

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



**BAZI PESTİSİTLERİN ALKALEN FOSFATAZ ENZİMİNE KARŞI**  
**AFİNİTESİNİN ARAŞTIRILMASI**

**İLAYDA AKBAŞ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Jüri Üyeleri :** Prof. Dr. Nahit GENÇER (Tez Danışmanı)  
Doç. Dr. Semra IŞIK  
Dr. Öğr. Üyesi Çiğdem BİLEN

**BALIKESİR, OCAK - 2025**

## ETİK BEYAN

Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak tarafımda hazırlanan “**Bazı Pestisitlerin Alkalen Fosfataz Enzimine Karşı Afinitesinin Araştırılması**” başlıklı tezde;

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

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

**İlayda AKBAŞ**

**Bu tez çalışması Balıkesir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından  
BAP (2023/178) nolu proje ile desteklenmiştir.**

## ÖZET

**BAZI PESTİSİTLERİN ALKALEN FOSFATAZ ENZİMİNE KARŞI  
AFİNİTESİNİN ARAŞTIRILMASI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
İLAYDA AKBAŞ  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI  
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. NAHİT GENÇER)**

**BALIKESİR, OCAK - 2025**

Alkalen fosfataz (EC 3.1.3.1), alkali pH'da fosfat gruplarının hidrolizini katalize eden bir fosfo-monoesteraz enzimidir. Bu enzim hücre zarı, plazma zarı ve vücut sıvılarında geniş bir yayılım göstermekte olup, fosfat metabolizması, hücre büyümesi ve mineralizasyon gibi süreçlerde rol almaktadır. Pestisitler, tarımsal üretimde zararlı organizmaları etkili bir biçimde kontrol ederek tarımsal üretimin verimliliğini artırma amacıyla kullanılan çeşitli kimyasallardır. Pestisitlerin tarım sektöründeki yaygın kullanımı ile bu maddelerin aşırı ve gereksiz bir şekilde kullanılması çevre, ekosistem dengesi ve insan sağlığı üzerinde birçok olumsuz etkiye yol açabilmektedir. Bu nedenle pestisitlerin etkilerinin iyi bir şekilde anlaşılması ile pestisitlerin kullanımında gerekli önlemlerin alınması gerekmektedir. Bu çalışmada 10 farklı pestisit çeşitli dozlarda intestinal alkalen fosfataz enzimi üzerinde etkileri analiz edilmiştir. Analiz sonunda pestisitlerin enzim üzerindeki  $IC_{50}$  değerleri belirlenmiştir ve en yüksek inhibitör etkiyi Prokloraz ( $IC_{50} = 56,79 \mu M$ ), en düşük inhibitör etkiyi ise Amitraz ( $IC_{50} = 238,46 \mu M$ ) gösterdiği belirlenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre pestisitlerin alkalen fosfatazın bilinen inhibitörü olan Levamisol ile karşılaştırıldığında düşük inhibitör etki gösterdiği görülmüştür.

**ANAHTAR KELİMELER:** Alkalen fosfataz enzimi, pestisit, inhibisyon

Bilim Kod / Kodları : 20104

Sayfa Sayısı : 44

## **ABSTRACT**

### **INVESTIGATION OF AFFINITY OF SOME PESTICIDES TOWARDS ALKALINE PHOSPHATASE ENZYME**

**MSC THESIS**

**ILAYDA AKBAS**

**BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE**

**DEPARTMENT OF CHEMISTRY**

**(SUPERVISOR: PROF. DR. NAHİT GENÇER )**

**BALIKESİR, JANUARY - 2025**

Alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1) is a phospho-monoesterase enzyme that catalyzes the hydrolysis of phosphate groups at alkaline pH. This enzyme is widely distributed in cell membranes, plasma membranes, and body fluids and plays a role in processes such as phosphate metabolism, cell growth, and mineralization. Pesticides are various chemicals used to increase the efficiency of agricultural production by effectively controlling harmful organisms. The widespread use of pesticides in the agricultural sector and excessive and unnecessary use of these substances can lead to many negative effects on the environment, ecosystem balance, and human health. Therefore, it is necessary to understand the effects of pesticides well and to take the necessary precautions in the use of pesticides. In this study, the effects of 10 different pesticides on intestinal alkaline phosphatase enzymes at various doses were analyzed. At the end of the analysis, IC<sub>50</sub> values of pesticides on the enzyme were determined and it was determined that Prochloraz (IC<sub>50</sub> = 56,79  $\mu$ M) showed the highest inhibitory effect and Amitraz (IC<sub>50</sub> = 238,46  $\mu$ M) showed the lowest inhibitory effect. According to the study results, it was seen that pesticides showed a low inhibitory effect compared to Levamisole, a known inhibitor of alkaline phosphatase.

**KEYWORDS:** Alkaline phosphatase enzyme, pesticide, inhibition

Science Code / Codes : 20104

Page Number : 44

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

<b>ÖZET</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iii</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....	<b>iv</b>
<b>TABLO LİSTESİ</b> .....	<b>v</b>
<b>KISALTMA LİSTESİ</b> .....	<b>vi</b>
<b>ÖNSÖZ</b> .....	<b>vii</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1 Alkalen Fosfataz Enzimi .....	2
1.1.1 Alkalen Fosfataz Enzimi Yapısı ve Reaksiyon Mekanizması .....	3
1.1.2 Alkalen Fosfataz Enzimi İşlevleri .....	5
1.1.3 Alkalen Fosfataz İnhibitörleri .....	6
1.1.4 Alkalen Fosfataz Enziminin Endüstriyel Önemi.....	6
1.2 Pestisitler.....	7
1.2.1 Pestisitlerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	7
1.2.2 Etkileri İncelenen Pestisitler .....	8
1.2.2.1 Etion .....	8
1.2.2.2 Prokloraz .....	9
1.2.2.3 Amitraz .....	10
1.2.2.4 Karboksın .....	11
1.2.2.5 Diüron.....	12
1.2.2.6 Koumatetralil.....	13
1.2.2.7 Karbaril.....	13
1.2.2.8 Dazomet.....	14
1.2.2.9 Karbofuran.....	15
1.2.2.10. Linuron .....	17
<b>2. MATERYALLER VE YÖNTEMLER</b> .....	<b>18</b>
2.1 Materyaller .....	18
2.1.1 Kullanılan Kimyasallar .....	18
2.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar.....	18
2.1.3 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışı.....	18
2.1.4 Kullanılan Pestisitler ve Hazırlanışı.....	19
2.2 Yöntemler .....	19
2.2.1 ALP Enziminin Aktivite Ölçümü .....	19
2.2.2 Enzimi İnhibe Eden Pestisitler için IC <sub>50</sub> Değerlerinin Belirlenmesi .....	20
<b>3. BULGULAR</b> .....	<b>21</b>
3.1. ALP Enziminin Çeşitli Pestisitlere Karşı Aktivitesinin Ölçülmesi .....	21
3.2. Pestisitlerin ALP Enzimi Üzerindeki IC <sub>50</sub> Değerlerinin Belirlenmesi .....	26
<b>4. TARTIŞMA VE SONUÇ</b> .....	<b>33</b>
<b>5. KAYNAKLAR</b> .....	<b>39</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>45</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 1.1: Intestinal ALP üç boyutlu yapısı. ....	3
Şekil 1.2: ALP enziminin katalitik mekanizması.....	4
Şekil 1.3: Etion kimyasal yapısı. ....	8
Şekil 1.4: Prokloraz kimyasal yapısı.....	9
Şekil 1.5: Amitraz kimyasal yapısı.. ....	10
Şekil 1.6: Karboksın kimyasal yapısı.....	11
Şekil 1.7: Diüron kimyasal yapısı .....	12
Şekil 1.8: Koumatetralil kimyasal yapısı. ....	13
Şekil 1.9: Karbaril kimyasal yapısı. ....	14
Şekil 1.10: Dazomet kimyasal yapısı.....	15
Şekil 1.11: Karbofuran kimyasal yapısı. ....	16
Şekil 1.12: Linuron kimyasal yapısı.....	17
Şekil 2.1: p-NPP bazlı ALP aktivite tayin yöntemi .....	20
Şekil 3.1: DMSO'nun ALP enziminin aktivitesi üzerine etkisi.....	22
Şekil 3.2: % Aktivite – [Etion] grafiği. ....	23
Şekil 3.3: % Aktivite – [Prokloraz] grafiği. ....	24
Şekil 3.4: % Aktivite – [Amitraz] grafiği. ....	25
Şekil 3.5: % Aktivite – [Karboksın] grafiği. ....	26
Şekil 3.6: % Aktivite – [Diüron] grafiği. ....	27
Şekil 3.7: % Aktivite – [Koumatetralil] grafiği. ....	28
Şekil 3.8: % Aktivite – [Karbaril] grafiği .....	29
Şekil 3.9: % Aktivite – [Dazomet] grafiği. ....	30
Şekil 3.10: % Aktivite – [Karbofuran] grafiği. ....	31
Şekil 3.11: % Aktivite – [Linuron] grafiği.....	32

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

<b>Tablo 1.1:</b> ALP enziminin kimyasal özellikleri.....	3
<b>Tablo 2.1:</b> Kullanılan alet ve cihazların bilgileri.....	18
<b>Tablo 2.2:</b> Kullanılan pestisitlerin moleküler ağırlıkları ve çözelti içerisindeki miktarları	19
<b>Tablo 3.1:</b> DMSO'nun ALP enziminin aktivitesi üzerine etkisi. ....	21
<b>Tablo 3.2:</b> Etion pestisitinin ALP enziminin aktivitesi üzerine etkisi. ....	22
<b>Tablo 3.3:</b> Prokloraz pestisitinin ALP enziminin aktivitesi üzerine etkisi. ....	23
<b>Tablo 3.4:</b> Amitraz pestisitinin ALP enziminin aktivitesi üzerine etkisi.....	24
<b>Tablo 3.5:</b> Karboksın pestisitinin ALP enziminin aktivitesi üzerine etkisi. ....	25
<b>Tablo 3.6:</b> Diüron pestisitinin ALP enziminin aktivitesi üzerine etkisi. ....	26
<b>Tablo 3.7:</b> Koumatetralil pestisitinin ALP enziminin aktivitesi üzerine etkisi. ....	27
<b>Tablo 3.8:</b> Karbaril pestisitinin ALP enziminin aktivitesi üzerine etkisi. ....	28
<b>Tablo 3.9:</b> Dazomet pestisitinin ALP enziminin aktivitesi üzerine etkisi. ....	29
<b>Tablo 3.10:</b> Karbofuran pestisitinin ALP enziminin aktivitesi üzerine etkisi. ....	30
<b>Tablo 3.11:</b> Linuron pestisitinin ALP enziminin aktivitesi üzerine etkisi.....	31
<b>Tablo 3.12:</b> Pestisitlerin IC50 değerleri.....	32
<b>Tablo 4.1:</b> Pestisitlerin enzim inhibitörü etkileri. ....	38

## KISALTMA LİSTESİ

<b>ADP</b>	: Adenozin Di Fosfat
<b>ALP</b>	: Alkalen Fosfataz
<b>AMP</b>	: Adenozin Mono Fosfat
<b>ATP</b>	: Adenozin Tri Fosfat
<b>DMSO</b>	: Dimetil Sülfoksit
<b>DNA</b>	: Deoksiribo Nükleik Asit
<b>EC</b>	: Enzim Kod Numarası
<b>ELISA</b>	: Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Deneyi
<b>EÜ</b>	: Enzim Ünitesi
<b>GCAP</b>	: Germ Hücreli Alkalen Fosfataz
<b>IAP</b>	: İntestinal Alkalen Fosfataz
<b>IC50</b>	: Enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
<b>l</b>	: Litre
<b>LPS</b>	: Lipopolisakkarit
<b>M</b>	: Molar
<b>P - NPP</b>	: p-nitrofenil fosfat
<b>PLAP</b>	: Plasental Alkalen Fosfataz
<b>TNAP</b>	: Dokuya Özgü Olmayan Alkalen Fosfataz

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimleriyle bana rehberlik eden, çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgeyemeyen, gösterdiği ilgi, anlayış ve hoş görüşüyle her konuda destek olan değerli danışman hocam Prof. Dr. Nahit GENÇER'e en içten saygı, minnet ve teşekkürlerimi iletirim.

Ayrıca, yüksek lisans sürecimde bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, her zaman yanımda hissettiğim değerli hocalarım Prof. Dr. Oktay Arslan ve Doç. Dr. Semra Işık'a sevgi, saygı ve şükranlarımı sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında desteğini esirgemeyen Dr. Kübra Çıkrıkçı'ya teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her anında yanımda olan, bana sonsuz destek veren kıymetli aileme ise yürekten teşekkür ederim.

**Balıkesir, 2025**

**İlayda AKBAŞ**

# 1. GİRİŞ

Enzimler, vücuttaki kimyasal reaksiyonların hızını artırabilen protein molekülleridir ve bu nedenle biyokatalizör olarak bilinirler. Normal koşullarda, enzimler önce substratla bağlanarak enzim-substrat kompleksi oluşturur, ardından nihai ürüne dönüşür. Nihai ürün enzimden ayrılır ve serbest enzim, başka bir aynı substratı nihai ürüne dönüştürmeye hazır hale gelir. Bazı doğal veya yapay moleküller, enzimin reaksiyon hızını etkileyebilir; eğer molekül enzimin aktivitesini artırıyorsa, buna enzim aktivatörü, azaltıyorsa enzim inhibitörü denir (Patadiya et al., 2021). Enzimler, hücrel metabolizma süreçlerinde kaçınılmaz bir role sahiptir ve hücrelerin normal işlevlerini sürdürebilmeleri için gerekli ve hayati bir unsur olarak öne çıkarlar. Bu bağlamda, enzimlerin varlığı, hücrel aktivitelerin düzenlenmesi ve metabolik denge açısından hayati bir öneme sahiptir.

Alkalen fosfataz enzimleri [ALP; ortofosforik monoester fosfohidrolaz (alkalen optimum) EC 3.1.3.1] plazma membranına bağlı glikoproteinlerdir (McComb, Bowers, & Posen, 1979). Alkalen fosfataz enzimi, hücrelerde bulunan fosfor bileşiklerinin hidrolizini başarıyla katalize eden önemli bir biyokatalizördür. ALP'ler, fosfoproteinlerin ve DNA parçalarının defosforile edilmesi, çeşitli immünolojik analizlerde son nokta tespiti ve in vivo haberci moleküller olarak çeşitli biyoteknolojik uygulamalar için faydalıdır (Millán, 2006). Bu enzim, birçok biyolojik süreç için kritik öneme sahip olan fosfor metabolizmasını dengede tutmada kilit bir rol oynamaktadır. Bunun yanı sıra, alkalen fosfatazın kemik sağlığı, hücre sinyalleşmesi ve enfeksiyon direnci gibi önemli fonksiyonları da mevcuttur.

Pestisitler, tarımda zararlı organizmaların etkilerini kontrol etmek, ortadan kaldırmak veya azaltmak amacıyla yaygın olarak kullanılan kimyasallardır. AB Pestisit Veritabanı (European Commission, 2016), 466'sı onaylanmış ve 858'i AB'de kullanım için onaylanmamış 1378'den fazla aktif bileşen listelemektedir. Modern formülasyonlar hedef dışı türler için nispeten güvenli olsa da çok sayıda teorik ve deneysel veri, pestisit kalıntılarının insan ve hayvan sağlığı ve ekosistemlerin istikrarı üzerinde uzun vadeli olumsuz etkilere neden olabileceğini göstermektedir (Kalyabina, Esimbekova, Kopylova, & Kratasyuk, 2021).

Pestisitlerin enzim aktivitesine etkileri, hücrel metabolizma ve biyolojik süreçlerde anahtar rol oynayan ve bazen de köklü değişikliklere yol açabilecek faktörlerdir. Özellikle

alkalen fosfataz enzimi üzerindeki etkileri incelendiğinde, fosfor metabolizmasının, hücre büyümesinin ve sinyalleşmenin temel süreçlerinde belirleyici bir rol üstlenebileceği anlaşılmaktadır. Pestisitlerin enzimler üzerindeki etkilerinin daha iyi anlaşılması, bu kimyasalların zararlı etkilerini azaltmayı ve daha sağlıklı çevresel koşullar geliştirmeyi hedefleyen stratejilerin oluşturulmasına olanak sağlamaktadır.

Bu çalışmada, çeşitli pestisitlerin alkalen fosfataz enzim aktivitesi üzerindeki etkileri detaylı bir şekilde incelenmiş ve elde edilen bulgular üzerinden önemli çıkarımlar yapılmıştır. Özellikle son yıllarda tarımsal ve endüstriyel alanlarda pestisit kullanımının artması, bu kimyasalların çevresel etkileri ve canlı organizmalar üzerindeki potansiyel zararlarının araştırılmasına sebep olmuştur. Tarımda kullanılan pestisitlerin ekosistem üzerinde yarattığı olumsuz etkiler, çeşitli hastalıklara yol açabilmeleri ve insan sağlığı üzerindeki olumsuz sonuçları, dikkatle incelenmesi gereken önemli hususlardandır. Bu nedenle, pestisitlerin alkalen fosfataz enzim aktivitesi üzerindeki etkilerini anlayabilmek, çevre sağlığı yanında insan sağlığı açısından da oldukça önemli bir ihtiyaç olarak öne çıkmaktadır. Bu bağlamda, gerçekleştirilen bu çalışmanın bulguları, pestisitlerin alkalen fosfataz üzerindeki etkilerini daha iyi açıklamayı ve gelecekteki araştırmalar için sağlam bir temel oluşturmayı amaçlamaktadır. Tüm bu unsurlar, pestisit kullanımının daha bilinçli bir şekilde yönetilmesine olanak tanırken, ekosistem dengelerinin korunmasına da katkıda bulunmaktadır. Dolayısıyla, bu konudaki çalışmalar ve araştırmaların sürdürülmesi, insan sağlığını tehdit eden potansiyel risklerin azaltılması açısından kritik bir öneme sahiptir. Farklı pestisitlerin çeşitli organizmalar üzerindeki etkilerini daha kapsamlı ve çok yönlü bir şekilde incelemek hem bilimsel literatüre katkı sağlamakta hem de pratik uygulamaların geliştirilmesine destek olmaktadır.

### **1.1 Alkalen Fosfataz Enzimi**

Alkalen fosfataz, 1923 yılında Dr. Robert Robison tarafından hayvan kemiğinde bulunan ve heksoz monofosforik asidi hızla fosforik aside hidrolize eden bir enzim olarak tanımlanmıştır (Robinson, 1923). Alkalen fosfataz enzimleri (ALP'ler), hücre zarının dış tabakasında bulunan bir grup izoenzimdir; hücre dışı alanda bulunan organik fosfat esterlerinin hidrolizini katalize ederler. Çinko ve magnezyum, bu enzimlerin biyolojik aktivitesi için önemli yardımcı faktörlerdir (Makris, Mousa, & Cavalier, 2023). Vücutta karaciğer, kemik, böbrekler ve bağırsaklar başta olmak üzere birçok dokuda yaygın olarak bulunur. ALP, fosfor metabolizması, kemik mineralizasyonu ve sindirim gibi hayati

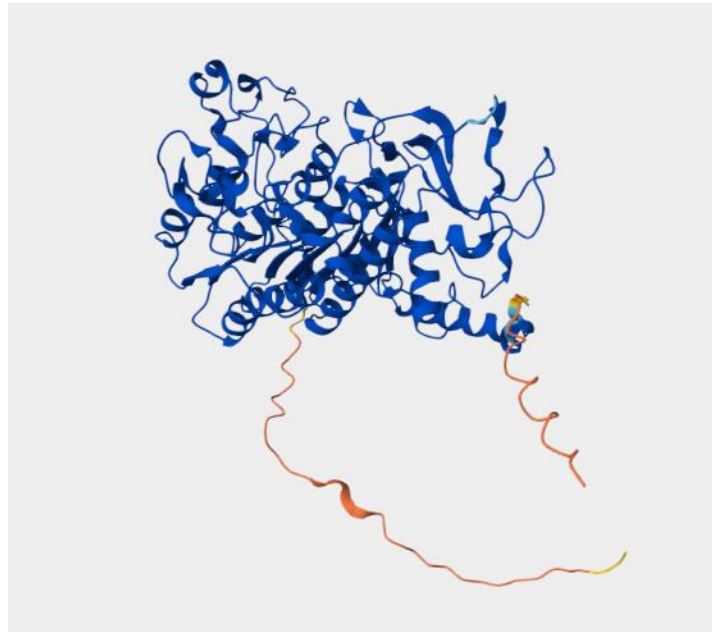
biyolojik süreçlerde önemli bir role sahiptir. ALP enziminin başlıca kimyasal özellikleri Tablo 1.1’de verilmiştir.

**Tablo 1.1:** ALP enziminin kimyasal özellikleri.

<b>Moleküler Ağırlık</b>	140 – 160 kDa (Neumann & Lustig, 1980)
<b>Optimum pH</b>	8 – 10 (Latner, Parsons & Skillen, 1970)
<b>İzoelektrik Nokta</b>	4.4 - 5.8 (Besman & Coleman, 1985)

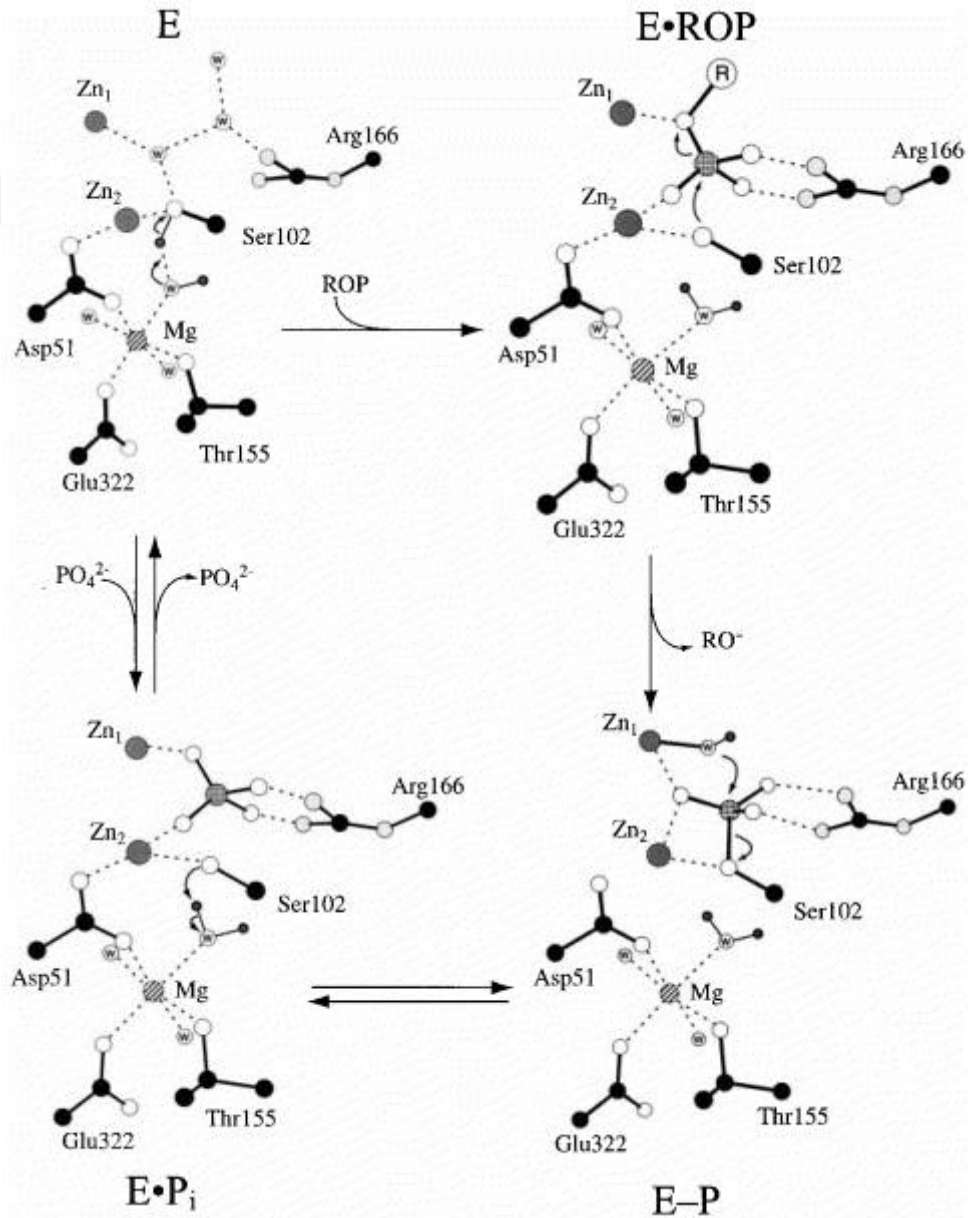
### 1.1.1 Alkalen Fosfataz Enzimi Yapısı ve Reaksiyon Mekanizması

Alkalen fosfatazlar, metal içeren aktif bir bölgeye sahip homodimerik enzimlerdir. Her bir monomer, iki  $Zn^{2+}$  ve bir  $Mg^{2+}$  olmak üzere üç metal iyonu içerir (Millán, 2006). Dört farklı ALP izoenzimi bulunmaktadır. Bunlardan üçü, plasental alkalen fosfataz (PLAP), intestinal alkalen fosfataz (IAP) ve germ hücreli alkalen fosfataz (GCAP) olarak bilinen, dokuya özgü enzimlerdir. Dördüncü izoenzim ise dokuya özel bir karakteristik taşımadığı halde, özellikle karaciğer, iskelet ve böbrek dokularında yoğun şekilde bulunur (TNAP) (Makris et al., 2023). Intestinal ALP için görselleştirilen üç boyutlu yapı Şekil 1.1’de verilmiştir.



**Şekil 1.1:** Intestinal ALP üç boyutlu yapısı (Varadi, 2024).

Alkalin fosfatase reaksiyon mekanizması üç metal iyon destekli kataliz içermektedir. Hidrojen atomları, enzimin katalitik bölgelerinde bulunur ve serbest enzim durumunda fosfat bağlanma bölgesi su molekülleriyle doludur. Fosfomonoester bağlanması sırasında, Mg-koordineli hidroksit iyonu Ser102'nin O<sub>γ</sub> atomunu deprotonlar ve kovalent enzim-fosfat ara ürünü oluşur. Bu süreç, fosfor merkezinde ters çevrilme ve ayrılan grubun kaybıyla sonuçlanırken, nükleofilik hidroksit iyonu kovalent olmayan enzim-fosfat kompleksi oluşturur (Stec, Holtz & Kantrowitz, 2000). Tüm katalitik aşamalar Şekil 1.2'de gösterilmiştir.



Şekil 1.2: ALP enziminin katalitik mekanizması (Stec et al., 2000).

### 1.1.2 Alkalen Fosfataz Enzimi İşlevleri

ALP'ler, ektofosfataz enzim ailesine ait olup, memeli hücre ve dokularında bulunur (Champion, Glazier, Greenwood, Mann, Rawlings, Sibley & Jones, 2003). ALP, birçok organ sisteminin fizyolojisi ve patofizyolojisinde önemli bir rol oynar.

Gastrointestinal sistemde hem TNAP hem de IAP, bağırsak mikroorganizmalarını nötralize ederek önemli bir anti-inflamatuar rol oynamaktadır (Brichacek & Brown, 2018). Çok sayıda peptit, lipit ve diğer moleküller, antijen sunan hücreler tarafından periferdeki T hücrelerini aktive etmek için tanınır. T hücresi aktivasyonu sırasında adenozin trifosfat (ATP) salınır ve inflammatuar ortama katkıda bulunur. TNAP, ATP'yi adenozin difosfata (ADP) ve adenozin monofosfata (AMP) aşamalı olarak dönüştürerek ATP'yi anti-inflamatuar molekül olan adenezine dönüştürebilir. ALP'nin lipopolisakkaritler ve pürin nükleotidleri (ATP, ADP, AMP) üzerindeki defosforilasyon etkisi, pro-inflamatuar sinyalleşmeyi önlemede kritik bir rol oynar; bu bağlamda, ALP, anti-inflamatuar adenozin üretimi, LPS detoksifikasyonu ve CD36 aracılığıyla  $\beta$ -oksidasyon aktivasyonu ile karmaşık fosfoproteinleri katabolik olarak parçalayarak temizleyici bir protein işlevi görebilmektedir (Balabanova, Bondarev, Seitkalieva, Son & Tekutyeva, 2024).

ALP hidroksiapatit oluşumunun bir inhibitörü olan inorganik pirofosfatı (PPi) parçalayarak ve hidroksiapatit oluşumunun bir indükleyicisi olan inorganik fosfatı (Pi) üreterek kemik oluşumunu destekler. Fakat bu durum ile ilişkili olarak kardiyovasküler sistemde kemik ALP'sinin fazlalığı, vasküler kalsifikasyona katkıda bulunarak sert kas duvarlarına ve sonunda ateroskleroza yol açabilmektedir. Zhou ve arkadaşlarının 2023 yılında yaptığı çalışmada, serum ALP seviyesinin erken ateroskleroz ile pozitif bir ilişki gösterdiği ve ALP = 135 U/l seviyesinin üzerinde saturasyon etkisi olduğu bulunmuştur.

Merkezi sinir sisteminde dokuya özgü olmayan alkalen fosfataz (TNAP), nöronlar ve beyin endotel hücreleri dahil birçok hücrede yüksek oranda ifade edilir ve kan-beyin bariyeri bozulmasında rol oynar. TNAP, inflammatuar süreçlerde ve nörolojik bozukluklarda önemli bir etkiye sahip olup, bağlantı proteinlerinin kaybı ile beyin parankimi ve serebral dolaşım arasında hücre geçişini artırır (Brichacek & Brown, 2018).

### **1.1.3 Alkalen Fosfataz İnhibitörleri**

Alkalen fosfataz inhibitörleri, farklı klinik durumlarda kullanılabilir. Bu inhibitörlerin bir kullanım alanı, osteoporoz ve kemik metabolizması bozukluklarıdır. Osteoporoz tedavisinde alkalen fosfataz seviyelerini dengelemek amacıyla kullanılan bu inhibitörler, kemik sağlığını destekleyerek kırık riskini azaltmada etkili olabilir. Ayrıca alkalen fosfataz inhibitörleri, karaciğer ve safra yolları hastalıklarının tedavisinde önemli bir kullanım alanına sahiptir. Karaciğer hastalıklarında alkalen fosfataz seviyelerindeki artış genellikle hastalığın şiddetini gösterebilirken, safra yolları hastalıkları da benzer şekilde bu enzim seviyelerini etkileyebilir. Bu bağlamda, alkalen fosfataz inhibitörlerinin kullanımı, karaciğer ve safra yolları hastalıklarında biyokimyasal dengeyi sağlamak için potansiyel bir tedavi stratejisi olarak değerlendirilmektedir.

Zaher ve arkadaşları tarafından 2020 yılında hazırlanan kapsamlı derlemede kısmen negatif atomların (örneğin, sulfonamid veya sulfonat gruplarındaki sülfonyal oksijen atomları) veya tamamen negatif grupların (örneğin, karboksilik asit) varlığının ALP inhibisyonunda önemli olduğu sonucuna varılmıştır.

### **1.1.4 Alkalen Fosfataz Enziminin Endüstriyel Önemi**

Alkalen fosfatazlar, biyoteknoloji araştırmaları ve uygulamaları için önemli bir etkiye sahiptir. Çeşitli reaksiyonları katalize etme yetenekleri, moleküler biyoloji, tanı ve çevresel biyoteknolojide değerli bir araç olmalarını sağlar. Örneğin ALP, yüksek katalitik aktivitesi, stabilitesi, düşük maliyeti ve geniş substrat spesifikliği nedeniyle enzim bağlantılı immünosorbent deneyi (ELISA) için kullanılır (Reid ve Wilson, 1971). Ayrıca, DNA uçlarının defosforilasyonu için moleküler klonlamada kullanılarak, vektörlerin kendiliğinden ligasyonunu önler (Rani, Datt & Rana 2012). Tıbbi olarak, fosfatazlar, karaciğer, prostat, kemik dokuları ve endokrin sistemdeki bozukluklar dahil birçok hastalığın biyomarkerleri olarak kabul edilmektedir (Shaban, Jo, Hafez, Cho & Kim, 2022). Tarımda ALP topraklardaki fosforun erişilebilirliğini artırarak faydalı olabilir. Genetik olarak modifiye edilmiş ALP üreten mikroorganizmalarla toprakların inoküle edilmesi, kimyasal fosfor gübrelere bağımlılığı azaltabilir (Shrivastava, Srivastava & D'souza, 2018). ALP enzimi gıda sektöründe süt pastörizasyonunun etkin bir şekilde gerçekleştirilmesinin kontrolü için de kullanılmaktadır. ALP aktivitesi, pastörizasyon süre ve sıcaklık gereksinimlerinin belirlendiği patojenik mikroflora ile karşılaştırıldığında daha yüksek ısı direncine sahiptir, bu nedenle ALP, süt ürünlerinin hızlı pastörizasyon doğrulaması için

tercih edilen yöntemdir (Rankin, Christiansen, Lee, Banavara & Lopez-Hernandez, 2010). ALP enziminin çok yönlü katalitik özellikleri, tıbbi tanıdan çevresel yönetime kadar çeşitli biyoteknolojik uygulamalarda değerli bir varlık olmasını sağlamakta ve bu alandaki araştırma ve geliştirmelerin önemini vurgulamaktadır.

## **1.2 Pestisitler**

Tarım sektöründe pestisitler, zararlı organizmaların kontrolü veya ortadan kaldırılması için kullanılan kimyasal maddelerdir. Tarım bitkilerinin korunması için bu kimyasallar çok önemlidir. Pestisitler hedef organizmalara göre dört ana kategoriye ayrılır: insektisit, herbisit, fungusit ve rodentisit. Herbisitler, tarım ürünleri üzerinde zararlı otların zararlı etkilerini azaltarak bitkilerin gelişimini teşvik ederken, insektisitler özellikle zararlı böcekleri kontrol etmek ve etkisiz hale getirmek için kullanılır. Fungisitler bitkileri mantar hastalıklarına karşı korumakta, rodentisitler ise tarım alanlarında kemirgenlerin kontrolünü sağlayarak tarım ürünlerinin zarar görmesini önleyen özel kimyasallardır. Pestisitler kimyasal doğasına göre ise organoklorinler, organofosfatlar, karbamatlar, piretroidler, fenil amidler, fenoksialkonatlar, trazinler, benzoik asit türevleri, benzonitriller, ftalimid türevleri, dipiridler ve çeşitli kategoriler olarak sınıflandırılabilir (Rani, Thapa, Kanojia, Sharma, Singh, Grewal, Srivastav & Kaushal, 2021). Pestisitlerin etkin bir şekilde kullanılması, tarımsal üretkenliği artırarak daha sağlıklı ve verimli ürünlerin elde edilmesine önemli ölçüde katkıda bulunur. Pestisitler, tarımda verim artırma, vektör hastalıklarını kontrol etme ve zararlı haşereleri öldürme gibi çeşitli uygulamalara sahiptir. Ancak, pestisitlerin insan sağlığı ve çevre üzerindeki zararlı etkileri göz ardı edilemez. Su ve toprak kalitesini bozarak hayvanlar, kuşlar, bitkiler ve insanlar üzerinde olumsuz etkiler yaratmaktadır. Pestisitler, kanser, diyabet, üreme bozuklukları, solunum ve sinir sistemi hastalıkları gibi ciddi sağlık sorunlarına yol açabilir (Rani et al., 2021).

### **1.2.1 Pestisitlerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi**

Pestisitlerin enzimler üzerindeki etkileri, karmaşık ve çok yönlü mekanizmalar aracılığıyla ortaya çıkmaktadır. Bu etkiler, genellikle enzim inhibisyonu ve enzim aktivitesinin düzenlenmesi şeklinde iki ana kategoride ele alınabilmektedir. Enzim inhibisyonu durumu, pestisitlerin belirli bir enzimi doğrudan hedef almasıyla başlamakta ve substratın o enzimle etkileşimini veya katalitik işlevselliğini engelleyerek enzim fonksiyonlarını olumsuz biçimde etkilemektedir. Ayrıca pestisitlerin enzim aktivitesine olan etkisi, bu aktivitenin artışı veya azalması ile enzimin işlevselliğini değiştirebilir. Böyle bir durum, enzimin inaktif

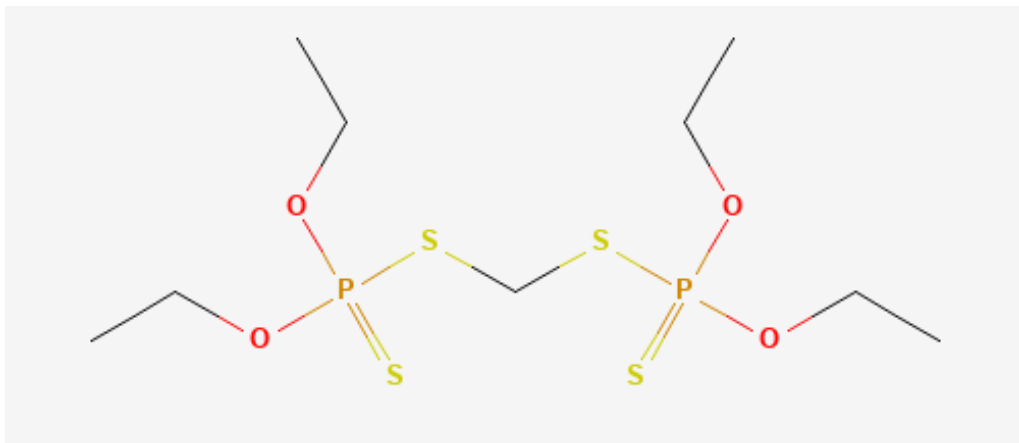
hale gelmesine veya substrat ve reaktiflerin alternatif reaksiyon yollarına yönlendirilmesine neden olabilmektedir. Özellikle tarım alanında kullanılan pestisitlerin, ekosistem dengesini tehdit etme potansiyeli göz önünde bulundurulduğunda, bu tür etkilerin anlaşılması son derece kritik bir öneme sahiptir.

Pestisitlerin enzim inhibitörleri arasında, özellikle organofosfor bileşikleri ve karbamat pestisitler gibi örnekler sıklıkla öne çıkar. Bu tür bileşikler, pek çok farklı biyolojik süreçte kritik öneme sahip olan asetilkolinesteraz enzimi üzerinde inhibitör etkisi göstererek sinir impuls iletimini bozmaktadır. Pestisitlere maruz kalmanın en yaygın etkileri, asetilkolinesteraz ve bütilkolinesteraz gibi kolinesteraz enzimlerinin inhibe edilmesi ve oksidatif stres olup, bu durum genellikle diğer hastalıklara yol açmaktadır (Parra-Arroyo, González-González, Castillo-Zacarias, Melchor Martínez, Sosa-Hernández, Bilal, Iqbal, Barceló & Parra-Saldívar, 2022). Sonuç olarak, bu durum toksik etkilere neden olabilir ve bu da insan sağlığı ve çevre üzerinde olumsuz sonuçlar doğurabilmektedir.

## 1.2.2 Etkileri İncelenen Pestisitler

### 1.2.2.1 Etion

Etion, beyaz kristal toz formunda bir kimyasal bileşiktir. Bu bileşik, suda çözünmez ve yüksek sıcaklıklarda ayrışabilme özelliğine sahiptir. Etion (O,O,O',O'-tetraetil S,S'-metilen bis (fosforoditiyoat)) kimyasal formülü olarak  $C_9H_{22}O_4P_2S_4$  belirlenmiş olmakla birlikte, yoğunluğu  $1,22 \text{ g/cm}^3$  olarak tespit edilmiştir. Etion kimyasal yapısı Şekil 1.3'de gösterilmiştir.

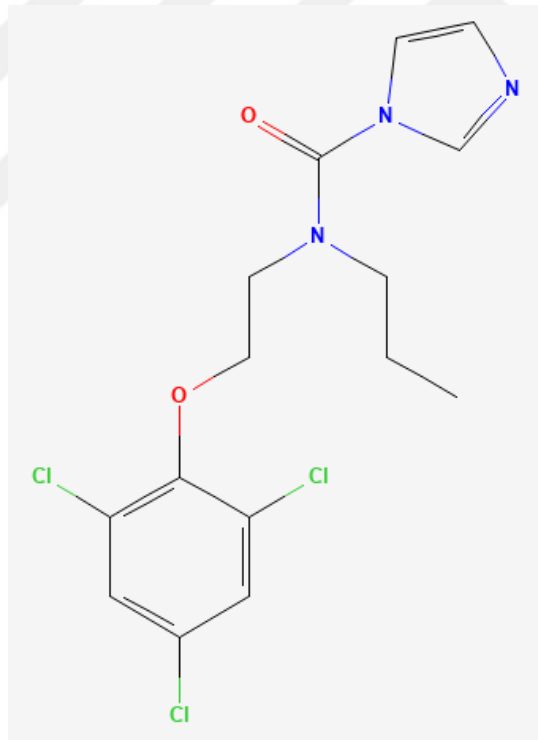


Şekil 1.3: Etion kimyasal yapısı.

Etion, dünya genelinde kısıtlı olarak kullanılan bir akarisit ve insektisit olan bir organofosfattır (Sanchez, Walteros, Estrada, Bustos Álvarez & Gomez, 2024). Uzun vadeli etkilerin anlaşılması, tarım uygulamalarının geliştirilmesi ve sürdürülebilir tarım yöntemlerinin oluşturulmasında kritik bir rol oynamaktadır.

### 1.2.2.2 Prokloraz

Prokloraz, Avrupa, Avustralya, Asya ve Güney Amerika'da tarımda yaygın olarak kullanılan bir imidazol fungusittir. Prokloraz [N-propil-N-[2-(2,4,6-triklorofenoksi)etil]imidazol-1-karboksamid], kimyasal formülü  $C_{15}H_{16}Cl_3N_3O_2$  olan bir bileşiktir. Antifungal etkisi, ergosterol biyosentezinde önemli bir enzim olan lanosterol 14 $\alpha$ -demetilazın inhibisyonu yoluyla gerçekleşir ve bunun sonucunda mantar hücre zarı hasar görür (Lundqvist, Hellman & Oskarsson, 2016). Organik çözücülerde çözünmez ancak polar çözücülerde rahatlıkla çözünür. Prokloraz kimyasal yapısı Şekil 1.4'de gösterilmiştir.



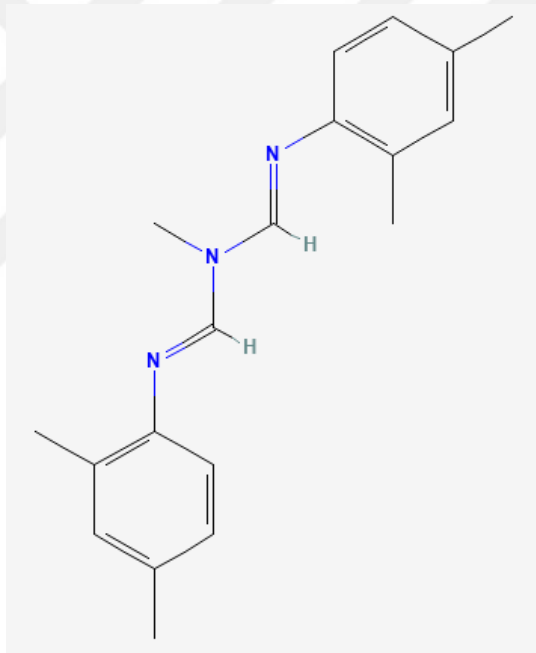
Şekil 1.4: Prokloraz kimyasal yapısı.

Ayrıca, triazoller gibi imidazoller de veterinerlik ve insan tıbbında mantar enfeksiyonlarını tedavi etmek için kullanılır. Proklorazın bir endokrin bozucu olduğu ve üreme sistemine

zarar verebileceği birkaç toksikolojik çalışma ile gösterilmiştir (Major, Petes, Szabó, Buda, Saidon & Lehel, 2024).

### 1.2.2.3 Amitraz

Amitraz, beyaz veya sarı renkte, kristalimsi bir katı olarak bilinen, kokusuz ve uçucu olmayan bir bileşiktir. Amitraz'ın kimyasal formülü  $C_{19}H_{23}N_3$  olarak belirlenmiştir ve moleküler ağırlığı 293,4 g/mol değerindedir. Amitraz özellikle böceklere karşı etkilidir ancak birçok farklı alanda pestisit ve pestisit sinerjisti olarak kullanılmaktadır (Del Pino, Moyano-Cires, Anadon, Díaz, Lobo, Capo & Frejo, 2015). Ayrıca, su ile çözünmemesi durumu, onun ortamda toksik olabilme potansiyelini de beraberinde getirmektedir. Genellikle emülsiyon konsantreleri veya toz halinde kullanımı yaygındır ve bu durumu sayesinde çok çeşitli uygulama alanları bulunmaktadır. Amitraz kimyasal yapısı Şekil 1.5'de gösterilmiştir.

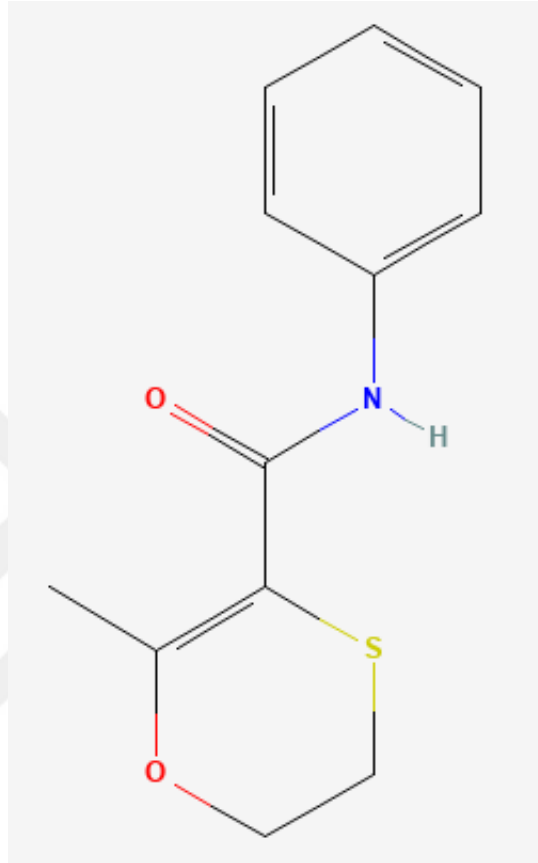


**Şekil 1.5:** Amitraz kimyasal yapısı.

Amitraz, sinir sistemini etkileyerek böcek ve akarların kasılmasını engeller. Bu nedenle sinirleri etkileyerek onları öldürür. Hayvanlarda ve insanlarda maruz kalındığında baş ağrısı, mide bulantısı, baş dönmesi gibi semptomlara neden olabilir. Yüksek dozlarda solunum ve dolaşım sistemi sorunlarına yol açabilir. Ayrıca zehirlenme durumunda hemen tıbbi yardım alınması önemlidir (Giorgini, Taroncher, Ruiz, Rodríguez-Carrasco & Tolosa, 2023).

#### 1.2.2.4 Karboksın

Karboksın (5,6-dihidro-2-metil-1,4-oksatiin-3-karboksanilid), beyaz kristal toz halinde bulunur. Yoğunluğu yaklaşık olarak 1,45 g/cm<sup>3</sup> seviyesindedir. Karboksın kimyasal yapısı Şekil 1.6'de gösterilmiştir.

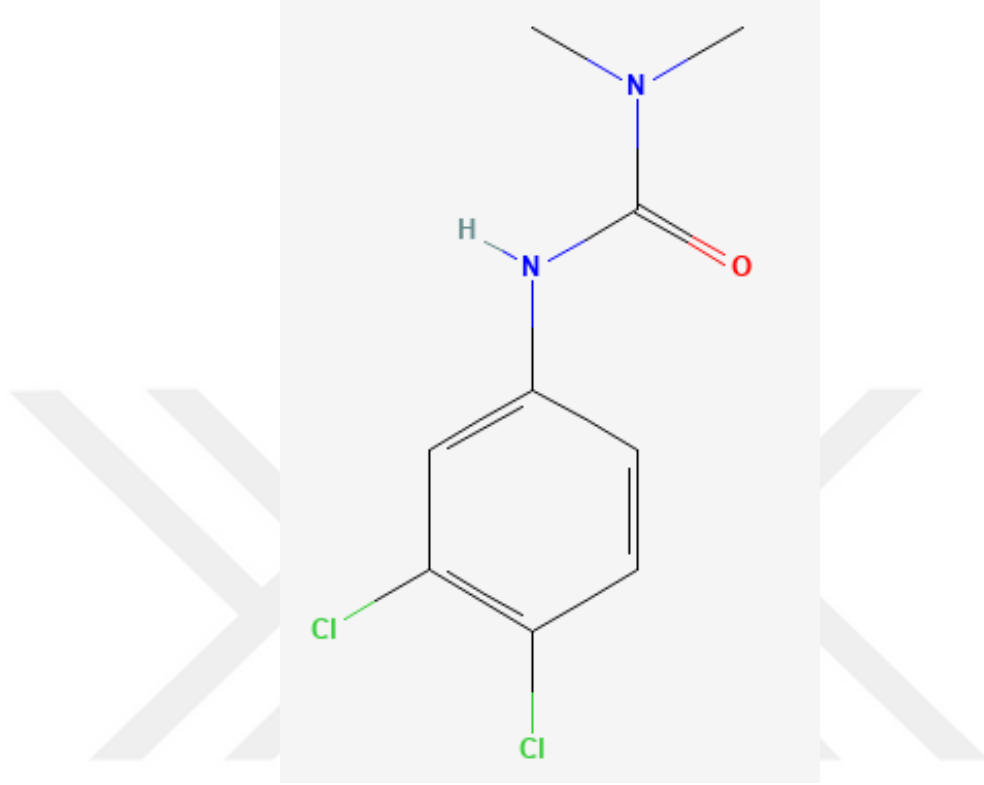


Şekil 1.6: Karboksın kimyasal yapısı.

Karboksın, arpa ve buğdayda gevşek kara lekenin kontrol altına alınmasını sağlayan tohumlara uygulanan ilk sentetik fungusittir. Bu pestisit oldukça reaktiftir ve çevre koşullarında karboksın sülfoksit ve oksikarboksine oksitlenebilir (Szewczuk-Karpisz, Tomczyk, Celińska, Sokołowska & Kuśmierz, 2021). Bu metabolitler, tahıllarda ve sebzelerde mantar hastalıklarını önlemek için kullanılabilir, ancak karboksın sülfoksit ve oksikarboksın çevrede daha uzun yarı ömre sahiptir ve karboksine benzer toksisiteye sahiptir. Ayrıca, karboksinin sekonder metaboliti olan anilin, son derece toksik ve kanserojendir (Li, Geng, Bao, Mei, Shi, Ma, Hua & Fang, 2024). Dolayısıyla, bu maddenin kullanımını oldukça dikkatli bir şekilde yönetilmelidir.

### 1.2.2.5 Diuron

Diuron (3-(3,4-Diklorofenil)-1,1-dimetilüre), kimyasal formülü  $C_9H_{10}Cl_2N_2O$  olan bir pestisit türüdür. Kristal toz halinde bulunur. Diuron kimyasal yapısı Şekil 1.7’de gösterilmiştir.

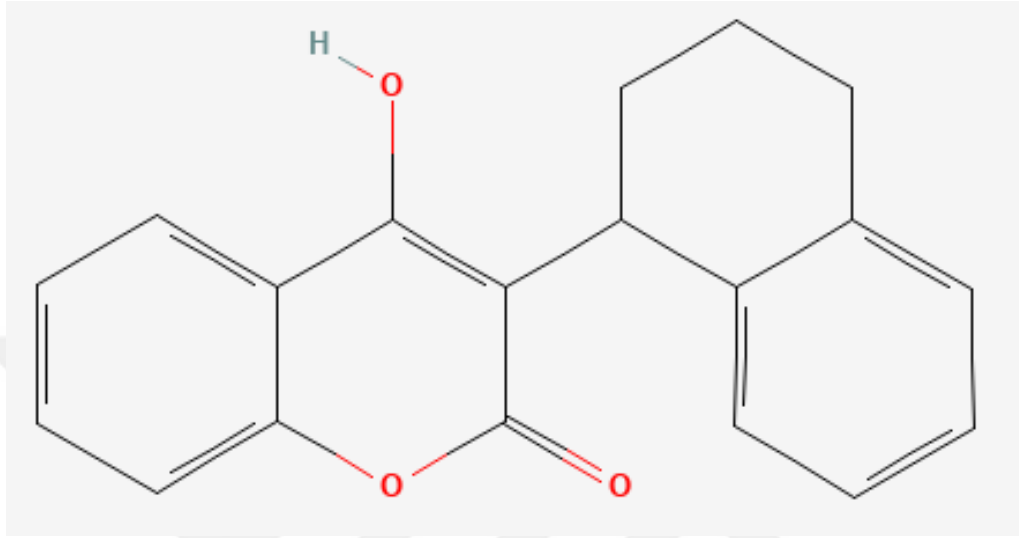


Şekil 1.7: Diuron kimyasal yapısı.

Diuron, fenilamid grubundan bir herbisittir. Fotosistem-II inhibitörü olarak etki eder (Szewczuk-Karpisz et al., 2021). Diuron, hedef olmayan organizmalarda oksidatif stresi artırarak reaktif oksijen türleri (ROS) üretimini teşvik eder. Bu herbisit in toprakta yavaş bozunması ve orta derecede çözünürlüğü, su kütlelerine sızmasına yol açar. Diuron, çeşitli metabolitlere dönüşebilir ve bu metabolitler, su, toprak ve tortular dahil ekosistemi kirletebilir (Sales, Pereira, Quintaneiro, et al. 2024). Bu durum, hedef olmayan türler ve çevre için potansiyel zarara yol açtığından, toksik potansiyelinin değerlendirilmesi için daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

### 1.2.2.6 Koumatetralil

Koumatetralil (3-( $\alpha$ -tetralil)-4-hidroksikumarin), beyaz kristal toz halinde olup kokusuzdur. Kimyasal formülü  $C_{19}H_{16}O_3$  olan bir pestisit olarak kullanılmaktadır. Koumatetralil kimyasal yapısı Şekil 1.8’de gösterilmiştir.

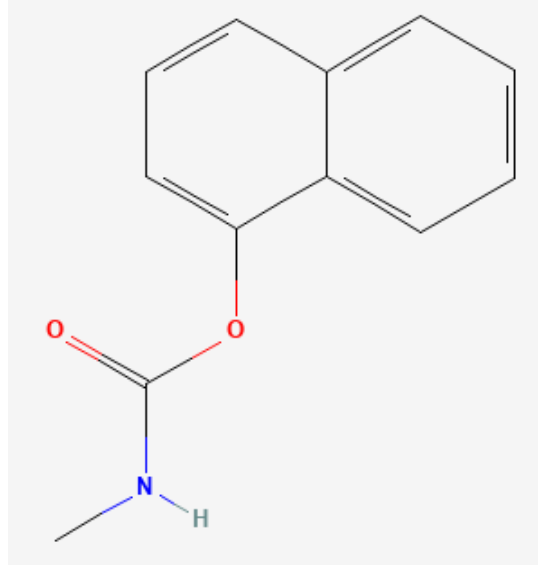


Şekil 1.8: Koumatetralil kimyasal yapısı.

Koumatetralil, bir kumarin türevidir ve genellikle fare zehiri olarak kullanılan bir rodentisit maddesidir. Koumatetralil, Bayer AG tarafından Racumin markasıyla piyasaya sürülmüştür. Saf koumatetralil, 150°C’nin altındaki sıcaklıklarda stabil kalabilen renksiz bir tozdur. Bu bileşik, özellikle farelerin kan pıhtılaşma mekanizmalarını inhibe ederek ölümcül etkiler gösterir (Murphy, 2018).

### 1.2.2.7 Karbaril

Karbaril, kimyasal adı 3-Hidroksibenzoil-N-metil-karbamat olan bir fungusittir. Beyaz kristal toz halde olan bu bileşik, suda çözünmez ve organik çözücülerde eriyebilir. Karbaril kimyasal yapısı Şekil 1.9’de gösterilmiştir.

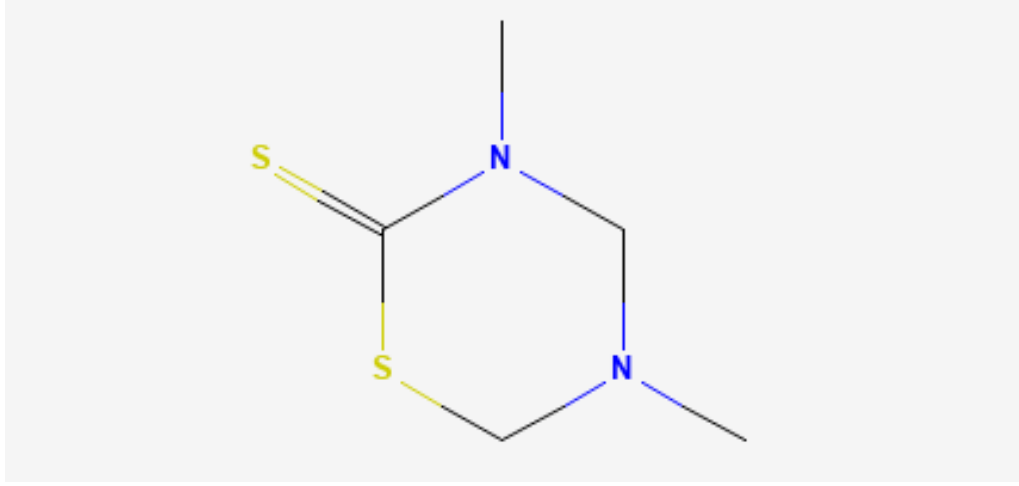


**Şekil 1.9:** Karbaril kimyasal yapısı.

Karbaril, karbamat sınıfına ait bir insektisit ve akarisit, genellikle tarımda zararlılara karşı kullanılır. Kimyasal formülü C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>2</sub> olan karbaril, zararlı böceklerin sinir sistemini hedef alarak, asetilkolinesteraz enziminin inhibisyonuna yol açar (Koshlukova & Reed, 2014). Mısır, pamuk, soya fasulyesi, pirinç gibi çeşitli mahsullerde ve ev bahçelerinde, bitki büyümesini kısıtlayarak verimliliği azaltan böcek türlerini kontrol etmek için kullanılır. Karbaril'in su çözünürlüğü 20 °C'de 36 mg/l olup, çevrede çeşitli bozunma süreçlerine girer ve yeraltı suyu ile bitkilerde hareket edebilir. Yarı ömrü, çevresel koşullara bağlı olarak 4-253 gün arasında değişir. İnsanlarda akut ve kronik maruziyet kolinesteraz inhibisyonu ve nörolojik etkiler gibi toksik semptomlara yol açabilir (Sooksawata, Adsatrooc, Bunmanat, Chittwanijc, Vangnoid, Kongtipf, & Inthornh, 2024).

#### **1.2.2.8 Dazomet**

Dazomet (3,5-dimetil-1,3,5-tiadiazinan-2-tion), beyaz veya hafif sarı toz halinde bulunan bir kimyasal bileşiktir. Kokusuz olup, su ve yağda çözünmez. Dazomet, C<sub>5</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>S<sub>2</sub> kimyasal formülüne sahip bir toprak dezenfektanı ve pestisit olarak bilinir. Dazomet kimyasal yapısı Şekil 1.10'de gösterilmiştir.

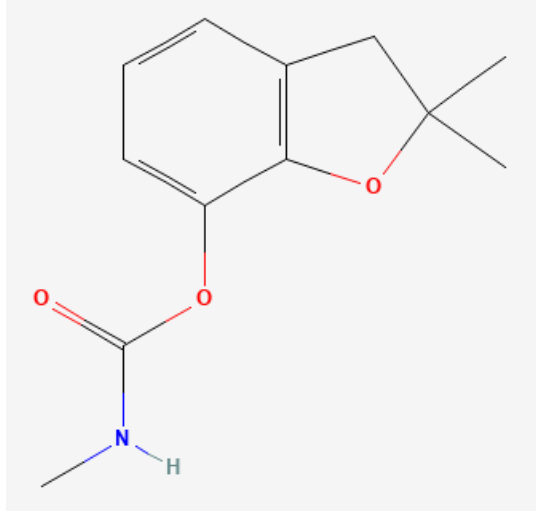


**Şekil 1.10:** Dazomet kimyasal yapısı.

Tarımsal faaliyetlerde, özellikle toprak kaynaklı zararlılar ve hastalıklara karşı mücadelede yaygın olarak tercih edilir. Toprağa uygulandığında, ısı ve nem etkisiyle metil izosiyanat gazına dönüşür (O'Malley, 2010). Dazomet, metil bromürün yerine geçen ve çevre açısından daha zararsız bir fumiganttır, çünkü toprakta tutulma süresi kısadır. Bu özellik, dazometi çevre dostu bir seçenek haline getirir. Granül formülasyonu, özellikle tarım makinelerinin ulaşmasının zor olduğu bölgelerde, sıvı veya gazlı fumigantlara göre daha kolay kullanılabilir. Çoğu dazomet uygulaması, çilek, domates, çiçek, zencefil, salatalık gibi değerli ürünlerde gerçekleştirilmektedir (Chen, Jiang, Xu, Fan, Chen, Shen, & Mao, 2022).

#### **1.2.2.9 Karbofuran**

Karbofuran, karbamat sınıfına dahil bir pestisit ve nematisit olup, tarım sektöründe yaygın olarak kullanılan bir maddedir. Kimyasal formülü C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub> olan bu bileşik, özellikle toprak ve yaprak uygulamaları ile bitki zararlıları, böcekler ve nematodlarla mücadelede yüksek etkililik göstermektedir. Karbofuran kimyasal yapısı Şekil 1.11'de gösterilmiştir.

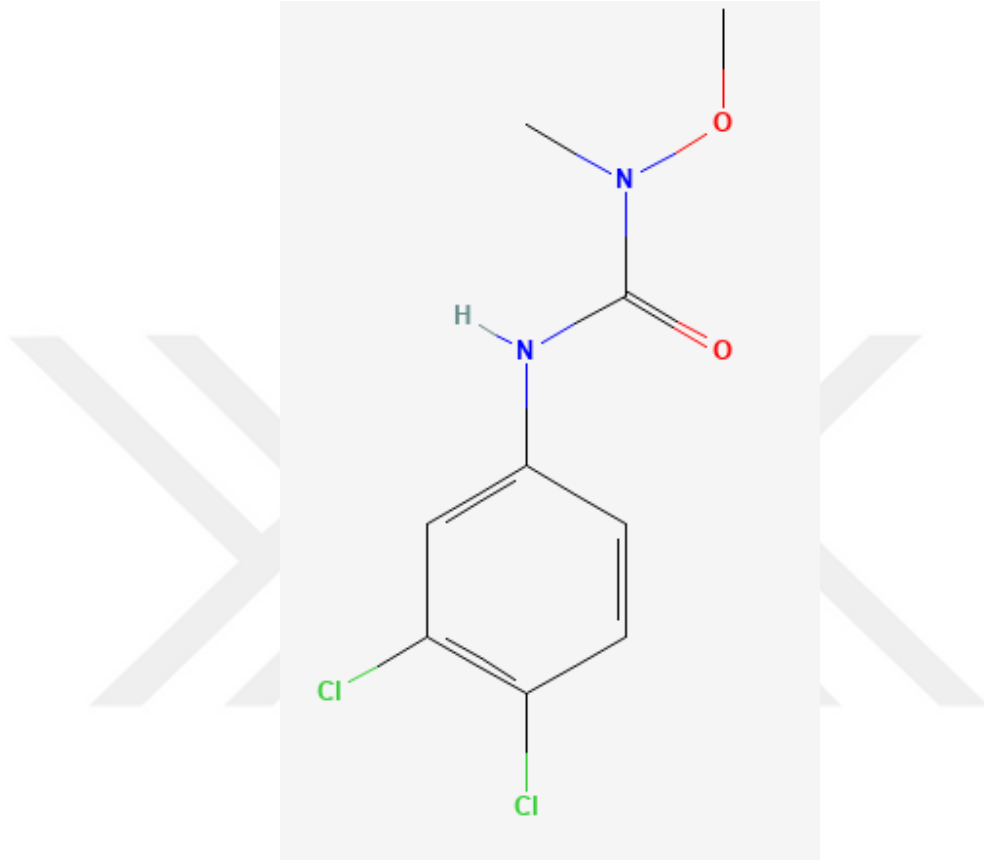


**Şekil 1.11:** Karbofuran kimyasal yapısı.

Antikolinesteraz aktivitesine bağlı olarak asetilkolinesteraz ve bütirikolinesteraz aktivitelerini inhibe etme potansiyeline sahip olduğundan, karbofuran memeliler, kuşlar ve balıklar üzerinde ciddi seviyede toksisite göstermektedir. İnsanlarda ise karbofuranın, üreme bozuklukları, endokrin sistemi bozucu etkiler, sitotoksik süreçler ve genotoksik anormalliklerle ilişkilendirildiği bildirilmektedir (Campos, Contreras-Cáceres, Bandosz, Jiménez-Jiménez, Rodríguez-Castellón, Esteves da Silva & Algarra, 2017). Karbofuran, insanlarda zehirlenmeye ve ciddi sağlık sorunlarına yol açabilecek bir böcek ilacıdır. Maruz kalma durumunda, göz problemleri, mide bulantısı, baş ağrısı, yüksek tansiyon, taşikardi gibi oküler ve oküler olmayan belirtiler görülebilir. Uzun süreli maruziyet, merkezi sinir sistemi üzerinde baskı yaparak nörolojik etkiler yaratır. Ayrıca, karbofuran tarafından gerçekleştirilen toksik etkiler kan damarlarında ve hücrelerde oksidatif stres, DNA hasarı, apoptoz ve anjiyogenez sürecinde bozulmalara yol açar. Karbofuran'ın toksisitesi, oksidatif stres ve hücre yaşlanmayı etkileyerek zararlı biyolojik etkilere neden olur. Ancak, yapılan bazı çalışmalar çiftçilerde karbofuran nedeniyle kanser riskinin artmadığını gösterse de hücre zarları üzerinde olumsuz bir etki yaratabilir. Yüksek dozda karbofuran, hücre ölümüne, aneuploidiye ve döllenme sürecinin bozulmasına neden olabilir (Kempuraj, Zhang, Gupta, Gupta, Sinha & Mohan, 2023).

### 1.2.2.10. Linuron

Linuron (3-(3,4-diklorofenil)-1-metoksi-1-metilüre) kimyasal formülü  $C_9H_{10}Cl_2N_2O_2$  olmakla birlikte beyaz renkli kristal toz formda bulunmaktadır. Linuron kimyasal yapısı Şekil 1.12’de gösterilmiştir.



Şekil 1.12: Linuron kimyasal yapısı.

Linuron’un bitkiler üzerindeki etkileri incelendiğinde, doğru bir şekilde uygulandığında istenmeyen otları yok edebilir ancak aşırı miktarda kullanımının bitkilere ve çevreye zarar verebileceği bilinmektedir. Linuron, hem mahsul hem de mahsul dışı alanlarda, yıllık ve çok yıllık geniş yapraklı ve otsu yabancı otları kontrol etmek için kullanılan bir herbisittir. Hem hasat öncesi hem de hasat sonrası olarak uygulanabilir ve yabancı otların fotosentezini engelleyerek etki gösterir (Chen, 2014).

## 2. MATERYALLER VE YÖNTEMLER

### 2.1 Materyaller

#### 2.1.1 Kullanılan Kimyasallar

Deneysel çalışmada kullanılan intestinal alkalen fosfataz enzimi, sodyum karbonat, sodyum bikarbonat, dimetil sülfoksit (DMSO), p-nitrofenil fosfat, hidroklorik asit ve pestisitler (Etion, Prokloraz, Amitraz, Karboksın, Diüron, Koumatetralil, Karbaril, Dazomet, Karbofuran, Linuron) Sigma Aldrich firmasından analitik saflıkta olarak temin edilmiştir.

#### 2.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar

Kullanılan alet ve cihazların isimleri ve marka / model bilgileri Tablo 2.1’de verilmiştir.

**Tablo 2.1:** Kullanılan alet ve cihazların bilgileri.

Alet ve Cihaz İsmi	Marka / Model
Hassas Terazi	Precisa XB 220A
UV Spektrofotometre	Biotek Power Wave XS
Manyetik Karıştırıcı	Heidolph
pH Metre	Hanna HI 221
Otomatik Pipetler	Isolab, Thermo Scientific ve Brand

#### 2.1.3 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışı

Enzim aktivite tayininde kullanılan 0,15 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> / 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> tampon çözeltisi, 15,9 gram (0,15 mol) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ve 8,4 gram (0,1 mol) NaHCO<sub>3</sub>’un yaklaşık 950 mL distile suda çözülmesiyle hazırlandı. Elde edilen karışımın pH değeri, 1 N HCl kullanılarak 10,0’a ayarlandı. Daha sonra toplam hacim distile su ile 1 litreye tamamlandı.

Substrat çözeltisi olarak ise 10 mM p-nitrofenil fosfat çözeltisi hazırlandı. Bunun için 0,0186 gram p-nitrofenil fosfat, 5 mL distile suda tamamen çözüldü ve kullanıma uygun hale getirildi.

### 2.1.4 Kullanılan Pestisitler ve Hazırlanışı

Deneysel çalışmada kullanılan tüm pestisitler 0,01 M derişiminde ve 5 mL dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözümlenerek hazırlandı. Pestisitlerin molekül ağırlıkları ve çözeltilerde kullanılan miktarları aşağıda Tablo 2.2’de verilmiştir.

**Tablo 2.2:** Kullanılan pestisitlerin moleküler ağırlıkları ve çözeltilerindeki miktarları.

Pestisit Adı	Moleküler Ağırlığı (g/mol)	Çözeltilerdeki Miktarı (g)
Etion	384,48	0,019
Prokloraz	376,67	0,019
Amitraz	293,41	0,015
Karboksin	235,30	0,012
Diüron	233,09	0,012
Koumatetralil	292,30	0,015
Karbaril	201,22	0,101
Dazomet	162,28	0,008
Karbofuran	221,25	0,011
Linuron	249,09	0,012

## 2.2 Yöntemler

### 2.2.1 ALP Enziminin Aktivite Ölçümü

Alkalin fosfat enzim aktivitesi, spektrofotometrik yöntemle p-nitrofenil fosfat (p-NPP) substratı kullanılarak 405 nm dalga boyunda belirlenmektedir. Aktivite ölçümü gerçekleştirmek için, kuvars küvete sırasıyla 950 µl Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> tampon çözeltisi, 50 µl substrat ve 50 µl enzim çözeltisi ilave edilmiştir. Ardından, karışım 405 nm dalga boyunda bir dakikalık süre zarfında oluşan absorbans değişimi kör çözeltilisine kıyasla izlenmiştir. Enzim aktivitesi, p-nitrofenil fosfatı (p-NPP) p-nitrofenole dönüştüren birim miktar enzim olarak tanımlanmaktadır. Buna göre bir Enzim Ünitesi (E.Ü.), reaksiyonun gerçekleştirildiği küvette, bir dakikada 1 mikromol p-NPP’yi p-nitrofenole dönüştüren enzim miktarıdır (Tang, Chen, He, & Ma, 2019). Bu çalışmada ALP enzim aktivitesi, Aschaffenburg ve Mullen tarafından 1949 yılında geliştirilen yöntem temel alınarak belirlenmiştir. Yöntem prensibi Şekil 2.1’de gösterilmiştir. Spektrofotometre ölçümlerinden elde edilen absorbans farkları doğrultusunda, enzim ünitesi aşağıdaki formül yardımıyla hesaplanmıştır (Fadıloğlu, Erkmen & Şekeroğlu, 2004).

$$E\ddot{U} = \frac{(V \times dA/dt)}{\epsilon_{405} \times v \times d} \times 1000 \quad (2.1)$$

$V$  = Reaksiyon Hacmi (mL)

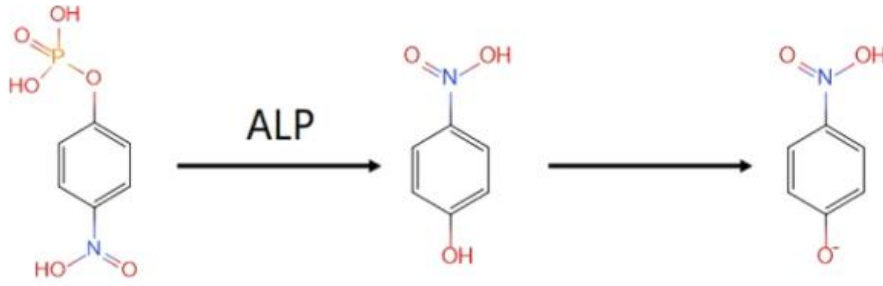
$dA$  =  $\Delta_{\text{numune}} - \Delta_{\text{kör reaktif}} - \Delta_{\text{kör numune}}$

$t$  = 1 dakika

$\epsilon_{405} = 18,2 \text{ l. cm}^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1}$

$v$  = Enzim Hacmi (mL)

$d$  = 1 cm



**Şekil 2.1:** p-NPP bazlı ALP aktivite tayin yöntemi (Tang et al., 2019).

### 2.2.2 Enzimi İnhibe Eden Pestisitler için $IC_{50}$ Değerlerinin Belirlenmesi

Çalışmada, ALP enzimine karşı inhibisyon etkisi gösteren pestisitlerin  $IC_{50}$  değerlerini belirlemek amacıyla, p-nitro fenilfosfat substratı ile optimum koşullarda deneyler gerçekleştirilmiştir. Öncelikle, reaksiyon ortamında pestisitler bulunmaksızın enzim aktivitesi belirlenmiş ve bu değer %100 aktivite olarak referans alınmıştır. Ardından, farklı pestisit konsantrasyonlarına ait absorbans değerleri 405 nm'de, kör çözeltiliye karşı ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değerleri kullanılarak % aktivite değerleri hesaplanmıştır. Bu sonuçlara dayanarak % Aktivite –  $[I]$  grafikleri oluşturulmuş ve grafiklerden her bir pestisit için  $IC_{50}$  değerleri belirlenmiştir.

### 3. BULGULAR

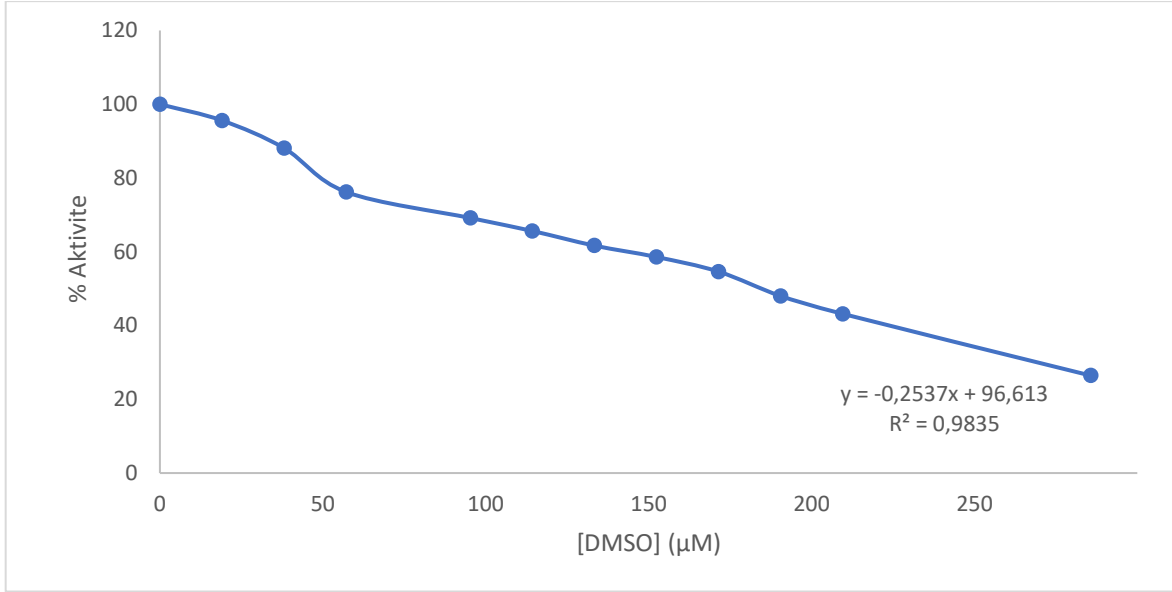
Yapılan deneysel çalışmada 10 farklı pestisit ALP enzimine karşı etkisi incelenmiştir. Aktivite ölçümü için pestisitler 0,01 M derişiminde DMSO içerisinde çözülerek farklı konsantrasyonlarda 50 µl enzim, 50 µl substrat çözeltisi ve toplam hacim 1050 µl olacak şekilde pH:10 aktivite tamponu ile hazırlanmış ve 405 nm’de 1 dakikalık absorbans farkı kayıt edilmiştir. Her ölçüm iki defa tekrarlanarak ortalamaları alınmıştır.

#### 3.1. ALP Enziminin Çeşitli Pestisitlere Karşı Aktivitesinin Ölçülmesi

Çalışmamızda 10 farklı pestisit çeşitli konsantrasyonlarda ALP enzim aktivitesine etkisi incelenerek, elde edilen veriler aşağıdaki tablolarda sunulmuştur. Enzim aktivitesini inhibe eden pestisitler için IC<sub>50</sub> değerlerinin belirlenmesi amacıyla % Aktivite – [I] grafikleri çizilmiş ve aşağıda grafiklerde sunulmuştur.

**Tablo 3.1:** DMSO’nun ALP enziminin aktivitesi üzerine etkisi.

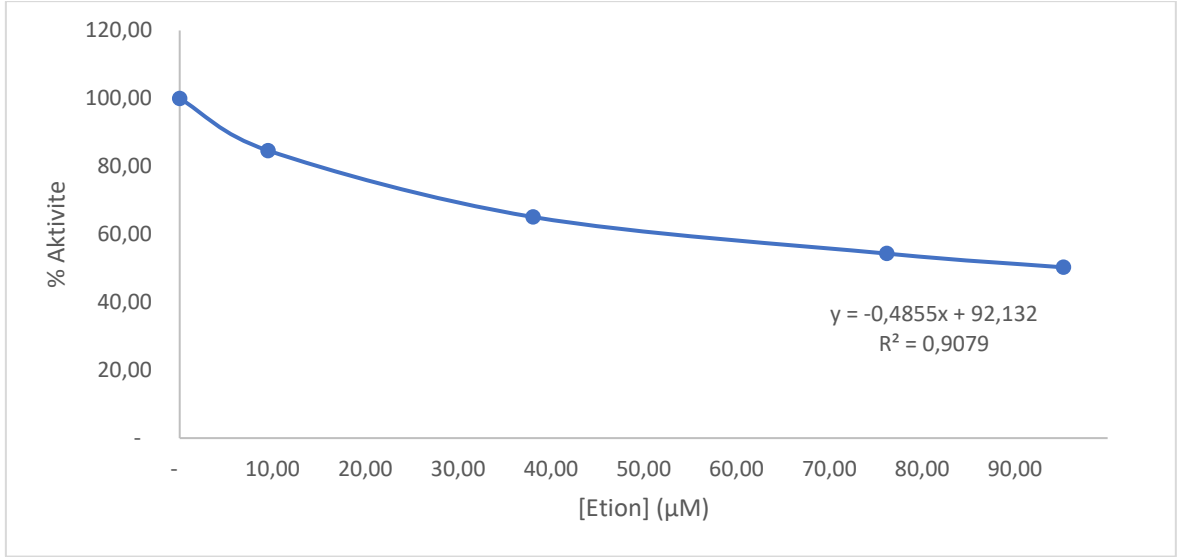
Tampon Miktarı (µl)	Substrat Miktarı (µl)	DMSO Miktarı (µl)	Enzim Miktarı (µl)	[DMSO] (µM)	ΔA	Aktivite (EU/dk)	% Aktivite
950	50	0	50	0	0,1135	124,73	100,00
940		10		9,52	0,1275	140,11	112,33
930		20		19,05	0,1085	119,23	95,59
910		40		38,10	0,1	109,89	88,11
890		60		57,14	0,0865	95,05	76,21
870		80		76,19	0,077	84,62	67,84
850		100		95,24	0,0785	86,26	69,16
830		120		114,29	0,0745	81,87	65,64
810		140		133,33	0,07	76,92	61,67
790		160		152,38	0,0665	73,08	58,59
770		180		171,43	0,062	68,13	54,63
750		200		190,48	0,0545	59,89	48,02
730		220		209,52	0,049	53,85	43,17
710		240		228,57	0,033	36,26	29,07
690		260		247,62	0,041	45,05	36,12
670		280		266,67	0,036	39,56	31,72
650	300	285,71	0,03	32,97	26,43		



**Şekil 3.1:** DMSO'nun ALP enziminin aktivitesi üzerine etkisi.

**Tablo 3.2:** Etion pestisitinin ALP enziminin aktivitesi üzerine etkisi.

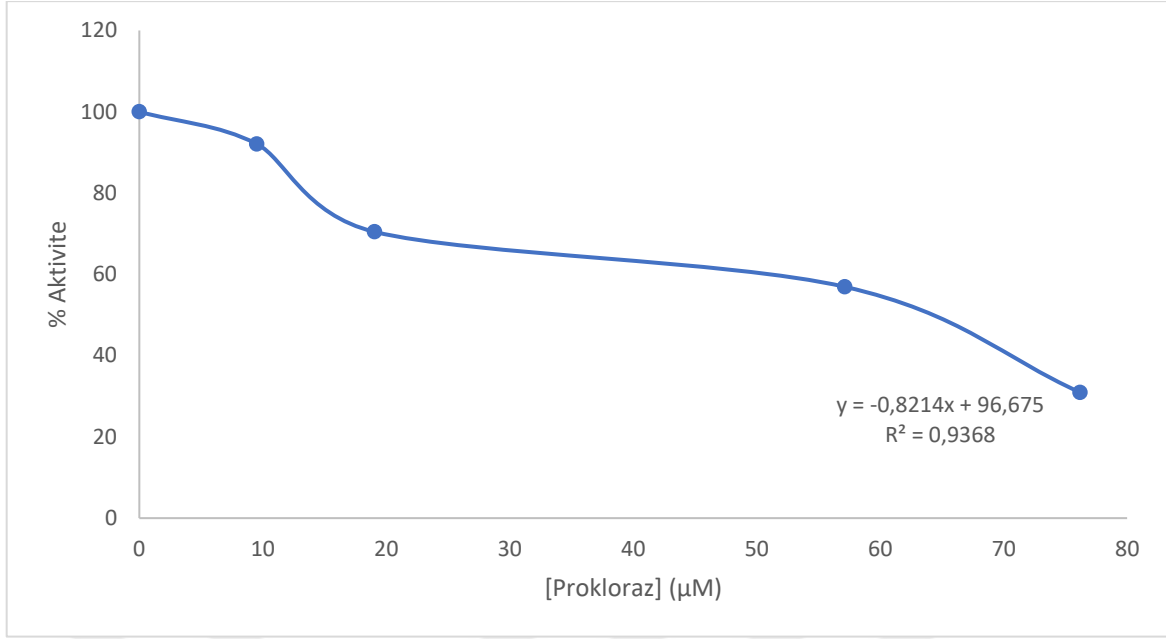
Tampon Miktarı (µl)	Substrat Miktarı (µl)	Etion Miktarı (µl)	Enzim Miktarı (µl)	[Etion] (µM)	ΔA	Aktivite (EU/dk)	% Aktivite
950	50	0	50	0	0,17	186,81	100,00
945		5		4,76	0,1275	140,11	75,00
940		10		9,52	0,1125	123,63	66,18
930		20		19,05	0,141	154,95	82,94
910		40		38,10	0,0845	92,86	49,71
890		60		57,14	0,0995	109,34	58,53
870		80		76,19	0,077	84,62	45,29
850		100		95,24	0,064	70,33	37,65



**Şekil 3.2:** % Aktivite – [Etion] grafiği.

**Tablo 3.3:** Prokloraz pestisitinin ALP enziminin aktivitesi üzerine etkisi.

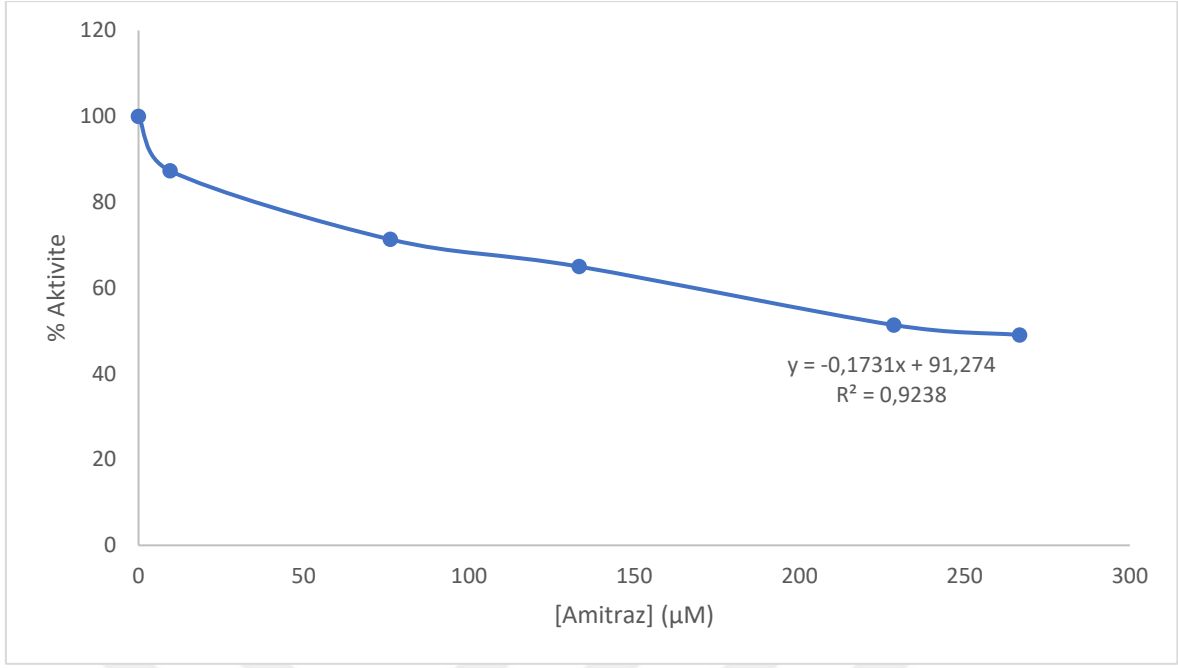
Tampon Miktarı (μl)	Substrat Miktarı (μl)	Prokloraz Miktarı (μl)	Enzim Miktarı (μl)	[Prokloraz] (μM)	ΔA	Aktivite (EU/dk)	% Aktivite
950	50	0	50	-	0,208	228,57	100,00
945		5		4,76	0,212	232,97	101,92
940		10		9,52	0,1685	185,16	81,01
930		20		19,05	0,118	129,67	56,73
910		40		38,10	0,1545	169,78	74,28
890		60		57,14	0,0965	106,04	46,39
870		80		76,19	0,0225	24,73	10,82



Şekil 3.3: % Aktivite – [Prokloraz] grafiği.

Tablo 3.4: Amitraz pestisitinin ALP enziminin aktivitesi üzerine etkisi.

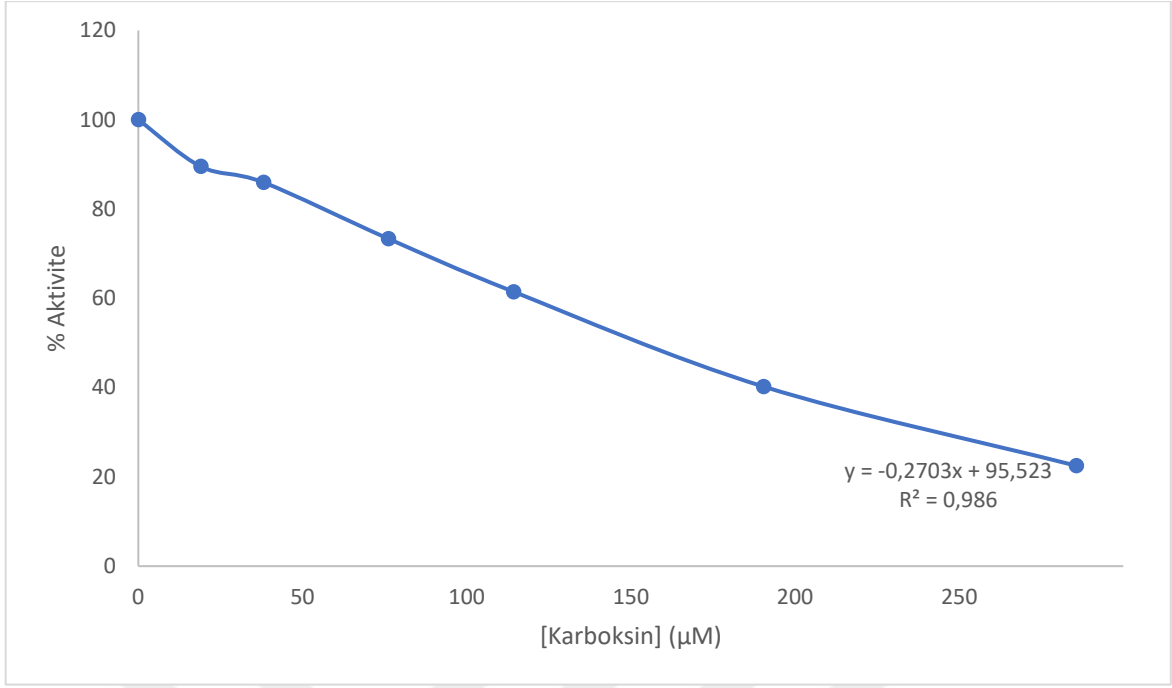
Tampon Miktarı (µl)	Substrat Miktarı (µl)	Amitraz Miktarı (µl)	Enzim Miktarı (µl)	[Amitraz] (µM)	ΔA	Aktivite (EU/dk)	% Aktivite
950	50	0	50	0	0,533	585,71	100,00
945		5		4,76	0,494	542,86	92,68
940		10		9,52	0,437	480,22	81,99
930		20		19,05	0,498	547,25	93,43
910		40		38,10	0,582	639,56	109,19
890		60		57,14	0,419	460,44	78,61
870		80		76,19	0,384	421,98	72,05
850		100		95,24	0,387	425,27	72,61
830		120		114,29	0,382	419,78	71,67
810		140		133,33	0,35	384,62	65,67
790		160		152,38	0,355	390,11	66,60
770		180		171,43	0,282	309,89	52,91
750		200		190,48	0,339	372,53	63,60
730		220		209,52	0,29	318,68	54,41
710		240		228,57	0,299	328,57	56,10
690		260		247,62	0,292	320,88	54,78
670		280		266,67	0,281	308,79	52,72
650		300		285,71	0,307	337,36	57,60
430		320		304,76	0,349	383,52	65,48
610		340		323,81	0,239	262,64	44,84
590	360	342,86	0,256	281,32	48,03		



Şekil 3.4: % Aktivite – [Amitraz] grafiği.

Tablo 3.5: Karboksın pestisitinin ALP enziminin aktivitesi üzerine etkisi.

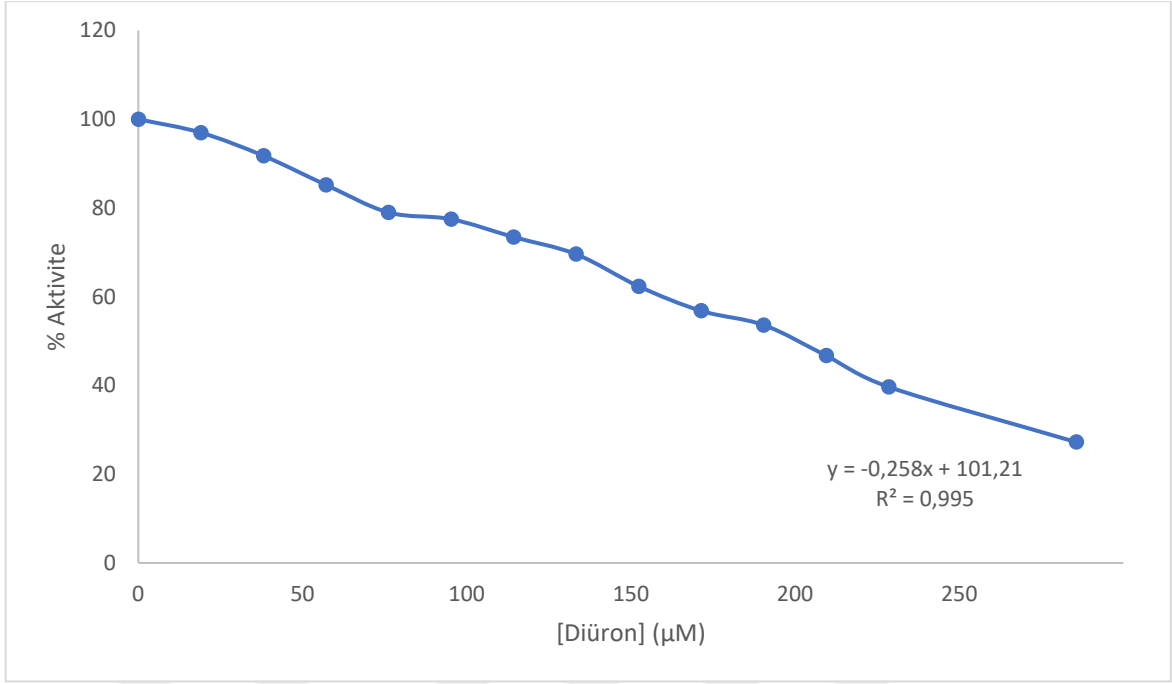
Tampon Miktarı (µl)	Substrat Miktarı (µl)	Karboksın Miktarı (µl)	Enzim Miktarı (µl)	[Karboksın] (µM)	ΔA	Aktivite (EU/dk)	% Aktivite
950	50	0	50	0	0,211	231,87	100,00
945		5		4,76	0,199	218,68	94,31
940		10		9,52	0,203	223,08	96,21
930		20		19,05	0,182	200,00	86,26
910		40		38,10	0,179	196,70	84,83
890		60		57,14	0,146	160,44	69,19
870		80		76,19	0,161	176,92	76,30
850		100		95,24	0,187	205,49	88,63
830		120		114,29	0,125	137,36	59,24
810		140		133,33	0,095	104,40	45,02
790		160		152,38	0,115	126,37	54,50
770		180		171,43	0,111	121,98	52,61
750		200		190,48	0,076	83,52	36,02
730		220		209,52	0,075	82,42	35,55
710		240		228,57	0,098	107,69	46,45
650		300		285,71	0,043	47,25	20,38



**Şekil 3.5:** % Aktivite – [Karboksin] grafiği.

**Tablo 3.6:** Diüron pestisitinin ALP enziminin aktivitesi üzerine etkisi.

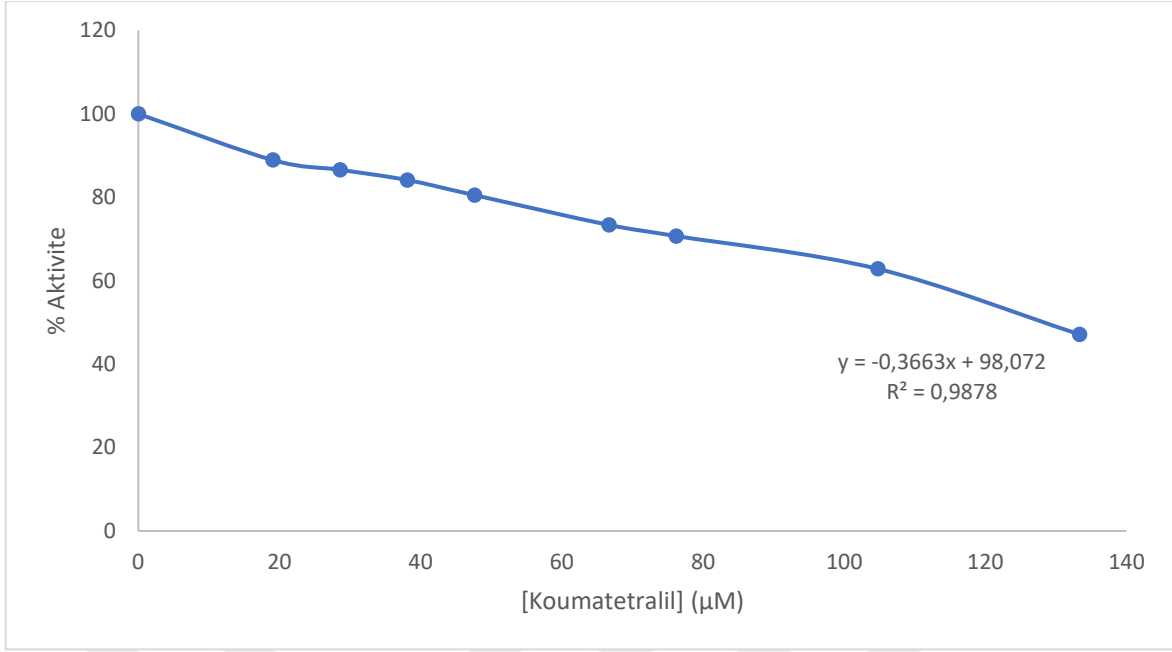
Tampon Miktarı (µl)	Substrat Miktarı (µl)	Diüron Miktarı (µl)	Enzim Miktarı (µl)	[Diüron] (µM)	ΔA	Aktivite (EU/dk)	% Aktivite
950	50	0	50	0	0,184	202,20	100,00
945		5		4,76	0,18	197,80	97,83
940		10		9,52	0,18	197,80	97,83
930		20		19,05	0,18	197,80	97,83
910		40		38,10	0,173	190,11	94,02
890		60		57,14	0,167	183,52	90,76
870		80		76,19	0,158	173,63	85,87
850		100		95,24	0,152	167,03	82,61
830		120		114,29	0,144	158,24	78,26
810		140		133,33	0,137	150,55	74,46
790		160		152,38	0,119	130,77	64,67
770		180		171,43	0,107	117,58	58,15
750		200		190,48	0,105	115,38	57,07
730		220		209,52	0,09	98,90	48,91
710		240		228,57	0,085	93,41	46,20
650		300		285,71	0,051	56,04	27,72



Şekil 3.6: % Aktivite – [Diüron] grafiği.

Tablo 3.7: Koumatetralil pestisitinin ALP enziminin aktivitesi üzerine etkisi.

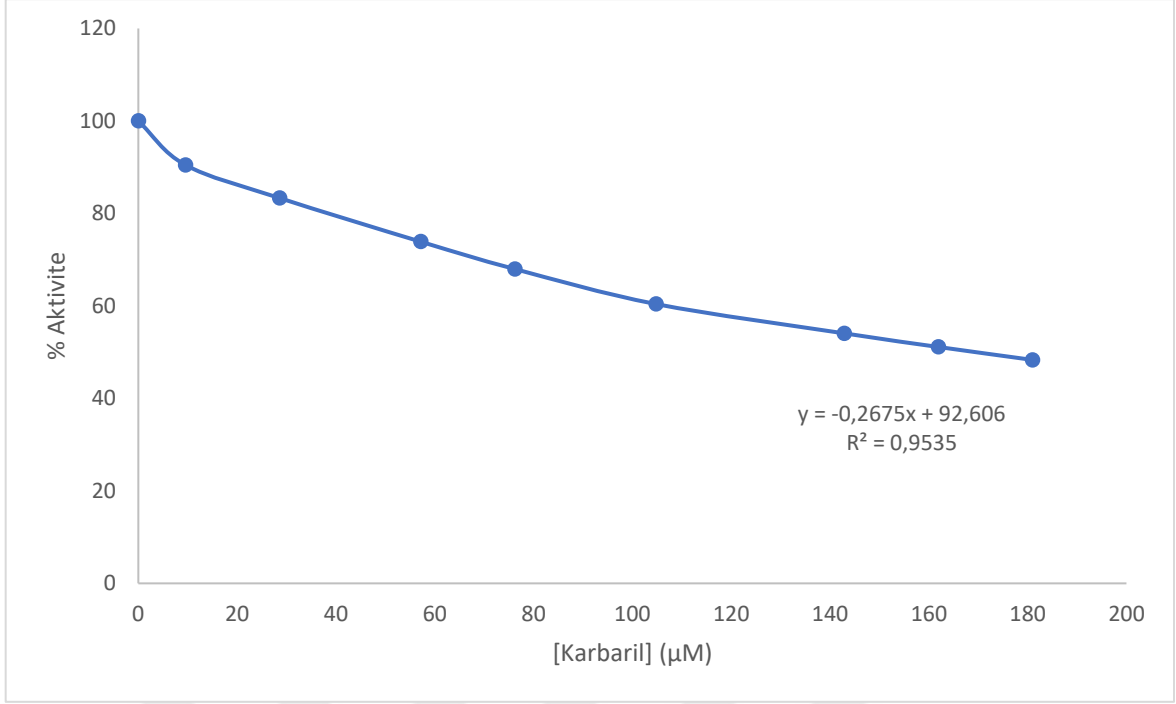
Tampon Miktarı (µl)	Substrat Miktarı (µl)	Koumatetralil Miktarı (µl)	Enzim Miktarı (µl)	[Koumatetralil] (µM)	ΔA	Aktivite (EU/dk)	% Aktivite
950	50	0	50	0	0,5865	644,51	100,00
945		5		4,76	0,5845	642,31	99,66
940		10		9,52	0,5655	621,43	96,42
930		20		19,05	0,514	564,84	87,64
920		30		28,57	0,501	550,55	85,42
910		40		38,10	0,489	537,36	83,38
900		50		47,62	0,4645	510,44	79,20
890		60		57,14	0,403	442,86	68,71
880		70		66,67	0,4205	462,09	71,70
870		80		76,19	0,418	459,34	71,27
860		90		85,71	0,412	452,75	70,25
850		100		95,24	0,42	461,54	71,61
840		110		104,76	0,359	394,51	61,21
830		120		114,29	0,302	331,87	51,49
810		140		133,33	0,26	285,71	44,33
800	150	142,86	0,24	263,74	40,92		



Şekil 3.7: % Aktivite – [Koumatetralil] grafiği.

Tablo 3.8: Karbaril pestisitinin ALP enziminin aktivitesi üzerine etkisi.

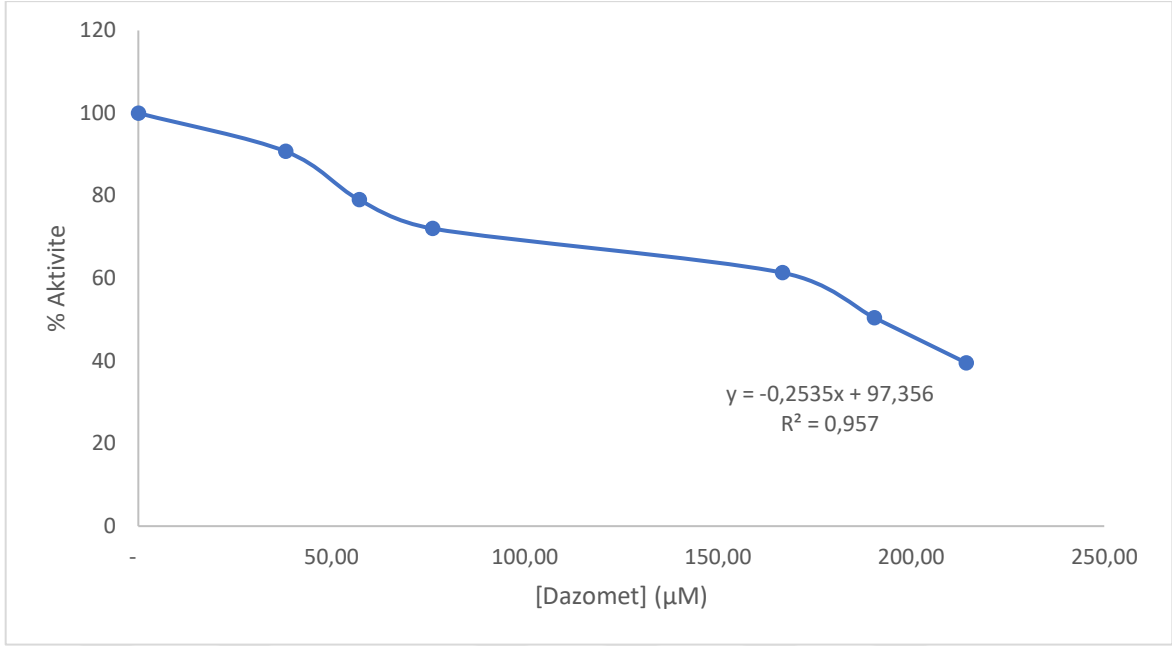
Tampon Miktarı (µl)	Substrat Miktarı (µl)	Karbaril Miktarı (µl)	Enzim Miktarı (µl)	[Karbaril] (µM)	ΔA	Aktivite (EU/dk)	% Aktivite
950	50	0	50	0	0,3175	348,90	100,00
945		5		4,76	0,2755	302,75	86,77
940		10		9,52	0,2625	288,46	82,68
930		20		19,05	0,231	253,85	72,76
920		30		28,57	0,254	279,12	80,00
910		40		38,10	0,2235	245,60	70,39
900		50		47,62	0,227	249,45	71,50
890		60		57,14	0,232	254,95	73,07
880		70		66,67	0,2195	241,21	69,13
870		80		76,19	0,216	237,36	68,03
860		90		85,71	0,1845	202,75	58,11
850		100		95,24	0,1745	191,76	54,96
840		110		104,76	0,1795	197,25	56,54
830		120		114,29	0,1715	188,46	54,02
820		130		123,81	0,187	205,49	58,90
800		150		142,86	0,1645	180,77	51,81
780		170		161,90	0,158	173,63	49,76
770	190	180,95	0,152	167,03	47,87		



Şekil 3.8: % Aktivite – [Karbaril] grafiği.

Tablo 3.9: Dazomet pestisitinin ALP enziminin aktivitesi üzerine etkisi.

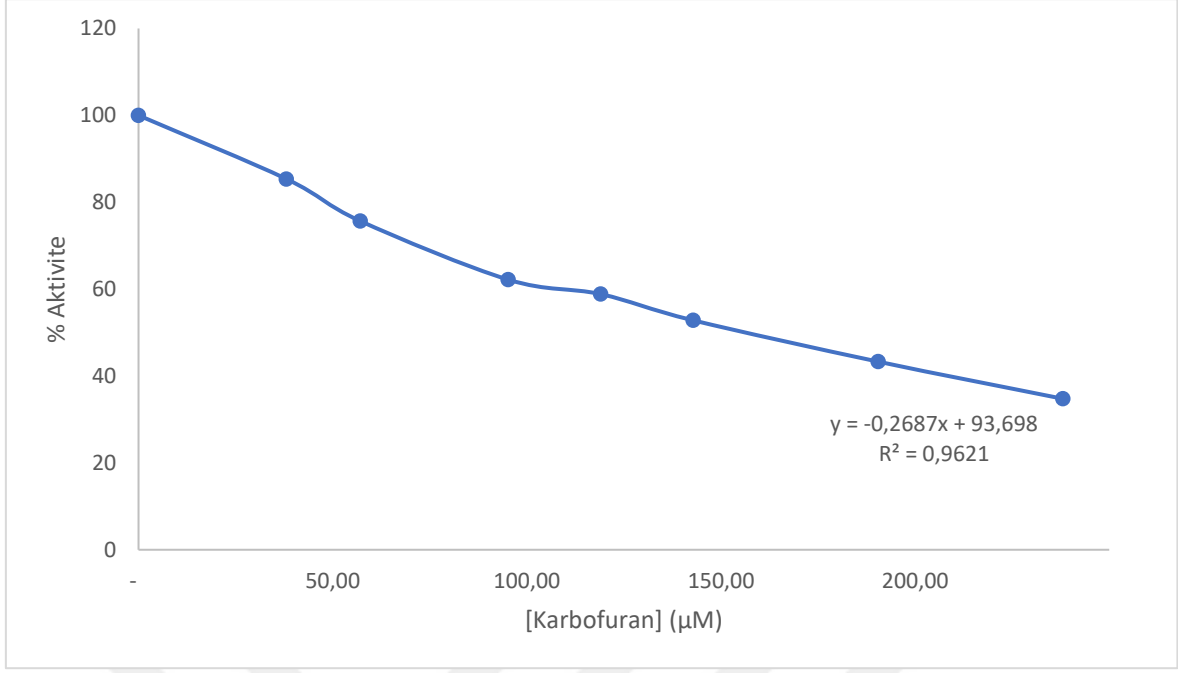
Tampon Miktarı (µl)	Substrat Miktarı (µl)	Dazomet Miktarı (µl)	Enzim Miktarı (µl)	[Dazomet] (µM)	ΔA	Aktivite (EU/dk)	% Aktivite
950	50	0	50	0	0,2155	236,81	100,00
940		10		9,52	0,2325	255,49	107,89
930		20		19,05	0,219	240,66	101,62
910		40		38,10	0,1985	218,13	92,11
890		60		57,14	0,1735	190,66	80,51
870		80		76,19	0,16	175,82	74,25
850		100		95,24	0,158	173,63	73,32
825		125		119,05	0,14	153,85	64,97
800		150		142,86	0,1645	180,77	76,33
775		175		166,67	0,141	154,95	65,43
750		200		190,48	0,1115	122,53	51,74
725		225		214,29	0,0845	92,86	39,21



Şekil 3.9: % Aktivite – [Dazomet] grafiği.

Tablo 3.10: Karbofuran pestisitinin ALP enziminin aktivitesi üzerine etkisi.

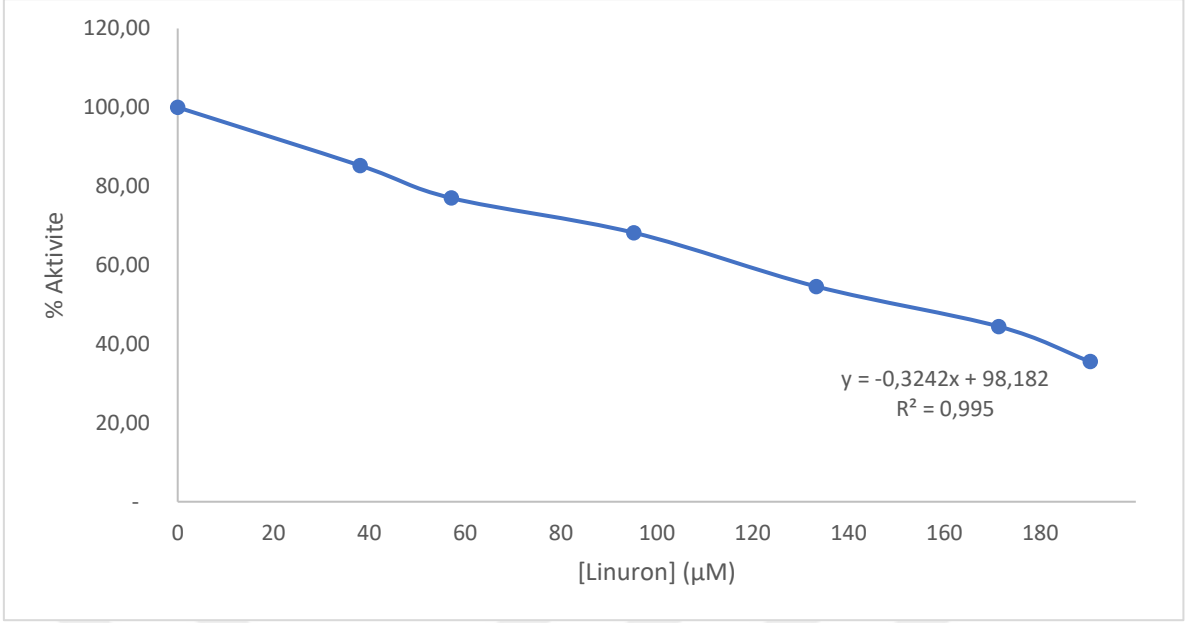
Tampon Miktarı (µl)	Substrat Miktarı (µl)	Karbofuran Miktarı (µl)	Enzim Miktarı (µl)	[Karbofuran] (µM)	ΔA	Aktivite (EU/dk)	% Aktivite
950	50	0	50	0	0,361	396,70	100,00
945		5		4,76	0,4005	440,11	110,94
940		10		9,52	0,372	408,79	103,05
930		20		19,05	0,366	402,20	101,39
920		30		28,57	0,337	370,33	93,35
910		40		38,10	0,3055	335,13	84,63
900		50		47,62	0,2945	323,63	81,58
890		60		57,14	0,2725	299,45	75,48
880		70		66,67	0,258	283,52	71,47
870		80		76,19	0,2295	252,20	63,57
860		90		85,71	0,2335	256,59	64,68
850		100		95,24	0,2165	237,91	58,20
825		125		119,05	0,203	223,08	56,23
800		150		142,86	0,182	200,00	50,42
750		200		190,48	0,151	165,93	41,38
700	250	238,10	0,127	139,56	35,18		



**Şekil 3.10:** % Aktivite – [Karbofuran] grafiği.

**Tablo 3.11:** Linuron pestisitinin ALP enziminin aktivitesi üzerine etkisi.

Tampon Miktarı (µl)	Substrat Miktarı (µl)	Linuron Miktarı (µl)	Enzim Miktarı (µl)	[Linuron] (µM)	ΔA	Aktivite (EU/dk)	% Aktivite
950	50	0	50	0	0,33	362,64	100,00
945		5		4,76	0,32	353,85	97,58
940		10		9,52	0,27	294,51	81,21
935		15		14,29	0,29	316,48	87,27
930		20		19,05	0,29	315,38	86,97
910		40		38,10	0,28	305,49	84,24
890		60		57,14	0,26	280,22	77,27
870		80		76,19	0,18	196,70	54,24
850		100		95,24	0,22	246,15	67,88
830		120		114,29	0,18	197,80	54,55
810		140		133,33	0,17	189,01	52,12
790		160		152,38	0,18	197,80	54,55
770		180		171,43	0,14	148,35	40,91
750		200		190,48	0,10	113,19	31,21



**Şekil 3.11:** % Aktivite – [Linuron] grafiği.

### 3.2. Pestisitlerin ALP Enzimi Üzerindeki IC<sub>50</sub> Değerlerinin Belirlenmesi

Oluşturulan tablo ve grafiklerden yararlanılarak pestisitlerin IC<sub>50</sub> değerleri hesaplanmıştır. Sonuçlar aşağıda tabloda verilmiştir.

**Tablo 3.12:** Pestisitlerin IC<sub>50</sub> değerleri.

Pestisit Adı	IC <sub>50</sub> (µM)
Etion	86,77
Prokloraz	56,79
Amitraz	238,46
Karboksin	168,64
Diüron	198,53
Koumatetralil	131,12
Karbaril	159,35
Dazomet	186,45
Karbofuran	162,33
Linuron	148,15

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada 10 adet pestisit ALP enzimi üzerinde etkileri incelenmiştir. Bu amaçla Etion, Prokloraz, Amitraz, Karboksın, Diüron, Koumatetralil, Karbaril, Dazomet, Karbofuran ve Linuron pestisitleri kullanılmıştır. Pestisitlerin yanlış kullanımı, toprak, su ve hava gibi doğal kaynakların kirlenmesine neden olabilmekte ve bu durum ekosistem üzerinde büyük olumsuz etkilere yol açabilmektedir. Bu pestisitlerin enzim aktivitesi üzerine etkilerinin araştırılması ile pestisit kullanımının olası negatif etkilerini anlamak ve çevresel sağlık risklerini azaltmak amacıyla temel bilgi sağlanması amaçlanmıştır.

Çalışmada enzim olarak ALP seçilmesinin nedeni ALP'nin canlı organizmalarda tüm fosfat süreçlerinden sorumlu olması ve hayati fonksiyonlarda önemli bir yere sahip olmasıdır. ALP enziminin görevlerine ve buldukları dokuya göre olmak üzere dört farklı izoenzimi mevcuttur. Çalışmada sığıır intestinal alkale fosfataz enzimi kullanılmıştır. Bu enzim canlılarda bağırsak homeostazını korur, duodenum yüzey pH'ını düzenler ve patojen bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlara karşı anti – inflamatuvar etki göstermektedir (Martins, Kooi, Poelstra & Hulscher, 2023).

LPS, gram-negatif bakterilerin dış hücre duvarında bulunan bir endotoksin olup, bağışıklık sistemi üzerinde güçlü bir etkiye sahiptir. LPS'nin dolaşıma girmesi, kardiyojenik şok ve akut miyokard enfarktüsü gibi durumlarla ilişkili inflamatuvar yanıtları tetikler. Bu yanıtlar, bağırsak geçirgenliğinin artması ve endotoksinin dolaşıma girmesiyle daha da güçlenir. Alkale fosfatazın, LPS'yi defosforile ederek detoksifiye etme potansiyeli üzerine yapılan çalışmalar, bu enzimin endotoksinle indüklenen inflamasyonu azaltma kapasitesini göstermektedir. Sığıır intestinal alkale fosfataz tedavisinin, LPS kaynaklı inflamatuvar yanıtı azaltarak hastalarda iyileşme sağladığına dair bulgular artmaktadır (Fiechter, Kats, Brands, van Middelaar, Pasterkamp, de Kleijn & Seinen, 2011).

Bağırsak sağlığı, çiftlik hayvanlarının performansı üzerinde önemli bir etkiye sahip olup, IAP'nin bu süreçteki rolü üzerine bilimsel kanıtlar giderek artmaktadır. IAP, enterositler tarafından üretilen ve bağırsak lümenine salgılanan bir enzim olup, bağırsak mukozasının korunmasında kritik bir işlev üstlenir. IAP'nin, bakteriyel lipopolisakkaritleri defosforile ederek inflamasyonu azalttığı, bağırsak pH'ını düzenlediği ve inorganik fosfat homeostazını koruduğu bilinmektedir. Ayrıca, IAP'nin hayvanlarda oral takviyesinin, bağırsak hastalıkları

ve inflamasyonun iyileştirilmesine yardımcı olabileceği gösterilmiştir. Bu bulgular, IAP'nin bağırsak sağlığını ve sistemik iltihaplanmayı iyileştirme potansiyelini ortaya koymakta ve hayvansal üretimde daha verimli ve sağlıklı hayvanlar için IAP'nin yem katkı maddesi olarak kullanılmasının önemini vurgulamaktadır (Escobar, Dobbs, Ellenberger, Parker, Latorre, J & Gabor, 2022).

Tarım sektörü, giderek azalan tarım alanları ve artan ürün verimliliği baskılarıyla birlikte gıda güvenliğini sağlama noktasında ciddi zorluklarla karşılaşmaktadır. Bu hedefe ulaşmak adına yüksek verimli bitki çeşitlerinin geliştirilmesi, dengeli gübreleme programlarının uygulanması ve pestisit kullanımına yönelme gibi çeşitli yöntemler benimsenmektedir. Ancak, organofosfatlar başta olmak üzere pestisitlerin insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri önemli bir sorun teşkil etmektedir. Bu pestisitler baş ağrısı, yorgunluk, solunum problemleri gibi yan etkilerin yanı sıra kolinesteraz aktivitesini inhibe ederek sağlık üzerinde ciddi tehditler oluşturabilmektedir.

Son dönemde, pestisit kalıntılarının tespiti için yeni teknolojiler geliştirilmektedir. Özellikle biyosensörler, yüksek hassasiyet, hız ve düşük maliyet avantajlarıyla dikkat çekmekte ve pestisit tespitinde geleneksel yöntemlere kıyasla daha etkili bir çözüm sunmaktadır. Enzim inhibisyonu, bir enzimin aktivitesinin, enzimin yapısına bağlanan bir molekül yani inhibitör tarafından azaltılması veya engellenmesi durumudur. Bu inhibitör ya enzimin aktif bölgesine bağlanarak ya da enzimin yapısında değişikliklere yol açarak substrat ile etkileşimini kısıtlar veya tamamen engeller. Bu süreç, biyokimyasal reaksiyonların hızını düşürebilir ya da tamamen durdurabilir. Enzim inhibisyonuna dayanan biyosensörler, pestisitlerin enzim aktivitesini engellemesi prensibiyle çalışır. Bu nedenle pestisitlerin enzim aktivitesi üzerindeki etkilerinin araştırılması son derece önem kazanmaktadır.

Tarım sektöründe yaygın biçimde kullanılan pestisitler, hayvansal gıda üretimi sırasında çevre kirliliğine neden olmakta ve biyolojik mekanizmaları olumsuz yönde etkileyerek enzimlerin normal işlevlerini bozabilmektedir. Pestisit kalıntılarının büyükbaş hayvan yemleriyle ekosisteme girişi, bu hayvanların organizmalarında toksik etkilere yol açarak bağırsak faaliyetlerini aksatabilir ve genel sağlık durumlarını olumsuz etkileyebilir. Bu çalışma, pestisitlerin hayvan sağlığı üzerindeki potansiyel zararlarını analiz etmeyi ve bu tür kirleticilerin gıda zinciri yoluyla insan sağlığı üzerindeki etkilerini öngörmeyi amaçlamaktadır. Aynı zamanda, hayvancılık alanında sürdürülebilir beslenme yöntemlerinin

geliştirilmesine katkıda bulunmayı hedeflemektedir. Son yıllarda canlılarda bağırsak sağlığı öneminin daha iyi anlaşılması ile söz konusu enzimde çalışma yapma kararı alınmıştır.

Çalışmada enzim aktivitesini belirlemek için p – NPP bazlı spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır. Bu yöntem ile gerçekleştirilen her ölçüm ikişer defa tekrarlanmıştır ve değerlerin ortalaması alınarak grafiksel analiz yapılmıştır. DMSO'nun enzim aktivitesi üzerine etkisine bakıldığında düşük hacimlerde kısmen inhibisyon etkisi görülmektedir, yüksek hacimlerde ise enzim aktivitesinde inhibisyon gözlemlenmiştir. Bu nedenle pestisitlerin inhibisyon etkisinin hesaplanmasında enzim aktivitesinden DMSO etkisi çıkarılarak sonuçlar bulunmuştur. Yapılan ölçümler sonucunda pestisitlerin alkalen fosfataz enzimi üzerine inhibisyon etkileri sırasıyla; Etion ( $IC_{50} = 86,77 \mu M$ ), Prokloraz ( $IC_{50} = 56,79 \mu M$ ), Amitraz ( $IC_{50} = 238,46 \mu M$ ), Karboksine ( $IC_{50} = 168,64 \mu M$ ), Diüron ( $IC_{50} = 198,53 \mu M$ ), Koumatetralil ( $IC_{50} = 131,12 \mu M$ ), Karbaril ( $IC_{50} = 159,35 \mu M$ ), Dazomet ( $IC_{50} = 186,45 \mu M$ ), Karbofuran ( $IC_{50} = 162,33 \mu M$ ), Linuron ( $IC_{50} = 148,15 \mu M$ ) şeklindedir (Tablo 3.12). Sonuçlara göre en zayıf inhibisyonu Amitraz pestisiti gösterir iken en güçlü inhibisyonu Prokloraz pestisiti göstermiştir.

Literatürde ALP enziminin inhibitörleri ile ilgili bazı çalışmalar mevcuttur. Butt ve arkadaşlarının 2023 yılında yaptığı bir çalışmada yeni bir thiazole-oxadiazole hibrit serisi, propanamid yapısı ile birlikte, alkalen fosfatazın umut verici bir inhibitörü olarak sentezlenmiştir. Bilgisayarla yapılan hesaplamalar, in vitro inhibisyon sonuçlarıyla uyumlu olup, hedef proteinin aktif bölgesinde iyi etkileşimler göstermiştir. Tüm bu bileşikler, kırmızı kan hücrelerinde hafif hemoliz sergilemiş; bu nedenle, bu biyohitrosiklik moleküllerin alkalen fosfataz ile ilişkili hastalıkların tedavisinde güvenli ve uygun terapötik ajanlar olarak kullanılabileceği öne sürülmektedir.

Shakila ve arkadaşları tarafından 2025 yılında yapılan bir çalışmada N-substitüted butanamid içeren indol-triazol hibritleri (9a-i) mükemmel verimlerle sentezlenmiş ve alkali fosfataz enzimi karşısında etkili inhibe edici aktiviteler göstermiştir. Özellikle, 9h bileşiği en yüksek aktiviteyi sergileyerek ( $IC_{50} = 0,062 \mu M$ ) potasyum dihidrojen fosfatla karşılaştırıldığında 10 kat daha etkili bulunmuştur. Bu moleküller, alkali fosfataz ile iyi bir bağlanma potansiyeline sahip olup, terapötik ajanlar geliştirmek için umut vaat etmektedir.

Zeb ve arkadaşlarının 2025 yılında yaptığı yeni bir çalışmaya göre N -(substituted phenyl)-(5-(3,4-dichlorobenzyl)-4-(4-chlorophenyl)-4H-1,2,4-triazol-3-ylthio)methylbenzamide 8(a-j) bileşenleri iyi verimlerle sentezlenmiş ve alkali fosfataz enzimi üzerindeki inhibitör aktiviteleri değerlendirilmiştir. Özellikle 8i bileşiği, yüksek inhibitör potansiyeli sergileyerek yarışmalı bir inhibisyon mekanizması göstermiştir. Bu moleküllerin, alkali fosfataz ile ilgili bozukluklar için potansiyel tıbbi terapötik ajanlar olabileceği sonucuna varılmıştır.

ALP enziminin en bilinen inhibitörü olan levamisol ile yapılan inhibisyon çalışmasında ise  $IC_{50}$  değeri 19,21  $\mu$ M olarak bulunmuştur (Alrokayan, Hussain, Alamery, 2023). Bu bilgiler ışığında çalışmada kullanılan pestisitlerin levimasole göre zayıf inhibitör etki gösterdiği görülmektedir.

Pestisitlerin ALP enzimi üzerine inhibitör etkisi, biyosensör geliştirme çalışmalarında kullanılmaktadır. 2016 yılında Lv ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada organofosforlu pestisitlerin ALP aktivitesini inhibe etmesini kullanarak biyosensör geliştirilmiştir. Bu çalışma, altın nanopartiküllerinin yüzeyinde gümüş nanopartiküllerinin birikimine dayanan, organofosforlu pestisitlerin (OPP'ler) kolorimetrik tespiti için bir yöntem geliştirmektedir. ALP, p-aminofenil fosfat (p-APP) substratını defosforile ederek Ag(I) iyonlarını Ag metaline indirger, bu da p-aminofenol (p-AP) birikimine ve renk değişimine yol açar. OPP'ler, ALP'nin defosforilasyon etkinliğini engelleyerek gümüş birikimini geciktirir veya tamamen bastırır, böylece renk değişimi daha az belirgin hale gelir. Yöntem, düşük tespit limitleriyle OPP'leri hassas bir şekilde tespit edebilir ve musluk suyu ve göl suyu örneklerinde başarıyla uygulanabilir.

2003 yılında Belledone tarafından yapılan bir çalışmada, ALP enziminin 1-naftil fosfatı floresan 1-naftol'e hidrolize etmesi, çeşitli inhibitörlerin varlığında incelenmiştir. İnhibitörlerin konsantrasyonu ile ters orantılı olan floresan sinyal, pestisitler ve ağır metaller gibi sınıf bileşenlerinin tespiti için kullanılabilir. Tetrametil ortosilikattan türetilen sol-jel matrislerine mikrokapsüle edilmiş ALP'nin yanıtı tekrarlanabilir bulunmuş ve tespit sınırları düşük seviyelerde belirlenmiştir. Karbamat pestisitleri ve tetradifon için doğrusal kalibrasyonlar elde edilerek, bu yöntemle pestisit ve inorganik bileşiklerin güvenilir bir şekilde tespit edilebileceği gösterilmiştir.

Pestisit kalıntılarını saptayabilecek bir biyosensör geliştirmek amacıyla pestisitlerin enzim aktivitesini inhibe etme mekanizmasını baz alarak ALP dışında farklı enzimlerin de kullanıldığı birçok çalışma mevcuttur. 2014 yılında Dutta ve Puzari tarafından yapılan çalışmada, organofosfat ve organokarbamat pestisitlerinin tespiti için düşük maliyetli ve yüksek hassasiyetli bir asetilkolinesteraz biosensörü geliştirmek amaçlanmıştır. Sensör, organofosfat pestisiti etilparoksin ve organokarbamat pestisiti karbofuranı tespit etmek için kullanılmıştır. Paroksinin tespit sınırı 1,1 ppb, karbofuranın tespit sınırı ise 0,12 ppb olarak belirlenmiştir. Depolama koşulları altında sensörün iyi stabilite gösterdiği ve kuru koşullarda 4 ay boyunca etkinliğinin %70'ini koruduğu tespit edilmiştir.

Başka bir çalışmada asetilkolinesteraz enziminin poröz indirgenmiş grafen oksit üzerine immobilize edilerek organofosfat pestisitlerinin tespiti için amperometrik bir biosensör geliştirmiştir. Biosensör, karbaril gibi pestisitlerin enzimatik aktiviteyi inhibe etme etkisini ölçerek, inhibisyon oranını konsantrasyonla ilişkilendirmiştir. Geliştirilen sensör, 0,5 ng mL<sup>-1</sup>'lik düşük bir tespit sınırına sahip olup, iyi performans ve stabilite sergileyerek enzim inhibitörlerinin analizinde kullanılabilir (Li, Bai, Han & Li, 2013).

ALP üzerinde yapılan bir çalışmada ise karbon nano-toz pastası elektrodu (CNPPE) üzerine immobilize edilmiş alkali fosfataz enzim aktivitesinin inhibisyonunu kullanarak karbofuran tespiti için dolaylı bir amperometrik biosensör tasarlanmıştır. Kalibrasyon eğrisi, 10 - 97 µg/l karbofuran aralığında doğrusal bir tepki sergilemiş ve tespit limiti 10 µg/l olarak belirlenmiştir. Kirletilmiş su ve chili örneklerinde yapılan analizler, referans spektrofotometrik yöntemle karşılaştırıldığında tatmin edici sonuçlar vermiştir ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Samphao, Suebsano, Wongs, Pekec, Jitchareon & Kalcher, 2013).

Literatürde Karbofuran dışında çalışmada kullanılan pestisitlerin ALP enzimi inhibitör etkisi üzerine bir çalışma bulunmamaktadır. Fakat pestisitlerin başka enzimler üzerine inhibisyon etkisi araştırılmıştır ve bulunan veriler aşağıda Tablo 4.1'de verilmiştir. Etion, Karboksine ve Diüron pestisitlerinin enzim aktivitesine etkileri ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır.

**Tablo 4.1:** Pestisitlerin enzim inhibitörü etkileri.

Pestisit İsmi	Enzim İsmi	IC <sub>50</sub> Değeri (µM)	Referans
Karbofuran	Aldoz Redüktaz	216	(Çomaklı, Adem & Güler, 2018)
Karbofuran	Karbonik Anhidraz	253,35	(Kirici, 2021)
Karbaril	Karbonik Anhidraz	126,43	(Kirici, 2021)
Amitraz	Glutasyon S – Transferaz	25770	Zandvakili, Memarizadeh, Ghadamyari, Alizadeh & Hasan Sajedi, 2019)
Prokloraz	5α – Redüktaz	12,40	Lo, King, Alléra & Klingmüller, 2007)
Linuron	5α – Redüktaz	86	Lo, King, Alléra & Klingmüller, 2007)
Amitraz	hCA – 1	7,40	Baltacı, Cıkrıkçı & Genç, 2023)
Dazomet	hCA – 1	8,45	Baltacı, Cıkrıkçı & Genç, 2023)
Koumatetralil	hCA – 1	6,55	Baltacı, Cıkrıkçı & Genç, 2023)
Karbofuran	hCA – 1	6,52	Baltacı, Cıkrıkçı & Genç, 2023)
Karbaril	hCA – 1	6,82	Baltacı, Cıkrıkçı & Genç, 2023)

Yüksek lisans tezi olarak sunulan bu çalışmada aşağıdaki bulgular elde edilmiştir:

1. Etion, Prokloraz, Amitraz, Karboksın, Diüron, Koumatetralil, Karbaril, Dazomet, Karbofuran ve Linuron pestisitlerinin Sığır Intestinal ALP enzim aktivitesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır.
2. Kullanılan pestisitlerin enzimi inhibe ettiği görülmüştür.
3. % Aktivite – [Pestisit] grafikleri çizilerek pestisitlerin IC<sub>50</sub> değerleri belirlenmiştir.
4. Elde edilen değerlere göre çalışılan pestisitler arasında proklorazın ALP enzim aktivitesi üzerinde en yüksek inhibitör etkiye sahip olduğu bulunmuştur.
5. Çalışılan pestisitler arasında amitrazın ALP enzim aktivitesi üzerinde en düşük inhibitör aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur.

## 5. KAYNAKLAR

- Alrokayan, S., Hussain, T., Alamery, S., et al. (2023). [1, 8]-Naphthyridine derivatives as dual inhibitors of alkaline phosphatase and carbonic anhydrase. *BMC Chemistry*, 17, 142. <https://doi.org/10.1186/s13065-023-01052-8>
- Aschaffenburg, R., & Mullen, J. E. C. (1949). A rapid and simple phosphatase test for milk. *Journal of Dairy Research*, 16, 58–67.
- Balabanova, L., Bondarev, G., Seitkalieva, A., Son, O., & Tekutyeva, L. (2024). Insights into Alkaline Phosphatase Anti-Inflammatory Mechanisms. *Biomedicines*, 12(11), 2502. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12112502>
- Baltacı, A., Cıkrıkçı, K., & Gençer, N. (2023). Investigation of the effects of some pesticides on carbonic anhydrase isoenzymes. *Journal of Molecular Recognition*, 36(9), e3048.
- Belledone, C., Sanchez, F., Díaz, A., & Peinado, M. (2003). Free and sol–gel immobilized alkaline phosphatase-based biosensor for the determination of pesticides and inorganic compounds. *Analytica Chimica Acta*, 484(1), 45–51. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(03\)00310-6](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(03)00310-6)
- Besman, M., & Coleman, J. E. (1985). Isozymes of bovine intestinal alkaline phosphatase. *The Journal of biological chemistry*, 260(20), 11190–11193.
- Brichacek, A. L., & Brown, C. M. (2018). Alkaline phosphatase: A potential biomarker for stroke and implications for treatment. *Metabolic Brain Disease*. <https://doi.org/10.1007/s11011-018-0322-3>
- Butt, A. R. S., Abbasi, M. A., Aziz-Ur-Rehman, Siddiqui, S. Z., Muhammad, S., Raza, H., Shah, S. A. A., Shahid, M., Alsehem, A. G., & Kim, S. J. (2023). Convergent synthesis, kinetics insight and allosteric computational ascriptions of thiazole-(5-aryl)oxadiazole hybrids embraced with propanamides as alkaline phosphatase inhibitors. *RSC advances*, 13(20), 13798–13808. <https://doi.org/10.1039/d3ra01348k>
- Campos, B. B., Contreras-Cáceres, R., Bandosz, T. J., Jiménez-Jiménez, J., Rodríguez-Castellón, E., Esteves da Silva, J. C. G., & Algarra, M. (2017). Carbon dots coated with vitamin B12 as selective ratiometric nanosensor for phenolic carbofuran. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 239, 553-561. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.08.055>
- Champion, E. E., Glazier, J. D., Greenwood, S. L., Mann, S. J., Rawlings, J. M., Sibley, C. P., & Jones, C. J. P. (2003). Localization of alkaline phosphatase and Ca<sup>2+</sup>-ATPase in the cat placenta. *Placenta*, 24(5), 453–461. <https://doi.org/10.1053/plac.2002.0952>

- Chen, G. (2014). Linuron. In P. Wexler (Ed.), *Encyclopedia of Toxicology* (3rd ed., pp. 83-84). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00155-X>
- Chen, R., Jiang, W., Xu, S., Fan, H., Chen, X., Shen, X., ... & Mao, Z. (2022). An emerging chemical fumigant: two-sided effects of dazomet on soil microbial environment and plant response. *Environmental Science and Pollution Research*, 29, 3022-3036.
- Çomaklı, V., Adem, Ş., & Güler, Ç. (2018). Toxic Effect of Pesticides on Aldose Reductase Enzyme. *Eastern Anatolian Journal of Science*, 4(2), 1-5.
- Del Pino, J., Moyano-Cires, P. V., Anadon, M. J., Díaz, M. J., Lobo, M., Capo, M. A., & Frejo, M. T. (2015). Molecular mechanisms of amitraz mammalian toxicity: a comprehensive review of existing data. *Chemical research in toxicology*, 28(6), 1073-1094.
- Dutta, R. R., & Puzari, P. (2014). Amperometric biosensing of organophosphate and organocarbamate pesticides utilizing polypyrrole entrapped acetylcholinesterase electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 52, 166–172. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.08.050>
- Escobar, J., Dobbs, M., Ellenberger, C., Parker, A., Latorre, J. D., & Gabor, L. (2022). Oral supplementation of alkaline phosphatase in poultry and swine. *Translational Animal Science*, 6(3), txac079. <https://doi.org/10.1093/tas/txac079>
- European Commission. (2016). EU Pesticides Database. Erişim tarihi: 16 Kasım 2019. <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=homepage&language=EN>
- Fadıloğlu, S., Erkmen, O., & Şekeroğlu, G. (2004). Thermal and carbon dioxide inactivation of alkaline phosphatase in buffer and milk. *Food Technology and Biotechnology*, 42(1), 27–32.
- Fiechter, D., Kats, S., Brands, R., van Middelaar, B., Pasterkamp, G., de Kleijn, D., & Seinen, W. (2011). Bovine Intestinal Alkaline Phosphatase Reduces Inflammation After Induction of Acute Myocardial Infarction in Mice. *Cardiology research*, 2(5), 236–242. <https://doi.org/10.4021/cr81w>
- Giorgini, M., Taroncher, M., Ruiz, M. -J., Rodríguez-Carrasco, Y., & Tolosa, J. (2023). In Vitro and Predictive Computational Toxicology Methods for the Neurotoxic Pesticide Amitraz and Its Metabolites. *Brain Sciences*, 13(2), 252. <https://doi.org/10.3390/brainsci13020252>

- Kalyabina, V. P., Esimbekova, E. N., Kopylova, K. V., & Kratasyuk, V. A. (2021). Pesticides: Formulants, distribution pathways and effects on human health – A review. *Toxicology Reports*, 8, 1179-1192. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2021.06.004>
- Kempuraj, D., Zhang, E., Gupta, S., Gupta, R. C., Sinha, N. R., & Mohan, R. R. (2023). Carbofuran pesticide toxicity to the eye. *Experimental eye research*, 227, 109355.
- Kirici, M. (2021). Toxicological effects of metal ions and some pesticides on carbonic anhydrase activity purified from bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) gill tissue. *Carpathian Journal of Earth and Environmental Sciences*, 16, 59-65. <https://doi.org/10.26471/cjees/2021/016/155>
- Koshlukova, S. E., & Reed, N. R. (2014). Carbaryl. In P. Wexler (Ed.), *Encyclopedia of Toxicology* (3rd ed., pp. 668-672). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00107-X>
- Latner AL, Parsons M, Skillen AW. (1970). Isoelectric focusing of alkaline phosphatases from human kidney and calf intestine. *Enzymologia*. 40(1):1-7.
- Li, S., Geng, Y., Bao, C., Mei, Q., Shi, T., Ma, X., Hua, R., & Fang, L. (2024). Complete biodegradation of fungicide carboxin and its metabolite aniline by *Delftia* sp. HFL-1. *Science of The Total Environment*, 912, 168957. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.168957>
- Li, Y., Bai, Y., Han, G., & Li, M. (2013). Porous-reduced graphene oxide for fabricating an amperometric acetylcholinesterase biosensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 185, 706–712. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.05.061>
- Lo, S., King, I., Alléra, A., & Klingmüller, D. (2007). Effects of various pesticides on human 5 $\alpha$ -reductase activity in prostate and LNCaP cells. *Toxicology in Vitro*, 21(3), 502–508. doi:10.1016/j.tiv.2006.10.016
- Lundqvist, J., Hellman, B., & Oskarsson, A. (2016). Fungicide prochloraz induces oxidative stress and DNA damage in vitro. *Food and Chemical Toxicology*, 91, 36–41. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.03.002>
- Lv, B., Wei, M., Liu, Y., Liu, X., Wei, W., & Liu, S. (2016). Ultrasensitive photometric and visual determination of organophosphorus pesticides based on the inhibition of enzyme-triggered formation of core-shell gold-silver nanoparticles. *Microchimica Acta*, 183(11), 2941–2948. <https://doi.org/10.1007/s00604-016-1939-8>
- Major, L., Petes, S., Szabó, F., Buda, I., Saidon, N. B., & Lehel, J. (2024). Dose-Dependent Embryotoxicity and Teratogenicity Study of Prochloraz on Chicken Embryos. *GEORGIKON FOR AGRICULTURE*, 28(Suppl. 1), 53-58.

- Makris, K., Mousa, C., & Cavalier, E. (2023). Alkaline phosphatases: Biochemistry, functions, and measurement. *Calcified Tissue International*, 112(2), 233-242. <https://doi.org/10.1007/s00223-022-01048-x>
- Martins, R. D. S., Kooi, E. M. W., Poelstra, K., & Hulscher, J. B. F. (2023). The role of intestinal alkaline phosphatase in the development of necrotizing enterocolitis. *Early Human Development*, 183, 105797. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2023.105797>
- McComb, R. B., Bowers, G. N., & Posen, S. (1979). *Alkaline phosphatase*. New York: Plenum Publishing Corp.
- Millán, J. L. (2006). Alkaline phosphatases: Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes. *Purinergic Signalling*, 2, 335. <https://doi.org/10.1007/S11302-005-5435-6>
- Murphy, M. J. (2018). Anticoagulant Rodenticides. *Veterinary Toxicology*, 583–612. [doi:10.1016/b978-0-12-811410-0.00046-5](https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811410-0.00046-5)
- Neumann, H., & Lustig, A. (1980). The activation of alkaline phosphatase by effector molecules. A combined kinetic and hydrodynamic study. *European journal of biochemistry*, 109(2), 475–480. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1980.tb04818.x>
- O'Malley, M. (2010). Chapter 28 - The regulatory evaluation of the skin effects of pesticides. In R. Krieger (Ed.), *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology* (3rd ed., pp. 701-787). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374367-1.00028-8>
- Parra-Arroyo, L., González-González, R. B., Castillo-Zacarías, C., Melchor Martínez, E. M., Sosa-Hernández, J. E., Bilal, M., Iqbal, H. M. N., Barceló, D., & Parra-Saldívar, R. (2022). Highly hazardous pesticides and related pollutants: Toxicological, regulatory, and analytical aspects. *Science of The Total Environment*, 807(Part 3), 151879. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151879>
- Patadiya, N., et al. (2021). A review on enzyme inhibitors. *International Research Journal of Pharmacy*, 12(6), 60-66. <http://dx.doi.org/10.7897/2230-8407.1206145>
- Rani, K., Datt, S., & Rana, R. (2012). Brief review on alkaline phosphatases-an overview. *International Journal of Microbiology and Bioinformatics*, 2(1), 1-4.
- Rani, L., Thapa, K., Kanojia, N., Sharma, N., Singh, S., Grewal, A. S., Srivastav, A. L., & Kaushal, J. (2021). An extensive review on the consequences of chemical pesticides on human health and environment. *Journal of Cleaner Production*, 283, 124657. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124657>

- Rankin, S. A., Christiansen, A., Lee, W., Banavara, D. S., & Lopez-Hernandez, A. (2010). Invited review: The application of alkaline phosphatase assays for the validation of milk product pasteurization. *Journal of Dairy Science*, 93(12), 5538–5551. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3400>
- Reid, T., & Wilson, I. (1971). *E. coli* alkaline phosphatase. In P. Boyer (Ed.), *The enzyme* (3rd ed., Vol. 4, p. 373). Academic Press.
- Robison R. (1923). The Possible Significance of Hexosephosphoric Esters in Ossification. *The Biochemical journal*, 17(2), 286–293. <https://doi.org/10.1042/bj0170286>
- Sales, B.C.P., Pereira, L.C., Quintaneiro, C., et al. (2024). Effects of diuron and two of its metabolites in biochemical markers and behavior of zebrafish larvae. *Environmental Science and Pollution Research*, 31, 62840–62852. <https://doi.org/10.1007/s11356-024-35291-6>
- Samphao, A., Suebsanoh, P., Wongsa, Y., Pekec, B., Jitchareon, J., & Kalcher, K. (2013). Alkaline phosphatase inhibition-based amperometric biosensor for the detection of carbofuran. *International Journal of Electrochemical Science*, 8(3), 3254–3264. [https://doi.org/10.1016/S1452-3981\(23\)14387-2](https://doi.org/10.1016/S1452-3981(23)14387-2)
- Sanchez, E. M., Walteros, D. M., Estrada, J. M., Bustos Álvarez, D. Y., & Gomez, J. L. (2024). Ethion food poisoning outbreak in Pereira, Colombia, 2022. *Clinical Toxicology*, 62(9), 564–568. <https://doi.org/10.1080/15563650.2024.2388756>
- Shaban, S. M., Jo, B., Hafez, E., Cho, H., & Kim, D. H. (2022). A comprehensive overview on alkaline phosphatase targeting and reporting assays. *Coordination Chemistry Reviews*, 465, 214567. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2022.214567>
- Shakila, Abbasi, M. A., Rehman, A.-u., Siddiqui, S. Z., Nazir, M., Raza, H., Shah, S. A. A., Ayine-Tora, D. M., Shahid, M., & Kim, S. J. (2025). Convergent synthesis, kinetics, and computational attributions of indole-N-phenyltriazole hybrids bearing N-(aryl)butanamides as alkaline phosphatase inhibitors. *Journal of Molecular Structure*, 1320, 139649. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2024.139649>
- Shrivastava, M., Srivastava, P. C., & D'souza, S. F. (2018). Phosphate-solubilizing microbes: diversity and phosphates solubilization mechanism. *Role of Rhizospheric Microbes in Soil: Volume 2: Nutrient Management and Crop Improvement*, 137-165.
- Sooksawata, N., Adsatrooc, S., Bunmanatc, S., Chittwanijc, A., Vangnaid, A., Kongtipf, P., ... & Inthornh, D. (2024). Phytoremediation potential of sunn hemp for carbaryl-contaminated soil. *ScienceAsia*, 50(5), 2024089.

- Stec, B., Holtz, K. M., & Kantrowitz, E. R. (2000). A revised mechanism for the alkaline phosphatase reaction involving three metal ions. *Journal of Molecular Biology*, 299(5), 1303–1311. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3799>
- Szewczuk-Karpisz, K., Tomczyk, A., Celińska, M., Sokołowska, Z., & Kuśmierz, M. (2021). Carboxin and Diuron Adsorption Mechanism on Sunflower Husks Biochar and Goethite in the Single/Mixed Pesticide Solutions. *Materials*, 14(10), 2584. <https://doi.org/10.3390/ma14102584>
- Tang, Z., Chen, H., He, H., & Ma, C. (2019). Assays for alkaline phosphatase activity: Progress and prospects. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 113, 32–43. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.01.019>
- Varadi, M., et al. (2024). AlphaFold protein structure database in 2024: Providing structure coverage for over 214 million protein sequences. *Nucleic Acids Research*, 52(D1), D368–D375. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad1011>
- Zaher, D. M., El-Gamal, M. I., Omar, H. A., Aljareh, S. N., Al-Shamma, S. A., Ali, A. J., ... Iqbal, J. (2020). Recent advances with alkaline phosphatase isoenzymes and their inhibitors. *Archiv der Pharmazie*. <https://doi.org/10.1002/ardp.202000011>
- Zandvakili, S. , Memarizadeh, N. , Ghadamyari, M. , Alizadeh, A. , & Hasan Sajedi, R. (2019). Purification and biochemical characterization of glutathione S-transferase from common pistachio psyllid, *Agonoscena pistaciae* Burckhardt and Lauterer (Hemiptera: Psyllidae). *Journal of Entomological Society of Iran*, 38(4), 409-421. doi: 10.22117/jesi.2019.124035.1277
- Zeb, A., Siddiqui, S. Z., Abbasi, M. A., Rehman, A.-u., Shah, S. A. A., Imran, S., Raza, H., Kim, S. J., Parveen, R., & Abbas, G. (2025). Synthesis, enzyme inhibitory kinetics, & computational studies of N-(substituted phenyl)-(5-(3,4-dichlorobenzyl)-4-(4-chlorophenyl)-4H-1,2,4-triazol-3-ylthio)methylbenzamides: As potent alkaline phosphatase inhibitors. *Journal of Molecular Structure*, 1321(Part 4), 139960. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2024.139960>
- Zhou, Y., Chen, C., Bai, L., Jia, L., Lu, B., Gu, G., & Cui, W. (2023). Positive association between alkaline phosphatase and arteriosclerosis: A cross-sectional study. *Journal of Cardiovascular Medicine*, 24(10), 721–728. <https://doi.org/10.2459/JCM.0000000000001550>