



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**PROPAZİN VE KİNOKSİFEN'İN SIĞIR SERUM
ALBÜMİNİ İLE ETKİLEŞİMİNİN
SPEKTROFLORİMETRİK VE HESAPLAMALI
TEKNİKLER KULLANILARAK İNCELENMESİ**

Bahadır DUMAN

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Bengi USLU**

**ANKARA
2023**

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PROPAZİN VE KİNOKSİFEN'İN SIĞIR SERUM ALBÜMİNİ İLE
ETKİLEŞİMİNİN SPEKTROFLORİMETRİK VE HESAPLAMALI
TEKNİKLER KULLANILARAK İNCELENMESİ

Bahadır DUMAN

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Bengi USLU

ANKARA
2023

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayarak sunduğum “Propazin ve Kinoksifen'in Sığır Serum Albümini ile Etkileşiminin Spektroflorimetrik ve Hesaplamalı Teknikler Kullanılarak İncelenmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve etik değerlere uygun şekilde tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tamamıyla tez danışmanlarım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tez içerisindeki tüm cümleler ve yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Adı Soyadı : Bahadır DUMAN
Tarih : 12/01/2023
İmza :

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim Dalında
Bahadır DUMAN tarafından hazırlanan “Propazin ve Kinoksifen'in Sığır Serum
Albümini ile Etkileşiminin Spektroflorimetrik ve Hesaplamalı Teknikler Kullanılarak
İncelenmesi” adlı tez çalışması, aşağıdaki jüri üyeleri tarafından Yüksek Lisans tezi
olarak Oy Birliği ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 12/01/2023

Prof. Dr. Nafiz Öncü CAN
Anadolu Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Bengi USLU
Ankara Üniversitesi
Üye

Doç. Dr. Sevinç KURBANOĞLU
Ankara Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza

Prof. Dr. Fügen AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	ixx
Çizelgeler	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Pestisit	1
1.2. Pestisitlerin Tarihçesi	3
1.3. Pestisitlerin Sınıflandırılması	4
1.3.1. Kullanımlarına ve Etki Ettikleri Türlerle Göre Sınıflandırma	4
1.3.2. Kimyasal Yapılarına Göre Pestisitlerin Sınıflandırması	7
1.3.3. Yapılarındaki Etkin Madde Gruplarına Göre Pestisitlerin Sınıflandırması	9
1.3.4. Etki Şekillerine Göre Pestisitlerin Sınıflandırılması	9
1.4. Pestisitlerin Zararları	9
1.5. Pestisitlerin İnsan Sağlığına Etkileri	12
1.5.1. Pestisitlerin Akut Etkileri	12
1.5.2. Pestisitlerin Kronik Etkileri	14
1.6. Tez Kapsamında Kullanılacak Pestisitler Hakkında Bilgiler	17
1.6.1. Kinoksifen	17
1.6.2. Propazin	18
1.7. Proteinler	19
1.7.1. Serum Albümini	20
1.7.1.1. Sığır serum/plazma albümini	21
2. GEREÇ VE YÖNTEM	24
2.1. Tez çalışmasında kullanılan protein ve pestisitler	24
2.1.1. Kullanılan Araç ve Gereçler	24
2.1.2. Floresans Analizleri	25
2.1.3. Moleküler Kenetlenme Analizleri	26
2.2. Yöntem	26

2.2.1. Floresans Yöntemler ve Uygulamaları	26
2.2.1.1. Floresans sönümlenme ve Stern-Volmer denklemi	29
2.2.1.2. Termodinamik etkileşmeler ve bağlanma parametreleri	31
2.2.1.3. Floresan maddeler ve işaretleme tekniği	32
2.2.2. Moleküler Kenetlenme	34
2.2.3. UV-Vis Absorpsiyon Spektroskopisi	36
3. BULGULAR	38
3.1. BSA Proteini ile PRO ve QUI Pestisitleri Arasındaki Etkileşimlerin Floresans Ölçümleriyle Karakterizasyonu	38
3.2. Floresans Sönüm ve Stern-Volmer Eşitliği	39
3.3. Termodinamik Parametreler ve Bağlanma Kuvvetleri	43
3.4. Pestisit- BSA Etkileşiminin 3 Boyutlu Floresan Spektral Sonuçları	46
3.5. PRO-BSA Sisteminin Moleküler Kenetlenme Sonuçları	48
3.6. QUI-BSA Sisteminin Moleküler Kenetlenme Sonuçları	51
4. TARTIŞMA	55
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	58
ÖZET	60
SUMMARY	61
KAYNAKLAR	62

ÖNSÖZ

Modern tarımda aşırı pestisit kullanımının birçok dezavantajı vardır. Pestisitlerin zararlı etkileri çok iyi bilinmemekte olup, gerekli önlemler alınmadan pestisit kullanılması ciddi sağlık sorunlarına yol açabilmektedir. Pestisitlerin insanlar üzerindeki toksik etkilerine ek olarak yapılan araştırmalar bazı pestisitlerin kansere sebep olduğunu göstermiştir.

Bu tez çalışmasında kinolon sınıfına ait bir fungusit olan kinoksifen ve triazin herbisitlerinden propazinin sığır serum albümin proteini ile etkileşim mekanizmaları spektrofotometrik ve hesaplamalı teknikler kullanılarak incelenmiştir.

Öncelikle, lisansüstü eğitim hayatıma adım attığım günden bu yana kendisinden güç aldığım, bilgi, birikim ve tecrübesiyle bana her an yol gösteren, moral ve desteğini hiç eksik etmeyen, akademik olarak da sosyal olarak da bana kuvvet veren, kendisini hem bilimsel hem de insani tarafıyla hep örnek aldığım çok değerli ve saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Bengi USLU'ya sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Lisans eğitimim süresince danışman hocam olan, lisans eğitimimin ilk yıllarından yüksek lisans eğitimimi tamamladığım şu ana kadar benden ilgisini hiç eksik etmeyen, kıymetli bilgi ve deneyimleriyle her zaman bana karşı maddi ve manevi desteklerini hissettiğim, benim bu günlere gelmemde büyük emeği olan çok sevdiğim değerli hocam Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN'a teşekkürlerimi sunmayı borç bilirim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi birikimleri ile bana rehberlik eden, her koşulda beni sabırla dinleyen, benim maddi ve manevi tüm sorunlarımı kendi derdi edinen ve hep çözümü olan, yüksek lisans tez çalışmamda büyük katkıların sahibi olan Dr. Cem ERKMEN'e sonsuz minnetimi ifade etmek isterim.

Tez çalışmalarında bana destek olan, bilgi birikimini benimle paylaşan, bana karşı her zaman anlayışlı olan araştırma grubumuzun çok değerli üyesi Dr. Md. Zahirul KABİR'e çok teşekkür ederim. Tez çalışmalarına sağladıkları desteklerden dolayı

Prof. Dr. Saharuddin B. MOHAMAD'e ve M.Sc. Lim Ching Yİ'ye katkıları için çok teşekkür ederim.

Lisansüstü öğrenimim boyunca sağladıkları katkılar ve desteklerinden dolayı Analitik Kimya Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyeleri, öğretim elemanları ve idari personeline teşekkür ederim.

Son olarak, bugün olduğum yere gelmemde büyük çabaları olan, hayata geçirmek istediğim hayaller için sınırsız sevgileriyle beni cesaretlendiren ve destekleyen, oğulları olmaktan her zaman gurur duyduğum biricik annem Ayşe DUMAN ve babam Mehmet DUMAN'a sonsuz minnetle teşekkür ederim.



SİMGELER VE KISALTMALAR

BSA	Sığır serum albümin
CD	Sirkular dikroizm
DBCP	1,2-dibromo-3-kloropropan
DDT	Dikloro difenil trikloroetan
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EDB	Etilen dibromür
ESA	At serum albümin
F	Floresans yoğunluğu
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
FRET	Förster rezonans enerji transfer
FTIR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
GABA	Gama aminobütirik asit
HCB	Heksa kloro benzen
HSA	İnsan serum albümin
IARC	Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı
K_f	Bağlanma sabiti
K_q	Biyomoleküle ait sönmleme hız sabiti
K_{SV}	Stern-Volmer sönmleme sabiti
n	Bağlanma birimlerinin sayısı
OF	Organofosfor
PDB	Protein data bank
PRO	Propazin
Q	Söndürücünün konsantrasyonu
QUI	Kinoksifen
RNA	Ribonükleik asid
RSA	Sıçan serum albümin
Trp	Triptofan
Tyr	Tirozin
UV	Ultraviyole
UZEM	Ulusal Zehir Danışma Merkezi
ΔG	Serbest enerji
ΔH	Entalpi değişimi
ΔS	Entropi değişimi
ϵ	Molar absorptivite katsayısı
λ	Dalga boyu

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. QUI'nin kimyasal yapısı	18
Şekil 1.2. PRO'nun kimyasal yapısı	18
Şekil 1.3. Protein yapısı	19
Şekil 1.4. Plazma albümin proteinin üç boyutlu hali	20
Şekil 1.5. Serum plazma proteinin alt etki bölgelerinin 3 boyutlu hali	21
Şekil 1.6. BSA bileşiğindeki triptofan bölgelerinin yapısı	21
Şekil 2.1. Jablonski diyagramı	28
Şekil 2.2. Spektrofluorometre genel yapısı	34
Şekil 2.3. Protein-ligand moleküler kenetlenmesinin gösterilmesi	36
Şekil 2.4. UV-Vis spektrofotometrenin şematik gösterimi	37
Şekil 3.1. Artan pestisit konsantrasyonlarının ilavesi ile BSA'nın floresans söndürme spektrumları	38
Şekil 3.2. Pestisit-BSA etkileşimleri için Stern-Volmer grafikleri	40
Şekil 3.3. Pestisit-BSA etkileşimleri için çift logaritmik doğrusal eğriler	42
Şekil 3.4. Pestisit-BSA etkileşimleri için van't Hoff grafikleri	44
Şekil 3.5. Artan pestisit konsantrasyonlarının ilavesi ile BSA'nın absorbans spektrumları	46
Şekil 3.6. BSA ve Pestisit-BSA karışımlarının 3 boyutlu floresan sinyalleri ve üst kontur haritaları	47
Şekil 3.7. (A) Bölge I ve (B) bölge II'de BSA'ya PRO kenetlenmesinin küme analizi	49
Şekil 3.8. BSA'nın bölge I ve bölge II'deki PRO kenetlenme modeli	50
Şekil 3.9. PRO ve BSA'nın bölge I ve bölge II'deki amino asit kalıntıları arasındaki hidrofobik ve polar etkileşimleri gösteren Ligplot+ diyagramları	51
Şekil 3.10. (A) bölge I ve (B) bölge II'de BSA'ya kenetlenen QUI'nin küme analizi	52
Şekil 3.11. BSA'nın bölge I ve bölge II'deki QUI kenetlenme modeli	53
Şekil 3.12. BSA'nın bölge I ve bölge II'deki amino asit kalıntıları ve QUI arasındaki hidrofobik ve polar etkileşimleri gösteren Ligplot+ diyagramları	54

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Pestisitlerin hedef aldıkları canlı türüne göre sınıflandırılması	4
Çizelge 1.2. Yapılarındaki etkin madde gruplarına göre pestisitlerin sınıflandırması	9
Çizelge 1.3. QUI'nin kimyasal özellikleri	17
Çizelge 1.4. PRO'nun kimyasal özellikleri	18
Çizelge 2.1. Tez kapsamında kullanılan pestisitler	24
Çizelge 3.1. Pestisit-BSA bağlanma reaksiyonlarının bağlanma özellikleri	40
Çizelge 3.2. Pestisit-BSA bağlanma reaksiyonlarının bağlanma özellikleri	42
Çizelge 3.3. Pestisit-BSA etkileşimlerinin termodinamik özellikleri	45
Çizelge 3.4. BSA ve Pestisit-BSA karışımlarının 3 boyutlu floresan sinyallerinin tepe konumları ve yoğunluk değerleri	48
Çizelge 3.5. I ve II bölgelerinde BSA amino asit kalıntıları ve PRO atomları arasında oluşan tahmin edilen hidrojen bağları	50
Çizelge 3.6. I ve II bölgelerinde BSA amino asit kalıntıları ve QUI atomları arasında oluşan tahmin edilen hidrojen bağları	53

1. GİRİŞ

1.1. Pestisit

Günümüzde hızla çoğalan dünya nüfusunun karşı karşıya olduğu en önemli sorunlardan biri beslenmedir. Dünya nüfusunun hızlı ve kontrolsüz büyümesine rağmen bu artışı karşılayacak ürün miktarı üretilmemekte ve gıda talebi karşılanamamaktadır. Birim alan başına verimliliği artırarak ve düşük maliyetle yüksek kaliteli ürünler elde ederek bu problem önlenmeye çalışılmaktadır (Vioque-Fernandez ve ark., 2009).

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü'ne (FAO) göre bugün küresel popülasyonun %40'ı yetersiz beslenmekte ve her yıl binlerce insan açlık ve sefaletten ölmektedir. Günümüzde pestisitler kullanılsaydı bazı ürünlerde %65 civarında kayıplar meydana gelebilirdi. Örneğin buğday üretiminde yabancı ot, süne böceği, kımıl böceği gibi zararlılara karşı tarımsal mücadele uygulanmadığında ürün kaybının değeri trilyonlarla ifade edilmektedir. Ancak bu kayıp birkaç milyarlık ilaçlama maliyeti ile en aza indirilebilmektedir (Karakaya ve Boyraz, 1992). Yine FAO verileri, dünya genelinde ürünlerin %20-40'ının böcekler nedeniyle kaybedildiğini ve bu oranın gelişmekte olan ülkelerde daha yüksek olduğunu göstermektedir. Hasat, kurutma, depolama, öğütme ve pişirme dahil olmak üzere hemen hemen her aşamada kayıplar meydana gelmektedir. Ortalama olarak tahıl ve taneliler için kayıp %10 civarındır; kökler, bitkiler ve sebzeler için %20 olarak hesaplanmıştır (Güler ve Çobanoğlu, 1997).

Bu amaçla, tarım arazilerini hem ürün kaybına hem de tohum kaybına neden olan tarımsal hastalık ve benzeri zararlıların etkilerinden korumak için çeşitli kimyasallar uygulanmaktadır. Bu kimyasallara yaygın olarak pestisit adı verilir (Karakaya ve Boyraz, 1992 ve Yıldız ve ark., 2005).

Pestisit; besinlerin “retimi, tüketimi ve saklanması” esnasında değerini düşüren mikroorganizmaları, zararlıları, kemirgenleri, mantarları, yabancı otları ortadan kaldırmak, bununla birlikte bitki büyümesini kontrol etmek için kullanılan fiziksel, kimyasal veya biyolojik ürünler olarak tanımlanabilir (Yorulmaz ve Recep, 2010 ve Vural, 1984). Pestisitlerin en yaygın kullanımı, bitkileri herbisit, fungusit ve insektisit kullanarak sırasıyla yabancı otlar, mantarlar ve böcekler gibi zararlılardan korumaktır (Gilden ve ark., 2010). Pestisitler; kullanımının kolay olması ve ucuz olması sebebiyle farkında olmadan aşırı olarak kullanılmaktadır (Hisar ve ark., 2003). Hasat edilen ürünleri; böceklere, yabancı otlara, hastalıklara ve diğer olumsuz etkilere karşı korudukları, verim ve kaliteyi artırdıkları için tarımda çok önemli bir yere sahiptirler (Huang ve ark., 2015).

Bunun dışında pestisitler veba, tifo, sarıhumma, sıtma ve tifüs gibi salgın rahatsızlıkların kontrol altına alınmasında da kullanılmış ve insanlığı bu tehditlerden korumuştur. Tarım bölgeleri haricinde pestisitler; depolanan mahsullerin korunmasında, ağaçları hasara uğratan haşerelere karşı, tren yolu taşımacılığını güçleştiren ve su yollarında akıntıyı zorlaştıran yabancı bitkilere karşı yaygın olarak tercih edilmektedir (Türkiye evre Sorunları Vakfı, 1998).

Pestisitler "etkili madde" veya "aktif madde" olarak isimlendirilebilir. Pestisitlerin aktif kısmı etkin madde olarak bilinir. Pestisitlerdeki etkin madde öldürücü etkiye sahip ana maddedir (Türk ve ark., 2013 ve Teoman ve Yaşar, 2016). Formülasyon ise, pestisitlerin hazırlanmasında kullanılan etkin maddeleri bazı yardımcı maddelerle karıştırıp kullanmaktır. Formülasyonun uygulanma nedeni, mümkün olduğu kadar güvenli, çevreye ve canlıların sağlığına daha az zararlı ve daha ucuz olmasını sağlamaktır (Teoman ve Yaşar, 2016). Zararlı etkilerin dozu pestisit türü, bileşimi, kullanım yöntemi ve tarım arazisinin yapısına göre düzenlenir. Hedef organizmalara ek olarak, tüm pestisitler hem omurgalılar hem de omurgasızlar olmak üzere diğer organizmaları da etkiler (Erdoğan, 2010).

Pestisitler, doğada kimyasal, fiziksel ve biyolojik süreçlerle yavaş yavaş bozunur ve yok edilir, ancak aynı zamanda içerdikleri kimyasal yapısal özellikler nedeniyle

oldukça kalıcıdır. Bazı pestisitler ise ana bileşenleri bozulduktan sonra çok daha tehlikeli kimyasallara dönüşmektedir. Ayrıca insan yapımı pestisitlerin çevre üzerinde çok kalıcı bir etkisi vardır (Yıldız ve ark., 2005 ve Bulut ve Kubilay, 2018). Ek olarak, pestisitler doğal olarak buharlaşma, sürüklenme veya sızma yoluyla diğer alanlara göç eder. Bu nedenle pestisitler hedef alan dışında da etkilidir (Fan ve ark., 2002).

1.2. Pestisitlerin Tarihçesi

1940 yılından bu yana tarımda basit uygulama ve hızlı etkililiğin yanı sıra ürünü zararlılara ve yabancı otlara karşı korumadaki başarısı nedeniyle pestisit üretimi ve kullanımı artmıştır (Tiryaki ve ark., 2010).

Tarih boyunca, tarımda mahsulleri korumak için pestisitlerden çok önce birçok farklı kimyasal kullanılmıştır. Örneğin Sümerler 4500 yıl önce böcekleri ve akarları kontrol etmek için kükürt kullanmışlardır (Bernardes ve ark., 2015).

1876'da sentezlenen dikloro difenil trikloroetan (DDT), II. Dünya Savaşı'ndan sonra haşere kontrolünde yaygın olarak kullanıldı. DDT başlangıçta insan sağlığı için zararsız, etkili ve ucuz bir kimyasal olarak ortaya çıktığından beri birçok çeşidi üretilmiştir. Rachel Carson, 1962 yılında yazdığı "Silent Spring" adlı kitabında DDT'nin çevre ve insanlar üzerindeki zararlı etkilerinden bahsetmiş ve DDT kullanımının sınırlandırılması konusunda toplumda farkındalık yaratmıştır. 1967'de bir İngiliz araştırmacı, kuş yumurta kabuklarının hızlı kırılmasının ve incelmesinin doğrudan DDT kullanımı ile ilgili olduğunu göstermiştir. DDT'nin hedef organizmaların yanı sıra kuşlar ve balıklar üzerindeki zararlı etkileri ve ekosistemdeki güçlü kalıcılığı nedeniyle, DDT'nin kullanımı 1972'de Amerika Birleşik Devletleri'nde ve daha sonra diğer ülkelerde yasaklanmaya başlandı (Bernardes ve ark., 2015). Daha sonraki çalışmalar, DDT'ye akut ve kronik maruziyetin kişilerde meme kanseri riskini artırdığını ve ayrıca diyabet ve karaciğer hastalıklarını indüklediğini göstermiştir (Li ve ark., 2017 ve Tang ve ark., 2014). DDT'nin bu olumsuz tesirleri göz önünde bulundurularak yeni, daha seçici ve daha güvenli

pestisitlerin üretilmesi için çalışmalar başlatılmış ve günümüzde sentetik organoklorlu, organofosforlu, karbamatlı ve piretroid türevi pestisitler ortaya çıkmıştır (Bernardes ve ark., 2015 ve McAfee, 2017).

1.3. Pestisitlerin Sınıflandırılması

Pestisitler, etki ettikleri ya da hedefledikleri canlı türüne, kimyasal yapılarına, etki şekillerine veya bileşimindeki kimyasal gruplara göre çeşitli şekillerde sınıflandırılmaktadırlar (Grimalt ve ark., 2007).

Bunlardan en sık kullanılan sınıflandırma şekilleri ise hedefledikleri zararlı gruplarına ve yapısındaki aktif madde grubuna göre yapılan sınıflandırmalardır (Ünal, 2004 ve Generali ve ark., 2015).

1.3.1. Kullanımlarına ve Etki Ettikleri Türlerle Göre Sınıflandırma

Kullanıldıkları zararlı gruplarına veya hedeflenen organizmaya göre yapılan sınıflandırmada; en önemli üç büyük pestisit grubu, insektisit, fungusit ve herbisitlerdir (Canhilal ve Tiryaki, 2010).

Çizelge 1.1. Pestisitlerin hedef aldıkları canlı türüne göre sınıflandırılması

PESTİSİT TÜRÜ	SINIFLANDIRILMASI
İnsektisitler	Böcek Öldürücüler
Akarisitler	Akar Öldürücüler
Herbisitler	Ot Öldürücüler
Fungusitler	Mantar Öldürücüler
Rodentisitler	Fare Öldürücüler
Mollusitler	Yumuşakça Öldürücüler
Nematisitler	Nematod Öldürücüler
Avisitler	Kuş Öldürücüler

İnsektisitler: Böcekleri kontrol etmek için kullanılan ana pestisit gruplarından biridir. Böcek yumurtalarına ve larvalarına karşı kullanılan ovisid ve larvisitler de insektisit sınıfında değerlendirilen insektisit türleridir. Böcek öldürücüler tarımda,

tıpta, endüstride ve ev içinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Yirminci asırda tarımsal verimliliği artırmanın en mühim faktörlerinden birisi olduğu bir gerçektir. En çok bilinenleri organoklorlular grubundan DDT, endosülfan, organofosfatlılar grubundan klorpirifos, malation, diazinon, karbomatlılar grubundan karbaril, karbosülfan, sentetik piretroidler grubundan sipermetrin, deltametrin, sihalotrindir (Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, 2018).

Fungusitler: Mantarları ve mantar sporlarını öldürmek ve kontrol etmek için kullanılan kimyasallar için genel bir terimdir. Fungi kelimesinden gelmektedir. Mantarlar tarımda verimi önemli ölçüde azaltmaktadır, bu nedenle verim kaybını önlemek için fungusitler kullanılır. Fungisit olarak bakır, kalay, kükürt, ditiyokarbamatlar, benzimidazoller, piperazinler, triazoller kullanılmaktadır. Kükürt yaygın bir etkin bileşendir. En düşük dozu %0,08 ve en yüksek dozu %0,5'tir. Toz fungusitler tipik olarak %90 kükürt içerir ve bu doz oldukça toksiktir. Mantar öldürücülerdeki diğer aktif maddeler arasında tesbih ağacı yağı, biberiye yağı, jojoba yağı, *Bacillus subtilis* ve faydalı bir mantar olan *Ulocladium oudemansi* bulunur (Hogan, 2011 ve Yadav ve Devi, 2017).

Herbisitler: Yabani otları kontrol etmek için kullanılan bir pestisitir. Genellikle yabani otları öldürmek veya normal gelişimini önlemek için kullanılan kimyasallara herbisit denir. Herbisit olarak benzimidazoller, karbamatlar, anilidler, triazinler, urasiller kullanılmaktadır. Örnek etkin maddeler olarak parakuat, dikuat, 2,4-dikloro fenoksi asetik asit verilebilir (Yadav ve Devi, 2017; Bradbury ve Coats, 2011 ve Karadağ, 2007).

Akarisitler: Akarisit, akarlarla (mite) savaşmak için kullanılan kimyasallara verilen addır. Benzilbenzoat bu kimyasallardan biridir. Avrupa'da "Acarosan" adı altında pazarlanmaktadır. Başlıca kullanımı tarımdır ancak ev halısı ve koltuk gibi alanlarda akarları ve yumurtalarını öldüren çeşitleri vardır. Akarisitler farklı etkin maddeler ve farklı marka isimleri ile satılmaktadır. Akarisit olarak amin ve hidrazin türevleri, kükürtlüler, organik kalaylılar akarasisit olarak kullanılmaktadır (Karadağ, 2007). Akarlara karşı seralarda kullanılan ilk spesifik akarasisit, 1945'te geliştirilmiş

olan azobenzen'dir. İlerleyen senelerde piyasaya sürülen akarisit etkin maddeleri bromopropilat, kloropropilat, klorobenzilat, klorfenetol, dikofol, tetradifondur. Bunlar birinci nesil akarisitler olarak bilinir. İlk nesil akarisitlerin çoğu, etki mekanizmaları tam olarak anlaşılamadan yasaklanmıştır. En son olarak Türkiye'de kullanılan ilk nesil akarisitlerden biri olan bromopropilat 2011 yılında yasaklanmıştır. 1960 ve 1970 arasında spesifik bir ikinci nesil akarisit grubu geliştirilmiştir. Bunlar proparjit, organotin (siheksatin, fenbutatin oksit), formamidinler (amitraz, klordimeform)'dir. Üçüncü nesil spesifik akarisitler ise akarsit büyüme düzenleyicileridir. Bu grupta ilk sentezlenen akarisitler klofentezin, heksiazoks olmuştur (Yadav ve Devi, 2017 ve İnak ve Çobanoğlu, 2016).

Molluskisitler: Sümüklü böcekler ve salyangoz gibi yumuşakçalara karşı kullanılan kimyasallardır. Bunlar metaldehit etkin maddesini içerirler. Sıcak kanlılarda zehirliliği düşüktür. Sıcakkanlı hayvanlar için düşük toksisite içerirler (Yadav ve Devi, 2017 ve Fishel ve Ferrell, 2013).

Rodentisitler: Kemirgenlere karşı kullanılan kimyasallardır. Ağırlıklı olarak depolarda, ambarlarda ve evlerde kullanılırlar. Dünya Sağlık Örgütü tarafından birinci ve ikinci nesil olarak sınıflandırılmaktadır. Varfarin gibi birinci nesil rodentisitler, tekrarlanan yem alımıyla iç kanamaya neden olur. İkinci nesil kemirgen öldürücüler (brodifacoum, difenacoum, vb.), birinci nesil kemirgen öldürücülere dirençli fare ve sıçanları kontrol etmenin yanı sıra, tek bir gıda alımıyla öldürücü bir doz verme olanağı tanır.

İkinci nesil antikoagülan kemirgen öldürücüler süper varfarin adıyla bilinir. Bu rodentisitler 4-hidroksikoumarin yapısında olan difenakoum, brodifakoum, bromadiolon, flokoumafen ve indanedion türevleri ve diphakinon'dur (Yadav ve Devi, 2017 ve Vural, 2005).

Nematisitler: Nematisit aktiviteye sahip birçok ajanın ayrıca fungusit ve insektisit etkileri de mevcuttur. Nematisitler toprak fumigantıdır. Birçoğu fitotoksiktir ve bu nedenler yalnızca tarlada ekin bulunmadığında uygulanabilir.

Bazıları ise bitkiler mevcut olduğunda bile uygulanabilir. Cadusafos, dazomet, dichloropropene, ethoprophos, fenomiphos, isazofos, metham-sodium iyi bilinen nematisitlerdir (Yadav ve Devi, 2017; Palüzar, 2013 ve Kumar ve ark., 2010).

1.3.2. Kimyasal Yapılarına Göre Pestisitlerin Sınıflandırması

Pestisitlerin kimyasal yapılarına göre sınıflandırılmalarında en önemlileri, organoklorlu pestisitler, organofosfatlı pestisitler, karbamatlar, doğal ve sentetik pretroidlerdir (Canhilal ve Tiryaki, 2010).

Organofosfatlı Pestisitler: Organofosfor (OF) bileşiklerinin çoğu insektisit, bazıları ise fungisit, nematisit veya bitki düzenleyici olarak kullanılır. Fosfor atomuna çift bağlı atomun oksijen mi yoksa kükürt mü olduğuna bağlı olarak sırasıyla "fosfatlar" ve "tiyofosfatlar" olarak adlandırılırlar. Klorpirifos, Diazinon, Malation ve Paration en iyi bilinen organofosfatlılardır (Kumar ve ark., 2010).

Pretiroidler: Pretiroidler krizantem çiçeklerinden elde edilen doğal insektisitlerdir. Işık ve su etkisi altında kolayca parçalanırlar, bu da onların açık havada kullanımlarını sınırlandıran bir durumdur. Bu sebeple pretiroidlerin ışığa dayanıklı sentetik türevleri olan türetilmiştir (Coats, 1990).

Karbamatlar: Karbamat esterleri nematisit ve insektisit olarak kullanılmakta olup R1 ve R'de alkil/aril gruplarına sahiptir. R1 ve R'de alifatik ve/ya da aromatik gruplara sahip karbamatlar herbisit (bitki öldürücü) ve filizlendirme inhibitörü olarak kullanılır. Karbofuran, aldikarb, karbaril çokça bilinen karbamatlardandır (Smith, 1987).

Organoklorlu pestisitler: En eski bilinen yapay pestisit grubudur. Klorlu hidrokarbon (organoklorlu) pestisitler grubunda klorlu benzen bileşikleri klorlu etan türevleri, klorlu sikloheksanlar ve klorlu siklodienler bulunmaktadır. Yüksek kimyasal kararlılıkları ve yağ çözünürlüğü, yavaş biyotransformasyon ve bozunma ve düşük

uçuculukları, 3-5 yıllık yarı ömürleri onları etkili insektisitler haline getirir. En iyi bilinen organoklorinler DDT, Klordan, Heptaklor, Endosülfan ve Toksafenindir. En iyi bilinen organoklorlular DDT, Klordan, Heptaklor, Endosülfan ve Toksafenindir. Bu gruba ait pestisitlerin çoğu, Stockholm Sözleşmesi kapsamında Kalıcı Organik Kirleticiler grubunda değerlendirilmektedir ve bunların ülkemizde kullanımı 1980'lerin ortalarından beri yasaklanmıştır (Coats, 1990).

Neonikotinoitler: Neonikotinoitler; organofosforlu ve organoklorlu pestisitlerin zararlı etkilerine karşı; düşük konsantrasyonlarda yüksek aktiviteleri ve düşük çevresel riskleri nedeniyle alternatif olarak kullanılmaktadır. Bu grup pestisitler, 2. ve 3. sınıf toksinler grubunun en yeni sınıfı olup, dünya çapında ve Türkiye'de yaygın olarak kullanılmaktadır. Neonikotinoidler nikotinin türevleridir ve N-nitroguanidinler (imidakloprid, tiyametoksam, dinotefuran, ve klotianidin) ve N-siyano-aminidler (asetamiprid, vethiakloprid) olarak sınıflandırılır. Post-sinaptik zarda nikotinik asetilkolin reseptörlerine ba lanırlar ve agonist davranış sergilerler. Neonikotinoitler, memeli nikotinik asetilkolin reseptörlerine b ceklerdeki nikotinik asetilkolin reseptörlerine kıyasla daha düşük afiniteye sahip olduklarından böcekler için daha toksik, memeliler ve su organizmaları için daha az toksiktirler.

Hepatik mikrozomal sitokrom p450 enzimleri ve sitozolik aldehit oksidaz neonikotinoitlerin biyotransformasyonunda yer alır.

Neonikotinoid grubu olan insektisitlerin DNA hasarına ve özellikle kromozomal anormalliklere neden olduğu tespit edilmiştir. Neonikotinoit grubu bir insektisit olan Tiyametoksam karsinojendir ve dişi erkek farelerde karaciğer tümörlerine neden olmaktadır. Son yıllarda neonikotinoit sınıfı pestisitlerin kullanımı kısıtlanmıştır. Avrupa Birliği Komisyonu, bal arıları üzerindeki olumsuz etkileri ortadan kaldırmak için neonikotinoit sınıfı klotianidin, imidakloprid ve tiyametoksamın kullanımını 1 Aralık 2013 tarihinden itibaren kısıtlamıştır (Seifert, 2014).

1.3.3. Yapılarındaki Etkin Madde Gruplarına Göre Pestisitlerin Sınıflandırması

Bileşimindeki kimyasal gruplara göre pestisitler inorganik, sentetik organik ve doğal organik olarak sınıflandırılır (Yadav ve Devi, 2017 ve Kaymak ve ark., 2015).

Çizelge 1.2.Yapılarındaki etkin madde gruplarına göre pestisitlerin sınıflandırması

I. İnorganik pestisitler	II. Yapay organik pestisitler	III. Doğal organik pestisitler
a. Florürlü	a. Organoklorürler	a. Rotenonlar
b. Civalı	b. Karbamatlar	b. Piretrum
c. Elementer kükürtlü	c. Organosülfürler	c. Nikotin
d. Bakırlı	d. Organofosfatlar	d. Alletrin
e. Arsenikli		

1.3.4. Etki Şekillerine Göre Pestisitlerin Sınıflandırılması

- Kolinesteraz (asetilkolinesteraz) inhibitörleri (bloklayıcıları)
- Kitin sentezi bloklayıcı
- Ekdizonagonisti
- GABA bloklayıcı (amino bütirikasit bloklayıcı)
- Jüvenil hormon analogu (böcek büyüme regülatörleri)
- Antikoagülantlar
- Glutaminsentetaz bloklayıcı
- Ergosterol biyosentezi (steroit demetilasyon) bloklayıcı
- RNA-polimeraz bloklayıcı
- Protein sentezi bloklayıcı
- Fotosentetik elektron taşıma inhibitörü
- Mitokondriyal solunum inhibitörü (Öztürk ve Özge, 1978 ve Birişik, 2018).

1.4. Pestisitlerin Zararları

Üretimi artırmak için, pestisitler bitkileri farklı zararlılardan; yabancı ot, mantar ve böceklerden korunmak için kullanılan bitki koruyucu ürünlerdir. Bu pestisitler

Üretim verimliliğini arttırırken; su, toprak, meyve ve sebzeler üzerinde bozulmadan kalarak çevreyi kirletir, besin zincirini ve insan metabolizmasını etkileyen çeşitli yan etkiler oluşturur (Kurutaş ve Kılınç, 2003). Bu kimyasallar ekosistemde biriken toksik ve kararlı maddelerdir. Bu nedenle aşırı kullanım olumsuz sonuçlara yol açabilir. İlk pestisit uygulaması sırasında hedef organizma popülasyonu önemli ölçüde azalır; ancak gelecekte bu insektisite dirençli organizmaların popülasyonları giderek artmakta ve sonunda kullanılan pestisitler etkisiz hale gelmektedir. Örneğin, 1970'lerde Meksika'da pamuk tarlalarında haşerelerle mücadelede kullanılan pestisitin etkinliğini kaybetmesi sonucu ekinleri korumanın hiçbir yolu kalmayınca 285.000 hektarlık alan terk edilmiştir (Wilson ve Tisdell, 2001).

Pestisitler, üretimleri sırasında veya kullanımları sonucunda suya, toprağa ve atmosfere bulaşmaktadır. Pestisite maruz kalan havadaki partiküllerin yağmur sularına dönüşmesi, pestisitli bitkiler ile toprak, toprak altı sularına ulaşması ya da pestisitlerin direk su içerisinde istenmeyen bazı bitki ve haşerelere karşı uygulanmasıyla su ekosistemine karışmasına sebebiyet vermektedir (Miles ve Harris, 1971).

Pestisit uygulamalarının %0,015 ile %6,0'ı hedef organizmalara ulaşır, fakat bunların %94-99,9'u tarım ekosistemlerdeki ve çevredeki diğer doğal ekosistemlerdeki hedef olmayan organizmalara aktarılmaktadır (Yıldız ve ark., 2005).

Hava, su ve toprakla doğrudan veya dolaylı olarak karışan pestisitler, ekosistem genelinde canlılar için ciddi sağlık sorunlarına neden olabilmektedir. İn vivo çalışmalardan elde edilen veriler doğrultusunda pestisitlerin birçok organın yapısal fonksiyonlarını bozduğu, hormonal, sinir ve üreme sistemlerini olumsuz etkilediği, nörodejeneratif hastalıklara ve gelişimsel bozukluklara neden olduğu görülmektedir (Mostafalou ve ark., 2012).

Pestisit kalıntıları besin zincirlerinde dolaşabilmekte ve kümes hayvanlarından balıklara, bitkisel yağlardan çeşitli meyve ve sebzelere kadar birçok üründe tespit edilebilmektedir (Grewal ve ark., 2017). Araştırmalar, hayvansal gıdaların büyük

miktarda pestisit kalıntısı içerdğini göstermiştir. Pestisit türü ve yoğunluğuna bağlı olarak hayvanların dokularında birikmektedir (Claborn ve ark., 1973).

Canlı organizmaları hedef almak için geliştirilen pestisitler; vücutta uzun süre kalıcılığı ve birikimi olan DDT, heksaklorobenzen (HCB), Aldrin, Heptaklor ve Endrin gibi organoklorlar küçük dozlarda dahi kronik zehirlenmelere neden olarak insanları etkilerine karşı savunmasız bırakmaktadır. İnsanlarda zehirlenme ilaçlar deri, solunum sistemi veya sindirim sistemi yoluyla vücuda girdiğinde meydana gelmektedir (Kurutaş ve Kılınç, 2003). Organoklorlu pestisitlerin %50'den fazlasının, uygulandığında toprakta 15 yıl kalabildiği bulunmuştur (Chisholm ve MacPhee, 1972). 2015 yılında 11 AB üye ülkesinden 375 toprak örneği incelendi ve 1.000'den fazla örnekte pestisit kalıntısı bulundu (Silva ve ark., 2019).

Pestisitler çeşitli şekillerde yeraltı suyu kaynaklarına, göllere ve akarsulara ulaşarak tatlı su kaynaklarını kirletmekte ve böylece oradaki biyolojik çeşitliliği tehlikeye atmaktadır (Lorenz ve ark., 2017). Hem yüzey hem de yeraltı sularındaki pestisit kontaminasyonu, bu suyu kullanan vahşi yaşamı, florayı ve insan sağlığını etkileyebilir (Maksymiv, 2015).

Pestisitlerin suyu ve toprağı kirletmesi gıda güvenliğini etkilediği gibi insan sağlığını da tehdit etmektedir. Pestisit kullanımından doğrudan etkilenen ana meslek grubu tarım üreticileridir ve birçok çalışma, pestisitlerin kontrol gruplarına kıyasla bu bireylerde DNA hasarını ve oksidatif stresi artırdığını ve serum asetilkolinesteraz aktivitesini azalttığını göstermiştir (Atherton ve ark., 2009). Deneysel çalışmalar ve epidemiyolojik çalışmalar pestisitlerin özellikle prostat kanseri, akciğer kanseri ve lösemide kanserinde önemli etkileri olduğunu göstermektedir (Blair ve ark., 2015).

1.5. Pestisitlerin İnsan Sağlığına Etkileri

1.5.1. Pestisitlerin Akut Etkileri

Herhangi bir kimyasal için yaygın olan doza bağımlı toksik etkiler, pestisitler için de geçerlidir. Bu pestisitler ve etkileri insan dışı organizmalar için tasarlanmış ve üretilmiş olsa da maruziyet düzeyine ve insan duyarlılığına bağlı olarak insanlar üzerinde kaçınılmaz etkileri vardır ve pestisitler de insanlar için toksik bileşikler olabilmektedir (Öncüler, 2000). Pestisitlerin insanlar üzerindeki toksik etkileri akut ve kronik etkiler olarak kendini göstermektedir. Pestisitlerin akut etkileri, tahrişten dermatite, sistemik absorpsiyondan ölüme kadar değişmektedir (Güler ve Çobanoğlu, 1997). Akut pestisit zehirlenmesi vakaları, özellikle gelişmekte olan ülkelerde, dünya çapında önemli morbidite ve mortaliteye neden olmaktadır. Akut pestisit zehirlenmesi, pestisitlere kasıtlı, mesleki veya kazara maruz kalmaktan kaynaklanabilir. Kazaen pestisit zehirlenmelerinin çoğu mesleki olmasına rağmen, evde haşere kontrolünde pestisitlerin amatör kullanımı, yanlış kullanımı veya depolanması nedeniyle insanlarda vakalar oluşmaktadır.

2004 yılındaki DSÖ verilerine göre her yıl 3 milyon kişi pestisitlerden zehirlenmekte ve yaklaşık 250.000 kişi de hayatını kaybetmektedir. 1992 ve 2000 yılları arasında Orta Amerika ülkelerinde yürütülen bir araştırma, pestisit zehirlenmesinde 100.000 nüfusta 6,3'ten 19,5'e ve ölüm oranında 100.000 nüfusta 0,3'ten 2,1'e önemli bir artış olduğunu göstermiştir. Fakat son yıllardaki vaka sayısındaki artışın, artan kullanımın dışında daha iyi istatistiklerin mevcudiyeti nedeniyle olabileceği de düşünülmektedir (Henao ve Arbelaez, 2002 ve Colosio ve Moretto, 2008). Gelişmiş ülkelerde yapılan çalışmaların sonuçlarına göre; tarım işçilerinde yıllık akut pestisit zehirlenmesi insidansının 100.000 tam zamanlı çalışan için milyonda 18,2 ve okul çocukları arasında 7,4 olduğunu göstermiştir (Thundiyil ve ark., 2008).

Ancak çeşitli nedenlerle dünyanın farklı bölgelerinde akut zehirlenme vakaları ortaya çıkabilmektedir. Yetersiz düzenleme, kontrol sistemleri eksikliği, daha fazla uygulama, eğitim noksanlığı, bilgi sistemlerine yetersiz erişim, kişisel koruyucu donanımın yetersiz olması veya hiç olmaması ve tarıma dayalı nüfusun daha fazla olduğu gelişmekte olan ülkelerde vakaların daha yaygın olması beklenmektedir. Gelişmiş ülkelerde yasaklanan, özellikle DSÖ tarafından oldukça toksik olarak sınıflandırılan pestisitlerin kullanımı, eski stoklar ve yanlış depolama uygulamaları, gelişmekte olan ülkelerde önemli akut zehirlenme risklerine neden olabilmektedir. Orta Amerika'nın gelişmekte olan bölgelerinde (El Salvador ve Nikaragua) yapılan araştırmalar, genel nüfusta akut pestisit zehirlenmesinin genel insidansının 100.000 nüfusta 35 ve Tayland'da 100.000'de 17,8 olduğunu göstermiştir. Geçmişte yapılan çalışmalar, pestisit maruziyetinin mesleki ve kasıtsız nedenlerinin gelişmekte olan ülkelerde %10'dan %50'ye kadar değiştiğini göstermiştir (World Health Organization, 2004).

Pestisitlerle zehirlenme, ülkemizde Ulusal Zehirlenme Danışma Merkezi (UZEM) tarafından yayımlanan 2019 yılı verilerine göre tüm zehirlenme vakarı arasında üçüncü sırada yer almaktadır. Bu grupta tüm başvuruların %4,26'sını temsil eden 9276 vaka bulunmaktadır. Pestisitler arasında sentetik piretroidler (%25) birinci sırada, Rodentisitler (%24) ikinci sırada, Fungusitler (%6) üçüncü sırada ve Organofosfatlar (%5) dördüncü sırada yer almıştır.

Akut zehirlenme belirtileri lokal (bölgesel) veya sistemik olabilir. Bölgesel etkilene temas noktasında meydana gelir. Sistemik etkiler için vücudun her bir bölgesi ve her noktasına dağılım ve emilim gereklidir (International Labour Organization, 2011). Pestisitle ilişkili deri hastalıklarının klinik en yaygın formu kontak dermatit ya da alerjidir. Daha nadir görülen hastalıklar kontakt ürtiker, eritema multiform, dermatoz, mesleki akne, saç ve tırnak hastalıkları ve daha sonraki senelerde cilt kanseri bir sonuç olarak ortaya çıkabilir (World Health Organization, 1990).

Solunum ve kardiyovasküler hastalıkları olan kişiler pestisit maruziyetine karşı daha hassastır. Astımlı veya şiddetli alerjisi olan kişiler de daha büyük bir reaksiyona sahiptir (Güler ve Çobanoğlu, 1997).

1.5.2. Pestisitlerin Kronik Etkileri

Pestisitlere kronik olarak düşük düzeyde maruz kalmanın sağlık üzerindeki etkileri, akut maruziyetin sağlık etkilerinden daha az bilinmektedir. Uzun vadeli maruz kalma; çiftçiler, profesyonel pestisit kullanıcıları ve çok daha küçük oranda gıda ve sudaki kalıntılar yoluyla genel popülasyonda görülür. Hem mesleki hem de meslek dışında kronik olarak pestisitlere maruz kalmış olabilecek kişileri belirlemek kolaydır. Bununla birlikte, toksikolojik kanıtlar ve maruz kalmanın nicel verilerini elde etmek için, özellikle tarımda maruziyetin kaynağını belirlemek nispeten zordur. Ayrıca belirli bir pestisit risklerini belirlemek ve belirli bir pestisite geçmişte maruz kalmayı değerlendirmek de zordur. Çünkü etkin maddeler ve uygulamalar gün geçtikçe farklılaşmakta ve değişmektedir. Bu, özellikle maruziyet ve biyolojik izleme verilerinin az olduğu genel nüfus için geçerlidir. Pestisitlerde bireylerde saptanan kronik etkilenim sonuçları; kanser, doğum anormallikleri (teratojenik), kronik nörotoksik etkiler ve üreme-fertilite üzerindeki olumsuz etkiler olarak sıralanabilir (Güler ve Çobanoğlu, 1997).

Karsinojenite: Pestisitlerin kanserojenliği, bileşik tescil edilip piyasaya arz edilmeden önce deney hayvanları çalışmaları ile değerlendirilir. Ancak bu sadece son 30-35 yılda piyasaya sürülen veya değerlendirilen aktif maddeler için geçerlidir. Bu çalışmaların sonuçları, üreticilerin tescilli verileri oldukları ve genellikle kamuya açık literatürlerde yayınlanmadıkları için yalnızca düzenleyici makamlar tarafından kullanılabilir. Pestisitlerin kanser riski değerlendirmesi genellikle sıçanlarda ve farelerde yapılan kanser çalışmalarından elde edilen kanıtlara dayanmaktadır, ancak yakın zamanda yapılan bir inceleme, farelerde yapılan karsinojenite çalışmalarının, insanlar için kanserojen risk hakkında sonuçlar çıkarmak için yeterli bilgi sağlamadığını göstermiştir (Doe ve ark., 2006). Ayrıca *in vitro* ve *in vivo* genotoksisite

alışmalarından elde edilen bulgular da dikkate alınmaktadır. Maruziyetten on yıllar sonra kanserojen etkiler ortaya çıkabileceğinden, kanserojen potansiyeli değerlendirirken epidemiyolojik veriler de dikkate alınır. Bu kapsamda Uluslararası Kanseri Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından birçok pestisit değerlendirilmiştir. IARC değerlendirmesi amacıyla bileşikleri seçmek için kullanılan kriterler; insan maruziyetinin kanıtını, bazı deneysel genetik kanıtları ve insanlar için bir risk olduğuna dair kanıtları veya şüpheleri içerir. Bugüne kadar, IARC tarafından yayınlanan liste, çoğu artık yaygın olarak kullanılmayan yaklaşık 60 aktif pestisit bileşeni içermektedir. Halihazırda piyasada bulunan ürünlerde kullanımı oldukça kısıtlı olan etilen dibromid, 2A (insanlar için kanserojen olduğundan şüphelenilen) olarak sınıflandırılmaktadır. Amitrol ve diklorvos ise 2B (olası insan kanserojenleri) olarak sınıflandırılır (European Food Safety Authority, 2006).

Tarım işçilerinde kanserin epidemiyolojisi oldukça karmaşık bir konudur. Pestisitler, kanser ve epidemiyoloji terimleri ile ilgili literatür araştırmalarında çok sayıda yayın ortaya çıkmıştır, ancak epidemiyolojik çalışmaların gerçek sonuçları tutarsızdır ve tarımsal maruziyetle ilgili olarak kanser epidemiyolojisinin net bir resmi henüz çizilmemiştir. Tarımdaki kanserojen tehlikeler, çok çeşitli maddelere ve risk faktörlerine bağlı olabilir. Çünkü iftiler; zoonotik virüsler, mikroplar, mantarlar, pestisitler, tozlar, yağlar, yakıtlar, boyalar, çözücüler ve kaynak dumanları dahil olmak üzere çeşitli maddelerle temas halindedirler (Alavanja ve ark., 2005 ve Alexander ve ark., 2005).

Kuzey Carolina'da pestisit kullanan çiftçiler üzerinde yapılan ileriye dönük bir kohort çalışması, muhtemelen genel sigara içimi ve diğer yaşam tarzı faktörlerine bağlı olarak düşük bir kanser insidansı göstermektedir. Bu veriler, literatürle uyumlu olarak, tarım işçilerinin genel nüfustan daha sağlıklı olduğunu, genel ölüm oranı ve beklenenden daha az toplam kanser ölüm oranına sahip olduğunu göstermektedir. Literatürle tutarlı olan bu veriler, tarım işçilerinin genel nüfusa göre daha sağlıklı olduğunu, genel ölüm oranı ve beklenenden daha az toplam kanser ölüm oranına sahip olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, lösemi, miyelom, Hodgkin dışı lenfoma, dudak kanseri, mide kanseri, cilt kanseri, beyin kanseri ve prostat kanseri gibi belirli

neoplazmalarda daha yüksek bir insidansa sahip oldukları görülmektedir (Alavanja ve ark., 2005 ve Alexander ve ark., 2005). Bu verilere ışığında, bazı endişe verici konular daha fazla araştırmayı gerektirse de pestisitlere kronik maruz kalmanın insanlarda kansere neden olduğuna dair yeterli kanıt olmadığı sonucuna varılabilir.

Kronik nörotoksisite: Pestisitlere maruz kalma, merkezi sinir sistemi hastalığı (Parkinson hastalığı), nörodavranışsal değişiklikler, periferik sinir sistemi hastalığı ve intihar dahil olmak üzere çeşitli nörolojik hastalıklarla ilişkilidir. Parkinson hastalığı ve pestisit maruziyeti ile ilgili çalışmalar 31 vaka kontrol çalışmasını içermektedir (Li ve ark., 2005). Bununla birlikte, bu çalışmalarda pestisitlere maruz kalma değerlendirmeleri büyük farklılıklar göstermiştir.

Gerçekte, çalışmaların %20'si pestisitleri yalnızca tek bir değişken olarak değerlendirirken, %25'i pestisit maruziyetinin süresini ve sıklığını, %33'ü ise hem pestisit türünü hem de süre/sıklık temasını dikkate almıştır. Bu çalışmaların sonucunda, pestisit maruziyeti ile parkinson hastalığı arasında varsa çok zayıf bir ilişki olduğu görülmektedir.

Çoğu çalışma, maruziyetten önemli ölçüde etkilenen bir veya daha fazla parametre tanımlamıştır. Bununla birlikte, çalışmaların sonuçları arasında tutarsızlık mevcuttur, bildirilen değişiklikler genellikle hafif düzeyde seyretmiş ve net bir sendrom tanımlanamamıştır. Vakalar, maruziyet sona erdikten çok sonra gözlemlendiğinden, bazen geri döndürülebilir, bazen geri döndürülemez değişiklikler bildirilmiştir. Bu olguların önemi, eğer gerçeklerse, belirsizliğini korumaktadır (Colosio ve ark., 2003 ve Lotti ve Moretto, 2005).

Doğurganlık ve üreme üzerindeki olumsuz etkiler: Pestisitlere maruz kalma nedeniyle hem erkekte hem de kadında üreme sistemi üzerinde etkiler meydana gelebilir. Maruz kalma, erkek ve kadın doğurganlığını ve cinsel işlevi etkileyebilir (International Labour Organization, 2011). Yapılan çalışmalarda tarımda nematisit olarak yararlanılan 1,2-dibromo-3-kloropropan (DBCP) ve etilen dibromürün (EDB)

sperm yokluğu (azospermi) ve sperm sayısı düşüklüğüne (oligospermi) neden olduğu tespit edilmiştir (Tekbaş, 2010).

Doğum defektleri: Pestisitler embriyotoksik veya fetotoksik olabilir. Bu durumda, gebeliğin ilk üç ayında pestisit maruziyeti doğum kusurları riskini daha da artırır (T.C. Milli Eğitim Bakanlığı, 2012). Örneğin, tarım işçisi kadınlarda doğum kusurları ve uzuvları kusurlu fetüslerin oranı genel nüfusa göre daha yüksektir (Tekbaş, 2010).

Çocuklar üzerindeki etkileri: Çocuklar, özellikle doğum sonrası ilk 6-12 ay boyunca, gelişmemiş metabolizmaları ve detoksifiye etme kapasiteleri nedeniyle pestisit maruziyetinin toksik etkileri için daha büyük risk altındadır. Bununla birlikte, toksik metabolitleri aktive eden metabolik yollar henüz geliştirilmediği için, pestisitler değil de metabolitlerin kendileri toksik ise, çocuklardaki bu olgunlaşmamış metabolizma faydalı olabilir (Tekbaş, 2010).

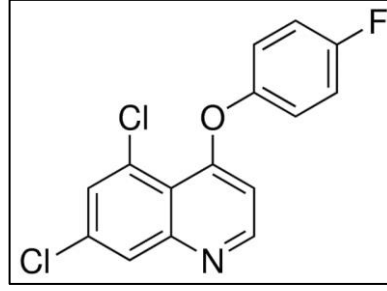
1.6. Tez Kapsamında Kullanılacak Pestisitler Hakkında Bilgiler

1.6.1. Kinoksifen

Kinoksifen (QUI) (Şekil 1.1) kinolon sınıfına ait bir fungusittir (Çizelge 1.3). Bitki çimlenmesine müdahale ederek külleme hastalıkları ile savaşan koruyucu bir fungusittir (Cabras ve Angioni, 2000). Biyokimyasal etki mekanizması bilinmemekle birlikte, QUI diğer tahıl fungusitleri gibi etki göstermez. Geniş bir ürün yelpazesinde küf enfeksiyonunun erken gelişim aşamalarını inhibe eden sistemik bir koruyucudur ve tek bir erken sezon spreyi ile yıl boyunca koruma sağlar (Hollomon ve ark., 1997).

Çizelge 1.3. QUI'nin kimyasal özellikleri

KİMYASAL FORMÜLÜ	C ₁₅ H ₈ Cl ₂ FNO
IUPAC ADI	(5,7-Dikloro-4-kinolil) (4-florofenil) eter
MOLEKÜL AĞIRLIĞI	308.13 g mol ⁻¹



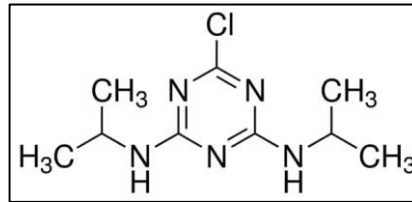
Şekil 1.1. QUT'nin kimyasal yapısı

1.6.2. Propazin

Propazin (PRO) (Şekil 1.2), tatlı sorgum tarlalarında geniş yapraklı yabancı otları ve yıllık otları kontrol etmek için kullanılan bir triazin herbisitidir (Çizelge 1.4). PRO, genellikle toprağa uygulanan, yaprak ve köklerden emilen ve hedeflenen bitkide fotosentezi engelleyerek etki eden sistemik bir herbisittir. Çok yıllık otları ve geniş yapraklı yabancı otları kontrol altında tutmak için, bu yabancı otlar ortaya çıkmadan önce veya yabancı otların sökülmesinden sonra seçici bir herbisit olarak kullanılır. PRO, oral (Kategori IV), dermal (Kategori IV) ve inhalasyon (Kategori III) maruziyet yolları yoluyla düşük bir akut toksisiteye sahiptir. Göz veya cilt tahriş edici veya dermal hassaslaştırıcı etkileri yoktur. Subkronik gelişimsel bir çalışmada, Gebe sıçanların PRO'ya maruz kalmasını takiben fetal sıçanlarda kırılmalı veya eksik kemik oluşumu ya da ossifikasyon (istenmeyen kemikleşme) gözlemlendi (National Center for Biotechnology Information, 2022).

Çizelge 1.4. PRO'nun kimyasal özellikleri

KİMYASAL FORMÜLÜ	C ₉ H ₁₆ ClN ₅
IUPAC ADI	6-kloro-2-N,4-N-di(propan-2-il)-1,3,5-triazin-2,4-diamin
MOLEKÜL AĞIRLIĞI	229.71 g mol ⁻¹

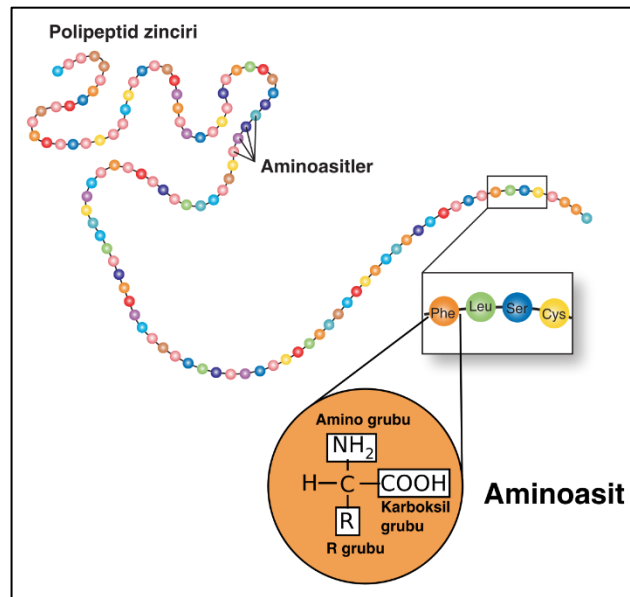


Şekil 1.2. PRO'nun kimyasal yapısı

1.7. Proteinler

Proteinler (Şekil 1.3) 20 amino asit biriminden oluşan yüksek moleküler ağırlıklı polimerlerdir ve temel katalitik özelliklerine ek olarak canlı organizmalarda meydana gelen yapısal destek, taşıma, depolama, sinyal aktarımı ve savunma gibi görevlerde yer alırlar. Dikkate değer özellikler arasında, hücrenin yirmi amino asidi çeşitli kombinasyonlarda ve dizilerde bir araya getirerek değişik özellik ve etkinlikte proteinler üretme yeteneği vardır. Bu yapı taşlarıyla çeşitli taşıyıcılar, enzimler, hormonlar, organizmalar, antikorlar, kas lifleri, süt proteinleri, antibiyotikler, fungusitler ve pek çok başka biyolojik etkinlik içeren ürünler elde edilir (Nelson ve Cox, 2004).

Amino asit molekülü; bir amino grubu, bir karboksilik asit ve bir R grubunun aynı karbon atomuna (α -karbon) bağlanmasıyla meydana gelir. R grupları; yapı, boyut, elektriksel yük ve suda çözünürlük bakımından farklılık gösterirler. Bu nedenle amino asitler, bu gruplara göre değişik özelliklere sahip aromatik, alifatik, bazik, asidik, kükürt ve amit içeren olarak sınıflandırılır. İki amino asit grubu aralarında peptit bağı oluşturup bir su molekülünü kaybederek birleşebilir. Proteinlerin üç boyutlu yapısı ve biyolojik özellikleri, büyük ölçüde ilgili amino asitlerin doğası ve dizisi tarafından belirlenir. Tüm proteinler genlerce belirlenen benzersiz amino asit serisi içermektedir (Nelson ve Cox, 2004).



Şekil 1.3. Protein yapısı

1.7.1. Serum Albümini

Albümin; suda çözünür bir proteini ya da protein grubunu belirtmek için kullanılan sözcüktür. Albümine yaygın olarak plazma albümini ya da serum albümini (Şekil 1.4) denir. İnsanlarda ve diğer memelilerde en çok bulunan plazma proteindir. Serum albümini, mükemmel geri dönüşümlü bağlanma özelliklerine, ligandlar için yüksek afiniteye sahiptir ve serumda çözünmeden hareket eden yağ asitlerinin ana taşıyıcısıdır. Ayrıca farklı metabolitleri, ilaçları ve hormonları taşıyabilen ve bunların vücutta dağılımında önemli bir rol oynayan bir proteindir (Novo ve Al-Soufi, 2007).



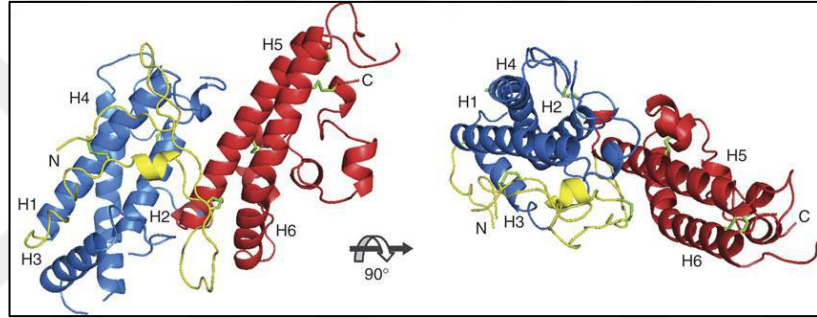
Şekil 1.4. Plazma albümin proteinin üç boyutlu hali

Birçok bilim insanı, farklı ligandlar ve moleküller ile etkileşimlerini anlamak için plazma albüminin yapısını, özelliklerini ve fonksiyonlarını aydınlatmak amacıyla deneyler yapmıştır. Sığır serum albümin (BSA), insan serum albümin (HSA), sıçan serum albümin (RSA) ve at serum albümin (ESA) bu çalışmalarda sıkça ele alınan albüminlerdedir. Metal iyonları, yağ asitleri, ilaç molekülleri ve boyalar kullanılarak bu albüminler araştırılmıştır. Örnek protein olarak plazma albümini, uzun yıllardır fizyolojik çalışmalar için kullanılmaktadır (Behrens ve ark., 1975).

Serum albümini, yaklaşık 280 nm'lik bir uyarma dalga boyuna sahiptir, bu durum Trp ve Tyr uçlarından kaynaklanmaktadır. Floresans maksimumları sırasıyla 340 nm ve 300 nm'dedir. Plazma albüminlerine bağlanabilen küçük bir molekül, bu Trp uçlarında veya yakınında bulunur. Bu sayede triptofan uçların floresansını söndürebilmektedir. Floresans, albümin protein çalışmalarını netleştirmek ve farklı maddelerle etkileşimleri araştırmak için önemli bir yöntemdir (Bi ve ark., 2008).

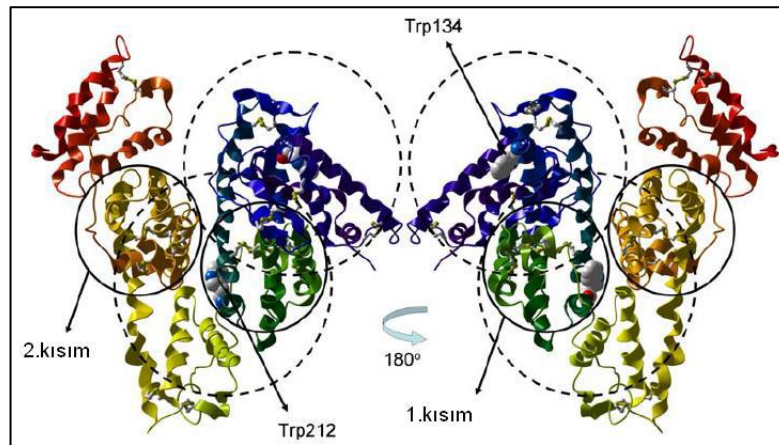
1.7.1.1. Sığır serum/plazma albümini (BSA)

BSA (Şekil 1.5), temel bir amino asit yapısına sahip olup büyük (66400 Da), dairesel bir proteindir. Karakterizasyonu ve fiziksel özellikleri iyi bilinen bir proteindir. BSA, 582 amino asitten oluşan tek zincirli bir proteindir. Bu protein yapısı, farklı üç lineer etki bölgesinden oluşur (domain I-II-III). Bu etki bölgeleri de dokuz sarmaldan meydana gelmekte ve sarmallar arasında on yedi disülfid bağı aracılığıyla köprü oluşmaktadır. Tüm etki bölgelerinde büyük-küçük-büyük üçlü döngülerle bir zincir oluşmaktadır. Tüm etki bölgeleri ayrıca A ve B olarak gösterilen iki alt etki bölgesi olan subdomain A ve subdomain B'den oluşur (Hebia ve ark., 2014).



Şekil 1.5. Serum plazma proteininin alt etki bölgelerinin 3 boyutlu hali

BSA iki triptofan içermektedir. Bunlar; triptofan 212 ve triptofan 134'tür (trp-212 ve trp-134) (Şekil 1.6) (Togashi ve ark., 2010).



Şekil 1.6. BSA bileşiğindeki triptofan bölgelerinin yapısı (Togashi ve ark., 2010)

Trp-134, birinci etki alanının (domain I) sekizinci sarmalında yer alır ve trp-212, ikinci etki alanının (domain II) ikinci sarmalında bulunur (Sun et al. 2005). Proteinin hidrofobik boşluğunda Trp-212 bulunurken, molekülün yüzeyinde Trp-134 bulunmaktadır (Hebia ve ark., 2014). BSA floresansı esas olarak birinci ve ikinci etki bölgelerinde triptofan alanlarının hidrofobik boşluklarında meydana gelir (Ojha ve Das, 2010). BSA'nın üç etki bölgesini (domain I-II-III) birbirleriyle karşılaştırsak, I. ve II. etki alanları arasında %25, I. ve III. etki alanları arasında %18 en son da II. ve III. etki alanları arasında %21 oranında benzeşme olduğu gösterilmiştir (Kragh-Hansen, 1981).

BSA ligandlarının bağlanmasına ilişkin çalışmalar, moleküllerin esas olarak BSA proteininin birincil (primer) bağlanma bölgelerinden alt etki bölgesi olan IIA ve IIIA alt etki alanlarında yer aldığını göstermiştir. Bilirubin, yağ asitleri ve triptofan gibi birçok ligand tercih olarak IIIA ve IIA alanlarıyla etkileşime girer (He ve Carter, 1992). Bağlanma bölgesi I öncelikle hidrofobik etkileşimler için afinite sergilerken, bağlanma bölgesi II ayrıca hidrojen bağı, hidrofobik, ve elektrostatik etkileşimler için de afinite gösterir (Jisha ve ark., 2006).

BSA; bağlanma, iletişim gerçekleştirme, yağ asitlerini, bilirubini ve steroidleri vb. dolaşıma kazandırma gibi pek çok işlevi yerine getirir. Pek çok ilacın özellikle plazma albüminine bağlandığı bilinir. İlaçların etkinliği, BSA proteinine bağlanma yeteneğiyle ilişkilidir. İlaçların BSA'ya bağlanarak yapısal özelliklerinin aydınlatılması ve terapötik etkinliklerinin belirlenmesi için önemli araştırma alanlarında (klinik tıp, yaşam bilimleri, kimya vb.) birçok çalışma yapılmıştır (Ashoka ve ark., 2006).

Bu tez çalışması kapsamında, PRO ile QUI ve BSA arasında olan etkileşimler, UV-görünür bölge spektroskopisi yöntemi ve floresans spektroskopisi ile incelenmiştir. Stern-Volmer denklemi yardımıyla değişik sıcaklıklarda bağlanma bölgesi sayıları ve bağlanma sabitleri, floresans sönüm mekanizmaları belirlenmiştir. Bağlanma türünü belirlemek amacıyla farklı sıcaklıklarda yapılan deneysel araştırmalardan ulaşılan verilerden termodinamik parametreler olan ΔS , ΔH , ΔG hesaplanmış ve enerji kinetiği

açıklanmıştır. Ayrıca PRO/BSA ve QUI/BSA etkileşimlerine ilişkin gözlemler, bir bilgisayar programı kullanılarak moleküler kenetlenme sonuçları ile desteklenmiştir. Bu çalışma ile, etkileşimler sonucunda gerçekleşen değişimlerin aydınlatılması, pestisitlerin insan sağlığına olan etkilerinin anlaşılması açısından önem arz etmektedir.



2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Tez çalışmasında kullanılan protein ve pestisitler

Tez çalışmaları kapsamında protein olarak BSA, pestisit olarak PRO ve QUI kullanılmıştır. Bu proteinin ve pestisit hammaddelerinin kısaltmaları, molekül ağırlıkları, çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler ve temin edildiği firmalar Çizelge 2.1’ de listelenmiştir.

Çizelge 2.1. Tez kapsamında kullanılan pestisitler

Proteinlerin ve ilaçların isimleri	Kısaltma	Molekül ağırlığı (g mol ⁻¹)	FİRMA
Sığır plazma albümin proteini	BSA	66430,3	Sigma-Aldrich
Propazin	PRO	229,71	Dr. Ehrenstorfer GmbH
Kinoksifen	QUI	308,14	Dr. Ehrenstorfer GmbH
Sodyum dihidrojen fosfat	NaH ₂ PO ₄	119,98	Sigma-Aldrich
Disodyum hidrojen fosfat	Na ₂ HPO ₄	141,96	Sigma-Aldrich
Sodyum klorür	NaCl	58,44	Sigma-Aldrich
Metanol	MeOH	32,04	Merck

2.1.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

Tez çalışmalarında kullanılan araç ve gereçler aşağıda listelenmiştir.

- Agilent marka Cary 60 model UV/Vis spektrofotometre
- Agilent marka Cary Eclipse model floresans spektrofotometre
- Elektronik hassas terazi: Mettler ML204/01
- pH metre: Hanna HI 2020 Edge ve kombine elektrot sistemi (cam elektrot-referans elektrot)
- Vortex
- Ultrasonik su banyosu (Nüve, Türkiye)
- Mikro hacimli otomatik pipetler (Axygen, İnterlab, Türkiye)
- Farklı hacimlere sahip deney tüpleri, balon jojeler ve sarf malzemeler

2.1.2. Floresans Analizleri

Protein-pestisit etkileşim çalışmasının ilk aşamasında fosfat tamponunda 3 μM 'lık stok BSA çözeltisi ve metanol içerisinde 3000 μM 'lık PRO ve QUI çözeltileri hazırlanmıştır. BSA protein solüsyonunun hazırlanması esnasında BSA'nın molekül ağırlığı 66430,3 g mol⁻¹ şeklinde belirtilmiştir (Jang ve ark., 2009). Protein ve pestisit stok çözeltileri kullanılarak sabit BSA konsantrasyonu ve artan pestisit konsantrasyonlarının olduğu protein-pestisit karışımları hazırlanmıştır. Protein-pestisit etkileşim çalışmalarını yürütmek amacıyla hazırlanan çözeltilerdeki BSA konsantrasyonu 3 μM olarak sabit tutulurken, pestisit konsantrasyonları BSA-PRO sistemi için 3 μM - 300 μM aralığında ve BSA-QUI sistemi için 10 μM - 150 μM aralığında değiştirilmiştir.

Yapılan protein-pestisit çözeltilerinin absorpsiyon ve emisyon spektrumları 15°C, 25°C ve 35°C'de elde edilmiştir. Çözeltilerin absorpsiyon spektrumlarını ölçmek amacıyla sıcaklık kontrol ünitesi Varian Cary 5000 model UV/Vis/NIR spektrofotometre aygıtı kullanılırken, emisyon spektrumlarını değerlendirmek amacıyla ise Peltier modüllü Varian Cary Eclipse model floresans spektrofotometre cihazları kullanılmıştır. Ölçümlerin tamamı 1,0 cm'lik kuartz hücreler kullanılarak yapılmıştır. Floresan spektrofotometre cihazındaki ölçümler sırasında uyarma ve emisyon yarık (slit) genişliği 5,0 nm'ye, uyarma dalga boyu 280 nm'ye ve emisyon dalga boyu aralığı da 285-500 nm olarak ayarlandı. Emisyon ve absorpsiyon spektrumları ölçülmeden önce sıcaklık kontrol ünitesinden sıcaklık ayarı yapılmış ve her bir numunenin ısı dengeye ulaşması amacıyla cihazın numune odasında 10 dakika bekletilmiştir. Ardından çözeltilerin emisyon ve absorpsiyon spektrumları kaydedilmiştir.

3 μM BSA'nın absorpsiyon spektrumları ($\lambda = 285\text{--}500\text{ nm}$) ve artan PRO konsantrasyonları (3 μM - 300 μM) ve artan QUI konsantrasyonlarında (10 μM - 150 μM) 25°C'de floresans verilerinin iç filtre etkisi düzeltilmesi için kayıt edilmiştir.

2.1.3. Moleküler Kenetlenme Analizleri

PRO-BSA sistemi ve QUI-BSA sisteminin bağlanma yapısı, moleküler kenetlenme simülasyonu kullanılarak ayrı ayrı incelenmiş ve analiz edilmiştir. PRO ve QUI'nin kimyasal yapıları Chemscketch'te oluşturulmuştur. Daha sonra bunların 3-D yapıları Avogadro'da, güncelleme başına 15 adım ve en dik iniş algoritması ile MMFF94 kuvvet alanı kullanılarak optimize edilmiştir. BSA'nın kristal yapısı (PDB ID: 4F5S) Protein Data Bank'tan (PDB) seçilmiş ve AutoDock4'te hazırlanmıştır. BSA'nın hazırlanması, kristalize suyun çıkarılması, polar hidrojenlerin eklenmesi ve Kollman yüklerinin hesaplanmasını içermektedir. Her bir herbisit için BSA'nın bağlanma bölgesi I ve II'de kenetlenme simülasyonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kenetlenme simülasyonu, Grid Box'ta 70×70×70 noktası ve 0,375Å boyutları bölge I (x = -4,49, y = 32,71 ve z = 100,41) ve bölge II (x =10,04, y =18,22 ve z =122,13)'de ortalananarak yapılmıştır. Tüm kenetlenme prosedürleri, 100 genetik algoritma çalıştırması, 150 popülasyon büyüklüğü, maksimum 250.000 enerji değerlendirmesi ve maksimum 27.000 nesil içeren aynı arama parametrelerine sahip Lamarckian genetik algoritması kullanılarak gerçekleştirildi.

2.2. Yöntem

2.2.1. Floresans Yöntemler ve Uygulamaları

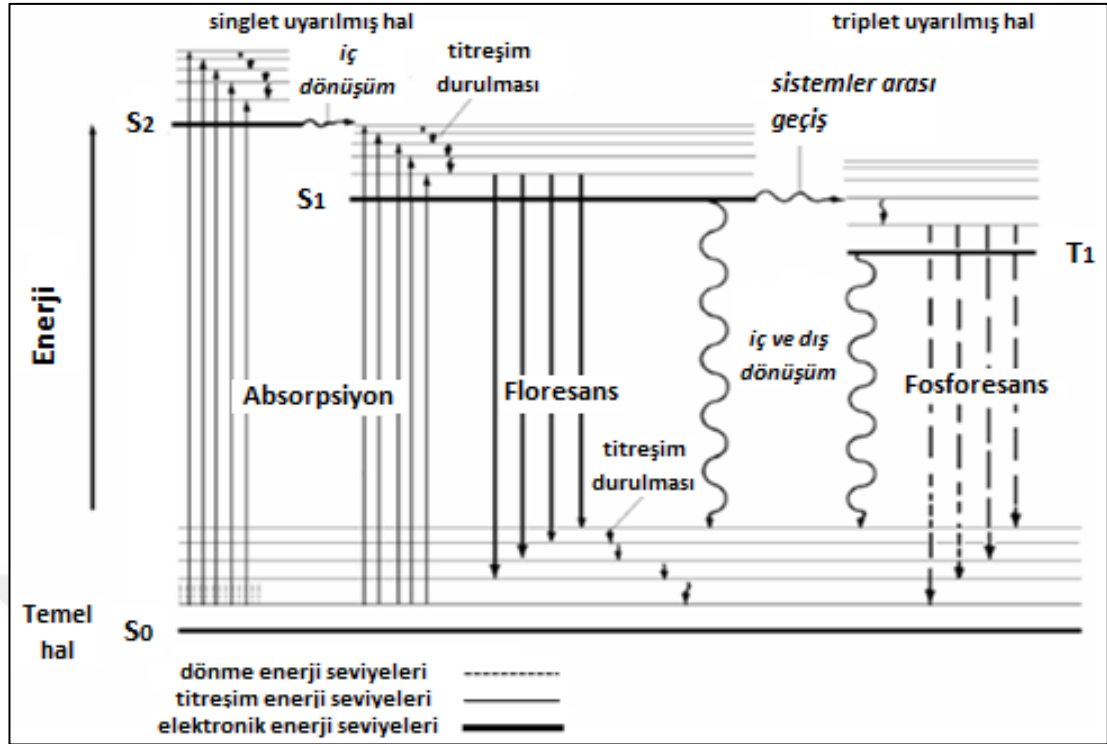
Madde ve ışık arasında gerçekleşen etkileşimini inceleyen bilim dalına spektroskopî denir. Floresans spektroskopisi ise, bilhassa biyofiziksel ve biyokimyasal araştırmalarda kullanılmakta olan oldukça duyarlı ve seçici bir analitik yöntem olup spektroskopinin bir alt alanıdır. İncelenmekte olan molekül floresans emisyonu yapıyorsa (bir florofor) molekülün yoğunluğu floresan yoğunluğundan hesaplanabilmektedir (Soylu, 2013).

Protein-ligand etkileşimlerinin bağlanma özelliklerini incelemek için floresans spektroskopisi, UV-Vis alan absorpsiyon spektroskopisi, 3D floresans spektroskopisi, moleküler docking, FRET ve FTIR, sirkular dikroizm (CD) gibi teknikler kullanılır (Zhang ve ark., 2009 ve Li ve Li, 2016).

Bu yöntemin üstünlükleri içinde çevresel değişikliklere karşı yüksek hassasiyet, kolaylık ve protein-ligand etkileşimlerinin kalitatif ve kantitatif ayrımı yer alır. Esas olarak floresans spektroskopisi florofor ortamındaki değişiklikleri bulan prob tabanlı bir yöntemdir. Protein ve ligand benzeri yapıların bağlanmasını incelemek amacıyla kullanılan bir teknik olan floresan spektroskopisi, bağlanma bölgelerinin sayısı, termodinamik ve etkileşim parametreleri, yapılar arasındaki bağlanma mekanizması hakkında bilgi sağlar (Bhattacharyya ve ark., 2010).

Lüminesans, kararlı durumdaki bir atom veya molekülün bazı dış faktörler tarafından uyarılmasından sonra gözlenen ışın emisyonuna dayanan; floresans, fosforesans ve kemolüminesans yöntemlerinin yaygın adlarıdır. Uyarılan atom ya da moleküller kararsız olup aşırı enerjilerinin tamamını ya da bir bölümünü ışın halinde kaybederek sistemden ışın yayılması (ışık emisyonu) ile temel duruma geri döner. *Fotolüminesans* şeklinde isimlendirilen *floresans* ve *fosforesans*, optik uyarılma ardından sistemden gözlemlenen ışımların yaygın adlandırmasıdır. Floresans yöntemleri, absorpsiyon yöntemlerinden daha duyarlı ve bilgilendiricidir, bu nedenle analitlerin yapısının nicel ve nitel analizi için yaygın olarak kullanılır. Bir lüminesans türü olan kemolüminesans ise, kimyasal bir reaksiyon sonucunda uyarılmış türlerin emisyonudur (Lakowicz, 2006).

Fotolüminesans ve kemilüminesans yoğunluk ölçümleri, az miktarda inorganik ve organik türlerin miktarının belirlenmesini sağlar. Bu yöntemlerin tespit limitleri tipik olarak absorpsiyon spektroskopisinden binlerce kat daha hassastır. Floresan spektroskopisi, geniş bir doğrusal çalışma aralığına sahip birçok bileşiği analiz edebilir. Bu durum kantitatif analiz için çok önemlidir (Skoog ve ark., 2013).



Şekil 2.1. Jablonski diyagramı

Jablonski diyagramının (Şekil 2.1) gösterdiği şekilde, uyarılan molekül aşırı enerjiyi ışıma olarak veya ışıma olmadan farklı şekillerde serbest bırakabilir. En alttaki koyu çizgi singlet olup S₀ ile gösterilmiştir ve molekülün temel hal enerjisini temsil etmektedir. Üstte bulunan koyu çizgiler, uyarılmış üç elektronik durumun ana titreşim durumlarının enerji düzeylerini temsil eder. S₁ ve S₂ uyarılmış singlet hal, T₁ ise uyarılmış triplet haldir. Genellikle birinci uyarılmış triplet halin enerjisi, karşılık gelen singlet halin enerjisinden daha düşüktür. S₀ seviyesinde bulunan molekül ışık absorplayınca uyarılmış singlet halin (S₁ ve S₂) farklı daha düşük titreşim seviyelerine geçebilir. Bununla birlikte direk triplet hale uyarılma gerçekleşmez. Singlet-triplet geçişlerinin olasılığı oldukça düşüktür ve bu tür düşük olasılıklı geçişlere yasak geçişler denir (Skoog ve ark., 2013).

Molekülün elektronik enerji seviyeleri, titreşim enerji seviyelerinin üst üste binmesine yetecek kadar yakın olduğunda, uyarılmış iki singlet enerji seviyesinin gösterdiği bir iç dönüşüm olayı oluşur ve fazla enerji ısı olarak dağılır. Uyarılmış singlet tipi molekül, yine ışımasız şekilde daha düşük enerjili triplet tipi uyarılmış bir moleküle dönüşebilir. Çok olası olmayan ve bu nedenle yavaş bir şekilde meydana

gelen bu olayda üst orbitaldeki elektronun spini ters çevrilir. Bu duruma sistemler arası geçiş denir (Lakowicz, 2006).

Floresans; molekülün uyarılmış singlet durumdan temel singlet duruma geçişi esnasında yaydığı ışına denmektedir. Fosforesans ise; molekülün uyarılmış triplet halden temel singlet hale geçiş esnasında yaydığı ışına denmektedir. Fosforesans ve floresans arasındaki fark; fosforesansta ışımaya neden olan elektronik enerji geçişinde elektron spini değişmesi, floresansta elektron spinlerinin yönü değişmemesidir. Tripletten singlete geçişin ortalama hızı, buna karşılık gelen singlet-singlet geçişin ortalama hızından daha yavaştır. Sonuçta, uyarılmış durumun ömrü floresansta çok kısa olup 10^{-5} s civarındadır. Öte yandan fosforesansta, uyarılmış durumun ömrü, elektronların spin değişimi nedeniyle saniyeler veya dakikalar aralığında olabilir (Skoog ve ark., 2013).

Stokes kayması; floresan veya fosforesans ardından bazı moleküllerin rezonans çizgisinden daha uzun dalga boylarına veya daha düşük enerjilere geçebilmesidir (Skoog ve ark., 2013).

2.2.1.1. Floresans sönümlenme ve Stern-Volmer denklemi

Floresans sönümlenme (quenching) tanımı, ışımsal olmayan enerjinin uyarılmış moleküllerden ortamdaki diğer türlere aktarılması şeklinde adlandırılır (Skoog ve ark., 2013) ve enerji aktarımı, uyarılmış hal tepkimeleri, temel hal kompleks oluşumu ve çarpışma gibi farklı işlemler nedeniyle floroforun kuantum veriminde azalmaya sebebiyet verir. Başka bir söyleyişle, floresans söndürme, söndürücü olarak adlandırılan bir maddenin çözeltideki bir floresan özellikli yapıya (florofor) eklendiği ve floresans yoğunluğunun azalması sonucu olan bir olgudur (Shi ve ark., 2010 ve Silva ve ark., 2004).

Floresans sönümlenmesi dinamik ve statik olmak üzere iki mekanizma ile açıklanır. Dinamik sönümlenme veya farklı bir adlandırma ile çarpışmalı sönümün

kaynağı florofor ve söndürücü arasındaki çarpışmalardır (Silva ve ark., 2004). Bu durumun olması florofor ile söndürücünün direkt teması ile mümkündür. Dinamik sönümleme hızı, çarpışan türlerin difüzyon oranlarıyla alakalıdır. Bu oran sıcak ve viskoziteyle ilişkilidir. Statik sönümleme, söndürücü molekülün ve floroforun temel durumda karmaşık bir yapı oluşturduğunu ortaya koymaktadır (Skoog ve ark., 2013). İki teknikte de floroforlar ve söndürücüler arasındaki moleküler etkileşimler için floresans söndürme özellikle gereklidir.

Dinamik ve statik sönümleme, sıcaklığa bağlı farklı tutumları ile ayırt edilebilir. Dinamik sönümlemede, sıcaklık ne kadar yüksek olursa, difüzyon o kadar hızlı ve sönüm o kadar iyi olur. Moleküller arası temas ve çarpışma olasılığı da artan sıcaklıkla arttığından, dinamik sönüm sabiti yükselen ısı ile artar. Ancak, statik sönümleme durumunda, yüksek sıcaklık kompleksin kararlılığını azalttığından, bunun tersi bir etki gözlenir (Zhang ve ark., 2012).

Söndürücüyle florofor arasında olan söndürme işleyişi, aşağıda bulunan Stern-Volmer denklemiyle araştırılır.

$$F_0/F = 1 + K_{SV} [Q] = 1 + K_q \tau_0 [Q] \quad (2.1)$$

F_0 ve F , sırasıyla söndürücü yokluğunda ve varlığında floresans yoğunluğudur. $[Q]$, söndürücünün konsantrasyonu. K_q , biyomoleküle ait sönümleme hız sabiti, K_{SV} , Stern-Volmer sönümleme sabiti ve τ_0 , ortamda söndürücü bulunmuyorken biyomolekülün yaklaşık yaşam süresidir (Lakowicz, 2006). Bu hususta sönümlemenin meydana geldiği mekanizmanın anlaşılması, çeşitli sıcaklıklarda floresans ölçümlerine dayanmaktadır. Farklı sıcaklıklarda florofor ve söndürücü arasındaki bağlanma sabiti (K_f) ve bağlanma birimlerinin sayısı (n). Stern-Volmer formülünün ikame edilmesiyle oluşturulan çift logaritmik formülde elde edilebilir.

$$\log (F_0-F)/F = \log K_f + n \log [Q] \quad (2.2)$$

2.2.1.2. Termodinamik etkileşimler ve bağlanma parametreleri

Bazı termodinamik etkileşimlere bağlı olarak, protein-ligand teması esnasında değişik bağlanma türleri meydana gelir (Li ve Yang, 2015). Van der Waals kuvvetleri, hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler ve elektrostatik etkileşimler küçük moleküller ve biyomoleküller arasında bulunan dört farklı non-kovalent bağ türüdür. Farklı ısı araştırmalarından bulunan termodinamik değişkenlerin ΔG (serbest enerji), ΔS (entropi değişimi), ΔH (entalpi değişimi) büyüklükleri ve işaretleri etkileşim türlerini belirlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu, ΔH ve ΔS bağlanma kuvveti arasında bulunan kanıt olarak alınabilir. Şayet ısıda mühim bir değişime olmuyorsa, ΔH 'ın sabit olduğu varsayılabilir, ardından aşağıdaki van't Hoff denkleminde ΔH ve ΔS elde edilebilir.

$$\log K = -\Delta H / 2,303RT + \Delta S / 2,303R \quad (2.3)$$

ΔH ve ΔS parametreleri $1/T$ değerlerine karşılık gelen $\log K_f$ değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle bulunur. Öte yandan, farklı sıcaklık değerleri için ΔG değeri, ΔS ve ΔH değerleri belirlendikten sonra aşağıdaki denklemden hesaplanır.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln K \quad (2.4)$$

Ortaya çıkan termodinamik değişkenlerin büyüklüğü ve işareti, etkileşimin çeşidi konusunda fikir sağlar. $\Delta G < 0$ olduğunda reaksiyonun kendiliğinden gerçekleştiğini, $\Delta H < 0$ durumu tepkimenin ısı veren (ekzotermik) olduğunu işaret etmektedir. Negatif değerli ΔS ve ΔH , florofor ve söndürücü arasındaki etkileşimde hidrojen bağı ile van der Waals kuvvetlerinin baskın faktörler olduğunu gösterir. $\Delta S > 0$, hidrofobik bir etkileşimi gösterir (Lakowicz, 2006).

2.2.1.3. Floresan maddeler ve işaretleme tekniği

Proteinler, canlı hücrelerde amino asitler ve peptitler gibi biyomoleküllerin izlenebilmesi için belirli sensörlerle işaretlenmesi gerekir. Günümüzde izotop etiketleme, radyoizleyiciler, kalorimetrik biyosensörler, elektrokimyasal sensörler ve floresan uçlar gibi birçok etiketleme (işaretleme/labeling) yöntemi buna uygundur. Bunlar arasında floresan etiketleme tekniği, tahribat oluşturmaması, floresans yönteminin düşük hacimli ölçümlerde ve düşük yoğunluklarda çalışmak için uygun oluşu ve iyi derecede duyarlılığa sahip olmasıyla diğer metotlara kıyasla üstündür. Floresans etiketleme, çoğunlukla bir hedef biyomolekülün fonksiyonel gruplarına bir floroforun selektif şekilde bağlanmasıyla meydana gelir.

Uygun floresans ucu seçerken ve işaretlerken aşağıda bulunan hususlar dikkate alınmalıdır:

- Floresans uçlar küçük ve kimyasal olarak stabil olmalıdır,
- Floresans uçlar, hedef proteinin yapısıyla en az biyolojik etkileşime sahip olmalıdır,
- Etiketleme reaksiyonu, oldukça verimli ve hedef moleküle adapte edilebilir olmalıdır,
- Tercihen, hedef molekülün özgül bölgesiyle floresan uç arasında bir kovalent bağ oluşturulmalıdır (Sahoo, 2012).

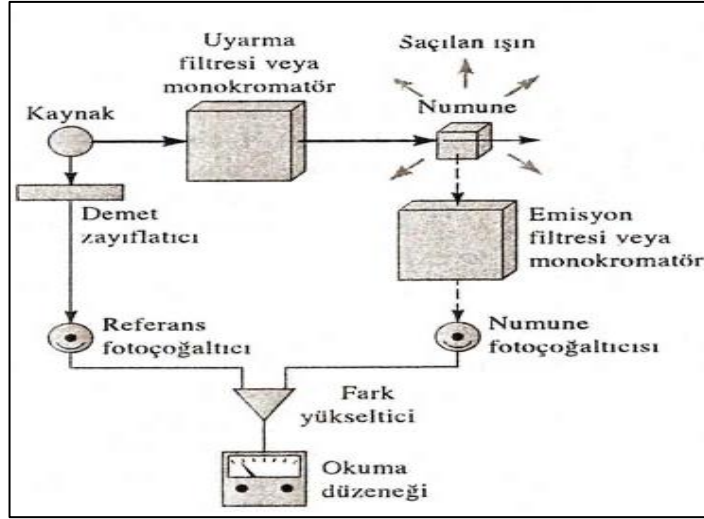
Gelişmiş floresan mikroskopisi ve floresans etiketleme yöntemleri, bilim insanlarının *in vivo* ve *in vitro* sistemlerde protein dağılımını, hareketini ve etkileşimini incelemelerini sağlar. Bu şekilde, proteinlerin biyolojik özelliklerinden yararlanmak ve karmaşık biyolojik yapılardaki işlevlerini özel ve verimli floresan etiketleme yöntemleri kullanarak aydınlatmak mümkündür. Bu tekniğin uygulaması, yalnızca küçük yapay floroforlar ve floresan proteinlerle sınırlanmamıştır. Bunun yanı sıra iletken nanokristaller kullanılarak kuantum noktalarıyla biyomoleküllerin işaretlenmesi son zamanlarda büyük ölçekli araştırmaları teşvik etmeye başladı (Sahoo, 2011 ve Fernandez-Suarez ve Ting, 2008). Ayriyeten, proteinlerin ya da

peptitlerin molekül yapısını (Sahoo, 2011) ve canlı hücrede bulunan metal iyonlarının ilişkili ligandlarla etkileşimlerini incelemeye olanak tanır (Jung ve ark., 2013).

Floresans uç iki yapıya ayrılır:

- İntinsik (doğal, iç) uçlar: Yapılarına özgü, floresans özelliği olan doğal uçlardır. Tyr ve Trp gibi aromatik amino asit terminalleri sebebiyle proteinler içsel floresan sergilerler (Gonçalves, 2009).
- Ekstrinsik (dış) uçlar: Tyr ve Trp amino asit terminalleri bulunmayan, kovalent bağlarla proteinlere bağlanan, DNA gibi az miktarda floresans özellikte bulunan ya da hiç floresans niteliği olmayan bileşiklere floresans özellik sağlayan uçlardır. Bu gruba örnekleme olarak tioflavin T benzeri floresans boyalar, rodamin, kumarin ve türevleri, floresein izosiyanatlar, etidinyum bromür, akridin oranj, floresein, naftofuran benzeri bileşikler gösterilebilir (Hawe ve ark., 2008 ve Piloto ve ark., 2005). Dış uçlar, diğer bir deyişle yapay floresan uçlar, gelişmiş fotokimyasal özellikte olduğundan renk çeşitliliği, daha geniş dalga boyu aralığı gibi üstünlükler ve işaretlemenin hangi bölgeden gerçekleştirilebileceği hususunda da esneklik yaratmaktadır (Toseland, 2013).

Floresans ve fosforesans spektrofotometrelerinde UV ve görünür bölge aralığında kullanılan bir ışık kaynağından gelen ışık, uyarma dalga boyu seçicisinden geçtikten sonra numuneye yönlendirilir. Numunenin emisyonu ışık kaynağıyla 90° açıyla emisyon dalga boyu seçicisinden geçip dedektöre ulaşır. Bu sayede ışık kaynağından iletilen ışığın dedektöre ulaşması engellenir. Şekil 2.2., fotolüminesans işleminde kullanılan tipik bir cihazın bileşenlerini göstermektedir.



Şekil 2.2. Spektroflorometre genel yapısı

2.2.2. Moleküler Kenetlenme

Moleküler kenetlenme (molecular docking) alanı son otuz yılda yapısal moleküler biyoloji ve yapı tabanlı ilaç keşfinin ihtiyaçlarını karşılamak için gelişmiştir. Bilgisayarların artan gücü ve kullanılabilirliği, küçük molekül ve protein veritabanlarına artan erişim, bu alanın uygulanabilmesini oldukça kolaylaştırmıştır. Moleküler kenetlenme yazılımının otomatikleştirilmesinin gayesi; yapısal anlamda olası bağlanma modları ile moleküler tanıma gerçekleştirmek ve enerji açısından bağlanma yakınlığını kestirmektir.

Son yıllarda, küçük moleküller ve reseptörler arasındaki moleküler docking üzerine yapılan çalışmalar, ilaç tasarımı büyük ilgi görmüştür. Yeni ilaçların tasarımı ve geliştirilmesinde protein-ligand bağlanma çalışmalarının önemi çok büyüktür. Moleküler kenetlenme incelemelerinde reseptör olarak kabul edilen yapılar, protein yapılarında bulunur. Moleküler kenetlenme yöntemleri, ilaç modelleriyle enzimlerin, nükleik asitlerin ve reseptör proteinlerin nasıl birleştiğini incelemek için bilgisayar destekli ilaç tasarımı yaygın olarak tercih edilir. Kenetlenme çalışmaları ile üç boyutlu yapıya sahip reseptörlere bağlanma enerjileri hesaplanabilir ve ligandın reseptörün bağlanma bölgesindeki konumu modellenir. Bu, bağlanma modlarını anlamamıza ve proteinleri hedeflemek için daha iyi küçük molekülü ligandlar tasarlamamıza yardımcı olacaktır. Kısacası kenetlenme, bir anahtar-kilit ilişkisine

benzer şekilde, bir ligandın uygun konformasyonu ile bir reseptörün arasındaki uyum durumudur. Ligandlar çoğunlukla hareketlidir ve çözücülerde çeşitli şekillerde bulunurlar. En sık kullanılan moleküler kenetlenme yöntemi; proteinin sabit olan aktif alanıyla ligandın bir dizi konformasyonu arasında gerçekleştirilen docking işlemidir.

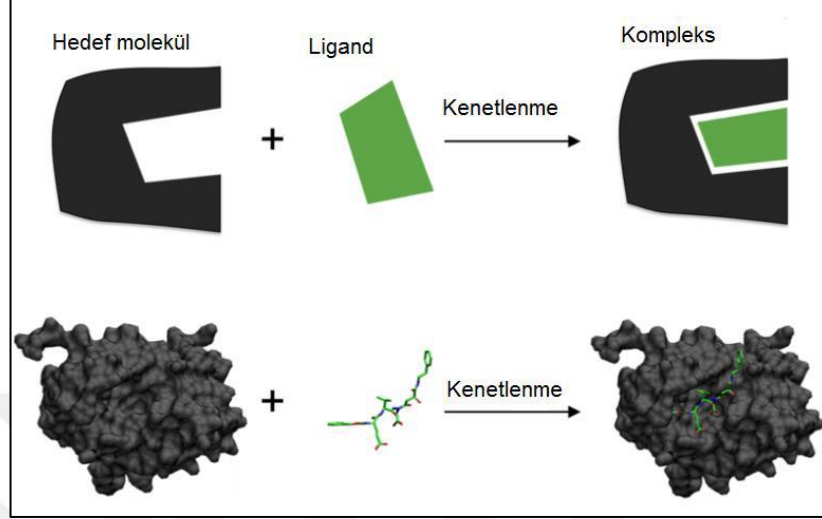
Moleküler yerleştirme tipik olarak küçük bir molekül ile bir hedef makromolekül arasında sağlanır. Buna çoğunlukla ligand-protein birleşmesi denir (Şekil 2.11).

Bununla birlikte protein-protein etkileşmesine olan ilgi de çoğalmaktadır. Ligand-protein birleşmesinde hedef bir DNA ya da RNA makromolekülüdür ve bu proteine kenetlenen ufak moleküle ligand denir (Morris ve Lim-Wilby, 2008). Moleküler kenetlenme yaklaşımları, atomik seviyede küçük moleküller ve proteinler arasındaki etkileşimleri modellemek için kullanılabilir. Küçük moleküllerin hedef protein bağlama bölgelerindeki davranışını karakterize etmek ve altta yatan biyokimyasal süreçleri aydınlatmak için kullanılabilir. Yerleştirme işleminin iki ana aşaması vardır: Ligandın konformasyonunun tahmin edilmesinin dışında, bu bölgelerdeki pozisyonu ve yönelimi (genellikle poz olarak anılır) ve bağlayıcının afinitesi değerlendirilir.

Kenetlenmeden önce bağlama bölgesinin konumunun bilinmesi kenetlenme verimliliğini büyük ölçüde yükseltir. Bağlanma yeri genellikle ligand fiilen implante edilmeden önce bilinir. Birleşme bölgesi hakkında hiçbir varsayımda bulunmayan bu tür eklemeye kör ekleme denir.

Ligand-reseptör bağlama sisteminin ilk izahı, Fischer tarafından önerilen, anahtar-kilit teorisidir. Bu teori, ligandların ve reseptörlerin katılar gibi davrandığını varsayar. Daha sonra Koshland tarafından geliştirilen "indüklenmiş-fit" teoremi ligand-protein etkileşimi esnasında proteinin aktif alanının ligand etkileşimleri tarafından devamlı olarak yeniden şekillendirildiğini açıklayarak; moleküler docking bilgisayar yardımlı ilaç tasarımı, anahtar-kilit teorisini daha da ileriye götürdü. Bu teori, ligand ve reseptörün docking esnasında esnek davranış sergilemesi gerekliliğini belirtir. Sonuç olarak, bu teori, ligandların ve reseptörlerin bağlanma durumunu net bir şekilde tanımlayabilir. Bununla birlikte kenetlenme

çalışmalarında ligandların ve protein yapılarının esnekliği, söz konusu yapının tüm konformasyonlarını içeren hesaplamaların yapılmasını çok zorlaştırır.



Şekil 2.3. Protein-ligand moleküler kenetlenmesinin gösterilmesi

Günümüzde kullanımda olan docking programlarının çoğu, protein yapılarını esnek olmayan bir şekilde değerlendirirken ligand yapılarını esnek bir şekilde ele alır. Bunun nedeni protein yapıları esnek biçimde değerlendirildiğinde proteinin tüm konformasyonlarını ayrı ayrı incelenmek ve bu konformasyonların her biri için kenetlenme hesaplarının uzun sürmesi anlamına gelmektedir. Reseptör (protein) esnekliğinin birçok sorununu ele almak için araştırmalar yapılmış olmasına rağmen, esnek reseptörde kenetlenme, bilhassa moleküler omurganın esnekliği, mevcut docking yöntemleri için kritik sorun olmaya devam etmektedir. (Meng ve ark., 2011). Moleküler dockingde, protein yapısına göre binlerce olası etkileşim pozı denenebilir ve değerlendirilebilir; en az enerji değerindeki poz "en uygun eşleşme" yani bağlanma modu olarak kabul edilmektedir (Shahabadi ve Hashempour, 2019).

2.2.3. UV-Vis Absorpsiyon Spektroskopisi

UV ve görünür bölgelerde oluşan absorpsiyon olayları genellikle bağ elektronlarından kaynaklanır. UV ve görünür spektrofotometri genellikle kantitatif analiz için tercih edilen yöntemlerdir. Bir maddenin ışık absorpsiyon derecesini

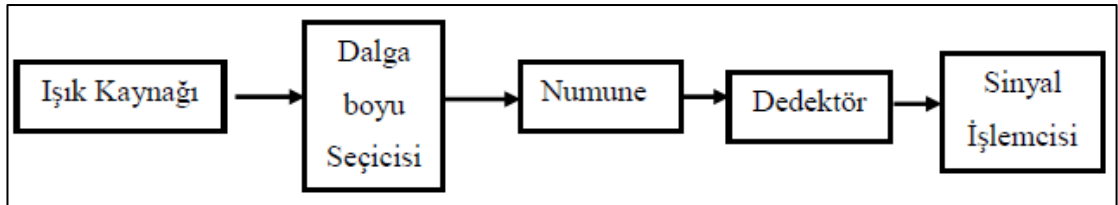
ölçmek ve ardından konsantrasyonunu belirlemek için, absorpsiyon ve konsantrasyon arasındaki ilişkiyi bilmemiz gerekir. Tek dalga boyulu (monokromatik) ve şiddeti I_0 (F_0) olan bir ışık demeti, çözelti şeklinde moleküller içeren b cm kalınlığındaki bir küvete yönlendirildiğinde, çözeltideki moleküller ışığı absorblayıp ışığın yoğunluğunda azalma oluşturur ve ışık küveti I (F) şiddetinde terk eder. Ortaya çıkan etkileşim, Lambert-Beer denklemi ile tanımlanır;

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \log \frac{F_0}{F} \epsilon bc \quad (2.5)$$

Bu denklemde;

A ; absorbans, I (F); numuneyi terk eden ışığın şiddeti, I_0 (F_0); numuneye gelen ışık şiddeti, b ; numune kabının kalınlığı (cm), c ; konsantrasyon (mol/L), ϵ ; molar absorptivite katsayısı ($L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) olarak ifade edilir.

Cisimlerin ışık emme (absorblama) özelliklerini araştırmak için bir spektrofotometre kullanılır. Bir spektrofotometre, temel olarak bir ışık kaynağı, bir monokromatör, bir numune kabı ve bir dedektörden oluşur. Bu tip aygıtlarda radyasyon kaynağı olarak UV ve görünür aralıkta ışıma yayan döteryum-ksenon, tungsten ya da hidrojen lambalara benzer kesintisiz ışık kaynakları kullanılmaktadır. Bu sistemlerde dedektör olarak UV ve görünür ışık alanlarında fotovoltaiik veya fotoiletken dedektörler, fototüpler ve foton çoğaltıcı tüpler kullanılmaktadır. Bu ana bileşenlere ek olarak, spektrofotometrelerde ayrıca ışığı toplayan, yansıtan ve bölen lensler, aynalar ve ışık ayırıcılar bulunur. Genel bir spektrofotometrenin şematik diyagramı da Şekil 2.4'te verilmiştir (Yıldırım, 2020).

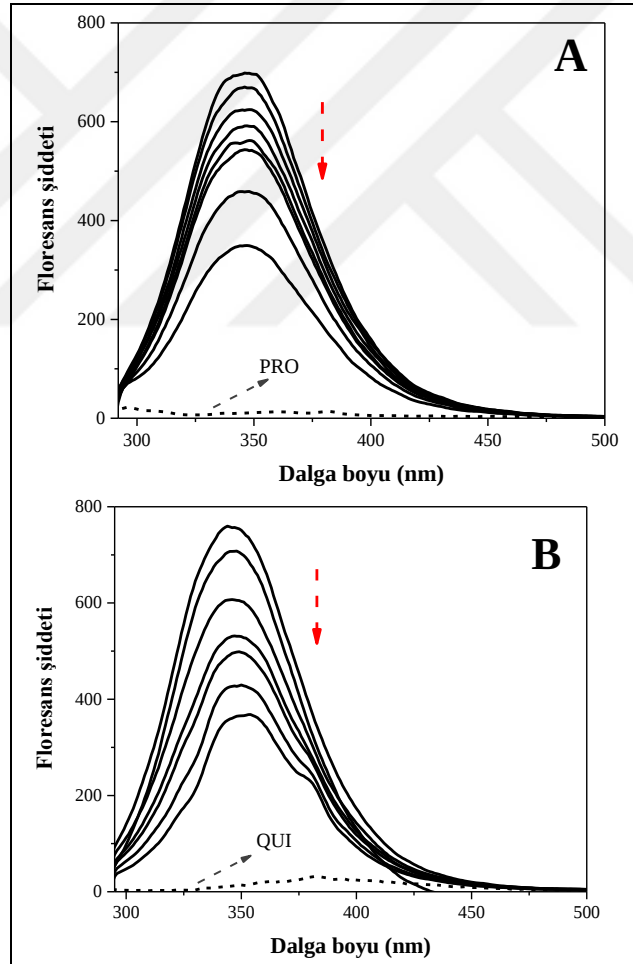


Şekil 2.4. UV-Vis spektrofotometrenin şematik gösterimi

3. BULGULAR

3.1. BSA Proteinini ile PRO ve QUI Pesticitleri Arasındaki Etkileşimlerin Floresans Ölçümleriyle Karakterizasyonu

BSA-pestisit etkileşimlerinin floresans sönümleme mekanizmalarını anlamak için 3 μM (mikromolar) konsantrasyondaki BSA üzerine 3 μM – 300 μM aralığında artan konsantrasyonlarda PRO ve 10 μM - 150 μM aralığında artan konsantrasyonlarda QUI ilave edilerek BSA'nın floresans şiddetinin düşüşü takip edilmiştir.



Şekil 3.1. Artan pestisit konsantrasyonlarının ilavesi ile BSA'nın floresans söndürme spektrumları A) PRO, B) QUI

3.2. Floresans Sönüm ve Stern-Volmer Eşitliği

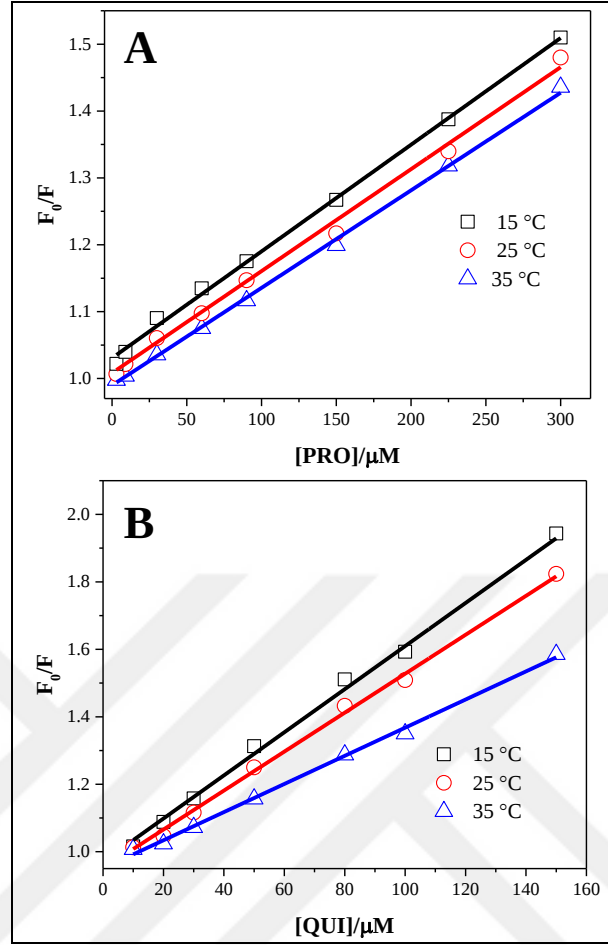
BSA-pestisit etkileşimleri için floresans sönüm verileri değişik ısılarda Stern-Volmer denklemi (Eşitlik 3.1.) kullanılarak elde edilmiştir.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} [Pestisit] = 1 + K_q \tau_0 [Pestisit] \quad (3.1)$$

Stern-Volmer eşitliğindeki F_0 ve F sırayla pestisit maddesi yokluğundaki ve varlığındaki BSA çözeltisinin floresans şiddetini, K_q proteinin sönümleme hız sabitini, τ_0 pestisit yokluğundaki floresansın ömürünü, $[Pestisit]$ protein-pestisit karışım solüsyonundaki pestisit konsantrasyonunu ve K_{SV} ise Stern-Volmer sönümleme sabitini gösterir.

İç filtre etkisini en aza indirmek için ise BSA-PRO ve BSA-QUI etkileşimlerine ait floresans şiddetleri Eşitlik 3.2. kullanılarak düzeltilmiştir.

$$F_{Düzeltilmiş} = F_{Gözlenen} \exp [(A_{ex} + A_{em})/2] \quad (3.2)$$



Şekil 3.2. Pestisit–BSA etkileşimleri için Stern-Volmer grafikleri A) PRO, B) QUI

BSA proteininin PRO ve QUI pestisit molekülleri ile etkileşimi sonucunda sönmülenme mekanizmasını belirlemek amacıyla yapılan çalışmada, 15°C (288 K), 25°C (298 K) ve 35°C (308 K)’de BSA ile PRO’nun etkileşimi sonucunda K_{SV} değerleri sırasıyla $1,60 \times 10^3$, $1,53 \times 10^3$, $1,46 \times 10^3$ K_q değerleri de sırasıyla $1,69 \times 10^{13}$, $1,53 \times 10^{13}$, $1,46 \times 10^{13}$ ve BSA ile QUI’nin etkileşimi sonucunda K_{SV} değerleri sırasıyla $6,39 \times 10^3$, $5,77 \times 10^3$, $4,17 \times 10^3$, K_q değerleri ise sırasıyla $6,39 \times 10^{13}$, $5,77 \times 10^{13}$, $4,17 \times 10^{13}$ olarak bulunmuştur.

Çizelge 3.1. Pestisit-BSA bağlanma reaksiyonlarının bağlanma özellikleri

Sıcaklık (K)	PRO			QUI		
	R^2	K_{SV}	K_q	R^2	K_{SV}	K_q
288	0,998	$1,60 \times 10^3$	$1,69 \times 10^{13}$	0,992	$6,39 \times 10^3$	$6,39 \times 10^{13}$
298	0,995	$1,53 \times 10^3$	$1,53 \times 10^{13}$	0,997	$5,77 \times 10^3$	$5,77 \times 10^{13}$
308	0,997	$1,46 \times 10^3$	$1,46 \times 10^{13}$	0,997	$4,17 \times 10^3$	$4,17 \times 10^{13}$

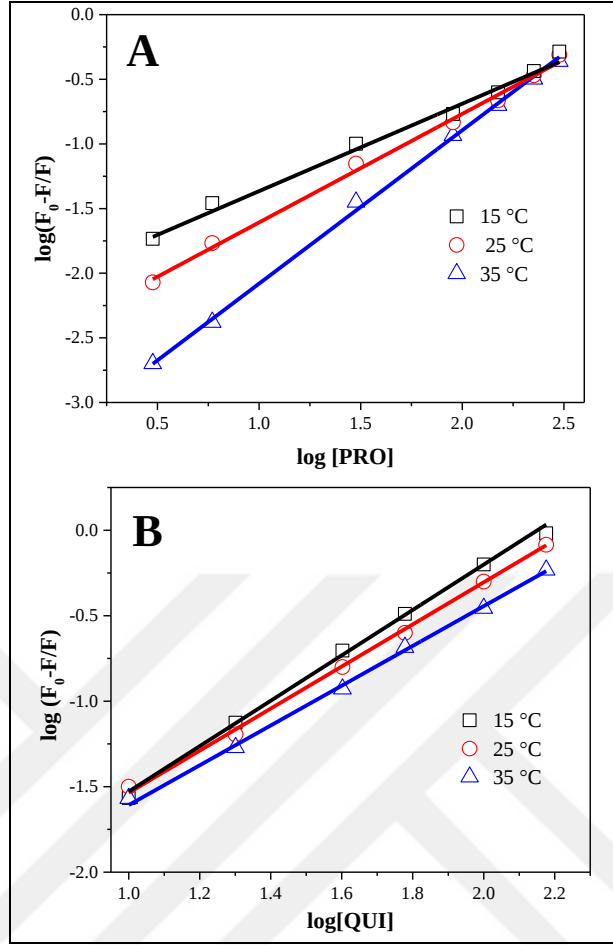
Çizelge 3.1.'da gösterildiği gibi çözeltinin sıcaklığının artması pestisit-protein sistemi için K_{SV} değerini düşürmektedir. Artan sıcaklıkla birlikte K_{SV} değerlerinin düşmesi, çalışılan protein-ilaç sistemindeki floresans söndürme mekanizmasının statik söndürmeden kaynaklandığını göstermektedir.

Sönüm mekanizması belirlenerek, her bir protein-pestisit sistemi için pestisitlerle protein molekülleri arasındaki bağlanma reaksiyonlarıyla ilgili detaylı bilgi elde edilebilir. BSA-PRO ve BSA-QUI etkileşimleri için farklı ısılarda protein molekülü başına pestisitlerin bağlanma bölgelerinin sayısı (n) ve bağlanma sabitleri (K_f), aşağıdaki Eşitlik 3.3. kullanılarak belirlenmiştir.

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = \log K_f + n \log [Pestisit] \quad (3.3)$$

Buradaki F_0 , F ve $[Pestisit]$ parametreleri Stern-Volmer eşitliğinde tanımlanan parametrelerle aynıdır. F_0 ve F sırasıyla pestisit yokluğundaki ve varlığındaki protein çözeltisinin floresans şiddeti, $[Pestisit]$ protein-pestisit karışım çözeltisindeki ilaç konsantrasyonudur. Eşitlik 3.3.'e göre, $\log (F_0 - F)/F$ 'ye karşı $\log[Pestisit]$ grafiğinin çizilmesiyle elde edilen doğrusal grafiklerin eğim ve kesişim değerlerinden yararlanılarak K_f ve n değerleri hesaplanmıştır.

15°C, 25°C, 35°C'de BSA-PRO ve BSA-QUI sistemi için çizilen $\log (F_0 - F)/F$ 'ye karşı $\log[Pestisit]$ grafiği aşağıdaki şekillerde gösterilmektedir.



Şekil 3.3. Pestisit–BSA etkileşimleri için çift logaritmik doğrusal eğriler A) PRO, B) QUI

BSA-PRO ve BSA-QUI etkileşimleri için $\log (F_0-F)/F$ 'ye karşı $\log[\text{Pestisit}]$ grafiklerindeki verilerin lineer regresyon analiziyle işlenmesi sonucunda elde edilen doğrusal grafiklerin eğim ve kesişim değerleri aracılığıyla hesaplanmış K_f ve n değeri aşağıdaki çizelgede yer almaktadır.

Çizelge 3.2. Pestisit-BSA bağlanma reaksiyonlarının bağlanma özellikleri

Sıcaklık (K)	PRO			QUI		
	R^2	n	K_f	R^2	n	K_f
288	0,996	0,75	$9,55 \times 10^{-3}$	0,990	1,32	$7,08 \times 10^2$
298	0,994	0,92	$3,63 \times 10^{-3}$	0,990	1,23	$5,80 \times 10^2$
308	0,990	1,18	$6,02 \times 10^{-4}$	0,990	1,16	$5,01 \times 10^2$

Yukarıdaki çizelgeye bakıldığında, PRO ve QUI pestisitlerinin BSA proteinlerine bağlanma işlemi için bağlanma sabiti değerleri, yükselen çözelti sıcaklığı ile birlikte azalmaktadır. Protein-pestisit sisteminde artan solüsyon sıcaklığıyla

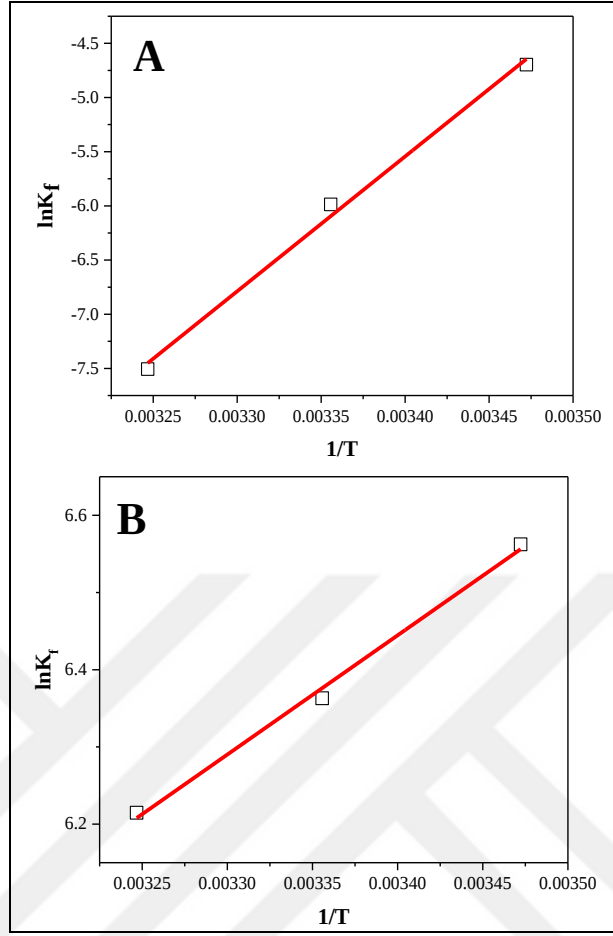
bağlanma sabitinin değerindeki azalma, kararsız bileşenlerin kısmi ayrışmasından ve yapının kararsız karakterinden kaynaklanmaktadır (Ge ve ark., 2010). PRO ve QUI pestisitlerinin BSA proteini üzerine bağlanma yeri sayısı olan “n” değerinin tüm sıcaklıklarda 1’e yakın olması nedeniyle 1 tanedir ve pestisit bağlanma yeri miktarı sıcaklığın yükselişiyle ciddi oranda değişmemektedir (He ve ark., 2005).

3.3. Termodinamik Parametreler ve Bağlanma Kuvvetleri

Proteinler ve pestisit molekülü arasında dört ana etkileşim vardır. Bunlar van der Waals kuvvetleri, hidrojen bağı, elektrostatik etkileşimler ve hidrofobik etkileşimlerdir (Hu ve ark., 2005; Jang ve ark., 2009 ve Ge ve ark., 2010). Protein-pestisit etkileşimlerinin yapısal bozulma olmadan çeşitli sıcaklıklarda etkileşimlerin doğasını saptamak amacıyla termodinamik değişken değerleri hesaplanmıştır. Entalpi değişimi (ΔH) ve entropi değişimi (ΔS) değerleri Van't Hoff denklemi (Eşitli 3.4.) kullanılarak belirlenmiştir. Van't Hoff denklemi;

$$\ln K_f = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (3.4)$$

şeklindedir. Bu denklemdeki K_f çalışılan sıcaklıktaki bağlanma sabiti değeri, T çözelti sıcaklığı ve R ideal gaz sabitidir. Her sistemin ΔH ve ΔS değerlerini hesaplama amacıyla $\ln K_a$ değerine karşı $1/T$ grafiği çizilmiştir. Van't Hoff grafiği verilerinin (Şekil 3.4.a ve Şekil 3.4.b) doğrusal regresyon analizleri kullanılarak işlenişle oluşturulan lineer grafiklerin eğim ve kayma değerlerinden sırasıyla ΔH ve ΔS değerleri hesaplanmıştır.



Şekil 3.4. Pestisit–BSA etkileşimleri için van't Hoff grafikleri A) PRO, B) QUI

Protein-ilaç sistemindeki bağlanma işlemindeki Gibbs serbest enerji değişiminin (ΔG) değerlerini hesaplamak için Eşitlik 3.5. kullanılmıştır.

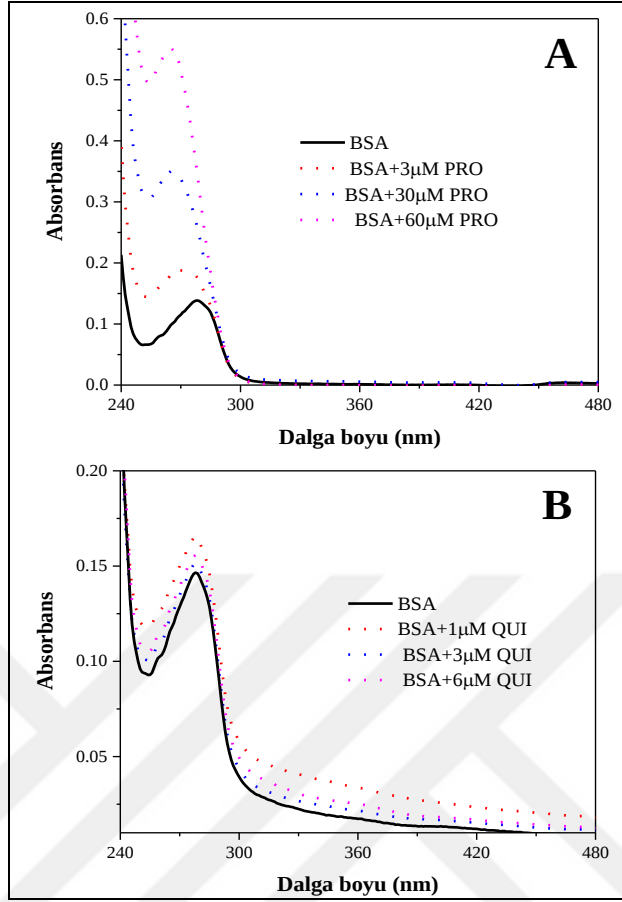
$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (3.5)$$

BSA proteininin PRO ve QUI pestisitlerine bağlanma prosesleri için elde edilen termodinamik değişkenlerin büyüklüğü ve işareti, etkileşimin türüyle ilgili bilgi vermektedir. $\Delta G < 0$ oluşu reaksiyonun kendiliğinden olduğunu ve $\Delta H < 0$ olduğu durumda reaksiyonun ısı veren (ekzotermik) olduğunu gösterir. ΔS ve ΔH değerlerinin negatif olması durumu florofor ile söndürücü arasındaki etkileşimde, hidrojen bağları ve van der Waals kuvvetlerinin ana faktörler olduğunu gösterir. $\Delta S > 0$ olması halinde hidrofobik etkileşimlerin olduğu hususunda bilgi elde edilir (Lakowicz, 2006).

Çizelge 3.3. Pestisit-BSA etkileşimlerinin termodinamik özellikleri

Sıcaklık (K)	PRO			QUI		
	ΔG (kJ mol ⁻¹)	ΔH (kJ mol ⁻¹)	ΔS (kJ mol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔG (kJ mol ⁻¹)	ΔH (kJ mol ⁻¹)	ΔS (kJ mol ⁻¹ K ⁻¹)
288	-89,67			-15,72		
298	-89,17	-103,45	-0,05	-15,82	-12,84	0,01
308	-88,71			-15,92		

PRO-BSA ve QUI-BSA komplekslerinin oluşumunu doğrulamak ve floresan sonuçlarını doğrulamak için UV-Vis absorpsiyon spektroskopisi kullanılmıştır. Çünkü pestisit etkileşimine bağlı olarak BSA absorpsiyon spektrumundaki değişiklikler, hem sönmüleme sürecinin göstergesi hem de pestisit ile BSA arasında bir kompleksin oluştuğunun kanıtıdır. Şekil 3.5., artan PRO konsantrasyonları ile BSA'nın absorbans spektrumundaki değişiklikleri göstermektedir. BSA, yapısındaki Triptofan (Trp) ve Tirozin (Tyr)'in mevcudiyeti nedeniyle 280 nm'de yüksek bir absorpsiyon zirvesi görülmektedir. Artan PRO konsantrasyonları ile BSA absorpsiyon zirvesindeki artış, BSA kromoforlarının etrafındaki değiştirilmiş mikro ortamı açıkça göstermektedir. Bu sonuç, PRO-BSA etkileşim mekanizmasının statik sönmüleme olarak sınıflandırıldığını ve PRO ile BSA arasında kompleksleşmenin meydana geldiğini ortaya çıkarmıştır. Benzer şekilde, artan QUI konsantrasyonları ile BSA absorpsiyon zirvesinde meydana gelen değişiklikler QUI- BSA etkileşim mekanizmasının da statik sönmüleme olarak sınıflandırıldığını ortaya koymaktadır (Şekil 3.5.)

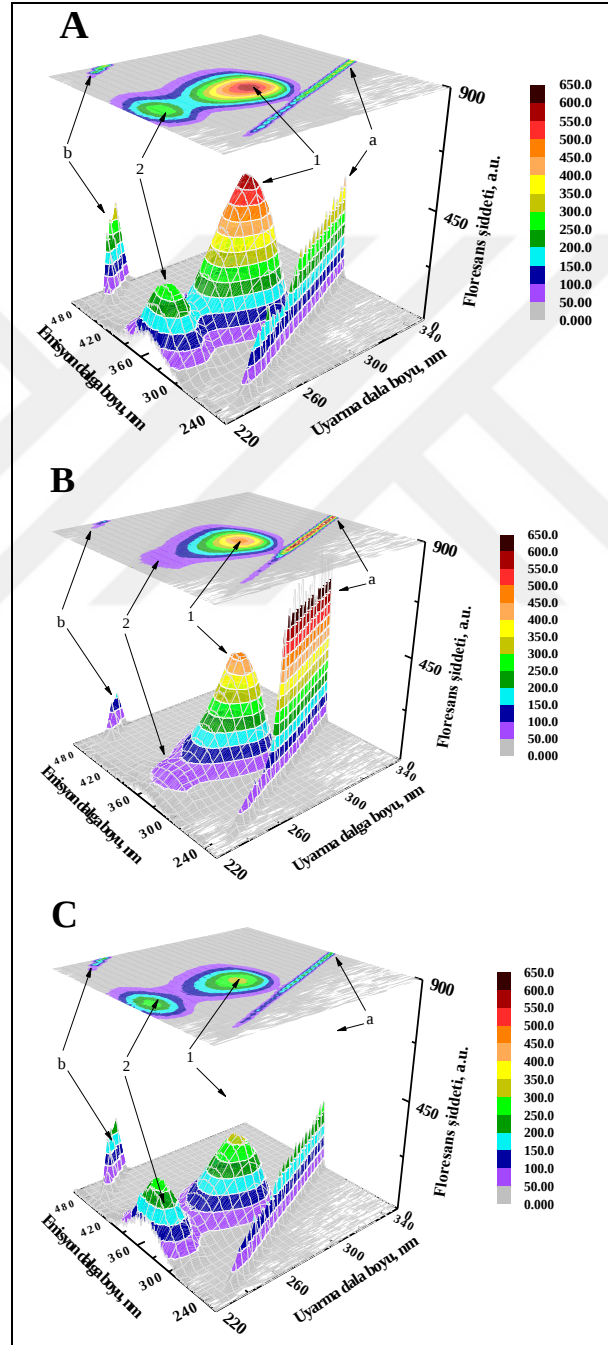


Şekil 3.5. Artan pestisit konsantrasyonlarının ilavesi ile BSA'nın absorbans spektrumları A) PRO, B) QUI

3.4. Pestisit- BSA Etkileşiminin 3 Boyutlu Floresan Spektral Sonuçları

Bu çalışmada, PRO ve QUI'nin Trp ve Tyr kalıntılarını çevreleyen mikro ortamı etkileyip etkilemediğini belirlemek için 3 μM BSA'nın ve bunun 30 μM PRO ve 30 μM QUI ile karışımının 3-D floresans spektrumu kaydedilmiştir. Şekil 3.6., yalnızca BSA'nın ve PRO-BSA ve QUI-BSA karışımlarının kontur haritalarını göstermektedir. Çizelge 3.4., BSA'nın pik konumlarını ve yoğunluklarını özetlemektedir. BSA'nın 3-D floresan spektrumundaki dört pik noktası arasında iki belirgin pik noktası vardır: sırasıyla '1' ($\lambda_{ex}=280$ nm) ve '2' zirvesi ($\lambda_{ex}=230$ nm), BSA'nın Trp ve Tyr kalıntılarının floresan spektral davranışıyla ilişkilidir. BSA'ya PRO eklenmesiyle zirve '1' ve zirve '2'nin floresans yoğunluklarında görünür söndürme tespit edildi. BSA-PRO kompleksinde yoğunluk değerleri %21 (tepe '1') ve %80 (tepe '2') azaldı. Bu veriler, PRO ve BSA arasındaki kompleks oluşumun, Trp ve Tyr kalıntılarını çevreleyen mikro ortamda

ölçülebilir değişikliklere neden olduğunu açıkça göstermiştir. Benzer şekilde BSA'ya QUI eklenmesiyle zirve '1' ve zirve '2'nin floresans yoğunluklarında görünür söndürme tespit edildi. BSA-QUI kompleksinde yoğunluk değerleri değerleri %45 (tepe '1') ve %7 (tepe '2') azaldı. Bu veriler, PRO ve QUI arasındaki kompleks oluşumun, Trp ve Tyr kalıntıların çevreleyen mikro ortamda ölçülebilir değişikliklere neden olduğunu açıkça göstermiştir.



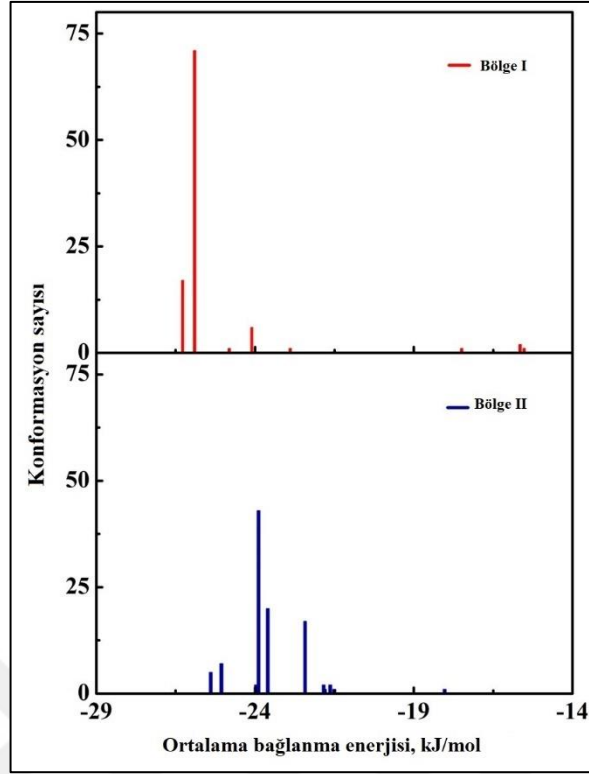
Şekil 3.6. BSA ve Pestisit-BSA karışımlarının 3 boyutlu floresan sinyalleri ve üst kontur haritaları A) BSA, B) [PRO]:[BSA] = 10:1 ve C) [QUI]:[BSA] = 10:1

Çizelge 3.4. BSA ve Pestisit-BSA karışımlarının 3 boyutlu floresan sinyallerinin tepe konumları ve yoğunluk değerleri

Sistem	Tepe	Tepe Pozisyonu [$\lambda_{ex} / \lambda_{em}$ (nm/nm)]	Yoğunluk
BSA	a	230/230→350/350	3,94 → 438
	b	250/500	285,1
	1	280/341	596,3
	2	230/341	282,0
[PRO]:[BSA] = 10:1	a	230/230→350/350	0,66 → 721
	b	250/500	140,2
	1	280/346	469,0
	2	230/346	58,9
[QUI]:[BSA] = 10:1	a	230/230→350/350	7,05 → 291
	b	250/500	200,8
	1	280/346	329,4
	2	230/346	262,4

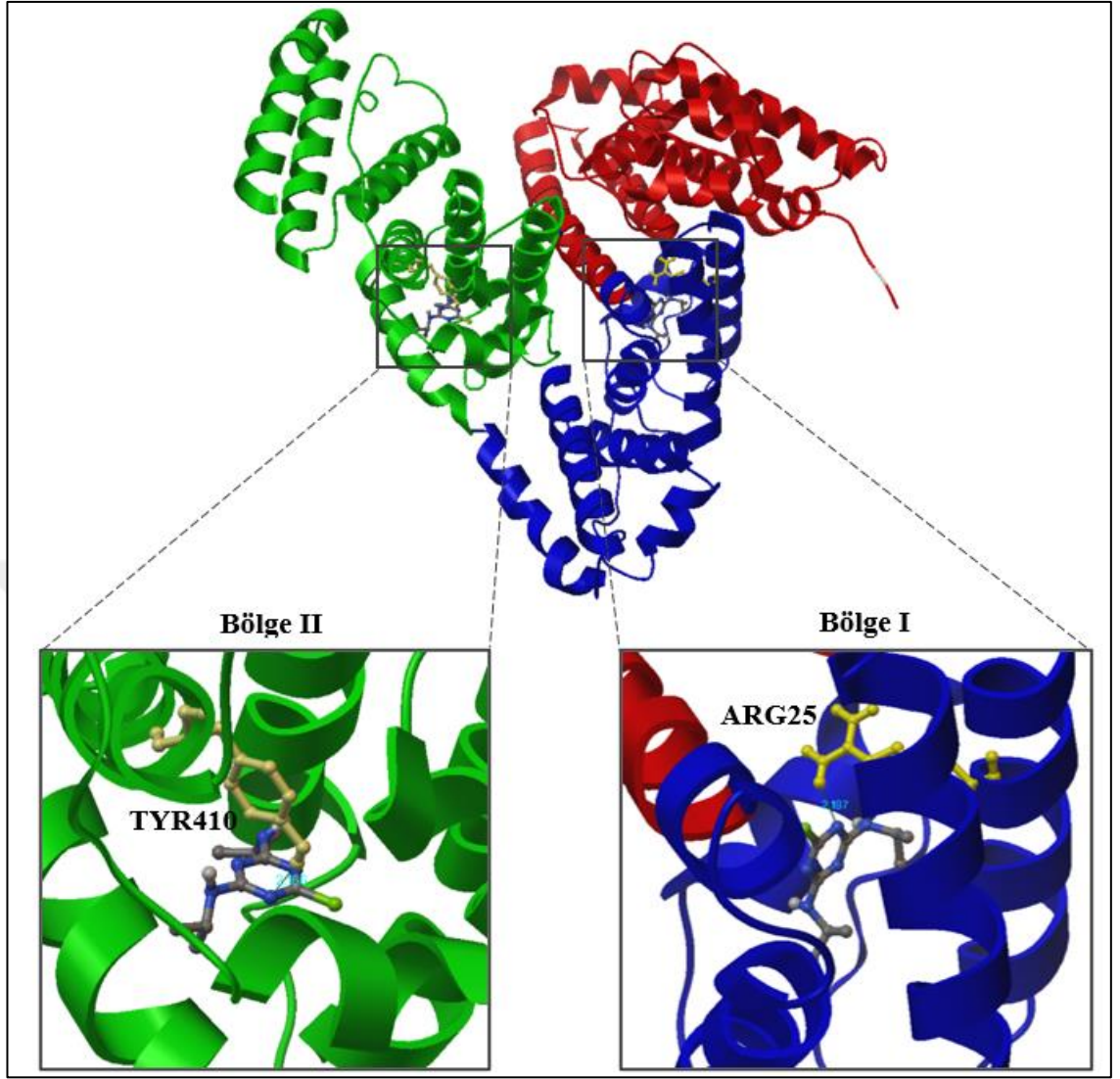
3.5. PRO-BSA Sisteminin Moleküler Kenetlenme Sonuçları

Moleküler yerleştirme sonuçlarının küme analizine dayanarak, sırasıyla BSA'nın I. ve II. bölgelerinde toplam 8 ve 10 farklı konformasyonel küme vardı. Bölge I'de, en yüksek nüfuslu küme 71 konformasyonel yapıya sahiptir ($\bar{x} = -25,90 \text{ kJ mol}^{-1}$). Bölge II'de, en yüksek nüfuslu kümede 43 konformasyonel küme vardır ($\bar{x} = -23,89 \text{ kJ mol}^{-1}$) (Şekil 3.7.). Bölge I için en kalabalık kümenin en düşük bağlanma enerjisi ($-25,98 \text{ kJ mol}^{-1}$) bölge II'ninkinden ($-24,69 \text{ kJ mol}^{-1}$) daha düşüktür (Şekil 3.7.). Düşük bağlanma enerjisi, PRO'nun bölge I'de BSA ile daha kararlı etkileşimler oluşturabileceğini göstermiştir. Bu nedenle PRO, BSA'nın I. bölgesine, II. bölgesine göre biraz daha yüksek bir afiniteye sahiptir.



Şekil 3.7. (A) Bölge I ve (B) bölge II'de BSA'ya PRO kenetlenmesinin küme analizi

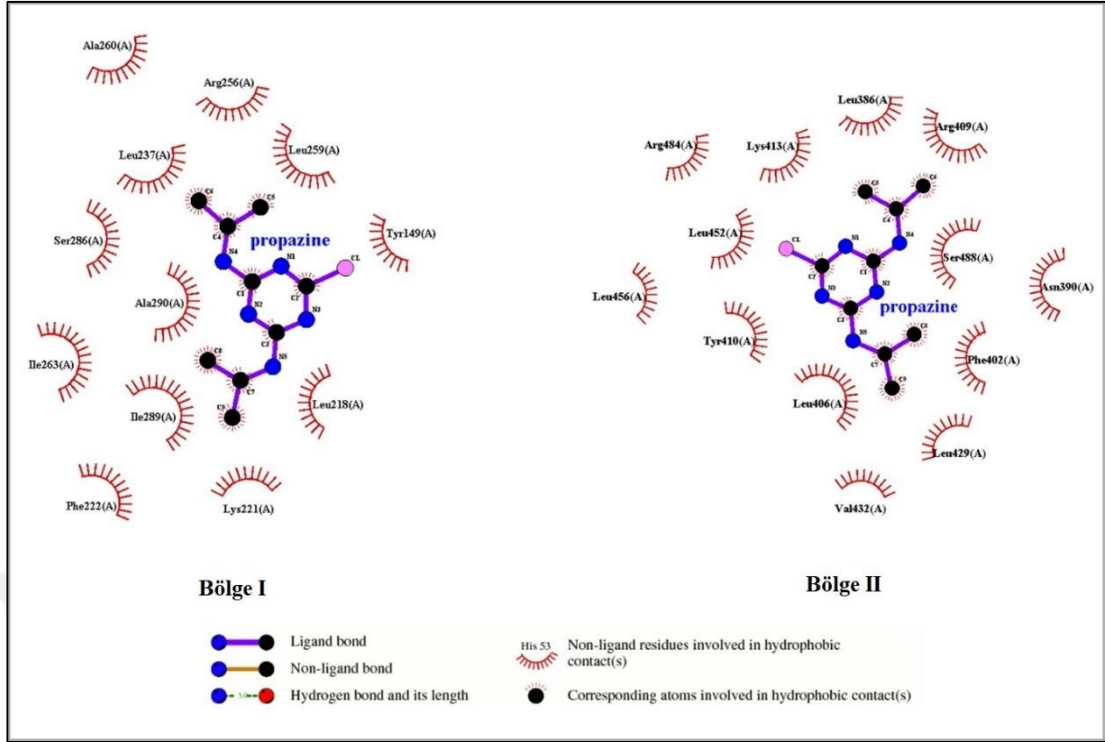
PRO ve BSA arasındaki moleküller arası etkileşimler, en düşük bağlanma enerjisindeki PRO-BSA kompleksine dayalı olarak ayrıca araştırılmıştır (Şekil 3.7.). Her bağlanma yerinde tekli hidrojen bağı oluşmuştur (Şekil 3.8.; Çizelge 3.5.). Bölge I'deki PRO'ya 5 Å içinde, amino asit kalıntıları (Ala-260, Ser-286, Ile-263, Phe-222, Leu-237, Ala-290, Ile-289, Arg-256, Lys-221, Leu-259, Leu-218, Tyr-149) PRO atomları ile hidrofobik etkileşimler oluşturmuştur (Şekil 3.9.). Analize dayanarak, hidrofobik etkileşimlerin BSA'nın aktif bölgesi içindeki PRO'yu stabilize etmede hayati bir rol oynadığı sonucuna varılmıştır. Bu nedenle kenetlenme sonuçlarımız, PRO'nun BSA'nın I. bağlanma bölgesi için bir bağlanma tercihinin sahip olduğunu ve kompleks oluşumunda hem hidrofobik etkileşimlerin hem de hidrojen bağlarının yer aldığını tahmin etmiştir.



Şekil 3.8. BSA'nın bölge I ve bölge II'deki PRO kenetlenme modeli. BSA'nın etki alanları farklı renklendirilir (I = kırmızı; II = mavi; III = yeşil) ve en düşük bağlanma enerjisine sahip konform görüntülenir. Alan I ve alan II'deki yakınlaştırılmış görüntüler, PRO ile BSA amino asit kalıntılarının (sarı) yan zincirleri arasında oluşan hidrojen bağlarını (koyu yeşil çizgiler) göstermektedir

Çizelge 3.5. I ve II bölgelerinde BSA amino asit kalıntıları ve PRO atomları arasında oluşan tahmin edilen hidrojen bağları

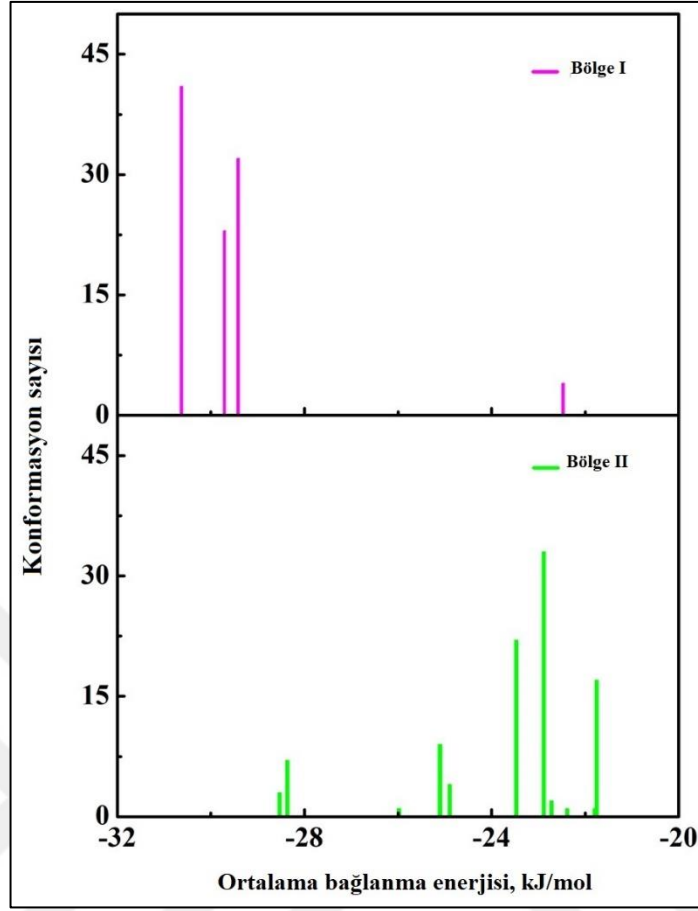
BSA bağlanma yeri	BSA kalıntısı: atom	PRO atomu	Mesafe (Å)
Bölge II	Tyr-410: HH	N (triazin)	2,166
Bölge I	Arg-256: HH22	N (triazin)	2,197



Şekil 3.9. PRO ve BSA'nın bölge I ve bölge II'deki amino asit kalıntıları arasındaki hidroforbik ve polar etkileşimleri gösteren Ligplot+ diyagramları. Ligplot+, Şekil 3.7.'de gösterildiği gibi hidrojen atomlarını göstermez: her iki bölgedeki hidrojen bağları, bir BSA amino asit kalıntısından bir hidrojen atomu ile PRO'dan bir nitrojen atomu arasında oluşturulur

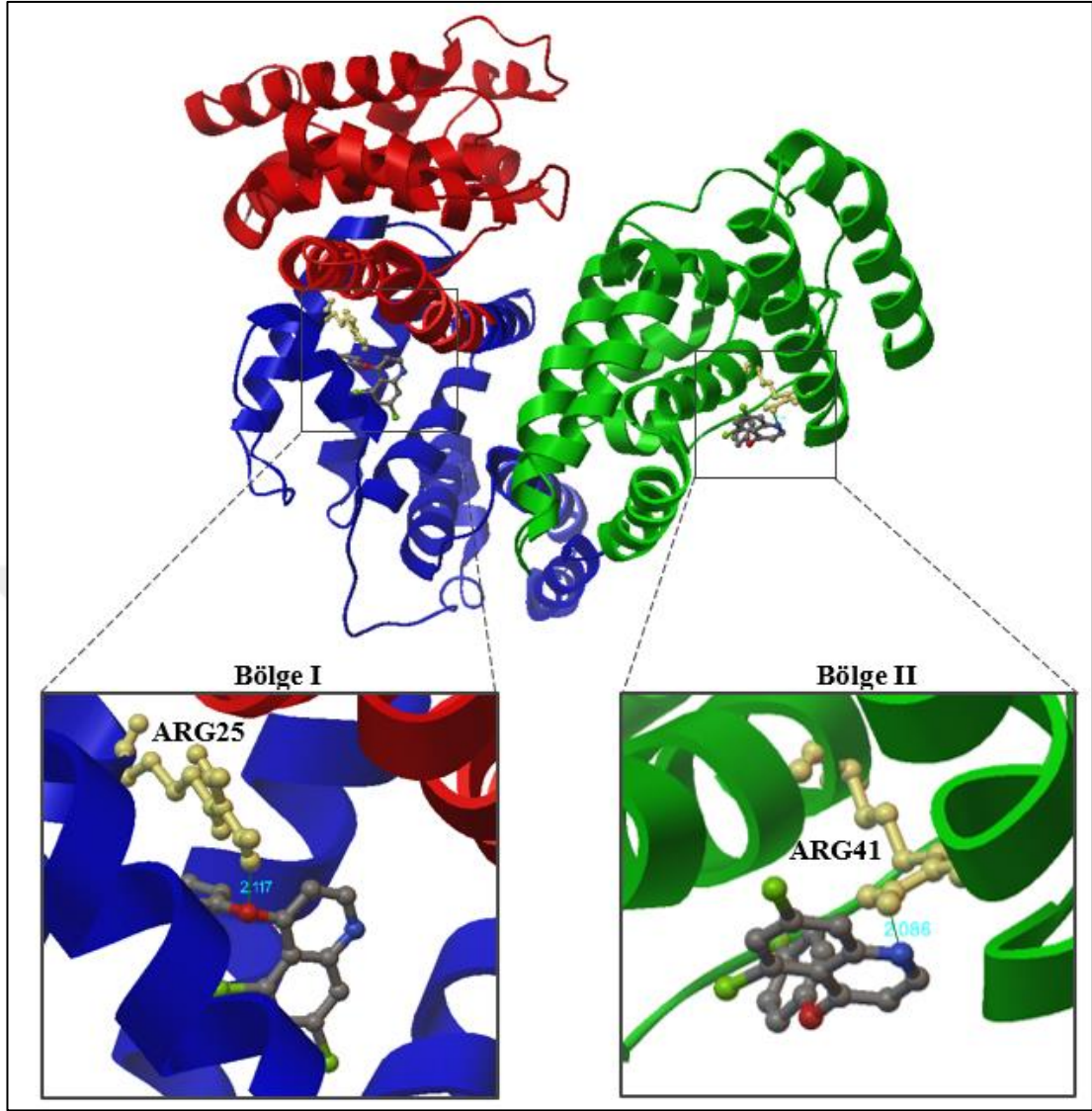
3.6. QUI-BSA Sisteminin Moleküler Kenetlenme Sonuçları

Küme analizi sonuçları, bölge I'de 4 farklı küme ve bölge II'de 11 farklı küme gösterir (Şekil 3.9.). Bölge I'de, en yüksek nüfuslu küme 41 konformasyonel yapıya sahipti ($\bar{x} = -30,63 \text{ kJ mol}^{-1}$). Bölge II'de, en yüksek nüfuslu kümede 43 konformasyonel yapı vardır ($\bar{x} = -22,89 \text{ kJ mol}^{-1}$). I. bölge için en kalabalık kümenin en düşük bağlanma enerjisi ($-31,05 \text{ kJ mol}^{-1}$) bölge II'ninkinden ($-22,97 \text{ kJ mol}^{-1}$) daha düşüktür (Şekil 3.10.). Düşük bağlanma enerjisi, QUI'nin bölge I'de BSA ile daha kararlı etkileşimler oluşturabileceğini gösterir. Bu nedenle QUI, BSA'nın II. bölgesine göre I. bölgeye daha yüksek bir afiniteye sahiptir.



Şekil 3.10. (A) bölge I ve (B) bölge II'de BSA'ya kenetlenen QUI'nin küme analizi

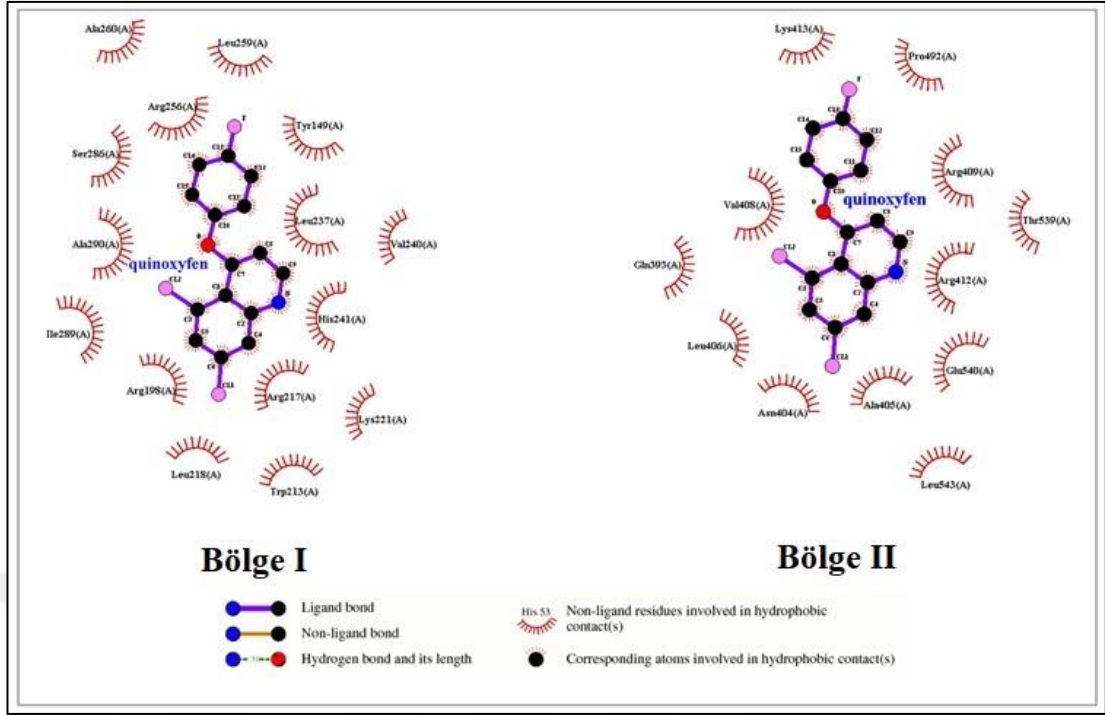
QUI ve BSA arasındaki moleküller arası etkileşimler, en düşük bağlanma enerjisindeki QUI-BSA kompleksine dayalı olarak ayrıca araştırıldı. Her bağlanma yerinde bir hidrojen bağı oluştu (Şekil 3.11.; Çizelge 3.6.). Bölge I'deki QUI'ne 5 Å içerisinde, protein kalıntıları (Ala-260, Ser-286, Ala-290, Ile-289, Arg-256, Arg-198, Leu-259, Leu-218, Tyr-149, Leu-237, His-241, Arg-217, Trp-213, Val-240, Lys-221) QUI atomları ile hidrofobik etkileşimler oluşturmuştur (Şekil 3.12.). Yukarıdaki sonuçlara dayalı olarak, QUI'nin bölge I'de BSA ile daha güçlü ve daha kararlı hidrofobik etkileşimler ve hidrojen bağları oluşturduğu ve böylece bölge I'i QUI için tercih edilen BSA bağlanma bölgesi haline getirdiği gösterilmiştir.



Şekil 3.11. BSA'nın bölge I ve bölge II'deki QUI kenetlenme modeli. BSA'nın alanları farklı renklendirilir (I = kırmızı; II = mavi; III = yeşil) ve en düşük bağlanma enerjisine sahip konform görüntülenir. Bölge I ve bölge II'deki yakınlaştırılmış görüntüler, QUI ile BSA amino asit kalıntılarının (sarı) yan zincirleri arasında oluşan hidrojen bağlarını (koyu yeşil çizgiler) gösterir

Çizelge 3.6. I ve II bölgelerinde BSA amino asit kalıntıları ve QUI atomları arasında oluşan tahmin edilen hidrojen bağları

BSA bağlama bölgesi	BSA kalıntısı: atom	QUI atomu	Mesafe (Å)
Bölge I	Arg-256: HH22	O (ether)	2,117
Bölge II	Arg-412: HH11	N (pyridine)	2,086



Şekil 3.12. BSA'nın bölge I ve bölge II'deki amino asit kalıntıları ve QUI arasındaki hidrofobik ve polar etkileşimleri gösteren Ligplot+ diyagramları. Ligplot+, Şekil 3.10.'da gösterildiği gibi hidrojen atomlarını göstermez: her iki bölgedeki hidrojen bağları, sırasıyla bölge I ve bölge II'de bir BSA amino asit kalıntısından bir hidrojen atomu ile QUI'den bir oksijen atomu ve bir nitrojen atomu arasında oluşturulur

Sonuç olarak, QUI-BSA kompleksinin en kalabalık kümesinde (bölge I: $-31,05\text{kJ mol}^{-1}$) PRO-BSA kompleksinden (Site I: $-25,98\text{kJ mol}^{-1}$) daha düşük bağlanma enerjisine sahip bir konformasyon yapısı elde edildi. QUI, bölge I'de PRO'ya kıyasla BSA'nın amino asit kalıntıları ile daha kararlı etkileşimler oluşturabilir ve bu nedenle QUI'nin BSA'ya PRO'dan daha yüksek bir afinitesi vardır.

4. TARTIŞMA

Dünyanın toplam popülasyonu her geçen gün artmaktadır. Popülasyonun artması açlık oranını da önemi derecede etkiler. Artan açlık ve kıtlık sebebiyle yetiştiriciler, mahsüllerini zararlılara karşı korumak ve geliştirmek için pestisitleri sıklıkla tercih etmektedir. Fakat, pestisitlerin ürünlerde ve değişik bölgelerdeki kalıntıları sebebiyle canlıları ve çevreyi olumsuz olarak etkilemektedir. Proteinler ile pestisitlerin arasındaki etkileşimlerin incelenmesi, pestisitlerin, insan vücudundaki etki mekanizmaları ve bağlanma noktaları ile ilgili bilgiler sağlamaktadır. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar ise pestisitlerin zararları konusunda daha fazla bilgi edinilmesine ve yeni pestisit tasarımları konusunda çalışmalar yapılmasına imkân sağlanmaktadır.

Bu tez çalışmasında kinolon sınıfına ait bir fungusit olan QUI ve triazin herbisitlerinden PRO'nun BSA proteini ile etkileşimi spektrofotometrik ve hesaplamalı yöntemler ile araştırılmış ve bu araştırmalar neticesinde aşağıda yer alan sonuçlar elde edilmiştir.

Fosfat tamponu içerisinde pH=7,48'de BSA konsantrasyonu sabit tutularak PRO ve QUI konsantrasyonu değiştirilerek floresans ve UV spektrumları alınmıştır. Floresans spektroskopisi ile elde edilen verilerde artan PRO ve QUI konsantrasyonlarına bağlı olarak BSA'nın floresans şiddetinin azaldığı görülmüştür. Buna bağlı olarak BSA-PRO ile BSA-QUI molekülleri arasında etkileşimin meydana geldiği, bu etkileşimin farklı sıcaklıklarda Stern-Volmer denklemine göre incelenmiş ve artan sıcaklıkla K_{SV} 'nin azalış gösterdiği ve PRO ve QUI için statik sönmüleme mekanizmasının olduğu sonucuna varıldı. Ayrıca, PRO ve QUI'nin BSA ile etkileşimi sonucunda elde edilen K_q değerlerinin birçok biyomolekül-sönmüleyici sistemleri için maksimum dağılma-çarpışma sönmüleme sabiti değeri olan $2,00 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 'den büyük olması da etkileşimlerde statik sönmülemenin baskın olduğunu göstermektedir.

PRO ve QUI ile BSA arasındaki kompleks oluşumunu göstermek ve floresans verilerini doğrulamak için UV-Vis absorpsiyon spektroskopisi ile de ölçümler gerçekleştirilmiştir. Çünkü ligand bağlanmasına bağlı olarak BSA'nın absorpsiyon spektrumundaki değişiklikler hem sönmleme işleminin göstergesi hem de ligand ile protein arasında bir kompleksin oluştuğunun kanıtıdır. Elde edilen floresans ölçüm sonuçlarından, artan pestisit konsantrasyonları ile BSA'nın absorbans spektrumunda meydana gelen değişimler, etkileşim mekanizmasında statik sönmlemenin baskın olduğunu ve çalışılan pestisitler ile BSA arasında kompleksleşmenin meydana geldiğini göstermektedir.

BSA-PRO ve BSA-QUI etkileşimleri için $\log(F_0-F)/F$ 'ye karşı $\log[\text{Pestisit}]$ grafiklerindeki verilerin lineer regresyon analiziyle işlenmesi sonucunda elde edilen doğrusal grafiklerin eğim ve kesişim değerleri aracılığıyla “ K_f ” ve “ n ” değerleri hesaplanmıştır (Oda sıcaklığında, pestisitlerin BSA ile bağlanma afiniteleri PRO-BSA kompleksi için $K_f=3,63 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}$; QUI-BSA kompleksi için $K_f=5,80 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ olarak bulunmuştur). PRO ve QUI pestisitlerinin BSA proteinlerine bağlanma işlemi için bağlanma sabiti değerleri, artan ortam sıcaklığı ile azalmaktadır. Protein-pestisit sisteminde artan sıcaklık ile bağlanma sabitinin değerindeki azalma, kararsız bileşenlerin kısmi ayrışmasından ve yapının kararsız karakterinden kaynaklanmaktadır. PRO ve QUI pestisitlerinin BSA proteini üzerine bağlanma yeri sayısı olan “ n ” değerinin tüm sıcaklıklarda 1'e yakın olması nedeniyle 1 tanedir ve pestisit bağlanma yeri miktarı sıcaklığın yükselişiyle ciddi oranda değişmemektedir.

Farklı sıcaklıklar kullanılarak elde edilen termodinamik parametreler (ΔG , ΔH , ΔS), BSA-PRO arasında hidrojen bağları ve van der Waals kuvvetlerinin etkin olduğu; BSA-QUI arasındaki etkileşimde güçlü hidrofobik etkileşimlerin etkin olduğu görülmüştür (PRO-BSA kompleksi için $\Delta S= - 0,05 \text{ kJ mol}^{-1}\text{K}^{-1}$, $\Delta H = - 103,45 \text{ kJ mol}^{-1}$ ve QUI-BSA kompleksi için $\Delta S= + 0,01 \text{ kJ mol}^{-1}\text{K}^{-1}$, $\Delta H = - 12,84 \text{ kJ mol}^{-1}$). Her iki sistem için Gibbs serbest enerji değişimin negatif olması moleküller arasındaki etkileşimin kendiliğinden gerçekleştiğini göstermiştir (Oda sıcaklığında PRO-BSA kompleksi için $\Delta G= - 89,17 \text{ kJ mol}^{-1}$ ve QUI-BSA kompleksi için $\Delta G= - 15,82 \text{ kJ mol}^{-1}$).

Çalışmalar kapsamında, PRO ve QUI'nin Trp ve Tyr kalıntılarını çevreleyen mikro ortamı etkileyip etkilemediğini belirlemek için BSA'nın ve BSA ile PRO ve QUI ile karışımlarının 3-D floresans spektrumları kaydedilmiştir. BSA'nın 3-D floresan spektrumundaki dört pik noktası arasında iki belirgin pik noktası vardır: sırasıyla '1' ($\lambda_{ex}=280$ nm) ve '2' ($\lambda_{ex}=230$ nm) zirvesi, BSA'nın Trp ve Tyr kalıntılarının floresan spektral davranışlarıyla ilişkilidir. BSA'ya hem PRO hem de QUI pestisitlerinin eklenmesiyle zirve '1' ve zirve '2'nin floresans yoğunluklarında görünür sönüm tespit edilmiştir. Bu veriler, PRO-BSA ve QUI-BSA arasındaki kompleks oluşumunun, Trp ve Tyr kalıntılarını çevreleyen mikro ortamda ölçülebilir değişikliklere neden olduğunu açıkça göstermiştir.

Tez çalışmaları kapsamında, PRO-BSA ve QUI-BSA arasındaki etkileşimleri açıklamak için moleküler kenetlenme çalışmaları da gerçekleştirilmiştir. Kenetlenme sonuçlarına göre, düşük bağlanma enerjisi, PRO'nun bölge I'de BSA ile daha kararlı etkileşimler oluşturabileceğini bu yüzden PRO'nun BSA'nın I. Bölgesine daha yüksek bir afinite sergilediğini göstermiştir. Ayrıca, bu bölgede, PRO ile BSA arasındaki kompleks oluşumunda hem hidrofobik etkileşimlerin hem de hidrojen bağlarının etkin rol oynadığı görülmüştür. En düşük bağlanma enerjisindeki QUI-BSA kompleksine dayalı olarak elde edilen sonuçlara göre, QUI'nin bölge I'de BSA ile daha güçlü ve daha kararlı hidrofobik etkileşimler ve hidrojen bağları oluşturduğu ve böylece bölge I'i QUI için tercih edilen BSA bağlanma bölgesi haline getirdiği gözlenmiştir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, pestisit olarak kullanılan PRO ve QUI'nin BSA ile etkileşiminin floresans spektroskopisi ve hesaplamaları teknikleri ile incelenmesi amaçlanmıştır.

Çözeltilerin sıcaklığının artması pestisit-protein sistemi için K_{SV} değerlerini düşürmektedir. Artan sıcaklıkla birlikte K_{SV} değerlerinin düşmesi, çalışılan protein-pestisit sistemindeki floresans sönümleme mekanizmasının statik sönümlemeden kaynaklandığını göstermektedir. Çalışmalar kapsamında gerçekleştirilen UV-vis absorpsiyon spektroskopisi ve 3-D floresans spektroskopisi sonuçları da hem etkileşim mekanizmasını hem de pestisitler ile BSA arasında oluşan kompleks oluşumunu doğrulamıştır.

BSA proteininin PRO ve QUI pestisitlerine bağlanma prosesleri için elde edilen termodinamik değişkenlerin büyüklüğü ve işareti (PRO-BSA kompleksi için $\Delta S = -0,05 \text{ kJ mol}^{-1}\text{K}^{-1}$, $\Delta H = -103,45 \text{ kJ mol}^{-1}$ ve QUI-BSA kompleksi için $\Delta S = +0,01 \text{ kJ mol}^{-1}\text{K}^{-1}$, $\Delta H = -12,84 \text{ kJ mol}^{-1}$) moleküler kenetlenme sonuçlarıyla uyumlu olarak desteklenmiştir. ΔS ve ΔH değerlerinin negatif olması durumu, PRO-BSA ve QUI-BSA komplekslerinin oluşumunda van der Waals etkileşimlerinin ve hidrojen bağlarının daha etkili olduğunu göstermiştir.

Van't Hoff eşitliğiyle hesaplanmış K_f ve n değeri yardımıyla PRO ve QUI pestisitlerinin BSA proteini üzerine bağlanma yeri sayısı olan “ n ” değerinin tüm sıcaklıklarda 1'e yakın olması nedeniyle 1 tane olup pestisit bağlanma yeri miktarı sıcaklığın yükselişiyle ciddi oranda değişmemektedir.

PRO-BSA sisteminin moleküler kenetlenme sonuçları'na göre PRO ve QUI'nin BSA'nın I. bölgesinde daha kararlı etkileşimler oluşturabildiğini ve QUI'nin bölge I'de PRO'ya kıyasla BSA'nın amino asit kalıntıları ile daha kararlı etkileşimler

oluşturabildiğini göstermiştir. Ayrıca her iki pestisit içinde etkileşimlerde hidrofobik etkileşimlerin ve hidrojen bağlarının etkin olduğu grlmştir.

Sonuç olarak pestisit moleküllerinin biyolojik moleküller ile etkileşimi ve yeni moleküllerin tasarlanma amacının daha derinden anlaşılmasına katkıda bulunabilecek bu alışma, PRO ve QUI özelinde pestisitler başta olmak üzere farklı moleküllerin biyolojik moleküller ile bağlanma mekanizmalarını ve bu tür moleküllerin farmakolojik etkilerini anlamanın yanı sıra yeni ve etkili moleküllerin yapısını tasarlamada daha fazla bilgi sağlayarak araştırmacılara katkıda bulunacaktır.



ÖZET

Propazin ve Kinoksifen'in Sığır Serum Albümini ile Etkileşiminin Spektroflorimetrik ve Hesaplamalı Teknikler Kullanılarak İncelenmesi

Bu tez çalışması kapsamında tarım ürünlerinin hem gelişimini düzenlemek hem de çeşitli haşarelere karşı korumak için yaygın olarak kullanılan iki pestisit olan Propazin (PRO) ve Kinoksifen (QUI)'nin dolaşım sisteminde ana taşıyıcı protein olarak bulunan sığır serum albümini (BSA) ile etkileşimlerinin floresans spektroskopisi ve hesaplamalı teknikleri ile incelenmesi amaçlanmıştır.

Floresans ve absorpsiyon spektroskopisinden elde edilen sonuçlar, PRO/QUI ve BSA arasındaki kompleksleşmeyi doğrulamıştır.

Artan sıcaklıkla beraber K_{SV} değerlerindeki azalış, BSA flüoresansının PRO/QUI kaynaklı sönümlenmesinin statik sönümleme olduğunu göstermiştir. Oda sıcaklığında, pestisitlerin BSA ile bağlanma afiniteleri PRO-BSA kompleksi için $K_f = 3,63 \times 10^{-3} M^{-1}$; QUI-BSA kompleksi için $K_f = 5,80 \times 10^2 M^{-1}$ olarak bulunmuştur. Artan sıcaklıklarda ise nispeten daha düşük bağlanma sabiti değerleri gözlenmiştir.

Termodinamik verilerin sayısal olarak değerlendirilmesi (PRO-BSA kompleksi için $\Delta S = -0,05 kJ mol^{-1}K^{-1}$, $\Delta H = -103,45 kJ mol^{-1}$ ve QUI-BSA kompleksi için $\Delta S = +0,01 kJ mol^{-1}K^{-1}$, $\Delta H = -12,84 kJ mol^{-1}$) moleküler kenetlenme sonuçlarıyla uyumlu olarak desteklenmiştir. Bulunan sonuçlar, PRO-BSA ve QUI-BSA komplekslerinin oluşumunda van der Waals etkileşimlerinin ve hidrojen bağlarının daha etkili olduğunu göstermiştir.

Bağlanma yerlerinde PRO ve QUI'nin BSA'ya bağlanmasına ilişkin gerçekleştirilen moleküler kenetlenme sonuçları hem PRO hem de QUI'nin BSA'nın I. bağlanma bölgesinde daha kararlı etkileşimler oluşturabildiğini ve QUI'nin bölge I'de PRO'ya kıyasla daha yüksek bir afinite sergilediğini göstermiştir.

Anahtar Sözcükler: Kinoksifen, Moleküler kenetlenme, Propazin, Sığır serum albümini, Spektroflorimetri.

SUMMARY

Investigation of The Interaction of Propazine and Quinoxifen With Bovine Serum Albumin Using Spectrofluorimetric and Computational Techniques

In this thesis, it is aimed to examine the interactions of Propazine (PRO) and Quinoxifen (QUI), two pesticides that are widely used both to regulate the development of agricultural products and to protect them against various pests, with bovine serum albumin (BSA), which is the main carrier protein in the circulatory system, using fluorescence spectroscopy and calculations techniques.

The results from fluorescence and absorption spectroscopy confirmed the complexation between PRO/QUI and BSA.

The decrease in K_{SV} values with increasing temperature showed that the PRO/QUI-induced quenching of BSA fluorescence is static quenching. At room temperature, the binding affinities of pesticides with BSA were $K_f = 3,63 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}$ for the PRO-BSA complex; For the QUI-BSA complex $K_f = 5,80 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$. Relatively lower binding constant values were observed at increasing temperatures.

Quantitative evaluation of thermodynamic data ($\Delta S = -0,05 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, $\Delta H = -103,45 \text{ kJ mol}^{-1}$ for PRO-BSA complex and $\Delta S = +0,01 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, $\Delta H = -12,84 \text{ kJ mol}^{-1}$ for QUI-BSA complex) was supported in agreement with the results of molecular docking. The results showed that van der Waals interactions and hydrogen bonds are more effective in the formation of PRO-BSA and QUI-BSA complexes.

Molecular docking results of PRO and QUI binding to BSA at the binding sites showed that both PRO and QUI can form more stable interactions at binding site I of BSA and QUI exhibited a higher affinity in site I compared to PRO.

Keywords: Bovine serum albumin, Molecular docking, Propazine, Spectrofluorimetry, Quinoxifen

KAYNAKLAR

- ALAVANJA MC, SANDLER DP, LYNCH CF (2005). Cancer incidence in the agricultural health study. *Scandinavian Journal of Work Environment & Health*, **31**: 39-45.
- ALEXANDER BH, BLOEMEN L, ALLEN RH (2005). Sessions on the epidemiology of agricultural exposure and cancer. *Scandinavian Journal of Work Environment & Health*, **31**: 5-7.
- ASHOKA S, SEETHARAMAPPA J, KANDAGAL PB, SHAIKH SMT (2006). Investigation of the interaction between trazodone hydrochloride and bovine serum albumin. *Journal of Luminescence*, **121(1)**: 179-186.
- ATHERTON KM, WILLIAMS FM, EGEA GONZÁLEZ FJ, GLASS R, RUSHTON S, BLAIN PG, MUTCH E (2009). DNA damage in horticultural farmers: a pilot study showing an association with organophosphate pesticide exposure. *Biomarkers*, **14(7)**: 443-451.
- BEHRENS PQ, SPIEKERMAN AM, BROWN JR (1975). Structure of human-serum albumin. *Federation Proceedings*, **34(3)**: 591.
- BERNARDES MFF, PAZIN M, PEREIRA LC, DORTA DJ (2015). Impact of pesticides on environmental and human health. In: *Toxicology Studies-Cells, Drugs and Environment*, IntechOpen, London, 195-233.
- BHATTACHARYYA B, KAPOOR S, PANDA D (2010). Fluorescence spectroscopic methods to analyze drug-tubulin interactions. *Methods in Cell Biology*, **95**: 301-329.
- BI S, ZHANG H, QIAO C, SUN Y, LIU C (2008). Studies of interaction of emodin and DNA in the presence of ethidium bromide by spectroscopic method. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **69(1)**: 123-129.
- BİRİŞİK N (Ed.) (2018). *Teoriden Pratiğe Kimyasal Mücadele*. Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü, T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Ankara.
- BLAIR A, RITZ B, WESSELING C, FREEMAN LB (2015). Pesticides and human health. *Occupational and Environmental Medicine*, **72(2)**: 81-82.
- BRADBURY SP, COATS JR (2011). Comparative toxicology of the pyrethroid insecticides. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, **108**: 133-177.

- BULUT C, KUBİLAY A (2018). Eğirdir Gölü su kalitesinin trofik durum indeksleriyle belirlenmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, **14(4)**: 324-338.
- CABRAS P, ANGIONI A (2000). Pesticide residues in grapes, wine, and their processing products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48(4)**: 967-973.
- CANHİLAL R, TİRYAKİ O (2010). Kayseri ve civarında bitki koruma uygulamaları: problemler ve çözüm önerileri. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, **26(2)**: 88-101.
- CHISHOLM D, MACPHEE AW (1972). Persistence and effects of some pesticides in soil. *Journal of Economic Entomology*, **65(4)**: 1010-1013.
- CLABORN HV, MANN H, IVEY MC, RADELEFF RD, WOODARD GT (1973). Extraction of toxaphene and strobane in the milk of dairy cows. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **11**: 286-289.
- COATS JR (1990). Mechanisms of toxic action and structure-activity relationships for organochlorine and synthetic pyrethroid insecticides. *Environmental Health Perspectives*, **88**: 255-262.
- COLOSIO C, MORETTO A (2008). Pesticides. In: *International Encyclopedia of Public Health*, Eds.: Heggenhougen, H.K., Quah, S.R., Elsevier, New York, 59-66.
- COLOSIO C, TIRAMANI M, MARONI M (2003). Neurobehavioral effects of pesticides: State of the art. *Neurotoxicology*, **24**: 577-591.
- DAR AM, MIR S (2017). Molecular docking: Approaches, types, applications and basic challenges. *Journal of Analytical and Bioanalytical Techniques*, **8(2)**: 1-3.
- DIAS R, AZEVEDO WRD (2008). Molecular docking algorithms. *Current Drug Targets*, **9**: 1040-1047.
- DOE JE, BOOBIS AR, BLACKER A (2006). A tiered approach to systemic toxicity testing for agricultural chemical safety assessment. *Critical Reviews in Toxicology*, **36**: 37.
- ERDOĞAN BY (2010). Samsun'da yaygın olarak kullanılan pestisitlerin sağlığa ve çevreye etkileri. *Alınları Zirai Bilimler Dergisi*, **19(2)**: 28-35.

- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (2006). Opinion of the Scientific Panel on Plant protection products and their residues (PPR) related to the evaluation of dichlorvos in the context of Council Directive 91/414/EEC. *The European Food Safety Authority Journal*, **4(4)**: 1-45.
- FAN X, HABIB L, FLECKENSTEIN J, HANEKLAUS S, SCHNUG E (2002). In situ digestion” a concept to manage soil phosphate in organic farming. In: *Proceedings of 13th International Fertilizer Symposium, Fertilizers in Context with Resource Management in Agriculture*, Eds.: Hera, C., Schnug, E., Topbas, T.M., Gunal, H., and Ersahin, S., Gaziosmanpasa University, Tokat, 219-228.
- FERNANDEZ-SUAREZ M, TING AY (2008). Fluorescent probes for super resolution imaging in living cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **9(12)**: 929–943.
- FISHEL FM, FERRELL JA (2013). *Managing pesticide drift*. Agronomy Department, UF/IFAS Extension, PI232. University of Florida, USA. Erişim Adresi: [<http://edis.ifas.ufl.edu/pi232>]. Erişim Tarihi: 30.01.2021.
- GE F, CHEN C, LIU D, HAN B, XIONG X, ZHAO S (2010). Study on the interactions between theasinesin and human serum albumin by fluorecence spectroscopy. *Journal of Luminescence*, **130(1)**: 168-173.
- GENERALI T, STEFANELLI P, GIROLIMETTI S, BARBINI DA (2015). Proficiency tests on olive oil organized by the Italian National Reference Laboratory for pesticides: long-term performance of laboratories. *Accreditation and Quality Assurance*, **20(4)**: 247-253.
- GILDEN RC, HUFFLING K, SATTLER B (2010). Pesticides and health risks. *Journal of Obstetric, Gynecologic & Neonatal Nursing*, **39(1)**: 103-110.
- GONÇALVES MST (2009). Fluorescent labeling of biomolecules with organic probes. *Chemical Reviews*, **109(1)**: 190–212.
- GREWAL AS, SINGLA A, KAMBOJ P, DUA JS (2017). Pesticide residues in food grains, vegetables and fruits: A hazard to human health. *Journal of Medicinal Chemistry & Toxicology*, **2(1)**: 1-7.
- GRIMALT S, POZO ÓJ, SANCHO JV, HERNÁNDEZ F (2007). Use of liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry to investigate pesticide residues in fruits. *Analytical Chemistry*, **79(7)**: 2833-2843.
- GÜLER Ç, ÇOBANOĞLU Z (1997). *Pestisitler*. Çevre Sağlığı Temel Kaynak Dizini No.52, İLKÖZ Matbaası, Ankara.

- HAWE A, SUTTER M, JISKOOT W (2008). Extrinsic fluorescent dyes as tools for protein characterization. *Pharmaceutical Research*, **25(7)**: 1487–1499.
- HE W, LI Y, XUE C, HU Z, CHEN X, SHENG F (2005). Effect of Chinese medicine alpinetin on the structure of human serum albumin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **13(5)**: 1837–1845.
- HE XM, CARTER DC (1992). Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature*, **358(6383)**: 209-215.
- HEBIA C, BEKALE L, CHANPHAI P, AGBEBAVI J, TAJMIR-RIahi HA (2014). Trypsin inhibitor complexes with human and bovine serum albumins: TEM and spectroscopic analysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **130**: 254-259.
- HENAO S, ARBELAEZ MP (2002). Epidemiological situation of acute pesticide poisoning in Central America, 1992–2000. *Epidemiological Bulletin*, **23**, 5-9.
- HİSAR O, BEYDEMİR Ş, BÜLBÜL M, ÇİFTÇİ M, KÜFREVİOĞLU Öİ (2003). Gökkuşığı alabalık (*oncorhynchus mykiss*) solungaçlarından karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması ve bazı kinetik özelliklerinin belirlenmesi. *XVII. Ulusal Kimya Kongresi*, 18-21 Eylül, İstanbul Üniversitesi, İstanbul.
- HOGAN CM (2011). Sulfur. *The Encyclopedia of Earth*. Erişim Adresi: [http://editors.eol.org/eoearth/wiki/Sulfur]. Erişim Tarihi: 15.02.2021.
- HOLLOMON DW, WHEELER I, DIXON K, LONGHURST C, SKYLAKAKIS G (1997). Defining the resistance risk of the new powdery mildew fungicide quinoxifen. *Pesticide Science*, **51(3)**: 347-351.
- HU YJ, LIU Y, PI ZB, QUA SS (2005). Interaction of cromolyn sodium with human serum albumin: A fluorescence quenching study. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **13(24)**: 6609–6614.
- HUANG L, LIN Z, ZHOU X, ZHU M, GEHRING R, RIVIERE JE, YUAN Z (2015). Estimation of residue depletion of cyadox and its marker residue in edible tissues of pigs using physiologically based pharmacokinetic modelling. *Food Additives & Contaminants: Part A*, **32(12)**: 2002-2017.
- INTERNATIONAL LABOUR ORGANIZATION (2011). *Safety and Health in Agriculture: Code of Practice*. ILO Publications, Geneva.
- İNAK E, ÇOBANOĞLU S (2016). Akarisitler ve etki mekanizmaları. *Türkiye Entomoloji Bülteni*, **6(4)**: 371-382.

- JANG J, LIU H, CHEN W, ZOU G (2009). Binding of mitomycin C to blood proteins: A spectroscopic analysis and molecular docking. *Journal of Molecular Structure*, **928(1-3)**: 72–77.
- JISHA VS, ARUN KT, HARIHARAN M, RAMAIAH D (2006). Site-selective binding and dual mode recognition of serum albumin by a squaraine dye. *Journal of the American Chemical Society*, **128(18)**: 6024-6025.
- JUNG D, MIN K, JUNG J, JANG W, KWON Y (2013). Chemical biology-based approaches on fluorescent labeling of proteins in live cells. *Molecular BioSystems*, **9(5)**: 862-872.
- KARADAĞ H (2007). *Süperdioksit Dismutaz Enzimin İnsan Eritrositlerinden Saflaştırılması ve Bazı Pestisitlerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisini İncelenmesi*. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- KARAKAYA M, BOYRAZ N (1992). Gıda kirlenmesinde pestisitler ve korunma yolları. *Çevre Dergisi*, **1(4)**: 11-15.
- KAYMAK S, ÖZDEM A, KARAHAN A, ÖZERCAN B, AKSU P, AYDAR A, KODAN M, YILMAZ A, BAŞARAN MS, ASAV Ü, ERDOĞAN P, GÜLER Y (2015). *Ülkemizde Zirai Mücadele Girdilerinin Değerlendirilmesi*. Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü, T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, Ankara.
- KRAGH-HANSEN U (1981). Molecular aspects of ligand binding to serum albumin. *Pharmacological Reviews*, **33(1)**: 17-53.
- KUMAR SV, FAREEDULLAH MD, SUDHAKAR Y, VENKATESWARLU B, ASHOK KUMAR E (2010). Current review on organophosphorus poisoning. *Archives of Applied Science Research*, **2(4)**: 199-215.
- KURUTAŞ EB, KILINÇ M (2003). Pestisitlerin biyolojik sistemler üzerine etkisi. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, **12(3)**: 215-228.
- LAKOWICZ JR (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (3rd Ed.). Springer, New York.
- LI AA, MINK PJ, MCINTOSH LJ, TETA MJ, FINLEY B (2005). Evaluation of epidemiologic and animal data associating pesticides with Parkinson's disease. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, **47**: 1059–1087.
- LI K, ZHU X, WANG Y, ZHENG S, DONG G (2017). Effect of aerobic exercise intervention on DDT degradation and oxidative stress in rats. *Saudi Journal of Biological Sciences*, **24(3)**: 664-671.

- LI X, LI P (2016). Study on the interaction of β -carotene and astaxanthin with trypsin and pepsin by spectroscopic techniques. *Luminescence*, **31(3)**: 782-792.
- LI X, YANG Z (2015). Dissection of the binding of l-ascorbic acid to trypsin and pepsin using isothermal titration calorimetry, equilibrium microdialysis and spectrofluorimetry. *RSC Advances*, **5(45)**: 35487–35496.
- LORENZ S, RASMUSSEN JJ, SÜß A, KALETTKA T, GOLLA B, HORNEY P, STÄHLER M, HOMMEL B, SCHÄFER RB (2017). Specifics and challenges of assessing exposure and effects of pesticides in small water bodies. *Hydrobiologia*, **793(1)**: 213-224.
- LOTTI M, MORETTO A (2005). PNS effects and delayed polyneuropathy. In: *Toxicology of Organophosphate and Carbamate Pesticides*, Ed.: Gupta, R.C., Elsevier, San Diego, 361–370.
- MAKSYMIV I (2015). Pesticides: benefits and hazards. *Journal of Vasyl Stefanyk Precarpathian National University*, **2(1)**: 70-76.
- MCAFEE A (2017). A brief history of pesticide. *American Bee Journal*, **157(7)**: 781-783.
- MENG XY, ZHANG HX, MEZEI M, CUI M (2011). Molecular docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. *Current Computer Aided-Drug Design*, **7**: 146-157.
- MILES JRW, HARRIS CR (1971). Insecticide residues in a stream and a controlled drainage system in agricultural areas of southwestern Ontario, 1970. *Pesticides Monitoring Journal*, **5(3)**: 289-294.
- MORRIS GM, LIM-WILBY M (2008). Molecular docking. *Molecular Modeling of Proteins*, **443**: 365-382.
- MOSTAFALOU S, ABDOLLAHI M, EGHBAL MA, KOUZEHKONANI NS (2012). Protective effect of NAC against malathion-induced oxidative stress in freshly isolated rat hepatocytes. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, **2(1)**: 79-88.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (2022). PubChem Compound Summary for CID 4937, Propazine. Erişim Adresi: [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Propazine]. Erişim Tarihi: 13.07.2022
- NELSON DL, COX MM (2004). *Lehninger Principles of Biochemistry* (4th Ed.). W.H. Freeman, New York.

- NOVO M, AL-SOUFI W (2007). Fluorescence study of the supramolecular interactions between coumarins and serum albumin. In *Proceedings of the 11th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry*, Eds.: Seijas, J.A., Tato, M.P.V., MDPI, Basel.
- OJHA B, DAS G (2010). The interaction of 5-(alkoxy) naphthalen-1-amine with bovine serum albumin and its effect on the conformation of protein. *The Journal of Physical Chemistry B*, **114(11)**: 3979-3986.
- ÖNCÜER C (2000). *Tarımsal Zararlılarla Savaş Yöntemleri ve İlaçları* (4. Baskı). Adnan Menderes Üniversitesi Yayınları, Aydın.
- ÖZTÜRK S, ÖZGE N (1978). *Bitki Koruma İlaçları*. Eser Yayıncılık, Ankara.
- PALÜZAR H. (2013). *Pestisitlerin Vücut Savunma Sistemi Enzimleri Üzerine Etkilerinin İn Vitro İncelenmesi*. Doktora Tezi, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.
- PILOTO AM, COSTA SPG, GONÇALVES MST (2005). A naphtho[2,1- b]furan as a new fluorescent label: synthesis and spectral characterisation. *Tetrahedron Letters*, **46(28)**: 4757–4760.
- SAHOO H (2011). Förster resonance energy transfer – A spectroscopic nanoruler: Principle and applications. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, **12(1)**: 20–30.
- SAHOO H (2012). Fluorescent labeling techniques in biomolecules: A flashback. *RSC Advances*, **2(18)**: 7017-7029.
- SEIFERT J (2014). Neonicotinoids. In: *Encyclopedia of Toxicology* (3rd Ed.), Eds.: Wexler, P., Academic Press, USA, 477-482.
- SHAHABADI N, HASHEMPOUR S (2019). DNA binding studies of antibiotic drug cephalexin using spectroscopic and molecular docking techniques. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, **38(6)**: 428-447.
- SHI X, LI X, GUI M, ZHOU H, YANG R, ZHANG H, JIN Y (2010). Studies on interaction between flavonoids and bovine serum albumin by spectral methods. *Journal of Luminescence*, **130(4)**: 637–644.
- SILVA D, CORTEZ CM, CUNHA-BASTOS J, LOURO SRW (2004). Methyl parathion interaction with human and bovine serum albumin. *Toxicology Letters*, **147(1)**: 53-61.

- SILVA V, MOL HG, ZOMER P, TIENSTRA M, RITSEMA CJ, GEISSEN V (2019). Pesticide residues in European agricultural soils–A hidden reality unfolded. *Science of the Total Environment*, **653**: 1532-1545.
- SKOOG DA, HOLLER FJ, NIEMAN TA (2013). *Enstrümental Analiz İlkeleri* (6. Baskı), Çev.: Kılıç, E., Yılmaz, H., Bilim Yayınları, Ankara.
- SMITH GJ (1987). *Pesticide Use and Toxicology in Relation to Wildlife: Organophosphorus and Carbamate Compounds*. U.S. Department of the Interior, Fish and Wildlife Service, Resource Publication, Washington, D.C.
- SOYLU İ (2013). *Spektroflorimetrik Metotla İnsan Serum Albumin Proteini ile Diklorprop, Karbofuran, Amitrol ve Dikuat Arasındaki Etkileşimlerin İncelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Antalya.
- T.C. MİLLİ EĞİTİM BAKANLIĞI (2012). *Çevre Sağlığı – Pestisitler*. MEB Yayınları, Ankara.
- TANG M, ZHAO M, SHANSHAN Z, CHEN K, ZHANG C, LIU W (2014). Assessing the underlying breast cancer risk of Chinese females contributed by dietary intake of residual DDT from agricultural soils. *Environment International*, **73**: 208-215.
- TEKBAŞ ÖF (2010). *Çevre Sağlığı*. GATA Basımevi, Ankara.
- TEOMAN Ö, YAŞAR P (2016). Türkiye’de 2003 sonrası buğday ve gübre fiyatları ilişkisinin piyasa yapıları bakımından değerlendirilmesi. *Afyon Kocatepe Üniversitesi İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi Dergisi*, **18(1)**: 55-72.
- THUNDIYIL JG, STOBBER J, BESBELLI N, PRONCZUK J (2008). Acute pesticide poisoning: A proposed classification tool. *Bulletin of the World Health Organization*, **86(3)**: 205-209.
- TİRYAKİ O, CANHİLAL R, HORUZ S. (2010). Tarım ilaçları kullanımı ve riskleri. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, **26(2)**: 154-169.
- TOGASHI DM, RYDER AG, O’SHAUGHNESSY D (2010). Monitoring local unfolding of bovine serum albumin during denaturation using steady-state and time-resolved fluorescence spectroscopy. *Journal of Fluorescence*, **20(2)**: 441-452.
- TOSELAND CP (2013). Fluorescent labeling and modification of proteins. *Journal of Chemical Biology*, **6(3)**: 85–95.

- TÜRK S, KARAKAYA E, İNCİ H (2013). Bingöl ilinde organik ürün tüketimini ve tüketim alışkanlıklarını etkileyen faktörler. *9. Ulusal Zootekni Öğrenci Kongresi*, 23-25 Mayıs, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
- TÜRKİYE ÇEVRE SORUNLARI VAKFI (1998). *Türkiye'nin Çevre Sorunları*. Önder Matbaa, Ankara.
- ÜNAL M (2004). Pestisit kullanımı ve meydana getirdiği çevre problemleri. *Morfoloji Dergisi*, **11-12(1-2)**: 78-84.
- VIOQUE-FERNANDEZ A, DE ALMEIDA EA, LOPEZ-BAREA J (2009). Biochemical and proteomic effects in *Procambarus clarkii* after chlorpyrifos or carbaryl exposure under sublethal conditions. *Biomarkers*, **14(5)**: 299-310.
- VURAL N (2005). *Toksikoloji*. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ankara.
- VURAL NT (1984). *Toksikoloji*. Ankara, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları.
- WILSON C, TISDELL C (2001). Why farmers continue to use pesticides despite environmental, health and sustainability costs. *Ecological Economics*, **39(3)**: 449-462.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (1990). *Public Health Impact of Pesticides Used in Agriculture*. WHO Publications, England.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (2004). *Epidemiology of Pesticide Poisoning: Harmonized Collection of Data on Human Pesticide Exposure in Selected Countries*. International Programme on Chemical Safety, Geneva.
- YADAV IC, DEVI NL (2017). Pesticides classification and its impact on human and environment. In: *Environmental Science and Engineering*, Eds.: Kumar, A., Singhal, J.C., Techato, K., Mokina, L.T., Singh, N., Kumar, P., Chandra, R., Caprio, S., Studium Press LLC, USA, 140-158.
- YILDIRIM B (2020). *Hidrazinlenmiş Bazı Kalkon Türevlerinin İnsan Serum Albümin ve Model Membran Sistemlerdeki Floresans Karakteristiği*. Yüksek Lisans Tezi, Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzincan.
- YILDIZ M, GÜRKAN MO, TURGUT C, KAYA Ü, ÜNAL G (2005). Tarımsal savaşımında kullanılan pestisitlerin yol açtığı çevre sorunları. *VI. Türkiye Ziraat Mühendisliği Teknik Kongresi*, TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası, 3-7 Ocak, Ankara.

YORULMAZ S, RECEP AY (2010). Akar ve böceklerde pestisitlerin detoksifikasyonunda rol oynayan enzimler. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, **24(2)**: 137-148.

ZHANG G, WANG L, PAN J (2012). Probing the binding of the flavonoid diosmetin to human serum albumin by multispectroscopic techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **60**: 2721-2729.

ZHANG HM, WANG YQ, ZHOU QH (2009). Investigation of the interactions of quercetin and morin with trypsin. Luminescence: *The Journal of Biological and Chemical Luminescence*, **24(5)**: 355-362.

