

**KARADENİZ ALABALIĞI (*Salmo trutta* Labrax)  
BÖBREK, KARACİĞER, SOLUNGAÇ VE KAS  
DOKULARINDAN KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİNİN  
SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE BAZI  
METAL İYONLARININ ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE  
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**Murat KÜÇÜK**

**Doktora Tezi**

**Kimya Anabilim Dalı**

**Biyokimya Bilim Dalı**

**Danışman: Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN**

**2015**

**Her hakkı saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

KARADENİZ ALABALIĞI (*Salmo trutta* Labrax)  
BÖBREK, KARACİĞER, SOLUNGAÇ VE KAS DOKULARINDAN  
KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI,  
KARAKTERİZASYONU VE BAZI METAL İYONLARININ  
ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Murat KÜÇÜK

KİMYA ANABİLİM DALI  
Biyokimya Bilim Dalı

ERZURUM  
2015

Her hakkı saklıdır



T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**KARADENİZ ALABALIĞI (*Salmo trutta* Labrax) BÖBREK, KARACİĞER,  
SOLUNGAÇ VE KAS DOKULARINDAN KARBONİK ANHİDRAZ  
ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE BAZI METAL  
İYONLARININ ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN  
İNCELENMESİ**

Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN danışmanlığında, Murat KÜÇÜK tarafından hazırlanan bu çalışma **23/02/2015** 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 KÜFREVLİOĞLU

İmza :

Üye : Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

İmza :

Üye : Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN

İmza :

Üye : Doç. Dr. Kubilay GÜÇLÜ

İmza :

Üye : Doç. Dr. Ercan BURSAL

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 12/03/2015 tarih ve 10/438 nolu kararı ile onaylanmıştır.

  
Prof. Dr. Ertan YILDIRIM  
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

### KARADENİZ ALABALIĞI (*Salmo trutta* Labrax) BÖBREK, KARACİĞER, SOLUNGAÇ VE KAS DOKULARINDAN KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE BAZI METAL İYONLARININ ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Murat KÜÇÜK

Atatürk Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı  
Biyokimya Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

Bu tez kapsamında Karadeniz alabalığı (*Salmo trutta* Labrax) böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokularından karbonik anhidraz (CA) enzimi sırasıyla 603.77, 561.79, 1395.35 ve 297.03 EÜ/mg spesifik aktiviteleriyle birlikte, %35.5, 18.6, 71.1 ve 75.0 verimlerle Sepharose-4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite kolon kromatografisi kullanılarak saflaştırıldı. Karadeniz alabalığının böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokuları CA enzimi için saflaştırma kat sayıları sırasıyla 349.00, 362.45, 1116.28 ve 471.47 olarak tespit edildi.

Enzimin saflığını kontrol etmek ve alt birim molekül kütlelerini tespit etmek amacıyla SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı ve tek bant gözlemlendi. Enzimin alt birim molekül kütlesi böbrek doku için 29.71 kDa, karaciğer doku için 29.50 kDa, solungaç doku için 32.00 kDa ve kas doku için 28.80 kDa olarak belirlendi.

Tüm dokulardan saflaştırılan CA enzimi için optimum iyonik şiddet 1 M Tris-SO<sub>4</sub> tamponu olarak belirlendi. Optimum ve stabil pH değerleri 4°C'de 1 M Tris-SO<sub>4</sub> ve fosfat tamponları kullanılarak hesaplandı. CA enziminin optimum sıcaklık, aktivasyon enerjisi (E<sub>a</sub>), aktivasyon entalpisi (ΔH) ve Q<sub>10</sub> değerleri Arrhenius grafiğinden elde edildi. Saflaştırılan enzimlerin K<sub>M</sub> ve V<sub>max</sub> değerleri Lineweaver-Burk grafiklerinden hesaplandı. Karadeniz alabalığının böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokuları CA enzimi k<sub>cat</sub> değerleri sırasıyla 688.05, 1505.62, 1824.29 ve 1222.78 s<sup>-1</sup> olarak hesaplandı. Bununla birlikte, Karadeniz alabalığı dokularından saflaştırılan CA enzimi aktivitesi üzerine bazı ağır metal iyonlarının (Fe<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ag<sup>+</sup> ve Cu<sup>2+</sup>) inhibisyon etkileri esteraz metodu kullanılarak *in vitro* şartlarda incelendi. Enzim aktivitesinin %50'sinin inhibe edildiği metal konsantrasyonları (IC<sub>50</sub>) tüm dokulardan saflaştırılan CA enzimleri için belirlendi. Son olarak bu dokular için K<sub>i</sub> değerleri ve inhibisyon tipleri Lineweaver-Burk grafiklerinden hesaplandı.

**2015, 162 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Karadeniz alabalığı, *Salmo trutta* Labrax, enzim saflaştırma, enzim karakterizasyon, karbonik anhidraz, ağır metal

## ABSTRACT

Ph. D. Thesis

### PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF CARBONIC ANHYDRASE ENZYME FROM BLACK SEA TROUT (*Salmo trutta* Labrax) TISSUES AND INHIBITION EFFECTS OF SOME METAL IONS ON THE ENZYME ACTIVITY

Murat KÜÇÜK

Atatürk University  
Graduate School of Natural and Applied Science  
Department of Chemistry  
Subdivision of Biochemistry

Supervisor: Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

In this thesis, carbonic anhydrase (CA) enzyme was purified from black sea trout (*Salmo trutta* Labrax) kidney, liver, gills and muscle tissues with a specific activity of 603.77, 561.79, 1395.35 and 297.03 EU/mg and a yield of 35.5%, 18.6, 71.1 and 75,0% using Sepharose-4B-L-tyrosine-sulphanilamide affinity column chromatography, respectively. The overall purifications from black sea trout kidney, liver, gills and muscle tissues CA enzymes were approximately 349.00, 362.45, 1116.28 and 471.47 fold purified respectively.

For determination of enzyme purity and subunit molecular weights, SDS-gel electrophoresis was performed and single band was absorbed for each tissue. The subunit molecular weight of enzymes were evaluated as 29.71 kDa for kidney, 29.50 kDa for liver, 32.00 kDa for gills and 28.80 kDa for muscle tissues.

Optimum ionic strengths for CA enzymes from all tissues were obtained as 1 M Tris-SO<sub>4</sub> buffer. Optimum and stable pHs were determined 1 M Tris-SO<sub>4</sub> and phosphate buffers at 4°C. The optimum temperature, activation energy (E<sub>a</sub>), activation enthalpy (ΔH) and Q<sub>10</sub> values were obtained from Arrhenius plot for CA enzymes. Then K<sub>M</sub> and V<sub>max</sub> values for *p*-nitrophenylacetate of the purified enzymes were calculated from Lineweaver-Burk graphs. K<sub>cat</sub> values of the black sea trout's kidney, liver, gills and muscle tissues CA enzymes were calculated as 688.05, 1505.62, 1824.29 and 1222.78 s<sup>-1</sup> respectively. Also, the inhibitory effects of different heavy metal ions (Fe<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ag<sup>+</sup> ve Cu<sup>2+</sup>) on black sea trout CA enzyme activities were investigated by using esterase method under *in vitro* conditions. The heavy metal concentrations inhibiting 50% of enzyme activity (IC<sub>50</sub>) were obtained for CA enzymes from all tissues. Finally, K<sub>i</sub> values and inhibition types for these tissues were also calculated from Lineweaver-Burk graphs.

**2015, 162 pages**

**Keywords:** Black sea trout, *Salmo trutta* Labrax, enzyme purification, enzyme characterization, carbonic anhydrase, heavy metal

## TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu alışmamın deneysel işlemleri Atatürk Üniversitesi, Fen Fakóltesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Öncelikle çalışmalarımda bana her türlü yardım ve desteği esirgemeyen değerli hocam ve tez danışmanım Sayın Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN'e şükranlarımı sunarım.

Bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Atatürk Üniversitesi rektör yardımcısı ve Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU'na, Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. şükrü BEYDEMİR'e ve Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR'e teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince yardımlarını esirgeyemeyen laboratuvarıda çalışan arkadaşlarım Sayın Yrd. Doç. Dr. Meryem TOPAL, Sayın Uzm. Dr. Hülya GÖÇER, Sayın Öğr. Gör. Dr. Fevzi TOPAL ve Sayın Mesut IşIK başta olmak üzere Biyokimya Laboratuvarında bulunan bütün arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Deneyleerde kullandığımız balıkların tespit ve temininde yardımcı olan Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su Ürünleri Fakóltesi öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Davut TURAN ve Sayın Arř. Gör. Cüneyt KAYA'ya teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmalarım boyunca gösterdikleri sabır ve anlayıştan dolayı eşim ve çocuklarıma da çok teşekkür ederim.

**Murat KÜÇÜK**

**şubat 2015**

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xvi
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1. Karbonik Anhidraz Enzimi.....	9
1.2. Balıklarda Karbonik Anhidraz Enzimi.....	15
1.3. Ağır Metallerin Karbonik Anhidraz Enzimine Etkisi.....	17
1.4. Karadeniz Alabalığı ( <i>Salmo trutta</i> Labrax).....	25
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ.....</b>	<b>28</b>
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM.....</b>	<b>32</b>
3.1. Materyal.....	32
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	32
3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar.....	32
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması.....	33
3.2. Yöntemler.....	36
3.2.1. Karadeniz alabalığı dokularından karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu çalışmaları ile ilgili yöntemler.....	36
3.2.1.a. Sepharose-4B-L-tirozin sülfanilamit afinite kolonunun hazırlanması.....	36
3.2.1.b. Karadeniz alabalığı böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokularının temini ve homojenat hazırlanması.....	38
3.2.1.c. Karadeniz alabalığı böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokularıyla hazırlanan homojenatların afinite kolonuna tatbiki ve elüsyonu.....	38
3.2.1.d. Sodyum Dodesilsülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) ile enzim saflığının kontrolü ve molekül kütlesi tayini.....	39
3.3. Protein Tayini.....	41

3.3.1. Kalitatif protein tayini .....	41
3.3.2. Bradford yöntemi ile protein tayini .....	41
3.4. Karbonik Anhidraz Enziminin Aktivite Ölçümü .....	42
3.5. Karadeniz Alabalığı Dokularından Saflaştırılan CA Enzimi ile İlgili Yapılan Kinetik Çalışmalar .....	45
3.5.1. Karbonik anhidraz enzimi için optimum pH çalışması .....	45
3.5.2. Karbonik anhidraz enzimi için optimum iyonik şiddet çalışması .....	45
3.5.3. Karbonik anhidraz enziminin stabil olduğu pH'nın bulunması ile ilgili çalışmalar .....	45
3.5.4. Karadeniz alabalığı dokularından elde edilen CA enziminin optimum sıcaklığın, aktivasyon enerjisinin ( $E_a$ ), aktivasyon entalpisinin ( $\Delta H$ ) ve $Q_{10}$ değerlerinin hesaplanması ile ilgili çalışmalar .....	46
3.5.5. Karadeniz alabalığı dokularından elde edilen CA enziminin $K_M$ , $V_{max}$ , $k_{cat}$ ve $V_0$ değerlerinin bulunmasına yönelik çalışmalar .....	46
3.5.6. Bazı ağır metallerin Karadeniz alabalığı dokularından elde edilen CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin incelenmesi .....	47
3.5.7. Karadeniz alabalığı dokularından elde edilen CA enzimi için inhibitör etkisi gösteren ağır metallerin $K_i$ sabitlerinin ve inhibisyon türlerinin bulunması .....	48
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>	<b>49</b>
4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Grafik .....	49
4.2. Karadeniz Alabalığı Böbrek, Karaciğer, Solungaç ve Kas Dokularından Karbonik Anhidraz Enziminin Saflaştırılma ve Karakterizasyon Sonuçları .....	50
4.2.1. Karbonik anhidraz enziminin Sepharose-4B afinite kromatografisi ile saflaştırılma kademeleri .....	50
4.2.2. Sodyum Dodesilsülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) ile enzim saflığının kontrolü ve molekül kütlesinin tayini .....	53
4.3. Karadeniz Alabalığı Böbrek, Karaciğer, Solungaç ve Kas Dokularından Saflaştırılan CA Enzimi İle İlgili Yapılan Kinetik Çalışmalar .....	55
4.3.1. Karbonik anhidraz enzimi için optimum pH çalışması .....	55
4.3.2. Karadeniz alabalığı böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokuları CA enzimi için optimum iyonik şiddetinin belirlenmesi .....	60



4.3.3. Karbonik anhidraz enziminin stabil olduğu pH'nın bulunması ile ilgili çalışmalar .....	64
4.3.4. Karadeniz alabalığı böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokularından elde edilen CA enziminin optimum sıcaklığın, aktivasyon enerjisinin ( $E_a$ ), aktivasyon entalpisinin ( $\Delta H$ ) ve $Q_{10}$ değerlerinin hesaplanması ile ilgili çalışmalar .....	73
4.3.5. Karadeniz alabalığı dokularından elde edilen CA enziminin $K_M$ , $V_{max}$ , $k_{cat}$ ve $V_0$ değerlerinin bulunmasına yönelik çalışmalar.....	80
4.3.6. Bazı ağır metallerin Karadeniz alabalığı böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokularından elde edilen CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin incelenmesi .....	83
4.3.7. Karadeniz alabalığı böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokularından elde edilen CA enzimi için inhibitör etkisi gösteren ağır metallerin $K_i$ sabitlerinin ve inhibisyon türünün bulunması.....	105
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....</b>	<b>138</b>
KAYNAKLAR .....	155
ÖZGEÇMİŞ .....	163

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

E	Enzim
CA	Karbonik anhidraz enzimi
E.C	Enzim komisyon numarası
S	Substrat
P	Ürün
I	İnhibitör
ES	Enzim- substrat kompleksi
EI	Enzim-inhibitör kompleksi
ESI	Enzim-substrat-inhibitör kompleksi
EPI	Enzim-ürün-inhibitör kompleksi
R	Metil
Ph	Fenil
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin
Tris	Trihidroksimetilaminometan
CNBr	Siyanür bromür
PER	Amonyumpersülfat
TCA	Triklorasetikasit
M <sub>A</sub>	Molekül Kütlesi
Da	Dalton
$\lambda$	Dalga boyu
EU	Enzim ünitesi
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi
k	Hız sabiti
R	Arrhenius sabiti
°K	Kelvin derece sıcaklık
E <sub>a</sub>	Aktivasyon enerjisi
$\Delta H$	Aktivasyon entalpisi

$Q_{10}$	Aralarında 10°C sıcaklık farkı bulunan aktivite değerlerinden büyük olanın küçük olanına oranı
$K_m$	Enzimin substrata ilgisini belirten sabit
$V_{max}$	Maksimum hız
$k_{cat}$	Turnover sayısı
$V_o$	Özgüllük sabiti
$IC_{50}$	Enzim aktivitesi yarıya indiren inhibitör konsantrasyonu
$K_i$	İnhibitörün enzime ilgisini gösteren sabit

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Dönüşümsüz inhibisyonun şematik gösterimi .....	5
Şekil 1.2. Yarışmalı inhibisyon şematik gösterimi .....	6
Şekil 1.3. Yarışmasız inhibisyonun şematik gösterimi .....	7
Şekil 1.4. Yarı yarışmalı inhibisyonun gösterimi .....	7
Şekil 1.5. hCA II izoenziminin metal iyon merkezinin gösterimi .....	12
Şekil 1.6. Karbonik anhidraz enziminin CO <sub>2</sub> -hidratasyon reaksiyonunu kataliz mekanizmasının şematik olarak gösterilişi .....	13
Şekil 3.1. CNBr Sepharose 4B-L-tirozin afinite jelinin hazırlanmasındaki reaksiyonların basamakları .....	37
Şekil 4.1. Bradford yöntemi ile BSA kullanılarak protein tayini için hazırlanan standart grafik .....	49
Şekil 4.2. Karadeniz alabalığı böbrek dokusundan afinite kromatografisiyle saflaştırılan CA enziminin elüsyon tüplerindeki hidrataz aktivitesi ve 280 nm'deki absorbans değerleri .....	50
Şekil 4.3. Karadeniz alabalığı karaciğer dokusundan afinite kromatografisiyle saflaştırılan CA enziminin elüsyon tüplerindeki hidrataz aktivitesi ve 280 nm'deki absorbans değerleri .....	51
Şekil 4.4. Karadeniz alabalığı solungaç dokusundan afinite kromatografisiyle saflaştırılan CA enziminin elüsyon tüplerindeki hidrataz aktivitesi ve 280 nm'deki absorbans değerleri .....	52
Şekil 4.5. Karadeniz alabalığı kas dokusundan afinite kromatografisiyle saflaştırılan CA enziminin elüsyon tüplerindeki hidrataz aktivitesi ve 280 nm'deki absorbans değerleri .....	52
Şekil 4.7. SDS-PAGE yöntemiyle Karadeniz alabalığı böbrek, karaciğer ve kas dokuları CA enziminin molekül kütlesi tayininde kullanılan standart grafik .....	54
Şekil 4.8. Afinite kromatografisiyle saflaştırılan Karadeniz alabalığı kas CA enziminin SDS-PAGE fotoğrafı .....	54

<b>Şekil 4.9.</b> SDS-PAGE yöntemiyle Karadeniz alabalığı solungaç dokusu CA enziminin molekül kütlesi tayininde kullanılan standart grafik .....	55
<b>Şekil 4.10.</b> Karadeniz alabalığı böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin optimum pH'sını bulmak için 1 M potasyum fosfat ve 1 M Tris-SO <sub>4</sub> tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları .....	57
<b>Şekil 4.11.</b> Karadeniz alabalığı karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin optimum pH'sını bulmak için 1 M potasyum fosfat ve 1 M Tris-SO <sub>4</sub> tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları .....	58
<b>Şekil 4.12.</b> Karadeniz alabalığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enziminin optimum pH'sını bulmak için 1 M potasyum fosfat ve 1 M Tris-SO <sub>4</sub> tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları .....	59
<b>Şekil 4.13.</b> Karadeniz alabalığı kas dokusundan saflaştırılan CA enziminin optimum pH'sını bulmak için 1 M potasyum fosfat ve 1 M Tris-SO <sub>4</sub> tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları .....	60
<b>Şekil 4.14.</b> Karadeniz alabalığı böbrek dokusu için Tris-SO <sub>4</sub> tampon çözeltisi kullanılarak farklı iyonik şiddetlerde yapılan aktivite ölçüm sonuçları .....	61
<b>Şekil 4.15.</b> Karadeniz alabalığı karaciğer dokusu için Tris-SO <sub>4</sub> tampon çözeltisi kullanılarak farklı iyonik şiddetlerde yapılan aktivite ölçüm sonuçları .....	62
<b>Şekil 4.16.</b> Karadeniz alabalığı solungaç dokusu için Tris-SO <sub>4</sub> tampon çözeltisi kullanılarak farklı iyonik şiddetlerde yapılan aktivite ölçüm sonuçları .....	63
<b>Şekil 4.17.</b> Karadeniz alabalığı kas dokusu için Tris-SO <sub>4</sub> tampon çözeltisi kullanılarak farklı iyonik şiddetlerde yapılan aktivite ölçüm sonuçları .....	64
<b>Şekil 4.18.</b> Karadeniz alabalığı böbrek dokusu CA enziminin stabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 1 M Tris-SO <sub>4</sub> tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları .....	65
<b>Şekil 4.19.</b> Karadeniz alabalığı böbrek dokusu CA enziminin stabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 1 M potasyum fosfat tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları .....	66
<b>Şekil 4.20.</b> Karadeniz alabalığı karaciğer dokusu CA enziminin stabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 1 M Tris-SO <sub>4</sub> tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları .....	67

<b>Şekil 4.21.</b> Karadeniz alabalığı karaciğer dokusu CA enziminin stabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 1 M potasyum fosfat tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları .....	68
<b>Şekil 4.22.</b> Karadeniz alabalığı solungaç dokusu CA enziminin stabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 1 M Tris-SO <sub>4</sub> tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları .....	69
<b>Şekil 4.23.</b> Karadeniz alabalığı solungaç dokusu CA enziminin stabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 1 M potasyum fosfat tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları .....	70
<b>Şekil 4.24.</b> Karadeniz alabalığı kas dokusu CA enziminin stabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 1 M Tris-SO <sub>4</sub> tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları .....	71
<b>Şekil 4.25.</b> Karadeniz alabalığı kas dokusu CA enziminin stabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 1 M potasyum fosfat tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları .....	72
<b>Şekil 4.26.</b> Karadeniz alabalığı böbrek doku CA enziminin optimum sıcaklığını gösteren grafik.....	74
<b>Şekil 4.27.</b> Karadeniz alabalığı böbrek doku CA enziminin aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişim grafiği .....	74
<b>Şekil 4.28.</b> Karadeniz alabalığı karaciğer doku CA enziminin optimum sıcaklığını gösteren grafik.....	75
<b>Şekil 4.29.</b> Karadeniz alabalığı karaciğer doku CA enziminin aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişim grafiği .....	76
<b>Şekil 4.30.</b> Karadeniz alabalığı solungaç doku CA enziminin optimum sıcaklığını gösteren grafik.....	77
<b>Şekil 4.31.</b> Karadeniz alabalığı solungaç doku CA enziminin aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişim grafiği .....	77
<b>Şekil 4.32.</b> Karadeniz alabalığı kas doku CA enziminin optimum sıcaklığını gösteren grafik.....	78
<b>Şekil 4.33.</b> Karadeniz alabalığı kas doku CA enziminin aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişim grafiği.....	79

<b>Şekil 4.34.</b> Karadeniz alabalığı böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi için 5 farklı p-nitrofenil asetat konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiği .....	80
<b>Şekil 4.35.</b> Karadeniz alabalığı karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi için 5 farklı p-nitrofenil asetat konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiği ....	81
<b>Şekil 4.36.</b> Karadeniz alabalığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enzimi için 5 farklı p-nitrofenil asetat konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiği ....	81
<b>Şekil 4.37.</b> Karadeniz alabalığı kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi için 5 farklı p-nitrofenil asetat konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiği .....	82
<b>Şekil 4.38.</b> Karadeniz alabalığı böbrek dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine $Fe^{2+}$ iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- [ $Fe^{2+}$ ] grafiği.....	84
<b>Şekil 4.39.</b> Karadeniz alabalığı böbrek dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine $Pb^{2+}$ iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- [ $Pb^{2+}$ ] grafiği.....	85
<b>Şekil 4.40</b> Karadeniz alabalığı böbrek dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine $Co^{2+}$ iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- [ $Co^{2+}$ ] grafiği .....	86
<b>Şekil 4.41.</b> Karadeniz alabalığı böbrek dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine $Ag^+$ iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- [ $Ag^+$ ] grafiği .....	87
<b>Şekil 4.42.</b> Karadeniz alabalığı böbrek dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine $Cu^{2+}$ iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- [ $Cu^{2+}$ ] grafiği .....	88
<b>Şekil 4.43.</b> Karadeniz alabalığı karaciğer dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine $Fe^{2+}$ iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- [ $Fe^{2+}$ ] grafiği.....	89
<b>Şekil 4.44.</b> Karadeniz alabalığı karaciğer dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine $Pb^{2+}$ iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- [ $Pb^{2+}$ ] grafiği.....	90
<b>Şekil 4.45.</b> Karadeniz alabalığı karaciğer dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine $Co^{2+}$ iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- [ $Co^{2+}$ ] grafiği .....	91

<b>Şekil 4.46.</b> Karadeniz alabalığı karaciğer dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine $Ag^+$ iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[Ag^+]$ grafiği .....	92
<b>Şekil 4.47.</b> Karadeniz alabalığı karaciğer dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine $Cu^{2+}$ iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[Cu^{2+}]$ grafiği .....	93
<b>Şekil 4.48.</b> Karadeniz alabalığı solungaç dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine $Fe^{2+}$ iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[Fe^{2+}]$ grafiği .....	95
<b>Şekil 4.49.</b> Karadeniz alabalığı solungaç dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine $Pb^{2+}$ iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[Pb^{2+}]$ grafiği.....	96
<b>Şekil 4.50.</b> Karadeniz alabalığı solungaç dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine $Co^{2+}$ iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[Co^{2+}]$ grafiği .....	97
<b>Şekil 4.51.</b> Karadeniz alabalığı solungaç dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine $Ag^+$ iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[Ag^+]$ grafiği .....	98
<b>Şekil 4.52.</b> Karadeniz alabalığı solungaç dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine $Cu^{2+}$ iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[Cu^{2+}]$ grafiği .....	99
<b>Şekil 4.53.</b> Karadeniz alabalığı kas dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine $Fe^{2+}$ iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[Fe^{2+}]$ grafiği.....	100
<b>Şekil 4.54.</b> Karadeniz alabalığı kas dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine $Pb^{2+}$ iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[Pb^{2+}]$ grafiği.....	101
<b>Şekil 4.55.</b> Karadeniz alabalığı kas dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine $Co^{2+}$ iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[Co^{2+}]$ grafiği .....	102



<b>Şekil 4.56.</b> Karadeniz alabalığı kas dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine $Ag^+$ iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[Ag^+]$ grafiği .....	103
<b>Şekil 4.57.</b> Karadeniz alabalığı kas dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine $Cu^{2+}$ iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[Cu^{2+}]$ grafiği .....	104
<b>Şekil 4.58.</b> Karadeniz alabalığı böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine $Fe^{2+}$ iyonunun etkisi .....	111
<b>Şekil 4.59.</b> Karadeniz alabalığı böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine $Pb^{2+}$ iyonunun etkisi .....	111
<b>Şekil 4.60.</b> Karadeniz alabalığı böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine $Co^{2+}$ iyonunun etkisi.....	111
<b>Şekil 4.61.</b> Karadeniz alabalığı böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine $Ag^+$ iyonunun etkisi.....	112
<b>Şekil 4.62.</b> Karadeniz alabalığı böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine $Cu^{2+}$ iyonunun etkisi.....	112
<b>Şekil 4.63.</b> Karadeniz alabalığı karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine $Fe^{2+}$ iyonunun etkisi .....	119
<b>Şekil 4.64.</b> Karadeniz alabalığı karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine $Pb^{2+}$ iyonunun etkisi .....	119
<b>Şekil 4.65.</b> Karadeniz alabalığı karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine $Co^{2+}$ iyonunun etkisi.....	119
<b>Şekil 4.66.</b> Karadeniz alabalığı karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine $Ag^+$ iyonunun etkisi.....	120
<b>Şekil 4.67.</b> Karadeniz alabalığı karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine $Cu^{2+}$ iyonunun etkisi.....	120
<b>Şekil 4.68.</b> Karadeniz alabalığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine $Fe^{2+}$ iyonunun etkisi .....	127
<b>Şekil 4.69.</b> Karadeniz alabalığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine $Pb^{2+}$ iyonunun etkisi .....	127
<b>Şekil 4.70.</b> Karadeniz alabalığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine $Co^{2+}$ iyonunun etkisi.....	128

<b>Şekil 4.71.</b> Karadeniz alabalığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine $Ag^+$ iyonunun etkisi.....	128
<b>Şekil 4.72.</b> Karadeniz alabalığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine $Cu^{2+}$ iyonunun etkisi.....	128
<b>Şekil 4.73.</b> Karadeniz alabalığı kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine $Fe^{2+}$ iyonunun etkisi .....	135
<b>Şekil 4.74.</b> Karadeniz alabalığı kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine $Pb^{2+}$ iyonunun etkisi .....	135
<b>Şekil 4.75.</b> Karadeniz alabalığı kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine $Co^{2+}$ iyonunun etkisi.....	135
<b>Şekil 4.76.</b> Karadeniz alabalığı kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine $Ag^+$ iyonunun etkisi.....	136
<b>Şekil 4.77.</b> Karadeniz alabalığı kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine $Cu^{2+}$ iyonunun etkisi.....	136

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 1.1.</b> Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyon türleri .....	10
<b>Çizelge 3.1.</b> Karadeniz alabalığı dokularından saflaştırılan CA enzimi aktivitesine karşı inhibitör özelliği gösteren ağır metallerin stok çözeltileri .....	35
<b>Çizelge 3.2.</b> Karbonik anhidraz enziminin hidrataz aktivitesi ölçümü için kullanılan çözeltiler ve miktarları .....	43
<b>Çizelge 3.3.</b> Karbonik anhidraz enziminin esteraz aktivitesi ölçümü için kullanılan çözeltiler ve miktarları .....	44
<b>Çizelge 4.1.</b> Karadeniz alabalığı böbrek dokusundan CA enziminin saflaştırma sonuçları.....	51
<b>Çizelge 4.2.</b> Karadeniz alabalığı karaciğer dokusundan CA enziminin saflaştırma sonuçları.....	51
<b>Çizelge 4.3.</b> Karadeniz alabalığı solungaç dokusundan CA enziminin saflaştırma sonuçları.....	52
<b>Çizelge 4.4.</b> Karadeniz alabalığı kas dokusundan CA enziminin saflaştırma sonuçları.....	53
<b>Çizelge 4.5.</b> Karadeniz alabalığı böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokuları CA enzimi için SDS-PAGE ile molekül kütleleri tayini sonuçları .....	55
<b>Çizelge 4.6.</b> Karadeniz alabalığı böbrek dokusu CA enziminin optimum pH'sı için 1 M potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	56
<b>Çizelge 4.7.</b> Karadeniz alabalığı böbrek dokusu CA enziminin optimum pH'sı için 1 M Tris-SO <sub>4</sub> tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	56
<b>Çizelge 4.8.</b> Karadeniz alabalığı karaciğer dokusu CA enziminin optimum pH'sı için 1 M potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	57

<b>Çizelge 4.9.</b> Karadeniz alabalığı karaciğer dokusu CA enziminin optimum pH'sı için 1 M Tris-SO <sub>4</sub> tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	57
<b>Çizelge 4.10.</b> Karadeniz alabalığı solungaç dokusu CA enziminin optimum pH'sı için 1 M potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları .....	58
<b>Çizelge 4.11.</b> Karadeniz alabalığı solungaç dokusu CA enziminin optimum pH'sı için 1 M Tris-SO <sub>4</sub> tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları .....	58
<b>Çizelge 4.12.</b> Karadeniz alabalığı kas dokusu CA enziminin optimum pH'sı için 1 M potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları .....	59
<b>Çizelge 4.13.</b> Karadeniz alabalığı kas dokusu CA enziminin optimum pH'sı için 1 M Tris-SO <sub>4</sub> tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları .....	59
<b>Çizelge 4.14.</b> Karadeniz alabalığı böbrek dokusu için Tris-SO <sub>4</sub> tampon çözeltisi kullanılarak farklı iyonik şiddetlerde yapılan aktivite ölçüm sonuçları ...	61
<b>Çizelge 4.15.</b> Karadeniz alabalığı karaciğer dokusu için Tris-SO <sub>4</sub> tampon çözeltisi kullanılarak farklı iyonik şiddetlerde yapılan aktivite ölçüm sonuçları ...	61
<b>Çizelge 4.16.</b> Karadeniz alabalığı solungaç dokusu için Tris-SO <sub>4</sub> tampon çözeltisi kullanılarak farklı iyonik şiddetlerde yapılan aktivite ölçüm sonuçları ...	62
<b>Çizelge 4.17.</b> Karadeniz alabalığı kas dokusu için Tris-SO <sub>4</sub> tampon çözeltisi kullanılarak farklı iyonik şiddetlerde yapılan aktivite ölçüm sonuçları ...	63
<b>Çizelge 4.18.</b> Karadeniz alabalığı böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin stabil pH'sı için 1 M Tris-SO <sub>4</sub> tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları .....	65
<b>Çizelge 4.19.</b> Karadeniz alabalığı böbrek dokusu CA enziminin stabil pH'sı için 1 M potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları .....	66
<b>Çizelge 4.20.</b> Karadeniz alabalığı karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin stabil pH'sı için 1 M Tris-SO <sub>4</sub> tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları .....	67

<b>Çizelge 4.21.</b> Karadeniz alabalığı karaciğer dokusu CA enziminin stabil pH'sı için 1 M potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları .....	68
<b>Çizelge 4.22.</b> Karadeniz alabalığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enziminin stabil pH'sı için 1 M Tris-SO <sub>4</sub> tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları .....	69
<b>Çizelge 4.23.</b> Karadeniz alabalığı solungaç dokusu CA enziminin stabil pH'sı için 1 M potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları .....	70
<b>Çizelge 4.24.</b> Karadeniz alabalığı kas dokusundan saflaştırılan CA enziminin stabil pH'sı için 1 M Tris-SO <sub>4</sub> tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları .....	71
<b>Çizelge 4.25.</b> Karadeniz alabalığı kas dokusu CA enziminin stabil pH'sı için 1 M potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları .....	72
<b>Çizelge 4.26.</b> Karadeniz alabalığı böbrek dokusu için değişik sıcaklıklardaki aktivite değerleri .....	73
<b>Çizelge 4.27.</b> Karadeniz alabalığı karaciğer dokusu için değişik sıcaklıklardaki aktivite değerleri .....	75
<b>Çizelge 4.28.</b> Karadeniz alabalığı solungaç dokusu için değişik sıcaklıklardaki aktivite değerleri .....	76
<b>Çizelge 4.29.</b> Karadeniz alabalığı kas dokusu için değişik sıcaklıklardaki aktivite değerleri .....	78
<b>Çizelge 4.30.</b> Karadeniz alabalığı böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokuları CA enzimi için optimum sıcaklık, E <sub>a</sub> , ΔH ve Q <sub>10</sub> değerleri .....	79
<b>Çizelge 4.31.</b> Karadeniz alabalığının böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimleri için p-nitrofenilasetat substratı ile K <sub>M</sub> , V <sub>max</sub> , k <sub>cat</sub> ve V <sub>0</sub> değerlerinin sonuçları .....	82
<b>Çizelge 4.32.</b> Karadeniz alabalığı böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine Fe <sup>2+</sup> iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri .....	83

<b>Çizelge 4.33.</b> Karadeniz alabalığı böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine $Pb^{2+}$ iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri.....	84
<b>Çizelge 4.34.</b> Karadeniz alabalığı böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine $Co^{2+}$ iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri.....	85
<b>Çizelge 4.35.</b> Karadeniz alabalığı böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine $Ag^+$ iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri.....	86
<b>Çizelge 4.36.</b> Karadeniz alabalığı böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine $Cu^{2+}$ iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri.....	87
<b>Çizelge 4.37.</b> Karadeniz alabalığı böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine metal iyonları ile yapılan çalışmalarda elde edilen $IC_{50}$ değerleri.....	88
<b>Çizelge 4.38.</b> Karadeniz alabalığı karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine $Fe^{2+}$ iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri.....	89
<b>Çizelge 4.39.</b> Karadeniz alabalığı karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine $Pb^{2+}$ iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri.....	90
<b>Çizelge 4.40.</b> Karadeniz alabalığı karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine $Co^{2+}$ iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri.....	91
<b>Çizelge 4.41.</b> Karadeniz alabalığı karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine $Ag^+$ iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri.....	92
<b>Çizelge 4.42.</b> Karadeniz alabalığı karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine $Cu^{2+}$ iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri.....	93

<b>Çizelge 4.43.</b> Karadeniz alabalığı'nın karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine metal iyonları ile yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen IC <sub>50</sub> değerleri .....	94
<b>Çizelge 4.44.</b> Karadeniz alabalığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine Fe <sup>2+</sup> iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri .....	94
<b>Çizelge 4.45.</b> Karadeniz alabalığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine Pb <sup>2+</sup> ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri .....	95
<b>Çizelge 4.46.</b> Karadeniz alabalığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine Co <sup>2+</sup> ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri .....	96
<b>Çizelge 4.47.</b> Karadeniz alabalığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine Ag <sup>+</sup> ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri .....	97
<b>Çizelge 4.48.</b> Karadeniz alabalığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine Cu <sup>2+</sup> iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri .....	98
<b>Çizelge 4.49.</b> Karadeniz alabalığı'nın solungaç dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine metal iyonları ile yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen IC <sub>50</sub> değerleri .....	99
<b>Çizelge 4.50.</b> Karadeniz alabalığı kas dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine Fe <sup>2+</sup> iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri .....	100
<b>Çizelge 4.51.</b> Karadeniz alabalığı kas dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine Pb <sup>2+</sup> iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri .....	101
<b>Çizelge 4.52.</b> Karadeniz alabalığı kas dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine Co <sup>2+</sup> iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri .....	102

<b>Çizelge 4.53.</b> Karadeniz alabalığı kas dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine $Ag^+$ iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri.....	103
<b>Çizelge 4.54.</b> Karadeniz alabalığı kas dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine $Cu^{2+}$ iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri.....	104
<b>Çizelge 4.55.</b> Karadeniz alabalığının kas dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine metal iyonları ile yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen $IC_{50}$ değerleri.....	105
<b>Çizelge 4.56.</b> Karadeniz alabalığı böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine $Fe^{2+}$ iyonunun $K_i$ değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	106
<b>Çizelge 4.57.</b> Karadeniz alabalığı böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine $Pb^{2+}$ iyonunun $K_i$ değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	107
<b>Çizelge 4.58.</b> Karadeniz alabalığı böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine $Co^{2+}$ iyonunun $K_i$ değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	108
<b>Çizelge 4.59.</b> Karadeniz alabalığı böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine $Ag^+$ iyonunun $K_i$ değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	109
<b>Çizelge 4.60.</b> Karadeniz alabalığı böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine $Cu^{2+}$ iyonunun $K_i$ değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	110
<b>Çizelge 4.61.</b> Karadeniz alabalığı böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi için 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan $K_i$ değerleri ve inhibisyon tipleri.....	113



<b>Çizelge 4.62.</b> Karadeniz alabalığı karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine $Fe^{2+}$ iyonunun $K_i$ değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	114
<b>Çizelge 4.63.</b> Karadeniz alabalığı karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine $Pb^{2+}$ iyonunun $K_i$ değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	115
<b>Çizelge 4.64.</b> Karadeniz alabalığı karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine $Co^{2+}$ iyonunun $K_i$ değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	116
<b>Çizelge 4.65.</b> Karadeniz alabalığı karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine $Ag^+$ iyonunun $K_i$ değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	117
<b>Çizelge 4.66.</b> Karadeniz alabalığı karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine $Cu^{2+}$ iyonunun $K_i$ değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	118
<b>Çizelge 4.67.</b> Karadeniz alabalığı karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi için 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan $K_i$ değerleri ve inhibisyon tipleri.....	121
<b>Çizelge 4.68.</b> Karadeniz alabalığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine $Fe^{2+}$ iyonunun $K_i$ değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	122
<b>Çizelge 4.69.</b> Karadeniz alabalığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine $Pb^{2+}$ iyonunun $K_i$ değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	123

<b>Çizelge 4.70.</b> Karadeniz alabalığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine $\text{Co}^{2+}$ iyonunun $K_i$ değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	124
<b>Çizelge 4.71.</b> Karadeniz alabalığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine $\text{Ag}^+$ iyonunun $K_i$ değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	125
<b>Çizelge 4.72.</b> Karadeniz alabalığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine $\text{Cu}^{2+}$ iyonunun $K_i$ değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	126
<b>Çizelge 4.73.</b> Karadeniz alabalığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enzimi için 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan $K_i$ değerleri ve inhibisyon tipleri.....	129
<b>Çizelge 4.74.</b> Karadeniz alabalığı kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine $\text{Fe}^{2+}$ iyonunun $K_i$ değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	130
<b>Çizelge 4.75.</b> Karadeniz alabalığı kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine $\text{Pb}^{2+}$ iyonunun $K_i$ değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	131
<b>Çizelge 4.76.</b> Karadeniz alabalığı kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine $\text{Co}^{2+}$ iyonunun $K_i$ değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	132
<b>Çizelge 4.77.</b> Karadeniz alabalığı kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine $\text{Ag}^+$ iyonunun $K_i$ değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	133

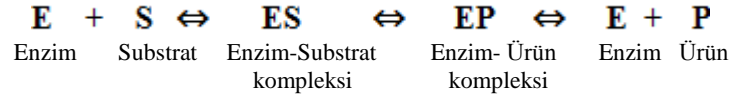
<b>Çizelge 4.78.</b> Karadeniz alabalığı kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine $Cu^{2+}$ iyonunun $K_i$ değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	134
<b>Çizelge 4.79.</b> Karadeniz alabalığı kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi için 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan $K_i$ değerleri ve inhibisyon tipleri.....	137
<b>Çizelge 5.2.</b> Karadeniz alabalığı karaciğer dokusu CA enzimi için elde edilen sonuçlar.....	152
<b>Çizelge 5.3.</b> Karadeniz alabalığı solungaç dokusu CA enzimi için elde edilen sonuçlar.....	153
<b>Çizelge 5.4.</b> Karadeniz alabalığı kas dokusu CA enzimi için elde edilen sonuçlar.....	154

## 1. GİRİŞ

Kimya laboratuvarlarında günlerce sürecektir bir sentez, canlı organizmalarda, seri haldeki reaksiyonlarla, enzimler tarafından saniyenin binde biri kadar bir süre içerisinde gerçekleşebilir. Mesela bir *E. coli* hücresinde üç basit molekülden (su, amonyak, ve glikoz) binlerce çeşit kompleks organik bileşik sentezlenmektedir. Bu olayda bir kimyagerin rüyasında bile göremeyeceği bir maharet sergilenmektedir. Eğer bir kimyagerden aynı maddeleri kullanarak bir amino asit veya lipidin tek bir kap içinde sentezi istense, kesinlikle bu zor işe kalkışmayacaktır. Çünkü bir kap içinde yalnız bir tek reaksiyon gerçekleşebilir ve yukarıdaki başlangıç maddelerinden istenilen sentezlerin yapılabilmesi de yüzden fazla reaksiyonla mümkün olur. Fakat *E.coli* hücresini bir kap kabul etsek, yaklaşık 7000 çeşit organik bileşik, basit su, amonyak ve glukozdan 20 dakika içinde bir arada yapılmaktadır. Bu işlemler, bu kadar kısa sürede ve düzenli olarak metabolizma içerisinde biyolojik katalizörler olan enzimler tarafından gerçekleşmektedir (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Enzimler, canlı hücreler tarafından sentezlenen ve canlı organizmalardaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürün oluşmasına fırsat vermeden %100'lük ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu hariç enzimler protein yapısındadır. Enzimler proteinlerin en büyük ve en özelleşmiş grubunu teşkil ederler (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Enzim kullanılan bir tepkimenin ayırt edici özelliği, aktif bölge olarak adlandırılan enzim üzerindeki sınırlanmış bir bölgenin içinde meydana gelmesidir. Enzimin aktif bölgesine bağlanan ve enzimin üzerinde aktivite gösterdiği moleküle substrat denir. Aktif bölge yüzeyi, yan grupları substrata bağlanan ve bunun kimyasal dönüşümünü katalizleyen amino asit kalıntılarıyla oluşmuştur. Enzimin aktif bölgesinin substrata bağlanması ile oluşan enzim-substrat kompleksi (ES) ilk olarak enzim ürün kompleksine (EP), sonra da serbest enzim (E) ve ürüne (P) dönüşmektedir (Onat ve Emerk 1997; Lehninger 2005).



ES enzimin substratla EP ise ürünle oluşturduğu geçiş komplekstir. ES hem enzim aktivitesinde merkezi bir rol oynar hem de enzim mekanizmalarının tanımlanması ve enzimle katalizlenen tepkimelerin kinetik davranışlarının anlaşılması için bir başlangıç noktası oluşturur (Lehninger 2005).

Enzimlerin katalizleme güçleri turnover sayısı ile ifade edilir. Turnover sayısı, birim zamanda bir mol enzimin ürüne dönüştürdüğü substratın mol sayısıdır. Karbonik anhidraz turnover sayısı  $600.000 \text{ s}^{-1}$  olan enzimdir. Turnover sayısı en yüksek olan enzim  $40.000.000 \text{ s}^{-1}$  ile katalazdır (Lehninger 2005; Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Enzimler reaksiyonların gerçekleşmesi için gereken aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyonları  $10^5$ – $10^{17}$  kat hızlandırırlar. Böylece enzimler laboratuvar şartlarında gerçekleşmesi çok zaman alan ve birçok basamağa ihtiyaç duyan, bazen de yüksek sıcaklık, basınç, aşırı bazik ve asidik ortam gerektiren reaksiyonların, hücre içi şartlarda birkaç saniye gibi çok kısa bir zamanda meydana gelmesini sağlar. Örneğin üreaz enziminin, üreyi  $\text{NH}_3$  ve  $\text{CO}_2$ 'e parçaladığı reaksiyon enzim varlığında  $10^{14}$  kat hızlanmaktadır (Alver 1997; Lehninger 2005).

Enzimlerin isimlendirmesi ile ilgili yapılan ilk çalışmalarda enzimin etki ettiği substrat adının sonuna (-az) eki getirilerek (üreaz, lipaz, fosfataz vb.) veya genel adlarıyla (pepsin, tripsin) yapılırken, günümüzde Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB) tarafından yapılan sistematik sınıflandırmaya göre isimlendirilmektedir. Bu sınıflandırmada her enzim dört rakamlı bir kod numarası ile (E.C.) tanımlanmıştır. Bu dört rakamdan birincisi enzimin bağlı bulunduğu grubu, ikinci rakam alt grubu, üçüncü rakam daha alt grubu ve son rakam ise ilk üç numarası aynı olan enzimler arasındaki sırayı ifade eder (Bingöl 1983; Tekman ve Öner 1986; Lehninger 2005; Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Enzimler etki ettiği reaksiyon tiplerine ve reaksiyon mekanizmalarına göre Şu Şekilde sınıflandırılmıŐtır;

- 1. Oksidoredüktazlar:** Yükseltgenme ve indirgenme (redoks) reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.
- 2. Transferazlar:** İki substrat molekülü arasında hidrojen dıŐındaki grupların transferini sağlayan enzimlerdir.
- 3. Hidrolazlar:** Su katılmasıyla peptid, glikozid, ester gibi bağların koparıldığı hidroliz reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.
- 4. Liyazlar:** Hidrolizden farklı bir mekanizma ile substratlardan grupların uzaklaŐtırıldıđı ve yeni çift bağların oluŐturulduđu reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir.
- 5. İzomerazlar:** İzomer molekülleri birbirine dönüştüren reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir.
- 6. Ligazlar:** Enerjice zengin bir bağın kopması ile açığa çıkan enerji yardımıyla iki molekülün bağlanması reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.

Enzimlerin en önemli özellikleri katalizleme güçleri ve spesifiklik olmalarıdır. Bazı enzimler katalizleme fonksiyonlarını yalnız protein yapılarıyla yerine getirebilirken, diğer bir kısmı bu görev için ya bir metal iyonu veya organik bir bileŐiđe ihtiyaç duyarlar. Kofaktör olarak bilinen bu yapılar enzimin protein kısmına farklı kuvvetlerle tutunmuş haldedirler. Bir proteinin işlevi için gerekli tüm yardımcı faktörleri içeren yapıya, holoenzim; kofaktrlerini kaybetmiŐ yalnızca protein kısmını içeren kısmı ise apoenzim olarak adlandırılır (Altan 2000).

Enzimler substratlarına ve katalizledikleri reaksiyon tiplerine son derece spesifiktir. Genellikle bir enzim sadece bir kimyasal reaksiyonu veya aynı tip benzer reaksiyonları katalizler. Örneğin, proteolitik enzimler peptid bağlarının hidrolizini gerçekleŐtirirler. Bu enzimlerin substrat özgüllükleri birbirinden farklıdır. Tripsin sadece lisin veya arginin rezdlerinin karboksil grubu tarafındaki peptid bağlarını parçalar. Birçok enzimin sterospesifiklik özelliği de vardır. Bazı enzimler substrat molekülünün D-formunu

ürüne çevirirlerken, bir kısmı da L- formunu ürüne dönüştüren tepkimeyi katalizlemektedir. Örneğin, glutamat 3-dehidrogenaz enzimi L-glutamat ve laktat dehidrogenaz enzimi ise L-laktat üzerinde etkilidir ve D-formunu etkilemez. Bazen enzimler bir grubu oluşturan substratlara etki ederler. Örneğin “hekzokinazlar” grup özgülüğü gösteren enzimler olup heksozların fosforilasyonunu sağlarlar. Enzimlerin bazıları ise belirli bir bağ ihtiva eden birçok maddelere etki ederler. Örneğin esterazlar birçok ester bağlarını parçaladıkları halde peptit bağlarını ihtiva eden proteinleri hidrolizlemezler (Lehninger 2005; Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Ayrıca aynı canlı türünde aynı reaksiyonu katalizleyen ancak farklı fiziksel ve kimyasal özellikleri olan enzimler de vardır. Bu tip enzimlere izoenzim denir. İzoenzimlerin substratlarına, kofaktörlerine ve inhibitörlerine karşı ilgileri farklıdır. İzoenzimlerin başlıca özellikleri arasında aminoasit dizilişlerinin farklı olması, izoelektrik noktalarının farklı olması, herbir izoenzimin farklı geninin olması ve inhibitörlere afinitelerinin farklı olması sayılabilir. İzoenzimler farklı dokularda lokalize olabildiği gibi, bir hücrenin farklı subsellüler fraksiyonlarında da yerleşebilirler. İzoenzimlere bu tez kapsamında çalışılan karbonik anhidraz örnek olarak verilebilir (Devlin 2002).

Bir doku ekstraktı içindeki enzimin miktarı, aktiviteleri esas alınarak belirlenir ve enzim ünitesi (EÜ) cinsinden verilir. 25°C’de ve optimal şartlarda 1 mikromol substratı 1 dakikada ürüne dönüştüren enzim miktarı 1 enzim ünitesi olarak kabul edilir. Enzimin saflığının diğer bir ölçüsü ise spesifik aktivitedir. Spesifik aktivite, mg protein başına düşen enzim ünitesi olarak tanımlanır (Lehninger 2005; Bingöl 1983).

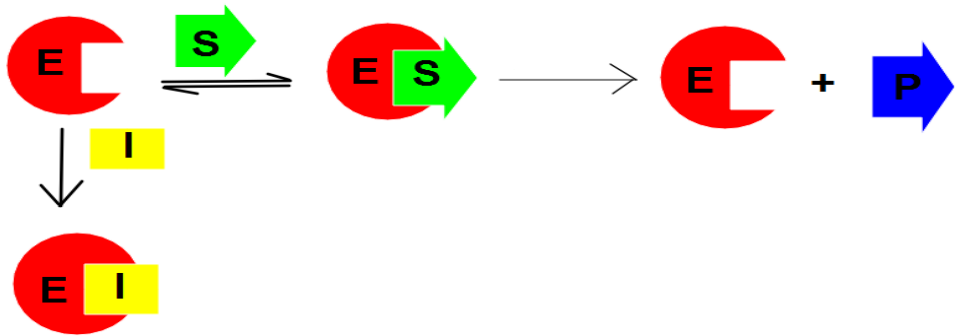
Enzimlerin aktivitelerini arttıran bileşiklere aktivatör adı verilir. Genellikle aktivatörler küçük iyonlar ya da fazla büyük olmayan moleküllerdir (Gözükara 1989). Bazı bileşikler tarafından enzimlerin hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak aktivitelerinin azaltılmasına hatta yok edilmesine inhibisyon, buna sebep olan bileşiklere de inhibitör denilir. İnhibitörler, genellikle küçük mol ağırlığına sahip bileşik ya da iyonlardır. İnhibitörler enzimin aktif bölgesine ya da aktif bölge dışında bir kısmına bağlanarak etkilerini gösterirler. Enzimatik aktivitenin inhibisyonu, biyolojik sistemlerde başlı

başına bir kontrol mekanizması oluşturur. Birçok ilaç ve toksik maddeler enzimler üzerinde etkilerini bu şekilde gösterir. Örneğin aspirin ağrıya sebep olan prostaglandinlerin sentezindeki ilk basamağı katalizleyen enzimi inhibe eder. İnhibitörler hem enzim etki mekanizmalarının hem de metabolik yolların aydınlatılmasında biyokimyacılar için önemli bir araçtır (Keha ve Küfrevioğlu 2009; Lehninger 2005).

Enzimatik inhibisyon iki türlüdür;

- Dönüşümsüz inhibisyon
- Dönüşümlü inhibisyon

**1-Dönüşümsüz inhibisyon:** Bu inhibisyon türünde inhibitör enzime ya kovalent olarak bağlanır ya da zor ayrılabilen bir kompleks oluşturur. Sinir uyarılarının iletilmesinde önemli bir rol oynayan asetil kolin esteraz enziminin, sinir gazı zehirleri tarafından inhibisyonu buna iyi bir örnektir. Dönüşümsüz inhibisyonda  $V_{max}$  (enzimatik reaksiyonun ulaşabileceği maksimum hız) azalır,  $K_M$  ise (enzimin substrata ilgisini gösteren sabit) değişmeden kalır (Segel 1975; Keha ve Küfrevioğlu 2009).

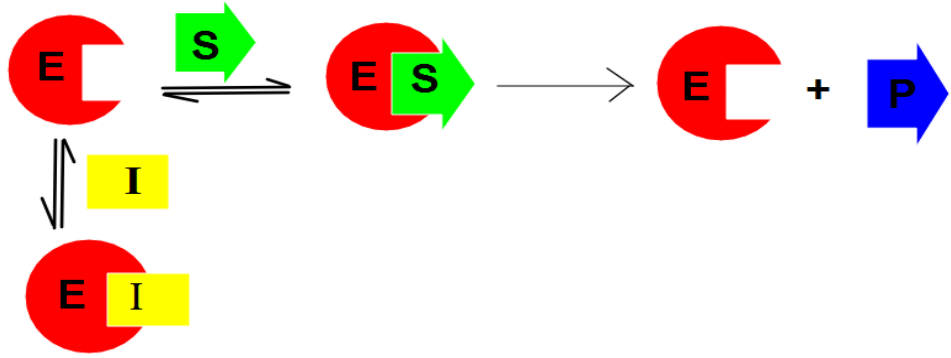


Şekil 1.1. Dönüşümsüz inhibisyonun şematik gösterimi

**2-Dönüşümlü İnhibisyon:** Dönüşümlü inhibisyonda enzim ile inhibitörün etkileşmesi bir denge tepkimesi şeklindedir. Dönüşümlü inhibisyon: Yarışmalı (kompetitif), yarışmasız (nonkompetitif) ve yarıyarışmalı (unkompetitif) olmak üzere üç grupta incelenir;

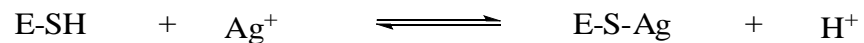


**a-Yarışmalı (Kompetitif) İnhibisyon:** Dönüşümlü inhibisyonun en basit türü yarışmalı inhibisyondur. Yarışmalı inhibitör yapı itibariyle substrata benzer ve enzimin aktif bölgesine bağlanarak substratın enzime bağlanmasını engeller. Böylece substrat ile inhibitör enzimin aktif bölgesine bağlanmak için bir tür yarış haline girerler. İnhibitör enzime dönüşümlü bağlandığı için substrat konsantrasyonu arttırıldığında inhibitörün inhibisyon etkisi ortadan kaldırılabilir. Bundan dolayı enzimin  $V_{max}$  değeri değişmezken,  $K_M$  değeri artar (Segel 1975; Telefoncu 1986; Keha ve Küfrevioğlu 2009).

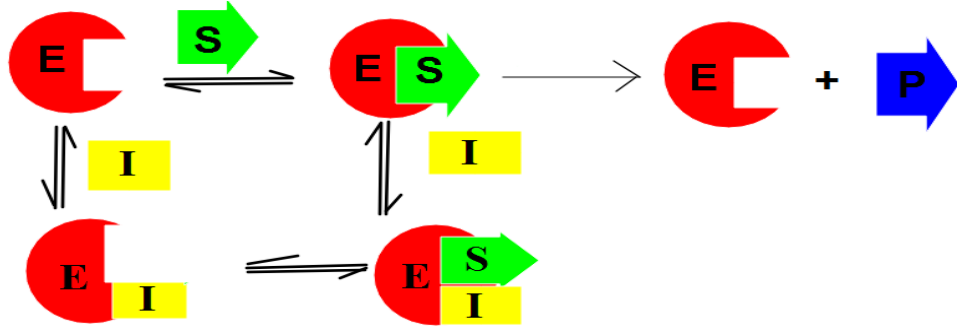


**Şekil 1.2.** Yarışmalı inhibisyon şematik gösterimi

**b-Yarışmasız (Nonkompetitif) İnhibisyon:** Yarışmasız inhibisyonda; inhibitör ve substrat enzim molekülüne aynı anda bağlanabilir. Bu tür bağlanma enzimin farklı bölgelerine olduğundan substrat ile inhibitör arasında yarışma söz konusu değildir. Substrat konsantrasyonu artırılmakla inhibisyonun kaldırılamaz. Yarışmasız bir inhibitör etkisini; enzimin turnover sayısını, yani katalitik aktivitesini düşürerek gösterir. Enzimin  $V_{max}$  değeri azalırken,  $K_M$  değeri sabit kalır. Substrat ve inhibitör farklı bölgelere bağlanabildiğinden, enzimin EI ve ESI olmak üzere iki farklı inaktif kompleksi meydana gelir. Yarışmasız inhibisyona örnek olarak enzimlerin sülfidril ( $-SH$ ) gruplarına bazı ağır metal iyonlarının merkaptan oluşturacak şekilde dönüşümlü olarak bağlanması verilebilir (Telefoncu 1986; Keha ve Küfrevioğlu 2009).

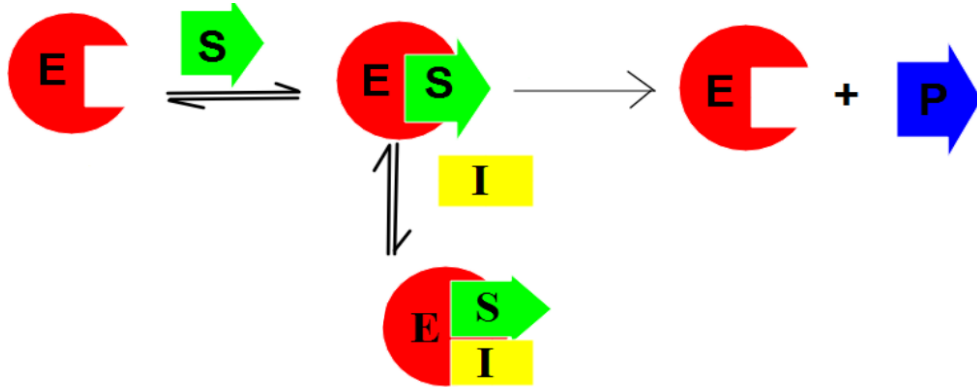


Burada -SH grubu aktif bölgede bulunabildiği gibi, enzimin üç boyutlu yapısının oluşumunda etkili olan bir bölgesinde de yer alabilir.



Şekil 1.3. Yarışmasız inhibisyonun şematik gösterimi

**c-Yarı Yarışmalı (Unkompetitif) İnhibisyon:** Bu inhibisyon türünde; inhibitör serbest haldeki enzime değil de, ES kompleksine bağlanır. Bunun için tek substratlı sistemlerde, yarı yarışmalı inhibisyon az görülür. Birden fazla substratlı enzimlerde bu inhibisyon tipine daha çok rastlanır. ESI kompleksi ortamda sürekli olarak var olacağından, yarı yarışmalı inhibitör varlığında  $V_{max}$  azalır. ESI kompleksinin oluşmasıyla ES kompleksi ortamdan sürekli azalacağından, enzim ve substrattan ES kompleksinin oluşum dengesi daha fazla sağa kayar ve  $K_M$  değeri küçülür (Segel 1975; Telefoncu 1986).



Şekil 1.4. Yarı yarışmalı inhibisyonun gösterimi

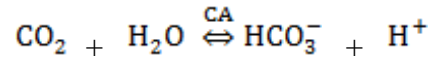
Birçok multienzim sistemi, reaksiyon hızlarını düzenleme kapasitesine sahiptir. Bu sistemlerin çoğunda, seri reaksiyonun son ürünü belirli bir konsantrasyona ulaştığında sistemin ilk enzimini veya dallanma noktasındaki enzimi inhibe eder. Bu enzimlere allosterik enzim, bu olaya da feed-back (geri besleme) inhibisyonu denir. Birden fazla polipeptid zinciri ihtiva eden allosterik enzimlerde; inhibitörlerin enzime bağlanmasıyla, değişik alt birimlerin bağlanma merkezleri arasındaki etkileşmelerle allosterik inhibisyon meydana gelir. Allosterik enzimleri etkileyen bileşiklere modülatör adı verilir. Allosterik enzimlerin kinetiği, sigmoidal grafikler gösterdiğinden Michaelis-Menten kinetiğinden farklıdır (Stryer 1988).

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

Canlı organizmaların en önemli ihtiyaçlarından biri dokulardan kana geçen  $CO_2$ 'in vücuttan uzaklaştırılmasıdır. Hücrelerde metabolizma sonrası oluşan  $CO_2$  kısmen plazmada, kısmen de eritrositlere difüze olarak onların içinde taşınırlar.  $CO_2$  ilk olarak doku sıvısına, oradan difüzyonla kılcal damarlara geçer. Karbondioksitin %7'lik çok az bir kısmı, plazmada çözülmüş olarak taşınır. Yaklaşık %70'lik kısmı alyuvarda karbonik anhidraz enzimi ile bikarbonata çevrilir ve bu esnada oluşan bir molekül  $H^+$  (proton) dokulardan geçerken indirgenmiş hemoglobinle birleşir. Böylece oluşan  $HHb^+$  karbondioksiti karbomino bileşiği şeklinde bağlar. Alveollerden atılan  $CO_2$ 'in yaklaşık %20-25'i bu şekilde hemoglobinle birleşip karbamino bileşikleri oluşturarak taşınır (Geers and Gros 2000). Oluşan  $HCO_3^-$  iyonları ise plazmada taşınarak akciğer kılcallarına oradan da tekrar alyuvarlara girer ve burada karbonik anhidraz enzimi ile  $CO_2$  ve  $H_2O$  oluşturur. Oluşan karbondioksit akciğer alveollerinden soluk verme ile dışarı atılır.

### 1.1. Karbonik Anhidraz Enzimi

Karbonik anhidraz (CA, E.C.4.2.1.1) çinko ( $Zn^{2+}$ ) iyonu içeren metaloenzim olup su ( $H_2O$ ) ve karbondioksiti ( $CO_2$ ) hızlı ve tersinir olarak bikarbonat ( $HCO_3^-$ ) ve protona ( $H^+$ ) katalizleyen enzimdir. Karbonik anhidraz (CA) enzimi bütün canlı sistemlerinde hemen hemen her dokuda mevcuttur. CA enzimi karboksilasyon tepkimeleri dışında ayrıca vücut sıvısının dengelenmesi, pH düzenleyici, kemik gelişimi, kireçlenme, bikarbonat sentezi ve diğer pek çok patolojik ve fizyolojik süreçlerde önemli roller oynamaktadır (Gülçin 2004).



Aerobik solunumda vücut oksijen kullanarak enerji üretirken metabolizmanın son ürünü karbondioksit oluşur. Hayvanlar alemi ve insanların dahil olduğu ve yaklaşık 4500 canlı türünün bulunduğu memelilerde karbondioksit kana salınarak akciğerlere taşınır ve solunum yoluyla vücuttan uzaklaştırılır. Alyuvarlarda karbondioksit bulunduğu sürece su ile tepkimeye girer. Bu tepkime sonucunda pKa:3,5 olan karbonik asit ( $H_2CO_3$ ) oluşur. Bu zayıf asit proton kaybederek bikarbonat ( $HCO_3^-$ ) iyonuna dönüşür (Nar 2014).

Karbonik anhidraz enzimi  $CO_2$  molekülünün hidratasyonu reaksiyonunun yanı sıra, siyanatın karbamik aside veya ürenin siyanamide, aldehidin geminal diol hidratasyonu reaksiyonlarını da katalizlemektedir. Karboksilik, sülfonik ve fosforik asit esterlerinin hidrolizleri de bu enzim tarafından katalizlenmektedir. Ancak CA enziminin hidrataz aktivitesi dışında elektrofilik bir merkeze, nükleofilik atakları içeren, aldehit, pirüvat ve alkil pirüvatların hidratasyonu, pirüvik sülfonik ve fosforik esterlerinin hidrolizi gibi reaksiyonlarını da katalizlediği bilinmektedir. Karbonik anhidrazın esteraz aktivitesini ortaya koyan bu özelliği ile organizmada fizyolojik bir rolü olup olmadığı henüz bilinmemektedir (Kaiser and Lo 1969; Jabusch and Deutsch 1989).

**Çizelge 1.1.** Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyon türleri

1.	$O=C=O + H_2O \leftrightarrow HCO_3^- + H^+$
2.	$O=C=NH + H_2O \leftrightarrow H_2NCOOH$
3.	$HN=C=NH + H_2O \leftrightarrow H_2NCONH_2$
4.	$RCHO + H_2O \leftrightarrow RCH(OH)_2$
5.	$RCOOAr + H_2O \leftrightarrow RCOOH + ArOH$
6.	$RSO_3Ar + H_2O \leftrightarrow RSO_3H + ArOH$
7.	$ArOPO_3^{2-} + H_2O \leftrightarrow HPO_3^{2-} + ArOH$
8.	$ArF + H_2O \leftrightarrow HF + ArOH$ (Ar: 2,4dinitrofenil)
9.	$PHCH_2OCOCI + H_2O \leftrightarrow PHCH_2OH + CO_2 + HCl$
10.	$RSO_2Cl + H_2O \leftrightarrow RSO_3H + HCl$ (R: Me; Ph)

CA enzimi ilk olarak memeli eritrositlerinden izole edilmiştir. Daha sonraki yıllarda enzim, insan eritrositleri, balık eritrositleri, sıçan eritrositleri, sıçan salviası, sığır kemiği, sığır lökositleri, bazı bakteriler ve bitki kaynaklarından saflaştırılmış ayrıca birçok kaynaktan da karakterize edilmiştir. Enzimin memelilerdeki molekül kütlesi 30 kDa civarında olduğu tespit edilmiştir (Feldstein and Silverman 1984; Krungkrai *et al.* 2001; Beydemir *et al.* 2002; Beydemir and Gülçin 2004).

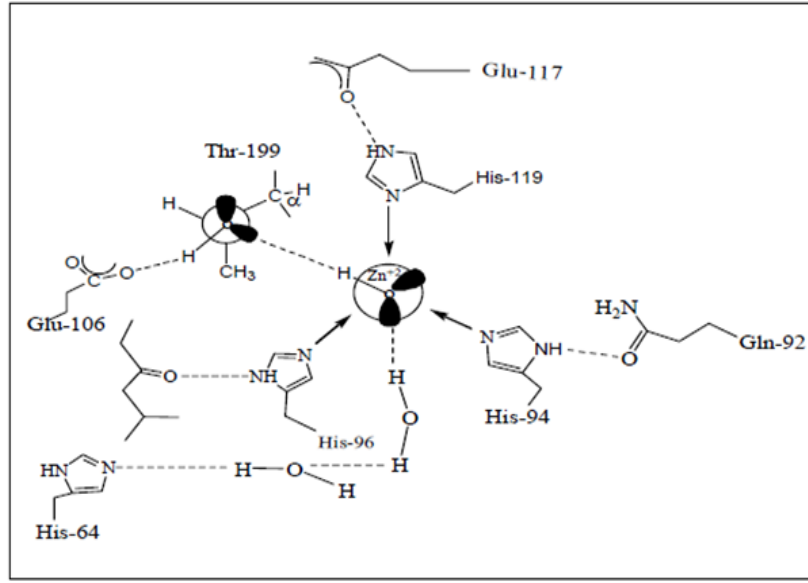
Karbonik anhidraz, genel olarak metabolik CO<sub>2</sub> geçişini sağlamanın yanı sıra, birçok dokunun H<sup>+</sup> ve HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>'in birikiminde de rol almaktadır. Balıkların solungaç ve salgı organlarında, bazı böbrek ve bakterilerde, kabuklu hayvanların kabuk yapımında, alglerde ve bitkilerin fotosentetik kloroplastlarında bu enzimin değişik rolleri olduğu ayrıca ispatlanmıştır. CA enzimi bu canlı hücrelerinde çoğu kez sitoplazmada çözünmüş, bazen de hücre membranına zayıfça bağlanmış olarak yer almaktadır (Polya and Wirtz 1965; Maren 1967; Carter 1972; Pocker and Joan 1974; Pocker and Sarkanen 1978).

Karbonik anhidraz enzimleri  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  ve  $\eta$  olmak üzere 6 farklı sınıfta incelenmiştir (Boztaş *et al.* 2015). Farklı familyalarla gösterilen homolog enzimler arasında önemli

bir fark yoktur, aksine hepsinde kataliz için aktif bölgede tek bir çinko iyonu vardır. Bundan dolayı bu familyaların hepsi katalitik fonksiyonu yerine getirmeleri yönünden birbirine benzer yapılardadır (Hewett-Emmett 2000).

Aynı canlı türünde aynı reaksiyonu katalizleyen ancak farklı kimyasal ve fiziksel özellikleri olan enzimlere izoenzim veya izozim denir. İzoenzimlerin substratlarına, kofaktörlerine ve inhibitörlerine karşı ilgileri farklıdır. Ayrıca amino asit sayısı, dizilişi ve izoelektrik pH değerleri de farklıdır. İzoenzimler farklı dokularda lokalize olabildiği gibi, bir hücrenin subsellüler fraksiyonlarında yerleşebilirler (Devlin 2002). Günümüze kadar çeşitli memeli dokularında 16 adet karbonik anhidraz izoenzimi tespit edilmiştir. Bunlardan, CA I, II, III, VII ve CA XIII sitozolik form; CA IV, IX, XII ve XIV membrana bağlı; CA VA ve VB mitokondriyel form; CA VIII, X, XI nonkatalitik; CA VI tükürük gibi çeşitli salgılarda mevcut olan karbonik anhidraz formlarıdır (Parkkila *et al.* 1998; Mori *et al.* 1999). CA XV'in katalitik aktivitesinin düşük olduğu ve CA IV ile benzer özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir. CA VIII, IX ve XII izozimlerinin ise tümörojen olduğu belirlenmiştir (Nishimori 2004).

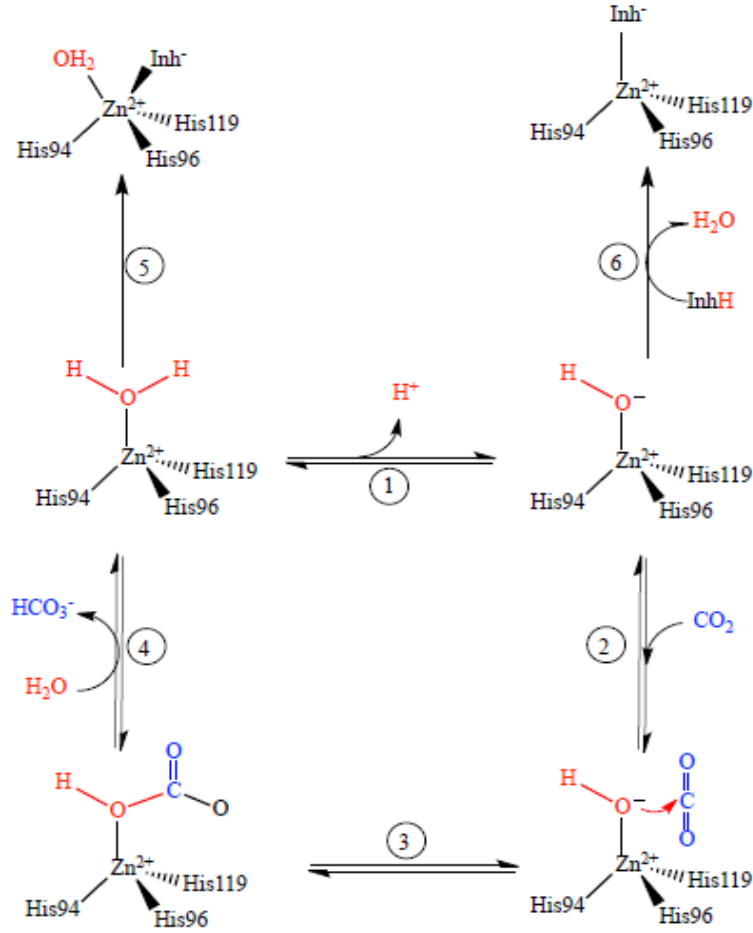
Monomerik yapıda olup, ilk tespit edilmiş ve üzerinde en fazla çalışma yapılmış bünyesinde izoenzimleri bulunduran  $\alpha$ -sınıfındaki enzimlerdir. Çok az sayıda prokaryotik  $\alpha$ -sınıfı karbonik anhidraz enzimi tespit edilmiştir. İnsan CA I ve II izoenziminin kristal yapısı, sığır CA III, yassı formlu bir sıçan CA V'i ve E. coli'de bulunan CA formu bu yapıdaki enzim tipidir. Enzimin aktif bölgesi oyuk şeklindedir. Koni biçimindeki bu oyuk hemen hemen molekülün merkezine kadar uzanır ve çinko iyonu bu oyukun alt kısmına bitişik durumdadır. Dört ligand gibi H<sub>2</sub>O veya OH<sup>-</sup> ile bir tetrahedral geometride His-94, His-96 ve His-119'da ki üç azot atomuyla koordine edilmiştir. Ligandlar, protein formundaki bir indirekt ligandın hidrojen bağı ile diğer gruplara bağlanmasıyla oluşur (Lesburg and Christianson 1995). İnsan CA II enziminin gösterimi Şekil 1.5. verilmiştir.



**Şekil 1.5.** hCA II izoenziminin metal iyon merkezinin gösterimi

CA enziminin reaksiyonları katalizinde  $Zn^{2+}$  iyonunun büyük önemi vardır. Çinko iyonu bağlı  $H_2O$ ; Glu-106'nın karboksilat grubuna sırayla köprü oluşturan Thr-199'un hidroksil grubuyla, hidrojen bağı etkileşmeleri sonucu tutunmaktadır. Bu etkileşmeler, çinko bağlı su molekülünün nükleofilitesini artırmakta ve molekül nükleofilik atak için uygun bir yerdeki  $CO_2$ 'e doğru hareket etmektedir (Supuran and Scozzafava 2001).  $Zn^{2+}$  iyonuna, hidroksil grubunun bağlanmasıyla enzimin aktif bir formu oluşur. Enzimin aktif formu, güçlü nükleofilik yapısıyla  $CO_2$  molekülüne saldırır. Bu da  $Zn^{2+}$  iyonuna bağlanmış bikarbonat iyonunun oluşmasını sağlar. Bikarbonat iyonu bir su molekülüyle yer değiştirir ve çözeltiliye geçer. Bunun sonucunda  $Zn^{2+}$  iyonuna su molekülü bağlanır ve bu da enzimin asit formuna dönüşmesini sağlar (Stams *et al.* 1998).

Su molekülleri asitlik sabitinin azalmasına bağlı olarak nötral pH'da ciddi miktarda çinko atomuna bağlı hidroksit iyonu oluşturarak proton kaybeder. Çinko iyonuna bağlı  $OH^-$  iyonu, sudan daha kolay bir şekilde  $CO_2$ 'ye saldırabilecek güçlü bir nükleofildir. CA enzimi çinko iyonuna bağlanma bölgesine yakın  $CO_2$  için bağlanma bölgesi olarak rol alacak hidrofobik alana sahiptir. Bunun için Şekil 1.6'daki mekanizma önerilmiştir.



**Şekil 1.6.** Karbonik anhidraz enziminin CO<sub>2</sub>-hidratasyon reaksiyonunu kataliz mekanizmasının şematik olarak gösterilişi (Gülçin 2014)

Bu tepkime mekanizma aşağıdaki sıra ile gerçekleşmektedir.

1. İlk önce çinko iyonu su molekülünden hidroksit iyonu oluşturan proton çıkışını kolaylaştırır. Daha sonra karbondioksit substrat olarak enzimin aktif bölgesine bağlanarak hidroksit iyonu ile tepkimeye girecek durumu alır.
2. Hidroksit (OH<sup>-</sup>) iyonu CO<sub>2</sub>'e saldırarak onu HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>'a çevirir.
3. Katalitik bölge HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>'in 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 yeleşmesini sağlayarak geçiş halini uyarır (Berg *et al.* 2014).



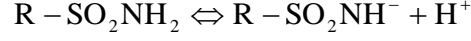
Karbonik anhidraz enzimi akciğer, böbrek, gastrik mukoza, göz lensi, tükürük bezleri, kaslar, sinir miyelin kılıfı, pankreas, prostat ve endometrium dokuları gibi pek çok dokudan karakterize edilmiş ve fonksiyonları belirlenmeye çalışılmıştır (Hewett-Emmett 2000; Sugrue 2000). Ayrıca balıkların solungaç ve salgı organlarında, bazı böcek ve bakterilerde, kabuklu hayvanların kabuk yapımında ve yumurta kabuğunun oluşumunda, alglerde ve karasal bitki kloroplastlarında bu enzimin önemli rolleri ispatlanmıştır. Karbonik anhidraz enzimi bu canlı hücrelerinde ve dokularında, genellikle sitoplazmada çözünmüş halde, bazen de hücre zarına zayıfça bağlanmış olarak bulunur (Graham *et al.* 1984; Tsuzuki and Miyachi 1989; Badger and Price 1994).

Karbonik anhidraz enzimi üzerinde yapılan inhibisyon çalışmalarında enzimin kataliz mekanizmalarının aydınlatılmasıyla birlikte, bu enzimin dokulara dağılımı ve bu dokulardaki hayati fonksiyonları anlaşılması sonucunda CA enziminin inhibitörleri ve aktivatörlerinin sentezlenmesine hız verilmiştir. Bu çalışmalarda çok çeşitli CA enzimi inhibitörleri sentezlenmiş ve bu inhibitörler başta glukom tedavisinde ilaç, antitümör, ağrı kesici, epilepsi ve nörolojik rahatsızlıklarda ilaç, pozitron, emisyon tomografisi ve manyetik rezonans belirlenmesinde, diagnostikte his materyali, antiülser, diüretik ilaçların gelişmesinde yol gösterici antibiyotik olarak halen kliniklerde kullanılmaktadır. Bu sebeple CA enziminin inhibisyon mekanizmasının bilinmesi ve yeni bileşiklerin sentezlenmesi çok büyük önem kazanmıştır (Supuran and Scozzafava 2001).

Karbonik anhidraz enzimi aktivitesinin birçok kimyasal madde ve ilaçlar tarafından inhibisyon ve aktivasyon etkileri bilim adamları tarafından araştırılmış ve literatürde rapor edilmiştir (Beydemir *et al.* 2000; Supuran *et al.* 2001; Beydemir and Gülçin 2004).

Yapılan çalışmalar karbonik anhidraz enziminin en güçlü organik inhibitörünün aromatik ve heteroaromatik sülfanilamidler olduğunu göstermektedir. Sülfanilamidlerin kolaylıkla iyonik yapı kazanması özelliği karbonik anhidraz enzimi üzerindeki inhibisyon için son derece önemlidir. Ayrıca sülfanilamid CA enziminin

saflaştırılmasında ligant olarak da kullanılmaktadır (Roughton and Booth 1946; Tozlu 1997). Bu iyonik yapı aşağıdaki reaksiyonda görülmektedir.



İnhibitörün enzimle etkileşiminde öncelikle R-SO<sub>2</sub>NH<sup>-</sup> bileşiğindeki N atomu karbonik anhidraz enziminin aktif bölgesinde bulunan Zn<sup>2+</sup> ile iyonik olarak bağlanırken, hidrofobik etkileşmelerle inhibitör enzime bağlanır (Maren 1987; Arslan 2001). Sülfonamidlerin, karbonik anhidraz enzimine güçlü bir şekilde bağlanması bu iki etkinin toplamının bir sonucudur. Bu nedenle asetozolamid, dorzolamid, metazolamid gibi sulfonamid türevleri kırk yıldır glukomada (göz tansiyonu) intraselüler basıncın düşürülmesinde, epilepsi tedavisinde, metabolik alkalozda bikarbonat tüketimini sağlamada, akut dağ hastalığı gibi birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır (Becker 1954).

## 1.2. Balıklarda Karbonik Anhidraz Enzimi

Balıklar solunum için suda çözülmüş oksijeni ihtiyaç duyarlar. Bu işlem için başın iki tarafında bulunan solungaçlar kullanırlar. Ön tarafı balığın ağzına arka tarafı yutağa bağlı solungaç boşlukları solungaç kapakları ile kaplıdır. Bu solungaç boşlukların her birinde ikişerli solungaç yapraklarından oluşan 4 adet solungaç yayı, solungaç yaylarının üzerinde ise filtre görevi gören solungaç dikenleri bulunur. Solunum esnasında ağız açılıp solungaç kapakları kapatılarak içeri su pompalanır. Çözülmüş oksijen içeren su solungaç dikenleri sayesinde kaba partiküllerden arındırılarak solungaç yaprakları arasından geçer. Bu esnada sudaki çözülmüş oksijen solungaç yapraklarındaki epitel hücrelere ve daha sonra kılcal damarlara geçerek kana karışır. Aynı şekilde kılcal damarlardaki kanda bulunan karbondioksit solungaç yaprağındaki epitel hücrelere oradan da suya geçer. Son olarak oksijen miktarı azalmış, karbondioksit miktarı artmış olan su ağız kapatılıp solungaç kapakları açılarak dışarı atılır. Balıklarda solungaç, solunum ile ilgili bir organ olup, doğrudan ortam ile ilişkisi olduğundan toksikoloji çalışmalarında hedef organ olarak seçilmektedir (Pelgrom *et al.* 1995).

Balıklarda metabolizma artıkları olarak oluşan ürik asit, üre ve anorganik tuzları dışarı atmakla yükümlü olan organ böbreklerdir. Bazen boşaltım işlemine bağırsak, deri ve solungaçlar da yardımcı olmaktadır. Boşaltım sistemleri tatlı su balıklarında çok iyi gelişmiştir. Zira yaşam ortamları olan tatlı suyun yoğunluğu vücut sıvısının yoğunluğundan daha az olduğundan vücutlarının devamlı şekilde suyu süzerek dışarı atılması gerekir. Bundan dolayı balıklarda boşaltım sistemi oldukça iyi gelişmiştir. Balıkların tamamında karaciğer büyük bir yapıya sahiptir. Genellikle midenin üzerinde bulunup mideyi kısmen sarar. A ve D vitaminlerinin depolandığı yer karaciğerdir. Ayrıca karaciğer üre ve diğer azotlu boşaltım maddelerinin oluşumu ile ilgili metabolik role sahiptir. Karaciğer dokusu ağır metallerin taşınmasında ve detoksifikasyonunda görev yapan metallothionein ve benzeri proteinlerin başlıca sentez yerlerinden biri olduğu için, ağır metal detoksifikasyonundaki işlevi oldukça fazladır (Kayhan 2006).

Kaslar görev olarak vücudun hareket işlevlerini sağlarken, kan dolaşımı, solunum, sindirim, üreme ve boşaltım gibi temel fonksiyonlarına yardımcı olur. Balıklarda kaslar işlevlerine göre istemli ve istemsiz, yapılarına göre de çizgili, düz ve kalp kası olarak sınıflandırılır. Gövdede, başta ve yüzgeçlerde istemli kaslar bulunur. Gövde kasları, başın gerisinden kuyruğa doğru iki tarafa uzanır ve deri ile omurga arasında kalan kısmı doldurur. Gözde, iç organlarda ve kan damarlarında bulunan düz kaslar ise istemsizdir.

Karbonik anhidraz enziminin aktivite eksikliği kaslardan kana geçen serbest protonların plazmaki bikarbonat iyonunu titre etme hızını azaltır. Oluşan bu asidin eritrosit hücrelerine transferi çok yavaş olduğundan oluşan asidik ortamdan eritrositler korunur. Plazmadaki CA enziminin aktivitesinin eksikliği solungaç epitelindeki CO<sub>2</sub> atılımını da yavaşlattığından, kanın pH'sının dengelenmesini kolaylaştırır. Aşırı egzersiz ve hipoksi durumunda ise kana çok yüksek oranda asit salınımı gerçekleştiğinden, düşen kan pH'sı ile birlikte hemoglobinin oksijen bağlama kapasitesi azalmaktadır. Balıklarda vücudun 2/3'ü kas oluşturur. Bu kaslarda etkin şekilde glikolitik yol aktiftir ve büyük miktarda kana asit salarlar. Plazmada CA enzimi olmamış olsaydı karbonik asit hızlıca kırmızı kan hücrelerine transfer olur ve orada bikarbonik aside dönüşerek CO<sub>2</sub> olarak vücuttan

atılırdı. Her iki durumda da CA enzimi aktivitesi yokluğunda tepkime çok yavaş meydana gelmektedir (Karahalil 2009).

### 1.3. Ağır Metallerin Karbonik Anhidraz Enzimine Etkisi

Bazı enzimlerin yapısında  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  ve  $\text{Mo}^{2+}$  gibi birçok ağır metal iyonu az miktarda bulunmaktadır. Ağır metaller, proteinlerde sisteinin sülfidril (-SH), tirozinin hidroksil (-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).

Ağır metal bileşiklerin çözeltilerinde oluşan anyon ve katyonlarının CA enzimine inhibisyonu araştırılmış. Yapılan araştırmalarda birçok tek değerlikli anyonların CA enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösterdikleri bulunmuştur (Lindskog 1997; Schcer and Dietsch 1984; Arslan *et al.* 1996). Ayrıca insan eritrosit CA izoenzimlerinin  $\text{CO}_2$  hidrataz aktivitesinin  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  ve  $\text{Pb}^{2+}$  ağır metal iyonları tarafından inhibe edilirken,  $\text{Co}^{2+}$  ve  $\text{Se}^{+4}$  iyonları tarafından da aktive edildiği belirlenmiştir (Roughton and Booth 1946; Murakami and Sly 1987).

Ağır metallerin, balıklar tarafından ortamdaki alınımları başlıca solungaçlar, besin, tatlı su balıklarında besinle birlikte alınan su ve deri aracılığı ile olmaktadır. Vücuda alınan metaller, tatlı su proteinlere bağlı bir şekilde kan yolu ile doku ve organlara taşınmakta ve dokulardaki metal bağlayıcı proteinler tarafından bağlanması sonucu yüksek derişimlere ulaşabilmektedir (Heath 1995).

Birçok metal iyonunun metabolizmanın biyolojik süreçlerinde önemli rolleri vardır. Demir, bakır, çinko ve kalsiyum gibi bazı metaller enzimin aktif bölgelerinde ligandlar gibi fonksiyonları vardır (Ekinci and Beydemir 2010; Alım and Beydemir, 2012). Örneğin çinko hücreler için kritiktir çünkü çinko konsantrasyonu azaldıkça hücresel

DNA hasarı artabilir (Jomova and Valko 2011). Karbonik anhidraz ve sorbital dehidrogenaz gibi bazı enzimler yapılarında  $Zn^{2+}$  iyonu bulundurlar. Çinko eksikliği birçok vücut kusurları ve metabolik bozukluklarla sonuçlanır ve çinko içeren enzimlerin azalmasına neden olur. Karbonik anhidraz miktarının azalması hücresel solunum yetersizliği gibi metabolik dengesizliklere yol açabilir. Ayrıca paraoksanaz gibi bazı enzimler üç boyutlu yapılarında birden fazla iyon içermektedir. Paraoksanaz iki kalsiyum iyonu içermektedir. Kalsiyum iyonlarından biri enzimde aktif role sahipken diğzerinin yapısal rolü vardır. Eğer  $Ca^{2+}$  iyonu enzimden ayrılırsa paraoksanaz aktivite kaybeder. Özellikle bakır ve kurşun iyonlarının düşük konsantrasyonları balıklarda kalsiyum hemaostasinin aksamalarına neden olduğu (Viarengo 1994) ve bazı dokularda iyon dengesini değıştirdiğı (McGeer *et al.* 2000; Roger *et al.* 2003), plazmadaki iyon konsantrasyonunu ve osmoregülasyon kapasitesini değıştirdiğı görölmüştür (Lauren and McDonald 1987).

Alabalıklarda  $Na^+$  ve  $Cl^-$  iyonlarının konsantrasyonlarındaki azalma ile bakır arasında bir ilişki görölmüştür. Ayrıca başka bir çalışmada kurşunun gökkuşağı alabalığındaki  $Na^+$  ve  $Cl^-$  iyonlarını önemli ölçüde artırdığı görölmüştür (Roger *et al.* 2003). Ağır metaller, sülfidril, karboksil ve imidazolin enzimdeki fonksiyonel gruplara bağlandığı gibi ya da enzime bağlı metalle yer değıştirmesiyle enzim aktivitesini değıştirebilir (Viarengo 1985). Aşırı miktarda metal iyonlarına maruz kalmak insanlar ve balıklar dolaylı olmak üzere birçok çeşitli organizmalarda toksikolojik etkilere neden olabilir. Çünkü balıklar fitoplanktonlarla beslendiğı için ağır metaller fitoplanktonlarla doğrudan balıklara geçer. Balıklardaki ağır metal konsantrasyonu balık türlerinin beslenme alışkanlıklarıyla ilgilidir. Örneğın Cochın bölgesinde balık marketlerinden ticari açıdan önemli kabuklu balık ve balık ürünlerinde metal konsantrasyonu incelenmiştir. Balıkların yapısında  $Cd^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Cr^{2+}$ ,  $As^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  ve  $Se^{2+}$  metal iyonlarının farklı seviyelerde mevcut olduğu görölmüştür (Sivaperumal and Sankar 2006).

Ağır metallerin toksikolojik etkileri genellikle enzim inhibisyonu ve denatürasyonuna yol açar (Gulcin *et al.* 2005; Ekinci and Beydemir 2010). Genel olarak enzimin metal

inhibisyon mekanizması temeli, ağır metalin proteine bağlanmasına dayanır. Metaller özellikle proteinlerdeki sülfidril gruplarına ve merkaptan ürünlerine bağlanır. Metaller ayrıca glutatayonun tüketilmesine neden olabilir. Hücre antioksidan kapasitesinde bozukluklar nedeniyle reaktif oksijen türlerinin oluşumuna yol açıyor. İnsan metabolizması doğrudan ya da dolaylı olarak metal zehirlenmesinden etkilenir. İnsanlarda özellikle kritik metal zehirlenmesi dolaylı olarak tatlı su, hava, deniz, endüstriyel faktörler ve gıdalardan doğar. Dünya çapında balık tüketimi önemli ölçüde yüksektir. Dolayısıyla kanser, kardiyovasküler, diyabet, ateroskleroz, nörolojik bozukluklar, Alzaymır ve parkison gibi metal kaynaklı hastalıklarda artmaktadır (Jomova and Valko 2011).

Günümüzde artan endüstriyel gelişim, kentleşme, nüfus artışı ve yoğun tarımsal ilaç uygulamaları, hızlı bir şekilde ortaya çıkan ve aşırı düzeylere ulaşan çevre kirliliğine neden olmaktadır. Oluşan bu kirlilikte metal ve metal bileşiklerde önemli etkenler arasında bulunmaktadır. Karasal ortamlarda ortaya çıkan atıklar, çeşitli yollarla sucul alanlara taşınmaktadır. Bunun yanında su kaynaklarının kirlenmesine asıl neden olan etkenlerin başında, sulara direkt deşarj edilen endüstriyel ve evsel atıklar gelmektedir. Ortama bırakılan bu atıklar zamanla çürüyüp çevreye dönmekte ve teknolojinin yoğun olarak ürettiği kalıcı toksik maddeler ve ağır metaller çevrede her geçen gün biraz daha birikmektedir. Tehlikeli boyutlarda ağır metal deşarjları neticesinde doğal suların kalitesi bozulmaktadır. Doğal sularda çeşitli tuzlar halinde bulunan ağır metaller genel olarak her türden su canlısına akut toksik etkiye sahiptir (Bilgili 1995).

Bakır, sucul ortamlarda genellikle eser miktarlarda bulunmakla birlikte gerek doğal gerekse endüstriyel, madencilik ve tarımsal aktiviteler gibi temelde antropojenik kaynaklı faktörlerin etkisi ile giderek artan derişimlerde bulunurlar. Bunun bir sonucu olarak, balıkların da içinde bulunduğu sucul organizmalar metallerin artan derişimlerinin etkisinde kalırlar (Cicik 2003).

Ağır metallerin doğadaki bulunma oranı diğer elementlere göre düşüktür. Gümüş, civa, bakır, kadminyum ve kurşun gibi ağır metallerin doğal ortamdaki konsantrasyonu

artıkça özellikle organizmalar üzerinde toksik etki yapmakta ve enzimleri inhibe etmektedir. Canlılardaki bazı enzimatik aktiviteler için bazı metaller belli konsantrasyonlarda olması gerekir. Organik maddeye bağlı olan metaller biyolojik aktiviteler sırasında kullanılabilirler ve organik maddelerin bozunması ile çözülmüş olarak tekrar serbest hale geçer (Balkıs ve Algan 2005). Sucul ortamdaki ağır metallerin balıklar tarafından bünyelerine alınması en fazla solungaçlar, vücut yüzeyi ve sindirim sistemi ile olmaktadır. Karaciğer dokusu ağır metallerin taşınmasında ve detoksifikasyonunda görev yapan metal bağlayıcı proteinlerin başlıca sentez yerlerinden biri olduğu için, kadmiyum detoksifikasyonundaki işlevi oldukça fazladır. Kadmiyum en toksit ağır metallerden biridir. Düşük konsantrasyonlarda bile su canlıları için son derece zararlı etkilere sahiptir (Kayhan 2007).

Kadmiyum (Cd), organizmalara toksik etkili, alınıp, depolama ve salınım gibi olayların meydana geldiği doku ve organlarda metal bağlayıcı bileşikler tarafından esterleştirilmesi sonucu birikim bakımından kümülatif etkili bir ağır metaldir (Almeida 2001).  $Cd^{2+}$  iyonunun, toksik etki göstermesi, çevrede yaygın dağılımı ve düşük düzeylerde bile organizmalarda yan etkilere yol açması nedeniyle ekolojik çalışmalarda yaygın olarak kullanılan bir metaldir. Metaller, sadece önemli bir ekosistem bileşeni değil aynı zamanda besin kaynağı olarak da kullanılan balıklarda fizyolojik ve biyokimyasal mekanizmaların bütünlüğünü bozabilmektedir. Balıklar ortamdaki ağır metali besin, su ve vücut yüzeyinden absorpsiyon yoluyla, en çok da solungaçlar aracılığıyla almaktadır (Basha 2003). Günümüzde su kirliliği ile ilgili geleneksel çalışmaların yanında, doku ve vücut sıvılarındaki kimyasal maddeler, toksik metabolitler, enzim aktiviteleri veya diğer biyokimyasal değişiklerin analizleri gibi toksik maddelerin biyolojik sistemleri nasıl etkilediğini gösteren belirteçlerin kullanımı daha da önem kazanmaktadır (De La Torre 2007).

Bakır gibi ağır metaller, sucul ortamlarda genellikle eser miktarlarda bulunmakla birlikte gerek doğal gerekse endüstriyel, madencilik ve tarımsal aktiviteler gibi temelde antropojenik kaynaklı faktörlerin etkisi ile giderek artan derişimlerde bulunurlar. Bunun bir sonucu olarak, balıkların da içinde bulunduğu sucul organizmalar metallerin artan

derişimlerinin etkisinde kalırlar. Bakır biyotik derişimlerde yüksek organizasyonlu canlılarda enzim aktivasyonu, kemik oluşumu, bağ dokusu gelişimi, omuriliğın miyelinleşmesi gibi çeşitli yapısal ve metabolik olaylarda işlev görmektedirler. Ağır metallerin ortam derişimindeki artışın balıklar üzerindeki başlıca etkisi, çeşitli doku ve organlarda birikmesidir (Allen 1995).

Kobalt doğada yaygın bulunur. Yer kabuğunun sadece %0,001'ini oluşturmaktadır. Yerkabuğu ve göktaşlarında demirde, güneşin ve yıldızların atmosferlerinde, diğer elementlerle birleşmiş halde doğal sularda, okyanus tabanlarındaki yumruklarda, toprakta, bitkilerde ve hayvanlarda az miktarda kobalta rastlanır. Kobalt B12 vitamininin temel bileşenidir. Vücudün günlük ihtiyacı 0,1-1,0 mg'dır. Diyetle alınan kobalt bağırsak mikroflorası tarafından kobalamin sentezinde kullanılabilir. Kobalt alkol üretiminde köpük oluşturulmasında kullanılır. Aşırı alkol içicilerinde toksik etki oluşturur. Kobalt eksikliği, bilinç kaybı, kilo kaybı ve anemi gibi rahatsızlıklara neden olabilir (Keser 2007).

Kurşun tadı ve kokusu olmayan mavimsi gri renkli bir metaldir. Çevrede yaygın bulunan kurşun kendiliğinden parçalanmaz, havada bir haftadan fazla 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. 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. Dolaşımında kurşun büyük ölçüde kırmızı kan hücrelerine (%80-90) ve az bir kısmı da plazma proteinlerine bağlanır. 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, bağırsak, sinir, kas ve beyin hastalıkları, kan yapısında normal olmayan değişkenlikler ile böbrek bozuklukları şeklinde ortaya çıkar. Kurşun zehirlenmelerinin tedavisinde ağız yoluyla meydana gelen zehirlenmelerde seyreltilmiş magnezyum ya da sodyum sülfat, sülfirik asit, tanik asit, süt, yumurta akı içeren solusyonlarla mide yıkanır. 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. Bu hastalara çinko ve C vitamini vermekle kurşunun atılması, yani eliminasyonu meydana gelir ve hastalık iyileşir. Aynı şekilde çevre toksinleriyle de örneğin SO<sub>2</sub> ile de aynı rahatsızlıkların meydana geldiği görülmüştür. Bu organlarda toksik rahatsızlık ile enzim sisteminin fonksiyonel bozuklukları oluşur. Vücuda hava yolu ile, içme suları ve gıdalarla alındığı gibi ayrıca sigara dumanından alınabilir. Kurşun vücuttaki hemen hemen her organı ve dokuları etkilemektedir. En duyarlı sistem, özellikle de çocuklar için merkezi sinir sistemidir (Temel 2014).

Demir vücutta pek çok önemli fonksiyonu bulunan temel elementlerden biridir. Kolaylıkla elektron alıp verebilme yeteneği ile ferrik (Fe<sup>2+</sup>) ve ferröz (Fe<sup>3+</sup>) formları arasında değişim gösterir. Bu fonksiyonu onu sitokrom, oksijen bağlayan moleküller hemoglobin ve miyoglobin ve birçok enzimin yararlı bir komponenti haline getirir. Demir, plazmada iki demir bağlama bölgesi bulunan ve 80 kDA ağırlığındaki bir protein olan transferrin ile kompleks halde taşınır. Bir erişkinin plazmasında 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. Besinlerle alınan demir transferrine bağlanmaz, transferrinin bağırsak 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 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; Seven 2010).

Demir bütün 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 demirin 20 mg kadarı hem yıkımından, geri kalanı depolardan, çok azı ise emilimden sağlanır. Demir yetmezliği genellikle çocuk, genç bayan ve yaşlı insanlarda görülür. Demir eksikliği anemi nedenidir (Keser 2007). Demir 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). Kanser hücrelerinin kemik iliği metastazına bağlı olarak ortaya çıkan myelofizik anemiler özellikle akciğer, meme, prostat kanserlerinde ve sarkomlarda sıktır 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).

Su ürünlerinde çok önemli yeri olan bir konuda ağır metal birikimidir. Sanayinin gelişmesiyle ve endüstri atıklarının denizlere boşaltılması sonrası denizlerde bir takım metal iyonlarının ( $Pb^{2+}$ ,  $Cr^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$  ve  $Ag^+$ ) artışı ve canlıların bu iyonları bünyesine katmasıyla oluşan bir takım zararlı etkiler meydana gelir. Sanayi ve insan etkilerinin yanı sıra toprak erezyonu, atmosferdeki gazlar yoluyla, akarsularla, tarım yoluyla, denizaltı volkanik aktiviteler gibi yollarla denizlere metal iyonları taşınır. Deniz suyunda metaller fiziksel olarak dört esas formda bulunur. Bunlar; suda çözülmüş olarak, kolloid parçacıkları olarak, canlı organizmaların bünyesinde, diğer kolloid parçacıkları üzerindedir. İnsanların vücutlarında biriken metal iyonlarının vücuttan atılması çok uzun yıllar gerektirmektedir. Bu metal iyonlarının vücutta birikimi toksik etkiye neden olmaktadır. Bu duruma en bilinen örnek Japonya'da görülmüş olan cıva zehirlenmesi ile oluşan Minamata hastalığıdır. Bunun nedeni Minamata' da kurulan bir fabrikadan metil-cıva bileşiğinin körfeze dökülmesi ile o körfezde bulunan balıkların vücutlarında birikmesi ve o balıklarla beslenen bölge halkının ağır metal olan Hg zehirlenmesiyle felç ve ölümlere neden olmasıdır. Kadmiyum bilinen en zehirli metal elementlerinden biridir. Vücutta fazla birikimi İtai itai olarak bilinen kemiklere ve iskelete zararı olan romatizmalı bir hastalıktır. İlk 1947 yılında Japonya'da görülmüştür. Metal iyonları birikimi sinir iletimini engelleyebilmektedir bu nedenle sinirsel iletim bozukluğu ve insanın kaslarını kontrol edemediği hastalıklar ağır metal kirliliği ile meydana gelmektedir. Kurşunda biyolojik olarak parçalanamaz ve toksik olmayan forma çevrilemez ve ciğerlerde birikerek insan

sağlığını olumsuz etkiler. Alüminyum, bakır, nikel vücuda alındığında diğer ağır metaller gibi insan sağlığını olumsuz etkiler (Söğüt 2008).

Besin zinciriyle ya direkt olarak planktonlar aracılığıyla ya da sudaki tüketici diğer organizmalar yolu ile balıkların bünyelerine geçen ağır metaller doğal fizyolojik mekanizmalarla atılmadıkları için birikime uğrar ve bünyede belirli konsantrasyonların aşılması halinde toksik etki yaparlar. Sonuçta toksik nitelikli ağır metaller balık tüketimi ile insana kadar ulaşabilmekte özellikle ağır metal yükü artmış iç sulardan avlanan su ürünleri insan sağlığını ciddi şekilde tehdit etmektedir. Besin zincirinin bir halkasını oluşturan ve önemli bir protein kaynağı olarak tüketilen balıkların ağır metal kirliliğine maruz kalmalarının etkilerinin araştırılması, ekolojik dengenin korunması ve insan sağlığı açısından gerekli hale gelmiştir (Blaxhall and Daisley 1973; Çiçek ve Koparal 2001; Kayhan 2006).

#### **1.4. Karadeniz Alabalığı (*Salmo trutta* Labrax)**

Karadeniz alabalığı (*Salmo trutta* Labrax), Salmonidae familyasından Doğu Karadeniz bölümünde görülen bir göçmen alabalıktır. Karadenize dökülen tatlı su derelerinde yaşayan alabalık türüdür. Karadeniz alası veya som balığı olarak bilinir. Genellikle ilkbaharda yumurta bırakırlar ve 4-5 yaşında denizden akarsulara girer ve kaynaklara yakın yerlerdeki kumsal çakıllı kısımlara yumurta bırakır. Her seferinde 10.000 civarında yumurta bırakır. Maksimum ömrü 10-13 yıl olup yaşamı boyunca birkaç kez yumurtlama göçü yapar. Uzunluğu 110 cm'ye, ağırlığı ise 24–25 kg'a kadar çıkabilir. Karadeniz alabalığının rengi zeytin yeşili olup, üst kısımlar kahverengi veya sarı, karın altı beyazdır. Kırmızı benekler her tarafa dağılmış olup, çoğunlukla etraflarında beyaz halkalar bulunur. Kuyruğu çok az çatallanmış düze yakındır. Karadeniz alabalığının vücudu çok küçük pullarla kaplıdır. Ağız terminal konumludur. Dişler sadece çenede bulunmaz, aynı zamanda dilde ve vomer kemiklerde üzerinde de bulunmaktadır. Üst çene alt çeneden daha uzun olup, ağzın kenarlarına doğru genişleyerek gözün arka kısmı hizasına kadar uzanmış ve sert kemiksi yapıdadır. Gözleri büyüktür. Baş boyu vücut yüksekliğinden fazla ve kuyruksuz vücut uzunluğunun 1/3'ü kadardır (Demirsoy 1993).

Türkiye’de yayılım gösteren alabalıkların hepsi *Salmo* cinsi ve *Salmo trutta* türünden olup, birçok alt türe ayrılarak incelenmektedir. Fakat bu konudaki bulgular, genetik çalışmalarla desteklenmediği için ırk, fenotip, genotip, ekotip gibi kavramlarla yapılan bu ayrımlar tartışma konusu olmaktadır. Çünkü ayrı ırklar olarak kabul edildikleri halde bazı sularda her iki ırka ait bireyleri bir arada görme olasılığı vardır. Bu bakımdan Türkiye alabalıklarının alt tür seviyesindeki taksonomik durumu henüz kesinlik kazanmış değildir. Fakat ülkemizde de yapılmaya başlayan gelişmiş genetik metotlarla desteklenen çalışmalarla ırkların kesin olarak ayrımı sağlanabilecektir (Tabak 2001; Kocabaş 2009).

Karadeniz alabalığının sistematikteki yeri aşağıda verilmiştir.

- Filum** : *Chordata*  
**Alt filum** : *Vertebrata*  
**Sınıf** : *Chondrostei*  
**Ordo** : *Salmoniformes*  
**Familya** : *Salmonidae*  
**Alt familya** : *Salmoninae*  
**Genus** : *Salmo*  
**Species** : *Salmo trutta* Labrax (Pallas, 1811)



**Şekil 1.7.** Çalışmalarda kullanılan Karadeniz alabalığı (*Salmo trutta* Labrax)

### 1.5. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmanın amacı balıkların birçok dokularında bulunan solunum enzimi olan karbonik anhidraz enziminin Karadeniz alabalığının karaciğer, böbrek, solungaç ve kas dokularından saflaştırılması ve karakteristik özelliklerinin belirlenmesidir. Ayrıca bazı ağır metallerin saflaştırılacak CA enzimi üzerine inhibisyon etkilerini *in vitro* olarak araştırmaktır.

Bununla birlikte yaptığımız çalışmada belirlenen ağır metallerin seçilmesindeki amaç, bu metallerin sucul ortamlarda çoğu zaman eser miktarda bulunmaktır. Ancak son yıllarda hızlı nüfus artışı, endüstrileşme, madencilik, tarımsal aktiviteler, sanayi kuruluşlarının deniz sahilleri ve turizm bölgelerinde yoğunlaşması, deniz, dere ve göl suları ile yerleşim yerlerinde oluşan atık sular gibi faktörlerin etkisi ile giderek artan konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Ağır metallerin ortam derişimindeki artışının balıklar üzerinde başlıca etkisi doku ve organlarda birikmesidir. Bu yüzden çeşitli kan parametrelerini, enzim aktivitelerini, büyüme ve gelişmeyi olumsuz etkiledikleri bilinmektedir. Bu çalışmada sudaki bazı ağır metal iyonlarının konsantrasyonlarının artması ile balıkların farklı dokularındaki karbonik anhidraz enzimine etkisi tespit edilerek ileriye dönük tedbirler alınmasına ve bölge için önemli bir değer olan bu balık türünün neslinin korunmasına ve balık türü için ileride yapılacak çalışmalara katkı sağlanacağı düşünülmektedir.

Ayrıca bu çalışmanın amacı, bundan sonra yapılacak çalışmalarda, özellikle karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu işlemlerinde yada Karadeniz alabalığından saflaştırılacak başka enzimler üzerinde gerçekleştirilecek çalışmalara örnek teşkil etmesidir.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Aktif bölgesinde  $Zn^{2+}$  iyonu bulunduran karbonik anhidraz enzimi genel olarak metabolik  $CO_2$  transportunu yanı sıra birçok dokuda  $H^+$  ve  $HCO_3^-$  iyonlarının birikiminde de önemli rol oynamaktadır. CA enzimi vücuttaki birçok dokuda  $H^+$  ve  $HCO_3^-$  iyonlarının birikimini sağlayarak, vücut sıvılarının dengelerinin kurulmasında da son derece önemlidir (Supuran 2001, Gulcin 2014). Bu dokular arasında böbrek, gastrik mukoza ve göz lensi sayılabilir. Bu dokuların dışında histokimyasal yöntemlerle tükürük bezleri, kaslar, beyin, sinir miyelin kılıfı, pankreas, prostat ve endometrium dokularında da CA enzime rastlanmış ve bunların saflaştırılarak biyokimyasal özellikleri incelenmiştir. Balıkların solungaç ve salgı organlarında, bazı böceklerde, bakterilerde, kabuklu hayvanların yapısında ve alglerde enzimin değişik rolleri olduğu da ispatlanmıştır (Chegwidden 2000).

Karbonik anhidraz enzimi ilk olarak 1933 yılında Meldrum ve Roughton ile Stadie ve O'Brien tarafından birbirlerinden habersiz olarak bulunmuştur. Bu bilim adamları, insan eritrositlerinden karbonik anhidraz enzimini yüksek oranda saflaştırmalarına rağmen sığır eritrositlerinden saflaştırmayı 1930'lu yılların sonlarında gerçekleştirebilmişler (Meldrum and Roughton 1933). Keilin, CA enzimi aktivitesinin çinko içeriği ile orantılı olduğunu bularak çinkonun katalizlemede spesifik rolü olduğunu belirlemiştir (Keilin 1944). Böylece CA enzimi tanımlanan ilk metaloenzim olarak tarihe geçmiştir. Daha sonra CA enzimi, suda yaşayan canlılarda da olmak üzere birçok bitki, mantar, böcek, sıçan ve memeli dokuları gibi geniş bir canlı topluluğunda bulunmuştur (Burt *et al.* 1992; Bottcher *et al.* 1994; Krungkrai *et al.* 2001; Beydemir *et al.* 2005; Yu *et al.* 2006).

CA enzimi insan eritrositlerini, fare eritrositlerini, fare salyası, sığır lökositleri, sığır kemiklerini içeren oldukça çok çeşitli kaynaktan saflaştırılmış ve üzerinde çalışılmıştır. Enzim göz, karaciğer ve merkezi sinir sistemi gibi birçok dokuda bulunmaktadır (Beydemir and Gülçin 2004).

Şimdiye kadar memeli dokularında, fotosentetik hücre yapısına sahip canlılarda, bakteri ve algler gibi pek çok organizmalarda karbonik anhidraz enziminin 16 tane izoenzimini tespit edilmiştir (Esbaugh and Tufts 2007). Halen bu konuda çalışmalar devam etmektedir.

CA enzimi günümüze kadar birçok balıktan ve memeli dokusundan saflaştırılmış ve kinetik özellikleri incelenmiştir. CA enzimi sığır eritrositlerinden (Kernohan 1964; DeVoe and Kistiakowsky 1961), archaeon türü olan *Methlinsarcina thermophila*'dan (Alber and Ferry 1994), yengeç solungaçlarından (Bottcher *et al.* 1994), zebrafish balığından (Peterson *et al.* 1997), pisi balığının (*Platichthys flesus*) eritrositlerinden (Sender *et al.* 1999), yılan balığından (*Anquilla anguilla*) (Lionetto *et al.* 2000), salmon türünden (*Oncorhynchus masou*) (Tohse and Mugiya 2001), gökkuşacağı alabalığı eritrositlerinden (Hisar vd 2002) ve gökkuşacağı alabalığı dokularından (Söyüt ve Beydemir 2008), mersin balığı eritrositlerinden (Karahalil 2009), levrek balığı solungaç ve karaciğerinden (Erdem *et al.* 2011), Çipura (*Sparus aurata*) balığının karaciğer, solungaç ve böbrek dokularından (Kaya ve Beydemir 2011), Kangal balığının (*Garra rufa*) farklı dokularından (Koçyiğit 2014) saflaştırılıp, üzerinde kinetik çalışmalar yapmışlardır.

Karbonik anhidraz enzimi balık solungaçlarında gaz değişiminde, osmoregülasyonda, iyon regülasyonunda ve asit-baz dengesinin sağlanmasında rol oynadığı, balık karaciğerinde üre sentezine bikarbonat sağladığı, tatlı su balıklarında proton ve bikarbonat oluşturarak  $\text{Na}^+$  ve  $\text{Cl}^-$  iyonlarının tatlı sudan alınmasını ve böylece NaCl regülasyonunda rol aldığı ve nitrojen metabolizmasını düzenlediği belirlenmiştir (Testereci vd 1997; Lionetto *et al.* 2000).

CA enzimleri, hayvanlarda ve özellikle de insan hastalıklarının birçoğunun tedavisinde kullanılan ilaçlar için hedef enzim olmuştur. Asetazolamit, dorzolamit ve brinzolamit gibi sülfonamid türevleri olan ilaçlar karbonik anhidraz izoenzimlerinin kuvvetli inhibitörleridirler (Bülbül *et al.* 2003). Örneğin insanlarda glukom hastalığında CA enzimi inhibitörleri farmakolojik ajan olarak, ayrıca ödem ve epilepsi tedavilerinde de



yaygın olarak kullanılmaktadır (Jackson 2001). Bununla birlikte birçok kimyasal maddeler ve atıklar da bu enzimin aktivitesini önemli ölçüde azaltmakta ve hatta tamamen durdurabilmektedir.

Lionetto 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 enzimi aktivitelerinin önemli oranda inhibe olduğunu belirlemişlerdir (Lionetto *et al.* 2000).

Van Gölü balığının solungaç ve karaciğer dokularından karbonik anhidraz enzimini aseton-kloroform ve etanol-kloroform olmak üzere iki ayrı ekstraksiyonla kısmi saflaştırarak kinetik özellikleri üzerinde çalışma yapmıştır (Testereci vd 1997). Balığın solungaç dokusundaki enzim aktivitesinin daha fazla olduğu görmüştür.

Hava soluyan ilkel bir balıklar olan (*Amia calva*) solungaç dokusundan ve hava kesesinden CA izoenzimlerinin karakterizasyonu ve hücre içindeki dağılımlarını araştırmışlar (Gervais and Tufts 1999). 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).

Salmon (*Oncorhynchus masou*) balıklarının otolit ve iç kulak sıvısı içerisine inorganik karbon ve kalsiyumun birleşimi üzerine *in vitro* şartlarda, enzim ve anyon taşıyıcı inhibitörlerinin etkisi araştırmış (Tohse and Mugiya 2001). Karbon bileşiminin ortamdaki klor iyonu artışı ile düştüğü, kalsiyum birleşiminin klor ve bikarbonat iyonlarının 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  $\text{HCO}_3^-$ , ATPaz ve  $\text{Cl}/\text{HCO}_3^-$  pompalarının bikarbonat iyonlarının iç kulak sıvısına transferinde yer aldıkları, CA enziminin ise otolit kalsifikasyonu için karbonat üretiminde rol aldığı kanaatine varılmıştır.

Karbonik anhidraz enzimini pisi balığının (*Platichthys flesus*) eritrosit ve solungaçlarından afinite kromotografisi yöntemi ile *p*-aminomethylbenzene sulfonamide–agarose (PAMBS) jel kullanarak saflaştırılmış ve moleköl kütlesinin 30 kDa olarak bulunmuştur. (Sender *et al.* 1999). Ayrıca (Rizello *et al.* 2007) Antartica Icefish balığının solungaçlarından CA enzimini afinite kromotografisi yöntemi ile saflaştırmış ve moleköl kütlesini 28,7 kDa olarak tespit etmiştir.

Ağır metallere kadmiyumun Japon balığı (*Carassius auratus*) türü balıklarda eritrosit oluşumunu engellediği yapılan çalışmalarda gözlemlenmiştir. Kadmiyumla birlikte ortamda çinko ve bakır metalleri bulunursa balıklar üzerindeki toksik etkinin daha da belirtilmektedir (Houston and Keen 1984; Atamanalp 2003).

Balıklar üzerinde bir çalışmada  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  ve  $\text{Ag}^+$  iyonlarının CA enzimi  $10^{-6}$  M dan daha düşük konsantrasyonlarda bile inhibe ettiği görölmüştür (Christensen and Tucker 1976).

Tatlı suda yaşayan yengeçlerin solungaçlarından saflaştırılan karbonik anhidraz enzimi üzerine çinko, kadmiyum ve bakır metallerinin inhibisyon etkisi araştırılmış (Vitale *et al.* 1999). Çalışma neticesinde bu ağır metallerin çok düşük konsantrasyonlarda CA enzimini inhibe ettiklerini belirlemişlerdir.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmalarda kullanılan p-nitrofenil asetat, standart serum albumin, Sepharose-4B, L-tirozin, N,N,N',N'-tetrametiletlen diamin (TEMED) ve diyaliz torbası Sigma Chemical Comp.'den; trihidroksimetilaminometan (Tris), sülfanilamid, sodyum hidroksit, sodyum bikarbonat, sodyum sülfat, sodyum perklorat, sodyum asetat, sodyum klorür, 2-merkaptto etanol, brom timol mavisi, hidroklorik asit, fosforik asit, sülfürik asit, glisin, metanol, etanol, izopropanol, aseton, sodyum barbital, sodyum azotür, akrilamid, N,N'-metilen bisakrilamid, coomassie brillant blue G-250, R-250 ve diğer kimyasal maddeler E. Merk AG'den karbondioksit gazı piyasadan temin edilmiştir.

##### 3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

Çalışmalar esnasında aşağıdaki alet ve cihazlar kullanılmıştır.

Afinite kolonu	: Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala (İsveç)
Çalkalayıcı	: Nüve SL 350
Derin dondurucu	: Sanyo, Japan
Elektroforez tankı	: Hoefer, HSI
Hassas terazi	: Denver Instrument
Kronometre	: Hanhard, Electronische Digital-stopphur Germany
Karıştırıcı	: Fisons, Whirlimixer
Magnetik karıştırıcı	: IKA Topolino
Otomatik pipetler	: Eppendorf, Fischer, Biohit, Socorex ve Oxford Pipettors
Peristaltik pompa	: Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala (İsveç)
pH metre	: Mettler Toledo

Saf su cihazı	: ISO LAB laborgerate GmbH 1 Glass Still
Santrifüj	: IEC Clinical centrifuge USA
Soğutmalı santrifüj	: Heraeus Sepatech Suprafuge-22
UV-VIS Spektrofotometre	: SHIMADZU 1240
UV-Spektrofotometre küveti	: 1 cm <sup>3</sup> 'lük ve 3 cm <sup>3</sup> 'lük Kuartz Küvet,
Vorteks	: Fisons, Whirlimixer
Isıtıcı	: WiseStir

### 3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

Araştırma süresince kullanılan çözeltilerin hazırlanışları ve kullanılış amaçları aşağıda belirtilmiştir.

- 1. NaCl çözeltisi (%0,9'luk)** (Homojenatın yıkanması için kullanılan çözelti): 4,5 g NaCl alınıp hacmi saf su ile 500 mL'ye tamamlandı.
- 2. NaHCO<sub>3</sub> tamponu (0,2M pH:8,8)** (Sepharose-4B matriksi üzerinde afinite jeli hazırlanırken kullanılan tampon): 16,8 g NaHCO<sub>3</sub> 950 mL saf suda çözülerek 1N NaOH ile pH:8,8'e titre edildikten sonra, toplam hacim saf su ile 1 litreye tamamlandı.
- 3. 25 mM Tris-HCl/0,1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH:8,7 tamponu** (afinite jelinin dengelenmesinde kullanılan tampon): 3,0275 g Tris ve 14,2 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 950 mL saf suda çözülerek 1 N HCl ile pH:8,7'ye getirildikten sonra saf su ile hacim 1 litreye tamamlandı.
- 4. 25 mM Tris-HCl/ 22 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH:8,7 tamponu** (afinite jelinin yıkanmasında kullanılan tampon): 3,0275 g Tris ve 3,124 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 950 mL saf suda çözülerek 1 N HCl ile pH:8,7'ye getirildikten sonra saf su ile hacim 1 litreye tamamlandı.
- 5. 0,1 M NaCH<sub>3</sub>COO/ 0,5 M NaClO<sub>4</sub>, pH:5,6 tamponu** (CA enziminin elüsyonu için kullanılan çözelti): 1,23 g NaCH<sub>3</sub>COO ve 10,534 g NaClO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 120 mL saf su ile çözülerek, 1 N HCl ile pH:5,6'ya getirildikten sonra saf su ile hacim 150 mL'ye tamamlandı.
- 6. Tris-SO<sub>4</sub> tamponu (0,05 M pH:7,4)** (Esteraz aktivitesi ve diyalizde kullanılan tampon çözelti): 6,055 g Tris 950 mL saf su içerisinde çözülerek 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile pH'sı 7,4'e getirildikten sonra hacim saf su ile 1 litreye tamamlandı.

**7. Tris-SO<sub>4</sub> tamponu (1 M pH:7,2–9,0 aralığında)** (Optimum pH ve stabil pH çalışması için kullanılan tampon çözeltiler): 12,11 g Tris 80 mL saf su içerisinde çözülerek 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile istenen pH'ya kadar titre edildi ve daha sonra saf su ile toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.

**8. Potasyum fosfat tamponu (1 M pH: 5,0–8,0 aralığında)** (Optimum pH ve stabil pH çalışması için kullanılan tampon çözeltiler): 13,6 g potasyum fosfat 80 mL saf su içerisinde çözülerek 1 N HCl ile istenen pH'ya kadar titre edildi ve daha sonra saf su ile toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.

**9. Veronal tamponu (0,025 M)** 0,025 mol sodyum barbitalin 900 mL suda çözülüp pH:8,2'ye kadar 0,1 N HCl ile titrasyonundan sonra saf su ile 1 litreye tamamlandı.

**10. Brom timol mavisi çözeltisi (%0,04'lük)** (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.

**11. CO<sub>2</sub> çözeltisi** (hidrataz aktivitesinde kullanılan çözelti): 0°C'de yarım saat süreyle buz banyosunda saf suyun içerisinde CO<sub>2</sub> gazı geçirilerek hazırlandı.

**12. Coomassie brilliant blue G-250 çözeltisi**, (proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti): 100 mg coomassie brilliant blue G-250, 50 mL %95'lik etanolde çözüldü, daha sonra bu çözeltiliye %95'lik fosforik asit ilave edilerek çözeltinin hacmi, saf su ile 1 litreye tamamlandı.

**13. Standart serum albumin çözeltisi** (1 mg/mL; protein tayini için kullanılan çözelti): 25 mg standart serum albuminin 25 mL saf suda çözülmesiyle hazırlandı.

**SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS-PAGE) için kullanılan çözeltiler;**

**14. Tris-HCl tamponu (1 M pH:8,8):** 12,1 g Tris 80 mL suda çözülüp 1 M HCl ile istenen pH'ya kadar titre edildi ve daha sonra saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

**15. Tris-HCl tamponu (1 M 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.

**16. %30'luk Akrlamid-%0,8 bisakrilamid çözeltisi:** 6 g akrilamid, 0,16 g bisakrilamid alınıp 13,84 mL suda çözüldü.

**17. SDS çözeltisi (%10'lük):** 0,5 g SDS alınıp 4,5 mL suda çözüldü.

**18. PER (Amonyum persülfat %10'lük):** 0,5 g amonyum persülfat alınıp 4,5 mL suda çözüldü.

**19. SDS-PAGE’de kullanılan numune tamponu:** pH:6,8 olan 1 M Tris-HCl tamponundan 650  $\mu$ L, 1 mL %10’luk SDS, 1 mL %100’lük gliserin ve 1 mL %0,1’lik brom timol mavisi karıştırılarak, son hacim saf su ile 10 mL’ye tamamlanması ile hazırlandı. Son olarak bu tamponu kullanmadan önce, hazırlanan numune tamponunun 950  $\mu$ L’sine 50  $\mu$ L  $\beta$ - merkapt etanol ilave edildi.

**20. SDS-PAGE’de kullanılan yürütme tamponu:** 2 g SDS, 6 g Tris ve 28,8 g glisin 200 mL suda çözüldü pH:8,3 olana kadar 1 M HCl ile titre edildi ve toplam hacim saf su ile 2 L’ye tamamlandı.

**21. Tespit çözeltisi:** 10 mL 1 M lık asetik asit, 30 mL %96’lık etanol ve 60 ml saf su karıştırılarak ağzı kapatılı 4°C de muhafaza edildi.

**22. Redüksiyon çözeltisi:** 4,8 g sodyum asetat 45 mL etil alkol içinde çözüldü üzerine 80 ml saf su eklendi. Karışım 1 M ‘lık asetik asitle pH’sı 6,8 ayarlandı. Sonra 150 mg sodyum tiyosülfat ve 3 mL glutaral aldehit ilave edilerek karışım ağzı kapatılarak 4°C de muhafaza edildi.

**23. Boyama çözeltisi:** 150 mg  $\text{AgNO}_3$  150 mL saf su çözülerek üzerine 30  $\mu$ L formaldehit ilave edildi. Karışım ağzı kapatılarak 4°C de muhafaza edildi.

**24. Yıkama 1 çözeltisi:** 3,75 g sodyum karbonat 270 mL saf suda çözülerek üzerine 120  $\mu$ L formaldehit ilave edildi.

**25. Yıkama 2 çözeltisi:** 12,5 mL asetik asit ve 1 mL gliserin karışımına saf suya ilave edilerek toplam hacim 250 mL' ye tamamlandı.

**Çizelge 3.1.** Karadeniz alabalığı dokularından saflaştırılan CA enzimi aktivitesine karşı inhibitör özelliği gösteren ağır metallerin stok çözeltileri

Metal Bileşiği	[Stok çözelti] (mM)	Madde Miktarı(g)	Çözelti Hacmi(mL)
$\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$	1000	3,25	10
$\text{FeCl}_2$	1000	1,27	10
$\text{CoCl}_2$	1000	1,30	10
$\text{AgNO}_3$	1000	1,70	10
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1000	2,50	10

## 3.2. Yöntemler

### 3.2.1. Karadeniz alabalığı dokularından karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu çalışmaları ile ilgili yöntemler

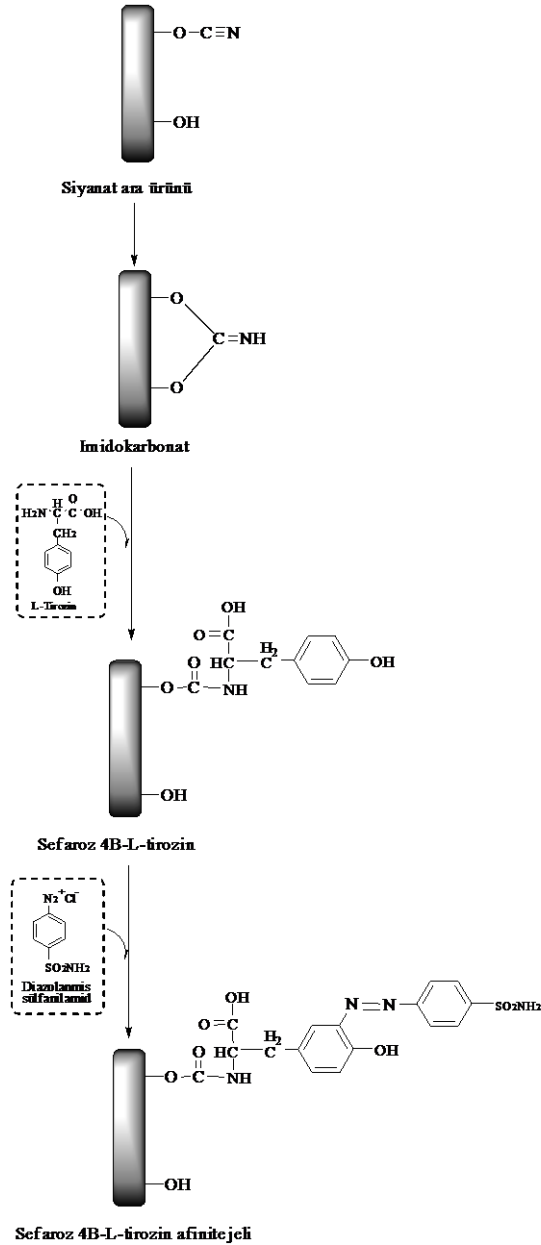
#### 3.2.1.a. Sepharose-4B-L-tirozin sülfanilamid afinite kolonunun hazırlanması

Afinite jeli CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B matriksi üzerine hazırlandı. Hazırlanan kolona L-tirozin kovalent olarak takıldı. Daha sonra sülfanilamid diazollanarak tirozine kenetlendi. Burada tirozin afinite jelinin uzantı kolunu, sülfanilamid ise enzimi spesifik olarak bağlayan kısmını oluşturmaktadır. Sülfanilamid, karbonik anhidraz enziminin spesifik bir inhibitörü olup, afinite jelinin yapısına girerek üzerinde çalışılacak enzimin yüksek oranda saflaştırılması amacıyla kullanıldı (Atasever *et al.* 2013). Afinite jeli aşağıdaki yöntemlere göre hazırlandı:

**i. CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye tirozin takılması:** CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose 4B, 250 mL soğuk NaHCO<sub>3</sub> tamponu (0,1 M, pH: 10) ile yıkanarak bir behere aktarıldı. Aynı tamponun 20 mL'sinde 80 mg tirozin çözünmüş soğuk çözelti behere ilave edilerek karıştırıldı. Yıkama, tirozin çözeltisi ilavesi ve bagetle karıştırma, 90 saniyeden az bir sürede tamamlanarak süspansiyon, 4°C'de 2 saat süreyle manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Daha sonra 16 saat 4°C'de bekletildi. Bu sürenin bitiminde yıkama suyu 280 nm'de absorbans vermeyinceye kadar bol su ile yıkandı ve böylece reaksiyona girmeyen tirozin tamamen uzaklaştırılmış oldu. Yıkama, 100 mL NaHCO<sub>3</sub> tamponu ile (0,2 M, pH: 8,8) tekrarlanarak tirozin takılı jel, aynı tamponun 40 mL'si içine alındı.

**ii. Sülfanilamid kenetlendirilmesi:** 25 mg sülfanilamid, 0°C civarında 10 mL 1 M HCl içinde çözürek ve içerisinde 75 mg NaNO<sub>2</sub> bulunan 0°C'deki 5 mL çözelti, sülfanilamid çözeltisine damla damla katıldı. 10 dakikalık reaksiyondan sonra diazolanmış sülfanilamid 40 mL Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonuna ilave edildi. Karışımın pH'sı 1 M NaOH ile 9,5'a çıkarılarak sabit tutularak 3 saat süreyle oda sıcaklığında

yavaşça karıştırıldı. Daha sonra 1 L saf su ve 200 mL Tris-SO<sub>4</sub> (0,05 M, pH: 7,4) tamponuyla yıkandı. Yıkandıktan sonra üzerine bir miktar daha aynı tampondan konularak saklandı (Atasever *et al.* 2013). Reaksiyonun açık formülleri Şeki 3.1 ile gösterilmiştir.



**Şekil 3.1.** CNBr Sepharose 4B-L-tirozin afinite jelinin hazırlanmasındaki reaksiyonların basamakları



### **3.2.1.b. Karadeniz alabalığı böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokularının temini ve homojenat hazırlanması**

Çalışmalarda kullanılan Karadeniz alabalıkları Rize’de alabalık çiftliğinden taze olarak alındı. Balıklar soğuk zincir kuralına göre laboratuvara getirildikten sonra böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokuları çıkarıldı. Doku örneği kan ve diğer kirlilikleri elimine etmek için %0,9’luk soğuk NaCl ile 3 kez yıkandı. Homojenatı hazırlanacak olan doku ilk olarak bisturi kullanılarak oldukça küçük parçalara ayrıldı. Daha sonra sıvı azot içinde parçalanarak dokunun her gramı için 25 mM Tris-SO<sub>4</sub>-HCl/0,1 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH: 8,7) tampon çözeltisinden 3 mL ilave edilerek homojenize edildi. Bu süspansiyon ultra santrifüj cihazı ile 4°C’de 60 dakika 16000xg’de 2 defa santrifüj yapıldı ve süpernatant analizler için kullanılmak üzere hazırlandı. Her doku için aynı işlem tekrarlandı (Wistrand 2002; Pullan and Noltmann 1985). Homojenat hazırlandıktan sonra doku üzerinde biriken yağ tabakasını elimine etmek için 2/7 oranında hekzan (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>)/homojenat 5 dakika 1500xg’de santrifüj edildi.

### **3.2.1.c. Karadeniz alabalığı böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokularıyla hazırlanan homojenatların afinite kolonuna tatbiki ve elüsyonu**

Karadeniz alabalığı böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokularından ayrı ayrı elde edilen doku homojenatları süzgeç kâğıdından süzüldükten sonra katı Tris-SO<sub>4</sub> kullanılarak pH’ ları 8,7’ye ayarlanıp kolona tatbik edildi ve kolon 400 mL 25 mM Tris-SO<sub>4</sub>-HCl / 22 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH:8,7) çözeltisi ile yıkandı. Böylece karbonik anhidraz enzimi kolona tutunmuş ve diğer safsızlıklar uzaklaştırılmış oldu. Daha sonra 0,1 M NaCH<sub>3</sub>COO/0,5 M NaClO<sub>4</sub> (pH: 5,6) çözeltisi kolona tatbik edilip CA enzimi elüe edildi. Peristaltik pompa vasıtasıyla kolonun akış hızı 20 mL/saat’e ayarlandı. Fraksiyon toplayıcı yardımıyla elüatlar 1,5’er mL halinde tüplere alınarak 280 nm’deki absorbanslarına bakıldı.

### 3.2.1.d. Sodyum Dodesilsülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) ile enzim saflığının kontrolü ve molekül kütlesi tayini

Karadeniz alabalığı böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokularından afinite kolonu ile karbonik anhidraz enziminin saflaştırılmasından sonra %3-8 kesikli sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektrofrez (SDS-PAGE) Laemmli (1970), tarafından açıklandığı gibi yapılarak saflaştırılan enzimlerin saflık derecesi kontrol edildi.

Başlangıçta elektrofrez plakaları saf su ile iyice yıkandı. Cam plakaları birleştiren mikalara (spacer) ince bir tabaka halinde vazelin sürüldü. İki cam plaka birbirini 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. Jelin katılaşması için bir süre beklendi, ardından tarak dikkatlice çıkarılarak plakalar elektrofrez tankına yerleştirildi.

**i. Ayırma jelinin hazırlanması:** 5 mL Tris-HCl (1 M, pH:8,8), 4.4 mL %30'luk akrilamid-%0,8'lik bisakrilamid, 0,2 mL %10'lik SDS, 3.13 mL saf su ve 0.13 mL %5'lik TEMED (N,N,N',N'-tetrametil etilen diamin) karıştırıldı. Bu karışımın üzerine en son olarak 0.1 mL %10'luk amonyum persülfat (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (PER) çözeltisi ilave edildi. Burada kullanılan PER kullanılmadan hemen önce taze olarak hazırlandı. PER ilave edildikten hemen sonra jelin üst kısmından izopropil alkol geçirildi.

**ii. Yığma jelinin hazırlanması:** 1 M'lık Tris-HCl (pH:6,8)'den 0,41 mL, %30'luk akrilamid-%0,8'lik bisakrilamid'den 0,44 mL, %10'lik SDS'den 0.03 mL, saf sudan 2.45 mL ve %5'lik TEMED'den 0.03 mL alınarak karıştırıldı. Son olarak yine günlük hazırlanmış %1,5'luk PER'den 0.08 mL ilave edildi.

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 100 µg protein olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim 200 µL olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu katıldı. 5 dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi. Numuneler ve standartlar jel kuyularına çok ince bir enjektör yardımıyla dikkatlice uygulandı. Tank kapağı kapatılarak alt tarafından (+) kablo (Anot), üstten (-) kablo (katot) yerleştirildi. Önce 80 voltta yarım saat bekletildi. Daha sonra gerilim 150 volta ayarlanarak 2 saat oda sıcaklığında tatbik edildi. Akım kesilerek, cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı. Bu yürütme tamponu tekrar kullanılmak üzere saklandı. İlk olarak tespit çözeltisinde 30 dakika çalkalayıcı içinde bekletildi. Daha sonra redüksiyon çözeltisinde 30 dakika çalkalandı. Çözeltiden çıkarılan jel özel kabına konularak en az 3 defa saf su ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra 20 dakika gümüş nitrat çözeltisinde boyamaya bırakıldı. Gümüş ile boyanan çözelti birkaç kez tekrar saf su ile yıkandı. Son olarak jel yıkama çözeltisi içine alınarak bantlar netleşene kadar çalkanarak yıkandı. Jel dikkatlice alınarak fotoğrafı çekildi. Powerpnt programı kullanılarak bantların yürütme mesafeleri ölçülerek enzimlerin mol kütleleri hesaplandı.

Laemmli (1970) metoduna göre molekül kütlesi tayini şu şekilde yapıldı; standart protein olarak molekül ağırlığı 170, 130, 100, 70, 55, 40, 35, 25, 15 ve 10 kDa olan standartlar kullanıldı. Elektroforez işleminden sonra standart proteinlerin  $R_f$  değerleri hesaplanarak log MA- $R_f$  standart grafiği çizildi. Daha sonra numunenin  $R_f$  değeri hesaplandı ve standart grafikte yerine konularak Karadeniz alabalığının karaciğer, solungaç, böbrek ve kas CA enziminin logMA'sı belirlendi. Bu değerlerin antilogaritması alınarak numunenin molekül kütlesi tespit edildi. Proteinlerin  $R_f$  değerleri;

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

formülü ile belirlendi. Bu formülde  $X_e$ : Proteinin yürütme mesafesi,  $X_{boya}$ : boyanın yürütme mesafesidir.

### **3.3. Protein Tayini**

#### **3.3.1. Kalitatif protein tayini**

Kalitatif protein tayini, Warburg metodu olarak bilinen 280 nm'de proteinlerin yapısında bulunan triptofan ve tirozinin maksimum absorbands göstermesi esasına dayanmaktadır (Segel 1968). Afinite kolonundan eşit hacimde alınmış tüplerde kalitatif protein tayini yapıldı. Kuvars küvetler kullanılarak spektrofotometrede 280 nm'de köre karşı absorbands değerleri okundu.

#### **3.3.2. Bradford yöntemi ile protein tayini**

Afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltisi ve homojenatlardaki protein miktarları bu yöntemle belirlendi. Bu yöntem, proteine coomassie brilliant blue G-250'nin bağlanması esasına dayanır. Oluşan kompleks 595 nm'de maksimum absorbands gösterir. Proteine boyanın bağlanması çok hızlı gelişir. Protein-boya kompleksi çözeltilerde uzun süre kalır. Bu yöntemin hassasiyeti 1–100 µg arasındadır (Bradford 1976).

Tayin işlemlerinde şu prosedür takip edildi: 1 mL'sinde 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 tamamlandı. Tüplerin hacmi coomassie brilliant blue G-250 reaktifi ile 5 mL'ye tamamlandı ve vortex ile karıştırıldı. Proteine boyanın tam olarak bağlanabilmesi için 10 dakika beklendi ve sonra 595 nm'de 3 mL'lik küvetlerde köre karşı absorbands değerleri okundu. Kör olarak 0,1 mL saf su ve 4,9 mL renklendirme reaktifinden oluşan karışım 5 mL tamamlanarak absorbands değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri standart grafik haline getirildi.

Numune çalışmaları için doku homojenatları ve saf enzim çözeltilerinden üç ayrı tüpe sırasıyla 100 µL alınarak üzerlerine renklendirme reaktifleri ilave edilerek toplam hacim

5 mL'ye tamamlandı. Karışım vorteks ile karıştırılıp 10 dakikalık bir inkübasyondan sonra 595 nm'de absorbans değerleri okundu. Bu işlem 3 defa tekrarlanarak 3 ayrı ölçümün aritmetik ortalaması alınıp standart grafikten yararlanarak protein miktarları belirlendi.

### 3.4. Karbonik Anhidraz Enziminin Aktivite Ölçümü

Karbonik anhidraz enziminin aktivitesi iki şekilde ölçülebilmektedir; birincisi, CA enziminin fizyolojik aktivitesi olan CO<sub>2</sub>-hidrataz aktivitesidir, ikincisi ise *in vitro* şartlarda gerçekleştirdiği spektrofotometrik olarak takip edilebilen esteraz aktivitesidir.

**a) CO<sub>2</sub>-hidrataz aktivitesi:** Bu yöntem Rickli ve arkadaşları tarafından geliştirilen edilen Wilbur-Anderson yöntemidir (Wilbur and Anderson 1948). CO<sub>2</sub>'nin hidrasyonu sonucu açığa çıkan H<sup>+</sup> iyonundan ileri gelen pH değişiminin brom timol mavisi indikatörü ile belirlenip, mavi rengin sarımsı yeşile dönüşmesine kadar geçen sürenin ölçülmesi esasına dayanır.

Bunun için kör olarak hazırlanan tüpe 1 mL veronal tamponu (0,025 M pH:8,2), 0,1 mL brom timol mavisi (%0,04'lük), 0,6 mL saf su ve 2,5 mL CO<sub>2</sub> çözeltisi ilave edildi. Böylece aktivite ölçüm ortamında toplam hacim 4,2 mL oldu. Daha sonra bir kronometre yardımıyla CO<sub>2</sub> çözeltisi katıldığı andan itibaren indikatörün mavi renginin sarımsı yeşile dönüşmesi (pH: 6,3) için geçen süre belirlendi (t<sub>0</sub>). Numune tüpüne ise sudan 0,1 mL azaltarak bunun yerine enzim çözeltisi ilave edildi ve CO<sub>2</sub> çözeltisi ilave edilmez indikatörün mavi renginin sarımsı yeşile dönüşmesi (pH: 6,3) için geçen süre bir kronometre vasıtasıyla belirlendi (t<sub>c</sub>).

Hidrataz aktivitesi tayini sırasında kullanılan çözeltiler ve miktarları kullanım sırasına göre aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

**Çizelge 3.2.** Karbonik anhidraz enziminin hidrataz aktivitesi ölçümü için kullanılan çözeltiler ve miktarları

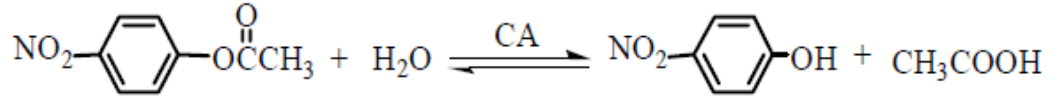
Çözeltiler	Kontrol Tüpü (µL)	Numune Tüpü (µL)
Veronal tamponu (0,025 M, pH:8,2)	1000	1000
Brom timol mavisi (%0,04)	100	100
Saf su	600	500
Enzim çözeltisi	-	100
CO <sub>2</sub> gazı ile doyurulmuş çözelti	2500	2500
<b>Toplam hacim</b>	<b>4200</b>	<b>4200</b>

Bu yöntemle göre CA enziminin aktivitesi için bir enzim ünitesi (EU) enzimsiz olarak meydana gelen CO<sub>2</sub> hidratasyonu süresini yarıya indiren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır.

Enzim aktivitesi, enzimsiz olarak gerçekleşen CO<sub>2</sub> hidratasyon süresi (t<sub>o</sub>) ile enzimli çözeltideki reaksiyon süresi (t<sub>c</sub>) arasındaki farkın (t<sub>c</sub>)'ye bölünmesi ile bulundu ve aşağıdaki formüle göre hesaplandı (Maren 1960).

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

**b) Esteraz aktivitesi:** Bu metodun prensibi, karbonik anhidraz enziminin substrat olarak kullanılan p-nitrofenilasetatı 348 nm'de absorpsiyon veren p-nitrofenol veya p-nitrofenolat'a hidroliz etmesi esasına dayanır. p-nitrofenol ve p-nitrofenolat'ın her ikisinde 348 nm'de aynı absorpsiyon gösterir. Bu nedenle fenol grubundaki proton (H<sup>+</sup>) iyonunun ayrışmaması ölçümü etkilememektedir (Verpoorte and Mehta 1967; Armstrong *et al.* 1996). Substrat olarak kullanılan p-nitrofenilasetat 348 nm'de çok az absorpsiyon verdiği için kör olarak kullanıldı. Reaksiyonun denklemi aşağıdaki gibidir.



Esteraz aktivitesinde absorbans ölçümü için kör olarak hazırlanan tüpe pH:9,0 olan Tris-SO<sub>4</sub> tamponundan 400 µL, substrat olarak 360 µL p-nitrofenilasetat ve 240 µL saf su ilave edildi. Böylece aktivite ölçüm ortamında toplam hacim 1 mL oldu. Numune tüpüne ise sudan 20 µL azaltarak bunun yerine enzim çözeltisi ilave edilerek her 1 dakikada bir absorbans miktarı okunarak 3 dakika sonundaki 25°C'de 348 nm'de absorbansı okunarak absorbans farkı alındı. Spektrofotometre, daha önce enzim yerine saf su konularak elde edilen karışımın 3 dakika sonundaki absorbansı ile sıfıra ayarlandı. Esteraz aktivitesi tayini sırasında kullanılan çözeltiler ve miktarları kullanım sırasına göre aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

**Çizelge 3.3.** Karbonik anhidraz enziminin esteraz aktivitesi ölçümü için kullanılan çözeltiler ve miktarları

Çözeltiler	Kontrol Tüpü (µL)	Numune Tüpü (µL)
Tris-SO <sub>4</sub> tamponu (1 M, pH:9,0)	400	400
p-nitrofenilasetat	360	360
Saf su	240	220
Enzim çözeltisi	-	20
<b>Toplam hacim</b>	<b>1000</b>	<b>1000</b>

Yapılan deneylerde kullanılan p-nitrofenilasetat substrat çözeltisi, günlük olarak hazırlandı. Çözelti için 13,6 mg p-nitrofenilasetat 1 mL aseton içinde çözüldü ve hızlıca karıştırılan 24 mL saf suya yavaş yavaş ilave edildi. Bu çözelti 3 mM'lık olup, daha derişğini hazırlamak, esterin sınırlı çözünürlüğü dolayısıyla mümkün değildir. Aseton, diğer organik çözücülere nispeten hidroliz reaksiyonunu en az inhibe eden çözücü olduğu için seçildi (Verpoorte and Mehta 1967). Kinetik çalışmalar esnasındaki aktivite ölçümleri enzimin esteraz aktivitesi ile gerçekleştirildi.

### **3.5. Karadeniz Alabalığı Dokularından Saflaştırılan CA Enzimi ile İlgili Yapılan Kinetik Çalışmalar**

#### **3.5.1. Karbonik anhidraz enzimi için optimum pH çalışması**

Optimum pH çalışması; pH:7,0-9,0 aralığında 1 M Tris-SO<sub>4</sub> ve pH:5,0-8,0 aralığında 1 M potasyum fosfat tampon çözeltilerinde Karadeniz alabalığı böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokularından elde edilen CA enzimlerinin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak ölçüldü. Enzim aktivitesi tayininde esteraz aktivitesi kullanıldı. Sonuçlar aktivite-pH grafikleri halinde gösterildi.

#### **3.5.2. Karbonik anhidraz enzimi için optimum iyonik şiddet çalışması**

Karadeniz alabalığı böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokularından elde edilen CA enzimlerinin aktiviteleri üzerine iyonik şiddetin etkisinin belirlenmesi, enzim aktivitesinin optimum olduğu Tris-SO<sub>4</sub> tamponu kullanılarak yapıldı. Bu tampon ile 0,01 M ile 1,25 M arasında iyonik şiddete sahip çözeltiler hazırlandı ve CA enzimleri için esteraz aktivite ölçümleri yapıldı. Tüm dokulardan elde edilen CA enzimleri için optimum iyonik şiddet 1 M Tris-SO<sub>4</sub> olarak belirlendi, sonuçlar çizelgeler 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-SO<sub>4</sub> 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. Karadeniz alabalığı dokularından elde edilen CA enziminin optimum sıcaklığın, aktivasyon enerjisinin ( $E_a$ ), aktivasyon entalpisinin ( $\Delta H$ ) ve $Q_{10}$ değerlerinin hesaplanması ile ilgili çalışmalar

Karadeniz alabalığı böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokularından saflaştırılan CA enzimlerinin aktivitelerinin optimum olduğu sıcaklıkların,  $E_a$ ,  $\Delta H$  ve  $Q_{10}$  değerlerinin belirlenmesi amacıyla dijital su banyosu kullanılarak 0°C ile 80°C arasında 10°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  $1/T \times 1000^\circ K^{-1}$  olarak ifade edildi (Danışan *et al.* 2004). Çizilen grafikten faydalanılarak Arrhenius eğrisi elde edildi ve bu eğrinin eğimi kullanılarak aktivasyon enerjisi ( $E_a$ ) hesaplandı.

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

Aktivasyon entalpisinin ( $\Delta H$ )'nin hesabında ise aşağıdaki formülünden faydalanıldı (Segel 1975; Wilson 1971).

$$\Delta H = E_a - RT$$

Son olarak 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. Karadeniz alabalığı dokularından elde edilen CA enziminin $K_M$ , $V_{max}$ , $k_{cat}$ ve $V_0$ değerlerinin bulunmasına yönelik çalışmalar

Karadeniz alabalığı böbrek, karaciğer, solungaç ve kas 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. Lineweaver-Burk grafiği çizildi ve bu grafikten  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri hesaplandı. Daha sonra kantitatif protein tayininde bulunan toplam enzim miktarı ( $E_T$ ) kullanılarak enzimin turnover sayısını ifade eden  $k_{cat}$  değeri aşağıda verilen formül ile hesaplandı.

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{E_T}$$

Birçok enzimin katalitik etkilerinin veya farklı substratların aynı enzimle ürüne dönüşümünün karşılaştırılmasının bir yolu da tepkimeler için özgülük sabitinin hesaplanmasıdır. Özgülük sabiti  $V_0$  formülü ile hesaplandı (Lehninger 2005).

$$V_0 = \frac{k_{cat}}{K_M}$$

### **3.5.6. Bazı ağır metallerin Karadeniz alabalığı dokularından elde edilen CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin incelenmesi**

Karadeniz alabalığının böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokularından afinite kromatografisi vasıtasıyla saflaştırılan karbonik anhidraz enziminin aktivitesi üzerine inhibisyon etkileri araştırıldı. Kinetik ölçümler enzimin esteraz aktivitesinden faydalanılarak gerçekleştirildi (Verpoorte and Mehta 1967; Armstrong *et al.* 1966).

Enzimin esteraz aktivitesini inhibe eden  $FeCl_2$ ,  $Pb(CH_3COO)_2$ ,  $CoCl_2$ ,  $AgNO_3$  ve  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  kimyasal maddeleri için sabit substrat konsantrasyonunda beş farklı inhibitör konsantrasyonu kullanılarak  $IC_{50}$  değerleri (enzimin aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu) % Aktivite-[I] grafikleri çizilerek belirlendi.

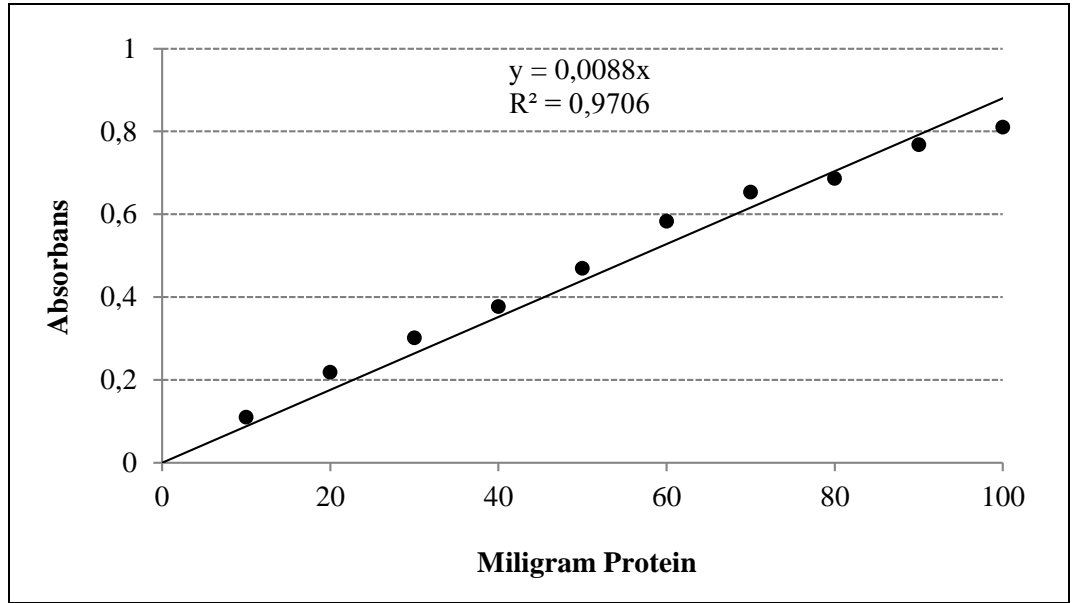
### **3.5.7. Karadeniz alabalığı dokularından elde edilen CA enzimi için inhibitör etkisi gösteren ağır metallerin $K_i$ sabitlerinin ve inhibisyon türlerinin bulunması**

İnhibitör çalışmaları için, Karadeniz alabalığı dokularından elde edilen CA enzimini inhibe eden  $\text{FeCl}_2$ ,  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{AgNO}_3$  ve  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  kimyasal maddeleri kullanıldı. 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. Daha sonra Karadeniz alabalığının böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokularından saflaştırılan CA enzimleri için üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda  $V$ -[S] değerleri belirlenerek her bir inhibitör için ayrı ayrı  $1/V$ -[ $1/S$ ] değerleri hesaplanıp 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 Hazırlanan Standart Grafik

Karadeniz alabalığı dokularından elde edilen homojenatlar ve saflaştırılan enzim çözeltilerindeki kantitatif protein miktarı için Bradford yöntemi kullanıldı (Bradford 1976). Bu yöntem için önce bir standart eğri hazırlandı. Hazırlanan homojenatlar ve saflaştırılan enzim çözeltilerindeki protein miktarı bu eğriye göre belirlendi. Kantitatif protein miktarları Şekil 4.1'den elde edilen denklemden hesaplandı ( $R^2:0,9706$  hesaplandı).

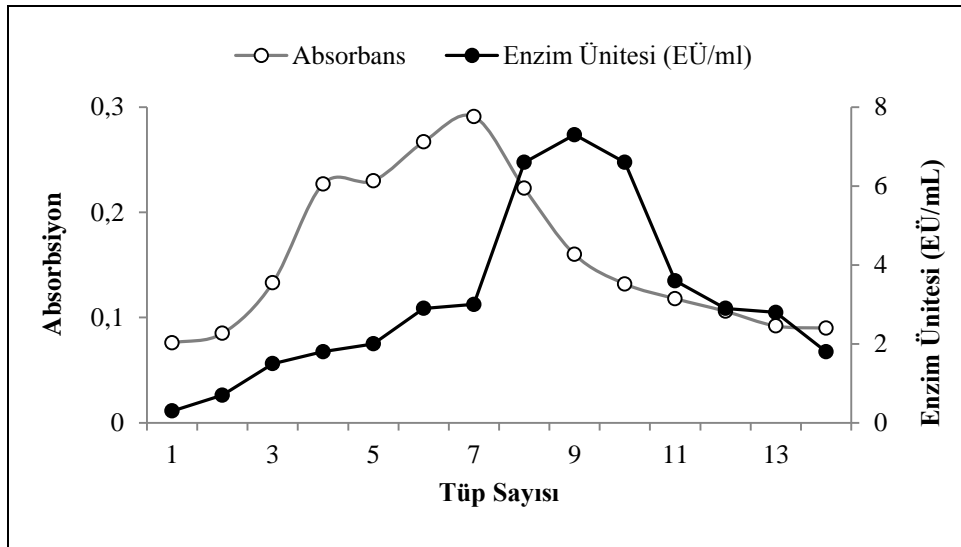


**Şekil 4.1.** Bradford yöntemi ile BSA kullanılarak protein tayini için hazırlanan standart grafik

## 4.2. Karadeniz Alabalığı Böbrek, Karaciğer, Solungaç ve Kas Dokularından Karbonik Anhidraz Enziminin Saflaştırılma ve Karakterizasyon Sonuçları

### 4.2.1. Karbonik anhidraz enziminin Sepharose-4B afinite kromatografisi ile saflaştırılma kademeleri

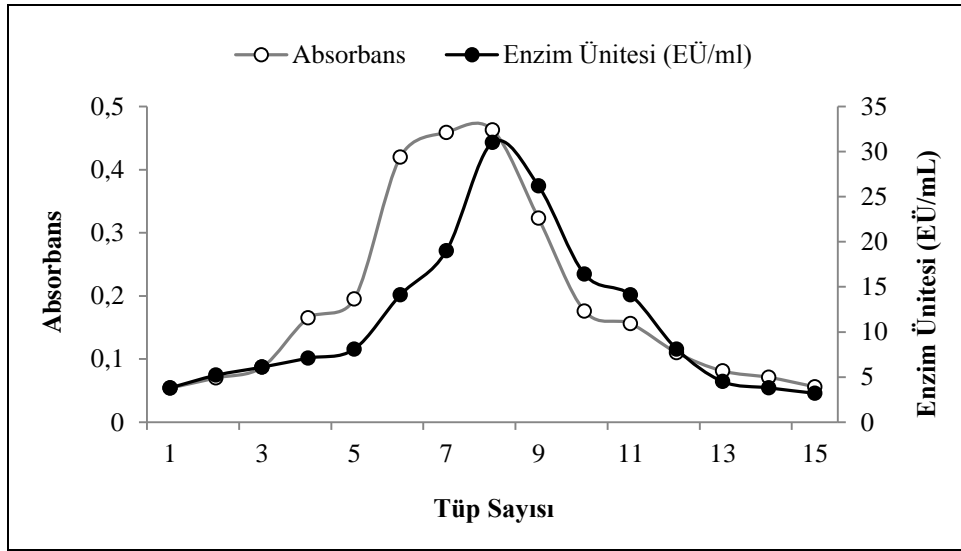
Karadeniz alabalığı böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokularından hazırlanan homojenatların pH'ları katı Tris kullanılarak pH metre ile 8,7'ye ayarlandı. Daha sonra bölüm 3.2.1.b'de anlatıldığı şekilde Sepharose-4B-L-Tirozin sülfonilamid afinite kolonuna doku numuneleri ayrı ayrı yüklendi. Afinite kolonundan her bir tüpe 1,5'er mL olacak şekilde elüe edilen numunelerin 280 nm'de Walburg metoduna göre kalitatif protein tayinleri yapıldı. Absorbans gösteren tüplerde CO<sub>2</sub> hidrataz aktivitesine bakıldı. Aktivite gösteren tüpler birleştirildi. Her bir doku için absorbans-tüp sayısı-aktivite grafikleri çizildi (Şekil 4.2, 4.3, 4.4, 4.5). Sepharose-4B-L-Tirozin sülfonilamid afinite kromatografisi ile elde edilen, yüzde verim ve saflaştırma katsayıları ise Çizelge 4.1, 4.2, 4.3 ve 4.4'te verildi.



Şekil 4.2. Karadeniz alabalığı böbrek dokusundan afinite kromatografisiyle saflaştırılan CA enziminin elüsyon tüplerindeki hidrataz aktivitesi ve 280 nm'deki absorbans değerleri

**Çizelge 4.1.** Karadeniz alabalığı böbrek dokusundan CA enziminin saflaştırma sonuçları

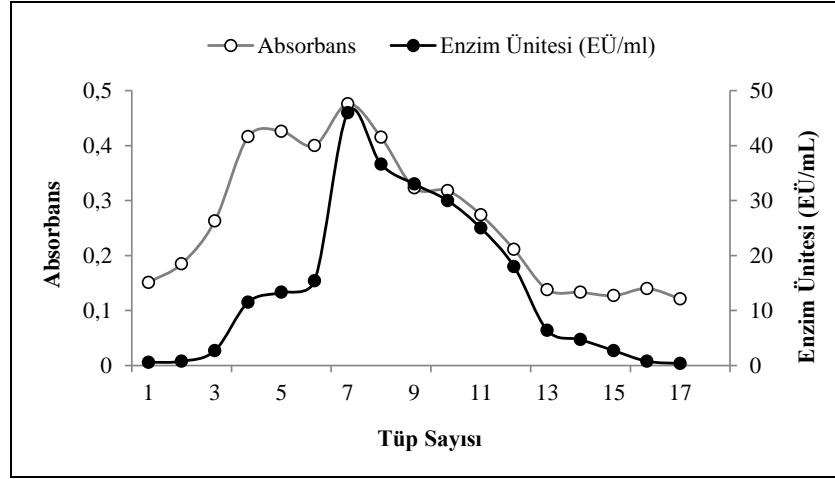
Numune	Aktivite (EÜ/mL)	Toplam hacim(mL)	Protein (mg/mL)	Toplam protein(mg)	Toplam aktivite	Spesifikaktivite (EÜ/mg)	Verim (%)	Saflaştırma katsayısı
Homojenat	60	22,5	34,55	777,4	1350	1,73	100	1,00
Sepharose-4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite kolon kromatografisi	160	3	0,265	0,795	480	603,77	35,55	349,00



**Şekil 4.3.** Karadeniz alabalığı karaciğer dokusundan afinite kromatografisiyle saflaştırılan CA enziminin elüsyon tüplerindeki hidrataz aktivitesi ve 280 nm'deki absorbans değerleri

**Çizelge 4.2.** Karadeniz alabalığı karaciğer dokusundan CA enziminin saflaştırma sonuçları

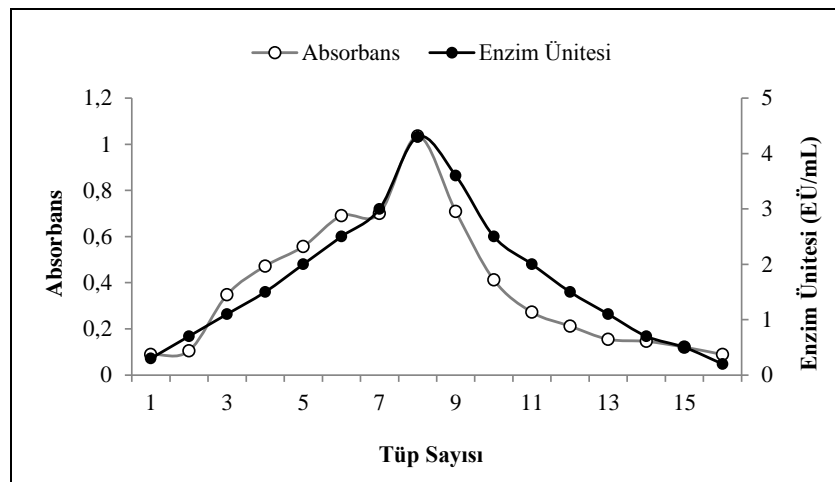
Numune	Aktivite (EÜ/mL)	Toplam hacim(mL)	Protein (mg/mL)	Toplam protein(mg)	Toplam aktivite	Spesifikaktivite (EÜ/mg)	Verim (%)	Saflaştırma katsayısı
Homojenat	70	23	45,11	1037,53	1610	1,55	100	1,00
Sepharose-4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite kolon kromatografisi	100	3	0,178	0,534	300	561,79	18,63	362,45



**Şekil 4.4.** Karadeniz alabalığı solungaç dokusundan afinite kromatografisiyle saflaştırılan CA enziminin elüsyon tüplerindeki hidrataz aktivitesi ve 280 nm'deki absorbands değerleri

**Çizelge 4.3.** Karadeniz alabalığı solungaç dokusundan CA enziminin saflaştırma sonuçları

Numune	Aktivite (EÜ/mL)	Toplam hacim(mL)	Protein (mg/mL)	Toplam protein(mg)	Toplam aktivite	Spesifikaktivite (EÜ/mg)	Verim (%)	Saflaştırma katsayısı
Homojenat	20	38	15,9	604,2	760	1,25	100	1,00
Sepharose-4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite kolon kromatografisi	180	3	0,129	0,387	540	1395,35	71,05	1116,28



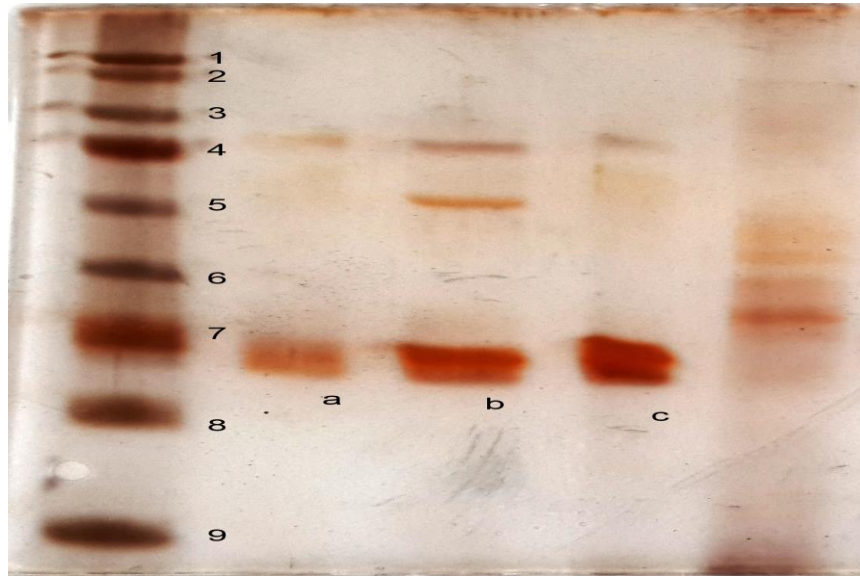
**Şekil 4.5.** Karadeniz alabalığı kas dokusundan afinite kromatografisiyle saflaştırılan CA enziminin elüsyon tüplerindeki hidrataz aktivitesi ve 280 nm'deki absorbands değerleri

**Çizelge 4.4.** Karadeniz alabalığı kas dokusundan CA enziminin saflaştırma sonuçları

Numune	Aktivite (EÜ/mL)	Toplam hacim(mL)	Protein (mg/mL)	Toplam protein(mg)	Toplam aktivite	Spesifikaktivite (EÜ/mg)	Verim (%)	Saflaştırma katsayısı
Homojenat	20	12	31,36	376,32	240	0,63	100	1,00
Sepharose-4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite kolon kromatografisi	60	3	0,202	0,6606	180	297,03	75	471,47

#### 4.2.2. Sodyum Dodesilsülfat-Poliakrilamit Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) ile enzim saflığının kontrolü ve molekül kütlesinin tayini

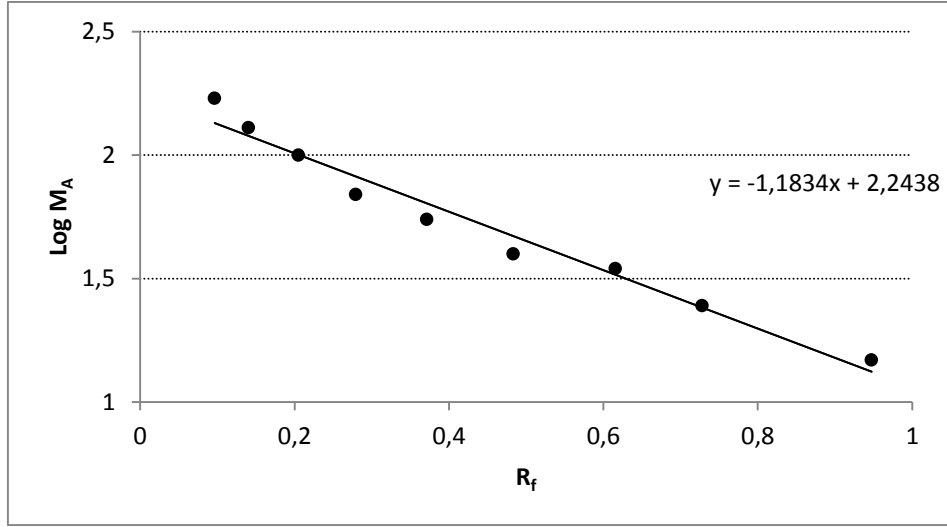
Karadeniz alabalığının böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokularından afinite kolonu ile karbonik ahhidraz enzimi ve standart proteinler, Bölüm 3.2.1.d’de anlatıldığı şekilde hazırlanan kesikli SDS-poliakrilamit jel elektrofrezine tatbik edildi. Daha sonra elde edilen protein bantlarının fotoğrafı çekildi. Karadeniz alabalığı dokusundan saflaştırılan CA enziminin molekül kütlesi log MA-R<sub>f</sub> grafiği çizilerek tespit edildi (Şekil 4.6, 4.7, 4.8, 4.9 ve Çizelge 4.5).



**Şekil 4.6.** Afinite kromatografisiyle saflaştırılan Karadeniz alabalığı karaciğer ve solungaç dokuları CA enziminin SDS-PAGE fotoğrafı

\*Standart numuneler: 1:170, 2:130, 3:100, 4:70, 5:55, 6:40, 7:35, 8:25, 9:15 kDa  
a:böbrek doku, b: karaciğer doku ve c:kas doku



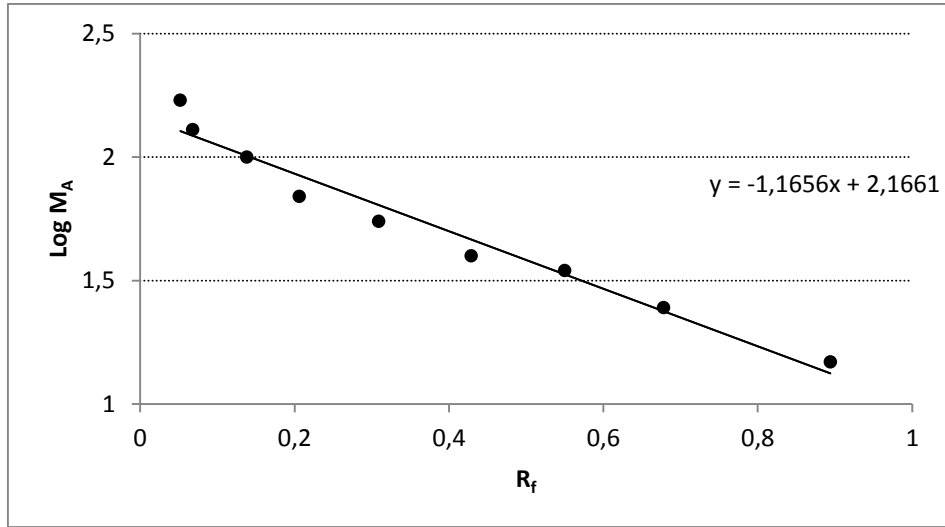


**Şekil 4.7.** SDS-PAGE yöntemiyle Karadeniz alabalığı böbrek, karaciğer ve kas dokuları CA enziminin molekül kütlesi tayininde kullanılan standart grafik



**Şekil 4.8.** Afinite kromatografisiyle saflaştırılan Karadeniz alabalığı kas CA enziminin SDS-PAGE fotoğrafı

\*Standart numuneler: 1:170, 2:130, 3:100, 4:70, 5:55, 6:40, 7:35, 8:25, 9:15, 10:10 kDa  
11:solungaç doku, 12:solungaç doku



**Şekil 4.9.** SDS-PAGE yöntemiyle Karadeniz alabalığı solungaç dokusu CA enziminin molekül kütlesi tayininde kullanılan standart grafik

**Çizelge 4.5.** Karadeniz alabalığı böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokuları CA enzimi için SDS-PAGE ile molekül kütleleri tayini sonuçları

Enzim	Doku	Molekül Kütlesi (kDa)
Karbonik Anhidraz (CA)	Böbrek	29,71
	Karaciğer	29,50
	Solungaç	32,00
	Kas	28,80

### 4.3. Karadeniz Alabalığı Böbrek, Karaciğer, Solungaç ve Kas Dokularından Saflaştırılan CA Enzimi İle İlgili Yapılan Kinetik Çalışmalar

#### 4.3.1. Karbonik anhidraz enzimi için optimum pH çalışması

Karadeniz alabalığı böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokuları karbonik anhidraz enzimlerinin optimum pH çalışması bölüm 3.5.1'de anlatıldığı şekilde, pH'sı 7,0-9,0 aralığında 1 M Tris-SO<sub>4</sub> ve pH'sı 5,0-8,0 aralığında 1 M potasyum fosfat tampon

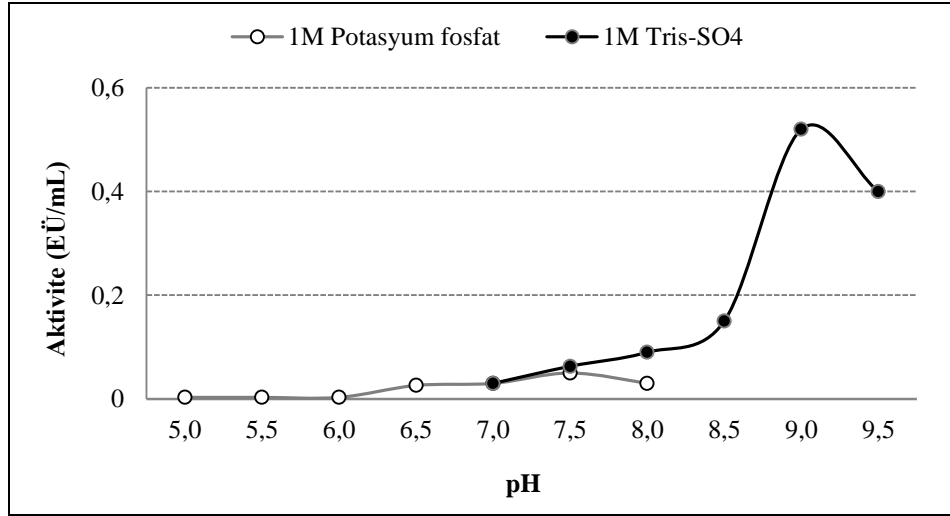
çözeltileri kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçüldü. Karadeniz alabalığı böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokuları karbonik anhidraz enzimi için optimum pH 1 M Tris-SO<sub>4</sub> pH:9,0 tamponu olarak belirlendi (Çizelge 4.6-4.13 ve Şekil 4.10-4.11).

**Çizelge 4.6.** Karadeniz alabalığı böbrek dokusu CA enziminin optimum pH'sı için 1 M potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

<b>1 M Potasyum Fosfat</b>	
<b>pH</b>	<b>Aktivite (EÜ/mL)</b>
5,0	0,003
5,5	0,003
6,0	0,003
6,5	0,026
7,0	0,033
7,5	0,050
8,0	0,030

**Çizelge 4.7.** Karadeniz alabalığı böbrek dokusu CA enziminin optimum pH'sı için 1 M Tris-SO<sub>4</sub> tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

<b>1 M Tris-SO<sub>4</sub></b>	
<b>pH</b>	<b>Aktivite (EÜ/mL)</b>
7,0	0,030
7,5	0,063
8,0	0,090
8,5	0,150
9,0	0,520
9,5	0,400



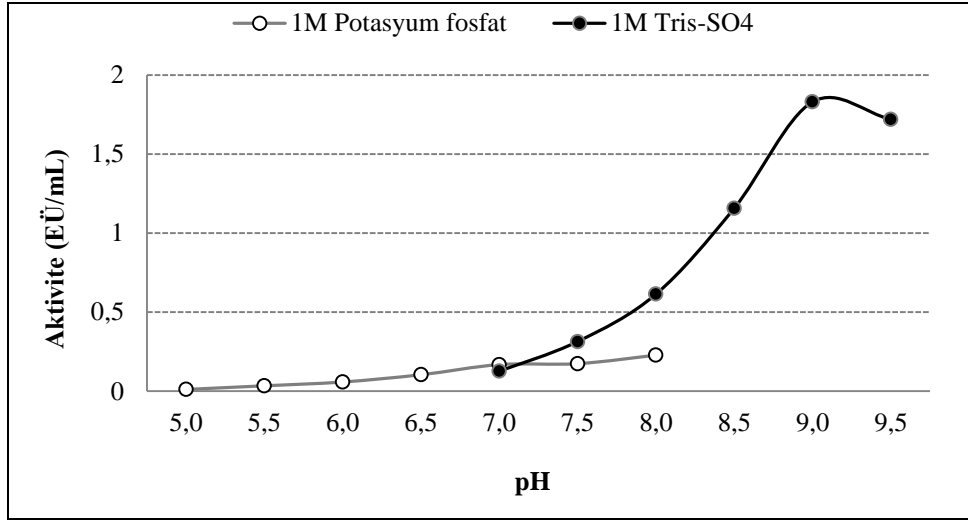
**Şekil 4.10.** Karadeniz alabalığı böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin optimum pH'sını bulmak için 1 M potasyum fosfat ve 1 M Tris-SO<sub>4</sub> tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

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

1 M Potasyum Fosfat	
pH	Aktivite (EÜ/mL)
5,0	0,010
5,5	0,033
6,0	0,057
6,5	0,103
7,0	0,167
7,5	0,173
8,0	0,227

**Çizelge 4.9.** Karadeniz alabalığı karaciğer dokusu CA enziminin optimum pH'sı için 1 M Tris-SO<sub>4</sub> tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

1 M Tris-SO <sub>4</sub>	
pH	Aktivite (EÜ/mL)
7,0	0,126
7,5	0,313
8,0	0,613
8,5	1,157
9,0	1,830
9,5	1,720



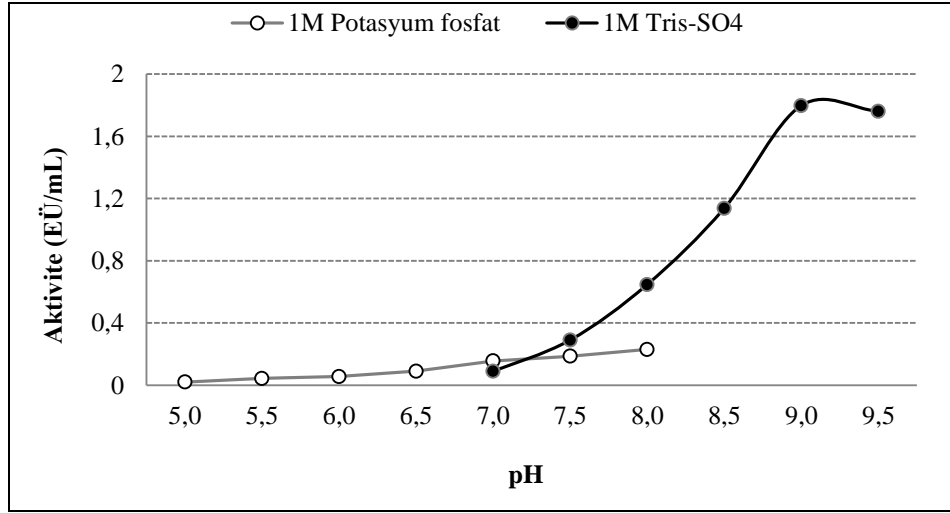
**Şekil 4.11.** Karadeniz alabalığı karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin optimum pH'sını bulmak için 1 M potasyum fosfat ve 1 M Tris-SO<sub>4</sub> tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

**Çizelge 4.10.** Karadeniz alabalığı solungaç dokusu CA enziminin optimum pH'sı için 1 M potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

1 M Potasyum Fosfat	
pH	Aktivite (EÜ/mL)
5,0	0,020
5,5	0,043
6,0	0,056
6,5	0,090
7,0	0,156
7,5	0,186
8,0	0,230

**Çizelge 4.11.** Karadeniz alabalığı solungaç dokusu CA enziminin optimum pH'sı için 1 M Tris-SO<sub>4</sub> tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

1 M Tris-SO <sub>4</sub>	
pH	Aktivite (EÜ/mL)
7,0	0,090
7,5	0,290
8,0	0,647
8,5	1,137
9,0	1,797
9,5	1,760



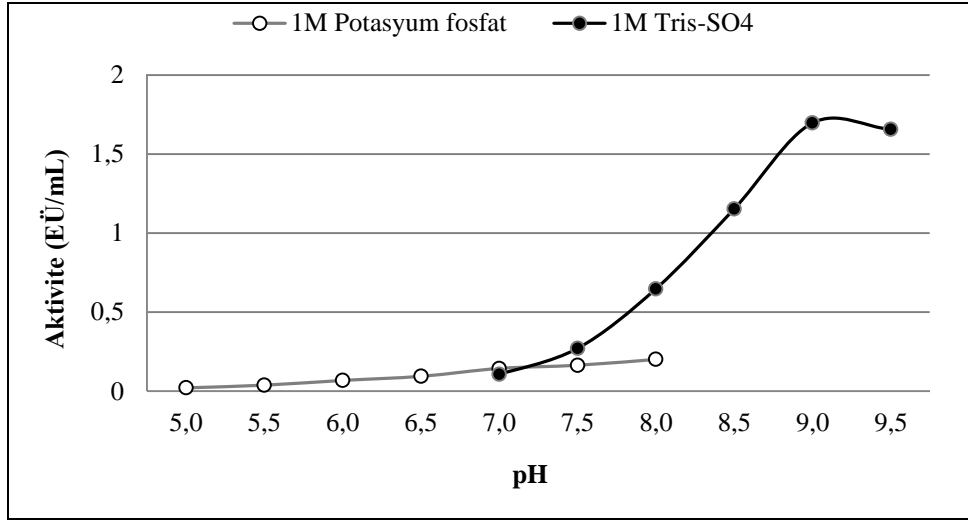
**Şekil 4.12.** Karadeniz alabalığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enziminin optimum pH'sını bulmak için 1 M potasyum fosfat ve 1 M Tris-SO<sub>4</sub> tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

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

1 M Potasyum Fosfat	
pH	Aktivite (EÜ/mL)
5,0	0,02
5,5	0,037
6,0	0,067
6,5	0,093
7,0	0,143
7,5	0,163
8,0	0,200

**Çizelge 4.13.** Karadeniz alabalığı kas dokusu CA enziminin optimum pH'sı için 1 M Tris-SO<sub>4</sub> tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

1 M Tris-SO <sub>4</sub>	
pH	Aktivite (EÜ/mL)
7,0	0,106
7,5	0,27
8,0	0,647
8,5	1,153
9,0	1,697
9,5	1,656



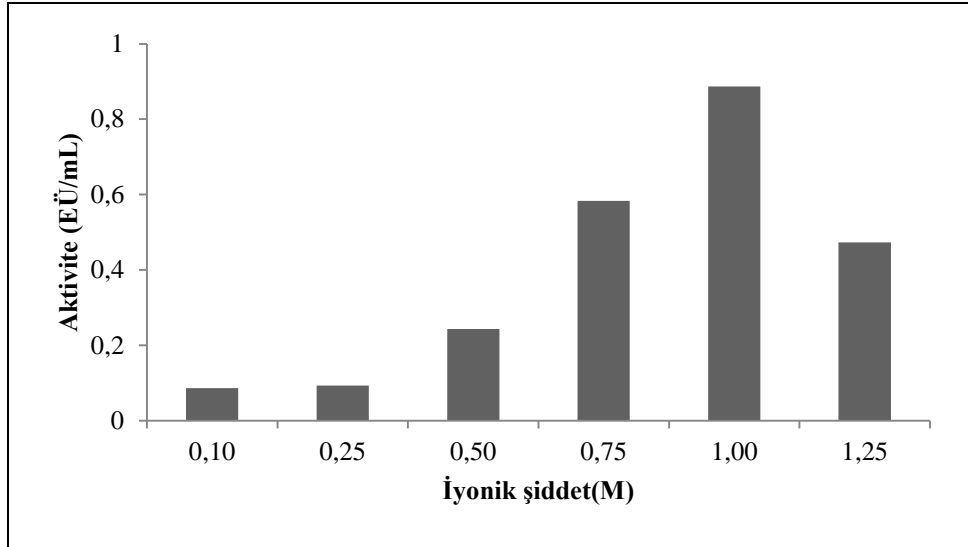
**Şekil 4.13.** Karadeniz alabalığı kas dokusundan saflaştırılan CA enziminin optimum pH'sını bulmak için 1 M potasyum fosfat ve 1 M Tris-SO<sub>4</sub> tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

#### 4.3.2. Karadeniz alabalığı böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokuları CA enzimi için optimum iyonik şiddetinin belirlenmesi

Karadeniz alabalığı böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokularından elde edilen CA enzimi aktivitesi üzerine iyonik şiddetinin etkisinin belirlenmesi için enzim aktivitesinin optimum olduğu Tris-SO<sub>4</sub> tamponu kullanılarak yapıldı. Bu tampon ile 0,1 M ile 1,25 M arasında iyonik şiddete sahip çözeltiler hazırlandı ve CA enzimleri için esteraz aktivite ölçümleri yapıldı. Tüm dokulardan elde edilen CA enzimleri için optimum iyonik şiddet 1 M Tris-SO<sub>4</sub> olarak belirlendi, sonuçlar çizelgeler ve aktivite-konsantrasyon grafikleri halinde gösterildi (Çizelge 4.14-4.17 ve Şekil 4.14-4.17).

**Çizelge 4.14.** Karadeniz alabalığı böbrek dokusu için Tris-SO<sub>4</sub> tampon çözeltisi kullanılarak farklı iyonik şiddetlerde yapılan aktivite ölçüm sonuçları

Tris-SO <sub>4</sub>	
İyonik Şiddet (M)	Aktivite (EÜ/mL)
0,10	0,086
0,25	0,093
0,50	0,243
0,75	0,583
1,00	0,887
1,25	0,473

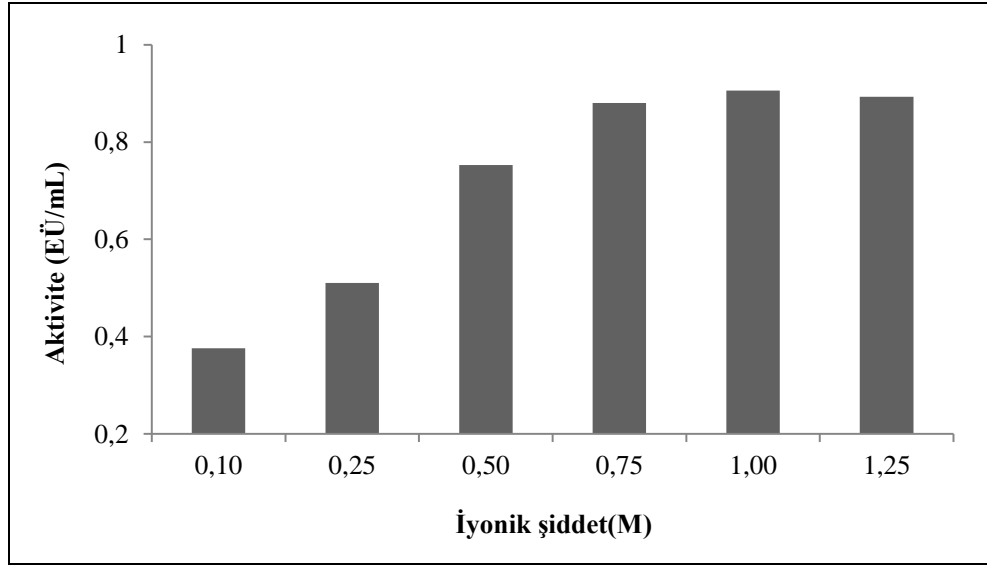


**Şekil 4.14.** Karadeniz alabalığı böbrek dokusu için Tris-SO<sub>4</sub> tampon çözeltisi kullanılarak farklı iyonik şiddetlerde yapılan aktivite ölçüm sonuçları

**Çizelge 4.15.** Karadeniz alabalığı karaciğer dokusu için Tris-SO<sub>4</sub> tampon çözeltisi kullanılarak farklı iyonik şiddetlerde yapılan aktivite ölçüm sonuçları

Tris-SO <sub>4</sub>	
İyonik Şiddet (M)	Aktivite (EÜ/mL)
0,10	0,376
0,25	0,510
0,50	0,753
0,75	0,880
1,00	0,906
1,25	0,893

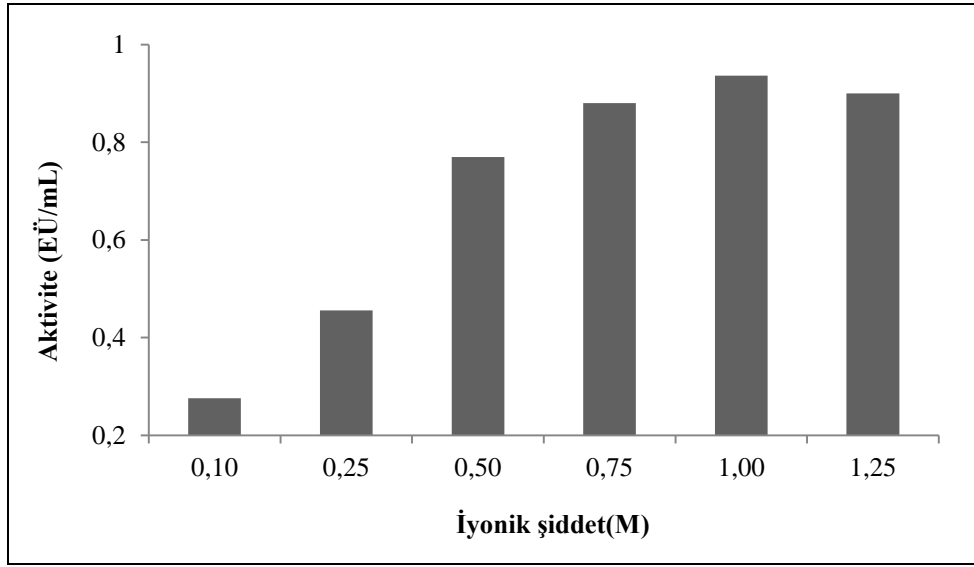




**Şekil 4.15.** Karadeniz alabalığı karaciğer dokusu için Tris-SO<sub>4</sub> tampon çözeltisi kullanılarak farklı iyonik şiddetlerde yapılan aktivite ölçüm sonuçları

**Çizelge 4.16.** Karadeniz alabalığı solungaç dokusu için Tris-SO<sub>4</sub> tampon çözeltisi kullanılarak farklı iyonik şiddetlerde yapılan aktivite ölçüm sonuçları

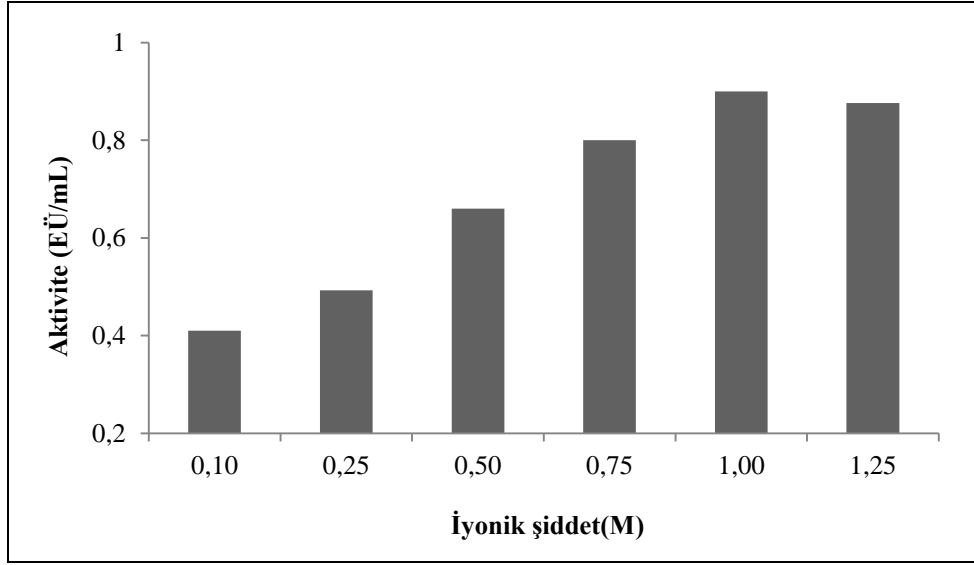
Tris-SO <sub>4</sub>	
İyonik Şiddet (M)	Aktivite (EÜ/mL)
0,10	0,276
0,25	0,456
0,50	0,770
0,75	0,880
1,00	0,936
1,25	0,900



**Şekil 4.16.** Karadeniz alabalığı solungaç dokusu için Tris-SO<sub>4</sub> tampon çözeltisi kullanılarak farklı iyonik şiddetlerde yapılan aktivite ölçüm sonuçları

**Çizelge 4.17.** Karadeniz alabalığı kas dokusu için Tris-SO<sub>4</sub> tampon çözeltisi kullanılarak farklı iyonik şiddetlerde yapılan aktivite ölçüm sonuçları

Tris-SO <sub>4</sub>	
İyonik Şiddet (M)	Aktivite (EÜ/mL)
0,10	0,410
0,25	0,493
0,50	0,660
0,75	0,800
1,00	0,900
1,25	0,876



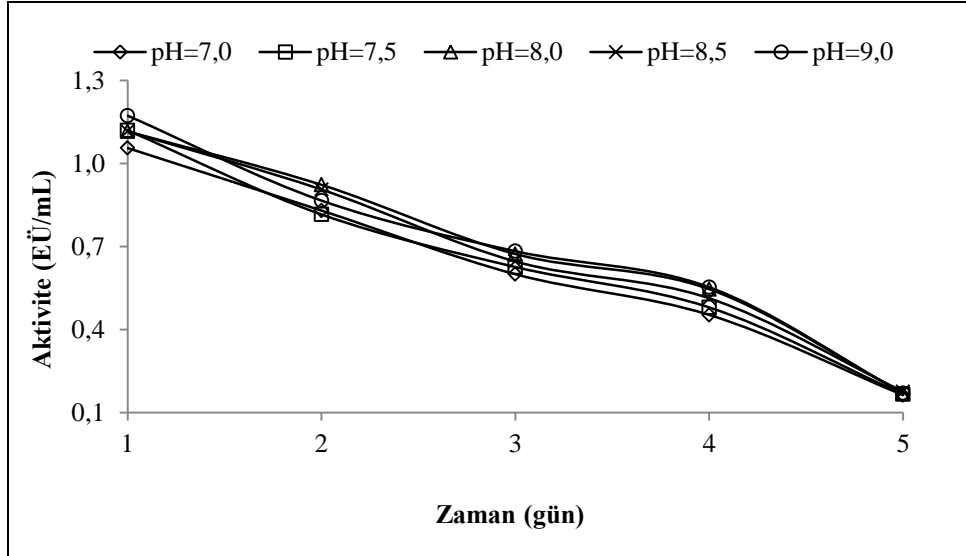
**Şekil 4.17.** Karadeniz alabalığı kas dokusu için Tris-SO<sub>4</sub> tampon çözeltisi kullanılarak farklı iyonik şiddetlerde yapılan aktivite ölçüm sonuçları

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

Karadeniz alabalığı böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokularından saflaştırılan karbonik anhidraz enziminin stabil olduğu pH'ları bölüm 3.5.3'te anlatıldığı şekilde pH'sı 7,0-9,0 olan Tris-SO<sub>4</sub> tamponu ve pH'sı 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 ve 24 saat arayla aktivite ölçümü yapıldı. 5 gün boyunca yapılan aktivite ölçümünde 1 M Tris-SO<sub>4</sub> tampon çözeltisinde böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokuları için enzimin stabil olduğu pH 8,5 olarak belirlendi. İnkübasyon süresine karşılık aktivite değerleri grafikler halinde gösterildi (Çizelge 4.18-4.25 ve Şekil 4.17-4.24)

**Çizelge 4.18.** Karadeniz alabalığı böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin stabil pH'sı için 1 M Tris-SO<sub>4</sub> tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

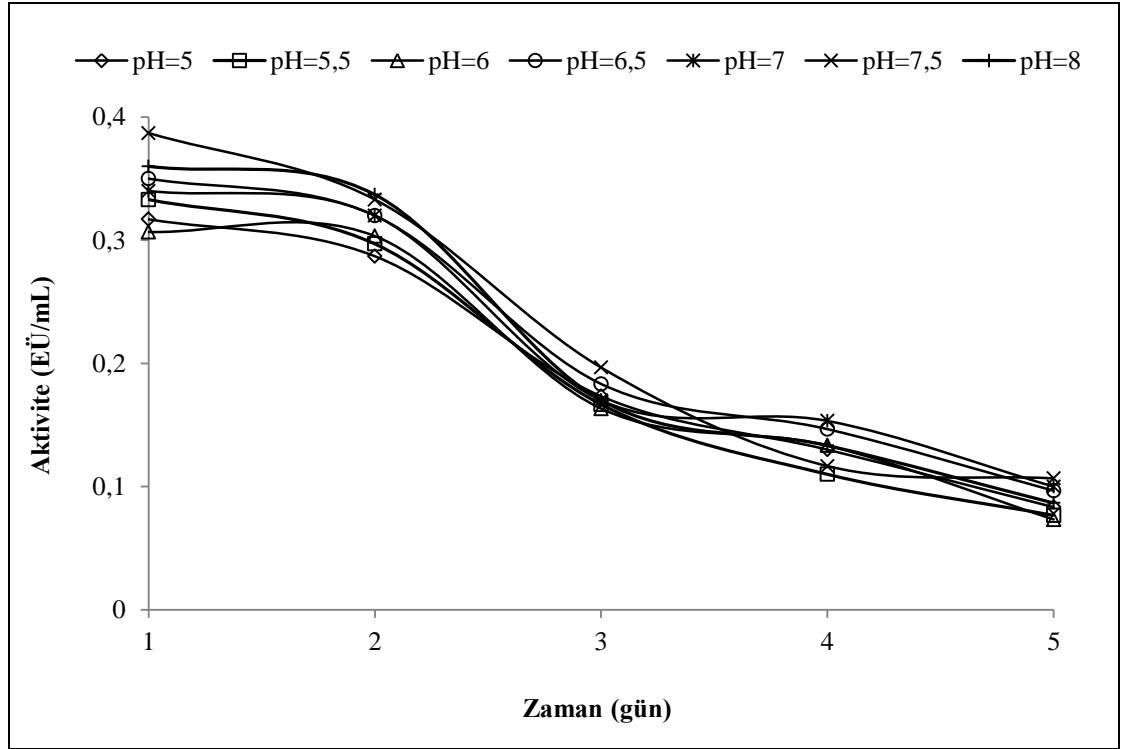
Zaman	pH:7,0 Aktivite (EÜ/mL)	pH:7,5 Aktivite (EÜ/mL)	pH:8,0 Aktivite (EÜ/mL)	pH:8,5 Aktivite (EÜ/mL)	pH:9,0 Aktivite (EÜ/mL)
1.gün	1,056	1,120	1,116	1,116	1,173
2.gün	0,830	0,816	0,923	0,906	0,866
3.gün	0,600	0,626	0,673	0,646	0,683
4.gün	0,453	0,480	0,546	0,513	0,553
5.gün	0,163	0,166	0,170	0,176	0,170



**Şekil 4.18.** Karadeniz alabalığı böbrek dokusu CA enziminin stabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 1 M Tris-SO<sub>4</sub> tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

**Çizelge 4.19.** Karadeniz alabalığı böbrek dokusu CA enziminin stabil pH'sı için 1 M potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

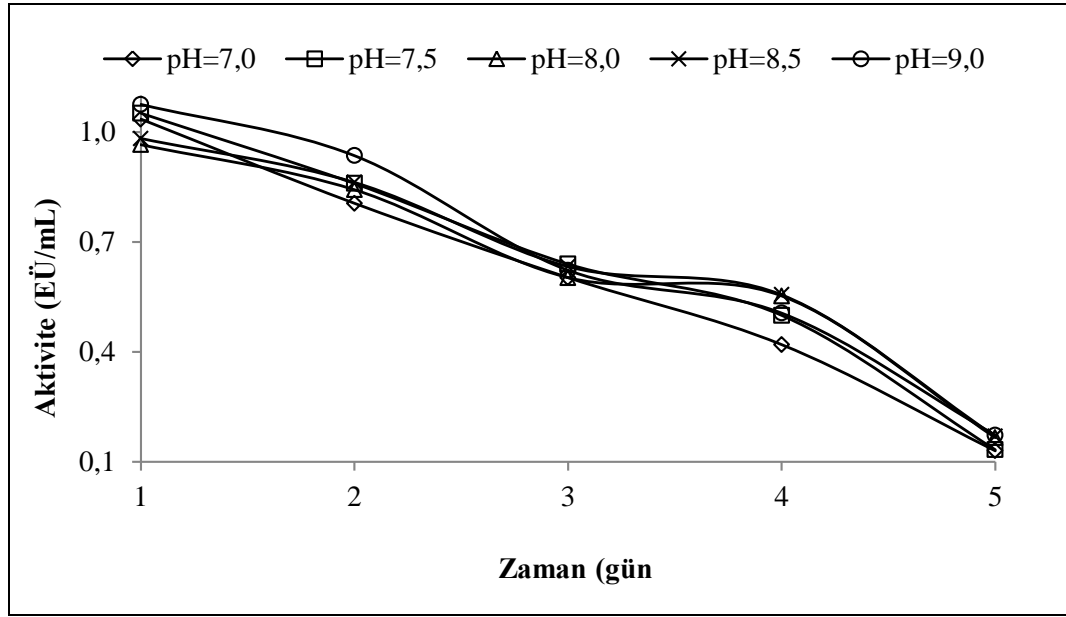
Zaman	pH:5,0 Ativite (EÜ/mL)	pH:5,5 Ativite (EÜ/mL)	pH:6,0 Ativite (EÜ/mL)	pH:6,5 Ativite (EÜ/mL)	pH:7,0 Ativite (EÜ/mL)	pH:7,5 Ativite (EÜ/mL)	pH:8,0 Ativite (EÜ/mL)
1.gün	0,317	0,333	0,307	0,350	0,340	0,387	0,360
2.gün	0,287	0,297	0,303	0,320	0,320	0,333	0,337
3.gün	0,173	0,167	0,163	0,183	0,170	0,197	0,170
4.gün	0,130	0,110	0,133	0,147	0,153	0,117	0,133
5.gün	0,083	0,077	0,073	0,097	0,100	0,107	0,087



**Şekil 4.19.** Karadeniz alabalığı böbrek dokusu CA enziminin stabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 1 M potasyum fosfat tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

**Çizelge 4.20.** Karadeniz alabalığı karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin stabil pH'sı için 1 M Tris-SO<sub>4</sub> tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

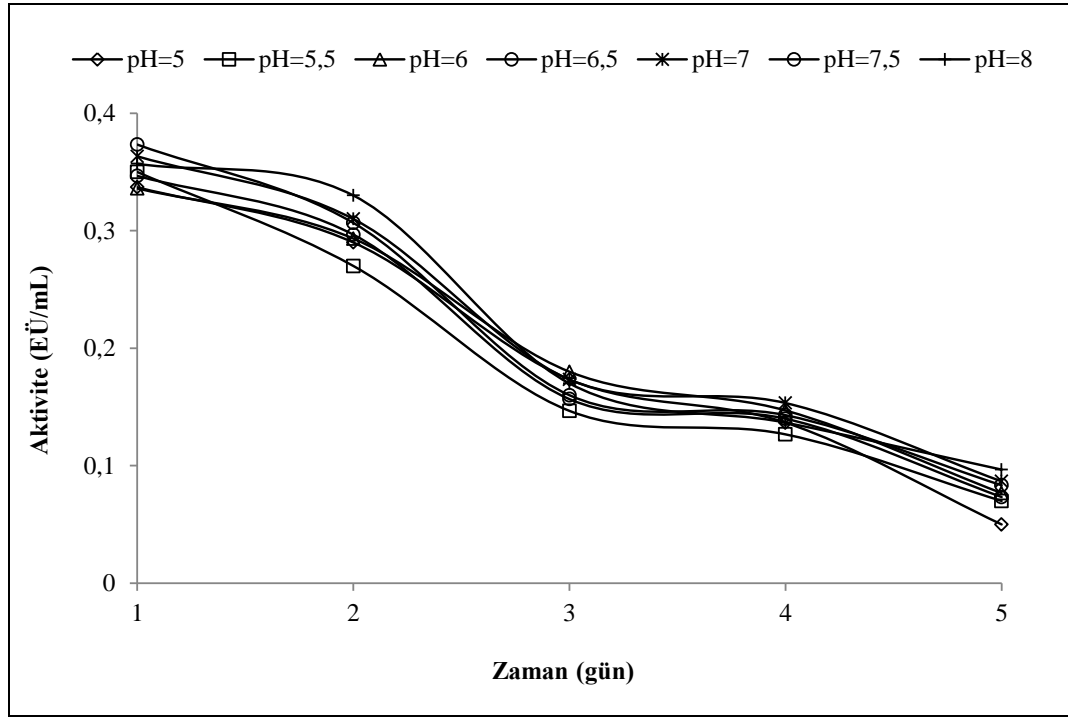
Zaman	pH:7,0 Aktivite (EÜ/mL)	pH:7,5 Aktivite (EÜ/mL)	pH:8,0 Aktivite (EÜ/mL)	pH:8,5 Aktivite (EÜ/mL)	pH:9,0 Aktivite (EÜ/mL)
1.gün	1,036	1,076	0,966	0,983	1,076
2.gün	0,806	0,860	0,843	0,863	0,936
3.gün	0,603	0,640	0,603	0,633	0,623
4.gün	0,420	0,500	0,553	0,556	0,506
5.gün	0,130	0,133	0,166	0,170	0,173



**Şekil 4.20.** Karadeniz alabalığı karaciğer dokusu CA enziminin stabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 1 M Tris-SO<sub>4</sub> tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

**Çizelge 4.21.** Karadeniz alabalığı karaciğer dokusu CA enziminin stabil pH'sı için 1 M potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

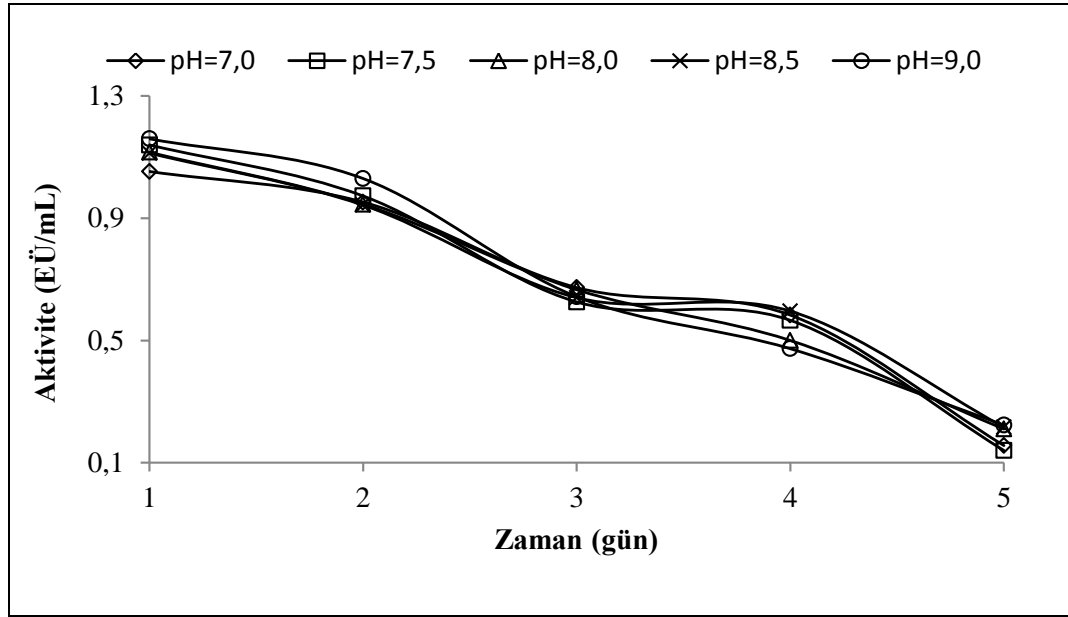
Zaman	pH:5,0 Ativite (EÜ/mL)	pH:5,5 Ativite (EÜ/mL)	pH:6,0 Ativite (EÜ/mL)	pH:6,5 Ativite (EÜ/mL)	pH:7,0 Ativite (EÜ/mL)	pH:7,5 Ativite (EÜ/mL)	pH:8,0 Ativite (EÜ/mL)
1.gün	0,337	0,350	0,336	0,347	0,363	0,373	0,357
2.gün	0,290	0,270	0,293	0,297	0,310	0,307	0,330
3.gün	0,173	0,147	0,180	0,157	0,173	0,160	0,170
4.gün	0,137	0,127	0,147	0,140	0,153	0,143	0,137
5.gün	0,050	0,070	0,077	0,073	0,087	0,083	0,097



**Şekil 4.21.** Karadeniz alabalığı karaciğer dokusu CA enziminin stabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 1 M potasyum fosfat tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

**Çizelge 4.22.** Karadeniz alabalığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enziminin stabil pH'sı için 1 M Tris-SO<sub>4</sub> tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

Zaman	pH:7,0 Aktivite (EÜ/mL)	pH:7,5 Aktivite (EÜ/mL)	pH:8,0 Aktivite (EÜ/mL)	pH:8,5 Aktivite (EÜ/mL)	pH:9,0 Aktivite (EÜ/mL)
1.gün	1,053	1,140	1,116	1,113	1,160
2.gün	0,953	0,973	0,946	0,943	1,030
3.gün	0,673	0,626	0,666	0,640	0,643
4.gün	0,583	0,566	0,500	0,596	0,473
5.gün	0,156	0,140	0,210	0,216	0,223

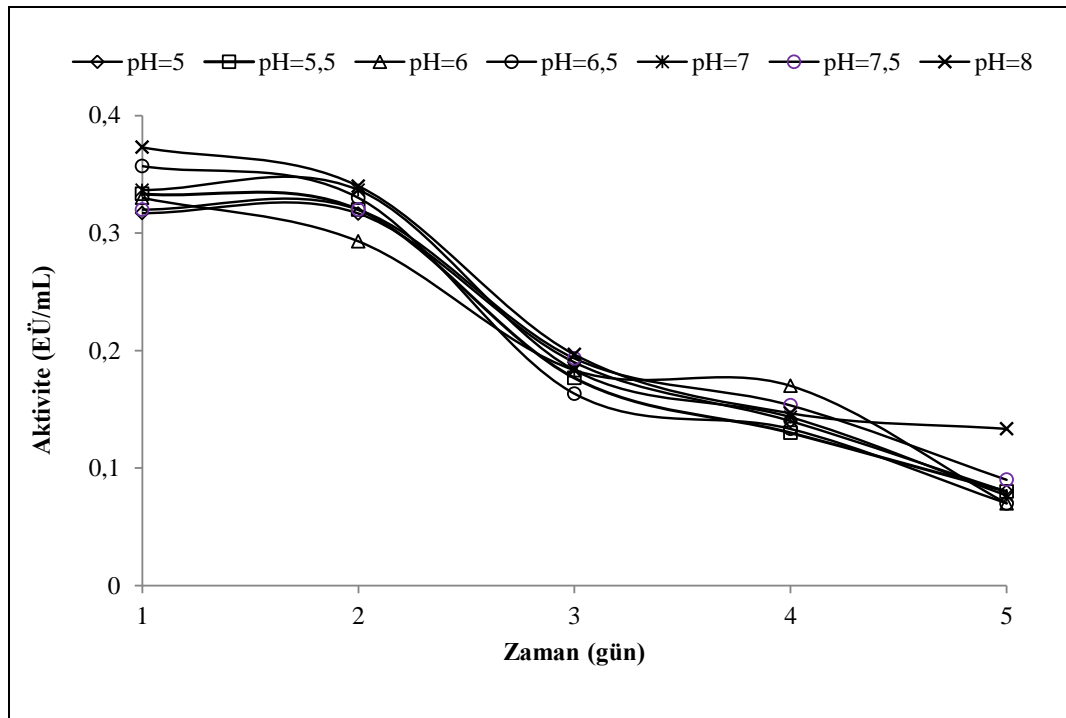


**Şekil 4.22.** Karadeniz alabalığı solungaç dokusu CA enziminin stabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 1 M Tris-SO<sub>4</sub> tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları



**Çizelge 4.23.** Karadeniz alabalığı solungaç dokusu CA enziminin stabil pH'sı için 1 M potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

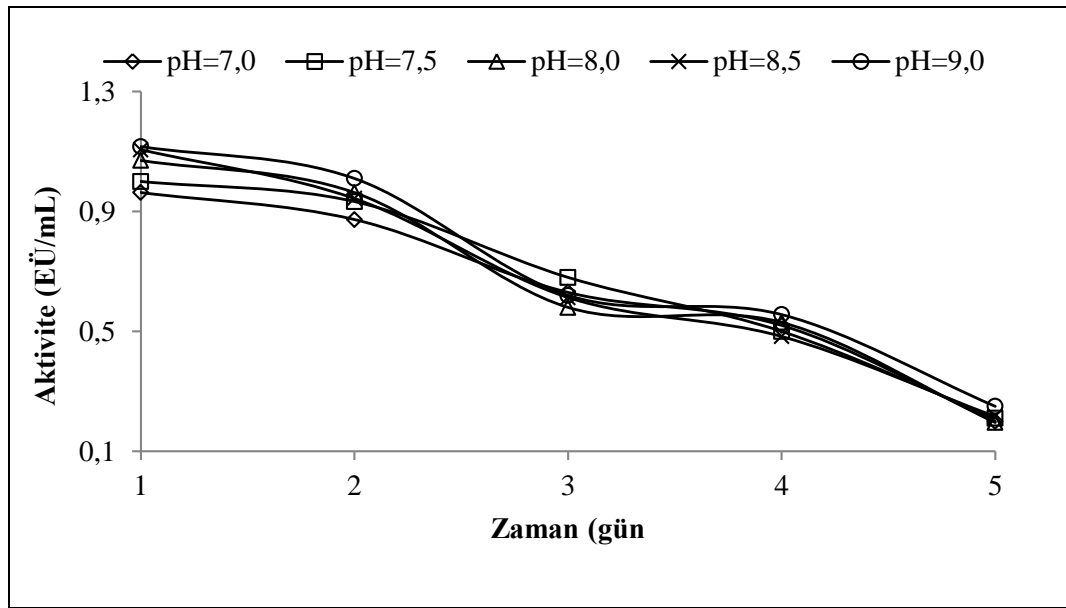
Zaman	pH:5,0 Ativite (EÜ/mL)	pH:5,5 Ativite (EÜ/mL)	pH:6,0 Ativite (EÜ/mL)	pH:6,5 Ativite (EÜ/mL)	pH:7,0 Ativite (EÜ/mL)	pH:7,5 Ativite (EÜ/mL)	pH:8,0 Ativite (EÜ/mL)
1.gün	0,317	0,333	0,330	0,357	0,337	0,320	0,373
2.gün	0,317	0,320	0,293	0,330	0,337	0,320	0,340
3.gün	0,190	0,177	0,183	0,163	0,183	0,193	0,197
4.gün	0,140	0,130	0,170	0,133	0,143	0,153	0,147
5.gün	0,080	0,080	0,070	0,070	0,077	0,090	0,133



**Şekil 4.23.** Karadeniz alabalığı solungaç dokusu CA enziminin stabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 1 M potasyum fosfat tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

**Çizelge 4.24.** Karadeniz alabalığı kas dokusundan saflaştırılan CA enziminin stabil pH'sı için 1 M Tris-SO<sub>4</sub> tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

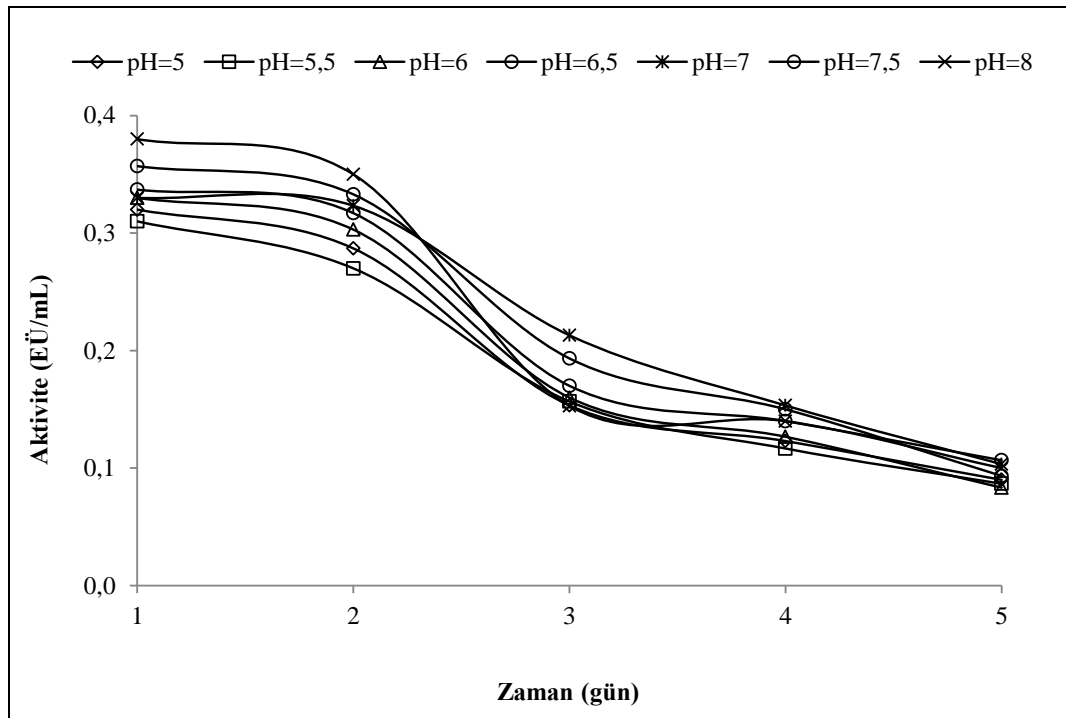
Zaman	pH:7,0 Aktivite (EÜ/mL)	pH:7,5 Aktivite (EÜ/mL)	pH:8,0 Aktivite (EÜ/mL)	pH:8,5 Aktivite (EÜ/mL)	pH:9,0 Aktivite (EÜ/mL)
1.gün	0,963	1,000	1,070	1,106	1,116
2.gün	0,873	0,933	0,963	0,943	1,010
3.gün	0,630	0,680	0,580	0,613	0,620
4.gün	0,520	0,500	0,530	0,483	0,556
5.gün	0,200	0,210	0,196	0,216	0,250



**Şekil 4.24.** Karadeniz alabalığı kas dokusu CA enziminin stabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 1 M Tris-SO<sub>4</sub> tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

**Çizelge 4.25.** Karadeniz alabalığı kas dokusu CA enziminin stabil pH'sı için 1 M potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

Zaman	pH:5,0 Ativite (EÜ/mL)	pH:5,5 Ativite (EÜ/mL)	pH:6,0 Ativite (EÜ/mL)	pH:6,5 Ativite (EÜ/mL)	pH:7,0 Ativite (EÜ/mL)	pH:7,5 Ativite (EÜ/mL)	pH:8,0 Ativite (EÜ/mL)
1.gün	0,320	0,310	0,330	0,337	0,330	0,357	0,380
2.gün	0,287	0,270	0,303	0,317	0,323	0,333	0,350
3.gün	0,153	0,157	0,160	0,170	0,213	0,193	0,153
4.gün	0,123	0,117	0,127	0,140	0,153	0,150	0,140
5.gün	0,090	0,087	0,083	0,107	0,103	0,093	0,100



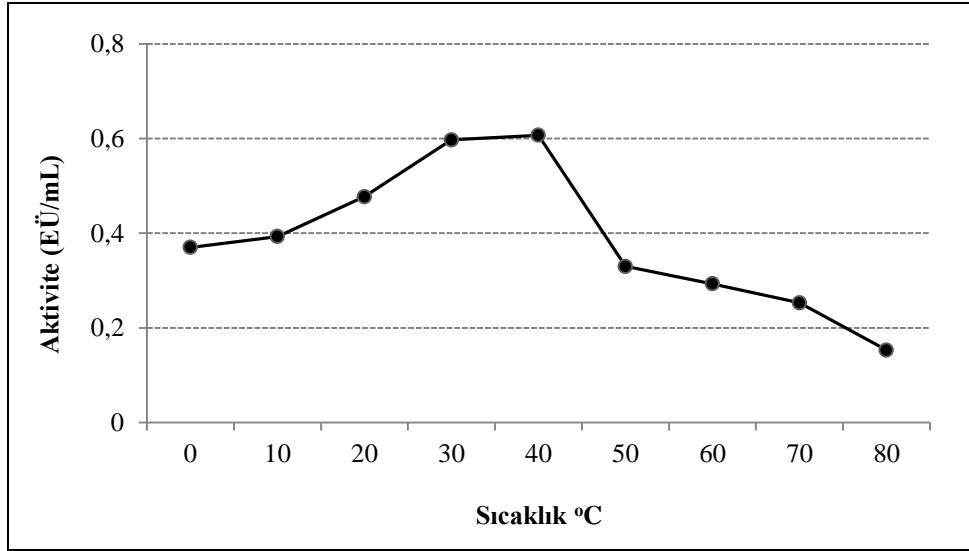
**Şekil 4.25.** Karadeniz alabalığı kas dokusu CA enziminin stabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 1 M potasyum fosfat tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

#### 4.3.4. Karadeniz alabalığı böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokularından elde edilen CA enziminin optimum sıcaklığın, aktivasyon enerjisinin (Ea), aktivasyon entalpisinin ( $\Delta H$ ) ve $Q_{10}$ değerlerinin hesaplanması ile ilgili çalışmalar

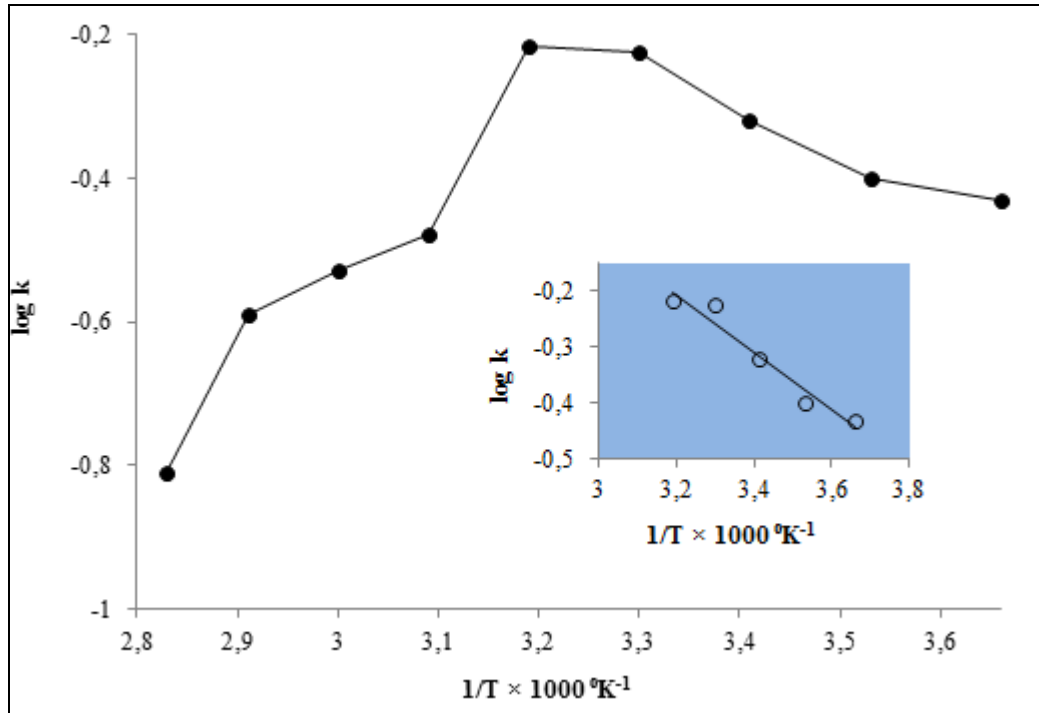
Karadeniz alabalığı böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokularından saflaştırılan CA enzimlerinin aktivitelerinin optimum olduğu sıcaklıkların, Ea,  $\Delta H$  ve  $Q_{10}$  değerlerinin belirlenmesi amacıyla dijital su banyosu kullanılarak 0°C ile 80°C arasında 10°C sıcaklık farkı oluşturularak, enzimin optimum pH'sında spektrofotometrik olarak esteraz aktivitesi deneyleri gerçekleştirildi. Daha sonra elde edilen aktivite değerlerinin logaritmaları ( $\log k$ ) alındı. Sıcaklık değerleri Kelvine çevrilerek grafikte  $1/T \times 1000^\circ K^{-1}$  olarak ifade edildi (Çizelge 4.26.-4.29. ve Şekil 4.24.-4.31.) (Danişan *et al.* 2004). Çizilen grafikten faydalanılarak Arrhenius eğrisi elde edildi ve bu eğrinin eğimi kullanılarak Ea,  $\Delta H$  ve  $Q_{10}$  değerleri hesaplandı.

**Çizelge 4.26.** Karadeniz alabalığı böbrek dokusu için değişik sıcaklıklardaki aktivite değerleri

Sıcaklık (°C)	Aktivite (EÜ/mL)
0	0,370
10	0,393
20	0,477
30	0,597
40	0,607
50	0,330
60	0,293
70	0,253
80	0,153



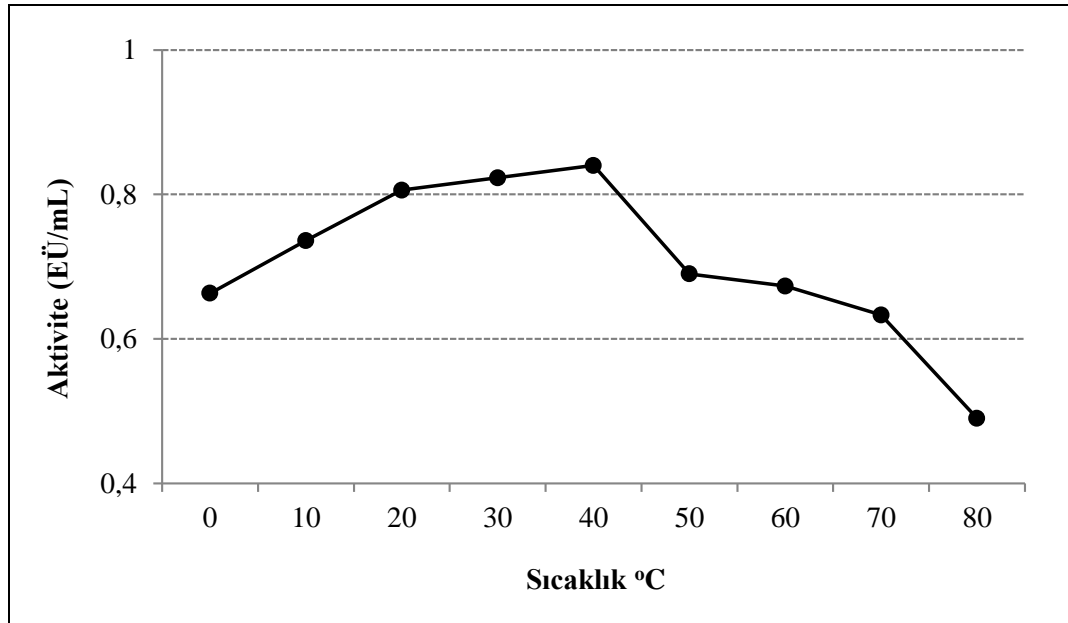
Şekil 4.26. Karadeniz alabalığı böbrek doku CA enziminin optimum sıcaklığını gösteren grafik



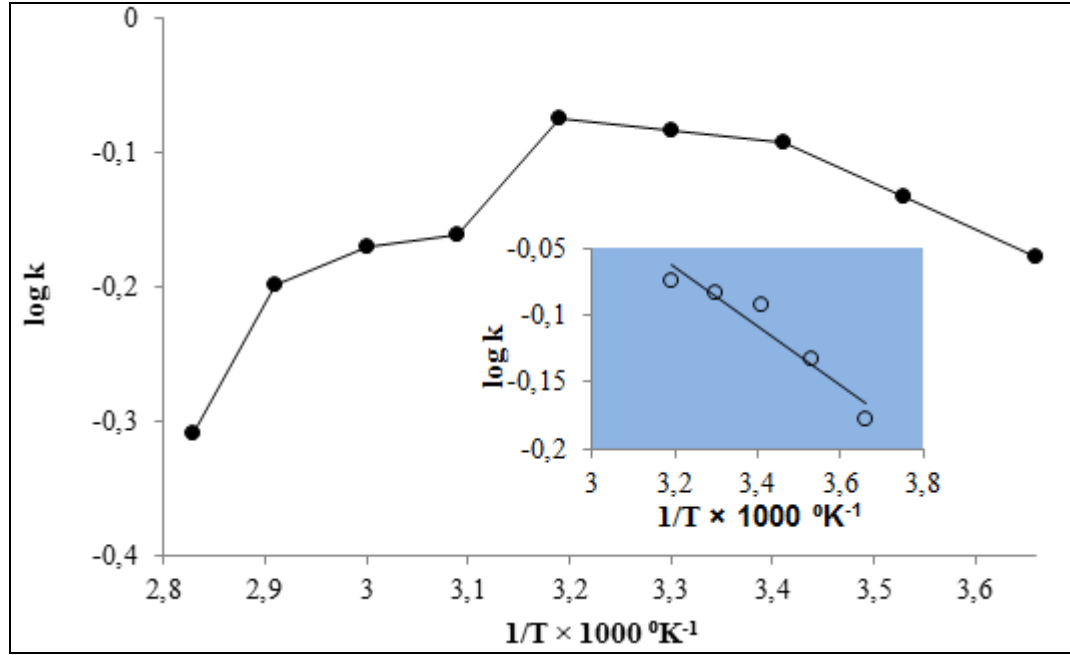
Şekil 4.27. Karadeniz alabalığı böbrek doku CA enziminin aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişim grafiği

**Çizelge 4.27.** Karadeniz alabalığı karaciğer dokusu için değişik sıcaklıklardaki aktivite değerleri

Sıcaklık (°C)	Aktivite (EÜ/mL)
0	0,663
10	0,736
20	0,806
30	0,823
40	0,840
50	0,690
60	0,673
70	0,633
80	0,490



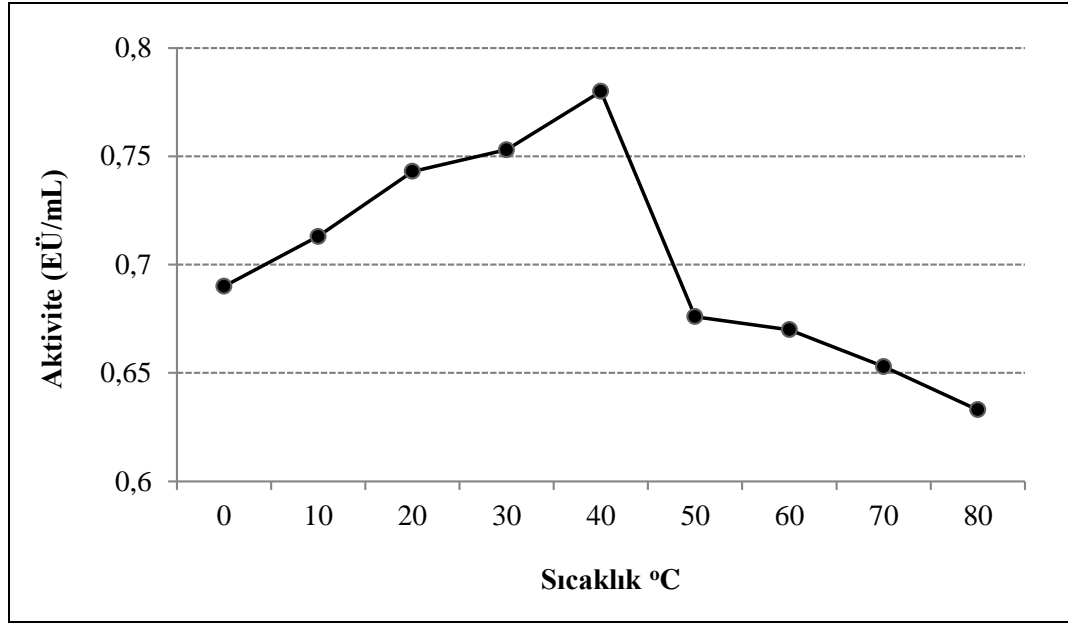
**Şekil 4.28.** Karadeniz alabalığı karaciğer doku CA enziminin optimum sıcaklığını gösteren grafik



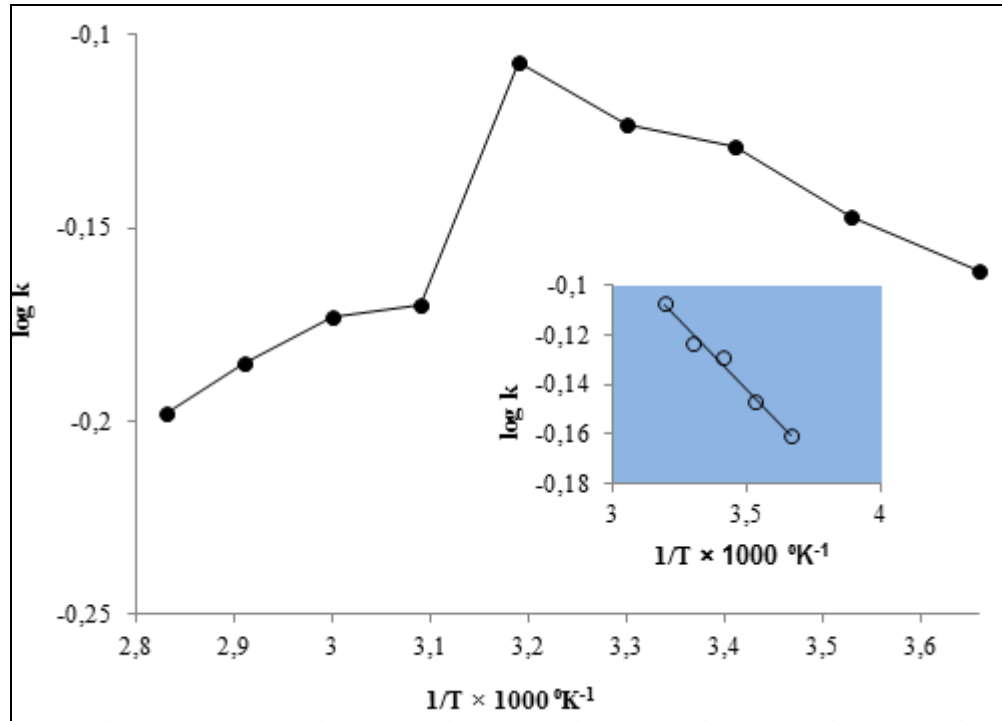
**Şekil 4.29.** Karadeniz alabalığı karaciğer doku CA enziminin aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişim grafiği

**Çizelge 4.28.** Karadeniz alabalığı solungaç dokusu için değişik sıcaklıklardaki aktivite değerleri

Sıcaklık (°C)	Aktivite (EÜ/mL)
0	0,690
10	0,713
20	0,743
30	0,753
40	0,780
50	0,676
60	0,670
70	0,653
80	0,633



Şekil 4.30. Karadeniz alabalığı solungaç doku CA enziminin optimum sıcaklığını gösteren grafik

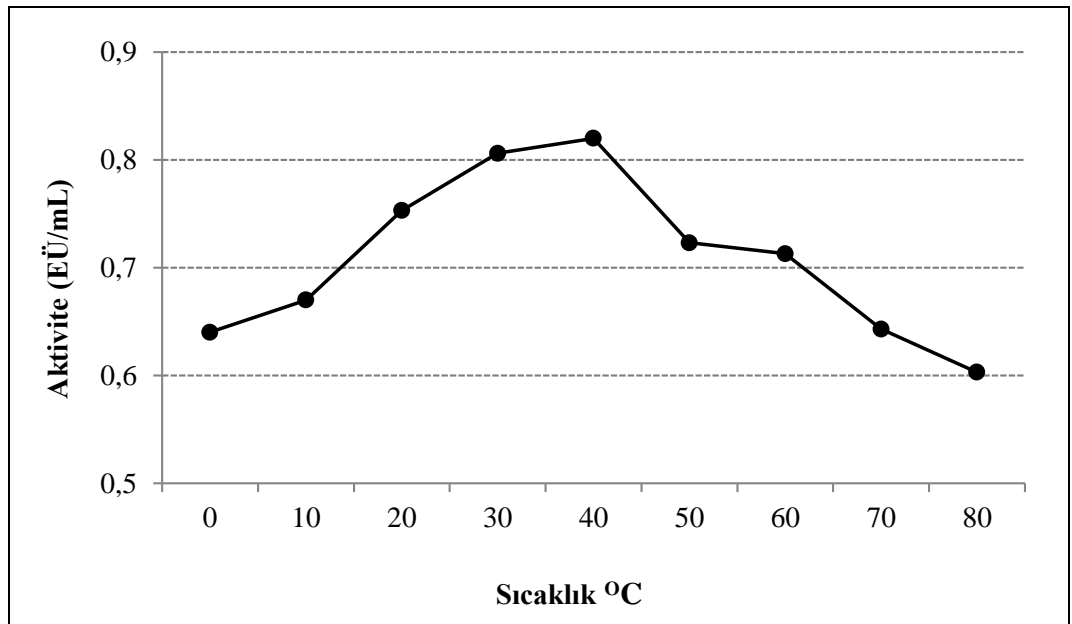


Şekil 4.31. Karadeniz alabalığı solungaç doku CA enziminin aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişim grafiği

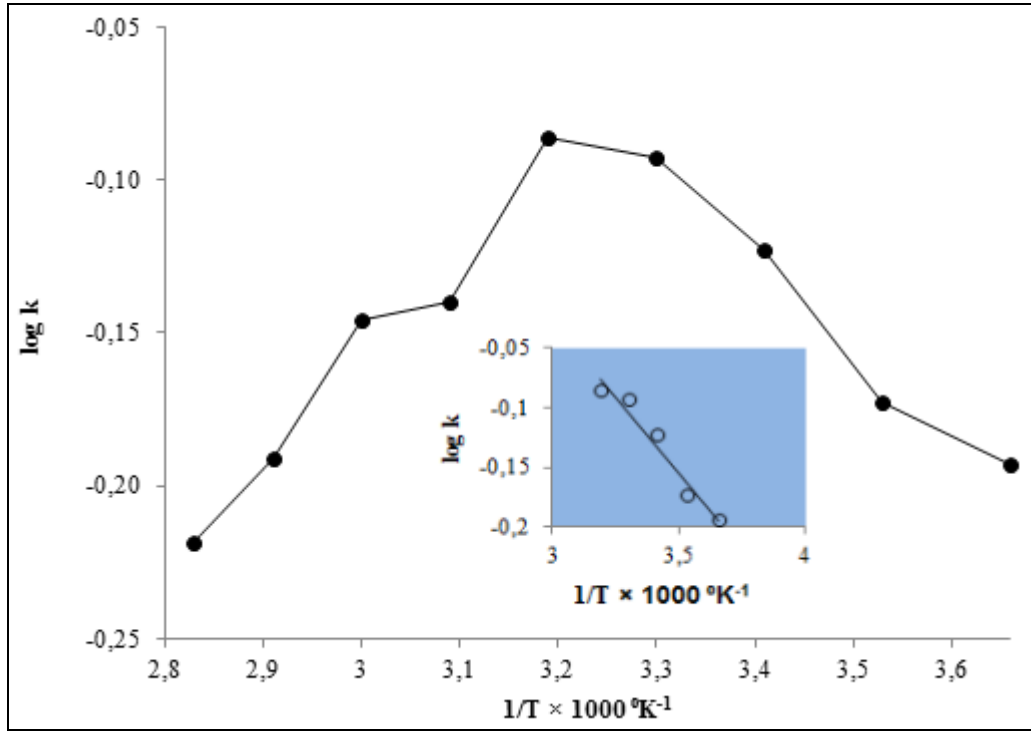


**Çizelge 4.29.** Karadeniz alabalığı kas dokusu için değişik sıcaklıklardaki aktivite değerleri

Sıcaklık (°C)	Aktivite (EÜ/mL)
0	0,640
10	0,670
20	0,753
30	0,806
40	0,820
50	0,723
60	0,713
70	0,643
80	0,603



**Şekil 4.32.** Karadeniz alabalığı kas doku CA enziminin optimum sıcaklığını gösteren grafik



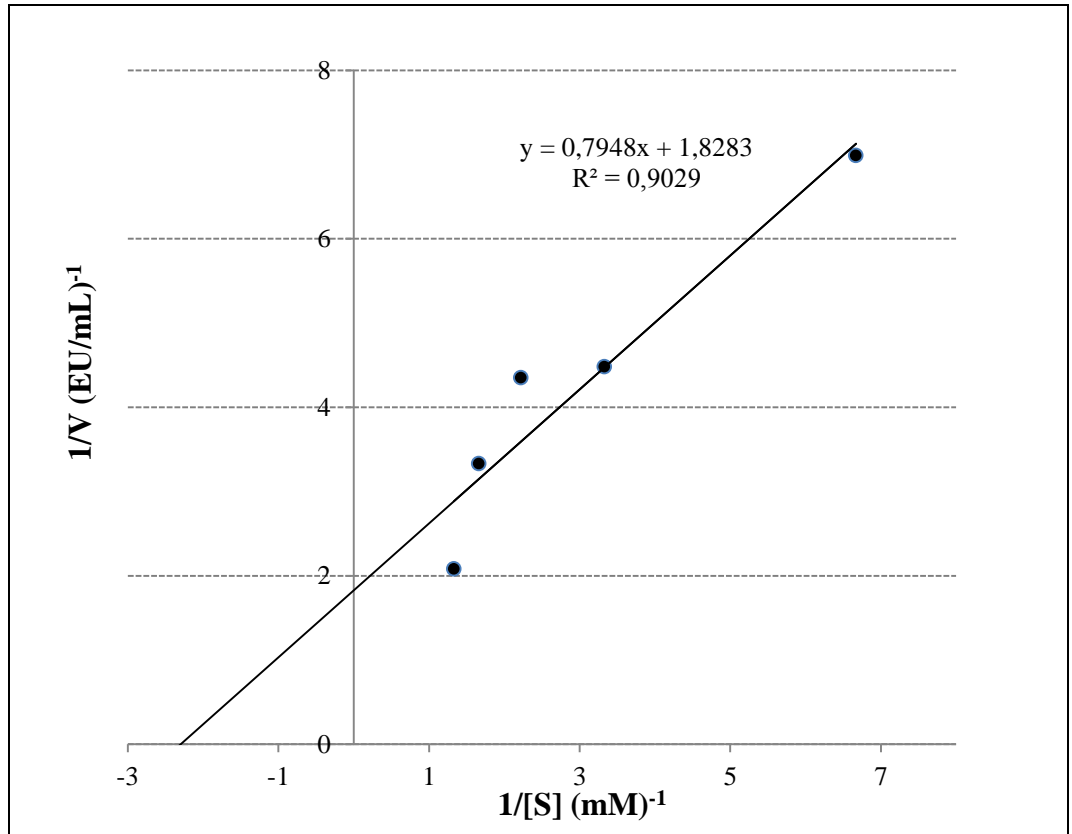
**Şekil 4.33.** Karadeniz alabalığı kas doku CA enziminin aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişim grafiği

**Çizelge 4.30.** Karadeniz alabalığı böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokuları CA enzimi için optimum sıcaklık,  $E_a$ ,  $\Delta H$  ve  $Q_{10}$  değerleri

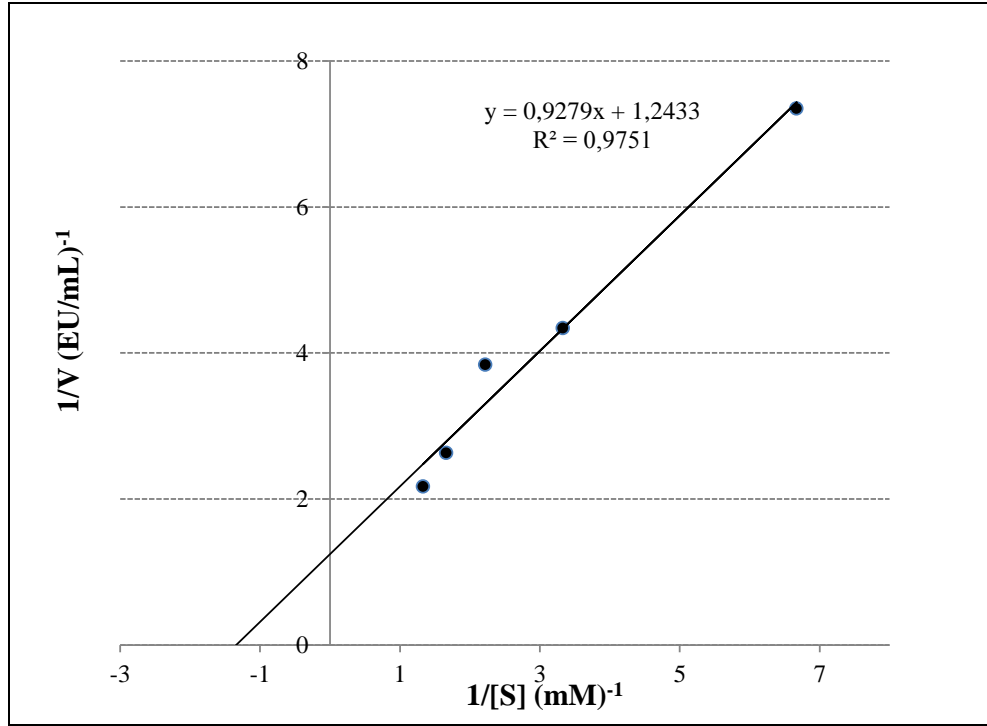
Enzim	Dokular	Optimum Sıcaklık ( $^\circ\text{C}$ )	Aktivasyon Enerjisi ( $E_a$ ) (kcal/mol)	Aktivasyon Entalpisi ( $\Delta H$ ) (kcal/mol)	$Q_{10}$
CA	Böbrek	40	2,356	1,730	1,83
CA	Karaciğer	40	1,009	0,387	1,22
CA	Solungaç	40	0,517	0,105	1,15
CA	Kas	40	1,152	0,530	1,13

#### 4.3.5. Karadeniz alabalığı dokularından elde edilen CA enziminin $K_M$ , $V_{max}$ , $k_{cat}$ ve $V_0$ değerlerinin bulunmasına yönelik çalışmalar

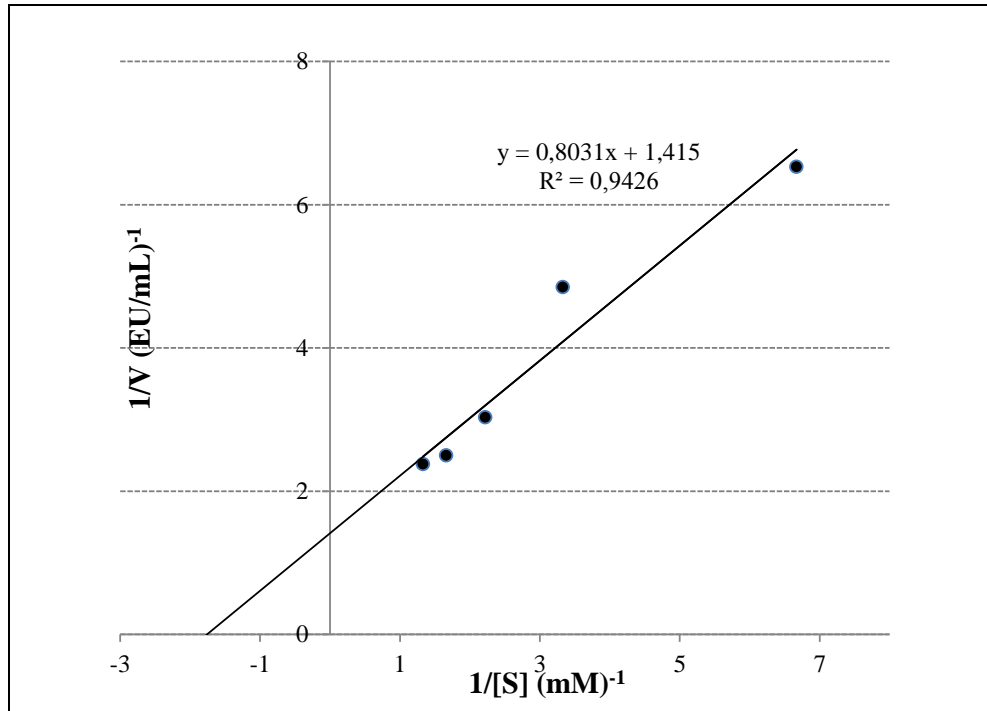
Karadeniz alabalığı böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokularından saflaştırılan CA enziminin  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin belirlenmesi için en az 5 farklı p-nitrofenilasetat konsantrasyonu kullanılarak optimum şartlarda aktivite ölçümü yapıldı ve Lineweaver-Burk grafiği çizildi ve bu grafikten  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri hesaplandı (Şekil 4.39-4.42). Daha sonra bulunan  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri kullanılarak CA enzimin p-nitrofenilasetat substratı için turnover sayısını ifade eden  $k_{cat}$  değeri hesaplandı. Hesaplanan bu değer ile enzimin özgülük sabiti değeri  $V_0$  tespit edildi. Bu değerler çizelge 4.31’de verildi.



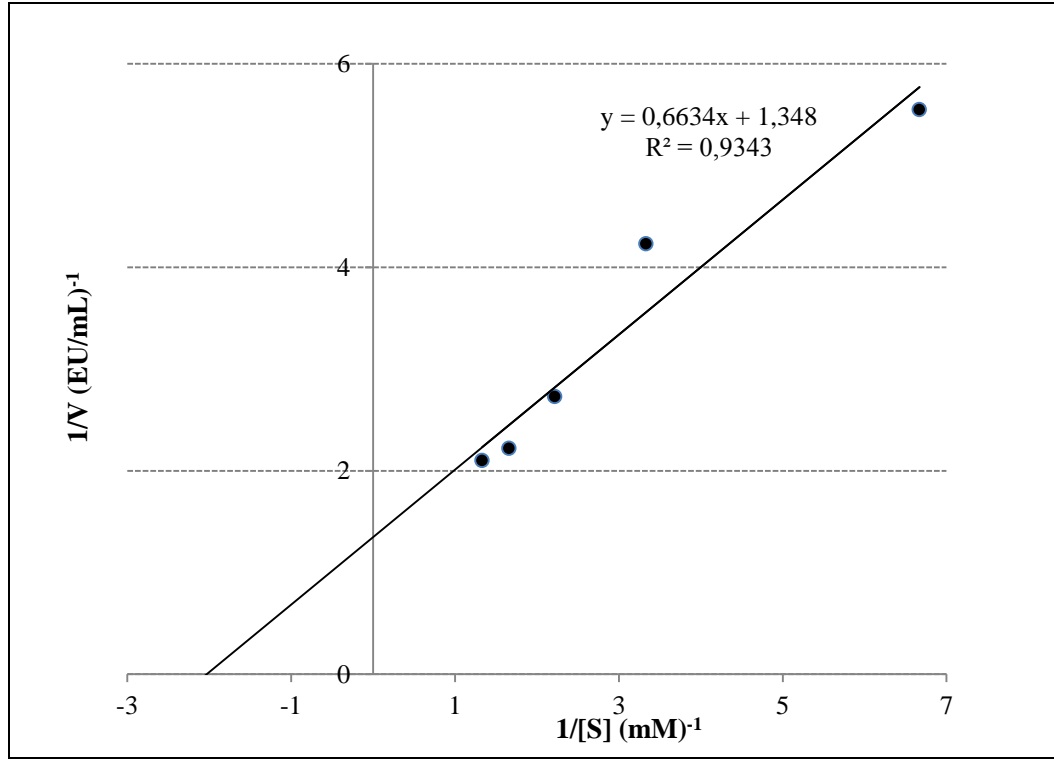
Şekil 4.34. Karadeniz alabalığı böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi için 5 farklı p-nitrofenil asetat konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.35. Karadeniz alabalığı karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi için 5 farklı p-nitrofenil asetat konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.36. Karadeniz alabalığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enzimi için 5 farklı p-nitrofenil asetat konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiği



**Şekil 4.37.** Karadeniz alabalığı kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi için 5 farklı p-nitrofenil asetat konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiği

**Çizelge 4.31.** Karadeniz alabalığının böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimleri için p-nitrofenilasetat substratı ile  $K_M$ ,  $V_{max}$ ,  $k_{cat}$  ve  $V_0$  değerlerinin sonuçları

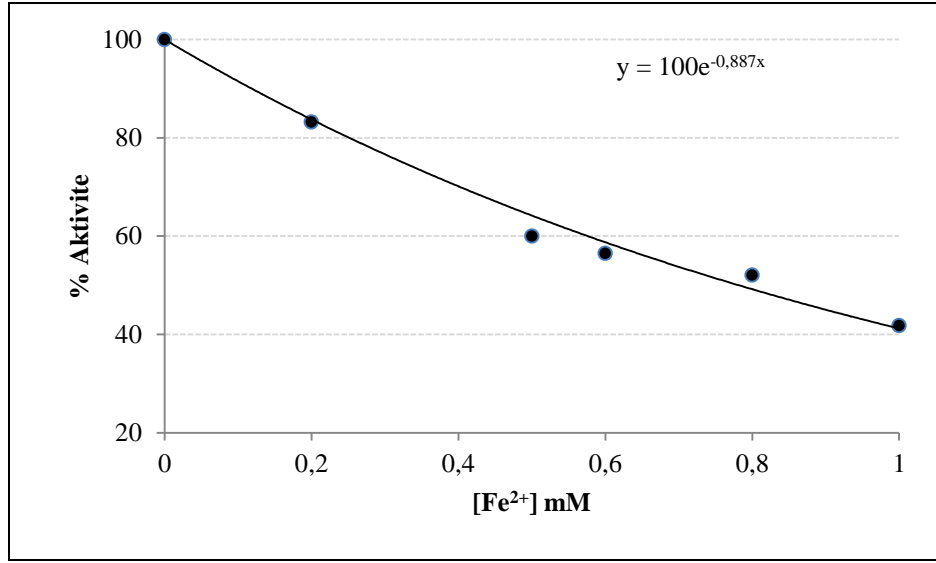
Enzim	Substrat	Dokular	$K_M$ (mM)	$V_{max}$ (EÜ/mL)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$V_0$ (M <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> ).10 <sup>6</sup>
CA	p-nitrofenilasetat	Böbrek	0,434	0,547	688,05	1,585
CA	p-nitrofenilasetat	Karaciğer	0,746	0,804	1505,62	2,018
CA	p-nitrofenilasetat	Solungaç	0,568	0,706	1824,29	3,211
CA	p-nitrofenilasetat	Kas	0,492	0,741	1222,78	2,485

#### 4.3.6. Bazı ağır metallerin Karadeniz alabalığı böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokularından elde edilen CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin incelenmesi

Karadeniz alabalığının böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokularından afinite kromatografisiyle saflaştırılan CA enziminin aktivitesi üzerine bazı metallerin inhibisyon etkileri incelendi. Kinetik ölçümler enzimin esteraz aktivitesinden faydalanılarak gerçekleştirildi (Armstrong *et al.* 1966; Verpoorte and Mehta 1967). Enzimin esteraz aktivitesini inhibe eden  $\text{FeCl}_2$ ,  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{AgNO}_3$  ve  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  bileşikleri ile sabit substrat konsantrasyonunda beş farklı inhibitör konsantrasyonu kullanılarak  $\text{IC}_{50}$  değeri (enzimin aktivitesini yarıya düşüren konsantrasyonu) % aktivite-[I] grafikleri çizilerek Çizelge 4.32-4.55 ve Şekil 4.38-4.57 aralığında verildi.

**Çizelge 4.32.** Karadeniz alabalığı böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine  $\text{Fe}^{2+}$  iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri

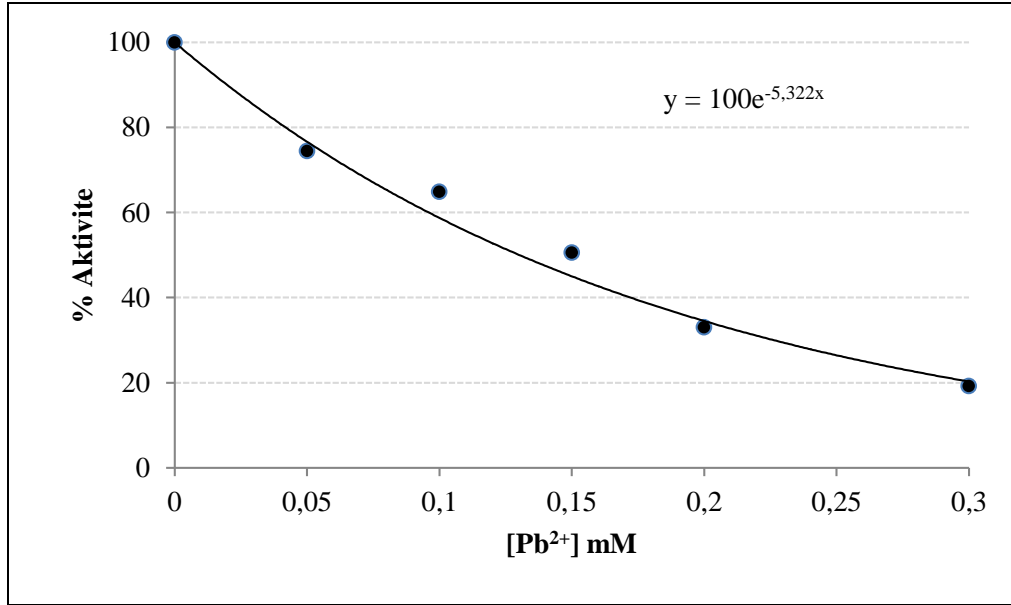
Substrat ( $\mu\text{L}$ )	Tris- $\text{SO}_4$ tamponu ( $\mu\text{L}$ )	Enzim ( $\mu\text{L}$ )	Safsu ( $\mu\text{L}$ )	Toplam Hacim ( $\mu\text{L}$ )	[I] (mM)	%Aktivite (EÜ/mL)
360	400	5	235	1000	0,00	100
360	400	5	225	1000	0,20	83,24
360	400	5	210	1000	0,50	60,00
360	400	5	205	1000	0,60	56,47
360	400	5	195	1000	0,80	52,06
360	400	5	185	1000	1,00	41,76



**Şekil 4.38.** Karadeniz alabalığı böbrek dokusu CA enziminin esterez aktivitesi üzerine Fe<sup>2+</sup> iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- [Fe<sup>2+</sup>] grafiği

**Çizelge 4.33.** Karadeniz alabalığı böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin esterez aktivitesi üzerine Pb<sup>2+</sup> iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri

Substrat (µL)	Tris-SO <sub>4</sub> tamponu(µL)	Enzim (µL)	Saf su (µL)	Toplam Hacim(µL)	[I] (mM)	%Aktivite (EÜ/mL)
360	400	10	230	1000	0,00	100
360	400	10	225	1000	0,05	74,47
360	400	10	220	1000	0,10	64,89
360	400	10	215	1000	0,15	50,53
360	400	10	210	1000	0,20	32,98
360	400	10	200	1000	0,30	19,15

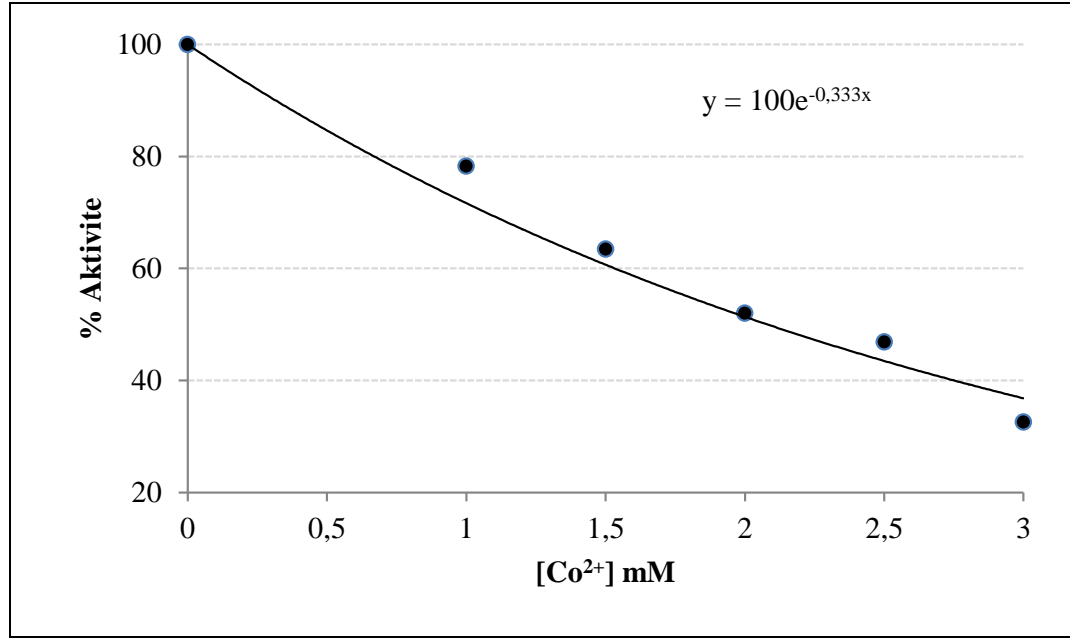


**Şekil 4.39.** Karadeniz alabalığı böbrek dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine Pb<sup>2+</sup> iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- [Pb<sup>2+</sup>] grafiği

**Çizelge 4.34.** Karadeniz alabalığı böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine Co<sup>2+</sup> iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri

Substrat (µL)	Tris-SO <sub>4</sub> tamponu(µL)	Enzim (µL)	Saf su (µL)	Toplam Hacim(µL)	[I] (mM)	%Aktivite (EÜ/mL)
360	400	10	230	1000	0,00	100
360	400	10	220	1000	1,00	78,29
360	400	10	215	1000	1,50	63,43
360	400	10	210	1000	2,00	52,00
360	400	10	205	1000	2,50	46,86
360	400	10	200	1000	3,00	32,57

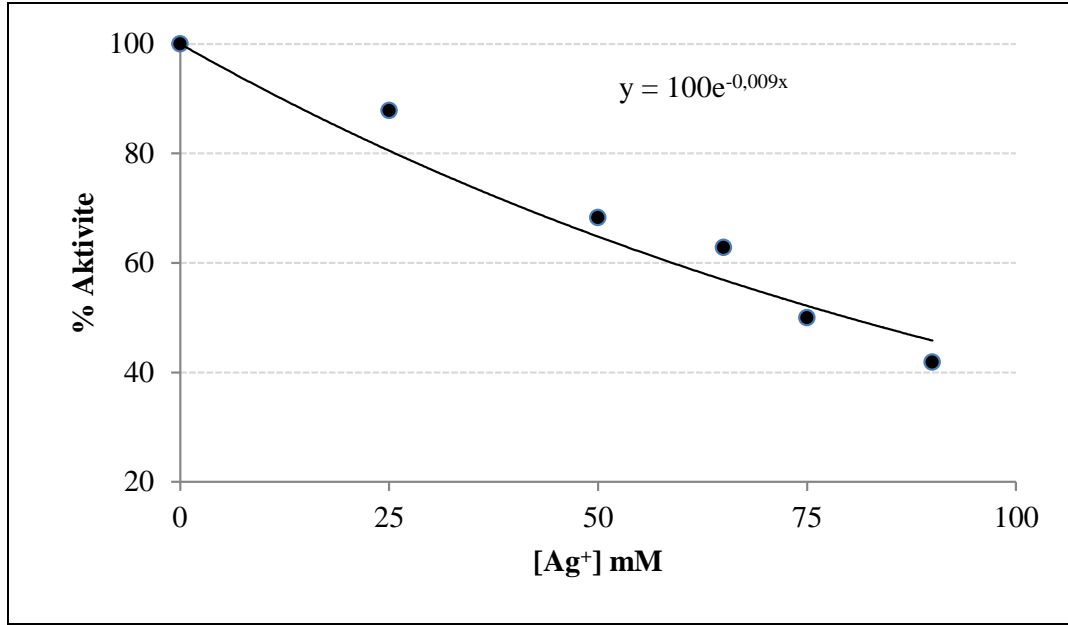




**Şekil 4.40** Karadeniz alabalığı böbrek dokusu CA enziminin esterez aktivitesi üzerine  $\text{Co}^{2+}$  iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-  $[\text{Co}^{2+}]$  grafiği

**Çizelge 4.35.** Karadeniz alabalığı böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin esterez aktivitesi üzerine  $\text{Ag}^+$  iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri

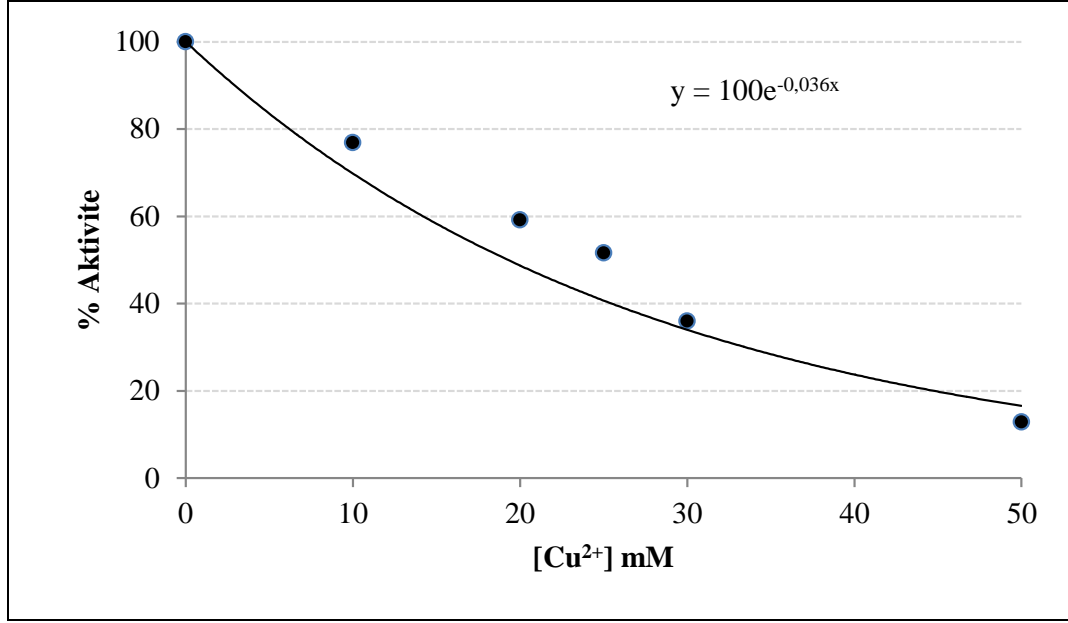
Substrat ( $\mu\text{L}$ )	Tris- $\text{SO}_4$ tamponu( $\mu\text{L}$ )	Enzim ( $\mu\text{L}$ )	Safsu ( $\mu\text{L}$ )	Toplam Hacim( $\mu\text{L}$ )	[I] (mM)	%Aktivite (EÜ/mL)
360	400	10	230	1000	0,00	100
360	400	10	180	1000	25,00	87,84
360	400	10	130	1000	50,00	68,24
360	400	10	100	1000	65,00	62,84
360	400	10	80	1000	75,00	50,00
360	400	10	50	1000	90,00	41,89



**Şekil 4.41.** Karadeniz alabalığı böbrek dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine  $Ag^+$  iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[Ag^+]$  grafiği

**Çizelge 4.36.** Karadeniz alabalığı böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine  $Cu^{2+}$  iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri

Substrat ( $\mu$ L)	Tris-SO <sub>4</sub> tamponu( $\mu$ L)	Enzim ( $\mu$ L)	Safsu ( $\mu$ L)	Toplam Hacim( $\mu$ L)	[I] (mM)	%Aktivite (EÜ/mL)
360	400	10	230	1000	0,00	100
360	400	10	220	1000	10,00	76,88
360	400	10	210	1000	20,00	59,14
360	400	10	205	1000	25,00	51,61
360	400	10	200	1000	30,00	36,02
360	400	10	180	1000	50,00	12,90



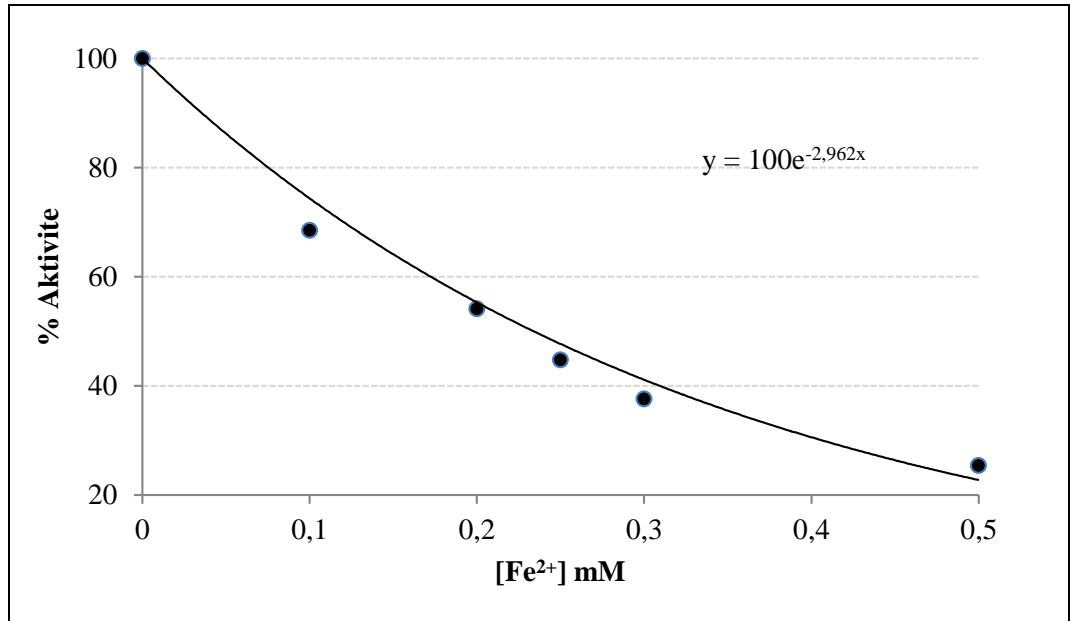
**Şekil 4.42.** Karadeniz alabalığı böbrek dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine Cu<sup>2+</sup> iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Cu<sup>2+</sup>] grafiği

**Çizelge 4.37.** Karadeniz alabalığı böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine metal iyonları ile yapılan çalışmalarda elde edilen IC<sub>50</sub> değerleri

Kimyasal Madde	IC <sub>50</sub> (mM)
Fe <sup>2+</sup>	0,78
Pb <sup>2+</sup>	0,13
Co <sup>2+</sup>	2,07
Ag <sup>+</sup>	76,67
Cu <sup>2+</sup>	19,17

**Çizelge 4.38.** Karadeniz alabalığı karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine  $\text{Fe}^{2+}$  iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri

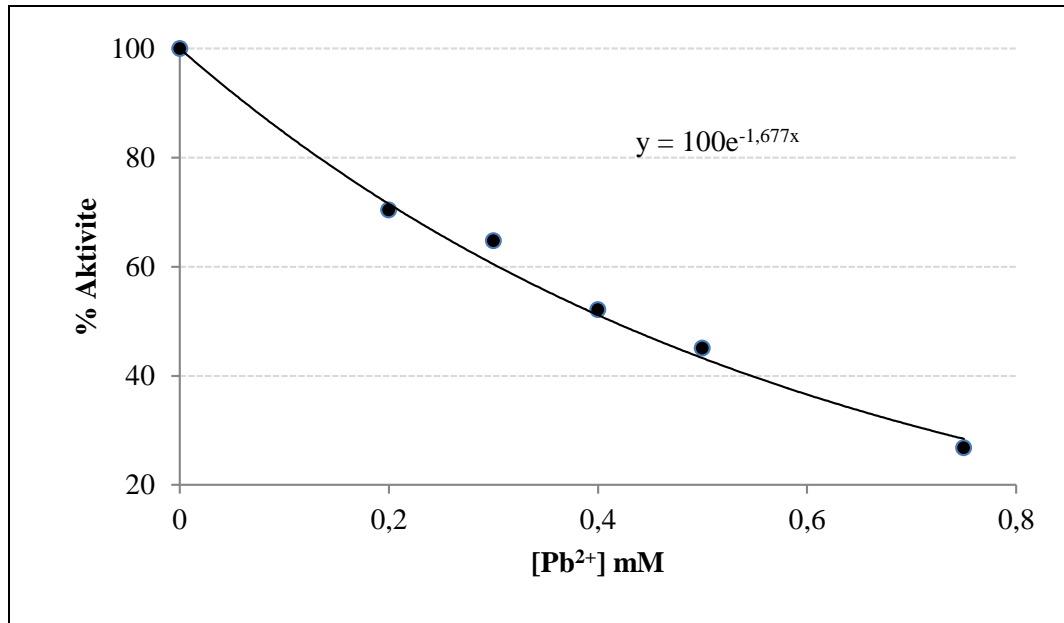
Substrat ( $\mu\text{L}$ )	Tris- $\text{SO}_4$ tamponu( $\mu\text{L}$ )	Enzim ( $\mu\text{L}$ )	Safsu ( $\mu\text{L}$ )	Toplam Hacim( $\mu\text{L}$ )	[I] (mM)	%Aktivite (EÜ/mL)
360	400	5	235	1000	0,00	100
360	400	5	225	1000	0,10	68,50
360	400	5	210	1000	0,20	54,10
360	400	5	205	1000	0,25	44,75
360	400	5	195	1000	0,30	37,56
360	400	5	185	1000	0,50	25,41



**Şekil 4.43.** Karadeniz alabalığı karaciğer dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine  $\text{Fe}^{2+}$  iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- [ $\text{Fe}^{2+}$ ] grafiği

**Çizelge 4.39.** Karadeniz alabalığı karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine  $Pb^{2+}$  iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri

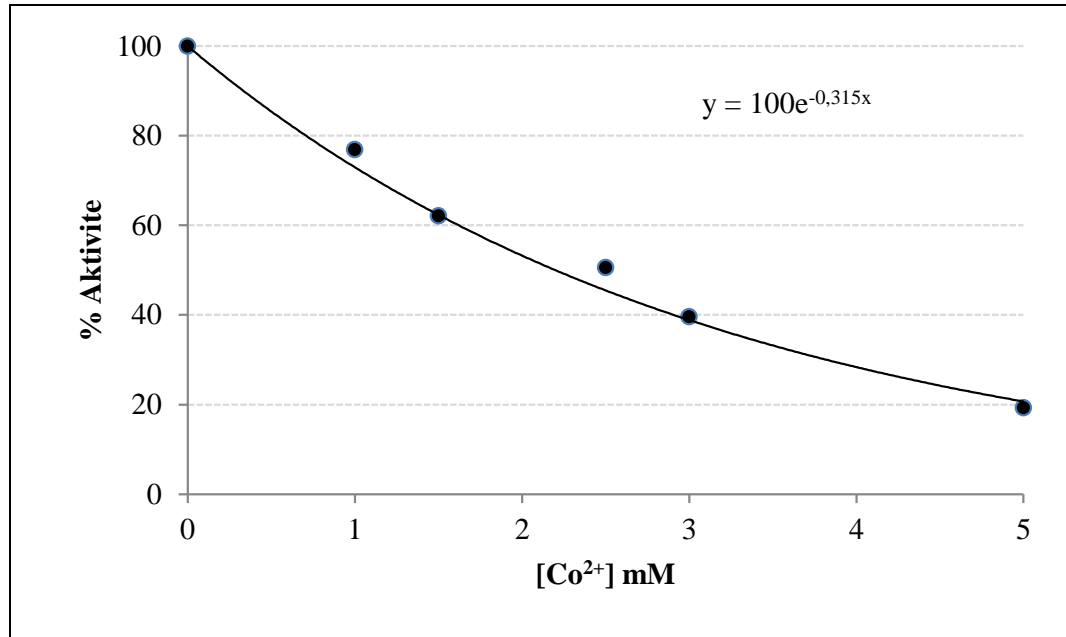
Substrat ( $\mu$ L)	Tris-SO <sub>4</sub> tamponu( $\mu$ L)	Enzim ( $\mu$ L)	Safsu ( $\mu$ L)	Toplam Hacim( $\mu$ L)	[I] (mM)	%Aktivite (EÜ/mL)
360	400	15	225	1000	0,00	100
360	400	15	205	1000	0,20	70,40
360	400	15	195	1000	0,30	64,78
360	400	15	185	1000	0,40	52,11
360	400	15	175	1000	0,50	45,07
360	400	15	150	1000	0,75	26,76



**Şekil 4.44.** Karadeniz alabalığı karaciğer dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine  $Pb^{2+}$  iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[Pb^{2+}]$  grafiği

**Çizelge 4.40.** Karadeniz alabalığı karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine  $\text{Co}^{2+}$  iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri

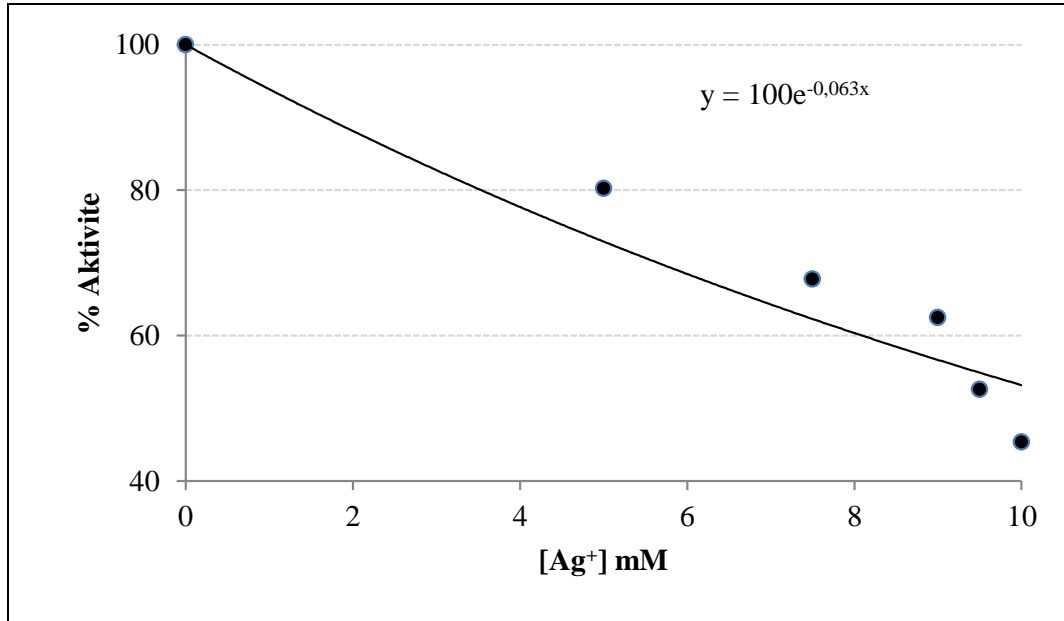
Substrat ( $\mu\text{L}$ )	Tris- $\text{SO}_4$ tamponu( $\mu\text{L}$ )	Enzim ( $\mu\text{L}$ )	Safsu ( $\mu\text{L}$ )	Toplam Hacim( $\mu\text{L}$ )	[I] (mM)	%Aktivite (EÜ/mL)
360	400	10	230	1000	0,00	100,0
360	400	10	220	1000	1,00	76,92
360	400	10	210	1000	1,50	62,09
360	400	10	200	1000	2,50	50,55
360	400	10	190	1000	3,00	39,56
360	400	10	180	1000	5,00	19,23



**Şekil 4.45.** Karadeniz alabalığı karaciğer dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine  $\text{Co}^{2+}$  iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- [ $\text{Co}^{2+}$ ] grafiği

**Çizelge 4.41.** Karadeniz alabalığı karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine  $Ag^+$  iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri

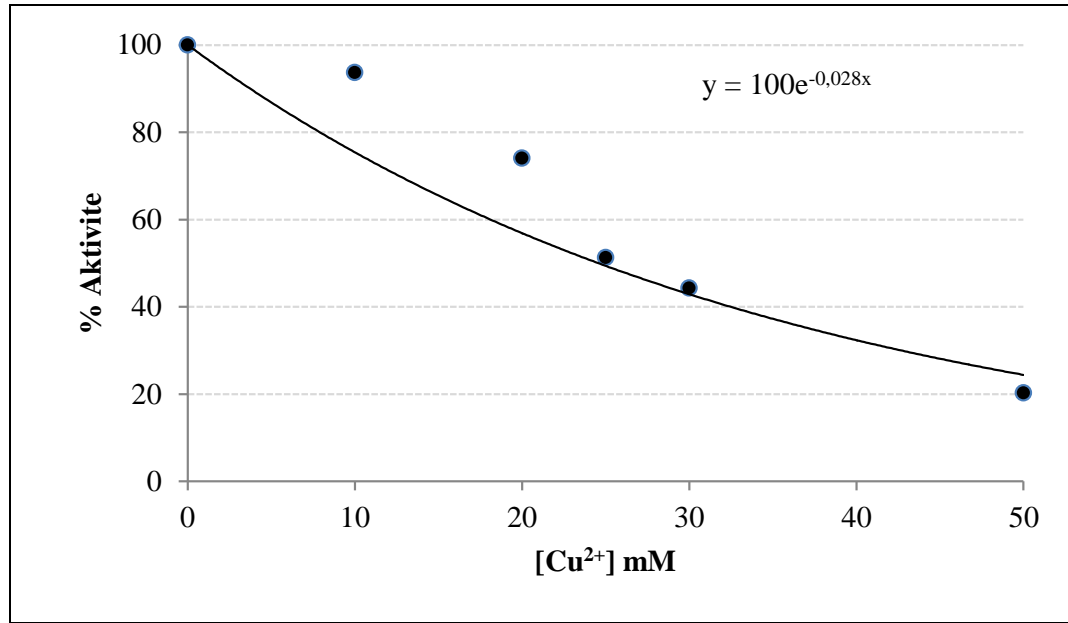
Substrat (µL)	Tris-SO <sub>4</sub> tamponu(µL)	Enzim (µL)	Safsu (µL)	Toplam Hacim(µL)	[I] (mM)	%Aktivite (EÜ/mL)
360	400	10	230	1000	0,00	100,00
360	400	10	130	1000	5,00	80,23
360	400	10	80	1000	7,50	67,76
360	400	10	50	1000	9,00	62,50
360	400	10	40	1000	9,50	52,63
360	400	10	30	1000	10,00	45,39



**Şekil 4.46.** Karadeniz alabalığı karaciğer dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine  $Ag^+$  iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[Ag^+]$  grafiği

**Çizelge 4.42.** Karadeniz alabalığı karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine  $\text{Cu}^{2+}$  iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri

Substrat ( $\mu\text{L}$ )	Tris- $\text{SO}_4$ tamponu ( $\mu\text{L}$ )	Enzim ( $\mu\text{L}$ )	Safsu ( $\mu\text{L}$ )	Toplam Hacim ( $\mu\text{L}$ )	[I] (mM)	%Aktivite (EÜ/mL)
360	400	10	230	1000	0,00	100,00
360	400	10	220	1000	10,00	93,67
360	400	10	210	1000	20,00	74,05
360	400	10	205	1000	25,00	51,27
360	400	10	200	1000	30,00	44,30
360	400	10	180	1000	50,00	20,25



**Şekil 4.47.** Karadeniz alabalığı karaciğer dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine  $\text{Cu}^{2+}$  iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-  $[\text{Cu}^{2+}]$  grafiği

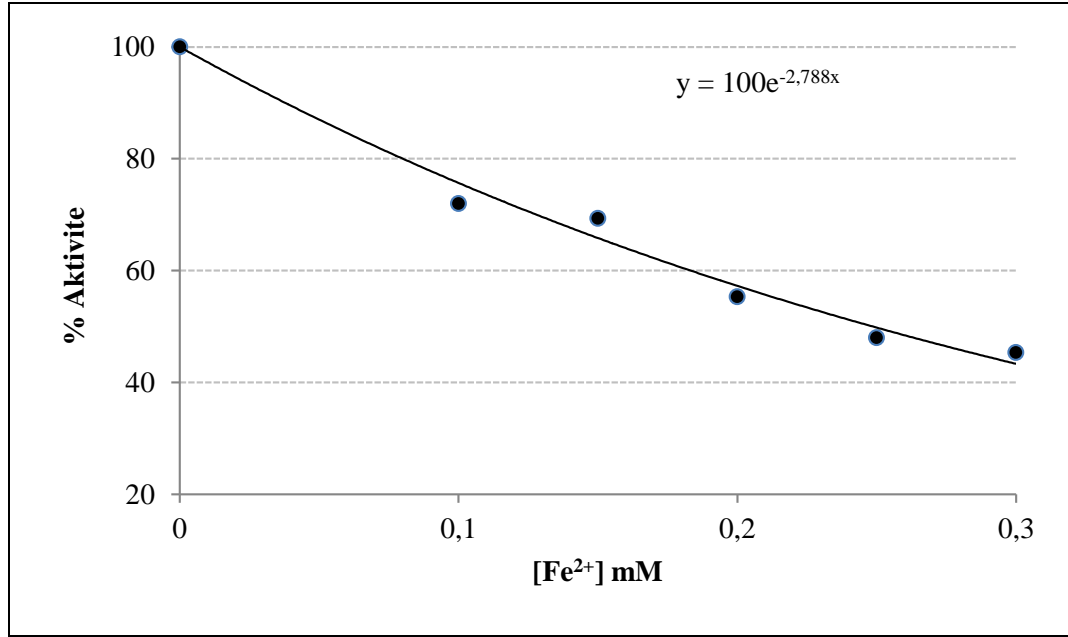


**Çizelge 4.43.** Karadeniz alabalığının karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine metal iyonları ile yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen IC<sub>50</sub> değerleri

Kimyasal Madde	IC <sub>50</sub> (mM)
Fe <sup>2+</sup>	0,23
Pb <sup>2+</sup>	0,41
Co <sup>2+</sup>	2,19
Ag <sup>+</sup>	10,95
Cu <sup>2+</sup>	24,64

**Çizelge 4.44.** Karadeniz alabalığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine Fe<sup>2+</sup> iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri

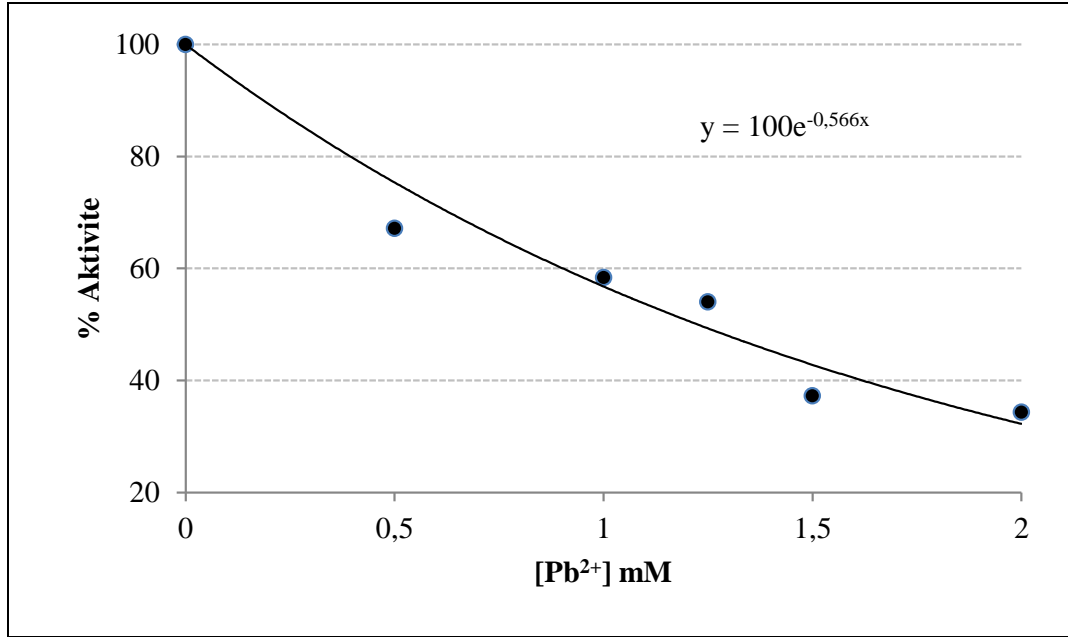
Substrat (µL)	Tris-SO <sub>4</sub> tamponu(µL)	Enzim (µL)	Safsu (µL)	Toplam Hacim(µL)	[I] (mM)	%Aktivite (EÜ/mL)
360	400	10	230	1000	0,00	100
360	400	10	220	1000	0,10	72,00
360	400	10	215	1000	0,15	69,30
360	400	10	210	1000	0,20	55,30
360	400	10	205	1000	0,25	48,00
360	400	10	200	1000	0,30	45,30



**Şekil 4.48.** Karadeniz alabalığı solungaç dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine  $\text{Fe}^{2+}$  iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[\text{Fe}^{2+}]$  grafiği

**Çizelge 4.45.** Karadeniz alabalığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine  $\text{Pb}^{2+}$  ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri

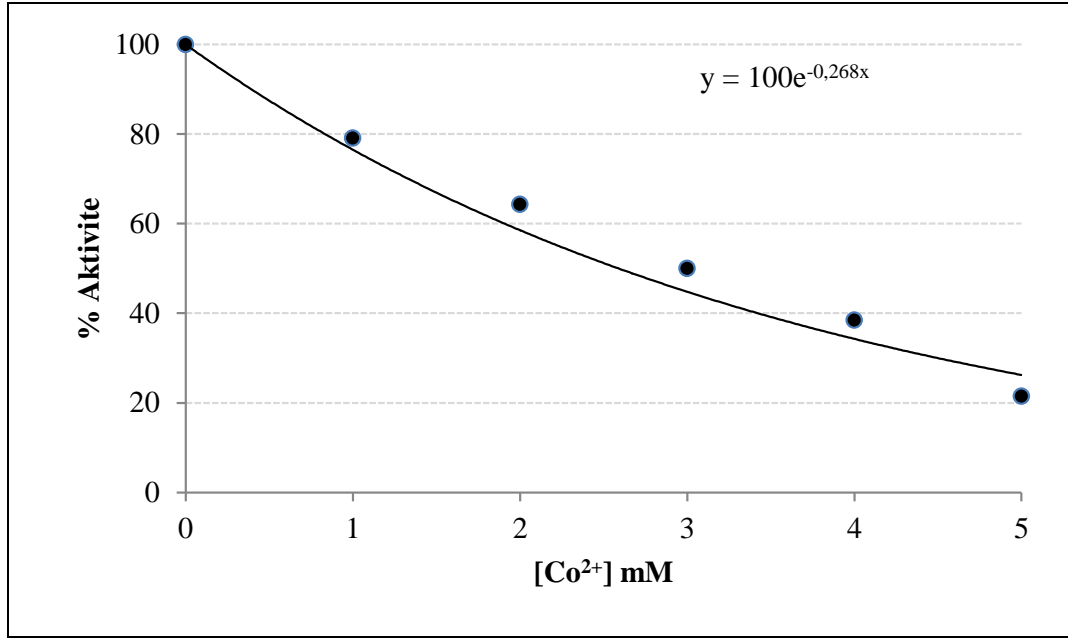
Substrat ( $\mu\text{L}$ )	Tris- $\text{SO}_4$ tamponu( $\mu\text{L}$ )	Enzim ( $\mu\text{L}$ )	Safsu ( $\mu\text{L}$ )	Toplam Hacim( $\mu\text{L}$ )	[I] (mM)	%Aktivite (EÜ/mL)
360	400	10	230	1000	0,00	100,0
360	400	10	180	1000	0,50	67,15
360	400	10	130	1000	1,00	58,39
360	400	10	105	1000	1,25	54,01
360	400	10	80	1000	1,50	37,23
360	400	10	30	1000	2,00	34,31



**Şekil 4.49.** Karadeniz alabalığı solungaç dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine  $Pb^{2+}$  iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[Pb^{2+}]$  grafiği

**Çizelge 4.46.** Karadeniz alabalığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine  $Co^{2+}$  ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri

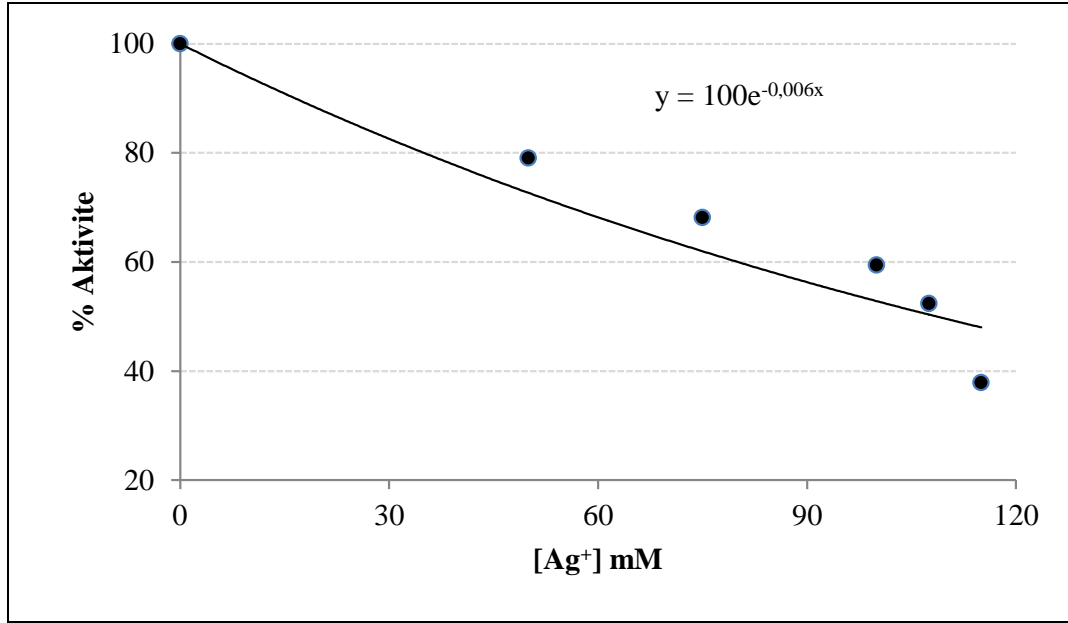
Substrat ( $\mu$ L)	Tris-SO <sub>4</sub> tamponu( $\mu$ L)	Enzim ( $\mu$ L)	Safsu ( $\mu$ L)	Toplam Hacim( $\mu$ L)	[I] (mM)	%Aktivite (EÜ/mL)
360	400	10	230	1000	0,00	100,0
360	400	10	220	1000	1,00	79,12
360	400	10	210	1000	2,00	64,29
360	400	10	200	1000	3,00	50,00
360	400	10	190	1000	4,00	38,46
360	400	10	180	1000	5,00	21,43



**Şekil 4.50.** Karadeniz alabalığı solungaç dokusu CA enziminin esterez aktivitesi üzerine  $\text{Co}^{2+}$  iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[\text{Co}^{2+}]$  grafiği

**Çizelge 4.47.** Karadeniz alabalığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enziminin esterez aktivitesi üzerine  $\text{Ag}^+$  ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri

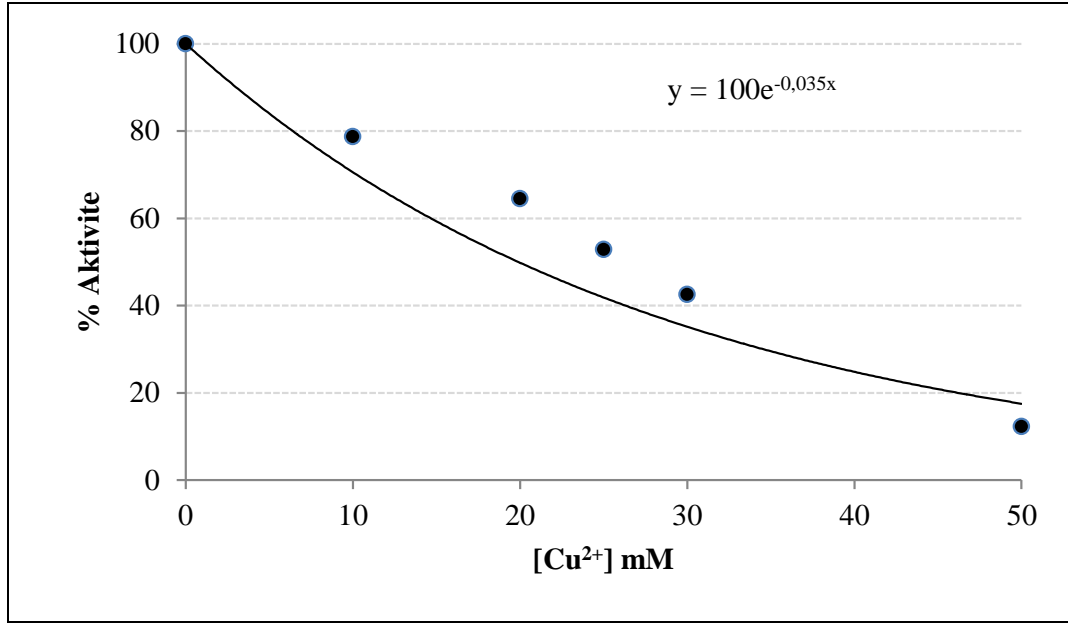
Substrat ( $\mu\text{L}$ )	Tris- $\text{SO}_4$ tamponu( $\mu\text{L}$ )	Enzim ( $\mu\text{L}$ )	Safsu ( $\mu\text{L}$ )	Toplam Hacim( $\mu\text{L}$ )	[I] (mM)	%Aktivite (EÜ/mL)
360	400	10	230	1000	0,00	100,00
360	400	10	130	1000	50,00	79,05
360	400	10	80	1000	75,00	68,15
360	400	10	30	1000	100,00	59,41
360	400	10	15	1000	107,50	52,35
360	400	10	0	1000	115,00	37,85



**Şekil 4.51.** Karadeniz alabalığı solungaç dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine  $Ag^+$  iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[Ag^+]$  grafiği

**Çizelge 4.48.** Karadeniz alabalığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine  $Cu^{2+}$  iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri

Substrat ( $\mu$ L)	Tris-SO <sub>4</sub> tamponu( $\mu$ L)	Enzim ( $\mu$ L)	Safsu ( $\mu$ L)	Toplam Hacim( $\mu$ L)	[I] (mM)	%Aktivite (EÜ/mL)
360	400	10	230	1000	0,00	100,00
360	400	10	220	1000	10,00	78,71
360	400	10	210	1000	20,00	64,52
360	400	10	205	1000	25,00	52,90
360	400	10	200	1000	30,00	42,58
360	400	10	180	1000	50,00	12,26



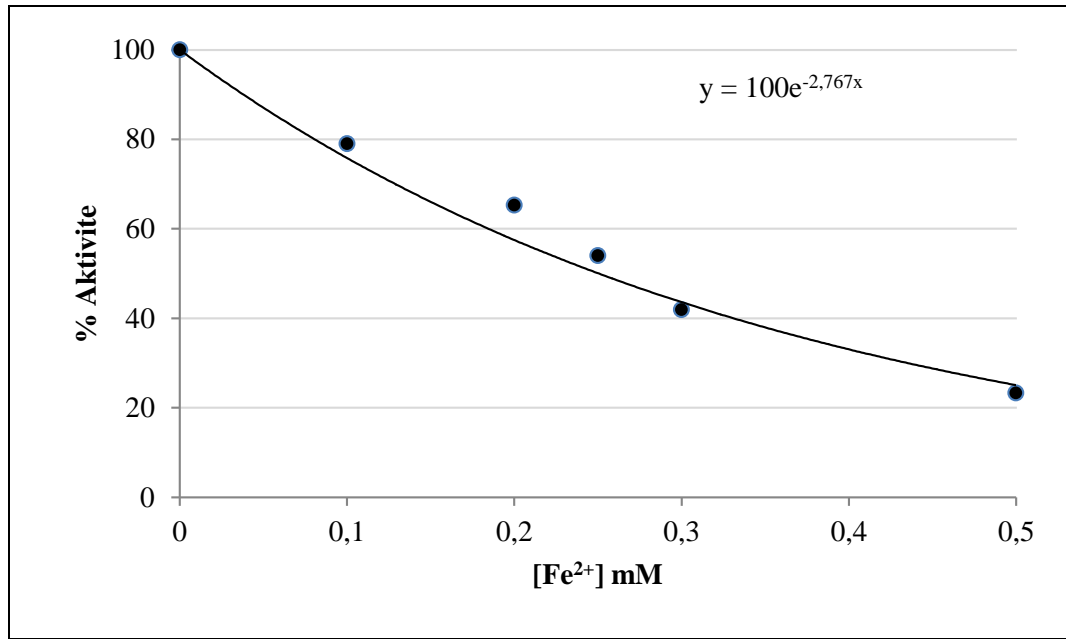
**Şekil 4.52.** Karadeniz alabalığı solungaç dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine  $\text{Cu}^{2+}$  iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-  $[\text{Cu}^{2+}]$  grafiği

**Çizelge 4.49.** Karadeniz alabalığının solungaç dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine metal iyonları ile yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen  $\text{IC}_{50}$  değerleri

Kimyasal Madde	$\text{IC}_{50}$ (mM)
$\text{Fe}^{2+}$	0,25
$\text{Pb}^{2+}$	1,22
$\text{Co}^{2+}$	2,57
$\text{Ag}^+$	115,00
$\text{Cu}^{2+}$	19,71

**Çizelge 4.50.** Karadeniz alabalığı kas dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine  $\text{Fe}^{2+}$  iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri

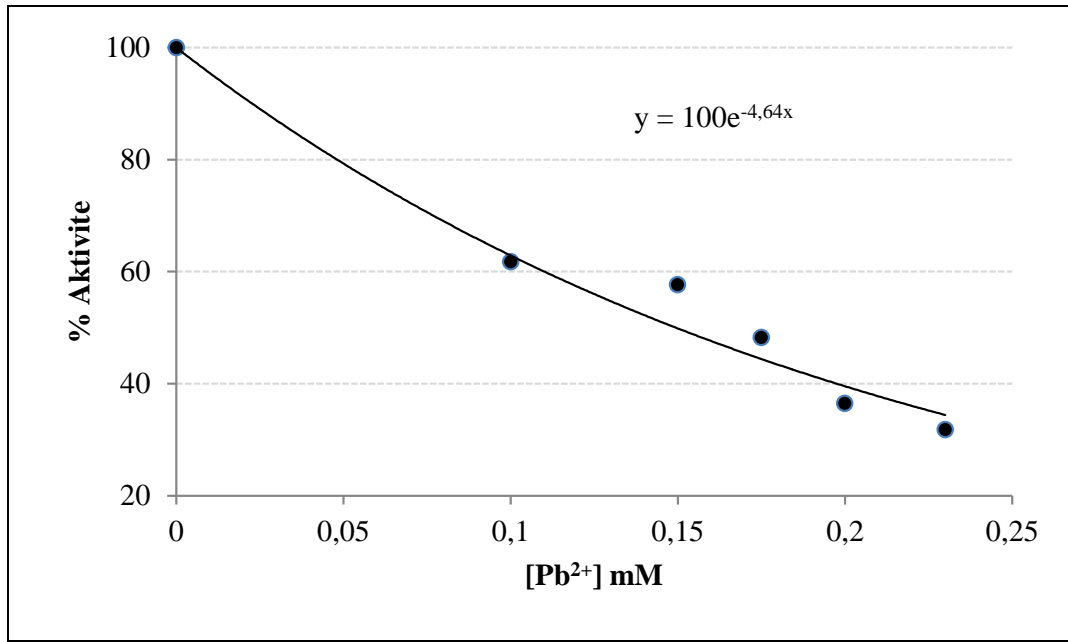
Substrat ( $\mu\text{L}$ )	Tris- $\text{SO}_4$ tamponu( $\mu\text{L}$ )	Enzim ( $\mu\text{L}$ )	Saf su ( $\mu\text{L}$ )	Toplam Hacim( $\mu\text{L}$ )	[I] (mM)	%Aktivite (EÜ/mL)
360	400	10	230	1000	0,00	100
360	400	10	220	1000	0,10	79,00
360	400	10	210	1000	0,20	65,30
360	400	10	205	1000	0,25	54,00
360	400	10	200	1000	0,30	41,90
360	400	10	180	1000	0,50	23,30



**Şekil 4.53.** Karadeniz alabalığı kas dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine  $\text{Fe}^{2+}$  iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- $[\text{Fe}^{2+}]$  grafiği

**Çizelge 4.51.** Karadeniz alabalığı kas dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine  $Pb^{2+}$  iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri

Substrat ( $\mu$ L)	Tris-SO <sub>4</sub> tamponu( $\mu$ L)	Enzim ( $\mu$ L)	Saf su ( $\mu$ L)	Toplam Hacim( $\mu$ L)	[I] (mM)	%Aktivite (EÜ/mL)
360	400	10	230	1000	0,000	100,00
360	400	10	130	1000	0,100	67,15
360	400	10	80	1000	0,150	58,39
360	400	10	55	1000	0,175	54,01
360	400	10	30	1000	0,200	37,23
360	400	10	0	1000	0,230	34,31

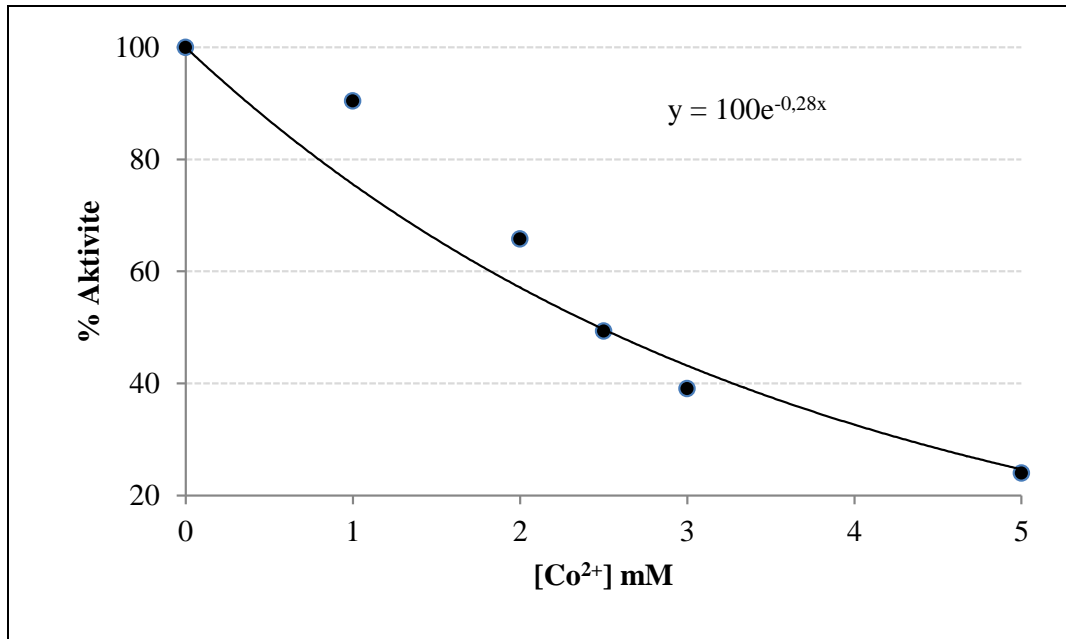


**Şekil 4.54.** Karadeniz alabalığı kas dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine  $Pb^{2+}$  iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-  $[Pb^{2+}]$  grafiği



**Çizelge 4.52.** Karadeniz alabalığı kas dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine  $\text{Co}^{2+}$  iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri

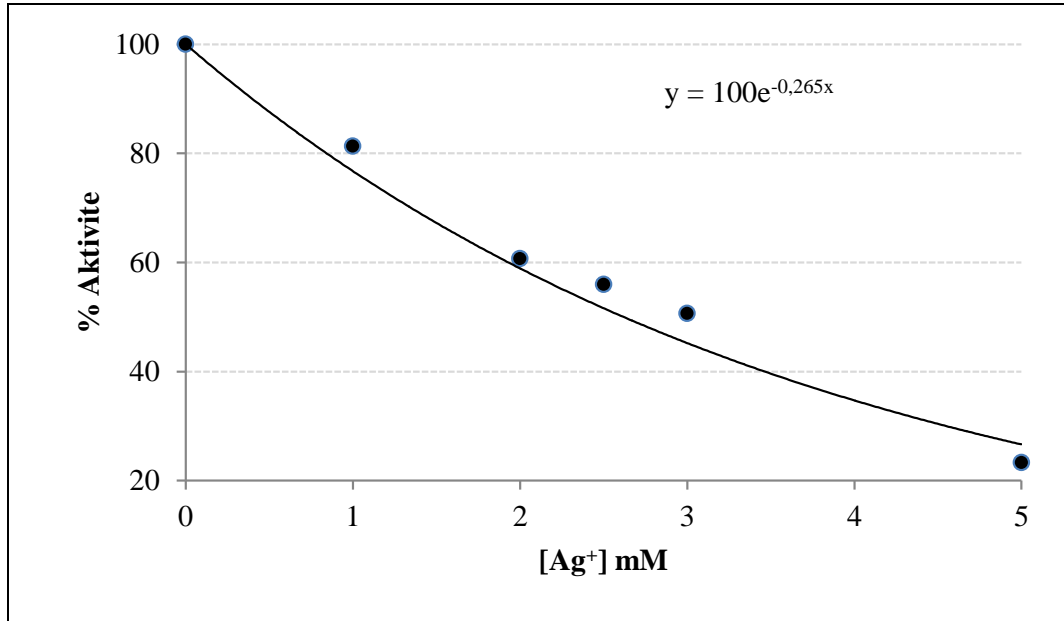
Substrat ( $\mu\text{L}$ )	Tris- $\text{SO}_4$ tamponu( $\mu\text{L}$ )	Enzim ( $\mu\text{L}$ )	Safsu ( $\mu\text{L}$ )	Toplam Hacim( $\mu\text{L}$ )	[I] (mM)	%Aktivite (EÜ/mL)
360	400	10	230	1000	0,00	100,00
360	400	10	220	1000	1,00	90,41
360	400	10	210	1000	2,00	65,75
360	400	10	205	1000	2,50	49,32
360	400	10	200	1000	3,00	39,04
360	400	10	180	1000	5,00	20,25



**Şekil 4.55.** Karadeniz alabalığı kas dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine  $\text{Co}^{2+}$  iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- [ $\text{Co}^{2+}$ ] grafiği

**Çizelge 4.53.** Karadeniz alabalığı kas dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine  $Ag^+$  iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri

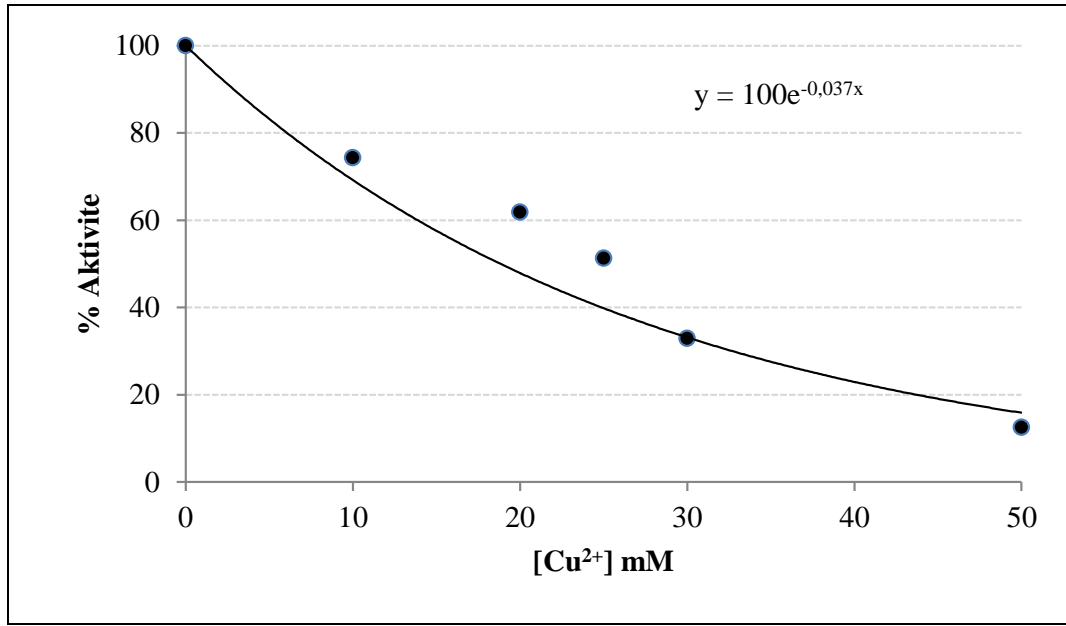
Substrat ( $\mu$ L)	Tris-SO <sub>4</sub> tamponu( $\mu$ L)	Enzim ( $\mu$ L)	Safsu ( $\mu$ L)	Toplam Hacim( $\mu$ L)	[I] (mM)	%Aktivite (EÜ/mL)
360	400	10	230	1000	0,00	100
360	400	10	220	1000	1,00	81,33
360	400	10	210	1000	2,00	60,67
360	400	10	205	1000	2,50	56,00
360	400	10	200	1000	3,00	50,67
360	400	10	180	1000	5,00	23,33



**Şekil 4.56.** Karadeniz alabalığı kas dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine  $Ag^+$  iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-  $[Ag^+]$  grafiği

**Çizelge 4.54.** Karadeniz alabalığı kas dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine  $\text{Cu}^{2+}$  iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri

Substrat ( $\mu\text{L}$ )	Tris- $\text{SO}_4$ tamponu ( $\mu\text{L}$ )	Enzim ( $\mu\text{L}$ )	Safsu ( $\mu\text{L}$ )	Toplam Hacim ( $\mu\text{L}$ )	[I] (mM)	%Aktivite (EÜ/mL)
360	400	10	230	1000	0,00	100,00
360	400	10	220	1000	10,00	74,34
360	400	10	210	1000	20,00	61,84
360	400	10	205	1000	25,00	51,32
360	400	10	200	1000	30,00	32,89
360	400	10	180	1000	50,00	12,50



**Şekil 4.57.** Karadeniz alabalığı kas dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine  $\text{Cu}^{2+}$  iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-  $[\text{Cu}^{2+}]$  grafiği

**Çizelge 4.55.** Karadeniz alabalığının kas dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine metal iyonları ile yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen IC<sub>50</sub> değerleri

Kimyasal Madde	IC <sub>50</sub> (mM)
Fe <sup>2+</sup>	0,25
Pb <sup>2+</sup>	0,15
Co <sup>2+</sup>	2,46
Ag <sup>+</sup>	2,60
Cu <sup>2+</sup>	18,65

#### 4.3.7. Karadeniz alabalığı böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokularından elde edilen CA enzimi için inhibitör etkisi gösteren ağır metallerin K<sub>i</sub> sabitlerinin ve inhibisyon türünün bulunması

İnhibitör çalışmasında alabalık böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokularından elde edilen CA enzimini inhibe eden FeCl<sub>2</sub>, Pb(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, AgNO<sub>3</sub> ve CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O maddeleri kullanıldı. 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. Karadeniz alabalığı böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokularından saflaştırılan CA enzimleri için K<sub>i</sub> değerlerinin belirlenmesinde kullanılan ağır metal için çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen ağır metal konsantrasyonları çizelge 4.56.-4.79'de verildi. Daha sonra Karadeniz alabalığının dokusundan saflaştırılan CA enzimi için üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda 1/V ve 1/[S] değerleri belirlenerek Lineweaver-Burk grafiği çizilerek K<sub>i</sub> değeri ve inhibisyon tipi tayin edildi (Şekil 4.58-4.77) (Lineweaver and Burk 1934).

**Çizelge 4.56.** Karadeniz alabalığı böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine  $Fe^{2+}$  iyonunun  $K_i$  değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

<b>Tris-SO<sub>4</sub> Hacmi(μL)</b>	<b>Enzim Hacmi(μL)</b>	<b>Saf su Hacmi(μL)</b>	<b>Substrat Hacmi(μL)</b>	<b>[S] (mM)</b>	<b>[I] (mM)</b>	<b>Toplam Hacim(μL)</b>
400	5	545	50	0,15	0,00	1000
400	5	515	50	0,15	0,60	1000
400	5	505	50	0,15	0,80	1000
400	5	495	50	0,15	1,00	1000
400	5	495	100	0,30	0,00	1000
400	5	465	100	0,30	0,60	1000
400	5	455	100	0,30	0,80	1000
400	5	445	100	0,30	1,00	1000
400	5	445	150	0,45	0,00	1000
400	5	415	150	0,45	0,60	1000
400	5	405	150	0,45	0,80	1000
400	5	395	150	0,45	1,00	1000
400	5	395	200	0,60	0,00	1000
400	5	365	200	0,60	0,60	1000
400	5	355	200	0,60	0,80	1000
400	5	345	200	0,60	1,00	1000
400	5	345	250	0,75	0,00	1000
400	5	315	250	0,75	0,60	1000
400	5	305	250	0,75	0,80	1000
400	5	295	250	0,75	1,00	1000

**Çizelge 4.57.** Karadeniz alabalığı böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine  $Pb^{2+}$  iyonunun  $K_i$  değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

<b>Tris-SO<sub>4</sub> Hacmi(μL)</b>	<b>Enzim Hacmi(μL)</b>	<b>Saf su Hacmi(μL)</b>	<b>Substrat Hacmi(μL)</b>	<b>[S] (mM)</b>	<b>[I] (mM)</b>	<b>Toplam Hacim(μL)</b>
400	10	540	50	0,15	0,00	1000
400	10	530	50	0,15	0,10	1000
400	10	525	50	0,15	0,15	1000
400	10	520	50	0,15	0,20	1000
400	10	490	100	0,30	0,00	1000
400	10	480	100	0,30	0,10	1000
400	10	475	100	0,30	0,15	1000
400	10	470	100	0,30	0,20	1000
400	10	440	150	0,45	0,00	1000
400	10	430	150	0,45	0,10	1000
400	10	425	150	0,45	0,15	1000
400	10	420	150	0,45	0,20	1000
400	10	390	200	0,60	0,00	1000
400	10	380	200	0,60	0,10	1000
400	10	375	200	0,60	0,15	1000
400	10	370	200	0,60	0,20	1000
400	10	340	250	0,75	0,00	1000
400	10	330	250	0,75	0,10	1000
400	10	325	250	0,75	0,15	1000
400	10	320	250	0,75	0,20	1000

**Çizelge 4.58.** Karadeniz alabalığı böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine  $\text{Co}^{2+}$  iyonunun  $K_i$  değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tris- $\text{SO}_4$ Hacmi( $\mu\text{L}$ )	Enzim Hacmi( $\mu\text{L}$ )	Saf su Hacmi( $\mu\text{L}$ )	Substrat Hacmi( $\mu\text{L}$ )	[S] (mM)	[I] (mM)	Toplam Hacim( $\mu\text{L}$ )
400	10	540	50	0,15	0,00	1000
400	10	525	50	0,15	1,50	1000
400	10	520	50	0,15	2,00	1000
400	10	515	50	0,15	2,50	1000
400	10	490	100	0,30	0,00	1000
400	10	475	100	0,30	1,50	1000
400	10	470	100	0,30	2,00	1000
400	10	465	100	0,30	2,50	1000
400	10	440	150	0,45	0,00	1000
400	10	425	150	0,45	1,50	1000
400	10	420	150	0,45	2,00	1000
400	10	415	150	0,45	2,50	1000
400	10	390	200	0,60	0,00	1000
400	10	375	200	0,60	1,50	1000
400	10	370	200	0,60	2,00	1000
400	10	365	200	0,60	2,50	1000
400	10	340	250	0,75	0,00	1000
400	10	325	250	0,75	1,50	1000
400	10	320	250	0,75	2,00	1000
400	10	315	250	0,75	2,50	1000

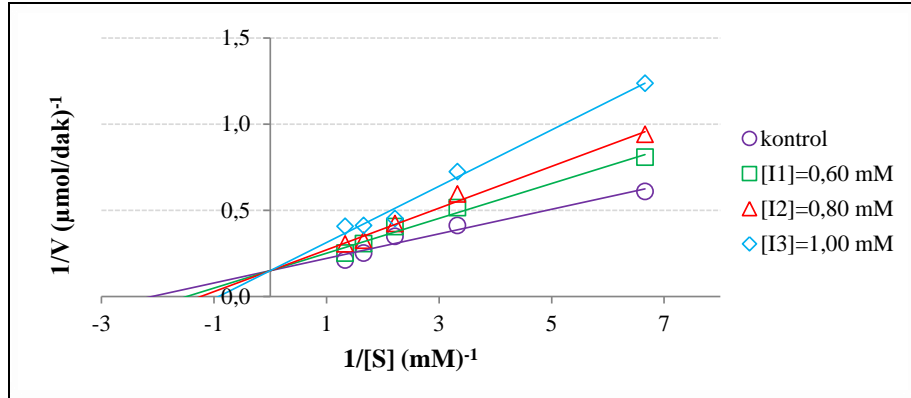
**Çizelge 4.59.** Karadeniz alabalığı böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine  $Ag^+$  iyonunun  $K_i$  değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tris-SO <sub>4</sub> Hacmi(μL)	Enzim Hacmi(μL)	Saf su Hacmi(μL)	Substrat Hacmi(μL)	[S] (mM)	[I] (mM)	Toplam Hacim(μL)
400	10	540	50	0,15	0,00	1000
400	10	475	50	0,15	65,00	1000
400	10	465	50	0,15	75,00	1000
400	10	450	50	0,15	90,00	1000
400	10	490	100	0,30	0,00	1000
400	10	425	100	0,30	65,00	1000
400	10	415	100	0,30	75,00	1000
400	10	400	100	0,30	90,00	1000
400	10	440	150	0,45	0,00	1000
400	10	375	150	0,45	65,00	1000
400	10	365	150	0,45	75,00	1000
400	10	350	150	0,45	90,00	1000
400	10	390	200	0,60	0,00	1000
400	10	325	200	0,60	65,00	1000
400	10	315	200	0,60	75,00	1000
400	10	300	200	0,60	90,00	1000
400	10	340	250	0,75	0,00	1000
400	10	275	250	0,75	65,00	1000
400	10	265	250	0,75	75,00	1000
400	10	250	250	0,75	90,00	1000

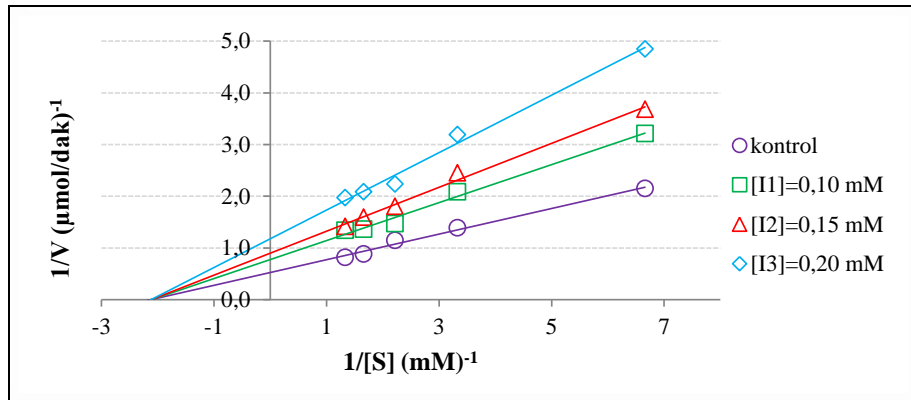


**Çizelge 4.60.** Karadeniz alabalığı böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine  $\text{Cu}^{2+}$  iyonunun  $K_i$  değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

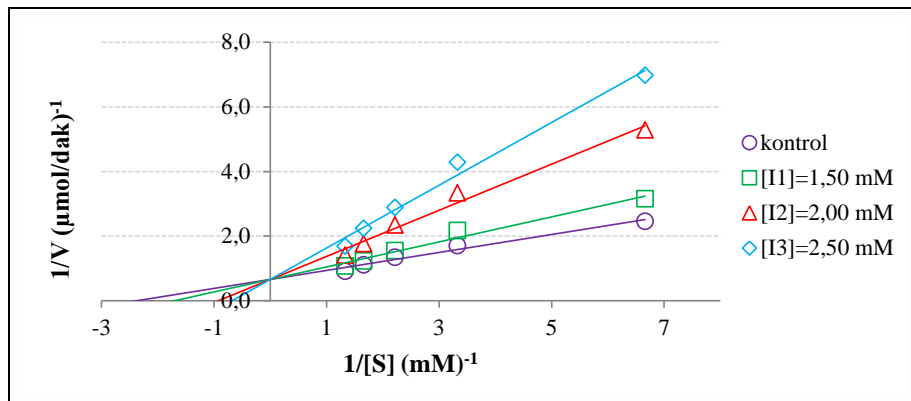
<b>Tris-SO<sub>4</sub> Hacmi(μL)</b>	<b>Enzim Hacmi(μL)</b>	<b>Saf su Hacmi(μL)</b>	<b>Substrat Hacmi(μL)</b>	<b>[S] (mM)</b>	<b>[I] (mM)</b>	<b>Toplam Hacim(μL)</b>
400	10	540	50	0,15	0,00	1000
400	10	520	50	0,15	20,0	1000
400	10	515	50	0,15	25,0	1000
400	10	510	50	0,15	30,0	1000
400	10	490	100	0,30	0,00	1000
400	10	470	100	0,30	20,0	1000
400	10	465	100	0,30	25,0	1000
400	10	460	100	0,30	30,0	1000
400	10	440	150	0,45	0,00	1000
400	10	420	150	0,45	20,0	1000
400	10	415	150	0,45	25,0	1000
400	10	410	150	0,45	30,0	1000
400	10	390	200	0,60	0,00	1000
400	10	370	200	0,60	20,0	1000
400	10	365	200	0,60	25,0	1000
400	10	360	200	0,60	30,0	1000
400	10	340	250	0,75	0,00	1000
400	10	320	250	0,75	20,0	1000
400	10	315	250	0,75	25,0	1000
400	10	310	250	0,75	30,0	1000



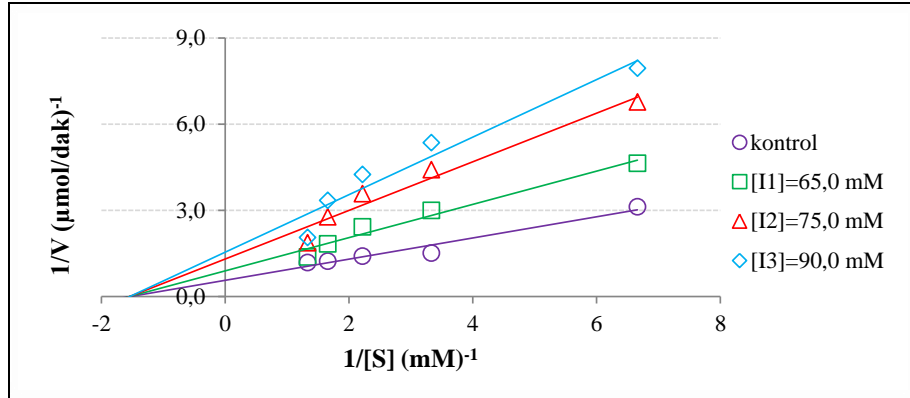
Şekil 4.58. Karadeniz alabalığı böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine Fe<sup>2+</sup> iyonunun etkisi



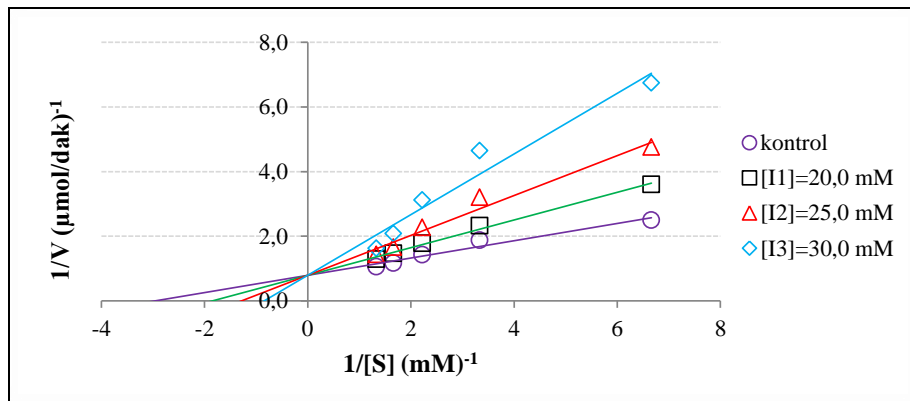
Şekil 4.59. Karadeniz alabalığı böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine Pb<sup>2+</sup> iyonunun etkisi



Şekil 4.60. Karadeniz alabalığı böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine Co<sup>2+</sup> iyonunun etkisi



Şekil 4.61. Karadeniz alabalığı böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine  $Ag^+$  iyonunun etkisi



Şekil 4.62. Karadeniz alabalığı böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine  $Cu^{2+}$  iyonunun etkisi

Karadeniz alabalığı böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokularından saflaştırılan CA enzimi için inhibitör olarak kullanılan  $Fe^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ag^+$  ve  $Cu^{2+}$  metal iyonlarının inhibisyon türüne göre  $K_i$  değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplanarak çizelge 4.61-4.67-4.73 ve 4.79'da verildi.

**Yarışmasız için:**

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

**Yarışmalı için:**

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

**Çizelge 4.61.** Karadeniz alabalığı böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi için 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan  $K_i$  değerleri ve inhibisyon tipleri

<b>İnhibitör Cinsi</b>	<b>[I] mM</b>	<b><math>K_i</math> (mM)</b>	<b>Ortalama <math>K_i</math> Değerleri (mM)</b>	<b>İnhibisyon Tipi</b>
<b>Fe<sup>2+</sup></b>	0,6	1,432	1,117	Yarışmalı
	0,8	1,144		
	1,0	0,774		
<b>Pb<sup>2+</sup></b>	0,10	0,207	0,185	Yarışmasız
	0,15	0,187		
	0,20	0,161		
<b>Co<sup>2+</sup></b>	1,50	3,835	2,038	Yarışmalı
	2,00	1,278		
	2,50	1,003		
<b>Ag<sup>+</sup></b>	65,00	114,135	74,795	Yarışmasız
	75,00	57,813		
	90,00	52,436		
<b>Cu<sup>2+</sup></b>	20,0	33,220	21,427	Yarışmalı
	25,0	19,106		
	30,0	11,956		

**Çizelge 4.62.** Karadeniz alabalığı karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine  $Fe^{2+}$  iyonunun  $K_i$  değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tris-SO <sub>4</sub> Hacmi(μL)	Enzim Hacmi(μL)	Saf su Hacmi(μL)	Substrat Hacmi(μL)	[S] (mM)	[I] (mM)	Toplam Hacim(μL)
400	5	545	50	0,15	0,00	1000
400	5	525	50	0,15	0,20	1000
400	5	520	50	0,15	0,25	1000
400	5	515	50	0,15	0,30	1000
400	5	495	100	0,30	0,00	1000
400	5	475	100	0,30	0,20	1000
400	5	470	100	0,30	0,25	1000
400	5	465	100	0,30	0,30	1000
400	5	445	150	0,45	0,00	1000
400	5	425	150	0,45	0,20	1000
400	5	420	150	0,45	0,25	1000
400	5	415	150	0,45	0,30	1000
400	5	395	200	0,60	0,00	1000
400	5	375	200	0,60	0,20	1000
400	5	370	200	0,60	0,25	1000
400	5	365	200	0,60	0,30	1000
400	5	345	250	0,75	0,00	1000
400	5	325	250	0,75	0,20	1000
400	5	320	250	0,75	0,25	1000
400	5	315	250	0,75	0,30	1000

**Çizelge 4.63.** Karadeniz alabalığı karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine  $Pb^{2+}$  iyonunun  $K_i$  değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tris-SO <sub>4</sub> Hacmi(μL)	Enzim Hacmi(μL)	Saf su Hacmi(μL)	Substrat Hacmi(μL)	[S] (mM)	[I] (mM)	Toplam Hacim(μL)
400	15	535	50	0,15	0,00	1000
400	15	505	50	0,15	0,20	1000
400	15	495	50	0,15	0,25	1000
400	15	485	50	0,15	0,30	1000
400	15	485	100	0,30	0,00	1000
400	15	455	100	0,30	0,20	1000
400	15	445	100	0,30	0,25	1000
400	15	435	100	0,30	0,30	1000
400	15	435	150	0,45	0,00	1000
400	15	405	150	0,45	0,20	1000
400	15	395	150	0,45	0,25	1000
400	15	385	150	0,45	0,30	1000
400	15	385	200	0,60	0,00	1000
400	15	355	200	0,60	0,20	1000
400	15	345	200	0,60	0,25	1000
400	15	335	200	0,60	0,30	1000
400	15	335	250	0,75	0,00	1000
400	15	305	250	0,75	0,20	1000
400	15	295	250	0,75	0,25	1000
400	15	285	250	0,75	0,30	1000

**Çizelge 4.64.** Karadeniz alabalığı karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine  $\text{Co}^{2+}$  iyonunun  $K_i$  değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tris-SO <sub>4</sub> Hacmi(μL)	Enzim Hacmi(μL)	Saf su Hacmi(μL)	Substrat Hacmi(μL)	[S] (mM)	[I] (mM)	Toplam Hacim(μL)
400	10	540	50	0,15	0,00	1000
400	10	525	50	0,15	1,50	1000
400	10	515	50	0,15	2,50	1000
400	10	510	50	0,15	3,00	1000
400	10	490	100	0,30	0,00	1000
400	10	475	100	0,30	1,50	1000
400	10	465	100	0,30	2,50	1000
400	10	460	100	0,30	3,00	1000
400	10	440	150	0,45	0,00	1000
400	10	425	150	0,45	1,50	1000
400	10	415	150	0,45	2,50	1000
400	10	410	150	0,45	3,00	1000
400	10	390	200	0,60	0,00	1000
400	10	375	200	0,60	1,50	1000
400	10	365	200	0,60	2,50	1000
400	10	360	200	0,60	3,00	1000
400	10	340	250	0,75	0,00	1000
400	10	325	250	0,75	1,50	1000
400	10	315	250	0,75	2,50	1000
400	10	310	250	0,75	3,00	1000

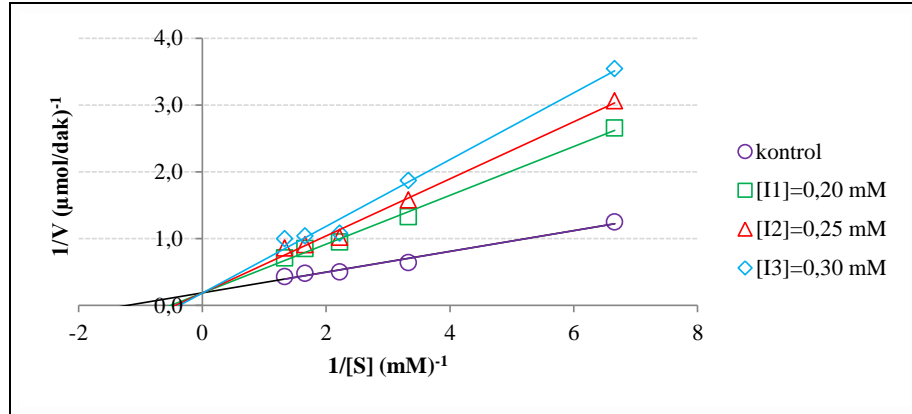
**Çizelge 4.65.** Karadeniz alabalığı karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine  $Ag^+$  iyonunun  $K_i$  değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

<b>Tris-SO<sub>4</sub> Hacmi(μL)</b>	<b>Enzim Hacmi(μL)</b>	<b>Saf su Hacmi(μL)</b>	<b>Substrat Hacmi(μL)</b>	<b>[S] (mM)</b>	<b>[I] (mM)</b>	<b>Toplam Hacim(μL)</b>
400	10	540	50	0,15	0,00	1000
400	10	360	50	0,15	9,00	1000
400	10	350	50	0,15	9,50	1000
400	10	340	50	0,15	10,00	1000
400	10	490	100	0,30	0,00	1000
400	10	310	100	0,30	9,00	1000
400	10	300	100	0,30	9,50	1000
400	10	290	100	0,30	10,00	1000
400	10	440	150	0,45	0,00	1000
400	10	260	150	0,45	9,00	1000
400	10	250	150	0,45	9,50	1000
400	10	240	150	0,45	10,00	1000
400	10	390	200	0,60	0,00	1000
400	10	210	200	0,60	9,00	1000
400	10	200	200	0,60	9,50	1000
400	10	190	200	0,60	10,00	1000
400	10	340	250	0,75	0,00	1000
400	10	160	250	0,75	9,00	1000
400	10	150	250	0,75	9,50	1000
400	10	140	250	0,75	10,00	1000

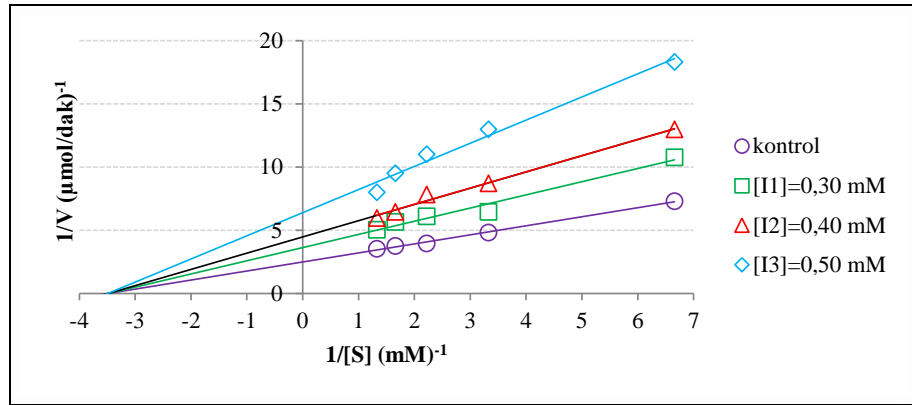


**Çizelge 4.66.** Karadeniz alabalığı karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine  $\text{Cu}^{2+}$  iyonunun  $K_i$  değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

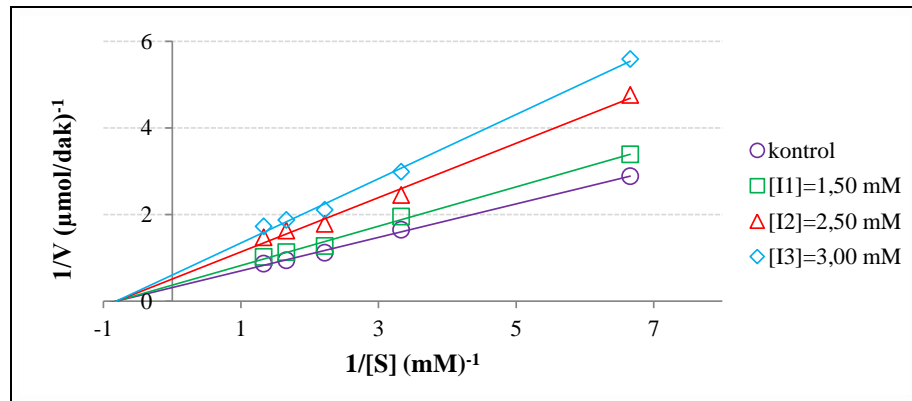
Tris-SO <sub>4</sub> Hacmi(μL)	Enzim Hacmi(μL)	Saf su Hacmi(μL)	Substrat Hacmi(μL)	[S] (mM)	[I] (mM)	Toplam Hacim(μL)
400	10	540	50	0,15	0,00	1000
400	10	520	50	0,15	20,0	1000
400	10	515	50	0,15	25,0	1000
400	10	510	50	0,15	30,0	1000
400	10	490	100	0,30	0,00	1000
400	10	470	100	0,30	20,0	1000
400	10	465	100	0,30	25,0	1000
400	10	460	100	0,30	30,0	1000
400	10	440	150	0,45	0,00	1000
400	10	420	150	0,45	20,0	1000
400	10	415	150	0,45	25,0	1000
400	10	410	150	0,45	30,0	1000
400	10	390	200	0,60	0,00	1000
400	10	370	200	0,60	20,0	1000
400	10	365	200	0,60	25,0	1000
400	10	360	200	0,60	30,0	1000
400	10	340	250	0,75	0,00	1000
400	10	320	250	0,75	20,0	1000
400	10	315	250	0,75	25,0	1000
400	10	310	250	0,75	30,0	1000



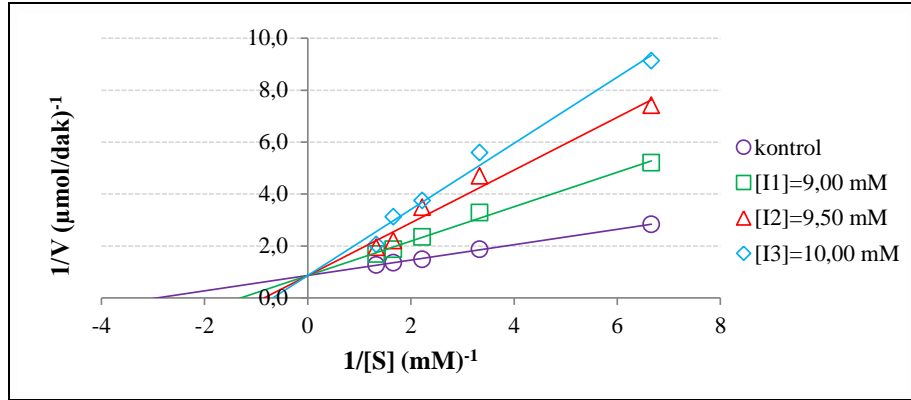
Şekil 4.63. Karadeniz alabalığı karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine  $\text{Fe}^{2+}$  iyonunun etkisi



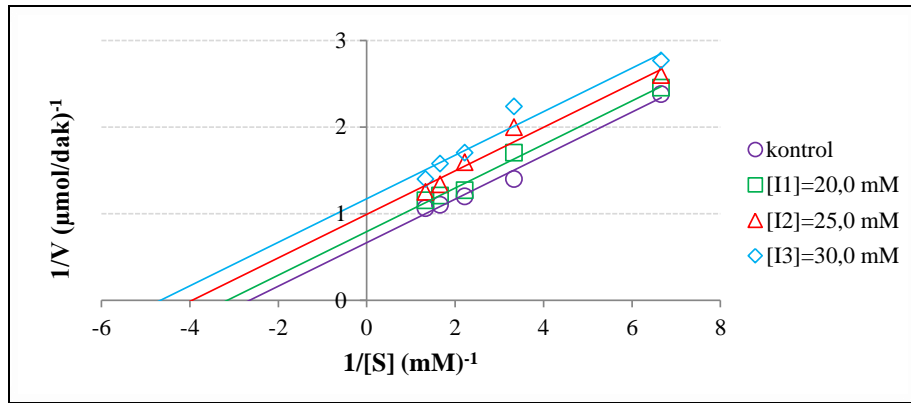
Şekil 4.64. Karadeniz alabalığı karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine  $\text{Pb}^{2+}$  iyonunun etkisi



Şekil 4.65. Karadeniz alabalığı karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine  $\text{Co}^{2+}$  iyonunun etkisi



Şekil 4.66. Karadeniz alabalığı karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine  $\text{Ag}^+$  iyonunun etkisi



Şekil 4.67. Karadeniz alabalığı karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine  $\text{Cu}^{2+}$  iyonunun etkisi

**Çizelge 4.67.** Karadeniz alabalığı karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi için 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan  $K_i$  değerleri ve inhibisyon tipleri

<b>İnhibitör Cinsi</b>	<b>[I] mM</b>	<b><math>K_i</math> (mM)</b>	<b>Ortalama <math>K_i</math> Değerleri (mM)</b>	<b>İnhibisyon Tipi</b>
<b>Fe<sup>2+</sup></b>	0,20	0,148	0,162	Yarışmalı
	0,25	0,142		
	0,30	0,135		
<b>Pb<sup>2+</sup></b>	0,3	0,658	0,494	Yarışmasız
	0,4	0,503		
	0,5	0,320		
<b>Co<sup>2+</sup></b>	1,50	8,621	5,302	Yarışmasız
	2,50	4,013		
	3,00	3,271		
<b>Ag<sup>+</sup></b>	9,00	7,247	4,727	Yarışmalı
	9,50	3,904		
	10,00	3,030		
<b>Cu<sup>2+</sup></b>	20,00	103,083	64,378	Yarıyarışmalı
	25,00	50,794		
	30,00	39,257		

**Çizelge 4.68.** Karadeniz alabalığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine  $Fe^{2+}$  iyonunun  $K_i$  değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

<b>Tris-SO<sub>4</sub> Hacmi(μL)</b>	<b>Enzim Hacmi(μL)</b>	<b>Saf su Hacmi(μL)</b>	<b>Substrat Hacmi(μL)</b>	<b>[S] (mM)</b>	<b>[I] (mM)</b>	<b>Toplam Hacim(μL)</b>
400	10	540	50	0,15	0,00	1000
400	10	525	50	0,15	0,15	1000
400	10	520	50	0,15	0,20	1000
400	10	515	50	0,15	0,25	1000
400	10	490	100	0,30	0,00	1000
400	10	475	100	0,30	0,15	1000
400	10	470	100	0,30	0,20	1000
400	10	465	100	0,30	0,25	1000
400	10	440	150	0,45	0,00	1000
400	10	425	150	0,45	0,15	1000
400	10	420	150	0,45	0,20	1000
400	10	415	150	0,45	0,25	1000
400	10	390	200	0,60	0,00	1000
400	10	375	200	0,60	0,15	1000
400	10	370	200	0,60	0,20	1000
400	10	365	200	0,60	0,25	1000
400	10	340	250	0,75	0,00	1000
400	10	325	250	0,75	0,15	1000
400	10	320	250	0,75	0,20	1000
400	10	315	250	0,75	0,25	1000

**Çizelge 4.69.** Karadeniz alabalığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine  $Pb^{2+}$  iyonunun  $K_i$  değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

<b>Tris-SO<sub>4</sub> Hacmi(μL)</b>	<b>Enzim Hacmi(μL)</b>	<b>Saf su Hacmi(μL)</b>	<b>Substrat Hacmi(μL)</b>	<b>[S] (mM)</b>	<b>[I] (mM)</b>	<b>Toplam Hacim(μL)</b>
400	10	540	50	0,15	0,00	1000
400	10	440	50	0,15	1,00	1000
400	10	415	50	0,15	1,25	1000
400	10	390	50	0,15	1,50	1000
400	10	490	100	0,30	0,00	1000
400	10	390	100	0,30	1,00	1000
400	10	365	100	0,30	1,25	1000
400	10	330	100	0,30	1,50	1000
400	10	440	150	0,45	0,00	1000
400	10	340	150	0,45	1,00	1000
400	10	315	150	0,45	1,25	1000
400	10	290	150	0,45	1,50	1000
400	10	390	200	0,60	0,00	1000
400	10	290	200	0,60	1,00	1000
400	10	265	200	0,60	1,25	1000
400	10	230	200	0,60	1,50	1000
400	10	340	250	0,75	0,00	1000
400	10	240	250	0,75	1,00	1000
400	10	215	250	0,75	1,25	1000
400	10	190	250	0,75	1,50	1000

**Çizelge 4.70.** Karadeniz alabalığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine  $\text{Co}^{2+}$  iyonunun  $K_i$  değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

<b>Tris-SO<sub>4</sub> Hacmi(μL)</b>	<b>Enzim Hacmi(μL)</b>	<b>Saf su Hacmi(μL)</b>	<b>Substrat Hacmi(μL)</b>	<b>[S] (mM)</b>	<b>[I] (mM)</b>	<b>Toplam Hacim(μL)</b>
400	10	540	50	0,15	0,00	1000
400	10	520	50	0,15	0,15	1000
400	10	510	50	0,15	0,20	1000
400	10	500	50	0,15	0,25	1000
400	10	490	100	0,30	0,00	1000
400	10	470	100	0,30	0,15	1000
400	10	460	100	0,30	0,20	1000
400	10	450	100	0,30	0,25	1000
400	10	440	150	0,45	0,00	1000
400	10	420	150	0,45	0,15	1000
400	10	410	150	0,45	0,20	1000
400	10	400	150	0,45	0,25	1000
400	10	390	200	0,60	0,00	1000
400	10	370	200	0,60	0,15	1000
400	10	360	200	0,60	0,20	1000
400	10	350	200	0,60	0,25	1000
400	10	340	250	0,75	0,00	1000
400	10	320	250	0,75	0,15	1000
400	10	310	250	0,75	0,20	1000
400	10	300	250	0,75	0,25	1000

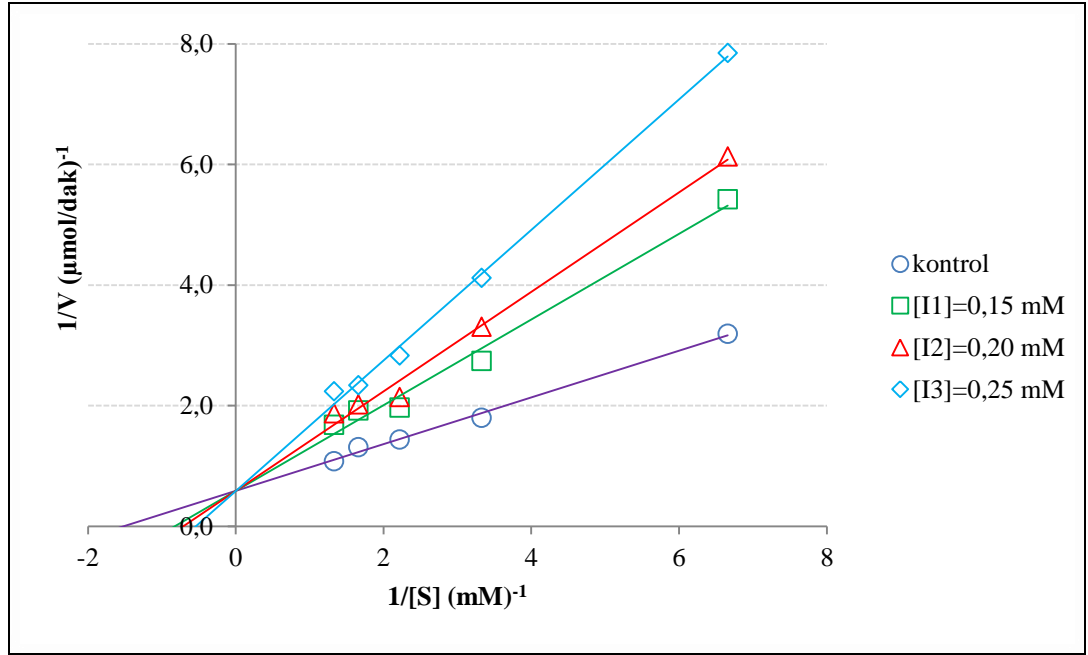
**Çizelge 4.71.** Karadeniz alabalığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine  $Ag^+$  iyonunun  $K_i$  değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

<b>Tris-SO<sub>4</sub> Hacmi(μL)</b>	<b>Enzim Hacmi(μL)</b>	<b>Saf su Hacmi(μL)</b>	<b>Substrat Hacmi(μL)</b>	<b>[S] (mM)</b>	<b>[I] (mM)</b>	<b>Toplam Hacim(μL)</b>
400	10	540	50	0,15	0,00	1000
400	10	340	50	0,15	100,00	1000
400	10	325	50	0,15	107,50	1000
400	10	310	50	0,15	115,00	1000
400	10	490	100	0,30	0,00	1000
400	10	290	100	0,30	100,00	1000
400	10	275	100	0,30	107,50	1000
400	10	260	100	0,30	115,00	1000
400	10	440	150	0,45	0,00	1000
400	10	240	150	0,45	100,00	1000
400	10	225	150	0,45	107,50	1000
400	10	210	150	0,45	115,00	1000
400	10	390	200	0,60	0,00	1000
400	10	190	200	0,60	100,00	1000
400	10	175	200	0,60	107,50	1000
400	10	160	200	0,60	115,00	1000
400	10	340	250	0,75	0,00	1000
400	10	140	250	0,75	100,00	1000
400	10	125	250	0,75	107,50	1000
400	10	110	250	0,75	115,00	1000

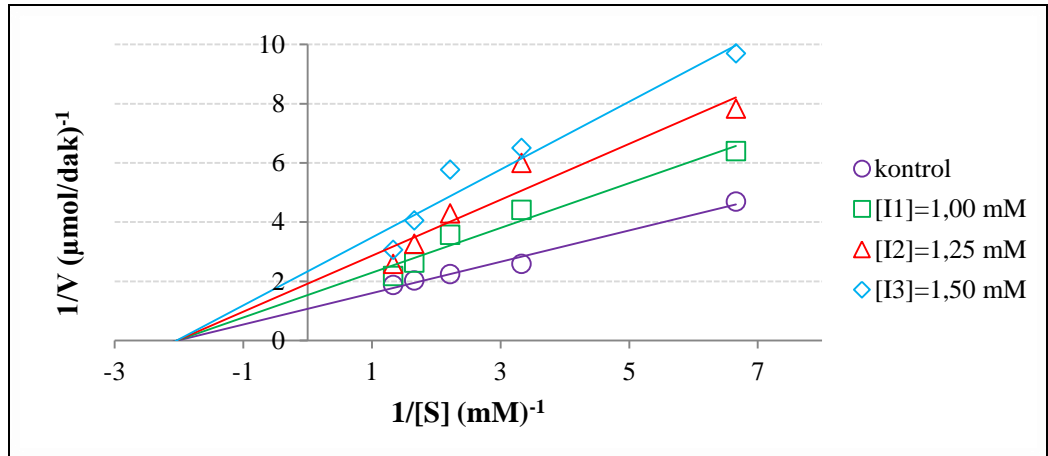


**Çizelge 4.72.** Karadeniz alabalığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine  $\text{Cu}^{2+}$  iyonunun  $K_i$  değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

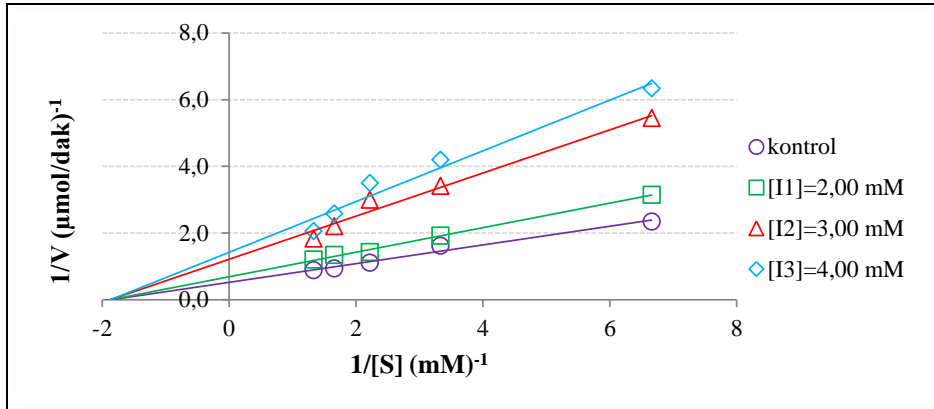
Tris-SO <sub>4</sub> Hacmi(μL)	Enzim Hacmi(μL)	Saf su Hacmi(μL)	Substrat Hacmi(μL)	[S] (mM)	[I] (mM)	Toplam Hacim(μL)
400	10	540	50	0,15	0,00	1000
400	10	520	50	0,15	20,0	1000
400	10	515	50	0,15	25,0	1000
400	10	510	50	0,15	30,0	1000
400	10	490	100	0,30	0,00	1000
400	10	470	100	0,30	20,0	1000
400	10	465	100	0,30	25,0	1000
400	10	460	100	0,30	30,0	1000
400	10	440	150	0,45	0,00	1000
400	10	420	150	0,45	20,0	1000
400	10	415	150	0,45	25,0	1000
400	10	410	150	0,45	30,0	1000
400	10	390	200	0,60	0,00	1000
400	10	370	200	0,60	20,0	1000
400	10	365	200	0,60	25,0	1000
400	10	360	200	0,60	30,0	1000
400	10	340	250	0,75	0,00	1000
400	10	320	250	0,75	20,0	1000
400	10	315	250	0,75	25,0	1000
400	10	310	250	0,75	30,0	1000



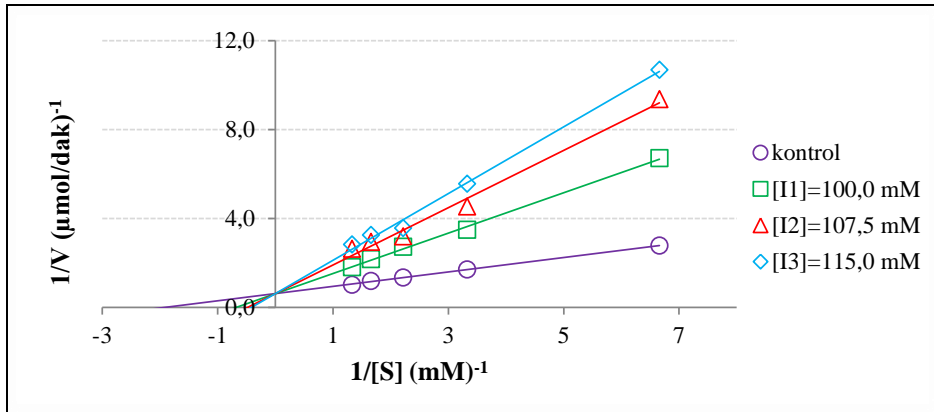
**Şekil 4.68.** Karadeniz alabalığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine  $\text{Fe}^{2+}$  iyonunun etkisi



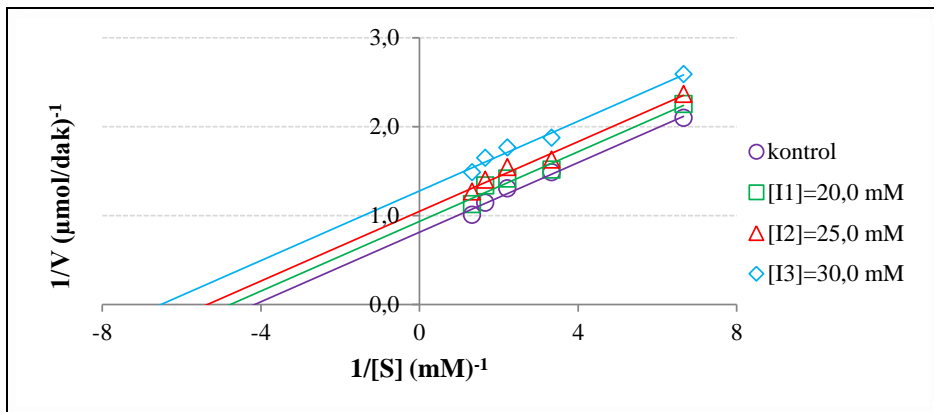
**Şekil 4.69.** Karadeniz alabalığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine  $\text{Pb}^{2+}$  iyonunun etkisi



Şekil 4.70. Karadeniz alabalığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine  $\text{Co}^{2+}$  iyonunun etkisi



Şekil 4.71. Karadeniz alabalığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine  $\text{Ag}^+$  iyonunun etkisi



Şekil 4.72. Karadeniz alabalığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine  $\text{Cu}^{2+}$  iyonunun etkisi

**Çizelge 4.73.** Karadeniz alabalığı solungaç dokusundan saflaştırılan CA enzimi için 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan  $K_i$  değerleri ve inhibisyon tipleri

<b>İnhibitör Cinsi</b>	<b>[I] mM</b>	<b><math>K_i</math> (mM)</b>	<b>Ortalama <math>K_i</math> Değerleri (mM)</b>	<b>İnhibisyon Tipi</b>
<b>Fe<sup>2+</sup></b>	0,15	0,179	0,165	Yarışmalı
	0,20	0,177		
	0,25	0,139		
<b>Pb<sup>2+</sup></b>	1,00	2,328	1,733	Yarışmasız
	1,25	1,586		
	1,50	1,285		
<b>Co<sup>2+</sup></b>	2,00	6,400	3,676	Yarışmasız
	3,00	2,292		
	4,00	2,336		
<b>Ag<sup>+</sup></b>	100,00	55,598	41,167	Yarışmalı
	107,50	36,190		
	115,00	31,713		
<b>Cu<sup>2+</sup></b>	20,00	133,230	90,737	Yarı yarışmalı
	25,00	86,494		
	30,00	52,489		

**Çizelge 4.74.** Karadeniz alabalığı kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine  $Fe^{2+}$  iyonunun  $K_i$  değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tris-SO <sub>4</sub> Hacmi(μL)	Enzim Hacmi(μL)	Saf su Hacmi(μL)	Substrat Hacmi(μL)	[S] (mM)	[I] (mM)	Toplam Hacim(μL)
400	20	530	50	0,15	0,00	1000
400	20	510	50	0,15	0,20	1000
400	20	505	50	0,15	0,25	1000
400	20	500	50	0,15	0,30	1000
400	20	480	100	0,30	0,00	1000
400	20	460	100	0,30	0,20	1000
400	20	455	100	0,30	0,25	1000
400	20	450	100	0,30	0,30	1000
400	20	430	150	0,45	0,00	1000
400	20	410	150	0,45	0,20	1000
400	20	405	150	0,45	0,25	1000
400	20	400	150	0,45	0,30	1000
400	20	380	200	0,60	0,00	1000
400	20	360	200	0,60	0,20	1000
400	20	355	200	0,60	0,25	1000
400	20	350	200	0,60	0,30	1000
400	20	330	250	0,75	0,00	1000
400	20	310	250	0,75	0,20	1000
400	20	305	250	0,75	0,25	1000
400	20	300	250	0,75	0,30	1000

**Çizelge 4.75.** Karadeniz alabalığı kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine  $Pb^{2+}$  iyonunun  $K_i$  değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tris-SO <sub>4</sub> Hacmi(μL)	Enzim Hacmi(μL)	Saf su Hacmi(μL)	Substrat Hacmi(μL)	[S] (mM)	[I] (mM)	Toplam Hacim(μL)
400	10	540	50	0,15	0,00	1000
400	10	390	50	0,15	1,00	1000
400	10	365	50	0,15	1,25	1000
400	10	340	50	0,15	1,50	1000
400	10	490	100	0,30	0,00	1000
400	10	340	100	0,30	1,00	1000
400	10	315	100	0,30	1,25	1000
400	10	290	100	0,30	1,50	1000
400	10	440	150	0,45	0,00	1000
400	10	290	150	0,45	1,00	1000
400	10	265	150	0,45	1,25	1000
400	10	240	150	0,45	1,50	1000
400	10	390	200	0,60	0,00	1000
400	10	240	200	0,60	1,00	1000
400	10	215	200	0,60	1,25	1000
400	10	190	200	0,60	1,50	1000
400	10	340	250	0,75	0,00	1000
400	10	190	250	0,75	1,00	1000
400	10	165	250	0,75	1,25	1000
400	10	140	250	0,75	1,50	1000

**Çizelge 4.76.** Karadeniz alabalığı kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine  $\text{Co}^{2+}$  iyonunun  $K_i$  değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tris-SO <sub>4</sub> Hacmi(μL)	Enzim Hacmi(μL)	Saf su Hacmi(μL)	Substrat Hacmi(μL)	[S] (mM)	[I] (mM)	Toplam Hacim(μL)
400	10	540	50	0,15	0,00	1000
400	10	520	50	0,15	2,00	1000
400	10	515	50	0,15	2,50	1000
400	10	510	50	0,15	3,00	1000
400	10	490	100	0,30	0,00	1000
400	10	470	100	0,30	2,00	1000
400	10	465	100	0,30	2,50	1000
400	10	460	100	0,30	3,00	1000
400	10	440	150	0,45	0,00	1000
400	10	420	150	0,45	2,00	1000
400	10	415	150	0,45	2,50	1000
400	10	410	150	0,45	3,00	1000
400	10	390	200	0,60	0,00	1000
400	10	370	200	0,60	2,00	1000
400	10	365	200	0,60	2,50	1000
400	10	360	200	0,60	3,00	1000
400	10	340	250	0,75	0,00	1000
400	10	320	250	0,75	2,00	1000
400	10	315	250	0,75	2,50	1000
400	10	310	250	0,75	3,00	1000

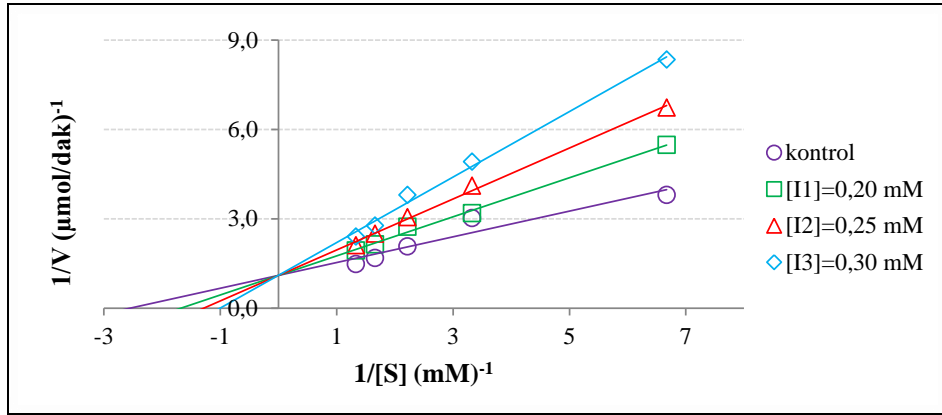
**Çizelge 4.77.** Karadeniz alabalığı kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine  $Ag^+$  iyonunun  $K_i$  değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tris-SO <sub>4</sub> Hacmi(μL)	Enzim Hacmi(μL)	Saf su Hacmi(μL)	Substrat Hacmi(μL)	[S] (mM)	[I] (mM)	Toplam Hacim(μL)
400	10	540	50	0,15	0,00	1000
400	10	520	50	0,15	2,50	1000
400	10	515	50	0,15	3,00	1000
400	10	510	50	0,15	5,00	1000
400	10	490	100	0,30	0,00	1000
400	10	470	100	0,30	2,50	1000
400	10	465	100	0,30	3,00	1000
400	10	460	100	0,30	5,00	1000
400	10	440	150	0,45	0,00	1000
400	10	420	150	0,45	2,50	1000
400	10	415	150	0,45	3,00	1000
400	10	410	150	0,45	5,00	1000
400	10	390	200	0,60	0,00	1000
400	10	370	200	0,60	2,50	1000
400	10	365	200	0,60	3,00	1000
400	10	360	200	0,60	5,00	1000
400	10	340	250	0,75	0,00	1000
400	10	320	250	0,75	2,50	1000
400	10	315	250	0,75	3,00	1000
400	10	310	250	0,75	5,00	1000

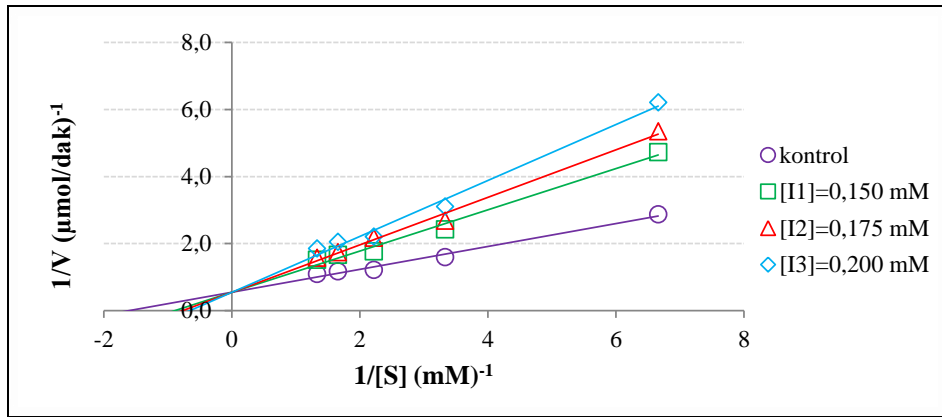


**Çizelge 4.78.** Karadeniz alabalığı kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine  $\text{Cu}^{2+}$  iyonunun  $K_i$  değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

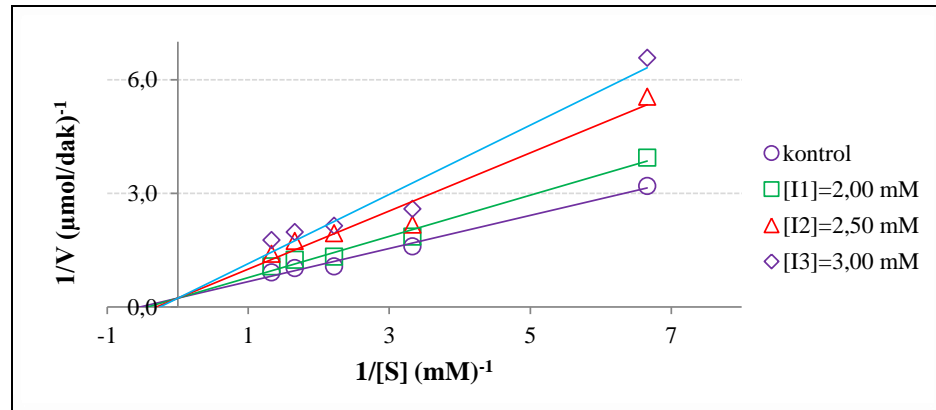
<b>Tris-SO<sub>4</sub> Hacmi(μL)</b>	<b>Enzim Hacmi(μL)</b>	<b>Saf su Hacmi(μL)</b>	<b>Substrat Hacmi(μL)</b>	<b>[S] (mM)</b>	<b>[I] (mM)</b>	<b>Toplam Hacim(μL)</b>
400	10	540	50	0,15	0,00	1000
400	10	520	50	0,15	20,0	1000
400	10	515	50	0,15	25,0	1000
400	10	510	50	0,15	30,0	1000
400	10	490	100	0,30	0,00	1000
400	10	470	100	0,30	20,0	1000
400	10	465	100	0,30	25,0	1000
400	10	460	100	0,30	30,0	1000
400	10	440	150	0,45	0,00	1000
400	10	420	150	0,45	20,0	1000
400	10	415	150	0,45	25,0	1000
400	10	410	150	0,45	30,0	1000
400	10	390	200	0,60	0,00	1000
400	10	370	200	0,60	20,0	1000
400	10	365	200	0,60	25,0	1000
400	10	360	200	0,60	30,0	1000
400	10	340	250	0,75	0,00	1000
400	10	320	250	0,75	20,0	1000
400	10	315	250	0,75	25,0	1000
400	10	310	250	0,75	30,0	1000



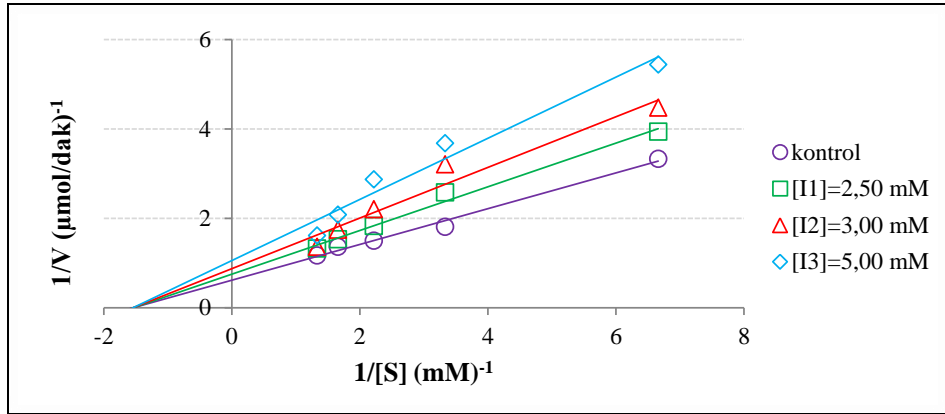
Şekil 4.73. Karadeniz alabalığı kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine  $\text{Fe}^{2+}$  iyonunun etkisi



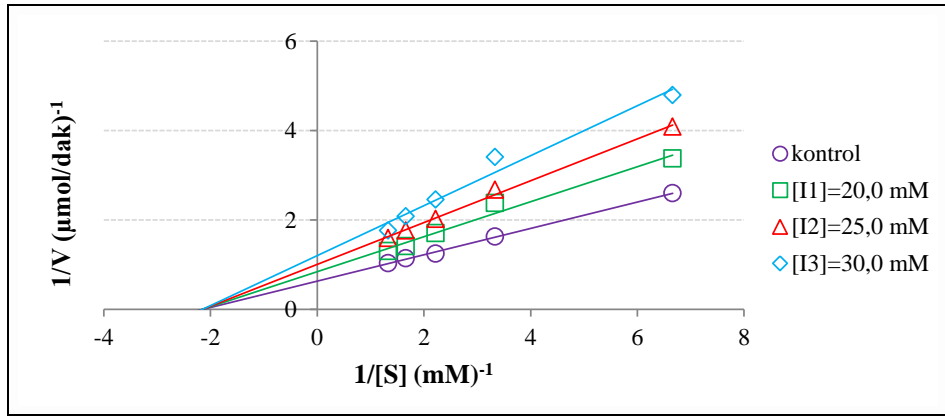
Şekil 4.74. Karadeniz alabalığı kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine  $\text{Pb}^{2+}$  iyonunun etkisi



Şekil 4.75. Karadeniz alabalığı kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine  $\text{Co}^{2+}$  iyonunun etkisi



Şekil 4.76. Karadeniz alabalığı kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine  $\text{Ag}^+$  iyonunun etkisi



Şekil 4.77. Karadeniz alabalığı kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine  $\text{Cu}^{2+}$  iyonunun etkisi

**Çizelge 4.79.** Karadeniz alabalığı kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi için 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan  $K_i$  değerleri ve inhibisyon tipleri

<b>İnhibitör Cinsi</b>	<b>[I] mM</b>	<b><math>K_i</math> (mM)</b>	<b>Ortalama <math>K_i</math> Değerleri (mM)</b>	<b>İnhibisyon Tipi</b>
<b>Fe<sup>2+</sup></b>	0,20	0,668	0,485	Yarışmalı
	0,25	0,443		
	0,30	0,343		
<b>Pb<sup>2+</sup></b>	0,150	0,188	0,163	Yarışmalı
	0,175	0,163		
	0,200	0,139		
<b>Co<sup>2+</sup></b>	2,00	8,165	4,738	Yarışmalı
	2,50	3,304		
	3,00	2,745		
<b>Ag<sup>+</sup></b>	2,50	11,276	8,505	Yarışmasız
	3,00	7,193		
	5,00	7,047		
<b>Cu<sup>2+</sup></b>	20,00	60,823	45,674	Yarışmasız
	25,00	42,658		
	30,00	33,541		

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Karbonik anhidraz (CA karbonik hidrolizaz E.C 4.2.1.1) enzimi asit-baz dengesi, solunum, karbondioksit ve iyon transferi, kemik erimesi, üreagenesis, glukoneogenez, lipogenez ve vücut sıvısının devamı için canlı organizmaların çeşitli dokularının önemli bir enzimidir (Balaydın *et al.* 2012). Çinko içeren bu enzim bikarbonat ve proton elde etmek için karbondioksidin hidratosyonunu tersinir olarak iki aşamalı reaksiyonla katalizler. Karbondioksit hemen hemen bütün dokulardan sentezlenir. Bu nedenle CA enzimi inhibisyonun canlı organizmalar için ciddi zararları vardır.

Çinko içeren karbonik anhidraz metabolizmanın hemen hemen her yerinde bulunan enzimidir. Memeli hücrelerin farklı dokularından toplam onaltı  $\alpha$ -CA izoenzim tespit edilmiştir (Supuran 2007). Karbonik anhidraz enzimi tükürük bezleri, kas, beyin, pankreas, prostat bezi, rahim ve endokrin dokuları gibi birçok dokuda vardır. Ayrıca CA enzimi balıkların solungaç ve salgı dokularında bulundu (Çoban *et al.* 2009). Bu enzim bitki ve hayvanlarda benzer moleküler özelliklere sahiptir (Kim 1983). Birçok dokuda CA enzimi yüksek spesifik aktiviteye sahiptir. Örneğin solungaç, kas, kalp ve deniz yengeçlerinin sindirim bezlerinde, erkek gonadlarda ve hipodermis bezlerinde yüksek spesifik aktiviteye sahiptir (Bottcher 1983; Vitale 1999). CA enziminin yaygın fizyolojik rolü  $\text{CO}_2$ 'nin hidratosyanunu tersinir olarak  $\text{HCO}_3^-$  ve  $\text{H}^+$  katalizler (Beydemir 2000; Esposite 2000).

Şu ana kadar bu önemli enzim üzerinde birçok çalışma yapılmıştır. Yüksek yapılı organizmalardan CA enziminin farklı izoenzimleri tespit edilmiştir (Bülbül 2003). CA enziminin tüm omurgasız canlıların mineralizasyonudaki rolü ve hızlı kabuk gelişimi için önemli olduğu tespit edilmiştir. Örneğin Yu ve arkadaşları biyomineralizasyon sürecindeki işlevini araştırmak için ince kabuklu istiridyeden yeni bir CA enzim izole edip karakterize etmişlerdir (Yu *et al.* 2006).

Buna ek olarak CA enzimi insan eritrositleri (Beydemir *et al.* 2002) dahil olmak üzere, balık solungaçlarından (Bone 1995), balık eritrositlerinden, sıçan tükürüğünden, sıçan eritrositlerinden (Feldstein 1984) ve böceklerden (Burt 1992) saflaştırılmış ve kinetik özellikleri incelenmiştir. Bunların yanı sıra CA enzimi kısmen bitki, maya ve bakterilerden de karakterize edildiği raporlara geçmiştir (Krungkrai 2001).

Bu çalışmada Karadeniz alabalığının böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokularından CA enzimi afinite kromatografisi yöntemiyle saflaştırılarak kinetik özellikleri incelendi. Ayrıca bazı ağır metallerin saflaştırılan CA enzimi üzerine inhibisyon etkileri *in vitro* olarak belirlenmeye çalışıldı.

Bunun için ilk olarak Rizede alabalık çiftliklerinden alınan alabalıklar uygun şartlarda muhafaza edilerek Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya laboratuvarına getirilerek böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokuları çıkartıldı. Daha sonra dokulardaki kan ve diğer kirlilikler %0,9'luk NaCl ile en az 3 kez yıkanarak giderildi. Sırasıyla her bir doku küçük parçalara ayrıldıktan sonra sıvı azot içerisinde dondurulup parçalanarak dokunun her gramı için 3 mL (pH:8,7) olan 25 mM Tris-HCl/0,1 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözeltisi içerisinde homojenize edildi. Bu karışım ultrasantrifüj cihazı ile santrifüjlenerek safsızlıklar uzaklaştırıldı. Kalan homojenattaki yağ dokusunu ayırmak için 2/7 oranında hekzanla tekrar santrifüj edildi. Bu işlem alabalığın diğer 3 dokusu içinde sırasıyla uygulandı. Elde edilen homojenatlar Sepharose 4B-L tirozin sülfanilamid afinite kromatografisinden geçirilerek saflaştırıldı.

Çok basamaklı saflaştırma işlemleri esnasında enzim aktivitesinde meydana gelen önemli kayıpları gidermek ve enzimi yüksek bir verimle elde etmek için kullanılan en önemli saflaştırma yöntemi afinite kromatografisidir. Karbonik anhidraz enziminin saflaştırılmasında kloroform-etanol ekstraksiyonu, Sephadex G-75 jel filtrasyon kromatografisi, CM Sephadex C-50 iyon değişim kromatografisi gibi afinite kromatografisi dışında farklı saflaştırma yöntemleri de kullanılmaktadır. Bunlar içerisinde, sülfanilamid takılı Sepharose-4B kolon materyali kullanılarak yapılan

saflaştırma yöntemi basit, kullanışlı, yüksek verime sahip, hızlı ve net sonuçlar vermesinden dolayı çok tercih edilmektedir (Bursal 2009).

Afinite kolonu CNBr ile aktifleştirildikten sonra Sepharose-4B matriksine L-tirozin ve sülfonilamid takılarak hazırlandı. Bu kolonda tirozin afinite jelinin uzantı kolunu oluştururken, sülfanilamid ise CA'nın kuvvetli bir inhibitörü olduğundan ligand olarak bağlanmıştır. Afinite kolonu pH:8,7 olan 25 mM Tris-HCl/0,1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tamponu ile dengelendi. Sırasıyla her bir doku homojenatı ayrı ayrı kolondan geçirildi ve saflaştırılmak istenen CA enziminin kolona tutunması ve diğer tüm kirliliklerin uzaklaştırılması yıkama tamponu kullanıldı. Yıkama işlemine 280 nm'de absorbans gözlenmeyinceye kadar devam edildi. Daha sonra kolondan pH:5,6 olan 0,1 M NaCH<sub>3</sub>COO/0,5 M NaClO<sub>4</sub> CA enzimi elüsyon tamponu geçirildi. Kolondan 1,5 ml'lik fraksiyonlar halinde elüsyonlar alındı. Alınan bütün elüatların 280 nm'de absorbanslarına bakıldı. Daha sonra hidrataz aktiviteleri ölçülerek en yüksek aktivite ve absorbans gösteren tüpler birleştirildi.

Karbonik anhidraz enzimi afinite kromotografisinden yararlanarak hazırlanan saflaştırma tablosuna göre Karadeniz alabalığının böbrek dokusundan 603,77 (EÜ/mg protein) spesifik aktivite ve %35,55 verimle 349,00 kat, karaciğer dokusundan 561,79 (EÜ/mg protein) spesifik aktivite ve %18,63 verimle 362,45 kat, solungaç dokusundan 1395,35 (EÜ/mg protein) spesifik aktivite ve %71,05 verimle 1116,28 kat ve kas dokusundan 297,03 (EÜ/mg protein) spesifik aktivite ve %75,00 verimle 471,47 kat saflaştırıldı. Karbonik anhidraz enzimi aynı yöntemle Sepharose-4B afinite kolonunun kullanılmasıyla gökkuşağı alabalığı solungaç dokusundan 104,8 kat (Hisar vd 2006), gökkuşağı alabalığı karaciğer dokusundan 2260 kat (Söyüt ve Beydemir 2008), mersin balığı eritrositlerinden 539 kat (Karahalil 2009), levrek balığı solungaç ve karaciğer dokusundan sırası ile 69,7 ve 73,4 kat (Erdem *et al.* 2011), Çipura balığı karaciğer, solungaç ve böbrek dokularından sırasıyla %9,1 verimle 354 kat, %32,84 verimle 84,1 kat ve %83,6 verimle 455 kat (Kaya ve Söyüt 2011), Van kedisi eritrositlerinden 367,2 kat (Söyler 2006), Kangal balığı (*Garra rufa*) solungaç, kas ve göz dokularından sırasıyla %15,44 verimle 240,9 kat, %17,98 verimle 203,3 kat ve %21,26 verimle 388,9

kat (Koçyiğit 2014), insan kanından 509,29 kat (Topal ve Gülçin 2014) saflaştırılmıştır. Yaptığımız çalışmalarda en yüksek saflaştırma katsayısı solungaç dokusunda belirlenirken en yüksek verim ise kas dokusundan elde edildi.

Karadeniz alabalığı böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokularından elde edilen homojenatlar ile Sepharose-4B afinite kromatografisinden saflaştırılan karbonik anhidraz enziminin protein miktarları Coomassie Brilliant Blue G-250 kullanarak Bradford yöntemiyle hesaplandı. Standart grafik elde edilerek kantitatif protein miktarları belirlendi. Bu yöntem daha kısa sürede sonuç vermesi, bozucu faktörlerinin olmaması, oluşan kompleksin uzun süre stabil kalması, hassasiyetinin diğer metodlara göre daha iyi olması (1-100 µg) sebebiyle tercih edilen yöntemdir (Bradford 1976).

Saflaştırılan karbonik anhidraz enziminin kalitatif protein tayininde Warburg yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde tirozin ve triptofan amino asitlerini içeren proteinlerin tayini için kolondan elüe edilen enzim çözeltilerinin 280 nm’de absorpsanlarına bakıldı (Segel 1975).

Enzim aktivitesinin tespiti için hidrataz ve esteraz yöntemleri kullandı. Hidrataz aktivitesi Rickli ve arkadaşlarını tarafından geliştirilen Wilbur yöntemidir. Bu yöntemde CO<sub>2</sub>’nin hidratasyonu sonucu açığa çıkan H<sup>+</sup> iyonlarının meydana getirdiği pH değişiminin brom timol mavisi indikatörü ile belirlenip renk değişimi için geçen sürenin ölçülmesi esasına dayanır. (Wilbur and Anderson 1948). Bu yöntemde göre CA enzimi aktivitesi için bir enzim ünitesi (EÜ) enzimsiz olarak meydana gelen CO<sub>2</sub>’in hidratasyon süresini yarıya indiren miktarı olarak tanımlanır. Enzimsiz gerçekleşen CO<sub>2</sub> hidratasyon süresi (t<sub>0</sub>) ile enzim kullanarak gerçekleşen reaksiyon süresi (t<sub>c</sub>) farkının t<sub>c</sub>’ye bölünmesiyle bulunur (Maren 1960). Diğer yaygın kullanılan yöntem esteraz aktivitesi yöntemidir. Substrat olarak kullanılan p-nitrofenilasetatın karbonik anhidraz enzimi katalizörlüğünde 348 nm’de absorpsiyon veren p-nitrofenol veya p-nitrofenolat hidrolizi esasına dayanır. Bu ürünlerin her ikisinde 348 nm’de aynı absorpsansı gösterdiğinden fenolün yapısındaki H<sup>+</sup> iyonunun ayrışmaması ölçümü etkilememektedir (Armstrong *et al.* 1966; Verpoorte and Mehta 1967).



Afinite kolunundan saflaştılan CA enziminin saflığını kontrol etmek için sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) yapıldı. Karadeniz alabalığı böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokularından elde edilen enzimlerin jelde tek bant olarak gözlenmesi saf olduklarını kanıtlamış oldu.

Karadeniz alabalığı böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokularından saflaştırılan enzimler ile molekül kütlesi bilinen standart proteinler SDS-PAGE’de aynı anda yürütüldü. Elde edilen değerlerle log  $M_A$ -Rf standart grafiği çizildi. Enzimlerin Rf değerleri ile grafikten yararlanarak standart grafikten saflaştırılan karbonik anhidraz enzimlerinin molekül kütleleri böbrek dokusu için 29,71 kDa, karaciğer dokusu için 29,50 kDa, solungaç dokusu için 32,00 kDa ve kas dokusu için 28,80 kDa olarak hesaplandı. Balıklardan saflaştırılan CA enzimi için yapılan daha önceki çalışmalarda SDS-PAGE ile hesaplanan molekül kütlesi; Pisi balığı solungaç dokusundan 29 kDa (Sender *et al.* 1999), Zebrafish (*Danio rerio*) balığı eritrositlerinden 29 kDa (Peterson *et al.* 1997), European flounder (*Platichthys flesus*) eritrositlerinden 30 kDa (Peters *et al.* 2000), Antartika İcefış (*Chinodraco hamatus*) balığının solungaç dokusundan 28 kDa (Rizello *et al.* 2007), Gökkuşağı alabalığı karaciğerinden 29,4 kDa (Söyüt ve Beydemir 2008), Mersin balığı eritrositlerinden 29 kDa (Karahalil 2009), ipura balığının (*Sparus aurata*) solungaç dokusundan 30,5 kDa, Kangal balığı (*Garra rufa*) göz dokusundan 31,72 kDa olarak hesaplandığı literatüre geçmiştir.

Karadeniz alabalığı dokularından saflaştırılan karbonik anhidraz enziminin optimum pH' sı 1 M Tris-SO<sub>4</sub> ve 1 M potasyum sülfat tampon zelteleri kullanılarak esteraz aktivitesi yöntemine göre belirlendi. Karadeniz alabalığı böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokularından saflaştırılan CA enzimlerini hepsi için optimum pH, 1 M Tris-SO<sub>4</sub> tamponu pH:9,0 olarak belirlendi. CA enzimi kullanılarak yapılan çalışmalarda optimum pH genellikle pH:7,5 ile pH:9,5 aralığında olduğu belirlenmiştir. Hisar vd (2006) gökkuşağı alabalığı dokularından, Mersin balığı eritrositlerinden (Karahalil 2009) ve Kangal balığı solungaç, kas ve göz dokularından (Koyığit 2014) saflaştırılan CA enziminin optimum pH’sını 9,0 olarak belirlenirken, ipura balığı karaciğer ve

böbrek dokularından saflaştırılan CA enziminin optimum pH'sı 7,5 olarak tespit edilirken solungaç doku için ise optimum pH:8,0 olarak belirlenmiştir (Kaya 2011).

Karadeniz alabalığı dokularından saflaştırılan karbonik anhidraz enziminin optimum iyonik şiddetin tespiti için Tris-SO<sub>4</sub> tamponun 0,1 M ile 1,25 M aralığında farklı derişimlerde çözeltiler kullanıldı. Bütün dokulardan saflaştırılan CA enziminin optimum iyonik şiddeti 1 M Tris-SO<sub>4</sub> tamponu olarak belirlendi.

Karadeniz alabalığı dokularından saflaştırılan karbonik anhidraz enziminin stabil pH'sının belirlemesi için pH:7,0-9,0 aralığında 1 M Tris-SO<sub>4</sub> tamponu ile pH:5,0-8,0 aralığında 1 M potasyum sülfat tamponu kullanıldı. Esteraz aktivitesi metoduna göre 24 saat zaman aralığında 5 gün boyunca yapılan ölçümlerde CA enziminin stabil pH'sı bütün dokular için 1 M Tris-SO<sub>4</sub> tamponunda pH:8,5 olarak tespit edilirken 1 M potasyum sülfat tamponunda böbrek ve kas dokular için stabil pH:7,5 olarak tespit edilirken karaciğer ve solungaç dokuları için ise stabil pH:8,0 olarak tespit edildi. Gökkuşığı alabalığı eritrositlerinde CA enziminin stabil pH'sı Tris-SO<sub>4</sub> tamponu pH:8,5 olarak (Hisar 2002), Aynı alabalığın göz lensi CA enziminin stabil pH'sı Tris-SO<sub>4</sub> tamponu pH:7,2 olarak Beydemir vd (2006) tarafından tespit edildi. Söğüt (2009) tarafından gökkuşığı alabalığının böbrek, kas ve beyin dokularından saflaştırılan CA enziminin stabil pH'sı 8,5 olarak belirlenmiştir. Ayrıca Kaya (2011) tarafından Çipura balığı böbrek ve solungaç dokularından saflaştırılan CA enziminin stabil pH'sı Tris-SO<sub>4</sub> tamponu pH:8,0 olarak belirlenirken aynı balığın solungaç dokusu için ise stabil pH'sı Tris-SO<sub>4</sub> tamponu pH:8,5 olarak tespit edilmiştir. Son olarak Kangal balığı solungaç, kas ve göz dokularından (Koçyiğit 2014) saflaştırılan CA enzimi için stabil pH bütün dokular için pH:8,5 olarak belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda genellikle CA enzimi için stabil pH bizimde tespit ettiğimiz gibi 8,5 olarak belirlenmiştir.

Enzimlerin daha yüksek aktivite gösterdiği optimum pH, optimum iyonik şiddet değerleri ile birlikte optimum sıcaklık değerleri de vardır. Bu sıcaklığın altındaki ve üstündeki değerlerde enzim aktivitesi düşer. Karadeniz alabalığı dokularından saflaştırılan karbonik anhidraz enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesi için dijital

su banyosunda 0°C'den başlayarak 10°C'lik artışla 80°C'ye kadar enzimin esteraz aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçülerek belirlendi. Böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokularının CA enzimi için optimum sıcaklık 40°C olarak tespit edildi. Karbonik anhidraz enziminin optimum sıcaklığı birçok canlı organizmanın farklı dokularında aynı değer ölçülmemiştir. Mercan balığının solungaç dokusundan saflaştırılan CA enzimi için optimum sıcaklığı 35°C iken, Karahalil (2009) tarafından Mersin balığı eritrositlerinden saflaştırılan CA enzimi için optimum sıcaklığı 30°C olarak, Söğüt (2006) gökkuşuğu alabalığı böbrek, kas ve beyin dokularından saflaştırdığı CA enziminin optimum sıcaklığını 40°C olarak, Kaya (2011) tarafından Çipura balığının karaciğer, böbrek ve solungaç dokularından saflaştırılan CA enziminin optimum sıcaklığı 50°C olarak tespit edilmiştir. Kangal balığı solungaç, kas ve göz dokularından (Koçyiğit 2014) dokularından saflaştırılan CA enziminin optimum sıcaklığı 35°C olarak tespit edilmiştir.

Bulunduğu sıcaklıkta reaksiyonun başlayabilmesi için gerekli olan minimum enerji miktarına aktivasyon enerjisi ( $E_a$ ) denir. Enzimler katalizledikleri reaksiyonun aktivasyon enerjisini düşürerek daha kısa sürede gerçekleştirmelerini sağlar. Sıcaklığın artması aktivasyon enerjisini aşan tanecik sayısını arttırarak daha fazla kompleks oluşumunu sağlayarak reaksiyonu hızlandırır (Keha ve Küfrevioğlu 2009). Deneysel olarak kullanılan p-nitrofenilasetat ile yapılan farklı sıcaklık çalışmalarında elde edilen aktivite değerlerinin logaritmaları alınarak mutlak sıcaklıklarına göre  $\log k - 1/T \times 1000^\circ K^{-1}$  grafiği çizildi. Bu işlem her bir doku için ayrı ayrı yapıldı. Grafikte oluşan Arrheniüs eğrisi kullanılarak her bir dokunun aktivasyon enerjisi ( $E_a$ ), aktivasyon entalpisi ( $\Delta H$ ) ve  $Q_{10}$  değerleri hesaplandı. Karadeniz alabalığı böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokularından saflaştırılarak CA enzimi için  $E_a$  değerleri sırasıyla 2,356 kcal/mol, 1,009 kcal/mol, 0,517 kcal/mol ve 1,152 kcal/mol olarak hesaplandı. Daha önce yapılan çalışmalarda (Söyüt 2006), gökkuşuğu alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokuları CA enzimi için  $E_a$  değerlerini sırasıyla 2,88 kcal/mol, 8,05 kcal/mol, 6,36 kcal/mol ve 5,32 kcal/mol olarak tespit edilmiştir. Kaya (2011) çipura balığı karaciğer, solungaç ve böbrek dokularından saflaştırdığı CA enzimi için  $E_a$  değerlerini sırasıyla 1,665 kcal/mol, 1,540 kcal/mol ve 1,290 kcal/mol olarak belirlemiştir. Ayrıca

Kangal balığı solungaç, kas ve göz dokularından (Koçyiğit 2014) saflaştırılan CA enziminin  $E_a$  değerleri sırasıyla 4,97 kcal/mol, 7,32 kcal/mol ve 5,91 kcal/mol olarak hesaplanmıştır. Elde ettiğimiz  $E_a$  değeri solungaç dokusu için en az, böbrek dokusu için en fazladır. Bu değerler enzimin reaksiyon hızının solungaç dokuda daha yüksek olduğunu gösterir. Literatürde bulunan değerler çalışmamızda tespit ettiğimiz değerlerden daha yüksektir.

Karadeniz alabalığının böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokuları CA enzimi için  $\Delta H$  değerleri  $\Delta H = E_a - RT$  formülünden yararlanarak sırasıyla 1,730 kcal/mol, 0,387 kcal/mol, 0,105 kcal/mol ve 0,530 kcal/mol olarak hesaplanmıştır. Kaya (2011) tarafından çipura balığı karaciğer, solungaç ve böbrek dokularından saflaştırdığı CA enzimleri  $\Delta H$  değerleri ise sırasıyla 1,023 kcal/mol, 0,89 kcal/mol ve 0,648 kcal/mol olarak bulunmuştur. Koçyiğit (2014) tarafından Kangal balığı solungaç, kas ve göz dokularından dokularından saflaştırılan CA enziminin  $\Delta H$  değerlerini sırasıyla 4,36 kcal/mol, 6,70 kcal/mol ve 5,29 kcal/mol olarak belirlenmiştir.

Bir enzim için 10°C'lik sıcaklık değişiminin oluşturduğu aktivite farkı  $Q_{10}$  değeriyle ifade edilir. Bu değer aralarında 10°C'lik fark bulunan aktivite değerlerinden büyük olanın küçük olanına bölümüyle bulunur. Karadeniz alabalığının böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokuları CA enzimi için  $Q_{10}$  değerleri sırasıyla 1.83, 1.22, 1.15 ve 1.13 olarak hesaplandı.

Karbonik anhidraz enziminin hidrataz aktivitesi için substrat olarak CO<sub>2</sub> kullanılırken esteraz aktivitesinde p-nitrofenilasetat kullanıldı. Deneylerimizde Karadeniz alabalığı dokularından saflaştırılan CA enziminin  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin tespiti için esteraz yöntemi uygulandı. Bu amaçla 5 farklı p-nitrofenilasetat konsantrasyonu kullanılarak spektrofotometrik olarak 348 nm'deki enzim aktiviteleri belirlendi. Her bir doku için substrat konsantrasyonuna karşı aktivite değerleri Lineveawer-Burk grafiği çizilerek  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin hesaplandı. Karadeniz alabalığı böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokularından saflaştırılan CA enzimlerinin  $V_{max}$  değerleri sırasıyla 0,547 EÜ/mL, 0,804 EÜ/mL, 0,706 EÜ/mL ve 0,741 EÜ/mL olarak hesaplandı. Enzimin  $K_M$  değerleri ise

böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokuları için sırasıyla 0,434 mM, 0,746 mM, 0,568 mM ve 0,492 mM olarak hesaplandı. Elde edilen sonuçlara göre böbrek ve kas dokulardan saflaştırılan CA enziminin  $K_M$  değeri daha düşüktür. Öyleyse böbrek ve kas dokulardan saflaştırılan CA enziminin substrat olarak kullanılan p-nitrofenilasetata karşı ilgileri diğer dokulardan daha fazladır. Literatürde alabalık dokuları için hesaplanan  $K_M$  değerlerin genellikle düşük olduğu görülmektedir. Hisar (2002) tarafından gökkuşuğu alabalığı eritrositlerinden saflaştırılan CA enzimi için  $K_M$  değeri 2,47 mM olarak hesaplanmıştır. Yine gökkuşuğu alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokuları CA enzimi  $K_M$  değerleri sırasıyla 0,66 mM, 0,40 mM, 1,29 mM ve 0,92 mM olarak Söyüt (2006) tarafından belirlenmiştir. Kaya (2011) tarafından Çipura balığı karaciğer, solungaç ve böbrek dokularından saflaştırılan CA enziminin  $K_M$  değerleri sırasıyla 0,497 mM, 0,972 mM ve 0,401 mM olarak tespit edilmiştir. Koçyigit (2014) tarafından Kangal balığı solungaç, kas ve göz dokularından dokularından saflaştırılan CA enziminin  $K_M$  değerleri 0,85 mM, 1,10 mM ve 1,29 mM olarak belirlenmiştir. Mersin balığının eritrositlerinden saflaştırılan CA enziminin  $K_M$  değeri ise 4,0 mM olarak daha yüksek bulunmuştur (Karahalil 2009). İnsan eritrositlerinden saflaştırılan hCA I ve hCA II izoenzimlerinin  $K_M$  değeri ise sırasıyla 5,0 mM ve 4,3 mM hesaplanmıştır (Çiftçi 1992). Bu değerler balıklar için hesaplanan değerlerden daha yüksektir.

Lineveawer-Burk grafiğinden elde edilen  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerleri kullanılarak enzimin turnover sayısını ifade eden  $k_{cat}$  değerleri hesaplandı. Deneylelerimizde Karadeniz alabalığı böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokularından saflaştırılan CA enziminin  $k_{cat}$  değerleri sırasıyla  $688,05 s^{-1}$ ,  $1505,62 s^{-1}$ ,  $1824,29 s^{-1}$  ve  $1222,78 s^{-1}$  olarak hesaplandı. Bu sonuçlara göre solungaç dokudan saflaştırılan CA enziminin turnover sayısı diğer dokulara göre daha yüksek olarak belirlenmiştir. Hesaplanan turnover sayıları büyükten küçüğe doğru sıralandığında solungaç > karaciğer > kas > böbrek olarak sıralanır. Gökkuşuğu alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokuları CA enzimi  $k_{cat}$  değerleri sırasıyla 32,8, 15,2, 28,8 ve 43,6  $s^{-1}$  olarak hesaplanmıştır (Söyüt 2006). İnsan eritrositlerinden saflaştırılan hCA I ve II izoenzimleri için  $1,9 \times 10^4 s^{-1}$  ve  $2,6 \times 10^4 s^{-1}$  olarak tespit edilmiştir (Matthieu *et al.* 1999). Koçyigit (2014) tarafından kangal balığı (*Garra rufa*) solungaç, kas ve dokularından saflaştırılan CA enziminin  $k_{cat}$  değerleri

sırasıyla 114.85, 19.21 ve 66.88 s<sup>-1</sup> olarak hesaplandı. Çalışmamızda elde edilen turnover sayıları daha önce yapılan benzer çalışmalarla karşılaştırıldığında balık dokularından yüksek ancak insan eritrositlerine göre düşüktür. Bu da enzimin bir dakikada ürüne dönüştürdüğü substrat sayısının daha çok olduğu göstermektedir.

Birçok enzimin katalitik etkilerinin veya farklı substratların aynı enzimle ürüne dönüşümünün karşılaştırılmasının bir yolu da tepkimeler için özgülük sabitinin belirlenmesidir. Özgülük sabiti  $V_0 = k_{cat}/K_M$  formülü ile hesaplandı. Karadeniz alabalığı böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokularından saflaştırılan CA enziminin  $V_0$  değerleri sırasıyla  $1,585 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ,  $2,018 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ,  $3,211 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  ve  $2,485 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  olarak hesaplandı. Gökkuşuğu alabalığı karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokuları CA enzimi  $V_0$  değerleri sırasıyla  $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ,  $4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ,  $2,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  ve  $4,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  olarak hesaplanmıştır (Söyüt 2006). Kangal balığı solungaç, kas ve göz dokularından saflaştırılan CA enziminin özgülük sabitleri sırasıyla  $1,35 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ,  $1,4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , ve  $5,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  olarak tespit edilmiş (Koçyiğit 2014). Literatürde hesaplanan en yüksek değerler  $10^{-8}$ - $10^{-9} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  kayıtlara geçmiştir. Mesala asetilkolinesteraz enziminin özgülük sabiti ( $V_0$ )  $1,6 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , katalaz enziminin  $4 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ,  $\beta$ -laktamaz enziminin  $2,4 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  olarak belirlenmiştir. Elde edilen değerlerin farklı olması kullanılan substratların aynı olmamasından kaynaklanabilir.

Ağır metaller doğada bileşikleri halinde bulunur. Bizler bu metal iyonlarını yediğimiz gıdalarla ve içme suları vücudumuza alırız. Bu metallerden bazıları ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$  ve  $\text{Cu}^{2+}$ ) düşük miktarları vücudumuzda metabolizmanın devamı için gerekli iken yüksek konsantrasyonları toksik etki yapabilir. Denizlere ve nehirlere karışan atıklarda ağır metaller balıklarda biyobirikime neden olur. Karadeniz bölgesinde yaşayan insanların balık tüketimi diğer insanlara oranla fazla olduğundan vücutlarında ağır metal birikimi daha fazla olması beklenir.

Deneylelerimizde ağır metal inhibisyonunu incelemek için  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$  ve  $\text{Cu}^{2+}$  metal iyonları seçildi. Karadeniz alabalığı böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokularından saflaştırılan CA enzimlerinin aktivitelerini yarıya indiren ağır metal

konsanrasyonları ( $IC_{50}$ ) değerleri esteraz aktivitesi yöntemi kullanılarak belirlendi. Bu metal iyonlarının her bir doku için  $IC_{50}$  değerleri kendi aralarında küçükten büyüğe doğru karşılaştırıldığında böbrek dokusunda  $IC_{50}$  değeri  $Pb^{2+} < Fe^{2+} < Co^{2+} < Cu^{2+} < Ag^+$  olarak belirlenmiştir. Buna göre böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine en fazla  $[Pb^{2+}]=0,13$  mM ile inhibisyon etkisi olmuştur. Karaciğer dokusu için  $IC_{50}$  değerleri küçükten büyüğe doğru  $Fe^{2+} < Pb^{2+} < Co^{2+} < Ag^+ < Cu^{2+}$  olarak sıralandığı tespit edilmiştir. Bu değerlere göre karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine en fazla  $[Fe^{2+}]=0,23$  mM inhibisyonu görölmüştür. Solungaç dokusu için  $IC_{50}$  değerleri küçükten büyüğe doğru  $Fe^{2+} < Pb^{2+} < Co^{2+} < Cu^{2+} < Ag^+$  olarak sıralandığı belirlenmiştir. Bu değerlere göre solungaç dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine en fazla  $[Fe^{2+}]=0,25$  mM inhibisyon etkisi görölmüştür. Son olarak kas dokusu için  $IC_{50}$  değerleri küçükten büyüğe doğru  $Pb^{2+} < Fe^{2+} < Co^{2+} < Ag^+ < Cu^{2+}$  olarak sıralandığı tespit edilmiştir. Bu değerlere göre kas dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine en fazla  $[Pb^{2+}]=0,15$  mM ile inhibisyonu tespit edilmiştir. Ayrıca bu metal iyonları dışında  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  ve  $Mn^{2+}$  iyonlarının da karbonik anhidraz enzimi aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi incelendi. Bu iyonların enzim aktivitesini inhibe etmediği aksine aktive ettiği göröldü.

Karbonik anhidraz enzimi üzerine yapılan benzer inhibisyon çalışmalarında Mersin balığı eritrositlerden saflaştırılan CA enziminin  $IC_{50}$  değerleri  $[Cu^{2+}]=5,2$  mM ve  $[Ag^+]=1,7$  mM olarak Karahalil (2009) tarafından tespit edilmiştir. Kaya (2011) tarafından Çipura balığı dokularından saflaştırılan CA enziminin  $IC_{50}$  değerleri karaciğer doku için  $[Cu^{2+}]=0,0121$  mM, solungaç doku için  $[Cu^{2+}]=0,0138$  mM ve böbrek doku için  $[Ag^+]=0,054$  mM olarak belirlenmiştir. Ayrıca Kangal balığı dokularından saflaştırılan CA enziminin  $IC_{50}$  değerleri solungaç doku için  $[Pb^{2+}]=0,35$  mM, kas doku için  $[Pb^{2+}]=0,33$  mM ve göz doku için  $[Pb^{2+}]=0,91$  mM belirlenmiştir (Koçyiğit 2014).

Karadeniz alabalığı dokularından saflaştırılan karbonik anhidraz enzimini inhibe eden  $Fe^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ag^+$  ve  $Cu^{2+}$  metal iyonları için  $K_i$  sabitlerinin tespit edilmesi için Lineweaver-Burk grafikleri kullanıldı (Telefoncu 1986). Deneylerde beş farklı

konsantrasyondaki substrat çözeltilerine karşılık üç farklı inhibitör konsantrasyonu kullanılarak  $1/V$  ile  $1/S$  değerleri hesaplanıp her bir doku ve her bir metal inhibitörü için ayrı ayrı grafikler çizilerek  $K_i$  değerleri ile inhibisyon çeşidi tespit edildi. Grafik çizimleri ve  $K_i$  değerlerinin hesaplanmasında Microsoft-Excel programı faydalanmıştır.

Inhibitörün  $K_i$  değeri ne kadar küçük ise enzime olan ilgisi o kadar büyük olur ve enzimin katalitik aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi de o kadar fazla olur. Karadeniz alabalığı dokularından saflaştırılan CA enzimi ortalama  $K_i$  değerleri böbrek dokusu için küçükten büyüğe doğru  $Pb^{2+} < Fe^{2+} < Co^{2+} < Cu^{2+} < Ag^+$  olarak sıralandı. Böbrek dokusu için inhibisyon türü  $Fe^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  ve  $Cu^{2+}$  iyonlarında yarışmalı  $Pb^{2+}$  ve  $Ag^+$  iyonlarında ise yarışmasız olarak belirlendi. Karaciğer dokusu için ortalama  $K_i$  değerleri küçükten büyüğe doğru  $Pb^{2+} < Fe^{2+} < Ag^+ < Co^{2+} < Cu^{2+}$  olarak sıralandı. Karaciğer dokusu için inhibisyon türü  $Fe^{2+}$  ve  $Ag^+$  iyonlarında yarışmalı  $Pb^{2+}$  ve  $Co^{2+}$  iyonlarında yarışmasız iken  $Cu^{2+}$  iyonunda ise yarıyarışmalı olarak belirlendi. Solungaç dokusu için ortalama  $K_i$  değerleri küçükten büyüğe doğru  $Fe^{2+} < Pb^{2+} < Co^{2+} < Ag^+ < Cu^{2+}$  olarak sıralandı. Solungaç dokusu için inhibisyon türü  $Fe^{2+}$  ve  $Ag^+$  iyonlarında yarışmalı  $Pb^{2+}$  ve  $Co^{2+}$  iyonlarında yarışmasız iken  $Cu^{2+}$  iyonunda ise yarıyarışmalı olarak belirlendi. Kas dokusu dokusu için ortalama  $K_i$  değerleri küçükten büyüğe doğru  $Pb^{2+} < Fe^{2+} < Co^{2+} < Ag^+ < Cu^{2+}$  olarak sıralandı. Kas dokusu için inhibisyon türü  $Fe^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  ve  $Co^{2+}$  iyonlarında yarışmalı  $Cu^{2+}$  ve  $Ag^+$  iyonlarında ise yarışmasız olarak belirlendi. Elde ettiğimiz bu değerlere göre böbrek ve kas dokuları için en yüksek inhibisyon oluşturan  $Pb^{2+}$  iyonunun böbrek dokusunda 0,185 mM ile yarışmasız inhibisyon oluştururken, kas dokusunda 0,163 mM ile yarışmalı inhibisyona neden olduğu tespit edilmiştir. Karaciğer ve solungaç dokuları için en yüksek inhibisyon oluşturan  $Fe^{2+}$  iyonunun karaciğer dokusunda 0,185 mM ve solungaç dokusunda 0,163 mM ile her iki doku içinde yarışmalı inhibisyona neden olduğu tespit edilmiştir.

Yapılan benzer çalışmalarda Hisar (2006) tarafından gökkuşağı alabalığında CA enzimin en bilinen inhibitörü olan sülfanilamid için  $K_i$  değerinin 3.94 mM olduğu ve yarışmasız inhibitör olduğu belirlenmiştir. Pisi balığı (*Platichthys flesus*) eritrosit ve solungaç dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine asetozolamid (ACTZ) ile yapılan



inhibisyon denemelerinde eritrosit CA enzimi için  $K_i$  değeri  $8,4 \cdot 10^{-9}$  M ve solungaç dokusu için  $7,6 \cdot 10^{-9}$  M olduğu, potasyum iyodür (KI) ile yapılan inhibisyon denemelerinde solungaç CA enzimi için  $K_i$  değerinin  $7,1 \cdot 10^{-3}$  M ve eritrosit CA enzimi için  $K_i$  değerinin  $4,4 \cdot 10^{-3}$  M olduğu gösterilmiştir (Sender *et al.* 1999). Söyüt (2006), yapmış olduğu çalışmada gökkuşuğu alabalığı karaciğer dokusunda en yüksek inhibisyonun gözlemlendiği  $Cd^{2+}$  metal iyonu için  $K_i$  değerinin 0,0056 mM olduğunu ve inhibisyon tipinin yarı yarışmalı olduğunu tespit etmiştir. Kaya (2011) tarafından Çipura balığı dokularından saflaştırılan CA enzime en yüksek inhibisyon oluşturan  $Ag^+$  metalinin yarışmasız inhibisyona neden olduğu ve  $K_i$  değerlerinin karaciğer dokusu için 0,025 mM, solungaç dokusu için 0,0082 mM ve böbrek dokusu için 0,178 mM olduğu tespit edilmiştir. Koçyiğit (2014) tarafından Kangal balığı solungaç, kas ve göz dokularından saflaştırılan CA enzime en yüksek inhibisyonu  $Pb^{2+}$  metal iyonlarının gerçekleştirdiğini ve her üç dokuda da yarışmalı inhibisyona neden olduğu ve  $K_i$  değerlerinin solungaç dokusu için 0,41 mM, kas dokusu için 0,25 mM ve göz dokusu için 1,60 mM olarak tespit edilmiştir.

Literatürde farklı kaynaklardan yapılan araştırmalara göre karbonik anhidraz (CA) enzimi ile ilgili birçok çalışmaya rastlanmıştır. Fakat Karadeniz alabalığı böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokularından saflaştırılan CA enziminin karakterizasyonu ve aktivitesi üzerine ağır metallerin inhibisyon etkilerinin incelenmesi konusunda herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Karadeniz alabalığı böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokularından saflaştırılan CA enzimi için elde edilen toplu sonuçlar Çizelge 5.1-5.4 verilmiştir.

**Çizelge 5.1.** Karadeniz alabalığı böbrek dokusu CA enzimi için elde edilen sonuçlar

<b>CA Enzimini İçin Kinetik Çalışma Sonuçları</b>		
Optimum pH	9,0 ( 1 M Tris-SO <sub>4</sub> )	
Optimum İyonik Şiddet	1 M Tris-SO <sub>4</sub>	
Stabil pH	8,5 ( 1 M Tris-SO <sub>4</sub> )	
Optimum Sıcaklık (°C)	40 °C	
Aktivasyon Enerjisi (Ea) (kcal/mol)	2,356	
Aktivasyon Entalpisi (Ea) (kcal/mol)	1,730	
Q <sub>10</sub>	1,83	
K <sub>M</sub> (p-nitrofenilasetat) (mM)	0,434	
V <sub>max</sub> (p-nitrofenilasetat) (EÜ/ml)	0,547	
k <sub>cat</sub> (p-nitrofenilasetat) (s <sup>-1</sup> )	688,05	
V <sub>0</sub> (p-nitrofenilasetat) (mM× s <sup>-1</sup> )	1,585 × 10 <sup>6</sup>	
<b>Molekül Kütlesi Tayini (kDa)</b>		
SDS-PAGE metodu ile	29,71	
<b>Ağır Metal etkisi</b>	<b>IC<sub>50</sub> (mM)</b>	
Fe <sup>2+</sup>	0,78	
Pb <sup>2+</sup>	0,13	
Co <sup>2+</sup>	2,07	
Ag <sup>+</sup>	76,67	
Cu <sup>2+</sup>	19,17	
<b>Ağır Metal Türü</b>	<b>Ortalama K<sub>i</sub> (mM)</b>	<b>İnhibisyon Tipi</b>
FeCl <sub>2</sub>	1,117	Yarışmalı
Pb(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub>	0,185	Yarışmasız
CoCl <sub>2</sub>	2,038	Yarışmalı
AgNO <sub>3</sub>	74,795	Yarışmasız
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	21,427	Yarışmalı

**Çizelge 5.2.** Karadeniz alabalığı karaciğer dokusu CA enzimi için elde edilen sonuçlar

<b>CA Enzimini İçin Kinetik Çalışma Sonuçları</b>		
Optimum pH	9,0 ( 1 M Tris-SO <sub>4</sub> )	
Optimum İyonik Şiddet	1 M Tris-SO <sub>4</sub>	
Stabil pH	8,5 ( 1 M Tris-SO <sub>4</sub> )	
Optimum Sıcaklık (°C)	40 °C	
Aktivasyon Enerjisi (Ea) (kcal/mol)	1,009	
Aktivasyon Entalpisi (Ea) (kcal/mol)	0,387	
Q <sub>10</sub>	1,22	
K <sub>M</sub> (p-nitrofenilasetat) (mM)	0,746	
V <sub>max</sub> (p-nitrofenilasetat) (EÜ/ml)	0,804	
k <sub>cat</sub> (p-nitrofenilasetat) (s <sup>-1</sup> )	1505,62	
V <sub>0</sub> (p-nitrofenilasetat) (mM× s <sup>-1</sup> )	2,018 × 10 <sup>6</sup>	
<b>Molekül Kütlesi Tayini (kDa)</b>	29,50	
SDS-PAGE metodu ile		
<b>Ağır Metal Etkisi</b>	<b>IC<sub>50</sub> (mM)</b>	
Fe <sup>2+</sup>	0,23	
Pb <sup>2+</sup>	0,41	
Co <sup>2+</sup>	2,19	
Ag <sup>+</sup>	10,95	
Cu <sup>2+</sup>	24,64	
<b>Ağır Metal Türü</b>	<b>Ortalama K<sub>i</sub> (mM)</b>	<b>İnhibisyon Tipi</b>
FeCl <sub>2</sub>	0,162	Yarışmalı
Pb(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub>	0,165	Yarışmasız
CoCl <sub>2</sub>	5,302	Yarışmasız
AgNO <sub>3</sub>	4,727	Yarışmalı
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	64,378	Yarıyarışmalı

**Çizelge 5.3.** Karadeniz alabalığı solungaç dokusu CA enzimi için elde edilen sonuçlar

<b>CA Enzimini İçin Kinetik Çalışma Sonuçları</b>		
Optimum pH	9,0 ( 1 M Tris-SO <sub>4</sub> )	
Optimum İyonik Şiddet	1 M Tris-SO <sub>4</sub>	
Stabil pH	8,5 ( 1 M Tris-SO <sub>4</sub> )	
Optimum Sıcaklık (°C)	40 °C	
Aktivasyon Enerjisi (Ea) (kcal/mol)	0,517	
Aktivasyon Entalpisi (Ea) (kcal/mol)	0,105	
Q <sub>10</sub>	1,15	
K <sub>M</sub> (p-nitrofenilasetat) (mM)	0,568	
V <sub>max</sub> (p-nitrofenilasetat) (EÜ/ml)	0,706	
k <sub>cat</sub> (p-nitrofenilasetat) (s <sup>-1</sup> )	1824,29	
V <sub>0</sub> (p-nitrofenilasetat) (mM× s <sup>-1</sup> )	3,211 × 10 <sup>6</sup>	
<b>Molekül Kütlesi Tayini (kDa)</b>		
SDS-PAGE metodu ile	32,00	
<b>Ağır Metal Etkisi</b>	<b>IC<sub>50</sub> (mM)</b>	
Fe <sup>2+</sup>	0,25	
Pb <sup>2+</sup>	1,22	
Co <sup>2+</sup>	2,57	
Ag <sup>+</sup>	115,00	
Cu <sup>2+</sup>	19,71	
<b>Ağır Metal Türü</b>	<b>Ortalama K<sub>i</sub> (mM)</b>	<b>İnhibisyon Tipi</b>
FeCl <sub>2</sub>	0,165	Yarışmalı
Pb(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub>	1,733	Yarışmasız
CoCl <sub>2</sub>	3,676	Yarışmasız
AgNO <sub>3</sub>	41,167	Yarışmalı
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	90,737	Yarıyarışmalı

**Çizelge 5.4.** Karadeniz alabalığı kas dokusu CA enzimi için elde edilen sonuçlar

<b>CA Enzimini İçin Kinetik Çalışma Sonuçları</b>		
Optimum pH	9,0 ( 1 M Tris-SO <sub>4</sub> )	
Optimum İyonik Şiddet	1 M Tris-SO <sub>4</sub>	
Stabil pH	8,5 ( 1 M Tris-SO <sub>4</sub> )	
Optimum Sıcaklık (°C)	40 °C	
Aktivasyon Enerjisi (Ea) (kcal/mol)	1,152	
Aktivasyon Entalpisi (Ea) (kcal/mol)	0,530	
Q <sub>10</sub>	1,13	
K <sub>M</sub> (p-nitrofenilasetat) (mM)	0,492	
V <sub>max</sub> (p-nitrofenilasetat) (EÜ/ml)	0,741	
k <sub>cat</sub> (p-nitrofenilasetat) (s <sup>-1</sup> )	1222,78	
V <sub>0</sub> (p-nitrofenilasetat) (mM× s <sup>-1</sup> )	2,485 × 10 <sup>6</sup>	
<b>Molekül Kütlesi Tayini (kDa)</b>		
SDS-PAGE metodu ile	28,80	
<b>Ağır Metal Etkisi</b>	<b>IC<sub>50</sub> (mM)</b>	
Fe <sup>2+</sup>	0,25	
Pb <sup>2+</sup>	0,15	
Co <sup>2+</sup>	2,46	
Ag <sup>+</sup>	2,60	
Cu <sup>2+</sup>	18,65	
<b>Ağır Metal Türü</b>	<b>Ortalama K<sub>i</sub> (mM)</b>	<b>İnhibisyon Tipi</b>
FeCl <sub>2</sub>	0,485	Yarışmalı
Pb(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub>	0,163	Yarışmalı
CoCl <sub>2</sub>	4,738	Yarışmalı
AgNO <sub>3</sub>	8,505	Yarışmasız
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	45,674	Yarışmasız

**KAYNAKLAR**

- Alber, B.E., Feery, J.G., 1994. Carbonic anhydrase from the archaeon *Methlinsarcina thermophila*. Proc. Nat. Acad. Sci., 91, 6909-6913.
- Allen P (1995) Chronic Accumulation of Cadmium in the Edible Tissues of *Oreochromis aureus* (Steindachner); Modification by Mercury and Lead. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 29, 8-14
- Almeida JA, Novelli ELB, DalPai-Silva M. and Alves Junior R. 2001. Environmental cadmium exposure and metabolic responses of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Environ. Pollut., 114:169-175.
- Altan, N., 2000. Biyokimya olgu sunumlu yaklaşım. Palme Yayıncılık, 69 -74, Ankara.
- Alver, A., 1997. Belirli yaş gruplarındaki sağlıklı bireylerde serum total karbonik anhidraz ve karbonik anhidraz III aktivitelerinin belirlenmesi. Y. Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Armstrong, J.M., Myers, D.V., Verpoorte, J.A. and Edsall, J.T., 1966. Purification and properties of human erythrocyte carbonic anhydrase. J. Biol. Chem, 214, 5137.
- Arslan, O., 2001. Inhibition of bovine carbonic anhydrase by new sulfonamide compounds. Biochemistry, 66, 1206-1208.
- Arslan, O., Nalbantoğlu, B., Demir, N., Ozdemir, H., and Kufreviöglu, O.I., 1996. A new method for the purification of carbonic anhydrase isozymes by affinity chromatography. Turk. J. Med. Sci., 26, 163-166.
- Atamanalp, M., Bayır, A. Sirkecioğlu, A.N. Cengiz. M., (2003), The effects of sublethal doses a disinfectant (*Malachite green*) on blood parameters of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Gazi Üniversitesi, Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi, 23: 177-187.
- Atasever, A., Ozdemir, H., Gulcin, I., Kufreviöglu, O.I., 2013. One-step purification of lactoperoxidase from bovine milk by affinity chromatography. Food Chem., 136, 864-870.
- Badger, M.R. And Price, G.D., 1994. The role of carbonic anhydrase in photosynthesis. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 45, 369-392.
- Balaydin, H.T., Soyut, H., Ekinçi, 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.
- Basha PS. and Ranı AU. 2003. Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). Ecotoxicol. Environmen. Saf., 56: 218–221.
- Becker, B., 1954. Decrease in intraocular pressure in man by a carbonic anhydrase inhibitor (Diamox), Am. J. Ophthalmol., 37, 13-17.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., 2014. Biyokimya. Palme Yayıncılık, 241-247p, Ankara.
- Beydemir, S., Ciftci, M., Ozmen, I., Buyukokuroglu, M.E., Ozdemir, H. and Kufreviöglu, 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, S., Ciftci, M., Kufreviöglu, O.I., 2002. Effects of gentamicine 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., Gulcin, I., 2004. Effect of melatonin on carbonic anhydrase from human erythrocyte *in vitro* and from rat erythrocyte *in vivo*. J. Enzym. Inhib. Med. Chem. 19, 193-197.
- Bilgili, A. Sağmanlıgil, H. Çetinkaya, N. Yersan ve E. Türel, İ. 1995. Van Gölü suyunun doğal kalitesi ve buradan inci kefali ( *Chalcalburnus tarichi* Pallas 1811) örneklerinde bazı ağır metal düzeyleri, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 42, 445-450.
- Bingöl, G., 1983. Biyokimya. Güven Matbaası, Ankara, 169-174 s.
- Blaxhall, P.C., Daisley, K.W., 1973. Routine haematological methods for use with fish blood. J. Fish Biol,5: 771-781.
- Bone Q, Marshall NB, Blaxter JHS (1995) Sensory systems and communication. In: Bone Q, Marshall NB, Blaxter JHS (eds) Biology of fishes. Chapman and Hall, New York.
- Bottcher, K., Waheed, A. and 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.
- Boztaş, M., Çetinkaya, Y., Topal, M., Gülçin, İ., Menzek, A., Şahin, E., Tanc, M., Supuran, C.T. 2015. Synthesis and carbonic anhydrase isoenzymes I, II, IX, and XII inhibitory effects of dimethoxy-bromophenol derivatives incorporating cyclopropane moieties. J. Med. Chem., 58, 640-650.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 72, 248.
- Bursal, E., 2009. Kivi meyvesinin (*Actinidia deliciosa*) antioksidan ve antiradikal aktivitelerinin belirlenmesi, karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu (Doktora Tezi) Atatürk Üniversitesi Erzurum.
- Burt E, Darlington MV, Graf G *et al.* (1992) Isolation, purification and characterization of an insect carbonic anhydrase. Insect. Biochem. Mol. Biol. 22:285–291.
- Bülbül, M., Hisar, O., Beydemir, S., Ciftci, M. and Kufreviöglu, O.I., 2003. The *in vitro* and *in vivo* inhibitory effects of some sulfonamide derivatives on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) erythrocyte carbonic anhydrase activity. J. Enzym. Inhib. Med. Chem. 18, 371–375.
- Carter, M.J., 1972. Carbonic anhydrase: Isoenzymes, properties, distribution and functional significance. Biology. Reviews, 42, 465-513.
- Chegwidden, W.R., Edwards, Y., Carter, N., 2000. The carbonic anhydrases-new horizons. molecular bases of inherited disease (Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., and Valle, D., eds) 8th Ed., McGraw-Hill, Inc. New York 2165–2204.
- Cicik, B., 2003. Bakır-çinko etkileşiminin sazan (*Cyprinus carpio* L.)'nın karaciğer, solungaç ve kas dokularındaki metal birikimi üzerine etkileri. Ekoloji Çevre Dergisi, 48, 32-36.
- Çiçek A., Koparal A.S., 2001. Porsuk baraj gölünde yaşayan *cyprinus carpio* ve *Barbus plebejus*'da kurşun, krom ve kadmiyum seviyeleri. Çev & Kor, 39, 3-6.

- Coban, T.A., Beydemir, S., Gulcin, I., Ekinci, D., Innocenti, A., Vullo, D., Supuran, C.T.: Sildenafil I is a strong activator of mammalian carbonic anhydrase isoforms I-XIV. *Bioorg. Med. Chem.*, 2009; 17: 5791-5795.
- Danişan, A., Ceyhan, D., Oğus, I. H. and Ozer, N., 2004. Purification and characterization glucose-6-phosphate dehydrogenase from rat small intestine. *Protein J*, 23, 317-324.
- De La Torre FR, Salıbian A. and Ferrari L, 2007. Assessment of the pollution impact on biomarkers of effect of a Freshwater Fish. *Chemosphere*, 68:1582-1590.
- Demirsoy, A., 1993, Yaşamın Temel Kuralları, Cilt 3, Kısım 1, 2.Baskı, Meteksan A.Ş. Basım Tesisleri.
- DeVoe, H. and Kistiakowsky, G.B., 1961. The enzyme kinetics of carbonic anhydrase from bovine and human erythrocytes. *J. Am. Chem. Soc.*, 83, 274-280.
- Devlin, T.M., 2002. *Biochemistry with clinical correlations*. 5th Ed., Wiley-Liss inc., Newyork.
- Ekinci, D., Beydemir, S., Alim, Z., 2007. Some drugs inhibit *in vitro* hydratase and esterase activities of human carbonic anhydrase-I and II. *Pharmacol. Rep.* 59, 580–587.
- Ekinci, D., Beydemir, S., 2010b. Risk assessment of pesticides and fungicides for acid-base regulation and salt transport in rainbow trout tissues. *Pestic. Biochem. Phys.* 97, 66-70.
- Erdem, D., Yerlikaya, E., Ceyhun, S.B., Demirdag, R., Senturk, M., Erdogan, O., Küfrevioğlu, O. I., 2011 Inhibition effect of some sulfonamides on carbonic anhydrase from european seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Hacettepe J. Biol & Chem* 39(2),139-144.
- Esbaugh, A.J., Tufts, B.L., 2007. Evidence for a carbonic anhydrase-related protein in the brain of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol.*, Part D, 2, 287–294.
- Esposito, E.X., Baran, K., Kelly, K., Madura, J.D., 2000. Docking of sulfonamides to carbonic anhydrase II and IV. *J.Mol. Graphks Med.*, 18:283–308.
- Feldstein, J.B., Silvarman D.N., 1984. Purification and characterization of carbonic anhydrase from the saliva of the rat. *J. Biol. Chem.* 259,9: 5447-53.
- Geers, C., Gros G., 2000. Carbon dioxide transport and carbonic anhydrase in blood and muscle. *Physiol. Rev.*, Vol. 80, No. 2, U.S.A.
- 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.
- Gözükara, E.M., 1989. *Biyokimya*. Ofset Repromat Ltd Şti., Ankara 792-795.
- Graham, D., Reed, M.L., Patterson, B.D., Hockley, D.G. and Dwyer, M., 1984. Chemical properties, distribution and physiology of plant and algal carbonic anhydrases. *Ann. NY Acad. Sci.* 429, 222-237.
- Gulcin, I., Beydemir, S., Hisar, O., 2005. Effect of alpha-tocopherol oil antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Acta Vet. Hung* 53, 425-433.
- Gulcin, I.; Beydemir, S.; Buyukokuroglu, M.E. In vitro and in vivo effects of dantrolene on carbonic anhydrase enzyme activities. *Biol. Pharm. Bull.* 2004, 27, 613.



- Gulcin, I., Beydemir, S., Hisar, O., 2005c. The effect of  $\alpha$ -tocopherol on the antioxidant enzymes activities and lipid peroxidation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Acta Veterinaria Hungarica*, 53, 425-433.
- Gulcin, I., Beydemir, S., Buyukokuroglu M.E., 2004f. In vitro and in vivo effects of dantrolene on carbonic anhydrase enzyme activities, *Biol. Pharm. Bull.*, 27, 613-616.
- Gulcin, I.; Beydemir, S. Phenolic compounds as antioxidants: Carbonic anhydrase isoenzymes inhibitors. *Mini Rev. Med. Chem.* 2013, 13, 408-430.
- Hakan S., 2006. Gökkuşığı alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) dokularından karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu ve kinetik özelliklerinin incelenmesi. (Doktora Tezi), Fen-Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Heath A G (1995) *Water Pollution and Fish Physiology*. 2nd edition, CRC Press, New York.
- Hewett-Emmett, D., 2000. In the carbonic anhydrase-new horizons. Birkhauser Verlag, Basel, 29-78.
- Hisar, O., 2002. Gökkuşığı alabalık eritrositlerinden karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu ve antibiyotiklerin enzim aktivitesine üzerine etkisinin incelenmesi, (Doktora Tezi), Fen-Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Hisar, O., Hisar, .S.A., Küfrevioğlu O.I. and Yanik, T., 2003. Inhibitory effects of some antibiotics on activity of carbonic anhydrase from rainbow trout erythrocytes *in vitro* and *in vivo*. *J. Aq. Anim. Heal.*, 15, 3, 221-228.
- Hisar, O., Beydemir, S., Bulbul, M. and Yanik, T., 2006. Kinetic properties of carbonic anhydrase purified from gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Appl. Anim. Res.*, 30, 2. 185-188.
- Houston, A.H., Keen. J.E., (1984), Cadmium inhibition of erythropoiesis in Goldfish (*Carassius auratus*). *Can. J. Fish. Aq. Sci.*, 41: 18-34.
- Jabusch, J.R., and Deutsch, H.F., 1989. Localization of the lysines acetylated in ubiquitin reacted with p-nitrophenyl acetat. *Arch. Biochem. Biophys.*, 238, 170.
- Jackson, E.K., 2001. Goodman and Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, ed. by Hardman, J.G., Limbird, L.E., McGraw Hill, U.S.A., pp.757-787.
- Jomova, K., Valko, M., 2011. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* 283, 65–87.
- Kaiser, E.T., Lo, K.W., 1969. The Carbonic anhydrase catalysed hydrolysis of 2-hydroxy-5-nitrotoluen sulfonic sultane. *J. Am. Chem. Soc.*, 4912.
- Karahalil. F., 2009. Mersin balığı (*acipenser gueldenstaedti*) eritrositlerinden elde edilen karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu ve kinetik özelliklerinin incelenmesi. (Doktora Tezi) Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Kaya, E.D, Soyut, H., Beydemir, S., Ceyhun, S.B., Erdogan, O., 2012. Changes in carbonic anhydrase activity and gene expressio of Hsp70 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle after exposure to some metals. *Turk J. Vet. Anim. Sci.* 36, 499–508.
- Kaya, E.D., 2011 Çipura (*Sparus aurata*) balığının karaciğer, solungaç ve böbrek dokularından saflaştırıp bazı ağır metallerin saflaştırılan CA enzimleri üzerindeki etkilerini *in vitro* olarak araştırılması (Doktora Tezi) Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

- Kayhan, E.F., 2006. Su ürünlerinde kadmiyumun biyobirikimi ve toksisitesi. E.U. J. Fish. Aq. Sci. 23, 215–220.
- Kayhan, F.E., 2007. Mercury levels of Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from Bosphorus, İstanbul, Turkey. J. Biol. Sci., 7, 369-373.
- Kayhan, F.E., N. Gulsoy, N. Balkis and R. Yuçe, 2007. Cadmium (Cd) and Lead (Pb) Levels of Mediterranean Mussel (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819) From Bosphorus, Istanbul, Turkey. Pak. J. Biol. Sci., 10: 915-919.
- Keha, E.E., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2009. Biyokimya. Aktif Yayınevi, Erzurum.
- Keilin, D. and Mann, T., 1944. Activity of purified carbonic anhydrase. Nature 153,107,108.
- Kernohan, J.C., 1964. The activity of carbonic anhydrase in imidazole buffers. Biochim. Biophys. Acta, 81, 346-356.
- 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.
- Kim, J.S., Gay, C.V., Schrärer, R.: Purification and properties of carbonic anhydrase from salmon erythrocytes. Comp. Biochem. Physiol. Part B., 1983; 76: 523-527.
- Kocabaş, M., 2009. Türkiye Doğal Alabalık (*Salmo trutta*) Ekotiplerinin Kültür Şartlarında Büyüme Performansı ve Morfolojik Özelliklerinin Karşılaştırılması, Doktora Tezi, K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Krungkrai, S.R., Suraveratum, N., Rochanakij, S. and 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.
- Lauren, D.J. and McDonald, D.G., 1987. Acclimation to copper by rainbow trout, *Salmo gairdneri*: Physiology. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 44: 99-104.
- Lauren, D.J., McDonald, D.G., 1987. Acclimation to copper by rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. J. Comp. Physiol. 155, 635–644.
- Lehninger, A.L., 2005. Principles of Biochemistry. Worth publisher, Academic Press, New York.
- Lineweaver, H., and Burk, D., 1934. The determination of enzyme dissociation constants. J. Am. Chem. Soc, 57, 685.
- Lesburg, C.A., Christianson, D.W., 1995. X-Ray crystallographic studies engineered hydrogen-bond networks in a protein-zinc binding-site. J. Am. Chem. Soc., 117, 6838-6844.
- Lindskog, S., 1997. Structure and mechanism of carbonic anhydrase. Pharmacol. Ther. 74, 1-20
- Lionetto, M.G., Giordano, M.E., Vilella, S., and Schettino, T., 2000. Inhibition of enzymatic activities by cadmium. Aq. Toxicol., 48, 561-571.
- Maren, T.H., 1960. A simplified micromethod for the determination of carbonic anhydrase and its inhibitors. J. Pharmacol., Exp. Therap., 130, 26.
- Maren, TH., 1967. Carbonic anhydrase: chemistry, physiology and inhibition. Physiol. Rev., 47, 595-781.
- Maren, T.H., 1987. Carbonic anhydrase general perspectives and advances in glaucoma research. Drug Dev. Res., 10:255-276.

- 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.
- Maynard, J.R. Coleman, J.E., 1971. Elasmobranch carbonic anhydrase. purification and properties of the enzyme from two species of shark. *J. Biol. Chem.*, 24 614, 4455.
- McGeer, J.C., Szebedinszky, K.Y.C., Mcdonald D.G. Wood C.M., 2000. Effect of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout tissues specific metal accumulation. *Aqa. Toxicol*, 50, 245-256.
- Mori, K., Ogawa, Y., Ebihara, K., Tamura, N., Tashiro, K., Kuwahara, T., Mukoyama, 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.
- Murakami, H. Sly, W.S., 1987. Purification and characterization human salivary carbonic anhydrase. *J. Biol. Chem.*, 262, 1382-1388.
- Nar, M., 2014. Bazı kinazların türevleri, antioksidan kapasiteleri karbonik anhidraz CAI ve CAII izo enzimleri üzerine inhibisyon etkileri. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Nishimori, I., 2004. Acatalytic CAs, carbonic anhydrase related proteins, in carbonic anhydrase, its inhibitors and activators (Supuran, C.T., Scozzafava, A., and Conway, J., Eds.) pp 24-43, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Onat, T., Emerk, K., 1997. Temel Biyokimya, Saray Medikal Yayıncılık, İzmir s:269-284.
- Okutur, S.K., 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.
- Parkkila, A.K., Scarim, A.L., Parkkila, S., Waheed, A., Corbett, J.A. and Sly, W.S., 1998. Expression of carbonic anhydrase v in pancreatic beta cells suggests role for mitochondrial carbonic anhydrase in insulin secretion. *J. Biol. Chem.*, 273, 24620-24623.
- Pelgrom SMGJ, Lamers LPM, Lock RAC, Balm PHM, Wendelaar Bonga SE (1995) Interactions between Copper and Cadmium Modify Metal Organ Distribution in Mature Tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Environ. Poll.*, 90, 415-423.
- Peter, T., Papadopoulos, F., Kubis, HP., Gros, G., 2000. Properties of a carbonic anhydrase inhibitor protein in flounder serum. *J. Exp. Biol.*, 203, 3003–3009
- Peterson, R.E., Tu, C., Linser, P.J., 1997. Isolation and characterisation of a carbonic anhydase homologue from the zebrafish (*danio rerio*). *J. Mol. Evol*, 448, 432-439.
- Pocker, Y., Joan, S.Y., 1974. Plant carbonic anhydrase activity and its reversible inhibition. *Biochem. J.*, 13, 5116-51120.
- Polya, JB., Wirtz, AJ., 1965. Studies on carbonic anhydrase-II. Occurrence of the enzyme in some invertebrates. *Enzymologia*, 29, 27-37.
- Pocker, Y., Sarkanen, S., 1978. Carbonic anhydrase: Structure, catalytic versatility and inhibition. *Adv. Enzymol.*, 47, 149-247.
- Pullan, L.M. and Noltmann, E.A., 1985. Purification and properties of pig muscle carbonic anhydrase III. *Biochim. Biophys. Acta*, 839, 147-54.

- Rizzello A, Ciardiello MA, Acierno R, Carratore V, Verri T, di Prisco G, Storelli C, Maffia M. 2007. Biochemical characterization of a s-glutathionylated carbonic anhydrase isolated from gills of the antarctic icefish. *Protein J.*, 26, 335-348.
- Roger, J. T., Richards, J.G. and Wood, C.M., 2003. Ionoregulatory disruption as the toxic mechanism for lead in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aqu. Toxicol.*, 64, 215-234.
- Roughton, F.J.W. and Booth, V.H., 1946. The effect of substrate concentration, pH and other factors upon the activity of carbonic anhydrase. *Biochem. J.* 40,319.
- Schcer, A., Dietsch, P., 1984. A-54000 molecular weight protein with carbonic anhydrase activity in rabbit erythrocytes. *Annal New York Acad. Sci.*, 429,241
- Segel, I.H., C. John Wiley and Sons, 1975. *Enzyme Kinetics*. New York.
- Sender, S., Böttcher, 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.
- Sivaperumal, T.V., Sankar, P.G., 2006. Heavy metal concentrations in fish, shellfish and fish products from internal markets of India vis-a-vis international standards. *Food Chem.* 102, 612–620.
- Söyler, M., 2006. Van kedisi eritrositlerinden karbonik anhidraz enziminin (E.C.4.2.1.1.) saflaştırılması ve karakterizasyonu. (Y.Lisans Tezi), Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Van.
- Soyut, H. and Beydemir, S. 2008. Purification and some kinetic properties of carbonic anhydrase from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver and metal inhibition, *Protein Peptide Lett.*, 15-55, 528-535.
- Söyüt, H. Gökkuşluğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) karaciğer, böbrek, kas ve beyin dokuları CA enzimlerinin afinite kromatografisi ile saflaştırılması, karakterizasyonu enzimlerin bazı kinetik özelliklerinin belirlenmesi ve bazı ağır metal iyonlarının bu enzimler üzerine etkileri belirlenmeye çalışılması (Doktora Tezi) Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Sugrue, M.F., 2000. Pharmacological and ocular hypotensive properties of topical carbonic anhydrase inhibitors. *Prog Ret Eye Res.* 19, 87-112.
- Supuran, C.T., Scozzafava, A., 2001. Carbonic anhydrase inhibitors. *Curr. Med. Chem.*, 1, 61-97.
- Supuran, C.T., C, A. Carbonic anhydrases as targets for medicinal chemistry. *Bioorg. Med Chem*, 15: 4336-4350, 2007.
- 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., 1998. Structures of murine carbonic anhydrase IV and human carbonic anhydrase II complexed with brinzolamide molecular basis of isozyme-drug discrimination. *Protein Sci.*, 7, 556-563.
- Stryer, L., 1988. *Biochemistry*. W.H. Freeman and Company, 3th Edition, 233-260, Newyork.

- Tabak, İ., Aksungur, M., Zengin, M., Alkan, A., Zengin, B. ve Mısır, S., 2001. Karadeniz Alabalığı (*Salmo trutta labrax* Pallas, 1811)'nın Biyoeekolojik Özelliklerinin Tespiti ve Kültüre Alınabilirliğinin Araştırılması Projesi Sonuç Raporu, No:(TAGEM/HAYSUD/12/01/007), Su Ürünleri Araştırma Enstitüsü.
- Tekman, S., Öner, N., 1986. Genel Kimya I. Fatih Yayınevi Matbaası, İstanbul s: 335-337.
- Telefoncu, A., 1986. Temel ve uygulamalı enzimoloji, Ege Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi yayını İzmir (Der) 59.
- 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., 1997 Vangölü balığının (*Calcalburnus tarichi*)da karbonik anhidrazın esteraz aktivitesi üzerine bir çalışma. Turk. J. Vet. Anim. Sci, 23, 145-153.
- Tohse H., Mugiya, Y., 2001. Effect 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, M., Gulcin, I., 2014. Rosmarinic acid: a potent carbonic anhydrase isoenzymes inhibitor. Turk. J. Chem. 38, 894-902.
- Tozlu, İ., 1997. İnci kefalı (*Chalcalburnus tarichi*, Palas 1881) eritrositlerinden afinite kromatografisi ile saflaştırılan karbonik anhidraz enziminin kinetik ve elektroforetik özelliklerinin incelenmesi. Yüksek lisans tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Van.
- Tsuzuki, M. and Miyachi S., 1989. The function of carbonic anhydrase in aquatic photosynthesis. Aquat. Bot. 34, 85-104.
- Verpoorte, J.A., Mehta, S., Edsall, J.T. 1967. Esterase Activities of Human Carbonic Anhydrases B and C. J.Biol. Chem, 242, 4221-4229.
- Viarengo, A., 1995. Biochemical effects of trace metals. Mar. Pollut. Bull. 16, 153–158.
- Viarengo, A., 1994. Heavy metal cytotoxicity in marine organism: effects on Ca<sup>+2</sup> homeostasis and possible alteration of signal transduction pathways. Gilles, R. (Ed.), Comp. and Environ. Physiol. Springer, Berlin, 85-110.
- Vitale, A.M., Monserrat, J.M., Castilho, P., Rodriguez, E.M.: Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). Comp. Biochem. Physiol. Part C., 1999; 122: 121-129.
- Wilbur, K.M. and Anderson, N.G., 1948. Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase. J. Biol. Chem., 176, 147-154.
- Wilson, J. E., 1971. An expeditious method for determining the activation energies of enzymatic reactions. Arch. Biochem. Biophys, 147, 471–474.
- Wistrand, P.J., 2002. Carbonic anhydrase III in liver and muscle of male rats purification and properties. Upsala J. Med. Sci., 107, 77-88 .
- Yu Z, Xie L, Lee S *et al.* (2006) A novel carbonic anhydrase from the mantle of the pearl oyster (*Pinctada fucata*). Comp. Biochem. Phys. B., 143:190-194.

## ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Erzurum'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini yılında Erzurum'da tamamladı. 2002 yılında Konya Selçuk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümünden mezun oldu. 2002-2004 yılları arasında dil eğitimi için yurtdışında bulundu. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Öğretmenliği Bölümünde Tezsiz yüksek lisans yaparak 2007 yılında mezun oldu. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü'nde Kimya Anabilimdalı, Biyokimya bilimdalı doktora çalışmalarına başladı. Evli ve iki çocuk babasıdır.