron alıcısı olarak kullanır ve oluşan okside glutatyon (GSSG) NADPH bağımlı GSH-Rd enzimi tarafından rejenere edilir. Reaksiyonları aşağıdaki gibi gösterilebilir.



Glutatyon (γ -glutamil sisteinil glisin, GSH); tripeptittir ve serbest sülfidril grubu içerir. GSH-Px'in katalizlediği reaksiyonla, hemoglobin ve membran lipidlerinin

peroksitlerle oksidasyonunu engeller. Bu tepkime hemoglobinin methemoglobine oksidasyonunu azaltarak eritrositin ömrünü uzatır [24, 25].

2.3. Serbest Radikaller

Alerji, kanser, diyabet, katarakt, ateroskleroz, nörodejeneratif hastalıklar, gibi birçok hastalığın patogeneğinde rol oynayan serbest radikaller son zamanlarda en çok çalışılan konular arasındadır. Serbest radikaller, dış orbitallerinde bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron içeren atom veya moleküller olup, bu elektronlarını paylaşabilmek adına hızla diğer moleküllerle reaksiyona girerler [26, 27, 28].

Serbest radikaller enerji üretimi, elektron transferi ve diğer metabolik olayların temelinde bulunurlar. Fakat radikallerle girilen reaksiyonda moleküllerin bir elektronu eksildiğinden onlar da reaktif hale gelir ve bu tepkime zincirleme devam ederken kontrolsüz bir davranış meydana gelirse hücrede hasarlara sebep olur. Serbest radikaller etkilediği atomun dolaylı olarak o atomu içeren maddenin görevini yapamamasına neden olur. Sonuç olarak, etkilenen maddenin biyolojik önemine ve onun tamir edilip edilememesine bağlı olarak önemli veya önemsiz kalıcı veya geçici etkiler gösterir. Serbest radikaller hem normal metabolizmanın yan ürünü olarak, hem de toksik maddelerin etkisiyle oluşabilmektedir [29].

Serbest radikal yaratan kaynaklar radyasyon, virüsler, güneş ışınlarının bir kısmı olan ultraviyole ışınları, hava kirliliğini yaratan fosil kökenli yakıtların yanma sonundaki ürünleri, sigara dumanı, enfeksiyon, stres, yağ metabolizması sonunda çıkan ürünler gibi hücre metabolizmasının toksik ürünleri, bazı tahrip edici kimyasallar, haşere kontrol ilaçları (pestisitler) ve birçok başka etkenlerdir. Çeşitli fiziksel ve kimyasal olaylar sebebiyle içinde bulunduğumuz çevrede sürekli bir radikal üretimi vardır, hücresel koşullarda da önemli bir miktar ve çeşitlilikte radikal üretimi vardır. Serbest radikaller üç temel mekanizma ile oluşur:

1. *Kovalent Bağların Homolitik Kırılması*; Yüksek sıcaklık ve yüksek enerjiye sahip elektromanyetik dalgalar sıcaklık kimyasal bağları kırarlar. Kırılma esnasında

bağdaki iki elektronun ayrı atomlar üzerinde kalması homolitik kırılmadır. Her iki atom üzerinde de paylaşılmamış elektron kalır.

2. *Normal Bir Molekülün Elektron Kaybetmesi*; Radikal özelliği taşımayan bir molekül elektron kaybederken dış orbitalinde paylaşılmamış elektron kalmasıyla radikal oluşur. Askorbik asit, GSH gibi hücrel antioksidanların radikal türlere tek elektron verip radikalleri indirgerken, kendilerinin radikal formu oluşturması örnek gösterilebilir.

3. *Normal Bir Moleküle Elektron Transferi*; Radikal özelliği taşımayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde paylaşılmamış elektron oluşması radikal oluşumuna sebep olabilir. Moleküler oksijenin tek elektron ile indirgenerek, radikal formu olan süperoksitin oluşması bu türe örnektir. Biyolojik sistemlerde en fazla bu yolla serbest radikaller meydana gelir [26, 27, 28]. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü veya nötral olabilirler. Organik veya inorganik moleküller şeklinde olabilirler.

2.4. Serbest Radikal Türleri

Biyolojik sistemlerdeki serbest radikallerin en önemlileri, oksijenden oluşanlardır. Bunlar, oksijenin kendisi, süperoksit, hidrojen peroksit, geçiş metallerinin iyonları, nitrik oksit ve hidroksil radikalidir. Hidroksil radikali; oksijen, süperoksit, hidrojen peroksit ve geçiş metallerinin iyonlarının çeşitli reaksiyonlarıyla oluşur. Süperoksit ve nitrik oksit enzimatik reaksiyonlarla sürekli üretildiği için temel radikaller olarak kabul edilebilirler. Ayrıca bunlar, biyolojik sistemlerdeki diğer bütün radikaller ile radikal yapıda olmayan reaktif türlerin oluşumunu başlatabilirler [7, 30].

2.4.1. Süperoksit Radikali

Canlılarda oluşan ilk ve temel radikal süperoksit radikalidir (Süperoksit Anyonu, O_2^-). Başlıca üretildiği mekanizmalar [31];

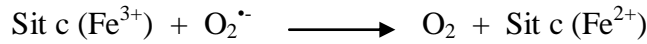
(a) İndirgeyici biyomoleküller oksijene tek elektron verip kendileri yükseltgenirken süperoksit radikali meydana gelir. Hidrokinonlar, flavinler, tiyoller,

ferrodoksinler, indirgenmiş nükleotitler vs. aerobik ortamda yükseltgenirken süperoksit oluşumuna sebep olurlar.

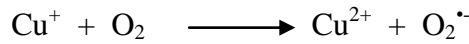
(b) Başta dehidrogenazlar ve oksidazlar olmak üzere, enzimlerin katalitik reaksiyonları esnasında süperoksit radikali oluşabilir.

(c) Mitokondrideki enerji metabolizmasında, tüketilen oksijenin % 1-5 kadarı süperoksit yapımına sebep olur. Bunun nedeni NADH-dehidrogenaz ve koenzim-Q gibi elektron taşıyıcılardan oksijene elektron kaçığının olmasıdır.

(d) Aktif hale gelen fagositik lökositler, süperoksit üreterek fagozom içine ve buldukları ortama verirler. Hücre koşullarında üretilen süperoksit, yükseltgeyici veya indirgeyici etki gösterebilir. Aldığı elektronu metal iyonuna, sitokrom-c ye veya bir radikale verdiğinde tekrar oksijene yükseltgenir.



İndirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu da süperoksit oluşabilir.



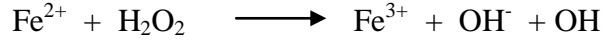
2.4.2. Hidrojen Peroksit

Bu radikal süperoksitlerin enzimatik ve enzimatik olmayan bozunumu veya oksijenin enzimatik yolla iki elektronla indirgenmesi ile oluşur.



H₂O₂ yapısında paylaşılmamış elektron içermez, bu sebeple radikal özellik taşımaz. H₂O₂'in yükseltgeyici tür olarak kabul edilmesinin sebebi demir, bakır gibi metal iyonları varlığında hidroksil radikaline öncülük yapmasıdır. H₂O₂ özellikle proteinlerdeki Hem grubunun demiri ile reaksiyona girerek yüksek oksidasyon

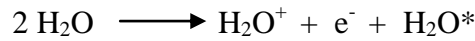
seviyesindeki reaktif demir formlarını oluşturur. Reaktif demir çok güçlü yükseltgeyici özelliklere sahiptir ve hücre zarında lipid peroksidasyonu başlatabilir [32].



2.4.3. Hidroksil Radikali

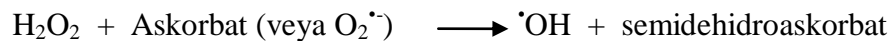
Hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$) canlılarda iki mekanizma ile üretilir:

(a) İyonlaştırıcı radyasyon etkisiyle sulu ortamda su moleküllerinin iyonlaşması ile oluşur.



Hidroksil radikali, uyarılmış su molekülünün (H_2O^*) homolitik yıkımıyla veya H_2O^+ 'nin bir su molekülü ile tepkimeye girmesiyle oluşur. Bu reaksiyonlar çok kısa sürede gerçekleşen reaksiyonlardır ve oluşan $\cdot\text{OH}$, radyasyonun canlılardaki toksik etkisinin başlıca sorumlusudur.

(b) H_2O_2 eksik indirgenmeye uğrarsa, $\cdot\text{OH}$ radikali oluşur. H_2O_2 'in tek elektron ile indirgenmesi $\cdot\text{OH}$ radikalini ortaya çıkarır. Bu indirgenmeyi Fe, Cu gibi metal iyonları katalizler. Askorbik asit, süperoksit gibi indirgeyicilerin de bulunduğu ortamda okside metal iyonunun tekrar indirgenmesi sebebiyle H_2O_2 'ten $\cdot\text{OH}$ yapımı sürekli bir hal alır [7, 30].



2.4.4. Nitrik Oksit

Azot merkezli bir radikal olan Nitrik oksit ($\cdot\text{NO}$), çok önemli biyolojik fonksiyonları gerçekleştirmek için üretilir. Azot atomuna ait paylaşılmamış elektron hem azot hem de oksijen atomu üzerinde delokalize olduğu için tam olarak radikal özellik göstermez. Bu sebeple oldukça uzun ömürlüdür çünkü bildiğimiz diğer

radikallere göre aktivitesi baskılanmaktadır. Vücudumuzda $\cdot\text{NO}$ sentezini sağlayan mekanizmalar oldukça kısıtlıdır. Radikal aktivitesi düşüktür ve $\cdot\text{NO}$, metal içeren merkezler ve radikaller ile hızla reaksiyona girer. Özellikle lipid radikallerle reaksiyona girdiğinde $\cdot\text{NO}$ antioksidan etki kazandırır. Oksijen radikallerinin aksine, nitrik oksidi ortamdaki temizleyen herhangi bir özel enzim yoktur. Aerobik ortamda $\cdot\text{NO}$ stabil değildir. Derişiminin artması ile oksidasyonu hızlanır. Bu nedenle ortamdaki derişimi ile kendi ömrü arasında ters bir orantı vardır [7, 30].

2.4.5. Singlet Oksijen

Singlet oksijen ($^1\text{O}_2$), ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Oksijenin enerjetik olarak uyarılan bu formunda reaktivite çok yüksektir. Aldığı enerjiyi çevreye dalga enerjisi şeklinde verip yeniden oksijene dönebilir. Başlıca şu mekanizmalarla vücutta oluşabilir:

- (a) Pigmentlerin (örneğin flavin içeren nükleotidler) oksijenli ortamda ışığı absorplamasıyla,
- (b) Hidroperoksitlerin metaller varlığındaki tepkimelerinde,
- (c) Kendiliğinden dismutasyon tepkimeleri sırasında,
- (d) Sitokrom P450 tepkimeleri, laktoperoksidaz enziminin etkileri sırasında [26, 27, 28].

2.5. Serbest Radikallerin Etkisi

Mitokondrial, endoplazmik ve nükleer elektron transport sistemlerinde (sitokrom P450), peroksizomlarda, monosit ve nötrofillerin fagositozu gibi normal metabolik olaylar sırasında bol miktarda serbest radikal üretilir. Bir anlamda serbest radikaller, solunum ve sindirim gibi normal vücut faaliyetlerinin zehirli atıkları durumundadır. Araştırmacılar, insan vücudundaki her hücrenin günde ortalama 10.000 serbest radikalın hücumuna uğradığını belirtmektedirler. Eğer serbest radikaller nötralize edilmezse; hücre membranı proteinlerini yıkarak hücreleri öldürmek, membran lipid ve proteinlerini

yok ederek hücre membranını sertleştirip hücre fonksiyonunu engellemek, nükleustaki genetik kodu içinde taşıyan, hücrenin üretimini ve büyümesini sağlayan nükleik asite (DNA) etki edip, DNA'yı kırılma ve mutasyonlara açık hale getirmek, bağışıklık sistemindeki hücreleri yok ederek bağışıklık sistemini zorlamak, yaşlanma ve kanser gibi olaylara neden olabilirler [7, 8].

2.6. Enzim İnhibisyonu ve Rejenerasyonu

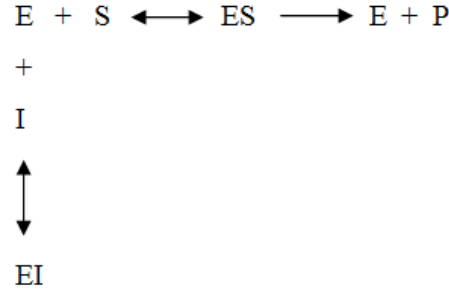
2.6.1. Enzim İnhibisyonu

Enzim inhibisyonu, enzimatik bir tepkimenin hızının inhibitör adı verilen bazı maddeler tarafından azaltılması veya tamamen durdurulmasıdır. Bazı hastalıkların nedeni, bir enzimin işlevini yerine getirmemesi olabilir; herhangi bir etken bir enzimi inhibe ederek enzimin katalize ettiği kimyasal olayı bozabilir veya bir farmakolojik ajan, bir hastalığı enzim inhibisyonu üzerinden tedavi edebilir.

Bazı ilaçlar ve bir kısım kimyasal maddeler enzimlerin katalitik etkilerine engel olurlar ki enzimlerin etkilerini önleyen maddelere enzim inhibitörleri denir. Enzim inhibitörleri ile enzim inhibisyonu tersinir veya tersinir olmayan olabilir.

Tersinir enzim inhibisyonları;

1) Yarışmalı enzim inhibisyonu: tersinir enzim inhibisyonunun yaygın bir tipidir. Yarışmalı enzim inhibisyonunda, bir yarışmalı inhibitör, enzimin aktif yeri için substrat ile yarışır. Enzimin aktif yerine inhibitör bağlanınca reaksiyon gerçekleşmez; inhibitör aktif yeri işgal ederken substratın enzime bağlanmasını önler. Yarışmalı enzim inhibisyonunda inhibitör madde, enzimin substratına olan ilgisini azaltır; Km değeri büyür. Yarışmalı inhibitör, sıklıkla yapısal olarak substrata benzeyen ve substrat gibi, enzime tersinir bağlanma özelliği gösteren bir bileşiktir; Enzim-İnhibitör (EI) kompleksi oluşturmak üzere enzim ile tersinir olarak birleşir:

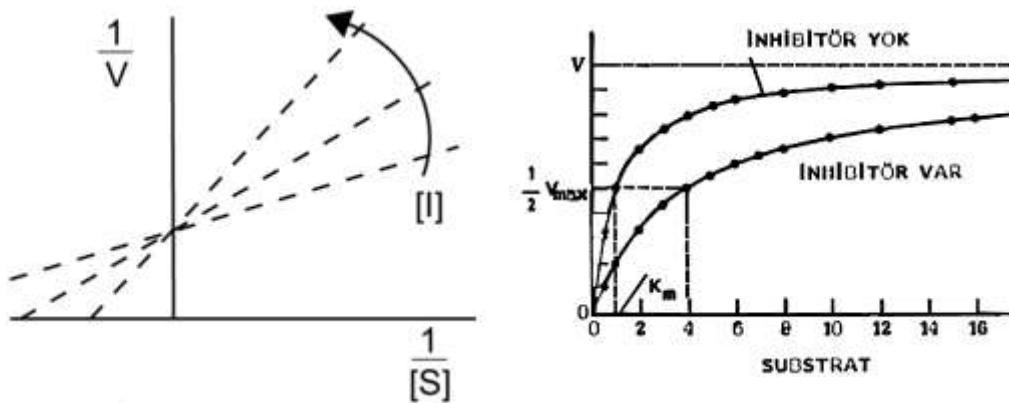


Şekil 2. 3. Yarışmalı enzim inhibisyonu

Süksinik aside (HOOC-CH₂-CH₂-COOH) yapıca çok benzeyen malonik asit (HOOC-CH₂-COOH), süksinat dehidrojenazın yarışmalı inhibitörüdür.

Yarışmalı enzim inhibisyonunda inhibitör enzime tersinir olarak bağlandığından yarışma, basit olarak daha fazla substrat ekleyerek substrat lehine çevrilebilir. Yeterli substrat varsa bir yarışmalı inhibitörün enzime bağlanma olasılığı çok azdır. Bu durumda reaksiyon az çok normal bir V_{max} değeri gösterir; fakat yarışmalı inhibitörün varlığında, yarı maksimal hızın gözleendiği noktadaki substrat konsantrasyonu olan K_m değeri artar.

K_m değeri üzerine belirgin etki ve V_{max} değeri üzerine etkinin az veya yok oluşu, yarışmalı enzim inhibisyonunun karakteristiğidir:



Lineweaver Burk grafiği

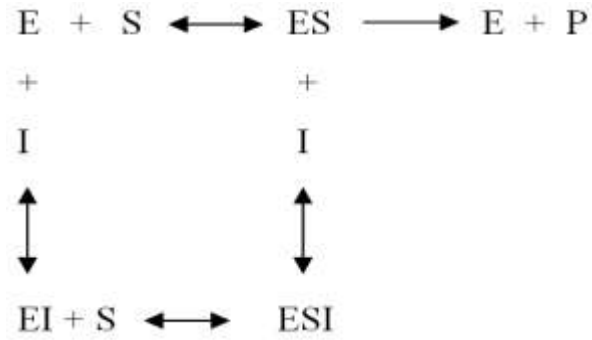
Michaelis Menten grafiği

Şekil 2. 4. Yarışmalı enzim inhibisyonu Lineweaver-Burk ve Michaelis-Menten Grafiği

[33]

Yarışmalı inhibitör, Lineweaver-Burk grafiğinin eğimini artırır. Yarışmalı inhibisyon, metanol için hastaları tedavi etmek için yararlı olarak kullanılır. Metanol, alkol dehidrojenaz enziminin etkisi vasıtasıyla formaldehite dönüştürülür; oluşan formaldehit, birçok dokuyu harap eder ki gözler özellikle duyarlı olduğundan sıklıkla körlüğe neden olur. Etanol, alkol dehidrojenaz için bir substrat olarak metanol ile etkili bir şekilde yarışır. Metanol ile zehirlenmede tedavi, etanolün hastaya intravenöz infüzyonudur. İntravenöz verilen etanol, formaldehit oluşumunu yeterince yavaşlatarak fazla metanolün zararsız bir şekilde idrarla atılımını sağlar [33].

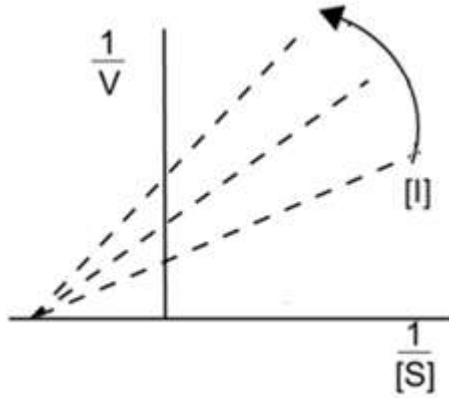
2) Yarışmasız enzim inhibisyonu: Yarışmalı olmayan enzim inhibisyonudur. Yarışmasız enzim inhibisyonunda, yarışmasız inhibitör, enzim üzerinde substratın bağlandığı aktif yerden ayrı bir yere tersinir olarak bağlanır; enzime yarışmasız inhibitörün bağlanması substrat bağlanmasını bloke etmez, substrat bağlanması da yarışmasız inhibitörün bağlanmasını bloke etmez. Yarışmasız inhibitör, kimyasal yapı yönünden substrata benzemez; serbest enzime veya ES kompleksi oluşuktan sonra enzimin substratın bağlı olduğu aktif yerden başka bir yerine tersinir bağlanarak enzimi inaktive eder.



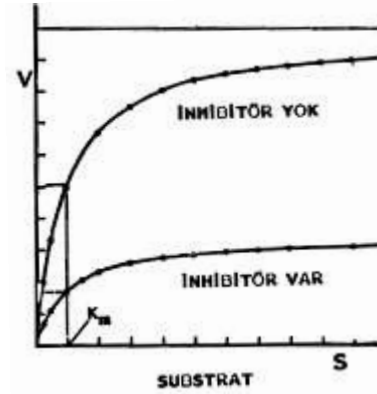
Şekil 2. 5. Yarışmasız enzim inhibisyonu

ESI kompleksi ürün vermek üzere ES kompleksinden daha yavaş parçalandığı için tepkimenin hızı yavaşlamaktadır. Bu tür inhibisyon ile tepkimenin V_{max} değeri azaldığı halde K_m değeri değişmez.

Yarışmasız inhibitör, aktif enzimin konsantrasyonunu ve dolayısıyla V_{max} değerini belirgin olarak azaltır; yarı maksimal hızın gözleendiği noktadaki substrat konsantrasyonu olan K_m değeri üzerine etkisi sıklıkla çok azdır veya yoktur.



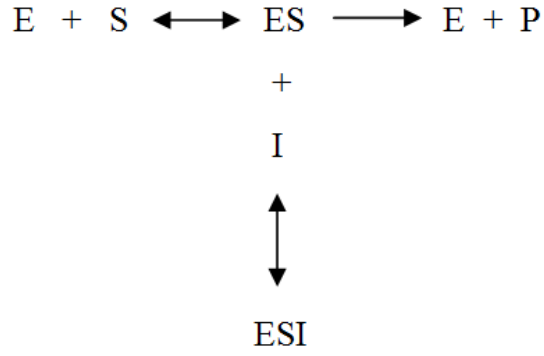
Lineweaver Burk grafiği



Michealis Menten grafiği

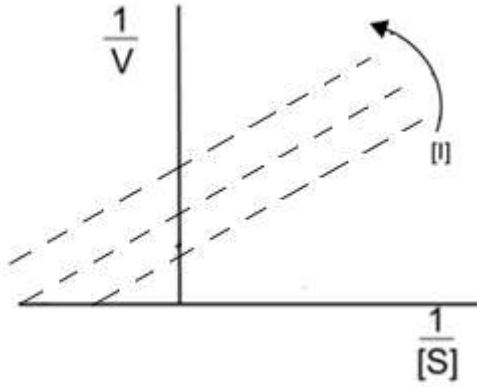
Şekil 2. 6. Yarışmasız enzim inhibisyonu Lineweaver-Burk ve Michaelis-Menten Grafiği [33]

3) Yarı-yarışmalı enzim inhibisyonu: Bir enzime bir yarı-yarışmalı inhibitörün bağlanması sonucu meydana gelen enzim inhibisyonudur. **Yarı-yarışmalı inhibitör**, yarışmasız inhibitör gibi, enzim üzerinde substratın bağlandığı aktif yerden ayrı bir yere tersinir olarak bağlanır; fakat yarışmasız inhibitör serbest enzime veya ES kompleksine bağlanabildiği halde yarı yarışmalı inhibitör, yalnızca ES kompleksi oluşuktan sonra enzimin substratın bağlı olduğu aktif yerden başka bir yerine tersinir bağlanarak enzimi inaktive eder.

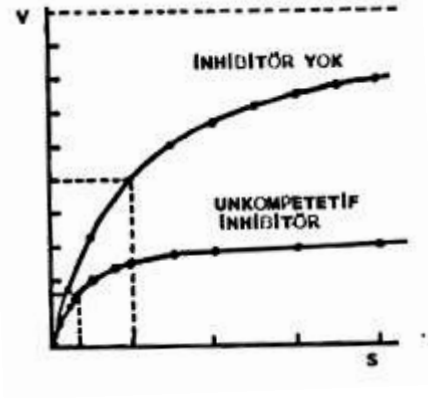


Şekil 2. 7. Yarıyarışmalı enzim inhibisyonu

Yarıyarışmalı inhibitör, ES konsantrasyonunu azaltır. Yarı yarışmalı inhibisyon sonucu hem V_{\max} hem K_m değeri değişmektedir; V_{\max} değeri azalırken K_m değeri küçülür [33].



Lineweaver Burk grafiği



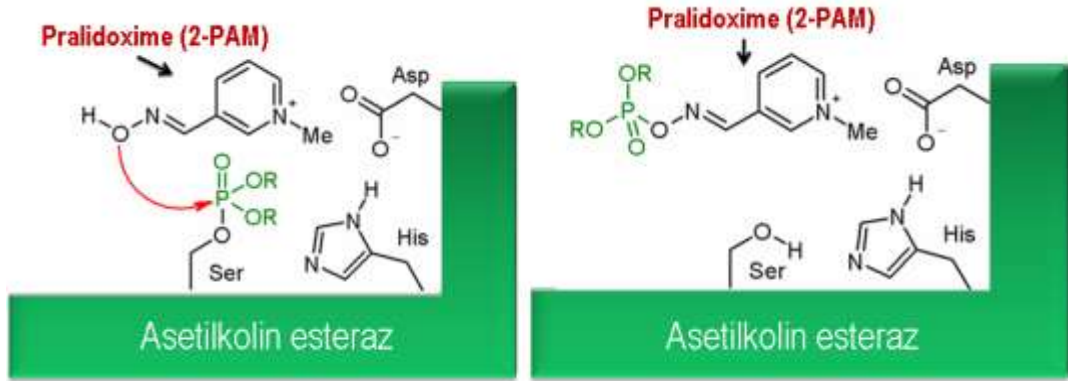
Michealis Menten grafiği

Şekil 2. 8. Yarıyarışmalı enzim inhibisyonu Lineweaver-Burk ve Michaelis-Menten Grafiği [33]

2.6.2. Enzim Rejenerasyonu (Renatürasyon)

Her protein tipinin sentez sırasında belirlenen belirli bir aminoasit bileşimi ve dizilimi vardır. Fakat biyolojik aktivite açısından önem taşıyan etkenler yalnız bunlar değildir. Polipeptit zincirleri arası bağlantılar ve uzaysal dizilimde önem taşımaktadır. Bu bilgilerin ışığı altında yapılan incelemeler göstermiştir ki proteinlerin denatürasyonu sonucunda oluşan aktivitesini yitirmiş moleküler geri dönüşümsüz (irreversibil) bir durumda değildirler. Uygun koşullar oluştuğunda bir renatürasyon olayının varolduğu saptanmıştır [34].

Daha önce pestisitlerle inhibe edilmiş asetilkolin esteraz enziminin rejenerasyonu için 2-PAM (2-aldoksim metiyodür) kullanılmış ve 2-PAM'ın inhibe olmuş enzimi rejenerasyonu ettiği bulunmuştur [35].



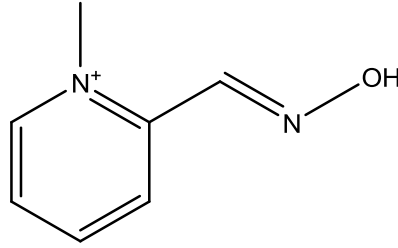
Şekil 2. 9. Organofosfatla inhibe olan AChE'nin Pralidoxime ile rejenerasyonu mekanizması

Tez çalışması kapsamında da pestisitlerle muamele edilmiş olan enzimlerin 2-PAM ile rejenerasyonu incelenecektir.

2.6.3. 2-PAM (2-aldoksim metiyodür)

OPlar ile zehirlenme sindirim, solunum ve ciltten emilim yoluyla gerçekleşir. Bu bileşikler kolinesteraz enzime bağlanarak asetikolinin parçalanmasını engeller ve asetilkolin birikimi ile asetilkolin reseptörlerinin aşırı stimülasyonuna neden olur. OP zehirlenmesinde antidot olarak kullanılan pralidoksim OP ve enzim arasındaki bağları kimyasal olarak kırarak etki gösterir [36].

2-PAM, genellikle klorür veya iyodür tuzu olarak bulunur. OP zehirlenmelerinde antidot olarak kullanılarak zehirlenme sonucu inaktive olan asetilkolin esteraz enzimini renatüre eder [37]. 2-PAM ile vücut savunma sistemi enzimlerinin inhibisyonunun rejenerasyonu ile ilgili çalışmaya rastlanmamıştır. İlk kez bu tez kapsamında çalışılmıştır.



Şekil 2. 10. 2-PAM

2.7. Pestisitler

Sorun yaratan böcekler, kemirgenler, mikroorganizmalar ve yabancı otların ölmesini ya da davranışlarını değiştirmesini sağlayan biyolojik olarak aktif kimyasallardır.

Son yıllarda tarımda kimyasal ilaç kullanımı artmıştır. Bunun sebebi, birim alandan daha fazla ve daha kaliteli ürün elde etme isteğidir. Tarımsal mücadelede kullanılan kimyasalların hepsine “Pestisit” denmektedir.



Şekil 2. 11. Ticari olarak satılan Pestisit örnekleri

Pestisitler, ekonomik bir şekilde üretilmeleri ve kullanım kolaylığı nedeniyle; ürünü zararlıların olumsuz etkilerinden koruyarak verim ve kaliteyi güvence altına almayı amaçlayan tarımsal mücadelede çok önemli bir yer tutmaktadırlar ve pestisitlerin kullanımıyla zararlılarla mücadelede daha kesin sonuçlar alınmaktadır. Ancak uygun pestisit doğru zamanda, doğru miktarda ve yeterli düzgünlükte atılmaması durumunda, bize faydadan çok zarar getirir. Yanlış olarak atılan pestisitler topraklarda, sularda ve tükettiğimiz ürünlerde birikerek insanların ve hayvanların hastalanmalarına, hatta ölmelerine yol açtığı gibi doğal hayatı yok ederek toprakları da çoraklaştırmaktadır.

Bugüne kadar 6000 kadar sentetik bileşik patent almasına karşın, bunlardan 600 kadarı ticari kullanım olanağı bulmuştur. Ülkemizde tarımı yapılan kültür bitkileri, sayıları 200'ü aşan hastalık ve zararlıların tehdidi altında olup yeterli savaşım yapılmadığı için toplam ürünün yaklaşık 1/3'ü kayba uğramaktadır. Bu kayıpların önlenmesi bakımından pestisitlerin daha uzun yıllar büyük bir kullanım potansiyeline sahip olacağı kuşkusuzdur [38].

2.7.1. Pestisitlerin Sınıflandırılması

Pestisitler çok değişik şekillerde sınıflandırılabilirler. Bu sınıflandırmalar Tablo 2.3'te gösterilmektedir [39];

Tablo 2. 3. Pestisitlerin sınıflandırılması

İlacın fiziki haline göre;		
- Katı formülasyonlar		- Sıvı formülasyonlar
İşlevlerine göre;		
- Yaprak dökücü		- Çekici
- Kurutucu		- Kaçırıcı
- Kısırlaştırıcı		- Büyüme yönlendirici
Zararlıının biyolojik dönemine göre;		
- Larvaları öldürenler (larvasitler)		- Yumurta ve Larvaları öldürenler (Ovalarvasitler)
- Yumurtaları öldürenler (ovisitler)		- Erginleri öldürenler
Bileşimindeki etkili madde grubuna göre;		
- Organofosfatlar		- Sentetik pyretroitler ve pyretrinler
- N-metil Karbamatlar		- Arsenikler
- Organoklorinler		
Yarı ömürlerine göre;		
- Dayanıksız (1-2 hafta)	- Orta dayanıklı (1-18 yıl)	- Dayanıklı (2-5 yıl)
Hedef aldığı organizmaya göre;		
- Böcek öldürenler (insektisitler)		- Kemiricileri öldürenler (rodentisitler)
- Fungusları öldürenler (fungusitler)		- Nematodları öldürenler (nematositler)
- Fungusların faaliyetini durduranlar (fungustatikler)		- Salyangozları öldürenler (molluskusitler)
- Yabancı otları öldürenler (herbisitler)		- Algleri öldürenler (algisitler)
- Örümcekleri öldürenler (akarisitler)		- Kuşları öldüren veya kaçırınlar (avenisitler)
- Bakterileri öldürenler (bakterisitler)		- Kaçırıcılar (repellentler)
- Yaprak bitlerini öldürenler (aphisitler)		- Çekiciler (attractantlar)

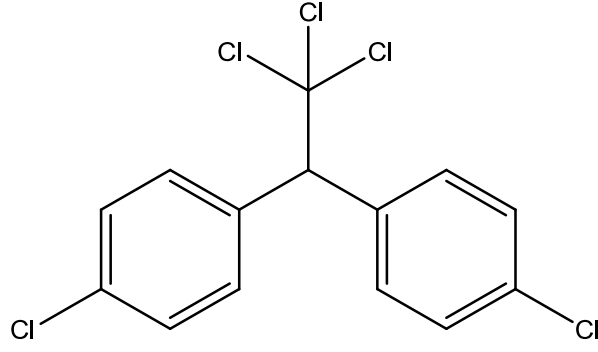
Pestisitlerin sınıflandırılması yaygın olarak hedef aldığı organizmaya göre yapılır. Bu sınıf arasından Dünyada ve Türkiye’de en yaygın kullanılanları sırasıyla İnsektisidler (böcek öldürücüler), Herbisidler (yabani ot öldürücüler), Fungusidler (fungus öldürücüler) ve Rodentisidlerdir (kemirgen öldürücüler). Pestisitlerin çoğu aromatik bileşiklerdir. Bunların kirletici potansiyelleri, yarılanma sürelerine ve zehir etkilerine bağlı olarak değişmektedir. Pestisitlerin topraktaki kalıcılığı “yarı ömür” tanımı ile belirlenir. Bir pestisit yarı-ömür, belirli bir miktarın (başlangıç düzeyinin yarısı) ortadan kalkması veya diğer bileşiklere ayrışabilmesi için gereken zaman aralığıdır. Ancak kimi durumlarda ayrışma ürünleri, özgün bileşik kadar veya ondan daha zararlı etkilere de sahip olabilmektedir. Yarı ömür verileri, pestisitlerin çevrede oluşturacağı tehlike potansiyelini kavramak açısından önemlidir [39].

Pestisitlerin organizmaya zararlı etkilerinin incelenebilmesi için de kimyasal yapılarının bilinmesi gerekmektedir ve bu nedenle kimyasal yapılarına göre sınıflandırılmaları daha da önem taşımaktadır.

2.7.1.1. Kimyasal Yapısına Göre Pestisitlerin Sınıflandırılması

2.7.1.1.1. Organoklorinler

Bilinen en eski sentetik insektisid grubudur. Organik klorlu (klorlu hidrokarbon) pestisitler grubunda klorlu etan türevleri, klorlu siklodienler, klorlu sikloheksan ve klorlu benzen bileşikleri yer almaktadır. Kimyasal stabiliteilerinin ve yağda çözünürlüklerinin yüksek, biyotransformasyon ve yıkılmalarının yavaş, uçuculuklarının az olması sebebiyle etkili insektisitlerdir ve yarı ömürleri 3 – 5 yıl arasındadır. En çok bilinen organoklorinler DDT (Diklorodifeniltrikloretan), Chlordane, Heptaklor, Endosülfan ve Toksafenindir.

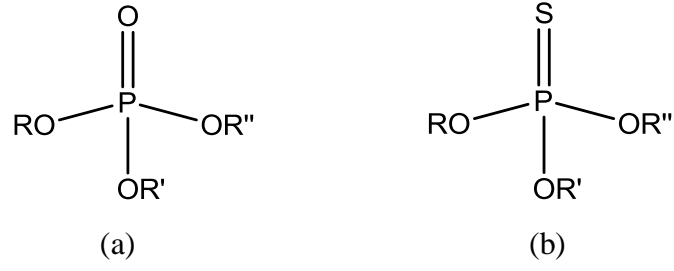


Şekil 2. 12. DDT'nin kimyasal yapısı

DDT başta olmak üzere bazı klorlu hidrokarbonlar, 1940-1960'lı yıllarda tarım ve sağlık programlarında uzun süreli kalıcılıkları ve diğer bileşiklere kıyasla daha az akut toksisiteye sahip olmaları nedeniyle yaygın olarak kullanılmışlardır. Ancak çevrede kalıcılıkları sonucu besin zincirine karışıp konsantre olmaktadır. Bunun sonucu olarak, 1960'lı yıllarda DDT'nin farelerde kanserojen olduğu bulunmuştur. Ünlü bir Biyolog olan Rachel Carson'ın "Silent Spring" adlı kitabında DDT'nin zararlarından bahsetmesinden sonra DDT kullanımı başta Amerika olmak üzere birçok ülkede yasaklanmıştır. 1985 yılında da Türkiye'de DDT başta olmak üzere Chlordane ve Heptaclor'un da kullanımı yasaklanmıştır [40].

2.7.1.1.2. Organofosfatlar

Organik fosforlu (OP) bileşiklerin çoğu insektisit az bir kısmı da fungusit, nematosit ya da bitki düzenleyicisi olarak kullanılmaktadır. Fosfor atomuna çifte bağ ile bağlı atomun oksijen ya da sülfür olmasına bağlı olarak sırasıyla 'fosfatlar' ya da 'tiyofosfatlar' diye adlandırılırlar.



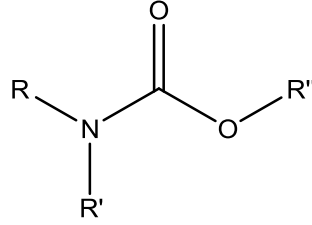
Şekil 2. 13. Organofosfatların (a) ve Tiyofosfatların (b) kimyasal yapısı

Pestisit zehirlenmelerinin çoğunu organik fosforlu bileşikler oluşturmaktadır. OP'lar toksik etkilerini asetilkolinin hidrolizinden sorumlu kolinesterazların inhibisyonu sonucu meydana getirirler. OP pestisitler doğrudan ya da 'okso' şekline metabolize olduktan sonra aktivite kazanarak asetilkolin esterazı inhibe ederler. Enzimin asetilkolin bağladığı aktif ester bölgesine OP'li bir bileşiğin bağlanmasıyla enzim fosforillenerek bloke olur. Kolinesterazların inhibisyonu, santral sinir sisteminde, düz kaslar gibi diğer dokuların sinaptik sinir uçlarında asetilkolin birikimiyle sonuçlanır. Kolinerjik sinirlerin aşırı uyarılmasıyla zehirlenme belirtileri ortaya çıkar. Chlorpyrifos, Diazinon, Malation ve Parathion en çok bilinen OPlardır.

OP'ların tümü hidroliz olarak suda çözünen bileşiklere dönüşürler. Çevrede kalıcılıkları organoklorinlere kıyasla çok azdır. Yarı ömürleri nötral pH'da birkaç saat (Ör: diklorvos) ile birkaç hafta (Ör: parathion) arasında değişir. OP'lardan diklorvos dışındakilerin uçuculuğu düşüktür buna rağmen buharlaşarak atmosfere karışabilirler ve sonradan yağmur sularıyla tekrar yeryüzüne dönebilirler. Havaya püskürtülerek uygulanmaları sırasında rüzgârla sürüklenebilirler ancak genellikle bu yolla dağılımları azdır. OP'lar başlıca ekim alanlarından sızarak veya aşımın toprakla birlikte sürüklenerek doğal sulara karışırlar. Suda çözünürlüğü 10 mg/L ya da daha fazla olan bileşikler ekim alanlarından sızarak doğal sulara karışırken suda çözünürlüğü 10 mg/L'den az olanlar toprağa adsorbe olarak taşınırlar. Toprakta ve sulu ortamda kalıcılıkları ve doğal sulara muhtemel dağılımları ışık şiddeti ve pH'dan etkilenebilir. OP'ların çoğu çevrede karşılaştıkları 3 - 6 pH aralığında daha dayanıklıdır [41].

2.7.1.1.3. Karbamatlar

İnsektisit ve nematosit olarak kullanılan karbamat esterlerinin R ve R' de alkil ya da aril grupları bulunur. R ve R' de aromatik ve/veya alifatik grup taşıyan karbamatlar herbisit ve sürgün inhibitörü olarak kullanılır. En çok bilinen karbamatlar Aldicarb, Carbaryl, Carbofuran'dır. Bu bileşikler böceklerde ve memelilerde asetilkolini geri dönüşlü inhibe ederler. Karbamat insektisitlerin yaptığı asetilkolinesteraz inhibisyonu kendiliğinden ve hızlı bir şekilde geri döndüğü için toksik etkileri OPlarınkinden az ve kısa sürelidir.



Şekil 2. 14. Karbamatların kimyasal yapısı

Fungusit olarak kullanılan karbamat bileşikleri de benzimidazol grubu taşırlar. Herbisit ve fungusit karbamat bileşikleri önemli derecede asetilkolin inhibisyonu yapmazlar. Karbamat grubu insektisitlerin buhar basınçları ve suda çözünürlükleri düşüktür.

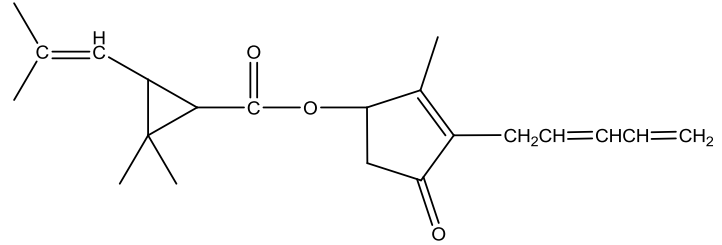
Karbamatların buhar basınçları düşüktür. Pekçok karbamat bileşiği oda sıcaklığında buharlaşıp toprak ve su yüzeyinden havaya dağılırlar. Çözünürlüğü yüksek olan karbamatların dağılımları için en önemli yol sulu ortamlardır. Endüstriyel atıklar, yanlışlıkla olan saçılmalar ya da boşaltmalar sonucu sulara karışabilir. Ancak sulu ortamda ışık absorplayarak çabuk parçalanırlar. Bu nedenle karbamat bileşikleriyle uzun süreli kontaminasyon meydana gelmez. Bileşiklerin parçalanmadan gerçekleşen teması ya da doğrudan uygulanması su canlılarında istenmeyen etkilere yol açabilir.

Karbamatlı insektisitler uygulandıkları bitkiler tarafından alınıp toprağa ulaşırken, karbamatlı nematosit ve herbisitler doğrudan toprağa uygulanırlar.

Karbamatların toprakta metabolik yıkılmasında ilk aşama hidrolizdir, biyodegradasyon uçuculuk, toprak tipi, nem, adsorpsiyon, pH, sıcaklık, ışıpta parçalanma, mikroorganizma varlığı ve aktivitesi gibi çeşitli faktörlerden etkilenir. Bitkilerin lifli yüzeyi karbamat absorpsiyonuna engel oluştururken kökler bileşiği daha fazla absorbe eder ve karbamat bitkinin tüm bölümlerine dağılır. Bitkiler karbamatları başlıca aril hidroksilasyon ve konjugasyon ya da hidroliz ile detoksifiye edebilirler [42].

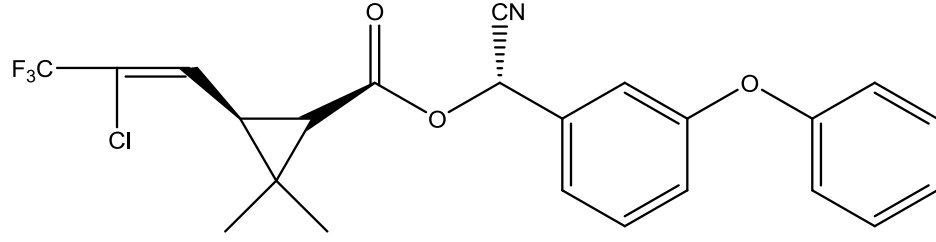
2.7.1.1.4. Pretrinler ve Sentetik Pretröitler

Pretrin'ler krizantem çiçeğinden elde edilen doğal insektisidlerdir. Işık ve su varlığında kolaylıkla parçalanırlar buda onların dışarıda kullanımlarını sınırlandırır. Bu nedenle pretrinlerin ışığa dayanıklı sentetik türevleri olan **piretroidler** türetilmiştir.



Şekil 2. 15. Krizantem çiçeği ve piretrinlerin kimyasal yapısı

Sentetik piretroidler yapıca piretrinlere benzeyen, ışığa karşı dayanıklılığını artırmak amacıyla, klor, brom ve siyanür grupları takılarak 1980 yılından itibaren ticari kullanıma sunulmuş bileşiklerdir.



Şekil 2. 16. Sentetik piretroidlerin kimyasal yapısı

Piretroidler memeliler için güvenli, böceklerde son derece toksik olmaları, çabuk parçalanmaları ve çevrede birikmemeleri nedeniyle güvenilir ve çok kullanılan insektisitlerdir. Tarım alanlarında, ev böcekleri ve sivrisineklerle mücadelede ve ağaç koruyucusu olarak, ayrıca insanlarda uyuz olgularının tedavisinde kullanılırlar. Piretrinler böceğin sinir sistemine kolayca girer ve uçmasını veya uzaklaşmasını engelleyerek etki eden temas zehirlerdir. Ancak bazı böceklerde enzimlerce hızlı detoksifiye edildiklerinden enzimin etkisini geciktirmek ve letal dozu sağlamak için formülasyonlara OPlar, karbamatlar gibi zehir etkisini artırıcı maddeler eklenmektedir. Piretrinler suda çözünmezler; alkol, kerozen, petrol eteri, karbon tetraklorür gibi organik çözücülerde çözünürlükleri fazladır [43].

2.8. Pestisitlerin Genel Etkileri

1960'lı yıllardan bu yana Dünya nüfusu iki katına çıkarken tarımsal alanların miktarı sabit kalmış bu da aynı miktar alandan daha fazla ürün elde edilmesi gerekliliğini doğurmuş buna bağlı olarak da tarımsal ürünlerde verimin artırılması, kayıpların azaltılması yönünde tarım zararlıları ile mücadele zorunlu hale gelmiştir. İnsanlık tarım zararlıları ile savaşarak besin üretimini artırma yolları aramış ve bu konuda pestisit adı verilen çeşitli kimyasal maddeler kullanmaya başlamıştır. Pestisitlerin yaygın kullanımı sonucu tarım ürünlerindeki kayıplar azaltılmış, bu yolla

üretim büyük oranda artırılmıştır. Pestisitlerin kullanılmaması durumunda salgın hastalıklar oluşabilir ve gıda üretiminde büyük kayıplar ortaya çıkabilirdi [44, 45].

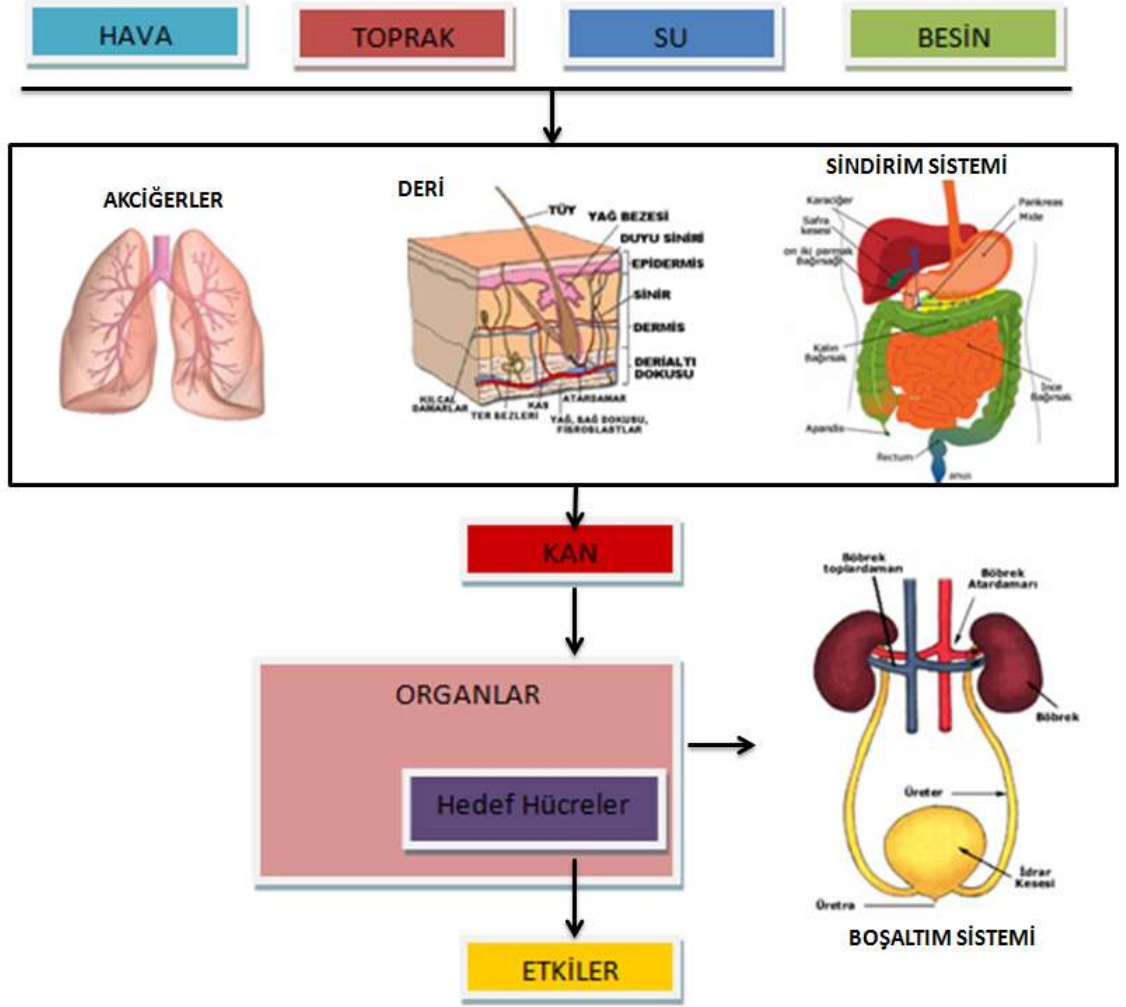
Pestisitler, bitki ve hayvanlardaki herhangi bir zararlının kontrolünde ya da önlenmesinde kullanılması tasarlanan bir madde ya da maddelerin karışımıdır. Binden fazla aktif maddenin karışımı ile elde edilen 35.000 civarında pestisit preparatı vardır [46, 47].

Günümüzde genel olarak kullanılan pestisitlerin yüzdeleri yaklaşık olarak; % 47'si herbisit, % 29'u insektisit, % 19'u fungusit ve % 5'i ise diğerleridir.

Pestisitler amaçlanan hedefleri dışında çevreye yayılarak, çevre kirliliğine ve doğal hayatın bozulmasına, içilen suda, yenilen meyve ve sebzelerde kalıntılar oluşturarak, insan sağlığına toksik yönde zararlı etkiler göstermektedir. Dünyada her yıl kayıt altına alınabilen 3 milyon akut pestisit zehirlenmesi ve 220.000 ölüm olmakta ve bu ölümlerin % 99'u az gelişmiş veya gelişmekte olan ülkelerde görülmektedir [44, 45].

Havadan çok düşük seviyelerde uygulanan pestisitler buradan sulara ve topraklara oradan da bitki ve hayvanlara geçerek besin zincirine ulaşabilmektedir. Sudaki büyük canlıların daha küçükleri yemesi ve kalıntı içeren maddeleri hayvanların yemesiyle bunlarda oluşan birikim, besin zincirinin son halkasında bulunan insanda kalıntı düzeyi çok daha yüksek ve yoğunlaşmış olarak ortaya çıkar. Doğada görülen bu kalıntının gıda zincirinde ve canlılarda giderek artması olayına biyokonsantrasyon denir [48].

Pestisitlerin insanlara zararlı etkileri iki şekilde olmaktadır. Birinci olarak, doğrudan pestisitlerin vücuda alınması ile oluşur. Bu şekilde zehirlenmelere akut zehirlenmeler denir. İkinci olarak, pestisit üretimde ve uygulama alanında çalışma ile veya çevreden gıdalardaki kalıntıların az oranlarda defalarca alımı ile ortaya çıkan kronik zehirlenmelerdir. Pestisitler vücuda alındığında enzimlerin etkisiyle metabolize edilerek dışarıya atılırlar. Ancak belirli bir kısmı da birikerek kronik zehirlenme oluşturur [47, 49]. Aşırı gübre ve tarım ilacı kullanımı nedeniyle tarım da majör kirletici sektörler arasına katılmıştır. Bu yolla sadece yüzey ve yeraltı suları kirlenmekle kalmamakta, aynı zamanda besinler de kirlilik taşıyıcısı olmaktadır. Kontaminasyon yolları Şekil 2.17'de gösterilmiştir.



Şekil 2. 17. Pestisitlerin bulaşma yolları

2.9. Pestisitler ile Oksidatif Stres

Gıdalardaki pestisit kalıntılarının uzun süre alınmasıyla uzun vadede akciğer hastalıkları, kanser, beyinde ve periferik sinir sisteminde harabiyet, karaciğer, kalp, endokrin, üreme sistemi ve böbrek hastalıkları oluşmaktadır. Bunların yanı sıra teratojenik, mutajenik, hematolojik, metabolik ve alerjik etkileri olan pestisitler de vardır. Pestisitlerin insanlarda yaptıkları bu etkilerin yanı sıra hayvanlar üzerinde de

olumsuz etkileri mevcuttur. Pestisitlerin kümes hayvanları ve kuşlarda yumurta kabuklarının incelmeye neden olduğu ayrıca doğada kuşların üreme ve çoğalmalarını engellediği bilinmektedir. Pestisitlerin bu olumsuz etkileri kimyasal yapı, uygulama ve kullanma sıklığı gibi faktörlere bağlıdır [50]. *In vivo* ve *in vitro* deneysel çalışmalar, akut, subakut, subkronik ve kronik OP uygulamalarının sonucu ortaya çıkan hepatotoksisite, nörotoksisite, genotoksisite, embriyotoksisite, immünotoksisite gibi etkenlerin patogeneğinde OP insektisitlerinin yol açtığı artmış reaktif oksijen türleri (ROS)'nin neden olduğu oksidatif doku hasarının rol oynadığını ortaya koymuştur. Bu çalışmalarda, karaciğer, beyin ve tiroit gibi çeşitli doku örneklerinde, serum ve eritrositlerde lipid peroksidasyonu (LPO)'nun bir göstergesi olan tiyobarbitürik asit reaktif substansları (TBARS) seviyelerinde artış ve enzimatik antioksidan savunma elemanlarından SOD, CAT, GSH-Px, G6PDH ve GSH-Rd aktivitelerindeki değişiklerin gösterilmesiyle OP inhibitörlerin toksisitesinde oksidatif hasarın rol oynayabileceği belirtilmiştir [51, 52, 53, 54].

Tarımda yaygın olarak kullanılan pestisitler, hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit ($O_2^- \bullet$) ve hidroksil ($\bullet OH$) radikali gibi reaktif oksijen türlerinin oluşumuna yol açarlar. Bu radikaller, biyolojik makromoleküllerle reaksiyona girebilirler, enzim inaktivasyonuna ve DNA hasarına neden olabilirler. Pestisitler, yağlı dokularda birikerek çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonuna neden olurlar. Bu oksidanlar, antioksidan savunma sistemi tarafından uzaklaştırılmazlarsa oksidatif strese neden olurlar. Oksidatif stres sonucu, DNA hasarı ve kanser oluşumları gibi patolojik durumlar gözlenir. Bazı çalışmalarda, pestisitlere maruz kalan işçilerde, akciğer kanseri, mesane kanseri ve lösemi riskinin önemli derecede arttığı gözlenmiştir. Bunun yanı sıra OPlar, Merkezi Sinir Sistemi'nde öğrenme ve hafıza fonksiyonlarını da içeren birçok nöropatolojik oluşumlara da yol açmaktadırlar. Çünkü bu kimyasalların hedefi, korteks ve hipokampüsteki sinirsel uyarılabilirliğin ana düzenleyicisi olan GABAerjik ve kolinerjik sistemlerdir [55]. OP'ların toksisitesi, asetilkolinesterazın inhibisyonundan dolayı asetilkolinin birikmesinden kaynaklanmaktadır. Asetilkolinin fazlalığı, kolinerjik reseptörler ile asetilkolinin etkileşimine bağlı olarak başlayan olayları olumsuz yönde etkiler [56]. Nörotoksisite birçok pestisitlerin ortak karakteristiğidir. OP'lar, asetilkolin esterazın aktivitesini inhibe ederek sinir sinapslarında asetilkolin birikmesine neden olur. Bu, merkezi ve periferel sinir

sisteminde nöral geçişin bozulmasına neden olur. Düşük dozda organofosforlu pestisitlere maruz kalmanın çeşitli biyokimyasal değişikliklere yol açtığı bilinmektedir. Bunların bazılarının olumsuz biyolojik etkilere neden olabileceği insanlar ve hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda belirtilmektedir. OP'ların biyolojik etkilerini, beyin ve diğer dokuların hücrel bileşenlerine özellikle elektrofilik saldırı yaparak gösterdiği öne sürülmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, *in vivo* sistemlerde olduğu kadar *in vitro* sistemlerde de birçok pestisitlerin reaktif oksijen türü üretme, DNA hasarı oluşturma ve sitotoksikite potansiyeli olduğunu göstermiştir. Pestisitler, membran bağlı enzimlerin ve reseptörlerin değişmesine, membran potansiyelini azaltarak membran bütünlüğünün bozulmasına yol açarlar. Bu tür olaylar özellikle lipid içeriği ve oksijen gereksinimi yüksek, nöral hücreleri yenilenemeyen beyinde dramatik sonuçlara neden olabilir [57, 58].

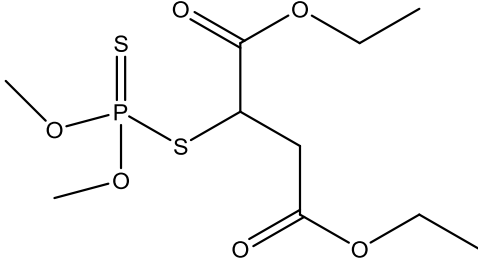
2.10. Çalışmada Kullanılan Pestisitlerin Genel Özellikleri

Bu çalışmada tarım ilaçları satan firmalarla yaptığımız görüşmeler ve literatür taramaları sonucu, antioksidan savunma sistemi enzimleri üzerine hangi pestisitlerin etkilerinin inceleneğine karar verildi. OP sınıfı pestisitlerin enzimleri inhibe ettiği literatür çalışmaları ile belirlenmiştir. Bu nedenle OP sınıfından birbirleri ile kıyaslayabilmemiz için iki pestisit Malation ve Diklorvos pestisitleri seçilmiştir. Organoklorinler ve karbamatlar da oldukça yüksek zehir etkiye sahiptir ancak son zamanlarda tarım ilaçları satan firmalarda satışları yasaklandığı için bu sınıf pestisitler tercih edilmemiştir. Sentetik piretroit sınıfı pestisitler daha az zehir etkili ve daha kısa yarı ömüre sahip oldukları için son zamanlarda yaygın kullanılan bir pestisit sınıfıdır. Bu nedenle çalışma kapsamında sentetik piretroitlerden Trakya Bölgesinde yaygın kullanıldıklarını tespit ettiğimiz Deltametrin ve Lambda cyhaloetrin tercih edilmiştir.

2.10.1. Malation

Kimyasal ismi: Di etil 2-dimetoksi fosforotioil sülfonil bütanedionat

Kimyasal yapısı:



Molekül ağırlığı: 330.358021 g/mol

Yoğunluğu: 1.23 g/cm³ (% 65'lik)

Ampirik formül: C₁₀H₁₉O₆PS₂

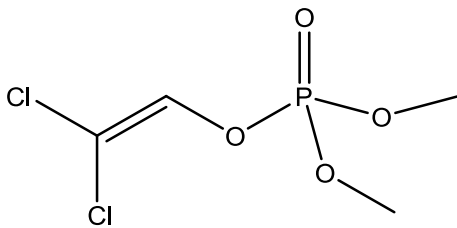
Pestisit sınıfı: Organofosfat

Malation, memeli hayvanlar ve insanlara yönelik toksisitesi en düşük OP türevlerden biri oluşu için, yaygın kullanım alanına sahiptir. Malation doğada birkaç günden birkaç aya kadar kalabilir. Gastrointestinal sistem, deri ve solunum yoluyla vücuda alınır ve karaciğer ile böbrekte yüksek yoğunlukta birikir. Başlıca karaciğerde estera hidrolizi ve konjugasyon ile metabolize edilir. Malation oksidatif ürünü ve etkin metaboliti olan maloksan'a dönüşür ve vücuttan çoğunlukla idrar, safra ve dışkı yolu ile atılır [59].

2.10.2. Diklorvos

Kimyasal ismi: 2,2 diklorovinil dimetil fosfat

Kimyasal yapısı:



Molekül ağırlığı: 220.98 g/mol

Yoğunluğu: 1.4205 g/cm³ (% 55'lik)

Ampirik formül: C₄H₇Cl₂O₄P

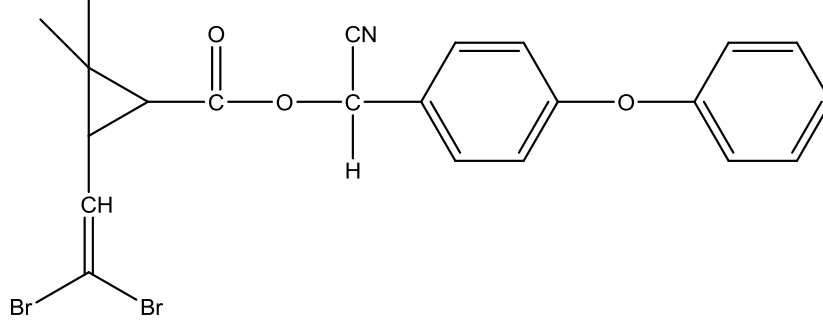
Pestisit sınıfı: Organofosfat

Tüm dünyada geniş şekilde kullanılan mide ve solunum sistemine etkili, OP insektisiti ve akarisitidir. Ticaretinin başladığı 1961 yılından beri pek çok ülkede geniş bir şekilde kullanılmaktadır. Çiftlik hayvanları ve ev hayvanlarının iç veya dış parazitlerinin kontrolünde, evlerin ve açık alanların böcek kontrolünde önemli yararlar sağlamaktadır. Diklorvos'un Türkiye'deki tüketimi, tüm insektisit tüketiminin % 8.8'ini oluşturmaktadır. Diklorvos birincil toksik etkisini, asetilkolinesteraz enzimini inhibe ederek gösterir. Diklorvos ile etkilenme sonrasında görülen rahatsızlıklar etkilenmenin çeşidine bağlı olarak farklı şekillerde ortaya çıkabilir. Hava ile diklorvos'a maruz kalındığında göz ve solunumda çeşitli rahatsızlıklar ortaya çıkabilir. Dermal absorpsiyon sonucunda etkilenmenin olduğu bölgede, ısınma ve absorpsiyon sonucu diklorvos'un yayıldığı bölgelerde istemsiz kas kasılmaları ortaya çıkar. Eğer yoğun bir şekilde etkilenme meydana gelmişse kaslarda zayıflama, kasılma, kas seğirmeleri ve belki de felç oluşabilir. Solunum ile ilgili kaslarda felç oluşumu, ölüme neden olabilir. Kalbin durmasını da içeren atım düzensizlikleri oluşabilir. Diklorvos çabuk buharlaşması nedeniyle deri, sindirim ve solunum yoluyla kolayca absorbe edilebilir. Bu pestisit karaciğer tarafından hızla inaktive edilerek desmetildiklorvos, dimetilfosfat ve dikloroasetaldehit metabolitlerine dönüştürülür. Diklorvos'un toksik etkilerine maruz kalan kişiler normal kişilere göre karaciğer hastalıklarına karşı daha az toleranslıdır. Pek çok araştırma OPlı pestisitlerin, organiklorlu pestisitler gibi karbohidrat metabolizmasını da etkilediğini ve hiperglisemiye neden olduğunu ileri sürmektedir [60].

2.10.3. Deltametrin

Kimyasal ismi: (s)-alfa-siyano-3-fenoksibenzil cis-(1R,2R)-3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilsiklopropankarboksilat

Kimyasal yapısı:



Molekül ağırlığı: 505.2 g/mol

Yoğunluğu: 1.5 g/cm³ (% 2.5'lik)

Ampirik formül: C₂₂H₁₉Br₂NO₃

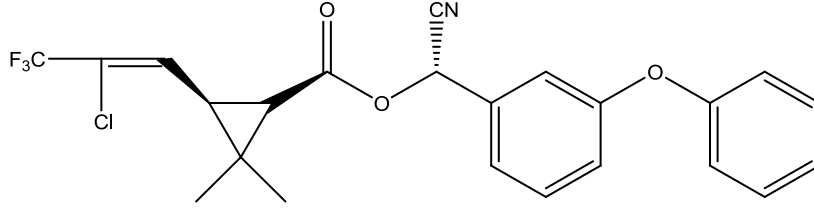
Pestisit sınıfı: Sentetik piretroit

Deltametrin, sineklerde öldürücü etkisi yüksek olan bir α -siyano piretroitdir. Piretroitler, yapısal olarak piretrumdan şekillenen farmakolojik olarak etkin, pestlere karşı ve tarım alanlarında yaygın olarak kullanılan sentetik bileşiklerdir [61, 62]. Deltametrin, sinekler, diğer antropotlar ve balıklar için son derece zehirlidir. Memelilerde ise metabolizması ve atılımı hızlı olduğu için zehirliliği oldukça düşüktür. Decis ve K-othrin ticari isimleriyle tanınır. Zehirli etkilerini gerek sineklerde, gerekse memelilerde öncelikle sinir sistemi üzerinde gösterir. Piretroit insektisitlerin, alerjik ve immünolojik etkileri de vardır [63, 64]. Piretroit zehirlenmeleri, hiper hassasiyet, aşırı salivasyon, koreoatetoz, titreme ve felç ile açığa çıkar fakat duyumsal sinirlerde hiçbir tekrarlayan sinir atışları görülmez. Zehirlenme belirtilerindeki bazı farklılıkların dışında, tüm piretroit tipleri için temel hedef sodyum kanalıdır. Tüm aktif piretroitler uyarılabilir doku içindeki sodyum kanallarıyla etkileşir ve zar depolarizasyonu ile sodyum akımını uzatır [64].

2.10.4. Lambda Cyhaloetrin

Kimyasal ismi: (S)- α -siyano-3-fenoksibenzil-(Z)-(1R,3R)-3-(2-kloro-3,3,3-trifloroprop-1-enil)-2,2-dimetilsiklopropan karboksilat ve (R)- α -siyano-3 fenoksibenzil (Z)-(1S,3S)-3-(2-kloro-3,3,3-trifloroprop-1-enil)-2,2-dimetilsiklopropan karboksilat'ın 1:1 karışımı

Kimyasal yapısı:



Molekül ağırlığı: 449.9 g/mol

Yoğunluğu: 1.33 g/cm³ (% 5'lik)

Ampirik formül: C₂₃H₁₉ClF₃NO₃

Pestisit sınıfı: Sentetik piretroit

Lambda cyhalothrin, cyhalothrin izomerlerinin bir karışımıdır. Yaygın olarak bilinen ticari isimleri "Karate", "Kung -Fu" ve "Matador"dur.

Lambda cyhalothrin dahil tüm piretroitler, bir organizmada sinir sisteminin işleyişini bozabilirler. Böceklerin sinir sistemi bozarak, felç veya ölümlerine neden olabilirler. Sıcaklık etkinliklerini etkiler. Birçok balık ve suda yaşayan omurgasız türler için son derece zehirlidirler. Ayrıca arılar için son derece zehirlidir. Bitki yüzeylerinde, lambda cyhalothrin'in yarıömrü 5 gündür. Lambda cyhalothrin, düşük su çözünürlüğü ve toprağa bağlanmak için yüksek potansiyeli nedeniyle yeraltı suyu kirliliğinde çok etken değildir [65].

2.11. Ölümcül Pestisit Dozları: LD50 ve MRL

Pestisitlerin karsinojenik olduğunun bulunmasından sonra 1960'lı yıllarda ünlü Biyolog Rachel Carson tarafından başlatılan bir çevre hareketiyle ilk olarak Amerika'da

pestisit yasaı çıkarılmıştır. Bu yasa ile birlikte kullanılan pestisit miktarlarının kontrol altında tutulması için EPA (Environmental Protection Agency), FAO (Food and Agriculture Organization) ve WHO (World Health Organization) olarak bilinen komiteler kurulmuştur. Bu kuruluşların yaptığı bilimsel araştırmalarla bütün dünyada pestisit kullanımının çok daha kontrollü yapıldığı, mevcut etkili maddelerin yeniden emniyetlilik testlerine alındığı ve bu değerlendirmeler sonunda bazı pestisitlerin çeşitli ülkelerde yasaklandığı, kısıtlandığı ya da kontrollü kullanıldığı bilinmektedir.

Son yıllarda canlı vücuduna alındığında ölümlere yol açabilecek pestisit miktarları ve pestisitlerin besin maddelerindeki kalıntılarının insanlar için kronik toksisitesi iki şekilde ele alınmaktadır:

- 1) **Letal Doz (LD50):** Belirli ağırlıktaki bir canlıya uygulandığında belirli bir süre içinde lme yol açan minimum miktardır. Deneklerin % 50'sinde ölüm meydana getiren dozdur. Birimi mg/kg (vücut ağırlığı) olarak belirtilmiştir.
- 2) **Maksimum kalıntı limitleri (Maximum Residue Limits-MRL):** Gıda maddelerinde bulunmasına izin verilen en fazla pestisit miktarını (ppm) ifade eden değerdir.

Codex Alimentarius ve EPA (Environmental Protection Agency) gibi kuruluşların bu değerleri içeren listeleri mevcuttur. Bu miktarlar tarımsal ürünlerin uluslararası pazarlaması bakımından da önemlidir. Zira tolerans miktarını aşan değerlerde pestisit kalıntısı tespit edilen tarımsal ürünler alıcı ülkeler tarafından geri çevrilmektedir [66].

2.12. Pestisit Tayin Yöntemleri

Ülkemizde pestisit kalıntılarıyla ilgili çalışmalar 1958 yılında Ankara Zirai Mücadele İlaç ve Aletleri Enstitü Kalıntı Analiz Laboratuvarı'nın kurulmasıyla başlamıştır. Ülkemizde yürütülen çalışmaların yaklaşık 30 tanesi pestisitlerin bekleme sürelerinin saptanmasına yönelik rutin analizlerdir. Genelde analizlerde kullanılan yöntemler yabancı kaynaklıdır ve metot geliştirme konusunda yapılmış oldukça az sayıda çalışma vardır.

Pestisit formülasyonlarının içerdiği etkili madde ve diğer maddeler ile bunların fiziksel ve kimyasal özellikleri, pestisitın zararlı üzerindeki biyolojik etkisini, ürün üzerindeki kalıcılığını, çevreye ve insan sağlığına etkisini belirler. Bu özellikler, Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı'nın laboratuvarlarında analiz yapılarak kontrol edilmekte ve uygun bulunanlara ruhsat verilmektedir.

Türkiye'de pestisit kalıntısı ile ilgili çalışmaları rutin pestisit kalıntı analizleri ile takip edilmektedir. Ülkemizde rutin kalıntı analizleri yapan laboratuvarlar Avrupa Birliğince tanınan TÜRKAK (Türk Akreditasyon Kurumu) tarafından ISO 17025 kalite sistemi ile akredite edilmektedir. Bu sistemde laboratuvarlara gelen örnek üzerinden prosedür başlamakta ve örneğin içeriğinden sorumlu olunmaktadır. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı'na bağlı 17 Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü'nde (Adana, Ankara, Antalya, Çanakkale, Denizli, Isparta, İstanbul, Mersin, İzmir, Kocaeli, Konya, Samsun, Trabzon, Hatay, Tekirdağ, Van) ve Tarım Bakanlığı'ndan çalışma izni alan 15 özel gıda kontrol laboratuvarında pestisit analizleri yapılabilmektedir.

GC ve MS; Çeşitli gıda maddelerinde, bitkilerde ve hayvansal ürünlerdeki az miktardaki pestisit kalıntılarının tespiti oldukça zor ve komplike bir işlemdir.

Genellikle gıdalardaki pestisit kalıntılarının tayini için GC, HPLC gibi cihazlar kullanılmaktadır. Pestisit analizlerinde bu cihazların kullanımı esnasında, çeşitli iç ve dış faktörlerin etkisiyle çok daha komplike yeni kimyasal maddelerin meydana gelmesi ve bu maddelerin kullanılan pestisitlerden daha fazla zehirli etkiye sahip olması, gerek analizlerin güçleşmesine ve gerekse insan sağlığı üzerine olumsuz etkiyi arttırmaktadır. Ayrıca bu yöntemlerin uzman gerektirmesi ve pahalı cihazlar olması son günlerde pestisit tayini için yeni tayin yöntemlerinin geliştirilmesi üzerine olan ilgiyi arttırmıştır.

Bir Uluslararası Atom Enerjisi Ajansı projesinde (IAEA-CRP/RC,TUR/9909), tahıllarda pestisit kalıntı analizlerinde GC ve HPLC'e alternatif olarak ince tabaka kromatografisinin (TLC) uygulanabilirliği araştırılmıştır. **TLC**'nin, basit bir teknik olduğu, maliyetinin ucuz olması nedeniyle gelişmiş tekniklere alternatif olabileceği ortaya çıkmıştır. Ancak bu yöntemde de optimum çalışma koşullarının sürekli olarak sağlanabilmesi ve adapte edilmiş olan kalıntı metodunun belirli aralıklarla validasyonunun yapılma zorunluluğu bu yöntemin de dezavantajlara sahip olduğunu göstermektedir.

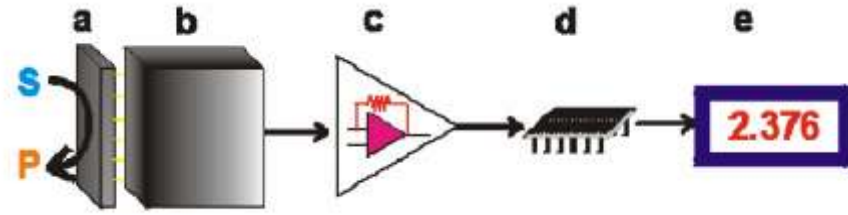
Son yıllarda pestisit tayini için araştırmaların çoğu yeni ve daha avantajlı tayin yöntemlerinin geliştirilmesi üzerinedir. Bu tayin yöntemlerinden birisi de biyosensörlerdir. Pestisitlerin (OP'lar, karbamatlar) asetilkolin esteraz (AChE) enzimini inhibe ettikleri bilinmektedir bu nedenle pestisit tayininde AChE enziminin inhibisyonu esaslı biyosensör çalışmalarını bulunmaktadır [67, 68].

2.13. Biyosensörler

Biyosensörler, tutuklanmış biyolojik aktif bileşenin, sinyal algılayıcı sistemi ve elektronik amplifikatörle direkt birleştirilmesi temeline dayanır. Algılayıcının esas görevi biyolojik aktif maddedeki değişikliği elektriksel sinyale dönüştürmektir [69]. Günümüzde biyosensörler, özellikle sağlık alanını başta olmak üzere; çevresel analizlerde, askeri sahada, gıda, farmasötik ve kimya endüstrilerinde kullanılmaktadır [70].

Biyosensörlerin gelişim aşamasına bakıldığında Clark ve Lyons 1956 yılında O₂ miktarını elektrotla izledikten sonra Updike and Hicks glukoz için işlevsel enzim elektrodunu geliştirmişlerdir [71].

Biyosensörler temel olarak; analiz edilecek maddenin biyosensör yüzeyindeki biyokomponentle etkileşime girmesi sonucu transduser yüzeyinde analit miktarıyla orantılı bir sinyalin oluşumu ve bu sinyalin ölçüm cihazına iletilmesi ilkesine dayanır. Biyosensörlerde biyokomponent olarak enzimler, mikroorganizmalar, bitkisel ve hayvansal dokular, reseptörler, antikorlar ve nükleik asitler kullanılabilir. Analiz edilecek moleküle uygun olarak bir biyokomponent ve analitin dönüşümü sonucunda oluşan elektrokimyasal, optik ya da gravimetrik sinyali elektriksel sinyale çeviren uygun bir transduser seçilmelidir. Transduser ve biyokomponent birbirine uygun fiziksel ya da kimyasal yöntemle bağlanabilir [72, 73]. Şekil 2.18'de bir biyosensör sisteminin birimleri şematik olarak gösterilmiştir.



- (a) **Biyoaktif tabaka:** Substratın ürüne dönüşüm reaksiyonu gerçekleşir
 (b) **Transduser:** Bu biyokimyasal reaksiyonu elektriksel bir sinyale dönüştürür
 (c) **Amplifikatör:** Transduserden çıkan sinyali artırır.
 (d) **İşlemci**
 (e) **Monitör:** Görüntüleyici

Şekil 2. 18. Biosensörün bileşenleri

2.13.1. Biosensörlerin Sınıflandırılması

2.13.1.1. İletim ve Ölçüm Sistemlerine Göre Biosensörlerin Sınıflandırılması

Biosensörler ölçüm prensiplerine ve transduser türüne göre aşağıdaki gibi sınıflandırılır:

- Elektrokimyasal esaslı biosensörler (Amperometri, Potansiyometri)
- Optik esaslı biosensörler (Fotometri, Fluorometri, Biyoluminesans)
- Piezoelektrik esaslı biosensörler (Kvartz kristal mikrobals, Mikrokantileverlar)
- Kalorimetri esaslı biosensörler (termistörler)

2.13.1.2. Biyobileşenin Türüne Göre Biosensörlerin Sınıflandırılması

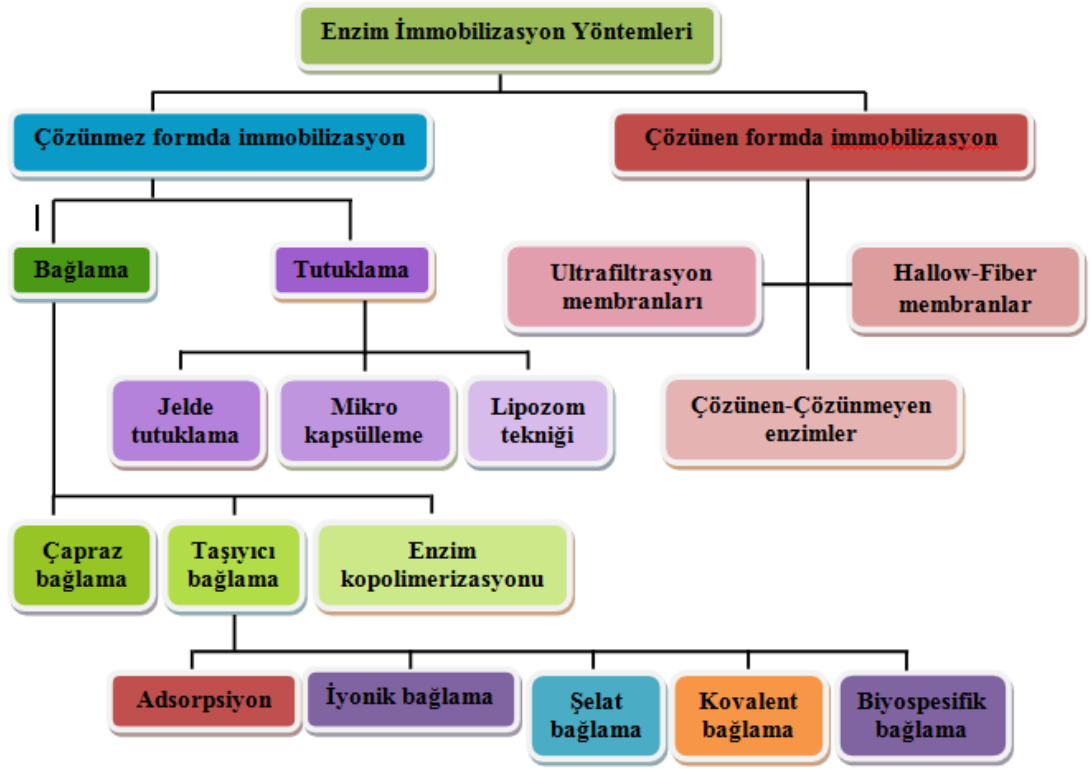
- Enzim temelli biosensörler
- Hücre temelli biosensörler
- DNA temelli biosensörler
- Antikor/Antijen temelli biosensörler (immünobiosensörler)

2.13.2. Biyosensörlerde İmmobilizasyon Yöntemleri

Enzimler suda çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel veya kimyasal olarak bağlanarak, suda çözünmeyen ürün veren ve kopolimerizasyona enzim molekülünün monomer olarak katılmasıyla ve suda çözünmeyen bir matris veya mikrokapsüllerde tutuklamalarla immobilize edilirler. İmmobilize enzimin serbest enzime üstünlükleri şunlardır:

- ✓ Çevre koşullarına (pH, sıcaklık v.b) karşı daha dayanıklıdır.
- ✓ Reaksiyon sonunda ortamdaki kolayca uzaklaştırılabilirler.
- ✓ Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir.
- ✓ Birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygundur.
- ✓ Birçok kez ve uzun süre kullanılabilir.
- ✓ Doğal enzime kıyasla daha karalıdır.
- ✓ Sürekli işlemlere uygulanabilir.
- ✓ Bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek aktivite gösterebilir.

Uygun biyobileşen ve fiziksel bileşen (transduser) seçildikten sonra bunların birbirine bağlanması en önemli sorundur. Bu bağlanma işlemi biyobileşen immobilizasyonu olarak adlandırılır. Bu amaçla çok değişik yöntemler kullanılabilir. Hangi yöntemin kullanılacağı seçilen biyobileşen ve fiziksel bileşene göre belirlenir. Biyobileşen ile fiziksel ölçüm sisteminin birleştirilmesi için immobilizasyon yöntemleri kullanılır. İmmobilizasyon, biyobileşenin kararlılığı ve tekrar kullanımı açısından büyük avantaj sağlar. İmmobilizasyon yöntemleri çeşitli şekillerde sınıflandırılmakla beraber Şekil 2.19'da verildiği gibi sınıflandırmak mümkündür [33].



Şekil 2. 19 Enzim immobilizasyon yöntemleri [33]

İmmobilizasyon için kullanılan temel yöntemler ise şunlardır:

- ✓ Adsorbsiyon
- ✓ Kovalent Bağlama
- ✓ Tutuklama
- ✓ Çapraz Bağlama

Adsorpsiyon;

Enzimin, film veya tabaka ile hidrofobik, hidrofilik ve/veya iyonik etkileşim sonucu assosiyasyonudur. Metot yalnızca kısa süreli araştırmalar için uygundur. Çünkü adsorbsiyon tersinir bir olaydır ve sorbsiyon gerçekleşebilir. Metot glutaraldehitin çapraz bağlanması ile kararlı kılınabilir ama bu bazı proteinleri denature edebilir.

Tutuklama;

Tutuklama, immobilizasyon için fiziksel bir metot veya enzimlerin küçük bir alanda fiziksel olarak muhafaza edilmesidir. Tutuklama metoduyla immobilizasyonda biyobileşen kafes görevi gören polimer matris veya membran içerisinde tutulmaktadır. Bu yöntem, enzimler yanında organeller, hücreler ve antikolar için de uygulanabilir. Yöntemin kullanılması durumunda çözeltilerdeki enzim aktivitesi hızlı bir şekilde düştüğünden fiziksel tutuklama yerine kimyasal bağlanma tercih edilir.

Çapraz Bağlama;

Tutuklama yöntemi ile kimyasal bağlanmanın bir kombinasyonudur. Metot, enzimle destek materyalinin büyük bir üç boyutlu yapı oluşturmak için birbirine katılmasını sağlar. Çapraz bağlamada, enzimlerin çözünmeyen agregatlar oluşturmaları için glutaraldehit, bis-diazobenzidin ve 2,2-disülfonik asit gibi bi-fonksiyonel çapraz bağlayıcılar kullanılabilir. Adsorbe enzimler çapraz bağlanabilir veya porlu destek materyalinin enzim solüsyonu ile doyurulmasının ardından çapraz bağlama yapılabilir.

Kovalent Bağlama;

Bu yöntem biyobileşenin suda çözünmeyen bir taşıyıcıya kovalent olarak bağlanmasına dayanmaktadır. Bağlanma, destek materyali üzerinde bulunan fonksiyonel gruplarla enzim yüzeyindeki aminoasit artıklarının sahip oldukları fonksiyonel gruplar arasında olur. Bağlanmada rol alan fonksiyonel gruplar; amino grubu (NH₂), karboksil grubu (CO₂H), sülfhidril grubu (SH), hidroksil grubu (OH), imidazol grubu, fenolik grup, tiyol grubu, treonin grubu ve indol grubudur.

Kovalent bağlanma yönteminde kullanılabilecek çok sayıda destek materyali vardır, hangi destek materyalinin kullanılacağı taşıyıcının avantaj ve dezavantajları dikkate alınarak seçilmektedir. Taşıyıcının seçimini birçok faktör etkilemektedir ve araştırmalar enzim aktivitesinin taşıyıcıda sürdürülebilmesi için taşıyıcının hidrofilik özelliğinin önemli olduğunu göstermektedir. Bu sebeple, çok hidrofilik olan polisakkarit polimerleri enzim immobilizasyonu için en çok tercih edilen destek materyalleridir. Örnek olarak, selüloz, dekstran, nişasta ve agaroz enzim immobilizasyonu için kullanılabilirler. Bu polimerlerdeki şeker artıkları, kovalent bağ oluşturmak için

kimyasal aktivasyon sağlayan hidroksil gruplarını içermektedir. Hidroksil grupları su molekülleri ile hidrojen bağı oluştururlar ve bu sayede taşıyıcı üzerinde hidrofilik bir çevre yaratırlar.

Enzim immobilizasyonunda kullanılan diğer popöler taşıyıcılar gözenekli silika ve camdır. Ancak bunların hidrofilik özelliği polisakkarit polimerlerinden daha düşüktür. Kovalent bağlanma ile immobilizasyonda çok fazla reaksiyon prosedürü bulunmaktadır. Bununla beraber çoğu reaksiyon aşağıdaki kategorilere dahil olmaktadır:

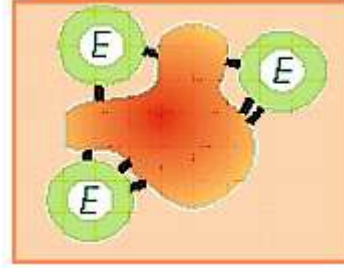
- 1- Diazo bağlanmasının oluşumu
- 2- Peptid bağının oluşumu
- 3- Alkilleme reaksiyonu

Metot seşiminde en önemli nokta, seçilen metotta bağlanmanın enzimin aktif merkezindeki aminoasitler üzerinden olmamasıdır. Uygun metodu seşerken üç ana unsur dikkate alınmalıdır:

- 1) Bağlanma enzim aktivitesinin düşmesine veya önemli ölçüde azalmasına neden olmayacak koşullarda gerçekteşmelidir.
- 2) Enzimin aktif merkezi kullanılan ayıraçlardan etkilenmemelidir.
- 3) Ticari olarak elde edilmesi kolay ve ucuz taşıyıcı kullanılmalıdır.

Enzimin destek materyaline kovalent bağlanması temelde iki adımı içermektedir. Birincisi, destek materyali üzerindeki fonksiyonel grubun spesifik bir ajan kullanımı ile aktive edilmesidir. İkincisi ise, enzimin destek materyali ile kovalent bağ oluşturması için bağlama reaksiyonuna ilave edilmesidir. Aktivasyon reaksiyonu, taşıyıcı üzerindeki fonksiyonel grupların oldukça elektrofilik hale gelmesini sağlar. Bağlama reaksiyonunda ise, bu gruplar enzim yüzeyindeki aminoasitlere ait amino grupları gibi güçlü nükleofilik özellik gösteren fonksiyonel gruplarla etkileşerek kovalent bağ oluştururlar [74].

Enzimin taşıyıcıya kovalent bağlanma yöntemi ile immobilize edilmesi şekilde görölmektedir (Şekil 2.20).



Şekil 2. 20 Kovalent Bağ Oluşumu [75]

Kovalent bağlama yönteminin en büyük avantajı, bağların çok kuvvetli olması nedeniyle her türlü ortamda kullanılabilmesidir. Enzim destek materyali üzerinde yer aldığından substrat ile teması kolaydır. Ayrıca enzim molekülü ve destek materyali birlikte genellikle ısı kararlılık gösterirler. Yöntemin dezavantajı ise, destek materyali ile enzim arasındaki sıkı etkileşimin enzimin doğal konformasyonunu bozmasıdır.

2.13.3. Biyotabaka Oluşturma Yöntemleri

Elektriği dağıtabilen veya iletebilen özel polimerler olan iletken polimerler biyotabakalarda polimerizasyon amacıyla kullanılmaktadırlar. İletken polimerleri sentezlemek için belli başlı dört metod kullanılmaktadır. Bunlar; elektrokimyasal polimerizasyon, kimyasal polimerizasyon, piroliz, katalitik polimerizasyon (Ziegler-Natta katalizörlü) teknikleridir. Bu polimerizasyon metotlarından sıkça kullanılanları elektrokimyasal polimerizasyon ve kimyasal polimerizasyondur. Bu çalışmada elektropolimerizasyon yöntemi kullanılmıştır.

2.13.3.1.1. Elektrokimyasal Yöntemle İletken Polimerlerin Üretilmesi

Elektrokimyasal olarak başlatılan polimerizasyonlarda iletken polimerler genellikle anot yüzeyinde yükseltgenme sonucunda büyümeye başlarlar. Çözelti içerisinde de belirli oranda polimer oluşabilir. Katot bölgesinde oluşan polimerizasyonlara daha ender rastlanır. Yükseltgenen monomer genellikle radikal

katyon oluşturur ve yeni monomer katılmasını takiben elektron aktarımları sonucunda yüzeyde artı yüklü polimer zincirleri oluşur [76].

Çözeltideki elektrolitin ClO_4^- , BF_4^- gibi anyonları da artı yüklü polimerde dopant olarak yer alır ve nötrleşmeyi sağlarlar. Yükseltgenmiş polimer iletken ve elektrolizle indirgenince nötrleşir ve anyonlar (dopant) çözeltiliye geçer indirgenmiş (nötr) polimer iletkenliğini kaybeder [77].

İletken polimerler çeşitli elektrokimyasal özelliklerinden dolayı çok değişik alanlarda kullanılabilir. Şarj olabilen piller, fotoelektrokimyasal hücreler, elektrokromik aletler ve iyon seçici elektrotların yapımında kullanılmaları yanında sensör olarak kullanım alanları bulunmaktadır.

Elektrokimyasal polimerizasyon, elektrot yüzeyinde gerçekleşen reaksiyonlarda oluşan ürünlerin başlattığı polimerizasyon olarak tanımlanmaktadır. Bu yöntemde elektrot zincir büyümesini katalitik olarak başlatır. Elektrokimyasal polimerizasyonda kullanılan başlatıcı, polimerizasyon ortamındaki monomerin veya elektroliz çözeltisinin yükseltgenmiş veya indirgenmiş şekli olabilir.

Elektrokimyasal polimerizasyonda monomer, uygun bir çözücü ve destek elektrolit ile birlikte elektroliz hücresine konularak elektroliz edildiğinde elektrot yüzeyinde veya çözeltide polimer oluşumu gerçekleşmektedir.

İlk elektrokimyasal yolla yapılan sentez Letheby tarafından anilin içeren seyreltik sülfürik asit çözeltisinde, anilinin anodik polimerizasyonu sonucu Pt elektrot üzerinde suda çözülmeyen polianilin polimerinin eldesidir.

Elektrokimyasal polimerizasyon yöntemi diğer polimerizasyon yöntemleri ile karşılaştırıldığında bazı avantajlara sahiptir:

- ✓ Reaksiyonlar oda sıcaklığında tamamlanabilmektedir.
- ✓ Potansiyel ya da akım zamanla değiştirilerek filmlerin kalınlığı kontrol edilebilmektedir. Bu sayede homojen filmler elde etmek mümkün olmaktadır.
- ✓ Polimerin dopingi istenilen iyon ile gerçekleştirilmektedir.
- ✓ Yöntemde, reaksiyonların başlama ve bitiş basamakları hassas bir şekilde kontrol edilebilmektedir. Buna bağlı olarak molar kütle dağılımı da kontrol altında tutabilmektedir.

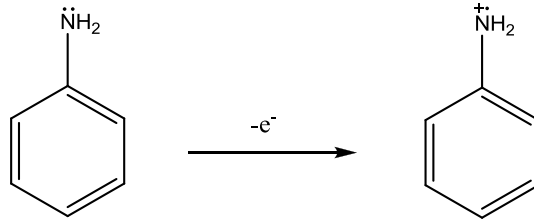
- ✓ Yöntem, seçici potansiyel kontrolü ile istenilen özellikli kopolimerlerin üretiminde önemli katkı sağlamaktadır.
- ✓ Polimerizasyon hızının incelenmesi sırasında hızlı olan elektrokimyasal yöntemlerin kullanılması avantaj sağlamaktadır.
- ✓ Kimyasal yöntemlerle aktivasyonu mümkün olmayan monomerler (ketonlar, aldehitler, tiyoketonlar vs.) elektrot potansiyeli ile kolayca aktifleştirilebilmektedirler.

En önemli iletken polimerler arasında yer alan polianilin diğer polimerlere göre hızlı ve kolay hazırlanabilmesi, neme ve yükseltgenmeye karşı kararlı oluşu gibi sahip olduğu avantajlardan dolayı kuru ve nemli pil yapımında kullanılabileceği önerilmiştir.

2.13.3.2. Anilin Elektrokimyasal Polimerleşme Mekanizması

Polimerleşme mekanizması :

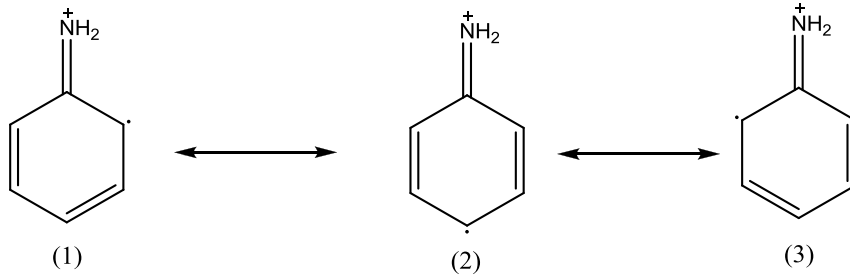
Sentez mekanizması adım adım ilerlediğinden bir polikondenzasyondur. pH değeri ne olursa olsun, en muhtemel birinci oksidasyon adımı, anilin azot atomunun 2s enerji seviyesinden bir elektron transferiyle radikal katyon oluşumunu kapsar (Şekil 2.21).



Şekil 2. 21 Anilin radikal katyonu oluşumu

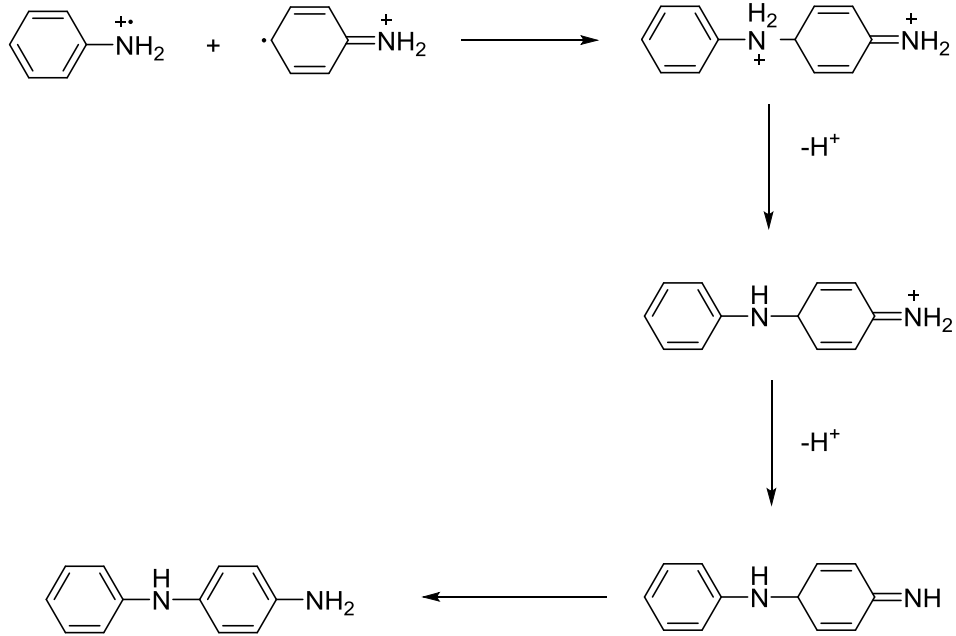
Kinetik olarak bakıldığında, bu adım sınırlayıcı adımdır ve bir katalizör tarafından hızlandırılabilir. Ardından reaksiyon kendiliğinden katalizlenir.

Bu anilin radikal katyonu üç rezonans formuna sahiptir (Şekil 2.22). Bu üç rezonans formunun arasında, form (2) bir taraftan önemli substitüent indüktif etkisi nedeniyle ve diğer taraftan sterik engel teşkil etmemesi sebebiyle en reaktif olanıdır.



Şekil 2. 22 Anilin radikal katyonunun rezonans formları

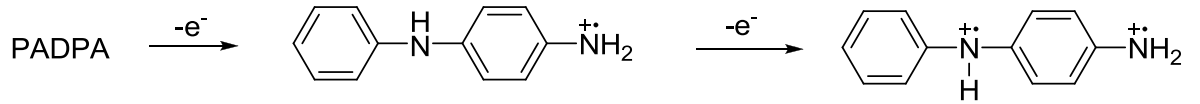
Sonraki adım (Şekil 2.23), radikal katyonu ve 2. rezonans formu arasında gerçekleşen , “baştan sona (head to tail)” reaksiyonu olarak bilinen ve asidik bir ortam isteyen dimer oluşumu reaksiyonudur.



Şekil 2. 23 Dimer oluşumu

Ardından, bu dimer, Şekil 2.24'te gösterildiği gibi, yeni bir radikal katyonu oluşturmak üzere oksitlenir. Oluşan radikal katyonu, ya radikal katyon monomeriyle ya da radikal katyon dimeriyle, yukarıda bahsedilen önerilen mekanizmaya göre, trimer veya tetramer oluşturmak üzere reaksiyon verebilir ve süreç polimerleşmeye kadar sürer.

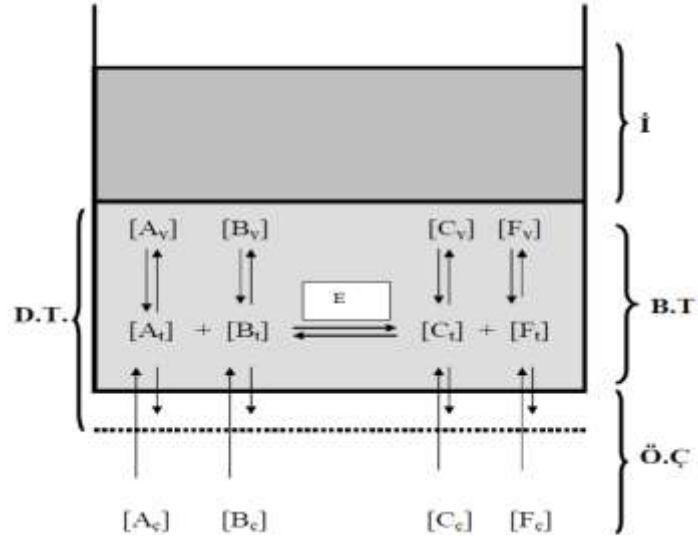
Uzunca zamandır, polianilin'in bir oktamer olduğu sanılmaktaydı. Fakat daha uzun bir zincirin oluştuğu, 10^4 g mol⁻¹ den daha da yüksek hesaplanmış olan ortalama moleküler ağırlığı sayesinde artık kanıtlanmıştır [79].



Şekil 2. 24 Radikal katyon dimerinin oluşumu

2.13.4. Elektrokimya Esaslı Biyosensörler

Enzim temelli biyosensörlerin pek çoğunda elektrokimyasal esaslı transduserler kullanılır. Bu transduserler ile amperometri ve/veya potansiyometri ilkelerine göre ölçümler alınabildiğinden genellikle oksidoredüktaz (elektron açığa çıkaran enzimler) sınıfı enzimler kullanılır [72]. Bir enzim biyosensörü şekil 2.25'te şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2. 25 Enzim biosensörünün genel çalışma ilkesi [70]

(A: Substrat, B: Kosubstrat veya Koenzim, C ve F: Ürünler, ç: Ölçüm çözeltisi içindeki, t: biyoaktif tabakadaki ve y: elektrot yüzeyindeki konsantrasyonlar. D.T: Difüzyon tabakası, Ö.Ç.: Ölçüm çözeltisi, B.T.: Biyoaktif tabaka, İ: İletici)

Şekilden de görüldüğü üzere A substratı elektrot yüzeyine immobilize olmuş enzim tarafından B koenziminin yardımıyla C ve F'ye dönüştürülür. Bu dönüşüm sonrasında elektrot yüzeyindeki madde konsantrasyonlarındaki farklanma iletici tarafından sinyal olarak yansıtılır.

2.13.4.1. Amperometrik Esaslı Enzim Biosensörleri

Amperometride, çalışma elektroduna stabil bir referans elektroduna karşı sabit potansiyel uygulanarak akım ölçülür. Bu iki elektrot arasında uygulanan potansiyel analizlenen bileşenin çalışma elektrodunda elektrokimyasal olarak indirgenmesine veya yükseltgenmesine neden olur. Çalışma ve referans elektrodu arasındaki akım çalışma elektrodunun stabilitesini azalttığından üçüncü bir karşılaştırma elektrodu kullanılmaktadır. Bu sistemde eğer reaksiyon difüzyon kontrollüysse, elde edilen

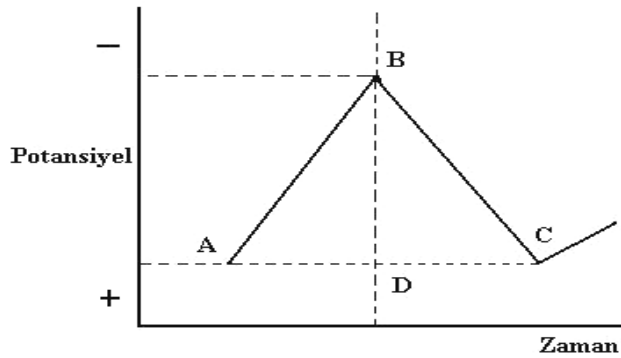
amperometrik akımlar doğrudan dedeksiyonu yapılan elektoraktif türün konsantrasyonunun bir fonksiyonudur [80].

İletici sistem olarak bir amperometrik sensörün kullanılması durumunda potansiyometrik sensörlerden en büyük fark, ürünlerden sinyal oluşturan türün elektrot yüzeyinde tüketilmesidir [70].

Örneğin; glukoz oksidaz tabanlı bir glukoz sensöründe, glukoz enzime bağlı durumda olan FAD'ı indirir. Sensörden elde edilen akım değeri, enzimi rejenere eden ve reaksiyonun tekrarını sağlayan prostetik grubun reokside olabilmesine bağlıdır. Sinyal sadece indirgenmiş enzim ve elektrod arasındaki elektron transferi gerçekleşirse elde edilir. Sonuç olarak biyosensörün performansı büyük oranda elektron transfer prosesinin kinetiğine bağlıdır [81].

2.13.4.2. Döngüsel Voltametri (Cyclic-Voltamery, Cv)

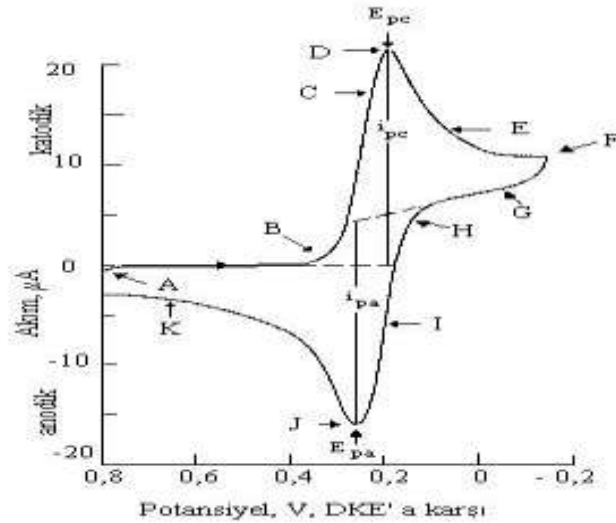
Döngüsel voltametri (CV), karıştırılmayan bir çözeltilde küçük durgun bir elektrodun akım cevabı Şekil 2.26'da görüldüğü gibi bir üçgen dalga şekilli potansiyel ile uyarılır [82].



Şekil 2. 26 İkizkenar üçgen dalgası şeklinde uygulanan potansiyel

Voltametri ve amperometri arasındaki fark, çalışma elektrodunda amperometrideki sabit potansiyel yerine, programlanmış zaman bağımlı bir potansiyel dalga formu olmasıdır. Çalışma elektrodu ve counter elektrot arasındaki farklı akımlar, çalışma elektroduna uygulanan farklı potansiyellerden dolayı oluşur. Bu programlanmış potansiyel dalga formu, önceden belirlenmiş olan düşük bir potansiyelden daha yüksek bir potansiyele tarama oluşturmak için kullanılır. Anodik tarama negatif veya küçük pozitif potansiyelden başlar ve daha yüksek pozitif değere doğru tarama yapar. Anodik tarama üst potansiyel sınıra ulaştığında bu sefer azalan potansiyel yönünde alt potansiyel sınıra dek farklı bir tarama yapılır. Bu aksi yöndeki tarama ise katodik taramadır [80].

Üçgen dalga uygulanan bir döngüsel voltammetriden elde edilen voltammogram Şekil 2.27'deki gibidir.



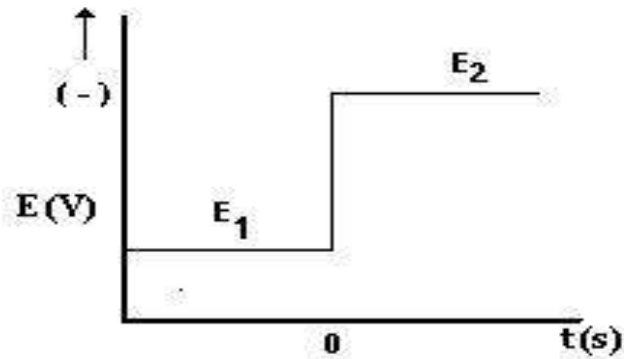
Şekil 2.27 Üçgen dalga potansiyel uygulandığında elde edilen voltammogram [82]

Bu eğri şöyle yorumlanır; gittikçe artan bir katodik gerilim uygulandığında eğrinin ABDF dalı elde edilir. İndirgenme sebebiyle bir katodik akım gözlenir (B noktası). B'den D'ye kadar ki bölgede indirgenebilen maddenin yüzey derişimi gittikçe küçülürken, akımda hızlı bir artış olur. Pik akımı iki bileşenden meydana gelir. Biri, analitin yüzey derişimini Nerst eşitliği ile verilen denge derişimine eşitlemek için

gerekli kapasitif akım artışıdır. İkincisi ise normal difüzyon kontrollü akımdır. Sonra ilk akım, difüzyon tabakası elektrot yüzeyinden uzaklaştıkça hızla azalır (D noktasından F noktasına). F’de uygulanan katodik gerilim azalmaya başlar. FH bölgesinde indirgenebilen maddenin indirgenmesi devam eder. Ancak indirgenmiş madde konsantrasyonu azalmış olduğundan akım da azdır. Potansiyel yeteri kadar pozitif olduğunda indirgenme daha fazla devam etmez, akım sıfıra gider ve sonra da anodik olur. Anodik akım, ileri yöndeki tarama sırasında yüzey yakınlarında biriken indirgenmiş maddenin yeniden yükseltgenmesi sonucu oluşur. Bu anodik akım pik yapar ve sonra biriken indirgenmiş maddenin anodik reaksiyon yoluyla kullanılmasıyla azalır [82].

2.13.4.3. Kromoamperometri (CA)

Kromoamperometride çalışma elektrodunun potansiyeli aniden değiştirilir ve durgun ortamda akım–zaman ilişkisi gözlenir. Kromoamperometride çözeltiye daldırılan çalışma elektroduna uygulanan potansiyel–zaman grafiği Şekil 2.28’de gösterildiği gibidir. Önce çalışma elektroduna herhangi bir indirgenmenin olmadığı E_1 potansiyeli uygulanır. Sonra potansiyel ani olarak E_2 ’ye değiştirilir. E_2 potansiyeli, indirgenme difüzyon kontrollü olacak şekilde seçilir.



Şekil 2. 28 Kromoamperometride elektroda uygulanan potansiyelin zamanla değişimi [82]

2.13.4.4. Potansiyometri

Potansiyometri bilindiği gibi en genel anlamda bir çalışma ve referans elektrot arasındaki potansiyel farkının ölçümünü esas alır. Elektrot potansiyelinin belirlenmesi doğrudan analit konsantrasyonunu tanımlar. Potansiyometrik biyosensörlerde kullanılan temel sensörler pH ya da tek değerlikli iyonlara duyar cam elektrotlar, anyon yada katyonlara duyar iyon seçimli elektrotlar ve karbondioksit ya da amonyağa yönelik gaz duyar elektrotlardır [83].

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Tez çalışmasında kullanılan enzimlerin tümü Sigma Aldrich'ten temin edilmiştir. Bu enzimler, Süperoksit Dismutaz (sığır eritrositlerinden, 300 KU, liyofilize toz, ≥ 3.000 units/mg protein), Katalaz (sığır karaciğerinden, liyofilize toz, ≥ 10.000 units/mg protein), Glutation peroksidaz (sığır eritrositlerinden, 300 KU, liyofilize toz, beyaz, ~ 100 units/mg), Glutation redüktaz (ekmek mayasından (*S. Cervisiae*), 2.5 KU, Amonyum sülfat süspansiyonunda, 100-300 units/mg protein (biuret))'dir.

GSH (≥ 98.0 %), t- bütül hidroperoksit, NADPH (≥ 95 %), Na_2CO_3 (≥ 99.0 %), 2-PAM (Piridin-2-aldoksim metiyodür), INT (iyodotetrazolyum klorür [2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolyum klorür]), Al_2O_3 (< 50 nm), Glutaraldehit (% 25), Anilin (% 99.5), Riboflavin Sigma-Aldrich'ten temin edildi.

KCl, K_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , Etanol (Absolute – % 99.9), HCl (% 37) Merck'ten temin edildi.

H_2O_2 (% 50) Tekkim'den temin edildi.

Deneylerde kullanılan pestisitler Malation®, Diklorvos®, Deltametrin®, Lambda Cyhaloetrin® tarım ilaçları satan firmalardan temin edildi.

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Deneylerde, ultrasonik su banyosu (Wise Clean DAIHAN, WUC-AO3H, Kore), mikroplate okuyucu (Thermo Scientific, Type 1510, Thermo fisher scientific Oy, Rotastie 2, FI-01620, Vantaa, Finland), hassas terazi (Precisa XB 220A, Precisa Gravimetrics AG/Switzerland), 8 kanallı dağıtıcı pipet (Eppendorff research plus, 10-100 µl), dağıtıcı pipet (Eppendorff multipette plus), mikropipetler (20µl, 200 µl, 1000 µl eppendorff mikropipet), sirkülasyonlu su banyosu (Nüve BM 302, Türkiye), manyetik karıştırıcı (Biosan magnetic stirrer MSH 300), Palm sens, pH metre (Jenco pH metre (6173 pH), made in China for USA), Spektrofotometre (Laxco Optizen Pop UV / Vis Single Beam Spectrophotometer 190 ~ 1100nm) kullanıldı.

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

0.05 M H₂O₂: 142.8 µl H₂O₂ 50 mM fosfat tamponu (pH: 7.5) ile 50 ml'ye tamamlanır.

50 mM fosfat tamponu (pH:7.5): 7.8004 g NaH₂PO₄ tartılır destile su ile 1000 ml'ye tamamlanır. 2.1772 g K₂HPO₄ tartılır destile su ile 250 ml'ye tamamlanır. Bu iki çözeltiden NaH₂PO₄'ten 803 ml, K₂HPO₄'ten 197 ml alınarak pH: 7.5 olacak şekilde karıştırılarak tampon hazırlandı.

Katalaz enzimi: 26.6 UN/ ml katalaz olacak şekilde 50 mM fosfat tamponu (pH:7.5) ile hazırlandı.

Süperoksit dismutaz enzimi: 379.75 UN/ ml SOD olacak şekilde 200 mM Tris tamponu (pH: 8.0) ile hazırlandı.

10⁻⁴ M INT: 0.0025 g INT 50 mM fosfat tamponu (pH: 7.5) ile 50 ml'ye tamamlanır.

0.05 M Na₂CO₃: 0.264 g Na₂CO₃ 50 mM fosfat tamponu (pH: 7.5) ile 50 ml'ye tamamlanır.

13 mM metiyonin: 0.04849 g methionine 50 mM fosfat tamponu (pH: 7.5) ile 25 ml'ye tamamlanır.

13µM riboflavin: 0.01 g riboflavin 50 mM fosfat tamponu (pH: 7.5) ile 250 ml'ye tamamlanır.

Glutation peroksidaz enzimi: 0.5 UN/ml GSH-Px olacak şekilde 200 mM Tris tamponu (pH: 8.0) ile hazırlandı.

200 mM Tris tamponu (pH:8.0): 0.1 M HCl çözeltisinden 27.9 ml ve Tris çözeltisinden (24.23 gTris/ 1L) 25 ml alınarak destile suyla 100 ml'ye tamamlanarak pH: 8.0 olana kadar karıştırılır.

0.1 M GSH: 0.7675 g GSH 200 mM Tris tamponu (pH: 8.0) ile 25 ml'ye tamamlandı.

7 mM t-bütil hidroperoksit: 32.7 µl t-bütil hidroperoksit 200 mM Tris tamponu (pH: 8.0) ile 25 ml'ye tamamlandı.

Glutation redüktaz enzimi: 10 UN/ml olacak şekilde 200 mM Tris tamponu (pH: 8.0) ile hazırlandı.

1.5 mM NADPH: 25 mg NADPH 200 mM Tris tamponu (pH: 8.0) ile 15 ml'ye tamamlandı.

1 mM 2-PAM: 0.05 g 2-PAM destile suyla 25 ml'ye tamamlandı.

Anilin: Firmadan satın alındığı şekilde kullanıldı.

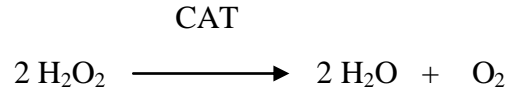
% 2.5'lik glutaraldehit: 5 µl % 25'lik glutaraldehit üzerine 45 µl 50 mM fosfat tamponu (pH: 7.5) ilave edilir.

3.2. Metodlar

3.2.1. Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

3.2.1.1. Katalaz Enzim Aktivitesinin Ölçümü

CAT enzimi H₂O₂'in yıkımını aşağıda gösterilen reaksiyondaki gibi katalize eder. H₂O₂'in CAT tarafından yıkım hızı H₂O₂'in 240 nm'de ışığı absorbe etmesinden yararlanılarak spektrofotometrik olarak izlenebilir [84]. Ancak bu dalga boyu değeri cihaza göre sapmalar gösterebildiğinden H₂O₂'nin maximum absorbans verdiği dalga boyunun hassas bir şekilde belirlenmesi için spektrofotometrede H₂O₂ için uygun dalga boyu taraması yapıldı ve kullandığımız cihazda maximum absorbans gösterdiği dalga boyu 209 nm olarak belirlendi ve deneyler 209 nm'de gerçekleştirildi.



CAT Aktivite Tayini:

CAT enzim çözeltisi, CAT enziminin 4 mg'ı toplam hacim 25 ml olacak şekilde 50 mM, pH 7.5 fosfat tamponu ile hazırlandı. Enzimin aktivite tayini için 2680 µl Fosfat tamponu (50 mM, pH 7.5) içeren tüplere enzim çözeltisinden (26.6 UN/ml) her defasında 50 µl ilave edildi. Tüplere fosfat tamponunda (50 mM, pH:7.5) hazırlanan 0.05 M H₂O₂ çözeltisinden 270 µl ilave edilerek toplam hacim 3 ml'ye tamamlandı. Kör hazırlanırken ise H₂O₂ çözeltisi ilave edilmeden sadece fosfat tamponu (50 mM, pH:7.5) ilave edildi. CAT enziminin H₂O₂'i yıkım reaksiyonunun süresi 3 dk olarak belirlendi. Köre ve numune küvetine yukarıda miktarları verilen kimyasallar eklendikten sonra 209 nm'de 3 dk boyunca köre karşı aktivite ölçüldü ve 3 dk sonunda H₂O₂'in yıkımından kaynaklanan absorbanstaki düşüş kaydedildi.

CAT aktivitesi 1 dk'da ortamdaki mg CAT başına düşen absorbans miktarı olarak tanımlandı.

CAT aktivitesi ölçümü Tablo 3.1’de verilen küvet içerikleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3. 1. Katalaz aktivite ölçümü için kullanılan maddelerin hacimleri

Küvet İçeriği	Numune (µl)	Kör (µl)
Fosfat tamponu	2680	2950
H ₂ O ₂	270	-
CAT	50	50

* CAT (26.6 UN/ml) (pH:7.5, 50 mM fosfat tamponunda), 0.05M H₂O₂, 209 nm

Hesaplama;

$$\text{CAT aktivitesi (U/ml)} = \frac{\Delta\text{OD} \times V_t}{0.0939 \times V_e}$$

ΔOD : Zamana göre absorbans değişimi

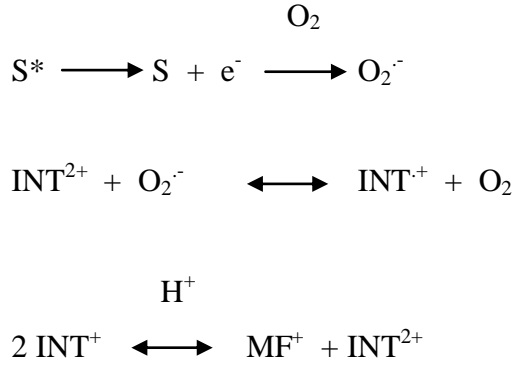
V_t : Toplam hacim

V_e : Enzim hacmi

0.0939 : H₂O₂’nin 209 nm’deki mM ekstinksiyon katsayısı

3.2.1.2. Süperoksit Dismutaz Enzim Aktivitesinin Ölçümü

SOD enzim aktivitesi tayini NitroBlue Tetrazolium/Riboflavin (NBT/RF) metodu esas alınarak yapıldı (Cakmak ve Marschner, 1992). Tez çalışması kapsamında SOD aktivite tayininde NBT yerine serbest radikal varlığında kırmızı renk veren INT (İyodonitrotetrazolyum klorür [2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-fenil tetrazlyum klorür) boyası kullanıldı. SOD aktivite ölçümünün esası, INT’nin ışık altında O₂⁻ tarafından indirgenmesi ve bu indirgenmenin 560 nm dalga boyunda ölçülmesi yöntemine dayandırıldı [85].



SOD aktivitesi tayini için; 379.75 UN/ml SOD 50 mM, pH 7.5 fosfat tamponunda hazırlandı. Hazırlanan SOD enzim çözeltisinin aktivite tayini için her defasında tüplere 50 µl Fosfat tamponu (50 mM, pH 7.5), 50 µl 0.05 M Na₂CO₃, 50 µl 13 mM Methionin, 50 µl 10⁻⁴ M INT boyası, 50 µl 13 µM Riboflavin ilave edildi. INT'nin O₂⁻ tarafından indirgenmesi örneklerin 24 °C ve 209 nm UV ışık (400 µmol m⁻² s⁻¹ ışık intensitesi) altında 15 dk tutulması ile gerçekleştirildi. Kör tüpüne Riboflavin ilave edilmedi, riboflavin yerine fosfat tamponu (50 mM, pH 7.5) ilave edildi. Kör tüpüne ve numune küvetine aşağıda Tablo 3.2'de miktarları verilen kimyasallar eklendikten sonra her bir tüpe 50 µl SOD enzim çözeltisinden ilave edilerek 560 nm'de 7 dk boyunca köre karşı absorbans ölçüldü. Bir SOD aktivitesi ünitesi, 560 nm'de ölçülen INT'nin indirgenme oranının % 50'sinin engellenebilmesi için gereken enzim miktarı olarak ifade edildi.

Tablo 3. 2. SOD aktivite ölçümü için kullanılan maddelerin hacimleri

Küvet içeriği	Numune (µl)	Kör (µl)
Tampon	50	100
Na ₂ CO ₃	50	50
Methionin	50	50
INT	50	50
Riboflavin	50	-

UV ışık altında (209 nm dalga boyunda) 15 dk bekletildi.

SOD	50	50
-----	----	----

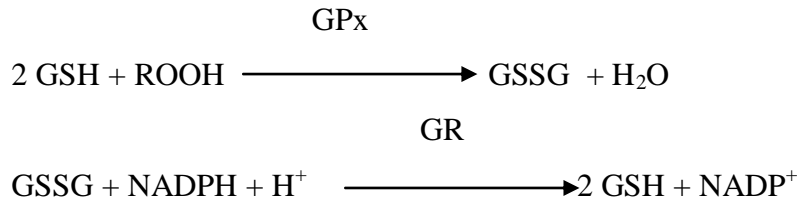
*Fosfat tamponu (50 mM pH:7.5), 10⁻⁴ M INT, 13 mM Methionine, 13 µM Riboflavin, 0.05 M Na₂CO₃, 379.75 UN/ml SOD

Hesaplama;

$$\text{SOD aktivitesi (U/ml)} = \frac{\text{Kör OD} - \text{Numune OD}}{\text{Kör OD}} \times 379.75 \text{ UN/ml SOD}$$

3.2.1.3. Glutasyon Peroksidaz Enzim Aktivitesinin Ölçümü

Redükte glutation (GSH)'un okside glutation (GSSG)'a oksidasyonu GSH-Px ile t-bütül hidroperoksit varlığında gerçekleşir. Yöntem, bu oksidasyon sonucu oluşan GSSG'nin GSH-Rd enzimi ile tekrar GSH'ye indirgenmesi tepkimesinde NADP⁺'ye oksitlenen NADPH'nin 340 nm dalga boyundaki absorban değeri farkının zamana karşı okunması prensibine dayanır [86, 87].



GSH-Px enzim aktivitesi ölçümü için 0.5 UN/ml GSH-Px enzimi, 200 mM pH 8.0 Tris Tamponunda hazırlandı. Hazırlanan GSH-Px enzim çözeltisinin aktivite tayini için her defasında tüplere 1980 µl Distile su, 300 µl Tris tamponu (200 mM, pH 8.0), 60 µl 0.1M GSH, 30 µl 7 mM t-bütül hidroperoksit, 30 µl GSH-Px (0.5 UN/ml), 300 µl GSH-Rd (10 UN/ml) ve 300 µl 1.5 mM NADPH ilave edildi.

Kör'e NADPH ilave edilmedi, NADPH yerine distile su ilave edildi. Köre ve numune küvetine yukarıda miktarları verilen kimyasallar eklendikten sonra 340 nm'de 5 dk boyunca köre karşı aktivite ölçüldü ve 5 dk sonunda absorbanstaki düşüş kaydedildi.

GSH-Px aktivitesi ölçümü Tablo 3.3'de verilen küvet içerikleri kullanılarak gerçekleştirildi.

Tablo 3. 3. Glutasyon Peroksidaz aktivite ölçümü için kullanılan maddelerin hacimleri

Küvet İçeriği	Numune (µl)	Kör (µl)
Distile su	1980	2280
Tris Tamponu	300	300
GSH	60	60
t-bütil hidroperoksit	30	30
GPx	30	30
GR	300	300
37 °C'de 15 dk inkübasyon		
NADPH	300	-

* Tris tamponu (pH:8.0; 200 mM), GSH-Rd (10 UN/ml), GSH-Px (0.5 UN/ml), GSH (0.1 M), t-bütil hidroperoksit (7mM), NADPH (1.5mM), 340 nm

Hesaplama;

$$\text{GSH-Px Aktivitesi (U/L): } \frac{\Delta\text{OD} \times \text{Vt}}{t \times 6.22 \times \text{Ve}}$$

ΔOD : Zamana göre absorbans değişimi

t : Zaman

Vt : Toplam hacim

Ve : Enzim hacmi

6.22×10^{-3} : NADPH için 340 nm deki ekstinksiyon katsayısı

3.2.2. Antioksidan Enzim Aktivitelerine Pestisitlerin Etkisinin İncelenmesi

Antioksidan savunma sistemi enzimlerinin aktivitesi üzerine pestisitlerin etkisinin incelenmesinde aktivite tayini için hazırlanan CAT (26.6 UN/ml (50 mM pH: 7.5 fosfat tamponunda), SOD (379.75 UN/ml (50 mM pH: 7.5 fosfat tamponunda), GSH-Px (0.5 UN/ml, 200 mM pH 8.0 Tris Tamponunda) enzim çözeltilerinin 250 µl'si içine Malation, Diklorvos, Deltametrin ve Lambda Cyhaloetrin'in Tablo 3.4'te belirtilen farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerinin her seferinde eşit hacimleri (50 µl) eklenerek 30 dk boyunca +4 °C'de bekletildi.

Bu şekilde pestisitlerle muamele edilmiş enzimlerin aktivite tayinlerinin ölçümü için Antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesi bölümünde belirtildiği üzere her enzimin aktivite tayini için hazırlanan tüplere aktivitesi ölçülecek enzim çözeltilerinden

CAT ve SOD aktivite tayini için her defasında 50 µL, GSH-Px aktivite tayini için 30 µl eklenerek aktivite ölçümleri yapıldı. Böylece pestisitlerin inhibisyon etkileri ve pestisit konsantrasyonuna göre inhibisyon dereceleri incelendi.

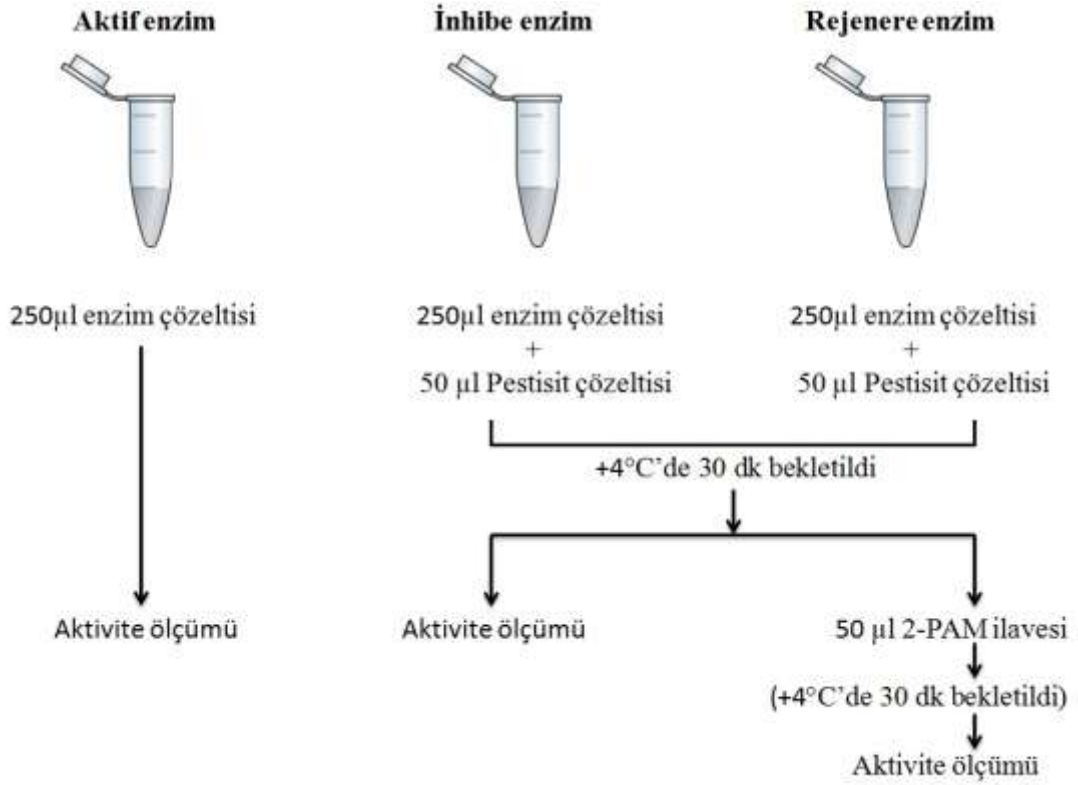
Tablo 3. 4. Antioksidan savunma sistemi enzimlerinin aktivitesi üzerine etkilerinin incelendiği pestisitler ve kullanılan derişimleri

Organofosfat sınıfı Pestisitler	Pestisit kons. (mM)	Sentetik Pyretröit sınıfı Pestisitler	Pestisit kons. (mM)
Malation	0.049	Deltametrin	0.002
	0.098		0.004
	0.196		0.008
	0.393		0.021
Diklorvos	0.098	Lambda Cyhalothrin	0.25
	0.196		0.49
	0.393		1.24
	0.980		2.47

3.2.3. PME Enzimlerin 2-PAM İle Rejenerasyonları

İnhibisyon çalışmaları için antioksidan savunma sistemi enzimlerinin (CAT, SOD, GSH-Px) 250 µl'si içine 50 µl uygun konsantrasyonlardaki pestisitler eklendi ve 30dk boyunca +4 °C'de bekletildikten sonra içerisine 50 µl 1 mM 2-PAM ilave edildi ve rejenerasyon için +4 °C'de 30 dk bekletildi.

Her enzimin aktivite tayini için hazırlanan tüplere aktivitesi ölçülecek enzim çözeltisinden CAT ve SOD aktivite tayini için her defasında 50 µL, GSH-Px aktivite tayini için 30 µl eklenerek aktivite ölçümleri yapıldı. Aynı işlem 10 mM 2-PAM ile de gerçekleştirildi. Böylece pestisitlerin inhibisyon etkileri üzerine 2-PAM'ın farklı konsantrasyonlarının rejenerasyon etkisi ve pestisit konsantrasyonuna göre rejenerasyon dereceleri incelendi.



Şekil 3. 1. Enzimlerin İnhibisyon ve rejenerasyon işleminin şematik gösterimi

3.2.4. Pestisit Tayini İçin Biyosensör Hazırlanmasında Uygun Enzimin Belirlenmesi

Çalışmada buraya kadar; Canlı Antioksidan savunma sistemi enzimleri CAT, SOD ve GSH-Px enzim aktiviteleri üzerine Malation, Diklorvos, Deltametrin ve Lambda Cyhaloetrin pestisitlerinin inhibisyon etkileri tayin edildi. İnhibisyon etkilerinin 2-PAM'ın farklı konsantrasyonları ile rejenere edilebilirliği incelendi. Elde edilen sonuçlara göre; çalışılan enzimlerin aktiviteleri pestisitlerin artan konsantrasyonlarıyla doğru orantılı olarak inhibisyon gösterdi. Bu inhibisyonların rejenere olarak kullanılan 2-PAM'ın farklı konsantrasyonlarıyla rejenerasyonları incelendi. Elde edilen sonuçlara göre; 2-PAM ile rejenere olabilen en uygun enzimin CAT olduğu belirlendi. Bu nedenle pestisitlerin tayini amacıyla, CAT'ın pestisitlerle inhibisyonunu esas alan bir biyosensörün bu pestisitlerin tayini için kullanılabilirliğinin incelenmesine geçildi.

3.2.4.1. Katalaz Biyosensörünün Hazırlanması

Pt elektrot fiziksel, kimyasal ve elektrokimyasal olarak temizlenir. Temizlik aşamaları aşağıda belirtildiği gibidir:

I. Bir miktar Gamma alümina tozu kadife yüzey (elektrot yüzeyinin çizilmemesi için) üzerine alınır. Alümina üzerine birkaç damla bidistile su damlatılarak, temiz bir spatül ucuyla alümina pelte kıvamına gelene kadar karıştırılır. Daha sonra Pt elektrot pelte kıvamına getirilmiş alümina üzerinde yavaş bir şekilde aynı yönde olacak şekilde gezdirilir.

II. Pt elektrot bidistile suyla durulandıktan sonra adsorblanmış partiküllerin uzaklaştırılması için 10 dk etanol (% 96) içerisinde sonikatörde bekletilir.

III. Pt elektrodun yüzeyinin elektrokimyasal olarak temizlenmesi için 15 ml 0.1 N HCl çözeltisi içerisinde +0.9V ve -0.2V potansiyelleri arasında 10 tane döngüsel voltammogram alınır.

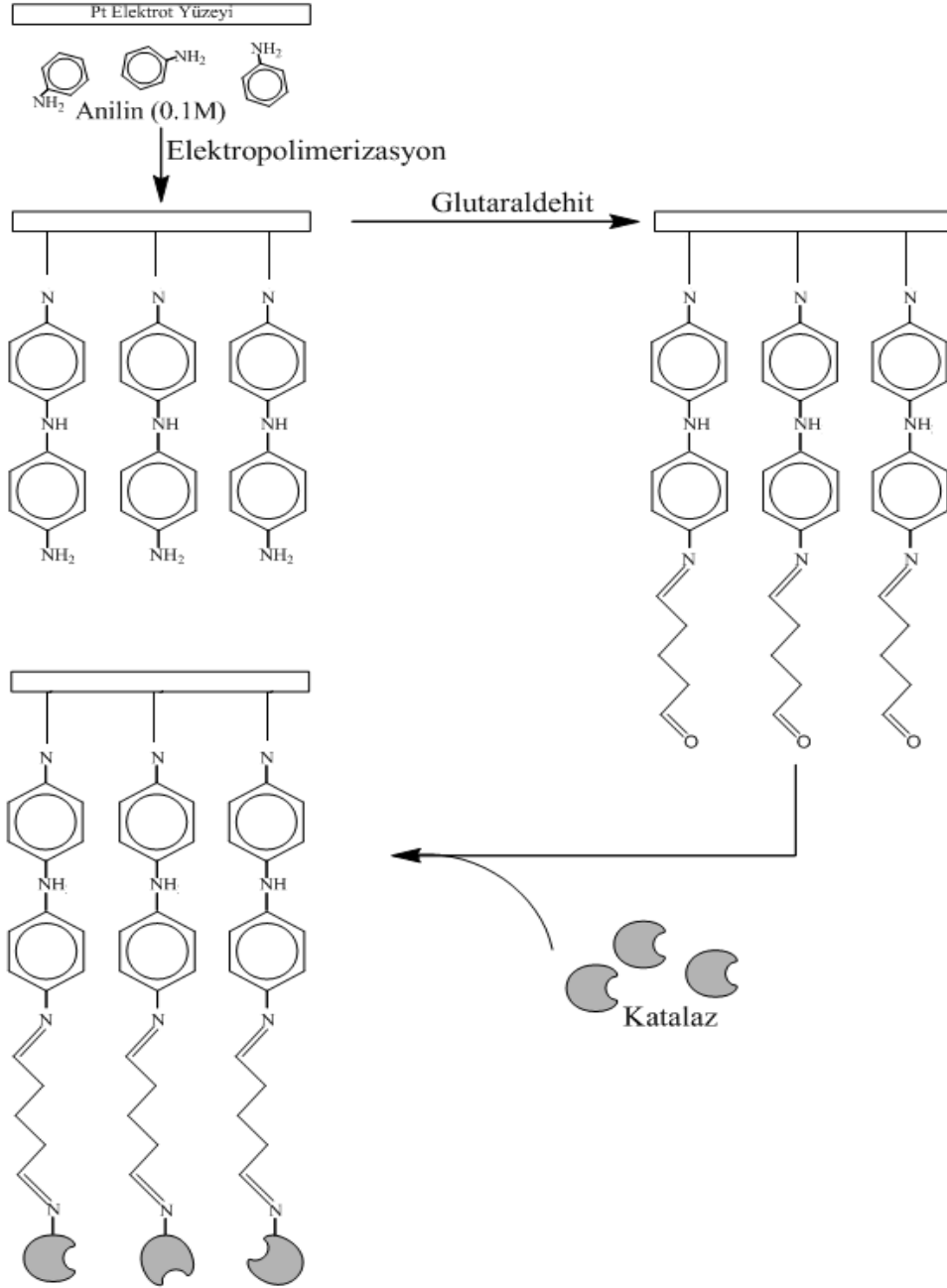
Reaksiyon hücresindeki 15 ml 0.1 N HCl içerisine anilinin kolay çözünmesi için 1.18 g KCl eklendi ve KCl tamamıyla çözüldükten sonra 275 µl 15.12 M anilin çözeltisi eklendi. 3'lü elektrot sistemi (Pt çalışma elektrodu, Ag/AgCl referans elektrodu, Pt yardımcı elektrot) çözeltiye daldırılarak (-0.2) - (+0.9) V aralığında tarama hızı 0.05 Vs⁻¹ olacak şekilde 20 döngü döngüsel voltametri yapılır. Elektropolimerizasyonun tamamlanmasının ardından çalışma elektrodu yüzeyine 10 µl % 2.5'lik glutaraldehit eklenir 30 dk bekletilir. Bekleme süresinin ardından elektrot distile suyla yıkanır ve azot gazı geçirilerek kurutulur. Polianilin modifiye elektrodu 2 mg/500 µl olarak eppendorff tüpe hazırlanmış CAT enziminin içerisine daldırılır ve 1 saat bekletilir. Enzimin elektrot yüzeyine glutaraldehitin bağlanması gerçekleştikten ve kalıntılar yıkandıktan sonra denemelere başlanır.

3.2.4.2. Katalaz Biyosensörünün Çalışma İlkesi

CAT biyosensörünün hazırlanması için Pt elektrot yüzeyinde polianilinin elektropolimerizasyonu ile film oluşturulmuştur. Döngüsel voltammogramda polianilinin indirgenmesinden kaynaklanan bir pik (-0.2 V) gözlenmiştir. Bu potansiyel

değeri esas alınarak amperometrik ölçümler gerçekleştirilmiş ve H₂O₂ konsantrasyonları bu potansiyelde gözlenen akım şiddeti değişimine göre tayin edilmiştir.

Biyosensörün hazırlanması esnasında Pt elektrodun polianilin film ile modifikasyonu ve glutaraldehit çapraz bağlayıcısı kullanılarak gerçekleştirilen enzim immobilizasyonu Şekil 3.2’de şematik olarak gösterilmektedir.



Şekil 3. 2. Pt elektrodun polianilin film ile modifikasyonu ve glutaraldehit çapraz bağlayıcısı kullanılarak gerçekleştirilen enzim immobilizasyonu

3.2.4.3. Katalaz Biyosensörünün Ölçüm Düzenegi

Ölçümlerin yapılacağı Palm-sens cihazı öncelikle Pt elektrot üzerinde anilin filmin oluşturulması için bilgisayara bağlanır. Bilgisayarda Ps Lite programı açıkken method olarak Amperometric detection seçilir ve aşağıdaki veriler girilir.

t equilibration: 60 (ölçüm almadan önceki denge zamanı)

E_{dc}: -0.7 V (Potansiyel)

t interval: 0.1 s (kaç sn'de 1 nokta okuduğu)

t run: 1000.0 s (Ölçüm süresi) (300 sn de ekleme yapılıyor)

Sonra; Döngüsel seçilir ve aşağıdaki veriler girilir.

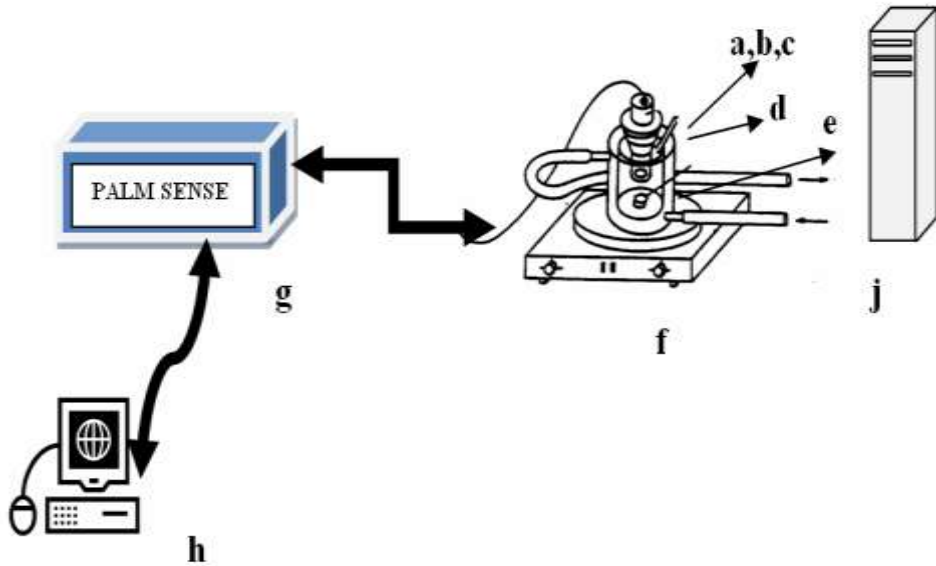
E_{vtx1}: -0,3 V (I. Potansiyel değeri)

E_{vtx2}: 1,0 V (II. Potansiyel değeri)

E_{start}: -0,3 V (Başlangıç potansiyel değeri)

Scan Rate: 0,020 V/s (Tarama hızı)

E_{step}: 0,010



Şekil 3. 3. Ölçüm sisteminin detayları: a) Polianilin tabakasına immobilize edilen CATın bulunduğu platin elektrot, b) Ag/AgCl referans elektrot, c) Platin yardımcı elektrot, d) Enjeksiyon haznesi, e) Manyetik bar, f) Manyetik karıştırıcı, g) Palm Sense potansiyostat, h) Bilgisayar, J) Termostat

Daha sonra elektrotlar cihaza bağlanıp içerisinde 15 ml 100 mM pH:8.0 fosfat tamponu bulunan reaksiyon hücresine daldırılıp sabitlenirler ve amperometrik ölçüm başlatılır. Reaksiyon hücresinde; öncelikle biyosensör cevabı olan akımın sabitlenmesi beklenir. Akım sabitlendikten sonra 300. sn'de substrat ilavesi yapılır. Akım düşmesi gözlenir ve akım tekrar sabitlenene kadar ölçüm alınır.

Ölçüm sonrasında reaksiyon hücresi ve elektrotlar saf suyla yıkanarak bir sonraki ölçüm için 15 ml 100 mM pH:8.0 fosfat tamponunda bekletilir ve bir sonraki ölçüme hazır hale getirilir.

Yapılan denemelerde H₂O₂'in farklı derişimleri için ölçümler alındı. Elde edilen verilerle hazırlanan grafikten H₂O₂ için doğrusal ölçüm aralığının 1.25–7.5 mM arasında olduğu belirlendi. CAT biyosensörünün pestisitlerle muamele edildiğinde aktivitesindeki değişimleri gözlemlmek için yapılan denemeler doğrusal ölçüm aralığında bulunan 3.125 mM H₂O₂ kullanılarak gerçekleştirildi.

3.2.4.4. Pestisitlerin Katalaz Biyosensörü Cevabına Etkisi

Pestisitlerin CAT biyosensörünün aktivitesine etkisinin incelenmesi için Tablo 3.5'te verilen konsantrasyonlarda hazırlanan pestisitlerden reaksiyon hücresine ilave edilir ve CAT biyosensörü ölçüm almadan önce inhibisyon için bu ortamda 10 dk bekletilir. Daha sonra CAT biyosensörünün 3.125 mM H₂O₂ için aktivite ölçümü alınarak pestisitlerin biyosensörü hangi ölçüde etkiledikleri hesaplanır.

Elektrotlar cihaza bağlanıp içerisinde 15 ml 100 mM pH:8.0 fosfat tamponu bulunan reaksiyon hücresine daldırılıp sabitlenir. 2.2.4.3'deki metoda göre 3.125 mM H₂O₂ konsantrasyonu için aktivite ölçümü alındıktan sonra ölçüm hücresi ve elektrotlar saf suyla yıkanarak 10 dk 15 ml 1 mM 2-PAM içinde bekletilerek bir sonraki ölçüm için hazır hale getirilir.

Tablo 3. 5. Katalaz biyosensörü üzerine etkisinin incelendiği pestisit konsantrasyonları

Stok Malation: 0.484 M	
Stoktan eklenen hacim (µl)	Reaksiyon hücreesindeki pestisit kons. (mM)
50	1.6
100	3.2
150	4.8
200	6.4
250	8.0
300	9.6
Stok Diklorvos: 0.707 M	
Stoktan eklenen hacim (µl)	Reaksiyon hücreesindeki pestisit kons. (mM)
50	2.35
100	4.71
150	7.05
200	9.40
250	11.75
300	14.10
Stok Deltametrin: 0.01484 M	
Stoktan eklenen hacim (µl)	Reaksiyon hücreesindeki pestisit kons. (µM)
50	0.49
100	0.98
150	1.47
200	1.96
250	2.45
300	2.94
Stok Lambda Cyhaloetrin: 0.0296 M	
Stoktan eklenen hacim (µl)	Reaksiyon hücreesindeki pestisit kons.(mM)
50	0.986
100	1.972
150	2.958
200	3.944
250	4.93
300	5.916

BÖLÜM 4

DENEYLER VE SONUÇLAR

4.1. Katalaz Enzimi Aktivite Tayini

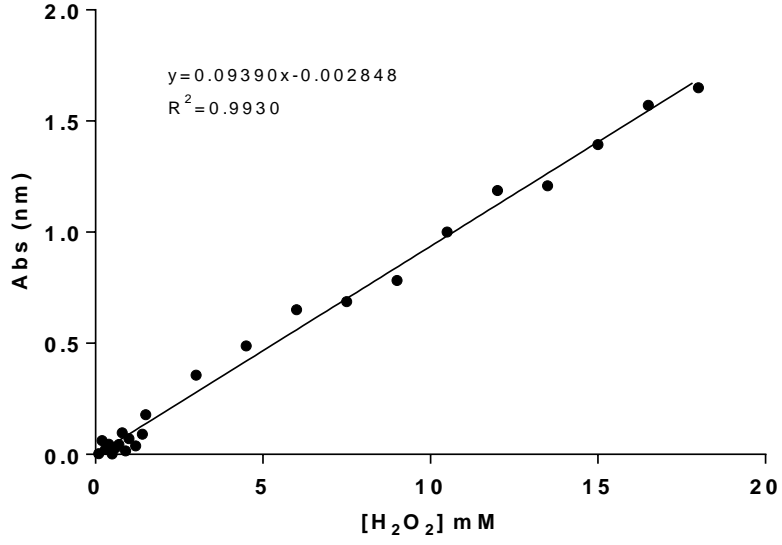
H₂O₂ için Standart Grafik Hazırlanması: 50 mM pH: 7.5 fosfat tamponu içinde H₂O₂'in farklı konsantrasyonları için Abs değerleri okundu. Çalışılan H₂O₂ konsantrasyonları; 100 µM - 18 mM aralığındadır. Uygun H₂O₂ konsantrasyon aralığı 1.5 – 1.8 mM olarak belirlendi.

Tablo 4. 1. H₂O₂ için okunan Absorbans değerleri

	Deneme	Tampon (µl)	H ₂ O ₂ (µl)	Abs
Stok H₂O₂ (M)	Kör (mM)	3000	-	-
0.003	0.1	2900	100	0.003
	0.2	2800	200	0.0616
	0.3	2700	300	0.0232
	0.4	2600	400	0.0456
	0.5	2500	500	0.0024
	0.6	2400	600	0.0298
0.005	0.7	2958	42	0.0446
	0.8	2952	48	0.0974
	0.9	2946	54	0.0158
	1	2940	60	0.0714
	1.2	2928	72	0.038
	1.4	2916	84	0.0904
	1.5	2910	90	0.1784
	3	2820	180	0.3566
	4.5	2730	270	0.4886
	6	2640	360	0.6508
	7.5	2550	450	0.6874
	9	2460	540	0.7826
0.35	10.5	2910	90	1.0012
	12	2897.2	102.8	1.1872

	13.5	2884.29	115.71	1.2084
	15	2871.43	128.57	1.3936
	16.5	2888.57	141.43	1.5704
	18	2845.72	154.28	1.65

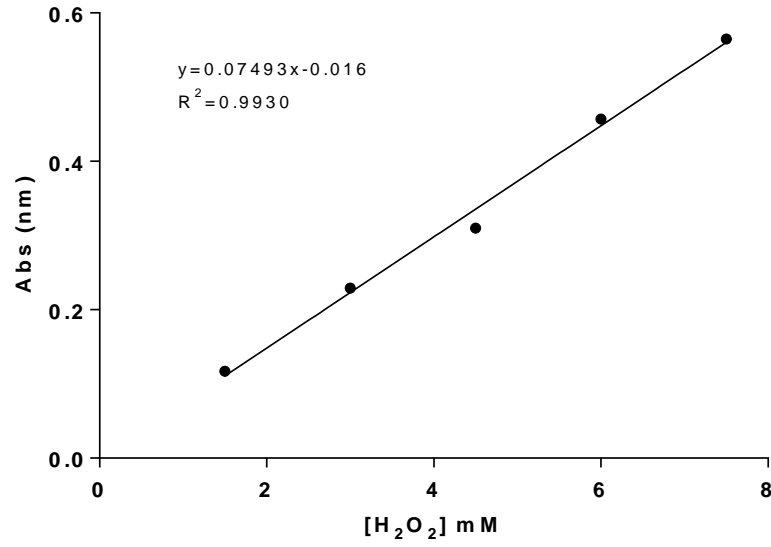
*CAT (26.6 UN/ml) (pH:7.5, 50 mM fosfat tamponunda), $\lambda=209$ nm



Şekil 4. 1. H₂O₂ için standart grafik

Saf CAT Enzimi Aktivite Tayini

26.6 UN/ml saf CAT enzimi 50 mM pH:7.5 fosfat tamponunda hazırlandı ve aktivite gösterdi. Enzimin substratı tüketme süresi 3 dk olarak belirlendi. H₂O₂'in farklı konsantrasyonlarına karşı saf CAT enziminin Michealis-Menten grafiği oluşturuldu ve lineer kısmı aşağıda grafikte verildi.



Şekil 4. 2. H₂O₂'nin Katalaz için lineer aralığı

4.1.1. Katalaz Enzim Aktivitesine Pestisitlerin Etkisi

4.1.1.1. Malation'un CAT Aktivitesine Etkisi

0.049 mM; 0.098 mM; 0.196 mM; 0.393 mM Malation konsantrasyonlarının 26.6 UN/ml saf CAT enziminin (50 mM pH: 7.5 fosfat tamponunda) aktivitesi üzerine etkisi spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. CAT aktivitesi 1dk'da ortamdaki mg CAT başına düşen absorbans miktarı olarak tanımlanmış ve deneysel veriler Tablo 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4. 2. CAT aktivitesine malation'un etkisi

Pestisit kons. (mM)	Aktivite (U/mL)	% Aktivite	% inhibisyon
0.049	65.81	99.04	0.96
0.098	65.18	98.07	1.93
0.196	10.22	15.38	84.62
0.393	7.67	11.53	88.47
Aktif enzim	66.45	100	0
Kör	-	-	-

*CAT: 26.6 UN/ml (pH:7.5, 50 mM fosfat tamponunda), Stok H₂O₂: 0.05 M, (n=5)

4.1.1.2. Diklorvos'un CAT Aktivitesine Etkisi

0.098 mM; 0.196 mM; 0.393 mM; 0.980 mM Diklorvos konsantrasyonlarının 4 mg/25 ml (26.6 UN/ml) (50 mM pH: 7.5 fosfat tamponunda) saf CAT enziminin aktivitesi üzerine etkisi spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. CAT aktivitesi 1dk'da ortamdaki mg CAT başına düşen absorbans miktarı olarak tanımlanmış ve deneysel veriler Tablo 4.3'de verilmiştir.

Tablo 4. 3. CAT aktivitesine diklorvos'un etkisi

Pestisit kons. (mM)	Aktivite (U/mL)	% Aktivite	% İnhibisyon
0.098	32.59	49.04	50.96
0.196	22.36	35.65	64.35
0.393	15.97	24.04	75.96
0.980	5.75	8.65	91.35
Aktif enzim	66.45	100	0
Kör	-	-	-

*CAT: 26.6 UN/ml (pH:7.5, 50 mM fosfat tamponunda), Stok H₂O₂: 0.05 M, (n=5)

4.1.1.3. Deltametrin'in CAT Aktivitesine Etkisi

0.002 mM; 0.004 mM; 0.008 mM; 0.021 mM Deltametrin konsantrasyonlarının 26.6 UN/ml saf CAT enziminin (50 mM pH: 7.5 fosfat tamponunda) aktivitesi üzerine etkisi spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. CAT aktivitesi 1 dk'da ortamdaki mg CAT başına düşen absorbans miktarı olarak tanımlanmış ve deneysel veriler Tablo 4.4'de verilmiştir.

Tablo 4. 4. CAT aktivitesine deltametrin'in etkisi

Pestisit kons (mM)	Aktivite (U/mL)	% Aktivite	% İnhibisyon
0.002	61.34	92.31	7.69
0.004	60.06	90.38	9.62
0.008	35.78	53.85	46.15
0.021	6.39	9.62	90.38
Aktif enzim	66.45	100	0
Kör	-	-	-

*CAT: 26.6 UN/ml (pH:7.5, 50 mM fosfat tamponunda), Stok H₂O₂: 0.05 M, (n=5)

4.1.1.4. Lambda Cyhaloetrin'in CAT Aktivitesine Etkisi

0.25 mM; 0.49 mM; 1.24 mM; 2.47 mM Lambda Cyhaloetrin konsantrasyonlarının 26.6 UN/ml saf CAT enziminin (50 mM pH: 7.5 fosfat tamponunda) aktivitesi üzerine etkisi spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. CAT aktivitesi 1 dk'da ortamdaki mg CAT başına düşen absorbans miktarı olarak tanımlanmış ve deneysel veriler Tablo 4.5'de verilmiştir.

Tablo 4. 5. CAT aktivitesine Lambda Cyhaloetrin'in etkisi

Pestisit kons. (mM)	Aktivite (U/mL)	% Aktivite	% İnhibisyon
0.25	65.18	98.08	1.92
0.49	57.51	86.54	13.46
1.24	22.36	33.65	66.35
2.47	8.31	12.5	87.5
Aktif enzim	66.45	100	0
Kör	-	-	-

*CAT: 26.6 UN/ml (pH:7.5, 50 mM fosfat tamponunda), Stok H₂O₂: 0.05 M, (n=5)

4.1.2. PME Katalazın 2-PAM İle Rejenerasyonları

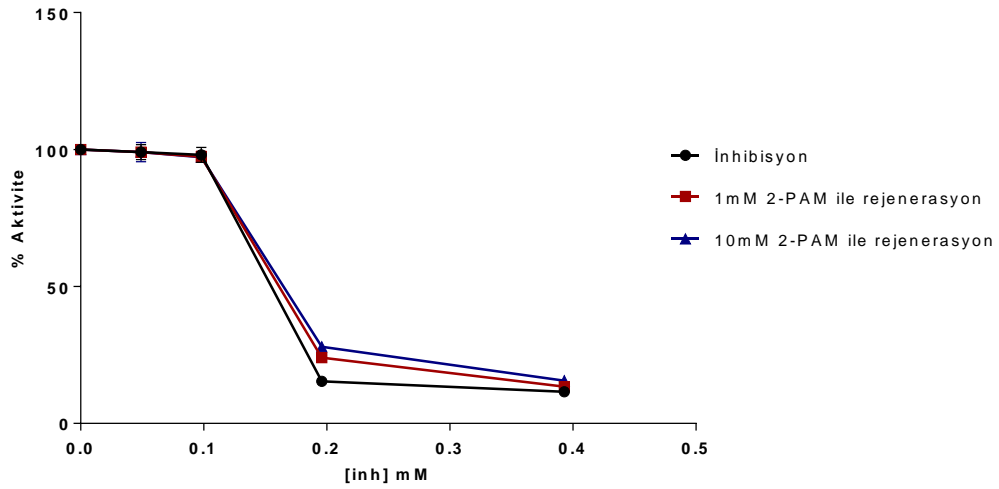
4.1.2.1. Malation'un CAT'a Etkisinin Rejenerasyonu

26.6 UN/ml saf CAT enziminin (50 mM pH: 7.5 fosfat tamponunda), 0.049 mM; 0.098 mM; 0.196 mM; 0.393 mM konsantrasyonlardaki Malation ile muamelesinden sonra, malationun enzim aktivitesi üzerine etkilerinin 1 mM ve 10 mM 2-PAM ile rejenerasyonları spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve deneysel veriler Tablo 4.6'da verilmiş ve Şekil 4.3'de grafik edilmiştir.

Tablo 4. 6. CAT aktivitesine malation'un etkisinin 2-PAM ile rejenerasyonu

Pestisit kons. (mM)	Aktivite (U/mL)	% Aktivite	% İnhibisyon	% Rejenerasyon	
				1 mM 2PAM	10 mM 2PAM
				% rej.	% rej.
0.049	65.81	99.04	0.96	-	-
0.098	65.18	98.07	1.93	-	-
0.196	10.22	15.38	84.62	8.66	12.64
0.393	7.67	11.53	88.47	1.93	4.07
Aktif enzim	66.45	100	0		
Kör	-	-	-		

*CAT: 26.6 UN/ml (pH:7.5, 50 mM fosfat tamponunda), Stok H₂O₂: 0.05 M, rejeneratör 2-PAM: 1mM stok (kuvette 2.33 µM), 10 mM stok (kuvette 23.3 µM), (n=5)



Şekil 4. 3. Malation için inhibisyon ve rejenerasyon

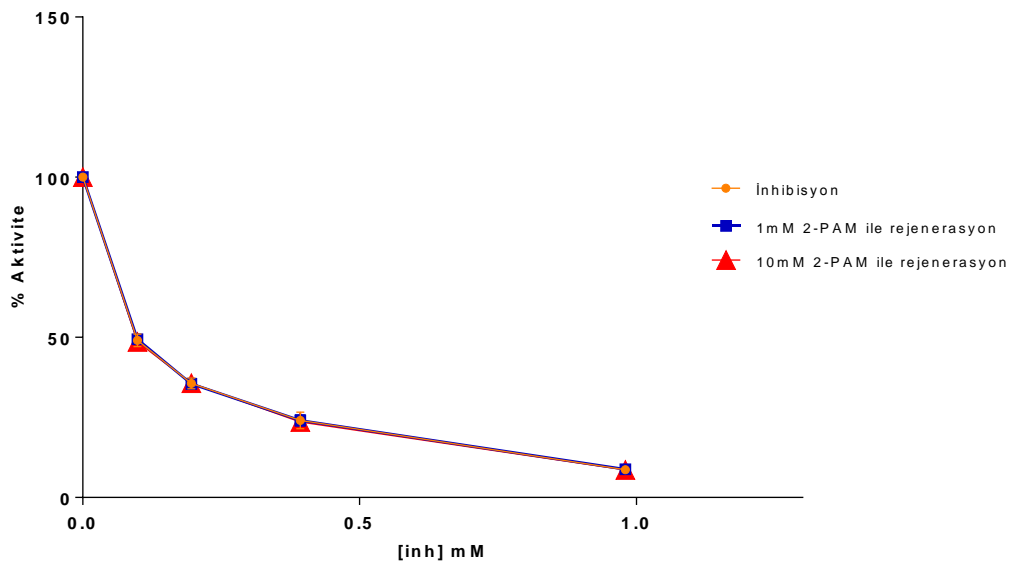
4.1.2.2. Diklorvos'un CAT'a Etkisinin Rejenerasyonu

26.6 UN/ml saf CAT enziminin (50 mM pH: 7.5 fosfat tamponunda), 0.098 mM; 0.196 mM; 0.393 mM; 0.980 mM konsantrasyonlardaki Diklorvos ile muamelesinden sonra, Diklorvosun enzim aktivitesi üzerine etkilerinin 1 mM ve 10 mM 2-PAM ile rejenerasyonları spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve deneysel veriler Tablo 4.7'de verilmiş ve Şekil 4.4'te gösterilmiştir.

Tablo 4. 7. CAT aktivitesine diklorvos'un etkisinin 2-PAM ile rejenerasyonu

Pestisit kons. (mM)	Aktivite (U/mL)	% Aktivite	% İnhibisyon	% Rejenerasyon	
				1 mM 2PAM	10 mM 2PAM
				% rej.	% rej.
0.098	32.59	49.04	50.96	0	0
0.196	22.36	35.65	64.35	0	0
0.393	15.97	24.04	75.96	0	0
0.980	5.75	8.65	91.35	0	0
Aktif enzim	66.45	100	0		
Kör	-	-	-		

*CAT: 26.6 UN/ml (pH:7.5, 50 mM fosfat tamponunda), Stok H₂O₂: 0.05 M, rejeneratör 2-PAM: 1mM stok (küvette 2.33 µM), 10 mM stok (küvette 23.3 µM), (n=5)



Şekil 4. 4. Diklorvos için inhibisyon ve rejenerasyon

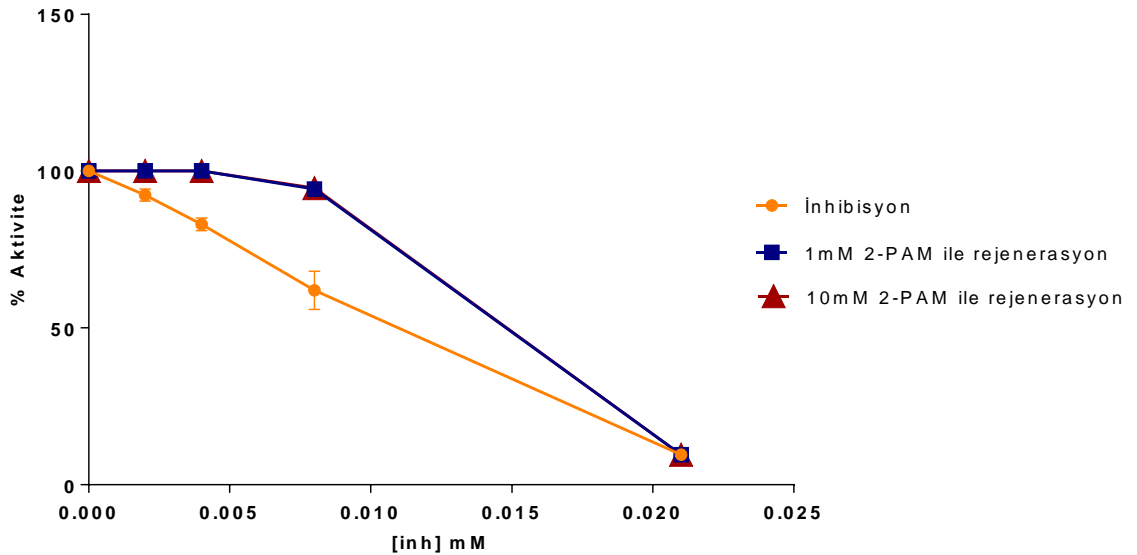
4.1.2.3. Deltametrin'in CAT'a Etkisinin Rejenerasyonu

26.6 UN/ml saf CAT enziminin (50 mM pH: 7.5 fosfat tamponunda), 0.002 mM; 0.004 mM; 0.008 mM; 0.021 mM konsantrasyonlardaki Deltametrin ile muamelesinden sonra, Deltametrin'in enzim aktivitesi üzerine etkilerinin 1 mM ve 10 mM 2-PAM ile rejenerasyonları spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve deneysel veriler Tablo 4.8'de verilmiş ve Şekil 4.5'te gösterilmiştir.

Tablo 4. 8. CAT aktivitesine deltametrin'in etkisinin 2-PAM ile rejenerasyonu

Pestisit kons. (mM)	Aktivite (U/mL)	% Aktivite	% İnhibisyon	% Rejenerasyon	
				1 mM 2PAM	10 mM 2PAM
				% rej.	% rej.
0.002 mM	61.34	92.31	7.69	7.69	
0.004 mM	60.06	90.38	9.62	9.62	
0.008 mM	35.78	53.85	46.15	40.38	
0.021 mM	6.39	9.62	90.38	0	
Aktif enzim	66.45	100	0		
Kör	-	-	-		

*CAT: 26.6 UN/ml (pH:7.5, 50 mM fosfat tamponunda), Stok H₂O₂: 0.05 M, rejeneratör 2-PAM: 1mM stok (küvette 2.33 µM), 10 mM stok (küvette 23.3 µM), (n=5)



Şekil 4. 5. Deltametrin için inhibisyon ve rejenerasyon

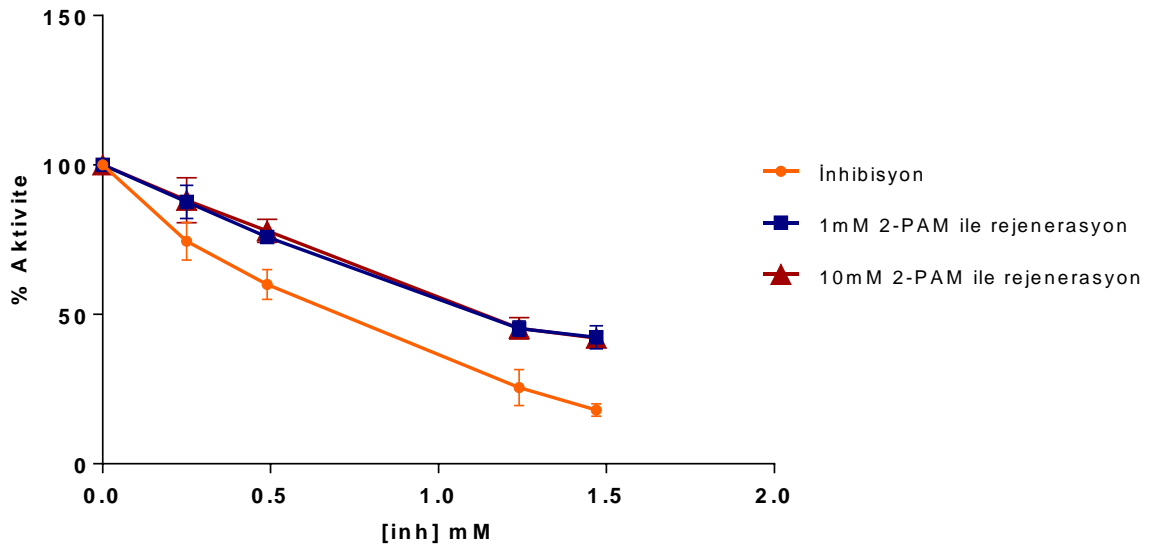
4.1.2.4. Lambda Cyhaloetrin'in CAT'a Etkisinin Rejenerasyonu

26.6 UN/ml saf CAT enziminin (50 mM pH: 7.5 fosfat tamponunda), 0.25 mM; 0.49 mM; 1.24 mM; 2.47 mM konsantrasyonlardaki Lambda Cyhaloetrin ile muamelesinden sonra, Lambda Cyhaloetrin'in enzim aktivitesi üzerine etkilerinin 1 mM ve 10 mM 2-PAM ile rejenerasyonları spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve deneysel veriler Tablo 4.9'da verilmiş ve Şekil 4.6'da gösterilmiştir.

Tablo 4. 9. CAT aktivitesine Lambda Cyhaloetrin'in etkisinin 2-PAM ile rejenerasyonu

Pestisit kons. (mM)	Aktivite (U/mL)	% Aktivite	% İnhibisyon	% Rejenerasyon	
				1 mM 2PAM	10 mM 2PAM
				% rej.	% rej.
0.25 mM	65.18	74.45	25.55	13.15	13.75
0.49 mM	57.71	65.69	34.31	17.52	18.41
1.24 mM	22.36	25.55	74.45	19.71	19.8
2.47 mM	8.31	9.49	90.51	32.85	32.41
Aktif enzim	66.45	100	0		
Kör	-	-	-		

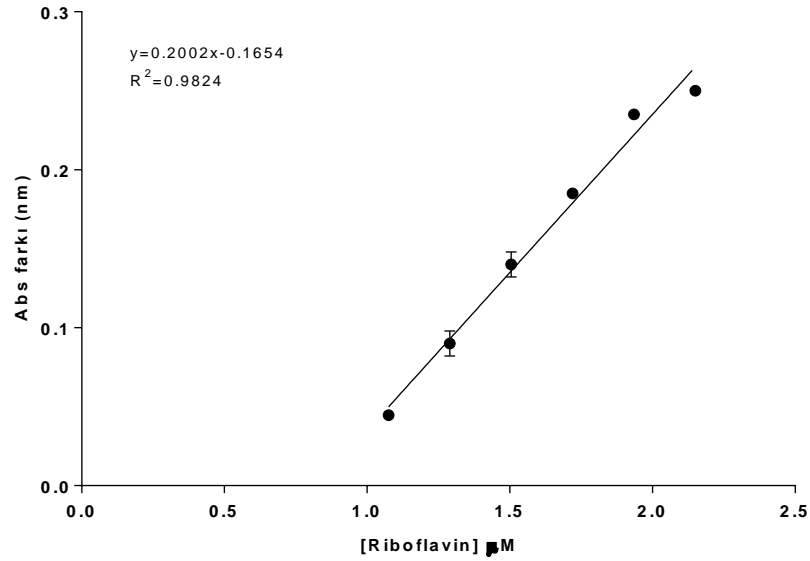
*CAT: 26.6 UN/ml (pH:7.5, 50 mM fosfat tamponunda), Stok H₂O₂: 0.05 M, rejeneratör 2-PAM: 1mM stok (kuvette 2.33 µM), 10 mM stok (kuvette 23.3 µM), (n=5)



Şekil 4. 6. Lambda Cyhaloetrin için inhibisyon ve rejenerasyon

4.2. Süperoksit Dismutaz Enzimi Aktivite Tayini

379.75 UN/ml saf SOD enzimi, 50 mM pH:7.5 Fosfat tamponunda hazırlandı ve aktivite gösterdi. Enzimin substratı tüketme süresi 7 dk olarak belirlendi. Riboflavin'in farklı konsantrasyonlarına karşı saf SOD enziminin Michaelis Menten grafiği oluşturuldu ve lineer kısmı Şekil 4.7'de verildi.



Şekil 4. 7. SOD için lineer aralık belirlenmesi

4.2.1. Süperoksit Dismutaz Enzim Aktivitesi Üzerine Pestisitlerin Etkisi

4.2.1.1. Malation'un SOD Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

0.049 mM; 0.098 mM; 0.196 mM; 0.393 mM Malation konsantrasyonlarının 379.75 UN/ml saf SOD enziminin (50 mM pH: 7.5 fosfat tamponunda) aktivitesi üzerine etkisi spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve deneysel veriler Tablo 4.10'da verilmiştir.

Tablo 4. 10. SOD enzim aktivitesi üzerine malation'un etkisi

Pestisit kons. (mM)	Aktivite (UN/mL)	% Aktivite	% İnhibisyon
0.049 mM	197.61	82.09	17.91
0.098 mM	171.72	71.34	28.66
0.196 mM	148.74	61.79	38.21
0.393 mM	17.95	7.46	92.54
Aktif enzim	240.72	100	-
Kör	-	-	-

*Fosfat tamponu (pH:7.5; 50 mM), 10^{-4} M INT, 13 mM Methionine, 13 μ M Riboflavin, 0.05 M Na_2CO_3 , 379.75 UN/ml SOD, $\lambda=560$ nm, (n=5)

4.2.1.2. Diklorvos'un SOD Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

0.098 mM; 0.196 mM; 0.393 mM; 0.980 mM Diklorvos konsantrasyonlarının 379.75 UN/ml saf SOD enziminin (50 mM pH: 7.5 fosfat tamponunda) aktivitesi üzerine etkisi spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve deneysel veriler Tablo 4.11'de verilmiştir.

Tablo 4. 11. SOD enzim aktivitesi üzerine Diklorvos'un etkisi

Pestisit kons. (mM)	Aktivite (UN/mL)	% Aktivite	% İnhibisyon
0.098 mM	215.56	89.55	10.45
0.196 mM	150.91	62.69	37.31
0.393 mM	109.53	45.5	54.5
0.980 mM	120.36	50.0	50.0
Aktif enzim	240.72	100	-
Kör	-	-	-

* Fosfat tamponu (pH:7.5; 50 mM), 10^{-4} M INT, 13 mM Methionine, 13 μ M Riboflavin, 0.05 M Na_2CO_3 , 379.75 UN/ml SOD, $\lambda=560$ nm, (n=5)

4.2.1.3. Deltametrin'in SOD Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

0.002 mM; 0.004 mM; 0.008 mM; 0.021 mM Deltametrin konsantrasyonlarının 379.75 UN/ml saf SOD enziminin (50 mM pH: 7.5 fosfat tamponunda) aktivitesi üzerine etkisi spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve deneysel veriler Tablo 4.12'de verilmiştir.

Tablo 4. 12. SOD enzim aktivitesi üzerine Deltametrin'in etkisi

Pestisit kons. (mM)	Aktivite (UN/mL)	% Aktivite	% İnhibisyon
0.002	154.49	64.18	35.82
0.004	176.04	73.13	26.87
0.008	219.18	91.05	8.95
0.021	298.20	123.88	-
Aktif enzim	240.72	100	-
Kör	-	-	-

*Fosfat tamponu (pH:7.5; 50 mM), 10^{-4} M INT, 13 mM Methionine, 13 μ M Riboflavin, 0.05 M Na₂CO₃, 379.75 UN/ml SOD, $\lambda=560$ nm, (n=5)

4.2.1.4. Lambda Cyhaloetrin'in SOD Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

0.25 mM; 0.49 mM; 1.24 mM; 2.47 mM Lambda Cyhaloetrin konsantrasyonlarının 379.75 UN/ml saf SOD enziminin (50 mM pH: 7.5 fosfat tamponunda) aktivitesi üzerine etkisi spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve deneysel veriler Tablo 4.13'te verilmiştir.

Tablo 4. 13. SOD enzim aktivitesi üzerine Lambda Cyhaloetrin'in etkisi

Pestisit kons. (mM)	Aktivite (UN/mL)	% Aktivite	% İnhibisyon
0.25	222.76	92.54	7.46
0.49	208.39	86.57	13.43
1.24	114.97	47.76	52.24
2.47	43.11	17.91	82.09
Aktif enzim	240.72	100	-
Kör	-	-	-

*Fosfat tamponu (pH:7.5; 50 mM), 10^{-4} M INT, 13 mM Methionine, 13 μ M Riboflavin, 0.05 M Na_2CO_3 , 379.75 UN/ml SOD, $\lambda=560$ nm, (n=5)

4.2.2. PME Süperoksit Dismutazın 2-PAM İle Rejenerasyonları

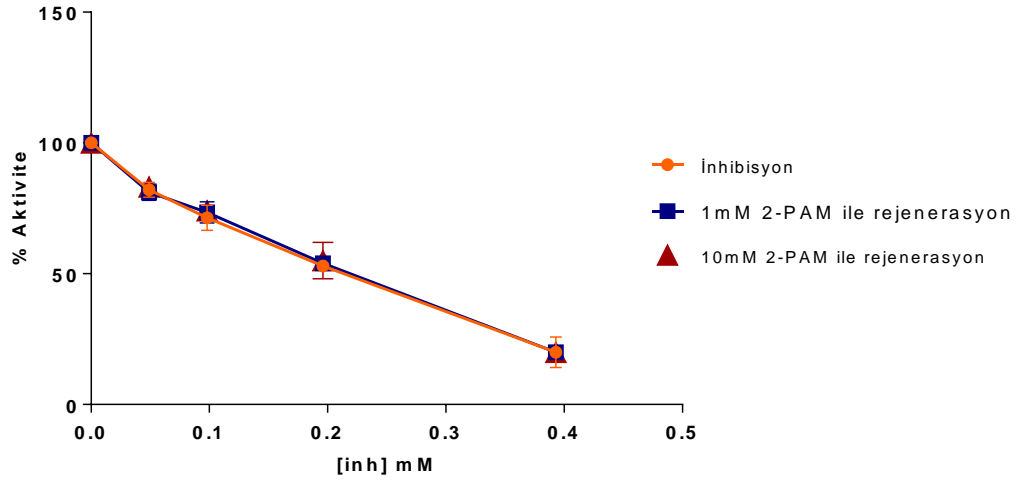
4.2.2.1. Malation'un Süperoksit Dismutaz'a Etkisinin Rejenerasyonu

379.75 UN/ml saf SOD enziminin (50 mM pH: 7.5 fosfat tamponunda), 0.049 mM; 0.098 mM; 0.196 mM; 0.393 mM konsantrasyonlardaki Malation ile muamelesinden sonra, malationun enzim aktivitesi üzerine etkilerinin 1 mM ve 10 mM 2-PAM ile rejenerasyonları spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve deneysel veriler Tablo 4.14'te verilmiş ve Şekil 4.8'de gösterilmiştir

Tablo 4. 14. SOD aktivitesine malation'un etkisinin 2-PAM ile rejenerasyonu

Pestisit kons. (mM)	Aktivite (UN/mL)	% Aktivite	% İnh.	% Rejenerasyon	
				1 mM 2PAM % rej.	10 mM 2PAM % rej.
0.049	197.61	82.09	17.91	-	1.09
0.098	171.72	71.34	28.66	2.09	2.76
0.196	148.74	61.79	38.21	1.13	0.36
0.393	17.95	7.46	92.54	-	-
Aktif enzim	240.72	100	-		
Kör	-	-	-		

*Fosfat tamponu (pH:7.5; 50 mM), 10^{-4} M INT, 13 mM Methionine, 13 μ M Riboflavin, 0.05 M Na_2CO_3 , 379.75 UN/ml SOD, 560 nm rejeneratör 2-PAM: 1mM stok (küvette 2.33 μ M), 10 mM stok (küvette 23.3 μ M)), (n=5)



Şekil 4. 8. Malation için inhibisyon ve rejenerasyon

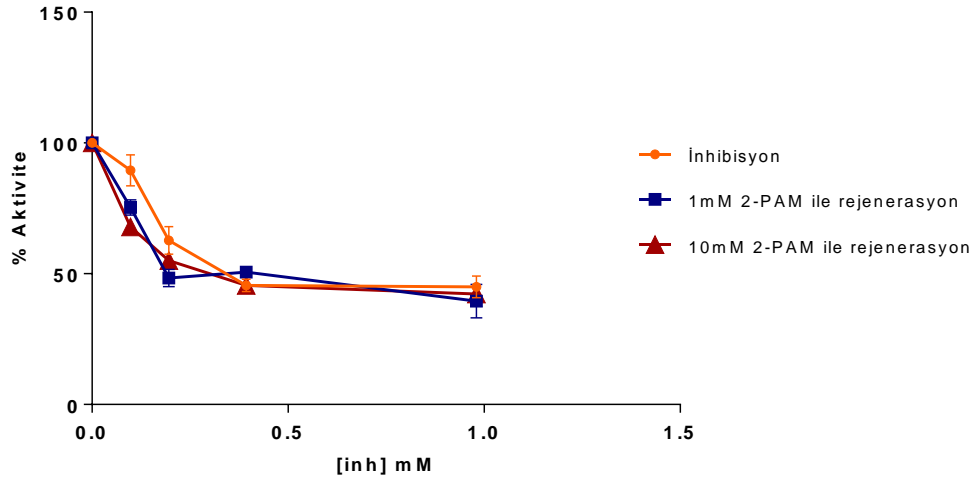
4.2.2.2. Diklorvos'un SOD'a Etkisinin Rejenerasyonu

379.75 UN/ml saf SOD enziminin (50 mM pH: 7.5 fosfat tamponunda), 0.098 mM; 0.196 mM; 0.393 mM; 0.980 mM konsantrasyonlardaki Diklorvos ile muamelesinden sonra, Diklorvosun enzim aktivitesi üzerine etkilerinin 1 mM ve 10 mM 2-PAM ile rejenerasyonları spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve deneysel veriler Tablo 4.15'te verilmiş ve Şekil 4.9'da gösterilmiştir.

Tablo 4. 15. SOD aktivitesine Diklorvos'un etkisinin 2-PAM ile rejenerasyonu

Pestisit kons. (mM)	Aktivite (UN/mL)	% Aktivite	% İnh.	% Rejenerasyon	
				1 mM 2PAM	10 mM 2PAM
				% rej.	% rej.
0.098	215.56	89.55	10.45	-	-
0.196	150.91	62.69	37.31	-	-
0.393	109.53	45.5	54.5	-	0.02
0.980	120.36	50.0	50.0	-	-
Aktif enzim	240.72	100	-		
Kör	-	-	-		

*Fosfat tamponu (pH:7.5; 50 mM), 10^{-4} M INT, 13 mM Methionine, 13 μ M Riboflavin, 0.05 M Na_2CO_3 , 379.75 UN/ml SOD, 560 nm, rejeneratör 2-PAM: 1mM stok (küvette 2.33 μ M), 10 mM stok (küvette 23.3 μ M)), (n=5)



Şekil 4. 9. Diklorvos için inhibisyon ve rejenerasyon

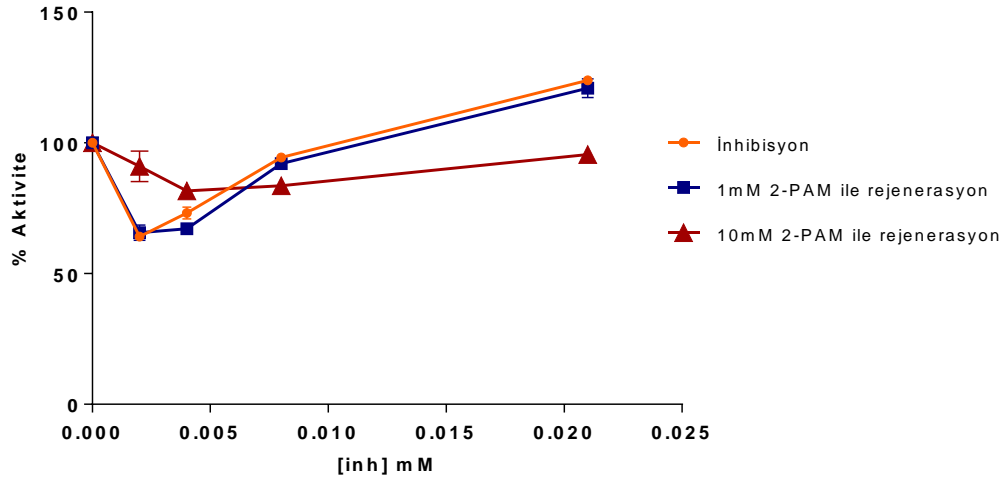
4.2.2.3. Deltametrin'in SOD'a Etkisinin Rejenerasyonu

379.75 UN/ml saf SOD enziminin (50 mM pH: 7.5 fosfat tamponunda), 0.002 mM; 0.004 mM; 0.008 mM; 0.021 mM konsantrasyonlardaki Deltametrin ile muamelesinden sonra, Deltametrin'in enzim aktivitesi üzerine etkilerinin 1 mM ve 10 mM 2-PAM ile rejenerasyonları spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve deneysel veriler Tablo 4.16'da verilmiş ve Şekil 4.10'da gösterilmiştir.

Tablo 4. 16. SOD aktivitesine deltametrin'in etkisinin 2-PAM ile rejenerasyonu

Pestisit kons. (mM)	Aktivite (UN/mL)	% Aktivite	% İnh.	Rejenerasyon			
				1 mM 2PAM		10 mM 2PAM	
				% akt.	% rej.	% akt.	% rej.
0.002	154.49	64.18	35.82	65.67	1.49	91.04	26.86
0.004	176.04	73.13	26.87	67.16	-	71.64	-
0.008	219.18	91.05	8.95	70.22	-	83.58	-
0.021	298.20	123.88	-	120.9	-	95.52	-
Aktif enzim	240.72	100	-				
Kör	-	-	-				

*Fosfat tamponu (pH:7.5; 50 mM), 10^{-4} M INT, 13 mM Methionine, 13 μ M Riboflavin, 0.05 M Na_2CO_3 , 379.75 UN/ml SOD, 560 nm rejeneratör 2-PAM: 1mM stok (küvette 2.33 μ M), 10 mM stok (küvette 23.3 μ M)), (n=5)



Şekil 4. 10. Deltametrin için inhibisyon ve rejenerasyon

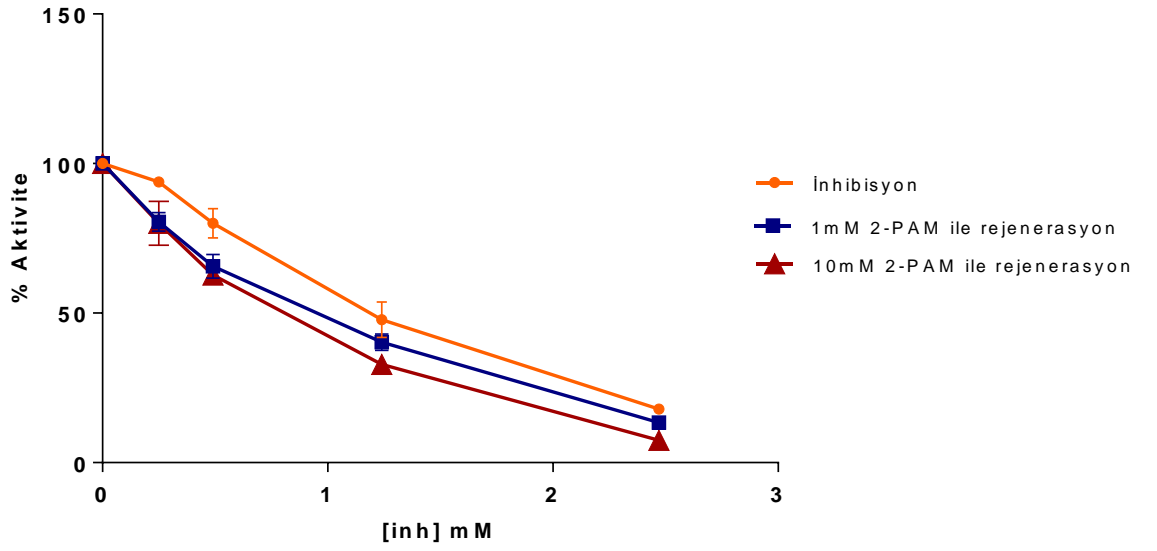
4.2.2.4. Lambda Cyhaloetrin'in SOD'a Etkisinin Rejenerasyonu

379.75 UN/ml saf SOD enziminin (50 mM pH: 7.5 fosfat tamponunda), 0.25 mM; 0.49 mM; 1.24 mM; 2.47 mM konsantrasyonlardaki Lambda Cyhaloetrin ile muamelesinden sonra, Lambda Cyhaloetrin'in enzim aktivitesi üzerine etkilerinin 1 mM ve 10 mM 2-PAM ile rejenerasyonları spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve deneysel veriler Tablo 4.17'de verilmiş ve Şekil 4.11'de gösterilmiştir.

Tablo 4. 17. SOD aktivitesine Lambda Cyhaloetrin'in etkisinin 2-PAM ile rejenerasyonu

Pestisit kons. (mM)	Aktivite (UN/mL)	% Aktivite	% İnh.	% Rejenerasyon	
				1 mM 2PAM % rej.	10 mM 2PAM % rej.
0.002	222.76	92.54	7.46	-	-
0.004	208.39	86.57	13.43	-	-
0.008	114.97	47.76	52.24	-	-
0.021	43.11	17.91	82.09	-	-
Aktif enzim	240.72	100	-		
Kör	-	-	-		

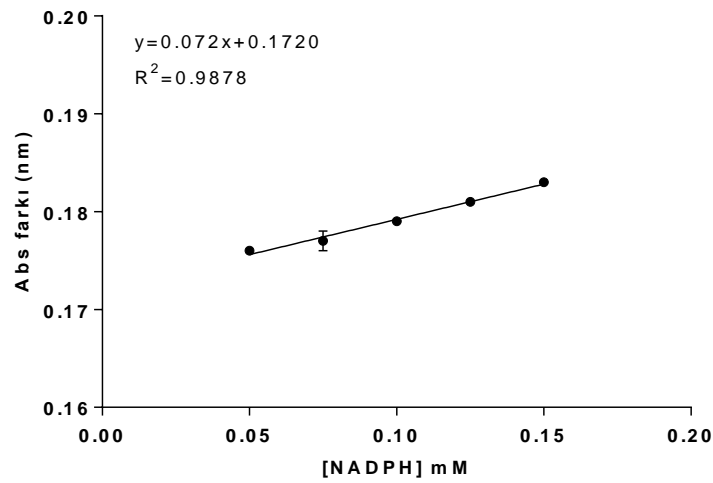
*Fosfat tamponu (pH:7.5; 50 mM), 10^{-4} M INT, 13 mM Methionine, 13 μ M Riboflavin, 0.05 M Na_2CO_3 , 379.75 UN/ml SOD, 560 nm rejeneratör 2-PAM: 1mM stok (kuvette 2.33 μ M), 10 mM stok (kuvette 23.3 μ M)), (n=5)



Şekil 4. 11. Lambda Cyhaloetrin için inhibisyon ve rejenerasyon

4.3. Glutatyon Peroksidaz Enzimi Aktivite Tayini

0.5 UN/ml saf Glutation peroksidaz enzimi, 200 mM pH:8.0 Tris tamponunda hazırlandı ve aktivite gösterdi. Enzimin substratı tüketme süresi 5 dk olarak belirlendi. NADPH'm farklı konsantrasyonlarına karşı saf glutatyon peroksidaz enziminin Michaelis-Menten grafiği oluşturuldu ve lineer kısmı aşağıda Şekil 4.12'de verildi.



Şekil 4. 12. GSH-Px lineer aralık

4.3.1. GSH-Px Enzim Aktivitesi Üzerine Pestisitlerin Etkisi

4.3.1.1. Malation'un GSH-Px Aktivitesine Etkisi

0.049 mM; 0.098 mM; 0.196 mM; 0.393 mM Malation konsantrasyonlarının 0.5 UN/ml saf GSH-Px enziminin (200 mM pH: 8.0 Tris tamponunda) aktivitesi üzerine etkisi spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve deneysel veriler Tablo 4.18'de verilmiştir.

Tablo 4. 18. GSH-Px aktivitesine malation'un etkisi

Pestisit kons. (mM)	Aktivite (U/L)	% Aktivite	% İnhibisyon
0.049	0.675	114.75	-
0.098	0.610	103.83	-
0.196	0.588	100	-
0.393	0.482	81.97	18.03
Aktif enzim	0.588	100	-
Kör	-	-	-

*Tris tamponu (pH:8.0; 200 mM), GSH-Rd (10 UN/ml), GSH-Px (0.5 UN/ml), GSH (0.1 M), t-bütil hidroperoksit (7mM), NADPH (1.5mM), $\lambda=340$ nm, (n=3)

4.3.1.2. Diklorvos'un GSH-Px Aktivitesi Üzerine Etkisi

0.098 mM; 0.196 mM; 0.393 mM; 0.980 mM Diklorvos konsantrasyonlarının 0.5 UN/ml saf GSH-Px enziminin (200 mM pH: 8.0 Tris tamponunda) aktivitesi üzerine etkisi spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve deneysel veriler Tablo 4.19'da verilmiştir.

Tablo 4. 19. GSH-Px aktivitesine dikorvos'un etkisi

Pestisit kons. (mM)	Aktivite (U/L)	% Aktivite	% İnhibisyon
0.098	0.025	4.37	95.63
0.196	0.019	3.28	96.72
0.393	0.013	2.19	97.81
0.980	0.006	1.09	98.91
Aktif enzim	0.588	100	-
Kör	-	-	-

*Tris tamponu (pH:8.0; 200 mM), GSH-Rd (10 UN/ml), GSH-Px (0.5 UN/ml), GSH (0.1 M), t-bütil hidroperoksit (7mM), NADPH (1.5mM), $\lambda=340$ nm, (n=3)

4.3.1.3. Deltametrin'in GSH-Px Aktivitesi Üzerine Etkisi

0.002 mM; 0.004 mM; 0.008 mM; 0.021 mM Deltametrin konsantrasyonlarının 0.5 UN/ml saf GSH-Px enziminin (200 mM pH: 8.0 Tris tamponunda) aktivitesi üzerine etkisi spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve deneysel veriler Tablo 4.20'de verilmiştir.

Tablo 4. 20. GSH-Px aktivitesine Deltametrin'in etkisi

Pestisit kons. (mM)	Aktivite (U/L)	% Aktivite	% İnhibisyon
0.002	0.103	17.49	82.51
0.004	0.068	11.48	88.52
0.008	0.058	9.84	90.16
0.021	0.035	6.01	93.99
Aktif enzim	0.588	100	-
Kör	-	-	-

*Tris tamponu (pH:8.0; 200 mM), GSH-Rd (10 UN/ml), GSH-Px (0.5 UN/ml), GSH (0.1 M), t-bütil hidroperoksit (7mM), NADPH (1.5mM), $\lambda=340$ nm, (n=3)

4.3.1.4. Lambda Cyhaloetrin'in GSH-Px Aktivitesine Etkisi

0.25 mM; 0.49 mM; 1.24 mM; 2.47 mM Lambda Cyhaloetrin konsantrasyonlarının 0.5 UN/ml saf GSH-Px enziminin (200 mM pH: 8.0 Tris tamponunda) aktivitesi üzerine etkisi spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve deneysel veriler Tablo 4.21'de verilmiştir.

Tablo 4. 21. GSH-Px aktivitesi üzerine Lambda cyhaloetrin'in etkisi

Pestisit kons. (mM)	Aktivite (U/L)	% Aktivite	% İnhibisyon
0.25 mM	0.576	97.81	2.19
0.49 mM	0.553	93.99	6.01
1.24 mM	0.517	87.98	12.02
2.47 mM	0.325	55.19	44.81
Aktif enzim	0.588	100	-
Kör	-	-	-

*Tris tamponu (pH:8.0; 200 mM), GSH-Rd (10 UN/ml), GSH-Px (0.5 UN/ml), GSH (0.1 M), t-bütil hidroperoksit (7mM), NADPH (1.5mM), 340 nm, (n=3)

4.3.2. PME Glutasyon Peroksidazın 2-PAM İle Rejenerasyonları

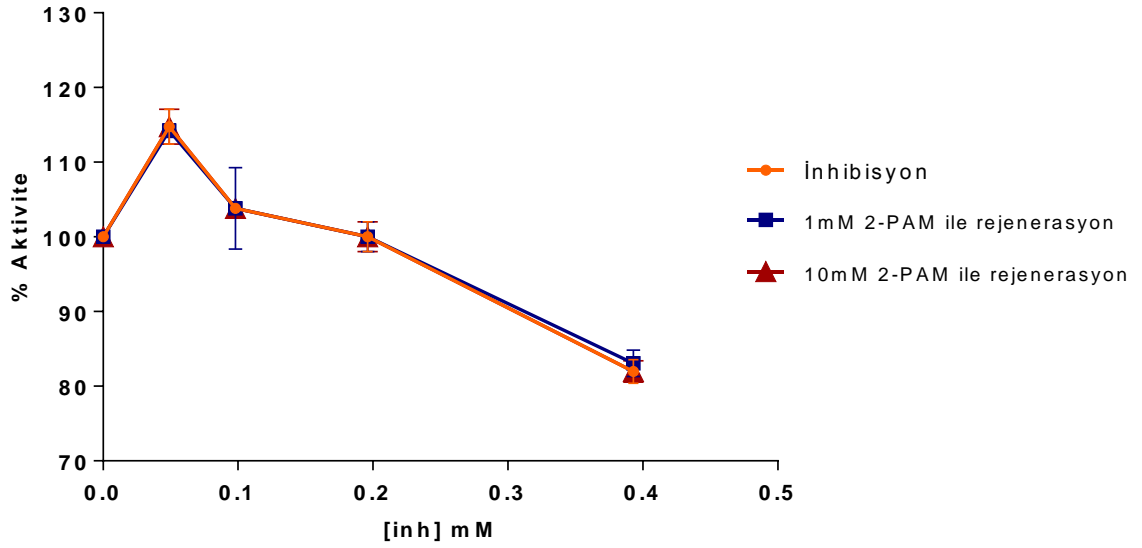
4.3.2.1. Malation'un GSH-Px'a Etkisi

0.5 UN/ml saf GSH-Px enziminin (200 mM pH: 8.0 Tris tamponunda), 0.049 mM; 0.098 mM; 0.196 mM; 0.393 mM konsantrasyonlardaki Malation ile muamelesinden sonra, malationun enzim aktivitesi üzerine etkilerinin 1 mM ve 10 mM 2-PAM ile rejenerasyonları spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve deneysel veriler Tablo 4.22'de verilmiş ve Şekil 4.13'te grafik edilmiştir.

Tablo 4. 22. GSH-Px aktivitesine malation'un etkisinin 2-PAM ile rejenerasyonu

Pestisit kons. (mM)	Akt. (U/L)	% Akt.	% İnh.	%Rejenerasyon	
				1 mM 2PAM	10 mM 2PAM
				% rej.	% rej.
0.049	0.675	114.75	-	-	-
0.098	0.610	103.83	-	-	-
0.196	0.588	100	-	-	-
0.393	0.482	81.97	18.03	1.09	-
Aktif enzim	0.588	100	-		
Kör	-	-	-		

*Tris tamponu (pH:8.0; 200 mM), GSH-Rd (10 UN/ml), GSH-Px (0.5 UN/ml), GSH (0.1 M), t-bütül hidroperoksit (7mM), NADPH (1.5mM), 340 nm, rejeneratör 2-PAM: 1mM stok (küvette 2.33 μ M), 10 mM stok (küvette 23.3 μ M), (n=3)



Şekil 4. 13. Malation için inhibisyon ve rejenerasyon

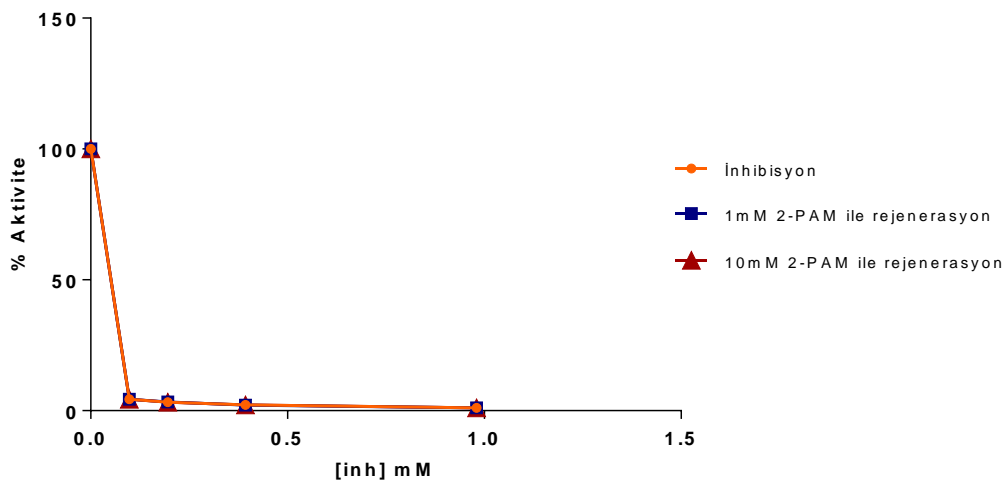
4.3.2.2. Diklorvos'un GSH-PX'a Etkisinin Rejenerasyonu

0.5 UN/ml (200 mM pH: 8.0 Tris tamponunda) saf GSH-Px enziminin, 0.098 mM; 0.196 mM; 0.393 mM; 0.980 mM konsantrasyonlardaki Diklorvos ile muamelesinden sonra, Diklorvosun enzim aktivitesi üzerine etkilerinin 1 mM ve 10 mM 2-PAM ile rejenerasyonları spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve deneysel veriler Tablo 4.23'te verilmiş ve Şekil 4.14'te grafik edilmiştir.

Tablo 4. 23. GSH-Px aktivitesine Diklorvos'un etkisinin 2-PAM ile rejenerasyonu

Pestisit kons. (mM)	Akt. (U/L)	% Akt.	% İnh.	Rejenerasyon	
				1 mM 2PAM	10 mM 2PAM
				% rej.	% rej.
0.098	0.025	4.37	95.63	-	0.04
0.196	0.019	3.28	96.72	0.03	-
0.393	0.013	2.19	97.81	-	0.01
0.980	0.006	1.09	98.91	-	-
Aktif enzim	0.588	100	-		
Kör	-	-	-		

*Tris tamponu (pH:8.0; 200 mM), GSH-Rd (10 UN/ml), GSH-Px (0.5 UN/ml), GSH (0.1 M), t-bütül hidroperoksit (7mM), NADPH (1.5mM), 340 nm, rejeneratör 2-PAM: 1mM stok (küvette 2.33 µM), 10 mM stok (küvette 23.3 µM)), (n=3)



Şekil 4. 14. Diklorvos için inhibisyon ve rejenerasyon

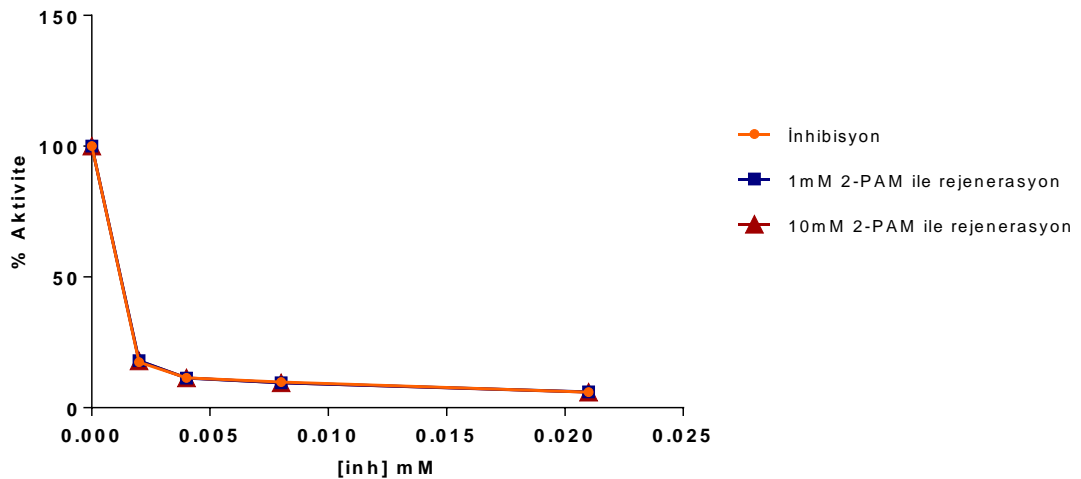
4.3.2.3. Deltametrin'in GSH-Px'a Etkisinin Rejenerasyonu

0.5 UN/ml saf GSH-Px enziminin (200 mM pH: 8.0 Tris tamponunda), 0.002 mM; 0.004 mM; 0.008 mM; 0.021 mM konsantrasyonlardaki Deltametrin ile muamelesinden sonra, Deltametrin'in enzim aktivitesi üzerine etkilerinin 1 mM ve 10 mM 2-PAM ile rejenerasyonları spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve deneysel veriler Tablo 4.24'te verilmiş ve Şekil 4.15'te grafik edilmiştir.

Tablo 4. 24. GSH-Px aktivitesine Deltametrin'in etkisinin 2-PAM ile rejenerasyonu

Pestisit kons. (mM)	Akt. (U/L)	% Akt.	% inh.	Rejenerasyon	
				1 mM 2PAM	10 mM 2PAM
				% rej.	% rej.
0.002	0.103	17.49	82.51	0.53	0.43
0.004	0.068	11.48	88.52	-	-
0.008	0.058	9.84	90.16	-	-
0.021	0.035	6.01	93.99	0.01	-
Aktif enzim	0.588	100	-		
Kör	-	-	-		

*Tris tamponu (pH:8.0; 200 mM), GSH-Rd (10 UN/ml), GSH-Px (0.5 UN/ml), GSH (0.1 M), t-bütül hidroperoksit (7mM), NADPH (1.5mM), 340 nm, rejeneratör 2-PAM: 1mM stok (küvette 2.33 µM), 10 mM stok (küvette 23.3 µM)), (n=3)



Şekil 4. 15. Deltametrin için inhibisyon ve rejenerasyon

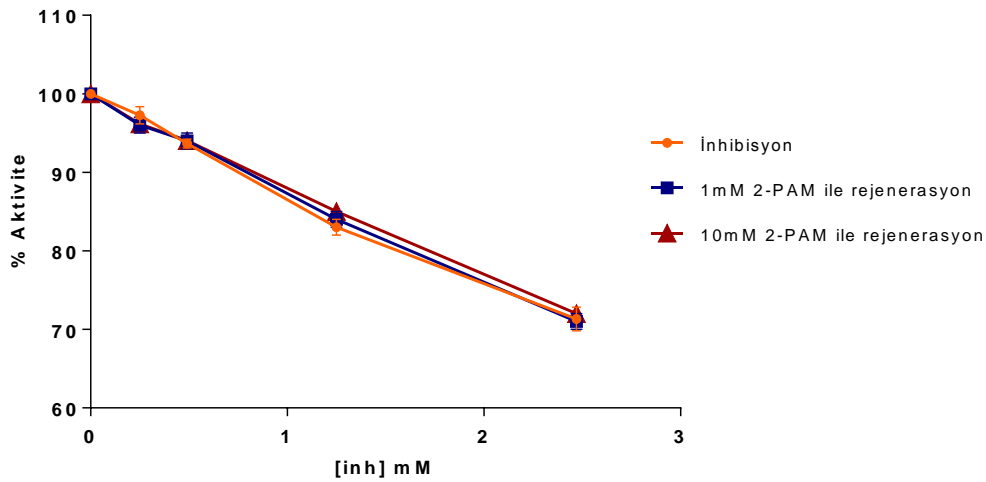
4.3.2.4. Lambda Cyhaloetrin'in GSH-Px'a Etkisinin Rejenerasyonu

0.5 UN/ml saf GSH-Px enziminin (200 mM pH: 8.0 Tris tamponunda), 0.25 mM; 0.49 mM; 1.24 mM; 2.47 mM konsantrasyonlardaki Lambda Cyhaloetrin ile muamelesinden sonra, Lambda Cyhaloetrin'in enzim aktivitesi üzerine etkilerinin 1 mM ve 10 mM 2-PAM ile rejenerasyonları spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve deneysel veriler Tablo 4.25'te verilmiş ve Şekil 4.16'da grafik edilmiştir.

Tablo 4. 25. GSH-Px aktivitesine Lambda Cyhaloetrin'in etkisinin 2-PAM ile rejenerasyonu

Pestisit kons. (mM)	Akt. (U/L)	% Akt.	% İnh.	% Rejenerasyon	
				1 mM 2PAM	10 mM 2PAM
				% rej.	% rej.
0.25	0.576	97.81	2.19	-	-
0.49	0.553	93.99	6.01	0.03	0.12
1.24	0.517	87.98	12.02	0.94	-
2.47	0.325	55.19	44.81	-	-
Aktif enzim	0.588	100	-		
Kör	-	-	-		

*Tris tamponu (pH:8.0; 200 mM), GSH-Rd (10 UN/ml), GSH-Px (0.5 UN/ml), GSH (0.1 M), t-bütül hidroperoksit (7mM), NADPH (1.5mM), 340 nm, rejeneratör 2-PAM: 1mM stok (küvette 2.33 µM), 10 mM stok (küvette 23.3 µM), (n=3)

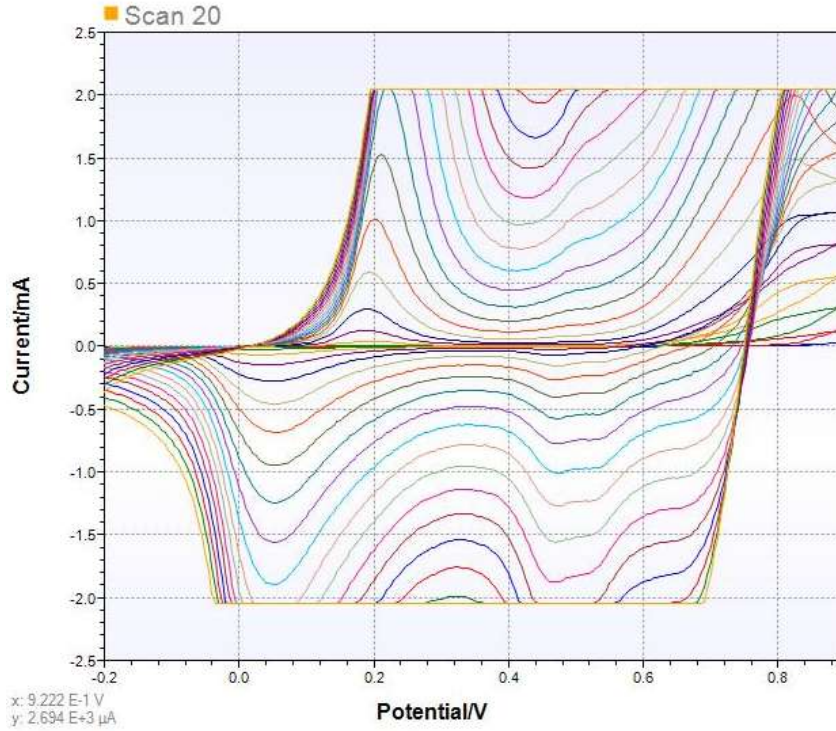


Şekil 4. 16. Lambda Cyhaloetrin için inhibisyon ve rejenerasyon

4.4. Katalaz Biyosensörüne Ait Bulgular

4.4.1. Anilin Elektropolimerizasyonu

CAT Biyosensörünün geliştirilmesinde ilk aşama olarak Şekil 3.2’de gösterildiği gibi Pt elektrot yüzeyi anilinin elektropolimerizasyonu sonucu oluşan polianilin ile kaplandı. Elektrot yüzeyinin polianilin kaplanmasının kontrolü amacıyla alınan voltammogram aşağıda Şekil 4.17’de gösterilmiştir. Ardından çapraz bağlayıcı glutaraldehit ile polianilin tabakasına enzim moleküllerinin bağlanması sağlanmıştır.

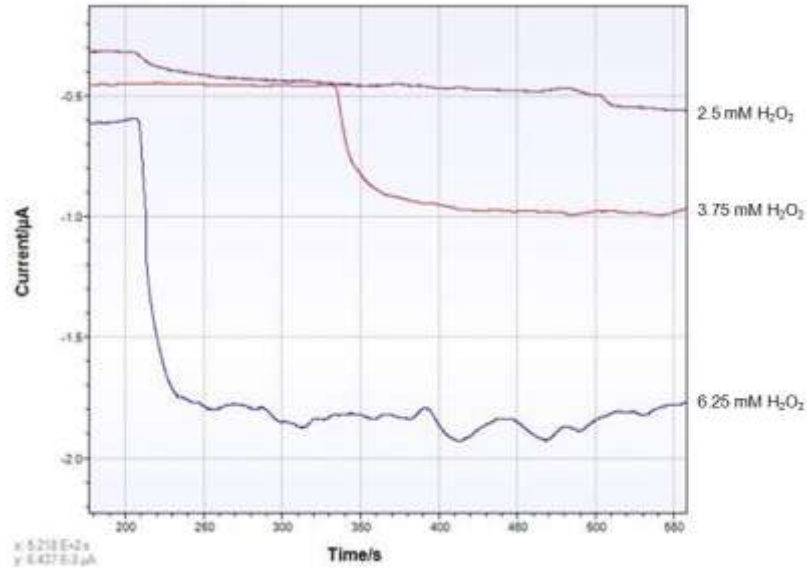


Şekil 4. 17. Anilinin 20 döngüyle -0.2 & 0.9 V arası alınan döngüsel voltammogram ile elektropolimerizasyonu sonucunda elde edilen polianilin grafiği

Anilin elektropolimerizasyonundan sonra elektrot bol destile suyla yıkanarak yüzeyine 10µl % 2.5'lik glutaraldehit eklenir 30 dk bekletilir. Bekleme süresinin ardından elektrot distile suyla yıkanır ve azot gazı geçirilerek kurutulur. Polianilin modifiye elektrodu 2 mg/500 µl olarak eppendorff'a hazırlanmış CAT enziminin içerisine daldırılır ve 1 saat bekletilir. Enzimin elektrot yüzeyine glutaraldehitin bağlanması gerçekleştiğinden sonra denemelere başlanır.

4.4.2. Biyosensörün H₂O₂ Tayini İçin Uygulanabilirliği

Anilin elektropolimerizasyonu ve çapraz bağlayıcı glutaraldehit ile hazırlanan CAT Biyosensörünün substratı olan H₂O₂ için uygunluğunun belirlenmesi için H₂O₂'nin artan konsantrasyonları için ölçümler alındı. H₂O₂'nin artan konsantrasyonlarına karşı biyosensör cevabı olan akımın da arttığı görülmüştür ve Şekil 4.18'de gösterilmiştir.

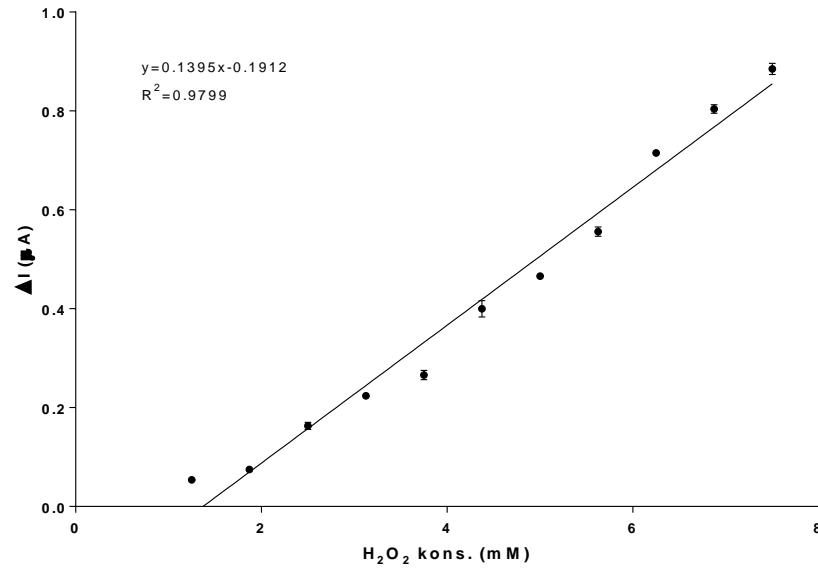


Şekil 4. 18. 2.5 mM, 3.75 mM, 6.25 mM H₂O₂ için alınan biyosensör cevabı

Elde edilen grafiklere ve tekrarlanabilirlik sonuçlarına göre Anilin elektropolimerizasyonu ve çapraz bağlayıcı glutaraldehit ile hazırlanan CAT biyosensörünün substratı H_2O_2 için uygun olduğu görülmüş ve CAT biyosensörünün doğrusal tayin aralığı denemelerine geçilmiştir.

4.4.3. Biyosensörün H_2O_2 İçin Doğrusal Tayin Aralığı

Biyosensörün hidrojen peroksit cevapları için doğrusal tayin aralığının belirlenmesi amacıyla yapılan denemelerde 1.25; 1.87; 2.5; 3.125; 3.75; 4.375; 5; 5.625; 6.25; 6.875; 7.5; 8.125 mM H_2O_2 derişimleri için ölçümler alındı. Elde edilen sonuçlardan H_2O_2 için doğrusal ölçüm aralığının 1.25 – 7.5 mM arasında olduğu belirlendi. Biyosensörün hidrojen peroksit cevapları için doğrusal tayin aralığı Şekil 4.19'da gösterilmiştir.



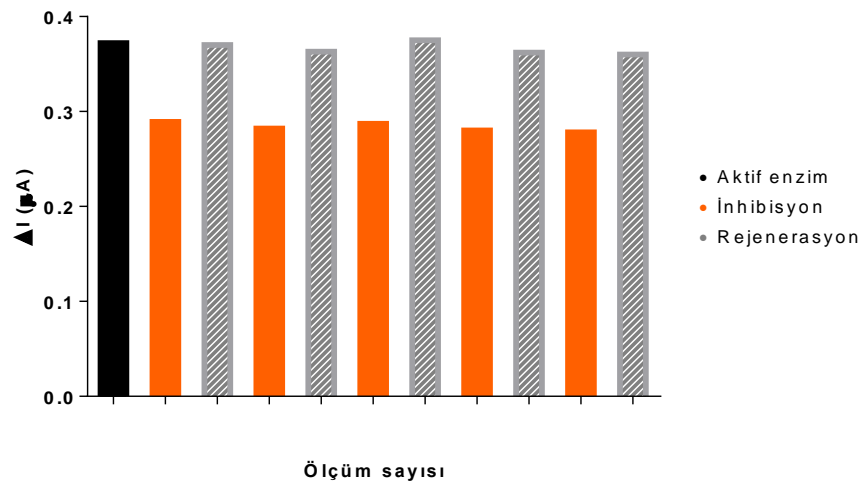
Şekil 4. 19. Katalaz biyosensörünün H_2O_2 için doğrusal tayin aralığı

CAT biyosensörünün pestisitlerle muamele edildiğinde aktivitesindeki değişimleri gözlemlemek için yapılan denemeler doğrusal ölçüm aralığında bulunan 3.125 mM H₂O₂ kullanılarak gerçekleştirildi.

4.4.4. Biyosensörün 2-PAM İle Rejenerasyonu

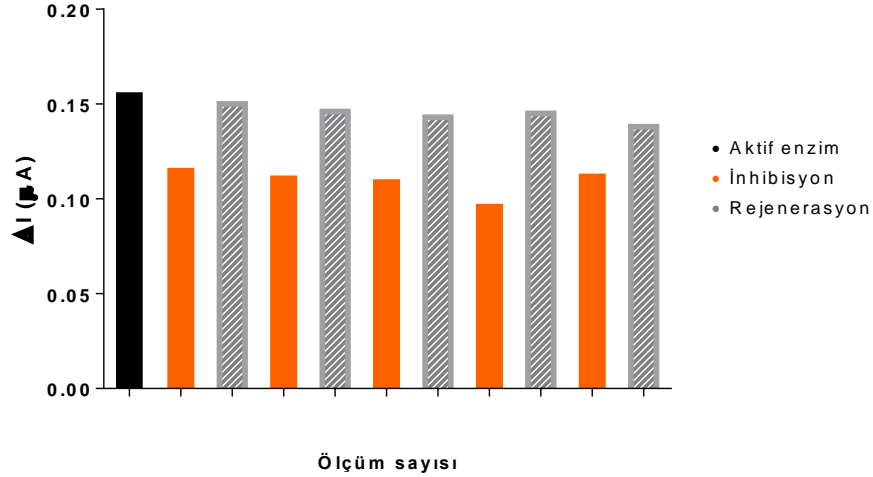
Biyosensörün pestisitlerle muamelesinden sonra 2-PAM ile rejenere olabirliklerinin incelenmesi için, pestisitle muamele edilmeden önce biyosensörün 3.125 mM H₂O₂ için aktivite ölçümü alındı. Daha sonra her bir pestisit (Malation, Diklorvos, Deltametrin, Lambda Cyhalotrein) sabit bir konsantrasyonu kullanılarak 3.125 mM H₂O₂ için tekrar aktivite ölçümü alındı. Bir ölçümden diğerine geçerken biyosensörün rejenerasyonunun kontrolü için biyoaktif tabakalı elektrot, spektrofotometrik çalışmalarda CAT enziminin rejenerasyonu için uygun bulunan 1 mM 2-PAM içerisinde 10 dk bekletildi ve yeniden biyosensörün 3.125 mM H₂O₂ için aktivite ölçümü alındı. Bu işlem her pestisit için 5 kere tekrarlandı.

4.71 mM Diklorvos ile muamele edilmiş CAT biyosensörü'nün 1 mM 2-PAM ile rejenerasyonu için 3.125 mM H₂O₂ için arka arkaya 5 ölçüm alınmış ve sonuçlar Şekil 4.20'de gösterilmiştir.



Şekil 4. 20. Diklorvos için rejenerasyon grafiği

1.47 mM Deltametrin ile muamele edilmiş CAT biyosensörü'nün 1 mM 2-PAM ile rejenerasyonu için 3.125 mM H₂O₂ için arka arkaya 5 ölçüm alınmış ve sonuçlar Şekil 4.21'de gösterilmiştir.

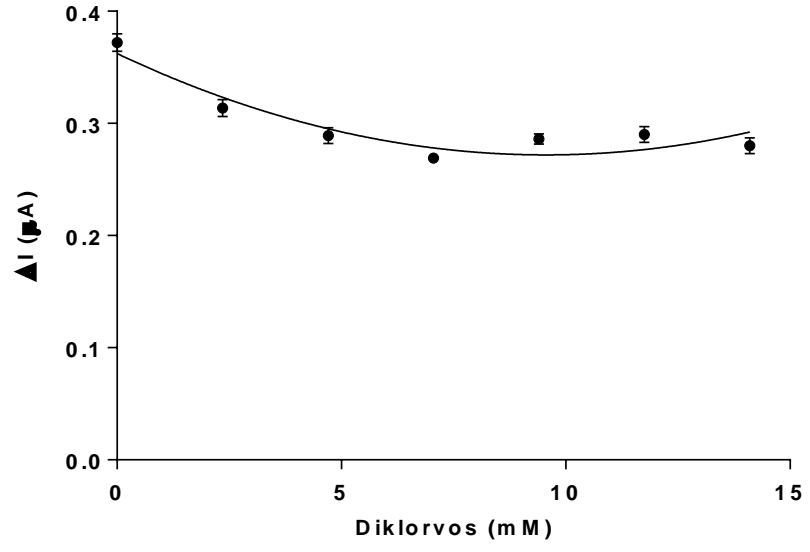


Şekil 4. 211. Deltametrin için rejenerasyon grafiği

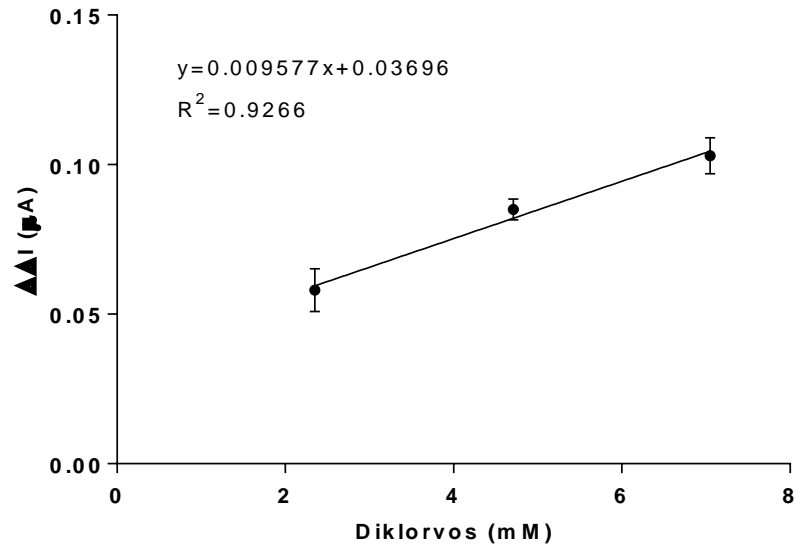
Malation ve Lambda cyhalotrin için yapılan rejenerasyon çalışmasında 2-PAM ile rejenerasyon gözlenmemiştir.

4.4.5. Pestisitlerin Katalaz Biyosensörü Aktivitesine Etkileri

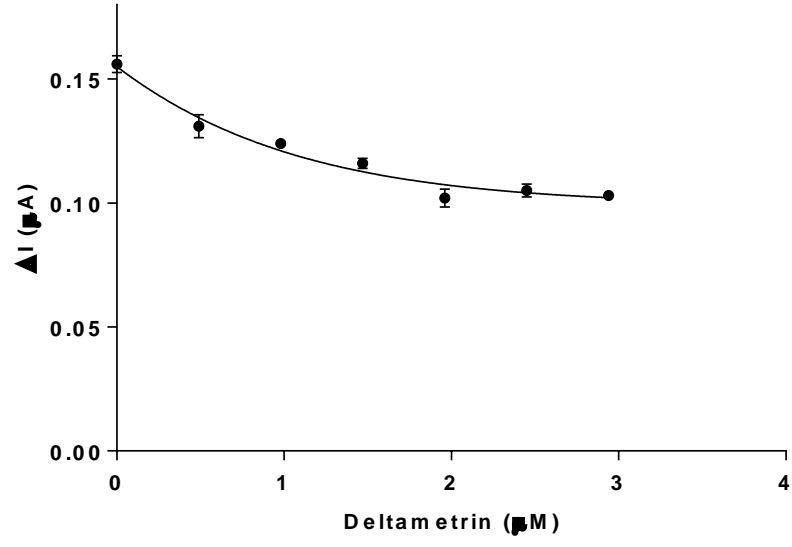
Pestisitlerin (Malation, Diklorvos, Deltametrin, Lambda Cyhalotrein) Tablo 3.5'te belirlenen konsantrasyonlarda CAT biyosensörü cevabı üzerine etkisinin incelenmesi için 3.125 mM H₂O₂ kullanıldı. 3.125 mM H₂O₂ için aktivite ölçümü alınarak pestisitlerin biyosensörü hangi ölçüde etkiledikleri hesaplandı. Biyosensörle bir ölçümden diğerine geçerken enzim rejenerasyonu için elektrot 1 mM 2-PAM çözeltisi içinde 10 dk bekletildi. Her bir pestisit farklı konsantrasyonlarına karşı elde edilen veriler Şekil 4.22, 4.24, 4.26 ve 4.27'de gösterilmiştir.



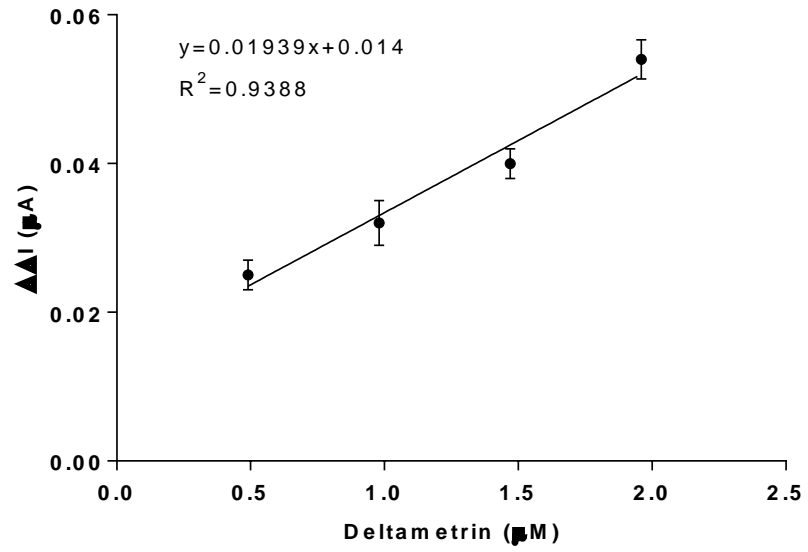
Şekil 4. 22. Diklorvos inhibisyonuna ait biyosensör cevabı



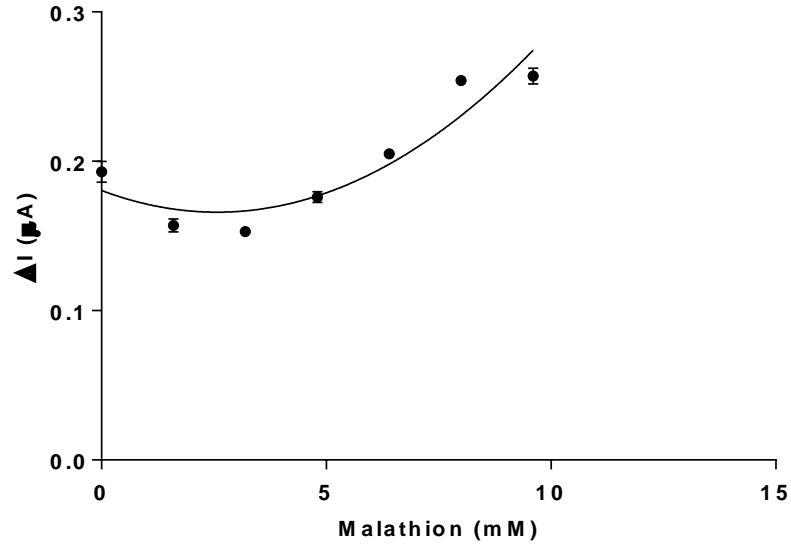
Şekil 4. 22 Diklorvos için lineer inhibisyon grafiği



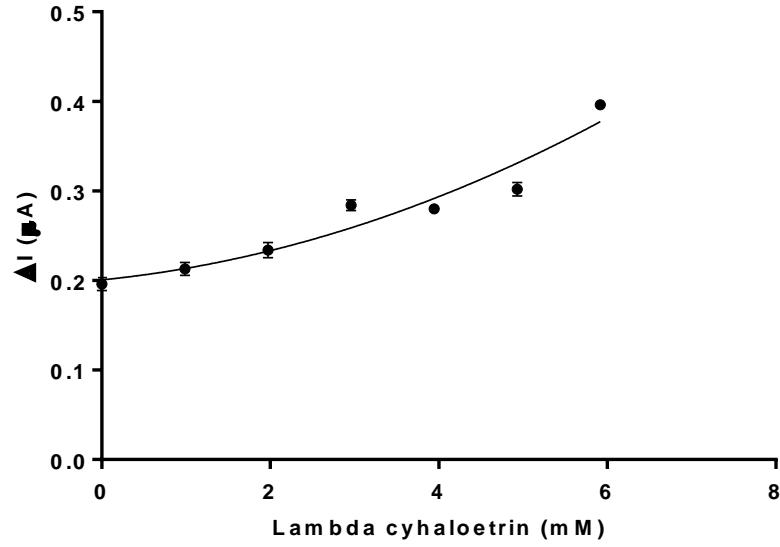
Şekil 4. 23 Deltametrin inhibisyonuna ait biyosensör cevabı



Şekil 4. 24 Deltametrin için lineer inhibisyon grafiği



Şekil 4. 25 Malation inhibisyonuna ait biyosensör cevabı



Şekil 4. 267. Lambda Cyhaloetirin inhibisyonuna ait biyosensör cevabı

Elde edilen verilere göre Pestisit tayinine yönelik CAT biyosensörünün geliştirilmesi için Deltametrin ve Diklorvos pestisitleri lineer inhibisyon gösterirken, Malation ve Lambda cyhalothrin inhibisyon göstermemiştir. Bu nedenle Deltametrin ve Diklorvos'un CAT temelli biyosensörle tayin edilmelerinin mümkün olduğu deney sonuçlarından görülmektedir.

BÖLÜM 5

TARTIŞMA

Bu tezin başlangıç aşamasında yapılan kaynak ve literatür taramaları sonucunda genellikle pestisitlerin *in vivo* ortamdaki etkilerinin incelendiği literatürler rastlanmıştır. Pestisitlerin *in vitro* ortamda antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkilerine ait az sayıda literatürlere rastlanmıştır. Ancak pestisitlerin antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkilerinin rejenerasyonunun incelendiği bir literatür çalışmasına rastlanmamıştır.

Bu çalışmada da Trakya bölgesinde yaygın kullanıldıklarını tespit ettiğimiz pestisitlerden Diklorvos, Malation, Deltametrin, Lambda cyhaloetrin'in antioksidan savunma enzimlerinden olan CAT, SOD ve GSH-Px aktivitesi üzerine etkileri incelendi. Çalışmanın devamında literatür taramaları sonucunda rejeneratör olarak belirlediğimiz 2-PAM'ın pestisitlerle muamele edilmiş olan enzimleri ne ölçüde rejenerere edebileceği incelendi. Tez çalışması kapsamında belirlenen pestisitlerin, CAT, SOD, GSH-Px enzimlerinin aktivitelerini ne ölçüde inhibe ettikleri ve bu etkinin 2-PAM ile ne ölçüde rejenerere edilebildiği incelendi. Veriler elde edildikten sonra kendi aralarında ve benzer literatürlerdeki verilerle kıyaslanarak rejenerasyonu anlamlı ve yüksek bulunan enzimin, uygun bulunan pestisit için biyosensörde biyoaktif bileşen olarak kullanılabilirliği de incelendi.

CAT aktivitesi üzerine pestisitlerin etkisi;

CAT aktivitesi 3.2.1.1'de belirtildiği gibi 209 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. CAT için H₂O₂'nin lineer konsantrasyon aralığı 1.5-7.5 mM olarak belirlendi ve Şekil 4.2'de verildi. Pestisitlerin CAT aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi için Şekil 4.2'de verilen lineer H₂O₂ konsantrasyon aralığında bulunan 3.125 mM H₂O₂ kullanıldı.

Malation, Diklorvos, Deltametrin, Lambda Cyhaloetrin pestisitlerinin enzim aktiviteleri üzerine hangi konsantrasyonlarının etkilerinin inceleneceği ön çalışmalarla belirlendi ve Tablo 3.4'te verildi.

Malation'un 0.049 mM, 0.098 mM, 0.196 mM ve 0.393 mM konsantrasyonlarının enzimler üzerine etkisi incelendi.

Malation'un CAT enzim aktivitesi üzerine etkisine ait sonuçlar Tablo 4.2'de ve Şekil 4.3'te verildi. Elde edilen verilere göre 0.049 mM malation için % 0.96, 0.098 mM malation için % 1.93, 0.196 mM malation için % 84.62, 0.393 mM malation için % 88.47 inhibisyon ölçüldü. Sonuçlardan görüldüğü gibi malation'un artan konsantrasyonu ile CAT enzimi aktivitesinde düşüş olmaktadır. Literatür çalışmalarında malation'un CAT aktivitesi üzerine etkisinin *in vitro* olarak ölçümüne ait sınırlı sayıda makaleye rastlanmıştır, bu konudaki çalışmaların çoğu *in vivo* ortamdadır. Ancak malation'un CAT aktivitesi üzerine etkisinin *in vivo* ve *in vitro* olarak ölçüldüğü makalelerde de malation'un CAT enzim aktivitesini inhibe ettiği veriler bulunmaktadır [51, 54].

Diklorvos'un 0.098 mM, 0.196 mM, 0.393 mM ve 0.980 mM konsantrasyonlarının enzim üzerine etkisi incelendi.

Diklorvos'un CAT enzim aktivitesi üzerine etkisine ait sonuçlar Tablo 4.7 ve Şekil 4.4'te verildi. Elde edilen verilere göre 0.098 mM diklorvos için % 50.96, 0.196 mM diklorvos için % 64.35, 0.393 mM diklorvos için % 75.96 ve 0.980 mM diklorvos için % 91.35 inhibisyon ölçüldü. Şekil 4.4'te de görüldüğü gibi diklorvos'un artan konsantrasyonları ile doğru orantılı bir inhibisyon gözlemlendi. Literatür çalışmalarında da diklorvos'un CAT enzim aktivitesini inhibe ettiği veriler bulunmaktadır [88, 89].

Deltametrin'in 0.002 mM, 0.004 mM, 0.008 mM ve 0.021 mM konsantrasyonlarının enzim üzerine etkisi incelendi.

Deltametrin'in CAT enzim aktivitesi üzerine etkisine ait sonuçlar Tablo 4.8 ve Şekil 4.5'te verildi. Elde edilen verilere göre 0.002 mM Deltametrin için % 7.69, 0.004 mM Deltametrin için % 9.62, 0.008 mM Deltametrin için % 46.15 ve 0.021 mM Deltametrin için % 90.38 inhibisyon ölçüldü. Şekil 4.5'te de görüldüğü gibi Deltametrin'in artan konsantrasyonları ile doğru orantılı bir inhibisyon gözlemlendi. Literatür çalışmalarında da Deltametrin'in CAT enzim aktivitesini inhibe ettiği veriler bulunmaktadır [90].

Lambda cyhaloetrin'in 0.25 mM, 0.49 mM, 1.24 mM, 2.47 mM konsantrasyonlarının enzimler üzerine etkisi incelendi.

Lambda cyhaloetrin'in CAT enzim aktivitesi üzerine etkisine ait sonuçlar Tablo 4.9 ve Şekil 4.6'da verildi. Elde edilen verilere göre 0.25 mM Lambda cyhaloetrin için % 25.55, 0.49 mM Lambda cyhaloetrin için % 34.31, 1.24 mM lambda cyhaloetrin için % 75.45, 1.47 mM Lambda cyhaloetrin için % 90.51 inhibisyon ölçüldü. Şekil 4.6'da da görüldüğü gibi lambda cyhaloetrin'in artan konsantrasyonlarıyla doğru orantılı bir inhibisyon gözlemlendi. Literatür çalışmalarında lambda cyhaloetrin'in CAT enzim aktivitesi üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Pestisitlerle muamele edilmiş CAT enziminin rejenerasyonu;

CAT enzimi aktivitesi üzerine malation, diklorvos, deltametrin, lambda cyhaloetrin'in inhibisyon etki gösterdiği elde edilen verilerden ve literatür çalışmalarından görülmektedir. Bu inhibisyon etkisinin rejenerasyonu çalışması için literatür çalışmalarından karar verilen 2-PAM'ın 1 mM ve 10 mM konsantrasyonlarının pestisitlerle muamele edilmiş CAT enzim aktivitesi üzerine etkisi incelendi [35]. Çalışılan pestisitlerin 2-PAM ile rejenerasyonuna ait literatür çalışması bulunamamıştır.

Malation ile muamele edilmiş CAT enziminin 1 mM ve 10 mM 2-PAM ile rejenerasyonunun ölçülmesi için yapılan denemeler sonucunda elde edilen veriler Tablo 4.6'da ve Şekil 4.3'te verildi. Elde edilen verilere göre 0.196 mM malation ile muamele edilmiş CAT enzimi 1 mM 2-PAM ile muamele edildiğinde aktivitesinin % 8.66'sını, 10 mM 2-PAM ile muamele edildiğinde % 12.64'ünü geri kazandı. 0.393 mM malation ile muamele edilmiş CAT enzimi 1 mM 2-PAM ile aktivitesinin % 1.93'ünü, 10 mM 2-PAM ile % 4.07'sini geri kazandı. Daha düşük malation konsantrasyonlarıyla muamele edildiğinde ise rejenerasyon gözlenmedi. Elde edilen rejenerasyon sonuçları anlamlı bulunmadı ve 2-PAM'ın malation için uygun rejeneratör olmadığına karar verildi.

Diklorvos ile muamele edilmiş CAT enziminin 1 mM ve 10 mM 2-PAM ile rejenerasyonunun ölçülmesi için yapılan denemeler sonucunda elde edilen veriler Tablo 4.7'da ve Şekil 4.4'te verildi. Elde edilen verilere göre diklorvos ile muamele edilmiş CAT enziminin 2-PAM ile rejenerasyonu olmadığı görüldü.

Deltametrin ile muamele edilmiş CAT enziminin 1 mM ve 10 mM 2-PAM ile rejenerasyonunun ölçülmesi için yapılan denemeler sonucunda elde edilen veriler Tablo 4.8'da ve Şekil 4.5'te verildi. Elde edilen verilere göre 0.002 mM deltametrin ile

muamele edilmiş CAT enzimi 1 mM 2-PAM ile muamele edildiğinde aktivitesinin % 7.69'unu, 10 mM 2-PAM ile muamele edildiğinde de % 7.69'unu geri kazandı. 0.004 mM deltametrin ile muamele edilmiş CAT enzimi 1 mM 2-PAM ile aktivitesinin % 9.62'sini, 10 mM 2-PAM ile de % 9.62'sini geri kazandı. 0.008 mM deltametrin ile muamele edilmiş CAT enzimi 1 mM 2-PAM ile aktivitesinin % 40.38'ini, 10 mM 2-PAM ile aktivitesinin % 40.71'ini geri kazandı. 0.021 mM deltametrin ile muamele edilmiş CAT enzimi ise 2-PAM ile rejenera olmadı. Elde edilen verilerden görüldüğü gibi artan deltametrin konsantrasyonu ile orantılı olarak 2-PAM ile rejenerasyon zorlaşmıştır. 0.021 mM deltametrin konsantrasyonunda ise rejenerasyon gözlenmedi.

Lambda cyhaloetrin ile muamele edilmiş CAT enziminin 1 mM ve 10 mM 2-PAM ile rejenerasyonunun ölçülmesi için yapılan denemeler sonucunda elde edilen veriler Tablo 4.9'da ve Şekil 4.6'da verildi. Elde edilen verilere göre 0.25 mM lambda cyhaloetrin ile muamele edilmiş CAT enzimi 1 mM 2-PAM ile muamele edildiğinde aktivitesinin % 13.15'ini, 10 mM 2-PAM ile muamele edildiğinde % 13.75'ini geri kazandı. 0.49 mM lambda cyhaloetrin ile muamele edilmiş CAT enzimi 1 mM 2-PAM ile aktivitesinin % 17.52'sini, 10 mM 2-PAM ile % 18.41'ini geri kazandı. 1.24 mM lambda cyhaloetrin ile muamele edilmiş CAT enzimi 1 mM 2-PAM ile aktivitesinin % 19.71'ini, 10 mM 2-PAM ile aktivitesinin % 19.8'ini geri kazandı. 2.47 mM lambda cyhaloetrin ile muamele edilmiş CAT enzimi 1 mM 2-PAM ile aktivitesinin % 32.85'ini, 10 mM 2-PAM ile aktivitesinin % 32.41'ini geri kazandı. Elde edilen verilerden görüldüğü gibi lambda cyhaloetrin 2-PAM ile rejenera olabilmektedir.

SOD aktivitesi üzerine pestisitlerin etkisi;

SOD aktivitesi 3.2.1.2'de belirtildiği gibi 540 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. SOD için riboflavin'in lineer konsantrasyon aralığı 1.075-2.150 μ M olarak belirlendi ve Şekil 4.7'de verildi. Pestisitlerin SOD aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi için Şekil 4.7'de verilen lineer riboflavin konsantrasyon aralığında bulunan 1.3 μ M riboflavin kullanıldı.

Malation, Diklorvos, Deltametrin, Lambda Cyhaloetrin pestisitlerinin enzim aktiviteleri üzerine hangi konsantrasyonlarının etkilerinin inceleneceği ön çalışmalarla belirlendi ve Tablo 3.4'te verildi.

Malation'un 0.049 mM, 0.098 mM, 0.196 mM ve 0.393 mM konsantrasyonlarının enzimler üzerine etkisi incelendi.

Malation'un SOD enzim aktivitesi üzerine etkisine ait sonuçlar Tablo 4.14'te ve Şekil 4.8'de verildi. Elde edilen verilere göre 0.049 mM malation için % 17.91, 0.098 mM malation için % 28.66, 0.196 mM malation için % 38.21, 0.393 mM malation için % 92.54 inhibisyon ölçüldü. Sonuçlardan görüldüğü gibi malation'un artan konsantrasyonu ile SOD enzimi aktivitesinde düşüş olmaktadır. Literatür çalışmalarında malation'un SOD aktivitesi üzerine etkisinin *in vivo* ve *in vitro* olarak ölçüldüğü makalelerde de malation'un SOD enzim aktivitesini inhibe ettiği veriler bulunmaktadır. Ancak E. Büyükgüzel, 2009 yılında yayınlamış olduğu makalesinde malation'un düşük konsantrasyonlarının SOD aktivitesini arttırırken, yüksek konsantrasyonlarının SOD aktivitesini inhibe ettiğini rapor etmiştir [91].

Diklorvos'un 0.098 mM, 0.196 mM, 0.393 mM ve 0.980 mM konsantrasyonlarının enzim üzerine etkisi incelendi.

Diklorvos'un SOD enzim aktivitesi üzerine etkisine ait sonuçlar Tablo 4.15 ve Şekil 4.9'da verildi. Elde edilen verilere göre 0.098 mM diklorvos için % 10.45, 0.196 mM diklorvos için % 37.31, 0.393 mM diklorvos için % 54.5 ve 0.980 mM diklorvos için % 50.0 inhibisyon ölçüldü. Şekil 4.9'da de görüldüğü gibi diklorvos'un artan konsantrasyonları ile doğru orantılı bir inhibisyon gözlemlendi. Literatür çalışmalarında da diklorvos'un SOD enzim aktivitesini inhibe ettiği veriler bulunmaktadır [88, 89].

Deltametrin'in 0.002 mM, 0.004 mM, 0.008 mM ve 0.021 mM konsantrasyonlarının enzim üzerine etkisi incelendi.

Deltametrin'in SOD enzim aktivitesi üzerine etkisine ait sonuçlar Tablo 4.16 ve Şekil 4.10'da verildi. Elde edilen verilere göre 0.002 mM Deltametrin için % 35.82, 0.004 mM Deltametrin için % 26.87, 0.008 mM Deltametrin için % 8.95 ve 0.021 mM Deltametrin için ise inhibisyon ölçülmedi. Şekil 4.10'dan görüldüğü gibi Deltametrin'in düşük konsantrasyonlarında inhibisyon gözlenirken artan konsantrasyonlarında aktivasyon gözlemlendi. Literatür çalışmalarında ise Deltametrin'in SOD enzim aktivitesini inhibe ettiği veriler bulunmaktadır [90].

Lambda cyhaloetrin'in 0.25 mM, 0.49 mM, 1.24 mM, 2.47 mM konsantrasyonlarının enzimler üzerine etkisi incelendi.

Lambda cyhaloetrin'in SOD enzim aktivitesi üzerine etkisine ait sonuçlar Tablo 4.17 ve Şekil 4.11'de verildi. Elde edilen verilere göre 0.25 mM Lambda cyhaloetrin için % 7.46, 0.49 mM Lambda cyhaloetrin için % 13.43, 1.24 mM lambda cyhaloetrin

için % 52.24, 1.47 mM Lambda cyhaloetrin için % 82.09 inhibisyon ölçüldü. Şekil 4.10'da da görüldüğü gibi lambda cyhaloetrin'in artan konsantrasyonlarıyla doğru orantılı bir inhibisyon gözlemlendi. Literatür çalışmalarında ise lambda cyhaloetrin'in SOD enzim aktivitesi üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Pestisitlerle muamele edilmiş SOD enziminin rejenerasyonu;

Malation, Diklorvos, Deltametrin ve Lambda cyhaloetrin pestisitleriyle muamele edilmiş SOD enziminin 2-PAM ile rejenerasyonu gözlemlenmedi.

GSH-Px aktivitesi üzerine pestisitlerin etkisi;

GSH-Px aktivitesi 3.2.1.3'de belirtildiği gibi 340 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. GSH-Px için NADPH'nin lineer konsantrasyon aralığı 0.05-0.15 mM olarak belirlendi ve Şekil 4.12'de verildi. Pestisitlerin GSH-Px aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi için Şekil 4.12'de verilen lineer NADPH konsantrasyon aralığında bulunan 0.1 mM NADPH kullanıldı.

Malation, Diklorvos, Deltametrin, Lambda Cyhaloetrin pestisitlerinin enzim aktiviteleri üzerine hangi konsantrasyonlarının etkilerinin inceleneceği ön çalışmalarla belirlenmiş ve Tablo 3.4'te verildi.

Malation'un 0.049 mM, 0.098 mM, 0.196 mM ve 0.393 mM konsantrasyonlarının enzimler üzerine etkisi incelendi.

Malation'un GSH-Px enzim aktivitesi üzerine etkisine ait sonuçlar Tablo 4.22'de ve Şekil 4.13'de verildi. Elde edilen verilere göre 0.049 mM, 0.098 mM, 0.196 mM malation için inhibisyon gözlemlenmezken, 0.393 mM malation için % 18.03 inhibisyon ölçüldü. Sonuçlardan görüldüğü gibi malation'un ancak yüksek konsantrasyonu ile GSH-Px enzimi aktivitesinde düşüş olmaktadır. Literatür çalışmalarında malation'un GSH-Px aktivitesi üzerine etkisinin *in vivo* ve *in vitro* olarak ölçüldüğü makalelerde GSH-Px aktivitesi düşük konsantrasyonlardaki malation muamelesi ile artarken, yüksek konsantrasyonlarda değişmeden kaldığı gösterildi [54].

Diklorvos'un 0.098 mM, 0.196 mM, 0.393 mM ve 0.980 mM konsantrasyonlarının enzim üzerine etkisi incelendi.

Diklorvos'un GSH-Px enzim aktivitesi üzerine etkisine ait sonuçlar Tablo 4.22 ve Şekil 4.14'te verildi. Elde edilen verilere göre 0.098 mM diklorvos için % 95.63, 0.196 mM diklorvos için % 96.72, 0.393 mM diklorvos için % 97.81 ve 0.980 mM diklorvos için % 98.91 inhibisyon ölçüldü. Şekil 4.14'te de görüldüğü gibi diklorvos'un

artan konsantrasyonları ile doğru orantılı bir inhibisyon gözlemlendi. Literatür çalışmalarında da diklorvos'un GSH-Px enzim aktivitesini inhibe ettiği veriler bulunmaktadır [88, 89].

Deltametrin'in 0.002 mM, 0.004 mM, 0.008 mM ve 0.021 mM konsantrasyonlarının enzim üzerine etkisi incelendi.

Deltametrin'in GSH-Px enzim aktivitesi üzerine etkisine ait sonuçlar Tablo 4.24 ve Şekil 4.15'te verildi. Elde edilen verilere göre 0.002 mM Deltametrin için % 82.51, 0.004 mM Deltametrin için % 88.52, 0.008 mM Deltametrin için % 90.16 ve 0.021 mM Deltametrin için % 93.99 inhibisyon ölçüldü. Şekil 4.15'ten görüldüğü gibi Deltametrin'in artan konsantrasyonu ile orantılı inhibisyon gözlemlendi. Deltametrin'in GSH-Px enzim aktivitesini inhibe ettiği veriler bulunmaktadır [90].

Lambda cyhaloetrin'in 0.25 mM, 0.49 mM, 1.24 mM, 2.47 mM konsantrasyonlarının enzimler üzerine etkisi incelendi.

Lambda cyhaloetrin'in GSH-Px enzim aktivitesi üzerine etkisine ait sonuçlar Tablo 4.25 ve Şekil 4.16'da verildi. Elde edilen verilere göre 0.25 mM Lambda cyhaloetrin için % 2.19, 0.49 mM Lambda cyhaloetrin için % 6.01, 1.24 mM lambda cyhaloetrin için % 12.01, 1.47 mM Lambda cyhaloetrin için % 44.81 inhibisyon ölçüldü. Şekil 4.16'da da görüldüğü gibi lambda cyhaloetrin'in artan konsantrasyonlarıyla doğru orantılı bir inhibisyon gözlenmiştir. Literatür çalışmalarında ise lambda cyhaloetrin'in GSH-Px enzim aktivitesi üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Pestisitlerle muamele edilmiş SOD enziminin rejenerasyonu;

Malation, Diklorvos, Deltametrin ve Lambda cyhaloetrin pestisitleriyle muamele edilmiş GSH-Px enziminin 2-PAM ile rejenerasyonu gözlenmemiştir.

Enzimlerin pestisitlerle inhibisyonu ve 2-PAM ile rejenerasyonları incelendiğinde, anlamlı bir inhibisyon ve yüksek oranda rejenerasyon CAT enzimi ile elde edildi. SOD ve GSH-Px enzimleri pestisitlerle inhibe olurken 2-PAM ile rejenerasyon göstermemektedir. Bu nedenle pestisit tayini için bir biyosensör geliştirilmesi için 2-PAM ile rejenere olabilen CAT enzimi en uygun görülmektedir. Bu nedenle tez çalışmasının devamında; CAT enzimi ile bir biyosensör hazırlayarak pestisit tayini için kullanılabilirliği incelendi.

Bu amaçla Anilin elektropolimerizasyonu ile CAT enzimi biyosensörün yüzeyine tutturuldu. Elektrodun 20 döngü sonucunda Anilin ile kaplandığı Şekil 4.17’de görülmektedir. CAT enziminin anilin tabakaya tutturulması ve glutaraldehit ile çapraz bağlanması sonucu biyoaktif tabaka hazırlandı. Biyoaktif tabakanın CAT enzimi substratı olan H₂O₂ ile tepkimeye girip girmediği farklı konsantrasyonlarda H₂O₂ kullanılarak ölçüldü ve artan H₂O₂ konsantrasyonu ile biyosensör cevabını da arttığı görüldü ve Şekil 4.18’de gösterildi.

Biyosensör’ün H₂O₂ için doğrusal tayin aralığı 1.25 – 7.5 mM H₂O₂ olarak belirlendi ve Şekil 4.19’da gösterildi. Pestisitlerin inhibisyon derecelerinin ve rejenerasyonlarının ölçülmesi için doğrusal tayin aralığındaki 3.125 mM H₂O₂ konsantrasyonu kullanıldı.

Biyosensörün pestisitlerle muamelesinden sonra 2-PAM ile rejenerasyonun olabirliklerinin incelenmesi için, pestisitle muamele edilmeden önce biyosensörün 3.125 mM H₂O₂ için aktivite ölçümü alındı. Daha sonra her bir pestisit (Malation, Diklorvos, Deltametrin, Lambda Cyhalotrin) sabit bir konsantrasyonu kullanılarak 3.125 mM H₂O₂ için tekrar aktivite ölçümü alındı. Bir ölçümden diğerine geçerken biyosensörün rejenerasyonunun kontrolü için biyoaktif tabakalı elektrot, spektrofotometrik çalışmalarda CAT enziminin rejenerasyonu için uygun bulunan 1 mM 2-PAM içerisinde 10 dk bekletildi ve yeniden biyosensörün 3.125 mM H₂O₂ için aktivite ölçümü alındı. Bu işlem her pestisit için 5 kere tekrarlandı.

4.71 mM Diklorvos ile muamele edilmiş CAT biyosensörü’nün 1 mM 2-PAM ile rejenerasyonu için 3.125 mM H₂O₂ için arka arkaya 5 ölçüm alındı ve sonuçlar Şekil 4.20’de gösterildi. Şekil 4.20’de görüldüğü gibi biyosensör 1 mM 2-PAM ile oldukça yüksek oranda rejenerasyon olabilmektedir.

1.47 mM Deltametrin ile muamele edilmiş CAT biyosensörü’nün 1 mM 2-PAM ile rejenerasyonu için 3.125 mM H₂O₂ için arka arkaya 5 ölçüm alındı ve sonuçlar Şekil 4.21’de gösterildi. Şekil 4.21’de görüldüğü gibi biyosensör 1 mM 2-PAM ile oldukça yüksek oranda rejenerasyon olabilmektedir.

Malation ve Lambda cyhalotrin için yapılan rejenerasyon çalışmasında 2-PAM ile rejenerasyon gözlenmemiştir.

Pestisitlerin (Malation, Diklorvos, Deltametrin, Lambda Cyhalotrin) Tablo 3.5’te belirlenen konsantrasyonlarda CAT biyosensörü cevabı üzerine etkisinin

incelenmesi için 3.125 mM H₂O₂ kullanıldı. 3.125 mM H₂O₂ için aktivite ölçümü alınarak pestisitlerin biyosensörü hangi ölçüde etkiledikleri hesaplandı. Biyosensörle bir ölçümden diğerine geçerken enzim rejenerasyonu için elektrot 1 mM 2-PAM çözeltisi içinde 10 dk bekletildi. Her bir pestisit farklı konsantrasyonlarına karşı elde edilen veriler Şekil 4.22, 4.24, 4.26 ve 4.27’de gösterildi.

Elde edilen verilere göre Pestisit tayinine yönelik CAT biyosensörünün geliştirilmesi için Deltametrin ve Diklorvos pestisitleri lineer inhibisyon gösterirken, Malation ve Lambda cyhaloethrin inhibisyon göstermedi. Bu nedenle Deltametrin ve Diklorvos’un CAT temelli biyosensörle tayin edilebilirliklerinin mümkün olduğu görülmektedir.

Antioksidan savunma sistemi enzimlerinin aktivitelerinin pestisitlerle önemli ölçüde değiştiğine dair literatür çalışmaları bulunmaktadır. Ancak içerdiği etken maddeye göre çok sayıda farklı pestisit bulunmakta ve bu pestisitler Türkiye’nin farklı bölgelerinde yetiştirilen ürünün farklılıklarından dolayı farklı çeşitlilikte kullanılmaktadır. Tez kapsamında özellikle Trakya bölgesinde yaygın kullanılan pestisitler tespit edilmiş ve birbirleriyle karşılaştırılabilirlikleri için OP ve sentetik piretroit olmak üzere iki kimyasal sınıftan ikişer pestisitle denemeler yapılmıştır. Seçilmiş olan pestisitlerden Lambda cyhaloethrin’in antioksidan savunma sistemi enzimleri üzerine etkisine dair daha önce yapılmış bir literatüre rastlanmamıştır. Bu nedenle elde edilen veriler bu alanda çalışma yapacak olanlara önemli ölçüde katkı sağlayacaktır. Elde edilen veriler pestisitlerin antioksidan savunma sistemi enzimlerinden CAT, SOD ve GSH-Px enzim aktivitelerini önemli ölçüde etkilediğini göstermektedir.

Tarım alanında ürünlerin korunması için oldukça dikkatsiz ve bol miktarda kullanılan ve de sağlık açısından bu kadar zararlı olan pestisitlerin tayin yöntemleri oldukça sınırlıdır ve pahalı cihazlarla yapılmaktadır. Tezin amaçlarından biri pestisitlerin tayin edilebilirliği için bir biyosensör geliştirmesinde uygun olabilecek bir enzimin seçilmesi ve bu enzimle tayin edilebilecek uygun bir pestisit belirlenmesidir. Biyosensör geliştirmede önemli olan parametrelerden biri de biyoaktif bileşenin bir ölçüm aldıktan sonra diğer ölçümler için rejenere edilebilir olmasıdır. Bu amaçla yapılan literatür çalışmaları sonucunda pestisitle inhibe olmuş enzimlerin rejenerasyonu için kullanılan 2-PAM’ın tez kapsamında çalışılacak olan enzimlerin pestisitlerle

muamele edildikten sonra rejenere olabilirlikleri incelenmiştir. 2-PAM'ın tez kapsamında çalışılan enzimleri rejenere ettiğine dair bir literatür çalışması bulunmamaktadır. Bu nedenle elde edilen sonuçlar bu alana daha fazla veri ile katkı sağlayacaktır.

Bu doktora tezi kapsamında çalışılan enzimler ve pestisitlere ait bulguların sonuçları şöyle özetlenebilir; Çalışılan enzimler pestisitler ile önemli ölçüde inhibe olmaktadır. Ancak 2-PAM ile sadece CAT enziminin rejenere olduğu görülmektedir. Bu nedenle pestisit tayini için CAT enziminin kullanılabilirliği biyosensör için ön çalışmalar yapılarak incelenmiştir. Elde edilen verilerden deltametrin ve diklorvos pestisitlerinin tayini için incelenen CAT temelli biyosensörün bu pestisitlerle lineer inhibisyon ve 2-PAM ile yüksek rejenerasyon gösterdiği tespit edilmiştir. Ancak malation ve lambda cyhaloetrin pestisitleri ile ölçüm alınan CAT biyosensörünün 2-PAM ile rejenere olmamasından bu pestisitlerin CAT temelli biyosensör ile tayin edilemeyeceği de görülmektedir.

Sonuç olarak pestisitlerin tayini için aktivitesi yüksek, uygun ve kolay ulaşılabilir bir enzim kaynağının belirlenmesi ve bu enzimin 2-PAM ile rejenere olabildiğinin tespit edilmesi ile pestisit tayini için CAT temelli bir biyosensör geliştirilmesinin mümkün olduğu görülmektedir ve ilerleyen çalışmalarla pestisit tayini için CAT temelli bir biyosensör geliştirilmesi düşünülmektedir.

BÖLÜM 6

KAYNAKLAR

- [1] F. L. McEwen ve G. R. Stephenson, *The Use and Significance of Pesticides in the Environment*, John Wiley & Sons, 66: 538, 1979
- [2] M. Moses, *Pesticide-related health problems and farmworkers*, AAOHN J. 37 (3) 115-130, 1989
- [3] J.A. Guest, M.P. Copley, K.L., *Homernic, Carcinogenic effects of pesticides*, Pathol Pharmacol., 71(3): 387-390, 1991
- [4] F.L. Chung, H.C. Chen, R.G. Nath, *Lipid peroxidation as a potential endogeneous source for the formation of exocyclic DNA adducts*, Carcinogenesis, 17, 2105-2111, 1996
- [5] Ü. Çömelekoğlu, A. Arpacı, B. Mazmancı, *Pestisidlerle kronik olarak karşılaşan tarım işçilerinin pestisidlerden korunma konusundaki tutumları*, 3. İşçi Sağlığı kongresi, Ankara, 1998
- [6] B.N. Ames, M.K. Shigenaga, T.M. Hagen, *Oxidants, Antioxidants and the Degenerative Diseases of Aging*, Proc Natl Acad Sci, 90:7915-7922, 1993
- [7] İ. Akkuş, *Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri*, Mimoza Yayınları, 38(5):1-123, 1995

- [8] Y. Dündar, R. Aslan, *Hekimlikte Oksidatif Stres ve Antioksidanlar*, Afyon Kocatepe Üniversitesi Yayınları, 29:95-101, 2000
- [9] B. Arosio, N. Gagliano, L.M.P. Fusaro, *Aloe-Emodin quinone pretreatment reduces acute liver injury induced by carbon tetrachloride*, *Pharmacol & Toxicol*, 87: 229-233, 2000
- [10] T. Higashi, F. Kawamata, T. Sakamoto, *Studies on Rat Liver Catalase. VII. Double-Labeling of Catalase by 14C-Leucine and 3H-d Aminolevulinic Acid*, *J Biochem, Tokyo*, 76: 703-708, 1974
- [11] B. Halliwell, J. M. Gutteridge, *Methods Enzymology*, 186:1-85, 1990
- [12] P. Nicholls, I. Fita, P.C. Loewen, *Enzymology and Structure of Catalases. Advances in Inorganic Chemistry*, 51: 51-106, 2000
- [13] A. Lanrı, A. Schejter, *On the Sixth Coordination Position of Beef Liver Catalase*, *FEBS Lett*, 55, 254, 1975
- [14] G.L. Jones, C.J. Masters, *On the Comparative Characteristics of Mammalian Catalases*, *Biochemistry and Molecular Biology*, 55(4) : 511-518, 1976
- [15] Dan E. Robertson, *Catalases*, U.S.P. No: 20040005655, 2004
- [16] M. Kremer, *Peroxidatic Activity of Catalase*, *Biochim Biophys Act.* 198,199, 1970
- [17] O. Lardinois, *Reactions of Bovine Liver Catalase with Superoxide Radicals and Hydrogen Peroxide*, *Free Radic Res* 22, 251, 1995
- [18] J. Switala, P.C. Loewen, *Diversity of Properties Among Catalases*, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 401(2): 145-154, 2002

- [19] L.A. Anderson, J.H. Dawson, *EXAFS Spectroscopy of Hemecontaining Oxygenases and Peroxidases*, Structure and Bonding, 64: 1-40, 1991
- [20] I. Fridovich, *Superoxide Radical and Superoxide Dismutase*, Biochem. Soc. Trans., 1: 48, 1973.
- [21] F. Lavelle, A. Michelson, L.Đimitrijević, *Biological Protection by Superoxide Dismutase*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 55,350, 1973
- [22] A. Petkau, W. Chelack, S. Pleskach, B. Meeker, C. Brady, *Radioprotection of Mice by Superoxide Dismutase*, Biochem Biophys.Res. Commun. 65, 886, 1975
- [23] L. Sheng, X. Zheng, H. Tong, S. Liu, J. Du, Q. Liu, *Purification and Characterization of Cytosolic Isoenzyme III of Cu, Zn- Superoxide Dismutase from Tobacco Leaves*, Plant Science, 167 (6): 1235-1241, 2004
- [24] S. Yanbeyi, *Aspirin ve antioksidant buthylated hydroxyanisole'ün tavşanlarda eritrosit total katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri üzerine etkileri*, Ondokuz Mayıs Üni. Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Samsun, 88s., 1999.
- [25] H. Ak, H. Dingiloğlu, N. Habif ve ark., *Plasma lipid peroxidation, Vit E, Superoksit dismutase and Glutathione peroxidase alterations in coronary atherosclerosis*, Tr J Med Sci, 26, 11-15, 1994
- [26] R. Hurst, Y. Bao, P. Jemth, B. Mannervı, G. Williamson, *Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase Activity of Rat Class Theta Glutathione Transferase T2-2*, Biochem. Soc. Trans., 25, S559, 1997
- [27] L. Jornot, H. Petersen, A.F. Junod, *Hydrogen peroxide-induced DNA damage is independent of nuclear calcium but dependent on redox-active ions*, Biochem J, 335: 85-94, 1998

- [28] EM. Mills, K. Takeda, ZX. Yu ve ark., *Nerve growth factor treatment prevents the increase in superoxide produced by epidermal growth factor in PC12 cells*, J Biol Chem, 273:22165-8, 1998.
- [29] C.E. Cross, B. Halliwell, E.T. Borish, *Oxygen Radicals and Human-Disease*, Annals of Internal Medicine, 107(4): 526-545, 1987
- [30] C.S., Foote, *Chemistry of reactive oxygen species*. In “ Chemical Changes in Food During Processing”, T. Richardson and J.W. Finley (Eds), Van Nostrand Reinhold Company, New York, 17-32, 1985
- [31] I. FRIDOVICH, *Superoxide Radical and Superoxide Dismutase*, Acc. Chem. Res., 5:321, 1972
- [32] Dr. C. Çavdar, Dr. A. Sifil, Dr. T. Çamsarı, *Reaktif Oksijen Partikülleri Ve Antioksidan Savunma*, Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi/Office Journal of the Turkish Nephrology, Association, 3-4: 92-95, 1997
- [33] Azmi Telefoncu, *Enzimoloji*, Lisansüstü yaz okulu, Kuşadası-Aydın, 21-27 Eylül 1997
- [34] A. Yemenicioğlu, B. Cemeroğlu, *Enzimlerin aktivasyon ve rejenerasyonunun gıdaların kalitesi üzerindeki etkileri*, GIDA, 23 (6): 415-423, 1998
- [35] K.C. Gulla, M.D. Gouda, M.S. Thakur, N.G. Karanth, *Reactivation of immobilized acetylcholinesterase in an amperometric biosensor for organophosphorus pesticide*, Biochimica et Biophysica Acta, 1597, 133–139, 2002
- [36] E. Gözkeser, S.Yüksel, H. Atalay, *Geç dönem Pralidoksim uygulamasına yanıt veren organofosfat zehirlenmesi olgusu*, Pam Tıp Derg 6(1):26-29, 2013

- [37] M. Jokanović, M. Prostran, *Pyridinium oximes as cholinesterase reactivators. Structure-activity relationship and efficacy in the treatment of poisoning with organophosphorus compounds*, Curr. Med. Chem. 16 (17): 2177–88, 2009
- [38] E. Durmusoglu, *Kontrolsüz ve bilinçsiz pestisit kullanımının neden olduğu sorunlar ve çözüm önerileri*, Hasad 32 (270): 32-36, 2007
- [39] K. H. Buchel, *Chemistry of Pesticides*, John Wiley & Sons, Inc. New York, USA, 1983
- [40] J.H. Kang and Y.S. Chang, *Organochlorine Pesticides in Human Serum*, Pohang University of Science and Technology (POSTECH), Republic of Korea, 215-240, 2011
- [41] S.V. Kumar, Md. Fareedullah, Y. Sudhakar, B. Venkateswarlu, E. Ashok Kumar, *Current review on organophosphorus poisoning*, Archives of Applied Science Research, 2 (4): 199-215, 2010
- [42] G.J. Smith, *Pesticide use and toxicology in relation to wildlife: Organophosphorus and carbamate compounds*, Washington, D.C., U.S. Department of the Interior, Fish and Wildlife Service, Resource Publication, 170, 171 p. 1987
- [43] W.M. Valentine, *Pyrethrin and pyrethroid insecticides*, Vet Clin North Am Small Anim Pract 20(2):375-382, 1990
- [44] P.K. Gupta, R.C. Gupta, *Pharmacology, Toxicology and Degradation of Endosulfan*, Toxicology, 13, 115-130. 1979
- [45] N. Delen, S. Toros, N. Tosun, S. Öztürk, E. Yücel, E. Çalı, *Tarım İlaçları Kullanımı ve Üretimi, Türkiye Ziraat Mühendisliği 4. Teknik Kongresi*, T.C. Ziraat Bankası Kültür Yayınları, No:26, 1015-1028, 1995

- [46] M. Malley, *Clinical Evaluation of Pesticide Exposure and Poisonings*, Lancet, 349, 1161-66, 1997
- [47] K. Karadağ, *Kolinesteraz İnhibitörü Pestisitlere Maruz Kalan İşçilerde İş Sağlığı Uygulamaları*, Türk Tabipler Birliği Mesleki Sağlık ve Güvenlik Dergisi, 2000
- [48] C.C. Ceron, C.G. Panizo, A. Montes, *Toxicological Effects in Rabbits Induced by Endosulfan, Lindane and Methylparation Representing Agricultural by Products Contamination*, Bull Environ Contam Toxicol, 54, 258-65, 1995
- [49] G.M. Rafi, T. Srinivas, S.J. Reddy, D.C. Reddy, R. Ramamurthy, *Acute and Chronic Toxicity of Endosulfan to Crap: Effect of Lipid Metabolism*, Bull Environ Contam Toxicol, 47, 918-24, 1991
- [50] L.S. Gold, N.B. Manley, T.H. Slone, J.M. Ward, *Conpendium of Chemical Carcinogens by Target Organ: Results of Chronic Bioassays in Rats, Mice, Hamsters, Dogs and Monkeys*, Toxicol Pathol, 29, 639-652, 2001
- [51] C. Datta, J. Gupta, A. Sarkar, D. Sengupta, *Effects of Organophosphorus Insecticide Phosphomidon on Antioxidant Defence Components of Human Erythrocyte and Plasma*, Indian J Exp Biol, 30(1), 65-67, 1992
- [52] B.D. Banerjee, V. Seth, A. Bhattacharya, S.T. Pasha, A.K. Chakraborty, *Biochemical Effects of Some Pesticides on Lipid Peroxidation and Free Radical Scavengers*, Toxicol Lett, 107, 33-47, 1999
- [53] M. Kale, N. Rathore, S. John, D. Bhatnagar, *Lipid Peroxidative Damage on Pyrethroid Exposure and Alteration in Antioxidant Status in Rat Erythrocytes: A Possible İnvolvement of Reactive Oxygen Spicies*, Toxicol Lett, 105, 197-205, 1999

- [54] M. Öncü, F. Gultekin, E. Karaöz, İ. Altuntaş, N.Delibas, ***Klorprifos-Etil Tarafından Oluşturulan Oksidatif Hasarın Sıçan Karaciğerine Etkileri***, Turk Klin J Med Sci, 22, 50-55, 2002
- [55] C.G. Castillo, M. Montante, L. Dufour, M.L. Martinez, M.E. Jimenez-Capdeville, ***Behavioral effects of exposure to endosulfan and methyl parathion in adult rats***, Neurotoxicology and Teratology, 24, 797–804, 2002
- [56] A. Hazarika, A.N. Sankar, S. Hajare, M. Kataria, J.K. Malik, ***Influence of malation pretreatment on toxicity of anilofos in male rats: a biochemical interaction study***, Toxicology, 185, 1-8, 2003
- [57] Y.Z. Fang, S. Yang, G. Wu, ***Free radical, antioxidants, nutrition***, Nutrition 18, 872-879, 2002
- [58] V. Seth, B.D. Banerjee, A. Bhattacharya, A.K. Chakravorty, ***Lipid peroxidation, free radical scavenging enzymes, and glutathione redox system in blood of human poisoning with Propoxur***, Clinical Biochemistry, 33 (8), 683-685, 2000
- [59] H. Alp, İ. Aytekin, O. Atakişi, M. Ogün, ***Ratlarda akut malation toksisitesinin neden olduğu stres üzerine kafeik asit fenetil ester ve elajik asit'in etkileri***, Atatürk Üniversitesi Vet. Bilg. Der., 6 (2): 117-124, 2011
- [60] E. Dere, F. Özdikicioğlu, H. Tosunoğlu, ***İntraperitoneal Diklorvos Uygulamasının Sıçanların (Rattus norvegicus) Bazı Dokularında Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz ve Malat Dehidrogenaz Aktiviteleri Üzerine Etkisi***, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 33 (1) 5-10, 2007
- [61] K.J. Stelzer, M.A. Gordon, ***Effects of Phyrethroids on Lymphocyte Mitogenic Responsiveness***, Res Commun Chem Pathol Pharmacol, 46(1), 137-150, 1984

- [62] J. Szepvöllgyi, K. Nagy, A. Bedo, A. Regöly-Merei, M. Szerletics, K. Soos, M. Athal, *Examination of The Interaction of Decis and Dithane in Rat*, TXCYA 53, 107-111, 1988
- [63] S.N. Kowalczyk-Bronisz, B. Bubac, *Immunological Profile of Animals Exposed to Pesticides-Deltamethrin*, Arch Immunol Ther Exp, 38(3-4), 229-238, 1990
- [64] A.K. Srivastav, S.K. Srivastava, S.K. Srivastav, *Impact of Deltamethrin on Serum Calcium and Inorganic Phosphate of Freshwater Catfish, Heteropneustes Fossils*, Bull. Environ. Contam Toxicol, 59, 840-846, 1997
- [65] S.J. Jr. Toth, T.C. Sparks, *Effect of Temperature on Toxicity and Knockdown Activity of cis-Permethrin, Esfenvalerate, and λ -Cyhalothrin in the Cabbage Looper (Lepidoptera: Noctuidae)*. J. Econ. Entomol. 83, 342-346, 1990
- [66] R.C. Gilden, K. Huffling, B. Sattler, *Pesticides and health risks*, J Obstet Gynecol Neonatal Nurs 39 (1): 103–10, 2010
- [67] H. Seçilmiş Canbay, S. Öğüt, M. Yılmaz, E. Küçüköner, *Seçilen Bazı Pestisitlerin Bal Örneklerinde Analizi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 16-1, 1-5, 2012
- [68] M. Kirchner ve ark., *Fast gas chromatography for pesticide residues analysis using analyte protectants*, Journal of Chromatography A, 1186, 271–280, 2008
- [69] E. Mavi, *Biyosensörler*, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta, 9-11 s, 2002
- [70] E. Dinçkaya, *Biyosensörler*, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskı Atölyesi, İzmir, 81 – 142 s, 1999

- [71] M. Gerard, A. Chaubey, B.D. Malhotra, *Application of conducting polymers to biosensors*, Biosens Bioelectron, 17(5):345-59, 2002
- [72] P.N. Bartlett, *Biosensors* (Cass, A.E.G. ed.), Oxford University Press, Oxford, 42. p, 1990
- [73] J.D. Newman, L.J. Tigwell, P.J. Warner, A.P.F. Turner, *Biosensors: boldly going into the new millennium*, Sensor Review 21: 268 – 271, 2001
- [74] G.F. Bickerstaff, *Immobilization of Enzyme and Cells*, Methods in Biotechnology, 1-10, 1997
- [75] C. Kasavi, *Kovalent Bağlanma ve Fiziksel Adsorbsiyon Metotları ile Proteaz Enziminin İmmobilizasyonu*, İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, 2006
- [76] C. Özdilek, K. Kazimierczak, D. van der Beek, S.J. Picken, *Preparation and properties of polyamide-6-boehmite nanocomposites*, Polymer 45:5207–5214, 2004
- [77] A. Telefoncu, *Biyosensörler*, Yaz Okulu, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskı Atölyesi, İzmir, 1999
- [78] D. Bejan, A. Duca, *Voltammetry of Aniline with Different Electrodes and Electrolytes*, Croatica Chemica Acta, 71(3) 745-756, 1998
- [79] Nicolas – Debarnot, D., Poncin – Epailard, F., *Polyaniline as a new sensitive layer for gas sensors*, Analytica Chimica Acta 475, 1–15, 2003
- [80] D. Wise I., *Bioinstrumentation and biosensors*, New York: Marcel Dekker, 233-238, 1991

- [81] D.R. Thévenot, K. Toth, R.A. Durst, G.S. Wilson, *Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification*, Biosensors & Bioelectronics 16, 121–131, 2001
- [82] D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman, *Principles of Instrumental Analysis*, Brooks/Cole, 325, 1997
- [83] P.R. Coulet, G. Bardeletti, *Biosensor-based instrumentation*, Biochem Soc trans.;19(1):1-4, 1991
- [84] E. Beutler, *Catalase. In: Red Cell Metabolism, A Manual of Biochemical Methods*. E Beutler (ed), Grune and Stratton, Inc., New York, 105-106, 1975
- [85] M.S. Rukmini, B. D'Souza, V. D'Souza, *Superoxide Dismutase and Catalase Activities And Their Correlation With Malondialdehyde in Schizophrenic Patients*, Indian Journal of Clinical Biochemistry, 19 (2) 114-118, 2004
- [86] E. Beutler, *Red Cell Metabolism*, Grune & Stratton, Inc. Orlando, 3rd ed, USA, 1984
- [87] A. Bayır, *Hınıs çayı (Murat havzası)'nda yasayan siraz balığı (Capoeta capoeta umbla)'nın antioksidan enzim aktiviteleri, serum lipitleri, lipoproteinleri ve hematolojik parametrelerin mevsimsel değişimlerinin incelenmesi*, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Anabilim Dalı, Erzurum, 2005
- [88] SM. Naqvi ve M. Hasan, *Acetylhomocysteine thiolactone protection against phosphamidon-induced alteration of regional superoxide dismutase activity in central nervous system and its correlation with altered lipid peroxidation*, Indian J. Exp. Biol., 30, 850–852, 1992
- [89] T. Yamano ve S. Morita, *Hepatotoxicity of trichlorfon and dichlorvos in isolated rat hepatocytes*, Toxicology, 76, 69–77, 1992

[90] Serap Yalın ve ark., *Deltametrine maruz kalan sıçanların kalp dokusunda Funalia trogii'nin etkisi*, Türk Biyokimya Dergisi [Turkish Journal of Biochemistry–Turk J Biochem], 37 (3), 239–244, 2012

[91] E. Büyükgüzel, *Evidence of Oxidative and Antioxidative Responses by Galleria mellonella Larvae to Malathion*, J. Econ. Entomol., 102,152-159, 2009

ÖZGEÇMİŞ

21 Ekim 1984 tarihinde Edirne’de doğdum. İlköğrenimimi Şehit Asım İlköğretim Okulunda, orta öğrenimimi Atatürk Orta Okulunda, lise öğrenimimi Edirne Anadolu Lisesinde tamamladım. 2006 yılında Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü’ mezun oldum. 2006-2009 yılları arasında Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Dalında yüksek lisans eğitimimi tamamladım. 2009 yılında Trakya Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya dalında Doktora eğitimime başladım.

2010 yılından itibaren Trakya Üniversitesi Arda Meslek Yüksek Okulu Kimya Teknolojileri Programında Öğretim Görevlisi olarak çalışmaktayım.