

T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YÜKSEK YAĞLI DİYETİN KARACİĞER KARBONİK
ANHİDRAZ AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

PINAR SARIŞIN

TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. AHMET ALVER

**YÜKSEK LİSANS TEZİ TIBBİ BİYOKİMYA
ANABİLİM DALI**

RİZE-2018

T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Yüksek Yağlı Diyetin Karaciğer Karbonik Anhidraz Aktivitesi Üzerine
Etkisinin İncelenmesi

Prof. Dr. Ahmet ALVER danışmanlığında, Pınar SARIŞIN tarafından hazırlanan bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla oluşturulan jüri tarafından 16/07/2018 tarihinde Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

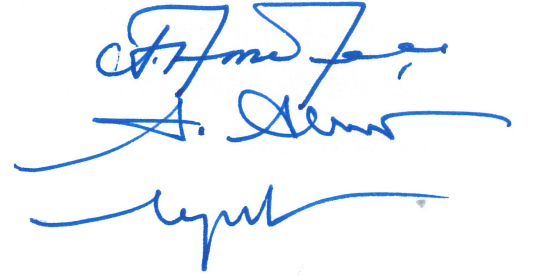
Jüri Üyeleri Unvanı Adı Soyadı

Başkan : Doç. Dr. Ahmet MENTEŞE

Üye : Prof. Dr. Ahmet ALVER

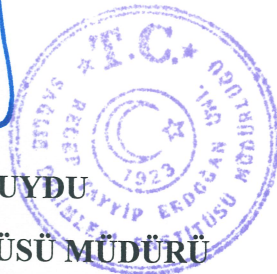
Üye : Dr. Öğr. Üyesi Ayşegül SÜMER

İmzası




Doç. Dr. Hüseyin Avni UYDU

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ



ÖNSÖZ

Bu bölüme başlamam için beni yüreklendiren, her zaman güler yüzü ve tüm yargılardan arınmış güzel kalbiyle tüm öğrencilerini olduğu gibi beni de, öğrencisinden ziyade bir evlat bir meslektaş olarak görüp her daim öğreten, öğretmeyi ve hoşgörüyü altını çizerek bize her anında hatırlatan, ne yazık ki şuan aramızda olamayan rahmetli hocam Prof. Dr. Hasan EFE'ye,

Bu çalışmada bana her daim yardımcı olan, emeğini bir an esirgemeyen, bana bu çalışmada ve gelecek hayatımda yol gösteren, bilgisiyle bir çok kazanımlar elde etmeme yardımcı olan güler yüzüyle motive eden danışman hocam Prof. Dr. Ahmet ALVER'e,

Bölümdeki katkıları ile biz öğrencilerine yol gösteren Prof. Dr. Adnan YILMAZ, Doç. Dr. Hüseyin Avni UYDU, Dr. Öğr. Üyesi Medeni ARPA' ya,

Bütün hayatım boyunca her düştüğümde beni yılmadan usanmadan tutup kaldıran, sabırla beni dinleyen, her daim yanımda olan, bütün eğitim hayatım boyunca bana sonsuz desteklerini sunan en kıymetli varlıklarım Gülsevrim ve Kemal SARIŞIN'a ve varlıklarına şükrettiğim kardeşlerim Zuhul SARIŞIN, Nurdan ZAVALSIZ ve eniştem Onur ZAVALSIZ'a; Yanımda olamadığı zamanlarda dahi desteğim olan hayattaki tüm yükümü severek paylaşan, beni hep yüreklendiren, güzel yürekli yol arkadaşım, eşim Mahir KAPLAN'a, sevgisi ve tüm yardımları ile hep yanımda hissettiğim, dualarının yolumu aydınlattığı Sevim ŞAİR'e,

Bana destek veren, burda geçirdiğim süre boyunca kazanımlarda bulunduğum bütün hocalarıma ve arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Pınar SARIŞIN

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Tarafımdan hazırlanan ‘Yüksek Yağlı Diyetin Karaciğer Karbonik Anhidraz Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi’ başlıklı bu tezin, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesindeki hususlara uygun olarak hazırladığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal işlemi kabul ettiğimi beyan ederim.
23/05/2018

Pınar SARISIN

Uyarı: Bu tezde kullanılan özgün ve/veya başka kaynaklardan sunulan içeriğin kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Yağlı Diyetin Karaciğer Karbonik Anhidraz Aktivitesi Üzerine Etkilerinin

İncelenmesi

Pınar SARIŞIN

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışmanı: Prof. Dr. Ahmet ALVER

Prokaryotlardan ökaryotlara kadar çok geniş bir dağılıma sahip olan karbonik anhidrazlar (CA, E.C.4.2.1.1, karbonat hidrolizaz), bikarbonatın (HCO_3^-) dehidrasyon veya (CO) karbondioksitin hidrasyonunu dönüşümlü olarak katalizleyen, aktif bölgesinde prostetik grup olarak Zn^{2+} içeren bir metaloenzimlerdir. Bu enzimler CO_2 , H^+ ve HCO_3^- ün hücre içi ve hücre dışındaki konsantrasyonlarının düzenlenmesi, dokularda elektrolit salınımı, kemik resorpsiyonu, tümör oluşumu ve idrar asidifikasyonu gibi birçok fizyolojik süreçte görev almaktadır. Bu tez çalışmasında yüksek yağlı diyetin *de novo* lipit sentezinin öncü bileşiği olan HCO_3^- 'ı sentezleyen CA aktivitesi üzerine etkilerinin, fare karaciğerinde incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışma kapsamında, 16 adet erkek C57BL/6J ırkı fare Research Diets' ten alınan yüksek yağlı ve standart fare yemleri ile beslendi. Dört aylık beslenme periyodunun sonunda farelerin ağırlıkları ölçüldü ve dekapitasyon ile sakrifiye edildi. Karaciğer dokuları homojenize edildikten sonra CA aktiviteleri potansiyometrik metod ile ölçüldü. Standart diyet ile beslenen farelerin CA aktivitesi $0,87 \pm 0,26$ U/mg protein olarak ölçülürken; Yüksek yağlı diyet grubundaki farelerde ise aktivite $0,60 \pm 0,15$ U/mg protein olarak bulundu. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda, bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p=0.038$). Sonuç olarak, yüksek yağlı diyet kullanımının *de novo* lipit sentezinde öncü bileşiği sentezleyen CA aktivitesini fare karaciğerinde azalttığı ve bu azalışa metabolik ve hormonal değişikliklerin sebep olabileceği kanaatine varıldı.

2018, 32 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Karbonik Anhidraz, Karaciğer, Fare, Yüksek Yağlı Diyet.

ABSTRACT

The Investigation Of Effect's High Fat Diet On Carbonic Anhydrase Activity in Liver

Pınar SARIŞIN

Recep Tayyip Erdoğan University

Graduate School of Health Sciences

Department of Medical Biochemistry

Master's Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Ahmet ALVER

Carbonic anhydrases (CA, E.C.4.2.1.1, carbonate hydrolase), which has a wide range from prokaryotes to eukaryotes, are a metalloenzyme containing Zn^{2+} as a prosthetic group in active site, catalyzes reversibly the dehydration or hydration of bicarbonate (HCO_3^-). These enzymes are involved in many physiological processes such as the regulation of intra and extracellular CO_2 , H^+ and HCO_3^- concentrations, electrolyte secretion in tissues, bone resorption, tumorigenesis and urinary acidification. In this thesis study, it is aimed to investigate of the effect's high fat diet on the activity of CA, synthesized HCO_3^- that is the precursor of *de novo* lipid synthesis, in mice liver. Within the study, 16 male C57BL / 6J mice fed with high fat and standard mouse feed from Research Diets. At the end of the four-month feeding period, mice were weighed and sacrificed by decapitation. After the liver tissues were homogenized, CA activities were measured by potentiometric method. The activity of the standard diet fed mice was measured as 0.87 ± 0.26 U/mg protein. For the rats in the high fat dietary group, the activity was 0.60 ± 0.15 U/mg protein. The result of statistical analysis, this difference was found to be statistically significant ($p= 0.038$). As a result, it was concluded that the use of high-fat diet reduced activity of CA synthesized the precursor substance for *de novo* lipid synthesis in mice live and metabolic and hormonal changes may be caused this decrease.

2018, 32 pages.

Keywords: Carbonic Anhydrase, Liver, Mouse, High Fat Diet

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	I
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	II
ÖZET.....	III
ABSTRACT.....	IV
SEMBOLLER VE KISALTMALAR.....	V
1.GENEL BİLGİLER.....	1
1.2. Karbonik Anhidraz ve Fizyolojik Önemi.....	1
1.3. Karbonik Anhidraz İzoenzimleri.....	2
1.3.1. Karbonik Anhidraz I (CA I).....	5
1.3.2 Karbonik Anhidraz II (CA II).....	5
1.3.3. Karbonik Anhidraz III (CA III).....	6
1.3.4. Karbonik Anhidraz VA ve VB (CA VA ve VB).....	7
1.4. Karaciğer Dokusu.....	8
1.5. Diyet Ve Obezite.....	9
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	10
2.1. Kullanılan Cihazlar ve Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	10
2.2. Kullanılan Ticari Kitler.....	11
2.3. Kullanılan Hayvanlar.....	12
2.4 Yöntem.....	12
2.4.1. Deney Gruplarının Oluşturulması.....	12
2.5. Karaciğer Dokusunda Karbonik Anhidraz Aktivitesinin Ölçümü.....	15
2.5.1. Homojenizasyon Aşaması.....	15
2.5.2. Karbonik Anhidraz Aktivitesinin Ölçülmesi.....	15
2.5.3. Serum Glukoz, TAG ve İnsülin Ölçümü.....	17
2.5.4. Karaciğer Dokusunda Protein Tayini.....	18
2.5.5. Karaciğer Dokusunda Triaçilgliserol Tayini.....	19
2.6. İstatistiksel Analiz.....	20
3. BULGULAR.....	21
3.1. Ağırlık, Serum Glukoz, TAG, İnsülin Sonuçları.....	21
3.2. CA Aktivitesi Ölçümü İçin Uygun Zaman Aralığının Belirlenmesi.....	22
3.3. Karaciğer Dokusunda Karbonik Anhidraz Aktivitesi.....	23

3.4. Karaciğer Dokusunda Triaçilgliserol Seviyesi.....	24
4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	25
KAYNAKLAR.....	28
ÖZGEÇMİŞ.....	32



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Karbonik Anhidrazın Dönüşümlü Reaksiyonu.....	1
Şekil 2. Karaciğer Dokusunda Protein Miktarı Tayininde Kullanılan Standart Grafik.....	18
Şekil 3. Karaciğer Dokusunda TAG Tayininde Kullanılan Standart Grafik.....	19
Şekil 4. Standart pH Değişimi.....	22
Şekil 5. Karaciğer Dokusu CA Aktivitesi.....	23
Şekil 6. Karaciğer Dokusu Triaçilgliserol Seviyeleri.....	24
Şekil 7. CA İzoenzimlerinin Yağ Asidi Sentezindeki Rollerini.....	26

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. α -CA Ailesinin Yerleşimi, Aktivitesi ve İşlevi.....	3
Tablo 2. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler.....	10
Tablo 3. Kullanılan Ticari Kitler.....	11
Tablo 4. Standart Fare Yeminin İçeriği.....	13
Tablo 5. Yüksek Kalorili Fare Yeminin İçeriği.....	14
Tablo 6. CA Hidrataz Aktivitesi Ölçümü İçin Gerekli Reaksiyon Bileşenleri ve Hacimleri.....	16
Tablo 7. Deney Gruplarında Ağırlık ve Serum Parametrelerindeki Değişimler.....	21

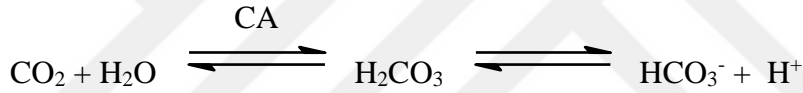
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

kDa:	Kilodalton
KTÜ:	Karadeniz Teknik Üniversitesi
LDL:	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
mL:	Mililitre
mM:	Milimolar
μ L:	Mikrolitre
s:	Saniye
TAG:	Triaçilgliserol
PC:	Pürivatkarboksilaz
ACC:	asetil-CoA Karboksilaz
%:	Yüzde
α :	Alfa
β :	Beta
γ :	Gama
δ :	Delta
ϵ :	Epsilon
η :	Eta

1.1. GENEL BİLGİLER

1.2. Karbonik Anhidraz Ve Fizyolojik Önemi

Karbonik anhidraz (CA, E.C.4.2.1.1, karbonat hidrolizaz), tüm canlılarda yaygın olarak bulunan, aktif bölgesinde prostetik grup olarak Zn^{2+} içeren, monomerik yapıya sahip bir metaloenzimdir. CA, bikarbonatın (HCO_3^-) dehidrasyon reaksiyonunu veya CO_2 'in hidrasyonunu dönüşümlü olarak katalizler (Şekil 1). Yaklaşık 260 amino asitten oluşan CA enzimi, 30 kDa ağırlığındadır. Bu enzim ilk olarak memeli eritrositlerden 1933 yılında saflaştırılmıştır (C.Frost and Mckenna, 2014; Şentürk, 2015; Diler vd., 2009). CA'nın katalitik bölgesinde, üç histidinle bir su molekülüne, aktif bölgesinde bulunan Zn^{2+} katyonu bağlanır (Bowser vd, 2016).



Şekil 1. Karbonik anhidrazın dönüşümlü reaksiyonu (Şentürk, 2015)

Karbonik anhidraz, yukarıdaki reaksiyonun yanında karbosilik, sülfonik, karbonik ve fosforik esterlerin, aldehitlerin, piruvatın hidroliz reaksiyonunu da katalizler. Ancak bunların fizyolojik önemi tam olarak ortaya konulamamıştır (Alver, 1996; Pocker, 1991).

CA katalizlediği bu reaksiyon ile, CO_2 ve bikarbonatın akciğer ve dokular arasında taşınmasında, pH regülasyonunda, dokularda elektrolit salgılanmasında, birçok biyosentez reaksiyonlarında (lipogenez, glukoneogenez vs.), kalsifikasyon, kemik resorpsiyonu, tümör oluşması, idrar asidifikasyonu gibi bir çok fizyolojik ve patolojik süreçlerde yer almaktadır (Browser vd., 2016; Saleem vd., 2017).

1.2. Karbonik Anhidraz İzoenzimleri

CA, prokaryotlardan ökaryotlara kadar oldukça geniş bir dağılıma sahip olmakla beraber, α , β , γ , δ , ϵ , η karbonik anhidrazlar olmak üzere 6 adet birbirinden farklı ve bağımsız gen ailesine sahiptir. α -CA (alglerin, bakterilerin omurgalıların ve de yeşil yapraklı bitkilerin sitoplazmalarında), β -CA (genellikle bakterilerin, alglerin, tek ve çift çenekli bitkilerin kloroplastlarında), γ -CA (başta archealar olmak üzere, bazı bakterilerde), δ ve ϵ -CA (bir takım deniz diatomlarında) ve yakın zamanda bulunan ve η -CA türleri ise protozoada bulunur (Hilvo vd,2005;Yalduz,2012).

Alglerin, bazı bakterilerin ve bitkilerin CA'ları biyosentetik reaksiyonlarda ve fotosentez reaksiyonlarında mühim fonksiyonlara sahiptir(Supuran, 2016). Diatomlarda δ - ve ϵ -CA'lar karbondioksit sabitlenmesinde (fiksasyon) rol almaktadır. Protozonlarda η -CA'ların görevi net olarak anlaşılamamıştır fakat *de novo* pürin/pirimidin biyosentetik yollara dahil olabileceği fikri vardır (Pocker ve Ng, 1973; Capasso ve Supuran, 2015; Supuran, 2016).

Karbonik anhidrazın en fazla bilinen ve aydınlanmış olan sınıfı alfa ailesinin 16 adet izoenzimi bulunmaktadır. Bunların 13 tanesi aktif izoform (CA I-VA, VB, VI, VII, IX ve XII-XV) ve 3 tanesi inaktif izoformdan (VIII, X, XI) oluşur. CA I, II, III, VII ve XIII sitozolde, CA IV, IX, XII, XIV, XV hücre membranında, CA-VI salgısal, CA-VA ve VB mitokondride bulunur. CA XV'in katalitik aktivitesinin düşük olmakla beraber CA-IV ile benzer özellikleri taşıdığı gözlemlenmiştir. CA VIII, X, XI izoenzimlerinin ise tümör gelişiminde etkili olduğu belirlenmiştir. CA VA ve VB izoenzimleri omurgasızlarda ve omurgalılarda glukoneogenez ve lipogenez gibi süreçlere katılmaktadır (Us, 2009; Şentürk, 2015; Saleem ve Saeed, 2016). α - CA izoenzimleri Tablo 1' de verilmiştir (Supuran, 2009).

Tablo.1 α -CA ailesinin yerleşimi, aktivitesi ve işlevi (Renner;2017)

Hücre içi Yerleşim	İzoenzim	Kcat (x 10 ⁵ s-1)	İşlevi	Bulunduğu Dokular
Sitozolik	I	2	• Solunum • Asit/baz homeostazı	Kolon, Göz, Ter Bezi, Yağ Doku, Kan Hücreleri
	II	14	• Solunum • Asit/baz homeostazı	Bütün Dokular
	III	0,1	• Metabolizma • Oksidatif hasar	Yağ Dokuları, İskelet Kası, Karaciğer
	VII	9,5	• Epilepsi • Oksidatif hasar • Kanser	Beyin, Kolon, Karaciğer ve İskelet Kası
	XIII	1,5	• Bilinmiyor	Akciğer, Böbrek, Kalp, Beyin, İskelet Kası, Üreme Organları, Bağırsaklar
Sitozolik (CARPS)	VII	---	• Motor fonksiyon • Kanser çoğalması	Beyin
	X	---	• CNS	Merkezi Sinir Sistemi
	XI	---	• CNS • Kanser çoğalması	Merkezi Sinir Sistemi
Membran bağımlı	IV	11	• Solunum • Sperm hareketliliği • CNS tamponlama	Akciğer, Böbrek
	IX	3,8	• Gastrik homeos taz • Kanser çoğalması • Hipoksi	Mide, Kolon, Pankreas
	XII	4,2	• Sıvı homeostazı • Kanser çoğalması • Hipoksi	Böbrek
	XIV	3,1	• Fotoreseptör • Sinyalizasyon • CNS tamponlama	Beyin ve Göz
	mXV	4,7	• Bilinmiyor	Böbrek
Mitokondriyal	VA	2,9	• Üre sentezi • Glukoneogenez • Lipogenez	Karaciğer, İskelet Kası, Böbrek
	VB	9,5	• Üre sentezi • Glukoneogenez • Lipogenez	Bütün Dokular
Salgısal	VI	3,4	• Tat algılaması • Diş boşlukları	Tükürük Bezleri

CA'lar özelleşmiş hücrelerde bulunan farklı izoformlarıyla bir çok yerde bulunur. Örneğin, CA I ve CA II izoenzimleri, serumda çok bol miktarda bulunan proteinlerdir. CA II, IV, XII ve XIV izoenzimleri asit-baz dengesini ve çözünür maddelerin atılmasını yüksek oranda düzenleyen böbrekte bulunur. CA III izoenzimi ise iskelet kasında bulunur (Keha vd, 2004).

1.2.1. Karbonik Anhidraz I (CA I)

CA I, eritrositlerde en bol bulunan proteinlerden biridir. Konsantrasyonu 12 mg/gram hemoglobindir. İnsan eritrositlerinde CAII' den neredeyse altı kat daha fazla bulunur. Aktivitesi düşük olan bu izoenzim CAII' nin %15' i kadar bir aktiviteye sahiptir ($K_{cat}=2.10^5 s^{-1}$). Sağlıklı yetişkin eritrositlerinde CA I, total CA aktivitesinin %50' sini oluşturmaktadır. CA I, insan fetal eritrositlerinde bulunmaz. CA I, Cl⁻ tarafından oluşan inhibisyona CAII' den daha hassastır, sülfonilamid inhibitörleinden de CAII' ye göre daha dirençlidir. CA I, kornea epitelyumunda, ter bezlerinde, lenste, kalın bağırsağın epitelyumunda ve adipoz dokular da bulunur. Kırmızı kan hücrelerinde hemoglobinden sonra en bol bulunan proteindir, fakat hiç bir bilinen hematolojik anormallik CA I eksikliğinden oluşmamaktadır. CA I izoenziminin fizyolojik önemi saptanamamış olmakla beraber başka CA izoenzimlerinin ve/veya diğer mekanizmaların CA I eksikliğini telafi edebildiği düşünülmektedir (Şentürk, 2015).

1.2.2. Karbonik Anhidraz II (CA II)

Yaklaşık olarak 30 kDa ağırlığındaki CA II, üzerinde en fazla araştırma yapılan karbonik anhidraz izoenzimidir (Lindskog, 1997). CA II, hemen hemen bütün doku ve organlarda hücrelerin sitozolünde bulunan, CO₂ hidrasyonu için maksimum turnover sayılı ($1.10^6 s^{-1}$) ve en geniş doku dağılımlı izoenzimidir (Şentürk, 2015).

Eritrositlerde hemoglobinden sonra en fazla bulunan protein CA I olmasına karşın hücresel solunumun devamlılığı için CA II' nin daha önemli bir rolü olduğu belirlenmiştir. CA II eksikliğine sahip insanlarda, solunum ve pH dengesi ile ilgili

birtakım hastalıklar ortaya çıkarken; CA I eksikliği olan insanlar da herhangi bir hastalığa rastlanmamıştır. Bu durum CA II ve CA I arasındaki katalitik aktivitenin farklılığından oluşmaktadır. CA I eksikliği diğer CA izoformlarıyla telafi edilebilirken aynı durum CA II için söz konusu değildir(Lindskog, 1997).

CA II beyinde oligodendrositler ve beyin epitelyumunda, gözde lensler ve retina hücrelerinde, düşük seviyede proksimal tüp, henle kulpu ve toplama kanallarında, eritrositlerde, trombositlerde, endotel hücrelerde, kemikte osteoklastlarda, karaciğerde, böbrek interkalate hücreleri, salgı bezlerinde asiner hücrelerde, pankreatik kanal hücrelerinde, gastrikparietal hücrelerde, uterus endometriumunda, spermatozoada bulunur (Lindskog, 1997). CA II karaciğerde, böbrekte proksimal tübüllerde ve eritrositlerde CO₂ değişimine katkı sağlamaktadır (Şentürk, 2015).

CA II izoenziminin eksikliğinde renal tubuler asidoz, osteopetroziscerebral kalsifikasyon ile sonuçlanan “CA II eksikliği sendromu” tanımlanmıştır. Dolayısıyla bu izoenzimin kemik, böbrek ve beyindeki önemi büyüktür (Lindskog, 1997).

Dönüşümsüz körlüğe sebep olan glakomda CA II enziminin önemli rolü vardır. Glakom anormal derecede yüksek göz içi basıncıyla ortaya çıkmaktadır. Aköz humor göz içi basıncının sağlanmasında büyük rol oynamaktadır (Şentürk, 2015). CA inhibitörleri glakom tedavisinde ilaç olarak da kullanılmaktadır. CA II' nin katalizlediği HCO₃⁻, sperm hareketliliği için önem teşkil etmektedir. Epididimal epitelyum boyunca CA II ve CA IV, bikarbonat (HCO₃⁻) homeostazını sağlamaktadırlar. CA II ve CA IV knockout fareler ile yapılan çalışmalarda HCO₃⁻ homeostazının bozulduğu görülmüş ve bu iki enzimin optimal fertilite açısından gerekliliği anlaşılmıştır (Lindskog, 1997; Frost vd, 2014).

CA II yağ asidi sentezinde de rol almaktadır. Asetil CoA karboksilaz basamağında asetil CoA' dan malonil CoA eldesi için gerekli olan bikarbonat, CA II tarafından sağlanmaktadır (Lindskog, 1997; Frost vd, 2014).

1.2.3. Karbonik Anhidraz III (CA III)

Yaklaşık olarak 30 kDa ağırlığında çok düşük aktiviteli sitozolik karbonik anhidraz izoenzimidir. İlk olarak 1979' da insan iskelet kasından saflaştırılmıştır. İskelet kası hücrelerinin total protein içeriğinin %1-2' sini oluşturur ve iskelet kasında en bol bulunan proteinlerden biridir. CA III, yapısal olarak CA II izoenzimine oldukça benzemektedir. Fakat CA III' ün hidrataz aktivitesi CA II' nin % 3' ü kadardır. 25 °C' de maksimum karbondioksit hidrasyon turnover sayısı yaklaşık olarak $8 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ ' dir. Düşük aktivitesi, aktif bölgesinde proton mekiği görevi yapan His 64' ün olmamasından ve yine aktif bölgesinde CA II' nin aksine Leu 198 yerine Phe 198 bulunmasından kaynaklanmaktadır (Frost and McKenna, 2014).

CA III, yağ dokusu, karaciğer ve yavaş kasılan iskelet kası fiberlerinde (tip I lifler) bol miktarda; tükürük bezleri, uterus düz kas hücreleri, akciğer, böbrek, kolon, eritrositler, prostat ve testislerde ise düşük miktarda ifade edilmektedir. Obez fare adipositlerinde ve karaciğerde kontrol grubuna göre daha düşük CA III seviyesi tespit edilmiştir (Frost and McKenna, 2014).

CA III, rodent yağ dokusunda bol miktarda bulunmaktadır. Yağ sentezinde Asetil CoA karboksilaz enzimine bikarbonat sağladığı ileri sürülmüştür. Ancak, CA III rodentlerde obezite ile birlikte down-regüle edilmektedir. Bu durum yakıt metabolizması ile ilgili rolünün sorgulanmasına sebep olmuştur. Günümüzde mevcut bilgiler CA III' ün PPAR γ 2 gen ekspresyonunu düzenleyerek adipogenezi düzenlediği yönündedir (Frost, 2009).

CA knockout farelerle yapılan çalışmalarda büyüme, yaşam süresi, üreme potansiyeli normaldir. Wild tiplerle knockout farelerin serum, kas, karaciğer ve adipoz dokularında serbest yağ asidi seviyesi aynı oranlarda olup beyin, kas ve karaciğer mRNA'larında önemli bir değişiklik görülmemiştir. Ancak, CA III knockout farelerin iskelet kaslarında yapılan çalışmada kasların dinlenme seviyesine gelme sürelerinin wild tiplere nazaran daha yavaş olduğu tespit edilmiş ve knockout farelerin fosfokreatin ATP depolarından daha uzun süre yararlandıkları görülmüştür. Bu durum CA III

knockout farelerde alternatif ATP üretim yolları olan glikoliz, oksidatif fosforilasyon ve yağ asidi oksidasyonunun düzenlenmesinin zarar gördüğünü düşündürmektedir (Frost, 2009; Frost and McKenna, 2014).

1.2.4. Karbonik Anhidraz CA VA ve CA VB

CA V, ilk kez 1980' de domuz karaciğeri mitokondrisinden izole edilmiştir. Daha sonra sırasıyla fare, sıçan, insan CA V cDNA' ları klonlanmıştır. 38 amino asitlik hidrofobik N-terminal mitokondriyal sinyal sekansı ve 267 amino asitlik katalitik domaini ile 305 amino asitlik uzun bir polipeptid zincirine sahiptir. İnsanda 267 amino asitlik sekans daha önce karakterize edilmiş olan karbonik anhidrazlarla (CA I- CA VII), %30-49 oranında benzerlik göstermiştir (Nagao vd, 1993).

Yapılan çalışmalar mitokondri iç membranının HCO_3^- için geçirgen olmadığını göstermiştir. Günümüzde 11 üyesi tanımlanmış olan bikarbonat taşıyıcılarının hiçbiri mitokondri iç membranında bulunmaz. Bu nedenle bikarbonatın mitokondri içerisinde sentezlenmesi gerekir (Frost, 2009). CA VA ve CA VB mitokondriyal izoenzimler olup omurgalı ve omurgasızlarda lipogenez, glukoneogenez, üregenez gibi önemli metabolik olaylarda bikarbonat sağlayarak rol almaktadırlar (Supuran and Winum, 2009).

De novo lipogenezin mitokondride gerçekleşen piruvatın oksaloasetata dönüşüm basamağı, bikarbonat ve piruvat karboksilaz olduğu durumlarda gerçekleşir. Tepkimenin bu basamağı için gerekli olan bikarbonatı CA VA ve/veya VB sağlamaktadır. Özellikle yağ hücrelerinde lipogenez için CA VB' nin çok daha önemli olduğu belirtilmiştir (Frost, 2009; Supuran and Winum, 2009).

CA VA ve CA VB enzimlerinin metabolizma üzerindeki etkilerinin ayrıntılı olarak görebilmek için knockout fare modelleri oluşturulmuştur. CA VA knockout farelerde wild tiplere nazaran hastalıklı yavru doğumu, kilo kaybı ve yüksek amonyak seviyesi gözlenirken CA VB knockout farelerin fenotipinde belirgin bir değişiklik gözlenmemiştir. Açlık kan şekeri ve büyüme geriliği ise CA V A/B double knockout farelerde artmıştır. Dolayısıyla CA V double knockout farelerde fenotipteki değişiklik daha fazla gözlemlenmiştir. Böylece CA VA'ın üregenez ve glukoneogenez gibi

metabolik olaylarda temel fonksiyonlu enzim olduğu öne sürülmüştür (Supuran and Winum, 2009).

1.3. Karaciğer Dokusu

Karaciğerin, yakıt metabolizmasında, sindirimde ve yabancı maddelerin detoksifikasyonu ve eliminasyonunda merkezi ve kritik biyokimyasal rolü vardır. Sindirim sisteminden gelen kanın tamamı ilk olarak karaciğerden geçer. Burada besinlerin sindiriminden kaynaklanan ürünler işlenir, dönüştürülür ve depolanır. Karaciğer proteinlerin, karbohidratların ve lipitlerin metabolizmasında merkezi role sahiptir. Ayrıca diyet kaynaklı yağların ve vitaminlerin emilimini kolaylaştırmak için, kolesterolden safra asitlerini sentezler. Karaciğer hem endojen, hemde ilaçlar ve toksinler gibi eksojen bileşiklerin biyotransformasyonunu gerçekleştirir ve bunların atılımını kolaylaştırır. Aynı zamanda, tiroid hormonları, kortizol, D vitamini gibi hormonların katabolizmasını gerçekleştirerek ve insülin like growt faktör I, anjiotensinojen ve eritropoetin gibi hormonları da sentezleyerek endokrin fonksiyonları gerçekleştirir (Burtis C.A. vd.; 2014).

Karaciğerde *de novo* yağ asidi sentezi için gerekli olan bikarbonatı sağlayan sitozolik CA' lar (CA I, CA II) ve mitokondriyal CA V, karaciğer dokusunda bol miktarda bulunmaktadır. Ayrıca yakıt metabolizması ile ilişkisi tam gösterilmemiş olmakla beraber CA III enzimi de erkek rodentlerin karaciğerinde bol miktarda bulunmaktadır. Ayrıca hepatositlerin membranlarında CA IV enzimi de bulunmaktadır. Bu enzimin hepatositik plazma membranlarında bikarbonat taşınması ile ilgilidir (Garg, 1974; Dodgson, 1991; Wilson vd., 2016).

Rodentlerde karaciğer dokusunda cinsiyete bağlı olarak sitozolik CA ların miktarları değişkendir. Dişilerde karaciğerde sitozolde CA II bol miktarda bulunurken erkeklerde CA III bol miktarda bulunmaktadır. Bu oranlar cinsiyet hormonları başta olmak üzere diğer faktörler tarafından düzenlenir (Garg, 1974; Dodgson, 1991). CA II izoenzimi fare karaciğerinde testosteron tarafından inibe edilirken östrojen tarafından aktive edilir; tam tersi olarak CA III, testosteron tarafından indüklenirken, östrojen tarafından baskılanır (Wilson vd., 2016).

1.4. Diyet ve Obezite:

Bilimsel çalışmalarda, deneysel obezite oluşturmak için çeşitli modeller kullanılmaktadır. Bu modeller, farklı diyet protokollerinin kullanıldığı, çevresel indüklenmiş obezite modeli, transgenik obezite modelleri, kimyasal bir ajanın uygulanması ya da cerrahi girişimle oluşturulan obezite modelleridir (örneğin: ventromedial nucleus lesion) (Tschop and Heiman,2001). Ancak bu modeller insanda görülen obezitenin etiyojisini tam olarak yansıtmamaktadır. İnsanlarda obezite büyük oranda diyetle ilgilidir. Bu yüzden rodentlerde diyet ile indüklenmiş obezite modelleri oldukça sık kullanılır ve bilgi vericidir. Özellikle fazla miktarda yağ veya karbohidrat içeren diyet modelleri sıklıkla kullanılmaktadır. Yüksek yağ içerikli diyetle oluşturulan obezite, insülin direnci ve hiperglisemi ile karakterizedir. Diyetle kullanılan yağın çeşidine bağlı olarak farklı kilo artışı ve metabolik süreçler gözlenebilir. Yüksek karbohidrat içerikli diyetle ise oluşan modeller aşırı kilo alınımı, insülin rezistansı ve yüksek TAG seviyeleri ile karakterizedir. Ancak, farelerde obezitenin derecesi yüksek yağlı diyetle beslenenlerde, yüksek karbohidrat diyetiyle beslenenlere göre daha fazladır (Torrens vd.,2008).

Bu tez çalışmasında yüksek yağlı diyet kullanımının *de novo* lipit sentezinde öncü bileşiği senteleyen CA aktivitesi üzerine etkilerinin fare karaciğerinde araştırılması amaçlanmıştır.

2. Yapılan Çalışmalar

2.1. Kullanılan Cihazlar ve Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bu çalışmada kullanılan cihazlar, laboratuvar aletleri ve kimyasal malzemeleri üretici firmaları ile beraber Tablo 2' de verilmiştir.

Tablo 2. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	Üretici Firma
Vorteks	Velp. Scientifica vortex
Magnetik karıştırıcı	Wise stir MSH-20D
Otomatik pipet 10-100 µL	Brand transferpette
Otomatik pipet 100-1000 µL	Brand transferpette
Otomatik pipet 1-5 mL	Gilson pipetman
pH metre	Hanna instruments HI 2210 pH Meter
Homojenizatör	Omni international tissue master 125
Hassas analitik terazi	Acculab sartorius group
Deney tüpleri	Isotherm test tube
Soğutmalı santrifüj	Thermo Scientific Multifuge3SR+
Derin dondurucu	Bosh
Çalkalayıcı	HLC Bio tech
H ₂ SO ₄	Merck
Tris baz	Merck
Deiyonize su	Merkez lab.
Tris HCl	Himedia
CO ₂ tüpü	Erkuloğlu Sınai Tıbbi Gazlar San. Tic.Ltd.

2.2. Kullanılan Ticari Kitler

Kullanılan ticari kitler ve üretici firmaları hakkındaki bilgi Tablo 3' te verilmiştir.

Tablo 3. Kullanılan ticari kitler

Kullanılan Ticari Kitler	Üretici Firmalar
Triglyceride Colorimetric Assay Kit	10010303, Cayman Chemical
Protein Colorimetric Assay Kit	Milipore, BCA Protein Assay

2.3. Kullanılan Hayvanlar

Yapılan deneylerin tamamı, Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan deneyleri yerel etik kurulunun 2010/39 protokol no' lu etik kurul onayı ile sakrifiye edilmiş hayvanların karaciğerlerinde yapılmıştır.

Çalışmamızda TÜBİTAK tarafından desteklenen 114S553 numaralı projede kullanılan ve Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma ve Uygulama Merkezinden temin edilen C57BL/6J ırkı 16 adet, 4-5 haftalık, 10-15 g ağırlığında erkek farelerden alınan karaciğer dokusu örnekleri kullanılmıştır. Yine aynı projeden üretilen ve İmran İNCE' nin doktora tezinde bulunan ve bu tez çalışmasında da faydalanılacak veriler kaynak belirtilerek kullanılmıştır (İnce,2017).

2.4. Yöntem

Çalışmada kullanılan fareler, Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ) Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezinden temin edilip, aynı yerde 12 saatlik karanlık-aydınlık ortam sağlanarak beslenmesi yapılmıştır. Çalışmada kullanılan yemler (D12550J ve D12492) *Research Diets*'ten satın alınmıştır (İnce,2017).

2.4.1. Deney Gruplarının Oluşturulması

Çalışmaya dahil edilen tüm fareler, 15 gün süreyle, kalorisinin % 70'ini karbohidrattan, % 20'sini proteinden, % 10'unu yağdan sağlandığı standart fare yemi (D12550J) ile beslendi. Yem ve su *ad libitum* olarak verildi. On beş gün sonra fareler rasTAGe her grupta 8 adet fare olacak şekilde 2 gruba ayrıldı ve tartım işlemleri gerçekleştirildi.

I. Grup: Kontrol grubu, kalorisini % 70 karbohidrat, % 20 protein, % 10 yağ'dan oluşan standart fare yemi ile,

II. Grup: Obez grup, kalorisini % 60 yağ, % 20 karbohidrat, % 20 protein' den oluşan yüksek kalorili yem (D12492) ile beslendi.

Farelerin kullanmış olduğu D12550J ve D12492 yemlerin içeriği Tablo 4 ve Tablo 5' te sunulmuştur (İnce,2017).

Tablo 4. Standart Fare Yeminin İçeriği (D12550J)

D12550J Kodlu Standart Fare Yemi İçeriği	% g	%Kcal
Protein	19.2	20
Karbohidrat	67.3	70
Yağ	4.3	10
Toplam Kalori	3.83	100
Bileşenler	g	Kcal
Kazein	200	800
L-sistin	3	12
Mısır nişastası	506.2	2024.8
Maltodeksrin 10	125	500
Sükroz	68.8	275
Selüloz	50	0
Soya fasulyesi yağı	25	225
Hayvansal yağ	20	180
Mineral karışımı S10026	10	0
Dikalsiyum fosfat	13	0
Kalsiyum karbonat	5.5	0
Potasyum sitrat (H2O' lu)	16.5	0
Vitamin karışımı W10001	10	40
Kolin bitartarat	2	0
FD&C Sarı gıda boyası #5	0.04	0
FD&C Kırmızı gıda boyası #40	0	0
FD&C Mavi gıda boyası #1	0.01	0
TOPLAM	1055.05	4057

Tablo 5. Yüksek Kalorili Fare Yeminin İçeriği (D12492)

D12492 Kodlu Yüksek Yağ İçerikli FareYemi İçeriği	% g	% kcal
Protein	26	20
Karbohidrat	26	20
Yağ	35	60
Toplam Kilo Kalori / gr	5.24	100
Bileşenler	g.	kcal.
Kazein	200	800
L-sistin	3	12
Mısır nişastası	0	0
Maltodeksrin 10	125	500
Sükroz	68.8	275
Selüloz, BW200	50	0
Soya fasulyesi yağı	25	225
Hayvansal yağ	245	2205
Mineral karışımı S10026	10	0
Dikalsiyum fosfat	13	0
Kalsiyum karbonat	5.5	0
Potasyum sitrat (1.H2O)	16.5	0
Vitamin karışımı W10001	10	40
Kolin bitartarat	2	0
FD&C Sarı gıda boyası #5	0	0
FD&C Kırmızı gıda boyası #40	0.025	0
FD&C Mavi gıda boyası #1	0.025	0
TOPLAM	1055.05	4057

Toplam dört aylık beslenme periyodunun sonunda, farelerin tartımı gerçekleştirildi ve saat 09:00-10:00 arasında dekapitasyon ile sakrifiye edildi. Alınan karaciğer dokuları ependorflara konularak analiz sürelerine kadar -80 °C' de saklandı.

2.5. Karaciğer Dokusunda Karbonik Anhidraz Aktivitesinin Ölçümü

CA hidrataz aktivitesi Wilbur-Anderson metodu ile potansiyometrik olarak ölçüldü. Bu yöntem, 20 mM Tris-Baz tamponunun 0 °C' de, pH' sınırı, 8.3' den 6.3' e düştüğü ana kadar geçen zamanın ölçülmesi esasına dayanır. Enzim katalizsiz sürenin (kör) yarısını veren CA aktivitesi, 1 Enzim ünitesi (1 Enzim ünitesi: Wilbur-Anderson ünitesi) olarak kabul edildi (<http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/enzymatic-assay-of-carbonic-anhydrase.html>).

2.5.1. Homojenizasyon aşaması

Karaciğer dokusu buz aküsü üstünde kesilerek hassas terazide yaklaşık 40 mg tartıldı. Doku buz içinde bekleyen 500 µL Tris HCl tamponuna (50mM Tris HCl içeren tampon, pH:7.5) konuldu. Dokular buz içinde 10 s süre ile el homojenizatörü ile homojenize edildi. Homojenize doku +4 °C' de, 12000 rpm' de 30 dakika santrifüj edildi. Pellet kısmı uzaklaştırılıp kalan süpernatant ikinci kez 12000 rpm' de +4 °C' de santrifüj edildi. Pellet kısmı uzaklaştırılıp, süpernatant kısmı ölçümlerde kullanıldı.

0,5 M Tris HCl (pH: 7.5) : 7.88 g Tris HCl tartılıp bir miktar saf suda çözüldü. pH: 7.5 ayarlandı ve son hacmi 100 mL' ye tamamlandı. Bu tampon homojenizasyon aşamasında kullanıldı.

2.5.2. Karbonik Anhidraz Aktivitesinin Ölçülmesi

20 mM Tris-Baz tamponu (pH=8.30): 2.43 gram tris-baz yaklaşık 900 mL deiyonize suda çözüldü ve 2 N sülfirik asit ile pH=8.30 oluncaya kadar titre edildi. Sonra toplam hacim deiyonize su ile 1 litreye tamamlandı. 1L' lik polipropilen şişede buz içinde saklandı. Bu çözelti numunelerdeki CA aktivitesi tayini için stok tampon çözeltisi olarak kullanıldı.

2N H₂SO₄ çözeltisi: %96 lık ve yoğunluğu 1.84 kg/L olan H₂SO₄ ten 5.55 mL alınıp 60-70 mL deiyonize suya yavaşça ilave edildi sonra hacim deiyonize su ile 100 mL'ye tamamlandı. Bu çözelti Tris-Baz (pH= 8.30) tamponu hazırlanmasında kullanıldı.

Hazırlanan Tris-Baz tamponu erlen içine bir miktar alınıp, CO₂ tüpüne parafilm yardımı ile sabitlendi ve hava almayacak şekilde kapatıldı. Erlenindeki tampon çözelti CO₂' ye yaklaşık 15 dakika doyurularak deneyde substrat olarak kullanıldı. Deney sırasında erlene sabit basınçla CO₂ gazı verilmeye devam edildi. Ölçümler tablo 6' da belirtildiği gibi gerçekleştirildi.

Tablo 6. CA Hidrataz aktivitesi ölçümü için gerekli reaksiyon bileşenleri ve hacimleri

	Homojenat Ölçümü (μ L)	Kör Ölçümü (μ L)	Kontrol Ölçümü (μ L)
Tampon	2850	2850	2850
Substrat	2100	2100	2100
Homojenat	100	-	-
Deiyonize Su	-	100	-

Her bir numune üç kez çalışıldı ve çalışılan her numuneden sonra iki kere kör çalışılıp substrat doygunluğundan emin olundu. Bütün homojenatlar aynı gün, tek düzenek kurularak buz içinde çalışıldı.

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

Enzim Ünitesi Formülü

t_c: Enzimatik Reaksiyonların pH Değişim Süresi (saniye)

t₀: Enzimatik Olmayan Reaksiyonlardaki pH Değişim Süresi

EU: Enzim Ünitesi (Wilbur-Anderson ünitesi)

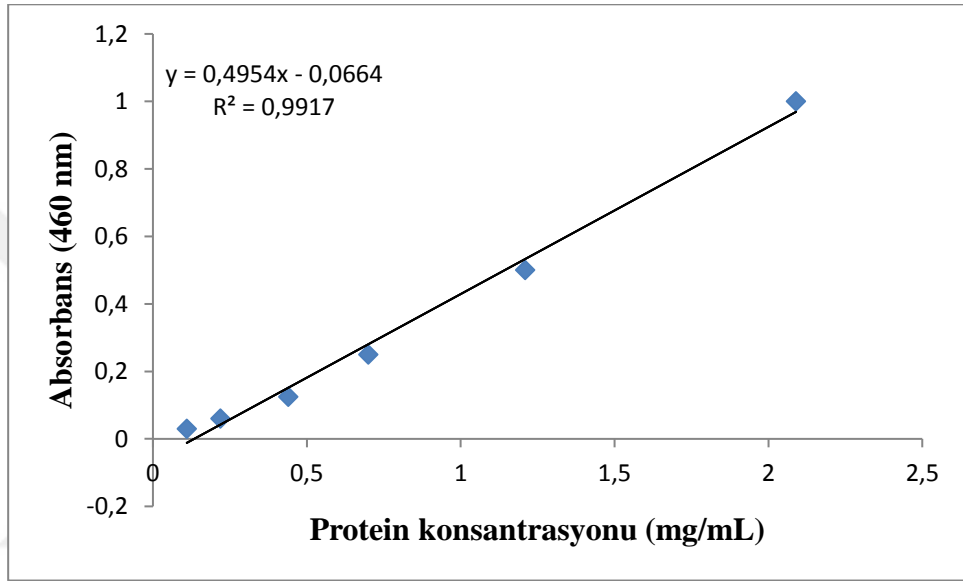
Yukarıda yer alan formül kullanılarak ayrı ayrı enzim üniteleri hesaplandı.

2.5.3. Serum Glukoz, TAG ve İnsulin Ölçümü

Deneyde kullanılan farelerden elde edilen serum örneklerinde glukoz ve Triasilgliserol ve ölçümleri 114S553 numaralı proje kapsamında, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya laboratuvarındaki otoanalizatörlerde gerçekleştirildi. İnsulin ölçümü ise, yine aynı proje kapsamında satın alınmış ELISA kiti (Ultra Sensitive Mouse ELISA, Crystal Chem. USA) ile gerçekleştirildi.

2.5.4. Karaciğerde Protein Tayini

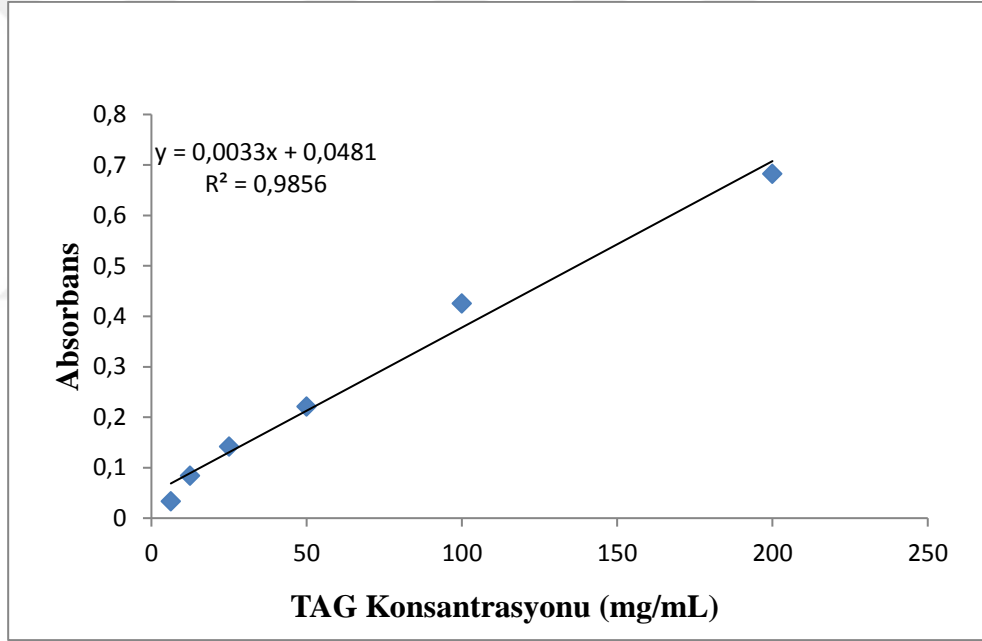
Homojenatlarda protein tayininde, Milipore Firmasının BCA protein Assay kiti kullanıldı. Ölçümler kit protokolüne uygun şekilde yapıldı. CA aktivitesi ve TAG seviyesi için kullanılan protein konsantrasyonu standart grafiği Şekil 3'de gösterilmiştir.



Şekil 3. Karaciğer Dokusunda Protein Miktarı Tayininde Kullanılan Standart Grafik

2.4.5. Karaciğer Triaçilgliserol Miktarı Tayini

Homojenatlarda TAG tayininde, Cayman Firmasının 10010509 nolu kit' i kullanılmıştır. Kit, TAG' lerin lipaz hidrolizi ile oluşan gliserolün, gliserol kinazla gliserol 3 fosfata dönüştürülmesi ve bu bileşiğin gliserol fosfat oksidazla, dihidroksi aseton fosfata dönüşümü sırasında oluşan H_2O_2 ' nin 4-AAP ve ESPA ile reaksiyona girerek pembe renk oluşturması esasına dayanır. Ölçümler kit protokolüne uygun şekilde yapıldı. Elde edilen Triaçilgliserol miktarının grafiği Şekil 4' de gösterilmiştir.



Şekil 4. Karaciğer Dokusunda TAG Miktarı Tayininde Kullanılan Standart Grafik

2.6. İstatistiksel Analiz

Sonuçlar ortalama ve standart sapma olarak ifade edildi. Grupların karşılaştırılması Mann-Whitney U testi ile yapıldı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Kullanılan potansiyometrik yöntemin performansını değerlendirmek için % CV hesaplaması yapıldı ($\% CV = 100 \times SD / \text{Mean}$).

% CV: Coefficient of Variation



3. BULGULAR

3.1. Ağırlık, Serum Glukoz, TAG, İnsulin Ölçüm Sonuçları

Dört aylık besleme periyodunun sonunda, farelerde gözlenen ağırlık, serum glukoz, TAG, insulin değerleri Tablo 7’ de verilmiştir. Farelerin son ağırlıkları yüksek yağlı diyetle beslenenlerde, kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulundu ($p<0.0001$).

Açlık serum glukoz değerleri kontrol grubunda, yüksek yağlı diyetle beslenen farelere göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük bulundu ($p=0.049$). Kontrol farelerin serum Triaçilgliserol değerleriyle yüksek yağ içerikli diyetle beslenen farelerin Triaçilgliserol değerleri karşılaştırıldığında bu gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir artışın olduğu gözlemlendi ($p= 0.015$).

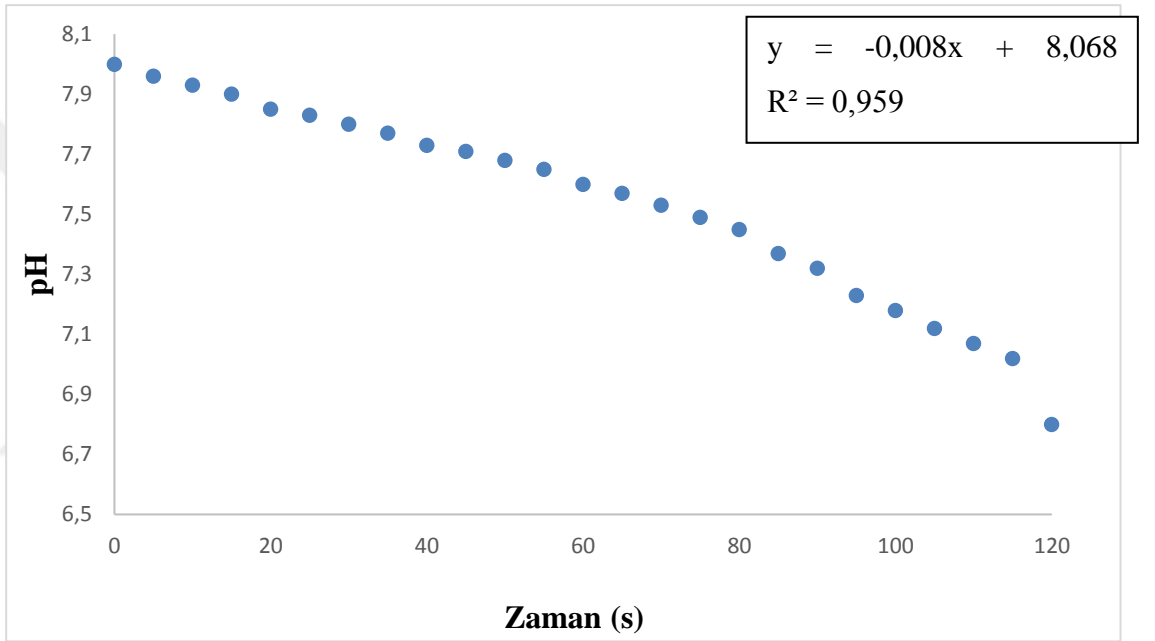
Serum insülin düzeyleri karşılaştırıldığında, yüksek yağlı diyetle beslenen farelerde insulin değerinin, kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu belirlendi ($p=0.017$). Sonuçlar beraber değerlendirildiğinde, yüksek yağlı diyet kullanımının, farelerde hiperglisemik, hiperinsulinemik ve hipertrigliseridemik bir obez durumu tetiklediği görülmektedir.

Tablo 7. Deney gruplarında ağırlık ve serum parametrelerindeki değişimler(İnce,2017)

	Kontrol (StandartDiyet)	Yüksek Yağlı Diyet
Son ağırlık (g)	26,6±2	35,4±6
Glukoz (mg/dL)	132±34	162±32
Triaçilgliserol (mg/dL)	84±14	105±17
İnsülin (ng/mL)	4,06±2,1	9,34±6

3.2. CA Aktivitesi Ölçümü İçin Uygun Zaman Aralığı Belirlenmesi

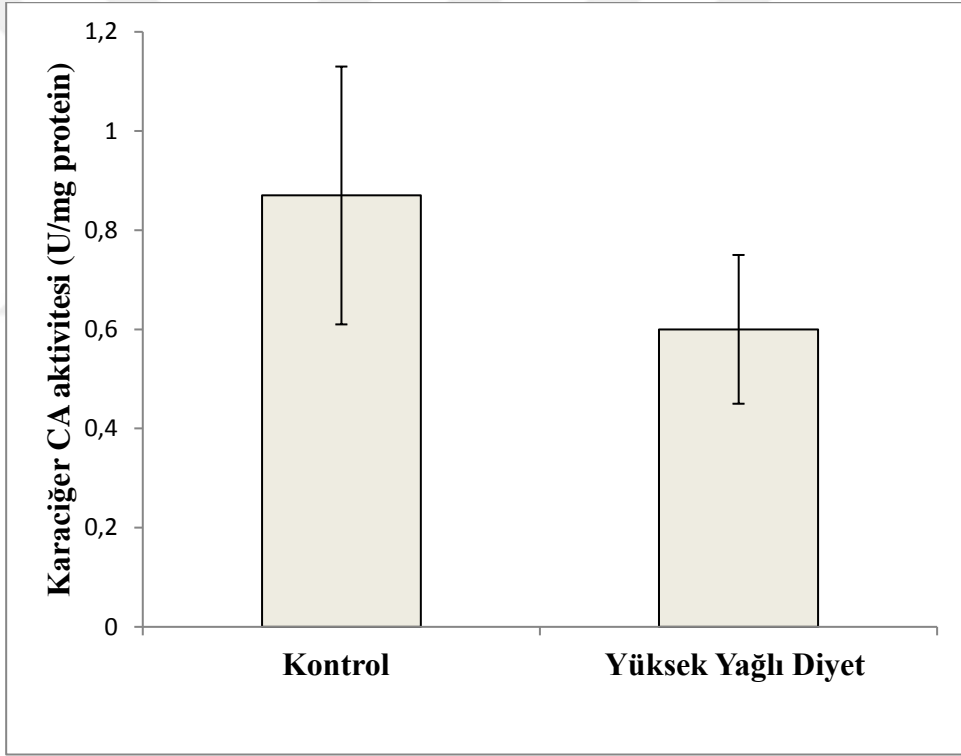
Karbonik anhidraz aktivitesi ölçümü için kullandığımız Tris-Baz Tamponunun pH 8.3' den 6.8' e kadar olan düşüşleri incelenmiş ve ölçüm için en uygun aralığın pH 8-7 olduğu görülmüştür. Örnek bir numunenin pH 8-7 arasındaki zamana bağlı azalış grafiği Şekil 5' te verilmiştir. Ölçüm yönteminin % CV değeri % 5.7' dir.



Şekil 5. Standart pH değişimi

3.3. Karaciğer Dokusunda Karbonik Anhidraz Aktivitesi

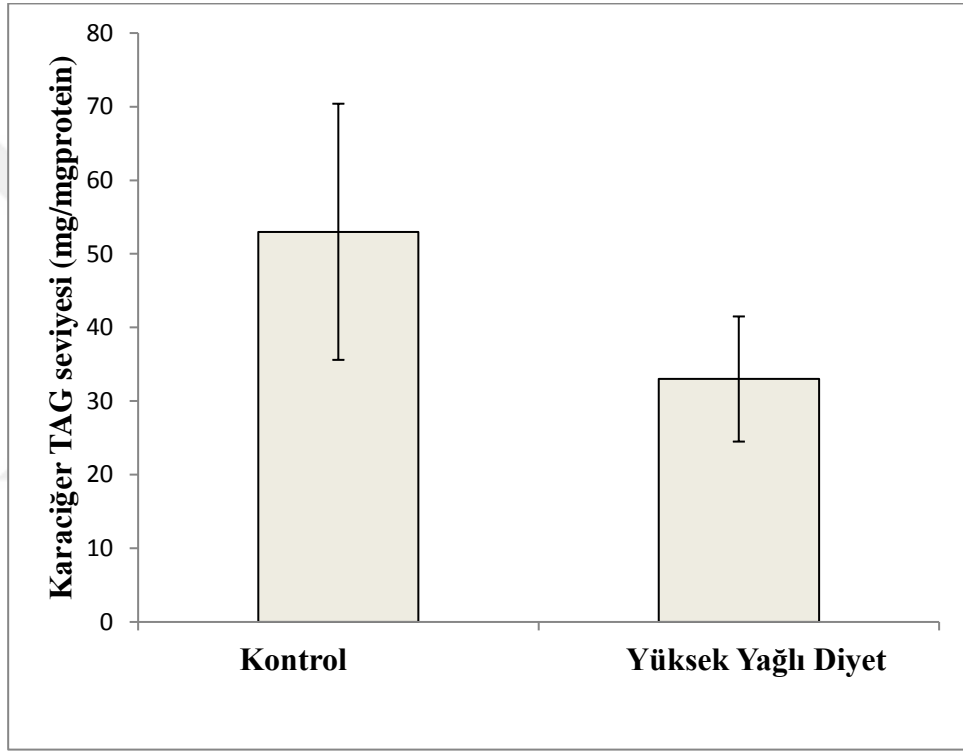
Karaciğer dokusunda yapılan CA aktivite ölçümlerinde standart diyet ile beslenen farelerdeki CA aktivitesi $0,87 \pm 0,26$ U/mg protein olarak ölçülmüştür. Yüksek yağlı diyet grubundaki farelerde ise aktivite $0,60 \pm 0,15$ U/mg protein olarak bulunmuştur. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda, bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p= 0.038$). Elde edilen sonuçlar Şekil 6' da verilmiştir.



Şekil 6. Karaciğer CA Aktivitesi

3.4. Karaciğer Dokusunda Triaçilgliserol Seviyesi

Karaciğer dokusunda yapılan TAG ölçümlerinde, kontrol grubundaki farelerde TAG seviyesi $53 \pm 17,4$ mg/mg protein, Yüksek yağlı diyet grubundaki farelerde ise $33 \pm 8,5$ mg/mg protein olarak bulundu. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda, bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p= 0.004$). Elde edilen sonuçlar Şekil 7' de verilmiştir.



Şekil 7. Karaciğer Triaçilgliserol Seviyeleri

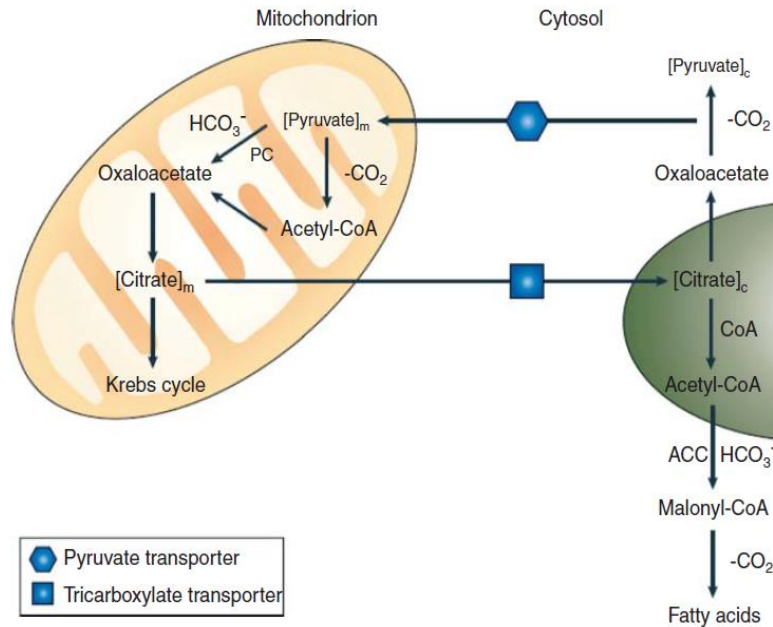
4. TARTIŞMA SONUÇ

CA tüm memelilerde geniş doku dağılımına sahip CO₂⁻ nin bikarbonata dönüşümünü reversable olarak katalizleyen bir metalloenzimdir. CA bu önemli fonksiyonu ile birçok fizyolojik ve patolojik süreçte yer alır. Özellikle asit-baz dengesinin sağlanması, metabolik yollar için yapı taşlarının sentezi, elektrolit sekresyonu ve kanser metastazı gibi olaylarda önemli roller oynar. Bu enzimin hücre içi yerleşimi, katalitik aktivitesi ve inhibitörlere dirençleri birbirinden farklı olan, 16 izoenzimi tanımlanmıştır. Bu izoenzimlerden CA II ve CAV' in lipit sentezinde katkıları olduğu ifade edilmiştir (Hazen vd.,1996; De Simone ve Supuran.; 2009).

Karaciğer memelilerde enerji metabolizmasının mekezinde bulunmaktadır. Sindirim sisteminden gelen yapı taşlarının ve yakıt moleküllerinin neredeyse tamamı öncelikle karaciğer tarafından alınır ve vücuda dağıtılır. Diyetten sonra alınan glukozun glikojen depoları için kullanımından sonra artan kısmı yağ asitlerine ve triaçilgliserollere çevrilerek VLDL ile dolaşıma verilir. Yine diyetle alınan yağ asitleri de karaciğerde işlenerek VLDL ile yine kan dolaşımına verilir. Karaciğer *de novo* yağ sentezinin merkezidir. Her ne kadar yağ dokusu diyetten sonraki dönemde yağ asidi sentezli ese de, sentez kapasitesi karaciğer kadar yüksek değildir. Yağ dokusu çoğunlukla bağırsaklar ve karaciğerden gelen yağ asitlerini triaçilgliserol olarak depolar. *De novo* yağ asitlerinin sentezinde, asetil CoA karboksilaz enziminin katalizlediği, asetil CoA'nın bikarbonat ile birleştirildiği basamak sentezin kontrol noktasıdır. Sentez bikarbonat sağlandığı sürece devam etmektedir. Bikarbonatta karaciğerde bulunan CA izoenzimlerince sağlanır. Karaciğerde çeşitli CA izoenzimleri bulunmakla beraber, *de novo* lipit sentezinde özellikle CA II, CA VA, CA VB ve kısmen CA I'in katkısı bulunmaktadır. Diğer izoenzimlerin bikarbonat taşınması, proton tedariki ve pH regülasyonu gibi rolleri vardır. Ancak bu izoenzimler için net bir fonksiyon tanımlanması oldukça zordur(Hazen vd.,1996; De Simone ve Supuran.; 2009).

Karbonik anhidraz izoenzimleri tarafından katalizlenen reaksiyonlar ile püvat karboksilaz (PC), Asetil-CoA Karboksilaz (ACC) ve Karbamoil fosfat sentetaz I ve II' ye bikarbonat sağlanır. *De novo* lipogeneze yeterli substratı sağlamak için Asetil gruplarının mitokondriden sitozole taşınması gerekir (Şekil 8). Fakat mitokondri

membranının Asetil-CoA'ya geçirgenliği yoktur. Bu taşınma Asetil-CoA'nın okzaloasetatla birleşerek sitrat oluşturması ile gerçekleşir. Pirüvat, bikarbonat ile pirüvatkarboksilaz enzimi sayesinde karboksillenerek okzalata dönüşür. Bu olay için gerekli olan bikarbonat karbonik anhidraz izoenzimi olan CA VA veya VB tarafından sağlanır. Okzalatin Asetil-CoA ile reaksiyonu sonucunda oluşan Sitrat, trikarboksilik asit taşıyıcıları ile sitozole taşınır. Burada sitrat ATP sitrat liyaz tarafından Asetil-CoA'ya dönüştürülür (Reaksiyon sonunda oluşan okzalat dekarboksilasyon sonucu pirüvata dönüşerek pirüvat taşıyıcıları ile mitokondriye taşınır). Asetil-CoA *de novo* lipogenez için sitozolde kullanılır. Asetil-CoA, asetil-CoAkarboksilaz ve bikarbonat ile Malonil-CoA'ya dönüşür. Bu olay için gereken bikarbonat CA II izoenzimi ile CO₂'in bikarbonata dönüşümü ile sağlanır. Bu reaksiyonlarla yağ zinciri uzatılır (Şekil 8). Sonuç olarak karbonik anhidraz izoenzimlerinin bir kaçı yağ asitleri biyosentezinde rol alır. Bu izoenzimler: mitokondride CA VA ve VB izoenzimleri (PC için yeterli substrat sağlar.) ve sitozoldeki CA II izoenzimidir (ACC için gereken substratı sağlar) (De Simone ve Supuran, 2009).



Şekil 8. Karbonik anhidraz izoenzimlerinin yağ asidi sentezindeki rolleri (De Simone ve Supuran, 2009)

Yukarıda özetlenen mekanizma, yeni anti-obezite ilaçlarının geliştirilmesinde CA izoenzimlerini potansiyel hedef yapmaktadır (De Simone ve Supuran, 2009). Gerçektende, yeni nesil antiobezite ilaçlarından olan *Qsymianın* etken maddelerinden biri CA inhibitörü olan topiramattır (Shin ve Gadde, 2013). Ayrıca CA inhibitörü sülfonamidlerin yağ hücresi kültürlerinde lipogenezi azatlığını gösteren çalışmalar vardır (Hazen vd.,1996).

Yukarıda da bahsedildiği gibi karaciğerde çeşitli CA izoenzimleri bulunmaktadır. Bunların katalitik aktiviteleri (Tablo.1) birbirinden farklı olmakla beraber hepsinin hidrataz aktivitesi vardır (Şentürk,2015). Tezimizde potansiyometrik olarak ölçtüğümüz hidrataz aktivitesine hangi izoenzimin ne kadar katkı verdiğini net olarak söylemek mümkün değildir. Ancak doku dağılımları ve Şekil 1' deki tablo incelendiğinde bu aktiviteye en büyük katkıyı CA II'nin vermiş olması muhtemeldir. Yine şekil 1 incelendiğinde en az katkının da CA III kaynaklı olabileceği söylenebilir. Doku homojenizasyonu için kullandığımız yöntem değerlendirildiğinde ve yine Tablo 1 dikkate alındığında CA V' in etkisinin de sınırlı kalacağı muhtemeldir.

Çalışmamızda dört ay süre ile yüksek yağlı diyet ile beslenen farelerde karaciğer total CA aktivitesinin normal diyet ile beslenen farelere göre daha düşük olduğunu bulduk ($p= 0.038$, Şekil 6). Karaciğerde *de novo* lipit sentezi tokluk safhasında, karbohidratlar ve lipitler bol iken sentezlenir ve diğer dokuların kullanımı için perifer dokulara taşınır. Yüksek yağlı diyet ile beslenmeye bağlı olarak vücuda bol miktarda yağ asidi ve lipit karakterli bileşikler alındığı için lipitlerin *de novo* sentezinin baskılanmasına bağlı olarak CA aktivitesi de baskılanmış olabilir. Ayrıca, çalışmamızda kullandığımız yüksek yağlı diyet ile beslenen fareler hiperglisemik, hiperinsulinemik ve hipertrigliseridemik bir metabolik durumda bulunduğu için (Tablo 7) gelişen insülin direncide CA aktivitesinde azalmaya sebep olabilir. Benzer şekilde deneysel olarak hayvanlarda oluşturulan diyabet modellerinde de CA aktivitesi kontrollere göre daha düşük bulunmuştur. Özellikle bu düşüşün CA III izoenziminde daha belirgin olduğu belirtilmiştir (Amodu vd., 2016). Beslenme periyodunun sonunda yüksek yağlı diyet kullanan farelerin obez bir karakter kazandığı görülmektedir (Tablo 7).

CA izoenzimlerinin karaciğerde sentezi hormonlar tarafından da kontrol edilmektedir. CA II sentezi fare karaciğerinde testosteron tarafından azaltılırken, östrojen tarafından arttırılır. Bu regülasyon CA III izoenzimi için tam tersi şekilde

gerçekleşmektedir. Testosteron tarafından arttırılırken östrojen tarafından azaltılır. Dolayısıyla bu enzimlerin sentez seviyeleri erkek ve dişi fare karaciğerlerinde farklıdır. Cinsiyet nedeniyle sentez farkı CA III için yaklaşık 10-20 kat iken CA II için 3 kat kadardır. Fakat hem dişi hem erkek farelerin karaciğerlerinde total karbonik anhidraz aktivitesi aynıdır. Bu durum fare karaciğerinde CA II ve CAIII izoenzimlerinin total karbonik anhidraz aktivitesini sabit tutmak için bir çeşit feedback mekanizması sergileyebileceklerini göstermektedir(McKenna,2014). Tablo.7 incelendiğinde yüksek yağlı diyet kullanan farelerin obez oldukları net olarak görülmektedir. CA izoenzimlerinin seviyeleri üzerine obezitenin de etkileri olduğu görülmektedir (Alver,2004). Karaciğerde gözlenen CA aktivitesi değişiklikleri yağ dokusundan salgılanan (leptin gibi) adipokinlerin karaciğere olan etkisinin bir sonucu olabilir.

Sonuç olarak, yüksek yağlı diyet kullanımının *de novo* lipid sentezinde öncü bileşiği sentezleyen CA aktivitesini fare karaciğerinde azalttığı bu azalışa, metabolik ve hormonal değişikliklerin sebep olabileceği kanaatine varıldı.

KAYNAKLAR

Alver A, Uçar F, Keha EE, Kalay E, Ovali E (2004). Effects of leptin and insulin on CA III expression in rat adipose tissue. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 19 (3):279-81.

Alver A. (1996). Belirli Yaş Gruplarındaki Sağlıklı Bireylerde Serum Total Karbonik Anhidraz Ve Karbonik Anhidraz-3 Aktivitelerinin Belirlenmesi, KTÜ, UZMANLIK TEZİ, TRABZON, 1996.

Anna-Kaisa Harju, Fatemeh Bootorabi, Marianne Kuuslahti, Claudiu T., Supuran & Seppo Parkkila (2013). Carbonic anhydrase III: A neglected isozyme is stepping into the limelight. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 28: 2, 231-239.

Capasso C and Supuran CT (2015). An overview of the alpha-beta and gamma-carbonic anhydrases from bacteria: can bacterial carbonic anhydrases shed new light on evolution of bacteria. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 325–332.

Carl A. Burtis, Edward R. Ashwood, David E. Bruns (2015). *Fundamentals of Clinical Chemistry*, Saunders Elsevier.

Champe, P.C. and Harvey, R.A. (1994). *Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry*. Second Edition. J.B. Lippincott Company, Philadelphia, 1994, sf. 47– 60.

Figen Gürdol F. (2015). *Tıbbi Biyokimya*, İstanbul Üniversitesi, Nobel Tıp Kitabevi, 2015

Frost, S.C.; McKenna, R. (2014). *Carbonic Anhydrase: Mechanism, Regulation, Links to Disease, and Industrial Applications*; Springer Science & Business Media: Haarlem, The Netherlands, 2014.

Hilvo M, Tolvanen M, Clark A, Shen B, Shah GN, Waheed A, Halmi P, Hänninen M, Hämäläinen JM, Vihinen M, Sly WS, Parkkila S (2005). Characterization of CA XV, a new GPI-anchored form of carbonic anhydrase. *Biochemical Journal*, 392: 83-92.

URL-1, 2018. <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/enzymatic-assay-of-carbonic-anhydrase.html> (1 Ağustos 2018).

Iqbal S, Saleem M, Azim MK, Taha M, Salar U, Khan KM, Perveen S, Choudhary MI (2017). Carbohydrazones as new class of carbonic anhydrase inhibitors: Synthesis, kinetics, and ligand docking studies. *Bioorganic Chemistry* 72: 89-101.

Karlson, P. (1988). *Tıp ve Fen Bilimcileri İçin Biyokimya* (Çev. A. Telefoncu). Arkadaş Tıp Kitapları, Kırklareli, 1988, s. 64 – 82.

- Kartal Özer N., Süha Yalçın S. A. (1996).** Temel Biyokimya, Marmara Üniversitesi Yayın No:609, İstanbul,1996.
- Keha, E.E. ve Küfrevioğlu, I. (1993).** Biyokimya. İkinci Baskı. Derya kitabevi, Trabzon, 1993, s. 89 – 134.
- Lindskog S. (1997).** Structureandmechanism of carbonicanhydrase. Phagfrmacology and Therapeutics, 1997;74:1–20. doi: 10.1016/S0163-7258(96)00198-2. [PubMed] [Cross Ref].
- Liu X, Lu D, Bowser R, Liu J (2016).** Expression of carbonic anhydrase in motor neurons and alterations in ALS. Int J Mol Sci 1;17(11).
- Pocker Y and Ng SY (1973).** Plant carbonic anhydrase. Properties and carbon dioxide hydration kinetics. Biochemical Journal, 12: 5127-5134.
- Pocker Y. (1991).** Moleküler Control of Carbonic Anhydrase Activity: Ionic Effectors, Differential Modifiers and Novel İnhibitors. In The Carbonic Anhydrase fromBiochemistry and Physiology and Clinical Medicine. Botré F. Storey, B. T. Gros,G. (Eds) VCH Publishers,Wienheim, 1991 pp.74 – 86.
- Saleem M, Saeed A, Atia-tul-Wahab (2016).** Benzamide sulfonamide derivatives: potent inhibitors of carbonic anhydrase-II. Medicinal Chemistry Research 25: 438-448,2016.
- Smith, E.L., Lehman, I.R. , Lefkowitz, R.J. ,Handler, P. , White, A.(1985).** Principles of Biochemistry General Aspects. Seventh Edition. McGraw-Hill Book Company, Hamburg, 1985 pp. 179 – 240.
- Supuran CT (2016).** Structure and function of carbonic anhydrases. Biochem Journal, 15;473(14):2023-32.
- Supuran CT, Winum JY (2009).** Drug design of zinc-enzyme inhibitors functional, structural, and disease applications. Drug design of antiobesity carbonic anhydrase inhibitors. (Ed. Giuseppina De Simone and Claudiu T Supuran). Canada. 241-245.
- Frost C. S., Robert Mckenna R. (2014).** Carbonic Anhydrase: Mechanism, Regulation, Links To Desease, And İndustrial Applications, Springer Science and Business Media.
- Şentürk A. (2015).** Oksidatif olarak modifiye edilmiş karbonik anhidraza karşı otoantikör oluşumunun ve bu antikörlerin bazı romatoid hastalıklarla ilişkisinin incelenmesi. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Us D. (2009).** Siprofibratın İnsan Karbonik Anhidraz II ve Glukoz 6-Fosfat Dehidragenaz Enzimlerinin Aktiviteleri Üzerine Etkilerinin İn Vitro İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.

Whitney Renner S. (2017). Metabolic characterization of mice lacking carbonic anhydrase III. Doctoral dissertation, University of North Carolina Genetics and Molecular Biology Curriculum, Chapel Hill.

Yalduz F. (2012). Hipotroidili ve hipertroidili hastalarda CAI ve CAII otoantikoları ile oksidatif stres parametreleri arasındaki ilişkinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.

Yoshiro Nagao, J. Suso Platero, Abdul Waheed, and William S. Sly. (1993). Human mitochondrial carbonic anhydrase: cDNA cloning, expression, subcellular localization, and mapping to chromosome 16. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA Vol. 90, pp. 7623-7627, August 1993.



ÖZGEÇMİŞ

1 Haziran 1989 yılında Manisa Merkez ilçesinde dünyaya gelen Pınar SARIŞIN Lisans öğrenimini Trabzon da, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünde tamamladı. Yüksek lisansına Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesinde devam etmektedir.

