KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KARBONİK ANHİDRAZ İNHİBİTÖRÜ METİLENAMİNOBENZEN SÜLFONAMİT TÜREVLERİNİN *Drosophila melanogaster'İN* GELİŞİMİ, MORFOLOJİSİ VE EŞEY ORANI ÜZERİNE ETKİLERİ

BAHAR ÖZBÖLÜK

KOCAELİ 2020

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KARBONİK ANHİDRAZ İNHİBİTÖRÜ METİLENAMİNOBENZEN SÜLFONAMİT TÜREVLERİNİN *Drosophila melanogaster*'İN GELİŞİMİ, MORFOLOJİSİ VE EŞEY ORANI ÜZERİNE ETKİLERİ

BAHAR ÖZBÖLÜK

Doç.Dr. Ayla KARATAŞ		
Danışman,	**Kocaeli Üniversitesi**	**.....**
Prof.Dr. Hüseyin AKSOY		
Jüri Üyesi,	**Sakarya Üniversitesi**	**.....**
Doç.Dr. Özlem AKSOY		
Jüri Üyesi,	**Kocaeli Üniversitesi**	**.....**

Tezin Savunulduğu Tarih: 12.08.2020

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, destek olan ve tezimin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Ayla KARATAŞ'a en derin minnet ve saygılarımı sunarım. Laboratuvar çalışmalarım sırasında benden yardımını esirgemeyen Doç. Dr. Özlem AKSOY'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Çalışmam da kullandığım test maddelerini sentezleyerek temin etmemi sağlayan SAÜ Kimya Bölümü Organik Kimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. Mustafa ARSLAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Zorluklarla geçen yüksek lisans hayatım boyunca en büyük motivasyonum olan, varlığından her zaman destek aldığım ekip arkadaşım ve dostum Duygu Fatma Can'a çok teşekkür ederim. Canım arkadaşıma hayatı boyunca başarılar dilerim.

Çalışmalarım esnasında manevi desteklerini eksiltmeyen dostlarım Sena Demirel ve Ahmet Bayköse'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın ve eğitimimin her anında yanımda olan canım aileme sonsuz teşekkürler…

Temmuz-2020 Bahar ÖZBÖLÜK

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR i
İÇİNDEKİLER ii
ŞEKİLLER DİZİNİ iv
TABLOLAR DİZİNİ v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ vi
ÖZET vii
ABSTRACT viii
GİRİŞ 1
1. GENEL BİLGİLER 2
1.1. Karbonik Anhidraz Enzimi (KA; EC: 4.2.1.1) 2
1.1.1. Karbonik anhidraz enziminin gen aileleri ve dağılımı 3
1.1.2. Karbonik anhidraz enziminin katalitik mekanizması 5
1.1.3. Karbonik anhidraz inhibitörleri 7
1.2. Karbonik Anhidraz İnhibitörü Olan Sülfonamitler 7
1.3. *Drosophila melanogaster* ile İlgili Genel Bilgiler 9
1.3.1. *D. melanogaster*'in sistematiği 9
1.3.2. *D. melanogaster*'in yaşam döngüsü 10
1.3.3. Model organizma olarak *D. melanogaster* seçilmesinin avantajları 13
2. MATERYAL VE METOD 15
2.1. Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar 15
2.2. Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Karbonik Anhidraz İnhibitörleri 15
2.3. Kullanılan Soy 16
2.4. D. melanogaster Kültürü ve Laboratuvar Koşulları 16
2.5. Deney Düzeneği ve Uygulama 17
2.5.1. Metamorfoz süresini gözlemlemek için uygulanan yöntem 17
2.5.2. Morfolojik karakterleri gözlemlemek için yapılan çalışma 17
2.5.3. Ergin birey sayısı 18
2.5.4. Eşey oranını gözlemlemek için yapılan çalışma 19
2.5.5. İstatiksel değerlendirme 19
3. BULGULAR 20
3.1. 6b Maddesinin (4-(1-methyl-2-oxo-3'H-spiro[indoline-3,2'-[1,3,4]oxadiazole]-5' yl))benzene sülfonamit) Etkileri 20
3.1.1. 6b maddesinin metamorfoz süresi üzerine etkileri 20
3.1.1.1. 6b maddesi karbonik anhidraz inhibitörlerin F_1 neslinde metamorfoz süresi üzerine etkisi 20
3.1.1.2. 6b maddesi karbonik anhidraz inhibitörlerin F_2 neslinde metamorfoz süresi üzerine etkisi 22
3.1.2. 6b maddesinin birey sayısına etkisi 23
3.1.2.1. 6b maddesinin F_1 neslinde birey sayısına etkisi 23
3.1.2.2. 6b maddesinin F_2 neslinde birey sayısına etkisi 25

3.1.2.3. 6b maddesinin F_1 neslinde anormal birey sayısına etkisi 28
3.1.2.4. 6b maddesinin F_2 neslinde anormal birey sayısına etkisi 30
3.1.3. 6b maddesinin fenotipe etkisi..... 33
3.1.4. 6b maddesinin eşey oranına etkisi..... 35
3.1.4.1. 6b maddesinin F_1 neslinde eşey oranına etkisi 35
3.1.4.2. 6b maddesinin F_2 neslinde eşey oranına etkisi 38
3.2. 2e Maddesinin 4-(((1,3-dimetil-2,4,6-trioksotetrahidropyrimidin-5(2H)-iliden) methil) amino) benzen sülfonamit) Etkileri..... 40
3.2.1. 2e maddesinin metamorfoz süresi üzerine etkileri..... 40
3.2.1.1. 2e maddesi karbonik anhidraz inhibitörlerin F_1 neslinde metamorfoz süresi üzerine etkisi 40
3.2.1.2. 2e maddesi karbonik anhidraz inhibitörlerin F_2 neslinde metamorfoz süresi üzerine etkisi 42
3.2.2. 2e maddesinin birey sayısına etkisi..... 43
3.2.2.1. 2e maddesinin F_1 neslinde birey sayısına etkisi..... 43
3.2.2.2. 2e maddesinin F_2 neslinde birey sayısına etkisi..... 46
3.2.2.3. 2e maddesinin F_1 neslinde anormal birey sayısına etkisi 48
3.2.2.4. 2e maddesinin F_2 neslinde anormal birey sayısına etkisi 51
3.2.3. 2e maddesinin fenotipe etkisi..... 53
3.2.4. 2e maddesinin eşey oranına etkisi..... 54
3.2.4.1. 2e maddesinin F_1 neslinde eşey oranına etkisi..... 54
3.2.4.2. 2e maddesinin F_2 neslinde eşey oranına etkisi..... 57
4. TARTIŞMA VE SONUÇ 59
KAYNAKLAR 65
KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER 73
ÖZGEÇMİŞ 74

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Karbondioksitin bikarbonata ve protona geri dönüşümlü hidrasyonu 2
Şekil 1.2. Karbonik anhidraz enziminin yapısı 3
Şekil 1.3. Zn+2 iyonunun üç histidin (His94, His96 ve His119) ve aktif bölgede bulunan Thr199 ve Glu106 kısımları ile şematik gösterimi. 6
Şekil 1.4. Karbonik anhidraz (KA) enziminin hidrataz aktivitesi. 7
Şekil 1.5. Prontosilden sülfonilamit oluşum reaksiyonu. 8
Şekil 1.6. Sülfonamid sınıflarının genel yapısı. 8
Şekil 1.7. *D. melanogaster*'in yaşam döngüsü. 11
Şekil 1.8. *D. melanogaster* yumurtasının görünüşü. 12
Şekil 2.1. Metilenaminobenzen sülfonamit türevlerinin sentezi. 16
Şekil 3.1. 6b maddesinin F_1 neslinde toplam birey sayısı 25
Şekil 3.2. 6b maddesinin F_2 neslinde toplam birey sayısı 28
Şekil 3.3. Dişi bireylerin F_1 neslinde anormal fenotipli bireyler 30
Şekil 3.4. Erkek bireylerin F_1 neslindeki anormal fenotipli bireyler 30
Şekil 3.5. Dişi bireylerin F_2 neslinde anormal fenotipli bireyler 33
Şekil 3.6. Erkek bireylerin F_2 neslindeki anormal fenotipli bireyler 33
Şekil 3.7. 6b maddesinin morfolojik karakterler üzerine etkileri (a-Her iki kanat mızrak, b-İki kanat üst üste yapışık ve kıvrık, c-Her iki kanat kırık, d-Sağ kanat kıvrık, e-3. ve 4. Segment oluşumu tamamlanmamış, f-Her iki kanat üst üste abdomene yapışık, g-Sol kanat kıvrık, h-Sol kanat abdomene yapışık) 34
Şekil 3.7. 6b maddesinin morfolojik karakterler üzerine etkileri (a-Her iki kanat mızrak, b-İki kanat üst üste yapışık ve kıvrık, c-Her iki kanat kırık, d-Sağ kanat kıvrık, e-3. ve 4. Segment oluşumu tamamlanmamış, f-Her iki kanat üst üste abdomene yapışık, g-Sol kanat kıvrık, h-Sol kanat abdomene yapışık) 35
Şekil 3.8. 2e maddesinin F_1 neslinde toplam birey sayısı 45
Şekil 3.9. 2e maddesinin F_2 neslinde toplam birey sayısı 48
Şekil 3.10. Dişi bireylerin F_1 neslinde anormal fenotipli bireyler 50
Şekil 3.11. Erkek bireylerin F_1 neslindeki anormal fenotipli bireyler 50
Şekil 3.12. Dişi bireylerin F_2 neslinde anormal fenotipli bireyler 53
Şekil 3.13. Erkek bireylerin F_2 neslindeki anormal fenotipli bireyler 53
Şekil 3.14. 2e maddesinin morfolojik karakterler üzerine etkileri (a-Sağ kanat kırık, b-Sol kanat kırık, c-Sol kanat mızrak, d-Her iki kanat abdomene yapışık 54

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1.1. α-KA ailesinin yerleşimi, aktivitesi ve işlevi..... 4
Tablo 1.2. *Drosophila melanogaster*'in sistematiği..... 10
Tablo 3.1. 6b maddesinin F_1 neslinde metamorfoz süresine etkisi..... 21
Tablo 3.2. 6b maddesinin F_2 neslinde metamorfoz süresine etkisi..... 22
Tablo 3.3. 6b maddesinin F_1 neslinde birey sayısına etkisi..... 24
Tablo 3.4. 6b maddesinin F_2 neslinde birey sayısına etkisi..... 27
Tablo 3.5. 6b maddesinin F_1 neslinde anormal birey sayısına etkisi..... 29
Tablo 3.6. 6b maddesinin F_2 neslinde anormal birey sayısına etkisi..... 32
Tablo 3.7. 6b maddesinin F_1 neslinde eşey oranına etkisi..... 37
Tablo 3.8. 6b maddesinin F_2 neslinde eşey oranına etkisi..... 39
Tablo 3.9. 2e maddesinin F_1 neslinde metamorfoz süresine etkisi..... 41
Tablo 3.10. 2e maddesinin F_2 neslinde metamorfoz süresine etkisi..... 43
Tablo 3.11. 2e maddesinin F_1 neslinde birey sayısına etkisi..... 44
Tablo 3.12. 2e maddesinin F_2 neslinde birey sayısına etkisi..... 47
Tablo 3.13. 2e maddesinin F_1 neslinde anormal birey sayısına etkisi..... 49
Tablo 3.14. 2e maddesinin F_2 neslinde anormal birey sayısına etkisi..... 52
Tablo 3.15. 2e maddesinin F1 neslinde eşey oranına etkisi..... 55
Tablo 3.16. 2e maddesinin F_2 neslinde eşey oranına etkisi..... 58

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

>	: Büyüktür
<	: Küçüktür
%	: Yüzde
µL	: Mikrolitre
Mm	: Milimolar
Gr	: Gram
kDa	: Kilodalton
LC50	: Ölümcül doz

Kısaltmalar

CO_2	: Karbondioksit
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
H_2CO_3	: Karbonik Asit
KA	: Karbonik Anhidraz
KAİ	: Karbonik Anhidraz İnhibitörü
KARP	: Karbonik Anhidraz İlişkili Protein
$NaAsO_2$	: Sodyum Arsenit
Zn	: Çinko

KARBONİK ANHİDRAZ İNHİBİTÖRÜ METİLENAMİNOBENZEN SÜLFONAMİT TÜREVLERİNİN *Drosophila melanogaster'İN* GELİŞİMİ, MORFOLOJİSİ VE EŞEY ORANI ÜZERİNE ETKİLERİ

ÖZET

Bu çalışmada insan karbonik anhidraz I ve II izoenzimlerini inhibe ettiği tespit edilmiş dolayısıyla ilaç ham maddesi olarak kullanılabilme potansiyeli olan, 4-(1-methyl-2-oxo-3'H-spiro[indoline-3,2'-[1,3,4]oxadiazole]-5'-yl)benzenesulfonamide (6b) ve 4-(((1,3-dimetil-2,4,6-trioksotetrahidropyrimidin-5(2H)-iliden)methil)amino)benzensülfonamit (2e) maddelerinin, *Drosophila melanogaster*'in F_1 ve F_2 neslinde ergin birey sayısı, fenotipik özellikler, eşey oranı ve metamorfoz süresine etkisi araştırılmıştır. Ki değerleri baz alınarak üç farklı konsantrasyonda 6b maddesi (0,85µl, 1,706 µl ve 3,4 µl) ve 2e maddesi (2,6 µl, 5,2 µl ve 10,4 µl) beslenme yoluyla uygulanmış, F_1 ve F_2 nesline ait veriler elde edilmiştir. F_1 nesli 6b maddesinde (0,85 µl, 1,706 µl ve 3,41 µl) konsantrasyon azaldıkça birey sayısında artma, anormal birey sayısında azalma meydana gelmiştir. 2e maddesinin (2,6 µl, 5,2 µl ve 10,4 µl) F_1 neslinde, konsantrasyon azaldıkça birey sayısında azalma, anormal birey sayısında sadece 2,6 µl'lik konsantrasyonda artma gözlenmiştir. F_2 neslinde 6b maddesi için, konsantrasyon arttıkça hem birey sayısı hem de anormal birey sayısı azalmıştır. F_2 neslinde 2e maddesi için, konsantrasyon azaldıkça birey sayısında artma, anormal birey sayısında sadece 2,6 µl'lik konsantrasyonda artma gözlenmiştir. Eşey oranı, F_1 neslinde 6b maddesi içeren 1,706 µl ve 3,41 µl'lik dozlarda dişi bireyler lehine artarken, 2e maddesinde ise 10,4 µl'lik dozda erkek bireyler lehine değişmiştir. F_2 neslinde 6b ve 2e maddesi için eşey oranı dişi bireyler lehine değişmiştir. Uygulanan her iki maddenin F_1 ve F_2 neslinde, metamorfoz süresini değiştirmediği ortaya çıkmıştır. Bulgular sonucunda 6b ve 2e maddesinin ilaç olarak kullanılması in vivo koşullarda pozitif sonuçlar vermiştir.

Anahtar Kelimeler: *Drosophila*, İlaç Hammaddesi, Karbonik Anhidraz İnhibitörler.

EFFECTS OF DERIVATIVES OF METHYLENE AMINOBENZENE SULFONAMIDE, A CARBONIC ANHYDRASE INHIBITOR ON DEVELOPMENT, MORPHOLOGY AND SEX RATE OF *Drosophila melanogaster*

ABSTRACT

In this study, it has been determined that human inhibitis the carbonic anhydrase I and II isoenzymes and thus the effects of 4- (1-methyl-2-oxo-3'H-spiro [indoline-3,2 '- [1,3,4] oxadiazole] -5'-yl) benzenesulfonamide (6b) and 4-(((13-dimethyl-2,4,6-trioxotetrahidropyrimidin-5(2H)-yliden)methyl)amino) benzenesulfonamide (2e) substances that have the potential to be used as drug raw materials on the number of adults in F1 and F2 generations, phenotypic features, sex ratio and metamorphosis duration of Drosophila melanogaster have been investigated. Based on the Ki values, three different concentrations of 6b (0.85 µl, 1.706 µl and 3.4 µl) and 2e (2.6 µl, 5.2 µl and 10.4 µl) were administered by feeding and data belonging to F1 and F2 generations were obtained. In F1 generation 6b item (0.85 µl, 1.706 µl and 3.41 µl), as the concentration decreased, the number of individuals increased and the number of abnormal individuals decreased. In F1 generation of the substance 2e (2.6 µl, 5.2 µl and 10.4 µl), the number of individuals decreased as the concentration decreased, and only an increase in the concentration of 2.6 µl of the number of abnormal individuals was observed. For item 6b in the F2 generation, both the number of individuals and the number of abnormal individuals decreased as the concentration increased. For the 2e substance in the F2 generation, an increase in the number of individuals was observed as the concentration decreased and an increase in the concentration of only 2.6 µl was observed in the number of abnormal individuals. The sex ratio increased in favor of female individuals at 1,706 µl and 3,41 µl doses containing 6b substance in F1 generation, while it changed in favor of male individuals in 2e item at 10.4 µl dose. The sex ratio for item 6b and 2e in the F2 generation changed in favor of the female individuals. It was revealed that both applied substances did not change the metamorphosis duration in F1 and F2 generation. As a result of the findings, the use of 6b and 2e drugs as drugs gave positive results under in vivo conditions.

Key Words: Drosophila, Drug Raw Material, Carbonic Anhydrase Inhibitors.

GİRİŞ

Geçmişten günümüze, karbonik anhidraz (KA)'lar ilaç hedefi olarak çok ilgi çeken enzim ailelerinden biridir. Karbonik anhidrazlar (KA, E.C.4.2.1.1), karbondioksitin (CO_2) hidratasyonunu geri dönüşümlü olarak katalizleyen çinko (Zn^{+2}) metalloenzim ailesinin üyelerinden biridir (Supuran, 2008).

Katalizledikleri bu reaksiyon sayesinde KA izoenzimleri; glukoneogenez, lipogenez ve üregenez gibi biyosentetik reaksiyonlar, CO_2/bikarbonatın solunum ve taşınımı, çeşitli dokularda ve organlarda elektrolit salgılaması, kemiklerde rezorbsiyon, kalsifikasyon ve karsinojenite gibi birçok fizyolojik ve patolojik süreçte önemli rol oynarlar (Meleddu ve diğ., 2015; Gulcin ve diğ., 2016). Bugüne kadar karbonik anhidraz'ın bilinen 16 izoenzimi (KA I, II, III, IV, VA, VB, VI, VII, IX, XII, XIII, XIV; KARP VIII, X, XI) bulunmaktadır. Bu izoenzimlerden KA II tüm karbonik anhidrazlar içinde en aktif olanıdır (Supuran ve diğ., 2001; Simone ve diğ., 2008; Pastorekova ve diğ., 2008; Pichake, 2014). Son yıllarda, bazı KA izoenzimlerinin kanser, obezite, osteoporoz gibi hastalıklarının patofizyolojisi ile patogenezinde rol oynadığı anlaşılmıştır. Dolayısıyla, bu hastalıklarla ilişkili KA izoenzimlerine spesifik olan yeni KAİ sülfonamit türevi ilaç etken maddelerinin senteziyle ilgili çalışmalar da yapılmaktadır (Supuran, 2010; Şen, 2018). KA'lar hem temel bilim çalışmaları için hem de üst düzeyde araştırılmış enzimlerin en iyi örneğini temsil eder. Proteinlerdeki karmaşık yapı-fonksiyon ilişkilerinin atomik seviyede incelenmesi, aynı zamanda pratik açıdan anlaşılmasını sağlayan bu enzimlerin inhibitörleri, çeşitli hastalıklar için klinik uygulamalara sahiptir (Bulmuş, 2019).

Yukarıda verilen bilgiler doğrultusunda, insan karbonik anhidraz I ve II izoenzimlerini inhibe ettiği tespit edilmiş, dolayısıyla ilaç ham maddesi olarak kullanılabilme potansiyeli olan, 4-(((1,3-dimetil-2,4,6-trioksotetrahidropyrimidin-5(2H)-iliden) methilamino) benzen sülfonamit (2e) ve 4-(1-methyl-2-oxo-3'H-spiro[indoline-3,2'-[1,3,4]oxadiazole]-5'yl) benzene sülfonamit (6b) bileşiklerinin, *Drosophila melanogaster*'in bazı gelişimsel özelliklerine etkisi araştırılmıştır.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Karbonik Anhidraz Enzimi (KA; EC: 4.2.1.1)

1933 yılında ilk kez memeli eritrositlerinden saflaştırılan karbonik anhizraz'ın (KA) temel fizyolojik fonksiyonu CO_2'nin hidrasyonu veya bikarbonatın dehidrasyon reaksiyonlarını tersinir olarak katalizlenmesini sağlayan bir rol oynar (Badger ve Price, 1994; Supuran and Scozzafava 2001; İrende, 2019).

Bu reaksiyon ile beraber birçok fizyolojik ve patolojik olayda rol oynayan KA'ın en önemli fonksiyonu ise, doku kılcal damarlarında, metabolizma ürünü olan karbondioksit'in (CO_2), karbonik asit'e (H_2CO_3), akciğer pulmoner kapilerde ise H_2CO_3'in, CO_2'e dönüşmesi reaksiyonunu katalizleyerek, solunum olayında bulunmasıdır (Şekil 1.1).

$$CO_2 + H_2O \xleftrightarrow{CA} H_2CO_3 \longleftrightarrow HCO_3^- + H^+$$

Şekil 1.1. Karbondioksitin bikarbonata ve protona geri dönüşümlü hidrasyonu

Bununla beraber pH homeostazisi, kemik resorpsiyonu, kalsifikasyon, tümör oluşumu, idrar asidifikasyonu, ve daha birçok biyosentez reaksiyonunda görev almaktadır (Pastarekova ve diğ., 2004).

Karbonik anhidraz memeli eritrositlerinden izole edildikten sonraki yıllarda, balık eritsositleri, sıçan tükürüğü ve eritrositlerinden, sığır kemiği ve lökositlerinden, bakteri ve bitkilerin saflaştırılmasından elde edilmiştir (Ekinci, 2006). Enzimin memelilerdeki molekül kütlesisinin 30 kDa civarında olduğu saptanmıştır (Feldstein ve Silverman, 1984; Krungkrai ve diğ., 2001; Beydemir ve diğ., 2002). Karbonik anhidraz genel olarak metabolik CO_2'in taşınmasını sağlamanın yanı sıra, birçok dokularda hidrojen (H^+) ve bikarbonat (HCO_3) birikiminde de rol almaktadır. Bu dokulara örnek böbrek, gastrit mukoza ve göz lensini söyleyebiliriz. Bunlardan başka histokimyasal metodlarla, tükrük bezleri, kaslar, sinir miyelin kılıfı, pankreas, prostat

ve endometrium dokularda da KA'ya rastlanmış ve bunların bazıları saflaştırılararak, biyokimyasal özellikleri incelenmiştir.

Karbonik anhidraz enzimleri (Karbonat Hidroliyaz E.C.4.2.1.1), 29-30 kDa molekül ağırlığında, 259-260 aminoasit içeren, monomerik ve katalitik aktiviteleri için Zn^{+2} iyonuna sahip metaloenzimlerdir ve organizmada çok önemli işleve sahiptir (Şekil 1.2) (Lindskog, 1994).



Şekil 1.2. Karbonik anhidraz enziminin yapısı (Lindskog, 1997)

1.1.1. Karbonik anhidraz enziminin gen aileleri ve dağılımı

Bir canlı türünde kimyasal yapıları farklı olan fakat aynı reaksiyonu katalizleyen enzimleri izoenzim olarak tanımlarız. İzoenzimlerin aktiviteleri farklı olup, substrat, kofaktör ve inhibitörlere karşı afiniteleri değişiklik gösterebilir (Keha ve Küfrevioğlu, 2009). Karbonik anhidraz izoenzimleri hücresel dağılımları, devinimsel özellikleri ve kimyasal reaksiyon profilleri açısından faklılık göstermektedirler (Beydemir ve diğ., 2000). α-KA ailesinin yerleşimi, aktivitesi ve işlevi Tablo 1.1. 'de verilmiştir.

Tablo 1.1. α-KA ailesinin yerleşimi, aktivitesi ve işlevi (İrende, 2019).

Hücreiçi Yerleşim	İzoenzim	İşlevi	Bulunduğu Dokular
Sitozolik	I	Solunum Asit/baz homeostazı	Kolon, Göz, Ter Bezi, Yağ Dokusu, Kan Hücreleri
	II	Solunum Asit/baz homeostazı	Bütün Dokular
	III	Metabolizma Oksidatif hasar	Yağ Dokuları, İskelet Kası, Karaciğer
	VII	Nöbetler Oksidatif hasar Kanser	Beyin, Kolon, Karaciğer ve İskelet Kası
	XIII	Bilinmiyor	Akciğer, Böbrek, Kalp, Beyin, İskelet Kası, Üreme Organları, Bağırsaklar
Sitozolik (KARPS)	VII	Motor fonksiyon Kanser çoğalması	Beyin
	X	CNS	Merkezi Sinir Sistemi
	XI	CNS Kanser çoğalması	Merkezi Sinir Sistemi
	IV	Solunum Sperm hareketliliği CNS tamponlama	Akciğer, Böbrek
	IX	Gastrik homeostaz Kanser çoğalması Hipoksi	Mide, Kolon, Pankreas
	XII	Sıvı homeostazı Kanser çoğalması Hipoksi	Böbrek
	XIV	Fotoreseptör Sinyalizasyon CNS tamponlama	Beyin ve Göz
	mXV	Bilinmiyor	Böbrek
Mitokondriyal	VA	Üre sentezi Glukoneogenez Lipogenez	Karaciğer, İskelet Kası, Böbrek
	VB	Üre sentezi Glukoneogenez Lipogenez	Bütün Dokular
Salgısal	VI	Tat algılaması Diş boşlukları	Tükürük Bezleri

Tüm canlı organizmalarda bulunan karbonik anhidrazların genetik olarak birbirinden farklı 6 tane sınıfı (α-KA, β-KA, γ-KA, δ-KA, ξ-KA, η-KA) bilinmektedir. Sınıflandırma yapılırken, proteindeki amino asitlerin dizilişi, karbonik anhidrazların üç boyutlu yapısı, aktif bölgenin yapısını ve katalitik özellikleri temel alınmıştır (Hewett-Emmett ve Tashian, 1996; Supuran, 2016).

Genel olarak α-KA'lar hayvanlarda yaygın olarak görülmektedir. β-KA'lar ise daha çok bitkiler, algler ve bazı bakterilerde bulunur. Bununla birlikte, γ-KA'lar arkealarda, δ-KA ve ξ-KA'lar ise yalnızca deniz diatomlarında bilinmektedir (Supuran ve Scozzafava, 2007).

Hayvanlar aleminde karbonik anhidraz'ın bilinen 16 izoenzimi bulunmaktadır. Bunların beş tanesi sitoplazmik (KA I, KA II, KA III, KA VII ve KA XIII), iki tanesi mitokondriyal (KA VA, KA VB), bir tanesi salgısal (KA VI), dört tanesi membrana bağlı (KA IV, KA IX, KA XII ve KA XIV), üç tanesi nonkatalitiktir (KA VIII, KA X, KA XI).

Bunlardan 12 tanesi KA I, II, III, IV, VA, VB, VI, VII, IX, XII, XIII ve XIV katalitik olarak aktif olduğu saptanmıştır. KA VIII, IX ve XII izoenzimlerinin ise tümör ile ilgili izoenzimler olduğu tespit edilmiştir (Tashian ve ark., 1983; Dodgson ve ark., 1991; Supuran, 2010).

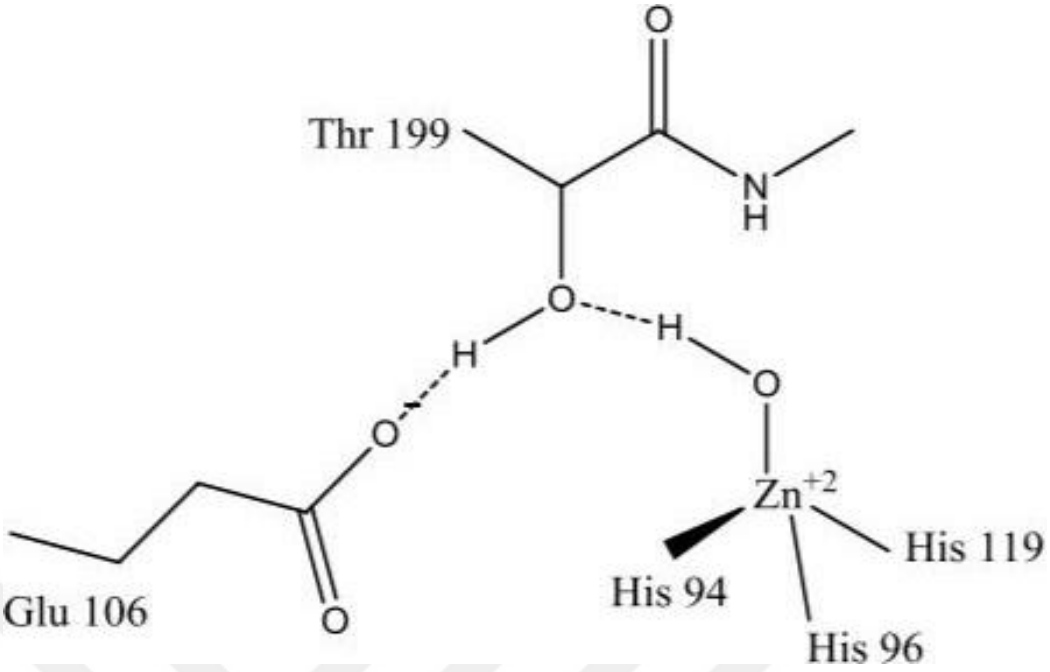
1.1.2. Karbonik anhidraz enziminin katalitik mekanizması

Tüm karbonik anhidraz (KA) izoenzimlerinin aktif bölgelerinde bir Zn^{+2} iyonu bulunmaktadır.

Zn^{+2} iyonu, koni yapısında aktif bölgede yaklaşık olarak 15 Å genişliğinde ve 15 Å derinliğinde bir yarığın dip kısmında bulunur.

Karbonik anhidraz (KA) üç adet histidin aminoasit rezidüzü (His 94, His 96, Hhis119), su (H_2O) molekülü ya da hidroksit (OH^-) iyonlarıyla koordine edilir (Christianson ve Alexander, 1989; Özensoy, 2006;).

Zn+2 iyonunun üç histidin (His94, His96 ve His119) ve aktif bölgede bulunan Thr199 ve Glu106 kısımları ile şematik gösterimi Şekil 1.3. 'de sunulmuştur.



Şekil 1.3. Zn+2 iyonunun üç histidin (His94, His96 ve His119) ve aktif bölgede bulunan Thr199 ve Glu106 kısımları ile şematik gösterimi (Tunca, 2018).

Enzimin aktif bölgesinde Zn^{+2} iyonuna bağlı olan H_2O, hem glutamik asit (Glu 106) aminoasit kısmına hem de Treonin (Thr 199) aminoasit kalıntısının hidroksil ucuna hidrojen bağı ile bağlıdır (Pasterokova ve ark., 2004; Nishimori ve ark., 2007).

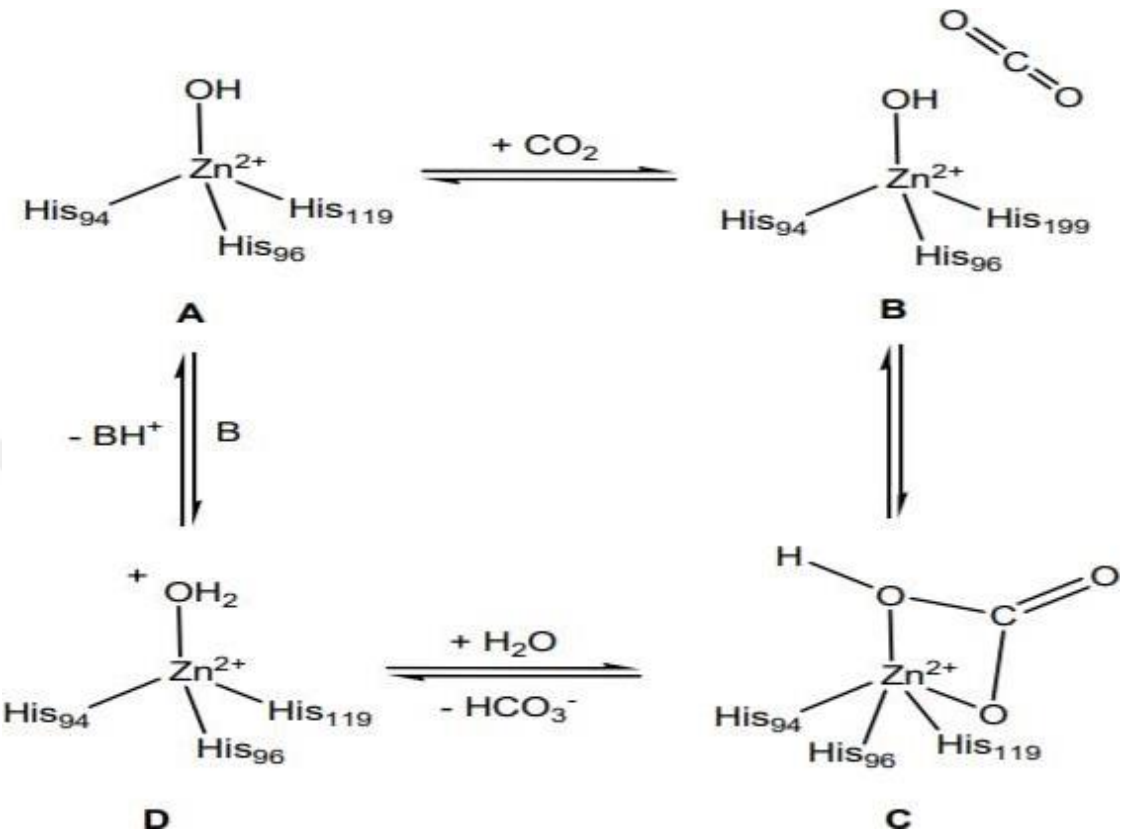
Bu etkileşimler, Zn^{+2} iyonuna bağlı olan H_2O molekülünün nükleofil karakterini artırması ve karbonik anhidrazın substratı olan CO_2'yi nükleofilik konuma yönlendirmesi açısından önemlidir (Supuran, 2004).

Genellikle karbonik anhidraz izoenzimlerinin CO_2 hidrataz aktivitesi ile çalıştığı bilinmektedir. Şekil 1.4'de verilen mekanizmaya göre, enzimin aktif bölgesinde bulunan Zn^{+2}'ye bağlı H_2O molekülünün hidrojenlerinden (H^+) biri, proton yakalayan kısımlar veya ortamdaki tampon bölgeler tarafından kopartılır. H_2O bir H^+ kaybeder ve hidroksit (OH^-) iyonu oluşur.

Böylece karbonik anhidraz (KA) enziminin aktif formu yani hidroksil grubunun çinkoya bağlı olduğu temel form meydana gelir (Şekil 1.4.A). Enzimin aktif formu, güçlü neofilik yapısı ile CO_2 molekülü ile etkileşir (Şekil 1.4.B).

Böylece bikarbonat (HCO^{-3}) iyonunun oluşmasını sağlar (Şekil 1.4.C). Bikarbonat iyonu daha sonra su (H_2O) molekülü ile yer değiştirir. Böylece Zn^{+2} iyonuna su

(H_2O) molekülü bağlanır. Bu form katalitik olarak inaktiftir (Şekil 1.4.D) (Stams ve diğ., 1998; Supuran ve diğ., 2004; Aydoğan, 2006).



Şekil 1.4. Karbonik anhidraz (KA) enziminin hidrataz aktivitesi (Çelik, 2010).

1.1.3. Karbonik anhidraz inhibitörleri

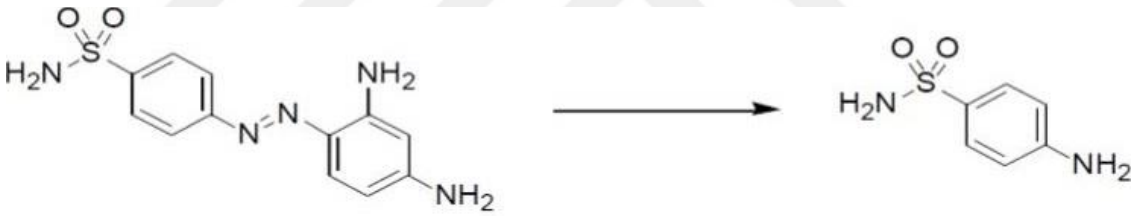
Son yıllarda çoğu KA izoformunun birçok hastalıkla olan ilişkisi keşfedildiğinden dolayı bu izoformlar ilaç dizaynında hedef olarak kullanılmaktadır (Whittington ve diğ., 2001). KA izoenzimlerini inhibe ederek, bazı insan hastalıklarının tedavi edilmesini sağlayan farmakolojik ajanlara karbonik anhidraz inhibitörleri (KAİ) denir (Babu, 2012). Bilinen en güçlü organik karbonik anhidraz inhibitörü ise sülfonamitlerdir. Bu sebeple, KAİ ilaçların senteziyle ilgili çalışmalarda motif olarak en çok sülfonamitler kullanılmıştır (Şen, 2018).

1.2. Karbonik Anhidraz İnhibitörü Olan Sülfonamitler

Sülfonamitler karbonik anhidraz (KA) inhibisyonu Zn^{+2} bağlayıcı işlevi için kullanılan en önemli yapılardan biridir. Kliniklerde birçok sülfonamitler karbonik anhidraz inhibitörü olarak kullanılmaktadır.

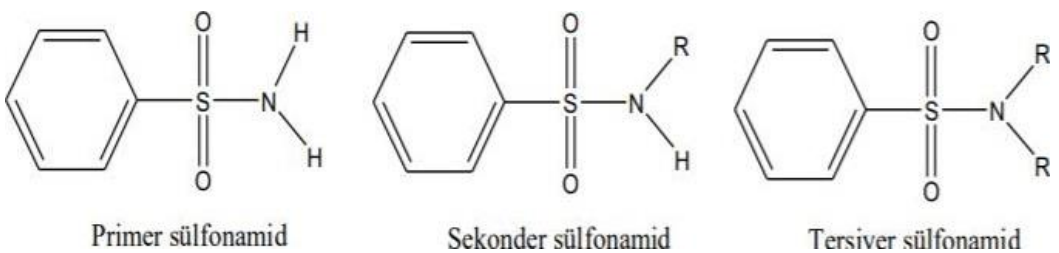
Antibakteriyellerin en eski grubu olan sülfonamitler, aromatik veya heterosiklik bileşik -SO_2NH_2 yapısındaki güçlü bir karbonik anhidraz inhibitörüdür. Temel yapısı R-SO_2H_2 şeklindedir.

Analin boyalarından köken alan sülfonamitler sülfa ilaçlarını içermektedirler. İlk kullanım alanı boya endüstrisinin bir artığı olan prontosildir. 1932 yılında Bayer firmasından Gerhard Domagk ve aynı firmanın kimyacılarından Klarer ve Mietzsch'in, sentezlediği azo boyalarından Prontosil'in (4-[(2,4 diaminofenil)azo]benzensülfonamit) etkisini araştırmıştır. Bu boyanın hücre kültürlerinde inaktif etkili olduğunu; ancak in vivo koşullarda farelerdeki bazı bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde etkili olduğunu keşfetmişlerdir. Bazı bakteriyel enfeksiyonları etkili bir şekilde yok eden bu ilk ilaca, Bayer Firması Prontosil adını vermiştir (Aktuğ, 2002; Babu, 2012; Şen, 2018). 1940 yılında sülfonamitlerin spesifik bir karbonik anhidraz enzimi inhibitörü (KAİ) gibi davrandığını ortaya koymuşlardır (Mann ve Keilin, 1940).



Şekil 1.5. Prontosilden sülfonilamit oluşum reaksiyonu (Elliot, 2010).

Sülfonamitler, amino grubu (-NH_2) azotuna bağlanan R-gruplarına göre primer, sekonder ve tersiyer olarak sınıflandırılırlar. Primer, sekonder ve tersiyer sülfonamitlerin genel yapıları Şekil 1.6. 'da gösterilmiştir. Tersiyer sülfonamitler, iyonlaşabilen proton taşımazlar bundan ötürü asidik özelliğinden yoksundurlar (Percin,2003; Yıldırım, 2018).



Şekil 1.6. Sülfonamid sınıflarının genel yapısı (Splendiani ve Condo, 2006).

Sülfonamit antibiyotikler dünyada en geniş kullanım alanına sahip ilaçlardır. Sülfonamitler önemli bir biyolojik aktif madde grubu olduklarından birçok ilacın yapısında sülfonamit grubu içermektedir (Supuran ve diğ., 2000).

Sülfonamidler antibaktriyel ajanlara karşı düşük maliyetleri, toksik etkileri ve yaygın olan bakteri hastalıklarna karşı güçlü etkileri dolayısı ile kullanılmaktadır (Erin, 1998).

Günümüzde sülfonamitler; antibakteriyel (Tella ve Obaleye, 2010), antikarbonik anhidraz (Supuran, 1998), hipoglisemik (Boyd, 1998), diüretik (Supuran ve diğ., 1996), antitümör (Owa ve Nagasu, 2000), antiepileptik (Barrios ve diğ., 2002), antimigren (Humphrey ve diğ., 1988) gibi farklı biyolojik aktivitelere sahip olan birçok farmakolojik ajanı kapsayan önemli bir ilaç sınıfıdır.

Karbonik anhidraz inhibitörü olan sülfonamitler; glokom, epilepsi, hipertansiyon, ödem (Lombroso, 1959; Kaur, 2002; Celebisoy ve diğ., 2007), West sendromu (Debus, 2004), duodenal ülser (Akbaba, 2013), insülin sekretuarı olarak bilinen tip 2 diyabet (Davis, 2004), AIDS (Doyon ve diğ., 2005) hastalıkların tedavilerde kullanılmaktadır.

1.3. *Drosophila melanogaster* ile İlgili Genel Bilgiler

Drosophila melanogaster, hayvanlar aleminin *Insecta* (böcekler) sınıfına dahil olan *Diptera* (çift kanatlılar) takımının *Drosophilidae* familyasına (sirke sinekleri) ait tam başkalaşım gösteren bir türdür.

Larvaları genellikle fermente meyveler üzerinde geliştiğinden ‘sirke sineği’ ya da ‘meyve sineği’ olarak tanınan bu tür (Özata, 2006) (Güneş, 2016) ilk kez 1910 yılında Thomas Hunt Morgan tarafından genetik araştırmalarında kullanılmaya başlanmıştır (Sheppard, 1973; Stine, 1973; Jones ve Rickards, 1992).

1.3.1. *D. melanogaster*’in sistematiği

D. melanogaster’in sistematiği Tablo 1.2. ‘de sunulmuştur.

Tablo 1.2. *Drosophila melanogaster*'in sistematiği

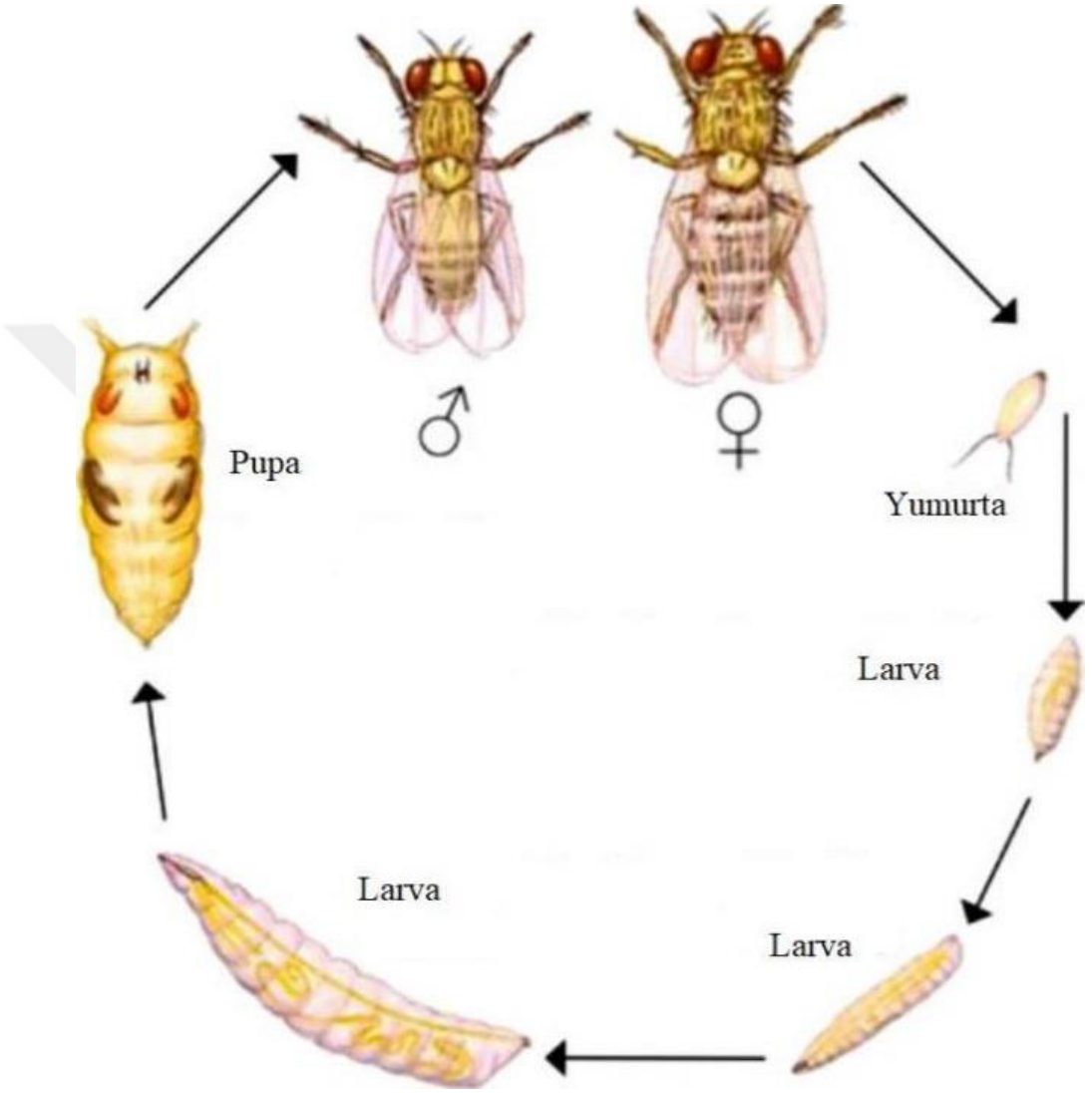
Alem	Animalia	Hayvanlar alemi
Şube	Arthropoda (Eklem bacaklılar)	Vücut yüzeyi, sert bir madde olan kitinden meydana gelmiş bir dış iskeletle örtülüdür.
Sınıf	Insecta-Hexapoda (Böcekler)	Vücut; cephalo (baş), thorax (gövde) ve abdomen (karın) olmak üzere üç kısma ayrılır.
Takım	Diptera (İki kanatlılar)	Göğüs bölgesinden bir çift kanat çıkar. Arka kanatlarının değişime uğramasıyla halter adı verilen topuz şeklinde bir denge organı bulunur.
Familya	Drosophilidae (Sirke sinekleri – meyve sinekleri)	Çürümekte olan meyvelerin ve bazı tatlı sıvıların (meyve suyu, şarap, bira vs.) kokusuna pozitif kemotaksi eğilimindedirler.
Cins	*Drosophila*	Oldukça küçüktürler. Ev sineğinin 1/3'ü kadardırlar.
Tür	*D. melanogaster*	

1.3.2. *D. melanogaster*'in yaşam döngüsü

D. melanogaster yaşam şartları 25±1˚C sıcaklık ve %40-60 bağıl nem ortamıdır. Metamorfoz aşamalarının tümünü 10-14 gün içinde tamamlayabilen bir organizmadır. Hayat döngüleri çok kısa olmasına rağmen yüksek oranda genetik çeşitliliğe sahiptirler (Kum, 2013).

Tam metamorfoz geçiren ve 4 çift kromozomları bulunan meyve sinekleri, yumurta (embriyonik), larva (1. instar, 2. instar ve 3. instar), pupa ve ergin (imago) olmak üzere yaşam döngüsünde 4 farklı evreye sahiptir (Şekil 1.7).

Embriyonik gelişim bir gün, birinci larval evre bir gün, ikinci larval evre bir gün, üçüncü larval evre iki gün, prepupa evresi 4 saat, pupa evresi ise 4.5 gün sürmektedir (Würgler ve Vogel, 1986).

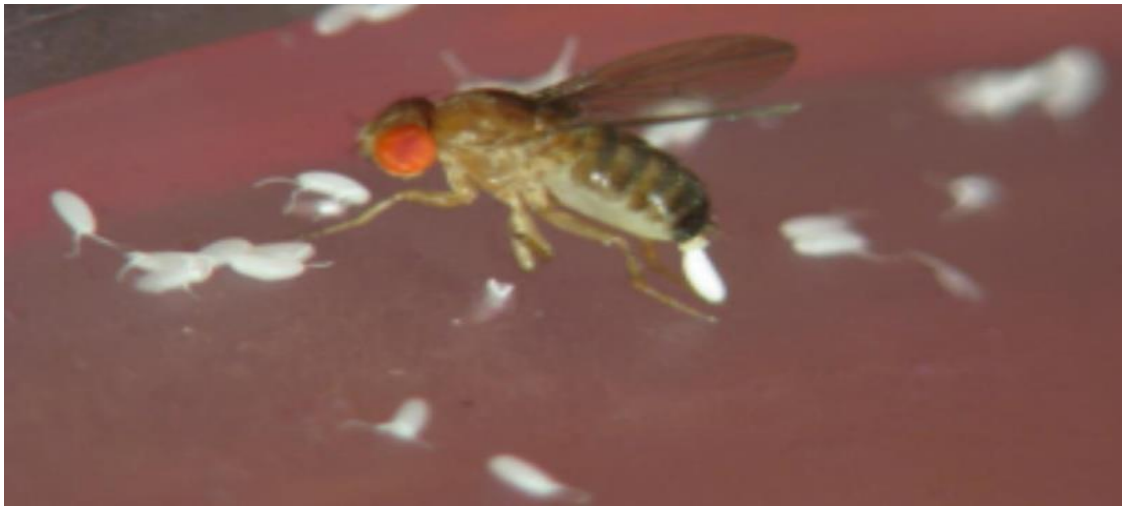


Şekil 1.7. *D. melanogaster*'in yaşam döngüsü (Researchgate, 2017).

Drosophila melanogaster yumurtaları yaklaşık 0,5 mm uzunluğunda oval ve beyaz renklidirler.

Dorsal bölgenin ön ucundan uzanan bir çift filament bulunur, yumurtalar ise bu filamentler sayesinde besi yerine batmadan tutunabilirler (Graf ve diğ., 1992).

D. melanogaster yumurtasının görünüşü Şekil 1.8. 'de sunulmuştur.



Şekil 1.8. *D. melanogaster* yumurtasının görünüşü (Candyvalera, 2018).

Larval evreleri üç periyottan oluşan Drosophilaların üçüncü larval evrede oluşan pupanın yetişkin sineğe dönüşmesiyle generasyon tamamlanmış olur. Yumurtanın larvaya dönüşmesi yaklaşık olarak 24 saat sürer (Ashburner, 1989; Hamamcı, 1993). Larval gelişim sırasında kütikül tabakası iki kez atılarak yenisi ile değiştirilir ve gömlek değiştirme olarak bilinen bu süreç üç evreye ayırır. İki gömlek değiştirme arasındaki dönem bir evre (instar) olarak adlandırılır (Atlı, 2010).

Üçüncü instar döneminin sonunda besiyerinde bulunan larva şişenin kuru kısmına tırmanır ve burada sarı kahverengimsi bir renk alarak sertleşip pupalaşmaya başlar. Yaklaşık dört gün sonra pupa, yetişkin sineğe gelişir. Göz pigmentleri pupada fark edilecek ölçüde belirginleşir (Ashburner, 1989; Doğan, 2002).

Gelişim tamamlandıktan sonra ergin birey pupa kılıfını delerek çıkar. Sinekler ilk önce uzun abdomenli, ince ve açık renkli pigmentsiz vücutları vardır. Pupadan çıktıktan birkaç saat içinde kanatlarının açılması gerçekleşir. Pupadan çıkan sinekler 3-5 saat içinde eşeysel olgunluğa erişmemişlerdir (Nurdan, 2006). Dişi sinekler iki üç günde yumurtlamaya başlar (Millan ve diğ., 1970) ve dişilerin çiftleşmesine bağlı olmaksızın yumurta bırakabilir ancak döllenmemiş yumurtalar açılmaz (Özata, 2006).

Vücutları baş, toraks, abdomen olmak üzere üç segmentten oluşur. Abdomende bulunan koyu halkalar, erkek ve dişi bireylerin ayrımında kullanılan önemli özelliktir. Erkek bireylerde abdomende bulunan gözle görülebilir 5 segment bulunur

ve bu segmentler siyah ve kısadır. Dişi bireyin abdomenin 7 segment olup abdomen uzun ve ucu sivridir. Mikroskobik gözlemlerde dış genital yapıda farklılıklar gözlenir. Erkekler bireylerde birinci çift bacağın tarsus segmenti üzerinde siyah ve kalın sıra sıra kıl demetinden oluşan eşey tarağı (sex comb) karakteristiktir. Dişilerde bu yapı bulunmamaktadır (Falakalı, 1990; Wixon & O'Kane, 2000). Yetişkin sineklerde dişiler erkeklerden biraz daha uzundurlar. Dişiler iki tane X kromozomundan, erkekler ise hem X hem de Y kromozomundan oluşurlar (Greenspan 2004).

1.3.3. Model organizma olarak *D. melanogaster* seçilmesinin avantajları

Model organizma olarak *D. melanogaster*'in tercih edilmesini sağlayan bazı önemli özellikleri vardır. Bunlardan bazıları aşağıda verilmektedir (Graf and Singer, 1992).

1. Holometabol canlılardır. Yani gelişimleri tam metamorfozludur (Olgun ve Yurtsever, 2003)
2. Besinleri ucuzdur ve laboratuvar ortamında kolayca üreyebilirler.
3. Küçük ortamlarda çok sayıda bireyle çalışma imkanı sağlar.
4. Yaşam döngüleri oldukça kısa sürelidir.
5. Çıplak gözle mikroskop altında organizmanın fenototipi kolayca gözlemlenebilir.
6. Larvaların tükürük bezi hücrelerinde büyük kromozomlar bulunur ve bu kromozomlar sitogenetik çalışmalar için kullanılabilir.
7. Eterle kolayca bayıltılarak üzerinde araştırmalar yapılabilir.
8. Genom dizileri, insan hastalıklarında belirlenen genlerin %70'ından fazlasının *D. melanogaster* uyumlu olduğunu yani genetik kodlarının insanlara benzediğini göstermiştir. (Fortini vd, 2000).
9. *D.melanogaster* ve insan hücre rotasyonları ve düzenleyici yolları birbirine çok yakınlık göstermektedir. Bu da tümörgenezis oluşumunda, çoğalma süreci çalışmalarında, model olarak kullanılmasını sağlar (Potter vd, 2000).
10. *D. melonogaster* küçük bir genom hacmine sahip olduğu için mutasyonların incelenmesi daha kolaydır (Graf, Schaik & Würgler, 1992).

Bu avantajlar göz önünde bulundurulduğunda *D. melanogaster*, günümüzde tercih edilen bir organizmadır. Bu nedenle bu çalışmada, insan karbonik anhidraz I ve II izoenzimlerini inhibe ettiği tespit edilmiş olan dolayısıyla ilaç ham maddesi olarak

kullanılabilme potansiyeli olan, 2e 4-(((1,3-dimetil-2,4,6-trioksotetrahidropyrimidin-5(2H)-iliden)methil)amino) benzen sülfonamit ve 6b 4-(1-methyl-2-oxo-3'H-spiro[indoline-3,2'-[1,3,4]oxadiazole]-5' yl) benzene sülfonamit bileşiğinin, *D. melanogaster*'in bazı gelişimsel özelliklerine etkisi araştırılmıştır.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar

İnkübatör (Nüve cooled ES 110)

Stereo mikroskop (Olympus SZ 51 sterio microscope)

Mikropipetler (Isolab Laborgerate GmbH) 0,5 – 10 µl / 10 - 100 µl

2.2. Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Karbonik Anhidraz İnhibitörleri

- Karbonik anhidraz inhibitörü birinci molekül: 6b

4-(1-methyl-2-oxo-3'H-spiro[indoline-3,2'-[1,3,4]oxadiazole]-5'yl) benzene sülfonamit

Molar kütle: 358 g/mol

Ki değeri: 0,273 µM

- Karbonik anhidraz inhibitörü ikinci molekül: 2e

4-(((1,3-dimetil-2,4,6-trioksotetrahidropyrimidin-5(2H)-iliden)methil)amino)benzen sülfonamit

Molar kütle: 238,34 g/mol

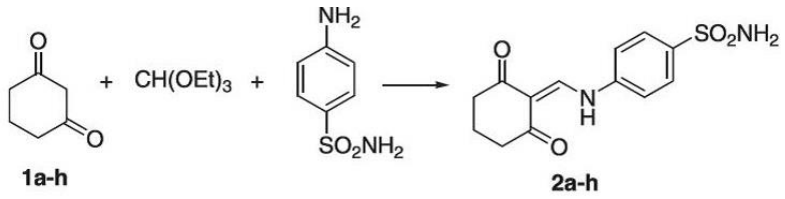
Ki değeri: 5.20 µM

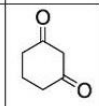
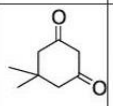
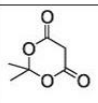
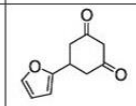
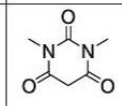
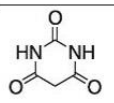
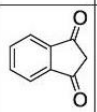
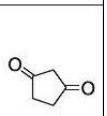
Sodyum arsenit ($NaAsO_2$): Araştırmada uygulanan maddelerin toksik etkisini karşılaştırmak için pozitif kontrol grubu olarak sodyum arsenit kullanılmıştır. Letal konsantrasyon (LC_{50}) değerleri için 5mM $NaAsO_2$, 10mM $NaAsO_2$, 50mM $NaAsO_2$

olmak üzere üç farklı konsantrasyon uygulanmıştır (Karataş, 2010). Molar kütle: 129,91 g/mol

Dimetil sülfoksit (DMSO – C_2H_6OS): Karbonik anhidraz inhibitörlerin çözülmesi için dimetil sülfoksit kullanılmıştır. Molar kütle: 78,13 g/mol

Distile su negatif kontrol grubu olarak kullanılmıştır.



Compound	2a	2b	2c	2d	2e	2f	2g	2h
1a-h								

Şekil 2.1. Metilenaminobenzen sülfonamit türevlerinin sentezi (Demirci ve diğ., 2014).

Çalışmalarda karbonik anhidraz inhibitörlerini uygulamak için toksik inhibisyon değerleri baz alınmıştır. Buna göre deney gruplarında besiyerine, 6b maddesi için 0,85µl, 1,706 µl ve 3,4 µl ve 2e maddesi için 2,6 µl, 5,2 µl ve 10,4 µl çözelti ilave edilmiştir. Negatif kontrol grubu olarak distile su, pozitif kontrol grubu olarak sodyum arsenit (10mM $NaAsO_2$), çözücü kontrol grubu olarak dimetil sülfoksit kullanılmıştır.

2.3. Kullanılan Soy

Deneylerde, *D. melanogaster* (Diptera : *Drosophilidae*)'in kendileşmiş yabanıl tip Oregon-R soyu kullanılmıştır.

2.4. D. melanogaster Kültürü ve Laboratuvar Koşulları

Deneylerde kullanılan ileri derecede kendileşmiş *D. melanogaster* (Diptera f: *Drosophilidae*)'in yabanıl tip Oregon-R soyu, Akdeniz Üniversitesi Biyoloji Bölümünden temin edilmiş olup, uzun süredir laboratuvarımızda yaşatılmaktadır. Drosophila kültürleri yabanıl tip *D. melanogaster* için standart kabul edilen 25±1˚C

sıcaklıkta, %60 bağıl nem koşullarına sahip NÜVE marka iklim dolabında muhafaza edilmiştir. Kültür şişesi olarak, sık sık steril edilen 250ml'lik cam süt şişeleri kullanılmıştır.

2.5. Deney Düzeneği ve Uygulama

2.5.1. Metamorfoz süresini gözlemlemek için uygulanan yöntem

Çalışmalarda karbonik anhidraz inhibitörlerini uygulamak için toksik inhibisyon değerleri baz alınmıştır. Buna göre deney gruplarında besiyerine, 6b maddesi için (0,85 µl, 1,706 µl ve 3,4 µl) ve 2e maddesi için (2,6 µl, 5,2 µl ve 10,4 µl) çözelti ilave edilmiştir. Negatif kontrol grubu olarak distile su, pozitif kontrol grubu olarak sodyum arsenit (10 mM $NaAsO_2$), çözücü kontrol grubu olarak dimetil sülfoksit kullanılmıştır.

Deney ve kontrol gruplarına ait kültür şişelerine 15 dişi ve 15 erkek birey ilave edilip her gün gözlem yapılmıştır. Yumurta, larva, pupa ve erginlerin ilk ortaya çıktıkları tarih kontrol edilerek not edilmiştir. F_1 nesline ait metamorfoz süreleri kontrol grupları ve deney grupları arasında karşılaştırılmıştır.

F_2 neslinde metamorfoz süresindeki etkiyi araştırmak için, F_1 neslinden elde edilen ergin bireyler, kimyasal içermeyen besiyerlerine aktarılarak F_2 nesli elde edilmiştir. Yalnız aktarma esnasında F_1 neslindeki konsantrasyonlara bağlı kalınmıştır. F_2 neslini elde etmek için deney ve kontrol gruplarına ait kültür şişelerine F_1 neslinden elde edilen 15 dişi ve 15 erkek birey aktarılmıştır. Daha sonra her gün besiyerleri kontrol edilmiş ve yumurta, larva, pupa ve erginlerin ilk ortaya çıktıkları gün kaydedilmiştir.

2.5.2. Morfolojik karakterleri gözlemlemek için yapılan çalışma

Araştırmanın bu bölümünde karbonik anhidraz inhibitörlerinin *D. melanogaster* 'de morfolojik özelliklere etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla 6b maddesi için besiyerine 0,85 µl, 1,706 µl ve 3,41 µl ve 2e maddesi için 2,6 µl, 5,2 µl ve 10,4 µl olan 1ml çözelti karıştırılarak beslenme yoluyla uygulanmıştır. Negatif kontrol grubu olarak distile su, pozitif kontrol grubu olarak sodyum arsenit (10 mM $NaAsO_2$), çözücü kontrol grubu olarak dimetil sülfoksit kullanılmıştır.

Deney ve kontrol grubuna ait besi yerlerine, 15 erkek ve 15 dişi birey konulduktan sonra, pupa evresinin gözlendiği gün, parental bireyler besi yerinden uzaklaştırılmıştır. F_1 neslindeki bireyler ilk çıktığı günden itibaren gözlemlenmiş ve bu süreç sekiz gün boyunca devam etmiştir. *Drosophila*'da gelişim süreci ortalama 10 günde tamamlanmaktadır. Bu yüzden çalışmalarda gelişim sürecini sekiz günle sınırlandırılıp F_2 nesli ile karışması önlenmiştir.

F_1 neslindeki fenotipik anormallikleri gözlemlemek amacıyla, ilk ergin bireyin gözlendiği günden itibaren, 8 gün boyunca ergin bireyler Stereo mikroskop (Olympus SZ 51 sterio microscope) altında, dişi ve erkek birey ayrımı yapılarak, morfolojik açıdan tek tek incelenmiştir. Gözlenen anormallikler not edilmiştir. (Mukhopadhyay, 2003; Piper ve diğ., 2005; Suckow and Suckow, 2006; Keser ve Karataş, 2012).

F_1 neslinde gözlenen fenotipik anormalliklerin kalıtsal olup olmadığını anlamak amacıyla, F_1 neslinden elde edilen normal ve anormal fenotipli bireyler toplanmış, başlangıç konsantrasyonlarına bağlı kalınmaksızın, normal besiyerine aktarılarak ayrı ayrı çaprazlanmıştır. F_1 neslinde yapılan işlemlerin aynısı F_2 neslinde de tekrar edilmiştir.

2.5.3. Ergin birey sayısı

Araştırmanın bu bölümünde karbonik anhidraz inhibitörlerinin ergin birey sayısına etkisi araştırılmıştır. Buna göre deney gruplarında, 6b maddesi için (0,85 µl, 1,706 µl ve 3,4 µl) ve 2e maddesi için (2,6 µl, 5,2 µl ve 10,4 µl), negatif kontrol grubu olarak distile su, pozitif kontrol grubu olarak sodyum arsenit (10 mM $NaAsO_2$), çözücü kontrol grubu olarak dimetil sülfoksit kullanılmıştır.

F_1 neslindeki ergin birey sayısını gözlemlemek amacıyla, ilk ergin bireyin gözlendiği günden itibaren, 8 gün boyunca ergin bireyler Stereo mikroskop (Olympus SZ 51 sterio microscope) altında, dişi ve erkek birey ayrımı yapılarak tek tek sayılmıştır.

F_1 neslinde gözlenen ergin birey sayısını F_2 nesliyle karşılaştırmak amacıyla, F_1 neslinden elde edilen normal ve anormal fenotipli bireyler toplanmış, başlangıç

konsantrasyonlarına bağlı kalınmaksızın, normal besiyerine aktarılarak ayrı ayrı çaprazlanmıştır. F_1 neslinde yapılan işlemlerin aynısı F_2 neslinde de tekrar edilmiştir.

2.5.4. Eşey oranını gözlemlemek için yapılan çalışma

Araştırmanın son aşamasında, eşey oranına karbonik anhidraz inhibitörlerinin etkisi araştırılmıştır. Eşey ayrımı için sineklerin ölümüne sebep olmayacak şekilde, kabın ağzı eterle kapatılarak bayıltma işlemi uygulandı. Tüm bu işlemler yapılırken erginlerin zarar görmemesi için yumuşak uçlu suluboya fırçası kullanılmıştır. Çaprazlama sonunda her iki nesilde de elde edilen erkek ve dişi bireyler tek tek sayıldı. Cinsiyet tayini ergin bireylerin dişi ve erkeğe özgü morfolojik karakterlerine göre ve diseksiyon mikroskobunda incelenerek yapıldı.

2.5.5. İstatiksel değerlendirme

Yumurta verimi ve larva gelişiminin değerlendirilmesinde z-testi kullanılmıştır. Her karşılaştırma sonunda yer alan p değeri, ±1,96'dan büyükse %5 oranında önemli veya ±2,575'den büyükse %1 oranında önemli kabul edilirken, diğer bir durumda z değerine göre fark vardır ya da yoktur diyebiliriz.

Kullanılan konsantrasyonların kendi içinde ve diğer konsantrasyonlarla karşılaştırılması için ikinci bir istatistik olarak, iki faktörlü varyans analizi kullanılmıştır. İki faktörlü varyans analizi ile aynı dozdaki tüm karşılaştırmalar yapılmıştır (Ratkowsky, 1990).

3. BULGULAR

6b 4-(1-methyl-2-oxo-3'H-spiro[indoline-3,2'-[1,3,4]oxadiazole]-5'yl) benzene sülfonamit ve 2e 4-(((1,3-dimetil-2,4,6-trioksotetrahidropyrimidin-5(2H)-iliden)methil)amino) benzen sülfonamit maddelerinin etkilerine ait bulgular ayrı ayrı verilmiştir.

3.1. 6b Maddesinin (4-(1-methyl-2-oxo-3'H-spiro[indoline-3,2'-[1,3,4]oxadiazole]-5' yl))benzene sülfonamit) Etkileri

6b maddesine ait veriler metamorfoz süresi, morfolojik karakterler üzerine toksik etkileri, ergin birey sayısı ve eşey oranına etkileri ayrı ayrı başlıklar halinde sunulmuştur.

3.1.1. 6b maddesinin metamorfoz süresi üzerine etkileri

Farklı konsantrasyonlardaki karbonik anhidraz inhibitörlerinin metamorfoz süresine olan etkileri F_1 ve F_2 nesillerinde ayrı ayrı olarak incelenmiştir.

3.1.1.1. 6b maddesi karbonik anhidraz inhibitörlerin F_1 neslinde metamorfoz süresi üzerine etkisi

F_1 nesli için hazırlanan deney ve kontrol gruplarına 15 dişi ve 15 erkek birey konulmuştur. Ki değerine göre belirlenen üç farklı konsantrasyonda (0,85 µl, 1,706 µl ve 3,41 µl) 6b maddesi içeren deney grupları ile kontrol grubu, çaprazlanmanın başlangıcından itibaren her gün incelenmiştir.

Deney ve kontrol grubuna ait bireyler, çaprazlama yapıldıktan sonraki ilk gün yumurta bırakmıştır.

1. instar larvalar, negatif kontrol grubu ve pozitif kontrol grubu olan sodyum arsenit içeren besiyerinde üçüncü gün görülmüştür. Buna karşılık karbonik anhidraz inhibitörü içeren tüm deney gruplarında ve çözücü kontrol grubunda ikinci gün gözlenmiştir.

2. instar larvalar, hem negatif kontrol grubunda hem de sodyum arsenit çözeltisi içeren besiyerinde dördüncü gün görülmelerine karşılık, DMSO ve 6b maddesi içeren 0,85 µl, 1,706 µl ve 3,41 µl'lik konsantrasyonlarda üçüncü gün görülmüştür.

3. instar larvalar, hem negatif kontrol grubunda hem de pozitif kontrol grubu sodyum arsenit çözeltisinde beşinci gün ortaya çıkmalarına karşılık, çözücü kontrol grubu ve 6b maddesi içeren 0,85 µl, 1,706 µl ve 3,41 µl'lik konsantrasyonlarda dördüncü gün görülmüştür.

Pupa evresi, negatif kontrol grubunda ve sodyum arsenit çözeltisinde yedinci gün gözlemlenmiştir. Buna karşılık çözücü kontrol grubu ve 6b maddesi içeren 0,85 µl, 1,706 µl ve 3,41 µl'lik konsantrasyonlarda altıncı gün görülmüştür.

Ergin bireyler, negatif kontrol grubunda dokuzuncu gün, çözücü kontrol grubu ve 6b maddesi içeren 0,85 µl ve 1,706 µl konsantrasyonlarda 10. gün görülürken, pozitif kontrol grubu sodyum arsenit ve 3,41 µl'lik konsantrasyonda 11. gün ortaya çıkmıştır (Tablo 3.1.).

Tablo 3.1. 6b maddesinin F_1 neslinde metamorfoz süresine etkisi

Gruplar	Yumurta	1. İnstar	2. İnstar	3. İnstar	Pupa	Ergin
6B 0,85 µl	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün	6. gün	10. gün
6B 1,706 µl	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün	6. gün	10. gün
6B 3,41 µl	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün	6. gün	11. gün
Pozitif Kontrol ($NaAsO_2$)	1. gün	3. gün	4. gün	5. gün	7. gün	11. gün
Çözücü Kontrol (DMSO)	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün	6. gün	10. gün
Negatif Kontrol (Su)	1. gün	3. gün	4. gün	5. gün	7. gün	9. gün

3.1.1.2. 6b maddesi karbonik anhidraz inhibitörlerin F_2 neslinde metamorfoz süresi üzerine etkisi

F_2 neslinde metamorfoz süresindeki etkiyi araştırmak için, F_1 neslinden elde edilen ergin bireyler, kimyasal içermeyen besiyerlerine aktarılarak F_2 nesli elde edilmiştir. F_2 neslini elde etmek için deney ve kontrol gruplarına ait kültür şişelerine F_1 neslinden elde edilen 15 dişi ve 15 erkek birey konulmuştur.

Çaprazlama yapıldıktan sonraki ilk yumurta evresinden pupa evresine kadar yaşam döngüleri gözlenmiştir.

Yumurta, hem deney grubunun tüm konsantrasyonlarında hem de negatif kontrol grubunda birinci gün gözlenmiştir.

1. ve 2. instar larvalar, deney gruplarının tüm konsantrasyonlarında ve negatif kontrol grubunda, sırasıyla ikinci ve üçüncü gün gözlenmiştir.

3. instar larvalar, pozitif kontrol grubu sodyum arsenit çözeltisinde beşinci gün ortaya çıkmalarına karşılık, negatif kontrol grubu ve deney gruplarında dördüncü gün görülmüştür (Tablo 3.2.).

Tablo 3.2. 6b maddesinin F_2 neslinde metamorfoz süresine etkisi

Gruplar	Yumurta	1. İnstar	2. İnstar	3. İnstar	Pupa	Ergin
6B 0,85 µl	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün	6. gün	10. gün
6B 1,706 µl	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün	6. gün	10. gün
6B 3,41 µl	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün	6. gün	10. gün
Pozitif Kontrol ($NaAsO_2$)	1. gün	2. gün	3. gün	5. gün	7. gün	11. gün
Çözücü Kontrol (DMSO)	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün	6. gün	10. gün
Negatif Kontrol (Su)	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün	6. gün	9. gün

Pupa evresi, pozitif kontrol grubu sodyum arsenit çözeltisinde yedinci gün görülmüştür. Negatif kontrol grubu ve deney gruplarında ise altıncı gün gözlenmiştir.

Ergin bireyler, negatif kontrol grubunda dokuzuncu gün, çözücü kontrol grubu ve 6b maddesi içeren 0,85 µl, 1,706 µl ve 3,41 µl'lik konsantrasyonlarda 10. gün görülürken, pozitif kontrol grubu sodyum arsenit çözeltisinde 11. gün ortaya çıkmıştır.

3.1.2. 6b maddesinin birey sayısına etkisi

3.1.2.1. 6b maddesinin F_1 neslinde birey sayısına etkisi

F_1 nesli için toplamda 11336 birey ile sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçlar pozitif kontrol grubu, negatif kontrol grubu, çözücü kontrol grubu ve 6b maddesi içeren 0,85 µl, 1,706 µl ve 3,41 µl'lik deney gruplarının birey sayısına olan etkisi, Tablo3.3. 'de gösterilmiştir.

6b maddesi içeren 0,85 µl'lik konsantrasyonunda 2394 ergin birey ortaya çıkmıştır. Negatif kontrol grubu ile (1812 birey) karşılaştırıldığında aradaki fark istatistik açıdan önem taşımaktadır ($p<0,01$ düzeyinde). Ayrıca 0,85 µl'lik konsantrasyon grubu ile pozitif kontrol grubu (868 birey) arasında da istatiksel açıdan anlamlı bir fark ortaya çıkmıştır ($p<0,01$ düzeyinde).

1,706 µl'lik konsantrasyonda gelişen bireylerin ergin birey sayısı (2136 birey) negatif kontrol grubu (1812 birey) ile karşılaştırıldığında aradaki fark $p<0,01$ düzeyinde önemli bulunmuştur.

3,41 µl'lik konsantrasyonda (2036 birey) gelişen birey sayısı, negatif kontrol grubu ile (1812 birey) karşılaştırıldığında aradaki fark istatistik açıdan önemlidir ($p<0,01$ düzeyinde). 6b maddesi uygulanan üç deney dozunda da ergin birey sayısı negatif kontrol grubuna göre artmıştır ve bu fark istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu artış 0,85 µl dozunda, negatif kontrol grubuna göre %32,12 oranında, 1,706 µl dozunda %17,88 oranında, 3,41 µl dozunda ise %12,36 oranında ergin birey sayısında artma söz konusudur.

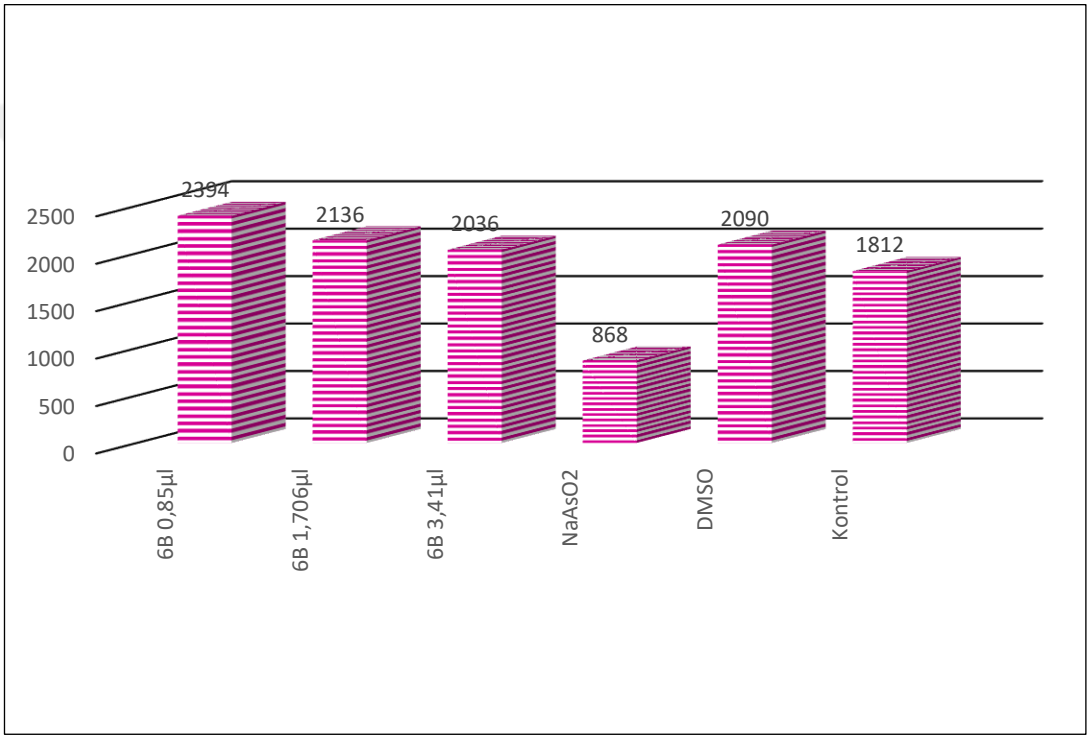
Tablo 3.3. 6b maddesinin F_1 neslinde birey sayısına etkisi

Gruplar	Toplam	Grup Karşılaştırma	Standart Sapma	Z Değeri
6B 0,85 µl	2394 (G1)	(G1-G2) (G1-G3) (G1-G4) (G1-G5) (G1-G6)	0,0039 0,0038 0,0075 -1,1741 -6,0483	-0,414 -0,839 3,579** -1,174 -6,048**
6B 1,706 µl	2136 (G2)	(G2-G3) (G2-G4) (G2-G5) (G2-G6)	0,0038 0,0075 0,0043 0,0060	-0,417 3,786** -1,542 -6,301**
6B 3,41 µl	2036 (G3)	(G3-G4) (G3-G5) (G3-G6)	0,0075 0,0042 0,0060	4,011** -1,937 -6,605**
Pozitif Kontrol ($NaAsO_2$)	868 (G4)	(G4-G5) (G4-G6)	0,0077 0,0088	2,834** -1,032
Çözücü Kontrol (DMSO)	2090 (G5)	(G5-G6)	0,0062	-4,980**
Negatif Kontrol (Su)	1812 (G6)			

*p<0,05; **p<0,01 anlamlılık seviyesinde aradaki fark önemlidir.

Çözücü kontrol grubu içeren besiyerinden 2090 birey elde edilmiştir. DMSO grubunda ergin birey sayısı negatif kontrol grubuna göre artmıştır ve bu bireyler negatif kontrol grubu (1812 birey) ile karşılaştırıldığında aradaki fark istatistik açıdan önemli bulunmuştur (p<0,01 düzeyinde).

Pozitif kontrol grubu içeren besiyeri içerisinde 868 birey elde edilmiştir. Pozitif kontrol grubundaki birey sayısı negatif kontrol grubundan düşüktür fakat negatif kontrol grubu (1812 birey) ile karşılaştırıldığında aradaki fark anlamlı bulunmamıştır. Bununla birlikte pozitif kontrol grubu ile 6b maddesi içeren (0,85 µl, 1,706 µl ve 3,41 µl) tüm konsantrasyonlar arasında istatistik açıdan anlamlı bir fark ortaya çıkmıştır ($p<0,01$ düzeyinde). $NaAsO_2$ uygulaması ergin birey sayısını düşürmüştür (Şekil 3.1). 6b maddesi içeren 0,85 µl, 1,706 µl ve 3,41 µl'lik dozlarda konsantrasyon azaldıkça birey sayısında artma gözlemlenmiştir.



Şekil 3.1. 6b maddesinin F_1 neslinde toplam birey sayısı

3.1.2.2. 6b maddesinin F_2 neslinde birey sayısına etkisi

F_2 nesli için toplamda 12234 birey ile sonuçlar elde edilmiştir. F_2 neslinde ergin birey sayısındaki etkiyi araştırmak için, F_1 neslinden elde edilen ergin bireyler, kimyasal içermeyen besiyerlerine aktarılarak F_2 nesli elde edilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda pozitif kontrol grubu, negatif kontrol grubu, çözücü kontrol grubu ve 6b maddesi içeren 0,85 µl, 1,706 µl ve 3,41 µl'lik deney gruplarının, ergin birey sayısına olan etkisi Tablo 3.4. 'de gösterilmiştir.

6b maddesi içeren 0,85 µl'lik konsantrasyonda 2438 ergin birey ortaya çıkmıştır. Negatif kontrol grubu ile (1868 birey) karşılaştırıldığında ise ergin birey sayısı artmıştır ve bu fark istatistik açıdan anlamlı bulunmuştur ($p<0,01$ düzeyinde). Ayrıca 0,85 µl'lik konsantrasyondaki birey sayısı, pozitif kontrol grubu (1363 birey), çözücü kontrol grubu (2741 birey) ve 6b maddesi içeren diğer dozlar (1,706 µl ve 3,41 µl) ile karşılaştırıldığında istatistik açıdan fark ortaya çıkmıştır ($p<0,01$ düzeyinde).

1,706 µl'lik doz uygulanan deney grubundaki bireylerin ergin birey sayısı (2010 birey) negatif kontrol grubuna (1868 birey) göre artmiştir, fakat bu farklılık istatistik açıdan önemsiz çıkmıştır. Öte yandan 1,706 µl'lik konsantrasyonundaki bireylerin sayısı çözücü kontrol grubu (2741 birey) ile karşılaştırıldığında aradaki fark önemli bulunmuştur ($p<0,01$ düzeyinde).

3,41 µl'lik konsantrasyonda (1814 birey) gelişen birey sayısı, negatif kontrol grubuna (1868 birey) göre %2,89 düzeyinde azalma söz konusudur ve bu fark istatistik açıdan anlamlı çıkmamıştır.

F_1 neslinde her üç dozda uygulanan deney grupları negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistik açıdan önemli çıkmasına karşın F_2 neslinde sadece 0,85 µl'lik dozda $p<0,01$ düzeyinde önemli bulunmuştur.

6b maddesi içeren 0,85 µl, 1,706 µl ve 3,41 µl'lik dozlarda konsantrasyon arttıkça F_2 neslinde önceki neslin aksine ergin birey sayısı azalmıştır (Şekil 3.2).

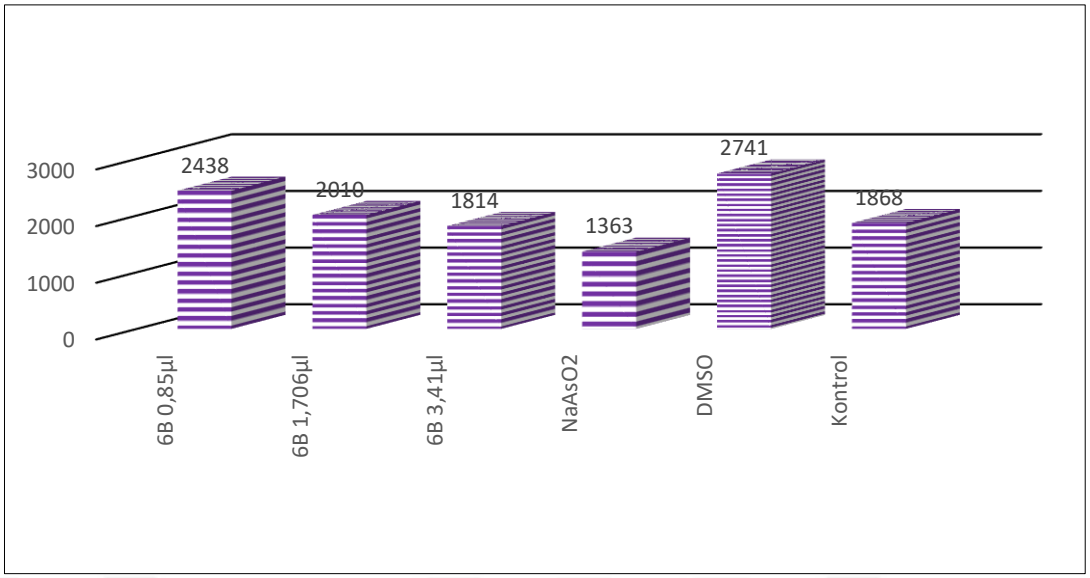
Çözücü kontrol grubu (DMSO) içeren besiyerinden 2741 birey elde edilmiştir. Negatif kontrol grubu (1868 birey) ile karşılaştırıldığında ergin birey sayısında artış gerçekleşmiştir ve bu fark istatistik açıdan anlamlıdır ($p<0,01$ düzeyinde). Ayrıca çözücü kontrol grubu içerisindeki birey sayısı, pozitif kontrol grubu (1363 birey) ve 6b maddesi içeren diğer dozlar (0,85 µl; 1,706 µl ve 3,41 µl) ile istatistik açıdan fark ortaya çıkmıştır ($p<0,01$ düzeyinde).

Pozitif kontrol grubu sodyum arsenit içeren besiyerinden 1363 birey elde edilmiştir. Birey sayıları negatif kontrol grubu (1868 birey) ile karşılaştırıldığında aradaki fark istatistik açıdan önemsiz çıkmıştır.

Tablo 3.4. 6b maddesinin F_2 neslinde birey sayısına etkisi

Gruplar	Toplam	Grup Karşılaştırma	Standart Sapma	Z Değeri
6B 0,85 µl	2438 (G1)	(G1-G2) (G1-G3) (G1-G4) (G1-G5) (G1-G6)	0,0061 0,0062 0,0069 0,0045 0,0067	2,873** 2,234** 2,183** 3,426** -4,188**
6B 1,706 µl	2010 (G2)	(G2-G3) (G2-G4) (G2-G5) (G2-G6)	0,0070 0,0077 0,0056 0,0074	-0,539 -0,339 5,932** -1,381
6B 3,41 µl	1814 (G3)	(G3-G4) (G3-G5) (G3-G6)	0,0077 0,0056 0,0075	0,155 5,188** -1,877
Pozitif Kontrol ($NaAsO_2$)	1363 (G4)	(G4-G5) (G4-G6)	0,0064 0,0081	4,762** -1,593
Çözücü Kontrol (DMSO)	2741 (G5)	(G5-G6)	0,0061	-7,052**
Negatif Kontrol (Su)	1868 (G6)			

*p<0,05; **p<0,01 anlamlılık seviyesinde aradaki fark önemlidir.



Şekil 3.2. 6b maddesinin F_2 neslinde toplam birey sayısı

3.1.2.3. 6b maddesinin F_1 neslinde anormal birey sayısına etkisi

F_1 nesli gözlemleri esnasında, pozitif kontrol grubu, negatif kontrol grubu, çözücü kontrol grubu ve 6b maddesi içeren üç konsantrasyonda (0,85 µl, 1,706 µl ve 3,41 µl) bazı morfolojik anormalliklere rastlanmıştır. Bu anormallikler; kıvrık kanatlılık, mızrak kanatlılık, kanadın vücuda yapışmış olması, abdominal bozukluk, kanat körelmesi ve segment eksikliği şeklindeki anormaliklerdir. F_1 neslinde gözlenen anormalikler ve yüzdelik oranlarına ait veriler Tablo 3.5 'de sunulmuştur.

6b maddesi içeren 0,85 µl'lik konsantrasyonda gelişen bireyler %1,80 oranında fenotipik anormallik göstermiştir. Gözlenen anormal birey oranı negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aradaki fark istatistik açıdan anlamlıdır ($p<0,01$düzeyinde). 1,706 µl'lik konsantrasyonda gelişen bireyler %1,63 oranında fenotipik anormallik göstermiştir. Gözlenen anormal birey oranı negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aradaki fark istatistik açıdan önemlidir ($p<0,01$ düzeyinde). 3,41 µl'lik konsantrasyonda gelişen bireyler %1,47 oranında fenotipik anormallik göstermiştir. Gözlenen anormal birey oranı negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aradaki önemlidir ($p<0,01$ düzeyinde).

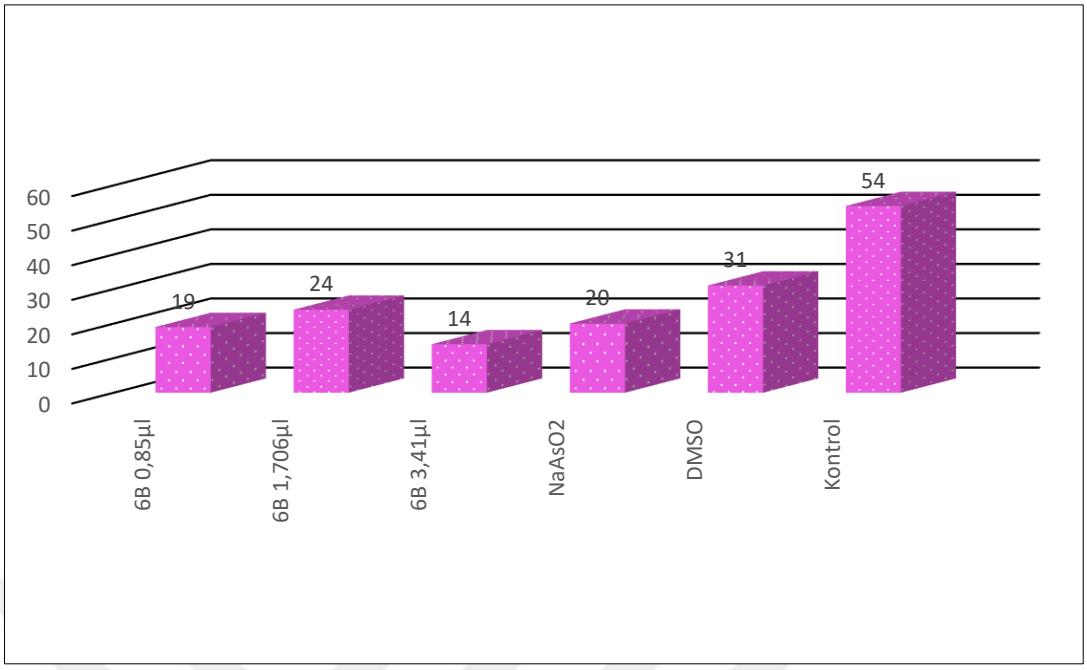
6b maddesi içeren üç dozun (0,85 µl, 1,706 µl ve 3,41 µl) anormal birey sayıları, pozitif kontrol grubu (NaAsO2) ile karşılaştırıldığında aradaki fark istatiksel olarak $p<0,01$ düzeyinde anlamlı bulunmuştur. Diğer yandan, 6b maddesi uygulanan deney

gruplarında konsantrasyon arttıkça hem ergin birey sayısı azalmış hem de anormal birey sayısı azalmıştır. Dişi ve erkek bireylerin F_1 neslinde anormal fenotipli bireyleri Şekil 3.3 ve Şekil 3.4 'de gösterilmiştir. Çözücü kontrol grubu içeren besiyeri içerisindeki 2090 bireyin %2,30'u fenotipik anormallik göstermiştir ve bu oran negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aradaki fark istatistik açıdan önemlidir ($p<0,01$ düzeyinde). Pozitif kontrol grubu içeren besiyeri içerisindeki 868 bireyin %4,50'si fenotipik anormallik göstermiştir ve bu oran negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aradaki fark istatistik açıdan önemsizdir.

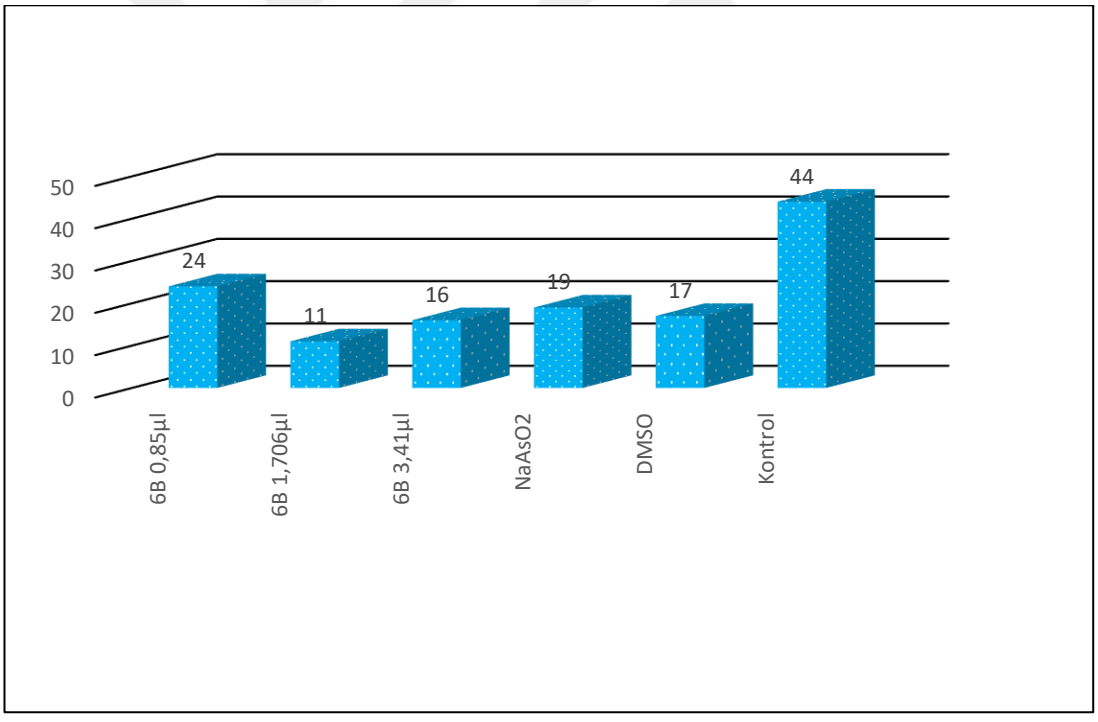
Tablo 3.5. 6b maddesinin F_1 neslinde anormal birey sayısına etkisi

Gruplar	Normal	(%)	Anormal birey Sayısı	(%) Anormal Birey Yüzdesi	Toplam	Grup Karşılaştırma	Standart Sapma	Z Değeri
6B 0,85 µl	2351	98,2	43 (G1)	1,80	2394	(G1-G2) (G1-G3) (G1-G4) (G1-G5) (G1-G6)	0,0038 0,0038 0,0075 0,0042 0,0060	0,415 0,841 -3,584** 1,176 6,055**
6B 1,706 µl	2101	98,37	35 (G2)	1,63	2136	(G2-G3) (G2-G4) (G2-G5) (G2-G6)	0,0038 0,0075 0,0043 0,0061	0,418 -3,791** 1,546 6,309**
6B 3,41 µl	2006	98,52	30 (G3)	1,48	2036	(G3-G4) (G3-G5) (G3-G6)	0,0075 0,0042 0,0060	-4,017** 1,942 6,614**
Pozitif Kontrol ($NaAsO_2$)	829	95,5	39 (G4)	4,50	868	(G4-G5) (G4-G6)	0,0077 0,0088	-2,837** 1,033
Çözücü Kontrol (DMSO)	2042	97,7	48 (G5)	2,30	2090	(G5-G6)	0,0062	4,986**
Negatif Kontrol (Su)	1714	94,60	98 (G6)	5,4	1812			

*p<0,05; **p<0,01 anlamlılık seviyesinde aradaki fark önemlidir.



Şekil 3.3. Dişi bireylerin F_1 neslinde anormal fenotipli bireyler



Şekil 3.4. Erkek bireylerin F_1 neslindeki anormal fenotipli bireyler

3.1.2.4. 6b maddesinin F_2 neslinde anormal birey sayısına etkisi

F_2 nesli gözlemleri esnasında hem deney hem de kontrol grubunda bazı morfolojik anormalliklere rastlanmıştır. F_2 neslinde gözlenen anormalikler ve yüzdelik oranlarına ait veriler Tablo 3.6 'da gösterilmiştir.

6b maddesi içeren 0,85 µl'lik konsantrasyonda gelişen bireyler %3,4 oranında fenotipik anormallik göstermiştir. Gözlenen anormal birey sayısı negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aradaki fark istatistik açıdan $p<0,01$ düzeyinde anlamlıdır.

0,85 µl'lik konsantrasyonun anormal birey oranı, pozitif kontrol grubu ve 3,41 µl'lik konsantrasyon ile karşılaştırıldığında aradaki fark istatistik açıdan anlamlıdır ($p<0,05$ düzeyinde).

1,706 µl'lik konsantrasyonda gelişen bireyler %5,18 oranında fenotipik anormallik göstermiştir.

Gözlenen anormal birey oranı negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aradaki fark istatistik açıdan önemsiz bulunmuştur. 6b maddesi uygulanan konsantrasyonlar arasında en yüksek anormal birey sayısı 1,706 µl'lik deney grubunda gözlemlenmiştir.

3,41 µl'lik konsantrasyonda gelişen bireyler %4,80 oranında fenotipik anormallik göstermiştir ki bu oran negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aradaki fark istatistik açıdan önemsizdir.

Çözücü kontrol grubu içeren besiyeri içerisindeki 2741 bireyin %1,86'sı fenotipik anormallik göstermiştir ve bu oran negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aradaki fark istatistik açıdan önemli bulunmuştur ($p<0,01$ düzeyinde).

En yüksek birey sayısı DMSO uygulanan deney grubundadır buna rağmen, anormal fenotipli birey sayısı diğer tüm gruplara göre düşmüştür.

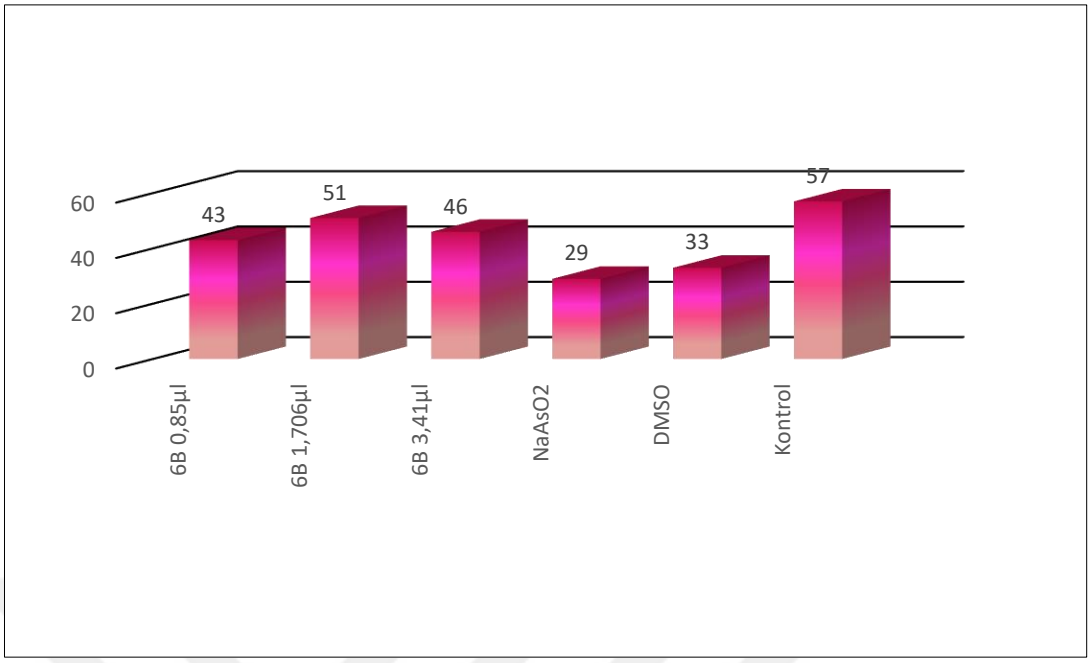
Pozitif kontrol grubunda 1363 bireyin %4,91'i fenotipik anormallik göstermiştir. Bu oran negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aradaki fark istatistik açıdan önemsizdir.

F_1 neslinde gözlemlendiği gibi F_2 neslinde de negatif kontrol grubu en fazla anormal birey yüzdesine sahiptir. Dişi ve erkek bireylerin F_2 neslinde anormal fenotipli bireyleri Şekil 3.5 ve Şekil 3.6 'de gösterilmiştir.

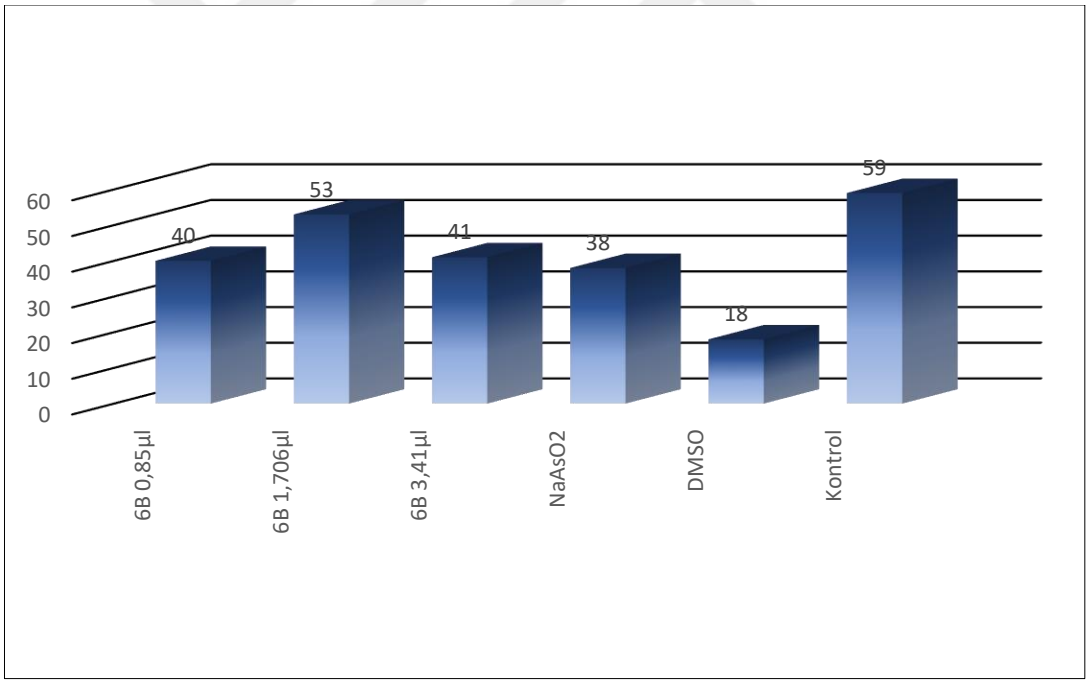
Tablo 3.6. 6b maddesinin F_2 neslinde anormal birey sayısına etkisi

Gruplar	Normal	(%)	Anormal birey Sayısı	(%) Anormal Birey Yüzdesi	Toplam	Grup Karşılaştırma	Standart Sapma	Z Değeri
6B 0,85 µl	2355	96,60	83 (G1)	3.4	2438	(G1-G2) (G1-G3) (G1-G4) (G1-G5) (G1-G6)	0,0061 0,0062 0,0070 0,0045 0,0067	-2,876** -2,236* -2,185* -3,432** 4,192**
6B 1,706 µl	1906	94,82	104 (G2)	5,18	2010	(G2-G3) (G2-G4) (G2-G5) (G2-G6)	0,0070 0,0076 0,0056 0,0074	0,539 0,339 -5,940** 1,382
6B 3,41 µl	1727	95,2	87 (G3)	4,80	1814	(G3-G4) (G3-G5) (G3-G6)	0,0077 0,0056 0,0075	-0,155 -5,195** 1,879
Pozitif Kontrol ($NaAsO_2$)	1296	95,09	67 (G4)	4.91	1363	(G4-G5) (G4-G6)	0,0064 0,0081	-4,768** 1,595
Çözücü Kontrol (DMSO)	2690	98,13	51 (G5)	1,87	2741	(G5-G6)	0,0061	7,059**
Negatif Kontrol (Su)	1752	93,80	116 (G6)	6,2	1868			

*p<0,05; **p<0,01 anlamlılık seviyesinde aradaki fark önemlidir.



Şekil 3.5. Dişi bireylerin F_2 neslinde anormal fenotipli bireyler

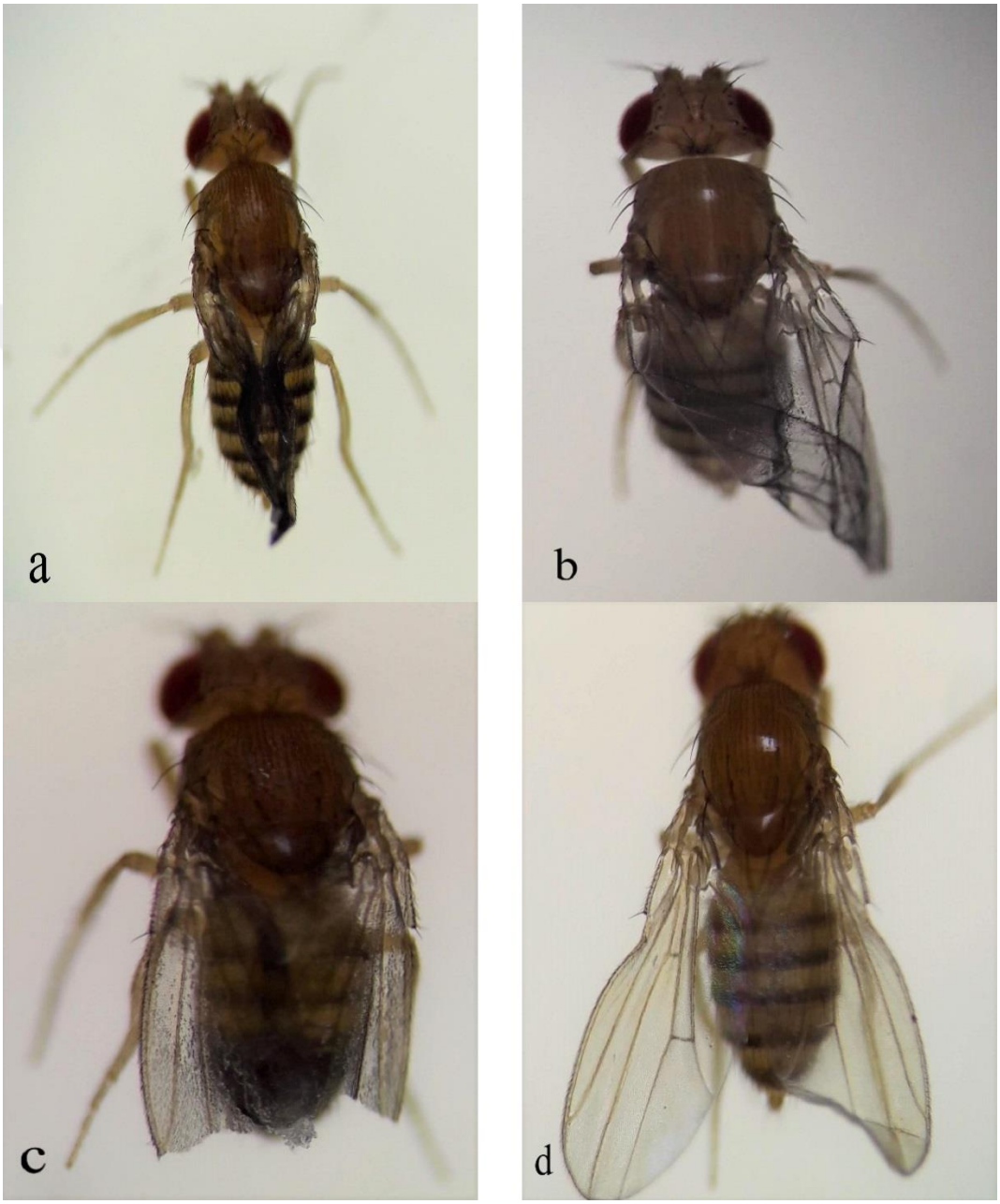


Şekil 3.6. Erkek bireylerin F_2 neslindeki anormal fenotipli bireyler

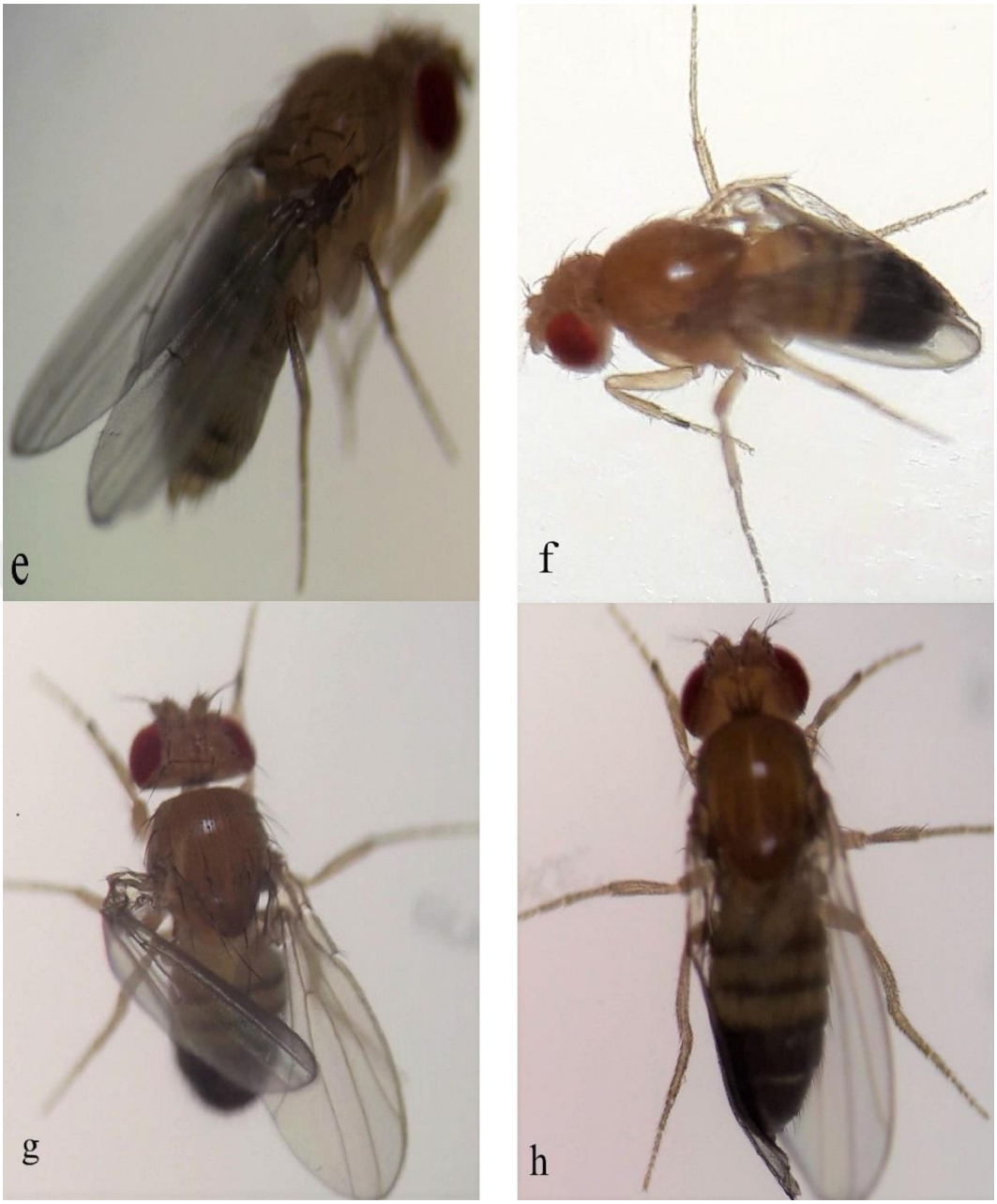
3.1.3. 6b maddesinin fenotipe etkisi

6b maddesi içeren 0,85 µl, 1,706 µl ve 3,41 µl dozluk besiyerinde gelişen bireylerde, çözücü kontrol grubu, pozitif kontrol grubu sodyum arsenit ve negatif kontrol grubundaki bireylerde bazı morfolojik anormalliklere rastlanmıştır.

Bu anormallikler, kıvrık kanatlılık, kanadın mızrak biçimini alması, kanadın vücuda yapışmış olması, püskül kanatlılık, kanadın abdomene yapışması, kanat körelmesi, segment eksikliği, segmentlerin kaynaşması gibi anormallikler gözlenmiştir (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. 6b maddesinin morfolojik karakterler üzerine etkileri (a-Her iki kanat mızrak, b-İki kanat üst üste yapışık ve kıvrık, c-Her iki kanat kırık, d-Sağ kanat kıvrık, e-3. ve 4. Segment oluşumu tamamlanmamış, f-Her iki kanat üst üste abdomene yapışık, g-Sol kanat kıvrık, h-Sol kanat abdomene yapışık)



Şekil 3.8. (Devam) 6b maddesinin morfolojik karakterler üzerine etkileri (a-Her iki kanat mızrak, b-İki kanat üst üste yapışık ve kıvrık, c-Her iki kanat kırık, d-Sağ kanat kıvrık, e-3. ve 4. Segment oluşumu tamamlanmamış, f-Her iki kanat üst üste abdomene yapışık, g-Sol kanat kıvrık, h-Sol kanat abdomene yapışık)

3.1.4. 6b maddesinin eşey oranına etkisi

3.1.4.1. 6b maddesinin F_1 neslinde eşey oranına etkisi

Araştırmanın bu aşamasında F_1 neslindeki erkek ve dişi bireylerin, eşey oranını nasıl etkilediğini ortaya koymak için yapılan deney sonucunda elde edilen bulgular Tablo 3.7 ’de verilmiştir.

F_1 neslinde 6b maddesi uygulanan deney gruplarından 0,85 µl'lik grupta eşey oranı değişmezken, 1,706 µl ve 3,41 µl'lik gruplarda dişi bireyler lehine eşey oranı değişmiştir. Buna ilave olarak, çözücü kontrol grubu ve negatif kontrol grubunda da eşey oranı değişmiş ve bu değişim istatistik açıdan farklı bulunmuştur.

Hem çözücü kontrol grubu hem negatif kontrol grubunda da eşey oranı dişiler lehine değişmiştir.

Deney gruplarının kendi arasında karşılaştırılmasında ise dişi birey oranı 0,85 µl ve çözücü kontrol grubu uygulaması karşılaştırmasında $p<0,05$ düzeyinde farklı çıkmıştır.

Negatif kontrol ve pozitif kontrol grubu uygulamasında $p<0,01$ düzeyinde anlamlı farklılık bulunmuştur.

Buna ilave olarak, 1,706 µl ve pozitif kontrol grubu arasında $p<0,05$ düzeyinde, 1,706 µl'lik doz ile negatif kontrol grubu arasında $p<0,01$ düzeyinde, istatistik açıdan anlamlı farklılık bulunmuştur.

3,41 µl ve pozitif kontrol grubu arasında $p<0,01$ düzeyinde, 3,41 µl'lik doz ile çözücü kontrol grubu arasında $p<0,05$ düzeyinde, istatistik açıdan anlamlı farklılık bulunmuştur.

Erkek birey oranının deney grupları karşılaştırıldığında ise 0,85 µl, 1,706 µl, 3,41 µl'lik doz ile negatif kontrol grubu arasında $p<0,01$ düzeyinde anlamlı farklılık bulunmuştur.

Öte yandan, 0,85 µl'lik doz ile pozitif kontrol grubu arasında $p<0,05$ düzeyinde farklı çıkmıştır.

1,706 µl'lik doz ile pozitif kontrol grubu arasında $p<0,01$ düzeyinde, 3,41 µl'lik doz ile pozitif kontrol grubu arasında $p<0,01$ düzeyinde anlamlı farklılık bulunmuştur.

Bunlara ilave olarak çözücü kontrol grubu ve negatif kontrol grubu arasında $p<0,01$ düzeyinde fark gözlenmiştir.

Tablo 3.7. 6b maddesinin F_1 neslinde eşey oranına etkisi

Gruplar	Dişi	(%)	Erkek	(%)	Grup İçi Z Değeri	Standart Sapma	Dişi Z Değeri	Erkek Z Değeri
6B 0,85 µl	1234 (G1)	51,54	1160 (G7)	48,45	(G1-G7) 2,14	0,0144	(G1-G2) 1,063 (G1-G3) -0,532 (G1-G4) 2,811** (G1-G5) -2,11* (G1-G6) 5,023**	(G7-G8) -1,846 (G7-G9) -0,605 (G7-G10) 2,256* (G7-G11) 0,596 (G7-G12) 3,505**
6B 1,706 µl	1127 (G2)	52,76	1009 (G8)	47,23	(G2-G8) 3,62**	0,0153	(G2-G3) -1,552 (G2-G4) 2,177* (G2-G5) -1,060 (G2-G6) 4,135**	(G8-G9) 1,159 (G8-G10) 3,235** (G8-G11) -1.197 (G8-G12) 4,888**
6B 3,41 µl	1098 (G3)	53,92	938 (G9)	46,07	(G3-G9) 5,025**	0,0156	(G3-G4) 3,075** (G3-G5) -2,562* (G3-G6) 5,365**	(G9-G10) 2,577** (G9-G11) -0,017 (G9-G12) 3,915**
Pozitif Kontrol ($NaAsO_2$)	451 (G4)	51,95	417 (G10)	48,04	(G4-G10) 1,63	0,0240	(G4-G5) 1,475 (G4-G6) -1,048	(G10-G11) 2,578** (G10-G12) -0,396
Çözücü Kontrol (DMSO)	1096 (G5)	52,44	994 (G11)	47,55	(G5-G11) 3,165**	0,0154	(G5-G6) 3,195**	(G11-G12) 3,928**
Negatif Kontrol (Su)	943 (G6)	52,04	869 (G12)	47,95	(G6-G12) 2,464*			

*p<0,05; **p<0,01 anlamlılık seviyesinde aradaki fark önemlidir.

3.1.4.2. 6b maddesinin F_2 neslinde eşey oranına etkisi

F_2 neslindeki erkek ve dişi bireylerin, eşey oranını nasıl etkilediğini ortaya koymak için yapılan deney sonucunda elde edilen bulgular Tablo3.8 'de anlatılmıştır.

F_2 neslinde 6b maddesi uygulanan deney gruplarından 1,706 µl ve 3,41 µl'lik gruplarda eşey oranı değişmezken, 0,85 µl'lik grupta dişi bireyler lehine eşey oranı değişmiştir.

Çözücü kontrol grubunda da eşey oranı dişiler lehine değişmiştir.

Deney gruplarının kendi arasında karşılaştırılmasında ise dişi birey oranı 0,85 µl ve 1,706 µl'lik uygulama dozlarında $p<0,05$ düzeyinde farklı çıkmıştır.

0,85 µl ve 3,41 µl'lik uygulama dozlarında ise $p<0,05$ düzeyinde farklı çıkmıştır.

Buna ilave olarak, 0,85 µl'lik doz ile negatif kontrol grubu arasında $p<0,01$ düzeyinde, 1,706 µl'lik doz ile çözücü kontrol grubu arasında $p<0,01$ düzeyinde anlamlı farklılık bulunmuştur.

Pozitif kontrol grubu ile çözücü kontrol grubu arasında $p<0,01$ düzeyinde istatistik açıdan anlamlı farklılık bulunmuştur.

Erkek birey oranının deney grupları karşılaştırıldığında ise 0,85 µl'lik doz ile çözücü kontrol grubu arasında $p<0,01$ düzeyinde farklı çıkmıştır.

1,706 µl'lik doz ile çözücü kontrol grubu arasında $p<0,01$ düzeyinde farklı çıkmıştır.

3,41 µl'lik doz ile çözücü kontrol grubu arasında $p<0,01$ düzeyinde anlamlı farklılık bulunmuştur.

Bunlara ilave olarak çözücü kontrol grubu ve negatif kontrol grubu arasında $p<0,01$ düzeyinde fark gözlenmiştir.

Çözücü kontrol grubunda ise pozitif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,01$ düzeyinde anlamlı farklılık gözlenmiştir.

Tablo 3.8. 6b maddesinin F_2 neslinde eşey oranına etkisi

Gruplar	Dişi	(%)	Erkek	%	Grup İçi Z Değeri	Standart Sapma	Dişi Z Değeri	Erkek Z Değeri
6B 0,85 µl	1339 (G1)	54,92	1099 (G7)	45,07	(G1-G7) 6,912**	0,0142	(G1-G2) 2,113* (G1-G3) 1,994* (G1-G4) 1,123 (G1-G5) 1,512 (G1-G6) -3,058**	(G7-G8) -1,201 (G7-G9) -1,926 (G7-G10) -0,897 (G7-G11) 6,396** (G7-G12) 0,190
6B 1,706 µl	1026 (G2)	51,04	984 (G8)	48,95	(G2-G8) 1,325	0,0158	(G2-G3) -0,051 (G2-G4) -0,721 (G2-G5) 3,444** (G2-G6) -0,993	(G8-G9) -0,732 (G8-G10) 0,184 (G8-G11) 5,045** (G8-G12) -0,959
6B 3,41 µl	933 (G3)	51,43	881 (G9)	48,56	(G3-G9) 1,729	0,0166	(G3-G4) -0,659 (G3-G5) 3,273** (G3-G6) -1,022	(G9-G10) 0,839 (G9-G11) 4,159** (G9-G12) -1,654
Pozitif Kontrol ($NaAsO_2$)	685 (G4)	50,25	678 (G10)	49,74	(G4-G10) 0,266	0,0191	(G4-G5) 2,269** (G4-G6) -1,616	(G10-G11) 4,459** (G10-G12) -0,693
Çözücü Kontrol (DMSO)	1453 (G5)	53	1288 (G11)	46,99	(G5-G11) 4,458**	0,0135	(G5-G6) -4,304**	(G11-G12) -5,760**
Negatif Kontrol (Su)	950 (G6)	50,85	918 (G12)	49,14	(G6-G12) 1,045			

*p<0,05; **p<0,01 anlamlılık seviyesinde aradaki fark önemlidir.

3.2. 2e Maddesinin 4-(((1,3-dimetil-2,4,6-trioksotetrahidropyrimidin-5(2H)-iliden) methil) amino) benzen sülfonamit) Etkileri

2e maddesine ait veriler, metamorfoz süresi, morfolojik karakterler üzerine toksik etkileri, ergin birey sayısı ve eşey oranına etkileri ayrı ayrı başlıklar halinde incelenecektir.

3.2.1. 2e maddesinin metamorfoz süresi üzerine etkileri

Farklı konsantrasyonlardaki karbonik anhidraz inhibitörlerinin metamorfoz süresine olan etkileri F_1 ve F_2 nesillerinde ayrı ayrı olarak incelenmiştir.

3.2.1.1. 2e maddesi karbonik anhidraz inhibitörlerin F_1 neslinde metamorfoz süresi üzerine etkisi

F_1 nesli için hazırlanan deney ve kontrol gruplarına 15 dişi ve 15 erkek birey konulmuştur. Ki değerine göre belirlenen üç farklı konsantrasyonda (2,6 µl, 5,2 µl ve 10,4 µl) 2e maddesi içeren deney grupları ile kontrol grubu, çaprazlanmanın başlangıcından itibaren her gün incelenmiştir.

Deney ve kontrol grubuna ait bireyler, çaprazlama yapıldıktan sonraki ilk gün yumurta bırakmıştır.

1. instar larvalar, çözücü kontrol grubu ve 2e maddesi içeren 2,6 µl'lik konsantrasyonda ikinci gün görülmüştür.

Buna karşılık negatif kontrol grubu, pozitif kontrol grubu olan sodyum arsenit çözeltisi ve 2e maddesi içeren 5,2 µl, 10,4 µl'lik konsantrasyonlarda üçüncü gün gözlenmiştir.

2. instar larvalar, çözücü kontrol grubu ve 2e maddesi içeren 2,6 µl, 5,2 µl'lik konsantrasyonlarda üçüncü gün görülmelerine karşılık, negatif kontrol grubu, pozitif kontrol grubu olan sodyum arsenit çözeltisi ve 2e maddesi içeren 10,4 µl'lik konsantrasyonda dördüncü gün görülmüştür.

3. instar larvalar, çözücü kontrol grubu ve 2e maddesi içeren 2,6 µl, 5,2 µl'lik konsantrasyonlarda dördüncü gün görülmelerine karşılık, negatif kontrol grubu,

pozitif kontrol grubu sodyum arsenit çözeltisi ve 2e maddesi içeren 10,4 µl'lik konsantrasyonda beşinci gün görülmüştür.

Pupa evresi, çözücü kontrol grubu ve deney grubunun tüm konsantrasyonlarında (2,6 µl, 5,2 µl ve 10,4 µl) altıncı gün görülmelerine karşılık, negatif kontrol grubu ve pozitif kontrol grubu olan sodyum arsenit çözeltisinde yedinci gün görülmüştür.

Ergin bireyler ise negatif kontrol grubunda dokuzuncu gün görülürken, çözücü kontrol grubu ve 2e maddesi içeren 2,6 µl, 5,2 µl'lik içeren konsantrasyonlarda 10. gün ortaya çıkmıştır.

2e maddesi içeren 10,4 µl'lik deney grubunda ve pozitif kontrol grubu sodyum arsenit çözeltisinde bir gün gecikmeyle 11.gün gözlenmiştir (Tablo 3.9).

Tablo 3.9. 2e maddesinin F_1 neslinde metamorfoz süresine etkisi

Gruplar	Yumurta	1. İnstar	2. İnstar	3. İnstar	Pupa	Ergin
2E 2,6 µl	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün	6. gün	10. gün
2E 5,2 µl	1. gün	3. gün	3. gün	4. gün	6. gün	10. gün
2E 10,4 µl	1. gün	3. gün	4. gün	5. gün	6. gün	11. gün
Pozitif Kontrol ($NaAsO_2$)	1. gün	3. gün	4. gün	5. gün	7. gün	11. gün
Çözücü Kontrol (DMSO)	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün	6. gün	10. gün
Negatif Kontrol (Su)	1. gün	3. gün	4. gün	5. gün	7. gün	9. gün

3.2.1.2. 2e maddesi karbonik anhidraz inhibitörlerin F_2 neslinde metamorfoz süresi üzerine etkisi

F_2 neslinde metamorfoz süresindeki etkiyi araştırmak için, F_1 neslinden elde edilen ergin bireyler, kimyasal içermeyen besiyerlerine aktarılarak F_2 nesli elde edilmiştir. F_2 neslini elde etmek için deney ve kontrol gruplarına ait kültür şişelerine F_1 neslinden elde edilen 15 dişi ve 15 erkek birey konulmuştur. Çaprazlama yapıldıktan sonraki ilk yumurta evresinden pupa evresine kadar yaşam döngüleri gözlenmiştir.

Deney ve kontrol grubuna ait bireyler, çaprazlama yapıldıktan sonraki ilk gün yumurta bırakmıştır.

1. instar larvalar, çözücü kontrol grubu, negatif kontrol grubu ve deney grubunun tüm konsantrasyonlarında (2,6 µl, 5,2 µl ve 10,4 µl) ikinci gün görülmüştür. Buna karşılık sadece pozitif kontrol grubu olan sodyum arsenit çözeltisi içeren besiyerinde üçüncü gün gözlenmiştir.

2. instar larvalar, çözücü kontrol grubu, negatif kontrol grubu ve deney grubunun tüm konsantrasyonlarında (2,6 µl, 5,2 µl ve 10,4 µl) üçüncü gün görülmelerine karşılık, pozitif kontrol grubu olan sodyum arsenit çözeltisi içeren besiyerinde dördüncü gün gözlenmiştir.

3. instar larvalar, pozitif kontrol grubu sodyum arsenit çözeltisinde beşinci gün görülmüştür. Buna karşılık negatif kontrol grubu, çözücü kontrol grubu ve 2e maddesi içeren 2,6 µl, 5,2 µl ve 10,4 µl'lik konsantrasyonlarda dördüncü gün gözlenmiştir.

Pupa evresi, pozitif kontrol grubu sodyum arsenit çözeltisinde yedinci gün gözlemlenirken buna karşılık, negatif kontrol grubu, çözücü kontrol grubu ve 2e maddesi içeren 2,6 µl, 5,2 µl ve 10,4 µl'lik konsantrasyonlarda altıncı gün gözlenmiştir.

Ergin bireyler, negatif kontrol grubu ve çözücü kontrol grubu 10. Gün görülürken, pozitif kontrol grubu sodyum arsenit ve 2e maddesi içeren 2,6 µl, 5,2 µl ve 10,4 µl'lik konsantrasyonlarda 11. gün ortaya çıkmıştır (Tablo 3.10).

Tablo 3.10. 2e maddesinin F_2 neslinde metamorfoz süresine etkisi

Gruplar	Yumurta	1. İnstar	2. İnstar	3. İnstar	Pupa	Ergin
2E 2,6 µl	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün	6. gün	11. gün
2E 5,2 µl	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün	6. gün	11. gün
2E 10,4 µl	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün	6. gün	11. gün
Pozitif Kontrol ($NaAsO_2$)	1. gün	3. gün	4. gün	5. gün	7. gün	11. gün
Çözücü Kontrol (DMSO)	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün	6. gün	10. gün
Negatif Kontrol (Su)	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün	6. gün	10. gün

3.2.2. 2e maddesinin birey sayısına etkisi

3.2.2.1. 2e maddesinin F_1 neslinde birey sayısına etkisi

F1 nesli için toplamda 9051 birey ile sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçlar pozitif kontrol grubu, negatif kontrol grubu, çözücü kontrol grubu ve 2e maddesi içeren 2,6 µl, 5,2 µl ve 10,4 µl'lik deney gruplarının birey sayısına olan etkisi, Tablo 3.11 'de gösterilmiştir.

2e maddesi içeren 2,6 µl'lik konsantrasyonundaki bireylerin ergin birey sayısına oranı, negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aradaki fark istatistik açıdan önemsizdir.

2,6 µl'lik konsantrasyonundaki birey sayısı, çözücü kontrol grubu ve 2e maddesi içeren diğer dozlar (5,2 µl ve 10,4 µl) ile karşılaştırıldığında istatistik açıdan $p<0,01$ düzeyinde, pozitif kontrol grubu sodyum arsenit ile karşılaştırıldığında $p<0,05$ düzeyinde fark ortaya çıkmıştır.

5,2 µl'lik konsantrasyonundaki bireylerin ergin birey sayısına oranı, negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aradaki fark istatistik açıdan önemlidir ($p<0,01$ düzeyinde). 5,2 µl'lik konsantrasyonu ile 10,4 µl arasında istatistik açıdan anlamlı bir fark ortaya çıkmıştır ($p<0,01$ düzeyinde). Bununla birlikte 5,2 µl'lik konsantrasyonu ile pozitif kontrol grubu sodyum arsenit arasında istatistik açıdan önemli bulunmuştur ($p<0,05$ düzeyinde).

Tablo 3.11. 2e maddesinin F_1 neslinde birey sayısına etkisi

Gruplar	Toplam	Grup Karşılaştırma	Standart Sapma	Z Değeri
2E 2,6 µl	1249 (G1)	(G1-G2)	0,0085	-5,021**
		(G1-G3)	0,0089	-2,580**
		(G1-G4)	0,0101	-2,525*
		(G1-G5)	0,0079	5,974**
		(G1-G6)	0,0089	-1,825
2E 5,2 µl	1307 (G2)	(G2-G3)	0,0068	2,923**
		(G2-G4)	0,0084	2,079*
		(G2-G5)	0,0056	0,822
		(G2-G6)	0,0070	-3,794**
2E 10,4 µl	1725 (G3)	(G3-G4)	0,0087	-0,298
		(G3-G5)	0,0061	4,042**
		(G3-G6)	0,0074	-0,880
Pozitif Kontrol ($NaAsO_2$)	868 (G4)	(G4-G5)	0,0078	2,834**
		(G4-G6)	0,0088	-1,032
Çözücü Kontrol (DMSO)	2090 (G5)	(G5-G6)	0,0062	-4,980**
Negatif Kontrol (Su)	1812 (G6)			

*p<0,05; **p<0,01 anlamlılık seviyesinde aradaki fark önemlidir.

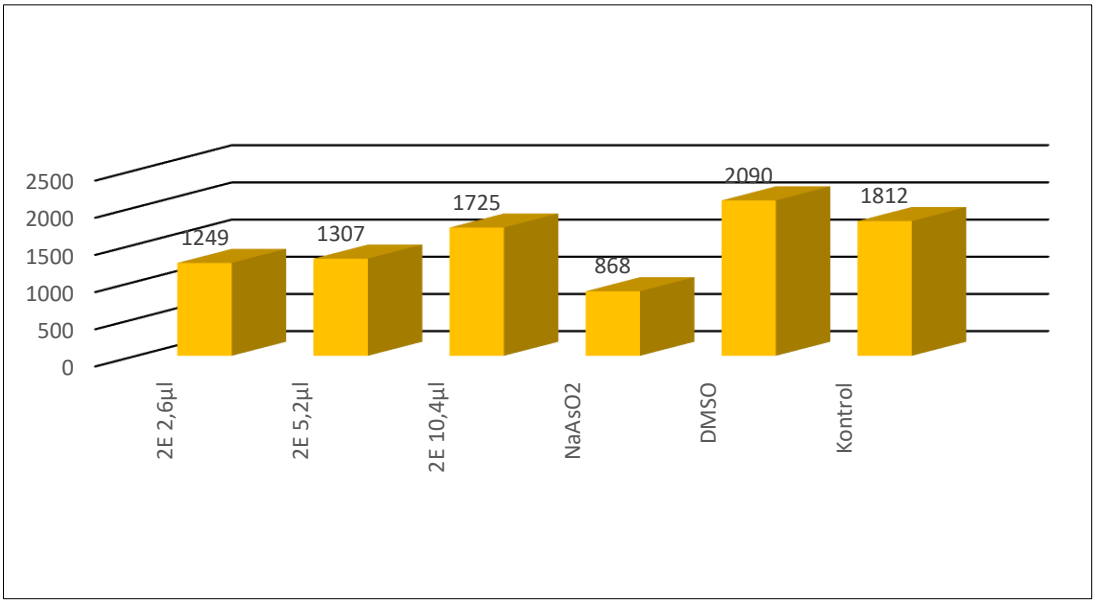
10,4 µl'lik konsantrasyonundaki bireylerin ergin birey sayısına oranı negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aradaki fark istatistik açıdan önemsizdir. 10,4 µl'lik konsantrasyonu ile çözücü kontrol grubu arasında istatistik açıdan anlamlı bir fark ortaya çıkmıştır ($p<0,01$ düzeyinde).

2e maddesi uygulanan üç deney dozunda da ergin birey sayısı negatif kontrol grubuna göre azalmıştır ve bu fark sadece 5,2 µl'lik konsantrasyonda istatiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p<0,01$ düzeyinde).

Çözücü kontrol grubu içeren besiyerinden 2090 birey elde edilmiştir. DMSO grubundaki ergin birey sayısı negatif kontrol grubuna göre artmıştır ve bu bireyler negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aradaki fark istatistik açıdan önemli bulunmuştur ($p<0,01$ düzeyinde).

Pozitif kontrol grubu sodyum arsenit besiyerinden 868 birey elde edilmiştir. Pozitif kontrol grubundaki birey sayısı negatif kontrol grubundan düşüktür ve negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aradaki fark anlamlı bulunmamıştır. Bununla birlikte pozitif kontrol grubu ile çözücü kontrol grubu arasında istatistik açıdan anlamlıdır ($p<0,01$ düzeyinde).

2e maddesi içeren 2,6 µl, 5,2 µl ve 10,4 µl'lik dozlarda konsantrasyon azaldıkça birey sayısında da azalma gözlemlenmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.9. 2e maddesinin F_1 neslinde toplam birey sayısı

3.2.2.2. 2e maddesinin F_2 neslinde birey sayısına etkisi

F_2 nesli için toplamda 12605 birey ile sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçlar pozitif kontrol grubu, negatif kontrol grubu, çözücü kontrol grubu ve 2e maddesi içeren 2,6 µl, 5,2 µl ve 10,4 µl'lik deney gruplarının birey sayısına olan etkisi, Tablo3.12 'de gösterilmiştir.

2e maddesi içeren 2,6 µl'lik konsantrasyonundaki bireylerin ergin birey sayısına oranı, negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aradaki fark istatistik açıdan önemsizdir. 2,6 µl'lik konsantrasyonundaki birey sayısı, çözücü kontrol grubu ve 2e maddesi içeren 5,2 µl'lik konsantrasyonu ile karşılaştırıldığında istatistik açıdan anlamlıdır ($p<0,01$ düzeyinde).

5,2 µl'lik konsantrasyonundaki bireylerin ergin birey sayısına oranı, negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aradaki fark istatistik açıdan önemlidir ($p<0,01$ düzeyinde). Bununla birlikte, 5,2 µl'lik konsantrasyonu ile çözücü kontrol grubu arasında da istatistik açıdan anlamlı bir fark ortaya çıkmıştır ($p<0,01$ düzeyinde).

10,4 µl'lik konsantrasyonundaki bireylerin ergin birey sayısına oranı negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bire istatiksel farklılık ortaya çıkmıştır ($p<0,01$ düzeyinde). 10,4 µl'lik konsantrasyonu ile çözücü kontrol grubu arasında istatistik açıdan anlamlı bir fark ortaya çıkmıştır ($p<0,01$ düzeyinde).

2e maddesi uygulanan üç deney dozunda da ergin birey sayısı negatif kontrol grubuna göre artmıştır ve bu artış konsantrasyon azaldıkça birey sayısında artma gözlemlenmiştir.

Çözücü kontrol grubu içeren besiyerinden 2741 birey elde edilmiştir. DMSO grubundaki ergin birey sayısı negatif kontrol grubuna göre artmıştır ve bu bireyler negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aradaki fark istatistik açıdan önemli bulunmuştur ($p<0,01$ düzeyinde). Pozitif kontrol grubu sodyum arsenit besiyerinden 1363 birey elde edilmiştir.

Pozitif kontrol grubundaki birey sayısı negatif kontrol grubundan düşüktür ve negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aradaki fark anlamlı bulunmamıştır. Bununla

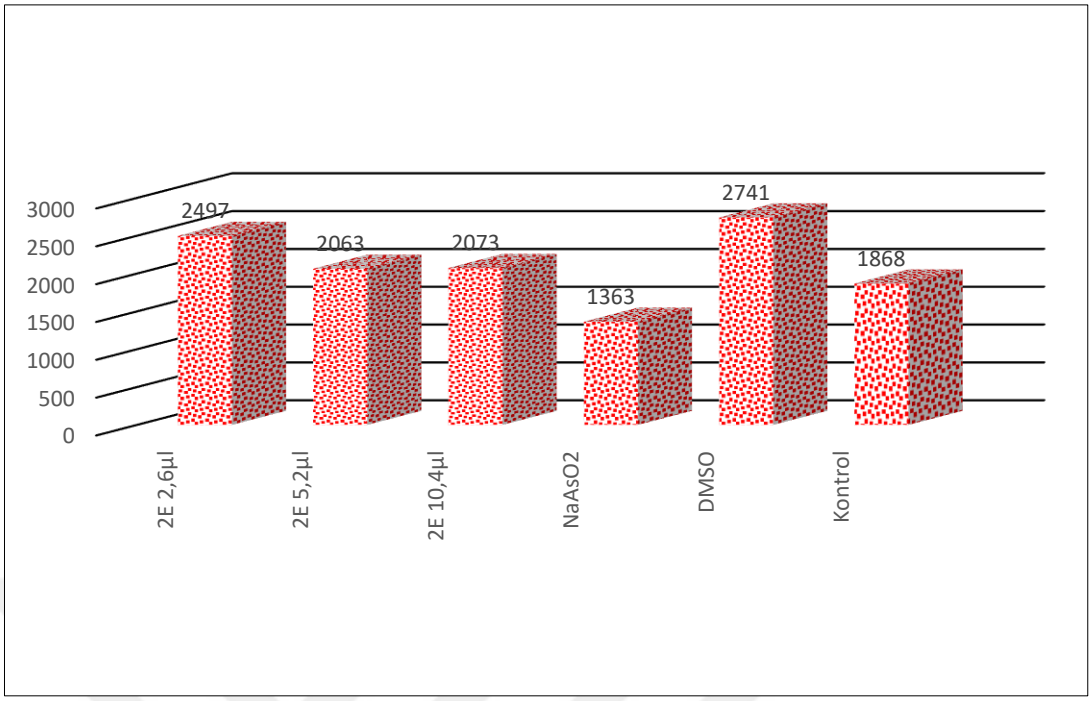
birlikte pozitif kontrol grubu ile çözücü kontrol grubu arasında istatistik açıdan anlamlıdır ($p<0,01$ düzeyinde).

Tablo 3.12. 2e maddesinin F_2 neslinde birey sayısına etkisi

Gruplar	Toplam	Grup Karşılaştırma	Standart Sapma	Z Değeri
2E 2,6 µl	2497 (G1)	(G1-G2)	0,0060	-2,648**
		(G1-G3)	0,0061	-1,902
		(G1-G4)	0,0073	-0,286
		(G1-G5)	0,0051	6,370**
		(G1-G6)	0,0071	-1,517
2E 5,2 µl	2063 (G2)	(G2-G3)	0,0059	0,710
		(G2-G4)	0,0071	1,934
		(G2-G5)	0,0048	3,463**
		(G2-G6)	0,0069	-3,864**
2E 10,4 µl	2073 (G3)	(G3-G4)	0,0072	1,322
		(G3-G5)	0,0050	4,176**
		(G3-G6)	0,0070	-3,197**
Pozitif Kontrol ($NaAsO_2$)	1363 (G4)	(G4-G5)	0,0064	4,762**
		(G4-G6)	0,0081	-1,593
Çözücü Kontrol (DMSO)	2741 (G5)	(G5-G6)	0,0061	-7,052**
Negatif Kontrol (Su)	1868 (G6)			

*p<0,05; **p<0,01 anlamlılık seviyesinde aradaki fark önemlidir.

F_1 nesline göre F_2 neslinde, 2e maddesi içeren (2,6 µl, 5,2 µl ve 10,4 µl) deney gruplarında birey sayısında artışlar gözlenmiştir (Şekil 3.9).



Şekil 3.10. 2e maddesinin F_2 neslinde toplam birey sayısı

3.2.2.3. 2e maddesinin F_1 neslinde anormal birey sayısına etkisi

F_1 nesli gözlemleri esnasında pozitif kontrol grubu, negatif kontrol grubu, çözücü kontrol grubu ve 2e maddesi içeren üç konsantrasyon (2,6 µl, 5,2 µl ve 10,4 µl) grubunda bazı morfolojik anormalliklere rastlanmıştır. Bu anormallikler, kıvrık kanatlılık, mızrak kanatlılık, kanadın vücuda yapışmış olması, abdominal bozukluk, kanat körelmesi ve segment eksikliği şeklindedir. F_1 neslinde gözlenen anormalikler ve yüzdelik oranlarına ait veriler Tablo 3.13 'de gösterilmiştir.

2e maddesi içeren 2,6 µl'lik konsantrasyonda yetiştirilen bireylerin %7,04 oranında fenotipik anormallik göstermiştir. Gözlenen anormal birey oranı negatif kontrol grubundan fazla olmasına rağmen aradaki fark istatistik açıdan anlamlı değildir.

5,2 µl'lik konsantrasyonda yetiştirilen bireylerin %2,75 oranında fenotipik anormallik göstermiştir. Gözlenen anormal birey oranı negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aradaki fark istatistik açıdan önemlidir ($p<0,01$düzeyinde).

10,4 µl'lik konsantrasyonda yetiştirilen bireylerin %4,75 oranında fenotipik anormallik göstermiştir. Gözlenen anormal birey oranı negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aradaki fark istatistik açıdan anlamlı değildir.

Tablo 3.13. 2e maddesinin F_1 neslinde anormal birey sayısına etkisi

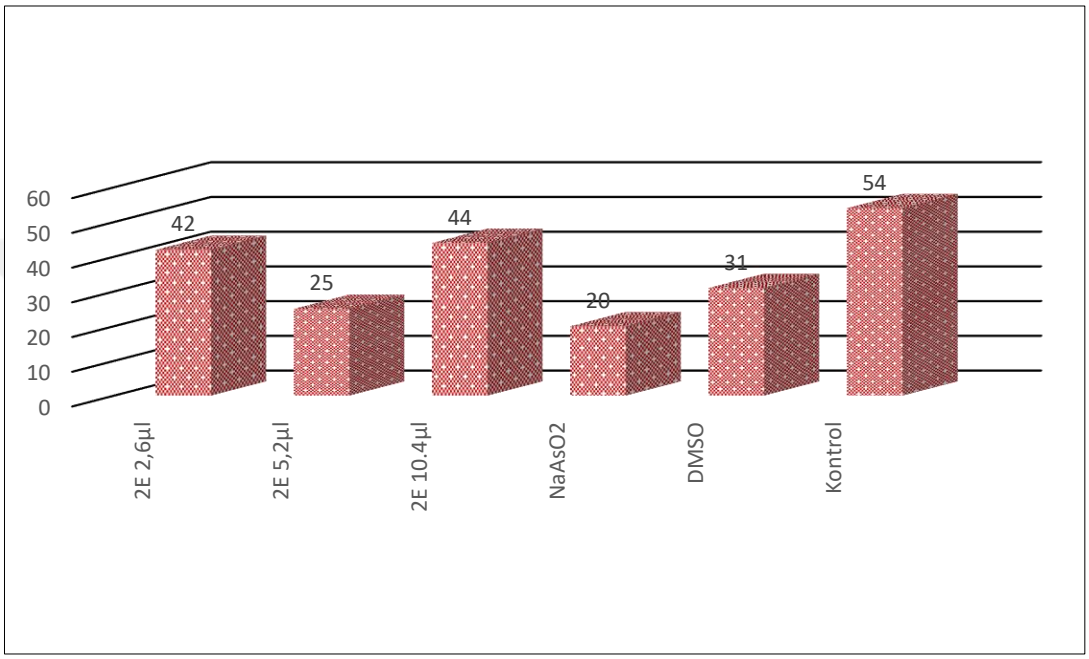
Gruplar	Normal	(%)	Anormal birey Sayısı	(%) Anormal Birey Yüzdesi	Toplam	Grup Karşılaştırma	Standart Sapma	Z Değeri
2,6 µl Dozu	1161	92,95	88 (G1)	7,04	1249	(G1-G2) (G1-G3) (G1-G4) (G1-G5) (G1-G6)	0,0085 0,0089 0,0101 0,0080 0,0090	5,025** 2,582** 2,527** -5,979** -1,826
5,2 µl Dozu	1271	97,24	36 (G2)	2,75	1307	(G2-G3) (G2-G4) (G2-G5) (G2-G6)	0,0068 0,0083 0,0056 0,0070	-2,926** -2,081* -0,823 3,799**
10,4 µl Dozu	1643	95,24	82 (G3)	4,75	1725	(G3-G4) (G3-G5) (G3-G6)	0,0087 0,0061 0,0074	0,298 -4,047** 0,881
Pozitif Kontrol ($NaAsO_2$)	829	95,5	39 (G4)	4,49	868	(G4-G5) (G4-G6)	0,0077 0,0088	-2,837** 1,033
Çözücü Kontrol (DMSO)	2042	97,7	48 (G5)	2,29	2090	(G5-G6)	0,0062	4,986**
Negatif Kontrol (Su)	1714	94,60	98 (G6)	5,4	1812			

*p<0,05; **p<0,01 anlamlılık seviyesinde aradaki fark önemlidir.

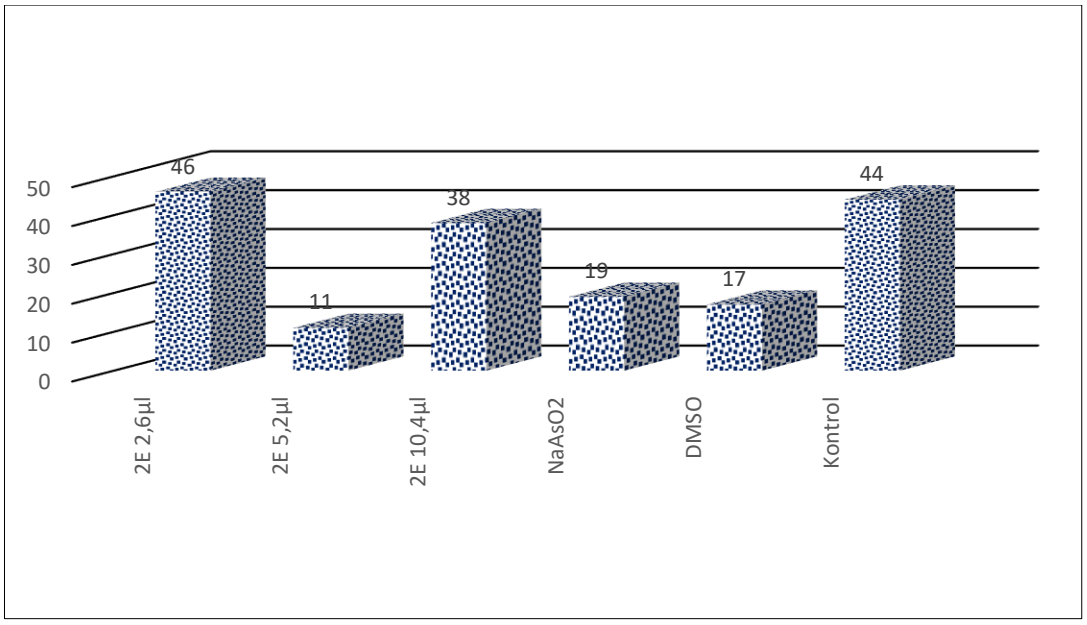
Çözücü kontrol grubu uygulanan besiyeri içerisindeki 2090 bireyin %2,29 oranında fenotipik anormallik göstermiştir ve bu oran negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aradaki fark istatistik açısından p<0,01 düzeyinde anlamlıdır. En yüksek birey sayısı DMSO uygulanan deney grubundadır buna rağmen, anormal fenotipli birey sayısı negatif kontrol grubuna göre düşmüştür. Pozitif kontrol grubu

sodyum arsenit uygulanan besiyeri içerisindeki 868 bireyin %4,49 oranında fenotipik anormallik göstermiştir ve bu oran kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aradaki fark istatistik açıdan anlamlı değildir.

Dişi ve erkek bireylerin F_1 neslinde anormal fenotipli bireyleri Şekil 3.10 ve Şekil 3.11 ‘de gösterilmiştir.



Şekil 3.11. Dişi bireylerin F_1 neslinde anormal fenotipli bireyler



Şekil 3.12. Erkek bireylerin F_1 neslindeki anormal fenotipli bireyler

3.2.2.4. 2e maddesinin F_2 neslinde anormal birey sayısına etkisi

F2 nesli gözlemleri esnasında hem deney hem de kontrol grubunda bazı morfolojik anormalliklere rastlanmıştır.

F_2 neslinde gözlenen anormalikler ve yüzdelik oranlarına ait veriler Tablo 3.14 'de gösterilmiştir.

2,6 µl'lik konsantrasyonda yetiştirilen bireylerin %5,12 oranında fenotipik anormallik göstermiştir. Gözlenen anormal birey oranı negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aradaki fark istatistik açıdan anlamlı değildir.

5,2 µl'lik konsantrasyonda yetiştirilen bireyin %3,53 oranında fenotipik anormallik göstermiştir. Gözlenen anormal birey oranı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aradaki fark istatistik açıdan anlamlıdır ($p<0,01$ düzeyinde).

10,4 µl'lik konsantrasyonda yetiştirilen bireylerin %3,95 oranında fenotipik anormallik göstermiştir. Gözlenen anormal birey oranı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aradaki fark önemli bulunmuştur ($p<0,01$ düzeyinde).

2e maddesine uygulanan 2,6 µl, 5,2 µl ve 10,4 µl'lik konsantrasyonlarda gözlenen anormal birey sayısı negatif kontrol grubundan düşüktür ve birey oranı sadece en düşük doz olan 2,6 µl'lik dozda anlamlı değildir.

Çözücü kontrol grubu uygulanan besiyeri içerisindeki 2741 bireyin %1,86 oranında fenotipik anormallik göstermiştir ve bu oran negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aradaki fark istatistik açıdan $p<0,01$ düzeyinde anlamlı bulunmuştur.

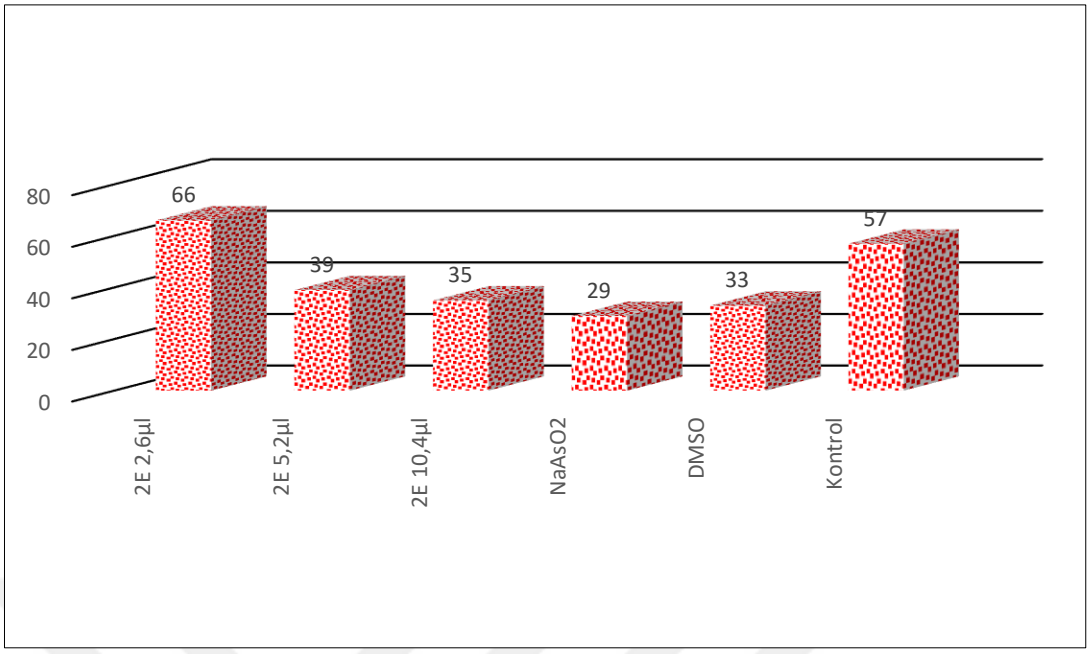
Pozitif kontrol grubu sodyum arsenit uygulanan besiyeri içerisindeki 1363 bireyin %4,91 oranında fenotipik anormallik göstermiştir ve bu oran negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aradaki fark istatistik açıdan önemli değildir.

F_1 neslinde en fazla anormal birey sayısı en düşük konsantrasyon olan 2,6 µl'lik dozda iken, F_2 neslinde en fazla anormal birey sayısı negatif kontrol grubunda görülmüştür. Dişi ve erkek bireylerin F_2 neslinde anormal fenotipli bireyleri Şekil 3.12 ve Şekil 3.13 'de gösterilmiştir.

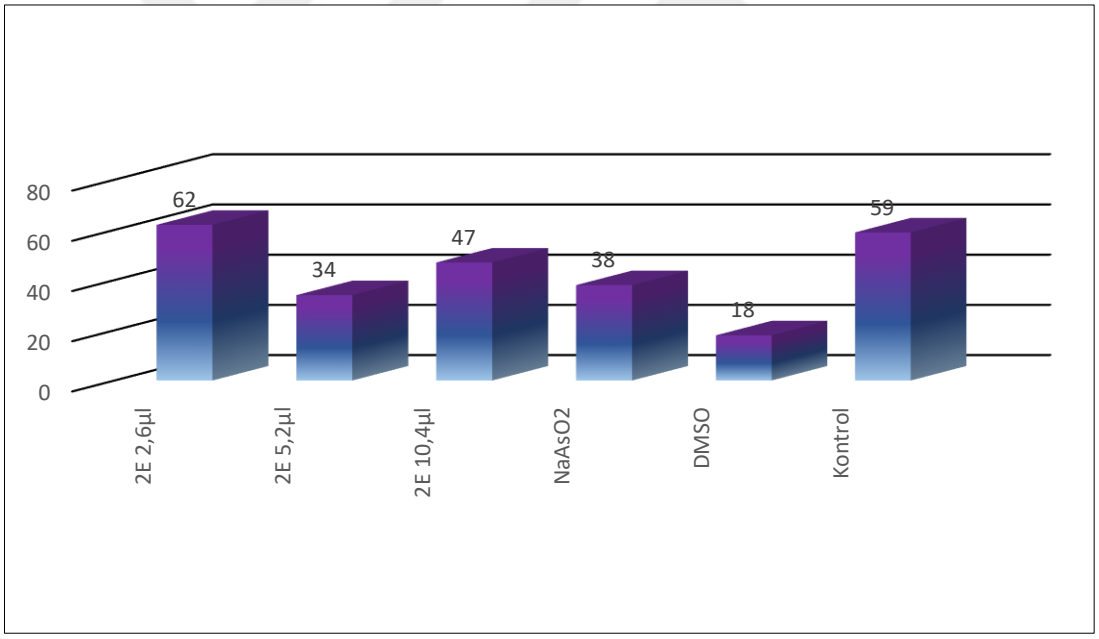
Tablo 3.14. 2e maddesinin F_2 neslinde anormal birey sayısına etkisi

Gruplar	Normal	(%)	Anormal birey Sayısı	(%) Anormal Birey Yüzdesi	Toplam	Grup Karşılaştırma	Standart Sapma	Z Değeri
2,6 µl Dozu	2369	94,87	128 (G1)	5,12	2497	(G1-G2) (G1-G3) (G1-G4) (G1-G5) (G1-G6)	0,0060 0,0061 0,0073 0,0051 0,0071	2,651** 1,904 0,286 -6,379** 1,518
5,2 µl Dozu	1990	96,46	73 (G2)	3,53	2063	(G2-G3) (G2-G4) (G2-G5) (G2-G6)	0,0059 0,0071 0,0048 0,0069	-0,711 -1,936 -3,469** 3,868**
10,4 µl Dozu	1991	96,04	82 (G3)	3,95	2073	(G3-G4) (G3-G5) (G3-G6)	0,0072 0,0050 0,0070	-1,324 -4,183** 3,200**
Pozitif Kontrol ($NaAsO_2$)	1296	95,08	67 (G4)	4,91	1363	(G4-G5) (G4-G6)	0,0064 0,0081	-4768** 1,595
Çözücü Kontrol (DMSO)	2690	98,13	51 (G5)	1,86	2741	(G5-G6)	0,0061	7,059**
Negatif Kontrol (Su)	1752	93,79	116 (G6)	6,2	1868			

*p<0,05; **p<0,01 anlamlılık seviyesinde aradaki fark önemlidir.



Şekil 3.13. Dişi bireylerin F_2 neslinde anormal fenotipli bireyler

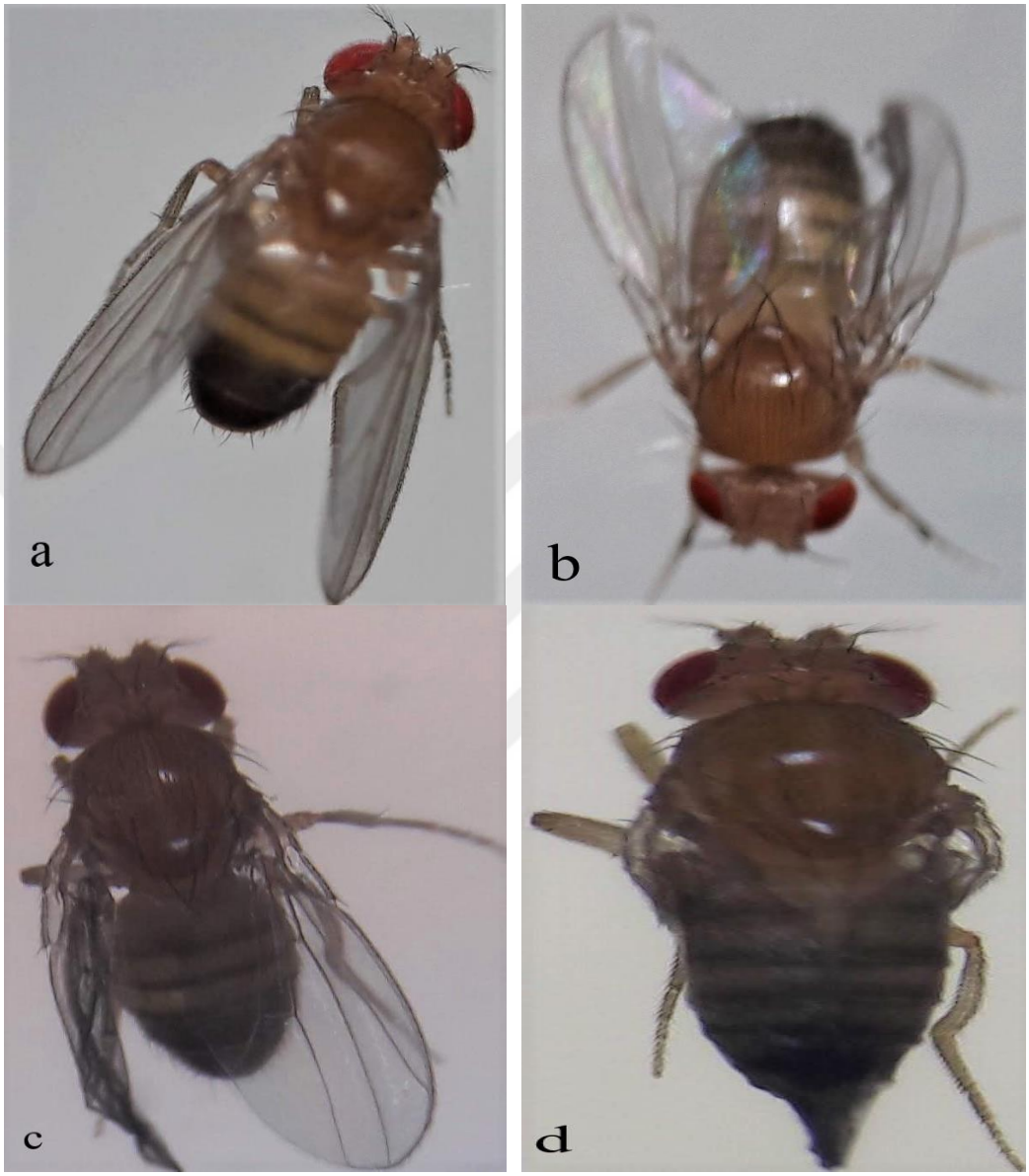


Şekil 3.14. Erkek bireylerin F_2 neslindeki anormal fenotipli bireyler

3.2.3. 2e maddesinin fenotipe etkisi

2e maddesi içeren 2,6 µl, 5,2 µl ve 10,4 µl'lik konsantrasyonlardaki besiyerinde gelişen bireylerde morfolojik anormalliklere rastlanmıştır. Bu anormallikler, kıvrık kanatlılık, mızrak kanatlılık, kanadın vücuda yapışmış olması, püskül kanatlılık, kanadın abdomene yapışması, kanat körelmesi, segment eksikliği, segmentlerin

kaynaşması gibi anormallikler gözlenmiştir. Dişi bireylerinin morfolojik oranlarına etkileri F_1 nesli ve F_2 nesli olarak ayrı başlıklar halinde incelenmiştir (Şekil 3.14).



Şekil 3.15. 2e maddesinin morfolojik karakterler üzerine etkileri (a-Sağ kanat kırık, b-Sol kanat kırık, c-Sol kanat mızrak, d-Her iki kanat abdomene yapışık

3.2.4. 2e maddesinin eşey oranına etkisi

3.2.4.1. 2e maddesinin F_1 neslinde eşey oranına etkisi

Araştırmanın bu aşamasında F_1 neslindeki erkek ve dişi bireylerin, eşey oranını nasıl etkilediğini ortaya koymak için yapılan deney sonucunda elde edilen bulgular Tablo3.15 ’de sunulmuştur.

F_1 neslinde 2e maddesi uygulanan deney gruplarından 2,6 µl ve 5,2 µl'lik gruplarda eşey oranı değişmezken, 10,4 µl'lik grupta eşey oranı erkek bireyler lehine değişmiştir. Bununla birlikte, çözücü kontrol grubu ve negatif kontrol grubunda eşey oranı istatistik açıdan farklılık göstermiştir.

Hem çözücü kontrol grubu hem de negatif kontrol grubunda da eşey oranı dişiler lehine değişmiştir.

Deney gruplarının kendi arasında karşılaştırılmasında ise dişi birey oranı 2,6 µl'lik doz ile 5,2 µl'lik doz karşılaştırmasında $p<0,05$ düzeyinde farklı çıkmıştır. 2,6 µl'lik doz ile çözücü kontrol grubu uygulamasında ise $p<0,01$ düzeyinde anlamlı farklılık bulunmuştur.

Buna ilave olarak, 10,4 µl ve çözücü kontrol grubu arasında $p<0,01$ düzeyinde anlamlı farklılık bulunmuştur. Çözücü kontrol grubu ile negatif kontrol grubu arasında $p<0,01$ düzeyinde anlamlı farklı çıkmıştır.

Erkek birey oranının deney grupları karşılaştırıldığında ise negatif kontrol grubu ile pozitif kontrol grubu arasında $p<0,01$ düzeyinde anlamlı farklılık bulunmuştur. 10,4 µl'lik doz ile çözücü kontrol grubu arasında $p<0,01$ düzeyinde anlamlı farklılık bulunmuştur.

2,6 µl'lik doz ile çözücü kontrol grubu arasında $p<0,01$ düzeyinde anlamlı farklılık bulunmuştur. 5,2 µl'lik doz ile pozitif kontrol grubu arasında $p<0,05$ düzeyinde fark gözlenmiştir.

Öte yandan, 5,2 µl'lik doz ile negatif kontrol grubu arasında $p<0,01$ düzeyinde fark gözlenmiştir. Çözücü kontrol grubu ile pozitif kontrol grubu arasında $p<0,01$ düzeyinde fark gözlenmiştir.

2,6 µl ile 5,2 µl'lik doz arasında $p<0,01$ düzeyinde fark gözlenmiştir. 5,2 µl ile 10,4 µl'lik doz arasında $p<0,01$ düzeyinde anlamlı farklılık bulunmuştur.

Çözücü kontrol grubu ile negatif kontrol grubu arasında $p<0,01$ düzeyinde fark gözlenmiştir.

Tablo 3.15. 2e maddesinin F1 neslinde eşey oranına etkisi

Gruplar	Dişi	(%)	Erkek	(%)	Grup İçi Z Değeri	Standart Sapma	Dişi Z Değeri	Erkek Z Değeri
2E 2,6 µl	644 (G1)	51,56	605 (G7)	48,43	(G1-G7) 1,565	0,0200	(G1-G2) -2,115* (G1-G3) -0,756 (G1-G4) -1,521 (G1-G5) 3,379** (G1-G6) 0,649	(G7-G8) -5,027** (G7-G9) -2,816** (G7-G10) 0,405 (G7-G11) 5,103** (G7-G12) 1,947
2E 5,2 µl	640 (G2)	48,96	665 (G8)	51,03	(G2-G8) -1,058	0,0196	(G2-G3) 1,483 (G2-G4) 0,429 (G2-G5) 1,179 (G2-G6) -1,689	(G8-G9) 2,976** (G8-G10) 2,565* (G8-G11) -0,109 (G8-G12) -3,822**
2E 10,4 µl	791 (G3)	45,85	934 (G9)	54,14	(G3-G9) -4,886**	0,0170	(G3-G4) -0,892 (G3-G5) 2,863** (G3-G6) -0,144	(G9-G10) 0,405 (G9-G11) 3,064** (G9-G12) -1,005
Pozitif Kontrol ($NaAsO_2$)	451 (G4)	51,95	417 (G10)	48,04	(G4-G10) 1,630	0,0240	(G4-G5) 1,475 (G4-G6) -1,048	(G10-G11) 2,578** (G10-G12) -0,396
Çözücü Kontrol (DMSO)	1096 (G5)	52,44	994 (G11)	47,55	(G5-G11) 3,165**	0,0154	(G5-G6) -3,195**	(G11-G12) -3,928**
Negatif Kontrol (Su)	943 (G6)	52,04	869 (G12)	47,95	(G6-G12) 2,464*			

*p<0,05; **p<0,01 anlamlılık seviyesinde aradaki fark önemlidir.

3.2.4.2. 2e maddesinin F_2 neslinde eşey oranına etkisi

F_2 neslindeki erkek ve dişi bireylerin, eşey oranını nasıl etkilediğini ortaya koymak için yapılan deney sonucunda elde edilen bulgular Tablo3.16 'da sunulmuştur.

F_2 neslinde 2e maddesi uygulanan deney gruplarından 2,6 µl, 5,2 µl, 10,4 µl 'lik dozlarda eşey oranı dişi bireyler lehine değişmiştir. Çözücü kontrol grubunda da dişiler lehine eşey oranı değişmiştir.

Deney gruplarının kendi arasında karşılaştırılmasında ise dişi birey oranı 2,6 µl doz ile 10,4 µl doz karşılaştırmasında $p<0,05$ düzeyinde, 2,6 µl'lik doz ile çözücü kontrol grubu arasında $p<0,01$ düzeyinde, istatistik açıdan anlamlı farklılık bulunmuştur.

5,2 µl'lik doz ile negatif kontrol grubu karşılaştırmasında $p<0,05$ düzeyinde anlamlı fark çıkarken, 10,4 µl doz ile negatif kontrol grubu karşılaştırmasında $p<0,01$ düzeyinde anlamlı fark bulunmuştur.

Buna ilave olarak, pozitif kontrol grubu ile çözücü kontrol grubu karşılaştırmasında $p<0,05$ düzeyinde, çözücü kontrol grubu ile negatif kontrol grubu arasında ise $p<0,01$ düzeyinde istatistik açıdan anlamlı farklılık bulunmuştur.

Erkek birey oranının deney grupları karşılaştırıldığında ise 2,6 µl'lik doz ile çözücü kontrol grubu karşılaştırıldığında $p<0,01$ düzeyinde fark gözlenmiştir.

5,2 µl'lik doz ile pozitif kontrol grubu arasında $p<0,05$ düzeyinde, 5,2 µl'lik doz ile çözücü kontrol grubu karşılaştırmasında $p<0,01$ düzeyinde, 5,2 µl'lik doz ile negatif kontrol grubu arasında $p<0,01$ düzeyinde fark gözlenmiştir. 10,4 µl'lik dozda ise sadece çözücü kontrol grubu karşılaştırmasında $p<0,01$ düzeyinde anlamlı fark bulunmuştur.

Bunlara ilave olarak pozitif kontrol grubu ile çözücü kontrol grubu karşılaştırmasında $p<0,01$ düzeyinde anlamlı fark bulunmuştur. Negatif kontrol grubu ile çözücü kontrol grubu karşılaştırmasında $p<0,01$ düzeyinde istatistik açıdan anlamlı farklılık bulunmuştur.

Tablo 3.16. 2e maddesinin F_2 neslinde eşey oranına etkisi

Gruplar	Dişi	(%)	Erkek	%	Grup İçi Z Değeri	Standart Sapma	Dişi Z Değeri	Erkek Z Değeri
2E 2,6 µl	1284 (G1)	51,42	1213 (G7)	48,57	(G1-G7) 2,015*	0,0141	(G1-G2) -1,866 (G1-G3) -2,287* (G1-G4) -0,922 (G1-G5) 3,928** (G1-G6) -0,861	(G7-G8) -1,889 (G7-G9) -0,445 (G7-G10) 0,451 (G7-G11) 5,211** (G7-G12) -1,285
2E 5,2 µl	1087 (G2)	52,69	976 (G8)	48,48	(G2-G8) 2,707**	0,0155	(G2-G3) -0,408 (G2-G4) 0,681 (G2-G5) 1,907 (G2-G6) -2,523*	(G8-G9) 1,371 (G8-G10) 1,999* (G8-G11) 3,096** (G8-G12) -2,951**
2E 10,4 µl	1072 (G3)	51,71	1001 (G9)	48,28	(G3-G9) 2,209*	0,0156	(G3-G4) 1,032 (G3-G5) 1,478 (G3-G6) -2,896**	(G9-G10) 0,812 (G9-G11) 4,431** (G9-G12) -1,647
Pozitif Kontrol ($NaAsO_2$)	685 (G4)	50,25	678 (G10)	49,74	(G4-G10) 0,267	0,0191	(G4-G5) 2,269* (G4-G6) -1,616	(G10-G11) 4,459** (G10-G12) -0,693
Çözücü Kontrol (DMSO)	1453 (G5)	53	1288 (G11)	47	(G5-G11) 4,458**	0,0135	(G5-G6) -4,304**	(G11-G12) -5,760**
Negatif Kontrol (Su)	950 (G6)	50,85	918 (G12)	49,14	(G6-G12) 1,045			

*p<0,05; **p<0,01 anlamlılık seviyesinde aradaki fark önemlidir.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Karbonik anhidraz enzimleri hemen hemen bütün hayvan dokularında, bakterilerde ve fotosentetik hücrelerde, asit-baz dengesi, sindirim, hücre bölümleri sırasındaki iyon değişimi ve bazı enzimatik reaksiyonlar için gerekli bikarbonatın sağlanması fonksiyonları gösteren önemli bir enzimdir (KA, Karbonat Hidroliyaz E.C.4.2.1.1). İlk defa memelilerin eritrositlerinden saflaştırılmıştır. Canlı organizmalarda bulunan monomerik ve katalitik aktiviteler için Zn^{+2} iyonuna sahip metaloenzim ailesidir. Canlılarda CO_2'in hidratasyonu ve HCO_3^-'ın dehidratasyonu reaksiyonlarını tersinir olarak katalize eden bir enzimdir. Karbonik anhidrazın en güçlü organik inhibitörleri ise, aromatik ve heteroaromatik sülfonamidlerdir. Kliniklerde birçok sülfonamit karbonik anhidraz inhibitörü olarak kullanılmaktadır (Tashian 1992; Sly ve Hu 1995; Smith ve Ferry 2000; Krungkrai 2001; Beydemir ve diğ., 2004; Balaydın ve diğ., 2012; Kaya ve diğ., 2013).

Bilim insanları tarafından karbonik anhidraz enzim aktivitesi üzerinde aktivasyon ve inhibisyon etkisi gösteren birçok ilaç ve kimyasal maddeler araştırılarak etkileri literatürde raporlandırılmıştır (Supuran ve Scozzafava, 2001; Beydemir ve Gülçin, 2004). Karbonik anhidraz enzimi bazı ilaçlar için birçok dokuda hedef molekül olarak kabul edilmektedir. Asetazolamid başta olmak üzere heteroaromatik sülfonamidler karbonik anhidraz enziminin en güçlü organik inhibitörleri olup KAI' lerinin ana sınıfını oluşturmaktadırlar. Klinikte başta glokom tedavisi olmak üzere anti-kanser, anti-tümör, anti-obezite, anti-epileptik ve nörolojik rahatsızlıklarda, antiülser, diüretik ilaçların geliştirilmesinde halen yol gösterici olarak kullanılmaktadır (Bülbül ve diğ., 2003; Supuran, 2008). Bu yüzden son yıllarda KA enziminin inhibisyon mekanizmasının bilinmesi ve yeni inhibitör bileşiklerin literatüre kazandırılması çok büyük önem kazanmıştır (Supuran, 2008). Bundan ötürü, doğada bulunan ya da sentetik yeni karbonik anhidraz inhibitörlerinin belirlenmesi ilaç potansiyeli yüksek olan bileşiklerin keşfi için önemli olacaktır.

Çalışmamızda, ilaç ham maddesi olarak kullanılabilme potansiyeli olan yeni sentezlenmiş sülfonamit türevlerinin 4-(((1,3-dimetil-2,4,6-

trioksotetrahidropyrimidin-5(2H)-iliden) methilamino) benzen sülfonamit (2e) ve 4-(1-methyl-2-oxo-3'H-spiro[indoline-3,2'-[1,3,4]oxadiazole]-5'yl) benzene sülfonamit (6b) maddelerinin *D. melanogaster*'in bazı gelişimsel özelliklerine etkisi incelenmiştir.

6b maddesinin üç konsantrasyonunda (0,85 µl, 1,706 µl ve 3,41 µl) ve 2e maddesinin üç konsantrasyonunda da (2,6 µl, 5,2 µl ve 10,4 µl) F_1 ve F_2 nesillerinde metamorfoz süresinin değiştirmediği ortaya çıkmıştır. Literatür araştırması sonucunda metamorfoza etkisini araştırmak amacıyla sülfonamidlerle ilgili yapılmış herhangi bir araştırmaya rastlanmamıştır. Yine de mevcut araştırmalarla literatür desteği yapılmıştır. Bu bulgumuzu destekleyen bir çalışmada, farklı konsantrasyonlarda kurşunun *D. melanogaster*'e uygulanması ile metamorfoz süresini değiştirmediği ifade edilmiştir (Cohn ve ark., 1992).

F_1 neslinde 6b maddesi üç konsantrasyonda da ergin birey sayısını arttırmıştır. 0,85 µl; 1,706 µl ve 3,41 µl'lik dozlarda konsantrasyon azaldıkça birey sayısında artma gözlenmiştir. Dolayısıyla F_1 neslinde ergin birey sayısı açısından fertiliteye pozitif etki gösterdiği düşünülebilir. Öte yandan, deney gruplarında anormal birey sayısında azalma meydana gelmiştir. En yüksek konsantrasyon olan 3,41 µl'lik dozunda (2036 birey) anormal birey yüzdesi %1.48 iken en düşük konsantrasyon olan 0,85 µl'lik dozunda (2394 birey) bu oran %1,80 anormal birey gözlenmiştir. 6b maddesinin Ki değerine göre hazırlanan üç konsantrasyonunda hem ergin birey sayısında artma hem de fenotipik anormallikte azalmaya neden olduğu söylenebilir. Sonuç olarak, karbonik anhidraz inhibitörü olan 6b maddesi uygulandığında, F_1 neslinde ergin birey gelişimine olumsuz etki yapmaktan öte olumlu etki gözlenmiştir. Hem fertilite teşvik edilmiş hem anormal birey oranı azalmıştır. Yapılan literatür araştırması sonucunda Ki değeri baz alınarak Drosophila ile yapılan herhangi bir araştırmaya rastlanmamıştır. Yine de mevcut araştırmalarla literatür desteği yapılmıştır. Bu bulgumuzu destekleyen bir çalışmada, bazı seçilmiş tıbbi bitkilerin (*Pimpinella anisum L., Rosmarinus officinalis L., Achillea millefolium L., Acorus calamus L., Hypericum perforatum L.*) *D. melanogaster*'in F_1 neslinin başkalaşımının uzamasına bununla birlikte birey sayısında fertiliteye olumlu etki ettiği rapor edilmiştir (Uysal ve diğ., 2007). Yine benzer bir çalışmada *D. melanogaster*'in protein ve karbonhidrat

alımı sonucunda dişi ve erkek bireylerin sayısında gerçekleşen pozitif etki rapor edilmiştir (Jensen ve diğ. 2015).

Gelişimlerini 2e maddesi içeren 2,6 µl; 5,2 µl ve 10,4 µl'lik besiyerinde tamamlayan F_1 nesline ait bireylerde, konsantrasyon azaldıkça birey sayısında da azalma gözlemlenmiştir. Dolayısıyla F_1 neslinde ergin birey sayısı açısından birey gelişimine olumsuz etki gösterdiği düşünülebilir. Öte yandan, deney gruplarında anormal birey sayısında sadece 5,2 µl ve 10,4 µl'lik konsantrasyonlar da azalma meydana gelmiştir. En düşük konsantrasyon olan 2,6 µl'lik (1249 birey) (%7,04 anormal birey yüzdesi) konsantrasyonda, negatif kontrol grubuna (1812 birey) (%5,4 anormal birey yüzdesi) göre anormal birey yüzdesinde artma söz konusudur. F_1 neslinde ergin birey sayısı açısından sadece 5,2 µl'lik dozda yumurta gelişiminde toksik bir etki gözlenmiştir. Uygulanan üç konsantrasyon içerisinde 5,2 µl'lik dozda en az anormal birey sayısına sahiptir. Sonuç olarak, karbonik anhidraz inhibitörü olan 2e maddesi uygulandığında, konsantrasyon düştükçe ergin birey sayısında düşme ve ergin birey fenotipik anormallik oranı açısından istatistik farklılık ortaya çıktığını söyleyebiliriz. Bulgumuzu direk desteklemese de Silva ve arkadaşları (2015), antitümör aktiviteye sahip olabileceklerini ve ilaç etken maddesi olarak kullanılabileceklerini düşünerek sentezledikleri şalkon N-{4-[3-(4nitrofenil)prop-2-enol]fenil} benzen sülfonamit türevlerinin genotoksisitesini in vivo fare kemik iliği MN testiyle araştırdıkları çalışmada, bu bileşiğin polikromatik eritrositlerdeki MN frekansını önemli derecede arttırdığını ve bu sonucun genotoksik etkinin bir göstergesi olduğunu bildirmiştir. Yine Abou-Eisha ve arkadaşları (2004), antibakteriyel bir sülfonamit türevi olan sulfametoksazol"ün nukleer bölünme indeksini düşürdüğünü ve sitotoksik etkili olduğunu bildirmiştir. Villar ve arkadaşları (2004), benzo[b]tiyofen 1,1-dioksit"in lipofilik yapıdaki sülfonamit türevlerinin insan tümör hücre hatları üzerinde sitotoksik aktiviteye sahip olduğunu bildirmiştir. Bir başka araştırmada, aynı gruptan bir sülfonamid olan karbonik anhidraz inhibitörü 2b ve 2e test maddelerinin in vitro insan periferal lenfositlerinde yüksek konsantrasyonda ve uzun süreli maruz kalmada sitotoksik olduğunu, ancak klastojenik ve/veya mutajenik olmadıkları ortaya çıkmıştır (Şen, 2018).

6b maddesi içeren 0,85 µl, 1,706 µl ve 3,41 µl'lik dozlarda konsantrasyon arttıkça F_2 neslinde önceki neslin aksine ergin birey sayısı azalmıştır. F_2 neslinde 6b maddesi

içeren 0,85 µl ve 1,706 µl'lik uygulama dozlarında ergin birey sayısı negatif kontrol grubuna göre artmış ve buna ilave olarak anormal birey oranı düşmüştür. Fakat en yüksek uygulama dozu olan 3,41 µl'lik konsantrasyonda ergin birey ve anormal birey sayısı negatif kontrol grubuna göre düşüktür. Bu da F_2 neslinde de hala 6b maddesine maruz kaldığını göstermektedir. F_1 neslinde her üç dozda uygulanan deney grupları negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistik açıdan anlamlı çıkmasına karşın F_2 neslinde sadece 0,85 µl'lik dozda $p<0,01$ düzeyinde anlamlı bulunmuştur. F_2 destekleyecek bir çalışma bulunmamaktadır. Şimdiye kadar yapılan çalışmalar F_1 nesliyle ilgili çalışmalardır. Dolayısıyla bu açıdan bu ara çalışma bu konuda bir ilktir. İlaç olarak kullanılacağı vakit F_2 ile ilgili araştırmalar yapılmalıdır. F_1 neslinde pozitif etki görülmesi umut verici olmasına rağmen F_2 neslinde gözlenen toksik etki nedeniyle diğer deney hayvanlarında da F_2 nesli verileri incelenmelidir. Sadece F_1 nesli üzerine araştırmalar yapılırsa sakat doğumlara neden olabilmektedir. Buna örnek vermek gerekirse, yaklaşık olarak 60 yıl önce, gebe kadınlarda sabah bulantıyı tedavi etmek için thalidomide verildi. Bunu takiben ise, 10.000'den fazla çocuğun çeşitli ciddi ve zayıflatıcı malformasyonlarla doğduğu en büyük insan yapımı tıbbi felaket olduğu söylenebilir (Vargesson Neil, 2015).

Gelişimlerini 2e maddesi içeren 2,6 µl, 5,2 µl ve 10,4 µl'lik besiyerinde tamamlayan F_2 nesline ait bireylerde, konsantrasyon azaldıkça birey sayısında da artma gözlemlenmiştir. Dolayısıyla F_1 neslinin aksine F_2 neslinde ergin birey sayısı açısından pozitif yönde bir etki gösterdiği düşünülebilir. Deney gruplarında anormal birey sayısında sadece 2,6 µl'lik konsantrasyonda negatif kontrol grubuna göre artma söz konusudur. Öte yandan 5,2 µl ve 10,4 µl'lik konsantrasyondaki ergin bireylerin sayısı negatif kontrol grubuna göre daha fazla olmasına karşın, anormal birey sayıları daha düşüktür. F2 neslinde fertiliteyi olumlu etkilmesi nedeniyle hayvancılıkta verim artışı çalışmaları araştırılması faydalı olacaktır.

Araştırmada elle ettiğimiz bir başka bulgu ise, pozitif kontrol grubunun ($NaAsO_2$) F_2 neslinde ergin birey sayısının F_1 nesline göre daha yüksek oluşudur. F_2 neslinde sodyum arsenitin fertilitiyeyi teşvik eden bir potansiyeli olduğu ifade edilebiliriz. Daha önce yapılan bir araştırmada da benzer bir sonuçla fertiliteyi olumlu yönde teşvik ettiği ortaya çıkmıştır (Karataş ve Bahçeci, 2010). Ayrıca arsenilik asitin

besicilikte domuz ve kümes hayvanları yemine, gelişme ve büyümeyi hızlandırıcı ajan olarak ilave edildiği rapor edilmiştir (Friberg ve diğ., 1986).

Eşey oranı çalışmasında, F_1 neslinde 6b maddesi uygulanan deney gruplarından 0,85 µl'lik deney grubunda eşey oranı etkilenmemiştir. Fakat 1,706 µl ve 3,41 µl'lik deney gruplarında dişi bireyler lehine eşey oranı arttığı gözlenmiştir. 6b maddesi için bu artışın gözlenmesi, maddenin dişi de eşeye bağlı gelişimi olumlu yönde etkilemiş olabileceğinden kaynaklanmış olabilir. Bu nedenle erkek bireylerin daha hassas olduğunu ve gelişimlerini tamamlayamadıklarını düşünebiliriz. Bu bulgumuzu destekleyen bir çalışmada, *D. melanogaster'* e uygulanan sodyum arsenit ve krom (III) klorürün, iki maddenin hem ayrı hem de birlikte uygulanmasıyla bazı konsantrasyonlarda eşey oranında 1:1 oranından sapma gözlenmiştir. Eşey oranı ise dişi bireylerin oranında artışı ile değişmiş ve erkek bireylerin gelişim sürecinde toksik etkiye karşı daha hassas olduğu bildirmiştir (Karataş ve Bahçeci, 2010). F_1 neslinde 2e maddesi uygulanan deney gruplarında ise, 2,6 µl ve 5,2 µl'lik konsantrasyonların da eşey oranı değişmezken, 10,4 µl'lik grupta eşey oranı erkek bireyler lehine değiştiği düşünülmektedir. 2e maddesi için bu artışın gözlenmesi, maddesinin erkek de eşey bağlı gelişimin olumlu yönde yani bu durumda dişilerin 2e maddesi için daha hassas oldukları söylenebilir. 6b ve 2e maddelerinin organizmanın hayatta kalmasında cinsiyete bağlı bir farklılık gösterdiğini söyleyebiliriz. Bu bulgumuzu destekleyen bir çalışmada, böcek ilacı olarak kullanılan sentetik bir piretroid olan cypermethrine *D. melanogaster'* e uyguladıklarında dişi bireylerin, erkek bireylerden daha hassas oldukları ifade edilmiştir (Karataş ve Zafer, 2009).

Eşey oranı çalışmasının F_2 neslinde ise, 6b maddesi uygulanan deney gruplarında, 1,706 µl ve 3,41 µl'lik konsantrasyonlarında eşey oranı değişmezken, 0,85 µl'lik grupta dişi bireyler lehine eşey oranı değiştiği gözlenmiştir. F_2 neslinde 2e maddesi uygulanan deney grupların ise, 2,6 µl, 5,2 µl, 10,4 µl 'lik konsantrasyonların da eşey oranı dişi bireyler lehine değiştiği gözlenmiştir.

Sonuç olarak; bu çalışmada kullanılan KA inhibütörü olan sülfonamit türevleri 6b ve 2e in vivo koşullarda olumlu etki etmiştir. Tüm bu bulgular sonucunda 6b ve 2e maddesinin ilaç olarak kullanılması, *Drosophila* ile yapılan bu çalışmada pozitif sonuçlar vermiştir. Fakat kesin bir sonuca varabilmek için farklı model

organizmalarla da desteklenmelidir. Bu çalışmanın ilk olması, devamında gelecek diğer çalışmalara bir kaynak niteliğindedir.

KAYNAKLAR

Abou-Eisha A., Marcos R., Creus A., Genotoxicity studies on the antimicrobial drug sulfamethoxazole in cultured human lymphocytes, *Mutation Research*, 2004, **564**(1), 51-56.

Akbaba Y., Dopamin benzeri bileşikler ile sülfamid ve beta aminoasit türevlerinin sentezi, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü, Erzurum, 2013, 335124.

Aktuğlu Y., Geçmişten günümüze antibiyotikler. Akılcı antibiyotik kullanımı ve erişkinde toplumdan edinilmiş enfeksiyonlar sempozyum dizisi, 2002, **31**, 9-22.

Babu, M. S. C., Synthesis, characterization and anticanser activity of novel sulfonamides, SRM University, Faculty of Science and Humanities, PhD thesis, 2012.

Ashburner M., 1989, Drosophila a Laboratory Handbook, Cold Spring Harbor Press, New York, 689s.

Ashburner M., *Drosophila* a laboratory handbook, Academic, New York, 1989.

Atlı E., Bazı çevresel östrojenlerin *Drosophila melanogaster*'de gelişim biyolojisi ve ömür uzunluğu üzerine etkilerinin incelenmesi, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2010, 270315.

Aydoğan S., Yönlendirilmiş mutagenez ile mutant Hca II geninin eldesi ve mutant genlerin inhibitörlere karşı ilgisinin araştırılması, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2006, 177981.

Babu M.S.C., Synthesis, characterization and anticanser activity of novel sulfonamides. SRM University, Faculty of Science and Humanities, PhD thesis, 2012.

Badger, M. R., Price G. D., The Role of Carbonic Anhydrase in Photosynthesis, Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1994, **45**, 369-392.

Balaydın H. T., Soyut H., Ekinci D., Goksu S., Beydemir S., Menzek A., Sahin E., Synthesis and carbonic anhydrase inhibitory properties of novel bromophenols including natural products, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 2012, **27**, 43- 50.

Barrios I. A., Bruno-Blanch L.E., Estiu G. L., Pharmacophoric pattern of anti-epileptic sulfonamides andsulfamates. Theoretical study of the associated requirements, *Journal of Molecular Structure: Theochem*, 2002, **580** (1-3), 243-250.

Beydemir S., Ciftci M., Ozmen I., Buyukokuroglu M. E., Ozdemir H., Kufrevioglu O. I., Effects of some medical drugs on enzyme activities of carbonicanhydrase from human erythrocytes in vitro and from rat erythrocytes in vivo, *Pharmacology Research.*, 2000, **42**, 187-191.

Beydemir S., Ciftci M., Kufrevioglu O. I., Buyukokuroglu M. E., Effects of gentamisin sulfate on enzyme activities of carbonic anhydrase from human erythrocytes in vitro and from rat erythrocytes in vivo, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2002, **25**, 966-969.

Beydemir Ş., Gülçin İ., Effect of melatonin on carbonic anhydrase from human erythrocyte in vitro and from rat erythrocyte in vivo. J. *Enzyme Inhib. Med. Chem*., 2004, **19**, 193-197.

Boyd A.E., Perspectives In Diabetes: Sulfonylurea receptors, ion channels and fruit flies. Diabetes, 1998, **37**(7), 847-850.

Bulmuş A., Bazı nanopartiküllerin insan karbonik anhidraz I ve II enzimleri üzerine etkilerinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya, 2019, 595420.

Bülbül M., Hisar O., Beydemir S., Ciftci M., Kufrevioglu O. I., The in vitro and in vivo Inhibitory effects of some sulfonamide derivatives on rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) erythrocyte carbonic anhydrase activity, *Journal of Enzyme Inhibition Medical Chemistry*, 2003, **18**, 371-375.

Celebisoy N., Gokcay F., Sirin H., Akyurekli O., Treatment of idiopathic intracranial hypertension: topiramate vs acetazolamide, an open-label study, *Acta Neurologica Scandinavica*, 2007, **116**(5), 322-327.

Christianson D.W., Alexander R.S., Carboxylate–histidine–zinc interactions in protein structure and function, *Journal of the American Chemical Society*, 1989, **111**, 6412–6419.

Davis S. N., The role of glimepiride in the effective management of Type 2 diabetes, *Journal of Diabetes and Its Complications*, **18**(6): 367–376, 2004.

Debus OM, Kurremann G. Sulthiame in the primary therapy of West syndrome: A randomized double-blind placebo-controlled add-on trial on baseline pyridoxine medication, *Epilepsia*, 2004, **45**(2), 103-108.

Dodgson S. J., Tashian R. E., Gros G., Carter N. D., The Carbonic Anhydrases, Cellular Physiology and Molecular Genetics, Plenum Press, New York, 1991, pp.297–306.

Doğan E. E., bazı astrozon grubu tekstil boyalarının genotoksik etkisinin *Drosophila melanogaster* somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) ile araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Malatya, 2002, 130934.

Doyon L., Tremblay S., Bourgon L., Wardrop E., Cordingley M., Selection and characterization of HIV-1 showing reduced susceptibility to the nonpeptidic protease inhibitor tipranavir, *Antiviral Research*, , 2005, **68** (1), 27–35.

Ekinci D., Fare genomunda bulunan karbonik anhidraz izoenzim ve karboksilaz enzim genlerinin cdna' larının üretilmesi, antisens mrna sentezi ve in situ hibridizasyonu ile gen ekspresyon analizi, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, 2006, 181495.

Elliot O.E., Vinyl sulfonates: a platform for novel substrates of biological importance, University College of London, Doctoral thesis, 2010.

Erin. E., Connor M.D., Honorable Mention Paper Sulfonamide Antıbıotıcs, Primary Care Update for OB/GYNS, 1998, **5**, 32-35.

Falakalı B., *Drosophila Genetiği*, Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova-İzmir, 1990.

Feldstein J. B., Silverman D. N., Purification and characterization of carbonicanhydrase from the saliva of the rat., *Journal of Biological Chemistry*, 1984, **259**, 5447-5453.

Fortini M.E., Skupski M.P. and Boguski M.S., A survey of human disease gene counterparts in the Drosophila genome, *The Journal Of Cell Biology*, 2000, **150**, 23-30.

Graf U., Schaik N.V. & Würgler F.E., Drosophila Genetics. New York: SpringerVerlag, 1992.

Graf U. and Singer D., Genotoxicity testing of promutagens in the wing somatic mutation and reco mbination test in Drosophila melanogaster, *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, 1992, **8**, 15-27.

Graf U., Van S.N., Würgler F.E., "Drosophila Genetics", A Pratical course, Springer-Verlag Press, New York, 1992.

Gulcin I. S.A., Supuran C.T., Koksal Z.., Turkan F., Cetinkaya S., Bingol Z., Huyut Z., Alwasel S.H., Rosmarinic acid inhibits some metabolic enzymes including glutathione Stransferase, lactoperoxidase, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and carbonic anhydrase isoenzymes, *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2016, **31**(6),1698-1702.

Güneş E., Besinler ve Beslenme Çalışmalarında Drosophila, *KSÜ Doğa Bil. Derg*., 2016, **19**(3), 236-243.

Olgun G., Yurtsever S., Genetik Laboratuar Klavuzu, Trakya Ünv. Rektörlüğü Yayınları, No:56, 2003.

Hamamcı D., *Drosophila melanogaster* oregon yabanıl tipi vestigial mutantı arasında ömür uzunluğu; antioksidatif enzimlerin ve ace vitamin kompleksinin yaşlanma ile olan ilişkileri, Yüksek lisans Tezi, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Malatya, 1993, 346095.

Hewett-Emmett D. ve Tashian R.E., Functional Diversity, Conservation and Convergence in the Evolution of the α, β and γ-Carbonic Anhydrase Gene Families, *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 1996, 50-77.

Humphrey P.P.A., Feniuk W., Perren M. J., Connor H.E., GR43175, a selective agonist for the 5-HT1-like receptor in dog isolated saphenous vein, *British Journal of Pharmacology*, 1988, **94**(4), 1123–1132.

İrende İ., Lityumun karbonik anhidraz ıı enzim aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, 2019, 577337.

JONES R., N., RICKARDS G., K., Practical Genetics, John Wiley& Sons, *Chichester*, 1992.

Karataş A., Bahçeci Z., Cypermethrinin *Drosophila Melanogaster*'in Üçüncü İnstar Larvalarının Tükrük Bezi Politen Kromozomları Üzerine Etkisi, *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 2009, **9**(1), 97-106.

Karataş A., Bahçeci Z., Soydum Arsenit ve Krom (III) Klorürün *Drosophila melanogaster*'in Eşey Oranı ve Bazı Gelişimsel Özellikleri Üzerine Etkileri, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2010, **26**(2), 102-111.

Karataş A., Bahçeci Z., Soydum Arsenit ve Krom (III) Klorürün *Drosophila melanogaster*'in Ergin Bireylerinin Morfolojisi Üzerine Etkileri, *Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2010, **31**(2), 1-21.

Kaya E. D., Söyüt H., Beydemir Ş., 2013. carbonic anhdrase activity from the gilthead sea bream (Sparus aurata) liver: The toxicological effects of heavy metals. Environ. Toxicol. Pharmacol **36**, 514-521.

Kaur I.P., Smitha R., Aggarwal D., Kapil M., Acetazolamide: future perspective in topical glaucoma therapeutics, *International Journal of Pharmaceutics*, 2002, **248**, 1-14.

Keha E.E., Küfrevioğlu Ö.G., Biyokimya, Aktif Yayınevi, Erzurum, 2009, 637-345 s.

Krungkrai S.R., Suraveratum N., Rochanakij S., Krungkrai J., Characterization of carbonic anhydrase in Plasmodium falciparium, *Int. J.Parasıtol*, 2001, **31**, 661-668.

Krungkrai S. R., Suraveratum N., Rochanakij S., Krungkrai J., Characterization of carbonic anhydrase in Plasmodium falciparium, *International Journal for Parasitology*, 2001, **31**, 661-668.

Kum E., Hayat hikayesi kuramı kapsamında adıyaman *drosophila melanogaster* meig. yabanıl tipinin poligenik fekondite, ömür uzunluğu, mortalite ve uyum karakterlerinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Adıyaman Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adıyaman, 2013, 334703.

Lindskog S., Structure and Mechanism of Carbonic Anhydrase, *Pharmacology and Therapeutics*, 1997, **74**, (1), 1-20.

Lombroso CT, Forxythe AN. A Long-term Follow-up of Acetazolamide (Diamox) in the Treatment of Epilepsy. Epilepsia, 1959, **1**, 493-500.

Mann T, Keilin D. Sulphanilamide as a Spesific Inhibitor of Carbonic Anhydrase, *Nature*, 1940, **146**, 164-165.

Meleddu R., Maccioni E., Distinto S., Bianco G., Melis C., Alcaro S., Cottiglia F., Ceruso M., Supuran C.T., New 4-[(3-cyclohexyl-4-aryl-2,3-dihydro-1,3-thiazol-2-ylidene)amino]benzene-1-sulfonamides, synthesis and inhibitory activity toward carbonic anhydrase I, II, IX, XII. *Bioorg Med Chem Lett* 2015, **25**, 3281-3284.

McMillan I., Fritz- Earl M., Rabson D. S., Quantitave Genetics of Fertility I. Life Time Egg Production of Drosophila melanogaster-Theoritical. *Genetics*, 1970, **65**, 349-353.

Nishimori I., Minakuchi T., Onishi, S., Vullo D., Cecchi A., Scozzafava A., Supuran C.T., Carbonic anhydrase inhibitors. Cloning, characterization and inhibition studies of the cytosolic isozyme III with sulfonamides, *Bioorg. Med. Chem*., 2007, **15**, 7229-7236.

Nurdan S., Değişik kimyasalların drosophila somatik mutasyon ve rekombinasyon testinde (smart) amifostine ile etkileşimleri, Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi, Bursa. 2006, 347096.

Özata L., Bazı tekstil boyalarının drosophila melanogaster üzerine toksik ve genotoksik etkilerinin araştırılması, Doktora Tezi, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Malatya, 2006, 196873.

Özensoy Ö., Kanser ilişkili karbonik anhidraz ıx ve xıı izo enzimlerinin (ca-ıx, ca-xııı) ekspresyonu, saflaştırılması ve bazı bileşiklere karşı inhibisyon etkilerinin araştırılması, Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir, 2006, 180163.

Pastarekova S., Parkkıla S., Pastorek J., Supuran T.C., Carbonic anhydrases: current State of the art, therapeutic applications and future prospects, *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2004, **19**, 199-229.

Pastorekova S., Zatovicova M., Pastorek J., Cancer-associated carbonic anhydrases and their inhibition. Current Pharmaceutical Design, 2008, **14**(7), 685-698.

Percin S., Bazı sülfonamitlerin elektrokimyasal ve kromatografik davranışlarının incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta, 2008, 268034.

Pichake J., Kharkar P.S., Ceruso M., Supuran C.T., Toraskar M.P., Carbonic anhydrase inhibitors: design, synthesis, and biological evaluation of novel sulfonyl semicarbazide derivatives, *ACS Med Chem Lett*, 2014, **5**, 793-796.

Potter C., Turenchalk S., Xu, I., *Drosophila* in cancer research-an expanding role, *Trends Genetics*, 2000, **16** (1), 3--39.

Sheppard P.M., Practical Genetics, Liverpool University species of Drosophila J. Genet. 1973, **82**, 191–205.

Silva C.R.E., Borges F.F.V., Bernardes, A., Perez, C.N., Silva, D.M., ChenChen, L. Genotoxic, cytotoxic, antigenotoxic, and anticytotoxic effects of sulfonamide chalcone using the AMES test and the mouse bone marrow micronucleus test, PLoS ONE, 2015, **10**(9), 137-148.

Simone G., Fiore A., Supuran C.T., Are carbonic anhydrase inhibitors suitable for obtaining antiobesity drugs? Current Pharmaceutical Design, 2008, **14**(7), 655-660.

Sly W.W., Hu P.Y., Human carbonic anhydrase and carbonic anhydrase deficiencies. Annu. Rev. Biochem, 1995, **64**, 375-401.

Smith, K. S,. Ferry, J. G., Prokaryotic carbonic anhydrases FEMS Microbiol. Rev. 2000., **24**, 335-366.

Splendiani G, Condò S. Diuretic therapy in heart failure, *G Ital Nefrol*, 2006; **34**: S74-6.

Stams T., Chen Y., Boriack – Sjodin, P. A., Hurt, J. D., Liao, J., May, J. A., Dean, T., Laipis. P. and Christianson, D. W., *Protein Sci*., 1998, **7**, 556 p.

Stine G. J., Laboratory exercises in genetics, University of North Florida, Florida, 1973.

Supuran, C.T., Conroy, C.W., Meren, T.H., Carbonic anhydrase inhibitors. Synthesis and inhibitory properties of 1,3,4-thiadiazole-2,5-bissulfonamide, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 1996, **31**(11), 843–846.

Supuran C.T., Scozzafava A., Ilies M.A., Iorga, B., Cristea T., Briganti F., Chiraleu F., Banciu M.D., Carbonic anhydrase inhibitors. Part 53. Synthesis of substituted-pyridinium derivatives of aromatic sulfonamides: The first non-polymeric membrane-impermeable inhibitors with selectivity for isozyme IV. European Journal of Medicinal Chemistry, 1998, **33**(7-8), 577–594,

Supuran CT., Briganti F., Menabuoni L., Mincione G., Mincione F., Scozzafava A. Carbonic anhydrase inhibitors - Part 78. Synthesis of water-soluble sulfonamides incorporating beta-alanyl moieties, possessing long lastingintraocular pressure lowering properties via the topical route, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2000, **35(**3), 309-321.

Supuran C.T., Briganti F., Tilli S., Chegwidden R.W., Scozzafava, A., Carbonic Anhydrase Inhibitors: Sulfonamides as antitumor agents, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2001, **9**(3), 703-714.

Supuran, C.T. and Scozzafava, A., Carbonic Anhydrase Inhibitors, *Current Medıcınal Chemıstry*, 2001, **1**, 61-97.

Supuran, C.T., Scozzafava, A., Conway, J., (Eds.) Carbonic Anhydrase: Its inhibitors and activators. Vol. 1, CRC Press, 2004.

Supuran CT, Scozzafava A. Carbonic anhydrases as targets for medicinal chemistry, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2007, **15**(13), 4336-50.

Supuran C., Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators, *Nature Reviews Drug Discovery*, 2008, **7**(2), 168-81.

Supuran C. T., Carbonic Anhydrases: Novel Therapeutic Applications for Inhibitors and Activators. Nat Rev Drug Discov., 2008, **7**, 168-181.

Supuran, C.T., Carbonic anhydrase inhibitors. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 2010, **20**(12), 3467-3474.

Supuran, C.T., Carbonic anhydrase inhibition with natural products: novel chemotypes and inhibition mechanisms, Molecular Diversity, 2010, **15**, 305-316.

Supuran C. T., Structure and Function of Carbonic Anhydrases, Biochemical Journal., 2016, **473**, 2023-2032.

Şahin A., Bazı karbonik anhidraz izoenzimlerinin saflaştırılması için yeni bir afinite jelinin sentezi ve uygulanması, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir, 2008, 237731.

Şen S., Karbonik anhidraz inhibitörü metilenaminobenzen sülfonamit türevlerinin genotoksik profillerinin belirlenmesi, Doktora Tezi, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya, 2018, 488436.

Tashian R.E., Hewett-emmett, D., Goodman, M., On the evolution and genetics of carbonic anhydrase I, II and III, Isozymes. Current Topics in Biological and Medical Research, 1983, **7**, 79-100.

Tashian R.E., Genetics of the mamalian carbonic anhydrases. Adv. Genet., 1992, **30**, 321-356.

Tella A.C., Obaleye, J.A. Synthesis of some novel N-acetyl derivative of sulpha drugs and their biological activities, *International Journal of Chemical and Analytical Science*, 2010, **1**(9), 202-204.

Uysal H., Kara A., Algur Ö., Dumlupınar R., Aydoğan M., Department of Biology, *Pakistan Journal of Biological Sciences* , 2007, **10** (10), 1708-1712.

Villar R., Encio I., Migliaccio M., Gila M.J., Martinez-Merinoa V., Synthesis and cytotoxic activity of lipophilic sulphonamide derivatives of the benzo[b]thiophene 1,1-dioxide, *Bioorganic&Medicinal Chemistry*, 2004, **12**(5), 963-968.

Yildirim A., α, β-doymamıǴ çift bağ içeren hidroksi ketonların CSI ile reaksiyonlarının incelenmesi ve olefinlerin allilik oksidasyonu ile metanol ve amin türevli rasem sülfonamĠt ve sülfamatlarin sentezi ve karbonik anhidraz I ve II

izoenzimleri üzerinde inhibisyon etkileri, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, 2018, 349030.

Whittington DA, Waheed A, Ulmasov B, Shah GN, Grubb JH, Sly WS, Christianson DW. Crystal structure of the dimeric extracellular domain of human carbonic anhydrase XII, a bitopic membrane protein overexpressed in certain cancer tumor cells, *Proc Natl Acad Sci U S A*., 2001, **98**(17), 45-50.

Wixon, J. and O'Kane, C. "Drosophila melanogaster", International Journal of Genomics, 2000, **1**(2), 146-153.

Würgler F. E., Vogel E. W., In vivo mutagenicity testing using somatic cells of *Drosophila melanogaster* In chemical mutagens, Principle and medhods for their detection, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 1986, **46**(10), 1-73.

KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER

Özbölük B., Karataş A., Karbonik Anhidraz İnhibitörünün *Droshophila melanogaster*'in Gelişimsel Özellikleri Üzerine Etkileri, *Uluslararası Akademik Araştırmalar Kongresi,* Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Bolu, 16-18 Eylül 2019.

Özbölük B., Karataş A., Karbonik Anhidraz İnhibitör Metilenaminobenzen Sülfonamid Türevinin *Droshophila melanogaster*'in Gelişimi, Morfolojisi ve Eşey Organı Üzerine Etkileri, *Uluslararası Akademik Araştırmalar Kongresi,* Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Bolu, 16-18 Eylül 2019.

ÖZGEÇMİŞ

Bahar Özbölük, ilk, orta ve lise eğitimini Bolu'da tamamladı. 2017 yılında Kocaeli Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden biyolog ünvanı ile mezun oldu. 2017 yılında Kocaeli Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nde yüksek lisans eğitimine başladı. 2018 yılında halen çalışmakta olduğu Deva Holding A.Ş.'de mikrobiyoloji uzman yardımcısı olarak göreve başladı.