ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KOMPOST SOLUCANINDAN GLUKOZ–6-FOSFAT DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE BAZI TOPRAK KİRLETİCİLERİN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Naciye KAYHAN

KİMYA ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2019

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

NACİYE KAYHAN tarafından hazırlanan "KOMPOST SOLUCANINDAN GLUKOZ–6-FOSFAT DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE BAZI TOPRAK KİRLETİCİLERİN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ" adlı tez çalışması …….tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Şevki ADEM

Jüri Üyeleri :

Başkan:

Üye:

Üye:

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Doç. Dr. Tamer KEÇELİ

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KOMPOST SOLUCANINDAN GLUKOZ–6-FOSFAT DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE BAZI TOPRAK KİRLETİCİLERİN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Naciye KAYHAN

Çankırı Karatekin Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Şevki ADEM

Sunulan bu tez kapsamında, kompost solucanından glukoz–6-fosfat dehidrogenaz enziminin saflaştırılmıştır. optimum pH, optimum iyonik şiddet, optimum aktivite gösterdiği sıcaklık, K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi, stabil pH, ürün inhibisyonu gibi biyokimyasal karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Ayrıca oxamyl, carbaryl, diniconazole, metalaxyl, methomyl, carbofuran, simazine, tebuconazol, atrazine, propoxur, 1- naphthol, 2,4 – D gibi pestisitlerinin ve $Pb(NO_3)_2$, $Cr(NO_3)_2$, $HgCI_2$, $FeSO_4$, $Ni(NO_3)_2$, $Cd(NO_3)_2$, $Co(NO_3)_2$, $AI(NO_3)_3$ metal iyonlarının *Eisenia Fetida* saflaştırılan glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminin aktivitesi üzerinde etkilerini araştırdık. Oxamyl, carboryl, diniconazole, metalaxyl, methomyl 7,6-77,12 μM arasında IC_{50} değerleri ile inhibisyon etkisi gösterdi. $Pb(NO_3)_2$, $Cr(NO_3)_2$, $HgCI_2$, $FeSO_4$, ve $Ni(NO_3)_2$ 56-120 μM aralığında IC_{50} değerleri ile inhibisyon etkisi göstermiştir. Yapılan çalışmalarda inhibisyon etkisi gösteren bileşikler için K_I sabitlerine Cheng-Prusoff denklemiyle hesaplanmıştır.

2019, 58 sayfa

Anahtar Kelimeler: glukoz–6-fosfat dehidrogenaz, saflaştırma, karakterizasyon inhibisyon, pestisit, metal iyonu

ABSTRACT

MSc. Thesis

PURIFICATION, CHARACTERIZATION OF THE GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE ENZYME FROM THE COMPOST SOLUTION AND THE INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF SOME SOIL POLLUTERS

Naciye KAYHAN

Cankırı Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Şevki ADEM

Within the scope of this thesis, the glucose-6-phosphate dehydrogenase enzyme from the compost worm was purified. Biochemical characterization studies of the enzyme such as optimum pH, optimum ionic intensity, optimum activity display temperature, content of K_M and V_{max}, stable pH, product inhibition were determined. Also, the effects of pesticides such as oxamyl, carbaryl, dinaconazole, metalaxyl, methomyl, carbofuran, simazine, tebuconazole, atrazine, propoxur, 1- naphthol, 2,4-D and metal ions such as $Pb(NO_3)_2$, $Cr(NO_3)_2$, $HgC1_2$, $FeS0_4$, $Ni(NO_3)_2$, $Cd(NO_3)_2$, $Co(NO_3)_2$, $AI(NO_3)_3$ on the activity of *Eisenia Fetida* glucose-6-phosphate dehydrogenase activity were investigated. Oxamyl, carboryl, dinaconazole, metalaxyl, metomil show inhibition with IC_{50} vaules between 7,6-77,12 μM. $Pb(NO_3)_2$, $Cr(NO_3)_2$, $HgCl_2$, $FeSO_4$, $Ni(NO_3)_2$ in inhibition with IC50 in 56-120 μM. In conducted study, K_i constants for substances exhibited inhibition effect was calculated by using the Cheng-Prusoff equation.

2019, 58 page

Key Words: glucose - 6-phosphate dehydrogenase, purification, characterization inhibition, pesticide, metal ion

ÖNSÖZ

Toprak tartışmasız en büyük besin kaynağımızdır. Sanayileşmenin hızla artması, nüfus popülasyonun artışı toprak kirliliğine neden olmaktadır. Bu kirleticiler çevremizde yaşayan canlılarında hayatını ve hayat kalitelerini önemli boyutlarda tehdit etmektedir. Ancak toprağın verimini içindeki canlıların toprağa olan katkısıyla artmakta ve canlılığın devamı oranında kalitesi de artmaktadır. Kompost solucanı da toprak biyosisteminin önemli bir parçası olup, toprak verimliliğine önemli katkı sağlamaktadır.

Bu çalışmada, bir kompost solucanı olan *Eisenia Fetida* (Savingy, 1826) glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminin kolon kromatografisi ile saflaştırılması amaçlanmaktadır. Enzimlerin saflıkları SDS-PAGE ile kontrol edilmiştir. Saflaştırılmış enzimin hangi pH'da optimum aktivite gösterdiği, tuz konsantrasyonunun enzim aktivitesini nasıl etkilediği, enzimin substrat ve koenzime karşı ilgisi, reaksiyon ürünlerinin enzim aktivitesini hangi düzeylerde ve hangi yöntemle etkilediği, enzim aktivitesinin sıcaklık karşısında nasıl bir değişim gösterdiğinin belirlenmesi çalışmaları tez kapsamında yapılmıştır.

Ayrıca önemli toprak kirleticilerinden olan pestisit ve metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerinde etkisi araştırılmıştır.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca, tüm bilgi ve birikimiyle yanımda olan benden desteğini esirgemeyen tez yazımında büyük yardımlarını gördüğüm değerli danışman hocam Doç. Dr. Şevki ADEM' e,

Kendisinin tüm laboratuvar imkanlarından yararlanmamı sağlayan sayın Doç. Dr. Volkan EYÜPOĞLU' na,

SDS-Page çalışmalarında değerli zamanından bana vakit ayırıp yardımlarını esirgemeyen sayın Doç. Dr. Sezer OKAY' a,

Kendi çalışmaları olmasına rağmen, tez çalışmalarım boyunca beni motive eden, deneyimlerinden faydalandığım sevgili hocalarım Arş. Gör. Serkan KOLDAŞ, Uzm. Ali Rıza TÜFEKÇİ ve Uzm. Fatih GÜL' e,

Laboratuvar çalışmalarım süresince yardımını ve desteğini esirgemeyen çalışma arkadaşım Çağlar GÜLER' e,

İyi günümde kötü günümde maddi manevi hiçbir desteğini benden esirgemeyen beni hayata en iyi şekilde hazırlayan bana zorluklardan kaçmayı değil onlarla savaşmayı öğreten, geleceğe güvenle bakmamı sağlayan aileme;

Teşekkürü borç bilirim.

Bu çalışma Çankırı Karatekin Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü Araştırma Laboratuvarında yapılmıştır. Çalışmalara desteklerinden dolayı bölüm çalışanlarına teşekkür ederim.

Bu çalışmanın bir kısmı Çankırı Karatekin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje no: FF200217B42)

Naciye KAYHAN

ÇANKIRI, Mart 2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
ÖNSÖZ ..... **iii**
TEŞEKKÜR ..... **iv**
SİMGELER DİZİNİ ..... **vi**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **vii**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **viii**
1. GİRİŞ **1**
1.1. GENEL BİLGİLER **2**
1.1.1. Enzim ile ilgili bilgiler **2**
1.1.1. Enzimlerin sınıflandırılması **4**
1.1.2. Enzim aktivitesini etkileyen faktörler **6**
1.1.3. Pentoz Fosfat Yolu ve Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz **8**
1.1.4. Pestisitlerin insan ve çevre üzerine etkileri **12**
1.1.5. Toprak kirliliği ve bazı ağır metaller **14**
2. LİTERATÜR ÖZETİ **20**
3. GEREÇ VE YÖNTEM **23**
3.1. Gereç **23**
3.1.1. Kullanılan maddeler **23**
3.2.1. Yararlanılan alet ve cihazlar **24**
3.2.2. Kullanılan çözelti ve kimyasalların hazırlanışı **24**
3.2. Yöntem **30**
3.2.1. Enzim saflaştırılması çalışmaları **30**
3.2.2. SDS- Poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının belirlenmesi **31**
3.2.3. Enzim aktivitelerinin ölçülmesi **32**
3.2.4. Enzim karakterizasyon çalışmaları **33**
3.2.5. Kantitatif protein tayini **34**
3.2.6. Enzimin K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi **35**
3.2.7. Pestisitlerin ve metal iyonlarının *in vitro* etkilerinin belirlenmesi **35**
4. BULGULAR **37**
5. TARTIŞMA ve SONUÇ **50**
KAYNAKLAR **53**
ÖZGEÇMİŞ **57**

SİMGELER DİZİNİ

mM	Milimolar
μM	Mikromolar
gr	Gram
mL	Mililitre
mg	Miligram
%	Yüzde
EÜ	Enzim Ünitesi
ATP	Adenin tri fosfat
ADP	Adenin di fosfat
ES	Enzim substrat kompleksi
GSH	İndirgenmiş Glutatyon
Ki	İnhibisyon katsayısı
Km	Enzimin aktif bölgelerinin yarısının dolduğu substrat konsantrasyonu
Vmax	Maksimum hız
G6PD	Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz
6PGD	6-Fosfoglukonat dehidrogenaz
$NADP^+$	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (okside form)
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
IC_{50}	Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
BSA	Bovin serum albümin
DTT	Dityotretiol
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilendiamin
Tris	Trihidroksimetil amino metan
KH_2PO_4	Potasyum Fosfat

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Pentoz fosfat yolunda gerçekleşen reaksiyonları.....9
Şekil 1.2. G6PD ve 6PGD enzimlerinin katalizlediği reaksiyon.....10
Şekil 2.1. Pestisit döngüsü(Tiryaki and Potur, 2017).....20
Şekil 2.2. Enzimin aktif bölgesine ağır metal bağlanması.....21
Şekil 4.1. Kantitatif protein tayininde kullanılan standart grafik.....37
Şekil 4.2 Solucan G6PD enziminin 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi ile saflaştırılması grafiği.....38
Şekil 4.3. Solucan saflaştırılan G6PD enziminin SDS-PAGE fotoğrafı.....39
Şekil 4.4. Enziminin optimum pH'sının belirlenmesine yönelik aktivite ölçümlerinin sonucunu gösteren grafik.....40
Şekil 4.5. Enzimin optimum tuz konsantrasyonun belirlenmesi amacıyla çizilen grafik.....40
Şekil 4.6. Enzimin sıcaklık aktivitesinin belirlenmesi amacıyla çizilen grafik.....41
Şekil 4.7. Enzimin stabil sıcaklık belirlenmesi için çizilen grafik.....41
Şekil 4.8. Solucan G6PD enziminin K_M ve V_{max} değerlerini bulmak için 5 farklı G6P derişimi kullanılarak çizilen grafik.....42
Şekil 4.9. Solucan G6PD enziminin K_M ve V_{max} değerlerini bulmak için 5 farklı $NADP^+$ derişimi kullanılarak çizilen grafik.....43
Şekil 4.10. Solucan G6PD enzimi üzerine Oxamylın % aktivite-[I] grafiği.....44
Şekil 4.11. Solucan G6PD enzimi üzerine Carborylın % aktivite-[I] grafiği.....45
Şekil 4.12. Solucan G6PD enzimi üzerine Diniconazolenin % aktivite-[I] grafiği.....45
Şekil 4.13. Solucan G6PD enzimi üzerine Metalaxylin % aktivite-[I] grafiği.....46
Şekil 4.14. Solucan G6PD enzimi üzerine Metomylin % aktivite-[I] grafiği.....46
Şekil 4.15. Solucan G6PD enzimi üzerine kurşunun % aktivite-[I] grafiği.....47
Şekil 4.16. Solucan G6PD enzimi üzerine krom % aktivite-[I] grafiği.....47
Şekil 4.17. Solucan G6PD enzimi üzerine civanın % aktivite-[I] grafiği.....48
Şekil 4.18. Solucan G6PD enzimi üzerine demirin % aktivite-[I] grafiği.....48
Şekil 4.19. Solucan G6PD enzimi üzerine nikelin % aktivite-[I] grafiği.....49

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Bazı enzimlerin optimum pH'sı 7
Çizelge 3.1. G6PD enziminin aktivite ölçüm küveti içeriği 32
Çizelge 3.2. Pestisitlerin çalışılan konsantrasyonu 35
Çizelge 3.3. Metallerin çalışılan konsantrasyonu 36
Çizelge 4.1. Solucan G6PD enziminin saflaştırılması basamakları 38
Çizelge 4.2. G6PD enziminin optimum şartlarının belirlenmesine yönelik çalışmaların sonuçları 41
Çizelge 4.3. Solucan G6PD enziminin subsratları için bulunan K_M ve V_{max} değerleri . 42
Çizelge 4.4. Pestisitlerin enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon değerleri 44
Çizelge 4.5. Metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon değerleri 44

1. GİRİŞ

Sanayileşmenin hızla artması ve nüfus popülasyonun artması günümüzde çevre kirliliğine neden olmaktadır. Bu kirlilik dolaylı olarak her bir canlıyı etkilemektedir. Çevre kirliliği hem toprak, hem hava, hem de su kirliliği olarak doğada meydana gelmektedir. Ancak son zamanlarda toprak kirliliği küresel bir sorun haline gelmektedir. Bu sorunun genellikle tarımda etkisini büyük bir oranda göstermektedir. Oysa ki toprak insanlar için önemli bir besin kaynaklarından biridir. Başlıca toprak kirleticileri, ağır metaller, pestisitler, organik bileşikler ve radyoaktif hidrokarbon yanma ürünleri tarafından oluşturulduğu bilim adamları tarafından bildirilmektedir. Ağır metaller, pestisitler ve diğer kirleticilerle kirletilmiş topraklarda tarımsal verimlilikte meydana getirdiği düşüklüğü ve beslenmedeki olumsuz etkileri birlikte düşünüldüğünde tüm canlı sistemlerini etkilediği gerçeği ortaya çıkmaktadır. Bu kirleticiler çevremizde yaşayan canlılarında hayatını ve hayat kalitelerini önemli oranda tehdit etmektedir. Toprağın verimliliğini içindeki canlıların toprağa olan katkısı ile artmakta ve canlılığın devamı oranında kalitesi de artmaktadır. Kompost solucanı toprak biyosisteminin önemli bir parçasıdır. Onun hayatını tehdit eden etmenler toprağı da etkilemekte ve toprağın verimini düşürmektedir.

Pentoz fosfat yolunun ilk enzimi olan glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (EC 1.1.1.49; G6PD) $NADP^+$ varlığında glukoz 6-fosfat bileşiğini, 6-fosfoglukonata bileşiğine dönüştürür. Reaksiyon sonucu birçok biyokimyasal reaksiyonda indirgeyici güç olarak kullanılan NADPH oluşur. Oluşan NADPH hücre içinde antioksidan metabolizmasından, yağların sentezine kadar birçok metabolik proseste görev almaktadır. Bu nedenle glukoz 6-fosfat dehidrogenaz metabolik olarak önemli bir yere sahiptir (Stanton, 2012).

Birçok araştırmacı pestisit ve metal iyonlarının farklı canlılardan saflaştırılan enzimler üzerinde etkisini araştırmıştır ve olumlu ya da olumsuz etkilerini rapor etmiştir. Bu çalışmada kompost solucanı olan *Eisenia Fetida* pentoz fosfat yolunun ilk enzimi glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzimin saflaştırılması, karakterizasyonu ve saflaştırılan enzimin bazı metal iyonları ve pestisitler üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

1.1. GENEL BİLGİLER

1.1.1. Enzim ile ilgili bilgiler

Enzimler makromoleküllü biyolojik katalizörlerdir. Kimyasal katalizörler gibi reaksiyonu hızlandıran moleküllerdir. Genel olarak enzimler belirli maddeler arasındaki belirli reaksiyonları katalize ederler. Hücrelerde organik maddelerin yapılması ve yıkılması sindirim kas kasılması hücre solunumu gibi önemli faaliyetler çeşitli metabolizma reaksiyonlarının sonucudur ve bu reaksiyonlar enzimlerin kataliz etkisiyle mümkün olmaktadır. Enzimlerin kimyasal katalizörlerden en önemli farkı özgül(spesifik)olmalıdır.

Canlıları oluşturan moleküller, yani biyomoleküller kinetik yönden oldukça kararlı olup, kendiliğinden kolayca reaksiyon vermezler. Bir hücredeki tüm kimyasal olaylar enzimler aracılığıyla gerçekleştirilir. Biyomoleküllerin kararlılığı şu önemli sonucu sağlamaktadır. Hücre içinde enzimi olmayan bir reaksiyon hemen hemen vuku bulmaz, kendiliğinden reaksiyonlar meydana gelmez. Bunun anlamı, enzimler protein yapısında olduğu ve DNA tarafından şifrelendiği için, bir hücredeki tüm olaylar DNA seviyesinde düzenlenip, kontrol edilmektedir. Buradan enzimleri sadece katalizör özelliği ile nitelemenin eksik bir tanımlama olacağı anlaşılmaktadır. Gerçekten, bu moleküller bir hücreyi diğerlerinden farklı kılan özelliklerine ait bilgilerin DNA' dan aktarılmasının en önemli araçlarındandır (Keha & Küfrevioğlu, 2011).

Proteinler gibi enzimler de basit ve bileşik olarak sınıflandırılabilirler. Bazı enzimler katalizleme fonksiyonlarını yalnız protein yapılarıyla yerine getirebilirken, bazıları da protein yapısında olmayan 'kofaktör' adı verilen gruplara ihtiyaç duyaralar. Kofaktör bir metal iyonu olabildiği gibi, 'koenzim' denilen kompleks bir organik bileşikte olabilir. Bazen aktivite için ikisi de gerekebilir. Enzimler sıcaklıkla denatüre olurken, kofaktörler ısıya dayanıklıdırlar. Katalitik olarak aktif olan enzim-kofaktör kompleksine haloenzim adı verilir. Kofaktörsüz proteine poprotein, enzime ise apoenzim denir. Enzimlerin bir çoğu protein özellikte olup bazı nükleotid yapılı enzimler de bulunmaktadır. Örneğin ribozomun sentezlenmesini sağlayan RNA yapıya sahip

Ribozim isimli enzimler gibi. Bu enzimler hücre içindeki binlerce tepkimenin hızını ve özgüllüğünü kendisini değişikliğe uğratmadan gerçekleştirir. Enzimin etki ettiği bu maddelere de substrat olarak adlandırılır. Bu tepkimeler sonucunda enzimler substratları farklı moleküller halinde yeni ürünlere dönüştürür. Reaksiyon sonucu oluşan maddeye de ürün denir. Ürün açığa çıktıktan sonra enzim başka bir substrat molekülünü ürüne dönüştürmek suretiyle çalışmaya devam eder (Bhat, 2000). Enzimler hücre içinde üretilmelerine karşın hücre dışında da aktivite gösterebilmektedir. Substratlar büyük ya da küçük yapılı olabilirler. Tepkime sonucu oluşturacakları yeni ürünler de büyük ya da küçük olabilirler. Substratların yeni ve farklı ürünlere hızlı bir şekilde dönüştürülmesi için canlı bir hücrede enzimlerin varlığına mutlaka ihtiyaç duyulur. Enzimler belli substratların varlığında çalışır. Kendi substratını seçici özelliktedirler diyebiliriz. Olabilecek tepkimeler arasında belli başlı tepkimeleri hızlandırırlar. Genel olarak çalışma prensibi tepkimenin ihtiyaç duyduğu başlangıç enerjisini azaltmak üzerinedir. Ayrıca enzimler girdikleri tepkimelerden yine bozulmadan ve eksilmeden çıkarlar (Keha & Küfrevioğlu, 2011).

Enzimler katalizledikleri reaksiyonlarını hızlarının enzimlerin kinetik özelliklerinden yararlanarak ifade edilirler. Enzimlerin kinetik özelliğini açıklamada Michaelis-Menten eşitliğinde yer alan değerlerle ifade edilmektedir. KM sabiti enzimin substrata ilgisini ifade ederken, Vmax enzimin katalitik aktivitesini gösterir. Enzim aktivitesi "Enzim Ünitesi" ile ifade edilir. "Enzim Ünitesi", 25°C' de ve optimal şartlarda 1 µmol substratı bir dakikada ürüne dönüştüren enzim miktarı şeklinde tanımlanır. Birim zamanın saniye olduğu uluslararası ölçü birimine göre, saniyede 1 mol madde dönüşümüne sebep olan enzime 1 katal enzim denir. "Spesifik aktivite" 1 mg protein başına enzim ünitesi olarak tanımlanmaktadır. Spesifik aktivite enzim saflığının bir ölçüsüdür ve saflaştırma basamaklarında maksimum ve sabit bir değere ulaşması ile enzimin saf hale geldiği anlaşılır (Keha & Küfrevioğlu, 2011).

Dönüşümlü inhibisyon da enzim-inhibitör etkileşmeleri bir denge reaksiyonudur. Bu inhibisyon yarışmalı, yarışmasız veya yarı yarışmalı olabilir.

Yarışmalı inhibisyon da inhibitör ile substrat enzimin aynı aktif bölgesine bağlanmakta yarışırlar. İnhibisyon etkisi, substrat konsantrasyonu arttıkça azalmaktadır. Yarışmalı inhibisyon da K_M değeri artar Vmax değişmez.

Yarışmasız inhibisyon da, inhibitör ile substrat enzimin farklı bölgelerine bağlandığından genelde inhibisyon etkisi substrat konsantrasyonundan bağımsızdır. Bu inhibisyon da Vmax düşerken K_M değişmez.

Yarı yarışmalı inhibisyon da, inhibitör ES (enzim-substrat) kompleksine bağlanır. Bu inhibisyon da Vmax ve K_M azalır. İnhibitör etkilerini genel olarak yarışmalı ve yarışmasız olarak kesin sınırlarla birbirinden ayırmak mümkün değildir. Genel olarak karışık inhibisyon gözlenir (Keha & Küfrevioğlu, 2011) .

1.1.1. Enzimlerin sınıflandırılması

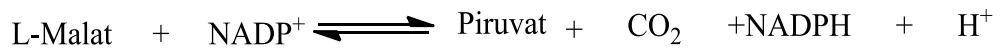
Enzimlerin, önceleri katalitik etkilerini üzerinde gösterdikleri ve 'substrat' adı verilen bileşiklerin isimlerinin sonuna, 'az' eki getirilerek isimlendirilmiştir. Üreyi CO_2 ve NH_3 'e parçalayan enzime üreaz, arginini ornitin ve üreye parçalayan enzime arginaz, fosfat esterlerinin hidrolizlenmesini katalizleyen enzimlere de fosfataz denilmiştir. Bu isimler en azından substratlar hakkında bilgi verirlerken, bu hususta hiçbir bilgi ifade etmeyen bazı enzim adları da biyokimyacılar tarafından kullanılmıştır. Örneğin; pepsin, tripsin ve katalaz gibi. Çoğu enzimin daha ortaya çıkarılması sonucu, sistematik bir isimlendirilmeye ihtiyaç duyuldu. Bu nedenle enzimler, uluslararası enzim komisyonu tarafından, katalizledikleri reaksiyon tipleri ve reaksiyon mekanizmalarına göre bir sınıflandırılmaya gerek duyuldu. Günümüzde ise çoğu biyokimyacı tarafından geleneksel isim hala kullanılmakta, sistematik isimleri de parantez içinde verilmektedir.

Sistematik isimlendirmenin başlıca özellikleri:

a. Reaksiyonlar ve onları katalizleyen enzimler 6 gruba ayrılmıştır. Her bir grup da kendi içinde 4 ile 13 arasında alt gruba ayrılmış ve bu 6 grup bir takım örnekleriyle aşağıda belirtilecektir.

b. Enzim ismi iki kısımda belirtilir. İlk bölümü substrat veya substratlarındır. İkinci kısım ise katalizlenen reaksiyon tipinin sonuna '-az' eki getirilmiş hali, yani grup veya alt gruptur. Substratlar aralarına iki nokta konularak yazılırlar.

c. Reaksiyonun tabiatını açıklayacak ifadeler gerekiyorsa, parantez içinde isminde ismin sonuna yazılabilir. Örneğin,



Reaksiyonunun bir dekarboksilasyon reaksiyonu olduğunu ifade etmek için enzim adı; L-malat:$NADP^+$ oksidoredüktaz (dekarboksile eden) şeklinde yazılır.

d. Her enzime bir sistematik kod numarası verilmiş ve bu numara E.C.(Enzyme Commission) harflerinden sonra ard arda gelen dört rakamdan oluşmaktadır. Örneğin, E.C.2.7.1.1. kod numarasında 2, bu enzimin bir transferaz enzimi olduğunu; 7, bir fosfat grubu transfer edildiğini; 1, fosfat transferinin alkol grubuna olduğunu ve son 1 rakamı da bu enzimin alkol grubuna fosfat transferi sağlayan enzimler arasında ilk sırayı aldığını göstermektedir. Sözü edilen enzim hekzokinaz geleneksel adıyla bilinen, ATP:D-heksoz 6-fosfotransferaz enzimidir.

Enzimlerin ayrıldıkları 6 ana grupta şöyledir (Keha & Küfrevioğlu, 2011).

I. **Oksidoredüktazlar:** İki substrat arasında redoks reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.

II. **Transferazlar:** İki substrat arasında hidrojen dışındaki grupların transferlerini yapan enzimlerdir.

III. **Hidrolazlar:** Ester, eter, peptid, glikozid, anhidrit, C-halojenür veya P-N bağlarının bir H_2O molekülünün katılmasıyla hidrolizini katalizlerler.

IV. **Liyazlar:** Hidrolizden farklı bir mekanizmayla substratlardan grupların uzaklaştırılıp, çift bağların oluşturulduğu reaksiyonları katalizlerler.

V. **İzomerazlar:** Optik, geometrik veya yapısal izomerlerin birbirine dönüştürülmesini katalizleyen enzimlerdir.

VI. **Ligazlar:** Yüksek enerjili ATP ve GTP gibi fosfat bileşiklerinden fosfat bağının kopması sonucu ortaya çıkan enerji yardımıyla iki molekül arası bağ oluşumu gerçekleşen reaksiyonları katalizlerler.

1.1.2. Enzim aktivitesini etkileyen faktörler

Bir çözelti veya doku ekstraktı içerisindeki enzim miktarı, enzimin katalitik aktivitesinden yararlanılarak bulunur. Enzim hakkında bazı bilgilerin bilinmesi gerekmektedir. Bu bilgiler (Keha & Küfrevioğlu, 2011):

1. Katalizlenen tepkimenin net reaksiyon sitokiyometrisi
2. Enzimin kofaktör veya metal iyonuna ihtiyacı olup olmadığına
3. Substrat ve varsa kofaktörü için K_m değerleri
4. Optimum pH'sı
5. Enzimin kararlı ve aktivitesinin yüksek olduğu sıcaklık aralığı
6. Substratın tükendiği veya ürünün oluşum hızlarının tespit edilebildiği basit bir analitik metot

Enzim aktivitesi tayin edilirken optimum pH ve doygunluğun üzerindeki substrat konsantrasyonları seçilir. Böylece sıfırıncı mertebeden bir reaksiyon gerçekleşir. Kofaktörlü enzimlerle ilgili tayinlerde, koenzim ve metal iyonlarının derişimleri de doygunluğun çok üzerinde alınır. Bu durumda hızı sınırlandıran tek faktör enzim derişimidir. Hız, enzim miktarıyla doğru orantılıdır. Çözeltideki enzim seviyesini direkt olarak verir. Ürünün oluşum hızının genellikle substratın harcanma hızına göre daha hassas sonuçlar verir. Çünkü tayinlerdeki substrat konsantrasyonu oldukça yüksektir. Harcanan miktar da buna oranla çok düşük olup farkı hassas olarak belirlemek imkansızdır. Reaksiyon ürünleri özel kimyasal ve spektroskopik yöntemlerle ölçülür. İkincisi daha avantajlıdır, çünkü reaksiyonun devamı boyunca ölçüm yapabilmek ve buna paralel olarak sonuçları grafik üzerine kaydetmek mümkündür (Keha & Küfrevioğlu, 2011).

pH etkisi: Her enzim için aktivitelerinin maksimum olduğu pH değerleri vardır. Bu değerlerin üzerinde ve altında aktivite düşer. Bununla birlikte bütün enzimlerin pH-aktivite eğrileri aynı şekilde değildir. pH-aktivite ilişkisinde etkili olan faktörler şunlardır (Keha & Küfrevioğlu, 2011):

1. Substratı bağlamada görev alan ve enzimin aktif bölgesinde bulunan iyonlaşabilir grubun pK'sı
2. Enzime bağlanma olayında görev gören substrat gruplarının pK'sı
3. Enzim üzerindeki katalitik göreve sahip grupların pK'sı
4. Enzimin biyolojik aktif konformasyonunu belirleyen grupların pK'sı

pH aktivite eğrileri, her bir pH için substratla doyurulmuş enzim çözeltileri ile yapılan çalışmalar sonucu elde edilir. Bunun nedeni çoğu enzimin K_M sabiti pH ile değişir.

Çizelge 1.1. Bazı enzimlerin optimum pH'sı

Enzim ve substratı	Optimum pH
Pepsin	
Yumurta albümini	1,5
Hemoglabin	2,2
Piruvat Karboksilaz	
Piruvat	4,8
Katalaz	
H_2O_2	7,6
Tripsin	
Benzoilargininamid	7,7
Benzoilarinin etil ester	7,0
Alkalen fosfataz	
Gliserol 3-fosfat	9,5
Arginaz	
Arginin	9,7

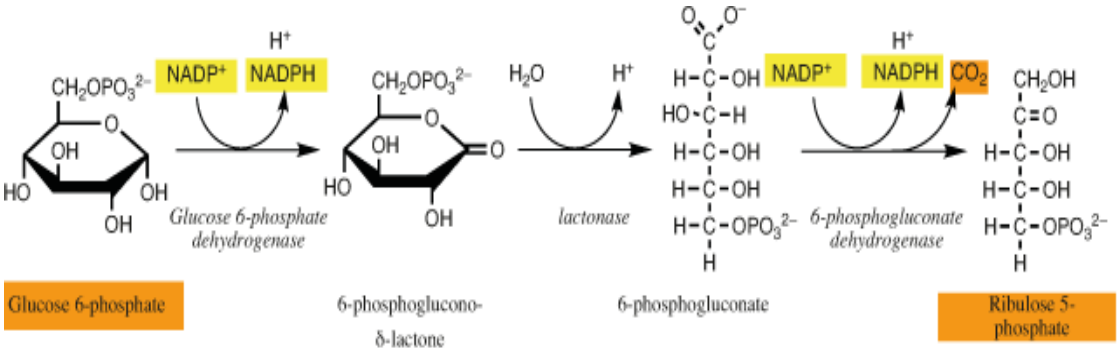
Elektriksel yönden nötür veya üzerindeki yüklerin kataliz olayında hiçbir rolü olmadığı substratlara sahip enzimlerin, pH-aktivite eğrileri çok basittir (Keha & Küfrevioğlu, 2011).

Sıcaklığın etkisi: Gerçekleşen bütün kimyasal reaksiyonların hızı sıcaklıkla artar. Enzimli reaksiyonlar bu genel kuraldan farklı davranış göstermez ve artan sıcaklıkla reaksiyon hızı artar. Ancak 50-60°C üzerine çıkıldığında aktivitede düşüş gözlenir. Bunun sebebi yüksek sıcaklıkla enzim yapısında meydana gelen denatürasyondan kaynaklanır. Enzim için, 10°C'lık bir sıcaklık farkının meydana getirdiği aktivite farkı Q10 değeriyle ifade edilir. Mesela 20°C ve 30°C sıcaklıklarda belirli miktarda enzim için ölçülen aktivitelerden yüksek olanının, düşük olana bölünmesiyle elde edilen sayı o enzim için Q10 değerini belirler. Bu değerler enzimler için Q10 değeri 1,7 ile 2,5 arasında değişir ve belirli sıcaklıkta gerçekleştirilen laboratuvar ölçümlerinde 0,1°C'lık hassasiyetin korunması gerekir (Keha & Küfrevioğlu, 2011). Sıcaklık bir *in vivo* düzenleme aracı olmayıp, canlılar sıcaklığın nispeten sabit olduğu izotermal sistemlerdir (Keha & Küfrevioğlu, 2011).

1.1.3. Pentoz Fosfat Yolu ve Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz

Pentoz fosfat yolu adlandırılırken pentoz yan yolu, heksoz mono fosfat yolu ya da fosfoglukonat oksidatif yolu olarak da adlandırılmaktadır. Pentoz fosfat yolu reaksiyon serisinin aydınlatılmasında ilk kez 1931 yılında Otto Warburg tarafından atılmış ve tamamı Fritz Lipmann, Frank Dickens, Bernard Horecker ve Efraim Racker isimli biyokimyacılar tarafından ifade edilmiştir (Keha & Küfrevioğlu, 2011).

Hücrelerde glikoz NADPH ve riboz-5-fosfat üretmek için kullanılan prosese pentoz fosfat yolu denir. Zararlı maddeleri yararlı hale getirme reaksiyonudur. Pentoz fosfat yolu iki aşamada gerçekleşir. I.aşamaya oksidatif faz; II.aşamaya oksidatif olmayan faz denir. Oksidatif reaksiyonların sonunda NADPH ve riboz—fosfat sentezlenir. NADPH indirgeyici biyosentez reaksiyonlarında indirgeyici güç olarak kullanılır.Riboz-5-fosfat ATP, RNA, DNA, CoA, FAD, NAD^+ gibi biyomoleküllerin bileşenidir. Oksidatif reaksiyonları aşağıdaki gibidir.

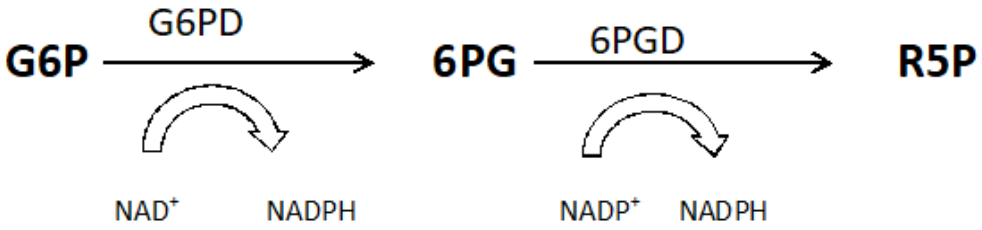


Şekil 1.1. Pentoz fosfat yolunda gerçekleşen reaksiyonları

Pentoz fosfat yolunun ilk reaksiyonu olan glikoz 6 fosfatın dehidrogenaz dönüşümsüz bir olaydır. Bu basamak glikoz 6 fosfatın dehidrogenaz enzimi tarafından katalizlenir. $NADP^+$ enzimi en önemli düzenleyici faktördür. NADPH, $NADP^+$ ile ATP glukoz-6-fosfatla enzime bağlanmak için birbirleriyle yarış içindedirler.

Riboz-5-fosfattan glikoliz reaksiyonlarının ara ürünlerinden olan gliseraldehit-3-fosfat, früktoz-6-fosfat sentezlenir. Ayrıca bu reaksiyonlarda farklı karbonlu şekerler diğer metabolik yollar için sentezlenmiş olur.

Bu iki enzim birçok mikroorganizma, bitki ve hayvan hücrelerinde bulunur. Şekil 1.2.'de belirtilen tepkimeleri katalizlerler. Çoğunlukla sitoplâzmada, ayrıca peroksizom, endoplazmik retikulum, lizozom, kloroplast ve mitokondri gibi çeşitli organellerde de bulunmaktadırlar (Adem, 2011)



Şekil 1.2. G6PD ve 6PGD enzimlerinin katalizlediği reaksiyon

Pentoz fosfat yolunun amaçlarından biri olan NADPH üretimi bu iki enzimin katalizlediği reaksiyonlarda gerçekleşir. Bu iki enzimin eksikliği oranında NADPH ve riboz-5-fosfat eksikliği oluşacaktır (Adem, 2011).

Pentoz fosfat yoluna giren glukoz 6-fosfat hücre içindeki kullanımı NADPH, riboz-5-fosfat ve ATP ihtiyacına göre dört fizyolojik şekilde reaksiyona girer. Bu reaksiyonları inceleyelim:

I. Riboz-5-fosfata NADPH' dan daha fazla ihtiyaçta, glukoz 6-fosfatın çoğu glikolizle fruktoz-6- fosfat ve gliseraldehid-3- fosfata çevrilir. Bu çevrilmeden sonra transketolaz ve transaldolaz enzimleriyle reaksiyonların dönüşümlü işlemesi sonucu bir molekül gliseraldehid-3- fosfat ve iki molekül fruktoz-6-fosfat, üç molekül riboz-5- fosfata dönüştürülür ve bu dönüşümün stokiyometrik denklemi şöyledir:

$$5 \text{ glukoz-6-fosfat} + ATP \longrightarrow 6 \text{ Riboz 5-fosfat} + ADP + H^+$$

II. Riboz-5- fosfat ve NADPH ihtiyacının eşit olduğunda; pentoz fosfat yolunun oksidatif reaksiyonları devreye girer ve reaksiyonun stokiyometrik denklemi şöyledir:

$$\text{Glukoz-6-fosfat} + 2NADP^+ + H_2O \rightarrow \text{Riboz-5-fosfat} + 2NADPH + 2H^+ + CO_2$$

III. NADPH' a riboz-5-fosfattan daha fazla ihtiyaçta; glukoz-6-fosfat tamamen CO_2'ye yükseltgenir ve bu durumda üç grup reaksiyonla gerçekleştirilir. Birincisinde iki NADPH ve bir riboz-5-fosfat oksidatif olarak sentezlenir ve sonrasında riboz-5-fosfat, transketolaz ve transaldolaz enzimleriyle fruktoz-6-fosfat ve gliseraldehid-3-fosfata dönüştürülür. Son olarak da glukoneogenez reaksiyonlarıyla 3 -fosfat ve fruktoz-6-fosfattan glukoz-6-fosfat yeniden sentezlenir. Sentezlenen üç reaksiyonun stokiyometrik denklemi şöyledir:

$$6\ \text{Glukoz 6-fosfat} + 12NADP^+ + 6H_2O \longrightarrow 6\text{Riboz 5 fosfat} + 12\ NADPH + 12\ H^+ + 6CO_2$$

$$6\ \text{Riboz 5-fosfat} \longrightarrow 4\ \text{Fruktoz 6- fosfat} + 2\text{Gliseraldehid 3-fosfat}$$

$$4\text{Fruktoz 6- fosfat} + 2\text{Gliseraldehid 3- fosfat} + H_2O \longrightarrow 5\text{Glukoz 6-fosfat} + P_i$$

+

$$\text{Glukoz 6-fosfat} + 12\ NADP^+ + 7H_2O \longrightarrow 6CO_2 + 12\ NADPH + 12H^+ + P_i$$

IV. Riboz-5-fosfattan daha fazla NADPH' a ve bununla birlikte ATP' ye ihtiyaçta; glukoz-6-fosfat piruvata dönüşür ve bu dönüşümde Riboz-5-fosfattan türetilen fruktoz-6-fosfat ve gliseraldehit-3-fosfat glukoneogenez yerine glikoliz yoluyla piruvata kadar yükseltgenir. Bu arada NADPH ve ATP beraberce sentezlenmiş olur ve sentezlenmenin stokiyometrik denklemi şöyledir:

$$3\text{Glukoz 6-fosfat} + 6NADP^+ + 5NAD^+ + 5\ P_i + 8ADP \longrightarrow 5\text{Piruvat} + 3CO_2 + 6NADPH + 5NADH + 8ATP + 2H_2O + 8H^+$$

Pentoz yolunun bazı doku ve hücreler için önemi; pentoz fosfat yolu ürünlerinden olan NADPH yağ asitlerinin sentezinde büyük miktarda kullanılmaktadır. Bu nedenle yağ asitlerinin sentezlediği yağ dokusu, karaciğer ve süt bezlerinde sentezlerinden pentoz fosfat yolu çok aktiftir. NADPH' ın kullanıldığı diğer hayati bir reaksiyonla glukatotyonun indirgemesidir (Keha & Küfrevioğlu, 2011).

1.1.4. Pestisitlerin insan ve çevre üzerine etkileri

Tarım ürünlerine ve hayvansal gıdalara üretim, hasat, depolama ve taşıma esnasında zarar veren herhangi bir zararlıyı (zararlı ot dahil) kontrol etmek veya bunların zararlarını önlemek üzere uygulanan veya hayvanların vücutlarında bulunan herhangi bir böcek veya zararlının kontrolü amacıyla hayvanlara verilen madde veya maddeler karışımına pestisit denir.

Pestisitler birçok özelliklerine göre sınıflandırılmaktadır. Pestisitler etkiledikleri canlı türlerine göre insektisit (böcek öldürücü), nematosit (solucan öldürücü), herbisit (yabani ot öldürücü), fungusit (küf öldürücü), rodentisit (kemirgen öldürücü) vb. şeklinde sınıflandırılırken; etkili kimyasal maddelerinin kökenlerine göre de inorganik maddeler, doğal organik maddeler(bitkisel ve petrol yağları vb.) ve sentetik organik maddeler(klorlu hidrokarbonlar, organik fosforlular, diğer sentetik organik maddeler) olmak üzere sınıflandırılmaktadır.

Tarihler boyunca pestisitlerin kullanımı görülmektedir. İsa'dan önce 1500' lere ait bir papirüs üzerinde bit, pire ve eşek arılarına karşı insektisitlerin hazırlanışı ile ilgili kayıtlar mevcuttur. Daha sonraki 19.yy' da zararlılara karşı inorganik pestisitler kullanılmaya başlanarak, 1940' lı yıllardan sonra pestisit üretiminde organik kimyadan yararlanılmıştır. İsviçreli kimyacı Paul Mueller 1939 yılında diklorodifenil trikoloroetan(DTT)' ın pestisitin özelliklerini keşfetmiştir. Kısa sürede ise çeşitli ülkelerde insektisit(benzen hekzaklorür vb.) ve fenoksi herbisitlerin (2,4-D ve 2,4,5-T) keşfedilmiştir. Günümüze kadar 6000' e yakın sentetik bileşik patent almasına karşın, bunlardan yalnızca yaklaşık olarak 600' ü ticari kullanım olanağı bulmuştur. Ülkemizde ise tarımı yapılan kültür bitkileri, sayıları 200' ü aşan hastalık ve zararlının tehdidi altında olduğu ve yeterli tedbirin alınmadığı için toplam ürün miktarı yaklaşık 1/3' ü kadar zarara neden olduğundan dolayı ürünün verimini artırmak için gelecekte de şüphesiz kullanılacaktır (Anonim, 2015).

Bununla birlikte, yoğun ve bilinçsiz pestisit kullanımının sonucunda gıdalarda, toprak, su ve havada kullanılan pestisitin kendisi ya da dönüşüm ürünleri olabilir. İnsan

üzerinde ve hedef olmayan diğer organizmalarda zararlı etkiler gözlenmektedir. Toprak kirliliği sadece toprağın kirliliği olmaz. Pestisitler topraktan havaya buharlaşabilecekleri gibi yer altı sularına sızarak ya da akarak tehlikede bulunabilirler. Canlılar ve insanlar toprak kirliliğine bağlı olarak pestisitleri doğrudan alabilirler. Ayrıyeten pestisitler toprak aracılığıyla bitkilere geçebilir ve bazı kültür bitkilerinde söz konusu kimyasallar toksik seviyede birikebilir. Toprakta kullanılan kimyasal maddelerin kalıcı olmaması ve kolayca parçalanarak zararsız hale getirilmelidir. Bitkiler ve hayvanlar dikkatle izlenerek kullanılan kimyasalları vücutlarında ve dokularında biriktiren canlılar ayırt edilmeli ve canlıların tüketiminden uzak tutulmalıdır. Topraktaki pestisitin var olması toprağa nasıl taşındığına bağlı bir durumdur. Mesela sızma, evaporasyon, erozyon, bitkilerce alınma vb. yollarla yayılabilmektedir. Aynı zamanda kalıcılık pestisitin nasıl parçalandığıyla da alakası bulunmaktadır. Su yosunu, mantar, bakteriler ve bazı organik materyali enerji kaynağı olarak kullandıklarından topraktaki pestisitin azalmasına katkı sağlamaktadır. Bu durum kimyasal aktiviteye bağlı olarak bazı pestisitler parçalanırken diğerlerinin dayanıklılarının ve kalıcılıklarının artmasını sağlayabilir (Güler & Çobanoğlu, 1997).

Pestisitin çevredeki hareketlerini onun kimyasal yapısı, fiziksel özellikleri, formülasyon türü, uygulama şekli, iklim ve tarımsal koşullar gibi birden çok nedene bağlıdır. Pestisitlerin püskürtülme işleminde bir kısmı evaporasyon ve dağılma nedeniyle kaybolurken, diğer kısım ise bitki üzerinde ve toprak yüzeyinde yerleşebilir. Hava da mevcut olan pestisit rüzgarlarla taşınabilir; yağmur, sis veya kar yağışıyla tekrar yeryüzüne yayılabilir. Bundan dolayı hedef olmayan diğer organizma ve bitkilere ulaşan pestisit, bunlarda kalıntı ve toksisite ile sonuçlanabilir (Yücel).

Toprak ve bitki uygulamalarından sonra yüzeyde mevcut olan pestisitler, yağmur suları veya toprak içerisinde aşağıya doğru yıkanmak suretiyle taban suyu ve başka su kaynaklarına ulaşabilirler. Pestisitler eğim, bitki örtüsü, formülasyon, toprak türü ve yağışla taşınarak, su ortamındaki balık ve diğer omurgasız su organizmalarının yaşamlarının sonlanmasına neden olmaktadır. Ayrıca bu insanların gıda zincirine girmesi ve kontamine olmuş suların içilmesiyle kronik toksisitenin oluşmasına sebep olurlar (Yücel).

Toprağa geçen pestisistler güneş ışınlarının etkisiyle fotokimyasal özelliklerin yitirilmesine, toprak mikroorganizmaları ve diğer başka organizmaların etkisiyle biyolojik yıkıma uğramakta; toprak katı maddeleri(kil ve organik madde) tarafından adsorplanıp, desorplanmakta ve kimyasal yıkıma uğramaktadırlar. Toprağı etkileyen etmenler; toprağın yapısı, kil yapısı ve miktarı, organik madde içeriği, demir ve alüminyum oksit içeriği, pH' sı ve toprakta var olan baskın mikroorganizma türleri bu olayları etkilemektedir (Cici, 2007).

Bilinen tüm pestisitler sadece hedef organizmaları öldürmez, omurgalı ve omurgasız diğer organizmaları da etkilerler. Zararlı etkilerin dozuna, pestisitin ve formülasyonun tipine, uygulama biçimine ve tarımsal arazinin yapısına bağlı olarak değişmektedir. En bilinen yan etkileri ise şunlardır (Yücel);

- Arılar, kuşlar ve balıklar, mikroorganizmalar ve omurgasızlar gibi hedef olmayan organizmalarda yaşamsal faaliyetlerin sona ermesi,
- Kuş, balık ve diğer organizmalarda üreme potansiyelinin düşmesi,
- Hedef olamayan organizmalarda meydana gelen dayanıklılık sonucu insanlara hastalık bulaştıran böcek ve parazitlerin kontrolden çıkması,
- Ekosistemin yapısının ve türlerinin miktarının değişmesi gibi uzun süreli etkiler.

1.1.5. Toprak kirliliği ve bazı ağır metaller

Antik çağlardan beri ağır metaller insan faaliyetleri sonucu atmosfer ve toprağa yayılmaya başlamıştır. Hızla çoğalan sanayileşmenin sonucunda meydana gelen su ve hava kirleticileri kimyasal veya fiziksel yollarla toprağa karışmakta ve toprağı etkilemektedir. Sanayileşmenin çoğalmasıyla ağır metal kirliliğini beraberinde getirmiş ve zamanla büyük boyutlara ulaşmıştır. Dış ortamda çevreyi etkileyen 35 den fazla metal bulunurken, bunların 23 tanesi ağır metaldir. Sıklıkla karşılaşabileceğimiz bazı ağır metalleri sıralarsak kurşun, kadminyum, krom, demir, kobalt, nikel, cıva ve çinko öncelikli ağır metallerdendir(Seven et al., 2018).

Toprak kirliliği; toprağın insan elinin etkisi sonucunda birden çok bileşiklere bulaştırması ve toprakta yaşayan canlılara, topraktan beslenen bitkilere, bu bitkilerle yaşamını sürdüren canlılara toksik etkide zarar verecek boyutlarda ve toprağa eklenen yararlı ya da zararlı kimyasalları toprağı etkilemesinin sonucunda toprağın veriminin bozulması olarak tanımlanmaktadır.

Toprak kirliliğine neden olan etkileri sıralarsak; tarımda kullanıla kimyasallar(pestisit ve kimyasal gübreler), nükleer atıklar, sanayi atıklar, evsel atıklar(ev atığı vb.), maden işletme atıkları ve tıbbi atıklardır(Taciroğlu et al., 2016).

Araçlardan çıkan egzoz gazları, pestisit kullanımı, kimyasal gübreleme, ağır metal içerikli arıtma çamurlarını toprağa serilmesi, kimyasal atıklarının toprağa gömülmesi, açık maden işletmeciliği gibi uygulamalar sonucunda ağır metaller toprağa ulaşmaktadır. Ağır metallerin toprağa etkisi olduğu kadar topraktan beslenen bitkilere de etkisi vardır. Bitkiler aracılığı ile insan bünyesine de ağır metaller ulaşmaktadır. Bu durumda ağır metallerin mikroorganizmalar, bitkiler, toprak, hayvanlar ve insanları içeren yaşamsal döngüye etkisinin büyük boyutlarda olduğu bir gerçektir(Taciroğlu et al., 2016).

Ağır metallerin topraktaki mikroorganizmaların, toprak solucanlarının azalmasına ve toprağın biyotik etkisinin azalmasına yol açmaktadır (Çağlarırmak & Hepçimen, 2010). Topraktaki ağır metallerin etkisini azaltmak için kirlenmiş toprakların temizlenmesi için bazı uygulamalar bulunmaktadır. Bu yöntemler fiziksel, kimyasal, termal ve biyolojik işlemleri içermektedir. İzolasyon ve immobilizasyon teknolojileri, mekanik ayırma teknolojileri, pirometalurjik teknolojiler, elektrokinetik teknolojiler, toprağı su/sıvı ile yerinde temizleme teknolojileri, toprak yıkama teknolojileri ve biyoremediasyon teknolojileri kirlenmiş toprakların temizlenmesinde uygulanan yöntemlerdir(Taciroğlu et al., 2016).

Toprak ve suların kirliliğinin giderimi için bitkiler, toprak solucanları, mantar, bakteri gibi makro ve mikroorganizmaların kullanılması yöntemine biyoremediasyon olarak tanımlanmaktadır. En önemli toprak organizmalarından toprak solucanları olup,

toprağın verimliliğinin üst seviyelere ulaştırılmasında önemli rol oynarlar. Toprak solucanların toprağa olan etkileri genel olarak fiziksel, kimyasal ve biyolojik yollarla olabilmektedir. Biyolojik etki; mikrobiyal ve konsantrasyonların ve diğer aktivitelerini etkilemekte, kimyasal etki ise; mineral ve organik madde dekompozisyonun artmasını etkilemekte, fiziksel etki ise; horizonlar arasındaki minerallerin taşınarak agreat yapısının değişmesi, havalandırma ve agregasyon şeklinde etkilemektedir(Taciroğlu et al., 2016).

Toprakta ağır metal giderimde toprak solucanların etkisi; toprak solucanları metallerce kirletilmiş topraklarda metal mobilitesini ve bitkiye metal transferini artırmak ile birlikte toprak faunasının diğer üyelerine göre metal toksisitesine karşı daha dirençli olup, metalleri bünyelerinde biriktirebilmekte olup alınabilir metal miktarında artışla sonuçlanmaktadır. Toprak solucanı dokularında ağır metal birikimi, toprak solucanlarının biriktirme kapasitelerine, metallerin toprak solucanlarındaki toksisitesine, ağır metallerin çeşidine, toprak ekosisteminin toprak solucanlarının ekolojik yaşamlarına göre değişkenliğe yol açabilmektedir. Bir başka deyişle; endojeik türler kadminyumu epijenik ve anesik türlere göre birikme konsantrasyonu daha yüksekken, anesik türler çinkoyu diğer iki türe göre birikme konsantrasyona daha yüksek etki etmektedir. *Lumbricus* bakır kirliliğini *Aporrectodea caliginosa* dan daha büyük boyutlarda tolere etmektedir. *Eisenia fetida*ların ise en minimum toksisiteyi kurşun da olarak sonuçlanmıştır (Hepşen Türkay, 2010).

Bu çalışmada ise *Eisenia fetida* türü üzerinde bazı ağır metaller (Pb, Cr, Hg, Fe, Ni, Cd, Co) incelenecektir.

Kurşun(Pb): İnsan aktiviteleri ile ekolojik sisteme çok büyük boyutlarda zarar veren metaldir. Dünya Sağlık Örgütünün (WHO) çalışmasına göre çalışma ortamında izin verilen miktar 0,1 mg/m^3 olarak belirtilmiştir.

Eser miktarda toprak ve bitkilerde kurşun saptanmaktadır. Doğal kurşun düzeyi bitkilerde 5 ppm' in altındadır. Bu değer bitkinin beslendiği toprağa, içinde bulunduğu ortam ve atmosfere göre doğal kurşun miktarı artabilir. Kurşunun bitki tarafından alınan

büyük bir çoğunluğu bitkinin köklerinde birikmektedir. Topraktaki çözünebilir kurşun miktarı 0.05-5 ppm düzeyindedir. Bu durumda çok çözünen kurşun bileşikleri toprakta çözünemeyen kurşun bileşikleri haline dönüşmekle sonuçlanmaktadır(Seven et al., 2018).

Krom(Cr): Geçmişte ilk kez 1789' da Fransız L.N.Vauquelin tarafından üretilmiş olup çok renkli olmasından dolayı yunanca renkler anlamında olan krom olarak isimlendirilmiştir. Krom havada >0,1 μg/m^3 ve temiz olan suda ortalama 1 μg/L bulunmaktadır. Çoğu toprakta az miktarda krom(2-60 mg/kg) bulunurken, temiz olan bazı topraklarda ise bu miktar 4 g/kg'a kadar artmaktadır. Krom için tarım topraklarında izin verilen toplam seviye 100 mg/kg ve ekstraktre ilave edilen Cr seviyesi ise 1 mg/kg'dır. Serpantin ana maddesinden oluşan topraklar bünyesinde bol miktarda krom içermektedir. Krom bitkilerde artışı fazla görülmemektedir. Krom bilinen çoğu topraklarda hareketsiz duruma geçmesiyle suda çözünürlüğü fazla olan krom kullanılmasıyla çoğunlukla zararlı bir etkiye rastlanmaktadır. Bitki bünyesinde kromun hareketi de olabildiğince sınırlıdır. Krom çok yüksek seviyelerde uygulandığında bitkilerde toksit etki olarak etkilenmektedir. Bitki kökleri krom küçülmektedir(Seven et al., 2018).

Cıva(Hg): Uçucu element olup oda sıcaklığında sürekli buharlaşan tek element ve buharlaştığı ortamda zehir etkisinde bulunmaktadır. Cıva hangi yüzey olursa olsun döküldüğü zaman üzerine kükürt serpilmesi gerekmektedir. Cıva metalik, inorganik ya da organik formda bulunmaktadır. Cıva inorganik formda pestisitlerin üretiminde kullanılmaktayken, organik formda ise kağıt ve selüloz endüstrisinde antibakteriyel olarak kullanılmaktadır. Cıvanın toprak ve sediment içindeki durumu cıva uygulanan kimyasal formuna, inorganik reaktivitesi, organik toprak kolloidleri, toprak pH'ı, toprak organik maddesi ve redoks potansiyeline bağlı bulunmaktadır. Toprakta fosfat, karbonat ve sülfit şeklinde çözünürlüğü düşük şekillerde oluşturmak üzere hareketsiz hale geçmektedir. Cıva bileşikleri hareketsiz haldeyken ve suda çözünemez durumda bitkiler tarafından alınamazlar. Bundan dolayı bileşiklerin yeniden metalik cıvaya redükte olan imkanı mevcuttur. Buda cıvanın buharlaşmasını ve çevresel hareketi olabilir(Seven et al., 2018).

Demir(Fe): Demir yer kabuğunda en çok bulunan elementler arasında dördüncü sıradadır. Demir bitkiler tarafından az seviyede alınmaktadır. Bitkilerdeki demir klorofilin oluşumu için gerekmektedir. Klorofil demir eksikliğinde yeterli oluşamaz ve bitkilerde görülen kloroz hastalığına neden olmaktadır. Bitkilerdeki demir eksikliğinde yaprakların renk tonu açık sarıdır. Bu özellik genellikle genç yapraklarda daha belirgindir. Yaprak damarları koyu renkli kaldığı halde damarların arası açık renk tonunu almaktadır. Toprağa doğrudan doğruya ferrisülfat(Fe_2SO_4) vermek suretiyle demir klorozu yapraklara önlenebilir. Demir sülfat kalkerli topraklarda toprağa verilmesi faydasız olup bu durumda bitkilerin yapraklarına püskürtülmelidir(Seven et al., 2018).

Nikel(Ni): Doğada çok az seviyede bulunan elementtir. Besin olarak alınan toplam nikel, hayvan besinine veya bitkilerin tükettiği miktarla ilgilidir. Genellikle nikel doğrudan ya da dolaylı yoldan atık sularla birlikte toprağa geçen miktar normal olarak 50-500 ppm seviyesindedir. Bitkilerdeki birikme miktarı genelde insan ve hayvanlara zararlı seviyede ulaşamaz. Konstrasyonu 600 ppm üzerinde olan toprak için kuvvetli toksit etki etmektedir. Nikeli bitkiler bünyelerinde biriktirerek, ekolojik döngüyle insanların tükettiği besinlerle vücutlarına alımı fazla miktardadır. Kirlenmiş toprak ve su deriyle temasında nikele maruz kalınmaktadır(Seven et al., 2018) (Gençer, 2008).

Kadminyum(Cd): Tek başına doğada bulunduğu minerali yoktur. Yüksek miktarda kadminyum ve bileşikleri zehirli maddedir. Yerkabuğunda 1 $mg/kg^{2'}$ dan az miktarda bulunmaktadır. Suda çözünebilir olduğundan Cd^{+2} formda bitki ve deniz canlıları tarafından biyolojik sisteme alır. Gübre ve pestisitlerin içeriğinde kadminyum bulunduğundan toprağa kolayca karışabilmektedir. Eser element olarak bulunan kadminyum fosforlu gübrelerin bileşiminde bulunduğundan tarım topraklarında mevcut olup, yüksek miktarda bulunmaktadır (Gençer, 2008) (Seven, Can, Darende, & Ocak, 2018).

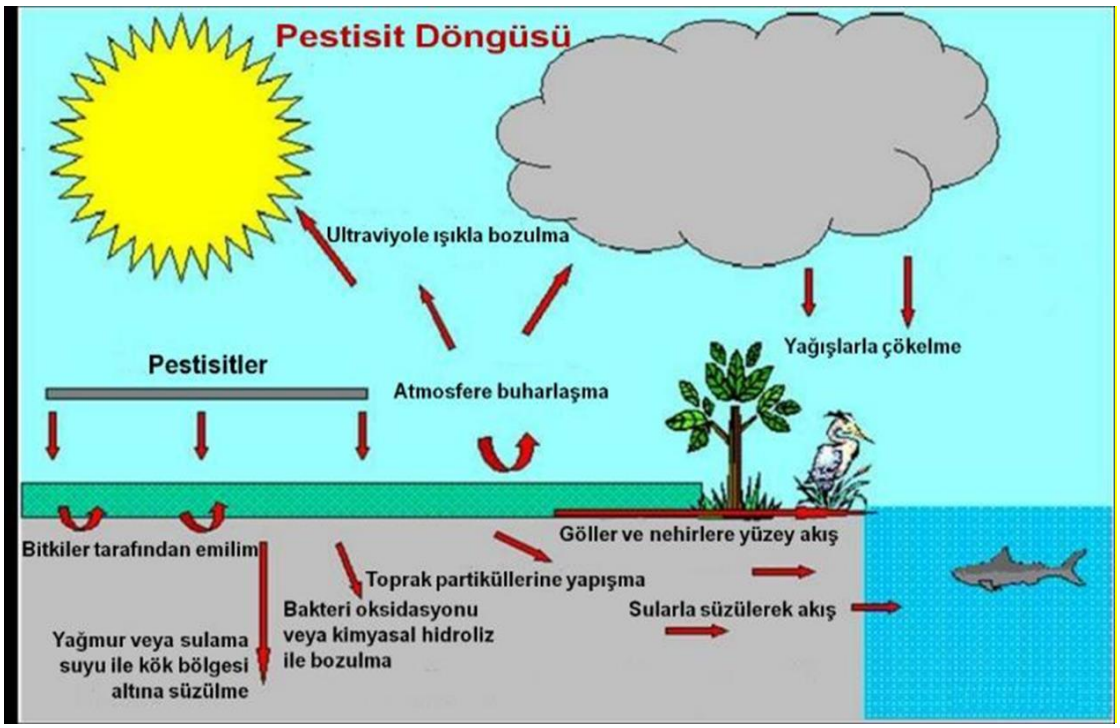
Kobalt(Co): Kobalt insan ve hayvanlar için önemli bir element olup bazı bitki mikroorganizmaları içinde önemlidir. Eğer kobalt 150 ppm'i aşarsa bu durumda

toprakta kuvvetli bir toksit etkide bulunabilir. Kobalt özellikle atık sular ve arıtma suyunda var olan süspanse maddelerle toprağa karışmaktadır (Gençer, 2008).

2. LİTERATÜR ÖZETİ

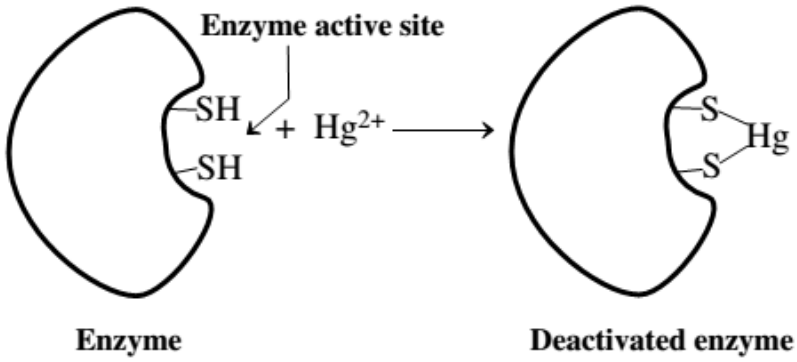
Çevre kirliliği; hava, toprak ve su kirliliği olarak üçlü bir çember içerisinde doğada meydana gelmekte ve bu kirlilik dolaylı olarak insanı da etkilemektedir. Günümüzde toprak kirliliğinin küresel bir sorun haline geldiği bilinmektedir. Başlıca toprak kirleticileri, ağır metaller, pestisitler, organik bileşikler ve radyoaktif hidrokarbon yanma ürünleri tarafından oluşturulduğu bilim adamları tarafından bildirilmektedir. Ağır metaller, pestisitler ve diğer kirleticilerle kirletilmiş topraklarda tarımsal verimlilikte meydana getirdiği düşüklüğü ve beslenmedeki olumsuz etkileri birlikte düşünüldüğünde tüm canlı sistemlerini etkilediği gerçeği ortaya çıkmaktadır. Toprak kirliliğine sebep olan başlıca ağır metaller arasında kurşun (Pb), cıva (Hg), arsenik (As), çinko (Zn), bakır (Cu), krom (Cr) ve kadmiyum (Cd) sayılabilir(Nordberg et al., 2014).

Şekil 2.1. görüleceği gibi, pestisitler çeşitli yollarla açığa çıktıkları noktadan çok uzaklara taşınmakta ve canlıları ciddi manada etkilemektedir. Canlı yapıya alınan pestisitler metabolizmada çeşitli şekillerde toksisiteye neden olmaktadır.



Şekil 2.1. Pestisit döngüsü(Tiryaki and Potur, 2017)

Enzim inhibisyonu, toksikanların önemli etki mekanizmalarından biridir. Enzimlere bağlanarak onların aktivitelerini kısıtlayan metal ve pestisitler o enzimin metabolik proseslerdeki görevini aksatmasına yol açmaktadır. Şekil 2.2. de görüleceği gibi, özellikle enzimlerin aktif merkezlerinde yer alan sistein amino asitleriyle ağır metal iyonları birleşerek merkaptan bileşikleri oluşturmak suretiyle enzim aktivitesinde kaybolma gözlenmektedir(Nordberg et al., 2014). Daha önce yapılan birçok çalışmada metal ve pestisitlerin enzim aktivitesini önemli oranda düşürdüğü tespit edilmiştir (Çankaya et al., 2011; Çomaklı et al., 2013; Hopa et al., 2011; Tekman et al., 2008).



Şekil 2.2. Enzimin aktif bölgesine ağır metal bağlanması

Tarımsal aktiviteler ve endüstriyel gelişimle birlikte sonuçlanan toprak kirliliği son yıllarda bu alana yönelik yüksek bir ilginin oluşmasına sebep olmuştur(Chen et al., 2015; Ha et al., 2014). Önemli kirleticiler olan pestisit ve ağır metal iyonları toprağa ve suya girdiklerinde doğrudan veya dolaylı olarak insan sağlığı ve doğal ekosistem için ciddi tehditler oluşturmaktadır (Tang et al.,2014; Zeng et al., 2013b; Zeng et al., 2013a). Özelikle toprakta yaşayan ve toprak bio-verimliliğinin artırılmasında önemli rol oynayan toprak solucanları tarımsal ve endüstriyel faaliyetler sonucu toprakta yaygın olarak bulunan pestisit ve ağır metal kirleticilerinin etkisine maruz kalırlar(Amador vd. Görres, 2007; Banni et al., 2014). Pestisitler, zararlılara karşı biyolojik ajan, antimikrobiyal ve dezenfektan olarak kullanılan kimyasal maddelerdir. Bunların bazıları toprağı ve çevrenin kontaminasyonuna katkıda bulunan organik kirleticilerdir. Ayrıca, bitki kirliliğinin oluşmasında önemli rol oynamaktadırlar (Ekinci et al., 2012). Çoğu durumda, pestisitler ve fungisitler çevreyle etkileşmeleri sonucu o çevrede yaşayan

canlılardaki biyokimyasal reaksiyonları katalizini gerçekleştiren spesifik proteinler için tehlikeli olabilir. Bazı pestisitlerin, ratların karaciğer ve serum üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar ksenobiyotik metabolizmasında önemli bir sistem olan P450 protein genleri üzerine toksik etki yaptıklarını göstermiştir(Gao et al., 2013).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan maddeler

- Standart serum albümin
- N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin (TEMED)
- Diyaliz torbaları
- β-nikotinamidadenindinükleotidfosfat (indirgenmiş form) (NADPH)
- β-nikotinamidadenindinükleotidfosfat (Na tuzu) (NADP+)
- okside glutatyon (GSSG)
- glukoz 6-fosfat (mono Na tuzu)
- etilendiamintetraasetikasit (EDTA)
- triklor asetik asit
- sodyum hidroksit
- trihidroksimetilaminometan (Tris)
- potasyum klorür
- sodyum klorür
- sodyum asetat
- hidroklorik asit
- glisin
- fosforik asit
- sodyum azotür
- gliserin
- potasyum fosfat
- potasyum bisfosfat
- potasyum asetat
- potasyum klorür
- etanol
- metanol
- asetik asit
- sodyum asetat
- izopropanol
- akrialmid, N,N'-metilen bisakrilamid
- Coomassie Brillant Blue G-250
- brom timol mavisi
- sodyum dodesil sülfat (SDS)
- sephadex-G150 ve 2', 5' ADP-Sepharose 4B

3.2.1. Yararlanılan alet ve cihazlar

- Vorteks
- Spektrofotometre
- pH metre
- Otomatik pipet
- Kuvars küvetler
- Manyetik Karıştırıcı
- Sonikasyon Cihazı
- Saf su cihazı
- Buzdolapları

3.2.2. Kullanılan çözelti ve kimyasalların hazırlanışı:

Çözelti hazırlamak amacıyla kullanılan su, saf sudur.

Homojenat hazırlanması için kullanılan çözelti

1. 100 mM potasyum fosfat çözeltisi(pH= 7,5): 1,36 gr KH_2PO_4 tartılarak bir miktar suda çözüldü. NaOH çözeltisi ile pH'ı 7,5'a ayarlandı Hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler:

1. 300 mM Tris-HCl çözeltisi (pH=8,5): 1,82 gr Tris-HCl tartılarak bir miktar suda çözüldü. 0,1 M HCl çözeltisi ile pH' ı 8,5' a ayarlandı. Toplam hacim saf su ile 50 ml' ye tamamlandı.

2. 6 mM G6P: 9,1 mg (0,3 mmol) G6P alınıp bir miktar suda çözüldü. Hacmi su ile 5 ml'ye tamamlandı.

3. 2mM $NADP^+$ Çözeltisi: 7,65 mg $NADP^+$ (0,1 mmol) alınarak bir miktar suda çözüldü. Hacim suyla 5 ml'ye tamamlandı.

Enzim karakterizasyonunda kullanılan çözeltiler:

1. 100 mM Tris-HCl çözeltisi (pH=7,5): 0,181 gr Tris-HCl tartılarak bir miktar suda çözüldü. 0,1 M HCl çözeltisi ile pH'ı 7,5' a ayarlandı. Toplam hacim saf su ile 15 ml' ye tamamlandı.
2. 100 mM Tris-HCl çözeltisi (pH=8): 0,181 gr Tris-HCl tartılarak bir miktar suda çözüldü. 0,1 M HCl çözeltisi ile pH'ı 8' e ayarlandı. Toplam hacim saf su ile 15 ml' ye tamamlandı.
3. 100 mM Tris-HCl çözeltisi (pH=8,5): 0,181 gr Tris-HCl tartılarak bir miktar suda çözüldü. 0,1 M HCl çözeltisi ile pH'ı 8,5' a ayarlandı. Toplam hacim saf su ile 15 ml' ye tamamlandı.
4. 100 mM Tris-HCl çözeltisi (pH=9): 0,181 gr Tris-HCl tartılarak bir miktar suda çözüldü. 0,1 M HCl çözeltisi ile pH'ı 9' a ayarlandı. Toplam hacim saf su ile 15 ml' ye tamamlandı.
5. 100 mM KH_2PO_4 çözeltisi (pH=6): 0,204 gr KH_2PO_4 tartılarak bir miktar suda çözüldü. NaOH çözeltisi ile pH'ı 6'a ayarlandı. Toplam hacim saf su ile 15 ml'ye tamlandı.
6. 100 mM KH_2PO_4 çözeltisi (pH=6,5): 0,204 gr KH_2PO_4 tartılarak bir miktar suda çözüldü. NaOH çözeltisi ile pH'ı 6,5'a ayarlandı. Toplam hacim saf su ile 15 ml'ye tamlandı.
7. 100 mM KH_2PO_4 çözeltisi (pH=7): 0,204 gr KH_2PO_4 tartılarak bir miktar suda çözüldü. NaOH çözeltisi ile pH'ı 7'e ayarlandı. Toplam hacim saf su ile 15 ml'ye tamlandı.
8. 100 mM KH_2PO_4 çözeltisi (pH=7,5): 0,204 gr KH_2PO_4 tartılarak bir miktar suda çözüldü. NaOH çözeltisi ile pH'ı 7,5'a ayarlandı. Toplam hacim saf su ile 15 ml'ye tamlandı.
9. 50 mM Tris-HCl çözeltisi (pH=8,5): 0,0908 gr Tris-HCl tartılarak bir miktar suda çözüldü. 0,1 M HCl çözeltisi ile pH'ı 8,5' a ayarlandı. Toplam hacim saf su ile 15 ml' ye tamamlandı.
10. 100 mM Tris-HCl çözeltisi (pH=8,5): 0,181 gr Tris-HCl tartılarak bir miktar suda çözüldü. 0,1 M HCl çözeltisi ile pH'ı 8,5' a ayarlandı. Toplam hacim saf su ile 15 ml' ye tamamlandı.

11. 200 mM Tris-HCl çözeltisi (pH=8,5): 0,363 gr Tris-HCl tartılarak bir miktar suda çözüldü. 0,1 M HCl çözeltisi ile pH' ı 8,5' a ayarlandı. Toplam hacim saf su ile 15 ml' ye tamamlandı.

12. 300 mM Tris-HCl çözeltisi (pH=8,5): 0,545 gr Tris-HCl tartılarak bir miktar suda çözüldü. 0,1 M HCl çözeltisi ile pH' ı 8,5' a ayarlandı. Toplam hacim saf su ile 15 ml' ye tamamlandı.

13. 400 mM Tris-HCl çözeltisi (pH=8,5): 0,727 gr Tris-HCl tartılarak bir miktar suda çözüldü. 0,1 M HCl çözeltisi ile pH' ı 8,5' a ayarlandı. Toplam hacim saf su ile 15 ml' ye tamamlandı.

Diyaliz için kullanılan tampon:

1. 10 mM Tris-HCl + 1 mM EDTA (Diyaliz çözeltisi): 1,211 g Tris, 0,29225 gr EDTA alınarak 975 ml suda çözüldü, pH' sı 0,1 M HCI ile 7,5'e ayarlandı ve toplam hacim 1 L'ye tamamlandı.

Afinite kromatografisi kolonunda kullanılan çözeltiler:

1. 50 mM KH_2PO_4 + 1 mM EDTA + 1mM DTT, pH=7,3 (Kolonun paketlenmesi, yıkanması ve dengelenmesi için kullanılan tampon): 6,8 g KH_2PO_4, 0,292 g EDTA ve 0,152 g DTT alınarak 950 ml suda çözüldü. pH'sı 0,1 M KOH 7,3'e ayarlandıktan sonra 1 L'ye tamamlandı.

2. 50 mM KH_2PO_4 + 80 mM KCI + 1 mM EDTA + 1mM DTT, pH=7,3 (Kolonun yıkanması için kullanılan tampon): 6,8 g KH_2PO_4, 0,292 g EDTA, 0,298 KCI ve 0,152 g DTT alınarak 950 ml suda çözüldü. pH' sı 0,1 M KOH 7,3'e ayarlandıktan sonra 1 L'ye tamamlandı.

3. 80 mM KH_2PO_4+ 10 mM EDTA + 80 mM KCI + 0,5 mM $NADP^+$ (Afinite jeline tutunmuş olan glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enziminin elüsyonu için kullanılan tampon): 0,544 g KH_2PO_4, 0,121g EDTA, 0,298 KCI ve 0,1913 g $NADP^+$ karışımı 40 ml suda çözüldü. pH'sı 0,1 M KOH 7,8'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 50 ml'ye tamamlandı.

4. 0,1 M Na-asetat + 0,5 M NaCl (Afinite kromatografisi kolonunun rejenerasyonu için kullanılan tampon): 4,1 g Na-asetat (50 mmol) ve 14,61 g NaCl (0,25 mol) alınıp suda çözüldü, pH= 4,5'e ayarlandı ve toplam hacim suyla 500 ml'ye tamamlandı.

5. 0,1 M Tris + 0,5 M NaCl (Afinite kromatografisi kolonunun rejeneresyonu için) 6,05 g Tris ve 14,61 g NaCI bir miktar suda çözündükten sonra pH' sı 0,1 M HCI ile 8,5'e ayarlandı. Daha sonra hacim suyla 500 ml'ye tamamlandı.

6. % 0,02'lik NaN_3 çözeltisi (Kromatografi kolon materyallerini bakterilerden korumak için): 10 mg NaN_3 alınarak 50 ml suda çözüldü.

Elektroforez için kullanılan çözeltiler:

1. 1M Tris-HCl (pH= 8,8): 12,11 g Tris (0,1 mol) tartılarak 80 ml suda çözüldü, pH ayarı 0,1 M HCI ile yapıldıktan sora 100 ml'ye tamamlandı.

2. 1 M Tris-HCl (pH= 6,8): 12,11 g Tris (0,1 mol) tartılarak 80 ml suda çözüldü, pH ayarı 0,1 M HCI ile yapıldıktan sonra 100 ml'ye tamamlandı.

3. %30 Akrilamid %0,8 Bisakrilamid çözeltisi: 15 g akrilamid, 0,4 g bisakrilamid alınarak hacmi su ile 50 ml'ye tamamlandı.

4. %10'luk amonyum persülfat çözeltisi: 1 g amonyum persülfat tartılarak su ile 10 ml'ye tamamlandı.

5. %10'luk SDS: 1 g SDS' nin hacmi su ile 10 ml'ye tamamlandı.

6. Yürütme tamponu: 1,51 g Tris (12,5 mmol) ve 7,51 g glisin (0,1 mol) tartılarak 450 ml suda çözüldü %10'luk SDS'den 5 ml ilave edildi, pH 0,1 M HCI ile 8,3'e ayarlandı ve toplam hacim 500 ml'ye tamamlandı.

7. Numune tamponu: 1 M Tris-HCl (pH= 8)'den 0,5 ml, %10'luk SDS' den 1 ml, %100'lük gliserinden 1 ml ve %0,1'lik bromtimol mavisinden 1 ml alınarak suyla 10 ml'ye tamamlandı. Bu tampona kullanılmadan önce 950 µl numune tamponundan 50 µl olacak şekilde β-merkaptoetanol ilave edildi.

8. Sabitleştirme çözeltisi (Jelde yürütülen proteinlerin sabitleştirilmesi için kullanılan çözelti): %50 izopropanol, %10 TCA ve %40 su olacak şekilde karıştırılarak hazırlandı.

9. Jel boyama çözeltisi: 50 ml metanol, 10 ml asetik asit ve 40 ml su içerisinde 0,1 g Coomassie Brillant Blue R-250 reaktifinin çözülmesiyle hazırlandı.

10. Jel yıkama çözeltisi: 50 ml metanol, 10 ml asetik asit ve 40 ml su karıştırılarak elde edildi.

11. Antikoagulant çözelti: 26,3 g Na-sitrat (dihidrat) (115,35 mmol), 3 g sitrik asit (15,62 mmol), 31,9 g glukoz (monohidrat) (177 mmol), 2,2 g $NaH_2PO_4.H_2O$ (15,94 mmol) ve 0,35 g adenin (2,6 mmol) tartılarak suda çözüldü ve saf su ile 1 L'ye tamamlandı.

12. %0,04'lük brom timol mavisi çözeltisi: 0,1 indikatör 0,01 M 16 ml NaOH içerisinde çözündü ve toplam hacim saf suyla 250 ml'ye tamamlandı.

Ayırma jeli

1M Tris-HCl (pH=8,8)	5 ml
%30 Akrilamid-%0,8 bisakrilamid	4,4 ml
%10'luk SDS	0,2 ml
%5'lik TEMED	0,13 ml
Saf su	3,13 ml
PER	katı

Yığma jeli

1M Tris-HCl (pH=6,8)	0,41 ml
%30 Akrilamid-%0,8 bisakrilamid	0,800 ml
%10'luk SDS	0,03 ml
%5'lik TEMED	0,03 ml
Saf su	2,45 ml
PER	katı

Proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti

1. Coomassie Brillant Blue G-250 reaktifi: 100 mg Coomassie Brillant Blue G-250, 50 ml %95'lik etanolde çözüldü. Bu çözeltiye %95'lik 100 ml fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin hacmi suyla 1 L'ye tamamlandı.

Pestisitlerin ve metal iyonlarının çözeltileri

Oxamyl: 1 mg tartılıp bir miktar saf suda çözülüp hacmi 1 mL' ye tamamlandı. Saf su ile 10 kat seyreltildi.

Carbaryl: 1 mg tartılıp bir miktar saf suda çözülüp hacmi 1 mL' ye tamamlandı. Saf su ile 10 kat seyreltildi.

Diniconazole: 1 mg tartılıp bir miktar saf suda çözülüp hacmi 1 mL' ye tamamlandı. Saf su ile 10 kat seyreltildi.

Metalaxyl: 1 mg tartılıp bir miktar saf suda çözülüp hacmi 1 mL' ye tamamlandı. Saf su ile 10 kat seyreltildi.

Methomyl: 1 mg tartılıp bir miktar saf suda çözülüp hacmi 1 mL' ye tamamlandı. Saf su ile 10 kat seyreltildi.

Carbofuran: 1 mg tartılıp bir miktar saf suda çözülüp hacmi 1 mL' ye tamamlandı. Saf su ile 10 kat seyreltildi.

Simazine: 1 mg tartılıp bir miktar saf suda çözülüp hacmi 1 mL' ye tamamlandı. Saf su ile 10 kat seyreltildi.

Tebuconazol: 1 mg tartılıp bir miktar saf suda çözülüp hacmi 1 mL' ye tamamlandı. Saf su ile 10 kat seyreltildi.

Atrazine: 1 mg tartılıp bir miktar saf suda çözülüp hacmi 1 mL' ye tamamlandı. Saf su ile 10 kat seyreltildi.

Propoxur: 1 mg tartılıp bir miktar saf suda çözülüp hacmi 1 mL' ye tamamlandı. Saf su ile 10 kat seyreltildi.

1-naphthol: 1 mg tartılıp bir miktar saf suda çözülüp hacmi 1 mL' ye tamamlandı. Saf su ile 10 kat seyreltildi.

2,4-D: 1 mg tartılıp bir miktar saf suda çözülüp hacmi 1 mL' ye tamamlandı. Saf su ile 10 kat seyreltildi.

$Pb(NO_3)_2$: 1 mg tartılıp bir miktar saf suda çözülüp hacmi 1 mL' ye tamamlandı. Saf su ile 10 kat seyreltildi.

$Cr(NO_3)_2$: 1 mg tartılıp bir miktar saf suda çözülüp hacmi 1 mL' ye tamamlandı. Saf su ile 10 kat seyreltildi.

$HgCl_2$: 1 mg tartılıp bir miktar saf suda çözülüp hacmi 1 mL' ye tamamlandı. Saf su ile 10 kat seyreltildi.

$FeSO_4$: 1 mg tartılıp bir miktar saf suda çözülüp hacmi 1 mL' ye tamamlandı. Saf su ile 10 kat seyreltildi.
$Ni(NO_3)_2$: 1 mg tartılıp bir miktar saf suda çözülüp hacmi 1 mL' ye tamamlandı. Saf su ile 10 kat seyreltildi.
$Cd(NO_3)_2$: 1 mg tartılıp bir miktar saf suda çözülüp hacmi 1 mL' ye tamamlandı. Saf su ile 10 kat seyreltildi.

3.2. Yöntem

3.2.1. Enzim saflaştırılması çalışmaları

Homojenatın hazırlanması: Solucanlar bir gün suda bekletilerek içlerindeki toprak ve diğer sindirilmemiş besinleri çıkarması beklendi. Daha sonra küçük parçalara ayrıldı ve ayrılan solucan parçaları havanda iyice ezildi. Elde edilen parçalanmış hücre peletine 1/10 oranında 100 mM pH'ı 7,5 olan potasyum fosfat tamponu içeren soğuk çözelti içinde süspanse edildi. Daha sonra süspansiyon 4000 rpm' de oda sıcaklığında 20 dakika santrifüj edildi ve alttaki çökelti atıldı.

2', 5' ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi: 10 ml'lik yatak hacmi için 2 g kuru 2', 5'-ADP Sepharose 4B jeli tartıldı ve 400 ml destile su ile katı maddelerin uzaklaştırılması için birkaç defa yıkandı. Yıkama esnasında jel şişirilmiş oldu. Şişirilmiş jelin havası su trombu kullanılarak vakum ile alındı ve paketleme tamponu ilave edilerek jel süspanse edildi. Süspanse edilmiş jel, 1x10 cm' lik kapalı sistemden oluşan soğutmalı kolona paketlendi. Jel çöktükten sonra peristaltik pompa yardımıyla yıkama ve dengeleme tamponu ile yıkandı. Kolonun dengelenmiş olduğu, eluat ile tamponun 280 nm' de absorbanslarının ve pH' larının eşitlenmesinden anlaşıldı. Böylece afinite kolonu hazırlanmış oldu.

Hazırlanan homojenat 2', 5'-ADP sepharose 4B afinite kolonuna uygulandı. Enzim çözeltisinin tamamı kolondan geçirildikten sonra yıkama işlemi yapıldı. Yıkama işleminden sonra dengeleme tamponu geçirildi ve bu tamponun geçmesi spektrofotometre de takip edilerek absorbans değerlerinin köre eşit olmasıyla

durduruldu. Kolon yıkandıktan sonra; sırayla G6PD elüsyon çözeltisi geçirilerek enzimler 1,5 ml'lik tüplere ayrı ayrı alındı. Her bir tüpdeki enzimlerin aktivitelerine bakılarak enzim ünitesi-tüp sayısı grafiği hazırlandı (Adem & Çiftçi, 2016).
Afinite sonrası enzim örneklerinin saflık kontrolü için SDS-PAGE yapıldı.

3.2.2. SDS- Poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının belirlenmesi

Afinite kolonundan alınan numunelerin saf olup olmadığının kontrolü %3-10 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile Laemmli tarafından anlatıldığı gibi yapıldı (Laemmli, 1970). Standart olarak Myosin,rabbit muscle, 212,000, MBP-ß-galactosidase, E. coli, 158,194; ß-Galactosidase, E. coli, 116,351 Phosphorylase b, rabbit muscle, 97,184, Serum albumin, bovine, 66,409; Glutamic dehydrogenase, bovine liver, 55,561; MBP2*, E. coli, 42,710; Thioredoxin reductase, E. coli, 34,622; Triosephosphate isomerase, E. coli, 26,972; Trypsin inhibitor, soybean, 20,100; Lysozyme, chicken egg white, 14,313; kullanıldı.

Elektroforez plakaları önce su, sonra alkol ile iyice yıkandı. Plakaları birleştiren mikalara vazelin ince tabaka halinde sürüldü. İki cam plaka birbiri üstüne konuldu ve kıskaçlarla tutturularak jel hazırlama cihazına yerleştirildi. Ayırma jeli hazırlanarak plakalar arasına pipetle bir tabaka oluşacak şekilde ilave edildi. Jel donduktan sonra üste yığma jel ilave edildi. Jel donmadan dikkatlice tarak yerleştirildi. Jel tamamen donunca tarak dikkatlice çıkarıldı. Oluşan jel plakalarla beraber elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konuldu.

Numuneler her birinde 20 µg protein (BSA eşdeğer) olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim 100 µl olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu konuldu. 3 dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi. Numuneler soğutularak, jeldeki yerine ince bir enjektörle tatbik edildi. Tank kapağı kapatılarak ''anot'' ve ''katot'' kabloları yerleştirildi. Önce 80 voltta 25 dakika, daha sonra 120 volta ayarlanarak 2,5 saat oda sıcaklığında yürütme işlemi gerçekleştirildi. Akım kesilerek, cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı. Plakalar arasından çıkarılan jel 30 dakika sabitleştirmede, 2 saat boyamada ve 30

dakikada yıkama çözeltilerinin içinde karıştırıcının üzerinde bekletildi. Daha sonra suyun içine alınan jelin, fotoğrafı çekildi.

Elektroforez sırasında kullanılan yürütme tamponu, boyama ve sabitleştirme çözeltileri tekrar kullanılmak üzere kaplarına alındı. Yıkama çözeltisi ise aktif karbondan geçirilerek kabına alındı.

Molekül kütlesinin belirlenmesi; molekül kütleleri belli standartlar ile bilinmeyen proteinlerinin aynı jelde yürütülmesiyle belirlenir. Molekül kütlesi hesaplamada proteinin yürüdüğü uzaklığın boyanın yürüdüğü uzaklığa oranını ifade eden ve alıkoyma veya yavaşlatma faktörü (retardation factor) olarak adlandırılan Rf değeri esas alınır. Standartların Rf değerleri belirlenir. LogMA-Rf değeri grafiği çizilerek bu garafikten Rf değeri belli enzimin veya proteinin molekül kütlesi hesaplanır.

3.2.3. Enzim aktivitelerinin ölçülmesi

Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enziminin aktivitesi spektrofotometre de 37°C'de Beutler metoduna göre ölçüldü. Bu metot glukoz 6-fosfat varlığında $NADP^{+}$' nın indirgenmesinden dolayı oluşan NADPH' ın 340 nm' de absorbans vermesi esasına dayanır. Aktivite ölçümleri her numune için 3 kez tekrarlandı (Beutler, 1971). Küvet içeriği Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. G6PD enziminin aktivite ölçüm küveti içeriği

Stok çözeltiler	Kontrol küveti	Numune küveti
	Hacim (µl)	Hacim (µl)
300 mM Tris-HCl, (pH= 8,5)	200	200
2 mM $NADP^{+}$	100	100
Saf su	660	560
Enzim örneği	40	40
10 dakika inkübasyon		
G6P	-	100

Enzim ünitesi hesaplamalarında aşağıdaki formül kullanıldı.

$$EÜ/ml = \frac{\Delta OD}{6,22} \times \frac{V_{Tc}}{V_E} \times S_F$$

Burada yer alan simgeler aşağıda açıklandı;

EÜ/ml : 1 ml'deki enzim ünitesi

ΔOD : Bir dakikadaki absorbans değişimi

6,22 : Ekstinksiyon katsayısı

V_T : Ölçümün yapıldığı toplam küvet hacmi

V_E : Ölçümün yapıldığı küvete ilave edilen enzim numunesinin hacmi

S_F : Seyreltme faktörü (seyreltilen örnek için kullanılır)

3.2.4. Enzim karakterizasyon çalışmaları

Enzimin optimum pH'larının belirlenmesi: Enzimin optimum pH'larını belirlemek amacıyla 100 mM potasyum fosfat tamponu - 100 mM tris tampon çözeltisi ile pH 6-9 arası tampon çözeltiler hazırlandı. Her bir pH'da enzim aktiveleri belirlendi. Aktivite ölçümlerinde en iyi aktivite gösteren tamponlarla çalışmalara devam edildi. Ölçülen değerlerle enzim aktivitesi-küvet içi konsantrasyon grafikleri çizildi.

Enzimin optimum tuz konsantrasyonlarının belirlenmesi: İmmobilize enzimin optimum aktivite sağladığı iyonik şiddetin belirlenmesi için belirlenen optimum 50, 100, 200, 300, 400 mM tris tamponu kullanılarak belirlendi. Ölçülen değerlerle enzim aktivitesi-küvet içi konsantrasyon grafikleri çizildi.

Enzimin sıcaklık aktivitesi: İmmobilize enzimin optimum sıcaklığının belirlenmesi amacıyla 15, 25, 30, 40, 50, 60 °C sıcaklıklarda çalışıldı. Enzim aktivitesi-sıcaklık grafikleri çizildi.

Stabil sıcaklığın belirlenmesi: Stabil sıcaklığı belirlemek amacıyla 20, 30, 40, 50 °C sıcaklıklarda küvet içi konsantrasyonu ayarlanıp ısıtıldı. 30 dk sonra aktivite ölçümü belirlendi. Enzim aktivitesi-sıcaklık grafiği çizilerek sonuçlar değerlendirildi.

3.2.5. Kantitatif protein tayini

Homojenat, amonyum sülfat çöktürmesi ve afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltilerindeki protein miktarı bu yöntemle belirlendi. Bu yöntemde boya olarak kullanılan Coomassie Brillant Blue G-250 negatif bir yüke sahiptir ve protein üzerindeki pozitif yüke bağlanır. Boyanın kırmızı (λ_{max}= 465 nm) ve mavi (λ_{max}= 595 nm) formu mevcuttur. Proteinin bağlanması sonucu kırmızı form mavi forma dönüşür. Reaksiyon hızı yüksektir ve iki dakikada tamamlanır. Renk stabilitesi iki saat' in üzerinde devam edebilir (Bradford, 1976). Bu yöntemin bozucu faktörlere hassasiyeti çok azdır (1-100 µg arası).

Bu yöntem ile protein tayini yapabilmek için standart bir grafik gereklidir. Bu amaçla 1 ml'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albümin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µl alındı. Saf su ile bütün tüplerin hacmi 0,1 ml'ye tamamlandı ve 5 ml Coomassie Brillant Blue G-250 çözeltisi ilave edilip vorteks ile karıştırıldı. 10 dakika inkübe edildikten sonra 595 nm' de 3 ml'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak, 0,1 ml enzim numunesinin içinde bulunduğu tampondan ve 5 ml Coomassie Brillant Blue G-250 çözeltisinden oluşan karışım kullanıldı. Absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri standart grafik haline getirildi.

Homojenat ve afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltilerindeki enzim numunelerinden 0,1 ml alınarak tüplere konuldu ve üzerine 5'er ml Coomassie Brillant Blue G-250 reaktifi ilave edildi. Vorteks ile karıştırıldıktan sonra 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Sonrasında 595 nm' de absorbans değerleri okundu. Her bir numune için üçer adet deneme yapılarak bu üç değerin aritmetik ortalaması alındı. Standart grafikten yararlanılarak, elde edilen bu değerlere göre protein miktarları belirlendi.

3.2.6. Enzimin K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi

Enzimin K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi amacıyla substratların 10 kat seyreltilmiş çözeltilerinden 5 farklı konsantrasyonu ile aktivite ölçümü yapıldı. Elde edilen değerlerle Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Grafikten yararlanarak $NADP^+$ ve G6P için K_m ve V_{max} değerleri belirlendi.

3.2.7. Pestisitlerin ve metal iyonlarının *in vitro* etkilerinin belirlenmesi

Pestisitlerin ve metal iyonlarının enzimin aktivitesi üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla küvet ortamına farklı konsantrasyonlarda katılarak aktivite değerleri okundu. Maddelerin inhibisyon etkileri mümkün olan en yüksek konsantrasyonlarda ön denemelerle belirlendi. IC_{50} değerlerin belirlenmesi için % aktivite-[I] inhibitör konsantarasyonu grafiği çizilerek belirlendi. Bu amaçla 5 farlı inhibitör konsantrasyonuyla aktivite ölçümleri yapıldı. Çalışmaların hangi aralıkta yapıldığı çizelge 3.2 ve 3.3 de verilmiştir.

Pestisit ve metallerin inhibisyon etkisi gösterenlerin K_i değerlerini belirlenmesi, solucan temininde yaşanan sıkıntı nedeniyle Cheng-Prusoff denklemiyle yapılmıştır (Cheng & Prusoff, 1973).

Çizelge 3.2. Pestisitlerin çalışılan konsantrasyonu

Madde	Çalışılan aralık
1. Oxamyl	1-180
2. Carboryl	1-20
3. Diniconazole	1-15
4. Metalaxyl	1-20
5. Methomyl	1-20
6. Carbofuran	1-45
7. Simazine	1-50
8. Tebuconazol	1-100
9. Atrazine	1-140
10. Propoxur	1-140
11. 1- naphthol	1-200
12. 2,4 – D	1-140

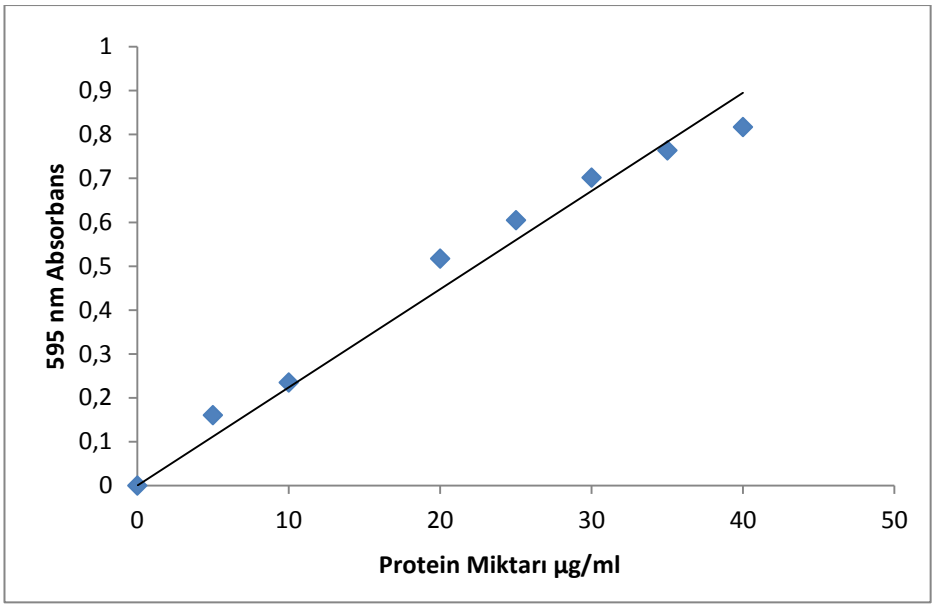
Çizelge 3.3. Metallerin çalışılan konsantrasyonu

Madde	Çalışılan Aralık
1. $Pb(NO_3)_2$	1-151
2. $Cr(NO_3)_2$	1-210
3. $HgCl_2$	1-184
4. $FeSO_4$	1-179
5. $Ni(NO_3)_2$	1-90
6. $CdS(NO_3)_2$	1-211
7. $Co(NO_3)_2$	1-274
8. $Al(NO_3)_3$	1-235

4. BULGULAR

Kantitatif protein tayini için kullanılan standart grafik

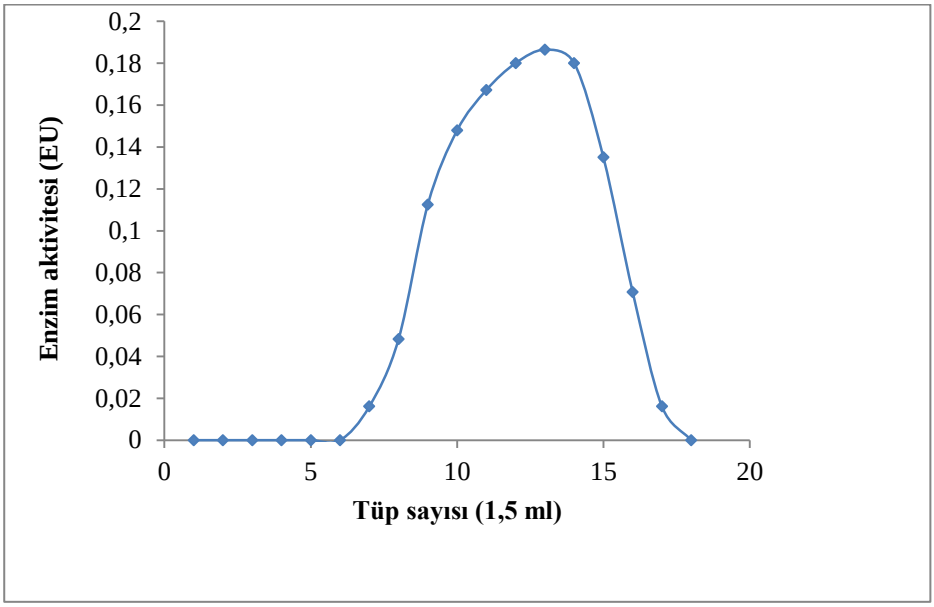
Enzim çözeltilerinin kantitatif protein tayini Bradford yöntemiyle belirlendi. Homojenat ve afinite kromatografisi sonucu elde edilen enzim çözeltilerindeki kantitatif protein tayinin bu standart grafikten faydalanılarak bulundu. Standart çözeltilerin µg proteine karşılık gelen absorbans değerleri şekil 4.1'de gösterildi.



Şekil 4.1. Kantitatif protein tayininde kullanılan standart grafik

2', 5' ADP Sepharose 4B Afinite kromatografisi saflaştırma sonuçları

Hazırlanan homojenat süzüldükten sonra afinite kolonuna tatbik edildi. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra sırasıyla G6PD elüsyon çözeltisi ile elüsyon yapıldı. Elüatlar ependorf tüplerine 1,5 ml'lik hacimlerle alındı. Elüatlar da 340 nm' de enzim aktiviteleri ölçüldü ve aktivite gösteren tüpler birleştirildi. Enzim ünitesi-tüp sayısı grafikleri aşağıda verilmiştir. Saflaştırma basamakları, elüsyonun sonucu ve saflaştırma değerleri Çizelge 4.1'de verilmiştir. Buna göre enzim %28 verimle 232 kat . saflaştırılmıştır. Spesifik aktivitesi 12 EÜ/mg protein olarak hesaplanmıştır.



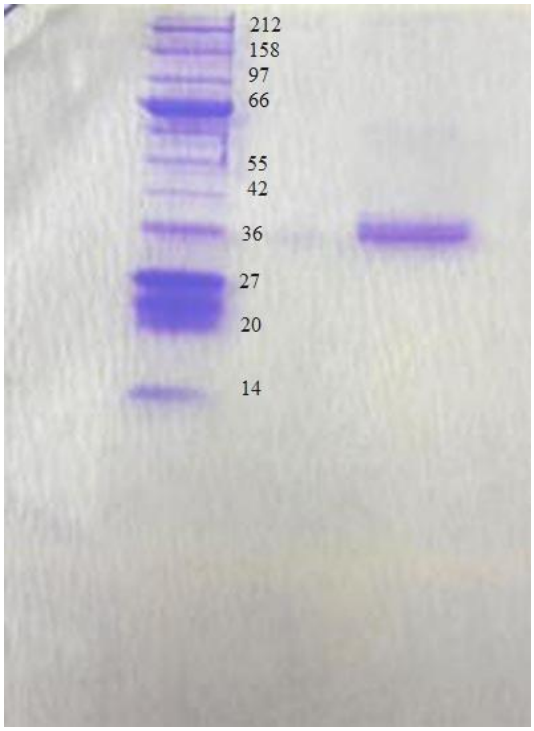
Şekil 4.2. Solucan G6PD enziminin 2', 5'-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi ile saflaştırma grafiği

Çizelge 4.1. Solucan G6PD enziminin saflaştırılması basamakları

Saflaştırma basamakları	Toplam hacim (ml)	Aktivite (EÜ/ml)	Toplam aktivite (EÜ)	Protein miktarı (mg/ml)	Spesifik aktivite (EÜ/mg)	% verim	Saflaştırma katsayısı
Homojenat	50	0,133	5,6	2,240	0,050	100	1
Afinite kromatografisi	9	0,177	1,5	0,015	11,635	28	232

SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi sonuçları

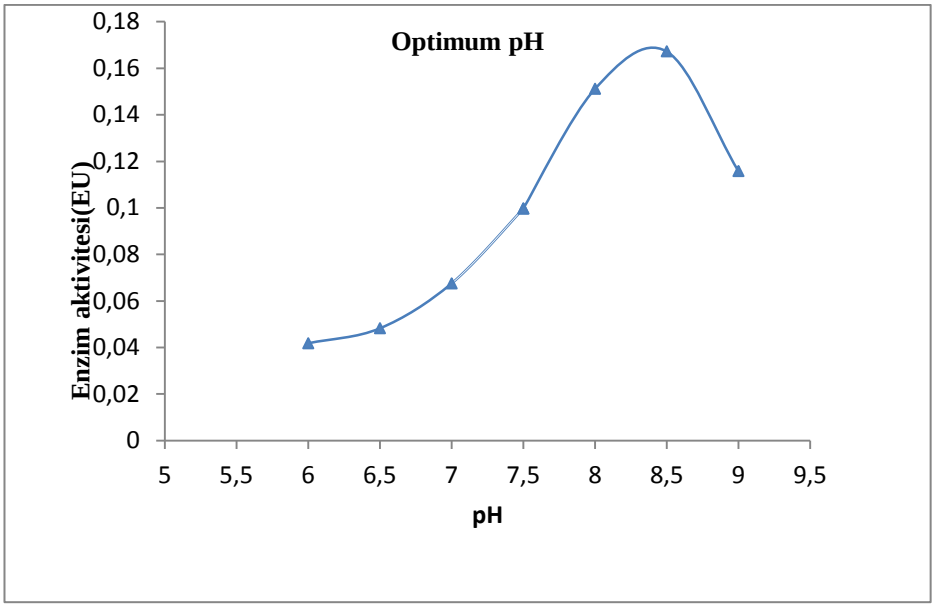
Afinite kromatografisi sonucu elde edilen enzimlerin saflığının kontrolü amacıyla SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı. Şekil 4.3 incelendiğinde enzimin molekül kütlesinin 37 kDa olduğu anlaşılmaktadır.



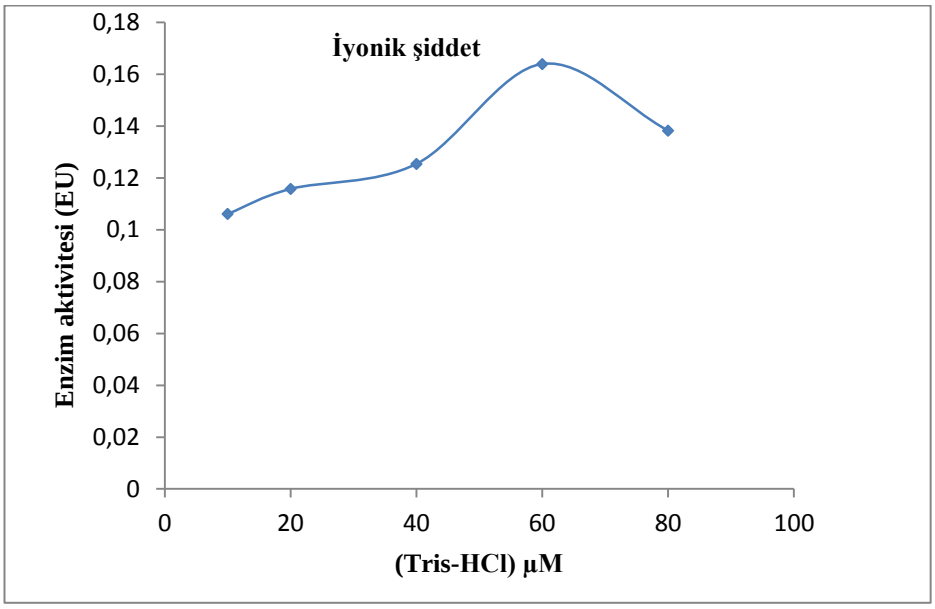
Şekil 4.3. Solucan saflaştırılan G6PD enziminin SDS-PAGE fotoğrafı

Enzim karakterizasyon çalışmaları sonuçları

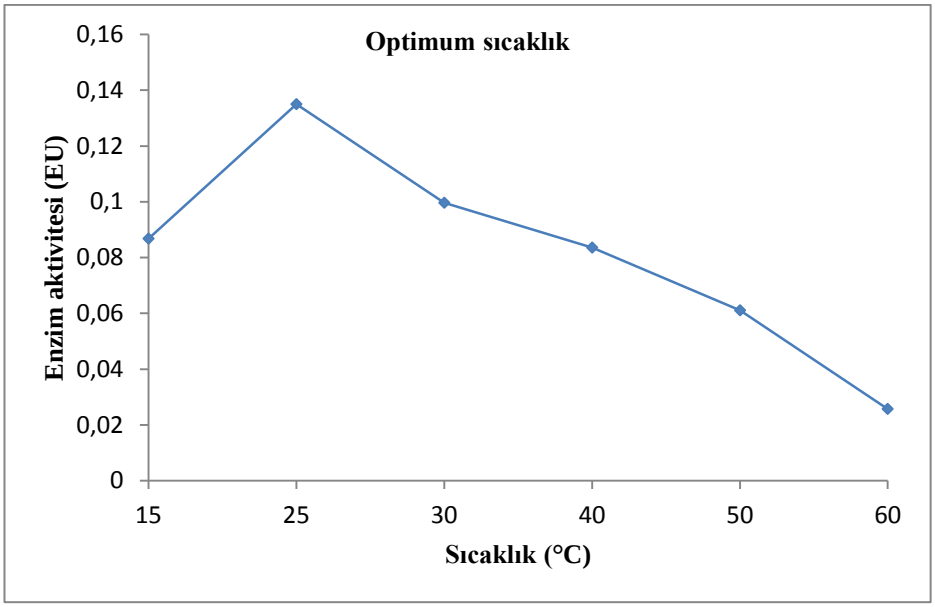
Çalışmalar bölüm 3.2.4'de belirtildiği şekliyle yapıldı. Çalışmaların sonucu elde edilen şekiller ve toplu sonuçlar çizelge 4.2' de verilmiştir.



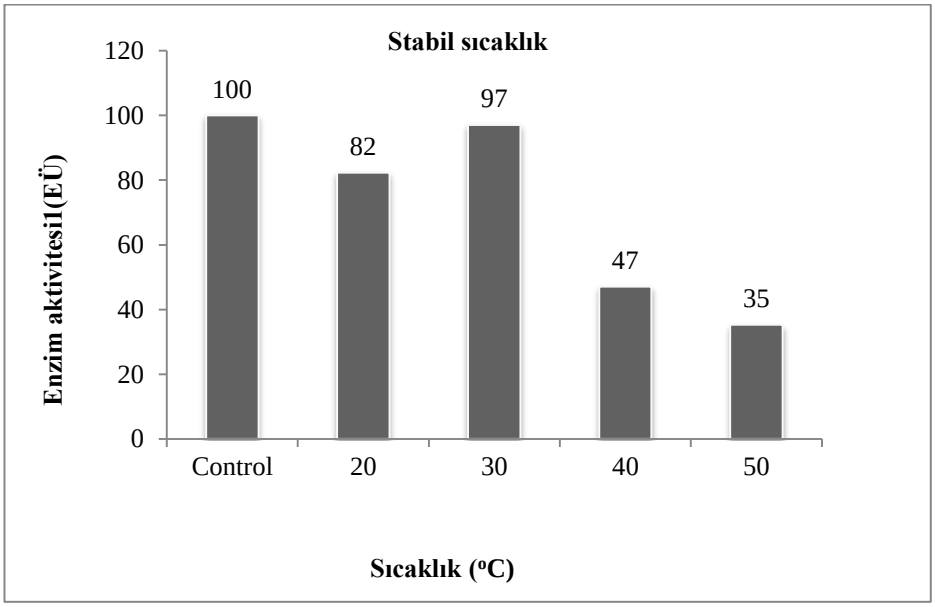
Şekil 4.4. Enziminin optimum pH'sının belirlenmesine yönelik aktivite ölçümlerinin sonucunu gösteren grafik



Şekil 4.5. Enzimin optimum tuz konsantrasyonun belirlenmesi amacıyla çizilen grafik



Şekil 4.6. Enzimin sıcaklık aktivitesinin belirlenmesi amacıyla çizilen grafik



Şekil 4.7. Enzimin stabil sıcaklık belirlenmesi için çizilen grafik

Çizelge 4.2. G6PD enziminin optimum şartlarının belirlenmesine yönelik çalışmaların sonuçları

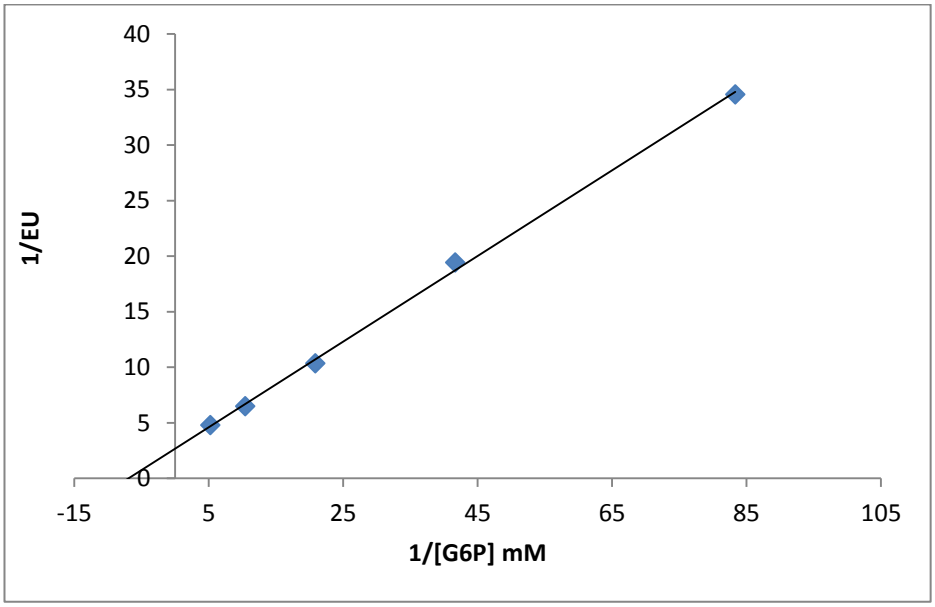
Optimum pH	Tris-HCl pH=8,5
İyonik Şiddet için tuz konsantrasyonu	Tris-HCl 300 mM
Optimum Sıcaklık	25ºC
Stabil Sıcaklık	30 ºC

Enzimin K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi

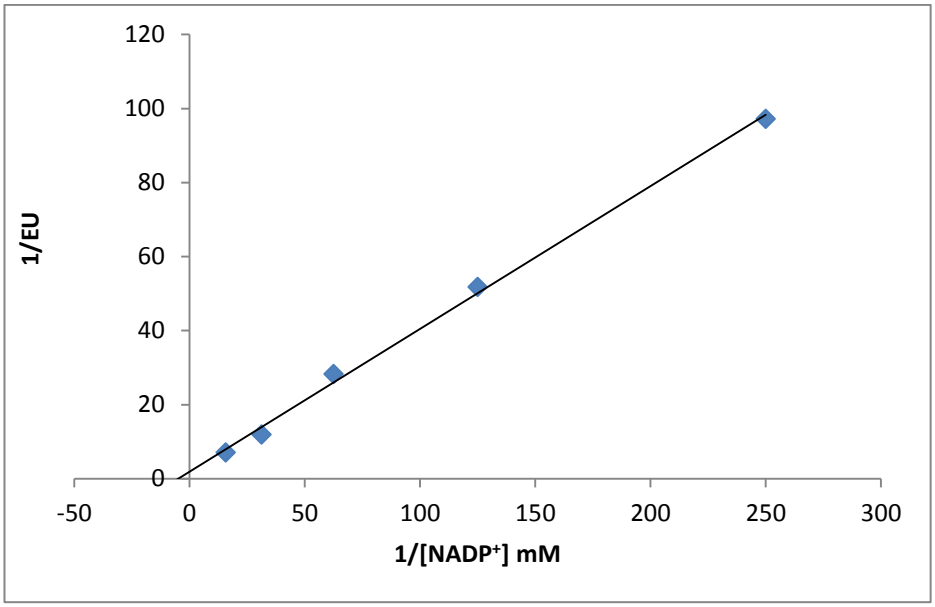
Enzimin substrat ve Koenzim için K_M ve Vmax değerleri Lineweaver–Burk grafiklerinden hesaplanmıştır. Çalışmaların sonucu elde edilen sonuçlar çizelge 4.3 'de verilmiştir. Yapılan kinetik çalışmada $NADP^+$ ve G6P substratları için hesaplanan K_M sabitleri sırasıyla 0,20 mM ve 0,14 mM; V_{max} değerleri ise 0,525 ve 0,374 EÜ/ml olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.3. Solucan G6PD enziminin subsratları için bulunan K_M ve V_{max} değerleri

Substratlar	K_M (mM)	V_{max} (EÜ/ml)
$NADP^+$	0.20 mM	0.525
G6P	0.14 mM	0.374



Şekil 4.8. Solucan G6PD enziminin K_M ve V_{max} değerlerini bulmak için 5 farklı G6P derişimi kullanılarak çizilen grafik.



Şekil 4.9. Solucan G6PD enziminin K_M ve V_{max} değerlerini bulmak için 5 farklı $NADP^+$ derişimi kullanılarak çizilen grafik.

Pestisitlerin ve metal iyonlarının etkilerinin belirlenmesine ait çalışmaların sonuçları

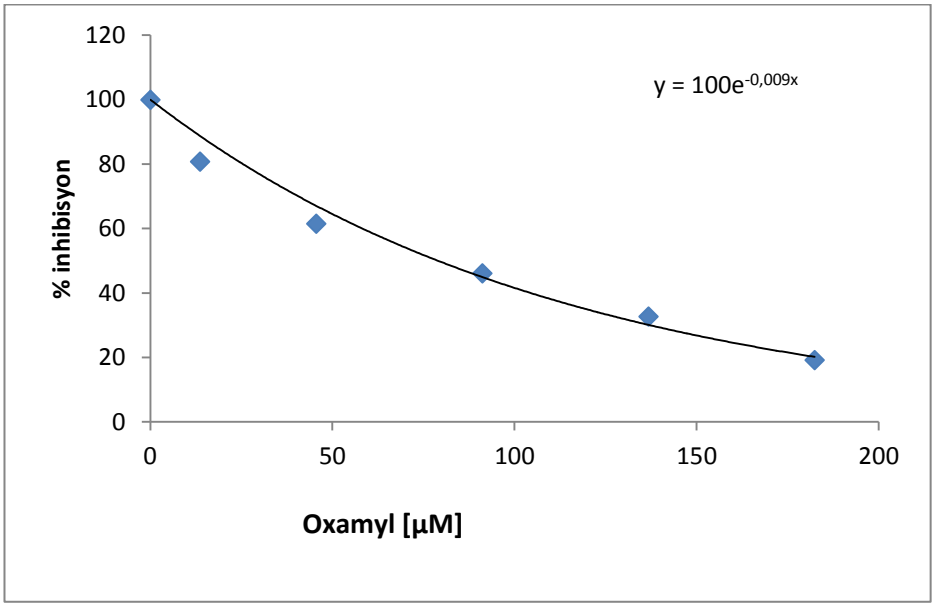
Pestisitlerin ve metal iyonlarının hazırlandığı stok çözeltileri kullanılarak; solucandan saflaştırılan G6PD enzim aktivitesi üzerine de Oxamyl, Carboryl, Diniconazole, Metalaxyl, Methomyl, Carbofuran, Simazine, Tebuconazol, Atrazine, Propoxur, 1-naphthol, 2,4 – D pestisitlerinin ve $Pb(NO_3)_2$, $Cr(NO_3)_2$, $HgCl_2$, $FeSO_4$, $Ni(NO_3)_2$, $Cd(NO_3)_2$, $Co(NO_3)_2$, $Al(NO_3)_3$ metal iyonlarının inhibisyon etkilerine bakıldı. İnhibisyon etkisi gösterenlerin sonuçları aşağıda çizelge 4.4 ve 4.3' de verilmiştir. Çizelgeye göre Oxamyl, Carboryl, Diniconazole, Metalaxyl, Methomyl 7,6-77,12 µM arasında IC_{50} değerleri ile inhibisyon etkisi göstermiştir. Metallerden $Pb(NO_3)_2$, $Cr(NO_3)_2$, $HgCl_2$, $FeSO_4$, $Ni(NO_3)_2$ 56-120 µM aralığında IC_{50} değerleri ile inhibisyon etkisi göstermiştir.

Çizelge 4.4. Pestisitlerin enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon değerleri

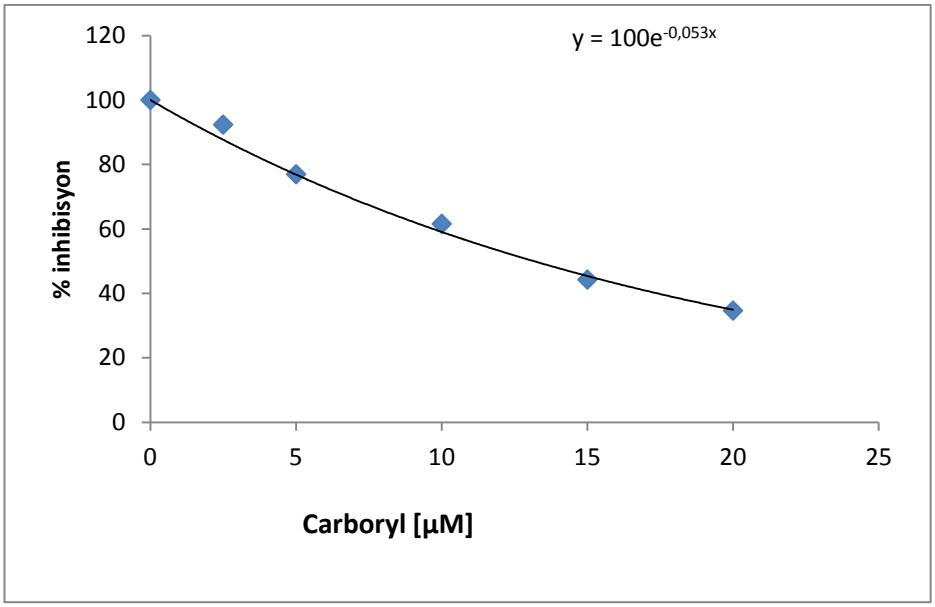
Pestisitler	IC_{50} Değerleri (µM)	G6P için K_i sabitleri (µM)	$NADP^+$ için K_i sabitleri (µM)
Diniconazole	7.6±1,2	1,44	3,80
Carboryl	13±2,6	2,46	6,50
Metalaxyl	10±0.9	1,89	5,00
Methomyl	11±0,8	2,08	5,50
Oxamyl	77±12	14,57	38,50

Çizelge 4.5. Metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon değerleri

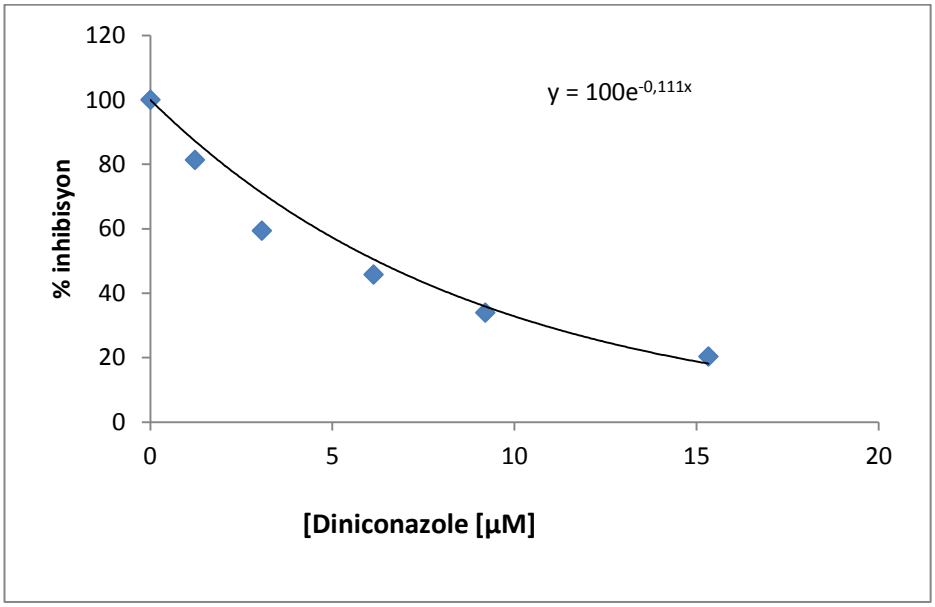
Metal İyonları	IC_{50} Değerleri (µM)	G6P için K_i sabitleri (µM)	$NADP^+$ için K_i sabitleri (µM)
Ni^{+2}	56±06	10,59	28,00
Hg^{+2}	93±8	17,59	46,50
Pb^{+2}	109±14	20,62	54,50
Cr^{+2}	110±15	20,81	55,00
Fe^{+2}	120±20	22,70	60,00



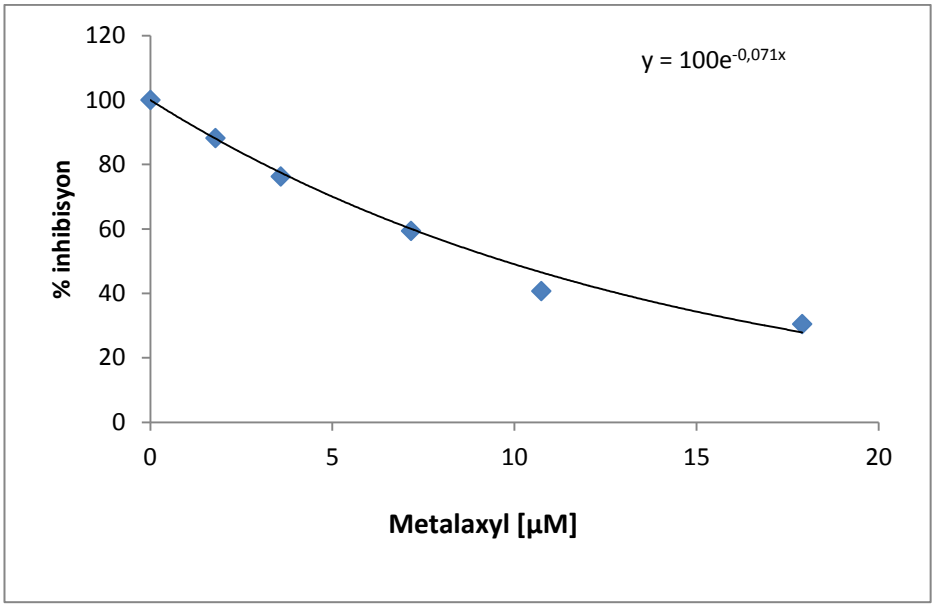
Şekil 4.10. Solucan G6PD enzimi üzerine Oxamylın % aktivite-[I] grafiği



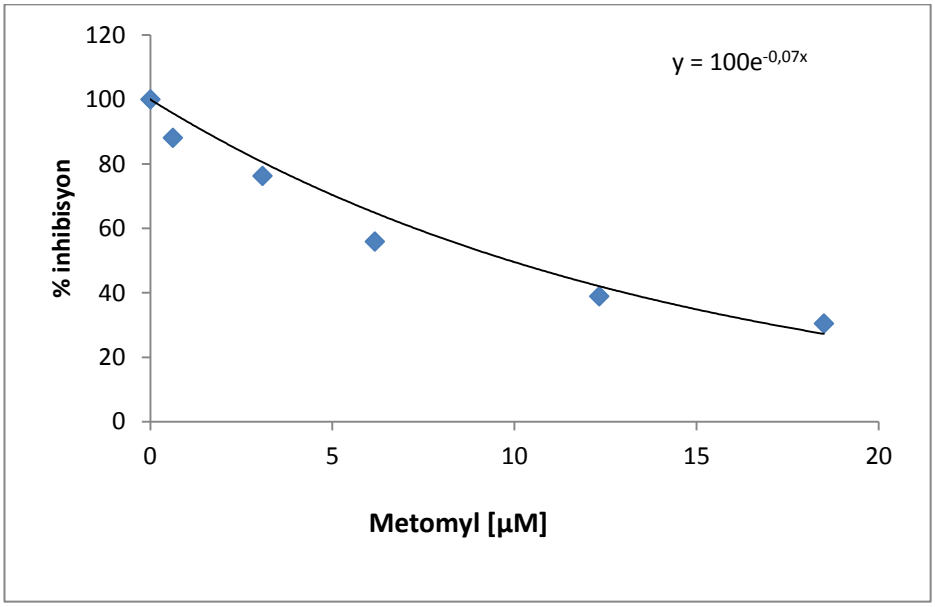
Şekil 4.11. Solucan G6PD enzimi üzerine Carborylın % aktivite-[I] grafiği



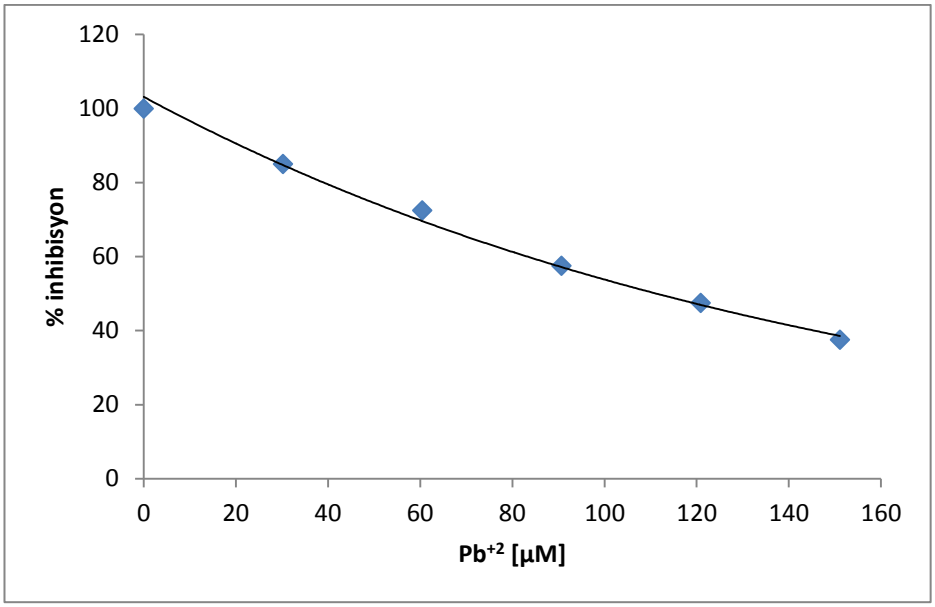
Şekil 4.12. Solucan G6PD enzimi üzerine Diniconazolenin % aktivite-[I] grafiği



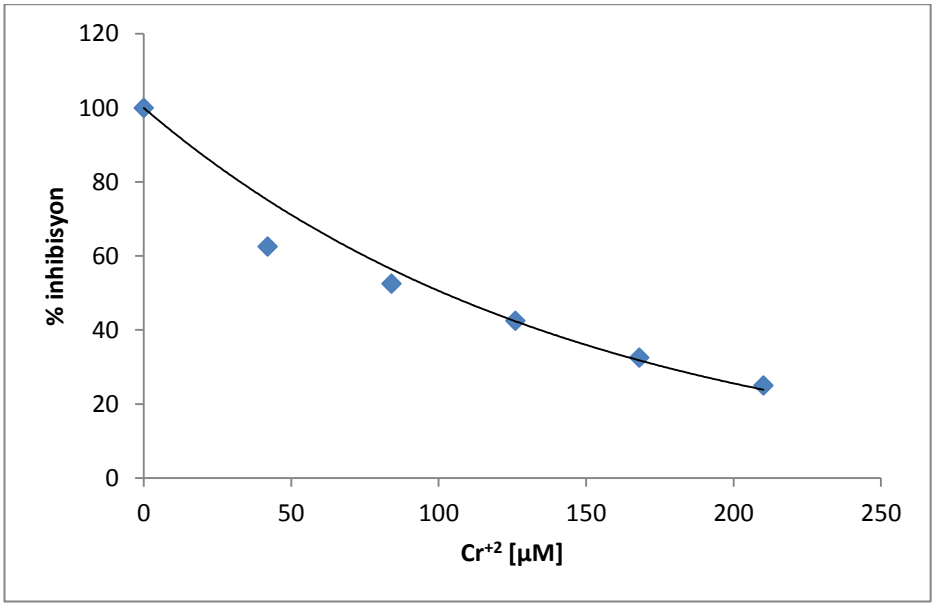
Şekil 4.13. Solucan G6PD enzimi üzerine Metalaxylin % aktivite-[I] grafiği



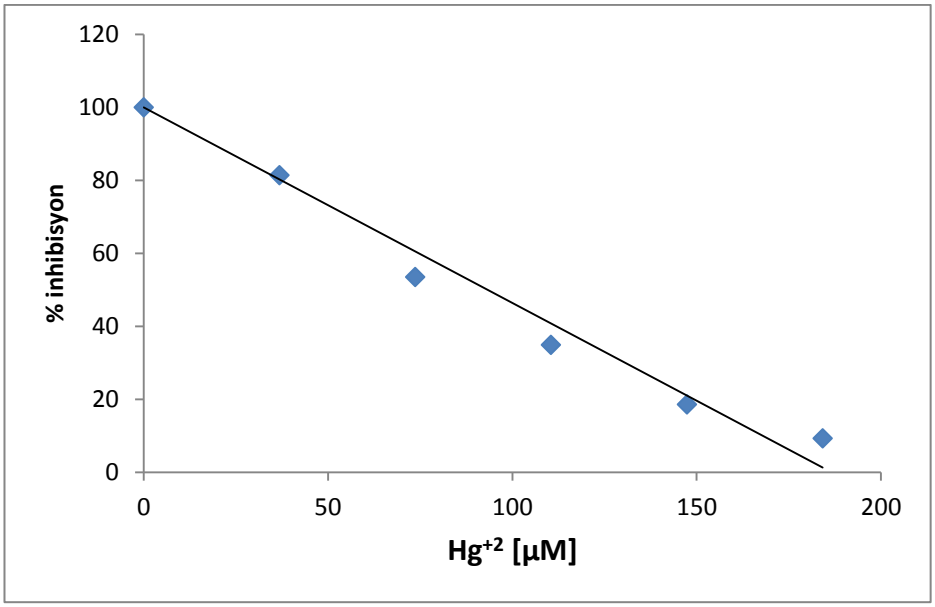
Şekil 4.14. Solucan G6PD enzimi üzerine Metomylin % aktivite-[I] grafiği



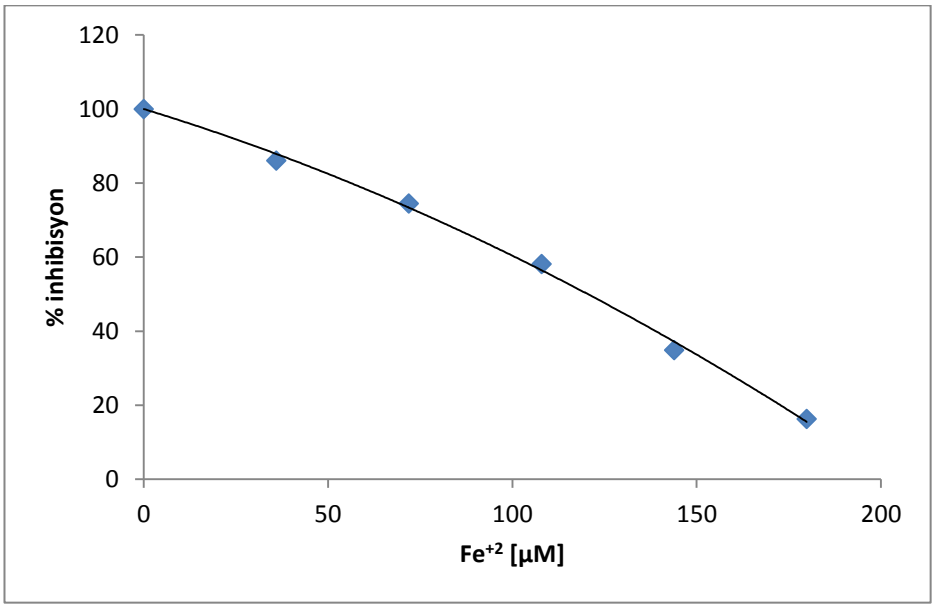
Şekil 4.15. Solucan G6PD enzimi üzerine kurşunun % aktivite-[I] grafiği



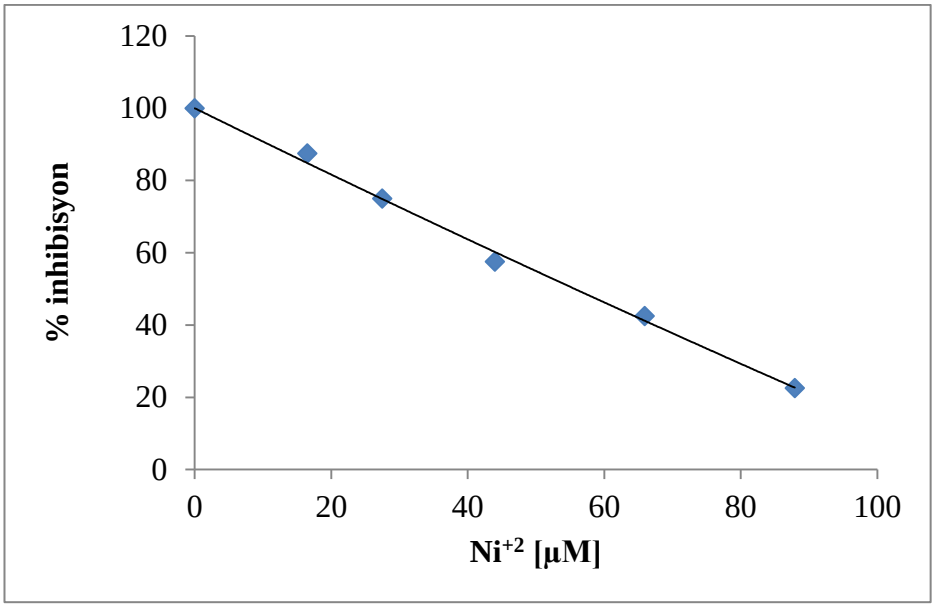
Şekil 4.16. Solucan G6PD enzimi üzerine krom % aktivite-[I] grafiği



Şekil 4.17. Solucan G6PD enzimi üzerine civanın % aktivite-[I] grafiği



Şekil 4.18. Solucan G6PD enzimi üzerine demirin % aktivite-[I] grafiği



Şekil 4.19. Solucan G6PD enzimi üzerine nikelin % aktivite-[I] grafiği

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Sanayideki gelişmelerle artan metal kullanımı ve bunların doğaya salınımı ciddi çevre kirliliğine ve sağlık problemlerine yol açmaktadır. Metal toksisitesi önemli bir halk sağlığı sorunu olarak güncelliğini korumaktadır. Birçok hastalığa sebep olmakla beraber, toksik olmayan düzeylerinin bile bazı yaygın hastalıkların tetikleyicisi olabileceği literatürde ifade edilmiştir. Bu nedenle birçok araştırmacı metallerin toksik etkilerini ve mekanizmalarını araştırırken bir kısmında bu toksisitenin nasıl azaltılacağını araştırmaktadır(Nordberg et al., 2014).

G6PD enzimi canlı metebolizmanın önemli enzimlerindendir. Metabolizma için gerekli indirgeyici molekül olan NADPH ve birçok biyomolekülün yapıtaşı olan riboz-5-fosfat, G6PD ve 6-PGD enzimlerinin katelizlediği reaksiyonlar sonucu oluşur (Meister, 1988) (Helmut, 1999).

G6PD enzimi aktivite ölçümleri Beutler metoduna göre oda şartlarında yapılmıştır. Aktivite G6PD enziminde ortamdaki NADPH oluşumuyla ölçülmüştür. Enzimlerin saflaştırılmasında, karekterizasyon işlemlerinde, kinetik çalışmalarında, maddelerin IC_{50} değerleri ile K_i sabitlerinin belirlenmesinde bu yöntem kullanılmıştır.

G6PD enzimi; solucandan %28 verimle 232 kat saflaştırma yapıldı. Spesifik aktivitesi 12 EÜ/mg protein olarak hesaplanmıştır.

G6PD enzimin optimum aktivite gösterdiği pH aralığı 7-9,5 arasında değişmektedir. Solucan dokusunda pH'ın G6PD üzerindeki etkisi 6-9 arasındaki pH değerlerinde çalışılmıştır. G6PD enzimin optimum pH'ı solucan dokusunda 8,5(Tris-HCl) olarak bulunmuştur. Bulunan değer literatürde bulunan değerler aralığındadır(Corpas *et al*. 1995; Özer *et al*. 2002; Beydemir *et al*. 2003; Türkoğlu *et al*. 2003; Tandoğan and Ulusu 2005).

Optimum tuz konsantrasyonu solucan dokusunda Tris-HCl için 300 mM olarak belirlenmiştir.

Sıcaklık enzim aktivitelerini etkileyen önemli parametrelerden biridir. G6PD enzimi yapılan çalışmalarda 60^{o}C üzerinde aktivitesini tamamen kaybetmektedir. Solucan dokusunda G6PD enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeri 25^{o}C olarak bulunmuştur.G6PD enzimi için yapılan stabil sıcaklık solucan dokusunda 30^{o}C olarak belirlenmiştir. Daha yüksek sıcaklıkta ise enzimin denatüre olduğu tespit edilmiştir. Bulunan değer literatür ile benzerlik göstermemektedir(Beydemir *et al*. 2003; Türkoğlu *et al*. 2003; Tandoğan and Ulusu 2005).

Solucan dokusundan saflaştırılan G6PD enzimi için yapılan kinetik çalışmada $NADP^{+}$ ve G6P substratları için hesaplanan K_M sabitleri sırasıyla 0,20 mM ve 0,14 mM; V_{max} değerleri ise 0,525 ve 0,374 EÜ/ml olarak hesaplanmıştır. G6PD enzimin NADP+'ya olan ilgisi G6P' ye göre daha yüksektir. Çünkü K_M sabiti daha düşüktür. Bu durum literatürde uygunluk göstermektedir(Yılmaz *et al*. 2002;Beydemir *et al*. 2003; Türkoğlu *et al*. 2003;).

Toprak insanların yaşamı için vazgeçilmezdir. Onun kendi içindeki dengesinin bozulması toprağın verimliliğini de önemli oranda düşürecektir. Özkan ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada Antalya'da sera sebzeciliğinde, tarım ilaçlarında, önerilen dozdan daha fazlasının kullanıldığını ortaya koymuştur(Özkan et al., 2002). Yoğun aşırı-kimyasal kullanımı çevre ve insan sağlığını ciddi boyutlarda tehdit etmektedir. Ayrıca, aşırı dozlarda uygulanan pestisitler, bitki patojen ve zararlılarında dayanıklılığı teşvik etmektedir(Delen et al., 2005). Metal toksisitesi toprak için diğer önemli bir kirleticidir. Sanayideki gelişmelerle havaya ve toprağa salınan metaller, sular ve çeşitli hava olayları ile çok farklı bölgelere taşınmaktadır. Yapılan bazı çalışmalarda metal iyonlarının solucanların üzerinde olumsuz etkilerini tespit edilmiştir(Spurgeon et al., 1994). Toprak solucanı, toprağın biyokimyasal içeriğinin oluşmasında önemli katkısı vardır. Onun hayat kalitesinin çeşitli kirleticilerle tehdit edilmesi toprak içinde önemli tehdit oluşturmaktadır. Bu nedenle yapılan çalışma önem kazanmaktadır.

Yapılan çalışmada 12 pestisitin ve 8 metal iyonunun, solucandan saflaştırılan glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerinde etkisi araştırılmıştır. Diniconazole, carboryl, metalaxyl, methomyl ve oxamyl 7.6 ile 77 μM arasında IC_{50} değeri ile

inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir. En yüksek inhibisyon etkisi diniconazole pestisitinde belirlenmiştir.

Metaller arasında ise Ni^{+2}, Hg^{+2}, Pb^{+2}, Cr^{+2} ve Fe^{+2} 56 ile 120 µM arasında IC_{50} değeri ile inhibisyon etkisi belirlenmiştir. Ni^{+2} en yüksek inhibisyon etkisi gösteren metal iyonu olup en düşük inhibisyon etkisini gösteren Fe^{+2} metal iyonudur. Hepşen(2010) yaptığı çalışmada en düşük toksititeyi kurşun olarak belirtmiştir.

Yapılan çalışma sonucunda bazı pestisitlerin ve metal iyonlarının G6PD enzim aktivitesini önemli oranda inhibe ettiği tespit edilmiştir. Bu kirleticilerin, solucan üzerinde oluşturduğu olumsuz etkide bu enzim aktivitesinin engellenmiş olmasının da önemli katkısı olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Adem , Ş., & Çiftçi, M. (2016). Purification and Characterization of Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase, 6-Phosphogluconate Dehydrogenase, and Glutathione Reductase from Rat Heart and Inhibition Effects of Furosemide, Digoxin, and Dopamine on the Enzymes Activities . *Jounar of Biochemical and Molecular Toxicology 30,*, 295-301.

Adem, Ş. (2011). Sıçan Kalp ve Akciğer Dokusundan Glukoz–6-Fosfat Dehidrogenaz, 6-Fosfoglukonat Dehidrogenaz, Glutatyon Redüktaz Enzimlerinin Saflaştırılması, Karakterizasyonu, Kotinin ve Bazi İlaçların Enzimlerin Aktiviteleri Üzerine Etkilerinin İncelenmesi. *Doktora tezi*. Atatürk Üniversitesi/ Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Amador, J. A., & Görres, J. H. (2007). Microbiological characterization of the structures built by earthworms. *Soil Biology & Biochemistry 39*, 2070-2077.

Anonim. (2015). Pestisit Analizleri Eğitim Notu. (Ö. Ç. Açar, Dü.) T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı Kalıntı/Pestisit Birimi.

Banni, M., Hajer, A., Sforzini, S., Oliveri, C., Boussetta, H., & Viarengo, A. (2014). Transcriptional expression levels and biochemical markers of oxidative. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 160*, 23-29.

Beutler, E. (1971). *Red cell metabolism manual of biochemical methods.* New York: Grune & Stratton.

Beydemir, Ş. Y. (2003). Purification of Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase From Goose Erythrocytes and Kinetic Properties. . *Turk J Vet Anim Sci 27*, 1179-1185 .

Bhat, M. K. (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances 18 Research review paper*, 355-383.

Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytıcal Bıochemıstry 72,*, 248-254.

Chen, M., Xu, P., Zeng, G., Yang, C., Huang, D., & Zhang, J. (2015). Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavymetals by composting: Applications, microbes and future research needs. *Biotechnology Advances 33*, 745-755.

Cheng, Y.-C., & Prusoff, W. H. (1973). Relatıonshıp Between The Inhıbıtıon Constant (&) And The Concentratıon Of Inhıbıtor Whıch Causes 50 Per Cent Inhıbıtıon (Iso) of an enzymatıc reactıon. *Biochemical Pharmacology 22*, 3099-3108.

Cici, D. (2007). İnsan Eritrositlerinden Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Enziminin Saflaştırılması ve Bazı Pestisitlerin Enzim Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*. Balıkesir Üniversitesi/ Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir.

Corpas, F. J., Garcia-Salguero, L., Peragon, J., & Lupianez, J. A. (1995). Kinetic properties of hexose-monophosphate dehydrogenases. I. Isolation and partial purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase from rat liver and kidney cortex. *Life Sciences*, 179-189.

Çağlarırmak, N., & Hepçimen, Z. A. (2010). Ağır Metal Toprak Kirliliğinin Gıda Zinciri ve İnsan Sağlığına Etkisi. *Akademik Gıda*, 31-35.

Çankaya, M., Şişecioğlu, M., Çiftçi, M., & Özdemir, H. (2011). Effects of Some Metal Ions on Trout Liver Glucose 6-phosphate Dehydrogenase. *Research Journal of Environmental Toxicology 5*, 385-391.

Çiftçi, M., Beydemir, Ş., Yılmaz, H., & Altıkat, S. (2003). Purification of glucose 6-phosphate dehydrogenase from Buffalo (Bubalus bubalis) erythrocytes and investigation of some kinetic properties. *Protein Expression and Purification 29*, 304-310.

Çomaklı, V., Akkemik, E., Çiftçi, M., & Küfrevioğlu, O. İ. (2013). Purification and characterization of glucose 6-phosphate dehydrogenase enzyme from rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) liver and investigation of the effects of some metal ions on enzyme activity. *Toxicology and Industrial Health*, 1-9.

Delen, N., Durmuşoğlu , E., Güncan, A., Güngör, N., Turgut, C., & Burçak, A. (2005). Türkiye'de Pestisit Kullanımı Kalıntı ve Organizmalarda Duyarlılık Azalışı Sorunları. *Türkiye Ziraat Mühendisliği VI. Teknik Kongre* , (s. 629-648). Ankara.

Deneke, S. M., & Fanburg, B. L. (1989). Regulation of cellular glutathione. *The American journal of physiology 257*, L163-L173.

Ekinci, D., Çavdar, H., Durdağı, S., Talaz, O., Şentürk, M., & Supuran, C. T. (2012). Structureeactivity relationships for the interaction of 5,10-dihydroindeno[1,2-b] indole derivatives with human and bovine carbonic anhydrase isoforms I, II, III, IV and VI. *European Journal of Medicinal Chemistry 49*,, 68-73.

Francis, R. O., Jhang, J. S., Pham, H. P., Hod, E. A., Zimring, J. C., & Spitalnik, S. L. (2013). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in transfusion medicine: the unknown risks. *Vox Sanguinis*, 1-11.

Gao, M., Song, W., Zhang, J., & Guo, J. (2013). Effect on enzymes and histopathology in earthworm (Eisenia foetida) induced by triazole fungicides. *Environmental toxicology and pharmacology 35*, 427-433.

Gençer, N. (2008). Paraoksonaz q ve r izoenzimlerinin saflaştırılması ve bazı çevre kirleticilere karşı afinitesinin araştırılması. *Doktora tezi*. Balıkesir Üniversitesi/ Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir.

Güler, Ç., & Çobanoğlu, Z. (1997). *Pestisitler*. Ankara: İLKÖZ Matbaası .

Ha, H., Olson, J. R., Bian, L., & Rogerson, P. A. (2014). Analysis of Heavy Metal Sources in Soil Using Kriging Interpolation on Principal Components. *Environmental Science & Technology*, 4999-5007.

Helmut, S. (1999). Glutathıone and Its Role In Cellular Functıons. *Free Radical Biology & Medicine 27*, 916-921.

Hepşen Türkay, F. Ş. (2010). Fındık zurufu ve arıtma çamurunun solucanlar ile kompostlanması ve elde edilen vermikompostun sera ve tarla koşullarında toprakların biyolojik özelliklerinde meydana getirdiği etkilerin belirlenmesi. *Doktora Tezi*. Ondokuz Mayıs Üniversitesi/ Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.

Hopa, E., Sinan, S., & Sevindik, E. (2011). The inhibitory effects of some pesticides on human erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase activity (in vitro). *Fresenius Environmental Bulletin 20*, 1314-1319.

Keha, E. E., & Küfrevioğlu, İ. Ö. (2011). *Biyokimya.* İstanbul: Aktif Yayınevi.

Knapen, M. F., Zusterzeel, P. L., Peters, W. H., & Steegers, E. A. (1999). Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology 82*, 171-184.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head Of Bacteriophage T4. *Nature 227*, 680-685.

Manahan, S. E. (2003). *Toxicological chemistry and biochemistry.* New York: CRC Press.

Meister, A. (1988). Glutathione Metabolism and Its Selective Modification. *The Journal of Biological Chemistry 263*, 17205-17208.

Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2005). *Lehninger Principles of Biochemistry.* New York: WH Freeman ve Company.

Nordberg, G. F., Fowler, B. A., & Nordberg, M. (2014). *Handbook on the Toxicology of Metals: Fourth Edition.* Academic Press.

Özer, N., Bilgi, C., & Ögüs, H. (2002). Dog liver glucose-6-phosphate dehydrogenase purification and kinetic properties. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 34*, 253–262.

Özkan, B., Karaman, S., Akçaöz, H. V., & Taşçıoğlu, Y. (2002). Antalya ilinde serada sebze üretiminde pestisit kullanımının ekonomik açıdan değerlendirilmesi. *Bahçe 31*, 9-16.

Seven, T., Can, B., Darende, B. N., & Ocak, S. (2018). Hava ve Toprakta Ağır Metal Kirliliği. *Ulusal Çevre Bilimleri Araştırma Dergisi 1*, 91-103.

Spurgeon, D. J., Hopkin, S. P., & Jones, D. T. (1994). Effects of cadmıum, copper, lead and zınc on growth, reproductıon and survıval of the earthworm eisenia fetida (savıgny): assessıng the envıronmental ımpact of poınt-source metal contamınatıon ın terrestrıal ecosystems . *Environmental Pollution 84*, 123-130.

Stanton , R. C. (2012). Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase, NADPH, and Cell Survival . *IUBMB Life 64*, 362-369.

Stanton, R. C. (2012). Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase, NADPH, and Cell Survival. *IUBMB Life*, 362-369.

Taciroğlu, B., Kara, E. E., & Sak, T. (2016). Toprakta Ağır Metal Gideriminde Solucanların Kullanımı. *KSÜ Doğa Bili Dergisi 19*, 201-207.

Tandogan, B., & Ulusu, N. (2005). Characterization of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Purified From Lamb Kidney Cortex. *Turk J Biochem 30(2)*, 178-182.

Tang , W.-w., Zeng, G.-M., Gong, J.-L., Liang, J., Xu, P., Zhang, C., et al. (2014). Impact of humic/fulvic acid on the removal of heavymetals fromaqueous solutions using nanomaterials: A review. *Science of the Total Environment 468* , 1014-1027.

Tekman, B., Özdemir, H., Şentürk, M., & Çiftçi, M. (2008). Purification and characterization of glutathione reductase from rainbow trout(Oncorhynchus mykiss) liver and inhibition effects of metal ions on enzyme activity. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 148*, 117-121.

Tiryaki, O., & Potur, T. (2017). Topraktan Pestisitlerin Arındırılmasında Önemli Bir Araç: Fitoremediasyon. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi Cilt 33*, 59-68.

Türkoğlu, V., Aldemir, S., & Ciftci, M. (2003). Purication and Characterization of Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase from Sheep Live. *Turk J Chem 27*, 395-402.

Yılmaz, H., Ciftci, M., Beydemir, Ş., & Bakan, E. (2002). Purıfıcatıon of glucose 6phosphate dehydrogenase from chıcken erythrocytes ınvestıgatıon of some kınetıc propertıes. *Preparative Biochemistry and Biotechnology, 32: 3*, 287-301 .

Yücel, Ü. (tarih yok). Pestisitlerin İnsan ve Çevre Üzerine Etkileri. Ankara Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi, Nükleer Kimya Bölümü .

Zeng, G., Chen, M., & Zeng, Z. (2013). Risk of Neonicotinoid Pesticides. *Science 340*, 1403.

Zeng, G., Chen, M., & Zeng, Z. (2013). Shale gas: pollution fears in China. *Nature 499*, 154.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı :Naciye KAYHAN

Doğum Yeri : Uşak

Doğum Tarihi : 04.08.1993

Medeni Hali :Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Adres : 31 Ağustos mah. Bahadır Sok. No:37 Kat:2 Banaz/UŞAK

Tel : (+09) 553 110 45 92

e-mail : naciye-93-64@hotmail.com

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : İzzettin Çalışlar Lisesi 2007-2011

Lisans : Çankırı Karatekin Üniversitesi, Kimya 2011 - 2015

Yüksek Lisans : Çankırı Karatekin Üniversitesi Kimya A.B.D. 2015-2017

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

Şeyma Doğrul Yükseköğrenim Kız Öğrenci Yurdu 2017

Rabsoil Geri Dönüşüm Fabrikası 2018

Yayınlar :

1. ÖZDEMİR ÖZMEN ÜMMÜHAN, Güler Çağlar, ADEM ŞEVKİ, Kayhan Naciye, YERLİKAYA EMRAH, OKAY SEZER,HAMURCU FATMA, ŞENTÜRK OZAN SANLI (2017). Aromatik ve heteroaromatik bütansülfonil hidrazon bileşiklerinin karbonik anhidraz II ve IX enzimleri üzerindeki inhibisyon etkilerinin incelenmesi. 3. Uluslararası İlaç ve Eczacılık Kongresi (Özet Bildiri/Poster)

2. ÖZDEMİR ÖZMEN ÜMMÜHAN, Güler Çağlar, ADEM ŞEVKİ, Kayhan Naciye, Yerlikaya Emrah, Oktay Sezer, HAMURCU FATMA (2017). Synthesis and Carbonic anhydrase Inhibition on isoenzymes (hCA-II and hCA-IX) of Ni (II) complexes obtained from aromatic ethane sulfonyl hydrazone compounds. IVEK 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies (Özet Bildiri/Poster)
3. ADEM ŞEVKİ, Güler Çağlar, KAYHAN NACİYE (2017). Farklı Enzimler Üzerinde Metil Civanın İnhibisyon Etkisi. Uluslararası İlaç ve Eczacılık Kongresi (Özet Bildiri/Poster)
4. ÖZDEMİR ÖZMEN ÜMMÜHAN, Güler Çağlar, ADEM ŞEVKİ, Kayhan Naciye,YERLİKAYA EMRAH, OKAY SEZER, HAMURCU FATMA (2017). Aromatik etan sülfonil hidrazon bileşiklerinden elde edilen Ni (II) komplekslerinin sentezi ve karbonik anhidraz izoenzimler (hCA-II ve hCA-IX) üzerindeki inhibiston etkileri. 3. Uluslararası İlaç ve Eczacılık Kongresi (Özet Bildiri/Poster)
5. ÖZDEMİR ÖZMEN ÜMMÜHAN, Güler Çağlar, ADEM ŞEVKİ, Kayhan Naciye, Yerlikaya Emrah, Oktay Sezer, HAMURCU FATMA, ŞENTÜRK OZAN SANLI (2017). Investigation of inhibitory effects on Carbonic anhydrase II and IX enzymes of Aromatic and Heteroaromatic butanesulfonyl hydrazone compounds. IVEK 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies (Özet Bildiri/Poster)
6. Naciye Kayhan, EYÜPOĞLU VOLKAN, ADEM ŞEVKİ (2016). The immobilization of lipase on PVDF co HFP membrane. International Conference on Advances in Natural and Applied Sciences, Doi: 10.1063/1.4945934 (Tam Metin Bildiri/Poster)
7. ADEM ŞEVKİ, Kayhan Naciye (2016). Inhibition effects of some metal ions on the rat liver 6 phosphogluconate dehydrogenase. International Conference on Advances in Natural and Applied Sciences, Doi: 10.1063/1.4945933 (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum)