

**T.C.
ADYAMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KATALAZ AKTİVİTESİ ÜZERİNE CYPRODİNİL VE FLUDİOXONİL
PESTİSİTLERİN ETKİSİ**

FADİL ÖZHAN

KİMYA ANABİLİM DALI

2014

**T.C.
ADİYAMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KATALAZ AKTİVİTESİ ÜZERİNE CYPRODİNİL VE FLUDİOXONİL
PESTİSİTLERİN ETKİSİ**

Fadil ÖZHAN

Yüksek Lisans Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Bu tez 27/03/2014 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

**Yrd. Doç. Dr. Hasan KARADAĞ
BAŞKAN (DANIŞMAN)**

**Doç. Dr. Özgür FIRAT
ÜYE**

**Yrd. Doç. Dr. Ahmet ÖZKAYA
ÜYE**

**Doç. Dr. Mustafa ÖZDEN
Enstitü Müdürü**

Bu çalışma Adıyaman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No:FEFYL/2012-0013

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirimlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KATALAZ AKTİVİTESİ ÜZERİNE CYPRODİNİL VE FLUDİOXONİL PESTİSİTLERİN ETKİSİ

Fadil ÖZHAN

Adıyaman Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Hasan KARADAĞ
Yıl: 2014, Sayfa Sayısı: 47
Jüri : Yrd. Doç. Dr. Hasan KARADAĞ
: Doç. Dr. Özgür FIRAT
: Yrd. Doç. Dr. Ahmet ÖZKAYA

Katalaz (CAT), antioksidan bir enzimdir. CAT, hidrojen peroksidin su ve oksijene parçalanmasını katalizler. Bu çalışmada, CAT'ın optimum sıcaklığı, 35 °C (308 K) olarak belirlenmiştir. 0 ppm'den 500 ppm'e artan cyprodinil ve fludioxonil pestisit derişimi ile CAT aktivitesi inhibisyona uğramıştır. 250 ppm ve 500 ppm pestisit derişiminde CAT aktivitesi değişmemiş ve durağan hale geçmiştir. Cyprodinil'in 10, 50, 100, 250 ve 500 ppm etkisinde CAT enzim aktivitesindeki yüzde azalışların sırasıyla 45,4; 68,0; 73,0; 77,8 ve 77,4 olduğu hesaplanmıştır. Fludioxonil'in 10, 50, 100, 250 ve 500 ppm etkisinde CAT enzim aktivitesindeki yüzde azalışların sırasıyla 20,0; 30,8; 42,8; 46,3 ve 45,9 olduğu hesaplanmıştır. Cyprodinil'in CAT'ı yarışmalı (kompetitif) olarak inhibe ettiği, fludioxonil'in CAT'ı yarışmasız (non-kompetitif) olarak inhibe ettiği bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Cyprodinil, Fludioxonil, İnhibisyon, Pestisit ve Katalaz.

ABSTRACT

Master Thesis

EFFECT OF CYPRODINIL AND FLUDIOXONIL PESTICIDES ON CATALASE ACTIVITY

Fadil ÖZHAN

Adiyaman University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor : Asst. Prof. Dr. Hasan KARADAĞ
Year: 2014, Number of Pages: 47
Jury : Asst. Prof. Dr. Hasan KARADAĞ
: Assoc. Prof. Dr. Özgür FIRAT
: Asst. Prof. Dr. Ahmet ÖZKAYA

Catalase (CAT) is antioxidant enzyme. CAT catalyzes the decomposition of hydrogen peroxide to water and oxygen. In this study, optimum temperature of CAT was determined as 35 °C (308 K). From 0 ppm to 500 ppm with increasing cyprodinil and fludioxonil pesticides concentrations, CAT activity were inhibited. At 250 ppm and 500 ppm pesticides concentrations, CAT activity remained unchanged and passed to steady state. Under the exposure of 10, 50, 100, 250 and 500 ppm cyprodinil concentrations, percent of CAT enzyme activity decreases were calculated as 45.4; 68.0; 73.0; 77.8 and 77.4, respectively. Under the exposure of 10, 50, 100, 250 and 500 ppm fludioxonil concentrations, percent of CAT enzyme activity decreases were calculated as 20.0; 30.8; 42.8; 46.3 and 45.9, respectively. Cyprodinil inhibited CAT competitively and fludioxonil inhibited CAT non-competitively.

KeyWords: Cyprodinil, Fludioxonil, Inhibition, Pesticide and Catalase.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmam süresince tıkanığım her anda her şeyi sorabildiğim, bu sorularım karşısında bıkmadan yardım eden ve kıymetli bilgilerini hiçbir zaman benden esirgemeyen değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Hasan KARADAĞ' a,

Yazım aşamasında benden vaktini, bilgilerini esirgemeyen Kimya Bölümü Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Ahmet ÖZKAYA'ya, Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Özgür FIRAT'a ve Kimya Bölümü Öğretim Üyelerine teşekkür ederim.

Tezimin deney aşamasında ilk göz ağrım olan oğlum Başar' a sabırla bakıp benim kahrımı çeken ve hep destek olan eşim Leman LEVENTOĞLU ÖZHAN'a,

Çalışmam boyunca benden manevi desteklerini esirgemeyen Tıp Fakültesi Dekanı Prof. Dr. Mustafa YILMAZ'a, Dekan Yardımcısı Prof. Dr. Haydar BAĞIŞ'a ve diğer çalışma arkadaşlarıma,

Adıyaman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Biriminin FEFYL/2012-0013 sayılı proje olarak tezime sağlamış oldukları destekten dolayı Adıyaman Üniversitesi Rektörlüğü'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Enzimler	2
1.1.1. Enzimlerin genel özellikleri ve yapıları	2
1.1.2. Katalizörlerin aktivasyon enerjisi üzerine etkisi	3
1.1.3. Enzimlerin sınıflandırılması ve isimlendirilmesi	4
1.1.4. Enzim aktivitesinin etkileyen etmenler	5
1.1.5. Enzim kinetiği	7
1.1.6. Enzim aktivitelerinin karşılaştırılması için kinetik parametrelerin kullanımı	8
1.1.7. Çoğu enzim iki veya daha fazla substratlı reaksiyonları katalizler	9
1.1.8. Enzim inhibisyonu.....	10
1.2. Antioksidanlar	14
1.3. Katalaz	14
1.4. Pestisitler ve Özellikleri	16
1.5. Cyprodinil ve Fludioxonil Pestisitleri	17
1.6. Çalışmanın Amacı	20
2. MATERYAL ve YÖNTEM.....	21
2.1. Materyal	21
2.1.1. Kimyasallar	21
2.1.2. Kullanılan cihazlar	21
2.2. Yöntem	21
2.2.1. Stok çözeltiler ve tamponlar.....	21
2.2.2. Pestisit etkisi.....	22

2.2.3. Optimum sıcaklık	22
2.2.4. Optimum pH.....	22
2.2.5. CAT aktivitesinin ölçülmesi.....	22
2.2.6. Protein tayini	23
2.2.7. İstatistik	25
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	26
3.1. Bulgular.....	26
3.1.1. CAT'ın karakterizasyonu ile ilgili bulgular	26
3.1.1.1. Optimum sıcaklık.....	26
3.1.2. Cyprodinil ve fludioxinil'in CAT ile etkileştirilmesi.....	27
3.1.2.1. Cyprodinil ile CAT'ın etkileştirilmesi.....	27
3.1.2.2. Cyprodinil'in inhibisyon türü	28
3.1.2.3. Fludioxinil ile CAT'ın etkileştirilmesi	30
3.1.2.4. Fludioxinil'in inhibisyon türü.....	31
3.1.2.5. Cyprodinil ve fludioxinil'in CAT aktivitesi üzerine etkisinin karşılaştırılması.....	33
3.2. Tartışma.....	34
4. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	40
4.1. Sonuçlar.....	40
4.2. Öneriler.....	40
KAYNAKLAR	41
ÖZGEÇMİŞ	47

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 1.1. Enzimlerin altı sınıfı ve katalize ettikleri reaksiyon tipleri.....	4
Çizelge 1.2. Cyprodinilin özellikleri.....	19
Çizelge 1.3. Fludioxonilin özellikleri.....	20
Çizelge 3.1. CAT'ın farklı sıcaklıklarda ölçülen aktivite değerleri.	26
Çizelge 3.2. Farklı cyprodinil derişimlerinin CAT aktivitesi üzerine etkisi.	27
Çizelge 3.3. CAT için farklı cyprodinil ve substrat derişimlerinde ölçülen aktivite değerleri.....	28
Çizelge 3.4. Farklı fludioxonil derişimlerinin CAT aktivitesi üzerine etkisi.....	30
Çizelge 3.5. CAT için farklı fludioxonil ve substrat derişimlerinde ölçülen aktivite değerleri.....	32
Çizelge 3.6. Cyprodinil ve fludioxonilin CAT aktivitesi üzerine % etkisi.	34

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 1.1. Enzim-Substrat, Enzim-Koenzim-Substrat bağlanması.....	3
Şekil 1.2. pH'nın reaksiyon hızına etkisi.	5
Şekil 1.3. Sıcaklığın reaksiyon hızına etkisi.	5
Şekil 1.4. Enzim konsantrasyonunun reaksiyon hızına etkisi.	6
Şekil 1.5. Substrat konsantrasyonunun reaksiyon hızına etkisi.	6
Şekil 1.6. Michaelis-Menten grafiği.	7
Şekil 1.7. Linewear-Burk grafiği.	8
Şekil 1.8. Kompetitif inhibitörlü tepkimede Michaelis-Menten ve Linewear-Burk grafiği.	11
Şekil 1.9. Yarışmasız inhibitörlü tepkimede Michaelis-Menten ve Linewear-Burk grafiği.	12
Şekil 1.10. Karışık inhibitörlü tepkimede Michaelis-Menten ve Linewear-Burk grafiği.	13
Şekil 1.11. CAT'ın etki mekanizması.	15
Şekil 1.12. Ferriprotoporfirin IX yapısı.	15
Şekil 1.13. CAT enziminin hem b ve hem d yapısı.	16
Şekil 1.14. Cyprodinilin kimyasal yapısı.	18
Şekil 1.15. Fludioxonilin kimyasal yapısı.	20
Şekil 2.1. Standart protein grafiği.	24
Şekil 3.1. CAT enzimi için aktivite-sıcaklık grafiği.	26
Şekil 3.2. Cyprodinil ile etkileştirilen CAT'ın aktivite grafiği.	27
Şekil 3.3. Cyprodinil ile etkileştirilen CAT'ın Lineweaver-Burk grafiği.	29
Şekil 3.4. Fludioxonil ile etkileştirilen CAT'ın aktivite grafiği.	31
Şekil 3.5. Fludioxonil ile etkileştirilen CAT'ın Lineweaver-Burk grafiği.	32
Şekil 3.6. Cyprodinil ve fludioxonilin CAT aktivitesi üzerine etkisinin karşılaştırılması grafiği.	34

SİMGELER VE KISALTMALAR

CAT	: Katalaz
DNA	: Deoksiribonükleik asit
GPx	: Glutasyon peroksidaz
GR	: Glutasyon Redüktaz
GSH	: Glutasyon
GST	: Glutasyon-S-Transferaz
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
IUB	: Uluslararası biyokimya birliği
K _i	: İnhibisyon sabiti
K _m	: Michealis-Menten hız sabiti
LPO	: Fosalonun lipid peroksidasyonu
MDA	: Malondialdehit
SOD	: Süperoksit dizmutaz
V ₀	: İlk Hız
V _{max}	: Doygun substrat konsantrasyonunda enzimin ulaşabileceği maksimum hız
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

Enzim araştırmaları biyokimya tarihini oluşturmaktadır. 1700'lü yılların sonunda mide salgılarının etin sindirimi üzerine etkileri araştırıldı ve biyolojik katalizörler olarak tanımlandı. 1800'lerde çeşitli bitki özütleri ve tükürük ile nişastanın şekere dönüşümü araştırılarak çalışmaların devamı getirildi. Louis Pasteur 1850'lerde yaptığı çalışmalar ile şekerin maya ile fermentlenmesinin fermentler tarafından gerçeleştirildiğini öne sürdü. 1897'de Eduard Buchner maya fermentlenmesini yani fermentasyonu hücrelerden uzaklaştırıldıkları halde işlevlerine devam eden bazı moleküller tarafından sağlandığını buldu. Frederic W. Kühne bu moleküllere enzim adını verdi (Nelson ve Cox 2005).

Tanımlaması yapılmış olan 2000 kadar enzimin çoğu saflaştırılarak kinetikleri incelenmiş ve 200'den fazlası kristal hale getirilmiştir (Keha ve Küfrevioğlu 2000). Enzimlerin bir kısmı vücuttaki antioksidan savunma sistemini oluştururlar ve vücutta oluşan serbest radikallerin olumsuz etkilerini ortadan kaldırırlar. Örneğin katalaz (CAT) enzimi serbest radikal kaynağı olan hidrojen peroksiti su ve oksijene parçalayarak etkisiz hale getirir (Akkuş 1995).

Serbest radikallerin yanı sıra tarımda kullanılan pestisitlerin olumsuz etkileri de mevcuttur. Pestisitlerin yaygın olarak kullanılmaya başlanılmasından sonra özellikle organoklorürlü pestisitler yasaklanmıştır. Organofosforlu ve karbamatlı pestisitlerin doğada daha kolay parçalanabilmesi üretimini ve kullanımını da hızla arttırmıştır (Richard ve vd. 2007). Kullanılan pestisitlerin çoğunluğunun bir miktar toksik etkisi olması nedeniyle sağlık açısından güvenli pestisit bulunmamaktadır. Risklerinin azaltılabilmesi için belirli koşullarda kullanılmaladırlar. Pestisitler, bıraktıkları kalıntılarla besin değerlerini düşürmekte, toprak, su ve hava ve kirlenmesine sebep olarak, doğadaki ekolojik sistemin dengesini olumsuz yönde etkilemektedirler (Vural 2005).

Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızda yeni pestisit türleri olan cyprodinil ve fludioxonil'in CAT enzim aktivitesi üzerinde gösterdikleri etki araştırılmıştır.

1.1. Enzimler

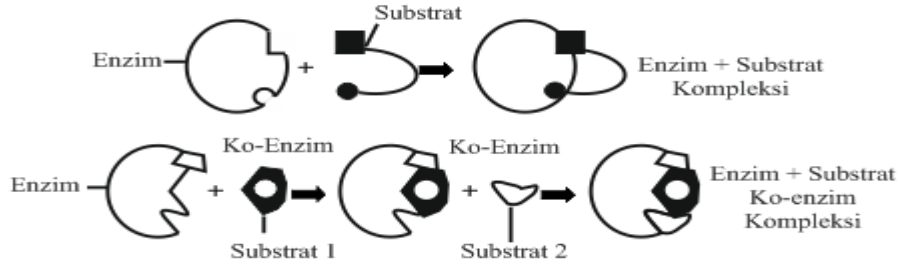
Enzimler, canlılarda meydana gelen biyokimyasal reaksiyonları hızlandıran, %100'lük ürün oluşması ile yan ürün oluşmasına fırsat vermeyen biyolojik katalizörlerdir. En çok özelleşmiş ve en büyük protein gruplarını oluştururlar. Hücrelerde meydana gelen tüm olaylar deoksiribo nükleik asit (DNA) tarafından düzenlenip kontrol edilir. Enzimlerde protein yapısında oldukları ve DNA tarafından şifrelediklerinden enzimler bir hücreye ait spesifik bilgilerin DNA'dan aktarılmasını sağlayan en önemli moleküllerdir (Keha ve Küfrevioğlu 2000).

1.1.1. Enzimlerin genel özellikleri ve yapıları

Enzimler protein yapısında olmalarına rağmen yalnız olarak aktivite gösteremezler. Bu nedenle kofaktör ve koenzimlere ihtiyaç duyarlar. Kofaktörler yan gruplar olup, metal iyonlarından (Cu^{+2} , Fe^{+3} , Zn^{+2} , Mg^{+2}) oluşurlar, protein yapısında değildirler, enzimlerin aktif merkezinde bulunurlar ve katalitik anlamda katkı sağlarlar (Aksoy 2008). Enzimler protein yapısında olduklarından ısıyla kolayca denatüre olabilirken, kofaktörler protein yapısında olmadıklarından ısıya dayanıklıdır (Keha ve Küfrevioğlu 2000).

Koenzimler, enzimlerin aktivite göstermelerini sağlayan ve enzimlerin spesifitesini belirleyen organik moleküllerdir. Bu moleküller çoğunlukla vitaminlerdir (Aksoy 2008).

Enzim koenzimi, kofaktörü ile birlikte ve biyokimyasal reaksiyonları kataliz edebilecek aktifliğe sahip halde ise enzimin bu durumuna haloenzim denir. Enzimin koenzimsiz ve kofaktörsüz haline yani inaktif olarak bulunduğu duruma apoenzim denir (Gözükara 2011). Kofaktörsüz protein kısmına apoprotein (Keha ve Küfrevioğlu 2000), enzimin yüzeyine kovalent olarak sıkıca bağlı protein olmayan gruplara ise prostetik grup denir (Gözükara 2011).

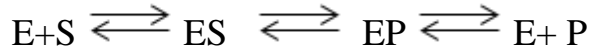


Şekil 1.1. Enzim-Substrat, Enzim-Koenzim-Substrat bağlanması (Aksoy 2008)

Enzimler substratları için yüksek spesifiteye sahiptir, kimyasal tepkimeleri oldukça hızlandırır, optimum pH ve optimum sıcaklık koşullarında oldukça aktiftirler, çoğu protein yapısındadır, protein konformasyonlarının sağlamlığı katalitik aktivitelerinde belirleyici unsurdur (Nelson ve Cox 2005).

1.1.2. Katalizörlerin aktivasyon enerjisi üzerine etkileri

Katalizörler biyokimyasal reaksiyonların dengesini değil hızını etkilerler.



E: Enzim, **S:** Substrat, **P:** Ürün, **ES:** Enzim-Substrat Kompleksi, **EP:** Enzim-Ürün Kompleksi (Nelson ve Cox 2005).

[S]'nin [P]'ye dönüştürülmesi için gerekli bağ oluşumları veya parçalanmalarının gerçekleşmesi ve bunun içinde bir enerji engelinin aşılması gereklidir. Aşılması gereken bu enerji engeline aktifleşme enerjisi denir (Keha ve Küfrevioğlu 2000).

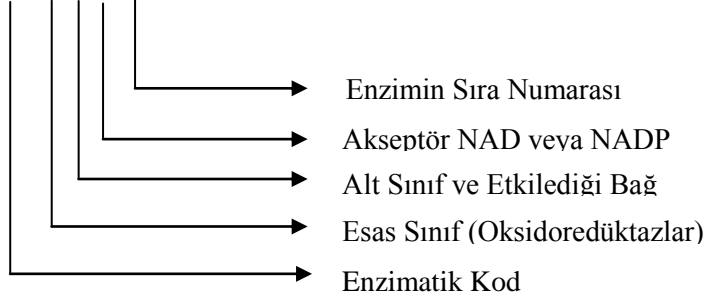
Enzimler biyokimyasal reaksiyonları vücut ısısında gerçekleştirmek için reaksiyonların aktivasyon enerjisini dokuz kat ya da daha fazla düşürerek reaksiyonları hızlandırır (Gözükara 2011).

1.1.3. Enzimlerin sınıflandırılması ve isimlendirilmesi

Enzimler katalizledikleri reaksiyon tipine veya spesifik oldukları substrata göre adlandırılmaktadır. Örneğin üreaz, orjinaz ve CAT gibi. Sayılarının günden güne artması yeni enzimlerin keşfedilmesi bu şekildeki adlandırmanın önemin kaybetmesine sebep olmuş ve Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB) tarafından bazı kurallara bağlı kalınarak 6 haneli bir adlandırma sistemi yapılmıştır.

Bu sistemi aşağıdaki örnek üzerinde açıklayalım;

E.C.1.1.1.49



Bu yeni adlandırma sistemine göre enzimler 6 ana sınıfa ayrılırlar (Gözükara 2011).

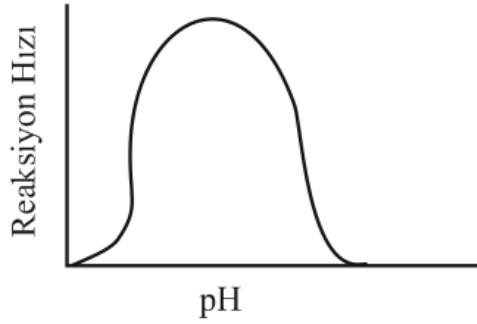
Çizelge 1.1. Enzimlerin altı sınıfı ve katalize ettikleri reaksiyon tipleri (Gözükara 2011).

Sınıf	İsim	Katalize Ettiği Reaksiyon Tipi
1	Oksidoredüktazlar	Oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları
2	Transferazlar	Fonksiyonel bir grubu bir donörden bir akseptöre transfer eden enzimlerdir
3	Hidrolazlar	Çeşitli bağları hidroliz eder örneğin C-O, C-N, C-C
4	Liyazlar	Substrattan C-O, C-N, C-C arasındaki bağları oksidasyon ve hidroliz yolu dışındaki bir yolla kırarak atomlar arasına çift bağ ekler
5	İzomerazlar	İzomerizasyon reaksiyonlarını yani bir molekül içindeki yapısal ve geometrik değişiklikleri katalize eder.
6	Ligazlar	C-O, C-N, C-C ve C-S arasında bağ oluşmasını sağlar yani ATP veya diğer nükleosidtri fosfatın yıkımı ile birlikte yeni bir bağın sentezi

1.1.4. Enzim aktivitesini etkileyen etmenler

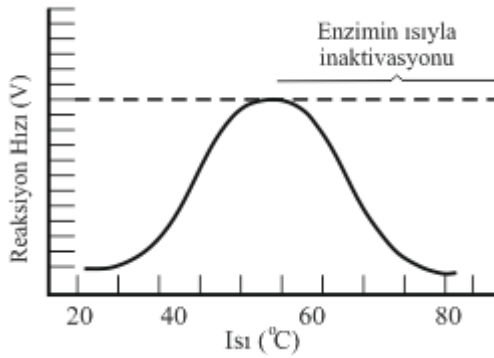
Enzimler tarafından katalizlenen biyokimyasal reaksiyonların hızını pH, sıcaklık, enzim konsantrasyonu, substrat konsantrasyonu, iyonik şiddet, varsa kofaktör konsantrasyonu, inhibitör konsantrasyonu gibi faktörler hızlandırır veya yavaşlatır (Keha ve Küfrevioğlu 2000).

Ortamın pH'sı enzimlerin reaksiyon hızları ortamda bulunan hidrojen iyonlarının konsantrasyonuna bağlı olarak değişiklik gösterir. Enzimin en aktif olduğu yani en fazla aktivite gösterdiği pH'a optimum pH denir (Gözükara 2011).



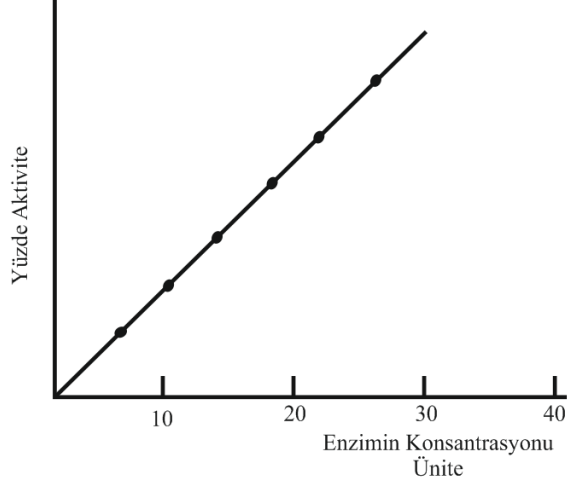
Şekil 1.2. pH'ın reaksiyon hızına etkisi (Keha ve Küfrevioğlu 2000)

Ortamın sıcaklığı, bütün kimyasal reaksiyonların hızı enzimlerin denatüre olma sıcaklığına kadar artar (Keha ve Küfrevioğlu 2000). Artan ısıyla tepkimenin hızının artmasının sebebi yeterli enerji seviyesinde gerekli enerji seviyesini veya sınırı aşan molekül sayısının artması ve ürünlerin oluşmasıdır (Aksoy 2008).



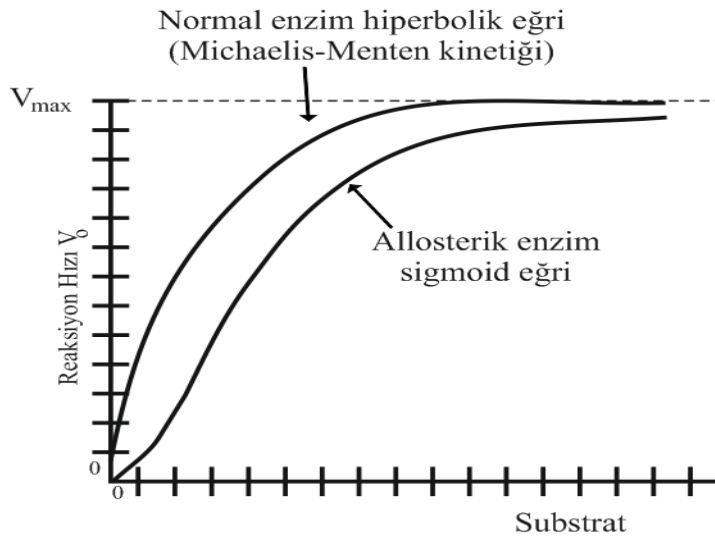
Şekil 1.3. Sıcaklığın reaksiyon hızına etkisi (Aksoy 2008)

Enzim konsantrasyonu, substrat konsantrasyonu ve diğerk koşulların sabit tutulduğu bir ortamda enzim konsantrasyonunun artışı ile enzim reaksiyon hızı da doğrusal bir artış gösterir. Bunun sebebi enzim moleküllerinin birbirlerinden bağımsız olarak hareket etmesidir (Gözükara 2011).



Şekil 1.4. Enzim konsantrasyonunun reaksiyon hızına etkisi (Gözükara 2011)

Substrat konsantrasyonu, enzim reaksiyon hızı substrat konsantrasyonuna bağlı olarak doğrusal bir şekilde artar fakat enzim doyunluğa ulaştığında yani boşta hiç enzim kalmadığında reaksiyon hızı sabit kalır (Gözükara 2011).

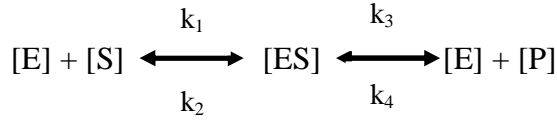


Şekil 1.5. Substrat konsantrasyonunun reaksiyon hızına etkisi (Aksoy 2008)

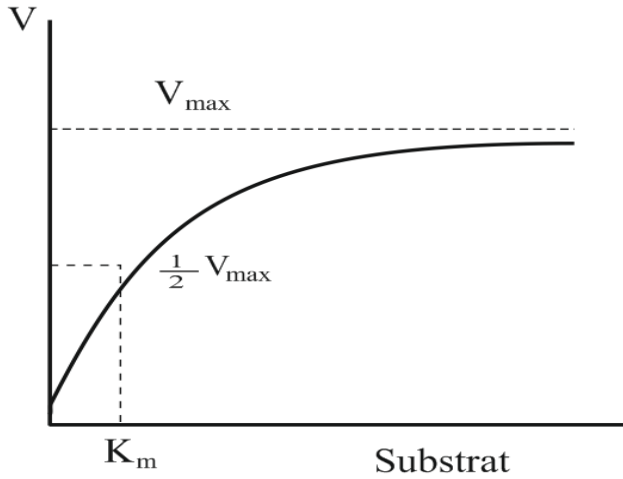
1.1.5. Enzim kinetiği

Enzimler tarafından katalize edilen biyokimyasal reaksiyonların hızlarının incelendiği kısımdır. Biyokimyasal reaksiyonların hızları kantitatif olarak incelendiği gibi hıza etki eden etmenlerde bu kısımda incelenir (Keha ve Küfrevioğlu 2000).

Sabit konsantrasyonda tutulan enzimlerin reaksiyon hızı substrat konsantrasyonuna bağlı olarak doğrusal şekilde artar. Enzim reaksiyon hızına V , substrat konsantrasyonuna $[S]$ dersek ve bunları grafiğe geçirirsek şekil 1.6'daki gibi bir hiperbolik eğri ortaya çıkar. Leonard MICHAELIS ve Malid MENTEN bu hiperbolik eğriyi matematiksel olarak tanımlamış olup enzimatik reaksiyonlarda oluşan enzim-substrat komplekslerinin ($[ES]$) önemli olduğunu ifade etmişlerdir. Bunun üzerine aşağıdaki şematik reaksiyonu hazırlamışlardır.



$[E]$ enzim, $[S]$ substrat, $[P]$ ürün, k_1 $[ES]$ 'nin oluşumundaki reaksiyon hız sabiti, k_2 $[ES]$ 'nin $[E]$ ve $[S]$ 'ye yıkılmasındaki hız sabiti, k_3 ürün oluşumundaki hız sabiti, k_4 $[P]$ ve $[E]$ 'den $[ES]$ oluşmasındaki hız sabitidir (Gözükara 2011).



Şekil 1.6. Michaelis-Menten grafiği (Gözükara 2011)

Michaelis-Menten eşitliği;

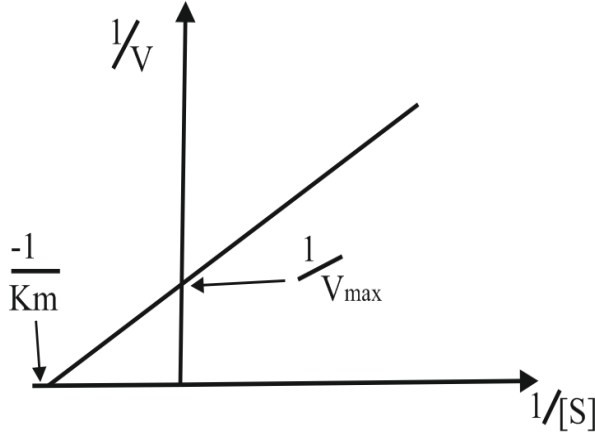
$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad K_m = \frac{(k_2 + k_3)}{k_1}$$

V_0 ilk hız, V_{\max} maksimum hız, K_m Michaelis-Menten sabitidir.

Michaelis-Menten eşitliğinin her iki tarafının tersinin alınmasında eşitlik;

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\max}[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

halini alır ve buna da Linewear-Burk eşitliği denir. Michaelis-Menten eşitliğine uyan enzim reaksiyonları için $1/V_0$ 'ın $1/[S]$ 'ye karşı grafiği çizildiğinde düz bir çizgi oluşur ve bu grafiğe Linewear-Burk grafiği denir.



Şekil 1.7. Linewear-Burk grafiği (Nelson ve Cox 2005)

Eğim = $\frac{K_m}{V_{\max}}$ olur.

Linewear-Burk grafiği V_{\max} 'ı daha doğru bulmak için avantaj sağlar. Michaelis-Menten eşitliği V_{\max} ve K_m 'nin belirlenmesinde ve inhibitör etkinliğinin analizinde kullanılır (Nelson ve Cox 2005).

1.1.6. Enzim aktivitelerinin karşılaştırılması için kinetik parametrelerin kullanımı

Michaelis-Menten kinetiğine uyan bütün enzimler için $V_0=(1/2)V_{\max}$ olduğunda $K_m=[S]$ kuralı geçerlidir. V_{\max} ve K_m değerleri bütün enzimler için farklıdır. K_m tepkime

mekanizmalarının basamak sayısı, hızları gibi reaksiyon özelliklerine bağlıdır. K_m , [ES] kompleksinde enzimin substratına olan ilgisinin ölçüsüdür (Nelson ve Cox 2005).

Enzimlerin V_{max} değerleri birbirinden farklı olup enzimin katalitik aktivitesinin bir ölçüsüdür. pH, substratın yapısı, iyonik şiddet ve sıcaklık ile değişime uğrar. Substrata doygunluğun olduğu reaksiyonlarda enzim miktarı ile hız doğru orantılıdır. Enzim miktarı iki katına çıktığında hızda iki katına çıkar anlamına gelmektedir (Keha ve Küfrevioğlu 2000).

1.1.7. Çoğu enzim iki veya daha fazla substratlı reaksiyonları katalizler

Kimyasal reaksiyonlar, ürünleri oluşturmak için birbirleriyle etkileşen enzim ve substratların sayılarına göre sınıflandırılabilirler (monomoleküler, bimoleküler, termoleküler) gibi reaksiyonların mertebelerine göre de sınıflandırılırlar. Reaksiyon mertebelerine göre sınıflandırma da sıfıncı, birinci, ikinci ve üçüncü dereceden mertebeli reaksiyonlar şeklinde olup reaksiyon hızlarına kaç çeşit reaktant konsantrasyonunun etki ettiği bilgisi mevcuttur (Keha ve Küfrevioğlu 2000).

Sıfıncı mertebeli reaksiyonlar, reaktant konsantrasyonlarının reaksiyon hızını etkilemediği reaksiyon tipi olup çok sık rastlanmaz. Bu tip reaksiyonlarda enzimlerin aktif merkezlerinde tutunan reaktanlar sayesinde yüzey reaksiyonları meydana gelir ve oluşan ürünler yüzeyden difüzyonla uzaklaştırılırlar (Atalay 2005).

Sıfıncı mertebeli reaksiyonların hızı;

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = k_0 = \text{sabit}$$

Yarılanma süresi ise;

$$t_{1/2} = \frac{[A]^0}{2k_0}$$

olarak yazılır (Atalay 2005).

Birinci mertebeli reaksiyonlar, bu tip mertebeli reaksiyonlara çok sık rastlanır ve genellikle radyoaktif bozunmalar, çözeltilerde meydana gelen bazı reaksiyonlar ve birçok gaz reaksiyonları bu mertebelidir (Atalay 2005).

Birinci mertebeli reaksiyonların hızı;

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = k[A]$$

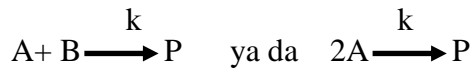
Yarılanma süresi ise;

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k_1}$$

olarak yazılır (Keha ve Küfrevioğlu 2000).

İkinci mertebeden reaksiyonlarda, reaksiyon hızı iki reaktantın konsantrasyonu ile orantılı bir hızda ya da bir reaktantın konsantrasyonunun ikinci kuvvetine yani reaktantın konsantrasyonunun karesi ile orantılı bir hızda oluşan reaksiyondur (Atalay 2005).

İkinci mertebe reaksiyon aşağıdaki şekilde gösterilirse;



Reaksiyon hız ifadeleri;

$$1) \quad v = -\frac{d[A]}{dt} = -\frac{d[B]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = k[A][B]$$

$$2) \quad v = -\frac{d[A]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = k[A]^2$$

olarak yazılır.

Üçüncü mertebeden reaksiyonlara çok sık rastlanmaz (Keha ve Küfrevioğlu 2000).

1.1.8. Enzim inhibisyonu

Hemen hemen bütün hücrel reaksiyonları katalizleyen enzimlerin reaksiyonlarını yavaşlatan veya durdurarak katalizleyen moleküler ajanlara enzim inhibitörleri (Nelson ve Cox 2005), buna sebep olan bileşiklere de inhibitör denir (Keha ve Küfrevioğlu 2000).

Enzimatik inhibisyon dönüşümlü ve dönüşümsüz olarak iki yolla gerçekleşir. Dönüşümsüz inhibisyonda, kararlı kovalent olamayan bir yapı oluşturan veya enzimin aktifliği için spesifik olan işlevsel bir grubu bozan bileşiklerdir. Bu inhibisyon türünde ortamdaki enzim bozunduğu ya da işlevini kaybettiği için enzim miktarı ortamda sürekli azalır (Nelson ve Cox 2005).

Dönüşümlü inhibisyonun üç tipi vardır.

- a) Yarışmalı (kompetitif) İnhibisyon
- b) Yarışmasız (non-kompetitif) İnhibisyon

c) Karışık İnhibisyon

a) Yarışmalı inhibisyonda, inhibitörler enzimin aktif merkezine bağlanmak için substratla yarışır. İnhibitör enzimin aktif merkezine bağlanarak substratın bağlanmasını engeller ve katalizi önler. Bu tip inhibisyonda inhibitörler yapı olarak substrata benzediğinden inhibitörün geometrik yapısı substratın hangi bölgesinin enzime bağlandığı hakkında bilgi verir. Yarışmalı inhibisyon geri dönüşümlü bir inhibisyon türü olduğundan substrat konsantrasyonunun artırılmasıyla inhibitörün enzimin aktif bölgesine bağlanma olasılığı azaltılır. Michaelis-Menten eşitliği bu tip inhibisyonda aşağıdaki hali alır (Nelson ve Cox 2005).

$$v = \frac{v_{\max} [S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]}$$

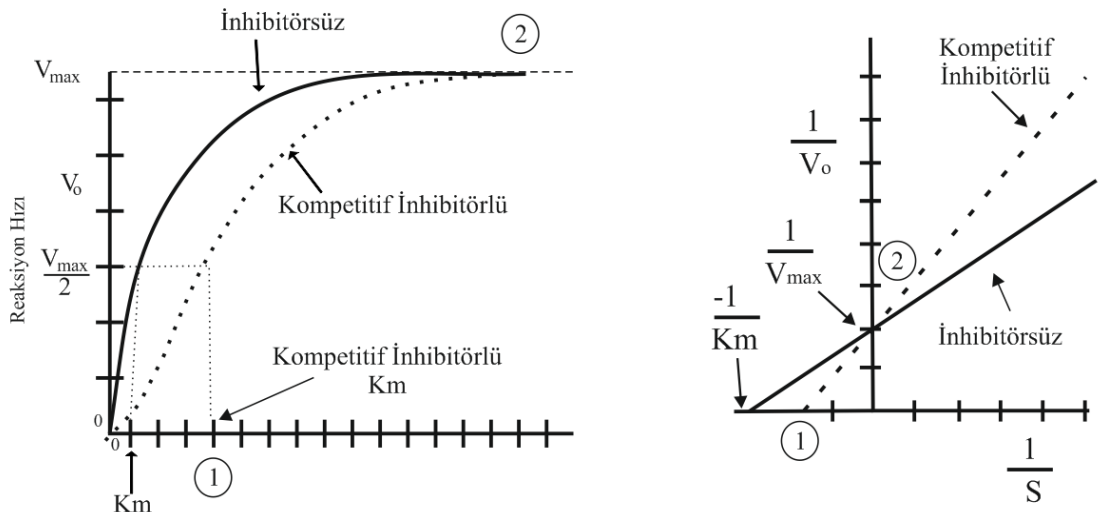
Linewear-Burk eşitliği ve eğim de;

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}}$$

$$\text{Eğim} = \frac{K_m}{v_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$$

halini alır (Pamuk 2000).

Yarışmalı inhibisyonda V_{\max} substrat konsantrasyonuyla değişmez. K_m ortamdaki substrat konsantrasyonuna bağlı olarak artar (Aksoy 2008).



Şekil 1.8. Kompetitif inhibitörlü tepkime Michaelis-Menten ve Linewear-Burk grafiği (Aksoy 2008).

b) Yarışmasız inhibisyonda, inhibitör enzimin aktif merkezinin dışında bir bölgede enzime bağlanır. Etkilerini enzimin üç boyutlu yapısında değişikliğe neden olarak gösterirler. Bu tip inhibisyonların bir kısmı geri dönüşümlü bir kısmı da dönüşümsüz olarak gerçekleşir yani enzim moleküllerinin bir kısmı [EI] bir kısmı da [ESI] kompleksi halinde bulunur (Gözükara 2011).

Michaelis-Menten eşitliği bu tip inhibisyonda aşağıdaki hali alır.

$$K'_m = K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \text{ ve } V'_{\max} = V_{\max} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$$

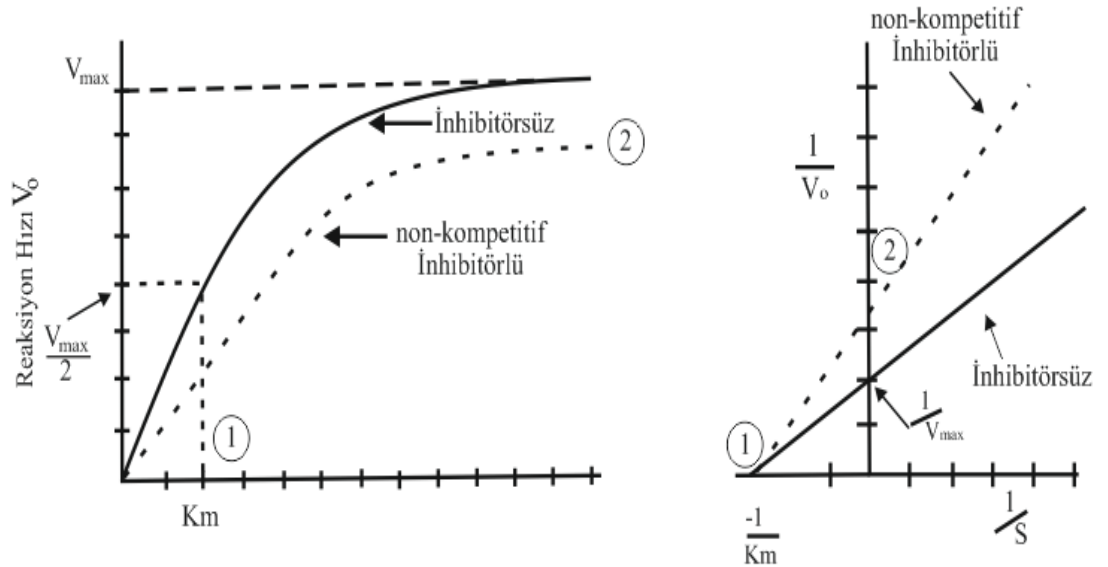
Linewear-Burk eşitliği ve eğim de;

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$$

$$\text{Eğim} = \frac{K_m}{v_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$$

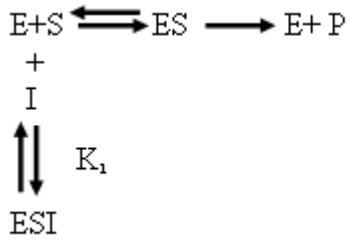
halindedir (Pamuk 2000).

Substrat konsantrasyonunun artırılmasıyla inhibisyon yok edilemez bu nedenle K_m sabittir (Keha ve Küfrevioğlu 2000). Yüksek substrat konsantrasyonlarında V_{\max} azalır (Nelson ve Cox 2005).



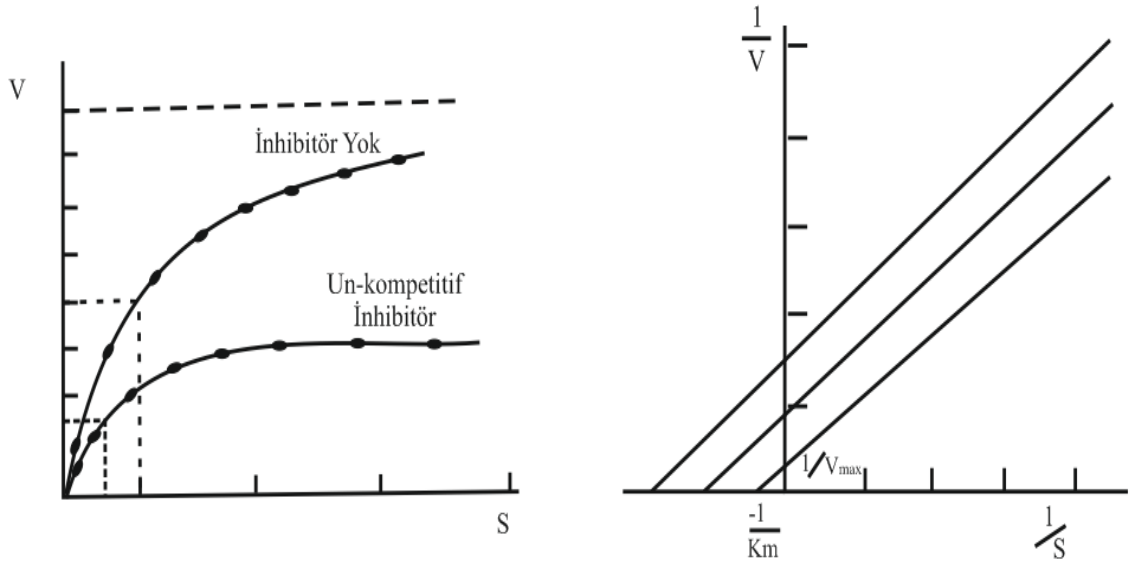
Şekil 1.9. Yarışmasız inhibitörlü tepkimede Michaelis-Menten ve Linewear-Burk grafiği (Aksoy 2008).

c) Karışık inhibisyonda, inhibitör madde enzim yerine [ES] kompleksine bağlanarak ürün oluşumunu engeller.



Bu durumda inhibisyon sabiti ; $K_i = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$ şeklindedir.

Karışık inhibisyonda ortamdaki [ES] derişimi sürekli azaldığından K_m azalır. [ES] derişimi azalıp ortamda da sürekli [ESI] kompleksinin olması V_{max} 'ı azaltır (Keha ve Küfrevioğlu 2000).



Şekil 1.10. Karışık inhibitörlü tepkimede Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafiği (Gözükara 2011).

Lineweaver-Burk eşitliği de;

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{mak}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{mak}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$

halindedir (Pamuk 2000).

1.2. Antioksidanlar

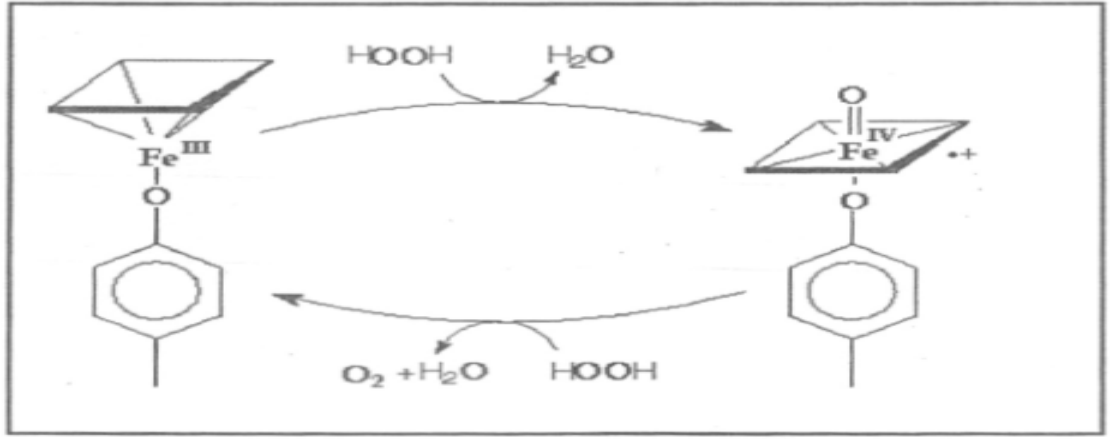
Antioksidanlar, reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların vücutta meydana getirdiği hasarları önlemek için gelişmiş savunma mekanizmalarıdır. Doğal (endojen) antioksidanlar ve eksojen antioksidanlar olmak üzere ikiye ayrılırlar. Eksojen antioksidanlar vitaminler (C, E vitaminleri ve folikasit) ve ilaçlar (sitokinler, barbitüratlar ve demir şelatörleri) olmak üzere ikiye ayrılır. Endojen antioksidanlar kendi aralarında enzim olanlar ve enzim olmayanlar olmak üzere ikiye ayrılırlar. Enzim olmayanlara askorbik asit, melatonin, ürat, sistein ve miyogloblin örnek verilebilir. Enzim olanlara ise süperoksit dizmütaz (SOD), CAT, glutatyon peroksidaz (GPx) ve hidroperoksidaz örnek verilebilir (Akkuş 1995).

1.3. Katalaz

Katalaz (CAT) (hidrojen peroksit (H_2O_2); hidrojen peroksit okdidoredüktaz, E.C.1.11.1.6), H_2O_2 'i su ve oksijene parçalayan, yüksek molekül ağırlıklı, tetramerik demir porfirin içeren ve antioksidan etkiye sahip bir enzimdir (Nancy ve vd. 1995, Gonçalves ve vd. 1999, Chaudiere ve Ferrari-Iliou 1999).

CAT enziminin yüksek konsantrasyonlardaki H_2O_2 'i indirgeyebildiği gibi, peroksidatif etki gösterebilmek amacıyla düşük H_2O_2 konsantrasyonlarında indirgenmiş substrat olan fenol, alkol ve askorbatı kullandığı saptanmıştır (Chaudiere ve Ferrari-Iliou 1999, Ahmad 2001).

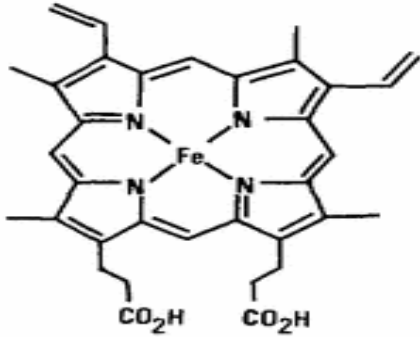




Şekil 1.11. CAT'ın etki mekanizması (Anderson ve Dawson 1991)

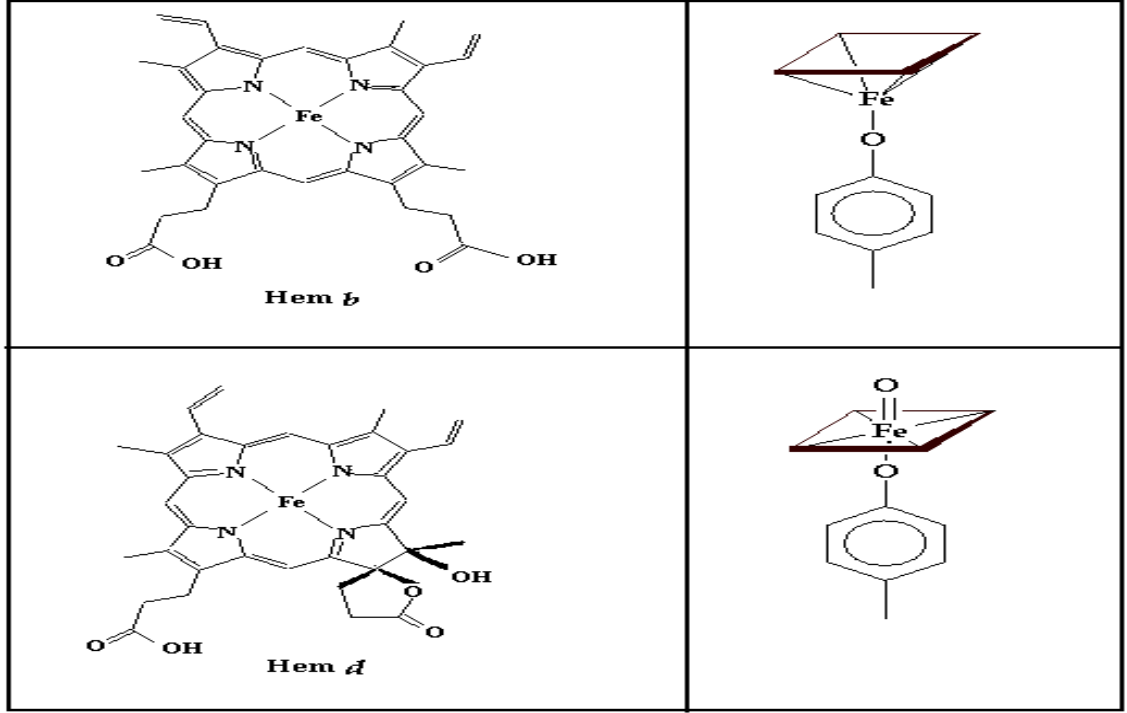
CAT bir oksido redüktaz olup hem grubu içerir. Hücrelerin peroksizomlarında yüksek derişimlerde bulunan bu enzim canlı organizmanın kemik iliği, böbrek, karaciğer, eritrosit ve çeşitli dokularında da bulunur (Çimen ve vd. 2005).

CAT geometrik olarak homotetramer bir yapıya sahip olup dört alt üniteden oluşur. Her bir alt birimi kovalent bağlı olmayan Fe (III) içerir ve protoporfirin IX hem prostetik grubunu (Şekil 1.12) oluşturur (Chelikani 2004).



Şekil 1.12. Ferritroporfirin IX yapısı (Anderson ve Dawson 1991)

Sığır karaciğer CAT'ının 250 kD molekül ağırlığına sahip olduğu ve bu CAT'ın 1922 aminoasitten meydana geldiği belirtilmiştir. Az sayıda mantar ve bakteriyal CAT hem d grubunu içerirken çoğu hem b prostetik grubunu içerdiği kaydedilmiştir (Vasudevan ve Weiland 1994).



Şekil 1.13. CAT enziminin hem b ve hem d yapısı (Vasudevan ve Weiland 1994)

1.4. Pestisitler ve Özellikleri

Pestisitler tarımsal ürünlerden yabancı otlar, böcekler ve mantarları uzak tutmak için kullanılmaktadır (Akdoğan 2011). Özellikle bitkilerin sağlıklı büyümesini sağlanması depolanması, üretilmesi ve taşınması esnasında zarar veren canlıların etkinliğini azaltmak için kullanılan kimyasallardır (Harte ve vd. 1991).

Kimyasal tarım ilaçlarından pestisitlerin böcek kaynaklı hastalıkları ortadan kaldırdığı ve tarımdaki verimin artmasına katkıda bulunduğu rapor edildi. Hızla artan dünya nüfusunun ihtiyacını karşılamak, gıda üretimi ve ürün verimliliğini artırmak için stratejiler geliştirildi. Dünyanın yıllık gıda üretiminin yaklaşık %45'i haşereler tarafından kötü yönde etkilenmekte olup bu oran tropikal ülkelerde daha fazladır. Özellikle bu nedenlerden dolayı pestisit kullanımı yaygınlaştı. Fakat pestisitlerin aşırı şekilde ve yanlış kullanımı olumsuz çevre ve sağlık problemlerinin oluşmasına neden oldu. Sonuç olarak toprak, hava, yer altı ve yer üstü sularının kirlendiği belirtilmiştir (Abhilash ve Singh 2009).

Solunum, beslenme ve deri teması gibi yollarla pestisitlere maruz kalan insanlarda akut ve kronik sağlık sorunları rapor edilmiştir. Ayrıca kanser, kronik böbrek

hastalıkları bağışıklık sisteminin çökmesi, endokrin bozuklukları, davranış ve nörolojik bozukluklar, kısırılık gibi sağlık problemlerinin ortaya çıktığı açıklanmıştır (Abhilash ve Singh 2009).

İnsanların pestisitlere maruz kalma derecesine göre sağlık problemleri değişir. Genellikle pestisitlerin yanlış uygulanması hafif baş ağrısı, grip ve deri döküntülerine, nadir olarak bulanık görme ve diğer nörolojik bozukluklara sebep olduğu gibi aşırı maruziyette insan sağlığı açısından daha tehlikeli durumlar olarak felç, körlük ve hatta ölüme sebep olmaktadır (Abhilash ve Singh 2009).

Ayrıca ülkemizde tarımsal alanda çok geniş bir kullanım ağına sahiptir. Son yıllarda seracılığın gelişmesi, meyve ve sebze üretim sektörlerinin genişlemesi kimyasal ürün kullanımının artmasına sebep oldu. Ülkemizde yapılan son bilimsel araştırmalardan Ersoy ve vd. (2011) yaptıkları çalışmada, üzüm ve çilek meyveleri üzerindeki pestisit kalıntı düzeylerine bakmışlardır. Bu meyve örneklerinin bazılarında kullanımı yasak olmayan pestisitlerin kalıntıları, bazılarında ise kullanımı yasak olan pestisit kalıntılarının olduğu rapor edildi. Uçan ve vd. (2009) yaptıkları çalışmada birçok meyve ve sebze üzerinde organoklorlu pestisitlerin analizlerini yapmışlardır. Çalışmadaki pestisit kalıntı düzeylerinin Avrupa Birliği mevzuatında yer alan değerlerin altında olduğu ve 8 adet numune üzerinde pestisit kalıntısına rastlandığı rapor edildi.

Modern tarım tekniklerinin kullanılarak tarımsal ürünlerin kalitesi ve veriminin artırılması gerekmekte olduğundan bitki koruma ürünleri içerisinde pestisitlerin kaliteli üretimi sağlamak, ürünleri zararlılardan (yabani otlar, böcekler vs.) ve hastalıklardan korumak gibi kullanım amaçları vardır (Tiryaki ve vd. 2010).

Pestisitler kullanım amaçlarına göre, toksisite değerleri, kimyasal yapıları, etkiledikleri zararlı grubu ve elde edildikleri kaynaklara göre gruplandırılabilir. Pestisitler rodentisit (kemirgen öldürücüler), herbisit (yabani ot öldürücüler), insektisit (böcek öldürücüler), fungusit (mantar öldürücüler) vb. şeklinde kimyasal maddelerin tamamını kapsayan bir sınıflandırmaya da tabii tutulurlar (Vural 2005, WHO 2009).

1.5. Cyprodinil ve Fludioxonil Pestisitleri

Switch 62,5 WG cyprodinil ve fludioxonil fungusitlerini içerir. Bağcılık ve sebzecilikte kurşuni küf (*Botrytis cinerea*) hastalığının mücadelesinde kullanılan sistemik ve kontak özelliklerine sahip yeni bir tarım ilacıdır. Switch 62,5 WG %25,0

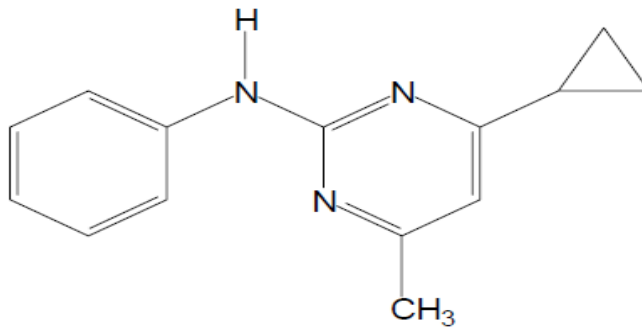
fludioxonil ve %37,5 cyprodinil ihtiva etmektedir. İlacın bileşiminde bulunan etkili maddelerden biri olan cyprodinil, fungusun bitki dokularına girişini, misellerinin gelişimini önleyerek hayat devresinin etkiler. Sistemik etkiye sahip olup bitkinin meyve ve yapraklarından hızlı bir şekilde bünyeye alınarak yaprağın bir yüzünden diğer yüzüne geçerken yukarıya doğru hareket eder (Karadağ 2007).

Cyprodinil (4-siklopropil-6-metil-N-fenilprimidin-2-amin), dünya tarımında çok geniş kullanım alanına sahip bir mantar ilacıdır. Bu pestisit özellikle asma, tahıl ve sebze gibi bitkilere etki eden patojenlere karşı kullanılmaktadır (Ma ve Ye 1997). Cyprodinil etki mekanizmasını, bitki üzerindeki mantarın methionin ve tionic aminoasitlerinin biyosentezini inhibisyona uğratarak göstermektedir (Mindt 1997, Masner et al. 1997, Fritz ve Lanen 2003, Kanetis et al 2008).

Özellikle elma ve üzüm üzerinde bulunan cyprodinil kalıntıları küçük çocukların bu meyveleri yemesi ile birlikte onların cyprodinile maruz kalmasına sebep olmaktadır (EFSA 2011, Esteve-Turrillas ve vd. 2012). Cyprodinilin ağız yolu ile uygulamalarında ratürüner sistemine hızlı bir şekilde geçtiği tespit edilmiştir. Rat üriner sistemi içerisindeki cyprodinilin önemli metabolitleri dihidroksi metabolit, N-4-(hydroxyphenyl)-4-cyclopropyl-5-hydroxy-6-methylpyrimidin-2-ylamine dir. Bu metabolitler ise metabolizmada sülfatlar ile birleşmektedir (Müller ve vd. 1999).

Bu pestisit en önemli özelliklerinden biride yer altı sularını kirletmesidir. Diğer bir özelliğide akut toksititeye sebep olmasıdır. Son yapılan çalışmalarda potansiyel bir endokrin bozukluğuna sebebiyet verdiği belirtildi (Fang ve vd. 2013).

Topraktaki organik maddelerle bitki üzerindeki cyprodinil kalıntısı mikrobiyal bir dönüşüm sağlayarak toprak ve sularda kirlenmelere sebep olmaktadır (Schocken ve vd. 1997, Dec ve vd. 1997a, b).



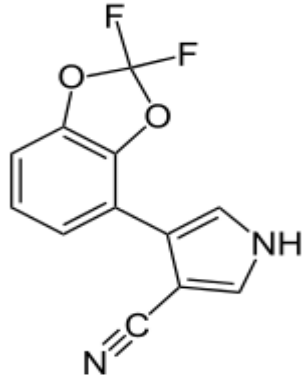
Şekil 1.14. Cyprodinilin kimyasal yapısı (Kang ve vd. 2002)

Çizelge 1.2. Cyprodinilin özellikleri (Juan ve vd. 2006, Karadağ 2007)

Adı	Cyprodinil	
IUPAC Adı	N-(4-cyclopropyl-6-methyl-pyrimidin-2-yl)-aniline	
Kapalı Formülü	C ₁₄ H ₁₅ N ₃	
Molekül Ağırlığı	225,3	
Organik Çözücüde Çözünürlük (25 °C)	1) Suda 16 mg/L 2) Aseton 610 g/L 3) Etanol 160 g/L	4) n-oktanol 160 g/L 5) Toluene 460 g/L 6) Hekzan 30 g/L
Erime Noktası(°C)	75,9	
Kimyasal Sınıfı	Anilinoprimidin	
Pestisit Sınıfı	Fungisit	
LD₅₀ Değeri (mg/kg)	2000 den fazla	
Maksimum Kalıntı Miktarı (MRL, mg/kg)	0,5	

İlacın bünyesinde bulunan diğer etkili madde olan fludioxonil organizmanın tamamını etkileyen bir yapıya sahip olmamasına rağmen, bitki dokularına hızlı bir şekilde yayılma özelliğine sahip olduğu bilinmektedir (Thomson 1997). Fludioxonil, [4-(2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-4-yl) pyrrole-3-carbonitrile] fenilpirol grubuna dahil olup antifungal özellikte bir bileşiktir (Gasztonyi ve Lyr 1995, Kojima ve vd. 2006). Bu fungusit oldukça geniş bir kullanım alanına sahip olup, meyvelerde, sebzelerde ve tahıllarda bulunan zararlılara karşı etkilidir (Ackerman ve vd. 2007). Bunun yanı sıra osmotik düzenleyicileri etkilemektedir. *Botrytis cinerea* da miselyalin büyümesini, çim tüpü uzamasını ve spor çimlenmesini engelleyen en etkili fungusittir (Petit ve vd. 2011).

Fludioxonil cyprodinil ile karıştırılarak püskürtme şeklinde kullanıldığında *Botrytis cinerea*' ya karşı etkilidir (Kanetis ve vd. 2006). Bu fungusit bağlarda zararlılara karşı çok etkili olduğundan patojenlerin fungusitlere dayanıklılığının azaltılması için kullanılmıştır (Courderchet 2003). Etkin maddesi fludioxonil olan fungusitlerin, ürünler üzerinde kalıntı bırakması nedeniyle ürünlerin hasat edilmesine yakın dönemde kullanılmaması gerektiği bildirilmiştir (Leroux 2007). Meyve ve sebzeler üzerindeki fludioxonil kalıntı düzeylerinin yüksek olduğu kabul edilmiştir (Orton ve vd. 2011)



Şekil 1.15. Fludioxonil kimyasal yapısı (Juan ve vd.2006).

Çizelge 1.3. Fludioxonil özellikleri (Juan ve vd. 2006, Karadağ 2007)

Adı	Fludioxonil	
IUPAC Adı	4-(2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-4-yl) pyrrole-3-carbonitrille	
Kapalı Formülü	C ₁₂ H ₆ F ₂ N ₂ O ₂	
Molekül Ağırlığı	248,19	
Organik Çözücüde Çözünürlük (25 °C)	1) Suda 1,53 mg/L 2) Aseton % 12 (w/v) 3) Etanol 44 g/L	4) Metanol% 2 (w/v) 5) N-metil% 60 (w/v)
Erime Noktası (°C)	199,4	
Kimyasal Sınıfı	Fenilpirol	
Pestisit Sınıfı	Fungisit	
LD₅₀ Değeri (mg/kg)	5000 den fazla	
Maksimum Kalıntı Miktarı (MRL, mg/kg)	2	

1.5. Çalışmanın Amacı

Serbest radikaller; oksijenli solunum, metabolizma ve enfeksiyon gibi vücut içinden kaynaklanan olayların yanında; sigara, alkol, uyuşturucu, x-ışınları, pestisitler, çözücüler, petrokimya ürünleri, ilaçlar, güneş ışını ve kirlilik gibi dış kaynaklı çevresel faktörlerin etkisiyle de oluşabilmektedirler. Doğal endojen enzim olan CAT enzimi, hücrelerdeki H₂O₂'in su ve oksijene dönüştürülmesinden sorumludur. Bu çalışmada sığır karaciğerinden saflaştırılmış ve hazır olarak alınmış CAT enzimi direkt olarak cyprodinil ve fludioxonil pestisitleri ile etkileştirilmiş ve enzim aktivitesi incelenmiştir. Ayrıca enzimin kinetik parametreleride belirlenmiştir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Kimyasallar

Etil Alkol, Cyprodinil, Fludioxonil, Sığır Serum Albumin, CH₃COOH (Asetik Asit), CH₃COONa (Sodyum Asetat), Na₂CO₃ (Sodyum karbonat), C₂H₆OS (Dimetil Sülfoksit), NaOH (Sodyum Hidroksit), HCl (hidroklorik Asit), NaCl (Sodyum Klorür), CuSO₄.5H₂O (Bakır iki sülfat pentahidrat), Folin-Ciocalteu, K₂HPO₄ (Potasyum hidrojen fosfat), KH₂PO₄ (Potasyum dihidrojen fosfat), H₂O₂ (Hidrojen peroksit), Na₃C₆H₅O₇ (Trisodyum Sitrat).

2.1.2. Kullanılan cihazlar

UV-Vis Spektrofotometre (Perkin Elmer), pH Metre, Isıticılı Magnetik Karıştırıcı, Vorteks, Kriyostat, Etüv, Otomatik Pipet, Analitik Terazî, Su Banyosu.

2.2. Yöntem

2.2.1. Stok çözeltiler ve tamponlar

Fosfat Tamponu: 2,273 g KH₂PO₄ ve 5,8 g K₂HPO₄ saf suda çözünüp saf su ile 1L'ye yakın tamamlanmıştır. 1M HCl ve 1M NaOH ile çözeltinin pH'sının 7,5 olması sağlanarak üzeri saf su ile 1L'ye tamamlanmıştır.

1M HCl Çözeltisi: Bir miktar saf su üzerine 8,3 ml HCL (stok, derişik) eklenip saf su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

1M NaOH Çözeltisi: 4 g NaOH alınıp 100 ml saf su içinde çözünmüştür.

CAT Çözeltisi (0,5mg/ml): 0,025 g CAT tartılarak üzeri fosfat tamponu ile 50 ml'ye tamamlanmıştır.

Serum Fizyolojik (%0,9 NaCl): 0,9 g NaCl tartılarak üzeri saf su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Standart Protein Çözeltisi: 0,025 g sığır albümini tartılır ve üzeri serum fizyolojik ile yavaşça karıştırılarak (köpürmemesi için) 50 ml'ye tamamlanmıştır.

Pestisit Çözeltileri: Pestisitler etil alkol içinde hazırlanacaktır. 0,0100 g pestisit alınarak üzerine 2 ml etil alkol eklenecektir. Böylece 5000 ppm (mg/L) pestisit çözeltisi hazırlanmış olacak bundan da 0, 10, 50, 100, 250 ve 500 ppm derişimlerde ki enzim pestisit çözeltileri hazırlanmıştır.

CAT enzimi için tamponda optimum sıcaklık 35°C bulunmuştur. Oda sıcaklığında enzim çözeltisi + pestisit 1 saat inkübe edilip aktivitelerine bakılmıştır.

2.2.2. Pestisit etkisi

Etil alkol içerisinde çözülmüş cyprodinil ve fludioxinil pestisitleri ile saf CAT enzimi ile oda sıcaklığında 1 saat etkileştirilerek aktivitedeki değişim incelenmiştir.

2.2.3. Optimum sıcaklık

CAT enziminin 5-50 °C arasındaki sıcaklıklardaki aktiviteleri ölçülerek optimum sıcaklık belirlenmiştir.

2.2.4. Optimum pH

Tükel ve Alptekin (2004) tarafından belirtilen 50 mM pH=7,5 fosfat tamponu kullanılmıştır.

2.2.5. CAT aktivitesinin ölçülmesi

CAT aktivitesi, Aebi, H. (1974) tarafından önerilen Lartillot, S. ve vd. (1988) tarafından geliştirilen metoda göre yapılmıştır. Enzimatik aktivite tayini, hidrojen peroksidin 240 nm'deki absorbansının enzim ile etkileşmesinden sonra zamanla azalmasına bağlı olarak yapılmıştır. Hidrojen peroksit için molar ekstinksiyon katsayısı 0,0396 cm²/µmol'dür. Yöntemde 50 mmol/L fosfat tamponu (pH=7,5) içinde 10 mmol/L H₂O₂ olacak şekilde substrat çözeltisi hazırlanır. 20 µL test edilecek enzim

çözeltisi üzerine 2,5 ml substrat çözeltisi eklenir ve 37 °C'de 2 dakika bekletilir. Reaksiyonu durdurmak için ortama 0,5 ml 1M HCl çözeltisi ilave edilir. 240 nm'de absorbansı (Ar) ölçülür (Lartillot ve vd. 1988).

Kör olarak 2,5 ml 50 mmol/L fosfat tamponu (pH=7,5) ve 0,5 ml 1M HCl içeren çözelti kullanılır (Lartillot ve vd. 1988).

H₂O₂'in başlangıçtaki absorbansını (As) belirlemek için 2,5 ml substrat ve 0,5 ml 1M HCl içeren çözeltinin absorbansı ölçülür (Lartillot ve vd. 1988).

Proteinin neden olacağı absorbansı (At) belirlemek için 20 µL enzim çözeltisi, 2,5 ml fosfat tamponu ve 0,5 ml 1M HCl içeren çözeltinin absorbansı ölçülür (Lartillot ve vd. 1988).

Enzimatik aktiviteden dolayı absorbans (A) değişimi;

$$A = (A_s + A_t) - A_r$$

Enzim aktivitesinin IU/mL cinsinden hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılır (Lartillot ve vd. 1988).

$$Akt = \frac{A.Vt}{\epsilon.t.Ve}$$

V_t= Toplam reaksiyon hacmi (mL)

V_e= Kullanılan enzim çözeltisinin hacmi (mL)

ε= H₂O₂'nin molar ekstinksiyon katsayısı (0,0396 cm²/µmol)

t= Reaksiyon zamanı (dakika)

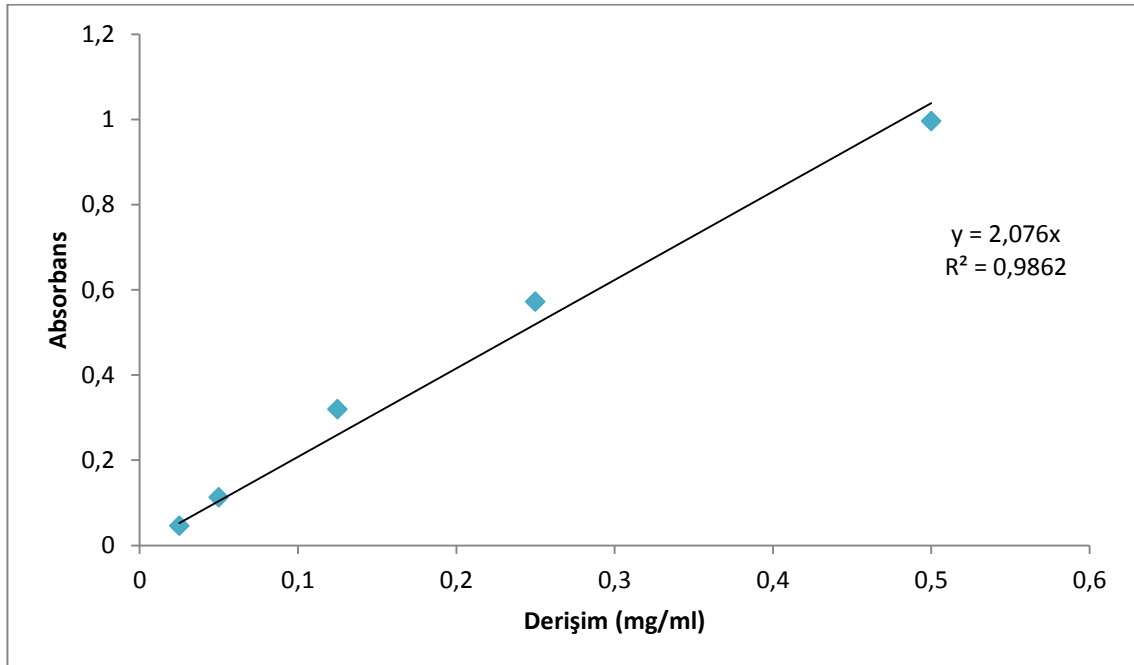
Her örnekteki protein miktarı belirlenerek aktivite µmol H₂O₂ mg prot⁻¹.dak⁻¹ olarak hesaplanmıştır (Lartillot ve vd. 1988).

2.2.6. Protein tayini

Protein tayini metodu Lowry ve vd. (1951) tarafından önerilen yöntemle göre yapılmıştır. Protein tayini için aşağıda özellikleri bildirilen A, B ve C çözeltileri hazırlanmıştır.

- 1) Çözelti A: Bu çözelti 2 g. Na₂CO₃, 0,1 M NaOH çözeltisinde çözülerek ve aynı çözelti ile son hacim 100 ml'ye seyreltilerek hazırlanmıştır.
- 2) Çözelti B: 0,5 g. CuSO₄.5H₂O, %1'lik tri sodyum sitrat. 2 H₂O çözeltisinde çözülerek son hacim aynı çözelti ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

- 3) Çözelti C: 50 ml A çözeltisi ile 1 ml B çözeltisi karıştırılarak hazırlanmıştır. (Kullanılacağı an hazırlanmasına dikkat edilmiştir.)
- 4) Folin-Ciocalteu Çözeltisi: Folin-Ciocalteu saf su ile 1:1 oranında seyreltilerek hazırlanmıştır.
- 5) Standart Protein Çözeltisi: 1 ml'sinde 0,5 mg. sığır albümini olacak şekilde %0,9'luk NaCl (serum fizyolojik) çözeltisiyle hazırlanmıştır.
- 6) Standart Protein Eğrisinin Çizimi: 6 adet deney tüpü alınarak tüplere sırasıyla standart protein çözeltisinden (0,5 mg/ml) 0; 50; 100; 250; 500; 1000 µl eklenip serum fizyolojik ile 1 ml'ye tamamlanmıştır. Bu tüplerin protein derişimleri sırasıyla 0; 0,025; 0,05; 0,125; 0,25; 0,5 mg/ml'ye karşılık gelir. Her tüpe 5 ml C çözeltisi ilave edilip, 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra her tüpe 1:1 oranında seyreltilmiş Folin-Ciocalteu çözeltisinden 0,5 ml eklenmiştir. 30 dakika oda sıcaklığında bekletilip tüp içeriklerinin absorbansları köre karşı 750 nm'de okunmuştur. Okunan bu absorbanslar standart protein derişimlerine karşı grafiğe geçirilmiştir (Lowry ve vd. 1951).



Şekil 2.1. Standart protein grafiği

2.2.7. İstatistik

Deneylerden elde edilen verilerin istatistik analizleri için SPSS 21 bilgisayar paket programı kullanılmıştır. Her bir pestisit etkisinde derişimler arasındaki aktivite düzeylerini karşılaştırmak için SNK (Student Newman Keul's) testi uygulanmıştır.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Bulgular

3.1.1. CAT'ın karakterizasyonu ile ilgili bulgular

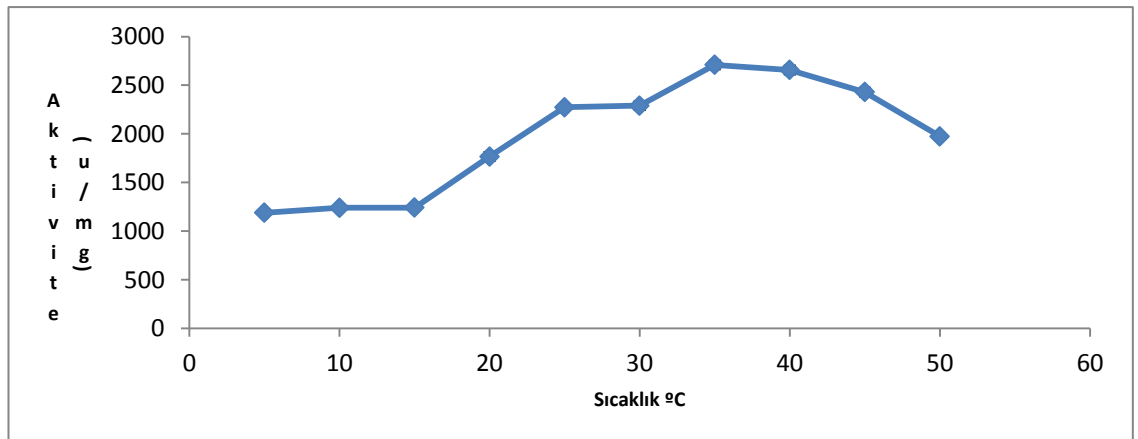
3.1.1.1. Optimum sıcaklık

Enzimin 5-50 °C arasındaki sıcaklıklardaki aktiviteleri ölçülüp, aktivite değerleri çizelge 3.1.'de verilmiştir, aktivite sıcaklık grafiği şekil 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1.CAT'ın farklı sıcaklıklarda ölçülen aktivite değerleri

T (°C)	Aktivite ±Standart Hata (U/mg)
5	1118±18
10	1240±18
15	1241±17
20	1766±46
25	2273±17
30	2289±46
35	2709±46
40	2656±46
45	2430±46
50	1974±35

Çizelge 3.1.'de görüldüğü gibi CAT'ın en fazla aktivite gösterdiği sıcaklık (optimum sıcaklık) 35 °C (308 K) olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.1. CAT için aktivite-sıcaklık grafiği

3.1.2. Cyprodinil ve fludioxinil'in CAT ile etkileştirilmesi

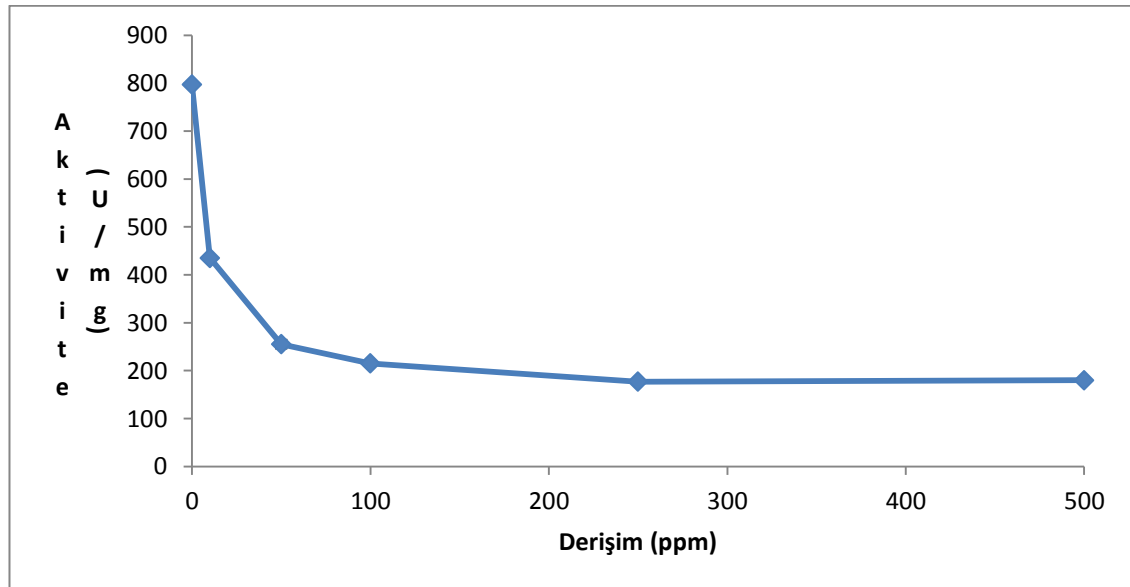
3.1.2.1. Cyprodinil ile CAT'm etkileştirilmesi

Farklı derişimlerde hazırlanan cyprodinil CAT enzimi ile etkileştirilerek, CAT enziminin aktivitesi ölçölüp elde edilen veriler çizelge 3.2'de verilmiş olup, aktivite derişim grafiğı şekil 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2.Farklı cyprodinil derişimlerinin CAT aktivitesi üzerine etkisi

Derişim (ppm)	Aktivite±Standart Hata (U/mg)
0	797±2 a
10	435±4 b
50	255±9 c
100	215±2 d
250	177±5 e
500	180±4 e

Veriler Aritmetik ortalama ± Standart hata şeklinde verilmiştir. Çizelgedeki "a, b, c, d ve e" harfleri derişimler arasındaki aktivite düzeylerinin ayırımını belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında istatistiksel ayırım vardır (P<0.05, n=3).



Şekil 3.2. Cyprodinil ile etkileştirilen CAT'm aktivite grafiğı

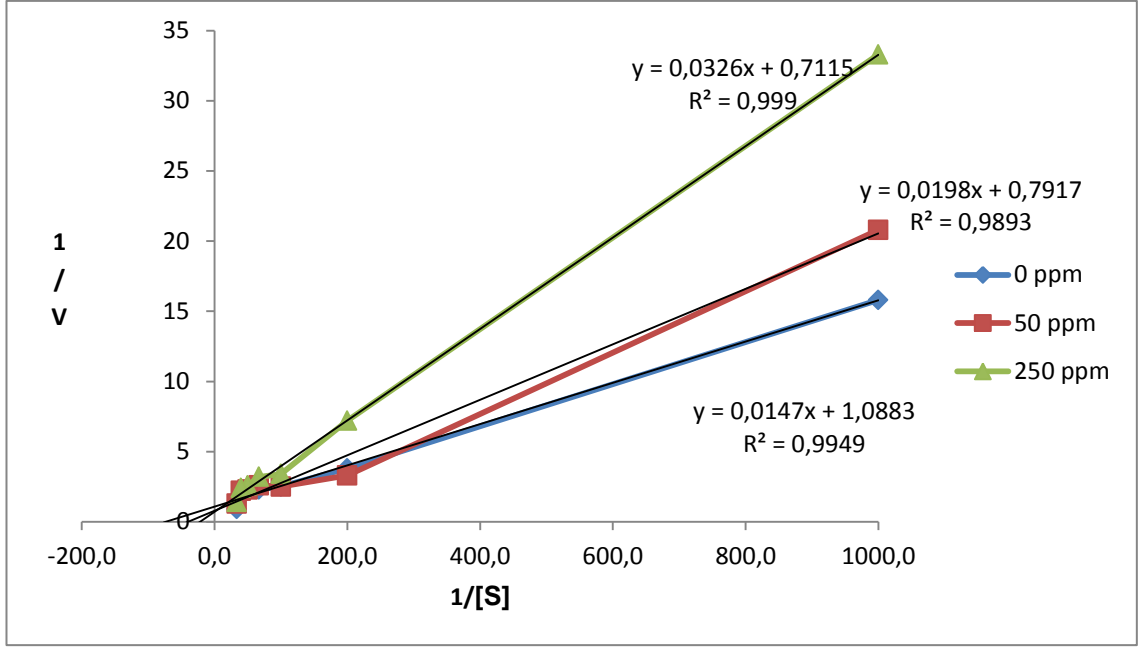
Çizelge 3.2. ve Şekil 3.2.'ye bakıldığında artan cyprodinil pestisit derişimi ile CAT enziminin aktivitesini kaybederek inhibisyona uğradığı saptanmıştır. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tüm test edilen etkileşim derişimlerinde CAT enzim aktivitesindeki inhibisyonların istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($P < 0.05$, $n=3$). Cyprodinil'in 10, 50, 100, 250 ve 500 ppm etkisinde CAT enzim aktivitesindeki yüzde azalışların sırasıyla 45.4; 68.0; 73.0; 77.8 ve 77.4 olduğu hesaplanmıştır.

3.1.2.2. Cyprodinil'in inhibisyon türü

Yapılan çalışmalar sonucu, CAT enzimi için farklı derişimlerde hazırlanan substrat (H_2O_2 : 1mM, 5mM, 10mM, 15mM, 20mM, 25mM ve 30mM) ve Cyprodinil (0ppm, 50ppm ve 250ppm) derişimlerinde CAT aktivitesine bakılmıştır. Cyprodinil'in CAT'ı yarışmalı (kompetitif) olarak inhibe ettiği bulunmuş olup, aktivite değerleri çizelge 3.3'de verilmiş, şekil 3.3'te de grafiği çizilmiştir.

Çizelge 3.3. CAT için farklı cyprodinil ve substrat derişimlerinde ölçülen aktivite değerleri

H_2O_2	0ppm (Cyprodinil)	50 ppm (Cyprodinil)	250 ppm (Cyprodinil)
$1/[S]$ (mM) ⁻¹	$1/V$ (U/mg prot) ⁻¹ × 10 ⁻³	$1/V$ (U/mg prot) ⁻¹ × 10 ⁻³	$1/V$ (U/mg prot) ⁻¹ × 10 ⁻³
1000,0	15,8	20,8	33,3
200,0	3,8	3,3	7,2
100,0	2,5	2,5	3,4
66,7	2,3	2,6	3,2
50,0	2,2	2,3	2,6
40,0	2	2,2	2,4
33,3	0,9	1,3	1,4



Şekil 3.3. Cyprodinil ile etkileştirilen CAT'ın Lineweaver-Burk grafiği

Şekil 3.3'teki verilerden yararlanarak V_{\max} , K_m ve K_i (inhibisyon sabiti) bulunmuştur. Yarışmalı (kompetitif) inhibisyon için Lineweaver-Burkeşitliği:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}}$$

$$\text{Eğim} = \frac{K_m}{v_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \text{ den } K_i \text{ bulunabilir.}$$

Lineweaver-Burk grafiğinden cyprodinil'in, CAT enzimini yarışmalı (kompetitif) olarak inhibe ettiği anlaşılmıştır.

0 ppm cyprodinil için V_{\max} ve K_m değerleri;

$$V_{\max} = 919 \text{ U/mg,}$$

$$K_m = 1,35 \times 10^{-2} \text{ M,}$$

$$K_i = 0,00 \text{ M}$$

50 ppm cyprodinil için V_{\max} ve K_m değerleri;

$$V_{\max} = 1263 \text{ U/mg,}$$

$$K_m = 2,50 \times 10^{-2} \text{ M,}$$

$$K_i = 1,65 \times 10^{-7} \text{ M}$$

250 ppm cyprodinil için V_{max} ve K_m değerleri;

$$V_{max}=1405 \text{ U/mg,}$$

$$K_m=4,58 \times 10^{-2} \text{ M,}$$

$$K_i=5,00 \times 10^{-7} \text{ M}$$

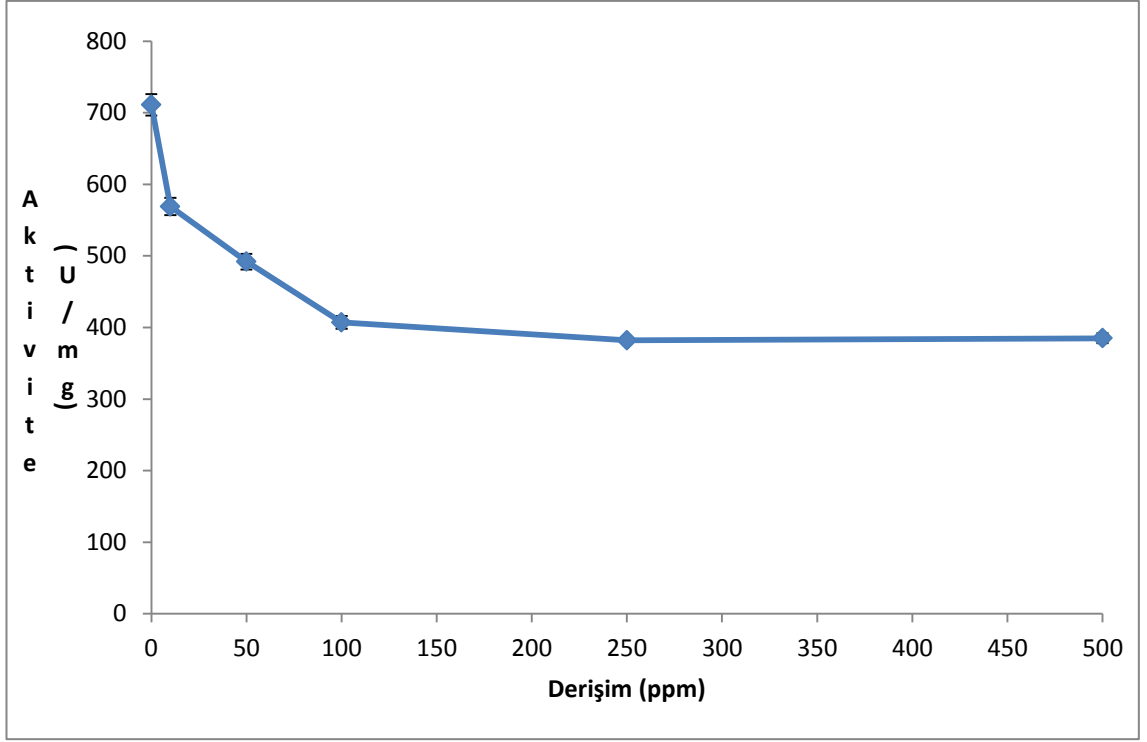
3.1.2.3. Fludioxonil ile CAT'ın etkileştirilmesi

Farklı derişimlerde hazırlanan fludioxonil pestisit CAT enzimi ile etkileştirilerek, CAT enziminin aktivitesi ölçölüp elde edilen veriler çizelge 3.4'de verilmiş olup, aktivite derişim grafiğı şekil 3.4'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. Farklı fludioxonil derişimlerinin CAT aktivitesi üzerine etkisi

Derişim (ppm)	Aktivite ±Standart Hata(U/mg)
0	711±15a
10	569±12b
50	492±11c
100	407±9d
250	382±4d
500	385±7d

Veriler Aritmetik ortalama ± Standart hata şeklinde verilmiştir. Çizelgedeki "a, b, c ve d" harfleri derişimler arasındaki aktivite düzeylerinin ayırımı belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında istatistiksel ayırım vardır ($P<0.05$, $n=3$).



Şekil 3.4. Fludioxonil ile etkileştirilen CAT'ın aktivite grafiği

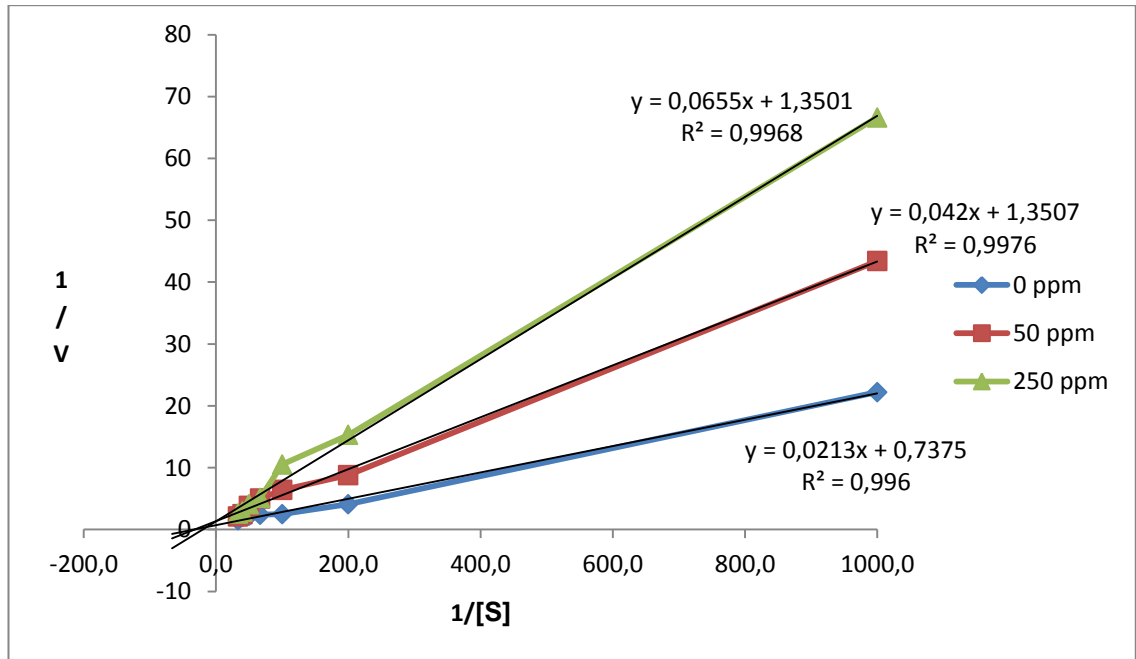
Çizelge 3.4.'e ve şekil 3.4.'ye bakıldığında artan fludioxonil pestisit derişimi ile CAT enziminin aktivitesini kaybederek inhibisyona uğradığı saptanmıştır. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tüm test edilen etkileşim derişimlerinde CAT enzim aktivitesindeki inhibisyonların istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($P < 0.05$, $n=3$). Fludioxonil'in 10, 50, 100, 250 ve 500 ppm etkisinde CAT enzim aktivitesindeki yüzde azalışların sırasıyla 20.0; 30.8; 42.8; 46.3 ve 45.9 olduğu hesaplanmıştır.

3.1.2.4. Fludioxonil'in inhibisyon türü

Yapılan çalışmalar sonucu, CAT enzimi için farklı derişimlerde hazırlanan substrat (H_2O_2 : 1mM, 5mM, 10mM, 15mM, 20mM, 25mM ve 30mM) ve fludioxonil (0ppm, 50ppm ve 250ppm) derişimlerinde CAT aktivitesine bakılmıştır. Fludioxonil'in CAT'ı yarışmasız (non-kompetitif) olarak inhibe ettiği bulunmuş olup, aktivite değerleri çizelge 3.5'de verilmiş, şekil 3.5'te de grafiği çizilmiştir.

Çizelge 3.5. CAT için farklı Fludioxonil ve substrat derişimlerinde ölçülen aktivite değerleri

H ₂ O ₂	0ppm	50 ppm	250 ppm
1/[S] (mM) ⁻¹	1/V (U/mg prot) ⁻¹ × 10 ⁻³	1/V (U/mg prot) ⁻¹ × 10 ⁻³	1/V (U/mg prot) ⁻¹ × 10 ⁻³
1000,0	22,2	43,4	66,6
200,0	4,1	8,8	15,3
100,0	2,5	6,4	10,5
66,7	2,4	5	5,1
50,0	2,2	3,8	4,1
40,0	2	2,5	2,9
33,3	1,5	2,1	2,6



Şekil 3.5. Fludioxonil ile etkileştirilen CAT'ın Lineweaver-Burk grafiği

Şekil 3.5'teki verilerden yararlanarak V_{\max} , K_m ve K_i (inhibisyon sabiti) bulunmuştur. Yarışmasız (non-kompetitif) inhibisyon için Lineweaver-Burk eşitliği:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$$

$$\text{Eğim} = \frac{K_m}{v_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right), \text{ den } K_i \text{ bulunabilir.}$$

Lineweaver-Burk grafiğinden fludioxonil'in CAT enzimini yarışmasız (non-kompetitif) olarak inhibe ettiğı anlaşılmıştır.

0 ppm fludioxonil için V_{max} ve K_m değerleri;

$$V_{max}= 1356 \text{ U/mg,}$$

$$K_m=2,88 \times 10^{-2} \text{ M,}$$

$$K_i=0,00 \text{ M}$$

50 ppm fludioxonil için V_{max} ve K_m değerleri;

$$V_{max}=740 \text{ U/mg,}$$

$$K_m=3,11 \times 10^{-2} \text{ M,}$$

$$K_i=1,02 \times 10^{-7} \text{ M}$$

250 ppm fludioxonil için V_{max} ve K_m değerleri;

$$V_{max}=741 \text{ U/mg,}$$

$$K_m=4,85 \times 10^{-2} \text{ M,}$$

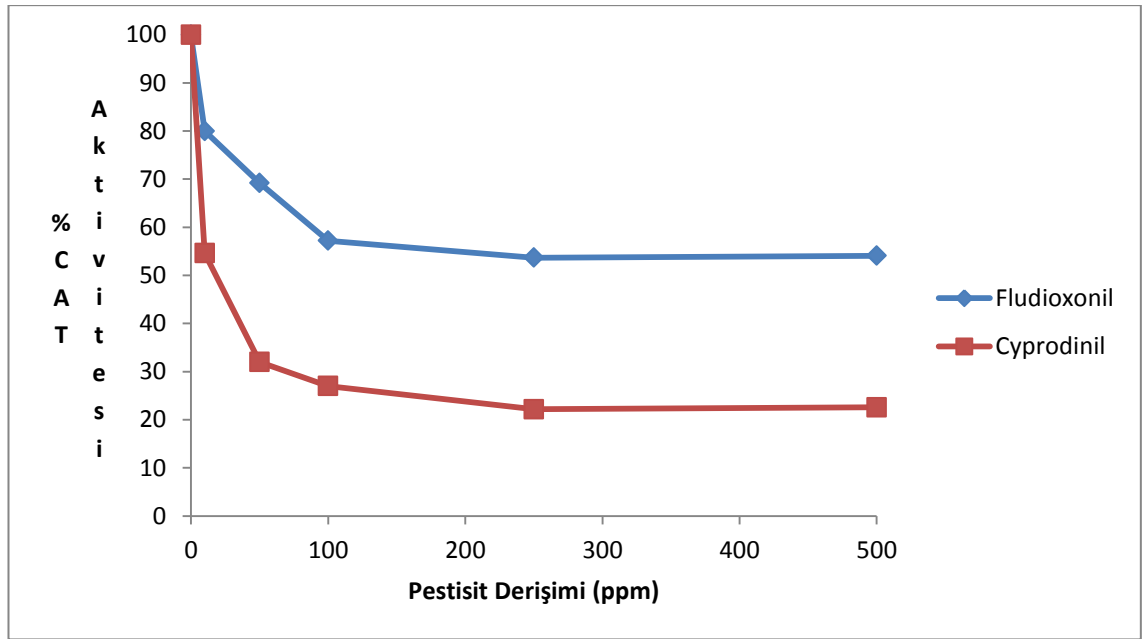
$$K_i=3,27 \times 10^{-7} \text{ M}$$

3.1.2.5. Cyprodinil ve fludioxonilin CAT aktivitesi üzerine etkisinin karşılaştırılması

Cyprodinil ve fludioxonilin CAT aktivitesi üzerine % etkisi çizelge 3.6'da verilmiş olup, şekil 3.6'da grafiğı çizilmiştir. Çizelge 3.6'da ve şekil 3.6'da görüldüğü gibi fludioxonil ile karşılaştırıldığında artan cyprodinil derişimi ile CAT enzimi daha fazla aktivite kaybetmektedir. 500 ppm cyprodinil derişimi ile CAT enzimi etkileştirildiğinde, CAT enzimi başlangıç aktivitesinin % 22,6'sını korurken, 500 ppm fludioxonil derişimi ile CAT enzimi etkileştirildiğinde, CAT enzimi başlangıç aktivitesinin % 54,1'ini korumuştur.

Çizelge 3.6. Cyprodinil ve fludioxonilin CAT aktivitesi üzerine % etkisi

Pestisit Derişimi (ppm)	Cyprodinil ile etkileştirilen CAT'da% Aktivite	Fludioxonil ile etkileştirilen CAT'da% Aktivite
0	100,0	100,0
10	54,6	80,0
50	32,0	69,2
100	27,0	57,2
250	22,2	53,7
500	22,6	54,1



Şekil 3.6. Cyprodinil ve fludioxonilin CAT aktivitesi üzerine etkisinin karşılaştırılması grafiği

3.2. Tartışma

Bu çalışmada, sığır karaciğerinden saflaştırılmış ve hazır olarak alınmış CAT enziminin 5-50 °C arasındaki sıcaklıklardaki aktiviteleri ölçülmüştür ve en yüksek aktivitesini (optimum sıcaklığı) 35 °C'de (308 K) göstermiştir. Çetinus ve vd., (2009), sığır karaciğerinden elde edilmiş olan CAT'ın glutaraldehit ile değiştirilmiş halini

kitosan (Ch) ve kitosana adsorbe edilmiş Cu^{+2} 'ye immobilize etmişlerdir. Serbest CAT enziminin en yüksek aktivitesini gösterdiği sıcaklık derecesinin 35 °C olduğunu bildirmişlerdir. Ch-Cu-CAT örneğinin diğer örneklere oranla 25-35 °C arasında termal olarak daha kararlı olduğunu bildirmişlerdir. Alkan ve vd., (2005), bentonite sığır karaciğerinden elde edilen CAT'ı adsorpsiyon ile immobilize etmişlerdir. Serbest CAT ve immobilize CAT örnekleri için optimum pH değerlerini sırasıyla 7,0 ve 8,0 olarak rapor etmişlerdir. 250 mM fosfat tamponu içindeki serbest CAT'ın aktivitesinin yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. 30 °C'de serbest CAT'ın maksimum aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Karadağ ve Bilgin (2010), farklı bir enzim olan SOD enzimini insan eritrositlerinden saflaştırmışlar ve SOD'un optimum sıcaklığını 15 °C olarak bulmuşlardır.

Yeni pestisitler olan cyprodinil ve fludioxonil CAT enzimi ile muamele edilmiştir. Artan cyprodinil pestisit derişimi ile CAT enziminin aktivitesini kaybederek inhibisyona uğradığı saptanmıştır. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tüm test edilen etkileşim derişimlerinde CAT enzim aktivitesindeki inhibisyonların istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($P<0.05$, $n=3$). Cyprodinil'in 10, 50, 100, 250 ve 500 ppm etkisinde CAT enzim aktivitesindeki yüzde azalışların sırasıyla 45.4; 68.0; 73.0; 77.8 ve 77.4 olduğu hesaplanmıştır. 0, 50 ve 250 ppm cyprodinil için V_{max} (919 U/mg, 1263 U/mg ve 1405 U/mg) ve K_m ($1,35 \times 10^{-2}$ M, $2,50 \times 10^{-2}$ M ve $4,58 \times 10^{-2}$ M) değerleri hesaplanmıştır. Artan fludioxonil pestisit derişimi ile CAT enziminin aktivitesini kaybederek inhibisyona uğradığı saptanmıştır. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tüm test edilen etkileşim derişimlerinde CAT enzim aktivitesindeki inhibisyonların istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($P<0.05$, $n=3$). Fludioxonil'in 10, 50, 100, 250 ve 500 ppm etkisinde CAT enzim aktivitesindeki yüzde azalışların sırasıyla 20.0; 30.8; 42.8; 46.3 ve 45.9 olduğu hesaplanmıştır. 0, 50 ve 250 ppm fludioxonil için V_{max} (1356 U/mg, 740 U/mg ve 741 U/mg) ve K_m ($2,88 \times 10^{-2}$ M, $3,11 \times 10^{-2}$ M ve $4,85 \times 10^{-2}$ M) değerleri hesaplanmıştır. Bu doğrultuda yapılan diğer çalışmalarda ise;

Chaterjee ve vd., (1990), yaptıkları çalışmada keçi karaciğer CAT'ını alüminyumoksit, jelatin, poliakrilamid ve tavuk yumurtası kabuğuna immobilize etmişlerdir. Yumurta kabuğuna bağlanan CAT enziminin depolama sırasında daha kararlı olduğunu, H_2O_2 için daha yüksek afinite sergilediğini ve çözünür enzime kıyasla formaldehit ve sodyum azid inhibisyonuna karşı daha az hassas olduğunu rapor

etmişlerdir. İmmobilize CAT enziminin etkinliğinin fazla kayba uğramadan birkaç kez daha tekrar edilebilir olduğunu bildirmişlerdir. CAT örneklerinin başlangıç aktivitelerini alüminyumoksit, jelatin, poliakrilamid ve tavuk yumurtası kabuğuna immobilizasyonu sonunda sırasıyla %29,2, %65,7, %56,7 ve %17,2 oranlarında koruduğu ve K_m değerlerinin de sırasıyla 110 mM, 200 mM, 140 mM ve 200 mM olduğunu rapor etmişlerdir.

Çetinus ve vd., (2009), serbest CAT için V_{max} değerlerini sırasıyla 18450 U/mg prot., 4800 U/mg prot. ve 32000 U/mg prot. olarak bulmuşlardır. K_m değerlerini ise 53 mM, 18 mM ve 35 mM olarak rapor etmişlerdir.

Alkan ve vd., (2005), serbest CAT için V_{max} ve K_m değerini sırasıyla 65,78 μ M/dk. ve 13,90 mM olarak, immobilize CAT için ise 55,86 μ M/dk. ve 13,22 mM olarak rapor etmişlerdir.

Karadağ ve Bilgin (2010), saflaştırılmış SOD'u, 500 ppm cyprodinil ile muamele ettiklerinde aktivitesinin % 76,2'ye düştüğünü, aynı şekilde 500 ppm fludioxonil muamele ettiklerinde aktivitesinin % 40,7'ye düştüğünü gözlemlemişlerdir. Cyprodinil'in SOD'u yarışmalı (kompetitif), fludioxonil'in ise SOD'u yarışmasız (non-kompetitif) olarak inhibe ettiklerini bulmuşlardır.

Çalışmamızda kullandığımız pestisitlerden cyprodinilin CAT enzimini yarışmalı, fludioxonilin ise yarışmasız inhibisyona uğrattığı bulunmuştur. Bizim yaptığımız çalışmada pestisitler ile etkileştirilen CAT enziminin aktivitesinde azalma gözlenmiştir. Bu durum insan vücuduna giren pestisitlerin H_2O_2 'yi parçalayarak zararsız hale getiren CAT enziminin aktifliğini azalttığı ve vücuttaki H_2O_2 miktarının artması, buna bağlı olarak radikal oluşumunun artacağını işaret etmekte olduğu düşünülmektedir. Aşağıda bahsedilen çalışmalarda pestisitler ile muamele edilen CAT enziminin inhibisyona uğrayarak aktivitesinde azalma gözlendiği ve bu nedenle oksidatif stresin arttığını bildirilmişlerdir. Yapılan bu çalışmalar bu nedenle çalışmamızı desteklemektedir.

Li ve vd., (2010), bir fungusit olan propiconazolenün gökkuşağı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) 7, 20 ve 30 günlük sürelerde bu fungusitin antioksidant (SOD, CAT ve GPx) sistem üzerindeki ve oksidatif stres göstergeleri (LPO ve ROS) ölçülmüştür. Antioksidan savunma sistemi yedi günlük süre zarfında propiconazole fungusitin etkilerine adaptasyonla yanıt vermiş, 20 ve 30 günlük sürelerde antioksidan savunma sisteminde yer alan enzimlerin inhibisyona uğradığı ve oksidatif stres

göstergelerinin yüksek olduğu, uzun süreli maruziyetlerde ise ciddi biçimde oksidatif hasara yol açtığı rapor edilmiştir.

Wang ve vd., (2009) tarafından yapılan çalışmada kullanılan cypermethrin bir insektisit olup, erkek üreme organları üzerinde olumsuz etkileri olduğunu bildirmişlerdir. Cypermethrinin 35 gün boyunca üç doz (1,10 ve 20 mg/kg) olarak ya da E vitamini olmadan erkek farelerin testislerine uygulamışlardır. Farelerin testislerindeki antioksidan enzim olan CAT, SOD ve GPx aktivitelerinin azaldığı, sonuç olarak cypermethrin pestisitinin oksidatif stresi uyararak testisleri hasara uğrattığı ve sperm üretiminin azaldığını rapor etmişlerdir.

Fetoui ve vd., (2010), sentetik piretroid bir insektisit olan Lamda-Cyhalothrin (LTC)'in dünya çapında tarımda, ev haşerelerinin uzaklaştırılmasında ve gıda maddelerini hastalıklardan korumada kullanıldığını bildirmişlerdir. Bu çalışmanın amacının erkek farelerin böbreklerinde bulunan enzimlerin aktivitelerinin ve biyokimyasal parametrelerin LTC ile uyarılarak değiştirilmesi, oksidatif stresin artırılması ve oksidatif stresin artmasıyla ortaya çıkacak olumsuz etkilerin C vitamini kullanılarak azaltılmasını araştırılmışlardır. Çalışma sonucunda böbrek fonksiyonu, histopatoloji, doku malondialdehit (MDA), protein karbonil (PCO) düzeyleri, antioksidan enzim aktiviteleri ve indirgenmiş glutatyon (GSH) düzeyleri değerlendirilmiştir. CAT, SOD, GPx, glutatyon redüktaz (GR) ve glutatyon-S-transferaz (GST) aktivitelerinde anlamlı olarak düştüğü rapor edilmiştir.

Rehman ve vd. (2006), deltamethrin haşere kontrolünde yaygın olarak kullanılan bir α -siyano piretroid insektisit olduğunu, 15 gün süreyle 2 doz olarak vücut ağırlıklarına göre oral yolla 5.6 ve 18 mg/kg olacak şekilde deltamethrin verildiğini bildirmişlerdir. Sonuç olarak farelerin karaciğer ve böbreklerinde önemli antioksidan etkiye sahip olan GPx, GST ve CAT aktivitelerinin baskılandığını rapor etmişlerdir.

Çömelekoğlu ve vd. (2000), İçel ilinde tarım alanlarında çalışan ($16,52 \pm 6,92$ yıl) ve çalışmaları sırasında pestisitlerin zararlı etkisine maruz kalan tarım işçilerinden (n=40) kan örnekleri alıp bu örneklerden elde edilen eritrositlerde antioksidan savunma enzimleri olan SOD ve CAT enzimlerinin aktivitelerini spektrofotometrik olarak ölçtüklerini bildirmişlerdir. Aynı ölçümleri doğrudan pestisitlere maruz kalmayan kişilerde de yaptıklarını (n=30) ve tarım işçilerinde SOD düzeyini kontrol grubuna

kıyasla daha yüksek bulduklarını ($p<0,001$), CAT aktivitesinde de anlamlı bir azalma olduğunu rapor etmişlerdir ($p<0,001$).

Radice ve vd. (2001), yaptıkları çalışmada bir dikarboksimid fungusit olan iprodione'nin farklı konsantrasyonlarını gökkuşağı alabalığına (*Oncorhynchus mykiss*) uyguladıklarını, balık karaciğerinde iprodione'nin 0,3 ve 0,4 mM konsantrasyonlarında MDA ürününün ve reaktif oksijen türlerinin arttığını, GSH içeriğinin ve CAT aktivitesinin azaldığını rapor etmişlerdir.

Altuntaş ve vd. (2003), organofosfatlardan kaynaklanan reaktif oksijen türlerinin çeşitli pestisit toksitesine yol açabileceğini bildirmişlerdir. Çalışmalarında, organofosfat insektisit olan fosalon ile in vitro koşullarda çalışarak, antioksidan savunma sistemine ve lipid peroksidasyonuna (LPO) nasıl etki ettiğini araştırmışlardır. Bu doğrultuda fosalonun insektisitinin farklı dozlarını SOD, GPx, ve CAT aktivitelerini ve LPO faaliyetlerini nasıl etkilediğini çalışmışlardır. Hazırlanan her doz fosalonu, 0, 60, 180 dakika boyunca + 4 °C'de eritrosit numuneleriyle inkübe ettiklerini bildirmişlerdir. İnkübasyon sonunda fosalonun, SOD, GPx, CAT aktivitesinde azalmaya ve MDA oluşumunda da artışa neden olduğunu rapor etmişlerdir.

Toni ve vd. (2011), çalışmalarının amacının fungusit sınıfında olan tebuconazole'nun farklı konsantrasyonlarına maruz kalan sazan balıklarında (*Cyprinus carpio*) oksidatif stres ve metabolik değişikliklerin oluşumunu araştırmak olduğunu bildirmişlerdir. Çok sayıda parameter çalıştıklarını ve sazan balığı için hesaplanan öldürücü dozun (LC_{50-96} saat) 2,37 mg/L olduğunu kaydetmişlerdir. Sazan balığında tiyobarbitürik asit düzeyinin az miktarda arttığını, glukoz ve glikojenin arttığını, protein seviyesinin, CAT, SOD ve GST'nin azaldığını rapor etmişlerdir.

Karadağ ve Bilgin (2010), cyprodinilin SOD'u yarışmalı (kompetitif), fludioxonilin ise SOD'u yarışmasız (non-kompetitif) olarak inhibe ettiğini bulmuşlardır.

Yapılan çalışmamız ile uyumluluk göstermeyen başka çalışmalarda mevcut olup bunlar;

Uçar ve vd. (2012), yaptıkları çalışmada tarımsal üretimde sıkça kullanılan bir fungusit olan karboksin pestisitinin gökkuşağı alabalıklarındaki (*Oncorhynchus mykiss*) antioksidan savunma sistemi üzerine etkisinin araştırılmasını amaçlamışlardır. 7 gün boyunca balıklar toksik etkisi olan bu bileşiğin 3,85 ppm derişimine maruz bırakmışlardır. Balıkların karaciğerlerden alınan kesitlerde bir antioksidan olan SOD

enziminin ölçümünü yapmışlardır. Yapılan ölçümler sonucunda karboksine pestisitine maruz kalan gökkuşuğu alabalıklarının karaciğer örneklerinde SOD aktivitesinin önemli oranda ($p < 0.01$) arttığını ve bu tür alabalıklarda oksidatif strese neden olduğunu rapor etmişlerdir.

Sayeed ve vd. (2003), yaptıkları çalışmada kullandıkları deltametrin pretroid sınıfına dahil bir böcek öldürücü olduğunu, çevre şartlarında düşük seviyelerde kalıntı bıraktığını, düşük toksisiteye sahip olduğunu bu nedenle de haşere kontrol programlarında organoklorlu ve organofosforlu pestisitlerin yerine tercih edildiğini bildirmişlerdir. Standart laboratuvar koşullarında bir tatlı su balığı olan yeşil yılanbaş (*Channa punctatus*) balıkları ile yaptıkları çalışmalarında balıktaki antioksidan sistem üzerine deltametrinin ($0,75 \mu\text{g/L}$) etkisini araştırmışlardır. 48 saat boyunca deltametrine maruz kalan balıkların böbrek ve karaciğerlerindeki enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların indüklendiğini belirtmişlerdir. Deltametrinin tüm böbrek ve karaciğer dokularında CAT enziminin aktivitesini artırdığını rapor etmişlerdir.

Sharma ve vd. (2005), organofosforlu bir pestisit olan dimethoatein bitkileri çeşitli zararlılardan korumak için kullanıldığını bildirmişlerdir. Çalışmalarında kullandıkları dimethoateinin serbest radikallerin oluşmasını ve antioksidan enzimlerin indüklenmesine yol açan oksidatif stresi oluşturmasındaki rolünü anlamak için yaptıklarını bildirmişlerdir. Bu çalışmayı sıçanlar üzerinde yapmışlardır. Bazı dozlarda, sıçan beyin ve karaciğerinde oksidatif stresi artırıcı etkisi görüldüğü gibi sitokrom P-450, LPO, CAT, SOD, GPx ve GR aktivitesinin arttığını ve antioksidant sistemdeki bozuklukların LPO'ya neden olduğunu rapor etmişlerdir.

Özdem ve vd. (2000), domatesleri sprey kullanarak 1, 10, 20 ppm konsantrasyonlarında hazırladıkları 4-klorofenoksiasetik asit ile yıkadıklarını, 1 ve 10 ppm 4-klorofenoksiasetik asit yıkadıkları domates homojenatlarını 1 ml/100 g vücut ağırlığı dozunda farelere şırınga ettiklerini ve fare antioksidan enzimlerinde belirgin bir değişme görmediklerini bildirmişlerdir. 20 ppm 4-klorofenoksiasetik asit yıkadıkları domates homojenatlarını aynı dozda verdiklerinde, CAT aktivitesinde artma ($p < 0,05$), selenyum bağlı GPx aktivitesinde azalma ($p < 0,05$), glukoz-6-fosfat dehidrojenaz ve Cu-Zn SOD aktivitesinde belirgin bir değişme gözlemediklerini rapor etmişlerdir.

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

4.1. Sonuçlar

Yapılan deneyler sonucunda aşağıdaki sonuçlar bulunmuştur.

- 1) CAT için optimum sıcaklık 35°C (308 K) olarak bulunmuştur.
- 2) 0' dan 500 ppm'e kadar artan Cyprodinil derişimleri ile etkileştirilen CAT enziminin aktivitesinde azalma gözlenmiştir.
- 3) Cyprodinil'in CAT'ı yarışmalı (kompetitif) olarak inhibe ettiği bulunmuştur.
- 4) 0'dan 500 ppm'e kadar artan Fludioxonil derişimleri ile etkileştirilen CAT enziminin aktivitesinde azalma gözlenmiştir.
- 5) Fludioxonil'in CAT'ı yarışmasız (non-kompetitif) olarak inhibe ettiği bulunmuştur.
- 6) Cyprodinilin fludioxonile oranla CAT enziminin aktivitesini daha fazla azalttığı anlaşılmıştır.

4.2. Öneriler

- 1) CAT ile başka pestisitler etkileştirilebilir.
- 2) Cyprodinil ve fludioxonil ile başka enzimler etkileştirilebilir.
- 3) Sığır karaciğerinden elde edilen CAT enzimi yerine başka kaynaklardan elde edilen CAT enzimi kullanılabilir.
- 4) CAT'ı başka hangi inhibitörlerin inhibe ettiği araştırılabilir.

KAYNAKLAR

- Abhilash, P.C. and Nandita, S. (2009). Pesticide use and application: An Indian scenario, *Journal of Hazardous Materials*, 165: 1–12.
- Ackerman, P., Knauf-Beiter, G. and Zeun, R. (2007). Chemistry and biology of fludioxonil, fenpiclonil and quinoxyfen, In: Kramer, W. and Schirmer, U. Eds., *Modern Crop Protection Compounds*, Wiley-VCH Verlag, GmbH and Co. KGaA, Weinheim, 2: 468-580.
- Aebi, H., Wyss, S. R., Scherz, B. and Skvaril, F. (1974). Heterogeneity of Erythrocyte Catalase II, *Eur. J. Biochem.*, (48): 137-145 .
- Ahmad, S., Anwar, A. and Saleemuddin, M. (2001). Immobilization and stabilization of invertase on *Cajanus cajan* lectin support. *BIORES TECH*, 79(2): 121-127.
- Akdoğan, A. (2011). Bazı Pestisitlerin Kromatografik Ayrılmaları ve Tayinleri, Doktora Tezi, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Akkuş., İ. (1995). Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, Sağlık Dizisi 5, Mimoza Basım Yayım Dağıtım, Konya.
- Aksoy, M., (2008). Beslenme Biyokimyası, 2. Baskı, Hatipoğlu Yayınları, Ankara.
- Alkan, S., Ceylan, H., Arslan, O., 2005. Bentonite-support Catalase. *Journal of Serbian Chemical Society*, 70(5): 721-726.
- Altuntaş, I., Delibaş, N., Doğuç, D. K., Ozmen, S., Gultekin, F. (2003). Role Of Reactive Oxygen Species In Organophosphate Insecticide Phosalone Toxicity In Erythrocytes In Vitro, *Toxicology In Vitro*, 17: 153–157.
- Anderson, L.A. and Dawson, J.H. (1991). EXAFS Spectroscopy of Heme containing Oxygenases and Peroxidases, *Structure and Bonding*, 64: 1- 40.
- Atalay, T. (2005). Kimyasal Kinetik, 1. Baskı, Nobel Yayınları, Ankara.
- Chatterjee, U., Kumar, A., Sanwal, G.G. (1990). Goat Liver Catalase Immobilization on Various Solid Supports. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 70: 429-430.

- Chaudière, J., and Ferrari-Iliou, R. (1999). Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms, *F*, 37(9-10): 949-62.
- Chelikani, P. V. G. B. K. (2004). Probing the Structure of *Escherichia coli* Catalase HPII, Doktora Tezi, Manitoba Üniversitesi, Manitoba.
- Courderchet, M. (2003). Benefits and problems of fungicides control of *Botrytis cinerea* invine yards of champagne. *Vitis*, 42: 165-171.
- Çetinus, Ş.A., Şahin, E., Saraydın, D., (2009). Preparation of Cu (II) Adsorbed Chitosan Beads for Catalase Immobilization, *Food Chemistry*, 114: 962-969.
- Çimen, Ç., Öter Ç., Demir, H. ve Savran A. (2005). Rat Eritrositlerinden Elde Edilen Katalaz Enziminin Karakterizasyonu ve Kinetiğinin incelenmesi. Yüzüncü Yıl Üniv., Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü, VAN YYÜ Vet. Fak. Derg., 16 (1): 15-20.
- Çömelekoğlu, Ü., Mazmancı, B., Arpacı, A. (2000). Erythrocyte Superoxide Dismutase And Catalase Activities In Agriculture Workers Who Have Been Chronically Exposed To Pesticides. *Turk J Biol* 24: 483–488.
- Dec, J., Haider, K., Benesi, A, Rangaswamy, V., Schaffer, A., Plucken, U. and Bollag, J.M. (1997a). Analysis of soil-boundresidues of the ¹³C-labeled fungicide cyprodinil by NMR spectroscopy, *Environ Sci Technol.*, 31: (11) 28–35.
- Dec, J., Haider, K., Rangaswamy, V., Schaffer, A., Fernandes, E. and Bollag, J.M. (1997b). Formation of soil-boundresidues of cyprodinil and their plant uptake. *J. Food Agric Chem.*, 45: 514–20.
- EFSA, (2011). The 2009 EuropeanUnionreport on pesticide residues in food. *EFSA J* 9, 225.
- Ersoy N., Tatlı Ö., Özcan S., Evcil E., Coşkun, Ş. L., Erdoğan E. ve Keskin G. (2011). Üzüm ve Çilekteki Pestisit Kalıntılarının LC-MS/MS ve GC-MS ile Belirlenmesi. *Selçuk Üniversitesi Selçuk Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 25 (2):70-80.
- Esteve-Turrillas, F. A., Agullo, C., Abad-Fuentes, A., Abad-Somovilla, A., Mercader, J.V. (2012). Immuno reagent generation and competitive assay development for cyprodinil analysis, *J. Agric. Food Chem.*, (60): 4803–4811.
- Fang, C. C., Chen, F. Y., Chen, C. R., Liu, C. C., Wong, L. C., Liu, Y. W. and Su J. G. J. (2012). Cyprodinil as an activator of aryl hydrocarbon receptor, *S Toxicology*, 304: 32– 40.

- Fetoui, H., Makni, M., Garoui, E.M. and Zeghal, N. (2010) . Toxic Effects of Lambda-Cyhalothrin, A Synthetic Pyrethroid Pesticide, on The Rat Kidney: Involvement of Oxidative Stress and Protective Role of Ascorbic Acid. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 62 (6): 593-599.
- Fritz, R., Lanen, C., Chapeland-Leclerc, F. and Leroux, P. (2003). Effect of the anilino pyrimidine fungicides pyrimethanil on the cystathionine beta-lyase of *Botrytis cinerea*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, (77): 54–65.
- Gasztonyi, M. and Lyr, H. (1995). Miscellaneous fungicides, In: Lyr, H. ed., *Modern Selective Fungicides-Properties, Applications, Mechanisms of Action*, 2nd Edition, Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart and New York, 389-414.
- Gonçalves, V. M., Cezar de Cerqueira Leite, Luciana., and Cabrera-Crespo, I. R. J. (1999). Purification of catalase from human placenta *Biotechnol. Appl. Biochem.*, (Printed in Great Britain) 29: 73–77
- Gözükara, E.M., (2011). *Biyokimya*, 5. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
- Harte, J., Holdren, C., Schneider, C., and Shirley, C. (1991). *Toxics A to Z, A Guide to Everyday Pollution Hazards*, University of California Pres.
- Juan, E. P., Grande, B. C., Otero, R. R., Ga'ndara, J. S. (2005). The dissipation rates of cyprodinil, fludioxonil, procymidone and vinclozoline during storage of grapejuice. *Food Control*, 17 (2006): 1012–1017.
- Kanetis, L., Forster, H., Jones, C. A., Borkovich, K. A. and Adaskaveg, J. E. (2008). Characterization of genetic and biochemical mechanisms of fludioxonil and pyrimethanil resistance in field isolates of *Penicillium digitatum*, *Phytopathology*, (98): 205–214.
- Kanetis, L., Forster, H. and Adaskaveg, J. E. (2006). Fludioxonil-resistant isolates of *Penicillium digitatum* Show diverse fitness and norelation ship osmotics tress regulation, *Phytopathology*, (Supplement) (96): 58.
- Kang, K. H., Dec, J., Park, H. and Bollag, J. M. (2002). Transformation of the fungicide cyprodinil by a laccase of *trametes villosa* in the presence of phenolic mediators and humic acid, *Water Research*, 36: 4907–4915.
- Karadağ, H. (2007). Süperoksit dizmutaz enziminin insan eritrositlerinden saflaştırılması ve bazı pestisitlerin enzim aktivitesi üzerine etkisi, Doktora tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 21.

- Karadağ, H., Bilgin, R. (2010). Effects of Cyprodinil and Fludioxonil Pesticides on Human Superoxide Dismutase. *As. J of Chem.* 22: 8147-8154.
- Keha, E. E., Küfrevioğlu Ö. İ., (2000). *Biyokimya*, 2. Baskı, Aktif Yayınevi, İstanbul.
- Kojima, K., Bahn, Y.S. and Heitman, J. (2006). Calcineurin, Mpk1 and Hog1 MAPK pathways independently control fludioxonil anti fungal sensitivity in *Cryptococcus neoformans*, *Microbiology* 152: 591–604.
- Lartillot, S., Kadziora, P., Athios, A. (1988). Purification and Characterization of New Fungal Catalase. *Preparative Biochemistry*, 18 (3): 241-246.
- Leroux, P., Delen, N., Elad, Y., Tudzynski, P., Williamson, P. (2007). Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides. *Botrytis: Biology and control*, Kluwer Academic Publishers London, 195-222.
- Li, B., Stribley, J.A., Ticu, A., Xie, W., Schopfer, L.M., Hammond, P., Brimijoin, S., Hinrichs, S.H. and Lockridge, O. (2010). Abundant Tissue Butyryl cholinesterase and Its Possible Function in The Acetyl cholinesterase Knockout Mouse. *J. Neurochem* 75: 1320–1331.
- Lowry, O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Rondall, R. J. (1951). Protein Measurement With The Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:261-275.
- Ma, Z.H. and Ye, Z.Y. (1997). The new target fungicide-pyrimidine amines. *World Pestic.*, (03): 12–13.
- Masner, P., Muster, P. and Schmid, J. (1997). Possible methionine biosynthesis inhibition by pyrimidine amine fungicides, *Pestic. Sci.*, (42): 163–166.
- Mindt, G. (1997). Novartiswill Cyprodinil in Deutschlande in führen. *Anwendung in Getreide Gemüse, Obstund Wein, Gesunde Pflanzen*,(49): 193–198.
- Müller, T., Thanei, P., Mücke, W., Kriemler, H.P. and Winkler, T. (1999). The sex-specific sulfatation of the major metabolite of the novel fungicide cyprodinil in the rat. *Pestic. Sci.*, (55): 566–614.
- Nancy, J., Brown-Peterson., Salin, M. L. (1995). Purification and Characterization of a Mesohalic Catalase from the Halophilic Bacterium *Halo bacterium halobium* (177), No. 2 *Journal of Bacteriology*, Jan., 378–384.

- Nelson, D. L., Cox, M. M. (2005). *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri* (çeviri: Kılıç N.), 3. Baskı, Palme Yayınları, Ankara.
- Orton, F., Rosivatz, E., Scholze, M., and Kortenkamp, A. (2011). Widely used pesticides with previously unknown endocrine activity revealed as in vitro antiandrogens, *Environ, Health Perspec.*, 119:794–800.
- Özdem, S., Özdem, S.S., Alıçgüzel, Y. (2000). The Effects Of 4-Chlorophenoxyacetic Acid-Raised Tomato Homogenate On Rat Erythrocyte Antioxidant Enzymes. *Pesticide Biochemistry And Physiology*, 67: 134–136.
- Pamuk, F. (2000). *Biyokimya*, 1. Baskı, Gazi Kitabevi, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi, Ankara.
- Petit, A. N., Vaillant-Gaveau, N., Walker A. S., Leroux, Baillieul, P. F., Panon, M. L., Clément, C. and Fontaine, F. (2011). Effects of fludioxonil on *Botrytis cinerea* and on grapevine defence response. *Phytopathol. Mediterr*, 50: 130–138.
- Radice, S., Ferraris M., Marabini L., Grande, S., Chiesara, E. (2001). Effect of iprodione, a dicarboximide fungicide, on primary cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes, *Aquatic Toxicology*, 54: 51–58.
- Rehman, H., Ali, M., Atif, F., Kaur, M., Bhatia, K. and Raisuddin, S. (2006). The Modulatory Effect of Deltamethrin on Antioxidants in Mice. *Clinica Chimica Acta*, 369:61-65.
- Richard, C., Halle, A., Brahmia, O., Malouki, M., and Halladja, S. (2007). Auto-remediation of surface waters by solar-light: Photolysis of 1-naphthol, and two herbicides in pure and synthetic waters, *Catalysis Today*, 124, 82-87.
- Sayeed, I., Parvez, S., Pandey, S., Bin-Hafeez, B., Haque, R., Raisuddin, S. (2003). Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56: 295–301.
- Schocken, M. J., Mao, J. and Schabacker, D. J. (1997). Microbial transformations of the fungicide cyprodinil (CGA-219417), *J Agric Food Chem*, 45:(36) 47–51.
- Sharma, Y., Bashir, S., Irshad, M., Nag, T. C. and Dogra, T. D. (2005). Dimehoate-Induced Effects on Antioxidant Status of Liver and Brain of Rats Following Subchronic Exposure, *Toxicology*, 215: 173-181.

- Thomson, T. H. (1997). Agricultural Chemicals, Book IV, Fungicides, Thomson Publications, Fresno, CA., USA.
- Tiryaki, O., Canhilal R., ve Horuz S. (2010). Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 26 (2): 154-169.
- Toni, C., Ferreira D., Kreutz L. C., Loro, V. L., Barcellos, L. J. G. (2011). Assessment of oxidative stress and metabolic changes in common carp (*Cyprinus carpio*) acutely exposed to different concentrations of the fungicide tebuconazole, Chemosphere, 83: 579–584.
- Tukel, S.S., Alptekin, O. (2004). Immobilization and kinetics of catalase onto magnesium silicate, Process Biochemistry, 39 (2004): 2149–2155.
- Uçan, H. N., Dursun, S., Gür, K., Aktümsek, A. (2009). Organochlorine Pesticide Residue Analyses in Some Fruit Samples Collected from Konya City Supermarkets, Asian Journal of Chemistry, 21 (6): 4843-4855.
- Uçar, A., AL – Hamdani, A. H. A., Alak, G., Atamanalp, M., Topal, A., Arslan, H., Parlak, V., Fakıoğlu ve Ö., Şensurat, T. (2012). Karboksın' in Gökkuşuğu Alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*)'nda Süperoksit dismutaz Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi, Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi 5 (2): 83-85.
- Vasudevan, P. T., Weiland, R.H. (1994). Studies on the Morphology of Immobilized Catalase, The Chemical Engineering Journal, 55:B41-B45.
- Vural, N. (2005). Toksikoloji, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara s. 344-379.
- Wang, X.Z., Liu, S.S., Sun, Y., Wu, J.Y., Zhou, Y.L. and Zhang, J.H. (2009). Beta-Cypermethrin Impairs Reproductive Function in Male Mice by Inducing Oxidative Stress Theriogenology 72 : 599–611.
- World Health Organization (WHO) (2009). The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification, Germany.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Fadil ÖZHAN
Doğum Yeri : Eruh
Doğum Tarihi : 01.07.1980
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dili : İngilizce (Orta Seviye)

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Sunar Nuri Çomu Lisesi Adana - 1998
Lisans : Çanakkale Onsekiz Mart Ünv. Fen Edebiyat Fakültesi
Kimya Bölümü. 2009
Yüksek Lisans : Adıyaman Üniversitesi – Fen Bilimleri Enstitüsü.

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

2007 yılının Şubat ayından bu yana Adıyaman Üniversitesinde çalışmaktayım.
Adıyaman Üniversitesinde Tıp Fakültesi Dekanlığı-Tıbbi Genetik Tanı Merkezinde çalışmaktayım.