



**SİRAZ (*Capoeta umbla*) KARACİĞERİNDEN KARBONİK ANHİDRAZ
ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU, BAZI METAL
VE PESTİSİTLERİN ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Ayşegül Mine ÖZAVCI

Yüksek Lisans Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Bilim Dalı

Doç. Dr. Ramazan DEMİRDAĞ

AĞRI-2019

(Her hakkı saklıd

T.C.
AĞRI İBRAHİM ÇEÇEN ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANA BİLİM DALI

Ayşegül Mine ÖZAVCI

**SİRAZ (*Capoeta umbla*) KARACİĞERİNDEN KARBONİK ANHİDRAZ
ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZASYONU, BAZI METAL VE PESTİSİTLERİN ENZİM AKTİVİTESİ
ÜZERİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ YÖNETİCİSİ
Doç. Dr. Ramazan DEMİRDAĞ

AĞRI -2019



T.C.
AĞRI İBRAHİM ÇEÇEN ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü



TEZ ONAY FORMU

**Siraz (*Capoeta umbla*) Karaciğerinden Karbonik Anhidraz Enziminin Saflaştırılması,
Karakterizasyonu, Bazı Metal ve Pestisitlerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin
Araştırılması**

Doç. Dr. Ramazan DEMİRDAĞ danışmanlığında, Ayşegül Mine ÖZAVCI tarafından hazırlanan bu çalışma, 20/08/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. Ramazan DEMİRDAĞ

İmza :

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Aykut ÖZTEKİN

İmza :

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Emrah YERLİKAYA

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu **26/08/2019** tarih ve **19/34-1** ... nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. İbrahim HAN
Enstitü Müdürü

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

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

SİRAZ (*Capoeta Umbla*) KARACİĞERİNDEN KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU, BAZI METAL VE PESTİSİTLERİN ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ayşegül Mine ÖZAVCI

Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Danışman: Doç. Dr. Ramazan DEMİRDAĞ

Bu tez kapsamında, Siraz (*Capoeta umbla*) karaciğer dokusunda karbonik anhidraz (CA, karbonat hidrolizaz, E.C. 4.2.1.1) enzimi üzerine bazı metallerin ve pestisitlerin *in vitro* etkileri incelendi. Siraz (*C.umbla*) balığının karaciğer dokusundan karbonik anhidraz enzimi ilk kez tarafımızdan afinite kromatografisi (Sepharose 4B–L–tirozin–sulfanilamid) yöntemi ile saflaştırıldı. Afinite kromatografisi neticesinde enzim 2026.32 EÜ/mg spesifik aktiviteyle ve % 59.97 verimle 212.40 kat saflaştırıldı. Saflaştırılan enzimin saflığını kontrol etmek amacıyla Sodyum dodesil sülfat–poliakrilamid jel (SDS-PAGE) elektroforezi yapıldı ve tek bant elde edildi.

Siraz (*C.umbla*) karaciğer dokusu CA enzimi için yapılan kinetik çalışmalarda; p–nitrofenil asetat substratı kullanılarak K_m ve V_{max} Lineweaver-Burk grafiklerinden hesaplandı. Tris-SO₄ tamponunda optimum pH 8.5, optimum iyonik şiddet 0,02 M Tris-SO₄, optimum sıcaklık 35°C olarak, stabil pH ise Tris-SO₄ tamponunda pH 7.0 olarak bulundu. Saflaştırılan CA enzimi üzerine bazı metal iyonları ile pestisitlerin etkileri incelendi ve inhibisyon gösteren Cu⁺², Mn⁺³, Ba⁺², Se⁻² metal iyonları ile aldrin, dieldrin, endosülfan, hexachlorbenzene, alpha- HCH pestisitleri için IC₅₀ değerleri ve K_i sabitleri hesaplandı.

2019,95 sayfa

Anahtar kelimeler: siraz, karaciğer, karbonik anhidraz, saflaştırma, karakterizasyon, metal, pestisit, inhibisyon

ABSTRACT

Master Thesis

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF CARBONIC ANHYDRASE FROM LIVER OF SIRAZ (*Capoeta Umbla*), EFFECTS OF SOME METALS AND PESTICIDIES' ON THE ENZYME ACTIVITY

Ayşegül Mine ÖZAVCI

Ibrahim Cecen University

Graduate School of Natural and Applied sciences

Supervisor: Assoc.Prof. Dr. Ramazan DEMİRDAG

In this thesis , *in vitro* effects of some ions and pesticides on carbonic anhydrase (CA, carbonate hydrolyase, E.C. 4.2.1.1) enzyme from Siraz (*Capoeta umbla*) liver tissue were investigated. Carbonic anhydrase enzyme was firstly purified from Siraz (*Capoeta umbla*) using by Sepharose-4B-L tyrosine-sulfanilamide affinity gel chromatography . As a result of affinity chromatography, 2026.32 0 EU / mg protein, which have specific activity, purified 212.40 fold with 59.97 % efficiency. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (SDS-PAGE) electrophoresis was performed to check the purity of the purified enzyme and a single band was obtained.

Siraz (*C.umbla*) liver tissue in the kinetic studies for CA enzyme; K_m and V_{max} were calculated from Lineweaver-Burk plots using p-nitrophenyl acetate substrate. Optimum pH of Tris-SO₄ was 8.5, optimal ionic strengths was 0.02 M Tris-SO₄ buffer, optimum temperature was 35 ° C, for the enzyme and stable pH was found in the Tris-SO₄ buffer at pH 7.0. The effects of some metal ions and some pesticides on purified CA enzyme were also investigated and ve Cu²⁺, Mn³⁺, Ba²⁺, Se²⁻ ions were inhibit the enzyme and values of IC₅₀ and K_i constants calculated for aldrin, dieldrin, endosulfan, hexachlorbenzene, alpha- HCH pesticides.

2019,95 pages

Key words: siraz fish, liver, carbonic anhydrase, purification, characterization, metal, inhibition, pesticides

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmanın deneysel kısmı Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Yüksek lisans öğrenimim boyunca bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Ramazan DEMİRDAĞ 'a teşekkürü borç bilirim.

Çalışmalarım esnasındaki yardımlarından dolayı değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Kani ZİLBEYAZ'a, Sayın Doç. Dr. Hülya AKINCIOĞLU'na, Sayın Doç. Dr. Müslüm KUZU'ya, Dr. Öğr. Üyesi Akın AKINCIOĞLU'na, Dr. Öğr. Üyesi Aykut ÖZTEKİN'e, Dr. Öğr. Üyesi Sara TAŞKESENLIOĞLU'na, Dr. Öğr. Üyesi Tayfun KARATAŞ'a, Dr. Öğr. Görevlisi Yeliz DEMİR'e ve labaratuvar çalışmalarımnda her koşulda yanımda olan ve desteğini esirgemeyen arkadaşım Öğr. Görevlisi Rüya KAYA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Ömrüm boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen bugünlere ulaşmamda büyük pay sahibi olan canım annem, babam ve kız kardeşime, bu süreçteki tüm yardımlarından dolayı kıymetli Kamil GÜMÜŞ'e çok teşekkür ediyorum.

Yeğenim Miraç'a itafen

Ayşegül Mine ÖZAVCI

Temmuz,2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET	ii
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	v
1.GİRİŞ.....	1
1.1.Enzimler.....	1
1.1.1.Enzimlerin Adlandırılması.....	1
1.2.Karbonik Anhidraz Enzimi.....	4
1.2.1.Karbonik Anhidraz Enziminin Kısa Tarihçesi.....	4
1.2.2.Karbonik Anhidraz Enzimi Sınıflandırılması, Dağılımı ve Fizyolojik Önemi.....	6
1.2.3.CA İnhibitörleri (CaIs)	11
1.3. Balıklarda Karbonik Anhidraz Enzimi	13
1.4. Siraz <i>Capoeta umbla</i> (Heckel 1843)	15
1.5. Ağır Metaller	18
1.6. Pestisitler.....	22
2.KAYNAK ÖZETLERİ.....	28
3.MATERYAL ve METOD.....	34
3.1. Materyal.....	34
3.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar.....	34
3.3. Çalışmada Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	35
3.4. Balıktan karaciğer Örneklerinin Alınması ve Hemolizatının Hazırlanması....	37
3.5. Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu.....	38
3.6. Yöntem.....	39
3.7. Bradford yöntemi ile protein tayini	42

3.7.1. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının kontrolü.....	43
3.8 Siraz (<i>C.umbra</i>) karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi ile ilgili yapılan karakterizasyon çalışmaları.....	45
3.8.1. Siraz (<i>C.umbra</i>) karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin alt birimlerinin molekül kütlelerinin SDS-PAGE ile tayini.....	45
3.8.2. Siraz (<i>C.umbra</i>) karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi için optimum pH'nın belirlenmesine yönelik çalışmalar.....	45
3.8.3. Siraz (<i>C.umbra</i>) karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi için optimum iyonik şiddetin belirlenmesine yönelik çalışmalar.....	46
3.8.4. Siraz (<i>C.umbra</i>) karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi için optimum sıcaklığın belirlenmesine yönelik çalışmalar.....	46
3.8.5. Siraz (<i>C.umbra</i>) karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi için stabil pH bulunmasına yönelik çalışmalar.....	46
3.8.6. Cu^{+2} , Mn^{+3} , Ba^{+2} , Se^{-2} iyonlarının ve aldrin, dieldrin, endosülfan, hexachlorbenzene, , alpha-HCH pestisitlerin CA enziminin aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi	47
4.ARAŞTIRMA BULGULARI.....	48
4.1.Protein(Kantitatif) Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik.....	48
4.2. Siraz (<i>C.umbra</i>) Karaciğer Dokusu CA Enziminin Saflaştırılması Sonuçları...48	
4.2.1. Afinite kromatografisi sonuçları.....	48
4.2.2. Siraz (<i>C.umbra</i>) karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin SDS-PAGE ile saflık kontrolü.....	49
4.3. Siraz (<i>C.umbra</i>) karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin karakterizasyon çalışmalarının sonuçları.....	50
4.3.1. Siraz (<i>C.umbra</i>) karaciğer CA enziminin alt birimlerinin SDS-PAGE ile molekül kütlelerinin belirlenmesi sonuçları.....	50
4.3.2 p-nitrofenilasetat substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesine yönelik sonuçlar	51
4.3.3. CA Enzimi için optimum pH bulunmasına yönelik sonuçlar	52
4.3.4. CA enziminin optimum iyonik şiddetinin belirlenmesine yönelik sonuçlar...55	
4.3.5 CA enziminin optimum sıcaklığın belirlenmesine yönelik sonuçlar...56	
4.4. Siraz (<i>C.umbra</i>) Karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi için stabil pH bulunmasına yönelik sonuçlar.....	57

4.5. Siraz (<i>C.umbra</i>) Karaciğer Dokusundan Saflaştırılan CA enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren metal iyonları için IC ₅₀ ve K _i değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışmaların sonuçları.....	58
4.6 Siraz (<i>C.umbra</i>) Karaciğer Dokusundan Saflaştırılan CA Enzimi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkilerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışma Sonuçları.....	59
4.7. Siraz (<i>C.umbra</i>) Karaciğer Dokusundan Saflaştırılan CA enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren bazı pestisitler için IC ₅₀ ve K _i değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışmaların sonuçları.....	63
4.8. Siraz (<i>C.umbra</i>) Karaciğer Dokusundan Saflaştırılan CA enzimi Üzerine Bazı Pestisitlerin Etkilerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışma Sonuçları....	63
5.TARTIŞMA-SONUÇ.....	69
KAYNAKLAR.....	85
ÖZGEÇMİŞ.....	96

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ADP	Adenozindifosfat
ATP	Adenozintrifosfat
CA	Karbonik anhidraz
CARP	Protein bağlı karbonik anhidraz
Da	Dalton
EC	Enzim komisyonu
Eİ	Enzim inhibitor kompleksi
ES	Enzim substrat kompleksi
EU	Enzim ünitesi
GST	Glutasyon S-transferaz
hCA I	İnsan karbonik anhidraz I izoenzimi
hCA II	İnsan karbonik anhidraz II izoenzimi I İnhibitör
His	Histidin
IC ₅₀	Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
IUB	Uluslararası Biyokimya Birliği
IOP	Yüksek Göz içi Basıncı
K _i	Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma denge sabiti
K _M	Michaelis-Menten sabiti
MK	Molekül kütlesi
PAGE	Poliakrilamid jelelektroforezi
SDS	Sodyum dodesilsülfat
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilendiamin
Tris	Trihidroksimetil aminometan
TCA	Triklor asetik asit
V _{max}	Maksimum hız

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Karbonik anhidraz enziminin aktif bölgesi.....	5
Şekil 1.2 Siraz (<i>C.umbra</i>) 'a ait örnek fotoğraf.....	17
Şekil 1.3. Aldrin pestisit molekül yapısı.....	25
Şekil 1.4. Heptachlor pestisit molekül yapısı	25
Şekil 1.5. Dieldrin molekül yapısı	25
Şekil 1.6. Endosülfan pestisit molekül yapısı	26
Şekil 1.7. Hexachlorbenzene pestisit molekül yapısı.....	26
Şekil 1.8. α -HCH pestisit molekül yapısı.....	26
Şekil. 1.9. 2,4DDT pestisit molekül yapısı.....	27
Şekil 3.1. Canlı olarak temin edilen Siraz balıkları.....	37
Şekil 4.1. Coomassie Brilliant Blue yöntemi ile sığır serum albümini kullanılarak protein tayini için hazırlanan standart grafik.....	48
Şekil 4.2. Afinite kromatografisi ile saflaştırılan CA enziminin SDS-PAGE ile saflık kontrolü.....	50
Şekil 4.3. SDS-PAGE sonucu çizilen R_f - log M_K grafiği.....	51
Şekil 4.4. Siraz (<i>C.umbra</i>) karaciğer dokusu CA enziminin PNF substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik çalışma sonuçları.....	52
Şekil 4.5. Siraz (<i>C.umbra</i>) karaciğer CA enzimi için yapılan optimum pH çalışmasının sonucuna yönelik pH-Aktivite grafiği.....	53
Şekil 4.6. Siraz (<i>C.umbra</i>) karaciğer CA enzimi için yapılan optimum pH çalışmasının sonucuna yönelik pH-Aktivite grafiği.....	54
Şekil 4.7. Siraz (<i>C.umbra</i>) karaciğer CA enzimi için yapılan iyonik şiddet çalışmasının sonucuna yönelik iyonik şiddet-aktivite grafiği.....	55
Şekil 4.8. Siraz (<i>C.umbra</i>) karaciğer CA enzimi için yapılan optimum sıcaklık çalışmasının sonucuna yönelik için sıcaklık- aktivite ölçüm sonuçları gösteren grafik	

Şekil 4.9. Değişik pH'lardaki Tris SO ₄ tampon çözeltisi kullanılarak <i>C.umbra</i> balığı karaciğer CA enzimi için elde edilen stabil pH-zaman grafiği.....	58
Şekil 4.10. <i>C. umbra</i> karaciğer CA enzimi için 5 farklı SeO ₂ ,konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği.....	59
Şekil 4.11. <i>C. umbra</i> karaciğer CA enzimi için 5 farklı BaCl ₂ konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği.....	60
Şekil 4.12. <i>C. umbra</i> karaciğer CA enzimi için 5 farklı MnCl ₂ konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği.....	61
Şekil 4.13. <i>C. umbra</i> karaciğer CA enzimi için 5 farklı CuSO ₄ konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği.....	62
Şekil 4.14. CA enzimi aktivitesi üzerine aldrin pestisitinin inhibisyon etkisini gösteren IC ₅₀ grafiği.....	64
Şekil 4.15. CA enzimi aktivitesi üzerine dieldrin pestisitinin inhibisyon etkisini gösteren IC ₅₀ grafiği.....	65
Şekil 4.16. CA enzimi aktivitesi üzerine endosülfan pestisitinin inhibisyon etkisini gösteren IC ₅₀ grafiği.....	66
Şekil 4.17. CA enzimi aktivitesi üzerine hexachlor pestisitinin inhibisyon etkisini gösteren IC ₅₀ grafiği.....	67
Şekil 4.18. CA enzimi aktivitesi üzerine α-HCH pestisitinin inhibisyon etkisini gösteren IC ₅₀ grafiği.....	68

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Enzimlerin sistematik isimlendirilmesi.....	3
Çizelge 1.2. CA enzim yapısında Zn^{+2} iyonizasyonu.....	5
Çizelge 1.3. Karbonik anhidraz enziminin CO_2 -hidratasyon reaksiyonunu kataliz mekanizmasının şematik olarak gösterilişi.....	8
Çizelge 1.4. Jakob Steward çevrimi.....	14
Çizelge 1.5. <i>Capoeta umbla</i> balığının sistematik yeri.....	17
Çizelge 3.1. CA enzimini aktivite ölçümünde kullanılan prosedür.....	40
Çizelge 3.2. Karbonik anhidraz enziminin hidrataz aktivitesi ölçümü için kullanılan çözeltiler ve miktarları.....	43
Çizelge 4.1. CA enziminin saflaştırma basamakları.....	49
Çizelge 4.2 Siraz (<i>C.umbla</i>) karaciğer CA enziminin optimum pH'sını belirlemek için fosfat tamponu kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	53
Çizelge 4.3. Siraz (<i>C.umbla</i>) karaciğer CA enziminin optimum pH'sını belirlemek için Tris SO_4 tamponu kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	54
Çizelge 4.4. Siraz (<i>C.umbla</i>) karaciğer CA enziminin optimum iyonik şiddeti belirlemek için Tris SO_4 tamponu kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları....	55
Çizelge 4.5. Siraz (<i>C.umbla</i>) karaciğer CA enziminin optimum sıcaklığı için aktivite ölçüm sonuçları.....	56
Çizelge 4.6. Siraz (<i>C. umbla</i>) karaciğer CA enzimi için yapılan stabil pH çalışmasının sonuçları.....	57
Çizelge 4.7. Siraz (<i>Capoeta umbla</i>) karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine metal iyonları ile yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen IC_{50} ve K_i değerleri.....	58
Çizelge 4.8. Se^{-2} iyonunun Siraz (<i>Capoeta umbla</i>) Karaciğer Dokusu CA enzimi üzerine etkisi.....	59

Çizelge 4.9. Ba ⁺² iyonunun Siraz (<i>Capoeta umbla</i>) Karaciğer Dokusu CA enzimi üzerine etkisi.....	60
Çizelge 4.10. Mn ⁺³ iyonunun Siraz (<i>Capoeta umbla</i>) Karaciğer Dokusu CA enzimi üzerine etkisi.....	61
Çizelge 4.11. Cu ⁺² iyonunun Siraz (<i>Capoeta umbla</i>) Karaciğer Dokusu CA enzimi üzerine etkisi.....	62
Çizelge 4.12. Siraz (<i>Capoeta umbla</i>) karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin estera z aktivitesi üzerine pestisitler ile yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen IC ₅₀ ve K _i değerleri.....	63
Çizelge 4.13. Aldrin pestisitinin Siraz (<i>Capoeta umbla</i>) Karaciğer Dokusu CA enzimi üzerine etkisi.....	63
Çizelge 4.14. Dieldrin pestisitinin Siraz (<i>Capoeta umbla</i>) Karaciğer Dokusu CA enzimi üzerine etkisi.....	64
Çizelge 4.15. Endosülfan pestisitinin Siraz (<i>Capoeta umbla</i>) Karaciğer Dokusu CA enzimi üzerine etkisi.....	65
Çizelge 4.16. Hexachlorbenzen pestisitinin Siraz (<i>Capoeta umbla</i>) Karaciğer Dokusu CA enzimi üzerine etkisi.....	66
Çizelge 4.17. α-HCH pestisitinin Siraz (<i>Capoeta umbla</i>) Karaciğer Dokusu CA enzimi üzerine etkisi.....	67
Çizelge 5.1. Siraz (<i>Capoeta umbla</i>) Balığı karaciğer CA enzimi için karakterizasyon sonuçları.....	84
Çizelge 5.2. Siraz (<i>Capoeta umbla</i>) Balığı karaciğer CA enziminin üzerine inhibisyon etkisi gösteren metal iyonları için IC ₅₀ ve K _i değerleri sonuçları.....	84
Çizelge 5.3. Siraz (<i>Capoeta umbla</i>) Balığı karaciğer CA enziminin üzerine inhibisyon etkisi gösteren pestisitler için IC ₅₀ ve K _i değerleri sonuçları.....	84

1.GİRİŞ

1.1. Enzimler

Enzimler, canlı organizmalardaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran biyolojik katalizörlerdir. Enzimler tarafından katalizlenen tepkimelerde yan ürün meydana gelmez ve tepkime verimi %100'dür (Keha ve Küfrevioğlu 2015).

Enzimle katalize edilen reaksiyonlar enzimle katalize edilmeyen reaksiyonlara göre çok daha hızlı gerçekleşir. Enzimler bu reaksiyonlar esnasında fiziksel değişikliğe uğramış olsalar bile orjinal haline dönebilirler. Bazı katalitik RNA moleküllerinin ufak bir kısmı dışında tüm enzimler protein yapısındadır (Kalaycıoğlu vd 2010; Keha ve Küfrevioğlu 2012; Adam ve Yiğitoğlu 2012).

Biyolojik sistemlerde tepkimeleri katalizleyen enzimler oldukça özelleşmiş proteinlerdir. Enzimler genellikle organik olmayan ve bireşimli (yapay) katalizörlerden çok daha fazla olağanüstü bir kataliz yeteneğine sahiptir. Enzimler substratlarına karşı son derece özgüdürler ve kimyasal tepkimeleri olağanüstü derecede hızlandırırlar (Lehninger 2013).

Metabolik reaksiyonların sonucunda canlılığın devamlılığı, hücrelerde organik maddelerin sentezi ve yıkılması, hücre solunumu ve kas kasılması gibi önemli faaliyetlerin gerçekleşmesi enzimlerin katalitik etkisiyle sürdürülmektedir. “Hayat katalizdir” ilkesine bağlı olarak üzerinde en çok çalışma yapılan biyomoleküller enzimlerdir (Karahalil 2009).

1.1. a Enzimlerin adlandırılması

Enzimler genellikle rol aldıkları kimyasal grup veya substratının sonuna – az eki getirilerek isimlendirilir. Enzimler katalizledikleri tepkimenin türüne göre sınıflandırılırlar. Enzimlerin adlandırılması için Uluslararası Biyokimya Birliğinin (IUB) Enzim Komisyonu tarafından Sistematik isimlendirme önerilmiş ve kabul görmüştür. Enzim türünün resmi E.C. numaraları ve isimleri vardır. Ayrıca çoğu enzimin sıradan isimleri de bulunmaktadır (Lehninger 2013).

Her enzim bir sistematik kod numarası ile numaralandırılmıştır. Kodlar öncelikle E.C. harfleri, bu harflerden sonra da verilen dört rakamı kapsar. İlk basamak enzimin 6 temel

sınıftan hangisine bağlı olduğunu gösterir. İkinci basamak alt sınıfları, üçüncü basamak ise alt-alt sınıfları belirtir. Son basamak ise ilk üç numaraya sahip enzimler arasındaki sırayı ifade eder. Altı temel sınıfın her biri, aynı reaksiyon spesifikliğine sahip enzimleri içerir (Keha ve Küfrevioğlu 2014).

a. Oksidoredüktazlar: İki substarat arası redoks reaksiyonlarını yani yükseltgenme-indirgenme katalizleyen enzimlerdir. Dehidrogenezlar, oksidazlar, katalaz ve peroksidazlar vb.

b. Transferazlar: İki substrat arasında hidrojen dışındaki grupların (C-, N- ve P-) transferini katalize eden enzimlerdir. Kinazlar, transketolazlar, transaldolazlar, alanin transferaz, heksokinaz ve glukokinaz bu gruptandır.

c. Hidrolazlar: Ester, peptit, C-halojenür veya P-N gibi kimyasal bağların, bir su molekülü eklenerek, hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Proteolitik enzimler, lipazlar, esteraz, fosfataz ve nükleazlar bu grubun üyeleridir.

d. Liyazlar: Hidrolizden farklı bir yol ile substrattan grupların uzaklaştırılıp çift bağların oluşmasını sağlayan reaksiyonları katalize eden enzimlerdir. ATP kullanılmaz. Hidratasyon ve dehidratasyon reaksiyonlarını katalize eden enzimler bu grubun üyeleridir. Tez kapsamında çalıştığım karbonik anhidraz enzim ailesi bu 4 grubun üyelerindendir. Bu durum CA'nın karbonat hidroliyz adından da anlaşılmaktadır.

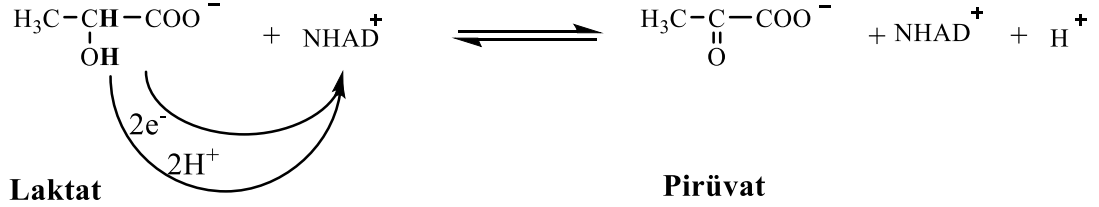
e. İzomerazlar: Molekül içindeki optik, geometrik ve yapısal izomerlerin birbirine dönüşümünü katalizleyen enzimlerdir. Mutazlar, rasemazlar, epimerazlar bu sınıfta yer almaktadır.

f. Ligazlar: ATP ve GTP gibi yüksek enerji içeren bir bağın kopması sonucu açığa çıkan enerjiyi kullanarak iki molekülü birbirine bağlayan reaksiyonlarını katalize eden enzimlerdir. Sentetazlar, karboksilazlar ve piruvat karboksilaz bu gruptandır (Keha ve Küfrevioğlu 2014).

Çizelge 1.1 Enzimlerin sistematik isimlendirilmesi

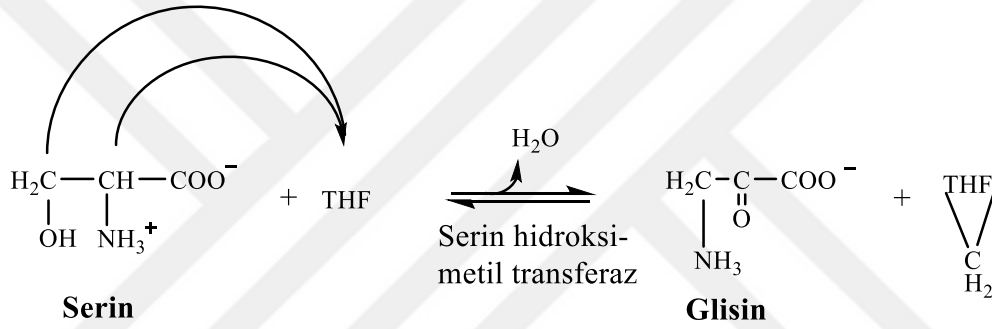
1. Oksido-redüktaz

Oksidasyon-redüksiyon, reaksiyonlarını katalizler:



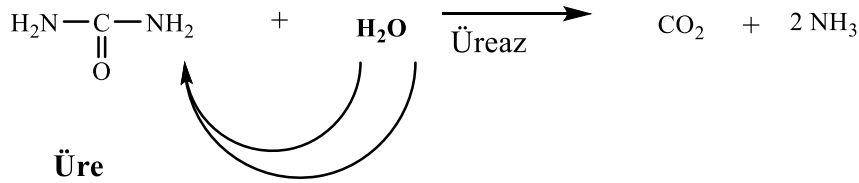
2. Transferaz

C-, N-, ve P- taşıyan grupların transferini katalizler:



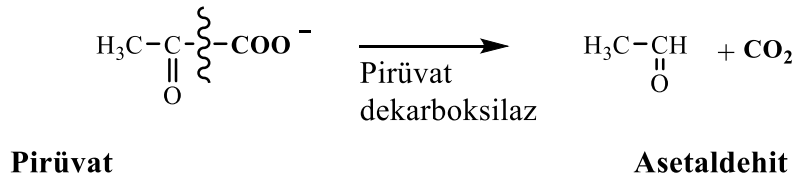
3. Hidrolaz

Bağlara su katarak yıkmayı katalizler:



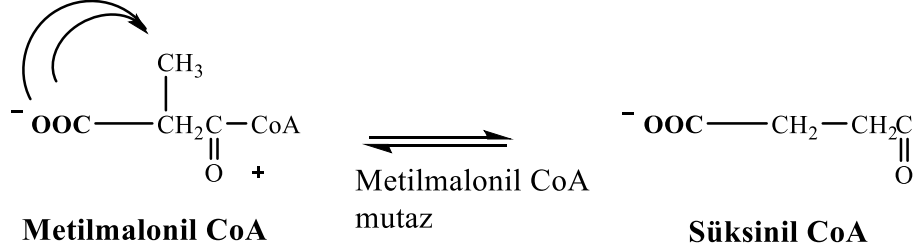
4. Liyaz

C-C, C-S ve belli C-N bağlarının yıkımını katalizler



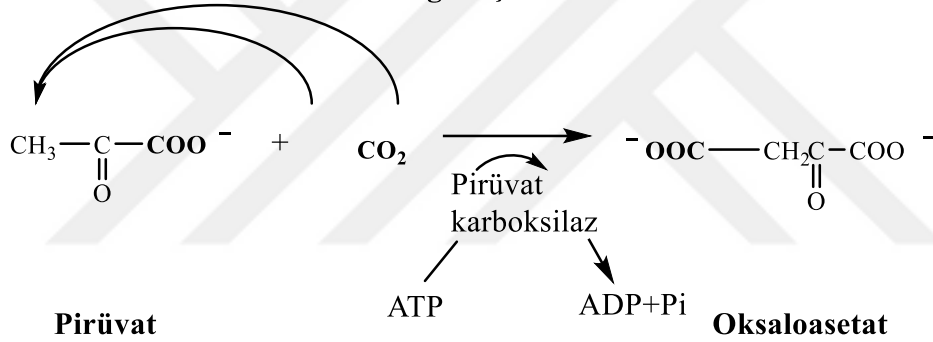
5. İzomeraz

Optik veya geometrik izomerlerin rasemizasyonunu katalizler:



6. Ligaz

Yüksek enerjili fosfatların hidroliziyle birlikte yürüyen karbon ve O, S, N arasında bağ oluşumunu katalizler:



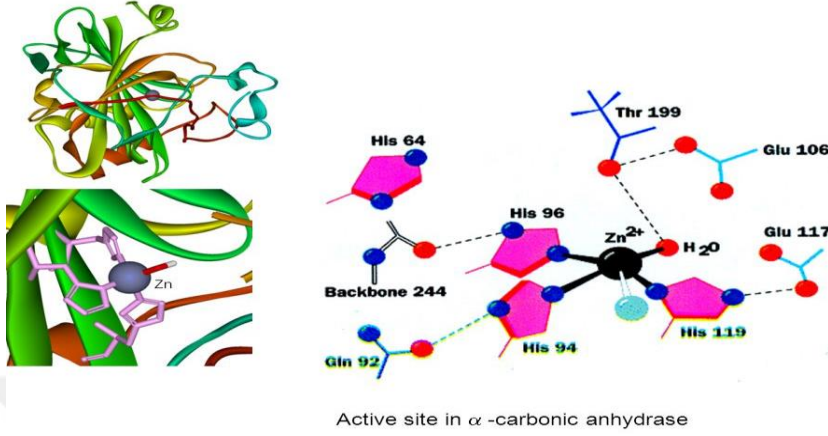
1.2. Karbonik Anhidraz Enzimi

1.2.1. Karbonik anhidraz enziminin kısa tarihçesi

Karbonik anhidraz (CA, karbonat hidrolizaz, E.C. 4.2.1.1) enzimini ilk kez 1933 senesinde Muldrum and Roughton keşfetmişlerdir (Kim *et al.* 2013). Muldrum and Roughton keşfettikleri bu enzimi, CO₂ ile su arasındaki katalizlediği reaksiyona bakarak, karbonik anhidraz olarak isimlendirmişlerdir.

Keline ve Martin (1944) de enzimin aktivitesinin Zn⁺² konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak arttığını, dolayısıyla çinkonun katalizleme reaksiyonunda özel bir rol üstlendiğini bulmuşlardır. Bu doğrultuda CA tanımlanan ilk metaloenzim olarak bilinmektedir (Karahalil 2009). Karbonik anhidrazın aktif bölgesi bir Zn (II) metal

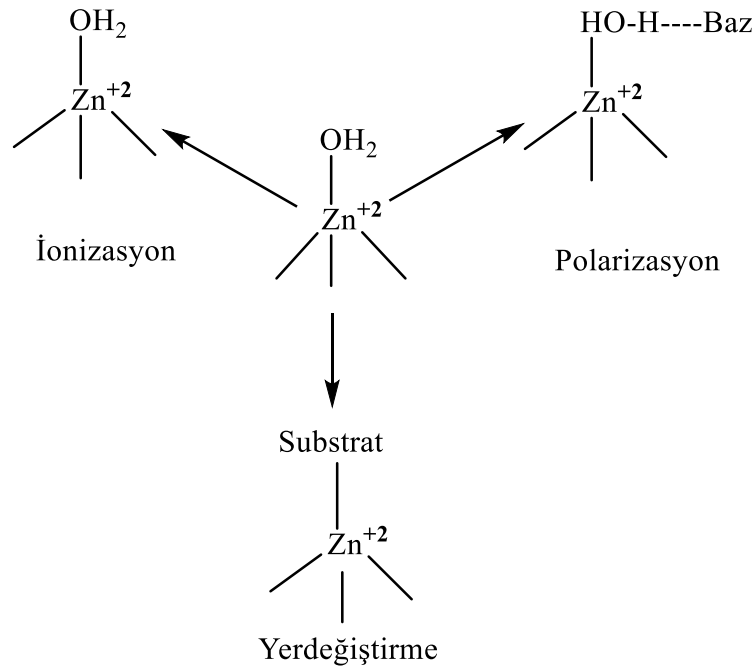
iyonundan oluşur, histidin kalıntılarının imidazol nitrojenlerine ve bir su molekülüne çarpık bir tetrahedral düzenlemede koordine olmuştur (Saha and Bandyopadhyay, 2019).



Şekil 1.1. Karbonik anhidraz enziminin aktif bölgesi
(<http://www.chemtube3d.com/solidstate/BC-26-29.htm>)

Zn^{+2} doğada enzim kofaktörü olarak bilinen en yaygın elementlerden biridir ve tüm CA ailelerinde varlığı doğrulanmıştır (Supuran 2018).

Çizelge 1.2. CA enzim yapısında Zn^{+2} iyonizasyonu



1952'de Janowit tarafından, CA'nın işlevi ilk olarak memelilerde mide suyunda HCl atılımı ile ilişkili olduğunu ortaya atılmıştır (Kim *et al.* 2013).

1960'lı yıllarda CA enziminin, karbondioksitin geri dönüşümlü hidrasyonu reaksiyonuna özgül olma durumunu en değerli özelliği olduğu düşünülüyordu; fakat Pocker ve Meany bunun yanında CA'nın asetaldehitin hidrasyonunu katalize ettiğini keşfetmişlerdir. Bu sonuca ek olarak enzimin katalitik çeşitliliğin araştırılması için yol açılmış, çok sayıda girişimin yapılması sağlanmıştır. Enzimin 2,2-dihidroksipropiyonatın piruvata dehidrasyonu, bazı aldehitlerin geri dönüşümlü hidrasyonu ve çeşitli aktifleşmiş esterlerin geri dönüşümsüz hidrolizini katalizlediği bulunmuştur. Bunun dışında yapılan araştırmalar ise CA'nın kinetik analizinde esteraz aktivitesinin son derece kullanışlı olduğunu ortaya çıkarmıştır (Pocker and Beug, 1972).

85 yıl önce keşfedilmesine rağmen, hala bu enzimler inhibitörlerinin ve aktivatörlerinin biyomedikal uygulamaları sebebiyle hala geniş ölçüde araştırılmaktadır (Supuran 2018).

Katalize edilmemiş CO₂ hidrasyonunun nötr pH'ta çok yavaş bir işlem olması ve iyonik, çözünür türlere (yani bikarbonat ve protonlara) dönüşümüne talebin yüksek olması nedeniyle CA'lar doğada bilinen en verimli enzimler arasındadır. Nitekim çoğu metabolik oksidatif süreçte CO₂ üretilir ve bir gaz olarak hızlı ve verimli bir şekilde çözünür ürünlere dönüştürülmesi gerekir (Supuran 2018).

1.2.2.Karbonik anhidraz enzimi sınıflandırılması, dağılımı ve fizyolojik önemi

Karbondioksit (CO₂) oksijenli solunum ile vücudun oksijen kullanarak enerji ürettikten sonra oluşan son ürünüdür. Memelilerde CO₂ kan ile akciğerlere ulaşır ve solunum sistemiyle organizmadan atılır. Alyuvarlar hücreleri içerisinde su ile reaksiyona girer. Bu reaksiyonun ürünü olan karbonik asit, proton kaybederek bikarbonat iyonuna (HCO₃⁻) çevrilir. Karbonik anhidrazlar tüm bu reaksiyonu hız katan enzimlerdir (Göçer 2014).

Karbonik anhidrazlar (CA), karbondioksit ve suyun bikarbonat ve H⁺ iyonlarına dönüşümünü katalize eden esansiyel enzimlerdir. Omurgalı genomları genellikle 15-21 farklı CA izoformu için gen lokusları içerir, bunların üçü enzimatik olarak aktif değildir. Sadece CA VI enzimatik olarak aktif izoformlar salgılayan proteindir (Supuran et al. 2017).

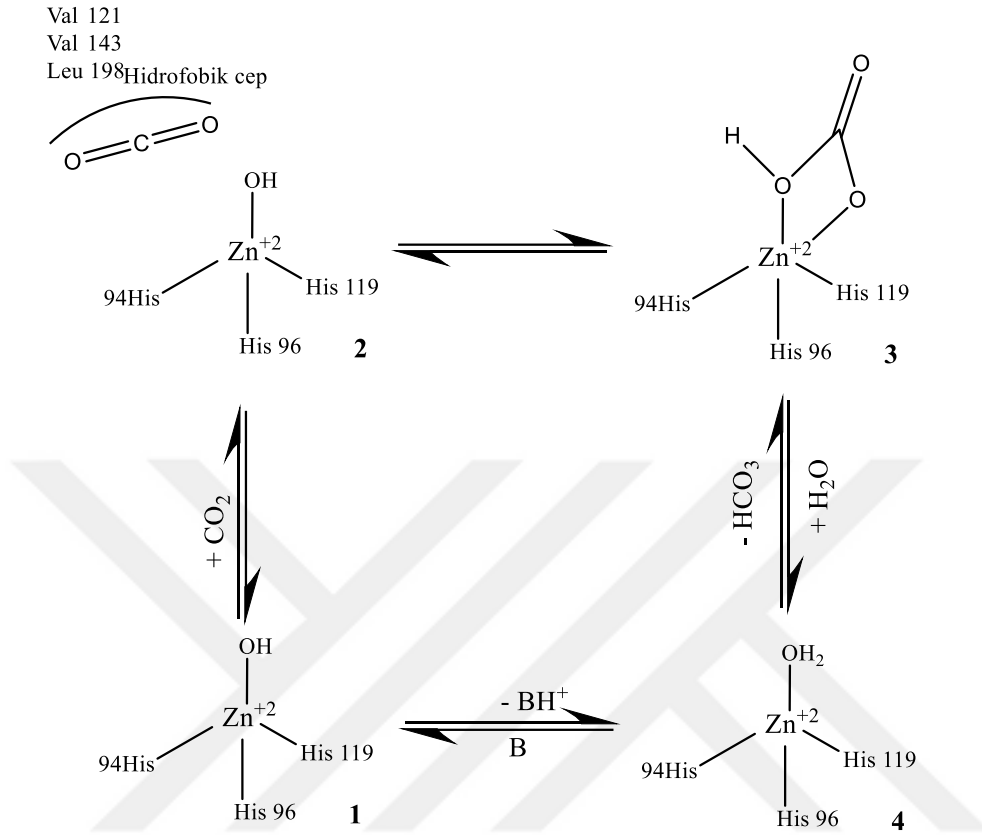


Enzimlerin aktif bölgesi, substratları (varsa kofaktörleri) bağlayan bağ yapım ile yıkımında görevli rezidüleri kapsar. Bunlara katalitik grup adı verilir. Aktif bölge enzimin toplam hacmine oranla küçük bir kısmı oluşturur (Keha ve Küfrevioğlu 2015).

CA'ların aktif bölgesinde iki değerli metal iyonu normal olarak bir tetrahedral geometriye sahiptir, çünkü üç amino asit grubu ile etkileşime girer ve su molekülünü / hidroksit iyonunu koordine eder.

Zn⁺² iyonuna, hidroksil grubun bağlanması sonucu enzimin aktif bir formu oluşur. Enzimin bu güçlü nükleofilik formu, CO₂ molekülüne hücum eder. Bu saldırı sonucunda Zn⁺² iyonuna bağlanmış bikarbonat iyonunun oluşumu gerçekleşir. Ardından HCO₃⁻ iyonu bir su molekülü ile yer değiştirir ve böylece çözeltiye geçer. Bu yer değiştirme sonrasında su molekülü çinko iyonuna bağlanır ve böylece enzim asit formuna dönüşmüş olacaktır. Enzimin yeniden katalitik olarak aktif (bazık) formuna dönüşmesi amacıyla, aktif bölgeden çevresine bir proton transferi gerçekleşir (Hisar vd. 2003). Bu reaksiyonlar şematik olarak gösterilmek istenirse;

Çizelge 1.3. Karbonik anhidraz enziminin CO₂-hidratasyon reaksiyonunu kataliz mekanizmasının şematik olarak gösterilişi (Göçer 2014).



Karbonik anhidraz çok sayıda dokuda H⁺ ve HCO₃⁻ iyonlarının birikmesinde de mühim bir görev üstlenmektedir. Bu dokulara örnek olarak göz lensi, gastrik mukoza ve böbrek dokusu verilebilir. Bu dokulardan farklı olarak histokimyasal yöntemlerle kaslarda, tükrük bezlerinde, beyinde, sinir miyelin kılıfında, pankreas, prostat ve endometrium dokularda da CA enzimi tespit edilmiş ve bunların bazıları saflaştırılmış, karakteristik ve biyokimyasal özellikleri incelenmiştir. Bazı bakterilerde, böceklerde, kabuklu hayvanların kabuk yapımında, alglerde ve balıkların solungaç ve salgı organlarında da enzimin değişik rolleri olduğu ayrıca ispatlanmıştır (Şahin 2008).

Bir canlı türünde aynı reaksiyonu katalizledikleri halde farklı kimyasal yapıya sahip enzimlere izoenzimler denilir. İzoenzimlerin aktiviteleri farklı; substrat, kofaktör ve inhibitörlere karşı özel ilgileri değişik olabilir (Keha ve Küfrevioğlu 2015).

İzoenzimlerin başlıca özellikleri arasında; her bir izoenzimin farklı bir gen tarafından ifade edilmesi, aminoasit sayısının ve aminoasit diziliminin farklı olması, izoelektrik noktalarının aynı olmaması, elektroforetik hareketliliklerinin farklı olması olarak gösterilebilir. İzoenzimler bir hücrenin farklı subsellüler fraksiyonlarına yerleşebildikleri gibi, farklı dokularda lokalize olabilirler (Devlin 2002, Koçyiğit 2014) . CA ailesindeki bazı izoenzimler çeşitli hayvan türlerinde izole edilmiş ve karakterize edilmiştir. Memeli hayvanlar için; eritrositlerde CA I ve CAII, iskelet kasında CAIII, insan böbreğinde CA IV, bazı dokuların mitokondrilerinde CAV, tükürük bezinde CA VI, sitozolde CA VII belirlenmiştir (Keha ve Küfrevioğlu 2015).

CA ailesinin evrensel olarak altı farklı sınıf içerdiği (α -, β -, γ -CA, δ , ζ ve η -CA'lar) hayvanlarda, bitkilerde, alglerde ve bakterilerde tanımlanmıştır. Hepsi aynı CO₂ hidrasyon reaksiyonunu katalize eder: ancak her aile birincil amino asit dizisinde uygun spesifik özellikleri ve 3D üçüncül yapı gösterir. (Supuran 2010, Supuran *et al.* 2014)

- α -karbonik anhidrazlar monomerik veya dimeriktir. Hayvanlarda, bazı mantarlarda, bakteri, yosun ve yeşil bitkilerde bulunur
- β -karbonik anhidrazlar, dimerler, tetramerler veya oktamerlerdir ve esas olarak monokotiledon ve dikotiledonların mantarları, bakterileri, archaea, algleri ve kloroplastları ve bazı prokaryotlarda bulunur.
- γ -anhidraz sınıfı, bakteri, Archaea ve bitkilerde tarif edilen bir homotrimerdir. Aynı zamanda, çeşitli türlerde bulunan, katalitik olarak aktif olmayan birkaç homolog içerir.
- δ - ve ζ -CA'lar deniz fitoplanktonlarının çeşitli sınıflarında bulunurlar.
- η -CA yakın zamanda Plasmodium cinsinin bir çok türünde bulundu (Lionetto *et al.* 2016).

Memelilerde farklı doku dağılımları gösteren α -CA gen ailesine bağlı 16 farklı CA izoenzimi ve CA bağlantılı protein (CARP) tanımlanmıştır. CA izoenzimlerinin hücre içindeki yerleşimleri de oldukça farklıdır, CA I-III, CA VII sitozolik, CA IV, CA IX, CA XII ve CA XIV membrana bağlı, CAVA - CAVB mitokondride, CA VI tükürük ve süt salgılarında bulunur. Karbonik anhidraz izoenzimleri kinetik özellikleri ve inhibisyon profilleri açısından farklılık göstermektedirler (Supuran 2008).

Karbonik anhidraz izoenzimleri, diabete, yağ ve üre oluşumuna tümöre yol açan etkenlerle çeşitli patojenlerin gelişmesini içine alan fizyolojik ve patolojik süreçlerde rol alan geniş bir enzim grubudur. Diüretikler ve antiglokoma ilaçlarının yanında CA inhibitörlerinin, yeni anti-obezite, anti-kanser ve antienfeksiyon ilaçları olarak kullanımı son senelerde yaygın bir biçimde vurgulanmaktadır. Ayrıca yeni çalışmalar CA aktivasyonunun Alzheimer hastalığı için yeni bir tedavi yöntemi sunacağını ileri sürülmektedir (Supuran 2008).

İnsanlarda CA I eritrositlere spesifiktir; ancak CA II çoğu hücrede bulunur. CA II'nin genetik olarak eksikliği, canlıda kemiklerde kalsiyum emiliminde yetersizlik ve diğer dokulardaki kireçleme sonucu ortaya çıkan osteopetroz (Albert-Schonberg hastalığı) ile bağlantılıdır. İzoenzim III ve VII daha özelleşmiş bir dağılıma sahiptir. CA III, bikarbonatı yağ asidi sentezinde kullanan adipositlerde daha yüksek oranda bulunmaktadır. İzoenzim V ise mitokondriyal matrikste ve karaciğerde bol bulunmaktadır. İzoenzim VI tükürükte salgılanırken izoenzim IV membrana bağlı olarak daha büyük bir formda bulunur (Meltzer 2003).

CA I, II ve IV. izoenzimleri solunum ve asit-baz dengesini düzenlenmesinde görevlidir. Bu akıştaki reaksiyonlar, $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ 'ün metabolize olduğu dokular ile boşaltım organları arasında yani akciğerden böbrekle taşınmasını kapsar. Kılcal damarlar ve pulmoner mikrovaskülerde CO_2 eliminasyonunun kolaylaştırılmasında, bikarbonatın böbreklerden geri emiliminin sağlanmasında ve H^+ iyonlarının renal tübüllerde ve damarlarda eliminasyonunda rol oynarlar (Supuran *et al.* 2004).

CA enzimleri, tükürük, gastrik asit, safra, pankreas özsuyu üretiminde ve bağırsakta iyon taşınmasında görevlidir. Doku ve organlarda elektrolit salgılanmasında, tat ve koku almada görev alırlar (Işık 2008). Gastrointestinal bölgeyi pH düzeylerinin aşırı değişiminden korurlar. Seminal sıvıdaki pH ve bikarbonat konsantrasyonunu, kas fonksiyonlarını düzenlerler ve hücrel strese adaptasyonu sağlarlar (Supuran 2003; Parkkila 2000). CA V gibi bazı izoenzimler moleküler sinyal iletiminde görev alır (pankreasın β hücrelerinden insülin salgılanması) (Parkkila 2000; Işık 2008). İzoenzim II ve V glukoneogeneze bikarbonat sağlamak, yağ asidi biyosentezi ve pirimidin sentezi gibi önemli metabolik süreçlerde yer alır (Chegwidden and Carter 2000). CA

IX, XII, CARP VIII gibi bazı izoenzimlerin onkogenez ve tümör gelişiminde rol aldığı bildirilmiştir (Supuran and Scozzafava 2004).

1.2.3 CA inhibitörleri (CAIs)

Hem *in vivo* hem *in vitro* şartlarda bazı bileşiklerin, enzim aktivitelerini düşürmesi ve hatta aktivitenin yok olması olayına inhibisyon; inhibisyona neden olan bileşiklere inhibitör denir. İnhibitörler genelde küçük molekül ağırlığına sahip iyon veya bileşiklerdir. Enzimatik aktivitenin inhibisyonu organizmalarda önemli bir kontrol mekanizmasıdır. Birçok zehirli bileşik ve ilacın etkisi inhibisyon ile ortaya çıkar (Keha ve Küfrevioğlu 2015).

Etki mekanizmasına bağlı olarak, beş farklı CAI sınıfı bilinmektedir.

a- Çinko bağlayıcılar, yani aktif bölgenin iki değerli metal iyonunu şelatlayan bileşikler. Bu etkileşim Zn^{2+} atomu ile su molekülü / hidroksit iyonu arasındaki koordinasyonu keser ve sonuç olarak enzimatik aktiviteyi bloke eder. Sülfonamidlere ve bunların izosterlerine ait önemli inhibitör sınıfıdır.(sülfamatlar veya sülfamidler), ditiyokarbamatlar, hidroksamat, vb. Sülfonamidler yıllardır klinik kullanımda en az 20 bileşik ile çalışılan CAI'lerin en yaygın olanıdır.

b- Fenoller gibi çinkoyla koordine edilmiş su molekülüne / hidroksit iyonuna tutturulan bileşikler ve poliaminler

c- Aktif alanın girişini oluşturan bileşikler (kumarinler ve izoserleri)

d- 2- (benzilsülfonil) benzoik asit gibi aktif bölgeye bağlanan bileşikler

e- İkincil / üçüncül sülfonamidler, imatinib gibi bilinen bir mekanizma olmadan hareket eden CAI'ler (Chiaramonte *et al* 2018).

Yüksek göz içi basıncı (IOP) ile ortaya çıkan glokom(göz tansiyonu) en ciddi göz hastalıklarından birisidir. %15-20 oranı ile körlüğe neden olmaktadır (Supuran 2008).

Göz retinasında bulunan CAII göz içi basıncı oluşumunun başlıca sorumlusudur. Glokomlu hastalarda IOP'yu düşürmek için en etkili çözüm CAII aktivitesini inhibe etmektir (Supuran 2004).

Asetazolamid, methazolamid ve sulfonamid türevleri gibi CA inhibitörleri glokomada (göz tansiyonu) intraselüler basıncın düşürülmesinde kullanılmaktadır. Asetazolamid,

methazolamid, diklorofenamid, dorzalamid gibi inhibitörler bikarbonat konsantrasyonunu azaltırlar, suyun ve Na^+ iyonunun posteriur kısmına akışı olur ve bu da sulu ortamın azalmasına, intraoküler basıncın azalmasına neden olur. Asetazolamid gibi inhibitörler CA' yı bloke ederek Na^+ ve H^+ değişim kapasitesini azaltırlar ve hafif diüretik etki ederek göz tansiyonunun azalmasına yardımcı olurlar. Asetazolamid ayrıca epilepsi hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır (Kaur *et al.* 2002).

Epilepsi (sara) hastalığı dünya üzerinde milyonlarca insanın yakalandığı, tekrarlayan nöbetlerle karakterize edilen kronik nörolojik bir hastalıktır. (Yeni 2008). Yaşam kalitesi üzerine etkisi büyük olan, tedavisi uzun süreli takip gerektiren ve kontrolü zor olan epilepsiyi yönetmekte ana hedef nöbetsizliği sağlamak ve ilaç yan etkilerini önlemektir.(Baker 1997). Birkaç yeni antiepileptik ilaçtan birisi olan Topiramatin, karbonik anhidraz izoenzimleri arasından özellikle CA-II ve CA-IV'ü inhibe eder ek etkisini gösterir (Sonat 2009).

Enzimlerin Saflaştırılmasında Amaç: hücre ekstraktında çok sayıda farklı madde ile beraber bulunan ile hedef enzimin içinde bulunduğu hücre ekstraktından ayrılması; izole edilmesi hedeflenen enzimin tam verimle elde edilmesini sağlamaktır. Bunun yanında saflaştırılan enzim maksimum saflığa sahip olmalı ve mümkün olan maksimum katalitik aktiviteyi göstermelidir. Saflaştırıldıktan sonra elde edilen enzim numunesi tıpta veya endüstri alanında kullanılabilir (Aktaş 2004).

CA enziminin, hidrataz aktivitesi ile son derece önemli bir fizyolojik fonksiyonu gerçekleştirdiği anlaşılmıştır. Ayrıca bazı ester bağlarını parçalaması ve aldehitlerin hidrasyonunu da katalizlemesi, bu enzimin endüstriyel organik sentezlerde kullanımını gündeme getirmiştir. Bu nedenle, CA enziminin saflaştırılmasında daha etkili ve ekonomik yöntemlerin geliştirilmesi için çok yoğun çalışmalar yapılmaktadır (Özensoy 2002).

Karbonik anhidraz enzimi üzerinde yapılan inhibisyon çalışmalarıyla enzimin çalışma sisteminin anlaşılması sonucu, bu enzimin canlı organizmalarda bulunduğu dokular ve dokulardaki yaşamsal fonksiyonları üzerine dikkat çekilmesiyle CA enziminin inhibitörleri ve aktivatörlerinin sentezlenmesi arttırılmıştır. Birçok CA enzimi inhibitörü sentezlenmiştir ve CA'ların inhibisyonu, diüretikler gibi birçok alanda farmakolojik uygulamalara sahiptir. Bu inhibitörler başta glokom tedavisinde, epilepsi

ilaçları, ağrı kesiciler, antiülser, antikonvülsan, antiobesite ve antikanser ajanlar / tanısal araçlar, fakat aynı zamanda antifungal, antibakteriyel ve yeni bir etki mekanizması olan antiprotozoan ajanlar olarak kullanılmaktadır. Manyetik rezonans belirlenmesinde, kliniklerde emisyon tomografisi ve diagnostikte his materyali gelişmesinde antibiyotik şeklinde kliniklerde yol gösterici olarak kullanımı önem arz eder (Supuran and Scozzafava 2001; Supuran 2018).

1.3. Balıklarda Karbonik Anhidraz Enzimi

Balıklarda solunum organları olarak özel şekilde gelişmiş bulunan solungaçları vardır; solungaçlar ile sudaki çözünmüş oksijeni alıp vererek solunum gerçekleştirirler. Bunlar kemikli balıklarda her bir taraftaki 4 solungaç yayı üzerinde gelişmiştir. Bir solungaç yayının konkav tarafında solungaç dikenleri (branchiospiri) , diğer tarafında ise kılcıl damarlarla kaplı solungaç lamelleri bulunmaktadır.

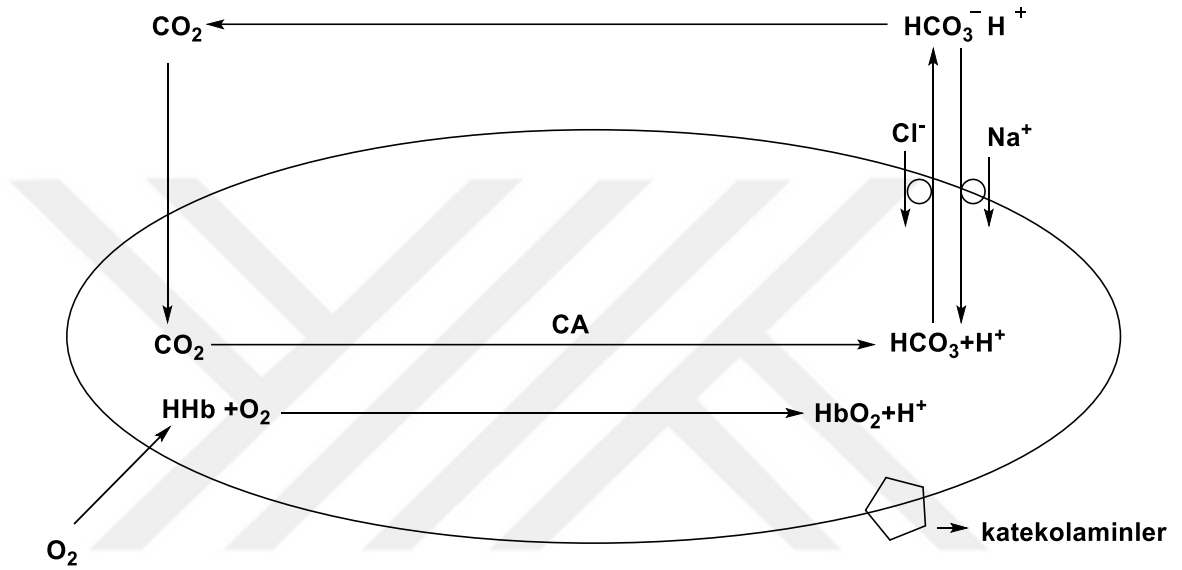
Solunum yapıldığı sırada ağızlar açılır ve solungaç kapakları kapatılarak içeri su pompalanır. İçerisinde çözünmüş oksijen barındıran su , “solungaç yaprakları arasından geçer. Tam bu sırada sudaki çözünmüş oksijen solungaç yapraklarındaki epitel hücrelere geçmiş olur. Daha sonra kılcıl damarlar yolu ile kana karışır. Aynı şekilde kandaki karbondioksit de solungaç yaprağındaki epitel hücrelere oradan da suya geçer” (Anonim, 2019). Bu esnada operkulumlar açılarak O₂ si alınmış olan su dışarıya atılmış olur (Pelgrom *et al.* 1995; Küçük 2015).

Balıklarda bulunan karaciğer hemen hemen hepsinde büyük bir yer kaplar. Genellikle midenin üst kısmındadır ve kısmen mideyi sarar. A ve D vitaminleri karaciğerde depolanır. Ayrıca bu organ azotlu boşaltım maddeleri ve üre oluşumunda metabolik bir rol üstlenmektedir. Karaciğer, ağır metallerin taşınımını ve detoksifikasyonu sağlayan metallothionein ve bunun gibi proteinlerin başlıca sentez yeri olduğundan işlevi oldukça fazladır (Kayhan 2006; Küçük 2015).

Karbonik anhidraz enzimi memelilerdekine göre balıklarda bazı farklılıklar göstermektedir. Memelilerdeki mekanizmanın tersine kemikli balıkların kan plazmasında ve solungaç epitelinin iç yüzeyinde karbonik anhidraz aktivitesi görülmez. Dolayısıyla, balık eritrositlerinde asitin plazmadan eritrositlere transferi

yavaş yavaş gerçekleşir. Böylece Na^+ / H^+ pompaları protonları eritrositlerden çıkartırken bu protonlar tekrar hücre içine **JacobSteward döngüsü (Şekil 1.4.)** ile girerler. Bahsedilen döngüde, plazmadaki $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ hidrasyon veya dehidratasyon reaksiyonları katalizlenmeden gerçekleşir (Hisar *et al.* 2003).

Çizelge 1.4. Jakob Steward çevrimi



Balıklarda CA enzimi pH kontrolü ve gaz dengesinde, asit-baz dengesinin korunması, osmoregülasyon, kalsifikasyon, iyon düzenlemesi ve azot metabolizmasındaki atık ürünlerin temizlenmesi gibi bir dizi temel fizyolojik süreçte rol oynar (Lionetto *et al.* 2000; Kim *et al.* 2013).

Balık plazmasında bulunan inhibitörlerinin seçimi, eritrositlerin intraselüler pH'larının korunması ve solunumun kontrolü gibi bir dizi fizyolojik etkilerin sonucunda gerçekleşir (Henry *et al.* 1997).

Tatlı su balıklarının solungaç epitelinin apikal bölgesinde CA proton ATPaz ile beraber bulunur. CA ATPaz' a proton temin etmektedir. CA solungaçların bazal bölgesinde bulunmadığından plazma solungaçlar içinden geçerken $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ reaksiyonları CA yokluğundan dolayı katalizlenemez. Bu reaksiyon kanın

solungaçlardan geçtiği esnada eritrositlerde katalizlenmektedir (Randall and Bruauner, 1998).

Kıkırdaklı balıklarda ise, CA enzimi solungaç damar sistemleri içindeki bazal membrana bağlı bulunmaktadır. Solungaç membranına bağlı CA enziminin, CO₂ atılımının devam ettirilmesinden ziyade pH veya solunum sistemindeki CO₂ duyarlılığı ile alakalı olduğu öne sürülmüştür (Henry *et al.* 1997).

Kıkırdaklı balıkların eritrositlerinde yavaş tip CA izoenzimi (CA I) bulunduğu bilinmektedir; buna karşın kemikli balıkların eritrosit hücrelerinde hızlı tip CA izoenzimi (CA II) mevcuttur.

CA enziminin kemikli balıkların solungaç epitel hücrelerinin bazal bölgesinde aktivitesi görülmez. Eğer sözü geçen bazal bölgelerde aktivite gösterseydi; plazmada reaksiyonlar sonucu oluşan pH değişimleri solungaç epitelini de etkilerdi. Bu olay sonucunda solungaç epitelinde bulunan ve pH değişimlerinden ziyadesiyle etkilenen proton pompaları plazma pH'sına bağımlı olarak çalışacaktı (Randall and Brauner, 1998).

Balıklarda hem bazı dokuların, solungaçların hem de eritrositlerin karbonik anhidraz (CA) izoenzimlerinin molekül ağırlıkları 30 kDa civarındadır. Balık CA izoenzimlerinin sülfanilamidlere olan yüksek ilgisinden dolayı, solungaç CA enziminin inhibisyon özellikleri de memelilerdeki hızlı CA II izoenzimine benzetilmektedir (Sender *et al.* 1999; Henry *et al.* 1997; Hisar *et al.* 2003).

1.4 Siraz (*Capoeta umbla*) (Heckel 1843)

Cyprinidae ailesine mensup Capoeta cinsi çok geniş bir coğrafyada yayılmıştır. Ortadoğu ve Anadolu'dan , Aral Gölü, Afganistan ,Türkistan, Güney Çin, Kuzey Hindistan'a kadar dağılışı göstermektedir. Capoeta cinsine ait bazı türler Fırat, Dicle, Kura ve Aras nehirlerine kadar ulaşmıştır (Geldiay ve Balık 1996).

Türkiye iç su varlığı yönünden zengin sayılabilecek kaynaklara sahiptir. Doğu Anadolu Bölgesinde bulunan türlerin yalnızca bir kaçı ekonomik açıdan alabalık, inci kefali, yayın, aynalı sazan, siraz, karabalık gibi türler avlanma kompozisyonuna girmektedir. Mevcut türlerin üretim potansiyelleri ve ekonomik değerleri yanı sıra,

ekolojik bakımdan önemi de dikkate alınmalı ve biyolojik bütünlüğü ele alınarak çalışılmalıdır (Güneş 2007).

Memleketimizin iç sularında *Capoeta antalyensis* (Battalgil, 1943), *Capoeta barroisi* (Lortet 1894), *Capoeta bergamae* (Karaman 1969), *Capoeta capoeta* (Guldenstaedt 1772), *Capoeta damascina* (Valenciennes, 1842), *Capoeta sieboldi* (Steindachne 1864), *Capoeta umbla* (Heckel 1843) *Capoeta pestai* (Pietschmann 1933), *Capoeta tinca* (Heckel 1843), *Capoeta trutta* (Heckel 1843), *Capoeta baliki* (Turan, Kottelat, Ekmekçi&İmamoğlu, 2006), *Capoeta banarescui* (Turan, Kottelat, Ekmekçi&İmamoğlu, 2006), *Capoeta ekmekciae* (Turan, Kottelat, Kırankaya, Engin, 2006), *Capoeta erhani* (Turan, Kottelat, Ekmekci, 2008), *Capoeta mauricii* (Küçük, Turan, Şahin, Güllü, 2009), *Capoeta caelestis* (Schöter, Özulug&Freyhof, 2009) yaşadığı bildirilmektedir (Özdemir 2013).

C. trutta ve *C. c. umbla*, başta Fırat ve Dicle nehir sisteminde olmak üzere Hazar gölü, Murat nehri, Karasu, Munzur suyu, Haman suyu, Batman suyu gibi Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesindeki birçok akarsu ve göllere yayılmıştır (Geldiay ve Balık 1996; Atay 1987). Bulunduğu bölgelerde beslenme kaynağı olarak görülen, tüketilen ve yöre halkınca avcılığı yapılan bu sebeple ekonomik önemi haiz *C. umbla* 'nın sistematikteki yeri Çizelge 1.5. te verilmiştir.

Capoeta umbla 'nın belirgin özellikleri şunlardır; vücudu silindirik, uzun ve yanlardan basıktır. Vücudu küçük pullarla örtülüdür, üst kısmı koyu renkli, yanları kahverengi, altı kirli beyaz rengindedir. Vücut uzunluğu (SB), maksimum vücut yüksekliğinin minimum 3,9 ve maksimum 4,7 katı kadardır. Ağız ventral konumlu olup, ağız köşesinde bir çift kısa ve ince bıyık bulunur. Başı sivri, burnu küttür. Üst dudak iyi gelişmiştir, boynuzumsu bir yapı ile kaplıdır. Dorsal yüzgecin son kemiksi ışını az gelişmiş olup posteriyor kenarında küçük dişçikler bulunmaktadır (Dağlı ve Erdemli 2009; Özdemir 2013).

Bu çalışmamızda ülkemiz içsularında yoğun şekilde bulunan, insanlar tarafından avlanıp besin olarak tüketilen ve ekonomik değeri olan *C. umbla* balığı karaciğer dokusundan karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca, saflaştırma işlemlerinin ardından doğada sıklıkla bulunan bazı metallerin ve pestisitlerin enzimler üzerine inhibisyon etkileri incelenmesi hedeflenmiştir.

Çizelge 1.5. *Capoeta umbla* balığının sistematik yeri

Şube	Chordata
Alt şube	Vertebrata
Üst sınıf	Pisces
Grup	Gnathostomata
Sınıf	Osteichthyes
Takım	Cypriniformes
Alttakım	Cyprinoidei
Familya	Cyprinidae
Cins	Capoeta
Tür	<i>C. umbla</i> (Heckel, 1843)



Şekil 1.2 Siraz (*C.umbla*) 'a ait örnek fotoğraf

1.5. Ağır Metaller

Ağır metal, metalik özellikler gösteren elementlerden oluşan, net tanımlaması yapılmamış olan grupta bulunan elementlerdir. Bu grubun içinde geçiş metalleri, bazı yarı metaller, lantanitler ve aktinitler bulunur.

Canlı organizmaların ihtiyaç duydukları “ağır metaller” miktarları değişkendir. İnsanların belirli oranda çinko, demir, bakır, mangan, molibden ve kobalta ihtiyaçları vardır; fakat ihtiyaçtan fazla yüksek derişimler canlıya zarar verebilir (Demirdağ 2014). Esansiyel metallerin yanı sıra, arsenik, kurşun, kadmiyum, civa gibi bir dizi başka ağır metallerin vücutta bilinen hiçbir işlevi yoktur ve toksik metaller olarak adlandırılır (Lionetto *et al.* 2014).

Besin zinciri, ekosistemde bir canlının diğer canlı üzerinden beslenmesi sonucu oluşan bir piramittir. Ağır metaller gibi bazı kirleticiler besin zincirinin ilk basamaklarında düşük düzeylerde bulunabilirler; ancak birbirini izleyen adımlarda yoğunlukları artabilir. Bu durum biyolojik birikim olarak isimlendirilir (Vural 1993).

Ekosistemde canlılar arasındaki dengeyi bozan kirleticiler; pestisitler, metaller, poliklorlu bifeniller vb. olup bunlar canlılarda toksik etki oluşturmaktadır (Taylan ve Özkoç 2007).

Sucul ortamlarda balıkların ağır metalleri, ortamdan alması solungaçlar ile solunum esnasında, besinlerle, tatlı su balıklarında ise besinlerle beraber tüketilen su ile ve deri yolu ile almaktadırlar. Vücuda alınan metaller kan vasıtası ile dokulara, organlara taşınmaktadır ve dokularda bulunan metal bağlayıcı proteinler tarafından bağlanması sonucu organizmada yüksek derişimlere ulaşabilmektedir (Heath 1995).

Sucul ortamlarda ağır metallerin derişimlerinin artması ile balıkların doku ve organlarında ağır metallerin birikmesi meydana gelir. Bunun üzerine balıkların büyüme ve gelişmesini, enzim aktivitelerini, çeşitli kan parametrelerini, etkiledikleri belirtilmiştir. Ortam derişimine ve balıkların etkide kalma süresine bağlı olarak balık doku ve organlarında biriken metal düzeyi artar. Fakat metalin önce hangi dokuda birikeceği canlının türüne ve metalin çeşidine göre değişir (Cicik 2003; Altındağ ve Yiğit 2005; Koçyiğit 2014).

Ağır metallerin zehirlenme kapasitesi çözünmüş oksijen miktarına, sıcaklık ve pH'a, balıkların büyüklüğüne oranla çözeltinin hacmine, çözeltide bulunana diğer maddelere, çözeltinin yenilenme frekansına ve sinerjik etki gibi etkenlere bağlı olarak değişir. Özellikle suyun pH derecesi önemli bir faktördür. Deniz sularına nispeten tatlı sular biraz daha zayıfça tamponlanmıştır ve bu işlem görmüş tatlı su sistemlerinde ağır metal toksitesi daha fazla gözlemlenir. Ağır metallerin sert ve bazik sulara oranla, distile ve yumuşak sularda daha toksik etkisi olduğu bilinmektedir (Mutluay ve Demirak 1996).

Sucul ortamlarda eser miktarlarda bulunan çinko, bakır gibi ağır metaller; doğal yollarla olabileceği gibi maden işlemeciliği, endüstriyel faaliyetler ve tarımsal aktiviteler gibi aslında insanlardan kaynaklanan faktörlerin etkisi ile gittikçe artan derişimlere ulaşabilirler. Balıkların da içinde bulundukları sucul organizmalar metallerin yüksek derişimlerinin olumsuz etkisi altında kalırlar (Cicik 2003).

Ağır metallerin toksik etkilerinin organizmayı etkilemesi; ya enzimin aktif bölgesinde yararlı bir metalle yer değiştirerek veya molekül üzerinde aktif olmayan bölgeye bağlanması yolu ile oluştuğu saptanmıştır (Viarengo 1985).

Bazı enzimlerin yapısında Cu^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} ve Mo^{2+} gibi ağır metal iyonları belli oranlarda bulunmaktadır. Ağır metaller, proteinlerin yapısını oluşturan amino asitlerdeki, tirozinin hidroksil (-OH), sistenin sülfidril (-SH), histidinin imidazol, glutamic ve aspartik asitlerin karboksilat (-COOH) gibi fonksiyonel gruplarına etki ederek proteinin yapısında farklılıklara neden olabilirler. Ağır metal iyonları özellikle enzimlerin aktif merkezlerinde yer alan sistin amino asitleriyle birleştiğinde merkaptan bileşikleri oluştururlar; böylece enzim aktivitesi yok olmaktadır (Keha ve Küfrevioğlu 2015).

Çalışmada kullanılan metalller:

Baryum: Toprak alkali metaller sınıfından gümüş beyazı renkli, yumuşak, periyodik sistemin 2A grubunda yer alan elementtir. Kimyasal sembolü Ba, atom numarası 56 'dır. En ağır elementler arasında yer alan almaktadır. Baryum sülfat; gama ve x ışını yayma özelliğine sahiptir ve sağlık alanında röntgen uygulamalarında, kanser teşhislerinde kullanılır. İç organların röntgen filmleri çekilmeden önce içirilen solüsyonların içeriğinde vardır. Havai fişeklerde, Vakum tüplerinde, bujilerde ve floresan lambalarda kullanılır. Suda çözünen bileşikler fazlasıyla toksik etki gösterir ve çok tehlikelidir. Diğer toprak alkali metallerden daha uçucu olan Baryum damıtılabilir. Baryum, kalsiyum ve stronsiyum; suyu ayrıştırarak hidrojen açığa çıkarır ve hidroksit oluşturur. Bu hidroksitler ısıtıldığında su kaybederek oksit haline döner. Türkiye'de de bol bulunan baryum, oldukça yüksek aktifliği olan bir elementtir. (<https://www.makaleler.com/baryum-nedir> , <http://www.kimyakulubu.com/baryum-klorur-bacl2/->)

Selenyum: Periyodik cetvelde 4. Periyot 6A grubunda olan bir ametaldir. Selenyumun atom numarası 34'tür. Jöns Jakob Barzelius, selenyumu 1817 yılında keşfetmiştir. Doğada az bulunan selenür ve ağır metal sülfürleri şeklinde bulunur. Bakır üretiminde yan ürün olarak elde edilir. Kimyasal yapısı bakımından kükürde benzer. Bileşikler zehirlidir. Yarı-iletkenlik özelliği gösteren selenyum, güneş pili ve fotosel yapımında, zeroks tekniğinde kullanılır (www.nkfu.com/Selenyum).

Bakır: Periyodik cetvelin I B grubunda bulunan Simgesi Cu olan bir geçiş elementidir. Rengi Kırmızı gibi, parlak görümlü, çekilebilen ve dövülen bir metaldir. Elektrik ve ısı iletkenliği oldukça fazladır. Gümüşten sonra metaller arasında elektriği en iyi ileten metaldir.

Bakır özellikle elektrik-elektronik sanayide kullanılır. Madeni para ve silah yapımında kullanılan metal alaşımlarının büyük çoğunluğu bakır içerir. Tarım alanında su yosunu öldürücü olarak kullanılır. Fehling çözeltisi gibi çeşitli bileşimler de bakır içerirler. (www.nkfu.com/bakir, www.dersimiz.com)

Tüm canlı organizmaların gereksinim duyduğu bir iz element olan bakır; birçok önemli enzimin bileşimine girer. Bu sayede damar, kan ve kemiklerin yapımında kullanılır. Pek çok omurgasızın kan proteininde solunum pigmenti halinde mevcuttur.

Bakır balıklar için yüksek derecede toksiktir. Ayrıca bakırın subletal derişimlerinin balıklarda büyüme, gelişme ve üremeyi olumsuz açıdan etkilediği araştırmacılar tarafından söylenmiştir.

Bakırın hücrede şelatlama kapasitesinin üstünde birikmesi halinde fazla sitotoksik olduğu, oksidatif strese neden olduğu ve hücresel düzeyde zarar verdiği de bilinmektedir. Kronik bakır etkisindeki balıklarda; oksijen tüketiminde artış, yüzme hızında düşme, iyon regulasyonunda dengesizlikler, lenfosit düzeyinde azalma, nötrofil düzeyinde artma, bağışıklık sisteminde düzensizlik, enzim aktivitelerinde kayıplar gözlenmektedir (Koçyiğit 2014; Kırıcı 2014).

Mangan veya Manganez: Periyodik cetvelin 7 B grubunda yer alan, atom numarası 25, simgesi Mn olan elementtir. 1774 yılında keşfedilmiştir. Grimsi metal rengindedir. İçinde bulundurduğu karbon miktarının fazlalığına bağlı olarak çeliğin dayanımını geliştiren alaşım elementi olarak bilinmektedir. Ferromanganez elde edilmesinde demirle karıştırılması sureti ile kullanılır. Bu da mangan çeliklerine sertlik vermeye yaramaktadır. Örneğin taş kırma makinelerinin çeneleri bu tür mangan çeliklerinden yapılmaktadır Bakırla karıştırılması sonucu sert ve korozyona dayanıklı alaşımlar ortaya çıkartır. Hayat için son derece zorunluluk arz eden bir elementtir. Bu nedenle gübrelere az miktarda manganez sülfat ($MnSO_4$) konur. Bazı enzimlerin görevleri esnasında katalitik aktiviteyi yerine getirebilmeleri için manganeze ihtiyaç duymaktadırlar (www.makaleler.com/mangan)

Mevcut çalışmada ağır metallerin seçilmesindeki amaç; ağır metallerin sucul ortamlarda genellikle eser miktarda bulunmakla birlikte son yıllarda hızlı nüfus artışı, endüstrileşme, madencilik, tarımsal aktiviteler, sanayi kuruluşlarının deniz sahilleri ve turizm bölgelerinde yoğunlaşması, drenaj suları ve yerleşim yerlerinde oluşan atık sular gibi faktörlerin etkisi ile giderek artan konsantrasyonlarda bulunmalarıdır. Balıklar üzerinde, ağır metallerin ortam derişimindeki artışının başlıca etkisi doku ve organlarda birikmesidir. Bunun yanında balıkların büyüme ve gelişimini, çeşitli kan parametrelerini, enzim aktivitelerini olumsuz etkiledikleri gözlemlenmiştir. Balık doku ve organlarında biriken metal düzeyi; ortam derişimine ve etkide kalma süresine bağlı olarak artar. Canlının türüne ve metalin çeşidine bağlı olarak, metalin hangi dokuda öncelikle birikeceği değişim gösterir (Koçyiğit 2014).

1.6. Pestisitler

Pestisitler, hastalıkların, zararlı organizmaların, yabancı otların bitkilere olumsuz etkilerini yok etmek, azaltmak ya da kontrol altına alabilmek için kullanılan, mikroorganizmalar ve başkaca zararlıların ölümüne yol açan, biyolojik olarak aktif çalışan kimyasal maddelerdir. Tarımsal üretimi artırmak, kaliteyi iyileştirmek ve bol ürün almak amacıyla zirai mücadelede oldukça geniş kullanım alanına sahiptir (Ribeiro *et al.* 2005; Delen 1990; Last and Robert 1992).

Pestisitler, hızla artan nüfusa karşı tarımı alanının kısıtlı oluşundan dolayı, modern tarımın tamamlayıcısı haline gelmiştir ve dünyanın tüm tarımsal ekosistemlerinde üretim süreci bir veya daha fazla pestisit uygulamasına gereksinim duymaktadır. Birçok uygulamada birden fazla aktif madde kullanılabilir (Yıldız 2014).

Pestisitler, tarım ve orman sahalarına uygulandıktan sonra; yağmur suları, sulama suları, yüzey akışları ve drenaj suları ile taşınarak akarsulara ulaşır ve ordaki ekosisteme, balık ve diğer canlılara zarar vermektedirler (Tuncer 1987).

Pestisitlerin tarımdaki yararlarının dışında uzun süreli kullanımları sonucunda insan sağlığına ve ekosisteme kalıcı hasarlar verdiği saptanmıştır, bu zararı en aza indirmek sebebiyle tarım amaçlı kullanılacak kimyasalların kullanımı bazı kurallarla sınırlandırılmıştır. Uzun süre ekosistemde kalan pestisitler, genetik hastalıklara ve kansere neden olabilirler. Pestisitler diğer zehirli maddeler arasında yapılan sınıflandırmada kimyasal ve sosyal olarak ayrı bir sınıfta tutulur. Çünkü pestisitlerin toksik etkisi direk bir organizmayı etkileme yolu ile gerçekleşmemektedir (Siemering *et al.* 2005; Güven 2005; Altıkat 2009).

Suda yaşayan canlılarda birikime neden olan, sağlık açısından tehlike oluşturan ve ekolojik dengeyi bozan ksenobiyotikler; pestisitler, endüstriyel atıklar, yapay tarımsal gübreler ve yapay organik kimyasallar, petrol ve türevleri, radyoaktivite, deterjanlar, inorganik tuzlar, ağır metaller ve atık gazlar yaygın olarak bilinmektedir (Hu 2000).

Pestisitler; kullanıldıkları zararlı grup, kimyasal yapıları, toksisitesi, formül şekli, kullanılma tekniği, ilacın fiziki hali, etki ettiği zararlının bulunduğu yer gibi kriterlere göre kategorize edilmektedir (Öztürk, 1990).

a)Etkili oldukları canlılara göre:

Pestisitler etki gösterdikleri canlılara göre şu şekilde gruplandırılabilir:

1. Fungisitler, 2. İnsektisitler , 3. Herbisitler , 4. Rodentisitler, 5. Akarisitler,
- 6.Pisisitler , 7. Nematositler, 8. Avisitler, 9. Mollusositler (Güler ve Çobanoğlu 1997).

b) Kimyasal yapılarına göre:

1. Organik klorlu pestisitler
2. Organik fosforlu pestisitler
3. Karbamatlı pestisitler
4. Piretroit grubu pestisitler (Açar 2015).

Pestisitlerin %75 i ABD de Tarımsal amaçla kullanılmaktadır. Pamuk, mısır ve soya fasulyesi ekiminde tercih edilmektedir. Günümüzde **DDT, aldrin, endrin, dieldrin, chlordane, heptachlor, lindane, toxaphene ve hexachlorobenzen** gibi klorlu hidrokarbonlar ABD de kullanımı yasaklanmıştır. Metoksiklor ve endosulfan gibi dayanıklı olmayan klorlu hidrokarbonlar ise yiyecek ürünlerinde kullanılmaktadır. Klorlu hidrokarbonların yasaklanmasından sonra akut toksik etki yapan organofosfatlar ve N metil karbamatlar yaygınlaşmıştır (Güler ve Çobanoğlu 1997).

Organik klorlular; bünyelerinde, karbon, hidrojen ve klor atomları barındıran bir gruptur. Bu gruba örnek olarak, **aldrin, dieldrin, DDT, endosulfan, heptachlor, endrin, lindane** gibi pestisitler gösterilebilir. Genel olarak gaz kromatografisi ile analiz edilirler. Vücuda temas etmesi ve solunum yolu ile alınması sonucu etki gösterirler. Ekosisteme verdikleri ciddi zararlardan ötürü bu grubun üyelerinin kullanımı yasaklanmaktadır (Açar 2015).

Organik klorlu pestisitlerin diğerlerine oranla daha toksik oldukları bilinmektedir. Uzun süre kalıcılığı ve vücutta birikme özelliği olduğundan düşük dozda da olsa kronik zehirlenmelere neden olur. Bakır sülfat (CuSO₄), paraquat (PQ) ve methidathion (MD) gibi pestisitler adi sazanlarda doku zararlanmaları ve strese yol açarak, laktat dehidrogenaz (LDH), glutamik oksaloasetik transaminaz (GOT) ve glutamit dehidrogenaz enzim aktiviteleri ile kan şekeri miktarını yükseltmektedirler (Atamanalp ve Yanık 2001).

Aldrin ve dieldrin gibi pestisitler merkez sinir sisteminin uyanlabilirliğini artırırken karaciğerde tahribat yapmaktadır. Pestisitler sadece merkezi sinir sistemini etkilemekle kalmaz; ayrıca pek çok enziminde inaktivasyonuna neden olmaktadır. Karbonik anhidraz enzimi de bunlara bir örnektir (Doğan, 2005).

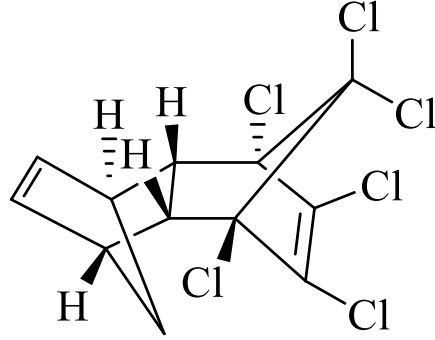
Balıklar, solungaçları vasıtasıyla ortamındaki kimyasalları absorbe ederek ya da bulaşmış materyalleri besin olarak tüketmeleri sonucu zehirlenebilirler ya da pestisitler balığa geçebilir. Balıklar üzerinde pestisitlerin olumsuz etkileri farklı yollarla gerçekleşir. Sucul ortamlarda doğrudan ölümlere neden olabileceği gibi balıkların üremesini engellemek ve yumurta bırakmalarını durdurmaları suretiyle de balık popülasyonu içerisinde ciddi problemlere neden olabilir. Ayrıca dokularda meydana getirdikleri hasarlar ile balıklarda duyarlılığa yol açarak; balıkların mevsimlik ısı değişimlerin ve geçici açlıktan normalinden daha fazla etkilenmesine neden olurlar. (Toros ve Maden 1991; Atamanalp ve Yanık 2001).

Ağır metaller, pestisitler ve çevre kirliliği gibi nedenlerle balıkların dokularında bulunan oksijen çok tehlikeli toksik formlar olan serbest radikallere dönüşebilmektedir. Serbest radikaller, dış halkalarında bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektron bulunan, kısa ömürlü reaktif atom, iyon veya moleküllerdir. Serbest radikallerin biyolojik yaşlanmaya, ciddi hücresel hasarlara, mutasyona ve kansere neden olduğu bilinmektedir (Akbulut vd. 2014).

Balıklar insanların alternatif besin kaynaklarının önemli bir bölümünü oluşturduklarından meydana gelebilecek toksik etkilerle ilgili önemli çalışmalar yapılmaktadır. Özellikle Türkiye’de çeşitli yasaklamalara ve her pestisit için kullanılacak doz miktarının oranları belirlenmiş olmasına rağmen tarım üreticileri, bu kimyasallardan bilinçsiz bir şekilde faydalanmakta ve sonuçta çevre kirliliğiyle birlikte besin zinciri ile insanlara kadar ulaşmasına neden olmaktadır (Yılayaz 2006).

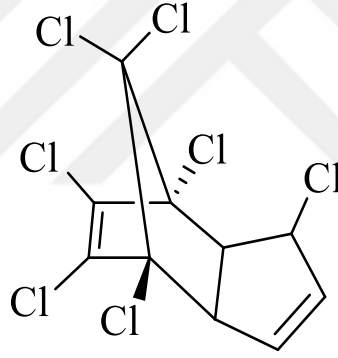
Çalışmada kullanılan pestisitler:

1-Aldrin: $C_{12}H_8Cl_6$



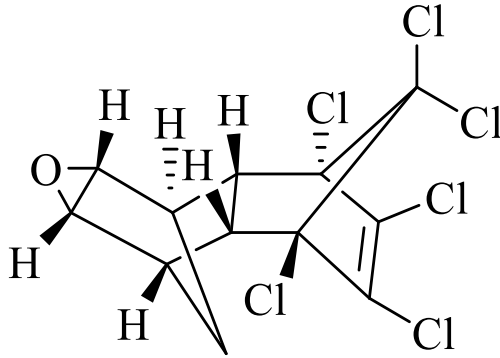
Şekil 1.3. Aldrin pestisiti moleküler yapısı

2-Heptachlor: $C_{10}H_5Cl_7$



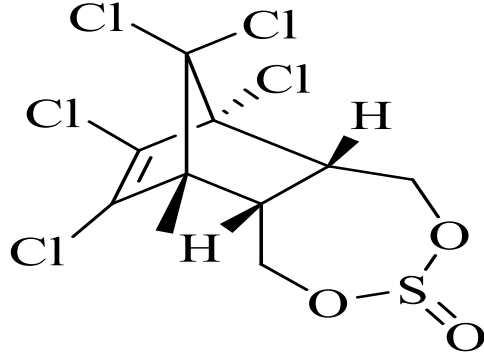
Şekil 1.4. Heptachlor pestisiti moleküler yapısı

3-Dieldrin: $C_{12}H_8Cl_6O$



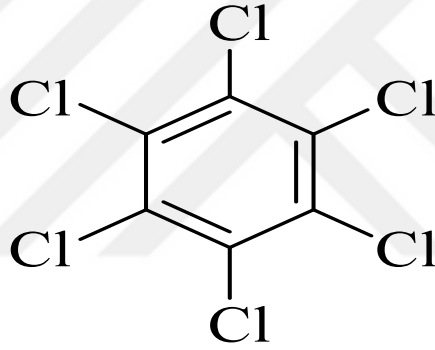
Şekil 1.5. Dieldrin moleküler yapısı

4-Endosülfan : $C_9H_6Cl_6O_3S$



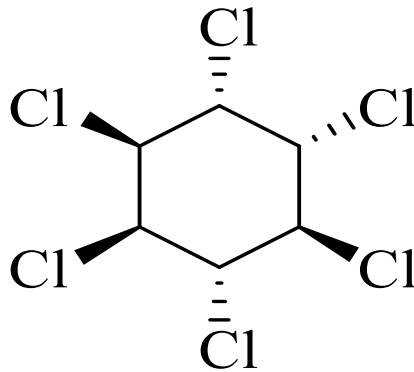
Şekil 1.6. Endosülfan pestisiti moleküler yapısı

5-Hexachlorbenzene: C_6Cl_6



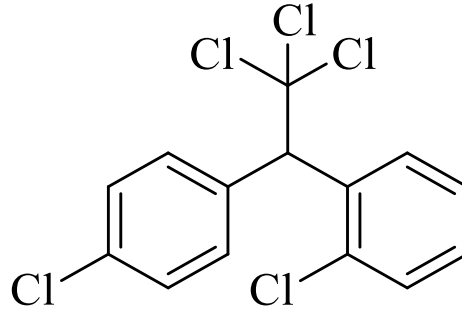
Şekil 1.7. Hexachlorbenzene pestisiti moleküler yapısı

6- α -HCH: $C_6H_6Cl_6$



Şekil 1.8. α -HCH pestisiti moleküler yapısı

7-2,4 DDT: $C_{14}H_9Cl_5$



Şekil. 1.9. 2,4-DDT pestisiti moleküler yapısı

(<https://www.lgcstandards.com/AE/en/Environmental/Pesticides-and-metabolites>)

2.KAYNAK ÖZETLERİ

1935 yılında yayınlanan ilk derlemede bazı vücut organlarında CA aktivitesinin olup olmadığı yönünde tanımlamalar yapılmıştır. Dr. Roughton tarafından kaslarda CA aktivitesinin olduğunu ve karaciğerde ise olmadığını belirtmiştir. İlaveten kastaki aktivitenin zararlı olduğunu ifade etmiş ve bunun olası sebebinin de CA'nın eritrositler gibi vücudun her yerinde aynı fizyolojik fonksiyona sahip olmasını göstermiştir (Tashian and Hewett-Emmett, 1984)

Yapılan ilk çalışmalarda sığır ve insan kanı kullanılmış, karbonik anhidrazın saflaştırılması işlemlerinde başlangıçta kandaki hemoglobinin giderilmesi saflaştırma işleminin birinci adımını oluşturmuştur. Keilin ve Mann (1940) bunu etanol-kloroform ekstraksiyonu ile başarı ile gerçekleştirmişlerdir. Etanolün kullanılmasının enzime zarar verdiği anlaşılmış, amonyum sülfat fraksiyonu ve alüminyum oksit ekstraksiyonu uygulanmış ve saflaştırma daha yüksek oranlarda başarıya ulaşmıştır (Verpoorte *et al.* 1967). Bu işlemde daha modern ayırma teknikleri olan kromatografi ve elektroforez ise Rickli ve arkadaşlarınca saflaştırma yöntemi olarak kullanılarak insan eritrositlerinden CA I ve CA II olarak bilinen iki izoenzim izole etmişlerdir (Rickli *et al.* 1964). İnsan CA'sını ise Edsall, Sephadex G-75 üzerine jel filtrasyonu ile hemoglobinden ayırmış ve izoenzim ayırımı için hidroksiapatit üzerine kromatografi uygulamıştır. Daha sonra A-50 ve amonyum sülfat ile çöktürmeyi takiben DEAE-Sephadex üzerinde izoenzimleri ayırmıştır (Tobin 1970; Lamb 1977; Kandel *et al.* 1978).

Günümüze yapılan CA araştırmalardan bazıları hakkında bilgiler verecek olursak; 1983 yılında Hall ve Schraer CA enzimini, gökkuşağı alabalığı (*Salmo gairdneri*) eritrositlerinden kloroform-etanol ekstraksiyonu, Sephadex G-75 jel filtrasyon kromatografisi ve DEAE Biojel iyon değişim kromatografisi yöntemi ile saflaştırmışlardır. Saflaştırılan CA enziminin molekül kütlesinin 28.3 kDa olduğu sonucuna varılmıştır. Hem N-etilenamid hem de akrilonitril ile sülfhidril modifikasyonu, her bir CA molekülünde 3 tane aktif sülfhidril grubunun olduğunu ve bu grupların modifikasyonu enzim aktivitesini doğrudan etkilemediği, modifiye olmuş CA enziminin oksidasyon ortamında inaktif olmadığı gözlemlenmiştir (Söyüt 2006; Koçyiğit 2014).

Ülkemizde *C. trutta* ve *C. umbla* balıkların üzerinde çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Köprücü ve Özdemir 2003; Dağlı ve Erdemli 2009; Kırıcı vd 2016). Bu çalışmalar kısaca şunlardır; yaş-boy ilişkisi, yaş-ağırlık ilişkisi, boy-ağırlık ilişkisi, eşeyssel olgunluk ve üreme zamanı, taksonomik özellikleri, et verimi ve organları arasındaki ilişki, besin analizleri, yaş tayinleri, mide muhteviyatı ve ağır metal analizleri şeklindedir (Celayir 2007).

Literatürde, *C. trutta* ve *C. c. umbla* ile ilgili birçok çalışma bulunmasına rağmen, CA enzimi saflaştırılması ile ilgili; Kırıcı vd (2016) ve Kırıcı (2014) yaptıkları çalışmalar olarak tespit edilmiştir.

Kırıcı vd. 2016 yılında *Capoeta umbla* (Heckel, 1843), Solungaç Dokusundan Karbonik Anhidraz Enziminin Saflaştırılması ve Bazı Metallerin Enzim Aktivitesi Üzerine Toksikolojik Etkilerinin İncelenmesi isimli çalışmasında, Karbonik anhidraz enzimi *C. umbla* solungaç dokusundan ilk kez; Sepharose 4B–L–tirozin–sulfanilamid afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırmıştır. *Capoeta umbla* solungaç sitoplazmik karbonik anhidraz enzimi üzerine bazı metallerin (Fe^{+3} , Cd^{+2} , Pb^{+2} ve Ni^{+2}) *in vitro* etkilerini incelemiştir.

Kırıcı 2014 yılında *Capoeta capoeta umbla* ve *Capoeta trutta*'nın solungaç, karaciğer, böbrek dokularından glukoz 6-fosfat dehidrogenaz ile glutatyon redüktaz enzimlerinin saflaştırılması ve bazı metallerin enzim aktivitesi üzerine etkilerini incelemişlerdir. *in vitro* olarak bazı metallerin (Cu^{+2} , Zn^{+2} , Ni^{+2} , Cd^{+2} , Ag^{+} , Pb^{+2} , Fe^{+3} , Co^{+2}) saflaştırılan enzim aktiviteleri üzerine etkileri incelenerek inhibisyon gösteren metaller için IC_{50} ve K_i değerleri hesaplanmış; sonuçta, Ag^{+} iyonunun tüm balık dokularında enzim aktiviteleri üzerine en etkili inhibisyonu gösterdiği belirlenmiştir.

Söyüt vd. 2008 yılında gökkuşağı alabalığı beyninden Sepharose-4B-L-tirozin –sulfanilamid afinite kromatografisi ile CA enzimini saflaştırdılar. SDS PAGE enzimin molekül kütlesini yaklaşık 29 kDa, jel filtrasyon kromatografisi ile enzimin molekül kütlesini yaklaşık 27,3 kDa olarak buldular. Söyüt ve Beydemir yine 2008 yılında Sepharose-4B-L-tirozin –sulfanilamid afinite kromatografisini kullanarak gökkuşağı alabalığının karaciğerinden CA enzimini saflaştırdılar. Enzimin molekül kütlesini SDS PAGE de 29,4 kDa jel filtrasyon kromatografisiyle molekül kütlesi yaklaşık 31 kDa civarında buldular.

Yerlikaya vd. 2017 yılında karbonik anhidraz enzimini siirt tiftik keçisi karaciğerinden saflaştırmışlar, karakterizasyonunu çalışmışlar ve metal toksisitesine karşı enzim kinetiğini değerlendirmişlerdir.

Demirdağ tarafından 2012 yılında yürütülen çalışmada Karbonik Anhidraz II Ve IV İzoenzimlerini Koyun Böbrek Dokusundan saflaştırılmış, Karakterizasyon ve Bazı Kimyasalların Etkilerini araştırılmıştır Her iki izoenzim üzerine hayvan tedavisinde sıklıkla kullanılan bazı antibiyotiklerin etkilerini hidrataz ve esteraz aktivitesi yöntemleri ile incelemiştir.

Demirdağ vd. 2014 yılında yaptıkları çalışmalarında Türkiye Doğu Anadolu'da Aras dağlarında bulunan, oluşumu açısından lav set gölü olan ve Türkiye'nin en yüksek gölü olan Ağrı Balık Gölünden elde ettikleri yörede kırmızı benekli alabalık olarak bilinen *Salmo trutta labrax*'tan CA enzimini sepharose4B-L tirozin-sülfanilamid afinite jel kromatografisi kullanılarak %79,3 verim ile 303.9 kat saflaştırmış ve enzim molekül kütleini 29.9 kDa olarak bulmuşlardır.

Karahalil 2009 yılında doktora tezi çalışmasında ilk defa mersin alabalığı eritrositlerinden CA enzimini Sepharose-4B-L tirozinsülfanilamid kolonundan %29 verimle 539 kat saflaştırmış ve karakterizasyon çalışmıştır. Enzimin molekül kütleini, saflığını kontrol etmek amacı ile SDS-PAGE yapılmış ve enzimin molekül kütleini 29 kDa olarak bulmuştur.

Göçer 2014 yılında Erzurum'da gerçekleştirdiği doktora tezi çalışmasında, Sinefrin ve fenilefrin: Antioksidan kapasitelerinin belirlemiş ve insan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA I ve hCA II) ile asetilkolin esteraz enzimi üzerine etkilerini araştırmıştır.

Koçyiğit 2014 yılında doktora tezi çalışmasında Sivas Kangal balıklı kaplıcalardaki doktor balıklar olarak bilinen Kangal balığının (*Garra rufa*) solungaç, kas ve göz dokularından karbonik anhidraz enzimi ilk kez saflaştırmış ve karakterizasyon çalışmalarını yapmıştır. Bazı metal iyonların (kobalt, kadmiyum, bakır, kurşun ve demir) inhibitör etkileri esteraz metodu kullanılarak *in vitro* şartlarda incelemiş,

Söyüt ve Beydemir 2010 yılında Erzurum Atatürk Üniversitesinde yaptıkları doktora çalışmasında Gökkuşığı Alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) türünde elde ettikleri böbrek dokusundan karbonik anhidraz enzimini saflaştırmışlar, karakterizasyon ve kinetik özellikleri incelemişlerdir.

Hisar 2002 yılında Gökkuşığı Alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) eritrositlerinden karbonik anhidraz enzimini saflaştırmışlar, karakterizasyon ve bazı antibiyotiklerin inhibisyon etkilerini incelemiştir.

Kaya 2011 yılında doktora tezi için yaptığı çalışmada Çipura (*Sparus aurata*) balığının karaciğer, solungaç ve böbrek dokularından karbonik anhidraz enzimini saflaştırmış, karakterizasyonu ve bazı metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkilerini incelemiştir.

Orhan 2017 yılında yüksek lisans tezi çalışmasında karbonik anhidraz enzimini koyun kalp dokusundan saflaştırmış, karakterizasyonu ve yeni sentezlenen sülfonamid kalkonların etkisini araştırmıştır.

Çağlayan, 2017 yılında doktora çalışmasında Keçi karaciğer ve böbrek dokularından CA enzimini %55.6 ve %51.0 verimlerle , 61229.29 ve 58974.33 EÜ/mg spesifik aktiviteleriyle birlikte Sepharose-4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite kolon kromatografisi kullanılarak saflaştırılmış, karakterizasyonu ve bazı metal iyonlarının, antibiyotiklerin ve avermektinlerin enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir.

Arslan 2015 yılında yaptığı çalışmada, Pestisit Sinerjisinin; Gökkuşığı Alabalıklarında (*Oncorhynchus Mykiss*) yüzme performansı, biyokimyasal hematolojik, histopatolojik ve genotoksik etkilerini araştırmış, balığın karaciğer ve solungaç dokularının histopatolojik incelemelerinde pestisitlerin lamellerde erime, hiperemi, epitel nekrozlar, vakuol oluşumları ve hücre infiltrasyonlarına neden olduğunu göstermiştir.

Keskinkaya 2015 yılında gerçekleştirdiği Çavuşçu ve Beyşehir göllerindeki toksik ve karsinogenik organik kirliliğin bu göllerde yaşayan sazan balığı(*Cyprinus carpio*) üzerine etkilerinin biyokimyasal olarak incelenmesinde; organik kirlilikle ilgili enzim aktivitesini değerlendirmişler ve her iki göldeki kirliliğin anilin 4- hidroksilaz enzim aktivitesine etkisinde anlamlı bir fark görülmemişken, eritromisin N-demetilaz enzim

aktivitesi $p=0.0073$ olup iki göl arasında anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur. Çavuşçu Gölündeki eritromisin N-demetilaz aktivitesi Beyşehir Gölündeki aktiviteye göre 1.4 kat daha fazla bulunmuşlardır.

Kaygısız 2018 Yüksek lisans tezinde glokom hastalığı tedavisinde kullanılmaya aday yeni karbonik anhidraz inhibitörlerinin bu enzim üzerindeki inhibisyon etkileri *in vitro* olarak araştırmıştır. İnsan eritrositlerinden hCA I ve hCA II izoenzimleri afinite jeli (Sepharose-4B-L-tirozin-sülfanilamid) kullanılarak, hCA I 1108,21 EU/mg protein spesifik aktivite ve %16,82 verimle, hCA II 2399,80 EU/mg protein spesifik aktivite ve %23,97 verimle saflaştırmıştır.

Birçok çalışmada CA aktivitesi üzerine, çeşitli hayvan türlerinde çeşitli dokularda, bazı geçiş metallerinin, aktif bölgedeki Zn^{+2} 'ı yerinden etme ya da histidini bağlama kabiliyeti olduğu ve aktif alan dışındaki bölgelerdeki sistein kalıntıları, bazı metallerin inhibe edici etkisini açıkladığı bildirilmiştir.

Teleost balıklarından (*Ictalurus punctatus*) Cd^{+2} , Cu^{+2} , Ag^{+} ve Zn^{+2} 'ın eritrosit CA aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir.

Avrupa deniz levreği (*Dicentrarchus labrax*) ile yapılan çalışmada Al^{+3} , Cu^{+2} , Pb^{+2} , Co^{+3} , Ag^{+1} , Zn^{+2} ve Hg^{+2} nin karaciğerin CA aktivitesinde rekabetçi inhibitörleri olduğu bulunmuştur.

Çipura balığı (*Sparus aurata*) karaciğeri karbonik anhidraz enzimi için, Ag^{+} , Ni^{+2} , Cd^{+2} ve Cu^{+2} 'nin CA aktivitesinin rekabetçi olmayan inhibitörleri olarak gösterilmiştir.

Gökkuşaağı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*), beyin dokularında Co^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Ag^{+} ve Cd^{+2} nin CA enzimi aktivitesini inhibe ettiği bulunmuştur (Lionetto 2016).

Bakteriler ayrıca üç farklı genetik aileye, CA'lara, α -CA'lara, β -CA'lara ve γ -CA'lara sahiptirler. Supuran ve Capasso enzimlerin bu organizmalarda sahip olduğu rolleri gözden geçirmiştir. Çoğunlukla patojenik bakterileri göz önüne alarak, örneğin *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Brucella suis*, *Helicobacter pylori*, *Porphyromonas gingivalis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Burkholderia pseudomallei* incelenmiştir (Supuran 2018).

Bazı metallerin CA'ya özgü izoformlar üzerine uyguladığı inhibisyon, doğal metal kofaktörü veya CA molekülündeki diğer bölgelere bağlanma, metallerin CA üzerindeki biyolojik etkilerinin hepsini açıklamamıştır (Lionetto 2016).Yapılan literatür taramaları sonucunda; pestisitlerin ve ağır metallerin sucul organizmaların antioksidan savunma sisteminde birtakım değişikliklere ve bunun sonucunda hücresel düzeyde hasarlara sebep olduğu görülmektedir.



3.MATERYAL ve METOD

3.1. Materyal

Mevcut çalışmada kullanılan Sepharose-4B, p-nitrofenil asetat, aseton, sodyum hidroksit, trihidroksi metil aminometan (Tris), sodyum klorür, sitrik asit, sıvı azot, saf su, brom timol mavisi, hidroklorik asit, sülfirik asit, fosforik asit, Coomassie Brilliant Blue G-250, standart serum albumin, N,N,N',N'-tetrametiletillen diamin (TEMED), karbondioksit gazı, merkaptotanol, glisin, sodyum azotür, metanol, etanol, izoproponal, sodyum barbital, akrilamid, N,N'- metilen bisakrilamid, ve diğer kimyasal maddeler Ağrı Merkezi Araştırma ve Uygulama Laboratuvarından sağlanmıştır.

3.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Çalışmalar sırasında aşağıda yazılı listede bulunan alet ve cihazlar kullanılmıştır.

Soğutmalı santrifüj	: ThermoSL 16R
Spektrofotometre	: SHIMADZU UV-1800
pH metre	:İnoLab pH-MeterCG840
Elektroforez tankı	:Consort EV265
Peristaltik pompa	:GILSON
Karıştırıcı(Shaker)	:COMBI-Shaker
Karıştırıcı (Vorteks)	: WiseMix
Hassas terazî	: OHAUS pioneer
(1x10), Sigma (ABD) Otomatik pipet	: Eppendorf
Çalkalayıcı	: İsoLab
Magnetik karıştırıcı	: BioCote
Safsu cihazı	: UltraPure (Typ1) Water
Güçkaynağı	:1-Bio Rad Power Pac 3000 2-Apparatus
CorporationECBuzdolapları	: Arçelik
Derindondurucu (-20°C)	: Arçelik

3.3. Çalışmada Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması:

1. 50 mM Tris-HCl pH:7.4 (Homojenat hazırlanması için) 0,607 gr tris 90 ml destile suda çözüldü, pH: 7.4'e getirildikten sonra destile su ile hacim 100ml'ye litreye tamamlandı.
2. 25 mM Tris-HCl/0,1 M Na₂SO₄, pH: 8.7 (afinite jelinin dengelenmesinde kullanılan tampon): 3,0275 g Tris ve 14,2 g Na₂SO₄, 950 ml destile suda çözüldü 1 N HCl ile pH: 8,7'ye getirildikten sonra destile su ile hacim 1 litreye tamamlandı.
3. 25 mM Tris-HCl/22 mM Na₂SO₄, pH: 8.7 (homojenatın tatbikinden sonra afinite jelinin yıkanmasında kullanılan tampon) 3,0275 g Tris ve 3,124 g Na₂SO₄, 950 ml destile suda çözüldü 1 N HCl ile pH: 8,7'ye getirildikten sonra destile su ile hacim 1 litreye tamamlandı.
4. 0,1 M NaCH₃COO / 0,5 M NaClO₄, pH: 5.6 (kolona tutunmuş CA enziminin elüsyonu için kullanılan tampon çözelti): 2,04 g NaCH₃COO.3H₂O ve 9,187 g NaClO₄ 30 120 ml destile su içinde çözüldü, 1N HCl ile pH: 5,6'ya getirildikten sonra destile su ile hacim 150 ml'ye tamamlandı.
5. 50 mM potasyum fosfat tamponu (Optimum pH çalışması için) 0,068 gr KH₂PO₄ 10 ml suda çözüldü ve istenen pH' lara ayarlandı.
6. 50 mM Tris-SO₄ pH:7.4 (esteraz aktivitesi ve diyalizde kullanılan tampon çözelti): 6,055 g Tris 950 mL destile su içerisinde çözülerek, 1 N H₂SO₄ ile pH'sı 7.4'e getirildikten sonra hacim destile su ile 1 L'ye tamamlandı.
7. 50 mM Tris-SO₄ (pH:7-9 aralığında) (Optimum pH ve stabil pH çalışması için kullanılan tampon çözeltiler): 0,06 g Tris 100 ml saf su içerisinde çözülerek H₂SO₄ ile istenen pH'ya getirildi .
8. 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.
9. Brom timol mavisi çözeltisi (%0,04'lük) (hidrataz aktivitesinde indikatör olarak kullanılan çözelti): 0,015 g indikatör ve 0,0275 NaHCO₃ 125 mL saf suyla çözüldükten sonra hazırlandı.

10. CO₂ çözeltisi (hidrataz aktivitesinde kullanılan çözelti): 0°C’de 15 dakika buz banyosunda saf suyun içerisinde CO₂ gazı geçirildi.
11. 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 50 mL fosforik asit ilave edilerek çözeltinin hacmi, saf su ile 1 litreye tamamlandı.
12. Standart serum albumin çözeltisi (1 mg/mL; protein tayini için kullanılan çözelti): 6 mg standart serum albuminin 6 mL saf suda çözülmesiyle hazırlandı.
13. SDS-PAGE’de kullanılan numune tamponu: 0,65 mL 1 M Tris-HCl (pH:6.8) 1 mL %10’luk SDS ve 1 mL %100’lük gliserin, 1 mL %0,1’lik brom timol mavisi karıştırılarak, son hacim saf su ile 10 mL’ye tamamlanması ile hazırlandı ve bu tamponu kullanmadan hemen önce, 950 µl numune tamponundan 50 µl olacak şekilde β-merkaptoetanol ilave edildi.
14. SDS-PAGE’de kullanılan yürütme tamponu: 3 g Tris ve 14,4 g glisin 950 mL suda çözüldü, üzerine 10 mL %10’luk SDS ilave edilerek pH:8,3 e ulaştırıldıktan sonra toplam hacim saf su ile 1000 mL’ye tamamlandı.
15. Boyama çözeltisi (elektroforez jelinin boyanması için kullanılan çözelti): 0,1 g Coomassie brilliant blue R-250, %50 metanol, %10 asetik asit ve %40 saf su olacak şekilde yeteri kadar hazırlandı.
16. Yıkama çözeltisi (elektroforez jelinin yıkanması için kullanılan çözelti): %50 metanol (250 ml) , %10 asetik (50 ml) asit ve 1 %40 saf su (200 ml) olacak şekilde hazırlandı.
17. Sabitleme çözeltisi (elektroforez jelindeki proteinlerin sabitleştirilmesi için kullanılan çözelti): %50 izopropanol, %10 TCA, %40 saf su olacak miktarda hazırlandı.
18. Ayırma jeli için; 1 M Tris-HCl pH:8,8: 12,1 g Tris 90 mL suda çözülüp 1 M HCl ile pH’sı 8,8’e kadar titre edildi ve daha sonra saf su ile 100 mL’ye tamamlandı.

19. Yığma jeli için ; 1 M Tris-HCl pH:6,8: 2,42 g Tris 5 mL suda çözülüp 1 M HCl ile pH'sı 6,8'e kadar titre edildi ve daha sonra saf su ile 20 mL'ye tamamlandı.
20. %30'luk Akrilamid-%0,8 bisakrilamid çözeltisi: 6 g akrilamid, 0,16 g bisakrilamid tartılıp 13,84 mL suda çözüldü.
21. %10'luk SDS çözeltisi: 0,5 g SDS 4,5 ml suda çözüldü.
22. Stok Çözeltiler:
- Metaller: Çalışmada kullanılan metaller 0.1 M olacak şekilde hazırlandı.
 - Pestisitler: Çalışmada kullanılan pestisitler 10mg/10 ml olacak şekilde hazırlandı.

3.4. Balıktan karaciğer Örneklerinin Alınması ve Homojenatın Hazırlanması

Deneylerde kullanılan Siraz (*C. umbla*) balığı Ağrı ilindeki Murat nehrinden yakalandı. Ortalama boyları 25-30 cm ve ağırlıkları 150-200 gr olan balıklar laboratuvara getirildi (soğuk zincir kuralına uyularak) ve karaciğer dokuları hızlı bir şekilde çıkarıldı. Deney süreci başlayana kadar -80°C'de muhafaza edildi.



Şekil 3.1. Canlı olarak temin edilen Siraz balıkları

Homojenatları hazırlamak için, öncelikle neşter yardımı ile dokular oldukça küçük parçalara ayrıldı ve sıvı azot ile muamele edilerek parçalanma sağlandı. Doku örnekleri havanda toz haline getirildikten sonra hücrelerin tamamen parçalanması için doku macun kıvamına gelinceye kadar havanda dövüldü. Daha sonra 3 ml/g olacak şekilde 50mM Tris HCl(pH:7.4) homojenat tampon çözeltisi ilave edilidi ve bu tampon çözeltisi içerisinde homojenize edildi. Homojenat 4 katlı tülbentte süzöldükten sonra bu süspansiyon 30 dakika 12000 rpm’de santrifüj edildi. Elde edilen homojenat süzgeç kağıdında tekrar süzölüp 30 dakika 12000 rpm’de 2.kez santrifüj edildi Böylece homojenat üzerinde biriken yağ tabakası uzaklaştırıldı. Süpernatant kısmı alınıp daha sonraki saflaştırma basamaklarında kullanıldı.

3.5. Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu

Hazırlanmış olan süpernatant süzgeç kâğıdından süzdükten sonra katı Tris ile pH’sı 8.7’ye getirildi. pH’sı ayarlandıktan sonra önceden hazırlanmış afinite kolonuna tatbik edildi. Homojenat yüklenmiş kolon daha sonra yıkama çözeltisi ile yıkandı ve uygun olmayan bileşikler kolondan uzaklaştırılmış oldu. Yıkama işlemi bittikten sonra Karbonik Anhidraz enzimi için gerekli olan elüsyon çözeltileri kolona tatbik edilip elüe edildi. Elüatlar 2’şer mL olacak şekilde ependorf tüplerde toplandı. 280 nm de Absorbanslarına bakıldı ve 348 nm de aktivite ölçümleri yapıldı. Yüksek değeri olan tüpler diyaliz edilmek üzere diyaliz torbasına konuldu.

Diyaliz: Afinite kolonundan elde edilen elüatlarda bulunulabilecek kullanılan tampon çözeltilerden kaynaklanan yan ürünlerden kurtulmak amacıyla diyaliz torbası 1 L’ lik beher içine yerleştirildi ve 0,05 M Tris-SO₄, (pH:7.4) tampon içerisinde 7 saat diyaliz işlemi yapılmıştır.

3.6. Yöntem

Karbonik anhidraz izoenzimlerinin izole edilmesinde ve karakterizasyonunda kromatografik ve elektroforetik olmak üzere çeşitli yöntemler uygulanmaktadır. Yaptığımız çalışmada saflaştırma işlemi afinite kromatografisi ile gerçekleştirilmiş ve enzimin aktivitesi *in vitro* şartlarda gerçekleştirilen spektrofotometrik ölçüme dayanan ve substrat olarak p-nitrofenilasetatın kullanıldığı esteraz aktivitesi ile ölçülmüştür. Bu yöntemin esası, substrat olarak kullanılan p-nitrofenilasetatı karbonik anhidraz enziminin 348 nm’de absorbsiyon veren p-nitrofenol ya da p-nitrofenolat’a hidroliz etmesidir.

Çalışmamızda enzim saflaştırmak için kullanılan Afinite Kromatografisi; biyolojik ligand veya onun sentetik bir analogu ile saflaştırılmak istenen molekül üzerindeki komplementer bağlama bölgesi arasındaki özel etkileşimi prensibine dayanan önemli bir protein saflaştırma tekniğidir (Bollog *et al.* 1996).

Afinite kromatografisinde, çözünmeyen destek materyali(matrix), üzerine “ligand” adı verilen özel bir molekül immobilize edilir. Bahsedilen yöntemde katı matrikse bağlanan ligandın afiniteye göre en uygun şekilde seçilmesi, ligandların katı matrikse bağlanmaları veya tutuklanmaları (immobilize edilmesi) işlem gerçekleşirken kolon içerisinde ayrımın yüksek oranda gerçekleşmesini sağlayan en önemli etkenlerden biridir. Seçilen molekül saflaştırılmak istenen materyale karşı özel ilgi duyarak, onu belirli bir kuvvette geri dönüşümlü bir şekilde adsorbe eder (Konak vd 2014; Arslan 2003).

Aromatik ve heteroaromatik sülfanilamitlerin daha önce yapılmış olan çalışmalarda karbonik anhidraz enziminin en güçlü inhibitörleri olduğu bildirilmiştir (Roughton and Booth 1946; Tozlu 1997). Bu doğrultuda sülfanilamit CA enziminin saflaştırılmasında ligant olarak kullanılmıştır. Afinite kromatografisi ile bu enzimin saflaştırılmasında kolon materyali (matrix) olarak Sepharose-4B kullanılmıştır.

Saflaştırma işleminde kullanılan Sepharoz-4B-L-tirozin-sulfonamid yapısına sahip afinite jelinin hazırlanışı: Afinite jeli CNBr ile aktive edilmiş Sepharose-4B matriksi üzerine hazırlandı. Hazırlanan kolon materyaline uzantı kolu olan L-tirozin kovalent olarak takıldı ve sonrasında sülfanilamid diazollanarak tirozine kenetlendi. Burada

sözü geçen sülfanilamid enzimi spesifik olarak bağlayan kısmını, tirozin ise afinite jelinin uzantı kolunu oluşturmaktadır. Karbonik anhidraz enziminin spesifik inhibitörü olan sülfanilamid , afinite jelinin yapısına katılarak çalışacağımız enzimin yüksek oranda saflaştırılmasını sağlamıştır (Atasever vd 2013; Küçük 2015 ; Koçyiğit 2014).

Afinite kolonundan elde edilen elüatlarda bulunulabilecek kullanılan tampon çözeltilerden kaynaklanan yan ürünlerden kurtulmak amacıyla diyaliz işlemi yapılmıştır.

Enzim, hidrataz aktivitesi yanında esteraz aktivitesine de sahiptir, ancak fizyolojik açıdan hidrataz aktivitesi önemlidir.

CA enziminin aktivite tayini:

Bir enzimatik tepkimenin hızı, enzimin aktivitesi veya enzimin etkinliği ile alakalıdır. Enzimin aktivitesi, o enzimin katalize ettiği enzimatik tepkimenin hızının, optimum koşullarda enzim etkisiyle belli bir sürede ürüne dönüştürülen substrat miktarına göre ifadesidir. Enzimin etkinliği veya aktivitesi fazla ise belirli bir sürede daha fazla substratı ürüne dönüştürür.

Enzim ünitesi (U) : 25°C’de, optimum şartlarda, 1 dakikada, 1 µM substratı ürüne dönüştüren enzim miktarıdır

Çizelge 3.1. CA enzimini aktivite ölçümünde kullanılan prosedür

Küvet İçeriği	Kör	Numune
TRİS tampon	1000 µl	400 µl
PNF	-	350 µl
Saf su	-	200 µl
Enzim numunesi	-	50 µl

Aktivite ölçüm kuvvetleri Çizelge 3.1’de gösterildiği şekilde önce enzim numunesi katılmaksızın pipetlendi. Daha sonra numune küvete pipetlenerek spektrofotometreye yerleştirildi ve okuma başlatıldı. Başlangıçta ve üç dakika sonundaki absorbans değerleri kaydedildi.

p-nitrofenilasetat substrat çözeltisi ise yapılan deneyler için günlük olarak hazırlandı. 50 mL PNF çözeltisi için; 0,027 gr p-nitrofenilasetat tartılıp 2 mL aseton içinde çözüldü ve ışık alamayacak şekilde etrafı kapatılmış, hızlı karıştırılan distile suya tam çözünüceye kadar yavaş yavaş ilave edildi.

Enzim ünitesi hesaplanırken aşağıdaki formül kullanıldı.

$$EU = \frac{\Delta OD/3}{5} \times \frac{VT}{VE} \times SF$$

EU/ml : 1 ml’deki enzim ünitesi

ΔOD : Bir dakikadaki absorbans değişimi

VT : Ölçümün yapıldığı toplam küvet hacmi

VE : Ölçümün yapıldığı küvete ilave edilen enzim numunesinin hacmi

SF : Seyreltme faktörü (seyreltilen örnek için kullanılır)

İnhibitör çalışmalarıyla ilgili farklı inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapılarak inhibitör etkisi gösteren metaller ve pestisitler belirlendi. Bu metallerden inhibisyon etkisi yüksek olanların % Aktivite-[I] olarak grafikleri çizildi, eğrinin denkleminde IC_{50} değerleri hesaplandı.

3.7. Bradford yöntemi ile protein tayini

Pozitif yüklü proteinlere, negatif yüklü Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifinin fosforik asitli ortamda bağlanmasına dayanmaktadır . Biz de yaptığımız çalışmada saflaştırdığımız enzim çözeltisi ve homojenatlardaki protein miktarlarını bu yöntemi kullanarak tespit ettik.

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 serum albümin çözeltisinden tüplere 10,20, 30, 40, 50, 60, 70,80,90,100 µL alındı. Saf su ile tüm tüplerin hacmi 0,1 mL’ye tamamlandı. Tüplerin hacmicoomassie brilliant blue G-250 reaktifi ile 5 mL’ye tamamlandı ve vortex ile karıştırıldı. Proteine boyanın tam olarak bağlanabilmesi için 10 dakika karanlıktainkübe edildi. Oluşan kompleks 595 nm’de maksimum absorbans göstereceği esasına dayanarak, 3 mL’lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu.

CO₂-hidrataz aktivitesi: 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 (to). 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 (t1).

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

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

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

3.7.1. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının kontrolü

Enzim saflaştırıldıktan sonra %3-8 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi. Elektroforez proteinlerin ayrıştırılmasında kullanılan, yüklü proteinlerin elektriksel alanda göç etmesi prensibine dayanan önemli bir metoddur. Proteinin elektroforez sırasında göçü onun boyutu ve şeklinin bir fonksiyonudur (Leninger 2013). Saflığının ve molekül kütlesinin belirlenmesinde sodium dodesil sülfat kullanılmıştır.

Yürütülecek numuneler yükleme yapmadan önce %1 SDS ve %10'luk 2-merkaptetanol ile muamele edilip yöntemde belirtildiği üzere 5 dk su banyosunda bekletildi. Enzim örnekleri yaklaşık 15 µl hazırlandı. Son hacim enzim/numune tamponu olacak şekilde 1/1 oranında ayarlandıktan sonra kaynar su banyosunda üç dakika boyunca inkübe edildi.

Elektroforeze başlamadan önce plakalar temizlendi. Düz bir plaka ile her iki kenarında jelin konulabileceği aralık oluşturacak şekilde plakalar üst üste tutularak sabitlendi. Plakalar jel hazırlama kabinine konuldu. Önceden hazırlanan ayırma jeli enjektör kullanılarak plakaların arasındaki boşluktan üstte 2-3 cm kalıncaya kadar dolduruldu. Ayırma jeli donup katılaşıncaya kadar 25 dk beklendi, ayırma jeli katılaştıktan sonra jelin üst kısmında bırakılan boşluğa yığma jeli dolduruldu. Numune kuyucuklarının oluşması amacıyla tarak yavaşça bahsedilen kısma yerleştirildi. Yığma jeli de katılaştıktan sonra oluşan numune kuyuları gözlemlenince tarak dikkatlice çıkartıldı ve jel plakaları elektroforez tankına yerleştirildi. Tank yürütme tamponu ile jelin üstünü geçecek şekilde doldurulduktan sonra elektroforez tankı kapatılarak üst tarafından (-) katot, alt tarafından (+) anot yerleştirildi.

Enerji kaynağı 80 voltta ayarlandı ve öncelikle 20 dakika yürütüldü ve örneğin ayırma jeline kadar gelip yığılması sağlandı ve akım 120 volt'a artırılıp numuneler jelin sınırına kadar yürütüldü. Numune tamponunda bulunan brom timol mavisi yardımıyla numuneler takip edildi. Bu işlem bittikten sonra enerji kaynağı durduruldu ve plakalar arasındaki jele zarar vermeden çıkarıldı. Uygun bir kapta sabitleştirme çözeltisine konuldu. Jel sabitleştirme çözeltisi içerisinde 30 dakika bekletildikten sonra çıkarılarak boyama çözeltisine konuldu ve çalkalayıcıda bekletildi. Jel boyama çözeltisinde boyandıktan sonra çıkarılarak yıkamak için hazırlanmış olan yıkama çözeltisine konuldu ve protein bantları belirginleşene kadar çalkalayıcıda yıkanan jel çıkarılarak fotoğrafı çekildi. (Çoban *et al.* 2008; Göçer 2014).

Ayırma jeli şöyle hazırlandı: 5 ml 1 M Tris-HCl pH=8,8, 4,4 ml %30'luk akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,2 ml %0,1'lik SDS, 0,13 ml %5'lik TEMED (N,N, N',N'-Tetrametil etilen diamin) ve 3,13 ml saf su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine en son olarak 0,27 ml %5'lik PER [amonyum persülfat, (NH₄)₂S₂O₈] eklendi.

Yığma jeli şöyle hazırlandı: 0,41 ml 1 M Tris-HCl pH: 6,8, 0,44 ml %30'luk Akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,03 ml %0,1'lik SDS, 0,03 ml %5'lik TEMED ve 2,45 ml saf su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine en son olarak 0,07 ml %5'lik PER eklendi.

3.8 Siraz (*C.umbra*) Karaciğer Dokusundan Saflaştırılan CA Enzimi ile İlgili Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları

3.8.1. Siraz (*C.umbra*) karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin alt birimlerinin molekül kütlelerinin SDS-PAGE ile tayini

Laemli (1970), metoduna göre molekül kütlesi tayini 5 farklı standart protein kullanıldı. her enzim için standart proteinlerin Rf değerleri hesaplanarak log MK-Rf grafikleri çizildi. Enzimin Rf değeri hesaplandı ve standart grafiğe yerleştirildi .CA enziminin log MK'sı hesaplandıktan sonra antilogaritması alınarak numunenin molekül ağırlıkları tespit edildi (Şekil 4.2, Şekil 4.3).

Proteinlerin R_f değerleri;

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

formülü ile belirlendi.

Bu formülde Xe: Proteinin yürüme mesafesi, Xboya: boyanın yürüme mesafesidir

3.8.2. Siraz (*C.umbra*) karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi için optimum pH'nın belirlenmesine yönelik çalışmalar

CA enziminin optimum pH'sını belirlemek için pH'sı 7.0-8.8 aralığında değişen 50mM Tris-SO₄ ve pH'sı 5.0-8.0 aralığında 50mM potasyum fosfat tampon çözeltilerinde karaciğer dokusundan izole edilmiş olan CA enziminin gösterdiği aktivite spektrofotometrik olarak ölçüldü. Sonuçlar çizelgelerde ve aktivite (%) -pH grafikleri halinde gösterildi.

3.8.3. Siraz (*C.umbla*) karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi için optimum iyonik şiddetin belirlenmesine yönelik çalışmalar

C.umbla Balığı karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin optimum aktivite gösterdiği iyonik şiddetin belirlenmesi amacıyla pH 7.4 Tris-SO₄ tamponu kullanılarak iyonik şiddeti 10mM ile 1000 mM olan çözeltiler hazırlandı .hazırlanmış olan çözeltiler ile esteraz aktivite ölçümleri yapıldı ve CA enzimleri için optimum iyonik şiddet 0,02M Tris-SO₄ olarak belirlendi . Bulunmuş olan sonuçlar çizelgelerde ve aktivite-konsantrasyon grafikleri halinde gösterildi.

3.8.4. Siraz (*C.umbla*) karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi için optimum sıcaklığın belirlenmesine yönelik çalışmalar

C.umbla Balığı karaciğer dokusundan saflaştırılan enziminin optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla 5°C ile 50°C (5°C aralıklarla) sıcaklığı arasında bulunan su banyosu kullanılarak aktivite ölçümü yapıldı. (100 ml 50mM pH 7.4 Tris SO₄ tamponu kullanıldı)

3.8.5. Siraz (*C.umbla*) karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi için stabil pH bulunmasına yönelik çalışmalar

Enzimin stabil olduğu pH'yı tespit etmek için pH'ları 7.0-8.8 aralığında değişen Tris SO₄ tamponları kullanıldı. Belirtilen pH'lardaki tampon çözeltilerinin içine bir ml enzim çözeltisi karıştırılarak +4°C 'de saklandı. Beş gün boyunca birer gün aralıklarla aktivite ölçümü yapıldığında enzimin stabil olduğu pH değeri tespit edildi.

3.8.6. Cu^{+2} , Mn^{+3} , Ba^{+2} , Se^{-2} iyonlarının ve aldrin, dieldrin, endosülfan, hexachlorbenzene, alpha-HCH pestisitlerin CA enziminin aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi

Metal iyonlarının inhibisyon üzerine etkisini değerlendirmek için ilk olarak metallerin Cu_2SO_4 , SeO_2 , MnCl_2 , BaCl_2 stok çözeltileri hazırlandı.

Beş farklı derişimdeki aktiviteleri ölçüldü. İnhibisyon olmayan koşuldaki aktivite değeri %100 olarak kabul edildi ve inhibitör bulunan ortamlarda aktiviteler bağıl yüzde olarak hesaplandı. İnhibitör konsantrasyonuna karşı gelen aktivite yüzdelerinin grafikleri çizildi. Enzim aktivitesini yarıya indiren inhibitör konsantrasyonları olan IC_{50} değerleri hesaplandı (Keha ve Küfrevioğlu 2014) .

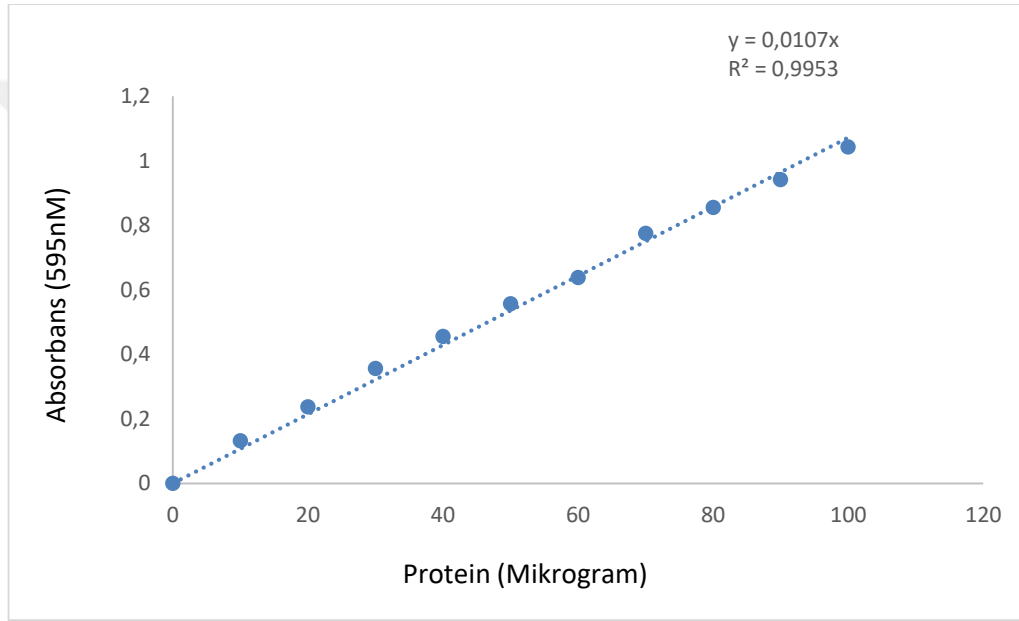
İnhibisyona neden olan iyonların K_i sabitlerini belirlemek amacıyla Cheng prosof denkleminde yararlanılarak K_i sabitleri hesaplandı. (Keha ve Küfrevioğlu 2012)

$$K_i = \frac{\text{IC}_{50}}{1 + [S] / K_M}$$

4.ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Protein (Kantitatif) Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

Bradford yöntemiyle enzim çözeltilerindeki protein tayini yapıldı. Standart grafik bölüm 3.7.'de anlatıldığı gibi hazırlandı. Homojenat ve afinite kromatografisi sonucu elde edilen enzim çözeltilerindeki protein tayini bu standart grafikten faydalanılarak bulundu. Standart çözeltilerin µg proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 4.1'de gösterildi.



Şekil 4.1 Coomassie Brilliant Blue yöntemi ile sığır serum albümini kullanılarak protein tayini için hazırlanan standart grafik

4.2. Siraz (*C.umbra*) Karaciğer Dokusu CA Enziminin Saflaştırılması Sonuçları

4.2.1. Afinité kromatografisi sonuçları

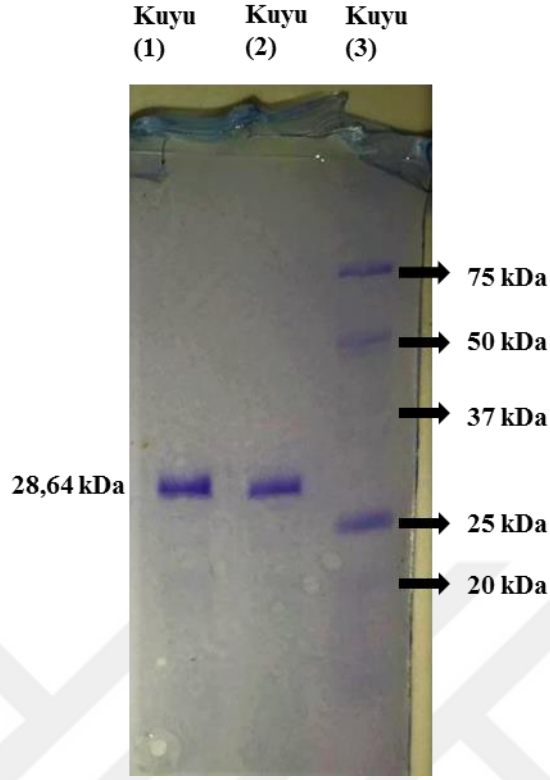
Hazırlanan homojenat dengelenen Sepharose 4B-L-tirozin sülfanilamid afinité kolonuna yüklendi. Kolon uygun tamponla yıkandı ve enzim elüsyon yapılarak 2026.32 EÜ/mg spesifik aktiviteyle % 59.97 verimle 212.40 kat saflaştırıldı. Saflaştırma basamakları Çizelge 4.1 'de gösterildi.

Çizelge 4.1. CA enziminin saflaştırma basamakları

Saflaştırma Basamakları	Toplam hacim (ml)	Aktivite (EÜ/ml)	Protein (mg/ml)	Toplam protein (mg)	Toplam aktivite (EU)	Spesifik aktivite (EÜ/mg)	Saflaştırma katsayısı	% verim
Homojenat	30	428	44.85	1345.50	12840	9.54	1	100
Sepharose-4B-L tyrosine-sulfanilamide affinite jel kromotografisi	5	1540	0.76	3.80	7700	2026.32	212.40	59.97

4.2.2. Siraz (*C.umbla*) karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin SDS-PAGE ile saflık kontrolü

Bu amaçla bölüm 3.7.1.'de izah edilen elektroforez prensbine uygun olarak hazırlandı. Enzim numuneleri kurulan sistemde sırayla kuyucuklara yüklendi ve yürütüldü. Çalışılmış olan bantlar fotoğraflandı ve fotoğraf Şekil 4.2.te verildi.

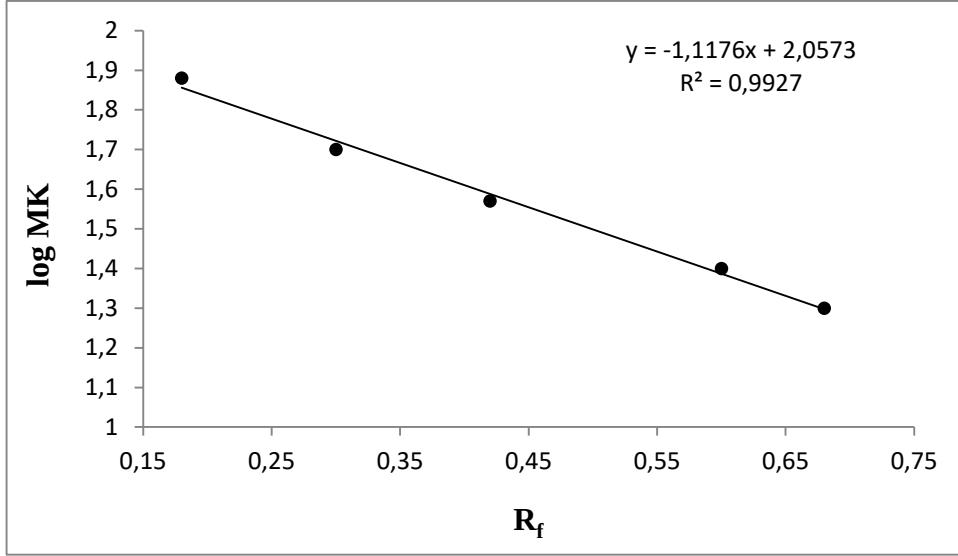


Şekil 4.2. Afinite kromatografisi ile saflaştırılan karbonik anhidraz enziminin SDS-poliakrilamit jel elektroforezi fotoğrafı

4.3. Siraz (*C.umbra*) Karaciğer Dokusundan Saflaştırılan CA Enziminin Karakterizasyon Çalışmalarının Sonuçları

4.3.1. Siraz (*C.umbra*) karaciğer CA enziminin alt birimlerinin SDS-PAGE ile molekül kütlesinin belirlenmesi sonuçları

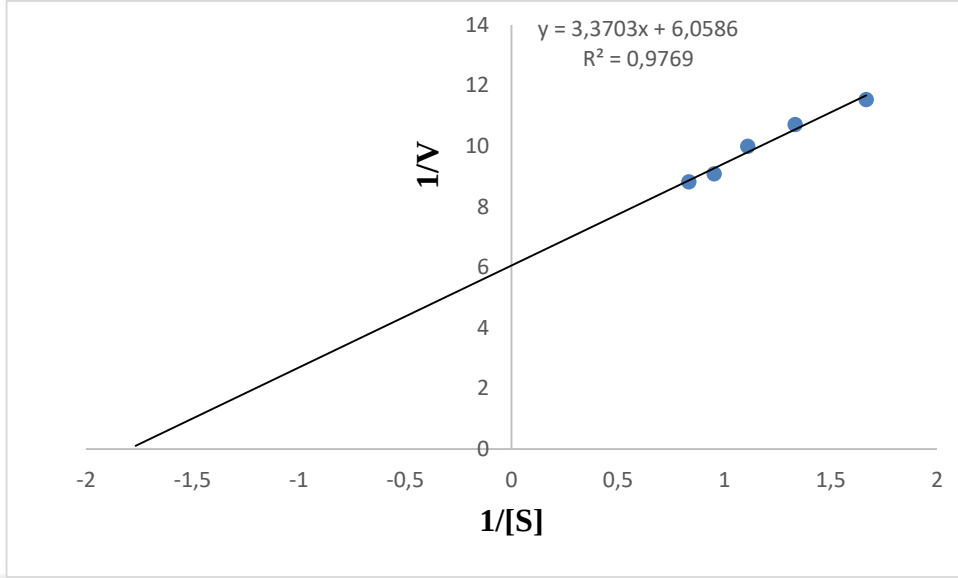
Afinite kolonundan alınan enzim elektroforez yürütülmesinden sonra standart proteinlerin ve enzim numunesinin bulunduğu jelin fotoğrafı çekildi (Şekil 4.2). Enzimin ve standartların jelde yürüdükleri mesafeler ölçümü ile R_f değerleri hesaplandı. R_f değerleri-log MK grafiği çizildi (Şekil 4.3). Molekül ağırlığı ise yaklaşık 28,64 kDa olarak hesaplandı.



Şekil 4.3.SDS-PAGE sonucu çizilen R_f - log MK grafiği

4.3.2 p-nitrofenilasetat substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesine yönelik sonuçlar

Siraz (*C.umbla*) karaciğer CA enziminin substratı için K_M ve V_{max} değerlerini belirlemek amacıyla sabit CA konsantrasyonunda PNF'nin 5 farklı konsantrasyonlarıyla aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen değerlerle 1/[PNF]-1/V Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Bu grafikten yararlanarak PNF için K_M ve V_{max} değerleri belirlendi. Yapılan çalışmalar neticesinde PNF için K_M değeri 0,556 mM ve V_{max} değeri 0,165 EÜ/ml olarak tespit edildi. Aktivite ölçümleri optimal şartlarda gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.4 te gösterildi.



Şekil 4.4. Siraz (*C.umbla*) karaciğer dokusu CA enziminin PNF substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin bulunmasına yönelik çalışma sonuçları

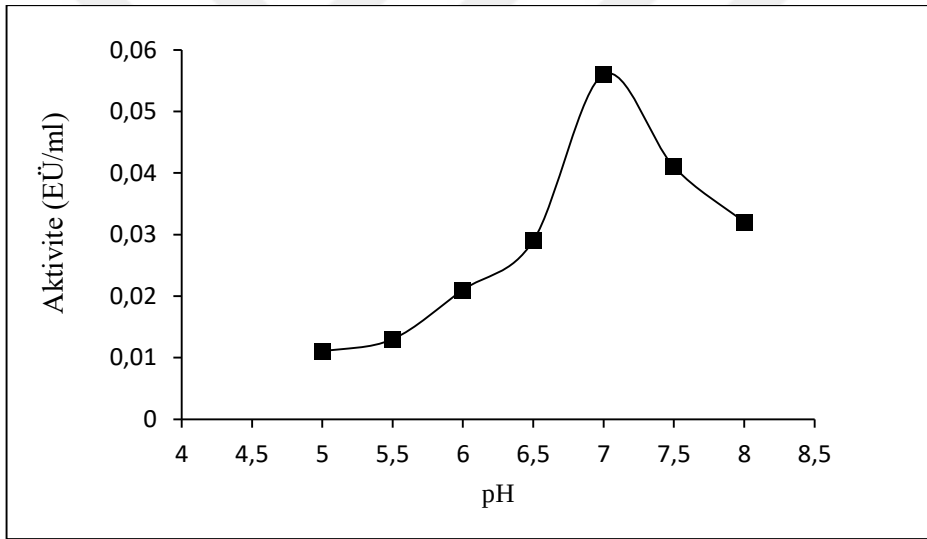
4.3.3. CA Enzimi için optimum pH bulunmasına yönelik sonuçlar

KH₂PO₄ tamponu için optimum pH çalışması

Siraz (*C.umbla*) karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin optimum pH'sını tespiti için pH değeri 5.0 ile 8.0 arasında değişen, K-Fosfat tamponlardan oluşan 7 adet çözelti kullanıldı. Enzim aktiviteleri hesaplanması için, enzimin ayrı ayrı her bir tampondaki absorbans değerleri spektrofotometri cihazında okundu. Enzimin optimum pH değeri 7 olarak bulundu.

Çizelge 4.2 Siraz (*C.umbra*) karaciğer CA enziminin optimum pH'sını belirlemek için fosfat tamponu aktivite ölçüm sonuçları.

pH	Aktivite (EÜ/ml)
5.0	0.011
5.5	0.013
6.0	0.021
6.5	0.029
7.0	0.056
7.5	0.041
8.0	0.032



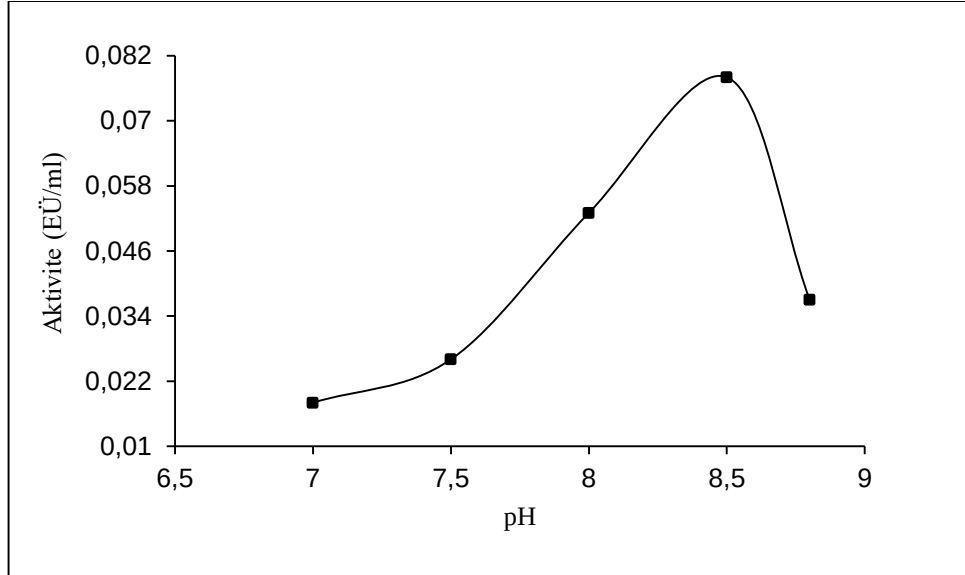
Şekil 4.5. Siraz (*C.umbra*) karaciğer CA enzimi için yapılan optimum pH çalışmasının sonucuna yönelik pH-Aktivite grafiği

Tris-SO₄ için optimum pH çalışması

CA enziminin optimum pH'sını tespiti için pH değeri 7.0 ile 8.8 arasında değişen, Tris SO₄ tamponlardan oluşan 5 adet çözelti kullanıldı. Enzimin her bir tampondaki absorbans değerleri spektrofotometrik olarak ölçülerek enzim aktiviteleri hesaplandı ve saflaştırılan enzimin optimum pH değeri 8.5 olarak bulundu.

Çizelge 4.3. Siraz (*C.umbla*) karaciğer CA enziminin optimum pH'sını belirlemek için Tris SO₄ tamponu aktivite ölçüm sonuçları.

pH	Aktivite (EÜ/ml)
7.0	0.018
7.5	0.026
8.0	0.053
8.5	0.078
8.8	0.037



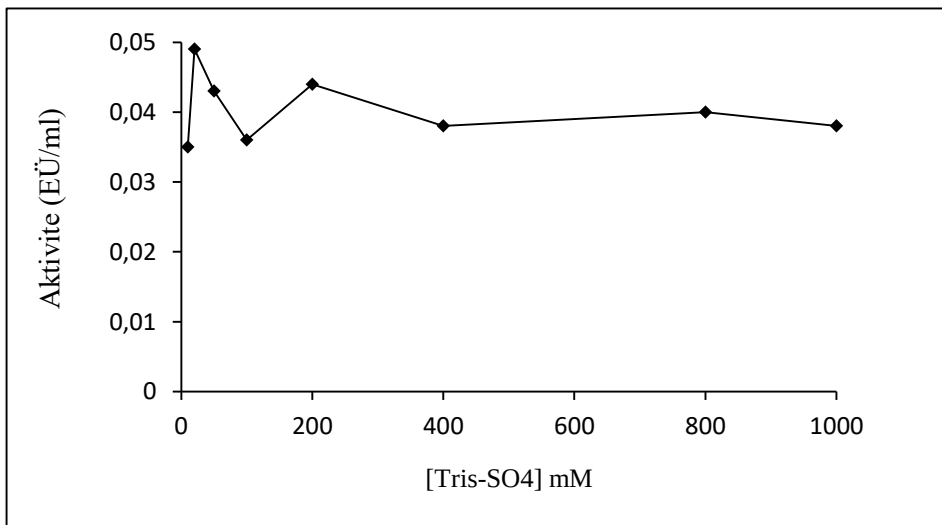
Şekil 4.6 Siraz (*C.umbla*) karaciğer CA enzimi için yapılan optimum pH çalışmasının sonucuna yönelik pH-Aktivite grafiği

4.3.4. CA enziminin optimum iyonik şiddetinin belirlenmesine yönelik sonuçlar

C.umbra balığı karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin optimum aktivite gösterdiği iyonik şiddet belirlenmesi amacıyla pH 7.4 Tris-SO₄ tamponu kullanılarak 10 mM ile 1000 mM arasında iyonik şiddete sahip çözeltiler ile ölçümler yapıldı. Sonuçlar Şekil 4.7 de gösterildi.

Çizelge 4.4. Siraz (*C.umbra*) karaciğer CA enziminin optimum iyonik şiddeti belirlemek için Tris SO₄ tamponu aktivite ölçüm sonuçları.

Tris SO ₄ (mM)	Aktivite (EÜ/ml)
10	0.035
20	0.049
50	0.043
100	0.036
200	0.044
400	0.038
800	0.040
1000	0.038



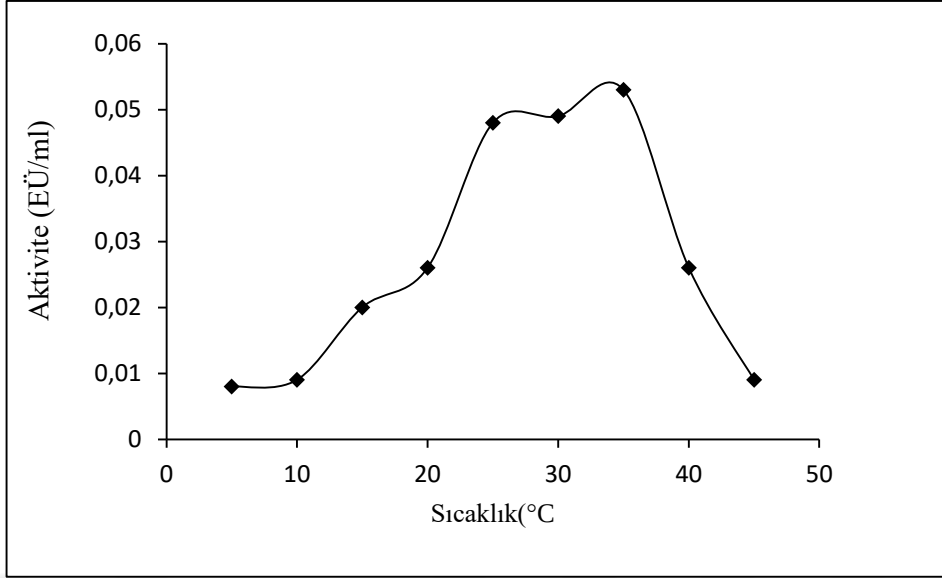
Şekil 4.7. Siraz (*C.umbra*) karaciğer CA enzimi için yapılan iyonik şiddet çalışmasının sonucuna yönelik iyonik şiddet-aktivite grafiği

4.3.5 CA enziminin optimum sıcaklığın belirlenmesine yönelik sonuçlar

Optimum sıcaklığını belirlemek üzere uygun pH ve iyonik şiddete sahip Tris SO₄ (pH 7.4) tamponu kullanıldı. 5°C ile 45°C arasında her 5°C’de bir olmak üzere aktivite ölçümleri yapıldı. Ölçümler sonucu optimum sıcaklık 35°C olarak tespit edildi.

Çizelge 4.5. Siraz (*C. umbla*) karaciğer CA enziminin optimum sıcaklığı için aktivite ölçüm sonuçları

Sıcaklık (°C)	Aktivite (EÜ/ml)
0	0.008
5	0.009
10	0.013
15	0.020
20	0.026
25	0.048
30	0.049
35	0.053
40	0.026
45	0.009



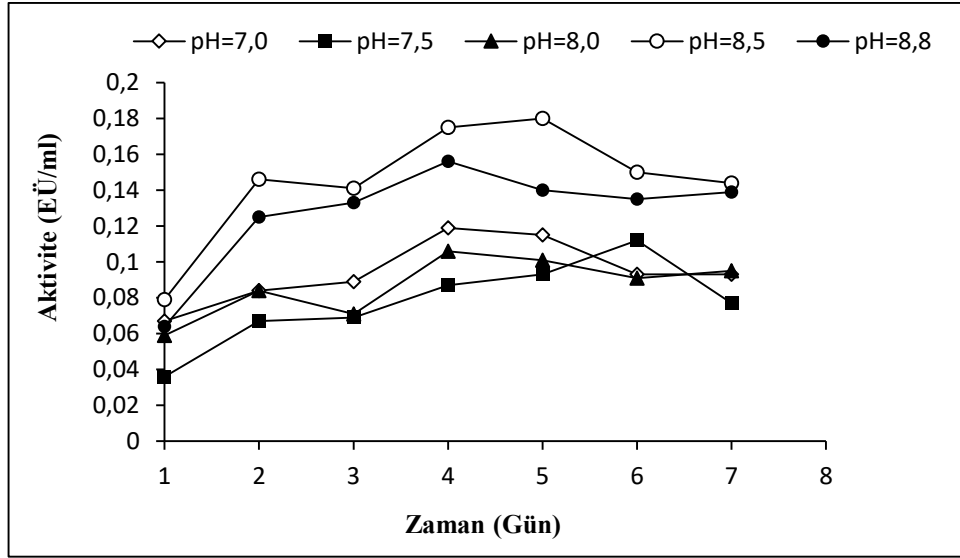
Şekil 4.8. Siraz (*C. umbla*) karaciğer CA enzimi için yapılan optimum sıcaklık çalışmasının sonucuna yönelik için sıcaklık- aktivite ölçüm sonuçları gösteren grafik

4.4. Siraz (*Capoeta umbla*) Karaciğer Dokusundan Saflaştırılan CA enzimi için Stabil pH Bulunmasına Yönelik Sonuçlar

C. umbla Balığı karaciğer dokusundan saflaştırılan, CA enziminin stabil olduğu pH'yı belirlemek için optimum iyonik şiddete sahip 7 ile 8.8 arasında farklı pH değerlerine sahip Tris SO₄ tamponları hazırlandı. Saf enzim ile tampon karıştırılarak bir hafta boyunca her gün olmak üzere aktivite ölçümleri yapıldı. Her bir çözelti ile ölçülen aktivite değerleri belirlendi CA enziminin stabil pH değeri pH: 7.0 olarak belirlendi.

Çizelge 4.6. Siraz (*C. umbla*) karaciğer CA enzimi için yapılan stabil pH çalışmasının sonuçları (EU)

Zaman(gün)	1	2	3	4	5	6	7
pH 7.0	0.067	0.084	0.089	0.119	0.115	0.093	0.093
pH 7.5	0.079	0.146	0.141	0.175	0.128	0.15	0.135
pH 8.0	0.059	0.084	0.071	0.106	0.101	0.091	0.095
pH 8.5	0.036	0.067	0.069	0.087	0.093	0.082	0.077
pH 8.8	0.064	0.125	0.133	0.156	0.14	0.135	0.139



Şekil 4.9. Değişik pH'lardaki Tris SO₄ tampon çözeltisi kullanılarak *C. umbla* balığı karaciğer CA enzimi için elde edilen stabil pH-zaman grafiği.

4.5. Siraz (*Capoeta umbla*) Karaciğer Dokusundan Saflaştırılan CAenzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren metal iyonları için IC₅₀ ve K_i değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışmaların sonuçları

Çalışılan ağır metallerin CA enzimi üzerine inhibisyon etkisinin gösterilmesine yönelik; 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümleri yapıldı.

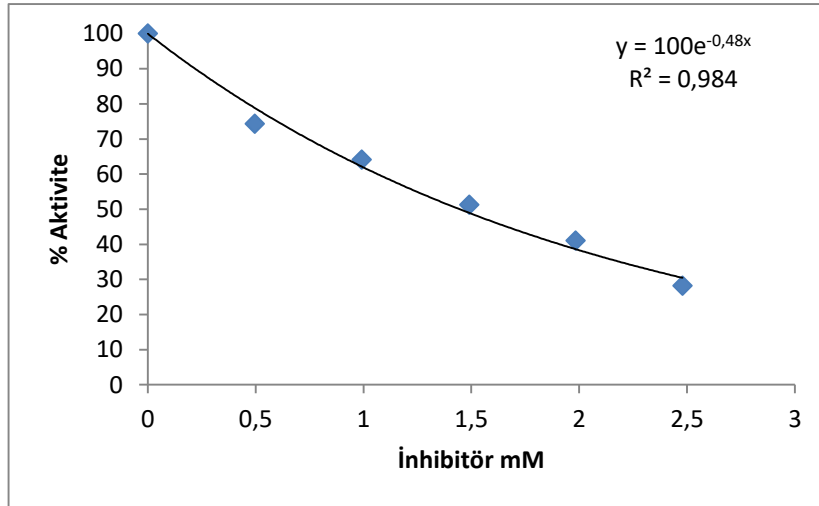
Çizelge 4.7. Siraz (*Capoeta umbla*) karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin esterase aktivitesi üzerine metal iyonları ile yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen IC₅₀ ve K_i değerleri

Kimyasal Madde	IC ₅₀ (mM)	K _i Değerleri (mM)
Cu ⁺²	2.30	0.822
Se ⁻²	1.45	0.518
Ba ⁺²	1.94	0.693
Mn ⁺²	3.89	1.390

4.6 Siraz (*Capoeta umbla*) Karaciğer Dokusundan Saflaştırılan CA Enzimi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkilerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışma Sonuçları

Çizelge 4.8. Se^{-2} iyonunun Siraz (*Capoeta umbla*) Karaciğer Dokusu CA enzimi üzerine etkisi

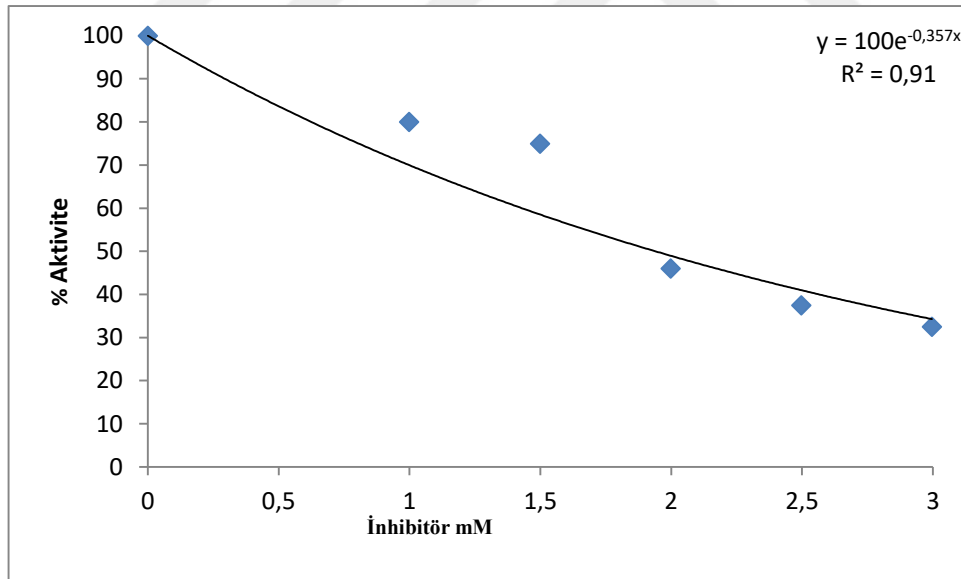
Konsantrasyon mM	% Aktivite
0.00	100
0.5	74.36
1.0	64.1
1.5	51.28
2.0	41.08
2.5	28.21



Şekil 4.10 *C. umbla* karaciğer CA enzimi ile farklı konsantrasyonlarda çalışılan SeO_2 elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği

Çizelge 4.9. Ba^{+2} iyonunun Siraz (*Capoeta umbla*) Karaciğer Dokusu CA enzimi üzerine etkisi

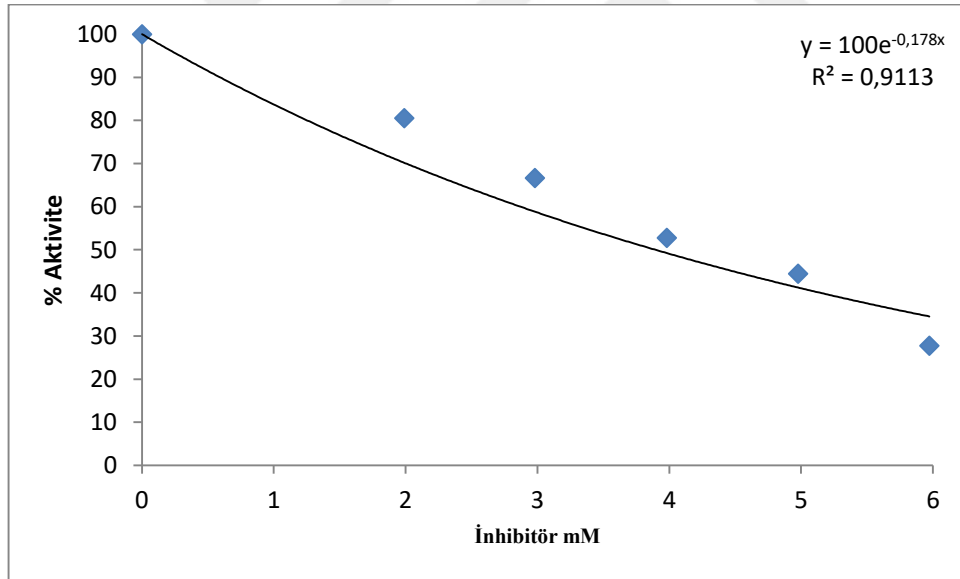
Konsantrasyon mM	% Aktivite
0.00	100
1.0	80
1.5	75
2.0	46
2.5	37.5
3.0	32.5



Şekil 4.11 *C. umbla* karaciğer CA enzimi ile farklı konsantrasyonlarda çalışılan $BaCl_2$ elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği

Çizelge 4.10. Mn^{+3} iyonunun Siraz (*Capoeta umbla*) Karaciğer Dokusu CA enzimi üzerine etkisi

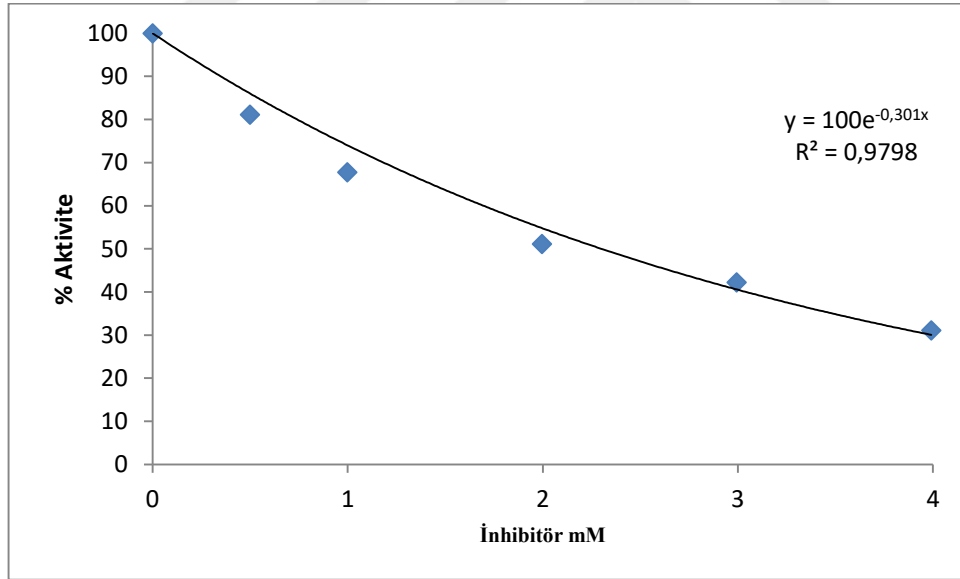
Konsantrasyon mM	% Aktivite
0,00	100
2.0	80.56
3.0	66.67
4.0	52.78
5.0	44.45
6.0	27.78



Şekil 4.12 *C. umbla* karaciğer CA enzimi ile farklı konsantrasyonlarda çalışılan $MnCl_2$ elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği

Çizelge 4.11. Cu^{+2} iyonunun Siraz (*Capoeta umbla*) Karaciğer Dokusu CA enzimi üzerine etkisi

Konsantrasyon mM	% Aktivite
0.00	100
0.5	81.11
1.0	67.78
2.0	51.11
3.0	42.22
4.0	31.11



Şekil 4.13. *C. umbla* karaciğer CA enzimi ile farklı konsantrasyonlarda çalışılan CuSO_4 elde edilen % Aktivite-[Metal] grafiği

4.7. Siraz (*Capoeta umbla*) Karaciğer Dokusundan Saflaştırılan CA enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren bazı pestisitler için IC₅₀ ve K_i değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışmaların sonuçları

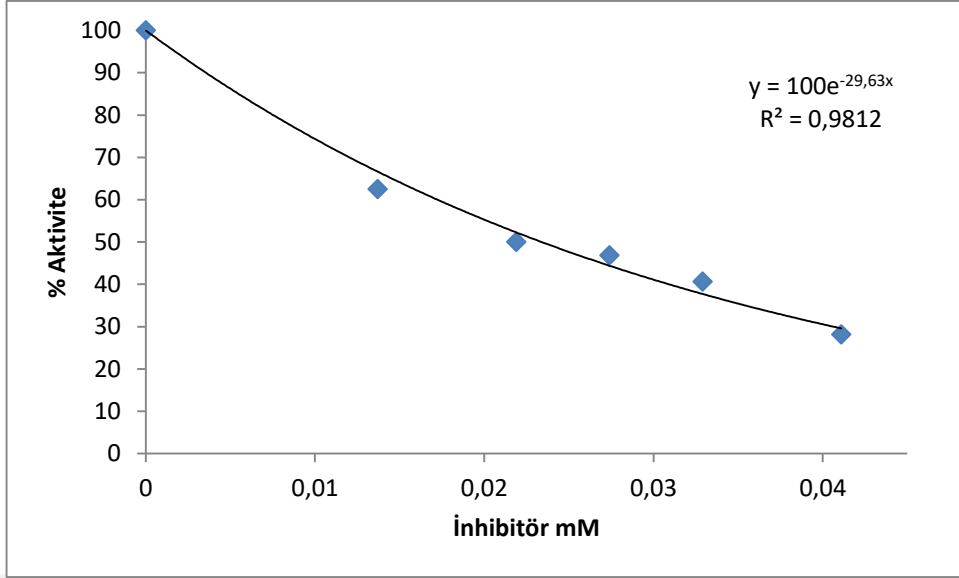
Çizelge 4.12. Siraz (*Capoeta umbla*) karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enziminin esteraz aktivitesi üzerine pestisitler ile yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen IC₅₀ ve K_i değerleri

Pestisit	IC ₅₀ (mM)	K _i Değerleri (mM)
Aldrin	0.0234	0.0084
Dieldrin	0.0261	0.0094
Endosülfan	0.0244	0.0087
Hexachlorbenzen	0.0216	0.0077
α-HCH	0.0744	0.0266

4.8. Siraz (*Capoeta umbla*) Karaciğer Dokusundan Saflaştırılan CA enzimi Üzerine Bazı Pestisitlerin Etkilerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışma Sonuçları

Çizelge 4.13. Aldrin pestisitinin Siraz (*Capoeta umbla*) Karaciğer Dokusu CA enzimi üzerine etkisi

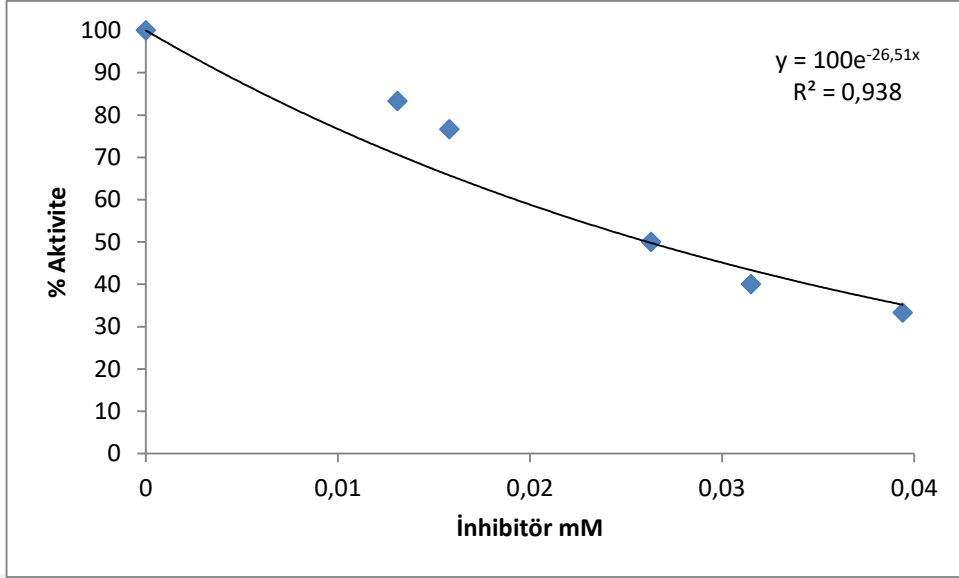
Konsantrasyon mM	% Aktivite
0.00	100
0.013	62.5
0.021	52
0.027	46.88
0.033	40.63
0.041	28.13



Şekil 4.14 CA enzimi aktivitesi üzerine aldrin pestisitinin inhibisyon etkisini gösteren IC₅₀ grafiği.

Çizelge 4.14. Dieldrin pestisitinin Siraz (*Capoeta umbla*) Karaciğer Dokusu CA enzimi üzerine etkisi

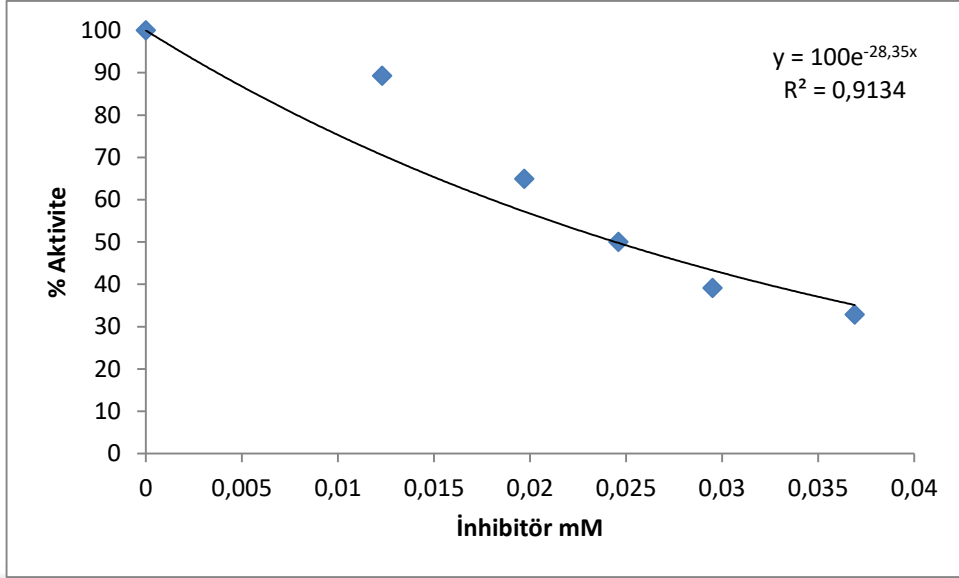
Konsantrasyon mM	% Aktivite
0.00	100
0.013	88.33
0.015	76.67
0.026	50
0.031	40
0.039	33.33



Şekil 4.15 CA enzimi aktivitesi üzerine dieldrin pestisitinin inhibisyon etkisini gösteren IC₅₀ grafiği.

Çizelge 4.15. Endosülfan pestisitinin Siraz (*Capoeta umbla*) Karaciğer Dokusu CA enzimi üzerine etkisi

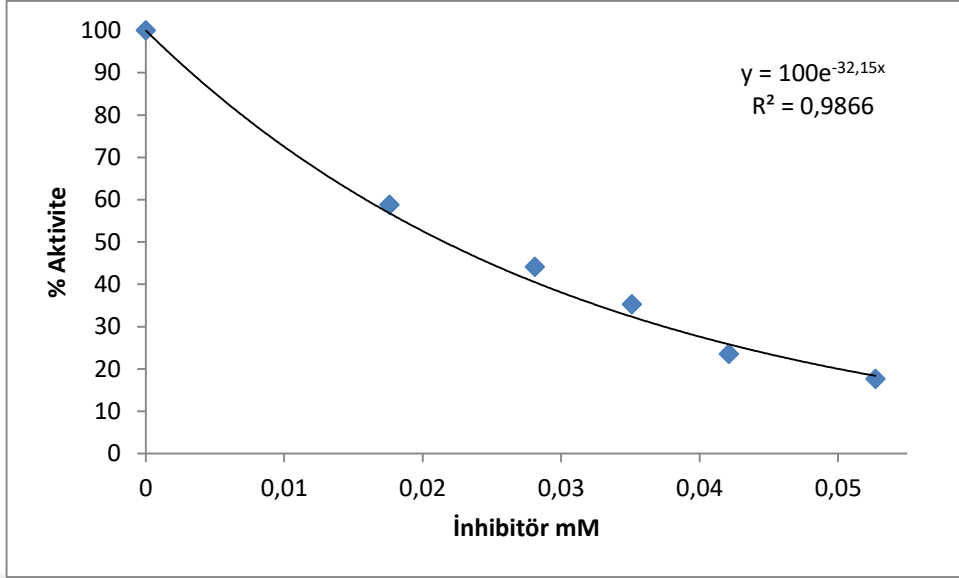
Konsantrasyon mM	% Aktivite
0.00	100
0.012	89.29
0.019	64.9
0.024	50
0.029	39.14
0.036	32.85



Şekil 4.16. CA enzimi aktivitesi üzerine endosülfan pestisitinin inhibisyon etkisini gösteren IC₅₀ grafiği.

Çizelge 4.16. Hexachlorbenzen pestisitinin Siraz (*Capoeta umbla*) Karaciğer Dokusu CA enzimi üzerine etkisi

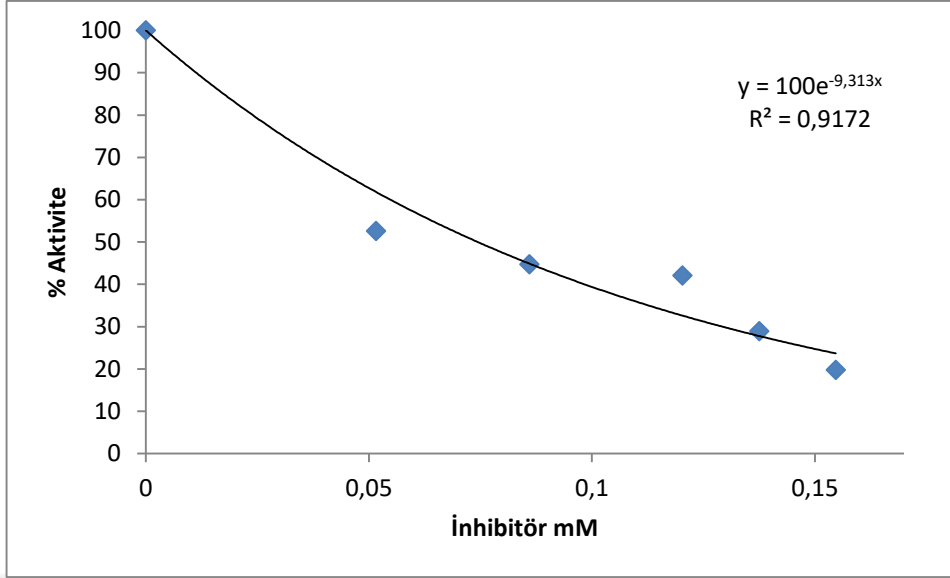
Konsantrasyon mM	% Aktivite
0.00	100
0.017	58.82
0.028	44.12
0.035	35.29
0.042	53.23
0.053	17.65



Şekil 4.17. CA enzimi aktivitesi üzerine hexachlorbenzen pestisitinin inhibisyon etkisini gösteren IC₅₀ grafiği

Çizelge 4.17. α-HCH pestisitinin Siraz (*Capoeta umbla*) Karaciğer Dokusu CA enzimi üzerine etkisi

Konsantrasyon mM	% Aktivite
0.00	100
0.050	52.63
0.086	44.74
0.120	42.11
0.137	28.95
0.154	19.79



Şekil 4.18. CA enzimi aktivitesi üzerine α -HCH pestisitinin inhibisyon etkisini gösteren IC_{50} grafiği.

5.TARTIŞMA-SONUÇ

Tüm canlı hücrelerde başarılı bir biyokimyasal akış için CO₂ ve HCO₃ arasındaki dönüşüm esastır. Karbonik anhidraz enzimi (CA karbonik hidroliyaz E.C 4.2.1.1) bikarbonat ve proton elde etmek için karbondioksitin dehidratasyonunu dönüşümlü olarak iki aşamalı reaksiyonla katalizler. Memeli hücrelerin CA'ları α -ailesine aittir ve bunlar aktif bölgesi içindeki iki değerli bir çinko iyonu varlığıyla karakterize edilir (Chiaramonte *et al* 2018).

Karbonik anhidraz enzimi solunum, iyon dengesi, karbondioksit transferi, üreagenesis, glukoneogenez, lipogenez olaylarında rol almalarının yanında kemik erimesi, kireçlenme, tümör oluşumu ve diğer patolojik ve fizyolojik işlemlerde de rol aldıkları açıklanmıştır canlı organizmaların farklı dokularında bulunan önemli bir enzimdir (Balaydın *et al.* 2012).

Memelilerde α -CA enziminin bugüne kadar bildirilen 16 tane izoenzimi vardır ve araştırmalar daha fazla izoenziminin olabileceğini göstermektedir (Esbaugh ve Tufts, 2007). Bu izoenzimlerden CA I, II, III, VII ve XIII sitozolik, CA IV, IX, XII ve XIV membrana bağlı, CA VA ve VB mitokondriyaldir ve CA VI tükürükte salgılanır (Supuran 2008).

Enzim ve izoenzimleri çok farklı dokudan saflaştırılmış ve çeşitli ilaçların, metallerin ve pestisitlerin enzim aktivitesi üzerine etkileri araştırılmıştır. Özellikle insanda birçok hastalığın tedavisinde CA izoenzimlerinin inhibisyonu kullanılmaktadır. Bu sebeple CA enzimi çoğu ilacın hedefidir (Demirdağ 2012).

Kornea, göz lensi ve silyer epitelyumda çok sayıda HCA-I ve HCA-IV izoenzimleri bulunmaktadır. Bu dokularda bulunan izoenzimlerin etki mekanizmaları, glokom hastalığının tedavisi için yürütülen araştırmalar sonucu ortaya çıkarılmıştır. Tükürük bezinde HCA-VI ve HCA-VII izoenzimleri vardır. Tükürük bezlerinden salgılanan HCA-VI izoenzimi, insan tükürüğünden izole edilmiş olup, tükürüğün pH dengesini sağladığına inanılmaktadır (Özensoy 2006).

CA-IX ve CA-XII izoenzimlerinin kanserle ilişkili olduğu tespit edilmiştir. CA-IX membran bağlı izoenzimi normal hücrelerde aktivite göstermez; kanserli hücrelerde

eksprese olan tümör ilişkili karbonik anhidraz izoenzimidir. Potansiyel bir kanser biomarkeri olarak önemlidir (Kivela 2003).

CA inhibitörlerine hastalıkların tedavisinde ve teşhisinde önemli ölçüde gereksinim duyulması, glokom hastalığı tedavisi için CA enzimi üzerinde yapılan inhibisyon çalışmaları sonucu ortaya çıkarılmıştır. Bu çalışmalarda hem CA enziminin kataliz mekanizmaları aydınlatılmış hem de bu enzimin organizmadaki dağılımı ve yaşamsal fonksiyonlarına dikkat çekilmiştir. Bu doğrultuda CA enziminin aktivatörlerinin ve inhibitörleri sentezlenmesi hızlandırılmıştır. Ardısıra sentezlenen inhibitörler başta glokom tedavisinde ilaç, antitümör, antiülser, ağrı kesici, epilepsi ve diğer nörolojik hastalıklara ilaç, pozitron emisyon tomografisi (PET) ve manyetik rezonans belirlenmesinde (MRI) diagnostik teşhis materyali, diüretik ilaçların yapımında ve antibiyotik olarak da kliniklerde kullanılmaktadır. (Özensoy 2006)

Karbonik anhidraz tüm omurgalılar olduğu gibi balıklarda da, metabolizma sonucu oluşan CO₂'nin taşınmasında ve atılmasında kritik önem arz eden bir enzimdir. Tüm canlılar için hayati bir önemi vardır. Ayrıca her canlı ve dokuda farklı izoenzimlere, farklı kinetik özelliklere sahiptir. Enzimin canlı organizmada nerelerde ve hangi şekilde lokalize olduğu ve nasıl fonksiyon gösterdiğini belirlemek için birçok canlı türünde ve dokularında ayrı ayrı CA' nın saflaştırılıp karakterizasyonu üzerine binlerce çalışma bulunmaktadır. Ancak *Capoeta umbla* balığı karaciğer dokularında bugüne kadar CA enziminin saflaştırılması ve karakterize edilmesi üzerine çalışmaya rastlanılmamaktadır.

Bu çalışma kapsamında Siraz (*Capoeta umbla*) türünden CA enzimi afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırılması, karakterizasyonu ve enzim aktivitesi üzerine bazı metallerin ve bazı pestisitlerin etkileri belirlenmeye çalışılmıştır. Afinite kromatografisi bağlanma afinitesine dayalı bir yöntemdir. Kolondaki boncuklar ligand-protein gibi bir makromoleküle bağlanan bir grup ya da molekül- adı verilen kovalent bağlı bir kimyasal gruba sahiptirler. Bir protein karışımı kolona eklendiğinde, bu liganda afinitesi olan protein boncuklara bağlanır ve böylece bu proteinin matrix boyunca göçü gecikir.(Leninger 2013) Bunun için Sepharose 4B sülfanil amid L tirozin afinite kolonu tercih edilmiştir.

CA enziminin canlılar için önemli reaksiyonlarda görev alması ve karaciğer dokusunun ağır metallerin detoksifikasyonunda önemli bir role sahip olmasından dolayı bu dokuyu tercih ettik. Bu amaçla deneylerimizde kullanılan balıklar Ağrı ili Tutak ilçesi Murat Nehrinden yakalanıp canlı olarak soğuk zincir kurallarına göre Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarına getirilmiş ve balıkların karaciğerleri ayrıldıktan sonra küçük parçalara ayrılarak homojenizasyon yöntemlerinden en etkili olan sıvı azot ile parçalanmıştır.

Tülbentle süzildükten sonra hazırlanan homojenat uygun tampon içerisine alınıp 12000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj ile çöktürülen hücre atıkları atılarak süzüntü, dengelenen afinite kolonuna yüklenerek enzimin saflaştırılması gerçekleştirilmiştir.

Afinite kromatografisi ile yapılan saflaştırma işlemleri sonucunda Siraz (*Capoeta umbla*) karaciğer dokusundan CA spesifik aktivitesi 2026.32 (EÜ/mg protein) olan, % 59.97 verimle yaklaşık 212.40 kat saflaştırıldı.

Literatür incelememiz sonucu Küçük, 2015 yılında Sepharose-4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite kromatografisi kullanılarak Karadeniz alabalığı (*Salmo trutta Labrax*) böbrek, karaciğer, solungaç ve kas dokularından sırasıyla 603.77, 561.79, 1395.35 ve 297.03 EÜ/mg spesifik aktiviteleriyle birlikte, %35.5, 18.6, 71.1 ve 75.0 verimlerle, sırasıyla 349.00, 362.45, 1116.28 ve 471.47 kat karbonik anhidraz enzimini saflaştırdığı görülmüştür. Aynı afinite yöntemini kullanarak Kaya, 2011 yılında doktora çalışmasında Çipura balığının karaciğer, solungaç ve böbrek dokularından CA enzimini sırasıyla %9.1, %32.84 ve %83.6 verimle, 6775.5, 2872.92, 2685 EÜ/mg spesifik aktiviteleriyle saflaştırmış; saflaştırma kat sayıları sırasıyla yaklaşık 354, 84.1 ve 455 olarak bulmuştur. Koçyiğit 2014 yılında 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 388.9 141 kat saflaştırmıştır.

Saflaştırdığımız enzimin saflığını kontrol etmek amacı ile yapılan SDS-PAGE sonucu Karabalıkların karaciğer dokusundan elde edilen enzimler jelde tek bant görülmüştür. SDS-PAGE 'de molekül ağırlığı bilinen standart proteinler ile siraz karaciğer dokusundan elde edilen enzim numuneleri aynı anda yürütüldü. Elde edilen Rf

değerleri ile çizilen grafik yardımı ile karbonik anhidraz enzimi molekül ağırlığı 28,64 kDa olarak tespit edildi.

Söyler 2006 yılında Van kedisinin eritrositlerinden saflaştırdığı CA enzimi molekül kütlelerini 30 kDa olarak , Demirdağ vd. 2012 yılında koyun karaciğer dokusundan CA II izoenzimi molekül kütlelerini yaklaşık 29 kDa olarak , Söyüt ve Beydemir, 2008 yılında Gökkuşığı alabalığı karaciğeri CA enzimi molekül kütlelerini yaklaşık 29.4 kDa buldular. Başka bir çalışmada Demirdağ koyun böbrek dokusundan saflaştırdığı CA II ve CA IV izoenzimlerinin molekül kütlelerini sırasıyla 29 ve 32 kDa olarak, Kılınç 2011 yılında, koyun midyesinden CA I ve II izoenzimlerini saflaştırmış ve her iki izoenzim için molekül ağırlıklarını 26.7 kDa civarında bulmuşlardır.

Söyüt ve Beydemir, 2008 yılında Gökkuşığı alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) karaciğer dokusundan CA enzimini %38 verimle ve 2260 kat saflaştırmış, aynı balığın beyninden %22.5 verimle 1.280 kat saflaştırmışlardır. Yine 2010 yılında yaptıkları çalışmalarında ise Gökkuşığı alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) böbrek dokusundan CA enzimini %31.7 verim ile yaklaşık 1800 kat saflaştırmış ve enzimin spesifik aktivitesi 17285 EU/mg protein olarak hesaplamışlardır.

Arslan, 2013 yılında hamsi (*Engraulis encrasicolus*) ve mezgit (*Merlangius merlangus euxinus*) balıklarının solungaç dokularından karbonik anhidraz (CA) enzimlerini sırasıyla 1473, 2800 EU/mg spesifik aktiviteleriyle ve %26.3, %23.3 verimlerle Sepharose-4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırmış, saflaştırma kat sayıları sırasıyla yaklaşık 39.1 ve 191.8 olarak; molekül kütlelerini yaklaşık 25.1 kDa, mezgit için yaklaşık 29.5 kDa olarak bulmuştur.

Siraz (*Capoeta umbla*) karaciğer dokusundan elde ettiğimiz CA enzimi için yaptığımız karakterizasyon çalışmalarında; enzim reaksiyon hızlarına etki eden faktörler arasında sayılan pH, sıcaklık, iyonik şiddet ayrı ayrı çalışıldı. Karbonik anhidraz enziminin optimum pH' sını belirlemek için; 50 mM Tris-SO₄ ve 50 mM KH₂PO₄ tampon çözeltileri kullanılarak esterase aktivitelerine bakıldı. Siraz (*Capoeta umbla*) karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi için optimum Tris-SO₄ tamponu pH 8.5; optimum KH₂PO₄ tamponu pH: 7.0 olarak tespit edildi.

Literatürdeki CA enzimi kullanılarak yapılan çalışmalar bize, optimum pH genellikle pH:7.0 ile pH:9.0 aralığında olduğunu göstermiştir. Karahalil ,2009 Mersin balığı eritrositlerinden elde ettiği CA enziminin optimum pH'sını 9.0, Kaya ,2011 yılında Çipura balığı (*Sparus aurata*) solungaç dokusu için ise optimum pH:8.0 , Kaya vd., 2013 yılında aynı balığın karaciğer dokusundan saflaştırdığı CA enziminin optimum pH'sı 7.5 ,Ceyhun vd. 2011 yılında Avrupa levreğinin (*Dicentrarchus labrax*) karaciğer dokusundan elde edilen karbonik anhidraz enziminin optimum pH'sı 7.5 olarak , Kurbanoglu, 2015 yılında Kalkan balığı kas dokusu için optimum pH'sını 9.0 olarak tespit etmişlerdir. Burdan anlaşılabacağı üzere farklı türlerin farklı dokularından elde edilen aynı enzimin optimum pH'ları değişkenlik göstermektedir.

Siraz (*Capoeta umbla*) karaciğer dokusundan elde ettiğimiz CA enziminin optimum aktivite gösterdiği iyonik şiddetin belirlenmesi amacıyla pH 7.4 Tris-sülfat tamponu kullanılarak 0.01 M ile 1 M arasında iyonik şiddete sahip çözeltiler hazırlandı ve PNF substratı kullanılarak esteraz aktivite ölçümleri yapıldı. Karaciğer dokusundan elde ettiğimiz CA enzimi için optimum iyonik şiddet 0.02M Tris-SO₄ olarak tespit edildi. Farklı tür balıklarla yapılan çalışmalardan elde edilen optimum iyonik şiddet verileri sonucu; Söyüt , 2006 yılında Gökkuşığı Alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) böbrek, kas, beyin dokuları için 1 M Tris-SO₄, Koçyiğit, 2014 yılında Kargal balığı (*Garra rufa*) solungaç, kas ve göz dokuları için 1 M Tris-SO₄ olarak belirlemişken Karahalil, 2009 yılında Mersin balığı eritrositlerinden elde ettiği CA için 0.05 M Tris-SO₄ olarak tespit etmiştir.

Siraz (*Capoeta umbla*) karaciğer dokusundan elde ettiğimiz CA enzimin stabil olduğu pH'sı, 50 mM Tris-SO₄ (pH 7-9) tampon çözeltileri kullanılarak, enzimin gösterdiği aktiviteler 5 gün süresince 24 saat aralıkla spektrofotometrik olarak ölçülerek; stabil pH 7 olarak tespit edilmiştir. Yapılan diğer çalışmalar incelendiğinde; Koçyiğit, 2014 yılında Kargal balığı solungaç dokusu için stabil pH 8.5, Kurbanoglu, 2015 yılında Kalkan balığı (*Psetta maxima*) kas dokusundan için için stabil pH 8.0, Söyüt ,2006 yılında Gökkuşığı alabalığı karaciğer karbonik anhidraz enziminin stabil pH'sı 8.5 iken böbrek, kas ve beyin dokuları karbonik anhidraz enzimi stabil pH'sı 9.0, Beydemir vd. 2006 yılında aynı balığın göz lensi CA enziminin stabil pH'sı Tris-SO₄ tamponu pH:7.2 olarak tespit etmişlerdir. Yapılan çalışmalar neticesinde enzimin gösterdiği aktivitenin stabil olduğu pH aralıklarının değişkenlik gösterdiği

anlaşılmıştır.

Enzimlerin çalışmasını etkileyen faktörlerden biri de sıcaklıktır. Yaptığımız çalışmada CA enziminin en verimli çalıştığı sıcaklık derecesini belirlemek üzere optimum pH ve uygun iyonik şiddete sahip Tris SO₄ (pH 7.4) tamponunu kullanarak 5°C ile 45°C arasında her 5 °C’de bir olmak üzere aktiviteleri spektrofotometrik olarak ölçüldü. Bu çalışmalar sonucu optimum sıcaklık 35°C olarak tespit edildi. Söyüt 2006 , Gökkuşığı alabalığı beyin, karaciğer, böbrek, dokuları karbonik anhidraz enzimleri için optimum sıcaklığı 40°C olarak bulmuştur. Hisar 2002, Gökkuşığı alabalığı eritrositlerinde yaptığı çalışmada CA enziminin optimum sıcaklığının 25°C olarak tespit ederken Karahalil 2009 , Mersin balığı eritrositlerinden elde edilen karbonik anhidraz enziminin optimum sıcaklığı 30°C olarak bulmuştur. Kaya vd. 2013 yılında Çipura balığının (*Sparus aurata*) karaciğer dokusu karbonik anhidraz enziminin optimum sıcaklığı 50°C olarak belirlemişlerdir.

Enzimler protein yapısında olup, proteinler de amino asitlerin birbirine bağlanması ile oluşur. Proteinleri oluşturan amino asitlerden biri olan Sistein , -SH grubu ihtiva eder. Bu grup asidik yapı gösterir ve kolay reaksiyona girer. Örneğin ağır metallere maruz kalırsa merkaptanlar oluştururlar. Enzimin aktif ve katalitik bölgesinde bulunan sisteinlerdeki –SH grubu ile merkaptanlar oluşur ve enzim aktivitesini yitirir (Keha ve Küfrevioğlu 2015).

Dünya üzerindeki nüfus artışı, tarımda kimyasal kullanımı, endüstrileşme, deniz kanarlarında sanayi tesislerinin artışı, drenaj suları ve atık suların etkisiyle ağır metaller suya karışmakta ve sucul ortamlarda derişimleri artmaktadır (Koçyiğit 2014). Tarımsal ilaçlamaların ardından, drenaj suları, sulama sularına karışarak veya doğrudan suya yapılan uygulamalar sonucu da sucul ortamlara pestisitler tutulurlar. Suda eriyebilenle sucul ortamda kısa sürede dağılırken, granüllü olanlar suda kalarak aktif maddelerinin yayılmasına neden olurlar. Balıklar da solunum yolu ya da beslenmesi sonucu pestisitlerle zehirlenebilirler. Bu durum ölümle sonuçlanabileceği gibi, üremeyi engellemek, dokularda hasarlara neden olmak gibi balıklar üzerinde ciddi zararlara yol açarlar (Atamanalp ve Yanık 2001).

Ağır metal derişimi artan ortamlarda dokularda protein sentezinin değiştiği, bu değişimin metal bağlayıcı proteinlere bağlı olduğu bilinmektedir. Suların ağır metaller ve pestisitlerle kontaminasyonu ciddi bir çevresel sorundur.

Birçok ağır metalin, balıklar, yengeçler, sığırlar ve insanlar dahil çeşitli organizmalarda CA aktivitesini inhibe ettiği *in vitro* şartlarda gösterilmiştir Christensen ve Tucker'ın (1976) yaptıkları çalışma ile ilk kez balıklarda karbonik anhidraz enziminin ağır metallerle inhibisyonunu gösterdiler. Gökkuşağı alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) ile yapılan çalışmada balık dokularında CA enzimi bolluğu ile bilinen eritrositlerde, Cd^{+2} , Cu^{+2} , Ag^{+} , and Zn^{+2} gibi ağır metal katyonlarının *in vitro* olarak inhibisyon etkileri belirgin olarak ortaya koyulmuştur (Lionetto 2014).

Çalışmamızda inhibisyon etkilerini görmek için metal iyonları olarak. Cu^{+2} , Mn^{+3} , Ba^{+2} , Se^{-2} seçilmiştir. Siraz (*Capoeta umbla*) karaciğer dokusundan elde ettiğimiz CA enziminin aktivitesini yarıya indiren metal konsantrasyonları olarak bilinen IC_{50} değerleri belirlenmiş; çizilen grafikler yardımı ile sırasıyla 2.30mM, 3.89 mM, 1.94 mM, 1.45 mM olarak bulunmuştur. Yani IC_{50} değerleri $Se^{-2} < Ba^{+2} < Cu^{+2} < Mn^{+3}$ olarak sıralanmıştır.

Kırıcı vd. 2014 yılında *Capoeta umbla* ve *Capoeta trutta*'nın solungaç, karaciğer, böbrek dokularından glukoz 6-fosfat dehidrogenaz ile glutasyon redüktaz enzimini saflaştırmışlar ve bazı metallerin enzim aktivitesi üzerine etkilerini incelemişlerdir. *in vitro* olarak çalışılan bazı metallerin (Cu^{+2} , Zn^{+2} , Ni^{+2} , Cd^{+2} , Ag^{+} , Pb^{+2} , Fe^{+3} , Co^{+2}) inhibisyon etkileri sonucunda, Ag^{+} iyonunun tüm balık dokularında enzim aktiviteleri üzerine en etkili inhibisyonu gösterdiği belirlenmiştir.

Başka bir çalışmalarında Kırıcı vd. 2017 yılında *Capoeta trutta* balığının solungaç ve karaciğerinde glutasyon redüktaz enzimi üzerine bazı metal iyonlarının *in vitro* etkilerini araştırmışlar: Balığın solungaçlarında; $Ag^{+} > Co^{+2} > Zn^{+2} > Ni^{+2} > Pb^{+2}$. Balığın karaciğerinde ise inhibisyon sırası $Ag^{+} > Cu^{+2} > Co^{+2} > Pb^{+2} > Ni^{+2}$ olarak tespit etmişlerdir. .Bu sonuçlara bakılarak solungaç ve karaciğer dokularındaki en güçlü GR enzimi inhibitörünü gümüş metal iyonu olduğu gösterilmiştir.

Kırıcı vd. 2012 yılında *Capoeta umbla* balığından saflaştırdıkları solungaç sitoplazmik karbonik anhidraz enzimini üzerine bazı metallerin (Fe^{+3} , Cd^{+2} , Pb^{+2} ve Ni^{+2}) *in vitro* etkilerini incelemişlerdir. Fe^{+3} , Cd^{+2} , Pb^{+2} ve Ni^{+2} metallerinin, IC_{50} değerlerini

sırasıyla 0.136, 0.191, 0.289 ve 0.924 mM olarak bulmuşlardır. Sonuç olarak, Fe^{+3} iyonunun *C. umbla* solungaç karbonik anhidraz enzimi için güçlü bir inhibitör olduğu belirlenmiştir.

Tez çalışmamıza konu olan balık cinsi dışında incelenen çalışmalarda;

Koçyiğit 2014, Kangal balığı solungaç dokusu CA'sı IC_{50} değerini $Pb^{+2} < Fe^{+2} < Co^{+2} < Cd^{+2} < Cu^{+2}$; kas dokusu CA'sı için IC_{50} değerini $Pb^{+2} < Fe^{+2} < Co^{+2} < Cd^{+2}$ olarak göstermiştir.

Söyüt 2006, Gökkuşığı alabalığı karaciğer dokusu karbonik anhidraz enzimi üzerinde Co^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Ag^{+} ve Cd^{+2} ağır metal iyonları ile yapılan inhibisyon çalışması neticesi belirlenen IC_{50} değerleri sırasıyla 0.03, 30.00, 47.10, 0.01 ve 15.00 mM olarak; Kaya vd. 2013, Çipura balığı karaciğer dokusu karbonik anhidraz enzimi üzerinde Cd^{+2} , Cu^{+2} , Ni^{+2} ve Ag^{+} ağır metal iyonları için belirlenen IC_{50} değerleri sırasıyla 21.3, 69.6, 3.0 ve 0.0169 mM olarak tespit edilmiştir.

Yine Söyüt vd. 2008 yılında Gökkuşığı alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) beyin dokusundan saflaştırdıkları CA enzimi için bazı metallerin inhibitör etkisini araştırmış, *in vitro* şartlarda Cu^{+2} , Zn^{+2} , Ag^{+} Cd^{+2} için IC_{50} değerlerini sırası ile 0.05, 30, 0.31, 159, ve 82.5 mM olarak bulmuşlardır.

Balık türlerinden farklı canlılarda yapılan karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması ve inhibisyon çalışmalarına örnek verecek olursak;

Orhan 2017, koyun kalp dokusundan CA enzimi 900 EU/mg spesifik aktivite ve %46,15 verimle ve 51,93 kat saflaştırmış olup; koyun kalp CA izoenzimi için molekül kütlesi 31 kDa olarak belirlemiştir. Ayrıca bu enzim için yapılan karakterizasyon çalışmalarında optimum iyonik şiddet 50 mM KH_2PO_4 , optimum pH:8.0 olarak belirlemiştir.

Yerlikaya vd 2017 yılında CA enzimini Siirt Tiftik Keçisi karaciğer dokusundan 1930.84 EU.mg⁻¹ spesifik aktivite ile %57.28 verimle 80.55 kat saflaştırılmış: optimum iyonik şiddet: 25 mM, optimum pH: 8.0, optimum sıcaklık: 40°C ve stabil pH: 7.0 olarak belirlenmiştir. Saflaştırılmış CA enzimi üzerine bazı metal iyonlarının inhibitör etkileri incelendiğinde; İnhibisyon gösteren metal iyonlarının IC_{50} değerleri

Al^{+3} , Ni^{+2} , Cd^{+2} , Cu^{+2} , Pb^{+2} , Ba^{+2} , Zn^{+2} , B^{+3} , Fe^{+3} , Se^{+2} , Ag^{+} and Co^{+2} için sırasıyla 2.24, 2.76, 2.36, 3.20, 2.55, 2.25, 3.28, 2.13, 3.10, 1.75, 2.16 ve 3.50 mM olarak bulunmuştur.

Demirdağ 2012 yılında Koyun böbrek dokusundan CA IV izoenzimi %30.83 verimle, 2055.56 EU/mg spesifik aktivite ile 139.45 kat; CA II izoenzimi %60.75 verimle, 4893.62 EU/mg spesifik aktivite ile 227.61 kat saflaştırmıştır. Koyun böbreği CA IV izoenzimi üzerine bazı metallerin etkisini araştırmış, Fe^{+2} , Cu^{+2} , Cr^{+2} , Al^{+3} , Ni^{+2} , Mn^{+2} , Cd^{+2} , Zn^{+2} metalleri arasından Cu^{+2} , Zn^{+2} , Ni^{+2} , Cd^{+2} metalleri enzimi inhibe ederken diğer metallerde herhangi bir inhibisyon etkisi görülmemiştir. İnhibisyon etkisi gösteren metaller için IC_{50} değerleri sırasıyla 0.067, 0.092, 1.03, 1.8 mM olarak tespit edilmiş olup bu metaller arasında en düşük konsantrasyonda inhibisyon etkisi gösteren metal Cu^{+2} olarak belirlenmiştir.

Çağlayan, 2017 Keçi karaciğer ve böbrek dokularından saflaştırdığı karbonik anhidraz enziminin molekül kütlelerini karaciğer dokusu için 27.70 kDa ve böbrek dokusu için 28.00 kDa olarak belirlemiştir. Optimum iyonik şiddet sırasıyla 0.5 M ve 0.6 M Tris- SO_4 tamponu olarak, Optimum ve stabil pH değerleri sırasıyla pH 7.5 ve 7.0 olarak belirlenmiştir. Keçi karaciğer dokusu için IC_{50} değerlerini $\text{Pb}^{2+} < \text{Hg}^{2+} < \text{Co}^{2+} < \text{Cu}^{2+} < \text{Ag}^{+} < \text{Fe}^{2+}$ olarak belirlemiştir. Bu sonuca göre karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi üzerine en fazla $[\text{Pb}^{2+}]$: 0.13 mM ile inhibisyon etki göstermiştir

Yaptığımız çalışmada Siraz (*Capoeta umbla*) karaciğer dokusundan elde ettiğimiz CA enziminin aktivitesini yarıya indiren metal konsantrasyonları Cu^{+2} için 2.30mM, Mn^{+3} için 3.89 mM, Ba^{+2} için 1.94 mM, Se^{-2} için 1.45 mM olarak bulunmuştur. Yani IC_{50} değerleri $\text{Se}^{-2} < \text{Ba}^{+2} < \text{Cu}^{+2} < \text{Mn}^{+3}$ olarak sıralanmıştır. Bu doğrultuda karaciğerden saflaştırılan CA enzimi üzerinde en fazla inhibisyona Se^{-2} neden olmuştur.

İncelenen çalışmalardan anlaşılabileceği üzere metal iyonları enzimlerin gerçekleştirdiği reaksiyonlarda değişikliklere neden olurken, enzim aktivitelere üzerinde inhibisyona yol açmaktadır. Karbonik anhidraz enziminin iyon taşınımı ve iyon dengesinin sağlanması açısından önemli bir role sahiptir. Çok düşük konsantrasyonlarda bile metal iyonlarının CA enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir.

Özellikle son zamanlarda artan tarımsal ve endüstriyel kimyasallar sucul ortamlarda fazla miktarlarda bulunmaktadır. Bu kimyasalların sucul canlılar tarafından metabolizmalarına alınması sonucu, serbest radikaller ile mücadele eden sistemlerin çalışma prensipleri bozulur. Örneğin sucul canlılarda oksidatif stresi indüklediği iyi bilinen bazı mekanizmalar (balıklarda reaktif oksijen türlerin oluşum ve yok edilme mekanizması). Pestisitler ve çevre kirliliğinin artması ile balıklarda serbest radikallerin oluşumu artar. Serbest radikaller hücrelerde DNA hasarlarına, mutasyon veya kansere, biyolojik yaşlanmalara neden olmaktadır (Akbulut vd. 2014).

Pestisitlerin enzimler üzerine inhibe edici etkisini gösteren çalışmalara örnek verecek olursak;

Sayeed vd. 2003 yılında yeşil yılanbaşı (*Channa punctatus*) balıklarını 48 saat boyunca deltametrine (0,75 µg/L) maruz bırakarak karaciğer ve böbrek dokularındaki antioksidan enzim aktivitelerindeki değişimi incelemişlerdir. Çalışma sonucunda deltametrinin kullanılan tüm dokulardaki lipid peroksidasyonunu indüklediğini ve katalaz aktivitesini artırdığını ortaya çıkarmışlardır.

Ceyhun vd. 2010 yılında deltametrin, diazinon, propoxur ve sipermetrin pestisitlerinin gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) solungaçlarındaki CA enzimi üzerine *in vitro* etkilerini araştırmışlardır. Deltametrin, diazinon, propoxur ve sipermetrin için IC₅₀ değerleri sırasıyla 0.137, 0.267, 0.420 ve 0.460 µM olduğu, pestisitlerin CA aktivitesini deltametrin> diazinon> propoxur> sipermetrin sırası ile inhibe ettiğini göstermişlerdir.

Sinan vd. tarafından 2007 yılında Saanen keçisi (*Capra hircus*) eritrositlerinden elde edilen CA enzimi üzerine Nuarimol (Tm), Fenarimol TM, Parathionmethyl (Tm) ve 2,4-D-TM pestisitlerinin *in vitro* etkileri araştırılmıştır. Enzimatik aktivitenin% 50'sini inhibe eden Nuarimol TM, Fenarimol TM ve 2,4-D-TM konsantrasyonları sırasıyla 0.352, 0.924 ve 2.04 mM olarak hesaplanmıştır.

Demirdağ vd. 2012 yılında Avrupa levreği karaciğeri ve sığır eritrositleri CA enzimi üzerine pestisidin, shalotrin, sipermetrin, diklorvos, mehamidofos, klorpirifos ve metilparathion pestisitlerinin inhibe edici etkilerini incelemişlerdir. Çalışmalarında tüm pestisitler düşük konsantrasyonlarda dahi enzimi inhibe etmiştir ve

metilparathion, her iki enzim için en etkili inhibitör olarak belirlenmiştir. Bu pestisitlerin kullanımının hayvan ölümleri ile sonuçlanan asit-baz düzenlenmesinin bozulmasına neden olabileceğine bildirmişlerdir.

Doğan 2006 yılında *Oncorhynchus mykiss* ve *Cyprinus carpio carpio* balıklarının kanından elde ettiği karbonik anhidraz aktivitesi üzerine bazı pestisitlerin *in vitro* etkilerini incelemiştir. Lambda-cyhalothrin, deltametrin, diozinon, dorzolamid ve brinzolarnid tarafından inhibe edilen *O. mykiss* CA enziminin IC₅₀ değerleri $6.05 \times 10^{(-4)}$, $1.48 \times 10^{(-5)}$, $6.84 \times 10^{(-3)}$, $3.82 \times 10^{(-5)}$ ve $1.80 \times 10^{(-6)}$ mol/l, ve *C. c. carpio* $6.86 \times 10^{(-4)}$, $4.70 \times 10^{(-4)}$, $3.92 \times 10^{(-3)}$, $8.34 \times 10^{(-6)}$ ve $1.42 \times 10^{(-6)}$ mol/l olarak hesaplanmıştır. Kullanılan pestisitler içerisinde en etkili CA enzimi inhibitörünün detrametrin olduğu bulunmuştur.

Tülüce 2000 yılında insan ve sığır eritrosit karbonik anhidraz enzimi üzerine deltamethrin, pyrazophos, öörpyrifos-methyl, dimethoat, metamidophos, dichlorvos, diazinon, çaptan ve malathion pestisitlerinin inhibisyon etkilerini araştırmış; düşük dozlarda dahi bu pestisitlerin enzim aktivitesinin inhibe ettiğini göstermiştir.

Zariç 2017 yılında Van Gölü İnci Kefali Balığı solungaç dokusundan saflaştırdığı GST enzime, oxamyl, diniconazole, carbofuran, tebuconazole ve atrazine pestisitlerinin inhibisyon etkisi gösterdiğini tespit etmiştir. Pestisitlerin IC₅₀ değerlerini diniconazole için 1.604 mM, oxamyl için 0.092 mM, atrazine için 0.750 mM, carbofuran için 0.041 mM ve tebuconazole için 0.056 mM olarak hesaplamıştır.

Taş 2017 yılında Kalkan balığı (*Psetta maxima*) solungaç dokusundan saflaştırdığı GST enzimi aktivitesi üzerine doğada bulunan pestisitlerden atrazin, karbaril, karbofuran, oksamil, propoksur, simazin, tebukonazol'un inhibitör etkilerini araştırmıştır. Bu pestisitlerin her birinin enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiğini tespit etmiş olup, pestisitler için IC₅₀ değerleri sırasıyla 18.728 µM, 14.395 µM, 19.716 µM, 17.854 µM, 16.709 µM, 14.281 µM ve 9.516 µM olarak bildirmiştir.

Cici 2007 yılında İnsan eritrositlerinden glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi saflaştırmış ve bazı pestisitlerin enzim üzerindeki etkisini araştırmıştır. Araştırması

sonucunda tarımda yaygın olarak kullanılan (Propil3-(dimetilamino)propilkarbomat hidroklorit), (RS)-5-etil-2-(4- izopropil-4-metil-5-okzo-2-imidazolin-2-yl) nikotinik asit), (N-(Fosfonometil)glisin), (2,4- Diklorofenoksiasetik asit dimetilamin)’in inhibisyon etkisini göstermiş, IC₅₀ değerlerini sırası ile 4.85x 10⁻³ mM, 4.48x 10⁻⁴ mM, 2.77x 10⁻³ mM, 1.76x 10⁻³ mM olarak bildirmiştir.

Maynart *et al.* 2012 yılında endosülfan pestisitinin farklı dozlarını (0.6, 1.2, 2.4, 5.0, 10.0 ve 50 µg/L) zebra balıklarına (*Danio rerio*) 96 saat boyunca uygulamışlardır. Çalışma sonunda balıkların yüzme aktivitelerinde; Endosülfanın 2.4 µg/L dozuna maruz olan grupta kontrol grubuna oranla düşüş meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Biz de çalışmamızda bazı pestisitlerin Siraz (*Capoeta umbla*) karaciğer dokusundan elde ettiğimiz CA enzimi üzerine inhibisyon etkilerini incelemek amacı ile aldrin, dieldrin, endosülfan, hexachlorbenzene, α-HCH, heptachlor ve 2,4 DDT pestisitlerini kullandık. Yaptığımız *in vitro* çalışmalar neticesinde CA enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu olan IC₅₀ değerlerini belirlemek için % Aktivite-[I] grafikleri çizildi. Bu grafiklerin denklemleri yardımıyla IC₅₀ değerleri hesaplandı. Pestisitlerin IC₅₀ değerleri sırasıyla aldrin 0.02339 mM, dieldrin 0.02612 mM, endosülfan 0.0244 mM, hexachlorbenzen 0.02155 mM, α-HCH 0.0744 mM olarak hesaplanmıştır. Stokları hazırlanan ve farklı konsantrasyonlar ile çalışılan heptachlor ve 2,4 DDT pestisitlerinin inhibisyon etkileri gözlemlenmemiştir.

Çalışmalarımız doğrultusunda Siraz (*Capoeta umbla*) karaciğer dokusu CA enzimi üzerine etkileri büyükten küçüğe sıralaması; hexachlorbenzen, aldrin, endosülfan, dieldrin, α-HCH şeklinde belirlenmiştir.

Pestisitler hedefleri olamayan organizmalar ve canlı sistemler üzerinde ciddi olumsuz etkiler yaratmaktadır. Literatür ışığında pestisitlerin enzim aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkilerinin olduğu anlaşılmıştır. Çalışmamız için seçtiğimiz pestisitlerin Siraz (*Capoeta umbla*) karaciğer dokusu CA enzimi üzerinde araştırılmış literatürüne rastlanmadı. Bu tez kapsamında bir çok metabolik süreçte rolü olan CA enzimi aktivitesinin bu pestisitler tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir.

Sonuç Olarak:

1. Siraz (*Capoeta umbla*) balığı karaciğer dokusundan CA enzimi Sepharose-4B-L-tirozin – sülfanilamit afinite kromatografisi ile saflaştırıldı. SDS-PAGE ile çalışmalarımızda kullanılan enzimlerin saflığı kontrol edildi. Enzimin saflığı elektroforezde bulunan tek bant ile tespit edildi. *Capoeta umbla* balığı karaciğer dokularından karbonik anhidraz enzimi 2026.32 EÜ/mg spesifik aktiviteyle % 59.97 verimle 212.40 kat saflaştırıldı.

2. Saflaştırılan enzim için kinetik çalışmalar yapıldı. Optimum iyonik şiddet, uygun değer pH, uygun değer sıcaklık, stabil pH değerleri belirlendi. Bu çalışmalar sonucunda CA enziminin optimum iyonik şiddeti 0.02 M Tris-SO₄ tamponu, optimum pH Tris-SO₄ tamponunda 8.5, optimum sıcaklık: 35°C ve stabil pH Tris-SO₄ tamponunda 7.0 olarak belirlenmiştir.

3. Enzimin kinetik özellikleri içerisinde yer alan K_M değeri 0,556 mM ve V_{max} değeri de 0.165 EÜ/ml olarak belirlenmiştir.

4. Yapmış olduğumuz çalışmada bazı ağır metallerin ve pestisitlerin etkileri incelendi. Etki gösteren metallerin ve pestisitlerin IC₅₀ ve K_i değerleri hesaplandı ve inhibisyon çalışmaları sonucunda bu pestisit ve metal iyonlarının düşük dozlarda dahi CA enzimini inhibe ettiği gözlenmiştir.

Capoeta umbla balığı karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi aktivitesi üzerine bakır, baryum, manganez ve selenyum iyonlarının *in vitro* etkileri incelenmiştir. (Cu⁺², Mn⁺³, Ba⁺², Se⁻²) metal iyonlarının inhibisyon etkisi gösterdikleri tespit edilmiştir. *Capoeta umbla* balığı karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu olan IC₅₀ değerlerini belirlemek için %Aktivite-[I] grafikleri çizilmiştir. Bu grafiklerin denklemleri yardımıyla IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Cu⁺², Mn⁺³, Ba⁺², Se⁻² metallerinin, IC₅₀ değerlerini sırasıyla 2.30, 3.89, 1.94 ve 1.45 mM olarak bulunmuştur.

“ K_i sabitleri düşük olan inhibitörün enzime ilgisi yüksek olduğundan enzimin katalitik aktivitesi üzerine inhibisyon etkisinin büyük olacağı bildirilmiştir” (Koçyiğit 2014). Siraz (*Capoeta umbla*) karaciğer dokusundan saflaştırdığımız CA enzimi üzerine Ba^{+2} , Cu^{+2} , Se^{-2} , Mn^{+3} metalleri için hesaplanan K_i değerleri sırası ile, 0.693 mM, 0.822 mM, 0.518 mM, 1.390 mM olarak hesaplanmış olup; ortalama K_i değerleri $Se^{-2} < Ba^{+2} < Cu^{+2} < Mn^{+3}$ olarak sıralandı.

Ayrıca yapmış olduğumuz çalışmada *Capoeta umbla* balığı karaciğer dokusundan saflaştırılan CA enzimi aktivitesi üzerine aldrin, dieldrin, endosülfan, hexachlorbenzene, α -HCH pestisitlerinin *in vitro* etkileri incelenmiştir. Pestisitlerin IC_{50} değerleri sırasıyla aldrin 0.02339 mM, dieldrin 0.02614 mM, endosülfan 0.0244 mM, hexachlorbenzen 0.02155 mM, α -HCH 0.0744 mM olarak; K_i değerleri ise sırasıyla 0.0084 mM, 0.0094 mM, 0.0087 mM, 0.0077 mM, 0.0266 mM olarak hesaplanmıştır. Stokları hazırlanan ve farklı konsantrasyonlarda çalışılan heptachlor ve 2,4 DDT pestisitlerinin inhibisyon etkileri gözlemlenmemiştir.

Metaller sucul çevrenin doğal iz bileşenleridir; ancak tarım ve madencilik faaliyetleri nedeniyle seviyeleri olması gerekenin üzerine çıkmaktadır. Çevre kirliliği gün geçtikçe artmakta olup gelişen sanayi beraberinde ağır metal kirliliğini en önemli çevre sorunlarından biri haline gelmiştir. Gelişen teknoloji sonucu, kentsel atıklar ve endüstri atıklarının bulunduğu kanalizasyon suları nehir ve göllere ulaşmaktadır.

Ağır metaller bitki örtüleri ve orman yangınları ile de sulara taşınır ve sulardaki anorganik kirlenmeyi meydana getirir. Özellikle sucul ortamlarda bulunan ve akabinde ekosistemde yaşayan organizma, bitki, hayvan ve insanların yaşam döngüsünü tehdit etmektedir.

Bu durum canlı sistemler için, özellikle sucul organizmalar ve spesifik enzimler için tehlikeli bir hal almıştır. Enzimlerin, canlı metabolizmalarındaki neredeyse tüm kimyasal reaksiyonları katalize ettiği bilinmektedir. Kirleticiler de dahil olmak üzere, metal iyonları, pestisitler, kimyasal maddeler ve ilaçlar düşük konsantrasyonlarda dahi enzim aktivitelerini azaltmak veya arttırmak sureti ile metabolizmayı etkilemektedir.

Hızla artan dünya nüfusuna karşılık yeterli ürün sağlanması ve gıda ihtiyacının giderilmesi hedeflenerek kullanılan tarım ilaçları çevre kirliliğine yol açmakta ve besin zinciri ile insana ulaşarak kalıcı hasarlara neden olmaktadır. Bu soruna çözüm üretilmesi amacıyla hangi kimyasalların inhibitör etkisi olduğu araştırılmalıdır.

Özellikle ekonomik değere sahip balıkları olumsuz etkileyebilecek, her türlü pestisit ile ilgili çalışmalar yapılmalıdır. Tarımsal uygulamalarda öncelikle biyolojik yöntemler tercih edilmelidir. Zararlı tarım ilaçları kullanan çiftçilerin bilinçlendirilmesi, ilaçlama yapılırken yağmur ve arazi şartları göz önünde bulundurmaları ve kullanımı biten atık kutuları suya atmamaları konusunda gerekli özeni göstermeleri sağlanmalıdır.

Karbonik anhidraz enziminin pek çok dokuda üstlendiği fonksiyonun yaşamın devamlılığı için son derece önemli rollere sahip olduğu bilinmektedir. Özellikle insanda birçok hastalığın tedavisinde CA izoenzimlerinin inhibisyonu kullanılmaktadır. Bu sebeple CA enzimi çoğu ilacın hedefidir. Karbonik anhidraz enzimi ve izoenzimleri çok farklı dokudan saflaştırılmış ve çeşitli ilaçların, metallerin ve pestisitlerin enzim aktivitesi üzerine etkileri araştırılmıştır. Metallerin ve pestisitlerin çalışmamızda anlatıldığı gibi CA enzimi üzerinde çok düşük konsantrasyonlarda bile inhibisyon etkisi gösterdiği ortaya koyulmuştur. Bu doğrultuda CA enzimi aktivasyon ve inhibisyon çalışmalarının literatüre kazandırılması gerekmektedir.

Çalışmamız sonucunda elde edilen veriler aşağıdaki tabloda özetlenmiştir

Çizelge 5.1. Siraz (*Capoeta umbla*) Balığı karaciğer CA enzimi için karakterizasyon sonuçları

Çalışma tipi	Sonuç
Optimum pH	8,5
Optimum iyonik şiddet	0.02 M
Optimum sıcaklık	35°C
Stabil pH	7.0
Mol kütlesi	28.64 kDA
CA K _M	0.556 Mm
CA V _{max}	0.165 EÜ/ml

Çizelge 5.2. Siraz (*Capoeta umbla*) Balığı karaciğer CA enziminin üzerine inhibisyon etkisi gösteren metal iyonları için IC₅₀ ve K_i değerleri sonuçları

Kimyasal Madde	IC ₅₀ (mM)	K _i Değerleri (mM)
Cu ⁺²	2.30	0.822
Se ⁻²	1.45	0.518
Ba ⁺²	1.94	0.693
Mn ⁺³	3.89	1.390

Çizelge 5.3. Siraz (*Capoeta umbla*) Balığı karaciğer CA enziminin üzerine inhibisyon etkisi gösteren pestisitler için IC₅₀ ve K_i değerleri sonuçları

Pestisit	IC ₅₀ (mM)	K _i Değerleri (mM)
Aldrin	0.0234	0.0084
Dieldrin	0.0261	0.0094
Endosülfan	0.0244	0.0087
Hexachlorbenzen	0.0216	0.0077
α-HCH	0.0744	0.0266

KAYNAKLAR

- Açar, Ö. Ç., 2015. Pestisit analizleri , T.C. Gıda tarım ve hayvancılık bakanlığı ulusal gıda referans laboratuvarı kalıntı/pestisit birimi.
- Adam, B., Yiğitoğlu, M.R., 2012. Tıbbi Biyokimya. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 52-549.
- Akbulut,C., Kaymak, G., Esmer,H.E., Yön, N.D., Kayhan, F.E., 2014. Balıklarda ağır metal ve pestisitler tarafından indüklenen oksidatif stres mekanizmaları, Ege J FishAquaSci 31(3), 155-160.
- Aktaş, D., 2004. Sığır karbonik anhidraz enziminin alginat üzerine immobilizasyon koşullarının incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Aydın.
- Altıkat, A. , Turan, T. , Ekmekyapar Torun, F., 2009. Türkiye’de Pestisit Kullanımı ve Çevreye Olan Etkileri. Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Derg. 40 (2), 87-92.
- Anonim 1, 2019. izmir.discuss.com
- Arslan,O., 2003. Biyomolükeller Teori ve Uygulamaları ile. Balıkesir.
- Arslan, N., 2013, Hamsi (*Engraulis encrasicolus*) ve mezgit (*Merlangius merlangus* euxinus) balıklarının solungaç dokularından karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu ve bazı metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi, Yüksek lisans tezi ,Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
- Atamanalp, M.,Yanık, T., 2001. Pestisitlerin Cyprinidae’lere Toksik Etkileri, E.Ü. Su Ürünleri Dergisi , 18, Sayı/Issue (3-4): 555 – 563, Erzurum.
- Baker G.A., Jacoby A., Buck D., Stalgis C., Monnet D. 1997. Quality of life of people with epilepsy: a European study. *Epilepsia*. 38(3):353–62
- Balaydın, H.T., Soyut, H., Ekinci, D., Goksu, S., Beydemir, S., Menzek, A., Sahin, E., 2012. Synthesis and carbonic anhydrase inhibitory properties of novel bromophenols including natural products. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 27, 43- 50
- Bollog, D. M.,Rozycki, M. D., and Edelstein, S. J., 1996. Protein Purification Methods. Second Edition. Wiley-Liss, Inc. New-York.
- Brauner, C. J. ve Randall, D. J., 1998. The Linkage Between Oxygen and Carbon Dioxide, In *Fish Physiology*. 17, 283-319.

- Celayir, Y., Siraz (Capoeta Capoeta Umbla Heckel, 1843) 'dan Tam Kontrollü Döl Alımı, 2007, Yüksek lisans tezi, Fırat Üniversitesi, Elazığ
- Chegwidden, W. R., Dodgson, S. J., and Spencer, I. M., 2000. In the Carbonic Anhydrase New Horizons. Birkhauser Verlag. Basel, 343.
- Chegwidden W.R., Carter, N., 2000. Introduction to the carbonic anhydrases. In The Carbonic Anhydrases – New Horizons, Chegwidden W.R., Edwards, Y., and Carter, N., Eds., Birkhauser Verlag, Basel, s. 14-28.
- Chiaromonte, N., Novella, M., Romanelli I., D., Teodoriand E., Supuran, C. T., 2018. Amino Acids as Building Blocks for Carbonic Anhydrase Inhibitors Metabolites. 8, 36; doi:10.3390.
- Cicik, B., 2003. Bakır-Çinko Etkileşiminin Sazan (Cyprinus carpio L.)'nın Karaciğer, Solungaç ve Kas Dokularındaki Metal Birikimi Üzerine Etkileri, Ekoloji Çevre Dergisi, Cilt: 12 Sayı: 48 32-36.
- Çağlayan, C., 2017. Keçi karaciğer ve böbrek dokularından karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu ve bazı metal iyonlarının, antibiyotiklerin ve avertinlerin enzim aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi , Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum
- Dağlı, M., Erdemli A. Ü., 2011. Capoeta umbla (Heckel, 1843) ve Capoeta trutta (Heckel, 1843)'nın Bazı Meristik ve Morfometrik Özelliklerinin Karşılaştırılması, Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi / The Black Sea Journal of Science ISSN: 1309-4726.
- Del Prete, S., Vullo, D., Fisher, G.M., Andrews, K.T., Poulsen, S.A., Capasso, C., Supuran, C.T. 2014. Discovery of a new family of carbonic anhydrases in the malaria pathogen Plasmodium falciparum—The η-carbonic anhydrases. Bioorg. Med. Chem. Lett. 24, 4389–4396.
- Delen, N., 1990. Ege Üniversitesi Tarımsal Uygulama ve Araştırma Merkezi Teknik Bülten.
- Demirdağ R., 2012. Karbonik Anhidraz II ve IV Izoenzimlerinin Koyun Böbrek Dokusundan Saflaştırılması Karakterizasyonu Ve Bazı Kimyasalların Etkilerinin Araştırılması. Doktora Tezi ,Atatürk Üniversitesi ,Erzurum.

- Demirdağ. R., Comaklı, V., Kuzu. M., Yerlikaya, E., Şentürk, M., 2014, Purification and Characterization of Carbonic Anhydrase from Ağrı Balık Lake Trout Gill (*Salmo trutta labrax*) and Effects of Sulfonamides on Enzyme Activity, *Biochem Molecular Toxicology*, 29,3
- Devlin, T.M., 2002. *Biochemistry with Clinical Correlations*. Kanada.
- DeVoe, H. ve Kistiakowsky, G. B., 1961. The Enzyme Kinetics of Carbonic Anhydrase from Bovine and Human Erythrocytes, *J. Am. Chem. Soc.*, 83, 274-280.
- Doğan, S., 2005. The in Vitro Effects of Some Pesticides on Carbonic Anhydrase Activity of *Oncorhynchus Mykiss* and *Cyprinus Carpio Carpio* Fish, *Journal of Hazardous Materials*, A132, 171–176.
- Esbaugh, A.J. ve Tufts, B.L., 2007. Evidence for a Carbonic Anhydrase-Related Protein in The Brain of Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*), *Comp. Biochem. Physiol, Part D*, 2, 287–294.
- Geldiay, R. ve Balık, S., 1996. *Türkiye Tatlı Su Balıkları*. Ege Üniv. Su Ürünleri Fak. Yayınları No: 46 Ders Kitabı dizisi No: 16, s. 357-362, Bornova, İzmir.
- Göçer, H., 2014. Sinefrin Ve Fenilefrin: Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesi Ve İnsan Karbonik Anhidraz İzoenzimleri (Hca I Ve HcaII) İle Asetilkolin Esteraz Enzimi Üzerine Etkilerinin Araştırılması, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
- Güneş, M., 2007. Tercan Baraj Gölü ve Tuzla Çayı'nda Yaşayan *Capoeta capoea umbla* Heckel, 1843 Populasyonlarının Bazı Biyo-Ekolojik Özellikleri, Total Yağ ve Yağ Asidi Kompozisyonlarının Karşılaştırılması. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Erzurum
- Heath A. G., 1995. *Water Pollution and Fish Physiology*. 2nd edition, CRC Press, New York.
- Heckel J.J., 1843. *Ichthyologie*. P. 991-1099 in: J. von Russeger. *Reisen in Europa, Asien und Africa, mit besonderer Rücksicht auf die naturwissenschaftlichen Verhältnisse der betreffenden Länder unternommen in den Jahren 1835 bis 1841*. Vol. 1. Theil 2. Reise in Griechenla. Stuttgart, E. Schweizerbart.

- Henry, R.P., Gilmour, K.M., Wood, C.M., Perry, S.F., 1997. Extracellular carbonic anhydrase and acid-base disequilibrium in the blood of the dog fish *Squalus acanthias*. *J. Exp. Biol.*, 200:173-183.
- Henry, R.P., Gilmour K.M., Wood, C.M., Perry, S. F., 1997. Extracellular carbonic anhydrase activity and carbonic anhydrase inhibitors in the circulatory system of fish. *Physiol. Zool.*, 70:650-659.
- Hisar, O., Hisar, Ş. A., ,Yanık, T., Aras, M. S., 2003. Balık Kan Karbondioksitinin Taşınması ve Atılmasında Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin Fonksiyonları Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Derg. 34 (4), 387-393.
- Hu, H., 2000. Exposure to metals. *Occupational and Environmental Medicine*, 27, 983- 996.
- Işık ,S., 2008. Maya Karbonik Anhidrazinin Ekspresyonu,Saflaştırılması, Elektroforetik ve Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi, Doktora Tezi ,Balıkesir.
- Kalaycıoğlu, S., Serpek. B., Nizamoğlu, M., Başpınar, N. Tiftik, A.M., 2010. Biyokimya, Nobel Yayınları, 213-50.
- Kaur, P.I.,Smitha, R., Aggarwal, D. ve Kapil, M., 2002. Acetazolamide Future Perspective in Topical Glaukoma Therapeutics, *International Journal of Pharmaceutics*, 248, 1-14.
- Karahalil Y., F., 2009. Mersin balığı (*Acipenser gueldenstaedti*) eritrositlerinden elde edilen karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu ve kinetik özelliklerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Trabzon.
- Kaya, E.D., 2011. Çipura (*Sparus aurata*) balığının karaciğer, solungaç ve böbrek dokularından karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu ve bazı metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi, doktora tezi, Atatürk Üniversitesi ,Erzurum.
- Kayhan, E.F., 2006. Su ürünlerinde kadmiyumun biyobirikimi ve toksisitesi. *E.U. J. Fish. Aq. Sci.* 23, 215–220.

- Kaygısız, Y., 2018, Benzotiyazol türevlerinin ve metal komplekslerinin insan eritrosit karbonik anhidraz enzimleri üzerine etkilerinin incelenmesi, yüksek lisans tezi, Dumlupınar Üniversitesi, Kütahya
- Keha, E.E. ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 2014. Biyokimya. Erzurum, Aktif yayınları.
- Kernohan, J. C., 1964. The Activity of Carbonic Anhydrase in İmidazole Buffers, Biochim. Biophys. Acta, 81, 346-356.
- Kırıcı, M., 2014. Capoeta Capoeta umbla ve Capoeta trutta'nın Solungaç, Karaciğer, Böbrek Dokularından Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz İle Glutatyon Redüktaz Enzimlerinin Saflaştırılması Ve Bazı Metallerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi, Doktora tezi, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
- Kırıcı, M., Kırıcı, M., Beydemir, Ş., Atamanap, M., 2016, Purification of Carbonic Anhydrase from Capoeta umbla (Heckel, 1843) Gills and Toxicological Effects of Some Metals on Enzyme Activity, Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 16: 169-175
- Kim, C. S., Kap S. C., Jung W. K., Myeong R. C., Kyeong H. H., Won K. L. and Kang H. K., 2013. Detection of Carbonic Anhydrase in the Gills of Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss) Journal of Life Science Vol. 23. No. 12. 1557-1561.
- Koçyiğit, Ü.M., 2014. Kangal Balığının (Garra rufa) Farklı Dokularından Karbonik Anhidraz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu Ve Bazı Metal İyonların Etkilerinin İncelenmesi, Doktora Tezi ,Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
- Konak, Ü. İ., Turhan, İ., Certel, M., 2014. Proteinlerin Kromatografik Yöntemlerle Saflaştırılması Akdeniz Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 07059, Antalya, Akademik Gıda 12(2), 79-87.

- Köprücü, K. ve Özdemir, Y., 2003, *Capoeta capoeta umbla* (Heckel, 1843)'nın Keban Baraj Gölü ve Hazar Gölünde (Elazığ) Yaşayan Populasyonlarının Et Verimi ve Bazı Büyüme Özelliklerinin Karşılaştırılması, *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, İzmir 20, 3-4, 337-343.
- Kurbanoğlu, T., 2015. Kalkan balığı (*Psetta maxima*) kas dokusundan karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu ve kinetik özelliklerinin belirlenmesi , Yüksek Lisans Tezi, Erzurum.
- Küçük, M., 2015. Karadeniz Alabalığı (*Salmo trutta labrax*) Böbrek, Karaciğer, Solungaç Ve Kas Dokularından Karbonik Anhidraz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu Ve Bazı Metal İyonlarının Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi ,Doktora tezi, Erzurum.
- Last, J. M. and Robert, B., 1992. Wallace. Moses, Marine, Pesticides, in, Maxcy Rosenau Last Public Health and Preventive Medicine. 13. th ed. Prentice Hall mtCo. NewYork.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M., 2005. Principles of biochemistry, 3. Baskıdan çeviri (Çeviri editörü: Kılıç N.), Palme Yayıncılık.
- Lionetto, M. G.,Giordano, M. E., Vilella, S. And Schettino, T. 2000. Inhibition of eelenzymatic activities by cadmium. *Aquat Toxicol* 48, 561.
- Lionetto G. M., Caricato, R., Maria Elena Giordano, M. E., 2014. Elisa Erroiand Trifone Schettino , Carbonic Anhydrase and HeavyMetals. Italy.
- Lionetto, M. G., Caricato, R., Elena M., 2016. Giordano and Trifone Schettino , The Complex Relationship between Metals and Carbonic Anhydrase. *New Insights and Perspectives*. 17,127.
- Maynart, V., Bortolotto, J., Kist, L., Azevedo, B.,Fritsch, R., Oliveira, R.,Pereira, T.,

- Bonan, C., Vianna, M., Bogo, M., Endosulfan exposure inhibits brain AChE activity and impairs swimming performance in adult zebrafish (**Danio rerio**), 2012. Neuro Toxology, 33(3) ,469-475
- Meltzer, D.E., 2003. Biochemistry. The Chemical Reactions of Living Cells. Elsevier Academic Press, New York, USA. 678.
- Mincione F., Menabuoni L. ve Supuran C. T. 2004. Carbonic Anhydrase, Its Inhibitors and Activators. London (Bölüm 8).
- Mutluay, H. Demirak, A., 1996. Su kimyası, Beta basım yayım dağıtım,İstanbul. 83-84
- Nar, M., Çetinkaya, Y., Gülçin, İ., Menzek, A., 2012. (3,4-Dihydroxyphenyl) (2,3,4- trihydroxyphenyl) methanone and its derivatives as carbonic anhydraseiso enzymes inhibitors. J. EnzymeInhibMed. Chem., 28, 402-406.
- Nar, M., 2014. Bazı kinazların türevleri, antioksidan kapasiteleri karbonik anhidraz ve izo enzimleri üzerine inhibisyon etkileri. Doktora Tezi, Erzurum.
- Nelson, D. L., Cox, M. M., 2013. Lehninger Biyokimyanın İlkeleri (Çeviri editörü:Murat Elçin) Palme yayıncılık.
- Orhan, M., 2017. Karbonik anhidraz enziminin koyun kalp dokusundan saflaştırılması, karakterizasyonu ve yeni sentezlenen sülfonamid kalkonların etkilerinin araştırılması Yüksek lisans tezi, İbrahim Çeçen Üniversitesi, Ağrı
- Özdemir, F., 2013. Türkiye’deki Capoeta (Teleostei: Cyprinidae) Cinsine Ait Tür Ve Alttürlerin Klasik Ve Moleküler Sistematik Yöntemler Kullanılarak Revizyonu, doktora tezi, Hacettepe Üniversitesi.
- Özensoy, Ö., 2002. Eritrositlerden Karbonik Anhidrazİzoenzimlerinin Saflaştırılması için Yeni Bir Afinite Jelinin Sentezi ve Uygulanması. Yüksek LisansTezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir.
- Öztürk, S., 1990. Tarım İlaçları. Hasad Yayıncılık, 65-71.

- Parkkila, S., 2000. An overview of the distribution and function of carbonic anhydrase in mammals. In *The Carbonic Anhydrases – New Horizons*, Chegwidde W.R., Edwards, Y., and Carter, N., Eds., Birkhauser Verlag, Basel s.79-93.
- Pelgrom S., Lamers L. P. M., Lock R. A. C., Balm P. H. M., Wendelaar Bonga S. E., 1995. Interactions between Copper and Cadmium Modify Metal Organ Distribution in Mature Tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Environ. Poll.*, 90, 415-423.
- Pocker, Y., Beug, M.W. 1972. Kinetic studies of bovine carbonic anhydrase catalyzed hydrolyses of para-substituted phenylesters. *Biochemistry*, 11: 698-707.
- Randall, D.J., Brauner, C., 1998. Interaction between ion and gas transfer in freshwater teleost fish. *Comp. Biochem. Physiol*, 119, 3-8.
- Ribeiro, C. A. O., Vollaie, Y., Sanchez-Chardi, A., Roche, H., 2005. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. *Aquatic Toxicology*, 1–17.
- Saha, M., Bandyopadhyay, S., 2019. Reversible photoresponsive activity of a carbonic anhydrase mimic, *Chem. Commun*, 55, 3294
- Sayeed, I., Parvez, S., Pandey, S., Hafeez, B., Haque, R., Raisuddin, S., 2003. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Ecotoxicology and Environmental Safety* Volume 56, Issue 2, 295-301
- Sender, S., Bottcher, K., Cetin, Y., Gros G., 1999. Carbonic anhydrase in the gills of seawater- and fresh water- acclimated flounders *Platichthys flesus*: Purification, characterization, and immunohistochemical localization. *J. Histochem. Cytochem.*, 47 (1): 43-50.
- Sinan, S., Gencer, N., Turan, Y., Arslan, O., 2007. In vitro inhibition of the carbonic anhydrase from saanen goat (*Capra hircus*) with pesticides, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88(3), 307-311
- Sonat, F. S., 2009. Antiepileptikler ve Yeni Bir Antiepileptik Olan Topiramatin

Epilepsi Tedavisindeki Yeri ve Önemi,Kafkas Univ Vet Fak Derg. Review 15(6): 987-992. DOI:10.9775/kvfd.2009.201.

Söyüt, H., 2006. Gökkuşığı alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) dokularından karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması karakterizasyonu ve kinetik özelliklerinin incelenmesi. Doktora tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum

Söyüt, H., Beydemir, Ş., 2008. Purification and some kinetic properties of carbonic anhydrase from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver and metal inhibition, Protein and peptide letters,15, 528-535

Söyüt, H., Beydemir, Ş.,Hisar, O., 2008. Effects of some metals on carbonic anhydrase from brains of rainbow trout, Biological Trace Element Research,123,1-3

Supuran, C. T., and Scozzafava, A., 2001. Carbonic Anhydrase Inhibitors. Curr. Med.Chem., 1, 61-97.

Supuran, C.T., Scozzafava, A., Casini, A., 2003. Carbonic anhydrase inhibitors. Medicinal Research Reviews 23: 146-189.

Supuran, C. T., Scozzafava, A., Conway,J., 2004. Carbonic Anhydrase: Its Inhibitors and Activators (Taylor & Francis Medicinal Chemistry Series)", CRC Press LLC Florida, USA, 2-20.

Supuran C. T., 2008. Carbonicanhydases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. Rev.7, 1-14.

Supuran, C.T., 2010. Carbonic anhydrase inhibitors. Bioorg. Med. Chem. Lett. 20, 3467–3474.

Supuran C. T., 2018. Carbonic Anhydases and Metabolism, Metabolites 2018, 8, 25

Şahin , A., 2008. Bazı Karbonik Anhidraz Izoenzimlerinin Saflaştirilmesi İçin Yeni Bir Afinite Jelinin Sentezi Ve Uygulanması,Yüksek Lisans Tezi ,Balıkesir.

Şehitoğlu, M.H., 2012. Bazı fenolik doğal bileşiklerin antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi ve insan karbonik anhidrazizo enzimleri (hCA-I ve hCA-II) üzerine inhibisyon etkilerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi ,Erzurum.

Tashian, R.E., and Hewett-Emmett, D. 1984. Biology and Chemistry of The Carbonic Anhydrase. The New York Academy of Science, New York.

- Taş, Ö., 2017. Kalkan balığı (*Psetta maxima*) solungaç dokusu glutatyon redüktaz enziminin karakterizasyonu ve bazı pestisitlerin inhibisyon kinetiğinin incelenmesi, Yüksek lisans tezi, ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun
- Toros, S. ve Maden, S. 1991. Tarımsal Savaşım Yöntem ve İlaçları. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yay. No: 1222, Ders Kitabı No: 352, s..332.
- Tuncer, E. 1987. Tarımsal İlaçların Çevre Kirliliği Üzerine Etkileri ve Alınması Gereken Önlemler. T. C. Tarım Bakanlığı Zir. Müc. ve Kar. Gen. Müd. Basılmamış Seminer Notları, 5 s, Sivas.
- Tülüce, Y.,2000. Bazı pestisitlerin insan ve sığır eritrosit karbonik anhidraz enzimi üzerine etkilerinin araştırılması, Yüksek lisans tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Van
- Verpoorte, J.A., Mehta, S., Edsall, J.T., 1967. Esterase activities of human carbonic anhydrases B and C. Journal of Biological Chemistry, 242, 4221-4229.
- Viarengo, A., 1985. Biochemical effects of trace metals. Mar. Pollut. Bull. 16, 153–158
- Vural, H.,1993. Ağır metal iyonlarının gıdalarda oluşturduğu kirlilikler. Çevre Dergisi, 8, 3-8.
- Wistrand, P.J., 1981. The importance of Carbonic Anhydrase B and C for the unloading of CO₂ by the human erythrocyte”, Acta Phisiol. Scand., 343.
- www.chemtube3d.com/solidstate/BC-26-29.htm
- www.dersimiz.com
- www.kimyakulubu.com/baryum-klorur-bacl2/-
- www.lgcstandards.com/AE/en/Environmental/Pesticides-and-metabolites
- www.makaleler.com/baryum-nedir
- www.makaleler.com/mangan
- www.nkfu.com/bakır, www.nkfu.com/selenyum
- Yeni, S. N., 2008. Epilepsi epidemiyolojisi. Türkiye Klinikleri J Neurol-Special Topics İstanbul, 1(2):9-16.

Yerlikaya, E., Karagecili, H., Demirdağ, R., Kaya, M.,O., 2017. Carbonic Anyhdrase

Enzyme From The Sırt Mohair Goat Liver Purification, Characterization And Assessment Of Enzyme Kinetıcs Against Metal Toxicity, Hacettepe Journal of Biol. & Chem., 45 (4), 629-634

Yılayaz, Ö., 2006. Parathion Methyl (İnsektisit)'İn CapoetaTrutta (Heckel, 1843)

Üzerindeki Genotoksik Etkisinin Eritrosit Mikronukleus Testi İle Belirlenmesi, Fırat üniversitesi, Elazığ.

Yıldız, M., Prof. Gürkan, M. O., Turgut, C., Kaya, Ü., Ünal, G., Tarımsal Savaşımda

Kullanılan Pestisitlerin Yol Açtığı Çevre Sorunları, İzmir.

Zakir, Ç. G., 1997. Pestisitler Çevre Sağlığı Temel Kaynak Dizisi No: 52,16-21, Ankara.

Zariç, Y., 2017. Glutasyon S-transferaz enziminin Van Gölü inci kefali balığı

(Chalcalburnus tarichi) solungacından saflaştırılması, karakterizasyonu, bazı metal ve pestisitlerin enzim aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi, Yüksek lisans tezi, İbrahim Çeçen Üniversitesi, Ağrı

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Ayşegül Mine ÖZAVCI
Doğum Yeri ve Tarihi	Antalya- 1989
Eğitim Durumu	
Lisans Öğrenimi	SDÜ Fen Edebiyat Fakültesi- Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans Öğrenimi	AIÇÜ Fen Bilimleri Enstitüsü- Kimya Anabilim Dalı
Bildiği Yabancı Diller	ingilizce
Bilimsel Faaliyetler	
İş Deneyimi	
Stajlar	
Projeler	TUBİTAK Öğrenci Projesi (2009)
Çalıştığı Kurumlar	Emniyet Müdürlüğü
İletişim	
E-posta Adresi	a.mineozavci_07@hotmail.com
Mezuniyet Tarihi	
20.08.2019	