



**KEÇİ KARACİĞER VE BÖBREK DOKULARINDAN
KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZASYONU VE BAZI METAL
İYONLARININ, ANTİBİYOTİKLERİN VE
AVERMEKTİNLERİN ENZİM AKTİVİTESİ
ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Cüneyt ÇAĞLAYAN

Doktora Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Bilim Dalı

Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

2017

Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

KEÇİ KARACİĞER VE BÖBREK DOKULARINDAN KARBONİK
ANHİDRAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZASYONU VE BAZI METAL İYONLARININ,
ANTİBİYOTİKLERİN VE AVERMEKTİNLERİN ENZİM
AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Cüneyt ÇAĞLAYAN

KİMYA ANABİLİM DALI
Biyokimya Bilim Dalı

ERZURUM
2017

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**KEÇİ KARACİĞER VE BÖBREK DOKUSUNDAN KARBONİK ANHİDRAZ
ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE BAZI METAL
İYONLARININ, ANTİBİYOTİKLERİN VE AVERMEKTİNLERİN ENZİM
AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN danışmanlığında, Cüneyt ÇAĞLAYAN tarafından hazırlanan bu çalışma 18/08/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı – Biyokimya Bilim Dalı’nda Doktora Tezi olarak ~~oybirliği/oy çokluğu~~ (.../...) ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ömer İrfan KÜFREYİOĞLU

İmza

Üye : Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

İmza

Üye : Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN

İmza

Üye : Prof. Dr. Burhan ATEŞ

İmza

Üye : Doç. Dr. Hülya AKINCIOĞLU

İmza

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 14/09/2017 tarih ve 36/50 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cavit KAZAZ
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

KEÇİ KARACİĞER VE BÖBREK DOKULARINDAN KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE BAZI METAL İYONLARININ, ANTİBİYOTİKLERİN VE AVERMEKTİNLERİN ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Cüneyt ÇAĞLAYAN

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

Bu tez kapsamında keçi karaciğer ve böbrek dokularından karbonik anhidraz (CA) enzimi sırasıyla 61229.29 ve 58974.33 EÜ/mg spesifik aktiviteleriyle birlikte, %55.6 ve %51.0 verimlerle Sepharose-4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite kolon kromatografisi kullanılarak saflaştırıldı. Keçi karaciğer ve böbrek dokuları CA enzimi için saflaştırma kat sayıları ise sırasıyla 359.18 ve 212.27 olarak tespit edildi.

Enzimin saflığını kontrol etmek ve molekül kütlelerinin alt birim tespit etmek amacıyla SDS-PAGE yapıldı ve tek bant gözlemlendi. Enzimin alt birim molekül kütlesi karaciğer dokusu için 27.70 kDa ve böbrek dokusu için 28.00 kDa olarak belirlendi.

Karaciğer ve böbrek dokularından saflaştırılan CA enzimi için optimum iyonik şiddet sırasıyla 0.5 M ve 0.6 M Tris-SO₄ tamponu olarak belirlendi. Optimum ve stabil pH değerleri sırasıyla pH 7.5 ve 7.0 olarak belirlendi. CA enziminin optimum sıcaklık, aktivasyon entalpisi (ΔH), aktivasyon enerjisi (E_a) ve Q_{10} değerleri Arrhenius grafiğinden elde edildi. Saflaştırılan enzimlerin K_m ve V_{max} değerleri Lineweaver-Burk grafiklerinden hesaplandı. Keçi karaciğer ve böbrek dokuları CA enzimi k_{cat} değerleri sırasıyla 1328.51 ve 906.66 s⁻¹ olarak hesaplandı. Bununla birlikte, Keçi karaciğer ve böbrek dokularından saflaştırılan CA enzimi aktivitesi üzerine bazı ağır metal iyonlarının (Pb²⁺, Co²⁺, Fe²⁺, Hg²⁺, Cu²⁺ ve Ag⁺), antibiyotiklerin (amoksisilin ve vankomisin) ve avermektinlerin (moksidektin, doramektin, abamektin ve eprinomektin) inhibisyon etkileri esteraz metodu kullanılarak incelendi. İnhibisyon etkisi gösteren antibiyotik, avermektin ve metallerin IC₅₀ ve K_i değerleri hesaplandı.

2017, 159 sayfa

Anahtar Kelimeler: Keçi, enzim saflaştırma, enzim karakterizasyon, karbonik anhidraz, ağır metal, avermektin

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF CARBONIC ANHYDRASE ENZYME FROM GOAT LIVER AND KIDNEY TISSUES AND INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF SOME METAL IONS, ANTIBIOTICS AND AVERMECTINS ON THE ENZYME ACTIVITY

Cüneyt ÇAĞLAYAN

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 goat liver and kidney tissues with a specific activity of 61229.29 and 58974.33 EU/mg and a yield of 55.6% and 51.0% by using Sepharose-4B-L-tyrosinesulfanilamide affinity chromatography, respectively. The overall purifications from goat liver and kidney tissues CA enzymes were approximately 359.18 and 212.47 fold purified respectively.

For determination of enzyme purity and subunit molecular weights, SDS-PAGE was performed and single band was absorbed for each tissue enzyme. The molecular weight of subunit of enzymes were evaluated as 27.70 kDa for liver and 28.00 kDa for kidney tissues.

Optimum ionic strengths for CA enzymes from liver and kidney tissues were obtained as 0.5 M and 0.6 M Tris-SO₄ buffer respectively. Optimum and stable pH values were determined as pH 7.5 and 7.0, respectively. The optimum temperature, activation enthalpy (ΔH), activation energy (E_a) and Q_{10} values were obtained from Arrhenius plot for CA enzymes. Then, K_m and V_{max} values for *p*-nitrophenylacetate of the purified enzymes were calculated from Lineweaver-Burk graphs. K_{cat} values of the goat liver and kidney tissues CA enzymes were determined as 1328.51 and 906.66 s⁻¹ respectively. Also, the inhibitory effects of some heavy metal ions (Pb²⁺, Co²⁺, Fe²⁺, Hg²⁺, Cu²⁺ and Ag⁺) antibiotics (amoxicillin and vancomycin) and avermectin (moxidectin, doramectin, abamectin and eprinomectin) on goat CA enzyme activities were evaluated by using esterase method. IC₅₀ and K_i values of metals, antibiotic and avermectins, which showing the inhibition effect were calculated.

2017, 159 pages

Keywords: Goat, enzyme purification, enzyme characterization, carbonic anhydrase, heavy metal, avermectin

TEŞEKKÜR

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

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

Bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVLİOĞLU'na, Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR'e, Kimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Hamdullah KILIÇ'a teşekkür ederim. Çalışmalarım süresince yardımlarını esirgemeyen doktora öğrencisi arkadaşlarım Parham TASLİMİ ve Yeliz DEMİR'e başta olmak üzere bütün Biyokimya Laboratuvarı çalışanı arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Doktora sürecimde maddi destek sağlayan TUBİTAK / BİDEB'e ve her daim bizlerle ilgilenen değerli çalışanlarına ayrıca teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmalarım boyunca gösterdikleri sabır ve anlayıştan dolayı eşim, annem ve babama çok teşekkür ederim.

Cüneyt ÇAĞLAYAN

Ağustos 2017

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Karbonik anhidraz enziminin tarihçesi.....	7
1.2. Karbonik anhidraz enzimi	8
1.3. Çalışmada kullanılan ağır metaller	14
1.4. Çalışmada kullanılan antibiyotikler.....	18
1.5. Çalışmada kullanılan avermektinler	20
1.6. Çalışmanın amacı	24
2. KAYNAK ÖZETLERİ	25
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	28
3.1. Materyal.....	28
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler	28
3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar	28
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması	29
3.2. Yöntemler.....	32
3.2.1. Keçi karaciğer ve böbrek dokularından karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu çalışmaları ile ilgili yöntemler.....	32
3.2.1.a. Sepharose-4B-L-tirozin sülfanilamit afinite kolonunun hazırlanması	32
3.2.1.b. Keçi karaciğer ve böbrek dokularının temini ve homojenat hazırlanması ...	34
3.2.1.c. Keçi karaciğer ve böbrek dokularıyla hazırlanan homojenatların afinite kolonuna tatbiki ve elüsyonu	34
3.2.1.d. Sodyum Dodesilsülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzim saflığının kontrolü ve molekül kütlesi tayini.....	35
3.3. Protein tayini	37

3.3.1. Kalitatif protein tayini	37
3.3.2. Bradford yöntemi ile protein tayini	37
3.4. Karbonik anhidraz enziminin aktivite ölçümü	38
3.5. Keçi karaciğer ve böbrek dokularından saflaştırılan CA enzimi ile ilgili yapılan kinetik çalışmalar.....	41
3.5.1. Karbonik anhidraz enzimi için optimum pH çalışması	41
3.5.2. Karbonik anhidraz enzimi için optimum iyonik şiddet çalışması	41
3.5.3. Karbonik anhidraz enziminin stabil olduğu pH'nın bulunması ile ilgili çalışmalar	42
3.5.4. Keçi karaciğer ve böbrek dokularından elde edilen CA enziminin optimum sıcaklığın, aktivasyon enerjisinin (E_a), aktivasyon entalpisinin (ΔH) ve Q_{10} değerlerinin hesaplanması ile ilgili çalışmalar.....	42
3.5.5. Keçi karaciğer ve böbrek dokularından elde edilen CA enziminin K_M , V_{max} , k_{cat} ve V_0 değerlerinin bulunmasına yönelik çalışmalar	43
3.5.6. Bazı ağır metallerin, antibiyotiklerin ve avermektinlerin keçi karaciğer ve böbrek dokularından elde edilen CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin incelenmesi	44
3.5.7. Keçi karaciğer ve böbrek dokularından elde edilen CA enzimi için inhibitör etkisi gösteren ağır metallerin, antibiyotiklerin ve avermektinlerin K_i sabitlerinin ve inhibisyon türlerinin bulunması	44
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	45
4.1. Kantitatif protein tayini için hazırlanan standart grafik	45
4.2. Keçi karaciğer ve böbrek dokularından karbonik anhidraz enziminin saflaştırılma ve karakterizasyon sonuçları	46
4.2.1. Karbonik anhidraz enziminin Sepharose-4B afinite kromatografisi ile saflaştırılma kademeleri	46
4.2.2. Sodyum Dodesilsülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzim saflığının kontrolü ve molekül kütesinin tayini	48
4.3. Keçi karaciğer ve böbrek dokularından saflaştırılan CA enzimi ile ilgili yapılan kinetik çalışmalar.....	49
4.3.1. Karbonik anhidraz enzimi için optimum pH çalışması	49

4.3.2. Keçi karaciğer ve böbrek dokuları karbonik anhidraz enzimi için optimum iyonik şiddetinin belirlenmesi	52
4.3.3. Karbonik anhidraz enziminin stabil olduğu pH'nın bulunması ile ilgili çalışmalar	54
4.3.4. Keçi karaciğer ve böbrek dokularından elde edilen CA enziminin optimum sıcaklığın, aktivasyon enerjisinin (E_a), aktivasyon entalpisinin (ΔH) ve Q_{10} değerlerinin hesaplanması ile ilgili çalışmalar	59
4.3.5. Keçi karaciğer ve böbrek dokularından elde edilen CA enziminin K_M , V_{max} , k_{cat} ve V_0 değerlerinin bulunmasına yönelik çalışmalar.....	62
4.3.6. Bazı ağır metallerin keçi karaciğer ve böbrek dokularından elde edilen CA enziminin esterase aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin incelenmesi.....	64
4.3.7. Bazı antibiyotiklerin keçi karaciğer ve böbrek dokularından elde edilen CA enziminin esterase aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin incelenmesi ...	77
4.3.8. Bazı avermektinlerin keçi karaciğer ve böbrek dokularından elde edilen CA enziminin esterase aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin incelenmesi ...	82
4.3.9. Keçi karaciğer ve böbrek dokularından elde edilen CA enzimi için inhibitör etkisi gösteren ağır metallerin K_i sabitlerinin ve inhibisyon türünün bulunması	91
4.3.10. Keçi karaciğer ve böbrek dokularından elde edilen CA enzimi için inhibitör etkisi gösteren antibiyotiklerin K_i sabitlerinin ve inhibisyon türünün bulunması	111
4.3.11. Keçi karaciğer ve böbrek dokularından elde edilen CA enzimi için inhibitör etkisi gösteren avermektinlerin K_i sabitlerinin ve inhibisyon türünün bulunması	120
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	135
KAYNAKLAR	152
ÖZGEÇMİŞ	160

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 _A	Molekül Kütlesi
Da	Dalton
λ	Dalga boyu
EU	Enzim ünitesi
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi
k	Hız sabiti
R	Arrhenius sabiti
°K	Kelvin derece sıcaklık
E _a	Aktivasyon enerjisi
ΔH	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 inhibisyon sabiti



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1	Karbonik anhidraz II izoenzimi modeli ve katalitik bölgesi	11
Şekil 1.2.	Karbonik anhidraz enziminin CO ₂ -hidratasyon reaksiyonunu kataliz mekanizmasının şematik olarak gösterilişi	12
Şekil 1.3.	Vankomisin antibiyotiğinin açık yapısı	19
Şekil 1.4.	Amoksisilin antibiyotiğinin açık yapısı	20
Şekil 1.5.	Moksidektin molekülünün açık yapısı	21
Şekil 1.6.	Doramektin molekülünün açık yapısı	22
Şekil 1.7.	Abamektin molekülünün açık yapısı	23
Şekil 1.8.	Eprinomektin molekülünün açık yapısı	23
Şekil 3.1.	CNBr Sepharose 4B-L-tirozin afinite jelinin hazırlanmasındaki reaksiyonların basamakları	33
Şekil 3.2.	p-Nitrofenilasetatın p-nitrofenole dönüşüm reaksiyonu	40
Şekil 4.1.	Bradford yöntemi ile BSA kullanılarak protein tayini için hazırlanan standart grafik	45
Şekil 4.2.	Keçi karaciğer dokusundan afinite kromatografisiyle saflaştırılan CA enziminin elüsyon tüplerindeki hidrataz aktivitesi ve 280 nm'deki absorbans değerleri	46
Şekil 4.3.	Keçi böbrek dokusundan afinite kromatografisiyle saflaştırılan CA enziminin elüsyon tüplerindeki hidrataz aktivitesi ve 280 nm'deki absorbans değerleri	47
Şekil 4.4.	Afinite kromatografisiyle saflaştırılan keçi karaciğer ve böbrek dokuları CA enziminin SDS-PAGE fotoğrafı	48
Şekil 4.5.	SDS-PAGE yöntemiyle keçi karaciğer ve böbrek dokusu CA enzimlerinin molekül kütlesi tayininde kullanılan standart grafik	49
Şekil 4.6.	Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin optimum pH'sını bulmak için 1 M potasyum fosfat ve 1 M Tris-SO ₄ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları	50

Şekil 4.7. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin optimum pH'sını bulmak için 1 M potasyum fosfat ve 1 M Tris-SO ₄ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	51
Şekil 4.8. Keçi karaciğer dokusu için Tris-SO ₄ tampon çözeltisi kullanılarak farklı iyonik şiddetlerde yapılan aktivite ölçüm sonuçları	53
Şekil 4.9. Keçi böbrek dokusu için Tris-SO ₄ tampon çözeltisi kullanılarak farklı iyonik şiddetlerde yapılan aktivite ölçüm sonuçları	54
Şekil 4.10. Keçi karaciğer dokusu CA enziminin stabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 0,5 M potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları	55
Şekil 4.11. Keçi karaciğer dokusu CA enziminin stabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 0,5 M Tris-SO ₄ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları	56
Şekil 4.12. Keçi böbrek dokusu CA enziminin stabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 0,6 M potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları	57
Şekil 4.13. Keçi böbrek dokusu CA enziminin stabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 0,6 M Tris-SO ₄ tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları	58
Şekil 4.14. Keçi karaciğer dokusu CA enziminin optimum sıcaklığını gösteren grafik	60
Şekil 4.15. Keçi karaciğer dokusu CA enziminin aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişim grafiği.....	60
Şekil 4.16. Keçi böbrek doku CA enziminin optimum sıcaklığını gösteren grafik	61
Şekil 4.17. Keçi böbrek dokusu CA enziminin aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişim grafik.....	62
Şekil 4.18. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi için 5 farklı PNF konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiği	63
Şekil 4.19. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi için 5 farklı PNF konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiği	63

Şekil 4.20. Keçi karaciğer dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine Fe^{2+} iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen Aktivite (%) - $[\text{Fe}^{2+}]$ grafiği.....	65
Şekil 4.21. Keçi karaciğer dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine Pb^{2+} iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen Aktivite (%) - $[\text{Pb}^{2+}]$ grafiği	66
Şekil 4.22. Keçi karaciğer dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine Co^{2+} iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen Aktivite (%) - $[\text{Co}^{2+}]$ grafiği	67
Şekil 4.23. Keçi karaciğer dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine Ag^+ iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen Aktivite (%) - $[\text{Ag}^+]$ grafiği	68
Şekil 4.24. Keçi karaciğer dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine Cu^{2+} iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen Aktivite(%) - $[\text{Cu}^{2+}]$ grafiği	69
Şekil 4.25. Keçi karaciğer dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine Hg^{2+} iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen Aktivite(%) - $[\text{Hg}^{2+}]$ grafiği.....	70
Şekil 4.26. Keçi böbrek dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine Fe^{2+} iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen Aktivite (%) - $[\text{Fe}^{2+}]$ grafiği.....	71
Şekil 4.27. Keçi böbrek dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine Pb^{2+} iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen Aktivite (%) - $[\text{Pb}^{2+}]$ grafiği	72
Şekil 4.28. Keçi böbrek dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine Co^{2+} iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen Aktivite (%) - $[\text{Co}^{2+}]$ grafiği	73
Şekil 4.29. Keçi böbrek dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine Ag^+ iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen Aktivite (%) - $[\text{Ag}^+]$ grafiği.....	74

Şekil 4.30. Keçi böbrek dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine Cu^{2+} iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen Aktivite (%) - $[\text{Cu}^{2+}]$ grafiği	75
Şekil 4.31. Keçi böbrek dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine Hg^{2+} iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen Aktivite (%) - $[\text{Hg}^{2+}]$ grafiği	76
Şekil 4.32. Keçi karaciğer dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine Amoksisilin'in farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- [Amoksisilin] grafiği	78
Şekil 4.33. Keçi karaciğer dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine vankomisin'in farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- [Vankomisin] grafiği	79
Şekil 4.34. Keçi böbrek dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine Amoksisilin'in farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- [Amoksisilin] grafiği	80
Şekil 4.35. Keçi böbrek dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine Vankomisin'in farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen Aktivite (%) - [Vankomisin] grafiği	81
Şekil 4.36. Keçi karaciğer dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine moksidektin'in farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- [Moksidektin] grafiği	83
Şekil 4.37. Keçi karaciğer dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine doramektin'in farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- [Doramektin] grafiği	84
Şekil 4.38. Keçi karaciğer dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine abamektin'in farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- [Abamektin] grafiği	85
Şekil 4.39. Keçi karaciğer dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine eprinomektin'in farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- [Eprinomektin] grafiği	86

Şekil 4.40. Keçi böbrek dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine moksidektin'in farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- [Moksidektin] grafiği.....	87
Şekil 4.41. Keçi böbrek dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine doramektin'in farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- [Doramektin] grafiği.....	88
Şekil 4.42. Keçi böbrek dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine abamektin'in farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- [Abamektin] grafiği.....	89
Şekil 4.43. Keçi böbrek dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine eprinomektin'in farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- [Eprinomektin] grafiği.....	90
Şekil 4.44. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine Fe^{2+} iyonunun etkisi	98
Şekil 4.45. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine Pb^{2+} iyonunun etkisi	98
Şekil 4.46. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine Co^{2+} iyonunun etkisi	99
Şekil 4.47. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine Ag^{+} iyonunun etkisi	99
Şekil 4.48. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine Cu^{2+} iyonunun etkisi	100
Şekil 4.49. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine Hg^{2+} iyonunun etkisi	100
Şekil 4.50. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine Fe^{2+} iyonunun etkisi	108
Şekil 4.51. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine Pb^{2+} iyonunun etkisi	108
Şekil 4.52. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine Co^{2+} iyonunun etkisi	109

Şekil 4.53. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine Ag^+ iyonunun etkisi	109
Şekil 4.54. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine Cu^{2+} iyonunun etkisi	110
Şekil 4.55. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine Hg^{2+} iyonunun etkisi	110
Şekil 4.56. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine amoksisilin etkisi	115
Şekil 4.57. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine vankomisin etkisi	115
Şekil 4.58. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine amoksisilin etkisi	119
Şekil 4.59. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine vankomisin etkisi	119
Şekil 4.60. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine moksidektin etkisi	125
Şekil 4.61. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine doramektin etkisi	125
Şekil 4.62. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine abamektin etkisi	126
Şekil 4.63. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine eprinomektin etkisi	126
Şekil 4.64. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine moksidektin etkisi	132
Şekil 4.65. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine doramektin etkisi	132
Şekil 4.66. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine abamektin etkisi	133
Şekil 4.67. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine eprinomektin etkisi	133
Şekil 5.1. <i>p</i> -Nitrofenilasetatın <i>p</i> -nitrofenole dönüşüm mekanizması	137

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyon türleri	9
Çizelge 3.1. Karbonik anhidraz enziminin hidrataz aktivitesi ölçümü için kullanılan çözeltiler ve miktarları	39
Çizelge 3.2. Karbonik anhidraz enziminin esteraz aktivitesi ölçümü için kullanılan çözeltiler ve miktarları	40
Çizelge 4.1. Keçi karaciğer dokusundan CA enziminin saflaştırma sonuçları.....	47
Çizelge 4.2. Keçi böbrek dokusundan CA enziminin saflaştırma sonuçları.....	47
Çizelge 4.3. Keçi karaciğer ve böbrek dokusu CA enzimi için SDS-PAGE ile molekül kütleleri tayini sonuçları.....	49
Çizelge 4.4. Keçi karaciğer dokusu CA enziminin optimum pH'sı için 1 M potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları	50
Çizelge 4.5. Keçi karaciğer dokusu CA enziminin optimum pH'sı için 1 M Tris- SO ₄ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	50
Çizelge 4.6. Keçi böbrek dokusu CA enziminin optimum pH'sı için 1 M potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	51
Çizelge 4.7. Keçi böbrek dokusu CA enziminin optimum pH'sı için 1 M Tris-SO ₄ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları	51
Çizelge 4.8. Keçi karaciğer dokusu için Tris-SO ₄ tampon çözeltisi kullanılarak farklı iyonik şiddetlerde yapılan aktivite ölçüm sonuçları	52
Çizelge 4.9. Keçi böbrek dokusu için Tris-SO ₄ tampon çözeltisi kullanılarak farklı iyonik şiddetlerde yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	53
Çizelge 4.10. Keçi karaciğer dokusu CA enziminin stabil pH'sı için 0.5 M potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları	55
Çizelge 4.11. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin stabil pH'sı için 0.5 M Tris-SO ₄ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları	56

Çizelge 4.12. Keçi böbrek dokusu CA enziminin stabil pH'sı için 0.6 M potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	57
Çizelge 4.13. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin stabil pH'sı için 0.6 M Tris-SO ₄ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları	58
Çizelge 4.14. Keçi karaciğer dokusu için değişik sıcaklıklardaki aktivite değerleri	59
Çizelge 4.15. Keçi böbrek dokusu için değişik sıcaklıklardaki aktivite değerleri.....	61
Çizelge 4.16. Keçi karaciğer ve böbrek dokuları CA enzimi için optimum sıcaklık, E _a , ΔH ve Q ₁₀ değerleri.....	62
Çizelge 4.17. Keçi karaciğer ve böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimleri için PNF substratı ile K _M , V _{max} , k _{cat} ve V ₀ değerlerinin sonuçları	64
Çizelge 4.18. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin esterase aktivitesi üzerine Fe ²⁺ iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve aktivite (%) değerleri.....	64
Çizelge 4.19. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin esterase aktivitesi üzerine Pb ²⁺ iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve aktivite (%) değerleri	65
Çizelge 4.20. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin esterase aktivitesi üzerine Co ²⁺ iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve aktivite (%) değerleri.....	66
Çizelge 4.21. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin esterase aktivitesi üzerine Ag ⁺ iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve aktivite (%) değerleri	67
Çizelge 4.22. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin esterase aktivitesi üzerine Cu ²⁺ iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve aktivite (%) değerleri.....	68
Çizelge 4.23. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin esterase aktivitesi üzerine Hg ²⁺ iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve aktivite (%) değerleri.....	69

Çizelge 4.24. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine metal iyonları ile yapılan çalışmalarda elde edilen IC ₅₀ değerleri.....	69
Çizelge 4.25. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine Fe ²⁺ iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve aktivite (%) değerleri	71
Çizelge 4.26. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine Pb ²⁺ iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve aktivite (%) değerleri.....	72
Çizelge 4.27. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine Co ²⁺ iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve aktivite (%) değerleri.....	73
Çizelge 4.28. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine Ag ⁺ iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve aktivite (%) değerleri.....	74
Çizelge 4.29. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine Cu ²⁺ iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve aktivite (%) değerleri.....	75
Çizelge 4.30. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine Hg ²⁺ iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve aktivite (%) değerleri.....	76
Çizelge 4.31. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine metal iyonları ile yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen IC ₅₀ değerleri.....	77
Çizelge 4.32. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine amoksisilin ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve aktivite (%) değerleri	78
Çizelge 4.33. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine vankomisin ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri.....	79

Çizelge 4.34. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine antibiyotikler ile yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen IC ₅₀ değerleri	79
Çizelge 4.35. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine amoksisilin ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve aktivite (%) değerleri.....	80
Çizelge 4.36. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine vankomisin ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri	81
Çizelge 4.37. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine antibiyotikler ile yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen IC ₅₀ değerleri.....	81
Çizelge 4.38. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine moksidektin ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri.....	82
Çizelge 4.39. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine doramektin ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri.....	83
Çizelge 4.40. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine abamektin ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri.....	84
Çizelge 4.41. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine eprinomektin ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri.....	85
Çizelge 4.42. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine avermektinler ile yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen IC ₅₀ değerleri	86
Çizelge 4.43. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine moksidektin ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri	87

Çizelge 4.44. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine doramektin ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri	88
Çizelge 4.45. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine abamektin ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri.....	89
Çizelge 4.46. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine eprinomektin ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri	90
Çizelge 4.47. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine avermektinler ile yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen IC ₅₀ değerleri.....	91
Çizelge 4.48. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine Fe ²⁺ iyonunun Ki değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	92
Çizelge 4.49. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine Pb ²⁺ iyonunun Ki değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	93
Çizelge 4.50. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine Co ²⁺ iyonunun Ki değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	94
Çizelge 4.51. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine Ag ⁺ iyonunun Ki değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	95
Çizelge 4.52. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine Cu ²⁺ iyonunun K _i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	96
Çizelge 4.53. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine Hg ²⁺ iyonunun K _i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	97

Çizelge 4.54. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi için 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan K_i değerleri ve inhibisyon tipleri	101
Çizelge 4.55. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine Fe^{2+} iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	102
Çizelge 4.56. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine Pb^{2+} iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	103
Çizelge 4.57. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine Co^{2+} iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	104
Çizelge 4.58. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine Ag^+ iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	105
Çizelge 4.59. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine Cu^{2+} iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	106
Çizelge 4.60. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine Hg^{2+} iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	107
Çizelge 4.61. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi için 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan K_i değerleri ve inhibisyon tipleri.....	111
Çizelge 4.62. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine amoksisilin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları	113
Çizelge 4.63. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine vankomisin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları	114

Çizelge 4.64. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi için 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan K_i değerleri ve inhibisyon tipleri.....	116
Çizelge 4.65. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine amoksisilin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	117
Çizelge 4.66. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine vankomisin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	118
Çizelge 4.67. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi için 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan K_i değerleri ve inhibisyon tipleri.....	120
Çizelge 4.68. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine moksidektin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları	121
Çizelge 4.69. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine doramektin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları	122
Çizelge 4.70. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine abamektin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	123
Çizelge 4.71. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine eprinomektin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları	124
Çizelge 4.72. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi için 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan K_i değerleri ve inhibisyon tipleri	127
Çizelge 4.73. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine moksidektin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	128

Çizelge 4.74. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine doramektin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	129
Çizelge 4.75. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine abamektin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	130
Çizelge 4.76. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine eprinomectin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.	131
Çizelge 4.77. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi için 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan K_i değerleri ve inhibisyon tipleri.....	134
Çizelge 5.1. <i>p</i> -Nitrofenilasetatın <i>p</i> -nitrofenole dönüşüm reaksiyonu.....	137
Çizelge 5.2. Keçi karaciğer dokusu CA enzimi için elde edilen kinetik parametre sonuçları	147
Çizelge 5.3. Keçi böbrek dokusu CA enzimi için elde edilen kinetik parametre sonuçları.	148
Çizelge 5.4. Keçi karaciğer ve böbrek dokuları CA enzimi için elde edilen IC_{50} sonuçlarının karşılaştırılması.....	149
Çizelge 5.5. Keçi karaciğer dokusu CA enzimi için elde edilen K_i sonuçları	150
Çizelge 5.6. Keçi böbrek dokusu CA enzimi için elde edilen K_i sonuçları.....	151

1. GİRİŞ

Canlılığın sürdürülmesi için iki temel koşul, organizmanın kendini kopyalaması ve kimyasal reaksiyonları yüksek seçicilik/verimlilik ile biyolojik ortamda kataliz edebilmesidir. Yaşayan sistemler fonksiyonlarını gerçekleştirebilmek için çevrelerindeki enerjiyi kullanırlar. Örneğin birçok canlı yakıt maddesi olarak süktroz tüketir. Süktrozun oksijen varlığında CO_2 ve H_2O 'ya parçalanması serbest enerji oluşumuyla seyreden oldukça ekzergonik bir süreç olmakla beraber, süktroz yıllarca CO_2 ve H_2O 'ya parçalanmadan da depolanabilmektedir. Bu kimyasal süreç termodinamik olarak elverişli olduğu halde oldukça yavaş ilerler. Oysa insan ve diğer birçok organizmanın süktrozu ya da diğer karbonhidratları tüketmesiyle oluşan kimyasal enerji saniyeler içinde elde edilir. İşte bu farkı oluşturan katalizörlerin varlığıdır. Katalizörlerin yokluğunda ise kimyasal reaksiyonların gerçekleşme hızları yaşamla uygunluk göstermez. Biyolojik sistemlerde yer alan katalizörler “enzim” denilen özelleşmiş polimer bileşiklerdir (Gürdöl ve Ademoğlu 2014).

Biyokimya tarihinin büyük bir bölümü aslında enzim araştırmalarının tarihidir. Biyolojik kataliz ilk defa 1700'lerin sonlarında etin mide salgılarıyla sindirilmesi üzerine yapılan çalışmalarda fark edildi ve tanımlandı. Araştırmalar 1800'lerde tükürük ve değişik bitki özütleriyle nişastanın şekere dönüştürülmesi çalışmalarıyla devam etti. Louis Pasteur 1850'lerde maya tarafından şekerin alkole fermentasyonunun “fermentler” tarafından katalizlendiği sonucuna vardı. Louis Pasteur bu fermentlerin canlı maya hücrelerinin yapısından ayırlamayacağını kabul ediyordu. Daha sonra 1897'de Eduard Buchner maya özütlerinin şekeri alkole dönüştürdüğünü buldu. Bu gözlem fermentasyonun hücrelerden uzaklaştırıldıkları zaman bile işlevlerine devam eden moleküller tarafından gerçekleştirildiğini ispatladı. Bu olay biyokimya biliminde önemli konulardan biri olarak tarihteki yerini aldı. Daha sonra Frederick W. Kühne, Buchner tarafından keşfedilen bu moleküllere enzim adını verdi (Lehninger 2013).

Enzimler, canlı hücreler tarafından sentezlenen ve canlı organizmalardaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürün oluşmasına fırsat vermeden %100'lük ürün

verimi sağlayan biyolojik kataliz6rlerdir. Katalitik RNA molek6llerinin k6çük bir grubu hariç enzimler protein yapısındadır. Enzimler proteinlerin en b6y6k ve en 6zelleşmiş grubunu teşkil ederler (Keha ve K6frevioğlu 2012).

Enzimler, reaksiyonları diğer kataliz6rlerden çok daha hızlı bir şekilde y6r6tmektedirler. Bazı enzimlerin bir dakikada milyonlarca molek6l6 etkilediği bilinmektedir. Bu y6zden enzimlerin katalizleme g6leri turnover sayısı ile ifade edilir. Turnover sayısı, birim zamanda bir mol enzimin 6r6ne d6n6řt6rd6đ6 substratın mol sayısıdır. Karbonik anhidraz turnover sayısı 600.000 s^{-1} olan enzimdir. Turnover sayısı en y6ksek olan enzim $40.000.000\text{ s}^{-1}$ ile katalazdır (Keha ve K6frevioğlu 2012; Lehninger 2013).

Enzimlerin genel 6zellikleri şu şekilde açıklanabilir;

1. Enzimlerin b6y6k çoğunluğu protein yapısındadırlar.
2. Benzer t6r reaksiyonlar enzimler tarafından defalarca gerçekleştirilebilir.
3. Bir enzim daima tek çeşit veya aynı tip reaksiyonları katalizler.
4. Katalizledikleri reaksiyonların aktivasyon enerjisini azaltırlar.
5. Enzimler gerçekleşecek reaksiyonun çabuk dengeye gelmesini sağlarlar.
6. Enzimler canlı ortamda olduğu gibi cansız ortamda da g6rev alırlar.

Enzimler için 6nceleri genel bir tanıma uymayan, amigdalin, pityalin, zimaz gibi karışık bir isimlendirme kullanılmıştır. Daha sonra enzimler etkili oldukları subtratın sonuna – az eki getirilerek (6reaz, amilaz, arginaz, proteaz, lipaz) veya katalizledikleri tepkimeyi tanımlayan (laktat dehidrogenaz, adenilat siklaz) isimler kullanılarak adlandırılmışlardır (Onat 2006).

Uluslararası Biyokimya ve Molek6ler Biyoloji Birliğine (IUBMB) g6re enzim adlandırılmaları enzimin katalizlediği tepkimenin t6r6 ve mekanizmasına g6re yapılmaktadır. Tepkimeler ve bu tepkimeleri katalizleyen enzimler altı ana gruba ayrılmıştır. Her grubun d6rt ile on 6 arasında değişen alt sınıfları bulunmaktadır. Her

enzime dört sayı ile belirlenen bir kod numarası verilmiştir. Tepkimenin tipini 1. sayı, vericisinin etkilediği grubu 2. sayı, alıcı olarak yararlanılan grubu 3. sayı, ve adlandırılan enzimi 4. sayı belirlemektedir. EC (Enzim komisyonu). 2.7.1.1. örneğinde (2) transferaz türü tepkimeyi, (7) fosfat transferini, (1) fosfat alıcısının bir alkol olduğunu göstermektedir. (1) ise ATP molekülünden, glukozun 6. karbonundaki alkol grubuna fosfat transferi yapan enzimi, ATP: glukoz fosfotransferazı (heksokinaz) tanımlamaktadır (Keha ve Küfrevioğlu 2012).

Enzimler etki ettiği reaksiyon tiplerine ve reaksiyon mekanizmalarına göre sırasıyla şu şekilde sınıflandırılmıştır;

1. **Oksidoredüktazlar:** Yükseltgenme ve indirgenme (redoks) reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.
2. **Transferazlar:** İki substrat molekülü arasında hidrojen dışındaki 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 uzaklaştırıldığı ve yeni çift bağların oluşturulduğu reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir.
5. **İzomerazlar:** İzomer moleküllerini birbirine dönüştüren reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir.
6. **Ligazlar:** Enerjice zengin bir bağın kopması ile açığa çıkan enerji yardımıyla iki molekülün bağlanması reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.

Enzimler hem substratlarına hem de katalizledikleri reaksiyon tiplerine göre son derece spesifikler. Genel olarak bir enzim sadece bir kimyasal reaksiyonu veya aynı tip benzer reaksiyonları katalizler. Substratlara karşı spesifiklikleri oldukça yüksektir. Örneğin, proteolitik enzimler peptit bağlarının hidrolizini gerçekleştirirler. Bu enzimlerin substrat özgüllükleri birbirinden farklıdır. Tripsin sadece lisin veya arginin rezüdülerinin karboksil grubu tarafındaki peptit bağlarını parçalarken, kan

pıhtılaşmasında görev alan trombin ise karboksil bileşeni arginine ve amino bileşeni glisin amino asitine ait peptit bağı parçalamaktadır. Dolayısıyla trombinin substrat özgüllüğü yine bir proteolitik enzim olan tripsine göre daha fazladır. Ayrıca birçok enzimin stereospesifiklik özelliğinin var olduğu bilinmektedir. Bir kısım enzim substrat molekülünün D- formunu ürüne çevirirken, bir kısmı da Lformunu ürüne dönüştüren tepkimeyi katalizlemektedirler. Örneğin; glutamat dehidrogenaz enzimi L-glutamat ve laktat dehidrogenaz enzimi de L-laktat üzerinde etkilidirler (Lehninger 2013; Keha ve Küfrevioğlu 2012).

Aynı canlı türünde aynı reaksiyonu katalizleyen ancak farklı kimyasal ve fiziksel özellikleri olan enzimler de vardır. Bu tip enzimlere izoenzim denir. İzoenzimlerin substratlarına, kofaktörlerine ve inhibitörlerine karşı ilgileri farklıdır. İzoenzimlerin başlıca özellikleri arasında amino asit sayı ve sırasının farklı olması, izoelektrik noktalarının farklı olması, her bir izoenzimin farklı geninin olması ve elektroforetik hareketliliklerinin farklı olması sayılabilir. İzoenzimler farklı dokularda lokalize olabildiği gibi, bir hücrenin farklı subsellüler fraksiyonlarında da yerleşebilirler. İzoenzimlere örnek olarak karbonik anhidraz, laktat dehidrogenaz ve alkalen fosfataz verilebilir (Devlin 2002; Keha ve Küfrevioğlu 2012; Söyüt 2006).

Enzimlerin büyük bir kısmı protein yapısında olduğundan ortam şartlarının değişmesine karşı oldukça hassastırlar. Bu yüzden bir çözeltideki enzim varlığı, enzimin etki ettiği substrat molekülü veya reaksiyon sonucu oluşan ürün ya da enzimatik reaksiyona aracılık eden diğer parametreler üzerinden tespit edilmektedir. Enzimlerin aktivitesi üzerine etki eden faktörler; substrat konsantrasyonu, enzim konsantrasyonu, pH, sıcaklık, allosterik etkiler, iyonik şiddet, hormonlar, inhibitör veya aktivatörlerin varlığıdır. Her enzim için aktivitelerin maksimum olduğu pH değerleri vardır. Bu değerlerin üzerinde ve altında aktivite düşer. Bu pH derecesine “Optimum pH” denir. Örneğin, proteini parçalayan pepsin, midede pH'nın 2.0 olduğu asidik ortamda maksimum çalışır; bunun aksine pankreastan salgılanan ve yine protein sindiriminde rol alan tripsin, ancak pH 8.5'de optimum olarak çalışabilir. Bir enzimin optimum pH'sı normal hücre içi ortamı pH'sı ile aynı değildir. Bu durum hücre içindeki enzim

aktivitesinin kontrolünde pH-aktivite ilişkisinin önemini göstermektedir. Genelde bir kimyasal reaksiyonun hızı sıcaklıkla artış göstermektedir. Sıcaklık, enzimli reaksiyonların hızlarının artışına sebep olan önemli bir faktördür, yani tepkime hızının yükselmesi, sıcaklıkla doğru orantılıdır. Fakat belirli bir noktaya gelindiğinde ise enzim aktivitesinde bir düşüş gözlenir. Bu durum yüksek sıcaklıkta enzimin üç boyutlu yapısının etkilendiğini yani enzimin denatüre olduğunu göstermektedir. Bir enzim için 10 °C'lik sıcaklık değişiminin meydana getirdiği aktivite farklılığına Q_{10} değeri denilir (Keha ve Küfrevioğlu 2012; Küçük 2015).

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. İnhibitörler hem enzim etki mekanizmalarının hem de metabolik yolların aydınlatılmasında biyokimyacılar için önemli bir araçtır (Keha ve Küfrevioğlu 2012; Lehninger 2013).

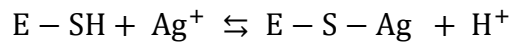
Enzimatik inhibisyon iki çeşittir;

- 1. Dönüşümsüz inhibisyon:** İnhibitör enzime ya kovalent olarak bağlanır ya da zor ayrılabilen bir kompleks oluşturur. Sinir uyarılarının iletilmesinde önemli bir rol oynayan asetil kolin esteraaz 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 (Keha ve Küfrevioğlu 2012).

2. Dönüşümlü İnhibisyon: Dönüşümlü inhibisyonda enzim ile inhibitörün etkileşmesi bir denge tepkimesi şeklindedir. Dönüşümlü inhibisyon 3'e ayrılır.

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 (Telefoncu 1986; Keha ve Küfrevioğlu 2012; Küçük 2015).

b. Yarışmasız (Nonkompetitif) İnhibisyon: Yarışmasız inhibisyonda; inhibitör ve substrat enzim molekülüne aynı anda bağlanabilir. Bu tür bağlanma enzimin farklı bölgelerine bağlı olduğundan substrat ile inhibitör arasında yarışma söz konusu değildir. Substrat konsantrasyonu artırılmakla inhibisyon 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 2012).



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

c. Yarı Yarışmalı (Unkompetitif) İnhibisyon: Bu inhibisyon türünde; inhibitör serbest haldeki enzime değil, 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 ortamdaki sürekli azalacağından, enzim ve substrattan ES kompleksinin oluşum dengesi daha fazla sağa kayar ve K_M değeri küçülür (Segel 1975; Telefoncu 1986).

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).

1.1. Karbonik anhidraz enziminin tarihçesi

Karbonik anhidraz (CA; E.C.4.2.1.1.) enzimi ilk kez 1933 yılında iki laboratuvar tarafından gerçekleştirilen çalışmaların sonucu olarak eritrositlerden karakterize edilmiştir. Bu çalışmalarda eritrositlerden bikarbonatın hızlı transferi için gerekli olduğu teorik olarak saptanan bir katalitik faktör araştırılmıştır. İki laboratuvar eş zamanlı olarak katalitik faktörü tanımlayan makale yayınlamışlardır. Cambridge Üniversitesindeki Dr. Roughton'un laboratuvarından tek bir enzimin ismini içeren hoş bir başlık ile bir makale hazırlanmış "Carbonic Anhydrase: Its Preparation and Properties", Philadelphia'dan Dr. Stadie'nin laboratuvarından ise daha az özlü bir başlıkla başka bir makale hazırlanmıştır "The Catalysis of the Hydration of Carbon Dioxide and Dehydration of Carbonic Acid by the Enzyme Isolated from Red Blood Cells". Cambridge makalesinin daha fazla atıf almasının nedeni belki de yeni keşfedilen enzimin kendinden emin ismi kadar bilimsel ve öz başlığından dolayı olabilir (Uygun 2012).

CA enzimi 1933 yılına kadar ilgi çekici bir enzim değildi. Bu enzim hakkındaki bunca yıllık büyük beklentilere karşılık araştırmacıların enzimi keşfi, tanımlaması ve bu katalitik

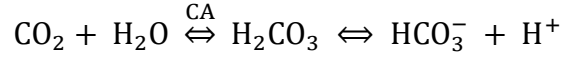
faktöre “karbonik anhidraz” isminin verilmesi sonucu bilim camiasında sadece küçük bir heyecan yaşatmıştı. Başlangıçta CA araştırmaları eritrositler ile ilgili olmuştur ve 1940’larda enzimin böbrekte keşfinden sonra ilgi ürenin asidifikasyonuna ve böbreğe kaymıştır. Bu arada ikinci dünya savaşının patlak vermesi ile Sör Hans Krebs Freiburg-im-Breisgau’daki laboratuvarından ayrılıp İngiltere’ye yerleşmiş ve İngilizce olarak CA inhibitörleri ve onun sülfonamid türevleri hakkında makaleler yazmıştır. Aynı zamanda ornitin hücre içi döngüsü ile üre sentezini de rapor etmiştir. Bundan sonra daha çok biyolojik döngüler keşfedilmiş ve araştırmalar bu yönde yoğunlaştırılmış ve gerçek enzim gibi hareket eden kofaktör ve efektörlü enzimler üzerinde durulmuştur. CA, bir fizyoloji ders kitabında gaz transportu üzerine yazılmış bölümde sadece bir paragraf içerisinde geçmiştir. Bu sırada, sülfonamid CA inhibitörleri geliştirilmiştir, bazıları spesifik CA inhibitörü olarak keşfedilmiş ve yüksek derişimlerde hayvan ve organ preparatlarına uygulanmıştır.

İlk CA derlemesi 1935 yılında birçok vücut organında CA aktivitesinin varlığı veya yokluğunun tanımlanması ile yayınlanmıştır. Dr. Roughton kesin olarak kaslarda CA aktivitesinin olduğunu ve karaciğerde ise olmadığını belirtmiştir. Ayrıca kastaki aktivitenin zararlı olduğunu ifade etmiş ve bunun olası sebebinin de CA’nın eritrositler gibi vücudun her yerinde aynı fizyolojik fonksiyona sahip olduğunu göstermiştir. 1935’den beri, çeşitli CA izoenzimleri kas ve karaciğerde bulunmuş ve insan vücudunda en azından onaltı farklı CA izoenziminin bulunduğu ifade edilmiştir (Tashian and Hewett-Emmett 1984).

1.2. Karbonik anhidraz enzimi

Karbonik anhidraz (CA, E.C.4.2.1.1) bütün organizmalarda bulunan ve Zn^{2+} iyonu ihtiva eden bir metaloenzimdir. İlk defa sığır eritrositlerinden keşfedilen karbonik anhidraz canlılarda HCO_3^- ’ın dehidratasyonu ve CO_2 ’in hidratasyon reaksiyonlarını tersinir olarak katalizleyen bir enzimdir. 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 (Küçük 2015; Gülçin *et al.* 2016).



CA tükrük bezleri, böbrek, beyin, göz merceği, pankreas, uterus ve prostatta aktiviteye sahiptir. Ayrıca bu enzim yumurta kabuğu yapımında, bazı böcek ve bakterilerde, balıkların solungaç salgı organlarında ve bitkilerin fotosentetik kloroplastlarında önemli rol oynamaktadır. Enzimin memelilerdeki molekül kütlesi 30 kDa civarında olduğu tespit edilmiştir. Karbonik anhidraz sitoplazmada çözünmüş halde veya hücre membranına bağlı olarak bulunur (Çağlayan 2013).

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 (Jabusch and Deutsch 1989; Küçük 2015).

Çizelge 1.1. Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyon türleri (Küçük 2015)

1.	$\text{O}=\text{C}=\text{O} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$
2.	$\text{O}=\text{C}=\text{NH} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_2\text{NCOOH}$
3.	$\text{HN}=\text{C}=\text{NH} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_2\text{NCONH}_2$
4.	$\text{RCHO} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{RCH(OH)}_2$
5.	$\text{RCOOAr} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{RCOOH} + \text{ArOH}$
6.	$\text{RSO}_3\text{Ar} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{RSO}_3\text{H} + \text{ArOH}$
7.	$\text{ArOPO}_3^{2-} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HPO}_3^{2-} + \text{ArOH}$
8.	$\text{ArF} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HF} + \text{ArOH}$ (Ar: 2,4dinitrofenil)
9.	$\text{PHCH}_2\text{OCOCl} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{PHCH}_2\text{OH} + \text{CO}_2 + \text{HCl}$
10.	$\text{RSO}_2\text{Cl} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{RSO}_3\text{H} + \text{HCl}$ (R: Me; Ph)

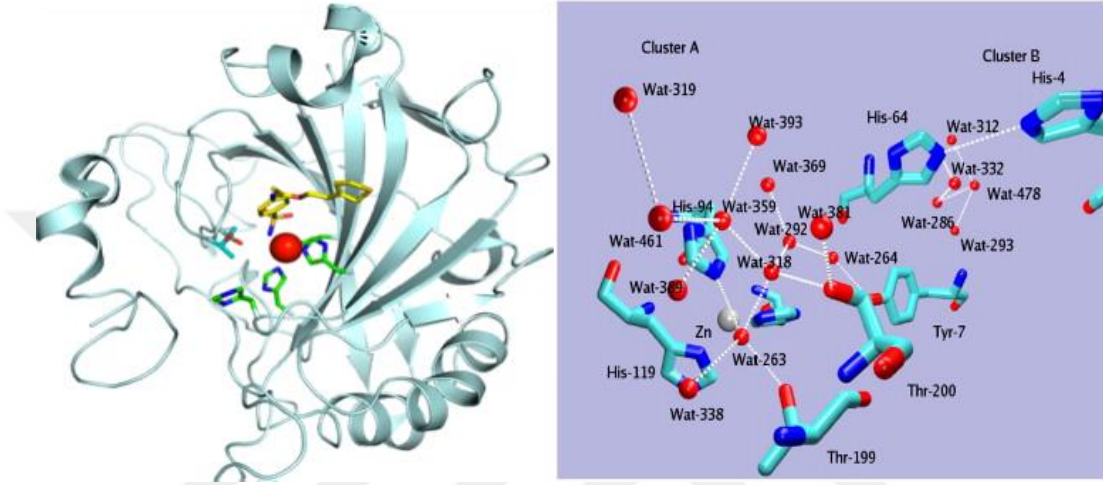
CA izoenzimleri α -, β -, γ -, δ -, ζ -, n- ve θ -CAs olmak üzere bağımsız yedi farklı gen ailesi tarafından kodlanır. Bu gen aileleri aminoasit dizilişleri açısından önemli sayılabilecek bir benzerlik göstermemektedir. Bunlar, omurgalılar, bakteriler, algler ve sitoplazmalı yeşil bitkilerde bulunan α -CA'lar, çoğunlukla bakteriler, algler ile tek ve iki kotiledon'lu bitkilerin kloroplastlarında bulunan β -CA'lar başlıca archaea ve bazı bakterilerde bulunan γ -CA'lar, bazı deniz diatomlarında bulunan δ -CA'lardır. Memelilerde, değişik katalitik aktiviteleri, hücre içi yerleşim ve organ üretim şekilleri olan α -CA izoenzimlerinden Zn^{+2} iyonu taşıyanlar dikkate alınmalıdır (Maren 1997; Küçük 2015; Taslimi *et al.* 2017).

Aynı canlı türünde aynı reaksiyonu katalizleyen ancak farklı kimyasal ve fiziksel özellikleri olan enzimlere izoenzim veya izozim denir. Memelilerde farklı doku dağılımları gösteren α -CA gen ailesine bağlı 16 farklı CA izoenzimi ve CA bağlantılı protein (CARP) tanımlanmıştır. Bunların beş tanesi sitoplazmik (CA I, II, III, VII ve XIII), iki tanesi mitokondriyal (CA VA, VB), bir tanesi salgısal (CA VI), dört tanesi membrana bağlı (CA IV, IX, XII ve XIV), üç tanesi nonkatalitiktir (VIII, X, XI) (Kılınç 2011). CA-XV'in ise katalitik aktivitesinin düşük olduğu ve CA-IV ile benzer özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir. CA VIII, IX ve XII izoenzimlerinin tümörojen olduğu belirlenmiştir (Nishimori 2004; Hilvo *et al.* 2005).

Üç boyutlu yapılardan ilki α -CA olup, insan CA I ve II izoenziminin kristal yapısı ile sığır CA III, yassı formlu bir sıçan CA V'i ve *E. Coli*'de bulunan CA formu bu yapıdaki enzim tipidir. Molekülün geri kalan kısmına zayıfça bağlanan amino terminal bölgesinin dışında, α -CA bir bölge proteini olarak düşünülebilir. Yapının ikinci bölgesi on iplikçik ve molekülü iki eşit parçaya bölen sarılmış bir β şeridinden oluşmuştur. Paralel iplikçiklerin iki parçası dışında, diğer β şeritleri anti paralel olarak uzanmışlardır. Diğerlerine nispetle daha kısa olan heliksler, molekülün yüzeyine yerleşmişlerdir (Kılınç 2011).

Enziminin aktif bölgesi oyuk şeklindedir ve geniş bir alana yerleşmiştir. Koni biçimindeki bu oyuk hemen hemen molekülün merkezine kadar uzanır. Zn^{2+} iyonu bu

oyuğun alt kısmına bitişik bir durumdadır. Dört ligant gibi H_2O ve OH^- ile bir tetrahedral geometride His-94, His-96 ve His-119'daki üç azot atomu ile koordine edilmiştir. Ligantlar protein formundaki bir indirekt ligandın H bağı ile diğer guruplara bağlanmasıyla oluşurlar (Aslan 2013; Çağlayan 2013).



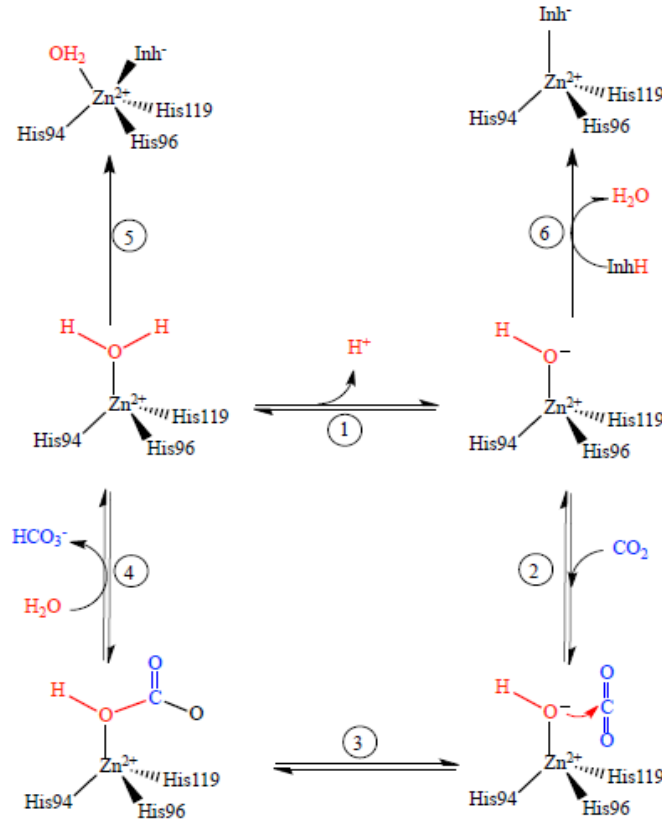
Şekil.1.1. Karbonik anhidraz II izoenzimi modeli ve katalitik bölgesi

Şekil.1.1.'de görüldüğü gibi merkezde koordine edilmiş Zn^{2+} iyonu kırmızı küre ile gösterilmiştir. Aktif bölgede gösterilen His ve Thr rezidüleri çubuk modelleri ile gösterilmiştir.

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 etkileşimleri sonucu tutunmaktadır. Bu etkileşimler, 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 çözeltiye geçer. Bunun sonucunda Zn^{2+} iyonuna su

molekölü bağlanır ve bu da enzimin asit formuna dönüşmesini sağlar (Stams *et al.* 1998; Kucuk and Gulcin 2016).

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 'e saldırabilecek güçlü bir nükleofildir. CA enzimi çinko iyonuna bağlanma bölgesine yakın CO_2 için bağlanma bölgesi olarak rol alacak hidrofobik alana sahiptir (Topal and Gülçin 2014). Bunun için Şekil 1.2'deki mekanizma önerilmiştir.



Şekil 1.2. Karbonik anhidraz enziminin CO_2 -hidratasyon reaksiyonunu kataliz mekanizmasının şematik olarak gösterilişi (Topal and Gülçin 2014)

Bu tepkime mekanizması 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^-) iyonu CO_2 'e saldırarak onu HCO_3^- 'a çevirir.
3. Katalitik bölge HCO_3^- '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 yerleşmesini sağlayarak geçiş halini uyarır (Berg *et al.* 2014; Küçük 2015).

CA 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, 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; Akbaba *et al.* 2014; Huyut *et al.* 2017). CA 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 CA 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. 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 (Küçük 2015).

1.3. Çalışmada kullanılan ağır metaller

Yoğunluğu $4,5 \text{ g/cm}^3$ 'den büyük olan metaller “ağır metal” olarak adlandırılır. Bakır (Cu), kobalt (Co), demir (Fe), mangan (Mn), molibden (Mo), çinko (Zn) ve nikel (Ni) gibi ağır metaller canlılar için elzem oldukları halde yüksek konsantrasyonlarda toksiktirler. Bununla birlikte, kadmiyum (Cd), krom (Cr), civa (Hg) ve kurşun (Pb) gibi ağır metaller canlılar için gerekli olmayıp eser miktarları bile toksik etki gösterebilir (Leblebici 2010).

Bazı enzimlerin yapısında Cu^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} ve Mo^{2+} gibi ağır metal iyonları az miktarda bulunmaktadır. Ağır metaller, proteinlerde sistenin sülfidril (-SH), tirozinin hidroksil (-OH), histidinin imidazol, aspartik ve glutamik asitlerin karboksilat (-COOH) gibi fonksiyonel gruplarına etki ederek proteinlerin yapısını değiştirebilmektedirler. Özellikle enzimlerin aktif merkezlerinde yer alan sisten amino asitleriyle ağır metal iyonları birleşerek merkaptan bileşikleri oluşturmak suretiyle enzim aktivitesinde kaybolma gözlenmektedir (Küçük 2015).

Ağır metallerin toksikolojik etkileri genellikle enzim inhibisyonu ve denatürasyonuna yol açar (Gulcin *et al.* 2005; Ekinci and Beydemir 2010). Yapılan bazı araştırmalarda ağır metal bileşiklerinin CA enzimi üzerinde inhibisyon etki gösterdikleri bulunmuştur (Lindskog 1997; Schcer and Dietsch 1984; Arslan *et al.* 1996).

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. Meydana gelen bu kirlilikte metal ve metal bileşikleri önemli etkenler arasında yer almaktadır. Karasal ortamlarda ortaya çıkan atıklar, çeşitli yollarla sucul alanlara taşınmaktadırlar. Ortama bırakılan bu atıklar zamanla çürüyüp çevrede birikmekle birlikte teknolojinin yoğun olarak ürettiği kalıcı toksik maddeler ve ağır metaller de çevrede her geçen gün biraz daha artış göstermektedir (Küçük 2015).

Bakır (Cu): Doğada geniş bir yayılım alanına sahip olan bakır günümüzde elektrik, makine ve otomotiv sanayisinin yanı sıra çeşitli alaşımlarda, dekoratif kaplama, bazı süs eşyaları ve altın alaşımlarında kullanılmaktadır (Leblebici 2010). Bakır, önemli fonksiyonları olan elementlerden birisidir. Vücutta demir ve çinkodan sonra en fazla bulunan iz elementtir. İnsan ve hayvanlarda kırmızı kan hücrelerinin ve birçok oksidasyon ve redüksiyon prosesinin vazgeçilmez bir parçasıdır. Eser miktardaki bakır organizma için birçok yönden gereklidir. Öncelikle bu element birçok önemli enzimin kofaktörü olarak görev yapar. Bu sayede kan, damar ve kemiklerin yapımında önemli bir rol üstlenir. Bakır yetersizliği sonucu kan damarlarında ve kemiklerde incelmeler görülebilir (Temel 2014). Dokulardaki bakırın çok düşük konsantrasyonları anemiye, çok yüksek konsantrasyonları karaciğer hasarına yol açmaktadır. Bakır metabolizmasının düzenlenmesinde etkili organ karaciğerdir ve karaciğerde depolanmaktadır (Akhan 2014). Vücuda gereğinden fazla alınan bakır Wilson hastalığına sebep olmaktadır. Bu hastalığın belirtileri arasında, sinir sistemi bozukluğu, karaciğer sirozu, gözlerde renk halkası oluşumları sayılabilir. İnce bağırsakta bakır absorpsiyonu karaciğer, böbrekler ve beyinde birikim yaparak vücutta birtakım bozukluklara neden olmaktadır (Leblebici 2010; Pal 2014).

Kobalt (Co): Yer kabuğunun sadece % 0,001'ini oluşturmaktadır. Yerkabuğunda, doğal sularda, okyanus tabanlarında, toprakta, bitkilerde ve hayvanlarda az miktarda kobalt elementine rastlanır (Küçük 2015). B₁₂ vitaminin bileşeni olan kobalt; günlük besin ihtiyacımızda çok az bir yer teşkil etse de, kırmızı kan hücrelerinin üretimi ve sinir düzenlenmesinde rol alır. Kobalt en çok jet motor türbinlerinde, malzemelere manyetik özelliği kazandırma, korozyondan korunma ve mekanik özelliklerin iyileştirilmesi, yüksek hız çeliklerinde, elmas takımlarında ve kesici uçlarda alaşım elementi olarak kullanılır (Bartacek et al. 2008; Leblebici 2010). Vücudun günlük ihtiyacı 0,1-1,0 mg'dır. Diyetle alınan kobalt bağırsak mikroflorası tarafından kobalamin sentezinde kullanılabilir. Kobalt eksikliği, bilinç kaybı, kilo kaybı ve anemi gibi rahatsızlıklara neden olabilir (Keser 2007). Suda çözünürlüğü olmayan kobalt oksit (Co₃O₄) solunum yoluyla alındığında vücut tarafından çok iyi emilerek bir kaç günde içerisinde çözünerek kana karışmaktadır. Uzun süre kobalt tozuna maruz kalındığında,

alerjik tepkiler ve kronik bronşit oluşmaktadır. Ayrıca kandaki O₂ miktarını azaltarak kalp damarlarını etkilemektedir (Leblebici 2010).

Kurşun (Pb): Periyodik cetvelin 4A grubunun en metalik elementidir. Doğada daha çok galen adlı kurşun sülfür formunda veya demir, bakır, çinko, antimon ve gümüş metalleriyle birleşik oluşturarak bulunur (Akhan 2014). Kurşun tadı ve kokusu olmayan mavi ve gri karışımı renkli bir metaldir (Temel 2014). Saf kurşun genelde levha, yapı kaplama, tel ve kablo imalatında kullanılırken, kurşun dioksit; patlayıcı fitili yapımında, kurşun klorür; boya imalatında, kurşun tetraetil ve kurşun tetrametil; motorlarda patlama önleyici olması nedeniyle benzine katılan başlıca bileşiklerdir (Dündar ve Aslan 2005). Kurşun, çevresel ve biyolojik sistemlerin hemen hemen her aşamasında bulunan çevresel ve endüstriyel bir kirleticidir. 20. yüzyılda kullanılan kurşun miktarı, tüm önceki dönemlerde tüketilen toplam miktarının çok üzerindedir. Bu ağır metalin kullanımı başta hava kirliliği olmak üzere toprak ve su kaynaklarının kirliliğine neden olmuştur (Hsu ve Guo 2002). Çeşitli kontaminasyon yollarıyla besinlere bulaşan kurşun oral yolla alındığında, kronik kurşun zehirlenmelerine ve sindirim sistemi iltihabına neden olur. Toz ve buhar şeklinde solunmasıyla birlikte, kolayca absorbe olup kana geçebilir. Kan kurşun düzeyi için normal sınır 90-400 µg/dL aralığıdır. Diğer taraftan plazma kurşun miktarının 40-80 µg/dL'ye ulaşması halinde protoporfirin metabolizması ve oksidasyon redüksiyon reaksiyonları baskılandığından dolayı, kandaki kurşun miktarının 40 µg/dL'yi geçmesi istenilen bir durum değildir (Akhan 2014). Kana geçen kurşun partiküllerinin büyük çoğunluğu kırmızı kan hücrelerine (%80-90) ve az bir kısmı ise plazma proteinlerine bağlanır. Organizmaya çeşitli yollarla giren kurşun karaciğer, dalak, kemik iliği, böbrekler, kas ve deri gibi organ ve dokularda birikmeye neden olur (Heidarian and Rafieian 2013; Temel 2014). Ayrıca merkezi ve periferik sinir sistemleri, hemopoietik sistem, kardiyovasküler sistem, erkek ve dişi üreme sistemleri dahil olmak üzere laboratuvar hayvanları ve insanlarda geniş bir fizyolojik, biyokimyasal ve davranışsal bozukluklara neden olduğu bildirilmiştir (Hsu ve Guo 2002; Gidlow 2015). Kurşun önemli bir enzim inhibitörüdür. Hipokrom anemi, depresyon, hafıza kaybı, perifer ve merkezi sinir sisteminde fonksiyon bozukluklarına, görme bozukluğu ve böbrek rahatsızlıklarına neden olmaktadır (Akhan 2014). Kurşun

zehirlenmeleri genelde hiçbir belirti göstermeden de sessizce seyredebilir. Çoğu kez tanı konulamaz ve tedaviden yoksun kalınır. Bu nedenle başta anemi olmak üzere, konvülziyon, mental gecikme, belirgin davranış bozuklukları, karın ağrısı gibi semptomlar görüldüğü zaman kurşun zehirlenmesi akla gelmelidir (Yapıcı *et al.* 2002).

Civa (Hg): Yaygın kullanım alanlarına sahip olmasına rağmen, çevresel ve endüstriyel bir kirletici bir ajan olarak bilinmektedir (Borouhaki *et al.* 2014). Termometre, barometre, pestisit, batarya üretimi, elektrik ekipmanları, klor üretimi, diş amalgamı, parazitik enfeksiyon, depresyon tedavileri ve kozmetik alanı başta olmak üzere birçok kullanım alanlarına sahiptir (Goldman and Shannon 2001). Dolayısıyla civa ve inorganic civa bileşikleri başta insan olmak üzere birçok hayvan türleri ve deniz canlılarına zarar vererek toksit etkiye neden olmaktadır (El-Shenawy and Hassan 2008). İnorganik civa bileşikleri, başta protein, sistein ve indirgenmiş glutatyon gibi endojenik biyomoleküllerin sülfhidril (-SH) gruplarına afinitesi yüksektir. Süperoksit anyon ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerini tetikleyerek başta karaciğer olmak üzere böbrek, testis, akciğer ve beyin gibi organlarda hasara neden olduğu bildirilmiştir (Agarwal and Behari 2007). Ayrıca Alzheimer, Parkinson, otizm, amiyotropik lateral skleroz (ALS) ve romatoid artrit gibi birçok kronik nörodejeneratif hastalıklar da civa kaynaklı olmaktadır (Zahir *et al.* 2005).

Demir (Fe): Vücutta birçok önemli fonksiyona sahip olan temel elementlerden biridir. Kanda oksijeni taşıyan kırmızı kan hücrelerinin ve çeşitli enzimlerin üretimi için gereklidir. Bitkiler demiri topraktan insan ve hayvanlar ise bitkilerden alır. Günlük ihtiyaç 8-10 mg kadardır. Demir organizmada hemoglobin, miyoglobin ve solunum enzimlerinde bulunur (Temel 2014). Demir, hemoglobin yapımı sayesinde dokulara oksijen transportunda görev alır. Miyoglobin yapısında bulunarak iskelet sistemindeki çizgili kasların ve kalbin çalışması için oksijen taşır. Enerji üretimi ve protein metabolizmasına etkili enzimler olan katalaz ve peroksidaz için demir önemli bir kofaktör olarak rol oynar. Kolaylıkla elektron alıp verebilme yeteneği ile ferrik (Fe^{2+}) ve ferröz (Fe^{3+}) formları arasında değişim gösterir. Bu fonksiyonu onu sitokrom, oksijen bağlayan moleküller hemoglobin, miyoglobin ve birçok enzimin komponenti haline getirir (Küçük 2015).

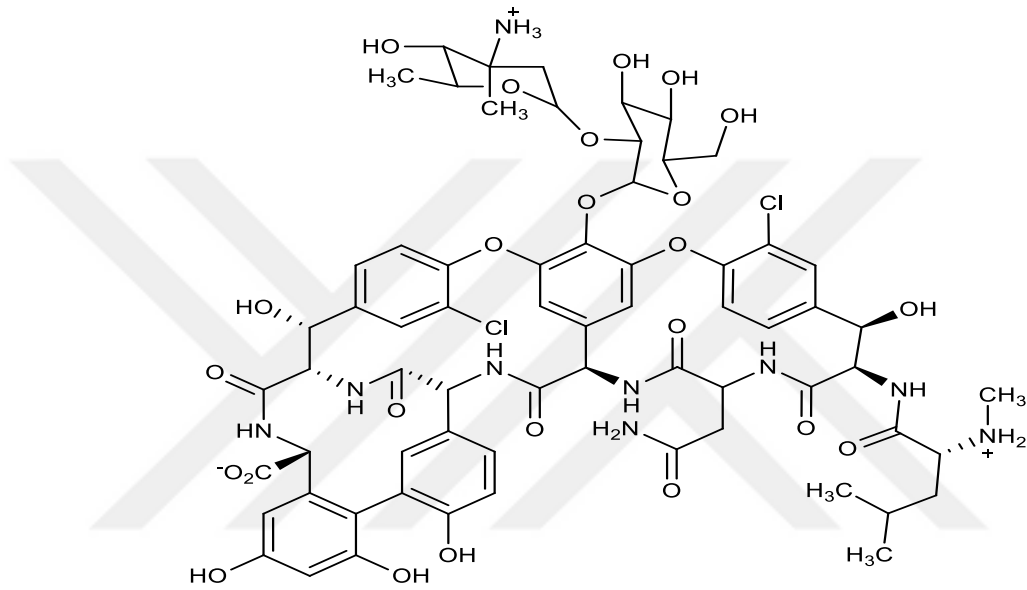
Demir tuzları doğrudan toksik etkiyle gastrointestinal sistemde kusma, diyare, karın ağrısı ve önemli miktarda kan kaybına neden olur. Hepatotoksik olduğu bilinen yüksek doz demir; kalp, böbrek, akciğerler ve hematolojik sistemi olumsuz etkileyebilir. Alınan elementer demir düzeyinin 20 mg/kg'ın üzerinde olması demir zehirlenmesini düşündürür. 40 mg/kg'ın üzerindeki değerler ciddi demir zehirlenmesine neden olurken, 60 mg/kg'ı aşan değerlerde ölüm görülebilir (Erdoğan *et al.* 2013).

Gümüş (Ag): Gümüş, periyodik tabloda simgesi Ag olan, beyaz, parlak, değerli bir metalik elementtir. Gümüş, ışığı çok iyi yansıtan, dövülebilen, esnek bir metaldir. Atmosferde oksitlenmeye karşı büyük bir direnç gösterir. Bakırdan daha zor, altından ise daha kolay oksitlenir. Asitlere ve bazı organik maddelere karşı dayanıklıdır. Fakat nitrik asit ve derişik sıcak sülfürik asitte kolayca eritilir (Altuner 2013). Gümüşün bakteri hücre duvarına ve hücre zarına bağlandığı, tiyol grupları ile etkileşerek solunum enzimlerini inhibe ederek mikroorganizmaların ölümüne yol açtığı bilinmektedir. Yapılan bazı çalışmalarda nano gümüş partiküllerinin memelilerde beyin, karaciğer ve üreme hücrelerinde hasarlar meydana getirdiği belirtilmiştir. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi 1999 yılında, mikro ya da nano partiküller içeren koloidal gümüş çözeltilerinin kullanımının nörolojik problemlere, baş ağrısına, cilt irritasyonuna, halsizliğe, mide rahatsızlıklarına ve böbrek rahatsızlıklarına yol açabileceği konusunda bazı uyarılar yapmıştır (Can and Körlü 2011).

1.4. Çalışmada kullanılan antibiyotikler

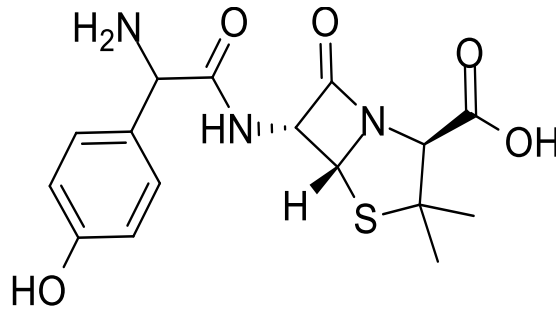
Vankomisin: Molekül ağırlığı 1449,3 g/mol olan trisiklik glikopeptid antibiyotik grubundandır. Gram pozitif bakterilerin hücre duvarı sentezinde yer alan D-alanil D-alanin içeren peptidlerle kompleksler oluşturarak peptidoglikan sentezini inhibe ederler. Vankomisin ayrıca protoplast hasarı oluşturarak RNA sentezi üzerine de etkili olur (Altunova 2016). Vankomisin, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ve metisiline dirençli koagülaz negatif stafilokoklarla oluşan ciddi enfeksiyonların seçkin ilacıdır. Endokardit gibi ciddi enfeksiyonlarda beta laktam allerjisi varsa tedavide seçilecek ajandır. Oral yoldan alındığında emilmez ve damar içi uygulamalarda da

sindirim yoluna hemen hiç ulaşmaz. Kas içi uygulamaları çok ağırlıdır. Bu yüzden damar içi infüzyon ile yavaş bir şekilde uygulanır. Steril distile suda çözüldükten sonra 100-250 ml %5 dekstroz ya da serum fizyolojik içinde 60 dakikadan az olmayacak sürede uygulanmalıdır. Albümine %10-55 oranında bağlanır. Yarılanma ömrü ($t_{1/2}$) 6-8 saattir. Neredeyse tamamı böbreklerden atılır (Lama 2010).



Şekil 1.3. Vankomisin antibiyotiğinin açık yapısı

Amoksisilin: Kirlı beyaz renkte, hafif aromatik kokulu, tadı acı olan kristal tozdu. Kimyasal formülü $C_{16}H_{19}N_3O_5$ olup, molekül ağırlığı 365,4 g/mol'dür. İlaçlarda amoksisilin trihidrat olarak kullanılır. Suda ve alkolde az çözünür. Kloroform veya eterde çözünmez. Mide asidine karşı dayanıklıdır (Koyuncu 2012). Gram pozitif ve gram negatif mikroorganizmalara karşı etkili bir penisilin olup, bakterisid etkiye sahip geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. Bakterilerin hücre duvarı sentezini inhibe eder. Ampisilin analogu olarak bilinir. Absorbe edilen dozun yaklaşık %50-70'i değişmeden böbreklerden atılır. Kalan kısmının büyük bir bölümü ise karaciğerden elimine edilir. Amoksisilinin yarılanma ömrü 1 saat kadardır (Kayaalp 2002).



Şekil 1.4. Amoksisilin antibiyotiğinin açık yapısı

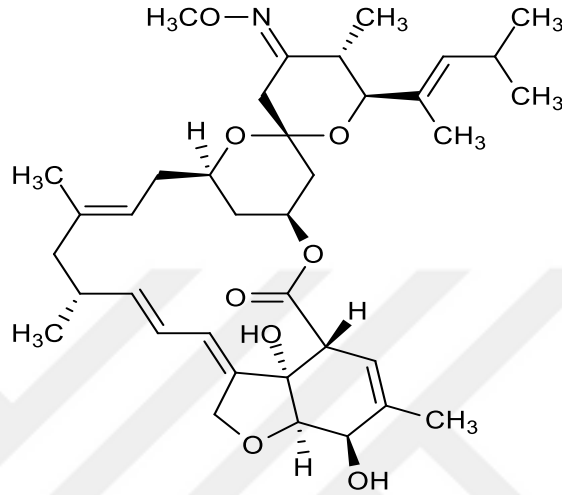
1.5. Çalışmada kullanılan avermektinler

Makrolid endektositleri; keneler, akarlar, bitler ve pireler gibi artropodlar ve bağırsak solucanları, akciğer solucanları, kalp solucanları, yuvarlak solucanlar gibi iç ve dış memeli parazitlerine karşı etki gösteren aktif hayvan ilaçlarıdır (Durden 2007; Shoop *et al.* 1995). Bu ilaçlar çok yüksek etkilere sahip olduğundan dolayı hayvanların tedavisi için uygundur. Bu makrosiklik lakton bileşiklerinin alt gruplarından biri avermektinlerdir.

Antiparazitik ilaçlar ve zirai mücadele ilaçları olarak bilinen avermektinler, nörotoksik makrosiklik lakton bileşiklerinin bir sınıfıdır (Valenzuela *et al.* 2000). Avermektinler genelde böcek ve akarlar karşı çiftlik hayvanlarını ve bazı tarım ürünlerinin korunmasında yaygın olarak kullanılır. Avermektinlerin etki mekanizması eklembacaklıların kasları ve sinirlerinde oluşan glutamatla aktive olan klorür kanallarının inhibisyonu ile gerçekleşir. Ayrıca sinir ve büyüme sistemleri için toksik etkilere sahiptir. Gıda ve tarım ürünlerinde kalıntı bıraktığından dolayı çevreye ve insanlara verdikleri zararlar konusundaki endişeler artmaktadır (Kose *et al.* 2016). Moksidektin, doramektin, eprinomektin ve abamektin gibi bazı avermektinler en önemli olanlarındandır.

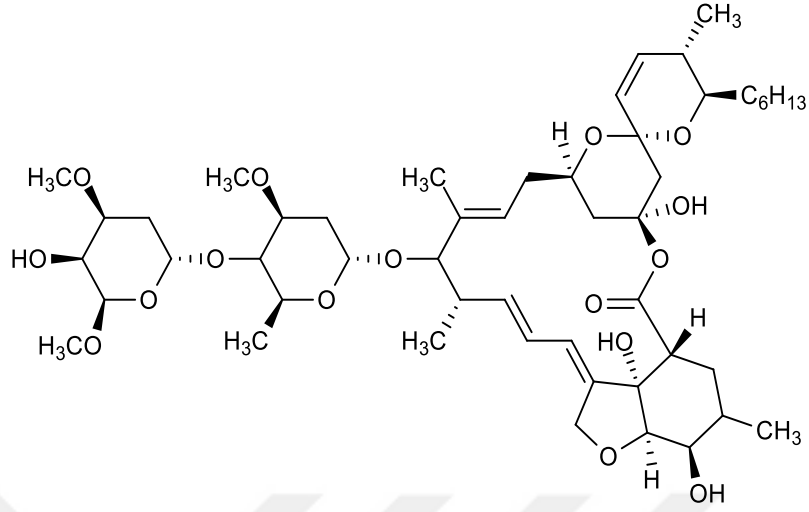
Moksidektin : İlk defa 1990 yılında Arjantin’de piyasaya sürülen milbesin grubu bir bileşiktir (Karademir 2005). İnsan onkoserkiazis’inin (nehir hastalığı) yok edilmesi ve kemoterapinin önlenmesi için ivermektine alternatif olan veteriner antihelmint bir ilaçtır

(Kose *et al.* 2016). Bilhassa inek ve koyun gibi çiftlik hayvanlarında çeşitli nematod ve eklem bacaklı parazitlere karşı çok düşük dozlarda bile (0.2 mg/kg) etki gösterebilir (Alvinerie *et al.* 1995; Prichard *et al.* 2012).



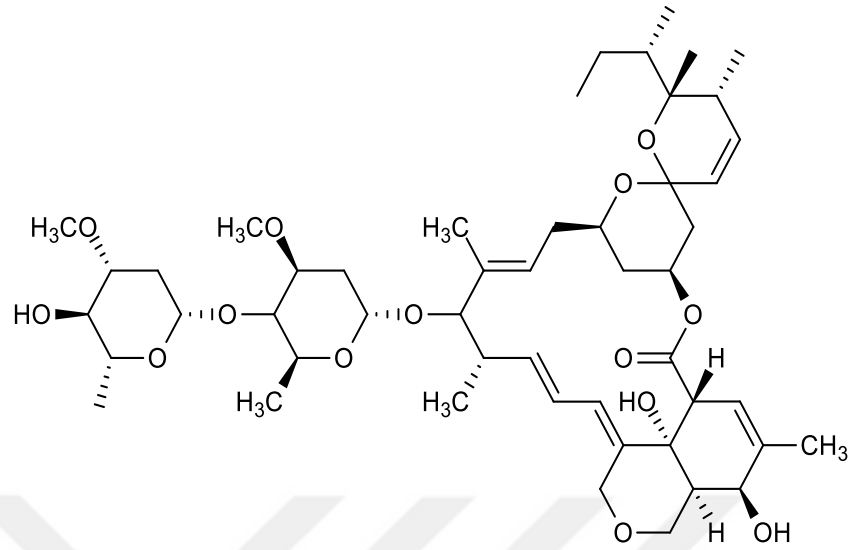
Şekil 1.5. Moxidectin molekülünün açık yapısı

Doramektin: Nematodlara ve eklem bacaklılara karşı etkili ve geniş spektrumlu bir antiparazitik endektosittir (Goudie *et al.* 1993). İlk defa 1993 yılında Brezilya ve Güney Afrika’da lisanslı olarak kullanılmaya başlanmıştır (Karademir 2005). Doramektin avermektin grubuna ait olup, yüksek bir antiparazitik aktiviteye sahiptir. Bu bileşik, çiftlik hayvanlarında endo ve ekzoparazitleri kontrol etmek için dünya çapında yaygın şekilde kullanılmaktadır (Maia *et al.* 2013; Kose *et al.* 2016).



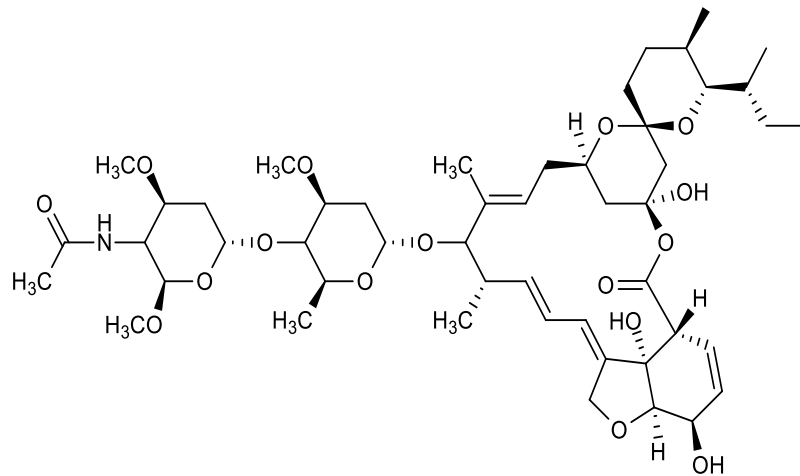
Şekil 1.6. Doramektin molekülünün açık yapısı

Abamektin: Büyük halkalı lakton disakarit bileşiğinin bir türüdür ve toprakta yaşayan aktinomycete *S. avermitilis*'in doğal fermentasyon ürünüdür (Roth *et al.* 1993; Luo *et al.* 2013). İlk defa 1985 yılında Avusturalya'da hayvan endektositi olarak kullanılmaya başlanılan abamektin, bitki insekt ve akarlar karşı kullanılan etkili bir ilaçtır (Karademir 2005). İvermektin, abamektinin cis hidrojene ürünüdür (Kose *et al.* 2016). Abamektin oldukça lipofilik bir bileşiktir, hem biyosid olarak hem de anthelmint bir ilaç olarak kullanılır. Abamektinin toksikolojik mekanizmasının g-aminobütirik asit (GABA) sistemini ve hayvan hücrelerinin klorür kanallarını etkilediği düşünülmektedir (Maioli *et al.* 2013).



Şekil 1.7. Abamektin molekülünün açık yapısı

Eprinomectin: 1990'ların sonlarında yeni bir avermektin olarak piyasaya sürülmüş antihelmintik bileşiklerinin avermektin sınıfının bir başka üyesidir (Chartier *et al.* 2001). Bilhassa sığırlarda deri üzerine dökme yöntemiyle kullanılmaktadır. Geniş spektrum aktivitesine ek olarak, laktasyondaki ineklerde süte düşük eliminasyon sergilemektedir (Kose *et al.* 2016). Süt hayvanlarında süte karışma oranı çok düşük olduğundan dolayı, parazitleri kontrol etmek için yoğun bir şekilde kullanılmıştır, bu yüzden laktasyon dönemindeki sığırlarda güvenle kullanılabilir (Rolim *et al.* 2015).



Şekil 1.8. Eprinomectin molekülünün açık yapısı

1.6. Çalışmanın amacı

Bu çalışmanın amacı keçi karaciğer ve böbrek dokularında bulunan karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması ve karakteristik özelliklerinin belirlenmesidir. Ayrıca bazı ağır metallerin, antibiyotiklerin ve avermektinlerin saflaştırılacak CA enzimi üzerine inhibisyon etkilerini *in vitro* olarak araştırmaktır.

Son yıllarda hızlı nüfus artışı, endüstrileşme, madencilik, tarımsal aktiviteler, sanayi kuruluşlarının yoğunlaşması sonucu hava, toprak ve suya bulaşan ağır metaller maruziyet giderek artmaktadır. Dolayısıyla keçi gibi küçük baş hayvanların toprakta yetişen bitkilerle beslenmesi ya da ağır metallerin bulaştığı su kaynaklarını içmeleri neticesinde dokuda metal birikimi artmaktadır. Ayrıca bu çalışmada bazı antibiyotiklerin ve antiparaziter ilaç olarak kullanılan avermektinlerin keçi CA enzimi üzerindeki inhibisyon etkileri araştırılmıştır. Bu yüzden çeşitli kan parametrelerini, enzim aktivitelerini, büyüme ve gelişmeyi olumsuz etkiledikleri bilinmektedir. Bu çalışmada bazı ağır metal iyonlarının, hayvan sağlığında tedavi amacıyla kullanılan bazı antibiyotiklerin ve avermektinlerin hayvan dokusunda birikmesi sonucu et ve süt kalitesini olumsuz etkilemektedir. Bu nedenle hayvancılıkta geçim kaynağı olan keçi gibi küçük baş hayvan dokusundaki karbonik anhidraz enzimine etkileri tespit edilerek ileriye dönük tedbirlerin alınmasına ve yapılacak çalışmalara katkı sağlanacağı düşünülmektedir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Karbonik anhidraz enzimi ilk defa 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 ve Martin (1944), CA enzimi aktivitesinin çinko içeriği ile orantılı olduğunu bularak çinkonun katalizlemede spesifik rolü olduğunu farkına varmışlardır. Dolayısıyla CA enzimi, tanımlanan ilk metaloenzim olarak tarihe geçmiştir. İlerleyen süreçte CA enzimi, birçok bitki, mantar, böcek, sıçan ve memeli dokuları gibi geniş bir canlı topluluğunda bulunup izole edilmiştir (Beydemir *et al.* 2005; Bottcher *et al.* 1994; Burt *et al.* 1992; 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; Küçük 2015). CA enzimi günümüze kadar birçok sucul ortamlarda yaşayan balık türleri ve bazı memeli canlı dokusundan saflaştırılmış ve kinetik özellikleri incelenmiştir. CA enzimi sığır eritrositlerinden (Kernohan 1964; DeVoe and Kistiakowsky 1961), yengeç solungaçlarından (Bottcher *et al.* 1994), zebrafish balığından (Peterson *et al.* 1997), yılan balığından (*Anquilla anguilla*) (Lionetto *et al.* 2000), salmon türünden (*Oncorhynchus masou*) (Tohse and Mugiya 2001), gökkuşağı alabalığı eritrositlerinden (Hisar *et al.* 2002) ve gökkuşağı alabalığı dokularından (Söyüt and Beydemir 2008), levrek balığı solungaç ve karaciğerinden (Erdem *et al.* 2011), Çipura (*Sparus aurata*) balığının karaciğer, solungaç ve böbrek dokularından (Kaya 2011), Karadeniz alabalığı (*Salmo trutta labrax*) böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokularından (Küçük 2015) saflaştırılıp, üzerinde kinetik çalışmalar yapmışlardır.

1970'li yılların başına kadar kandan ve diğer dokulardan CA'yı izole etmek için bir kaç deneme yapıldı. Bazı bilim adamları 1940 yılında domuz midesinden %30 saflıkta CA

enzimini elde etmeyi başardılar (Keilin and Mann 1940). Daha sonraları 1963 yılında Sen, Drance ve Woodford sığır lens ekstraktından 2 enzim fraksiyonu elde ettiler, fakat enzimi saf elde etmeyi başaramadılar. 1967 yılında Byvoet ve Gotti CA enzimini köpek böbreğinden kısmen saflaştırdılar. 1982 yılında Whitney ve Brigle sığır akciğerinden membrana bağlı karbonik anhidraz enzimini saflaştırdılar ve molekül kütlelerini 52 kDa civarında buldular. 1990 yılında Zhu ve Sly insan akciğerinden karbonik anhidraz IV izoenzimini saflaştırdılar. İnsan akciğer CA IV ünün molekül kütlelerini 35 kDa civarında olduğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca CA IV'ün yüksek aktivitesi sülfonamidlere olan ilgisinden dolayı CA II ye benzediğini bulmuşlardır.

Tatlı su yengeçlerinin solungaç dokularından saflaştırılan karbonik anhidraz enzimi üzerine çinko, kadminyum ve bakır metallerinin inhibisyon etkisi araştırılmış (Vitale *et al.* 1999). Çalışma neticesinde bu ağır metallerin çok düşük konsantrasyonlarda CA enzimini inhibe ettiklerini belirlemişlerdir.

2006 yılında Beydemir vd. gökkuşağı alabalığının lensinden Sepharose-4B-L tirozin-sülfanilamit afinite kolonunu kullanarak % 60 verimle 900 kat enzimi saflaştırdılar ve enzimin molekül kütlesi SDS Poliakrilamid jel elektroforezi ile yaklaşık 27 kDa olarak hesapladılar. Söyler 2006 yılında hazırladığı yüksek lisans tezinde Van kedisinin eritrositlerinden CA enzimini saflaştırmış ve enzimin molekül kütlesi 30 kDa olarak bulmuştur. Demirdağ et al. 2012 yılında koyun karaciğer dokusundan CA II izoenzimini %72 verimle saflaştırmışlar ve enzimin molekül kütlelerini yaklaşık 29 kDa olarak buldular. Benzer şekilde, Demirdağ yaptığı doktora tezinde koyun böbrek dokusundan CA II ve CA IV izoenzimlerini Sepharose-4B-L-tirozin-sülfanilamit afinite kromatografisi kullanılarak sırasıyla %30,83 ve %60,75 verimlerle saflaştırıp, molekül kütlelerini sırasıyla 29 ve 32 kDa olarak bulmuştur. Kılınç 2011 yılında yaptığı yüksek lisans tezinde, koyun midesinden CA I ve II izoenzimlerini saflaştırmış ve her iki izoenzim için molekül ağırlıklarını 26,7 kDa civarında bulmuştur.

CA enziminin saflaştırılması için yaygın olarak kullanılan metod, afinite kromatografisidir. Karbonik anhidraz enzimi ilk kez 1972 yılında Falkbring ve

arkadaşları tarafından bir afinite jeli kullanılarak saflaştırılmış, daha sonra 1980 yılında Wistrand ve arkadaşlarının ve 1996'da Arslan ve arkadaşlarının, 2004'te Özensoy ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda farklı afinite jelleri sentezlenmiştir.

CA enzimleri, bir çok hastalığın 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 enzim inhibitörleri farmakolojik ajan olarak kullanılmasının yanında ödem ve epilepsi tedavilerinde de yaygın olarak kullanılmaktadır (Jackson 2001; Casini et al. 2002; Gülçin et al. 2004).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmada kullanılan standart serum albumin, p-nitrofenil asetat, HgCl_2 , FeCl_2 , AgNO_3 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, CoCl_2 , $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, amoksisilin, vankomisin, doramektin, abamektin, moksidektin, eprinomektin, L-Tirozin, Sepharose-4B, N,N,N',N'-tetrametiletillen diamin (TEMED) ve diyaliz torbası Sigma Chemical Comp.'den; sodyum hidroksit, sodyum sülfat, sodyum bikarbonat, trihidroksimetilaminometan (Tris), sülfanilamid, sodyum perklorat, sodyum asetat, sodyum klorür, brom timol mavisi, 2-merkaptto etanol, metanol, hidroklorik asit, fosforik asit, sülfürik asit, aseton, glisin, etanol, izopropanol, sodyum barbital, sodyum azotür, N,N'-metilen bisakrilamid, akrilamid, coomassie brilliant blue G-250, R-250 ve diğer kimyasal maddeler E. Merck 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, 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
Soğutmalı santrifüj	: Heraeus Sepatech Suprafuge-22
UV-VIS Spektrofotometre	: SHIMADZU 1240
UV-Spektrofotometre küveti	: 1 cm ³ 'lük ve 3 cm ³ '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): 0,9 g NaCl alınıp hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.
- 2. NaHCO₃ tamponu (0,2 M pH 8,8)** (Sepharose-4B matriksi üzerinde afinite jeli hazırlanırken kullanılan tampon): 16,8 g NaHCO₃ 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 Na₂SO₄, pH 8,7 tamponu** (afinite jelinin dengelenmesinde kullanılan tampon): 3,0275 g Tris ve 14,2 g Na₂SO₄, 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 Na₂SO₄, pH:8,7 tamponu** (afinite jelinin yıkanmasında kullanılan tampon): 3,0275 g Tris ve 3,124 g Na₂SO₄, 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 NaCH₃COO/ 0,5 M NaClO₄, pH:5,6 tamponu** (CA enziminin elüsyonu için kullanılan çözelti): 1,23 g NaCH₃COO ve 10,534 g NaClO₄.H₂O 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-SO₄ 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 H₂SO₄ ile pH'sı 7,4'e getirildikten sonra hacim saf su ile 1 litreye tamamlandı.
- 7. Tris-SO₄ 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 H₂SO₄ 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. CO₂ çözeltisi** (hidrataz aktivitesinde kullanılan çözelti): 0°C'de yarım saat süreyle buz banyosunda saf suyun içerisinde CO₂ gazı geçirilerek hazırlandı.
- 11. 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.
- 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 çözeltiye %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 Elektroferez (SDS-PAGE) için kullanılan çözeltiler;

- 1. 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.
- 2. 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.

- 3. %30'luk Akrlamid-%0,8 bisakrlamid çözeltisi:** 6,0 g akrilamid, 0,16 g bisakrlamit alınıp 13,84 mL suda çözöldü.
- 4. SDS çözeltisi (%10'luk):** 0,5 g SDS alınıp 4,5 mL suda çözöldü.
- 5. PER (Amonyum persölfat %10'luk):** 0,5 g amonyum persölfat alınıp 4,5 mL suda çözöldü.
- 6. SDS-PAGE'de kullanılan numune tamponu:** pH:6,8 olan 1 M Tris-HCl tamponundan 650 µL, 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 µL'sine 50 µL β-merkaptoetanol ilave edildi.
- 7. SDS-PAGE'de kullanılan yürütme tamponu:** 2 g SDS, 6 g Tris ve 28,8 g glisin 200 mL suda çözöldü pH:8,3 olana kadar 1 M HCl ile titre edildi ve toplam hacim saf su ile 2 L'ye tamamlandı.
- 8. 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.
- 9. Redüksiyon çözeltisi:** 4,8 g sodyum asetat 45 mL etil alkol içinde çözöldü üzerine 80 ml saf su eklendi. Karışım 1 M 'lık asetik asitle pH'sı 6,8 ayarlandı. Sonra 150 mg sodyum tiyosölfat ve 3 mL glutaral aldehit ilave edilerek karışım ağzı kapatılarak 4°C de muhafaza edildi.
- 10. Boyama çözeltisi:** 150 mg AgNO₃ 150 mL saf su çözölerek üzerine 30 µL formaldehit ilave edildi. Karışım ağzı kapatılarak 4°C de muhafaza edildi.
- 11. Yıkama 1 çözeltisi:** 3,75 g sodyum karbonat 270 mL saf suda çözölerek üzerine 120 µL formaldehit ilave edildi.
- 12. Yıkama 2 çözeltisi:** 12,5 mL asetik asit ve 1 mL gliserin karışımına saf suya ilave edilerek toplam hacim 250 mL' ye tamamlandı.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Keçi karaciğer ve böbrek dokularından karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu çalışmaları ile ilgili yöntemler

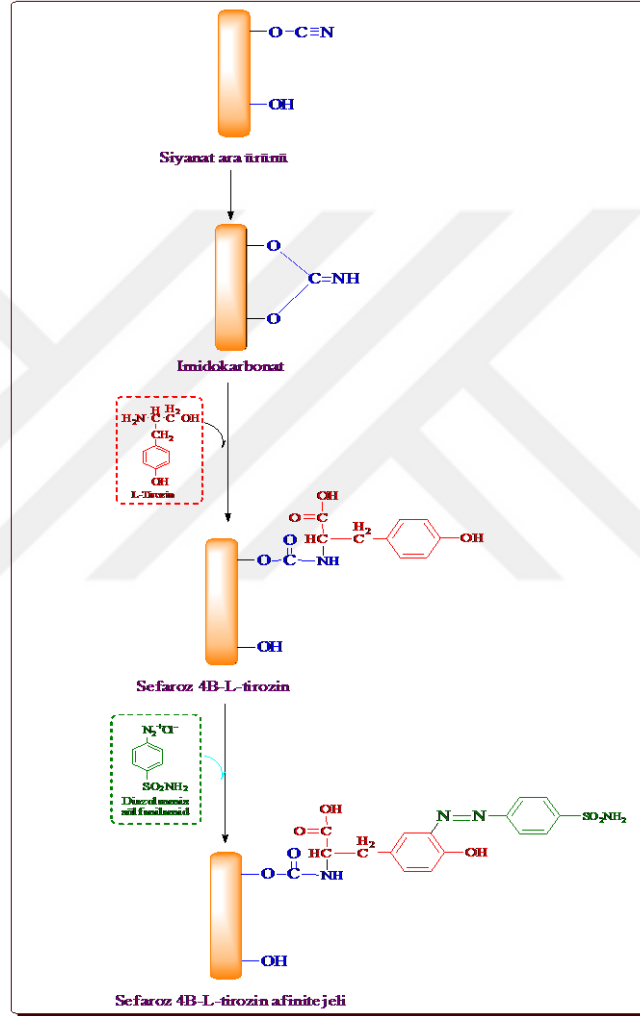
3.2.1.a. Sepharose-4B-L-tirozin sülfanilamid afinite kolonunun hazırlanması

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 NaHCO₃ 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 NaHCO₃ 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 çözülerek ve içerisinde 75 mg NaNO₂ 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-SO₄ (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. Keçi karaciğer ve böbrek dokularının temini ve homojenat hazırlanması

Çalışmada kullanılan keçi karaciğer ve böbrek dokuları Bingöl ili Belediye mezbahanesinden taze olarak alındı. Alınan taze dokular -20°C 'de birkaç gün bekletildikten sonra Erzurum Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Anabilim Dalı Biyokimya araştırma laboratuvarına getirildi. Doku örneklerindeki 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-HCl/0,1 mM Na_2SO_4 (pH 8,7) tampon çözeltisinden 3 mL ilave edilerek homojenize edildi. Bu süspansiyon ultra santrifüj cihazı ile 4°C 'de 60 dakika $13000\times g$ 'de 2 defa santrifüj yapıldı ve süpernatant analizler için kullanılmak üzere hazırlandı. Her doku için aynı işlem tekrarlandı (Wistrand 2002; Pullan and Noltmann 1985; Küçük 2015). Homojenat hazırlandıktan sonra doku üzerinde biriken yağ tabakasını elimine etmek için 2/7 oranında hekzan (C_6H_{14})/homojenat 5 dakika $1500\times g$ 'de santrifüj edildi. Bu işlemde sonra afinite kolonunu tıkamaması için, homojenat Sepharose-4B-L-tirozin sülfanilamit kolonundan geçirildi.

3.2.1.c. Keçi karaciğer ve böbrek dokularıyla hazırlanan homojenatların afinite kolonuna tatbiki ve elüsyonu

Keçi karaciğer ve böbrek dokularından ayrı ayrı elde edilen doku homojenatları süzgeç kâğıdından süzöldükten sonra katı Tris- SO_4 kullanılarak pH'ları 8,7'ye ayarlanıp kolona tatbik edildi ve kolon 400 mL 25 mM Tris-HCl / 22 mM Na_2SO_4 (pH 8,7) çözeltisi ile yıkandı. Böylece karbonik anhidraz enzimi kolona tutunmuş ve diğer safsızlıklar uzaklaştırılmış oldu. Daha sonra 0,1 M NaCH_3COO /0,5 M NaClO_4 (pH 5,6) çözeltisi kolona tatbik edilip CA enzimi elüe edildi. Peristaltik pompa vasıtasıyla kolonun akış hızı 20 mL/saat'e ayarlandı. Fraksiyon toplayıcı yardımıyla elüatlar 1,5'er mL halinde tüplere alınarak 280 nm'deki absorbanlarına bakıldı.

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

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

Başlangıçta elektroföze plakaları saf su ile iyice yıkandı. Cam plakaları birleştiren mikalara ince bir tabaka halinde vazelin sürüldü. İki cam plaka birbiri üstüne konuldu ve özel naylon kaplarına yerleştirilerek jel hazırlama cihazına konuldu. Daha sonra cam plakalar aralık oluşturunu mikaların bulunduğı kısımlardan kısıkaçlarla 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 elektroföze 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 (NH₄)₂S₂O₈ (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. Son olarak jel yıkama çözeltisi içine alınarak bantlar netleşene kadar çalkanarak yıkandı. Jel dikkatlice alınarak fotoğrafı çekildi. Powerpoint programı kullanılarak bantların yürüme mesafeleri ölçülerek enzimlerin mol kütleleri hesaplandı.

Laemmli (1970) metoduna göre molekül kütlesi tayini şu şekilde yapıldı; standart protein olarak molekül ağırlığı 250, 130, 95, 72, 55, 36, 28, 17 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 keçi karaciğer ve böbrek CA enziminin logMA'sı belirlendi. Bu değer 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 yürüme mesafesi, X_{boya} : boyanın yürüme 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’inde 1 mg protein ihtiva eden standart sıgır 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 CO₂-hidrataz aktivitesidir, ikincisi ise *in vitro* şartlarda gerçekleştirdiği spektrofotometrik olarak takip edilebilen esteraz aktivitesidir.

a) CO₂-hidrataz aktivitesi: Bu yöntem Wilbur and Anderson 1948 yöntemi kullanılarak yapıldı. CO₂'nin hidrasyonu sonucu açığa çıkan H⁺ 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 CO₂ çözeltisi ilave edildi. Böylece aktivite ölçüm ortamında toplam hacim 4,2 mL oldu. Daha sonra bir kronometre yardımıyla CO₂ çözeltisi katıldığı andan itibaren indikatörün mavi renginin sarımsı yeşile dönüşmesi (pH 6,3) için geçen süre belirlendi (t₀). Numune tüpüne ise sudan 0,1 mL azaltarak bunun yerine enzim çözeltisi ilave edildi ve CO₂ çözeltisi ilave edilir edilmez indikatörün mavi renginin sarımsı yeşile dönüşmesi (pH 6,3) için geçen süre bir kronometre vasıtasıyla belirlendi (t_c).

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

Çizelge 3.1. Karbonik anhidraz enziminin hidrataz aktivitesi ölçümü için kullanılan çözeltiler ve miktarları

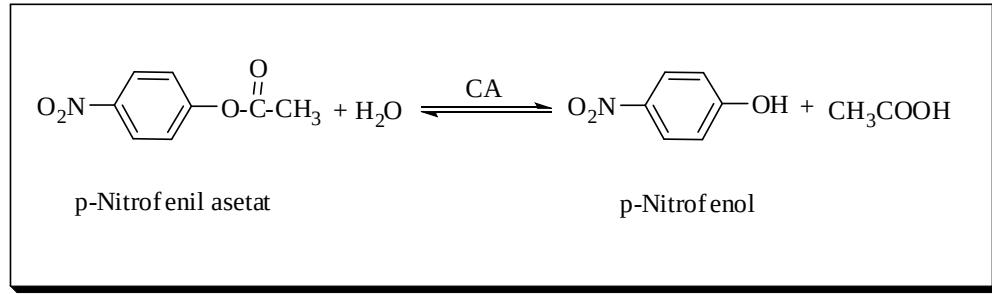
Çözeltiler	Kontrol Tüpü (µL)	Numune Tüpü (µL)
Veronal tamponu (25 mM, pH:8,2)	1000	1000
Brom timol mavisi (%0,04)	100	100
Saf su	600	500
Enzim çözeltisi	-	100
CO ₂ gazı ile doyurulmuş çözelti	2500	2500
Toplam hacim	4200	4200

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

Enzim aktivitesi, enzimsiz olarak gerçekleşen CO₂ hidratasyon süresi (t₀) ile enzimli çözeltideki reaksiyon süresi (t_c) arasındaki farkın (t_c)'ye bölünmesi ile bulundu ve aşağıdaki formüle göre hesaplandı (Maren 1960).

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

b) Esteraz aktivitesi: Bu metodun prensibi, karbonik anhidraz enziminin substrat olarak kullanılan *p*-nitrofenilasetatı (PNF) 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 absorbansı gösterir. Bu nedenle fenol grubundaki proton (H⁺) iyonunun ayrışmaması ölçümü etkilememektedir (Verpoorte and Mehta 1967; Armstrong *et al.* 1996). Substrat olarak kullanılan PNF 348 nm'de çok az absorpsiyon verdiği için kör olarak kullanıldı. Reaksiyonun denklemi aşağıdaki gibidir.



Şekil 3.2. *p*-Nitrofenilasetatın *p*-nitrofenole dönüşümünü sağlayan enzimatik reaksiyon

Esteraz aktivitesinde absorbans ölçümü için kör olarak hazırlanan tüpe pH 8,5 olan Tris-SO₄ tamponundan 400 µL, substrat olarak 360 µL PNF 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 3.2. Karbonik anhidraz enziminin esteraz aktivitesi ölçümü için kullanılan çözeltiler ve miktarları

Çözeltiler	Kontrol Tüpü (µL)	Numune Tüpü (µL)
Tris-SO ₄ tamponu (1.0 M, pH 8,5)	400	400
PNF	360	360
Saf su	240	220
Enzim çözeltisi	-	20
Toplam hacim	1000	1000

Yapılan deneylerde kullanılan *p*-nitrofenilasetat substrat çözeltisi, günlük olarak hazırlandı. Çözelti için 13,6 mg PNF 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, esterın 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. Keçi karaciğer ve böbrek dokularından saflaştırılan CA enzimi ile ilgili 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-SO₄ ve pH 5,0-8,0 aralığında 1 M potasyum fosfat tampon çözeltilerinde keçi karaciğer ve böbrek 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

Keçi karaciğer ve böbrek dokularından elde edilen CA enzimlerinin aktiviteleri üzerine iyonik şiddetin etkisinin belirlenmesi, enzim aktivitesinin optimum olduğu Tris-SO₄ tamponu kullanılarak yapıldı. Bu tampon ile 0,1 M ile 1,0 M arasında iyonik şiddete sahip çözeltiler hazırlandı ve CA enzimleri için esteraz aktivite ölçümleri yapıldı. Keçi karaciğer ve böbrek dokularından elde edilen CA enzimleri için optimum iyonik şiddet sırasıyla 0,5 M ve 0,6 M Tris-SO₄ 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-SO₄ tamponu ve pH'ları 5,0-8,0 olan potasyum fosfat tamponu kullanıldı. Belirtilen pH'lardaki tampon çözeltilerinin 1 mL'si ile 1 mL enzim çözeltisi karıştırılarak 4°C'de muhafaza edildi. 12 saat aryla yapılan aktivite ölçümünde enzimin stabil olduğu pH belirlendi. İnkübasyon süresine karşılık aktivite değerleri grafikler halinde gösterildi.

3.5.4. Keçi karaciğer ve böbrek dokularından elde edilen CA enziminin optimum sıcaklığın, aktivasyon enerjisinin (E_a), aktivasyon entalpisinin (ΔH) ve Q₁₀ değerlerinin hesaplanması ile ilgili çalışmalar

Keçi karaciğer ve böbrek, dokularından saflaştırılan CA enzimlerinin aktivitelerinin optimum olduğu sıcaklıkların, E_a, ΔH ve Q₁₀ değerlerinin belirlenmesi amacıyla dijital su banyosu kullanılarak 0°C ile 60°C arasında 10°C sıcaklık farkı oluşturularak, enzimin optimum pH'sında spektrofotometrik olarak esterez aktivitesi deneyleri gerçekleştirildi. Daha sonra elde edilen aktivite değerlerinin logaritmaları (log k) alındı. Sıcaklık değerleri Kelvine çevrilerek grafikte 1/Tx1000°K⁻¹ olarak ifade edildi (Danişan *et al.* 2004). Çizilen grafikten faydalanılarak Arrhenius eğrisi elde edildi ve bu eğrinin eğimi kullanılarak aktivasyon enerjisi (E_a) hesaplandı.

$$Eğim = \frac{-E_a}{2.303 \times R}$$

Aktivasyon entalpisinin (ΔH)'nin hesabında ise aşağıdaki formülünden faydalanıldı (Wilson 1971; Segel 1975).

$$\Delta H = E_a - RT$$

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 2012).

3.5.5. Keçi karaciğer ve böbrek dokularından elde edilen CA enziminin K_M , V_{max} , k_{cat} ve V_0 değerlerinin bulunmasına yönelik çalışmalar

Keçi karaciğer ve böbrek dokularından saflaştırılan CA enziminin K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi için en az 5 farklı PNF 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 özgüllük sabitinin hesaplanmasıdır. Özgüllük sabiti V_0 formülü ile hesaplandı (Lehninger 2013).

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

3.5.6. Bazı ağır metallerin, antibiyotiklerin ve avermektinlerin keçi karaciğer ve böbrek dokularından elde edilen CA enziminin esterase aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin incelenmesi

Keçi karaciğer ve böbrek dokularından afinite kromatografisi vasıtasıyla saflaştırılan karbonik anhidraz enziminin aktivitesi üzerine inhibisyon etkileri araştırıldı. Kinetik ölçümler enzimin esterase aktivitesinden faydalanılarak gerçekleştirildi (Verpoorte and Mehta1967; Armstrong *et al.* 1966; Kose *et al.* 2016).

Enzimin esterase aktivitesini inhibe eden FeCl_2 , $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, HgCl_2 , CoCl_2 , AgNO_3 ve $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ gibi ağır metaller, vankomisin ve amoksisilin gibi antibiyotikler ve moksidektin, abamektin, doramektin ve eprinomektin gibi avermektinler için sabit substrat konsantrasyonunda beş farklı inhibitör konsantrasyonu kullanılarak enzimin aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu (IC_{50}) değerleri % Aktivite-[I] grafikleri çizilerek belirlendi.

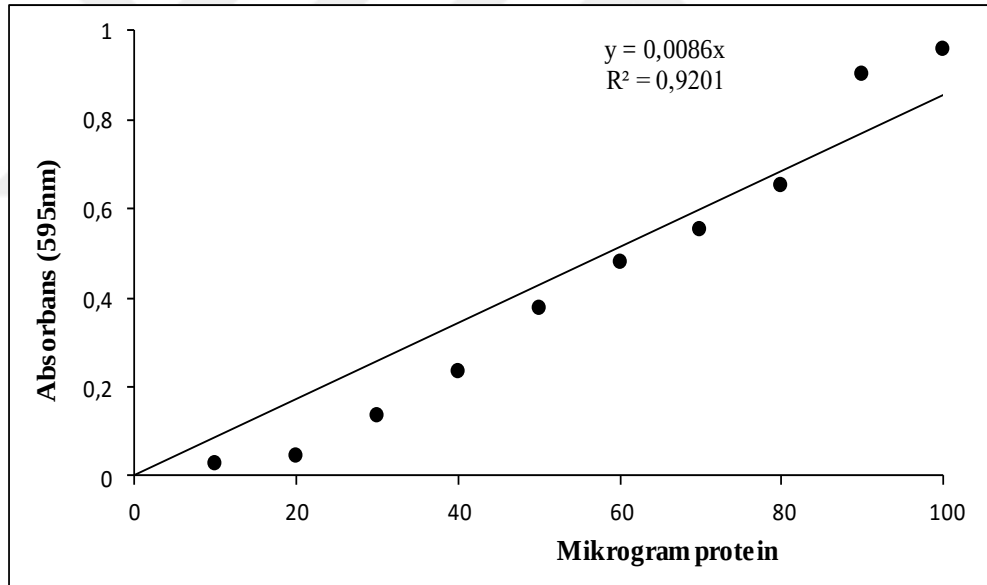
3.5.7. Keçi karaciğer ve böbrek dokularından elde edilen CA enzimi için inhibitör etkisi gösteren ağır metallerin, antibiyotiklerin ve avermektinlerin K_i sabitlerinin ve inhibisyon türlerinin bulunması

İnhibitör çalışmaları için, keçi karaciğer ve böbrek dokularından elde edilen CA enzimini inhibe eden FeCl_2 , $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, HgCl_2 , CoCl_2 , AgNO_3 ve $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ gibi ağır metaller, vankomisin ve amoksisilin gibi antibiyotikler ve moksidektin, abamektin, doramektin ve eprinomektin gibi avermektinler 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 keçi karaciğer ve böbrek 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 için hazırlanan standart grafik

Keçi karaciğer ve böbrek dokularından elde edilen homojenatlar ve saflaştırılan enzim çözeltililerindeki kantitatif protein miktarı için Bradford yöntemi kullanıldı (Bradford 1976). Bu yöntemde öncelikle bir standart eğri hazırlandı. Daha sonra hazırlanan homojenatlar ve saflaştırılan enzim çözeltilisindeki protein miktarı bu eğriye göre belirlendi. Kantitatif protein miktarları Şekil 4.1'den elde edilen denklemden hesaplandı ($R^2:0,9201$ hesaplandı).

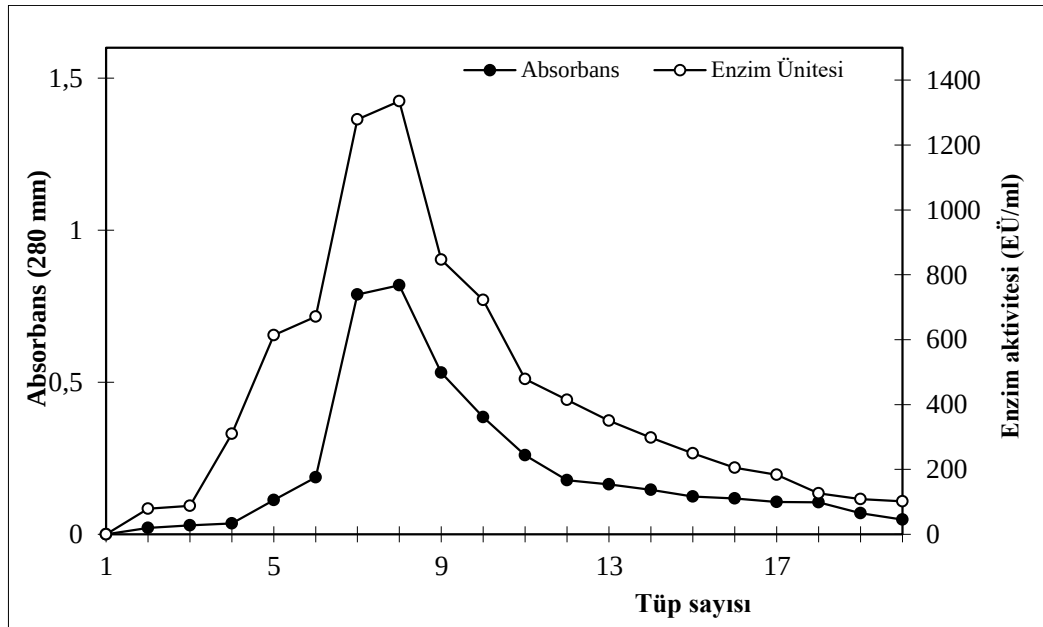


Şekil 4.1. Bradford yöntemi ile BSA kullanılarak protein tayini için hazırlanan standart grafik

4.2. Keçi karaciğer ve böbrek dokularından karbonik anhidraz enziminin saflaştırılma ve karakterizasyon sonuçları

4.2.1. Karbonik anhidraz enziminin Sepharose-4B-L-Tirozin sülfonilamid afinite kromatografisi ile saflaştırılma kademeleri

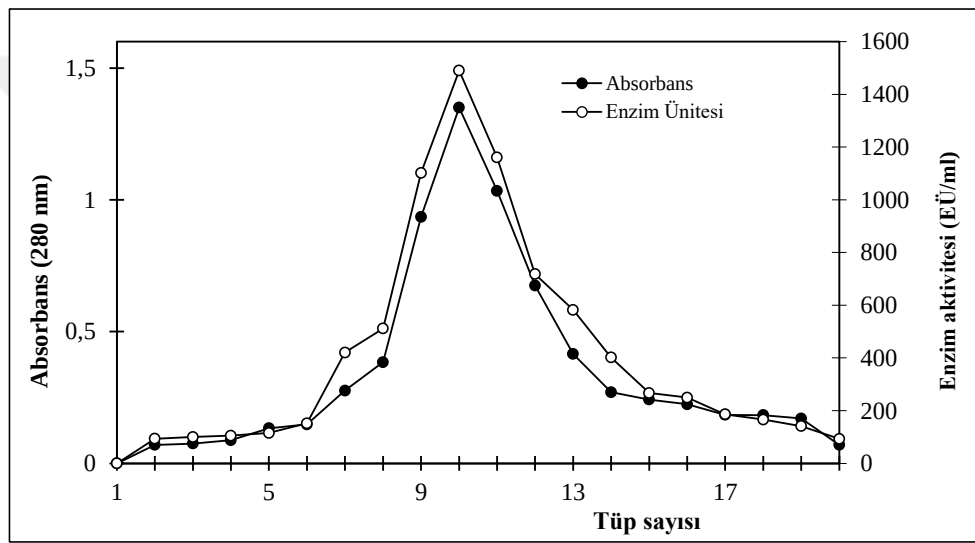
Keçi karaciğer ve böbrek dokularından hazırlanan homojenatların pH'ları katı Tris kullanılarak pH metre ile 8,7'ye ayarlandı. Daha sonra Sepharose-4B-L-Tirozin sülfonilamid afinite kolonuna doku numuneleri ayrı ayrı yüklendi. Afinite kolonundan her bir tüpe 1,5'er mL olacak şekilde elüe edilen numunelerin 280 nm'de Walburg metoduna göre kalitatif protein tayinleri yapıldı. Absorbans gösteren tüplerde CO₂ hidrataz aktivitesine bakıldı. Aktivite gösteren tüpler birleştirildi. Her bir doku için absorbans-tüp sayısı-aktivite grafikleri çizildi (Şekil 4.2 ve 4.3). Sepharose-4B-L-Tirozin sülfonilamid afinite kromatografisi ile elde edilen, yüzde verim ve saflaştırma katsayıları ise Çizelge 4.1 ve 4.2'te verildi.



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

Çizelge 4.1. Keçi karaciğer dokusundan CA enziminin saflaştırma sonuçları

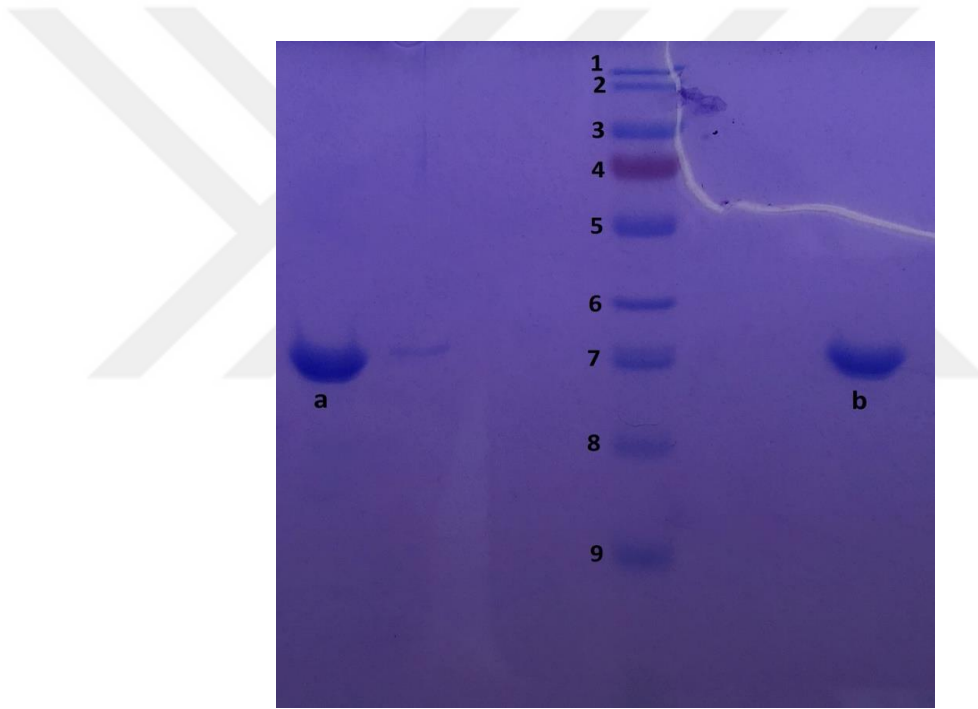
Numune	Aktivite (EÜ/mL)	Toplam hacim (mL)	Protein (mg/mL)	Toplam protein (mg)	Toplam aktivite (EÜ)	Spesifik aktivite (EÜ/mg)	Verim (%)	Saflaştırma katsayısı
Homojenat	1450	21,0	8,51	178,63	30450	170,47	100,0	1,00
Sepharose-4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite kolon kromatografisi	3769	4,5	0,06	0,28	16960	61229,20	55,6	359,18

**Şekil 4.3.** Keçi böbrek dokusundan afinite kromatografisiyle saflaştırılan CA enziminin elüsyon tüplerindeki hidrataz aktivitesi ve 280 nm'deki absorbens değerleri**Çizelge 4.2.** Keçi böbrek dokusundan CA enziminin saflaştırma sonuçları

Numune	Aktivite (EÜ/mL)	Toplam hacim (mL)	Protein (mg/mL)	Toplam protein (mg)	Toplam aktivite	Spesifik aktivite (EÜ/mg)	Verim (%)	Saflaştırma katsayısı
Homojenat	2306,01	23	8,30	190,90	53038	277,83	100	1,00
Sepharose-4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite kolon kromatografisi	8846,15	3	0,15	0,45	26538	58974,33	51	212,27

4.2.2. Sodyum Dodesilsülfat-Poliakrilamit Jel Elektrofözezi (SDS-PAGE) ile enzim saflığıının kontrolü ve molekül kütesinin tayini

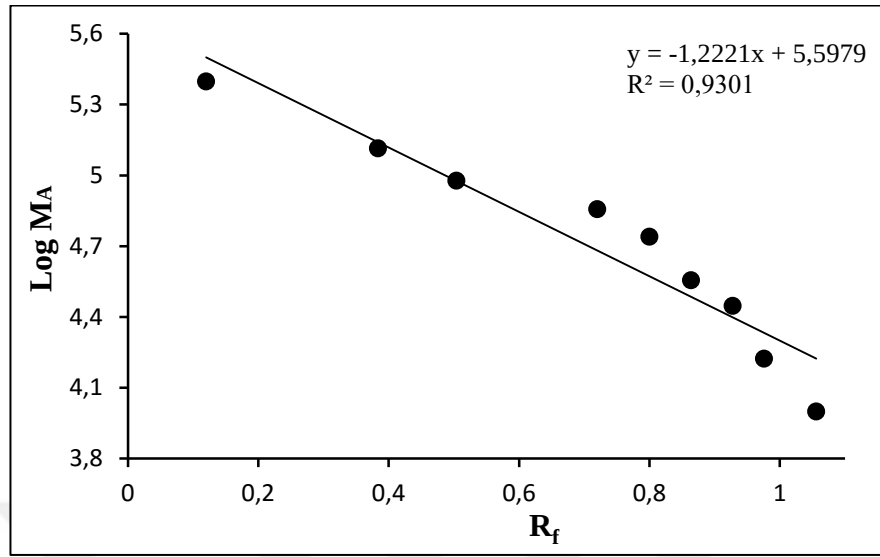
Keçi karaciğer ve böbrek dokularından afinite kolonu ile karbonik ahhidraz enzimi ve standart proteinler, hazırlanan kesikli SDS-PAGE'ye tatbik edildi. Daha sonra elde edilen protein bantlarının fotoğrafi çekildi. Keçi karaciğer ve böbrek dokularından saflaştırılan CA enziminin molekül kütesi log MA-R_f grafiğı çizilerek tespit edildi (Şekil 4.4 ve 4.5, Çizelge 4.3).



Şekil 4.4. Afinite kromatografisiyle saflaştırılan keçi karaciğer ve böbrek dokuları CA enziminin SDS-PAGE fotoğrafi

*Standart numuneler: 1:250, 2:130, 3:95, 4:72, 5:55, 6:36, 7:28, 8:17, 9:10 kDa

a: karaciğer doku , b: böbrek doku



Şekil 4.5. SDS-PAGE yöntemiyle keçi karaciğer ve böbrek dokusu CA enzimlerinin molekül kütlesi tayininde kullanılan standart grafik

Çizelge 4.3. Keçi karaciğer ve böbrek dokusu CA enzimi için SDS-PAGE ile molekül kütleleri tayini sonuçları

Enzim	Doku	Molekül Kütlesi (kDa)
Karbonik Anhidraz (CA)	Karaciğer	27,70
	Böbrek	28,00

4.3. Keçi karaciğer ve böbrek dokularından saflaştırılan CA enzimi ile ilgili yapılan kinetik çalışmalar

4.3.1. Karbonik anhidraz enzimi için optimum pH çalışması

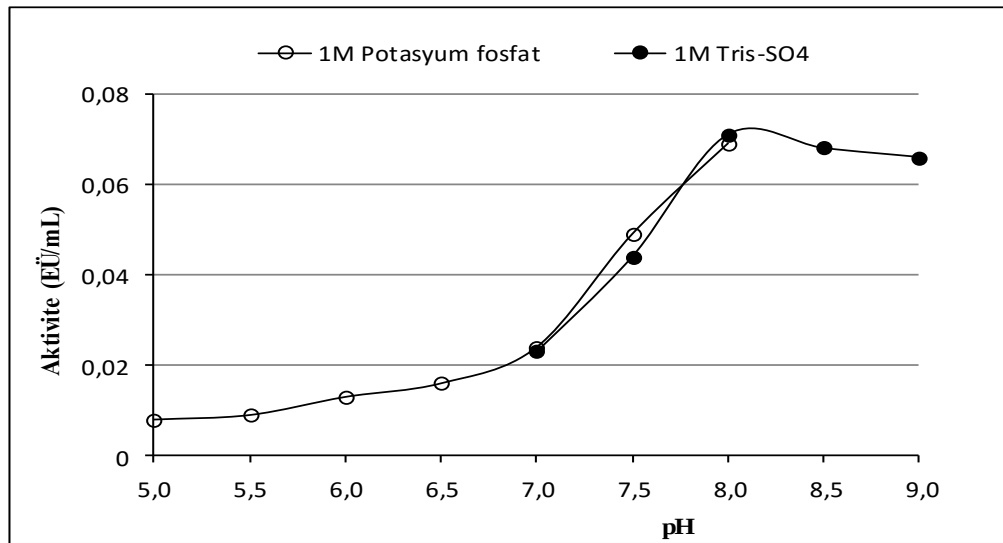
Keçi karaciğer ve böbrek dokuları karbonik anhidraz enzimlerinin optimum pH çalışması bölüm 3.5.1’de anlatıldığı şekilde, pH’sı 7,0-9,0 aralığında 1.0 M Tris-SO₄ ve pH’sı 5,0-8,0 aralığında 1.0 M potasyum fosfat tampon çözeltileri kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçüldü. Keçi karaciğer dokusu için optimum pH 1.0 M Tris-SO₄ tamponunda pH 8,0 ve böbrek dokusu için ise optimum pH 1M Tris-SO₄ tamponunda pH 8,5 tamponu olarak belirlendi (Çizelge 4.4-4.7 ve Şekil 4.6-4.7).

Çizelge 4.4. Keçi karaciğer dokusu CA enziminin optimum pH'sı için 1.0 M potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

Potasyum Fosfat tamponu (1.0 M)	
pH	Aktivite (EÜ/mL)
5,0	0,008
5,5	0,009
6,0	0,013
6,5	0,016
7,0	0,024
7,5	0,049
8,0	0,069

Çizelge 4.5. Keçi karaciğer dokusu CA enziminin optimum pH'sı için 1.0 M Tris-SO₄ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

Tris-SO₄ Tamponu (1.0 M)	
pH	Aktivite (EÜ/mL)
7,0	0,023
7,5	0,044
8,0	0,071
8,5	0,068
9,0	0,066



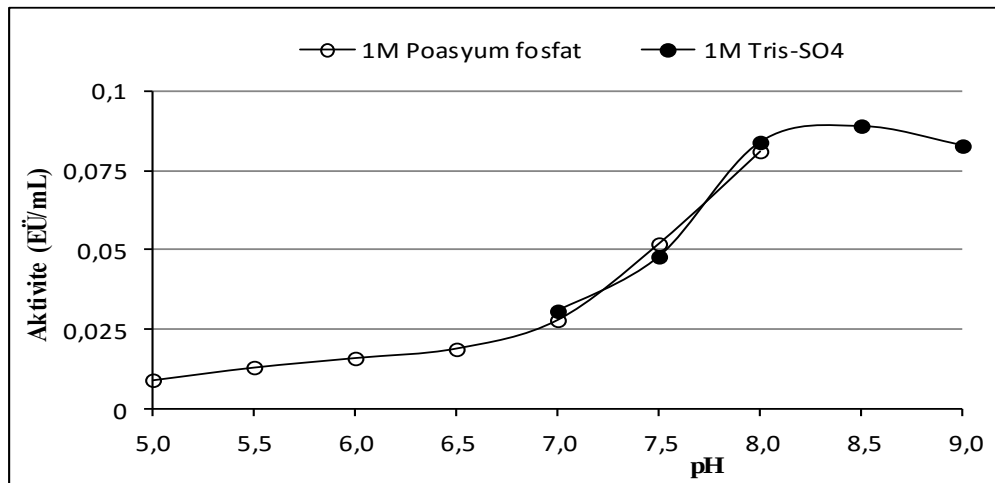
Şekil 4.6. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin optimum pH'sını bulmak için 1.0 M potasyum fosfat ve 1.0 M Tris-SO₄ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

Çizelge 4.6. Keçi böbrek dokusu CA enziminin optimum pH'sı için 1.0 M potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

Potasyum Fosfat Tamponu (1.0 M)	
pH	Aktivite (EÜ/mL)
5,0	0,009
5,5	0,013
6,0	0,016
6,5	0,019
7,0	0,028
7,5	0,052
8,0	0,081

Çizelge 4.7. Keçi böbrek dokusu CA enziminin optimum pH'sı için 1.0 M Tris-SO₄ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

Tris-SO₄ Tamponu (1.0 M)	
pH	Aktivite (EÜ/mL)
7,0	0,031
7,5	0,048
8,0	0,084
8,5	0,089
9,0	0,083



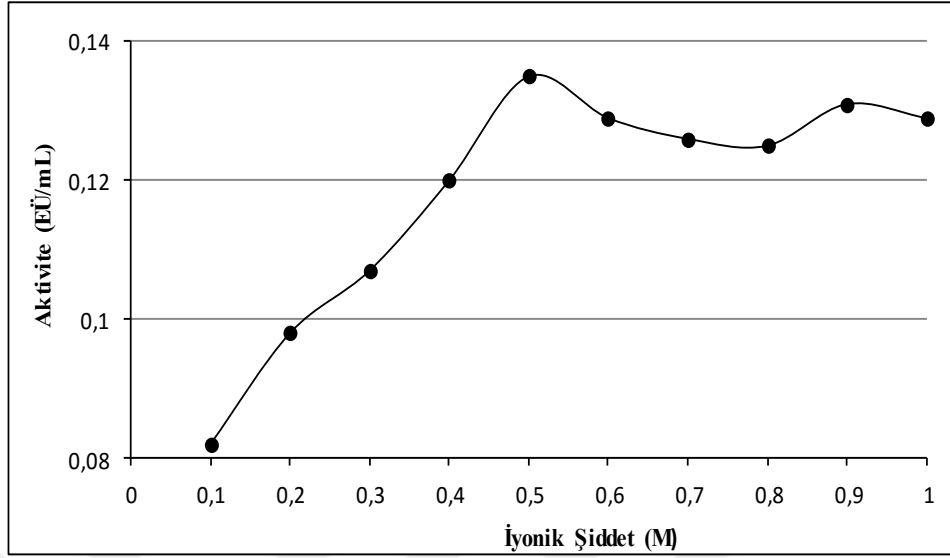
Şekil 4.7. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin optimum pH'sını bulmak için 1.0 M potasyum fosfat ve 1.0 M Tris-SO₄ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

4.3.2. Keçi karaciğer ve böbrek dokuları CA enzimi için optimum iyonik şiddetinin belirlenmesi

Keçi karaciğer ve böbrek dokularından elde edilen CA enzim aktivitesi üzerine iyonik şiddetin etkisinin belirlenmesi için enzim aktivitesinin optimum olduğu Tris-SO₄ tamponu kullanılarak yapıldı. Bu tampon ile 0,1 M ile 1,0 M arasında iyonik şiddete sahip çözeltilerle hazırlandı ve CA enzimleri için esterase aktivite ölçümleri yapıldı. Karaciğer ve böbrek dokularından elde edilen CA enzimleri için optimum iyonik şiddet sırasıyla 0,5 M ve 0,6 M Tris-SO₄ olarak belirlendi, sonuçlar çizelgeler ve aktivite-konsantrasyon grafikleri halinde gösterildi (Çizelge 4.8, 4.9 ve Şekil 4.8, 4.9).

Çizelge 4.8. Keçi karaciğer dokusu için Tris-SO₄ tampon çözeltisi kullanılarak farklı iyonik şiddetlerde yapılan aktivite ölçüm sonuçları

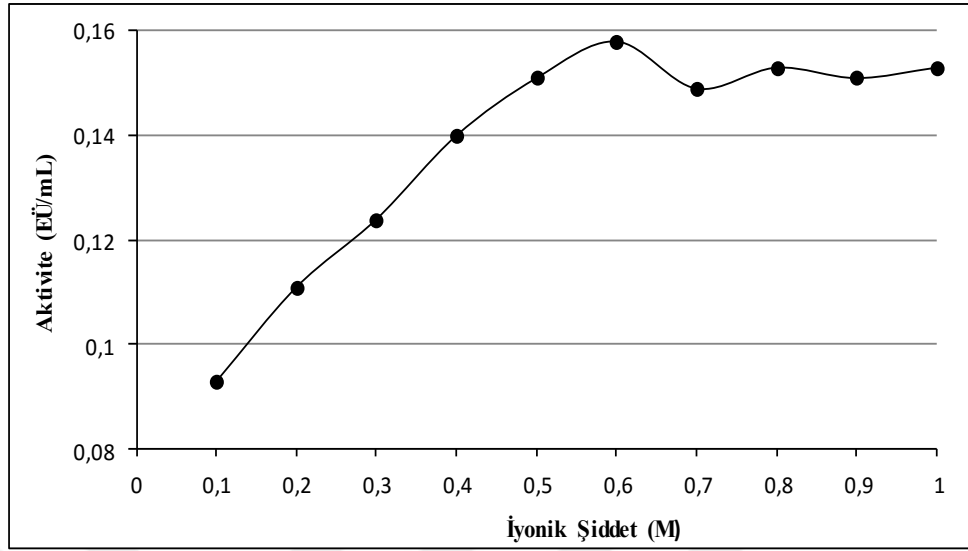
Tris-SO ₄	
İyonik Şiddet (M)	Aktivite (EÜ/mL)
0,1	0,082
0,2	0,098
0,3	0,107
0,4	0,120
0,5	0,135
0,6	0,129
0,7	0,126
0,8	0,125
0,9	0,131
1,0	0,129



Şekil 4.8. Keçi karaciğer dokusu için Tris-SO₄ tampon çözeltisi kullanılarak farklı iyonik şiddetlerde yapılan aktivite ölçüm sonuçları

Çizelge 4.9. Keçi böbrek dokusu için Tris-SO₄ tampon çözeltisi kullanılarak farklı iyonik şiddetlerde yapılan aktivite ölçüm sonuçları

Tris-SO ₄	
İyonik Şiddet (M)	Aktivite (EÜ/mL)
0,1	0,093
0,2	0,111
0,3	0,124
0,4	0,140
0,5	0,151
0,6	0,158
0,7	0,149
0,8	0,153
0,9	0,151
1,0	0,153



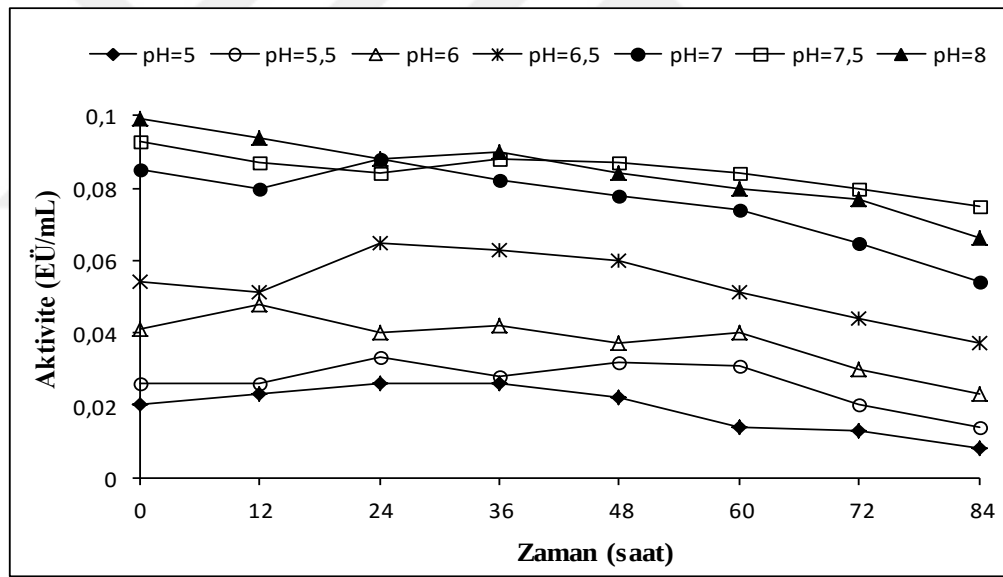
Şekil 4.9. Keçi böbrek dokusu için Tris-SO₄ tampon çözeltisi kullanılarak farklı iyonik şiddetlerde yapılan aktivite ölçüm sonuçları

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

Keçi karaciğer ve böbrek dokularından saflaştırılan karbonik anhidraz enziminin stabil olduğu pH'ları bulmak için pH'sı 7,0-9,0 olan Tris-SO₄ tamponu ve pH'sı 5,0-8,0 olan potasyum fosfat tamponu kullanıldı. Belirtilen pH'lardaki tampon çözeltilerinin 1 mL'si ile 1 mL enzim çözeltisi karıştırılarak 4°C'de muhafaza edildi ve 12 saat arayla aktivite ölçümü yapıldı. 84 saat boyunca yapılan aktivite ölçümünde sırasıyla 0.5 M ve 0.6 M Tris-SO₄ tampon çözeltisinde karaciğer ve böbrek dokuları için enzimin stabil olduğu pH sırasıyla 7,5 ve 7 olarak belirlendi. İnkübasyon süresine karşılık aktivite değerleri grafikler halinde gösterildi (Çizelge 4.10-4.13 ve Şekil 4.10-4.13).

Çizelge 4.10. Keçi karaciğer dokusu CA enziminin stabil pH'sı için 0.5 M potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

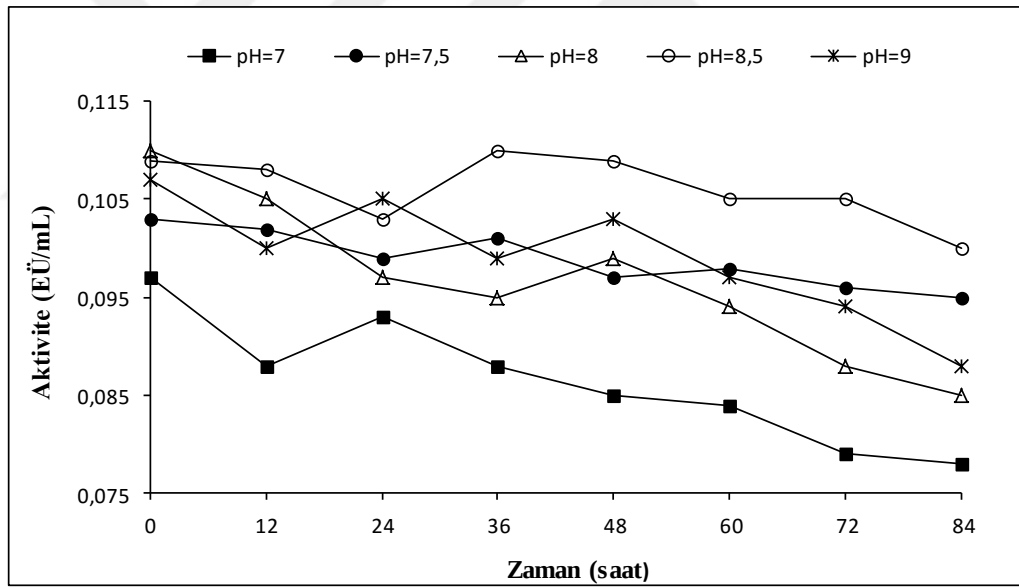
Zaman	pH:5,0	pH:5,5	pH:6,0	pH:6,5	pH:7,0	pH:7,5	pH:8,0
Başlangıç	0,020	0,026	0,041	0,054	0,085	0,093	0,099
12. saat	0,023	0,026	0,048	0,051	0,080	0,087	0,094
24. saat	0,026	0,033	0,040	0,065	0,088	0,084	0,088
36. saat	0,026	0,028	0,042	0,063	0,082	0,088	0,090
48. saat	0,022	0,032	0,037	0,060	0,078	0,087	0,084
60. saat	0,014	0,031	0,040	0,051	0,074	0,084	0,080
72. saat	0,013	0,020	0,030	0,044	0,065	0,080	0,077
84. saat	0,008	0,014	0,023	0,037	0,054	0,075	0,066



Şekil 4.10. Keçi karaciğer dokusu CA enziminin stabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 0.5 M potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

Çizelge 4.11. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin stabil pH'sı için 0.5 M Tris-SO₄ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

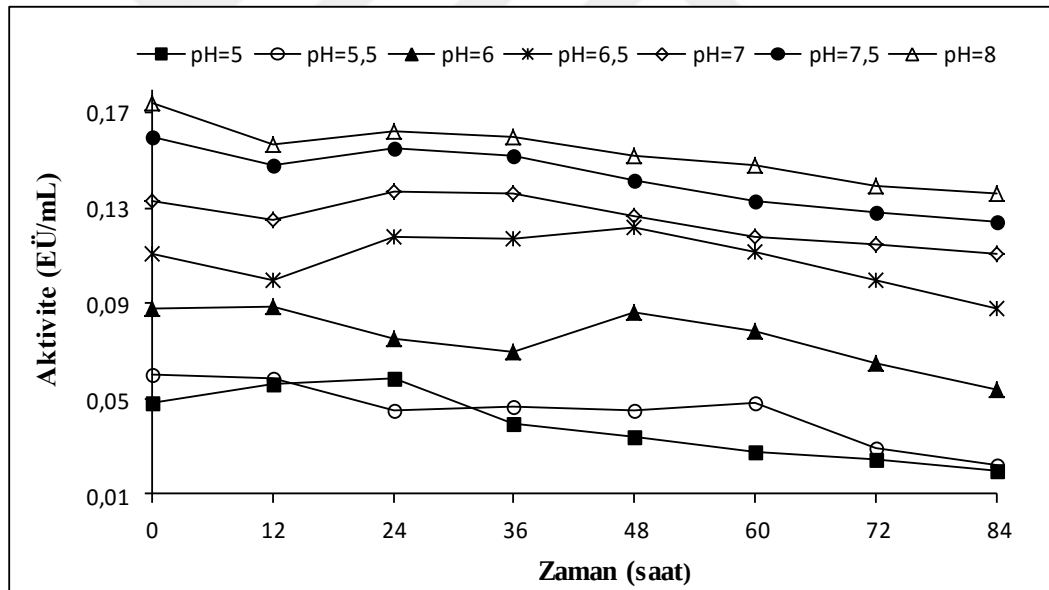
Zaman	pH:7,0	pH:7,5	pH:8,0	pH:8,5	pH:9,0
Başlangıç	0,097	0,103	0,110	0,109	0,107
12. saat	0,088	0,102	0,105	0,108	0,100
24. saat	0,093	0,099	0,097	0,103	0,105
36. saat	0,088	0,101	0,095	0,110	0,099
48. saat	0,085	0,097	0,099	0,109	0,103
60. saat	0,084	0,098	0,094	0,105	0,097
72. saat	0,079	0,096	0,088	0,105	0,094
84. saat	0,078	0,095	0,085	0,100	0,088



Şekil 4.11. Keçi karaciğer dokusu CA enziminin stabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 0.5 M Tris-SO₄ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

Çizelge 4.12. Keçi böbrek dokusu CA enziminin stabil pH'sı için 0.6 M potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

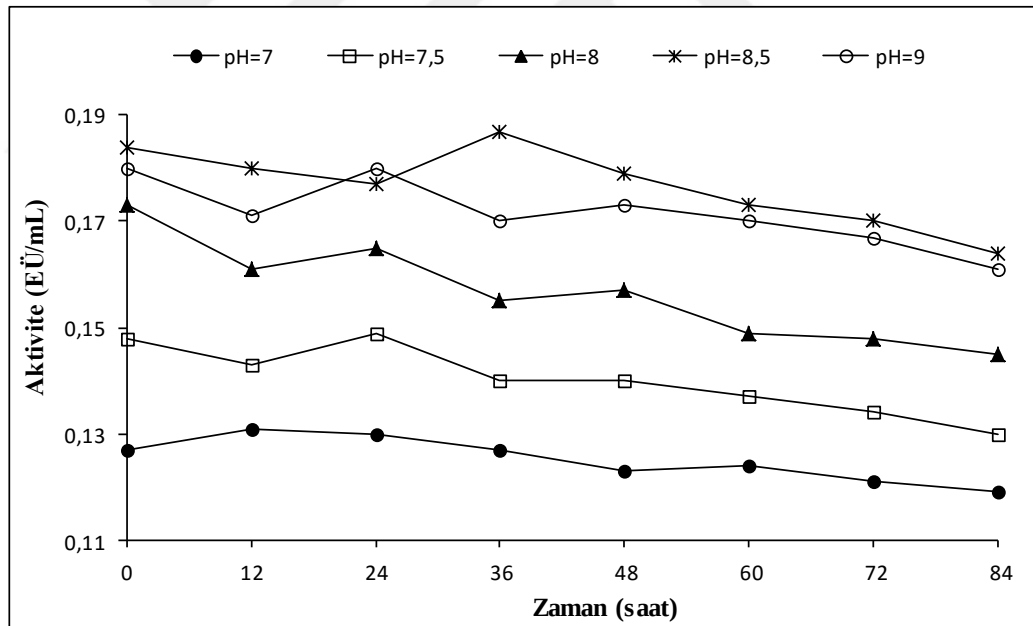
Zaman	pH:5,0	pH:5,5	pH:6,0	pH:6,5	pH:7,0	pH:7,5	pH:8,0
Başlangıç	0,048	0,060	0,088	0,111	0,133	0,160	0,174
12. saat	0,056	0,059	0,089	0,100	0,125	0,148	0,157
24. saat	0,059	0,045	0,075	0,118	0,137	0,155	0,162
36. saat	0,040	0,047	0,070	0,117	0,136	0,152	0,160
48. saat	0,034	0,045	0,086	0,122	0,127	0,142	0,152
60. saat	0,028	0,048	0,078	0,112	0,118	0,133	0,148
72. saat	0,025	0,029	0,065	0,100	0,115	0,128	0,139
84. saat	0,020	0,022	0,054	0,088	0,111	0,124	0,136



Şekil 4.12. Keçi böbrek dokusu CA enziminin stabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 0.6 M potasyum fosfat tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

Çizelge 4.13. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin stabil pH'sı için 0.6 M Tris-SO₄ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

Zaman	pH:7,0	pH:7,5	pH:8,0	pH:8,5	pH:9,0
Başlangıç	0,127	0,148	0,173	0,184	0,180
12. saat	0,131	0,143	0,161	0,180	0,171
24. saat	0,130	0,149	0,165	0,177	0,180
36. saat	0,127	0,140	0,155	0,187	0,170
48. saat	0,123	0,140	0,157	0,179	0,173
60. saat	0,124	0,137	0,149	0,173	0,170
72. saat	0,121	0,134	0,148	0,170	0,167
84. saat	0,119	0,130	0,145	0,164	0,161



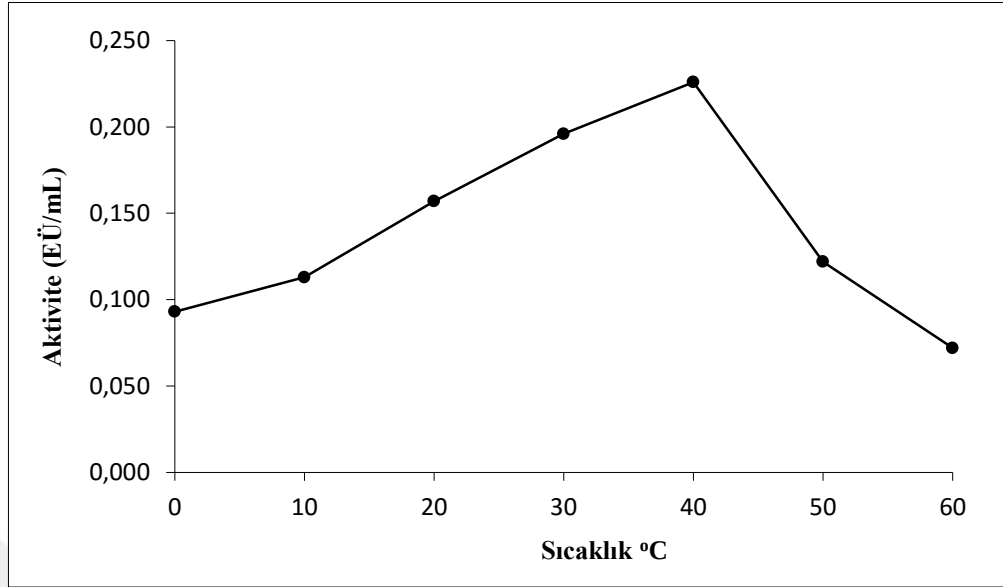
Şekil 4.13. Keçi böbrek dokusu CA enziminin stabil pH'sını bulmak için değişik pH'larda 0.6 M Tris-SO₄ tampon çözeltileri kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

4.3.4. Keçi karaciğer ve böbrek dokularından elde edilen CA enziminin optimum sıcaklığın, aktivasyon enerjisinin (E_a), aktivasyon entalpisinin (ΔH) ve Q_{10} değerlerinin hesaplanması ile ilgili çalışmalar

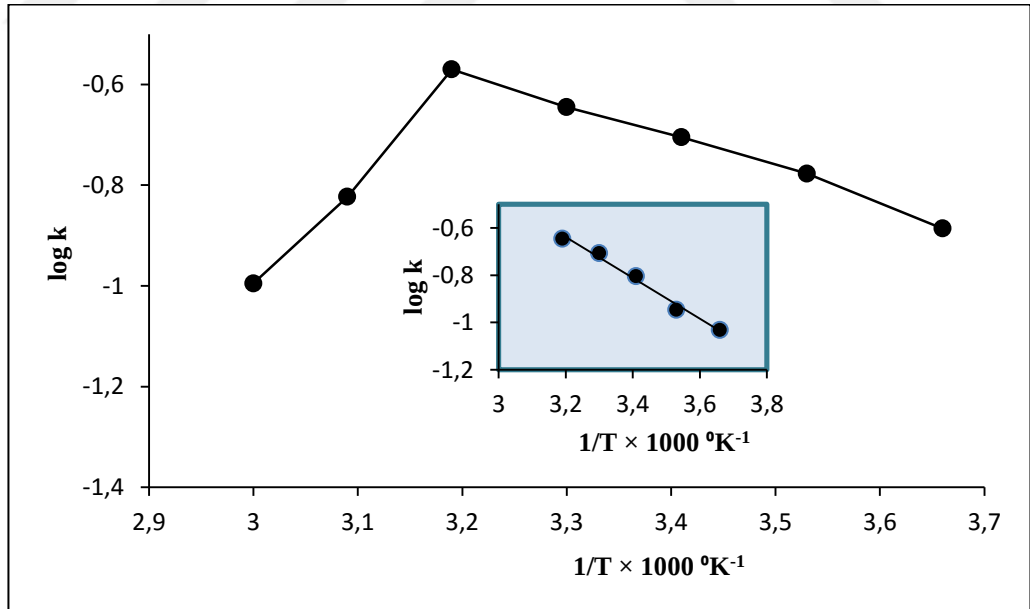
Keçi karaciğer ve böbrek dokularından saflaştırılan CA enzimlerinin aktivitelerinin optimum olduğu sıcaklıkların, E_a , ΔH ve Q_{10} değerlerinin belirlenmesi amacıyla dijital su banyosu kullanılarak 0°C ile 60°C arasında 10°C sıcaklık farkı oluşturularak, enzimin optimum pH'sında spektrofotometrik olarak esteraz aktivitesi deneyleri gerçekleştirildi. Daha sonra elde edilen aktivite değerlerinin logaritmaları ($\log k$) alındı. Sıcaklık değerleri Kelvine çevrilerek grafikte $1/T \times 1000$ °K⁻¹ olarak ifade edildi (Çizelge 4.14.- 4.16, Şekil 4.14.-4.17.) (Danişan *et al.* 2004). Çizilen grafikten faydalanılarak Arrhenius eğrisi elde edildi ve bu eğrinin eğimi kullanılarak E_a , ΔH ve Q_{10} değerleri hesaplandı.

Çizelge 4.14. Keçi karaciğer dokusu için değişik sıcaklıklardaki aktivite değerleri

Sıcaklık (°C)	Aktivite (EÜ/mL)
0	0,093
10	0,113
20	0,157
30	0,196
40	0,226
50	0,122
60	0,072



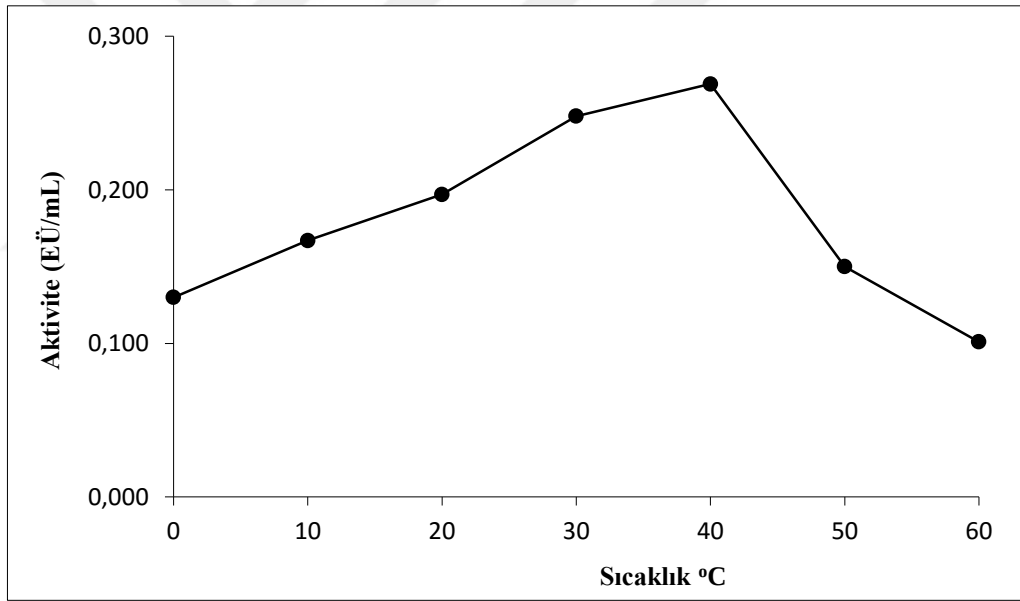
Şekil 4.14. Keçi karaciğer dokusu CA enziminin optimum sıcaklığını gösteren grafik



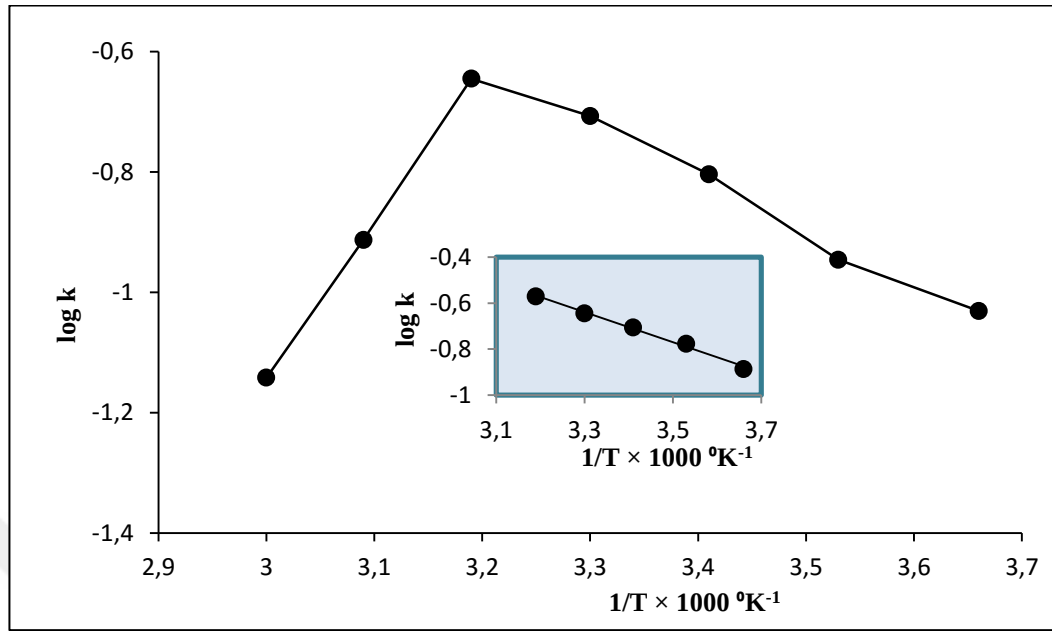
Şekil 4.15. Keçi karaciğer dokusu CA enziminin aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişim grafiği

Çizelge 4.15. Keçi böbrek dokusu için değişik sıcaklıklardaki aktivite değerleri

Sıcaklık (°C)	Aktivite (EÜ/mL)
0	0,130
10	0,167
20	0,197
30	0,248
40	0,269
50	0,150
60	0,101



Şekil 4.16. Keçi böbrek doku CA enziminin optimum sıcaklığını gösteren grafik



Şekil 4.17. Keçi böbrek dokusu CA enziminin aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişim grafik

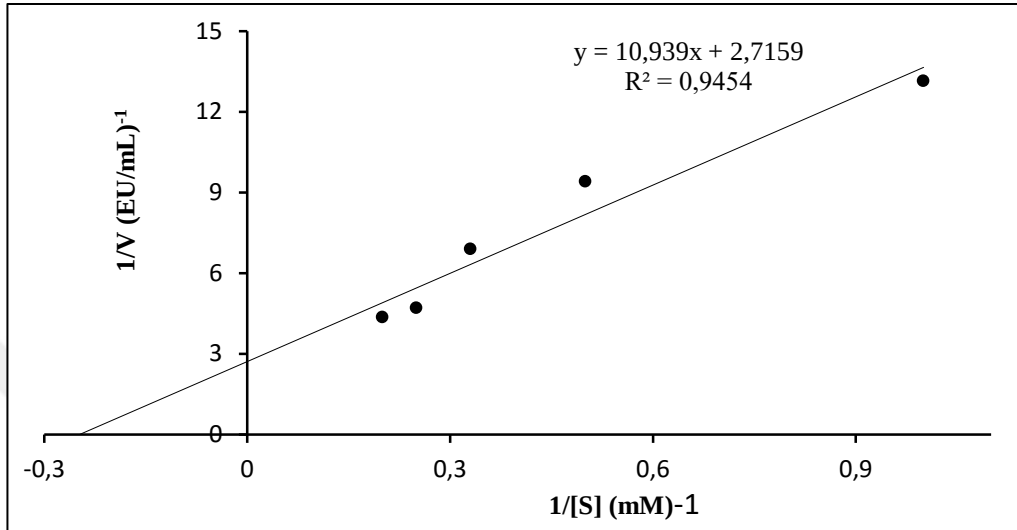
Çizelge 4.16. Keçi karaciğer ve böbrek dokuları CA enzimi için optimum sıcaklık, E_a , ΔH ve Q_{10} değerleri

Enzim	Dokular	Optimum Sıcaklık ($^\circ\text{C}$)	Aktivasyon Enerjisi (E_a , kcal/mol)	Aktivasyon Entalpisi (ΔH , kcal/mol)	Q_{10}
CA	Karaciğer	40	3,957	3,335	1,85
CA	Böbrek	40	2,995	2,374	1,79

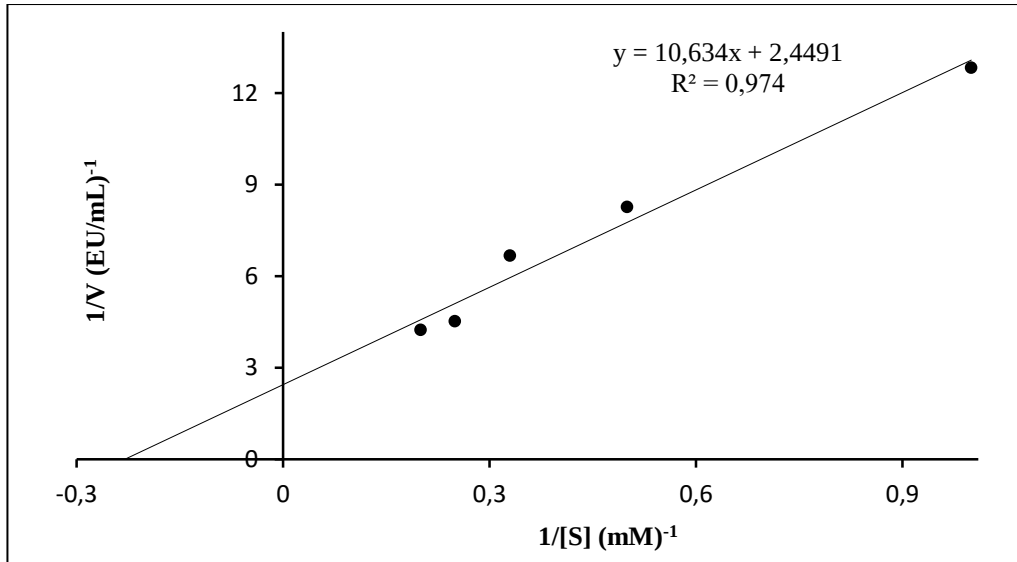
4.3.5. Keçi karaciğer ve böbrek dokularından elde edilen CA enziminin K_M , $V_{\max}$, k_{cat} ve V_0 değerlerinin bulunmasına yönelik çalışmalar

Keçi karaciğer ve böbrek dokularından saflaştırılan CA enziminin K_M ve $V_{\max}$ değerlerinin belirlenmesi için en az 5 farklı PNF konsantrasyonu kullanılarak optimum şartlarda aktivite ölçümü yapıldı ve Lineweaver-Burk grafiği çizildi ve bu grafikten K_M ve $V_{\max}$ değerleri hesaplandı (Şekil 4.18 ve 4.19). Daha sonra bulunan K_M ve $V_{\max}$ değerleri kullanılarak CA enzimin PNF substratı için turnover sayısını ifade eden k_{cat}

değeri hesaplandı. Hesaplanan bu değer ile enzimin özgülük sabiti değeri V_0 tespit edildi (Küçük 2015). Bu değerler çizelge 4.17’de verildi.



Şekil 4.18. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi için 5 farklı PNF konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.19. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi için 5 farklı PNF konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.17. Keçi karaciğer ve böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimleri için PNF substratı ile K_M , V_{max} , k_{cat} ve V_0 değerlerinin sonuçları

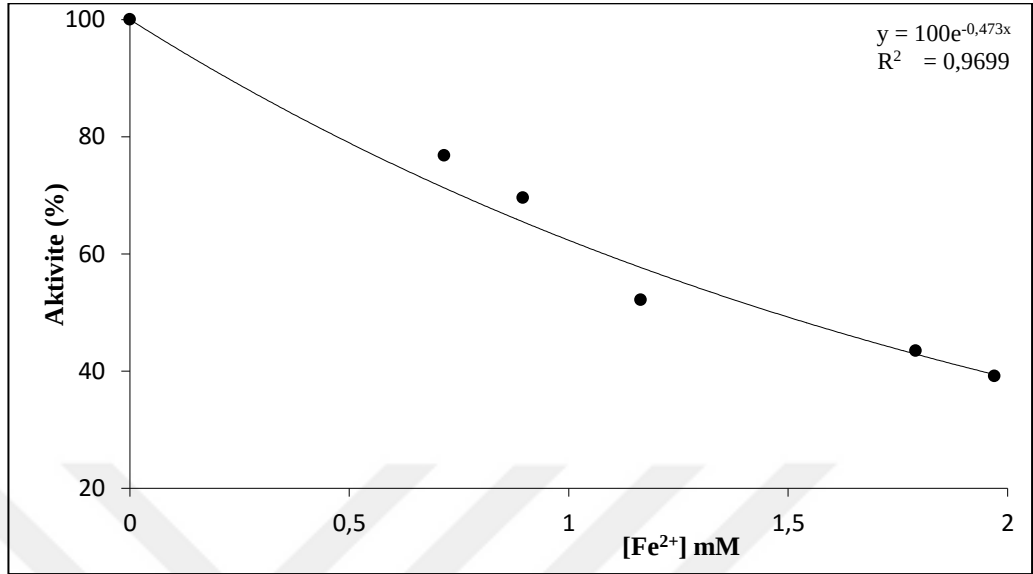
Enzim	Substrat	Dokular	K_M (mM)	V_{max} (EÜ/mL)	k_{cat} (s ⁻¹)	V_0 (mM ⁻¹ .s ⁻¹)
CA	PNF	Karaciğer	4,027	0,368	1328,51	$3,3 \times 10^5$
CA	PNF	Böbrek	4,342	0,408	906,66	$2,1 \times 10^5$

4.3.6. Bazı ağır metallerin keçi karaciğer ve böbrek dokularından elde edilen CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin incelenmesi

Keçi karaciğer ve böbrek 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 $FeCl_2$, $Pb(CH_3COO)_2$, $HgCl_2$, $CoCl_2$, $AgNO_3$ ve $CuSO_4.5H_2O$ bileşikleriyle sabit substrat konsantrasyonunda beş farklı inhibitör konsantrasyonu kullanılarak IC_{50} değeri (enzimin aktivitesini yarıya düşüren konsantrasyonu) % aktivite-[I] grafikleri çizilerek Çizelge 4.18-4.29 ve Şekil 4.20-4.29 aralığında verildi

Çizelge 4.18. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine Fe^{2+} iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve aktivite (%) değerleri

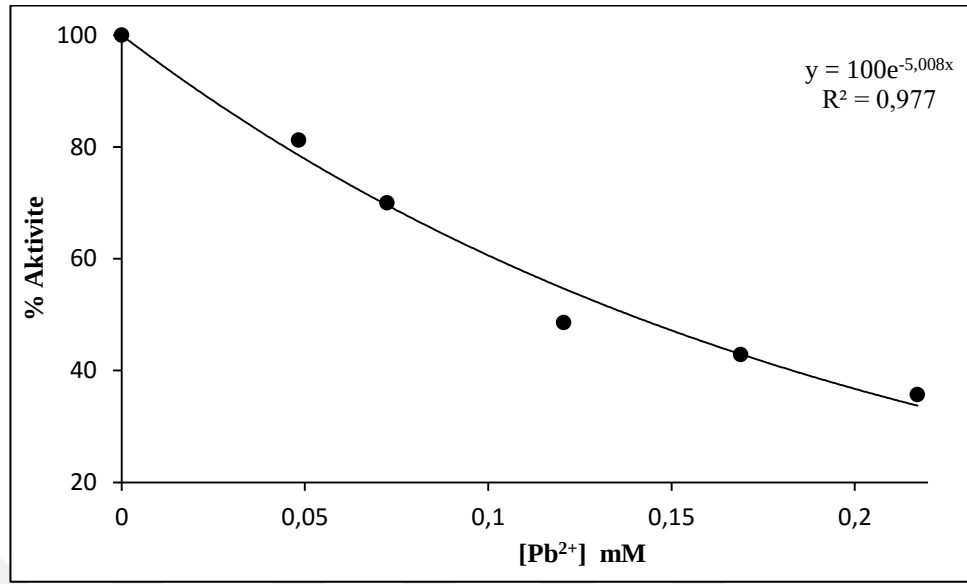
Substrat (µL)	Tris-SO ₄ tamponu (µL)	Enzim (µL)	Saf su (µL)	Toplam Hacim (µL)	[I] (mM)	Aktivite (%) (EÜ/mL)
360	400	50	190	1000	0,00	100
360	400	50	150	1000	0,71	76,81
360	400	50	150	1000	0,89	69,56
360	400	50	125	1000	1,16	52,17
360	400	50	90	1000	1,79	43,47
360	400	50	80	1000	1,96	39,13



Şekil 4.20. Keçi karaciğer dokusu CA enziminin esterase aktivitesi üzerine Fe^{2+} iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen Aktivite (%) - $[\text{Fe}^{2+}]$ grafiği

Çizelge 4.19. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin esterase aktivitesi üzerine Pb^{2+} iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve aktivite (%) değerleri

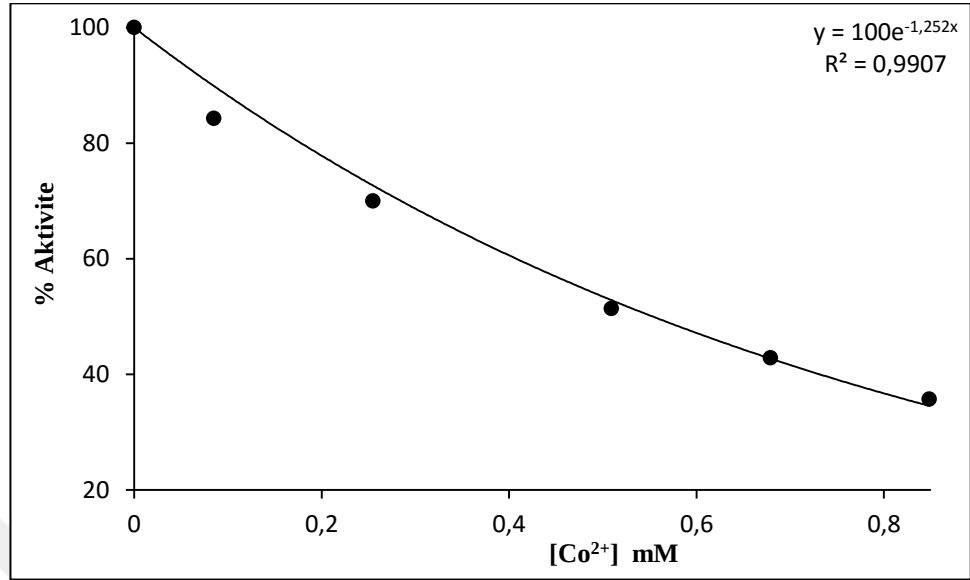
Substrat (μL)	Tris- SO_4 tamponu (μL)	Enzim (μL)	Saf su (μL)	Toplam Hacim(μL)	[I] (mM)	Aktivite (%) (EÜ/mL)
360	400	50	190	1000	0,00	100
360	400	50	180	1000	0,04	81,24
360	400	50	175	1000	0,07	70,00
360	400	50	165	1000	0,12	48,57
360	400	50	155	1000	0,16	42,85
360	400	50	145	1000	0,21	35,71



Şekil 4.21. Keçi karaciğer dokusu CA enziminin esterase aktivitesi üzerine Pb^{2+} iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen Aktivite (%) - $[Pb^{2+}]$ grafiği

Çizelge 4.20. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin esterase aktivitesi üzerine Co^{2+} iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve aktivite (%) değerleri

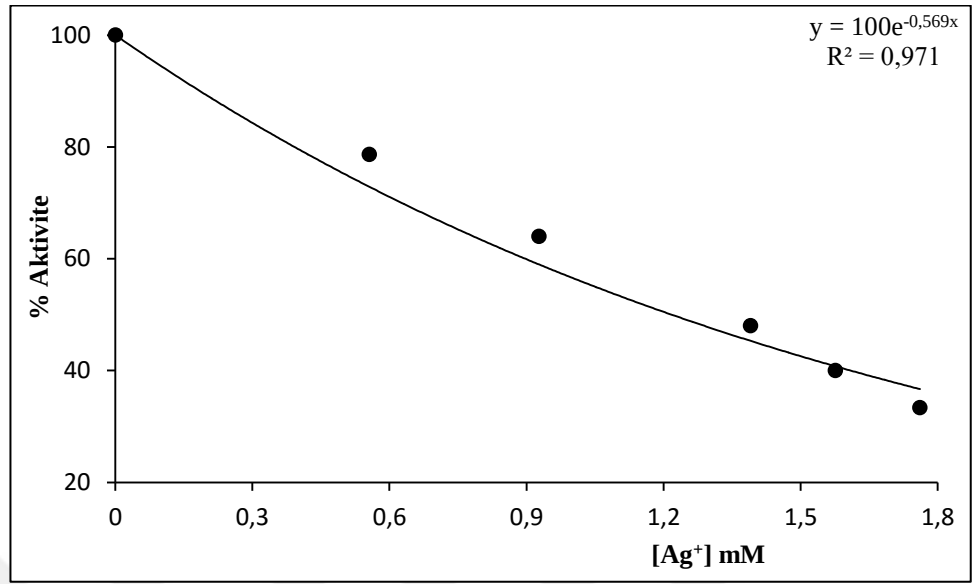
Substrat (μ L)	Tris-SO ₄ tamponu (μ L)	Enzim (μ L)	Saf su (μ L)	Toplam Hacim (μ L)	[I] (mM)	Aktivite (%) (EÜ/mL)
360	400	50	190	1000	0,00	100
360	400	50	185	1000	0,08	84,28
360	400	50	175	1000	0,25	70,00
360	400	50	160	1000	0,50	51,42
360	400	50	150	1000	0,67	42,85
360	400	50	140	1000	0,84	35,71



Şekil 4.22. Keçi karaciğer dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine Co^{2+} iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen Aktivite (%) - $[\text{Co}^{2+}]$ grafiği

Çizelge 4.21. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine Ag^+ iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve aktivite (%) değerleri

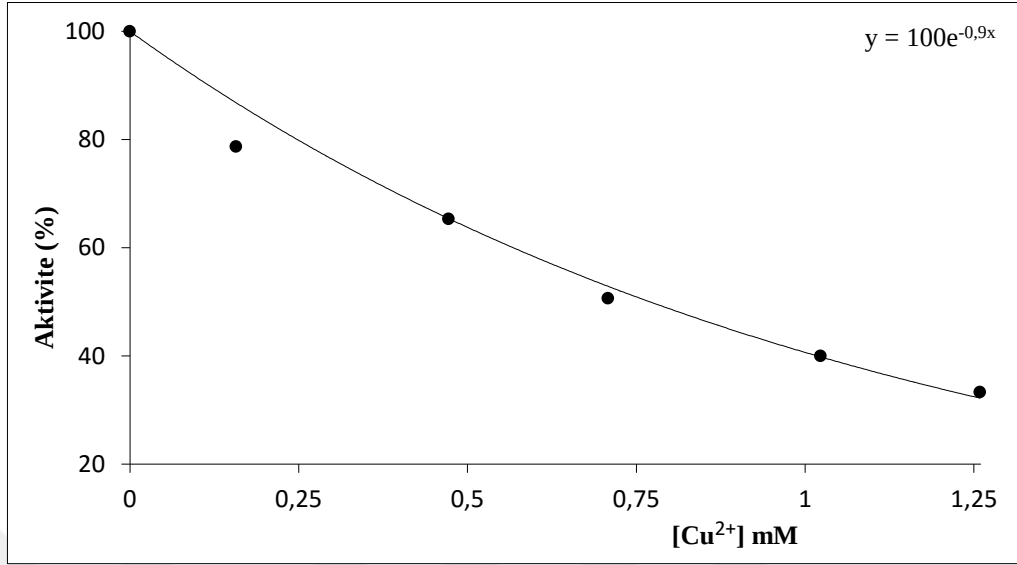
Substrat (μL)	Tris- SO_4 tamponu (μL)	Enzim (μL)	Saf su (μL)	Toplam Hacim (μL)	[I] (mM)	Aktivite (%) (EÜ/mL)
360	400	50	190	1000	0,00	100
360	400	50	130	1000	0,55	78,66
360	400	50	90	1000	0,92	64,00
360	400	50	40	1000	1,39	48,00
360	400	50	20	1000	1,57	40,00
360	400	50	0	1000	1,76	33,33



Şekil 4.23. Keçi karaciğer dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine Ag^+ iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen Aktivite (%) - $[\text{Ag}^+]$ grafiği

Çizelge 4.22. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine Cu^{2+} iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve aktivite (%) değerleri

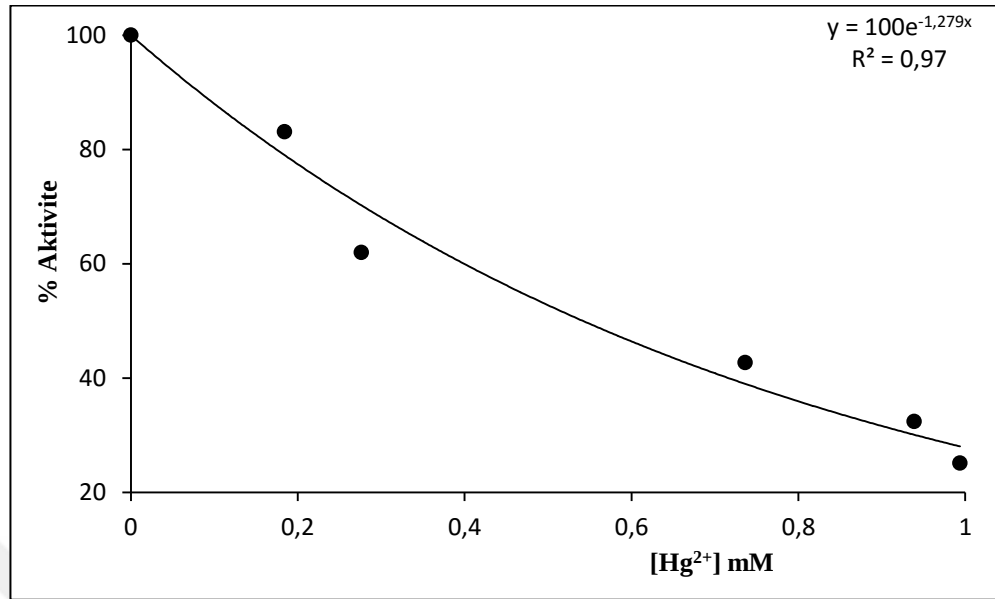
Substrat (μL)	Tris- SO_4 tamponu (μL)	Enzim (μL)	Saf su (μL)	Toplam Hacim (μL)	[I] (mM)	Aktivite (%) (EÜ/mL)
360	400	50	190	1000	0,00	100
360	400	50	180	1000	0,15	78,66
360	400	50	160	1000	0,47	65,33
360	400	50	145	1000	0,70	50,66
360	400	50	125	1000	1,02	40,00
360	400	50	110	1000	1,25	33,33



Şekil 4.24. Keçi karaciğer dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine Cu^{2+} iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen Aktivite (%) - $[\text{Cu}^{2+}]$ grafiği

Çizelge 4.23. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine Hg^{2+} iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve aktivite (%) değerleri

Substrat (μL)	Tris- SO_4 tamponu (μL)	Enzim (μL)	Saf su (μL)	Toplam Hacim (μL)	[I] (mM)	Aktivite (%) (EÜ/mL)
360	400	40	200	1000	0,00	100
360	400	40	150	1000	0,18	83,09
360	400	40	125	1000	0,27	61,97
360	400	40	0	1000	0,73	47,70
360	345	40	0	1000	0,93	32,39
360	330	40	0	1000	0,99	25,12



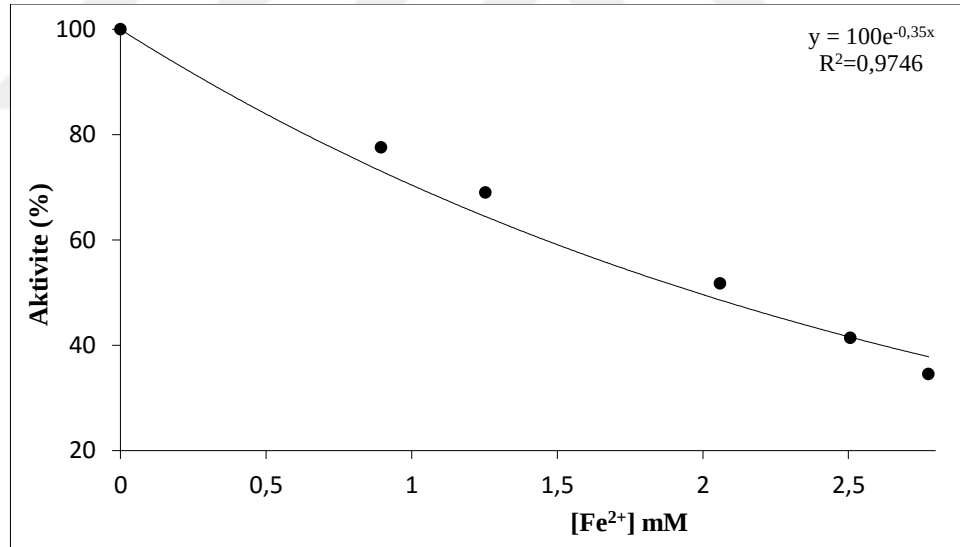
Şekil 4.25. Keçi karaciğer dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine Hg^{2+} iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen Aktivite (%) - $[\text{Hg}^{2+}]$ grafiği

Çizelge 4.24. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine metal iyonları ile yapılan çalışmalarda elde edilen IC_{50} değerleri

Kimyasal Madde	IC_{50} (mM)
Fe^{2+}	1,46
Pb^{2+}	0,13
Co^{2+}	0,55
Ag^+	1,21
Cu^{2+}	0,77
Hg^{2+}	0,54

Çizelge 4.25. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine Fe^{2+} iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve aktivite (%) değerleri

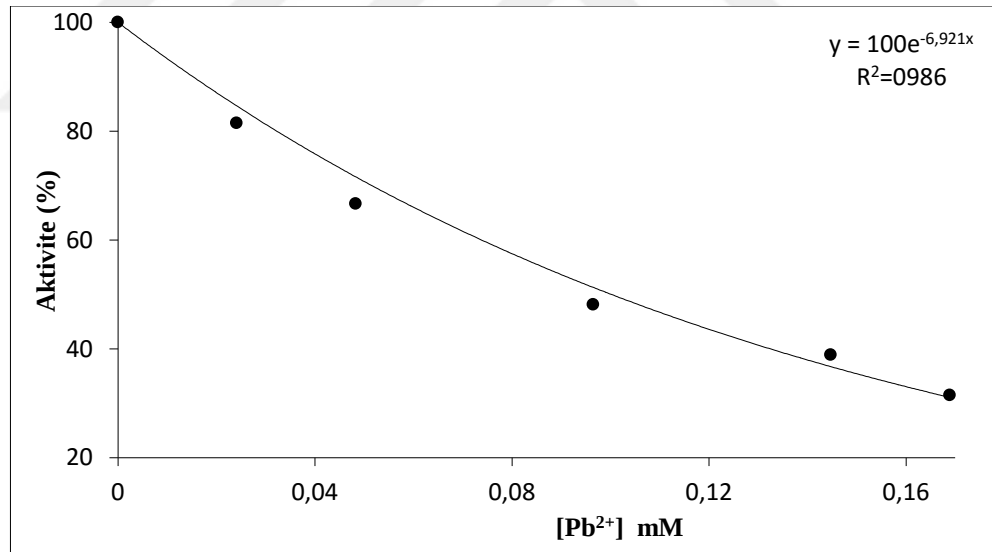
Substrat (μL)	Tris- SO_4 tamponu (μL)	Enzim (μL)	Saf su (μL)	Toplam Hacim (μL)	[I] (mM)	Aktivite (%) (EÜ/mL)
360	400	30	210	1000	0,00	100
360	400	30	160	1000	0,89	77,58
360	400	30	140	1000	1,25	68,96
360	400	30	95	1000	2,05	51,72
360	400	30	70	1000	2,50	41,38
360	400	30	55	1000	2,77	34,48



Şekil 4.26. Keçi böbrek dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine Fe^{2+} iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen Aktivite (%) - $[\text{Fe}^{2+}]$ grafiği

Çizelge 4.26. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine Pb^{2+} iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve aktivite (%) değerleri

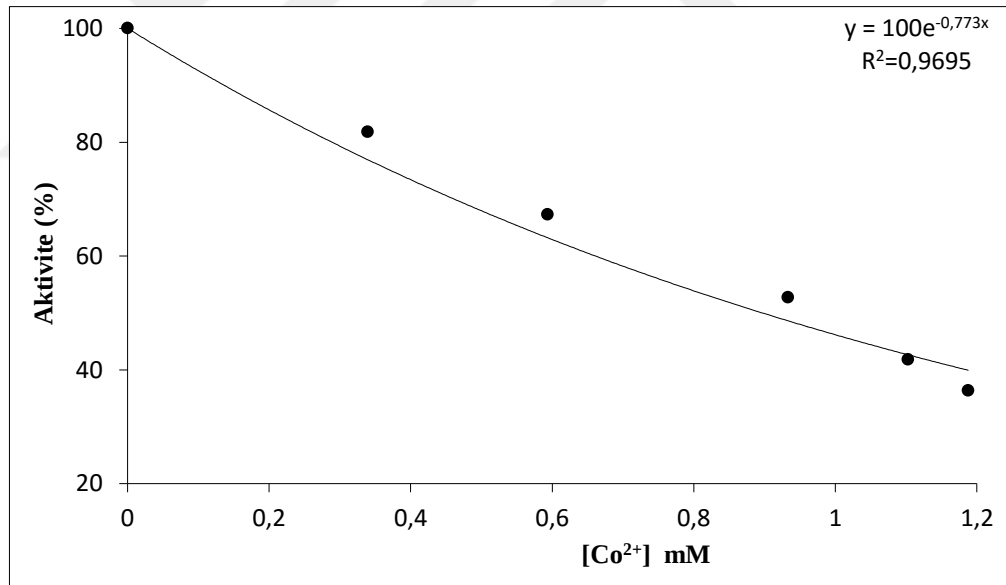
Substrat (μ L)	Tris-SO ₄ tamponu (μ L)	Enzim (μ L)	Saf su (μ L)	Toplam Hacim (μ L)	[I] (mM)	Aktivite (%) (EÜ/mL)
360	400	30	210	1000	0,00	100
360	400	30	205	1000	0,02	81,48
360	400	30	200	1000	0,04	66,66
360	400	30	190	1000	0,09	48,14
360	400	30	180	1000	0,14	38,88
360	400	30	175	1000	0,16	31,48



Şekil 4.27. Keçi böbrek dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine Pb^{2+} iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen Aktivite (%) - $[Pb^{2+}]$ grafiği

Çizelge 4.27. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine Co^{2+} iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve aktivite (%) değerleri

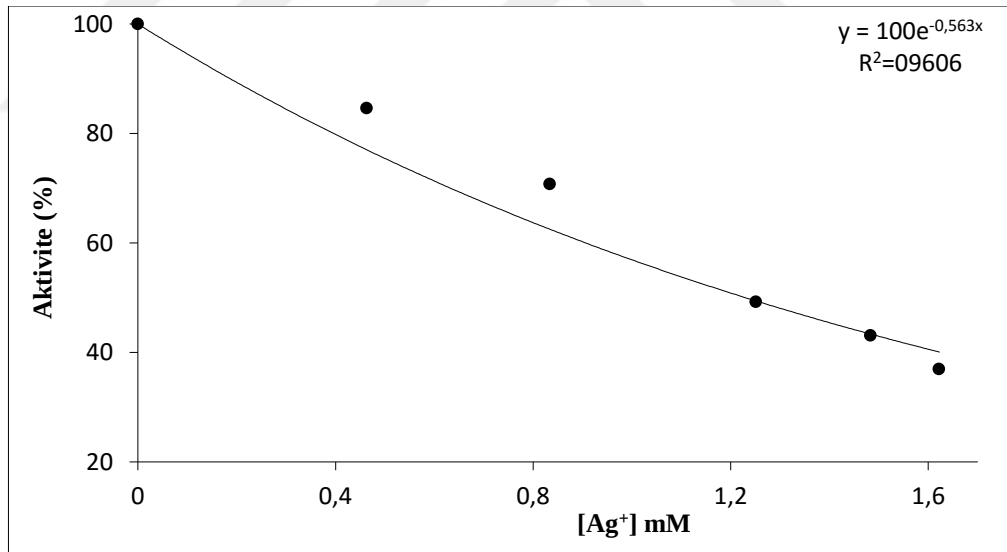
Substrat (μL)	Tris- SO_4 tamponu (μL)	Enzim (μL)	Saf su (μL)	Toplam Hacim (μL)	[I] (mM)	Aktivite (%) (EÜ/mL)
360	400	30	210	1000	0,00	100,0
360	400	30	190	1000	0,33	81,81
360	400	30	175	1000	0,59	67,27
360	400	30	155	1000	0,93	52,72
360	400	30	145	1000	1,10	41,81
360	400	30	140	1000	1,18	36,36



Şekil 4.28. Keçi böbrek dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine Co^{2+} iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen Aktivite (%) - $[\text{Co}^{2+}]$ grafiği

Çizelge 4.28. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine Ag^+ iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve aktivite (%) değerleri

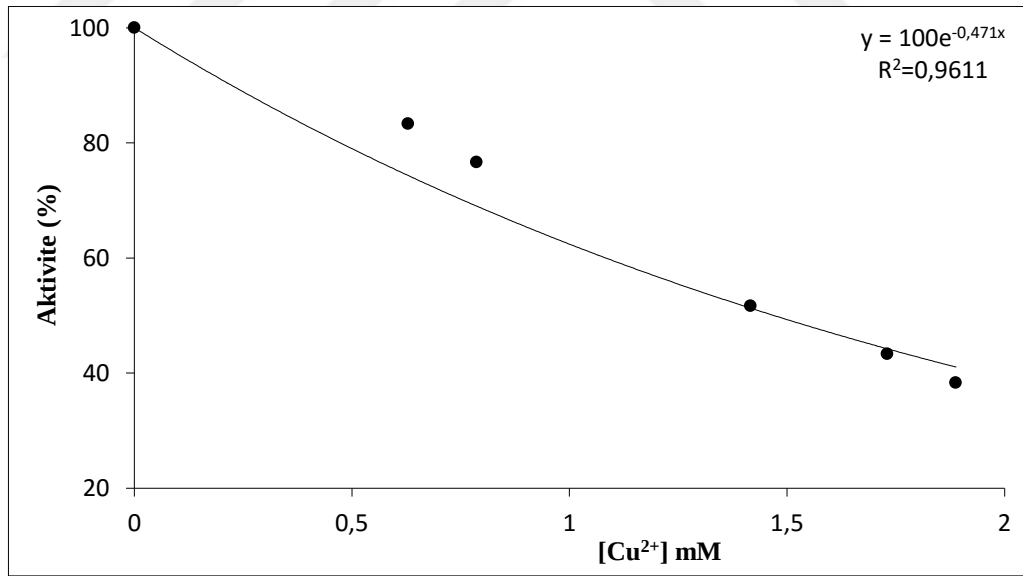
Substrat (μL)	Tris- SO_4 tamponu (μL)	Enzim (μL)	Saf su (μL)	Toplam Hacim (μL)	[I] (mM)	Aktivite (%) (EÜ/mL)
360	400	30	210	1000	0,00	100,00
360	400	30	160	1000	0,46	84,61
360	400	30	120	1000	0,83	70,77
360	400	30	75	1000	1,25	49,23
360	400	30	50	1000	1,48	43,07
360	400	30	35	1000	1,62	36,92



Şekil 4.29. Keçi böbrek dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine Ag^+ iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen Aktivite (%) - $[\text{Ag}^+]$ grafiği

Çizelge 4.29. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine Cu^{2+} iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve aktivite (%) değerleri

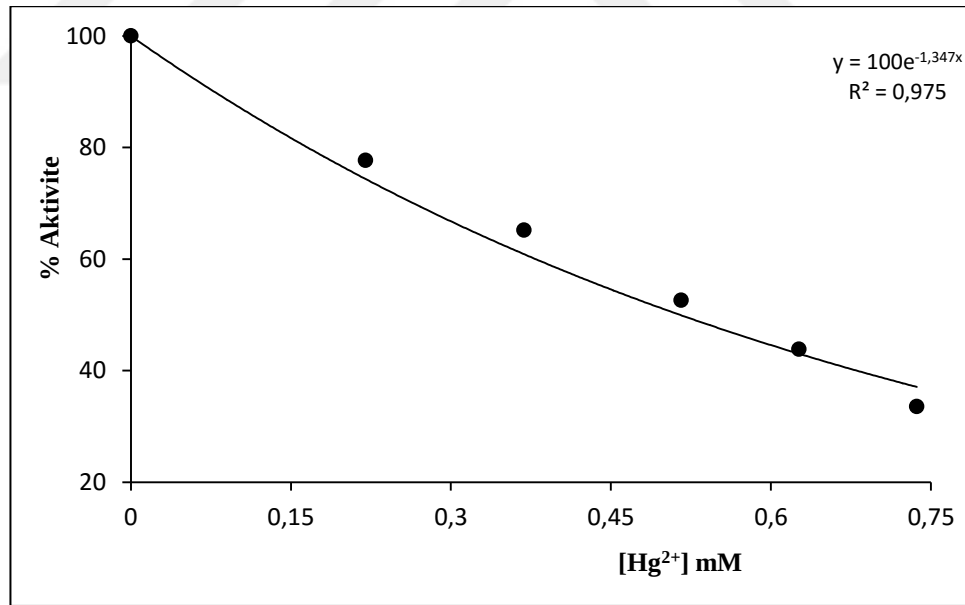
Substrat (μL)	Tris- SO_4 tamponu (μL)	Enzim (μL)	Saf su (μL)	Toplam Hacim (μL)	[I] (mM)	Aktivite (%) (EÜ/mL)
360	400	30	210	1000	0,00	100,00
360	400	30	170	1000	0,62	83,33
360	400	30	160	1000	0,78	76,66
360	400	30	120	1000	1,41	51,66
360	400	30	100	1000	1,73	43,33
360	400	30	90	1000	1,88	38,33



Şekil 4.30. Keçi böbrek dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine Cu^{2+} iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen Aktivite (%) - $[\text{Cu}^{2+}]$ grafiği

Çizelge 4.30. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine Hg^{2+} iyonu ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve aktivite (%) değerleri

Substrat (μL)	Tris- SO_4 tamponu (μL)	Enzim (μL)	Saf su (μL)	Toplam Hacim (μL)	[I] (mM)	Aktivite (%) (EÜ/mL)
360	400	50	190	1000	0,00	100,00
360	400	50	130	1000	0,22	77,71
360	400	50	90	1000	0,36	65,17
360	400	50	50	1000	0,51	52,63
360	400	50	20	1000	0,62	43,85
360	390	50	0	1000	0,73	33,57



Şekil 4.31. Keçi böbrek dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine Hg^{2+} iyonunun farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen Aktivite (%) - [Hg^{2+}] grafiği

Çizelge 4.31. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine metal iyonları ile yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen IC₅₀ değerleri

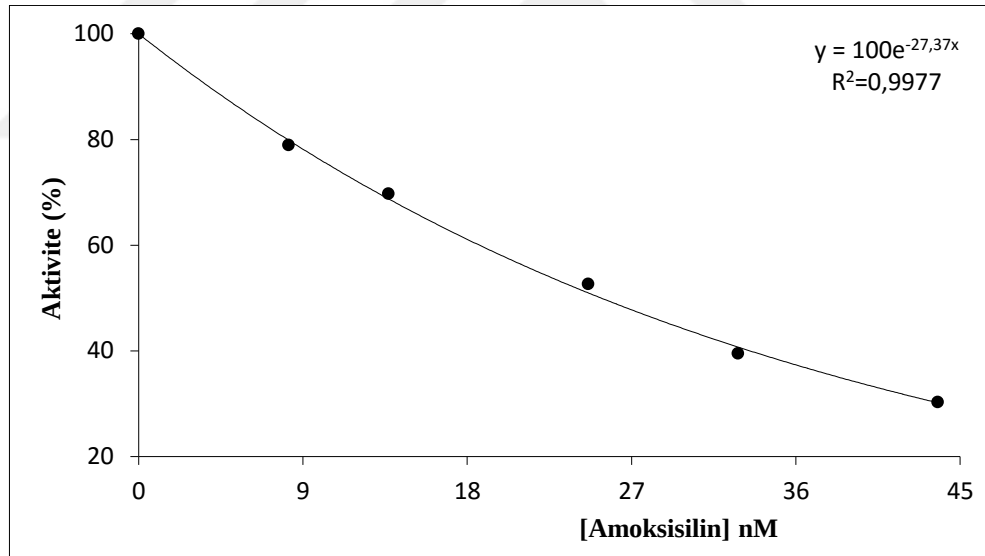
Kimyasal Madde	IC ₅₀ (mM)
Fe ²⁺	1,98
Pb ²⁺	0,10
Co ²⁺	0,89
Ag ⁺	1,23
Cu ²⁺	1,47
Hg ²⁺	0,51

4.3.7. Bazı antibiyotiklerin keçi karaciğer ve böbrek dokularından elde edilen CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin incelenmesi

Keçi karaciğer ve böbrek dokularından, afinite kromatografisiyle saflaştırılan CA enziminin aktivitesi üzerine bazı antibiyotik ilaçların inhibisyon etkileri incelendi. Kinetik ölçümler enzimin esteraz aktivitesinden faydalanılarak gerçekleştirildi (Kılınç 2011). Enzimin esteraz aktivitesini inhibe eden amoksisilin ve vankomisin gibi antibiyotiklerin sabit substrat konsantrasyonunda beş farklı inhibitör konsantrasyonu kullanılarak IC₅₀ değeri (enzimin aktivitesini yarıya düşüren konsantrasyonu) % aktivite-[I] grafikleri çizildi.

Çizelge 4.32. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine amoksisilin ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve aktivite (%) değerleri

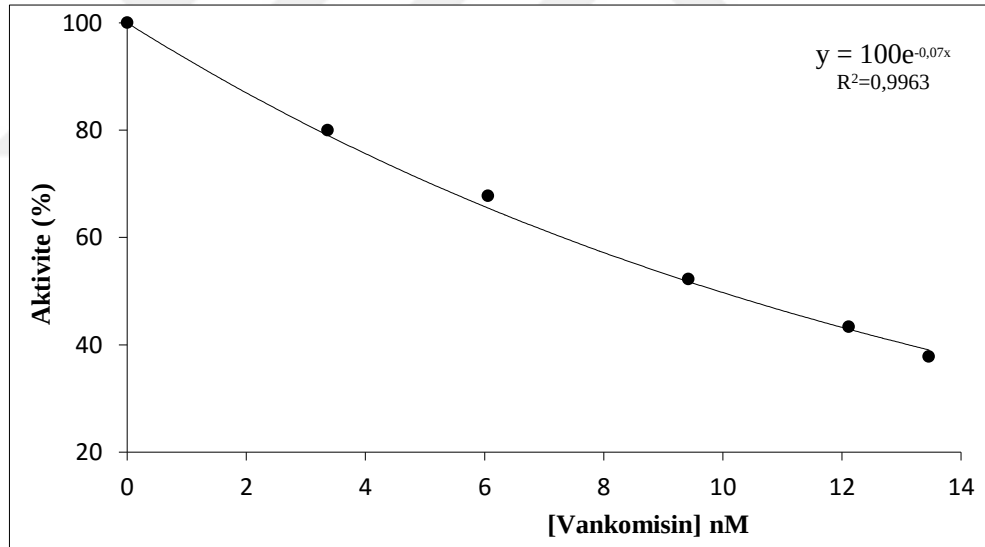
Substrat (µL)	Tris-SO ₄ tamponu (µL)	Enzim (µL)	Saf su (µL)	Toplam Hacim (µL)	[I] (nM)	Aktivite (%) (EÜ/mL)
360	400	40	200	1000	0,00	100
360	400	40	170	1000	8,21	78,94
360	400	40	150	1000	13,68	69,73
360	400	40	110	1000	24,63	52,63
360	400	40	80	1000	32,84	39,47
360	400	40	40	1000	43,78	30,26



Şekil 4.32. Keçi karaciğer dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine amoksisilin'in farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen Aktivite (%) - [Amoksisilin] grafiği

Çizelge 4.33. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine vankomisin ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri

Substrat (µL)	Tris-SO ₄ tamponu(µL)	Enzim (µL)	Saf su (µL)	Toplam Hacim(µL)	[I] (nM)	Aktivite (%) (EÜ/mL)
360	400	40	200	1000	0,00	100
360	400	40	150	1000	3,36	80,00
360	400	40	110	1000	6,05	67,77
360	400	40	60	1000	9,42	52,22
360	400	40	20	1000	12,11	43,33
360	400	40	0	1000	13,46	37,77



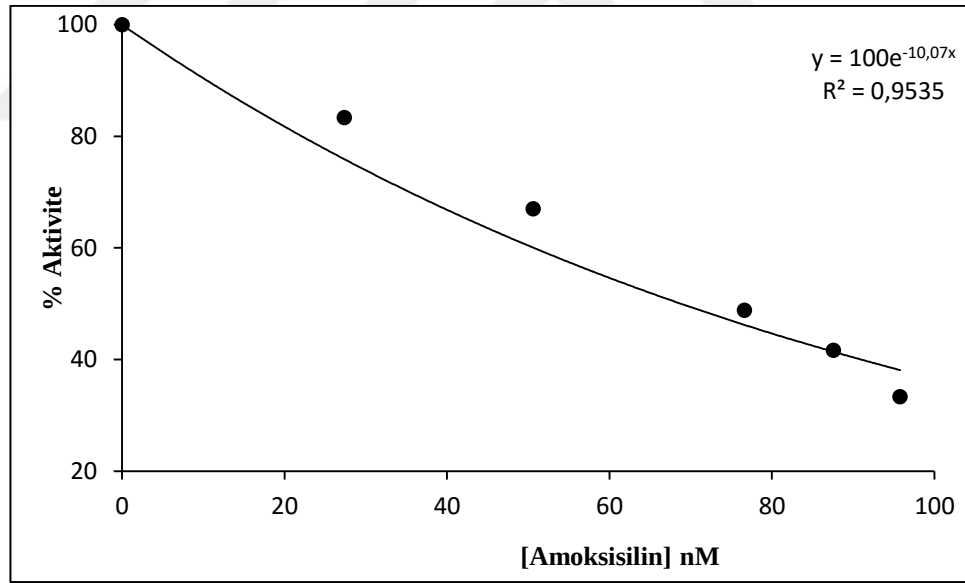
Şekil 4.33. Keçi karaciğer dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine vankomisin'in farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen Aktivite (%) - [Vankomisin] grafiği

Çizelge 4.34. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine antibiyotikler ile yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen IC₅₀ değerleri

Antibiyotik	IC ₅₀ (nM)
Amoksisilin	25,32
Vankomisin	9,90

Çizelge 4.35. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine amoksisilin ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve aktivite (%) değerleri

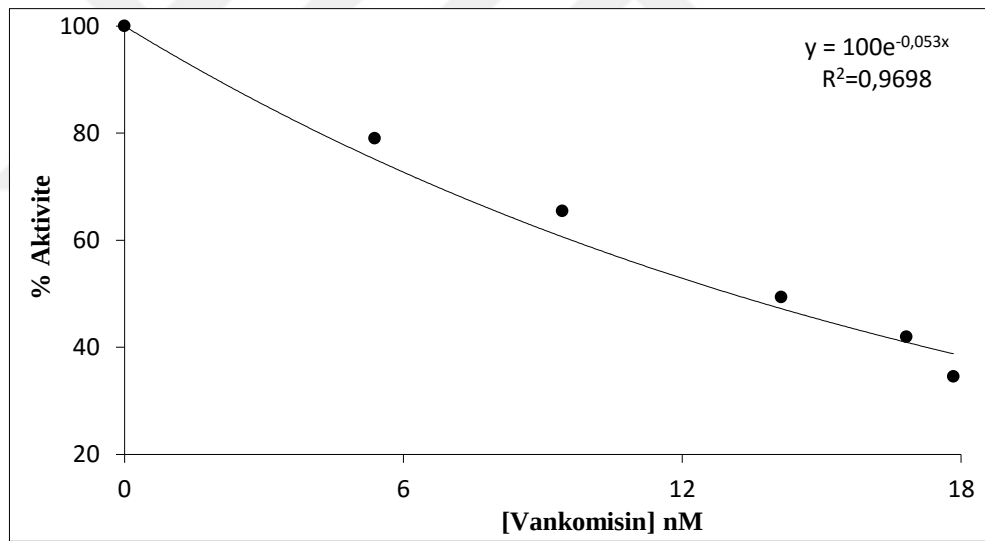
Substrat (μL)	Tris-SO ₄ tamponu (μL)	Enzim (μL)	Saf su (μL)	Toplam Hacim (μL)	[I] (nM)	Aktivite (%) (EÜ/mL)
360	400	30	210	1000	0,000	100
360	400	30	110	1000	27,36	83,33
360	400	30	25	1000	50,62	67,00
360	330	30	0	1000	76,62	48,81
360	290	30	0	1000	87,57	41,66
360	260	30	0	1000	95,78	33,33



Şekil 4.34. Keçi böbrek dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine amoksisilin'in farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen Aktivite (%)-[Amoksisilin] grafiği

Çizelge 4.36. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine vankomisin ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve Aktivite (%) değerleri

Substrat (μL)	Tris-SO ₄ tamponu (μL)	Enzim (μL)	Saf su (μL)	Toplam Hacim (μL)	[I] (nM)	Aktivite (%) (EÜ/mL)
360	400	30	210	1000	0,00	100
360	400	30	130	1000	5,38	79,01
360	400	30	70	1000	9,42	65,43
360	400	30	0	1000	14,13	49,38
360	360	30	0	1000	16,82	41,97
360	345	30	0	1000	17,82	34,56



Şekil 4.35. Keçi böbrek dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine Vankomisin'in farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen Aktivite (%) - [Vankomisin] grafiği

Çizelge 4.37. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine antibiyotikler ile yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen IC₅₀ değerleri

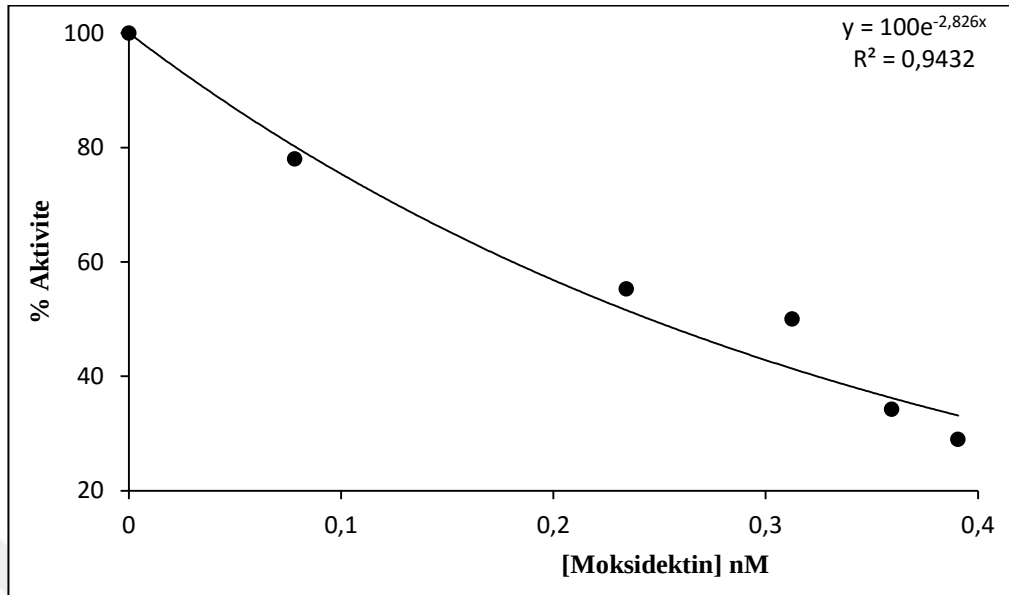
Antibiyotik	IC ₅₀ (nM)
Amoksisilin	68,818
Vankomisin	13,075

4.3.8. Bazı avermektinlerin keçi karaciğer ve böbrek dokularından elde edilen CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin incelenmesi

Keçi karaciğer ve böbrek dokularından, afinite kromatografisiyle saflaştırılan CA enziminin aktivitesi üzerine bazı avermektinlerin inhibisyon etkileri incelendi. Kinetik ölçümler enzimin esteraz aktivitesinden faydalanılarak gerçekleştirildi. Enzimin esteraz aktivitesini inhibe eden Moksidektin, Doramektin, Abamektin ve Eprinomektin gibi avermektin grubu ilaçların sabit substrat konsantrasyonunda beş farklı inhibitör konsantrasyonu kullanılarak enzimin aktivitesini yarıya düşüren konsantrasyonu (IC_{50}) değeri ile % aktivite-[I] grafikleri çizildi (Kose *et al.* 2016).

Çizelge 4.38. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine moksidektin ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve aktivite (%) değerleri

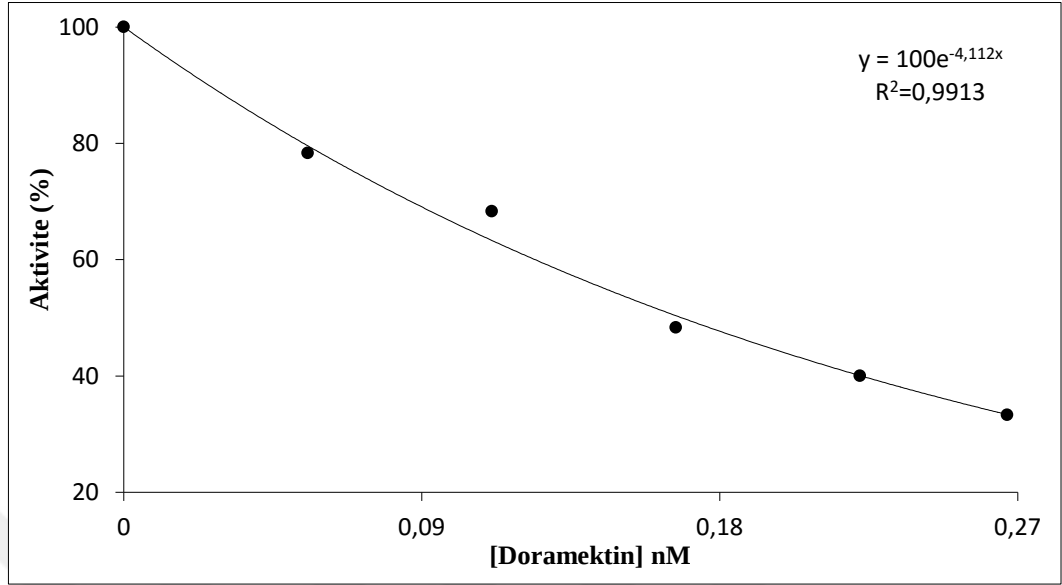
Substrat (μ L)	Tris-SO ₄ tamponu (μ L)	Enzim (μ L)	Saf su (μ L)	Toplam Hacim (μ L)	[I] (nM)	Aktivite (%) (EÜ/mL)
360	400	100	140	1000	0,00	100
360	400	100	90	1000	0,078	78,00
360	390	100	0	1000	0,234	55,26
360	340	100	0	1000	0,312	50,00
360	310	100	0	1000	0,359	34,21
360	290	100	0	1000	0,390	28,94



Şekil 4.36. Keçi karaciğer dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine moksidektin'nin farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen Aktivite (%)-[Moksidektin] grafiği

Çizelge 4.39. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine doramektin ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve aktivite (%) değerleri

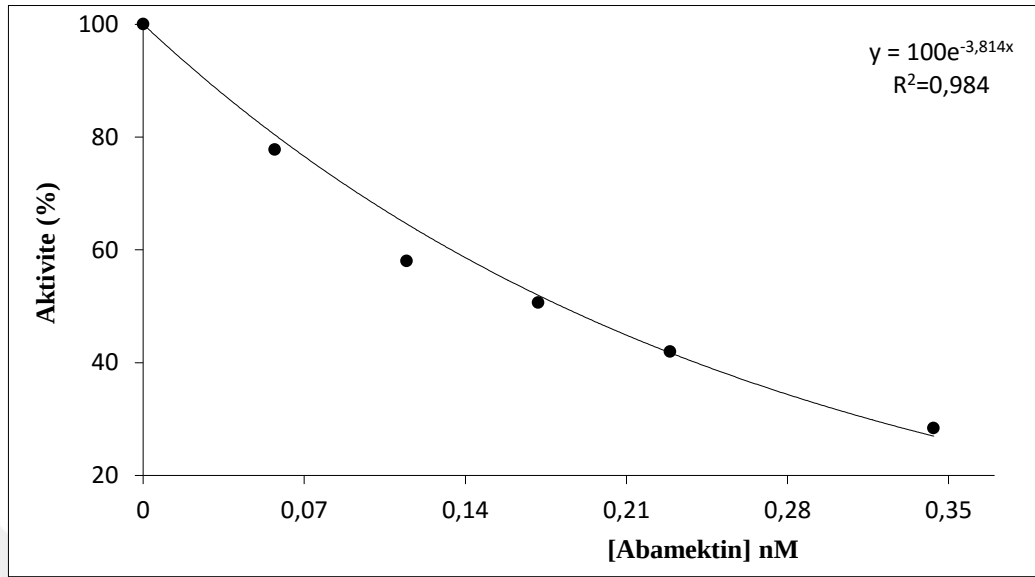
Substrat (µL)	Tris-SO ₄ tamponu(µL)	Enzim (µL)	Saf su (µL)	Toplam Hacim(µL)	[I] (nM)	Aktivite (%) (EÜ/mL)
360	400	80	160	1000	0,000	100
360	400	80	110	1000	0,055	78,33
360	400	80	60	1000	0,111	68,33
360	400	80	10	1000	0,166	48,33
360	360	80	0	1000	0,222	40,00
360	320	80	0	1000	0,266	33,33



Şekil 4.37. Keçi karaciğer dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine doramektin'in farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen aktivite (%)- [Doramektin] grafiği

Çizelge 4.40. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine abamektin ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve aktivite (%) değerleri

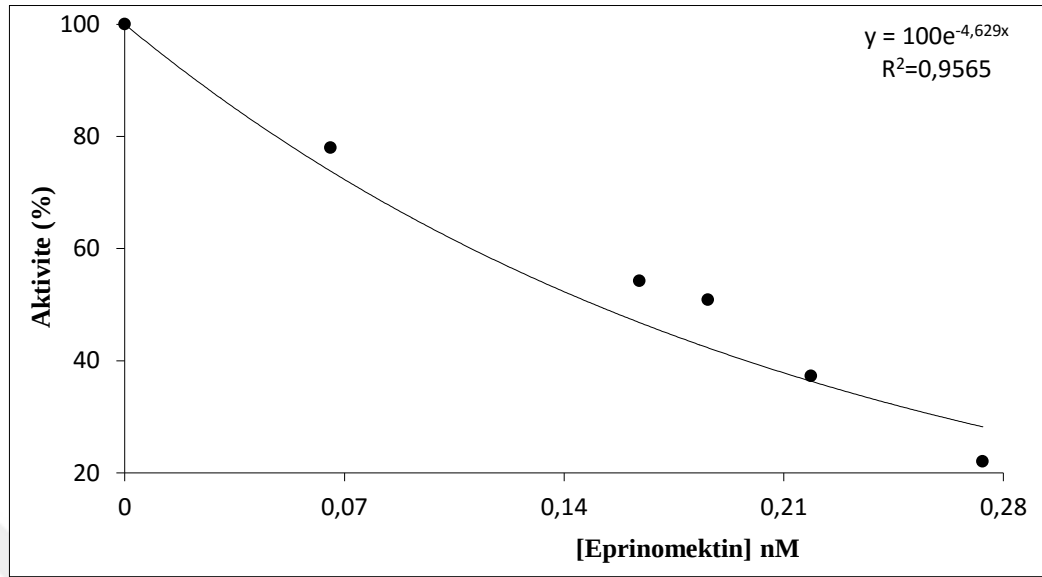
Substrat (µL)	Tris-SO ₄ tamponu (µL)	Enzim (µL)	Saf su (µL)	Toplam Hacim (µL)	[I] (nM)	Aktivite (%) (EÜ/mL)
360	400	80	160	1000	0,000	100
360	400	80	110	1000	0,057	77,77
360	400	80	60	1000	0,114	50,61
360	400	80	10	1000	0,171	41,97
360	360	80	0	1000	0,229	40,00
360	260	80	0	1000	0,343	28,39



Şekil 4.38. Keçi karaciğer dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine abamektin'in farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Abamektin] grafiği

Çizelge 4.41. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine eprinomektin ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve % aktivite değerleri

Substrat (µL)	Tris-SO ₄ tamponu(µL)	Enzim (µL)	Saf su (µL)	Toplam Hacim(µL)	[I] (nM)	Aktivite (%) (EÜ/mL)
360	400	80	160	1000	0,000	100
360	400	80	100	1000	0,065	77,96
360	400	80	10	1000	0,164	54,23
360	390	80	0	1000	0,185	50,84
360	360	80	0	1000	0,218	37,28
360	310	80	0	1000	0,273	22,03



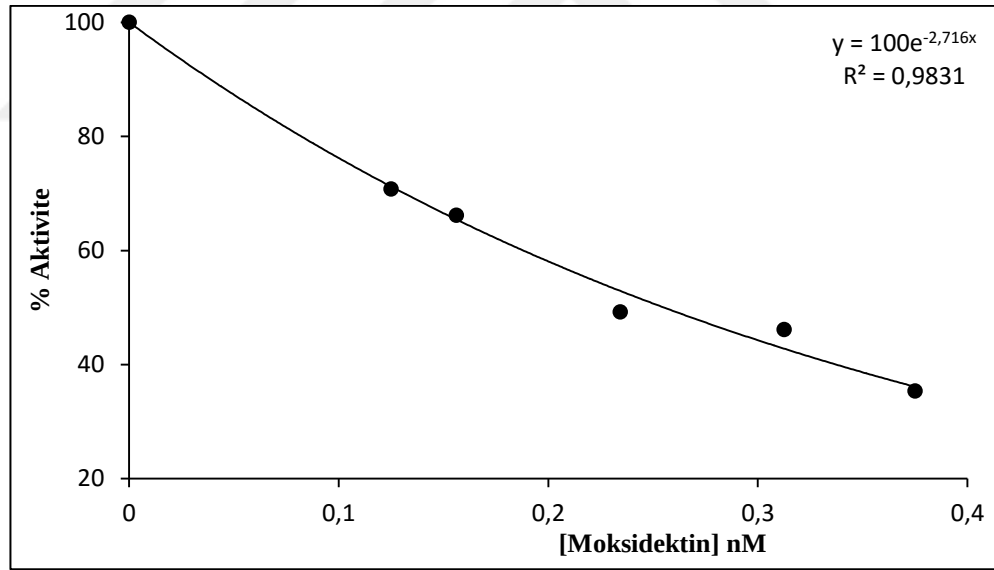
Şekil 4.39. Keçi karaciğer dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine eprinomectin'in farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen aktivite (%) - [Eprinomectin] grafiği

Çizelge 4.42. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine avermektinler ile yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen IC₅₀ değerleri

Avermektinler	IC ₅₀ (nM)
Moksidektin	0,245
Doramektin	0,168
Abamektin	0,181
Eprinomectin	0,149

Çizelge 4.43. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine moksidektin ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve aktivite (%) değerleri

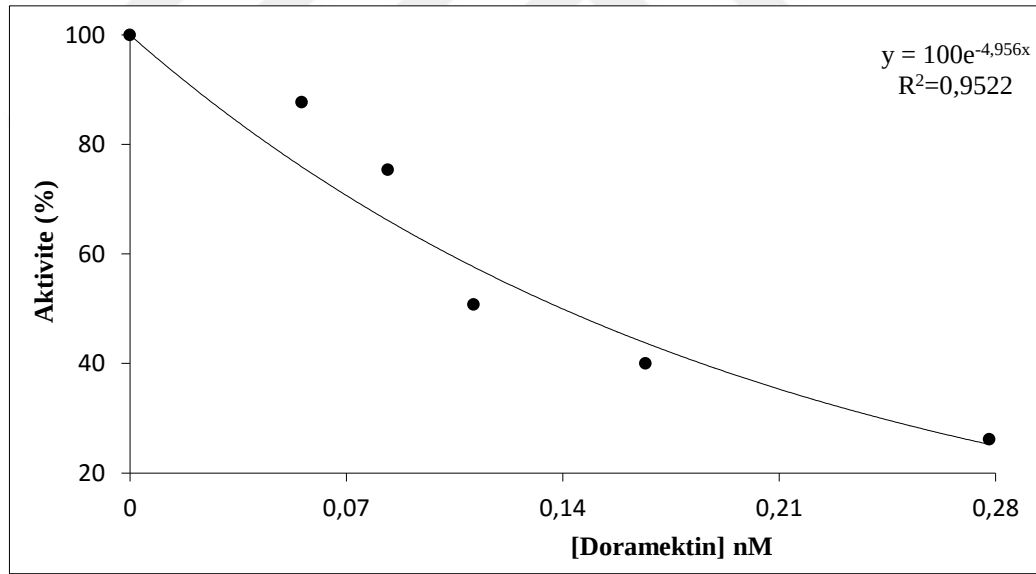
Substrat (µL)	Tris-SO ₄ tamponu (µL)	Enzim (µL)	Saf su (µL)	Toplam Hacim (µL)	[I] (nM)	Aktivite (%) (EÜ/mL)
360	400	50	190	1000	0,00	100
360	400	50	110	1000	0,125	70,77
360	400	50	90	1000	0,156	66,15
360	400	50	40	1000	0,234	49,23
360	390	50	0	1000	0,312	46,15
360	350	50	0	1000	0,375	35,38



Şekil 4.40. Keçi böbrek dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine moksidektin'in farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen Aktivite (%) - [Moksidektin] grafiği

Çizelge 4.44. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine doramektin ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve aktivite (%) değerleri

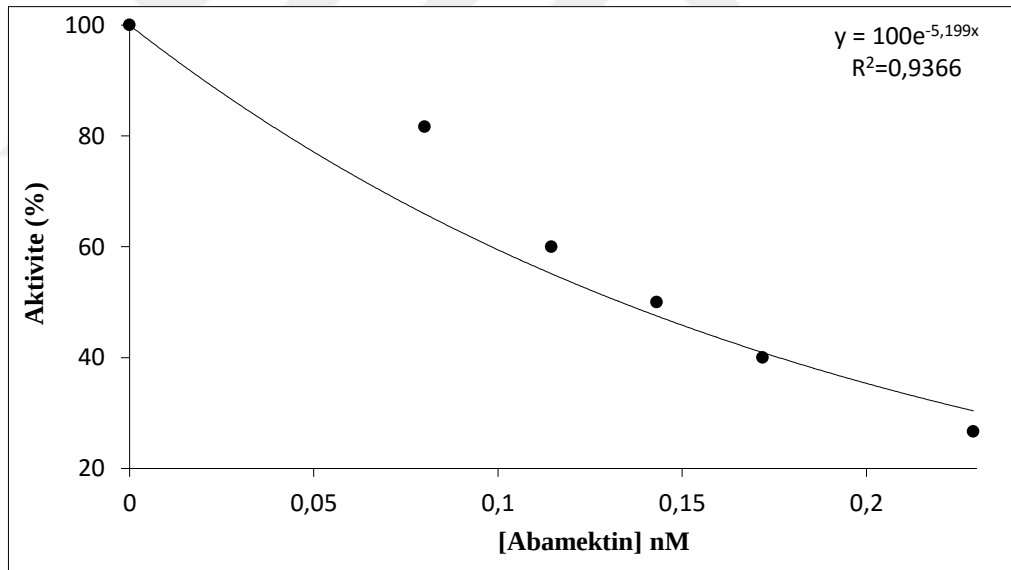
Substrat (µL)	Tris-SO ₄ tamponu (µL)	Enzim (µL)	Saf su (µL)	Toplam Hacim (µL)	[I] (nM)	Aktivite (%) (EÜ/mL)
360	400	75	165	1000	0,000	100
360	400	75	115	1000	0,055	87,69
360	400	75	90	1000	0,083	75,38
360	400	75	65	1000	0,111	50,76
360	400	75	15	1000	0,166	40,00
360	315	75	0	1000	0,278	26,15



Şekil 4.41. Keçi böbrek dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine doramektin'nin farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen aktivite (%) -[Doramektin] grafiği

Çizelge 4.45. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine abamektin ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve aktivite (%) değerleri

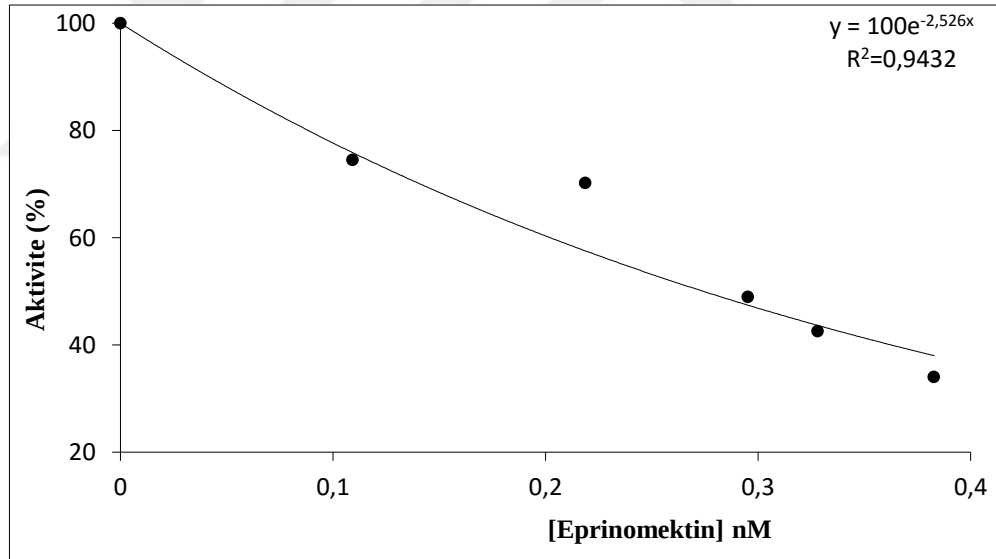
Substrat (µL)	Tris-SO ₄ tamponu (µL)	Enzim (µL)	Saf su (µL)	Toplam Hacim (µL)	[I] (nM)	Aktivite (%) (EÜ/mL)
360	400	60	180	1000	0,000	100
360	400	60	110	1000	0,080	81,66
360	400	60	80	1000	0,114	60,00
360	400	60	55	1000	0,143	50,00
360	400	60	30	1000	0,171	40,00
360	380	60	0	1000	0,229	26,66



Şekil 4.42. Keçi böbrek dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine abamektin'nin farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite- [Abamektin] grafiği

Çizelge 4.46. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine eprinomektin ile yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör konsantrasyonu ve aktivite (%) değerleri

Substrat (µL)	Tris-SO ₄ tamponu (µL)	Enzim (µL)	Saf su (µL)	Toplam Hacim (µL)	[I] (nM)	Aktivite (%) (EÜ/mL)
360	400	60	180	1000	0,000	100
360	400	60	80	1000	0,080	81,66
360	380	60	0	1000	0,114	60,00
360	310	60	0	1000	0,143	50,00
360	280	60	0	1000	0,171	40,00
360	230	60	0	1000	0,229	26,66



Şekil 4.43. Keçi böbrek dokusu CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine eprinomektin'in farklı inhibitör konsantrasyonunda elde edilen Aktivite (%) - [Eprinomektin] grafiği

Çizelge 4.47. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine avermektinler ile yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen IC₅₀ değerleri

Antibiyotik Madde	IC ₅₀ (nM)
Moksidektin	0,255
Doramektin	0,139
Abamektin	0,133
Eprinomektin	0,274

4.3.9. Keçi karaciğer ve böbrek dokularından elde edilen CA enzimi için inhibitör etkisi gösteren ağır metallerin Ki sabitlerinin ve inhibisyon türünün bulunması

Inhibitör çalışmasında keçi karaciğer ve böbrek dokularından elde edilen CA enzimini inhibe eden FeCl₂, Pb(CH₃COO)₂, HgCl₂, CoCl₂, AgNO₃ ve CuSO₄.5H₂O 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. Saflaştırılan CA enzimleri için K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan ağır metal için çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen ağır metal konsantrasyonları belirlendi. Daha sonra keçi karaciğer ve böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi için üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda 1/V ve 1/[S] değerleri belirlenerek Lineweaver-Burk grafiği çizilerek K_i değeri ve inhibisyon tipi tayin edildi (Lineweaver and Burk 1934).

Çizelge 4.48. Keçi 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_4 (μL)	Enzim (μL)	Saf su (μL)	Substrat (μL)	[S] (mM)	[I] (mM)	Toplam (μL)
400	50	500	50	0,15	0,00	1000
400	50	460	50	0,15	0,71	1000
400	50	435	50	0,15	1,16	1000
400	50	390	50	0,15	1,96	1000
400	50	450	100	0,30	0,00	1000
400	50	410	100	0,30	0,71	1000
400	50	385	100	0,30	1,16	1000
400	50	340	100	0,30	1,96	1000
400	50	400	150	0,45	0,00	1000
400	50	360	150	0,45	0,71	1000
400	50	335	150	0,45	1,16	1000
400	50	290	150	0,45	1,96	1000
400	50	350	200	0,60	0,00	1000
400	50	310	200	0,60	0,71	1000
400	50	285	200	0,60	1,16	1000
400	50	240	200	0,60	1,96	1000
400	50	300	250	0,75	0,00	1000
400	50	260	250	0,75	0,71	1000
400	50	235	250	0,75	1,16	1000
400	50	190	250	0,75	1,96	1000

Çizelge 4.49. Keçi 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 ₄ (μL)	Enzim (μL)	Saf su (μL)	Substrat (μL)	[S] (mM)	[I] (mM)	Toplam (μL)
400	50	500	50	0,15	0,00	1000
400	50	490	50	0,15	0,04	1000
400	50	475	50	0,15	0,12	1000
400	50	455	50	0,15	0,21	1000
400	50	450	100	0,30	0,00	1000
400	50	440	100	0,30	0,04	1000
400	50	425	100	0,30	0,12	1000
400	50	405	100	0,30	0,21	1000
400	50	400	150	0,45	0,00	1000
400	50	390	150	0,45	0,04	1000
400	50	375	150	0,45	0,12	1000
400	50	355	150	0,45	0,21	1000
400	50	350	200	0,60	0,00	1000
400	50	340	200	0,60	0,04	1000
400	50	325	200	0,60	0,12	1000
400	50	305	200	0,60	0,21	1000
400	50	300	250	0,75	0,00	1000
400	50	290	250	0,75	0,04	1000
400	50	275	250	0,75	0,12	1000
400	50	255	250	0,75	0,21	1000

Çizelge 4.50. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine Co^{2+} iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tris- SO_4 (μL)	Enzim (μL)	Saf su (μL)	Substrat (μL)	[S] (mM)	[I] (mM)	Toplam (μL)
400	50	500	50	0,15	0,00	1000
400	50	495	50	0,15	0,08	1000
400	50	470	50	0,15	0,50	1000
400	50	450	50	0,15	0,84	1000
400	50	450	100	0,30	0,00	1000
400	50	445	100	0,30	0,08	1000
400	50	420	100	0,30	0,50	1000
400	50	400	100	0,30	0,84	1000
400	50	400	150	0,45	0,00	1000
400	50	395	150	0,45	0,08	1000
400	50	370	150	0,45	0,50	1000
400	50	350	150	0,45	0,84	1000
400	50	350	200	0,60	0,00	1000
400	50	345	200	0,60	0,08	1000
400	50	320	200	0,60	0,50	1000
400	50	300	200	0,60	0,84	1000
400	50	300	250	0,75	0,00	1000
400	50	295	250	0,75	0,08	1000
400	50	270	250	0,75	0,50	1000
400	50	250	250	0,75	0,84	1000

Çizelge 4.51. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine Ag^+ iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

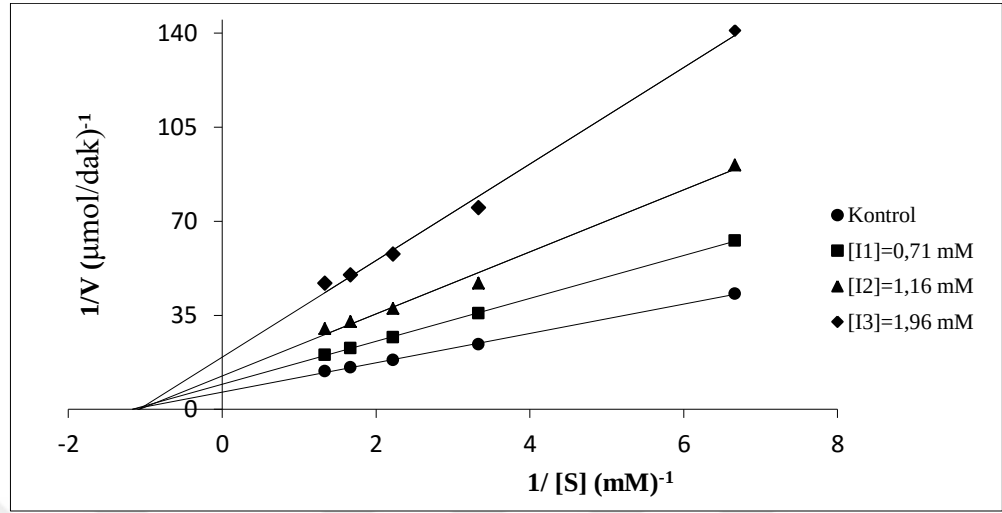
Tris-SO ₄ (μL)	Enzim (μL)	Saf su (μL)	Substrat (μL)	[S] (mM)	[I] (mM)	Toplam (μL)
400	50	500	50	0,15	0,00	1000
400	50	440	50	0,15	0,55	1000
400	50	350	50	0,15	1,39	1000
400	50	310	50	0,15	1,76	1000
400	50	450	100	0,30	0,00	1000
400	50	390	100	0,30	0,55	1000
400	50	300	100	0,30	1,39	1000
400	50	260	100	0,30	1,76	1000
400	50	400	150	0,45	0,00	1000
400	50	360	150	0,45	0,55	1000
400	50	250	150	0,45	1,39	1000
400	50	210	150	0,45	1,76	1000
400	50	350	200	0,60	0,00	1000
400	50	290	200	0,60	0,55	1000
400	50	200	200	0,60	1,39	1000
400	50	160	200	0,60	1,76	1000
400	50	300	250	0,75	0,00	1000
400	50	260	250	0,75	0,55	1000
400	50	150	250	0,75	1,39	1000
400	50	110	250	0,75	1,76	1000

Çizelge 4.52. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine Cu^{2+} iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

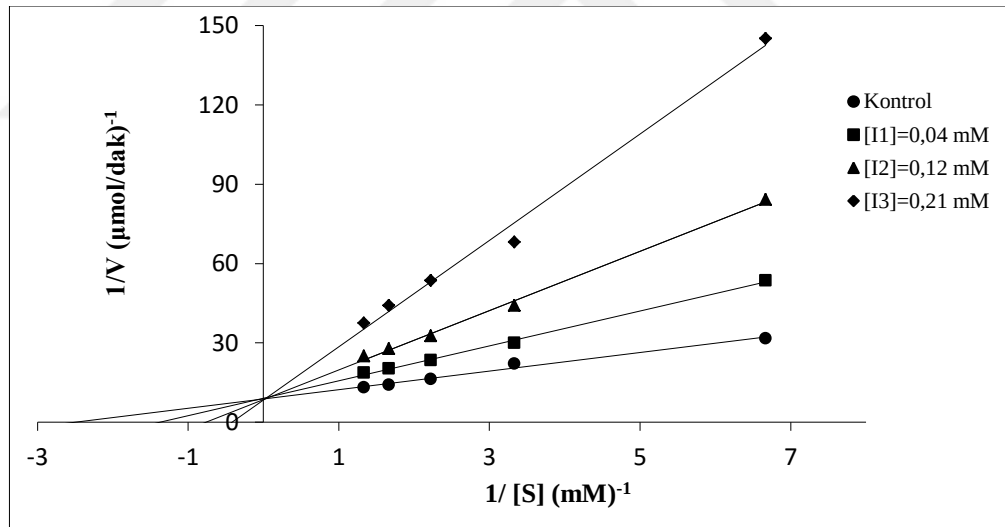
Tris- SO_4 (μL)	Enzim (μL)	Saf su (μL)	Substrat (μL)	[S] (mM)	[I] (mM)	Toplam (μL)
400	50	500	50	0,15	0,00	1000
400	50	490	50	0,15	0,15	1000
400	50	455	50	0,15	0,70	1000
400	50	420	50	0,15	1,25	1000
400	50	450	100	0,30	0,00	1000
400	50	440	100	0,30	0,15	1000
400	50	405	100	0,30	0,70	1000
400	50	370	100	0,30	1,25	1000
400	50	400	150	0,45	0,00	1000
400	50	390	150	0,45	0,15	1000
400	50	355	150	0,45	0,70	1000
400	50	320	150	0,45	1,25	1000
400	50	350	200	0,60	0,00	1000
400	50	340	200	0,60	0,15	1000
400	50	305	200	0,60	0,70	1000
400	50	270	200	0,60	1,25	1000
400	50	300	250	0,75	0,00	1000
400	50	290	250	0,75	0,15	1000
400	50	255	250	0,75	0,70	1000
400	50	220	250	0,75	1,25	1000

Çizelge 4.53. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine Hg^{2+} iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

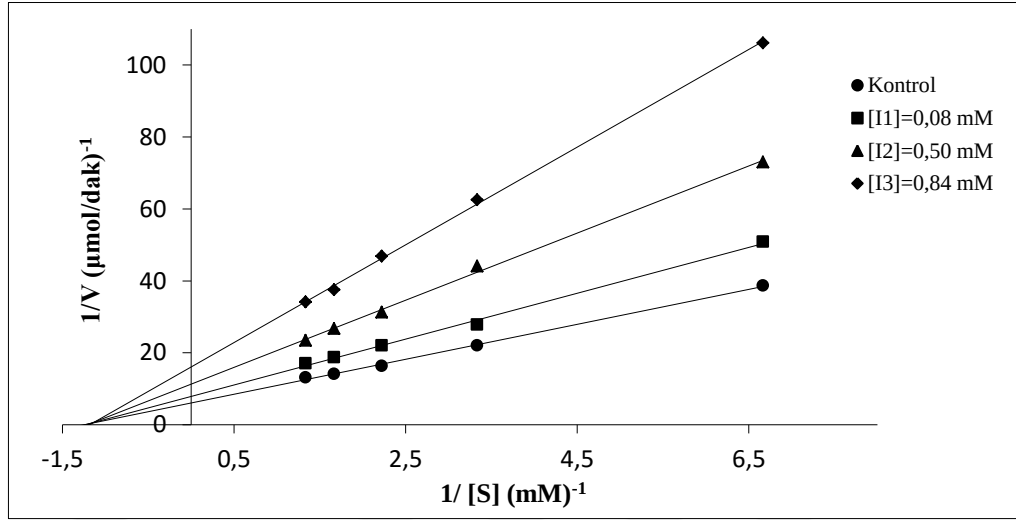
Tris-SO ₄ (µL)	Enzim (µL)	Saf su (µL)	Substrat (µL)	[S] (mM)	[I] (mM)	Toplam (µL)
400	40	510	50	0,15	0,00	1000
400	40	460	50	0,15	0,18	1000
400	40	310	50	0,15	0,73	1000
400	40	240	50	0,15	0,99	1000
400	40	460	100	0,30	0,00	1000
400	40	410	100	0,30	0,18	1000
400	40	260	100	0,30	0,73	1000
400	40	190	100	0,30	0,99	1000
400	40	410	150	0,45	0,00	1000
400	40	360	150	0,45	0,18	1000
400	40	210	150	0,45	0,73	1000
400	40	140	150	0,45	0,99	1000
400	40	360	200	0,60	0,00	1000
400	40	310	200	0,60	0,18	1000
400	40	160	200	0,60	0,73	1000
400	40	90	200	0,60	0,99	1000
400	40	310	250	0,75	0,00	1000
400	40	260	250	0,75	0,18	1000
400	40	110	250	0,75	0,73	1000
400	40	40	250	0,75	0,99	1000



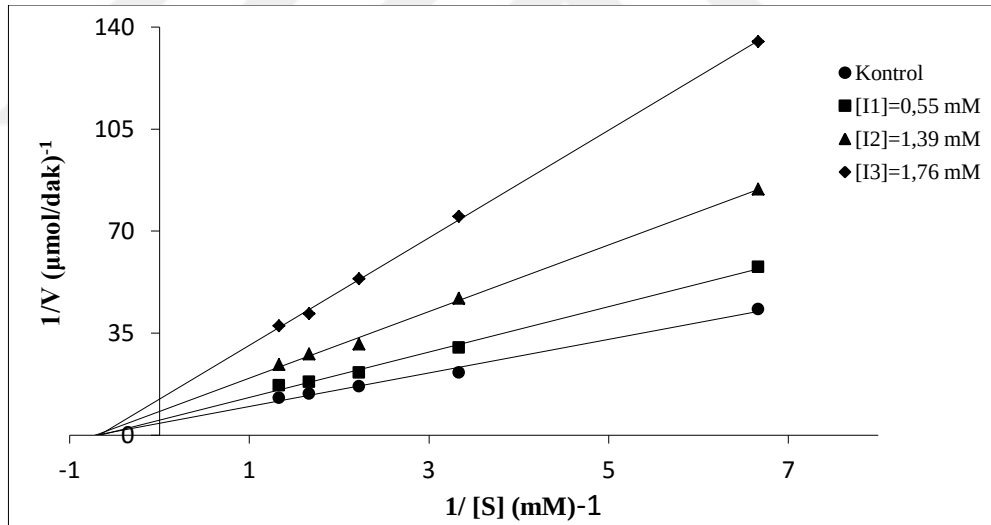
Şekil 4.44. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine Fe^{2+} iyonunun etkisi



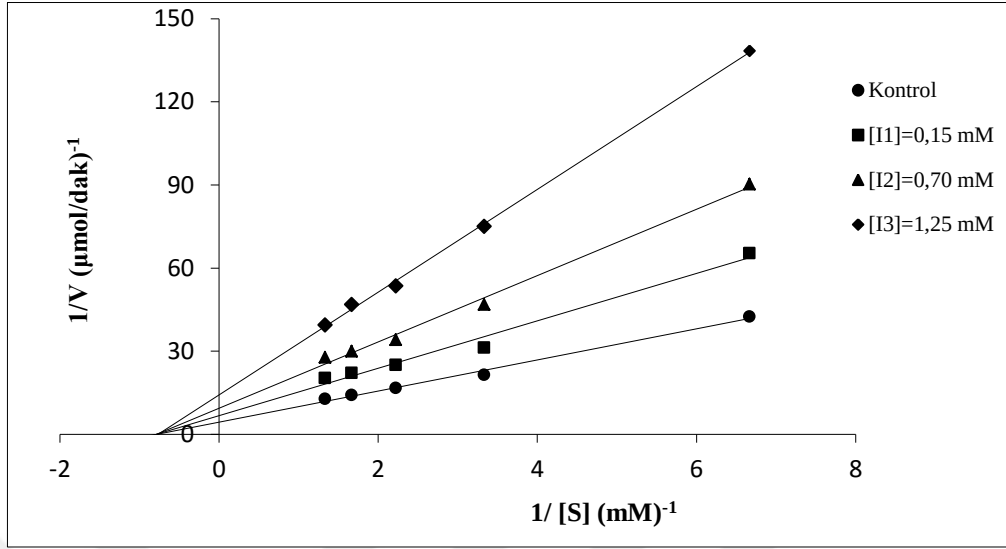
Şekil 4.45. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine Pb^{2+} iyonunun etkisi



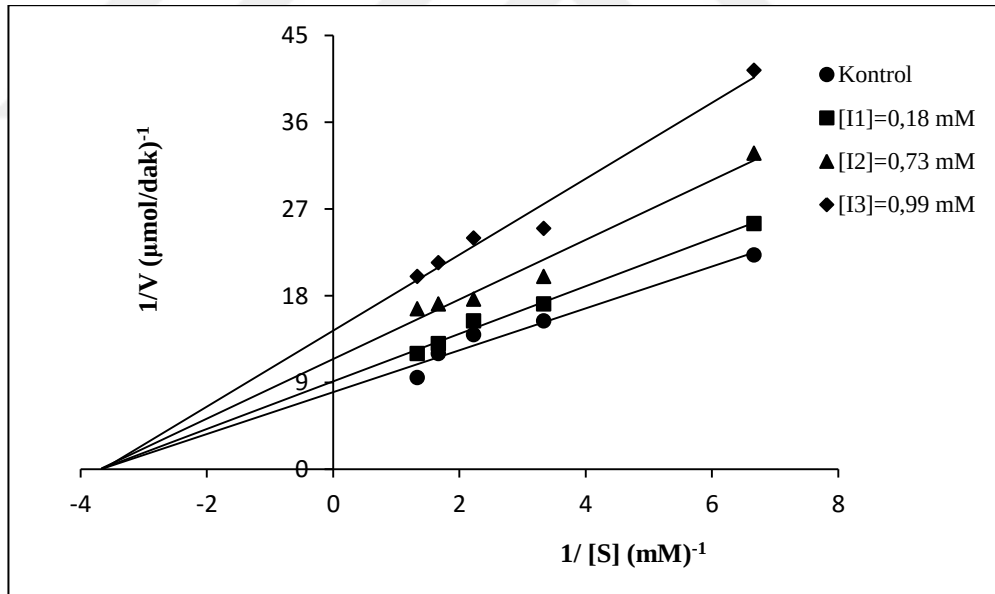
Şekil 4.46. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine Co^{2+} iyonunun etkisi



Şekil 4.47. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine Ag^{+} iyonunun etkisi



Şekil 4.48. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine Cu^{2+} iyonunun etkisi



Şekil 4.49. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine Hg^{2+} iyonunun etkisi

Keçi karaciğer ve böbrek 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 hesaplandı.

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 4.54. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi için 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan K_i değerleri ve inhibisyon tipleri

İnhibitör	[I] mM	K_i (mM)	Ortalama K_i (mM)	İnhibisyon Tipi
Fe^{2+}	0,71	1,511	1,134 ± 0,340	Yarışmasız
	1,16	1,037		
	1,96	0,853		
Pb^{2+}	0,04	0,059	0,052 ± 0,007	Yarışmalı
	0,12	0,053		
	0,21	0,043		
Co^{2+}	0,08	0,278	0,452 ± 0,157	Yarışmasız
	0,50	0,584		
	0,84	0,493		
Ag^+	0,55	2,104	1,453 ± 0,636	Yarışmasız
	1,39	1,422		
	1,76	0,832		
Cu^{2+}	0,15	0,292	0,484 ± 0,171	Yarışmasız
	0,70	0,620		
	1,25	0,540		
Hg^{2+}	0,18	0,235	0,336 ± 0,094	Yarışmasız
	0,73	0,375		
	0,99	0,398		

Çizelge 4.55. Keçi böbrek 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_4 (μL)	Enzim (μL)	Saf su (μL)	Substrat (μL)	[S] (mM)	[I] (mM)	Toplam (μL)
400	30	520	50	0,15	0,00	1000
400	30	470	50	0,15	0,89	1000
400	30	405	50	0,15	2,05	1000
400	30	365	50	0,15	2,77	1000
400	30	470	100	0,30	0,00	1000
400	30	420	100	0,30	0,89	1000
400	30	355	100	0,30	2,05	1000
400	30	315	100	0,30	2,77	1000
400	30	420	150	0,45	0,00	1000
400	30	370	150	0,45	0,89	1000
400	30	305	150	0,45	2,05	1000
400	30	265	150	0,45	2,77	1000
400	30	370	200	0,60	0,00	1000
400	30	320	200	0,60	0,89	1000
400	30	255	200	0,60	2,05	1000
400	30	215	200	0,60	2,77	1000
400	30	320	250	0,75	0,00	1000
400	30	270	250	0,75	0,89	1000
400	30	205	250	0,75	2,05	1000
400	30	165	250	0,75	2,77	1000

Çizelge 4.56. Keçi böbrek 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 ₄ (μL)	Enzim (μL)	Saf su (μL)	Substrat (μL)	[S] (mM)	[I] (mM)	Toplam (μL)
400	30	520	50	0,15	0,00	1000
400	30	515	50	0,15	0,02	1000
400	30	500	50	0,15	0,09	1000
400	30	485	50	0,15	0,16	1000
400	30	470	100	0,30	0,00	1000
400	30	465	100	0,30	0,02	1000
400	30	450	100	0,30	0,09	1000
400	30	435	100	0,30	0,16	1000
400	30	420	150	0,45	0,00	1000
400	30	415	150	0,45	0,02	1000
400	30	400	150	0,45	0,09	1000
400	30	385	150	0,45	0,16	1000
400	30	370	200	0,60	0,00	1000
400	30	365	200	0,60	0,02	1000
400	30	350	200	0,60	0,09	1000
400	30	335	200	0,60	0,16	1000
400	30	320	250	0,75	0,00	1000
400	30	315	250	0,75	0,02	1000
400	30	300	250	0,75	0,09	1000
400	30	285	250	0,75	0,16	1000

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

Tris- SO_4 (μL)	Enzim (μL)	Saf su (μL)	Substrat (μL)	[S] (mM)	[I] (mM)	Toplam (μL)
400	30	520	50	0,15	0,00	1000
400	30	500	50	0,15	0,33	1000
400	30	465	50	0,15	0,93	1000
400	30	450	50	0,15	1,18	1000
400	30	470	100	0,30	0,00	1000
400	30	450	100	0,30	0,33	1000
400	30	415	100	0,30	0,93	1000
400	30	400	100	0,30	1,18	1000
400	30	420	150	0,45	0,00	1000
400	30	400	150	0,45	0,33	1000
400	30	365	150	0,45	0,93	1000
400	30	350	150	0,45	1,18	1000
400	30	370	200	0,60	0,00	1000
400	30	350	200	0,60	0,33	1000
400	30	315	200	0,60	0,93	1000
400	30	300	200	0,60	1,18	1000
400	30	320	250	0,75	0,00	1000
400	30	300	250	0,75	0,33	1000
400	30	265	250	0,75	0,93	1000
400	30	250	250	0,75	1,18	1000

Çizelge 4.58. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine Ag^+ iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

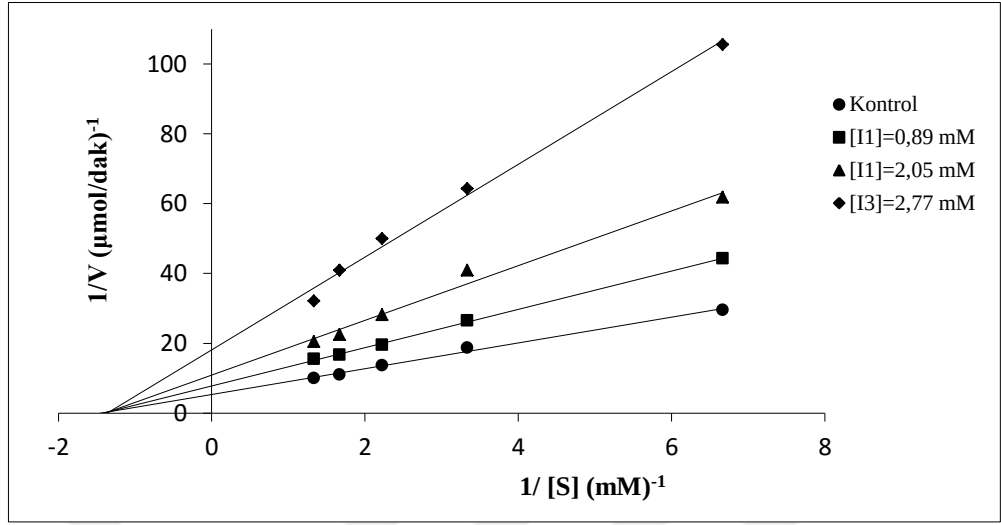
Tris-SO ₄ (μL)	Enzim (μL)	Saf su (μL)	Substrat (μL)	[S] (mM)	[I] (mM)	Toplam (μL)
400	30	520	50	0,15	0,00	1000
400	30	470	50	0,15	0,46	1000
400	30	385	50	0,15	1,25	1000
400	30	345	50	0,15	1,62	1000
400	30	470	100	0,30	0,00	1000
400	30	420	100	0,30	0,46	1000
400	30	335	100	0,30	1,25	1000
400	30	295	100	0,30	1,62	1000
400	30	420	150	0,45	0,00	1000
400	30	370	150	0,45	0,46	1000
400	30	285	150	0,45	1,25	1000
400	30	245	150	0,45	1,62	1000
400	30	370	200	0,60	0,00	1000
400	30	320	200	0,60	0,46	1000
400	30	235	200	0,60	1,25	1000
400	30	195	200	0,60	1,62	1000
400	30	320	250	0,75	0,00	1000
400	30	270	250	0,75	0,46	1000
400	30	185	250	0,75	1,25	1000
400	30	145	250	0,75	1,62	1000

Çizelge 4.59. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine Cu^{2+} iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

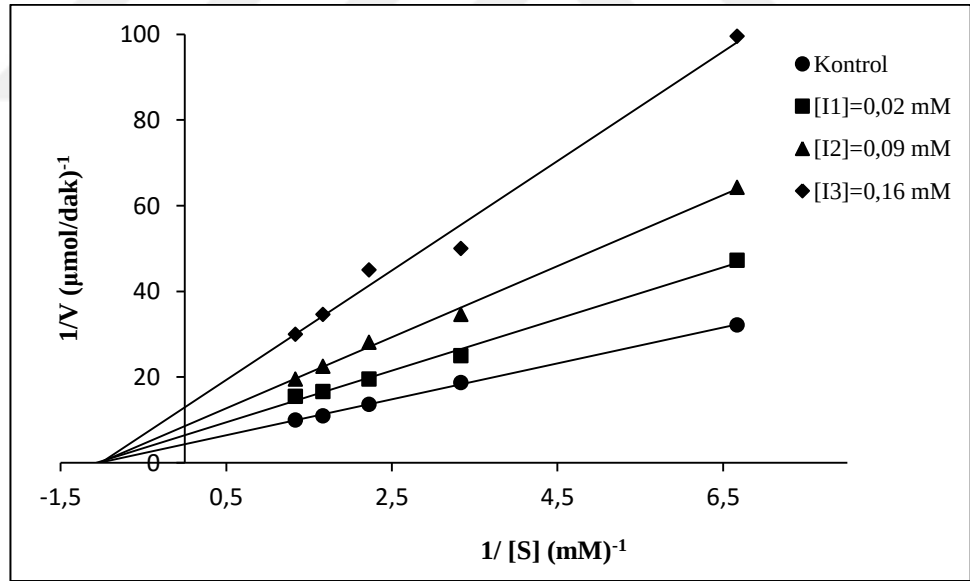
Tris- SO_4 (μL)	Enzim (μL)	Saf su (μL)	Substrat (μL)	[S] (mM)	[I] (mM)	Toplam (μL)
400	30	520	50	0,15	0,00	1000
400	30	480	50	0,15	0,62	1000
400	30	430	50	0,15	1,41	1000
400	30	400	50	0,15	1,88	1000
400	30	470	100	0,30	0,00	1000
400	30	430	100	0,30	0,62	1000
400	30	380	100	0,30	1,41	1000
400	30	350	100	0,30	1,88	1000
400	30	420	150	0,45	0,00	1000
400	30	380	150	0,45	0,62	1000
400	30	330	150	0,45	1,41	1000
400	30	300	150	0,45	1,88	1000
400	30	370	200	0,60	0,00	1000
400	30	330	200	0,60	0,62	1000
400	30	280	200	0,60	1,41	1000
400	30	250	200	0,60	1,88	1000
400	30	320	250	0,75	0,00	1000
400	30	280	250	0,75	0,62	1000
400	30	230	250	0,75	1,41	1000
400	30	200	250	0,75	1,88	1000

Çizelge 4.60. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine Hg^{2+} iyonunun K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

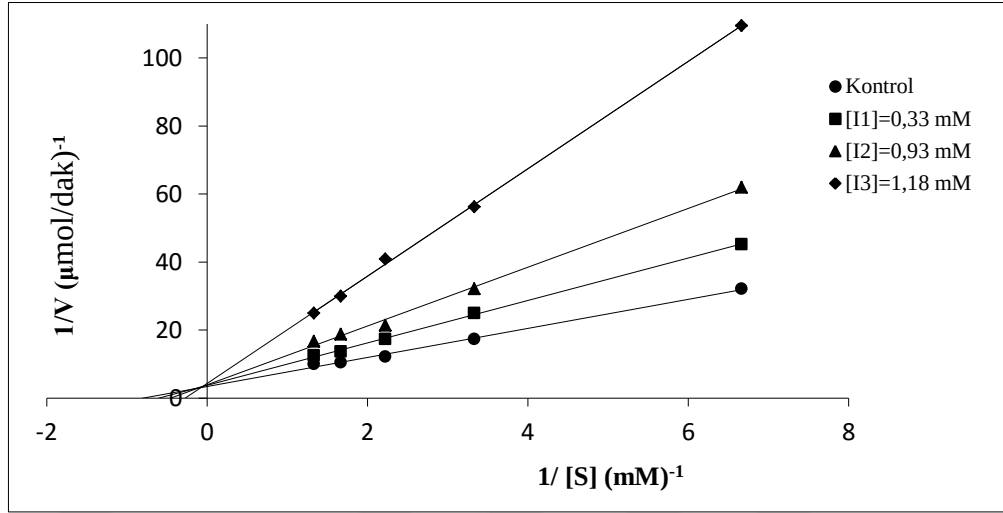
Tris-SO ₄ (μL)	Enzim (μL)	Saf su (μL)	Substrat (μL)	[S] (mM)	[I] (mM)	Toplam (μL)
400	50	500	50	0,15	0,00	1000
400	50	440	50	0,15	0,22	1000
400	50	360	50	0,15	0,51	1000
400	50	300	50	0,15	0,73	1000
400	50	450	100	0,30	0,00	1000
400	50	390	100	0,30	0,22	1000
400	50	310	100	0,30	0,51	1000
400	50	250	100	0,30	0,73	1000
400	50	400	150	0,45	0,00	1000
400	50	340	150	0,45	0,22	1000
400	50	260	150	0,45	0,51	1000
400	50	200	150	0,45	0,73	1000
400	50	350	200	0,60	0,00	1000
400	50	290	200	0,60	0,22	1000
400	50	210	200	0,60	0,51	1000
400	50	150	200	0,60	0,73	1000
400	50	300	250	0,75	0,00	1000
400	50	240	250	0,75	0,22	1000
400	50	160	250	0,75	0,51	1000
400	50	100	250	0,75	0,73	1000



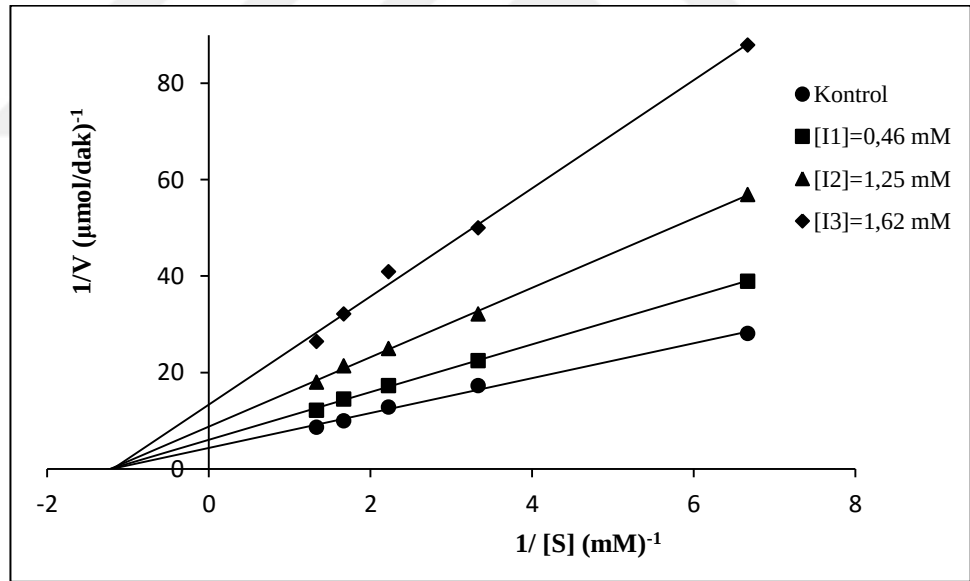
Şekil 4.50. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine Fe^{2+} iyonunun etkisi



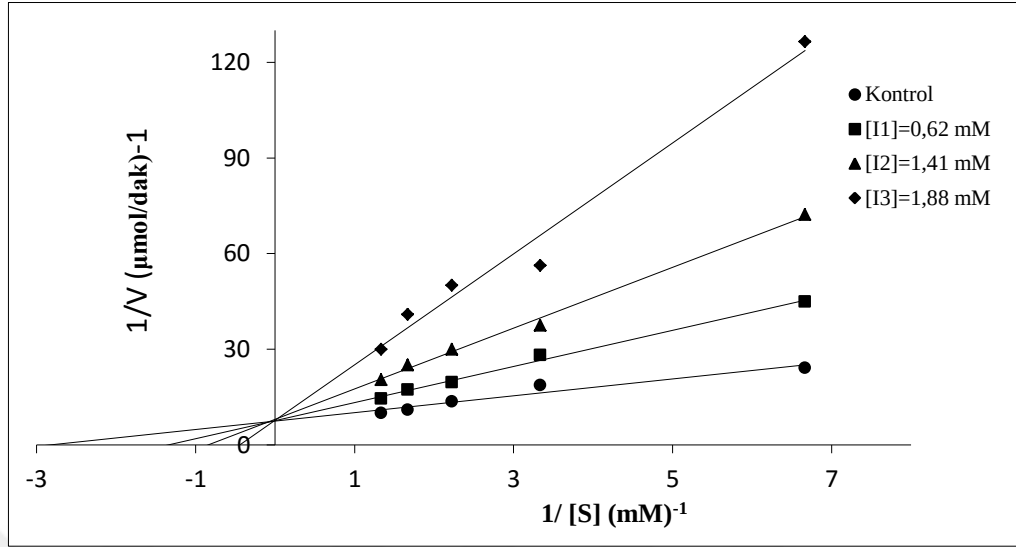
Şekil 4.51. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine Pb^{2+} iyonunun etkisi



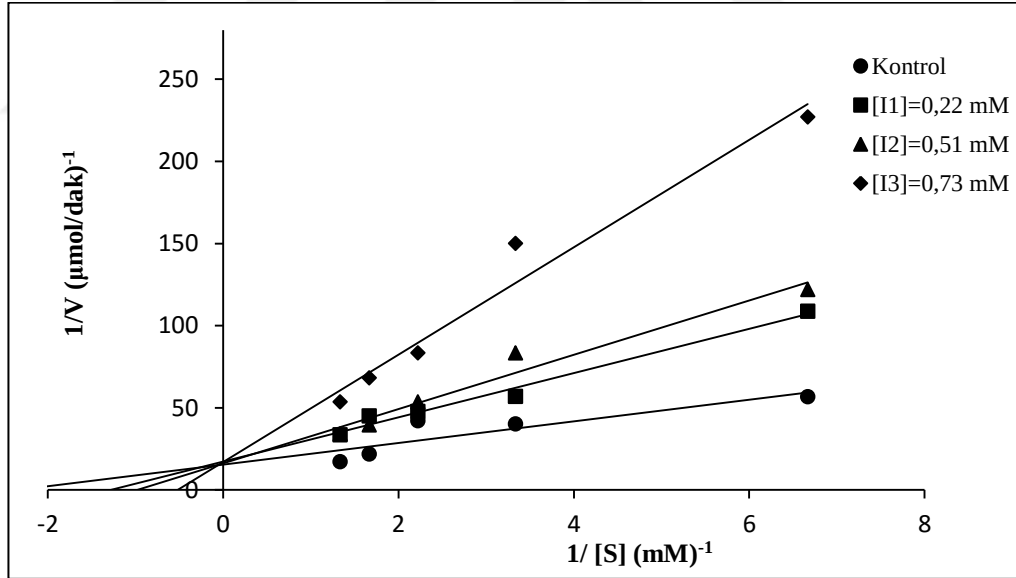
Şekil 4.52. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine Co^{2+} iyonunun etkisi



Şekil 4.53. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine Ag^{+} iyonunun etkisi



Şekil 4.54. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine Cu^{2+} iyonunun etkisi



Şekil 4.55. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine Hg^{2+} iyonunun etkisi

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

İnhibitör	[I] (mM)	K_i (mM)	Ortalama K_i (mM)	İnhibisyon Tipi
Fe²⁺	0,89	1,935	1,686 ± 0,471	Yarışmasız
	2,05	1,980		
	2,77	1,141		
Pb²⁺	0,02	0,050	0,078 ± 0,025	Yarışmasız
	0,09	0,099		
	0,16	0,085		
Co²⁺	0,33	1,039	0,947 ± 0,298	Yarışmalı
	0,93	1,187		
	1,18	0,613		
Ag⁺	0,46	1,220	1,076 ± 0,264	Yarışmasız
	1,25	1,237		
	1,62	0,771		
Cu²⁺	0,62	0,573	0,508 ± 0,134	Yarışmalı
	1,41	0,598		
	1,88	0,354		
Hg²⁺	0,22	0,272	0,286 ± 0,071	Yarışmalı
	0,51	0,318		
	0,73	0,268		

4.3.10. Keçi karaciğer ve böbrek dokularından elde edilen CA enzimi için inhibitör etkisi gösteren antibiyotiklerin K_i sabitlerinin ve inhibisyon türünün bulunması

İnhibitör çalışmasında keçi karaciğer ve böbrek dokularından elde edilen CA enzimini inhibe eden amoksisilin ve vankomisin 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. Saflaştırılan CA enzimleri için K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan antibiyotikler için çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen antibiyotiklerin konsantrasyonları çizelge 4.58-4.62’de verildi. Daha sonra keçi karaciğer ve böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi için üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri belirlenerek Lineweaver-Burk grafiği çizilerek K_i değeri ve inhibisyon tipi tayin edildi (şekil 4.51-4.54) (Lineweaver and Burk 1934).

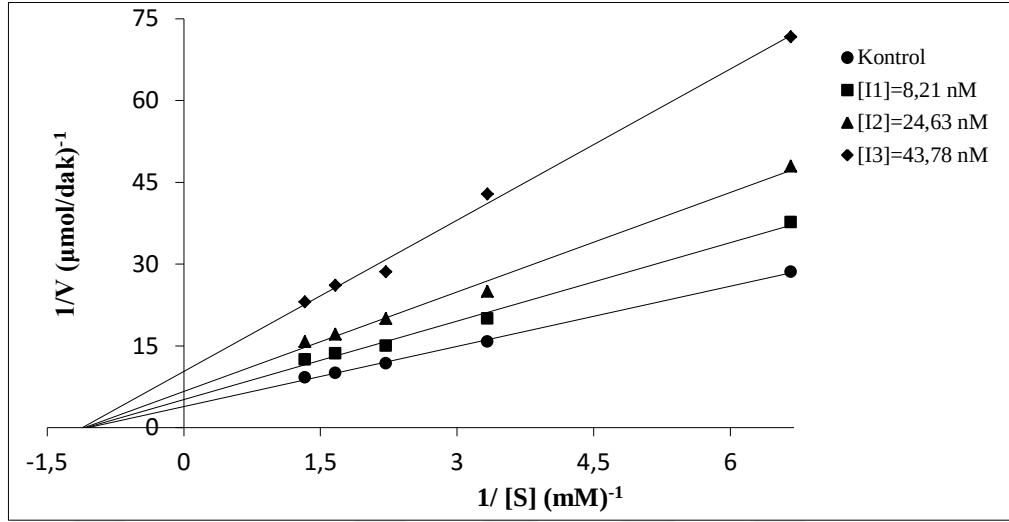


Çizelge 4.62. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine amoksisilin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

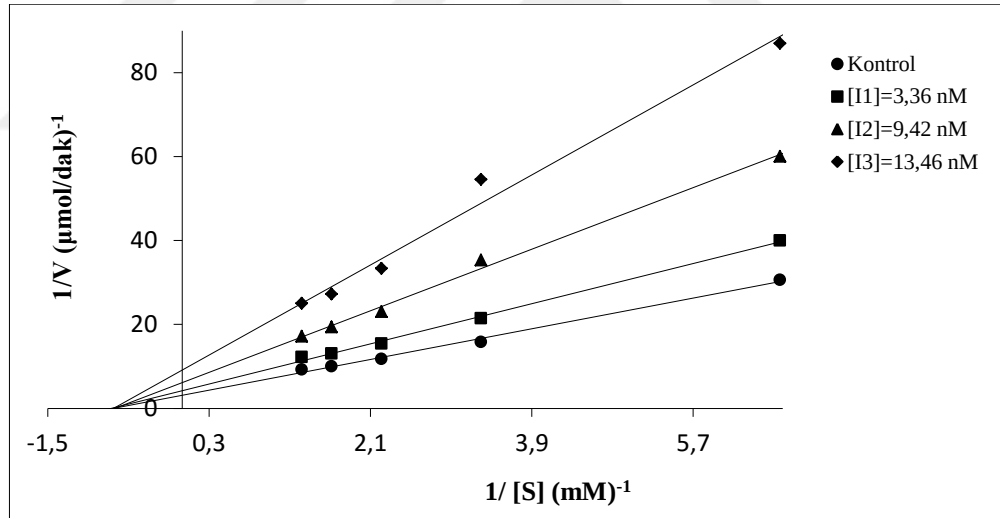
Tris-SO ₄ (μL)	Enzim (μL)	Saf su (μL)	Substrat (μL)	[S] (mM)	[I] (nM)	Toplam (μL)
400	40	510	50	0,15	0,00	1000
400	40	480	50	0,15	8,21	1000
400	40	420	50	0,15	24,63	1000
400	40	350	50	0,15	43,73	1000
400	40	460	100	0,30	0,00	1000
400	40	430	100	0,30	8,21	1000
400	40	370	100	0,30	24,63	1000
400	40	300	100	0,30	43,73	1000
400	40	410	150	0,45	0,00	1000
400	40	380	150	0,45	8,21	1000
400	40	320	150	0,45	24,63	1000
400	40	250	150	0,45	43,73	1000
400	40	360	200	0,60	0,00	1000
400	40	330	200	0,60	8,21	1000
400	40	270	200	0,60	24,63	1000
400	40	200	200	0,60	43,73	1000
400	40	310	250	0,75	0,00	1000
400	40	280	250	0,75	8,21	1000
400	40	220	250	0,75	24,63	1000
400	40	150	250	0,75	43,73	1000

Çizelge 4.63. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine vankomisin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tris-SO ₄ (μL)	Enzim (μL)	Saf su (μL)	Substrat (μL)	[S] (mM)	[I] (nM)	Toplam (μL)
400	40	510	50	0,15	0,00	1000
400	40	460	50	0,15	3,36	1000
400	40	370	50	0,15	9,42	1000
400	40	310	50	0,15	13,46	1000
400	40	460	100	0,30	0,00	1000
400	40	410	100	0,30	3,36	1000
400	40	320	100	0,30	9,42	1000
400	40	260	100	0,30	13,46	1000
400	40	410	150	0,45	0,00	1000
400	40	360	150	0,45	3,36	1000
400	40	270	150	0,45	9,42	1000
400	40	210	150	0,45	13,46	1000
400	40	360	200	0,60	0,00	1000
400	40	310	200	0,60	3,36	1000
400	40	220	200	0,60	9,42	1000
400	40	160	200	0,60	13,46	1000
400	40	310	250	0,75	0,00	1000
400	40	260	250	0,75	3,36	1000
400	40	170	250	0,75	9,42	1000
400	40	110	250	0,75	13,46	1000



Şekil 4.56. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine amoksisilin etkisi



Şekil 4.57. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine vankomisin etkisi

Çizelge 4.64. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi için 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan K_i değerleri ve inhibisyon tipleri

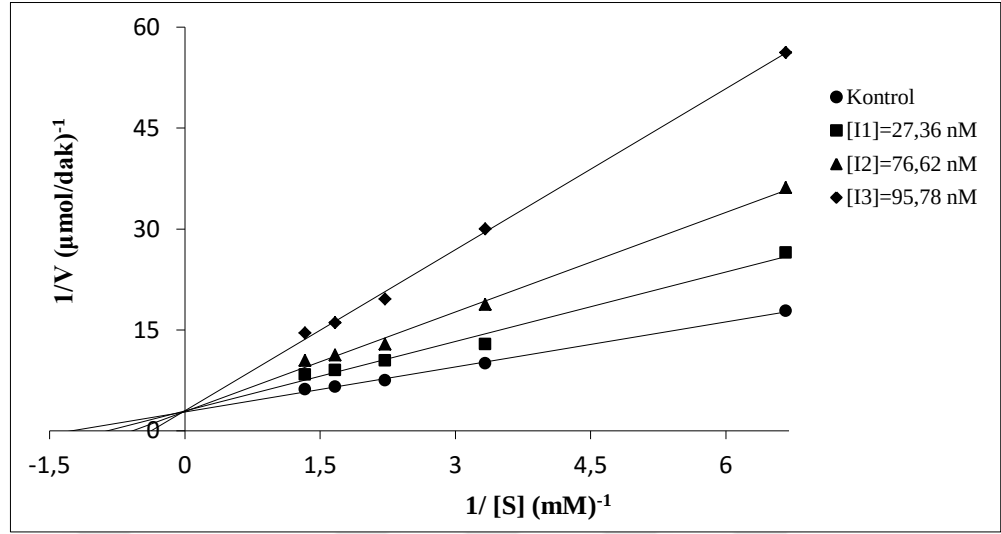
İnhibitör	[I] (nM)	K_i (nM)	Ortalama K_i (nM)	İnhibisyon Tipi
Amoksisilin	8,21	24,70	$28,47 \pm 5,16$	Yarışmasız
	24,63	34,34		
	43,73	26,40		
Vankomisin	3,36	9,20	$8,48 \pm 1,56$	Yarışmasız
	9,42	9,55		
	13,46	6,69		

Çizelge 4.65. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine amoksisilin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

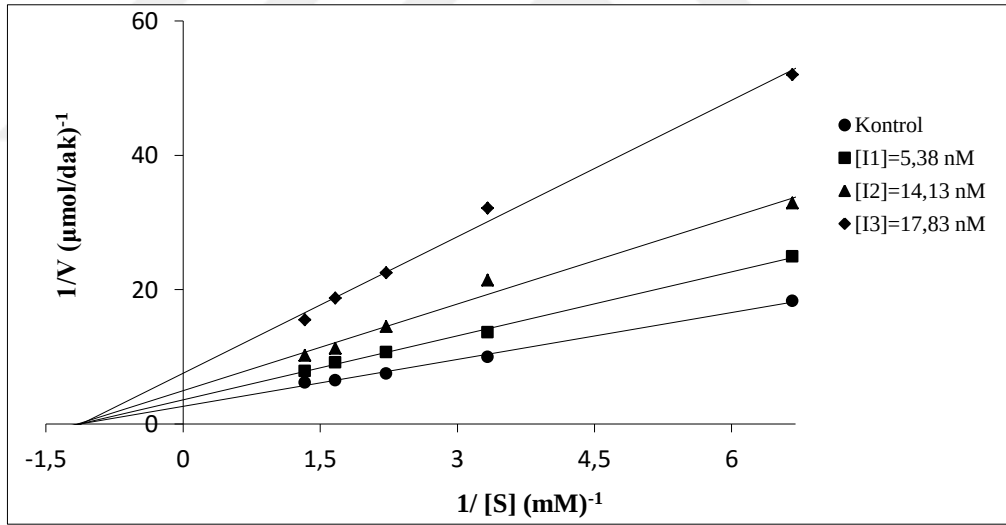
Tris-SO ₄ (μ L)	Enzim (μ L)	Saf su (μ L)	Substrat (μ L)	[S] (mM)	[I] (nM)	Toplam (μ L)
400	30	520	50	0,15	0,00	1000
400	30	420	50	0,15	27,36	1000
400	30	240	50	0,15	76,62	1000
400	30	170	50	0,15	95,78	1000
400	30	470	100	0,30	0,00	1000
400	30	370	100	0,30	27,36	1000
400	30	190	100	0,30	76,62	1000
400	30	120	100	0,30	95,78	1000
400	30	420	150	0,45	0,00	1000
400	30	320	150	0,45	27,36	1000
400	30	140	150	0,45	76,62	1000
400	30	70	150	0,45	95,78	1000
400	30	370	200	0,60	0,00	1000
400	30	270	200	0,60	27,36	1000
400	30	90	200	0,60	76,62	1000
400	30	20	200	0,60	95,78	1000
400	30	320	250	0,75	0,00	1000
400	30	220	250	0,75	27,36	1000
400	30	40	250	0,75	76,62	1000
370	30	0	250	0,75	95,78	1000

Çizelge 4.66. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine vankomisin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tris-SO ₄ (μL)	Enzim (μL)	Saf su (μL)	Substrat (μL)	[S] (mM)	[I] (nM)	Toplam (μL)
400	30	520	50	0,15	0,00	1000
400	30	440	50	0,15	5,38	1000
400	30	310	50	0,15	14,13	1000
400	30	255	50	0,15	17,83	1000
400	30	470	100	0,30	0,00	1000
400	30	390	100	0,30	5,38	1000
400	30	260	100	0,30	14,13	1000
400	30	205	100	0,30	17,83	1000
400	30	420	150	0,45	0,00	1000
400	30	340	150	0,45	5,38	1000
400	30	210	150	0,45	14,13	1000
400	30	155	150	0,45	17,83	1000
400	30	370	200	0,60	0,00	1000
400	30	290	200	0,60	5,38	1000
400	30	160	200	0,60	14,13	1000
400	30	105	200	0,60	17,83	1000
400	30	320	250	0,75	0,00	1000
400	30	240	250	0,75	5,38	1000
400	30	110	250	0,75	14,13	1000
400	30	55	250	0,75	17,83	1000



Şekil 4.58. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine amoksisilin etkisi



Şekil 4.59. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine vankomisin etkisi

Çizelge 4.67. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi için 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan K_i değerleri ve inhibisyon tipleri

İnhibitör	[I] (nM)	K_i (nM)	Ortalama K_i (nM)	İnhibisyon Tipi
Amoksisilin	27,36	58,30	$54,80 \pm 13,01$	Yarışmalı
	76,62	65,70		
	95,78	40,39		
Vankomisin	5,38	14,12	$13,00 \pm 3,37$	Yarışmasız
	14,13	15,67		
	17,83	9,21		

4.3.11. Keçi karaciğer ve böbrek dokularından elde edilen CA enzimi için inhibitör etkisi gösteren avermektinlerin K_i sabitlerinin ve inhibisyon türünün bulunması

İnhibitör çalışmasında keçi karaciğer ve böbrek dokularından elde edilen CA enzimini inhibe eden moksidektin, doramektin, abamektin, eprinomektin gibi avermektin çeşitleri kullanıldı. Çalışmalarda en uygun beş farklı substrat konsantrasyonu substrat stok çözeltileri kullanılarak ön çalışmayla belirlendi. Keçi karaciğer ve böbrek dokularından saflaştırılan CA enzimleri için K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan avermektinler için çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen avermektin konsantrasyonları çizelge 4.64-4.72’de verildi. Daha sonra keçi karaciğer ve böbrek dokularından saflaştırılan CA enzimi için üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri belirlenerek Lineweaver-Burk grafiği çizilerek K_i değeri ve inhibisyon tipi tayin edildi (Lineweaver and Burk 1934).

Çizelge 4.68. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine moksidektin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tris-SO ₄ (μL)	Enzim (μL)	Saf su (μL)	Substrat (μL)	[S] (mM)	[I] (nM)	Toplam (μL)
400	100	450	50	0,150	0,000	1000
400	100	400	50	0,150	0,078	1000
400	100	250	50	0,150	0,312	1000
400	100	200	50	0,150	0,390	1000
400	100	400	100	0,300	0,000	1000
400	100	350	100	0,300	0,078	1000
400	100	200	100	0,300	0,312	1000
400	100	150	100	0,300	0,390	1000
400	100	350	150	0,450	0,000	1000
400	100	300	150	0,450	0,078	1000
400	100	150	150	0,450	0,312	1000
400	100	100	150	0,450	0,390	1000
400	100	300	200	0,600	0,000	1000
400	100	250	200	0,600	0,078	1000
400	100	100	200	0,600	0,312	1000
400	100	50	200	0,600	0,390	1000
400	100	250	250	0,750	0,000	1000
400	100	200	250	0,750	0,078	1000
400	100	50	250	0,750	0,312	1000
400	100	00	250	0,750	0,390	1000

Çizelge 4.69. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine doramektin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

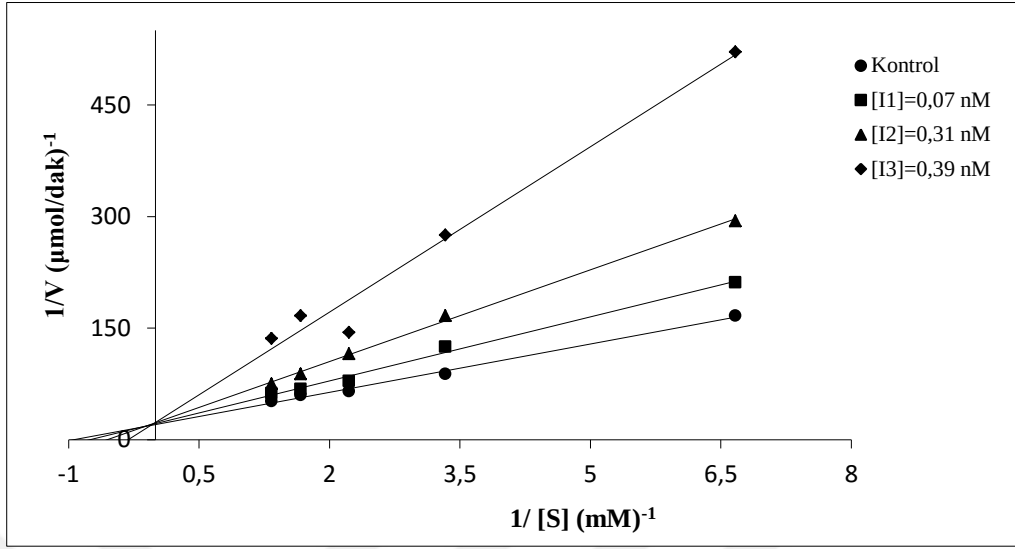
Tris-SO ₄ (μL)	Enzim (μL)	Saf su (μL)	Substrat (μL)	[S] (mM)	[I] (nM)	Toplam (μL)
400	80	470	50	0,150	0,000	1000
400	80	420	50	0,150	0,055	1000
400	80	320	50	0,150	0,166	1000
400	80	230	50	0,150	0,266	1000
400	80	420	100	0,300	0,000	1000
400	80	370	100	0,300	0,055	1000
400	80	270	100	0,300	0,166	1000
400	80	180	100	0,300	0,266	1000
400	80	370	150	0,450	0,000	1000
400	80	320	150	0,450	0,055	1000
400	80	220	150	0,450	0,166	1000
400	80	130	150	0,450	0,266	1000
400	80	320	200	0,600	0,000	1000
400	80	270	200	0,600	0,055	1000
400	80	170	200	0,600	0,166	1000
400	80	80	200	0,600	0,266	1000
400	80	270	250	0,750	0,000	1000
400	80	220	250	0,750	0,055	1000
400	80	120	250	0,750	0,166	1000
400	80	30	250	0,750	0,266	1000

Çizelge 4.70. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine abamektin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

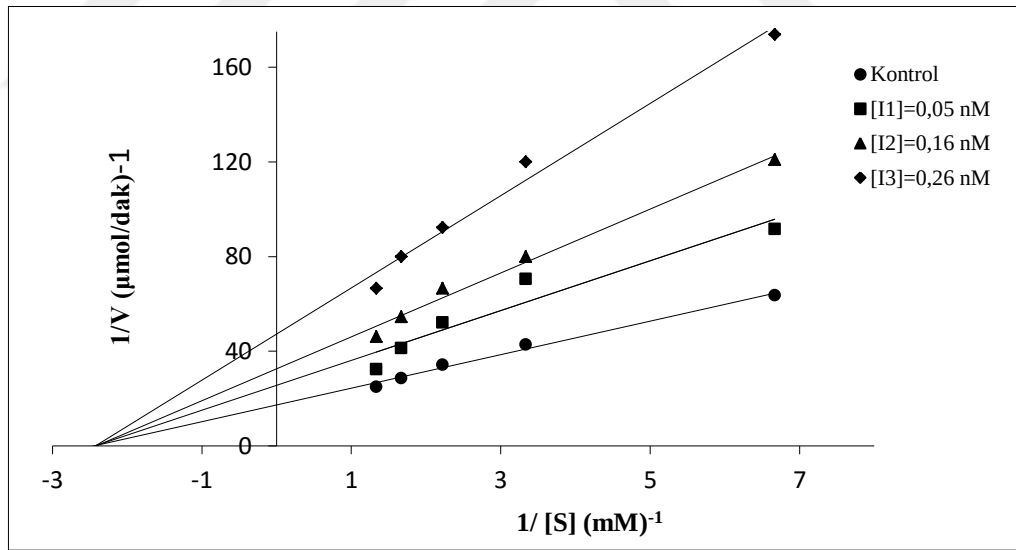
Tris-SO ₄ (μL)	Enzim (μL)	Saf su (μL)	Substrat (μL)	[S] (mM)	[I] (nM)	Toplam (μL)
400	80	470	50	0,150	0,000	1000
400	80	420	50	0,150	0,057	1000
400	80	320	50	0,150	0,171	1000
400	80	170	50	0,150	0,343	1000
400	80	420	100	0,300	0,000	1000
400	80	370	100	0,300	0,057	1000
400	80	270	100	0,300	0,171	1000
400	80	120	100	0,300	0,343	1000
400	80	370	150	0,450	0,000	1000
400	80	320	150	0,450	0,057	1000
400	80	220	150	0,450	0,171	1000
400	80	70	150	0,450	0,343	1000
400	80	320	200	0,600	0,000	1000
400	80	270	200	0,600	0,057	1000
400	80	170	200	0,600	0,171	1000
400	80	20	200	0,600	0,343	1000
400	80	270	250	0,750	0,000	1000
400	80	220	250	0,750	0,057	1000
400	80	120	250	0,750	0,171	1000
370	80	00	250	0,750	0,343	1000

Çizelge 4.71. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine eprinomektin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

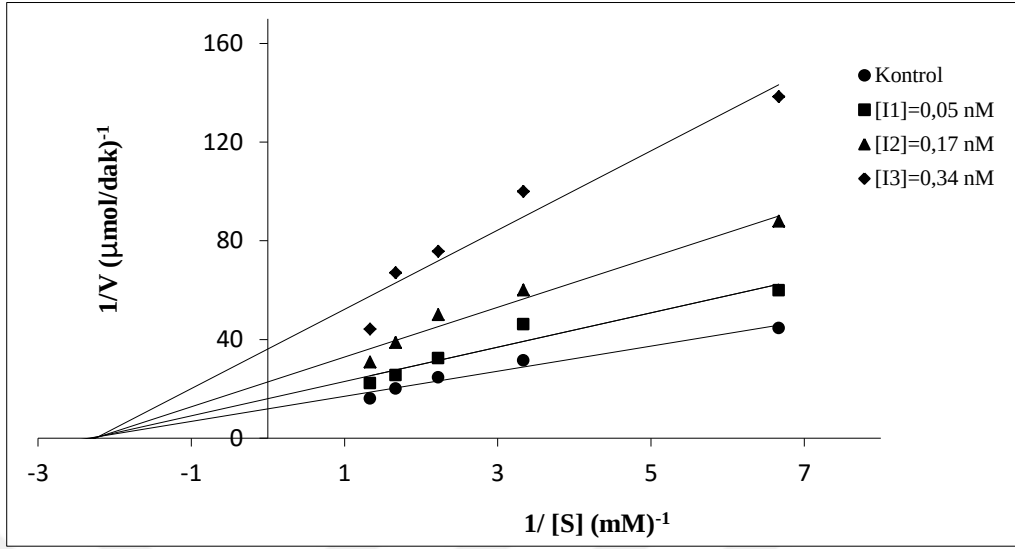
Tris-SO ₄ (μL)	Enzim (μL)	Saf su (μL)	Substrat (μL)	[S] (mM)	[I] (nM)	Toplam (μL)
400	80	470	50	0,150	0,000	1000
400	80	410	50	0,150	0,065	1000
400	80	300	50	0,150	0,185	1000
400	80	220	50	0,150	0,273	1000
400	80	420	100	0,300	0,000	1000
400	80	360	100	0,300	0,065	1000
400	80	250	100	0,300	0,185	1000
400	80	170	100	0,300	0,273	1000
400	80	370	150	0,450	0,000	1000
400	80	310	150	0,450	0,065	1000
400	80	200	150	0,450	0,185	1000
400	80	120	150	0,450	0,273	1000
400	80	320	200	0,600	0,000	1000
400	80	260	200	0,600	0,065	1000
400	80	150	200	0,600	0,185	1000
400	80	70	200	0,600	0,273	1000
400	80	270	250	0,750	0,000	1000
400	80	210	250	0,750	0,065	1000
400	80	100	250	0,750	0,185	1000
400	80	20	250	0,750	0,273	1000



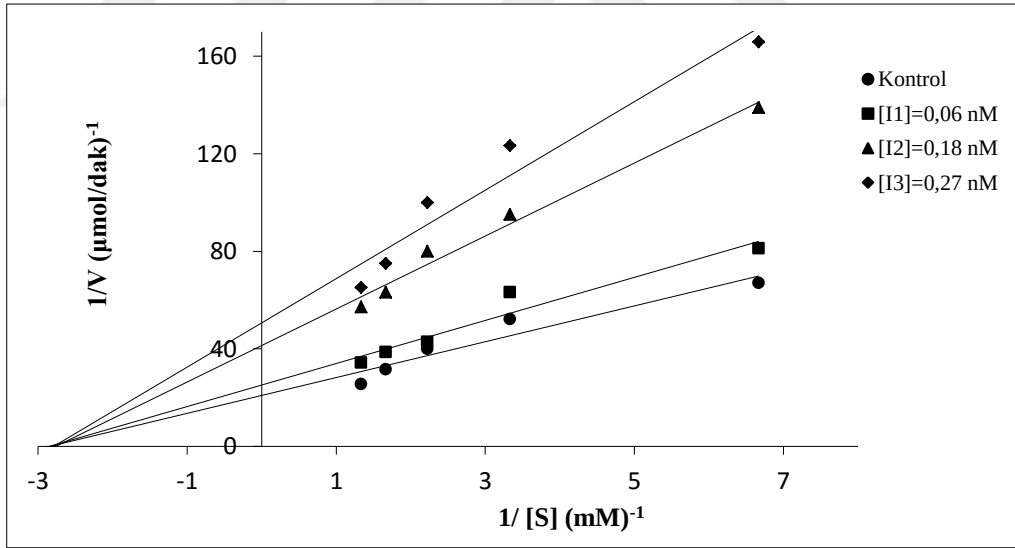
Şekil 4.60. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine moksidektin etkisi



Şekil 4.61. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine doramektin etkisi



Şekil 4.62. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine abamektin etkisi



Şekil 4.63. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine eprinomectin etkisi

Çizelge 4.72. Keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi için 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan K_i değerleri ve inhibisyon tipleri

İnhibitör	[I] (nM)	K_i (nM)	Ortalama K_i (nM)	İnhibisyon Tipi
Moksidektin	0,078	0,320	0,317 ± 0,123	Yarışmalı
	0,312	0,439		
	0,390	0,192		
Doramektin	0,055	0,116	0,153 ± 0,036	Yarışmasız
	0,166	0,189		
	0,266	0,154		
Abamektin	0,057	0,368	0,283 ± 0,078	Yarışmasız
	0,171	0,268		
	0,343	0,213		
Eprinomektin	0,065	0,326	0,232 ± 0,082	Yarışmasız
	0,185	0,178		
	0,273	0,191		

Çizelge 4.73. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine moksidektin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tris-SO ₄ (µL)	Enzim (µL)	Saf su (µL)	Substrat (µL)	[S] (mM)	[I] (nM)	Toplam (µL)
400	50	500	50	0,150	0,000	1000
400	50	420	50	0,150	0,125	1000
400	50	350	50	0,150	0,234	1000
400	50	260	50	0,150	0,375	1000
400	50	450	100	0,300	0,000	1000
400	50	370	100	0,300	0,125	1000
400	50	300	100	0,300	0,234	1000
400	50	210	100	0,300	0,375	1000
400	50	400	150	0,450	0,000	1000
400	50	320	150	0,450	0,125	1000
400	50	250	150	0,450	0,234	1000
400	50	160	150	0,450	0,375	1000
400	50	350	200	0,600	0,000	1000
400	50	270	200	0,600	0,125	1000
400	50	200	200	0,600	0,234	1000
400	50	110	200	0,600	0,375	1000
400	50	300	250	0,750	0,000	1000
400	50	220	250	0,750	0,125	1000
400	50	150	250	0,750	0,234	1000
400	50	60	250	0,750	0,375	1000

Çizelge 4.74. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine doramektin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

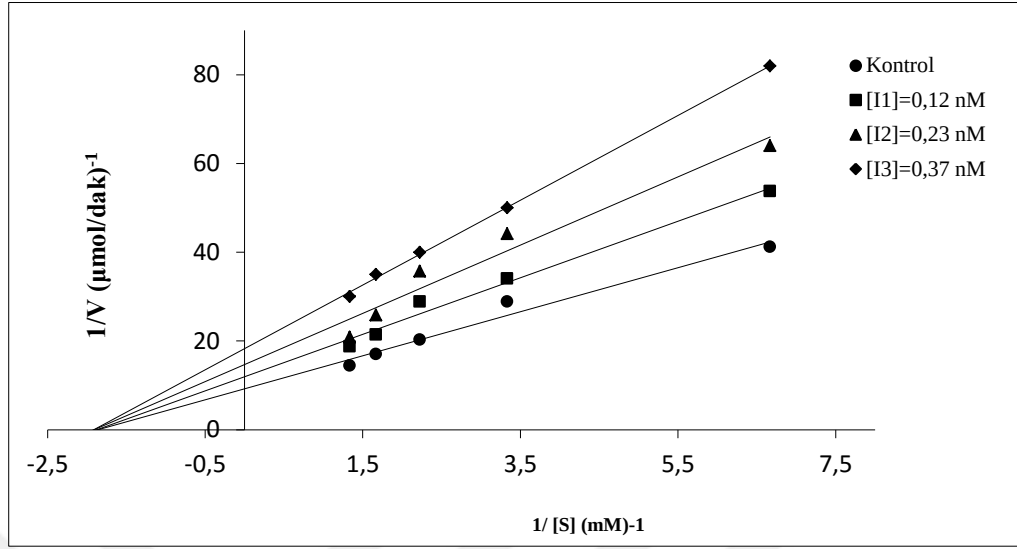
Tris-SO ₄ (μL)	Enzim (μL)	Saf su (μL)	Substrat (μL)	[S] (mM)	[I] (nM)	Toplam (μL)
400	75	425	50	0,150	0,000	1000
400	75	375	50	0,150	0,055	1000
400	75	325	50	0,150	0,111	1000
400	75	175	50	0,150	0,278	1000
400	75	375	100	0,300	0,000	1000
400	75	325	100	0,300	0,055	1000
400	75	275	100	0,300	0,111	1000
400	75	125	100	0,300	0,278	1000
400	75	325	150	0,450	0,000	1000
400	75	275	150	0,450	0,055	1000
400	75	225	150	0,450	0,111	1000
400	75	75	150	0,450	0,278	1000
400	75	275	200	0,600	0,000	1000
400	75	225	200	0,600	0,055	1000
400	75	175	200	0,600	0,111	1000
400	75	25	200	0,600	0,278	1000
400	75	225	250	0,750	0,000	1000
400	75	175	250	0,750	0,055	1000
400	75	125	250	0,750	0,111	1000
375	75	00	250	0,750	0,278	1000

Çizelge 4.75. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine abamektin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

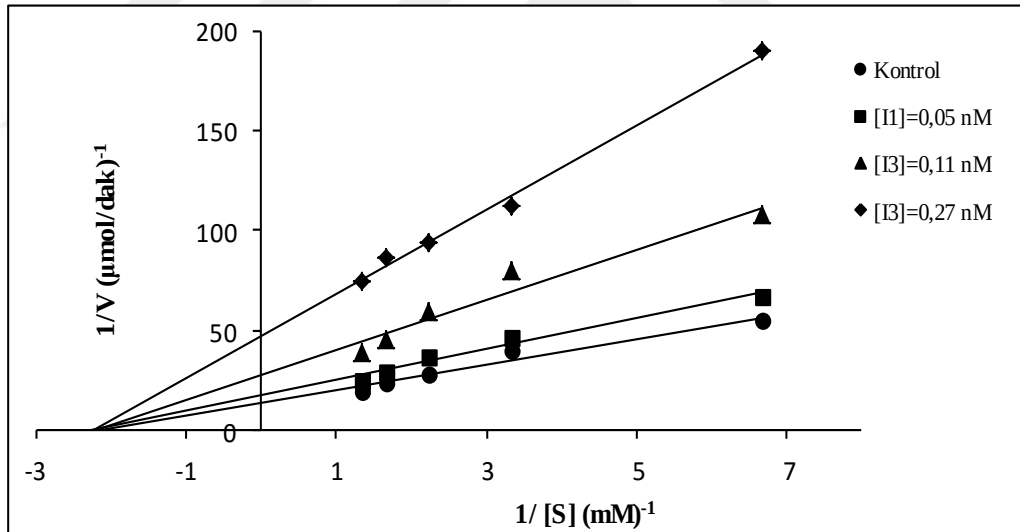
Tris-SO ₄ (μL)	Enzim (μL)	Saf su (μL)	Substrat (μL)	[S] (mM)	[I] (nM)	Toplam (μL)
400	60	490	50	0,150	0,000	1000
400	60	420	50	0,150	0,080	1000
400	60	365	50	0,150	0,143	1000
400	60	290	50	0,150	0,229	1000
400	60	440	100	0,300	0,000	1000
400	60	370	100	0,300	0,080	1000
400	60	315	100	0,300	0,143	1000
400	60	240	100	0,300	0,229	1000
400	60	390	150	0,450	0,000	1000
400	60	320	150	0,450	0,080	1000
400	60	265	150	0,450	0,143	1000
400	60	190	150	0,450	0,229	1000
400	60	340	200	0,600	0,000	1000
400	60	270	200	0,600	0,080	1000
400	60	215	200	0,600	0,143	1000
400	60	140	200	0,600	0,229	1000
400	60	290	250	0,750	0,000	1000
400	60	220	250	0,750	0,080	1000
400	60	165	250	0,750	0,143	1000
400	60	90	250	0,750	0,229	1000

Çizelge 4.76. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine eprinomektin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

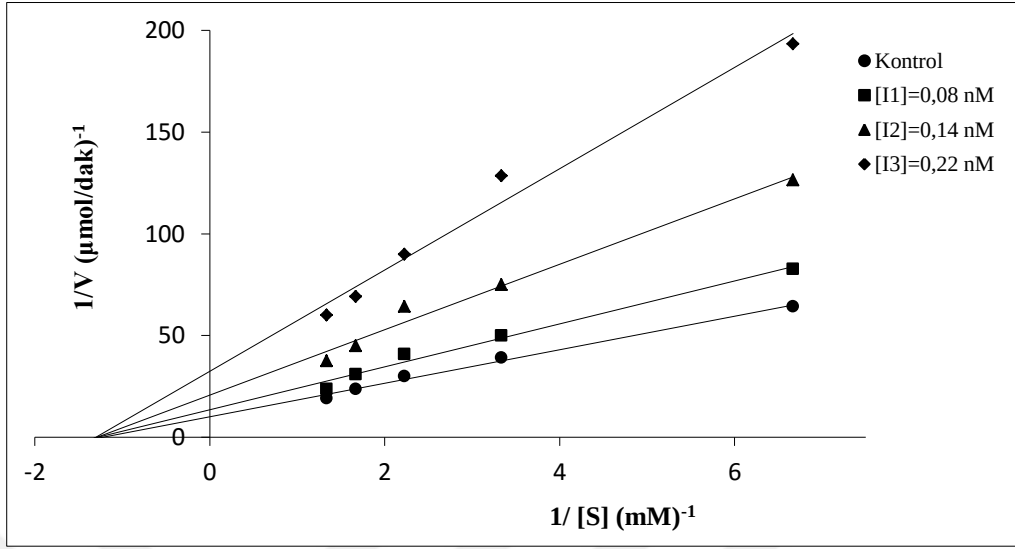
Tris-SO ₄ (μL)	Enzim (μL)	Saf su (μL)	Substrat (μL)	[S] (mM)	[I] (nM)	Toplam (μL)
400	60	490	50	0,150	0,000	1000
400	60	390	50	0,150	0,109	1000
400	60	220	50	0,150	0,295	1000
400	60	140	50	0,150	0,382	1000
400	60	440	100	0,300	0,000	1000
400	60	340	100	0,300	0,109	1000
400	60	170	100	0,300	0,295	1000
400	60	90	100	0,300	0,382	1000
400	60	390	150	0,450	0,000	1000
400	60	290	150	0,450	0,109	1000
400	60	120	150	0,450	0,295	1000
400	60	40	150	0,450	0,382	1000
400	60	340	200	0,600	0,000	1000
400	60	240	200	0,600	0,109	1000
400	60	70	200	0,600	0,295	1000
390	60	0	200	0,600	0,382	1000
400	60	290	250	0,750	0,000	1000
400	60	190	250	0,750	0,109	1000
400	60	20	250	0,750	0,295	1000
340	60	0	250	0,750	0,382	1000



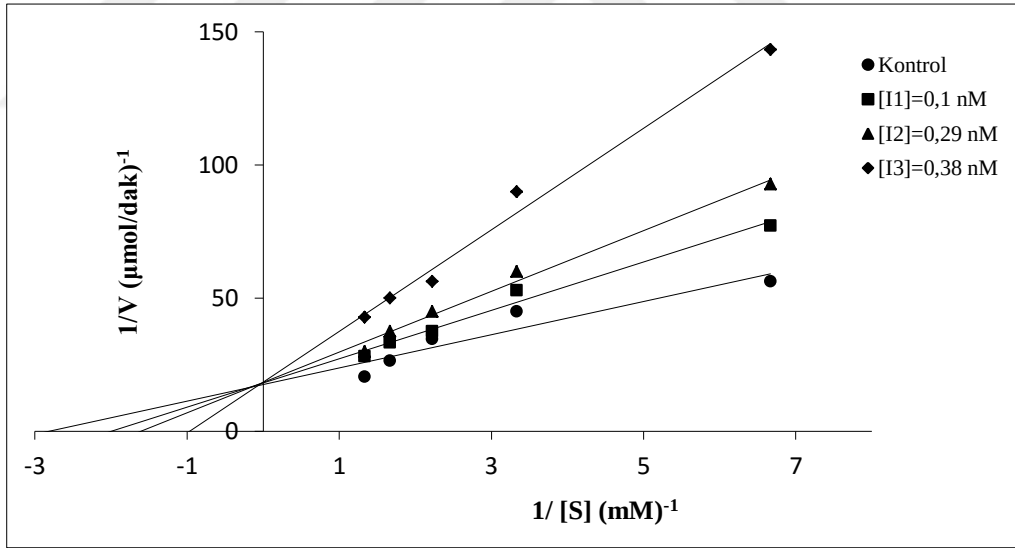
Şekil 4.64. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine Moksidektin etkisi



Şekil 4.65. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine Doramektin etkisi



Şekil 4.66. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine Abamektin etkisi



Şekil 4.67. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine Eprinomectin etkisi

Çizelge 4.77. Keçi böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi için 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonlarında Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan K_i değerleri ve inhibisyon tipleri

İnhibitör	[I] (nM)	K_i (nM)	Ortalama K_i (nM)	İnhibisyon Tipi
Moksidektin	0,125	0,425	0,402 ± 0,021	Yarışmasız
	0,234	0,399		
	0,375	0,384		
Doramektin	0,055	0,213	0,145 ± 0,058	Yarışmasız
	0,111	0,109		
	0,278	0,115		
Abamektin	0,080	0,239	0,160 ± 0,070	Yarışmasız
	0,143	0,138		
	0,229	0,104		
Eprinomektin	0,109	0,266	0,286 ± 0,097	Yarışmalı
	0,295	0,392		
	0,382	0,200		

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada keçi karaciğer ve böbrek dokularında karbonik anhidraz enziminin afinite kromotoğrafisi ile saflaştırılması, karakterizasyonu ve bazı kinetik özellikleri incelendi. Ayrıca bazı ağır metallerin, antibiyotiklerin ve veterinerlikte antiparaziter ilaç olarak kullanılan avermektinlerin saflaştırılan CA enzimi üzerine inhibisyon etkileri *in vitro* olarak incelendi.

Karbonik anhidraz (CA, E.C: 4.2.1.1), bikarbonatın (HCO_3^-) dehidrasyonu ve karbondioksitin (CO_2) hidratasyonunu hızlı ve dönüşümlü olarak kataliz eden çinko içerikli metaloenzim ailesinin bir üyesidir. Bu enzim; asit-baz düzenlemesi, gaz dengesi, kemik rezorpsiyonu ve kalsifikasyon gibi fizyolojik pH'ların kontrolü ile solunum ve biyosentetik prosesler dahil olmak üzere önemli bir rol oynamaktadır (Akbaba *et al.* 2014; Arabacı *et al.* 2014; Kucuk and Gülçin 2016). CA enzimi ilk önce memeli eritrositlerden izole edildi. Daha sonraki yıllarda insan eritrositlerinden, balık eritrositlerinden, sıçan eritrositlerinden, sıçan tükürüklerinden, sığır kemiklerinden, sığır lökositlerinden, bazı bakterilerden ve bitki kaynaklarından karakterize edilmiştir. Memelilerde enzimin moleküler kütlesi yaklaşık 30 kDa olduğu tespit edilmiştir (Beydemir *et al.* 2002; Beydemir and Gulcin 2004; Akıncıoğlu *et al.* 2015; Scozzafava *et al.* 2015). Çinko içeren bu enzim bikarbonat ve proton elde etmek için karbondioksitin hidratasyonunu tersinir olarak iki aşamalı reaksiyonla katalizler. Karbondioksit hemen hemen bütün dokulardan sentezlenir. CA enzimi inhibisyonunun canlı organizmalar için ciddi zararları vardır. Çünkü ağır metaller de dahil olmak üzere hemen hemen tüm ilaçlar ve kimyasalların çoğu enzim etkileşim mekanizması üzerine işlevlerini sergilemektedir (Kucuk and Gülçin 2016).

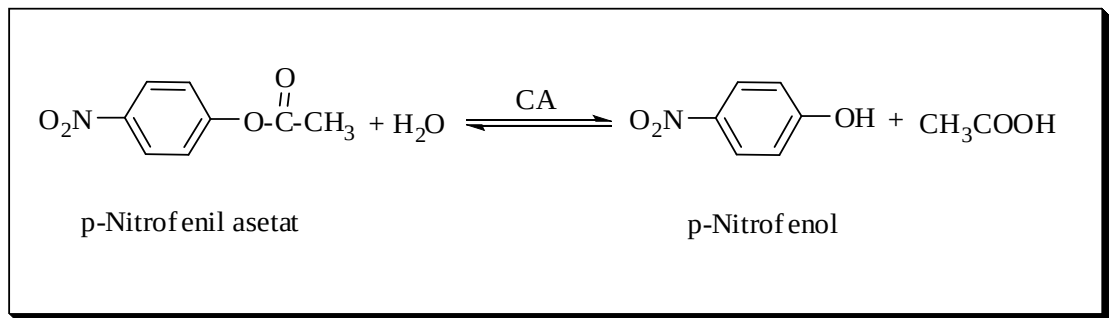
Çalışmada keçi karaciğer ve böbrek CA enziminin tercih edilmesinin temel sebepleri; CA enziminin canlılar için hayati öneme sahip olması, karaciğer ve böbrek dokusunun insanlar için temel besin kaynakları arasında yer alması ve bu konunun daha önce hiç çalışılmamış olmasından kaynaklanmaktadır. Bunun için çalışmada kullanılan keçi karaciğer ve böbrek dokuları Bingöl ili Belediye mezbahanesinden taze olarak alındı.

Alınan taze dokular -20°C 'de birkaç gün bekletildikten sonra Erzurum Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya araştırma laboratuvarına getirildi. Dokularda biriken 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 yardımıyla havan içinde parçalanarak dokunun her gramı için 25 mM Tris- SO_4 -HCl/0,1 mM Na_2SO_4 (pH 8,7) tampon çözeltisinden 3 mL ilave edilerek homojenize edildi. Bu süspansiyon ultra santrifüj cihazı ile 4°C 'de 60 dakika $13000\times g$ 'de 2 defa santrifüj yapılarak süpernatant kısmı analizler için kullanılmak üzere alındı. Homojenat hazırlandıktan sonra doku üzerinde biriken yağ tabakasını elimine etmek için 2/7 oranında hekzan (C_6H_{14})/homojenat 5 dakika $1500\times g$ 'de santrifüj edildi. Elde edilen homojenatlar Sepharose 4B-L tirozin sülfanilamit afinite kromatografisinden geçirilerek saflaştırıldı.

Afinite kromatografisinden yararlanarak hazırlanan saflaştırma tablosuna göre CA enzimi, keçi karaciğer dokusundan 61229,20 (EÜ/mg protein) spesifik aktivite ve %55,6 verimle 359,18 kat, böbrek dokusundan 58974,33 (EÜ/mg protein) spesifik aktivite ve %51,00 verimle 212,27 kat saflaştırıldı. CA enzimi için daha önce yapılan benzer çalışmalarda da aynı yöntemle Sepharose-4B afinite kolonunun kullanılmasıyla 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), Karadeniz alabalığı (*salmo trutta labrax*) böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokularından sırasıyla %35,55 verimle 349 kat, %18,63 verimle 362,45 kat, %71,05 verimle 1116,28 kat, %75 verimle 471,47 kat (Küçük 2015), 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 2011), koyun midesi CA I ve II izoenzimleri için sırasıyla %51,09 verimle 529,4 kat ve %78 verimle 615,2 kat (Kılınç 2011), koyun böbreği CA II ve IV izoenzimleri için sırasıyla %60,75 verimle 227,61 kat ve %30,83 verimle 139,45 kat (Demirdağ 2012), Van kedisi eritrositlerinden 367,2 kat (Söyler 2006), insan kanı hCA I ve II izoenzimleri için sırasıyla %57,86 verimle 76 kat ve %67 verimle 509,29 kat (Topal ve Gülçin 2014) saflaştırılmıştır. Yapılan çalışmada en yüksek saflaştırma katsayısı ve en yüksek verim karaciğer dokusunda olduğu

belirlenmiş olup, çalışmanın sonucu daha önce yapılan çalışmalarla uygunluk göstermiştir. Afinite kolonundan elüe edilen saf enzim çözeltileri için kalitatif protein tayini yapıldı. Kalitatif protein tayininde kolondan elüe edilen enzim çözeltilerinin 280 nm’de absorbanslarına bakıldı. Bu yöntem proteinlerde bulunan tirozin ve triptofan aminoasitlerinin 280 nm’de ışığı maksimum absorblamaları esasına dayanmaktadır (Segel 1975).

CA enzim aktivitesinin tespiti için hidrataz ve esteraz yöntemleri kullanıldı. Hidrataz aktivitesi Rickli ve arkadaşlarını tarafından geliştirilen Wilbur yöntemidir. Bu yöntem kısaca özetlenecek olursa; CO₂’nin hidratasyonu sonucu açığa çıkan H⁺ iyonlarının meydana getirdiği pH değişiminin brom timol mavisi indikatörü ile belirlenip renk değişimi için geçen sürenin ölçülmesi esasına dayanır. (Wilbur and Anderson 1948). Diğer yaygın kullanılan yöntem ise 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 absorbansı gösterdiğinden fenolün yapısındaki H⁺ iyonunun ayrışmaması ölçümü etkilememektedir (Armstrong *et al.* 1966; Verpoorte and Mehta 1967).



Şekil 5.1. p-Nitrofenilasetatın p-nitrofenole dönüşüm mekanizması

Afinite kolunundan saflaştırılan CA enziminin saflığını kontrol etmek için sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) yapıldı. Keçi karaciğer ve böbrek dokularından elde edilen enzimler jelde tek bant olarak gözlemlendi. Dolayısıyla tek bandın olması enzimin saf elde edildiği hakkında bilgi vermektedir.

Keçi karaciğer ve böbrek dokularından saflaştırılan CA enzimleri 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 CA enzimlerinin molekül kütleleri karaciğer dokusu için 27,70 kDa ve böbrek dokusu için 28,00 kDa olarak hesaplandı. Daha önce yapılan çalışmalarda bazı balık türleri ve memeli canlılardan saflaştırılan CA enzimi için SDS-PAGE ile molekül kütlesi hesaplandı. Örneğin; Zebra balığı (*Danio rerio*) balığı eritrositlerinden 29 kDa (Peterson *et al.* 1997), Gökkuşaağı alabalığı karaciğer dokusundan 31 kDa ve böbrek dokusundan 28,7 kDa (Söyüt 2006), Kangal balığı (*Garra rufa*) göz dokusundan 31,72 kDa (Koçyiğit 2014), insan eritrositlerinden saflaştırılan CA II izoenzimi için 30 kDa (Beydemir *et al.* 2002), koyun mide dokusundan saflaştırılan CA I ve II izoenzimleri için 26,7 kDa (Kılınç 2011), van kedisi eritrositlerinden yaklaşık 30 kDa (Söyler), koyun böbrek dokusundan saflaştırılan CA II izoenzimi için 29 kDa ve CA IV izoenzimi için ise 32 kDa olarak hesaplanmıştır (Demirdağ 2012).

Keçi karaciğer ve böbrek dokularından saflaştırılan CA enziminin optimum pH’sı 1 M Tris-SO₄ ve 1 M potasyum fosfat tampon çözeltileri kullanılarak esterase aktivitesi yöntemine göre belirlenirken, optimum iyonik şiddetini tespiti için Tris-SO₄ tamponunun 0,1 M ile 1 M aralığında farklı derişimlerdeki çözeltileri kullanıldı. Buna göre, keçi karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin optimum pH, 1,0 M Tris-SO₄ tamponunda pH 8,0 iken, böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi için optimum pH, 1,0 M Tris-SO₄ tamponunda pH 8,5 olarak belirlendi. Ayrıca karaciğer ve böbrek dokularından saflaştırılan CA enziminin optimum iyonik şiddeti sırasıyla 0,5 M ve 0,6 M Tris-SO₄ tamponu olarak belirlendi. Yapılan literatür taramaları sonucu CA ile ilgili yapılan çalışmalar veya tezlerde enzimin optimum pH’ı genelde pH 7,5 ile pH 9,5 aralığında olduğu kaydedilmiştir. Örneğin; Kangal balığı solungaç, kas ve göz dokularından (Koçyiğit 2014) ve Karadeniz alabalığı (*salmo trutta labrax*) böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokularından (Küçük 2015) saflaştırılan CA enziminin optimum pH’sı 9,0 olarak belirlenirken, optimum iyonik şiddetleri 1,0 M Tris-SO₄ tamponu olarak belirlenmiştir. Ayrıca Demirdağ (2012) yaptığı doktora tezinde koyun

böbrek dokusundan saflaştırdığı CA II ve IV izoenzimleri için, sırasıyla optimum pH değerini pH 8,0 ve pH 7,5 olarak bulurken, optimum iyonik şiddet değerlerini her iki izoenzim için de 20 mM Tris-HCl tamponu olarak belirlemiştir.

Çalışmada saflaştırılan CA enziminin stabil pH'sının belirlenmesi için pH 7,0-9,0 aralığında Tris-SO₄ tamponu ile pH 5,0-8,0 aralığında potasyum fosfat tamponu kullanıldı. Esteraz aktivitesi metoduna göre 12 saat zaman aralığında 84 saat boyunca yapılan ölçümlerde CA enziminin stabil pH'sı karaciğer dokusu için 0,5 M Tris-SO₄ tamponunda pH 7,5 olarak tespit edilirken, böbrek dokusu için 0,6 M Tris-SO₄ tamponunda pH 7,0 olarak belirlendi. Benzer şekilde koyun böbreğinden saflaştırılan CA II ve CA IV izoenzimleri için stabil pH değerleri sırasıyla pH 7,5 ve pH 7,0 olarak bulunmuştur (Demirdağ 2012).

Genel olarak enzimlerin karakterizasyon işlemlerinde yüksek aktivite gösterdikleri optimum pH, optimum iyonik şiddet değerlerinin yanında optimum sıcaklık değerleri de vardır. Bu sıcaklık değerinde enzimler en yüksek aktivite gösterirken bu değerlerin altındaki ve üstünde enzim aktivitesinde düşüş gözlemlenir. Yapılan çalışmada keçi karaciğer ve böbrek dokularından saflaştırılan CA enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesi amacıyla dijital su banyosu kullanıldı. 0°C'den başlayarak 10°C'lik artışla 60°C'ye kadar enzimin esteraz aktivitesi, spektrofotometrik olarak ölçülerek belirlendi. Hem karaciğer hem de böbrek dokularının CA enzimi için optimum sıcaklık değeri 40°C olarak belirlendi. Bu değer sıcak kanlı memelilerde yaklaşık 35-40 °C aralığında iken balık türlerinde bu değerler daha değişken olabilmektedir. Örneğin; Çipura balığının karaciğer, böbrek ve solungaç dokularından saflaştırılan CA enziminin optimum sıcaklığı 50°C (Kaya 2011), Kangal balığı solungaç, kas ve göz dokularından dokularından saflaştırılan CA enziminin optimum sıcaklığı 35°C (Koçyiğit 2014) ve koyun böbrek dokusundan saflaştırılan CA II ve IV izoenzimleri için 40 °C (Demirdağ 2012) olarak tespit edilmiştir.

Bir enzim için 10°C'lik sıcaklık değişiminin oluşturduğu aktivite farkı Q₁₀ değeriyle ifade edilir. Bu değer aralarında 10°C'lik fark bulunan aktivite değerlerinden büyük

olanın küçük olanına bölümüyle bulunur (Keha ve Küfrevioğlu 2012). Buna göre keçi karaciğer ve böbrek dokuları CA enzimi için Q_{10} değerleri sırasıyla 1,85 ve 1,79 olarak hesaplandı.

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 (Küçük 2015). Yapılan çalışmada substrat olarak kullanılan PNF 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 hem karaciğer hem de böbrek dokusu için yapıldı. Grafikte oluşan Arrheniüs eğrisi kullanılarak her bir dokunun aktivasyon enerjisi (E_a), aktivasyon entalpisi (ΔH) ve Q_{10} değerleri hesaplandı. Keçi karaciğer ve böbrek dokularından saflaştırılan CA enzimi için E_a değerleri sırasıyla 3,957 kcal/mol ve 2,995 kcal/mol olarak hesaplanırken, ΔH değerleri $\Delta H = E_a - RT$ formülünden yararlanarak karaciğer ve böbrek dokuları için sırasıyla 2,335 kcal/mol ve 2,374 kcal/mol olarak hesaplandı. Çalışmada elde edilen E_a değeri böbrek dokuda düşük, karaciğer dokusunda ise yüksek bulunmuştur. Çıkan sonuçlara göre enzimin reaksiyon hızının böbrek dokusunda daha yüksek olduğu gözlemlendi.

Karbonik anhidraz enziminin esteraz aktivitesinde PNF kullanıldı. Çalışmada keçi karaciğer ve böbrek dokularından saflaştırılan CA enziminin K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi için 5 farklı PNF konsatrasyonu kullanılarak spektrofotometrik olarak 348 nm'deki enzim aktiviteleri belirlendi. Dokular için substrat konsantrasyonuna karşı aktivite değerleri Lineveawer-Burk grafiği çizilerek K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı. Keçi karaciğer ve böbrek dokularından saflaştırılan CA enzimlerinin V_{max} değerleri sırasıyla 0,368 EÜ/mL ve 0,434 EÜ/mL olarak hesaplandı. Enzimin K_M değerleri karaciğer ve böbrek dokuları için sırasıyla 4,027 mM ve 4,342 mM olarak hesaplandı. Elde edilen sonuçlara göre karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin K_M değeri daha düşüktür. Dolayısıyla karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin substrat olarak kullanılan PNF'a karşı ilgisi böbrek dokusuna göre daha fazladır. Gökkuşluğu 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 (Söyüt 2006), Çipura balığı karaciğer, solungaç ve böbrek dokularından saflaştırılan CA enziminin K_M değerleri sırasıyla 0,497 mM, 0,972 mM ve 0,401 mM (Kaya 2011) olarak tespit edilmiştir. Ayrıca koyun midesinden saflaştırılan CA I ve CA II izoenzimlerinin K_M değeri ise sırasıyla 1,32 mM ve 1,96 mM olarak hesaplanmıştır (Kılınç 2011).

K_M ve V_{max} değerleri kullanılarak enzimin turnover sayısını ifade eden k_{cat} değerleri hesaplandı. Yapılan çalışmada keçi karaciğer ve böbrek dokularından saflaştırılan CA enziminin k_{cat} değerleri sırasıyla $1328,51 \text{ s}^{-1}$ ve $906,66 \text{ s}^{-1}$ olarak hesaplandı. Karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin turnover sayısı böbrek dokusu CA enzimine göre daha yüksek bulunmuştur. Benzer şekilde; kangal balığı (*Garra rufa*) solungaç, kas ve göz dokularından saflaştırılan CA enziminin k_{cat} değerleri sırasıyla 114.85, 19.21 ve 66.88 s^{-1} (Koçyiğit 2014), Karadeniz alabalığı böbrek ve karaciğer dokularından saflaştırılan CA enziminin k_{cat} değerleri sırasıyla $688,05 \text{ s}^{-1}$ ve $1505,62 \text{ s}^{-1}$ (Küçük 2015), insan sitozolik hCA III izoenzimi için k_{cat} değeri $1,3 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ (Nishimori *et al.* 2007), insan sitozolik hCA VII izoenzimi için k_{cat} değeri $9,5 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ (Vullo *et al.* 2005) olarak bulunmuştur. Yapılan çalışmada keçi karaciğer ve böbrek dokularından saflaştırılan CA enziminin turnover sayıları balık dokularından saflaştırılan CA enziminin turnover sayılarına göre yüksek, ancak insan CA enzimi turnover sayısına göre düşük olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmada yapılan CA enziminin karakterizasyon işlemlerinden biri de özgülük sabitinin (V_0) bulunmasıdır. Çünkü 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. Keçi karaciğer ve böbrek dokularından saflaştırılan CA enziminin V_0 değerleri sırasıyla $3,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ve $2,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ olarak hesaplandı.

Günümüzde toprak, su ve hava gibi ortamlarda yaygın bir şekilde birikmeye başlayan ağır metaller, dünya yüzeyindeki tüm organizmaların yaşamını tehdit eden önemli bir çevre sorunu haline gelmiştir. Ağır metallerin çevreye yayılmasına neden olan

etmenlerin başında endüstriyel faaliyetler, motorlu taşıtların egzozları, maden yatakları ve işletmeleri, volkanik faaliyetler, tarımda kullanılan gübre ve ilaçlar ile kentsel atıklar gelmektedir. Ekosfere ulaşan ağır metallerden çinko, nikel, arsenik, kobalt, civa, kurşun ve kadmiyum canlı organizmaları birçok yönden olumsuz etkiler. Bilhassa ağır metallerin toksik etkileri nedeniyle bitkilerde transpirasyon, stoma hareketleri, su alımı, fotosentez, enzim aktivitesi, çimlenme, protein sentezi, membran stabilitesi, hormonal denge gibi birçok fizyolojik olayın bozulmasına neden olmaktadır (Asri ve Sönmez 2006). Çayır ve merada otlayan koyun, keçi ve sığır gibi et ve süt verimi yüksek olan hayvanlar ağır metal kontaminasyona maruz kalan bitkilerle belendikleri zaman çeşit organ ve dokuda ağır metal birikimine maruz kalırlar. Dolayısıyla bu döngünün en tepesinde bulunan insan bu hayvanlardan yararlandığı için biyokimyasal ve fizyolojik fonksiyon bozuklukları sonucu birçok hastalığa maruz kalabilmektedir.

Son yıllarda insan ve yaban hayatı için toksikolojik risk açısından en endişe verici kimyasal kirletici sınıflarından biri ağır metallerdir. Ağır metaller tarafından kirlenme, çevrede metallerin devam eden birikimi nedeniyle dünya çapında bir sorundur (de Mora *et al.* 2004; Hwang *et al.* 2006). Ağır metaller organizmaya yiyecek, su, hava veya deri yoluyla emilim ile girebilir ve canlı organizmalar üzerinde toksik etkilere neden olabilir (Lionetta *et al.* 1998; Vilella *et al.* 2000; Calisi *et al.* 2011). Yapılan çalışmalarda ağır metallerin CA'nın katalitik aktivitesinde kofaktör olarak görev yapmasının yanı sıra, çeşitli omurgalı ve omurgasız hayvanlar olmak üzere *in vitro* CA aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir. İlk kez CA'nın balıklarda ağır metallerle inhibe edildiğini gösterdiler (1976). Daha sonra yapılan çalışmalarda küçük omurgalı ve memelilerde CA üzerinde metal izine duyarlılığını ortaya koydu. Bu bağlamda yapılan çalışmalarda Lionetto ve ark. (1998 and 2000), Avrupa yılanbalığı bağırsağında ve solungaçlarında kadmiyumun dokuya özgü önemli ölçüde CA aktivitesini inhibe ettiklerini buldu. Solungaçlarda bulunan sitozolik CA aktivitesi ($IC_{50}: 9.979 \times 10^{-6}$ M), barsaktaki sitosolik CA aktivitesine ($IC_{50}: 3.64 \times 10^{-5}$ M) göre ağır metallere karşı çok daha duyarlı olduğu tespit edildi. Özellikle hem sitozolik ve hem de membran bağımlı izoformların bulunduğu barsakta, kadmiyumun inhibisyon etkisi sitozolik CA üzerinde etkisi membrana bağlı CA'dan daha belirgindir.

Skaggs ve ark. *Callinectes sapidus* and *Carcinus maenas* gibi yengeç türlerinin solungaçlarında Ag^+ , Cd^{2+} , Cu^{2+} ve Zn^{2+} gibi ağır metaller tarafından sitozolik CA'nın önemli *in vitro* inhibisyonunu göstermişlerdir. İnhibisyon, *Callinectes sapidus*'a göre *Carcinus maenas*'ta metaller için bin kat daha zayıf bir bağlanma afinitesiyle birlikte türe özgü idi (2002). Ayrıca insanlarda CA aktivitesi, ağır metal maruziyetine karşı belirgin bir duyarlılık göstermiştir. Ekinci ve ark. (2007) sitozolik hCA I ve II'nin kurşun, kobalt ve cıva ile inhibisyonunu göstermişlerdir. Kurşun, hCA I için yarışmasız bir inhibitör iken hCA II için yarışmalı inhibisyon gösterdiği gözlenmiştir. Kobalt HCA I için yarışmalı, hCA II için ise yarışmasız inhibitör özellik olarak davrandı. Cıva, hem hCA-I ve hem de hCA II için yarışmasız inhibisyon etkisi sergiledi. Kurşun ise hem hCA I hem de hCA II için en iyi inhibitördü.

Hem insanlarda hem de diğer hayvanlarda ağır metaller tarafından CA aktivitesinin engellenmesinde gözlemlenen tür özgüllüğü, ağır metallerin CO_2 hidrasyonunun spesifik katalitik sitesinde değil, ancak "Proton servisi" diye isimlendirilen yakınındaki bir cebe bağladığı gerçeği ortaya çıkmaktadır (Tu *et al.* 1981). Bu nedenle, CA protein izoformlarındaki yapısal farklılıkların, farklı türlerde farklı metal bağlama afinitelerine neden olabilmektedir. CA'nın organizmaların fizyolojisinde oynadığı kilit rol göz önünde bulundurulduğunda, bu sonuçlar hem insan hem de çevresel sağlık takibi için ağır metal maruziyetine karşı CA yanıtının araştırılmasına yönelik ilgiyi göstermektedir.

Bu çalışma kapsamında yapılan çalışmada Fe^{2+} , Pb^{2+} , Co^{2+} , Ag^+ , Cu^{2+} ve Hg^{2+} gibi ağır metallerin CA enzimi üzerine inhibisyon etkileri incelendi. Buna göre; karaciğer ve böbrek dokularından saflaştırılan CA enziminin aktivitesini yarıya indiren ağır metal iyon konsantrasyonları (IC_{50}) değerleri esterez aktivitesi yöntemi ile belirlendi. Bu metal iyonlarının her bir doku için IC_{50} değerleri kendi aralarında küçükten büyüğe doğru karşılaştırıldığında karaciğer dokusunda IC_{50} değeri $Pb^{2+} < Hg^{2+} < Co^{2+} < Cu^{2+} < Ag^+ < Fe^{2+}$ olarak belirlenmiştir. Bu sonuca göre karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine en fazla $[Pb^{2+}]$: 0,13 mM ile inhibisyon etki göstermiştir. Bir diğer doku olan böbrek dokusu için de IC_{50} değerleri küçükten büyüğe doğru $Pb^{2+} < Hg^{2+} < Co^{2+} < Ag^+ < Cu^{2+} < Fe^{2+}$ olarak belirlenmiştir. Bu değerlere göre böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine en fazla $[Pb^{2+}]$: 0,10 mM ile inhibisyon etkisi

görülmüştür. Benzer şekilde Demirdağ (2012) yaptığı doktora tez çalışmasında bazı ağır metal iyonlarının koyun CA II ve CA IV izoenzimleri üzerine inhibisyon etkilerini incelemiştir. Buna göre, Cu^{+2} , Zn^{+2} , Cd^{+2} , Co^{+2} , gibi metal iyonları CA II enzimini inhibe etmiştir. Bu metal iyonları için IC_{50} değerleri sırasıyla 0.021, 0.082, 0.53 ve 2.4 mM olarak belirlenmiştir. Ayrıca CA IV izoenzimi inhibisyon çalışmasında Fe^{+2} , Cu^{+2} , Cr^{+2} , Al^{+3} , Ni^{+2} , Mn^{+2} , Cd^{+2} , Zn^{+2} gibi metal iyonlarını kullandı. Çalışma sonucunda Cu^{+2} ve Al^{+3} metalleri CA IV izoenzimini inhibe ettiğini ve Fe^{+2} nin enzimi aktive ettiğini kaydetmiştir. Cu^{+2} ve Al^{+3} sırasıyla IC_{50} değerleri 0,23 ve 1,22 mM olarak belirlemiştir.

Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak keçi karaciğer ve böbrek dokularından saflaştırılan CA enzimi üzerine inhibisyon etki gösteren Fe^{2+} , Pb^{2+} , Co^{2+} , Ag^{+} , Hg^{2+} ve Cu^{2+} metal iyonlarının K_i sabitleri tespit edildi. Beş farklı konsantrasyondaki substrat çözeltilerine karşılık üç farklı inhibitör konsantrasyonu kullanılarak $1/V$ ile $1/S$ değerleri hesaplanıp K_i değerleri ile inhibisyon çeşitleri Microsoft-Excel programı yardımıyla tespit edildi. Bir inhibitörün K_i değeri ne kadar düşük ise enzime olan ilgisi o kadar yüksek olur ve enzimin katalitik aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi de o kadar fazla olur. Keçi karaciğer ve böbrek dokularından saflaştırılan CA enziminin ortalama K_i değerleri karaciğer dokusu için küçükten büyüğe doğru $\text{Pb}^{2+} < \text{Hg}^{2+} < \text{Co}^{2+} < \text{Cu}^{2+} < \text{Fe}^{2+} < \text{Ag}^{+}$ olarak sıralandı. Karaciğer dokusu için inhibisyon türü Pb^{2+} iyonunda yarışmalı Fe^{2+} , Ag^{+} , Co^{2+} , Cu^{2+} ve Hg^{2+} iyonlarında ise yarışmasız olarak belirlendi. Böbrek dokusu için ortalama K_i değerleri küçükten büyüğe doğru $\text{Pb}^{2+} < \text{Hg}^{2+} < \text{Cu}^{2+} < \text{Co}^{2+} < \text{Ag}^{+} < \text{Fe}^{2+}$ olarak sıralandı. Böbrek dokusu için inhibisyon türü Hg^{2+} , Co^{2+} ve Cu^{2+} iyonlarında yarışmalı Fe^{2+} , Ag^{+} ve Pb^{2+} iyonlarında ise yarışmasız olarak belirlendi. Çıkan sonuçlara göre karaciğer ve böbrek dokuları için en yüksek inhibisyon etki gösteren Pb^{2+} iyonunun karaciğer dokusunda 0,052 mM ile yarışmalı inhibisyon, böbrek dokusunda ise 0,078 mM ile yarışmasız inhibisyona neden olduğu tespit edilmiştir.

Antibiyotikler, kısmen yada tamamen mikroorganizmalardan türetilen, bakteriyel enfeksiyonları tedavi etmek amacıyla kullanılan ilaçlardır. Yapılan bazı çalışmalarda

antibiyotiklerin CA izoenzimlerini düşük konsantrasyonlarda inhibe ettiği bildirilmiştir (Kılınç 2011). Mikroorganizmaların sebep olduğu hemen hemen tüm hastalıklarda antibiyotikler tedavi edici olarak kullanılmaktadır. Antibiyotikler insan sağlığında olduğu kadar hayvan sağlığında da önemli bir kullanım alanına sahiptir. Hayvan sağlığında kullanılan ilaçların, metabolik önemi yüksek olan bir enzim üzerine etkisinin incelenmesi bilimsel açıdan büyük önem arz etmektedir (Demirdağ 2012). Bu nedenle CA enzimi üzerine hayvan sağlığında yaygın olarak kullanılan bazı ilaçların etkilerini inceledik.

Yapılan çalışmada amoksisilin ve vankomisin gibi antibiyotik ilaçların keçi karaciğer ve böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine inhibisyon etkileri incelendi. Hem IC_{50} değerleri hem de K_i sabitleriyle beraber inhibisyon türü belirlendi. Buna göre; karaciğer dokusunda IC_{50} değeri Vankomisin (9,90 nM) < Amoksisilin (25,32 nM) olarak belirlenirken, böbrek dokusunda IC_{50} değeri Vankomisin (13,07 nM) < Amoksisilin (68,81) nM olarak belirlenmiştir. Keçi karaciğer ve böbrek dokularından saflaştırılan CA enziminin ortalama K_i değerleri karaciğer dokusu için küçükten büyüğe doğru Vankomisin (8,48 nM) < Amoksisilin (28,47 nM) olarak sıralandı. Karaciğer dokusu için inhibisyon türü her iki antibiyotik ilaç için yarışmasız olarak belirlendi. Böbrek dokusu için küçükten büyüğe doğru Vankomisin (13,00 nM) < Amoksisilin (54,80 nM) olarak sıralandı. İnhibisyon türü Amoksisilin için yarışmalı, Vankomisin için yarışmasız olarak belirlendi.

Avermektinler tüm dünyada insan ve hayvan parazitlerinin kontrolünde yaygın olarak kullanılan ilaçlardır (Karademir 2005). Antiparazitik ilaçlar ve zirai mücadele ilaçları olarak avermektinler, nörotoksik makrosiklik lakton bileşiklerinin bir sınıfı olarak bilinir. Genel olarak böcek ve akarlar karşı çiftlik hayvanları ve bazı tarım ürünlerinin korunmasında yaygın olarak kullanılır. Gıda ve tarım ürünlerinde kalıntı bıraktığından dolayı çevreye ve insanlara verdikleri zararlar konusundaki endişeler artmaktadır (Kose *et al.* 2016). Moksidektin, doramektin, abamektin ve eprinomektin gibi avermektinler bu grubun en çok bilinenleridir.

Moksidektin, doramektin, abamektin ve eprinomektin gibi avermektin grubu ilaçların keçi karaciğer ve böbrek dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine inhibisyon etkileri incelendi. Hem IC_{50} değerleri hem de K_i sabitleriyle beraber inhibisyon türleri belirlendi. Keçi karaciğer dokusunda IC_{50} değerleri Eprinomektin < Doramektin < Abamektin < Moksidektin olarak belirlenirken, böbrek dokusunda IC_{50} değerleri Abamektin < Doramektin < Moksidektin < Eprinomektin olarak belirlendi. Bu sonuca göre karaciğer ve böbrek dokularından saflaştırılan CA enzimi üzerine sırasıyla en fazla Eprinomektin (0,149 nM) ve Abamektin (0,133 nM) ile inhibisyon etki göstermiştir. Ayrıca bu dokulardan saflaştırılan CA enziminin ortalama K_i değerleri karaciğer dokusu için küçükten büyüğe doğru Doramektin < Eprinomektin < Abamektin < Moksidektin olarak sıralandı. Karaciğer dokusu için inhibisyon türü Moksidektin için yarışmalı Doramektin, Eprinomektin ve Abamektin için yarışmasız olarak belirlendi. Böbrek dokusu için ortalama K_i değerleri küçükten büyüğe doğru Doramektin < Abamektin < Eprinomektin < Moksidektin olarak sıralandı. Böbrek dokusu için inhibisyon türü Eprinomektin için yarışmalı inhibisyon Moksidektin, Doramektin ve Abamektin için yarışmasız inhibisyon olarak belirlendi.

Literatür taramalarında CA enziminin farklı canlılardan saflaştırma, karakterizasyon ve inhibisyon etkileri incelenmiş, fakat keçi karaciğer ve böbrek dokusu ile ilgili herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Keçi karaciğer ve böbrek dokularından saflaştırılan CA enzimi için elde edilen toplu sonuçlar Çizelge 5.2 - 5.6'da verilmiştir.

Çizelge 5.2. Keçi karaciğer dokusu CA enzimi için elde edilen kinetik parametre sonuçları

Parametreler	Sonuçlar
Optimum pH (1.0 M, Tris-SO ₄)	8,0
Optimum İyonik Şiddet (M, Tris-SO ₄)	0,5
Stabil pH (0,6 M Tris-SO ₄)	7.5
Optimum Sıcaklık (°C)	40
Aktivasyon Enerjisi (Ea) (kcal/mol)	3,957
Aktivasyon Entalpisi (ΔH) (kcal/mol)	2,335
Q ₁₀	1,85
K _M (PNF) (mM)	4,027
V _{max} (PNF) (EÜ/mL)	0,368
k _{cat} (PNF) (s ⁻¹)	1328,51
V ₀ (PNF) (mM×s ⁻¹)	3,3×10 ⁵
SDS-PAGE ile tayin edilen molekül kütlesi (kDa)	27,70

Çizelge 5.3. Keçi böbrek dokusu CA enzimi için elde edilen kinetik parametre sonuçları

CA Enzimini İçin Kinetik Çalışma Sonuçları	
Optimum pH (1,0 M Tris-SO ₄)	8,5
Optimum iyonik şiddet (Tris-SO ₄)	0,6 M
Stabil pH (0,6 M Tris-SO ₄)	7.0
Optimum Sıcaklık (°C)	40
Aktivasyon Enerjisi (Ea) (kcal/mol)	2,995
Aktivasyon Entalpisi (ΔH) (kcal/mol)	2,374
Q ₁₀	1,79
K _M (PNF, mM)	4,342
V _{max} (PNF, EÜ/mL)	0,408
k _{cat} (PNF, s ⁻¹)	906,66
V ₀ (PNF, mM× s ⁻¹)	2,1×10 ⁵
SDS-PAGE ile tayin edilen molekül kütlesi (kDa)	28,00

Çizelge 5.4. Keçi karaciğer ve böbrek dokuları CA enzimi için elde edilen IC₅₀ sonuçlarının karşılaştırılması

Doku	Karaciğer	Böbrek
Ağır Metal etkisi	IC₅₀ (mM)	IC₅₀ (mM)
Fe ²⁺	1,46	1,98
Pb ²⁺	0,13	0,10
Co ²⁺	0,55	0,89
Ag ⁺	1,21	1,23
Cu ²⁺	0,77	1,47
Hg ²⁺	0,54	0,51
Antibiyotik etkisi	IC₅₀ (nM)	IC₅₀ (nM)
Amoksisilin	25,320	68,818
Vankomisin	9,900	13,075
Avermektin etkisi	IC₅₀ (nM)	IC₅₀ (nM)
Moksidektin	0,245	0,255
Doramektin	0,168	0,139
Abamektin	0,181	0,133
Eprinomektin	0,149	0,274

Çizelge 5.5. Keçi karaciğer dokusu CA enzimi için elde edilen K_i sonuçları

Ağır Metal Türü	Ortalama K_i (mM)	İnhibisyon Tipi
Fe^{2+}	$1,134 \pm 0,340$	Yarışmasız
Pb^{2+}	$0,052 \pm 0,007$	Yarışmalı
Co^{2+}	$0,452 \pm 0,157$	Yarışmasız
Ag^+	$1,453 \pm 0,636$	Yarışmasız
Cu^{2+}	$0,484 \pm 0,171$	Yarışmasız
Hg^{2+}	$0,336 \pm 0,094$	Yarışmasız
Antibiyotik Türü	Ortalama K_i (nM)	İnhibisyon Tipi
Amoksisilin	$28,47 \pm 5,160$	Yarışmasız
Vankomisin	$8,48 \pm 1,560$	Yarışmasız
Avermektin Türü	Ortalama K_i (nM)	İnhibisyon Tipi
Moksidektin	$0,317 \pm 0,123$	Yarışmalı
Doramektin	$0,153 \pm 0,036$	Yarışmasız
Abamektin	$0,283 \pm 0,078$	Yarışmasız
Eprinomektin	$0,232 \pm 0,082$	Yarışmasız

Çizelge 5.6. Keçi böbrek dokusu CA enzimi için elde edilen K_i sonuçları

Ağır Metal Türü	Ortalama K_i (mM)	İnhibisyon Tipi
Fe^{2+}	$1,686 \pm 0,471$	Yarışmasız
Pb^{2+}	$0,078 \pm 0,025$	Yarışmasız
Co^{2+}	$0,947 \pm 0,298$	Yarışmalı
Ag^+	$1,076 \pm 0,264$	Yarışmasız
Cu^{2+}	$0,508 \pm 0,134$	Yarışmalı
Hg^{2+}	$0,286 \pm 0,071$	Yarışmalı
Antibiyotik Türü	Ortalama K_i (nM)	İnhibisyon Tipi
Amoksisilin	$54,80 \pm 13,01$	Yarışmalı
Vankomisin	$13,00 \pm 3,37$	Yarışmasız
Avermektin Türü	Ortalama K_i (nM)	İnhibisyon Tipi
Moksidektin	$0,402 \pm 0,021$	Yarışmasız
Doramektin	$0,145 \pm 0,058$	Yarışmasız
Abamektin	$0,160 \pm 0,070$	Yarışmasız
Eprinomektin	$0,286 \pm 0,097$	Yarışmalı

KAYNAKLAR

- Agarwal, R., Behari, J.R., 2007. Role of selenium in mercury intoxication in mice. *Ind. Health.*, 45, 388-395.
- Akbaba, Y., Akıncıoğlu, A., Göçer, H., Göksu, S., Gülçin, İ., Supuran, C.T., 2014. Carbonic anhydrase inhibitory properties of novel sulfonamide derivatives of aminoindanes and aminotetralins. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 29, 35-42.
- Akhan, M., 2014. Piyasada satışa sunulan kaynak suları ve doğal mineralli sularda ağır metal kalıntılarının araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, İstanbul.
- Akıncıoğlu, A., Akıncıoğlu, H., Gülçin, I., Durdağı, S., Supuran, C.T., Göksu, S., 2015. Discovery of potent carbonic anhydrase and acetylcholine esterase inhibitors: Novel sulfamoylcarbamates and sulfamides derived from acetophenones. *Bioorg. Med. Chem.*, 23, 3592-3602.
- Altuner, E.S., 2013. Nano kremlerin üretimi. Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Konya.
- Altunova, H., 2016. Menengiç (*Pistacia terebinthus* L.) meyve ekstrelerinin metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (mrsa) ve vankomisine dirençli enterococcus (vre)'a karşı antibakteriyel aktivitesi. Gaziantep Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Gaziantep.
- Alvinerie, M., Sutra, J.F., Badri, M., Galtier, P., 1995. Determination of moxidectin in plasma by high-performance liquid chromatography with automated solid-phase extraction and fluorescence detection. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.*, 674, 119-124.
- Arabacı, B., Gulcin, I., Alwasel, S. 2014. Capsaicin: A potent inhibitor of carbonic anhydrase isoenzymes. *Molecules*, 19, 10103-10114.
- 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, N., 2013. Hamsi (*Engraulis encrasicolus*) ve mezgıt (*Merlangius merlangus euxinus*) balıklarının solungaç dokularından karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu ve bazı metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Erzurum.
- Arslan, O., Nalbantoğlu, B., Demir, N., Ozdemir, H., Kufrevioglu, O.I., 1996. A new method for the purification of carbonic anhydrase isozymes by affinity chromatography. *Turk. J. Med. Sci.*, 26, 163-166.
- Asri, F.Ö., Sönmez, S. 2006. Ağır metal toksisitesinin bitki metabolizması üzerine etkileri. *Derim.*, 23, 36-45.
- Atasever, A., Ozdemir, H., Gulcin, I., Kufrevioglu, O.I., 2013. One-step purification of lactoperoxidase from bovine milk by affinity chromatography. *Food Chem.*, 136, 864-870.
- Bartacek, J., Feroso, F. G., Baldó-Urrutia, A.M., van Hullebusch, E.D., Lens, P.N. 2008. Cobalt toxicity in anaerobic granular sludge: influence of chemical speciation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 35, 1465-1474.

- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., 2014. Biyokimya. Palme Yayıncılık, 241-247p, Ankara.
- Beydemir, S., Bulbul, M., Hisar, O., Soyut, H., and Yanık, T. 2006. Carbonic anhydrase: affinity purification and kinetic properties from rainbow trout lens. *Int. J. Appl. Chem.*, 2, 45-55.
- Beydemir, S., Ciftci, M., Kufrevioglu, 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., Ciftci, M., Ozmen, I., Buyukokuroglu, M.E., Ozdemir, H. Kufrevioglu, 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., Gulcin, I., 2004. Effect of melatonin on carbonic anhydrase from human erythrocyte *in vitro* and from rat erythrocyte *in vivo*. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 19, 193-197.
- Beydemir, Ş., Hisar, O., Gülçin, İ., Küfrevioğlu, Ö.İ. and Supuran, C.T., 2005. Effects of low molecular weight plasma inhibitors rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) on human erythrocyte carbonic anhydrase-II isozyme activity *in vitro* and rat erythrocytes *in vivo*. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 20, 35-39.
- Borouhaki, M.T., Mollazadeh, H., Rajabian, A., Dolati, K., Hoseini, A., Paseban, M., Farzadnia, M. 2014. Protective effect of pomegranate seed oil against mercuric chloride-induced nephrotoxicity in rat. *Renal Failure*, 36, 1581-1586.
- 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.
- 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.
- Burt, E., Darlington, M.V., Graf, G., 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 Kufrevioglu, 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. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 18, 371–375.
- Byvoet, P. and Gotti, A., 1967. Isolation and properties of carbonic anhydrase from dog kidney and erythrocytes. *Mol. Pharmacol.*, 3, 142-152.
- Calisi, A., Lionetto, M.G., Sanchez-Hernandez, J.C., Schettino, T., 2011. Effect of heavy metal exposure on blood haemoglobin concentration and methemoglobin percentage in *Lumbricus terrestris*. *Ecotoxicology*, 20, 847-854.
- Can, C. ve Körlü, A., 2011. Antibakteriyel tekstil üretiminde sıkça kullanılan gümüşün etki mekanizması ve toksisitesi. *Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 5, 54-59.
- Casini, A., Antel, J., Abbate, F., Scozzafava, A., David, S., Waldeck, H., Schafer, S., Supuran, C.T., 2003. Carbonic anhydrase inhibitors: SAR and X-ray crystallographic study for the interaction of sugar sulfamates/sulfamides with isozymes I, II, and IV. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 13, 841-845.

- Christensen, G.M., Tucker, J.H., 1976. Effects of selected water toxicants on the in vitro activity of fish carbonic anhydrase. *Chem. Biol. Interact.* 13, 181-192.
- Çağlayan, C., 2013. Oktopamin: antioksidan kapasitesi ve insan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA I ve hCA II) üzerine etkisi. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi, Erzurum.
- Danişan, A., Ceyhan, D., Ogus, I. H. Ozer, N., 2004. Purification and characterization glucose-6-phosphate dehydrogenase from rat small intestine. *Protein J.* 23, 317-324.
- de Mora, S., Fowler, S.W., Wyse, E., Azemard, S., 2004. Distribution of heavy metals in marine bivalves, fish and coastal sediments in the Gulf and Gulf of Oman. *Mar. Pollut. Bull.* 49, 410-424.
- Demirdag, R., Yerlikaya, E., Kufrevioğlu, O.I., 2012. Purification of Carbonic Anhydrase-II from Sheep Liver and Inhibitory Effects of Some Heavy Metals on Enzyme Activity, *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* 27, 795-799.
- Demirdağ, R., 2012. Karbonik anhidraz II ve IV izoenzimlerinin koyun böbrek dokusundan saflaştırılması karakterizasyonu ve bazı kimyasalların etkilerinin araştırılması. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, Erzurum.
- Devlin, T.M., 2002. *Biochemistry with clinical correlations*. 5th Ed., Wiley-Liss inc., Newyork.
- 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.
- Durden, D.A. 2007. Positive and negative electrospray LC-MS-MS methods for quantitation of the antiparasitic endectocide drugs, abamectin, doramectin, emamectin, eprinomectin, ivermectin, moxidectin and selamectin in milk. *J. Chromatogr. B.* 850, 134-146.
- Dündar, Y., Aslan, R., 2005. Yaşamı kuşatan ağır metal kurşunun etkileri. *Kocatepe Tıp Dergisi*, 6, 2.
- Ekinci, D., Beydemir, S., 2010. Risk assessment of pesticides and fungicides for acid-base regulation and salt transport in rainbow trout tissues. *Pestic. Biochem. Physiol.* 97, 66-70.
- Ekinci, D., Beydemir, Ş., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2007. In vitro inhibitory effects of some heavy metals on human erythrocyte carbonic anhydrases. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 22, 745-750.
- El-Shenawy, S.M., Hassan, N.S., 2008. Comparative evaluation of the protective effect of selenium and garlic against liver and kidney damage induced by mercury chloride in the rats. *Pharmacol Rep.* 60, 199.
- Erdem, D., Yerlikaya, E., Ceyhan, 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, 139-144.
- Erdoğan, M.A., Özgül, Ü., Aydoğan, M.S., Kaçmaz, O., Gedik, E., Toğal, T., 2013. Akut demir zehirlenmesi olgularına klinik yaklaşım: Olgu serisi. *J. Turgut Ozal Med Cent.* 20,4.
- Falkbring, S.O., Göthe, P.O., Nyman, P.O., Sundberg, L., Porath, J. 1972. Affinity chromatography of carbonic anhydrase. *FEBS Letters*, 24,2: 229-235.
- Gidlow, D.A., 2015. Lead toxicity. *Occup. Med.* 65, 348-356.

- Goldman, L.R., Shannon, M.W., Committee on Environmental Health. 2001. Technical report: mercury in the environment: implications for pediatricians. *Pediatrics*, 108, 197-205.
- Goudie, A., Evans, N., Gration, K., et al. 1993. Doramectin, a potent novel endectocide. *Vet Parasitol.* 49, 5-15.
- Gözükara, E.M., 1989. *Biyokimya*. Ofset Repromat Ltd Şti., Ankara, 792-795.
- Gulcin, I., Beydemir, S., Buyukokuroglu M.E., 2004. In vitro and in vivo effects of dantrolene on carbonic anhydrase enzyme activities, *Biol. Pharm. Bull.*, 27, 613-616.
- 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.
- Gülçin, İ., Scozzafava, A., Supuran, C.T., Koksall, Z., Turkan, F., Çetinkaya, S., Alwasel, S.H. 2016. Rosmarinic acid inhibits some metabolic enzymes including glutathione S-transferase, lactoperoxidase, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and carbonic anhydrase isoenzymes. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 31, 1698-1702.
- Gürdöl, F., Ademoğlu, E., 2014. *Biyokimya*. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul
- Heidarian, E., and Rafieian-Kopaei, M. 2013. Protective effect of artichoke (*Cynara scolymus*) leaf extract against lead toxicity in rat. *Pharmaceut. Biol.* 51, 1104-1109.
- Hilvo, M., Tolvanen, M., Clark, A., Shen, B.R., Shah, G.N., Waheed, A., Halmı, P., Hanninen, M., Hamalainen, J.M., Vihinen, M., Sly, W.S., Parkkila, S., 2005. Characterization of CA XV, a new GPI-Anchored form of carbonic anhydrase. *Biochem. J.*, 392, 83-92.
- Hisar, O., 2002. Gökkuşığı alabalık eritrositlerinden karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu ve antibiyotiklerin enzim aktivitesine üzerine etkisinin incelenmesi, (Doktora Tezi), Fen-Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Hsu, P.C., Guo, Y.L., 2002. Antioxidant nutrients and lead toxicity. *Toxicology.*, 180, 33-44.
- Huyut, Z., Beydemir, Ş., and Gülçin, İ. 2017. Inhibition properties of some flavonoids on carbonic anhydrase I and II isoenzymes purified from human erythrocytes. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 2017, 9, e21930.
- Hwang, H.M., Green, P.G., Young, T.M., 2008. Tidal salt marsh sediment in California, USA: Part 3. Current and historic toxicity potential of contaminants and their bioaccumulation. *Chemosphere*, 71, 2139-2149.
- Jabusch, J.R., Deutsch, H.F., 1989. Localization of the lysines acetylated in ubiquitin reacted with p-nitrophenyl acetat. *Arch. Biochem. Biophys.*, 238, 170.
- Karademir, Ü., 2005. Köpeklerde ivermektin ve doramektinin ağız ve derialtı yol ile uygulanmalarının takiben karşılaştırmalı farmakokinetikleri. Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- 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.
- Kayaalp, S.O., 2002. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. Hacettepe-Tas Yayıncılık. Ankara.

- Keha, E.E., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2012. Biyokimya. Aktif Yayınevi, Erzurum.
- Keilin, D. Mann, T., 1940. Carbonic anhydrase. Purification and nature of the enzyme. Biochem. J. 34, 1163.
- Keilin, D. 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.
- Kılınç, N., 2011. Karbonik anhidraz ı ve ıı izoenzimlerinin koyun midesinden saflaştırılması, karakterizasyonu ve bazı ilaçların enzim aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Erzurum
- Koçyiğit, Ü.M., 2014. Kangal balığının (*Garra rufa*) farklı dokularından karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu ve bazı metal iyonların etkilerinin incelenmesi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum
- Kose, L. P., Gülçin, İ., Özdemir, H., Atasever, A., Alwasel, S. H., Supuran, C. T., 2016. The effects of some avermectins on bovine carbonic anhydrase enzyme. J. Enzyme Inhib. Med. Chem, 31, 773-778.
- Koyuncu, G., 2012. Sulu çözeltilerde amoksisilin ve sefalotin antibiyotiklerinin ileri oksidasyon teknikleri ile arıtılabilirliğinin araştırılması. Mersin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Mersin.
- Kucuk, M., Gulcin, İ. 2016. Purification and characterization of the carbonic anhydrase enzyme from Black Sea trout (*Salmo trutta* Labrax Coruhensis) kidney and inhibition effects of some metal ions on enzyme activity. Environ. Toxicol. Pharmacol. 44, 134-139.
- Küçük, M., 2015. Karadeniz alabalığı (*salmo trutta* Labrax Coruhensis) böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokularından karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu ve bazı metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680.
- Lama, T., 2010. Son üç yıl içinde yoğun bakımda yatan hastalarda, solunum yollarında gram pozitif bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlarda vankomisin, teikoplanin ve linezolid antibiyotiklerinin etkinliğinin retrospektif olarak karşılaştırılması. İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Anesteziyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.
- Leblebici, Z., 2010. Türkiye’de yayılış gösteren lemnaceae (sumercimeğigiller) üyelerinde bazı ağır metallerin alınımı üzerinde nitrat, sülfat ve fosfatın etkisi. Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kayseri.
- Lehninger, A.L., 2013. Principles of Biochemistry. Worth publisher, Acedemic Press, New York.
- Lindskog, S., 1997. Structure and mechanism of carbonic anhydrase. Pharmacol. Ther. 74, 1-20
- Lineweaver, H., Burk, D., 1934. The determination of enzyme dissociation constants. J. Am. Chem. Soc, 57, 685.
- Lionetto, M.G., Giordano, M.E., Vilella, S., Schettino, T., 2000. Inhibition of eel enzymatic activities by cadmium. Aquat. Toxicol. 48, 561-571.

- Lionetto, M.G., Maffia, M., Cappello, M.S., Giordano, M.E., Storelli, C., Schettino, T., 1998. Effect of cadmium on carbonic anhydrase and $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ in eel, *Anguilla anguilla*, intestine and gills. *Comp. Biochem. Phys. A.* 120, 89-91.
- Lionetto, M.G., Vilella, S., Trischitta, F., Cappello, M.S., Giordano, M.E., Schettino, T., 1998. Effects of CdCl_2 on electrophysiological parameters in the intestine of the teleost fish, *Anguilla anguilla*. *Aquat. Toxicol.* 41, 251-264.
- Luo, L., Sun, Y.J., Wu, Y.J. 2013. Abamectin resistance in drosophila is related to increased expression of P-glycoprotein via the dEGFR and dAkt pathways. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 43, 627–634.
- Maia, P.M., Rezende, F.B., Netto, A.D., Marques, F.F., 2013. An alternative derivatization reaction to the determination of doramectin in bovine milk using spectrofluorimetry. *Spectrochim. Acta A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, 100, 127-130.
- Maioli, M.A., de Medeiros, H.C.D., Guelfi, M. et al. 2013. The role of mitochondria and biotransformation in abamectin-induced cytotoxicity in isolated rat hepatocytes. *Toxicology in Vitro.* 27, 570–579.
- Maren, T.H., 1960. A simplified micromethod for the determination of carbonic anhydrase and its inhibitors. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 130, 26-29.
- 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.
- Meldrum, N.U., Roughton, F.J.W., 1933. Carbonic anhydrase: its preparation and properties. *J. Physiol.* 80, 113–142.
- 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.
- Nishimori, I., Minakuchi, T., Onishi, S., Vullo, D., Cecchi, A., Scozzafava, A., Supuran, C.T. 2007. Carbonic anhydrase inhibitors: cloning, characterization, and inhibition studies of the cytosolic isozyme III with sulfonamides. *Bioorg. Med. Chem.* 15, 7229-7236.
- Onat, T., Emerk, K., 2006. İnsan Biyokimyası, Palme Yayınları, Ankara s:221-222.
- Özensoy, O., Arslan, O., Oznur Sinan, S. 2004. A new method for purification of carbonic anhydrase isozymes by affinity chromatography. *Biochemistry (Moscow)*. 69, 216-219.
- Pal, A., 2014. Copper toxicity induced hepatocerebral and neurodegenerative diseases: An urgent need for prognostic biomarkers. *Neurotoxicology*, 40, 97-101.
- Peterson, R.E., Tu, C., Linser, P.J., 1997. Isolation and characterisation of a carbonic anhydrase homologue from the zebrafish (*Danio rerio*). *J. Mol. Evol.* 448, 432-439.
- Prichard, R., Me'nez, C., Lespine, A., 2012. Moxidectin and the avermectins: consanguinity but not identity. *Int. J. Parasitol. Drugs. Drug. Resist.* 2, 134-153.
- Pullan, L.M. and Noltmann, E.A., 1985. Purification and properties of pig muscle carbonic anhydrase III. *Biochim. Biophys. Acta*, 839, 147-54.
- Rolim, L.A., Maria dos Santos, F.C., Chaves, L.L., Gonçalves, M.L.C.M., Freitas-Neto, J.L., da Silva do Nascimento, A.L., Soares-Sobrinho, J.L., de Albuquerque, M.M., de Lima, M.C.A., Rolim-Neto, P.J., 2015. Preformulation study of ivermectin raw material. *J. Therm. Anal. Calorim.* 120, 807–816.

- Roth, M., Richards, R.H., Sommerville, C. 1993. Current practices in the chemotherapeutic control of sea lice infestations in aquaculture-a review. J. Fish. Dis. 16,1-26.
- Schcer, A., Dietsch, P., 1984. A-54000 molecular weight protein with carbonic anhydrase activity in rabbit erythrocytes. Annal. New York Acad. Sci., 429,241.
- Scozzafava, A., Passaponti, M., Supuran, C.T., Gülçin, İ., 2015. Carbonic anhydrase inhibitors: Guaiacol and catechol derivatives effectively inhibit certain human carbonic anhydrase isoenzymes (hCA I, II, IX, and XII). J. Enzyme Inhib. Med. Chem. 30, 586-591.
- Segel, I.H., 1968. Biochemical Calculations: Enzim kinetics. John Wiley and Sons, Inc, New York, 213
- Segel, I.H., C. John Wiley and Sons, 1975. Enzyme Kinetics. New York.
- Sen, M., Drance, S.M. Woodford, V.R., 1963. Separation of bovine lens carbonic anhydrase into two components. Can. J. Biochem, 41, 1235.
- Shoop, W.L., Mrozik, H., Fisher, M.H. 1995. Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. Vet. Parasitol. 59, 139–156.
- Skaggs, H.S., Henry, R.P., 2002. Inhibition of carbonic anhydrase in the gills of two euryhaline crabs, *Callinectes sapidus* and *Carcinus maenas*, by heavy metals. Comp. Biochem. Phys. C. 133, 605-612.
- 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.
- Söyler, M., 2006. Van kedisi eritrositlerinden karbonik anhidraz enziminin (E.C.4.2.1.1.) saflaştırılması ve karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Van.
- Söyüt, H., 2006. 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.
- Supuran, C.T., Scozzafava, A., 2001. Carbonic anhydrase inhibitors. Curr. Med. Chem., 1, 61-97.
- Tashian, R.E., and Hewett-Emmett, D. 1984. Biology and Chemistry of The Carbonic Anhydrase. The New York Academy of Science, New York.
- Taslimi, P., Osmanova, S., Gülçin, İ., Sardarova, S., Farzaliyev, V., Sujayev, A., Kufrevioglu, O.I. 2017. Discovery of potent carbonic anhydrase, acetylcholinesterase, and butyrylcholinesterase enzymes inhibitors: The new amides and thiazolidine-4-ones synthesized on an acetophenone base. J. Biochem. Mol. Toxicol. 2017, 9, e21931.
- Telefoncu, A., 1986. Temel ve Uygulamalı Enzimoloji, Ege Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Yayını, İzmir, 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.
- 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.
- Tu, C., Wynns, G.C., Silverman, D.N., 1981. Inhibition by cupric ions of ^{18}O exchange catalyzed by human carbonic anhydrase II. Relation to the interaction between carbonic anhydrase and hemoglobin. J. Biol. Chem. 256, 9466-9470.
- Uygun, M., 2012. karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması için moleküler baskılanmış kriyojellerin hazırlanması ve karakterizasyonu, Doktora Tezi, Fen-Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Valenzuela, A.I., Redondo, M.J., Pico, Y., Font, G. 2000. Determination of abamectin in citrus fruits by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. J. Chromatogr. A. 871, 57–65.
- Verpoorte, J.A., Mehta, S., Edsall, J.T. 1967. Esterase Activities of Human Carbonic Anhydrases B and C. J. Biol. Chem, 242, 4221-4229.
- Vilella, S., Ingrosso, L., Lionetto, M.G., Schettino, T., Zonno, V., Storelli, C. 2000. Effect of cadmium and zinc on the Na^+/H^+ exchanger present on the brush border membrane vesicles isolated from eel kidney tubular cells. Aquat. Toxicol. 48, 25-36.
- Vitale, A.M., Monserrat, J.M., Castilho, P., Rodriguez, E.M., 1999. Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). Comp. Biochem. Physiol. Part C., 122: 121-129.
- Vullo, D., Voipio, J., Innocenti, A., Rivera, C., Ranki, H., Scozzafava, A., Supuran, C. T. 2005. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of the human cytosolic isozyme VII with aromatic and heterocyclic sulfonamides. Bioorg. Med. Chem. Lett. 15, 971-976.
- Whitney, P.L., Briggles, T.V., 1982. Membrane-associated carbonic anhydrase purified from bovine lung. J. Biol. Chem., 257, 12056-12059.
- 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., Knuutila, K.G., 1980. Bovine lens carbonic anhydrases: Purification and properties. Experimental Eye Research, 30, 277-290.
- Wistrand, P.J., 2002. Carbonic anhydrase III in liver and muscle of male rats purification and properties. Upsala J. Med. Sci., 107, 77-88 .
- Yapıcı, G., Günay, C.A.N., Şahin, Ü., 2002. Çocuklarda asemptomatik kurşun zehirlenmesi. Cerrahpaşa Tıp Dergisi, 33, 3.
- Yu Z, Xie L, Lee S., Zhang, R., 2006. A novel carbonic anhydrase from the mantle of the pearl oyster (*Pinctada fucata*). Comp. Biochem. Phys. B., 143:190-194.
- Zahir, F., Rizwi, S.J., Haq, S.K., Khan, R.H., 2005. Low dose mercury toxicity and human health. Environ. Toxicol. Pharmacol., 20, 351-360.
- Zhu, X.L. Sly, S.W., 1990. Carbonic Anhydrase IV from human lung purification, characterization and comparison with membrane carbonic anhydrase from human kidney. J. Biol. Chem. 265,15; 8795-8801.

ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Muş'un Bulanık ilçesinde doğdu. İlk ve orta öğrenimini Bulanık'ta tamamladı. 2006 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nden 2010 yılında dereceyle mezun oldu. 2010-2011 Eğitim-öğretim yılında Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim dalında yüksek lisans öğrenimine başladı. 2013 yılında Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim dalında doktora çalışmalarına başladı.

