

**GÖKKUŞAĞI ALABALIK (*Oncorhynchus mykiss*)
DOKULARINDAN KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE KİNETİK
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

Hakan SÖYÜT

**Doktora Tezi
Kimya Anabilim Dalı**

**Danışman: Yrd. Doç. Dr. Şükrü BEYDEMİR
Ortak Danışman: Doç. Dr. Olcay HİSAR**

2006

Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

GÖKKUŞAĞI ALABALIK (*Oncorhynchus mykiss*)
DOKULARINDAN KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE KİNETİK
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Hakan SÖYÜT

KİMYA ANABİLİM DALI

ERZURUM
2006

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi
GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI (*Oncorhynchus mykiss*)
DOKULARINDAN KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZASYONU VE KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Hakan SÖYÜT

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Şükrü BEYDEMİR
Ortak Danışman: Doç. Dr. Olcay HİSAR

Bu çalışmada gökkuşağı alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokuları CA enzimleri sırasıyla 4318, 17285, 2300 ve 2275 EU x mg⁻¹ spesifik aktiviteleriyle ve %38, %31,7, %19 ve %22,5 verimlerle Sepharose-4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırıldı. Gökkuşağı alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin için tüm saflaştırma işlemleri boyunca saflaştırma kat sayıları sırasıyla 2260, 1800, 1080 ve 1283 olarak bulundu.

Saflaştırılan enzimlerin saflığını kontrol etmek ve alt birim molekül kütlelerini tespit etmek amacıyla SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı ve tek bant gözlemlendi. Alt birim molekül kütleleri karaciğer için yaklaşık 29,4 kDa, böbrek için yaklaşık 28,7 kDa, kas için yaklaşık 30,3 kDa ve beyin için yaklaşık 29 kDa olarak belirlendi. Karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokularındaki enzimlerin doğal hallerinin molekül kütleleri Sephadex-G 200 jel filtrasyon kolonu kullanılarak sırasıyla 31 kDa, 26,9 kDa, 31,5 kDa ve 27,3 kDa olarak belirlendi. Tüm dokulardan saflaştırılan CA'lar için optimum iyonik şiddetler 1M Tris-SO₄ tamponu olarak belirlendi. Optimum ve stabil pH'lar 4°C'de 1 M Tris-SO₄ ve fosfat tamponlarında hesaplandı. Gökkuşağı alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokuları için optimum sıcaklık, aktivasyon enerjisi (E_a), aktivasyon entalpisi (ΔH) ve Q₁₀ değerleri Arrhenius grafiğinden elde edildi. Saf enzimlerin K_M ve V_{max} değerleri Lineweaver-Burk grafiklerinden hesaplandı. Gökkuşağı alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokuları CA'larının k_{cat} değerleri sırasıyla 32,8 15,25, 28,83 and 43,67 s⁻¹ olarak bulundu. Bunun yanı sıra, gökkuşağı alabalığı CA aktiviteleri üzerine bazı ağır metallerin (kobalt, bakır, çinko, gümüş ve kadmiyum) inhibitör etkileri esteraz metodu kullanılarak *in vitro* şartlarda incelendi. Doku CA enzimleri aktivitelerinin %50'sinin inhibe edildiği ağır metal konsantrasyonları tüm dokulardan saflaştırılan CA enzimleri için elde edildi. Daha sonra, bu maddeler için K_i değerleri Lineweaver-Burk grafiklerinden hesaplandı.

2006, 174 sayfa

Anahtar Kelimeler: Karbonik anhidraz, karakterizasyon, gökkuşağı alabalığı, ağır metal

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF CARBONIC ANHYDRASE FROM RAINBOW TROUT (*Oncorhynchus mykiss*) TISSUES AND INHIBITION EFFECTS OF SOME ANTIBIOTICS ON ENZYME ACTIVITY

Hakan SÖYÜT

Atatürk University
Graduate School of Science and Arts Faculty
Department of Chemistry

Supervisor: Asst. Yrd. Doç. Dr. Şükrü BEYDEMİR
Co-Supervisor: Assoc. Doç. Dr. Olcay HİSAR

In the present study, CA enzymes were purified from rainbow trout (RT) liver, kidney, muscle and brain with a specific activity of 4318, 17285, 2300 and 2275 EU x mg⁻¹ and a yield of 38%, 31.7%, 19% and 22.5% using Sepharose-4B-L tyrosine-sulfanilamide affinity gel chromatography, respectively. The overall purifications from RT liver, kidney, muscle and brain were approximately 2260, 1800, 1080 and 1283-fold respectively. To check the purity and determine subunit molecular weights of enzymes, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis was performed, which showed a single band and Mw of approx. 29.4 kDa for liver, 28.7 kDa for kidney, 30.3 kDa for muscle and 29 kDa for brain. The molecular weight of native enzyme in liver, kidney, muscle and brain was estimated to be approx. 31 kDa, 26.9 kDa, 31.5 kDa and 27.3 kDa by Sephadex-G 200 gel filtration chromatography, respectively. Optimum ionic strengths for the CAs from all tissues were obtained as 1M Tris-SO₄ buffer. Optimum and stable pHs were determined in 1 M Tris-SO₄ and phosphate buffers at 4°C. The optimum temperature, activation energy (E_a), activation enthalpy (ΔH) and Q₁₀ values from Arrhenius plot for the RT liver, kidney, muscle and brain CA were obtained. An apparent K_M and V_{max} for p-nitrophenylacetate of the purified enzymes were calculated from Lineweaver-Burk graphs. k_{cat} values of the RT liver, kidney, muscle and brain CAs were found as 32.8, 15.25, 28.83 and 43.67 s⁻¹, respectively. Besides, the inhibitory effects of different heavy metals (cobalt, copper, zinc, silver and cadmium) on RT CA activities were investigated using the esterase method under in vitro conditions. The heavy metal concentrations, inhibited in vitro 50% of tissue CA enzymes activity, were obtained for CA enzymes from all tissues. Then, K_i values for these substances were also calculated from Lineweaver-Burk graphs.

2006, 174 pages

Key words: Carbonic anhydrase; characterization; rainbow trout; heavy metal

TEŞEKKÜR

Doktora Tezi olarak sunduğum bu çalışmanın deneysel kısmı Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmamda bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Ana Bilim Dalı Başkanı değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU ve tezimin her aşamasında her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen tez danışmanım değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Şükrü BEYDEMİR'e derin minnet ve şükranlarımı sunarım. Tez çalışmam süresince yardımlarını esirgemeyen Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Bölümünün öğretim üyesi ortak danışmanım Sayın Doç. Dr. Olcay HİSAR'a şükranlarımı sunarım.

Çalışmam boyunca değerli katkılarından dolayı değerli hocalarım Sayın Doç.Dr.Münir OKTAY, Sayın Doç.Dr.Mehmet ÇİFTÇİ, Sayın Doç.Dr.Hasan ÖZDEMİR ve Sayın Yrd.Doç.Dr.İlhami GÜLÇİN'e ayrı ayrı teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca çalışmalarım boyunca her türlü yardımı esirgemeyen Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Başkanı Sayın Prof Dr. Hasan SEÇEN, Biyokimya Ana Bilim Dalı araştırma laboratuvarında çalışan arkadaşlarıma ve Kimya Bölümünün tüm elemanlarına teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarımın her aşamasında maddi manevi yardım ve desteklerinin yanı sıra göstermiş oldukları sabır ve anlayıştan dolayı babama ve anneme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hakan SÖYÜT

Haziran, 2006

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	19
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	24
3.1. Materyal.....	23
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	23
3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar.....	23
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması.....	24
3.2. Yöntemler.....	28
3.2.1. Gökkuşığı alabalık dokularından CA enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu çalışmaları ile ilgili yöntemler.....	28
3.2.1.1. Sepharose-4B afinite kolonunun hazırlanması.....	28
3.2.1.2. Gökkuşığı alabalık karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokularının temini ve homojenat hazırlanması.....	30
3.2.1.2.a Gökkuşığı alabalık karaciğer dokusunun temini ve homojenat hazırlanması.....	30
3.2.1.2.b. Gökkuşığı alabalık böbrek dokusunun temini ve homojenat hazırlanması.....	30
3.2.1.2.c. Gökkuşığı alabalık kas dokusunun temini ve homojenat hazırlanması.....	30
3.2.1.2.d. Gökkuşığı alabalık beyin dokusunun temini ve homojenat hazırlanması.....	31
3.2.1.3. Gökkuşığı alabalık karaciğer, böbrek, kas ve beyin doku homojenatlarının afinite kolonuna tatbiki ve elüsyonu.....	31

3.2.1.4. Sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzim saflığının kontrolü.....	31
3.2.1.4.a. Sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzimin molekül kütlesi tayini.....	33
3.2.1.5. Sephadex g 200 jel filtrasyon kromatografisi kolonunun hazırlanması ve gökkuşağı alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokularından saflaştırılan CA enzimlerinin doğal hallerinin molekül kütlelerinin tayini.....	34
3.3. Protein Tayini	35
3.3.1. Kalitatif protein tayini.....	35
3.3.2. Bradford yöntemi ile protein tayini.....	36
3.4. Karbonik anhidraz Aktivite Tayini.....	37
3.5. Gökkuşağı Alabalık Dokularından Saflaştırılan CA Enzimi ile İlgili Yapılan Kinetik Çalışmalar.....	40
3.5.1. Karbonik anhidraz enzimi için optimum pH çalışması.....	40
3.5.2. Karbonik anhidraz enzimi için optimum iyonik şiddet çalışması.....	40
3.5.3. Karbonik anhidraz enziminin stabil olduğu pH'nın bulunması ile ilgili çalışmalar.....	41
3.5.4. Gökkuşağı alabalığı dokularından elde edilen CA enziminin optimum sıcaklığın, aktivasyon enerjisinin (E_a), aktivasyon entalpisinin (ΔH) ve Q_{10} değerinin hesaplanması ile ilgili çalışmalar.....	41
3.5.5. p-Nitrofenilasetat substratı için K_M , V_{max} , k_{cat} ve özgülük sabitinin (V_0) bulunmasına yönelik çalışmalar.....	42
3.5.6. Bazı ağır metallerin gökkuşağı alabalığı dokularından elde edilen CA enziminin aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin incelenmesi.....	43
3.5.7. Gökkuşağı alabalığı dokularından elde edilen CA enzimi için inhibitör etkisi gösteren ağır metallerin K_i sabitlerinin bulunması.....	43
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	45
4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik.....	45
4.2. Gökkuşağı alabalığı Karaciğer, Böbrek, Kas ve Beyin Dokularından Karbonik Anhidraz Enziminin	

Saflaştırılma, Karakterizasyon ve Kinetik Çalışma Sonuçları.....	46
4.2.1. Karbonik anhidraz enziminin sepharose 4B-L-tirozin sülfanilamid afinite kromatografisi ile saflaştırılma kademeleri.....	46
4.2.2. Sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) sonucu.....	51
4.2.3. Gökkuşığı alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokularından saflaştırılan CA enziminin molekül kütesinin sephadex g-200 jel filtrasyon kromatografisi ile belirlenmesi.....	55
4.2.4. Gökkuşığı alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokuları karbonik anhidraz enzimleri için optimum pH'ların belirlenmesi.....	58
4.2.5. Gökkuşığı alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokuları karbonik anhidraz enzimleri için optimum iyonik şiddetlerin belirlenmesi.....	63
4.2.6. Gökkuşığı alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokuları karbonik anhidraz enzimleri için stabil pH'ların belirlenmesi.....	68
4.2.7. Gökkuşığı alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokuları karbonik anhidraz enzimleri için optimum sıcaklık, aktivasyon enerjisi (E_a), aktivasyon entalpisi (ΔH) ve Q_{10} değerlerinin belirlenmesi.....	76
4.2.8 p-Nitrofenilasetat Substratı İçin K_m , V_{max} , k_{cat} ve Özgüllük Sabiti (V_0) Değerlerinin Belirlenmesi.....	85
4.2.9. Bazı ağır metallerin gökkuşığı alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokuları karbonik anhidraz enzimleri aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin sonuçları.....	85
4.2.10. Gökkuşığı alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokuları karbonik anhidraz enzimlerini inhibe eden bazı ağır metaller için K_i sabitlerinin bulunmasına yönelik çalışmaların sonuçları.....	108
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	148
KAYNAKLAR.....	167
ÖZGEÇMİŞ.....	175

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

E	Enzim
S	Substrat
I	İnhibitör
P	Ürün
ES	Enzim-substrat kompleksi
EI	Enzim-inhibitör kompleksi
$V_{\max}$	Maksimum hız
K_m	Enzimin substrata ilgisini gösteren sabit
ESI	Enzim-substrat-inhibitör kompleksi
R	Metil
Ph	Fenil
Ar	2,4-dinitrofenil
CA	Karbonik anhidraz enzimi
His	Histidin
Glu	Glutamat
Thr	Treonin
Asn	Asparagin
Gln	Glutamin
MCP	Multikatalitik proteinaz enzimi
MtCK	Mitokondrial kreatin kinaz enzimi
Da	Dalton
TEMED	N,N,N',N',-tetrametiletildiamin
Tris	Trihidroksimetilaminometan
CNBr	Siyanojen bromür
PER	Amonyumpersülfat
TCA	Triklorasetikasit
M_A	Molekül kütlesi
λ	Dalga boyu
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat- Poliakrilamid Jel Elektroforezi

SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
E.U	Enzim ünitesi
E.C.	Enzim kod numarası
E_a	Aktivasyon enerjisi
ΔH	Aktivasyon entalpisi
Q_{10}	Aralarında 10°C fark olan iki aktivite değerinden büyük olanın küçük olanına oranı
R	Gaz sabiti
T	Kelvin sıcaklık
k	Hız sabiti
V_o	Özgüllük sabiti
IC_{50}	Enzimatik aktivitesini yarıya indiren inhibitör konsantrasyonu
K_i	Inhibitörün enzime ilgisini gösteren sabit
k_{cat}	Turnover sayısı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. HCA-II izoenziminin ligand yapısındaki metal merkezinin şematik olarak gösterilişi.....	12
Şekil 1.2. Karbonik anhidraz enziminin CO ₂ -hidratasyon reaksiyonunu kataliz mekanizmasının şematik olarak gösterilişi.....	13
Şekil 3.1. CNBr Sepharose 4B-L-tirozin afinite jelinin hazırlanmasındaki reaksiyonların açık formülleri.....	29
Şekil 4.1. Bradford yöntemiyle proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart grafik.....	45
Şekil 4.2. Gökkuşığı alabalık karaciğer CA enziminin Sepharose 4B-L-tirozin sülfanilamid afinite kromatografisi ile saflaştırma grafiği.....	47
Şekil 4.3. Gökkuşığı alabalık böbrek CA enziminin Sepharose 4B-L-tirozin sülfanilamid afinite kromatografisi ile saflaştırma grafiği.....	47
Şekil 4.4. Gökkuşığı alabalık kas CA enziminin Sepharose 4B-L-tirozin sülfanilamid afinite kromatografisi ile saflaştırma grafiği.....	48
Şekil 4.5. Gökkuşığı alabalık beyin CA enziminin Sepharose 4B-L-tirozin sülfanilamid afinite kromatografisi ile saflaştırma grafiği.....	48
Şekil 4.6. Afinite kromatografisiyle saflaştırılan gökkuşığı alabalığı karaciğeri karbonik anhidraz enziminin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi fotoğrafı.....	51
Şekil 4.7. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yöntemiyle alabalık karaciğer CA enziminin moleköl kütlesi tayininde kullanılan standart grafik.....	52
Şekil 4.8. Afinite kromatografisiyle saflaştırılan gökkuşığı alabalığı böbrek karbonik anhidraz enziminin	

SDS-poliakrilamid jel elektroforezi fotoğrafı.....	52
Şekil 4.9. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yöntemiyle alabalık böbrek CA enziminin molekül kütlesi tayininde kullanılan standart grafik.....	53
Şekil 4.10. Afinite kromatografisiyle saflaştırılan gökkuşığı alabalığı kas ve beyin karbonik anhidraz enziminin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi fotoğrafı.....	53
Şekil 4.11. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yöntemiyle alabalık kas ve beyin CA enziminin molekül kütlesi tayininde kullanılan standart grafiği.....	54
Şekil 4.12. Gökkuşığı alabalığı karaciğer CA enziminin molekül kütlesini tayini için kullanılan jel filtrasyon kromatografisi grafiği.....	55
Şekil 4.13. Gökkuşığı alabalığı böbrek CA enziminin molekül kütlesini tayini için kullanılan jel filtrasyon kromatografisi grafiği.....	56
Şekil 4.14. Gökkuşığı alabalığı kas CA enziminin molekül kütlesini tayini için kullanılan jel filtrasyon kromatografisi grafiği.....	56
Şekil 4.15. Gökkuşığı alabalığı beyin CA enziminin molekül kütlesini tayini için kullanılan jel filtrasyon kromatografisi grafiği.....	57
Şekil 4.16. Gökkuşığı alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin CA enziminin molekül kütlesini tayini için Sephadex G-200 kolon materyali kullanılarak yapılan jel filtrasyon kromatografisi sonucu elde edilen standart grafiği.....	57
Şekil 4.17. Gökkuşığı alabalık karaciğer dokusu CA enziminin optimum pH'sını bulmak için 1M Potasyum fosfat ve 1M Tris-SO ₄ tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	61
Şekil 4.18. Gökkuşığı alabalık böbrek dokusu CA enziminin optimum pH'sını bulmak için 1M Potasyum fosfat ve 1M Tris-SO ₄ tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	62
Şekil 4.19. Gökkuşığı alabalık kas dokusu CA enziminin optimum pH'sını bulmak için 1M Potasyum fosfat ve 1M Tris-SO ₄ tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	62
Şekil 4.20. Gökkuşığı alabalık beyin dokusu CA enziminin optimum	

pH'sını bulmak için 1M Potasyum fosfat ve 1M Tris-SO ₄ tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	63
Şekil 4.21. Gökkuşaağı alabalık karaciğer dokusu için Tris-SO ₄ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları (a=0,1M, b=0,5M, c=1M).....	64
Şekil 4.22. Gökkuşaağı alabalık böbrek dokusu için Tris-SO ₄ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları (a=0,1M, b=0,5M, c=1M).....	65
Şekil 4.23. Gökkuşaağı alabalık kas dokusu için Tris-SO ₄ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları (a=0,1M, b=0,5M, c=1M).....	66
Şekil 4.24. Gökkuşaağı alabalık beyin dokusu için Tris-SO ₄ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları (a=0,1M, b=0,5M, c=1M).....	67
Şekil 4.25. Gökkuşaağı alabalık karaciğer dokusu CA enziminin stabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 1M Tris-SO ₄ tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	69
Şekil 4.26. Gökkuşaağı alabalık karaciğer dokusu CA enziminin stabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 1M potasyum fosfat tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	70
Şekil 4.27. Gökkuşaağı alabalık böbrek dokusu CA enziminin stabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 1M Tris-SO ₄ tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	71
Şekil 4.28. Gökkuşaağı alabalık böbrek dokusu CA enziminin stabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 1M potasyum fosfat tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	72
Şekil 4.29. Gökkuşaağı alabalık kas dokusu CA enziminin stabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 1M Tris-SO ₄ tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	73
Şekil 4.30. Gökkuşaağı alabalık kas dokusu CA enziminin stabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 1M potasyum fosfat tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	74

Şekil 4.31. Gökkuşığı alabalık beyin dokusu CA enziminin stabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 1M Tris-SO ₄ tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	75
Şekil 4.32. Gökkuşığı alabalık beyin dokusu CA enziminin stabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 1M potasyum fosfat tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	76
Şekil 4.33. Gökkuşığı alabalık karaciğer CA enziminin aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişim grafiği.....	77
Şekil 4.34. Gökkuşığı alabalık böbrek CA enziminin aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişim grafiği.....	78
Şekil 4.35. Gökkuşığı alabalık kas CA enziminin aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişim grafiği.....	79
Şekil 4.36. Gökkuşığı alabalık beyin CA enziminin aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişim grafiği.....	80
Şekil 4.37. Gökkuşığı alabalık karaciğer CA enzimi için 5 farklı p-nitrofenilasetat konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiği.....	82
Şekil 4.38. Gökkuşığı alabalık böbrek CA enzimi için 7 farklı p-nitrofenilasetat konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiği.....	82
Şekil 4.39. Gökkuşığı alabalık kas CA enzimi için 7 farklı p-nitrofenilasetat konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiği.....	83
Şekil 4.40. Gökkuşığı alabalık beyin CA enzimi için 7 farklı p-nitrofenilasetat konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiği.....	83
Şekil 4.41. Gökkuşığı alabalık karaciğer dokusu CA enzimi için 5 farklı Co ⁺² konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Co ⁺²] grafiği.....	88
Şekil 4.42. Gökkuşığı alabalık karaciğer dokusu CA enzimi için 8 farklı Cu ⁺² konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Cu ⁺²] grafiği.....	89
Şekil 4.43. Gökkuşığı alabalık karaciğer dokusu CA enzimi için 6 farklı Zn ⁺² konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Zn ⁺²] grafiği.....	89
Şekil 4.44. Gökkuşığı alabalık karaciğer dokusu CA enzimi için 5 farklı Ag ⁺ konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Ag ⁺] grafiği.....	90
Şekil 4.45. Gökkuşığı alabalık karaciğer dokusu CA enzimi için 7 farklı Cd ⁺² konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Cd ⁺²] grafiği.....	90

Şekil 4.46. Gökkuşığı alabalık böbrek dokusu CA enzimi için 7 farklı Co^{+2} konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[\text{Co}^{+2}]$ grafiği.....	94
Şekil 4.47. Gökkuşığı alabalık böbrek dokusu CA enzimi için 7 farklı Cu^{+2} konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[\text{Cu}^{+2}]$ grafiği.....	94
Şekil 4.48. Gökkuşığı alabalık böbrek dokusu CA enzimi için 8 farklı Zn^{+2} konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[\text{Zn}^{+2}]$ grafiği.....	95
Şekil 4.49. Gökkuşığı alabalık böbrek dokusu CA enzimi için 7 farklı Ag^{+} konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[\text{Ag}^{+}]$ grafiği.....	95
Şekil 4.50. Gökkuşığı alabalık böbrek dokusu CA enzimi için 6 farklı Cd^{+2} konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[\text{Cd}^{+2}]$ grafiği.....	96
Şekil 4.51. Gökkuşığı alabalık kas dokusu CA enzimi için 7 farklı Co^{+2} konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[\text{Co}^{+2}]$ grafiği.....	99
Şekil 4.52. Gökkuşığı alabalık kas dokusu CA enzimi için 5 farklı Cu^{+2} konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[\text{Cu}^{+2}]$ grafiği.....	100
Şekil 4.53. Gökkuşığı alabalık kas dokusu CA enzimi için 6 farklı Zn^{+2} konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[\text{Zn}^{+2}]$ grafiği.....	100
Şekil 4.54. Gökkuşığı alabalık kas dokusu CA enzimi için 6 farklı Ag^{+} konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[\text{Ag}^{+}]$ grafiği.....	101
Şekil 4.55. Gökkuşığı alabalık kas dokusu CA enzimi için 6 farklı Cd^{+2} konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[\text{Cd}^{+2}]$ grafiği.....	101
Şekil 4.56. Gökkuşığı alabalık kas dokusu CA enzimi için 7 farklı Co^{+2} konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[\text{Co}^{+2}]$ grafiği.....	105
Şekil 4.57. Gökkuşığı alabalık beyin dokusu CA enzimi için 5 farklı Cu^{+2} konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[\text{Cu}^{+2}]$ grafiği.....	105
Şekil 4.58. Gökkuşığı alabalık kas dokusu CA enzimi için 6 farklı Zn^{+2} konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[\text{Zn}^{+2}]$ grafiği.....	106
Şekil 4.59. Gökkuşığı alabalık kas dokusu CA enzimi için 6 farklı Ag^{+} konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[\text{Ag}^{+}]$ grafiği.....	106
Şekil 4.60. Gökkuşığı alabalık kas dokusu CA enzimi için 5 farklı Cd^{+2} konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[\text{Cd}^{+2}]$ grafiği.....	107
Şekil 4.61. Gökkuşığı alabalık karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kobalt iyonunun	

etkisi $[I_1] = 10^{-2}$ mM, $[I_2] = 10^{-1}$ mM, $[I_3] = 1$ mM.....	114
Şekil 4.62. Gökkuşuğu alabalık karaciğer dokusundan saflaştırılan	
CA enzimi üzerine bakır iyonunun etkisi	
$[I_1] = 10$ mM, $[I_2] = 25$ mM, $[I_3] = 40$ mM.....	115
Şekil 4.63. Gökkuşuğu alabalık karaciğer dokusundan saflaştırılan	
CA enzimi üzerine çinko iyonunun etkisi	
$[I_1] = 1$ mM, $[I_2] = 13$ mM, $[I_3] = 20$ mM.....	115
Şekil 4.64. Gökkuşuğu alabalık karaciğer dokusundan saflaştırılan	
CA enzimi üzerine gümüş iyonunun etkisi	
$[I_1] = 10^{-3}$ mM, $[I_2] = 10^{-2}$ mM, $[I_3] = 1$ mM.....	116
Şekil 4.65. Gökkuşuğu alabalık karaciğer dokusundan saflaştırılan	
CA enzimi üzerine kadmiyum iyonunun etkisi	
$[I_1] = 10^{-2}$ mM, $[I_2] = 10$ mM, $[I_3] = 30$ mM.....	116
Şekil 4.66. Gökkuşuğu alabalık böbrek dokusundan saflaştırılan	
CA enzimi üzerine kobalt iyonunun etkisi	
$[I_1] = 10^{-2}$ mM, $[I_2] = 1$ mM, $[I_3] = 20$ mM.....	123
Şekil 4.67. Gökkuşuğu alabalık böbrek dokusundan saflaştırılan	
CA enzimi üzerine bakır iyonunun etkisi	
$[I_1] = 20$ mM, $[I_2] = 40$ mM, $[I_3] = 60$ mM.....	124
Şekil 4.68. Gökkuşuğu alabalık böbrek dokusundan saflaştırılan	
CA enzimi üzerine çinko iyonunun etkisi	
$[I_1] = 1$ mM, $[I_2] = 10$ mM, $[I_3] = 20$ mM.....	124
Şekil 4.69. Gökkuşuğu alabalık böbrek dokusundan saflaştırılan	
CA enzimi üzerine gümüş iyonunun etkisi	
$[I_1] = 150$ mM, $[I_2] = 200$ mM, $[I_3] = 250$ mM.....	125
Şekil 4.70. Gökkuşuğu alabalık böbrek dokusundan saflaştırılan	
CA enzimi üzerine kadmiyum iyonunun etkisi	
$[I_1] = 90$ mM, $[I_2] = 100$ mM, $[I_3] = 200$ mM.....	125
Şekil 4.71. Gökkuşuğu alabalık kas dokusundan saflaştırılan	
CA enzimi üzerine kobalt iyonunun etkisi	
$[I_1] = 10^{-2}$ mM, $[I_2] = 1$ mM, $[I_3] = 20$ mM.....	132
Şekil 4.72. Gökkuşuğu alabalık kas dokusundan saflaştırılan	

CA enzimi üzerine bakır iyonunun etkisi	
[I ₁]= 20 mM, [I ₂]= 40 mM, [I ₃]= 60mM.....	133
Şekil 4.73. Gökkuşığı alabalık kas dokusundan saflaştırılan	
CA enzimi üzerine çinko iyonunun etkisi	
[I ₁]= 1 mM, [I ₂]= 10 mM, [I ₃]= 20 mM.....	133
Şekil 4.74. Gökkuşığı alabalık kas dokusundan saflaştırılan	
CA enzimi üzerine gümüş iyonunun etkisi	
[I ₁]= 150 mM, [I ₂]= 200mM, [I ₃]= 250 mM.....	134
Şekil 4.75. Gökkuşığı alabalık kas dokusundan saflaştırılan	
CA enzimi üzerine kadmiyum iyonunun etkisi	
[I ₁]= 90 mM, [I ₂]= 100mM, [I ₃]= 200 mM.....	134
Şekil 4.76. Gökkuşığı alabalık beyin dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kobalt	
iyonunun etkisi [I ₁]= 10 ⁻² mM, [I ₂]= 1 mM, [I ₃]= 20 mM.....	141
Şekil 4.77. Gökkuşığı alabalık beyin dokusundan saflaştırılan	
CA enzimi üzerine bakır iyonunun etkisi	
[I ₁]= 20 mM, [I ₂]= 40 mM, [I ₃]= 60mM.....	142
Şekil 4.78. Gökkuşığı alabalık beyin dokusundan saflaştırılan	
CA enzimi üzerine çinko iyonunun etkisi	
[I ₁]= 1 mM, [I ₂]= 10 mM, [I ₃]= 20 mM.....	142
Şekil 4.79. Gökkuşığı alabalık beyin dokusundan saflaştırılan	
CA enzimi üzerine gümüş iyonunun etkisi	
[I ₁]= 150 mM, [I ₂]= 200mM, [I ₃]= 250 mM.....	143
Şekil 4.80. Gökkuşığı alabalık beyin dokusundan saflaştırılan	
CA enzimi üzerine kadmiyum iyonunun etkisi	
[I ₁]= 90 mM, [I ₂]= 100mM, [I ₃]= 200 mM.....	143

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyon türleri.....	10
Çizelge 4.1. Gökkuşığı alabalık karaciğer dokusundan CA enziminin saflaştırılma sonuçları.....	49
Çizelge 4.2. Gökkuşığı alabalık böbrek dokusundan CA enziminin saflaştırılma sonuçları	49
Çizelge 4.3. Gökkuşığı alabalık kas dokusundan CA enziminin saflaştırılma sonuçları	50
Çizelge 4.4. Gökkuşığı alabalık beyin dokusundan CA enziminin saflaştırılma sonuçları	50
Çizelge 4.5. Gökkuşığı alabalık dokuları CA enzimleri için SDS-PAGE ile molekül kütleleri tayini sonuçları.....	54
Çizelge 4.6. Gökkuşığı alabalık dokuları CA enzimleri için Sephadex G-200 jel filtrasyon kromatografisi ile molekül kütleleri tayini sonuçları.....	58
Çizelge 4.7. Gökkuşığı alabalık karaciğer dokusu CA enziminin optimum pH'sı için 1M Tris-SO ₄ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	58
Çizelge 4.8. Gökkuşığı alabalık karaciğer dokusu CA enziminin optimum pH'sı için 1M potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	59
Çizelge 4.9. Gökkuşığı alabalık böbrek dokusu CA enziminin optimum pH'sı için 1M Tris-SO ₄ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	59
Çizelge 4.10. Gökkuşığı alabalık böbrek dokusu CA enziminin optimum pH'sı için 1M potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	59
Çizelge 4.11. Gökkuşığı alabalık kas dokusu CA enziminin optimum pH'sı için 1M Tris-SO ₄ tampon çözeltisi	

kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	60
Çizelge 4.12. Gökkuşuğu alabalık kas dokusu CA enziminin optimum pH'sı için 1M potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	60
Çizelge 4.13. Gökkuşuğu alabalık beyin dokusu CA enziminin optimum pH'sı için 1M Tris-SO ₄ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	60
Çizelge 4.14. Gökkuşuğu alabalık beyin dokusu CA enziminin optimum pH'sı için 1M potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	61
Çizelge 4.15. Gökkuşuğu alabalık karaciğer dokusu için Tris-SO ₄ çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	64
Çizelge 4.16. Gökkuşuğu alabalık böbrek dokusu için Tris-SO ₄ çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	65
Çizelge 4.17. Gökkuşuğu alabalık kas dokusu için Tris-SO ₄ çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	66
Çizelge 4.18. Gökkuşuğu alabalık beyin dokusu için Tris-SO ₄ çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	67
Çizelge 4.19. Gökkuşuğu alabalık karaciğer dokusu CA enziminin stabil pH'sı için 1M Tris-SO ₄ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	68
Çizelge 4.20. Gökkuşuğu alabalık karaciğer dokusu CA enziminin stabil pH'sı için 1M potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	69
Çizelge 4.21. Gökkuşuğu alabalık böbrek dokusu CA enziminin stabil pH'sı için 1M Tris-SO ₄ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	70
Çizelge 4.22. Gökkuşuğu alabalık böbrek dokusu CA enziminin stabil pH'sı için 1M potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	71
Çizelge 4.23. Gökkuşuğu alabalık kas dokusu CA enziminin stabil pH'sı için 1M Tris-SO ₄ tampon çözeltisi	

kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	72
Çizelge 4.24. Gökkuşuğu alabalık kas dokusu CA enziminin stabil pH'sı için 1M potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	73
Çizelge 4.25. Gökkuşuğu alabalık beyin dokusu CA enziminin stabil pH'sı için 1M Tris-SO ₄ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	74
Çizelge 4.26. Gökkuşuğu alabalık beyin dokusu CA enziminin stabil pH'sı için 1M potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	75
Çizelge 4.27. Gökkuşuğu alabalık karaciğer dokusu için değişik sıcaklıklarda yapılan % aktivite değerleri.....	77
Çizelge 4.28. Gökkuşuğu alabalık böbrek dokusu için değişik sıcaklıklarda yapılan % aktivite değerleri.....	78
Çizelge 4.29. Gökkuşuğu alabalık kas dokusu için değişik sıcaklıklarda yapılan % aktivite değerleri.....	79
Çizelge 4.30. Gökkuşuğu alabalık beyin dokusu için değişik sıcaklıklarda yapılan % aktivite değerleri.....	80
Çizelge 4.31. Gökkuşuğu alabalık dokuları CA enzimleri için optimum sıcaklık, E_a , ΔH ve Q_{10} tayini sonuçları.....	81
Çizelge 4.32. Gökkuşuğu alabalık dokuları CA enzimleri için p-nitrofenilasetat substratı ile K_M , V_{max} , k_{cat} ve V_0 çalışmaları sonuçları.....	86
Çizelge 4.33. Gökkuşuğu alabalık karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin esterase aktivitesi üzerine kobalt iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen kobalt iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri.....	86
Çizelge 4.34. Gökkuşuğu alabalık karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin esterase aktivitesi üzerine bakır iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen bakır iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri.....	87

Çizelge 4.35. Gökkuşığı alabalık karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine çinko iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen çinko iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri.....	87
Çizelge 4.36. Gökkuşığı alabalık karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine gümüş iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen gümüş iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri.....	87
Çizelge 4.37. Gökkuşığı alabalık karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine kadmiyum iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen kadmiyum iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri.....	88
Çizelge 4.38. Gökkuşığı alabalık karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine metal iyonları ile yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen IC ₅₀ değerleri.....	91
Çizelge 4.39. Gökkuşığı alabalık böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine kobalt iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen kobalt iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri.....	91
Çizelge 4.40. Gökkuşığı alabalık böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine bakır iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen bakır iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri.....	92
Çizelge 4.41. Gökkuşığı alabalık böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine çinko iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen çinko iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri.....	92
Çizelge 4.42. Gökkuşığı alabalık böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine gümüş iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen gümüş iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri.....	93
Çizelge 4.43. Gökkuşığı alabalık böbrek dokusundan saflaştırılan CA	

enziminin esteraz aktivitesi üzerine kadmiyum iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen kadmiyum iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri.....	93
Çizelge 4.44. Gökkuşığı alabalık böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine metal iyonları ile yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen IC ₅₀ değerleri.....	96
Çizelge 4.45. Gökkuşığı alabalık kas dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine kobalt iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen kobalt iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri.....	97
Çizelge 4.46. Gökkuşığı alabalık kas dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine bakır iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen bakır iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri.....	97
Çizelge 4.47. Gökkuşığı alabalık kas dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine çinko iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen çinko iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri.....	98
Çizelge 4.48. Gökkuşığı alabalık kas dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine gümüş iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen gümüş iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri.....	98
Çizelge 4.49. Gökkuşığı alabalık kas dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine kadmiyum iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen kadmiyum iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri.....	99
Çizelge 4.50. Gökkuşığı alabalık kas dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine metal iyonları ile yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen IC ₅₀ değerleri.....	102
Çizelge 4.51. Gökkuşığı alabalık beyin dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine kobalt iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık	

gelen kobalt iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri.....	102
Çizelge 4.52. Gökkuşığı alabalık beyin dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine bakır iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen bakır iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri.....	103
Çizelge 4.53. Gökkuşığı alabalık beyin dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine çinko iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen çinko iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri.....	103
Çizelge 4.54. Gökkuşığı alabalık beyin dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine gümüş iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen gümüş iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri.....	104
Çizelge 4.55. Gökkuşığı alabalık beyin dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine kadmiyum iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen kadmiyum iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri.....	104
Çizelge 4.56. Gökkuşığı alabalık beyin dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine metal iyonları ile yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen IC ₅₀ değerleri.....	107
Çizelge 4.57. Gökkuşığı alabalık karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kobalt iyonunun K _i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	109
Çizelge 4.58. Gökkuşığı alabalık karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine bakır iyonunun K _i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	110
Çizelge 4.59. Gökkuşığı alabalık karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine çinko iyonunun K _i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	111

Çizelge 4.60. Gökkuşığı alabalık karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine gümüş iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	112
Çizelge 4.61. Gökkuşığı alabalık karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kadmiyum iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	113
Çizelge 4.62. Gökkuşığı alabalık karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi için 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan K_i değerleri ve inhibisyon tipleri.....	117
Çizelge 4.63. Gökkuşığı alabalık böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kobalt iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	118
Çizelge 4.64. Gökkuşığı alabalık böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine bakır iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	119
Çizelge 4.65. Gökkuşığı alabalık böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine çinko iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	120
Çizelge 4.66. Gökkuşığı alabalık böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine gümüş iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	121
Çizelge 4.67. Gökkuşığı alabalık böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kadmiyum iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	122

Çizelge 4.68. Gökkuşığı alabalık böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi için 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan K_i değerleri ve inhibisyon tipleri.....	126
Çizelge 4.69 Gökkuşığı alabalık kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kobalt iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	127
Çizelge 4.70. Gökkuşığı alabalık kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine bakır iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	128
Çizelge 4.71. Gökkuşığı alabalık kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine çinko iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	129
Çizelge 4.72. Gökkuşığı alabalık kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine gümüş iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	130
Çizelge 4.73. Gökkuşığı alabalık kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kadmiyum iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitor konsantrasyonları.....	131
Çizelge 4.74. Gökkuşığı alabalık kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi için 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan K_i değerleri ve inhibisyon tipleri.....	135
Çizelge 4.75. Gökkuşığı alabalık beyin dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kobalt iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitor konsantrasyonları.....	136

Çizelge 4.76. Gökkuşığı alabalık beyin dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine bakır iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	137
Çizelge 4.77. Gökkuşığı alabalık beyin dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine çinko iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	138
Çizelge 4.78. Gökkuşığı alabalık beyin dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine gümüş iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	139
Çizelge 4.79. Gökkuşığı alabalık beyin dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kadmiyum iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	140
Çizelge 4.80. Gökkuşığı alabalık beyin dokusundan saflaştırılan CA enzimi için 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan K_i değerleri ve inhibisyon tipleri.....	144
Çizelge 5.1. Gökkuşığı alabalığı karaciğer CA enzimi için yapılan çalışmaların toplu sonuçları.....	162
Çizelge 5.2. Gökkuşığı alabalık böbrek dokusundan CA enzimi için çalışmaların toplu sonuçları.....	163
Çizelge 5.3. Gökkuşığı alabalık kas dokusundan CA enzimi için çalışmaların toplu sonuçları.....	164
Çizelge 5.4. Gökkuşığı alabalık beyin dokusundan CA enzimi için çalışmaların toplu sonuçları.....	165

1. GİRİŞ

Laboratuvarlar bir çok önemli kimyasal reaksiyonların kimyagerler tarafından gerçekleştirildiği ve buradan çıkan sonuçların insanlığa sunulduğu önemli merkezlerdir. Bunun gibi her canlı vücudunda da milyonlarca laboratuvarın varlığı dikkatlerden kaçmamalıdır. Hücre ve hücrelerden oluşmuş canlılar durup dinlenmeden reaksiyonlar gerçekleştiren kimyasal laboratuvarlardır. Bu laboratuvarlarda iş gören kimyagerler ise enzim olarak adlandırılan biyo-makromoleküllerdir. Biyokimya tarihinde en fazla yer kaplayan çalışmalar enzimler üzerinde gerçekleştirilmiştir (Lehninger 2005).

Enzimler canlı hücreler tarafından sentezlenen ve canlı metabolizmasındaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürün oluşturmada %100 lük bir ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Örneğin, karbondioksit'in (CO_2) su ile reaksiyona girmesiyle karbonik asit meydana gelmektedir. Fizyolojik pH'da oluşan karbonik asitin bir kısmı hemen bikarbonat iyonuna dönüşmektedir. İyonizasyon işlemi enzim gerektirmez ve asit özelliğine bağlıdır. Canlı vücudunda ise bikarbonat iyonu oluşması karbonik anhidraz enziminin katalizörlüğünde gerçekleşir. Katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu hariç tutulduğunda, bütün enzimler protein yapısındadır. Enzimlerin katalizleme güçleri, turnover sayısı ile ifade edilir. Turnover sayısı birim zamanda bir mol enzimin ürüne dönüştürdüğü substratın mol sayısıdır. Turnover sayısı en yüksek olan enzim, $40.000.000 \text{ s}^{-1}$ ile katalazdır (Fersht 1999).

Genel olarak enzimlerin özellikleri şu şekilde sıralanabilir;

1. Enzimlerin büyük çoğunluğu protein yapısındadırlar.
2. Aynı tür reaksiyonlar enzimler tarafından defalarca gerçekleştirilebilir.
3. Bir enzim daima bir çeşit veya aynı tip benzer reaksiyonları katalizler.
4. Katalizledikleri reaksiyonların aktivasyon enerjisini düşürürler.
5. Enzimler gerçekleşecek reaksiyonun çabuk dengeye ulaşmasını sağlarlar.
6. Enzimler canlı ortamda olduğu gibi cansız ortamda da görev yaparlar.

Enzimlerin etki ederek ürüne dönüştürdükleri maddelere substrat denir. Enzimler genelde ya substrat adının sonuna “-az” eki getirilerek ya da ilk bulucularının ortaya

attıkları isimlerle tanınmaktadırlar. Örneğin, fosfataz, üreaz, lipaz, tripsin ve pepsin gibi. Fakat bu isimler çoğu enzimlerin fonksiyonları hakkında eksik bilgi verdiği için Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB) tarafından sistematik bir sınıflandırma yapılmıştır. Ayrıca her bir enzim için 4 rakamlı enzim kod numarası (E.C.) öngörülmüştür (Yüreğir 1981). Bundan dolayı enzimler katalizledikleri reaksiyon tiplerine ve reaksiyon mekanizmalarına göre şu şekilde sınıflandırılmışlardır;

- 1. Oksidoredüktazlar:** Redoks (elektron transferi) tepkimelerini katalizleyen enzimlerdir.
- 2. Transferazlar:** İki substrat arasında hidrojen dışındaki grupların transferini gerçekleştiren enzimlerdir.
- 3. Hidrolazlar:** Su katılması suretiyle bağların parçalandığı hidroliz reaksiyonlarını katalize eden enzimlerdir.
- 4. Liyazlar:** Oksidasyon veya hidrolizden farklı bir mekanizma ile substratlardan bazı grupların uzaklaştırıldığı ve çift bağların oluşturulduğu tepkimeleri katalizleyen enzimlerdir.
- 5. İzomerazlar:** Molekül içindeki değişiklikleri katalizleyen enzimlerdir.
- 6. Ligazlar:** Enerjice zengin bir bağın kopması ile ortaya çıkan enerji yardımıyla iki molekülün bağlanması reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.

Enzimler substratlarına ve katalizledikleri reaksiyon tiplerine son derece spesifiktirler. Genellikle bir enzim sadece bir kimyasal reaksiyonu veya aynı tip benzer reaksiyonları katalizler. Substratlara karşı spesifiklikleri oldukça yüksektir, hatta bazı enzimlerin substrat özgüllükleri mutlaklıdır. Örneğin, proteolitik enzimler peptit bağlarının hidrolizini gerçekleştirirler. Bu enzimlerin substrat özgüllükleri birbirinden farklıdır. Tripsin sadece lizin veya arginin rezüdülerinin karboksil grubu tarafındaki peptit bağlarını parçalar. Kan pıhtılaşmasında görev alan trombin ise karboksil bileşeni arginine ve amino bileşeni glisin amino asitine ait peptit bağını parçalamaktadır. Buradan anlaşılacağı gibi trombinin substrat özgüllüğü yine bir proteolitik enzim olan tripsine göre daha fazladır. Birçok enzimin stereospesifiklik özelliği de vardır. Bazı enzimler substrat molekülünün D- formunu ürüne çevirirlerken, bir kısmı da L- formunu ürüne dönüştüren tepkimeyi katalizlemektedirler. Örneğin, glutamat

dehidrogenaz enzimi L-glutamat ve laktat dehidrogenaz enzimi de L-laktat üzerinde etkilidirler (Lehninger 2005., Keha ve Küfrevioğlu 2004). Bununla birlikte, aynı canlı türünde aynı reaksiyonu katalizleyen ancak farklı kimyasal ve fiziksel özellikleri olan enzimler de vardır. Bu tip enzimlere izoenzim denir. İzoenzimlerin substratlarına, kofaktörlerine ve inhibitörlerine karşı ilgileri farklıdır. İzoenzimlerin başlıca özellikleri arasında amino asit sayı ve sırasının farklı olması, izoelektrik noktalarının farklı olması, herbir izoenzimin farklı geninin olması ve elektroforetik hareketliliklerinin farklı olması sayılabilir. İzoenzimler farklı dokularda lokalize olabildiği gibi, bir hücrenin farklı subsellüler fraksiyonlarında da yerleşebilirler. İzoenzimlere örnek olarak bu tez kapsamında çalışılan karbonik anhidraz, laktat dehidrogenaz, alkalen fosfataz verilebilir (Devlin 2002).

Enzimleri saflaştırmak oldukça zor bir işlemdir. Enzimlerin büyük bir kısmı protein yapısında olduğundan şartların değişmesine karşı oldukça hassastırlar. Bu yüzden bir çözeltideki enzim varlığı, enzimin etki ettiği substrat molekülü veya reaksiyon sonucu oluşan ürün ya da enzimatik reaksiyona aracılık eden diğer parametreler üzerinden tespit edilmektedir. Enzimlerin aktivitesi üzerinde etkili olan faktörler arasında, substrat konsantrasyonu, enzim konsantrasyonu, pH, sıcaklık, allosterik etkiler, iyonik şiddet, hormonlar, inhibitör veya aktivatörlerin varlığı sayılabilir. Her enzim için aktivitelerin maksimum olduğu pH değerleri vardır. Bu değerlerin üzerinde ve altında aktivite düşer. Bu pH derecesine "Optimum pH" denir. Örneğin, proteini parçalayan pepsin, midede pH'nın 2,0 olduğu asidik ortamda maksimum çalışır; bunun aksine pankreastan salgılanan ve yine protein sindiriminde rol alan tripsin, ancak pH 8,5 da optimum olarak çalışabilir. Bir enzimin optimum pH'sı normal hücre içi ortamı pH'sı ile aynı değildir. Bu durum hücre içindeki enzim aktivitesinin kontrolünde pH-aktivite ilişkisinin önemini göstermektedir. Genelde bir kimyasal reaksiyonun hızı sıcaklıkla artış göstermektedir. Sıcaklık enzimli reaksiyonlarında hızlarının artışına sebep olan önemli bir faktördür, yani tepkime hızının yükselmesi, sıcaklıkla doğru orantılıdır. Bununla birlikte belirli bir noktaya gelindiğinde enzim aktivitesinde bir düşüş gözlenir. Bu durum yüksek sıcaklıkta enzimin üç boyutlu yapısının etkilendiğini yani enzimin denatüre olduğunu göstermektedir. Bir enzim için 10°C'lik sıcaklık değişiminin

meydana getirdiği aktivite farklılığı Q_{10} değeriyle ifade edilir (Keha ve Küfrevioğlu 2004).

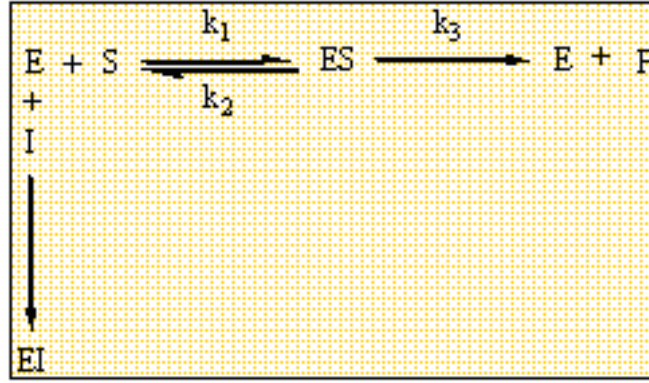
Enzimlerin aktivitelerini pozitif yönde etkileyen bileşiklere aktivatör adı verilir. Genellikle enzim aktivatörleri küçük iyonlar veya fazla büyük olmayan moleküllerdir. Bunlar kofaktörlerin aksine kataliz olayına her zaman katılmazlar. Aktivatörleri iki grupta toplamak mümkündür. Birinci gruptakiler sadece substratla birleşerek aktivatör rolü oynayan bileşikler. İkinci gruptakiler ise serbest enzimle birleşerek aktivatör rolü oynayan bileşiklerdir (Gözükara 1989).

Enzimlerin, bazı bileşikler tarafından hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak aktivitelerinin azaltılması ve hatta yok edilmesi olayına inhibisyon adı verilir. Buna sebep olan bileşiklere de inhibitör denilir. İnhibitörler, genellikle küçük mol kütlelerine sahip bileşik veya iyonlardır. Enzimatik aktivitenin inhibisyonu, biyolojik sistemlerde başlı başına bir kontrol mekanizması oluşturur. Bu yüzden enzim inhibisyonu büyük bir önem arz etmektedir. Bir çok ilaç ve zehirli bileşik fonksiyonlarını bu yolla gerçekleştirirler. Enzim etki mekanizmalarının incelenmesinde de inhibisyon olayından faydalanılır (Keha ve Küfrevioğlu 2004).

Enzimatik inhibisyon iki grupta incelenir;

- a) Dönüşümsüz inhibisyon
- b) Dönüşümlü inhibisyon

Dönüşümsüz inhibisyon'da inhibitör enzime ya kovalent olarak bağlanır ya da zor ayrışabilen bir kompleks oluşturur. Sinir uyarılarının iletilmesinde önemli bir rol oynayan asetil kolin esteraz enziminin, sinir gazı zehirleri tarafından inhibisyonu buna güzel bir örnektir. Bu gazlardan diizopropilflorofosfat, enzimin aktif bölgesinde yer alan serin amino asidiyle reaksiyona girerek, inaktif diizopropilfosfo-enzim oluşturur. Dönüşümsüz inhibisyonda V_{max} (enzimatik reaksiyonda ulaşılabilecek maksimum hız) azalır, K_M ise (enzimin substrata ilgisini gösteren sabit) değişmeden kalır. Reaksiyon şeması;



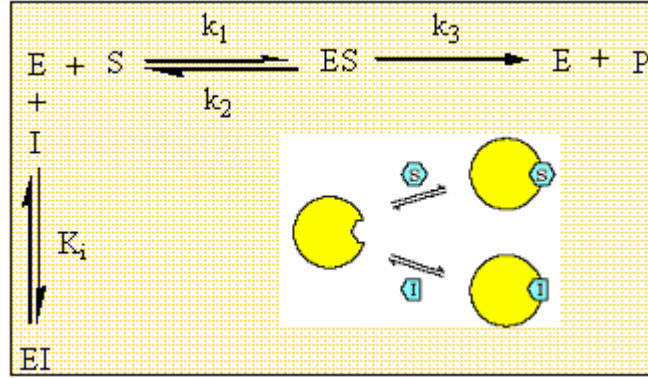
şeklinde yazılabilir (Segel 1975., Keha ve Küfrevioğlu 2004).

Dönüşümsüz inhibisyonun aksine dönüşümlü inhibisyonda enzim ile inhibitör etkileşmesi bir denge reaksiyonu şeklindedir.

Dönüşümlü inhibisyon üç grupta incelenir;

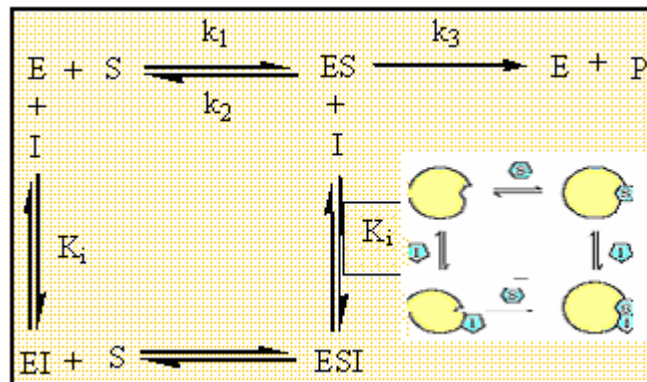
- i) Yarışmalı (kompetitif) inhibisyon
- ii) Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon
- iii) Yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyon

Dönüşümlü inhibisyonun en basit tipi yarışmalı (kompetitif) inhibisyondur. Yarışmalı inhibitör yapı itibariyle substrata benzer ve enzimin aktif bölgesine bağlanır. Böylece substratın enzime bağlanması önlenmiş olur. Fakat substrat konsantrasyonu artırılmakla inhibisyon etkisi ortadan kaldırılabilir. Yani enzimin $V_{\max}$ değeri değişmezken, K_M değeri artar. Yarışmalı inhibitör varlığında reaksiyon şeması;



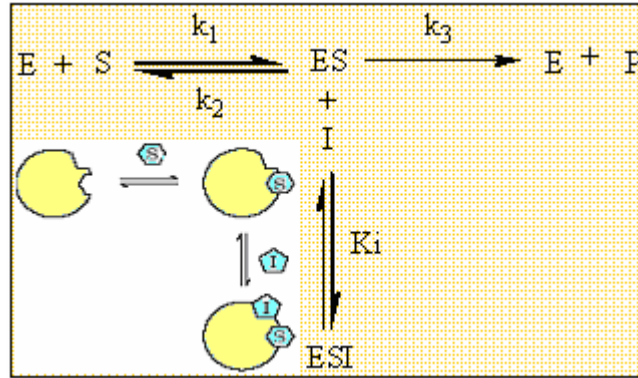
şeklinde yazılabilir (Segel 1975., Telefoncu 1986., Keha ve Küfrevioğlu 2004).

Yine dönüşümlü bir tip olan yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyonda; inhibitör ve substrat enzim molekülüne aynı anda bağlanabilir. Bu durum bağlanmanın enzimin aynı bölgesine olmadığını gösterir. Yarışmasız bir inhibitör etkisini; bir enzimin turnover sayısını, yani katalitik aktivitesini düşürerek gösterir. Burada substrat ve inhibitör arasında yarışma söz konusu değildir. Substrat konsantrasyonu artırılmakla inhibisyon kaldırılamaz. Enzimin $V_{\max}$ değeri azalırken, K_M değeri sabit kalır. Substrat ve inhibitör farklı bölgelere bağlanabildiğinden, enzimin iki farklı inaktif kompleksi meydana gelir: EI ve ESI. Yarışmasız inhibitör varlığında reaksiyon şeması;



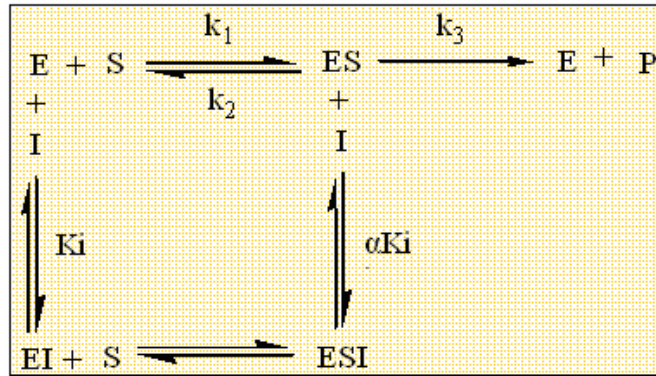
şeklinde yazılabilir (Telefoncu 1986., Keha ve Küfrevioğlu 2004).

Bir başka dönüşümlü inhibisyon tipi, yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyonudur. Bu inhibisyon çeşitinde; inhibitör serbest enzime bağlanamaz, sadece ES kompleksine bağlanır. Bunun için tek substratlı sistemlerde, yarı yarışmalı inhibisyona seyrek rastlanır. Birden fazla substratlı enzimlerde bu inhibisyon tipine daha sık rastlanır. Reaksiyon şeması;



şeklinde yazılabilir. ESI kompleksi ortamda sürekli olarak var olacağından, yarı yarışmalı inhibitör varlığında V_{max} azalır. ESI kompleksinin oluşumu vasıtasıyla; ES kompleksi ortamdan sürekli çekildiğinden, enzim ve substrattan ES kompleksinin oluşum dengesi daha fazla sağa kayar ve K_M değeri küçülür (Segel 1975., Telefoncu 1986).

Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyonun özel bir türü olan lineer karışık tür inhibisyon, dönüşümlü inhibisyon sınıfına girer. Bu tür inhibisyonda; E, S ve I'nın bağlanma denge sabitleri farklılaşmaktadır (Segel 1975., Gilbert 1992).



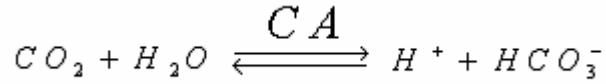
Birçok multienzim sistemi, net reaksiyon hızlarını kendileri düzenleme kapasitesine sahiptir. Bu sistemlerin çoğunda, seri reaksiyonların son ürünü belirli bir konsantrasyona ulaştığında; sistemin ilk enzimini veya dallanma noktasındaki enzimi inhibe eder. Bu enzimlere allosterik enzimler adı verilir. Bu olaya da feed-back (geri besleme) inhibisyonu denir. Birden fazla polipeptid zinciri ihtiva eden allosterik enzimlerde; inhibitörlerin enzime bağlanmasıyla, değişik alt birimlerin bağlanma merkezleri arasındaki etkileşmelerle allosterik inhibisyon meydana gelir. Allosterik enzimleri etkileyen bileşiklere modülatör adı verilir. Homotropik allosterik enzimlerde; substrat, bizzat pozitif modülatör olarak etki yapar. Heterotropik allosterik enzimlerde ise; enzim, substratlardan başka bileşikler tarafından etkilenmektedir. Bazı allosterik enzimler homotropik-heterotropik karakterde olup, modülatörlerden birisi o enzimin substratı, diğerleri başka bileşiklerdir. Allosterik enzimlerin kinetiği, Michaelis-Menten kinetiğinden farklılık gösterir (Stryer 1988).

Inhibisyon çeşidinin ve ilgili K_i sabitinin belirlenmesi için en çok başvurulan yöntem Lineweaver-Burk eğrileridir. Bu yöntemde $1/V$ ye karşı $1/[S]$ grafiği en az üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda çizilir. Kesim noktalarından değerlendirmeler yapılır. K_i sabitlerinin bulunmasının ikinci yöntemi Dixon grafikleri yoludur. Bu yöntemde en az iki sabit substrat konsantrasyonunda $1/V-[I]$ grafiği çizilerek kesim noktalarından K_i sabitleri hesaplanır (Telefoncu 1986).

Canlı metabolizmasında anahtar bir metabolit olan CO_2 'in çevresel konsantrasyonu nadiren yüksektir. Ayrıca CO_2 , karbonik asit ve bikarbonat oluşumu ile dengededir. Bikarbonat negatif yüklüdür ve sulu çözeltilerde yüksek bir çözünürlüğe sahip olmasına rağmen, lipidlerde çözünürlüğü çok azdır. CO_2 'in ise hem sulu çözeltilerde hem de lipidlerde çözünürlüğü yüksektir. Bu nedenle CO_2 çok kolay şekilde hücre içine ve dışına difüze olurken, bikarbonatın hücre membranından geçmesi için taşınması gerekmektedir. pH 6,3'ün üzerinde, CO_2 ve HCO_3^- arasındaki denge HCO_3^- 'a doğru kayar ve böylece hücre içinde ihtiyaç duyulan CO_2 ve HCO_3^- konsantrasyonlarının sürdürülebilmesinde problemler oluşur. Fizyolojik pH'da CO_2 'in HCO_3^- 'a dönüşümü çok yavaştır ve enzim tarafından katalizlenmesi gerekir. CO_2 'in HCO_3^- 'a çevrimi

CO₂'in hücre içinde tutulmasında önemli iken, HCO₃⁻'in CO₂'e çevrimi ise bikarbonatın hücre içine girişini kolaylaştırır. Böylece, enzimatik olarak CO₂ ve HCO₃⁻'in çevrilmesi yalnızca hücrel enzimlerin ihtiyaç duydukları seviyede hücrenin CO₂ miktarını artırmasında değil, ayrıca hücrel proseslerin başarılabilmesi için uygun hücre içi CO₂ ve HCO₃⁻ seviyelerinin devamında da hücreye yardım eder. İşte, CO₂ ve HCO₃⁻'in birbirlerine çevrilmesi reaksiyonlarını katalizleyen 'karbonik anhidraz' enzimidir (Smith and Ferry 2000).

Karbonik anhidrazlar (CA: karbonat hidrolizaz, EC 4.2.1.1) aktif bölgelerinde Zn⁺² bulunduran önemli bir metalloenzim ailesidir. Canlılarda karbondioksitin hidratasyonu ve bikarbonatın dehidratasyonu reaksiyonlarını tersinir olarak katalizler:



CA enzimi, karbonik asit meydana getirmeden farklı bir yol izleyerek CO₂ ve HCO₃⁻'in birbirlerine çevrilmesi reaksiyonlarını katalizleyen enzimidir (Smith and Ferry 2000). Enzim HCO₃⁻ ve H⁺ oluşturarak hem CO₂ in uzaklaştırılmasında hem de asit-baz dengesinin korunmasında önemli rol oynar. Karbonik anhidraz CO₂ 'in hidratasyonu reaksiyonunun yanı sıra, siyanatın karbamik aside veya ürenin siyanamide, aldehidin geminal diol hidratasyonu reaksiyonlarını da katalizlemektedir. Karboksilik, sülfonik ve fosforik asit esterlerinin hidrolizleri de bu enzim tarafından katalizlenmektedir (Çizelge 1.1) (Supuran and Scozzafava 2001).

Çizelge 1.1. Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyon türleri

(1)	$O=C=O$	+	H_2O	$\rightleftharpoons$	HCO_3^-	+	H^+
(2)	$HN=C=NH$	+	H_2O	$\rightleftharpoons$	H_2NCONH_2		
(3)	$RCHO$	+	H_2O	$\rightleftharpoons$	$RCH(OH)_2$		
(4)	$RCOOAr$	+	H_2O	$\rightleftharpoons$	$RCOOH$	+	$ArOH$
(5)	RSO_3Ar	+	H_2O	$\rightleftharpoons$	RSO_3H	+	$ArOH$
(6)	$ArOPO_3^{-2}$	+	H_2O	$\rightleftharpoons$	HPO_3^{-2}	+	$ArOH$
(7)	ArF	+	H_2O	$\rightleftharpoons$	HF	+	$ArOH$
(8)	$PhCH_2OCOC l$	+	H_2O	$\rightleftharpoons$	$PhCH_2OH$	+	$CO_2 + HCl$
(9)	RSO_2Cl	+	H_2O	$\rightleftharpoons$	RSO_3H	+	HCl

(R =Me ; Ph)

(Ar=2,4-dinitrofenil)

CA enziminin; hayvan dokularında, bitki hücrelerinde ve bakteriler gibi hemen hemen bütün organizmalarda bulunduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, son yıllarda yapılan çalışmalarda çeşitli memeli dokularında 14 farklı CA izoenziminin olduğu bildirilmektedir (Chegwitten *et al.* 2000., Solis *et al.* 1999., Clare and Supuran 2000., Supuran and Scozzafava 2002). Belirlenen CA izoenzimleri arasında, CA I, CA II, CA III ve CA VII sitozolik form; CA IV, CA IX, CA XII ve CA XIV membrana bağlı; CA V mitokondriyel form; CA VI tükürük gibi çeşitli salgılarda mevcut olan karbonik anhidraz formlarıdır (Parkkila *et al.* 1998., Mori *et al.* 1999., Bülbül *et al.* 2003). Son yıllarda katalitik etkisi olmayan birkaç formu da (CA VIII, CA X and CA XI) canlılardan izole edilmiştir (Ilies *et al.* 2000).

CA ilk olarak memeli eritrositlerinden izole edilmiştir. Daha sonraki yıllarda enzim, insan eritrositleri, balık eritrositleri, sıçan eritrositleri, sıçan tükürüğü, sığır kemiği, sığır lökositleri, çeşitli bakteriler ve bitki kaynaklarından saflaştırılmış ve birçok kaynaktan karakterize edilmiştir. Enzimin memelilerdeki molekül kütlesi 30.000 Da civarında olduğu tespit edilmiştir (Feldstein and Silverman 1984., Krunkrai *et al.* 2001., Demir *et al.* 2001., Beydemir *et al.* 2002., Beydemir and Gülçin 2004).

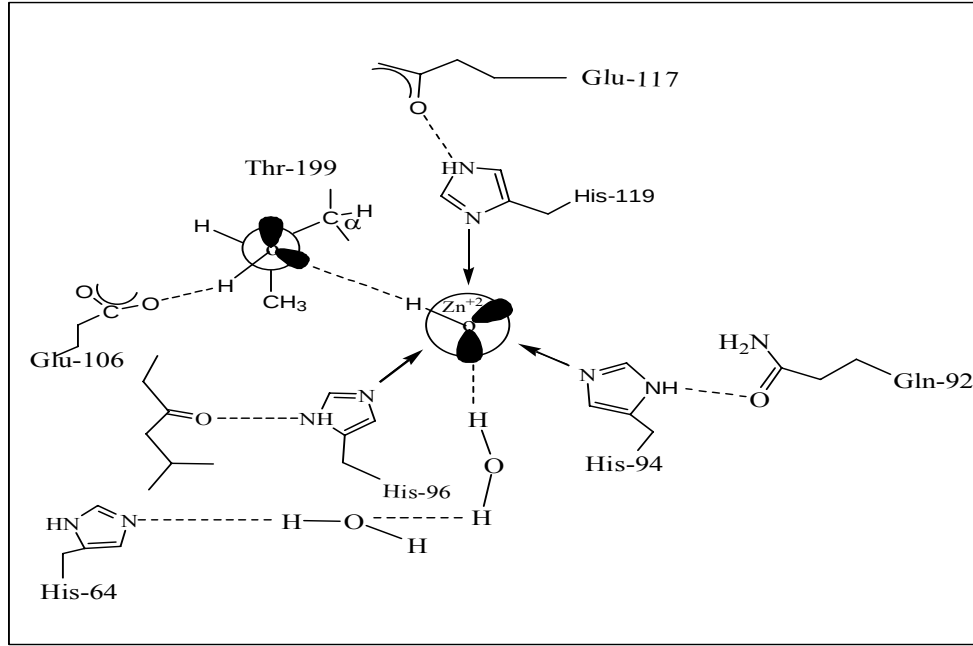
CA canlılarda CO_2 'in hidratasyon ve HCO_3^- 'in dehidratasyon reaksiyonlarını tersinir olarak katalizlemesinin yanı sıra; böbrek, gastrik mukoza ve göz lensi dokularında H^+ ve HCO_3^- birikiminde de rol almaktadır. Bunlardan başka önemli miktarda tükürük bezleri, beyin, sinir miyelin kılıfı, pankreas, prostat, uterus ve endometrium dokularında da belirli miktarlarda bulunmaktadır (Supuran *et al* 1998). Ayrıca balıkların solungaç ve salgı organlarında, bazı böcek ve bakterilerde, kabuklu hayvanların kabuk yapımında ve yumurta kabuğunun oluşumunda, alglerde ve karasal bitki kloroplastlarında bu enzimin önemli rolleri ispatlanmıştır (Graham *et al.*1984., Tsuzuki and Miyachi 1989., Badger and Price 1994).

Karbonik anhidraz enzimlerinin üç boyutlu yapıları α -CA, β -CA ve γ -CA olmak üzere üç farklı familyada incelenmiştir. Farklı familyalarla gösterilen homolog enzimler arasında önemli bir fark yoktur, aksine onların hepsinde çinko iyonu vardır. Bundan dolayı bu familyaların hepsi, katalitik fonksiyonu yerine getirmeleri yönünden birbirine benzer yapıdadır (Hewett-Emmett 2000).

Üç boyutlu yapılardan ilki α -CA olup, insan CA-I ve CA-II izoenziminin kristal yapısı ile sığır CA-III, yassı formu bir sıçan CA-V 'i ve E. coli de bulunan CA formu bu yapıdaki enzim tipidir. Bir yapı da Hindistan bufalosunun CA-II 'sinde bulunmuştur. Molekölün geri kalan kısmına zayıfça bağlanan amino terminal bölgesinin dışında, α -CA bir bölge proteini olarak düşünülebilir. Yapının ikinci bölgesi on iplikçik ve molekülü iki eşit parçaya bölen sarılmış bir β şeridinden oluşmuştur. Paralel iplikçiklerin iki parçası dışında, diğer β şeritleri antiparalel olarak uzanmışlardır. Diğerlerine nisbetle daha kısa olan heliksler, molekülün yüzeyine yerleşmişlerdir (Boriack-Sjodin *et al.* 1995).

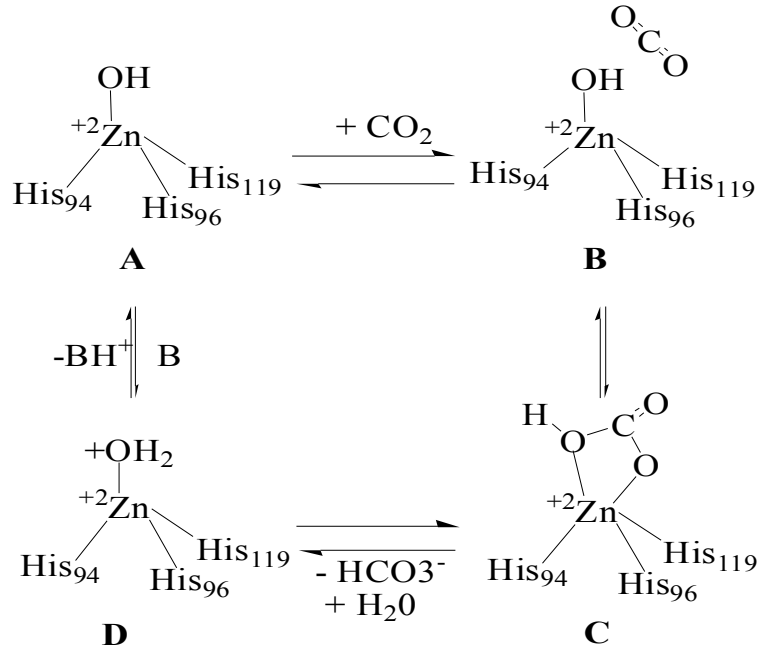
Enzimin aktif bölgesi oyuk şeklindedir ve geniş bir alana yerleşmiştir. Koni biçimindeki bu oyuk hemen hemen molekülün merkezine kadar uzanır. Çinko iyonu bu oyuğun alt kısmına bitişik durumdadır. Dört ligand gibi H_2O veya OH^- ile bir tetrahedral geometride His-94, His-96 ve His-119 'daki üç azot atomuyla koordine edilmiştir.

Ligandlar protein formundaki bir indirekt ligandın hidrojen bağı ile diğer gruplara bağlanmasıyla oluşurlar (Şekil 1.1) (Lesburg and Christianson 1995).



Şekil 1.1. HCA-II izoenziminin ligand yapısındaki metal merkezinin şematik olarak gösterilişi

Karbonik anhidraz enziminin katalitik mekanizması; son altmış yıldır yapılan çalışmalar sonucu aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bu çalışma sonuçlarına göre CA enziminin; metabolizmada son derece önemli olması, çözelti ortamında kararlı olması ve uygun şartlar altında aktivitesi kaybolmadan uzun süre bekletilebilmesi gibi avantajlı özelliklere sahip olduğu anlaşılmıştır. Enzim kinetiği hakkında insan HCA-II izoenzimi üzerinde yapılan spesifik bölgenin mutasyonu ve X-ray kristalografisi çalışmalarında da, katalitik mekanizma oldukça ayrıntılı bir şekilde ortaya çıkarılmıştır. Diğer izoenzimlerin mekanizmaları genellikle bu mekanizma ile aynı olmasına rağmen, bazı spesifik detaylarda farklı olabilmektedir. Bu çalışmalar sonucunda, CA'nın yapısal olarak iki önemli özelliğe sahip olduğu tespit edilmiştir. Bunlardan birincisi, aktif bölgede Zn^{+2} iyonu ve ona bağlı bir hidroksil grubu ihtiva etmektedir. İkinci olarak da, aktif bölge yakınındaki amino asitler, proton verici ve proton gradienti oluşturacak şekilde düzenlenmişlerdir (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Karbonik anhidraz enziminin CO_2 -hidratasyon reaksiyonunu kataliz mekanizmasının şematik olarak gösterilişi

Zn^{+2} iyonuna OH^- iyonunun bağlanmasıyla enzimin aktif formu meydana gelir. Enzimin aktif formu güçlü nükleofilik yapısıyla CO_2 molekülüne saldırır. Bu da Zn^{+2} iyonuna bağlanmış bikarbonat iyonunun oluşmasını sağlar. Daha sonra bikarbonat iyonu bir su molekülü ile yer değiştirir ve çözeltiye geçer. Bunun sonucunda Zn^{+2} iyonuna su molekülü bağlanır ve bu da enzimin asit formuna dönüşmesini sağlar (Stams *et al.* 1988). Tekrar bazik formu olan A formuna geçmek için aktif bölgeden çevresine bir proton transferi gerçekleşir. Bu reaksiyonun gerçekleşmesine His-64 gibi proton yakalayan aktif bölgeler ve ortamdaki tampon bölgeler yardımcı olurlar (Lindskog and Silverman 2000., Supuran and Scozzafava 2001).

Karbonik anhidraz enzimi aktivitesinin bir çok kimyasal madde ve ilaçlar tarafından inhibisyon ve aktivasyon etkileri bilim adamları tarafından araştırılmış ve literatürde rapor edilmiştir (Beydemir *et al.* 2000., Beydemir and Gülçin 2004., Supuran *et al.* 2001). Bu enzim bir çok dokuda ilaçlar için hedef molekül olarak kabul edilmektedir. Bu ilaçların bir çoğu hayvanlarda ve insanlarda CA'nın kuvvetli inhibitörü olarak bilinen

sülfonamid türevleridir. Glokom gibi bazı hastalıkların tedavisinde bu enzimin inhibisyonu ile hastalığın tedavisi amaçlanmış ve hala uygulanmaktadır (Bülbül *et al.* 2003). CA inhibitörleri iki grupta ele alınmaktadır. Birinci grup inhibitörler metallerle kompleks yapmış anyonlar ve ikinci grup inhibitörler ise enzimin Zn^{+2} iyonuna bağlanan moleküllerdir (Esposito *et al.* 2000). İnorganik anyon ve katyonların, CA enziminin inhibisyonu hakkında yapılan araştırmalarda, birçok tek değerlikli anyonların CA enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösterdikleri bulunmuştur (Lindskog 1997., Schcer and Dietsch 1984., Arslan *et al.* 1996). Ayrıca insan eritrosit CA izoenzimlerinin CO_2 hidrataz aktivitesinin Pb^{+2} , Ag^{+} , Zn^{+2} , Cd^{+2} ve Cu^{+2} ağır metal iyonları tarafından inhibe edilirken, Se^{+4} ve Co^{+2} iyonları tarafından da aktive edildiği belirlenmiştir (Roughton and Booth 1946., Murakami and Sly 1987).

Çeşitli balıkların organ fizyolojileri hakkında birçok bilgi bulunmaktadır. Organların yapısal ve metabolik fonksiyonları arasında küçük farklılıklar bulunmasına rağmen genelde benzer özellikler taşımaktadırlar. Karaciğer tüm balıklarda büyük bir yapıya sahiptir; fakat kimi balıklarda vücut ağırlığının %20'si kadar aşırı büyüklükte olabilmektedir. Balıklarda karaciğer genelde midenin üzerinde uzanır veya mideyi kısmen sarar bir şekildedir. Tipik olarak iki lop'lu şekilde bulunmakla birlikte bazı balıklarda üç, alabalıkta ise tek lop'ludur. Bu lop'lardan safra kesesine giden iki ayrı kanal mevcuttur. Karaciğer aynı zamanda balıklarda yağ, glikojen A ve D vitaminlerinin depolandığı yerdir. Karaciğerin üre ve diğer azotlu boşaltım maddelerinin oluşumuyla ilgili önemli metabolik rolü de vardır (Demir 2006).

Hayvanlarda boşaltım ve osmoregülasyon fonksiyonları birbiriyle çok yakın alakalıdır. Bu fonksiyonlar genelde aynı organlar tarafından gerçekleştirilmektedir. Balıklarda bu fonksiyonu gören başlıca iki temel organ solungaçlar ve böbreklerdir. Böbrekler, sadece metabolizma artıklarının bir kısmı ve fazla suyun dışarı atılmasında rol oynamakla kalmazlar, bununla birlikte belirli madensel tuzların dışarı atılmasını ya da vücutta tutulması fonksiyonunu da görürler. Dolayısıyla, balıklarda boşaltım ve osmoregülasyon fonksiyonları, böbrekler, solungaçlar, bağırsak ve derinin birlikte çalışmaları sonucu gerçekleştirilebilmektedir (Demir 2006).

Diğer omurgalı hayvanlardakine benzer balıklarda da fonksiyonları farklı iki tip kas bulunmaktadır. Bu iki tip kaslardan çizgili kasların kontrolü istemli düz kasların ve kalp kasının kontrolü ise istemsizdir. Balıklarda bulundukları bölgelere göre kaslar şu şekilde özetlenebilir; gövde ve kuyruk kasları, baş kasları ve yüzgeç kaslarıdır (Demir 2006).

Balıklarda sinir sistemi, diğer omurgalı canlılara benzer şekilde, merkezi ve çevresel sinir sistemi olmak üzere, iki kısımda incelenmektedir. Merkezi sinir sistemi beyin ve omurilikten, çevresel sinir sistemi ise beyin ve omuriliğe ait sinir ve gangliyonlardan meydana gelmiştir. Çeşitli tür balıkların beyinleri arasında bazı farklar bulunmaktadır. Bazı balıklarda beyin büyüklüğü vücut ağırlığının %1'inden çok daha az olabilmektedir, bazılarında ise bu oran artmaktadır (Demir 2006).

Günümüzde bütün canlılar ister istemez değişik kimyasal maddelerin etkisine maruz kalabilmektedirler. Bu durum, özellikle insanların çalışma ortamları gibi bulundukları ortamların özelliğinden kaynaklandığı gibi, hiç böyle bir çalışma atmosferi ile bağlantısı olmadığı halde yine insanların meydana getirdikleri atıklar yüzünden başta insanların kendisi ve diğer organizmalarda önemli ölçüde etkilenmektedirler. Bilhassa gelişmekte olan ülkelerde çeşitli fabrikalardan meydana çıkan atık maddelerin eliminasyonu toprağa gömülerek veya havaya verilerek yapılmaya çalışılmaktadır. Bunun sonucunda ağır metaller gibi birçok toksik madde toprağa, suya, oradan bitkilere daha sonra da hayvan ve insanlara geçmektedir. Bu yüzden günümüzde özellikle enzim aktivitelerini etkileyen bu maddeler kullanılarak yapılan çalışmalar popülaritesini korumaktadır (Çelik *et al.* 1996., Norris *et al.* 2000., Blasco and Puppo 1999., Ekinci *et al.* 2006).

Ağır metaller yer kabuğunda doğal olarak bulunurlar. Bozulmaz ve yok edilemezler. Küçük bir miktara kadar vücudumuza gıdalar, içme suyu ve hava yolu ile girerler. İz elementler gibi bazı ağır metaller (örneğin bakır, selenyum, çinko) insan vücudunun metabolizmasını sürdürmek için gereklidirler. Bununla birlikte yüksek konsantrasyonlarda toksik olabilirler (<http://www.lenntech.com/heavy-metals.htm>).

Ağır metaller tehlikelidir çünkü biyobirikme eğilimlidirler. Biyobirikim zamanla biyolojik bir organizmada bir kimyasal konsantrasyonunun, kimyasalın doğadaki konsantrasyonu ile karşılaştırıldığında artması demektir. Bileşikler herhangi bir zamanda canlı bünyesinde birikebilirler ve onların vücuda alınmaları ve depolanması, metabolize edilmelerinden veya atılmalarından daha hızlıdır.

Ağır metallere kaynaklanan gıda zehirlenmeleri çok nadir görülmekle birlikte, bu durum genelde çevresel kirlenmeden sonra meydana gelmektedir. Böyle bir çevresel kirlenmenin en iyi bilinen örneği 1932-55 yılları arasında Japonya'da meydana gelmiştir. 1932'den itibaren, Japonya'da Chisso's kimyasalları tarafından civa içeren lağım Minamata sahiline serbest bırakılmıştı ve bu da civanın deniz ürünlerinin vücudunda birikmesine sebep olmuştu. Daha sonra burada yaşayan halkta civa zehirlenmesi gözlenmiş ve bunun nedeni olarak civa ile kirlenmiş balıkların tüketimi gösterilmişti. 1950'lerde bu bölgede toplam 500 ölüm vakası kaydedildi. Bu olaydan sonra; Japonya, endüstri dünyasının en katı çevresel kanunlarını çıkardı ve hastalık da Minamata sendromu olarak literatüre geçmiş oldu (<http://www.lenntech.com/heavy-metals.htm>).

Pb, Hg, Cu, Zn gibi ağır metaller suda çok az miktarlarda bulunmalarına rağmen bu maddelerin hepsi suda yaşayan hayvanlar için toksiktir. Çoğu 1 ppm sınırında öldürücüdür. Çinko normal miktarlarda bazı enzimatik fonksiyonlar için gereklidir ve birçok proteinlerde yapı elementi olarak bulunur. Bakır bazı enzimlerde bulunur ve pek çok omurgasızın kan proteininde solunum pigmenti halinde mevcuttur. Çinko ve bakır özellikle deniz balıklarındaki protozoonlardan meydana gelen hastalıkların tedavisinde kullanılır. Burada metalin toksik etkileri bir süre sonra CaCO_3 ile çökelmeyle giderilir. Çinko ve bakır balıklarda aşırı salgılanmaya neden olur ve balıklara zararlı olan bazı organizmaları öldürürler. Şelatlaşma bakırın balıklara karşı zehirliliğini azaltır. Örneğin sitrik asitle şelatlaşan CuSO_4 daha az toksiktir. $\text{pH} = 6-8.5$ arasında şelatlaşma bakırın %90'ının suda çözülmüş kalmasını sağlar. Şelatlaşmış bakır, bakırın uzun süre çözülmüş miktarlarda kalması istendiğinde denizde uygulanır. Fakat birçok bakteriler, hastalıktan koruyucu düzeylerde bakıra direnç gösterdiklerinden organik şelatları

kademeli bozundururlar. Böylece Cu^{+2} iyonları karbonat iyonlarıyla birleşerek çöker. Balıklarda görülen ağır metal zehirlenmelerinde bakır, solungaç yüzeylerinde çözünmeyen organometalik bileşikler oluşturur. Diğer bir görüşe göre solungaçlar içindeki proteinler kimyasal bozunmaya uğrar. Ayrıca bakırın, deniz balıklarının kan ve dokularında toplandığı gözlenmiştir. $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, ZnSO_4 ve HgCl_2 çözeltilerine konmuş bazı tatlı su balıklarında solunum hızının arttığı görülmüştür. Bu esnada oksijen harcama hızında düşme olur. Artan solunum hızı bakırla muamele edilmiş sulardaki balıklarda gözlenir. Ağır metaller solungaç üzerine çökerler ve salgıyı pıhtılaştırırlar. Böylece oksijen alınması zorlaşır (Mutluay ve Demirak 1996).

Ağır metallerin toksisitesi; pH, çözünmüş oksijen, sıcaklık, balığın büyüklüğüne oranla çözeltilerin hacmi, çözeltilerin yenilenme frekansı, çözeltideki diğer maddeler ve sinerjik etki gibi faktörlere bağlıdır. Suyun pH'sı en önemli faktör olabilir. Tatlı sular deniz suyundan biraz daha zayıfça tamponlanmıştır ve bu işlem görmüş tatlı su sistemlerinde ağır metal toksisitesinin etkileri görülür. Ağır metallerin destile ve yumuşak sularda sert ve bazik sulara göre daha toksik olduğu sanılmaktadır. Yüksek miktarda çözünmüş oksijen, bakırın toksik etkilerini bir dereceye kadar azaltarak solunumu kolaylaştırır. Su yüzeyinin kuvvetli bir şekilde karıştırılması, suyun pH'sını düşürecek ve bakırı çözünür halde tutacak olan serbest CO_2 birikimini önler. Sıcaklık artışı ağır metallerin balıklara karşı olan toksikliğini çoğaltır. Kurşun tuzlarının toksisitesi, su miktarı ve balığın büyüklüğü arttıkça azalır. Ayrıca kurşun salgıyla balık üzerinde çöktürülerek zehirliliği giderilir. İşleme sokulan suyun sık sık değiştirilmesi de toksisiteye etki eden bir faktördür. Eğer su değiştirilmezse balıklar salgı salarak metal iyonlarını çöktürerek kısmen toksisiteyi azaltırlar. İki ağır metal ya da bir ağır metalle başka bir madde arasındaki sinerjik etkiye gelince örneğin bakır-çinko kombinasyonları bazen tek başına çinko veya bakırdan daha zehirlidir. Başka bir örnek ise bakır ile amonyaktır. Bakır (II) iyonlarının amonyağa karşı afinitesi büyüktür. Bu iyonlar NH_3 ile birleşerek $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{+2}$ bakır tetramin kompleksi verir. Bu kompleks toksisite olarak bakıra eşdeğerdir (Mutluay ve Demirak 1996).

Balıkların maruz kaldıkları stres unsurlarına (stok yoğunluğu, sıcaklık, oksijen v.s.), hastalık durumuna, çeşitli ilaçlar, ağır metaller ve pestisitler gibi kimyasal kirleticilere karşı göstermiş oldukları fizyolojik cevapların anlaşılması için yapılan çalışmalar daha çok hemotolojik, biyokimyasal ve histopatolojik metodlara dayanmaktadır (Heath 1987., Pickering and Pottinger 1987., Mazur and Iwama 1993., Sohlberg *et al.* 1990., Asztalos *et al.* 1990., Mughal *et al.* 1993., Shakoori *et al.* 1994). Fakat kullanılan metodların hiçbiri tek başlarına balıkların göstermiş oldukları fizyolojik cevapların anlaşılmasında yeterli değildir. Bu nedenle bu çalışmanın amacı, solunum enzimi olmasının yanı sıra, balıklarda hemen hemen her organ ve dokuda bulunan karbonik anhidraz (CA) enzimini, karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokularından saflaştırıp karakterize ederek yukarıda belirtilen unsurlara karşı, *in vitro* ortamda, gökkuşağı alabalığının fizyolojik cevaplarının tam olarak belirlenebilmesi için gerekli olan temeli oluşturmaktadır. Ayrıca bu çalışma kapsamında bazı ağır metallerin saflaştırılan CA enzimleri üzerindeki etkilerini *in vitro* olarak araştırmaktır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Şimdiye kadar suda yaşayan pek çok türde hayvan ve bitki dokularından farklı enzimlerin aktivitelerine bakılmış ve bazı enzimler için de saflaştırma, karakterizasyon ve kinetik çalışmalar gerçekleştirilmiş ve sonuçlar literatürde rapor edilmiştir. Örneğin, multikatalitik proteinaz enzimi (MCP) kurbağa gibi ses çıkaran balık manasına gelen ve literatürde croaker fish olarak bilinen balığın iskelet kasından saflaştırılmış ve enzimin özellikleri incelenmiştir (Busconi *et al.* 1992). Bunun yanı sıra, karagöz balığının iskelet kasından mitokondrial kreatin kinaz enzimi (MtCK) saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir (Grzyb and Skorkowski 2005). Ek olarak, bir çok balık türünün belirli dokularında proteaz enzimleri, gökkuşağı alabalığı karaciğerinden glutatyon S-transferaz, yengeç mitokondriyal aldehit dehidrogenaz enzimi saflaştırılmış ve kinetik özellikleri incelenmiştir (El-Beltagy *et al.* 2004., Ohkubo *et al.* 2004., Fong and Ka-Fai Choy 2001., Rioli *et al.* 2001).

Karbonik anhidraz enzimi, 1933 yılında Meldrum ve Roughton ile Stadie ve O'Brien tarafından ve birbirlerinden habersiz olarak keşfedilmiştir. Meldrum ve Roughton (1933) insan eritrosit karbonik anhidraz enzimini yüksek oranda saflaştırmalarına rağmen sığır eritrositlerinden saflaştırmayı 1930'lu yılların sonlarında gerçekleştirebilmiştir. Keilin ve Martin (1944), CA aktivitesinin çinko içeriği ile orantılı olduğunu bularak çinkonun katalizlemede spesifik rolü olduğunu bildirmişlerdir. Böylece CA enzimi tanımlanan ilk metalloenzim olarak tarihe geçmiştir.

Daha sonra CA enzimi, suda yaşayan canlılar da içinde olmak üzere birçok bitki, mantar, böcek, sıçan ve memeli dokuları gibi geniş bir canlı topluluğunda bulunmuştur (Yu *et al.* 2006., Beydemir *et al.* 2005., Krungkrai *et al.* 2001., Demir *et al.* 1997., Bottcher *et al.* 1994., Burt *et al.* 1992).

Memeli dokularında şimdiye kadar 14 adet CA izoenzimi belirlenmiş ve bu izoenzimlerin farklı canlıların hangi dokularında eksprese oldukları araştırılmış ve hala

bu konuda çalışmalar sürdürülmektedir (Christie *et al.* 1997., Lnnerholm *et al.* 1985., Parkkila and Parkkila 1996., Raisanen *et al.* 1999., Okuyama *et al.* 1995).

Hall ve Schraer (1983) gökkuşağı alabalık (*Salmo gairdneri*) eritrositlerinden CA enzimini kloroform-etanol ekstraksiyonu, Sephadex G-75 jel filtrasyon kromatografisi ve DEAE Bio-jel iyon değişim kromatografisi kullanarak saflaştırmışlardır. Daha sonra saflaştırılan CA enziminin molekül kütlesinin 28.300 Da olduğunu, amino asit analizi ile her bir enzim molekülünde 6 yarı-sistein rezidüsünün olduğu ve *in vitro* şartlarda CA aktivitesinin devamı için sülfhidril indirgeyici ajanın ortamda olması gerektiği belirlenmiştir. Hem N-etilenamid hem de akrilonitril ile sülfhidril modifikasyonu, her bir CA molekülünde 3 tane aktif sülfhidril grubunun olduğunu ve bu grupların modifikasyonu enzim aktivitesini doğrudan etkilemediği, modifiye olmuş CA enziminin oksidasyon ortamında inaktive olmadığı gözlemlenmiştir.

Yapılan bir araştırmada hava soluyan ilkel balıklardan olan *Amia calva*'larda solungaç ve hava kesesi CA izoenzimlerinin karakterizasyonu ve hücre içindeki dağılımlarını incelemişlerdir. Solungalardan elde edilen CA enziminin, diferansiyel santrifüj ile belirlenen hücre içi fraksiyonları dağılımının büyük bir çoğunluğunu sitoplazmik orjinli olduğu bildirilmiştir. Çeşitli denemeler sonucunda, solungaçlarda bir tek CA izoenziminin olduğu ve CA II'ye benzediği belirlenmiştir. Solungaçlarda gözlenen durumun aksine hava kesesinde bulunan CA'nın membrana bağlı mikrozomal orjinli olduğu bulunmuştur (Gervais and Tufts 1998).

Sender *et al.* (1999), yapmış oldukları çalışmada, *Platichthys flesus* balıklarının solunum sistemindeki CA enziminin izolasyonu, saflaştırılmasını ve hücresel yerini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda, solungaç ve eritrositlerden saflaştırılan CA enziminin 30.000 Da molekül kütlesine sahip çözünebilir enzim olduğu belirlenmiştir.

Karbonik anhidraz enzimleri pek çok dokudan saflaştırılmış ve molekül kütleleri belirlenmiştir. Burt ve arkadaşlarının 1992'de yaptıkları bir çalışmada literatürde yüz sineği olarak ifade edilen *Musca autumnalis* larvalarından CA saflaştırılmış SDS-PAGE

yapılarak enzimin saflığı kontrol edilmiş ve molekül kütlesi 32.000 Da olarak belirlenmiştir. Daha sonra enzimin doğal molekül kütlesini belirlemek amacıyla jel filtrasyon kromatografisi yapılmış ve 31.000 Da olarak tespit edilmiştir. Böylece enzimin aktif formunun monomerik yapıda olduğu gösterilmiştir. Yengeç solungaçlarında gerçekleştirilen bir çalışmada CA enziminin molekül kütlesi 36.000 Da olarak elde edilmiştir (Bottcher *et al.* 1994). Krungkrai ve arkadaşlarının (2001), yaptıkları bir araştırmada, *Plasmodium falciparum*'dan saflaştırılan CA'nın molekül kütlesi 32.000 Da olarak belirlenmiştir. Zebrafish'den izole edilen CA enziminin molekül kütlesinin ise 29.000 Da olduğu tespit edilmiştir (Peterson *et al.* 1997). Buna ek olarak, Hisar ve arkadaşlarının gökkuşağı alabalığı eritrositlerinde gerçekleştirdikleri bir çalışmada CA'nın molekül kütlesi hem SDS-PAGE hem de jel filtrasyon teknikleri ile yaklaşık 28.000 Da olarak tespit edilmiştir (Hisar 2002, Hisar *et al.* 2003). Dolayısıyla gökkuşağı alabalığı eritrositlerinde de bu enzimin monomerik yapıda aktivite gösterdiği belirtilmiştir. Bunun yanı sıra, bitki kloroplastlarından elde edilen CA'nın molekül kütlesi yaklaşık 180.000 Da olarak belirlenmiş ve enzimin aktif halinin heksamerik yapıda olduğu belirtilmiştir (Pocker and Joan 1973., Pocker and Joan 1974., Demir *et al.* 1999., Demir *et al.* 2000).

CA enzimleri hayvanlarda ve özellikle de insan hastalıklarının bir çoğunun tedavisinde kullanılan ilaçlar için hedef enzim olmuştur. Asetazolamid, dorzolamid ve brinzolamid gibi sülfonamid türevleri olan ilaçlar karbonik anhidraz izoenzimlerinin kuvvetli inhibitörleridirler (Bülbül *et al.* 2003). Örneğin insanlarda glokom hastalığında CA inhibitörleri farmakolojik ajan olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Casini *et al.* 2002., Casini *et al.* 2002., Gülçin *et al.* 2004). Bununla birlikte bir çok kimyasal maddeler ve atıklar da bu enzimin aktivitesini önemli ölçüde azaltmakta ve hatta tamamen durdurabilmektedir.

Lionetto *et al.* (2000), yapmış olduğu çalışmada, kemikli balıklardan olan yılan balıklarında (*Anguilla anguilla*) kadmiyumun *in vitro* şartlarda, hem solungaç hem de bağırsak CA izoenzimlerinin aktiviteleri üzerine etkisini araştırmış, solungaç ve

bağırsak homojenatlarında CA aktivitelerinin önemli oranda inhibe olduğunu belirlemişlerdir.

Tohse and Mugiya (2001), *in vitro* şartlarda, enzim ve anyon taşıyıcı inhibitörlerinin, salmon (*Oncorhynchus masou*) balıklarının otolit ve iç kulak sıvısı içerisine inorganik karbon ve kalsiyumun birleşimi üzerine olan etkisi araştırmışlardır. Karbon bileşiminin ortamdaki klor iyonu artışı ile düştüğü, kalsiyum birleşiminin klor ve bikarbonat iyon konsantrasyonunun 10 mM'a kadar etkilenmediği fakat daha yüksek bikarbonat iyon konsantrasyonunda azaldığı belirlenmiştir. İç kulak sıvısı ve otolitlerde karbon birleşiminin asetazolamid, disülfonat stilbenes (DIDS ve SITS), tiyosiyanat ve oubain tarafından inhibe olduğu, kalsiyum birleşiminin bu inhibitörlerden etkilenmediği gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar ışığında HCO_3^- ATPaz ve $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ pompalarının bikarbonat iyonlarının iç kulak sıvısına transferinde yer aldıkları, CA enziminin ise otolit kalsifikasyonu için karbonat üretiminde rol aldığı kanaatine varılmıştır.

Christensen and Tucker'in (1976), balıklar üzerinde yaptıkları bir çalışmada Ag^+ , Cd^{+2} , Cu^{+2} ve Zn^{+2} iyonlarının balık CA enzimi üzerine yaklaşık 10^{-6} M gibi çok düşük konsantrasyonlarda inhibisyon etkisinin olduğu belirlenmiştir. Bunun yanı sıra, Özdemir ve arkadaşlarının (1997), gerçekleştirdiği diğer bir çalışmada, sığır CA ve insan (HCA-I ve HCA-II) enzimlerinin aktiviteleri üzerine bazı aktif katyonların *in vitro* etkileri incelenmiştir. Buna göre Al^{+3} 'ün yarışmalı, Mn^{+2} , Sr^{+2} , Hg^{+2} , Ni^{+2} , Ca^{+2} ve Cd^{+2} iyonlarının ise yarışmasız inhibisyon gösterdiği tespit edilmiştir.

Vitale ve arkadaşlarının (1999) tatlı suda yaşayan yengeçlerin solungaçlarında yaptıkları bir çalışmada, CA'nın kuvvetli bir inhibitörü olan ve bir sülfonamid türevi olan asetazolamidi standart alarak çinko, kadmiyum ve bakır'ın inhibisyon etkilerini araştırmışlardır. Çalışma sonunda çok düşük konsantrasyonlarda bu ağır metallerin karbonik anhidraz enziminin aktivitesini inhibe ettiklerini rapor etmişlerdir. Gökkuşluğu alabalığı üzerinde gerçekleştirilmiş diğer bir çalışmada ise Ag^+ 'nın CA enzimi aktivitesi üzerinde $2,9 \times 10^{-7}$ gibi çok düşük bir IC_{50} değerine sahip olduğu bildirilmiştir (Morgan *et al.* 1997).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmada kullanılan Sepharose-4B, p-nitrofenil asetat, standart serum albumin, N,N,N',N'-tetrametiletillen diamin (TEMED), diyaliz torbası ve L-tirozin Sigma Chemical Comp.'den; sülfanilamid, sodyum hidroksit, sodyum bikarbonat, trihidroksimetilaminometan (Tris), sodyum sülfat, sodyum perklorat, sodyum asetat, 2-merkaptotanol, brom timol mavisi, hidroklorik asit, sülfirik asit, glisin, fosforik asit, sodyum azotür, metanol, aseton, etanol, izoproponal, sodyum barbital, akrilamid, N,N'-metilen bisakrilamid, Sephadex G-200, coomassie brilliant blue G-250, R-250 ve diğer kimyasal maddeler E. Merk AG'den; karbondioksit gazı piyasadan sağlanmıştır.

3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

Çalışmalar esnasında aşağıdaki alet ve cihazlardan faydalanılmıştır.

Santrifüj:	IEC Clinical centrifuge USA
Soğutmalı santrifüj:	Heraeus Sepatech Suprafuge-22
Spektrofotometre:	SHIMADZU UV-VIS 1208 (Japan)
pH metre:	Lab Star
Elektroforez tankı:	Hoefer, HSI
Peristaltik pompa:	Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala (İsveç)
Karıştırıcı:	Vortex-Genie, Model K-55: GE, Sci. Ind. Inc. Spring field, Mass. 01103 (ABD)
Hassas terazi:	Metler Ha 51 Gallenkamp

Afinite kolonu:	Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala (İsveç)
Kronometre:	Hanhard, Electronische Digital-stopphur Germany
Otomatik pipetler:	Fischer
Magnetik karıştırıcı:	İka Combimag RCO
Çalkalayıcı:	GFL

3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

Araştırma süresince kullanılan çözeltilerin kullanılış yerleri ve hazırlanış şekilleri aşağıda belirtilmiştir.

1. 0,2 M NaHCO_3 , pH=8,8 (Sephacrose-4B matriksi üzerinde afinite jeli hazırlanırken kullanılan tampon): 16,8 g NaHCO_3 , 950 ml destile suda çözülerek, 1N NaOH ile pH=8,8'e titre edildikten sonra, toplam hacim destile su ile 1 litreye tamamlandı.
2. 25 mM Tris-HCl/0,1M Na_2SO_4 , pH=8,7 (afinite jelinin dengelenmesinde kullanılan tampon): 3,0275 g Tris ve 14,2 g Na_2SO_4 , 950 ml destile suda çözülerek 1 N HCl ile pH=8,7'ye getirildikten sonra destile su ile hacim 1 litreye tamamlandı.
3. 25 mM Tris-HCl/22 mM Na_2SO_4 , pH=8,7 (hemolizatın tatbikinden sonra afinite jelinin yıkanmasında kullanılan tampon) 3,0275 g Tris ve 3,124 g Na_2SO_4 , 950 ml destile suda çözülerek 1 N HCl ile pH=8,7'ye getirildikten sonra destile su ile hacim 1 litreye tamamlandı.
4. 0,1 M NaCH_3COO / 0,5 M NaClO_4 , pH=5,6 (kolona tutunmuş gökkuşağı alabalık doku CA enziminin elüsyonu için kullanılan tampon çözelti): 2,04 g $\text{NaCH}_3\text{COO} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ve 9,187 g NaClO_4 120 ml destile su ile çözülerek, 1 N HCl ile pH = 5,6'ya getirildikten sonra destile su ile hacim 150 ml'ye tamamlandı.

5. %0,9'luk NaCl (Homojenatın yıkanması için kullanılan çözelti): 4,5 g NaCl alınıp hacmi saf su ile 500 ml'ye tamamlandı.

6. 0,05 M Tris-SO₄, pH=7,4 (Esteraz aktivitesi ve diyalizde kullanılan tampon çözelti): 6,055 g Tris 950 ml destile su içerisinde çözülerek, 1 N H₂SO₄ ile pH'sı 7,4'e getirildikten sonra hacim destile su ile 1 litreye tamamlandı.

7. %0,02'lik NaN₃ çözeltisi (Afinite kolonunun bakterilerden korunması için kullanılan çözelti): 20 mg NaN₃ alınarak hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

8. 1 M Tris-SO₄ (pH=7,2-8,9 aralığında) (Optimum pH ve stabil pH çalışması için kullanılan tampon çözeltiler): 12,11 g (0,1 mol) Tris 80 ml saf su içerisinde çözülerek 1 M H₂SO₄ ile istenen pH'ya kadar titre edildi ve daha sonra saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

9. 1M Potasyum fosfat pH= 4,9-8,0 aralığında (optimum pH ve stabil pH çalışması için kullanılan tampon çözeltiler): 13,6 g (0,1 mol) potasyum fosfat 80 ml saf su içerisinde çözülerek 1 M HCl ile istenen pH'ya kadar titre edildi ve daha sonra saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

10. SDS-PAGE'de kullanılan numune tamponu: 0,65 ml 1M Tris-HCl (pH=6,8) 1 ml %10'luk SDS ve 1 ml %100'lük gliserin, 1 ml %0,1'lik brom timol mavisi karıştırılarak, son hacim saf su ile 10 ml'ye tamamlanması ile hazırlandı ve bu tamponu kullanmadan hemen önce, 950 µl numune tamponundan 50 µl olacak şekilde β-merkaptoetanol ilave edildi.

11. SDS-PAGE'de kullanılan yürütme tamponu: 1,5 g Tris ve 7,2 g glisin 50 ml suda çözüldü, daha sonra bunun üzerine 5 ml %10'luk SDS ilave edilerek toplam hacim saf su ile 500 ml'ye tamamlandı.

- 12.** Boyama çözeltisi (elektroforez jelinin boyanması için kullanılan çözelti): 0,1 g Coomassie brilliant blue R-250, %50 metanol, %10 asetik asit ve %40 saf su olacak şekilde yeteri kadar hazırlandı.
- 13.** Yıkama çözeltisi (elektroforez jelinin yıkanması için kullanılan çözelti): %50 metanol, %10 asetik asit ve %40 saf su olacak şekilde yeteri kadar hazırlandı.
- 14.** Sabitleştirme çözeltisi (elektroforez jelindeki proteinlerin sabitleştirilmesi için kullanılan çözelti): %50 izopropanol, %10 TCA, %40 saf su olacak şekilde yeteri kadar hazırlandı.
- 15.** Coomassie brilliant blue G-250, reaktifi (proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti): 100 mg coomassie brilliant blue G-250, 50 ml %95'lik etanolde çözüldü, bu çözeltiye %95'lik fosforik asit ilave edilerek çözeltinin hacmi, saf su ile 1 litreye tamamlandı.
- 16.** 0,025 M veronal tamponu; 0,025 mol sodyum barbitalin 900 ml suda çözülüp pH=8,2'ye kadar 0,1 M HCl ile titrasyonundan sonra destile su ile 1 litreye tamamlandı.
- 17.** CO₂ çözeltisi (CO₂-hidrataz aktivitesinde kullanılan çözelti): 0°C'de yarım saat süreyle saf suyun içerisinde CO₂ gazı geçirilerek hazırlandı.
- 18.** %0,04'lük brom timol mavisi çözeltisi (CO₂-hidrataz aktivitesinde indikatör olarak kullanılan çözelti): 0,1 g indikatörün 16 ml 0,01 N NaOH içerisinde çözüldükten sonra hacminin saf suyla 250 ml'ye tamamlanmasıyla hazırlandı.
- 19.** 1 M Tris-HCl pH=8,8 12,1 g Tris 90 ml suda çözülüp 1 M HCl ile istenen pH'ya kadar titre edildi ve daha sonra saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

20. 1 M Tris-HCl pH=6,8 2,42 g Tris 5 ml suda çözölüp 1 M HCl ile istenen pH'ya kadar titre edildi ve daha sonra saf su ile 20 ml'ye tamamlandı.

22. %30'luk Akrilamid-%0,8 bisakrilamid çözeltisi: 6 g akrilamid, 0,16 g bisakrilamid alınıp 13,84 ml suda çözölldü.

23. %10'luk SDS çözeltisi: 0,5 g SDS alınıp 4,5 ml suda çözölldü.

24. Standart serum albumin çözeltisi (1 mg/ml; protein tayini için kullanılan çözelti): 25 mg standart serum albuminin 25 ml saf suda çözölmesiyle hazırlandı.

25. Gökkuşığı alabalıkları dokularından saflaştırılan CA enzimi aktivitesine karşı inhibitör özelliği gösteren ağır metallerin stok çözeltileri:

Madde Adı	Stok Çözelti Konsantrasyonu (mM)	Madde Miktarı (g)	Çözelti Miktarı (ml)
CoCl ₂ .6H ₂ O	1000	1,23	5
CuSO ₄ .5H ₂ O	1000	1,25	5
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1000	1,44	5
AgNO ₃	1000	0,85	5
CdCl ₂ .H ₂ O	1000	1,10	5

3.2. Yöntem

3.2.1. Gökkuşığı alabalık dokularından CA enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu çalışmaları ile ilgili yöntemler

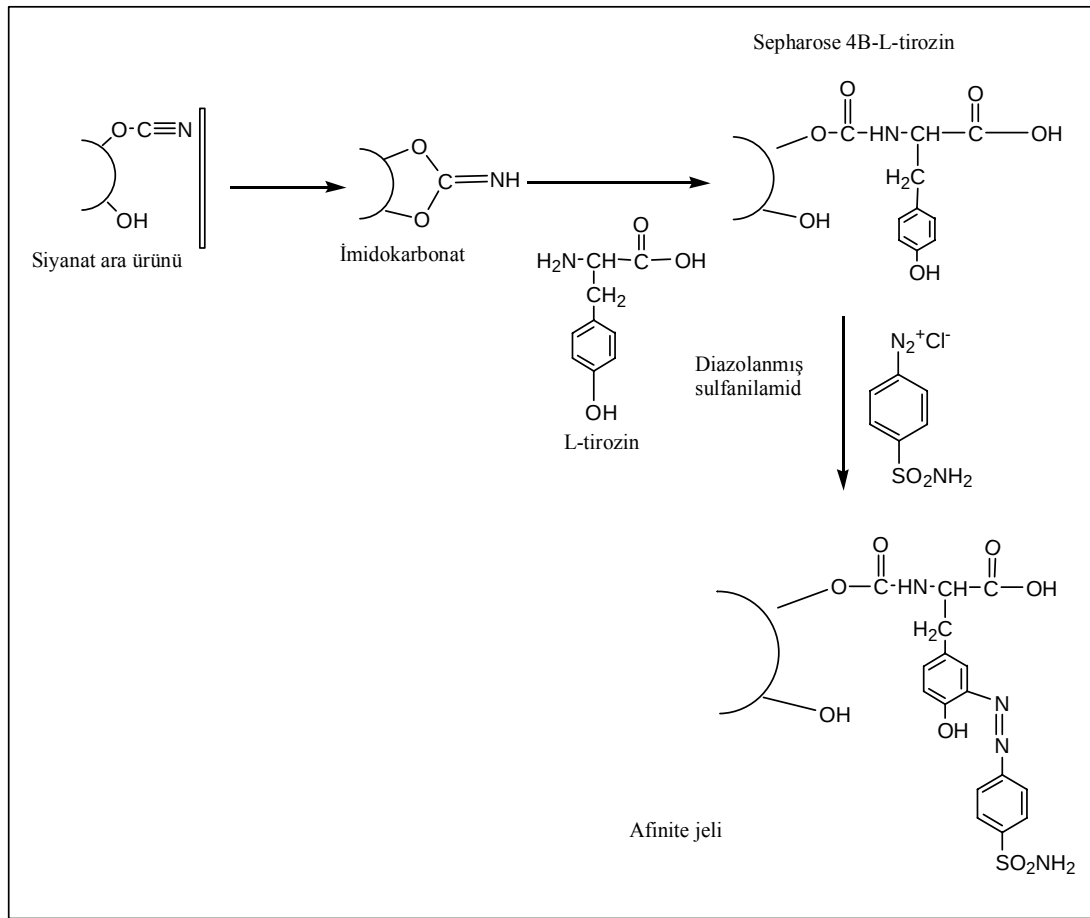
3.2.1.1. Sepharose-4B afinite kolonunun hazırlanması

Afinite jeli CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B matriksi üzerinde hazırlandı. Bu kolon materyaline L-tirozin kovalent olarak takıldı. Daha sonra sülfanilamid diazollanarak tirozine kenetlendi. Burada tirozin afinite jelinin uzantı kolunu, sülfanilamid ise enzimi spesifik olarak bağlayan kısmını oluşturmaktadır. Sülfanilamid, karbonik anhidrazın spesifik bir inhibitörü olup, afinite jelinin yapısına girerek söz konusu enzimin yüksek oranda saflaştırılması amacıyla kullanıldı (Arslan *et al.* 1996). Afinite jeli aşağıdaki prosedüre göre hazırlandı:

a. CNBr ile aktifleştirilmiş sepharose 4B'ye tirozin takılması: CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose 4B, 250 ml soğuk 0,1 M NaHCO₃ tamponu (pH=10) ile yıkanarak bir behere aktarıldı. Aynı tamponun 20 ml'sinde 80 mg tirozin çözünmüş soğuk çözelti behere ilave edilerek karıştırıldı. Yıkama, tirozin çözeltisi ilavesi ve bagetle karıştırma, 90 saniyeden az bir sürede tamamlandı ve bundan sonra süspansiyon, 4°C'de 2 saat süreyle manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Daha sonra 16 saat 4°C'de bekletildi. Bu sürenin bitiminde yıkama suyu 280 nm'de absorbans vermeyinceye kadar bol su ile yıkandı ve böylece reaksiyona girmeyen tirozin tamamen uzaklaştırılmış oldu. Yıkama, 100 ml 0,2 M NaHCO₃ tamponu ile (pH =8,8) tekrarlanarak tirozin takılı jel, aynı tamponun 40 ml'si içine alındı.

b. Sülfanilamid kenetlendirilmesi: 25 mg sülfanilamid, 0°C civarında 10 ml 1 M HCl içinde çözüldü ve içerisinde 75 mg NaNO₂ bulunan 0°C'deki 5 ml çözelti, sülfanilamid çözeltisine damla damla katıldı. 10 dakikalık reaksiyondan sonra diazolanmış bulunan sülfanilamid 40 ml Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonuna ilave edildi. 1 M NaOH ile pH=9,5'a çıkarılarak sabit tutuldu ve 3 saat süreyle oda sıcaklığında yavaşça karıştırıldı.

Daha sonra 1 litre saf su ve 200 ml 0,05 M Tris-SO₄ (pH=7,4) tamponuyla yıkandı. Daha sonra üzerine bir miktar daha aynı tampondan konularak saklandı (Arslan *et al.* 1996). Tüm basamaktaki reaksiyonların açık formülleri Şekil 3.1’de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. CNBr Sepharose 4B-L-tirozin afinite jelinin hazırlanmasındaki reaksiyonların açık formülleri

3.2.1.2. Gökkuşığı alabalık karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokularının temini ve homojenat hazırlanması

3.2.1.2.a Gökkuşığı alabalık karaciğer dokusunun temini ve homojenat hazırlanması

Deneylerde kullanılan alabalıklar Atatürk Üniversitesi Alabalık Çiftliğinden taze olarak temin edildi. Alınan alabalıklar soğuk zincir kuralına göre laboratuara getirilerek karaciğer dokusu hızlı bir şekilde çıkarıldı. Daha sonra doku örneği kan ve diğer kirlilikleri elimine etmek için %0,9'luk NaCl ile 3 defa yıkandı. Doku homojenatını hazırlamak için, ilk olarak numune ultraturrax cihazı kullanılarak parçalandı. Böylece dokular oldukça küçük parçalara ayrılmış oldu. Daha sonra sıvı azot içinde parçalanarak, 3 ml/g olacak şekilde 25 mM Tris HCl/0,1 M Na₂SO₄ (pH= 8,7) tampon çözeltisinin içinde homojenize edildi. Bu süspansiyon 60 dakika 20000 rpm'de 2 defa santrifüj edildi. Süpernatant analizler için kullanıldı (Wistrand 2002., Pullan and Noltmann 1985).

3.2.1.2.b. Gökkuşığı Alabalık Böbrek Dokusunun Temini ve Homojenat Hazırlanması

Gökkuşığı alabalık böbrek dokusunun temini ve homojenat hazırlanması işlemleri bölüm 3.2.1.2.a'da anlatıldığı gibi gerçekleştirildi.

3.2.1.2.c. Gökkuşığı alabalık kas dokusunun temini ve homojenat hazırlanması

Gökkuşığı alabalık kas dokusunun temini ve homojenat hazırlanması işlemleri bölüm 3.2.1.2.a'da anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. Karaciğer ve böbrek dokularından farklı olarak homojenat hazırlandıktan sonra 2/7 oranında CCl₄/homojenat 5 dakika 1500 x g'de santrifüj edildi. Böylece kas dokusu üzerinde kalabilecek yağ tabakası elimine edilmiş oldu ve üstte kalan kısım analizler için kullanıldı.

3.2.1.2.d. Gökkuşığı alabalık beyin dokusunun temini ve homojenat hazırlanması

Gökkuşığı alabalık beyin dokusunun temini ve homojenat hazırlanması işlemleri bölüm 3.2.1.2.a'da anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. Beyin dokusunda da karaciğer ve böbrek dokularından farklı olarak homojenat hazırlandıktan sonra 2/7 oranında CCl_4 /homojenat 5 dakika 1500 x g'de santrifüj edildi ve üstte kalan kısım analizler için kullanıldı. Böylece beyin dokusundaki yağlı kısımlar elimine edilmiş oldu ve süpernatant analizler için kullanıldı.

3.2.1.3. Gökkuşığı alabalık karaciğer, böbrek, kas ve beyin doku homojenatlarının afinite kolonuna tatbiki ve elüsyonu

Gökkuşığı alabalığından elde edilen dokulardan ayrı ayrı hazırlanan homojenatların pH'ları 8,7'ye ayarlandı. Alabalık doku homojenatları ayrı ayrı kolona tatbik edildi ve kolon 400 ml 25 mM Tris-HCl/22 mM Na_2SO_4 (pH=8,7) çözeltisi ile yıkandı. Böylece karbonik anhidraz enzimi kolona tutunmuş ve diğer safsızlıklar uzaklaştırılmış oldu. Daha sonra 0,1 M $\text{NaCH}_3\text{COO} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ /0,5 M NaClO_4 (pH=5,6) çözeltisi kolona tatbik edilip CA enzimi elüe edildi. Peristaltik pompa vasıtasıyla kolonun akış hızı 20 ml/saat'e ayarlandı. Fraksiyon toplayıcı yardımıyla elüatlar 5'er ml halinde tüplere alındı ve 280 nm'deki absorbanslarına bakıldı.

3.2.1.4. Sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzim saflığının kontrolü

Alabalık karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokularından Sepharose 4B afinite kolonu ile CA enzimlerinin saflaştırılmasından sonra %3-8 kesikli sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) Laemmli (1970), tarafından açıklandığı gibi yapılarak saflaştırılan enzimlerin saflık derecesi kontrol edildi.

Bunun için elektroforez plakaları önce su, sonra alkol ile iyice yıkandı. Cam plakaları birleştiren mikalara (spacer) ince bir tabaka halinde vazelin sürüldü. İki cam plaka

birbiri üstüne konuldu ve özel naylon kaplarına yerleştirilerek jel hazırlama cihazına konuldu. Daha sonra cam plakalar aralık oluşturunca mikaların bulunduğu kısımlardan kısıpçılarla dikkatlice sıkıştırıldı. Ayırma jeli hazırlanarak plakalar arasına enjektörle döküldü. Ortamda hava olmamasına dikkat edildi. Jel yüzeyinin düzgün olması için %0,1'lik SDS ile ince bir tabaka oluşturuldu. Katılaşınca kadar (yaklaşık yarım saat) beklendi. Katılaştıktan sonra üstündeki %0,1'lik SDS alındı. Daha sonra plakaların üst kısmına tarak yerleştirildi ve yığma jel tarağın yanından üst yüzeye kadar ilave edildi. Tarağın üstüne nemli süzgeç kağıdı konularak bir gece bekletildi. Ertesi gün tarak dikkatlice çıkarılarak plakalar elektroforez tankına yerleştirildi.

Oluşan boşluklar işaretlenerek jelin üstü önce saf su, sonra da yürütme tamponu ile yıkandı. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konuldu. Numuneler her birinde 20 µg protein olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim 100 µl olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu katıldı. 3 dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi. Numuneler soğutulurak, jel kuyularına çok ince bir enjektör yardımıyla uygulandı. Tank kapağı kapatılarak alt tarafından (+) kablo (Anot), üstten (-) kablo (Katot) yerleştirildi. Önce 80 voltta yarım saat bekletildi. Daha sonra akım 150 volta ayarlanarak 4-5 saat oda sıcaklığında tatbik edildi. Akım kesilerek, cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı. Bu yürütme tamponu tekrar kullanılmak üzere saklandı ve sabitleştirme çözeltisinde (%50 izopropanol + %10 TCA + %40 saf su) 15 dakika bekletildi. Daha sonra sabitleştirme çözeltisinden çıkarılan jel özel kabına konularak, renklendirme çözeltisi üstünü örtünceye kadar eklendi. 45 dakika kadar çalkalayıcı üzerinde bırakıldı. Daha sonra renklendirme çözeltisinden çıkarılarak, yıkama çözeltisine alındı. Belirli aralıklarla değiştirilmek suretiyle jelin zemin rengi açılıp, protein bantları belirginleşinceye kadar 1-2 gün bu çözeltide çalkalandı. Yıkama çözeltisi, aktif karbon üzerinden geçirilerek tekrar tekrar kullanıldı. Jel yıkama çözeltisinden çıkarıldıktan sonra fotoğrafı çekildi. Elektroforezde kullanılan renklendirme çözeltisi ; %0,1 Coomassie brilliant blue R-250, %50 metanol, %10 asetik asit, %40 saf su ile hazırlandı. Yıkama çözeltisi ise; %50 metanol, %10 asetik asit, %40 saf sudan ibarettir.

Ayırma jeli şöyle hazırlandı: 15 ml 1M Tris-HCl (pH=8,8), 10,66 ml %30'luk akrilamid-%0,8'lik bisakrilamid, 0,61 ml %1'lik SDS, 0,4 ml %5'lik TEMED

(N,N,N',N'-tetrametiletilen diamin) ve 11,94 ml su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine en son olarak 0,8 ml %1,5'luk amonyum persülfat (NH₄)₂S₂O₈ (PER) ilave edildi. Burada kullanılan PER kullanılmadan hemen önce taze olarak hazırlandı.

Yığma jeli hazırlanması sırasında 1M'lik Tris-HCl (pH=6,8)'den 1,24 ml, %30'luk akrilamid-%0,8'lik bisakrilamid'den 1ml, %1'lik SDS'den 0,1 ml, %5'lik TEMED'den 0,1 ml ve saf sudan 7,36 ml alınarak karıştırıldı. Son olarak yine günlük hazırlanmış %1,5'luk PER'den 0,2 ml ilave edildi.

Jel hazırlandıktan sonra standart proteinler ve gökkuşağı alabalığı dokularından saflaştırılan enzim jele tatbik edildi. Deney sonunda jelin fotoğrafı çekildi. Her bir doku için yukarıda anlatılan elektroforez işlemi ayrı ayrı yapıldı.

3.2.1.4.a. Sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzimin molekül kütlesi tayini

Laemmli (1970), metoduna göre molekül kütlesi tayini şu şekilde yapıldı; standart protein olarak E.Coli-galaktosidazı 116 kDa, tavşan fosforilazı B 97 kDa, sığır serum albumini 66 kDa, ovalbumini 45 kDa, sığır eritrosit karbonik anhidrazı 29 kDa kullanıldı. Her bir doku için gerçekleştirilen elektroforez işlemlerinden sonra standart proteinlerin R_f değerleri hesaplanarak log MK-R_f standart grafikleri çizildi. Daha sonra balık dokularından elde edilen CA enzimlerinin ayrı ayrı R_f değerleri hesaplandı ve standart grafikte yerine konularak gökkuşağı alabalık karaciğer, böbrek, kas ve beyin CA enzimlerinin log MK'sı belirlendi. Bu değerlerin antilogaritması alınarak numunelerin molekül kütleleri tespit edildi.

Proteinlerin R_f değerleri;

$$R_f = \frac{X_e}{X_{boya}}$$

formülü kullanılarak belirlendi.

X_e = Proteinin yürüme mesafesi X_{boya} = Boyanın yürüme mesafesi

3.2.1.5. Sephadex G-200 jel filtrasyon kromatografisi kolonunun hazırlanması ve gökkuşağı alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokularından saflaştırılan CA enzimlerinin doğal hallerinin molekül kütlelerinin tayini

Gökkuşağı alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin CA enzimlerinin molekül kütleleri Andrews ve arkadaşlarının metodu ile belirlendi (Andrews 1964., Whitaker 1963., Marshall 1970).

Jel filtrasyon kromatografisi ile molekül kütlelerinin tayini için önceden 88 ml yatak hacmi elde etmek için 3 g Sephadex G-200, 150 ml saf su içine alındı. 90°C'de su banyosunda bekletilerek polimer materyal (Sephadex G-200) şişirildi. Şişirilmiş materyalin içindeki hava, su trompu kullanılarak vakumla uzaklaştırıldı. Şişirilmiş ve havası uzaklaştırılmış polimer materyali 1 M'lık ve pH'sı 7,0 olan Tris-SO₄ tamponuyla dolu kolona, içinde hava kabarcığı kalmayacak şekilde paketlenerek aynı tamponla dengeleme işlemi yapıldı. Kolonun dengelendiğini tespit etmek için, üstten ilave edilen tamponla alttan alınan tamponun pH ve 280 nm'de absorbans değerleri aralıklarla ölçüldü ve bu değer aynı oluncaya kadar dengeleme işlemine devam edildi. Kolonun akış hızı 10-15 ml/saat olarak ayarlandı.

Gökkuşağı alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokularından saflaştırılan CA enziminin molekül kütlesi tayininde kullanılacak olan standart grafiği elde edebilmek için kolondan önce standart proteinler geçirildi. Standart olarak, blue dekstran; 2.000.000 Da, β -amilaz; 200.000 Da, maya alkol dehidrogenaz; 150.000 Da, sığır eritrosit karbonik anhidraz; 29.000 Da, sitokrom c; 12.000 Da standart proteinler ayrı ayrı kolona uygulandı. Daha sonra numuneler jel filtrasyon kolonuna ayrı ayrı uygulandı (Keha and Küfrevioğlu 2004).

Elüsyon hacmi için dengelenen kolonun, jel üzerindeki tampon çözeltisi jel seviyesine indirildi. Kolona her bir protein çözeltisinden 2 ml tatbik edildi. Kolona uygulanan protein çözeltisi jel tarafından tamamen emildikten sonra üzerine birkaç ml elüsyon tamponu %10'luk gliserinli 1M Tris-SO₄ (pH=7) ilave edilerek tekrar jele emdirildi. Daha sonra kolonun üstü elüsyon tamponuyla doldurularak, elüatlar 3'er ml olacak şekilde tüplere toplandı. Elüsyon tamponu kör olarak kullanıldı ve toplanan elüatların 280 nm'de absorbansları ölçülerek kaydedildi. Elüsyon işlemine 280 nm'deki absorbans değerleri 0 oluncaya kadar devam edildi. 280nm'de absorbans gösteren tüplerde aktivite ölçümleri yapıldı. 280 nm'de kalitatif ölçüm için alınan absorbans değerleri tüp sayısına karşı grafiğe geçirildi. Daha sonra enzimin molekül kütlesini belirlemek için her bir protein için ayrı ayrı K_{av} değerleri ve Log MK değerleri hesaplandı. Log MK-K_{av} grafiği bilgisayarda Excel programı yardımıyla çizildi. Son olarak gökkuşağı alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokularından elde edilen karbonik anhidraz enzimlerinin K_{av} değerleri belirlenerek grafik vasıtasıyla enzimleri doğal hallerinin molekül kütleleri hesaplandı.

Aşağıdaki formül kullanılarak K_{av} değeri hesaplandı ve Log MK-K_{av} grafiği çizildi.

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

V₀= Void hacim, V_e= Elüsyon hacmi, V_t= Kolon yatak hacmi

3.3. Protein Tayini

3.3.1. Kalitatif protein tayini

Kalitatif protein tayini, proteinlerin yapısında bulunan aromatik gruplara sahip tirozin ve triptofan amino asitlerinin 280 nm'de maksimum absorbans göstermesi esasına dayanan Warburg metodu olarak bilinen yolla gerçekleştirildi (Segel 1968). Sepharose

4B-L-tirozin sülfanilamid afinite kromatografisi işlemlerinden sonra eşit hacimde alınmış olan bütün tüplerde kalitatif protein tayini yapıldı. Kuvarz küvetler kullanılarak spektrofotometrede absorbansları 280 nm'de köre karşı okundu. Sephadex G-200 ile yapılan jel filtrasyon kromatografisinde de proteinlerin kalitatif tayini aynı metodla belirlendi.

3.3.2. Bradford yöntemi ile protein tayini

Alabalık dokuları numunelerden hazırlanan homojenatlar ve Sepharose 4B-L-tirozin sülfanilamid afinite kromatografisi yöntemiyle saf halde elde edilen enzim çözeltilerindeki kantitatif protein miktarı bu metod vasıtasıyla belirlendi. Bu yöntemde boya olarak kullanılan Coomassie brilliant blue G-250, negatif bir yüke sahiptir ve protein üzerindeki pozitif yüke bağlanır. Boyanın kırmızı ($\lambda_{\max}=465$ nm) ve mavi ($\lambda_{\max}=595$ nm) formu mevcuttur. Proteinin bağlanması, kırmızı formun mavi forma dönüşümünü sağlar. Bradford yönteminin diğer kantitatif protein tayin metodlarına göre avantajlı tarafları ise;

- a) Kısa sürede uygulanabilirliği,
- b) Fazla miktarda bozucu faktörün bulunmaması,
- c) Protein-boya kompleksinin çözeltilerde uzun süre kalabilmesi,
- d) Her bir çalışma için başka bir standart eğrinin gerekmemesi,
- e) Bu yöntemin hassasiyetinin 1-100 μ g arasında olmasıdır (Bradford 1976).

Tayin işlemleri şu prosedüre göre gerçekleştirildi: 1 ml'sinde 1 mg protein ihtiva edecek şekilde standart sığır albumin standart protein çözeltisi olarak hazırlandı. Bu çözeltilerden deney tüplerine 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 μ l aktarıldı. Saf su ile tüm tüplerin hacmi 0,1 ml'ye tamamlandı. Daha sonra her bir tüpe 5 ml Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi ilave edildi. Vortex kullanılarak tüpler içerisindeki çözeltilerin karışması sağlandı ve protein-boya kompleksinin tam olarak sağlanabilmesi için 10

dakika inkübasyona bırakıldı. Bu işlemlerden sonra, 3 ml'lik küvetler kullanılarak spektrofotometreyle 595 nm'de köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak, 0,1 ml aynı tampon ve 5 ml renklendirme reaktifinden oluşan karışım kullanıldı. Absorbans değerlerine karşılık gelen μg protein değerleri standart grafik halinde verildi (Şekil 4.1).

Numune çalışmaları için, doku homojenatları ve saf enzim çözeltilerinden üç ayrı tüpe sırasıyla 100'er μl alınarak üzerlerine 5'er ml renklendirme reaktifi ilave edildi. Vorteks ile karıştırılıp 10 dakikalık bir inkübasyondan sonra 595 nm'de absorbans değerleri okundu. Bu işlem 3 defa tekrarlanarak 3 ayrı ölçümün aritmetik ortalaması alınıp standart grafikten yararlanılarak protein miktarları belirlendi.

3.4. Karbonik anhidraz enziminin aktivite tayini

CA enziminin aktivitesi iki şekilde ölçülebilmektedir; birincisi, CA'nın fizyolojik aktivitesi olan CO_2 -hidrataz aktivitesidir, ikincisi ise *in vitro* şartlarda gerçekleştirdiği spektrofotometrik olarak takip edilebilen esteraz aktivitesidir.

a) CO_2 -hidrataz aktivitesi: Bu yöntem Rickli ve arkadaşları tarafından modifiye edilen Wilbur-Anderson yöntemidir (Wilbur and Anderson 1948). CO_2 'nin hidrasyonu sonucu açığa çıkan H^+ iyonundan ileri gelen pH değişiminin brom timol mavisi indikatörü ile belirlenip, geçen sürenin ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Aktivite tayini işlemleri için reaksiyon karışımını oluşturan maddelerin ortama katılım sırasına göre aşağıdaki prosedür uygulandı:

Kullanılan Maddeler	Kontrol Tüpü (Kör) (µl)	Numune Tüpü (µl)
0,025 M veronal tamponu (pH=8,2)	1000	1000
%0,04'lük brom timol mavisı	100	100
Saf su	600	550
Enzim çözeltisi	—	50
CO ₂ gazı ile doyurulmuş çözelti	2500	2500
Toplam hacim	4200	4200

Daha sonra bir kronometre yardımıyla CO₂ çözeltisi katıldığı andan itibaren indikatörün mavi renginin sarımsı yeşile dönüşmesi (pH =6,3) için geçen süre (t₀) belirlendi. İndikatörün mavi renginin sarımsı yeşile dönüşmesi (pH=6,3) için geçen süre (t_c) bir kronometre vasıtasıyla belirlendi. Bu yöntemle göre CA aktivitesi için bir enzim ünitesi (EÜ) enzimsiz olarak meydana gelen CO₂ hidratasyonu süresini yarıya indiren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır.

Enzimin aktivitesi; enzimsiz CO₂ hidratasyon süresi (t₀) ile enzimli reaksiyon süresi (t_c) arasındaki farkın t_c'ye bölünmesi ile belirlendi.

$$EU = \frac{t_0 - t_c}{t_c}$$

formülüne göre hesaplandı (Maren 1960). Alabalık doku homojenatları ve saf enzimin aktivite tayininde aynı işlemler uygulandı ve saflaştırma tablolarında sunulan aktivite değerleri bu metoda göre hesaplandı.

b) Esteraz aktivitesi: Bu yöntem, karbonik anhidrazın esteraz aktivitesine sahip olması esasına dayanmaktadır. Metodun prensibi kısaca şöyledir; karbonik anhidraz enzimi substrat olarak kullanılan p-nitrofenilasetatı 348 nm'de absorpsiyon veren p-nitrofenol

veya p-nitrofenolat'a hidroliz etmektedir. Reaksiyon mekanizması aşağıda verildiği gibidir:



348 nm'de p-nitrofenol ve p-nitrofenolat'ın her ikisi aynı absorbansı göstermektedir. Bu yüzden fenol grubundaki H^+ iyonunun ayrışıp ayrışmaması ölçümü etkilememektedir (Verpoorte and Mehta 1967., Armstrong *et al.* 1966). Bu dalga boyunda p-nitrofenilasetatın çok az absorpsiyonu olduğundan, kör olarak kullanılmaktadır. 3 ml'lik kuvarz küvetler kullanılarak ölçülen aktivite tayini işlemleri için reaksiyon karışımını oluşturan maddelerin ortama katılım sırasına göre şu prosedür uygulandı:

Kullanılan Maddeler	Kontrol Tüpü (Kör) (µl)	Numune Tüpü (µl)
1 M Tris-SO ₄ tamponu (pH=9)	1400	1400
p-Nitrofenilasetat	1000	1000
Saf su	600	500
Enzim çözeltisi	—	100
Toplam hacim	3000	3000

1 ml'lik kuvarz küvetler kullanılarak ölçülen aktivite tayini işlemleri için reaksiyon karışımını oluşturan maddelerin ortama katılım sırasına göre şu prosedür uygulandı:

Kullanılan Maddeler	Kontrol Tüpü (Kör) (µl)	Numune Tüpü (µl)
1 M Tris-SO ₄ tamponu (pH=9)	467	467
p-Nitrofenilasetat	333	333
Saf su	200	167
Enzim çözeltisi	—	33
Toplam hacim	1000	1000

Tablodaki reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra her 15 saniyede bir absorbans miktarı okundu ve 3 dakika sonundaki 25°C de 348 nm’de absorbansı okunarak absorbans farkı alındı. Spektrofotometre, daha önce enzim yerine saf su konularak elde edilen karışımın 3 dakika sonundaki absorbansı ile sıfıra ayarlandı.

Yapılan deneylerde kullanılan p-nitrofenilasetat substrat çözeltisi, günlük olarak hazırlandı: 27,2 mg ester, 1ml aseton içinde çözüldü ve hızlıca karıştırılan 49 ml destile suya yavaş yavaş ilave edildi. Bu çözelti 3 mM’lık olup, daha derişğini hazırlamak, esterin sınırlı çözünürlüğü dolayısıyla mümkün değildir. Aseton, diğer organik çözücülere nispeten hidroliz reaksiyonunu en az inhibe eden çözücü olduğu için seçildi (Verpoorte and Mehta 1967). Kinetik çalışmalar esnasındaki aktivite ölçümleri enzimin esteraz aktivitesi ile gerçekleştirildi.

3.5. Gökkuşığı Alabalık Dokularından Saflaştırılan CA Enzimi ile İlgili Yapılan Kinetik Çalışmalar

3.5.1. Karbonik anhidraz enzimi için optimum pH çalışması

Optimum pH çalışması; pH’sı 7,0-9,0 aralığında 1M Tris-SO₄ ve pH’sı 5,0-8,0 aralığında 1M potasyum fosfat tampon çözeltilerinde alabalık karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokularından elde edilen CA enzimlerinin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak ölçüldü. Sonuçlar çizelgelerde ve % aktivite-pH grafikleri halinde gösterildi (Çizelge 4.7-4.14) (Şekil 4.17-4.20).

3.5.2. Karbonik anhidraz enzimi için optimum iyonik şiddet çalışması

Alabalık karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokularından elde edilen CA enzimlerinin aktiviteleri üzerine iyonik şiddetin etkisinin belirlenmesi, enzim aktivitesinin optimum olduğu Tris-sülfat tamponu kullanılarak yapıldı. Bu tampon ile 1M ile 0,1 M arasında iyonik şiddete sahip çözeltiler hazırlandı ve CA enzimleri için esteraz aktivite ölçümleri

yapıldı. Tüm dokulardan elde edilen CA enzimleri için optimum iyonik şiddet 1 M Tris-SO₄ olarak belirlendi, sonuçlar çizelgelerde ve aktivite-konsantrasyon grafikleri halinde gösterildi (Çizelge 4.15-4.18) (Şekil 4.21-4.24).

3.5.3. Karbonik anhidraz enziminin stabil olduğu pH'nın bulunması ile ilgili çalışmalar

Enzimlerin stabil olduğu pH'yı tespit etmek için pH'ları 7,0-9,0 olan Tris- SO₄ tamponu ve pH'ları 5,0-8,0 olan potasyum fosfat tamponu kullanıldı. Belirtilen pH'lardaki tampon çözeltilerinin 2 ml'si ile 1 ml enzim çözeltisi karıştırılarak 4°C'de muhafaza edildi. 6 saat arayla yapılan aktivite ölçümünde enzimin stabil olduğu pH belirlendi. İnkübasyon süresine karşılık aktivite değerleri grafikler halinde gösterildi (Çizelge 4.19-4.26) (Şekil 4.25-4.32).

3.5.4. Gökkuşığı alabalığı dokularından elde edilen CA enziminin optimum sıcaklığın, aktivasyon enerjisinin (E_a), aktivasyon entalpisinin (ΔH) ve Q_{10} değerlerinin hesaplanması ile ilgili çalışmalar

Alabalık dokularından saflaştırılan CA enzimlerinin aktivitelerinin optimum olduğu sıcaklıkların, E_a , ΔH ve Q_{10} değerlerinin belirlenmesi amacıyla dijital su banyosu kullanılarak 20°C ile 60°C arasında 5'er °C sıcaklık farkı oluşturularak, enzimin optimum pH'sında spektrofotometrik olarak esteraz aktivitesi deneyleri gerçekleştirildi. Daha sonra elde edilen aktivite değerlerinin logaritmaları (log k) alındı. Sıcaklık değerleri Kelvine çevrilerek grafikte $1/T \times 1000^{-1}$ olarak ifade edildi (Danişan *et al.* 2004). Daha sonra bu grafikten faydalanılarak Arrhenius eğrisi elde edildi ve bu eğrinin eğimi kullanılarak aşağıdaki formülden aktivasyon enerjisi (E_a) hesaplandı.

$$E_{\text{ğim}} = \frac{-E_a}{2,303 \times R}$$

Aktivasyon entalpisinin (ΔH)'nin hesabında ise şu formülden faydalanıldı;

$$\Delta H = E_a - R \times T$$

(Segel 1975., Wilson 1971., Onganer *et al.* 1998). Daha sonra bir enzim için, 10⁰C'lik sıcaklık değişiminin meydana getirdiği aktivite farklılığı olan Q₁₀ değeri, aralarında 10⁰C fark olan iki aktivite değerinden yüksek olanın düşük olan aktivite değerine bölünmesi ile hesaplandı (Keha ve Küfrevioğlu 2004).

3.5.5. p-Nitrofenilasetat substratı için K_M, V_{max}, k_{cat} ve özgülük sabitinin (V₀) bulunmasına yönelik çalışmalar

p-Nitrofenilasetat substratı için alabalık karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokularından saflaştırılan CA enziminin K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi için en az 5 farklı p-nitrofenilasetat konsantrasyonu kullanılarak optimum şartlarda aktivite ölçümü yapıldı ve Lineweaver-Burk grafiği çizildi ve bu grafikten K_Mve V_{max} değerleri hesaplandı. Daha sonra, K_M ve V_{max} değerleri hesaplanması için gerçekleştirilen deneyde kullanılan enzim çözeltisinde kantitatif protein tayini yapılarak toplam enzim (E_T) miktarı bulundu. Enzimin turnover sayısını gösteren k_{cat} değeri $k_{cat} = \frac{V_{max}}{E_T}$ formülünden faydalanılarak hesaplandı.

Çeşitli enzimlerin katalitik etkilerinin veya farklı substratların aynı enzimle ürüne dönüşümünün karşılaştırılmasının bir yolu da tepkimeler için özgülük sabitinin (V₀) bulunmasıdır. Özgülük sabiti $V_0 = \frac{k_{cat}}{K_m}$ formülü kullanılarak hesaplandı (Lehninger 2005).

3.5.6. Bazı ağır metallerin gökkuşağı alabalığı dokularından elde edilen CA enziminin aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin incelenmesi

Günümüzde pek çok canlı çeşitli şekillerde ağır metallerin etkilerine maruz kalabilmektedirler. Bu çalışma kapsamında da gökkuşağı alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokularından afinite kromatografisi vasıtasıyla saflaştırılan karbonik anhidraz enziminin aktivitesi üzerine inhibisyon etkileri araştırıldı. Kinetik ölçümler enzimin esteraz aktivitesinden faydalanılarak gerçekleştirildi (Verpoorte and Mehta 1967., Armstrong *et al.* 1966). Enzimi inhibe eden $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, AgNO_3 ve $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ kimyasal maddeler için sabit substrat konsantrasyonunda beş farklı inhibitör konsantrasyonu kullanılarak IC_{50} değerleri (enzimin aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu) % aktivite-[I] grafikleri çizilerek belirlendi.

3.5.7. Gökkuşağı alabalığı dokularından elde edilen CA enzimi için inhibitör etkisi gösteren ağır metallerin K_i sabitlerinin bulunması

İnhibitör çalışmaları için, Bölüm 3.5.6’da anlatıldığı gibi ön denemeye alabalık dokularından elde edilen CA enzimini inhibe eden $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, AgNO_3 ve $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ maddeleri kullanıldı. Karaciğer, böbrek, kas ve beyin için yapılan tüm çalışmalarda kullanılan inhibitörlerin stok konsantrasyonları bölüm 3.1.3’de verilmiştir.

Çalışmalarda en uygun beş farklı substrat konsantrasyonu substrat stok çözeltileri kullanılarak ön çalışmayla belirlendi. Yine aynı şekilde her bir substrat konsantrasyonu için en uygun üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonu inhibitör stok çözeltileri kullanılarak ön çalışmayla tespit edildi.

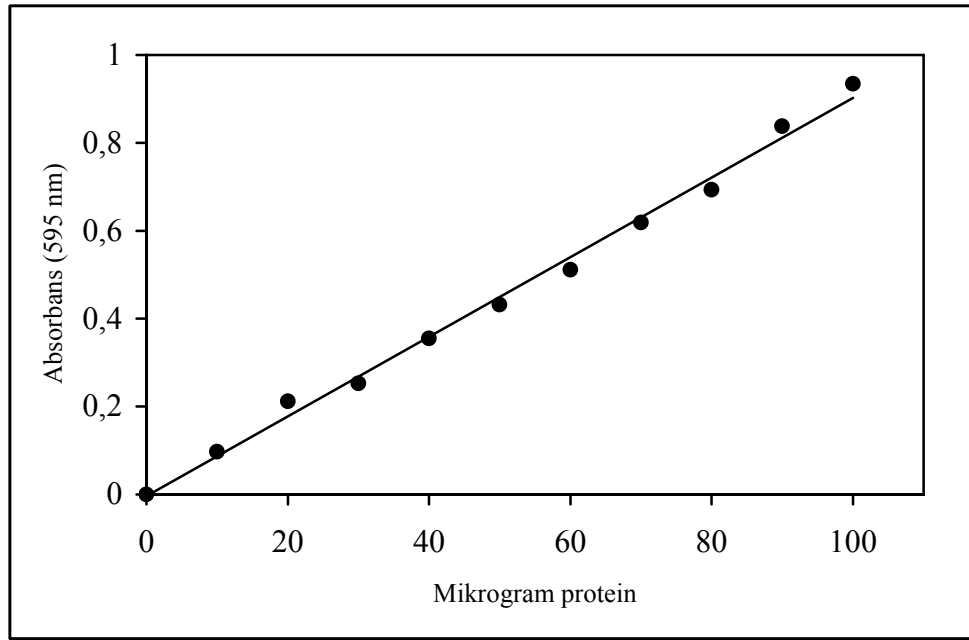
Spektrofotometrenin hassasiyet sınırları içinde absorbans değerinin ölçüldüğü konsantrasyonlar diğer deneylerde de kullanıldı. İnhibitör çalışmaları için kullanılan

Daha sonra alabalık dokularından saflaştırılan CA enzimleri için üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda $V-[S]$ değerleri belirlenerek her bir inhibitör için ayrı ayrı Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek K_i değerleri ve inhibisyon tipleri tayin edildi (Lineweaver and Burk 1934).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

Alabalık dokularından elde edilen homojenatlar ve saf enzim çözeltilerindeki kantitatif protein miktarı Bradford yöntemiyle tayin edildi. Standart grafik bölüm 3.3.2’de anlatıldığı gibi hazırlandı. Homojenatlar ve saf enzim çözeltilerindeki kantitatif protein miktarı bu standart grafikten faydalanılarak bulundu. Standart çözeltilerin μg proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 4.1’de gösterildi.

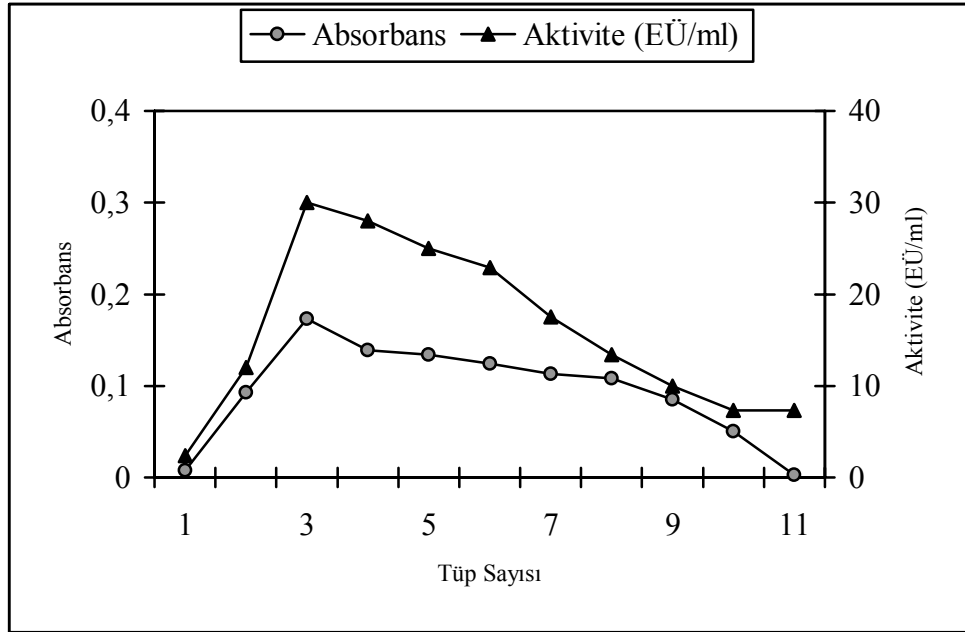


Şekil 4.1. Bradford yöntemiyle proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart grafik.

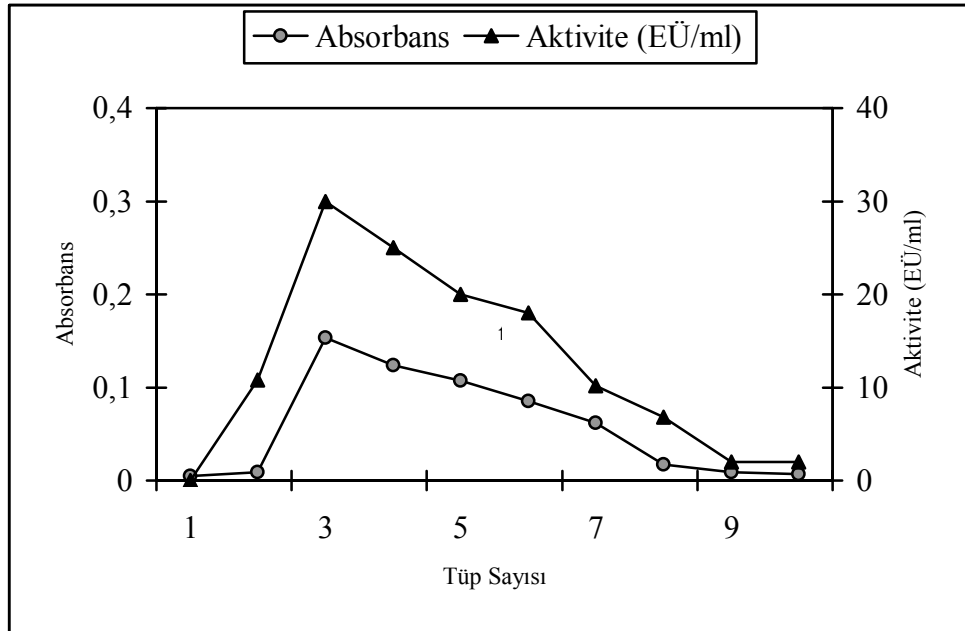
4.2. Gökkuşığı Alabalığı Karaciğer, Böbrek, Kas ve Beyin Dokularından Karbonik Anhidraz Enziminin Saflaştırılma, Karakterizasyon ve Kinetik Çalışma Sonuçları

4.2.1. Karbonik anhidraz enziminin sepharose 4B-L-tirozin sülfanilamid afinite kromatografisi ile saflaştırılma kademeleri

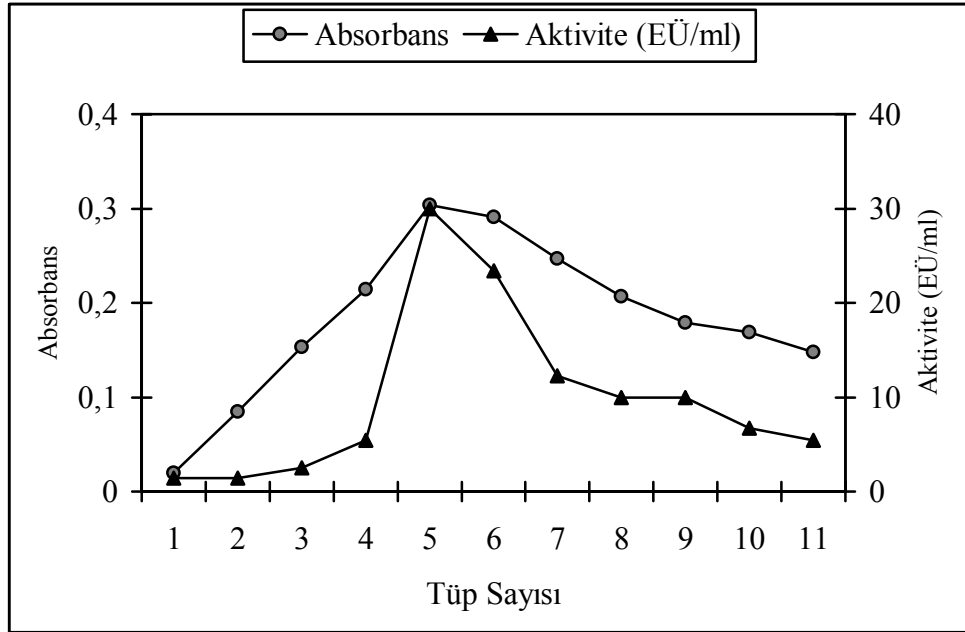
Alabalık karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokularından hazırlanan homojenatların pH'ları katı Tris kullanılarak 8,7'ye ayarlandıktan sonra, bölüm 3.2.1.1.'de anlatıldığı gibi daha önceden hazırlanmış olan Sepharose 4B-L-tirozin sülfanilamid afinite (1,5 cm²x30 cm'lik ve 20 cm jel yüksekliğine sahip) kolonuna doku numuneleri ayrı ayrı tatbik edildi. Daha sonra elüsyonlar 20 ml/saat elüsyon hızında 3'er ml'lik fraksiyonlar halinde toplandı. Kolondan alınan her bir fraksiyon için 280 nm'de Warburg metoduna göre kalitatif protein tayinleri yapıldı. Absorbans gösteren tüplerde CO₂-hidrataz aktivitesi yapıldı ve aktivite gösteren tüpler birleştirildi (Şekil 4.2-4.5). Alabalık karaciğer, böbrek, kas ve beyin CA enzimi Sepharose 4B-L-tirozin sülfanilamid afinite kromatografisi ile saflaştırılması sırasında elde edilen, yüzde verim ve saflaştırma katsayıları sırasıyla Çizelge 4.1, Çizelge 4.2, Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4'de verildi.



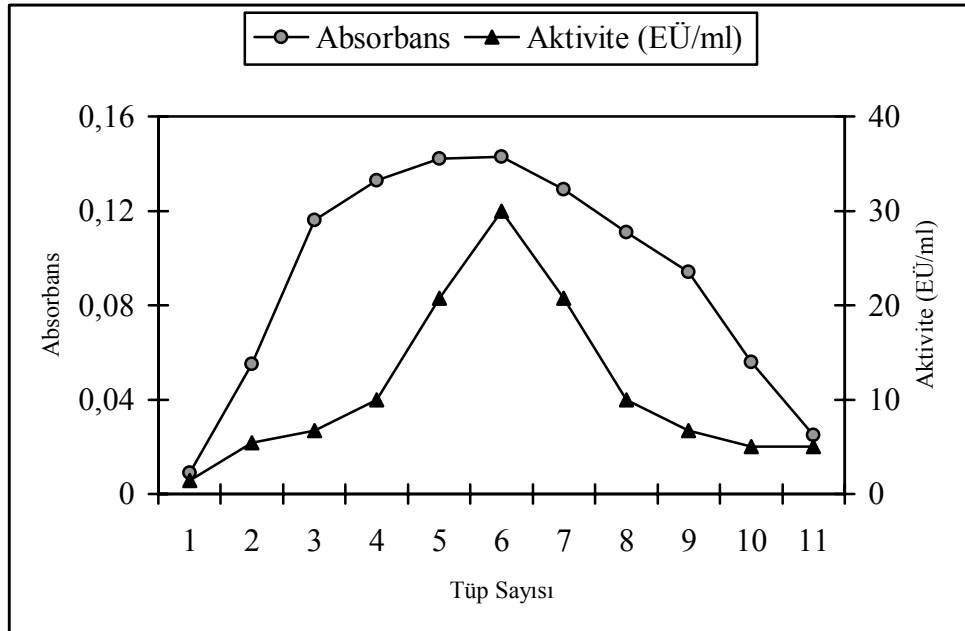
Şekil 4.2. Gökkuşığı alabalık karaciğer CA enziminin Sepharose 4B-L-tirozin sülfanilamid afinite kromatografisi ile saflaştırma grafiği



Şekil 4.3. Gökkuşığı alabalık böbrek CA enziminin Sepharose 4B-L-tirozin sülfanilamid afinite kromatografisi ile saflaştırma grafiği



Şekil 4.4. Gökkuşığı alabalık kas CA enziminin Sepharose 4B-L-tirozin sülfanilamid afinite kromatografisi ile saflaştırma grafiği



Şekil 4.5. Gökkuşığı alabalık beyin CA enziminin Sepharose 4B-L-tirozin sülfanilamid afinite kromatografisi ile saflaştırma grafiği

Çizelge 4.1. Gökkuşığı alabalık karaciğer dokusundan CA enziminin saflaştırılma sonuçları

Saflaştırma basamakları	Aktivite (EÜ/ml)	Toplam hacim (ml)	Protein miktarı (mg/ml)	Toplam protein (mg)	Toplam aktivite (EÜ)	Spesifik aktivite (EÜ/mg)	Yüzde verim (%)	Saflaştırma katsayısı
Homojenat	30	50	15,68	784	1500	1,91	100	1
Sepharose-4B Afinite Kromatografisi ve Diyaliz	190	3	0,05	0,13	570	4318	38	2260

Çizelge 4.2. Gökkuşığı alabalık böbrek dokusundan CA enziminin saflaştırılma sonuçları

Saflaştırma basamakları	Aktivite (EÜ/ml)	Toplam hacim (ml)	Protein miktarı (mg/ml)	Toplam protein (mg)	Toplam aktivite (EÜ)	Spesifik aktivite (EÜ/mg)	Yüzde verim (%)	Saflaştırma katsayısı
Homojenat	30	60	3,12	187,44	1800	9,60	100	1
Sepharose-4B Afinite Kromatografisi ve Diyaliz	190	3	0,011	0,0329	570	17285	31,70	1800

Çizelge 4.3. Gökkuşığı alabalık kas dokusundan CA enziminin saflaştırılma sonuçları

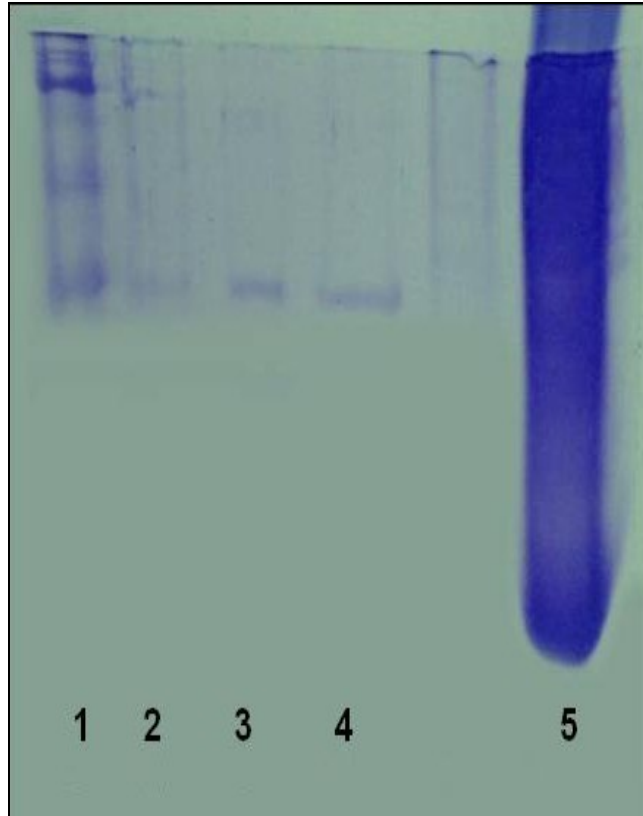
Saflaştırma basamakları	Aktivite (EÜ/ml)	Toplam hacim (ml)	Protein miktarı (mg/ml)	Toplam protein (mg)	Toplam aktivite (EÜ)	Spesifik aktivite (EÜ/mg)	Yüzde verim (%)	Saflaştırma katsayısı
Homojenat	30	100	14,05	1405	3000	2,13	100	1
Sepharose-4B								
Afinite Kromatografisi ve Diyaliz	190	3	0,083	0,25	570	2300	19	1080

Çizelge 4.4. Gökkuşığı alabalık beyin dokusundan CA enziminin saflaştırılma sonuçları

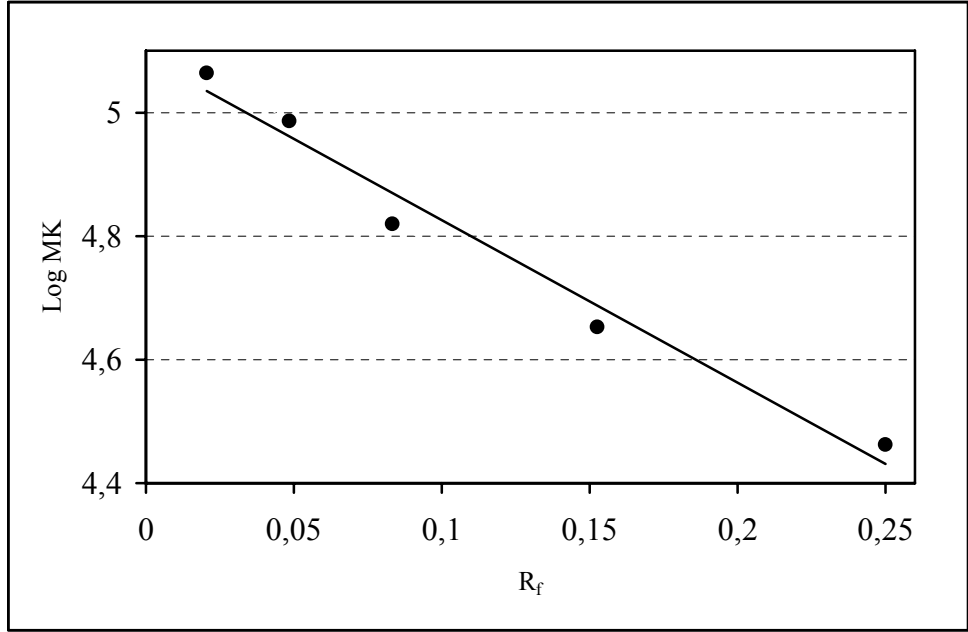
Saflaştırma basamakları	Aktivite (EÜ/ml)	Toplam hacim (ml)	Protein miktarı (mg/ml)	Toplam protein (mg)	Toplam aktivite (EÜ)	Spesifik aktivite (EÜ/mg)	Yüzde verim (%)	Saflaştırma katsayısı
Homojenat	30	40	16,91	676,75	1800	1,77	100	1
Sepharose-4B								
Afinite Kromatografisi ve Diyaliz	90	3	0,04	0,12	270	2275	22,5	1283

4.2.2. Sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) sonucu

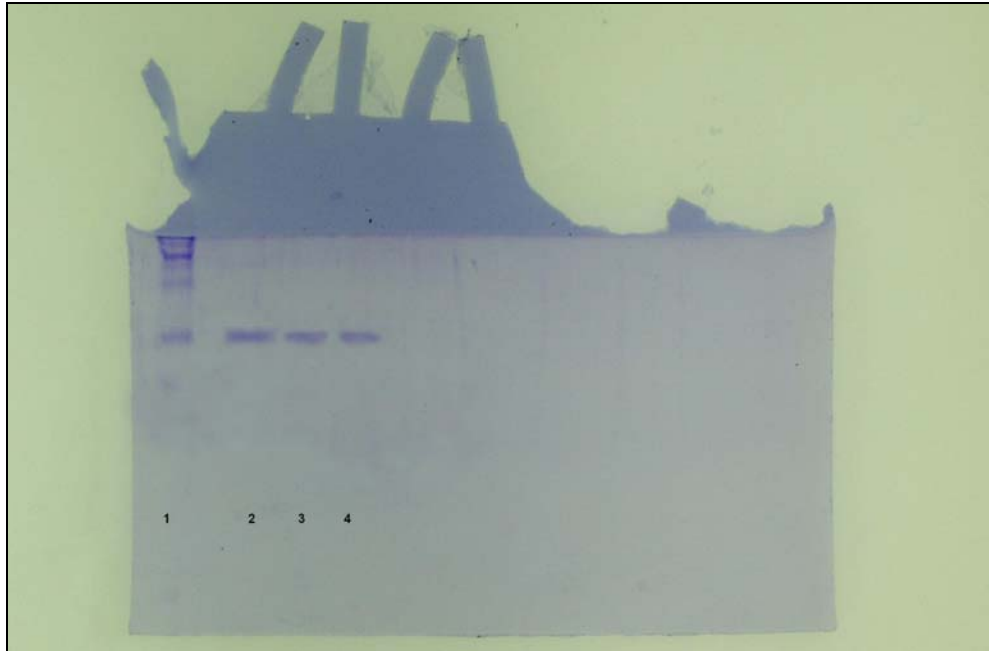
Sepharose-4B afinite kromatografisinden saf olarak elde edilen alabalık dokuları CA enzimi ve standart proteinler, Bölüm 3.2.1.4.'de anlatıldığı şekilde her bir enzim için ayrı ayrı hazırlanan kesikli SDS-poliakrilamid jel elektroforezine tatbik edildi. Daha sonra elde edilen protein bantlarının fotoğrafı çekildi ve gökkuşağı alabalık dokularından saflaştırılan CA enzimlerinin molekül kütleleri log MK- R_f grafikleri çizilerek bu grafiklerden hesaplandı (Şekil 4.6-4.11) (Çizelge 4.5).



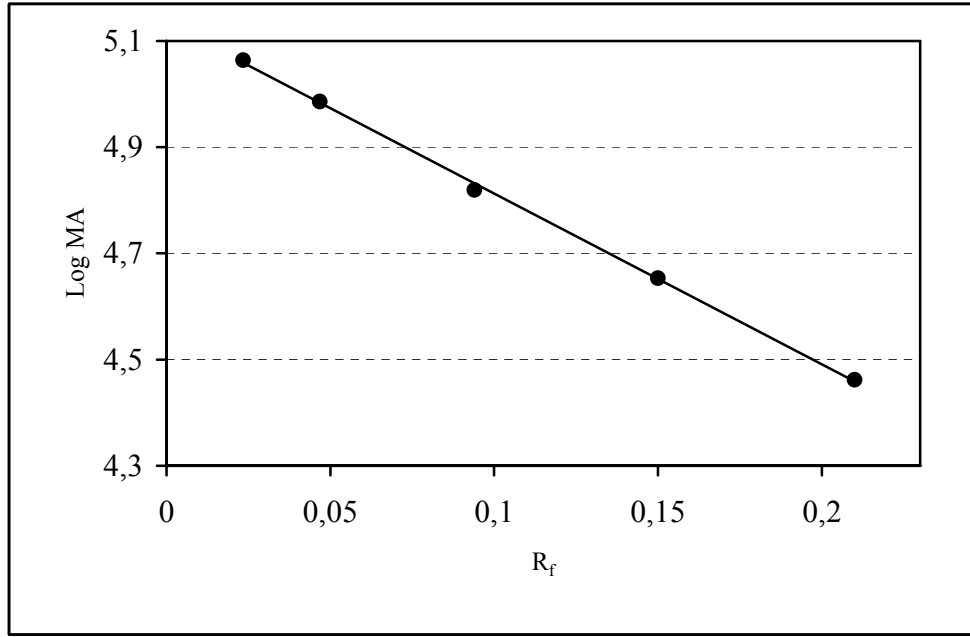
Şekil 4.6. Afinite kromatografisiyle saflaştırılan gökkuşağı alabalığı karaciğeri karbonik anhidraz enziminin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi fotoğrafı ((1) standart proteinler (E.coli β -galaktosidaz 116 kDa, tavşan fosforilaz B 97 kDa, sığır serum albumin 66 kDa ve sığır eritrosit CA 29 kDa), (2), (3) ve (4) karaciğer CA ve (5) karaciğer homojenat)



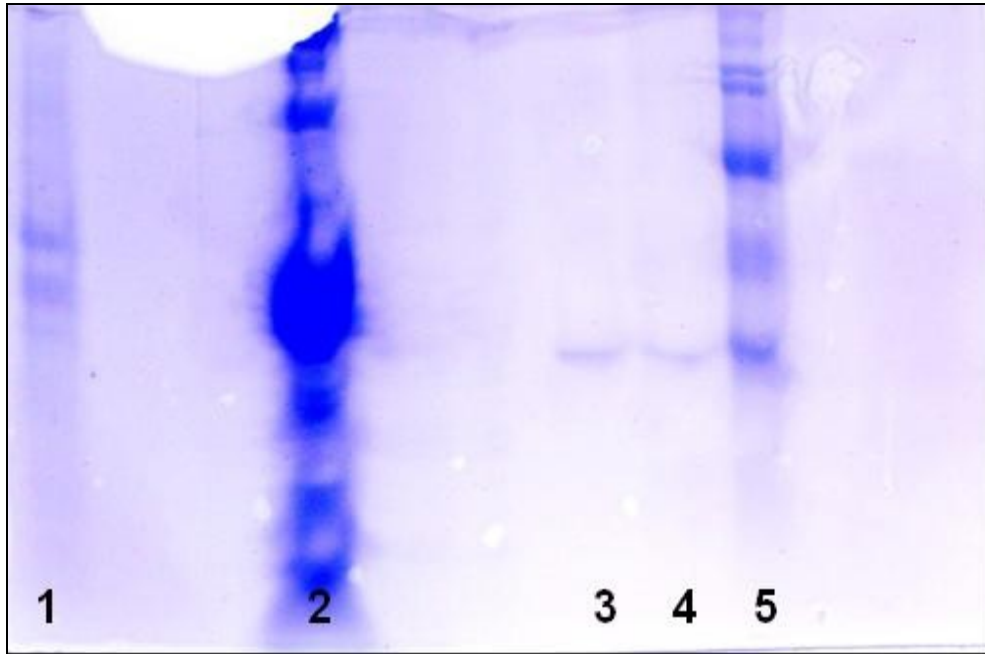
Şekil 4.7. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yöntemiyle alabalık karaciğer CA enziminin molekül kütlesi tayininde kullanılan standart grafik ($R_f=0,236$)



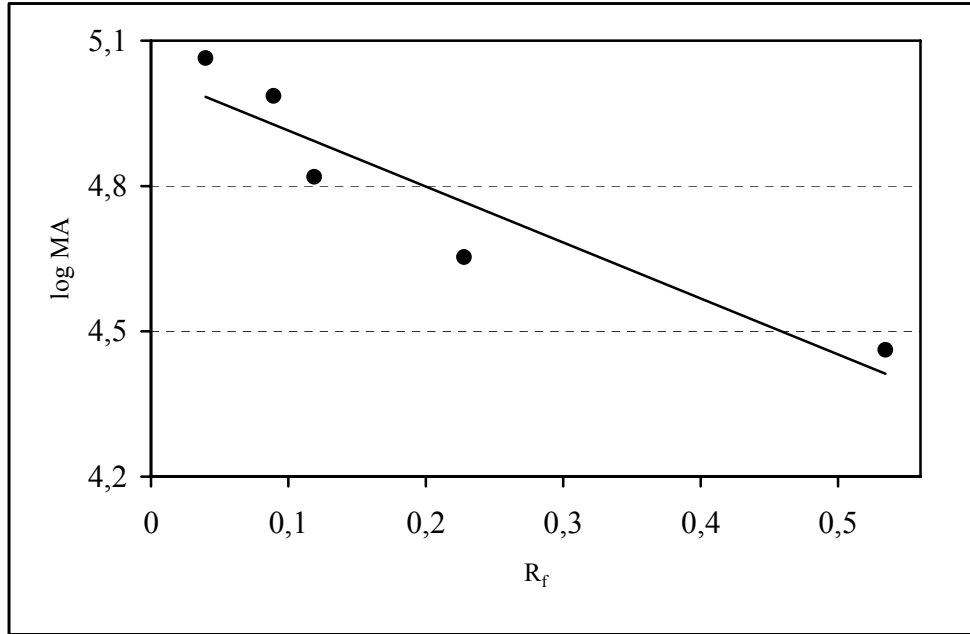
Şekil 4.8. Afinité kromatografisiyle saflaştırılan gökkuşuğu alabalığı böbrek karbonik anhidraz enziminin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi fotoğrafı ((1) standart proteinler (E.coli β -galaktosidaz 116 kDa, tavşan fosforilaz B 97 kDa, sığır serum albumin 66 kDa ve sığır eritrosit CA 29 kDa), (2), (3) ve (4) böbrek CA)



Şekil 4.9. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yöntemiyle alabalık böbrek CA enziminin molekül kütlesi tayininde kullanılan standart grafik ($R_f=0,2102$)



Şekil 4.10. Afinité kromatografisiyle saflaştırılan gökkuşuğu alabalığı kas ve beyin karbonik anhidraz enziminin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi fotoğrafı ((1) beyin homojenat, (2) kas homojenat, (3) beyin CA ve (4) kas CA (5) standart proteinler (E.coli β -galaktosidaz 116 kDa, tavşan fosforilaz B 97.4 kDa, sığır serum albumin 66 kDa ve sığır eritrosit CA 29 kDa))



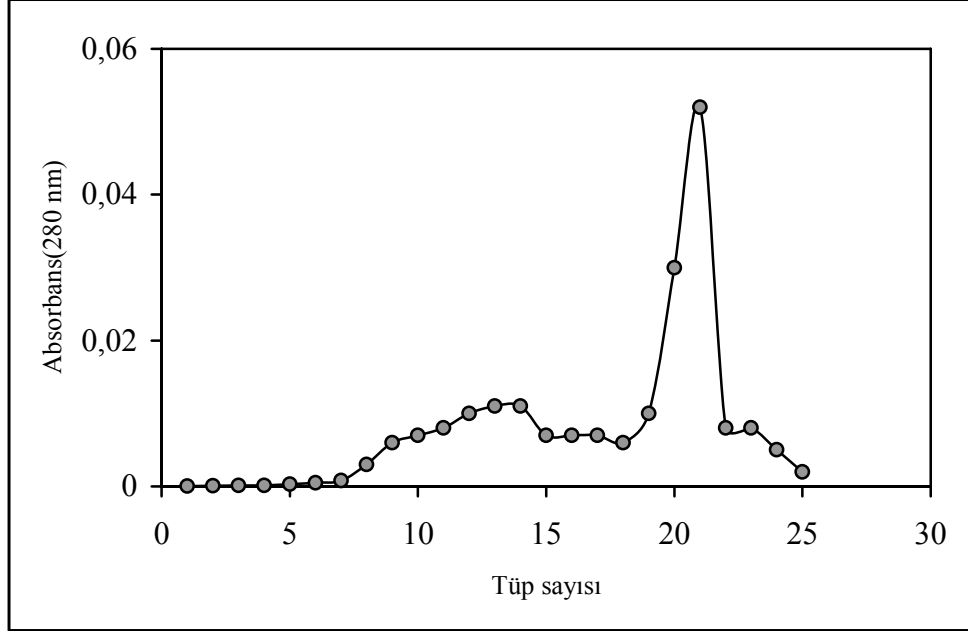
Şekil 4.11. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yöntemiyle alabalık kas ve beyin CA enziminin molekül kütlesi tayininde kullanılan standart grafik ($R_f=0,539$), ($R_f=0,534$)

Çizelge 4.5. Gökkuşuğu alabalık dokuları CA enzimleri için SDS-PAGE ile molekül kütleleri tayini sonuçları

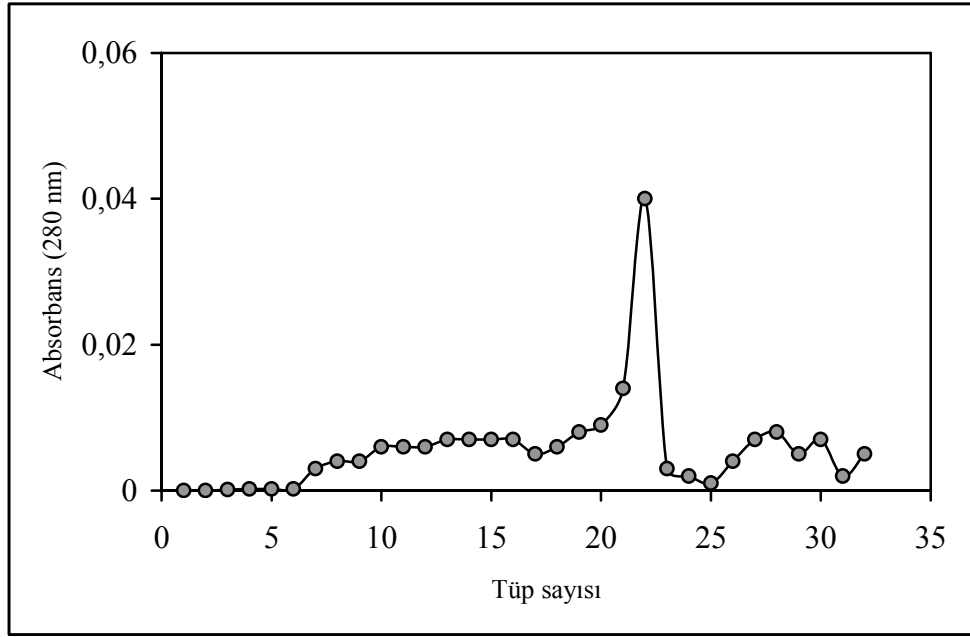
Enzim	Dokular	Molekül Kütleleri (kDa)
Karbonik Anhidraz (CA)	Karaciğer	29,4
	Böbrek	28,7
	Kas	30,3
	Beyin	29,0

4.2.3. Gökkuşığı alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokularından saflaştırılan CA enziminin molekül kütlelerinin sephadex G-200 jel filtrasyon kromatografisi ile belirlenmesi

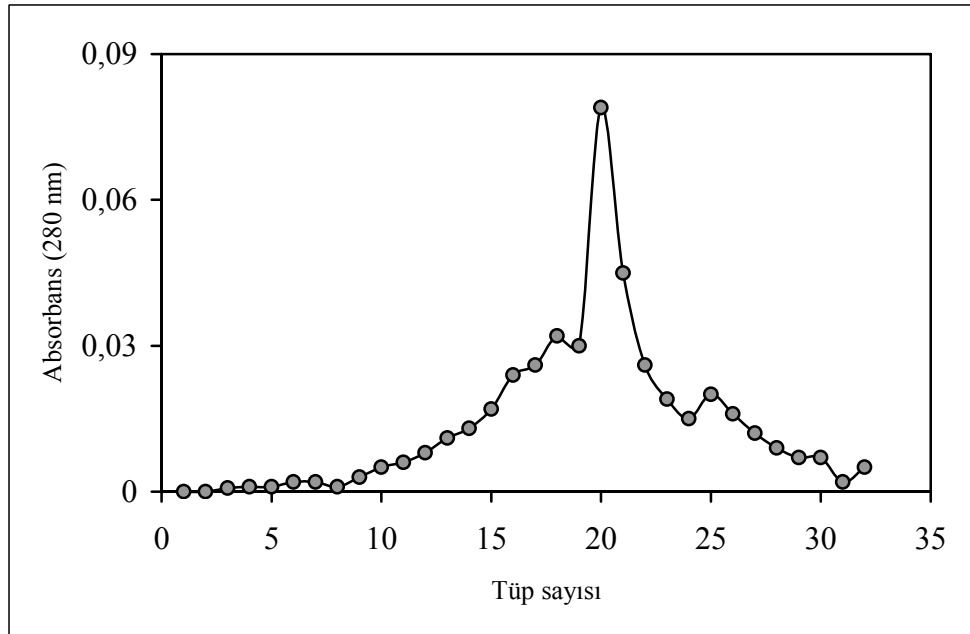
Gökkuşığı alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokularından saflaştırılan CA enziminin molekül kütlesi Bölüm 3.2.1.5.'de anlatıldığı şekilde kolon materyali olarak Sephadex G-200 jeli ile jel filtrasyon kromatografisi yapıldı ve sonuçlar Şekil 4.12-4.15'de verildi. Bu işlem esnasında; Blue dextran (2000 kDa) kolona uygulandı. Daha sonra β -amilaz (200 kDa), alkol dehidrogenaz (150 kDa), bovin serum albumin (66 kDa), sitokrom c (12,4 kDa) sığır eritrosit CA (29 kDa) standart proteinleri sırasıyla kolona uygulandı. Daha sonra log MK- K_{av} grafiği çizilerek, karaciğer, böbrek, kas ve beyin CA enzimlerinin molekül kütleleri tespit edildi (Şekil 4.16) Çizelge 4.6).



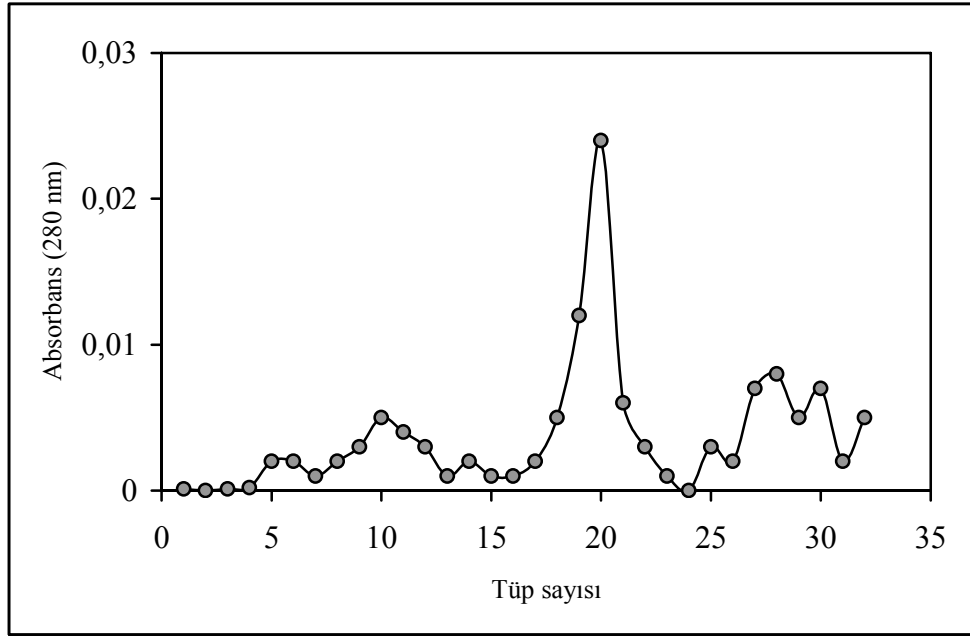
Şekil 4.12. Gökkuşığı alabalığı karaciğer CA enziminin molekül kütlesini tayini için kullanılan jel filtrasyon kromatografisi grafiği



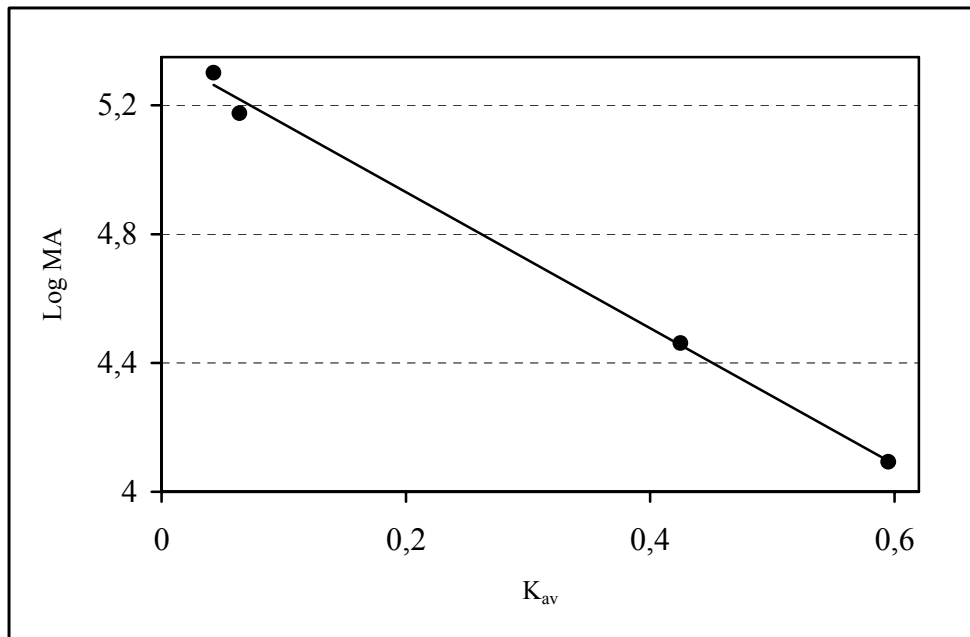
Şekil 4.13. Gökkuşığı alabalığı böbrek CA enziminin molekül kütlesini tayini için kullanılan jel filtrasyon kromatografisi grafiği



Şekil 4.14. Gökkuşığı alabalığı kas CA enziminin molekül kütlesini tayini için kullanılan jel filtrasyon kromatografisi grafiği



Şekil 4.15. Gökkuşığı alabalığı beyin CA enziminin molekül kütlelerini tayini için kullanılan jel filtrasyon kromatografisi grafiği



Şekil 4.16. Gökkuşığı alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin CA enziminin molekül kütlelerini tayini için Sephadex G-200 kolon materyali kullanılarak yapılan jel filtrasyon kromatografisi sonucu elde edilen standart grafik

Çizelge 4.6. Gökkuşığı alabalık dokuları CA enzimleri için Sephadex G-200 jel filtrasyon kromatografisi ile molekül kütleleri tayini sonuçları

Enzim	Dokular	Molekül Kütleleri (kDa)
Karbonik Anhidraz (CA)	Karaciğer	31,0
	Böbrek	26,9
	Kas	31,5
	Beyin	27,3

4.2.4. Gökkuşığı alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokuları karbonik anhidraz enzimleri için optimum pH'ların belirlenmesi

Alabalık karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokuları karbonik anhidraz enzimlerinin optimum pH'ları Bölüm 3.5.1'de anlatıldığı şekilde; pH'sı 7,2 - 9,0 aralığında 1 M Tris-SO₄ ve pH'sı 5,0 - 8,0 aralığında 1 M potasyum fosfat tampon çözeltileri kullanılarak enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak belirlendi (Çizelge 4.7 - 4.14, Şekil 4.17 - 4.20). Alabalık karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokuları CA'ları için optimum pH'lar 1 M Tris-SO₄ pH= 9,0 tamponu olarak belirlendi.

Çizelge 4.7. Gökkuşığı alabalık karaciğer dokusu CA enziminin optimum pH'sı için 1M Tris-SO₄ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

1M Tris-SO ₄	
pH	Aktivite (EÜ/ml)
7,0	0,0046
7,5	0,0120
8,0	0,0256
8,5	0,0706
9,0	0,1038
9,5	0,0800

Çizelge 4.8. Gökkuşığı alabalık karaciğer dokusu CA enziminin optimum pH'sı için 1M potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

1M Potasyum fosfat	
pH	Aktivite (EÜ/ml)
5,0	0,0012
5,5	0,0018
6,0	0,0024
6,5	0,0036
7,0	0,0048
7,5	0,0076
8,0	0,0090

Çizelge 4.9. Gökkuşığı alabalık böbrek dokusu CA enziminin optimum pH'sı için 1M Tris-SO₄ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

1M Tris-SO ₄	
pH	Aktivite (EÜ/ml)
7,0	0,0036
7,5	0,0080
8,0	0,0166
8,5	0,0384
9,0	0,0672
9,5	0,0550

Çizelge 4.10. Gökkuşığı alabalık böbrek dokusu CA enziminin optimum pH'sı için 1M potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

1M Potasyum fosfat	
pH	Aktivite (EÜ/ml)
5,0	0,0012
5,5	0,0014
6,0	0,0022
6,5	0,0034
7,0	0,0038
7,5	0,0064
8,0	0,0080

Çizelge 4.11. Gökkuşığı alabalık kas dokusu CA enziminin optimum pH'sı için 1M Tris-SO₄ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

1M Tris-SO ₄	
pH	Aktivite (EÜ/ml)
7,0	0,0114
7,5	0,0222
8,0	0,0572
8,5	0,0884
9,0	0,1198
9,5	0,1000

Çizelge 4.12. Gökkuşığı alabalık kas dokusu CA enziminin optimum pH'sı için 1M potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

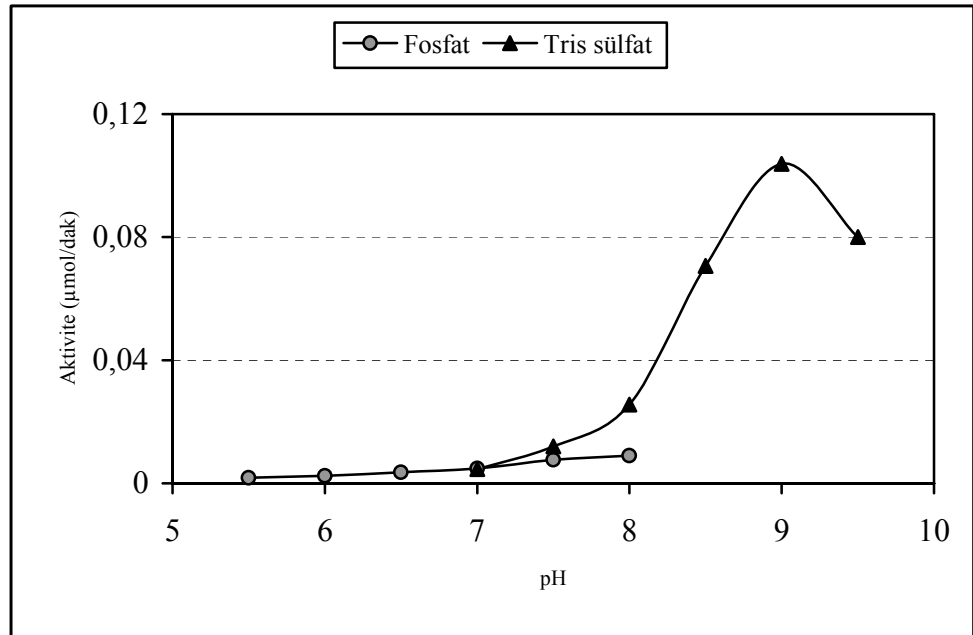
1M Potasyum fosfat	
pH	Aktivite (EÜ/ml)
5,0	0,0022
5,5	0,0026
6,0	0,0052
6,5	0,0062
7,0	0,0066
7,5	0,0076
8,0	0,0100

Çizelge 4.13. Gökkuşığı alabalık beyin dokusu CA enziminin optimum pH'sı için 1M Tris-SO₄ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

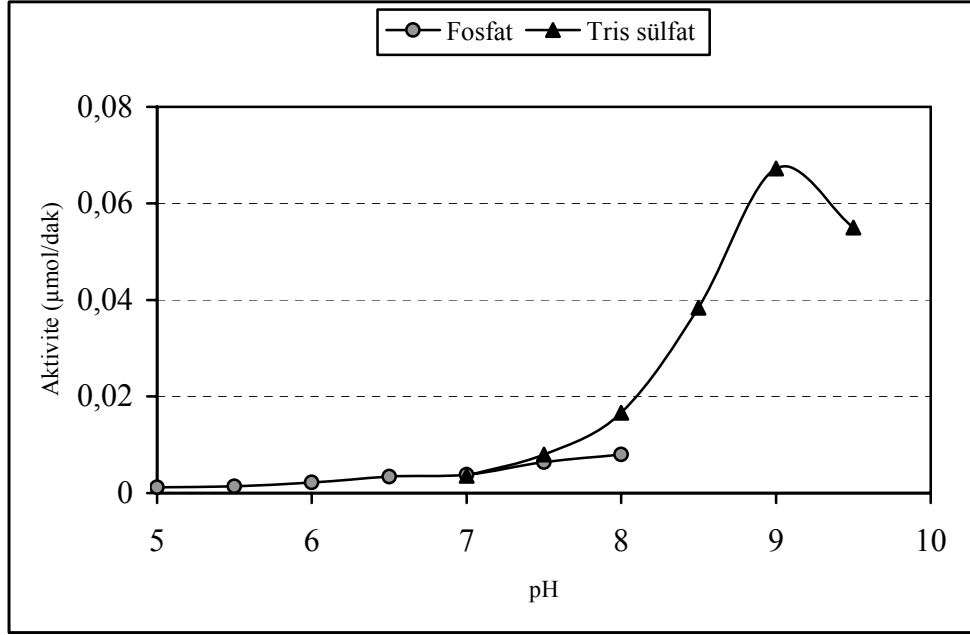
1M Tris-SO ₄	
pH	Aktivite (EÜ/ml)
7,0	0,0124
7,5	0,0236
8,0	0,0536
8,5	0,0918
9,0	0,1240
9,5	0,1200

Çizelge 4.14. Gökkuşığı alabalık beyin dokusu CA enziminin optimum pH'sı için 1M potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

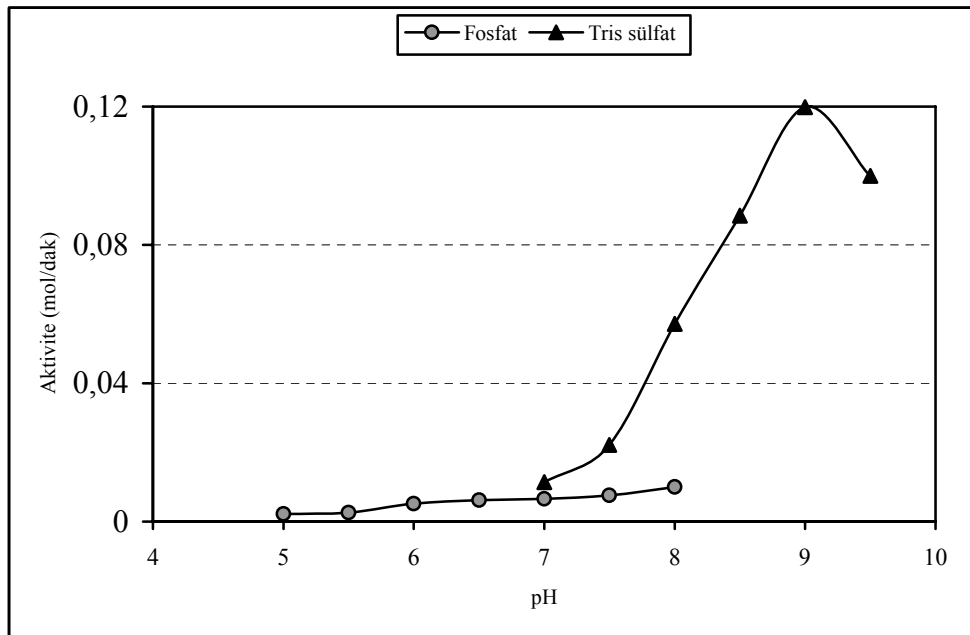
1M Potasyum fosfat	
pH	Aktivite (EÜ/ml)
5,0	0,0014
5,5	0,0020
6,0	0,0040
6,5	0,0044
7,0	0,0054
7,5	0,0072
8,0	0,0120



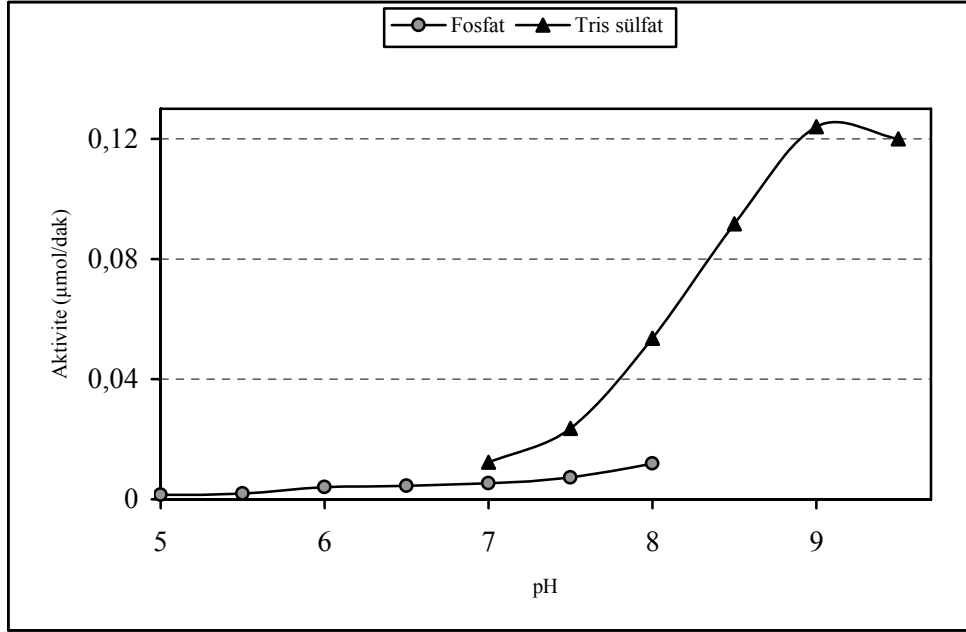
Şekil 4.17. Gökkuşığı alabalık karaciğer dokusu CA enziminin optimum pH'sını bulmak için 1M Potasyum fosfat ve 1M Tris-SO₄ tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları



Şekil 4.18. Gökkuşığı alabalık böbrek dokusu CA enziminin optimum pH'sını bulmak için 1M Potasyum fosfat ve 1M Tris-SO₄ tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları



Şekil 4.19. Gökkuşığı alabalık kas dokusu CA enziminin optimum pH'sını bulmak için 1M Potasyum fosfat ve 1M Tris-SO₄ tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları



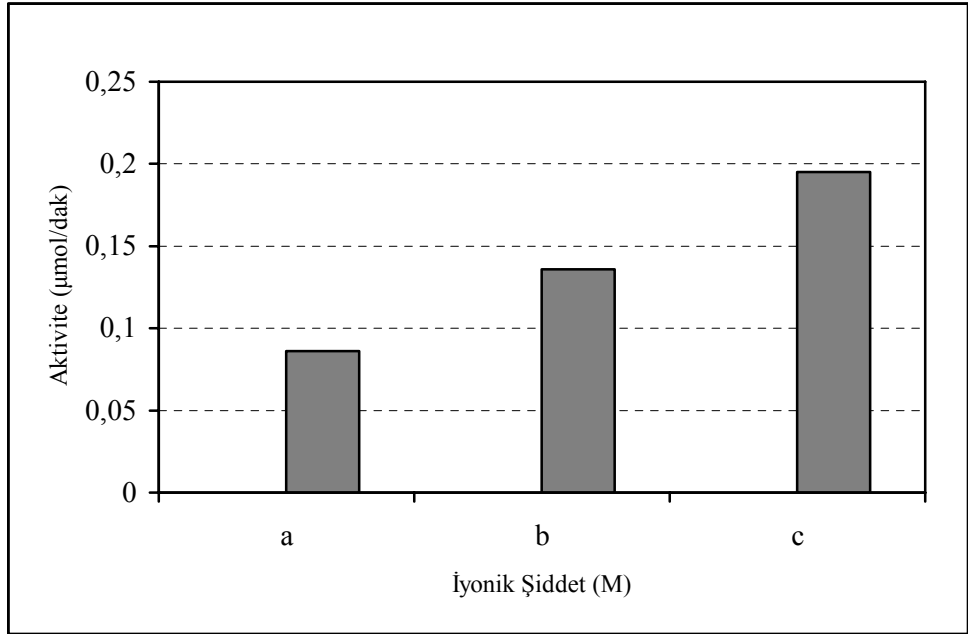
Şekil 4.20. Gökkuşığı alabalık beyin dokusu CA enziminin optimum pH'sını bulmak için 1M Potasyum fosfat ve 1M Tris-SO₄ tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

4.2.5. Gökkuşığı alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokuları karbonik anhidraz enzimleri için optimum iyonik şiddetlerin belirlenmesi

Alabalık karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokuları karbonik anhidraz enzimlerinin optimum iyonik şiddetler Bölüm 3.5.2'de anlatıldığı şekilde; pH'sı 7,2-9,0 aralığında 1 M Tris-SO₄ tampon çözeltisi kullanılarak enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak belirlendi (Çizelge 4.15-4.18, Şekil 4.21-4.24). Alabalık karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokuları CA'ları için optimum iyonik şiddetler 1 M Tris-SO₄ tamponu olarak belirlendi. Literatürde optimum iyonik şiddet çalışmalarında kullanılan tamponların molar derişimi 1 M veya daha düşüktür. Bundan dolayı optimum iyonik şiddet çalışmaları 0,1 M ile 1 M aralığında yapıldı. Diğer bir hususta 1 M'dan daha yüksek konsantrasyonlarda tampon çözeltisinde çökme gözlemlendi.

Çizelge 4.15. Gökkuşığı alabalık karaciğer dokusu için Tris-SO₄ çözeltisi kullanılarak farklı iyonik şiddetlerde yapılan aktivite ölçüm sonuçları

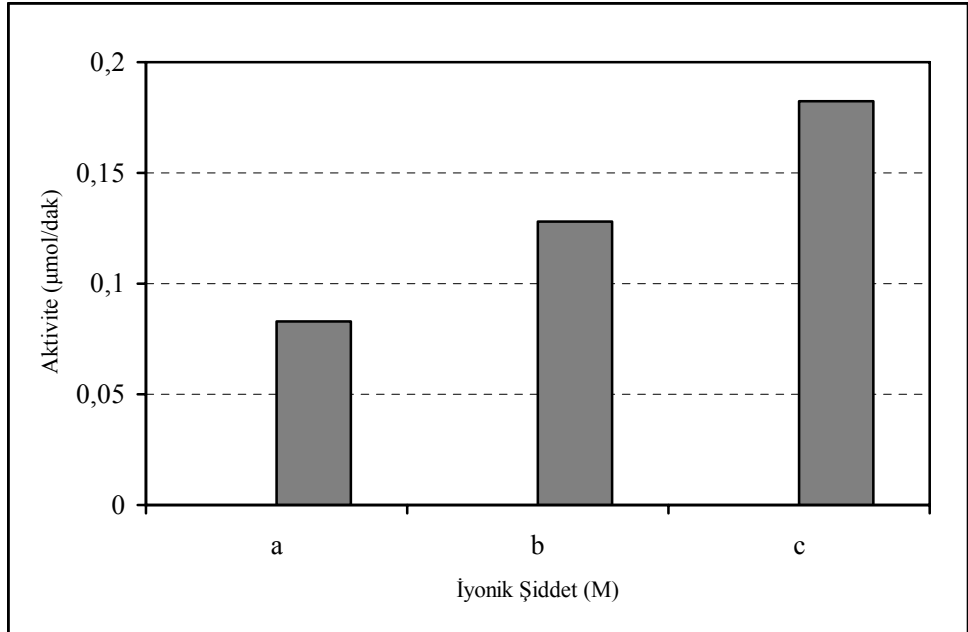
Tris-SO ₄	
İyonik Şiddet(M)	Aktivite (EÜ/ml)
0,1	0,086
0,5	0,136
1,0	0,1952



Şekil 4.21. Gökkuşığı alabalık karaciğer dokusu için Tris-SO₄ tampon çözeltisi kullanılarak farklı iyonik şiddetlerde yapılan aktivite ölçüm sonuçları (a=0,1M, b=0,5M, c=1M)

Çizelge 4.16. Gökkuşığı alabalık böbrek dokusu için Tris-SO₄ çözeltisi kullanılarak farklı iyonik şiddetlerde yapılan aktivite ölçüm sonuçları

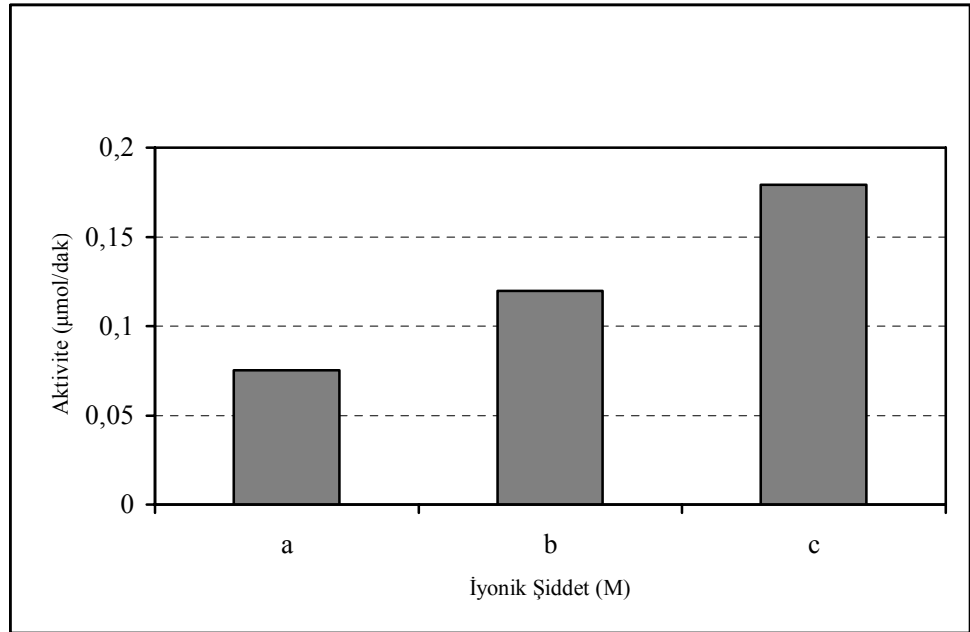
Tris-SO ₄	
İyonik Şiddet(M)	Aktivite (EÜ/ml)
0,1	0,083
0,5	0,128
1,0	0,182



Şekil 4.22. Gökkuşığı alabalık böbrek dokusu için Tris-SO₄ tampon çözeltisi kullanılarak farklı iyonik şiddetlerde yapılan aktivite ölçüm sonuçları (a=0,1M, b=0,5M, c=1M)

Çizelge 4.17. Gökkuşığı alabalık kas dokusu için Tris-SO₄ çözeltisi kullanılarak farklı iyonik şiddetlerde yapılan aktivite ölçüm sonuçları

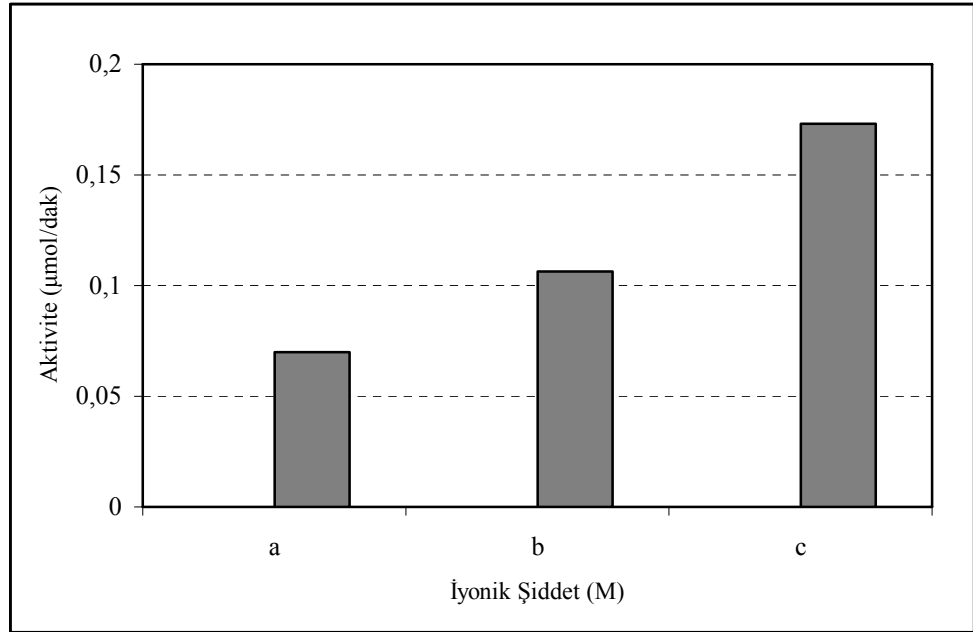
Tris-SO ₄	
İyonik Şiddet(M)	Aktivite (EÜ/ml)
0,1	0,0752
0,5	0,1176
1,0	0,1792



Şekil 4.23. Gökkuşığı alabalık kas dokusu için Tris-SO₄ tampon çözeltisi kullanılarak farklı iyonik şiddetlerde yapılan aktivite ölçüm sonuçları (a=0,1M, b=0,5M, c=1M)

Çizelge 4.18. Gökkuşığı alabalık beyin dokusu için Tris-SO₄ çözeltisi kullanılarak farklı iyonik şiddetlerde yapılan aktivite ölçüm sonuçları

1M Tris-SO ₄	
İyonik Şiddet(M)	Aktivite (EÜ/ml)
0,1	0,07
0,5	0,11
1,0	0,17



Şekil 4.24. Gökkuşığı alabalık beyin dokusu için Tris-SO₄ tampon çözeltisi kullanılarak farklı iyonik şiddetlerde yapılan aktivite ölçüm sonuçları (a=0,1M, b=0,5M, c=1M)

4.2.6. Gökkuşığı alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokuları karbonik anhidraz enzimleri için stabil pH'ların belirlenmesi

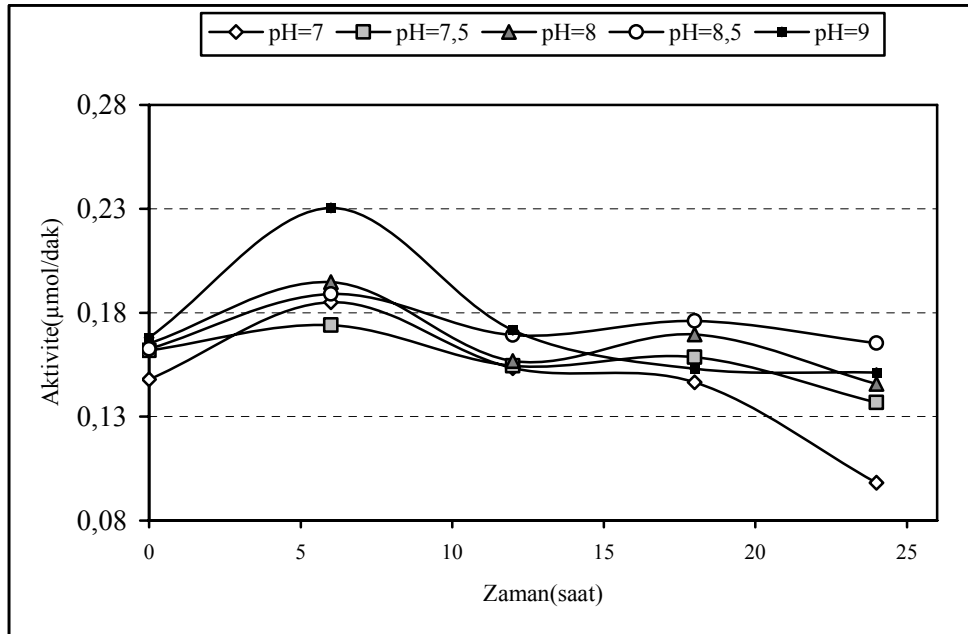
Alabalık karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokuları karbonik anhidraz enzimlerinin stabil pH'ları Bölüm 3.5.3'de anlatıldığı şekilde; pH'sı 7,2-9,0 aralığında 1 M Tris-SO₄ ve pH'sı 5,0-8,0 aralığında 1 M potasyum fosfat tampon çözeltileri kullanılarak enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak belirlendi (Çizelge 4.19-4.26, Şekil 4.25-4.32). Alabalık karaciğer dokusu için stabil pH 8,5 1M Tris-SO₄ olarak belirlenirken, böbrek, kas ve beyin için stabil pH aynı tampon çözelti için 9,0 olarak elde edildi.

Çizelge 4.19. Gökkuşığı alabalık karaciğer dokusu CA enziminin stabil pH'sı için 1M Tris-SO₄ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

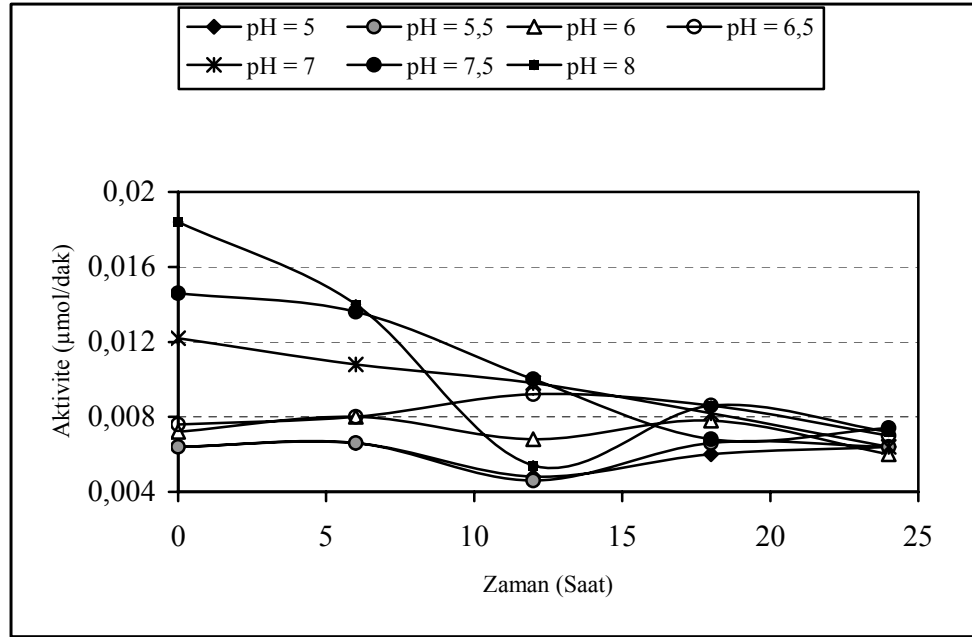
Zaman	(pH=7,0) Aktivite (EÜ/ml)	(pH=7,5) Aktivite (EÜ/ml)	(pH=8,0) Aktivite (EÜ/ml)	(pH=8,5) Aktivite (EÜ/ml)	(pH=9,0) Aktivite (EÜ/ml)
0. saat	0,148	0,1618	0,1652	0,1626	0,168
6. saat	0,185	0,174	0,1948	0,189	0,23
12. saat	0,1534	0,1544	0,1568	0,1692	0,1716
18. saat	0,1466	0,1586	0,1696	0,176	0,153
24. saat	0,0982	0,1368	0,1458	0,1654	0,1512

Çizelge 4.20. Gökkuşığı alabalık karaciğer dokusu CA enziminin stabil pH'sı için 1M potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

Zaman	(pH=5,0) Aktivite (EÜ/ml)	(pH=5,5) Aktivite (EÜ/ml)	(pH=6,0) Aktivite (EÜ/ml)	(pH=6,5) Aktivite (EÜ/ml)	(pH=7,0) Aktivite (EÜ/ml)	(pH=7,5) Aktivite (EÜ/ml)	(pH=8,0) Aktivite (EÜ/ml)
0. saat	0,0064	0,0064	0,0072	0,0076	0,0122	0,0146	0,0184
6. saat	0,0066	0,0066	0,008	0,008	0,0108	0,0136	0,014
12. saat	0,0048	0,0046	0,0068	0,0092	0,0098	0,01	0,0054
18. saat	0,006	0,0066	0,0078	0,0086	0,0082	0,0068	0,0086
24. saat	0,0064	0,0064	0,006	0,007	0,0064	0,0074	0,0072



Şekil 4.25. Gökkuşığı alabalık karaciğer dokusu CA enziminin stabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 1M Tris-SO₄ tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları



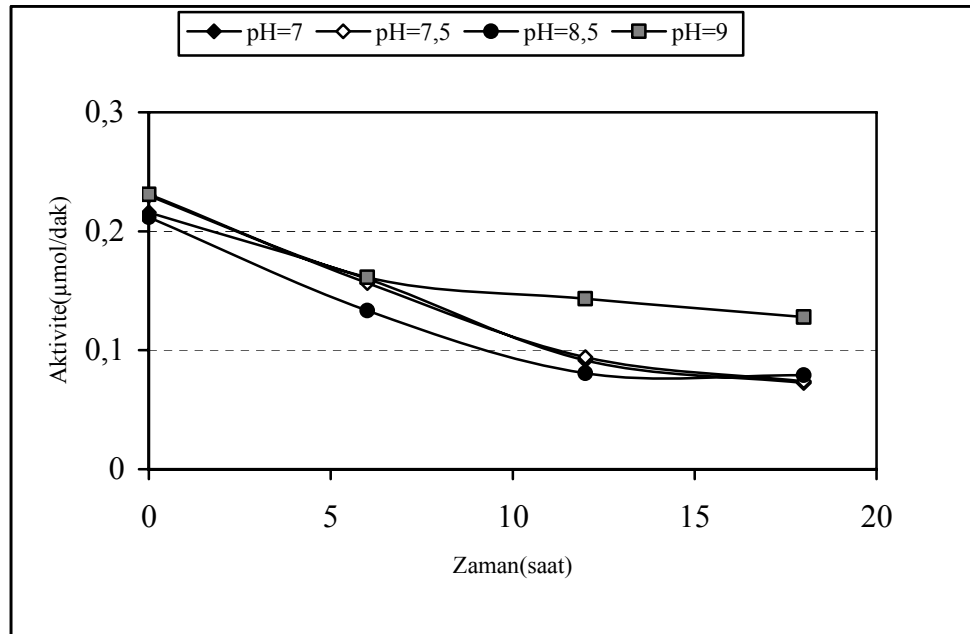
Şekil 4.26. Gökkuşığı alabalık karaciğer dokusu CA enziminin stabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 1M potasyum fosfat tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

Çizelge 4.21. Gökkuşığı alabalık böbrek dokusu CA enziminin stabil pH'sı için 1M Tris-SO₄ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

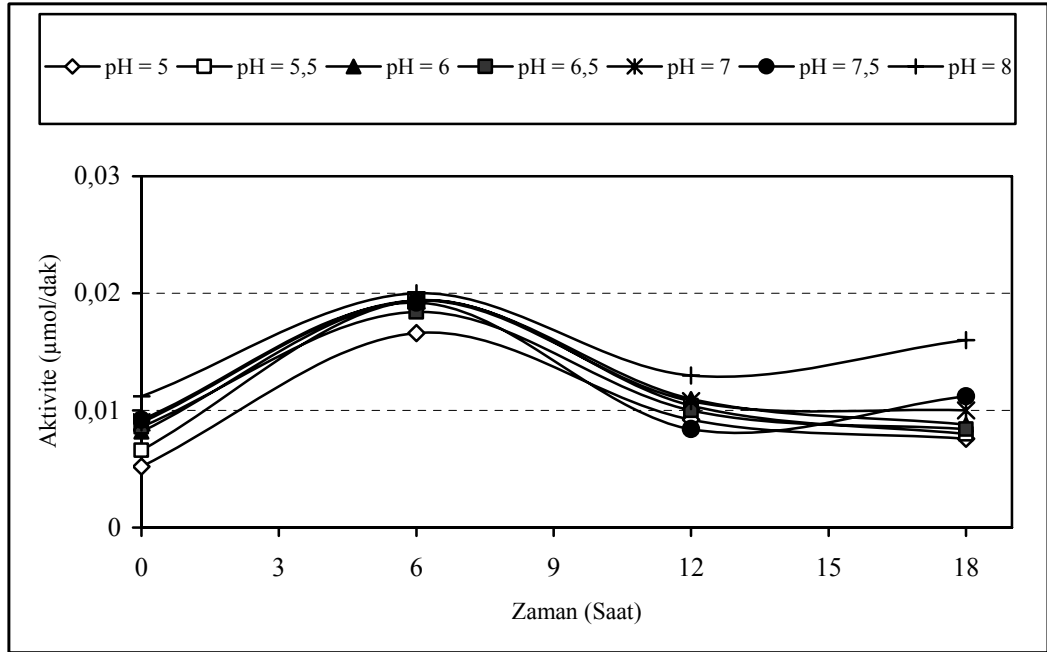
Zaman	(pH=7,0) Aktivite (EÜ/ml)	(pH=7,5) Aktivite (EÜ/ml)	(pH=8,0) Aktivite (EÜ/ml)	(pH=8,5) Aktivite (EÜ/ml)	(pH=9,0) Aktivite (EÜ/ml)
0. saat	0,2158	0,2298	0,2136	0,2118	0,231
6. saat	0,16	0,1566	0,1638	0,1334	0,1614
12. saat	0,0914	0,0942	0,096	0,0808	0,1432
18. saat	0,0726	0,074	0,0766	0,079	0,128
24. saat	0,2158	0,2298	0,2136	0,2118	0,231

Çizelge 4.22. Gökkuşığı alabalık böbrek dokusu CA enziminin stabil pH'sı için 1M potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

Zaman	(pH=5,0) Aktivite (EÜ/ml)	(pH=5,5) Aktivite (EÜ/ml)	(pH=6,0) Aktivite (EÜ/ml)	(pH=6,5) Aktivite (EÜ/ml)	(pH=7,0) Aktivite (EÜ/ml)	(pH=7,5) Aktivite (EÜ/ml)	(pH=8,0) Aktivite (EÜ/ml)
0. saat	0,0052	0,0066	0,0082	0,0086	0,009	0,0092	0,0112
6. saat	0,0166	0,0194	0,0194	0,0184	0,0194	0,0192	0,0234
12. saat	0,0092	0,0104	0,011	0,01	0,0108	0,0084	0,008
18. saat	0,0076	0,008	0,0088	0,0084	0,01	0,0112	0,016



Şekil 4.27. Gökkuşığı alabalık böbrek dokusu CA enziminin stabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 1M Tris-SO₄ tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları



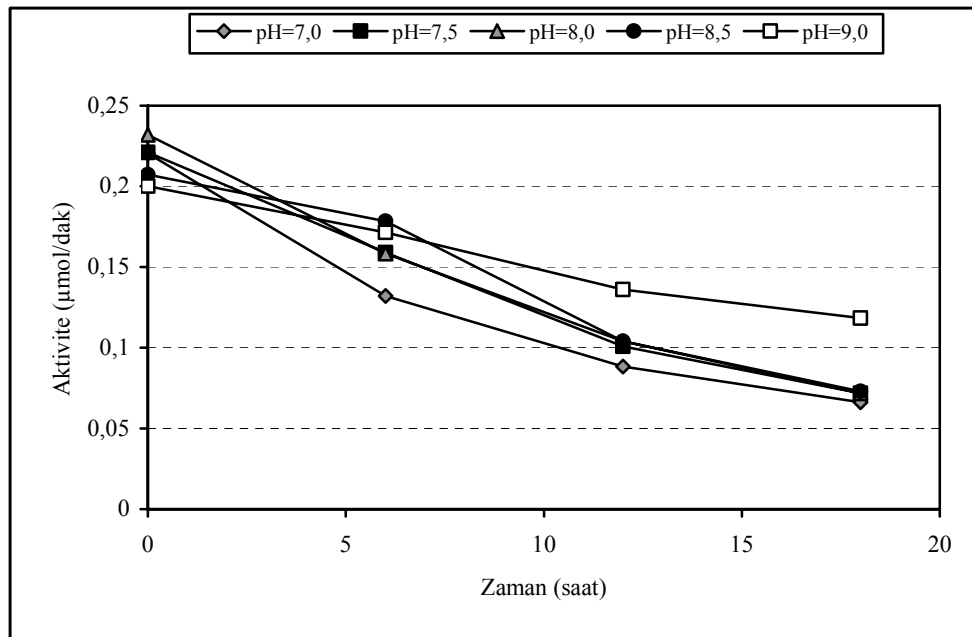
Şekil 4.28. Gökkuşağı alabalık böbrek dokusu CA enziminin stabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 1M potasyum fosfat tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

Çizelge 4.23. Gökkuşağı alabalık kas dokusu CA enziminin stabil pH'sı için 1M Tris-SO₄ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

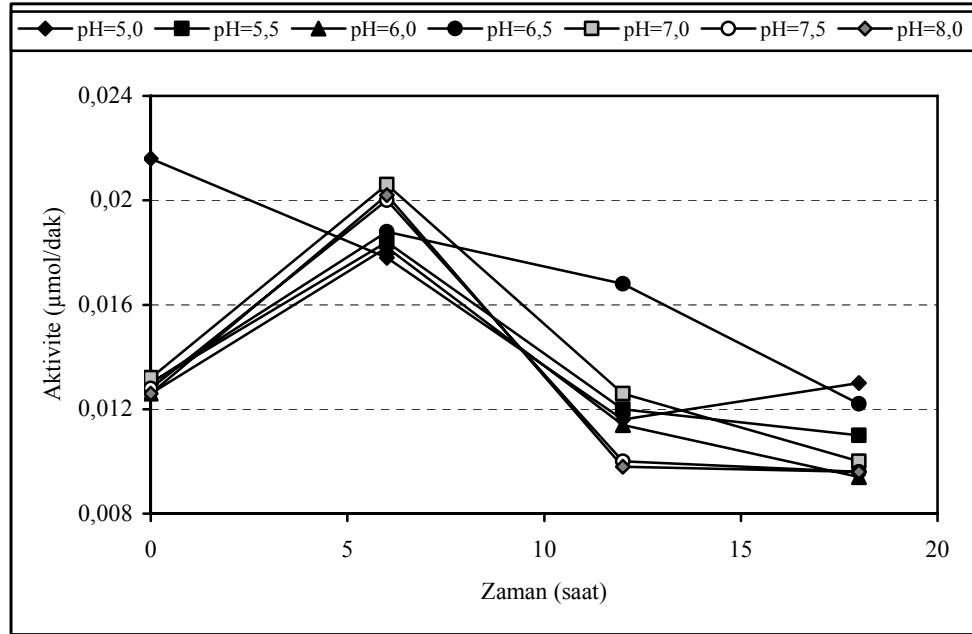
Zaman	(pH=7,0) Aktivite (EÜ/ml)	(pH=7,5) Aktivite (EÜ/ml)	(pH=8,0) Aktivite (EÜ/ml)	(pH=8,5) Aktivite (EÜ/ml)	(pH=9,0) Aktivite (EÜ/ml)
0. saat	0,2204	0,221	0,232	0,2072	0,2
6. saat	0,132	0,159	0,1584	0,1784	0,1714
12. saat	0,0884	0,1008	0,104	0,104	0,106
18. saat	0,0662	0,0718	0,0718	0,073	0,0764

Çizelge 4.24. Gökkuşığı alabalık kas dokusu CA enziminin stabil pH'sı için 1M potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

Zaman	(pH=5,0) Aktivite (EÜ/ml)	(pH=5,5) Aktivite (EÜ/ml)	(pH=6,0) Aktivite (EÜ/ml)	(pH=6,5) Aktivite (EÜ/ml)	(pH=7,0) Aktivite (EÜ/ml)	(pH=7,5) Aktivite (EÜ/ml)	(pH=8,0) Aktivite (EÜ/ml)
0. saat	0,0216	0,013	0,0126	0,013	0,0132	0,0128	0,0126
6. saat	0,0178	0,0184	0,0182	0,0188	0,0206	0,02	0,0202
12. saat	0,0116	0,012	0,0114	0,0088	0,0096	0,01	0,0098
18. saat	0,018	0,018	0,0204	0,0192	0,018	0,0196	0,0196



Şekil 4.29. Gökkuşığı alabalık kas dokusu CA enziminin stabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 1M Tris-SO₄ tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları



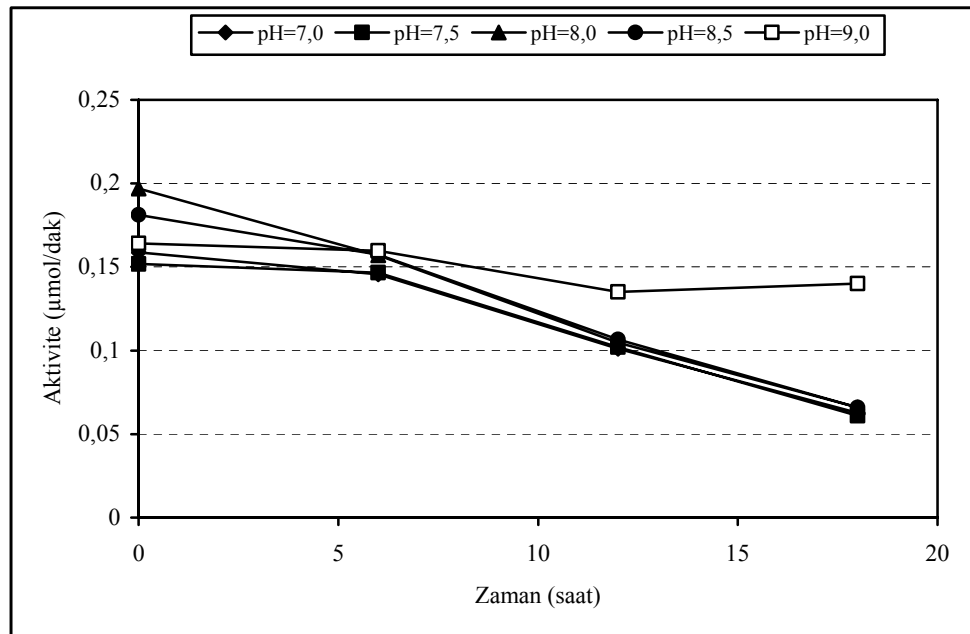
Şekil 4.30. Gökkuşağı alabalık kas dokusu CA enziminin stabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 1M potasyum fosfat tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

Çizelge 4.25. Gökkuşağı alabalık beyin dokusu CA enziminin stabil pH'sı için 1M Tris-SO₄ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

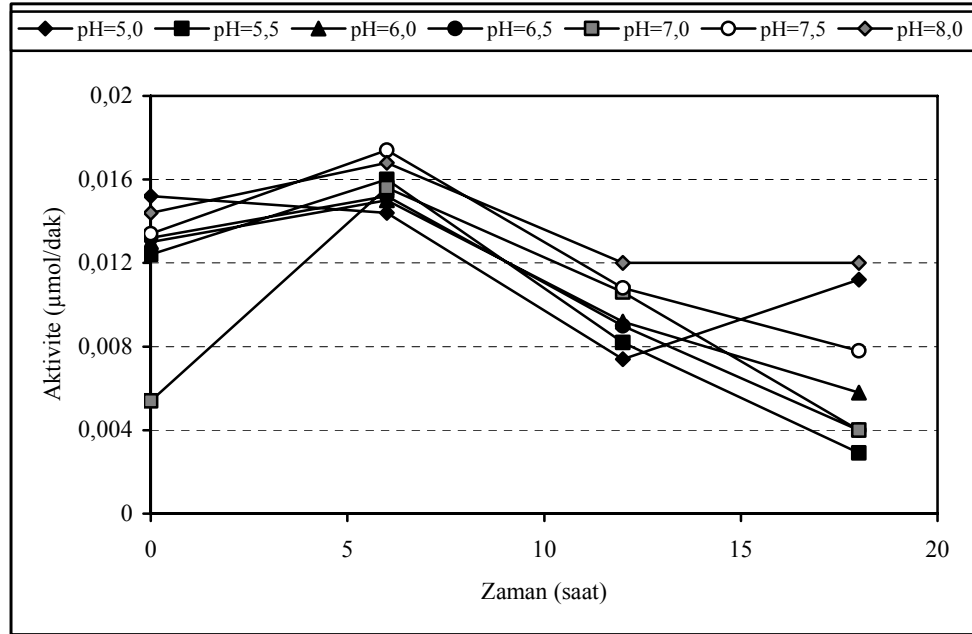
Zaman	(pH=7,0) Aktivite (EÜ/ml)	(pH=7,5) Aktivite (EÜ/ml)	(pH=8,0) Aktivite (EÜ/ml)	(pH=8,5) Aktivite (EÜ/ml)	(pH=9,0) Aktivite (EÜ/ml)
0. saat	0,1588	0,1518	0,197	0,1812	0,1642
6. saat	0,1456	0,1466	0,157	0,1574	0,1576
12. saat	0,101	0,102	0,1048	0,1066	0,11
18. saat	0,0626	0,061	0,066	0,066	0,0704

Çizelge 4.26. Gökkuşığı alabalık beyin dokusu CA enziminin stabil pH'sı için 1M potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

Zaman	(pH=5,0) Aktivite (EÜ/ml)	(pH=5,5) Aktivite (EÜ/ml)	(pH=6,0) Aktivite (EÜ/ml)	(pH=6,5) Aktivite (EÜ/ml)	(pH=7,0) Aktivite (EÜ/ml)	(pH=7,5) Aktivite (EÜ/ml)	(pH=8,0) Aktivite (EÜ/ml)
0. saat	0,0152	0,0124	0,013	0,0132	0,0054	0,0134	0,0144
6. saat	0,0144	0,016	0,015	0,0152	0,0156	0,0174	0,0168
12. saat	0,0074	0,0082	0,0092	0,009	0,0106	0,0108	0,012
18. saat	0,0182	0,019	0,0198	0,0204	0,0204	0,0198	0,02



Şekil 4.31. Gökkuşığı alabalık beyin dokusu CA enziminin stabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 1M Tris-SO₄ tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları



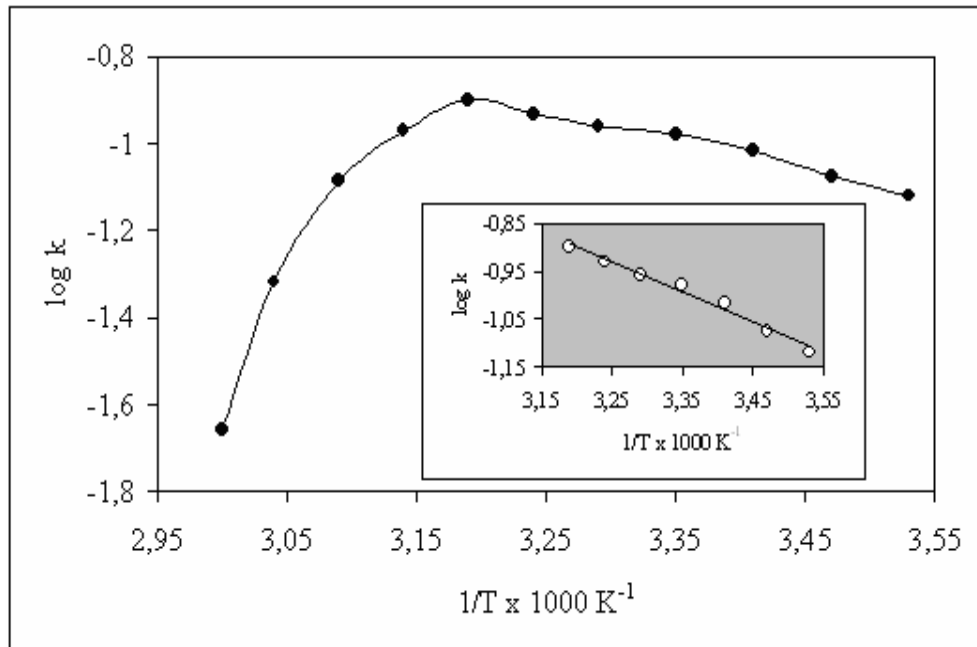
Şekil 4.32. Gökkuşığı alabalık beyin dokusu CA enziminin stabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 1M potasyum fosfat tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

4.2.7. Gökkuşığı alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokuları karbonik anhidraz enzimleri için optimum sıcaklık, aktivasyon enerjisi (E_a), aktivasyon entalpisi (ΔH) ve Q_{10} değerlerinin belirlenmesi

Alabalık karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokuları karbonik anhidraz enzimlerinin optimum sıcaklık çalışmaları Bölüm 3.5.4'de anlatıldığı şekilde; 20°C ile 60°C arasında yapıldı ve her 5°C'de enzimlerin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak belirlendi. Alabalık karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokuları için optimum sıcaklık 40°C olarak belirlendi. Elde edilen aktivite değerlerinin logaritmaları alınarak bütün dokular için ayrı ayrı log k-1/T grafikleri çizildi. Bu grafikten faydalanılarak Arheniüs eğrisi elde edildi ve buradan her bir doku için E_a , ΔH ve Q_{10} değerleri hesaplandı (Şekil 4.33-4.36) (Çizelge 4.27-4.31).

Çizelge 4.27. Gökkuşuğu alabalık karaciğer dokusu için değişik sıcaklıklarda yapılan % aktivite değerleri (25⁰C’deki aktivite değeri %100 olarak alındı)

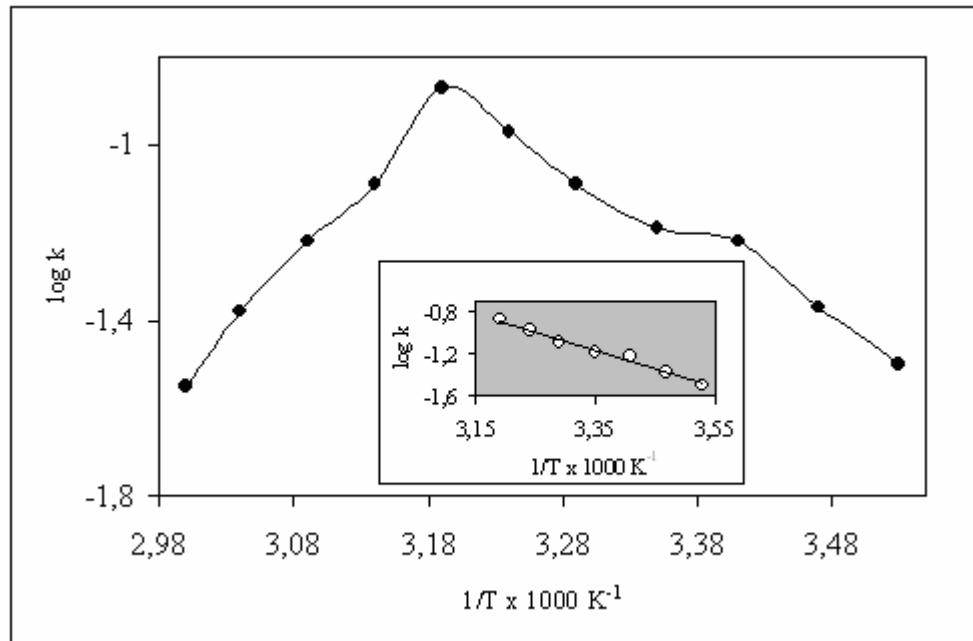
Sıcaklık (⁰ C)	% Aktivite
20	83,33
25	100,00
30	114,28
35	130,95
40	137,62
45	128,80
50	97,14
55	85,71
60	69,05



Şekil 4.33. Gökkuşuğu alabalık karaciğer CA enziminin aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişim grafiği

Çizelge 4.28. Gökkuşuğu alabalık böbrek dokusu için değişik sıcaklıklarda yapılan % aktivite değerleri (25⁰C'deki aktivite değeri %100 olarak alındı)

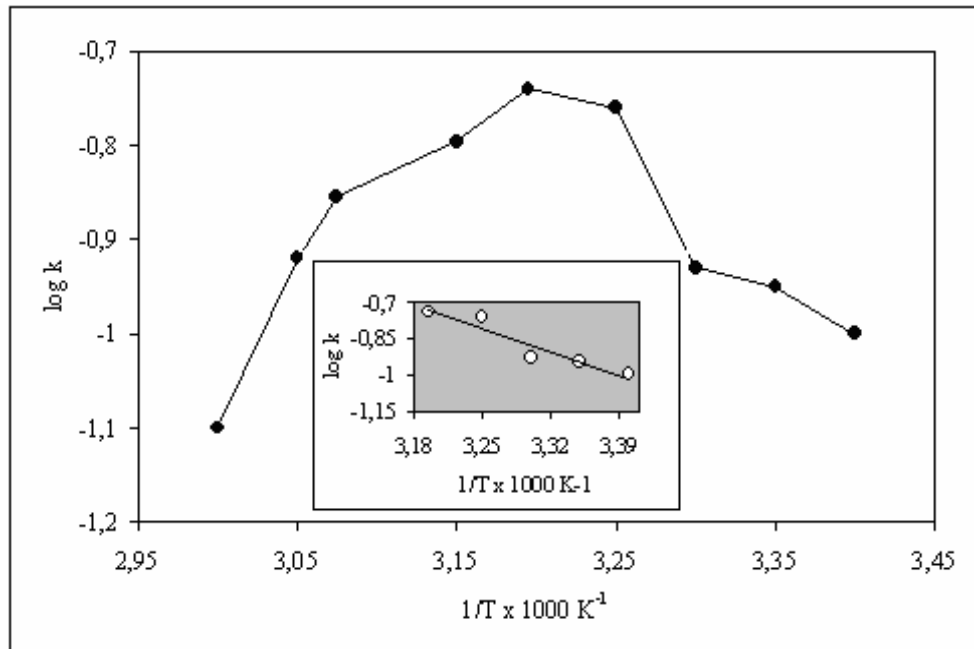
Sıcaklık (⁰ C)	% Aktivite
20	93,75
25	100,00
30	125,00
35	165,63
40	209,38
45	125,00
50	93,75
55	64,06
60	43,75



Şekil 4.34. Gökkuşuğu alabalık böbrek CA enziminin aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişim grafiği

Çizelge 4.29. Gökkuşuğu alabalık kas dokusu için değişik sıcaklıklarda yapılan % aktivite değerleri (25⁰C'deki aktivite değeri %100 olarak alındı)

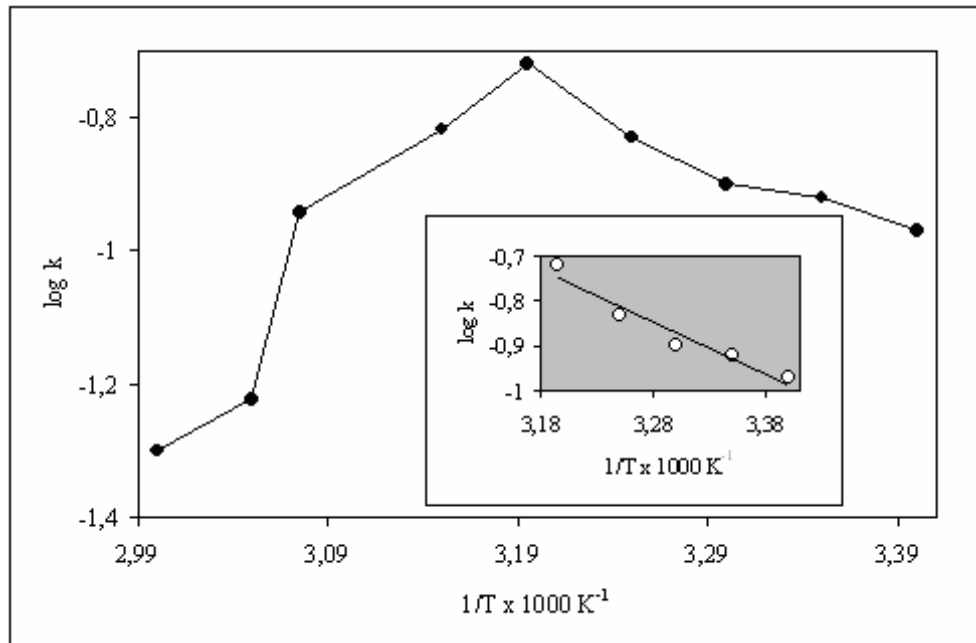
Sıcaklık (⁰ C)	% Aktivite
20	92,59
25	100,00
30	111,11
35	125,92
40	129,62
45	118,51
50	103,70
55	88,89
60	59,25



Şekil 4.35. Gökkuşuğu alabalık kas CA enziminin aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişim grafiği

Çizelge 4.30. Gökkuşuğu alabalık beyin dokusu için değişik sıcaklıklarda yapılan % aktivite değerleri (25⁰C’deki aktivite değeri %100 olarak alındı)

Sıcaklık (⁰ C)	% Aktivite
20	87,00
25	100,00
30	108,00
35	119,35
40	135,48
45	122,58
50	91,93
55	48,38
60	40,32



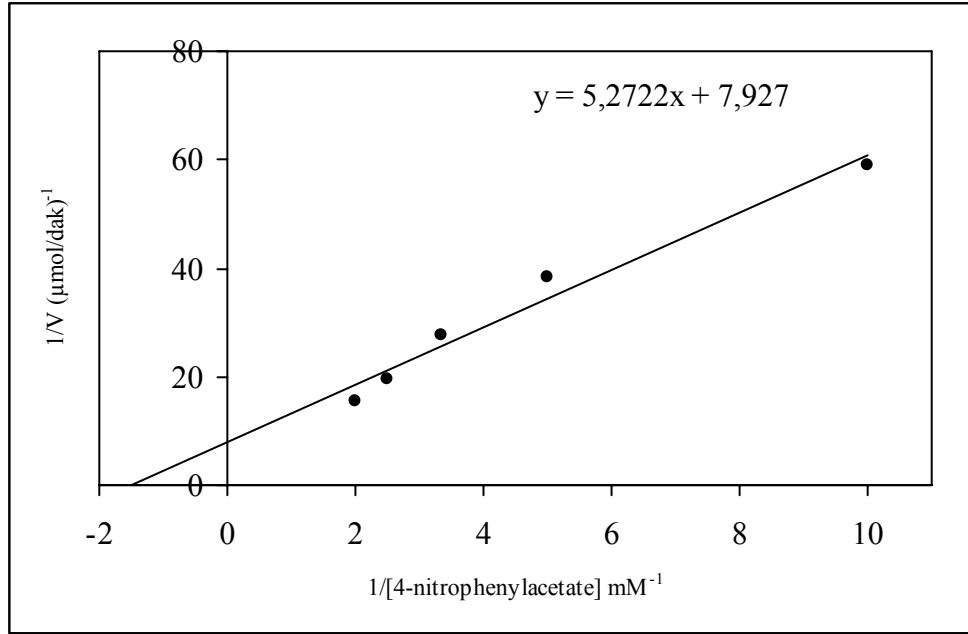
Şekil 4.36. Gökkuşuğu alabalık beyin CA enziminin aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişim grafiği

Çizelge 4.31. Gökkuşığı alabalık dokuları CA enzimleri için optimum sıcaklık, E_a , ΔH ve Q_{10} tayini sonuçları

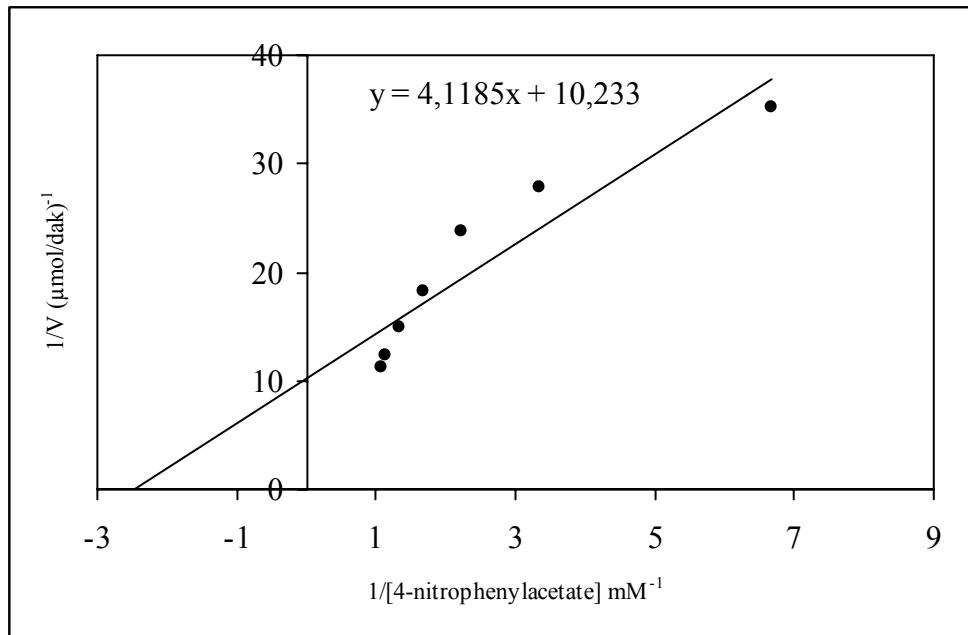
Enzim	Dokular	Optimum Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)	Aktivasyon Enerjisi (E_a) (kcal/mol)	Aktivasyon Entalpisi (ΔH) (kcal/mol)	Q_{10}
Karbonik Anhidraz (CA)	Karaciğer	40	2,88	2,28	1,53
	Böbrek	40	8,05	7,458	1,675
	Kas	40	6,363	5,77	1,56
	Beyin	40	5,32	4,78	1,51

4.2.8 p-Nitrofenilasetat substratı için K_m , $V_{\max}$, k_{cat} ve özgülük sabiti (V_0) değerlerinin belirlenmesi

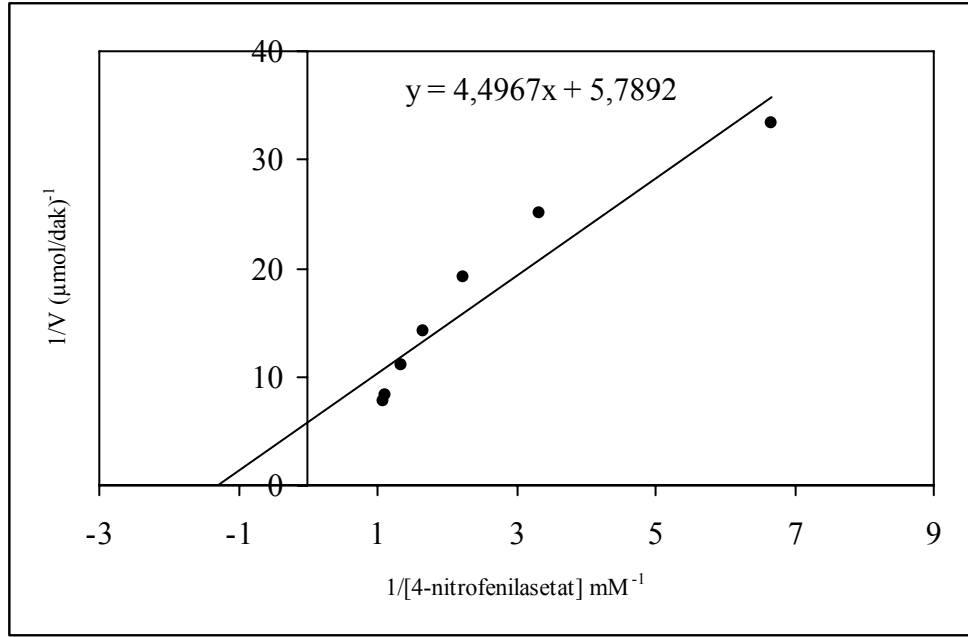
Alabalık karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokuları karbonik anhidraz enzimleri için ayrı ayrı p-nitrofenilasetat substratı ile K_m ve $V_{\max}$ çalışmaları, Bölüm 3.5.5’de anlatıldığı şekilde yapıldı. Daha sonra alabalık karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokuları ile ilgili p-nitrofenilasetat substratı için ayrı ayrı Lineweaver-Burk grafikleri hazırlandı ve bu grafiklerden K_m ve $V_{\max}$ değerleri bulundu (Şekil 4.37-4.40). Daha sonra buluna K_m ve $V_{\max}$ değerleri kullanılarak enzimin p-nitrofenilasetat substratı için turnover sayısını gösteren k_{cat} değeri hesaplandı ve buradan enzimin özgülük sabiti değeri V_0 tespit edildi. Bu değerler Çizelge 4.32 verildi.



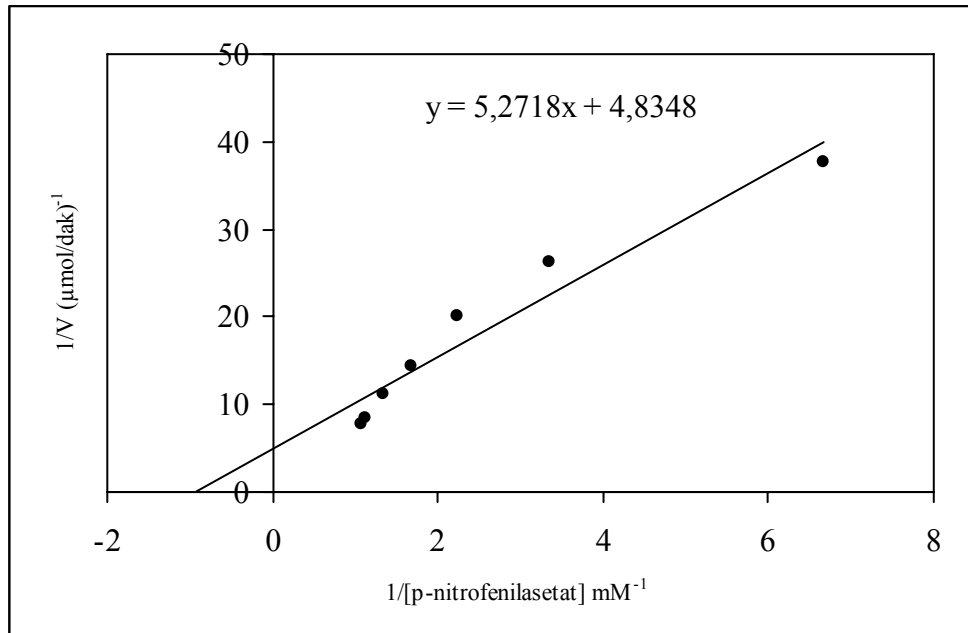
Şekil 4.37. Gökkuşağı alabalık karaciğer CA enzimi için 5 farklı p-nitrofenilasetat konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.38. Gökkuşağı alabalık böbrek CA enzimi için 7 farklı p-nitrofenilasetat konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.39. Gökkuşağı alabalık kas CA enzimi için 7 farklı p-nitrofenilasetat konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.40. Gökkuşağı alabalık beyin CA enzimi için 7 farklı p-nitrofenilasetat konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.32. Gökkuşığı alabalık dokuları CA enzimleri için p-nitrofenilasetat substratı ile K_M , V_{max} , k_{cat} ve V_0 çalışmaları sonuçları.

Enzim	Substrat	Dokular	K_M (mM)	V_{max} (EÜ/ml)	k_{cat} (s ⁻¹)	V_0 (M ⁻¹ .s ⁻¹)
Karbonik Anhidraz (CA)	p-Nitrofenilasetat	Karaciğer	0,66	0,126	32,8	$5,0.10^4$
		Böbrek	0,40	0,097	15,2	$4,0.10^4$
		Kas	1,29	0,173	28,8	$2,2.10^4$
		Beyin	0,92	0,207	43,6	$4,7.10^4$

4.2.9. Bazı ağır metallerin gökkuşığı alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokuları karbonik anhidraz enzimleri aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin sonuçları

Gökkuşığı alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokularından Sepharose 4B-L tirozin sülfanilamid afinite kromatografisi ile saflaştırılan karbonik anhidraz enzimleri için Bölüm 3.5.6'de anlatıldığı şekilde, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, AgNO_3 ve $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ maddelerinin stok çözeltileri hazırlandı ve Bölüm 3.1.3 verildi. Gökkuşığı alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin CA enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren yukarıda adı geçen kimyasal maddeler ile ilgili konsantrasyonlar ve % aktivite değerleri karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokuları için sırasıyla Çizelge 4.33-4.37, Çizelge 4.39- 4.43, Çizelge 4.45- 4.49 ve Çizelge 4.51- 4.55'de verildi. Daha sonra CA enzimleri üzerinde inhibisyon etkileri araştırıldı. Karaciğer CA enzimi için elde edilen sonuçlar Şekil 4.41-4.45, böbrek CA enzimi için elde edilen sonuçlar Şekil 4.46-4.50, kas CA enzimi için elde edilen sonuçlar Şekil 4.51-4.55 ve beyin CA enzimi için elde edilen sonuçlar Şekil 4.56-4.60'da verildi. Son olarak IC_{50} değerleri karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokuları için sırasıyla Çizelge 4.39, Çizelge 4.44 Çizelge 4.50 ve Çizelge 4.56'de verildi.

Çizelge 4.33. Gökkuşığı alabalık karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine kobalt iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen kobalt iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri

Substrat (μ l)	Tris-SO ₄ tamponu (μ l)	Enzim (μ l)	Saf su (μ l)	Toplam Hacim (μ l)	[I] (mM)	% Aktivite
333	467	33	167	1000	-	100
333	467	33	157	1000	10^{-3}	71,8
333	467	33	157	1000	10^{-2}	61,5
333	467	33	157	1000	10^{-1}	51,2
333	467	33	157	1000	1	18,8
333	467	33	157	1000	10	2,56

Çizelge 4.34. Gökkuşığı alabalık karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine bakır iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen bakır iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri

Substrat (μ l)	Tris-SO ₄ tamponu (μ l)	Enzim (μ l)	Saf su (μ l)	Toplam Hacim (μ l)	[I] (mM)	% Aktivite
333	467	33	167	1000	-	100
333	467	33	157	1000	10^{-2}	93,75
333	467	33	157	1000	1	87,5
333	467	33	157	1000	10	75
333	467	33	147	1000	20	60
333	467	33	137	1000	30	50,5
333	467	33	127	1000	40	35
333	467	33	117	1000	50	25
333	467	33	107	1000	60	15

Çizelge 4.35. Gökkuşığı alabalık karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine çinko iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen çinko iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri

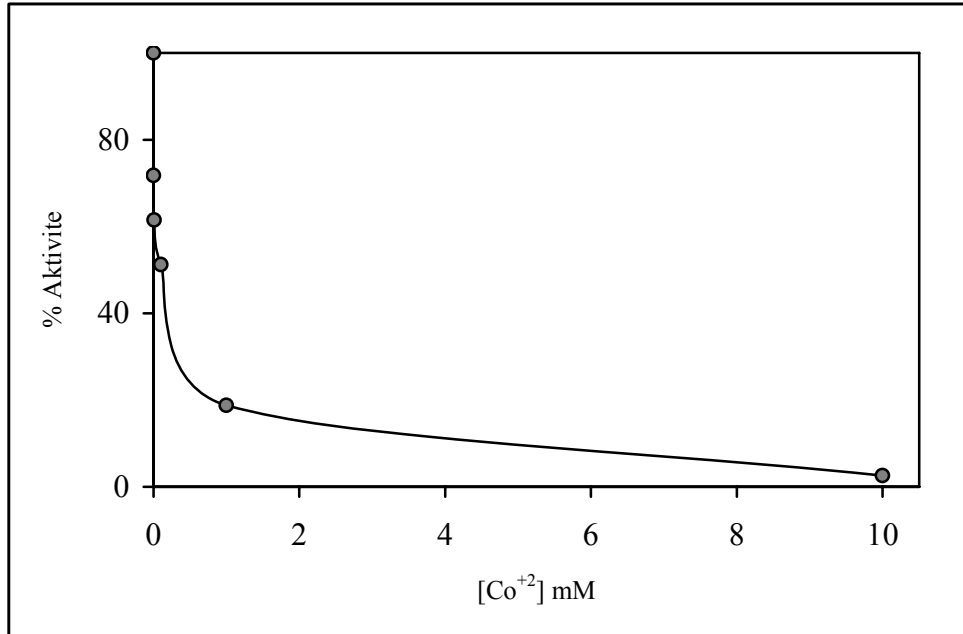
Substrat (μ l)	Tris-SO ₄ tamponu (μ l)	Enzim (μ l)	Saf su (μ l)	Toplam Hacim (μ l)	[I] (mM)	% Aktivite
333	467	33	167	1000	-	100
333	467	33	157	1000	10^{-3}	93,2
333	467	33	157	1000	10^{-2}	88
333	467	33	157	1000	10^{-1}	84
333	467	33	157	1000	1	83
333	467	33	157	1000	10	74
333	467	33	147	1000	20	26

Çizelge 4.36. Gökkuşığı alabalık karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine gümüş iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen gümüş iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri

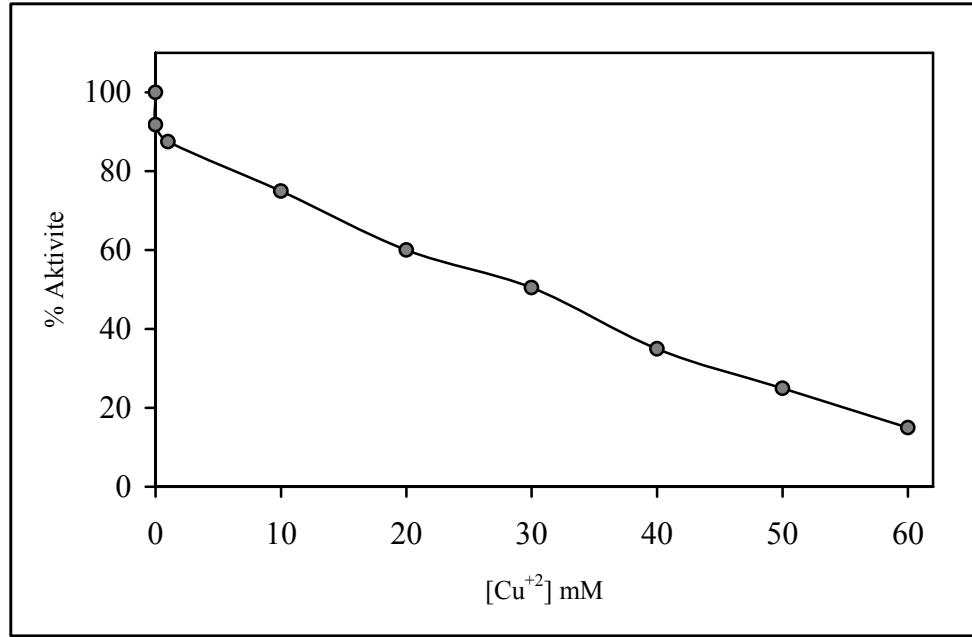
Substrat (μ l)	Tris-SO ₄ tamponu (μ l)	Enzim (μ l)	Saf su (μ l)	Toplam Hacim (μ l)	[I] (mM)	% Aktivite
333	467	33	167	1000	-	100
333	467	33	157	1000	10^{-3}	82,5
333	467	33	157	1000	10^{-2}	47,5
333	467	33	157	1000	10^{-1}	45
333	467	33	157	1000	1	40
333	467	33	157	1000	10	35

Çizelge 4.37. Gökkuşığı alabalık karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine kadmiyum iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen kadmiyum iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri

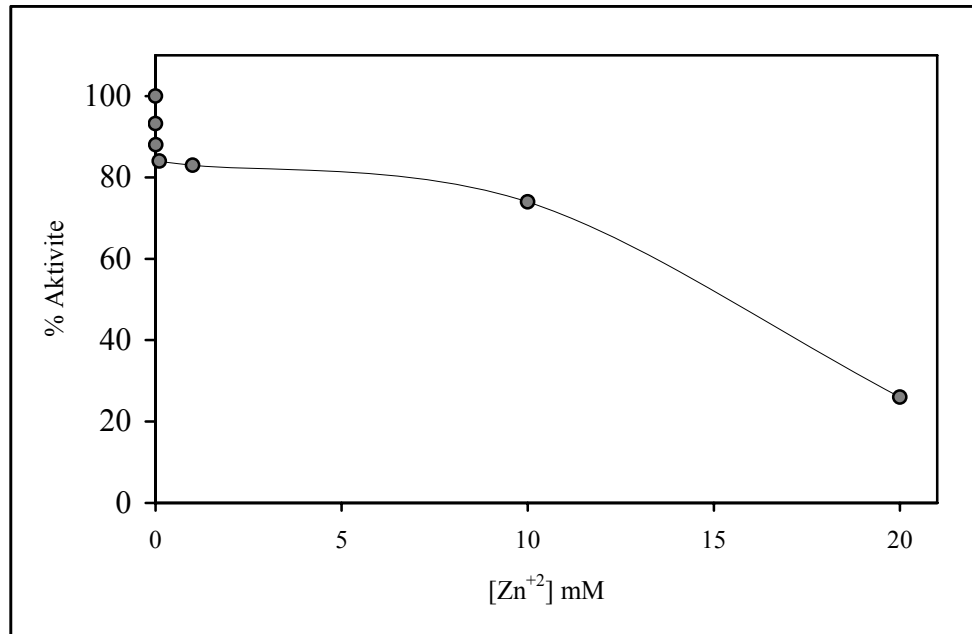
Substrat (μ l)	Tris-SO ₄ tamponu (μ l)	Enzim (μ l)	Saf su (μ l)	Toplam Hacim (μ l)	[I] (mM)	% Aktivite
333	467	33	167	1000	-	100
333	467	33	157	1000	10^{-3}	88,2
333	467	33	157	1000	10^{-2}	79,4
333	467	33	157	1000	10^{-1}	69,1
333	467	33	157	1000	1	64,7
333	467	33	157	1000	10	58,8
333	467	33	147	1000	20	33,8
333	467	33	137	1000	30	31,7



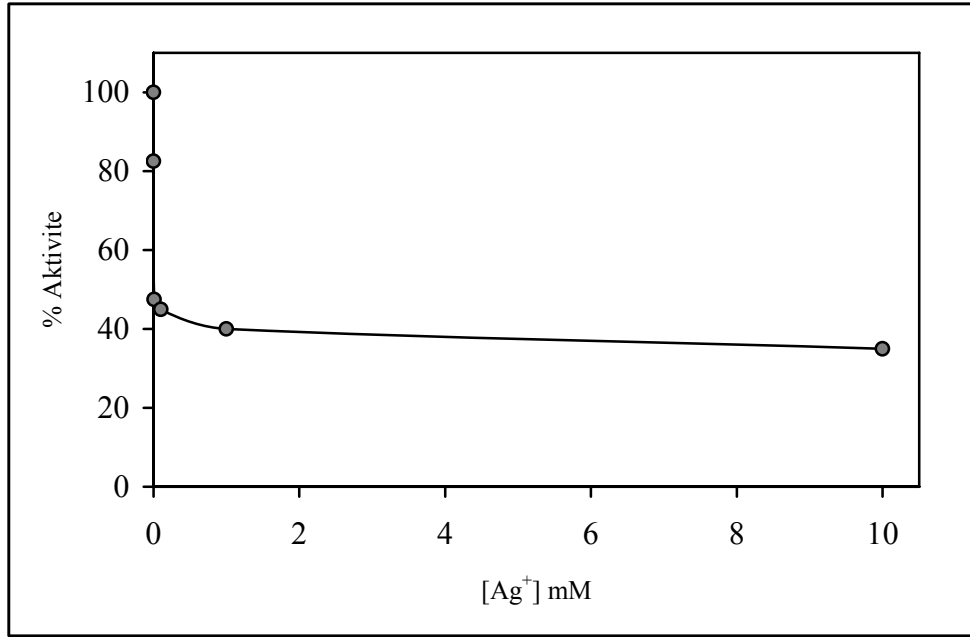
Şekil 4.41. Gökkuşığı alabalık karaciğer dokusu CA enzimi için 5 farklı Co²⁺ konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Co²⁺] grafiği



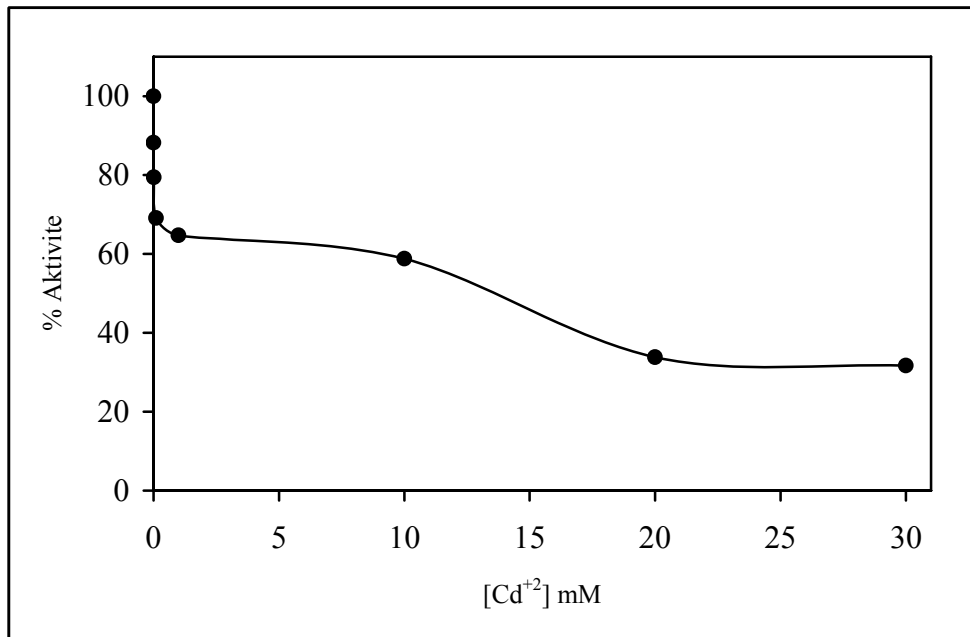
Şekil 4.42. Gökkuşığı alabalık karaciğer dokusu CA enzimi için 8 farklı Cu^{+2} konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[\text{Cu}^{+2}]$ grafiği



Şekil 4.43. Gökkuşığı alabalık karaciğer dokusu CA enzimi için 6 farklı Zn^{+2} konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[\text{Zn}^{+2}]$ grafiği



Şekil 4.44. Gökkuşığı alabalık karaciğer dokusu CA enzimi için 5 farklı Ag^+ konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[\text{Ag}^+]$ grafiği



Şekil 4.45. Gökkuşığı alabalık karaciğer dokusu CA enzimi için 7 farklı Cd^{+2} konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[\text{Cd}^{+2}]$ grafiği

Çizelge 4.38. Gökkuşığı alabalık karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin esterase aktivitesi üzerine metal iyonları ile yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen IC₅₀ değerleri

Kimyasal Madde Türü	IC ₅₀ (mM)
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,03
CuSO ₄ .5H ₂ O	30,0
ZnSO ₄ .7H ₂ O	47,1
AgNO ₃	0,01
CdCl ₂ .H ₂ O	15

Çizelge 4.39. Gökkuşığı alabalık böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin esterase aktivitesi üzerine kobalt iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen kobalt iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri

Substrat (µl)	Tris-SO ₄ tamponu (µl)	Enzim (µl)	Saf su (µl)	Toplam Hacim (µl)	[I] (mM)	% Aktivite
333	467	33	167	1000	-	100
333	467	33	157	1000	10 ⁻³	78,5
333	467	33	157	1000	10 ⁻²	67,29
333	467	33	157	1000	10 ⁻¹	56,07
333	467	33	157	1000	1	46,73
333	467	33	157	1000	10	37,78
333	467	33	147	1000	20	24,29
333	467	33	137	1000	30	5,23

Çizelge 4.40. Gökkuşuğu alabalık böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine bakır iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen bakır iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri

Substrat (μ l)	Tris-SO ₄ tamponu (μ l)	Enzim (μ l)	Saf su (μ l)	Toplam Hacim (μ l)	[I] (mM)	% Aktivite
333	467	33	167	1000	-	100
333	467	33	157	1000	1	65,42
333	467	33	157	1000	10	56,07
333	467	33	147	1000	20	54,2
333	467	33	137	1000	30	52,34
333	467	33	127	1000	40	50,47
333	467	33	117	1000	50	46,73
333	467	33	107	1000	60	44,86

Çizelge 4.41. Gökkuşuğu alabalık böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine çinko iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen çinko iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri

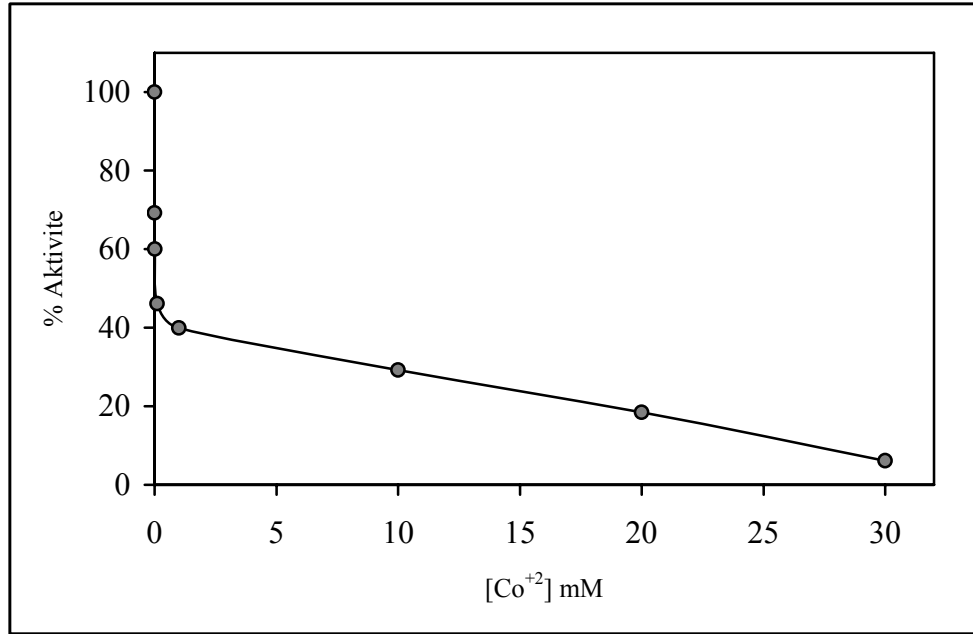
Substrat (μ l)	Tris-SO ₄ tamponu (μ l)	Enzim (μ l)	Saf su (μ l)	Toplam Hacim (μ l)	[I] (mM)	% Aktivite
333	467	33	167	1000	-	100
333	467	33	157	1000	10^{-3}	93,46
333	467	33	157	1000	10^{-2}	87,85
333	467	33	157	1000	10^{-1}	74,76
333	467	33	157	1000	1	68,22
333	467	33	157	1000	10	46,73
333	467	33	147	1000	20	24,3
333	467	33	137	1000	30	18,69
333	467	33	127	1000	40	7,47

Çizelge 4.42. Gökkuşığı alabalık böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine gümüş iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen gümüş iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri

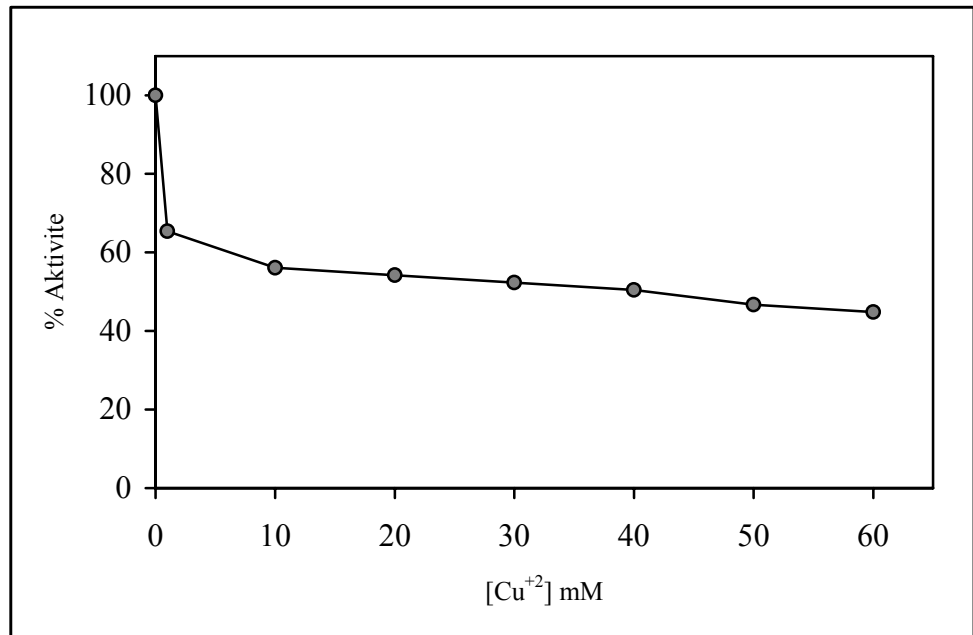
Substrat (μ l)	Tris-SO ₄ tamponu (μ l)	Enzim (μ l)	Saf su (μ l)	Toplam Hacim (μ l)	[I] (mM)	% Aktivite
333	467	33	167	1000	-	100
333	467	33	117	1000	50	72,89
333	467	33	107	1000	60	67,29
333	467	33	97	1000	70	63,55
333	467	33	87	1000	80	59,81
333	467	33	77	1000	90	54,2
333	467	33	67	1000	100	46,73
333	467	33	-	1000	200	31,77

Çizelge 4.43. Gökkuşığı alabalık böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine kadmiyum iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen kadmiyum iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri

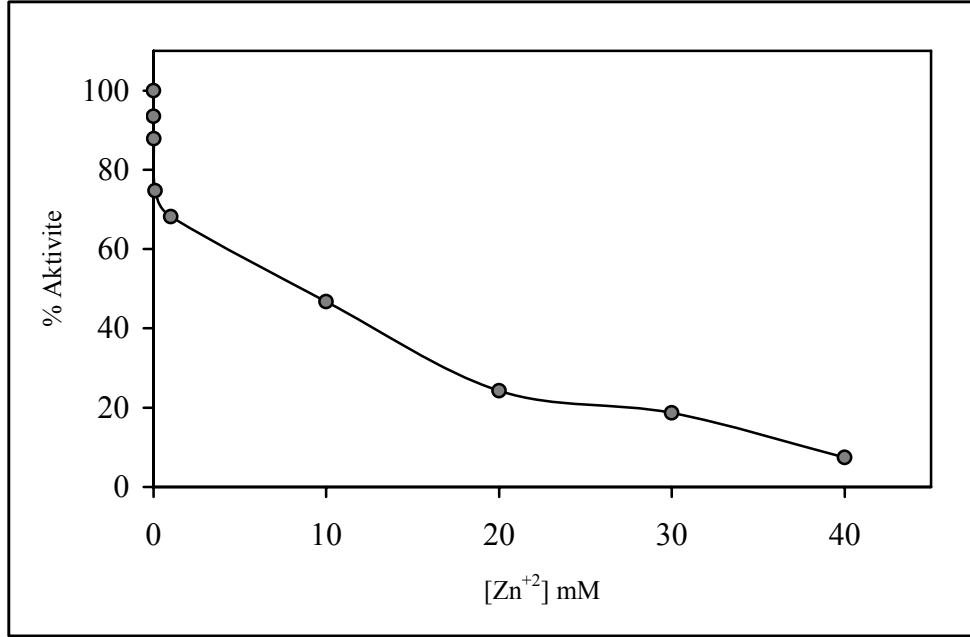
Substrat (μ l)	Tris-SO ₄ tamponu (μ l)	Enzim (μ l)	Saf su (μ l)	Toplam Hacim (μ l)	[I] (mM)	% Aktivite
333	467	33	167	1000	-	100
333	467	33	107	1000	60	78,85
333	467	33	97	1000	70	74,76
333	467	33	97	1000	80	68,09
333	467	33	77	1000	90	60,74
333	467	33	67	1000	100	55,46
333	467	33	-	1000	200	26,17



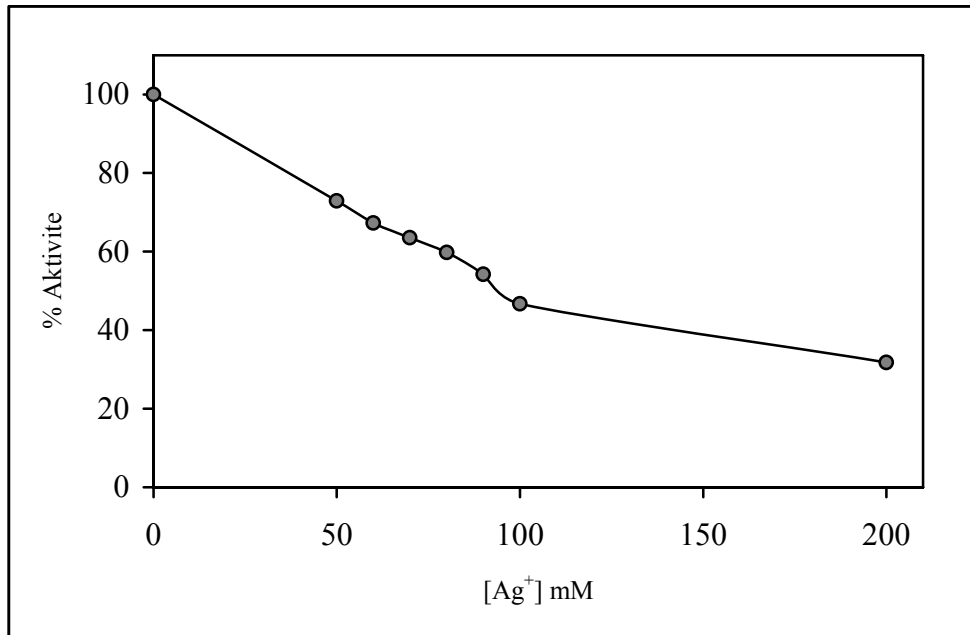
Şekil 4.46. Gökkuşağı alabalık böbrek dokusu CA enzimi için 7 farklı Co^{+2} konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[\text{Co}^{+2}]$ grafiği



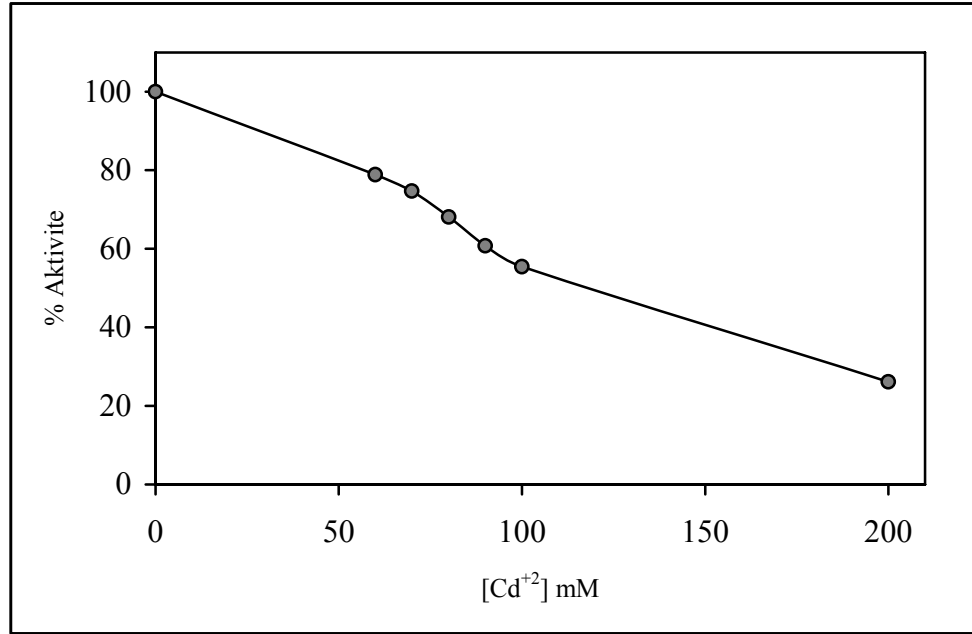
Şekil 4.47. Gökkuşağı alabalık böbrek dokusu CA enzimi için 7 farklı Cu^{+2} konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[\text{Cu}^{+2}]$ grafiği



Şekil 4.48. Gökkuşığı alabalık böbrek dokusu CA enzimi için 8 farklı Zn^{+2} konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[Zn^{+2}]$ grafiği



Şekil 4.49. Gökkuşığı alabalık böbrek dokusu CA enzimi için 7 farklı Ag^{+} konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[Ag^{+}]$ grafiği



Şekil 4.50. Gökkuşağı alabalık böbrek dokusu CA enzimi için 6 farklı Cd^{+2} konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[\text{Cd}^{+2}]$ grafiği

Çizelge 4.44. Gökkuşağı alabalık böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine metal iyonları ile yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen IC_{50} değerleri

Kimyasal Madde Türü	IC_{50} (mM)
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,075
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	34,20
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,850
AgNO_3	98,88
$\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	128,8

Çizelge 4.45. Gökkuşığı alabalık kas dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine kobalt iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen kobalt iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri

Substrat (μ l)	Tris-SO ₄ tamponu (μ l)	Enzim (μ l)	Saf su (μ l)	Toplam Hacim (μ l)	[I] (mM)	% Aktivite
333	467	33	167	1000	-	100
333	467	33	157	1000	10^{-3}	69,23
333	467	33	157	1000	10^{-2}	60
333	467	33	157	1000	10^{-1}	46,15
333	467	33	157	1000	1	39,92
333	467	33	157	1000	10	29,23
333	467	33	147	1000	20	18,46
333	467	33	137	1000	30	6,15

Çizelge 4.46. Gökkuşığı alabalık kas dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine bakır iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen bakır iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri

Substrat (μ l)	Tris-SO ₄ tamponu (μ l)	Enzim (μ l)	Saf su (μ l)	Toplam Hacim (μ l)	[I] (mM)	% Aktivite
333	467	33	167	1000	-	100
333	467	33	157	1000	1	90,47
333	467	33	157	1000	10	79,36
333	467	33	147	1000	20	63,49
333	467	33	127	1000	40	38,09
333	467	33	107	1000	60	20,63

Çizelge 4.47. Gökkuşığı alabalık kas dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine çinko iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen çinko iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri

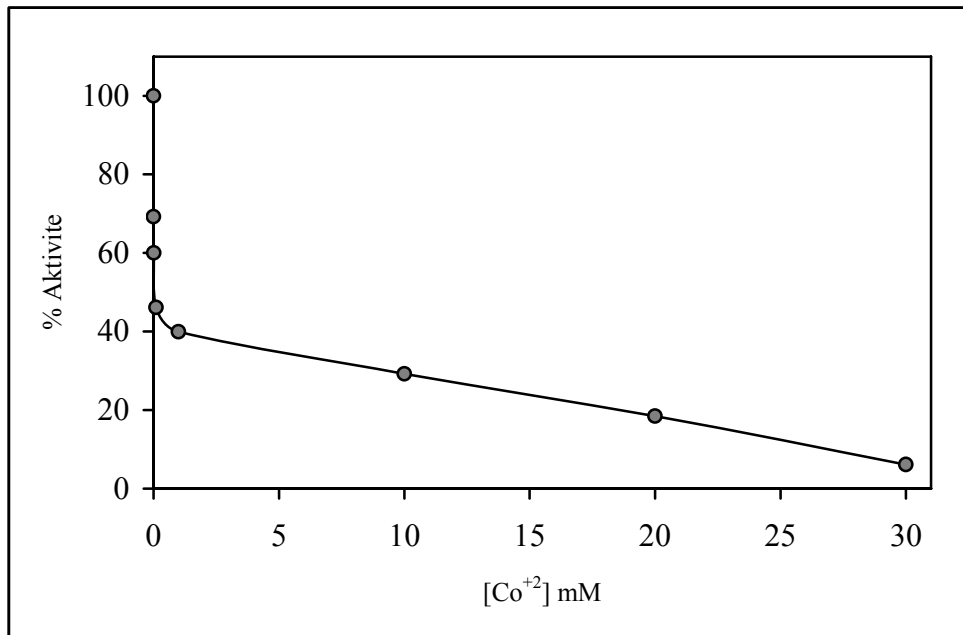
Substrat (μ l)	Tris-SO ₄ tamponu (μ l)	Enzim (μ l)	Saf su (μ l)	Toplam Hacim (μ l)	[I] (mM)	% Aktivite
333	467	33	167	1000	-	100
333	467	33	157	1000	10^{-3}	83,07
333	467	33	157	1000	10^{-2}	72,3
333	467	33	157	1000	10^{-1}	61,53
333	467	33	157	1000	1	58,46
333	467	33	157	1000	10	36,92
333	467	33	147	1000	20	16,92

Çizelge 4.48. Gökkuşığı alabalık kas dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine gümüş iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen gümüş iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri

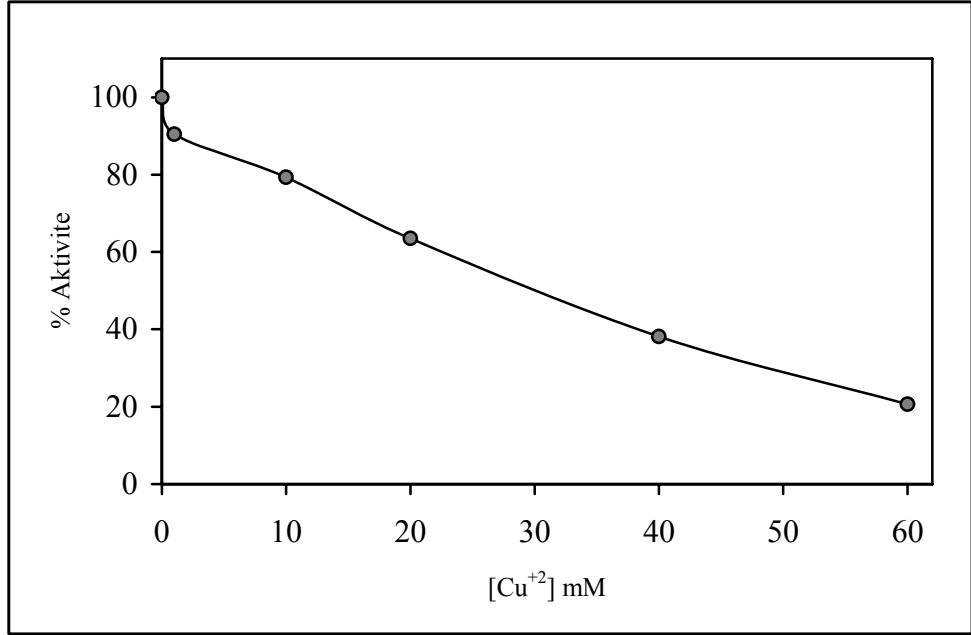
Substrat (μ l)	Tris-SO ₄ tamponu (μ l)	Enzim (μ l)	Saf su (μ l)	Toplam Hacim (μ l)	[I] (mM)	% Aktivite
333	467	33	167	1000	-	100
333	467	33	87	1000	80	90,07
333	467	33	77	1000	90	73,28
333	467	33	67	1000	100	65,64
333	467	33	17	1000	150	51,9
333	467	33	-	1000	200	33,58
333	467	33	-	1000	250	21,37

Çizelge 4.49. Gökkuşığı alabalık kas dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine kadmiyum iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen kadmiyum iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri

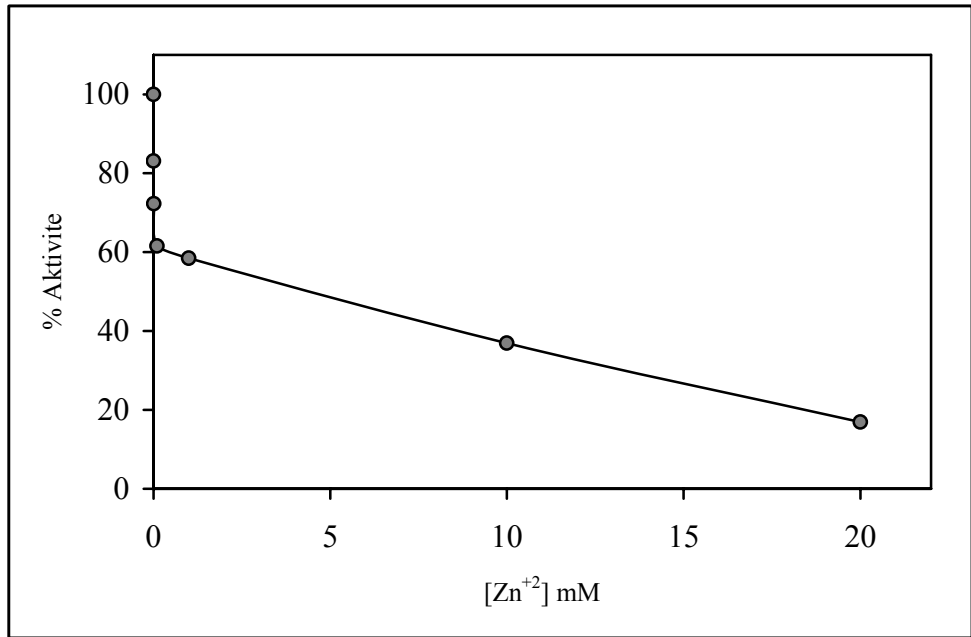
Substrat (μ l)	Tris-SO ₄ tamponu (μ l)	Enzim (μ l)	Saf su (μ l)	Toplam Hacim (μ l)	[I] (mM)	% Aktivite
333	467	33	167	1000	-	100
333	467	33	107	1000	60	89,23
333	467	33	97	1000	70	86,15
333	467	33	87	1000	80	73,84
333	467	33	77	1000	90	61,53
333	467	33	67	1000	100	44,61
333	467	33	-	1000	200	24,61



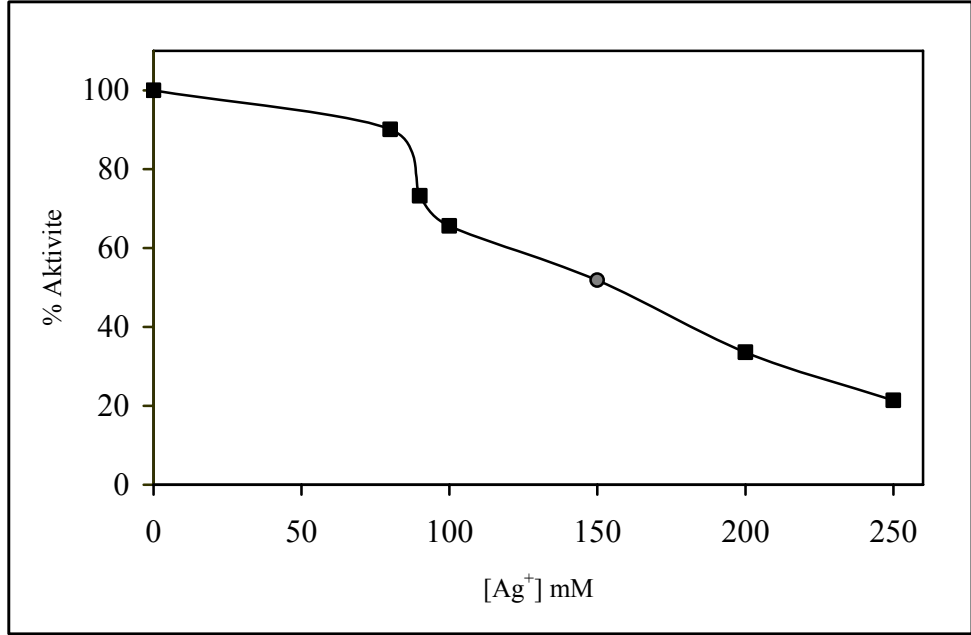
Şekil 4.51. Gökkuşığı alabalık kas dokusu CA enzimi için 7 farklı Co⁺² konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Co⁺²] grafiği



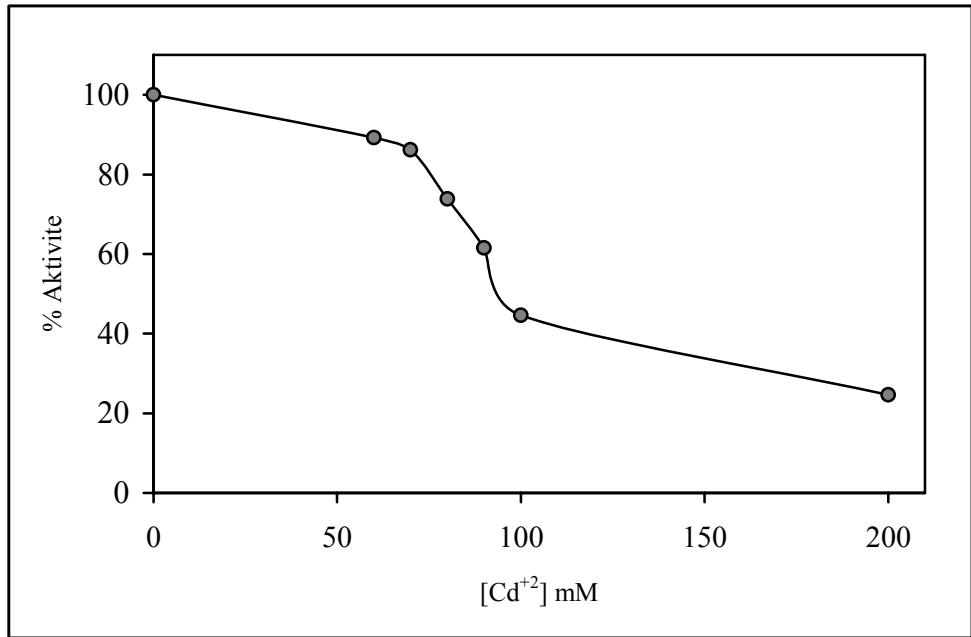
Şekil 4.52. Gökkuşığı alabalık kas dokusu CA enzimi için 5 farklı Cu^{+2} konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[\text{Cu}^{+2}]$ grafiği



Şekil 4.53. Gökkuşığı alabalık kas dokusu CA enzimi için 6 farklı Zn^{+2} konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[\text{Zn}^{+2}]$ grafiği



Şekil 4.54. Gökkuşığı alabalık kas dokusu CA enzimi için 6 farklı Ag^+ konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[Ag^+]$ grafiği



Şekil 4.55. Gökkuşığı alabalık kas dokusu CA enzimi için 6 farklı Cd^{+2} konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[Cd^{+2}]$ grafiği

Çizelge 4.50. Gökkuşığı alabalık kas dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine metal iyonları ile yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen IC₅₀ değerleri

Kimyasal Madde Türü	IC ₅₀ (mM)
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,099
CuSO ₄ .5H ₂ O	29,92
ZnSO ₄ .7H ₂ O	5,330
AgNO ₃	157,46
CdCl ₂ .H ₂ O	146,42

Çizelge 4.51. Gökkuşığı alabalık beyin dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine kobalt iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen kobalt iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri

Substrat (µl)	Tris-SO ₄ tamponu (µl)	Enzim (µl)	Saf su (µl)	Toplam Hacim (µl)	[I] (mM)	% Aktivite
333	467	33	167	1000	-	100
333	467	33	157	1000	10 ⁻³	68,75
333	467	33	157	1000	10 ⁻²	60,15
333	467	33	157	1000	10 ⁻¹	45,31
333	467	33	157	1000	1	34,37
333	467	33	157	1000	10	26,56
333	467	33	147	1000	20	17,18
333	467	33	137	1000	30	4,68

Çizelge 4.52. Gökkuşığı alabalık beyin dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine bakır iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen bakır iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri

Substrat (μ l)	Tris-SO ₄ tamponu (μ l)	Enzim (μ l)	Saf su (μ l)	Toplam Hacim (μ l)	[I] (mM)	% Aktivite
333	467	33	167	1000	-	100
333	467	33	157	1000	1	85,93
333	467	33	157	1000	10	75,78
333	467	33	147	1000	20	59,37
333	467	33	127	1000	40	34,37
333	467	33	107	1000	60	17,18

Çizelge 4.53. Gökkuşığı alabalık beyin dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine çinko iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen çinko iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri

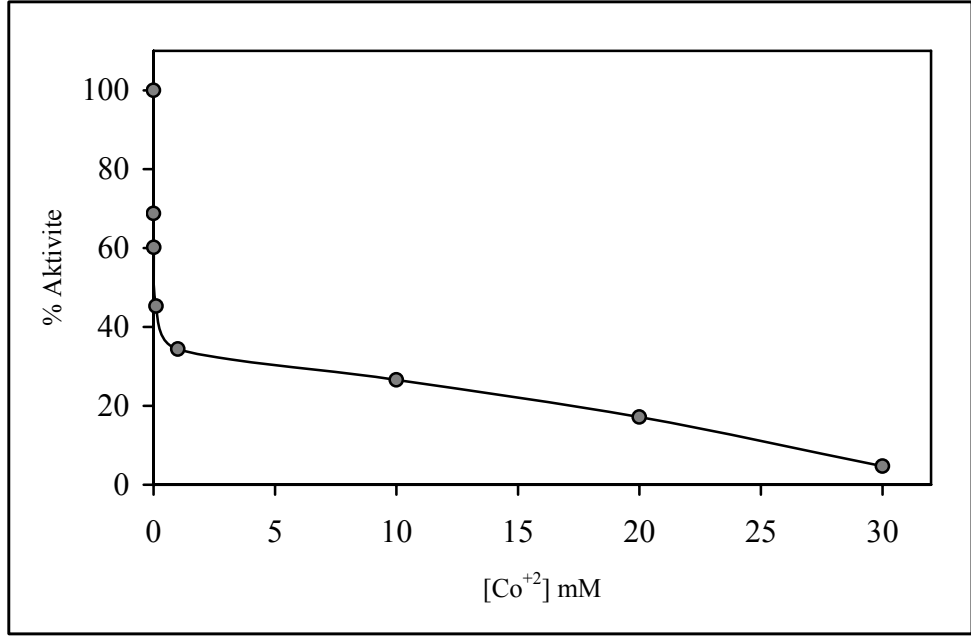
Substrat (μ l)	Tris-SO ₄ tamponu (μ l)	Enzim (μ l)	Saf su (μ l)	Toplam Hacim (μ l)	[I] (mM)	% Aktivite
333	467	33	167	1000	-	100
333	467	33	157	1000	10^{-3}	82,03
333	467	33	157	1000	10^{-2}	72,65
333	467	33	157	1000	10^{-1}	60,15
333	467	33	157	1000	1	48,43
333	467	33	157	1000	10	31,25
333	467	33	147	1000	20	15,62

Çizelge 4.54. Gökkuşuğu alabalık beyin dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine gümüş iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen gümüş iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri

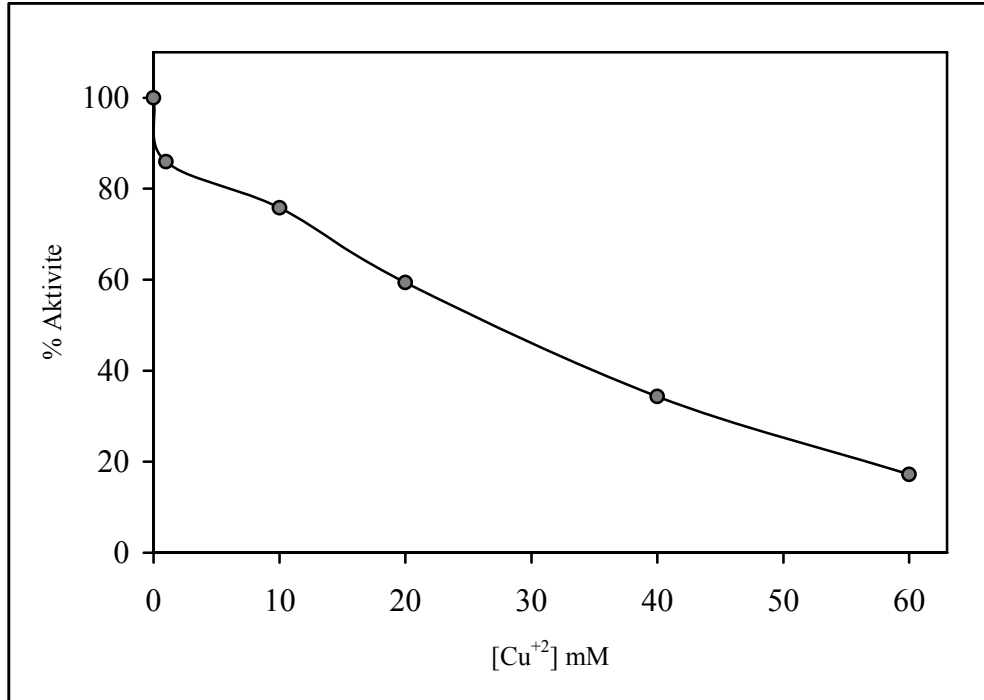
Substrat (μ l)	Tris-SO ₄ tamponu (μ l)	Enzim (μ l)	Saf su (μ l)	Toplam Hacim (μ l)	[I] (mM)	% Aktivite
333	467	33	167	1000	-	100
333	467	33	87	1000	80	85,93
333	467	33	77	1000	90	73,43
333	467	33	67	1000	100	64,06
333	467	33	17	1000	150	53,12
333	467	33	-	1000	200	32,03
333	467	33	-	1000	250	21,09

Çizelge 4.55. Gökkuşuğu alabalık beyin dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine kadmiyum iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen kadmiyum iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri

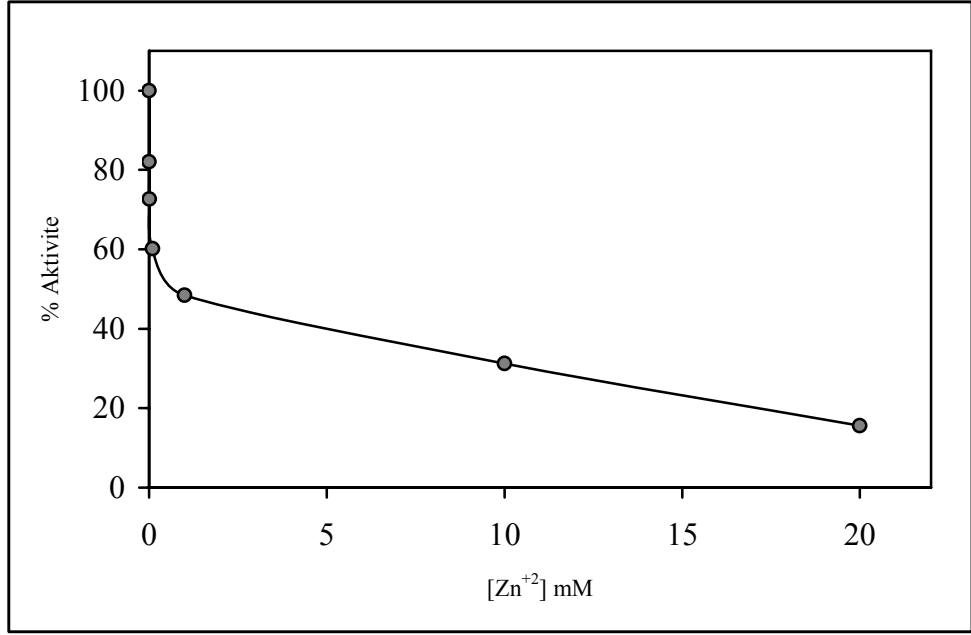
Substrat (μ l)	Tris-SO ₄ tamponu (μ l)	Enzim (μ l)	Saf su (μ l)	Toplam Hacim (μ l)	[I] (mM)	% Aktivite
333	467	33	167	1000	-	100
333	467	33	97	1000	70	55,15
333	467	33	97	1000	80	51,22
333	467	33	77	1000	90	45,93
333	467	33	67	1000	100	42,96
333	467	33	-	1000	200	23,43



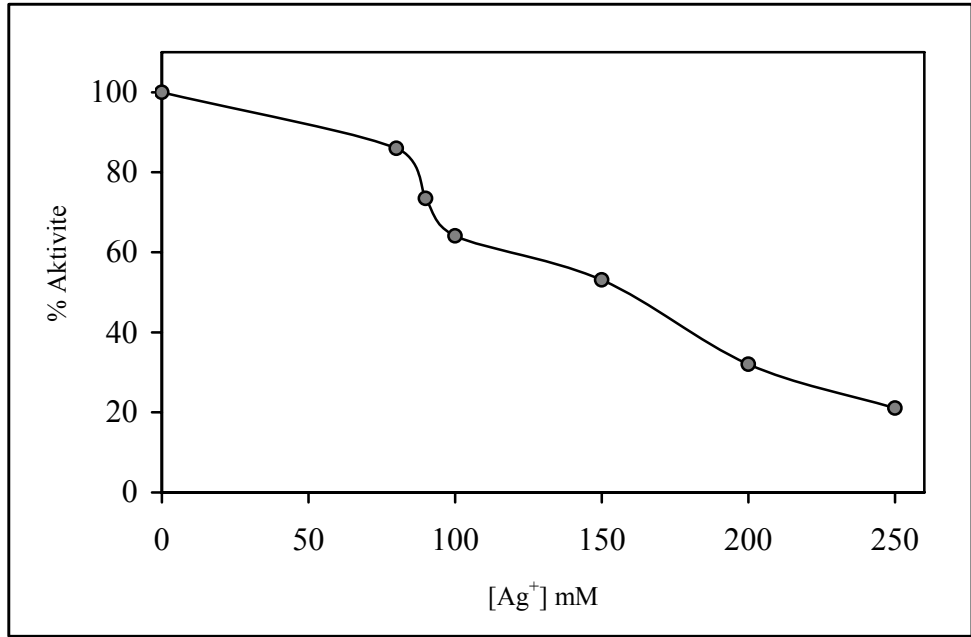
Şekil 4.56. Gökkuşığı alabalık beyin dokusu CA enzimi için 7 farklı Co^{+2} konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[\text{Co}^{+2}]$ grafiği



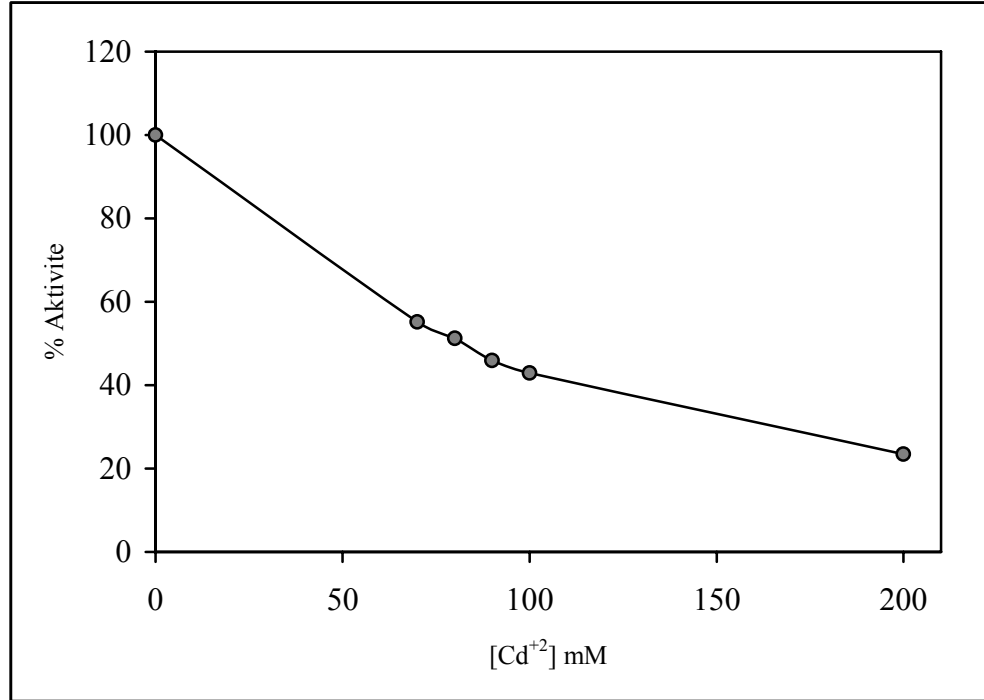
Şekil 4.57. Gökkuşığı alabalık beyin dokusu CA enzimi için 5 farklı Cu^{+2} konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[\text{Cu}^{+2}]$ grafiği



Şekil 4.58. Gökkuşığı alabalık beyin dokusu CA enzimi için 6 farklı Zn^{+2} konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[Zn^{+2}]$ grafiği



Şekil 4.59. Gökkuşığı alabalık beyin dokusu CA enzimi için 6 farklı Ag^{+} konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[Ag^{+}]$ grafiği



Şekil 4.60. Gökkuşığı alabalık beyin dokusu CA enzimi için 5 farklı Cd^{+2} konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[\text{Cd}^{+2}]$ grafiği

Çizelge 4.56. Gökkuşığı alabalık beyin dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine metal iyonları ile yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen IC_{50} değerleri

Kimyasal Madde Türü	IC_{50} (mM)
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,05
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	30,0
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,31
AgNO_3	159
$\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	82,5

4.2.10. Gökkuşığı alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokuları karbonik anhidraz enzimlerini inhibe eden bazı ağır metaller için K_i sabitlerinin bulunmasına yönelik çalışmaların sonuçları

Gökkuşığı alabalık dokularından saflaştırılan CA enziminin inhibitörsüz ve inhibitörlü ortamda beş farklı sübstrat konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapılmıştır. Daha sonra, kullanılan ağır metaller için üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonu ve beş farklı substrat konsantrasyonunda elde edilen aktivite değerleri kullanılarak; $1/V-1/S$ değerleri bulunmuştur. Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek, K_i değerleri hesaplanmıştır. Ayrıca gökkuşığı alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokuları CA enzimleri için K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan ağır metaller için çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen ağır metal konsantrasyonları karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokuları için sırasıyla Çizelge 4.57-4.61, Çizelge 4.63-4.67, Çizelge 4.69-4.73 ve Çizelge 4.75-4.49 verildi.

Karaciğer CA enzimi için elde edilen sonuçlar Şekil 4.61-4.65, böbrek CA enzimi için elde edilen sonuçlar Şekil 4.66-4.70, kas CA enzimi için elde edilen sonuçlar Şekil 4.71-4.76 ve beyin CA enzimi için elde edilen sonuçlar Şekil 4.76-4.80'de verildi. Son olarakta K_i , ortalama K_i değerleri ve inhibisyon türleri karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokuları için sırasıyla Çizelge 4.62, Çizelge 4.68, Çizelge 4.74 ve Çizelge 4.80 verildi.

Çizelge 4.57. Gökkuşığı alabalık karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kobalt iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tris-SO4 (µl)	Enzim Hacmi (µl)	Saf su (µl)	Substrat Hacmi (µl)	Küvetteki substrat kons (Mm)	Küvetteki inhibitör kons (mM)	Toplam Hacim (µl)
467	33	450	50	0,15	-	1000
467	33	440	50	0,15	0,01	1000
467	33	440	50	0,15	0,05	1000
467	33	440	50	0,15	0,1	1000
467	33	400	100	0,3	-	1000
467	33	390	100	0,3	0,01	1000
467	33	390	100	0,3	0,05	1000
467	33	390	100	0,3	0,1	1000
467	33	350	150	0,45	-	1000
467	33	340	150	0,45	0,01	1000
467	33	340	150	0,45	0,05	1000
467	33	340	150	0,45	0,1	1000
467	33	300	200	0,6	-	1000
467	33	290	200	0,6	0,01	1000
467	33	290	200	0,6	0,05	1000
467	33	290	200	0,6	0,1	1000
467	33	250	250	0,75	-	1000
467	33	240	250	0,75	0,01	1000
467	33	240	250	0,75	0,05	1000
467	33	240	250	0,75	0,1	1000

Çizelge 4.58. Gökkuşığı alabalık karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine bakır iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tris-SO4 (µl)	Enzim Hacmi (µl)	Saf su (µl)	Substrat Hacmi (µl)	Küvetteki substrat kons (Mm)	Küvetteki inhibitör kons (mM)	Toplam Hacim (µl)
467	33	300	200	0,6	-	1000
467	33	290	200	0,6	10	1000
467	33	275	200	0,6	25	1000
467	33	260	200	0,6	40	1000
467	33	275	225	0,675	-	1000
467	33	265	225	0,675	10	1000
467	33	250	225	0,675	25	1000
467	33	235	225	0,675	40	1000
467	33	250	250	0,75	-	1000
467	33	240	250	0,75	10	1000
467	33	225	250	0,75	25	1000
467	33	210	250	0,75	40	1000
467	33	225	275	0,875	-	1000
467	33	215	275	0,875	10	1000
467	33	200	275	0,875	25	1000
467	33	185	275	0,875	40	1000
467	33	200	300	0,9	-	1000
467	33	190	300	0,9	10	1000
467	33	175	300	0,9	25	1000
467	33	160	300	0,9	40	1000

Çizelge 4.59. Gökkuşığı alabalık karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine çinko iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tris-SO4 (µl)	Enzim Hacmi (µl)	Saf su (µl)	Substrat Hacmi (µl)	Küvetteki substrat kons (Mm)	Küvetteki inhibitör kons (mM)	Toplam Hacim (µl)
467	33	450	50	0,15	-	1000
467	33	440	50	0,15	5	1000
467	33	437	50	0,15	13	1000
467	33	430	50	0,15	20	1000
467	33	400	100	0,3	-	1000
467	33	390	100	0,3	5	1000
467	33	387	100	0,3	13	1000
467	33	380	100	0,3	20	1000
467	33	350	150	0,45	-	1000
467	33	340	150	0,45	1	1000
467	33	337	150	0,45	13	1000
467	33	330	150	0,45	20	1000
467	33	300	200	0,6	-	1000
467	33	290	200	0,6	5	1000
467	33	287	200	0,6	13	1000
467	33	280	200	0,6	20	1000
467	33	250	250	0,75	-	1000
467	33	240	250	0,75	5	1000
467	33	237	250	0,75	13	1000
467	33	230	250	0,75	20	1000

Çizelge 4.60. Gökkuşığı alabalık karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine gümüş iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tris-SO4 (µl)	Enzim Hacmi (µl)	Saf su (µl)	Substrat Hacmi (µl)	Küvetteki substrat kons (Mm)	Küvetteki inhibitör kons (mM)	Toplam Hacim (µl)
467	33	300	200	0,6	-	1000
467	33	290	200	0,6	0,001	1000
467	33	290	200	0,6	0,01	1000
467	33	290	200	0,6	0,1	1000
467	33	275	225	0,675	-	1000
467	33	265	225	0,675	0,001	1000
467	33	265	225	0,675	0,01	1000
467	33	265	225	0,675	0,1	1000
467	33	250	250	0,75	-	1000
467	33	240	250	0,75	0,001	1000
467	33	240	250	0,75	0,01	1000
467	33	240	250	0,75	1	1000
467	33	225	275	0,875	-	1000
467	33	215	275	0,875	0,001	1000
467	33	215	275	0,875	0,01	1000
467	33	215	275	0,875	0,1	1000
467	33	200	300	0,9	-	1000
467	33	190	300	0,9	0,001	1000
467	33	190	300	0,9	0,01	1000
467	33	190	300	0,9	0,1	1000

Çizelge 4.61. Gökkuşuğı alabalık karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kadmiyum iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

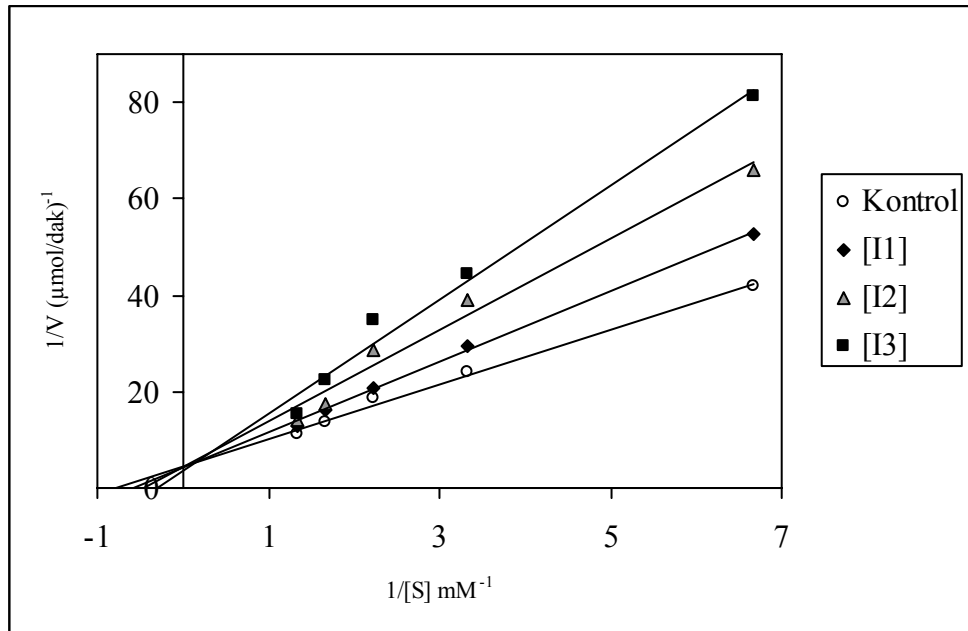
Tris-SO4 (µl)	Enzim Hacmi (µl)	Saf su (µl)	Substrat Hacmi (µl)	Küvetteki substrat kons (Mm)	Küvetteki inhibitör kons (mM)	Toplam Hacim (µl)
467	33	450	50	0,15	-	1000
467	33	440	50	0,15	0,01	1000
467	33	440	50	0,15	0,05	1000
467	33	420	50	0,15	0,1	1000
467	33	400	100	0,3	-	1000
467	33	390	100	0,3	0,01	1000
467	33	390	100	0,3	0,05	1000
467	33	370	100	0,3	0,1	1000
467	33	350	150	0,45	-	1000
467	33	340	150	0,45	0,01	1000
467	33	340	150	0,45	0,05	1000
467	33	320	150	0,45	0,1	1000
467	33	300	200	0,6	-	1000
467	33	290	200	0,6	0,01	1000
467	33	290	200	0,6	0,05	1000
467	33	270	200	0,6	0,1	1000
467	33	250	250	0,75	-	1000
467	33	240	250	0,75	0,01	1000
467	33	240	250	0,75	0,05	1000
467	33	220	250	0,75	0,1	1000

Gökkuşığı alabalık karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi için inhibitör olarak kullanılan ağır metallerin inhibisyon tipleri kompetitif (yarışmalı) ve unkompetitif (yarıyarışmalı) olduğundan;

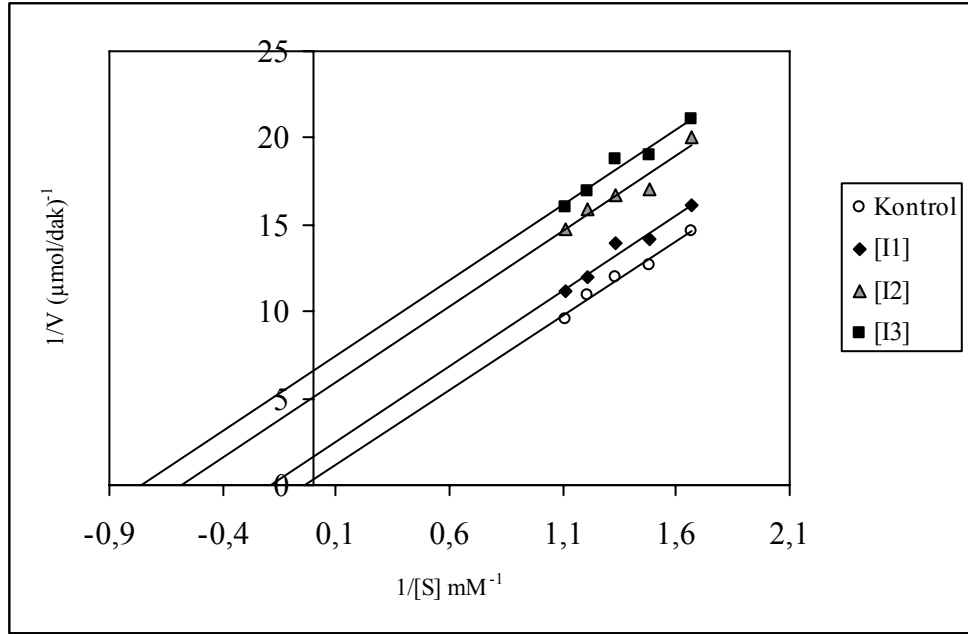
$$K_M^I = K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$

$$V_{\max}^I = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$$

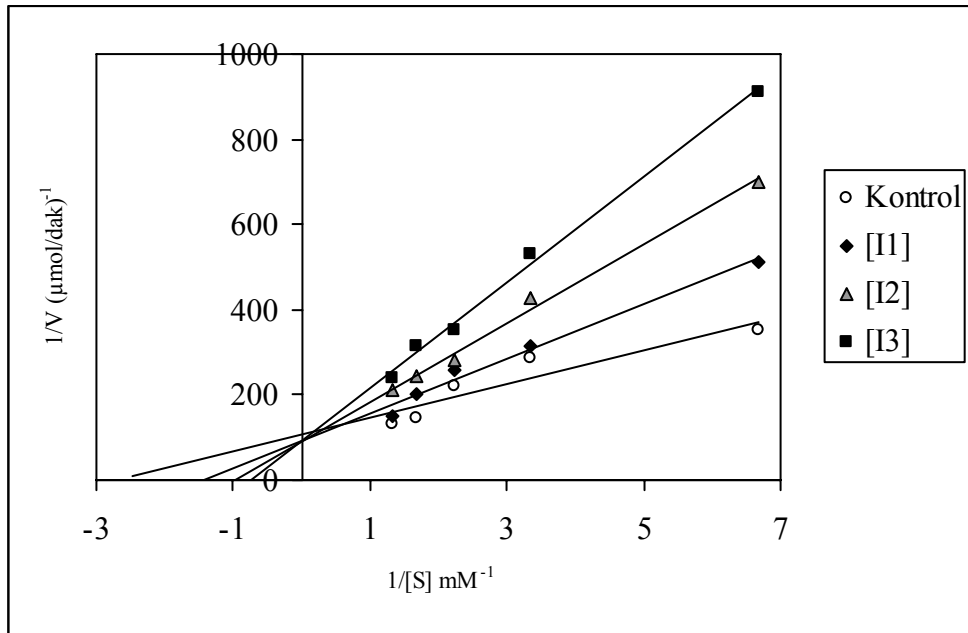
formülleri kullanıldı. Elde edilen K_i değerleri Çizelge 4.62’de verilmiştir.



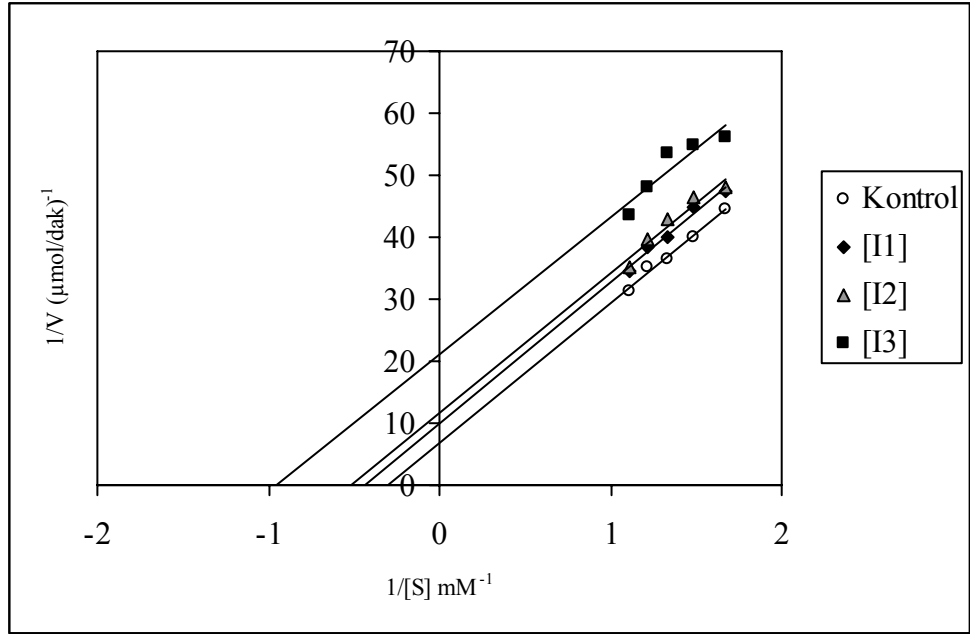
Şekil 4.61. Gökkuşığı alabalık karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kobalt iyonunun etkisi $[I_1] = 10^{-2}$ mM, $[I_2] = 5 \cdot 10^{-1}$ mM, $[I_3] = 10^{-1}$ mM



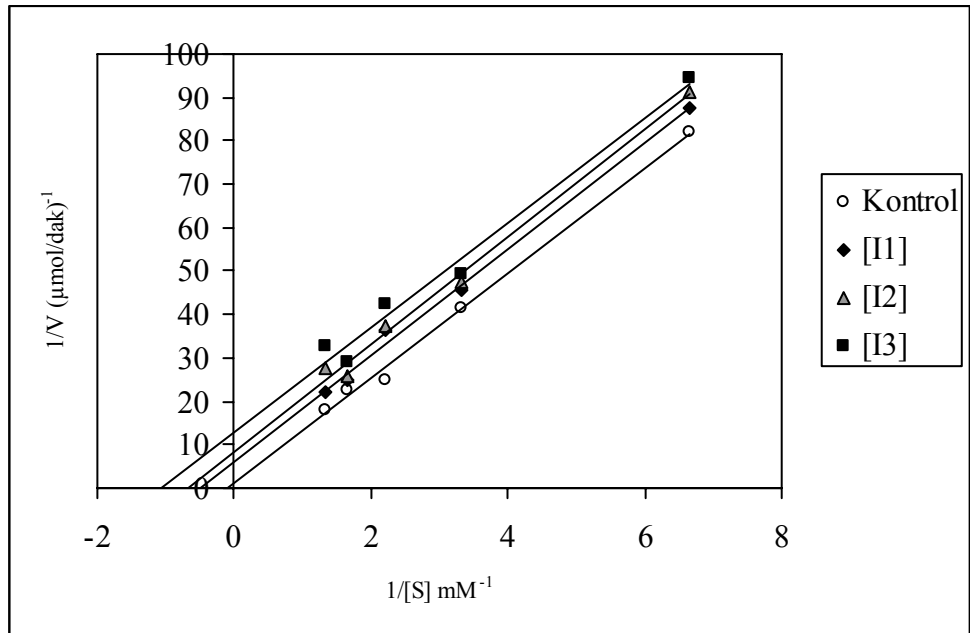
Şekil 4.62. Gökkuşığı alabalık karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine bakır iyonunun etkisi $[I_1] = 10 \text{ mM}$, $[I_2] = 25 \text{ mM}$, $[I_3] = 40 \text{ mM}$



Şekil 4.63. Gökkuşığı alabalık karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine çinko iyonunun etkisi $[I_1] = 5 \text{ mM}$, $[I_2] = 13 \text{ mM}$, $[I_3] = 20 \text{ mM}$



Şekil 4.64. Gökkuşığı alabalık karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine gümüş iyonunun etkisi $[I_1] = 10^{-3}$ mM, $[I_2] = 10^{-2}$ mM, $[I_3] = 10^{-1}$ mM



Şekil 4.65. Gökkuşığı alabalık karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kadmiyum iyonunun etkisi $[I_1] = 10^{-2}$ mM, $[I_2] = 5 \cdot 10^{-2}$ mM, $[I_3] = 10^{-1}$ mM

Çizelge 4.62. Gökkuşığı alabalık karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi için 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan K_i değerleri ve inhibisyon tipleri

İnhibitör Cinsi	[I] mM	K_i (mM)	Ortalama K_i Değerleri (mM)	İnhibisyon Tipi
CoCl ₂ .6H ₂ O	10 ⁻²	0,022	0,05	Yarışmalı
	5.10 ⁻²	0,062		
	10 ⁻¹	0,064		
CuSO ₄ .5H ₂ O	10	2,3	1,95	Yarıyarışmalı
	25	1,6		
	40	1,9		
ZnSO ₄ .7H ₂ O	5	5,880	7,035	Yarışmalı
	13	7,465		
	20	7,761		
AgNO ₃	10 ⁻³	2,0929	2,19	Yarıyarışmalı
	10 ⁻²	2,0929		
	10 ⁻¹	2,397		
CdCl ₂ .H ₂ O	10 ⁻²	0,0019	0,0056	Yarıyarışmalı
	5.10 ⁻²	0,0067		
	10 ⁻¹	0,0082		

Çizelge 4.63. Gökkuşığı alabalık böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kobalt iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tris-SO4 (µl)	Enzim Hacmi (µl)	Saf su (µl)	Substrat Hacmi (µl)	Küvetteki substrat kons (mM)	Küvetteki inhibitör kons (mM)	Toplam Hacim (µl)
467	33	300	200	0,6	-	1000
467	33	290	200	0,6	0,01	1000
467	33	290	200	0,6	0,05	1000
467	33	280	200	0,6	0,1	1000
467	33	275	225	0,675	-	1000
467	33	265	225	0,675	0,01	1000
467	33	265	225	0,675	0,05	1000
467	33	255	225	0,675	0,1	1000
467	33	250	250	0,75	-	1000
467	33	240	250	0,75	0,01	1000
467	33	240	250	0,75	0,05	1000
467	33	230	250	0,75	0,1	1000
467	33	225	275	0,875	-	1000
467	33	215	275	0,875	0,01	1000
467	33	215	275	0,875	0,05	1000
467	33	205	275	0,875	0,1	1000
467	33	200	300	0,9	-	1000
467	33	190	300	0,9	0,01	1000
467	33	190	300	0,9	0,05	1000
467	33	180	300	0,9	0,1	1000

Çizelge 4.64. Gökkuşığı alabalık böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine bakır iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tris-SO4 (µl)	Enzim Hacmi (µl)	Saf su (µl)	Substrat Hacmi (µl)	Küvetteki substrat kons (mM)	Küvetteki inhibitör kons (mM)	Toplam Hacim (µl)
467	33	300	200	0,6	-	1000
467	33	280	200	0,6	20	1000
467	33	260	200	0,6	40	1000
467	33	240	200	0,6	60	1000
467	33	275	225	0,675	-	1000
467	33	255	225	0,675	20	1000
467	33	235	225	0,675	40	1000
467	33	215	225	0,675	60	1000
467	33	250	250	0,75	-	1000
467	33	230	250	0,75	20	1000
467	33	210	250	0,75	40	1000
467	33	190	250	0,75	60	1000
467	33	225	275	0,875	-	1000
467	33	205	275	0,875	20	1000
467	33	185	275	0,875	40	1000
467	33	165	275	0,875	60	1000
467	33	200	300	0,9	-	1000
467	33	180	300	0,9	20	1000
467	33	160	300	0,9	40	1000
467	33	140	300	0,9	60	1000

Çizelge 4.65. Gökkuşığı alabalık böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine çinko iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tris-SO4 (µl)	Enzim Hacmi (µl)	Saf su (µl)	Substrat Hacmi (µl)	Küvetteki substrat kons (mM)	Küvetteki inhibitör kons (mM)	Toplam Hacim (µl)
467	33	300	200	0,6	-	1000
467	33	290	200	0,6	1	1000
467	33	290	200	0,6	10	1000
467	33	280	200	0,6	20	1000
467	33	275	225	0,675	-	1000
467	33	265	225	0,675	1	1000
467	33	265	225	0,675	10	1000
467	33	255	225	0,675	20	1000
467	33	250	250	0,75	-	1000
467	33	240	250	0,75	1	1000
467	33	240	250	0,75	10	1000
467	33	230	250	0,75	20	1000
467	33	225	275	0,875	-	1000
467	33	215	275	0,875	1	1000
467	33	215	275	0,875	10	1000
467	33	205	275	0,875	20	1000
467	33	200	300	0,9	-	1000
467	33	190	300	0,9	1	1000
467	33	190	300	0,9	10	1000
467	33	180	300	0,9	20	1000

Çizelge 4.66. Gökkuşığı alabalık böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine gümüş iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tris-SO4 (µl)	Enzim Hacmi (µl)	Saf su (µl)	Substrat Hacmi (µl)	Küvetteki substrat kons (mM)	Küvetteki inhibitör kons (mM)	Toplam Hacim (µl)
467	33	300	200	0,6	-	1000
467	33	150	200	0,6	150	1000
467	33	100	200	0,6	200	1000
467	33	50	200	0,6	250	1000
467	33	275	225	0,675	-	1000
467	33	125	225	0,675	150	1000
467	33	75	225	0,675	200	1000
467	33	25	225	0,675	250	1000
467	33	250	250	0,75	-	1000
467	33	100	250	0,75	150	1000
467	33	50	250	0,75	200	1000
467	33	-	250	0,75	250	1000
467	33	225	275	0,875	-	1000
467	33	75	275	0,875	150	1000
467	33	25	275	0,875	200	1000
467	33	-	275	0,875	250	1000
467	33	200	300	0,9	-	1000
467	33	50	300	0,9	150	1000
467	33	-	300	0,9	200	1000
467	33	-	300	0,9	250	1000

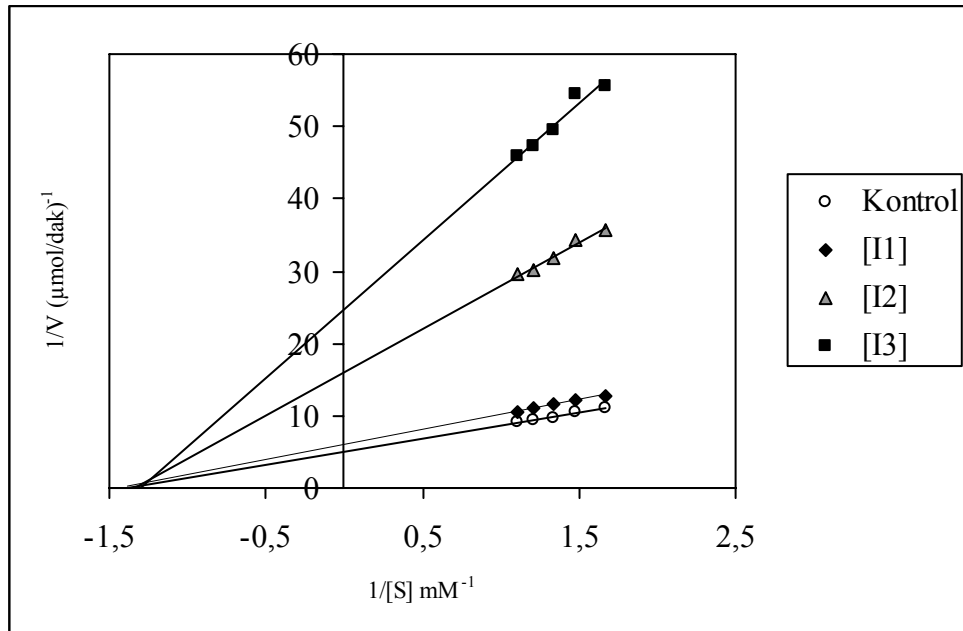
Çizelge 4.67. Gökkuşığı alabalık böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kadmiyum iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

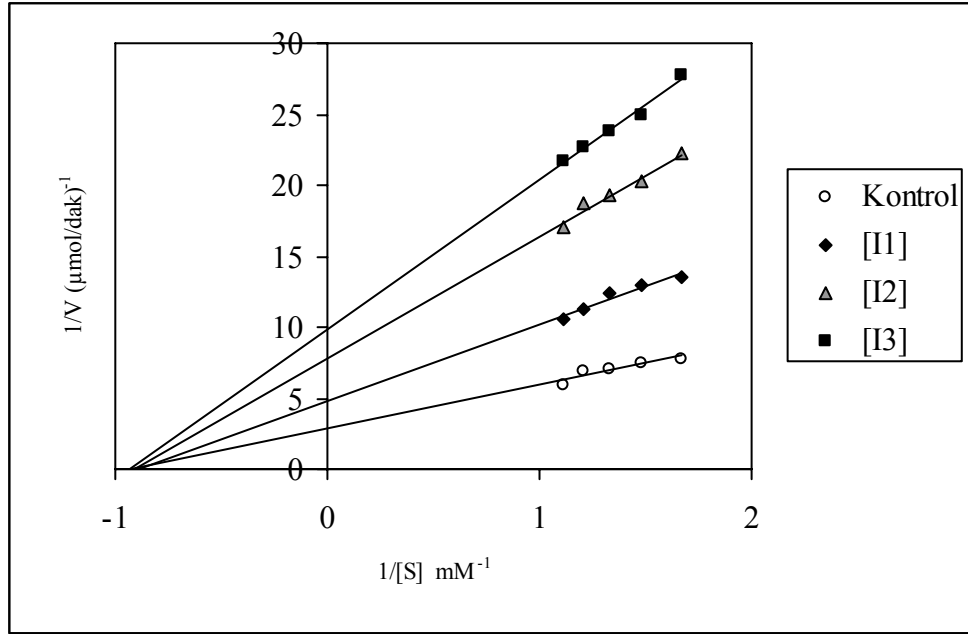
Tris-SO4 (µl)	Enzim Hacmi (µl)	Saf su (µl)	Substrat Hacmi (µl)	Küvetteki substrat kons (mM)	Küvetteki inhibitör kons (mM)	Toplam Hacim (µl)
467	33	300	200	0,6	-	1000
467	33	210	200	0,6	90	1000
467	33	200	200	0,6	100	1000
467	33	100	200	0,6	200	1000
467	33	275	225	0,675	-	1000
467	33	185	225	0,675	90	1000
467	33	175	225	0,675	100	1000
467	33	75	225	0,675	200	1000
467	33	250	250	0,75	-	1000
467	33	160	250	0,75	90	1000
467	33	150	250	0,75	100	1000
467	33	50	250	0,75	200	1000
467	33	225	275	0,875	-	1000
467	33	135	275	0,875	90	1000
467	33	125	275	0,875	100	1000
467	33	25	275	0,875	200	1000
467	33	200	300	0,9	-	1000
467	33	110	300	0,9	90	1000
467	33	100	300	0,9	100	1000
467	33	-	300	0,9	200	1000

Gökkuşığı alabalık böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi için inhibitör olarak kullanılan ağır metallerin inhibisyon tipleri nonkompetitif (yarışmasız) ve unkompetitif (yarıyarışmalı) olduğundan;

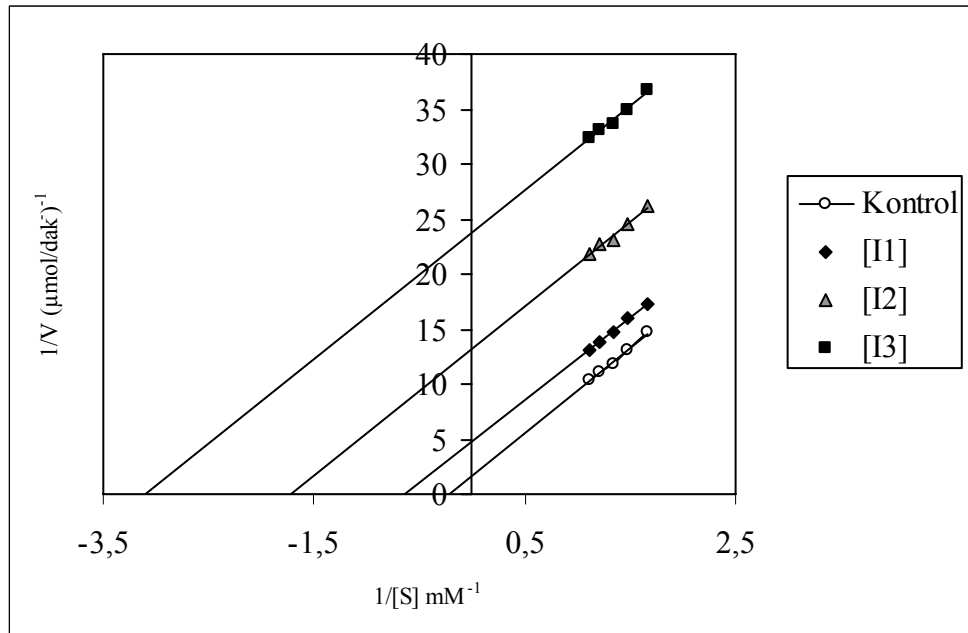
$$V_{\max}^I = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$$

formülleri kullanıldı. Elde edilen K_i değerleri Çizelge 4.68’de verilmiştir.

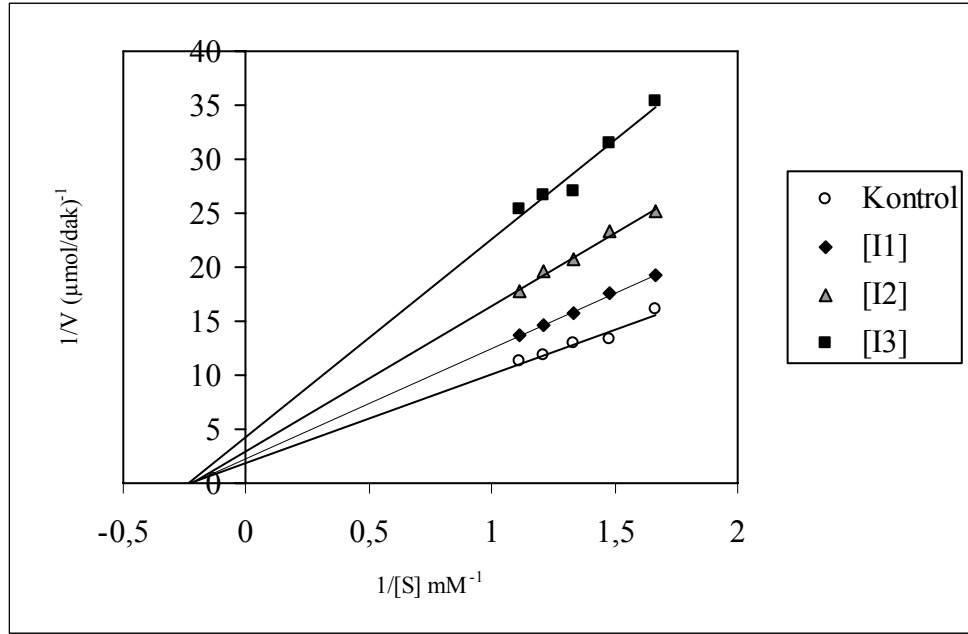




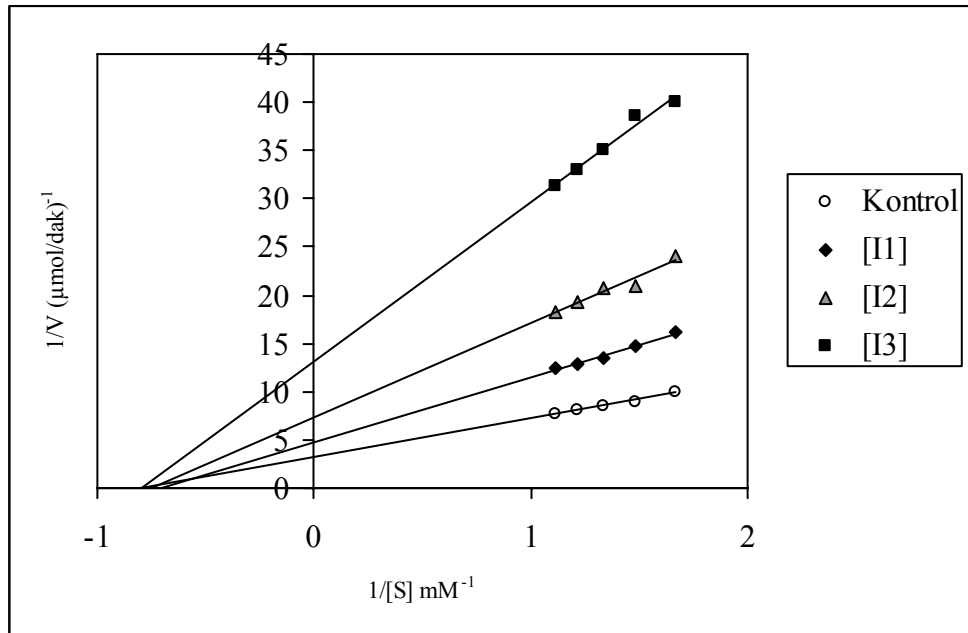
Şekil 4.67. Gökkuşığı alabalık böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine bakır iyonunun etkisi $[I_1]=20$ mM, $[I_2]=40$ mM, $[I_3]=60$ mM



Şekil 4.68. Gökkuşığı alabalık böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine çinko iyonunun etkisi $[I_1]=1$ mM, $[I_2]=10$ mM, $[I_3]=20$ mM



Şekil 4.69. Gökkuşığı alabalık böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine gümüş iyonunun etkisi [I₁]= 150 mM, [I₂]= 200mM, [I₃]= 250 mM



Şekil 4.70. Gökkuşığı alabalık böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kadmiyum iyonunun etkisi [I₁]= 90 mM, [I₂]= 100mM, [I₃]= 200 mM

Çizelge 4.68. Gökkuşığı alabalık böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi için 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan K_i değerleri ve inhibisyon tipleri

İnhibitör Cinsi	[I] mM	K_i (mM)	Ortalama K_i Değerleri (mM)	İnhibisyon Tipi
CoCl ₂ .6H ₂ O	10 ⁻²	0,0526	0,033	Yarışmasız
	5.10 ⁻²	0,0227		
	10 ⁻¹	0,0250		
CuSO ₄ .5H ₂ O	20	27,70	34,8	Yarışmasız
	40	52,63		
	60	27,29		
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1	0,56	1,2	Yarıyarışmalı
	10	1,50		
	20	1,56		
AgNO ₃	150	216,5	257	Yarışmasız
	200	355,6		
	250	200,0		
CdCl ₂ .H ₂ O	90	171,75	103	Yarıyarışmalı
	100	74,18		
	200	63,19		

Çizelge 4.69. Gökkuşuğı alabalık kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kobalt iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tris-SO4 (µl)	Enzim Hacmi (µl)	Saf su (µl)	Substrat Hacmi (µl)	Küvetteki substrat kons (mM)	Küvetteki inhibitör kons (mM)	Toplam Hacim (µl)
467	33	300	200	0,6	-	1000
467	33	290	200	0,6	0,01	1000
467	33	290	200	0,6	0,05	1000
467	33	280	200	0,6	0,1	1000
467	33	275	225	0,675	-	1000
467	33	265	225	0,675	0,01	1000
467	33	265	225	0,675	0,05	1000
467	33	255	225	0,675	0,1	1000
467	33	250	250	0,75	-	1000
467	33	240	250	0,75	0,01	1000
467	33	240	250	0,75	0,05	1000
467	33	230	250	0,75	0,1	1000
467	33	225	275	0,875	-	1000
467	33	215	275	0,875	0,01	1000
467	33	215	275	0,875	0,05	1000
467	33	205	275	0,875	0,1	1000
467	33	200	300	0,9	-	1000
467	33	190	300	0,9	0,01	1000
467	33	190	300	0,9	0,05	1000
467	33	180	300	0,9	0,1	1000

Çizelge 4.70. Gökkuşığı alabalık kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine bakır iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tris-SO4 (µl)	Enzim Hacmi (µl)	Saf su (µl)	Substrat Hacmi (µl)	Küvetteki substrat kons (mM)	Küvetteki inhibitör kons (mM)	Toplam Hacim (µl)
467	33	300	200	0,6	-	1000
467	33	280	200	0,6	20	1000
467	33	260	200	0,6	40	1000
467	33	240	200	0,6	60	1000
467	33	275	225	0,675	-	1000
467	33	255	225	0,675	20	1000
467	33	235	225	0,675	40	1000
467	33	215	225	0,675	60	1000
467	33	250	250	0,75	-	1000
467	33	230	250	0,75	20	1000
467	33	210	250	0,75	40	1000
467	33	190	250	0,75	60	1000
467	33	225	275	0,875	-	1000
467	33	205	275	0,875	20	1000
467	33	185	275	0,875	40	1000
467	33	165	275	0,875	60	1000
467	33	200	300	0,9	-	1000
467	33	180	300	0,9	20	1000
467	33	160	300	0,9	40	1000
467	33	140	300	0,9	60	1000

Çizelge 4.71. Gökkuşuğı alabalık kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine çinko iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tris-SO4 (µl)	Enzim Hacmi (µl)	Saf su (µl)	Substrat Hacmi (µl)	Küvetteki substrat kons (mM)	Küvetteki inhibitör kons (mM)	Toplam Hacim (µl)
467	33	300	200	0,6	-	1000
467	33	290	200	0,6	1	1000
467	33	290	200	0,6	10	1000
467	33	280	200	0,6	20	1000
467	33	275	225	0,675	-	1000
467	33	265	225	0,675	1	1000
467	33	265	225	0,675	10	1000
467	33	255	225	0,675	20	1000
467	33	250	250	0,75	-	1000
467	33	240	250	0,75	1	1000
467	33	240	250	0,75	10	1000
467	33	230	250	0,75	20	1000
467	33	225	275	0,875	-	1000
467	33	215	275	0,875	1	1000
467	33	215	275	0,875	10	1000
467	33	205	275	0,875	20	1000
467	33	200	300	0,9	-	1000
467	33	190	300	0,9	1	1000
467	33	190	300	0,9	10	1000
467	33	180	300	0,9	20	1000

Çizelge 4.72. Gökkuşığı alabalık kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine gümüş iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tris-SO4 (µl)	Enzim Hacmi (µl)	Saf su (µl)	Substrat Hacmi (µl)	Küvetteki substrat kons (mM)	Küvetteki inhibitör kons (mM)	Toplam Hacim (µl)
467	33	300	200	0,6	-	1000
467	33	150	200	0,6	150	1000
467	33	100	200	0,6	200	1000
467	33	50	200	0,6	250	1000
467	33	275	225	0,675	-	1000
467	33	125	225	0,675	150	1000
467	33	75	225	0,675	200	1000
467	33	25	225	0,675	250	1000
467	33	250	250	0,75	-	1000
467	33	100	250	0,75	150	1000
467	33	50	250	0,75	200	1000
467	33	-	250	0,75	250	1000
467	33	225	275	0,875	-	1000
467	33	75	275	0,875	150	1000
467	33	25	275	0,875	200	1000
467	33	-	275	0,875	250	1000
467	33	200	300	0,9	-	1000
467	33	50	300	0,9	150	1000
467	33	-	300	0,9	200	1000
467	33	-	300	0,9	250	1000

Çizelge 4.73. Gökkuşığı alabalık kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kadmiyum iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

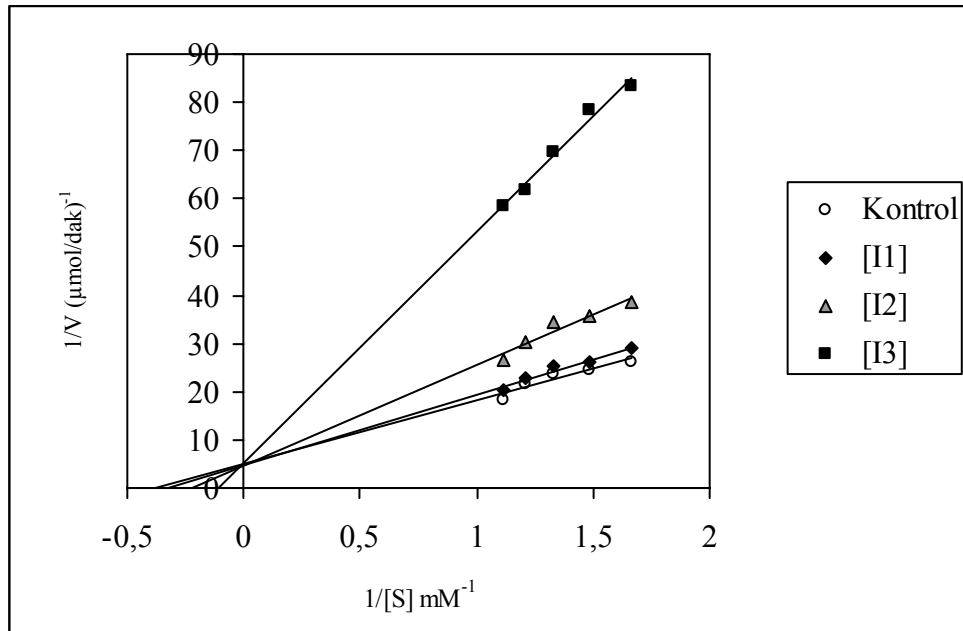
Tris-SO4 (µl)	Enzim Hacmi (µl)	Saf su (µl)	Substrat Hacmi (µl)	Küvetteki substrat kons (mM)	Küvetteki inhibitör kons (mM)	Toplam Hacim (µl)
467	33	300	200	0,6	-	1000
467	33	210	200	0,6	90	1000
467	33	200	200	0,6	100	1000
467	33	100	200	0,6	200	1000
467	33	275	225	0,675	-	1000
467	33	185	225	0,675	90	1000
467	33	175	225	0,675	100	1000
467	33	75	225	0,675	200	1000
467	33	250	250	0,75	-	1000
467	33	160	250	0,75	90	1000
467	33	150	250	0,75	100	1000
467	33	50	250	0,75	200	1000
467	33	225	275	0,875	-	1000
467	33	135	275	0,875	90	1000
467	33	125	275	0,875	100	1000
467	33	25	275	0,875	200	1000
467	33	200	300	0,9	-	1000
467	33	110	300	0,9	90	1000
467	33	100	300	0,9	100	1000
467	33	-	300	0,9	200	1000

Gökkuşığı alabalık kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi için inhibitör olarak kullanılan ağır metallerin inhibisyon tipleri nonkompetitiv (yarışmasız) ve kompetitiv (yarışmalı) olduğundan;

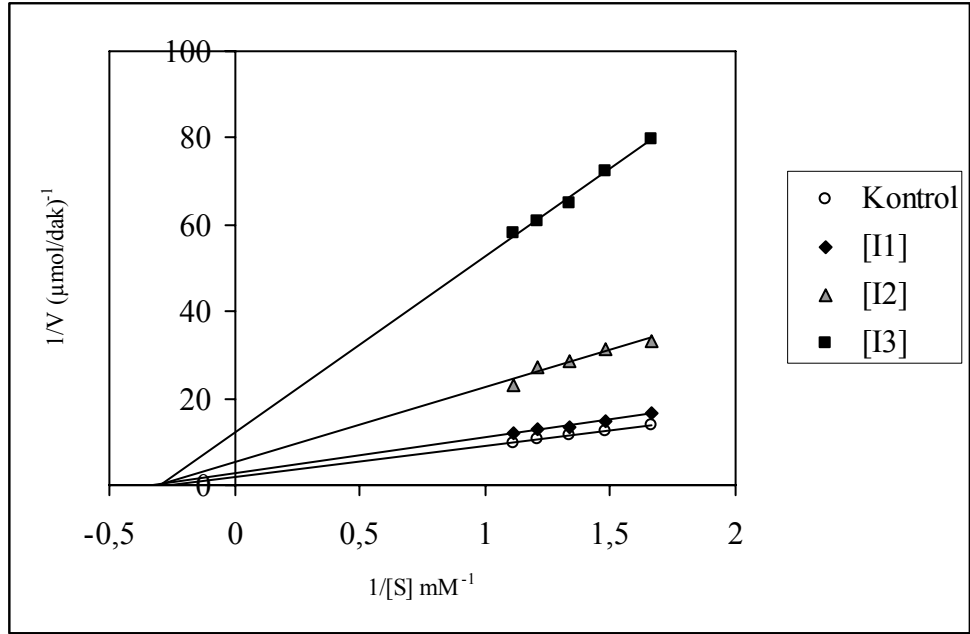
$$V_{\max}^I = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$$

$$K_M^I = K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$

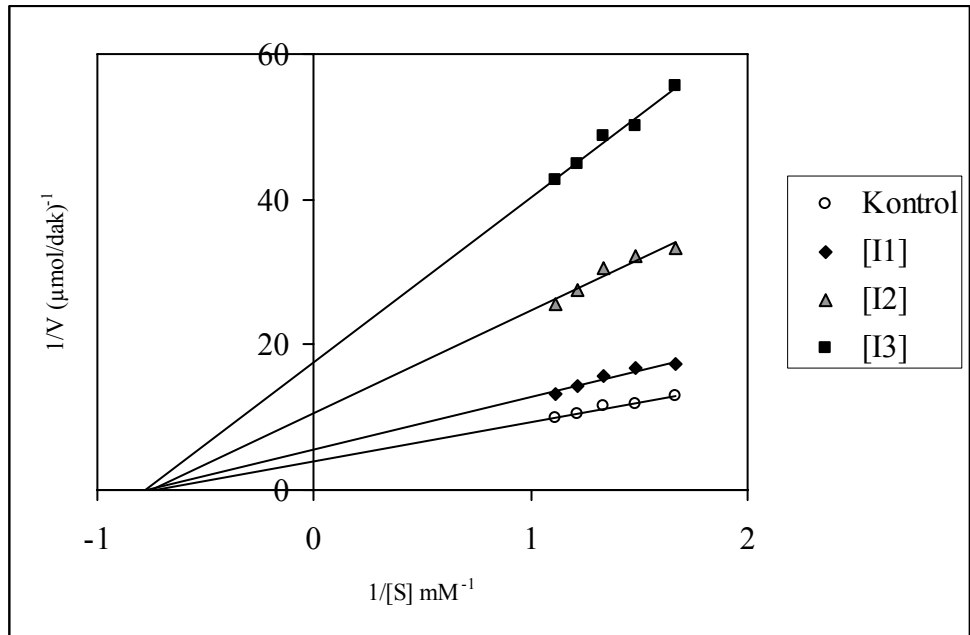
formülleri kullanıldı. Elde edilen K_i değerleri Çizelge 4.74’de verilmiştir.



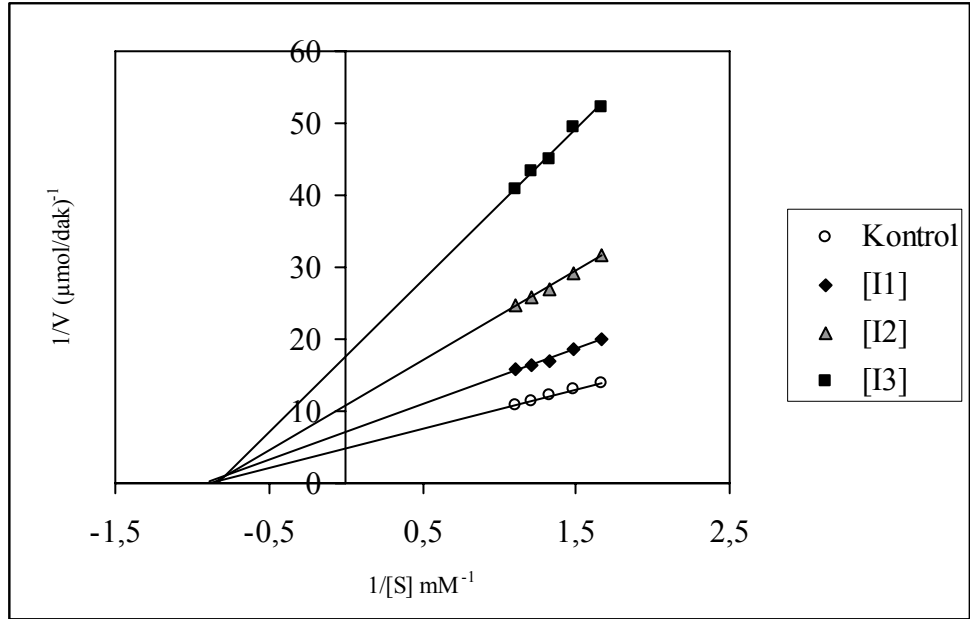
Şekil 4.71. Gökkuşığı alabalık kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kobalt iyonunun etkisi $[I_1] = 10^{-2}$ mM, $[I_2] = 5 \cdot 10^{-2}$ mM, $[I_3] = 10^{-1}$ mM



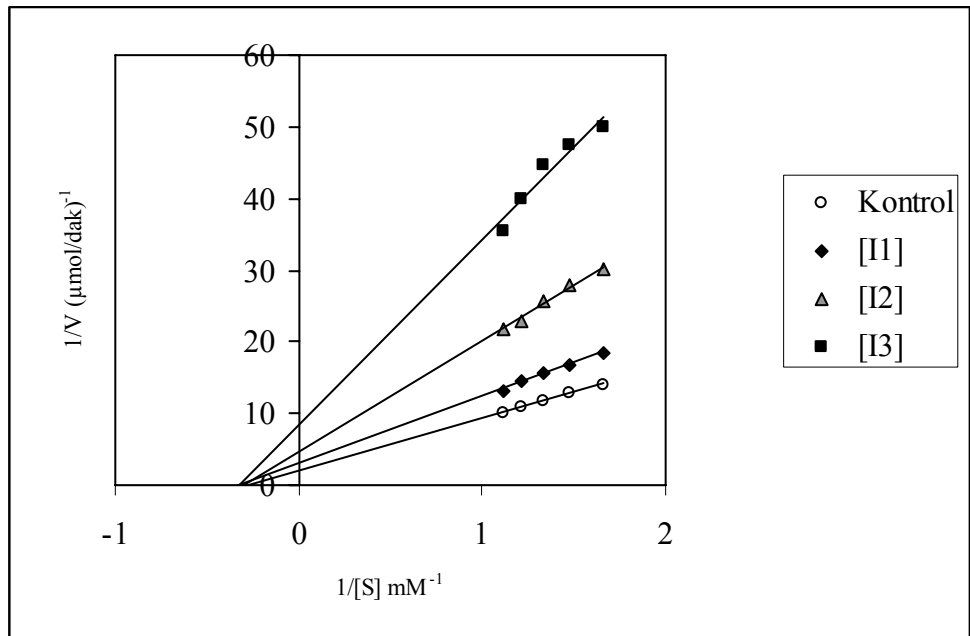
Şekil 4.72. Gökkuşığı alabalık kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine bakır iyonunun etkisi [I₁]= 20 mM, [I₂]= 40 mM, [I₃]= 60mM



Şekil 4.73. Gökkuşığı alabalık kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine çinko iyonunun etkisi [I₁]= 1 mM, [I₂]= 10 mM, [I₃]= 20 mM



Şekil 4.74. Gökkuşığı alabalık kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine gümüş iyonunun etkisi $[I_1]=150$ mM, $[I_2]=200$ mM, $[I_3]=250$ mM



Şekil 4.75. Gökkuşığı alabalık kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kadmiyum iyonunun etkisi $[I_1]=90$ mM, $[I_2]=100$ mM, $[I_3]=200$ mM

Çizelge 4.74. Gökkuşığı alabalık kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi için 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan K_i değerleri ve inhibisyon tipleri

İnhibitör Cinsi	[I] mM	K_i (mM)	Ortalama K_i Değerleri (mM)	İnhibisyon Tipi
CoCl ₂ .6H ₂ O	10 ⁻²	0,086	0,067	Yarışmasız
	5.10 ⁻²	0,075		
	10 ⁻¹	0,039		
CuSO ₄ .5H ₂ O	20	63,29	34,15	Yarışmasız
	40	27,03		
	60	121,46		
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1	2,5	4,79	Yarıyarışmalı
	10	6,1		
	20	5,8		
AgNO ₃	150	340,9	211	Yarışmasız
	200	165,8		
	250	96,3		
CdCl ₂ .H ₂ O	90	191,89	111	Yarıyarışmalı
	100	76,62		
	200	64,30		

Çizelge 4.75. Gökkuşuğu alabalık beyin dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kobalt iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tris-SO4 (µl)	Enzim Hacmi (µl)	Saf su (µl)	Substrat Hacmi (µl)	Küvetteki substrat kons (mM)	Küvetteki inhibitör kons (mM)	Toplam Hacim (µl)
467	33	300	200	0,6	-	1000
467	33	290	200	0,6	0,01	1000
467	33	290	200	0,6	0,05	1000
467	33	280	200	0,6	0,1	1000
467	33	275	225	0,675	-	1000
467	33	265	225	0,675	0,01	1000
467	33	265	225	0,675	0,05	1000
467	33	255	225	0,675	0,1	1000
467	33	250	250	0,75	-	1000
467	33	240	250	0,75	0,01	1000
467	33	240	250	0,75	0,05	1000
467	33	230	250	0,75	0,1	1000
467	33	225	275	0,875	-	1000
467	33	215	275	0,875	0,01	1000
467	33	215	275	0,875	0,05	1000
467	33	205	275	0,875	0,1	1000
467	33	200	300	0,9	-	1000
467	33	190	300	0,9	0,01	1000
467	33	190	300	0,9	0,05	1000
467	33	180	300	0,9	0,1	1000

Çizelge 4.76. Gökkuşuğı alabalık beyin dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine bakır iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tris-SO4 (µl)	Enzim Hacmi (µl)	Saf su (µl)	Substrat Hacmi (µl)	Küvetteki substrat kons (mM)	Küvetteki inhibitör kons (mM)	Toplam Hacim (µl)
467	33	300	200	0,6	-	1000
467	33	280	200	0,6	20	1000
467	33	260	200	0,6	40	1000
467	33	240	200	0,6	60	1000
467	33	275	225	0,675	-	1000
467	33	255	225	0,675	20	1000
467	33	235	225	0,675	40	1000
467	33	215	225	0,675	60	1000
467	33	250	250	0,75	-	1000
467	33	230	250	0,75	20	1000
467	33	210	250	0,75	40	1000
467	33	190	250	0,75	60	1000
467	33	225	275	0,875	-	1000
467	33	205	275	0,875	20	1000
467	33	185	275	0,875	40	1000
467	33	165	275	0,875	60	1000
467	33	200	300	0,9	-	1000
467	33	180	300	0,9	20	1000
467	33	160	300	0,9	40	1000
467	33	140	300	0,9	60	1000

Çizelge 4.77. Gökkuşığı alabalık beyin dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine çinko iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tris-SO4 (µl)	Enzim Hacmi (µl)	Saf su (µl)	Substrat Hacmi (µl)	Küvetteki substrat kons (mM)	Küvetteki inhibitör kons (mM)	Toplam Hacim (µl)
467	33	300	200	0,6	-	1000
467	33	290	200	0,6	5	1000
467	33	290	200	0,6	10	1000
467	33	280	200	0,6	20	1000
467	33	275	225	0,675	-	1000
467	33	265	225	0,675	5	1000
467	33	265	225	0,675	10	1000
467	33	255	225	0,675	20	1000
467	33	250	250	0,75	-	1000
467	33	240	250	0,75	1	1000
467	33	240	250	0,75	10	1000
467	33	230	250	0,75	20	1000
467	33	225	275	0,875	-	1000
467	33	215	275	0,875	5	1000
467	33	215	275	0,875	10	1000
467	33	205	275	0,875	20	1000
467	33	200	300	0,9	-	1000
467	33	190	300	0,9	5	1000
467	33	190	300	0,9	10	1000
467	33	180	300	0,9	20	1000

Çizelge 4.78. Gökkuşığı alabalık beyin dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine gümüş iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tris-SO4 (µl)	Enzim Hacmi (µl)	Saf su (µl)	Substrat Hacmi (µl)	Küvetteki substrat kons (mM)	Küvetteki inhibitör kons (mM)	Toplam Hacim (µl)
467	33	300	200	0,6	-	1000
467	33	150	200	0,6	150	1000
467	33	100	200	0,6	200	1000
467	33	50	200	0,6	250	1000
467	33	275	225	0,675	-	1000
467	33	125	225	0,675	150	1000
467	33	75	225	0,675	200	1000
467	33	25	225	0,675	250	1000
467	33	250	250	0,75	-	1000
467	33	100	250	0,75	150	1000
467	33	50	250	0,75	200	1000
467	33	-	250	0,75	250	1000
467	33	225	275	0,875	-	1000
467	33	75	275	0,875	150	1000
467	33	25	275	0,875	200	1000
467	33	-	275	0,875	250	1000
467	33	200	300	0,9	-	1000
467	33	50	300	0,9	150	1000
467	33	-	300	0,9	200	1000
467	33	-	300	0,9	250	1000

Çizelge 4.79. Gökkuşuğu alabalık beyin dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kadmiyum iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

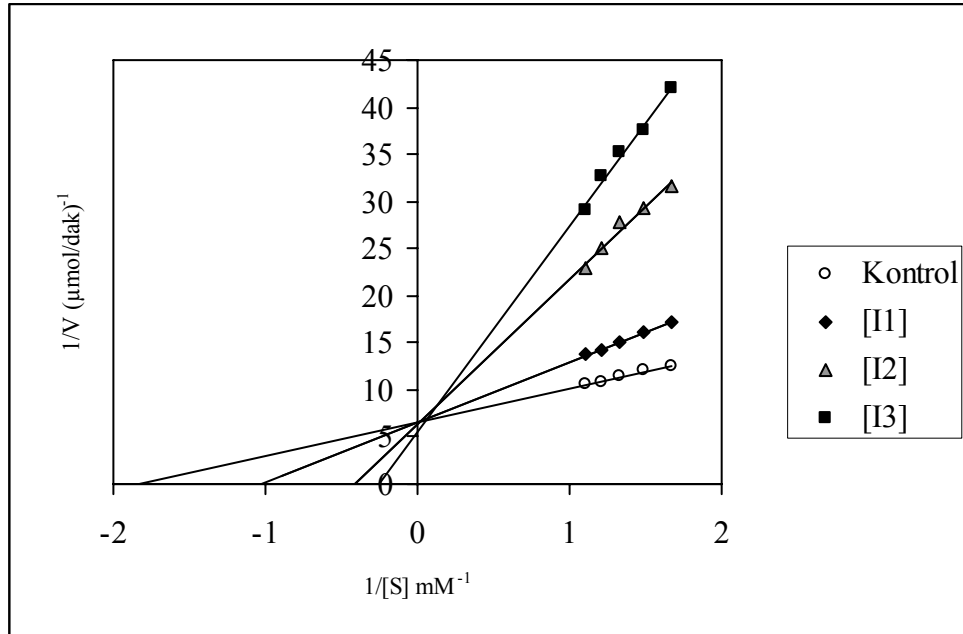
Tris-SO4 (µl)	Enzim Hacmi (µl)	Saf su (µl)	Substrat Hacmi (µl)	Küvetteki substrat kons (mM)	Küvetteki inhibitör kons (mM)	Toplam Hacim (µl)
467	33	300	200	0,6	-	1000
467	33	210	200	0,6	90	1000
467	33	200	200	0,6	100	1000
467	33	100	200	0,6	200	1000
467	33	275	225	0,675	-	1000
467	33	185	225	0,675	90	1000
467	33	175	225	0,675	100	1000
467	33	75	225	0,675	200	1000
467	33	250	250	0,75	-	1000
467	33	160	250	0,75	90	1000
467	33	150	250	0,75	100	1000
467	33	50	250	0,75	200	1000
467	33	225	275	0,875	-	1000
467	33	135	275	0,875	90	1000
467	33	125	275	0,875	100	1000
467	33	25	275	0,875	200	1000
467	33	200	300	0,9	-	1000
467	33	110	300	0,9	90	1000
467	33	100	300	0,9	100	1000
467	33	-	300	0,9	200	1000

Gökkuşığı alabalık beyin dokusundan saflaştırılan CA enzimi için inhibitör olarak kullanılan ağır metallerin inhibisyon tipleri kompetitif (yarışmalı), nonkompetitif (yarışmasız) ve unkompetitif (yarıyarışmalı) olduğundan;

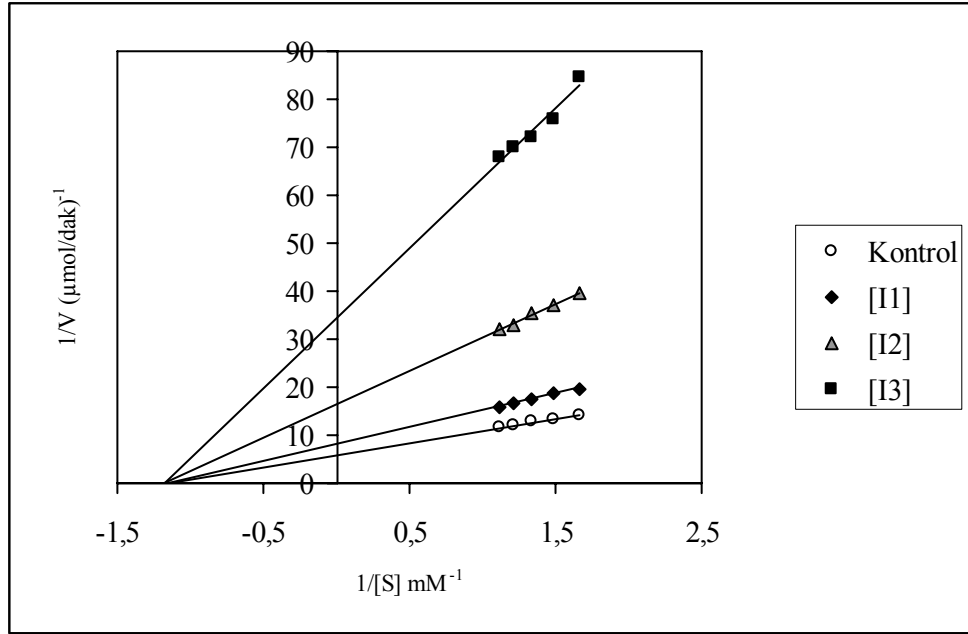
$$V_{\max}^I = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$$

$$K_M^I = K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$

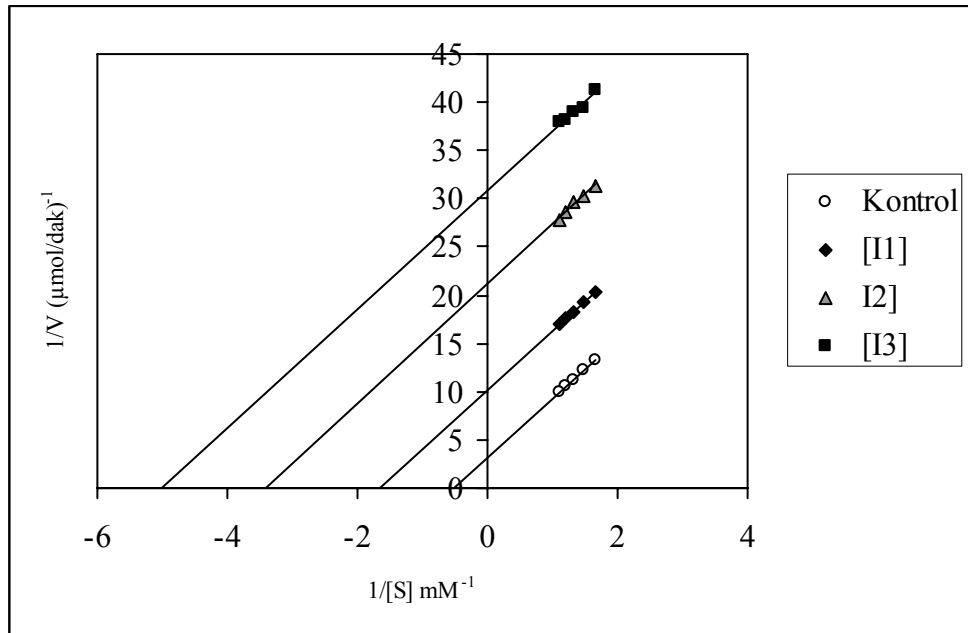
formülleri kullanıldı. Elde edilen K_i değerleri Çizelge 4.80’da verilmiştir.



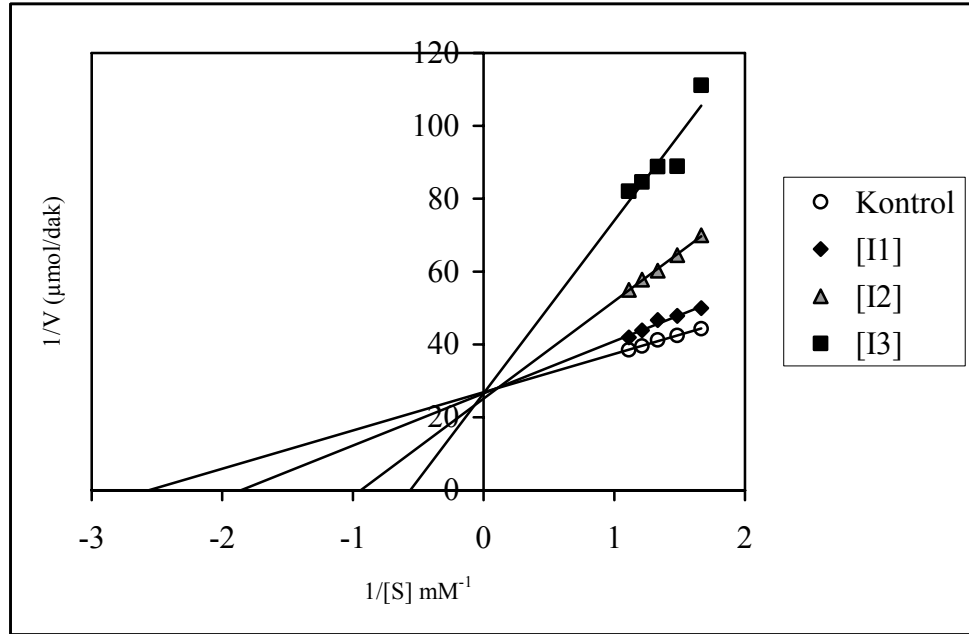
Şekil 4.76. Gökkuşığı alabalık beyin dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kobalt iyonunun etkisi $[I_1] = 10^{-2}$ mM, $[I_2] = 5 \cdot 10^{-2}$ mM, $[I_3] = 10^{-1}$ mM



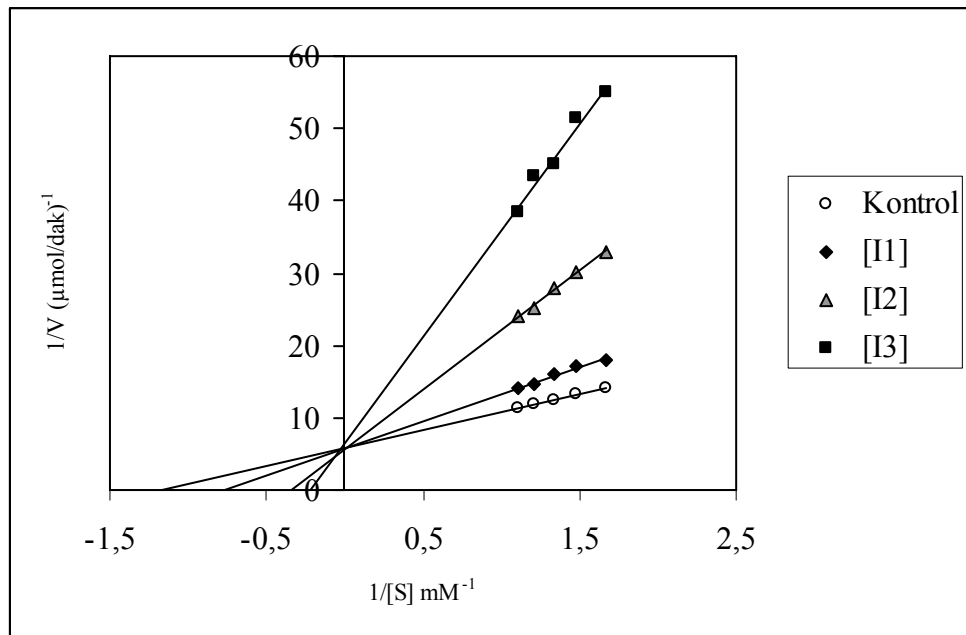
Şekil 4.77. Gökkuşığı alabalık beyin dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine bakır iyonunun etkisi [I₁]= 20 mM, [I₂]= 40 mM, [I₃]= 60mM



Şekil 4.78. Gökkuşığı alabalık beyin dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine çinko iyonunun etkisi [I₁]= 5 mM, [I₂]= 10 mM, [I₃]= 20 mM



Şekil 4.79. Gökkuşığı alabalık beyin dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine gümüş iyonunun etkisi $[I_1]=150$ mM, $[I_2]=200$ mM, $[I_3]=250$ mM



Şekil 4.80. Gökkuşığı alabalık beyin dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kadmiyum iyonunun etkisi $[I_1]=90$ mM, $[I_2]=100$ mM, $[I_3]=200$ mM

Çizelge 4.80. Gökkuşuğı alabalık beyin dokusundan saflaştırılan CA enzimi için 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan K_i değerleri ve inhibisyon tipleri

İnhibitör Cinsi	[I] mM	K_i (mM)	Ortalama K_i Değerleri (mM)	İnhibisyon Tipi
CoCl ₂ .6H ₂ O	10 ⁻²	0,0123	0,0141	Yarışmalı
	5.10 ⁻²	0,0144		
	10 ⁻¹	0,0157		
CuSO ₄ .5H ₂ O	20	50	27,68	Yarışmasız
	40	21		
	60	12		
ZnSO ₄ .7H ₂ O	5	2,35	2,15	Yarıyarışmalı
	10	1,78		
	20	2,34		
AgNO ₃	150	395,8	193,86	Yarışmalı
	200	115,6		
	250	70,2		
CdCl ₂ .H ₂ O	90	191,5	94,18	Yarışmalı
	100	42,1		
	200	48,9		

5. TARTIŞMA

Karbonik anhidraz (CA, karbonat hidrolizaz, E.C.4.2.1.1) canlı organizmalarda pH düzenleyici, iyon transportu, su ve elektrolit dengesi gibi önemli fonksiyonları olan ve aktif bölgesinde Zn^{+2} iyonu bulunduran yaygın bir metaloenzim ailesidir. Bu enzim fizyolojik şartlarda karbondioksitin hidratasyonu ve bikarbonatın dehidratasyonu reaksiyonlarını tersinir olarak katalizlemektedir (Maren 1967., Tashian 1992., Sly and Hu 1995., Smith and Ferry 2000). CA, hemen hemen bütün hayvan dokularında, bakterilerde ve fotosentetik hücrelerde fonksiyon gören önemli bir enzimdir (Beydemir *et al.* 2004., Demir *et al.* 1999., Krungkrai 2001).

Karbonik anhidraz'ın (CA) canlı metabolizmasında hidrataz aktivitesinin yanı sıra; böbrek, gastrik mukoza ve göz lensi gibi dokularda H^+ ve HCO_3^- birikiminde rol almaktadır. Bunlardan başka önemli miktarda tükürük bezleri, beyin, sinir miyelin kılıfı, pankreas, prostat, uterus ve endometrium dokularında da belirli miktarlarda bulunmaktadır (Supuran *et al.* 1998).

Ayrıca balıkların solungaç ve salgı organlarında, bazı böcek ve bakterilerde, kabuklu hayvanların kabuk yapımında ve yumurta kabuğunun oluşumunda, alglerde ve karasal bitki kloroplastlarında bu enzimin önemli rolleri ispatlanmıştır (Graham *et al.* 1984., Tsuzuki and Miyachi 1989., Badger and Price 1994).

Bugüne kadar çeşitli memeli dokularında 14 adet karbonik anhidraz izoenzimi tespit edilmiştir. Belirlenen CA izoenzimleri arasında, CA I, CA II, CA III ve CA VII sitozolik form; CA IV, CA IX, CA XII ve CA XIV membrana bağlı; CA V mitokondriyel form; CA VI tükürük gibi çeşitli salgılarda mevcut olan karbonik anhidraz formlarıdır (Parkkila *et al.* 1998., Mori *et al.* 1999., Bülbül *et al.* 2003). Son yıllarda katalitik etkisi olmayan birkaç formu da (CA VIII, CA X and CA XI) canlılardan izole edilmiştir (Ilies *et al.* 2000)..

CA enziminin fotosentez olayının Calvin siklüsünde önemli bir görevi olduğu, kloroplast hücresinin tilakoid membrana bağlı CA enziminin Calvin siklüsündeki diğer enzimler ile birlikte bir multienzim sistemi içerisinde çalıştığı belirlenmiştir (Jebanathirajah and Coleman 1998). Karbonik anhidraz'ın bikarbonatın CO_2 dehidratasyonunu aktive ederek CO_2 üretiminde artışa ve böylece hücreye CO_2 desteğinde artışa sebep olduğu tespit edilmiştir (Tsuzuki and Miyachi 1989).

Balıklarda CA aktivitesi memeli canlılardakine göre bazı farklılıklar göstermektedir. Örneğin; kemikli balıkların, memelilerdeki durumun aksine, hem kan plazmasında hem de solungaç epitelinin iç yüzeyinde karbonik anhidraz aktivitesi yoktur. Bu sebeple $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ hidratasyon veya dehidratasyon reaksiyonları katalizlenmemiş oranda gerçekleşir (Rahim *et al.* 1988., Henry *et al.* 1988, 1993, 1997., Perry *et al.* 1996., Acierno *et al.* 1997., Gilmour *et al.* 1997). CA aktivitesinin olmayışı, kaslardan kana geçen serbest protonların plazma bikarbonatını titre etme hızını azaltır ve oluşan bu asitin eritrosit hücrelerine transferi çok yavaş olduğundan oluşan bu asidik ortamdan eritrositler korunur. Ayrıca plazmadaki CA aktivitesi eksikliği solungaç epitelindeki CO_2 atılımını da yavaşlattığından, kan pH'sının dengelenmesini kolaylaştırır (Lessard *et al.* 1995). Aşırı egzersiz veya hipoksi (yeterli oksijenin bulunmaması) durumunda kana çok yüksek oranda asit salınımı gerçekleştiğinden, düşen kan pH'sı ile birlikte hemoglobinin oksijen bağlama kapasitesi de düşmektedir ve bu düşüşle birlikte dokulara da oksijen dağılımının azalacağı düşünülür. Fakat bu etki, balıklarda salgılanan katekolaminlerin eritrosit pH'sını artırmasıyla en aza indirgenir (Motais *et al.* 1989., Nikinmaa *et al.* 1990., Wood and Munger 1994).

Tatlı su balıklarının solungaç epitelinin apikal bölgesinde, karbonik anhidraz ve proton ATPaz birlikte bulunmaktadır. Karbonik anhidraz proton ATPaz'a proton sağlamaktadır. Karbonik anhidraz enzimi solungaç epitelinin bazal bölgesinde yoktur. Bu sebeple, plazma solungaçlar içerisinden geçerken plazma $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ bikarbonat reaksiyonları, CA yokluğundan dolayı katalizlenmemekte ve bu reaksiyonlar kanın solungaçlardan geçmesi esnasında eritrositlerde katalizlenmektedir (Randall and Brauner 1998).

Görüldüğü gibi karbonik anhidraz enzimi canlı dokularında çok büyük öneme sahiptir. Bununla birlikte her canlıda farklı kısımlarda aktivite gösteren bu enzim sadece o canlının metabolizmasına spesifiktir. Yani CA farklı canlı metabolizmalarında farklı yapılarda ve molekül kütlelerinde fonksiyon gösteren ve canlılarda hayati önemi bulunan bir enzimdir. Dolayısıyla bu enzimin canlı metabolizmasında nerelerde ve hangi şekilde lokalize olduğu ve nasıl bir fonksiyon gösterdiğini belirleyebilmek için yukarıda da anlatıldığı şekilde birçok çalışmalar gerçekleştirilmiş ve enzim birçok canlıdan karakterize edilerek kinetik özellikleri incelenmiştir. Buradan da görüleceği gibi yaptığımız bu çalışmanın önemi açıktır.

Karbonik anhidraz enzimi, 1933 yılında Meldrum ve Roughton ile Stadie ve O'Brien tarafından ve birbirlerinden habersiz olarak keşfedilmiştir. Meldrum ve Roughton (1933), insan eritrosit karbonik anhidraz enzimini yüksek oranda saflaştırmalarına rağmen sığır eritrositlerinden saflaştırmayı 1930'lu yılların sonlarında gerçekleştirebilmiştir. Keilin ve Martin (1944), CA aktivitesinin çinko içeriği ile orantılı olduğunu bularak çinkonun katalizlemede spesifik rolü olduğunu bildirmişlerdir. Böylece CA enzimi tanımlanan ilk metalloenzim olarak tarihe geçmiştir.

CA ilk olarak memeli eritrositlerinden izole edilmiştir. Daha sonraki yıllarda enzim, insan eritrositleri, balık eritrositleri, sıçan eritrositleri, sıçan tükürüğü, sığır kemiği, sığır lökositleri, çeşitli bakteriler ve bitki kaynaklarından saflaştırılmış ve birçok kaynaktan karakterize edilmiştir. Enzimin memelilerdeki molekül kütlesi 30.000 Da civarında olduğu tespit edilmiştir (Feldstein and Silverman 1984., Krungkrai *et al.* 2001., Demir *et al.* 2001., Beydemir *et al.* 2002., Beydemir and Gülçin 2004).

Bu çalışmada gökkuşağı alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokuları CA enzimlerinin afinite kromatografisi ile saflaştırılması, karakterizasyonu enzimlerin bazı kinetik özelliklerinin belirlenmesi ve bazı ağır metal iyonlarının bu enzimler üzerine etkileri belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla öncelikle Erzurum Atatürk Üniversitesi Alabalık Çiftliğinden taze olarak balıklar alınmış ve hemen karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokuları çıkarılarak soğuk zincir kuralına uygun olarak laboratuvarımıza getirilmiştir.

Enzimin saflaştırılması işlemi iki basamakta gerçekleştirildi; 1) Alabalık karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokularından homojenatlar ayrı ayrı elde edildi. 2) Her dört kaynaktan elde edilen homojenat numuneleri için ayrı ayrı Sepharose 4B-L tirozin sülfanilamid afinite kromatografisi işlemi yapıldı. Bütün saflaştırma işlemleri soğuk ortamda gerçekleştirildi. Böylece sıcaklığın sebep olacağı enzim aktivitesindeki kaybın önüne geçilmiş oldu.

Önceleri CA saflaştırılması işlemlerinde kloroform-etanol ekstraksiyonu, Sephadex G-75 jel filtrasyon kromatografisi kullanılmıştır (Hall ve Schaer 1983). Fakat enzimler protein yapısındaki biyomakromoleküller olduklarından herhangi bir enzimin saflaştırılması esnasında uygulanan tekniklerin uygulama süreleri de çok büyük bir önem arz etmektedir. Bu yüzden afinite kromatografisi yöntemi için ligandların geliştirilmesiyle birlikte CA enzimi zaman almadan ve daha iyi bir yüzde verimle saflaştırılabilmektedir. Afinite kromatografisi ile bu enzimin saflaştırılmasında kolon materyali olarak Sepharose-4B kullanılmıştır (Arslan *et al.* 1996). Afinite kromatografisi çok basamaklı saflaştırma işlemleri esnasında enzim aktivitesinde meydana gelen önemli kayıpları elimine etmek ve enzimi yüksek bir verimle elde etmek için kullanılan en önemli saflaştırma metodudur (Ninfali *et al.* 1990).

Karbonik anhidraz enziminin saflaştırıldığı afinite kromatografisi kolonunda kolon materyali olarak kullanılan Sepharose 4B'ye L-tirozin uzantı kolu olarak takılmıştır ve buna da CA'nın kuvvetli bir inhibitörü olan sülfanilamid ligand olarak bağlanmıştır. Böylece bir dokudan CA'nın saflaştırma işlemi homojenat hazırlama işlemi ile birlikte 5-6 saat gibi kısa bir sürede tamamlanmıştır. Çizelge 4.1-4.4'lerden de görüldüğü gibi CA enzimi afinite kromatografisi ile kısa bir sürede, gökkuşağı alabalığı karaciğer dokusundan, spesifik aktivitesi 4318 (EÜ/mg protein) olan, %38 verimle ve yaklaşık 2260 kat; böbrek dokusundan, spesifik aktivitesi 17285 (EÜ/mg protein) olan, %31,7 verimle ve yaklaşık 1800 kat; kas dokusundan, spesifik aktivitesi 2300 (EÜ/mg protein) olan, %19 verimle ve yaklaşık 1080 kat; beyin dokusundan spesifik aktivitesi 2275 (EÜ/mg protein) olan %22,5 verimle ve yaklaşık 1283 kat saflaştırılmıştır. Hisar ve arkadaşları (2002) yine gökkuşağı alabalık eritrositlerinden CA enzimini Sepharose-4B

afinite kolonunun kullanılmasıyla 422,5 EÜ/mg protein spesifik aktivite, %20,9 verimle 222,4 kat saflaştırılmışlardır.

Hall ve Schaer (1983), kloroform-etanol ekstraksiyonu, Sephadex G-75 jel filtrasyon kromatografisi ve DEAE Biogel iyon değişim kolonu kullanarak gökkuşağı alabalıkları eritrositlerinden CA enzimi 3,7 kat saflaştırmışlardır. Buna ek olarak, insan eritrositlerinden CA-I izoenzimi 10366 EÜ/mg protein spesifik aktivite, %39,5 verimle ve yaklaşık 1000 kat ve HCA-II ise 52200 EÜ/mg protein spesifik aktivite, %22,4 verimle ve yaklaşık 5000 kat saflaştırılmıştır (Beydemir *et al.* 2002). Enzim *plasmodium falciparum*'dan katyon değiştirici Mono S kolonu, anyon değiştirici Mono Q kolonu ve Sepharose 12 jel filtrasyon kromatografisinin kombine edilmesiyle 18 EÜ/mg protein spesifik aktivite, %6,5 verimle ve 66,7 kat saflaştırılmıştır (Krungrai *et al.* 2001). Banerjee *et al.* 2004, rekombinant HCA-II'yi Sepharose-IDA-Zn²⁺ afinite kolonu kullanarak 0,74 EÜ/mg protein spesifik aktivite, %76 verimle ve 4,6 kat saflaştırmışlardır. Görüldüğü gibi gökkuşağı alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokularından saflaştırdığımız CA enzimlerinin spesifik aktiviteleri ve saflaştırma katsayıları insan eritrositlerinden saflaştırılan HCA-I ve HCA-II'nin spesifik aktivitelerinden ve saflaştırma katsayılarından daha düşük olmasına rağmen alabalık eritrositlerinden, *plasmodium falciparum*'dan saflaştırılan CA enzimlerinin spesifik aktivitelerinden ve saflaştırma katsayılarından çok daha yüksektir. Bizim deneylerimizde elde ettiğimiz en yüksek saflaştırma katsayısı karaciğer ve böbrek için belirlenmiştir. Kas ve beyin dokusunda ise elde edilen saflaştırma katsayıları birbirine yakındır. Deneyler sonucunda en fazla % verim alabalık karaciğer dokusundan elde edilmiştir. Bununla birlikte alabalık karaciğer dokusundan elde edilen % verim ile insan HCA-I den elde edilen % verim oranları birbirine yakındır. Alabalık kas ve beyin dokuları CA enzimlerinin % verimi ile HCA-II den elde edilen % verim de birbirine benzerlik göstermektedir. Bununla birlikte alabalık eritrositlerinden saflaştırılan CA'nın % verimi karaciğer ve böbrek dokularından elde edilen CA'nın kinde düşük olmakla birlikte kas ve beyin CA'sının % verimine benzemektedir.

Gökkuşığı alabalık dokularından elde edilen homojenatlar ve Sepharose-4B afinite kromatografisinden elde edilen saf enzim çözeltisinde protein miktarları Bradford yöntemiyle Şekil 4.1’de verilen standart grafikten kantitatif olarak belirlendi. Bu yöntemde boya olarak kullanılan Coomassie brilliant blue G-250 negatif bir yüke sahiptir ve protein üzerindeki pozitif yüke bağlanır. Boyanın kırmızı ($\lambda=465$ nm) ve mavi ($\lambda=595$ nm) formu mevcuttur. Birçok protein hemen hemen aynı sonuç eğrilerini verdiği için, yöntem geniş bir kullanım alanına sahiptir. Bu yöntem, az zaman alması, daha az reaktif gerektirmesi ve hassasiyetinin diğer protein tayin metotlarına nazaran daha iyi olması (1-100 μ g) sebebiyle avantajlı bir yöntemdir (Bradford 1976).

Afinite kolonundan elüe edilen saf enzim çözeltileri için kalitatif protein tayini yapıldı. Kalitatif protein tayininde kolondan elüe edilen enzim çözeltilerinin 280 nm’de absorbanslarına bakıldı. Bu yöntem proteinlerde bulunan tirozin ve triptofan aminoasitlerinin 280 nm’de ışığı maksimum absorblamaları esasına dayanmaktadır (Segel 1968).

Aktivitelerin belirlenmesinde iki yöntem kullanıldı. i). Hidrataz Aktivitesi: Bu yöntem Rickli ve arkadaşları tarafından modifiye edilen Wilbur-Anderson yöntemidir (Wilbur and Anderson 1948). CO_2 ’nin hidrasyonu sonucu açığa çıkan H^+ iyonundan ileri gelen pH değişiminin brom timol mavisi indikatörü ile belirlenip, geçen sürenin ölçülmesi esasına dayanır. Bu yönteme göre CA aktivitesi için bir enzim ünitesi (EÜ) enzim olarak meydana gelen CO_2 hidratasyonu süresini yarıya indiren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır. Enzimin aktivitesi (t_0-t_c/t_c) formülüne göre hesaplandı (Maren 1960).

ii. Esteraz Aktivitesi: Bu yöntem, karbonik anhidrazın ester bağı kırması esasına dayanmaktadır. Prensipte olarak, karbonik anhidraz substrat olarak kullanılan p-nitrofenilasetatı 348 nm’de absorbsiyon veren p-nitrofenol veya p-nitrofenolat’a hidroliz etmektedir. 348 nm’de p-nitrofenol ve p-nitrofenolat’ın her ikisi aynı absorbansı göstermektedir.



Bu yüzden fenol grubundaki H^+ iyonunun ayrışıp ayrışmaması ölçümü etkilememektedir (Verpoorte and Mehta 1967., Armstrong *et al.* 1966).

Enzimlerin saflığını kontrol etmek için ayrı ayrı sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) yapıldı. Jelde tek bandın gözlenmesi ile gökkuşağı alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokularından elde edilen CA enzimlerinin saf oldukları ispatlanmış oldu (Şekil 4.6, Şekil 4.8 ve Şekil 4.10).

Gökkuşağı alabalık dokularından saflaştırılan CA enzimleri için optimum pH'lar 1M Tris- SO_4 tamponunda 9,0 olarak belirlendi. Literatürde Van gölü balığı solungaç ve karaciğer dokularından elde edilen karbonik anhidraz enziminin aktivitesinin pH= 7,4'e kadar etkilenmediği ve pH= 8,0'in üzerinde enzim aktivitesinde önemli bir artış gözlemlenmiştir. (Testereci *et al.* 1999). Bununla birlikte Hisar ve arkadaşlarının (2002), yaptıkları bir çalışmada gökkuşağı alabalığı eritrositlerinden saflaştırılan CA enziminin optimum pH'sı 9,5 olarak tespit edilmiştir. Sığır midesinden karbonik anhidraz enziminin saflaştırıldığı bir çalışmada dış periferik, sitozolik ve iç periferik CA enzimlerinin optimum pH'sı 7,5 olarak bulunurken integral CA'nın optimum pH'sı ise 8,0 Tris- SO_4 tamponu olarak belirlenmiştir (Demir *et al.* 2005). Havuç yapraklarında ve köklerinde yapılan bir çalışmada, yapraklardan saflaştırılan CA enziminin optimum pH'sı 8,5 bitkinin köklerinden saflaştırılan CA enziminin optimum pH'sı ise 9,0 olarak belirlenmiştir (Demir *et al.* 1997). Görüldüğü gibi aynı kaynağın farklı kısımlarından saflaştırılan enzimin optimum pH'sı dahi birbirinden farklı olabilmektedir.

pH'nın sekizin üstünde olduğu bölgelerde CA II, III, IV, V ve VII izoenzimlerinin CO_2 'i hidratazlama kapasitelerinin arttığı belirlenmiş ve bu artış pH 8,0'de proton alıcısı olarak görev yapan rezidülerin varlığına bağlanmıştır (Qian *et al.* 1999).

Gökkuşağı alabalık dokularından saflaştırılan CA enzimi aktivitesi üzerine optimum iyonik şiddetin etkisi, enzim aktivitesinin optimum olduğu tris-sülfat tamponunda p-

nitrofenilasetat substratı kullanılarak 348 nm'de yapılan spektrofotometrik ölçümler sonucunda 1 M olarak belirlendi.

Gökkuşığı alabalık dokularından saflaştırılan CA enziminin stabil pH'sı, 1M Tris-SO₄ (pH= 7,2-9,0) ve 1M Potasyum-fosfat (pH= 5,0-8,0) tampon çözeltileri kullanılarak enzimin gösterdiği aktiviteler, belirli zaman aralıklarında spektrofotometrik olarak ölçüldü. Alabalık karaciğer dokusu için stabil 1 M Tris-SO₄ tampon çözeltisinde pH= 8,5 olarak belirlenirken, böbrek, kas ve beyin için stabil pH'lar ise aynı tampon çözeltide 9,0 olarak elde edildi (Şekil 4.27, Şekil 4.29, Şekil 4.31). Beydemir ve arkadaşlarının (2006), alabalık göz lensi üzerinde karbonik anhidraz enzimi üzerinde yaptıkları bir çalışmada enzimin stabil pH'sını 0,025 M Tris-SO₄ tampon çözeltisinde 7,2 olarak belirlemişlerdir. Bununla birlikte yine alabalık eritrosit CA enziminin stabil pH'sı 8,5 Tris-SO₄ olarak tespit edilmiştir (Hisar 2002). Buna göre gökkuşığı alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokularından saflaştırılan CA enzimlerinin stabil pH'ları alabalık göz lensinden saflaştırılan CA enziminin stabil pH'sından ve yine alabalık eritrosit CA'sının sahip olduğu stabil pH dan daha yüksektir.

Genelde her enzimin aktivitesinin optimum olduğu bir maksimum sıcaklık değeri vardır. Bu sıcaklığın üstünde aktivite düşmeye başlar ve enzimin üç boyutlu yapısında bozulma meydana gelir. Bizim çalışmamızda gökkuşığı alabalık karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokularından saflaştırılan CA enzimlerinin optimum sıcaklıkları 20°C ile 60°C arasında ve 5'er °C arayla enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak ölçülerek belirlendi. Dört doku için de optimum sıcaklık değeri 40°C olarak bulundu. Elde edilen aktivite değerlerinin logaritmaları alınarak bütün dokular için ayrı ayrı log k-1/T grafikleri çizildi. Bu grafikten faydalanılarak Arrhenius eğrisi elde edildi ve her bir doku için optimum sıcaklık, aktivasyon enerjisi (E_a), aktivasyon entalpisi (ΔH) ve Q₁₀ değerleri hesaplandı (Şekil 4.33-4.36). Hisar (2002), gökkuşığı alabalığı eritrositlerinde yaptığı çalışmada CA enziminin optimum sıcaklığının 25°C olduğunu belirlemiştir. Yine alabalık lens karbonik anhidraz enziminin optimum sıcaklığı 22,5°C olarak bulunmuştur (Beydemir *et al.* 2006). Havuç yapraklarından ve köklerinden saflaştırılan CA enziminin optimum sıcaklığı her iki kaynak için de 75°C olarak belirlenmiştir (Demir *et al.* 1997). Dolayısıyla, alabalık karaciğer, böbrek, kas ve beyin

dokuları CA'sı'nın optimum sıcaklığı yine alabalık eritrosit ve göz lensi CA enziminin optimum sıcaklığından daha yüksektir. Fakat bitkiden saflaştırılan karbonik anhidraz enziminin optimum sıcaklığından düşük olduğu görülmüştür.

Enzimler katalizledikleri reaksiyonların aktivasyon enerjilerini (E_a) düşürerek reaksiyonun ürünler tarafına doğru hızlanmasını sağlarlar. Aktivasyon enerjisinin yükselmesi ve düşmesi bazı parametrelerden etkilenebilir. Örneğin; reaksiyonun hızı geçiş kompleksi konsantrasyonu ile orantılıdır. Sıcaklığın yükseltilmesi; termik hareket ve enerjiyi arttıracığından geçiş kompleksi konsantrasyonu yükselecek ve bunun sonucu olarak da reaksiyon hızlanacaktır (Keha and Küfrevioğlu 2004, Lehninger 2005). Çalışmamızda substrat olarak kullanılan p-nitrofenilasetat ile yapılan sıcaklık denemelerinden sonra belirlenen aktivite değerlerinin logaritmaları alınarak $1/T$ 'ye karşı grafik çizildi ve bu grafikten elde edilen Arrhenius eğrisi vasıtasıyla alabalık karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokuları için E_a değerleri Bölüm 4.2.7'de anlatıldığı şekilde sırasıyla 2,88, 8,05, 6,36 ve 5,32 kcal/mol olarak belirlendi. Daha sonra, yine karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokuları için ΔH değerleri sırasıyla 2,28, 7,46, 5,77 ve 4,78 kcal/mol olarak bulundu. Bir enzim için, 10°C 'lik sıcaklık değişiminin meydana getirdiği aktivite farklılığı olan Q_{10} değeri de aralarında 10°C 'lik fark bulunan iki aktivite değerinin birbirine bölümü ile hesaplandı. Böylece, alabalık karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokuları için Q_{10} değerleri sırasıyla 1,53, 1,68, 1,56 ve 1,51 olarak belirlendi. Literatür araştırmaları sonucunda CA ile ilgili bu tür bir çalışmaya rastlanmamakla birlikte bazı enzimlerle böyle çalışmaların yapıldığı görülmüştür. Örneğin sıçan bağırsak glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzimi için yapılan çalışmada Q_{10} değerleri bulunmuştur (Danişan *et al.* 2004).

Gökkuşığı alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokularından saf olarak elde edilen CA enzimlerinin alt birimlerinin molekül kütlelerinin saptanmasında SDS-PAGE metodu kullanıldı. Şekil 4.6, Şekil 4.8 ve Şekil 4.10'da verildiği gibi karaciğer, böbrek, kas ve beyin numuneleri ile birlikte standart protein numuneleri SDS-PAGE'de aynı zamanda yürütüldü. log MK- R_f standart grafiği çizildi ve Şekil 4.7, Şekil 4.9 ve Şekil 4.11'de verildi. Daha sonra gökkuşığı alabalığı dokularından elde edilen enzim numunelerinin R_f değerleri yardımıyla standart grafikten alabalık karaciğer, böbrek, kas

ve beyin dokularından saflaştırılan karbonik anhidraz enzimlerinin alt birim molekül kütleleri sırasıyla 29.4000 Da, 28.700 Da, 30.300 Da ve 29.000 Da olarak hesaplandı.

Gökkuşığı alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokularından elde edilen CA enzimlerinin aktif formlarının molekül kütlelerinin hesaplanması amacıyla Sephadex G-200 jel filtrasyon kromatografisi yapıldı. Kolondan standart proteinler birer birer geçirildikten sonra log MK- K_{av} standart grafiği çizildi ve Şekil 4.16'da verildi. Daha sonra alabalık dokuları enzim numunelerinin K_{av} değerleri yardımıyla standart grafikten enzimlerin molekül kütleleri belirlendi. Bu metotla aktif enzimin molekül kütlesi, alabalık karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokuları için sırasıyla 31.000 Da, 26.900 Da, 31.500 Da ve 27.300 Da olarak bulundu. Karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokuları CA enzimleri için Sephadex G 200 jel filtrasyon kromatografisi ile hesaplanan molekül kütleleri ile SDS-PAGE yöntemi ile bulunan molekül kütleleri birbirlerine çok yakın değerler olmasından alabalık karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokularından saflaştırılan CA enziminin monomer yapıda olduğu tespit edilmiş oldu.

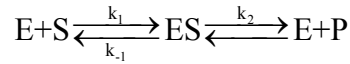
Literatürde çeşitli kaynaklardan saflaştırılan karbonik anhidraz enzimlerinin genelde monomer olarak işlev gördüğü rapor edilmektedir (Satoh *et al.* 2001., Sender *et al.* 1999., Baillie and Yellowlees 1998). Örneğin; insan eritrositlerinden izole edilen CA-I ve CA-II izoenzimleri, sığır eritrositlerinden saflaştırılan CA enziminin molekül kütleleri yaklaşık 30 kDa olarak belirlenmiştir. Buna ek olarak, yuvarlak ağızlı balıklardan *Myxine glutinosa* balıklarında eritrosit CA enziminin molekül kütlesi 29 kDa bulunmuştur (Peterson *et al.* 1997) İki farklı köpek balığında ise molekül kütlesi 36 kDa ve 40 kDa olarak bulunmuştur (Maynard and Coleman 1971). Bunun yanı sıra bitki kloroplastlarından elde edilen hekzamerik bir yapıya sahip olan CA'nın ise yaklaşık 180 kDa olduğu görülmüştür (Pocker and Joan 1974., Demir *et al.* 1999., Demir *et al.* 2000., Özdemir *et al.* 1997). Ek olarak, insan böbreğinde hücre zarına bağlı ve molekül kütleleri 66 kDa civarında olan CA izoenzimlerine de rastlanmıştır (Pocker and Sarkanen 1979).

Karbonik anhidraz enziminin fizyolojik şartlardaki substratı CO₂'dir. CO₂ diğer kullanılan substratlardan daha düşük K_M ve daha yüksek V_{max} 'a sahiptir. Enzimlerin

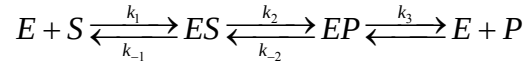
doğal substratı yerine aynı deney şartlarında analogları veya enzimin *in vitro* şartlarda farklı bir reaksiyonu katalizleyebilmesi ve bu reaksiyonda ürüne dönüştürdüğü substratı kullanıldığında genellikle enzim aktivitesinin düştüğü gözlemlenmiştir (Ulus *et al.* 1997). Çalışmamızda gökkuşağı alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokularından saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesinde substrat olarak kullanılan p-nitrofenilasetat için K_M , V_{max} , k_{cat} ve özgülük sabiti (V_0) değerleri belirlenmiştir. Bu amaçla 5 farklı p-nitrofenilasetat substratı konsantrasyonu kullanılarak spektrofotometrik olarak 348 nm’de enzim aktiviteleri belirlendi ve her bir dokudan saflaştırılan CA enzimi için Lineveawer-Burk grafiği çizilerek bu grafikten K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı (Şekil 4.37-4.40). Gökkuşağı alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokularından CA enzimlerinin K_M değerleri sırasıyla 0,66, 0,40, 1,29 ve 0,92 mM olarak bulundu. V_{max} değerleri karaciğer, böbrek, kas ve beyin için sırasıyla 0,126, 0,097, 0,173 ve 0,207 $\mu\text{mol/mg}$ protein dakika olarak grafik denklemi yardımıyla hesaplandı. Bu dokular için elde edilen K_M değerleri karşılaştırıldığında gökkuşağı alabalığı böbrek dokusu CA enzimi için hesaplanan K_M değeri diğer dokular için bulunan K_M değerlerinden daha küçüktür. Dolayısıyla buluna bu değer böbrek CA enziminin p-nitrofenilasetat substratına karşı diğer dokulardan daha fazla ilgisi olduğunu göstermektedir. Gökkuşağı alabalığından çalışılan diğer dokuların CA enzimlerinin p-nitrofenilasetat substratına ilgilerini K_M değeri en küçük olandan en büyük olana doğru sıralayacak olursak böbrek < karaciğer < beyin < kas olarak sıralayabiliriz. Bununla birlikte gökkuşağı alabalık eritrosit CA enziminde yapılan bir çalışmada enzimin p-nitrofenilasetat substratı için K_M değeri 2,47 mM ve V_{max} değeri ise 0,613 $\mu\text{mol/mg}$ protein x dakika olarak hesaplanmıştır (Hisar 2002). Çalışmamızda dört doku için hesapladığımız K_M değerlerinin tümü alabalık eritrosit CA’sı için bulunan K_M değerinden daha düşüktür. Dolayısıyla dokulardaki enzimin substrata ilgisi eritrosit CA’sına nazaran daha yüksektir. İnsan eritrositlerinden elde edilen HCA-I ve HCA-II izoenzimlerinin K_M değerleri sırasıyla 5,0, 4,3 mM iken V_{max} değerleri 1,0 ve 2,0 $\mu\text{mol/mg}$ protein dakika bulunmuştur (Çiftçi 1992). Sığır eritrositleri plazma membranındaki CA enziminin K_M ve V_{max} değerleri de 3,596 mM ve $1,948.10^{-3}$ mM /L.dak olarak bulunmuştur (Demir *et al.* 2000). Matthieu ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada turna balığı eritrosit CA enziminin K_M değeri 8,4 mM olarak tespit edilmiştir (Matthieu *et al.* 1999). Literatürde bulunan bu değerler de gökkuşağı alabalığı

dokularından saflaştırdığımız CA enzimlerinin substrata olan ilgilerinden daha düşük oldukları anlaşılmaktadır.

Doygun durumda herhangi bir enzim için limit hızını açıklayan daha genel bir hız sabiti olan k_{cat} 'ın belirlenmesi yararlıdır. k_{cat} sabiti bir mol enzimin birim zamanda ürüne dönüştürdüğü substratın mol sayısı olarak tanımlanmaktadır. Bunun diğer bir adı turnover sayısıdır. Eğer bir tepkimede değişik basamaklar varsa ve bir tanesi hız sınırlayıcı ise k_{cat} bu basamak için hız sabitine eşittir. Örneğin aşağıdaki basit tepkime için;



k_{cat} değeri k_2 'ye eşittir. Örneğin aşağıdaki tepkimede;



$k_{cat} = k_3$ 'dür. Çeşitli basamaklar kısmen hız kısıtlayıcı olduğu zaman, k_{cat} her bir reaksiyon için belirlenen çeşitli hız sabitlerinin kompleks bir türevi olabilir (Lehninger 2005). Çalışmamızda alabalık karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokuları CA enzimlerinin k_{cat} değerleri sırasıyla 32,8, 15,2, 28,8, 43,6 s^{-1} olarak hesaplandı (Çizelge 4.32). Bulunan bu değerler karşılaştırıldığında beyin dokusundan saflaştırılan CA enziminin turnover sayısının diğer dokulardan saflaştırılan CA'dan daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu verilere göre alabalık dokuları CA enzimlerinin turnover sayılarının küçükten büyüğe doğru sıralanışına göre böbrek < kas < karaciğer < beyin olarak sıralanabilir. Literatürde çeşitli kaynaklardan saflaştırılan CA enzimin k_{cat} değerleri substrat olarak CO_2 kullanılarak insan eritrosit HCA-I için $1,9 \times 10^4 s^{-1}$, HCA-II için $26 \times 10^4 s^{-1}$ ve turna balığı eritrosit CA'sı için $5,1 \times 10^4 s^{-1}$ olarak hesaplanmıştır (Matthieu *et al.* 1999). *Plasmodium falciparum* CA enzimi ile yapılan bir çalışmada k_{cat} değeri 10,4 dak^{-1} olarak belirlenmiştir (Krungkrai *et al.* 2001). Çalışmamızda enzimin fizyolojik şartlardaki substratı olmayan p-nitrofenilasetat kullanılması alabalık dokularından elde edilen CA enziminin turnover sayısının insan ve turna balığı eritrositleri CA enziminin turnover sayısından daha düşük olması sonucunu vermiştir.

Çeşitli enzimlerin katalitik etkilerinin veya farklı substratların aynı enzimle ürüne dönüşümünün karşılaştırılmasının en iyi yolu iki tepkime için k_{cat}/K_M oranının karşılaştırılmasıdır. k_{cat} ve K_M parametreleri enzimlerin kinetik verimliliklerini değerlendirmemizi sağlar, fakat parametrelerin her ikisi de bu iş için tamamen yeterli değildir. k_{cat}/K_M oranı bazen E + S'nin E + P'ye dönüşümü için hız sabiti olan özgülük sabiti olarak adlandırılır k_{cat}/K_M 'e, bir sıvı çözeltide E ve S'nin difüzleneceği hız tarafından sağlanan bir üst limit vardır. Bu difüzyon-kontrollü sınır 10^8 - 10^9 $M^{-1} \cdot s^{-1}$ dir ve bir çok enzim bu aralığa yakın k_{cat}/K_M oranına sahiptir. Örneğin; asetilkolinesteraz'ın özgülük sabiti ($V_0 = k_{cat}/K_M$) $1,6 \times 10^8$, katalaz'ın 4×10^7 β -laktamaz'ın $2,4 \times 10^8$ olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda gökkuşağı alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokularından saf olarak elde edilen CA enzimlerinin özgülük sabitleri sırasıyla 5×10^4 , 4×10^4 , $2,2 \times 10^4$ ve $4,7 \times 10^4$ olarak tespit edilmiştir. Yukarıdaki değerlerle karşılaştırıldığında alabalık dolularından elde edilen sonuçların diğerlerinden elde edilen sonuçlardan daha düşük olduğu görülmektedir. Bu da çalışmada CA'nın fizyolojik substratı olan CO_2 'in yerine p-nitrofenilasetat'ın kullanılmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Proteinler amino asitlerin peptit bağları ile bağlanması ile meydana gelirler. Proteinin yapısındaki amino asitler, R gruplarında ihtiva ettikleri fonksiyonel grupların üzerinden reaksiyon verirler. Örneğin, sistein -SH, tirozin -OH ve arginin guanidyum grupları üzerinden reaksiyon verirler. Sisteinde bulunan -SH grubu zayıf asit özelliği taşır ve reaksiyona girmeye oldukça yatkındır. Sistein eser miktarda da olsa ağır metal iyonlarına maruz bırakıldığı zaman merkaptanlar teşekkül eder. Sistein birçok enzimin aktif ve katalitik bölgelerinin çok önemli bir bileşenidir. Bu tip enzimler Ag^+ ve Hg^{+2} gibi ağır metal iyonlarıyla muamele edilirse -SH üzerinden merkaptanlar oluşur ve enzim aktivitesini kaybeder (Keha & Küfrevioğlu 2004).

Ağır metaller yerkabuğunda doğal olarak bulunurlar. Bozulmaz ve yok edilemezler. Küçük bir miktara kadar vücudumuza gıdalar, içme suyu ve hava yolu ile girerler. İz elementler gibi bazı ağır metaller (örneğin bakır, selenyum, çinko) insan vücudunun

metabolizmasını sürdürmek için gereklidirler. Bununla birlikte yüksek konsantrasyonlarda toksik olabilirler (<http://www.lenntech.com/heavy-metals.htm>).

Çevremizde çeşitli şekillerde bulunan ağır metallerin kolay kolay bozulmaması ve yok edilememesi bu çalışmanın önemini bir kez daha ortaya koymaktadır. Çünkü havaya, nehirlerle ve denizlere karışan atıklar içerisinde bulunan veya bulunabilecek ağır metaller insanların en fazla tükettikleri balıklar gibi birçok besin maddesi vasıtasıyla vücudumuza girmekte ve atılamayarak biyobirikime sebep olmaktadır. Bunun sonuçları ise günümüzde tartışılmaz boyuttadır.

Çalışmamızda ağır metal iyonları olarak Co^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Ag^{+} ve Cd^{+2} seçilmiştir. Gökkuşuğu alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokularından saflaştırılan karbonik anhidraz enzimlerinin aktivitelerini yarıya indiren ağır metal konsantrasyonları olarak bilinen IC_{50} değerleri belirlendi ve grafikler halinde Şekil 4.41-4.60'da verildi. Her bir doku için yukarıda sözü edilen ağır metal iyonlarının IC_{50} değerleri kendi aralarında karşılaştırıldıklarında karaciğer dokusunda IC_{50} değeri en küçükten en büyük olan ağır metal iyonuna doğru sıralandığında $\text{Ag}^{+} < \text{Co}^{+2} < \text{Cu}^{+2} < \text{Zn}^{+2} < \text{Cd}^{+2}$ olduğu görülmektedir. Karaciğer dokusu CA enzimi üzerinde Ag^{+} ve Co^{+2} en fazla inhibisyona sebep olmuşlardır. Böbrek CA'sı için IC_{50} değeri en küçükten en büyük olan ağır metal iyonuna doğru sıralandığında $\text{Co}^{+2} < \text{Zn}^{+2} < \text{Cu}^{+2} < \text{Ag}^{+} < \text{Cd}^{+2}$ olarak tespit edilmiştir. Böbrek dokusu CA enzimi üzerinde $\text{Co}^{+2} < \text{Zn}^{+2}$ yaklaşık eşit miktarda inhibisyona sebep olmuşlardır. Kas dokusu CA'sı için IC_{50} değeri en küçükten en büyük olan ağır metal iyonuna doğru sıralandığında $\text{Co}^{+2} < \text{Zn}^{+2} < \text{Cu}^{+2} < \text{Cd}^{+2} < \text{Ag}^{+}$ olarak tespit edilmiştir. Kas dokusundan saflaştırılan CA enzimini Co^{+2} ağır metal iyonu diğer metal iyonlarından çok daha düşük konsantrasyonda inhibisyona uğrattığı belirlenmiştir. Beyin dokusu CA'sı için ise IC_{50} değeri en küçükten en büyük olan ağır metal iyonuna doğru sıralandığında $\text{Co}^{+2} < \text{Zn}^{+2} < \text{Cu}^{+2} < \text{Cd}^{+2} < \text{Ag}^{+}$ olarak tespit edilmiştir. Beyin dokusundan saflaştırılan CA enzimi aktivitesi üzerine ağır metal iyonlarının etkinlik sırası kas CA'sının aktivitesi üzerindeki etkinlik sırasına benzemektedir. Literatürde ağır metallerin farklı enzimlerin *in vitro* ve *in vivo* aktiviteleri üzerine ve özellikle çeşitli kaynaklardan saflaştırılan karbonik anhidraz enzimi aktivitesi üzerine etkileri birçok çalışmada rapor edilmiştir. Nil tilapia'sı olarak geçen bir tatlı su balığı 96 saat farklı

konsantrasyonlarda Ag^+ , Cd^{+2} , Cr^{+6} , Cu^{+2} ve Zn^{+2} iyonlarına maruz bırakılmış ve karaciğer, böbrek, solungaç, bağırsak ve beyin dokularında *in vivo* katalaz aktivitesine bakılmıştır. Karaciğerde diğer metal iyonları katalaz aktivitesini artırırken 0,5 mg/L konsantrasyonundaki Ag^+ 'nin %44 oranında inhibisyona sebep olduğu tespit edilmiştir. Cd^{+2} ve Zn^{+2} 'nin solungaç katalazına her hangi bir etki yapmadığı gözlenirken yine Ag^+ ve Cr^{+2} metal iyonları % 50'nin üzerinde katalazı inhibisyona uğrattıkları belirlenmiştir. Böbrek,bağırsak ve beyin dokuları için de yaklaşık benzer sonuçlar alınmıştır (Atli *et al.*2006). Buna ek olarak, Vitale ve arkadaşları tatlı su yengeci solungaç CA enzimi üzerine Zn^{+2} , Cu^{+2} ve Cd^{+2} ağır metal iyonlarının inhibisyon etkilerini araştırdılar. Bu çalışma sonucunda Zn^{+2} için IC_{50} değeri $1,62 \times 10^{-2}$ Cu^{+2} için $3,75 \times 10^{-3}$ ve Cd^{+2} için $2,15 \times 10^{-2}$ mM olarak tespit edildi. İskorbit balığı CA enzimi üzerinde gerçekleştirilen diğer bir inhibisyon çalışmasında Ag^+ , Cd^{+2} Cu^{+2} ve Zn^{+2} ağır metal iyonları için belirlenen IC_{50} değerleri sırasıyla $3,5 \times 10^{-2}$, 0,9, $6,5 \times 10^{-2}$ ve 0,7 mM olarak tespit edilmiştir. Literatürde bulunan bu değerlerin bir kısmı bizim çalışmamızda belirlediğimiz IC_{50} değerlerini de desteklemektedirler.

Gökkuşığı alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokularından saflaştırılan CA enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Co^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Ag^+ ve Cd^{+2} ağır metal iyonları için K_i sabitlerinin belirlenmesi işleminde Lineweaver-Burk grafikleri kullanıldı (Segel 1975, Telefoncu 1986). Sonuçların hassas bulunabilmesi için her inhibitörlü çalışma için 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri elde edilmiştir (Şekil 4.61-4-80). Grafik çiziminde Microsoft-Excel programından faydalanılmıştır.

K_i sabitleri küçük olan inhibitörün enzime ilgisi büyük olduğundan dolayı enzimin katalitik aktivitesi üzerine inhibisyon etkisinin büyük olacağı bilinmektedir. Gökkuşığı alabalık dokularından saflaştırılan karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokuları CA enzimleri için Çizelge 4.62, Çizelge 4.66, Çizelge 4.74 ve Çizelge 4.80 verilen $(K_i)_{ort}$ değerleri sırası; karaciğer dokusu CA enzimi için küçükten büyüğe doğru kadmiyum, kobalt, bakır, gümüş ve çinko şeklindedir. $(K_i)_{ort}$ değerleri sırası; böbrek dokusu CA

enzimi için küçükten büyüğe doğru kobalt, çinko, bakır, kadmiyum ve gümüş şeklindedir. (K_i)_{ort} değerleri sırası; kas dokusu CA enzimi için küçükten büyüğe doğru kobalt, çinko, bakır, kadmiyum ve gümüş şeklindedir. (K_i)_{ort} değerleri sırası; beyin dokusu CA enzimi için küçükten büyüğe doğru kobalt, çinko, bakır, kadmiyum, gümüş ve şeklindedir (Şekil 4.61-4.65, Şekil 4.66-4.70, Şekil 4.71-4.76 ve Şekil 4.76-4.80).

K_i sabiti küçük olan inhibitörün enzime ilgisi büyük olduğundan dolayı enzimin katalitik aktivitesi üzerine inhibisyon etkisinin büyük olacağı bilinmektedir. Alabalık karaciğer CA enzimi için Çizelge 4.62’de verilen K_i değerlerine göre küçükten büyüğe doğru ağır metal iyonlarının sıralanışı; Cd^{+2} , Co^{+2} , Cu^{+2} , Ag^+ ve Zn^{+2} şeklindedir. Böbrek dokusu CA enzimi için Çizelge 4.66’de verilen K_i değerlerine göre küçükten büyüğe doğru ağır metal iyonlarının sıralanışı; Co^{+2} , Zn^{+2} , Cu^{+2} , Cd^{+2} ve Ag^+ şeklindedir. Kas dokusu CA enzimi için Çizelge 4.74’de verilen K_i değerlerine göre küçükten büyüğe doğru ağır metal iyonlarının sıralanışı; Co^{+2} , Zn^{+2} , Cu^{+2} , Cd^{+2} ve Ag^+ şeklindedir. Son olarak da alabalık beyin dokusu CA enzimi için Çizelge 4.80’de verilen K_i değerlerine göre küçükten büyüğe doğru ağır metal iyonlarının sıralanışı; Co^{+2} , Zn^{+2} , Cu^{+2} , Cd^{+2} ve Ag^+ şeklindedir. Bu sonuçlara göre böbrek, kas ve beyin dokuları CA enzimleri için en yüksek inhibisyon etkisine Co^{+2} metal iyonu sahiptir. Karaciğer dokusu CA enzimi aktivitesi üzerinde ise en yüksek inhibisyon etkisine Cd^{+2} metal iyonu sahiptir. Görüldüğü gibi enzim için bu maddeler oldukça küçük konsantrasyonlarda inhibisyon etkisi göstermişlerdir ve böylece bu metal iyonlarının CA enzimi için potansiyel inhibitör oldukları görülmektedir. Çizilen Lineweaver-Burk grafikleri yardımıyla K_i sabitleri hesaplanarak inhibitörlerin inhibisyon tipleri belirlenmiş ve Şekil 4.61-4.65, Şekil 4.66-4.70, Şekil 4.71-4.76 ve Şekil 4.76-4.80’de verilmiştir.

Literatürde çeşitli kaynaklardan saflaştırılan karbonik anhidraz enzimi ile ilgili birçok çalışma bulunmasına rağmen gökkuşağı alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokularından saflaştırılan CA enzimleri karakterizasyonu ve aktiviteleri üzerine ağır metallerin etkilerinin araştırılması konusunda herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bunun yanı sıra gökkuşığı alabalık eritrositlerinden saflaştırılan CA enzimi üzerinde bazı antibiyotiklerin ve kimyasal maddelerin inhibisyon etkileri araştırılmış ve K_i değerleri hesaplanmıştır.

Sonuç olarak tez kapsamında yapılan çalışmaların toplu değerleri Çizelge 5.1, Çizelge 5.2, Çizelge 5.3 ve Çizelge 5.4’de özetlenmiştir.

Çizelge 5.1. Gökkuşluğu alabalığı karaciğer CA enzimi için yapılan çalışmaların toplu sonuçları

CA Enzimi İçin Kinetik Çalışmalar		
Optimum pH	9,0 (1M Tris-SO ₄)	
Optimum iyonik şiddet	1M (Tris-SO ₄)	
Stabil pH	8,5 (1M Tris-SO ₄)	
Optimum Sıcaklık (°C)	40 °C	
Aktivasyon Enerjisi (Ea) (kcal/mol)	2,88	
Aktivasyon Entalpisi (ΔH) (kcal/mol)	2,28	
Q ₁₀	1,53	
K _M (p-nitrofenilasetat) (mM)	0,66	
V _{max} (p-nitrofenilasetat) (EÜ/ml)	0,126	
k _{cat} (p-nitrofenilasetat) (s ⁻¹)	32,80	
V ₀ (p-nitrofenilasetat) (mM x s ⁻¹)	5,0 x 10 ⁴	
Molekül Kütlesi Tayini (kDa)		
SDS-PAGE metodu ile	31,0	
Jel filtrasyon kromatografisi ile	29,4	
Ağır Metaller	IC ₅₀ (mM)	
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,03	
CuSO ₄ .5H ₂ O	30,0	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	47,1	
AgNO ₃	0,01	
CdCl ₂ .H ₂ O	15	
Ağır Metaller	Ortalama K _i (mM)	İnhibisyon Tipi
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,05	Yarışmalı
CuSO ₄ .5H ₂ O	1,95	Yarıyarışmalı
ZnSO ₄ .7H ₂ O	7,03	Yarışmalı
AgNO ₃	2,19	Yarıyarışmalı
CdCl ₂ .H ₂ O	0,0056	Yarıyarışmalı

Çizelge 5.2. Gökkuşığı alabalık böbrek dokusundan CA enzimi için çalışmaların toplu sonuçları

CA Enzimi İçin Kinetik Çalışmalar		
Optimum pH	9,0 (1M Tris-SO ₄)	
Optimum iyonik şiddet	1M (Tris-SO ₄)	
Stabil pH	9,0 (1M Tris-SO ₄)	
Optimum Sıcaklık (°C)	40 °C	
Aktivasyon Enerjisi (Ea) (kcal/mol)	8,05	
Aktivasyon Entalpisi (ΔH) (kcal/mol)	7,458	
Q ₁₀	1,675	
K _M (p-nitrofenilasetat) (mM)	0,400	
V _{max} (p-nitrofenilasetat) (EÜ/ml)	0,097	
k _{cat} (p-nitrofenilasetat) (s ⁻¹)	15,20	
V ₀ (p-nitrofenilasetat) (mM x s ⁻¹)	4,0 x 10 ⁴	
Molekül Kütlesi Tayini (kDa)		
SDS-PAGE metodu ile	28,7	
Jel filtrasyon kromatografisi ile	26,9	
Ağır Metaller	IC ₅₀ (mM)	
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,075	
CuSO ₄ .5H ₂ O	34,20	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,850	
AgNO ₃	98,88	
CdCl ₂ .H ₂ O	128,8	
Ağır Metaller	Ortalama K _i (mM)	İnhibisyon Tipi
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,035	Yarışmasız
CuSO ₄ .5H ₂ O	34,8	Yarışmasız
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,20	Yarıyarışmalı
AgNO ₃	257	Yarışmasız
CdCl ₂ .H ₂ O	103	Yarışmasız

Çizelge 5.3. Gökkuşığı alabalık kas dokusundan CA enzimi için çalışmaların toplu sonuçları

CA Enzimi İçin Kinetik Çalışmalar		
Optimum pH	9,0 (1M Tris-SO ₄)	
Optimum iyonik şiddet	1M (Tris-SO ₄)	
Stabil pH	9,0 (1M Tris-SO ₄)	
Optimum Sıcaklık (°C)	40 °C	
Aktivasyon Enerjisi (Ea) (kcal/mol)	6,36	
Aktivasyon Entalpisi (ΔH) (kcal/mol)	5,77	
Q ₁₀	1,56	
K _M (p-nitrofenilasetat) (mM)	1,29	
V _{max} (p-nitrofenilasetat) (EÜ/ml)	0,17	
k _{cat} (p-nitrofenilasetat) (s ⁻¹)	28,8	
V ₀ (p-nitrofenilasetat) (mM x s ⁻¹)	2,2 x 10 ⁴	
Molekül Kütlesi Tayini (kDa)		
SDS-PAGE metodu ile	30,3	
Jel filtrasyon kromatografisi ile	31,5	
Ağır Metaller	IC ₅₀ (mM)	
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,099	
CuSO ₄ .5H ₂ O	29,92	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	5,330	
AgNO ₃	157,46	
CdCl ₂ .H ₂ O	146,42	
Ağır Metaller	Ortalama K _i (mM)	İnhibisyon Tipi
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,065	Yarışmalı
CuSO ₄ .5H ₂ O	34,15	Yarışmasız
ZnSO ₄ .7H ₂ O	4,790	Yarışmasız
AgNO ₃	211,0	Yarışmasız
CdCl ₂ .H ₂ O	111,0	Yarışmasız

Çizelge 5.4. Gökkuşığı alabalık beyin dokusundan CA enzimi için çalışmaların toplu sonuçları

CA Enzimi İçin Kinetik Çalışmalar		
Optimum pH	9,0 (1M Tris-SO ₄)	
Optimum iyonik şiddet	1M (Tris-SO ₄)	
Stabil pH	9,0 (1M Tris-SO ₄)	
Optimum Sıcaklık (°C)	40 °C	
Aktivasyon Enerjisi (Ea) (kcal/mol)	5,32	
Aktivasyon Entalpisi (ΔH) (kcal/mol)	4,78	
Q ₁₀	1,51	
K _M (p-nitrofenilasetat) (mM)	0,92	
V _{max} (p-nitrofenilasetat) (EÜ/ml)	0,207	
k _{cat} (p-nitrofenilasetat) (s ⁻¹)	43,6	
V ₀ (p-nitrofenilasetat) (mM x s ⁻¹)	4,7 x 10 ⁴	
Molekül Kütlesi Tayini (kDa)		
SDS-PAGE metodu ile	29	
Jel filtrasyon kromatografisi ile	27,3	
Ağır Metaller	IC ₅₀ (mM)	
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,05	
CuSO ₄ .5H ₂ O	30,0	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,31	
AgNO ₃	159	
CdCl ₂ .H ₂ O	82,5	
Ağır Metaller	Ortalama K _i (mM)	İnhibisyon Tipi
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,014	Yarışmalı
CuSO ₄ .5H ₂ O	27,68	Yarışmasız
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,15	Yarıyarışmalı
AgNO ₃	193,86	Yarışmalı
CdCl ₂ .H ₂ O	94,18	Yarışmalı

Yukarıda verilen sonuçlara göre bu tez kapsamında, hemen hemen tüm canlı organizmalarda yaygın bir şekilde bulunan ve birçok metabolik olayda hayati önem taşıyan CA enzimi gökkuşığı alabalık karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokularından Sepharose 4B afinite kromatografisi kullanılarak tek bir basamakta ve çok kısa sürede yüksek bir saflıkla elde edildi ve enzimin karakteristik ve kinetik özellikleri belirlendi.

Ayrıca bu dokulardan elde edilen CA'nın esteraz aktivitesi üzerine 5 farklı ağır metal iyonunun inhibisyon etkileri araştırıldı ve küçük konsantrasyonlarda bile bu iyonların enzimi inhibisyona uğrattıkları tespit edildi. Daha sonra Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek inhibisyon tipleri belirlendi. Bu inhibisyon alabalıklarda asit-baz dengesi, osmoregülasyon ve iyon-regülasyon gibi fizyolojik fonksiyonlara zarar verebilir. Ayrıca tatlı su balıklarında CA üzerine toksikolojik bilgilerin az olmasından dolayı bu enzimin Co, Ag, Cd, Zn ve Cu metallerine duyarlılığı toksikolojik alanda bu enzim üzerine yapılacak çalışmalara temel teşkil edecektir. Diğer bir husus ise enzim inhibisyonu gibi biyokimyasal değişiklikler çevresel sağlığın indikatörleri olarak kullanılmaktadır. Çünkü bu biyokimyasal değişiklikler suda yaşayan organizmalar üzerine kimyasalların zararlı etkilerinin gözlemlenmesinde hızlı ve hassas araçlardır. Bu nedenle CA enzimi çevresel kirliliğin kalitatif tayininde biyomarker olarak kullanılabileceği kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

- Acierno, R., Maffia, M., Rollo, M. and Storelli, C., 1997. Buffer capacity in the blood of the hemoglobinless Antarctic fish *chionadraco hamatus*. Comp. Biochem. Physiol, 118, 989-992.
- Andrews, P., 1964. Biochem. J. 91, 222.
- Andrews, P., 1965. The gel filtration behavior of proteins related to their molecular weights over a wide range. Biochem. J. 96, 595-606.
- Armstrong, J.M., Myers, D.V., Verpoorte, J.A. and Edsall, J.T., 1966. Purification and properties of human erythrocyte carbonic anhydrase. J. Biol. Chem, 214, 5137.
- Arslan, O., Nalbantoğlu, B., Demir, N., Özdemir, H. and Küfrevioğlu, Ö.İ., 1996. A New Method for the Purification of Carbonic Anhydrase Isozymes by Affinity Chromatography. Turkish Journal of Medical Sciences, 26, 163-166.
- Asztalos, B., Nemcsok, J., Benedeczky, I., Gabriel, R., Szabo, A. and Refaie, O. J., 1990. The effects of pesticides on some biochemical parameters of carp (*Cyprinus carpio*). Arch. environ. Toxicol. 19, 275-282.
- Atli, G., Alptekin, Ö., Tükel, S. and Canli, M., 2006. Response of catalase activity to Ag^+ , Cd^{2+} , Cr^{6+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. Comparative Biochemistry and Physiology, 143, 218-224.
- Badger, M.R. and Price, G.D., 1994. The role of carbonic anhydrase in photosynthesis. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 45, 369-392.
- Baillie, B.K. and Yellowlees D., 1998. Characterization and function of carbonic anhydrases in the zooxanthellae-giant clam symbiosis. Proc Biol Sci, 22, 465-73.
- Banerjee, A.L., Swanson, M., Malik, S., and Srivastava, DK., 2004. Purification of recombinant human carbonic anhydrase-II by metal affinity chromatography without incorporating histidine tags. Protein Express. Purif, 37, 450-454.
- Beydemir, S., Çiftçi, M., Küfrevioğlu, O.İ. and Buyukokuroğlu, M.E., 2002. Effects of gentamisin sulfate on enzyme activities of carbonic anhydrase from human erythrocytes in vitro and from rat erythrocytes in vivo. Biol. Pharm. Bull. 25, 966-969.
- Beydemir, S., Çiftçi, M., Özmen, I., Buyukokuroğlu, M.E., Özdemir, H. and Küfrevioğlu, O.İ., 2000. Effects of some medical drugs on enzyme activities of carbonic anhydrase from human erythrocytes *in vitro* and from rat erythrocytes *in vivo*. Pharmacol. Res. 42, 187-191.
- Beydemir, Ş., Bülbül, M., Hisar, O., Söyüt, H. and Yanık, T., 2006. Carbonic anhydrase affinity purification and kinetic properties from rainbow trout lens. International Journal of Applied Chemistry,
- Beydemir, Ş., Gülçin, İ., 2004. Effect of melatonin on carbonic anhydrase from human erythrocyte in vitro and from rat erythrocyte in vivo. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 19, 193-197.
- Beydemir, Ş., Hisar, O., Gülçin, İ., Küfrevioğlu, Ö.İ. and Supuran, C.T., 2005. "Effects of low molecular weight plasma inhibitors rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) on human erythrocyte carbonic anhydrase-II isozyme activity in vitro and rat erythrocytes in vivo". J. Enzym. Inhib. Med. Ch, 20, 35-39.
- Blasco, J. and Puppo, J., 1999. Effect of heavy metals (Cu, Cd and Pb) on aspartate and alanine aminotransferase in *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia).

- Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, 122, 253-263.
- Boriack-Sjodin, P.A., Heck, R.W., Laipis, P.J., Silverman, D.N. and Christianson, D.W., 1995. Structure determination of murine mitochondrial carbonic anhydrase V at 2.45-Å resolution, implications for catalytic proton transfer and inhibitor design. *Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America*, 92, 10949-10953.
- Bottcher, K., Waheed, A. and Sly, W. S., 1994. Membrane-Associated Carbonic Anhydrase from the Crab Gill: Purification, Characterization, and Comparison with Mammalian CAs. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 312, 429-435.
- Burt, E., Darlington, M.V., Graf, G. and Meyer, H. J., 1992. Isolation, purification and characterization of an insect carbonic anhydrase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 22, 285-291.
- Busconi, L., Folco, E. J., Studdert, C. and Sanchez, J. J., 1992. Purification and characterization of a latent form of multicatalytic proteinase from fish muscle. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 102, 303-309.
- Bülbül, M., Hisar, O., Beydemir, S., Çiftçi, M. and Küfrevioğlu, Ö. I., 2003. The *In Vitro* and *In Vivo* Inhibitory Effects of Some Sulfonamide Derivatives on Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Erythrocyte Carbonic Anhydrase Activity. *J. Enzym. Inhib. Med. Ch.* 18, 371-375.
- Casini, A., Mincione, F., Vullo, D., Menabuoni, L., Scozzafava, A. and Supuran, C.T., 2002. Carbonic anhydrase inhibitors with strong topical antiglaucoma properties incorporating a 4-(2-aminopyrimidin-4-yl-amino)-benzenesulfonamide scaffold. *J. Enzym. Inhib. Med. Ch.* 17, 9-18.
- Casini, A., Scozzafava, A., Mincione, F., Menabuoni, L. and Supuran, C.T., 2002. Carbonic anhydrase inhibitors: synthesis of water soluble sulfonamides incorporating a 4-sulfamoylphenylmethylthiourea scaffold, with potent intraocular pressure lowering properties. *J. Enzym. Inhib. Med. Ch.* 17, 333-343.
- Chegwidden, W.R., Dodgson, S.J. and Spencer, I.M., 2000. In the Carbonic Anhydrase-New Horizons. Birkhauser Verlag, Basel, 343-363.
- Chegwidden, W.R., Edwards, Y. and Carter, N., 2000. The Carbonic Anhydrase-New Horizons. *Molecular Bases of Inherited Disease* (Scriver, C.R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., and Valle, D., eds) 8th Ed., pp. 2165-2204, McGraw-Hill, Inc., Newyork.
- Christensen, G. and Tucher, J., 1976. Effect of selected water toxicants on the in vitro activity of fish carbonic anhydrase. *Chem Biol. Interact*, 13, 181-192.
- Christie, K.N., Thomson, C., Xue, L.Z., Lucocq, J.M. and Hopwood, D., 1997. Carbonic anhydrase isoenzymes I, II, III and IV are present in human esophageal epithelium. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 45, 35-40.
- Clare, B.W. and Supuran, C.T., 2000. Carbonic Anhydrase Inhibitors. Part 86. A QSAR study on some sulfonamide drugs which lower intra-ocular pressure, using the ACE non-linear statistical method. *Eur. J. Med. Chem.* 35: 859-865.

- Çelik, İ., Çamaş, H., Arslan, O. and Küfrevioğlu, Ö.İ., 1996. The effects of some pepticides on human and bovine erythrocyte carbonic anhydrase enzyme activities in vitro. *J. Environ. Sci. Health*, 31, 2651-2652.
- Danişan, A., Ceyhan, D., Ögüs, I. H. and Özer, N., 2004. Purification and Characterization of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from Rat Small Intestine. *Protein J*, 23, 317-324.
- Demir, N., 1996. İhtiyoloji, İstanbul Üniversitesi Yayınları, s:116-290, İstanbul.
- Mutluay, H. ve Demirak, A., 1996. Su kimyası, Beta basım yayım dağıtım AŞ, s: 83-84, İstanbul.
- Demir, N., Demir, Y. and Nadaroğlu, H., 2001. Carbonic anhydrase from bovine bone. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 31, 33-47.
- Demir, N., Demir, Y. and Yıldırım, Ali., 1997. Carbonic anhydrases from leaves and roots of *Daucus carota*. *Phytochemistry*, 44, 1247-1250.
- Demir, Y., Demir, N. and Küfrevioğlu, Ö.İ., 1999. Carbonic Anhydrase from *Vicia canescens* Leaves. *Prep. Biochem. & Biotechnol.*, 29, 235-244
- Demir, Y., Demir, N., Nadaroğlu, H. and Bakan, E., 2000. Purification and Characterization of Carbonic Anhydrase from Bovine Erythrocyte Plasma Membrane. *Prep. Biochem. Biochem. & Biotechnol.*, 30, 49-59.
- Demir, Y., Nadaroğlu, H. and Demir, N., 2005. Purification and characterization of carbonic anhydrase from bovine stomach and effects of some known inhibitors on enzyme activity. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 20, 75-80.
- Devlin, T.M., 2002. *Biochemistry with Clinical Correlations*, Kanada.
- Ekinci, D., Beydemir, Ş. ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 2006. İnsan eritrositlerinden karbonik anhidraz izoenzimlerinin saflaştırılması ve bazı ağır metallerin in vitro inhibisyon etkilerinin incelenmesi. II. Afinite Teknikleri Kongresi, Zonguldağ.
- El-Beltagy, A. E., El-Adawy, T. A., Rahma E. H. and El-Bedawey A. A., 2004. Purification and characterization of an acidic protease from the viscera of boliti fish (*Tilapia nilotica*). *Food Chemistry*, 86, 33-39.
- Esposito, E.X., Baran, K., Kelly, K. and Madura, J.D., 2000. Docking of sulfonamides to carbonic anhydrase II and IV. *J. Mol. Graph. Model.* 18, 283-289.
- Feldstein, J. B., Silverman, D. N., 1984. Purification and characterization of carbonic anhydrase from the saliva of the rat. *J. Biol. Chem.* 259, 5447-5453.
- Fong, W.P. and Choy, K.F., 2001. Purification and characterization of grass carp mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Chemico-Biological Interactions*, 130-132, 161-171.
- Fresht, A., 1999. *Structure and Mechanism in protein science*. W.H. Freeman and Company, s. 166 New York.
- Gervais, M. R. and Tufts, B. L., 1999. Characterization of carbonic anhydrase and anion exchange in the erythrocytes of bowfin (*Amia calva*), a primitive air-breathing fish. *Comp. Biochem. Phys.* 23A, 343-350.
- Gilbert, H.F., 1992. *Basic Concepts in Biochemistry*, Mc Graw-Hill Inc, p.81 Germany.
- Stryer, L., 1988. *Biochemistry*. W.H. Freeman and Company, 3th Edition, 233-260, Newyork

- Gilmour, K.M., Henry, R.P., Wood, C.M. and Perry, S.F., 1997. Extracellular carbonic anhydrase and acid-base disequilibrium in the blood of the dog fish *Squalus acanthias*. *J. Exp. Biol.*, 200, 173-183.
- Gözükara, E., 1989. Enzimler Biyokimya. Ofset Repromat Ltd. Şti., 572-576, Ankara.
- Graham, D., Reed, M.L., Patterson, B.D., Hockley, D.G. and Dwyer, M., 1984. Chemical properties, distribution and physiology of plant and algal carbonic anhydrases. *Ann. NY Acad. Sci.* 429, 222-237.
- Grzyb, K. and Skorkowski, E.F., 2005. Characterization of creatine kinase isoforms in herring (*Clupea harengus*) skeletal muscle. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 140, 629-634.
- Gülçin, I., Beydemir, S. and Büyükokuroglu, M. E., 2004. *In vitro* and *in vivo* effects of dantrolene on carbonic anhydrase enzyme activities. *Biol. Pharm. Bull.*, 27, 613-616.
- Hall, G. E. and Schraer, R., 1983. Characterization of a high activity carbonic anhydrase isozyme purified from erythrocytes of *salmo gairdneri*. *Comp. Biochem. Phys.*, 75B, 81-92.
- Heath, A.G., 1987. *Water Pollution and Fish Physiology*. CRC Pres, Inc. Boca Raton, Florida, 52.
- Henry, R.P., Smatresk, N.J. and Cameron, J.N., 1988. The distribution of brachial carbonic anhydrase and the effect of gill and erythrocyte carbonic anhydrase inhibition in the canal catfish, *Ictalurus punctatus*. *J. Exp. Biol.*, 134, 201-218.
- Hewett-Emmett, D., 2000. In the Carbonic Anhydrase-New Horizons. Birkhauser Verlag, Basel, 29-78.
- Hisar, O., 2002. Gökkuşığı Alabalık Eritrositlerinden Karbonik Anhidraz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Bazı Antibiyotiklerin Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkilerinin İncelenmesi. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Hisar, O., Hisar, S.A., Kufrevioglu, O.İ. and Yanik T., 2003. Inhibitory effects of some antibiotics on activity of carbonic anhydrase from rainbow trout erythrocytes in vitro and in vivo. *Journal of Aquatic Animal Health*, 15, 221-228.
- Jebanathirajah, J.A. and Coleman, J.R., 1998. Association of carbonic anhydrase with a Calvin cycle enzyme complex in *Nicotiana tabacum*. *Planta*, 204, 177-82.
- Keha, .E. ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 2004. *Biyokimya, Aktif yayınları*, 97-125, Erzurum.
- Keilin, D. and Mann, T., 1944. Activity of purified carbonic anhydrase. *Nature* 153, 107-108.
- Krungskrai, S. R., Suraveratum, N., Rochanakij, S. and Krungskrai, J., 2001. Characterization of carbonic anhydrase in *Plasmodium falciparum*. *Int. J. Parasitol.* 31, 661-668.
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680.
- Lenntech, 2006. Heavy metals. ([http:// www.lenntech.com/heavy metals htm](http://www.lenntech.com/heavy_metals.htm)) (25.06.2006)
- Lesburg, C.A. and Christianson D.W., 1995. X-RAY crystallographic studies oengineered hydrogen-bond network in protein-zinc binding-site. *Journal of the American Chemical Society*, 117, 6838-6844.

- Lessard, J., Val, A.L., Aota, S. and Randall, D.J., 1995. Why is there no carbonic anhydrase activity available to fish plasma? The Journal of Experimental Biology, 198, 31-38.
- Lindskog, S. and Silverman, D.W., 2000. In the Carbonic Anhydrase-New Horizons. Basel, 175-196.
- Lindskog, S., 1997. Structure and mechanism of carbonic anhydrase. Pharmacol. Ther. 74, 1-20
- Lineweaver, H., and Burk, D., 1934. The determination of enzyme dissociation constants. J. Am. Chem. Soc, 57, 685.
- Lionetto, M.G., Giordano, M.E., Vilella, S. and Schettino T., 2000. Inhibition of enzymatic activities by cadmium. Aquatic Toxicology, 48, 561-571.
- Lonnerholm, G., Selking, O. and Wistrand, P.J., 1985. Amount and distribution of carbonic-anhydrases CA-I and CA-II in the gastrointestinal-tract. Gastroenterology, 88, 1151-1161.
- Maren, T.H., 1960. A simplified micromethod for the determination of carbonic anhydrase and its inhibitors. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 130, 26.
- Marshall, J.J., 1970. Chromatog 53,379.
- Mazur, C.F. and Iwama, O.K., 1993. Effect of handling and stocking density on haematocrit, plasma cortisol and survival in wild and hatchery-reared Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). Aquaculture, 112, 291-299.
- Meldrum, N.N. and Roughton, F.J.W., 1933. Carbonic anhydrase: its preparation and properties. Nature 80, 113-142.
- Morgan, I.J., Henry, R.P. and Wood, C.M., 1997. The mechanism of acute silver nitrate toxicity in freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is inhibition of Na⁺ and Cl⁻ transport. Aquat Toxicol, 39, 145-63.
- Mori, K., Ogawa, Y., Ebihara, K., Tamura, N., Tashiro, K., Kuwahara, T., Mukoyama, M., Sugawara, A., Ozaki, S., Tanaka, I. and Nakao, K., 1999. Isolation and characterization of CA XIV, a novel membrane-bound carbonic anhydrase from mouse kidney. Journal of Biological Chemistry, 274, 15701-15705.
- Motais, R., Fievet, B., Garcia-Romeo, F. and Thomas, S., 1989. Na⁺/H⁺ Exchange and pH regulation in red blood cells: role of uncatalyzed H₂CO₃ dehydration. Am. J. Physiol, 256, 728-735.
- Mughal, A.L., Iqbal, M.J., and Shakoori, A.R., 1993. Toxicity of short term exposure of sublethal doses of a synthetic pyrethroid, fenvalerate, on the Chinese grass carp, *Ctenopharyngodon idella*. Proc. Sem. Aqua. Dev. Pak., 49-74.
- Murakami, H. and Sly, W.S., 1987. Purification and characterization human salivary carbonic anhydrase. J.Biol. Chem., 262, 1382.
- Nelson, D.L. and Cox M.M., 2005. Lehninger Biyokimyanın İlkeleri. (Çeviren: N. KILIÇ), Palme Yayıncılık, Ankara, 243-293.
- Nikinmaa, M., Tithonen, K. and Paajaste, M., 1990. Adrenergic control of red cell pH in salmonid fish: roles of the sodium/proton Exchange, Jacobs-Stewart cycle and membrane potential. J. Exp. Biol, 154, 257-271.
- Norris, D.O., Camp, J.M., Maldonado, T.A. and Woodling, J.D., 2000. Some aspects of hepatic function in feral brown trout, *Salmo trutta*, living in metal contaminated water . Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, 127, 71-78.

- Ohkubo, M., Miyagawa, K., Osatomi, K., Hara, K., Nozaki, Y. and Ishihara, T. 2004 Purification and characterization of myofibril-bound serine protease from lizard fish (*Saurida undosquamis*) muscle. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 137, 139-150.
- Okuyama, T., Waheed, A., Kusomoto, W., Zhu, X.L. and Sly, W.S., 1995. Carbonic anhydrase IV role of removal of c-terminal domain in glycosylphosphatidylinositol anchoring and realization of enzyme-activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 320, (315-312).
- Onganer, Y., Şakiroğlu, H. and Küfrevioğlu, O. I., 1998. Temperature effect on polyphenol oxidase and investigation of thermodynamic functions. *Chim. Acta Turcica*, 26, 41-46.
- Özdemir, H., Küfrevioğlu, Ö.İ., Nalbantoğlu, B., Demir, N. and Bakan, N., 1997. The Inhibition Kinetics of Bovine and Human Erythrocyte Carbonic Anhydrase Isoenzymes with Some Active Cations. *Turk J. Med. Sci*, 27, 559-563.
- Parkkila, A.K., Scarim, A.L., Parkkila, S., Waheed, A., Corbett, J.A. and Sly, W.S., 1998. Expression of carbonic anhydrase V in pancreatic beta cells suggests role for mitochondrial carbonic anhydrase in insulin secretion. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 24620-24623.
- Parkkila, S. and Parkkila, A.K., 1996. Carbonic anhydrase in the elementary tract-roles of the different isoenzymes and salivary factors in the maintenance of optimal conditions in the gastrointestinal canal. *Scandinavian Journal of Biological Gastroenterology*, 31, 305-317.
- Perry, S.F., Wood, C.M., Walsh, P.J. and Thomas, S., 1996. Fish red blood cell carbon dioxide excretion in vitro: a comparative study. *Comp. Biochem. Physiol*, 113, 121-130.
- Peterson, R.E., Tu, C. and Linser, P.J., 1997. Isolation and Characterization of a Carbonic Anhydrase Homologue from the Zebrafish (*Danio rerio*). *J. Mol. Evol*, 44, 432-439.
- Pickering, A.D., and Pottinger, T.G., 1987. Crowding causes prolonged leucopenia in salmonid fish, despite acclimation. *J. Fish Biol.*, 20, 229-244.
- Pocker, Y. and Joan, S. Y., 1973. Plant carbonic anhydrase. Properties and carbon dioxide hydration kinetics. *Biochemistry*, 12, 5127.
- Pocker, Y. and Joan, S. Y., 1974. Plant carbonic anhydrase. Hydrase activity and its reversible inhibition. *Biochemistry*, 13, 5116.
- Pullan, L.M. and Noltmann, E.A., 1985. Purification and properties of pig muscle carbonic anhydrase III. *Biochimica et Biophysica Acta*, 839, 147-54.
- Qian, M., Earnhardt, J.N., Wadhwa, N.R., Tu, C., Laipis, P.J. and Silverman, D.N., 1999. Proton transfer to residues of basic pKa during catalysis by carbonic anhydrase. *Biochimica Biophysica Acta*, 1434, 1-5.
- Rahim, S.M., Deaungy, J.P. and Laurent, P., 1988. Identification and immunocytochemical localization of two different carbonic anhydrase isoenzymes in the teleostean fish erythrocytes and gill epithelia. *Histochemistry*, 89, 451-459.
- Raisanen, S.R., Lehenkari, P., Tasanen, M., Rahkila, P., Harkonen, P.L. and Vaananen, H.K., 1999. Carbonic anhydrase III protects cells from hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Faseb Journal*, 13, (3) p: 513-522.

- Randall, D.J. and Brauner, C., 1998. Interaction Between Ion and Gas Transfer in Freshwater Teleost Fish. *Comp. Biochem. Physiol*, 119, 3-8.
- Riol, M.J.M., Valiñas, M.C.N., Fernández, M.A.G. and López, M.P., 2001. Glutathione S-transferases from rainbow trout liver and freshly isolated hepatocytes: purification and characterization. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 128, (2) p: 227-235 .
- Roughton, F.J.W. and Booth, V.H., 1946. The effect of substrate concentration, Ph and other factors upon the activity of carbonic anhydrase. *Biochem. J.* 40,319.
- Satoh, D., Hiraoka, Y., Colman, B. and Matsuda, Y., 2001. Physiological and molecular biological characterization of intracellular carbonic anhydrase from the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Physiol*, 126, 1459-70.
- Schcer, A. and Dietsch, P., 1984. A 54000 molecular weight protein with carbonic anhydrase activity in rabbit erythrocytes. *Annals New York Acad. Sci.*, 429, 241.
- Segel, I.H., C. John Wiley and Sons, 1975. *Enzyme Kinetics*. New York.
- Sender, S., Bottcher, K., Cetin, Y. and Gros, G., 1999. Carbonic anhydrase in the gills of seawater- and freshwater-acclimated flounders *Platichthys flesus*: Purification, characterization, and immunohistochemical localization. *J. Histochem. Cytochem*, 47, 43-50.
- Shakoori, A.R., Iqbal, M.J., Mughal, A.L. and Ali, S.S., 1994. Biochemical changes induced by inorganic mercury on the blood, liver and muscles of freshwater Chinese grass carp, *Ctenopharyngodon idella*. *J. Ecotoxicol. Environ. Monit.*, 4, 81-92.
- Sly, W.W. and Hu, P.Y., 1995. Human carbonic anhydrase and carbonic anhydrase deficiencies. *Annu. Rev. Biochem*, 64, 375-401.
- Smith, K.S. and Ferry, J.G., 2000. Prokaryotic carbonic anhydrases *FEMS Microbiology Reviews* 24,335-366.
- Sohlberg, S., Czerwinska, K., Rasmusen, K. and Soli. N.e., 1990. Plasma concentration flumequine after intra-arterial and oral administration to rainbow trout (*Salmo gairdneri*) exposed to low water temperatures. *Aquaculture*, 84, 355-361.
- Solis, C., Olivera, A., Andrade, E., Ruvalcaba-Sil, J.L., Romero, I. and Celis, H., 1999. PIXE analysis of Zn enzymes. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 150, 222-225.
- Stams, T., Chen, Y., Boriack-Sjodin, P.A., Hurt, J.D., Liao, J., May, J.A., Dean, T., Laipis, P., Silverman, D.N. and Christianson, D.W., 1988. Structures of murine carbonic anhydrase IV and human carbonic anhydrase II complexed with brinzolamide. Molecular basis o isozyme-drug discrimination. *Protein Sience*, 7, 556-563.
- Supuran, C.T., and Scozzafava, A., 2001. Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Curr. Med. Chem.*, 1: 61-97.
- Supuran, C.T., Briganti, F., Tilli, S., Chegwidde, W.R. and Scozzafava, A., 2001. Carbonic anhydrase inhibitors: Sulfonamides as antitumor agents? *Bioorg. Med. Chem.* 9, 703–714.
- Supuran, C.T., Ilies, M. and Scozzafava, A., 1998. Carbonic Anhydrase Inhibitors – Part 29¹ : Interaction of isoenzymes I, II and IV with benzolamide-likke derivaties. *Eur.J.Med.Chem.* 33, 739-751.

- Supuran, C.T. and Scozzafava, A., 2002. Applications of carbonic anhydrase inhibitors and activators in therapy. *Expert Opin. Ther. Pat.* 12, 217–242.
- Supuran, C.T., Scozzafava, A., Casini, A., Mincione, F., Menabuoni, L., Caproiu, M.T., Maganu, M. and Banciu, M.D., 2000. Carbonic Anhydrase Inhibitors: Sulfonamides Incorporating Furan-Thiophene- and Pyrrole-carboxamido Groups Possess Strong Topical Intraocular Pressure Lowering Properties as Aqueous Suspensions. *Biororganic & Medicinal Chemistry* 8, 2145-2155.
- Tashian, R.E., 1992. Genetics of the mammalian carbonic anhydrases. *Adv. Genet.*, 30, 321-356.
- Telefoncu, A., 1986. Temel ve Uygulamalı Enzimoloji, Ege Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi yayını (Der) 59, İzmir.
- Testereci, H., Sekin, S. ve Ekin, S., 1999. Van Gölü Balığın (*Calcalburnus tarichi*) da Karbonik Anhidrazın Esteraz Aktivitesi Üzerine Bir Çalışma. *Tr. J. of Veterinary and Animal Sciences*, 23, 145-153.
- Tohse, H. and Mugiya, Y., 2001. Effects of enzyme and anion transport inhibitors on in vitro incorporation of inorganic carbon and calcium into endolymph and otoliths in salmon (*Oncorhynchus masou*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 128, 177-184.
- Tsuzuki, M. and Miyachi S., 1989. The function of carbonic anhydrase in aquatic photosynthesis. *Aquat. Bot.* 34, 85-104.
- Verpoorte, J. A., 1967. Esterase Activities of Human Carbonic Anhydrases B and C Mehta S, Edsall J.T. *J. Biol. Chem.*, 242, 4221-4229.
- Vitale, A. M., Monserrat, J. M., Castilho, P. and Rodriguez, E.M., 1999. Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). *Comp. Biochem. Physiol. C*, 122, 121–129.
- Whitaker, J.R., 1963. *Anal. Chem* 35, 1950.
- Wilson, J. E., 1971. An expeditious method for determining the activation energies of enzymatic reactions. *Arch. Biochem. Biophys.* 147, 471–474.
- Wood, C.M. and Munger, S., 1994. Carbonic anhydrase injection provides evidence for the role of blood acid-base status in stimulating ventilation after exhaustive exercise in rainbow trout. *J. Exp. Biol.* 94, 247-270.
- Yu, Z., Xie, L., Lee, S. and Zhang, R., 2006. A novel carbonic anhydrase from the mantle of the pearl oyster (*Pinctada fucata*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 143, 190-194.
- Yüreğir, G.T., 1981. Enzimler ve Enzim Kinetikleri. *Temel Biyokimya*, Kemal Matbaası, 1. cilt, s. 148-167, Adana.

ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Bayburt'ta doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Bayburt'ta tamamladıktan sonra 1995 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde başladığı üniversite eğitimini 1999 yılında başarıyla tamamladı. 1999 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde başladığı yüksek lisans eğitimini 2003'de başarıyla tamamladı. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde Biyokimya Anabilim Dalında doktora eğitimine başladı. 18 Ağustos 2003'den bu yana Milli Eğitim Bakanlığına bağlı okullarda Kimya Öğretmeni olarak çalışmaktadır.