

25270

T. C.  
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SITMA VEKTÖRÜ *Anophles sacharovi* ERGİNLERİNDE  
ATPaz AKTİVİTESİ VE SİVRİSİNEK MÜCADELESİNDE  
KULLANILAN PİRİMİPHOS METHYL'İN BU AKTİVİTEYE  
ETKİSİ

T. C.  
Yükseköğretim Kurulu  
Dokümantasyon Merkezi

Bilim Uzmanlığı Tezi

Tez Yöneticisi : Prof. Dr. Halil KASAP

Arş. Gör. Ümit LÜLEYAP

ADANA - 1992

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne

Bu çalışma, Jürimiz tarafından, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında Master tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan

Uye

Uye

ONAY

Yukarıda imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

.... / .. / 1982

Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Müdürü

## TEŞEKKÜR

Tez konumun seçilmesi, yürütülmesi ve tamamlanmasında katkı ve desteği ile her türlü yardımlarını esirgemeyen değerli hocam ve Anabilim Dalı Başkanımız sayın Prof.Dr. Halil Kasap'a , Prof. Dr. Mülkiye Kasap ve Prof.Dr. Ali Matur'a, biyokimyasal konulardaki yardımları için Prof.Dr. Turgay İsbir ve Doç. Dr. Levent Kayrın'a sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Arazi çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Teknisyen Ömer Demir'e ve tezini yazılıp bitirilmesini büyük bir sabırla tamamlayan Anabilim Dalımız Sekreteri Aysel Aslan ve şekilleri çizen Teknisyen Zeliha Teyhani ile birlikte tüm Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı personeline teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
TABLO LİSTESİ	III
ŞEKİL LİSTESİ	IV
ÖZET	VI
1. GİRİŞ	1
1.1. SİVRİSİNEKLERİN GENEL ÖZELLİKLERİ	1
1.1.1. ÇUKUROVA'DA İNSEKTİSİT UYGULAMALARI	3
1.1.2. PİRİMİPHOS METHYL (ACTELLIC)İN TEKNİK ÖZELLİKLERİ	4
1.2. HÜCRE ZARI (=PLAZMA ZARI)	4
1.2.1. HÜCRE ZARININ SIVI MOZAYİK MODELİ	6
1.2.2. HÜCRE ZARININ KİMYASAL YAPISI	7
1.2.3. MEMBRANDAN MADDE GEÇİŞİ	9
1.2.3.1. AKTİF TAŞIMA	9
1.3. SODYUM POTASYUM/MAGNEZYUM ATPaz	11
1.4. KALSİYUM/MAGNEZYUM ATPaz (Ca <sup>+2</sup> /Mg <sup>+2</sup> ATPaz)	14
1.5. MAGNEZYUM ATPaz	15
2. ARAŞTIRMANIN AMACI	18
3. ARAÇ GEREÇ VE YONTEMLER	17
3.1. ARAÇ VE GEREÇLER	17
3.1.1. KİMYASAL MADDELER	17
3.2. BİYOLOJİK MATERİYAL	17
3.3. CİHAZLAR VE DİĞER GEREÇLER	17
3.4. AYIRAÇLARIN HAZIRLANMASI	18
3.4.1. ATKINSON YONTEMİNE GÖRE İNORGANİK FOSFAT ÖLÇÜMÜNDE KULLANILAN AYIRAÇLAR	18
3.4.2. FİSKE-SUBBAROW METODUNA GÖRE İNORGANİK FOSFAT ÖLÇÜMÜNDE KULLANILAN AYIRAÇLAR	18
3.4.3. ATPaz TAYİNİ İÇİN İNKUBASYON ORTAMININ HAZIRLANMASINDA KULLANILAN AYIRAÇLAR	19
3.4.4. PROTEİN TAYİNİNİNDE KULLANILAN AYIRAÇLAR	20
3.5. YONTEMLER	20
3.5.1. BİYOLOJİK MATERİYALIN HAZIRLANMASI	20
3.5.2. ATPaz AKTİVİTESİNİN ÖLÇÜMÜ	21
3.5.2.1. ATKINSON'A GÖRE İNORGANİK FOSFAT ÖLÇÜMÜ	21

3.5.2.2.	Fiske-SUBBAROW'A GÖRE İNORGANİK FOSFAT ÖLÇÜMÜ ...	22
3.5.2.3.	ATP ENZİM SİSTEMİ TAYİNİNDE KULLANILAN İNKUBASYON KOŞULLARI .....	23
3.5.3.	PROTEİN TAYİNİ .....	26
3.6.	İRİMİPHOS METHYL (ACTELLİCTM)™ HAZIRLANMASI ...	27
3.7.	OUABİN'İN HAZIRLANMASI .....	28
4.	<b>BULGULAR</b> .....	29
4.1.	Fiske-SUBBAROW METODUNA GÖRE SİVRİSİNEKLERDE ATPaz SPEİİİK AKTİVİTESİ .....	29
4.1.2.	KONTROL GRUPLARINDA ATPaz SPEİİİK AKTİVİTESİ ....	29
4.1.3.	İRİMİPHOS METHYL'İN ARAZİ VE KOLONİ SİVRİSİNEK- LERİNİN ATPaz SPEİİİK AKTİVİTESİNE ETKİSİ .....	29
4.1.4.	OUABİN'İN ARAZİ VE KOLONİ SİVRİSİNEKLERİNİN ATPaz SPEİİİK AKTİVİTESİNE ETKİSİ .....	31
4.1.5.	İRİMİPHOS METHYL (% 1 LİK) İLE BİRLİKTE KULLANILAN OUABİN'İN ARAZİ VE KOLONİ SİVRİSİNEKLERİNİN ATPaz AKTİVİTESİNE ETKİSİ .....	32
4.1.6.	İRİMİPHOS METHYL (% 2 LİK) İLE BİRLİKTE KULLANILAN OUABİN'İN ARAZİ VE KOLONİ SİVRİ- SİNEKLERİNİN ATPaz AKTİVİTESİNE ETKİSİ. ....	34
4.1.7.	İRİMİPHOS METHYL (% 1 LÜK) İLE BİRLİKTE KULLANILAN OUABİN'İN ARAZİ VE KOLONİ SİVRİSİNEKLERİNİN ATPaz AKTİVİTESİNE ETKİSİ .....	36
4.2.	ATKINSON METODUNA GÖRE SİVRİSİNEKLERİN ATPaz AKTİVİTESİ .....	40
4.2.1.	KONTROL GRUPLARINDA ATPaz SPEİİİK AKTİVİTESİ ....	40
4.2.2.	İRİMİPHOS METHYL'İN ARAZİ VE KOLONİ SİVRİSİNEK- LERİNİN ATPaz SPEİİİK AKTİVİTESİNE ETKİSİ.....	40
4.2.3.	İRİMİPHOS METHYL'İN (% 4 LÜK) YAĞLANMIŞ VE YAĞLANMAMIŞ ARAZİ SİVRİSİNEKLERİNİN ATPaz SPEİİİK AKTİVİTESİNE ETKİSİ .....	42
4.2.4.	% 4 LÜK İİRİMİPHOS METHYL'İN Mg ATPaz ENZİMİ UZERİNDE YAPTIĞI ETKİNİN KİNETİK ÖZELLİKLERİ ....	48
5.	<b>TARTIŞMA VE SONUÇ</b> .....	47
6.	<b>KAYNAKLAR</b> .....	51
7.	<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	61

## TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1. ATPaz tayininde kullanılan iyon ve tampon sistemler .....	24
Tablo 2. ATPaz tayini için kullanılan tamponların ve iyonların miktarları .....	25
Tablo 3. Fiske-subbarow Metoduna göre Pirimiphos metthyl ve Ouabain'in Arazi Sivrisineklerinin ATPaz Enzim Sistemi Üzerindeki Spesifik Aktivitesi. ....	38
Tablo 4. Fiske-Subbarow Metoduna göre Pirimiphos methyl ve Ouabain'in koloni sivrisineklerinin ATPaz Enzim Sistemi Üzerindeki Spesifik Aktivitesi. ....	39
Tablo 5. Atkinson Metoduna göre Pirimiphos methyl'in Arazi ve Koloni Sivrisineklerinin ATPaz Enzim Sistemi üzerindeki Spesifik Aktivite değerler. ....	42
Tablo 6. Fiske-Subbarow Metoduna göre Pirimiphos methyl ve Ouabain'in Arazi sivrisineklerinin ATPaz enzim sistemi üzerindeki inhibasyonunu yüzde (%) olarak gösteren tablo. ....	44
Tablo 7. Fiske-Subbarow Metoduna göre Pirimiphos methyl ve Ouabain'in Koloni Sivrisineklerinin ATPaz enzim sistemi üzerindeki inhibasyonunu yüzde (%) olarak gösteren tablo. ....	45
Tablo 8. Atkinson Metoduna göre Pirimiphos methyl'in Arazi ve Koloni sivrisineklerinin ATPaz enzim sistemi üzerindeki inhibasyonunu yüzde (%) olarak gösteren tablo. ....	45

## ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1. Plazma Zarının Davson-Danielli Modeli .....	5
Şekil 2. Plazma Zarının Robertson Modeli.....	5
Şekil 3. Plazma Zarının Sıvı-Mozayik Modeli. ....	6
Şekil 4. Madde ve moleküllerin hücre zarından geçişi. ...	9
Şekil 5. Sodyum Potasyum pompasının yapısı ve işleyiş basamaklarının döngüsel şekli ( ). ....	12
Şekil 6. Atkinson Yöntemine Göre Çizilen Standart inorganik fosfat eğrisi. ....	22
Şekil 7. Fiske-Subbarow yöntemine göre çizilen standart inorganik fosfat eğrisi. ....	23
Şekil 8. Lowry Yöntemine göre çizilmiş standart Protein Eğrisi. ....	28
Şekil 9. Arazi örneklerinde Pirimiphos methyl'in değişik dozlarının ATPaz enzim sistemine etkileri. ...	30
Şekil 10. Koloni örneklerinde Pirimiphos methyl'in değişik dozlarının ATPaz enzim sistemine etkileri....	30
Şekil 11. Arazi örneklerinde Ouabain'in değişik dozlarının ATPaz enzim sistemine etkileri. ....	31
Şekil 12. Koloni örneklerinde Ouabain'in değişik dozlarının ATPaz enzim sistemine etkileri. ....	32
Şekil 13. Arazi örneklerinde % 1 Pirimiphos methyl ve Ouabain'in 5.25 ve 50 dozlarının ATPaz enzim sistemine etkileri. ....	33

Şekil 14.	Koloni örneklerinde % 1 Pirimiphos methyl ve Ouabain'in 5, 25 ve 50 µM dozlarının ATPaz enzim sistemine etkileri. ....	34
Şekil 15.	Arazi örneklerinde % 2 Pirimiphos methyl ve Ouabain'in 5, 25 ve 50 µM dozlarının ATPaz enzim sistemine etkileri. ....	35
Şekil 16.	Koloni örneklerinde % 2 Pirimiphos methyl ve Ouabain'in 5, 25 ve 50 µM dozlarının, ATPaz enzim sistemine etkileri. ....	36
Şekil 17.	Arazi örneklerinde % 4 Pirimiphos methyl ve Ouabain'in 5, 25 ve 50 µM dozlarının ATPaz Enzim sistemine Etkileri. ....	37
Şekil 18.	Koloni örneklerinde % 4 Pirimiphos methyl ve Ouabain'in 5, 25 ve 50 µM dozlarının ATPaz Enzim Sistemine etkileri. ....	37
Şekil 19.	Arazi örneklerinde Pirimiphos methyl'in değişik dozlarının ATPaz Enzim sistemine Etkileri....	41
Şekil 20.	Koloni örneklerinde Pirimiphos methyl'in değişik dozlarının ATPaz Enzim Sistemine etkileri.....	41
Şekil 21.	Yağlanmamış Arazi örneklerinde % 4 lük Pirimiphos methyl'in ATPaz Enzim aktivitesine etkisi. ....	43
Şekil 22.	Yağlanmış arazi örneklerinde % 4 lük Pirimiphos methyl'in ATPaz Enzim aktivitesine etkisi.....	43
Şekil 23.	% 4 lük Pirimiphos methyl ve ATP'nin artan konsantrasyonlarının Mg ATPaz enzimi üzerinde yaptığı etkiye ait Lineweaver-Burk grafiği. ...	46



## OZET

Bu çalışmada, Sitmanın primer vektörü olan *Anopheles maculipennis* L. türü sivrisineklerin, araziden toplanan ve koloniden alınan örneklerinin, aç (kan emmemiş) ve yağlanmış olanlarında, Pirimiphos methyl (% 1, % 2 ve % 4 luk) ve Ouabain'in (5, 25, 50 mikromolarlık) artan dozlarının in vitro koşullarda uygulanmasıyla, Na-K/Mg, Mg ve Ca/Mg ATPaz enzimlerinin spesifik aktiviteleri üzerindeki inhibisyon etkisi araştırılmıştır.

Kullanılan sivrisinek gruplarının ATPaz aktivitesi, hem Atkinson hem de Fiske-Subbarow tayin yöntemlerine göre Na-K/Mg ATPaz için en yüksek olduğu ve bunu sırasıyla Mg ATPaz ile Ca/Mg ATPaz'ın izlediği ve Arazi örneklerinde, ATPaz aktivitesinin koloni örneklerindeki nazaran daha yüksek olduğu saptandı.

Arazi ve koloni örneklerine Pirimiphos methyl'in artan dozları (% 1, % 2 ve % 4 lük) uygulandığında her iki grupta da insektisit dozunun artışına paralel olarak ATPaz aktivitesinin inhibe olduğu (giderek azaldığı) ve bu inhibisyonun Mg ATPaz üzerinde non-kompetitif olduğu saptandı. Ayrıca Ouabain'in artan dozlarının her iki grubun Na-K/Mg ATPaz'ı üzerinde inhibisyon yaptığı, diğer ATPaz (Mg ve Ca/Mg ATPaz) enzimlerini ise fazla etkilemediği bulundu.

Arazi sivrisineklerinin yağlanmış dişilerine % 4 luk Pirimiphos methyl'in, yağlanmamış olanlara kıyasla daha az etkili olduğu, yani ATPaz aktivitesini daha az inhibe ettiği bulundu.

## 1. GİRİŞ

### 1.1. SIVRISİNEKLERİN GENEL ÖZELLİKLERİ

Sivrisineklerin bağlı bulunduğu Culicidae familyası, içerdiği 2500 kadar tür ile insan ve hayvan yaşamında oldukça önemli bir yer tutmaktadır. Bu familya içerisinde Anopheles, Culex ve Aedes gibi insan sağlığını tehdit eden cinsler yer almaktadır. Sivrisinekler tam metamorfoz geçiren Holometabol böceklerdir. Yumurta, larva ve pupa evreleri suda, ergin evreleri ise karada geçer. Sivrisinekler sıtma ve filarya gibi paraziter hastalıklar ile sarı humma, ensefalitler gibi arthropod kökenli viral hastalık etkenlerinin vektörüdür.

Subtropikal kuşakta yer alan ülkemizde iklim koşulları ve doğal şartlar, sivrisineklerin yaşaması ve üremesi için son derece uygundur. Ülkemizde Anopheles cinsinin on türü bilinmektedir. Bu türlerden, sıtmanın yayılması bakımından en önemlisi olan An. sacharovi'nin hem doğada hem de laboratuvarında birinci derecede sıtma vektörü olduğu saptanmıştır (Ramsdale 1978, Kasap ve ark. 1987, 1989). Vektör An. sacharovi Çukurova bölgesinde oldukça yaygın olup, tüm yıl boyunca görülmekte, hatta kış aylarında bile kan emmiş dişilerine rastlanmaktadır (Kasap ve ark. 1983, Kasap 1987, Kasap ve ark. 1989).

An. sacharovi larvalarına deniz seviyesinden 1720 metre yüksekliğe kadar olan bölgelerde rastlanması (Gökberk, 1961) ve 21-32°C arasındaki sıcaklıklara uyum sağlayabilmeleri, ayrıca erginlerin yüksek sıcaklığa ve neme toleranslı olmaları (Bradley ve ark. 1949, Clements 1963) ülkemizde ve özellikle Çukurova bölgesinde bazı Anopheles türlerinin yaygın olarak bulunmasına ve sıtmanın yayılmasına neden olmaktadır. An. sacharovi dişileri Çukurova bölgesinde tüm yıl boyunca bulunmakta ve yumurta gelişiminin durması çok kısa bir periyoda (Sadece Aralık-Ocak ayları) rastlamaktadır (Kasap ve ark. 1981). Vektör kış aylarında, sıcak ve kuru olan insan barınaklarından ziyade kuytu, nemli ve sıcaklığı 15-16°C olan, içinde hayvan bulunan barınakları tercih etmektedir.

İnsektisit genel olarak böcekleri herhangi bir biyolojik safhada öldürmek için kullanılan bir kimyasal madde veya madde grubudur. Türkiye'de tarımsal ve halk sağlığını koruma amacıyla insektisit uygulaması 1947 yılında kullanılmaya başlanmıştır. İnsektisitler etkili olduğu böceğin biyolojik evrelerine,

böceğin vücuduna giriş biçimine ve kimyasal yapılarına göre sınıflandırılır. Kimyasal yapılarına göre ise insektisitler doğal organik ve sentetik organik bileşikler olarak sınıflandırılır. Insektisitlerin doğal organik kökenli olup bitkilerden Chrysanthemum türlerinin çiçeklerinden elde edilen prethroidler kalıcılık süresinin kısalığı ve pahalı oluşu nedeniyle fazla tercih edilmeyen bir insektisit grubudur. Sentetik organik bileşikler grubuna dahil olan insektisitler organoklorlu, organofosforlu, karbamatlı olarak üçe ayrılır.

**Organoklorlu insektisitler :** Bu grup insektisitlerin çoğu temas yolu ile bazılarında mide zehiri ya da solunum yolu ile vücuda girip kas sinir sistemi üzerinde zehir etkisi yaparlar. DDT, DLN (Dieldrin), BHC (Benzen heksaklorit) bu gruptandır.

**Organofosfatlı insektisitler :** Bu grup bileşikler kolinesteraz enzimini baskı altına alıp sinir impulslarının sürekli kaslara geçmesini sağlayarak zehir etkisi yaparlar. Kalıcılık etkileri organoklorlulara göre daha kısadır. Malathion, Fenitrothion, Parathion, Dieldrin, Fenthion, Temephos (abate) ve bu çalışmada kullandığımız Pirimiphos methyl (Actellic) bu gruptandır.

**Karbamatlı insektisitler :** Bu grup insektisitlerin etki mekanizması organoklorlu bileşiklerde olduğu gibi kas-sinir sistemi üzerinde ve organofosfatlılar gibi asetilkolinesteraz aktivitesinin bloke edilmesi prensibine dayalı olan temas etkili insektisitlerdir. Bendiocarp, karbaryl ve propoxur bu gruptandır.

**Pyrethroid Grubu insektisitler :** Sentetik olarak elde edilmiş olan Pyrethrinlerdir. Etki mekanizmaları doğal pyrethrinlerinki gibi kas-sinir sistemi üzerindedir. Bunlar genel olarak ani etki (knock-down) yaparlar. En çok kullanılanları allethrin, resmethrin ve permethrin'dir.

Böcek büyüme hormonları, feromonlar ve mikrobiyal insektisitlerde sentetik organik bileşikler grubuna dahil olup kullanımları şu anda sınırlıdır.

### 1.1.1. ÇUKUROVA'da İNSEKTİSİT UYGULAMALARI

Çukurova ve özellikle Adana bölgesinde 1957 yılından itibaren planlı bir şekilde kullanılmakta olan değişik insektisitlerin, An. sacharovi'de geliştirdiği fizyolojik rezistans farklı olup, rezistans ve sıtma vakalarındaki artış arasında da çok belirgin bir ilişki vardır (Gökberk ve Bayadal 1962).

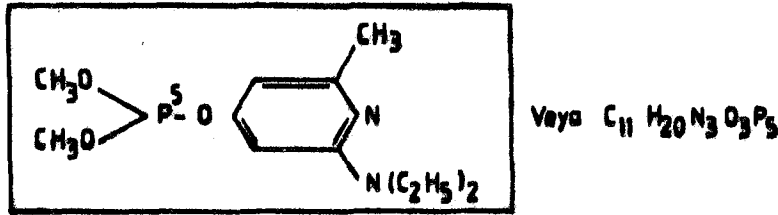
Türkiye'de 1957-1959 yılları arasında sıtma vektörü sivrisineklerle mücadele için konutlarda kalıcı insektisit olarak klorlu hidrokarbonlardan DDT kullanılmıştır. Bu insektisite karşı An. sacharovi'de 1959 yılında gelişen direnç (rezistans) nedeniyle 1959 yılından itibaren aynı gruptan DLN (Dieldrin) kullanılmaya başlanmıştır (Curtis 1962, Gökberk 1959, De Zulueta 1959, Ramsdale 1975 ve Kasap M. 1989). Bu insektisite karşı da direnç geliştiğinden 1971 yılında terk edilmiştir (Ramsdale, Herath ve Davidson 1980).

Daha sonra organofosforlu insektisitlere geçilerek Malathion kullanılmaya başlanmıştır. Malathion'a karşı hafif bir direnç gelişmekle beraber kötü kokusu ve duvarlarda bıraktığı lekeler yüzünden 1984 yılında vazgeçilmiş (Ünsal, 1982) ve 1990 yılına kadar aynı gruptan Pirimiphos-methyl (Actellic) kullanılmıştır. Pirimiphos methyl'e karşı herhangi bir direnç oluşmamış (Kasap ve ark. 1990) ancak uzun yıllar kullanıldığından, sivrisineklerde gelişecek muhtemel bir direnci önlemek için kullanım dışı bırakılmış ve daha toksik etkileri olduğu kabul edilen karbamatlar grubuna geçilerek 1990 yılından sonra Bendiocarb (Ficam) kullanılmaya başlanmıştır.

Pirimiphos methyl, kalıcı insektisit olarak kullanıldığı yıllarda hem ıslanabilir granül (WP) formu hem de sıvı formülasyonu (EC). 2g a.i/m<sup>2</sup> olarak konutların duvar ve tavanlarına püskürtülerek uygulanmıştır. Altı yıl gibi uzun bir uygulama süresinden sonra An. sacharovi'nin bu insektisite karşı halen hassas olduğu, sıvı formülasyonun 1 g a.i/m<sup>2</sup> bile kullanımının bu vektörle mücadelede yeterli olduğu bulunmuştur (Kasap ve ark. 1990).

### 1.1.2. PİRİMİPHOS METHYL (ACTELLIC)'İN TEKNİK ÖZELLİKLERİ

Actellic ve Blax gibi adlarla kullanıma sunulmuş olan kimyasal adı O-2 diethylamina 6 metil pirimidin-4-y100 dimethyl phosphorothialed olan Pirimiphos methylin kimyasal yapısı



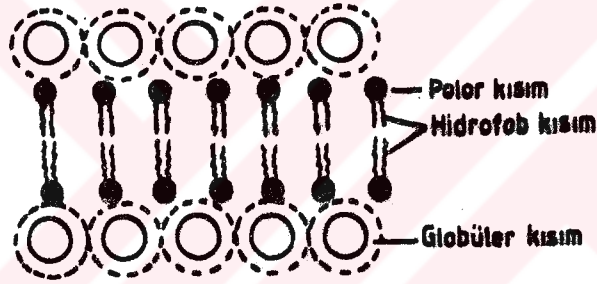
şeklinde olup Molekül ağırlığı 305.4 tür.

Bitki zararlılarına karşı, halk sağlığında ve çalışmamızda kullanılan Actellic, 1970 yılında ICI (Imperial Chemical Industries) Firmasının Plant Protection Division (Bitki Koruma Bölümü) tarafından "PP 511" kod numarası ile üretilmiştir. Pirimiphos methyl (Actellic) organik çözücülerinin çoğu ile çözülür, kuvvetli asidik ve bazik ortamlarında hidrolize olur. Temas ve solunum yolu (fumigant) ile etki gösteren bir insektisit olup akarisit olarak da kullanılır.

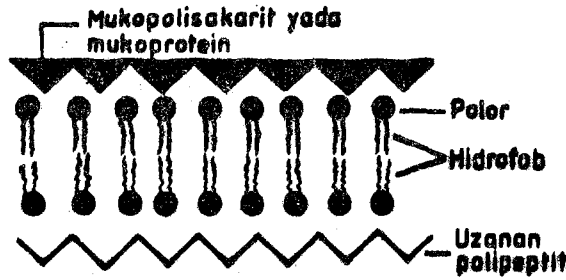
### 1.2. HÜCRE ZARI (=PLAZMA ZARI)

Hücre zarı geçirgenliği üzerinde yapılan ilk araştırmalar hücre zarından yağ ve yağda erimis maddelerin kolayca geçtiğini göstermiştir. Bu nedenle hücre zarının lipid içerdiği ve yağda eriyen maddelerin kolayca geçebildiği sonucuna varılması ile zarın iki katlı lipid'den oluştuğu kabul edilmiştir. Ayrıca suda eriyebilen çoğu küçük moleküllü maddelerin de kolayca girip çıktığı da gözlemlendiğinden zarın por denen delikçikler ve lipid olmayan bölgeler içerdiği düşünülmüştür. 1930 yılında Davson ve Danielli hücre zarı

hakkındaki bu görüşleri birleştirerek hücre zarı yapısını lipoprotein sandviç modeli ile açıklamışlardır (Andaç 1977). Buna göre hücre zarı, ortadaki bir çift fosfolipid tabakası ile bunları saran bir çift protein tabakasından oluşur (Şekil 1). Zarın yapısına giren proteinler, Robertson tarafından önerilen unit membran yapısında (Şekil 2), tabaka şeklinde gösterilmiş olup Sandviç modelini öneren Davson-Danielli modelinde ise globular yapıda gösterilmiştir. Her iki modelde de hücre zarı; ortadaki bir çift lipid tabakası ile bunları saran bir çift protein tabakasından oluşur. Bu modellere göre membran elemanlarının simetrik biçimde yer alması ile çok karmaşık olan membran işlevlerinin açıklanması mümkün olmadığından Singer ve Nicolson tarafından sıvı zar modeli ileri sürülmüştür.



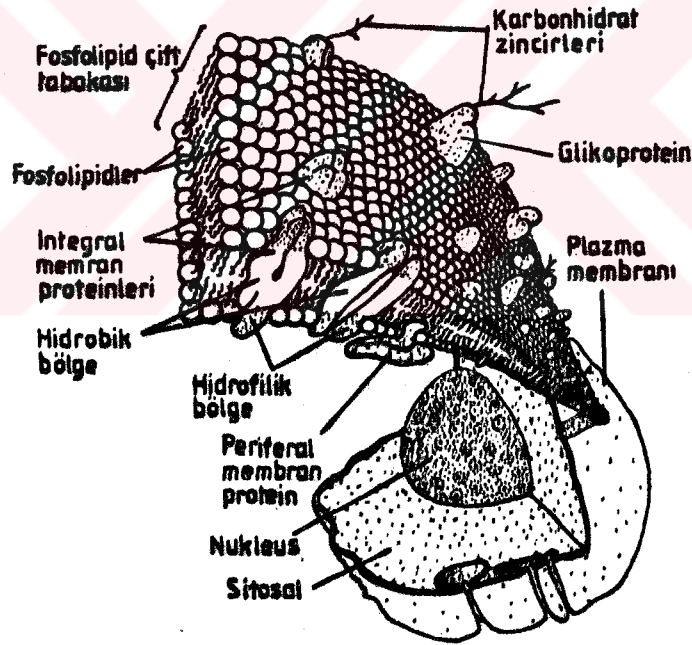
Şekil 1. Hücre Zarının Dawson Danielli Modeli.



Şekil 2. Hücre Zarının Robertson Modeli.

### 1.2.1. HÜCRE ZARININ SIVI MOZAYIK MODELİ

1972 yılında Jonathan Singer ve Garth Nicolson tarafından biyolojik zarların yapısı hakkında sıvı-mozayik zar modeli önerilmiştir (Singer, Nicolson 1972). Bu modele göre asimetrik çift fosfolipid tabakası ve globüler protein tabakalarından oluşmakta ve normal şartlarda bu çift tabaka sıvı halde bulunmaktadır (Bretscher 1973). Lipidlerin polar (hidrofilik) uçları dıştaki sulu ortama doğru yönelirken, hidrofobik (apolar) uçları zar yapısının içine doğru uzanır (Rothman ve ark. 1977). Protein ve glikoproteinler tabaka halinde değil, fakat parçalı ve asimetrik olarak yerleştiğinden, zara mozayik görünümü vermektedir (Şekil 3).



Şekil 3. Hücre zarının Sıvı-Mozayik Modeline göre şekli.

Hücrenin çevreden gelen uyarılara cevap vermesinde, hücre zarının görevi büyüktür. Çok karmaşık fonksiyonların yerine getirilmesine; membran yapısında mevcut olan ve zarın iç ile dış yüzeyi arasında değişik kompozisyonlarda yer alan

proteinlerin vermiş olduğu asimetri ile bu proteinlerin zar bütünlüğünü bozmayacak sınırlı hareketlerinin önemi büyüktür. Ayrıca normal şartlarda lipid ve türevlerinin neden olduğu akıcı özellikten kaynaklanan dinamizm, hücre zarının işlevlerini yerine getirmesini daha iyi açıklayan sıvı mozayik modeli, önerilen diğer modellere göre günümüzde daha çok kabul görmektedir.

### 1.2.2. HÜCRE ZARININ KİMYASAL YAPISI

Hücre zar sisteminde lipid, protein ve karbonhidrat olmak üzere üç ana madde mevcuttur. Zar lipidleri fosfolipid, glikolipid ve kolesterol olmak üzere başlıca üç gruptan oluşur.

#### LİPİDLER:

**Fosfolipidler :** Membran yapısında yer alan fosfolipidlerin en çok rastlanılanı fosfogliseridlerdir, 3 karbonlu gliserolun, 2 yağ asidi ve fosforlanmış alkol ile ester bağı yapmasından oluşmuştur. Diğer fosfolipidlerde ise 3' fosfat grubu; etanolamin, kolin, serin, gliserol yada inositol gibi alkoller ile ester bağı yapmış olarak bulunduğu için bunlara fosfotidilkolin, fosfotidilserin ve fosfotidil etanolamin gibi isimler verilir. Fosfolipidlerde bir polar baş ile apolar kuyruk mevcuttur.

**Glukolipidler :** Karbonhidratlar, karbonhidrat türevleri, sfingozin ve yağ asidini içeren lipidlerdir. Bunlar yaygın olarak serebrozid ve gangliozid şekillerinde bulunurlar. Serebrozidler sfingozinin primer alkol grubuna bir D-galaktoz veya D-glukoz bağlanmasıyla oluşan yapılardır. Gangliozid beynin kul rengi maddesinden ve dalaktan elde edilmiş, hidrolizi noraminik asit, galaktoz, glikoz, kondrozamin, sfingozin ve C<sub>22</sub> ile C<sub>24</sub> yağ asitleri veren lipidlerdir.

**Kolesterol :** Bu sterol genellikle ökaryotik canlılarda bulunur. Kolesterol, zarın her iki tarafında eşit olarak dağılmıştır. Kolesterolün lokalizasyonu fosfolipid dağılımı ile yakın bir ilgi içindedir. Ayrıca lipidlerin dağılımı çeşitli zarlarda değişkenlik gösterir. Örneğin myelinli aksonların zarında % 80 lipid türevleri bulunmasına karşılık, iskelet kası zarında ancak % 15 oranında lipid vardır.



## **KARBONHİDRATLAR :**

Okaryotik hücre zarları % 2-10 arasında glikolipid ve glikoprotein şeklindeki karbonhidratlardan oluşmuştur. Yüksek organizmalarda bulun sfinjosin türevi glikolipidler bir veya daha fazla şeker içerirler. Zar yapısında yer alan şeker molekülleri, protein yan zinciri olarak serin, treonin, asparagin, N-asetil glukozamin veya N-asetil galaktozamine bağlı olarak bulunurlar.

## **PROTEİNLER :**

### **Hücre Zarı Proteinleri ve Görevleri**

Fosfolipid molekülleri, zarın destek ve koruyuculuk özelliğini sağlarken su ve suda eriyen maddelere karşı da bir engel oluşturur. Zarın yapısında yer alan proteinler, zardaki lokalizasyonuna (içte ve dışta oluşuna) göre periferel yada integral olarak ikiye ayrılır. Fakat hücrenin dış ortamla olan ilişkisinde çok önemli yer tutan zar proteinleri işlevlerine göre şu şekilde sınıflandırılırlar.

1) **Kanal Proteinleri :** Bu proteinler hücre zarını enine kat ederek su ve suda erimiş maddelerin geçişine olanak sağlar. Bazıları her zaman açıktır. Bazıları ise hücrenin fonksiyonuna göre açılır veya kapanır.

2) **Elektron transfer Proteinleri:** Elektronları bir molekülden diğerine taşıyarak işlev gören proteinlerdir. Fotosentez ve solunumda görev yapan sitokromlar bu gruba girer.

3) **İmmüni Proteinler :** Doku oluşumunda ve hücreler arası ilişkilerde görev yapan bu proteinlere genellikle polisakkarit zincirleri bağlı olarak bulunur. Bu yapılar hücrelerin birbirine bağlanmasında rol oynadığı gibi bulunduğu hücreye özgü davranış ve eşgüdümü (koordinasyonu) de sağlayabilir.

4) **Reseptör Proteinleri :** Bu proteinler bazı maddelerin bağlanmasını sağlayarak hücre metabolizmasında ve davranışında etkili olur. Örneğin somatotropin (Büyüme hormonu) reseptörlerinin bazı enzimleri etkileyerek hücrenin büyümesi ve bölünmesinde rol oynadığı gibi.

5) **Transport Proteinleri:** Kanal proteinlerine büyük benzerlik

gösteren bu proteinler, hücrenin durumuna göre dış ortamıyla yaptığı madde alışverişi, zarın elektrik potansiyelinin korunması için (Sodyum-Potasyum pompası) ya da Kalsiyum pompasında olduğu gibi) gerekli kimyasal gradiyentin sağlanması veya korunması gibi görevler için özelleşmiş proteinlerdir. Hücre hacminin kontrolünde direkt olarak rol oynayan bu proteinler, hücrenin iç ve dış ortamıyla madde (iyon, aminoasit, şeker v.b. gibi) alışverişini kinetik prensiplere bağlı olarak gerçekleştirir.

### 1.2.3. MEMBRAN'DAN MADDE ULÇIĞI

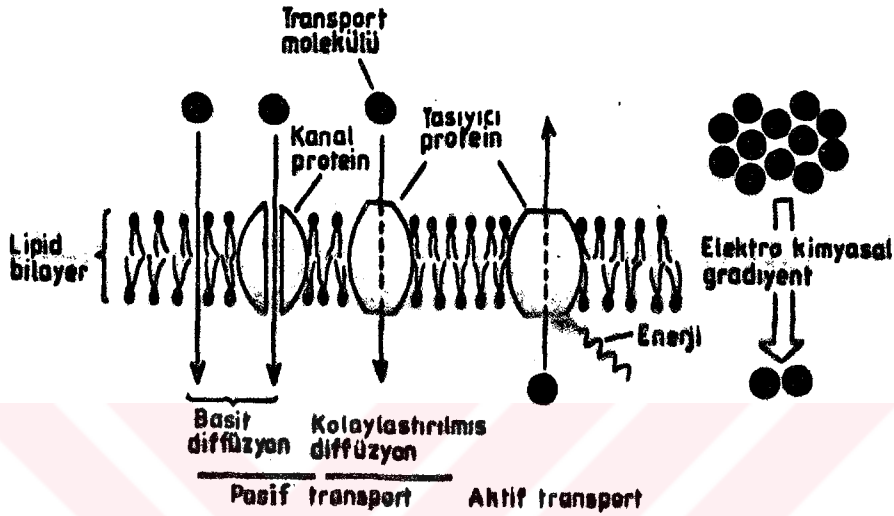
Hücre zarından geçecek olan maddeler hücrenin ihtiyacına ve moleküllerin büyüklüğüne bağlıdır. Hücre zarından maddelerin geçişi; suyun çok yoğun olduğu ortamdaki az yoğun olduğu ortama, yarı geçirgen bir zar aracılığıyla diffüzyonu olan ozmosis ve molekül, iyon gibi maddelerin yoğun oldukları ortamdaki az yoğun oldukları ortama kendi kinetik enerjileri ile yayılmaları olan diffüzyon olayları ile gerçekleşir.

Diffüzyon basit yada kolaylaştırılmış şekilde olabilmektedir. Kolaylaştırılmış diffüzyonda, hücre için gerekli olan aminoasit, şeker gibi moleküllerin herhangi bir enerjiye ihtiyaç duymadan sadece geçirgenliği artırılan yada azaltılan bazı özel taşıyıcı proteinler aracılığıyla yapılan bir transport işidir.

#### 1.2.3.1. AKTİF TAŞIMA

Molekül ve iyonların konsantrasyon veya elektrokimyasal gradiyent farkından dolayı zarın geçişiyle ilgili olan ve metabolik enerjiye ihtiyaç gösteren bir taşıma şeklidir. Aktif taşınmada, benzer molekül ve iyonların zarın bir yüzünden diğer yüzüne tek yönlü olarak taşınması uniport, farklı iki maddenin aynı anda aynı yönde taşınması simport (sitrat, malat ve  $\alpha$ -keto glutarat'ın potasyum eşliğinde aynı yöne taşınmaları) ve farklı iki molekül yada iyonun hücre zarından farklı iki yöne taşınmaları olan antiport şeklinde olmaktadır. Antiport sistemine en iyi örnek  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  pompasıdır. Tüm ökaryotik hücrelerin, hücre zarında yer alan

bu iyon pompası sınıır ve kas gibi hücrelerdeki zar potansiyelesinin oluşmasında, hücre hacminin kontrolünde ve bazı maddelerin hücrelere birlikte taşınmasında önemli rol oynar (Şekil 4).



Şekil 4. Madde ve moleküllerin hücre zarından geçişi.

Hücre zarının iç yüzeyi dışı oranla daha negatif olduğundan iki yüzey arasında bir potansiyel farkı vardır ve buna membran potansiyeli denir. Bu potansiyelin korunması kısmen  $K^+$  kanalı yolu ile hücre dışına sızan  $K^+$  un tekrar hücre içine alınmasına ve aynı kanaldan hücre içine sızma eğilimi gösteren  $Na^+$  un hücre dışına verilmesine bağlıdır. İyonların bulunmaları gereken yerlere gönderilmesi ise  $Na^+-K^+$  pompası ile gerçekleşir. İlk defa 1957 yılında Sodyum Potasyum pompasının bir  $Na^+-K^+$  ATPaz olduğu anlaşılmıştır (Skou, 1957). Daha sonra yapılan araştırmalarda doku ve organlardaki hücrelerde değişik iyon ve moleküllerin taşınmasında görevli, enzim özgüllüğü gösteren ve taşıdıkları iyon veya maddelere göre isimlendirilen farklı pompa (=ATPaz) proteinleri bulunmuştur. Örneğin Hidrojen ATPaz, Magnezyum ATPaz, kalsiyum/Magnezyum ATPaz ve Sodyum-Potasyum ATPaz gibi.

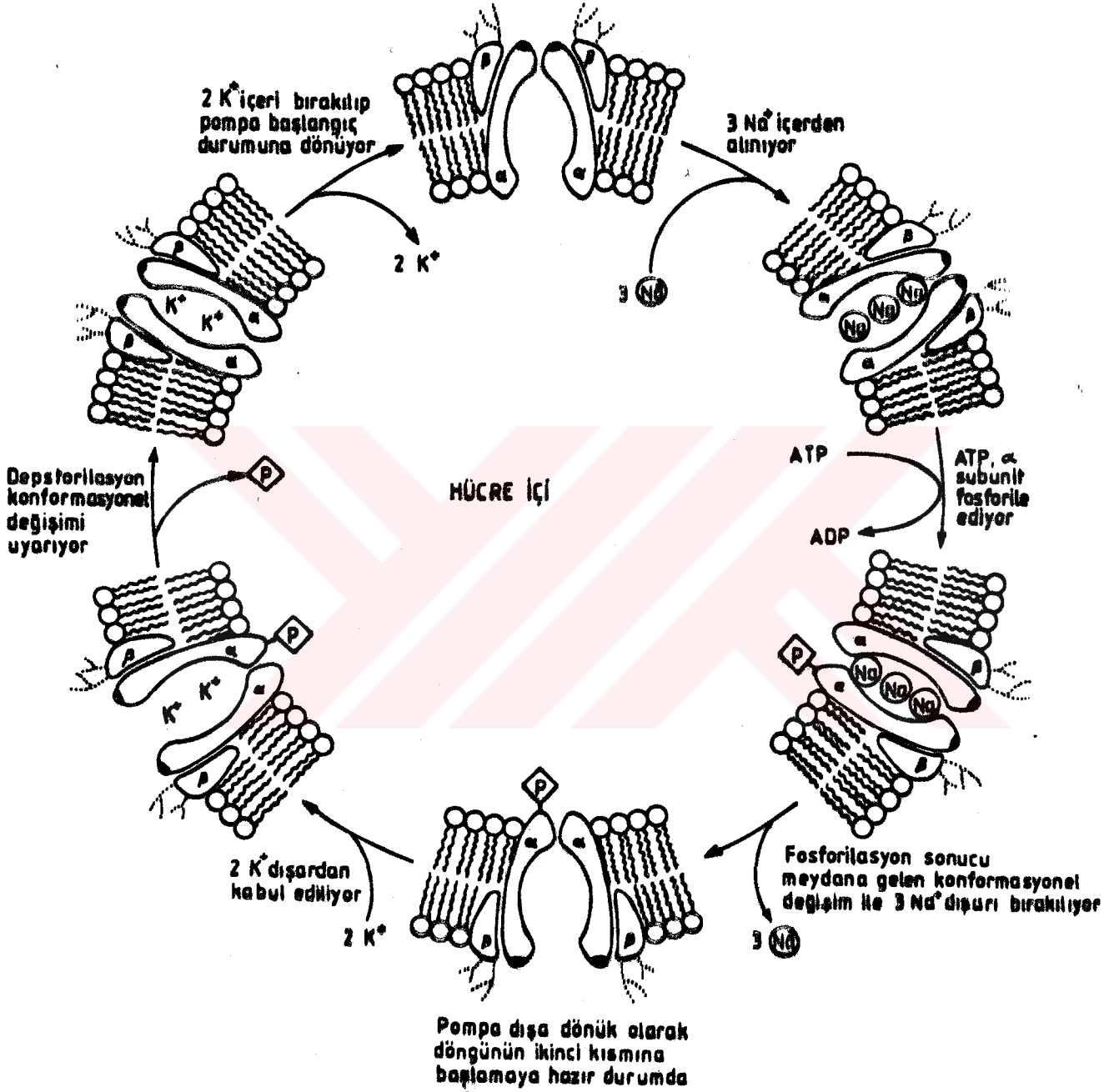
### 1.3. Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>/Mg<sup>2+</sup> ATPaz (SODYUM-POTASYUM ATPaz)

Sodyum-Potasyum pompası oligomerik yapıda bir transmembran proteini olup, 270 kilo dalton molekül ağırlığında  $\alpha_2\beta_2$  yapısında bir tetramerdir. Bu tetramerlerden  $\alpha$  biriminin molekül ağırlığı 95 kilo daltondur. Bu birimde ATP hidrolizi meydana gelir, kardiyotonik steroidlerde bu birime bağlanır. Beta biriminin molekül ağırlığı 40 k dalton olup karbonhidrat grupları taşır. Karbonhidrat grupları diğer zar glikoproteinleri ile birlikte bulunmaktadır. Şekil 5'te görüldüğü gibi her alfa birimi zarı dikine kat eder. Ayrıca alfa birimleri birbirine yakın olup beta birimleri ise birbirine uzaktır.

Pompanın çalışması süresince fosforilasyona bağlı sodyum ve defosforilasyona bağlı potasyum transportu gerçekleşir. Başlangıç durumunda hücre içindeki sodyum konsantrasyonu'nun fazla olması nedeniyle üç sodyum sitosölden alınır ve ATP'nin alfa alt birimini fosforile etmesi sonucu pompanın yapısında meydana gelen konformasyonel değişim ile dışarı bırakılır. Bu durumda pompa dışı doğru açık olduğundan potasyum kabul edecek durumdadır. Potasyumun pompaya bağlanması ve defosforilasyonun neden olduğu konformasyonel değişim ile potasyum iyonları sitosöle bırakılıp pompa başlangıç durumuna döner.

Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>/Mg<sup>2+</sup> ATPaz enzimi CTP, ITP, GTP ve UTP gibi nükleotidleri substrat olarak kullanabilmesine rağmen enzimin birinci derecede substratı ATP dir. Enzimin ATP ye bağlanması için ortamda magnezyum iyonunun bulunması gerekir (Flaschner ve ark.1978). Eğer ortamda magnezyum yoksa bağlanma gerçekleşmez. Magnezyum dışında enzim % 10 oranında mangan ve kobalt gibi iki değerli aktivatörleri de kullanır. Fakat Fe<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup> ve Be<sup>2+</sup> gibi bazı iki değerli katyonlar ATP hidrolizini inhibe eder. Enzim üzerinde spesifik inhibisyon yapan diğer bir madde ise Ouabain'dir (Akeru, 1971). Enzim üzerine ouabainin etkisi, Ouabain'in hücre dışından verilmesi ile olmakta, sitozöle verilmesi durumunda ise hiçbir etki olmamaktadır. Inhibisyon sırasında ouabain/ATP oranı 1/1 dir. Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pompasına ouabainin yaptığı inhibisyon defosforilasyon basamağında olup inhibisyon

Pompanın başlangıç durumu:  
pompa ie dönük olarak bulunmaktadır



Sekil 5. Hüc re zarında Sodyum-Potasyum pompasının yapısı ve işleyiş basamaklarının döngüsel şekli.

derecesi ortamda bulunan potasyum konsantrasyonuyla ters orantılı biçimdedir (Ronald, E, 1970). Yani dış ortamdaki  $K^+$  derişimi yükselttilerek bu inhibitör etki azaltılabilmektedir.  $K^+$  varlığında azalan bu inhibisyonu karşılık  $Na^+$  varlığında inhibisyon hızlanmaktadır (Akeru, 1971). Ouabain-enzim kompleksinin oluşumu yüksek  $K^+$  ile yavaş yavaş önlenir. Fakat oluşan ouabain-enzim bileşigi, enzim-substrat bileşiginden daha stabildir.  $K^+$  un artan konsantrasyonlarının ouabainin enzim üzerindeki inhibitör etkisini azaltması şu şekilde açıklanmaktadır. Potasyum enzim üzerine bağlanarak enzimin yapısında konformasyonel bir değişim yapmakta ve bundan dolayı ouabainin enzime bağlanmasını engellemektedir (Moczydlowski, Fates, 1980). Ouabain inhibisyonunun  $K^+$  a kompetitif olmasına karşın, ATP hidrolizinin başlangıç yeri olan iç kısma (sitozöle bakan kısma) etkisinin allosterik ve nonkompetitif olduğu ileri sürülmüştür (Akeru, 1971). İnsektisitlerde, insektisit'in çeşidi ve dozuna (DDT ve turevleri gibi) bağlı olarak inhibisyona neden olmaktadır (Akeru ve ark. 1971, Bailin ve ark. 1988). Bu inhibisyonun membran kompozisyonunda yaptığı değişim özellikle fosfolipidlerin yapısındaki değişiklikten ya da enzimin özgül substratına benzerlik gösteren inhibitör ajanın moleküler yapısından kaynaklanabilir.

Her ne türde inhibisyon olursa olsun bunun enzim kinetiği açısından belirli bir anlamı vardır. Örneğin yapılan çalışmalarda Ouabain'in  $Na^+-K^+$  ATPaz enzimi üzerinde kompetitif ( $V_{max}$  ler aynı  $K_m$  farklı) inhibisyona neden olduğu bildirilmiştir (Akeru ve ark. 1970). Oysa organoklorlu bir insektisit olan Aldrin'in  $Na^+-K^+$  ATPaz üzerinde nonkompetitif ( $K_m$  aynı  $V_{max}$  farklı), Magnezyum ATPaz da ise un kompetitif ( $V_{max}$  ve  $K_m$  ler farklı) inhibisyona neden olduğu bildirilmiştir (Chandra ve Podda 1990).

$Na^+-K^+/Mg$  ATPaz zar sistemine bağlı diğer enzimler gibi zar sisteminden deterjan, fosfolipaz ve benzerlerinin yardımı ile izole edilmekle birlikte lipidlerin uzaklaştırılması, enzimin kısmen veya tamamen inaktive olmasına neden olur (Stephen, Goldman, Albers, 1972). Bu değişimin ortamdaki tüm fosfolipidlerin uzaklaştırılmasıyla mı yada özel bazı fosfolipidlerin ayrılması sonucu mu meydana geldiği henüz tam

anlamıyla anlaşılammıştır (Noyan, 1979). Yapılan araştırmalar sonucu, enzim fraksiyonlarında fosfotidil serin, fosfotidilinositol'un aktivasyonu en yüksek noktaya çıkardığı gözlenmiştir. Aktivasyondan fosfolipidlerin polar grupları mı? yoksa yağ asitlerinin mi sorumlu olduğu hala tartışmalıdır. Deterjan ve benzer etki yapan maddelerin bu tür olumsuz etkilerinden sonra ortama konulan fosfotidil serin (PS) in, ATP az enzimi için en yüksek restorasyon kaynağı olduğu gözlenmiştir (Hokin, 1959, Priestlind, Whittam 1972).

#### 1.4. $Ca^{+2}/Mg^{+2}$ ATPaz (KALSİYUM / MAGNEZYUM ATPaz)

Magnezyum ve ATP,  $Na^{+}-K^{+}/Mg^{+2}$  ATPaz da olduğu gibi  $Ca^{+2}/Mg^{+2}$  ATPaz'ın da gerçek bir substratıdır. Daha çok sarkoplazmik retikulumda çalışan bu enzim, kalsiyum iyonlarının taşınmasından sorumludur (Petithory ve Jenks 1988). Eritrosit zarında bulunan  $Ca^{+2}/Mg^{+2}$  ATPaz 150.000 dalton molekuler ağırlıkta olup bir ATP bağlama, bir fosforilasyon ve iki kalsiyum, bağlama bölgesine sahiptir.  $Ca^{+2}/Mg^{+2}$  ATPaz her mol ATP hidrolizi ile kalsiyum iyonunun hücre içinden hücre dışına taşınmasını sağlamaktadır. Etki mekanizmasında, ATP'nin  $Ca^{+2}/Mg^{+2}$  ATPaz'a bağlanmasının magnezyum iyonuna gereksinim duyması, bu enzimi  $Na^{+}/K^{+}/Mg^{+2}$  ATPaz dan ayırt edici niteliktedir (Reeading ve Isbir 1980).  $Ca^{+2}/Mg^{+2}$  ATPaz enziminin katalik etkisi konusunda  $Na^{+}-K^{+}/Mg^{+2}$  ATPaz için önerilen mekanizmanın benzeri önerilmektedir.  $Ca^{+2}/Mg^{+2}$  ATPaz, divalen katyonlardan mangan ve kobalt % 70 verimle enzim üzerinde olumlu etki yapabilmekte, baryum ve bakır ise aktivasyonu inhibe etmektedir. Ancak monovalent katyonların inhibitor ya da uyarıcı etkisine ait hiçbir sonuç gözlenmemiştir. Ouabainin  $Na^{+}-K^{+}/Mg^{+2}$  ATPaz üzerinde olduğu gibi bu enzimin özgün bir inhibitörü olmadığı, ayrıca oligomisinden etkilendiği rapor edilmiştir (Whitton ve Ager 1965).

### 1.5. Mg<sup>2+</sup> ATPaz (MAGNEZYUM ATPaz)

Magnezyum iyonunun transportundan sorumlu olan Mg<sup>2+</sup> ATPaz enzimi hakkındaki bilgilerimiz henüz yeterli değildir; Şeker ve fosfatların taşınmasından sorumlu olduğu ileri sürülmektedir. Yalnız nörotransmitörlerin taşınmasından sorumlu olduğu kesinlik kazanmış gibidir (Harrison ve Lunt 1990).



## 2. ARASTIRMANIN AMACI

Türkiye'de özellikle Çukurova bölgesinde Halk sağlığını etkileyen zararlılar ve tarımsal zararlılarla mücadele için yoğun bir pestisit kullanımı vardır. Bunlardan insektisitler zararlıya temas, solunum veya mide yolu ile geçerek etkili olmaktadır. Son yıllarda organo-fosfatlı insektisitlerin kullanımı ağırlık kazanmıştır. Organo-fosfatlı (ve karbamatlı) insektisitlerin asetil kolinesteraz enzimini inhibe ederek, sinir-kas yapısında impuls geçişini bozması sonucu, hedef canlının ölümüne neden olduğu iyi bilinmektedir. Ayrıca insektisitlerin uygulandığı zararlıda ATPaz aktivitesini etkilediği hakkında sınırlı sayıda yayın bulunmaktadır; çalışmamızda bu konudaki bilgilere katkıda bulunmak üzere sıtma vektörü An. sacharovi'nin halen hassas olduğu Pirimiphos methyl'in bu türün farklı gruplarındaki ATPaz aktivitesine etkilerinin incelenmesi düşünölmüş ve bu amaçla aşığıdaki hususların araştırılması planlanmıştır:

1. Insektisit (Pirimiphos methyl)in araziden toplanan ve koloniden alınan An. sacharovi erginlerinin ATPaz aktivitesine etkisinin incelenmesi.
  - 1.a. Na-K/Mg, Mg ve Ca/Mg ATPaz aktivitesinin Ouabain'den nasıl etkilendiğinin incelenmesi
  - 1.b. Ouabain ve insektisit'in birlikte uygulanmasının ATPaz aktivitesini nasıl etkilediğinin incelenmesi.
  - 1.c. ATPaz'ın özgül substratı olan ATP ile insektisit'in enzim kinetiği açısından incelenmesi.
2. Pirimiphos methyl'in An. sacharovi dişilerinde ATPaz aktivitesine etkisinin incelenmesi.

### 3. ARAC GEREÇ VE YÖNTEMLER

#### 3.1. ARAC VE GEREÇLER

##### 3.1.1. KİMYASAL MADDELER

Çalışmada kullanılan ayıraçlar, Potasyum dihidrojen fosfat, Molibdik asit, sulfirik asit, lubrol, sodyum klorür, EDTA, Folin Ciocalleu Fenol, Bovine albumin, Adenozin 5'-fosfat, Potasyum klorür, Magnezyum klorür ve Kalsiyum klorürden hazırlanmıştır.

##### 3.2. BİYOLOJİK MATERYAL

Biyolojik inceleme materyali olan sıvrisinekler (*M. saccharovi*) ergin dişileri olup Tabaklar (Tuzla-Adana) koyundan toplanan doğal populasyon (yabani) örnekleri ile Çukurova Üniversitesi İip Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı inektaryumunda  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  ve % 60-80 nispi nemde yetiştirilen koloni örneklerinden oluşmaktadır. ATPaz aktivitesi nanomol inorganik fosfat/miligram protein/saat (nmol Pi/mg Protein/saat) şeklinde spesifik aktivite olarak belirlendiğinden, sadece kan emmiş ve yağlanmış dişiler ayrı gruplar halinde incelenmiştir. Diğer fizyolojik yaş grupları (kan emmiş, yarı-gravit ve gravit olanlar) ATPaz spesifik aktivitesinin ölçümünde yüksek protein değeri vererek yanlışlara neden olacağı için kullanılmamıştır.

##### 3.3. CİHAZLAR VE DİĞER GEREÇLER

Biyolojik materyalin (sıvrisineğin) hazırlanmasında Sartorius terazi, Virtis (Virsonic-300) sonik homojenizator, Nave (NF-415) santrifüj aleti, ATPaz enzim sistemi ölçümünde ise Shimadzu UV-160 spektrofotometresi ve Grant Benmari cihazları kullanılmıştır.

### 3.4. AYIRACLARIN HAZIRLANMASI

#### 3.4.1. ATKINSON YÖNTEMİNE GÖRE İNORGANİK FOSFAT ÖLÇÜMÜNDE KULLANILAN AYIRACLAR

a) Cirrasol ALN-WP (LUBROL): % 5 konsantrasyonunda su banyosunda ısıtılarak hazırlanmış ve misel agregasyonuna bağlı bulanıklığın giderilmesi için kullanılmadan önce 37°C de su banyosunda bekletilmiştir.

b) Molibdik asit çözeltisi: % 2 Molibdik asit'in 1.8 M sülfirik asit içinde çözünmesiyle hazırlanmıştır. Bu çözelti + 4°C de ve polietilen şişede uzun süre saklanabilmektedir.

c) Cirrasol-Asit Molibdat Çözeltisi: 10 hacim % 5'lik Lubrol + 25 hacim % 2'lik Molibdik asit + 65 hacim saf su karıştırılmıştır. Bu çözelti günlük hazırlanır. Uda ısısında 8 saat, + 4°C de 24 saat dayanıklıdır.

d) Standart fosfat çözeltisinin hazırlanması: 27 mg  $KH_2PO_4$  100 ml saf suda 0.2 mM olarak hazırlandı. İnkübasyon ortamında 2.5 ml iyon ve tampon kullanılması gerekliliğinden 2.5 ml : 1000 x 0.2 mM=500 nmol inorganik fosfat bulunacak şekilde stok solüsyon hazırlandı. Stok solüsyonun 1:1, 1:4, 1:10 olarak sulandırılmasıyla 250, 125 ve 50 nmol/2.5 ml konsantrasyonlarında standart inorganik fosfat çözeltileri hazırlanmıştır. Stok standart çözeltisine bozulmasını önlemek için % 1 lik kloroformdan 1-2 damla ilave edilmiştir.

#### 3.4.2. FISCHE SUBBAROW METODUNA GÖRE İNORGANİK FOSFAT ÖLÇÜMÜNDE KULLANILAN AYIRACLAR

a) Fiske-Subbarow Reducer: Sigma Firmasından alınan ve içinde 1 amino-2 naftol-4 sülfanik asit'in sodyum bisülfid ve sodyum sülfid'in karışımından oluşan Reducer ajanı kullanılmıştır.

b) Amonyum Molibdat : % 2.5 Amonyum molibdat'ın saf suda çözünmesiyle hazırlanmıştır.

c) Sülfirik Asit: 5 N sülfirik asit in hazırlanması için 68.1 ml % 98'lik ve 1.036 gr/cm<sup>3</sup> yoğunlukta olan stok sülfirik asit e 431,9 ml su ilave edilmesiyle hazırlanmıştır.

d) Standart fosfat solüsyonu'nun hazırlanması için 0.1363 gr analitik saflıktaki  $KH_2PO_4$ 'in 100 ml suda

çözünmesiyle elde edilen 0.2 mM stok solüsyonun 1:1, 1:4 ve 1:10 şeklinde sulandırılmasıyla 250, 125 ve 50 nmol/2.5 ml içindeki konsantrasyonları hazırlanmıştır.

### 3.4.3. ATPaz TAYINI İÇİN İNKUBASYON ORTAMININ HAZIRLANMASINDA KULLANILAN AYIRACLAR :

1. 0.75 mM Kalsiyum klorür çözeltisi :  
Kalsiyum klorür 0.0275 gr.  
250 ml saf suda çözülür.

2. 30 mM Magnezyum klorür çözeltisi :  
Magnezyum klorür 1.52 gr.  
250 ml saf suda çözülür.

3. 25 mM Potasyum klorür çözeltisi :  
Potasyum klorür 0.466 gr.  
250 ml saf suda çözülür.

4. 500 mM Sodyum klorür çözeltisi:  
Sodyum klorür 7.305 gr.  
250 ml saf suda çözülür.

5. 2.5 mM EDTA Na<sub>2</sub> çözeltisi :  
EDTA Na<sub>2</sub> 0.2326 gr.  
250 ml saf suda çözülür.

6. 125 mM Tris PH: 7.4 (B<sub>1</sub>)  
Tris HCl 5.72 gr.  
Tris Baz 1.66 gr.  
400 ml saf suda çözülür.

7. 211 mM Tris PH=7.4 (B<sub>2</sub>)  
Tris HCl 5.72 gr.  
Tris Baz 1.66 gr.  
675 ml saf suda çözülür.

8. 306 mM Tris PH= 7.4 (Bz)  
Tris HCl 7.72 gr.  
Tris Baz 1.66 gr.  
980 ml saf suda çözülür.
9. 117.9 mM Tris PH= 7.4 (Ba)  
Tris HCl 5.72 gr.  
Tris Baz 1.66 gr.  
370 ml saf suda çözülür.
10. 202.9 mM Tris PH=7.4 (Bb)  
Tris HCl 5.72 gr.  
Tris Baz 1.66 gr.  
649.28 ml saf suda çözülür.
11. 287 mM Tris PH=7.4 (Bc)  
Tris HCl 5.72 gr.  
Tris Baz 1.66 gr.  
9118 ml saf suda çözülür.
12. 75 mM ATP disodyum  
ATP disodyum 0.4674 gr.  
Saf su 10 ml.

#### 3.4.4. PROTEİN TAYİNİNDE KULLANILAN AYIRACLAR

Analizi yapılan örneklerin protein miktarı, Sığır Serum Albumini (BSA), Folin Ciocalteus Fenol, Deoksikolat (DOÇ), Triklorasetat (TCA) ve Lowry solüsyonundan oluşan kimyasal maddelerin bulunduğu (Sigma) Protein Tayin kiti (P-5656) ile yapıldı.

#### 3.5. YÖNTEMLER

##### 3.5.1. BİYOLOJİK MATERYALIN HAZIRLANMASI

Biolojik materyalin hazırlanmasında, Albers ve arkadaşları (Albers ve ark, 1965) tarafından geliştirilen yöntem kullanılmıştır. Arazi ve koloniden sağlanan sinekler miligram ağırlıklarına göre 1000 kez sulandırılarak homojenize edildi. Kullanılan sonik homojenizatörün yüksek frekansta protein denaturasyonuna neden olmaması için, örnekler buzlu ortama alındı. Ayrıca in vitro deney koşullarında izotonikliğin sağlanması ve ozmolaritenin değişmemesi için 0.32 M sukroz ile muamele edildi.

Sivrisineklerin yapısında bulunan kitin, homojenizatör ile parçalanmadığından örnekler 3 defa 5'er dakikalık sürelerle 5000 rpm'de santrifüj edildi. Böylece kitinden arındırılmış olan örnekler ATPaz enzim tayini için hazır hale getirildi.

Kontrol ve diğer deney gruplarına ait ATPaz tayini için her deney 10 kez tekrarlanmış ve her çalışmada 7-12 arasında değişen sivrisinek kullanılmıştır. ATPaz enzimlerinin spesifik aktivitelerine ait elde edilen değerler için sınıflanmamış gruplarda aritmetik ortalama ve standart hata hesaplamaları yapılarak ortalamalar bulunmuştur.

### 3.5.2. ATPaz AKTİVİTESİNİN ÖLÇÜMÜ

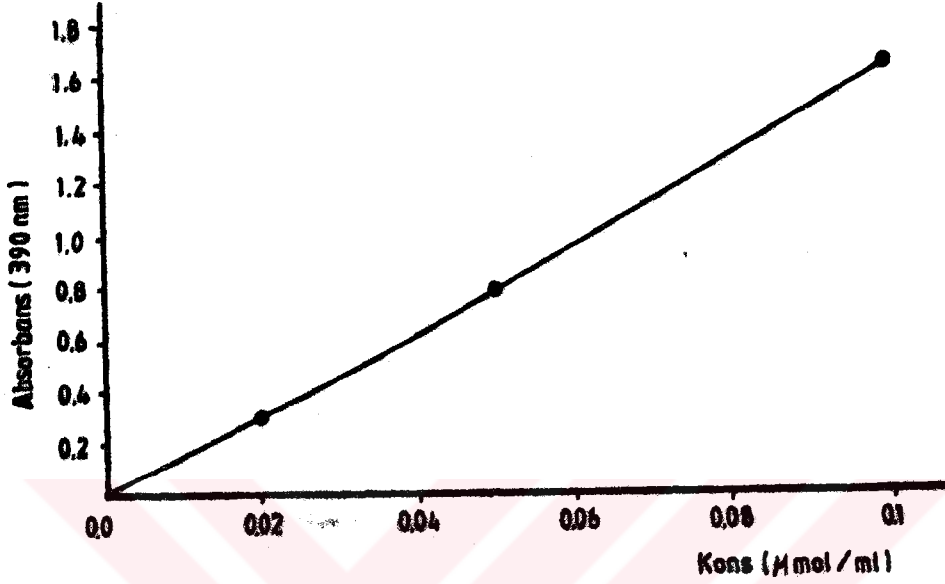
Adenozin trifosfataz aktivitesi, inkubasyon sırasında ortama eklenen 3 mM disodym ATP varlığında her miligram protein için bir saatte açığa çıkan inorganik fosfatın ölçülmesi prensibine dayanarak ölçüldü.

#### 3.5.2.1. ATKINSON'A GÖRE İNORGANİK FOSFAT ÖLÇÜMÜ

**ilke :** inkubasyon ortamına eklenen ATP'den açığa çıkan inorganik fosfatın, Cirrasol ALN-WF (Lubrol) ve fosfomolibdat ile kompleks kurması ilkesine dayanır (Atkinson ve ark. 1973).

**telem :** Buzda bekletilen ve inkubasyon ortamından dolayı içeriği 2.5 ml olan tüplere 5 ml Cirrasol-Asit molibdik ayırıcı eklenir ve 10 dakika bekletildikten sonra, kör tüpüne karşı 390 nm'de absorbanans değerleri alınır.

**Değerlendirme :** Standart eğrinin çizimi için mililitrede 0.1, 0.05 ve 0.02 mikromol  $KH_2PO_4$  içeren ortofosfat standartları hazırlanır ve 390 nm dalga boyunda bu standart solüsyonların optik dansitelerine (O.D.) göre standart inorganik fosfat eğrisi çizilmiştir (Şekil 6). örneklerde, ATPaz aktivitesi sonucu açığa çıkan inorganik fosfatın miktarını belirlemek için standart inorganik fosfat eğrisinden yararlanılmıştır.



Şekil 6. Atkinson yöntemine göre çizilen standart inorganik fosfat eğrisi.

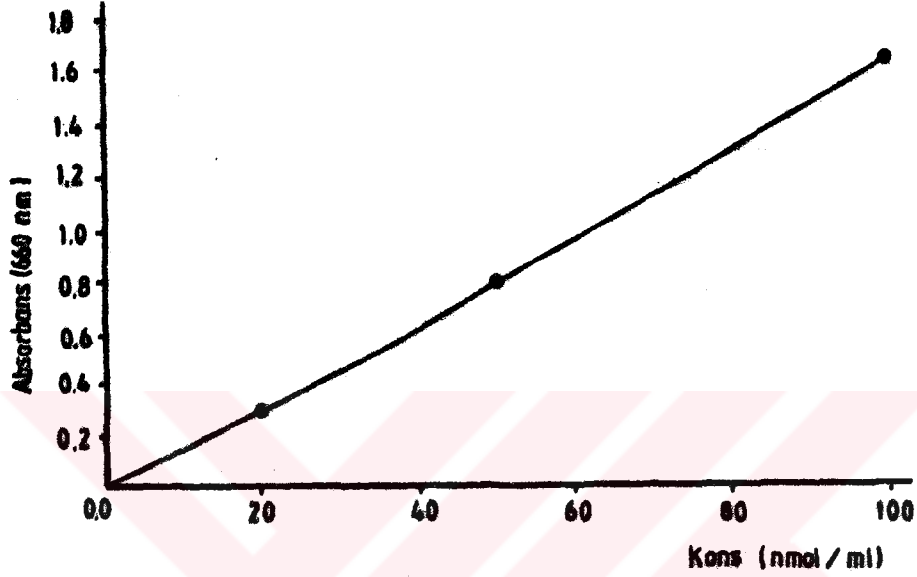
### 3.5.2.2. FISCHE-SUBBAROW'A GÖRE İNORGANİK FOSFAT ÖLÇÜMÜ

**ilke** : inkübasyon ortamına eklenecek ATP'den açığa çıkan inorganik fosfatın, sülfirik asit, Amonyum molibdat ve Fiske-Subbarow (Fiske-Subbarow 1925) indirgeyici ajanıyla kompleks kurması ilkesine dayanır.

**işlem** : inkübasyon ortamından dolayı içeriği 2.5 ml olan tüplere 1 ml 5N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 ml Amonyum molibdat ve 0.1 ml Fiske-Subbarow indirgeyici ajanı ilave edildikten sonra bu ile 10 ml ye tamamlanır. 10 dakika bekletildikten sonra kör tüpüne karşı 660 nm dalga boyunda absorbans değerleri alınır.

**Değerlendirme** : Standart eğrinin çizimi için mililitrede 100, 50 ve 20 n mol KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> içeren ortofosfat standartları hazırlanır ve 660 nm dalga boyunda bu standart solüsyonların optik dansitelerine göre standart inorganik fosfat eğrisi çizilmiştir (Şekil 7). örneklerde, ATPaz aktivitesi sonucu

açığa çıkan inorganik fosfatın miktarını belirlemek için standart inorganik fosfat eğrisinden yararlanılmıştır.



Sekil 7. Fiske-Subbarow yöntemine göre çizilen standart inorganik fosfat eğrisi.

### 3.5.2.3. ATP ENZİM SİSTEMİ TAYİNİNDE KULLANILAN İNKUBASYON KOSULLARI

Çalışmada, ATPaz enzim aktivitesi, Atkinson ve Fiske-subbarow metodlarına göre yapılmış olup inkübasyon ortamları Isbir ve Reading (Reading ve Isbir 1979, 1980) tarafından önerilen koşullara dayanılarak hazırlanmıştır. ATPaz aktivitesi :  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ / \text{Mg}^{+2}$  ATPaz,  $\text{Mg}^{+2}$  ve  $\text{Ca}^{+2} / \text{Mg}^{+2}$  ATPaz olarak 3 değişik şekilde ölçülmüştür.

örneklerin adenozin trifosfataz aktivitelerinin ölçümünde kullanılan iyonların ve tampon sistemlerinin miktarları Tablo 1 ve 2'de verilmiştir.



Tablo 1: ATPaz Tayininde Kullanılan iyon ve tampon sistemleri

ÖLÇÜLEN ATPaz AKTİVİTESİ

Stok Ayıraçlar	Her Tüpte bulunan son konsantrasyonlar		
	Na <sup>+</sup> ve K <sup>+</sup> ve Mg <sup>+2</sup>	Mg <sup>+2</sup>	Ca <sup>+2</sup>
469 mM CaCl	100 mM	-	-
25 mM KCl	5 mM	-	-
30 mM MgCl <sub>2</sub>	5 mM	6 mM	6 mM
0.75 mM CaCl <sub>2</sub>	-	-	0.15 mM
2.50 mM EDTA	0.1 mM	0.1 mM	0.1 mM
125 mM Tris HCl B <sub>1</sub>	30 mM	-	-
211 mM Tris HCl B <sub>2</sub>	-	135 mM	-
306.5 mM Tris HCl B <sub>3</sub>	-	-	135.08 mM
117.9 mM Tris HCl B <sub>a</sub>	33 mM	-	-
202.9 mM Tris HCl B <sub>b</sub>	-	138 mM	-
287.0 mM Tris HCl B <sub>c</sub>	-	-	137.85 mM
75 mM ATP	3 mM	3 mM	3 mM
Total iyonik Kuvet	144.1 mM	144.1 mM	144.1 mM

Tablo 2 : ATPaz Tayini için Kullanılan Tamponların ve iyonların Miktarları

	Na	K	Mg	Ca	EDTA	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>	B <sub>4</sub>	B <sub>5</sub>	B <sub>6</sub>	ATP	ör.
Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> ve Mg <sup>2+</sup>	0.5	0.5	0.5	-	0.1	0.6	-	-	-	-	-	0.1	0.2
Mg <sup>2+</sup>	-	-	0.5	-	0.1	-	1.6	-	-	-	-	0.1	0.2
Ca <sup>2+</sup>	-	-	0.5	0.5	0.1	-	1.1	-	-	-	-	0.1	0.2
Örnek körü													
Na <sup>+</sup> ve Mg <sup>2+</sup>	0.5	0.5	0.5	-	0.1	-	-	-	0.7	-	-	-	0.2
Örnek körü													
Mg <sup>2+</sup>	-	-	0.5	-	0.1	-	-	-	-	1.7	-	-	0.2
Örnek körü													
Ca <sup>2+</sup>	-	-	0.5	0.5	0.1	-	-	-	-	-	1.2	-	0.2
ATP körü													
Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> ve Mg <sup>2+</sup>	0.5	0.5	0.5	-	0.1	0.6	-	-	-	-	-	0.1	0.2
													kaynamış
ATP körü													
Mg <sup>2+</sup>	-	-	0.5	-	0.1	-	1.6	-	-	-	-	0.1	0.2
													kaynamış
ATP körü													
Ca <sup>2+</sup>	-	-	0.5	0.5	0.1	-	-	1.1	-	-	-	0.1	0.2
													kaynamış

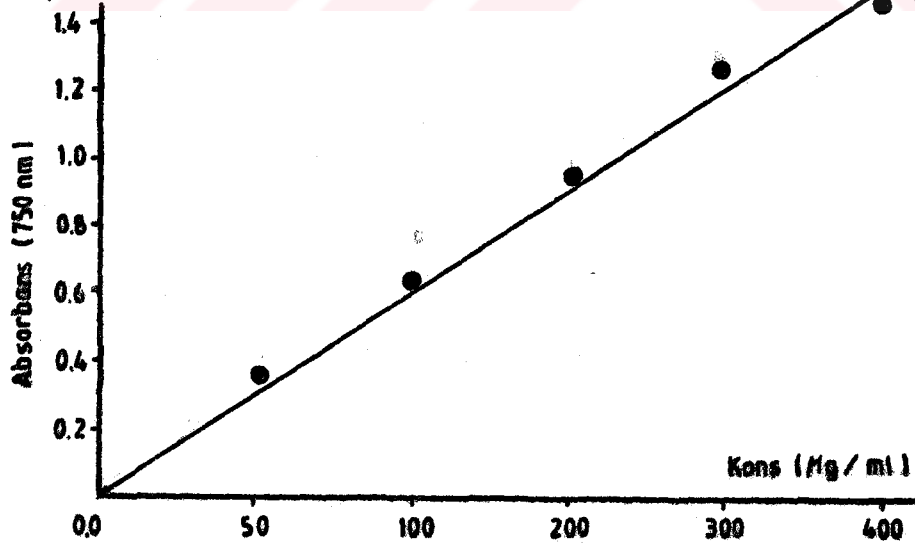
ATP ve EDTA'nın disodyum tuzları kullanıldığından her ikisinin sodyum iyon dağılımı 6 mM ve 0.2 mM olup, total dağılım ise 6.2 mM dir. Stok sodyum iyonunun konsantrasyonu 469 mM olduğu için son konsantrasyon  $0.5/2.5 \cdot 469 = 93.8$  mM olur. Bu konsantrasyona ATP ve EDTA'dan gelen sodyum konsantrasyonları eklenirse toplam sodyum konsantrasyonu 100 mM olur.

### 3.5.3. PROTEİN TAYİNİ

**ilke :** Örneklerin içerdiği total protein miktarı, Lowry ve arkadaşları (Lowry ve ark.1951) tarafından geliştirilen yonteme göre saptanmış olup, bu yöntem protein miktarı belirlenecek örnek içine konulan Lowry solusyonu ve Folin ciocalteu fenol ayırıcının protein ile renk reaksiyonu vermesi ve bunun 750 nm dalga boyunda okunup değerlendirilmesi ilkesine dayanmaktadır.

**işlem :** 0.2 ml örnek üzerine 1 ml lowry solüsyonu ilave edilir ve tüpler iyice karıştırılarak 20 dakika oda ısısında bekletilir. Sürenin bitiminde, tüplere 0.5 ml Folin-Ciocalteus Fenol ayıracı ilave edilir. 1 ml saf su kullanılarak aynı işlem kör tüpü içinde uygulanır ve 30 dakika sonra tüpler 750 nm dalga boyunda okunur.

**Değerlendirme :** Standart eğrinin çizimi için, mililitrede 50, 100, 200, 300 ve 400 mikrogram protein içeren sığır serum albumininden hazırlanmış standart solusyonlar, yonteme göre gerekli solüsyon ve ayırac ilavesinden sonra 750 nm dalga boyundaki absorbans değerleri okunup Standart protein eğrisi çizilmiştir (Şekil 8). Örneklerdeki protein miktarının belirlenmesi için aynı işlemler yapılmış ve miktarlar standart protein eğrisinden karşılaştırılarak hesaplanmıştır.



Şekil 8. Lowry yöntemine göre çizilmiş Standart Protein eğrisi.

### 3.6. PİRİMİPHOS METHYL (ACTELLİC™) İN HAZIRLANMASI

ICI (Imperial Chemical Industries) firmasından Pirimiphos methyl'in teknik (saf) aktif maddesi (a.i = active ingredient) sağlanarak Türkiye'de ergin sivrisinek mücadelesinde kullanılan doz (2 g.a.i/m<sup>2</sup>) göz önüne alınarak hazırlandı. Bu çalışmada Pirimiphos methyl'in % 1, % 2 ve % 4 lük konsantrasyonları kullanıldı. Diğer konsantrasyonlar % 4 lük çözeltiden seyreltilerek hazırlandı. Pirimiphos Methyl'in çözünmesi için çözücü olarak doymuş etil alkolün uygun olduğu saptanmış olup, deneylerde çözücü olarak kullanılmıştır.

Çözeltide kullanılan Pirimiphos methyl'in miktarını bulmak için şu formülden yararlanıldı  $n=M.V$ . Buna göre % 4 lük aktif çözelti için 0.505 gr. Pirimiphos methyl'in aktif maddesi 12.5 ml çözücüde hazırlandığında, çözeltideki aktif

$$\frac{m}{\text{Mol. Ag.}} = M.V. = \frac{0.505 \text{ gr.}}{305.4} = M. 0.0125 = \boxed{0.132}$$

insektisit konsantrasyonu 0.132 m olur. 0.132 Molarlık bu insektisit çözeltisinden alınacak 250 mikrolitre, 2.5 ml'lik inkübasyon ortamına ilave edildiğinde 1:11 oranında seyreltiğinden, 2.2 gr Pirimiphos methyl aktif maddesi 5 ml çözücüde karıştırılarak % 44 lük insektisit çözeltisi hazırlanmıştır. Böylece % 44 lük Pirimiphos methyl çözeltisinden alınacak 250 µl lik miktar inkübasyon ortamına ilave edildiğinde 1:11 oranında seyreltiğinde bile insektisit'in ilave edildiği inkübasyon ortamına göre aktif madde miktarı % 4 te kalmış olmaktadır (Yani birim hacimdeki insektisit konsantrasyonu sabit tutulmaktadır). Bu % 4 lük Pirimiphos methyl (insektisit) konsantrasyonundan sulandırma ile % 2 ve % 1 lik dozlar elde edildi.

\* TM= Trade Markt

### 3.7. QUABAIN'İN HAZIRLANMASI

Duabain'in (Sigma) 50.25 ve 5 mikromolar konsantrasyonlarının enzim aktivitesi üzerinde yaptığı inhibisyonu incelemek için 50 mikromol'lük Duabain hazırlanmış bunun 1:1 ve 1:10 şeklinde sulandırılmasıyla 25 ve 5  $\mu\text{M}$  lük konsantrasyonları elde edilmiştir.

50  $\mu\text{M}$  Duabain'in 5 ml suda hazırlanmasında gereken miktarı saptamak için şu formül kullanıldı.

$$\frac{m}{M.Agr.} = \frac{Ağırlık}{Molekül Ağırlığı} = \text{Molarite} \cdot \text{Hac.}$$

$$\begin{aligned} M.Agr. &= 728.8 \\ \text{Molarite} &= 50 \mu\text{M} (5 \cdot 10^{-6} \text{ M}) \\ V &= 5 \text{ ml} (5 \cdot 10^{-3} \text{ lt}) \\ M &= 1.82 \times 10^{-4} \text{ gr olur.} \end{aligned}$$

Bu şekilde hazırlanan Duabain çözeltisinden 100 mikrolitre alınıp 2.5 ml'lik inkübasyon ortamına ilave edildiğinde 1:26 oranında seyreceği için 5 ml suya  $1.82 \times 10^{-4}$  gr Duabain yerine bu miktarın 26 katı olan  $1.82 \times 10^{-4} \times 26 = 4.73 \times 10^{-3}$  gr. Duabain ilave edilmiştir. Böylece inkübasyon ortamında 50 mikromol'lük Duabain konsantrasyonu sağlanmış oldu. Daha sonra 5 ml'lik bu stoktan 25 ve 5  $\mu\text{M}$  lük Duabain konsantrasyonları hazırlandı.

#### 4. BULGULAR

##### 4.1. Fiske-SUBBAROW METODUNA GÖRE SIVRİSİNEKLERDE ATPaz SPESİFİK AKTİVİTESİ

##### 4.1.2. KONTROL GRUPLARINDA ATPaz SPESİFİK AKTİVİTESİ

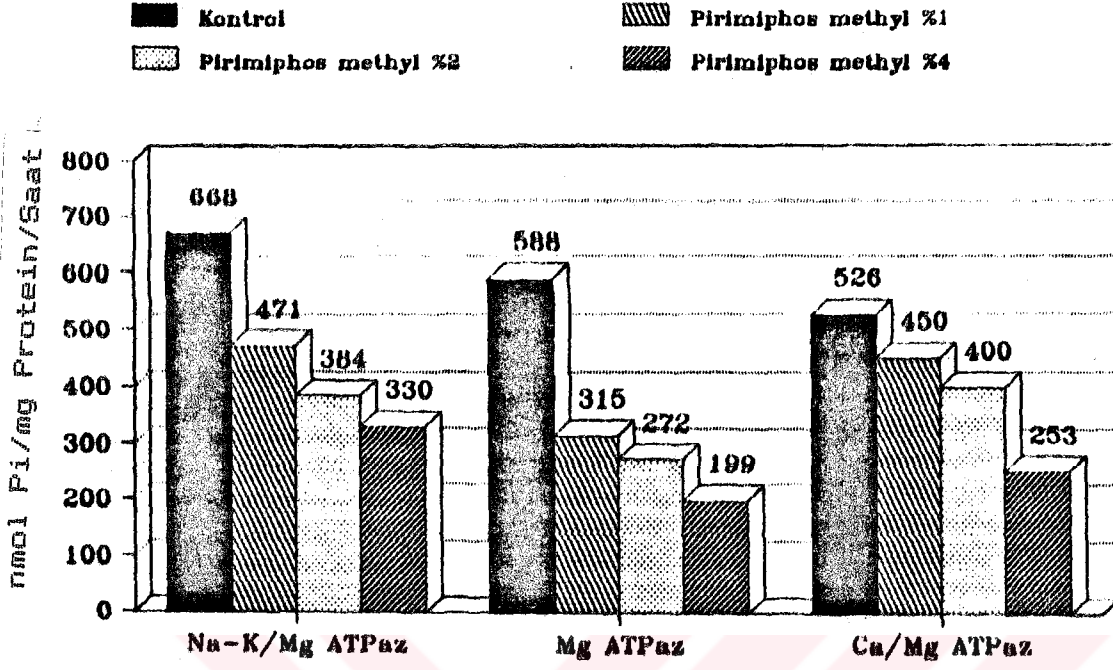
Araziden toplanan ve kontrol olarak kullanılan sivrisineklerin, Na-K/Mg ATPaz için spesifik aktivitesi  $668 \pm 143$  nmol Pi/mg Protein/Saat, Mg ATPaz için  $588 \pm 63$  nmol/Pi/Mg Protein/Saat ve Ca/Mg ATPaz için  $526 \pm 98$  nmol Pi/mg Protein/Saat olarak bulunmuştur.

Laboratuvar kolonisinden alınan kontrol gruplarında Na-K/Mg ATPaz, Mg ATPaz ve Ca/Mg ATPaz için spesifik aktivite değerleri sırasıyla;  $261 \pm 40$ ,  $233 \pm 51$  ve  $194 \pm 37$  nmol Pi/mg Protein/Saat olarak bulunmuştur.

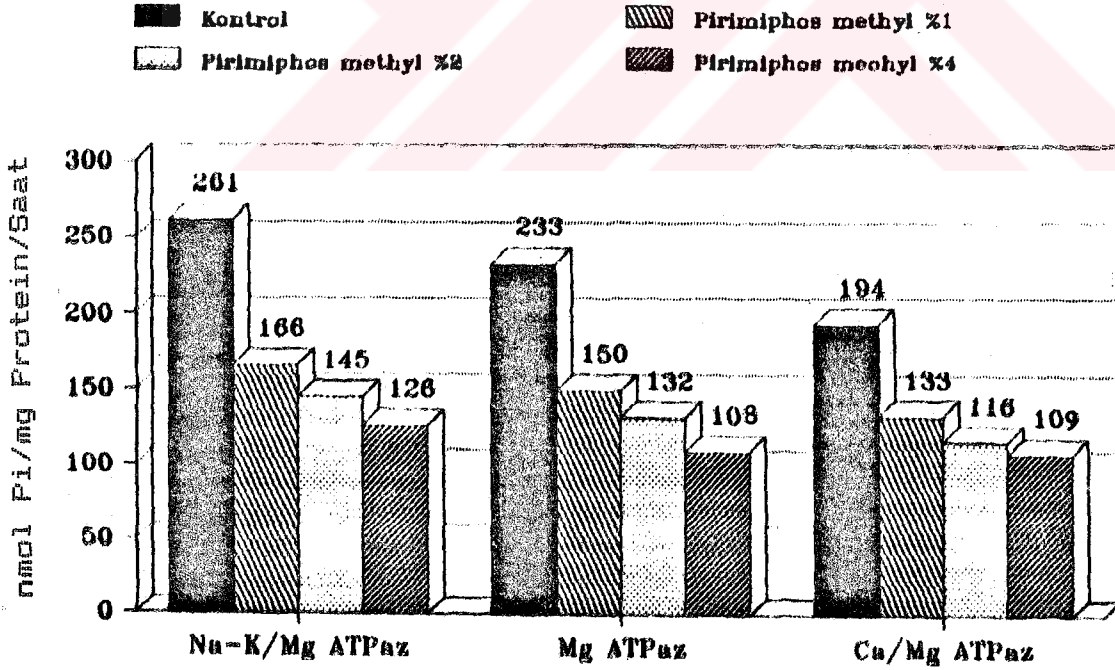
##### 4.1.3. PİRİMİPHOS METHYL'İN ARAZI VE KOLONİ SIVRİSİNEKLERİNİN ATPaz SPESİFİK AKTİVİTESİNİN ETKİSİ

Araziden getirilen örneklerle uygulanan Pirimiphos methyl'in %1, %2 ve %4'lük dozlarının Na-K/Mg, Mg ve Ca/Mg ATPaz enzimlerinin spesifik aktiviteleri ölçüldü. %1 lik Pirimiphos methyl dozu uygulandığında Na-K/Mg ATPaz enzimidaki spesifik aktivite değeri  $471 \pm 75$ , %2 Pirimiphos methyl dozu uygulandığında  $384 \pm 98$  ve %4'lük en yüksek Pirimiphos methyl dozu uygulandığında  $330 \pm 50$  nmol Pi/mg Protein/saat olarak bulundu. Mg ATPaz spesifik aktivitesi %1, %2 ve %4 Pirimiphos methyl dozlarının uygulanmasında sırasıyla  $315 \pm 70$ ,  $272 \pm 37$ ,  $197 \pm 37$  nmol Pi/mg Protein/saat, Ca/Mg ATPaz spesifik aktivitesi aynı dozlar uygulandığında sırasıyla  $450 \pm 58$ ,  $400 \pm 46$  ve  $253 \pm 43$  nmol Pi/mg Protein/saat olarak saptandı (Tablo 3, Şekil 9).

Pirimiphos methyl'in %1, %2 ve %4'lük dozları koloni örneklerine uygulandığında Na-K/Mg ATPaz aktivitesi için sırasıyla  $166 \pm 26$ ,  $145 \pm 24$ ,  $126 \pm 34$  nmol Pi/mg Protein/saat Mg ATPaz aktivitesi  $150 \pm 32$ ,  $132 \pm 33$ ,  $109 \pm 27$  nmol Pi/mg Protein/saat ve Ca/Mg ATPaz aktivitesi için  $133 \pm 25$ ,  $116 \pm 21$ ,  $108 \pm 15$  nmol Pi/mg Protein/saat olarak bulundu (Tablo 4, Şekil 10).



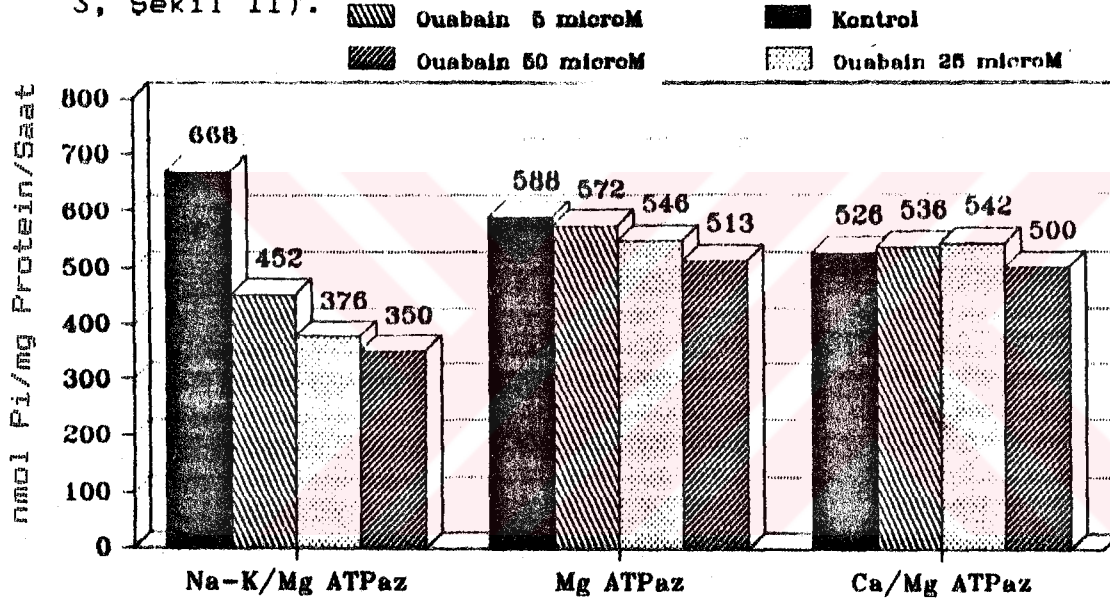
Şekil 9. Arazi örneklerinde Pirimiphos methyl'in değişik dozlarının ATPaz enzim sistemine etkileri.



Şekil 10. Koloni örneklerinde Pirimiphos methyl'in değişik dozlarının ATPaz enzim sistemine etkileri.

#### 4.1.4. OUABAIN'IN ARAZI VE KOLON: SIVRISİNEKLERİNİN ATPaz SPESİFİK AKTİVİTESİNE ETKİSİ.

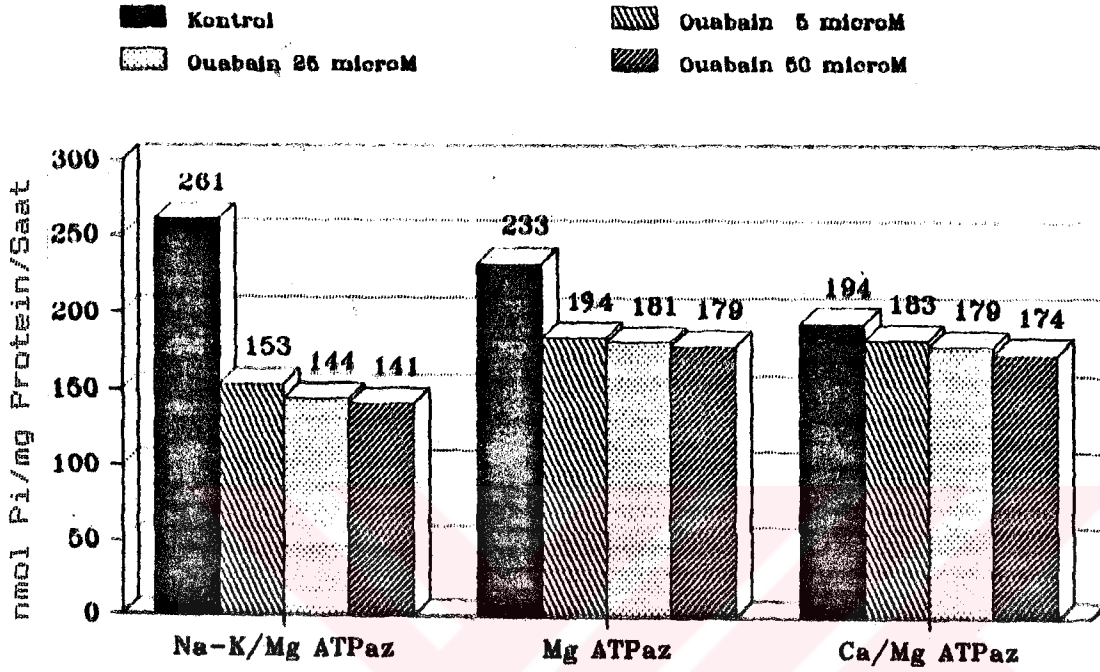
Ouabain'in 5, 25 ve 50 mikromol olarak araziden toplanan sivrisinek örneklerine uygulandığında, Na-K/Mg ATP az spesifik aktivitesi dozlara göre sırasıyla;  $452 \pm 35$ ,  $376 \pm 13$ ,  $350 \pm 31$  nmol Pi/Mg Protein/Saat, Mg ATPaz spesifik aktivitesi  $572 \pm 14$ ,  $546 \pm 29$ ,  $513 \pm 51$  nmol Pi/Mg Protein/saat ve Ca/Mg ATPaz spesifik aktivitesi  $536 \pm 34$ ,  $542 \pm 34$ ,  $500 \pm 20$  nmol Pi/Mg Protein/saat olarak bulundu (Tablo 3, Şekil 11).



Şekil 11. Arazi örneklerinde Ouabain'in değişik dozlarının ATPaz enzim sistemine etkileri.

Koloniden alınan örneklerde Ouabain 5, 25 ve 50 mikromol dozlarının Na-K/Mg ATP az için bulunan spesifik aktivite değerleri, dozlara göre sırasıyla  $153 \pm 22$ ,  $144 \pm 19$ ,  $141 \pm 21$  nmol Pi/Mg Protein/Saat, Mg ATP az spesifik aktivitesi  $184 \pm 17$ ,  $181 \pm 21$ ,  $179 \pm 25$  nmol Pi/mg Protein/saat ve Ca/Mg ATP az spesifik aktivitesi  $183 \pm 17$ ,  $179 \pm 14$ ,  $174 \pm 10$  nmol Pi/Mg Protein /Saat olarak bulundu (Tablo 4, Şekil 12).

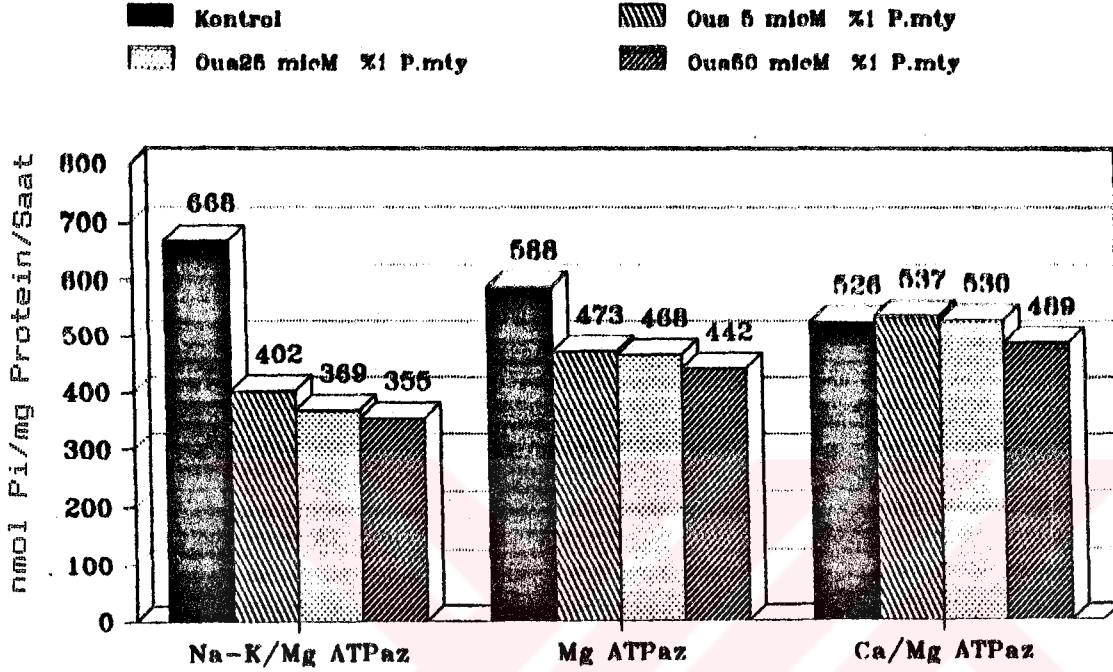




Şekil 12. Koloni örneklerinde Ouabain'in değişik dozlarının ATPaz enzim sistemine etkileri.

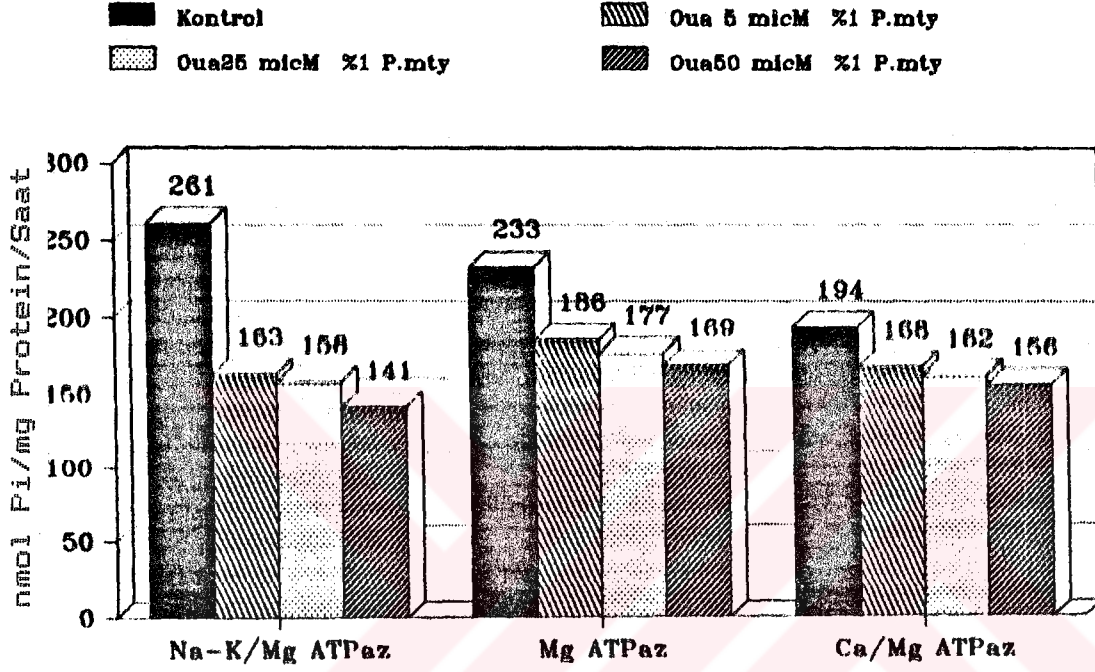
#### 4.1.5. PİRİMİPHOS METHYL (% 1) İLE BİRLİKTE KULLANILAN OUABAIN'İN ARAZI VE KOLONİ SIVRISİNEKLERİNİN ATPaz AKTİVİTESİNE ETKİSİ.

Araziden toplanan sivrisineklere % 1 lik Pirimiphos methyl ile Ouabain'in 5, 25 ve 50 mikromol'luk artan konsantrasyonlarının birlikte uygulanması sonucu Na-K/Mg ATPaz aktivitesi dozlara göre sırasıyla  $402 \pm 47$ ,  $369 \pm 32$ ,  $355 \pm 33$  nmol Pi/Mg Protein/Saat, Mg ATPaz aktivitesi  $473 \pm 23$ ,  $468 \pm 32$ ,  $442 \pm 31$  nmol Pi/Mg Protein/Saat ve Ca/Mg ATPaz aktivitesi için  $537 \pm 31$ ,  $530 \pm 32$ ,  $489 \pm 16$  nmol Pi/Mg Protein/saat olarak bulundu (Tablo 3, Şekil 13).



Sekil 13. Arazi örneklerinde, % 1 Pirimiphos methyl ve Ouabain'in 5, 25, 50  $\mu$ M dozlarının ATPaz enzim sistemine etkileri.

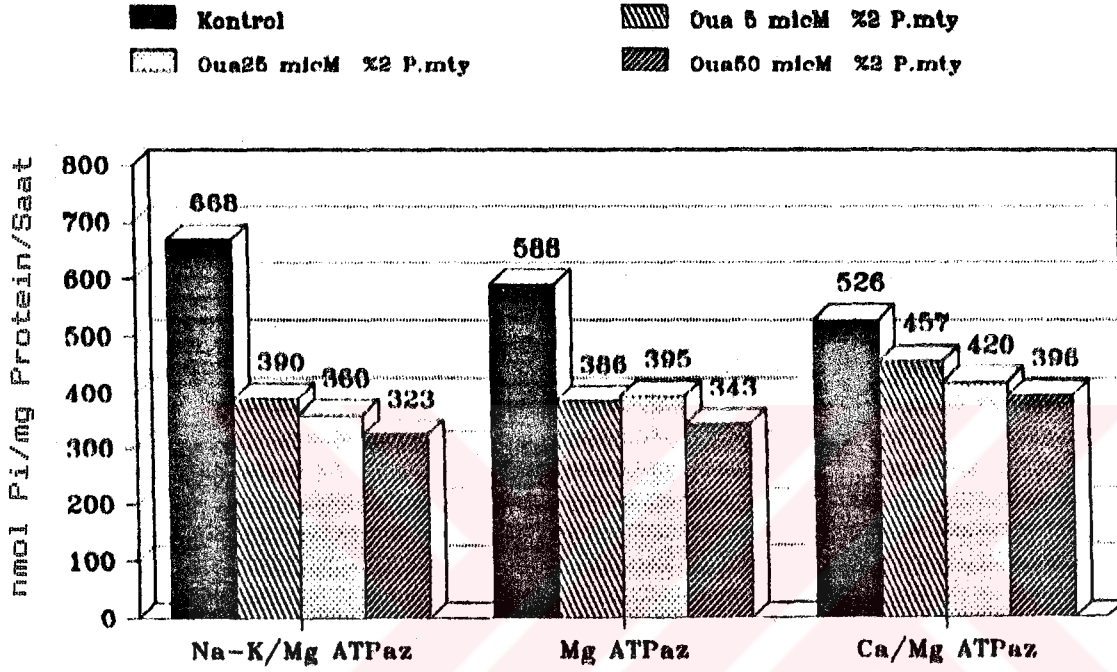
Koloniden alınan sıvrisineklere % 1 lik Pirimiphos methyl ile Ouabain'in 5, 25 ve 50 mikromol'lük artan konsantrasyonlarının birlikte uygulanması sonucu Na- K/Mg ATPaz aktivitesi dozlara göre sırasıyla  $163 \pm 28$ ,  $158 \pm 30$ ,  $141 \pm 23$  nmol Pi/Mg Protein/Saat, Mg ATPaz aktivitesi için  $186 \pm 30$ ,  $177 \pm 22$ ,  $169 \pm 43$  nmol Pi/Mg Protein/Saat ve Ca/Mg ATPaz aktivitesi ise  $168 \pm 26$ ,  $162 \pm 29$ ,  $156 \pm 35$  nmol Pi/Mg Protein/Saat olarak bulundu (Tablo 4, Şekil 14).



Sekil 14. Koloni örneklerinde, % 1 Pirimiphos methyl ve Ouabain'in değişik (5, 25 ve 50  $\mu$ M) dozlarının ATPaz enzim sistemine etkileri.

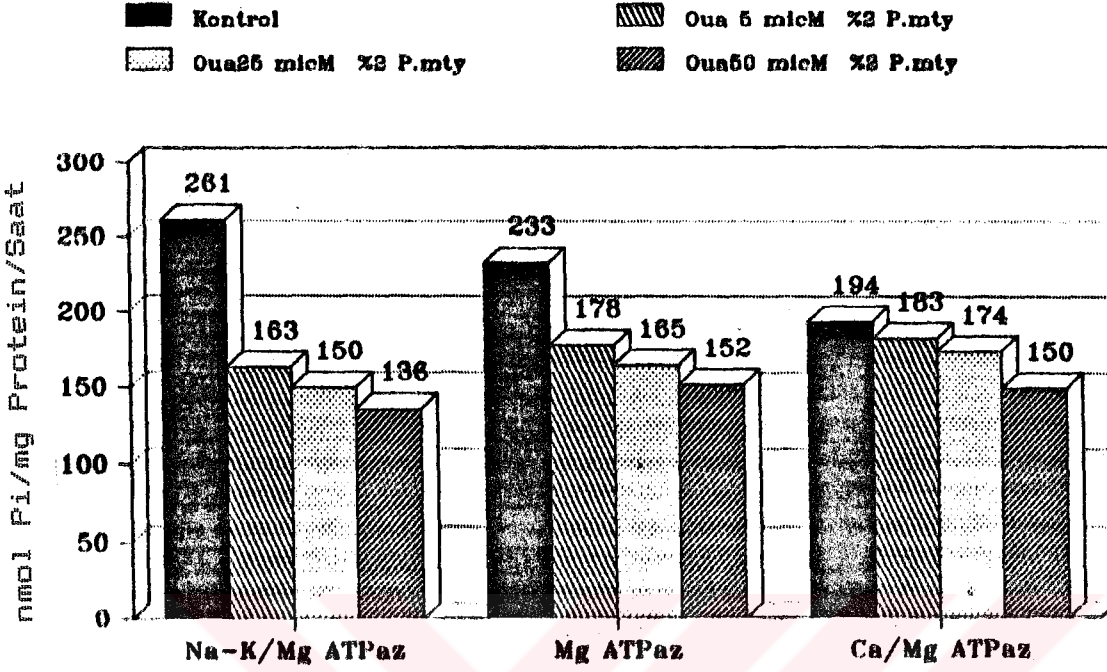
#### 4.1.6. PİRİMİPHOS METHYL (% 2) İLE BİRLİKTE KULLANILAN OUABAIN'İN ARAZI VE KOLONİ SIVRISİNEKLERİNİN ATPaz AKTİVİTESİNE ETKİSİ.

Araziden toplanan sivrisineklere % 2 lik Pirimiphos ile Ouabain'in 5, 25 ve 50 mikromol'luk artan konsantrasyonlarının birlikte uygulanması sonucu, Na-K/Mg ATPaz aktivitesi dozlara göre sırasıyla  $390 \pm 23$ ,  $360 \pm 33$ ,  $323 \pm 28$ ; Mg ATPaz  $386 \pm 29$ ,  $395 \pm 17$ ,  $348 \pm 20$  ve Ca/Mg ATPaz aktivitesi için  $457 \pm 40$ ,  $420 \pm 41$ ,  $396 \pm 20$  nmol Pi/Mg Protein/Saat olarak bulundu (Tablo 3, Sekil 15).



Sekil 15. Arazi örneklerinde, % 2 Pirimiphos methyl ve Ouabain'in değişik (5, 25 ve 50 µM) dozlarının ATPaz Enzim sistemine etkileri.

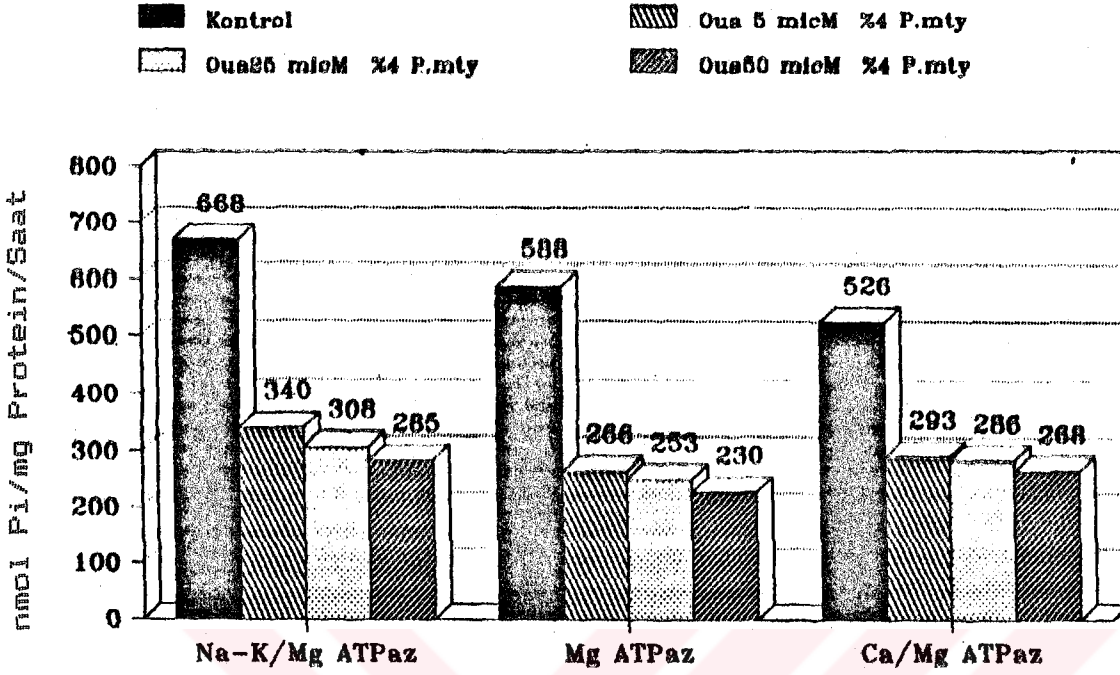
Koloniden alınan sıvı örneklerle Pirimiphos methyl'in sabit % 2 lik dozuna karşılık, Ouabain'in artan konsantrasyonlarının (5, 25 ve 50 mikromol) birlikte uygulanması sonucu Na-K/Mg ATPaz aktivitesi dozlara göre sırasıyla :  $163 \pm 25$ ,  $150 \pm 20$ ,  $136 \pm 19$  nmol Pi/Mg Protein/Saat; Mg ATPaz aktivitesi  $175 \pm 25$ ,  $165 \pm 28$ ,  $152 \pm 34$  nmol Pi/Mg Protein/Saat ve Ca/Mg ATPaz aktivitesi için  $178 \pm 120$ ,  $174 \pm 28$ ,  $150 \pm 23$  nmol Pi/Mg Protein/Saat olarak bulundu (Tablo 4, Sekil 16).



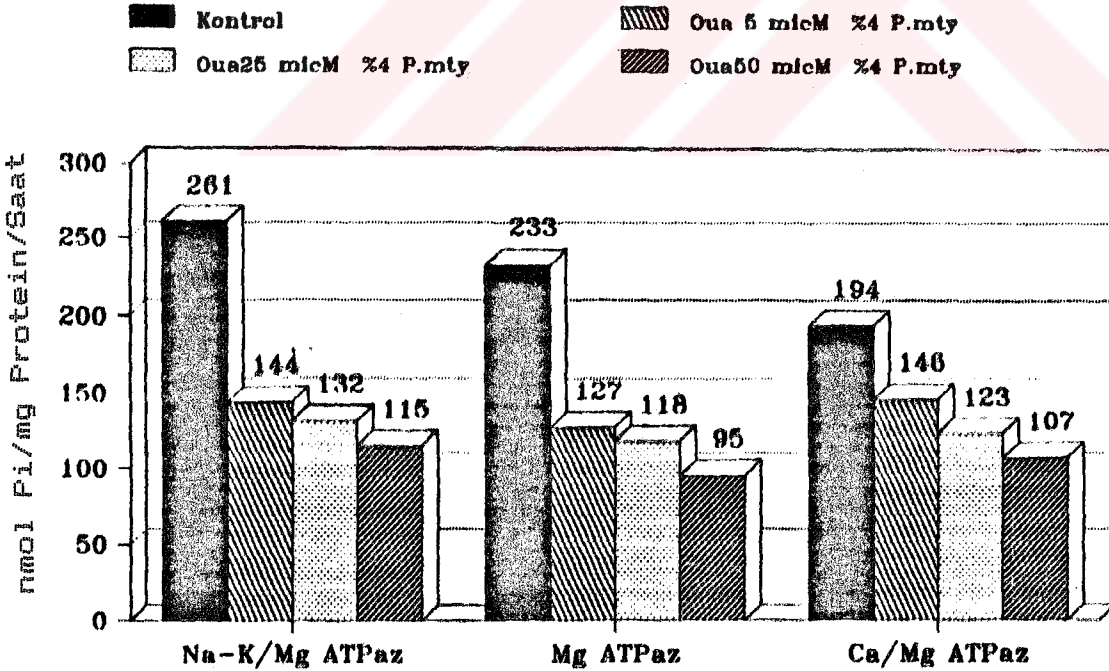
Sekil 16. Koloni örneklerinde % 2 Pirimiphos methyl ve Ouabain'in değişik (5, 25 ve 50  $\mu$ M) dozlarının ATPaz Enzim sistemine etkileri.

#### 4.1.7. PİRİMİPHOS METHYL (% 4) İLE BİRLİKTE KULLANILAN QUABAİN'İN ARAZİ VE KOLONİ SIVRİSİNEKLERİNİN ATPaz AKTİVİTESİNE ETKİSİ.

Araziden toplanan sivrisineklere Pirimiphos methyl'in sabit % 4 lük dozuna karşılık Ouaban'in 5, 25 ve 50 mikromol'lük artan konsantrasyonlarının birlikte uygulanması sonucu Na-K/Mg ATPaz aktivitesi dozlara göre sırasıyla  $340 \pm 38$ ,  $308 \pm 16$ ,  $285 \pm 35$ , Mg ATPaz aktivitesi için  $266 \pm 33$ ,  $253 \pm 54$ ,  $230 \pm 20$  ve Ca/Mgf ATPaz aktivitesi için  $293 \pm 53$ ,  $286 \pm 50$ ,  $268 \pm 34$  nmol Pi/Mg Protein/Saat olarak bulundu (Tablo 3, Sekil 17).



Sekil 17. Arazi örneklerinde % 4 Pirimiphos methyl ve Ouabain'in değişik (5, 25 ve 50  $\mu$ M) dozlarının ATPaz Enzim sistemine etkileri.



Sekil 18. Koloni örneklerinde, % 4 Pirimiphos methyl ve Ouabain'in değişik (5, 25 ve 50  $\mu$ M) dozlarının ATPaz Enzim sistemine etkileri.

Koloniden alınan sivrisineklere Pirimiphos methyl'in sabit % 4 lük dozuna karşılık Ouabain'in (5, 25 ve 50 mikromol) artan konsantrasyonlarının birlikte uygulanması sonucu Na-K/Mg ATPaz aktivitesi dozlara göre sırasıyla : 141 ± 31, 132 ± 28, 115 ± 30 nmol Pi/Mg Protein/Saat ; Mg ATP az aktivitesi 127 ± 15, 118 ± 27, 95 ± 24 nmol Pi/Mg Protein/Saat ve Ca/Mg ATPaz aktivitesi içinde 146 ± 39, 123 ± 44, 107 ± 23 nmol Pi/Mg Protein/saat olarak bulundu (Tablo 4, Şekil 18).

Tablo 3. Fiske-Subbarow Metoduna göre Pirimiphos methyl ve Ouabain'in Arazi Sivrisineklerinin ATPaz Enzim Sistemi üzerindeki Spesifik Aktivitesi (nmol Pi/Mg Protein/saat). X) Ortalama, SD= Standart Sapma.

	Na-K/Mg ATPaz		Mg ATPaz		Ca/Mg ATPaz	
	X	SD	X	SD	X	SD
Kontrol	664 ± 143		588 ± 163		556 ± 91	
% 1 Pirimiphos methyl	471 ± 73		315 ± 70		430 ± 58	
% 2 Pirimiphos methyl	384 ± 98		272 ± 37		400 ± 46	
% 4 Pirimiphos methyl	330 ± 50		199 ± 37		253 ± 43	
Ouabain 5 µM	452 ± 35		572 ± 14		536 ± 34	
Ouabain 25 µM	376 ± 13		546 ± 29		542 ± 34	
Ouabain 50 µM	350 ± 31		513 ± 51		500 ± 20	
% 1 P.mty + 5 µM Ouabain	402 ± 47		473 ± 23		537 ± 31	
% 1 P.mty + 25 µM Ouabain	369 ± 32		468 ± 32		530 ± 32	
% 1 P.mty + 50 µM Ouabain	355 ± 33		442 ± 31		489 ± 16	
% 2 P.mty + 5 µM Ouabain	390 ± 23		386 ± 29		457 ± 40	
% 2 P.mty + 25 µM Ouabain	360 ± 33		395 ± 17		420 ± 41	
% 2 P.mty + 50 µM Ouabain	323 ± 28		348 ± 20		396 ± 21	
% 4 P.mty + 5 µM Ouabain	340 ± 38		266 ± 33		293 ± 53	
% 4 P.mty + 25 µM Ouabain	308 ± 16		253 ± 54		286 ± 50	
% 4 P.mty + 50 µM Ouabain	285 ± 35		230 ± 20		268 ± 34	

\* P.mty = Pirimiphos methyl

Tablo 4. Fiske-Subbarow Metoduna göre Pirimiphos methyl ve Ouabainin Koloni sivrisineklerinin ATPaz Enzim Sistemi Üzerindeki Spesifik Aktivite değerleri (nmol Pi/mg Protein/saat). X= Ortalama, SD= Standart Sapma

	Na-K/Mg ATPaz		Mg ATPaz		Ca/Mg ATPaz	
	X	SD	X	SD	X	SD
Kontrol	261 ± 40		233 ± 51		194 ± 37	
% 1 Pirimiphos methyl	166 ± 26		150 ± 32		133 ± 25	
% 2 Pirimiphos methyl	145 ± 24		132 ± 33		116 ± 21	
% 4 Pirimiphos methyl	126 ± 34		108 ± 27		108 ± 15	
Ouabain 5 µM	153 ± 22		184 ± 17		183 ± 17	
Ouabain 25 µM	144 ± 19		181 ± 21		179 ± 14	
Ouabain 50 µM	141 ± 21		179 ± 25		174 ± 10	
% 1 P.mty + 5 µM Ouabain	163 ± 28		186 ± 30		168 ± 26	
% 1 P.mty + 25 µM Ouabain	158 ± 30		177 ± 22		162 ± 29	
% 1 P.mty + 50 µM Ouabain	141 ± 23		169 ± 43		156 ± 35	
% 2 P.mty + 5 µM Ouabain	175 ± 25		178 ± 20		178 ± 20	
% 2 P.mty + 25 µM Ouabain	150 ± 20		165 ± 28		174 ± 28	
% 2 P.mty + 50 µM Ouabain	136 ± 19		152 ± 34		150 ± 23	
% 4 P.mty + 5 µM Ouabain	144 ± 31		127 ± 15		146 ± 39	
% 4 P.mty + 25 µM Ouabain	132 ± 28		118 ± 27		123 ± 44	
% 4 P.mty + 50 µM Ouabain	115 ± 30		95 ± 24		107 ± 23	

\* P.mty = Pirimiphos methyl



## 4.2. ATKINSON METODUNA GÖRE SIVRİSİNEKLERİN ATPaz AKTİVİTESİ

### 4.2.1. KONTROL GRUPLARINDA ATPaz SPESİFİK AKTİVİTESİ

Araziden toplanan ve kontrol olarak kullanılan sivrisineklerin Na-K/Mg ATPaz için spesifik aktivitesi  $4378 \pm 575$ , Mg ATP az aktivitesi  $3866 \pm 305$  ve Ca/Mg ATPaz aktivitesi  $3475 \pm 393$  nmol Pi/Mg Protein/Saat olarak bulundu.

Koloniden alınan ve kontrol olarak kullanılan sivrisineklerin Na-K/Mg ATPaz için spesifik aktivitesi  $3285 \pm 197$ , Mg ATPaz için  $2876 \pm 212$  ve Ca/Mg ATPaz için  $2541 \pm 265$  nmol Pi/Mg Protein/Saat olarak bulundu.

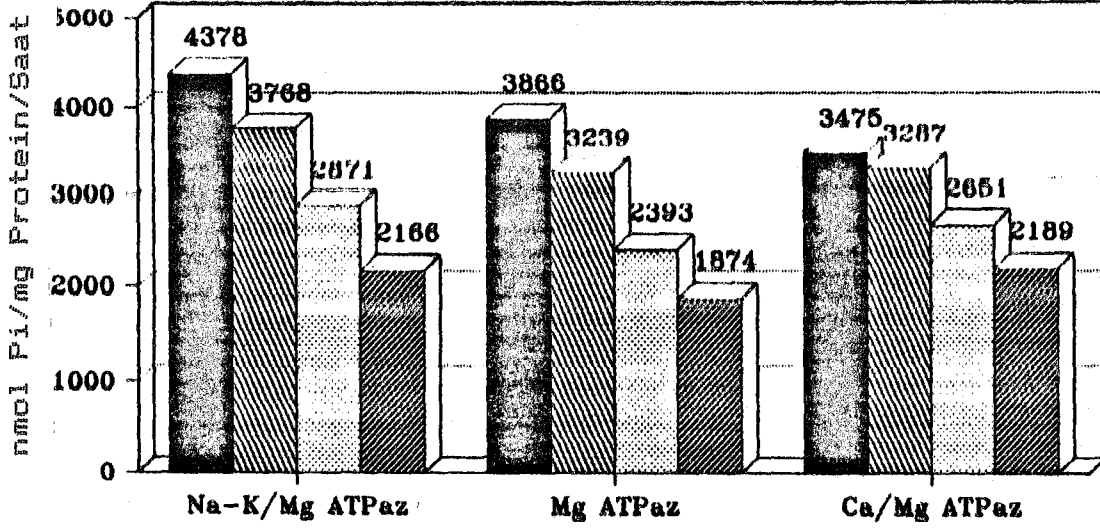
### 4.2.2. PİRİMİPHOS METHYL'İN ARAZI VE KOLONİ

#### SIVRİSİNEKLERİNİN ATPaz SPESİFİK AKTİVİTESİNE ETKİSİ.

Araziden toplanan sivrisineklere uygulanan Pirimiphos methyl'in, % 1, % 2 ve % 4 lük dozlarının Na-K/Mg ATPaz enziminin spesifik aktivitesi dozlara göre sırasıyla  $3768 \pm 295$ ,  $2871 \pm 414$ ,  $2166 \pm 263$  nmol Pi/Mg Protein/Saat, Mg ATPaz aktivitesi  $3239 \pm 285$ ,  $2393 \pm 283$ ,  $1874 \pm 176$  nmol Pi/Mg Protein/Saat ve Ca/Mg ATPaz aktivitesi ise  $3287 \pm 317$ ,  $2651 \pm 204$ ,  $2189 \pm 375$  nmol Pi/Mg Protein saat olarak bulundu (Tablo 5, Şekil 19).

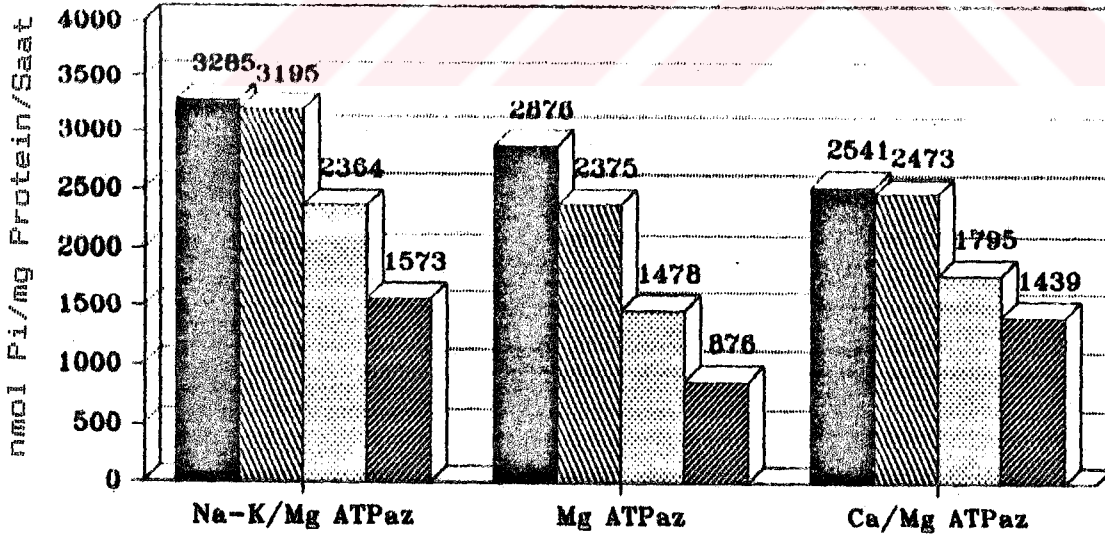
Koloniden alınan sivrisineklere uygulanan Pirimiphos methyl'in % 1, %2 ve % 4 lük dozlarının Na-K/Mg ATPaz enzim spesifik aktivitesi dozlara göre sırasıyla  $3195 \pm 300$ ,  $2364 \pm 338$ ,  $1573 \pm 229$  nmol Pi/Mg Protein /Saat, Mg ATPaz aktivitesi  $2375 \pm 309$ ,  $1478 \pm 299$ ,  $876 \pm 206$  nmol Pi/Mg Protein/Saat ve Ca/Mg ATPaz aktivitesi ise  $2473 \pm 247$ ,  $1795 \pm 178$ ,  $1439 \pm 272$  nmol Pi/Mg Protein/Saat olarak bulundu (Tablo 5, Şekil 20).

■ Kontrol  
 ▨ Pirimiphos methyl %1  
 ▩ Pirimiphos methyl %2  
 ▧ Pirimiphos methyl %4



Sekil 19. Arazi örneklerinde Pirimiphos methyl'in değişik dozlarının ATPaz Enzim sistemine etkileri.

■ Kontrol  
 ▨ Pirimiphos methyl %1  
 ▩ Pirimiphos methyl %2  
 ▧ Pirimiphos methyl %4



Sekil 20. Koloni örneklerinde Pirimiphos methyl'in değişik dozlarının ATPaz Enzim sistemine etkileri.

**4.2.3. PİRİMİPHOS METHYL (% 4 lük) İN YAĞLANMIŞ VE YAĞLANMAMIŞ ARAZI SIVRİSİNEKLERİNİN ATPaz SPESİFİK AKTİVİTESİNE ETKİSİ.**

Araziden kontrol amacıyla toplanan yağlanmış sivrisineklerin Na-K/Mg, Mg ve Ca/Mg ATPaz için spesifik aktivitesi, sırasıyla 7953±861, 5863±613 ve 5658±578 nmol Pi/Mg Protein/Saat olarak bulundu.

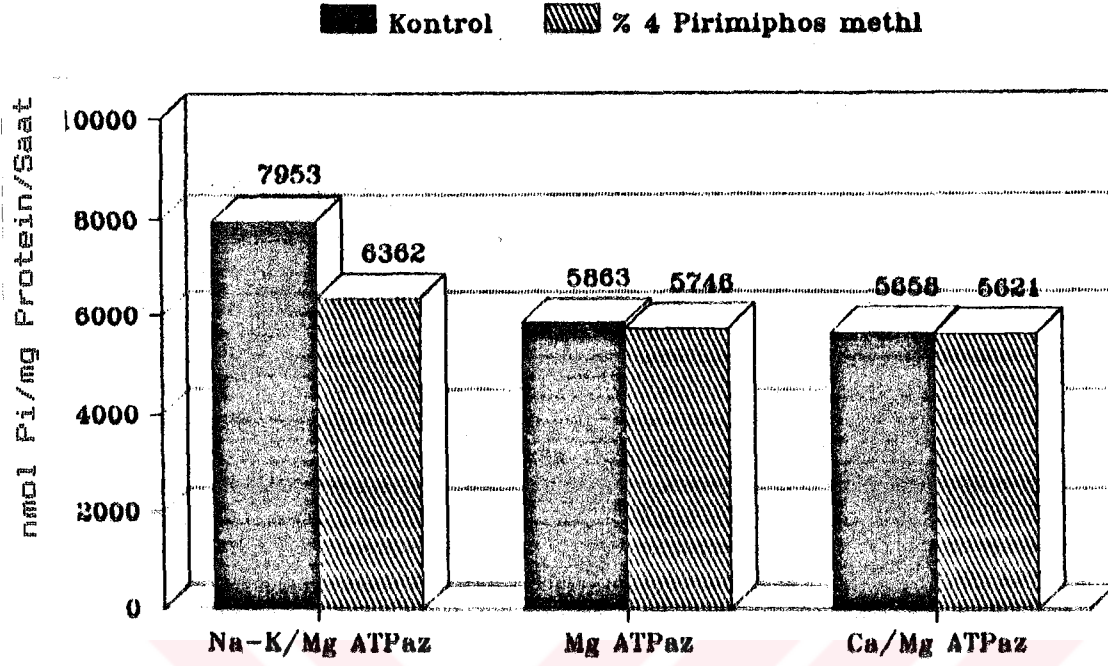
Araziden kontrol amacıyla toplanan yağlanmamış sivrisineklere ait spesifik aktivite değerleri sırasıyla Na-K/Mg ATPaz için 4450±498, Mg ATPaz 3971±513, Ca/Mg ATPaz ise 3546±471 nmol Pi/Mg Protein/Saat olarak bulundu.

Yağlanmış sivrisineklere % 4 lük Pirimiphos methyl uygulandığında Na-K/Mg Mg ve Ca/Mg ATPaz enzimlerine ait spesifik aktivite sırasıyla 6362±786, 5746±661 ve 5621±578 nmol Pi/Mg Protein/saat olarak bulundu (Şekil 21).

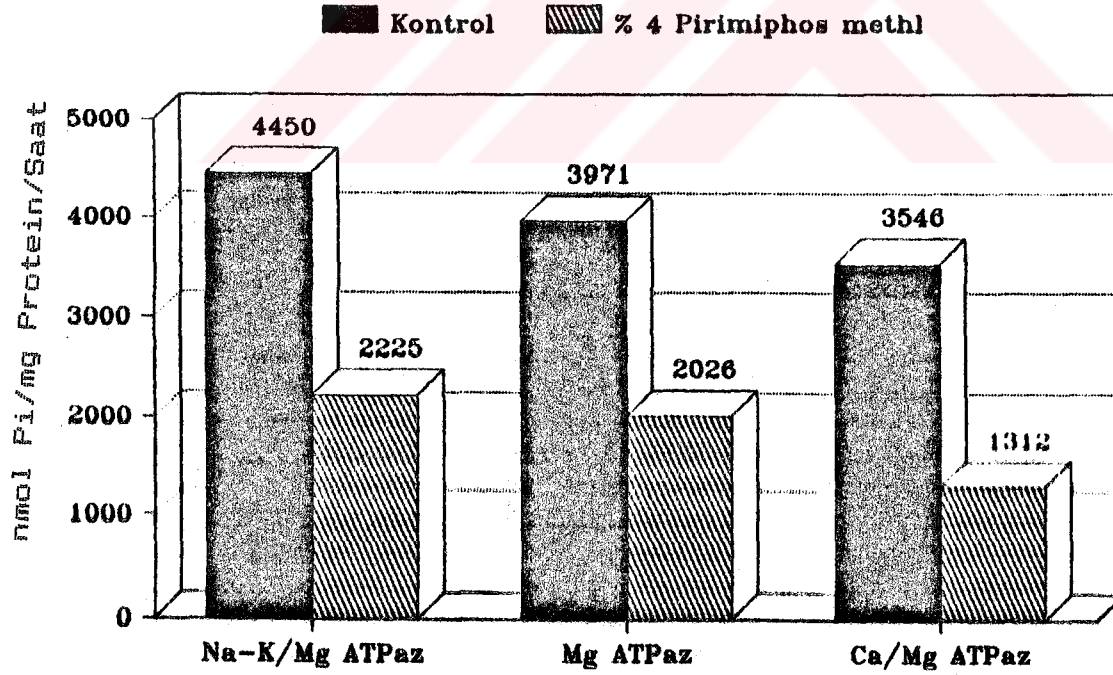
Yağlanmamış sivrisineklere % 4 lük Pirimiphos methyl uygulandığında Na-K/Mg ATPaz için bulunan spesifik aktivite 2225±375, Mg ATPaz için 2026±296 ve Ca/Mg ATPaz içinde 1312±261 nmol Pi/Mg Protein/Saat şeklindedir (Şekil 22).

Tablo 5. Atkinson Metoduna Göre Pirimiphos methyl in Arazi ve Koloni Sivrisineklerinin ATPaz Enzim Sistemi Üzerindeki Spesifik Aktivite değerleri (nmol Pi/Mg Protein/Saat).

	ARAZI						KOLONİ					
	Na-K/Mg		Mg		Ca/Mg		Na-K/Mg		Mg		Ca/Mg	
	X	SD	X	SD	X	SD	X	SD	X	SD	X	SD
Kontrol	4378±575	3866±305	3475±393		3285±197	2876±212	2541±265					
% 1 P.methyl	3763±295	3239±285	3287±317		3195±300	2375±307	2473±247					
% 2 P.methyl	2871±414	2393±283	2651±204		2364±338	1478±277	1795±178					
% 4 P.methyl	2166±263	1874±176	2189±375		1573±229	876±206	1439±272					



Şekil 21. Yağlanmış Arazi örneklerinde % 4 lük Pirimiphos methyl'in ATPaz Enzim aktivitesine etkileri



Şekil 22. Yağlanmamış arazi örneklerinde % 4 lük Pirimiphos methyl'in ATPaz Enzim aktivitesine etkisi.

Tablo 6. Fiske-Subbarow Metoduna göre Pirimiphos methyl ve Ouabain'in Arazi sivrisineklerinin ATPaz enzim sistemi üzerindeki inhibisyonunu yüzde (%) olarak gösteren Tablo

	Na-K/Mg			
	<u>ATPaz</u>	<u>Mg ATPaz</u>	<u>Ca/Mg ATPaz</u>	<u>Total ATPaz</u>
% 1 Pirimiphos methyl	30	46	14	30
% 2 Pirimiphos methyl	42	54	23	41
% 4 Pirimiphos methyl	50	66	51	56
Ouabain 5 $\mu$ M	32	7	1	12
Ouabain 25 $\mu$ M	43	7	2	18
Ouabain 50 $\mu$ M	47	12	5	23
% 1 P.mty + 5 $\mu$ M Ouabain	39	19	3	19
% 1 P.mty + 25 $\mu$ M Ouabain	44	20	1	21
% 1 P.mty + 50 $\mu$ M Ouabain	47	25	7	26
% 2 P.mty + 5 $\mu$ M Ouabain	42	33	13	29
% 2 P.mty + 25 $\mu$ M Ouabain	46	33	20	33
% 2 P.mty + 50 $\mu$ M Ouabain	51	41	25	39
% 4 P.mty + 5 $\mu$ M Ouabain	49	55	44	49
% 4 P.mty + 25 $\mu$ M Ouabain	53	56	46	52
% 4 P.mty + 50 $\mu$ M Ouabain	57	61	49	56

Tablo 7. Fiske-Gubbarow Metoduna göre Pirimiphos methyl ve Ouabain'in, koloni sivrisineklerinin ATPaz Enzim Sistemi Üzerindeki inhibisyonunu yüzde (%) olarak gösteren tablo.

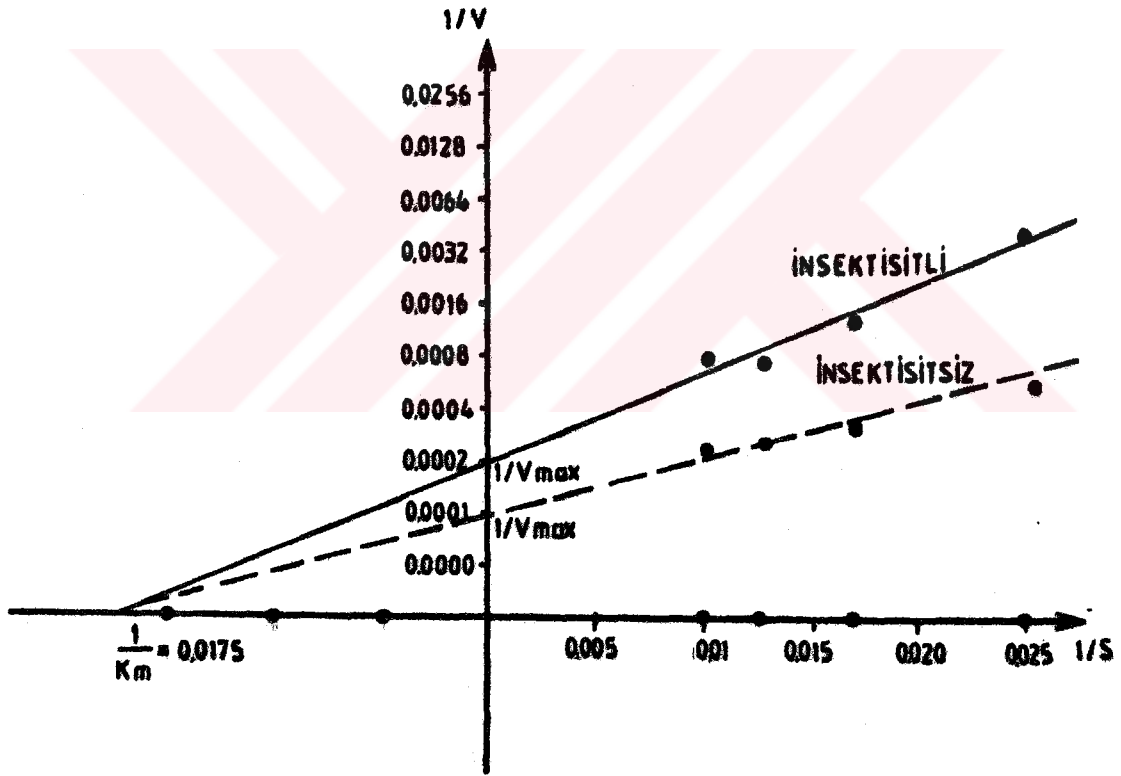
	Na-K/Mg			Total ATPaz
	ATPaz	Mg ATPaz	Ca/Mg ATPaz	
% 1 Pirimiphos methyl	36	36	33	35
% 2 Pirimiphos methyl	44	44	41	43
% 4 Pirimiphos methyl	51	54	45	50
Ouabain 5 µM	41	21	8	23
Ouabain 25 µM	44	21	11	25
Ouabain 50 µM	45	23	12	28
% 1 P.mty + 5 µM Ouabain	37	20	15	24
% 1 P.mty + 25 µM Ouabain	39	24	18	27
% 1 P.mty + 50 µM Ouabain	45	27	21	31
% 2 P.mty + 5 µM Ouabain	37	24	10	24
% 2 P.mty + 25 µM Ouabain	42	29	13	28
% 2 P.mty + 50 µM Ouabain	48	34	25	34
% 4 P.mty + 5 µM Ouabain	45	46	27	40
% 4 P.mty + 25 µM Ouabain	49	50	38	46
% 4 P.mty + 50 µM Ouabain	55	59	46	57

Tablo 8. Atkinson Metoduna göre Pirimiphos methyl'in Arazi ve Koloni sivrisineklerinin ATPaz enzim Sistemi Üzerindeki inhibisyonunu yüzde (%) olarak gösteren Tablo.

	A R A Z I				K O L O N I			
	Na-K/Mg	Mg	Ca/Mg	Total ATP	Na-K/Mg	Mg	Ca/Mg	Total ATP
% 1 P.methyl	15	16	6	12	3	18	3	8
% 2 P.methyl	34	38	23	32	24	40	10	34
% 4 P.methyl	51	52	37	47	52	70	43	55

#### 4.2.4. ATP VE PİRİMİPHOS METHYL'İN, MG ATPaz AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ

% 4'lük Pirimiphos methyl (insektisitli) ve insektisitsiz olarak ATP'nin 40, 60, 80 ve 100 mM'lik artan konsantrasyonlarına bağlı aktivite değişimi Mg ATPaz enzimi için  $1/V$  ve  $1/S$ 'e dönüştürülerek Lineweaver-Burk eğrisi ( $1/\text{hız}$ )( $1/\text{substrat}$ ) çizildiğinde insektisit ATP ile non-kompetitif ( $K_m$  aynı  $V_{max}$  farklı) olduğu bulunmuştur (Şekil 23).



Şekil 23. % 4'lük Pirimiphos methyl ve ATP nin artan konsantrasyonlarının Mg ATPaz enzimi üzerinde yaptığı etkiye ait Lineweaver-Burk grafiği.

## 5. TARTIŞMA VE SONUC

ATPaz enzimlerinin hücrede, zar'a bağılı bir enzim olduğu ve zar boyunca konsantrasyon veya iyon gradiyentine karşı bazı iyon yada molekülleri, ATP yi hidroliz ederek taşıdığı 40 seneden beri bilinmektedir (Skou 1957, 1965, 1967 ve Jørgensen 1974). Çalışmamızda spesifik aktivitelerini ölçtüğümüz Na-K/Mg, Mg ve Ca /Mg ATPaz enzimleri ve diğer ATPazların bulunduğu organizmada, homeostazisi sağlamak için hücre hacminin kontrolü, hücre için gerekli molekül ve iyonların alınımı, sinir-kas hücrelerinde impuls iletimi, mide hücrelerinden asit salınması, böbrek tübüllerinde suyun geri Emilimi ve canlının biyolojik ritmi gibi biyolojik olaylarda çok önemli görevleri vardır.

Kontrol amacıyla araziden toplanan ve koloniden alınan aç (kan emmemiş) veya yağlanmış An. sacharovi erginlerinin ATPaz spesifik aktiviteleri karşılaştırıldığında, her grupta en yüksek aktivitenin Na-K/Mg ATPaz'a ait olduğu ve bunu sırasıyla Mg ATPaz ile Ca/Mg ATPazın izlediği saptanmıştır. Na-K/Mg ATPaz aktivitesinin diğerlerine nazaran yüksek olması, ökaryotik canlılarda bu enzimin hücre hacminin kontrolü ve hücre zarı denge potansiyelini sağlamadaki görevinden ileri geldiği söylenebilir (Tedeschi 1974).

Arazi ve koloni gruplarının ATPaz spesifik aktiviteleri, kullanılan her iki ATPaz Tayin Yöntemine (Fiske-Subbarow, Atkinson) göre karşılaştırıldığında koloniden alınan örneklerin ATPaz aktivitesi, arazi örneklerine göre daha düşük bulunmuştur. Bu durum, laboratuvar koşullarında yetiştirilen koloni erginlerinin besin, barınak, konak ve üreme alanı bulma gibi biyolojik ihtiyaçları için fazla



enerji sarfını gerektirmeyen bir ortama uyum sağlamaları nedeniyle, doğal koşullarda yetişen arazi örneklerine göre daha az aktif dolayısıyla daha az ATPaz aktivitesi gösterdikleri şeklide açıklanabilir.

ATPaz enzimleri hücre zarının yapısında yer alan fosfolipidlerle ilişki kurmuş ve hücre zarına gömülmüş (transmembran) proteinlerdir. Hücre zarının kimyasal kompozisyonunu etkileyen ısı, organik maddeler ile enzimin substrat analogları, direkt ya da indirekt olarak ATPaz aktivitesini de etkiler.

Organo-fosfatlı insektisitler böceklerin vücuduna, temas, solunum ve mide yollarından girmektedir. Araştırmamızda organo-fosfatlı bir insektisit olan Pirimiphos methyl'in hücre zarından geçerken enzimin substratı ile katalitik etkisini engelliyerek ATPaz aktivitesini inhibe ettiği saptanmıştır.

Arazi ve koloni örneklerine Pirimiphos methyl'in artan dozları (% 1, % 2 ve % 4 lük) uygulandığında her iki grupta da insektisit dozunun artışına paralel olarak enzim spesifik aktivite değerlerinin düştüğü, yani ATPaz enzimlerinin inhibisyona uğradığı bulunmuştur. ATPaz enzimleri arasında ise en yüksek inhibisyonu, Mg ATPaz üzerinde gösterdiği bunu sırasıyla Na-K/Mg ve Ca/Mg ATPaz enzimlerinin izlediği saptanmıştır. ATPaz enzimlerinin spesifik aktivitelerini inhibe etmesi, kullanılan insektisit'in substrat'a olan benzerliğinden mi (onunla yarışmasından dolayı mı) yoksa zar yapısını bozmasından mı kaynaklandığı konusunu aydınlatabilmek için, en yüksek doz olan % 4 lük Pirimiphos methyl ve en fazla etkilenen Mg ATPaz enzimi kriter olarak alınmıştır. Pirimiphos methyl (% 4) konsantrasyonuna karşılık ATPaz enziminin özgül substratı olan ATP'nin 40, 60, 80 ve 100 milimol'lük artan konsantrasyonları birlikte kullanılmış ve çıkan değerler lineweaver-Burk grafiginde değerlendirilerek ATP ile non-kompetitif (yarışmasız) inhibisyon ilişkisi gösterdiği saptanmıştır. Bu sonuca göre Pirimiphos methyl, hücre zarında ATPaz enziminin aktif merkezi dışında bir bölgeye bağlanmakta ve enziminin substratıyla yapacağı katalitik etkileşimi önlemektedir. Daha önce sıçan beyinde yapılan çalışmada (Chandra ve ark. 1990) ise Mg ATPaz'ın

organo-klorlu bir insektisit olan Aldrin ile un-kompetitif inhibisyon gösterdiği bulunmuştur. Bu farklılığın çalışılan organizma, doku ve kullanılan insektisit farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Arazi ve koloni örneklerinin ATPaz enzimlerine Ouabain'in 5, 25 ve 50 mikromol'lük konsantrasyonları tatbik edildiğinde, en yüksek inhibisyonun Na-K/Mg ATPaz üzerinde olduğu, diğer enzimlerin Ouabain'den fazla etkilenmedikleri bulunmuştur. Bu durum daha önceki araştırmacıların (Chipperfield ve Whittam 1972, Ronald 1970) Ouabain'in Na-K/Mg ATPaz için spesifik bir inhibitör olduğunu gösteren sonuçlarıyla uygunluk göstermekte olup Ouabain konsantrasyonu arttıkça Na-K/Mg ATPaz üzerindeki inhibisyonda artmaktadır.

Çalışmamızda Pirimiphos methyl ve Ouabain'in ATPaz enzimleri üzerinde sinerjik bir etki yapmadığı da bulunmuştur. Yani Na-K/Mg ATPaz aktivitesi Pirimiphos methyl ve Ouabain'in ayrı ayrı uygulanması durumunda her ikisi ile de inhibe olmakta, beraber uygulanması durumunda ise sadece Ouabain'in inhibisyon etkisi görülmektedir. Ouabain ve Pirimiphos methyl'in ayrı ayrı uygulanması durumunda Mg ve Ca/Mg ATPaz enzimi ise sadece Pirimiphos methyl'den inhibe olmaktadır.

ATPaz enzimlerinin, spesifik aktivite değerlerini tayin için kullanılan Fiske-subbarow ve Atkinson yöntemleri arasında büyük bir uyum bulunmuştur. İki yöntem karşılaştırıldığında, Atkinson yöntemine göre elde edilen ATPaz aktivite değerleri, Fiske-subbarow yöntemine nazaran daha yüksektir. Bu farklılığın, Atkinson yönteminde kullanılan lubrol ayırıcısının deterjan özelliğe olması nedeniyle, zar'a gömülmüş olan ATPaz enzimini maskeleyen fosfolipidlerin etkisini kaldırmış olabileceği düşünülmektedir. Fiske-Subbarow yönteminde ise, deterjan ve benzer etki yapan kimyasallar, hücre zarı lipidleriyle ilişki kurmuş ATP az enzimini inaktif yapabileceği (Hokin 1964, Taniguchi ve ark 1971 ve Tanaka ve ark 1973) şüphesiyle kullanılmamıştır. Enzimlerin spesifik aktivitelerinde ki bu göreceli farklılığın, uygulanan yöntemlerde, deterjan kullanılıp kullanılmamasıyla bağlantılı olduğu düşünülmektedir.

Sivrisineklerdeki yağlanmanın, insektisit etkisini ne yönde etkilediğini göstermek amacıyla yaptığımız çalışmada % 4 lük Pirimiphos methyl ile araziden toplanan yağlanmış ve yağlanmamış sivrisineklerin ATPaz aktiviteleri Atkinson yöntemine göre ölçülmüş ve insektisit etkisinin yağlanmayla birlikte azaldığı bulunmuştur. Yağlanmış arazi örneklerine % 4 lük Pirimiphos methyl uygulandığında Na-K/Mg ATPaz enzimi % 50 Mg ATPaz % 49 ve Ca/Mg ATPaz enzimi % 48 inhibe olmaktadır. Oysa yağlanmış arazi örneklerinde bu inhibisyon; Na-K/Mg ATPaz için % 20, Mg ATPaz'da % 2 ve Ca/Mg ATPaz'da ise % 1 e inmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Akera, T., Brady, T. M. (1970). Membrane Adenosine Triphosphate : The effect of Potassium on the formation and dissociation of the Ouabain-enzyme complex. The J. of Pharm. Exp. Therap. 176(3).
2. Akera, T. (1971). Quantitative aspects of the interaction between Ouabain and (Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>) Activated ATPase in vitro. Biochem Biophys. Acta. 249:53-62.
3. Akera, T., Brody, T.M., Leeling, N. (1971). Insecticide Inhibition of Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> ATPase activity. Biochem. Pharmacol 20: 471-473.
4. Albers, R.W. (1967). Biochemical Aspects of Active Transport. Ann. Rev. Biochem 36:727-756.
5. Andaç, S.O. (1977). Hücre Fizyolojisi. Hacet. Univ. Yayın A/20, 47, ANKARA.
6. Atkinson, A., Gatenby, A.D., Lowe, A.G. (1973). The Determination of inorganic orthophosphate in biological systems. Biochem. Biophys. Acta 320: 195-204.
7. Dailin, O., Huang, J.R. (1988). Modification of the (Ca<sup>2+</sup> + Mg<sup>2+</sup>). ATPase protein of Sarcoplasmic reticulum with 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa, 1,3 diazole. Biochemi Biophys Acta 195:122-132.
8. Bradley, G. H., Godwin, M.H. and Stone, A. (1949). Entomologic techniques as applied to Anophelines. In "Malariaology" 331-378. Saunders Philadelphia. Pennsylvania.
9. Bretscher, M.S. (1973). Membrane Structure. Some General Principles. Science 181: 622-629.

10. Chandra, P. and Poddar, M. K. (1990). In vivo and in vitro effects of Aldrin on rat brain synaptosomal  $Mg^{+2}$  and  $Na^{+}$ ,  $K^{+}$  - Adenosine Triphosphatase. *Biochem. Pharmacol.* 40(7): 1449-1456.
11. Chipper Field, A. R. (1972). Ouabain Binding to the Sodium Pump. *Nature* 242:2
12. Clements, A.N. (1963). *The Physiology of mosquitoes.* Pergamon Press. Oxford. England. 393 p.
13. Curtin, T.J. (1965). Status of Mosquito and fly insecticide susceptibility in Turkey. *Mosquito. News.* 22:2 (143-146).
14. Fiske, C.H., Subbarow, Y. (1925). Measurements of inorganic fosfat Methods in *Enzymologia.* XXXII: Part B.
15. Flashner, M.S., Robinson, J.D. (1978). Effects of  $Mg^{+2}$  on Activation of the  $(Na^{+}-K^{+})$  Dependent ATPase by  $Na^{+}$ . *Arch. Biochem.* 192:584-591.
16. Garrahan, P.J., Glynn, I.M. (1967). The sensitivity of the sodium pump to external sodium *J. Physiol.* 197: 175-188.
17. Goldman, S. S. and Albers, W.R. (1972). Sodium-Potassium activated Adenosine Triphosphatase : The role of phospholipids. *Biochem. Chemistry.* 248(3):867-874.
18. Gökberk, C. (1959). Increase in insidance of malaria cases in Adana region Turkey on the resistance of vector An. sacharovi to insecticidy. *Revista di Malarialogia* XXXVIII: 197-211.
19. Gökberk, C. (1961). An. sacharovi in Turkey. *Mos. News.* 21:101-102.

20. Gökberk, C., Bayadal, K. (1962). 1962 yılında Türkiye Sıtma eradikasyonunu kampanyasında entomolojik faaliyetler. Türk. Hij. ve Teer. Biyo. Derg. Cilt XXIII. Sayı .2
21. Harrison, R., Lunt, G.G. (1980). Biological Membranes. Their Structure and Function. Thomson litte Ltd. East Kilbride.
22. Hokin, L.E., Hokin, M.R. (1959). Evidence for Phosphatidic acid as the Sodium carrier Nature 184: 1068-1069.
23. Hokin, M.R., Hokin, L.E. (1964). Interconversion of phosphatidilinositol and phosphatidic acid involved in the response to acetylcholine in the salt gland "Metabolism and physiological signifiinance of lipid's". John Wiley and Sons Ltd.
24. Jörgensen, P. L. (1974). Purification and characterization of (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>) ATP ase IV. Biochem. Biophys. Acta 356:53-67.
25. Kasap, H., Kasap, M., Mimioğlu, M.M. ve Aktan, F. (1981). Çukurova ve çevresinde sivrisinek ve malaria üzerinde araştırmalar. Doğa Bil. Derg., Tıp. 5:141-150.
26. Kasap, H., Kasap, M., Mimioğlu, M. ve Aktan, F. (1983). Anopheles sacharovi erginlerinin Adana yöresinde kışlama durumu. TUBİTAK-TAG VII B.1. Kong. Teb: 325-330.
27. Kasap, H., Kasap, M., Demirhan, O. and Alptekin, D. (1987). Development of Plasmodium vivax in Anopheles superpictus under experimental conditions. Am. J. Trop. Med. Hyg. 37(2):241-245.

28. Kasap, H., Kasap, M., Akbaba, M., Alptekin, D., Demirhan, O., Lüleyap, Ü. and Pazarbaşı, A. (1990). Residual efficacy of Pirimiphos methyl (Actellic) on Anopheles sacharovi in Çukurova Turkey. J. Am. Mosq. Cont. Assoc., 8(1) (Galey proof)
29. Kasap, M., Kasap, H., Alptekin, D. ve Demirhan, O. (1989). Anopheles sacharovi'de beslenme ve Fizyolojik yaş. Ç.U. Tıp Fak. Derg. Sayı 4:581-589.
30. Lowry, O.H. Rosebrough, N.J., Farr, A.L. (1951). Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
31. Morzydlowski, E.G., Fortes, P.A.G. (1980). Kinetic of Cardiac Glycoside Binding to Sodium, Potassium Adenosine Triphosphatase studied with a Fluorescent Derivative of Ouabain. Biochem. 19: 969-977.
32. Noyan, A. (1979). Fizyoloji Ders Kitabı. Anadolu Univ. Yay. 2:6, ANKARA.
33. Petithory, J.R. and Jencks, W.P. (1988). Binding of Ca<sup>2+</sup> to the Calcium Adenosinetriphosphatase of Sarcoplasmic Reticulum. Biochemistry. Nov 15. 27(2):862-35.
34. Priestland, R.N., Whittam, R. (1972). The temperature dependence of activation by fhsfotidyl serine of the sodium pump Adenosine Triphosphatase. 1. Physiol. 220:353-361.
35. Ramsdale, C.D. (1975). Insecticid resistance in the Anopheles of Turkey. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 69(2): 226-235.
36. Ramsdale, C.D. (1978). Some aspects of epidemiology of resurgent malaria in Turkey. Trans. Roy. Sos. Med. and Hyg. 72:6.

37. Ramsdale, C.D, Herath, P.R.J. and Davidson, G. (1980). Recent developments of insecticide resistance in some Turkish anophelines. Journ. Trop. Med. and Hyg. 83:11-19.
38. Reading, H.W., Ishir, T. (1979). Action of Lithium on ATPases in Transmitter Release from Rat Iris. Biochem Pharmacol 28:3471.
39. Reading, H.W., Ishir, T. (1980). The role of Cation-Activated ATPases in Transmitter Release From Rat Iris. Quart. J. Exper. Phys. 65:105.
40. Ronald, E.B. (1970). Effect of Monovalent Cations on the Ouabain Inhibition of the Sodium and Potassium Ion Activated Adenosine Triphosphatase. Bioch. Vol. 9:24.
41. Rothman, J.E., Lenard, J. (1977). Membrane Asymetry. Science. 195. 743-752.
42. Singer, S.J. and Nicolson, G. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes Science 175 (4023):720-731.
43. Skou, L.C. (1957). The influence of some cations on an Adonosine Triphosphatase from peripheral nerves. Biochm. Biophy Acta 23 : 394-401.
44. Skou, J.C. (1965). Enzymatic Basis for Active transport of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> across Cell Membrane. Physiol. Rew. 45:596-618.
45. Skou, J.C. (1967). The enzymatic basis for the active transport of sodium and Potassium Protopl 63: 303-308.
46. Tanaka, R. and Teruya, A. (1973). Lipid dependence of activity temperature relation ship of (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-activated ATP ase Biochm. Biophys. Acta. 323:584-591.



47. Taniguchi, K., Tonomura, Y. (1971). Inactivation of Na., K<sup>+</sup> dependent ATP ase by phospholipase treatment and its reactivation by phospholipids. J. Biochem. 69:543-557.
48. Tedeschi, H. (1974). Cell Physiology. Molecular dynamics. Academic Press. New-York and London.
49. Unsal, U., Eren, N., Benli, D. (1982). Sitma Epidemiyolojisi Hacet. Univ. Yayın No.25, ANKARA.
50. Whitton, R., Ager, M.E. (1965). The connexion Between Active-Cation. Transport and Metabolism in Erythrocytes. Biochem. J. 97:214.
51. Zulueta, J. DE. (1959). Insecticide resistance in Anopheles sacharovi Bull. World. Health. Org. 20:797-822.

## OZGEÇMİŞ

1961 yılında Mersin'de doğdum. 1972 yılında Mersin İleri İlk Okulu'ndan, 1977 yılında Mersin Tevfik Sırrı Gür Lisesi'nden mezun oldum. 1978-1981 yılları arasında Erlangen (ALMANYA) Aleksander Üniversitesi Makine Mühendisliği Bölümünde öğrenim yaptım. 1983 yılında Türkiye'ye dönüp aynı yıl Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümüne girdim. 1987 yılı Temmuz ayında Lisans Öğrenimimi tamamlayıp, 1988 yılında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başladım ve halen Ç.U.Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktayım.

Evli ve bir çocuk babasıyım.

T. C.  
Yükseköğretim Kurulu  
Dokümantasyon Merkezi