

**KANGAL BALIĞININ (*Garra rufa*) FARKLI
DOKULARINDAN KARBONİK ANHİDRAZ
ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZASYONU ve BAZI METAL
İYONLARIN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Ümit Muhammet KOÇYİĞİT

Doktora Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Bilim Dalı

Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

2014

Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

KANGAL BALIĞININ (*Garra rufa*) FARKLI DOKULARINDAN
KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZASYONU ve BAZI METAL İYONLARIN
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Ümit Muhammet KOÇYİĞİT

KİMYA ANABİLİM DALI
Biyokimya Bilim Dalı

ERZURUM
2014

Her hakkı saklıdır



**T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



TEZ ONAY FORMU

**KANGAL BALIĞININ (*Garra rufa*) FARKLI DOKULARINDAN KARBONİK
ANHİDRAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU ve BAZI
METAL İYONLARIN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN danışmanlığında, Ümit Muhammet KOÇYİĞİT tarafından hazırlanan bu çalışma 05/12/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı – Biyokimya Bilim Dalı’nda Doktora tezi olarak ~~oybirliği/oy çokluğu (.../...)~~ ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREYİOĞLU

İmza :

Üye : Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

İmza :

Üye : Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR

İmza :

Üye : Prof. Dr. İsa GÖKÇE

İmza :

Üye : Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu ..11...../..12...../2014 tarih ve ..49../..1648..... nolu kararı ile onaylanmıştır.

**Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU
Enstitü Müdürü**

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Doktora Tezi

KANGAL BALIĞININ (*Garra rufa*) FARKLI DOKULARINDAN KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU ve BAZI METAL İYONLARIN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Ümit Muhammet KOÇYİĞİT

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

Bu çalışmada Sivas Kangal balıklı kaplıcalardaki doktor balıklar olarak bilinen Kangal balığının (*Garra rufa*) solungaç, kas ve göz dokularından karbonik anhidraz enzimi ilk kez saflaştırılmış ve karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Balığın solungaç, kas ve göz dokularından saflaştırılan CA enzimleri sırasıyla 12.77, 34.36 ve 17.50 EU x mg⁻¹ spesifik aktiviteleriyle, %15.4, %34.4 ve %21.2 verimleriyle ve 240.9, 203.3 ve 388.9 saflaştırma katsayıları ile Sepharose-4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırıldı.

Enzimlerin saflığını kontrol etmek amacıyla SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yapıldı ve her bir doku için tek bant gözlemlendi. Tüm dokulardan saflaştırılan CA'lar için bazı kinetik özellikler araştırıldı. Bunun için, optimum iyonik şiddet 1M Tris-SO₄ tamponu olarak belirlendi. Optimum ve stabil pH değerleri 4°C'de 1 M'luk sırasıyla Tris-SO₄ ve fosfat tamponlarında hesaplandı. Ayrıca, her bir doku için optimum sıcaklık, aktivasyon enerjisi (E_a), aktivasyon entalpisi (ΔH), Q₁₀ ve değerleri Arrhenius grafiğinden elde edildi. K_M ve V_{max} değerleri p-nitrophenylacetate substratı kullanılarak Lineweaver-Burk grafiklerinden hesaplandı. Kangal balığının solungaç, kas ve göz dokuları CA'larının k_{cat} değerleri sırasıyla 114.9, 19.2 ve 66.9 s⁻¹ olarak bulundu. Bunun yanı sıra, Kangal balığının dokularından saflaştırılan CA aktiviteleri üzerine bazı ağır metal iyonlarının (kobalt, kadmiyum, bakır, kurşun ve demir) inhibitör etkileri esteraz metodu kullanılarak *in vitro* şartlarda incelendi. Doku CA enzimleri aktivitelerinin %50'sinin inhibe edildiği ağır metal konsantrasyonları (IC₅₀) hesaplandı. Son olarak Lineweaver-Burk grafiklerinden inhibisyon sabitleri (K_i) tüm dokulardan saflaştırılan CA enzimleri için belirlendi.

2014, 153 sayfa

Anahtar Kelimeler: Kangal Balığı, *Gara rufa*, enzim saflaştırma, enzim inhibisyonu, karbonik anhidraz, afinite kromatografisi

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF CARBONIC ANHYDRASE FROM DIFFERENT TISSUES OF KANGAL FISH (*Garra rufa*) AND INHIBITION EFFECTS OF SOME METAL IONS ON THE ENZYME ACTIVITY

Ümit Muhammet KOÇYİĞİT

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry
Department of Biochemistry

Supervisor: Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

In the present study, carbonic anhydrase enzyme (CA) was firstly purified and characterized from gill, muscle and eye tissues from Kangal fish (*Garra rufa*) as known doctor fish, in which living Sivas Kangal spring. CA, which purified from gill, muscle and eye tissues was purified using by Sepharose-4B-L tyrosine-sulfanilamide affinity gel chromatography with specific activities of 12.77, 34.36 and 17.50 EU x mg⁻¹, yields of 12.44%, 34.36% and 25% and purification folds of 241, 201 and 389, respectively.

To check the purities of enzymes, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed, and single band was observed for each tissue. Some kinetic properties were performed. For this, optimum ionic strengths for the CAs from all tissues were found as 1 M Tris-SO₄ buffer. Optimum and stable pH values were determined in 1 M Tris-SO₄ and phosphate buffers at 4°C, respectively. In addition, the optimum temperature, activation energy (E_a), activation enthalpy (ΔH) and Q₁₀ values were calculated from Arrhenius plot for tissues. K_M and V_{max} values were determined from Lineweaver-Burk graphs using p-nitrophenylacetate as a substrat. K_{cat} values of the Kangal fish gill, muscle and eye CAs were found as 114.85, 19.21 and 66.88 s⁻¹, respectively. Also, the inhibitory effects of different heavy metals (cobalt, cadmium, copper, lead and iron) on Kangal fish gill, muscle and eye CAs activities were investigated using by 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. Finally, K_i values for these substances were also calculated from Lineviewer-Burk graphs.

2014, 153 pages

Keywords: Kangal fish (*Garra rufa*), enzyme purification, enzyme inhibition, carbonic anhydrase, affinity chromatography

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmanın deneysel kısmı Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Öncelikle çalışmalarında her zaman bana her türlü yardım ve desteği sağlayan, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım değerli hocam Sayın Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN'e,

Ayrıca, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi dekanı Sayın Prof. Dr. Yavuz ONGANER'e, bölümümüzün bütün imkanlarını benden esirgemeyen Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. Abdullah MENZEK'e, Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı ve değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREYİOĞLU'na, Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR'e ve Sayın Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR'e,

Çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya Araştırma Laboratuvarı çalışanı arkadaşlarım Sayın Uzm. Dr. Hülya GÖÇER, Sayın Öğr. Gör. Dr. Fevzi TOPAL ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Meryem TOPAL başta olmak üzere Biyokimya Araştırma Laboratuvarında bulunan bütün arkadaşlarıma ve Kimya Bölümünün tüm elemanlarına,

Ömrüm boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen bu günlere ulaşmamda büyük pay sahibi olan canım anneme, babama ve kardeşlerime, çalışmalarında ve hayatımda desteğini esirgemeyen çok kıymetli eşim Songül KOÇYİĞİT'e ve kızlarım Elvin Erva'ya ve Elif Beyza'ya çok teşekkür ediyorum.

Ümit Muhammet KOÇYİĞİT

Aralık, 2014

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Enzimler	1
1.2. Karbonik Anhidraz	8
1.3. Balıklarda Karbonik Anhidraz Enzimi.....	15
1.4. Kangal Balığı (<i>Garra rufa</i>)	17
1.5. Ağır Metaller	19
1.6. Afinite Kromatografisi	26
1.7. Çalışmanın Amacı	28
2. KAYNAK ÖZETLERİ	30
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	37
3.1. Materyal.....	37
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	37
3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar.....	37
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması	38
3.2. Yöntem	41
3.2.1. Kangal balığı dokularından CA enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu çalışmaları ile ilgili yöntemler	41
3.2.1.a. Sepharose-4B-L-tirozin sülfanilamit afinite jelinin hazırlanması	41
3.2.1.b. Kangal balığı solungaç, kas ve göz dokularının temini ve homojenat hazırlanması	43
3.2.1.c. Kangal balığı solungaç, kas ve göz doku homojenatlarının afinite kolonuna tatbiki ve elüsyonu	44
3.2.1.d. SDS-PAGE ile enzim saflığının kontrolü	44

3.3. CA Aktivitesi Tayini	47
3.3.1. Hidrataz aktivitesi.....	47
3.3.2. Esteraz aktivitesi.....	48
3.4. Protein Tayini	50
3.4.1. Kalitatif protein tayini	50
3.4.2. Kantitatif protein tayini	50
3.5. Kangal balığı dokularından saflaştırılan CA enzimleri İçin Yapılan Kinetik Çalışmalar.....	51
3.5.1. Karbonik anhidraz enzimi için optimum pH çalışması	51
3.5.2. Karbonik anhidraz enzimi için optimum iyonik şiddet çalışması	51
3.5.3. Karbonik anhidraz enziminin stabil olduğu pH'nın bulunması ile ilgili çalışmalar	51
3.5.4. Kangal balığı dokularından elde edilen CA enziminin optimum sıcaklığın, aktivasyon enerjisinin (E_a), aktivasyon entalpisinin (ΔH) ve Q_{10} değerlerinin hesaplanması ile ilgili çalışmalar.....	52
3.5.5. <i>p</i> -Nitrofenilasetat substratı için K_M , V_{max} , k_{cat} ve özgülük sabitinin (V_0) bulunmasına yönelik çalışmalar.....	53
3.5.6. Bazı metallerin kangal balığı dokularından elde edilen CA enziminin aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin incelenmesi.....	53
3.5.7. Kangal balığı dokularından elde edilen CA enzimi için inhibitör etkisi gösteren ağır metallerin K_i sabitlerinin bulunması.....	54
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	55
4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik.....	55
4.2. Kangal balığı solungaç, kas ve göz dokularından karbonik anhidraz enziminin saflaştırılma, karakterizasyon ve kinetik çalışma sonuçları	56
4.2.1. Karbonik anhidraz enziminin sepharose 4B-L-tirozin sülfanilamid afinite kromatografisi ile saflaştırılma kademeleri.....	56
4.2.2. Sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) sonucu	59
4.2.3. Kangal balığı solungaç, kas ve göz dokuları karbonik anhidraz enzimleri için optimum pH'ların belirlenmesi	61
4.2.4. Kangal balığı solungaç, kas ve göz dokuları karbonik anhidraz enzimleri için optimum iyonik şiddetlerin belirlenmesi	66

4.2.5. CA Enzimi İçin Yapılan Optimum Sıcaklık Çalışması.....	69
4.2.7. <i>p</i> -Nitrofenilasetat substratı için K_M , V_{max} , k_{cat} ve özgülük sabiti (V_0) değerlerinin belirlenmesi.....	79
4.2.9. Bazı ağır metallerin Kangal balığı solungaç, kas ve göz dokuları karbonik anhidraz enzimleri aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin sonuçları	82
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	122
KAYNAKLAR	144
ÖZGEÇMİŞ	154

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ABTS	2,2'-Azino-bis(3-etilbenzttiyazolin-6-sülfonik asit)
ABTS ^{•+}	2,2'-Azino-bis(3-etilbenzttiyazolin-6-sülfonik asit) radikali
CA	Karbonik anhidraz
CNBr	Siyonojen bromür
CARP	Protein bağlı karbonik anhidraz
Da	Dalton
E.C.	Enzim komisyon numarası
Eİ	Enzim inhibitör kompleksi
ES	Enzim substrat kompleksi
EİS	Enzim inhibitör subsrat kompleksi
E.Ü.	Enzim Ünitesi
hCA I	İnsan karbonik anhidraz I izoenzimi
hCA II	İnsan karbonik anhidraz II izoenzimi
I	İnhibitör
IC ₅₀	Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
IUB	Uluslararası Biyokimya Birliği
IOP	Yüksek Göz içi Basıncı
K _M	Maksimum hızın yarısına neden olan substrat derişimi
K _i	Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti
MA	Molekül kütlesi
MLP	Multikatalitik proteinaz enzimi
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PER	Amonyum persülfat
Q ₁₀	Aralarında 10°C fark olan iki aktivite değerinden büyük olanın küçük olanına oranı
SDS	Sodyum dodesil sülfat
T	Kelvin sıcaklık
TCA	Triklorasetik asit
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametilendiamin

Tris	Trihidroksimetil amino metan
V	Enzimatik reaksiyon hızı
V _{max}	Maksimum hız
V _o	Özgüllük sabiti
His	Histidin
Val	Valin
ΔH	Aktivasyon entalpisi
λ	Dalga boyu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. CO ₂ 'in farklı açılara sahip piramidal yapıda HCO ₃ ⁻ 'e kendiliğinden dönüşümü	9
Şekil 1.2. Eritrosit membranının klorür-bikarbonat değiştiricisi. Bu kotransport sistemi, transmembran elektriksel potansiyelde herhangi bir değişiklik yapmadan HCO ₃ ⁻ 'in giriş ve çıkışını sağlar. Görevi kanın CO ₂ taşıma kapasitesini artırmaktır	9
Şekil 1.3. hCA II izoenzimi tarafından CO ₂ 'in hidratasyon mekanizması	11
Şekil 1.4. Kırmızı kan hücresinde Jacob-Stewart çevrimi	16
Şekil 1.7. Saflaştırılmak istenen enzimin liganda bağlanması ve elüsyonu.	27
Şekil 1.8. Afinite kromatografisi	27
Şekil 3.1. CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose 4B-L-tirozin afinite jelinin hazırlanmasındaki reaksiyonların basamakları.....	42
Şekil 3.2. <i>p</i> -Nitrofenilasetatın <i>p</i> -nitrofenole dönüşüm mekanizması	48
Şekil 4.1. Bradford yöntemi ile proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart grafik.....	55
Şekil 4.2. Kargal balığı solungaç dokusu CA enziminin Sepharose 4B-L-tirozin sülfanilamid afinite kromatografisi ile saflaştırma grafiği.....	56
Şekil 4.3. Kargal balığı kas dokusu CA enziminin Sepharose 4B-L-tirozin sülfanilamid afinite kromatografisi ile saflaştırma grafiği.....	57
Şekil 4.4. Kargal balığı göz dokusu CA enziminin Sepharose 4B-L-tirozin sülfanilamid afinite kromatografisi ile saflaştırma grafiği.....	57
Şekil 4.5. Afinite kromatografisi ile saflaştırılan karbonik anhidraz enzimlerinin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi fotoğrafı	60
Şekil 4.6. Kargal balığı solungaç dokusu CA enziminin optimum pH'sını bulmak için 1 M Potasyum fosfat ve 1 M Tris-SO ₄ tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm değerleri	62
Şekil 4.7. Kargal balığı kas dokusu CA enziminin optimum pH'sını bulmak için 1 M Potasyum fosfat ve 1 M Tris-SO ₄ tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm değerleri	64

Şekil 4.8. Kangal balığı göz dokusu CA enziminin optimum pH'sını bulmak için 1 M Potasyum fosfat ve 1 M Tris-SO ₄ tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm değerleri	65
Şekil 4.9. Kangal balığı solungaç dokusu için Tris-SO ₄ çözeltisi kullanılarak farklı iyonik şiddetlerde yapılan aktivite ölçüm sonuçları	67
Şekil 4.10. Kangal balığı kas dokusu için Tris-SO ₄ çözeltisi kullanılarak farklı iyonik şiddetlerde yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	68
Şekil 4.11. Kangal balığı göz dokusu için Tris-SO ₄ çözeltisi kullanılarak farklı iyonik şiddetlerde yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	69
Şekil 4.12. Kangal balığı solungaç dokusu CA enziminin optimum sıcaklığının ölçülmesi için çizilen sıcaklık-aktivite grafiği (20°C'deki aktivite değeri %100 olarak alındı)	70
Şekil 4.13. Kangal balığı kas dokusu CA enziminin optimum sıcaklığının ölçülmesi için çizilen sıcaklık-aktivite grafiği.....	71
Şekil 4.14. Kangal balığı göz dokusu CA enziminin optimum sıcaklığının ölçülmesi için çizilen sıcaklık-aktivite grafiği.....	72
Şekil 4.15. Kangal balığı solungaç dokusu CA enziminin satabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 1 M Tris-SO ₄ tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçlarının grafiksel gösterimi	74
Şekil 4.16. Kangal balığı solungaç dokusu CA enziminin satabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 1 M Potasyum fosfat tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçlarının grafiksel gösterimi	75
Şekil 4.17. Kangal balığı kas dokusu CA enziminin satabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 1 M Tris-Sülfat tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçlarının grafiksel gösterimi	76
Şekil 4.18. Kangal balığı kas dokusu CA enziminin satabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 1 M Potasyum fosfat tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçlarının grafiksel gösterimi	77
Şekil 4.19. Kangal balığı göz dokusu CA enziminin satabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 1 M Tris-Sülfat tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçlarının grafiksel gösterimi	78

Şekil 4.20. Kangal balığı göz dokusu CA enziminin satabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 1 M Potasyum fosfat tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçlarının grafiksel gösterimi	79
Şekil 4.21. Kangal balığı solungaç CA enzimi için 5 farklı <i>p</i> -nitrofenilasetat konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiği	80
Şekil 4.22. Kangal balığı kas CA enzimi için 5 farklı <i>p</i> -nitrofenilasetat konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiği	80
Şekil 4.23. Kangal balığı göz CA enzimi için 5 farklı <i>p</i> -nitrofenilasetat konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiği	81
Şekil 4.24. Kangal balığı solungaç dokusu CA enzimi için 7 farklı Co^{2+} konsantrasyonunda elde edilen Aktivite (%) - $[\text{Co}^{2+}]$ grafiği	83
Şekil 4.25. Kangal balığı kas dokusu CA enzimi için 6 farklı Co^{2+} konsantrasyonunda elde edilen Aktivite (%) - $[\text{Co}^{2+}]$ grafiği	84
Şekil 4.26. Kangal balığı göz dokusu CA enzimi için 7 farklı Co^{2+} konsantrasyonunda elde edilen Aktivite (%) - $[\text{Co}^{2+}]$ grafiği	85
Şekil 4.27. Kangal balığı solungaç dokusu CA enzimi için 8 farklı Cd^{2+} konsantrasyonunda elde edilen Aktivite (%) - $[\text{Cd}^{2+}]$ grafiği	86
Şekil 4.28. Kangal balığı kas dokusu CA enzimi için 10 farklı Cd^{2+} konsantrasyonunda elde edilen Aktivite (%) - $[\text{Cd}^{2+}]$ grafiği	87
Şekil 4.29. Kangal balığı göz dokusu CA enzimi için 10 farklı Cd^{2+} konsantrasyonunda elde edilen Aktivite (%) - $[\text{Cd}^{2+}]$ grafiği	88
Şekil 4.30. Kangal balığı solungaç dokusu CA enzimi için 5 farklı Cu^{2+} konsantrasyonunda elde edilen Aktivite (%) - $[\text{Cu}^{2+}]$ grafiği	89
Şekil 4.31. Kangal balığı göz dokusu CA enzimi için 7 farklı Cu^{2+} konsantrasyonunda elde edilen Aktivite (%) - $[\text{Cu}^{2+}]$ grafiği.....	90
Şekil 4.32. Kangal balığı solungaç dokusu CA enzimi için 9 farklı Pb^{2+} konsantrasyonunda elde edilen Aktivite (%) - $[\text{Pb}^{2+}]$ grafiği.....	91
Şekil 4.33. Kangal balığı kas dokusu CA enzimi için 7 farklı Pb^{2+} konsantrasyonunda elde edilen Aktivite (%) - $[\text{Pb}^{2+}]$ grafiği.....	92
Şekil 4.34. Kangal balığı göz dokusu CA enzimi için 6 farklı Pb^{2+} konsantrasyonunda elde edilen Aktivite (%) - $[\text{Pb}^{2+}]$ grafiği.....	93

Şekil 4.35. Kangal balığı solungaç dokusu CA enzimi için 7 farklı Fe^{2+} konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[\text{Fe}^{2+}]$ grafiği.....	94
Şekil 4.36. Kangal balığı kas dokusu CA enzimi için 7 farklı Fe^{2+} konsantrasyonunda elde edilen Aktivite (%)- $[\text{Fe}^{2+}]$ grafiği.....	95
Şekil 4.37. Kangal balığı göz dokusu CA enzimi için 5 farklı Fe^{2+} konsantrasyonunda elde edilen Aktivite (%)- $[\text{Fe}^{2+}]$ grafiği.....	96
Şekil 4.38. Kangal balığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kobalt iyonunun etkisi	102
Şekil 4.39. Kangal balığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kadmiyum iyonunun etkisi	102
Şekil 4.40. Kangal balığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine bakır iyonunun etkisi.....	103
Şekil 4.41. Kangal balığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kurşun iyonunun etkisi	103
Şekil 4.42. Kangal balığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine demir iyonunun etkisi.....	104
Şekil 4.43. Kangal balığı kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kobalt iyonunun etkisi	110
Şekil 4.44. Kangal balığı kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kadmiyum iyonunun etkisi	110
Şekil 4.45. Kangal balığı kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kurşun iyonunun etkisi	111
Şekil 4.46. Kangal balığı kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine demir iyonunun etkisi	111
Şekil 4.47. Kangal balığı göz dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kobalt iyonunun etkisi	118
Şekil 4.48. Kangal balığı göz dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kadmiyum iyonunun etkisi	118
Şekil 4.49. Kangal balığı göz dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine bakır iyonunun etkisi	119
Şekil 4.50. Kangal balığı göz dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kurşun iyonunun etkisi	119

Şekil 4.51. Kangal balığı göz dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine demir	
iyonunun etkisi	120

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyonlar	13
Çizelge 1.2. Kangal balığı bilimsel sınıflandırılması.....	17
Çizelge 3.1. Ağır metallerin stok çözeltileri	41
Çizelge 3.2. Esteraz aktivitesi için 3 mL’lik kuvarz küvetlere kullanılan çözeltiler	49
Çizelge 3.3. Esteraz aktivitesi için 1 mL’lik kuvarz küvetlere kullanılan çözeltiler	49
Çizelge 4.1. Kangal balığı solungaç dokusundan CA enzimi saflaştırma sonuçları	58
Çizelge 4.2. Kangal balığı kas dokusundan CA enzimi saflaştırma sonuçları	58
Çizelge 4.3. Kangal Balığı Göz dokusundan CA enzimi saflaştırma sonuçları	59
Çizelge 4.4. Kangal balığı solungaç dokusu CA enziminin optimum pH’sı için 1 M Tris-SO ₄ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları	61
Çizelge 4.5. Kangal balığı solungaç dokusu CA enziminin optimum pH’sı için 1 M potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	62
Çizelge 4.6. Kangal balığı kas dokusu CA enziminin optimum pH’sı için 1 M Tris-SO ₄ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları	63
Çizelge 4.7. Kangal balığı kas dokusu CA enziminin optimum pH’sı için 1 M potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	63
Çizelge 4.8. Kangal balığı göz dokusu CA enziminin optimum pH’sı için 1 M Tris-SO ₄ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	64
Çizelge 4.9. Kangal balığı göz dokusu CA enziminin optimum pH’sı için 1 M potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	65
Çizelge 4.10. Kangal balığı solungaç dokusu için Tris-SO ₄ çözeltisi kullanılarak farklı iyonik şiddetlerde yapılan aktivite ölçüm sonuçları	66
Çizelge 4.11. Kangal balığı kas dokusu için Tris-SO ₄ çözeltisi kullanılarak farklı iyonik şiddetlerde yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	67
Çizelge 4.12. Kangal balığı göz dokusu için Tris-SO ₄ çözeltisi kullanılarak farklı iyonik şiddetlerde yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	68

Çizelge 4.13. Kangal balığı solungaç dokusu için sıcaklıklarda yapılan aktivite (%) değerleri.....	70
Çizelge 4.14. Kangal balığı kas dokusu için sıcaklıklarda yapılan aktivite (%) değerleri.....	71
Çizelge 4.15. Kangal balığı göz dokusu için sıcaklıklarda yapılan aktivite (%) değerleri (20°C'deki aktivite değeri %100 olarak alındı)	72
Çizelge 4.16. Kangal balığı dokuları CA enzimleri için optimum sıcaklık, E_a , ΔH ve Q_{10} tayini sonuçları.....	73
Çizelge 4.17. Kangal balığı solungaç dokusu CA enziminin satabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 1 M Tris-SO ₄ tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	74
Çizelge 4.18. Kangal balığı solungaç dokusu CA enziminin satabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 1 M Potasyum fosfat tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları	75
Çizelge 4.19. Kangal balığı kas dokusu CA enziminin satabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 1 M Tris-SO ₄ tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	76
Çizelge 4.20. Kangal balığı kas dokusu CA enziminin satabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 1 M Potasyum fosfat tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	77
Çizelge 4.21. Kangal balığı göz dokusu CA enziminin satabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 1 M Tris-SO ₄ tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	78
Çizelge 4.22. Kangal balığı göz dokusu CA enziminin satabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 1 M Potasyum fosfat tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	79
Çizelge 4.23. Kangal balığı solungaç,kas ve göz CA enzimi için <i>p</i> -nitrofenilasetat ile K_M , V_{max} , k_{cat} ve V_0 çalışmaları sonuçları.....	81
Çizelge 4.24. Kangal balığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enziminin esterez aktivitesi üzerine kobalt iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen kobalt iyonu konsantrasyonları ve aktivite (%) değerleri.....	82

Çizelge 4.25. Kangal balığı 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.....	83
Çizelge 4.26. Kangal balığı göz dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine kobalt iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen kobalt iyonu konsantrasyonları ve aktivite (%) değerleri.....	84
Çizelge 4.27. Kangal balığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine kobalt iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen kadmiyum iyonu konsantrasyonları ve aktivite (%) değerleri.....	85
Çizelge 4.28. Kangal balığı kas dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine kobalt iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen kadmiyum iyonu konsantrasyonları ve aktivite (%) değerleri.....	86
Çizelge 4.29. Kangal balığı göz dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine kobalt iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen kadmiyum iyonu konsantrasyonları ve aktivite (%) değerleri.....	87
Çizelge 4.30. Kangal balığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine kobalt iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen bakır iyonu konsantrasyonları ve aktivite (%) değerleri.....	88
Çizelge 4.31. Kangal balığı göz dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine kobalt iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen bakır iyonu konsantrasyonları ve aktivite (%) değerleri.....	89
Çizelge 4.32. Kangal balığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine kobalt iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen kurşun iyonu konsantrasyonları ve aktivite (%) değerleri.....	90

Çizelge 4.33. Kangal balığı kas dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine kobalt iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen kurşun iyonu konsantrasyonları ve aktivite (%) değerleri.....	91
Çizelge 4.34. Kangal balığı göz dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine kobalt iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen kurşun iyonu konsantrasyonları ve aktivite (%) değerleri.....	92
Çizelge 4.35. Kangal balığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine kobalt iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen demir iyonu konsantrasyonları ve aktivite (%) değerleri.....	93
Çizelge 4.36. Kangal balığı kas dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine kobalt iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen demir iyonu konsantrasyonları ve aktivite (%) değerleri.....	94
Çizelge 4.37. Kangal balığı göz dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine kobalt iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen demir iyonu konsantrasyonları ve aktivite (%) değerleri.....	95
Çizelge 4.38. Kangal balığı solungaç, kas ve göz dokularından saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine metal iyonları ile yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen IC ₅₀ değerleri.....	96
Çizelge 4.39. Kangal balığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kobalt iyonunun K _i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	97
Çizelge 4.40. Kangal balığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kadmiyum iyonunun K _i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	98

Çizelge 4.41. Kangal balığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine bakır iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	99
Çizelge 4.42. Kangal balığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kurşun iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	100
Çizelge 4.43. Kangal balığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine demir iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	101
Çizelge 4.44. Kangal balığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enzimi için 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan K_i değerleri ve inhibisyon tipleri	105
Çizelge 4.45. Kangal balığı kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kobalt iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları	106
Çizelge 4.46. Kangal balığı kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kadmiyum iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	107
Çizelge 4.47. Kangal balığı kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kurşun iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	108
Çizelge 4.48. Kangal balığı kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine demir iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	109

Çizelge 4.49. Kangal balığı kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi için 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan K_i değerleri ve inhibisyon tipleri	112
Çizelge 4.50. Kangal balığı göz dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kobalt iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	113
Çizelge 4.51. Kangal balığı göz dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kadmiyum iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	114
Çizelge 4.52. Kangal balığı göz dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine bakır iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	115
Çizelge 4.53. Kangal balığı göz dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kurşun iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	116
Çizelge 4.54. Kangal balığı göz dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine demir iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	117
Çizelge 4.55. Kangal balığı göz dokusundan saflaştırılan CA enzimi için 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan K_i değerleri ve inhibisyon tipleri.....	121
Çizelge 5.1. Kangal balığı solungaç dokusu CA enzimi için yapılan çalışmaların toplu sonuçları.....	141
Çizelge 5.2. Kangal balığı kas dokusu CA enzimi için yapılan çalışmaların toplu sonuçları.....	142
Çizelge 5.3. Kangal balığı göz dokusu CA enzimi için yapılan çalışmaların toplu sonuçları.....	143

1. GİRİŞ

1.1. Enzimler

Biyokimyasal reaksiyonların çoğu enzim denilen organik maddeler tarafından katalize edilir. Bu maddeler kendileri bir değişikliğe uğramadan hücre içinde meydana gelen reaksiyonların hızlarını artırır. On dokuzuncu yüzyıla kadar sütün ekşimesi, şekerin alkolle fermantasyonu gibi reaksiyonların sadece canlı organizmalar tarafından meydana getirilebileceğine inanılırdı. 1833 yılında şekeri parçalayan aktif etken kısmen izole edildi ve bugün amilaz olarak isimlendirilen bu enzime diastaz ismi verildi. Bundan kısa bir süre sonra mide suyundan proteinleri sindiren bir madde elde edilerek pepsin olarak isimlendirildi. Bu tip aktif preparatlara genel bir isim olarak ‘ferment’ denildi. Liebig bu fermentlerin canlı organizmalardan elde edilen cansız materyaller olabileceğini ileri sürerken Pastör ve arkadaşları halen fermentlerin canlı organizma ihtiva etmeleri gerektiğini savunuyorlardı. Bu sırada ferment terimi yerini tedrici olarak enzime bırakmağa başladı. İlk olarak 1878 yılında Kühne tarafından teklif edilen enzim kelimesi Yunanca’da ‘Maya İçinde’ anlamına gelmektedir. 1897 yılında Büchner şekerin fermantasyonunun canlı hücre ihtiva etmeyen maya hücreleri ekstraktı ile meydana geldiğini göstermiştir. 1926 yılında Sumner dokuz yıllık bir çalışma sonunda soya fasülyesi ekstraktından üreazı izole etti. Sumner’in çalışmaları devam ederken J. Northrop ve W. M. Stanley de ayrı ayrı enzimler konusunda çalışmalar yapmışlar ve bir çok enzimi izole etmişlerdir. Bu çalışmaları ile bu üç araştırmacı 1946 yılında Nobel ödülünü paylaşmışlardır. Son elli yıl içinde 2500 kadar enzim, çeşitli organizmalardan izole edilmiş ve çoğu kristalize edilmiştir (Kalaycıoğlu vd 2010).

Çeşitli metabolik reaksiyonların sonucunda canlılığın devamı, hücrelerde organik maddelerin yapılması ve yıkılması, sindirim, kas kasılması, hücre solunumu gibi önemli faaliyetlerin gerçekleşmesi enzimlerin katalitik etkisiyle sağlanmaktadır. Bu doğrultuda son zamanlarda üzerinde çok sayıda çalışma yapılan biyomolekül olarak yer almasındaki sebep ‘Hayat katalizdir’ ilkesidir (Karahalil 2009).

Vücuttaki tüm kimyasal reaksiyonları katalizleyen ve tam ürün verimi sağlayan enzimler, çok etkili ve spesifik biyolojik katalizörlerdir. Enzimle katalize edilen reaksiyonlar enzimle katalize edilmeyen reaksiyonlardan 10^3 - 10^{17} defa daha hızlı gerçekleşirler. Reaksiyonlara spesifik olan enzimler kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve bu reaksiyonlar esnasında fiziksel değişikliğe uğramış olsalar bile orjinal haline dönen katalizör moleküllerdir. Bazı katalitik RNA moleküllerinin küçük bir gurubu hariç bütün enzimler protein yapısındadır (Kalaycıoğlu vd 2010; Keha ve Küfrevioğlu 2012; Adam ve Yiğitoğlu 2012).

Enzimler incelendiğinde bir reaksiyonun sadece kinetik özelliğini etkilemelerine karşın termodinamik özelliklere etkilerinin olmadığı görülmüştür (Adam ve Yiğitoğlu 2012). Ayrıca enzimler, spesifik katalizleme fonksiyonlarından sorumludurlar. Bir kısım enzimler katalizleme fonksiyonlarını sadece protein yapılarıyla sağlarken, diğer bir kısmı bu görev için ya bir metal iyonu veya kompleks bir organik bileşiğe ihtiyaç duyarlar. Kofaktör olarak bilinen bu yapılar enzimin protein kısmına tutunmuş haldedirler (Sigman and Boyer 1990). Kofaktörler inaktif protein yapısındaki apo enzimlerin, aktif holo enzime (Holo Yununca'da tam veya bütün anlamına gelir) çevrilmesi için gerekli kimyasal maddelerdir. Bunlar esansiyel iyonlar ve organik bileşikler yani koenzimler olmak üzere ikiye ayrılır (Kalaycıoğlu vd 2010).

Bazı enzimler aynı organizmada aynı reaksiyonu kataliz ettikleri halde molekül yapıları bakımından farklılık gösterirler. Bunlara izoenzimler denilir (Kalaycıoğlu vd 2010). İzoenzimler substratlarına, kofaktörlerine ve inhibitörlerine karşı farklı ilgilere sahiptirler. İzoenzimlerin başlıca özellikleri arasında aminoasit sayı ve sırasının farklı olması, izoelektrik noktalarının farklı olması, her bir izoenzimin farklı bir geninin bulunması ve elektroforetik hareketliliklerinin farklı olması olarak sıralanabilir. İzoenzimler farklı dokularda lokalize olabildiği gibi bir hücrenin farklı subsellüler fraksiyonlarında da yerleşebilirler (Devlin 2002).

Enzimler önceleri genellikle 'az' eki ile biten (katalaz gibi) isimlerle ve bazı proteolitik enzimlerde 'in' eki ile biten (tripsin gibi) isimlerle isimlendirilmişlerdir. Katalize

ettikleri reaksiyonu (transkarboksilaz gibi) veya etki ettikleri substratı (üreaz gibi) belirleyici olabilen isimlendirme şekli aynı özelliklerde çok sayıda enzimin izole edilmesi ile yetersiz kalmıştır. Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB) bir enzim komisyonu kurmuş ve bu komisyon 1964 yılında sistematik bir isimlendirme ve sınıflandırma yapmıştır. Bu sistem üzerine 1972 ve 1978 yıllarında yapılan düzenlemelerle enzimlere kod numarası verilmiş ve enzimler altı ana gruba ayrılmıştır. Enzim kod numaraları noktalarla ayrılmış 4 rakamdan ibaret olup ilk rakam enzimin 6 ana enzim grubundan hangisine girdiğini, ikinci rakam etki ettiği kimyasal yapıyı ve fonksiyonel grubu, üçüncü rakam akseptörü, dördüncü rakam ise belli bir sınıfta enzimin aldığı sıra numarasını gösterir (Kalaycıoğlu vd 2010).

Sistematik adlandırma ise Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) enzimleri altı ana sınıfa ayırmaktadır. Bunlar;

1. Oksidoredüktazlar: Oksidasyon-redüksiyon yani yükseltgenme-indirgenme katalize eden enzimlerdir. Dehidrogenezlar, oksidazlar, redüktazlar, katalaz, monooksijenazlar ve peroksidazlar bu grubun üyeleridirler.
2. Transferazlar: İki substrat arasında hidrojen dışındaki grupların (C, N ve P) transferini gerçekleştiren enzimlerdir. Kinazlar, transketolazlar, transaldolazlar, alanin transferaz, heksokinaz ve glukokinaz bu gruptandır.
3. Hidrolazlar: Su katılması suretiyle bağların parçalandığı hidroliz reaksiyonlarını katalize eden enzimlerdir. Proteolitik enzimlerin tümü, lipazlar, esterazlar, fosfatazlar, nükleazlar bu grubun üyeleridir.
4. Liyazlar: Bu enzimler C-C, C-O ve C-N arasındaki bağları hidrolizden ve oksidasyondan farklı bir yolla parçalar veya bu atomlar arasında bir çift bağ ilave eder. ATP kullanılmaz. Hidratasyon ve dehidratasyon reaksiyonlarını katalize eden enzimler bu grubun üyeleridir. Tez kapsamında çalıştığım karbonik anhidraz enzim ailesi bu

gurubun üyelerindendir. Bu durum CA'nın karbonat hidroliz adından da anlaşılmaktadır.

5. İzomerazlar: Molekül içindeki geometrik, optik ve yapısal izomerizasyon değişikliklerini katalizleyen enzimlerdir. Molekül içi düzenleme yaparlar. Mutazlar, rasemazlar, epimerazlar bu sınıfta yer almaktadır.

6. Ligazlar: ATP ve GTP gibi enerjice zengin bir bağın kopması ile ortaya çıkan enerji yardımıyla iki molekülün bağlanması reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. Sentetazlar, karboksilazlar ve piruvat karboksilaz bu gruptandır (Lehninger 2005; Keha ve Küfrevioğlu 2012; Adam ve Yiğitoğlu 2012; Berg *et al.* 2014).

Bu gruplar aşağıdaki gibi özetlenebilir;

Çizelge 1.1. Enzimlerin sınıflandırılması

Sınıf	İsim	Kataliz ettiği reaksiyon tipi
1	Oksidoredüktazlar	Oksidasyon-redüksiyon reaksiyonları
2	Transferazlar	İki molekül arasında bir atom ya da grubun transferi
3	Hidrolazlar	Hidroliz reaksiyonları
4	Liyazlar	Substrattan hidroliz dışında bir yolla bir grubun ayrılması
5	İzomerazlar	İzomerizasyon reaksiyonları
6	Ligazlar	ATP veya diğer NTP yıkımı ile birlikte yeni bir bağın sentezi

Enzimlerin katalizleme güçleri, turnover sayısı ile ifade edilir. Turnover sayısı birim zamanda bir mol enzimin ürüne dönüştürdüğü substratın mol sayısıdır. Karbonik anhidraz enzimi turnover sayısı yüksek olan enzimlerdendir ve $600\ 000\ s^{-1}$ turnover sayısına sahiptir. Turnover sayısı en yüksek olan enzim $40.000.000\ s^{-1}$ ile katalazdır (Lehninger 2005; Keha ve Küfrevioğlu 2012).

Enzim konsantrasyonları aktivite üniteleri ile belirlenir. Bir miligram proteindeki enzim ünitesi sayısına spesifik aktivite denir. Bu, enzim saflığının ölçüsüdür. Enzim saflaştıkça spesifik aktivite artar. Spesifik aktiviteden başka bir de molar veya moleküler aktivitede vardır. Önceler çevirme sayısı da denilen bu terim, bir tek enzim molekülü tarafından optimal şartlarda bir dakikada çevrilen substrat molekül sayısıdır

Enzim üniteleri zaman içinde farklı şekillerde belirtilmiştir. Önceleri Bodanski, Karmen, Wroblewski gibi araştırmacı isimleri kullanılmış. 1961 yılında toplanan enzim komisyonu üniteleri standardize etmeye çalışmış ve bir uluslararası ünite tarifini ‘optimal ısı, pH ve substrat konsantrasyonunda bir dakikada bir mikromol substratın çevrilmesini katalize eden enzim miktarı’ enzim ünitesi olarak belirlemiştir. IU sembolü ile gösterilen bu ünite 1972 yılında yeniden düzenlenmiş ve ‘bir saniyede bir mol substratı çeviren enzim aktivitesi’ bir katal olarak isimlendirilip ‘kat’ sembolü ile gösterilmiştir (Kalaycıoğlu vd 2010).

Enzimlerin doku ve hücrelerdeki konsantrasyonu son derece az olduğundan miktarlarını ölçmek çok güçtür. En iyi enzim aktivitesinin ölçülme yöntemi enzimin katalitik aktivitesinin ölçülmesidir. Dolayısıyla enzim miktarı, enzim konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak meydana gelen ürün miktarı ölçülerek saptanmaktadır. Biyolojik maddelerde görev alan birçok enzim “Enzim Ünitesi” birimi ile ifade edilir (Champe, 1987). Bir çözelti veya doku ekstraktı içindeki enzimlerin miktarı, aktiviteleri esas alınarak belirlenir ve enzim ünitesi (EÜ) cinsinden verilir. 25°C’de ve optimal şartlarda 1 mikromol substratı bir dakikada ürüne dönüştüren enzim miktarı bir enzim ünitesi olarak kabul edilir. Spesifik aktivite, 1 mg protein başına düşen enzim ünitesi olarak tanımlanır ve bu da enzimin saflığının bir ölçüsüdür (Lehninger 2005).

Günümüze kadar enzimler üzerinde yapılan çeşitli çalışmalardan biri de enzim inhibisyonudur. Enzimlerin hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak aktivitelerinin bazı bileşikler tarafından azaltılması veya yok edilmesi olayına enzim inhibisyonu, buna neden olan bileşiklere ise inhibitör denilmektedir. İnhibitörler genellikle küçük molekül ağırlığına sahip bileşikler ya da iyonlardır. Birçok ilaç ve toksik madde, enzimler

üzerinde inhibitör etkisi yapabilir ve inhibisyona neden olabilir. İnhibitörler hem enzim etki mekanizmalarının, hem de metabolik yolların aydınlatılmasında biyokimyacılar için oldukça önemlidir (Keha ve Küfrevioğlu 2012; Şehitoğlu 2012).

Enzim inhibisyonu geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz olabilir. Geri dönüşümsüz inhibitör enzime çok sıkı bağlanır. Bu nedenle enzimden çok zor ayrışır. Geri dönüşümsüz inhibitörler enzimlere kovalent veya kovalent olmayan etkileşimlerle bağlanırlar (Berg *et al.* 2014). Geri dönüşümlü enzim inhibisyonu ise geri dönüşümsüz enzim inhibitörlerinin aksine enzim-inhibitör kompleksinden hızlıca ayrılırlar (Nar 2014).

Üç tip geri dönüşümlü inhibisyon vardır. Geri dönüşümlü enzim inhibisyonunda yarışmalı tip inhibisyonunda (kompetitif), enzim substrata bağlanarak ES (enzim substrat) kompleksi veya EI (enzim inhibitör) kompleksi oluşturur ancak EIS (enzim-substrat-inhibitör) kompleksi oluşturmaz. Yarışmalı inhibitör, enzimin substratına benzer ve enzimin aktif bölgesine bağlanarak substratın enzime bağlanmasını engeller. Substrat derişimi arttırılarak substratın aktif bölgeye bağlanması sağlanılır (Keha ve Küfrevioğlu 2012; Berg *et al.* 2014).

Yarışmasız inhibisyonda (nonkompetitif), inhibitör enzim substrat kompleksine bağlanır. Yarışmasız inhibitörün bağlanma bölgesi enzim-substrat kompleksi oluştuktan sonra açığa çıkar. Bu inhibisyonda substrat derişiminin değiştirilmesi inhibisyonu değiştirmez. Çünkü inhibitör ve substrat enzimin farklı bölgelerine bağlanır. İnhibitör serbest enzime bağlandığı gibi enzim-substrat kompleksine de bağlanabilir (Berg *et al.* 2014). Yarı yarışmalı inhibisyonda (unkompetitif) ise inhibitör serbest enzime değil, sadece ES kompleksine bağlanabilir (Keha ve Küfrevioğlu 2012).

Tıpta enzimolojiden yararlanılması: Tıp alanında enzimolojiden aratan bir ölçüde yararlanılmaktadır. Enzimlerin nicelik ve nitelik tayinlerinin yapılması suretiyle hastalıkların ve kalıtsal anomalilerin teşhisi yapılabilmekte ve prognaz hakkında fikir edinilebilmektedir. Enzim tayinlerinin hastalıkların teşhisindeki önemi, çeşitli

sebeplerle hücrelerden serbest hale geçen enzimlerin kandaki miktarlarının artması esasına dayanır. Bu sebepler (Kalaycıoğlu vd 2010);

1. Hücre membran permeabilitesinin artışı
2. Hücre ölümü
3. Enzim teşekkülünün artışı
4. Normal ıtrah yollarının tıkanması
5. Sirkülasyon bozukluğu

Enzimlerin endüstride kullanılması: Gıda endüstrisinde pastörizasyon ve sterilizasyonun uygun şekilde yapılıp yapılmadığını tespit için enzim tayinlerinden faydalanılır. Örneğin sütte bulunan alkali fosfataz enzimi, pastörizasyon için gerekli olan ısıda inaktive olur. Dolayısıyla pastörizasyondan sonra ALP enzimi tayini, pastörizasyonun uygun ısıda yapılıp yapılmadığını gösterir. Benzer şekilde gıdalardaki bakteriyel kontaminasyonun derecesinde, gıdada normal olarak bulunması gereken mikrobiyel enzimlerin tayini ile tespit edilir.

Ekinler çok rutubetli yerlerde muhafaza edilirse veya hasat zamanı yağmurlu geçerse buğday tohumlarında filizleme meydana gelir. Tohumlarda amilaz aktivitesi tayini filizlenmenin derecesini gösterir. Zira bu şekilde bekletilen tohumlarda α amilaz ve bazı proteolitik enzimlerde artış meydana gelir. Bu artış da nişasta ve proteinlerin yıkılmasına sebep olur.

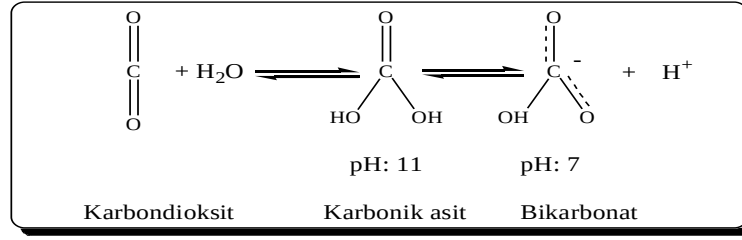
Glukoz izomeraz enzimi etkisiyle glukozun fruktoza çevrilmesi de ekonomik olan bir tatlandırıcı elde etmek bakımından ticari olarak uygulanan bir enzimatik işlemdir. Deri ve tekstil endüstrisinde bakteriyel proteazlar deriden yünün gevşetilerek ayrılmasında kullanılır (Kalaycıoğlu vd 2010).

1.2. Karbonik Anhidraz Enzimi

Karbonik anhidraz (Karbonat hidroliyaz; E.C.4.2.1.1), 1933 yılında birbirinden habersiz olarak Meldrum ve Rouhton ile Stadie ve O'Brien tarafından keşfedilmiştir. Enzim ilk olarak, eritrositlerden akciğer kılcal damarlarına bikarbonatın hızlı transferini gerçekleştiren katalitik faktörün arandığı bir çalışma sonucunda karakterize edilmiştir (Feldstein and Silverman 1984; Krungkrai *et al.* 2001; Beydemir *et al.* 2002; Beydemir and Gülçin 2004; Bursal 2009; Topal 2014).

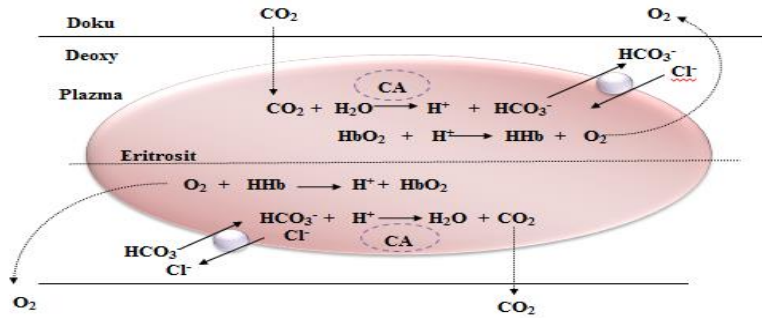
CA enzimi, canlı sistemlerde CO_2 'nin hidratasyonu ve HCO_3^- 'in dehidratasyonu reaksiyonlarını tersinir olarak katalizleyen önemli bir enzimdir. CA, canlı organizmada hemen hemen her dokuda görülebilir. Karbonik anhidraz (Karbonat hidroliyaz, E.C.4.2.1.1) aktif bölgesinde Zn^{2+} iyonu içeren bir metaloenzimdir. CA enziminin katalitik aktivitesi için Zn^{2+} iyonuna ihtiyaç vardır. Zn^{2+} ihtiva eden enzimler önemli fizyolojik etkilere sahiptir. Tüm enzimlerin üçte birinden fazlası aktivite için ya bağlı metal iyonu içermekte ya da bu tip iyonların eklenmesine ihtiyaç duymaktadır. Metal iyonları kimyasal reaktiviteyi arttıran birçok özelliğe sahiptir. Bu özellikler; pozitif yükleri, kinetik olarak stabil ancak sağlam bağlar oluşturma yeteneği ve bazı hallerde birden fazla yükseltgenme halinde kararlı kalma kapasitesidir (Nar *et al.* 2012; Şehitoğlu 2012; Berg *et al.* 2014; Nar 2014).

Vücudun oksijen kullanarak enerji üretimi olarak bilinen aerobik metabolizmanın başlıca son ürünü karbon dioksit (CO_2)'tir. Hayvanlar alemi ve insanların da dahil olduğu ve yaklaşık 4500 canlı türünün bulunduğu memelilerde CO_2 kana salınarak akciğerlere taşınır ve solunum yoluyla uzaklaştırılır. Alyuvarlarda, bulunduğu sürece CO_2 su ile tepkimeye girer. Bu tepkimenin ürünü, orta derecede kuvvetli bir asit olan ve proton kaybederek bikarbonat iyonuna (HCO_3^-) çevrilen karbonik asit (H_2CO_3)'tir (pKa:3,5) (Berg *et al.* 2014, Nar 2014).



Şekil 1.1. CO₂'in farklı açılara sahip piramidal yapıda HCO₃⁻'e kendiliğinden dönüşümü

CO₂ hidrasyonu ve HCO₃⁻ dehidrasyonu sıklıkla hızlı süreçlerde ve kısmen de taşınım süreçlerinde birleşmiştir. Bu yüzden hemen hemen tüm organizmalar karbonik anhidraz (CA) olarak anılan, tepkimenin hızını uygun durumdan daha da hızlandıran bu enzimdir. Örneğin, karbonik anhidrazlar kanda HCO₃⁻'i dehidrate eder ve kanın akciğerlerden geçerken nefes alıp verme ile dışarı atacağı CO₂'i oluşturur. Diğer taraftan CO₂'i HCO₃⁻'a dönüştürür. Bunlardan başka CO₂ hem de HCO₃⁻ çok çeşitli enzimlerin hem substratı hem de ürünüdür. Bu türlerin birbirlerine hızlı dönüşümü yeterli substrat düzeyinin sağlanması için gereklidir (Berg *et al.* 2014; Nar 2014).



Şekil 1.2. Eritrosit membranının klorür-bikarbonat değişiricisi. Bu kotransport sistemi, transmembran elektriksel potansiyelde herhangi bir değişiklik yapmadan HCO₃⁻'in giriş ve çıkışını sağlar. Görevi kanın CO₂ taşıma kapasitesini artırmaktır (Lehninger 2005).

CA, pek çok canlı organizmada altı farklı gen ailesi olan α -, β -, γ -, δ -, ζ - ve η -CA tarafından kodlanan bir metaloenzim ailesidir. α -, β - ve δ -CA'ları aktif bölgesinde Zn²⁺ iyonu içerirken γ -CA'lar ise Fe²⁺ içerir (ancak bu enzimler aktif bölgesinde Zn²⁺ veya Co²⁺ iyonları da içerebilirler). ζ -CA'ların aktif bölgesindeki Fe²⁺ iyonu kadmiyumla

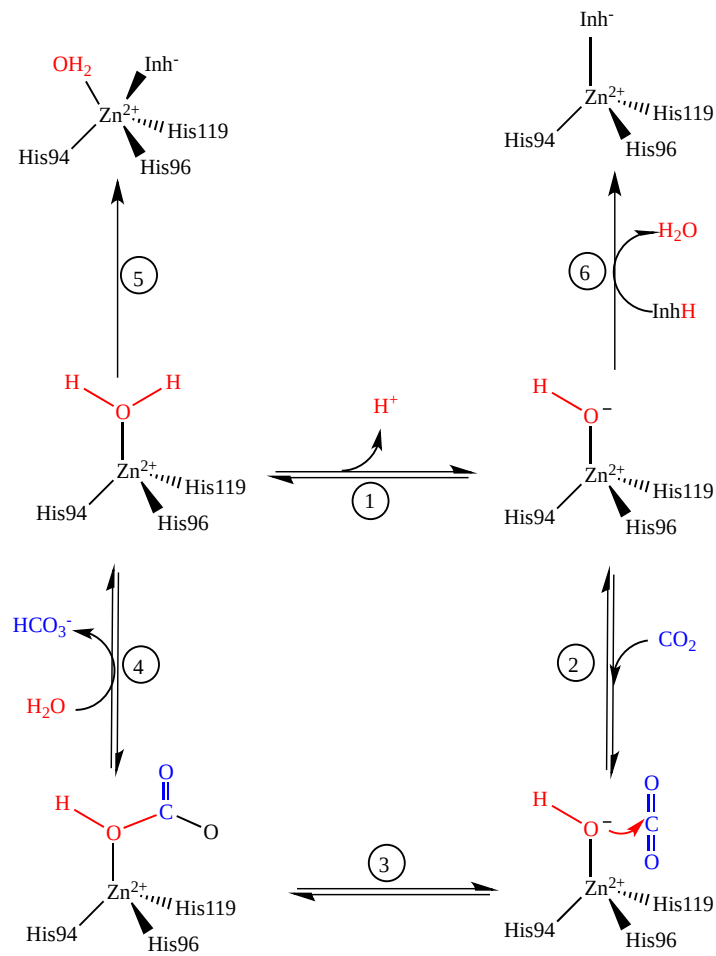
genellikle yer değiştirir. Bütün insan CA'ları α -sınıfıdır (Alterio *et al.* 2012). Memelilerde günümüze kadar α -CA enziminin 16 tane izoenziminin var olduğu tespit edilmiştir. Bu izoenzimlerden CA I, II, III, VII ve XIII sitozolik, CA IV, IX, XII ve XIV membrana bağlı, CA VA ve VB mitokondriyaldır ve CA VI tükürükte salgılanır. CA XV ise insanlarda ve diğer primatlarda eksprese olmaz rodent ve yüksek omurgalılarda olur (Göçer and Gülçin 2011; Nar *et al.* 2012; Aksu *et al.* 2013; Topal 2014; Güney *et al.* 2014).

İnsanlarda herbirinin kendi geni olan yedi CA enzimi bulunmaktadır. Dizi benzerliği ile hepsinin homolog olduğu açıkça gösterilmiştir (Berg *et al.* 2014). CA, CO₂'in hidrojen iyonuna geri dönüşümlü hidrasyonunu katalizleyen ve yaygın olarak memeli dokularında yer alan bir enzimdir. Aktif bölgesinde kataliz için bir tek çinko atomu mevcuttur (Mafra and Cozzolino 2004). Çinko büyüme, bağışıklık sistemi, hücre solunumu, redoks tepkimeleri ve protein sentezinde önemli görevleri olan birçok enzimin kofaktörüdür (Underwood 1977; Costanzo *et al.* 1995; Leung and Lsi 1996; Nar 2014).

Biyolojik fonksiyonu tam olarak bilinmeyen ve CARP'lar CA-ilişkili protein olarak bilinir. CA izoenzimlerinin katalitik fonksiyonları için önemli rezidülerin çoğu CARP ile ilişkilendirilir. Ancak önemli bir istisna vardır: CA'nın çinko ligantlarından biri olan His94, CARP deki Arg ile yerdeğiştirir. Bunun nedeni ise CARP'nin CO₂-hidrat aktivitesinin eksikliği ve çinkoya bağlı olmamasıdır. Ayrıca CARP'e CA'nın aktif bölgesindeki His94'e hidrojen bağı ile bağlı olan Gln92 yerine Glu bağlıdır (Elleby *et al.* 2000).

CA enzimi, hidrataz ve esteraz aktivitesine sahiptir. Fakat fizyolojik açıdan hidrataz aktivitesi önemlidir. Çünkü hidrataz aktivitesi, canlı organizmanın asit-baz dengesinin düzenlenmesi dolayısıyla önemlidir (Puscas *et al.* 2000). CO₂'in HCO₃⁻'a ve H⁺'a dönüşümünü katalizleyen bu enzimler, hücre membranında ve hücre içindeki değişik bir çok alanda gaz değişimi, iyon transportu ve asit baz dengesinin sağlanması olaylarına katılmaktadırlar (Chegwidden *et al.* 2000).

CA enzimi metabolizmada katılmış olduğu reaksiyonlardan dolayı pek çok doku ve organda oluşan patolojik durumdan etkilenir. CA'nın katalizlediği reaksiyonlar Çizelge 1.1'de gösterilmiştir. CA'nın en çok çalışılan izoenzimi CA II'dir. CA II eksikliğinde kemiklerin kireçlenmesi, böbrek taşı oluşumu ve beyinde kireçlenmeye neden olduğu tespit edilmiştir. Bu da CA II izoenziminin kemik, böbrek ve beyin dokuları için ne kadar önemli bir enzim olduğunu göstermiştir (Maren *et al.* 1997).



Şekil 1.3. hCA II izoenzimi tarafından CO₂'in hidratasyon mekanizması (Aksu *et al.* 2013)

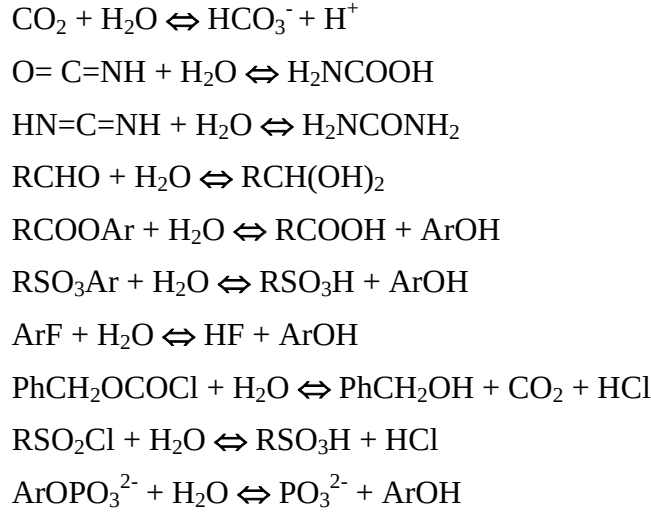
Su molekülleri pKa değerinin azalmasına bağlı olarak nötral pH'da ciddi miktarda çinko atomuna bağlı hidroksit iyonu oluşturarak proton kaybeder. Çinko bağlı OH⁻, sudan daha kolay bir şekilde CO₂'ye saldırabilecek güçlü bir nükleofildir. CA çinko bağlanma bölgesine yakın CO₂ için bağlanma bölgesi olarak rol alacak hidrofobik alana sahiptir.

Bunun için Şekil 1.3'deki mekanizma önerilmiştir. Bu mekanizmaya göre ilk önce çinko iyonu su molekülünden hidroksit iyonu oluşturan proton çıkışını kolaylaştırır.

1. Daha sonra karbon dioksit substrat olarak enzimin aktif bölgesine bağlanarak hidroksit iyonu ile tepkimeye girecek pozisyon alır.
2. Hidroksit iyonu CO_2 'e saldırarak onu HCO_3^- 'a çevirir.
3. Katalitik bölge HCO_3^- 'ın salınımı ve bir diğer su molekülünün bağlanmasıyla eski haline döner.
4. Bu şekilde çinko iyonuna su molekülünün bağlanması protonun salınması kolaylaştırır ve su molekülünün diğer reaktiflerin yakın bölgesine yerleşmesini sağlayarak geçiş halini uyarır (Berg *et al.* 2014).

Yüksek göz içi basıncı (IOP) ile ortaya çıkan glukom en ciddi göz hastalıklarından birisidir. %15-20 oranı ile körlüğe neden olmaktadır. Göz retinasında bulunan CA II izoenzimi, göz içi basıncı oluşumunun başlıca sorumlusudur. Glukomlu hastalarda IOP'yu düşürmenin en etkili yolu CA II aktivitesini inhibe etmektir. Bu amaçla başta asetazolamit olmak üzere heteroaromatik sülfonamidler uzun yıllardan beri kullanılmaktadır. İnsan eritrosit CA I ve II (hCA I ve II) izoenzimlerinin aminoasit dizilişlerinin belirlenmesi, bu konudaki çalışmaların başlangıç basamağı olmuştur. Sonraki yıllarda sığır, at, şempanze ve rhesus maymunlarına ait CA I izoenzimleri ve yine sığır, at, koyun ve tavşan kaynaklı CA II izoenzimlerinin aminoasit dizilişleri tam anlamıyla belirlenmiştir. Kas izoenzimi olarak da bilinen CA III'ün aminoasit dizilişi sığır ve atlarda da tespit edilmiş ve büyük oranda benzerlik tespit edilmiştir (Şahin 2008).

CA'nın katalizlediği bazı reaksiyonlar aşağıda verilmiştir (Suparan and Scozzafava 2001).

Çizelge 1.2. Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyonlar

*Ar = 2,4 dinitrofenil, R= Me veya Ph

Eritrositlerde CA I izoenzimi ile beraber CA II izoenzimi de bulunmaktadır. hCA I ve II izoenzimlerin en önemli fonksiyonları, doku kılcal damarlarının metabolik ürünü olan CO_2 'i HCO_3^- 'a, akciğer pulmoner kapillerde ise HCO_3^- 'in CO_2 'e dönüşmesi reaksiyonunu katalizleyerek solunum olayında görev almaktadırlar. CA I izoenziminin 25°C 'de turnover sayısı $2,5 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$, CA II izoenziminin turnover sayısı ise 10^6 s^{-1} 'dir. hCA I eksikliği tanı olarak belirlenmiş ancak herhangi bir klinik bulguyla ilgisi belirlenememiştir (Ren and Lindskog 1992; Sly and Hu 1995; Supuran and Scozzafava 2001). İskelet kasında CA enzimi olarak hCA III izoenzimi bulunmuş ve laktik asit-laktat dengesinde çok önemli bir rol oynadığı tespit edilmiştir. hCA III izoenzimi doku kapillerine CO_2 'in difüzyonunu kolaylaştırıcı bir görev yapmaktadır. hCA III izoenzimi, kırmızı kas dokusuna zayıf bağlı olup büyük oranda çözünebilir bir proteindir. Doku kapillerine CO_2 'in difüzyonunu kolaylaştırıcı bir görev yapmaktadır (Topal 2009; Göçer and Gülçin 2011).

hCA III düşük aktiviteli bir izoenzimdir ve bu enzimin turnover sayısı $8 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ 'dir. Aynı zamanda bu izoenzim yağ dokusunda yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır. hCA I ve II izoenzimleri gibi hCA III de *p*-nitrofenil asetatı hidroliz aktivitesine sahiptir. Ayrıca hCA III izoenziminin fosfataz aktivitesi de vardır (Topal 2009).

hCA IV izoenzimi membrana bağı bir enzimdir ve böbrek membranına bağı olarak bulunduğı gibi, bazı epitel hücrelerin membranlarına bağı olarak ve akciğerde kapiller hücrelerinin plazma yüzeylerine lokalize olmuştur. Yapılan çalışmalar, sülfonamid inhibitörlerinin üre sentezini azalttığını göstermiştir. Bu durum mitokondriyal CA enzimi olan hCA IV'ün, sitrulin sentezi için gerekli olan HCO_3^- iyonunu, sitrik asit devrinden gelen CO_2 'ten sağlayarak, üre devrinin ilerlemesinde büyük role sahip olmasıyla açıklanmaktadır (Okuyama *et al.* 1995; Şehitoğlu 2012).

hCA V izoenzimi de, bazı dokuların mitokondri matrikslerine yerleşmiş haldedir. Karbamoil fosfat sentetaz-I ve piruvat karboksilaz enzimlerine sıralı olarak HCO_3^- sağlamasından dolayı, üre devri ve glukoneogenezde rol oynadığı düşünülmektedir (Hazen *et al.* 1996). Tükrük bezinde CA enzimi olarak hCA VI ve hCA VII izoenzimi vardır. hCA VI izoenzimi, tükrük bezlerinden salgılanan bir enzimdir. İnsan tükrüğünden izole edilmiş olup, tükrüğün pH dengesini sağladığına inanılmaktadır (Lakkis *et al.* 1996).

CA VIII izoenzimi sıçan beyninden elde edilen bir cDNA kütüphanesinde keşfedilmiştir. İnsan cDNA homologlarının amino asit dizilişleri de tespit edilmiştir. CA VIII nörodejeneratif hastalıklar ile ilişkilendirilmiştir. CA VIII geni insanlarda yürüme ve zeka geriliğı ile bağdaştırıldığı gibi fare beyninde CA VIII'in aktivitesi yaşam boyu koşma duyusunu etkilediğı belirlenmiştir (Alterio *et al.* 2012).

Omurgalılarda filogenetik sınıflandırma üzerindeki proteinlerin fizyolojik fonksiyonları ve insan hastalıklarında iki katalitik izoform olan CA X ve CA XI izoenzimleri ile ilişkili hiçbir şey bilinmemektedir (Alterio *et al.* 2012).

Birçok hastalığın tespiti için CA IX izoenzimi belirleyicidir. CA IX'un inhibisyonu metaztaz ve primer tümörlerin gelişimini önemli miktarda etkilemektedir (Alterio *et al.* 2012). CA IX ve XII kanser hücrelerinde baskındır ve normal dokularda görülmez. Ayrıca CA IX izoenzimi mide mukozası ve beyin tümörlerinde bulunmaktadır. CA XII az çalışılmış ancak temelde antitümör ajandır (Alterio *et al.* 2012).

CA XIII muhtemelen CA XIV ile birlikte erkek üreme hücrelerinde tespit edilmiştir. Bu enzimin inhibisyonu doğum kontrollerinde kullanılabilir. CA XIV epilepsi hastalığı ile ilişkilendirilmiştir (Alterio *et al.* 2012).

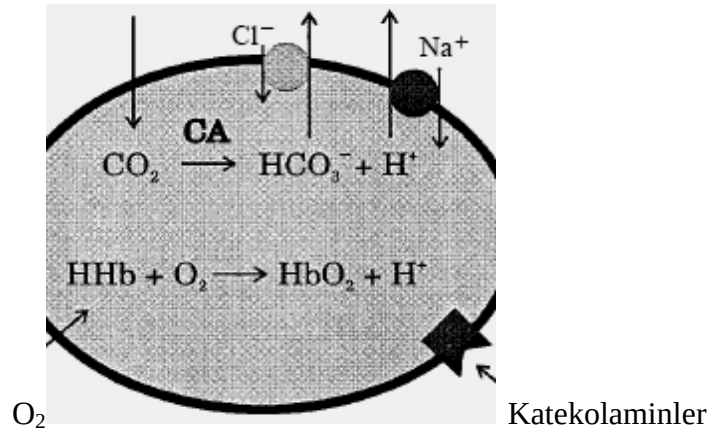
CA/inhibitor kompleksleri ile ilgili yapılan analizlerin sonuçlarına göre CA inhibisyonlarının iki temel sınıfı vardır. İnhibisyon etkilerini ya CA'nın aktif bölgesindeki Zn^{2+} iyonuna bağlı su molekülü ile yer değiştirerek veya Zn^{2+} iyonuna ilave bir liganta bağlanarak gösterirler. Bu inhibitörler, mononegatif anyonlar (halojenürler, NCO^- , SCN^- , CN^- gibi), ve bazı nötral organik bileşikler (sülfonamitler) enzime sıkıca bağlanarak dönüşümlü inhibisyona neden olmaktadır. Bunlar daha çok deneysel inhibisyon için kullanılır. Farmakokinetik özelliklerinden dolayı glukom, epilepsi gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Alterio *et al.* 2012; Şehitoğlu 2012).

CA, biyokimyada inhibitör özellikleri yanısıra biyofizik, biyoanalitik ve fiziksel-organik çalışmalarında ilaç tasarımlarında model olarak hizmet etmek için çok uygun bir proteindir (Aksu *et al.* 2013). Son yıllarda CA izoenzimleri biyomedikal uygulamalarda inhibitör veya aktivatörlerin dizaynı için ilgi çekici olmuştur (Alterio *et al.* 2012).

1.3. Balıklarda Karbonik Anhidraz Enzimi

Asit döngüsünde hız sınırlayıcı basamak plazmada bikarbonatın dehidratasyonudur. Katekolaminler bir adrenerjik reseptör yoluyla, plazma pH'sından kırmızı hücre pH'sını ayırarak Na^+/H^+ pompasını aktive ederler. Katekolaminler hipoksi durumunda olduğu gibi kanın içine girerler ve eritrosit membranının karşısında Na^+/H^+ pompasını aktive ederler. Balık eritrositlerinde asit Jacob-Stewart çevrimi yoluyla plazmadan eritrositlere transfer edilmektedir. Bu döngü CO_2 'in HCO_3^- 'a dönüşümüyle şekildedir (Lessard *et al.* 1994; Karahalil 2009).

Karbonik anhidraz enzimi memelilerdekine göre balıklarda bazı farklılıklar göstermektedir. Memelilerdekinin aksine teleostların kan plazmasında ve solungaç epitelinin iç yüzeyinde CA aktivitesi yoktur. Dolayısıyla $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ hidrasyon ve dehidrasyon reaksiyonları katalizsiz olarak gerçekleşir (Perry vd 1996; Acierno vd 1997). Hipoksi durumunda katekolaminler kana salıverilir ve bu durumda Na^+/H^+ pompasını aktive ederek, kırmızı kan hücrelerinin pH'sının artmasına yol açar. Memeli hücrelerindeki gibi balık eritrositlerinde plazmadan kırmızı kan hücrelerine yavaşça asit transferi Jacob-Stewart yolu üzerinden olur (Karahalil 2009).



Şekil 1.4. Kırmızı kan hücresinde Jacob-Stewart çevrimi

Plazmada CA'nın eksikliği katekolaminlerin eritrosit pH'sını düzenlemesine neden olur. Balık plazması tamamen CA'dan yoksundur ve solungaçların bazal membranında bulunmaz. Memeli plazması akciğer endotelyumunda CA aktivitesine sahip ve fakat katekolminler tarafından eritrositlerde pH düzenlemesi yoktur. Lessard vd 1989'da, katekolaminlerin alabalık kırmızı kan hücresi 0.5 mg/mL karbonik anhidraz varlığında bile pH'sını *in vitro* olarak artırdığını bulmuşlardır (Karahalil 2009).

CA aktivitesinin eksikliği kaslardan kana geçen serbest protonların plazma bikarbonatını titre etme hızını azaltır ve oluşan bu asidin eritrosit hücresine transferi çok yavaş olduğundan oluşan asidik ortamdan eritrositler korunur. Plazmadaki CA aktivitesinin eksikliği solungaç epitelindeki CO_2 atılımını da yavaşlattığından, kan

pH'sının dengelenmesini kolaylaştırır. Aşırı egzersiz ve hipoksi durumunda ise kana çok yüksek oranda asit salınımı gerçekleştiğinden, düşen kan pH'sı ile birlikte Hb'in oksijen bağlama kapasitesi azalmaktadır. Balık organlarının 2/3 kas oluşturur. Bu kaslarda etkin şekilde glikolitik yol aktiftir ve büyük miktarda kana asit bırakırlar. Plazmada CA bulunmuş olsaydı karbonik asit hızlıca kırmızı kan hücrelerine transfer olur ve oda bikarbonik aside dönüşerek ve CO₂ çıkışı olurdu. Her iki yol da CA aktivitesi yokluğunda çok yavaş meydana gelmektedir (Karahalil 2009).

Tatlı su balıklarının solungaç epitelinin apikal bölgesinde CA proton ATPaz ile birlikte bulunur. CA ATPaz'a proton temin etmektedir. CA solungaçların bazal bölgesinde bulunmadığından plazma solungaçlar içinden geçerken CO₂/HCO₃⁻ reaksiyonları CA yokluğundan dolayı katalizlenemez ve kanın solungaçlardan geçmesi esnasında eritrositlerde katalizlenmektedir (Randall and Bruauner 1998).

1.4. Kangal Balığı (*Garra rufa*) ve Kaplıca

Çalışmada kullanılan balık, Sivas'ın Kangal ilçesinin Kavak köyü yakınlarında termallerde ve derelerinde yetişen sardalya ya benzeyen balık türüdür. Sırtı gümüşü, karnı gri renktedir. Balığın yaşadığı suyun pH'sı 7,0-7,4 ve sıcaklığı ise 28-36°C Yaklaşık 3 ile 10 cm arası büyüklüğe sahip bir balık türüdür. Avrupalı Biyolog Heckel 1843 senesinde bu balık türünü tespit etmiş ve literatürlere Latince *Garra rufa* olarak geçmiş olup, sınıflandırılması aşağıda gösterilmiştir.

Çizelge 1.3. Kangal balığı bilimsel sınıflandırılması

Alem	<i>Animalia</i> (Hayvanlar)
Şube	<i>Chordata</i> (Kordalılar)
Sınıf	<i>Actinopterygii</i> (Işınsal Yüzgeçliler)
Takım	<i>Cypriniformes</i> (Sazansılar)
Familya	<i>Cyprinidae</i> (Sazangiller)
Cins	<i>Garra</i>
Tür	<i>Garra rufa</i>

Bu balıkların en önemli özelliği protein besisi yetersizliği sebebi ile insanlara yaklaşması ve cilt ve ten üzerindeki ölü deri parçalarını ve bir çeşit genetik cilt hastalığı *Atopik dermatit*'i kemirmeleridir. Bir çeşit tuz salyasıda kemirme sırasında deri altına karışmakta ve bu şekilde sedef (*Psoriasis*) hastalığını iyileştirdiğine inanılmaktadır.

Kangal balıklı kaplıcadaki bu balıkların hasta deri bölgelerini özellikle kemirmeleri, suda bulunan selenyum, yüksek rakımdaki doğal ultraviyolesi ile sedef tedavisinde olumlu sonuçlar elde edildiğinden bu balıklara ayrıca “doktor balığı” denilir. Tıbben 28°C derecenin üzerinde yaşamaması gereken balıklar su sıcaklığının 36-37°C derece olduğu bu kaplıcada Kangal balıkları yaşamaktadırlar.

Çeşitli cilt hastalıklarına iyi geldiği yöre halkı tarafından bilinirken, 1988 yılından itibaren, tıbben tedavisi mümkün olmayan sedef (*Psoriasis*) hastalığının bu kaplıca da tedavi edildiği dünya geneline basın - yayın organları aracılığıyla duyurulmuş ve kaplıca ile ilgili yüzlerce program yapılmıştır. Kaplıcanın turizm kapsamına alınması 1991 yılında gerçekleşmiş, 2003 tarihinde ise Sağlık bakanlığı tarafından "Sağlık Tesisi" olarak tescili yapılmıştır.



Şekil 1.5. Kangal balığı (*Garra rufa*)



Şekil 1.6. Kangal balıklarının deriyi tedavileri

1.5. Ağır Metaller

Bir ekosistemde madde iletimi canlılar arasında besin zinciri ile sağlanır. Besin zinciri bir canlının diğeri üzerinden beslenmesi sonucu oluşan bir piramittir. Ağır metaller gibi bazı kirleticiler besin zincirinin ilk halkalarında düşük düzeylerde bulunsalar bile, birbirini izleyen halkalarda artan yoğunluklarda bulunabilirler. Bu olay biyolojik birikim olarak adlandırılır (Vural 1993).

Biyolojik olarak metaller üç grupta incelenir. Birincisi hafif metaller, bunlar sodyum, potasyum, kalsiyum vb. sıvı ortamda normalde hareketli katyonlar olarak taşınırlar. İkincisi demir, bakır, kobalt ve mangan gibi düşük konsantrasyonlarda esansiyel fakat yüksek konsantrasyonlarda toksik olan geçiş elementleri ve üçüncüsü metabolik aktivite için genelde gerekli olmayan fakat oldukça düşük konsantrasyonlarda bile hücrede toksik etki yapan civa, kurşun, kalay gibi metaloitlerdir. Geçiş elementleri ve metalloitler genelde ağır metaller olarak adlandırılırlar. Ağır metaller fiziksel olarak yoğunluğu 5 g/cm^3 'ten daha yüksek olan metaller olarak tanımlanır. Bunların içine kurşun, kadmiyum, bakır, nikel, civa ve demir gibi 60'dan fazla metal dahildir. Bunlar su kaynaklarına, endüstriyel atıklar veya asit yağmurlarının toprağı ve dolayısıyla bileşiminde bulunan ağır metalleri çözmesi ve çözünen ağır metallerin ırmak, göl ve yeraltı sularına ulaşmasıyla geçerler (Kaya 2011).

Ağır metallerle suların kontaminasyonu uzun yıllardır devam eden çevresel bir problemdir. Ağır metallerin sucul ortamlarda son yıllarda artan yoğunluğu, toksititesi hakkındaki farkındalığın artmasını sağlamıştır. Özellikle kıyılarda ve körfezlerde oluşan ağır metal kirlenmesi dünyanın çeşitli bölgelerinde önemli halk sağlığı sorunları oluşturmuştur. Böyle bir çevresel kirlenmenin en iyi bilinen örneğı 1932–1955 yılları arasında Japonya'nın Minimata körfezinde civa ile kirlenmiş balıkların tüketiminin neden olduğu Minimata sendromu olarak adlandırılan hastalıktır. Minimata sendromu görme bozuklukları ile başlayan, nörolojik bir hastalıktı ve bölgede 1950 yıllarında 500'den fazla ölüm vakasının kaydedilmesi ile sonuçlanmıştır. Bu hastalığın ortaya

ıkmasıyla inorganik cıvanın besin zinciri ile insan vucudunda toplandığı anlaşılmıştır (Moonis *et al.* 2008).

Ağır metaller sucul ortamlarda genellikle eser miktarda bulunmakla birlikte son yıllarda hızlı nüfus artışı, endüstrileşme, madencilik, tarımsal aktiviteler, sanayi kuruluşlarının deniz sahillerinde yoğunlaşması, drenaj suları ve yerleşim yerlerinde oluşan atık sular gibi faktörlerin etkisi ile giderek artan derişimlerde bulunurlar. Metallerin hem çok geniş bir sahada kullanılması, hem de çok yavaş korozyona uğraması sudaki konsantrasyonlarının gittikçe artmasına neden olmuştur. Bunun bir sonucu olarakta balıklarında içinde bulunduğu sucul organizmalar metallerin artan derişimlerinin etkisinde kalırlar.

Ağır metallerin ortam derişimindeki artışının balıklar üzerinde başlıca etkisi doku ve organlarda birikmesidir. Ayrıca çeşitli kan parametrelerini, enzim aktivitelerini, büyüme ve gelişmeyi de etkiledikleri belirtilmiştir. Balık doku ve organlarında biriken metal düzeyi; ortam derişimine ve etkide kalma süresine bağlı olarak artar. Ancak metalin hangi dokuda öncelikle birikeceği metalin çeşidine ve canlının türüne bağlı olarak değişir (Cicik 2003; Altındağ ve Yiğit 2005).

Ağır metallerin toksisitesi pH, çözünmüş oksijen, sıcaklık, balık büyüklüğüne oranla çözeltinin hacmi, çözeltinin yenilenme frekansı, çözeltideki diğer maddeler ve sinerjik etki gibi faktörlere bağlıdır. Suyun pH değeri önemli bir faktördür. Tatlı sular deniz suyundan biraz daha zayıfça tamponlanmıştır ve bu işlem görmüş tatlı su sistemlerinde ağır metal toksititesinin etkileri görülür. Ağır metallerin distile ve yumuşak sularda sert ve bazık sulara göre daha toksik olduğu düşünülmektedir (Mutluay ve Demirak 1996).

Ağır metallerin balıklar tarafından alınımı başlıca solungaçlar ve besin yolu ile tatlı su balıklarında ise besinle birlikte alınan su ve deri aracılığı ile olmaktadır. Vücuda alınan bu ağır metaller taşıyıcı proteinlere bağlı bir şekilde kan yolu ile doku ve organlara taşınır ve metal bağlayıcı proteinler sayesinde yüksek derişimlere ulaşır. Balıklarda metallerin toksik etkileri ilk olarak solungaçlarda görülür. Bunun nedeni, solungaçların

lamellar yapı sayesinde oldukça geniş yüzey alanına sahip olması, ortamla doğrudan doğruya temas halinde olması ve su ile kan arasındaki difüzyon aralığının kısa olmasıdır (Kuşatan ve Cicik 2004). Ağır metallerin etkisi ile solungaç epitelinde hiperplazi (organ ve dokularda ihtiyacı karşılamak için bölünebilme kabiliyeti olan hücre sayısındaki artış), mukoz hücrelerin fazla aktif olması, primer lamellerin ayrılması gibi defektler biyolojik yanıtların sadece bazılarıdır (Kayhan *et al.* 2009).

Ağır metaller subletal ortam derişimlerinin etkisinde balıkların karaciğer, böbrek ve dalak gibi metal detoksifikasyonu ile ilgili organlarında yüksek düzeyde birikir. Balıklarda karaciğer, ağır metalleri bağlayarak toksik etkilerinin yok edilmesinde işlev gören metallothionein ve glutatyon gibi metal bağlayıcı proteinlerin başlıca sentez yerinden biridir. Balıklardaki kas dokusu karaciğer, solungaçlar ve barsaklar gibi aktif organ ve dokulardan daha az ağır metal akümüle etmektedir (Kayhan 2006; Cicik 2003).

Ağır metallerin toksik etkileri birçok grupta toplanarak incelenebilir. Bunlar enzim inhibisyonu, esansiyel elementlerin yerini alma, proteinlerle birleşme, metallerin oksidasyon basamağı ve bileşik şekli ve dış faktörler olarak gösterilebilir.

Cu, Ni, Fe, Zn, Mn, Co ve Mo gibi birçok ağır metaller belirli enzimlerin yapısında az miktarda bulunmaktadır. Ağır metaller, proteinlerde sisteinin (-SH), tirozinin (-OH), histidinin imidazol, aspartik ve glutamik asitlerin karboksilat (-COOH) gibi fonksiyonel gruplarına etki ederler. Böylece proteinlerin yapısını değiştirebilmektedirler. Özellikle enzimlerin aktif merkezlerinde yer alan sistein amino asitleriyle ağır metal iyonları birleşerek merkaptan bileşikleri oluşturmak suretiyle enzim aktivitesinde kaybolma gözlenmektedir (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Bakır (Cu) hayvanlarda ve insanlarda kırmızı kan hücrelerinin ve birçok oksidasyon ve redüksiyon prosesinin vazgeçilmez parçasıdır. Buna karşın yaşamsal olmayan ağır metaller çok düşük konsantrasyonda dahi psikolojik yapıyı etkileyerek sağlık problemlerine yol açabilmektedirler (Kahvecioğlu vd 2004). Organizmaya bakır birçok

yönden gereklidir. Öncelikle bu element birçok önemli enzimin bileşimine girer. Bu sayede kanın, damarların, kirişlerin ve kemiklerin yapımında görev alır. Bakırdan yoksun bir beslenme, zayıflık ve kan damarları ile kemiklerde narinliğe yol açar. Bakır bazı enzimlerde bulunur ve pek çok omurgasızın kan proteininde solunum pigmenti halinde mevcuttur. Çinko ve bakır özellikle deniz balıklarındaki protozonlardan meydana gelen hastalıkların tedavisinde kullanılır. Burada metalin toksik etkileri bir süre sonra CaCO_3 ile çökelmeyle giderilir (Mutluay ve Demirak 1996; Sever 2010; Temel 2014).

Kurşun (Pb) özel bir tadı ve kokusu olmayan mavimsi gri renkli bir metaldir. Çevreye yayılmış bulunan kurşun kendiliğinden parçalanmaz, havada 10 gün asılı kalabilir, topraktaki kurşunun çoğu havadan kaynaklanır. Kurşun toprak partiküllerine yapışır ve topraktaki kurşun asidik ve yumuşak olmadıkça yeraltı ve içme sularına karışmaz. Toprak ve suda uzun süre kalabilir (Bilici 2005; Kanat 2005). Sindirim yoluyla mideye giren kurşun bileşiklerinin çoğu daha çok kronik kurşun zehirlenmelerine ve sindirim sisteminin iltihabına sebep olur. Toz ve buhar şeklindeki bileşiklerinin solunmasıyla kolayca absorbe olup kana geçebilir. Dolaşımda kurşun büyük ölçüde kırmızı kan hücrelerine (%80-90) ve az bir kısmı da plazma proteinlerine bağlanır (WHO 1993). Organizmaya giren kurşun karaciğer, dalak, kemik iliği, böbrekler, kas ve deri gibi çeşitli organ ve dokularda birikir. Daha sonra buralardan serbest hale geçen kurşun molekülleri kalsiyum bağımlı olarak kemik dokusunda (kurşun fosfat) birikim yapar. Serbest kurşunun vücuttan eliminasyonu dışkı ve idrar yolları ile olur. Kurşun uzun süre organizmada kalabilen bir maddedir. Biyolojik yarı ömrü 700-800 gün kadardır. Organizmada kurşunun Koenzim-A inhibisyonu sonucu glisin ile birleşmesini engelleyip hemoglobin sentezini bozduğu bildirilmektedir. Kurşunla akut zehirlenmelerde en önce görülen belirtiler bulantı, kusma, sindirim sistemi iltihabı, ağızda metalik tat, karın ağrıları ve boğazda yanma duygusu şeklindedir. Birkaç saat sonra dilde koyu renkli çizgiler, idrar azlığı, akut kalp dolaşım yetmezliği, kasılma nöbetleri ve koma görülür. Akut zehirlenmeler 2-3 gün içinde ölümle sonuçlanabilir. Kronik zehirlenmeler daha sık rastlanır. Toz, duman ve diğer kurşun partiküllerinin solunum, ağız ve cilt yoluyla alınmasıyla meydana gelir. Kronik kurşun

zehirlenmelerinin en belirgin belirtileri; mide-barsak, sinir-kas ve beyin hastalıkları, kan yapısında normal olmayan değişkenlikler ve böbrek bozuklukları şeklinde ortaya çıkar.

Kurşun zehirlenmelerinin tedavisinde ağız yoluyla meydana gelen zehirlenmelerde seyreltilmiş magnezyum yada sodyum sülfat, sülfirik asit, tanik asit, süt, yumurta akı içeren solusyonlarla mide yıkanır (Kanat 2005). Yapılan araştırmalarda kurşun zehirlenmesinin, santral sinir sistemi ile diğer organlarda, karaciğer, pankreas, böbreklerde ve bütün kemiklerde kurşun depolanması görülmüştür. Bu organlarda toksik rahatsızlık ile enzim sisteminin fonksiyonel bozuklukları meydana gelir. Daha toksik sınıra varmadan da immün reaksiyonlara ait belirtiler, mesela IgG sentezi 17 bozukluğu görülür. Burada çinko ve C vitamini vermekle kurşun atılması (eliminasyonu) meydana gelir ve hastalık iyileşir. Aynı şekilde çevre toksinleri ile, örneğin SO₂ ile de aynı rahatsızlıkların meydana geldiği görülmüştür. Bu organlarda toksik rahatsızlık ile enzim sisteminin fonksiyonel bozuklukları oluşur. Vücuda havadan solunarak, içme suları ve besinlerle, ayrıca sigara dumanından alınabilir. Kurşun vücuttaki hemen hemen tüm organ ve dokuları etkilemektedir. En duyarlı sistem, özellikle de çocuklar için, merkezi sinir sistemidir (Bilici 2005; Kanat 2005; Kahvecioğlu 2009; Sever 2010; Temel 2014).

Kadmiyum (Cd), kadmiyum oksit, kadmiyum klorid, kadmiyum sülfat ve sülfite şekillerinde bulunabilen ve özel bir tad ve kokusu olmayan bir maddedir (Laskey *at al.* 1984). Havaya karışan kadmiyum partikülleri yere ya da sulara düşmeden önce çok uzun mesafeler kat edebilir. Kadmiyum doğada greenockit (CdS), otavit (CdCO₃) ve kadmiyum oksit (CdO) olarak ve genelde çinko, bakır ve kurşun madenleri ile birlikte bulunur. İçme suyundaki sınır değeri 0.006 mg/L'dir. Solunum havasında 0.1-0.5 ug Cd/m³ düzeyinde bulunması halinde akciğerler için önemli tehlike arz etmektedir (Alonso and Martinez 2001). Sigara içen insanlar solunum havası ile çok miktarda kadmiyum alırlar. Örneğin günde 20 sigara içen bir insan 2-4 ug Cd alıyor demektir (Elinder *at al.* 1983). Sigara içenle içmeyen kanları karşılaştırıldığında sigara içenin kanında iki misli fazla kadmiyum bulunduğu görülmüştür. Uzun süreli tedavi, kadmiyum'un kullanımdan kaldırılması, bu toksik ağır metal yerine başka madde

bulunması ile gerçekleşir (Suna vd 1991). Kadmiyum'un olumsuz çevresel etkileri de ortadan kalkar. Zehirli atık depo alanlarından gerçekleşen sızıntı ve taşmalar sonucunda suya ve toprağa karışabilir. Toprak partiküllerine güçlü bir şekilde bağlanır, bazı kadmiyum bileşikleri suda çözünebilir, ancak doğada parçalanmaz (Laskey 1991). Vücutta çok uzun süre kalabilir ve düşük düzeyde maruz kalırsa bile yıllar içinde birikebilir (Hew *at al.* 1993). Kadmiyum havadan solunarak, kadmiyum bulaşmış yiyeceklerin yenmesiyle, sigara dumanından, kadmiyumla kirlenmiş suların içilmesiyle vücuda alınabilir. Yüksek düzeyde kadmiyumun solunması akciğer hasarına bağlı olarak ölüme neden olabilir. Çok yüksek düzeyde kadmiyumun yiyeceklerle alınması durumunda kusma ve ishale neden olur. Hava, su ya da besinler yoluyla düşük düzeyde kadmiyuma uzun süre maruziyet sonucunda kadmiyum böbreklerde birikir ve böbrek hastalıklarına neden olabilir. Günlük 15 µg dan fazla alındığında böbreklerde birikerek böbrek arteriollerini ve glomerülleri bozmaktadır. Aşırılığında ölümcül olabilir (Keser 2007; Sever 2010).

Kobalt (Co) doğada yaygın bulunmakla birlikte yer kabuğunun yalnızca %0,001'ini oluşturmaktadır. Yer ve gök taşı menşeli demirde, güneşin ve yıldızların atmosferlerinde, öbür elementlerle birleşmiş halde doğal sularda, okyanus tabanlarındaki yumruklarda, toprakta, bitkilerde ve hayvanlarda az miktarda kobalta rastlanır. Kobalt B12 vitamininin temel bileşenidir. Günlük gereksinimi 0,1-1,0 mg'dır. Diyetle alınan kobalt barsak mikroflorası tarafından kobalamin sentezinde kullanılabilir. Kobalt alkol üretiminde köpük oluşturulmasında kullanılır ve ağır alkol içicilerinde toksik etki oluşturur. Co eksikliği, bilinç kaybı, kilo kaybı ve anemi gibi rahatsızlıklara neden olabilir (Keser 2007).

Demir (Fe) vücutta pek çok önemli ve elzem fonksiyonu bulunan temel elementlerden biridir. Kolayca elektron alıp verebilme yeteneği ile ferrik (Fe^{2+}) ve ferröz (Fe^{3+}) formları arasında değişim gösterir. Bu fonksiyonu (kapasitesi) onu sitokrom, oksijen bağlayan moleküller (hemoglobin ve miyoglobin) ve birçok enzimin yararlı bir komponenti haline getirir. Demir, plazmada 2 demir bağlama bölgesi bulunan ve 80 kDA ağırlığındaki bir protein olan transferrin ile kompleks halde taşınır. 70 kg'lık bir

erişkinde plazmada yaklaşık 3 mg demir bulunur ve bunun büyük çoğunluğu transferrine bağlı taşınır. Plazma ile her gün hücrelere yaklaşık 30 mg demir taşınır. Demir normalde duodenum ve proksimal jejunumdan emilse de gerektiğinde ince bağırsağın distal bölümünden de emilebilir. Duodenal kript hücreleri vücudun demir gereksinimini ve eritropoezin ihtiyacını algılama yeteneğine sahiptir ve matür enterositler bu bilgiyle absorbtif enterositlere dönüşmeye programlanır. Gastroduodenal bileşkeye yakın yerleşmiş absorbtif villuslarda bulunan enterositler, tüm demir emiliminden sorumludur. Demir plazmaya ulaşmak için enterositin apikal ve bazolateral membranı boyunca ilerleyerek barsak lümeninden geçmek zorundadır. Besinlerden edinilen demir transferrine bağlanmaz, transferrinin barsak lümeninde rolü yoktur. Mide içeriğinin düşük pH'ı sindirilmiş demiri çözmeye yardım eder ve ayrıca protondan zengin bir ortam sağlar. Tüm bunlar, fırçamsı kenarda bulunan ferriredüktaz enzimi tarafından ferrik iyonunun ferröz formuna indirgenmesini kolaylaştırır. İki değerlikli (divalent) metal transporter 1 (DMT1; daha önce Nramp2 veya DCT1 olarak isimlendirilmiştir); demirin enterosit apikal membranını geçmesini ve proton-coupled işlemi yoluyla hücre içine girişini sağlayan bir proteindir. DMT1, demire spesifik değildir; mangan, kobalt, bakır, çinko, kadmiyum ve kurşunu da taşır (Okutur 2006; Sever 2010).

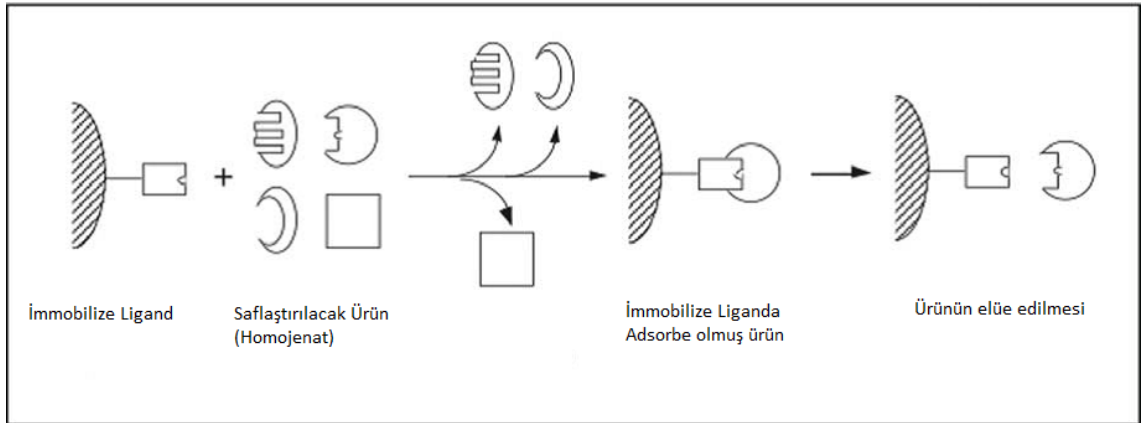
Tüm doku ve organlar için esansiyel elementir. Demir emilimi en fazla %10 oranında gerçekleşir. Bu oranın küçük olmasında “Mukozal Blok” adı verilen doğal bir direnç olduğu ileri sürülmektedir. Toplam demirin %77’si porfirin sentezinde (%55 Hem, %15 doku enzimleri,%7 miyogloblin) Ferritin olarak çeşitli dokularda %20, plazma transferrin yapısında %3 oranında bulunur. Organizmanın gereksindiği günlük 27 mg Fe’in 20 mg kadarı hem yıkımından, geri kalanı depolardan, çok azı ise emilimden sağlanır. Fe yetmezliği genellikle çocuk, genç bayan ve yaşlı insanlarda görülür. Fe eksikliği anemi nedenidir (Keser 2007). Fe hemoglobin yapımı sayesinde dokulara oksijen transportunda önemli rol oynar. Miyogloblin yapısında bulunarak iskelet sistemindeki çizgili kasların ve kalbin çalışması için oksijen taşır. Enerji üretimi ve protein metabolizmasına etkili enzimler olan katalaz ve peroksidaz için Fe önemli bir kofaktör olan Fe karnitine olan etkisi ile yağ asitlerinin metabolizmasında da etkilidir.

RNA ya kuvvetli şekilde bağlanan Fe'in, purin ve pirimidin bazlarına veya her ikisine kovalent bağlar boyunca zincirlenerek RNA molekülünün figürasyonunda rol oynadığı belirtilmekte olup protein senteziyle fonksiyonel bir bağlantı durumunda olduğu ve genetik informasyonun taşınmasında rol oynadığı düşünülmektedir (Utku 2006). Kanseri hücrelerinin kemik iliği metastazına bağlı olarak ortaya çıkan myelofizik anemiler özellikle akciğer, meme, prostat kanserlerinde ve sarkomlarda sıklıkla yani %10 sıklıkta görülmektedir. Ancak küçük hücreli akciğer karsinomunda %20-30 kemik iliği metastazı görülür. Eritrositlerde anizopoikilositoz, lokoeritroblastik kan tablosu (eritroid ve myeloid serinin öncü ve olgun hücrelerinin görülmesi), karsinositemia (periferik kanda kanser hücreleri), lokositoz, trombositoz ya da pansitopeni görülebilir. En önemli tanı yöntemi kemik iliği aspirasyonu ve biyopsisidir (Kadıköylü 2009; Sever 2010).

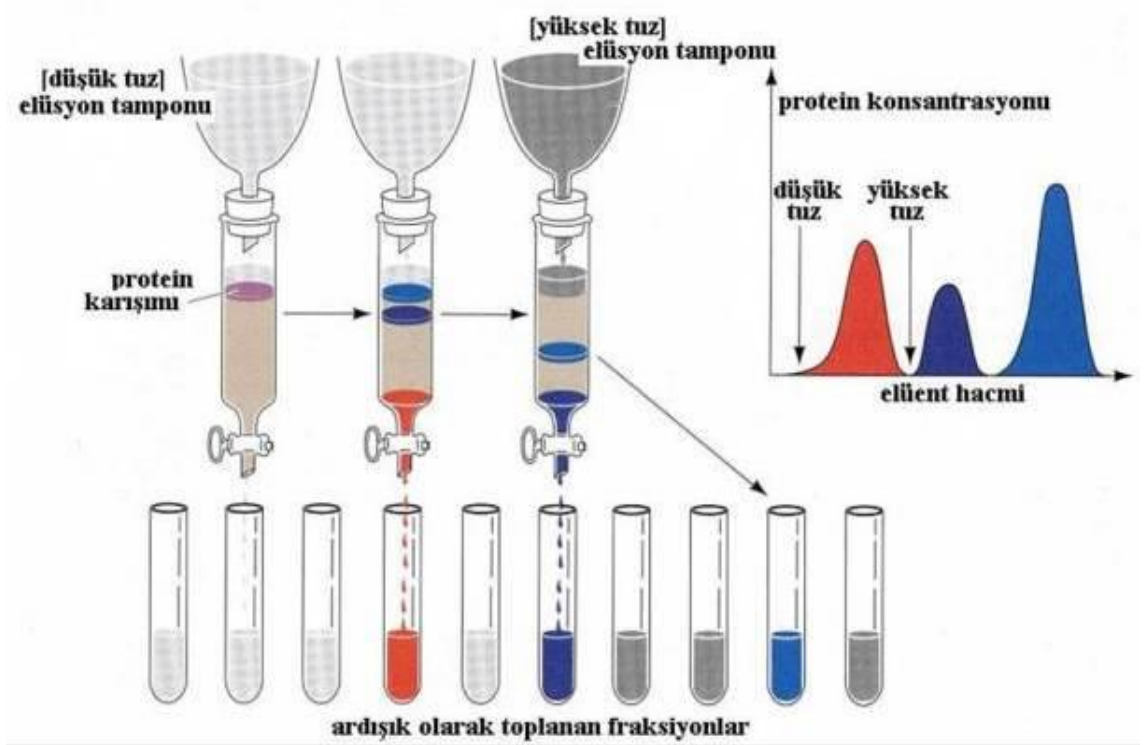
1.6. Afinite Kromatografisi

Bazı proteinler afinite kromatografisi vasıtasıyla bir basamakla çok kompleks olan bir karışımdan bile izole edilebilirler. Afinite kromatografisi bir çeşit adsorbsiyon kromatografisi olup saflaştırılması istenen molekül, matriks adı verilen bir kolon maddesine kovalent olarak immobilize olmuş bir komplementer bağlanma ligandına spesifik ve tersinir olarak bağlanır. Matriks olarak, kullanılacak ligandın, saflaştırılacak olan maddeye özel olması gerekmektedir. Küçük olan ligandları bağlamak için hazırlanmış adsorbanların, sterik engellemelerden dolayı ayırma kapasiteleri düşük olabilir. Bu gibi durumlarda ekstra uzantı kolları takmak gerekmektedir. Uzantı kolları matriksle ligand arasına takılırlar (Keha 2000).

Afinite kromatografisi mükemmel ayırma gücü, yüksek kapasite ve hızıyla örneklerin fraksiyonlanmasında kullanılan bir yöntemdir (Harris and Angal 1990).



Şekil 1.7. Safıaştırılmak istenen enzimin liganda bağlanması ve elüsyonu.



Şekil 1.8. Afinitite kromatografisinin temel prensipleri

Kimyasal ayırma modern araştırma yöntemlerinin temel elemanı olup kompleks örneklerde çok geniş bir kullanım alanı vardır. Örnekler ilaç ya da kandaki hormonların iz analizlerinden, rekombinant proteinlere kadar geniş bir alanda alınabilir. Likit kromatografisi metodu bu tür ayırmalar için pek çok bileşeni ayırma yeteneği nedeniyle özellikle yaygındır. Uygun materyallerle birleştirildiğinde bu teknik hem yüksek

performansta kimyasal ayırma hem de ölçümde kolaylık sağlar. Likit kromatografisinde bulunan durgun ve hareketli fazlar geniş bir aralıkla yer alırlar ve metodun esnek olmasıyla kimyasal ya da fiziksel özellikler bu ayırmanın temelinde kullanılabilirler.

Likit kromatografisinin en esnek ve kullanışlı formu olarak afinite kromatografisi tekniği bilinir. Bu teknikte seçici ve dönüşümlü etkileşimler kullanılır ki bu etkileşimler pek çok biyolojik sistemde enzimin substrata bağlanması ya da antijen antikor etkileşimi gibi olaylarda da bulunmaktadır. Bu etkileşimler afinite kromatografisinde etkileşen molekül çiftlerinden birinin katı desteğe immobilizasyonu ve kolonun içine yerleştirilmesinde etkili olmaktadır. Mobil faz çözünen madde-ligand bağlanması için uygun pH, iyonik şiddet ve çözücü içeriğine sahip olmalıdır. Bu haldeyken örnek içeriği afinite kolonuna tatbik edilir. Bu çözücü afinite kolonunda zayıf hareketli fazın yerine geçer ve uygulama tamponu olarak işaret eder. Örnek bu şartlarda kolondan geçerken afinite ligandına bağlanmak için tamamlayıcı olur. Fakat bu ilişki, içerisinde yüksek seçicilikten dolayı örnekteki diğer bileşenlerin yıkanarak ya da elüe edilerek kolondan pik vermeyecek şekilde uzaklaştırılmasını gerektirmektedir. Kolona tutunmamış bileşenler kolon yıkanarak uzaklaştırılır. Bu çözücü güçlü hareketli faz olup elüsyon tamponu olarak bilinir (David 2006).

1.7. Çalışmanın Amacı

Günümüzde endüstrileşme, teknoloji ve artan ekonomik seviye ile değişen yaşam şartları ile insanlar, kimi zaman gezip eğlenmek, yeni kültürleri keşfetmek ve sağlıklı bir yaşam için farklı bölge ve ülkelere seyahat etme ihtiyacı hissetmektedirler. Buna paralel olarak bir sektör haline gelen turizm hemen hemen her ülke için önemli bir maddi kaynak olmanın yanı sıra, özellikle ülkemiz gibi gelişmekte olan ülkeler için ise, gerek döviz girişi gerekse istihdam oluşturmaya yönü ile oldukça önemlidir. Son yıllarda artan refah düzeyi, yerli turist sayısında artışa ve bunun sonucu olarak turizm bölgeleri açısından da olumlu katkılar sağlamaktadır. Ülkemizde tarihi, kültürel ve sağlık turizmi gittikçe artan bir ülkedir.

Yukarıda sayılan sebepler doğrultusunda, bizi çalışmamızda bölgenin turizm potansiyelinin artışına vesile olarak, yörenin sosyal, ekonomik ve politik olarak gelişmesine yardımcı olacağına inanılan Kangal balıklı kaplıcalarındaki Kangal balıkları (*Garra rufa*) üzerinde bir araştırma yapmaya sevk etmiştir. Ayrıca çalışmada, kaplıcadaki balıkların cildiye açısından sıkıntılı bölgeler ile temasları, suda bulunan selenyum, yüksek rakımdaki doğal ultraviyole ile sedef tedavisinde olumlu sonuçlar elde edilmesi ile “doktor balığı” adıda verilen bu balıkların seçilmesinde etkili olmuştur.

Bu çalışma ile daha önce çalışılmamış bir balık türü olan Kangal balığından asit-baz dengesi, kardiovasküler tonusun düzenlenmesi, sindirim, hücre bölümleri arasındaki iyon değişim ve değişik enzimatik reaksiyonlar için gerekli bikarbonatın sağlanması gibi biyolojik prosesler için son derece önemli bir enzim olan karbonik anhidrazı Kangal balığının solungaç, kas ve göz dokularından saflaştırıp kinetik özellikleri incelendi. Balığın farklı dokularından elde edilen karbonik anhidraz enzimlerinin aktivitesi üzerine ciddi çevresel sıkıntılara sebep olan bazı ağır metal iyonlarının etkisi incelendi. Bu ağır metal iyonlarından enzimi inhibe edenlerin inhibisyon kinetikleri incelenip balığın yaşam için gerekli koşulların optimize edilmesinde yardımcı olacağı düşünülmektedir.

Çalışmamızda ağır metallerin seçilmesindeki amaç, ağır metallerin sucul ortamlarda genellikle eser miktarda bulunmakla birlikte son yıllarda hızlı nüfus artışı, endüstrileşme, madencilik, tarımsal aktiviteler, sanayi kuruluşlarının deniz sahilleri ve turizm bölgelerinde yoğunlaşması, drenaj suları ve yerleşim yerlerinde oluşan atık sular gibi faktörlerin etkisi ile giderek artan konsantrasyonlarda bulunmalarıdır. Ağır metallerin ortam derişimindeki artışının balıklar üzerinde başlıca etkisi doku ve organlarda birikmesidir. Ayrıca çeşitli kan parametrelerini, enzim aktivitelerini, büyüme ve gelişmeyi de olumsuz etkiledikleri de bilinmektedir. Bu çalışmada sudaki bazı ağır metal iyonlarının konsantrasyonlarının artması ile balıkların farklı dokularındaki karbonik anhidraz enzimine etkisi tespit edilerek ileriye dönük önlemler alınmasına ve bölge için önemli bir değer olan bu balık türünün korunmasına katkı sağlanacağı düşünülmektedir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Tüm canlı türlerinde mevcut olan ve üzerinde en çok çalışma yapılan enzim olan Karbonik anhidraz (CA, karbonat hidrolizaz, E.C. 4.2.1.1) canlı sistemlerde pH düzenleyici, su, elektrosit ve iyon transportunu düzenleyici olarak rol alan bir enzimdir. (Gülçin *et al.* 2004; Karahalil 2009; Güney *et al.* 2014). Bu enzim ilk olarak, 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. 1944 yılında ise Keilin ve Martin, enzimin aktivitesinin Zn^{+2} konsantrasyonuna bağımlı olduğunu ve aktif bölgesinde Zn^{+2} içerdiğini bulmuşlardır. Bununla beraber CA enzimi tanımlanan ilk metalloenzim olarak tarihe geçmiştir. 1974 yılında ise Appleton ve Sarkar karbonik anhidraz aktivitesinin çinko atomu yakınlarındaki iyonlaşabilir gruplarla ilgili olduğunu belirtmişlerdir (Söyüt 2006; Kaya 2011).

Karbonik anhidraz enzimi üzerine günümüze kadar birçok araştırma yapılmış ve bu araştırmalar sonucunda bütün hayvanlarda, fotosentetik hücre yapısına sahip canlılarda, bakteri ve algler gibi pek çok organizmalarda bu enzimin bulunduğu bildirilmiştir (Burt *et al.* 1992; Bottcher *et al.* 1994; Demir *et al.* 1997; Krungkrai *et al.* 2001; Beydemir *et al.* 2005; Yu *et al.* 2006; Esbaugh and Tufts 2007; Topal and Gülçin 2014). Bu çalışmalarda karbonik anhidraz enziminin molekül kütlesinin 20-36 kDa arasında değişim gösterdiği ve memeli dokularında tek alt birim halinde bulunduğu bildirilmiştir (Kaya 2011).

Canlılarda çok yaygın olarak bulunan CA enzimin bulunduğu ortamın şartlarına ve ihtiyacına göre değişik izoenzimleri mevcuttur. Her geçen gün yeni bir izoenzimi ortaya çıkartılmakta olup bugün itibariyle 16 tane izoenzimi bulunmaktadır. Üzerinde en çok çalışma yapılan ve en yaygın olarak bulunan izoenzimleri ise CA I ve CAII'dir. (Lönnerholm *et al.* 1985; Okuyama *et al.* 1995; Parkkila and Parkkila 1996; Christie *et al.* 1997; Raisanen *et al.* 1999; Söyüt 2006; Karahalil 2009; Kaya 2011; Şentürk *et al.*

2012). Günümüze kadar suda yaşayan canlılar üzerinde yapılan CA araştırmalardan bazıları hakkında bilgiler verecek olursak;

1983 yılında Hall ve Schraer'in gökkuşağı alabalık (*Salmo gairdneri*) eritrositlerinden CA enzimini kloroform-etanol ekstraksiyonu, Sephadex G-75 jel filtrasyon kromatografisi ve DEAE Biojel iyon değişim kromatografisi kullanarak saflaştırmışlardır. Yapılan bu çalışma sonucunda saflaştırılan CA enziminin molekül kütlesinin 28.3 kDa 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 tespit edilmiştir. 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 (Söyüt 2006).

Gervais ve Tufts (1998) hava soluyan ilkel balıklardan olan *Amia calva*'larda solungaç ve hava kesesi CA izoenzimlerinin karakterizasyonu ve hücre içindeki dağılımlarını araştırmışlardır. Solungaçlardan elde edilen CA enziminin, diferansiyel santrifüj ile belirlenen hücre içi fraksiyonları dağılımının büyük bir çoğunluğunu sitoplazmik orjinli olduğunu tespit etmişlerdir. Farklı 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 (Söyüt 2006).

Sender ve arkadaşlarının (1999), pisi balıkları (*Platichthys flesus*) solunum sistemindeki CA enziminin izolasyonu, saflaştırılmasını ve hücresel yeri üzerine araştırmış yapmışlar ve neticesinde solungaç ve eritrositlerden saflaştırılan CA enziminin 30 kDa molekül kütlesine sahip çözünebilir enzim olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmalarla birlikte 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 kDa olarak belirlenmiştir. Daha sonra enzimin doğal molekül kütlesini belirlemek amacıyla jel filtrasyon kromatografisi yapılmış ve 31 kDa olarak tespit edilmiştir. Böylece enzimin aktif formunun monomerik yapıda olduğu gösterilmiştir. Yengeç solungaçlarında gerçekleştirilen bir çalışmada CA enziminin molekül kütlesi 36 kDa olarak elde edilmiştir (Bottcher *et al.* 1994). Krungkrai ve arkadaşlarının (2001), yaptıkları bir araştırmada, *Plasmodium falciparum*'dan saflaştırılan CA'nın molekül kütlesi 32 kDa olarak belirlenmiştir. Zebrafish'den izole edilen CA enziminin molekül kütlesinin ise 29 kDa 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 kDa 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 kDa 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; Söyüt 2006; Kaya 2011).

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 birçok kimyasal maddeler ve atıklar da bu enzimin aktivitesini önemli ölçüde azaltmakta ve hatta tamamen durdurabilmektedir (Söyüt 2006).

Christensen ve 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 konsantrasyonlar da inhibisyon etkisinin olduğu belirlenmiştir. Bunun yanı sıra,

Özdemir vd (1997), gerçekleştirdiği diğer bir çalışmada, sığır CA ve insan (hCA I ve 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 *et al.* (1999), tatlı suda yaşayan yengeçlerin solungaçlarında yaptıkları bir çalışmada, CA'nın kuvvetli bir inhibitörü olan ve bir sülfonamid türevi olan asetazolamidi standart alarak Zn^{2+} , Cd^{2+} ve Cu^{+} inhibisyon etkilerini araştırmışlardır. Çalışma sonunda çok düşük konsantrasyonlar da bu ağır metallerin karbonik anhidraz enziminin aktivitesini inhibe ettiklerini rapor etmişlerdir. Gökkuşığı alabalığı üzerinde gerçekleştirilmiş diğer bir çalışmada ise Ag^{+} 'nin CA enzimi aktivitesi üzerinde $2,9 \times 10^{-7}$ gibi çok düşük bir IC_{50} değerine sahip olduğu bildirilmiştir (Morgan *et al.* 1997).

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 belirlemiştir.

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, tiyosiyanat ve oubain tarafından inhibe olduğu, kalsiyum birleşiminin bu inhibitörlerden etkilenmediği gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar ışığında HCO_3^- , ATPaz ve Cl^-/HCO_3^- pompalarının bikarbonat iyonlarının iç kulak sıvısına transferinde yer aldıkları, CA enziminin ise otolit kalsifikasyonu için karbonat üretiminde rol aldığı kanaatine varılmıştır.

Söyüt (2006), çalışmasında gökkuşaağı alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokuları CA enzimleri sırasıyla 4318, 17285, 2300 ve 2275 EU x mg⁻¹ spesifik aktiviteleriyle ve %38.0, %31.7, %19.0 ve %22.5 verimlerle Sepharose-4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırmıştır. Gökkuşaağı alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin için tüm saflaştırma işlemleri boyunca saflaştırma kat sayıları sırasıyla 2260, 1800, 1080 ve 1283 olarak buldu. Saflaştırılan enzimlerin saflığını kontrol etmek ve alt birim molekül kütlelerini tespit etmek amacıyla SDS-PAGE 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 31.0, 26.9, 31.5 ve 27.3 kDa olarak belirlendi. Tüm dokulardan saflaştırılan CA'lar için optimum iyonik şiddetler 1 M Tris-SO₄ tamponu olarak belirlendi. Optimum ve stabil pH'lar 4°C'de 1 M Tris-SO₄ ve fosfat tamponlarında hesaplandı. Saf enzimlerin K_M ve V_{max} değerleri Lineweaver-Burk grafiklerinden hesaplandı. Gökkuşaağı alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokuları CA'larının k_{cat} değerleri sırasıyla 32.8, 15.25, 28.83 ve 43.67 s⁻¹ olarak buldu. Bunun yanı sıra, gökkuşaağı alabalığı CA aktiviteleri üzerine bazı ağır metallerin (kobalt, bakır, çinko, gümüş ve kadmiyum) inhibitör etkileri esteraz metodu kullanılarak *in vitro* şartlarda incelendi ve küçük konsantrasyonlarda bile bu iyonların enzimi inhibisyona uğrattıkları tespit edildi.

Rizello *et al.*(2007) yaptıkları çalışmada Antartica ıcefış balığının solungaçlarından CA enzimini afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırmış ve molekül kütlelerini 28,7 kDa olarak tespit etmişlerdir. Soğuk ortama adapte olmuş Antartica ıcefış balığının 0-40°C sıcaklık aralığında yapılan ölçümlerde optimum sıcaklığının 24°C olduğu, sıcaklık arttıkça aktivitenin azalma gösterdiği ve 40°C'de katalitik aktivitenin tamamen yok olduğu tespit edilmiştir.

Karahalil (2009), çalışmasında Mersin balığı (*Acipenser gueldenstaedti*) eritrositlerinden karbonik anhidraz enzimini ilk kez saflaştırmış ve karakterizasyon çalışmaları yapmıştır. Enzim Sefaroz-4B-L tirozin-sülfanilamid kolonundan balık

kanından 539 kat ve %29 verimle saflaştırmıştır. Mersin balığı eritrositlerinde tek izoenzimin olduğu ve spesifik aktivitesinin $26943 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$ olduğu tespit etmiştir. Enzimin saflığını ve alt birim molekül kütlelerini tespit etmek için SDS-PAGE yapılmış ve tek alt birimden oluştuğu gözlemiştir. Enzimin alt birim molekül kütlesi 29 kDa olarak tespit etmiştir. Enzimin esterase aktivitesine göre pH 9.0'da 30°C sıcaklıkta ve 0.05 M Tris- SO_4 tamponunda optimum aktivite gösterdiği bulmuştur. Enzimin K_M ve $V_{\max}$ kinetik değerleri *p*-nitrofenil asetat (*p*-NFA) substratı kullanılarak Lineweaver-Burk grafiğine göre hesaplanmış ve sırasıyla K_M 4 mM ve $V_{\max}$ 20 mM/dakika olarak tespit etmiştir. Enzimin etkinliğini belirlemek için k_{cat} ve k_{cat}/K_M değerleri belirlemiştir. *p*-NFA'ya karşı k_{cat} değeri $20,8 \text{ s}^{-1}$ olarak bulmuştur. Enzimin sülfanilamid ve asetazolamid inhibitörlerine karşı 4.0 ve 0.1 μM gibi oldukça düşük IC_{50} değerine sahip olduğu bulmuştur. Ayrıca enzimin Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} ve Ag^+ iyonları tarafından değişen IC_{50} değerlerinde inhibe olduğu belirlemiştir. Ayrıca çevresel kirlilik oluşturan bazı pestisitler tarafından hidrataz aktivitesine göre değişen IC_{50} değerlerinde inhibe olduğu tespit etmiştir.

Ekinci *et al.* (2011), Avrupa deniz levreğinin (*Dicentrarchus labrax*) solungaç dokularında yapmış oldukları çalışmada karbonik anhidraz enzimini afinite kromatografisi yöntemi ile %58 verim ile 84.9 kat ve $838.9 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$ spesifik aktivite ile saflaştırmışlardır. Çalışmalarında optimum pH 8.0, optimum sıcaklık 10°C olarak esterase aktivitesini kullanarak belirlemiştir.

Ceyhun vd (2011), Avrupa deniz levreğinin (*Dicentrarchus labrax*) karaciğer dokusunda yapmış oldukları çalışmada karbonik anhidraz enzimi afinite kromatografisi yöntemi ile %46 verim ile 78.8 kat ve $751.72 \text{ EU} \cdot \text{mg}^{-1}$ spesifik aktivite ile saflaştırmışlardır. Çalışmalarında optimum pH 7.5, optimum sıcaklık 25°C optimum iyonik şiddet 10 mM ve stabil pH 8.5 olarak bulundu. Ayrıca bu çalışmada bazı ağır metallerin inhibisyon etkileri araştırılmış ve Al^{3+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Co^{3+} , Ag^+ , Zn^{2+} ve Hg^{2+} metallerinin *in vitro* şartlarda enzimin aktivitesini inhibe ettiğini tespit etmişlerdir. Al^{3+} ve Cu^{2+} metallerini güçlü inhibitör etki sergilemelerini karşın Co^{3+} , Ag^+ , Zn^{2+} ve Hg^{2+} metallerinin zayıf inhibitör etki gösterdikleri tespit edilmiştir. Bu metaller için

inhibisyon türü ve K_i değerleri Lineweaver-Burk eğrisinden hesaplanmıştır. Buna göre Al^{3+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Co^{3+} , Ag^+ , Zn^{2+} ve Hg^{2+} metalleri için sırasıyla K_i değerleri 0.148, 0.175, 0.242, 0.532, 0.640, 0.721 ve 0.768 mM olarak bulunup tüm metallerin yarışmalı inhibitör oldukları tespit edilmiştir. Ayrıca metallerin yine aynı sırayla IC_{50} değerleri 0.0692, 0.0715, 0.1128, 0.3165, 0.3790, 0.3900 ve 0.4484 mM olarak bulunmuştur.

Kaya vd (2013), çipura (*Sparus aurata*) balığında yapmış oldukları çalışmada bu balığın karaciğer dokusundan afinite kromatografisi yöntemi ile karbonik anhidraz enzimini $6775.5 \text{ EU mg}^{-1}$ spesifik aktivite ile saflaştırmışlardır. Ayrıca bu çalışmada bazı ağır metallerin inhibisyon etkileri araştırılmış ve Cd^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} ve Ag^+ metallerinin *in vitro* şartlarda enzimin aktivitesini inhibe ettiğini tespit etmişlerdir. Bu metaller için inhibisyon türü ve K_i değerleri Lineweaver-Burk eğrisinden hesaplanmış ve buna göre Cd^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} ve Ag^{2+} metalleri için K_i değerleri sırasıyla 17.74, 36.20, 12.85 ve 0.025 mM olarak bulunup tüm metallerin yarışmasız inhibitör oldukları tespit edilmiştir.

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'-tetrametiletilen diamin (TEMED), diyaliz torbası ve L-tirozin Sigma Chemical Comp.'den; sülfanilamid, sodyum hidroksit, sodyum bikarbonat, trihidroksimetil amino metan (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, 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

UV-VIS Spektrofotometre	Shimadzu, UV-1208
Derin dondurucular (-30 ve -86°C)	Sanyo, Japan
pH metre	Hanna Instrument
Hassas terazi	Denver Instrument
İnkübatör	Wiseven
Otomatik pipetler	Eppendorf ve Socorex Pipettors
Çalkalayıcı	Nüve SL 350
Vorteks	Fisons, Whirlimixer
Saf su cihazı	Firstreem Calypso MK 1 Glass Still
Magnetik karıştırıcı	IKA Topolino
UV-Spektrofotometre küveti	1 cm ³ 'lük Kuartz küvet

3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

Çalışmada kullanılan çözeltilerin pek çoğu günlük hazırlanmış olup buzdolabında +4°C’de muhafaza edilmiştir. Çalışma süresince kullanılan çözeltilerin kullanılış yerleri ve hazırlanış şekilleri aşağıda belirtilmiştir.

Afinite kolonunda kullanılan çözeltiler:

1. 0,2 M NaHCO₃, pH: 8,8 (Sepharose-4B matriksi üzerinde afinite jeli hazırlanırken kullanılan tampon): 16,8 g NaHCO₃, 950 mL destile suda çözülerek, 1 N NaOH ile pH: 8,8’e titre edildikten sonra, toplam hacim destile su ile 1 litreye tamamlandı.
2. 25 mM Tris-HCl/0,1 M Na₂SO₄, pH:8,7 (afinite jelinin dengelenmesinde kullanılan tampon): 3,0275 g Tris ve 14,2 g Na₂SO₄, 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 Na₂SO₄, pH:8,7 (hemolizatın tatbikinden sonra afinite jelinin yıkanmasında kullanılan tampon) 3,0275 g Tris ve 3,124 g Na₂SO₄, 950 mL destile suda çözülerek 1 N HCl ile pH:8,7’ye getirildikten sonra destile su ile hacim 1 L’ye tamamlandı.
4. 0,1 M NaCH₃COO / 0,5 M NaClO₄, pH:5,6 (kolona tutunmuş Kangal balığı doku CA enziminin elüsyonu için kullanılan tampon çözelti): 2,04 g NaCH₃COO.3H₂O ve 9,187 g NaClO₄ 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 0.5 L’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 L'ye 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 ve stabil pH çalışmaları 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.** 1 M 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 1 M 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-merkaptetanol 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 çözülüp 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 çözüldü.

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

24. Standart serum albümin çözeltisi (1 mg/mL; protein tayini için kullanılan çözelti): 25 mg standart serum albüminin 25 mL saf suda çözölmesiyle hazırlandı.

25. Kangal balığı dokularından saflaştırılan CA enzimi aktivitesine karşı inhibitör özelliğı gösteren ağır metallerin stok çözeltileri:

Çizelge 3.1. 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
FeCl ₂ .H ₂ O	1000	1,54	5
Pb(NO ₃) ₂	1000	1,66	5
CdCl ₂ .H ₂ O	1000	1,10	5

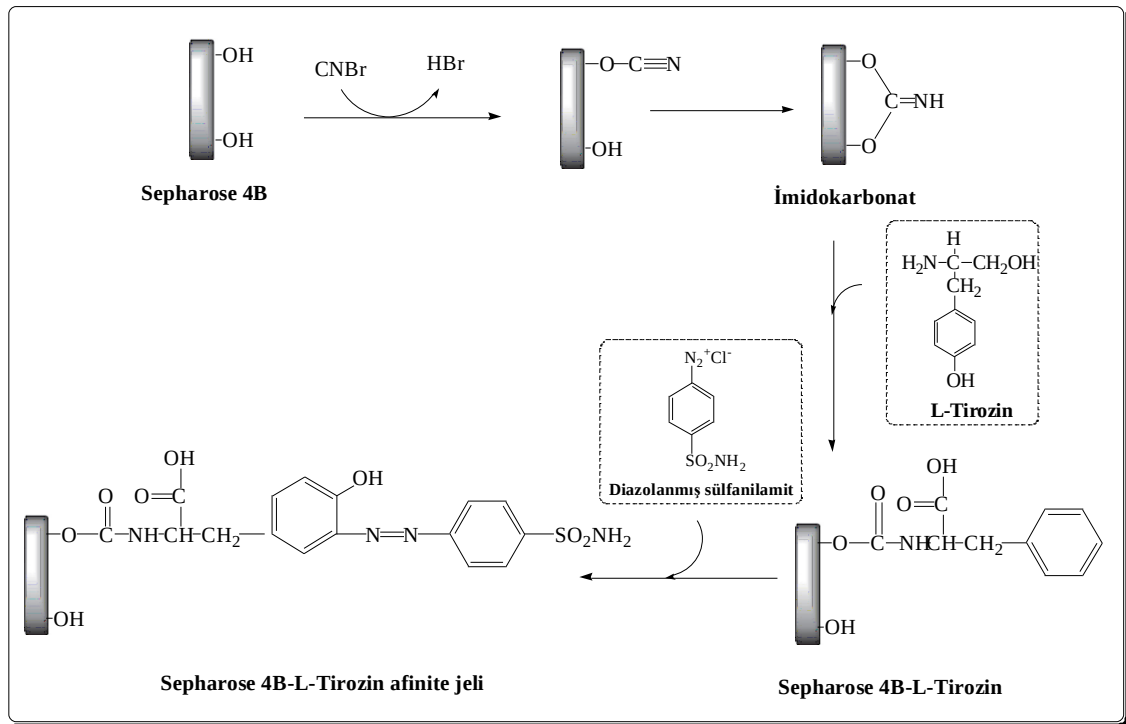
3.2. Yöntem

3.2.1. Kangal balığı dokularından CA enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu çalışmaları ile ilgili yöntemler

3.2.1.a. Sepharose-4B-L-tirozin sülfanilamit afinite jelinin hazırlanması

Afinite jeli CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B matriksi üzerinde hazırlandı. Bu kolon materyaline L-Tirozin kovalent olarak takıldı. Daha sonra sülfanilamit diazollanarak tirozine kenetlendi. Burada tirozin afinite jelinin uzantı kolunu, sülfanilamit ise enzimi spesifik olarak bağlayan kısmını oluşturmaktadır. Sülfanilamit, 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:

CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye tirozin takılması: CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B, 250 mL soğuk 0,1 M NaHCO₃ tamponu (pH: 10,0) 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 karıştırmanın, 90 saniyeden az bir sürede tamamlandığı gözlemlendi ve bundan sonra süspansiyon, 4°C'de 2 saat süreyle manyetik karıştırıcıda karıştırıldı ve 16 saat boyunca 4°C'de bekletildi. Bu sürenin bitiminde yıkama suyu 280 nm'de absorbans vermeyinceye kadar bol su ile yıkanarak böylece reaksiyona girmeyen tirozin tamamen uzaklaştırıldı. Yıkama 100 mL'lik 0,2 M NaHCO₃ tamponu ile (pH:8,8) tekrarlanarak tirozin takılı jel, aynı tamponun 40 mL'si içine alındı.



Şekil 3.1. CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose 4B-L-tirozin afinite jelinin hazırlanmasındaki reaksiyonların basamakları (Atasever *et al.* 2013)

Sülfanilamit kenetlendirilmesi: 25 mg sülfanilamit, 0°C civarında 10 mL, 1 M HCl içinde çözüldü ve içerisinde 75 mg NaNO₂ bulunan 0°C'deki 5 mL çözelti, sülfanilamit çözeltisine damla damla katıldı. 10 dakikalık reaksiyondan sonra diazolanmış bulunan sülfanilamit 40 mL Sepharose-4B-L-tirozin sülfanilamit süspansiyonuna ilave edildi. 1

M'lık NaOH ile pH: 9,5'a çıkarılarak sabit tutularak 3 saat süreyle oda sıcaklığında yavaşça karıştırıldı. Daha sonra 1 L saf su ve 200 mL 0,05 M Tris-SO₄ (pH: 7,4) tamponuyla yıkandı. Sonra da üzerine bir miktar daha aynı tampondan konularak saklandı (Arslan *et al.* 1996).Tüm basamaktaki reaksiyonların açık formülleri Şekil 3.1'de gösterildi.

3.2.1.b. Kangal balığı solungaç, kas ve göz dokularının temini ve homojenat hazırlanması

a. Kangal balığı solungaç dokusunun temini ve homojenat hazırlanması

Çalışmamız esnasında kullanılacak olan balıklar 2013 yılının yaz aylarında, Sivas ilinin Kangal ilçesine bağlı Kangal balıklı kaplıcalarından temin edilmiştir. Kaplıcadan alınan balıklar soğuk zincir kuralına göre laboratuvara getirilmiş ve solungaç dokusu çıkarılmıştır. Yirmi beş adet balıktan elde edilen solungaç dokuları öncelikli olarak başta kan olmak üzere diğer kirliliklerden elimine etmek için %9'luk NaCl üç kere yıkandı. Temizlenen dokulardan homojenat hazırlamak için dokular bir bıçak yardımıyla önce küçük parçalara ayrıldı. Parçalanmış bu dokuların üzerine 10 ml 25 mM Tris HCl/0,1 M Na₂SO₄ (pH:8,7) tampon çözeltisinden ilave edilip ultraturrax cihazı kullanılarak dokular oldukça küçük parçalara ayrılmış oldu. Daha sonra sıvı azot içinde parçalanarak, 3 ml/g olacak şekilde yine aynı tampon çözelti içinde homojenize edildi. Bu süspansiyon 60 dakika 20.000 rpm'de 2 defa santrifüj edildi. Süpernatant analizler için kullanıldı (Pullan and Noltmann 1985; Wistrand 2002).

b. Kangal balığı kas dokusunun temini ve homojenat hazırlanması

Kangal balığı kas dokusunun temini ve homojenat hazırlanması işlemleri Bölüm 3.2.1.b.a'da anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. Solungaç dokularından farklı olarak homojenat hazırlandıktan sonra 2/7 oranında CCl₄/homojenat 5 dakika 1500xg'de santrifüj edildi. Böylece kas dokusu üzerinde kalabilecek yağ tabakası elimine edilmiş oldu ve üstte kalan kısım analizler için kullanıldı.

c. Kangal balığı göz dokusunun temini ve homojenat hazırlanması

Kangal balığı göz dokusunun temini ve homojenat hazırlanması işlemleri Bölüm 3.2.1.b.a'da anlatıldığı gibi gerçekleştirildi.

3.2.1.c. Kangal balığı solungaç, kas ve göz doku homojenatlarının afinite kolonuna tatbiki ve elüsyonu

pH'sı 8,7'ye ayarlanmış olan Kangal balığı doku homojenatı kolona tatbik edildi ve kolon 400 mL 25 mM Tris-HCl/22 mM Na₂SO₄ (pH:8,7) çözeltisi ile yıkandı. Böylece karbonik anhidraz enzimi kolona tutunmuş ve diğer safsızlıklar uzaklaştırılmış oldu. Daha sonra 0.1 M NaCH₃COO/0.5 M NaClO₄ (pH:5,6) çözeltisi kolona tatbik edilip CA enzimi elüe edildi. Fraksiyon toplayıcı yardımıyla elüatlar 5'er mL halinde tüplere alınarak ve 280 nm'deki absorbanlarına bakıldı. Peristaltik pompa vasıtasıyla kolonun akış hızı 20 mL/saat'e ayarlandı.

3.2.1.d. SDS-PAGE ile enzim saflığının kontrolü

Kangal balığı solungaç, kas ve göz dokularından Sepharose 4B afinite kolonu ile CA enzimlerinin saflaştırılmasından sonra %3-8 kesikli 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 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 oluşturucu mikaların bulunduğu kısımlardan kıskaçlarla 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. Katılaşıncaya 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 soğutulurken, 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.

Ayrırma 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'-Tetrametiletillen 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 1 M'lik Tris-HCl (pH:6,8)'den 1,24 mL, %30'luk akrilamid-%0,8'lik bisakrilamid'den 1 mL, %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 Kangal balığı 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. SDS-PAGE ile enzimin molekül kütlesi tayini

Laemmli (1970), metoduna göre molekül kütlesi tayini şu şekilde yapıldı; standart proteinler olarak molekül ağırlığı 170, 130, 100, 70, 55, 35, 40, 35, 25, 15 ve 10 kDa olan standartlar kullanıldı. Her bir doku için gerçekleştirilen elektroforez işlemlerinden sonra standart proteinlerin R_f değerleri hesaplanarak log MA- R_f standart grafikleri çizildi. Daha sonra balık dokularından elde edilen CA enzimlerinin ayrı ayrı R_f değerleri hesaplandı ve standart grafikte yerine konularak Kangal balığı solungaç, kas ve göz CA enzimlerinin log MA'sı belirlendi. Bu değerlerin antilogaritması alınarak Proteinlerin R_f değerleri;

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

formülü ile belirlendi. Burada X_e : Proteinin yürüme mesafesi, X_{boya} : boyanın yürüme mesafesidir.

3.3. CA Aktivitesi Tayini

3.3.1. Hidrataz aktivitesi

CA enzimlerinin aktivitesi tayini için hidrataz aktivitesi kullanıldı (Wilbur and Anderson 1948). Bu yöntem daha sonra Rickli ve arkadaşları tarafından modifiye edilmiştir (Rickli *et al.* 1964). Bu yöntemin esası CO₂'in hidrasyonu sonucu açığa çıkan H⁺ iyonundan ileri gelen pH değişiminin brom timol mavisi indikatörü ile belirlenip, geçen sürenin ölçülmesi esasına dayanır.

Bunun için kör olarak hazırlanan tüpe 1 mL veronal tamponu (0,025 M, pH:8,2), 0,1 mL %0,04'lük brom timol mavisi, 0,6 mL saf su ve 2,5 mL CO₂ çözeltisi ilave edildi. Böylece aktivite ölçüm ortamında toplam hacim 4,2 mL oldu. Daha sonra bir kronometre yardımıyla CO₂ çözeltisi katıldığı andan itibaren indikatörün mavi renginin sarımsı yeşile dönüşmesi (pH:6,3) için geçen süre belirlendi (t_o). Numune tüpüne ise sudan 0,05 mL azaltarak bunun yerine enzim çözeltisi ilave edildi ve yine en son olarak CO₂ çözeltisi ilave edilir edilmez, indikatörün mavi renginin sarımsı yeşile dönüşmesi (pH:6,3) için geçen süre bir kronometre vasıtasıyla belirlendi (t_c).

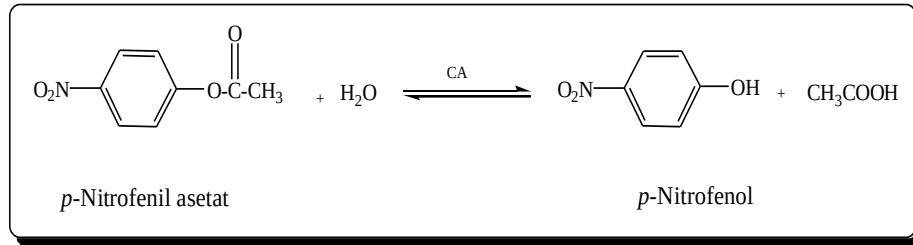
Bu yönteme göre CA aktivitesi için bir enzim ünitesi (EU) enzimsiz olarak meydana gelen CO₂ hidratasyonu süresini yarıya indiren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır.

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

formülüne göre kullanılan enzim çözeltisi hacmi için enzim ünitesi hesaplandı (Maren 1960). Hemolizat, saf enzim çözeltisi ve inhibisyon çalışmalarında aktivite tayininde aynı işlemler uygulandı.

3.3.2. Esteraz aktivitesi

Kinetik ve inhibisyon çalışmaları için esteraz aktivite yöntemi uygulandı. Bu yöntem, CA'nın esteraz aktivitesine sahip olması esasına dayanmaktadır. Metodun prensibi kısaca şöyledir; karbonik anhidraz enzimi substrat olarak kullanılan *p*-nitrofenilasetatı 348 nm'de absorbsiyon veren *p*-nitrofenol veya *p*-nitrofenolata hidroliz etmektedir. Reaksiyon mekanizması aşağıda verildiği gibidir.



Şekil 3.2. *p*-Nitrofenilasetatın *p*-nitrofenole dönüşüm mekanizması

p-Nitrofenol ve onun tuzu olan *p*-nitrofenolat'ın her ikisi de 348 nm'de absorbansı göstermektedir. Bu yüzden fenol grubundaki H⁺ iyonunun ayrışıp ayrışmaması ölçümü etkilememektedir (Armstrong *et al.* 1966; Verpoorte and Mehta 1967). Bu dalga boyunda *p*-nitrofenilasetatın çok az absorbsiyonu olduğundan, kör olarak kullanılmaktadır.

3 mL'lik kuvarz küvetler kullanılarak ölçülen aktivite tayini işlemleri için reaksiyon karışımını oluşturan maddelerin ortama katılım sırasına göre aşağıdaki prosedür uygulandı.

Çizelge 3.2. Esteraz aktivitesi için 3 mL’lik kuvarz küvetlere kullanılan çözeltiler

Kullanılan Maddeler	Kontrol Tüpü (µL)	Numune Tüpü
Tris-SO ₄ (0.05 M, pH:7,4)	1400	1400
<i>p</i> -Nitrofenol asetat	1000	1000
Saf su	600	500
Enzim çözeltisi	-	100
Toplam hacim	3000	300

1 mL’lik kuvarz küvetler kullanılarak ölçülen aktivite tayini işlemleri için reaksiyon karışımını oluşturan maddelerin ortama katılım sırasına göre ise aşağıdaki prosedür uygulandı.

Çizelge 3.3. Esteraz aktivitesi için 1 mL’lik kuvarz küvetlere kullanılan çözeltiler

Kullanılan Maddeler	Kontrol Tüpü (µL)	Numune Tüpü
Tris-SO ₄ (0,05 M; pH:7,4)	467	467
<i>p</i> -Nitrofenol asetat	333	333
Saf su	200	167
Enzim çözeltisi	-	33
Toplam hacim	1000	1000

Çizelge 3.3’deki reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra her 15 saniyede bir absorbands miktarı okundu ve 3 dakika sonundaki 25°C’de 348 nm’de absorbandsı okunarak absorbands farkı alındı. Spektrofotometre, daha önce enzim yerine saf su konularak elde edilen karışımın 3 dakika sonundaki absorbandsı ile sıfıra ayarlandı.

Yapılan deneylerde kullanılan *p*-nitrofenilasetat substrat çözeltisi, günlük olarak hazırlandı: 27,2 mg ester, 1 mL aseton içinde çözülerek 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 *et al.* 1967). Kinetik çalışmalar esnasındaki aktivite ölçümleri enzimin esteraz aktivitesi ile gerçekleştirildi.

3.4. Protein Tayini

3.4.1. Kalitatif protein tayini

Kalitatif protein tayini, 280 nm’de proteinlerin yapısında bulunan fenilalanin, triptofan ve tirozin aminoasitlerinin maksimum absorbens göstermesi esasına dayanmaktadır (Segel 1968). Bu metot yardımıyla kromatografi işlemlerinde fraksiyon toplayıcısı yardımıyla eşit hacimde alınan bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Fraksiyonlar kuvarz küvetlere alınarak, absorbensları spektrofotometrede köre karşı okundu.

3.4.2. Kantitatif protein tayini

Afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltisindeki ve hemolizattaki protein miktarları bu yöntemle belirlendi. Bu yöntem, proteine Coomassie Brilliant Blue G-250’nin bağlanması esasına dayanır. Oluşan kompleks 595 nm’de maksimum absorbens gösterir. Proteine boyanın bağlanması çok hızlı gelişir. Protein-boya kompleksi çözeltiilerde uzun süre kalır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır (Bradford 1976).

Tayin işlemlerinde şu prosedür takip edildi: 1 mL’inde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albümin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µL alındı. Saf su ile tüm tüplerin hacmi 0,1 mL’ye tamamlanarak 5 mL renklendirme reaktifi tüplere ilave edilip vorteks ile karıştırıldı. 10 dakika sonra 595 nm’de 3 mL’lik küvetlerde köre karşı absorbens değerleri okundu.

Kör olarak 0,1 mL aynı tampon ve 5 mL renklendirme reaktifinden oluşan karışım kullanılarak absorbans değerlerine karşılık gelen μg protein değerleri standart grafik haline getirildi. Protein tayini yapılacak numuneler için aynı yöntem uygulandı ve standart grafikten miktar tayini yapıldı.

3.5. Kangal balığı dokularından saflaştırılan CA enzimleri İçin 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 1 M potasyum fosfat tampon çözeltilerinde Kangal balığı solungaç, kas ve göz dokularından elde edilen CA enzimlerinin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak ölçüldü. Sonuçlar çizelgelerde ve aktivite (%) -pH grafikleri halinde gösterildi.

3.5.2. Karbonik anhidraz enzimi için optimum iyonik şiddet çalışması

Kangal balığı solungaç, kas ve göz dokularından elde edilen CA enzimlerinin aktiviteleri üzerine iyonik şiddetin etkisinin belirlenmesi, enzim aktivitesinin optimum olduğu Tris-sülfat tamponu kullanılarak yapıldı. Bu tampon ile 1.0 M ile 0,1 M arasında iyonik şiddete sahip çözeltiler hazırlandı ve CA enzimleri için esterase 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.

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. 24 saat arayla yapılan aktivite ölçümünde enzimin stabil olduğu pH belirlendi. İnkübasyon süresine karşılık aktivite değerleri grafikler halinde gösterildi.

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

Kangal balığı dokularından saflaştırılan CA enzimlerinin aktivitelerinin optimum olduğu sıcaklıkların, E_a , ΔH ve Q_{10} değerlerinin belirlenmesi amacıyla dijital su banyosu kullanılarak 0°C ile 60°C arasında 10'ar °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.

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

Aktivasyon entalpisinin (ΔH)'nin hesabında ise şu formülden faydalanıldı (Wilson 1971; Segel 1975; Onganer *et al.* 1998);

$$\Delta H = E_a - RT$$

Daha sonra bir enzim için, 10°C'lik sıcaklık değişiminin meydana getirdiği aktivite farklılığı olan Q_{10} değeri, aralarında 10°C fark olan iki aktivite değerinden yüksek olanın düşük olan aktivite değerine bölünmesi ile hesaplandı (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

3.5.5. *p*-Nitrofenilasetat substratı için K_M , V_{max} , k_{cat} ve özgülük sabitinin (V_0) bulunmasına yönelik çalışmalar

p-Nitrofenilasetat substratı için Kangal balığı solungaç, kas ve göz 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_M ve 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 $k_{cat} = V_{max} / E_T$ formülünden faydalanılarak hesaplandı. Çeşitli enzimlerin katalitik etkilerinin veya farklı substratların aynı enzimle ürüne dönüşümünün karşılaştırılmasının bir yolu da tepkimeler için özgülük sabitinin (V_0) bulunmasıdır. Özgülük sabiti $V_0 = k_{cat} / K_M$ formülü kullanılarak hesaplandı (Lehninger 2005).

3.5.6. Bazı metallerin Kangal balığı 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 Kangal balığı solungaç, kas ve göz dokularından afinite kromatografisi vasıtasıyla saflaştırılan karbonik anhidraz enziminin aktivitesi üzerine inhibisyon etkileri araştırıldı. Kinetik ölçümler enzimin esterez aktivitesinden faydalanılarak gerçekleştirildi (Verpoorte and Mehta 1967; Armstrong *et al.* 1966). Enzimi inhibe eden $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $FeCl_2 \cdot H_2O$, $Pb(NO_3)_2$ ve $CdCl_2 \cdot H_2O$ 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. Kangal balığı dokularından elde edilen CA enzimi için inhibitör etkisi gösteren ağır metallerin K_i sabitlerinin bulunması

İnhibitör çalışmaları için, Bölüm 3.6.6'da anlatıldığı gibi ön denemeyle balık dokularından elde edilen CA enzimini inhibe eden $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ve $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ maddeleri kullanıldı. Solungaç, kas ve göz için yapılan tüm çalışmalarda kullanılan inhibitörlerin stok konsantrasyonları Bölüm 3.1.3'de verilmiştir.

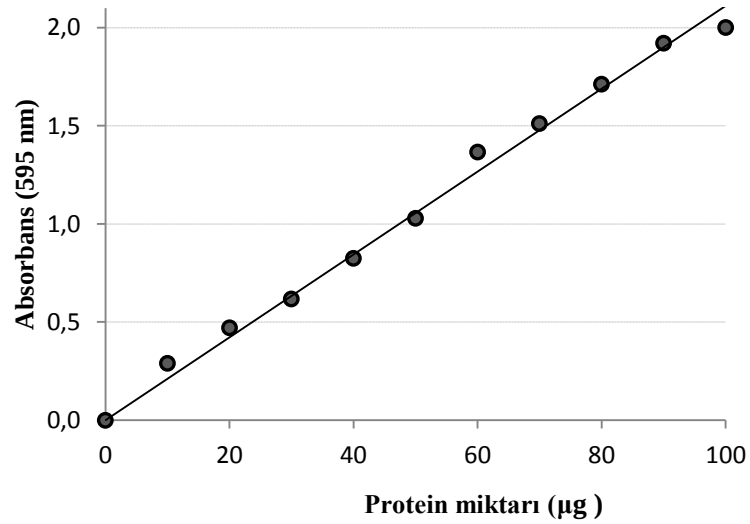
Çalışmalarda en uygun beş farklı substrat konsantrasyonu substrat stok çözeltileri kullanılarak ön çalışmayla belirlendi. Yine aynı şekilde her bir substrat konsantrasyonu için en uygun üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonu inhibitör stok çözeltileri kullanılarak ön çalışmayla tespit edildi. Spektrofotometrenin hassasiyet sınırları içinde absorbans değerinin ölçüldüğü konsantrasyonlar diğer deneylerde de kullanıldı. İnhibitör çalışmaları için kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları çizelgeler halinde verildi.

Daha sonra balık 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

Kangal balığı 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.

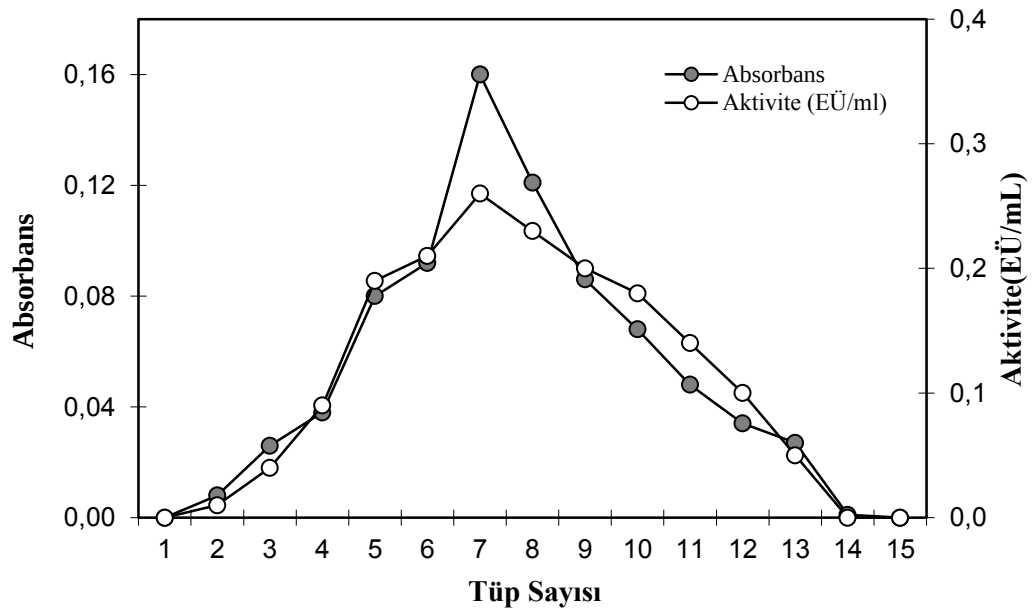


Şekil 4.1. Bradford yöntemi ile proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart grafik

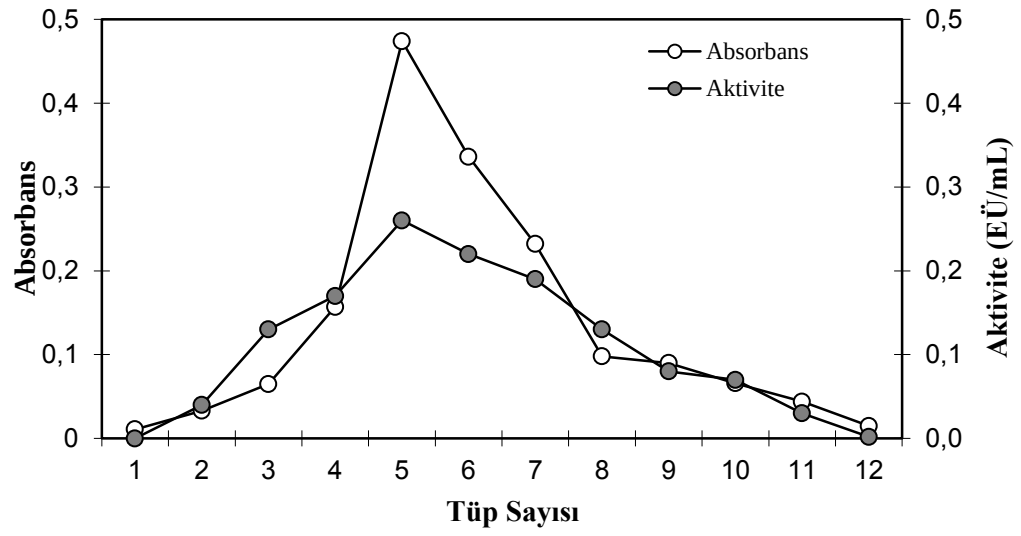
4.2. Kangal balığı solungaç, kas ve göz dokularından karbonik anhidraz enziminin saflaştırılma, karakterizasyon ve kinetik çalışma sonuçları

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

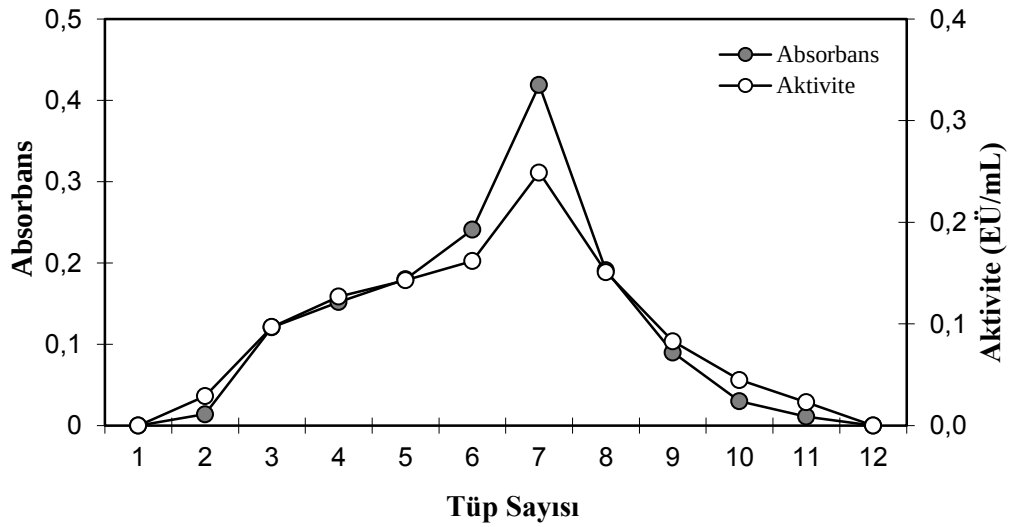
Kangal balığı solungaç, kas ve göz dokularından hazırlanan homojenatların pH'ları katı Tris kullanılarak 8,7'ye ayarlandıktan sonra, bölüm 3.2.1.1.'de anlatıldığı gibi daha önceden hazırlanmış olan Sepharose 4B-L-tirozin sülfanilamid afinite (1,5 cm²x30 cm'lik ve 20 cm jel yüksekliğine sahip) kolonuna 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 4.2-4.4). Kangal balığı solungaç, kas ve göz dokularından elde edilen 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 ve Çizelge 4.3'de verildi.



Şekil 4.2. Kangal balığı solungaç dokusu CA enziminin Sepharose 4B-L-tirozin sülfanilamid afinite kromatografisi ile saflaştırma grafiği



Şekil 4.3. Kangal balığı kas dokusu CA enziminin Sepharose 4B-L-tirozin sülfanilamid afinite kromatografisi ile saflaştırma grafiği



Şekil 4.4. Kangal balığı göz dokusu CA enziminin Sepharose 4B-L-tirozin sülfanilamid afinite kromatografisi ile saflaştırma grafiği

Çizelge 4.1. Kangal balığı solungaç dokusundan CA enzimi saflaştırma sonuçları

Numune Türü	Aktivite (EÜ/mL)	Toplam hacim (mL)	Protein (mg/mL)	Toplam protein (mg)	Toplam aktivite	Spesifik aktivite (EÜ/mg)	Verim (%)	Saflaştırma katsayısı
Hemolizat	0,091	50,0	1,711	85,550	4,550	0,053	100	1
Sepharose-4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite kolon kromatografisi	0,281	2,5	0,022	0,055	0,703	12,770	15,44	240,9

Çizelge 4.2. Kangal balığı kas dokusundan CA enzimi saflaştırma sonuçları

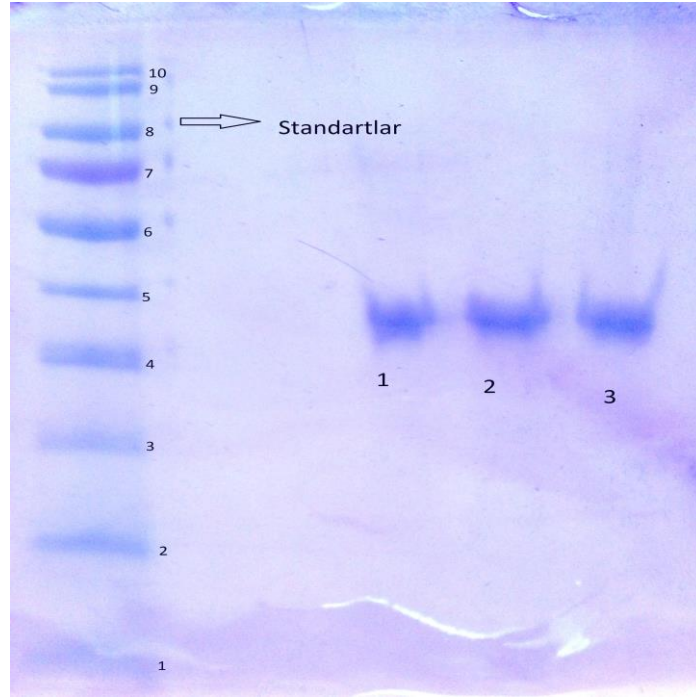
Numune Türü	Aktivite (EÜ/mL)	Toplam hacim (mL)	Protein (mg/mL)	Toplam protein (mg)	Toplam aktivite	Spesifik aktivite (EÜ/mg)	Verim (%)	Saflaştırma katsayısı
Hemolizat	0,189	40,0	1,108	44,320	7,56	0,171	100	1
Sepharose-4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite kolon kromatografisi	0,536	2,5	0,016	0,039	1,34	34,360	17,98	203,3

Çizelge 4.3. Kangal balığı göz dokusundan CA enzimi saflaştırma sonuçları

Numune Türü	Aktivite (EÜ/mL)	Toplam hacim (mL)	Protein (mg/mL)	Toplam protein (mg)	Toplam aktivite	Spesifik aktivite (EÜ/mg)	Verim (%)	Saflaştırma katsayısı
Hemolizat	0,098	30,0	2,170	65,280	2,940	0,045	100	1
Sepharose-4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite kolon kromatografisi	0,245	3,0	0,014	0,042	0,622	17,500	21,26	388,9

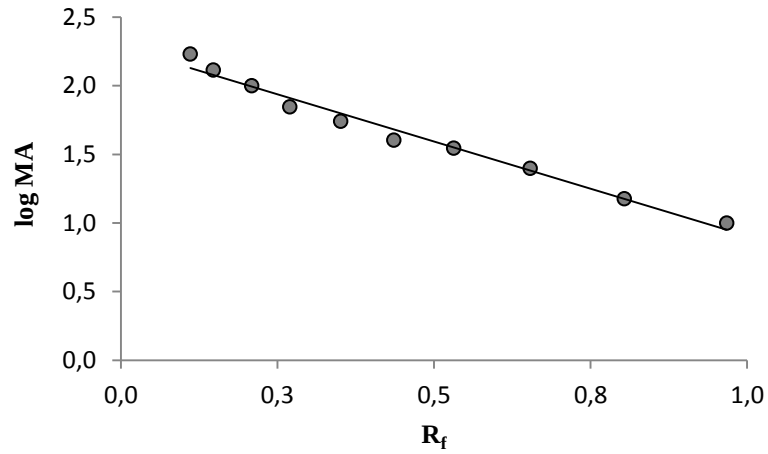
4.2.2. Sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) sonucu

Sepharose-4B afinite kromatografisinden saf olarak elde edilen Kangal balığı dokularından elde edilem CA enzimi ve standart proteinler, her bir enzim için ayrı ayrı hazırlanan kesikli SDS-poliakrilamid jel elektroforezine tatbik edildi. Daha sonra elde edilen protein bantlarının fotoğrafı çekildi ve Şekil 4.5'te gösterilmiştir.



Şekil 4.5. Afinite kromatografisi ile saflaştırılan karbonik anhidraz enzimlerinin SDS-PAGE fotoğrafı

* 1:Solungaç dokusu CA, 2: Kas dokusu CA, 3: Göz dokusu CA (1: 10 kDa 2: 15 kDa 3: 25 kDa, 4: 35 kDa 5: 40 kDa 6: 55 kDa 7: 70kDa 8:100 kDa 9:130 kDa 10:170 kDa)



Şekil 4.6. Kangal balığı solungaç, kas ve göz dokuları CA enzimi için SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yöntemiyle proteinlerin molekül kütlesi tayininde kullanılan standart grafik

Çizelge 4.4. Kangal balığı dokuları CA enzimleri için SDS-PAGE ile molekül kütleleri tayini sonuçları

Enzim	Doku	Molekül Kütlesi (kDa)
Karbonik	Solungaç	32,86
Anhidraz	Kas	33,39
	Göz	31,72

4.2.3. Kangal balığı solungaç, kas ve göz dokuları karbonik anhidraz enzimleri için optimum pH'ların belirlenmesi

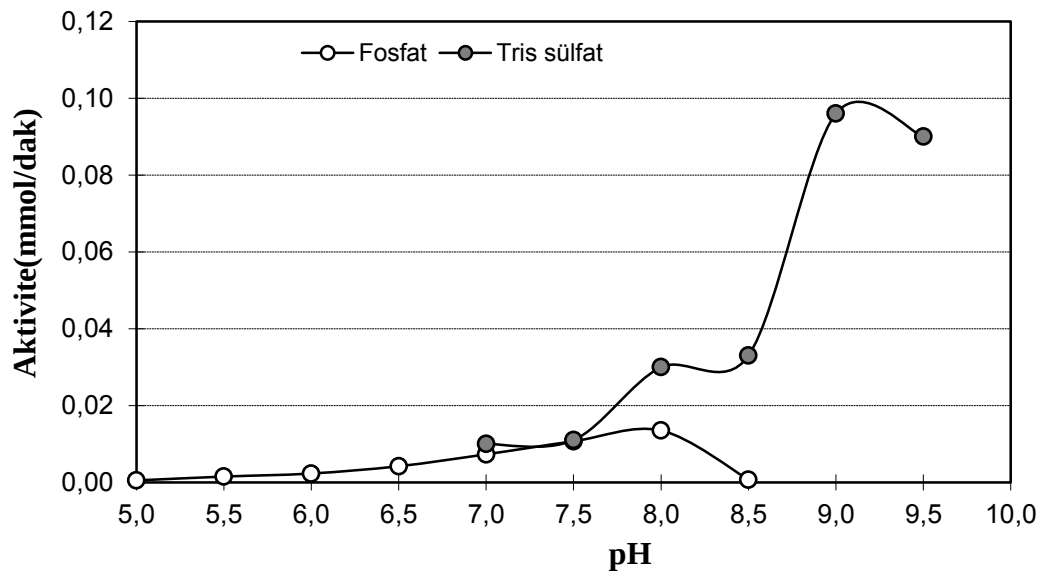
Kangal balığı solungaç, kas ve göz dokuları karbonik anhidraz enzimlerinin optimum pH'ları Bölüm 3.5.1'de anlatıldığı şekilde; pH'sı 7,2 - 9,0 aralığında 1 M Tris- SO₄ ve pH'sı 5,0 - 8,0 aralığında 1 M potasyum fosfat tampon çözeltileri kullanılarak enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak belirlendi (Çizelge 4.5 - 4.10 ve Şekil 4.7 - 4.9). Kangal balığı solungaç, kas ve göz dokuları CA'ları için optimum pH'lar 1 M Tris-SO₄ pH: 9,0 tamponu olarak belirlendi.

Çizelge 4.5. Kangal balığı solungaç dokusu CA enziminin optimum pH'sı için 1 M Tris-SO₄ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

pH	Aktivite (EÜ/mL)
7,00	0,010
7,50	0,011
8,00	0,030
8,50	0,033
9,00	0,096
9,25	0,092
9,50	0,090

Çizelge 4.6. Kangal balığı solungaç dokusu CA enziminin optimum pH'sı için 1 M potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

pH	Aktivite (EÜ/mL)
5,00	0,0005
5,50	0,0015
6,00	0,0023
6,50	0,0042
7,00	0,0073
7,50	0,0107
8,00	0,0135
8,25	0,0123
8,50	0,0070



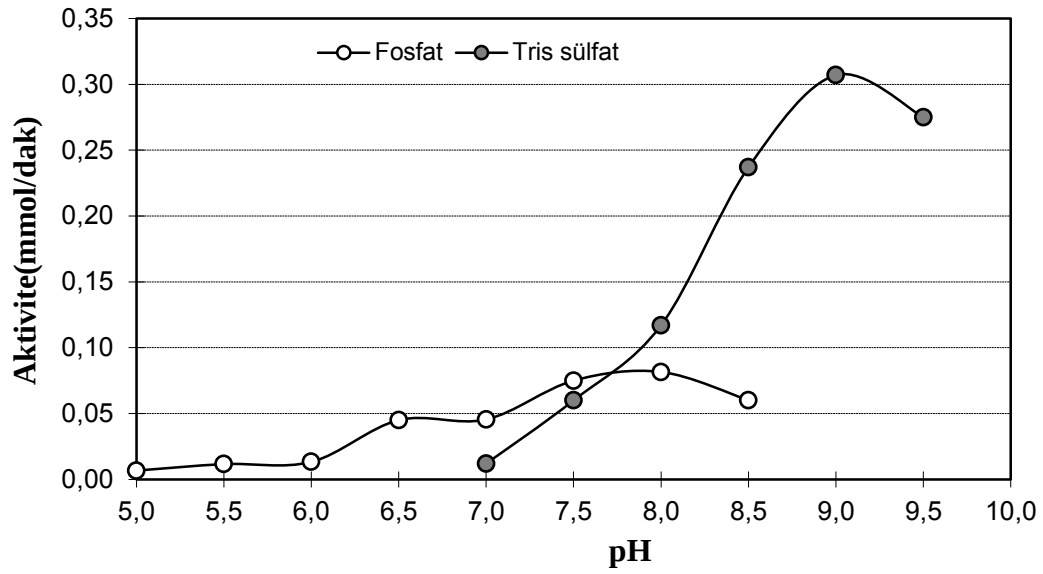
Şekil 4.7. Kangal balığı solungaç dokusu CA enziminin optimum pH'sını bulmak için 1 M Potasyum fosfat ve 1 M Tris-SO₄ tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm değerleri

Çizelge 4.7. Kangal balığı kas dokusu CA enziminin optimum pH'sı için 1 M Tris-SO₄ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

pH	Aktivite (EÜ/mL)
7,00	0,012
7,50	0,060
8,00	0,117
8,50	0,237
9,00	0,307
9,25	0,295
9,50	0,275

Çizelge 4.8. Kangal balığı kas dokusu CA enziminin optimum pH'sı için 1 M potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

pH	Aktivite (EÜ/mL)
5,00	0,0067
5,50	0,0116
6,00	0,0133
6,50	0,0450
7,00	0,0455
7,50	0,0750
8,00	0,0816
8,25	0,0680
8,50	0,0600



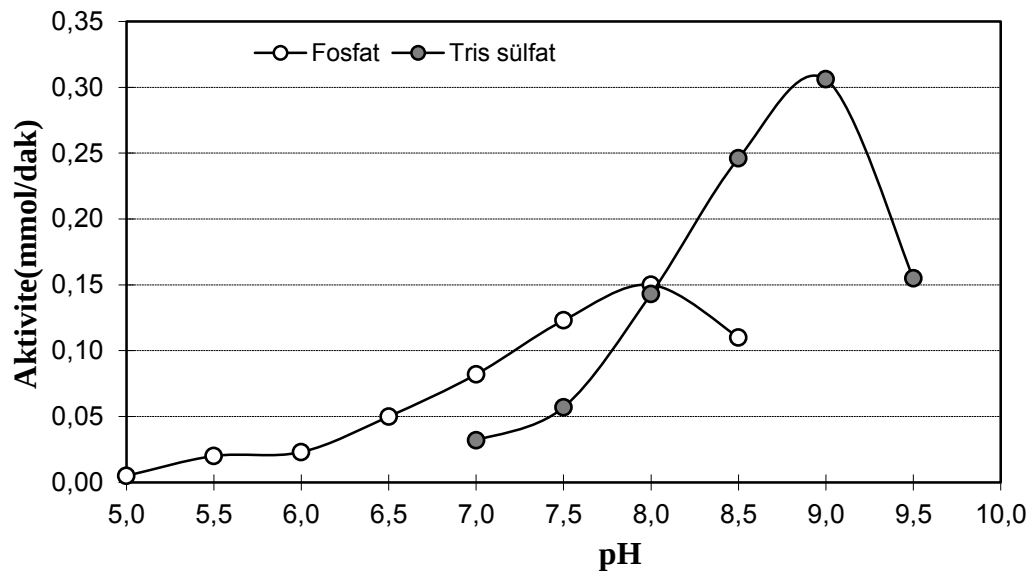
Şekil 4.8. Kangal balığı kas dokusu CA enziminin optimum pH'sını bulmak için 1 M Potasyum fosfat ve 1 M Tris-SO₄ tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm değerleri

Çizelge 4.9. Kangal balığı göz dokusu CA enziminin optimum pH'sı için 1 M Tris-SO₄ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

pH	Aktivite (EÜ/mL)
7,00	0,032
7,50	0,057
8,00	0,143
8,50	0,246
9,00	0,306
9,25	0,296
9,50	0,155

Çizelge 4.10. Kangal balığı göz dokusu CA enziminin optimum pH'sı için 1 M potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

pH	Aktivite (EÜ/mL)
5,00	0,005
5,50	0,020
6,00	0,023
6,50	0,050
7,00	0,082
7,50	0,123
8,00	0,150
8,25	0,127
8,50	0,110



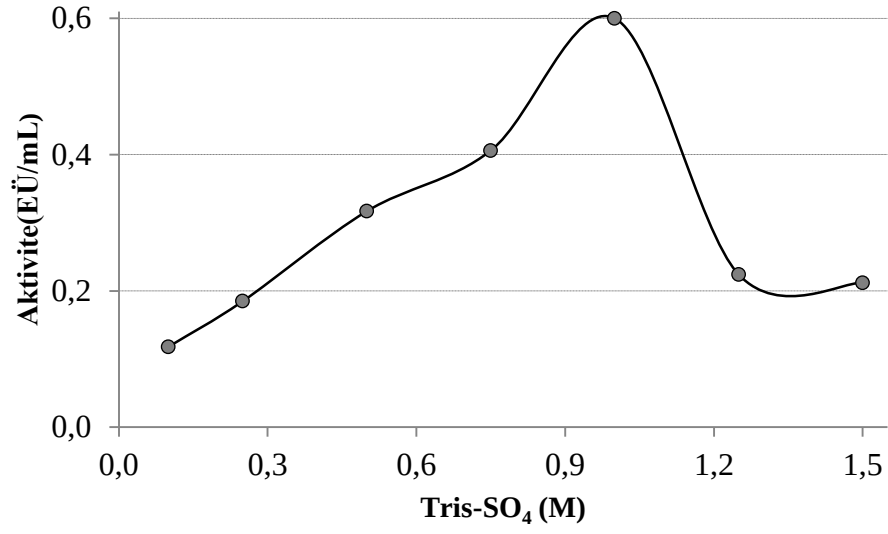
Şekil 4.9. Kangal balığı göz dokusu CA enziminin optimum pH'sını bulmak için 1 M Potasyum fosfat ve 1 M Tris-SO₄ tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm değerleri

4.2.4. Kangal balığı solungaç, kas ve göz dokuları karbonik anhidraz enzimleri için optimum iyonik şiddetlerin belirlenmesi

Kangal balığı solungaç, kas ve göz 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 4.11-4.13, Şekil 4.10-4.12). Kangal balığı solungaç kas ve göz 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’den daha yüksek konsantrasyonlarda tampon çözeltisinde çökme gözlemlendi.

Çizelge 4.11. Kangal balığı solungaç dokusu için Tris-SO₄ çözeltisi kullanılarak farklı iyonik şiddetlerde yapılan aktivite ölçüm sonuçları

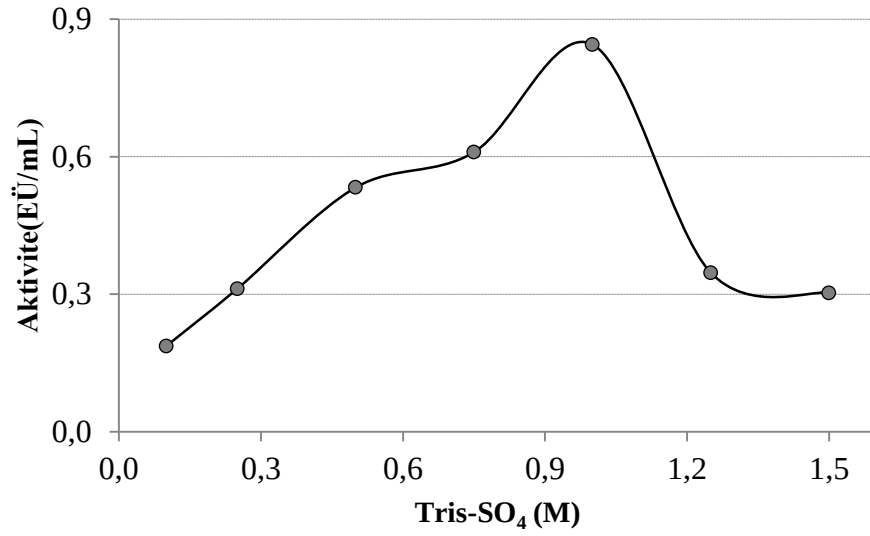
İyonik şiddet (M)	Aktivite (EÜ/mL)
0,10	0,118
0,25	0,185
0,50	0,317
0,75	0,406
1,00	0,600
1,25	0,224
1,50	0,212



Şekil 4.10. Kangal balığı solungaç dokusu için Tris-SO₄ çözeltisi kullanılarak farklı iyonik şiddetlerde yapılan aktivite ölçüm sonuçları

Çizelge 4.12. Kangal balığı kas dokusu için Tris-SO₄ çözeltisi kullanılarak farklı iyonik şiddetlerde yapılan aktivite ölçüm sonuçları

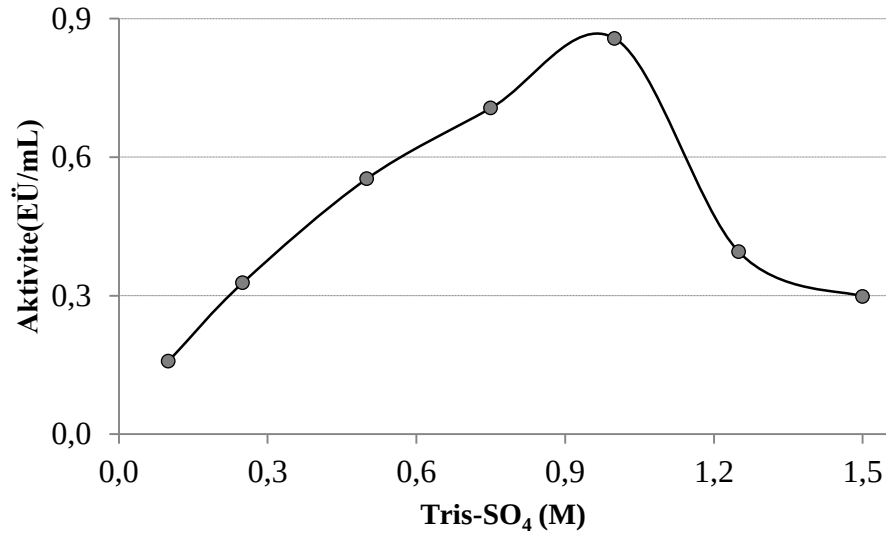
İyonik şiddet (M)	Aktivite (EÜ/mL)
0,10	0,187
0,25	0,312
0,50	0,533
0,75	0,610
1,00	0,845
1,25	0,347
1,50	0,303



Şekil 4.11. Kangal balığı kas dokusu için Tris-SO₄ çözeltisi kullanılarak farklı iyonik şiddetlerde yapılan aktivite ölçüm sonuçları

Çizelge 4.13. Kangal balığı göz dokusu için Tris-SO₄ çözeltisi kullanılarak farklı iyonik şiddetlerde yapılan aktivite ölçüm sonuçları

İyonik Şiddet (M)	Aktivite (EÜ/mL)
0,10	0,158
0,25	0,328
0,50	0,553
0,75	0,706
1,00	0,857
1,25	0,395
1,50	0,298



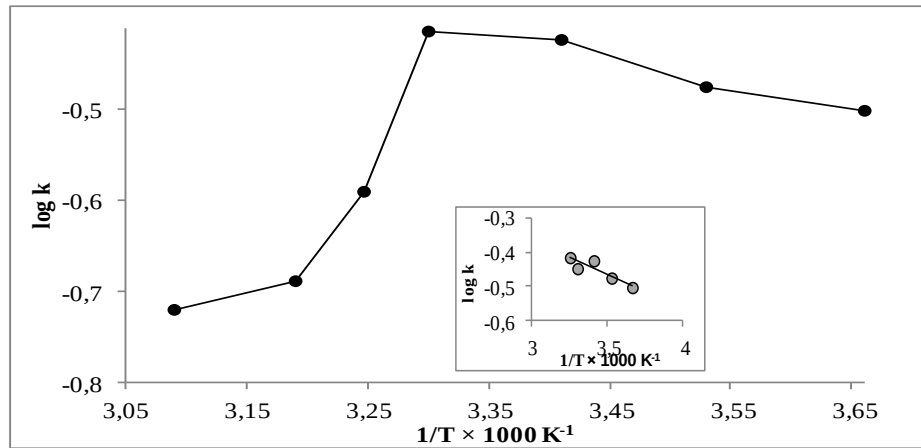
Şekil 4.12. Kangal balığı göz dokusu için Tris-SO₄ çözeltisi kullanılarak farklı iyonik şiddetlerde yapılan aktivite ölçüm sonuçları

4.2.5. Kangal balığı solungaç, kas ve göz dokuları karbonik anhidraz enzimleri için yapılan optimum sıcaklık çalışması

Kangal balığı solungaç, kas ve göz dokuları karbonik anhidraz enzimlerinin optimum sıcaklık çalışmaları 0°C ile 60°C arasında yapıldı ve her 10°C enzimlerin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak belirlendi. Sonuçlar Çizelge 4.14, Çizelge 4.15 ve Çizelge 4.16'te ve Şekil 4.3, Şekil 4.14 ve Şekil 4.15'de gösterildi. Kangal balığı dokuları CA enzimleri için optimum sıcaklık, E_a , ΔH ve Q_{10} tayini sonuçları ise Çizelge 4.17'da gösterildi.

Çizelge 4.14. Kangal balığı solungaç dokusu için sıcaklıklarda yapılan aktivite (%) değerleri (20 °C’deki aktivite değeri %100 olarak alındı)

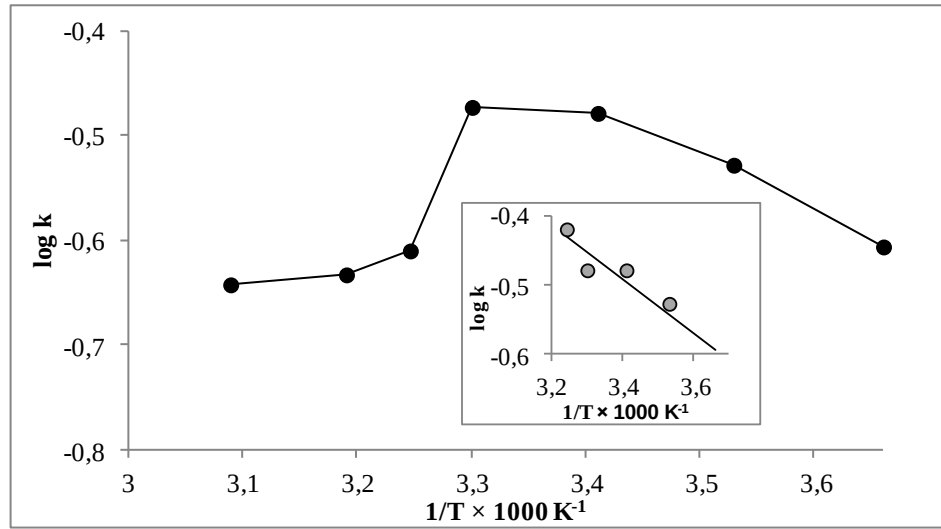
Sıcaklık (°C)	Aktivite (%)
0	83,62
10	88,94
20	100,00
30	102,21
35	73,89
40	68,14
50	54,42
60	50,44



Şekil 4.13. Kangal balığı solungaç dokusu CA enziminin aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişimi

Çizelge 4.15. Kangal balığı kas dokusu için sıcaklıklarda yapılan aktivite (%) değerleri (20°C'deki aktivite değeri %100 olarak alındı)

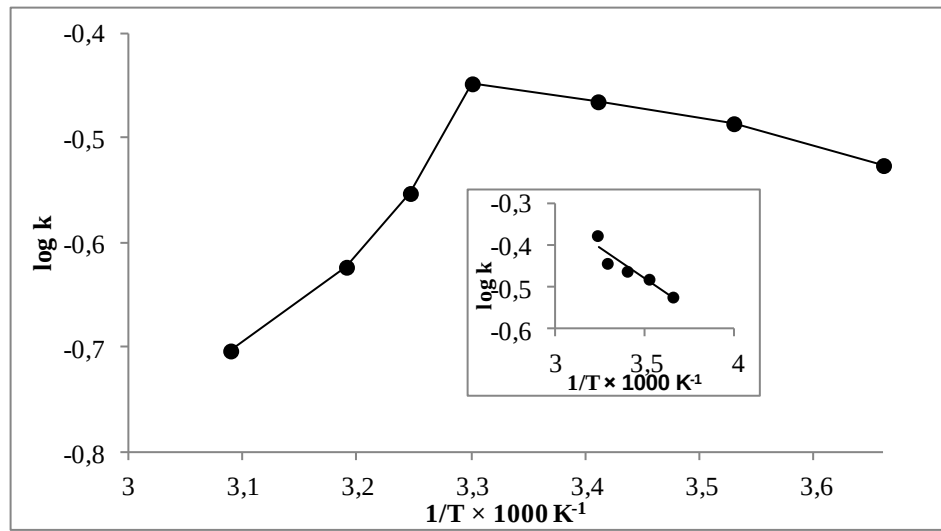
Sıcaklık (°C)	Aktivite (%)
0	74,87
10	89,44
20	100,00
30	101,51
35	112,06
40	73,87
50	70,35
60	58,84



Şekil 4.14. Kangal balığı kas dokusu CA enziminin aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişim grafiği

Çizelge 4.16. Kangal balığı göz dokusu için sıcaklıklarda yapılan aktivite (%) değerleri 20°C'deki aktivite değeri %100 olarak alındı)

Sıcaklık (°C)	Aktivite (%)
0	86,89
10	95,15
20	100,00
30	103,88
35	121,84
40	81,55
50	69,41
60	57,77



Şekil 4.15. Kangal balığı göz dokusu CA enziminin aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişim grafiği

Çizelge 4.17. Kangal balığı dokuları CA enzimleri için optimum sıcaklık, E_a , ΔH ve Q_{10} tayini sonuçları

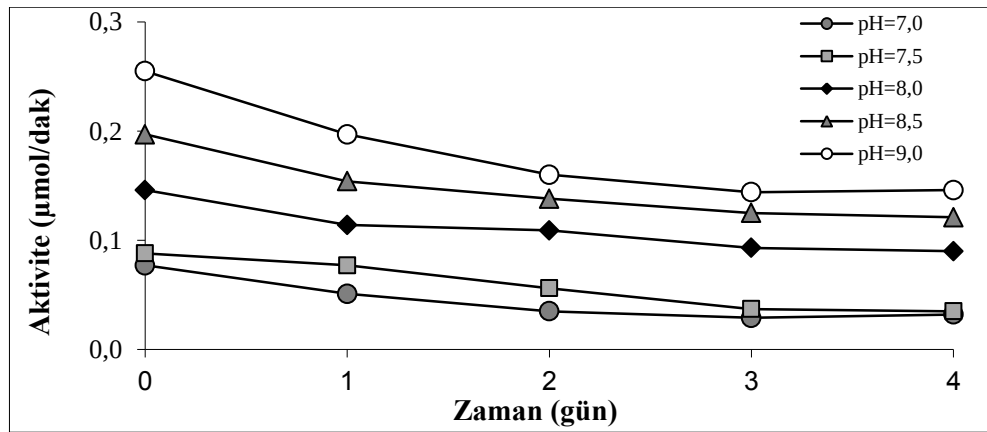
Dokular	Solungaç	Kas	Göz
Optimum Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)	30	35	35
E_a (kcal/mol)	4,97	7,32	5,91
E_H (kcal/mol)	4,36	6.70	5,29
Q_{10}	1,50	1,37	1,27

4.2.6. Kangal balığı solungaç, kas ve göz dokuları karbonik anhidraz enzimleri için yapılan stabil pH çalışması

Enzimlerin stabil olduğu pH'yı tespit etmek için pH'ları 7,5-9,0 olan Tris- SO_4 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. 24 saat arayla yapılan aktivite ölçümünde enzimin stabil olduğu pH belirlendi. İnkübasyon süresine karşılık aktivite değerleri Çizelge 4.18-4.23'de tablolar halinde ve Şekil 4.16-4.21'de şekiller halinde gösterildi. Kangal balığı solungaç dokusundan stabil pH 8,5 olarak tespit edilirken kas ve göz dokuları için stabil pH 9,0 olarak belirlendi.

Çizelge 4.18. Kangal balığı solungaç dokusu CA enziminin satabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 1 M Tris-SO₄ tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

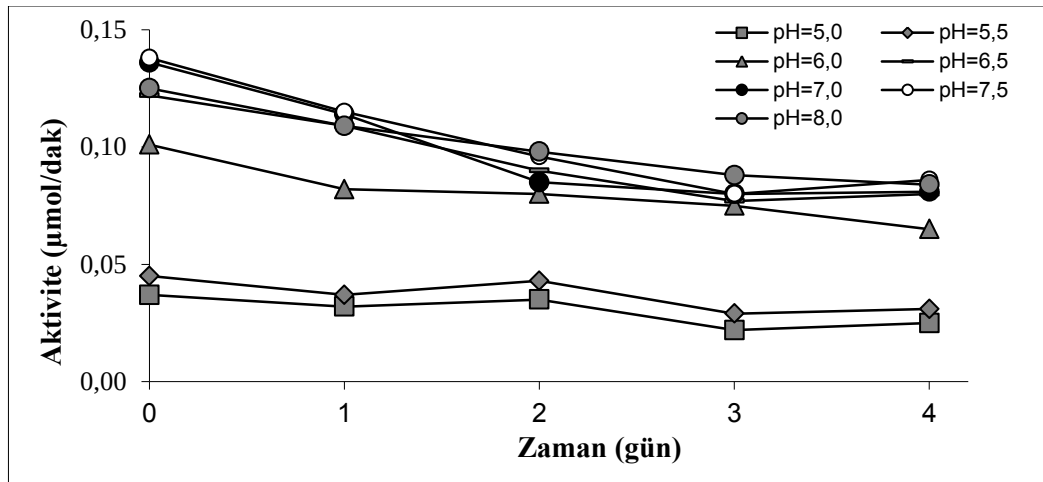
Zaman (Gün)	pH				
	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0
0	0,077	0,088	0,146	0,197	0,255
1	0,051	0,077	0,114	0,154	0,197
2	0,035	0,056	0,109	0,138	0,160
3	0,029	0,037	0,093	0,125	0,144
4	0,032	0,035	0,090	0,121	0,146



Şekil 4.16. Kangal balığı solungaç dokusu CA enziminin satabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 1 M Tris-SO₄ tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçlarının grafiksel gösterimi

Çizelge 4.19. Kangal balığı solungaç dokusu CA enziminin satabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 1 M Potasyum fosfat tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

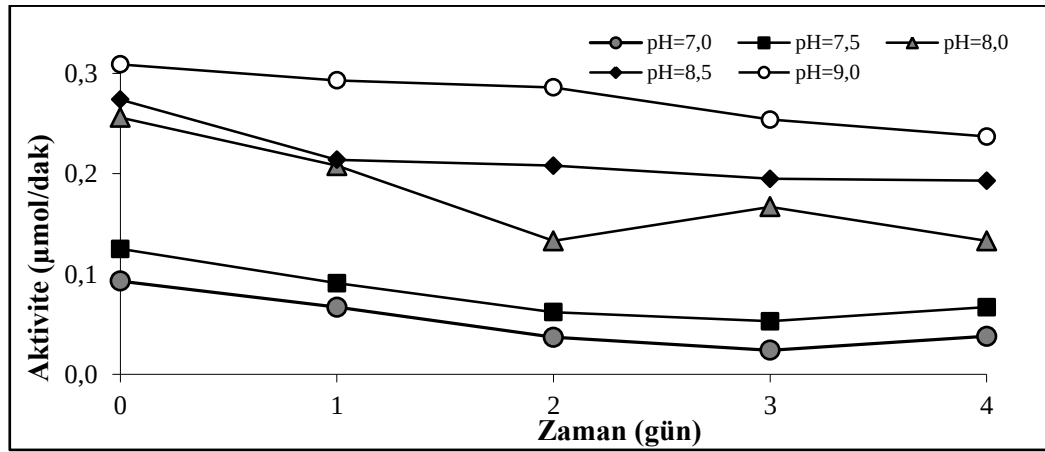
Zaman (Gün)	pH						
	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
0	0,037	0,045	0,101	0,122	0,136	0,138	0,125
1	0,032	0,037	0,082	0,109	0,114	0,115	0,109
2	0,035	0,043	0,080	0,090	0,085	0,096	0,098
3	0,022	0,029	0,075	0,077	0,080	0,080	0,088
4	0,025	0,031	0,065	0,080	0,081	0,086	0,084



Şekil 4.17. Kangal balığı solungaç dokusu CA enziminin satabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 1 M Potasyum fosfat tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçlarının grafiksel gösterimi

Çizelge 4.20. Kangal balığı kas dokusu CA enziminin satabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 1 M Tris-SO₄ tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

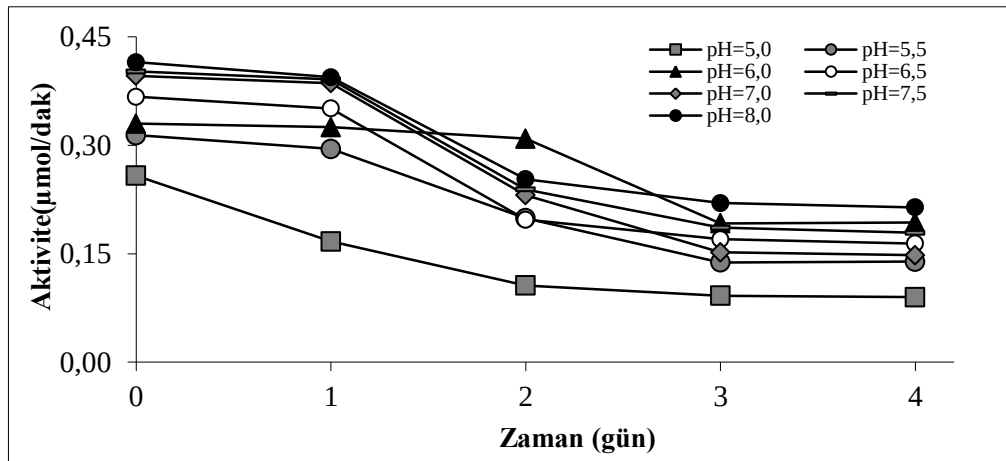
Zaman (Gün)	pH				
	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0
0	0,093	0,125	0,256	0,274	0,309
1	0,067	0,091	0,208	0,214	0,293
2	0,037	0,062	0,133	0,208	0,286
3	0,024	0,053	0,167	0,195	0,254
4	0,038	0,067	0,133	0,193	0,237



Şekil 4.18. Kangal balığı kas dokusu CA enziminin satabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 1 M Tris-Sülfat tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçlarının grafiksel gösterimi

Çizelge 4.21. Kangal balığı kas dokusu CA enziminin satabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 1 M Potasyum fosfat tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

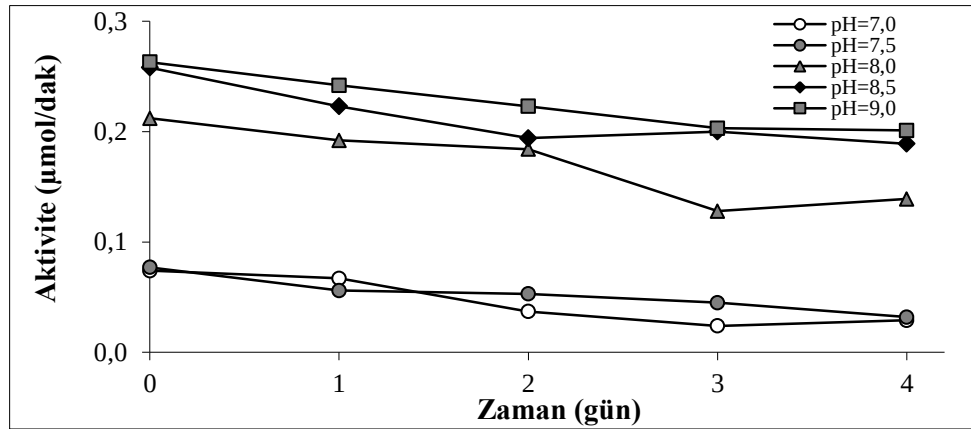
Zaman (Gün)	pH						
	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
0	0,258	0,314	0,330	0,367	0,396	0,402	0,415
1	0,167	0,295	0,325	0,351	0,386	0,391	0,394
2	0,106	0,199	0,309	0,197	0,231	0,239	0,253
3	0,092	0,138	0,192	0,170	0,152	0,186	0,220
4	0,090	0,139	0,193	0,164	0,148	0,197	0,214



Şekil 4.19. Kangal balığı kas dokusu CA enziminin satabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 1 M Potasyum fosfat tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçlarının grafiksel gösterimi

Çizelge 4.22. Kangal balığı göz dokusu CA enziminin satabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 1 M Tris-SO₄ tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

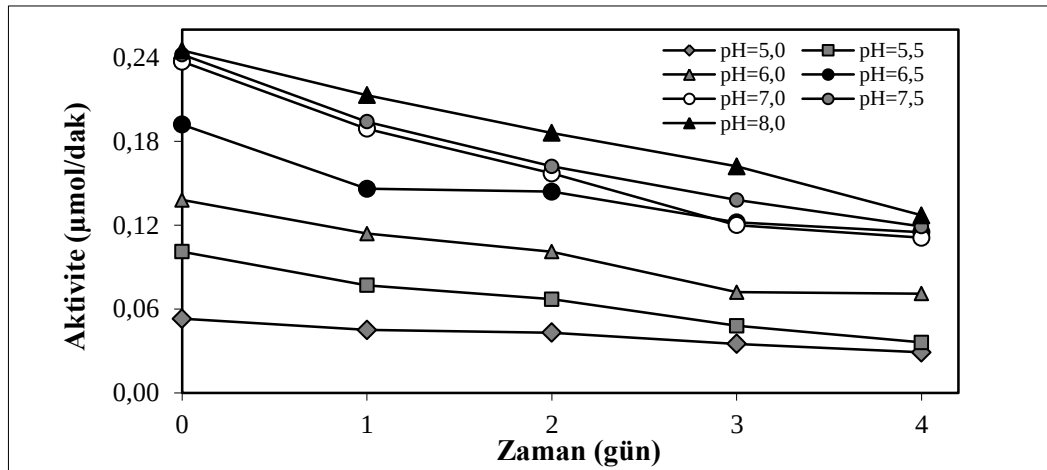
Zaman (Gün)	pH				
	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0
0	0,074	0,077	0,212	0,258	0,263
1	0,067	0,056	0,192	0,223	0,242
2	0,037	0,053	0,184	0,194	0,223
3	0,024	0,045	0,128	0,200	0,203
4	0,029	0,032	0,139	0,189	0,201



Şekil 4.20. Kangal balığı göz dokusu CA enziminin satabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 1 M Tris-Sülfat tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçlarının grafiksel gösterimi

Çizelge 4.23. Kangal balığı göz dokusu CA enziminin satabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 1 M Potasyum fosfat tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

Zaman (Gün)	pH						
	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
0	0,053	0,101	0,138	0,192	0,237	0,242	0,245
1	0,045	0,077	0,114	0,146	0,189	0,194	0,213
2	0,043	0,067	0,101	0,144	0,157	0,162	0,186
3	0,035	0,048	0,072	0,122	0,120	0,138	0,162
4	0,029	0,036	0,071	0,115	0,111	0,119	0,127

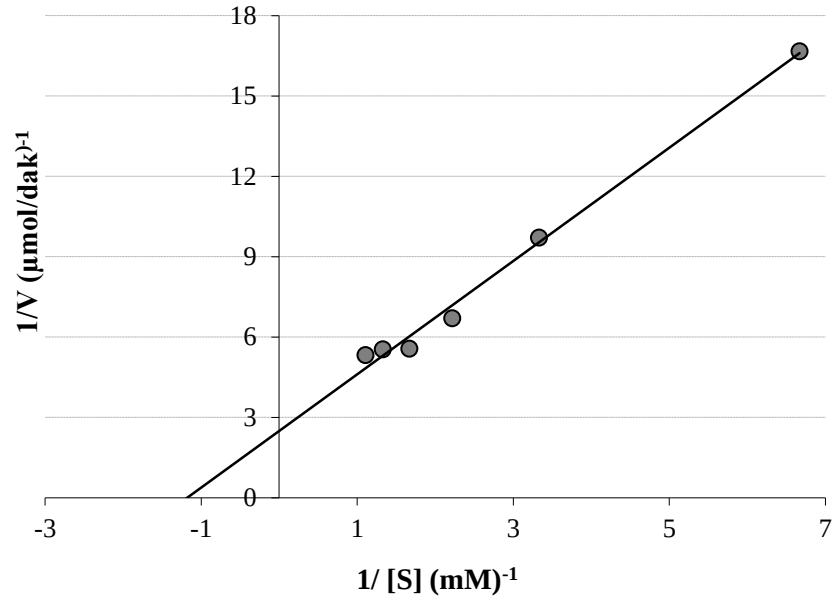


Şekil 4.21. Kangal balığı göz dokusu CA enziminin satabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 1 M Potasyum fosfat tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçlarının grafiksel gösterimi

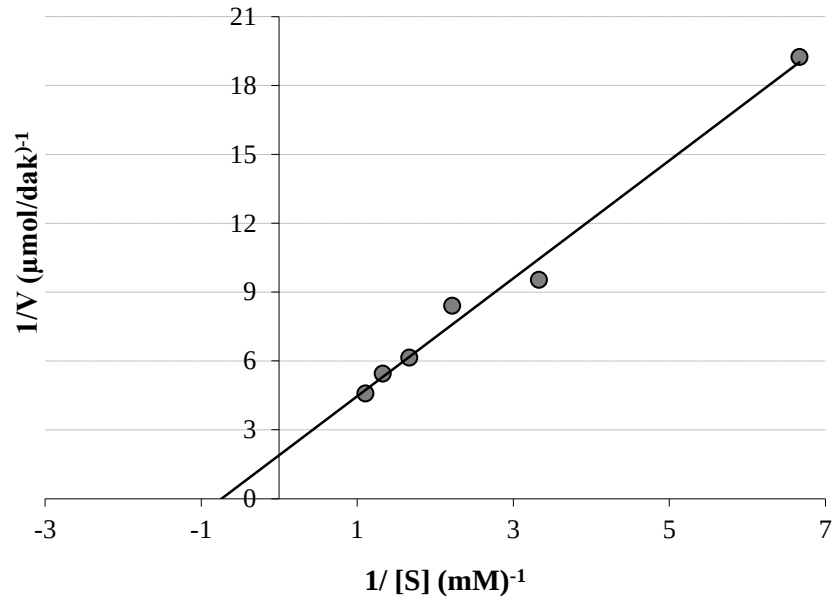
4.2.7. *p*-Nitrofenilasetat substratı için K_M , V_{max} , k_{cat} ve özgülük sabiti (V_0) değerlerinin belirlenmesi

Kangal Balığı solungaç, kas ve göz dokuları için karbonik anhidraz enzimleri için ayrı ayrı *p*-nitrofenilasetat substratı ile K_M , V_{max} çalışmaları yapıldı. Daha sonra Kangal Balığı solungaç, kas ve göz dokuları ile *p*-nitrofenilasetat substratı için ayrı ayrı Lineweaver-Burk grafikleri hazırlandı ve bu grafiklerden K_M ve V_{max} değerleri bulundu (Şekil 4.22-4.24). Daha sonra bulunan K_M ve V_{max} değerleri kullanılarak k_{cat} değeri

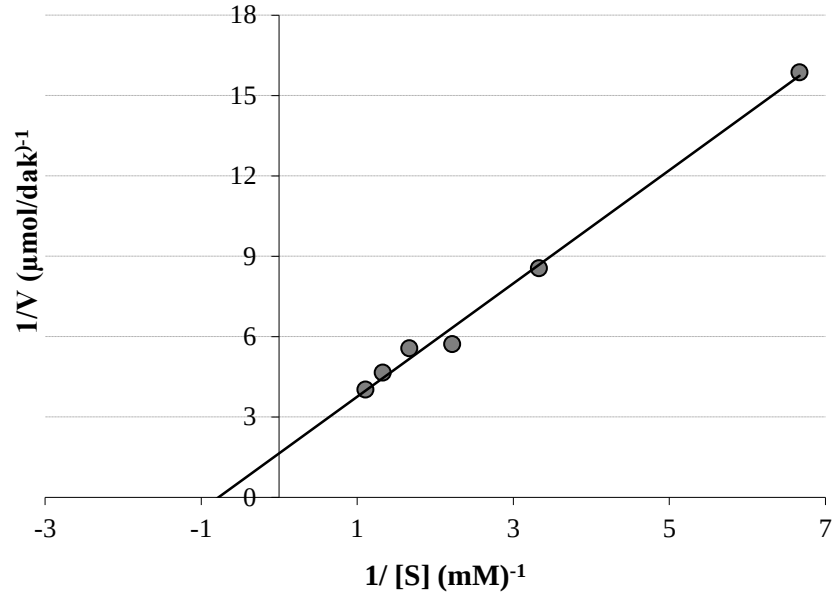
hesaplandı ve buradan enzimin özgülük sabitit V_0 tespit edildi. Bulunan değerler Çizelge 4.24'te verildi.



Şekil 4.22. Kangal balığı solungaç CA enzimi için 5 farklı *p*-nitrofenilasetat konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.23. Kangal balığı kas CA enzimi için 5 farklı *p*-nitrofenilasetat konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.24. Kangal balığı göz CA enzimi için 5 farklı *p*-nitrofenilasetat konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.24. Kangal balığı solungaç, kas ve göz CA enzimi için *p*-nitrofenilasetat ile K_M , V_{max} , k_{cat} ve V_0 çalışmaları sonuçları

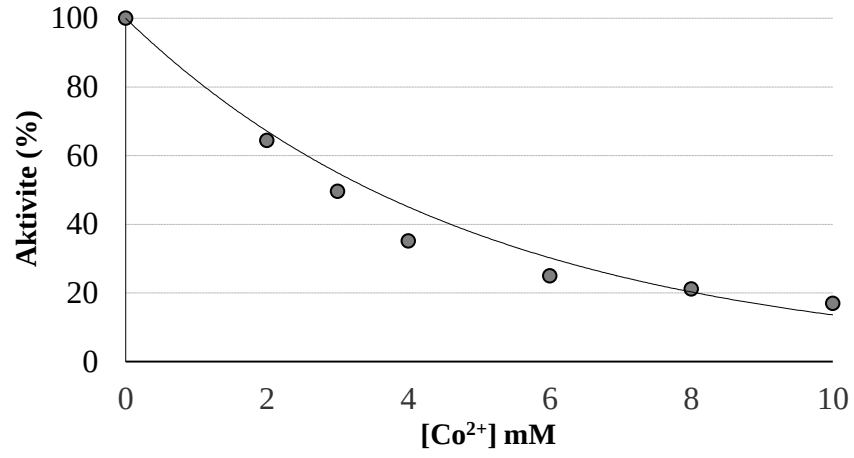
Dokular	K_M (mM)	V_{max} (EÜ/ml)	k_{cat} (S ⁻¹)	V_0 (M ⁻¹ S ⁻¹)
Solungaç	0,85	0,402	114,85	$1,35 \cdot 10^4$
Kas	1,10	0,442	19,21	$1,8 \cdot 10^4$
Göz	1,29	0,611	66,88	$5,2 \cdot 10^4$

4.2.9. Bazı ağır metallerin Kangal balığı solungaç, kas ve göz dokuları karbonik anhidraz enzimleri aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin sonuçları

Kangal balığı solungaç, kas ve göz dokularından Sepharose 4B-L tirozin sülfanilamid afinite kromatografisi ile saflaştırılan karbonik anhidraz enzimleri için Bölüm 3.5.6’de anlatıldığı şekilde, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ve $\text{FeCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ maddelerinin stok çözeltileri hazırlandı ve Çizelge 3.1’de verildi. Kangal balığı solungaç, kas ve göz CA enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren yukarıda adı geçen kimyasal maddeler ile ilgili konsantrasyonlar ve aktivite (%) değerleri Co^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} ve Fe^{2+} metal iyonları solungaç, kas ve göz dokuları için sırasıyla Çizelge 4.25-4.27, Çizelge 4.28-4.30, Çizelge 4.31-4.32, Çizelge 4.33-4.35 ve Çizelge 4.36-4.38’de verildi. Daha sonra CA enzimleri üzerinde inhibisyon etkileri araştırıldı. Co^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} ve Fe^{2+} metal iyonları solungaç, kas ve göz dokuları için sırasıyla elde edilen sonuçlar Şekil 4.25-4.27, Şekil 4.28-4.30, Şekil 4.31-4.33, Şekil 4.32-4.35 ve Şekil 4.36-4.38’de verildi. Son olarak IC_{50} değerleri solungaç, kas ve göz dokular için toplu halde Çizelge 4.39’de verildi.

Çizelge 4.25. Kangal balığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enziminin esterase aktivitesi üzerine kobalt iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen kobalt iyonu konsantrasyonları ve aktivite (%) değerleri

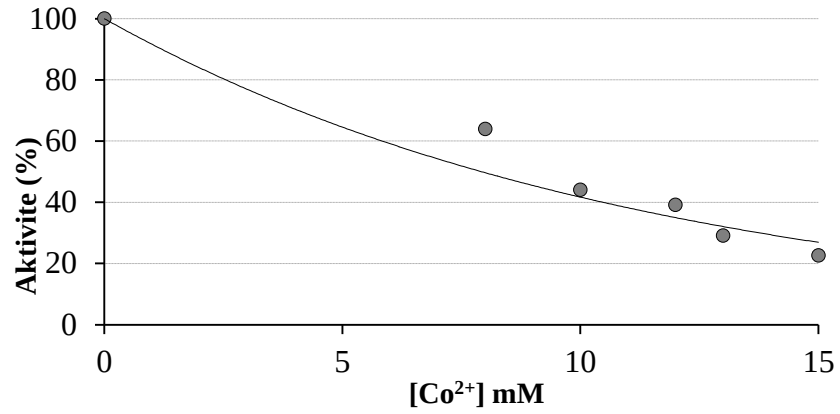
Substrat (μL)	Tris- SO_4 Tamponu(μL)	Enzim (μL)	Saf su (μL)	Toplam Hacim (μL)	[I] (mM)	Aktivite (%)
360	400	25	215	1000	–	100
360	400	25	195	1000	2	64,38
360	400	25	185	1000	3	49,60
360	400	25	155	1000	4	35,13
360	400	25	155	1000	6	24,96
360	400	25	135	1000	8	21,14
360	400	25	115	1000	10	17,01



Şekil 4.25. Kangal balığı solungaç dokusu CA enzimi için 7 farklı Co^{2+} konsantrasyonunda elde edilen Aktivite (%) - $[\text{Co}^{2+}]$ grafiği

Çizelge 4.26. Kangal balığı kas dokusundan saflaştırılan CA enziminin esterez aktivitesi üzerine kobalt iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen kobalt iyonu konsantrasyonları ve aktivite (%) değerleri

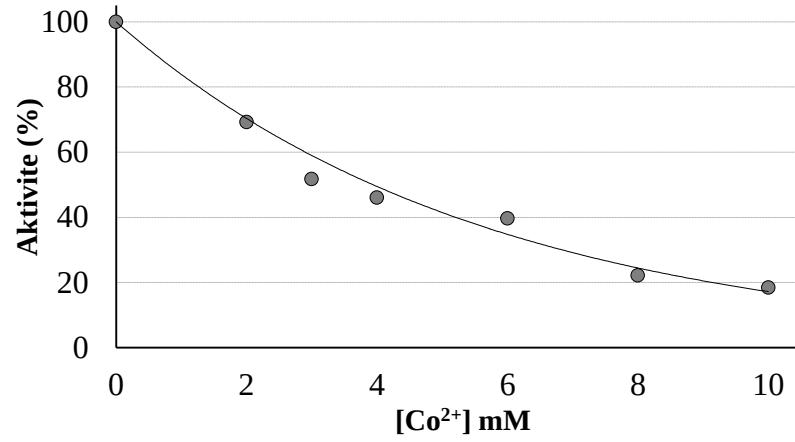
Substrat (μL)	Tris- SO_4 tamponu(μL)	Enzim (μL)	Saf su (μL)	Toplam Hacim (μL)	[I] (mM)	Aktivite (%)
360	400	25	215	1000	–	100,00
360	400	25	135	1000	8	73,93
360	400	25	115	1000	10	69,04
360	400	25	95	1000	12	49,10
360	400	25	85	1000	13	39,10
360	400	25	65	1000	15	32,58



Şekil 4.26. Kangal balığı kas dokusu CA enzimi için 6 farklı Co^{2+} konsantrasyonunda elde edilen Aktivite (%)- $[\text{Co}^{2+}]$ grafiği

Çizelge 4.27. Kangal balığı göz dokusundan saflaştırılan CA enziminin esterez aktivitesi üzerine kobalt iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen kobalt iyonu konsantrasyonları ve aktivite (%) değerleri

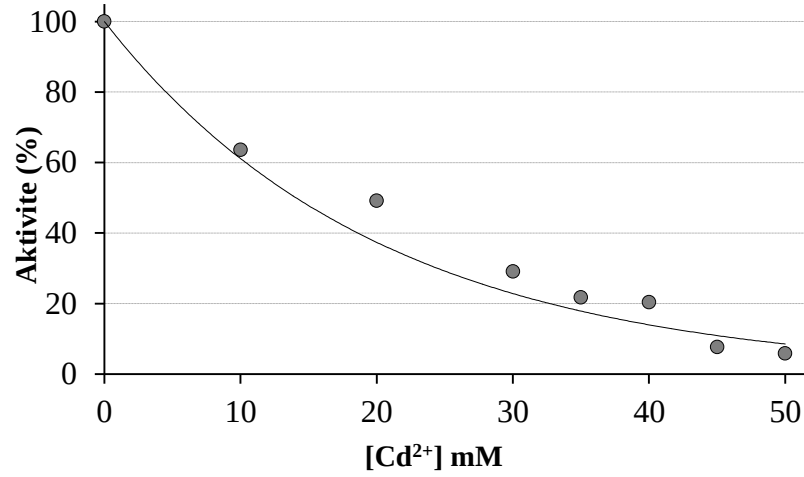
Substrat (μL)	Tris- SO_4 Tamponu (μL)	Enzim (μL)	Saf su (μL)	Toplam Hacim (μL)	[I] (mM)	Aktivite (%)
360	400	25	215	1000	—	100,00
360	400	25	195	1000	2	69,24
360	400	25	185	1000	3	51,78
360	400	25	175	1000	4	46,03
360	400	25	155	1000	6	39,68
360	400	25	135	1000	8	22,22
360	400	25	115	1000	10	18,45



Şekil 4.27. Kangal balığı göz dokusu CA enzimi için 7 farklı Co^{2+} konsantrasyonunda elde edilen Aktivite (%) - $[\text{Co}^{2+}]$ grafiği

Çizelge 4.28. Kangal balığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine kadmiyum iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen kadmiyum iyonu konsantrasyonları ve aktivite (%) değerleri

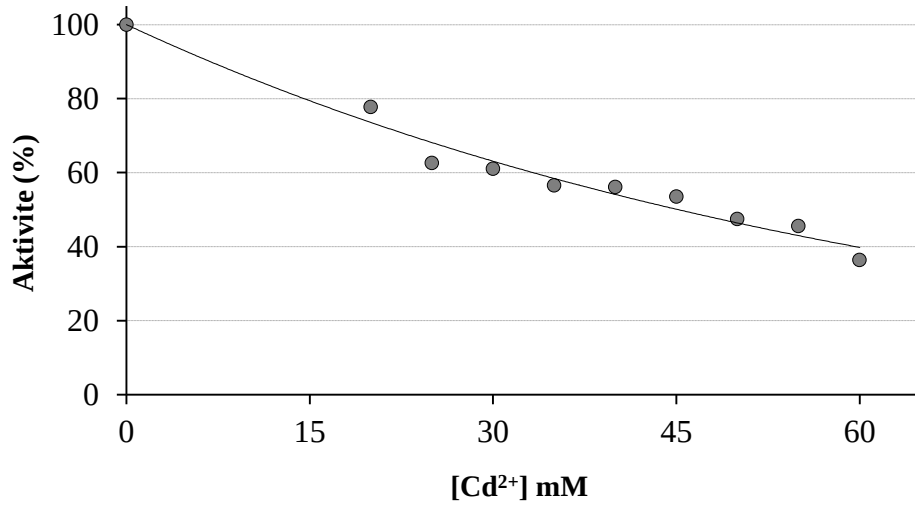
Substrat (μL)	Tris- SO_4 Tamponu (μL)	Enzim (μL)	Saf su (μL)	Toplam Hacim (μL)	[I] (mM)	Aktivite (%)
360	400	20	220	1000	—	100,00
360	400	20	210	1000	10	63,61
360	400	20	200	1000	20	57,76
360	400	20	190	1000	30	49,10
360	400	20	185	1000	35	40,71
360	400	20	180	1000	40	20,35
360	400	20	175	1000	45	7,633
360	400	20	170	1000	50	5,852



Şekil 4.28. Kangal balığı solungaç dokusu CA enzimi için 8 farklı Cd^{2+} konsantrasyonunda elde edilen Aktivite (%) - $[\text{Cd}^{2+}]$ grafiği

Çizelge 4.29. Kangal balığı kas dokusundan saflaştırılan CA enziminin esterase aktivitesi üzerine kadmiyum iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen kadmiyum iyonu konsantrasyonları ve aktivite (%) değerleri

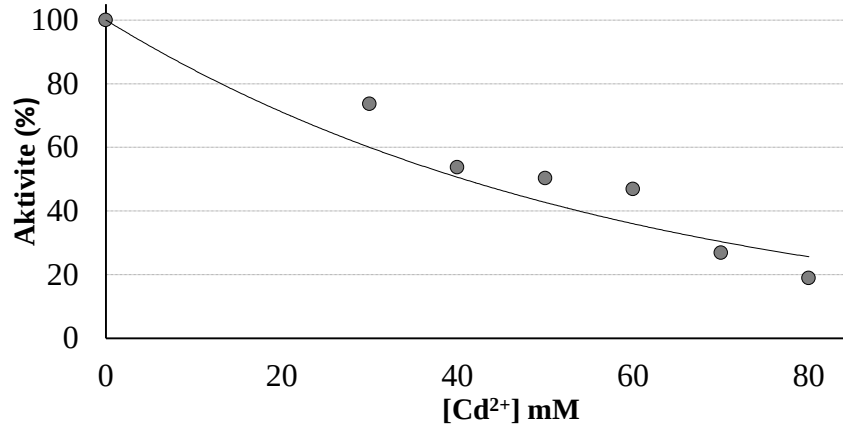
Substrat (μL)	Tris- SO_4 Tamponu(μL)	Enzim (μL)	Saf su (μL)	Toplam Hacim (μL)	[I] (mM)	Aktivite (%)
360	400	20	220	1000	—	100,00
360	400	20	200	1000	20	77,72
360	400	20	195	1000	25	62,57
360	400	20	190	1000	30	61,06
360	400	20	185	1000	35	56,51
360	400	20	180	1000	40	56,06
360	400	20	175	1000	45	53,48
360	400	20	170	1000	50	47,42
360	400	20	165	1000	55	45,54
360	400	20	160	1000	60	36,36



Şekil 4.29. Kangal balığı kas dokusu CA enzimi için 10 farklı Cd²⁺ konsantrasyonunda elde edilen Aktivite (%)-[Cd²⁺] grafiği

Çizelge 4.30. Kangal balığı göz dokusundan saflaştırılan CA enziminin esterez aktivitesi üzerine kadmiyum iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen kadmiyum iyonu konsantrasyonları ve aktivite (%) değerleri

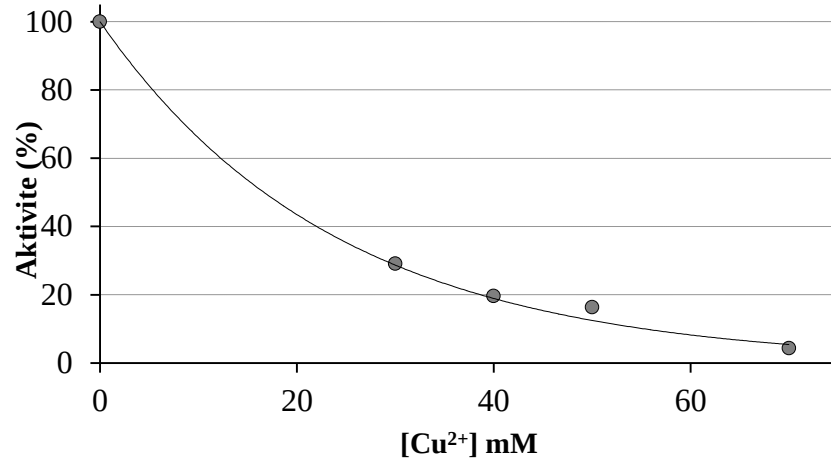
Substrat (µL)	Tris-SO ₄ Tamponu(µL)	Enzim (µL)	Saf su (µL)	Toplam Hacim (µL)	[I] (mM)	Aktivite (%)
360	400	20	220	1000	—	100,00
360	400	20	190	1000	30	91,62
360	400	20	180	1000	40	73,78
360	400	20	170	1000	50	64,30
360	400	20	160	1000	60	46,92
360	400	20	150	1000	70	26,86
360	400	20	140	1000	80	18,96



Şekil 4.30. Kangal balığı göz dokusu CA enzimi için 10 farklı Cd²⁺ konsantrasyonunda elde edilen Aktivite (%)-[Cd²⁺] grafiği

Çizelge 4.31. Kangal balığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine bakır iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen bakır iyonu konsantrasyonları ve aktivite (%) değerleri

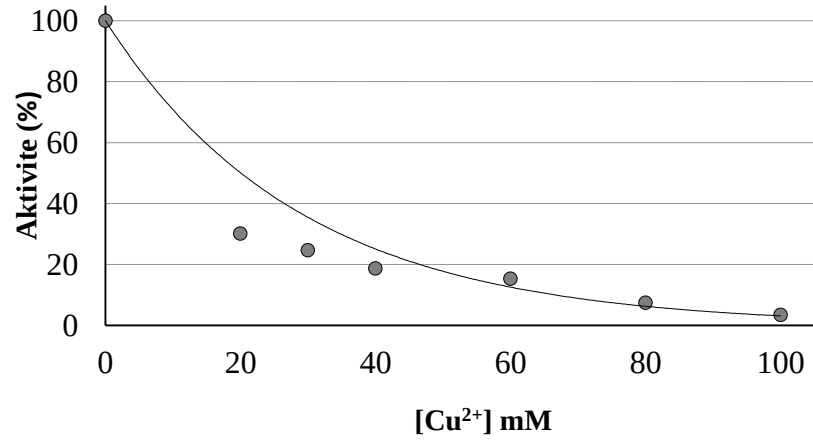
Substrat (µL)	Tris-SO ₄ Tamponu(µL)	Enzim (µL)	Saf su (µL)	Toplam Hacim (µL)	[I] (mM)	Aktivite (%)
360	400	25	215	1000	—	100,00
360	400	25	185	1000	3	29,24
360	400	25	175	1000	4	19,61
360	400	25	165	1000	5	16,35
360	400	25	145	1000	7	4,36



Şekil 4.31. Kangal balığı solungaç dokusu CA enzimi için 5 farklı Cu^{2+} konsantrasyonunda elde edilen Aktivite (%) - $[\text{Cu}^{2+}]$ grafiği

Çizelge 4.32. Kangal balığı göz dokusundan saflaştırılan CA enziminin esterez aktivitesi üzerine bakır iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen bakır iyonu konsantrasyonları ve aktivite (%) değerleri

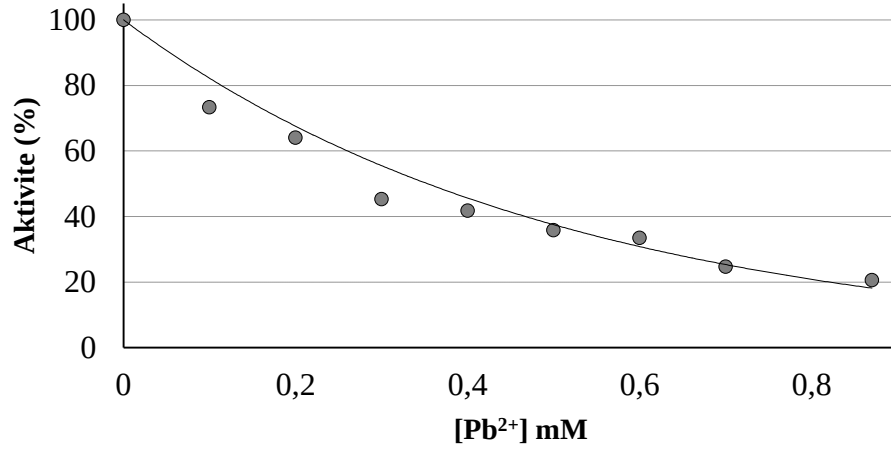
Substrat (μL)	Tris- SO_4 Tamponu(μL)	Enzim (μL)	Saf su (μL)	Toplam Hacim (μL)	[I] (mM)	Aktivite (%)
360	400	25	215	1000	—	100,00
360	400	25	195	1000	2	30,11
360	400	25	185	1000	3	24,71
360	400	25	175	1000	4	18,65
360	400	25	135	1000	8	15,28
360	400	25	115	1000	10	7,42



Şekil 4.32. Kangal balığı göz dokusu CA enzimi için 7 farklı Cu^{2+} konsantrasyonunda elde edilen Aktivite (%) - $[\text{Cu}^{2+}]$ grafiği

Çizelge 4.33. Kangal balığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine kurşun iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen kurşun iyonu konsantrasyonları ve aktivite (%) değerleri

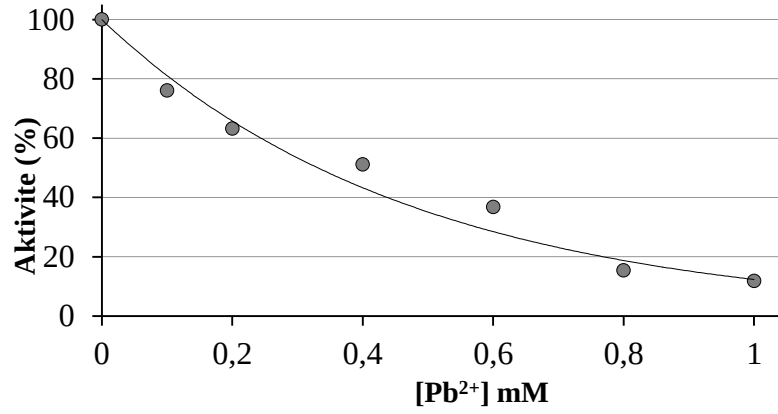
Substrat (μL)	Tris- SO_4 Tamponu (μL)	Enzim (μL)	Saf su (μL)	Toplam Hacim (μL)	[I] (mM)	Aktivite (%)
360	400	20	220	1000	—	100,00
360	400	20	210	1000	0,1	73,31
360	400	20	200	1000	0,2	64,02
360	400	20	190	1000	0,3	45,32
360	400	20	180	1000	0,4	41,79
360	400	20	170	1000	0,5	35,80
360	400	20	160	1000	0,6	33,50
360	400	20	150	1000	0,7	24,69
360	400	20	140	1000	0,8	20,63



Şekil 4.33. Kangal balığı solungaç dokusu CA enzimi için 9 farklı Pb^{2+} konsantrasyonunda elde edilen Aktivite (%) - $[Pb^{2+}]$ grafiği

Çizelge 4.34. Kangal balığı kas dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine kurşun iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen kurşun iyonu konsantrasyonları ve aktivite (%) değerleri

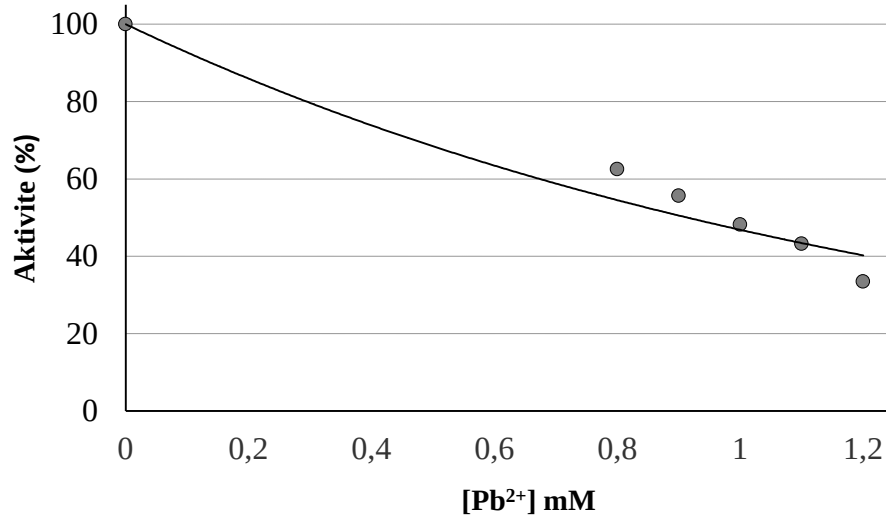
Substrat (μ L)	Tris-SO ₄ Tamponu(μ L)	Enzim (μ L)	Saf su (μ L)	Toplam Hacim (μ L)	[I] (mM)	Aktivite (%)
360	400	20	220	1000	—	100,00
360	400	20	210	1000	0,1	76,07
360	400	20	200	1000	0,2	63,21
360	400	20	180	1000	0,4	51,07
360	400	20	160	1000	0,6	36,78
360	400	20	140	1000	0,8	15,36
360	400	20	120	1000	1,0	11,76



Şekil 4.34. Kangal balığı kas dokusu CA enzimi için 7 farklı Pb²⁺ konsantrasyonunda elde edilen Aktivite (%)-[Pb²⁺] grafiği

Çizelge 4.35. Kangal balığı göz dokusundan saflaştırılan CA enziminin esterez aktivitesi üzerine kurşun iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen kurşun iyonu konsantrasyonları ve aktivite (%) değerleri

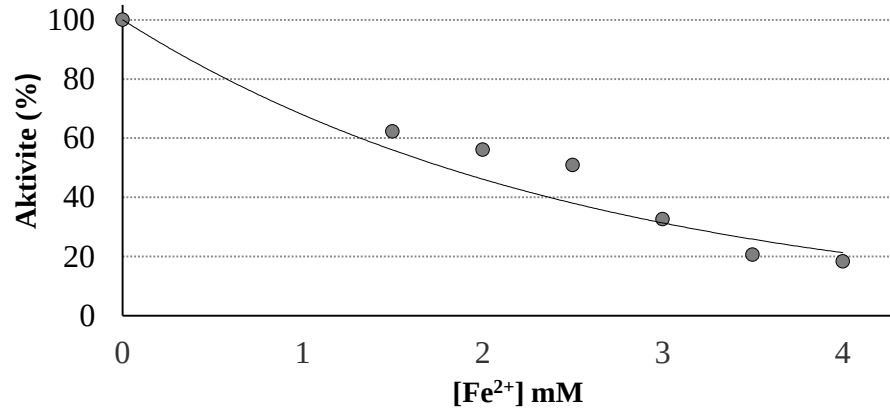
Substrat (µL)	Tris-SO ₄ Tamponu(µL)	Enzim (µL)	Saf su (µL)	Toplam Hacim (µL)	[I] (mM)	Aktivite (%)
360	400	20	220	1000	—	100,00
360	400	20	140	1000	0,8	62,50
360	400	20	130	1000	0,9	55,66
360	400	20	120	1000	1,0	48,25
360	400	20	110	1000	1,1	43,25
360	400	20	100	1000	1,2	33,45



Şekil 4.35. Kangal balığı göz dokusu CA enzimi için 6 farklı Pb^{2+} konsantrasyonunda elde edilen Aktivite (%)- $[Pb^{2+}]$ grafiği

Çizelge 4.36. Kangal balığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enziminin esterase aktivitesi üzerine demir iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen demir iyonu konsantrasyonları ve aktivite (%) değerleri

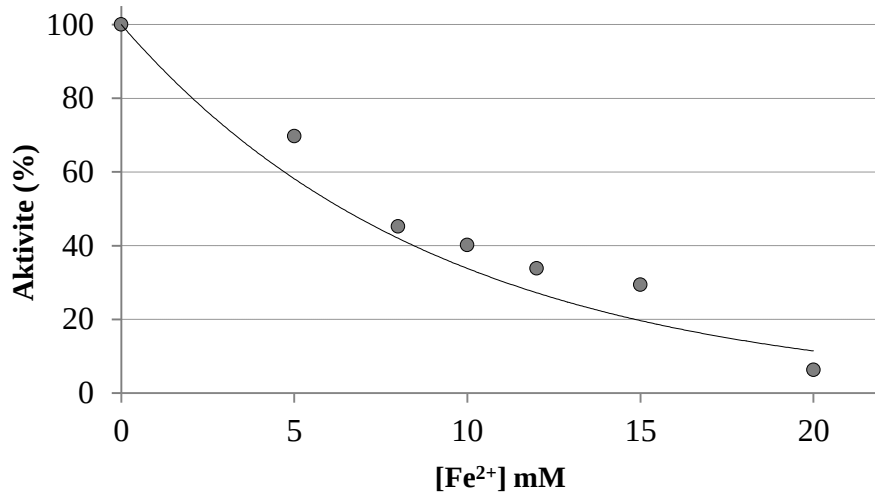
Substrat (μ L)	Tris-SO ₄ Tamponu(μ L)	Enzim (μ L)	Saf su (μ L)	Toplam Hacim (μ L)	[I] (mM)	Aktivite (%)
360	400	20	220	1000	—	100,00
360	400	20	205	1000	1,5	62,26
360	400	20	200	1000	2,0	56,09
360	400	20	195	1000	2,5	50,94
360	400	20	190	1000	3,0	32,59
360	400	20	185	1000	3,5	20,58
360	400	20	180	1000	4,0	18,85



Şekil 4.36. Kangal balığı solungaç dokusu CA enzimi için 7 farklı Fe^{2+} konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[\text{Fe}^{2+}]$ grafiği

Çizelge 4.37. Kangal balığı kas dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine demir iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen demir iyonu konsantrasyonları ve aktivite (%) değerleri

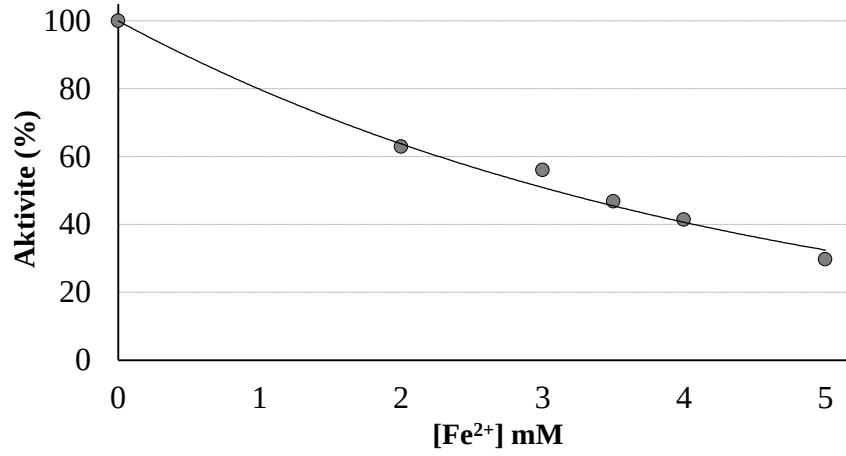
Substrat (μL)	Tris- SO_4 Tamponu(μL)	Enzim (μL)	Saf su (μL)	Toplam Hacim (μL)	[I] (mM)	Aktivite (%)
360	400	20	220	1000	—	100,00
360	400	20	215	1000	5	69,75
360	400	20	212	1000	8	45,23
360	400	20	210	1000	10	40,18
360	400	20	208	1000	12	33,86
360	400	20	205	1000	15	29,43
360	400	20	200	1000	20	6,32



Şekil 4.37. Kangal balığı kas dokusu CA enzimi için 7 farklı Fe^{2+} konsantrasyonunda elde edilen Aktivite (%) - $[\text{Fe}^{2+}]$ grafiği

Çizelge 4.38. Kangal balığı göz dokusundan saflaştırılan CA enziminin esterase aktivitesi üzerine demir iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen demir iyonu konsantrasyonları ve aktivite (%) değerleri

Substrat (μL)	Tris- SO_4 Tamponu(μL)	Enzim (μL)	Saf su (μL)	Toplam Hacim (μL)	[I] (mM)	Aktivite (%)
360	400	20	220	1000	—	100,00
360	400	20	200	1000	2,0	69,75
360	400	20	190	1000	3,0	45,23
360	400	20	185	1000	3,5	40,18
360	400	20	180	1000	4,0	33,86
360	400	20	170	1000	5,0	29,43



Şekil 4.38. Kangal balığı göz dokusu CA enzimi için 5 farklı Fe^{2+} konsantrasyonunda elde edilen Aktivite (%) - $[\text{Fe}^{2+}]$ grafiği

Çizelge 4.39. Kangal balığı solungaç, kas ve göz dokularından saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine metal iyonları ile yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen IC_{50} değerleri

Doku	Kimyasal Madde	IC_{50} (mM)
Solungaç	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	3,48
	$\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	14,50
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	16,50
	$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	0,35
	$\text{FeCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,79
Kas	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	7,97
	$\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	46,21
	$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	0,33
	$\text{FeCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	6,42
Göz	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	3,94
	$\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	40,77
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	19,80
	$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	0,91
	$\text{FeCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	3,08

Çizelge 4.40. Kangal balığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kobalt iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tris-SO ₄ Tamponu (μL)	Enzim Hacmi (μL)	Saf su (μL)	Substrat Hacmi (μL)	[S] (mM)	[I] (mM)	Toplam Hacim (μL)
400	25	525	50	0,15	-	1000
400	25	505	50	0,15	2	1000
400	25	495	50	0,15	3	1000
400	25	465	50	0,15	6	1000
400	25	425	100	0,30	-	1000
400	25	405	100	0,30	2	1000
400	25	395	100	0,30	3	1000
400	25	365	100	0,30	6	1000
400	25	375	150	0,45	-	1000
400	25	355	150	0,45	2	1000
400	25	345	150	0,45	3	1000
400	25	315	150	0,45	6	1000
400	25	325	200	0,60	-	1000
400	25	305	200	0,60	2	1000
400	25	295	200	0,60	3	1000
400	25	265	200	0,60	6	1000
400	25	275	250	0,75	-	1000
400	25	255	250	0,75	2	1000
400	25	245	250	0,75	3	1000
400	25	215	250	0,75	6	1000

Çizelge 4.41. Kangal balığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kadmiyum iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tris-SO ₄ Tamponu (μL)	Enzim Hacmi (μL)	Saf su (μL)	Substrat Hacmi (μL)	[S] (mM)	[I] (mM)	Toplam Hacim (μL)
400	20	530	50	0,15	-	1000
400	20	520	50	0,15	10	1000
400	20	500	50	0,15	30	1000
400	20	490	50	0,15	40	1000
400	20	430	100	0,30	-	1000
400	20	420	100	0,30	10	1000
400	20	400	100	0,30	30	1000
400	20	390	100	0,30	40	1000
400	20	380	150	0,45	-	1000
400	20	370	150	0,45	10	1000
400	20	350	150	0,45	30	1000
400	20	340	150	0,45	40	1000
400	20	330	200	0,60	-	1000
400	20	320	200	0,60	10	1000
400	20	300	200	0,60	30	1000
400	20	290	200	0,60	40	1000
400	20	280	250	0,75	-	1000
400	20	270	250	0,75	10	1000
400	20	250	250	0,75	30	1000
400	20	240	250	0,75	40	1000

Çizelge 4.42. Kangal balığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine bakır iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

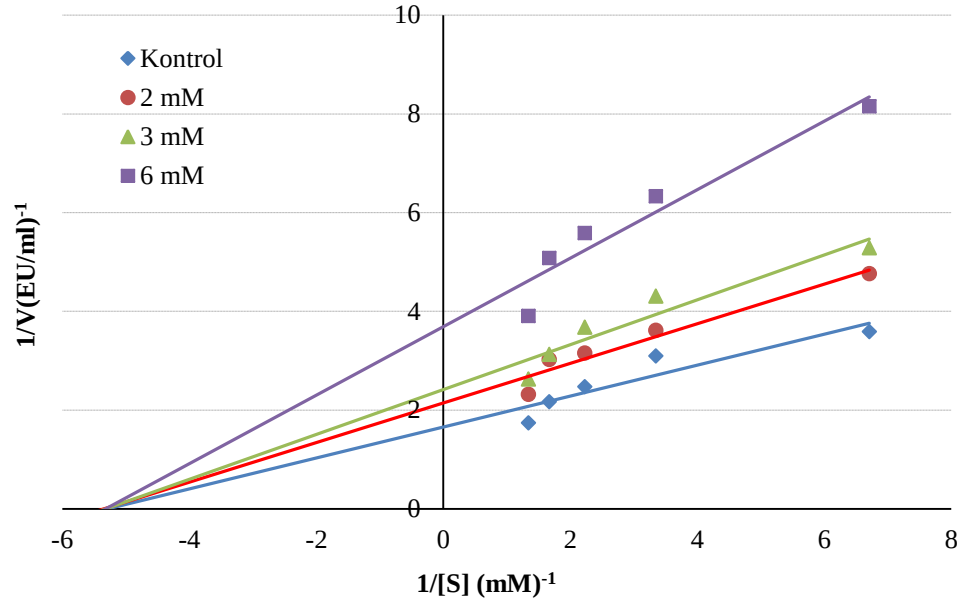
Tris-SO ₄ Tamponu (μL)	Enzim Hacmi (μL)	Saf su (μL)	Substrat Hacmi (μL)	[S] (mM)	[I] (mM)	Toplam Hacim (μL)
400	25	525	50	0,15	-	1000
400	25	495	50	0,15	30	1000
400	25	475	50	0,15	50	1000
400	25	465	50	0,15	60	1000
400	25	425	100	0,30	-	1000
400	25	395	100	0,30	30	1000
400	25	375	100	0,30	50	1000
400	25	365	100	0,30	60	1000
400	25	375	150	0,45	-	1000
400	25	345	150	0,45	30	1000
400	25	325	150	0,45	50	1000
400	25	315	150	0,45	60	1000
400	25	325	200	0,60	-	1000
400	25	295	200	0,60	30	1000
400	25	275	200	0,60	50	1000
400	25	265	200	0,60	60	1000
400	25	275	250	0,75	-	1000
400	25	245	250	0,75	30	1000
400	25	225	250	0,75	50	1000
400	25	215	250	0,75	60	1000

Çizelge 4.43. Kangal balığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kurşun iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

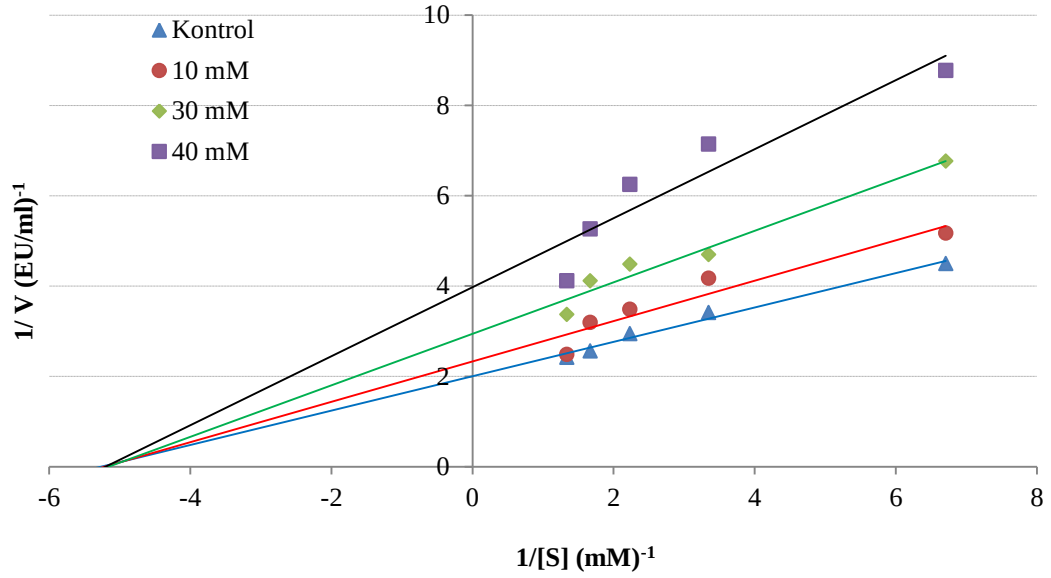
Tris-SO ₄ Tamponu (μL)	Enzim Hacmi (μL)	Saf su (μL)	Substrat Hacmi (μL)	[S] (mM)	[I] (mM)	Toplam Hacim (μL)
400	20	530	50	0,15	-	1000
400	20	520	50	0,15	0,1	1000
400	20	500	50	0,15	0,3	1000
400	20	480	50	0,15	0,5	1000
400	20	430	100	0,30	-	1000
400	20	420	100	0,30	0,1	1000
400	20	400	100	0,30	0,3	1000
400	20	380	100	0,30	0,5	1000
400	20	380	150	0,45	-	1000
400	20	370	150	0,45	0,1	1000
400	20	350	150	0,45	0,3	1000
400	20	330	150	0,45	0,5	1000
400	20	330	200	0,60	-	1000
400	20	320	200	0,60	0,1	1000
400	20	300	200	0,60	0,3	1000
400	20	280	200	0,60	0,5	1000
400	20	280	250	0,75	-	1000
400	20	270	250	0,75	0,1	1000
400	20	250	250	0,75	0,3	1000
400	20	230	250	0,75	0,5	1000

Çizelge 4.44. Kangal balığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine demir iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

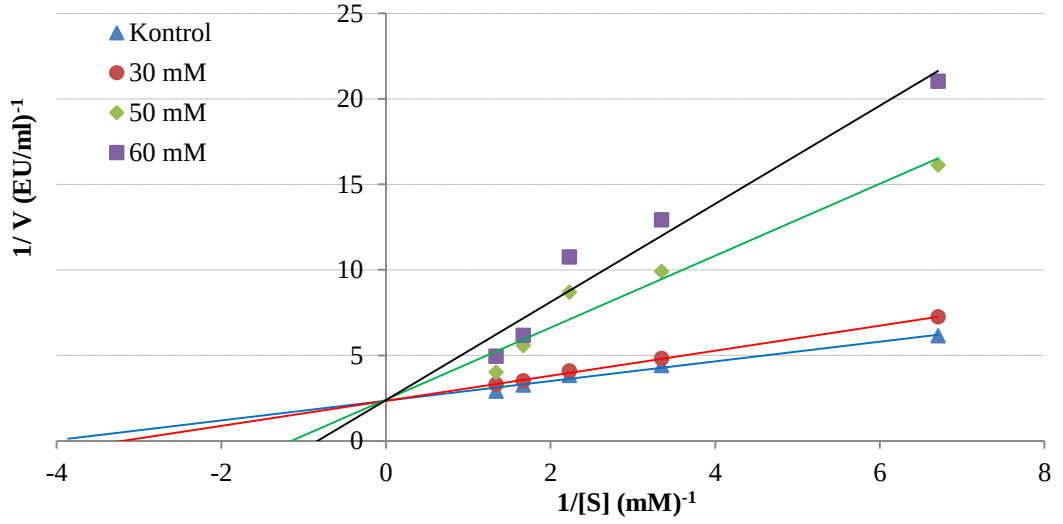
Tris-SO ₄ Tamponu (μL)	Enzim Hacmi (μL)	Saf su (μL)	Substrat Hacmi (μL)	[S] (mM)	[I] (mM)	Toplam Hacim (μL)
400	20	530	50	0,15	-	1000
400	20	515	50	0,15	1,5	1000
400	20	505	50	0,15	2,5	1000
400	20	495	50	0,15	3,5	1000
400	20	430	100	0,30	-	1000
400	20	415	100	0,30	1,5	1000
400	20	405	100	0,30	2,5	1000
400	20	395	100	0,30	3,5	1000
400	20	380	150	0,45	-	1000
400	20	365	150	0,45	1,5	1000
400	20	355	150	0,45	2,5	1000
400	20	345	150	0,45	3,5	1000
400	20	330	200	0,60	-	1000
400	20	315	200	0,60	1,5	1000
400	20	305	200	0,60	2,5	1000
400	20	295	200	0,60	3,5	1000
400	20	280	250	0,75	-	1000
400	20	265	250	0,75	1,5	1000
400	20	255	250	0,75	2,5	1000
400	20	245	250	0,75	3,5	1000



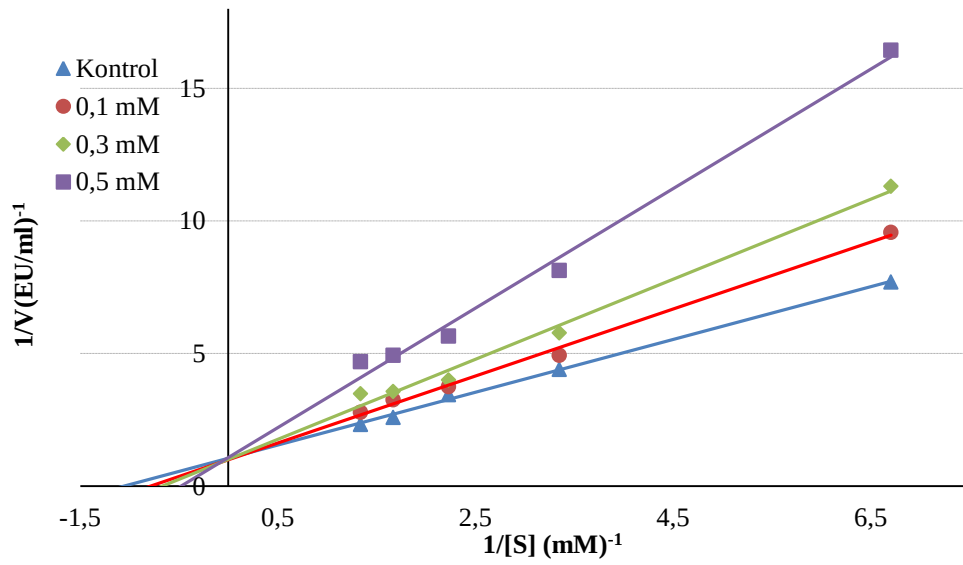
Şekil 4.39. Kangal balığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kobalt iyonunun etkisi



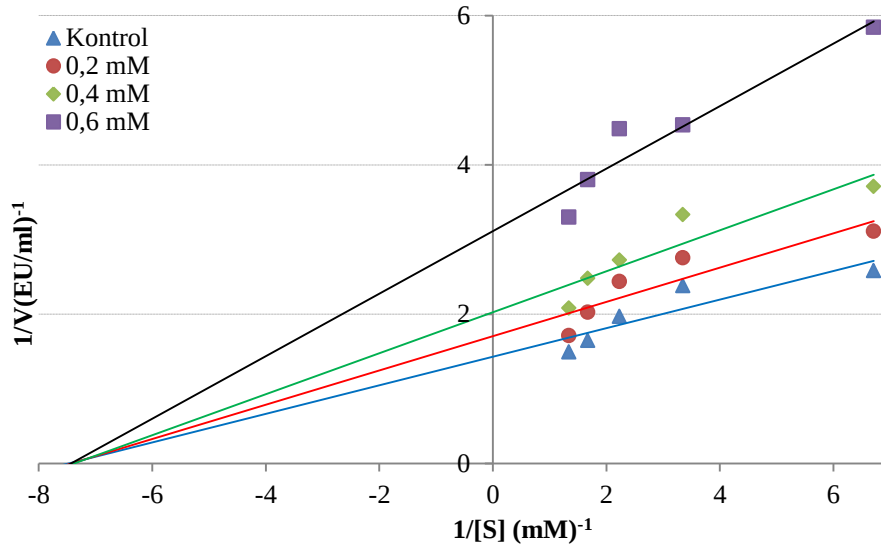
Şekil 4.40. Kangal balığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kadmiyum iyonunun etkisi



Şekil 4.41. Kangal balığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine bakır iyonunun etkisi



Şekil 4.42. Kangal balığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kurşun iyonunun etkisi



Şekil 4.43. Kangal balığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine demir iyonunun etkisi

Kangal balığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enzimi için inhibitör olarak kullanılan ağır metallerin inhibisyon tipleri yarışmasız ve yarışmalı olduğundan; yarışmasız için $V_{\max I} = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$ ve yarışmalı için $K_{M I} = K_M + (1 + \frac{[I]}{K_i})$ formülleri

kullanılarak K_i değerleri hesaplandı ve Çizelge 4.45’de gösterildi.

Çizelge 4.45. Kangal balığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enzimi için 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan K_i değerleri ve inhibisyon tipleri

İnhibitörün Adı	IC₅₀ (μM)	[I] (mM)	K_i (mM)	Ortalama K_i (mM)	İnhibisyon Tipi
CoCl ₂ .6H ₂ O	3,48	2,0	6,74	6,04±1,02	Yarışmasız
		3,0	6,52		
		6,0	4,87		
CdCl ₂ .H ₂ O	14,50	10,0	60,82	55,20±12,65	Yarışmasız
		30,0	64,08		
		40,0	40,72		
CuSO ₄ .5H ₂ O	16,50	30,0	11,90	15,70±3,95	Yarışmalı
		50,0	19,79		
		60,0	15,41		
Pb(NO ₃) ₂	0,35	0,1	0,30	0,41±0,11	Yarışmalı
		0,3	0,53		
		0,5	0,42		
FeCl ₂ .H ₂ O	1,79	1,5	1,15	0,75±0,39	Yarışmasız
		2,5	0,71		
		3,5	0,38		

Çizelge 4.46. Kangal balığı kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kobalt iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tris-SO ₄ Tamponu (μL)	Enzim Hacmi (μL)	Saf su (μL)	Substrat Hacmi (μL)	[S] (mM)	[I] (mM)	Toplam Hacim (μL)
400	25	525	50	0,15	-	1000
400	25	425	50	0,15	10	1000
400	25	405	50	0,15	12	1000
400	25	375	50	0,15	15	1000
400	25	425	100	0,30	-	1000
400	25	325	100	0,30	10	1000
400	25	305	100	0,30	12	1000
400	25	275	100	0,30	15	1000
400	25	375	150	0,45	-	1000
400	25	275	150	0,45	10	1000
400	25	255	150	0,45	12	1000
400	25	225	150	0,45	15	1000
400	25	325	200	0,60	-	1000
400	25	225	200	0,60	10	1000
400	25	205	200	0,60	12	1000
400	25	75	200	0,60	15	1000
400	25	275	250	0,75	-	1000
400	25	175	250	0,75	10	1000
400	25	155	250	0,75	12	1000
400	25	125	250	0,75	15	1000

Çizelge 4.47. Kangal balığı kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kadmiyum iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

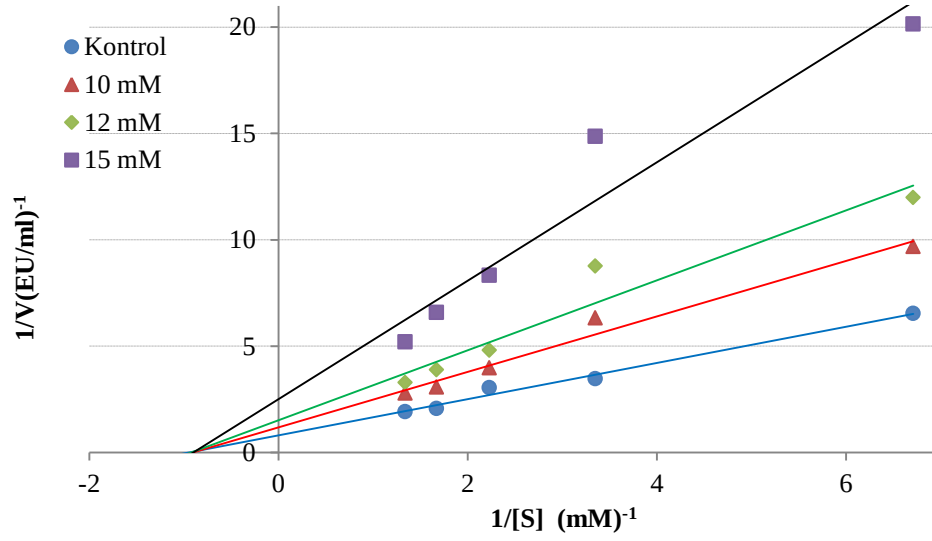
Tris-SO ₄ Tamponu (μL)	Enzim Hacmi (μL)	Saf su (μL)	Substrat Hacmi (μL)	[S] (mM)	[I] (mM)	Toplam Hacim (μL)
400	20	530	50	0,15	-	1000
400	20	500	50	0,15	30	1000
400	20	485	50	0,15	45	1000
400	20	475	50	0,15	55	1000
400	20	430	100	0,30	-	1000
400	20	400	100	0,30	30	1000
400	20	385	100	0,30	45	1000
400	20	375	100	0,30	55	1000
400	20	380	150	0,45	-	1000
400	20	350	150	0,45	30	1000
400	20	335	150	0,45	45	1000
400	20	325	150	0,45	55	1000
400	20	330	200	0,60	-	1000
400	20	300	200	0,60	30	1000
400	20	285	200	0,60	45	1000
400	20	275	200	0,60	55	1000
400	20	280	250	0,75	-	1000
400	20	250	250	0,75	30	1000
400	20	235	250	0,75	45	1000
400	20	225	250	0,75	55	1000

Çizelge 4.48. Kangal balığı kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kurşun iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

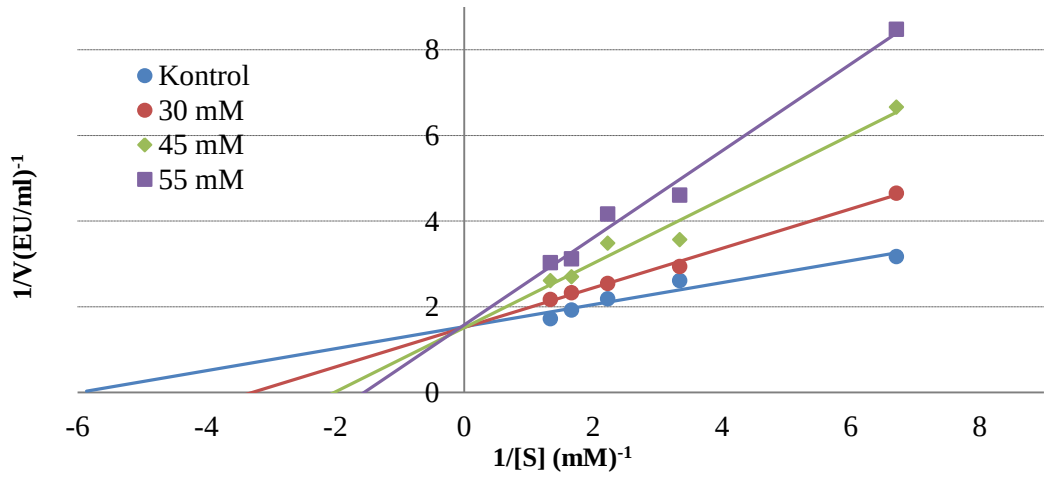
Tris-SO ₄ Tamponu (μL)	Enzim Hacmi (μL)	Saf su (μL)	Substrat Hacmi (μL)	[S] (mM)	[I] (mM)	Toplam Hacim (μL)
400	20	530	50	0,15	-	1000
400	20	510	50	0,15	0,2	1000
400	20	490	50	0,15	0,4	1000
400	20	470	50	0,15	0,6	1000
400	20	430	100	0,30	-	1000
400	20	410	100	0,30	0,2	1000
400	20	390	100	0,30	0,4	1000
400	20	370	100	0,30	0,6	1000
400	20	380	150	0,45	-	1000
400	20	360	150	0,45	0,2	1000
400	20	340	150	0,45	0,4	1000
400	20	320	150	0,45	0,6	1000
400	20	330	200	0,60	-	1000
400	20	310	200	0,60	0,2	1000
400	20	290	200	0,60	0,4	1000
400	20	270	200	0,60	0,6	1000
400	20	280	250	0,75	-	1000
400	20	260	250	0,75	0,2	1000
400	20	240	250	0,75	0,4	1000
400	20	220	250	0,75	0,6	1000

Çizelge 4.49. Kangal balığı kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine demir iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

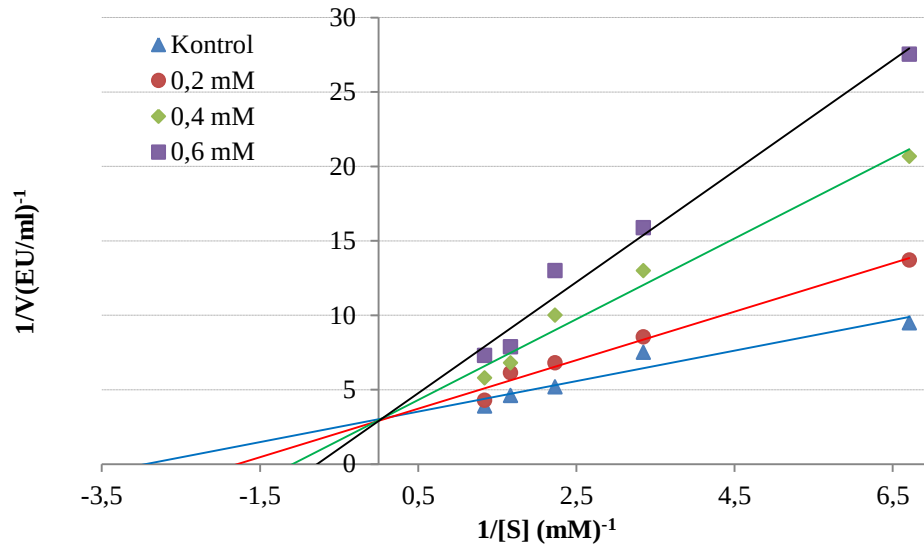
Tris-SO ₄ Tamponu (μL)	Enzim Hacmi (μL)	Saf su (μL)	Substrat Hacmi (μL)	[S] (mM)	[I] (mM)	Toplam Hacim (μL)
400	20	530	50	0,15	-	1000
400	20	525	50	0,15	5	1000
400	20	522	50	0,15	8	1000
400	20	250	50	0,15	10	1000
400	20	430	100	0,30	-	1000
400	20	425	100	0,30	5	1000
400	20	422	100	0,30	8	1000
400	20	420	100	0,30	10	1000
400	20	380	150	0,45	-	1000
400	20	375	150	0,45	5	1000
400	20	372	150	0,45	8	1000
400	20	370	150	0,45	10	1000
400	20	330	200	0,60	-	1000
400	20	325	200	0,60	5	1000
400	20	322	200	0,60	8	1000
400	20	320	200	0,60	10	1000
400	20	280	250	0,75	-	1000
400	20	275	250	0,75	5	1000
400	20	272	250	0,75	8	1000
400	20	270	250	0,75	10	1000



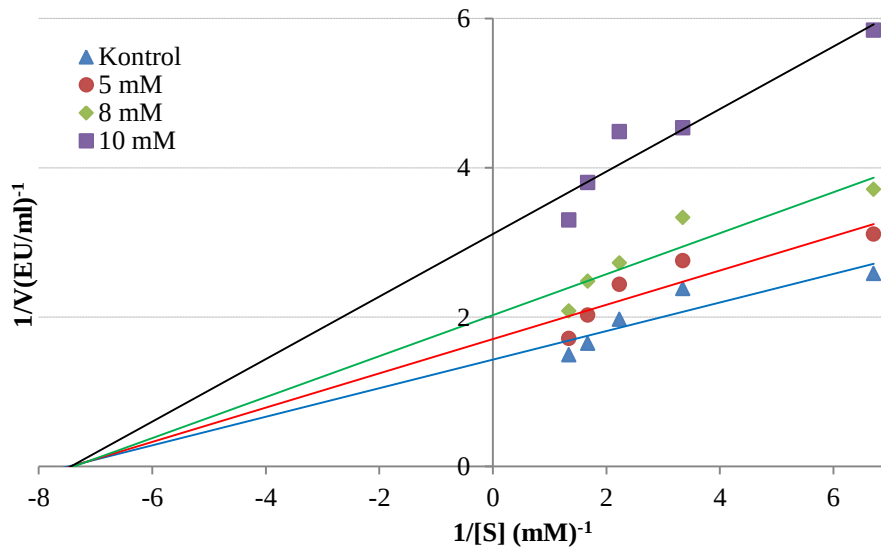
Şekil 4.44. Kangal balığı kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kobalt iyonunun etkisi



Şekil 4.45. Kangal balığı kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kadmiyum iyonunun etkisi



Şekil 4.46. Kangal balığı kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kurşun iyonunun etkisi



Şekil 4.47. Kangal balığı kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine demir iyonunun etkisi

Kangal balığı kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi için inhibitör olarak kullanılan ağır metallerin inhibisyon tipleri yarışmasız ve yarışmalı olduğundan; yarışmasız için

$$V_{\max I} = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{[I]}{K_i}} \text{ ve yarışmalı için } K_{M I} = K_M + (1 + \frac{[I]}{K_i}) \text{ formülleri kullanılarak } K_i$$

değerleri hesaplandı ve Çizelge 4.50’de gösterildi.

Çizelge 4.50. Kangal balığı kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi için 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan K_i değerleri ve inhibisyon tipleri

İnhibitörün Adı	IC₅₀ (μM)	[I] (mM)	K_i (mM)	Ortalama K_i (mM)	İnhibisyon Tipi
CoCl ₂ .6H ₂ O	7,97	10	21,49	14,10±7,19	Yarışmasız
		12	13,69		
		15	7,12		
CdCl ₂ .H ₂ O	46,21	30	36,32	26,09±9,04	Yarışmalı
		45	22,80		
		55	19,17		
Pb(NO ₃) ₂	0,33	0,2	0,31	0,25±0,05	Yarışmalı
		0,4	0,24		
		0,6	0,22		
FeCl ₂ .H ₂ O	6,42	5	25,84	17,85±8,74	Yarışmasız
		8	19,21		
		10	8,51		

Çizelge 4.51. Kangal balığı göz dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kobalt iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tris-SO ₄ Tamponu (μL)	Enzim Hacmi (μL)	Saf su (μL)	Substrat Hacmi (μL)	[S] (mM)	[I] (mM)	Toplam Hacim (μL)
400	25	525	50	0,15	-	1000
400	25	485	50	0,15	4	1000
400	25	465	50	0,15	6	1000
400	25	445	50	0,15	8	1000
400	25	425	100	0,30	-	1000
400	25	385	100	0,30	4	1000
400	25	365	100	0,30	6	1000
400	25	345	100	0,30	8	1000
400	25	375	150	0,45	-	1000
400	25	335	150	0,45	4	1000
400	25	315	150	0,45	6	1000
400	25	295	150	0,45	8	1000
400	25	325	200	0,60	-	1000
400	25	285	200	0,60	4	1000
400	25	265	200	0,60	6	1000
400	25	245	200	0,60	8	1000
400	25	275	250	0,75	-	1000
400	25	235	250	0,75	4	1000
400	25	215	250	0,75	6	1000
400	25	195	250	0,75	8	1000

Çizelge 4.52. Kangal balığı göz dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kadmiyum iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tris-SO ₄ Tamponu (μL)	Enzim Hacmi (μL)	Saf su (μL)	Substrat Hacmi (μL)	[S] (mM)	[I] (mM)	Toplam Hacim (μL)
400	20	530	50	0,15	-	1000
400	20	480	50	0,15	50	1000
400	20	470	50	0,15	60	1000
400	20	450	50	0,15	80	1000
400	20	430	100	0,30	-	1000
400	20	380	100	0,30	50	1000
400	20	370	100	0,30	60	1000
400	20	350	100	0,30	80	1000
400	20	380	150	0,45	-	1000
400	20	330	150	0,45	50	1000
400	20	320	150	0,45	60	1000
400	20	300	150	0,45	80	1000
400	20	330	200	0,60	-	1000
400	20	280	200	0,60	50	1000
400	20	270	200	0,60	60	1000
400	20	250	200	0,60	80	1000
400	20	280	250	0,75	-	1000
400	20	230	250	0,75	50	1000
400	20	220	250	0,75	60	1000
400	20	200	250	0,75	80	1000

Çizelge 4.53. Kangal balığı göz dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine bakır iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

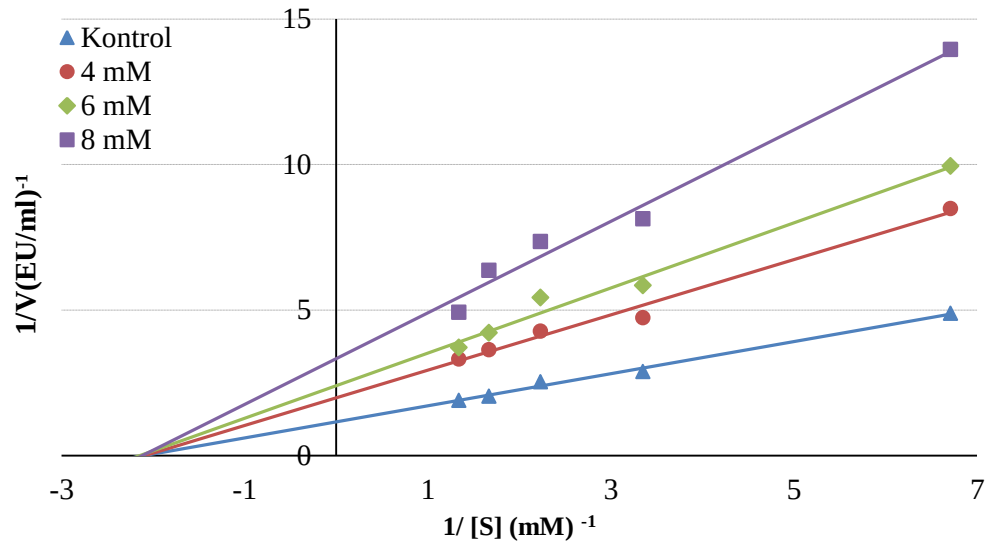
Tris-SO ₄ Tamponu (μL)	Enzim Hacmi (μL)	Saf su (μL)	Substrat Hacmi (μL)	[S] (mM)	[I] (mM)	Toplam Hacim (μL)
400	25	525	50	0,15	-	1000
400	25	495	50	0,15	30	1000
400	25	485	50	0,15	40	1000
400	25	445	50	0,15	80	1000
400	25	475	100	0,30	-	1000
400	25	445	100	0,30	30	1000
400	25	435	100	0,30	40	1000
400	25	395	100	0,30	80	1000
400	25	425	150	0,45	-	1000
400	25	395	150	0,45	30	1000
400	25	385	150	0,45	40	1000
400	25	345	150	0,45	80	1000
400	25	295	200	0,60	-	1000
400	25	265	200	0,60	30	1000
400	25	255	200	0,60	40	1000
400	25	215	200	0,60	80	1000
400	25	245	250	0,75	-	1000
400	25	215	250	0,75	30	1000
400	25	205	250	0,75	40	1000
400	25	165	250	0,75	80	1000

Çizelge 4.54. Kangal balığı göz dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kurşun iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

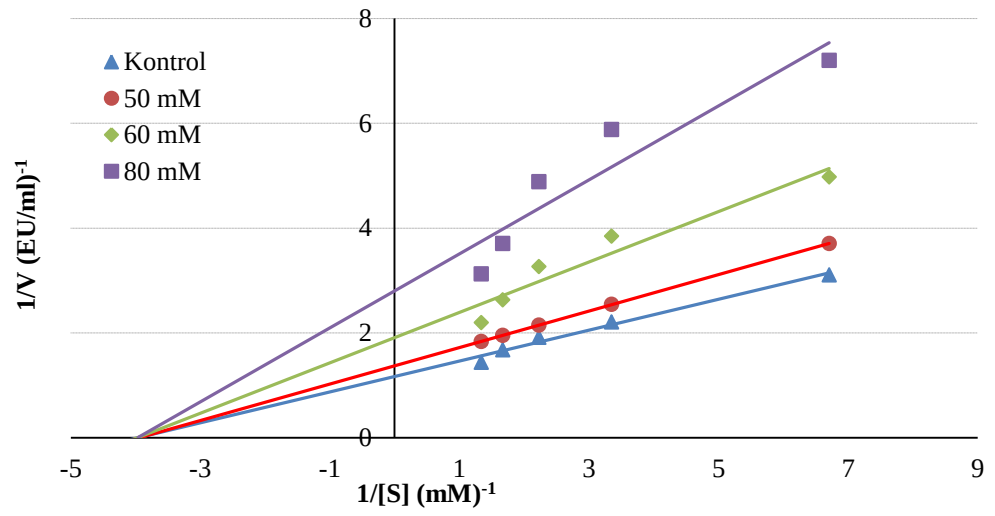
Tris-SO ₄ Tamponu (μL)	Enzim Hacmi (μL)	Saf su (μL)	Substrat Hacmi (μL)	[S] (mM)	[I] (mM)	Toplam Hacim (μL)
400	20	530	50	0,15	-	1000
400	20	450	50	0,15	0,8	1000
400	20	440	50	0,15	0,9	1000
400	20	420	50	0,15	1,1	1000
400	20	430	100	0,30	-	1000
400	20	350	100	0,30	0,8	1000
400	20	340	100	0,30	0,9	1000
400	20	320	100	0,30	1,1	1000
400	20	380	150	0,45	-	1000
400	20	300	150	0,45	0,8	1000
400	20	290	150	0,45	0,9	1000
400	20	270	150	0,45	1,1	1000
400	20	330	200	0,60	-	1000
400	20	250	200	0,60	0,8	1000
400	20	240	200	0,60	0,9	1000
400	20	220	200	0,60	1,1	1000
400	20	280	250	0,75	-	1000
400	20	200	250	0,75	0,8	1000
400	20	190	250	0,75	0,9	1000
400	20	170	250	0,75	1,1	1000

Çizelge 4.55. Kangal balığı göz dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine demir iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

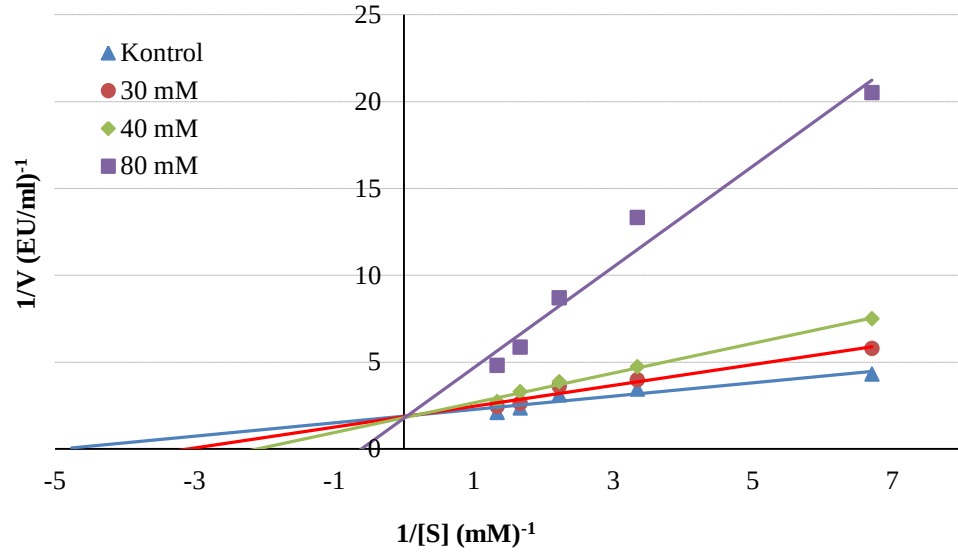
Tris-SO ₄ Tamponu (μL)	Enzim Hacmi (μL)	Saf su (μL)	Substrat Hacmi (μL)	[S] (mM)	[I] (mM)	Toplam Hacim (μL)
400	20	530	50	0,15	-	1000
400	20	510	50	0,15	2,0	1000
400	20	495	50	0,15	3,5	1000
400	20	480	50	0,15	5,0	1000
400	20	430	100	0,30	-	1000
400	20	410	100	0,30	2,0	1000
400	20	395	100	0,30	3,5	1000
400	20	380	100	0,30	5,0	1000
400	20	380	150	0,45	-	1000
400	20	360	150	0,45	2,0	1000
400	20	345	150	0,45	3,5	1000
400	20	330	150	0,45	5,0	1000
400	20	330	200	0,60	-	1000
400	20	310	200	0,60	2,0	1000
400	20	295	200	0,60	3,5	1000
400	20	280	200	0,60	5,0	1000
400	20	280	250	0,75	-	1000
400	20	260	250	0,75	2,0	1000
400	20	245	250	0,75	3,5	1000
400	20	230	250	0,75	5,0	1000



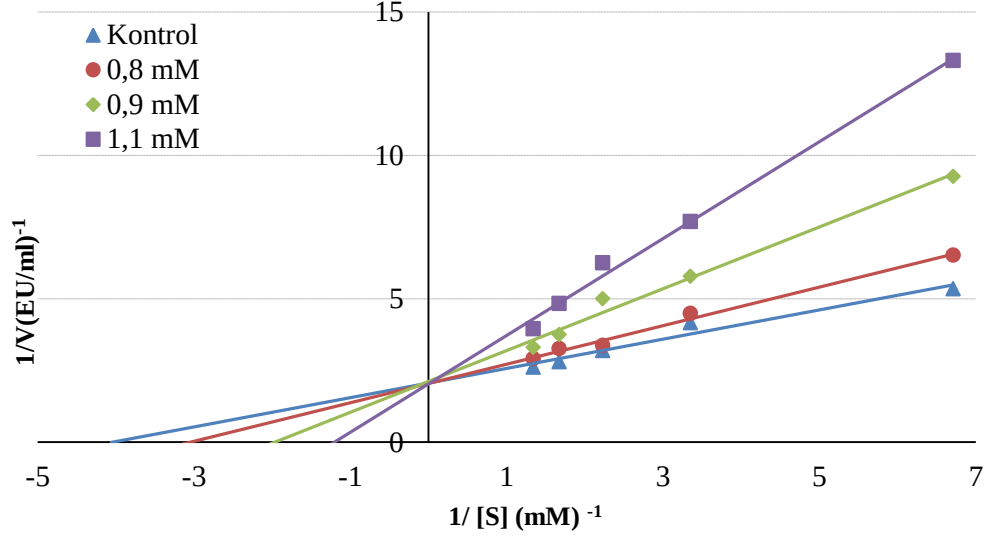
Şekil 4.48. Kangal balığı göz dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kobalt iyonunun etkisi



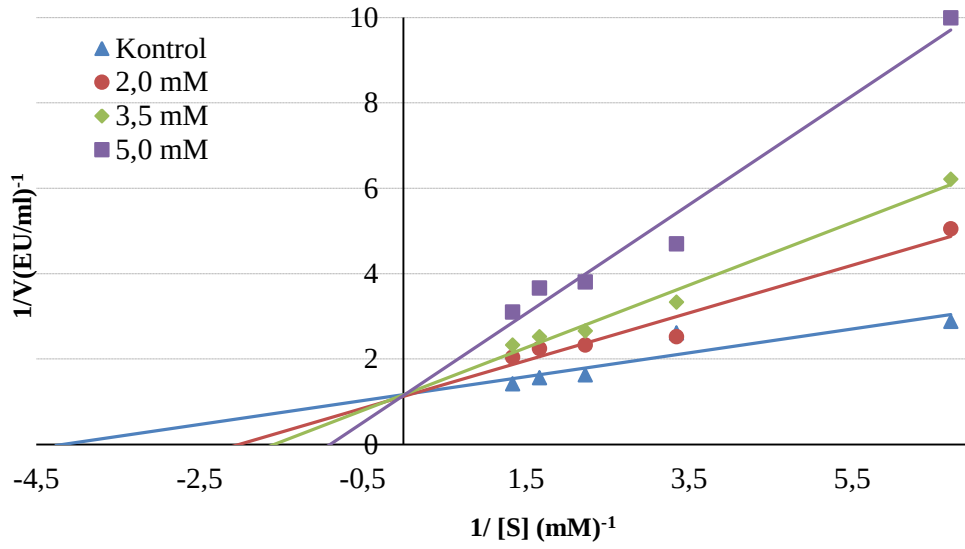
Şekil 4.49. Kangal balığı göz dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kadmiyum iyonunun etkisi



Şekil 4.50. Kangal balığı göz dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine bakır iyonunun etkisi



Şekil 4.51. Kangal balığı göz dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine kurşun iyonunun etkisi



Şekil 4.52. Kangal balığı göz dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine demir iyonunun etkisi

Kangal balığı göz dokusundan saflaştırılan CA enzimi için inhibitör olarak kullanılan ağır metallerin inhibisyon tipleri yarışmasız ve yarışmalı olduğundan; yarışmasız için $V_{\max}^I = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$ ve yarışmalı için $K_{M^I} = K_M + (1 + \frac{[I]}{K_i})$ formülleri kullanılarak K_i değerleri hesaplandı ve Çizelge 4.56'da gösterildi.

Çizelge 4.56. Kangal balığı göz dokusundan saflaştırılan CA enzimi için 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan K_i değerleri ve inhibisyon tipleri

İnhibitör	IC₅₀ (μM)	[I] (mM)	K_i (mM)	Ortalama K_i (mM)	İnhibisyon Tipi
CoCl ₂ .6H ₂ O	3,94	4	5,64	5,17±0,77	Yarışmasız
		6	5,58		
		8	4,28		
CdCl ₂ .H ₂ O	40,77	50	28,54	59,93±32,84	Yarışmasız
		60	94,05		
		80	57,19		
CuSO ₄ .5H ₂ O	19,80	30	51,09	30,64±19,97	Yarışmalı
		40	29,62		
		80	11,20		
Pb(NO ₃) ₂	0,91	0,8	2,48	1,60±0,82	Yarışmalı
		0,9	0,85		
		1,1	1,47		
FeCl ₂ .H ₂ O	3,08	2,0	1,87	1,79±0,40	Yarışmalı
		3,5	2,15		
		5,0	1,36		

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Günümüze kadar üzerinde en çok çalışılan ve hemen hemen bütün hayvan dokularında, bakterilerde ve fotosentetik hücrelerde asit-baz dengesi, kardiovasküler tonusun düzenlenmesi, sindirim, hücre bölümleri arasındaki iyon değişimi ve değişik enzimatik reaksiyonlar için gerekli bikarbonatın sağlanması fonksiyonlar gören önemli bir enzim olan karbonik anhidraz (CA, karbonat hidroliyz, E.C.4.2.1.1) canlı organizmalarda bulunan aktif bölgesinde Zn^{2+} iyonu bulunduran yaygın bir metaloenzim ailesidir. Bu enzim fizyolojik şartlarda karbondioksitin hidratasyonu ve bikarbonatın dehidratasyonu reaksiyonlarını tersinir olarak katalizler (Maren 1967; Tashian 1992; Sly and Hu 1995; Demir *et al.* 1999; Smith and Ferry 2000; Krungkrai 2001; Beydemir *et al.* 2004; Balaydın *et al.* 2012; Kaya *et al.* 2013; Topal and Gülçin 2014).

Karbonik anhidraz canlılar için hayati öneme sahip bir enzimdir ve CO_2 taşınması, bikarbonatın dokular ve akciğerler arasında metabolize olması, pH homeostazisi, doku ve organlardaki elektrolit sekresyonu, birçok biyosentez reaksiyonu, kemik resorpsiyonu, kalsifikasyon, tümör oluşumu, idrar asidifikasyonu ve daha birçok fizyolojik ve patolojik olayda etkili olan bir enzimdir (Pastarekova 2004; Supuran and Scozzafava 2007; Kaya 2011).

Ayrıca bunlara ilave olarak balıkların solungaç ve salgı organlarında, bazı böcek ve bakterilerde, kabuklu hayvanların kabuk yapımında ve yumurta kabuğunun oluşumunda, alglerde ve karasal bitki kloroplastlarında önemli fonksiyonları olduğu bulunmuştur (Graham *et al.* 1984; Tsuzuki and Miyachi 1989; Badger and Price 1994; Söyüt 2006).

Fotosentez olayının Calvin siklüsünde bu enzimin önemli bir görevi olduğu, kloroplast hücresinin tilakoid membrana bağlı CA enziminin Calvin siklüsündeki diğer enzimler ile birlikte bir multienzim sistemi içerisinde çalıştığı tespit edilmiştir (Jebanathirajah and Coleman 1998). Karbonik anhidraz'ın bikarbonatın CO_2 dehidratasyonunu aktivite

ederek CO₂ üretiminde artışa ve böylece hücreye CO₂ desteğinde artışa sebep olduğu bulunmuştur (Tsuzuki and Miyachi 1989; Söyüt 2006).

Karbonik anhidraz enzimini ilk olarak memeli eritrositlerinden daha sonraki yıllarda, 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 yaklaşık 30 kDa civarında olduğu tespit edilmiştir (Feldstein and Silverman 1984; Krungkrai *et al.* 2001; Demir *et al.* 2001; Beydemir *et al.* 2002; Beydemir and Gülçin 2004; Söyüt 2006; Topal and Gülçin 2014).

Bunlardan başka önemli miktarda tükürük bezleri, beyin, sinir miyelin kılıfı, pankreas, prostat, uterus ve endometrium dokularında da belirli miktarlarda bulunmaktadır (Supuran *et al.* 1998; Gülçin *et al.* 2004; Söyüt 2006).

CA, pek çok canlı organizmada altı farklı gen ailesi olan α -, β -, γ -, δ -, ζ - ve η -CA tarafından kodlanan bir metaloenzim ailesidir. α -, β - ve δ -CA'ları aktif bölgesinde Zn²⁺ iyonu içerirken γ -CA'lar ise Fe²⁺ içerir (ancak bu enzimler aktif bölgesinde Zn²⁺ veya Co²⁺ iyonları da içerebilirler). ζ -CA'ların aktif bölgesindeki Fe²⁺ iyonu kadmiyumla genellikle yer değiştirir. Bütün insan CA'ları α -sınıfıdır (Alterio *et al.* 2012). Memelilerde günümüze kadar α -CA enziminin 16 tane izoenziminin var olduğu tespit edilmiştir. Bu izoenzimlerden CA I, II, III, VII ve XIII sitozolik, CA IV, IX, XII ve XIV membrana bağlı, CA VA ve VB mitokondriyaldir ve CA VI tükürükte salgılanır. CA XV ise insanlarda ve diğer primatlarda eksprese olmaz rodent ve yüksek omurgalılarda olur (Nar *et al.* 2012; Aksu *et al.* 2013)

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 CO₂/HCO₃⁻ 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 eksikliği, 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 CO₂ 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 (Motaïs *et al.* 1989; Nikinmaa *et al.* 1990; Wood and Mungelr 1994).

Tatlı su balıklarının solungaç epitelinin apikal bölgesinde, karbonik anhidraz ve proton ATPaz birlikte bulunmaktadır. CA enzimi, ATPaz'a proton sağlamaktadır. CA enzimi solungaç epitelinin bazal bölgesinde yoktur. Bu sebeple, plazma solungaçlar içerisinden geçerken plazma CO₂/HCO₃⁻ dönüşümleri, CA yokluğundan dolayı katalizlenmemekte ve bu reaksiyonlar kanın solungaçlardan geçmesi esnasında eritrositlerde katalizlenmektedir (Randall and Brauner 1998).

Karbonik anhidraz enzimi, enzimler içerisinden canlı dokularındaki fonksiyonları açısından çok büyük öneme sahip olduğu görülmektedir. Ayrıca her canlıda farklı kısımlarda aktivite gösteren bu karbonik anhidraz sadece o canlının metabolizmasına spesifiktir. Yani CA farklı canlı metabolizmalarında farklı yapılarda ve molekül kütlelerinde fonksiyon gösteren ve canlılarda hayati önemi bulunan bir enzimdir. Bu doğrultuda 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 (Söyüt 2006).

Bu çalışma ile daha önce çalışılmamış bir balık türü olan Kangal balığından asit-baz dengesi, kardiovasküler tonusun düzenlenmesi, sindirim, hücre bölümleri arasındaki

iyon değişimive değişik enzimatik reaksiyonlar için gerekli bikarbonatın sağlanması gibi biyolojik prosesler için son derece önemli bir enzim olan karbonik anhidrazı Kangal balığının solungaç, kas ve göz dokularından saflaştırıp kinetik özellikleri incelendi. Balığın farklı dokularından elde edilen karbonik anhidraz enzimlerinin aktivitesi üzerine ciddi çevresel sıkıntılara sebep olan bazı ağır metal iyonların etkisi incelendi. Bu ağır metal iyonlarından enzimi inhibe edenlerin inhibisyon kinetikleriincelenip balığın yaşam için gerekli koşulların optimize edillmesinde yardımcı olacağı düşünülmektedir.

Çalışmamızda ağır metallerin seçilmesindeki amaç, ağır metallerin sucul ortamlarda genellikle eser miktarda bulunmakla birlikte son yıllarda hızlı nüfus artışı, endüstrileşme, madencilik, tarımsal aktiviteler, sanayi kuruluşlarının deniz sahilleri ve turizm bölgelerinde yoğunlaşması, drenaj suları ve yerleşim yerlerinde oluşan atık sular gibi faktörlerin etkisi ile giderek artan konsantrasyonlarda bulunmalarıdır. Ağır metallerin ortam derişimindeki artışının balıklar üzerinde başlıca etkisi doku ve organlarda birikmesidir. Ayrıca çeşitli kan parametrelerini, enzim aktivitelerini, büyüme ve gelişmeyi de olumsuz etkiledikleri de bilinmektedir. Bu çalışmada sudaki bazı ağır metal iyonlarının konsantrasyonlarının artması ile balıkların farklı dokularındaki karbonik anhidraz enzimine etkisi tespit edilerek ileriye dönük önlemler alınmasına ve bölge için önemli bir değer olan bu balık türünün korunmasına katkı sağlanacağı düşünülmektedir.

Bu çalışmamızda Kangal balığı solungaç, göz ve kas dokuları CA Sepharose 4B-L tirozin sülfanilamid afinite kromatografisi ile saflaştırılması, karakterizasyonu enzimlerin bazı kinetik özelliklerinin belirlenmesi baz ve bazı ağır metal iyonlarının bu enzimler üzerine etkileri belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla öncelikle Sivas Kangal balıklı kaplıcalardan balıklar alınmış ve hemen solungaç, göz ve kas dokuları çıkarılarak soğuk zincir kuralına uygun olarak laboratuvarımıza getirilmiştir.

Karbonik anhidrazın farklı dokulardan enzimin saflaştırılması işlemi iki adımda gerçekleştirildi; 1. Kangal balığı solungaç, göz ve kas dokularından homojenatlar ayrı

ayrı elde edildi. 2. Her üç kaynaktan elde edilen homojenat numuneleri için ayrı ayrı Sepharose 4B-L tirozin sülfanilamid afinite kromatografisi işlemi yapıldı. Yapılan tüm saflaştırma işlemleri sıcaklığın sebep olacağı enzim aktivitesindeki kaybın önlenmesi amacıyla soğuk ortamda gerçekleştirildi.

Yapılan literatür araştırmalarında karbonik anhidraz saflaştırılması işlemlerinde eskiden kloroform-etanol ekstraksiyonu, Sephadex G-75 jel filtrasyon kromatografisi kullanıldığı tespit edilmiştir (Hall and Schaer 1983). İlerleyen zamanlarda 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. 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 (Arslan *et al.*1996; Ninfali *et al.* 1990; Söyüt 2006; Bursal 2009). İlk defa 1970'lerde uygulanmaya başlanmış olan bu yöntemle sonraları karbonik anhidraz I ve II izoenzimleri başarılı bir şekilde birbirinden ayrılabilmiştir.

Kangal balığının farklı dokularından karbonik anhidraz enzimi saflaştırma sürecini kısaltma amacıyla, 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 bağlanmış ve böylece süreç bir günlük bir sürede sonuçlandırılabilmiştir (Söyüt 2006). Çizelge 4.1-4.3'lerden de görüldüğü gibi CA enzimi afinite kromatografisi ile kısa bir sürede, Kangal balığı solungaç dokusundan, spesifik aktivitesi 12,77 (EÜ/mg protein) olan, %15,44 verimle ve yaklaşık 241 kat; kas dokusundan, spesifik aktivitesi 34,76 (EÜ/mg protein) olan, %17,73 verimle ve yaklaşık 201 kat; göz dokusundan, spesifik aktivitesi 17,50 (EÜ/mg protein) olan, %25 verimle ve yaklaşık 389 kat saflaştırılmıştır. Görüldüğü gibi Kangal balığı solungaç, kas ve göz dokularından saflaştırdığımız CA enzimlerinin spesifik aktiviteleri ve saflaştırma katsayıları incelendiğinde en yüksek saflaştırma katsayısı göz dokusundan elde edilirken sonra solungaç dokusundan en az

saflaştırma katsayısı ise kas dokundan elde edilmiştir. Solungaç ve kas dokularının saflaştırma katsayıları birbirine yakın olduğu görülmüştür. Deneyler sonucunda en fazla % verim göz dokusundan, en düşük % verim ise solungaç dokusundan elde edilmiştir.

Bunu benzer çalışmalar literatürde incelendiğinde; karbonik anhidraz keçi (*Capra hircus*) eritrositlerinde 262 kat (Sinan vd 2007), alabalık karaciğerinde 2260 kat (Soyut ve Beydemir, 2008), gökkuşığı alabalık solungaçlarında 104.8 kat (Hisar vd 2006) ve insan eritrositlerinden 646 kat (Hisar vd 2003), Mersin balığı eritrositlerinde 539 kat (Karahalil 2009), çipura (*Sparus aurata*) karaciğer dokusundan 354 kat (Kaya vd 2013), Avrupa levreğinin (*Dicentrarchus labrax*) karaciğer dokusundan 78.8 kat (Ceyhun vd 2011) ve Hall ve Schaer (1983), kloroform-etanol ekstraksiyonu, Sephadex G-75 jel filtrasyon kromatografisi ve DEAE Biogel iyon değişim kolonu kullanarak gökkuşığı 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 (Krungkrai *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.

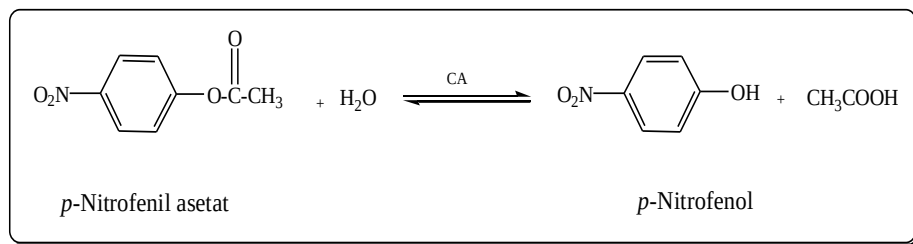
Kangal balığı dokularından elde edilen homojenatlar ve Sepharose 4B-L tirozin sülfanilamid afinite kromatografisinden elde edilen saf enzim çözeltisinde protein miktarları Bradford yöntemiyle Şekil 4.1'de verilen standart grafikten kantitatif olarak belirlendi. Bu yöntemde boya olarak kullanılan Coomassie brilliant blue G-250 negatif bir yüke sahiptir ve protein üzerindeki pozitif yüke bağlanır. Boyanın kırmızı (λ : 465 nm) ve mavi (λ : 595 nm) formu mevcuttur. Birçok protein hemen hemen aynı sonuç eğrilerini verdiğinden, 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 µg) 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). CO₂'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) enzimsiz olarak meydana gelen CO₂ hidratasyonu süresini yarıya indiren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır. Enzimin aktivitesi (t₀-t_c/t_c) formülüne göre hesaplandı (Maren 1960).
- ii. Esteraz Aktivitesi: Bu yöntem, karbonik anhidrazın ester bağınyı koparması esasına dayanmaktadır. Prensip 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 (Armstrong *et al.* 1966; Verpoorte and Mehta 1967). Enzimlerin saflığını kontrol etmek için ayrı ayrı sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) yapıldı. Jelde tek bandın gözlenmesi ile Kangal balığı solungaç, kas ve göz dokularından elde edilen CA enzimlerinin saf oldukları ispatlanmış oldu (Şekil 4.6).

Kangal balığı dokularından saflaştırılan CA enzimleri için optimum pH'lar 1 M 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 etkilendiği 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 gökkuşuğu 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). Gökkuşuğu alabalığının karaciğer, kas, beyin ve böbrek dokularından karbonik anhidrazın saflaştırıldığı çalışmada optimum pH: 9,0 olarak belirlenmiştir (Söyüt 2006). Mersin balığı eritrositlerinden elde edilen karbonik anhidraz enziminin optimum pH'sı 9,0 olarak bulunmuştur (Karahalil 2009). Çipura balığının (*Sparus aurata*) karaciğer dokusundan elde edilen karbonik anhidraz enziminin optimum pH'sı 7,5 olarak bulunmuştur (Kaya vd 2013). Avrupa levreğinin (*Dicentrarchus labrax*) karaciğer dokusundan elde edilen karbonik anhidraz enziminin optimum pH'sı 7,5 olarak bulunmuştur (Ceyhun vd 2011). 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 CO₂'i hidratazlama kapasitelerinin arttığı belirlenmiş ve bu artış pH 8,0'de proton alıcısı olarak görev yapan rezidülerin varlığına bağlanmıştır (Qian *et al.* 1999).

Kangal balığı 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. Daha önce yapılan optimum iyonik şiddet çalışmalarından bir kaçına baktığımızda; Gökkuşluğu alabalığı karaciğer karbonik anhidraz enziminin böbrek, kas, beyin dokuları karbonik anhidraz optimum iyonik şiddeti 1 M Tris-sülfat olarak bulunmuştur (Söyüt 2006). Mersin balığı eritrositlerinden elde edilen karbonik anhidraz enziminin optimum iyonik şiddeti 0,05 M Tris-sülfat olarak bulunmuştur (Karahalil 2009). Çipura balığının (*Sparus aurata*) karaciğer dokusundan elde edilen karbonik anhidraz enziminin optimum iyonik şiddeti 1 M Tris-sülfat olarak bulunmuştur (Kaya vd 2013).

Kangal balığı dokularından saflaştırılan CA enziminin stabil pH'sı, 1 M Tris-SO₄ (pH: 7,2-9,0) ve 1 M Potasyum-fosfat (pH: 5,0-8,0) tampon çözeltileri kullanılarak enzimin gösterdiği aktiviteler, belirli zaman aralıklarında spektrofotometrik olarak ölçüldü. Kangal balığı solungaç dokusu için stabil pH 1 M Tris-SO₄ tampon çözeltisinde pH: 8,5 olarak belirlenirken, kas ve göz için stabil pH'lar ise aynı tampon çözeltide 9,0 olarak elde edildi (Şekil 4.16-4.21). Beydemir ve arkadaşlarının (2006), alabalık göz lense 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). Gökkuşluğu alabalığı karaciğer karbonik anhidraz enziminin stabil pH'sı 8,5 iken böbrek, kas ve beyin dokuları karbonik anhidraz enzimi stabil pH'sı 9,0 olarak bulunmuştur (Söyüt 2006). Mersin balığı eritrositlerinden elde edilen karbonik anhidraz enziminin stabil pH'sı 9,0 olarak bulunmuştur (Karahalil 2009). Avrupa levreğinin (*Dicentrarchus labrax*) karaciğer dokusundan elde edilen karbonik anhidraz enziminin stabil pH'sı 8,5 olarak bulunmuştur (Ceyhun vd 2011). Çipura

balığının (*Sparus aurata*) karaciğer dokusundan elde edilen karbonik anhidraz enziminin stabil pH'sı 8,5 olarak bulunmuştur (Kaya vd 2013).

Buna göre Kangal balığı solungaç, kas ve göz dokularından saflaştırılan CA enzimlerinin stabil pH'ları literatürdeki bilgilerle paralellik gösterdiği gözlemlenmiştir.

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 Kangal balığı solungaç, kas ve göz dokularından saflaştırılan CA enzimlerinin optimum sıcaklıkları 0°C ile 60°C arasında 5'er ve 10'ar °C aralıklarla enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak ölçülerek belirlendi. Üç doku için sırayla optimum sıcaklık değeri 30°C, 35°C ve 35°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 Q_{10} değerleri hesaplandı (Şekil 4.13-4.15). Hisar (2002), gökkuşağı 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). Gökkuşağı alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokuları karbonik anhidraz enzimi optimum sıcaklığı 40°C bulunmuştur (Söyüt 2006). Mersin balığı eritrositlerinden elde edilen karbonik anhidraz enziminin optimum sıcaklığı 30 °C olarak bulunmuştur (Karahalil 2009). Avrupa levreğinin (*Dicentrarchus labrax*) karaciğer dokusundan elde edilen karbonik anhidraz enziminin optimum sıcaklığı 25°C olarak bulunmuştur (Ceyhun vd 2011). Çipura balığının (*Sparus aurata*) karaciğer dokusundan elde edilen karbonik anhidraz enziminin optimum sıcaklığı 50°C olarak bulunmuştur (Kaya vd 2013).

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 Kangal balığı solungaç, kas ve göz dokuları için E_a değerleri Bölüm 4.2.7'de anlatıldığı şekilde sırasıyla 4.97, 7.32 ve 5.91 kcal/mol olarak belirlendi. Daha sonra, yine solungaç, kas ve göz dokuları için ΔH değerleri sırasıyla 4.36, 6.70 ve 5.29 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, solungaç, kas ve göz dokuları için Q_{10} değerleri sırasıyla 1.50, 1.37 ve 1.27 olarak belirlendi. Literatür araştırmaları sonucunda Gökkuşluğu alabalığı karaciğer karbonik anhidraz aktivasyon enerjisi (E_a) 2,88 kcal/mol, aktivasyon entalpisi (ΔH) 2,28 kcal/mol ve Q_{10} değeri 1,53 olarak bulunmuştur. Gökkuşluğu alabalığı böbrek karbonik anhidraz aktivasyon enerjisi (E_a) 8,05 kcal/mol, aktivasyon entalpisi (ΔH) 7,458 kcal/mol ve Q_{10} değeri 1,675 olarak bulunmuştur. Gökkuşluğu alabalığı kas karbonik anhidraz aktivasyon enerjisi (E_a) 6,36 kcal/mol, aktivasyon entalpisi (ΔH) 5,77 kcal/mol ve Q_{10} değeri 1,56 olarak bulunmuştur. Gökkuşluğu alabalığı beyin karbonik anhidraz aktivasyon enerjisi (E_a) 5,32 kcal/mol, aktivasyon entalpisi (ΔH) 4,78 kcal/mol ve Q_{10} değeri 1,51 olarak bulunmuştur (Söyüt 2006). Çipura balığının (*Sparus aurata*) karaciğer dokusundan elde edilen karbonik anhidraz enziminin aktivasyon enerjisi (E_a) 1,665 kcal/mol, aktivasyon entalpisi (ΔH) 1,023 kcal/mol ve Q_{10} değeri 1,37 olarak bulunmuştur (Kaya vd 2013). Dolayısıyla, Kangal balığı solungaç, kas ve göz dokuları CA'sı'nın aktivasyon enerjisi (E_a), aktivasyon entalpisi (ΔH) ve Q_{10} değerleri literatürle benzeşmektedir.

Kangal balığı solungaç, kas ve göz dokularından saf olarak elde edilen CA enzimlerinin alt birimlerinin molekül kütlelerinin saptanmasında SDS-PAGE metodu kullanıldı. Şekil 4.10'da verildiği gibi solungaç, kas ve göz numuneleri ile birlikte standart protein numuneleri SDS-PAGE'de aynı zamanda yürütüldü. $\log MA-R_f$ standart grafiği çizildi Şekil 4.11'de verildi. Daha Kangal balığı dokularından elde edilen enzim numunelerinin R_f değerleri yardımıyla standart grafikten solungaç, kas ve göz dokularından saflaştırılan karbonik anhidraz enzimlerinin alt birim molekül kütleleri sırasıyla 32.86, 33.39 ve 31.72 kDa olarak hesaplandı. Yapılan çalışmalarda enzimin molekül kütlelerinin 20-36 kDa arasında değişim gösterdiği ve memeli dokularında tek alt birim halinde bulunduğu bildirilmiştir (Kaya 2011).

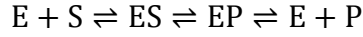
Karbonik anhidraz enziminin fizyolojik şartlardaki substratı CO_2 'dir. CO_2 diğer kullanılan substratlardan daha düşük K_M ve daha yüksek V_{max} 'a sahiptir. Enzimlerin doğal substratı yerine aynı deney şartlarında analogları veya enzimin *in vitro* şartlarda farklı bir reaksiyonu katalizleyebilmesi ve bu reaksiyonda ürüne dönüştürdüğü substratı kullanıldığında genellikle enzim aktivitesinin düştüğü gözlemlenmiştir (Ulus *et al.* 1997). Çalışmamızda Kangal balığı solungaç, kas ve göz 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 4.22-4.24). Kangal balığı solungaç, kas ve göz dokularından saflaştırılan CA enziminin K_M değerleri sırasıyla 0.85, 1.10 ve 1.29 mM olarak bulundu. V_{max} değerleri solungaç, kas ve göz dokuları için sırasıyla 0.402, 0.442 ve 0.611 $\mu\text{mol/mg}$ protein dakika olarak grafik denklemi yardımıyla hesaplandı. Bu dokular için elde edilen K_M değerleri karşılaştırıldığında Kangal balığı solungaç dokusu CA enzimi için hesaplanan K_M değeri diğer dokular için bulunan K_M değerlerinden daha küçüktür. Dolayısıyla bulunan bu değer solungaç CA enziminin *p*-nitrofenilasetat substratına karşı diğer dokulardan daha fazla ilgisi olduğunu göstermektedir.

Kangal balığında çalışılan diğer dokuların CA enzimlerinin *p*-nitrofenilasetat substratına ilgilerini K_M değeri en küçük olandan en büyük olana doğru sıralayacak olursak solungaç < kas < göz olarak sıralayabiliriz. Daha önceki çalışmalara bakıldığında 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/dakika olarak hesaplanmıştır (Hisar 2002). İnsan eritrositlerinden elde edilen hCA I ve 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). Gökkuşağı alabalığı kas dokusu karbonik anhidraz enzimi için K_M 1,29 mM ve V_{max} 0,17 EÜ/mL olarak, karaciğer dokusu karbonik anhidraz enzimi için K_M 0,66 mM ve V_{max} 0,126 EÜ/mL olarak, böbrek dokusu karbonik anhidraz enzimi için K_M 0,400 mM ve V_{max} 0,097 EÜ/mL olarak, beyin dokusu karbonik anhidraz enzimi için K_M 0,92 mM ve V_{max} 0,207 EÜ/mL olarak bulunmuştur (Söyüt 2006). Mersin balığı eritrositlerinden elde edilen karbonik anhidraz enzimi için K_M 4 mM ve V_{max} 20 mM/dak olarak bulunmuştur (Karahalil 2009). Avrupa levreğinin (*Dicentrarchus labrax*) karaciğer dokusundan elde edilen karbonik anhidraz enziminin K_M 0,44 mM ve V_{max} 0,249 EÜ/mL olarak bulunmuştur (Ceyhun vd, 2011). Çipura balığının (*Sparus aurata*) karaciğer dokusundan elde edilen karbonik anhidraz enziminin K_M 0,497 mM ve V_{max} 0,171 EÜ/mL olarak bulunmuştur (Kaya vd 2013).

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 Kangal balığı solungaç, kas ve göz dokuları CA enzimlerinin k_{cat} değerleri sırasıyla 114.85, 19.21 ve 66.88 s^{-1} olarak hesaplandı (Çizelge 4.24). Bulunan bu değerler karşılaştırıldığında solungaç dokusundan saflaştırılan CA enziminin turnover sayısının diğer dokulardan saflaştırılan CA'dan daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu verilere göre Kangal balığı dokuları CA enzimlerinin turnover sayılarının küçükten büyüğe doğru sıralanışına göre kas < göz < solungaç 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 (Krungrai *et al.* 2001). Gökkuşuğu alabalığı kas dokusu karbonik anhidraz enzimi için k_{cat} 28,8 s^{-1} olarak, karaciğer dokusu karbonik anhidraz enzimi için k_{cat} 32,8 s^{-1} olarak, böbrek dokusu karbonik anhidraz enzimi için k_{cat} 15,20 s^{-1} olarak, beyin dokusu karbonik anhidraz enzimi için k_{cat} 43,6 s^{-1} olarak bulunmuştur (Söyüt 2006). Mersin balığı eritrositlerinden elde edilen karbonik anhidraz enzimi için k_{cat} 20,8 s^{-1} olarak bulunmuştur (Karahalil 2009).

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 Kangal balığı solungaç, kas ve göz dokularından saf olarak elde edilen CA enzimlerinin özgülük sabitleri sırasıyla $1,35 \times 10^4$, $1,4 \times 10^4$, ve $5,2 \times 10^4$ olarak tespit edilmiştir. Literatür incelendiğinde Gökkuşluğu alabalığı kas dokusu karbonik anhidraz enzimi için V_0 $2,2 \times 10^4$ $mM \times s^{-1}$ olarak, karaciğer dokusu karbonik anhidraz enzimi için V_0 $5,0 \times 10^4$ $mM \times s^{-1}$ olarak, böbrek dokusu karbonik anhidraz enzimi için V_0 $4,0 \times 10^4$ $mM \cdot s^{-1}$ olarak, beyin dokusu karbonik anhidraz enzimi için V_0 $4,7 \times 10^4$ $mM \cdot s^{-1}$ olarak bulunmuştur (Söyüt 2006). Mersin balığı eritrositlerinden elde edilen karbonik anhidraz enzimi için V_0 $0,5 \times 10^4$ $mM \cdot s^{-1}$ olarak bulunmuştur (Karahalil 2009).

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 and Küfrevioğlu 2004).

Ağır metaller sucul ortamlarda genellikle eser miktarda bulunmakla birlikte son yıllarda hızlı nüfus artışı, endüstrileşme, madencilik, tarımsal aktiviteler, sanayi kuruluşlarının deniz sahillerinde yoğunlaşması, drenaj suları ve yerleşim yerlerinde oluşan atık sular gibi faktörlerin etkisi ile giderek artan derişimlerde bulunurlar. Metallerin hem çok geniş bir sahada kullanılması, hem de çok yavaş korozyona uğraması sudaki konsantrasyonlarının gittikçe artmasına neden olmuştur. Bunun bir sonucu olarakta balıklarında içinde bulunduğu sucul organizmalar metallerin artan derişimlerinin etkisinde kalırlar (Kaya 2011).

Ağır metallerin ortam derişimindeki artışının balıklar üzerinde başlıca etkisi doku ve organlarda birikmesidir. Ayrıca çeşitli kan parametrelerini, enzim aktivitelerini, büyüme ve gelişmeyi de etkiledikleri belirtilmiştir. Balık doku ve organlarında biriken metal düzeyi; ortam derişimine ve etkide kalma süresine bağılı olarak artar. Ancak metalin hangi dokuda öncelikle birikeceğı metalin çeşidine ve canlının türüne bağılı olarak değışir (Cicik 2003; Altındağ ve Yiğit 2005).

Çalışmamızda ağır metal iyonları olarak Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Pb^{2+} ve Cd^{2+} seçilmiştir. Kangal balığı solungaç, kas ve göz dokularından saflaştırılan karbonik anhidraz enzimlerinin aktivitelerini yarıya indiren ağır metal konsantrasyonları olarak bilinen IC_{50} değerleri belirlendi ve grafikler halinde Şekil 4.24-4.37’de verildi. Her bir doku için yukarıda sözü edilen ağır metal iyonlarının IC_{50} değerleri kendi aralarında karşılaştırıldıklarında solungaç dokusunda IC_{50} değeri en küçükten en büyük olan ağır metal iyonuna doğru sıralandığında $\text{Pb}^{2+} < \text{Fe}^{2+} < \text{Co}^{2+} < \text{Cd}^{2+} < \text{Cu}^{2+}$ olduğu görülmektedir. Solungaç dokusu CA enzimi üzerinde Pb^{2+} ve Fe^{2+} en fazla inhibisyona sebep olmuşlardır. Kas CA’sı için IC_{50} değeri en küçükten en büyük olan ağır metal iyonuna doğru sıralandığında $\text{Pb}^{2+} < \text{Fe}^{2+} < \text{Co}^{2+} < \text{Cd}^{2+}$ olarak tespit edilmiştir. Kas dokusu CA enzimi üzerinde Pb^{2+} ve Fe^{2+} en fazla inhibisyona sebep olmuşlardır. Göz dokusu CA’sı için IC_{50} değeri en küçükten en büyük olan ağır metal iyonuna doğru sıralandığında $\text{Pb}^{2+} < \text{Fe}^{2+} < \text{Co}^{2+} < \text{Cu}^{2+} < \text{Cd}^{2+}$ olarak tespit edilmiştir. Göz dokusundan saflaştırılan CA enzimini Pb^{2+} ağır metal iyonu diğer metal iyonlarından çok daha düşük konsantrasyonda inhibisyona uğrattığı belirlenmiştir.

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^+ ’nın %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 3.5×10^{-2} , 0.9, 6.5×10^{-2} ve 0.7 mM olarak tespit edilmiştir.

Gökkuşığı alabalığı kas dokusu karbonik anhidraz enzimi üzerinde gerçekleştirilen bir inhibisyon çalışmasında Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ag^+ ve Cd^{2+} ağır metal iyonları için belirlenen IC_{50} değerleri sırasıyla 0.099, 29.920, 5.330, 157.460 ve 146.420 mM olarak, karaciğer dokusu karbonik anhidraz enzimi üzerinde gerçekleştirilen bir inhibisyon çalışmasında Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ag^+ ve Cd^{2+} ağır metal iyonları için belirlenen IC_{50} değerleri sırasıyla 0.03, 30.00, 47.10, 0.01 ve 15.00 mM olarak, böbrek dokusu karbonik anhidraz enzimi üzerinde gerçekleştirilen bir inhibisyon çalışmasında Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ag^+ ve Cd^{2+} ağır metal iyonları için belirlenen IC_{50} değerleri sırasıyla 0.075, 34.200, 0.850, 98.880 ve 128.800 mM olarak, beyin dokusu karbonik anhidraz enzimi üzerinde gerçekleştirilen bir inhibisyon çalışmasında Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ag^+ ve Cd^{2+} ağır metal iyonları için belirlenen IC_{50} değerleri sırasıyla 0.05, 30.00, 0.31, 159.0 ve 82.5 mM olarak tespit edilmiştir (Söyüt 2006). Mersin balığı eritrositlerinden elde edilen karbonik anhidraz enzimi üzerinde gerçekleştirilen bir inhibisyon çalışmasında Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} ve Ag^+ ağır metal iyonları için belirlenen IC_{50} değerleri sırasıyla 3.4, 5.2, 2.8 ve 1.7 mM olarak, tespit edilmiştir (Karahalil 2009). Avrupa levreği karaciğer dokusundan edilen karbonik anhidraz enzimi üzerinde gerçekleştirilen bir inhibisyon çalışmasında Co^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ag^+ , Pb^{2+} , Hg^{2+} ve Al^{3+} ağır metal iyonları için belirlenen IC_{50} değerleri sırasıyla 0.3165, 0.0715, 0.390, 0.3790, 0.1128, 0.4484 ve 0.0692 mM olarak, tespit edilmiştir (Ceyhun vd 2011). Çipura balığı karaciğer

dokusundan edilen karbonik anhidraz enzimi üzerinde gerçekleştirilen bir inhibisyon çalışmasında Cd^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} ve Ag^{+} ağır metal iyonları için belirlenen IC_{50} değerleri sırasıyla 21.3, 69.6, 3.0 ve 0.0169 mM olarak tespit edilmiştir (Kaya vd 2013).

Literatürde bulunan bu değerlerin bir kısmı bizim çalışmamızda belirlediğimiz IC_{50} değerlerini de desteklemektedirler.

Kangal balığı solungaç, kas ve göz dokularından saflaştırılan CA enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Pb^{2+} 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 4.39-4.51). 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. Kangal balığı dokularından saflaştırılan solungaç, kas ve göz dokuları CA enzimleri için Çizelge 4.45, Çizelge 4.50 ve Çizelge 4.56 verilen ortalama K_i değerleri sırası; solungaç dokusu CA enzimi için küçükten büyüğe doğru kurşun, kobalt, bakır ve kadmiyum şeklindedir. Ortalama K_i değerleri sırası; kas dokusu CA enzimi için küçükten büyüğe doğru kurşun, kobalt, demir ve kadmiyum şeklindedir. Ortalama K_i değerleri sırası; göz dokusu CA enzimi için küçükten büyüğe doğru kurşun, demir, kobalt, bakır ve kadmiyum şeklindedir.

Kangal balığı solungaç CA enzimi için Çizelge 4.45’de verilen K_i değerlerine göre küçükten büyüğe doğru ağır metal iyonlarının sıralanışı; Pb^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} ve Cd^{2+} şeklindedir. Kas dokusu CA enzimi için Çizelge 4.50’de verilen K_i değerlerine göre küçükten büyüğe doğru ağır metal iyonlarının sıralanışı; Pb^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} ve Cd^{2+} şeklindedir. Göz dokusu CA enzimi için Çizelge 4.56’de verilen K_i değerlerine göre küçükten büyüğe doğru ağır metal iyonlarının sıralanışı; Pb^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} ve Cd^{2+} şeklindedir.

Bu sonuçlara göre solungaç, kas ve göz dokuları CA enzimleri için en yüksek inhibisyon etkisine Pb^{2+} metal iyonu sahiptir.

Literatürde çeşitli kaynaklardan saflaştırılan karbonik anhidraz enzimi ile ilgili birçok çalışma bulunmasına rağmen Kangal balığı solungaç, kas ve göz dokularından saflaştırılan CA enzimleri karakterizasyonu ve aktiviteleri üzerine ağır metallerin etkilerinin araştırılması konusunda herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Sonuç olarak deneysel verilerden elde edilen değerler toplu olarak Çizelge 5.1, Çizelge 5.2, Çizelge 5.3’de verilmiştir.

Çizelge 5.1. Kangal balığı solungaç dokusu *p*-nitrofenilasetat substratı kullanılarak CA enzimi için yapılan çalışmaların toplu sonuçları

CA Enzimi İçin Kinetik Çalışmalar			
Optimum pH	9,0 (1 M Tris-SO ₄)		
Optimum iyonik şiddet	1 M (Tris-SO ₄)		
Stabil pH	8,5 (1 M Tris-SO ₄)		
Optimum Sıcaklık (°C)	30°C		
Aktivasyon Enerjisi (Ea) (kcal/mol)	4,97		
Aktivasyon Entalpisi (ΔH) (kcal/mol)	4,36		
Q ₁₀	1,50		
K _M (mM)	0,85		
V _{max} (EÜ/ml)	0,40		
k _{cat} (s ⁻¹)	114,85		
V ₀ (mM x s ⁻¹)	1,35x10 ⁴		
Molekül Kütlesi Tayini (kDa)			
SDS-PAGE metodu ile	32,86		
Ağır Metaller	IC ₅₀ (mM)	Ortalama K _i (mM)	İnhibisyon Tipi
CoCl ₂ .6H ₂ O	3,48	6,04	Yarışmasız
CdCl ₂ .H ₂ O	14,50	55,20	Yarışmasız
CuSO ₄ .5H ₂ O	16,50	48,70	Yarışmalı
Pb(NO ₃) ₂	0,35	0,41	Yarışmalı
FeCl ₂ .H ₂ O	1,79	0,75	Yarışmasız

Çizelge 5.2. Kangal balığı kas dokusu *p*-nitrofenilasetat substratı kullanılarak CA enzimi için yapılan çalışmaların toplu sonuçları

CA Enzimi İçin Kinetik Çalışmalar			
Optimum pH		9,0 (1 M Tris-SO ₄)	
Optimum iyonik şiddet		1 M (Tris-SO ₄)	
Stabil pH		8,5 (1 M Tris-SO ₄)	
Optimum Sıcaklık (°C)		35 °C	
Aktivasyon Enerjisi (Ea) (kcal/mol)		7,32	
Aktivasyon Entalpisi (ΔH) (kcal/mol)		6,70	
Q ₁₀		1,37	
K _M (<i>p</i> -nitrofenilasetat) (mM)		1,10	
V _{max} (<i>p</i> -nitrofenilasetat) (EÜ/ml)		0,44	
k _{cat} (<i>p</i> -nitrofenilasetat) (s ⁻¹)		19,21	
V ₀ (<i>p</i> -nitrofenilasetat) (mM x s ⁻¹)		1,8 x 10 ⁴	
Molekül Kütlesi Tayini (kDa)			
SDS-PAGE metodu ile		33,39	
Ağır Metaller	IC ₅₀ (mM)	Ortalama K _i (mM)	İnhibisyon Tipi
CoCl ₂ .6H ₂ O	7,97	14,10	Yarışmasız
CdCl ₂ .H ₂ O	46,21	26,09	Yarışmalı
Pb(NO ₃) ₂	0,33	0,25	Yarışmalı
FeCl ₂ .H ₂ O	6,42	17,85	Yarışmasız

Çizelge 5.3. Kangal balığı göz dokusu *p*-nitrofenilasetat substratı kullanılarak CA enzimi için yapılan çalışmaların toplu sonuçları

CA Enzimi İçin Kinetik Çalışmalar			
Optimum pH		9,0 (1 M Tris-SO ₄)	
Optimum iyonik şiddet		1 M (Tris-SO ₄)	
Stabil pH		8,5 (1 M Tris-SO ₄)	
Optimum Sıcaklık (°C)		35 °C	
Aktivasyon Enerjisi (E _a) (kcal/mol)		5,91	
Aktivasyon Entalpisi (ΔH) (kcal/mol)		5,29	
Q ₁₀		1,27	
K _M (<i>p</i> -nitrofenilasetat) (mM)		1,29	
V _{max} (<i>p</i> -nitrofenilasetat) (EÜ/ml)		0,61	
k _{cat} (<i>p</i> -nitrofenilasetat) (s ⁻¹)		66,88	
V ₀ (<i>p</i> -nitrofenilasetat) (mM x s ⁻¹)		5,2 x 10 ⁴	
Molekül Kütlesi Tayini (kDa)			
SDS-PAGE metodu ile		31,72	
Ağır Metaller	IC ₅₀ (mM)	Ortalama K _i (mM)	İnhibisyon Tipi
CoCl ₂ .6H ₂ O	3,94	5,17	Yarışmasız
CdCl ₂ .H ₂ O	40,77	59,93	Yarışmasız
CuSO ₄ .5H ₂ O	19,80	30,64	Yarışmalı
Pb(NO ₃) ₂	0,91	1,60	Yarışmalı
FeCl ₂ .H ₂ O	3,08	1,79	Yarışmalı

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.
- Adam, B., Yiğitoğlu, M.R., 2012. Tıbbi Biyokimya. Nobel Tıp Kitabevleri, 52-549, İstanbul.
- Aksu, K., Nar, M., Tanc, M., Vullo, D., Gülçin, İ., Göksu, S., Tümer, F., Supuran, C.T., 2013. Synthesis and carbonic anhydrase inhibitory properties of sulfamides structurally related to dopamine. Bioorg. Med. Chem., 21, 2925-2931.
- Alterio, V., Fiore, A. D., Ambrosio, K. D., Supuran, C.T., Simone, G. D., 2012. Multiple binding modes of inhibitors to carbonic anhydrases: how to design specific drugs targeting 15 different isoforms? Chem. Rev., 112, 4421-4468.
- 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.
- anhydrase activity in rabbit erythrocytes. Annals New York Acad. Sci., 429,241.
- Armstrong, J.M., Myers, D.V., Verpoorte, J.A., 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., Küfrevioğlu, Ö.İ., 1996. A New method for the purification of carbonic anhydrase isoforms by affinity chromatography. Turk. J. Med. Sci., 26, 163-166.
- Asztalos, B., Nemcsok, J., Benedeczky, I., Gabriel, R., Szabo, A., 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., Canli, M., 2006. Response of catalase activity to Ag⁺, Cd²⁺, Cr⁶⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺ in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. Comp. Biochem. Physiol., 143, 218-224.
- Badger, M.R., Price, G.D., 1994. The role of carbonic anhydrase in photosynthesis. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 45, 369-392.
- Baillie, B.K., Yellowlees D., 1998. Characterization and function of carbonic anhydrases in the zooxanthellae-giant clam symbiosis. Proc Biol Sci, 22, 465-73.
- Balaydin, H.T., Soyut, H., Ekinci, D., Goksu, S., Beydemir, S., Menzek, A., Sahin, E., 2012. Synthesis and carbonic anhydrase inhibitory properties of novel bromophenols including natural products. J. Enzyme Inhib. Med. Chem. 27, 43-50
- Banerjee, A.L., Swanson, M., Malik, S., Srivastava, DK., 2004. Purification of recombinant human carbonic anhydrase-II by metal affinity chromatography without incorporating histidine tags. Protein Expres. Purif, 37,450-454.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., 2014. Biyokimya. Palme Yayıncılık, 241-247p, Ankara.
- Beydemir, S., Çiftçi, M., Küfrevioğlu, O.İ., Büyükokuroğlu, 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., Ozmen, I., Buyukokuroglu, M.E., Ozdemir, H., Küfrevioğlu, O.I., 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, 42, 187-191.
- Beydemir, Ş., Gülçin, İ., 2004. Effect of melatonin on carbonic anhydrase from human erythrocyte *in vitro* and from rat erythrocyte *in vivo*. J. Enzyme Inhib. Med. Chem., 19, 193-197.
- Beydemir, Ş., Hisar, O., Gülçin, İ., Küfrevioğlu, Ö.İ., 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. Enzyme Inhib. Med. Chem., 20, 35-39.
- Blasco, J., Puppo, J., 1999. Effect of heavy metals (Cu, Cd and Pb) on aspartate and alanine aminotransferase in *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia). Comp. Biochem. Physiol. Part C: Pharmacol., Toxicol. Endocrinol., 122, 253-263.
- Boriack-Sjodin, P.A., Heck, R.W., Laipis, P.J., Silverman, D.N., 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. Comp. Biochem. Physiol. Part C: Pharmacol., Toxicol. Endocrinol. 92, 10949-10953.
- Bottcher, K., Waheed, A., Sly, W.S., 1994. Membrane-Associated Carbonic Anhydrase from the Crab Gill: Purification, Characterization, and Comparison with Mammalian CAs. Arch. Biochem. Biophys., 312, 429-435.
- Bursal, E., 2009. Kivi meyvesinin (*Actinidia deliciosa*) antioksidan ve antiradikal aktivitelerinin belirlenmesi, karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu. Doktora tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Burt, E., Darlington, M.V., Graf, G., Meyer, H. J., 1992. Isolation, purification and characterization of an insect carbonic anhydrase. Insect Biochem. Mol. Biol., 22, 285-291.
- Busconi, L., Folco, E. J., Studdert, C., Sanchez, J. J., 1992. Purification and characterization of a latent form of multicatalytic proteinase from fish muscle. Comp. Biochem. Physiol. Part B: Biochem. Mol. Biol., 102, 303-309.
- Bülbül, M., Hisar, O., Beydemir, S., Çiftçi, M., 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. Enzyme Inhib. Med. Chem., 18, 371-375.
- Casini, A., Mincione, F., Vullo, D., Menabuoni, L., Scozzafava, A., Supuran, C.T., 2002. Carbonic anhydrase inhibitors with strong topical antiglaucoma properties incorporating a 4-(2-aminopyrimidin-4-yl-amino)-benzenesulfonamide scaffold. J. Enzyme Inhib. Med. Chem., 17, 9-18.
- Casini, A., Scozzafava, A., Mincione, F., Menabuoni, L., Supuran, C.T., 2002. Carbonic anhydrase inhibitors: synthesis of water soluble sulfonamides incorporating a 4-

- sulfamoylphenylmethylthiourea scaffold, with potent intraocular pressure lowering properties. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 17, 333–343.
- Ceyhun, S.B., Şentürk, M., Yerlikaya, E., Erdoğan, O., Küfrevioğlu, Ö.İ. ve Ekinçi, D., 2011. Purification and characterization of carbonic anhydrase from the teleost fish *Dicentrarchus labrax* (*Eurapean seabass*) liver and toxicological effects of metals on enzyme activity. *Environ. Toxicol. Pharmacol* 32, 62-74.
- 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., Carter, N., 2000. The carbonic anhydrase-new horizons. molecular bases of inherited disease (Scriber, C.R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., and Valle, D., eds) 8th Ed., pp. 2165-2204, McGraw-Hill, Inc., Newyork.
- Christensen, G., 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., Hopwood, D., 1997. Carbonic anhydrase isoenzymes I, II, III and IV are present in human esophageal epithelium. *J. Histochem. Cytochem*, 45, 35-40.
- Clare, B.W., 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.
- Costanzo, L., De-Guidi, G., Giuffrida, S., Sortino, S., Condorelli, G., 1995. Antioxidant effect of inorganic ions on UVC and UVB inuced lipid peroxidation. *J Inorg. Biochem.*, 59, 1-13.
- Çelik, İ., Çamaş, H., Arslan, O. 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., Özer, N., 2004. Purification and characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase from rat small intestine. *Protein J*, 23, 317-324.
- Devlin, T.M., 2002. *Biochemistry with Clinical Correlations*, Kanada.
- Ekinçi, D., Beydemir, Ş., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2006. İnsan eritrositlerinden karbonikanhidraz izoenzimlerinin saflaştırılması ve bazı ağır metallerin in vitro inhibisyon etkilerinin incelenmesi. II. Afinite Teknikleri Kongresi, Zonguldak.
- Ekinçi, D., Ceyhun, S.B., Şentürk, M., Erdem, D., Küfrevioğlu, Ö.İ., Supuran, C.T., 2010. Characterization and anions inhibition studies of an α -carbonic anhydrase from the teleost fish *Dicentrarchus labrax*. *Bioorg. Med. Chem.*, 19, 744-748.
- El-Beltagy, A.E., El-Adawy, T.A., Rahma E.H., El-Bedawey A.A., 2004. Purification and characterization of an acidic protease from the viscera of bolti fish (*Tilapia nilotica*). *Food Chem.*, 86, 33-39.
- Elleby, B., Sjöblom, B., Tu, C., Silverman, D.N., Lindskog, S., 2000. Enhancement of catalytic efficiency by the combination of site-specific mutations in a carbonic anhydrase-related protein. *Eur. J. Biochem.*, 267, 5908-5915.
- Esposito, E.X., Baran, K., Kelly, K., 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., Choy, K.F., 2001. Purification and characterization of grass carp mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Chem. Biol. Interact.* 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., 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, New York.
- Gilmour, K.M., Henry, R.P., Wood, C.M., 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., Dwyer, M., 1984. Chemical properties, distribution and physiology of plant and algal carbonic anhydrases. *Ann. NY Acad. Sci.* 429, 222-237.
- Grzyb, K., Skorkowski, E.F., 2005. Characterization of creatine kinase isoforms in herring (*Clupea harengus*) skeletal muscle. *Comp. Biochem. Physiol. Part B: Biochem. Mol. Biol.* 140, 629-634.
- Gülçin, I., Beydemir, S., Büyükkuroğlu, 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., Schraer, R., 1983. Characterization of a high activity carbonic anhydrase isozyme purified from erythrocytes of *salmo gairdneri*. *Comp. Biochem. Phys.* 75B, 81-92.
- Haris, E., Angal, S., 1990. *Protein purification applications: a practical approach*, Oxford University Press, 179.
- Hazen, S.A., Waheed, A., Sly, W.S., LaNoue, K.F., Lynch, C.J., 1996. Differentiation dependent expression of CA V and the role of carbonic anhydrase isozymes in pyruvate carboxylation in adipocytes. *FASEB Journal*, 10, 481-490.
- Heath, A.G., 1987. *Water Pollution and Fish Physiology*. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, 52.
- Henry, R.P., Smatresk, N.J., Cameron, J.N., 1988. The distribution of brachial carbonic anhydrase and the effect of gill and erythrocyte carbonic anhydrase inhibition in the channel 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. Gökkuşluğu alabalık eritrositlerinden karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu ve bazı antibiyotiklerin enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Hisar, O., Hisar, S.A., Kufrevioglu, O.İ., Yanik T., 2003. Inhibitory effects of some antibiotics on activity of carbonic anhydrase from rainbow trout erythrocytes *in vitro* and *in vivo*. *J. Aquat. Anim 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.

- Kadıköylü, G., 2009. Kanser ve Anemi: Epo Kullanım Kılavuzu, Türk Hematoloji Derneği - Hematolojide Destek Tedavileri ve Enfeksiyonlar Kursu, İstanbul, Sayfa; 77-78.
- Kahvecioğlu, Ö., Kartal G., Güven, A. ve, Timur, S., 2004. Metallerin çevresel etkileri. İTÜ yayınları. İstanbul.
- Kalaycıoğlu, S., Serpek. B., Nizamoğlu, M., Başpınar, N. Tiftik, A.M., 2010. Biyokimya, Nobel Yayınları, 213-50.
- Karahalil Yaylacı, F., 2009. Mersin balığı (*Acipenser gueldenstaedti*) eritrositlerinden elde edilen karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu ve kinetik özelliklerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Kaya, E. D., Söyüt, H., Beydemir, Ş., 2013. carbonic anhidrase activity from the gilthead sea bream (*Sparus aurata*) liver: The toxicological effects of heavy metals. Environ. Toxicol. Pharmacol 36, 514-521
- Keha, E., Küfrelioğlu, Ö.İ., 2012. Biyokimya, Aktif yayınları, 97-125, Erzurum.
- Keilin, D. and Mann, T., 1944. Activity of purified carbonic anhydrase. Nature 153, 107-108.
- Keser, M., 2007. Aterosklerotik plakalarda ağır metal oranlar ile e-NOS ve İL-6 gen polimorfizmi arasındaki ilişki, Uzmanlık Tezi, T.C. Sağlık Bakanlığı. Dr. Siyami Ersek Göğüs Kalp ve Damar Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul.
- Krungkrai, S.R., Suraveratum, N., Rochanakij, S., Krungkrai, 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.
- Lakkis, M.M., Bergenhem, N.C.H., Tashian, R.E., 1996. Expression of mouse carbonic anhydrase VII in e-coli and demonstration of its CO₂ hydrase activity. Biochem. Biophys. Res Com., 226, 268-272.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M., 2005. Principles of biochemistry, 3. Baskıdan çeviri (Çeviri editörü: Kılıç N.), Palme Yayıncılık.
- Lenntech, 2006. Heavy metals. ([http// www.lenntech.com/heavy metals htm](http://www.lenntech.com/heavy_metals.htm))(25.06.2006)
- Lesburg, C.A., Christianson D.W., 1995. X-RAY crystallographic studies oengineered hydrogen-bond network in protein-zinc binding-site. J. Am. Chem. Soc., 117, 6838-6844.
- Lessard, J., Val, A.L., Aota, S., Randall, D.J., 1995. Why is there no carbonic anhydrase activity available to fish plasma? J. Exp. Biol., 198, 31-38.
- Leung, P.L., Lsi, X.L., 1996. Multielement analysis in serum of thyroid cancer patients before and after a surgical operation. Biol. Trace Elem. Res., 51, 259-266.
- Lindskog, S., 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., Burk, D., 1934. The determination of enzyme dissociation constants. J. Am. Chem. Soc, 57, 685.
- Lionetto, M.G., Giordano, M.E., Vilella, S., Schettino T., 2000. Inhibition of enzymatic activities by cadmium. Aquat. Toxicol., 48, 561-571.

- Lonnerholm, G., Selking, O. Wistrand, P.J., 1985. Amount and distribution of carbonic-anhydrases CA-I and CA-II in the gastrointestinal-tract. *Gastroenterology*, 88, 1151-1161.
- M., Sugawara, A., Ozaki, S., Tanaka, I., Nakao, K., 1999. Isolation and characterization of CA XIV, a novel membrane-bound carbonic anhydrase from mouse kidney. *J. Biol. Chem.*, 274, 15701-15705.
- Mafra, M., Cozzolino, S.M.F., 2004. Erythrocyte zinc and carbonic anhydrase levels in nondialyzed chronic kidney disease patients. *Clinical Biochemistry*, 37, 67-71.
- Maren, T.H., 1960. A simplified micromethod for the determination of carbonic anhydrase and its inhibitors. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 130, 26.
- Maren, T.H., Conroy, C.W., Wynns, G.C., Godman, D.F., 1997. Renal and cerebrospinal fluid formation pharmacology of a high molecular weight carbonic anhydrase inhibitor. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 280, 98-104.
- Mazur, C.F., 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., Roughton, F.J.W., 1933. Carbonic anhydrase: its preparation and properties. *Nature* 80, 113-142.
- Morgan, I.J., Henry, R.P., 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, Motais, R., Fievet, B., Garcia-Romeo, F., Thomas, S., 1989. Na^+/H^+ exchange and pH regulation in red blood cells: role of uncatalyzed H_2CO_3 dehydration. *Am. J. Physiol*, 256, 728-735.
- Mughal, A.L., Iqbal, M.J., 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., Sly, W.S., 1987. Purification and characterization human salivary carbonic anhydrase. *J. Biol. Chem.*, 262, 1382.
- Mutluay, H. Demirak, A., 1996. Su kimyası, Beta basım yayım dağıtım AŞ, s: 83-84, İstanbul.
- Nar, M., 2014. Bazı kinazların türevleri, antioksidan kapasiteleri karbonik anhidraz ı ve ıı izo enzimleri üzerine inhibisyon etkileri. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Nar, M., Çetinkaya, Y., Gülçin, İ., Menzek, A., 2012. (3,4-Dihydroxyphenyl)(2,3,4-trihydroxyphenyl)methanone and its derivatives as carbonic anhydrase isoenzymes inhibitors. *J. Enzyme Inhib Med. Chem.*, 28, 402-406.
- Nelson, D.L., Cox M.M., 2005. *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri*. (Çeviren: N.KILIÇ), Palme Yayıncılık, Ankara, 243-293.
- Nikinmaa, M., Tithonen, K., 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., Woodling, J.D., 2000. Some aspects of hepatic function in feral brown trout, *Salmo trutta*, living in metal contaminated water . *Comp. Biochem. Physiol. Part C: Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, 127, 71-78.

- Ohkubo, M., Miyagawa, K., Osatomi, K., Hara, K., Nozaki, Y., Ishihara, T. 2004 Purification and characterization of myofibril-bound serine protease from lizard fish (*Saurida undosquamis*) muscle. *Comp. Biochem. Physiol. Part B: Biochem. Mol. Biol.*, 137, 139-150.
- Okutur, SK., 2006. Tip 2 Diabetes Mellitus'lu hastalarda vücut demir depoları ile metabolik kontrol, insülin rezistansı ve mikroalbuminüri arasındaki ilişki. Uzmanlık Tezi, Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, III. Dahiliye Kliniği, İstanbul.
- Okuyama, T., Waheed, A., Kusomoto, W., Zhu, X.L., Sly, W.S., 1995. Carbonic anhydrase IV role of removal of c-terminal domain in glycosylphosphatidylinositol anchoring and realization of enzyme-activity. *Arch Biochem Biophys.*, 320, 315-312.
- Onganer, Y., Şakiroğlu, H., 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., 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., Sly, W.S., 1998. Expression of carbonic anhydrase V in pancreatic beta cells suggests role for mitochondrial carbonic anhydrase in insulin secretion. *J. Biol. Chem.*, 273, 24620-24623.
- Parkkila, S., 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. *Scand. J. Biol. Gastroenterol.*, 31, 305-317.
- Perry, S.F., Wood, C.M., Walsh, P.J., 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., 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., Pottinger, T.G., 1987. Crowding causes prolonged leucopenia in salmonid fish, despite acclimation. *J. Fish Biol.*, 20, 229-244.
- Pocker, Y., Joan, S.Y., 1973. Plant carbonic anhydrase. Properties and carbon dioxide hydration kinetics. *Biochemistry*, 12, 5127.
- Pocker, Y., Joan, S. Y., 1974. Plant carbonic anhydrase. Hydrase activity and its reversible inhibition. *Biochemistry*, 13, 5116.
- Pullan, L.M., Noltmann, E.A., 1985. Purification and properties of pig muscle carbonic anhydrase III. *Biochim. Biophys. Acta*, 839, 147-54.
- Qian, M., Earnhardt, J.N., Wadhwa, N.R., Tu, C., Laipis, P.J., Silverman, D.N., 1999. Proton transfer to residues of basic pKa during catalysis by carbonic anhydrase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1434, 1-5.
- Rahim, S.M., Deaungy, J.P., 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., Vaananen, H.K., 1999. Carbonic anhydrase III protects cells from hydrogen peroxide-induced apoptosis. *FASEB Journal*, 13, 513-522.
- Randall, D.J., Brauner, C., 1998. Interaction between ion and gas transfer in freshwater teleost fish. *Comp. Biochem. Physiol*, 119, 3-8.
- Ren, X.L., Lindskog, S., 1992. Buffer dependence of CO₂ hydration catalyzed by human carbonic anhydrase-I. *Biochim. Biophys. Acta*, 1120, 81-86.
- Riol, M.J.M., Valiñas, M.C.N., Fernández, M.A.G., López, M.P., 2001. Glutathione S-transferases from rainbow trout liver and freshly isolated hepatocytes: purification and characterization. *Comp. Biochem. Physiol Part C: Toxicol. Pharmacol.*, 128, 227-235 .
- Roughton, F.J.W., 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., 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., Dietsch, P., 1984. A 54000 molecular weight protein with carbonic
- Segel, I.H., C. John Wiley and Sons, 1975. *Enzyme Kinetics*. New York.
- Sender, S., Bottcher, K., Cetin, Y., 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.
- Seven, G., 2010. Meme, baş, boyun ve mide kanserli hastalarda radyoterapi öncesi ve sonrası iz elementler ve ağır metal düzeyleri ve bazı biyokimyasal (katalaz ve karbonik anhidraz) parametrelerinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Van.
- Shakoori, A.R., Iqbal, M.J., Mughal, A.L., 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.
- Sigman, D.S., Boyer, P.D., 1990. *The enzymes*. Academic Press, (3rd. Ed.), 19, 118.
- Sly, W.W., Hu, P.Y., 1995. Human carbonic anhydrase and carbonic anhydrase deficiencies. *Annu. Rev. Biochem*, 64, 375-401.
- Smith, K.S., Ferry, J.G., 2000. Prokaryotic carbonic anhydrases *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 335-366.
- Sohlberg, S., Czerwinska, K., Rasmusen, K., 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., Celis, H., 1999. PIXE analysis of Zn enzymes. *Nucl. Instrum. Meth. Phys. Res. B.* 150, 222-225.
- Söyüt, H., 2006. Gökkuşluğu alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) dokularından karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması karakterizasyonu ve kinetik özelliklerinin incelenmesi. Doktora tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Stams, T., Chen, Y., Boriack-Sjodin, P.A., Hurt, J.D., Liao, J., May, J.A., Dean, T., Laipis, P., Silverman, D.N., 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 Sci., 7, 556-563.
- Supuran, C.T., Scozzafava, A., 2001. Carbonic anhydrase inhibitors. Curr. Med. Chem., 1, 61-97.
- Supuran, C.T., Briganti, F., Tilli, S., Chegwidde, W.R., Scozzafava, A., 2001. Carbonic anhydrase inhibitors: Sulfonamides as antitumor agents? Bioorg. Med. Chem. 9, 703-714.
- Supuran, C.T., Ilies, M., Scozzafava, A., 1998. Carbonic Anhydrase Inhibitors –Part 291 : Interaction of isoenzymes I, II and IV with benzolamide-like derivatives. Eur. J. Med. Chem., 33, 739-751.
- Supuran, C.T., Scozzafava, A., Casini, A., Mincione, F., Menabuoni, L., Caproiu, M.T., Maganu, M., 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. Bioorg. Med. Chem. 8, 2145-2155.
- Supuran, C.T., Scozzafava, A., 2002. Applications of carbonic anhydrase inhibitors and activators in therapy. Expert Opin. Ther. Pat. 12, 217-242.
- Şahin, A., 2008. Bazı karbonik anhidraz izoenzimlerinin saflaştırılması için yeni bir afinite jelinin sentezi ve uygulanması. Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir.
- Şehitoğlu, M.H., 2012. Bazı fenolik doğal bileşiklerin antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi ve insan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA-I ve hCA-II) üzerine inhibisyon etkilerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- 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 59, İzmir.
- Temel, Y., 2014. Hindi karaciğer Tiyoredoksin Redüktaz enziminin saflaştırılması karakterizasyonu ve bazı kimyasalların enzim aktivitesi üzerine etkileri. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Testereci, H., Sekin, S., Ekin, S., 1999. Van Gölü balığının (*Calcalburnus tarichi*) da karbonik anhidrazın esteraz aktivitesi üzerine bir çalışma. Tr. J. Vet Anim. Sci., 23, 145-153.
- Tohse, H., 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*). Comp. Biochem. Physiol. Part A 128, 177-184.
- Topal, F., 2009. İnsan eritrositlerinden saflaştırılan karbonik anhidraz izoenzimleri (HCA-I ve HCA-II) üzerine bazı kemoterapi ilaçlarının etkilerinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Tsuzuki, M., Miyachi S., 1989. The function of carbonic anhydrase in aquatic photosynthesis. Aquat. Bot. 34, 85-104.
- Underwood, E.J., 1977. Trace Elements in Human and Animal Nutrition, 4th ed Academic Press, New York.
- Utku, A., 2006. *Glioblastoma multiforme* ve *Benign meningioma* olgularında tümör dokusunda ölçülen çinko, demir ve kadmiyum düzeylerinin karşılaştırılması,

- Bakırköy Ruh Sağlığı ve Sinir Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Uzmanlık Tezi, İstanbul.
- Verpoorte, J.A., 1967. Esterase activities of human carbonic anhydrases B and C J.Biol. Chem, 242, 4221-4229.
- Vitale, A. M., Monserrat, J. M., Castilho, P., 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. Determination of molecular weights of proteins by gel filtration of sephadex. 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., 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.
- Yılmaz, A., 2014. Topraklarımızdaki çinko noksanlığının bitki beslenme ve insan sağlığına etkileri. (<http://www.tarimkutuphanesi.com//ağırmetaller.htm>). (05.05.2014)
- Yu, Z., Xie, L., Lee, S., Zhang, R., 2006. A novel carbonic anhydrase from the mantle of the pearl oyster (*Pinctada fucata*). Comp. Biochem. Physiol. Part B: Biochem. Mol. Biol., 143, 190-194.
- Yüreğir, G.T., 1981. Enzimler ve Enzim Kinetikleri. Temel Biyokimya, Kemal Matbaası, 1. cilt, s. 148-167, Adana

ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Sivas'ta doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Sivas'ta 2002 yılında tamamladı. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fatih Eğitim Fakültesi Kimya Öğretmenliği bölümünden 2007 yılında mezun oldu. Aynı yıl Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Fizikokimya Anabilim dalında yüksek lisans öğrenimine başladı. 2009 yılında tezini tamamladı. Aynı dönem Cumhuriyet Üniversitesi Yıldızeli Meslek Yüksekokulunda öğretim görevlisi olarak işe başladı. 2011-2012 Eğitim ve Öğretim yılında Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü'nde doktora çalışmalarına başladı. 2014 Ağustos ayından itibaren Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Hizmetler Meslek Yüksekokulunda Öğretim görevlisi olarak çalışmaktadır. Evli ve iki çocuk babasıdır.