

**BAZI DOĞAL MADDELERİN İNSAN KARBONİK  
ANHİDRAZ I VE II İZOENZİMLERİ ÜZERİNDEKİ  
İNİBİTÖR ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**Tunay ÇELİK**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Kimya Anabilim Dalı**

**Dr. Öğr. Üyesi Kadriye URUÇ PARLAK**

**AĞRI-2018**

**(Her hakkı saklıdır.)**

**T.C.**  
**AĞRI İBRAHİM ÇEÇEN ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**KİMYA ANABİLİM DALI**

**Tunay ÇELİK**

**BAZI DOĞAL MADDELERİN İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ I VE II  
İZOENZİMLERİ ÜZERİNDEKİ İNHİBİTÖR ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ YÖNETİCİSİ**

**Dr. Öğr. Üyesi Kadriye URUÇ PARLAK**

**AĞRI-2018**

## FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum “Bazı Doğal Maddelerin İnsan Karbonik Anhidraz I Ve II İzoenzimleri Üzerindeki İnhibitör Etkilerinin İncelenmesi” adlı tezin tamamen kendi çalışmam olduğunu ve her alıntıya kaynak gösterdiğimi taahhüt eder, tezimin kağıt ve elektronik kopyalarının Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü arşivlerinde aşağıda belirttiğim koşullarda saklanmasına izin verdiğimi onaylarım.

Lisansüstü Eğitim-Öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim.

Tezimin 3 yıl süreyle erişime açılmasını istemiyorum. Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin tamamı her yerden erişime açılabilir.

29.08.2018

Tunay ÇELİK



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



TEZ ONAY FORMU

BAZI DOĞAL MADDELERİN İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ I VE II İZOENZİMLERİ  
ÜZERİNDEKİ İNHİBİTÖR ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Dr. Öğr. Üyesi Kadriye URUÇ PARLAK danışmanlığında, Tunay ÇELİK tarafından hazırlanan bu çalışma, 29 /08/2018. tarihinde aşağıdaki jüri tarafından. KİMYA Anabilim Dalı BİYOKİMYA Bilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (3./3.)** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Doç. Dr. Murat ŞENYERK

İmza :

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Kadriye URUÇ PARLAK

İmza :

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Emir Alper TURKOĞLU

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu .../.../201.. tarih ve .... / . . . . . nolu kararı ile onaylanmıştır.

Doç. 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

### BAZI DOĞAL MADDELERİN İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ I VE II İZOENZİMLERİ ÜZERİNDEKİ İNHİBİTÖR ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Tunay ÇELİK

Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Dr.Öğr.Üyesi Kadriye URUÇ PARLAK

Karbonik anhidrazlar (CA'lar), karbondioksit ve su arasındaki reaksiyonu katalize eden metaloenzimlerdir. Bu çalışmadaki amacımız belirli doğal maddelerin insan kırmızı kan hücrelerinden saflaştırılmış CA I ve II enzimleri üzerindeki etkilerini belirlemektir. Bu amaçla öncelikle CA izoenzimleri insan taze kanından Sefaroz-4B-L-tirozin sülfanilamid kolon kromatografisi vasıtasıyla elde edildi. Karbonik anhidrazlar sırasıyla 98,92 ve 438,85 kat saflaştırıldı ve %69,6, %44,12 verimle elde edildi. Daha sonra IC<sub>50</sub> değerlerini bulmak için esteraz aktivitesi kullanılarak doğal maddelerin türevlerinin insan karbonik anhidraz izoenzimi I ve II üzerine inhibisyon etkileri araştırıldı ve (%) Aktivite grafikleri çizildi.

Elde edilen grafiklerden yararlanılarak, **1-5** numaralı doğal maddelerin hCA I ve hCA II için IC<sub>50</sub> değerleri hesaplandı. hCA I-II için IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 0,0955-1,055 µM ve 0,1566-0,760 µM olarak tespit edildi.

2018, 61 Sayfa

**Anahtar kelimeler:** Enzim, hCA I-II, IC<sub>50</sub>, inhibisyon, karbonik anhidraz

## ABSTRACT

Master Thesis

### INVESTIGATION OF THE INHIBITORY EFFECTS OF SOME NATURAL SUBSTANCES ON HUMAN CARBONIC ANHYDRASE I AND II ISOENZYMES

Tunay ÇELİK

Ağrı İbrahim Çeçen University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Asist. Prof.Dr. Kadriye URUÇ PARLAK

Carbonic anhydrases (CAs) are metalloenzymes that catalyze the reaction between carbon dioxide and water. In this our aim was to examine the effects of certain natural substances on the purified derivatives of human carbonic anhydrase 1 and 2 that were collected from human red blood cells. For this purpose firstly carbonic anhydrase isoenzymes were isolated from fresh blood using Sepharose-4B-L-tyrosine sulfanilamide column chromatography. Carbonic anhydrases were purified 98.92 and 438.85 fold and obtained with a yield of %69.6 and %44.12 respectively. Subsequently, the inhibitory effects of derivatives of natural compounds on human carbonic anhydrase isoenzymes were investigated using esterase activity to find  $IC_{50}$  values, and (%) activity graphics were plotted.

Using the data obtained from the graphics, the  $IC_{50}$  values for hCA I and hCA II of natural substances **1-5** were calculated. The  $IC_{50}$  values for hCA I and II are in the range of 0.0955-1.055  $\mu$ M and 0.1566-0.760  $\mu$ M, respectively.

**2018, 61 Pages**

**Keywords:** Carbonic anhydrase, enzyme, hCA I-II,  $IC_{50}$ , inhibition

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın tamamlanmasında engin bilgilerinden faydalandığım, her türlü desteği ile yanımda olan, bilgi ve tecrübelerini kendime örnek aldığım çok değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi. Kadriye URUÇ PARLAK'a, diosgenin, jervin,  $\beta$ -stigmasterol ve  $\beta$ -sitosterol maddelerinin tarafıma verilmesinde emeği geçen Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dr. Öğr. Üyesi Tuba AYDIN ve çalışma esnasında yardımlarını esirgemeyen Özkan SEVİM' e derin minnet ve saygılarımı arz ederim.

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmanın deneysel kısmı Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Beni bugünlere getiren, her türlü maddi ve manevi desteklerini üzerimde hissettiğim, beni benden çok düşünen canım annem, babam ve kardeşlerime en içten sevgilerimi sunarım. İyi ki varsınız.

29.08.2018

Tunay ÇELİK

# İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b> .....	ii
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	vii
<b>ŞEKİL DİZİNİ</b> .....	ix
<b>ÇİZELGELER</b> .....	xi
1.2. Karbonik anhidrazlar .....	6
1.2.1. Karbonik anhidraz izoenzimleri.....	7
1.2.2. Karbonik anhidraz I (CA I).....	10
1.2.3. Karbonik anhidraz II (CA II) .....	11
1.2.4. Karbonik anhidrazın üç boyutlu yapısı .....	12
1.2.5. Karbonik anhidraz enziminin katalitik mekanizması.....	13
1.2.6. Karbonik anhidraz inhibitörleri.....	14
1.2.7. Karbonik anhidraz aktivitesi .....	15
1.2.8. Karbonik anhidraz enzimin afinite kromatografisi ile saflaştırılması.....	16
1.3. Bazı Doğal İnhibitörler .....	17
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ</b> .....	26
<b>3. MATERYAL VE METOD</b> .....	30
3.1. Materyal .....	30
3.1.1. Kimyasal maddeler .....	30
3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar .....	30
3.1.3. Çözeltilerin hazırlanmaları.....	31
3.1.4. Deneyde kullanılan kanın temini ve hemolizat hazırlanması.....	32
3.2. Metodlar.....	32
3.2.1. Karbonik anhidraz enziminin aktivite tayin yöntemleri.....	32
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI</b> .....	35
4.1. Kantitatif Protein Tayini için Kullanılan Standart Grafik.....	35
4.2. hCA I ve hCA II İzoenzimlerinin Bazı Doğal Maddelerle İnhibisyon Türevlerinin Etkilerinin Belirlenmesi İçin Yapılan Çalışmaların Sonuçları.....	35
4.3. hCA I ve hCA II İzoenzimlerinin Esteraz Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon Etkisi Gösteren	



Bazı Doğal Maddelerle İnhibisyon Türevlerinin Etkilerinin IC <sub>50</sub> Değerlerinin Belirlenmesi İle İlgili Sonuçlar.....	40
4.4. İnsan Eritrosit CA I-II Enzimlerinin Afinite Kromatografisi İle Saflaştırma basamakları Sonuçları.....	41
<b>5. SONUÇ VE TARTIŞMA .....</b>	<b>43</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>49</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>61</b>



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AMS	:Akut hastalığı
bCA	:Sığır karbonik anhidraz
°C	:Santigrat derece
CA	:Karbonik anhidraz enzimi
CAI	:Karbonik anhidraz inhibitörü
Cm	:Santimetre
DMSO	:Dimetil sülfoksit
E	:Enzim
EC	:Enzim kod numarası
ES	:Enzim-substrat kompleksi
G	:Gram
G	:Yer çekimi ivmesi
GİB	:Göz içi basıncı
hCA	:İnsan karbonik anhidraz enzimi
I	:İnhibitör
IC <sub>50</sub>	:Enzim inhibisyonunu yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
kDA	:Kilo dalton
K <sub>m</sub>	:Michaelis Menten sabiti
k <sub>1</sub> ,k <sub>2</sub> ,k <sub>3</sub>	:Hız sabitleri
L	:Litre
M	:Molar
Mg	:Miligram
mL	:Mililitre
mM	:Milimolar
P	:Reaksiyon ürünü
Ppm	:Milyonda birlik birim
S	:Substrat
S	:Saniye
s.	:Sayfa
Tris	:Trihidroksimetilaminometan

$V_{\max}$	:Maksimum hız
$V_0$	:İlk hız
UV	:Ultraviole
$\mu\text{g}$	:Mikrogram
$\mu\text{l}$	:Mikrolitre
$\mu\text{M}$	:Mikromolar



## ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1.1. Jervine şematik gösterimi .....	20
Şekil 1.2. Diosgenin şematik gösterimi .....	21
Şekil 1.3. Kolestrol şematik gösterimi .....	22
Şekil 1.4. $\beta$ -stigmasterol şematik gösterimi .....	24
Şekil 1.5. $\beta$ -sitosterol şematik gösterimi .....	25
Şekil 3.1. <i>p</i> -Nitrofenilasetatin <i>p</i> -nitrofenole dönüşüm mekanizması .....	32
Şekil 4.1. Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayini için kullanılan standart grafik .....	35
Şekil 4.2. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile jervinin farklı konsantrasyonlarında IC <sub>50</sub> değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[Jervin] grafiği .....	36
Şekil 4.3. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile diosgeninin farklı konsantrasyonlarında IC <sub>50</sub> değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[Diosgenin] grafiği .....	36
Şekil 4.4. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile kolestrolün farklı konsantrasyonlarında IC <sub>50</sub> değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[Kolestrol] grafiği .....	37
Şekil 4.5. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile $\beta$ -stigmasterolün farklı konsantrasyonlarında IC <sub>50</sub> değerinin bulunması için çizilen % Aktivite- $[\beta$ -stigmasterol] grafiği .....	37
Şekil 4.6. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile $\beta$ -sitosterolün farklı konsantrasyonlarında IC <sub>50</sub> değerinin bulunması için çizilen % Aktivite- $[\beta$ -sitosterol] grafiği .....	38
Şekil 4.7. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile jervinin farklı konsantrasyonlarında IC <sub>50</sub> değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[Jervin] grafiği .....	38
Şekil 4.8. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile diosgeninin farklı konsantrasyonlarında IC <sub>50</sub> değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[Diosgenin] grafiği .....	39

<b>Şekil 4.9.</b> hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile kolestrolün farklı konsantrasyonlarında IC <sub>50</sub> değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[Kolestrol] grafiği. ....	39
<b>Şekil 4.10.</b> hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile β-stigmasterolün farklı konsantrasyonlarında IC <sub>50</sub> değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[β-stigmasterol] grafiği. ....	40
<b>Şekil 4.11.</b> hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile β-sitosterolün farklı konsantrasyonlarında IC <sub>50</sub> değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[β-sitosterol] grafiği.....	40



## ÇİZELGELER

<b>Çizelge 1.1.</b> Afinite kromatografisinde en sık kullanılan biyolojik sistemler. ....	6
<b>Çizelge 1.2.</b> Afinite jelleri kullanılarak karbonik anhidraz (EC 4.2.1.1) izoenzimlerinin izolasyonu.....	11
<b>Çizelge 1.3.</b> Memeli karbonik anhidraz II (CA II) izoenziminin doku dağılımı ve bu dokulardaki işlevi. ....	12
<b>Çizelge 1.4.</b> $\alpha$ -CA izoenzimleri tarafından katalizlenen reaksiyonlar. ....	14
<b>Çizelge 4.1.</b> hCA I ve hCA II izoenzimlerinin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren doğal maddelerin %50 inhibisyona sebep olan konsantrasyonları (IC <sub>50</sub> değerleri).....	41
<b>Çizelge 4.2.</b> İnsan eritrositlerinden hCA I-II izoenzimlerinin Sefaroz-4B-L-tirozin sülfonilamid afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırılması basamakları. ....	42

# 1.GİRİŞ

## 1.1. Enzimler

Günümüzde biyokimya alanında en fazla çalışılan konulardan bir tanesi de enzimlerdir. Endüstriden, sağlık temelli çeşitli alanlara kadar enzimler çok fazla uygulama alanına sahiptirler (Gong *et al.* 2017; Lehninger *et al.* 2005). Enzimler, reaksiyonla tüketilmeksizin kimyasal reaksiyonları hızlandıran katalizörler veya kimyasal maddelerdir (Reece *et al.* 2010).

Enzimler vücudumuzdaki bütün reaksiyonların yürütülmesinde önemli bir role sahiptirler. Çoğu enzim, kimyasal reaksiyonlarda aktivasyon enerjisini azaltmaya yarayan proteinlerdir (Petersen and Anderson 2005). Enzimler substrat denilen reaktanlar üzerinde çalışırlar. Enzim substratlar ile etkileşir ve enzim substratı ürüne dönüştürdükten sonra enzim etkilenmeden kalır (Reece *et al.* 2010). Enzim aktivitesi bazı çevresel faktörlerden etkilenebilir (Petersen and Anderson 2005). Sıcaklık, enzim aktivitesini etkileyebilen çevresel bir faktördür (Conant 2012). Enzimleri etkileyen diğer bir faktör ise pH'dır (Petersen and Anderson 2005). Enzimler hem ürüne dönüştürdükleri substratlara karşı hem de katalizledikleri reaksiyon tiplerine karşı son derece spesifiktirler. Genel olarak aynı tip benzer reaksiyonları veya tek bir kimyasal reaksiyonları katalizler (Berg *et al.* 2006).

Enzimlerin genel yapısına bakıldığında katalitik bölge, katalizde rol oynayan aminoasit kalıntıları ve aktif bölge denilen özel bir yuva veya cep olduğu gözlemlenir (Engelking 2015). Enzim yapıları aminoasit sekanslarından müteşekkil olup bu sekansların oluşturduğu bir veya daha fazla polipeptit yapıdan oluşur. Enzimler aktivitelerine göre isimlendirilirler. Gösterdikleri aktiviteyi ifade eden terimin sonuna "az" eki getirilerek enzim adı meydana getirilir. Örnek vermek gerekirse substrat olarak üreyi kullanan enzim isimlendirilirken sonuna "az" eki eklenmiş ve üreaz olarak isimlendirmiştir (Perales *et al.* 2016).

Enzimlerin büyük bir bölümü aktive olabilmek için protein yapıya sahip olmayan bir kofaktöre gereksinim duyarlar. Kofaktör, koenzim ismi verilen organik bir bileşik ya da metal iyonu olabilir. Enzim, kofaktörü ile birlikte bulunuyor ise holoenzim denir. Apoenzimler, enzimlerin proteinden meydana gelen kısımlarıdır. Kofaktör gerektiren enzimlerde; uygun kofaktör yoksa apoenzimin biyolojik

aktivitesi yoktur. Bazı enzim-kofaktör bağlanmaları kovalent yapıda veya diyalizle uzaklaştırılmayacak kadar sıklıdır. Böyle kofaktörlere “prostetik grup” adı verilir (Ergen 2015).

Koenzimler, aldehitler ve açıl grupları gibi özgül işlevsel grupların geçici taşıyıcısı olarak görev yaparlar. Koenzimler çoğunlukla diyet ile düşük miktarlarda alınan organik besinler olan vitaminlerden temin edilirler (Nelson and Cox 2005).

Metaloenzim kofaktör olarak metal iyonu kullanan enzimlere denir. Metal iyonları ya kovalent kataliz ya da asit-baz katalizi yapar veya enzimin konformasyonunda değişiklik meydana getirerek substratın bağlanmasını kolaylaştırır (İnan ve Gül 2001).

Enzimlerin etki ettiği maddelere substrat denir. Enzimler hakkında yapılmış olan ilk çalışmalarda, enzimin etkilemiş olduğu substrat isminin sonuna –az eki getirilerek (Ör; üreaz, lipaz v.b.) veya genel isimleri (Ör; pepsin, tripsin v.b.) adlandırılırken, günümüzde Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB) tarafından yapılan sistematik sınıflandırmaya göre adlandırılmıştır. Yapılmış olan bu sınıflandırmada her enzim dört rakamlı bir kod numarası ile tanımlanmıştır (E.C. 4.2.1.1). Bundan dolayı enzimler katalizledikleri reaksiyon tiplerine ve reaksiyon mekanizmalarına göre altı sınıfa ayrılmıştır (Keller *et al.* 2015).

**Oksidoredüktazlar:** Redoks tepkimesini katalizleyerek iki substrat arasında (elektron transferi) tepkimesini gerçekleştirirler. Oksidoredüktazlara örnek vermek gerekirse redüktazlar, oksidazlar, oksijenazlar, peroksidazlar, dehidrogenazlar sayılabilir.

**Transferazlar:** Bu enzimler substratlar arasında hidrojen dışı grup transferini sağlarlar.

**Hidrolazlar:** Ester, eter, anhidrit, glikozit, peptid bağlarının parçalanmasında rol oynarlar. Bu reaksiyonu gerçekleştirirken su molekülü kullanılarak bağlar parçalandığından yani hidroliz reaksiyonu gerçekleştirdiğinden hidrolaz olarak adlandırılmışlardır. Bu gurubun üyeleri arasında glikozidaz, lipaz, fosfataz, esteraz ve nükleaz gibi enzimler sayılabilir. Proteolitik enzimlerin tamamı bu grubun üyesidir.

**Liyazlar:** Bu enzimler çift bağ oluşumu ve belirli grupların substratlardan uzaklaştırılması görevini üstlenirler. Burada kullanılan mekanizma hidroliz ve



oksidasyon reaksiyonlarından daha farklıdır. Bu gruba örnek vermek gerekirse hidrasyon ve dehidrasyon reaksiyonlarını katalizleyen enzimler sayılabilir.

**İzomerazlar:** Yapısal, geometrik veya izomerlerin birbirine dönüştürülmesini katalizleyen enzimlerdir. Bu gruba örnek olarak mutaz ve epimeraz enzimleri sayılabilir.

**Ligazlar:** Moleküllerin birbirlerine bağlanmasını katalizleyen enzimlerdir. Bu reaksiyonu gerçekleştirirken yüksek enerjili bağların kopmasıyla ortaya çıkan enerji kullanılır (Kuzucu 2011).

Genetik mühendisliği tekniklerinin gelişmeye başlaması özellikle yirminci yüzyılın ikinci yarısında enzim çalışmalarının ivmelenmesine yardımcı olmuştur. Teknolojik olarak gelinen noktada organizmaların enzimlerini saf halleri ile ve bol miktarda elde etmek mümkün hale gelmiştir. Laboratuvar ortamında gerçekleşmesi çok uzun süren ve birçok basamağa ihtiyaç duyan, bazen de yüksek basınç, yüksek sıcaklık, aşırı asidik ve bazik ortam gerektiren reaksiyonların enzimler sayesinde hücre içi şartlarda birkaç saniye gibi çok kısa bir zamanda tamamlanmasını sağlarlar (Haertle 2016).

Bazı bileşikler enzimlerin aktivitelerini azaltabilir veya tümüyle yok edebilir; bu olaya “inhibisyon” adı verilir. Bu bileşiklere ise “inhibitör” denilir. İnhibitörler küçük molekül kütlelerine sahip bileşikler veya iyonlardır. Biyolojik mekanizmaların kontrolünde inhibitör maddeler önemli rollere sahiptir. Bunun yanı sıra bazı ilaçlar ve zehirli bileşikler inhibitör madde özelliği taşır. İnhibitörlerin incelenmesi enzim etki mekanizmalarının anlaşılmasına ve bu enzimlerin faaliyet gösterdiği metabolik yolların incelenmesinde yardımcıdır (Kuzucu 2011; Keha ve Küfrevioğlu 2010).

Enzimatik reaksiyonların hızlarına etki eden faktörler:

1. pH
2. İyonik şiddet
3. Substrat konsantrasyonu
4. Sıcaklık
5. İnhibitör ve aktivatör konsantrasyonu
6. Kofaktör konsantrasyonu

Bunlara ek olarak inhibitörler, aktivatörler substrat olarak organik çözücüler, metal-nükleotit kompleksleri, tamponlar ve basınç gibi faktörlerden de söz etmek gerekir (Purich 2010).

Enzimlerin miktarı aktiviteleri esas alınarak belirlendikten sonra enzim ünitesi (EU) cinsinden verilir. Yaygın bir enzim ünitesi tarifi olmamasına rağmen genel olarak 25°C’de ve optimal şartlarda 1 mikromol substratı 1 dakikada ürüne dönüştüren enzim miktarı, 1 enzim ünitesi olarak kabul edilmiştir. Spesifik aktivite, 1 mg protein başına düşen enzim ünitesi olarak tanımlanır ve bu da enzimin saflığının bir ölçüsüdür (Smith and Ferry 2000).

1. Genel olarak enzimlerin özellikleri şu şekilde sıralanabilir:
2. Enzimlerin büyük bir kısmı protein yapısındadırlar.
3. Aynı tür reaksiyonlar enzimler tarafından defalarca gerçekleştirilebilir.
4. Bir tane enzim her zaman bir çeşit ya da aynı tip benzer reaksiyonları katalizler.
5. Katalizlemiş oldukları reaksiyonların aktivasyon enerjisini indirirler.
6. Enzimler gerçekleşecek reaksiyonun daha kısa sürede dengelenmesini sağlarlar.
7. Enzimler canlı ortamda olduğu gibi cansız ortamda da işlev gösterir.

İnhibisyonlar; reversible (dönüşümlü) veya irreversible (dönüşümsüz) olabilir (Keha ve Küfrevioğlu 2009). Dönüşümlü inhibisyonda, enzimin inhibitör ile etkileşmesi bir denge reaksiyonu şeklindedir. Dönüşümlü inhibisyon üç başlık altında incelenir;

1. Yarışmalı (kompetitif) inhibisyon
2. Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon
3. Yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyon

Dönüşümlü inhibisyonun en basit tipi yarışmalı (kompetitif) inhibisyonudur. Yarışmalı inhibitör; yapı itibariyle substrata benzer ve enzimin aktif bölgesine

bağlanır. Böylece substratın enzime bağlanması önlenmiş olur. Fakat substrat konsantrasyonunu artırmakla inhibisyon etkisi kaldırılabilir. Yani enzimin  $V_{max}$  değeri değişmez. Yarışmalı inhibitör belli bir substrat için belirlenmiş  $K_M$ 'i (Michaelis sabiti) yükseltir. Yarışmalı bir inhibitör varlığında  $1/2 V_{max}$ 'a erişmek için daha fazla substrat gerekeceği anlamına gelir.

Dönüşümlü bir tip olan yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyonda inhibitör ve substrat, enzim moleküllerine aynı anda bağlanabilir. Bu bağlanmanın enzimin aynı bölgesine olmadığını gösterir. Yarışmasız bir inhibitör etkisini, enzimin turnover sayısını yani katalitik aktivitesini düşürerek gösterir. Burada substrat ve inhibitör arasında yarışma söz konusu değildir. Substrat konsantrasyonunu artırmakla inhibisyon kaldırılmaz. Enzimin  $V_{max}$  değeri azalırken,  $K_M$  sabit kalır (Kurbanoglu *et al.* 2016).

Yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyon çeşidinde, inhibitör serbest enzime bağlanamaz, ES kompleksine bağlanır. Birden fazla substratlı enzimlerde bu inhibisyon tipine daha sık rastlanır. Yarı yarışmalı inhibitor varlığında substrat konsantrasyonunun yükseltilmesi ile inhibisyon artabilir. Yarı yarışmalı inhibitör varlığında  $V_{max}$  ve  $K_M$  değeri azalır.

Dönüşümsüz inhibitör enzime ya kovalent olarak bağlanır veya zor ayrışabilen bir kompleks oluşturur. Dönüşümsüz inhibisyonda  $V_{max}$  azalır,  $K_M$  ise değişmeden kalır. İnhibitörleri çok defa yarışmalı ve yarışmasız olmak üzere kesin sınırlarla birbirinden ayırmak mümkün değildir. Gerçekte inhibisyon genellikle karışıktır (Keha ve Küfrevioğlu 2015).

Afinite kromotografisi ilk defa 1910 yılında amilazın çözünmeyen nişastaya adsorpsiyonun izolasyonunda kullanılmıştır. Fakat kovalent olarak ligandların bağlanabileceği dayanıklı matrikslerin bulunmayışından bu tekniğin yaygın halde uygulanması 1967'den sonra gerçekleşebilmiştir. Bu tarihte, primer amino grubuna sahip bileşiklerin siyano bromür (CNBr) ile aktifleştirilmiş polisakkarit matriks üzerine kovalent bağlanabileceği gösterilmiştir. Ayrıca literatürde, afinite jelleri için kullanılan matrikslerin aktivasyonu için oksiran aktifleştirilmesi, karbodiimid aktifleştirilmesi gibi değişik aktifleştirme yöntemleri de kullanılmıştır. Bu keşiften sonra afinite kromotografisinden yararlanarak, biyospesifik ligandlarla antikorlar,

bazı taşıyıcı proteinler, enzimler, nükleik asitler ve hatta birtakım hücrelerde çok saf halde elde edilmeye başlanmıştır (Çizelge 1.1) (Arslan 1994).

**Çizelge 1.1.** Afinite kromatografisinde en sık kullanılan biyolojik sistemler (Arslan 1994).

Safılaştırılacak madde	Ligand
Enzim	Substrat, inhibitör, kofaktör
Antikor	Antijen, virüs, hücre
Lektin	Polisakkarit, glikoprotein, hücre, hücre yüzey reseptörü
Nükleik asit	Komplementer baz dizisi, histon, nükleik asit polimeraz, bağlayıcı protein
Hormon, vitamin	Reseptör, taşıyıcı protein
Hücre	Hücre yüzeyi spesifik proteini, lektin

## 1.2. Karbonik Anhidrazlar

Karbonik anhidraz (CA, karbonat hidrolizaz; E.C.4.2.1.1) enzimi bütün canlılarda mevcuttur. Aktif bölgesinde  $Zn^{+2}$  iyonu içeren metaloenzimin bir çeşididir (Gül vd 2016). Karbondioksit, bikarbonat ve proton filogenetik ağaç içindeki tüm yaşayan organizmalarda (bakteri ve ökaryot) birçok önemli fizyolojik işlemde esasi moleküller/iyonlar olduklarından ve bu organizmaların farklı doku/hücre kompartmanlarında bağıl olarak yüksek miktarlarda bulduklarından dolayı, CA'lar yedi gen ailesi tarafından eksprese edilir, bunlar ;  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\zeta$ -,  $\eta$ - ve  $\theta$ -CA'lardır (Kikutani *et al.* 2016; Gulcin *et al.* 2016).

Sığır eritrositlerinden ilk defa keşfedilmiş olan karbonik anhidraz (CA), canlılarda karbon dioksitin hidratasyonu ve bikarbonatın dehidratasyonu reaksiyonlarını dönüşümlü olarak katalizleyen son derece önemli bir enzimdir (Gulcin *et al.* 2016).

CA enzimi eritrositleri de içine alan çoğu dokuda pH düzenleyici enzim olarak karakterize edilmiştir. Başta asit-baz dengesi olmak üzere birçok metabolik olayda rol oynamaktadır. Doku/organlar ile akciğer arasındaki CO<sub>2</sub>/bikarbonatın respirasyonu ve transportu ile ilgili kritik fizyolojik olaylarda pH ve CO<sub>2</sub> homeostazında, elektrolit sekresyonunda, biyosentetik reaksiyonlarda (glukoneogenez, lipogenez ve üre sentezi), kemik resorpsiyonu, kalsifikasyon, tümör oluşumu ve diğer birçok fizyolojik ve patolojik olayda görev alır (Goksu *et al.* 2014).

Memeli eritrositlerden izole edilen karbonik anhidraz enzimi ilerleyen yıllarda balık eritrositleri, enzim, sıçan eritrositleri, sığır kemiği, sığır lökositleri, sığır kemik iliği çeşitli bakteriler ve bitki kaynaklarından saflaştırılmış olup aynı zamanda birçok kaynaktan da karakterize edilmiştir. Son olarak enzimin memelilerdeki molekül kütlesi 30.000 Da civarında olduğu tespit edilmiştir. Bazı bakteriler, böcekler, balıkların salgı organlarında ve solungaçlarında, kabuklu hayvanların kabuk yapımında ve alglerde enzimin farklı rolleri olduğu ayrıca ispatlanmıştır (Beydemir and Gulcin 2004; Bursal 2009).

Karbonik anhidrazın katalizlemiş olduğu süreçlere dahil olan kimyasallar CO<sub>2</sub>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ve H<sup>+</sup>'lardır. Filogenetik ağaçtaki organizmaların çoğu fizyolojik süreçlerinde bu molekül ve iyonların temelini oluşturmaktadır. Sonuç olarak bu proteinler hücre ve doku bölmelerinde yüksek miktarda bulunur (Supuran 2010; Alterio *et al.* 2012).

### **1.2.1. Karbonik anhidraz izoenzimleri**

Bir enzimin aminoasit dizisi bakımından çok az farklı olan aynı veya farklı genler tarafından kodlanan fakat katalizledikleri (hızlandırdıkları) kimyasal reaksiyon aynı olan türlerinin her birine verilen isimdir. Enzim izoenzimlerinin kofaktörlerine, substratlarına ve inhibitörlerine karşı ilgileri değişiktir. İzoenzimlerin başlıca özellikleri arasında izoelektrik pH değerinin farklı olması, aminoasit sayısı ve sırasının farklı olması, elektroforetik hareketliliklerinin farklı olması ve her bir alt ünitenin ayrı gen tarafından eksprese edilmesi sayılabilir. İzoenzimler bir hücrenin subsellüler fraksiyonlarına yerleşebildiği gibi farklı dokularda lokalize olabilir (Keha ve Küfrevioğlu 2015).

Şimdiye kadar farklı kinetik ve moleküler özellikleri, ekspresyon seviyeleri ve oligomerik yeniden düzenlemeleri olan çeşitli dokularda ve organlarda 16 farklı  $\alpha$ -CA izoenzimi tanımlanmıştır. Bilinen hücresel lokalizasyona göre bazıları sitoplazmik olup (CA I, II, III, VII ve XIII), bazı CA izoenzimleri membrana bağlı (CA IV, IX, XII ve XIV), CA'lardan ikisi mitokondriyal (CA VA ve VB) ve CA'lardan biri salgısaldır (CA VI). İnsanlarda bulunan farklı izoenzimlerin gen yapısı belirlendikten sonra bu izoenzimlerin hayati fonksiyonlarının doku ile organlara göre farklılık gösterdiği tespit edilmiştir (De Simone *et al.* 2014).

Eritrositlerden elde edilen CA'nın en önemli fonksiyonu doku kılcallarında metabolizma ürünü olan  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{CO}_3^-$ 'e akciğer pulmoner kapilerde ise  $\text{H}_2\text{CO}_3^-$ 'in  $\text{CO}_2$ 'e dönüşmesi reaksiyonunu katalizleyerek solunum olayında da yer alırlar (Rahman *et al.* 2010).

CA, böbrek, mide mukozası, göz merceği, tükürük bezleri, beyin, sinir miyelin kılıfı, pankreas, prostat ve rahim içinde aktif özelliklere sahiptir (Arabacı *et al.* 2014). CA izoformları çeşitli önemli biyolojik süreçlere katılır ve çeşitli dokularda bulunurlar. Çalışmalar çeşitli fizyolojik süreçlerde CA'ların önemli rollerini göstermiştir ve bu enzimlerin olağanüstü düzeylerinin veya aktivitelerinin sıklıkla farklı insan hastalıkları ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Gocer *et al.* 2014).

CA III ilk olarak 1974'te erkek sıçanların karaciğer homojenatında bulunmuştur. CA III çok düşük aktiviteli bir izoenzim olup  $\text{CO}_2$  hidrasyonu için aktivitesi yalnızca CA II'ninkinin %1'i kadardır (Sly and Hu 1995). İskelet kasında CA enzimi olarak hCA III izoenzimi bulunmuş ve laktik asit-laktat dengesinde çok önemli bir role sahip olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Kırmızı kas dokusuna CA III enzimi zayıf bağlı olup, doku kapilerine  $\text{CO}_2$ 'nin difüzyonunu kolaylaştırıcı bir görev yapmaktadır (Lynch *et al.* 1993). Düşük aktiviteli bir izoenzimdir ve bu enzimin turnover sayısı  $8 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ 'dir. Kırmızı kas dokusuna zayıf bağlı olduğundan büyük oranda çözünebilir bir proteindir. Aynı zamanda bu izoenzimden yağ dokusunda yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır. hCA I ve hCA II izoenzimleri gibi hCA III de p-nitrofenil asetat hidrolizi aktivitesine sahiptir. Diğer yandan hCA III izoenziminin fosfataz aktivitesi de vardır (Engberg 1985).

hCA IV ve hCA VI ise iki sinyal sekans izoenzimleri olup sinyallerin hedef doku ve organlara ulaşmasını sağlarlar. hCA IV izoenzimi membrana bağlı bir

enzimdir ve böbreklerin membranına bağlı olarak bulunduğu gibi, bazı epitel hücrelerin membranlarına bağlı olarak ve akciğerde kapiler hücrelerinin plazma yüzeylerine yerleşmiş olarak bulunur. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, sülfonamid inhibitörlerinin üre sentezini azalttığı gösterilmiştir. Bu durum mitokondriyal CA enzimi olan hCA IV'ün, sitrulin sentezi için gerekli olan  $\text{HCO}_3^-$  iyonunu, sitrik asit devrinden gelen  $\text{CO}_2$ 'den sağlayarak, üre devrinin ilerlemesinde büyük role sahip olmasıyla açıklanmaktadır (Okuyama *et al.* 1995).

hCA V izoenzimi de, bazı dokuların mitokondri matrikslerine yerleşmiş olarak bulunur. Bu izoenzimin lipojenz olayında da etkili olduğu bildirilmiştir (Hazen *et al.* 1996).

Tükrük bezinde CA enzimi olarak hCA VI ve hCA VII izoenzimi vardır. hCA VI izoenzimi, tükrük bezlerinden salgılanan bir enzimdir. İnsan tükrüğünden izole edilmiş olup, tükrüğün pH dengesini sağladığına inanılmaktadır. hCA VII izoenzimi ise, tükrükte bikarbonat salgılanması için katkıda bulunmaktadır (Lakkis *et al.* 1996).

CA VIII enzimi de sıçan beyninden elde edilen bir cDNA kütüphanesinde keşfedilmiştir. İnsan cDNA homologlarının aminoasit dizilişleri de tespit edilmiştir (Sjöblom *et al.* 1996; Supuran and Scozzafava 2007).

CA IX ilk olarak tümöre bağlı yeni bir antijen olarak tanımlanmış, insan serviks kanser hücrelerinde ekspresyonu yapılmıştır.

Katalitik izoenzim CA X'in beyin, böbrek, serebral korteks, hipokampus, talamus, yumurtalık ve hipofiz bezinde eksprese olduğu belirlenmiştir.

CA XI, ilk olarak 36 kDa molekül ağırlıklı koyun beyin cDNA kütüphanesinde açıklamıştır. Proteinin güçlü bir sinyal sekansa, çeşitli potansiyel fosforilasyon bölgeleri ve bağlama motiflerine sahip olduğu ve sinyal uyumunda rol oynadığı önerilmektedir. Beyinde kuvvetli bir şekilde eksprese olduğu gösterilmiştir. İnsan pankreası, böbrek, karaciğer, tükrük bezi ve spinal kortta tespit edilmiştir. Normal pankreasa göre pankreatik kanser hücresinde daha güçlü sinyal görülmüştür.

CA XIII, tükrük bezleri, böbrek, ince bağırsak, kolon, uterus ve testisi de içeren çeşitli dokularda eksprese olmuş bir enzimdir. CA XIII proteinini modelleme çalışmaları globüler bir molekül olduğunu ve CA I, II ve III sitozolik enzimleriyle yüksek derecede (%60) özdeşlik gösterdiği belirtilmiştir. Yapılan gen ekspresyon

çalışmalarında insan dokularında; timus, ince bağırsak, dalak, prostat, yumurtalık, kolon ve testiste, farede; dalak, akciğer, böbrek, kalp, beyin, iskelet kası ve testislerde pozitif sinyal elde edilmiştir. Esas olarak hipoksik tümörlerde bulunan iki CA izoenzimidir ve kanser tedavisi için çekici hedeflerdir (Gül vd 2017; Gokce 2009).

CA XIV ilk olarak fare böbreğinde; en çok eksprese olduğu proksimal çapraşık tübüllerde tanımlanmıştır. Fare dokularındaki Northern Blot analizleri CA XIV mRNA ekspresyonunun en bol böbrek ve kalpte, daha sonra iskelet kası, beyin ve karaciğerde olduğunu göstermiştir.

CA XV'in yapısının CA IV ile çok benzer olduğu filogenetik çalışmalarla belirlenmiştir ve katalitik aktivitesinin düşük olduğu bildirilmiştir.

CA'nın değişik izoenzimleri değişik şekillerde dokulara dağılmıştır. Bir takım izoenzimler aynı dokularda bir arada bulunduğu gibi (eritrosit CA I ve CA II), bazı dokularda ise tek bir izoenzim olarak da bulunmaktadır (membrana bağlı CA IV gibi) (Gokce 2009).

16 adet CA izoenzimi çok çeşitli fizyolojik işlemlerde yer almaktadır. Sonuçta bu izoenzimlerin çalışmamaları veya değişmiş ekspresyonları patolojik durumları başlatabilmektedir. Birçoğu aktive veya inhibe edilebilme ihtimalinden dolayı çeşitli hastalıkların tedavisinde terapötik hedef oluşturmaktadır (Carradori *et al.* 2015).

### **1.2.2. Karbonik anhidraz I (CA I)**

1960'ların başına kadar, CA'nın tek bir biçimde var olduğu düşünülüyordu. İki ana eritrosit izoenzimleri CA I ve CA II arasındaki farklar 1976 yılında gözden geçirildi. Eritrosit içindeki yüksek konsantrasyonlu (CA I) izoenzimin daha düşük sayıya sahip olduğu hemen anlaşıldı. CA I, eritrositlerde hemoglobinden sonra en fazla bulunan protein olup konsantrasyonu 12 mg/(gram hemoglobin)'dir. İnsan eritrositlerinde CA II'den hemen hemen 6 kat fazla bulunan, lakin aktivitesi CA II'nin %15'i oluşturan bir izoenzimidir ( $K_{cat}=2.10^5s^{-1}$ ). Sağlıklı insan eritrositlerinde CA I maksimum CA aktivitesinin yaklaşık %50'sini oluştururlar. CA I, kalın bağırsağın epitelyumunda, ter bezlerinde, lenste, kornea epitelyumunda ve adipoz dokuda bulunur. İnsan fetal eritrositlerinde CA I'e rastlanılmaz. Kırmızı kan



hücrelerinde hemoglobinden sonra en çok rastlanan protein olmasına rağmen hiçbir hematolojik anormallikler onun eksikliğinde ortaya çıkmaz. CA I izoenziminin fizyolojik önemi belli değildir. Diğer CA izoenzimlerinin ve başka mekanizmaların CA I eksikliğini telafi edebildiği tahmin edilmektedir (Lehninger *et al.* 2005).

**Çizelge 1.2.** Afinite jelleri kullanılarak karbonik anhidraz (EC 4.2.1.1) izoenzimlerinin izolasyonu (Guler *et al.* 2016).

<b>Afinite ligandları</b>	<b>Katı destekler veya immobilize afinite ligandları</b>
Sülfanilamid	Sefadeks G-150
(P-Aminometilbenzen sülfonamid)	Sefaroz-4B
2-Amino-1,3,4-tiadiazol-5 sülfonamid	NH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> COOH ile sefaroz
P - [(2,4-Diaminofenil) azo] benzen-sülfonamid (Prontosil)	CM-Sefadeks

### 1.2.3. Karbonik anhidraz II (CA II)

CA II, hemen hemen her doku veya organdaki bazı hücre tiplerinin sitozolünde bulunan maksimum CO<sub>2</sub> hidrasyonu turnover sayısına sahip olan (1.106 s<sup>-1</sup>) ve en geniş dağılımlı, yüksek aktiviteli bir izoenzimdir (Alterio *et al.* 2012).

CA II kemikte, beyinde, beyin epitelyumunda, böbrekte, karaciğerde, salgı bezlerindeki asiner hücrelerde, gastrik parietal hücrelerde, pankreatik kanal hücrelerinde, endotel hücrelerde, eritrositlerde ve trombositlerde bulunurlar (Frost and Mc Kenna 2014; Sly and Hu 1995). Bu hücre tiplerinde CA II'nin fiziksel rolü dönüşümlüdür. Bazı hücrelerde CA II asit-baz homeostazı için temel rol oynar. Üriner asidifikasyon üretimi için H<sup>+</sup> salgılayan renal tubuler, gastrik parietal hücreler tarafından H<sup>+</sup> salgısına katkıda bulunur (Sly and Hu 1995).

Dönüşümsüz körlüğe neden olan glokomda CA II enzimi önemli bir role sahiptir. Glokom hastalığı anormal derecede yüksek göz içi basıncıyla ortaya çıkmaktadır. Dünyada on milyondan fazla kişinin yüksek göz içi basıncına sahip olduğu düşünülmektedir. Aköz hümör göz içi basıncının sağlanmasında önemli rol oynamaktadır. Aköz hümörün salgılanmasında da CA II enziminin uyarıcı etkisi vardır. CA II aynı zamanda eritrositlerde, böbrekte ve karaciğerde proksimal tübüllerde CO<sub>2</sub> değişimine katkıda bulunmuştur. CA II eksikliğinin osteopetrozis, renal tübüler asidoz ve serebral kalsifikasyon hastalıklarına yol açan çok nadir görülen otozomal resesif bir hastalık olduğu Nampoothiri ve Anikster tarafından 2008 yılında bildirilmiştir. Memeli karbonik anhidraz II (CA II) izoenziminin doku dağılımı ve bu dokulardaki işlevi Çizelge 1.3’de gösterilmiştir (Epstein and Grant 1977; Pastarekova *et al.* 2004).

**Çizelge 1.3.** Memeli karbonik anhidraz II (CA II) izoenziminin doku dağılımı ve bu dokulardaki işlevi (Pastarekova *et al.* 2004).

Doku dağılımı	İşlevsel rolleri
Yemek borusu (özafagus) ve larinks epiteli	Mideden yemek borusu ve daha yukarı bölgelere mide içeriğinin geri akımını engeller
Kemik osteoklast hücreleri	Kemik resorpsiyonu
Göz	Aköz hümörün üretimi
Testis	Sperm hareketliliği
Böbrek	İdrar asidifikasyonu
Beyin	BOS salgısı
Akciğer	Gaz değişimi
Eritrositler	Gaz değişimi
Gastrointestinal epiteli	H <sup>+</sup> salgısı, HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> salgısı

#### 1.2.4. Karbonik anhidrazın üç boyutlu yapısı

Şimdiye kadar keşfedilmiş olan bütün CA’lar metaloenzim olup kendi aralarında yedi enzim sınıfına ayrılmışlardır. Bu enzimlerin sınıflandırması bu şekil

de yapılmakta;  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\zeta$ -,  $\eta$ - ve  $\theta$ -CA'lardır (Kikutani *et al.* 2016). Farklı familyalarla gösterilmiş olan homolog enzimler arasında mühim bir fark bulunmayıp, aksine bunların tamamında çinko iyonu bulunmaktadır. Bu sebepten ötürü bu familyaların tamamı, katalitik fonksiyonları yerine getirmeleri yönünden birbirine benzer yapıdadır (Frost and Mc Kenna 2014).

$\alpha$ -,  $\beta$  ve  $\delta$ -CA'ların aktif bölgelerinde  $Zn^{+2}$  bulunmaktadır.  $\gamma$ -CA'ların aktif bölgesinde ise muhtemelen  $Fe^{+2}$  iyonu vardır. Fakat  $Co^{+2}$  ve  $Zn^{+2}$  iyonları bağlı iken de aktiflik gösterememektedirler.  $\zeta$ -CA'lar ise fizyolojik reaksiyonların katalizini yapmak için  $Zn^{+2}$  ve  $Cd^{+2}$  kullanmaktadırlar (Supuran 2016).

### 1.2.5. Karbonik anhidraz enziminin katalitik mekanizması

Yıllarca CA enziminin katalitik mekanizmasını aydınlatmayı amaçlayan çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre, CA enziminin metabolizmada son derece önemli görevleri olması, uygun şartlar altında aktivitesini kaybetmeden uzun süre saklanabilmesi ve çözelti ortamında kararlı olması gibi avantajlı özelliklere sahip olduğu anlaşılmıştır. Aktif bölgesinde  $Zn^{+2}$  iyonu ve ona bağlı bir hidroksil grubu ihtiva etmektedir. Aktif bölgenin yanındaki aminoasitler, proton verici ve proton gradienti oluşturacak şekilde düzenlenmiştir.

Bugüne kadar belirlenen tüm CA'lar iki basamaklı ping-pong mekanizmasına aracılık etmek amacıyla metal-hidroksit mekanizmasını kullanırlar (Aggarwal *et al.* 2013).  $Zn^{+2}$  iyonuna hidroksil grubunun bağlanmasıyla enzimin aktif formu oluşur. Enzimin aktif formu, güçlü nükleofilik yapısıyla  $CO_2$  molekülüne atak yapar. Bu etkileşim,  $Zn^{+2}$  iyonuna bağlanmış bikarbonat iyonunun oluşmasını sağlar. Daha sonra,  $HCO_3^-$  iyonu bir su molekülüyle yer değiştirir ve çözeltiliye geçer.  $Zn^{+2}$  iyonuna su molekülü bağlanır. Bu durum enzimin katalitik olarak inaktif asit formuna dönüşmesini sağlar. Temel formu elde etmek için aktif bölgedeki rezidüel veya tamponda bulunan iyonların etkisi ile aktif bölgeden çevreye bir  $H^+$  transferi gerçekleşir. Enzimin temel hale dönmesi hız belirleyici basamak olduğu için son derece önemlidir.

Fizyolojik reaksiyonların yanı sıra karbonik anhidrazlar çeşitli reaksiyonları da katalizler: Örneğin  $CO_2$ 'nin bikarbonata dönüştürülebilir hidrasyonu (reaksiyon 1, Çizelge 1.4); siyanatın karbamik aside ve siyanamidin üreye hidrasyonu

(reaksiyon 2, 3); gem-diollere aldehid hidrasyonu (reaksiyon 4); karboksilik veya sülfonik asit hidrolizi (reaksiyon 5, 6) ve daha az incelenen hidrolitik işlemler (reaksiyon 7 ve 9)'dir (Supuran 2008).

**Çizelge 1.4.**  $\alpha$ -CA'lar tarafından katalizlenen reaksiyonlar (Supuran and Scozzafava 2001).

Reaksiyon no	Reaksiyonlar
1	$O=C=O + H_2O \leftrightarrow HCO_3^- + H^+$
2	$O=C=NH + H_2O \leftrightarrow H_2NCOOH$
3	$HN=C=NH + H_2O \leftrightarrow H_2NCONH_2$
4	$RCHO + H_2O \leftrightarrow RCH(OH)_2$
5	$RCOOAr + H_2O \leftrightarrow RCOOH + ArOH$
6	$RSO_3Ar + H_2O \leftrightarrow RSO_3H + ArOH$
7	$ArF + H_2O \leftrightarrow HF + ArOH$ (Ar=2,4-Dinitrofenil)
8	$PhCH_2OCOCI + H_2O \leftrightarrow PhCH_2OH + CO_2 + HCl$
9	$RSO_2Cl + H_2O \leftrightarrow RSO_3H + HCl$ (Re=Me; Ph)

### 1.2.6. Karbonik anhidraz inhibitörleri

Karbonik anhidraz inhibitörleri iki sınıfta incelenmektedir. Birinci grup inhibitörler metallerle kompleks yapmış anyonlar ve ikinci grup inhibitörler ise enzimin  $Zn^{+2}$  iyonuna bağlanan moleküllerdir (Arslan 2001).

Karbonik anhidrazın en güçlü inhibitörleri aromatik ve heteroaromatik sulfonamidlerdir. Sulfonamidler R-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> kimyasal yapısına sahiptir. Bu formüldeki R grubu, genellikle aromatik veya heteroaromatik halka sistemidir.

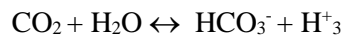
Bu özelliği, CA enzimi üzerine inhibisyon etkisi için son derece önemlidir. Sulfonamidlerin bu hidrofilik bölgesine ilaveten, aromatik ve heteroaromatik hidrofobik bölgelere sahiptir. Sulfonamidlerin enzimle etkileşmesi, öncelikle R-SO<sub>2</sub>NH- bileşiğindeki N atomunun CA enziminin aktif bölgesinde bulunan Zn<sup>+2</sup> ile iyonik bağlanması ile olurken, ikinci olarak da hidrofobik etkileşmelerle inhibitörün enzime bağlanması ile bu etkileşme tamamlanmış olur (Arslan 1994).

Organik ve inorganik anyonlar karbonik anhidraz inhibitörlerinin önemli sınıflarından olup günümüzde yeni inhibitör tiplerinin tasarlanması amacıyla tasarlanmıştır (De Simone and Supuran 2012).

Gözün aköz müköz üretmesinde kilit rol üstlenen karbonik anhidraz enziminin inhibe edilmesi aköz humoral salgının azalmasına neden olarak göz içi basıncının düşürülmesine katkı sağlar (Hollò 2015). Birleşik Milletler Gıda ve İlaç İdaresi topikal karbonik anhidraz inhibitörü dorzolamidin göz içi basıncın tedavisinde kullanımına 1995 senesinde müsaade etmiştir (Pfeiffer 1997). Karbonik anhidraz inhibitörü veterinerlikte glokom tedavisi amacıyla kullanılmaktadır (Maślanka 2015). Akut dağ hastalığı tedavisinde kullanılan asetozalemid etken maddeleri de yine bir karbonik anhidraz inhibitörüdür (Xiao *et al.* 2011). Bu enzim inhibitörleri kafa içi hipertansiyon tedavisi amacıyla nörolojide de kullanılmaktadır (Topal *et al.* 2017). Anti-enfektif tedavide karbonik anhidrazların kullanımı ile ilgili giderek artan çalışmada gündeme girmiştir (Altıntop *et al.* 2017).

### 1.2.7. Karbonik anhidraz aktivitesi

Enzimin CO<sub>2</sub>'i hidratasyonu bikarbonatın dehidratasyonu ve bazı esterleri hidrolizi gibi özelliklerinden yararlanılarak belirlenir.



Yukarıdaki reaksiyonda görüldüğü gibi, CO<sub>2</sub> gazı meydana gelmekte veya harcanmaktadır. Aynı zamanda H<sup>+</sup> konsantrasyonu çoğalmakta veya azalmaktadır. Açığa çıkan veya azalmış olan CO<sub>2</sub> gazı, kantitatif olarak manometrik metodu

reaksiyon pH'sının değişken olması, CO<sub>2</sub>'in suda sınırlı çözümlenmesi ve uzun zaman alması gibi dezavantajları vardır (Gocer *et al.* 2016).

İkinci olarak, ortamdaki H<sup>+</sup> konsantrasyonu; pH'nın yükselmesi veya düşmesi için geçen süre potansiyometrik yolla inhibitörle belirlenebilir. Fakat bu metodun kısa sürede oluşması gibi bir avantajının yanı sıra, reaksiyon sırasında pH'nın değişken olması CO<sub>2</sub>'in suda çözümlenmesi ve kullanılan indikatörünün inhibisyon etkisi gibi olumsuz sonuçlarının olması da vardır. Bu dezavantajları en az düzeye indirmek için sabit pH'da titrasyon veya 0,02-0,05 birimlik pH düşüşünün indikatörlü ortamda, spektrofotometre ile ölçüm yapıldığı hızlı akış reaksiyonu gibi metotlar aktivite tayininde kullanılmaktadır (Ahmed *et al.* 2001).

Enzimin saflaştırma basamağında aktivite ölçümleri, genellikle bütün araştırmacılar tarafından Wilbur-Anderson metodu ile yapılmaktadır. Bu yöntemde; CO<sub>2</sub> hidratasyonunda pH'nın 8,2'den 6,3'e düşmesi için geçen süre, pH-stat metodu kullanılarak bulunmaktadır. Enzim birimi ise, enzimsiz CO<sub>2</sub><sup>-</sup> hidratasyon süresi (t<sub>0</sub>) ile enzimli reaksiyon süresi (t<sub>c</sub>) arasındaki farkın, t<sub>c</sub>'ye bölünmesi ile belirlenmektedir. Buna göre enzim ünitesi, enzimsiz reaksiyon süresini yarıya düşüren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır.

Enzimin esteraz aktivitesi ise, p-nitro fenil asetatın hidrolizi ile açığa çıkan p-nitro fenol miktarının 348 nm'de spektrofotometrik ölçümü ile tayin edilmektedir (Ahmed *et al.* 2001).

### **1.2.8. Karbonik anhidraz enzimin afinite kromatografisi ile saflaştırılması**

Afinite kromatografisi karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması için en fazla uygulanan yöntemdir. Bu yöntem sayesinde hedeflenmiş olan protein tek basamakta, yüksek verimle ve kısa sürede saflaştırılarak elde edilmektedir (Landolfi *et al.* 1998). Karbonik anhidraz enziminin afinite kromatografisi ilk kez 1972 yılında Falkbring ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu tekniğe yönelik yapılan çalışmalar; 1974 yılında Whitney, 1975 yılında Wistrand ile arkadaşları, 1976 yılında Chanpagnol ve aynı yılı takiben Jölsen, 1977 yılında Kalfa ve arkadaşları, 1980 yılında Wistrand ve aynı yıl Beha'nın araştırmaları, 1995 yılında Arslan ile arkadaşları, 2000 yılında ise Demir ile arkadaşlarının araştırmalarıyla devam etmiştir (Cuatrecasas 1970). Chanpagnol ligant olarak hetero aromatik sülfonamid bileşiği

olan asetozolamidi kullanmış olup Chanpagnol haricindeki diğer araştırmacılar ligand olarak benzen sülfonamid türevlerini kullanmışlardır. Chanpagnol ise bir bitki CA enzimi dışında ligand olarak benzen sülfonamid türevlerini kullanılmıştır. Bunun sebebi bitki CA enziminin benzen sülfonamidler tarafından fazla inhibe edilmemesiyle açıklanmıştır. Bunu uzantı koluna sahip afinite jellerinin yüksek bir kapasiteye sahip oldukları ile açıklamışlar. Ayrıca matrikse takmış olan uzantı kollarının farklılığı da kolon verimi üzerindeki farklı sonuçları beraberinde getirmektedir (Arslan 1994).

### 1.3. Bazı doğal inhibitörler

Doğal ürünlerden izole edilerek elde edilen kumarinler, farmakoloji bilimi için oldukça önemli biyoaktif maddelerdir (Gomez-Verjan *et al.* 2015). Kumarinler ilk defa 1820 yılında izole edilip, farmasötik endüstrisinde antikoagülan ilaç sentezinde ön madde olarak kullanılmıştır. Kumarinler bir çeşit K-vitamini antagonistidirler ve birçok ülkede warfarin, asenokumarol ve fenprokumon isimleriyle kullanılmaktadır (Matos *et al.* 2015).

Kumarinlerin temel kimyasal yapıları (1,2-benzopiron ya da 2H-1benzopiron-2-on) doğada fazla miktarda bulunan benzopiron iskeletine sahiptirler (Venugopala *et al.* 2013).

En çok vanilyaya benzeyen kokusuyla tanınır ve yeni biçilmiş çimlerin hoş kokmasının sebebi yapısında yer alan kumarin bileşimidir. Tonka fasüyesi, sarıyonca, akasya, lavanta, kayısı, çilek, kiraz, lovage (yaban kerevizi) ve tarçını kapsayan pek çok bitkinin meyve, kabuk, gövde, yaprak ve dallarında ve yeşil çayda bulunan doğal bir üründür. Kapalı formülü  $C_9H_6O_2$ , molekül ağırlığı 146,15 g/mol olan kumarin, parlak, beyaz kristal yapılu bir maddedir. Erime noktası 68-70°C ve kaynama noktası 297-299°C'dir. Kumarin kloroformda çözündüğünde UV'de 272 nm'de maksimum absorpsiyon gösterir. Etanol, kloroform, dietileter ve yağlarda kolay çözünür, kaynar suda az, 20°C'deki suda çok az çözünmektedir (Sethna and Shah 1945). Kumarin ilk defa 1822 yılında Tonka fasüyesinden izole edilmekle beraber, 1868 yılından bu yana laboratuarlarda sentezlenmekte ve pek çok amaç için kullanılmaktadır (Maggi *et al.* 2011).

Kumarinlerin yıllarca farmakolojik özellikleri ve antioksidan özellikleri incelenmiştir. Kumarinlerin bitki biyokimyası ve fizyolojisinde, antioksidan gibi hareket etme, enzim inhibitörü, toksik maddeleri önleme gibi önemli etkileri gözlenmiştir. Kumarinler, anti-iltihap, antioksidant, antialerjik, antitrombotik, anti-viral, karaciğer koruyucu ve anti-kanserojen aktivite gösterme özellikleriyle tanımlanmaktadır. Bu yüzden ilaç endüstrisinde iyi bir potansiyel göstermektedir.

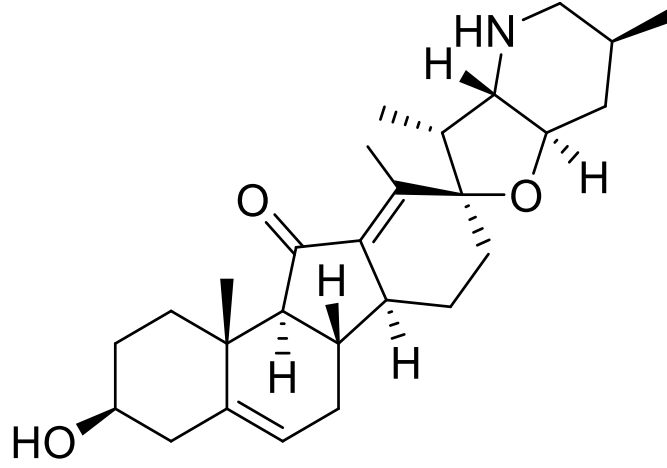
Hidroksikumarinler tipik fenolik bileşiklerdir. Güçlü metal kelat ve serbest radikal toplayıcılar gibi hareket ederler. Bunlar güçlü zincir kırıcı antioksidanlardır (Kostova 2006).

Fenolik bileşikler arasındaki baskın sınıflardan biri olan flavonoidler önemli bir antioksidan aktiviteye sahiptir (Xu *et al.* 2007). Flavonoidler, sekiz bini doğal olarak meydana gelen fenolik bileşiğin %50'sinden fazlasını içeren en büyük bitki fenolik bileşikleri grubunu temsil eder. Bir milyar yıldır bitkiler aleminde var oldukları sanılır (Middleton *et al.* 2000; Ren *et al.* 2003). Flavanon bileşikleri yaygın olarak kullanılan antioksidan maddelerdir. Naringenin bir flavanon bileşiğidir ve doğada tıp, gıda kimyası ve biyokimyannın çeşitli alanlarında bitki çayları olarak kullanılan bitki yapraklarında, çiçeklerinde ve gövdelerinde bulunabilirler (Karadağ ve Böhmer 2001). Doğal bir flavanon olarak naringenin (4',5,7-trihidroksi-flavanon-7-ramnoglikozit), narenciye, domates, meyve, çilek, greylort ve kakaoda zengin miktarlarda bulunur. Naringenin antioksidan, antitümör, anti-inflamatuar ve hepatoprotektif etkileri üzerinde çok fazla araştırma vardır. Naringenin, farmakolojik olarak potansiyel bir antioksidan olarak kabul edilir ve naringeninle ilgili antikarkinojenik, antiaterojenik, hepatoprotektif, nefroprotektif ve antimutagenik aktiviteler bildirilmiştir (Huyut *et al.* 2016). Flavonoidler düşük yoğunluklu oksidasyonunu azaltarak lipoproteinler, kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu rol oynarlar (Pietta and Na 2000). Son zamanlarda yapılan birkaç çalışma fenolik ve flavonoid moleküllerin karbonik anhidrazilara karşı inhibisyon etkisi olduğunu göstermiştir (Gocer *et al.* 2016; Rahman *et al.* 2015; Huyut *et al.* 2016). Limon kabuğundan 1936 yılında elde edilen flavon bileşiklerinin, P-vitamini adı altında, kılcal damar geçirgenliği ve kırılgenliğini düşürmede kullanılması, flavonoidlere verilen önemi arttırmıştır. Bu nedenle flavonoidlere karşı ilgi 1940'lardan itibaren artmaya başlamıştır. Bu sınıf 8000'den daha fazla flavonoid bileşikleri içerir (Rice -



Evans and Packer 2003). Flavonoidler çiçekli bitkilere renk veren maddelerdir (Kumar and Sinha 2004). Flavonoidler birkaç bitkisel olmayan kaynağa da sahiptirler. *Satyridae*, *Lycaenidae* ve *Papilionidae* familyalarında ki kelebeklerin kanat ve gövdelerindeki renkleri oluştururlar (Watson and Preedy 2004). Flavonoidler aynı zamanda insan sağlığı üzerinde önem teşkil eden bileşenlerin en yaygın gruplarından birisidir (Kumar and Sinha 2004). Tıp alanında; iltihap önleyici, antialerjik, tümör oluşumunu önleyici, antiviral, şeker hastalığını önleyici, damar koruyucu, antioksidan, antimikrobiyal ve enzim inhibe edici olarak kullanılmaktadır (Forgacs and Cserhati 2002). Flavonoidler yapılarında 4 pozisyonunda bir karbonil (C=O) ve 5 ya da 3 pozisyonunda bir hidroksil (OH) grubu içerdiğinden metallere kompleks yapma yeteneklerine sahiptirler. Metal iyonları ile flavonoidlerin etkileşimi biyolojik olarak önemli bir aşamadır (Hajji *et al.* 2006). Bu etkileşim flavonoidlerin bazı biyolojik ve antioksidan özelliklerini değiştirebilir (De Souza and De Giovanni 2005). Flavonoidler, glikozidler gibi canlı hücrelerde ortaya çıkarak sıcak asit ve enzimler ile aglikon ve şekere parçalanabilirler (Burak ve Çimen 1999).

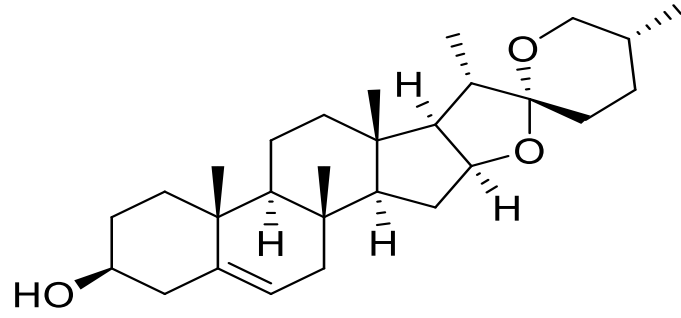
Jervin *Veratrum* türlerinde majör olarak bulunan steroidal alkaloitlerden birisidir. Kalp hastalıkları ve hipertansiyon tedavisinde kullanılan jervin, Hedgehog sinyal yolununun inhibisyonuna sebep olduğu için güçlü bir teratojen olarak da bilinmektedir (Chen *et al.* 2002). Antitümör aktivitesinin olduğu tespit edilmiş olan jervin, mühim bir steroidal alkaloit olan siklopamin bileşiğinin de analogudur (Şekil 1.1) (Lee *et al.* 2007; Heretsch *et al.* 2010; Tang 2008). Bu özelliğinden ötürü jervin ve *Veratrum* türlerinden elde edilen steroidal alkaloitlerce zengin ekstrelerin, bazı kanser hücrelerine karşı test edilmiş olup antikanser özelliklerinin olduğu tespit edilmiştir (Vachalkova *et al.* 1998). Epeyce toksik bileşik olan jervin siklopamin bileşiğinin biyosenteziyle meydana gelebilmektedirler (Heretsch *et al.* 2010). Siklopamin kanserli hücrelerin çoğalmasında önemli Hedgehog sinyal yolunun güçlü bir antagonisti ve blokeridir (Jimeno *et al.* 2009; Growdon *et al.* 2009). Bu özelliğinden ötürü siklopamin literatürde safra kesesi kanseri, göğüs kanseri, prostat kanseri, sedef hastalığı, deri kanseri, pankreas kanseri, sedef hastalığı ve daha birçok kanser hastalığının tedavisinde oldukça etkili bir ajan olduğu tespit edilmiştir (Wu *et al.* 2011; Kim *et al.* 2012).



**Şekil 1.1.** Jervine şematik gösterimi

İlaç endüstrisinde, diosgenin birkaç sentetik steroidal ilacın üretiminde başlıca öncü bileşiktir (Chen *et al.* 2015). Aynı zamanda çeşitli biyolojik özellikler sergileyen umut verici bir biyoaktif biyomolekülü temsil eder; Bunlar hipolipidemik, hipoglisemik, antioksidan, antiinflamatuvar ve antiproliferatif aktiviteleri içerir (Jesus *et al.* 2016). Bu nedenle diosgenin son yıllarda farmasötik, fonksiyonel gıda ve kozmetik endüstrilerinde büyük ilgi çekmiştir (Hua *et al.* 2016). Bu yüzden sentetik ve farmakolojik çalışmalarda saf diosgenin oldukça değerli bir maddedir (Şekil 1.2) (Son *et al.* 2007; Wang *et al.* 2011). Örneğin diosgenin doğum kontrol hapı gibi birçok önemli ilaçların sentezinde çıkış maddesi olarak kullanılmaktadır. Bir fitosteroid saponin olan diosgenin, *Costus speciosus*, *Smilax menispermoides*, *Trigonella foenum*, *Paris türleri*, *Aletris*, *Trigonella* ve *Trillium* gibi birçok bitki türünde ve birçok *Dioscorea* türünde yüksek düzeyde bulunur (Patel *et al.* 2013; Quilez *et al.* 2004). *Dioscorea* türleri Meksika, Güney Amerika ve Asya’da yetişmektedir ve rizomları diosgenin maddesi bakımından zengin olup “yabani yam” veya “wild yam” olarak bilinir (Chiang *et al.* 2007). Bu tür maddelerin antikan, serantiviral, antifungal, antiobezite ve antitümör etkilere sahip oldukları rapor edilmiştir (İndrayanto *et al.* 2001).

Saponin bitkisi diosgeninin safrasal kolesterol miktarının artmasında etkili olup; bunu da toplam safra tuz çıkışını değiştirmeden, 3 kat ya da fazla bir faktörle, safranın kolesterol/fosfolipid oranını artırarak gerçekleştirirle



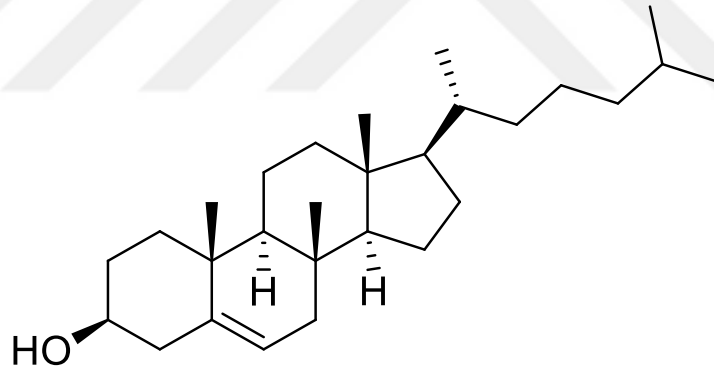
**Şekil 1.2.** Diosgenin şematik gösterimi

Kolesterol, genel olarak steroller olarak adlandırılan ve bütün hayvansal ve bitkisel dokularda yer alan bileşiklerden birisidir. Hayvansal dokularda bulunan en önemli sterol, kolesteroldür. Hayvanlardaki bir başka sterol ise yün yağının (lanoline) sabunlaştırılmayan kısmının temel bileşeni olan lanosterol'dür. Hayvan dokuları kolesterole ilaveten küçük miktarlarda 7-dehidrokolesterol içerir. Bu madde ultraviyole ışık altında vitamin D3'e (kolekalsiferol) dönüşür. Bitkisel dokulardaki en önemli bitki sterolü ise beta-sitosteroldür. Hayvansal dokularda yer alan sterollerin insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkisini, bitkilerde bulunan steroller düşürmektedir ve bu nedenle bitki sterollerini üzerinde giderek daha fazla durulmaktadır (Kris-Etherton *et al.* 1999; Gylling and Miettinen 2000). Bitki sterollerinin plazma kolesterolünü düşürücü özellikleri 1950'lerden beri bilinmektedir (Pollack 1953; Gould *et al.* 1995). Bitki sterollerinin kolesterol azaltıcı potansiyelleri hakkında yapılan ilk çalışmalarda günlük 25 g sterol katı (kristal) formda tüketilmiştir. Bununla birlikte daha sonraki yıllarda sterollerin yağlarda çözünen formlarının kan kolesterol seviyesini azaltmada kristal formundan daha etkili olduğu gösterilmiştir (Moreau *et al.* 2002).

İnsanlarda, diyetle ve endojen sentezi kolesterol alımı yaklaşık olarak toplam 1-2 g/gündür. Oluşan bu kolesterolü vücut, safra sekresyonu ile dengeler; bunun yaklaşık olarak yarısı, serbest kolesterol olarak salgılanırken diğer yarısı ise safra tuzları halinde dışkıyla dışarı atılır (Carey *et al.* 1994). Dolayısıyla hepatosit kanalikuler membranı, kolesterol homeostazisinde önemli bir rol oynar. Safraya, safra asitleri ve kolesterolü salgılayan etkili bir hepatik mekanizmadan yoksun olan insanoğlu, arterosklerotik harap etkisine maruz kalırlar.

Kolesterol, hücresel plazma zarlarında belirli hücre içi organellerde ve ayrıca plazma lipoproteinlerinde yüksek konsantrasyonlarda bulunan tüm memeli hücreleri için bir lipiddir. Beslenmedeki kolesterol, mezenterik lenf yoluyla dolaşıma aktaran enterositler tarafından emilmekte ve ardından, karaciğer tarafından kalıntının bir bileşeni olarak ele geçirilmektedir. Yıllarca kolesterol düşürücü madde olarak hizmet etmek için farklı gıda matrislerine bitki sterolleri eklenmiştir (Ikonen 2008; Maxfield and Van Meer 2010).

Kolesterol, suda hemen hemen hiç çözünmez. Dolayısıyla fosfatidilkolin ve safra asitleriyle kombine halde, safra asit-fosfolipid-kolesterol misellerini oluşturması, kolesterolün sudaki çözünürlüğünü belirgin bir şekilde artırır. Kolesterol çözünürlüğünün sekonder bir olay olarak kaldığı safradaki kolesterol transportu için primer mekanizmanın ise veziküller olduğu önerilmiştir (Cohen *et al.* 1989). Ayrıca kolesterol, fosfatidilkolin ile sekresyonun yokluğunda, luminal safra asitleri tarafından kanalikuler membrandan ekstrakte de edilebilir (Şekil 1.3) (Rigotti *et al.* 1993).

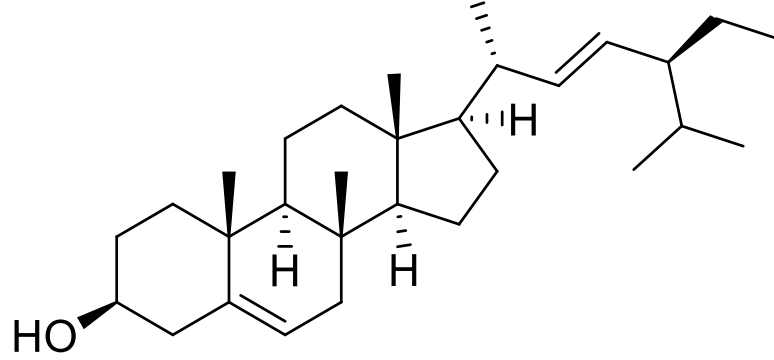


Şekil 1.3. Kolestrol şematik gösterimi

Fitosteroller olarak bilinen bitki sterolleri, bitki hücre zarlarının ayrılmaz doğal bileşenleri olup omurgalılarda kolesterol ile yapısal ve işlevsel olarak benzerdirler. Bitki sterolleri, bitki kaynaklı tüm besin maddelerinde bulunabilir. İnsan sağlığı için birçok biyo-aktif özelliğe sahip oldukları bilinmektedir. Serum kolesterol düşürücü etkisi en iyi olanıdır. Bitki sterolleri, bitki kaynaklı tüm besin maddelerinde bulunabilir. İnsan sağlığı için birçok biyo-aktif özelliğe sahip oldukları bilinmektedir. Bilinen diğer özellikler arasında en etkili olan serum kolesterol düşürücü etkisi bağırsakları inhibe eder. Kolesterolün emilmesi, toplam plazma

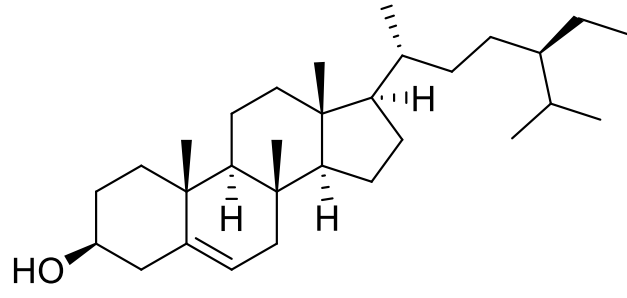
kolesterolu ve LDL (düşük yoğunluklu lipoprotein) seviyelerini düşürme ile sonuçlanır (Ryan *et al.* 2007). Bitki sterolleri kolon kanseri gelişimi için de inhibitör etkiye sahip olabilir. Ana bitki sterol,  $\beta$ -sitosterol, insan kanser hücresi büyümesini inhibe ettiği, epitel hücre proliferasyonu üzerine doza bağlı bir etkiye sahip olduğu ve ayrıca kolonda gelişen tümör sayısında azalma meydana getirmiştir. Söz konusu etkilere ek olarak, bitki sterollerinin antifungal, antibakteriyel, anti-enflamatuar, anti-laseratif, anti-oksidatif ve anti-anflamatuar aktivitelere sahip olduğu anlaşılmıştır (Kavite *et al.* 2014; Mbambo *et al.* 2012). Bu nedenle, fitosterollerin insan sağlığı üzerindeki etkileri, çeşitli hastalıkların tedavisinde ve önlenmesinde önemli rol oynarlar ve klinik düzeyde veya model sistemlerde fitosterollerle ilgili çalışmalar, bu bileşiklerin bu çeşitlilikteki işlevinin arkasındaki moleküler mekanizmayı anlamak için çok önemlidir. Literatürde çeşitli sterofiziksel ve yapısal teknikler kullanılarak bitki sterollerinin membran bileşenleriyle ve özellikle lipitlerle etkileşimi hakkında bir dizi çalışma mevcuttur (Halling and Slotte 2004). Sitosterollerin vücuttaki kolesterolu düşürmede rol oynadığı düşünülmektedir. Soya yağı, stigmasterol, tecavüz tohumu, kalaba fasulyesi ve kakao yağı gibi bitki yağlarında oluşan doymamış bir bitki sterolüdür. Estrojen ve adet döngüsünün luteal fazının neden olduğu vücuda yapılan değişiklikleri düzenli hale getirmek ve yeniden oluşturmak için önemli fizyolojik bir rol oynayan bir kadın seks hormonu olan sentetik progesteron üretiminde başlangıç malzemesi olarak kullanılır. Menstrüel döngüsü sırasında seviyeleri değişir. Buna ek olarak, progesteron, androjenlerin, östrojenlerin ve kortikoidlerin biyosentezinde bir ara madde olarak kullanılır. Progesteronlu sentetik bileşikler, menstrüel bozuklukların tedavisinde düşük yapmaktan kaçınmak için kullanılır. D2 provitamin olarak da adlandırılan ergosterol, sabunlaştırılmaz bir lipid olup ergot, maya ve diğer mantarlarda bulunur. Suda çözünmeyen ve organik çözücüler içinde çözünen beyaz kristalin bir bileşiktir. Ultraviyole ışığı veya elektronik bombardıman yoluyla ışınlama üzerine ergokalsiferol (D2 vitamini) haline dönüştürülür. Bununla birlikte, kolkalsiferol normalde ciltte ultraviyole ışığının bileşik 7-dehidrokolesterolu aktive ettiği yerde sentezlenir. D2 ve D3 vitamini, tüm memelilerde yaklaşık olarak eşittir. D vitamininin eksikliği, çocuklarda raşitizm ve erişkinlerde osteomalazi ile sonuçlanabilir. Ancak fazla seviyeler de yenmesi,

hiperkalsemi, kemikten kalsiyumun harekete geçirilmesi ve böbrek fonksiyon bozukluğuna neden olabilir (Şekil 1.4).



Şekil 1.4.  $\beta$ -stigmaşterol şematik gösterimi

$\beta$ -sitosterol yaklaşık olarak her bitki türünde bulunan yaygın bir steroiddir. Örneğin, *Elaphoglossum spathulatum*, *Tephrosia strigosa*, *Plantago ovata* Forsk, *Lilium longiflorum*, *Ajuga macrosperma*, *Heliotropium indicum*, *Brillantaisia palisatii*, *Parahancornia amapa*, *Conyza bonariensis*, *Tulipa gesneriana*, *Atractylodes chinense*, *Zhongguo zhongyao*, *Atractylodes chinense*, *Hygrophila spinosa*, *Ageratum conyzoides*, *Eulophia epidendraea* ve *Hypericum hyssopifolium* bunlardan bazılarıdır (Maridass and Ramesh 2010; Kamboj *et al.* 2011).  $\beta$ -sitosterol 3-O- $\beta$ -D-glukopiranozit bileşiminin ise *Eulophia epidendraea*, *Tribulus terrestris*, *Ocimum sanctum* L, *Dioscorea zingiberensis* C.H. Wright bitkilerinde bulunduğu tespit edilmiştir (Rahman *et al.* 2009). Bitkilerde yaygın olarak bulunan bu steroller farklı farmakolojik etkilere sahip bileşiklerdir. Literatürde bu iki metabolitin kolon kanserini tedavi edici etkilerinin yanı sıra antitümör, antipiretik ve antikompleman aktivitelerinin olduğu, kolesterolü ve kan şekeri düşürdükleri, kanda periferik lenfositleri çoğalttıkları ve immünomodülatör ajan oldukları bildirilmiştir (Bouic *et al.* 2002; Ju *et al.* 2004). Bu farmakolojik özelliklerinin yanı sıra  $\beta$ -sitosterol'ün, östrojeni etkilediği ve prostat büyümesini tedavi ettiği, antiartritlik, insülini hafiflettiği ve antiülser özelliğinin olduğu, spermatogenezi inhibe ettiği, antioksidan özellik gösterdiği ve kanser riskini düşürdüğu, karaciğer aktivitesini geliştirdiği de tespit edilmiştir (Şekil 1.5) (Ye *et al.* 2010; Donald *et al.* 1997).



Şekil 1.5.  $\beta$ -sitosterol şematik gösterimi



## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Karbonik anhidraz enzimi, 1933 yılında Meldrum, Roughton ile Stadie ve O'Brien tarafından ve birbirlerinden habersiz olarak keşfedilmiştir (Meldrum and Roughton 1933). İnsan eritrosit karbonik anhidraz enzimini yüksek oranda saflaştırmalarına rağmen sığır eritrositlerinden saflaştırmayı 1930'lu yılların sonlarında gerçekleştirebilmiştir (Bone *et al.* 1995).

Karbonik anhidraz izoenzimleri insan eritrositleri, balık solungaçları, balık eritrositleri, sıçan tükürüğü ve eritrositleri, böcekler, sığır kemik ve lökositlerini kapsayan birçok kaynaktan saflaştırılmış, karakterize edilmiş ve kinetik özellikleri incelenmiştir. Ayrıca CA'nın bitki, maya ve bakterilerden de karakterize edildiği belirtilmiştir (Bursal 2009).

CA inhibitörleri özellikle aromatik ve heterosiklik sülfonilamidler klinikte asit-baz dengesizliği, glukoma ve gastrik gibi birçok hastalığın tedavisinde uzun yıllardır kullanılmaktadır. Bunlara ek olarak inhibitörler antitümör ajanlar olarak da uygulanmaktadır (Bülbül *et al.* 2002; Supuran 2003).

CA I yaklaşık 30 kDa molekül kütleli düşük aktiviteli sitoplazmik bir enzimdir. Kapiler ve korneal endotelyum, plasenta ve memeli fetal membranlarında bol miktarda bulunduğu tespit edilmiştir (Mühlhauser *et al.* 1994). CA I geni insan genomik cDNA kütüphanesinden klonlanmıştır (Tashian 1989).

Fizyolojik koşullarda  $1,3-1,9 \times 10^6$  s<sup>-1</sup> turnover sayısına sahip CA II izoenzimi bilinen en verimli enzimlerden bir tanesidir (Supuran 2003). İnsan CA II geni, CA I ve CA III genleri gibi kromozom 8 üzerindedir (Nakai *et al.* 1987). Hemen hemen tüm insan doku ve organlarında bulunan CA II karbonik anhidraz gen familyasında en fazla dağılım gösteren izoenzimdir (Tashian 1992). İlk olarak CO<sub>2</sub>'nin hidrasyonunda yer aldığı eritrositlerde bulunmuştur (Wistrand 1980).

Metaloenzim olan karbonik anhidrazın 12 memeli izoformlarının fenol serisiyle inhibisyonu araştırılmıştır. Bu CA'ların fenol serisiyle inhibisyonunun sülfanilamidlerden farklı olduğu bildirilmiştir. Fenolün 2-, 3- ve 4- konumlarına hidroksi, siyan, flor, amino, karboksil ve asetoamid gruplarının bağlanmasıyla oluşan seri, CA enzim aktiveteleri üzerine düşük konsantrasyonlarda bile inhibisyon etkisi gösterdiği belirtilmiştir (Innocenti *et al.* 2008).



hCA I ve hCA II enzimleri üzerine hidrataz aktivitesi ile bazı antibiyotiklerin inhibisyon etkilerini incelemiştir. Çalışma sonucunda; sodyum amfisilin hCA I'ı inhibe ettiğini, sodyum dipirionun aktive ettiğini fakat MgSO<sub>4</sub>'ün hiçbir etki göstermediğini bulmuşlardır. hCA II'yi ise sodyum amfisilin ve MgSO<sub>4</sub> inhibe ederken sodyum dipirionun aktive ettiğini tespit etmişlerdir (Beydemir *et al.* 2000).

İnsan eritrositlerinden %66,95 verim, 745,1 kat, 3892,3 EU/mg protein spesifik aktiviteyle saflaştırdıkları hCA I ve %62,82 verim, 2232,6 kat 116632 EU/mg protein spesifik aktiviteyle saflaştırdıkları hCA II enzimleri üzerine morfinin inhibisyon etkisini incelemiştir. Çalışma sonucunda; enzimin hidrataz aktivitesiyle hCA I için IC<sub>50</sub> değeri 4,5x10<sup>-5</sup> M ve hCA II için IC<sub>50</sub> değeri 9,23x10<sup>-5</sup> M olarak bulunmuştur. Ayrıca aynı çalışma kapsamında *in vivo* olarak sıçan eritrositlerinde yapılan çalışmada her iki enziminde morfin tarafından inhibe edildiği bulunmuştur (Hisar *et al.* 2005).

Bitkiler daha ayrıntılı bir şekilde incelendiği zaman içeriklerinde çok farklı maddelerin olduğu görülür (Sajfirova 2012). Bitkilerin içindeki maddeler genellikle fenolik bileşiklerden oluşur. Bu sebeple bitkiler incelenirken içerisindeki uçucu yağlara bakılarak yorumlar yapılabilmektedir (Filly 2014).

Albayrak ve ark. (2009) Türkiye'de *Helichrysum* türlerinin tamamının kompozisyonlarına bakarak antioksidan ve antibiyotik faaliyetlerini incelemiştir.

Genistein, nörokoruyucu etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Ayrıca Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanılır (Matsuda *et al.* 2015). Doğal olarak soya içerisinde bulunur ve fitoöstrojenleri oluşturur. Bununla birlikte diğer fitoöstrojenlerle de karşılaştırıldığında östrojen reseptörlerine daha yüksek bir afiniteyle bağlanır (Kohara *et al.* 2015).

Tangeretin, turunçgillerin içerisinde bulunur. Aynı zamanda metoksi grupları içeren bir flavondur. Tangeretin, antioksidan etkisinden dolayı birçok farmakolojik özelliğe sahiptir (Lakshmi *et al.* 2014).

Formononetin, "*Astragalus membranaceus*" tarafından üretilen bir fitoöstrojendir. Kan artırıcısı ve düzenleyici olarak kullanılır (Huh *et al.* 2011).

Delphinidin, petunidin, peonidin, pelargonidin, malvinidin gibi antosiyanidinler, farmakolojik aktivitelerde geniş ölçüde kullanılır. Delphinidin, çiçeğin ve meyvenin epidermal dokusunda temelde mevcut olup, önemli bir

antosiyamididir. Delphinidin; antioksidan, antimutajenik, anti-enflamatuar ve anti-anjiyojenik gibi çeşitli farmakolojik aktiviteler gösterir (Patel *et al.* 2013).

Ekinci *et al.* (2007) tarafından yapılan bir çalışmada; karbonik anhidraz I ve II izoenzimleri sepharose-4B L-tyrosine afinite kromatografisiyle sırasıyla 104 ve 900 kat saflaştırılmıştır. %30 ve %40 verimle saflaştırılan 920 ve 8000 EU/mg protein spesifik aktivitesine sahip CA I ve CA II izoenzimlerinin aktiviteleri üzerine seftriakson sodyum, imipenem ve ornidazol ilaçlarının *in vitro* etkileri incelenmiştir. hCA I'in hidrataz aktivitesi için sırasıyla IC<sub>50</sub> değerleri 0,864 mM, 0,00354 mM ve 0,131 mM, esteraz aktivitesi için 1,9 mM, 0,0081 mM ve 0,318 mM olarak bulunmuştur. hCA II'nin hidrataz aktivitesi için sırasıyla IC<sub>50</sub> değerleri 1,118 mM 0,0214 mM ve 0,263 mM, esteraz aktivitesi için 2,542 mM 0,0258 mM ve 0,343 mM olarak bulunmuştur (Ekinci *et al.* 2007).

Innocenti (2010) bir dizi (poli) fenol ile memeli CA izoformlarının (CA I ve CA XIV) ayrıntılı bir inhibisyon çalışmasını gerçekleştirmiştir. P-hidroksibenzoik asit, p-kumarin asit, kafeik asit, ferulik asit, galik asit, sirinjik asit, kersetin ve elajik asit gibi çeşitli fenolik asitler ve fenol doğal ürünleri ile bu enzimler üzerindeki inhibe edici etkisi araştırılmıştır. Tüm memeli izozimleri; hCA I, XII, XIII ve XIV düşük mikromolar veya submikromolar aralıkta bu (poli) fenoller ile inhibe edilmiştir. Burada araştırılan fenoller, klinik olarak kullanılan sülfonamidlerin/sülfamadların veya kumarinkilerden farklı olan bir CA inhibisyon mekanizmasına sahiptir. Katalitik çinko iyonuna bağlanan sülfonamidlerin aksine fenoller, Zn(II) koordinatlı su molekülüne bağlanır ve aktif bölge boşluğunda daha dışa bağlanarak çeşitli aminoasit kalıntılarıyla temas eder. Memelilerde bulunan birçok CA izoenzimi arasında en değişkenliğe sahip bölge olduğundan bu bileşik sınıfı tıbbi açıdan ilgili CA'ların yalnızca birisini veya birkaçını hedef alan izoform seçici inhibitörlere yol açabileceği belirtilmiştir.

Özdemir (2014) yeni aromatik/heteroaromatik propansülfonilhidrazon bileşiklerinin sentezi, fiziksel özellikleri ve karbonik anhidraz II (CA II) enzimine karşı inhibisyon çalışmasında bu izoformun en iyi aromatik/heteroaromatik propansülfonilhidrazon inhibitörleri, o-aminobenzaldehid, propansülfonilhidrazon ve aynı IC<sub>50</sub> (0,55 mM) değerine sahip olan tiofenkarboksialdehit propansülfonilhidrazon olduğu belirtilmiştir.

hCA I ve hCA II enzimleri üzerine sprofloksasin, kloritromisin, rifamisin SV, gentamisin sülfat, klindamisin fosfat, klorafenikol, sodyum ampicilin ve sefazolin sodyum antibiyotiklerinin *in vitro* etkilerini incelemiştir (Xu *et al.* 2008). Çalışma sonucunda hCA I ve hCA II için en etkili inhibitörün sırasıyla 0,00163 mM ve 0,00114 mM IC<sub>50</sub> değeri ile sodyum ampicilin olduğu bulunmuştur. En az etkiyi ise hCA I ve hCA II için sırasıyla 0,00358 mM ve 0,00308 mM IC<sub>50</sub> değeri ile sefazolin sodyumun gösterdiği bulunmuştur.

Yapılan başka bir çalışmada ise kemoterapide sık sık kullanılan bleomisin sülfat, sitarabin bevacizumab tratuzumab, fludarabin, kalsiyum folinat, vinkristin sülfat ve rituksimab ilaçlarının hCA I ve hCA II üzerine inhibisyon etkileri incelenmiştir. Bu amaçla öncelikle hCA I ve hCA II izoenzimleri taze insan kanından Sefaroz-4B-L-Tirozin sülfanilamid afinite kolon kromatografisi ile saflaştırılmış. hCA I ve hCA II izoenzimleri sırasıyla 93,52 ve 661,90 kat ve %54, %56,46 verimle elde edilmiş. K<sub>i</sub> değerlerinin bulunması için esteraz aktivitesi ile ilaçların inhibisyon etkilerine bakılmış, fakat en yüksek konsantrasyonda bile bu ilaçların esteraz aktivitesinde hCA I ve hCA II izoenzimleri üzerinde herhangi bir inhibisyon etkisi gözlenmemiştir (Topal 2009).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Kimyasal maddeler

Tez kapsamında yapılan çalışmalarda kullanılan trietanolamin, serum albümin diyaliz torbaları, Sepharose 4B, N, N, N, N'-tetrametil etilendiamin, benzamidin Sigma Chemical Comp.'den; trihidroksi metil amino metan (Tris), sodyum hidroksit, hidroklorik asit, sodyum asetat, etanol, glisin, kolesterol, sodyum azitür Co Merck'de; gliserin, metanol, sodyum asetat, fosforik asit, asetik asit, akrilamid, kolestrol, N, N'-metilen bisakrilamid, coomassie brilliant blue G-250, amonyum persülfat ise E.Merk'ten AG'den temin edildi. Jervin, diosgenin, sitosterol ve beta-stigmasterol ise Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dr. Öğr. Üyesi Tuba AYDIN'dan alınmıştır.

##### 3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

Tez kapsamında yapılan çalışmalarda aşağıda belirtilen alet ve cihazlardan yararlanılmıştır.

<b>Cihaz</b>	<b>Marka</b>
Karıştırıcı (Vorteks)	WiseMix VM-10
Hassas Terazi	OHAUS Pioneer
Buzdolapları	Arçelik
Spektrofotometre	Thermo Scientific Evolution 201 UV-Visible Spectrophotometer
Elektroforez Tankı	Bio Rad (Dikey)
Güç kaynağı	Consort EV265 Elektrophoresis Power Supply
pH Metre	Crison MM41 Multimeter
Saf Su Cihazı	Barnstead Easy Pure UV/U
Otomatik Pipet	ISOLAB Seti
Magnetik Karıştırıcı	Chilten Hotplate Magnetic Stirrer HSBI

Peristaltik pompa	Gilson Minipuls 3
Santrifüj	Thermo Scientific
Derin dondurucu (-20)	Arçelik Dikey Derin Dondurucu

### 3.1.3. Çözeltilerin hazırlanmaları

Çalışma kapsamında hazırlanan çözeltilerde kullanılan su, deiyonize veya saf sudur. Bazı karışımlarda kullanılmış olduğumuz su ise steril hale getirildi.

1. 0,2 M  $\text{NaHCO}_3$  çözeltisi, pH 8,8 (sefaro-4B matriksi üzerinde afinite jeli hazırlanırken kullanılan tampon çözelti): 16,8 g  $\text{NaHCO}_3$ , 950 ml distile suda çözülerek 0,1 N NaOH ile pH 8,8'e titre edildikten sonra toplam hacim distile su ile 1 litreye tamamlandı.

2. 25 mM Tris-HCl/0,1 M  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  çözeltisi, pH 8,7 (afinite jelinin dengelenmesinde kullanılan tampon çözelti): 950 ml distile suda 3,0275 g Tris ve 14,2 g  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  çözülerek 0,1 N HCl ile pH 8,7'ye titre edildi. Daha sonra distile su ile hacim 1 litreye tamamlandı.

3. 25 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ /1 M NaCl çözeltisi, pH 6,3 (kolona tutunmuş hCA I izoenziminin elüsyonu için kullanılan tampon çözelti): 2,2 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ve 14,625 g NaCl alınıp, pH 6,3'e titre edildikten sonra toplam hacim 250 ml'ye distile su ile tamamlandı

4. %0,9'luk NaCl (homojenatın yıkanması için kullanılmış olan çözelti): 4,5 g NaCl alındı. Karışımın hacmi saf su ile 500 ml'ye tamamlandı.

5. 0,05 M Tris- $\text{SO}_4$ , pH 7,4 (esteraz aktivitesi ve diyalizde kullanılan tampon çözelti): 950 ml distile su içerisinde 6,055 g Tris çözülerek, 1 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ile pH'sı 7,4'e getirildikten sonra distile su ile hacim 1 litreye tamamlandı.

6. %0,02'lik  $\text{NaN}_3$  çözeltisi (afinite kolonunun bakterilerden korunması için kullanılmış olan çözelti): 20 mg  $\text{NaN}_3$  alındı. Karışımın hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

7. *p*-nitrofenilasetat çözeltisi: 1 ml aseton içerisinde 27,2 mg *p*-nitrofenilasetat çözündükten sonra 49 ml saf suya azar azar katılarak hazırlandı.

8. Kullanılan inhibitör çözeltilerinin hazırlanması: 1mg/ml olacak şekilde hassas terazide katı halde tartımı yapılan maddeler dimetilsülfoksit (DMSO) kullanılarak çözüldü. Sonrasında inhibisyon çalışmalarında kullanılmak üzere 100, 1000 veya 10000 kat safsu ile seyreltme işlemleri gerçekleştirildi (Kaplan 2014).

#### 3.1.4. Deneyde kullanılan kanın temini ve hemolizat hazırlanması

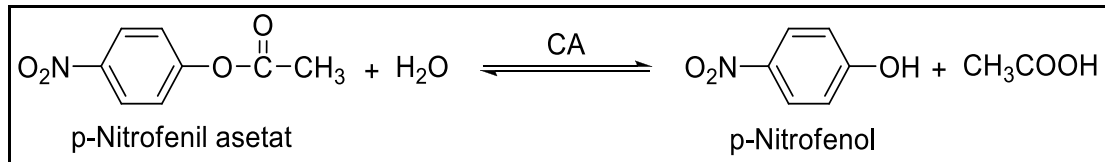
Ağrı Devlet Hastanesi Kan Merkezinden taze olarak insan kanı temin edilmiştir. Alınan taze insan kanı EDTA içeren tüpler içerisinde +4°C ortam şartıyla laboratuvar ortamına getirildi. Getirilen kanlar günlük olarak kullanıldı (Hunaiti and Soud 2000).

### 3.2. Metodlar

#### 3.2.1. Karbonik anhidraz enziminin aktivite tayin yöntemleri

##### Esteraz Aktivitesi

Esteraz aktivitesi enzimin kinetik çalışmalarında kullanılan yöntemdir. Bu yöntem, karbonik anhidrazın bir substrat olarak hidroliz *p*-nitrofenilasetata reaksiyonunun *p*-nitrofenol veya *p*-nitrofenolat mekanizmasına esteraz etkinliğine dayanmaktadır. Bu metodun prensibine göre; CA enzimi substrat olarak kullanılmış olan *p*-nitroasetatı 348 nm dalga boyunda absorpsiyon vererek *p*-nitrofenol veya *p*-nitrofenolat'a hidroliz etmektedir (Şekil 3.1) (Verpoorte *et al.* 1967).



Şekil 3.1. *p*-Nitrofenilasetatın *p*-nitrofenole dönüşüm mekanizması.

#### Bradford yöntemi ile protein tayini

Afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltisi ve hemolizattaki protein miktarları bu yöntemle belirlendi. Kullanılan bu yöntem Coomassie Brilliant Blue G-

250 organik olan boyasının asidik ve bazik grupların etkileşmesiyle mavi renk oluşması esas alınmıştır. Protein'in aminoasitle birleşmesiyle mavi rengin meydana gelişinde önemli bir yere sahiptir. Coomassie Brilliant Blue G-250 maksimum absorbanı normal şartlarda 465 nm'de verirken proteine bağlandığı zaman maksimum absorbanı 595 nm'de verir (Bradford 1976).

### **Afinite kromatografisi jelinin hazırlanması**

Bir tür adsorbsiyon kromatografisi olan afinite kromatografisi, saflaştırılmak istenen maddenin, matriks olarak adlandırılan polimer bir maddeye kovalent olarak bağlanan bir koplementer maddeye (ligand) spesifik ve geri dönüşümlü bağlanmanın olduğu bir yöntem kullanılmaktadır. Matriks olarak biyojel, sephadeks ve sefaroz v.b. değişik polimerler kullanılmaktadır. Kullanılacak ligand saflaştırılması düşünülen maddeye spesifik ve geri dönüşümlü bir şekilde bağlanma afinitesine sahiptir.

### **Afinite kolonunun paketlenmesi**

Afinite jeli dengelenmesi için Tris-HCl, pH:7,8 tamponu içerisine alındı ve böylece jel süspanse edilmiş oldu. Süspanse edilen afinite jeli su trompu yardımı ile vakumlanarak gözenekleri arasında kalan hava kabarcıkları uzaklaştırıldı. Havası alınan jel, 1x10 cm'lik soğutmalı kapalı sistem cam kolona dolduruldu. Jel doldurulduktan sonra peristaltik pompa kullanılarak dengeleme çözeltisi kullanılarak yıkama işlemi yapıldı. Afinite jelinin dengelenip dengelenmediği alttan alınan eluat ile üstten ilave edilen dengeleme çözeltisinin 280 nm'de gösterdiği absorban ve pH değerlerinin eşit çıkması ile belirlendi.

### **CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye tirozin takılması**

Afinite jeli Sefaroz-4B matriksi üzerinde hazırlandı. L-tirozin kolon materyaline kovalent olarak takıldıktan sonra diazollenmiş sülfanilamid tirozine kenetlendi. Söz konusu sülfanilamid enzimi spesifik olarak bağlayan kısmını, tirozin ise afinite jelinin uzantı kolunu oluşturmaktadır. Karbonik anhidraza özgü bir inhibitör olan sülfanilamid, afinite jelinin yapısına girerek CA'nın yüksek oranda saflaştırılmasında başarı bir şekilde kullanılmaktadır (Kohn and Wilchek 1978).

### **Sülfanilamid Bağlanması**

0,050 g sülfanilamid, yaklaşık 0°C'deki 10 ml 1 N HCl içerisinde çözüldü ve içinde 0,150 g NaNO<sub>2</sub> olan 0°C'deki 5 ml karışım, hazırlanan bu sülfanilamid çözeltisi içerisinde azar azar ilave edildi. Yaklaşık 10 dk içerisinde diazolama reaksiyonu tamamlanan sülfanilamid 40 ml Sepharose-4B-tirozin karışımına eklendi. pH'sı, 1 N NaOH çözeltisi kullanılarak 9,5'a çıkarılarak sabit tutuldu ve 3 saat kadar oda sıcaklığında yavaşça karıştırıldı. Sonrasında 1 litre saf su ve 200 ml 0,05 M Tris-SO<sub>4</sub> (pH: 7,4) tamponu kullanılarak yıkandı. Yıkandıktan sonra hazırlanan jel aynı tampondan 20 ml kadar eklenerek buzdolabında +4°C'ye konularak kullanılıncaya kadar saklandı.

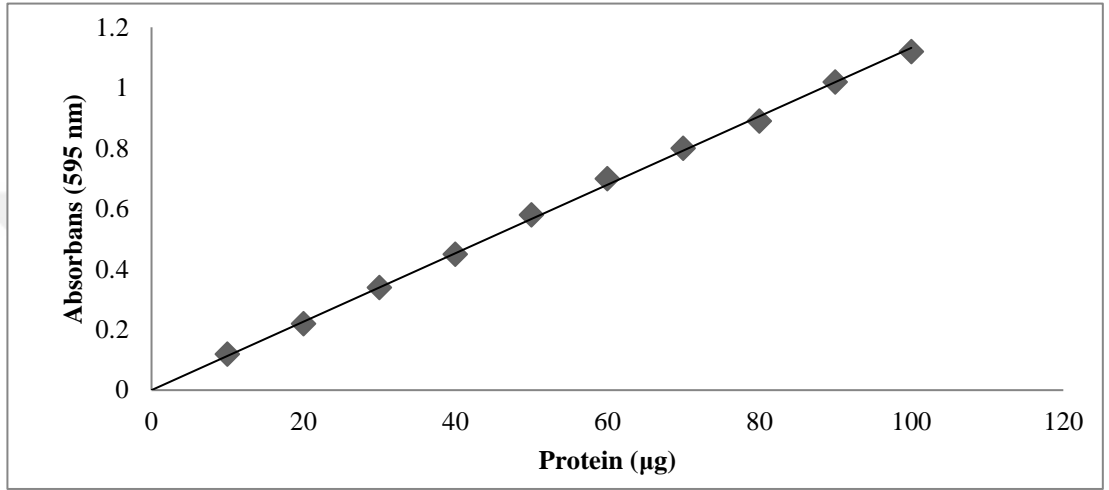




## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. Kantitatif Protein Tayini için Kullanılan Standart Grafik

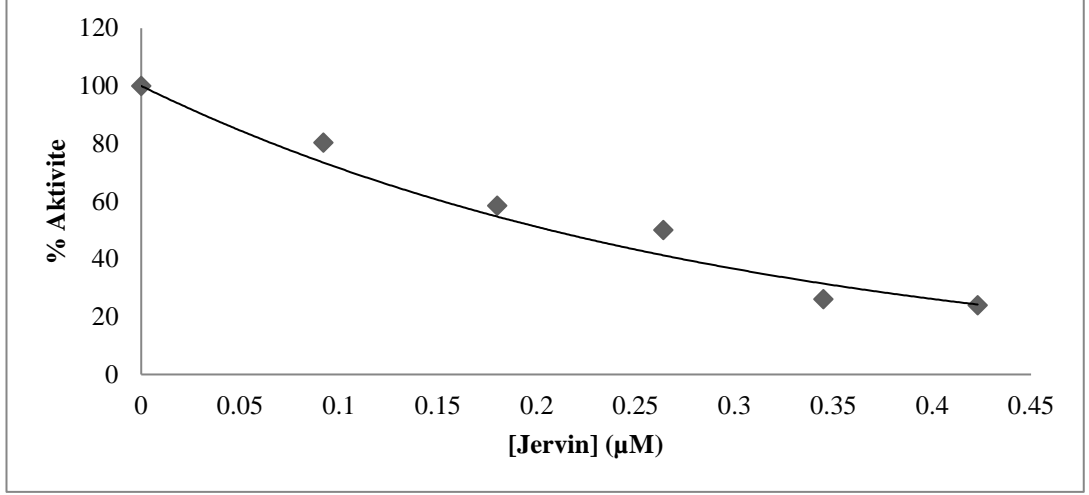
Bradford yöntemiyle, elde ettiğimiz enzim çözeltilerindeki kantitatif protein tayini yapıldı. Öncelikle standart grafik hazırlandı. Daha sonra hazırlanan standart grafikten faydalanılarak protein miktarları hesaplandı (Şekil 4.1).



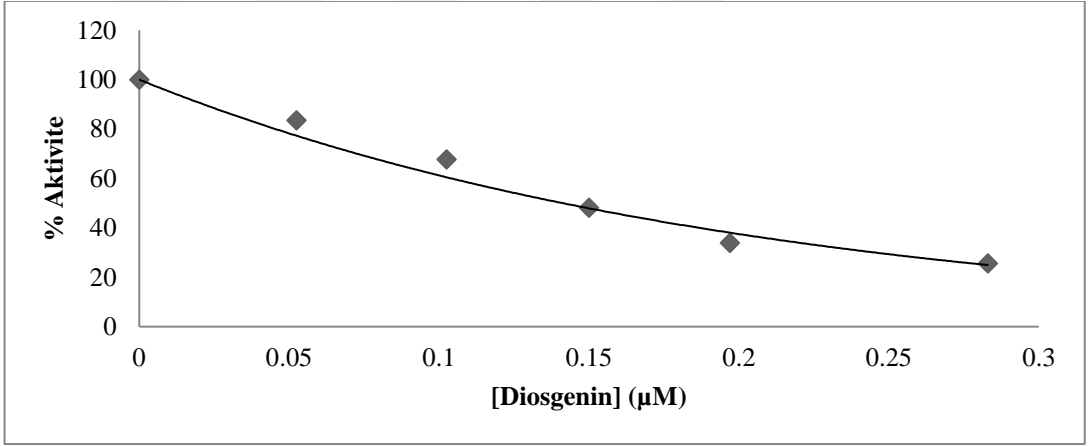
Şekil 4.1. Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayini için kullanılan standart grafik.

### 4.2. hCA I ve hCA II izoenzimlerinin bazı doğal maddelerle inhibisyon türevlerinin etkilerinin belirlenmesi için yapılan çalışmaların sonuçları

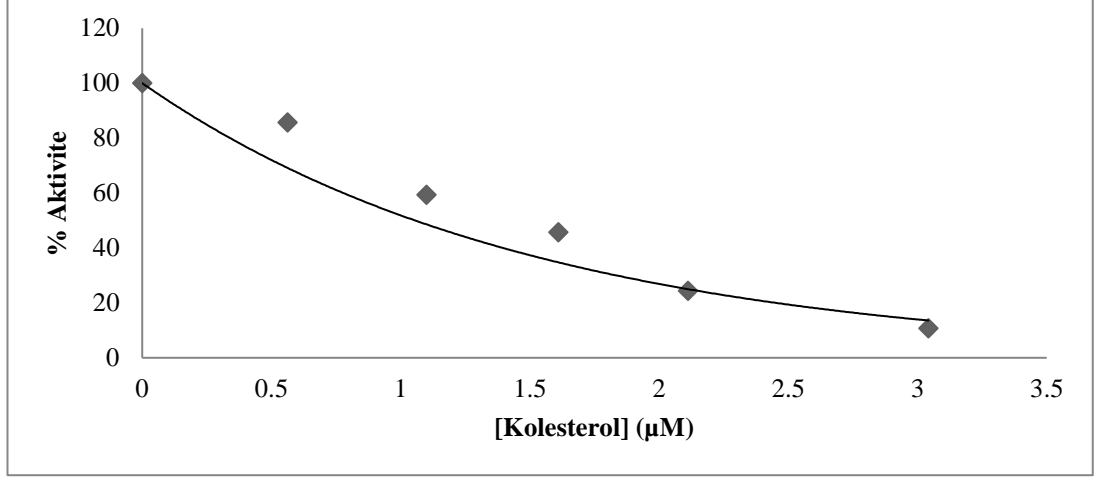
İnsan eritrositlerinden saflaştırılan hCA I izoenzimi için diosgenin, jervin, kolestrol,  $\beta$ -Stigmasterol ve  $\beta$ -sitosterol bileşiklerinin etkisi araştırıldı. Ölçümler, esteraz aktivitesi tayini yöntemiyle yapıldı. İnhibisyon etkisi gösteren her bir madde için (%) aktivite-[I] grafikleri çizildi. Daha sonra bu grafiklerden yararlanılarak %50 enzim inhibisyonuna sebep olan maddelerin konsantrasyonları ( $IC_{50}$  değerleri) hesaplandı.



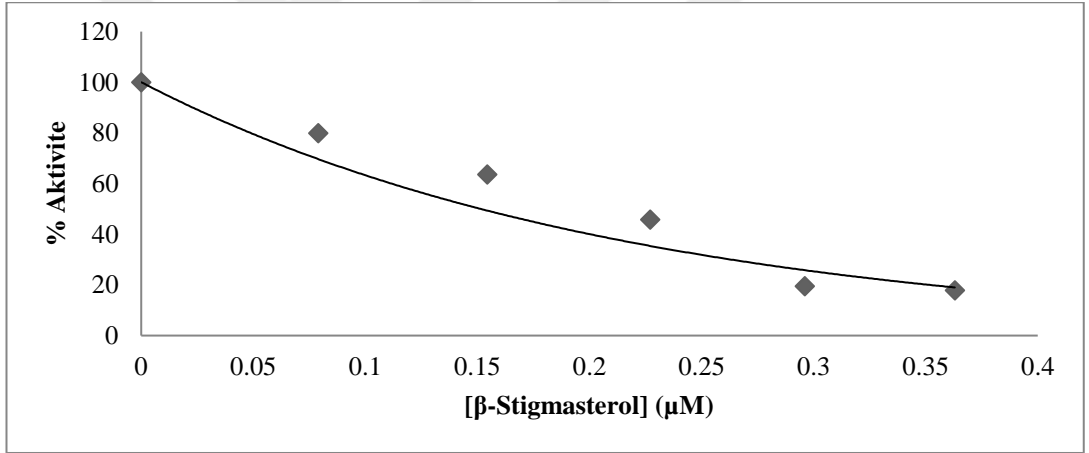
**Şekil 4.2.** hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile jervinin farklı konsantrasyonlarında IC<sub>50</sub> değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[Jervin] grafiği.



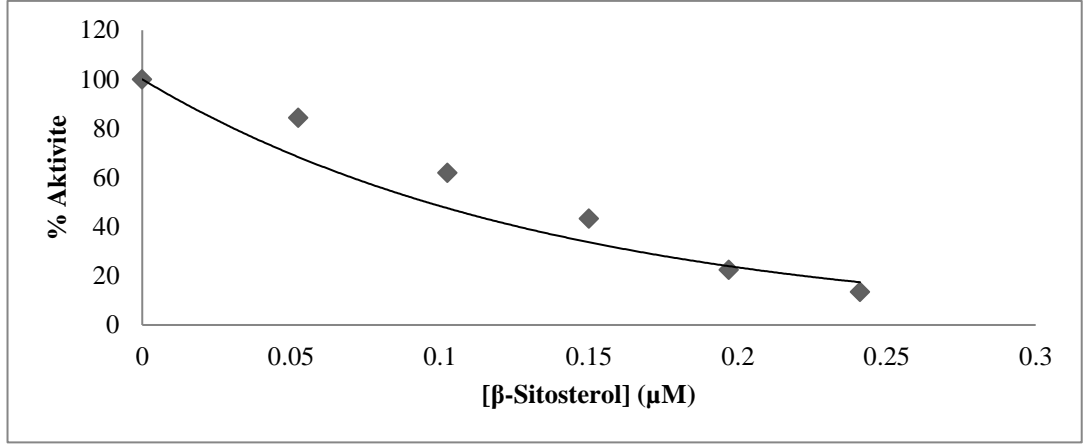
**Şekil 4.3.** hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile diosgeninin farklı konsantrasyonlarında IC<sub>50</sub> değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[Diosgenin] grafiği.



**Şekil 4.4.** hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile kolesterolün farklı konsantrasyonlarında IC<sub>50</sub> değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[Kolesterol] grafiği

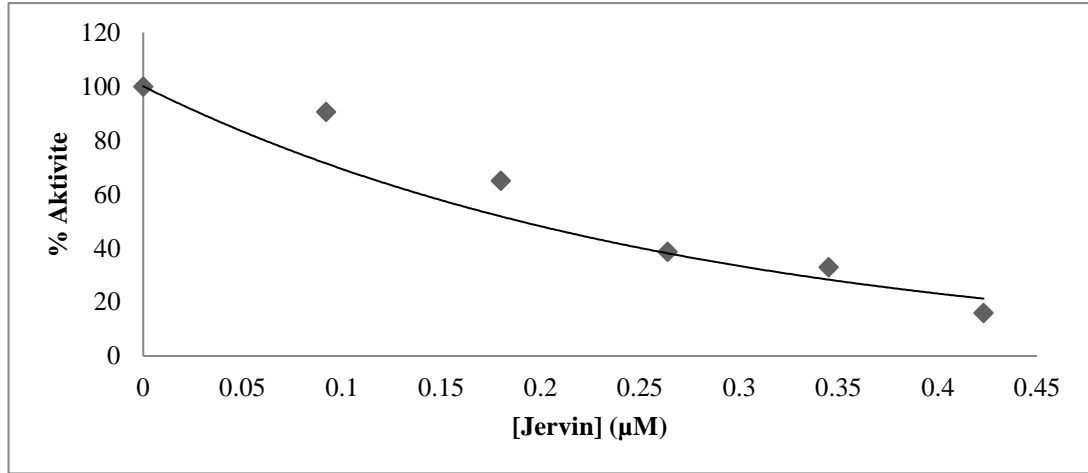


**Şekil 4.5.** hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile β-stigmasterolün farklı konsantrasyonlarında IC<sub>50</sub> değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[β-stigmasterol] grafiği.

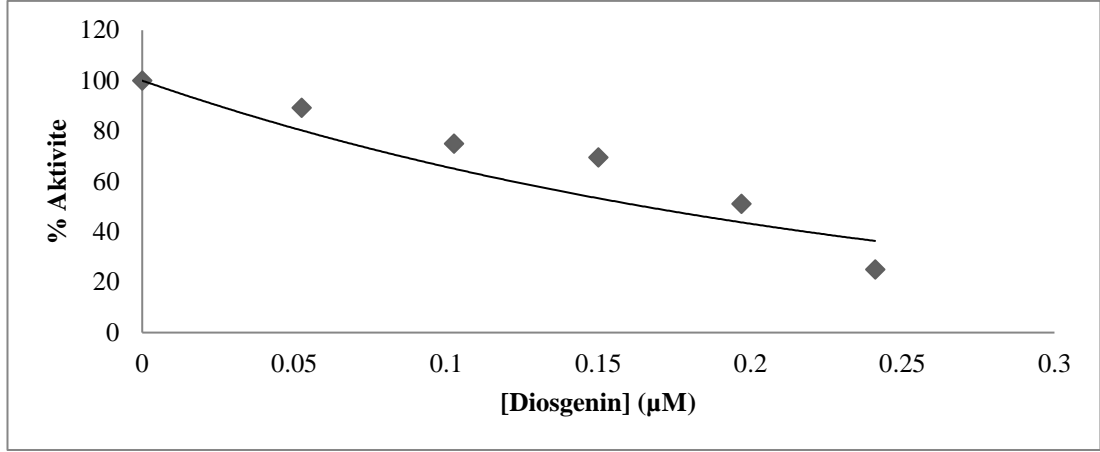


**Şekil 4.6.** hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile  $\beta$ -sitosterolün farklı konsantrasyonlarında  $IC_{50}$  değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[ $\beta$ -sitosterol] grafiği.

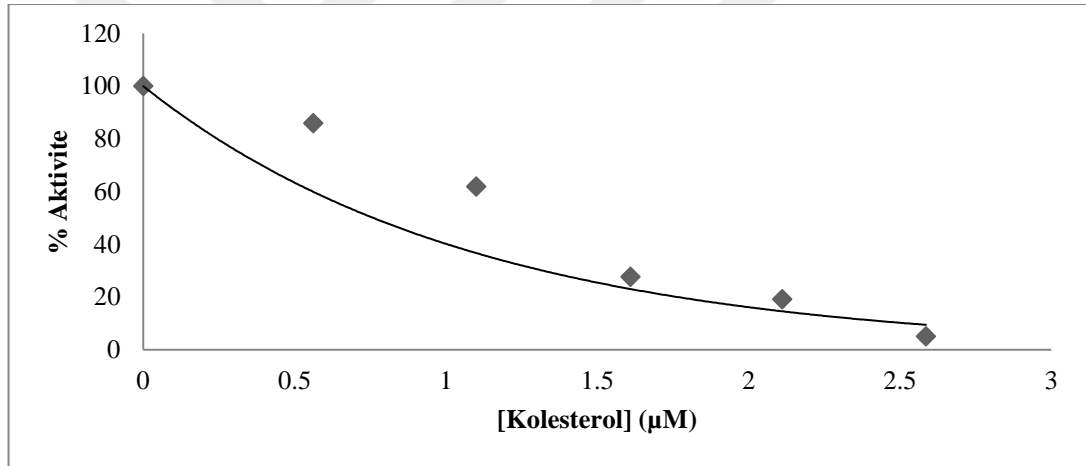
İnsan eritrositlerinden saflaştırılan hCA II izoenzimi için diosgenin, jervin, kolestrol,  $\beta$ -stigmasterol ve  $\beta$ -sitosterol bileşiklerinin etkisi araştırıldı. Ölçümler, esteraz aktivite tayin yöntemiyle yapıldı. İnhibisyon etkisi gösteren her bir madde için (%) aktivite-[I] grafikleri çizildi. Daha sonra bu grafiklerden yararlanılarak %50 enzim inhibisyonuna sebep olan doğal maddelerin konsantrasyonları ( $IC_{50}$  değerleri) hesaplandı.



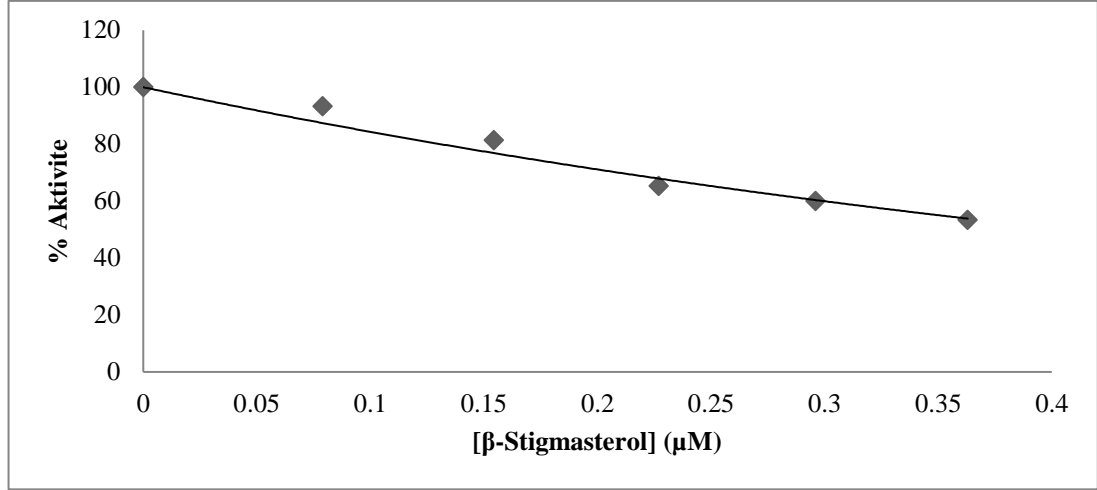
**Şekil 4.7.** hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile jervinin farklı konsantrasyonlarında  $IC_{50}$  değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[Jervin] grafiği.



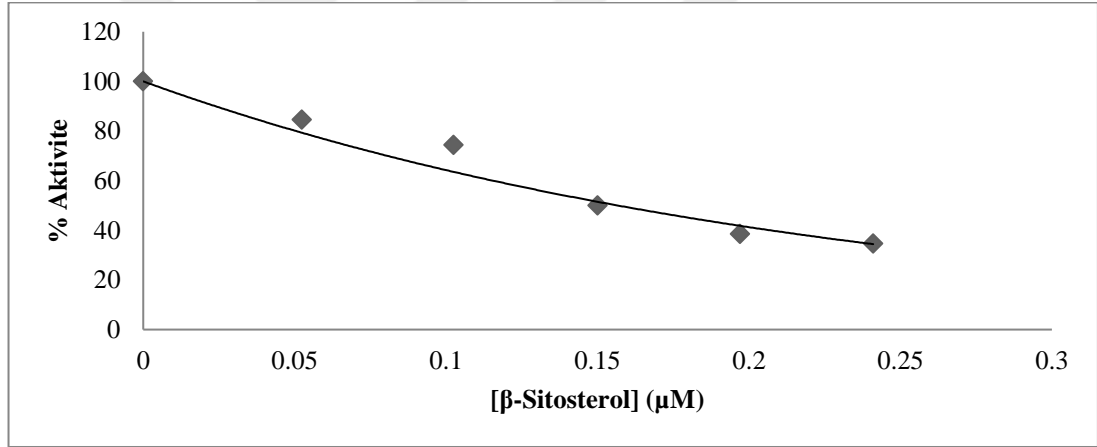
**Şekil 4.8.** hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile diosgeninin farklı konsantrasyonlarında IC<sub>50</sub> değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[Diosgenin] grafiği.



**Şekil 4.9.** hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile kolesterolün farklı konsantrasyonlarında IC<sub>50</sub> değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[Kolesterol] grafiği.



**Şekil 4.10.** hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile  $\beta$ -stigmasterolün farklı konsantrasyonlarında  $IC_{50}$  değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[ $\beta$ -stigmasterol] grafiği.



**Şekil 4.11.** hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile  $\beta$ -sitosterol farklı konsantrasyonlarında  $IC_{50}$  değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[ $\beta$ -sitosterol] grafiği.

### 4.3. hCA I ve hCA II İzoenzimlerinin Esteraz Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon Etkisi Gösteren Bazı Doğal Maddelerle İnhibisyon Türevlerinin Etkilerinin $IC_{50}$ Değerlerinin Belirlenmesi İle İlgili Sonuçlar

Çalışılan doğal bileşiklerine ait %Aktivite-[I] grafikleri çizildikten sonra bu grafiklerden faydalanılarak %50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonları

(IC<sub>50</sub> değerleri) hesaplandı. Elde edilen tüm verilerin daha iyi karşılaştırılabilmesi için bu değerler bir tablo halinde gösterildi (Çizelge 4.1).

**Çizelge 4.1.** hCA I ve hCA II izoenzimlerinin esteraz aktivitesi ile inhibisyon etkisi belirlenen doğal maddeler için IC<sub>50</sub> değerleri.

<b>İnhibitör</b>	<b>hCA I için IC<sub>50</sub> değerleri (µM)</b>	<b>hCA II için IC<sub>50</sub> değerleri (µM)</b>
Jervin	0,2069	0,1896
Diosgenin	0,1413	0,1652
Kolesterol	1,055	0,76
β-stigmasterol	0,1515	0,4063
β-sitosterol	0,0955	0,1566

#### **4.4. İnsan Eritrosit CA I-II Enzimlerinin Afinite Kromatografisi İle Saflaştırma Basamakları Sonuçları**

İnsan kanından elde edilen hemolizatın, Sefaroz-4B-L-tirozin sülfonilamid kolonuna uygulanması sonucu elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2’de verilmiştir.

**Çizelge 4.2.** İnsan eritrositlerinden hCA I-II izoenzimlerinin Sefaroz-4B-L-tirozin sülfonilamid afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırılması basamakları.

Saflaştırma basamakları	Toplam hacim (mL)	Protein (mg/mL)	Aktivite (EU/mL)	Toplam protein (mg)	Toplam aktivite (EU)	Spesifik aktivite (EU/mg)	Verim (%)	Saflaştırma katsayısı
Homogenat	10	14,92	102	149,2	1020	6,836	100	1
hCA I	5	0,21	142	1,05	710	676,2	69,60	98,92
hCA II	3	0,05	150	0,15	450	3000	44,12	438,85



## 5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Binlerce yıldır bitkiler insanlar tarafından çeşitli faydaları nedeniyle kullanılmıştır. Sadece tedavi için bir milyona yakın farklı bitki çeşidinden faydalandığı bildirilmiştir. Tüm dünyada son dönemde giderek artan bitkisel tedaviler ülkemizde de giderek artmaya başlamıştır. Bilinçsiz kullanım sağlık açısından tehlikeli olduğundan dolayı bitkilerin etki ve yan etkilerinin tespiti toplum sağlığı için önem teşkil etmektedir.

Tez kapsamında yapılan çalışmada bitki kaynaklı ekstraların ve kimyasal denemelerin karbonik anhidraz enzimleri üzerine inhibitör etkilerini inceledik. Elde ettiğimiz sonuçlar bitkilerden ürettiğimiz bileşenlerin konstrasyonlarının artmasıyla karbonik anhidraz üzerindeki inhibitör etkilerinin arttığını gösterdi.

Farmasötik bilimlerde de karbonik anhidraz araştırmaları osteoporozdan kansere geniş bir yelpazede birçok hastalığının tedavisi amacıyla kullanılmaktadır. Karbonik anhidraz inhibisyonundan faydalanılarak geliştirilen ilaçlar arasında antiobezite ilaçları, glokom ilaçları, antiinfekfif ilaçlar sayılabilir (Supuran 2003).

Teknoloji sayesinde yaşam süreleri uzamış ve yaşam kalitesinin artırılması için çeşitli arayışlara gidilmiştir. Bu çerçevede günümüzde eğilim kimyasal ürünlerden uzak durma ve doğal ürünlere yönelme şeklindedir (Carlsen *et al.* 2010).

Günümüzde ham madde olarak kozmetik, gıda ve ilaç sanayinde tıbbi ve aromatik bitkilerin önem kazanması ile birlikte bitkilere olan ilgi daha da artmasına neden olmuştur. Özellikle tıbbi ilaçlarda sentetik maddelerin oluşturduğu olumsuz sonuçlar ve yüksek maliyet doğal ürünlere olan ilgi ve ihtiyacın gün geçtikçe artmasına neden olmuştur.

Yirminci yüzyıldan itibaren tedavi edici etkisi belirlenen bitkilerin sentezledikleri etken maddelerin saflaştırılması kimyasal yapıların belirlenmesine yönelik çalışmalar başlamıştır. Bununla birlikte doğal ürün olarak saflaştırılan maddelerin sentetik üretimde önem kazanmıştır. Bitki izalasyonu ve sentetik ilaç üretiminin hız kazandığı bu dönemlerde saf etken maddeler endüstriyel ilaç olarak kullanılmıştır (Koçer *et al.* 2012). Günümüzde kimyasal maddelerden kaynaklanan olumsuz sonuçlar ve bu kimyasal maddelerin ortaya çıkardığı yeni hastalıklar bitkilerin ve bitkisel ilaçların kullanımını ön plana çıkarıp bitkisel kaynaklara ciddi bütçeler ayrılmasına neden olmuştur (Aggarwal *et al.* 2015).

Oldukça zengin bir floraya sahip olan ülkemizde yetiştirilen tıbbi ve aromatik bitkilerin bilinmeyen yeni ve ekonomik değeri yüksek farmakolojik aktivitelerin ortaya çıkarılması için bilimsel çalışmalar yapılmakta ve gün geçtikçe bu çalışmalar daha fazla teşvik edilmektedir.

Son zamanlarda doğal antioksidanlar yaralı etkilerinden dolayı aktif araştırma konusu olmuştur. Doğal antioksidanlar besin olarak alınabildikleri gibi gıda katkısı olarakta verilebilmektedir. Dünya kamoyunda doğal antioksidan kullanımının faydalı olduğu kanısı geliştiğinden tüketiciler arasında bu ürünlere rağbet giderek artmaktadır. Bu da ekonomik yönden getiri sağladığından doğal antioksidanlar üzerine araştırmalar giderek önem kazanmıştır.

Antioksidanlar organizma veya dokuları oksidatif strese karşı korurlar. Aynı zamanda gıdalarda da oksidasyona karşı korumayı yine antioksidanlar yaparlar. Bu durum antioksidanları fizyoloji, farmakoloji, beslenme ve gıda endüstrisinde önemli bir çalışma alanı haline getirmiştir (Magalhaes Santos *et al.* 2009). Gıda endüstrisinde antioksidanların oksidasyondan dolayı besinde meydana gelen bozunmaları önleyici etkileri vardır. Antioksidanlar oksidasyonu iki şekilde durudurabilir ya da geciktirebilir. Birincisi serbest radikalleri gidererek ki bu tür bileşikler primer antioksidanlar olarak tanımlanır. Primer antioksidanlar  $\alpha$ - tokoferoller gibi fenolik bileşiklerdir. Sekonder antioksidanlar ise metal iyonlarını bağlama, reaktif oksijen türlerini giderme, hidroperoksitleri radikal olmayan türlere dönüştürme, UV ışınlarını absorblama ve singlet oksijeni deaktive etme gibi reaksiyonları gerçekleştirirler (Gulcin *et al.* 2008).

Antioksidan bileşikler antioksidan aktivitelerini metal iyonlarını bağlama, peroksitleri parçalama ve radikal giderme gibi birçok farklı mekanizmalar ile ortaya koyabilirler (Gulcin 2002).

Antioksidan maddeler, yaşlanma süreci ve hastalıklarda rolü olduğu bilinen serbest radikallerin sağlık üzerindeki zararlı etkilerini; serbest radikallerin reaksiyonlarını durdurmak, oksijeni ve metalleri bağlayarak oksidasyonun sebep olduğu zararları engellemek, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) ve lipoprotein oksidasyonunu önlemek yoluyla azaltırlar. Bitkisel ürünlerin antioksidan etkileri özellikle flavonoidler başta olmak üzere sinamik asit türevleri, kumarinler gibi fenolik bileşiklerden kaynaklanmaktadır. Yapılan farklı çalışmalarda, fenolik

bileşiklerin; antidiyabetik, antialerjik, antiinflamatuvar, antipatojenik, antimikrobiyal, antiviral ve antitrombotik özellikleri ve kardiyovasküler hastalıklar, kanser, osteoporoz, diyabetes mellitus ve nörodejeneratif hastalıklarda koruyucu etkileri gösterilmiştir. 2000'li yılların başına kadar 8000 fazla fenolik bileşik tanımlanmıştır. Ve bu sayı her geçen gün artmaktadır. Bazı bitki fenolikleri son zamanlarda antioksidan olarak kabul edilmekte ve ticari olarak üretilmektedir.

Şifalı bitkiler ve bileşenleri, modern ilaç keşif programında yeni kimyasal varlıkların keşfedilmesi için ortak bir platform oluşturmaya devam etmektedir. Geleneksel tıp sisteminde çeşitli tıbbi bitkiler ve bunların formülasyonları hiperglisemi için kullanılır. Diosgenin bir anti hiperkolesterolemi ve antihiperglisemik ajan olarak geleneksel tıpta kullanılmıştır. Bazı raporlar, diosgeninin proliferasyonu inhibe ettiğini ve insan kolon, osteosarkom, lösemi, eritrolösemi, meme ve karaciğerin çok çeşitli tümör hücrelerinde apoptosisi indüklediğini göstermiştir. Diosgenin ayrıca karsinogenezde rol oynayan ve kanser kemoterapisi ve tedavisi için önemli hedefler olan siklooksijenaz-2 ve lipoksijenazı da ortadan kaldırır. Bu nedenle, diosgenin kanser kemoterapötik potansiyeline sahip olabilir ve bunun aktivitesi çoklu hücrel ve moleküler hedefleri içerir (Li *et al.* 2010). Prostat kanseri, erkeklerde en sık rastlanan tümörlerden biridir ve Amerika Birleşik Devletleri'nde kanser mortalitesinin ikinci önde gelen nedenidir. Diosgenin'in, hücre büyümesini inhibe etmek ve çeşitli kanser hücre dizilerinin apoptozunu indüklemesi gibi anti-kanserojenik potansiyellere sahip olduğu gösterilmiştir. Çemen otu tohumu yaygın Hint baharatlarında kullanılır (Srinivasan *et al.* 2009). Çemen (*Trigonella foenum Graecum*, *Leguminosae*) Hindistan, Mısır ve Orta Doğu ülkelerinde yaygın olarak yetiştirilen bir bitkidir. Tohumların özü, Ayurveda (Hint), Unani (Arapça) ve Çin tıbbi sistemlerinde diyabet tedavisi için de yararlı olduğu düşünülmektedir. Diosgenin, çemen otu (*Trigonella foenum graecum*) ve yabani yamunun (*Dioscorea villosa*) kökleri dahil olmak üzere çeşitli bitkilerde bulunan doğal olarak ortaya çıkan bir steroidal saponindir. Çemen otu tohumu gibi diosgenin açısından zengin gıda kaynakları, streptozotosin ile başlatılan diyabet sıçanlarında insulün benzeri bir antihiperglisemik etki sergiler ve ayrıca karaciğerdeki glikoz metabolizması seviyelerindeki değişiklikleri tersine çevirir (Marles and Farnsworth 1995; Flammang *et al.* 2004; Kang *et al.* 2011). Bu yüzden sentetik ve

farmakolojik çalışmalarda saf diosgenin oldukça değerli bir maddedir (Denance *et al.* 2006; Son *et al.* 2007; Wang *et al.* 2011).

$\beta$ -sitosterol yaklaşık olarak her bitki türünde bulunan yaygın bir steroidtir. Örneğin, fitosterollerin çeşitli gıda ürünlerinde uygulanan koroner kalp hastalıklarının riskini en aza indirgenmesine katkıda bulunduğu bilinmektedir. Özellikle stigmasterol, D3 vitamini, kortizon, androjenler, östrojenler ve progesteron için bir ön-madde olarak kullanıldığı farmasötik endüstrisinde yaygın olarak uygulanmaktadır. Bilinen endüstriyel kullanımlarının dışında, stigmasterol yakın zamanda birçok araştırma çalışmasında başarılı olarak kullanılmıştır. Bu durumun çeşitli kanser hastalıklarının, yani yumurtalık, prostat ve göğüs tiplerinin önlenmesinde yardımcı olabileceği gösterilmiştir (Woyengo *et al.* 2009; Panda *et al.* 2009).

$\beta$ -sitosterol söz konusu etkilere ek olarak, bitki sterollerinin antibakteriyel, antifungal, anti-ülseratif, anti-enflamatuar ve anti-oksidatif aktivitelere sahip olduğu gösterilmiştir (Maguire *et al.* 2007). Bu nedenle, fitosterollerin insan sağlığı üzerindeki etkileri, çeşitli hastalıkların tedavisinde ve önlenmesinde önemli rol oynarlar ve klinik seviyedeki veya model sistemlerdeki fitosterollerle ilgili çalışmalar, bu bileşiklerin bu farklı işlevinin arkasındaki moleküler mekanizmayı anlamak için çok önemlidir (Lagarda *et al.* 2006).

Bu çalışmada jervine, diosgenin, kolesterol,  $\beta$ -Stigmasterol ve  $\beta$ -sitosterol bitkilerinin ekstre ve biyolojik aktivite gösterebilecek saf maddelerin özellikle glokom hastalığının tedavisinde kullanılan ilaçların hedef enzimi olan CA I ve II izoenzimlerine karşı inhibisyon etkileri araştırılmıştır.

Bu çalışmada insan eritrositlerinden CA I ve II izoenzimleri afinite kromatografisi ile saflaştırarak jervine, diosgenin, kolesterol,  $\beta$ -stigmasterol ve  $\beta$ -sitosterol bitkilerinin etanol, diklormetan, n-hekzan ve metanol ekstreleri ile major metaboliti herniarinin bu enzimler üzerindeki inhibisyon etkileri incelenmiştir.

İnsan ve hayvanlarda birçok hastalığın tedavisinde kullanılan ilaçlar CA enzimlerini hedef alırlar. Asetazolamit, dorzolamit ve brinzolamit gibi sülfonamid ve brinzolamit gibi sülfonamid türevleri ilaçlar karbonik anhidraz izoenzimleri tarafından kuvvetli bir şekilde inhibe edilirler (Bülbül *et al.* 2002). İnsanlarda glukom hastalığının tedavisinde, ödem ve epilepsi tedavilerinde kullanılan ilaçlar CA

enzimlerini inhibe ederler. CA enzimi eritrosit içeren çoğu dokuda iyi karakterize edilmiş pH düzenleyici bir enzimdir. Karbon dioksitin bikarbonat ve protona dönüşümünü katalizlerler. Bu oldukça hızlı bir reaksiyondur. CA bu reaksiyonun hızlı ileri derecede artırarak saniyede  $10^4$ - $10^5$  reaksiyon hızına ulaştırır (Supuran 2008).

Karbonik anhidraz saflaştırması afinite kromatografisi yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. İşlem esnasında 280 nm de absorban ölçümü gerçekleştirilerek eluatların protein içeriği belirlenmiştir (Segel 1968).

Coomassie-Blue yöntemi kantitatif protein tayini amacıyla kullanılmıştır. Kısa sürede uygulanabilmesi az sayıda bozucu faktörden etkilenmesi ve boyanan proteinlerin çözeltilerde uzun süresince tespit edilebilmesi bu yöntemin diğer tayin yöntemlerine olan üstünlükleri arasındadır. Hassasiyet aralığı  $\mu\text{g}$  arasındadır (Bradford 1976).

Çalışmada enzim aktivite tayinini gerçekleştirmek için iki yöntem kullanıldı. Birincisi; Maren ve arkadaşlarının modifiye ettikleri Wilbur-Anderson yöntemi olarak bilinen  $\text{CO}_2$  hidrataz aktivitesidir (1960). Bu yöntemle  $\text{CO}_2$ 'nin  $\text{H}_2\text{O}$  ile reaksiyona girmesi sonucu meydana gelen  $\text{H}_2\text{CO}_3^-$  iyonlarına ayrılarak ortamın pH'sını değiştirme süresinin ölçülmesine dayanmaktadır. Bu yöntem saflaştırma işlemlerinde elüatlardaki aktivitenin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Esteraz aktivitesi yöntemi kullandığımız bir başka yöntem olmuştur. Karbonik anhidrazın ester bağlarının parçalanması üzerine inşa edilmiş olup bu yöntem Armstrong ve arkadaşları tarafından bulunmuştur (1966).

Son yıllarda artan şekilde doğal fenolik ya da hidroksilli moleküllerin CA izoenzimleri ya da diğer önemli enzimler üzerindeki etkileri incelenmektedir. Birçok doğal fenolik maddenin insan karbonik anhidraz izoenzimleri üzerinde sonderece etili oldukarı yapılan çalışmalarda görülmektedir (Senturk *et al.* 2011; Ekinci *et al.* 2013; Guney *et al.* 2015; Turkoglu *et al.* 2017).

Çelik'in 2017 yılında yaptığı tez çalışmasında kuersetin, katekin, morin ve rutin doğal fenolik maddelerinin sığır böbrek CA enzimi üzerinde yaptıkları incelemede 0,074-0,117  $\mu\text{M}$  arasındaki değerlerde inhibisyon gösterdiği tespit edilmiştir (Çelik 2017).

Literatürde önemli farmakolojik aktiviteleri rapor edilen ve günlük hayatımızda hastalıkların tedavisinde kullanılan jervine, diosgenin, kolestrol,  $\beta$ -stigmasterol ve  $\beta$ -sitosterol maddelerine olan ilgilinin bu çalışma ile daha da artacağı ümit edilmektedir. Ülkemizde jervine, diosgenin, kolestrol,  $\beta$ -stigmasterol ve  $\beta$ -sitosterol tedavi edici ve faydalı yeni bir özelliğinin ortaya çıkarıldığı bu çalışmanın, bitkilerin tüketimine teşvik edeceği gibi ekonomik değerlerinin artıracığı tahmin edilmektedir.

Sonuç olarak bu tez kapsamında;

- İnsan kanından Karbonik anhidrazın I ve II izoenzimlerinin saflaştırılması gerçekleştirilmiştir.
- Çalışma sonucunda CA I enzimi % 69,6 verimle yaklaşık 98,92 kat saflaştırılabilmektedir. Enzimin saflığı elektroforezle kontrol edilerek tek bant gözlenmiştir.
- CA II enzimi % 44,12 verimle yaklaşık 438,85 kat saflaştırılabilmektedir. Enzimin saflığı elektroforezle kontrol edilerek tek bant gözlenmiştir.
- CA I ve II izoenzimleri üzerine bazı doğal maddelerinin inhibisyon etkileri incelenmiştir. Bu amaçla jervine, diosgenin, kolestrol,  $\beta$ -stigmasterol ve  $\beta$ -sitosterol enzim üzerine inhibisyon etkileri incelenmiştir.

## KAYNAKLAR

- Aggarwal, M., Kondeti, B. and Mc Kenna, R., 2013. Insights towards sulfonamide drug specificity in  $\alpha$ -carbonic anhydrases, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21(6):1526-33.
- Aggarwal, S., Shalindra, G., M. Ribnicky, D., Burk, D., Karki, N., M.S. Wang, Q., 2015. An extract of *Artemisia dracunculus L.* Stimulates insulin secretion from  $\beta$  cells, activates AMPK and suppresses inflammation. *Journal of Ethnopharmacology*, 170, 98-105.
- Ahmed, S., James, K., Owen, C P., Patel, C.K. and Patel, M., 2001. Acid dissociation constant: A potential physicochemical factor in the inhibition of the enzyme estrone sulfatase (ES). *Bioorg Med Chem Lett*, 11, 899-902.
- Albayrak, S., Aksoy, A., Sagdic, O. ve Hamzaoglu E., 2009. Compositions, antioxidant and antimicrobial activities of *Helichrysum* (Asteraceae) species collected from Turkey, 119, 114-120. *Türkiye*
- Alterio, V., Di Fiore, A., D'Ambrosio, K., Supuran, C.T. and De Simone, G., 2012. Multiple binding modes of inhibitors to carbonic anhydrases: how to design specific drugs targeting 15 different isoforms? *Chemical Reviews*. 112(8):4421-68.
- Altıntop, M.D., Sever, B., Ozdemir, A., Kucukoğlu, K., Onem, H., Nadaroglu, H. and Kaplancıklı, Z.A., 2017. "Potential inhibitors of human carbonic anhydrase isozymes I and II: Design, synthesis and docking studies of new 1,3,4-thiadiazole derivatives." *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25(13), 3547-3554.
- Arabacı, B., Gulcin., I. and Alwasel, S., 2014. Capsaicin: a potent inhibitor of carbonic anhydrase isoenzymes *Molecules* 19, 10103–10114.
- Arslan, O., 1994. "Glaucoma Tedavisinde Kullanılmaya Aday Karbonik Anhidraz İnhibitörlerinin Sentezi ve İnhibisyon Etkilerinin Araştırılması", Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Erzurum.
- Arslan, O., 2001. "Inhibition of Bovine Carbonic Anhydrase by New Sulfonamide Compounds", *Turk J. Med. Sci.*, 66 (9), 982.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L. and Stryer, L., 2006. *Biochemistry*, International Edition, WH Freeman & Co. New York.
- Beydemir, S., Ciftci, M., Ozmen, I., Buyukokuroglu, M.E., Ozdemir, H. and Kufrevioglu, O.I., 2000. Effects of some medical drugs on enzyme activities of carbonic anhydrase from human erythrocytes in vitro and from rat erythrocytes in vivo. *Pharmacol. Res*, 42, 187-191.
- Beydemir, Ş., and Gulcin, İ., 2004. "Effect of melatonin on carbonic anhydrases from human erythrocyte in vitro and from rat erythrocyte in vivo." *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 19, 193-197.
- Bone, Q., Marshall, N.B. and Blaxter, J.H.S., 1995. In *Sensory systems and communication In: Biology of Fishes* Chapman. Ed. New York. 219–261.
- Bradfield, J.R., 1947. Plant carbonic anhydrase, *Nature*, 159 (4040):467.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.

- Bundy, H.F., 1977. Carbonic-Anhydrase. *Comparative Biochemistry And Physiology B-Biochemistry and Molecular Biology*, 57, 1-7.
- Burak, M. ve Çimen, Y., 1999. Flavonoids and their antioxidant properties. *T. Klin. J. Med. Sci.*, 19, 296-304.
- Bursal, E., 2009. Kivi meyvesinin (*Actinidia deliciosa*) antioksidan ve antiradikal aktivitelerinin belirlenmesi, karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Erzurum.
- Bülbül, M., Saracoglu, N., Kufrevioglu, O.I. and Ciftci M., 2002. Bile acid derivatives of 5-amino-1.3, 4-thiadiazole-2-sulfonamide as new carbonic anhydrase inhibitors: Synthesis and investigation of inhibition effects. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 10: 2561.
- Carey, M.C., Duane, W.C., 1994. Enterohepatic Circulation. In: Arias, I.M., Boyer, J.L., Fausto, N., Jakoby, W.B., Schachter, D., And Shafritz, D.A., (Eds). *The Liver: Biology And Pathobiology*, New York: Raven Press; 719-76,
- Carradori, S., Mollica, A., Ceruso, M., D'Ascenzio, M., De Monte, C., Chimenti, P., Sabia, R., Akdemir, A. and Supuran C.T., 2015. New amide derivatives of Probenecid as selective inhibitors of carbonic anhydrase IX and XII: biological evaluation and molecular modelling studies. *Bioorg Med Chem*, 23: 2975-2981.
- Carlsen, M.H., Halvorsen, B.L., Holte, K., Bohn, S.K., Dragland, S., Sampson, L., Willey, C., Senoo, H., Umezono, Y., Sanada, C., Barikmo, I., Berhe, N., Willet, W.C., Phillips, K.M., Jacobs, D.R., Blomhoff, R., 2010, The Total Antioxidant Content Of More Than 3100 Foods, Beverages, Spices, Herbs And Supplements Used Worldwide, *Nutrition Journal*, 9, 1-11.
- Chegwidden, W.R., Edwards, Y. and Carter, N., 2000. The Carbonic Anhydrases- New Horizons., *Molecular Bases of Inherited Disease* (Scriver, C.R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., and Valle, D.) 8th Ed, McGraw-Hill, Inc., New York, 2165-2204.
- Chen, J.K., Taipale, J., Cooper, M.K. and Beachy, P.A., 2002. Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothed. *Genes and Development*, 16(21), 2743-2748.
- Chen, Y., Tang, Y.M., Yu, S.L., Han, Y.W., Kou, J.P., and Liu, B.L., 2015. Diosgenin farmakolojik aktivitelerinde ve mekanizmalarındaki gelişmeler. *Chin J Nat Med*. 13: 578-587.
- Chiang, C.T., Way, T.D., Tsai, S.J. and Lin, J.K. 2007. Diosgenin, a naturally occurring steroid, suppresses fatty acid synthase expression in HER2-overexpressing breast cancer cells through modulating Akt, mTOR and JNK phosphorylation. *FEBS Letters*, 581(30), 5735-5742.
- Cohen, D.E, Angelico, M. And Carey, M.C., 1989. Quasielastic Light Scattering Evidence For Vesicular Secretion Of Biliary Lipids. *Am. J. Physiol*. 257: G1-G8.
- Conant, Richard T., 2012. "A litter-slurry technique elucidates the key role of enzyme production and microbial dynamics in temperature sensitivity of organic matter decomposition." *Soil Biology and Biochemistry* 47: 18. *Academic OneFile*. Web. 13 Apr. 2012.



- Çelik, H., 2017. Sığır Böbrek Karbonik Anhidraz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu Ve Bazı Doğal Moleküllerle İnhibisyonunun Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı.
- Deepak, M., Dipankar, G., Prashanth, D., Asha, M.K., Amit, A. and Venkataraman, B.V., 2002. Tribulosin and  $\beta$ -sitosterol-D-glucoside, the anthelmintic principles of *Tribulus terrestris*. *Phytomedicine*, 9, 753-756.
- Denance, M., Guyot, M. and Samadi, M., 2006. Short synthesis of 16  $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$  cholestane-3,6-dione a novel cytotoxic marine oxysterol. *Steroids*, 71(7), 599-602.
- De Simone, G. and Supuran, C.T., 2012. "(In)organic anions as carbonic anhydrase inhibitors." *Journal of Inorganic Biochemistry*, 111, 117-129.
- De Simone G., Pizika G., Monti S.M., Di Fiore A., Ivanova J., Vozny I., Trapencieris P., Zalubovskis R., Supuran, C.T. and Alterio V., 2014. Hydrophobic substituents of the phenylmethylsulfamide moiety can be used for the development of new selective carbonic anhydrase inhibitors. *Biomed Res Int*, 2014: 523210.
- De Souza, RFV., and De Giovanni, W.F., 2005. Synthesis, spectra and electrochemical properties of Al(III) and Zn(II) complexes with flavonoids. *Spectrochimica Acta Part A*, 61, 1985-1990.
- Donald, P.R., Lamprecht, J.H., Freestone, M., Albrecht, C.F., Bouic, P.J.D., Kotze, D. and van Jaarsveld P.P., 1997. A randomised placebo-controlled trial of the efficacy of beta-sitosterol and its glucoside as adjuvants in the treatment of pulmonary tuberculosis. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 1(6), 518-522.
- Ekinci, D., Beydemir, S. and Alim, Z., 2007. Some drugs inhibit in vitro hydratase and esterase activities of human carbonic anhydrase-I and II. *Pharmacologica Report*, 59, 580-587.
- Ekinci, D., Karagoz, L., Ekinci, D., Senturk, M., Supuran, C.T., 2013. Carbonic anhydrase inhibitors: in vitro inhibition of  $\alpha$  isoforms (hCA I, hCA II, bCA III, hCA IV) by flavonoid. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 28 (2) 283-288.
- Engberg, P., 1985, Purification And Some Properties Of Carbonic Anhydrase From Bovine Skeletal Muscle, *Archives Of Biochemistry And Biophysics*, 241, 628-638.
- Engelking, L.R., 2015. "Chapter 5-properties of enzymes." *Textbook of Veterinary Physiological Chemistry (Third Edition)*, 26-31.
- Epstein, D.L. and Grant, W.M., 1977. Carbonic Anhydrase Inhibitors Side Effects; Serum Chemical Analysis, *Arc.Ophthalmol*, 85:1387.
- Ergen, A., 2015. "Enzimler Biyokimya." *Ulukaya, E. Nobel Tıp Kitabevleri, Bursa*, 53-68.
- Flammang A.M., Cifone M.A., and Erexson G.L., 2004. Genotoxicity testing of a fenugreek extract. *Food Chem Toxicol*; 42: 1769-75.
- Forgacs, E. ve Cserhati, T., 2002. Thin-layer chromatography of natural pigments: new advances. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol*, 25(10&11), 1521-1541.
- Filly, A., Fernandez, X., Minuti, M., Visinoni, F., Cravotto, G., Chemat F., 2014. Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: From laboratory to pilot and industrial scale, 150, 193-198. France

- Gylling, H. and Miettinen, T.A., 2000. Plant sterols in nutrition. *Scand J Nutr* 44, 155-157.
- Gocer, H., Cetinkaya, Y., Goksu, S., Gulcin, I. and Supuran, C.T., 2014. Carbonic anhydrase and acetylcholine esterase inhibitory effects of carbamates and sulfamoyl carbamates. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*
- Gocer, H., Topal, F., Topal, M., Küçük, M., Teke, D., Gulcin, I. Alwasel, S H. and Supuran, C.T., 2016. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 31, 441–447.
- Gong, W., Ran, Z., Ye, F. and Zhao, G., 2017. “Lignin from bamboo shoot shells as an activator and novel immobilizing support for  $\alpha$ -amylase.” *Food Chemistry*, 228, 455-462.
- Gokce, B., 2009, Tiyadiazol Türevleri Bileşikleri Karbonik Anhidraz İnhibitörü Olarak Karbonik Anhidraz Enzimi Üzerinde İnhibisyon Etkilerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı.
- Goksu, S., Naderi, A., Akbaba, Y., Kalın, P., Akıncıoğlu, A., Gulcin, I., Durdagi, S. ve Salmas, R E., 2014. *Bioorg. Chem*, 56, 75.
- Gould, A.L, Rossow, J.E, Santanello, N.C., Heyse, J.F., and Furberg, C.D., 1995. Cholesterol reduction yields clinical benefit. A new look at old data. *Circulation* 91, 2274-2282.
- Growdon, W.B., Curley, M., Friel, A., Ferguson, J., Mandley, E., Foster, R., MacDougal, J. and Rueda, B., 2009. Hedgehog pathway inhibitor cyclopamine suppresses GLI1 expression and inhibits seruos ovarian cancer xenograft.
- Gomez-Verjan, J.C., Estrella-Parra, E.A., Gonzalez-Sanchez, I., Arivero-Segura, N., Vazquez-Martinez, R., Magos-Guerrero, G., Mendoza-Villanuev, D., Cerbon-Cervantes, M.A., and Reyes-Chilpa, R., 2015. Toxicogenomic analysis of pharmacological active coumarins isolated from *Calophyllum brasiliense*. *Genomics Data*, 6, 258-259.
- Gulcin, I., 2002. Determination of antioxidant activity, characterization of oxidative enzymes and investigation of some in vivo properties of nettle (*Urtica dioica*). PhD, Ataturk University.
- Gulcin, I., Oktay, M., Koksall, E., Serbetci, H., Beydemir, S. and Kufrevioglu, O.I., 2008. "Antioxidant and radical scavenging activities of uric acid." *Asian Journal of Chemistry* 20(3): 2079-2090.
- Gulcin, I., Scozzafava, A., Supuran, C.T., Koksall, Z., Turkan, F., Cetinkaya, S., Bingol, Z., Huyut, Z. and Alwasel S.H., 2016. Rosmarinic acid inhibits some metabolic enzymes including glutathione S-transferase, lactoperoxidase, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and carbonic anhydrase isoenzymes. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem*, In Press. DOI: 10.3109/14756366.2015.
- Guler, O.O., Capasso, C. and Supuran, C.T., 2016. “A magnificent enzyme superfamily: carbonic anhydrases, their purification and characterization.” *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(5), 689-694.
- Guney, M., Cavdar, H., Senturk, M., Ekinçi, D., 2015. Synthesis and carbonic anhydrase inhibitory properties of novel uracil derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 25 (16) 3261-3263.
- Gül H.I., Kucukoglu, K., Yamali, C., Bilginer, S., Yuca, H., Ozturk, I., Taslimi, P., Gulcin, I., and Supuran, C.T., 2016. Synthesis of 4-(2-substituted hydraziny)

- benzenesulfonamides and their carbonic anhydrase inhibitory effects. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 31: 568-573.
- Gül, H.I., Mete, E., Eren, S.E., Sakagami, H., Yamali, C. and Supuran, C.T., 2017. Designing, synthesis and bioactivities of 4-[3-(4-hydroxyphenyl)-5-aryl-4,5-dihydropyrazol-1-yl]benzenesulfonamides, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 32 (1) 169–175.
- Haertle', T., 2016. "Enzymes: Analysis and food processing. Encyclopedia of food and healthy." Caballero, B., Finglas, P M. and Toldra, F. Elsevier, Amsterdam, 2, 524-538.
- Hajji, H E., Nkhili, E., Tomao, V. ve Dangles, O., 2006. Interactions of quercetin with iron and copper ions: complexation and autoxidation. *Free Radical Research*, 40(3), March, 303-320.
- Halling, K.K., Slotte, J.P., 2004. Membrane properties of plant sterols in phospholipid bilayers as determined by differential scanning calorimetry, resonance energy transfer and detergent-induced solubilization, *Biochim. Biophys. Acta* 1664, 161e171.
- Hazen, S.A., Waheed, A., Sly, W.S., Lanoue, K.F. and Lynch, C.J., 1996, Differentiation-Dependent Of Ca And The Role Of Carbonic Anhydrase Isozymes In Pyruvate Carboxylation In Adipocytes, *Faseb Journal*, 10, 481-490.
- Heretsch, P., Tzagkaroulaki, L. and Giannis, A., 2010. Cycloamine and Hedgehog Signaling: Chemistry, Biology, Medical Perspectives. *Angewandte Chemie International Edition*, 49(20), 3418-3427.
- Hisar, O., Beydemir, S., Gulcin, I., Küfrevioğlu, O.I. and Supuran, C.T., 2005. Effects of low molecular weight plasma inhibitors of rainbow trout on human erythrocyte carbonic anhydrase-II isozyme activity in vitro and rat erythrocytes in vivo. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 20 (1) 35–39.
- Hollò, G. 2015., "54-Carbonic anhydrase inhibitors." *Glaucoma (Second Edition)*, 1, 559-565.
- Hua S, Li Y, Su L, Liu X., 2016. Diosgenin, sterol düzenleyici element bağlayıcı protein-1'in inhibisyonu yoluyla gestasyonel diyabeti iyileştirir. *Biyomed Farmakolojik*. 84: 1460-1465.
- Huh J.E., Nam D.W., Baek Y-H., Kang J.W., Park D-S., Choi D.Y. and Lee J.D., 2011. Formononetin accelerates wound repair by the regulation of early growth response factor-1 transcription factor through the phosphorylation of the ERK and p38 MAPK pathways. *International Immunopharmacology*; volume 11: 46-54.
- Hunaiti, A.A. and Soud, M., 2000. Effect of lead concentration on the level of glutathione, glutathione S-transferase, reductase and peroksidase in human blood. *Science Total Environ.*, 248, 45-50.
- Huyut, Z., Beydemir, S., ve Gulcin, I., 2016. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 31, 1234-1240.
- Ikonen, E., 2008. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 125–138.
- Indrayanto, G., Zumaroh, S., Syahrani, A. and Wilkins, A.L., 2001. C-27 and C-3 glucosylation of diosgenin by cell suspension cultures of *Costus speciosus*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 3(2), 161-168.

- Innocenti, A., Vullo, D., Scozzafava, A. and Supuran, C.T., 2008. Carbonic anhydrase inhibitors: Inhibition of mammalian isoforms I-XIV with a series of substituted phenols including paracetamol and salicylic acid. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 16, 7424-7428.
- Innocenti, A., Sarıkaya, S.B.Ö., Gulcin, I. and Supuran, C.T., 2010. "Carbonic anhydrase inhibitors, Inhibition of mammalian isoforms I-XIV with a series of natural product polyphenols and phenolic acids." *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18(6), 2159-2164.
- İnan, Y. and Gül, M., 2001, *Biyokimya*, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. 447 s.
- İsa M, Martins A.P, Gallardo E, Silvestre S., 2016. Diosgenin: farmakoloji ve analitik metodoloji üzerine son gelişmeler. *J Anal Yöntemler Chem*. 2016: 415, 62, 93.
- Jimeno, A., Feldmann, G., Suarez-Gauthier, A., Rasheed, Z., Solomon, A., Zou, G M., Rubio-Viqueira B., Garcia-Garcia, E., Lopez-Rios, F., Matsui, W., Maitra, A. and Hidalgo, M., 2009. A direct pancreatic cancer xenograft model as a platform for cancer stem cell therapeutic development. *Molecular Cancer Therapeutics*, 8(2), 310-314.
- Ju, Y.H., Clausen, L M., Allred, K.F., Almada, A.L. and Helferich, W.G., 2004.  $\beta$ -sitosterol,  $\beta$ -sitosterol glucoside, and a mixture of  $\beta$ -sitosterol and  $\beta$ -sitosterol glucoside modulate the growth of estrogen-responsive breast cancer cells in vitro and in ovariectomized athymic mice. *Journal of Nutrition*, 134(5), 1145-1151.
- Kamboj, A. and Saluja, A.K., 2011. Isolation of stigmasterol and  $\beta$ -sitosterol from petroleum ether extract of aerial parts of *Ageratum conyzoides* (asteraceae). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(1), 94-96.
- Kang, TH, Moon E, and Hong B.N., 2011. Diosgenin from *Dioscorea nipponica* ameliorates diabetic neuropathy by inducing nerve growth factor. *Biol Pharm Bull*;34: 1493-8.
- Kaplan, S.T., 2014. "İnsan Kanından Safılaştırılan Karbonik Anhidraz I İzoenzimi Üzerinde Bazı İlaçların Etkilerinin In Vitro Olarak İncelenmesi" Yüksek lisans Tezi, Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzincan, 26-28.
- Karadag, R. and Böhmer, H., 2001. "Dye analyses using derivatized UV-Visible spectrophotometry and fibre-safe extraction with EDTA." *Dyes in History and Archaeology*.16: 106-118.
- Kavita, K., Singha, V.K., Jha, B., 2014. 24-Branched D5 sterols from *Laurencia papillosa* red seaweed with antibacterial activity against human pathogenic bacteria, *Microbiol. Res*. 169, 301-306.
- Keeler, R.F. and Binns, W., 1966. Teratogenic compounds of *Veratrum californicum* (Durand). I. Preparation and characterization of fractions and alkaloids for biologic testing. *Canadian Journal of Biochemistry*, 44(6), 819-828.
- Keha, E.E. ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 2004, *Biyokimya*, Aktif Yayınevi, 642 s.
- Keha, E.E. ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 2009, *Biyokimya*, Aktif Yayınevi, Erzurum, 637-645.
- Keha, E.E. ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 2015. "Biyokimya, Muhtelif kısımlar." Şafak Yayınevi. Erzurum.
- Keller, M.A., Piedrafita, G. and Ralser, M., 2015. "The widespread role of non-enzymatic reactions in cellular metabolism." *Current Opinion in Biotechnology*, 34, 153-161.

- Kikutani, S., Nakajima, K., Nagasato, C., Tsuji, Y., Miyatake, A. and Matsuda, Y., 2016. Proc Natl Acad Sci USA. 113:9828–9833.
- Kim, Y.J., Bin Park, S., Park, J.Y., Park, S.W., Chung, J.B., Song, S.Y. and Bang, S., 2012. The sonic hedgehog pathway as a treatment target for extrahepatic biliary tract cancer. *Molecular Medicine Reports*, 5(1), 12-16.
- Kocer, A., Tauk L. and Déjardin, P., 2012. Nanopore sensors: from hybrid to abiotic systems. *Biosens. Bioelectron.* 38, 1–10.
- Kohara, Y., Kawaguchi, S., Kuwahara, R., Uchida, Y. and Oku, Y., 2015. Yamashita K., Genistein improves spatial learning and memory in male rats with elevated glucose level during memory consolidation. *Physiology & Behavior* Volume 140, 15-22.
- Kohn, J. and Wilchek, M., 1978. “A colormetric method for monitoring activation of sepharose by cyanogen bromide.” *Biochemical Biophysical Research Communications*, 84(1), 7-14.
- Kostova., 2006. Senteticand Natural Coumarins as Antioxidants, *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 6, 365-374.
- Kris-Etherton, P.M., Yu-Poth, S., Sabate, J., Ratcliffe, H.E, Zhao, G. and Etherton, T.D., 1999. Nuts and their bioactive constituents: effects on serum lipids and other factors that affect disease risk. *Am J Clin Nutr* 70, 1009-1015.
- Kumar, J.K. ve Sinha, A.K., 2004. Resurgence of natural colourants: A holistic view. *Natural Product Letters*, 18 (1), 59-84.
- Kurbanoglu, S., Özkan, S.A. and Merkoçi, A., 2017. “Nanomaterials-based enzyme electrochemical biosensors operating through inhibition for biosensing applications.” *Biosensors and Bioelectronics*, 89, 886-898.
- Kuzucu, M., 2011. Karbonik anhidraz I ve II izoenzimleri üzerine bazı ilaçların in vitro etkilerinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Erzincan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzincan.
- Lagarda, M.J., García-Llatas, G. and Farre, R., 2006. Analysis of phytosterols in foods, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41, 1486-1496.
- Lakkis, MM., Bergenhem, NCH. and Tashian, R.E., 1996, Expression Of Carbonic Anhydrase Of Mouse VII İn E.Coli And Demonstration Of İts CO<sub>2</sub> Hydrase Activity, *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 226, 268-272.
- Lakshmi, A. and Subramanian, S.P., 2014. Tangeretin ameliorates oxidative stress in the renal tissues of rats with experimental breast cancer induced by 7,12-dimet hylbenz[a] anthracene. *Toxicology Letters* 229, 333-348.
- Landolfi, C., Marchetti, M., Ciocci, G. and Milanese, C., 1998, Development and pharmacological characterization of a modified procedure for the measurement of carbonic anhydrase activity *J. Pharm. And. Toxicol. Meth.*, 38, 169-172p.
- Lee, J., Wu, X., di Magliano, M.P., Peters, E.C., Wang, Y., Hong, J., Hebrok, M., Din, S., Cho, C.Y. and Schultz, P.G., 2007. A small-molecule antagonist of the hedgehog signaling pathway. *Chembiochem*, 8(16), 1916-1919.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L. and Cox, M.M., 2005. *Principles of Biochemistry* 3. Baskıdan çeviri (Çeviri editörü: Kılıç N.), Palme Yayıncılık.
- Li F, Fernandez P.P, Rajendran P, Hui K.M, *et al* Sethi, G., 2010. Diosgenin, a steroidal saponin, inhibits STAT3 signaling pathway leading to suppression

- of proliferation and chemosensitization of human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett* 292: 197–207.
- Lynch, C.J., Brennen, W.A., Vary, T.C., Carter, N. and Dodgson, S.J., 1993, Carbonic Anhydrase III in obese Zucker rats, *American Journal of Physiology*, 264:E621-E630.
- Magalhaes, L.M., Santos, M., Segundo, M.A., Reis, S. and Lima, J.L.F.C., 2009. "Flow injection based methods for fast screening of antioxidant capacity." *Talanta* 77(5): 1559-1566.
- Maggi, F., Barboni, L., Caprioli, G., Ricciutelli, M., Sagratini, G. ve Vittori, S., 2011. HPLC quantification of coumarin in bastard balm (*Melittis melissophyllum* L. Lamiaceae), *Fitoterapia*, 82, 8, 1215-1221.
- Maguire, L.S., O'Sullivan, S.M., Galvin, K., O'Connor, T.P. and O'Brien, N.M., 2004. Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of walnuts, almonds, peanuts, hazelnuts and the macadamia nut, *Int. J. Food Sci. Nutr.* 55, 171-178.
- Mann, T. and Keilin, D., 1940. Sulphanilamide as a Specific Inhibitor of Carbonic Anhydrase, *Nature*, 146, 164-165.
- Maren, C.H., 1960. Simplified Micromethod for the Determination of Carbonic Anhydrase and its Inhibitors, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 130:26.
- Maridass, M. and Ramesh, U., 2010. Investigation of phytochemical constituents from *Eulophia epidendrea*. *International Journal of Biological Technology*, 1(1), 1-7.
- Marles, R.J. and Farnsworth, N.R., 1995. Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine*; 2:137-89.
- Maślanka, T., 2015. "A review of the pharmacology of carbonic anhydrase inhibitors for the treatment of glaucoma in dogs and cats." *The Veterinary Journal*, 203(3), 278-284.
- Matos, M., Santana, L., Riarte, E., Abreu, O., Molina, E. and Yordi, E.G., 2015. Coumarins-An Important Class of Phytochemicals Chapter. *Phytochemicals-Isolation, Characterisation and Role in Human Health, Agricultural and Biological Sciences*.
- Matsuda, S., Minami, A., Ono, Y. and Kitagishi, Y., 2015. Chapter 93-Neuroprotection of Genistein in Alzheimer's disease. *Diet and nutrition in dementia and cognitive decline*, 1003-1010.
- Maxfield, F.R. and Van Meer, G., 2010. Cholesterol, the central lipid of mammalian cells, *Curr. Opin. Cell Biol.* 22 422–429.
- Mbambo, B., Odhav, B., Mohanlall, V., 2012. Antifungal activity of stigmastanol, sitosterol and ergosterol from *Bulbine natalensis* Baker (Asphodelaceae), *J. Med. Plants Res.* 6, 5135-5141.
- Middleton, E., Kandaswami, C. ve Theoharides, T.C., 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*, 52(4), 673-751.
- Moreau, R.A., Whitaker, B.D., and Hicks, K.B., 2002. Phytosterols, phytostanols and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis and health-promoting uses. *Prog Lipid Res* 41, 457-500.
- Mühlhauser, J., Crescimanno, C., Rajaniemi, H., Parkkila, S., Milovanov, A.P., Castellucci, M. and Kaufmann, P., 1994. Immunohistochemistry of carbonic

- anhydrase in human placenta and fetal membranes. *Histochemistry*, 101, 91-98.
- Nakai, H., Byers, M.G., Venta, P.J., Tashian, R.E. and Shows, T.B., 1987. The gene for human carbonic anhydrase-II (CA II) is located at chromosome 8q22. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 44, 234-235.
- Nelson, D.L. and Cox, M.M., 2005. "Lehninger Biyokimyanın İlkeleri", Çeviri Editörü: Prof. Dr. Nedret Kılıç, Üçüncü Baskıdan Çeviri, Palme Yayıncılık.
- Okuyama, T., Waheed, A., Kusumoto, W., Zhu, X.L. and Sly, W.S., 1995. Carbonic Anhydrase Iv: Role Of C-Terminal Domain İn Glycosylphosphatidylinositol Anchoring And Realization of enzyme activity, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 320, 315-322.
- Özdemir, Ü.Ö., Altuntas, A., Gunduzalp, A.B., Arslan, F. and Hamurcu, F., 2014. "New aromatic/heteroaromatic propanesulfonylhydrazone compounds: Synthesis, physical properties and inhibition studies against carbonic anhydrase II (CAII) enzyme." *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 128, 452-460.
- Panda, S., Jafri, M., Kar, A. and Meheta, B.K. 2009. Thyroid inhibitory, antiperoxidative and hypoglycemic effects of stigmasterol isolated from *Butea monosperma*, *Fitoterapia* 80, 123-126.
- Parisi G., Perales M., Fornasari MS., Colaneri A., González-Schain N., Gómez-Casati D., Zimmermann S., Brennicke A., Araya A., Ferry J.G., Echave J. ve Zabaleta, E., 2004. "Gamma Carbonic Anhydrases in Plant Mitochondria", *Plant Molecular Biology*, 55: 193–207.
- Parkkila, S., 2008. "Significance of pH regulation and carbonic anhydrases in tumour progression and implications for diagnostic and therapeutic approaches", *BJU Int.* 101, 16-21.
- Pastarekova, S., Parkkila, S., Pastorek, J. and Supuran C.T., 2004. Carbonic Anhydrases: Current State of the Art, Therapeutic Applications and Future Prospects, Vol.119, No. 3: 199-229.
- Patel, K., Jain, A. and Patel, D.K., 2013. Medicinal significance, pharmacological activities, and analytical aspects of anthocyanidins 'delphinidin'; A concise report. *Journal of Acute Disease*. 169-178.
- Patel, K., Gadewar, M., Tahilyani, V., Patel, D.K., 2013. Diosmetinin farmakolojik ve analitik yönleri üzerine bir inceleme: kısa bir rapor. *Çene J Integr Med*.19: 792-800.
- Perales, D.T., Navarro, J.M. and Polaina, J., 2016. "Enzymes: Function and characteristics. Encyclopedia of food and health." Caballero, B., Finglas, P. M., and Toldra, F. Elsevier, Amsterdam, 2, 532-538.
- Petersen, Chris E., and Barbara, J., 2005. Anderson. *Investigation in the Biology 1151 Laboratory*. Champaign, IL: Stipes LLC, Print.
- Pfeiffer, N., 1997. "Dorzolamide: Development and clinical application of a topical carbonic anhydrase inhibitor." *Survey of Ophthalmology*, 42(2), 137-151.
- Pietta, P.G., 2000. *Nat, J. Prod.* 63, 1035-1042.
- Pollack, Ö.J., 1953. Reduction of blood cholesterol in man. *Circulation* 7, 702-706.
- Purich, D.L., 2010. "Enzyme kinetics: Catalysis & Control." Elsevier, 865 p, Florida.
- Rahman, S.M.M., Mukta, Z.A. and Hossain, M.A., 2009. Isolation and characterization of  $\beta$ -sitosterol-D-glycoside from petroleum extract of the

- leaves of *Ocimum sanctum* L. *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, 2(01), 39-43.
- Rahman, M.A, Siddiqui, A., 2010. Pyrazoline derivatives: a worthy insight into the recent advances and potential pharmacological activities. *Int J Pharm Sci Drug Res*, 2: 165-175.
- Rahman, T.U., Khattak, KF., Liaqat, W., Zaman K. and Musharraf, S.G., 2015. *Rec. Nat. Prod.*, 9, 553–560.
- Reece, Jane B., Lisa, A. Urry., Michael, L., Cain, Steven A., Wasserman, Peter V., Minorsky and Robert., B, Jackson., 2011. *Campbell Biology*. 9th ed. Boston: Benjamin Cummings/Pearson Education, Print.
- Ren, W., Qiau, Z., Wang, H., Zhu, L. and Zhang, L., 2003. Flavonoids: promising anticancer agents. *Medicinal Research Reviews, China*, 23(4), 519-534.
- Rigotti, A., Nunez, L., Amigo, L., Puglielli, L., Garrido, J., Santos, M., Gonzalez, S., M.Ngrone, G., Greco, A. and Nevri, F., 1993. Biliary Lipidsecretion: Immunolocalization And Identification Of A Protein Associated With Lamellar Cholesterol Carriers In Supersaturated Rat And Human Bile. *J. Lipid Res*. 34: 1883-1894.
- Rice - Evans, C. and Packer, L., 2003. Flavonoids in health and disease second edition revised and expanded. Marcel Dekker, Inc., NewYork, U.S.A, s. 43.
- Roeske, CA. ve Ogren, WL., 1990. "Nucleotide Sequence of Pea cDNA Encoding Chloroplast Carbonic Anhydrase", *Nucleic Acids Research* 18: 3413.
- Ryan, E., Galvin, K., O'Connor, TP., Maguire, AR., O'Brien, NM., 2007. Phytosterol,squalene, tocopherol content and fatty acid profile of selected seeds, grains and legumes, *Plant Foods Hum. Nutr.* 62, 85-91.
- Sajfrtova, M., Sovova, H., Karban, J., Rochova, K., Pavela, R. and Barnet, M., 2012, Effect of seperation method on chemical composition and insecticidal activity of Lamiaceae isolates, 47, 69-77.
- Scozzafava, A., Kalin, P., Claudiu, T., Supuran, C.T., Gulcin, I., Alwasel, S.H., 2015. *J Enzyme Inhib. Med. Chem.* 30, 941.
- Segel, I.H., Wiley, J.C. and Sons., 1975. *Enzyme Kinetics*. New York.
- Senturk, M., Gulcin, I., Beydemir, S., Küfrevioğlu, S.I., Supuran, C.T., 2011. In vitro inhibition of human carbonic anhydrase I and II isozymes with natural phenolic compounds. *Chemical Biology & Drug Design*. 77, 494-499.
- Sethna, S.M. ve Shah, N.M., 1945. *The Chemistry of Coumarins*, *Chemical Reviews*, 36, 1, 1-62.
- Sjoblom, B., Elleby, B., Wallgren, K., Jonsson, B.H., Lindskog, S., 1996, Two Point Mutations Convert A Catalytically Inactive Carbonic Anhydrase-Related Protein (Carp) To, An Active Enzyme, *Febs Letters*, 398, 322- 325.
- Sly, S.W. and Hu, Y.P., 1995. Human Carbonic Anhydrase and Carbonic Anhydrase Deficiencies, *Annual Reviews*, 64: 375-401.
- Smith, K.S. and Ferry, J.G., 2000. Prokaryotic carbonic anhydrases *FEMS Microbiology Reviews* 24,335-366.
- Son, I.S., Kim, J.H., Sohn, H.Y., Son, K.H., Kim, J.S. and Kwon, C.S., 2007. Antioxidative and hypolipidemic effects of diosgenin, a steroidal saponin of yam (*Dioscorea* spp.), on high-cholesterol fed rats. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 71(12), 3063-3071.



- Srinivasan, S., Koduru, S., Kumar, R., Venguswamy, G. *et al.* Kyprianou, N., 2009. Diosgenin targets Akt-mediated prosurvival signaling in human breast cancer cells. *Int J Cancer* 125: 961–967.
- Supuran, C.T. and Scozzafava, A., 2001. Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Current Medicinal Chemistry*, 1. 61-97.
- Supuran, C.T., Scozzafava, A. and Casini, A., 2003. “Carbonic anhydrase inhibitors.” *Medicinal Research Reviews*, 23(2), 146-189.
- Supuran, C.T., 2003. Indisulam: an anticancer sulfonamide in clinical development. *Exp Opin Investing Drugs*, 12, 283-287.
- Supuran, C.T. and Scozzafava, A., 2007 Carbonic Anhydrases as targets for medicinal chemistry. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 15: 4336-4350.
- Supuran, C.T., 2008. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators, *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(2):168-81
- Supuran, C.T., 2010. Carbonic anhydrase inhibition with natural products: novel chemotypes and inhibition mechanisms. *Springer*, 305,308.
- Supuran, C.T., 2016. “Structure and function of carbonic anhydrases.” *Biochemical Journal*, 473(14), 2023-2032.
- Tal, B., Tamir, I., Rokem, J.S. and Goldberg, I., 1984. Isolation and characterization of an intermediate steroid metabolite in diosgenin biosynthesis in suspension cultures of *Dioscorea deltoidea* cells. *Biochemical Journal*, 219(2), 619–624.
- Tanker, M. ve Tanker, N., 1990, *Farmakognozi*. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 546 s, Ankara.
- Tashian, R.E., 1989. The carbonic anhydrases-Widening perspectives on their evolution, expression and function. *Bioessays*, 10, 186-192.
- Tashian, R.E., 1992. Genetics of the mammalian carbonic-anhydrases. *Advances In Genetics Incorporating Molecular Genetic Medicine*, 30, 321-356.
- Topal, F., 2009. İnsan Eritrositlerinden Saflaştırılan Karbonik Anhidraz İzoenzimleri (hCA-I ve hCA-II) Üzerine Bazı Kemoterapi İlaçlarının Etkilerinin İncelenmesi Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Topal, F., Gulcin, I., Dastan, A. and Guney, M., 2017. “Novel eugenol derivatives: Potent acetylcholinesterase and carbonic anhydrase inhibitors.” *International Journal of Biological Macromolecules*, 94(B), 845-851.
- Turkoglu, E.A., Senturk, M., Supuran, C.T., Ekin, D., 2017. Carbonic anhydrase inhibitory properties of some uracil derivatives. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 32 (1) 74-77.
- Vachalkova, A., Grancai, D., Nagy, M. and Novotny, L., 1998. Evaluation of potential carcinogenicity of steroidal alkaloids from *Veratrum album* L. by the DC polarography method. *Neoplasma*, 45(4), 243-247.
- Venugopala, K.N., Rashmi, V. and Odhav, B., 2013. Review on Natural Coumarin Lead Compounds for Their Pharmacological Activity. *Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International*, 14.
- Verpoorte, J. A., Mehta, S. and Edsall, J.T., 1967. “Esterase activities of human carbonic anhydrases B and C.” *The Journal of Biological Chemistry*, 242(18), 4221-4229.
- Yamamoto, M., Masui, T., Sugiyama, K., Yakota, M., Nakagomi, K. and Nakazawa, H., 1991. Anti-inflammatory active constituents of *Aloe arborescens* Miller. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55(6), 1627-1629.

- Ye, J.C., Chang, W.C., Hsieh, D.J.Y. and Hsiao, M.W., 2010. Extraction and analysis of  $\beta$ -sitosterol in herbal medicines. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(7), 522-527.
- Zhang, X.F., Cui, Y., Huang, J.J., Zhang, Y.Z., Nie, Z., Wang, L.F., Yan, B.Z., Tang, Y.L. and Liu, Y., 2007. Immuno-stimulating properties of diosgenyl saponins isolated from *Paris polyphylla*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 17(9), 2408-2413.
- Xiao, Z., Duan, R., Cui, W., Zhang, Y., Zhang, S., Chen, F., Zhang, Y., Liu, J., Zhang, D., Meng, Y., Wang, L. and Wang, H., 2011. "Synthesis and evaluation of new carbonic anhydrase inhibitors." *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 19(10), 3221-3228.
- Xu Y, Feng L, Jeffrey P.D, Shi Y. and Morel F.M., 2008. Structure and metal exchange in the cadmium carbonic anhydrase of marine diatoms, *Nature*, 452(7183):56-61.
- Wang, F. *et al.* Lothrop, A.P., 2007. "A novel murine protein with no effect on iron homeostasis is homologous with transferrin and is the putative inhibitor of carbonic anhydrase." *Biochem. J*, 406, 85-95.
- Wang, L., Wang, X., Yuan, X. and Zhao, B., 2011. Simultaneous Analysis of Diosgenin and Sarsasapogenin in *Asparagus officinalis* byproduct by thin-layer chromatography. *Phytochemical Analysis*, 22(1), 14-17.
- Wistrand, P.J. 1981. "The Importance of Carbonic Anhydrase B and C for the Unloading of CO<sub>2</sub> by the Human Erythrocyte," *Acta Physiol. Scand.*, 343.
- Wistrand, P.J., 1980. "Solubilization and preliminary characterization of membrane bound Carbonic anhydrase", *J. Med. Sci*, 85,75.
- Woyengo, T., Ramprasath, V. and Jones, P., 2009. Anticancer effects of phytosterols, *Eur. J. Clin. Nutr.* 63, 813-820.
- Wu, J.Y., Xu, X.F., Xu, L., Niu, P.Q., Wang, F., Hu, G.Y., Wang, X.P. and Guo, C.Y., 2011. Cyclopamine Blocked the Growth of Colorectal Cancer SW116 Cells by Modulating Some Target Genes of Gli1 in vitro. *Hepato-Gastroenterology*, 58(110), 1511-1518.
- Quilez, A.M., Saenz, M.T., Garcia, M.D. and de la Puerta, R., 2004. Phytochemical analysis and anti-allergic study of *Agave intermixta* Trel. and *Cissus sicyoides* L. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 56(9), 1185-1189.

## ÖZGEÇMİŞ

<b>Kişisel Bilgiler</b>	
Adı Soyadı	Tunay ÇELİK
Doğum Yeri ve Tarihi	Ağrı 28.08.1990
<b>Eğitim Durumu</b>	
Lisans Öğrenimi	Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi/Fen Edebiyat Fakültesi/Biyoloji Bölümü (2011-2015)
Yüksek Lisans Öğrenimi	Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı/Biyokimya Bilim Dalı (2015-Devam)
<b>İş Deneyimi</b>	
Çalıştığı Kurumlar	Sağlık Bakanlığı (2016-devam ediyor)
<b>İletişim</b>	
E-posta Adresi	tunay_199035@hotmail.com