

Atf İçin: Gençer, N., Baltacı, A. ve Çıkrıkçı, K. (2024). Afinite Kromatografisi Yöntemi ile Saflaştırılan Karbonik Anhidraz (I-II) İzoenzimleri Üzerine Bazı Pestisitlerin İn Vitro Etkilerinin Araştırılması. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 14(2), 783-789.

To Cite: Gençer, N., Baltacı, A. & Çıkrıkçı, K. (2024). Investigation of In Vitro Effects of Some Pesticides on Carbonic Anhydrase (I-II) Isoenzymes Purified by Affinity Chromatography Method. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 14(2), 783-789.

Afinite Kromatografisi Yöntemi ile Saflaştırılan Karbonik Anhidraz (I-II) İzoenzimleri Üzerine Bazı Pestisitlerin İn Vitro Etkilerinin Araştırılması

Nahit GENÇER^{1*}, Aybike BALTACI¹, Kübra ÇIKRIKCI¹

Öne Çıkanlar:

- Karbonik anhidraz izoenzimlerinin saflaştırma
- Enzim üzerine pestisitlerin inhibisyon etkilerinin belirlenmesi
- IC₅₀ değerlerinin hesaplanması

ÖZET:

Bu çalışmanın amacı; çevre ve insan sağlığı için toksisitesi yüksek olan bazı pestisitlerin hidrataz aktivite yöntemi kullanılarak karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA I ve II) üzerine etkilerini araştırmaktır. İnsan kan eritrositlerinden Sefaroz-4B-4-(6-Amino-heksilokzi)-benzenesülfonamid afinite jeli kullanılarak hCA I ve II izoenzimleri saflaştırıldı. Enzimlerin saflığı; sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi ile kontrol edildi. Ayrıca bazı pestisitlerin hCAI-II izoenzimlerini *in vitro* ortamda μM düzeylerde inhibe ettiği belirlendi. Bu pestisitlerden hCA-I enzimi için en güçlü inhibitörün Simazin (IC₅₀: 0,366 μM), en zayıf ise Koumatetralil (IC₅₀: 6,41 μM) olduğu belirlendi. hCA-II enzimi için en güçlü inhibitörün Klorpirifos (IC₅₀: 0,527 μM), en zayıf inhibitörün ise Koumatetralil (IC₅₀: 8,74 μM) olduğu belirlendi.

Anahtar Kelimeler:

- Karbonik anhidraz,
- Pestisitler,
- Enzim inhibisyonu

Investigation of *In Vitro* Effects of Some Pesticides on Carbonic Anhydrase (I-II) Isoenzymes Purified by Affinity Chromatography Method

Highlights:

- Purification of carbonic anhydrase isoenzymes
- Determination of the inhibitory effects of pesticides on the enzyme
- Calculation of IC₅₀ values

ABSTRACT:

The aim of this study was to investigate the effects of some pesticides with high toxicity for the environment and human health on carbonic anhydrase isoenzymes (hCA I and II) using hydratase activity method. hCA I-II were purified from human blood erythrocytes using Sepharose-4B-4-(6-Amino-hexyloxy)-benzenesulfonamide affinity gel. In order to determine the purity of the enzymes, sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis was performed. In addition, it was determined that some pesticides inhibited hCAI-II isoenzymes at μM levels *in vitro*. It was determined that among these pesticides, the strongest inhibitor for the hCA-I enzyme was simazine (IC₅₀: 0.366 μM), and the weakest was coumatetralil (IC₅₀: 6.41 μM). The strongest inhibitor for the hCA- II enzyme was chlorpyrifos (IC₅₀: 0.527 μM), and the weakest inhibitor was coumatetralil (IC₅₀: 8.74 μM).

Keywords:

- Carbonic anhydrase,
- Pesticides
- Enzyme inhibition

¹*Nahit GENÇER ([Orcid ID: 0000-0001-7092-8857](https://orcid.org/0000-0001-7092-8857)), Aybike BALTACI ([Orcid ID: 0000-0003-1185-7336](https://orcid.org/0000-0003-1185-7336)), Kübra ÇIKRIKCI ([Orcid ID: 0000-0003-2276-1516](https://orcid.org/0000-0003-2276-1516)), Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Çağış Kampüsü, Balıkesir, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Nahit GENÇER, e-mail: ngencer@balikesir.edu.tr

Bu çalışma Aybike Baltacı'nın tezinden üretilmiştir.

GİRİŞ

Pestisitler, dünya nüfusunun artması ile tarımda ürün ihtiyacını karşılamak ve verimi arttırmak için son yıllarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Pestisit, “ürünler üzerinde zararlı etkiye sahip olan ve verimi azaltan herhangi bir zararlıyı (böcek, akar, sıçan, yabancı ot vb.) önlemek, yok etmek veya uzaklaştırmak için kullanılan madde veya madde karışımı” olarak tanımlanabilir (Ortiz-Hernández ve ark., 2013). Bu pestisitler, kimyasal yapılarına ve kullanım alanlarına göre sınıflandırılmaktadır. Kimyasal yapılarına göre en yaygın olanları; organoklorinler, organofosfatlar ve karbamatlardır. Organoklorinler, en az bir tane kovalent olarak bağlı klorin atomu ile karakterize edilir ve biyolojik olarak parçalamayan uçucu kimyasallar sınıfında yer alır. Diklofluanid ile dimetaklor bu grupta yer alır ve fungusit olarak kullanılır (Parte ve ark., 2017). Organofosfatlar ise fosforik asitlerden türetilen esterlerdir ve en bilinen nörolojik etkileri asetilkolin aktivitesinin inhibisyonu olup, çeşitli zehirlenme semptomlarına neden olurlar. İnsektisit olarak kullanılan klorpirifos, klorpirifos-metil ve azinfos-etil organofosfatlar sınıfındadır (Rathod ve Garg, 2017). Organofosforlu pestisitler, organoklorlu pestisitler ile kıyaslandığında daha az toksiktir, ayrıca daha etkilidirler. Karbamatlar, dimetil/metil/ditiyo-N-metil karbamik asit türevleri olarak kabul edilir ve karbaril, propoksür, karbofuran ve 1-naftol bu sınıfa ait pestisitlerdir. Bu pestisitler, canlı organizmada oksidasyon, hidroliz, biyotransformasyon, fotoliz ve metabolik reaksiyonlar gibi farklı yollardan birkaç ürüne dönüştürülür. Söz konusu pestisitler; cilt, göz yoluyla, ağızdan buhar, aerosol veya toz şeklinde maruz kaldığında sağlık problemlerine neden olabilmekte ve maruz düzeyi arttıkça canlılar için ölümcül olabilmektedir (Aravind ve ark., 2020; Fama ve ark., 2022).

İnsan karbonik anhidrazları (E.C 4.2.2.1.1) (hCA), alfa (α) sınıfına ait ve karbondioksitin (CO_2) bikarbonat ve protona hidrasyonunu katalize eden, aktif bölgesinde çinko (Zn^{+2}) içeren metaloenzimdir (Beydemir ve Gülçin, 2004; Supuran ve ark., 2003). CA'lar, farklı katlanmalara ve yapıya sahip olmalarına rağmen ortak CO_2 hidrataz aktivitesine sahip düşük sekans benzerliğine bağlı sekiz farklı ailede gruplanır. Bunlar: α -, β -, γ -, δ -, ζ -, η -, θ - ve ι -CA'lar olarak adlandırılır (Del Prete ve ark., 2020). α -CA ailesi gen dizilimine bağlı 16 farklı izoenzimi, farklı dokularda dağılım gösterir. CA-I ve CA-II sitoplazmikdir. Ayrıca CA-I eritrositlere özgü iken, CA-II çoğu hücrede bulunur. CA-I, insan kan eritrosit hücrelerinde bulunan ve solunum olayında görev alan izoenzimdir (Christie ve ark., 1997). CA-II ise kemik, beyin, böbrek dokularında önemlidir, çünkü renal kortekste Na^+ ve suyun yeniden emilmesini sağlar; bu nedenle bu izoenzimin eksikliği, böbrek taşı ve kemiklerde kireçlenmeye neden olmaktadır (Burish ve Redd., 1994).

Bu çalışmada, insan kan eritrositlerinden CA (I-II) izoenzimleri, afinite kromatografisi ile tek adımda saflaştırılmıştır. Fungusit, insektisit, herbisit olarak kullanılan 15 farklı pestisit (Alaklor, Propoksür, 1-Naftol, Simazin, Diklofluanid, Klorpirifos, Klorpirifos – Metil, Azinfos – Etil, Dimetaklor, Tebukonazol, Amitraz, Dazomet, Koumatetralil, Karbaril, Karbofuran) CA (I-II) izoenzimleri üzerine *in vitro* etkileri hidrataz atkitive metodu kullanılarak araştırıldı.

MATERYAL VE METOT

Kimyasallar

Pestisitler, Sefaroz-4B, CNBr, protein standartı ve elektroforez kimyasalları dahil olmak üzere bu çalışmada kullanılan malzemeler Sigma-Aldric firmasından ve kullanılan diğer malzemeler ise Merck'den temin edildi. Çalışma yerel etik kurul tarafından (Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırma Etik Kurulu, Balıkesir, Türkiye, Karar No. 2020/24 ve Tarih: 05.02.2020) onaylandı.

Numunenin Hazırlanması ve CA I ve II'nin Afinite Kolonundan Saflaştırılması

Sağlıklı gönüllülerden kan (20 mL) numuneleri alındı. Kan örnekleri +4 °C' de 15000 rpm'de 20 dakika santrifüjlendi. Plazma ve beyaz kan hücreleri ayrıldı. Daha sonra kan numunesi 2 kez % 0,9 NaCl ile yıkandı ve hacminin 3 katı soğuk distile su ile hemoliz edildi. Hemolizat +4 °C' de 15000 rpm'de 40 dakika santrifüj edildi. Hazırlanan hemolizat katı Tris-bazı ile pH:8,7'ye ayarlandı. Sefaroz-4B-4-(6-Amino-heksilokzi)-benzensülfonamit içeren afinite kolonu dengeleme tamponu (25 mM Tris-Baz/ 0,1 M Na₂SO₄ pH:8,7) ile dengelendikten sonra hemolizat kolona tatbik edildi. Daha sonra afinite kolonu yıkama tamponu (25 mM Tris-Baz / 22 mM Na₂SO₄ pH:8,7) ile yıkandı ve hCA-I (50 mM Na₂HPO₄ / 1 M NaCl pH:6,3) ile hCA-II (0,1 M CH₃COO / 0,5 M NaClO₄ pH:5,6) izoenzimleri sırasıyla elüe edildi.

Bradford yöntemi ile protein tayini

Afinite kromatografi tekniği ile saflaştırılan izoenzimlerin protein miktarı, standart olarak sığır serum albümin kullanılarak Bradford yöntemine göre 595 nm'de spektrofotometrik olarak belirlendi (Bradford, 1976). Oluşturulan standart grafiğin eğiminden, protein miktarı belirlenerek saflaştırma tablosu oluşturuldu.

SDS-PAGE

İzoenzimlerin saflığının kontrolü için Laemmli yöntemine göre, sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) uygulandı (Laemmli, 1970). Yığma ve ayırma jelleri sırasıyla %3- %10 olacak şekilde iki farklı akrilamid konsantrasyonu hazırlandı. İzoenzim numuneleri 20 µL jele yüklendi. Jeller, %0,1 Coomassie Brilliant Blue R-250, %50 metanol ve %10 asetik asit içinde 1,5 saat boyunca inkübatörde boyamaya bırakıldı. Renk açma çözeltisi içinde 1 gün boyunca bekletildikten sonra jel görüntüleme sistemi ile görüntü bilgisayar ortamına aktarıldı.

CO₂-hidrataz aktivite tayini

CA hidrataz aktivitesi; CO₂ hidrasyonu sonucu açığa çıkan H⁺ iyonu ile pH'nın 10' dan 7,4'e düşmesi için gereken sürenin ölçülmesi prensibine dayanan Maren metodu ile ölçüldü (Maren ve ark., 1997). 10 mL'lik ve 1 cm çaplı cam tüp içine 0,5 M Na₂CO₃/ 0,1 M NaHCO₃ (pH:10) tamponu ve pH indikatörü olarak fenol kırmızı ilave edildi, kırmızıdan sarıya renk değişiminin süresi (saniye) kaydedilerek aşağıdaki denklem ile enzim ünitesi (EU) hesaplandı. Burada, *t*₀ enzimatik olmayan ve *t*_c enzimatik reaksiyonların pH değişimi ile kaydedilen süreyi ifade etmektedir.

$$\text{Enzim Ünitesi (EU)} = \frac{t_0 - t_c}{t_c}$$

İnhibitörlerin IC₅₀ değerlerinin hesaplanması

İnsan kan eritrositlerinden saflaştırılan CA izoenzimleri üzerine 15 farklı pestisit'in inhibisyon etkisini belirlemek için hidrataz metodu kullanıldı (Maren ve ark., 1997). 10 mL'lik ve 1 cm çaplı cam tüp içine 1,9 mL pH indikatörü olarak fenol kırmızısı ve 1,3 mL doymun CO₂ substrat çözeltisi ilave edildi. Ardından 100 µL enzim ve en son 400 µL 0,5 M Na₂CO₃/ 0,1 M NaHCO₃ (pH=10) tamponu ilave edilerek süre kronometre ile ölçüldü (*t*_c). Aynı işlemler her örnek çalışmasından önce enzim çözeltisi yerine 100 µL destile su konularak tekrar yapıldı (*t*₀). Destile suyun hacmi, kullanılan pestisit hacmi kadar azaltılarak, hacim miktarı sabit tutuldu. Pestisitler 10 mM konsantrasyonda DMSO içerisinde çözülerek hazırlandı ve ortamda inhibitör yok iken enzim aktivitesi belirlenerek, %100 aktivite olarak kabul edildi. Test edilen inhibitör hacimlerindeki DMSO'nun enzim aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkisi olmadığı belirlendi (Grafik çizilmedi) Tüm inhibitörler için ölçümler

belirlenen konsantrasyonlarda 3 kez tekrar edildi. Her inhibitör için % Aktivite – İnhibitör grafikleri çizildi ve bu grafiklerin eğimlerinden IC₅₀ değeri hesaplandı.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Pestisitlerin ekolojik etkileri ile ilgili endişeler dünyanın hemen hemen her yerinde artmaktadır. Tarımda verimi artırmak için birçok pestisit kullanılmaktadır ancak bazı pestisitler çevre üzerinde öngörülemez birçok olumsuz etkiye sahiptir. Ayrıca uzun yarılanma ömrüne sahip pestisitler nispeten küçük dozlarda enzimlerin aktivitelerini değiştirir ve organizmaların metabolizmasını etkileyerek hayvan ve insan sağlığı için potansiyel risk oluşturur (Arslan ve ark., 2018; Gençer ve ark., 2012; Sinan ve ark., 2007).

Bu çalışmada, insan kan eritrositlerinden CA (I-II) izoenzimleri, Sefaroz-4B-4-(6-Aminoheksilokzi)-benzensülfonamit jelinden afinite kromatografi tekniği ile tek adımda saflaştırıldı. Kantitatif protein tayini olarak Bradford yöntemi kullanıldı ve standart grafik oluşturularak izoenzim çözeltilerinin protein miktarı belirlendi. hCA-I, 709,09 EU/mg spesifik aktivite ve % 70,91 verimle 95,53 kat, hCA-II ise 1600 EU/mg spesifik aktivite ve % 52,36 verimle 215,56 kat saflaştırıldı (Çizelge 1). Enzim saflığının kontrolü ve molekül kütesinin belirlenmesi için SDS-PAGE yapıldı, ve tek bant gözlemlendi. Molekül kütleleri yaklaşık 30 kDa bulundu ve literatür ile uyumlu olduğu tespit edildi (Cuatrecasas, 1970).

Çizelge 1: Enzim Saflaştırma tablosu

Saflaştırma Basamağı	Toplam Hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Protein (mg/mL)	Toplam Protein(mg)	Toplam Aktivite (EU)	Spesifik Aktivite (EU/mg)	Saflaştırma Kat sayısı	%Verim
Hemolizat	20	110	14,82	296,40	2200	7,42	-	-
hCA-I	10	156	0,22	2,20	1560	709,1	95,53	70,91
hCA-II	8	144	0,09	0,72	1152	1600	215,56	52,36

Çalışmamızda, CA-I ve CA-II izoenzimleri üzerine 15 farklı pestisitlerin inhibitör etkisi hidrataz aktivite metodu ile belirlendi. Genel olarak inhibitörlerin enzimler üzerine etkileri IC₅₀ (enzim aktivitesini %50 azaltan inhibitör konsantrasyonu) değeri olarak verilmektedir. İnhibisyon çalışmamız için; beş farklı inhibitör konsantrasyonunda hidrataz aktivitesiyle ölçümler yapıldı. Her pestisit için %Aktivite-İnhibitör grafiği çizilerek IC₅₀ değerleri belirlendi. Çalışmamızda kullanılan pestisitlerin CA-I ve II izoenzimlerini önemli ölçüde inhibe ettiği belirlendi (Çizelge 2).

Bu pestisilerden CA-I için en güçlü inhibitörün Simazin (IC₅₀:0,366 µM), en zayıf inhibitörün ise Koumatetralil (IC₅₀:6,41 µM) olduğu ve CA-II için ise en güçlü inhibitörün Klorprifos (IC₅₀:0,527 µM), en zayıf inhibitörün Koumatetralil (IC₅₀:8,74 µM) olduğu bulunmuştur. Simazin, tarım alanlarında herbisit olarak kullanılan ve geniş yapraklı otları elektron taşıma sistemi aracılığıyla inhibe ederek kontrol altında tutan pestisittir. Simazin yüzey suyu, yeraltı suyu ve okyanuslarda tespit edilmiştir. Potansiyel toksisitesi ve biyobirikimi nedeniyle biyokimyasal döngüyü ve çevre güvenliğini etkilemektedir. Bu pestisit konsantrasyonu 0,06-4,00 mg/L olduğunda balık hematolojisi ve biyokimyasındaki birçok fizyolojik özelliklerini değiştirdiğini ve konsantrasyon 121 mg/L'ye çıktığında, 24 saat içerisinde sığanlarda dopaminerjik nöral hasara neden olduğu tespit edilmiştir. Simazin'in insan vücudu üzerindeki toksisitesi net olmasa da üzerine odaklanması gereken eser miktarda bir kirletici olduğu belirtilmiştir (Heydens ve ark., 1999; Ren ve ark., 2021).

Çizelge 2: İnhibisyon Değerleri

Pestisitler	IC ₅₀ (µM) (Hidrataz) hCA-I	IC ₅₀ (µM) (Hidrataz) hCA-II
Propoksur	0,600	1,280
Alaklor	2,360	0,536
1-Naftol	1,310	0,685
Klorpirifos	0,591	0,527
Simazin	0,366	0,594
Diklofluanid	1,395	0,529
Klorpirifos-metil	0,614	6,040
Azinfos - etil	0,534	0,544
Dimetaklor	0,585	0,578
Tebukonazol	0,602	0,603
Amitraz	3,300	3,470
Dazomet	3,860	3,900
Koumatetralil	6,410	8,740
Karbofuran	3,350	3,410
Karbaril	2,860	3,460

Simazin'in bazı enzimleri üzerine inhibisyon etkisi araştırılmış, domuz böbreğinden proliferatif enzimi üzerine IC₅₀: 17 mM, asetilkolinesteraz enzimi üzerine IC₅₀: 10,38 µM ve paraoksonaz1 (PON1) enzimi üzerine IC₅₀:11,78 µM olduğu bildirilmiştir (Holovská ve ark., 2020; Topal ve ark., 2016; Ergun, 2022). Yapılan başka bir çalışmada ise bal arısından (*Apis mellifera*) CA saflaştırılmış ve esteraz aktivitesi ile Simazin'in inhibisyon etkisi IC₅₀: 0,0273 µM olarak belirlenmiştir (Soydan ve ark., 2017). Koumetetralil; antikoagülan kemirgen öldürücüler sınıfında yer alan simbiyotik kemirgenleri kontrol etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu pestisit etki mekanizması, K vitamini döngüsünü engellemesidir (Han ve ark., 2023; Lin ve ark., 2022). Koumetetralilün gökkuşuğu alabalığı beyninden saflaştırılan asetilkolinesteraz enzimi üzerine inhibitör etkisi IC₅₀: 30 µM olarak bulunurken, insan kan serumundan saflaştırılan PON1 üzerine inhibitör etkisi IC₅₀: 9,55 µM olarak tespit edilmiştir (Ergun, 2022; Topal ve ark., 2015). Literatürde Klorpirifos için yapılan çalışmalarda, *Rassostrea Rhizophora* solungaçlarından Asetilkolinesteraz enzimi saflaştırılmış ve inhibisyon etkisi IC₅₀: 7,55 mM olarak bulunmuştur. Gökkuşuğu alabalığı karaciğerinden ise tiyoredoksin redüktaz enzimi saflaştırılmış ve Klorpirifosun inhibisyon etkisi IC₅₀:0,38 µM olarak bulunmuştur. Bir başka çalışmada ise sığır eritrositlerinden CA enzimini saflaştırılmış ve Klorpirifosun inhibisyon etkisi esteraz aktivitesi ile IC₅₀:84,124 µM olarak tespit edilmiştir (Souza ve ark., 2018; Özgençli ve ark., 2013; Demirdağ, ve ark., 2012). Bu çalışmada CA(I-II) izoenzimlerini kullanılan pestisitler µM düzeyde inhibe etmiştir. Yapılan bir diğer çalışmada İmazethapyr, 2,4-D dimetilamin, Glifosat izopropilamin ve Propamokarb HCl'nin insan eritrosit karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA-I-II) üzerindeki etkileri hidrataz aktivitesi ile *in vitro* yöntemi kullanılarak kolorimetrik olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak CA-I ve CA-II için mazetapir, 2,4-D dimetilamin, Glifosat izopropilamin ve Propamokarb HCl'nin IC₅₀ değerleri; 0,093 mM, 0,463 mM, 0,617 mM, 0,46 mM ve 0,152 mM, 0,628 mM, 0,904 mM, 0,62 mM olarak bulunmuştur (Gençer ve ark., 2012). Bir başka çalışmada ise Saneen keçisinden CA enzimi saflaştırılmış ve bazı pestisitlerin inhibisyon etkisi çalışılmış; Nuarimol, Fenarimol ve 2,4- diklorofenoksi asetik asit için IC₅₀ değerleri sırasıyla 0,352 mM, 0,924 mM ve 2,04 mM olarak bulunmuştur (Sinan 2007). Bu çalışmalarda kullanılan pestisitlerin, farklı enzimler veya CA'lar üzerine inhibisyon etkileri incelenmiş ve sonuçlar farklı konsantrasyonlarda (µM veya mM) bulunmuştur. Bunun nedeni bazı çalışmalarda esteraz bazı çalışmalarda ise hidrataz aktivitesi kullanılmasından dolayı olabileceği gibi kullanılan enzim kaynaklarının farklı olmasıdır. Bu

çalışmada ise CA'nın spesifik substratı olan CO₂'i kullanarak hidrataz aktivitesi ile bazı pestisitlerin inhibisyon etkilerini belirlenmiştir.

SONUÇ

Sonuç olarak, bu çalışmada CA (I-II) izoenzimleri affinite kromatografisi ile saflaştırıldı ve bazı pestisitlerin *in vitro* toksikolojik etkileri araştırıldı. CO₂'nin hidrasyonu sonucu açığa çıkan H⁺ iyonu ile pH 10.0'dan 7,4 'e düşmesi için geçen sürenin ölçülmesi prensibine göre CO₂ hidrataz aktivitesi bulunmuştur ve pestisitlerin inhibisyon etkilerini belirlemek için çizilen % aktivite-inhibitör grafiklerden IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Tarım alanlarında kontrolsüzce kullanılan bu pestisitler besin zinciri yolu ile insan sağlığını tehdit etmekle beraber, çevre ve su kirliliğine de neden olmaktadır. Bundan dolayı canlıların yapısında son derece fizyolojik fonksiyona sahip karbonik anhidraz enzimi saflaştırılmış ve bazı pestisitlerin hidrataz aktivitesi ile inhibisyon etkisi araştırılmıştır. Çalışmamızda elde edilen sonuçların bundan sonraki yapılacak toksikoloji araştırmalarına veya nitelikli benzer çalışmalara kaynak olacağı kanaatindeyiz.

Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Yazar Katkıları

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Aravind, S., Kumar, P. S., Kumar, N. S., & Siddarth, N. (2020). Conversion of green algal biomass into bioenergy by pyrolysis. A review. *Environmental Chemistry Letters*, 18, 829-849.
- Arslan, M., Tak, T., Ergun, A., Gencer, N., & Arslan, O. (2018). Effects of four pesticides on broilers glutathione-s-transferase activity. *Fresenius Environmental Bulletin*, 9529.
- Beydemir, S. Ü., & Gülçin, İ. (2004). Effects of melatonin on carbonic anhydrase from human erythrocytes *in vitro* and from rat erythrocytes *in vivo*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 19(2), 193-197.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Burish, T. G., & Redd, W. H. (1994). Symptom control in psychosocial oncology. *Cancer*, 74(S4), 1438-1444.
- Christie, K. N., Thomson, C., Xue L., Lucocq, J. M., & Hopwood, D. (1997). Carbonic anhydrase isoenzymes I, II, III, and IV are present in human esophageal epithelium. *Journal of Histochem Cytochem*, C. 45(1),35-40.
- Cuatrecasas, P. (1970). Protein purification by affinity chromatography: Derivatizations of agarose and polyacrylamide beads. *Journal of Biological Chemistry*, 245(12), 3059-3065.
- Del Prete, S., Nocentini, A., Supuran, C. T., & Capasso, C. (2020). Bacterial α -carbonic anhydrase: a new active class of carbonic anhydrase identified in the genome of the Gram-negative bacterium *Burkholderia territorii*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 35(1), 1060-1068.
- De Souza, P.R., De Souza, K.S., De Assis, C.R.D., De Araújo, M.C., Silva, K.C.C., Da Silva, J.D.F.X. & Souza Bezerra, R.De. (2018). Acetylcholinesterase of mangrove oyster *crassostrea rhizophorae*: a highly thermostable enzyme with promising features for estuarine biomonitoring. *Aquatic Toxicology*, 197, 109-121.
- Demirdağ, R., Yerlikaya, E., Aksakal, E., Küfrevioğlu, Ö. I. & Ekinci, D. (2012). Influence of pesticides on the pH regulatory enzyme, carbonic anhydrase, from european seabass liver and bovine erythrocytes. *Environ Toxicol Pharmacol*, 34(2),218-222.

- Ergun, A. (2022). Effects of some pesticides on purified human paraoxonase 1 activity, in vitro. *Fresenius Environmental Bulletin*, 31(9), 9627-9633.
- Fama, F., Feltracco, M., Moro, G., Barbaro, E., Bassanello, M., Gambaro, A., & Zanardi, C. (2022). Pesticides monitoring in biological fluids: Mapping the gaps in analytical strategies. *Talanta*, 123969.
- Gençer, N., Ergün, A., & Demir, D. (2012). *In vitro* effects of some herbicides and fungicides on human erythrocyte carbonic anhydrase activity. *Fresenius Environmental Bulletin*, 21(3), 549-552.
- Han, M., Zhang, J., Wei, H., Zou, W., Zhang, M., Meng, X., ... & Wang, C. (2023). Rapid and robust analysis of coumatetralyl in environmental water and human urine using a portable raman spectrometer. *ACS Omega*, 8(14), 12878-12885.
- Heydens, W. F., Wilson, A. G., Kier, L. D., Lau, H., Thake, D. C., & Martens, M. A. (1999). An evaluation of the carcinogenic potential of the herbicide alachlor4 to man. *Human & Experimental Toxicology*, 18(6), 363-391.
- Holovská, V., Pistl, J. & Kovalkovičová, N. (2007). *In vitro* effect of pesticides (dichlofluanid, endosulfan, simazine, tolylfluanid and triallate) on proliferative activity of animal derived cell cultures. *Acta Biologica Hungarica*, 58(1), 61- 74,
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Lin, W. L., Chen, K. H., Liao, C. P., & Tseng, H. Y. (2022). Short-term exposure of anticoagulant rodenticides leads to the toxin accumulation from prey (*Rattus losea*) to predator (*Elanus caeruleus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 233, 113361.
- Maren, T. H., Conroy, C. W., Wynns, G. C., & Godman, D. R. (1997). Renal and cerebrospinal fluid formation pharmacology of a high molecular weight carbonic anhydrase inhibitor. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 280(1), 98-104.
- Ortiz-Hernández, M.L., Sánchez-Salinas, E., Dantán-González, E., & Castrejón-Godínez, M.L. (2013). Pesticide biodegradation: mechanisms, genetics and strategies to enhance the process. *Biodegradation-life of Science*, 10, 251-287.
- Özgençli, İ., Temel, Y., Çiftçi, M. & Küfrevioğlu, Ö. (2013). Bazı Pestisitlerin Gökkuşığı Alabalığı Karaciğerinden Saflaştırılan Mitokondrial Tiyoredoksin Redüktaz Enziminin Aktivitesi Üzerine *In Vitro* Etkilerinin İncelenmesi. *Muş Alparslan Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 1(2), 109-117.
- Parte, S. G., Mohekar, A. D., & Kharat, A. S. (2017). Microbial degradation of pesticide: a review. *African Journal of Microbiology Research*, 11(24), 992-1012.
- Rathod, A. L., & Garg, R. K. (2017). Chlorpyrifos poisoning and its implications in human fatal cases: A forensic perspective with reference to Indian scenario. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 47, 29-34.
- Ren, W., Huang, X., Wang, L., Liu, X., Zhou, Z., Wang, Y., ... & Ouyang, W. (2021). Degradation of simazine by heat-activated peroxydisulfate process: A coherent study on kinetics, radicals and models. *Chemical Engineering Journal*, 426, 131876.
- Sinan, S., Gencer, N., Turan, Y., & Arslan, O. (2007). *In vitro* inhibition of the carbonic anhydrase from saanen goat (*Capra hircus*) with pesticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88(3), 307-311.
- Soydan, E., Güler, A., Bıyık, S., Şentürk, M., Supuran, C.T. & Ekinci, D. (2017). Carbonic anhydrase from apis mellifera: purification and inhibition by pesticides. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32(1), 47-50,
- Supuran, C. T., Scozzafava, A., & Casini, A. (2003). Carbonic anhydrase inhibitors. *Medicinal Research Reviews*, 23(2), 146-189.
- Topal, A., Şişecioğlu, M., Atamanalp, M., Işık, A. & Yılmaz, B. (2016). The *in vitro* and *in vivo* effects of chlorpyrifos on acetylcholinesterase activity of rainbow trout brain. *Journal of Applied Animal Research*, 44(1), 243-247.