

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

**AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMİYLE KOYUN BÖBREĞİNDEN
SAFLAŞTIRILAN ANJİOTENSİN KONVERTİNG ENZİMİ (ACE, E.C.3.4.15.1)
AKTİVİTESİNE NADH ve FAD BİLEŞİKLERİNİN *İN VİTRO*
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Ayşenur KIYLIK
DANIŞMAN: Prof. Dr. Vedat TÜRKOĞLU

VAN-2019

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

**AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMİYLE KOYUN BÖBREĞİNDEN
SAFLAŞTIRILAN ANJİOTENSİN KONVERTİNG ENZİMİ (ACE, E.C.3.4.15.1)
AKTİVİTESİNE NADH ve FAD BİLEŞİKLERİNİN *İN VİTRO*
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Ayşenur KIYLIK

Bu çalışma YYÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından **FYL-2018-7037**
No'lu proje olarak desteklenmiştir.

VAN-2019

KABUL VE ONAY SAYFASI

Kimya Anabilim Dalı'nda Prof. Dr. Vedat TÜRKOĞLU danışmanlığında, Ayşenur KIYLIK tarafından sunulan "Afinite Kromatografisi Yöntemiyle Koyun Böbreğinden Saflaştırılan Anjiotensin Konverting Enzimi (ACE, E.C.3.4.15.1) Aktivitesine NADH ve FAD Bileşiklerinin *İn Vitro* Etkilerinin Araştırılması" isimli bu çalışma Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili hükümleri gereğince 11/07/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile başarılı bulunmuş ve yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Vedat TÜRKOĞLU

İmza:

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Mahire BAYRAMOĞLU AKKOYUN

İmza:

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Zehra BAŞI

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 19.07.2019 tarih ve 2019/39-1 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

İmza
Enstitü Müdürü



TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.



Ayşenur KIYLIK

ÖZET

AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMİYLE KOYUN BÖBREĞİNDEN SAFLAŞTIRILAN ANJİOTENSİN KONVERTİNG ENZİMİ (ACE, E.C.3.4.15.1) AKTİVİTESİNE NADH ve FAD BİLEŞİKLERİNİN *İN VİTRO* ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

KIYLIK, Ayşenur
Yüksek Lisans Tezi, Kimya Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Vedat TÜRKOĞLU
Temmuz 2019, 71 sayfa

Anjiotensin konverting enzim (ACE EC 3.4.15.1), vazokonstriktör anjiotensin II'yi üreterek kan basıncının düzenlenmesinde merkezi bir rol oynar. Bu çalışmada ACE, koyun böbreğinden afinite kromatografisi yöntemi ile tek basamakta saflaştırıldı ve enzimin saflaştırma oranı 10305 kat ve spesifik aktivite 19075 EU/mg protein olarak hesaplandı. SDS-PAGE ile ACE'in 60 kDa ve 70 kDa molekül ağırlığında iki alt birime sahip olduğu belirlendi. Koyun böbreğinden saflaştırılan ACE aktivitesi üzerine NADH ve FAD bileşiklerinin etkisi araştırıldı. FAD bileşiği ACE aktivitesi üzerine hiçbir etki göstermedi. NADH bileşiği ise inhibisyon etkisi gösterdi. NADH bileşiği için % Aktiviteye karşı İnhibitör konsantrasyonu grafiği çizildi. Bu grafiğin denkleminde IC_{50} değeri 244.33 μ M olarak hesaplandı. İnhibisyon çeşidi ve K_i değerini belirlemek için Lineveawer-Burk grafiği çizildi. İnhibisyon çeşidi yarışmasız inhibisyon ve K_i değeri 175.08 μ M olarak belirlendi.

Anahtar kelimeler: Anjiotensin konverting enzim, Flavin adenin dinükleotid, İnhibisyon, Redükte nikotinamid adenin dinükleotid, Saflaştırma.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF IN VITRO EFFECTS OF NADH AND FAD COMPOUNDS ON THE ACTIVITY OF ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME (ACE, E.C.3.4.15.1) PURIFIED FROM SHEEP KIDNEY BY AFFINITY CHROMATOGRAPHY METHOD

KIYLIK, Ayşenur
M. Sc., Thesis Department of Chemistry
Supervisor: Prof. Dr. Vedat TÜRKOĞLU
July 2019, 71 pages

The angiotensin converting enzyme (ACE EC 3.4.15.1) plays a central role in regulating blood pressure by producing vasoconstrictor angiotensin II. In this study, ACE was purified from sheep kidney by affinity chromatography in one step and the purification rate of enzyme was 10305 fold and specific activity was calculated as 19075 EU/mg protein. The SDS-PAGE showed that ACE had two subunits with a molecular weight of 60 kDa and 70 kDa. The effect of NADH and FAD compounds on ACE activity purified from sheep kidney was investigated. The FAD compound showed no effect on ACE activity. NADH compound showed inhibition effect. For the NADH compound, % Activity against inhibitor concentration was plotted. The IC₅₀ value of this graph was calculated as 244.33 µM. Lineveawer-Burk graph was used to determine the type of inhibition and Ki value. Inhibition type was determined as non-competitive inhibition and Ki value 175.08 µM.

Keywords: Angiotensin converting enzyme, Flavin adenine dinucleotide, Inhibition, Purification, Reduced nicotinamide adenine dinucleotide.



ÖN SÖZ

Bu yüksek lisans tez çalışması, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Vedat TÜRKOĞLU yönetiminde Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma laboratuvarında yapılmıştır. Yüksek lisans çalışmamın planlanmasında, araştırılmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda deneyim ve özverisini hiç eksik etmeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım saygı değer hocam Prof. Dr. Vedat TÜRKOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Aynı zamanda bu çalışmayı gerçekleştirebilmem için gerekli kimyasal malzemeyi temin etmek amacıyla vermiş olduğumuz FYL-2018-7037 ID numaralı projemizi destekleyen Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Daire Başkanlığı'na teşekkür ederim. Çalışmalarım boyunca bana yardımcı olan Dr. Öğretim Üyesi Zehra BAŞI'ya teşekkür ederim. Çalışmalarım süresince bana destek olan aileme teşekkür ederim.

2019

Ayşenur KIYLIK



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖN SÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELER LİSTESİ	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xv
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Renin Anjiotensin Aldosteron Sistemi	1
1.2. Anjiotensin Konverting (Dönüştürücü) Enzim.....	4
1.3. Anjiotensin Konverting Enzim İnhibitörleri.....	6
1.4. Oksidatif Stres.....	7
1.5. Antioksidan Sınıflandırma.....	10
1.6. Antioksidan Süreci.....	11
1.7. Hipertansiyon.....	11
1.8. Hipertansiyon Üzerine Antioksidan Bileşiklerin Etkisi.....	12
1.9. Oksidatif Fosforilasyon.....	14
1.10. Elektron Transport Zinciri (ETZ)	15
1.11. Koenzimler.....	16
1.12. Nikotinamid adenin dinükleotit (NAD) ve Flavin adenin dinükleotit (FAD)	17
2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ	23
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	33
3.1. Materyal	33
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler	33
3.1.2. Kullanılan alet ve cihazlar	33
3.1.3. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması	34
3.1.3.1. Protein tayininde kullanılan çözeltiler.....	34

	Sayfa
3.1.3.2. Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler	35
3.1.3.3. Kolon dolgu maddesi için kullanılan çözeltiler.....	35
3.1.3.4. Afinite kromatografisi kolonunda kullanılan çözeltiler	35
3.1.3.5. SDS-PAGE elektroforez için kullanılan çözeltiler.....	36
3.2. Yöntem.....	38
3.2.1. Protein tayini.....	38
3.2.1.1. Kalitatif protein tayini	38
3.2.1.2. Bradford yöntemiyle kantitatif protein tayini.....	38
3.2.2. Afinite kolonunun hazırlanması	39
3.2.3. Koyun böbreği anjiotensin konverting enziminin saflaştırılması	40
3.2.3.1. Koyun böbreği eldesi	40
3.2.3.2. Koyun böbreğinin afinite kolonuna uygulanması ve enzim elüsyonu	41
3.2.4. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile ACE'in saflığının kontrolü	41
3.2.5. Koyun böbreği ACE'in alt birimlerinin SDS-PAGE ile molekül ağırlıklarının belirlenmesi	43
3.2.6. Enzim aktivitesinin ölçümü	44
3.2.7. NADH ve FAD bileşiklerinin çözeltilerinin hazırlanması	45
3.2.8. ACE ile yapılan kinetik çalışmalar	45
3.2.8.1 Koyun böbreği ACE aktivitesi üzerine NADH ve FAD bileşiklerinin etkilerinin belirlenmesi	45
3.2.9. Koyun böbreği ACE aktivitesi üzerine etkisi incelenen NADH bileşiğinin K _i değeri, inhibisyon türü ve IC ₅₀ değerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar.....	46
4. BULGULAR	47
4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Grafik.....	47
4.2. Koyun Böbreği Anjiotensin Konverting Enziminin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması Sonuçları	47
4.2.1. Koyun böbreği anjiotensin konverting enzimi için saflaştırma sonuçları	48

	Sayfa
4.3. Koyun böbreği ACE'in SDS-PAGE ile Saflığının Kontrolü.....	49
4.4. Koyun böbreği ACE'in Alt Birimlerinin SDS-PAGE ile Molekül Ağırlığının Belirlenmesine Ait Sonuçlar	50
4.5. Koyun böbreği ACE Aktivitesi Üzerine NADH ve FAD Bileşiklerinin Etkilerinin Belirlenmesine Ait Çalışma Sonuçları	51
4.6. Koyun böbreği ACE Aktivitesi Üzerine İnhibitör Etkisi Gösteren NADH Bileşiğinin İnhibisyon Türünün Belirlenmesine Ait Çalışma Sonuçları	52
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	55
KAYNAKLAR.....	63
ÖZ GEÇMİŞ.....	71

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1.SDS-PAGE için ayırma jeli ve yığıma jeli konsantrasyonları	43
Çizelge 3.2. Koyun böbreği ACE'nin NADH ve FAD içeren aktivite ölçüm kuvvet içeriği	46
Çizelge 4.1. Koyun böbreği ACE'in saflaştırma basamakları.....	49
Çizelge 4.2. Koyun böbreğindeki ACE'in NADH konsantrasyonu değişen aktivite ve % aktivite değerleri	51
Çizelge 4.3. Koyun böbreği ACE için bulunan IC ₅₀ ve K _i değerleri ve inhibisyon türü.....	52



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1.1. Renin anjiotensin aldosteron sistemi (RAAS)	4
Şekil 1.2. Okside NAD ve redükte NADH bileşiklerinin reaksiyonu.....	18
Şekil 1.3. Okside FAD ve redükte FADH ₂ bileşiklerinin reaksiyonu.....	19
Şekil 4.1. Bradford yöntemi ile proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart grafik	47
Şekil 4.2. Afinite kolonundan alınan koyun böbreği fraksiyonlarının kalitatif protein tayinleri ve aktivite değerleri.....	49
Şekil 4.3. Koyun böbreğinden saflaştırılan ACE'in jel elektroforez fotoğrafı ve standart belirteç (markır)'in orijinal göstergesi	50
Şekil 4.4. Koyun böbreği anjiotensin konverting enziminin SDS-PAGE ile alt birimlerinin molekül ağırlığının belirlenmesinde kullanılan standart grafik	51
Şekil 4.5. Koyun böbreğindeki ACE üzerine NADH bileşiğinin etkisi.....	52
Şekil 4.6. Koyun böbreğindeki ACE üzerine NADH bileşiğinin etkisi.....	53



SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
$\mu\text{g/mL}$	Mikrogram/mililitre
μL	Mikrolitre
μM	Mikromolar
cm Hg	Santimetre civa
mm Hg	Milimetre civa
Da	Dalton
dk	Dakika
EU	Enzim ünitesi
g	Gram
IC₅₀	% 50 inhibisyona neden olan inhibitör konsantrasyonu
kcal	Kilokalori
K_{kat}	Turnover sayısı
kDa	Kilodalton
K_i	İnhibisyon sabiti
K_M	Michealis menten sabiti
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
mg/mL	Miligram/mililitre
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
μM	Mikromolar

Simgeler

Açıklama

nM	Nanomolar
nm	Nanometre
°C	Santigrat derece
V_{max}	Maksimum hız

Kısaltmalar

Açıklama

ACE	Anjiotensin konverting enzim
ACTH	Adrenokortikotropik hormon
AD	Alzheimer hastalığı
ADP	Adenozin difosfat
AKB	Arteryel kan basıncı
APS	Amoyum persülfat
AT1	Anjiotensin II tip 1 reseptörü
ATP	Adenozin trifosfat
BPP	Bradikinin kuvvetlendirici peptidler
CAT	Katalaz
CoQ	Koenzim Q
CTAB	Setiltrimetilamonyum bromür
DMBA	Dimetilbenz [α] antrasen
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
ETZ	Elektron Transport Zinciri
FAD	Flavin adenin dinükleotid
FADH₂	Redükte flavin adenin dinükleotid
FAPGG	N-[3-(2-Furil)akriloil]-Fenil-Glisil-Glisin
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FLIM	Multiphoton floresan ömür boyu görüntüleme mikroskobu

Kısaltmalar

Açıklama

FMN	Flavin mononükleotid
FMNH₂	Redükte flavin mononükleotid
FPLC	Ters fazlı hızlı protein sıvı kromatografisi
GC-MS	Gaz kromatografisi-kütle spektrofotometresi
GPx	Glutasyon peroksidaz
GRx	Glutasyon redüktaz
GSH	Redükte glutasyon
GSSG	Okside glutasyon
H₂O₂	Hidrojen peroksit
HCl	Hidroklorik asit
HDL	Yüksek dansiteli lipoprotein
HEPESNa	(2-[4-(2-hidroksietil) piperazin-1-il] etan sülfonik asit sodyum)
HNO₂	Nitröz asit
HOCl	Hipoklorik asit
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HWE	Sıcak su ekstraktı
JG	Jukstaglomerüler
JNC	Ortak Ulusal Komite
KB	Kan basıncı
LDL	Düşük dansiteli lipoprotein
LOO•	Lipit peroksil radikali
LOOH	Lipit peroksit
MDA	Malondialdehit
MDRS	Mattis Demans Derecesi Ölçeği
N₂O₃	Diazot trioksit
Na₂B₄O₇·10H₂O	Sodyum tetra borat
NaCl	Sodyum klorür

Kısaltmalar

Açıklama

NAD⁺	Nikotinamid adenin dinükleotid
NADH	Redükte nikotinamid adenin dinükleotid
NADP⁺	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NADPH	Redükte Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NaHCO₃	Sodyum bikarbonat
NaN₃	Sodyum azid
nativ-PAGE	Nativ-poliakrilamid jel elektroforezi
NHS	N-hidroksisüksinimid
NMR	Nükleer manyetik rezonans
NO•	Nitrik oksit radikali
NO₂•	Azot dioksit radikali
¹O₂	Tekli oksijen
O^{2•-}	Süperoksit radikali
O₃	Ozon
OH•	Hidroksil radikali
ONOO•	Peroksinitrit radikali
PN-1	Protein hidrolizatları
PRA	Plazma renin aktivitesi
RAAS	Renin anjiotensin aldosteron sistemi
RAS	Renin anjiotensin sistemi
R_f	Göreceli göç
RNS	Reaktif azot türleri
ROO•	Peroksit radikali
ROS	Reaktif oksijen türleri
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SHR	Spontan hipertansif ratlar
SOD	Süperoksit dismutaz

Kısaltmalar**Açıklama****TCA**

Trikarboksilik devri

TEMED

N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin

TFE

Trifloroetanol

Tris

Trihidroksimetil aminometan

ZnCl₂

Çinko klorür





1. GİRİŞ

Hipertansiyon, kardiyovasküler hastalıklar için en yaygın risk faktörü olarak kabul edilir, aynı zamanda dünya çapında mortalite ve morbiditenin önde gelen bir nedeni olarak kabul edilir. Bu hastalıklar 600 milyondan fazla insanı içine almaktadır ve dünya nüfusunun % 29'unun 2025 yılına kadar hipertansiyondan muzdarip olacağı tahmin edilmektedir. Hipertansiyonun patolojik sürecinin altında yatan mekanizmalar tam olarak açıklanamamıştır (Kearney ve ark., 2005; Ahmad ve ark., 2017). Hipertansiyon, nadiren herhangi bir semptomun eşlik ettiği kronik bir tıbbi durumdur. Genellikle tarama yoluyla veya hasta ilgisiz bir problem ararken belirlenir (Chobanian ve ark., 2003; Nasri, 2012; Rafieian-Kopaei ve Nasri, 2012; Behradmanesh ve Nasri, 2013). Hipertansiyon miyokard enfarktüsü, kalp yetmezliği, inme, periferik arter hastalığı, aort anevrizması için önemli bir risk faktörüdür ve kronik böbrek hastalığının bir nedenidir. Arteriyel kan basıncının yükselmesi, kısaltılmış yaşam beklentisi ile ilişkilidir. Günümüzde hipertansiyon tedavisi, kaptopril, enalapril ve lisinopril gibi sentetik ilaçları içermektedir. Bununla birlikte, bu ilaçlar genellikle anjiyoödem, kalıcı kuru öksürükler ve fetopati gibi istenmeyen yan etkilere neden olur. Anjiyotensin konverting enzim (ACE, EC, 3.4.15.1), kan basıncının düzenlenmesinde anahtar bir enzimdir. Renin anjiyotensin sistemindeki anjiyotensin konverting enzim anjiyotensin I'i katalize ederek vazokonstriktör olan anjiyotensin II'yi üretir. Aynı zamanda kallikrein kinin sisteminde, ACE bradikininini aktif olmayan bir bileşiğe dönüştürür. Bu nedenle, ACE'nin inhibisyonu, kan basıncının düşmesine neden olur (Cotton ve ark., 2002; Dicipinigaitis, 2006; Bernstein ve ark., 2012).

1.1. Renin Anjiyotensin Aldosteron Sistemi

Vücuttaki mineral dengesinin korunabilmesi için adrenal mineralokortikoidlere ihtiyaç duyulmaktadır. En güçlü mineralokortikoid olan aldosteron, böbreklerden sodyum tutulmasına ve potasyum atılmasına neden olmaktadır. Dışarıdan verilen adrenokortikotropik hormon (ACTH) aldosteron yapımını geçici olarak uyarır ancak bu hormonu esas kontrol eden mekanizma bu değildir. Esas uyarılar, damar içindeki hacim

ve tuz durumuna cevap olarak böbreğin jukstaglomerüler (JG) hücrelerinden gelir. JG hücreleri glomerül yakınında, afferent böbrek arteriolünün özel kısımlarında yerleşmişlerdir. Bu hücreler, kendilerine bitişik bir böbrek tübülünde yerleşmiş olan ve tübüldeki tuz ve sıvı bileşimine duyarlı olan makula densa hücreleri ile birlikte çalışırlar. (Brown ve ark., 1998; Guyton ve Hall, 2006; Marketou ve ark., 2010).

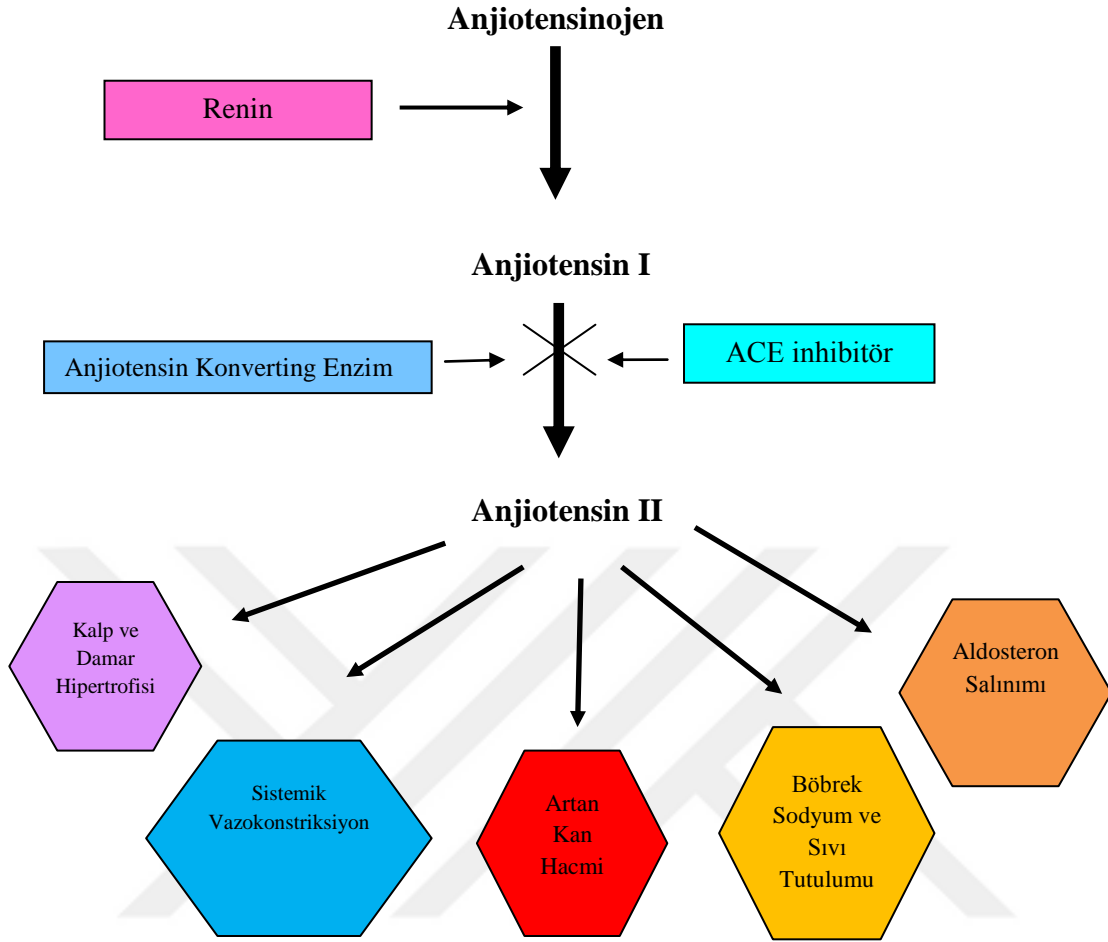
JG hücreleri tuz eksikliği, kan hacmi veya basıncının düşmesi gibi durumlarda cevap olarak 40000 daltonluk bir glikoprotein enzimi olan renini üretir ve salgılar. Renin enzimi, anjiotensinojeni proteolitik olarak kırar ve aktivitesi düşük bir decapeptid olan anjiotensin I oluşur. Anjiotensin I daha sonra anjiotensin-dönüştürücü enzim ile (anjiotensin-konverting enzim, ACE) ile anjiotensin II'ye dönüştürülür. Anjiotensin II bir aminopeptidaz ile anjiotensin III'e dönüştürülür. Her ikisi de adrenal korteksin zona glomerulosa hücrelerindeki spesifik reseptörlerine bağlanır ve aldosteron salgısını arttırlar. Yüksek potasyum düzeyleri de aldosteron salgısını arttırır (Brown ve ark., 1998; Guyton ve Hall, 2006; Hanif ve ark., 2010).

Anjiotensin II'nin doğrudan vazokonstriksiyonu ve aldosteronun tuz tutulumunu arttırıcı etkileri ortak olarak kan basıncını arttırır. Kan basıncının artması 'feedback (geri bildirim)' olarak renin salınımını baskılar. Anjiotensin II'de doğrudan renin salgısını baskılar. β -adrenerjik uyarı, vazopressin, atrial natriüretik faktör, endotelin ve prostaglandinler gibi çeşitli faktörler de kan basıncının ve böbrek fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (Sealey ve Laragh, 1990; Skidgel ve Erdos, 1993; Brown ve ark., 1998; Hanif ve ark., 2010).

Dünya Sağlık Örgütü, hipertansiyonu mortalite için bir numaralı risk faktörü olarak tanımlamaktadır, çünkü dünya çapında yıllık 7,5 milyon ölüm (tüm ölümlerin % 13'ü) yüksek tansiyon ile ilgili hastalıklar, özellikle kardiyovasküler hastalıklar ile ilgilidir. Bu nedenle, hipertansiyon ve kardiyoloji topluluklarının kılavuzları, hipertansiyon tedavisinin uzun vadeli (kardiyovasküler) morbidite ve mortalite riskini azaltmayı hedeflemesi gerektiğini vurgulamaktadır. Hipertansiyon, genellikle semptomsuz olduğu için sıklıkla "sessiz katil" olarak adlandırılır. Bu nedenle, antihipertansif ilaçlara uyum, çoğu hasta için bir zorluktur, özellikle de yeterli kan basıncı kontrolü, çoğu zaman, ilave yan etkilere neden olan çoklu ajanların kullanılmasını gerektirir. Hastaların öngörülen tedaviye uymalarını arttırmak için

tercihen mortalite üzerinde yararlı etkileri olan güçlü ilaçlara sürekli bir ihtiyaç duyulmaktadır (Ezzati ve ark., 2002; Chobanian ve ark., 2003).

Antihipertansif tedavide β -blokerler, diüretikler, kalsiyum kanalı blokerleri ve renin-anjiotensin-aldosteron sistemi (RAAS) inhibitörleri gibi ilaçlar kullanılmaktadır. RAAS'ın blokajı, aşırı aktif bir RAAS'ın yüksek kan basıncı ile güçlü bir şekilde ilişkili olması nedeniyle, hipertansiyonlu hastalarda anahtar tedavi edici hedeflerden biridir. RAAS, insan vücudundaki dolaşım hacmini ve elektrolit dengesini kontrol eder ve bu nedenle hemodinamik stabilitenin önemli bir düzenleyicisidir (Brown ve ark., 1998; Marketou ve ark., 2010). RAAS inhibitörleri, hipertansiyon tedavisi için en çok reçete edilen ilaç sınıfıdır. Halen RAAS'ı bloke eden klinik olarak en alakalı farmakolojik ajanlar, anjiotensin konverting (dönüştürücü) enzim (ACE) inhibitörleri ve AT1 reseptör blokerleridir. Her iki ilaç da anjiotensin II'yi bloke eder. Ancak ACE inhibitörleri, ilave vazodilatasyon ile sonuçlanan nitrik oksit ve prostaglandin salınımına neden olan bradikininin bileşimini aktive ederek karakterize edilir. Örneğin, kalp yetmezliğinde enalapril, yüksek kardiyovasküler riski olan hastalarda ramipril ve stabil koroner hastalıkta kullanılan perindopril gibi ACE inhibitörleri ile kardiyovasküler nedenlerden, miyokard infarktüsünden veya inmeden kaynaklanan ölümlerde önemli oranda düşüş gözlemlenmiştir (Skeggs ve ark., 1976; Marketou ve ark., 2010).



Şekil 1.1. Renin anjiotensin aldosteron sistemi (RAAS).

1.2. Anjiotensin Konverting (Dönüştürücü) Enzim (ACE)

Anjiotensin konverting enzim (ACE) veya kininaz II, endotelial hücrelerde, epitel veya nöroepitelyal hücrelerde ve beyinde membrana bağlı bir formda; kanda ve çok sayıda vücut sıvısında ise çözünür bir formda mevcut olan iki değerli bir dipeptidil karboksil metaloproteidazdır. ACE veya kininaz II, Anjiotensin I ve bradikininden ve bir penultimate (sondan ikinci) prolin kalıntısı içermeyen bir dizi başka küçük peptitten C-terminal dipeptidini ayırır. Bu nedenle, ACE renin anjiotensin sistemi (RAS) ve kallikrein-kinin sistemi arasındaki dengeyi düzenlemek için stratejik olarak hazır bulunmaktadır. RAS, kan basıncı düzenlemesinde çok önemli bir rol oynar. Makula densada azalmış sodyum verimi, azalmış renal perfüzyon basıncı ve sempatik

aktivasyonun tümü, dolaşımdaki RAS'ta klasik renin kaynağı olan jukstaglomerular hücre tarafından renin salgılanmasını uyarır. Alternatif olarak, renin lokal olarak dokularda üretilebilir. Renin, inaktif dekapeptid anjiotensin I'i prohormon anjiotensinojenden ayırır. Daha sonra anjiotensin II ACE'nin etkisiyle anjiotensin I'den ayrılır. Anjiotensin II, doğrudan vasküler düz kas hücrelerine etki eden güçlü bir vazokonstriktördür. Ek olarak, anjiotensin II, vasküler tonu arttırmak için periferik ve merkezi olarak sempatik sinir sistemi ile etkileşime girer. Anjiotensin II, sodyum tutma (aldosteron ve renal vazokonstriksiyon yoluyla) ve sıvı tutma (antidiüretik hormon aracılığıyla) yoluyla hacim genişlemesine neden olur. Hücresel düzeyde, anjiotensin II göç, proliferasyon ve hipertrofiyi destekler. Anjiotensin II'nin bu etkilerinin çoğuna AT1 reseptörü aracılık ediyor gibi görünmesine rağmen, son çalışmalar AT2 ve AT4 alt tipi reseptörleri için de roller tanımlamaktadır (Bell ve Madri, 1990; Daemen ve ark., 1991; Dzau, 1993; Danser ve ark., 1994).

ACE (veya kininaz II) anjiotensin II oluşumunu katalize etmenin yanı sıra, bradikinin bozulmasını da katalize eder. Belirli dokularda veya organlarda bradikinin; düz kas kasılmasına (örneğin, uterin ve ileal), damar geçirgenliğinin artmasına, periferik ve C liflerinin uyarılmasına ve mukoza salgılanmasının artmasına neden olur. Bununla birlikte, daha önemlisi, bradikinin, vasküler endotelde araşidonik asit metabolitleri, nitrik oksit ve endotel kaynaklı hiperpolarize edici faktörün üretimini uyararak vazodilasyonu teşvik eder. Böbreklerde, bradikinin, doğrudan tübüler etkilerle natriüze neden olur. Bradikininin fizyolojik etkilerinin çoğuna B2 reseptörü aracılık ediyor gibi görünmektedir. Özet olarak ACE, bradikininin vasodilatuar ve natriüretik özellikleri ile Ang II'nin vazokonstriktif ve tuz tutma özellikleri arasındaki dengeyi düzenlemektedir. ACE inhibitörleri, anjiotensin II oluşumunu ve bradikinin yıkımını azaltarak bu dengeyi değiştirir. ACE inhibitörleri ayrıca P maddesi gibi diğer birkaç vazoaktif maddenin oluşumunu ve bozulmasını da değiştirir, ancak bu bileşiklerin ACE inhibitörlerinin tedavi edici veya ters etkilerine katkısı belirsizdir (Itoh ve ark., 1993; Timmermans ve ark., 1993; Huckle ve Earp, 1994; Dostal ve ark., 1996).

1.3. Anjiotensin Konverting Enzim İnhibitörleri

ACE inhibitörleri, kardiyovasküler ve böbrek hastalığının tedavisinde geniş kullanım alanı sağlamıştır. ACE inhibitörleri, anjiotensin II'nin vazokonstriktif, tuz tutan ve hipertrofik özellikleri ile bradikininin vasodilatuar ve natriüretik özellikleri arasındaki dengeyi değiştirir ve diğer birçok vasoaktif maddenin metabolizmasını değiştirir. ACE inhibitörleri; aktif kısımlarının kimyasal yapısında, potansiyelinde, biyoyararlanımda, plazma yarı ömründe, eliminasyon yolunda, dokuya bağlı ACE için dağılımları ve afiniteleri ve ön ilaçlar olarak uygulanıp uygulanmadıkları açısından farklılık gösterir. Bu yüzden, ACE inhibitörlerinin yan etkileri sınıfa özgü olanlar ve spesifik ajanlarla ilgili olanlar olmak üzere ikiye ayrılabilir. ACE inhibitörleri, kalp atış hızını arttırmadan sistemik vasküler direnci azaltır ve natriüresi yükseltir. Hipertansiyon tedavisinde etkili oldukları kanıtlanmıştır. Aynı zamanda konjestif kalp yetmezliğinde mortaliteyi ve miyokard enfarktüsünden sonra sol ventrikül fonksiyon bozukluğunu azaltırlar ve diyabetik nefropatinin ilerlemesini geciktirirler (Sealey ve Laragh, 1990; Skidgel ve Erdos, 1993; Brown ve ark., 1998).

ACE inhibitörleri, aktif kısımlarının kimyasal yapılarına göre üç gruba ayrılabilir. Kaptopril, sülfidril içeren ACE inhibitörlerinin prototipidir; diğerleri fentiapril, pivalopril, zofenopril ve alaseprildir. *İn vitro* çalışmalar, sülfidril grubunun varlığının, serbest radikal temizliği ve prostaglandinler üzerindeki etkileri gibi etkilerin bu ilaçlara ACE inhibisyonu dışındaki özellikler verebileceğini göstermektedir. Fosinopril, reaktif kısmı olarak bir fosfinil grubu içeren tek FDA (Amerikan gıda ve ilaç dairesi) onaylı ACE inhibitörüdür. Diğer ACE inhibitörlerinin çoğunluğu bir karboksil kısmı içerir. Kaptopril, kısa yarı ömrü nedeniyle diğer ACE inhibitörlerinden farklıdır. Fosinopril, trandolapril ve spirapril hariç, ACE inhibitörleri ağırlıklı olarak böbrek tarafından temizlenir. Bu nedenle, bozulmuş böbrek fonksiyonunun ayarında doz azaltmaları gerekir. ACE inhibitörlerinin çoğu, karaciğerde esterleşene kadar etkisiz kalan ön ilaçlar olarak uygulanır. Bu ön ilaçlar, aktif ilaçlarına kıyasla oral biyoyararlanımı arttırmıştır. ACE, dokularda olduğu gibi plazmada da bulunur ve ACE inhibitörlerinin ilgili doku afinitesinde farklılıklar vardır. Örneğin, Fabris ve arkadaşları tarafından çeşitli ACE inhibitörlerinin kalp homojenatlarına bağlanması incelenmiştir ve quinaprilat = benazaprilat > perindoprilat > lisinoprilat > fosinoprilat olarak

potansiyelinin sırası bulunmuştur. Bazı araştırmacılar, ACE inhibitörlerinin kan basıncı üzerindeki etkilerinin, dolaşımdaki ACE'den ziyade doku ACE seviyeleri ile daha iyi bağlantı kurduğunu göstermiştir (Cohen ve Kurz, 1982; Zusman, 1987; Fabris ve ark., 1989; Mira ve ark., 1994; Brown ve ark., 1998).

ACE inhibitörleri, hipertansif hastalarda ve ayrıca tuz tüketen normotansif deneklerde ortalama, sistolik ve diyastolik basınçları etkili bir şekilde azaltır. Kan basıncındaki keskin değişim, tedavi öncesi plazma renin aktivitesi (PRA) ve anjiotensin seviyeleri ile ilişkilidir, yani kan basıncındaki en büyük düşüşler PRA'nın en yüksek olduğu hastalarda görülür. Bununla birlikte, uzun süreli tedaviyle, hastaların daha büyük bir yüzdesinde kan basıncında önemli bir düşüş gözlenmiştir ve antihipertansif etki artık tedavi öncesi PRA ile ilişkili değildir. Kronik uygulamada bu artan etkinlik için mekanizma açık değildir, ancak kallikrein-kinin sistemini veya vazodilatör prostaglandinlerin üretimini içerebilir. ACE inhibitörlerinin en belirgin özelliklerinden biri, kalp hızında telafi edici bir artışa neden olmadan periferik vasküler direnci düşürmeleridir (Waerber ve ark., 1982; Given ve ark., 1984; Todd ve Heel, 1986; Pool ve ark., 1987; Ujhelyi ve ark., 1989).

1.4. Oksidatif Stres

Oksijen yaşam için vazgeçilmez bir unsurdur. Hücreler enerji üretmek için oksijen kullandıklarında, mitokondri tarafından ATP (adenozin trifosfat) üretilmesinin bir sonucu olarak serbest radikaller oluşur. Bu yan ürünler genellikle hücrel redoks işleminden kaynaklanan reaktif azot türleri (RNS) ve reaktif oksijen türleridir (ROS). Bu türler hem toksik hem de faydalı bileşikler olarak ikili bir rol oynamaktadır. Düşük veya orta seviyelerde, ROS ve RNS hücrel tepkiler ve bağışıklık fonksiyonu üzerinde faydalı etkiler gösterir. Yüksek konsantrasyonlardaki ROS ve RNS, tüm hücre yapılarına hasar verebilecek zararlı bir süreç olan oksidatif stresi oluştururlar (Bahorun ve ark., 2004; Willcox ve ark., 2006; Valko ve ark., 2006; Pacher ve ark., 2007; Genestra, 2007; Halliwell, 2007).

Oksidatif stres; kanser, artrit, yaşlanma, otoimmün hastalıklar, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar gibi kronik ve dejeneratif hastalıkların gelişiminde önemli bir rol oynar. İnsan vücudu, doğal olarak vücutta üretilen veya harici olarak gıdalar ve

takviyeler yoluyla tedarik edilen antioksidanlar üreterek oksidatif stresi gidermek için çeşitli mekanizmalara sahiptir. Endojen ve eksojen antioksidanlar, ROS ve RNS'nin neden olduğu zararları önleyerek ve onararak “serbest radikal temizleyiciler” olarak işlev görür ve bu nedenle bağışıklık savunmasını artırabilir ve kanser ve dejeneratif hastalık riskini azaltabilir. Oksijensiz radikallerin teorisi yaklaşık elli yıl önce bilinmektedir. Bununla birlikte, sadece son 20 yılda, antioksidanların hastalıkların gelişimindeki rollerinin ve ayrıca sağlığa koruyucu etkilerinin önemli ölçüde bir keşfi olmuştur (Parthasarathy ve ark., 1999; Valko ve ark., 2006; Chatterjee ve ark., 2007).

ROS ve RNS, serbest radikalleri ve ayrıca oksidanlar olarak da adlandırılan diğer radikal olmayan reaktif türevleri toplu olarak tanımlayan terimlerdir. Radikaller, radikal olmayan türlere göre daha az stabildir, ancak reaktiviteleri genellikle daha güçlüdür. Dış kabuğunda bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron bulunan bir moleküle serbest radikal denir. (Bahorun ve ark., 2004; Willcox ve ark., 2006; Pacher ve ark., 2007; Genestra, 2007; Halliwell, 2007; Pham-Huy ve ark., 2008).

Serbest radikaller, her bir fragmanın bir elektronu tutacak şekilde kimyasal bir bağın kopmasıyla moleküllerden oluşur. Aynı zamanda, serbest radikaller başka bir radikal vermek için bir radikalın parçalanmasıyla ve redoks reaksiyonları ile de meydana gelir. Serbest radikaller arasında hidroksil ($\text{OH}\cdot$), süperoksit ($\text{O}^{2\cdot-}$), nitrik oksit ($\text{NO}\cdot$), azot dioksit ($\text{NO}_2\cdot$), peroksit ($\text{ROO}\cdot$) ve lipid peroksil ($\text{LOO}\cdot$) radikalleri bulunur. Ayrıca, hidrojen peroksit (H_2O_2), ozon (O_3), tekli oksijen ($^1\text{O}_2$), hipoklorik asit (HOCl), azotlu asit (HNO_2), peroksinitrit ($\text{ONOO}\cdot$), dinitrojen trioksit (N_2O_3), lipid peroksit (LOOH) radikalleri genellikle oksidanlar olarak adlandırılır ve bu radikaller canlı organizmalardaki serbest radikal reaksiyonlara kolayca yol açabilir. Bu yüzden biyolojik serbest radikaller; lipidler, proteinler, DNA gibi çeşitli organik substratlarla reaksiyona girebilecek elektronlara sahip olan oldukça karasız moleküllerdir. (Pacher ve ark., 2007; Genestra, 2007; Halliwell, 2007; Pham-Huy ve ark., 2008).

ROS ve RNS'nin oluşumu hücrelerde enzimatik ve enzimatik olmayan reaksiyonlar olmak üzere iki yolla oluşabilir. Serbest radikallere neden olan enzimatik reaksiyonlar arasında solunum zincirinde rol oynayanlar, fagositoz, prostaglandin sentezi ve sitokrom P450 sistemi bulunur. Örneğin, süperoksit anyon radikali ($\text{O}^{2\cdot-}$) NADPH oksidaz, ksantin oksidaz, peroksidazlar gibi çeşitli hücresel oksidaz sistemleri ile üretilir. Serbest radikaller, oksijenin iyonize edici radyasyonlarla başlatılanların yanı

sıra organik bileşiklerle enzimatik olmayan reaksiyonlarından da elde edilebilir. Nonenzimatik işlem, mitokondride oksidatif fosforilasyon (yani aerobik solunum) sırasında da ortaya çıkabilir. (Willcox ve ark., 2006; Valko ve ark., 2006; Pacher ve ark., 2007; Genestra, 2007).

ROS ve RNS, endojen veya eksojen kaynaklardan üretilir. Endojen serbest radikalleri, immün hücre aktivasyonu, iltihaplanma, zihinsel stres, aşırı egzersiz, iskemi, enfeksiyon, kanser, yaşlanma sonucu ortaya çıkar. Ekzojen ROS ve RNS radikalleri ise hava ve su kirliliği, sigara dumanı, alkol, ağır veya geçiş metallerinden (Cd, Hg, Pb, Fe, As), bazı ilaçlardan (siklosporin, takrolimus, gentamisin, bleomisin), endüstriyel çözücülerden, pişirme (füme et, kullanılmış yağ, yağ) ve radyasyondan kaynaklanır. Farklı yollardan vücuda nüfuz ettikten sonra, bu eksojen bileşikler serbest radikallere ayrışır veya metabolize edilir. Serbest radikaller ve oksidanlar aşırı miktarda üretildiğinde, hücre membranları, proteinler, lipidler, lipoproteinler ve deoksiribonükleik asit (DNA) gibi yapılara ciddi bir şekilde zarar veren oksidatif stres meydana gelir. Hücreler, oluşan serbest radikallerin fazlalığını yeterince yok edemediği zaman oksidatif stres oluşur. Başka bir deyişle, oksidatif stres, ROS / RNS'nin oluşumu ve nötralizasyonu arasındaki dengesizlikten kaynaklanmaktadır. Örneğin, aşırı hidroksil radikali ve peroksinitrit oluşumu, lipid peroksidasyon adı verilen bir işlemle hücre zarlarına ve lipoproteinlere zarar verebilir. Bu reaksiyon malondialdehit (MDA) ve sitotoksik ve mutajenik olan konjuge dien bileşiklerin oluşumuna yol açar. Lipid peroksidasyonu, radikal bir zincir reaksiyonu ile meydana gelir, yani bir kez başlatıldığında, hızla yayılır ve çok sayıda lipid molekülünü etkiler. Aynı zamanda, proteinler de ROS/RNS'den zarar görebilir, bu da yapısal değişikliklere ve enzim aktivitesinin kaybına neden olur. Oksidatif hasar, mutasyonlara neden olabilen farklı oksidatif DNA lezyonlarının oluşumuna yol açarak DNA'ya da zarar verir. Vücudun, DNA tamir enzimleri ve antioksidanları kullanarak bu saldırılara karşı koymak için çeşitli mekanizmaları vardır. Oksidatif stres doğru şekilde düzenlenmezse, yaşlanma süreci ve bazı akut patolojilerin (travma, inme) yanı sıra çeşitli kronik ve dejeneratif hastalıkları da tetikleyebilir (Parthasarathy ve ark., 1999; Valko ve ark., 2006; Chatterjee ve ark., 2007; Pham-Huy ve ark., 2008).

Kardiyovasküler hastalık gelişimi hiperkolesterolemi, hipertansiyon, sigara içme, diyabet, zayıf beslenme, stres ve fiziksel hareketsizlik gibi çeşitli risk faktörleriyle

ilişkilidir. Son zamanlarda, yapılan çalışmalarda oksidatif stresin birçok kardiyovasküler hastalığın birincil veya ikincil nedeni olup olmadığı araştırılmaktadır. Ayrıca *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar ateroskleroz, iskemi, hipertansiyon, kardiyomiyopati, kalp hipertrofisi ve konjestif kalp yetmezliği gibi bir dizi kardiyovasküler hastalıkta oksidatif stresin rolünü kanıtlamıştır (Valko ve ark., 2006; Chatterjee ve ark., 2007; Pham-Huy ve ark., 2008).

1.5. Antioksidan sınıflandırma

Hücrelerdeki endojen bileşikler, enzimatik antioksidanlar ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak sınıflandırılabilir. ROS ve RNS'nin nötralizasyonuna doğrudan katılan başlıca antioksidan enzimler süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) ve glutatyon redüktaz (GRx) enzimleridir. Serbest radikallere karşı ilk savunma hattı olan SOD, süperoksit radikalini ($O_2^{\cdot-}$) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) katalizleyen enzimatik bir antioksidandır. Oluşan oksidan (H_2O_2), katalaz (CAT) veya glutatyon peroksidaz (GPx) ile su ve oksijene (O_2) dönüştürülür. Selenoprotein GPx enzimi, redükte glutatyonun (GSH) okside glutatyonu (GSSG) oksitlenmesini kullanarak H_2O_2 'i $2H_2O$ molekülüne dönüştürerek zararsızlaştırır. Bir flavoprotein enzimi olan glutatyon redüktaz, bir indirgeyici güç kaynağı olan NADPH ile GSSG'den GSH'yi yeniden üretir. GPx, glutatyon'u oksitlerken hidrojen peroksitin yanı sıra lipit veya lipit olmayan hidroperoksitleri de azaltır (Young ve Woodside, 2001; Pacher ve ark., 2007; Genestra, 2007; Halliwell, 2007; Pham-Huy ve ark., 2008).

Enzimatik olmayan antioksidanlar metabolik antioksidanlar ve besin antioksidanları olmak üzere ikiye ayrılmıştır. Lipoik asit, glutatyon, L-arginin, koenzim Q10, melatonin, ürik asit, bilirubin, metal şelatlayıcı proteinler ve transferrin gibi endojen antioksidanlara ait metabolik antioksidanlar vücutta metabolizma tarafından üretilir. Eksojen antioksidanlara ait E vitamini, C vitamini, karotenoidler, iz metaller (selenyum, manganez, çinko), flavonoidler, omega 3 ve omega-6 yağ asitleri gibi besin antioksidanları vücutta üretilemez. Bu yüzden gıdalar veya takviyeler yoluyla temin edilmesi gereken bileşiklerdir (Willcox ve ark., 2006; Pacher ve ark., 2007; Genestra, 2007; Pham-Huy ve ark., 2008).

1.6. Antioksidan Süreci

Bir antioksidan serbest bir radikali yok ettiğinde, bu antioksidanın kendisi oksitlenir. Bu nedenle, antioksidan kaynaklar vücutta sürekli olarak yenilenmelidir. Dolayısıyla, belirli bir sistemde bir antioksidan serbest radikallere karşı etkili iken, diğer sistemlerde aynı antioksidan etkisiz hale gelebilir. Ayrıca, belirli durumlarda, bir antioksidan, toksik ROS/RNS üretebileceği bir ön-oksidan olarak bile hareket edebilir. Antioksidan işlemi, zincir kırma veya engelleme gibi iki yoldan biriyle işlev görebilir. Zincir kırma için, bir radikal bir elektron serbest bıraktığında veya aldığı anda, ikinci bir radikal oluşur. Bir sonraki radikal (sonuncusu) başka bir moleküle aynı etkiyi uygular ve oluşan serbest radikal zincir kırıcı bir antioksidan (C vitamini, E, karotenoidler, vb.) ile stabilize olana veya basit bir şekilde zararsız bir ürüne parçalanana kadar devam eder. Böyle bir zincirleme reaksiyonun klasik örneği lipit peroksidasyondur. Engelleme yolu için, örneğin; süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi bir antioksidan enzim, serbest radikalleri temizleyerek veya bakır ve demir gibi geçiş metali radikallerini sabitleyerek zincir başlatma hızını azaltması ile oksidasyonu önleyebilir (Young ve Woodside, 2001; Halliwell, 2007; Pham-Huy ve ark., 2008).

1.7. Hipertansiyon

Arteriyel kan basıncının (AKB) normal kabul edilen sınırlarının üstüne çıkmasına, sistemik arteriyel hipertansiyon, sistemik hipertansiyon veya hipertansiyon denir. Hipertansif hastalarda, sistolik kan basıncı, diyastolik kan basıncı veya her ikisi beraber yükselmiş olabilir. Sık görülen sistolik kan basıncı, diyastolik kan basıncının beraber yükselmesidir. Hipertansiyon AKB'nin sürekli yüksek oluşu olarak da tanımlanabilir. Heyecanlanma, korku veya egzersizin neden olduğu AKB'ndeki geçici yükselmeler hipertansif hastalık (sistemik arteriyel hipertansif hastalık) olarak kabul edilmez (Brown ve ark., 1998; Özcan, 2001; Aktümsek, 2009).

Kardiyovasküler risk oluşturan en önemli risk faktörleri, hipertansiyon, total kolesterol veya LDL kolesterol düzeyi yüksekliği, düşük HDL kolesterol düzeyleri, diabetes melitus, aile öyküsü (genetik), tütün kullanımı, yaşın ilerlemesi, erkek cinsiyetten olmak, obezite, menapoz ve fiziksel inaktivitedir. Kardiyovasküler risk

araştırılması ve tedavisi, hipertansif hastaların tedavisinde anahtar noktadır. Herhangi bir düzeyde hipertansiyonu olan hastalarda, kardiyovasküler risk oranı, hedef organ hasarı olanlarda artar (Brown ve ark., 1998; Özcan, 2001; Aktümsek, 2009).

Hipertansiyon, kişiler ve toplumlar için çok önemli bir hastalıktır. Araştırma çalışmaları, tedavi edilmeyen hipertansiyonun, kalp yetersizliğini, koroner kalp hastalığını, hemorajik ve trombotik inmeyi, böbrek yetersizliğini, periferik arter hastalıklarını, aort diseksiyonunu ve ölüm oranını artırdığını açıkça göstermektedir. hipertansiyonun bu komplikasyonları, devamlı tedavi ve kontrol altında tutulan hastalarda, önemli derecede azalmasına rağmen; tedavi edilen hastalarda bile, yaşın artmasıyla birlikte komplikasyonlarda artmaktadır (Özcan, 2001; Aktümsek, 2009).

Hipertansiyon hastalığının ilk tedavisinde önerilen beş ilaç sınıfı, anjiotensin konverting enzim (ACE) inhibitörleri, anjiotensin reseptör blokerleri, β -blokerler, kalsiyum kanal blokerleri ve diüretik ajanlardır (Hackam ve ark., 2013). Hipertansiyonlu hastaların ilaçla tedavisi sayesinde tansiyon düşürülerek oluşabilecek hasarların engellenmesine çalışılır. Bu ilaçlardan ACE inhibitörleri kuvvetli vazokonstriktör olan anjiotensin II oluşumunu engelleyerek kan damarlarının genişlemesini sağlar. Anjiotensin reseptör blokerleri, anjiotensin reseptörlerinin Anjiotensin II tip 1 (AT1) alt tipini seçici olarak bloke ederek, anjiotensin II isimli polipeptidin bağlanmasını engeller ve vazodilatasyona neden olur. Diüretikler kan hacmini azaltarak kan basıncının düşmesini sağlayan bileşiklerdir. Beta blokerler renin salgılanmasını inhibe ederek ve kalp kasının kasılma hızını düşürerek etkili olan ilaçlardır. Kalsiyum kanal blokerleri ise damar düz kas hücrelerine kalsiyum girişini yavaşlatarak yüksek kan basıncını düşürürler. Bu bileşikler arasında bulunan diüretiklerin etkisi oldukça hızlıdır (Aktümsek, 2009; Hackam ve ark., 2013).

1.8. Hipertansiyon Üzerine Antioksidan Bileşiklerin Etkisi

Hipertansiyon patolojisinin çeşitli işlemlerinde, oksidatif stres yaygın bir hasar sistemidir ve ROS üretimi ile vücuttaki antioksidan savunma arasında dengesizlik olduğunda ortaya çıkar. Kan basıncı ile oksidatif strese bağlı bazı parametreler arasında güçlü bir ilişki vardır. ROS-üreten enzimlerdeki genetik eksiklikler, rasgele tipteki benzerleri ile karşılaştırıldığında kan basıncının daha düşük olduğu gözlemlenmiştir.

Ayrıca, hipertansif insanlardan ve hayvanlardan izole edilmiş arterlerde; antioksidan biyoaktivite azalır, redoks bağımlı sinyalleşme güçlendirilir ve ROS üretimi arttırılır. Anjiotensin I konverting enzim inhibitörleri, anjiotensin-II reseptör antagonistleri, β -adrenerejik ve kalsiyum kanal blokerleri gibi antihipertansif ajanların faydalı etkilerine, vasküler oksidatif stresi azaltılarak aracılık edilebilir (Touyz ve Schiffrin, 2001; Gavazzi ve ark., 2006; Baradaran ve ark., 2014).

Antioksidanlar, ROS'u tutabilen ve bu nedenle oksidatif hasarı ve muhtemelen kan basıncını azaltabilen bileşiklerdir. Antioksidanlar, serbest radikal ara maddeleri uzaklaştırarak ROS'un zincir reaksiyonlarını sonlandırır ve diğer oksidasyon reaksiyonlarını inhibe eder. Bunu kendi kendilerini okside ederek yaparlar, bu nedenle antioksidanlar sıklıkla C vitamini (askorbik asit), E vitamini veya farklı mekanizmalar tarafından oluşan polifenoller gibi indirgen maddelerdir. Oksidatif stres ve arteriyel hipertansiyon arasında bir korelasyon olabilir. Bu durum, kan basıncını düşürmek için eksojen antioksidanların kullanılmasına yol açmıştır (Rodrigo ve ark., 2011; Montezano ve Touyz, 2012; Baradaran ve ark., 2014).

Antioksidanlar C ve E vitaminleri ve diğer antioksidanlar, oksidatif stresi azaltmak ve böylece kan basıncını düşürmek için olası bir tedavi olarak kabul edilmiştir. Ek olarak, C ve E vitaminleri, vasküler duvarda ROS'un ana kaynağı olan NADPH oksidazı aşağı doğru düzenlerken, kan basıncını düşüren nitrik oksit sentazı yukarı doğru düzenler. Örneğin; randomize bir çift kör klinik çalışmada, C ve E vitaminlerinin deneklere takviyesi ile hem hipertansiyonun tedavi edildiği hem de antioksidan durumunun arttırıldığı rapor edilmiştir. Aynı zamanda C vitamini, E vitamini, beta karoten ve çinko karışımının takviyesi sistolik kan basıncında önemli bir düşüşle sonuçlanmıştır. Meyve ve sebze yönünden zengin diyetler, hipertansif ve normotansif hastalarda kan basıncını düşürür. Diyetteki modifikasyon, serum antioksidan kapasitesinde bir artışa ve oksidatif stresin azaldığını gösteren, *in vitro* bir lipid peroksidasyon belirteci olan malondialdehitte bir azalmaya neden olur. Bir çalışmada, hipertansif bireylerin diyetinde 6 ay boyunca meyve ve sebze alımının artması ile kan antioksidan kapasitesinin artması ve sistolik ve diyastolik kan basıncının düşmesi gözlemlenmiştir. Bu nedenle, antioksidan tedavi vasküler hasarı ve hipertansiyonu önlemenin ideal bir yolu olabilir (Rodrigo ve ark., 2008; Briones ve Touyz, 2010; Ardalán ve Rafieian-Kopaie, 2014).

1.9. Oksidatif Fosforilasyon

Pentoz fosfat yolunda NADPH, glikoliz, yağ asitleri oksidasyonu ve sitrik asit devrinde ise NADH ve FADH₂ üretilir. Oluşan NADH ve FADH₂ enerjice zengin moleküllerdir. Çünkü her biri yüksek indirgeme potansiyeline sahip olan bir elektron çifti ihtiva eder. Bu elektronlar O₂' ye aktarıldığı zaman büyük miktarda enerji salınır ($\Delta G^0 = -2 \times 23,062 \times 1,14 = -52,6$ kcal/mol). Bu enerjinin ATP sentezinde kullanılabilmesi için bir defa da değil de, yavaş yavaş salınması gerekir. İşte NADH ve FADH₂'den elektronların O₂' ye transferlerinin bir seri elektron taşıyıcıları vasıtasıyla gerçekleşmesi yavaş salınmayı sağlar. Bu şekilde ATP'nin sentezlendiği olaya oksidatif fosforilasyon adı verilir. Aerobik organizmalarda ATP'nin en önemli kaynağı budur. Mesela glukozun CO₂ ve H₂O'ya oksidasyonunda elde edilen 36 ATP'den 32'si oksidatif fosforilasyonla sağlanır (Gözükara, 1997; Nelson ve Cox, 2000; Keha ve Küfrevioğlu, 2012).

Oksidatif fosforilasyon mitokondri iç membranında yer alan bir solunum zinciri (elektron transport sistemi [ETZ]) tarafından yürütülür. Oluşan NADH ve FADH₂' nin önemli bir kısmını sağlayan trikarboksilik (TCA) devri ve yağ asitlerinin oksidasyonu mitokondri iç membranına bitişik olan matriks sıvısında gerçekleşir. Çok çeşitli olan elektron taşıma gruplarının hepsi de proteinlerle birleşmiş vaziyettedir. Elektron transport zincirinde proteinlerin dışında aşağıdaki moleküller bulunmaktadır. Çeşitli dehidrogenazlarla aktif olarak çalışan bileşikler arasında nikotinamid adenin dinükleotid (NAD), flavin mononükleotid (FMN), lipid çözünebilir izoprenoid yapısındaki koenzim Q, iki farklı demir sülfür ihtiva eden demir-sülfür merkezi (Fe-S), yapısında hem grubu bulunan sitokromlar ve yapısında bakır (Cu⁺²) ihtiva eden sitokrom oksidaz bulunmaktadır (Gözükara, 1997; Smith ve ark., 2007; Keha ve Küfrevioğlu, 2012).

Diğer önemli nokta da bütün elektron taşıyan proteinler suda çözünür olmayıp mitokondri iç membranına gömülmüş vaziyette bulunmaktadır. Bilindiği gibi elektron transport zincirinin başında NADH bulunmakta daha sonra FMN, bunu koenzim Q ve sitokromlar takip etmektedir (Nelson ve Cox, 2000; Smith ve ark., 2007; Keha ve Küfrevioğlu, 2012).

NADH'ın oksidasyonu 3 ATP, FADH₂'nin ki ise, 2 ATP verir. Oksidasyon ve fosforilasyon beraber yürüyen mekanizmalardır.

Solunum zinciri aralarında protein yapısındaki sitokromların da bulunduğu birçok çeşit elektron taşıyıcılarından ibarettir. Aynı zamanda, redoks merkezleri şeklinde de tanımlanabilen bu elektron taşıyıcıları artan indirgenme potansiyeline göre sıralanmıştır. NADH veya FADH₂'den elektronların O₂'ye taşıyıcılar tarafından basamak basamak transferi esnasında mitokondri matriksi dışına protonlar pompalanır ve bir membran potansiyelinin oluşmasına yol açar (proton-motif kuvvet) (Nelson ve Cox, 2000; Smith ve ark., 2007).

Protonlar, üç çeşit elektron transfer kompleksi tarafından pompalanır. Bu protonların bir enzim kompleksi içinden mitokondri matriksine geri akışı esnasında da ATP sentezlenir. Yani, oksidasyon ve fosforilasyon olayları, iç mitokondri membranı üzerindeki bir proton gradienti ile bağlantılıdır. Solunum zinciri enzim ve proteinleri iç mitokondri membranının integral proteinleridir. Dış membranının birçok küçük molekül ve iyonlara karşı geçirgen olmasına karşılık, mitokondri iç membranı hemen hemen bütün iyonları ve yüksüz moleküllerin çoğunu geçirmez. ADP ve uzun zincirli yağ asitleri gibi bazı molekül ve iyonların matrikse taşınması iç mitokondri membranında bulunan spesifik protein yapısında taşıyıcılar aracılığıyla gerçekleşir (Gözükara, 1997; Nelson ve Cox, 2000; Smith ve ark., 2007).

1.10 Elektron Transport Zinciri (ETZ)

Elektronlar NADH' tan O₂'ye, flavinlerden, hem gruplarından, Fe-S protein komplekslerinden, kinonlardan ibaret elektron taşıyıcıları tarafından aktarılır. Kinonların dışında bu elektron taşıyıcılarının tamamı proteinlerin prostetik gruplarıdır. İlk reaksiyon NADH'ın NADH dehidrogenaz (veya NADH-Q redüktaz) multienzim kompleksi tarafından yükseltgenmesidir. Bu kompleks bakterilerde en az 16, ökaryotlarda 43 polipeptid zincirinden ibarettir. NADH'dan iki elektron enzimin prostetik grubu olan flavin mononükleotid (FMN)'e aktarılarak FMNH₂'ye indirgenir (Gözükara, 1997; Nelson ve Cox, 2000; Keha ve Küfrevioğlu, 2012).

Koenzim Q (CoQ) uzun bir izopren zinciri takılı bir kinon türevidir olup, ubikinon adı da verilir. İzopren birimlerinin sayısı türden türe değişir. Memelilerde en bol bulunanı n=10 izopren birimine sahiptir ve CoQ₁₀ olarak gösterilir (Gözükara, 1997; Keha ve Küfrevioğlu, 2012).

Süksinat dehidrogenaz enzimi tarafından sitrik asit devrinde, süksinatın fumarata yükseltgenmesiyle, FADH₂'nin oluştuğunu biliyoruz. Bu enzim süksinat-CoQ redüktaz enzim kompleksinin bir bileşeni olup, diğeri bileşeni de 3 adet Fe-S merkezine sahip olan bir proteindir. Bu kompleks de NADH dehidrogenaz gibi iç mitokondri membranının integral proteindir. FADH₂'deki yüksek potansiyele sahip elektronlar kompleksteki FeS merkezlerine ve oradan da solunum zincirindeki CoQ'ya aktarılır (Gözükara, 1997; Nelson ve Cox, 2000; Smith ve ark., 2007; Keha ve Küfrevioğlu, 2012).

1.11. Koenzimler

Pek çok enzimatik reaksiyonda bazı elementler katalitik faaliyetini gösterebilmek için substratı yanında koenzim denen bazı organik moleküllere ihtiyaç duymaktadır. Bu tip enzimler koenzimleri olmadan reaksiyonlarını gerçekleştiremez. Bazen koenzim enzim yüzeyine sıkıca bağlanmıştır. O zaman prostetik grup adını almaktadır. Normal olarak koenzimler enzim molekülünden sefalon tüplerde yapılan diyaliz ile ayrılmaktadır. Diyaliz esnasında proteinler büyük moleküller olduğundan diyaliz tüpünden dışarı çıkamamakta fakat koenzimler kolaylıkla bu tüpten dışarı çıkmakta ve dolayısıyla enzimden ayrılmaktadır (Nelson ve Cox, 2000; Smith ve ark., 2007; Keha ve Küfrevioğlu, 2012).

Koenzimler, genellikle bir atom veya atom grubu için akseptör veya donör rolü oynayarak bu grupları küçük substrat molekülünden alarak veya ilave ederek, grup transferlerinde izomerizasyon reaksiyonlarında, oksidoredüksiyon reaksiyonlarının başarılmasında önemli rol oynamaktadırlar. Bir substrat ve koenzimi enzimatik reaksiyonlarda birbirinden ayırmak ve açık bir tarif yapmak bazen oldukça zordur. Çünkü bir reaksiyon esnasında hem substrat hem de koenzim kimyasal yapı bakımından değişikliğe uğramaktadır. Yegane ayırıcı özellik olarak substratlar sonraki reaksiyon basamaklarında daha fazla değişikliğe uğrarken koenzimler tekrar eski hallerine dönüşmektedir. Örneğin glukoz anaerobik koşullarda bir sıra değişikliğe uğrayarak laktik asite kadar değişirken mikotianamdi adenin dinükleotid ancak okside (NAD⁺) ve redükte (NADH) hale dönüşmekte ve daha fazla bir değişikliğe uğramadan kalmaktadır. Yani koenzimler enzimatik reaksiyonda geçici bir değişikliğe uğramaktadır. Fakat bir

sonraki basamakta tekrar eski hallerine dönüşmektedirler. (Gözükara, 1997; Nelson ve Cox, 2000; Keha ve Küfrevioğlu, 2012).

Koenzimler ile vitaminler arasında büyük bir ilişki vardır. Bazı koenzimlerin yapılarının büyük bir kısmı vitaminlerden meydana gelmiştir. Örneğin thiaminin yapısında B₁ vitamini, flavin mononükleotid (FMN) ve flavin adenin dinükleotidin (FAD) yapısında B₂ vitamini, piridin nükleotidlerin yapısında niasin, kobalaminin yapısında ise B₁₂ vitamini bulunmaktadır. Bazı hallerde vitamin eksikliğine bağlı olarak koenzim eksikliği gözlenir ve enzimatik reaksiyon başarısızdır. Dolayısıyla ile metabolizmanın işleyişinde aksaklıklar gözlenir. O halde metabolik olayların düzenli bir şekilde yürütülmesi için esansiyel vitaminlere ihtiyaç vardır. (Gözükara, 1997; Nelson ve Cox, 2000; Smith ve ark., 2007).

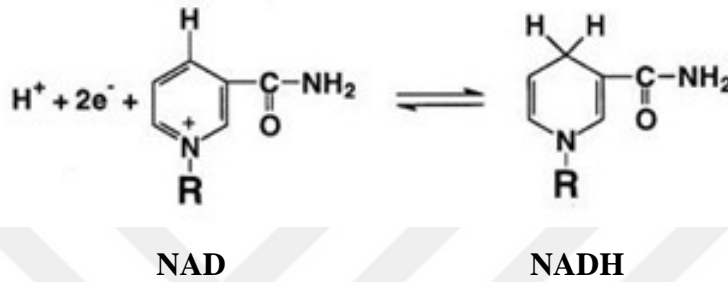
1.12. Nikotinamid adenin dinükleotit (NAD) ve Flavın adenin dinükleotit (FAD)

Hem FAD hem NAD⁺ elektron alan koenzimlerdir. Bazı tepkimelerde FAD kullanılırken bazılarında ise NAD⁺ kullanılmaktadır. Bunların özgün çâtsal nitelikleri FAD ve NAD⁺'ın farklı tipte tepkimelerde bir elektron alıcısı olarak davranmasını ve hücrede farklı fizyolojik roller oynamasını sağlar. FAD tek elektronları (H) kabul edebilmekte ve yarı indirgenmiş tek elektronlu ara ürünleri yapabilmektedir. Yani bu madde, çift bağ (örneğin, süksinatın fumarata) ve disülfid bağı (örneğin; α -ketoglutaratdehidrogenaz tepkimesinde lipoatın lipoat disülfide) oluşmasında görülen, tek elektronların iki farklı atomun birbirlerinden bağımsız olarak aktarıldığı tepkimelere katılmaktadır. (Gözükara, 1997; Smith ve ark., 2007; Keha ve Küfrevioğlu, 2012).

NAD⁺, bir elektron çiftini, artı yüklü piridin halkasının karşı yanındaki karbon tarafından kendisine çekilen bir hidrid iyonu (H⁻) şeklinde kabul etmektedir. Bu olay örneğin alkollerin malat dehidrogenaz izositrat dehidrogenaz tarafından ketonlara oksidasyonunda görülür. Nikotinamid halkası C-H bağından gelen bir hidrid iyonunu kabul eder ve alkolik hidrojen ortama artı yüklü bir proton, yani H⁺ halinde salınır (Nelson ve Cox, 2000; Smith ve ark., 2007).

NADH enerji metabolizmasını dengelemede düzenleyici bir role sahip olup enzimine bağı kalmasından dolayı FADH₂ bu tip bir rol oynayamaz. Serbest NAD⁺ bir dehidrogenaza bağlanır ve NADH'a indirgenir, bu ise daha sonra ortama salınır ve

farklı bir dehidrogenaza bağlanabilir ve bunu inhibe edebilir. Sonuç olarak, oksidatif enzimler NADH/NAD⁺ oranı tarafından denetlenir ve elektron taşıma zincirinde tekrar okside edilebildiği bir hızdan daha hızlı şekilde NADH üretmez. TCA döngüsü ve yakıt oksidasyonunun diğer yollarının NADH/NAD⁺ tarafından düzenlenmesi, yakıt oksidasyon hızının ATP tüketim hızı ile koordine edilmesini sağlayan mekanizmanın bir bölümünü oluşturmaktadır (Gözükara, 1997; Smith ve ark., 2007).



Şekil 1.2. Okside NAD ve redükte NADH bileşiklerinin reaksiyonu.

Piridin-3-karboksilik asitte nikotinik asit adı verilir. Nikotinamid ise nikotinik asidin amididir. Nikotinamid ve nikotinik asitin her ikisinde vitamin etkisi gösterirler. (Nelson ve Cox, 2000; Smith ve ark., 2007).

Nikotinik asit suda az, alkalide ve alkolde daha çok çözünür. Isıya dayanıklıdır. Nikotinamid, dokularda nikotinamid adenin dinukleotid (NAD⁺) ve Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADP⁺) şeklinde bulunur. NAD⁺ ve NADP⁺ çok sayıda oksidoredüktazların (Dehidrogenazlar) koenzimidirler. Dehidrogenazlarda koenzim olarak bulunan NAD⁺ ve NADP⁺ nin hidrojen alıp veren kısmı nikotinamid bölümüdür (Smith ve ark., 2007; Keha ve Küfrevioğlu, 2012).

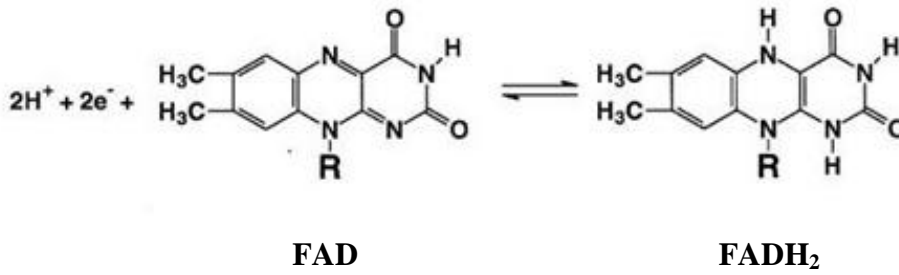
Nikotinik asit ve nikotinamid bağırsaklardan emildikten sonra kan plazmasında görünürler ve bütün organlarda ve dokularda NAD⁺ ve NADP⁺ sentezi için kullanılabilirler. Yüksek nikotinik asit dozlarının kolesterin sentezini önleyici (kan kolesterol seviyesini azaltıcı) etkisi henüz açıklanmamıştır. (Gözükara, 1997; Nelson ve Cox, 2000; Smith ve ark., 2007).

NAD⁺ ve NADP⁺ ye piridin nükleotidlerde denilmektedir. Bu nükleotidler piridine bağımlı dehidrogenaz sınıfından oksidoredüktaz enzimlerinin koenzimi olarak fonksiyon görürler. Bu koenzimler enzimin katalitik işlem sırasında enzimin protein

kısmına nispeten zayıf bağlarla bağlanmıştır ve enzime has substrattan hidrojen uzaklaştırılması esnasında elektron alıcısı rolünü oynarlar. (Gözükara, 1997; Nelson ve Cox, 2000; Keha ve Küfrevioğlu, 2012).

Bu reaksiyonlarda substrat üzerindeki hidrojen atomlarından birisi doğrudan koenzimin okside şeklinin nikotinamid kısmına (NAD^+ veya NADP^+ ye) aktarılırken, diğeri H^+ iyonu halinde çözeltiye geçer. Buna örnek TCA'daki (sitrik asit devri) Malat dehidrogenaz enzimi verilebilir. (Gözükara, 1997; Nelson ve Cox, 2000; Smith ve ark., 2007).

Flavin adenin dinükleotidin (FAD) serbest radikal, tek-elektron biçimleri aşırı tepkicidir ve FADH , suyla temas etme veya zincir tepkimelerinin başlaması ile elektronlarını kaybedebilir. Sonuç olarak FAD'ın elektronları alır veya enzime bağlı bir diğer gruba aktarırken kendisine ait enzime çok sıkı ve bazen kovalent olarak bağlı kalması zorunludur. FAD'ın aktif noktadaki aminoasit yan zincirleri üzerindeki birçok işlevsel grupla etkileşmesi nedeniyle enzime bağlı FAD'a ait E^0 ileri derecede değişkendir ve NAD^+ 'a ait olandan daha büyük veya daha küçük olabilir. Bunun aksine, NAD^+ ve NADH koenzim olmaktan ziyade substrat ve üründür (Gözükara, 1997; Nelson ve Cox, 2000; Smith ve ark., 2007; Keha ve Küfrevioğlu, 2012).



Şekil 1.3. Okside FAD ve redükte FADH_2 bileşiklerinin reaksiyonu.

Flavinlerin tanınmasına ait ilk çalışmalar 1879 yıllarında Blyth tarafından başlatılmış ve daha çok saf olmayan riboflavin türevleri üzerinde olmuştur. Hayvan dokularından, yumurtadan ve süttten izole edilen yeşil pigmentin riboflavin ile aynı bileşik olduğu kabul edilmektedir. Riboflavin süttten ilk defa izole edildiği zaman laktoflavin adı verilmiş fakat daha sonra bu ad riboflavine dönüşmüştür. Riboflavin köpek ve diğer memeliler için bir büyüme faktörü olarak bulunmuştur. Riboflavin bütün

bitkiler ve pek çok mikroorganizma tarafından sentez edilmekte fakat memeliler tarafından sentez edilmesi mümkün değildir. (Gözükara, 1997; Smith ve ark., 2007).

Yeşil flavin pigmentinin koenzim olarak görev yaptığı belirlenmiştir. Daha sonraları oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarına karışan bileşiğin flavin mononükleotid (FMN) olduğu ortaya çıkarılmıştır. Warburg 1938 yılında bir kısmı flavinden meydana gelmiş olan flavin adenin dinükleotidi (FAD) keşfetmiştir. Riboflavin memeliler için besinsel bir faktör olduğu belirlenmiş ve B₂ vitamini olarak adlandırılmıştır. (Gözükara, 1997; Smith ve ark., 2007).

Riboflavin, Flavin-mononükleotid (FMN) veya Flavin-adenin-dinükleotid (FAD) şeklinde prostetik grup olarak çok sayıda enzimde bulunur. Bu enzimler oksidasyon ile görevli enzimlerdir. Retinada riboflavin miktarının yüksek olması, bu vitaminin görme olayına katıldığı şüphesini uyandırmakta ise de henüz ispatlanmamıştır. (Gözükara, 1997; Nelson ve Cox, 2000).

Riboflavin, izoalloksazin halkası ve bir şeker alkol olan ribitoldan meydana gelmiştir. Riboflavinin son hidroksil grubuna bir fosfat grubunun bağlanması ile flavin mononükleotid (FMN) ve bu hidroksil grubuna iki fosfat, bir riboz şekeri ve bir adenin grubunun bağlanması ile de flavin adenin dinükleotid (FAD) meydana gelmektedir. (Gözükara, 1997; Nelson ve Cox, 2000; Smith ve ark., 2007).

Flavin nükleotidler oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerde prostetik grup olarak rol oynarlar. Bu enzimlere flavo enzimler veya flavoproteinler adı verilmektedir. Bu enzimler piruvatın, yağ asitlerinin ve aminoasitlerin oksidatif degradasyonunda rol oynadıkları gibi, elektron transport zincirinde de rol oynarlar. Flavo proteinler daha kuvvetli elektron akseptörü olduklarından elektronları piridin nükleotidlerden çok kolaylıkla almaktadırlar. Flavin nükleotidler, flavo enzimlere kuvvetlice kovalent olmayan bir şekilde bağlanmaktadır. (Gözükara, 1997; Nelson ve Cox, 2000; Smith ve ark., 2007; Keha ve Küfrevioğlu, 2012).

Flavonükleotidler, flavoprotein katalitik etkisi sırasında riboflavinin yapısı olan izoalloksazin halkasının dönüşümlü bir indirgenmesine maruz kalırlar, bu sırada FMNH₂ ve FADH₂ ile adlandırılan indirgenmiş nükleotidler meydana gelir. (Gözükara, 1997; Smith ve ark., 2007).

Flavin koenzimler dehidrogenasyon yapan enzimlerle reaksiyona katılırlar. İzoalloksazin halkasının 1 ve 5 nolu azotuna elektron ve protonlar katılmakta çift bağlar açılmakta ve flavin koenzimler redükte hale gelmektedir. Daha sonraları kuvvetli bir elektron akseptörü tarafından elektronlar alındığı zaman flavin koenzimler okside hale gelmektedir. (Gözükara, 1997; Nelson ve Cox, 2000; Smith ve ark., 2007;).





2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ

Nakajima ve ark. yaptığı bir çalışmada, anjiotensin I konverting (dönüştürücü) enzim (ACE, peptidil dipeptid hidrolaz) domuz akciğerinden saflaştırılmıştır. Enzimin sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezindeki moleküler ağırlığı 206 kDa olarak belirlenmiştir. İzoelektrik odaklamada pI 4.3 olarak bulunmuştur. Benzoil-Gly-Gly-Gly ve bradikinin bileşikler saflaştırılan ACE ile hidrolizlenmiştir. ACE yüksek miktarda üre ve nonapeptid SQ 20881 ile inhibe edilmiştir. Her iki bileşik, suda çözünmeyen sepharose dönüştürücü enzim kompleksi ile yapılan çalışmalarda gösterildiği gibi tersinir olarak ACE'yi inhibe etmiştir. Bir Sephadex G-200 kolonunda jel filtrasyonundan sonra iki ilave dönüştürücü enzim formu tespit edilmiştir (Nakajima ve ark., 1973).

Başka bir çalışmada, insan akciğerinin membran fraksiyonundan ve karşılaştırma için insan ve domuz böbreğinden ACE (peptidil-dipeptidaz, EC 3.4.15.1) homojenliğe kadar saflaştırılmıştır. Membran bağlı akciğer enzimi % 19 verimle 1800 kat ve böbrek enzimi % 10 verimle 640 kat saflaştırılmıştır. Bz-Gly-His-Leu ile spesifik aktiviteler akciğer enzimi için 81 ve böbrek enzimi için 65 $\mu\text{mol/dak/mg}$ olarak hesaplanmıştır. Akciğer enziminin molekül ağırlığı 155 kDa olarak bulunmuştur. Akciğer veya böbrek enzimine karşı ortaya çıkan antikorlar, diğer organdan gelen enzimlerle çapraz reaksiyona girmiştir ancak domuz enzimi ile reaksiyona girmemiştir. İzoelektrik odaklamada her iki insan enzimi pI=5.2'lik bir izoelektrik noktasına sahip olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda akciğer preparatı, neuraminidaz tedavisi ile elimine edilen daha fazla asidik form (pI=4-5) içermektedir. Akciğer ve böbrek ACE enzimleri bradikinin, anjiotensin I ve enkefalinleri hidrolizlemiştir ve benzer kinetik sabitleri olduğu belirlenmiştir. K_{kat}/K_M değeri ile bradikinin en iyi substrat olarak bulunmuş ancak enkefalin bileşiğinin en yüksek turnover sayısına sahip olduğu gözlemlenmiştir. Benzoil-Gly-His-Leu bileşiğinin hidrolizi, kaptopril (SQ 14225) ile kompetitif olarak ve Benzoil-Phe-Gly-Pro'nun non-peptid bir türevi olan Keto-ACE ile nonkompetitif olarak inhibe edilmiştir (Stewart ve ark., 1981).

Strittmatter ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, ACE rat beyin korpus striatumundan ve akciğerinden saflaştırılmıştır. Beyin enzimi molekül ağırlığı SDS

elektroforezi ile 165.000 Da bulunurken akciğer enzimi molekül ağırlığı 175.000 Da olarak bulunmuştur. Ters fazlı kromatografi ile ¹²⁵I-etiketli akciğer ve beyin ACE'nin triptik fragmantlerinin bölünmesi ile ayrı ama benzer maddeler görülmüştür. Sükroz gradient sedimentasyon ve jel filtrasyonu yöntemleri ile iki dokudan ACE'nin dansil tripeptid bölünme spesifitesi, inhibitör profili, immünolojik özellikleri belirlenmiştir ve nativ enzimler arasında fark olmadığı gözlemlenmiştir. Ancak akciğer ve beyin ACE'leri arasında amit peptidlerini ayırma açısından farklılık olabilir. (Strittmatter ve ark., 1985).

Anjiotensin konverting enzim (ACE), yetişkin ev sineklerinden (*Musca domestica*) lisinopril-sepharose afinite kolon kromatografisiyle saflaştırılmıştır ve molekül ağırlığı 67 kDa olarak bulunmuştur. Benzoil-Gly-His-Leu bileşiğine karşı dipeptidil karboksipeptidaz aktivitesi, iki ACE inhibitörü olan kaptopril (IC₅₀=50 nM) ve fosinoprilat (IC₅₀=251 nM) ile inhibe edilmiştir ve Cl⁻ (optimum Cl⁻ konsantrasyonu 600 mM) ile aktive edilmiştir. *Musca domestica* ACE, anjiotensin I, bradikinin [Leu5] enkefalin ve [Met5] enkefalinden C-terminal dipeptitlerini çıkarmıştır ve ayrıca [Leu5] enkefalinamid ve [met5] enkefalinamidden dipeptidamidleri ve substans P'den bir dipeptidamid ve bir tripeptidamidi hidrolizleyerek bir endopeptidaz olarak görev yapmıştır. *Musca domestica* ACE bir C-terminal hidrolizine baskın olarak, hem N terminalinde hem de luteinize edici hormon salgılayan hormonun C terminalinde bir tripeptiti parçalayabilmiştir. Maksimum N-terminal tripeptidaz aktivitesi, 150 mM NaCl konsantrasyonunda gerçekleşirken, C-terminal tripeptidaz aktivitesi, artan Cl⁻ (0-0,5 M) konsantrasyonuyla yükselmeye devam etmiştir. *Musca* ACE, ACE'nin substrat spesifitesinin gelişimi ve bunun Cl⁻'ye cevabını yüksek derecede korumasına işaret ederek, insan ACE enziminin hem N hem de C domainlerinin (alanlarının) özelliklerini gösterir (Lamango ve ark., 1996).

Anjiotensin konverting enzim domuz serumundan afinite kromatografisi ile epoxy-activated sepharose 6B kolon dolgu maddesi kullanılarak birkaç basamakta yüksek verimle saflaştırılmıştır. Anyon değişim kromatografisinin iki basamağı farklı pH'larda (pH 9.0 ve pH 6.0) gerçekleştirilmiştir. FAPGG için K_M = 0.793±0.052 mM ve K_{kat} = 5830 s⁻¹ olarak hesaplanmıştır. İki spesifik ACE enzimi inhibitörü kaptopril ve lisinopril için IC₅₀ değerleri sırasıyla 5.7±0.67 nM ve 1.0±0.29 nM olarak bulunmuştur (Quassinti ve ark., 1998).

Lisinopril - afinite kromatografisi ile köpek testislerinden ACE saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Deterjanla ekstrakte edilmiş köpek testisleri, proteaz inhibitörleri varlığında parçalanmış ve ACE inhibitörü olan lisinopril ile afinite kolonuna yüklenmiştir. Başlangıç testis ekstraktlarındaki ACE spesifik aktivitesi 3.53 ± 0.99 mU mg^{-1} protein, lisinopril afinite kromatografisi sonrası ACE'nin spesifik aktivitesi 4239 ± 2600 mU mg^{-1} protein olarak bulunmuş ve ACE 1588 kat saflaştırılmıştır. Lisinopril afinite kromatografisinden sonra ACE enziminin geri kazanım verimliliği % 71.2 olarak belirlenmiştir. Deterjan ekstraktlarındaki ve saflaştırılan fraksiyonlardaki ACE enzim aktivitesi, spesifik bir ACE inhibitörü olan $10 \mu\text{M}$ kaptopril ile önemli ölçüde inhibe edilmiştir. ACE aktivitesi Zn^{+2} (5.28 ± 0.70 mU mg^{-1}) ile tamamen geri kazanılmıştır. ACE molekül ağırlığı 65-70 kDa'luk bir protein olarak tanımlanmıştır. Köpek testislerinde bulunan anjiotensin konverting enzim aktivitesi kaptopril ve EDTA ile inhibe edilirken N-etilmaleimit ve çinko ile yeniden aktivite kazandığı belirlenmiştir (Sabeur ve ark., 2001).

Anjiotensin konverting enzim Concanavalin-A Sepharose 4B ve Lisinopril Sepharose 6B afinite kromatografisi kullanılarak iki basamakta domuz akciğerinden 530 kat saflaştırılmıştır. ACE'nin molekül ağırlığı SDS-PAGE ile 170 kDa olarak belirlenmiştir. Aynı saflaştırma şeması, enzimin aktif bölgesinde bulunan çinko (Zn^{+2}) iyonunun kobalt iyonu (Kobalt-ACE) ile yer değiştirmesini sağlamak için kullanılmıştır. Kobalt-ACE görünür spektrumu 500 nm'den 600 nm'ye karakteristik geniş bir pik gösterir. Bu piklerin şekil ve maksimum absorptivitesi, katalitik bölgeye bağlı olan ACE inhibitörleri ile değişmektedir (Andújar Sánchez ve ark., 2003).

Anjiotensin konverting enzim kurbağa yumurtalıklarından afinite kromatografisi yöntemiyle saflaştırılmıştır. Kolon dolgu maddesi olarak Sepharose 6B ve ligand olarak lisinopril kullanılmıştır. Kurbağa yumurtası deterjan ve tripsin ile ekstrakte edilerek saflaştırılmıştır. Hem deterjanla ekstrakte edilen hem de tripsin ile ekstrakte edilen ACE için molekül ağırlığı 150 kDa olarak belirlenmiştir. Optimum pH aralığı 7-8.5 ve optimum sıcaklık 50°C olarak bulunmuştur. FAPGG için K_M ve K_{kat} değerleri sırasıyla 0.608 ± 0.07 mM ve 249 s^{-1} olarak hesaplanmıştır. ACE'nin iki spesifik inhibitörü olan kaptopril ve lisinopril için IC_{50} değerleri sırasıyla 68 ± 12.55 nM ve 6.763 ± 0.66 nM olarak belirlenmiştir (Miano ve ark., 2003).

ACE domuz akciğerinden homojenat hazırlanarak çok aşamalı bir prosedürle saflaştırılmıştır. % 23.6 verimle saflaştırılan ACE'inin, spesifik aktivitesi 37 U mg^{-1} , saflaştırma faktörü 308 olarak bulunmuştur. Saflaştırılan ACE sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ve nativ-PAGE ile karakterize edilmiştir. Saflaştırılan glikozillenmiş ACE'inin monomer boyutu SDS-PAGE ile 175 kDa, yeni bir aktivite boyama protokolü kullanılarak dimerik formu ise nativ-PAGE ile 330 kDa olarak bulunmuştur (Eisele ve ark., 2012).

Anjiotensin konverting enzim (ACE) devekuşu (*Struthio camelus*) akciğerinden saflaştırılmış ve biyokimyasal karakterizasyonu yapılmıştır. Saflaştırılmış enzimin moleküler ağırlığı yaklaşık 200 kDa olarak bulunmuştur ve maksimum enzim aktivitesi pH 7.5'te gözlenmiştir. Enzim aktivitesi % 0.01, Triton X-100, 0.1 ve 1 mM setiltrimetilamonyum bromür (CTAB) ve 0.1 mM sodyum dodesil sülfat (SDS) deterjanları ile arttırılırken, % 1 ve % 10 Triton X-100 ve 1 mM ve 10 mM SDS konsantrasyonları ile azalmıştır. ACE'nin ikincil ve üçüncül yapısı ve aktivitesi, trifloroetanol (TFE) yokluğunda ve varlığında, sırasıyla dairesel dikroizm, floresan söndürme ve UV-görünür spektroskopisi kullanılarak incelenmiştir. Sonuçlar, TFE'nin ACE'yi düşük konsantrasyonlarda stabilize ettiğini, aynı zamanda daha yüksek konsantrasyonda (% 20) denatürant olarak görev yaptığını ortaya çıkarmıştır. Devekuşu ACE'nin FAPGG'ye karşı K_M , K_{kat} ve K_{kat}/K_M değerleri sırasıyla $0.8 \times 10^{-4} \text{ M}$, 59.240 dk^{-1} ve $74 \times 10^7 \text{ dk}^{-1} \text{ M}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Kaptopril için IC_{50} ve K_i değerleri sırasıyla 36.5 nM ve 16.6 nM olarak belirlenmiştir (Mojallal-Tabatabei ve ark., 2013) .

Basi ve Turkoglu tarafından yapılan bir çalışmada kan basıncının düzenlenmesinden sorumlu olan anjiotensin konverting enzim insan plazmasından afinite kromatografisi yöntemi ile tek basamakta 12860 kat saflaştırılmıştır ve spesifik aktivitesi 5080 EU / mg protein olarak hesaplanmıştır. ACE için optimum sıcaklık 35-40 °C iken optimum pH 7.4-7.5 olarak belirlenmiştir. ACE'nin saflığı SDS-PAGE ile belirlenmiş ve enzimin jel üzerinde 60 ve 70 kDa'da iki bant gösterdiği gözlemlenmiştir. ACE'nin nativ moleküler ağırlığı, jel filtrasyon kromatografisi ile grafik denkleminde 260 kDa olarak hesaplanmıştır. Kolon kromatografisi yöntemi ile *Nigella sativa* bitkisinden doğal yağ asitleri izole edilmiştir. Bu bileşiklerin yapıları, NMR ve GC-MS kullanılarak belirlenmiştir. ACE aktivitesi üzerine izole edilen altı fraksiyonun (Fr 1-6) etkisi araştırılmıştır. Fraksiyon 3, ACE aktivitesini arttırırken, diğer fraksiyonların ACE

aktivitesini inhibe ettiği belirlenmiştir. Enzimin aktivitesini inhibe eden fraksiyonların IC_{50} değerleri; Fr1 için 1.597 mg / mL, Fr2 için 0.053 mg / mL, Fr4 için 0.527 mg / mL, Fr5 için 0.044 mg / mL ve Fr6 için 0.136 mg / mL olarak hesaplanmıştır (Basi ve Turkoglu, 2018).

Anjiotensin konverting enzim (EC 3.4.15.1), sığır akciğerinden afinite kromatografisi yöntemi ile 1748 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılan ACE için optimum sıcaklık ve pH sırasıyla 35-40 °C ve 7.6 olarak belirlenmiştir. SDS-PAGE ile ACE'in 57 kDa, 66 kDa ve 190 kDa molekül ağırlığında üç alt birime sahip olduğu gözlemlenmiştir. Daha sonra jel filtrasyon kromatografisi yöntemi ile ACE'nin molekül ağırlığı 303 kDa olarak hesaplanmıştır. ACE inhibitörleri; lisinopril, kaptopril, fosinopril, beta blokerler; atenolol, propranolol ve diüretikler; triamteren, spironolakton ve indapamidin ACE aktivitesi üzerine etkileri incelenmiştir. ACE inhibitörleri lisinopril, kaptopril, fosinopril ve diüretik olan triamteren, ACE aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösterirken beta blokerleri herhangi bir etki göstermemiştir. Lisinopril, kaptopril, fosinopril ve triamteren gibi etken maddeler ACE aktivitesi üzerine yarışmasız inhibisyon etkisi göstermiştir ve grafik denkleminde bu bileşiklerin IC_{50} değerleri sırasıyla 4.085 nM, 0.835 nM, 1.159 μ M ve 227 μ M olarak belirlenmiştir. Aynı zamanda lisinopril, kaptopril, fosinopril ve triamteren için K_i sabitleri, sırasıyla 6.449 nM, 1.057 nM, 1.675 μ M ve 419.5 μ M olarak hesaplanmıştır. Kaptopril, 0.835 nM IC_{50} değeri ile en yüksek inhibitör aktivitesini göstermiştir (Karahana ve Türkoğlu, 2019).

Anjiotensin konverting enzim (ACE, peptidildipeptidaz A, EC 3.4.15.1) kan basıncının düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Bu çalışmada, ACE tek basamakta afinite kromatografisi ile insan plazmasından saflaştırılmıştır. ACE insan plazmasından 5367 kat saflaştırılmıştır ve spesifik aktivite 1208 EU/mg protein olarak belirlenmiştir. ACE'nin saflığı ve moleküler ağırlığı, SDS-PAGE ile belirlenmiştir ve jelde 60 kDa ve 70 kDa olarak iki bant belirlenmiştir. Oksitlenmiş glutatyon (GSSG) peptidi ve indirgenmiş glutatyon (GSH) peptidinin saflaştırılmış ACE aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir. Lisinopril referans inhibitörü olarak kullanılmıştır. GSSG, ACE aktivitesi üzerinde aktivasyon etkisi gösterirken GSH, inhibisyon etkisi göstermiştir. GSH ve lisinopril için IC_{50} değerleri sırasıyla 16.2 μ M ve 0.781 nM olarak bulunmuştur. Lineweaver-Burk grafiğinden GSH ve lisinopril için inhibisyon tipi geri dönüşümlü

olmayan non-kompetitif inhibisyon olarak belirlenmiştir. GSH ve lisinopril için K_i sabitleri sırasıyla 11.7 μ M ve 0.662 nM olarak hesaplanmıştır (Basi ve Turkoglu, 2019).

Hou ve ark. yaptığı bir çalışmada, redükte glutatyon (GSH), okside glutatyon (GSSG), karnosin, homokarnosin ve anserin bileşiklerinin ACE aktivitesi üzerine inhibitör etkisi FAPGG substratı kullanılarak belirlenmiştir. Tüm peptitler doza bağımlı ACE inhibitör aktivitesi göstermiştir. Referans inhibitör olarak kullanılan kaptoprilin IC_{50} değeri 0.00781 μ M, olarak kullanılmasıyla GSH, karnosin, homokarnosin ve anserin bileşikleri için IC_{50} değerleri sırasıyla 32.4 μ M, 5.216 mM, 6.147 mM ve 6.967 mM olarak hesaplanmıştır. GSH ve karnosin, ACE aktivitesine karşı non-kompetitif inhibisyon etkisi göstermiştir. 0.0164 mM GSH ve 0.4098 mM karnosin eklendiğinde, K_i değerleri sırasıyla 49.7 μ M ve 3.899 mM olarak bulunmuştur (Hou ve ark., 2003).

Balti ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada mürekkep balığı kasından ACE inhibitör peptidleri izole edilmiştir. Proteinler hidrolizlenmiş ve hidrolizatlar daha sonra aktif peptidleri izole etmek için çeşitli kromatografi tekniklerine tabi tutulmuştur. Dokuz ACE inhibe edici peptit izole edilmiştir ve moleküler kütleleri ve amino asit dizileri, sırasıyla ESI-MS ve ESI-MS/MS kullanılarak belirlenmiştir. En güçlü peptitlerin yapıları Val-Glu-Leu-Tyr-Pro, Ala-Phe-Val-Gly-Tyr-Val-Leu-Pro ve Glu-LysSer-Tyr-Glu-Leu-Pro olarak tanımlanmıştır. İlk peptit, 5.22 μ M'lık bir IC_{50} değeri ile en yüksek ACE inhibitör aktivitesini göstermiştir. Lineweaver-Burk grafikleri Val-Glu-Leu-Tyr-Pro'nun ACE'ye karşı nonkompetitif bir inhibitör olarak etki ettiğini göstermektedir. Ayrıca, spontan hipertansif ratlarda (SHR) antihipertansif etkiler, Val-Glu-Leu-Tyr-Pro'nun oral uygulamasının sistolik kan basıncını önemli ölçüde azaltabildiğini ortaya koymuştur ($p < 0.01$). Bu sonuçlar, Val-Glu-Leu-Tyr-Pro peptidinin, hipertansiyon ve buna bağlı hastalıklara karşı etkili olan nutrasötikler ve farmasötikler için faydalı bir bileşen olabileceğini göstermektedir (Balti ve ark., 2015).

Protein içeriği yüksek bir deniz ürünü olan Sipuncula'dan (*Phascolosoma esculenta*) üç yeni anjiotensin konverting enzim inhibe edici peptit saflaştırılmıştır. RYDF, YASGR ve GNGSGYVSR peptidleri, pepsin ve tripsin kullanılarak Sipuncula'nın suda çözünür proteininin hidrolizi ile elde edilmiştir. Peptitler jel filtrasyonu ve ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile saflaştırılmış ve MALDI-TOF'un de novo sekanslama metodu ile tanımlanmıştır. Her üç peptit, Lineweaver-Burk grafikleri ile anjiotensin konverting enzimin nonkompetitif

inhibitörleri olarak belirlenmiştir. RYDF, YASGR ve GNGSGYVSR peptidlerinin IC_{50} değerleri sırasıyla 235, 184 ve 29 μM olarak hesaplanmıştır. Yerleştirme (doking) sonuçları, üç peptidin inhibitör aktivitelerinin farklılıklarının, peptitler ve ACE, özellikle hidrojen bağları arasındaki non-kovalent bağ bazlı etkileşimlerin derecesinden kaynaklandığını göstermiştir. Peptitlerin antihipertansif etkisi, oral yolla verilen kendiliğinden hipertansif ratlarda kan basıncını 5 mg/kg vücut ağırlığı olarak düşürdüğü gözlemlenmiştir. Peptit GNGSGYVSR, oral uygulamadan sonra 2 saatte 31 mmHg sistolik kan basıncını düşürmüştür ve 4 saate kadar seviyesini korumuştur (Guo ve ark., 2017).

Chlorella sorokiniana mikroalglerinin sıcak su ekstraktı ve hidrolizatlarının anjiotensin konverting enzim aktivitesine karşı inhibe edici etkileri araştırılmıştır. *Chlorella sorokiniana* sıcak su ekstraktını (HWE) elde etmek için sıcak su kullanılmıştır. Daha sonra, bu yan ürün dondurularak kurutulmuştur. *Chlorella sorokiniana* protein hidrolizatlarını (PN-1) elde etmek için Protease N kullanılarak 50 °C'de hidrolize edilmiştir ve daha sonra bir gastrointestinal enzim (PN-1G) ile sindirilmiştir. Çözünabilir protein ve peptid içerikleri, HWE için sırasıyla 379.9 ve 179.7 mg/g, PN-1 için sırasıyla 574.8 ve 332.8 mg/g olarak belirlenmiştir. ACE aktivitesi üzerindeki HWE, PN-1 ve PN-1G'nin IC_{50} değerleri sırasıyla 1.070, 0.035 ve 0.044 mg/mL olarak hesaplanmıştır. PN-1G, boyut dışlama (jel filtrasyon) kromatografisi yoluyla yedi fraksiyona ayrılmıştır. Hidrolizatın altıncı fraksiyonu, 270 ile 340 Da arasında bir moleküler ağırlığa sahiptir ve ACE aktivitesi üzerine en düşük IC_{50} değeri, 0.015 mg/mL olarak bulunmuştur. ACE inhibitör peptitlerin amino asit dizileri, Trp-Val, Val-Trp, Ile-Trp ve Leu-Trp ve bunların IC_{50} değerleri sırasıyla 307.61, 0.58, 0.50 ve 1.11 μM olarak belirlenmiştir. Sistolik kan basıncı ve diyastolik kan basıncı, 171.4 mg PN-1 toz/kg vücut ağırlığı dozu ile 6 saatlik bir oral uygulamadan sonra, kendiliğinden hipertansif ratlarda sırasıyla 20 ve 21 mm Hg azalmıştır (Lin ve ark., 2018).

Xue ve ark. yaptığı bir çalışmada, sığır kazeinden yeni bir anjiotensin-I-konverting enzim (ACE) inhibitör peptidi YQKFPQYLQY (YQK) izole edilmiştir. Kazein; pepsin ve tripsin kullanılarak hidrolize edilmiştir. YQK peptidi, ultrafiltrasyon ve sephadex G-15 kromatografisi ile hidrolizattan ayrılmıştır. YQK peptidinin IC_{50} değeri 11.1 μM olarak hesaplanmıştır. Aynı zamanda, bu peptid pepsin ve tripsin

sindirim enzimlerine karşı da karardır. Lineweaver-Burk grafiği ile YQK'nın inhibisyon tipi yarışmalı inhibitör olarak belirlenmiştir. Ayrıca, kendiliğinden hipertansif ratlara YQK'nin oral uygulanması ile sistolik kan basıncını önemli ölçüde azaldığı gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, YQK peptidinin antihipertansif bir ajan olarak fonksiyonel gıdalarda veya farmasötiklerde potansiyel uygulamalara sahip olabileceğini göstermiştir (Xue ve ark., 2018).

Bradikinin kuvvetlendirici peptidler (BPP), *Lachesis muta rhombeata* yılan zehirinde bulunan önemli bir toksin grubudur. Anjiotensin konverting enzimin (ACE) inhibisyonu yoluyla doğrudan renin-anjiotensin-aldosteron sistemine etki ederler. Bu eylem, bu türün zehrini akıttığı sırada gözlenen hipotansif şoka katkıda bulunabilir. Bu yüzden, Pinheiro-Júnior ve ark. yaptığı bir çalışmada, *Lachesis muta rhombeata* zehirinde bulunan bir BPP'nin katı fazı sentezlenmiştir ve sırasıyla ACE inhibisyonu ve hipotansif aktivite ile ilgili olarak *in vitro* ve *in vivo* karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. LmrBPP9 peptidi, bir otomatik katı faz peptit sentezleyici kullanılarak sentezlenmiştir ve ters fazlı hızlı protein sıvı kromatografisi (FPLC) ile saflaştırılmıştır. Önemli bir ACE inhibisyon kapasitesi gösteren bu sentetik peptidin *in vitro* IC₅₀ değeri 4.25±0.10 µM olarak bulunmuştur. Aynı zamanda, *in vivo* çalışmalar, LmrBPP9 peptidinin hem normotansif hem de hipertansif ratlarda kan basıncını düşürdüğünü göstermiştir. Bu sonuçlar, sentetik peptit LmrBPP9'un, yeni bir antihipertansif ilacın geliştirilmesinde potansiyel bir molekül olduğunu gösteren *in vitro* sonuçları da desteklemektedir (Pinheiro-Júnior ve ark., 2018).

Açık etiketli bir çalışmada 885 parkinson hastasında bir koenzim olan redükte nikotinamid adenin dinükleotid (NADH) ilaç olarak kullanılmıştır. Hastaların yaklaşık yarısı intravenöz infüzyonla, diğer kısmı ise kapsüller ile oral olarak NADH almıştır. Hastaların yaklaşık % 80'inde yararlı bir klinik etki gözlenmiştir: hastaların% 19.3'ü çok iyi (% 30-50) sakatlığın iyileşmesi, % 58.8'i orta iyileşme (% 10-30) göstermiştir. % 21.8'i ise NADH'e cevap vermemiştir. Tedavi öncesi sakatlık, hastalığın süresi ve hastaların yaşı ile ilişkili olarak düzelmenin istatistiksel analizi aşağıdaki sonuçları ortaya koymuştur: Bütün bu 3 parametre, iyileştirme üzerinde zayıf bir etkiye sahip olmasına rağmen, önemli bir etkiye sahiptir. Tedavi öncesi özürülük pozitif bir regresyon katsayısına sahiptir (t değeri <0.01). Hastalığın süresi negatif bir regresyon katsayısına (<0.01) sahiptir ve bu nedenle yaş da negatif bir regresyon katsayısına (t

değeri <0.05) sahiptir. Başka bir deyişle, genç hastalar ve daha kısa hastalık süresi olan hastalar, yaşlı hastalardan ve hastalık süresi daha uzun olan hastalardan belirgin bir iyileşme elde etme şansına sahiptir. Oral olarak uygulanan NADH formu, parenteral olarak (damardan) uygulanan formuna benzer bir şekilde, engellilikte genel bir gelişme sağlamıştır (Birkmayer ve ark., 1993).

Sıklıkla hipertansif seviyelere ulaşan kan basıncında kademeli bir artış, yaşlanma sırasında (yaşa bağlı hipertansiyon) yaygındır. Bu yüzden, bu yükselmiş kan basıncını güvenli bir şekilde önlemenin veya iyileştirmenin tedavileri oldukça önemlidir. Bushehri ve ark. yaptığı bir çalışmada, doğal bir koenzim olan oral B-nikotinamid adenin dinükleotidi (NADH), temelde çeşitli nörolojik rahatsızlıkları tedavi etmek için kullanılmasına rağmen, benzer tip bir ajan olan koenzim Q10'da olduğu gibi bu ajanın kan basıncını düşürme ve kardiyovasküler sistem için faydalı olma gibi bir potansiyele sahip olup olmadığı araştırılmıştır. İlk olarak, oral NADH'nin etkilerini belirlemek için kendiliğinden hipertansif ratlar (SHR) kullanılmıştır. Kör, plasebo kontrollü bir çalışmada, on rata plasebo verilmiştir. Kör, plasebo kontrollü bir çalışmada, on rata on hafta boyunca plasebo ve NADH verilmiştir. Her ne kadar sistolik kan basıncı her iki grup arasında ilk ayda farklılık göstermese de, oral NADH alan kendiliğinden hipertansif rat gruplarında çalışmanın geri kalanı için sistolik kan basıncında belirgin bir şekilde azalma görülmüştür. 60 günün sonunda, NADH ile muamele edilmiş SHR'deki sistolik kan basıncı ($184 \text{ mm Hg}^{\pm} 2.8 \text{ (SEM)}$), kontrol SHR'deki sistolik kan basıncı ile karşılaştırıldığında ($201 \text{ mm Hg}^{\pm} 2.1 \text{ (SEM)}$) azaldığı gözlemlenmiştir ($p < 0.001$). Kan glukoz, insülin, trigliserit ve HDL düzeylerinde anlamlı bir fark görülmemiştir, ancak NADH alımı toplam kolesterolü ($p < 0.002$) ve LDL'yi ($p < 0.02$) azaltmıştır. Buna göre, doğal koenzim olan NADH ile takviye, yüksek kan basıncında ve buna bağlı olarak çeşitli kardiyovasküler hastalıklardaki yaşla ilgili artışların önlenmesinde faydalı olabilir (Bushehri ve ark., 1998).

Stabilize oral indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotidi (NADH) kullanılarak alzheimer hastalığı (AD) olan hastalarda bilişsel işlevsellik üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. NADH, hücrel enerji üretiminde kilit bir rol oynayan ve dopamin üretimini uyaran bir koenzimdir. Daha önceki çalışmalarda NADH'nin Parkinson hastalığı, depresyon ve AD olan hastaların bilişsel işleyişini iyileştirdiği belirlenmiştir. Bu çalışma randomize, plasebo kontrollü, eşleştirilmiş çiftler, çift kör gruplardan oluşan

6 aylık bir klinik çalışmadır. Muhtemel AD'li (n = 26) hastalar stabilize oral NADH (10 mg / gün) veya plasebo almak için randomize edilmiştir. Mattis Demans Derecesi Ölçeği (MDRS) ve Mini Zihinsel Durum İncelemesinde on iki denek çifti yaş ve temel toplam puan için eşleştirilmiştir. 6 aylık tedaviden sonra, NADH ile tedavi edilen denekler, ilerleyen bilişsel bozulma kanıtı göstermemiştir ve MDRS'de plasebo ile tedavi edilenlere kıyasla önemli derecede daha yüksek toplam puan almıştır (p <0.05). MDRS alt ölçeklerinin analizi, NADH deneklerinin sözel akıcılık ölçütleri (p = 0.019), görsel-yapısal yetenek (p = 0.038) ve soyut sözel akıl yürütme ölçütünde daha iyi performans eğilimi (p = 0.08) ölçümlerinde anlamlı olarak daha iyi performans gösterdiği belirlenmiştir. Gruplar arasında dikkat, hafıza veya klinisyen demans şiddeti derecelerinde (Klinik Demans Derecesi) farklılık bulunmamıştır. Daha önceki çalışmalarla tutarlı olarak, mevcut bulgular AD için bir tedavi olarak NADH'yi desteklemektedir (Demarin ve ark., 2004).

Multiphoton floresan ömür boyu görüntüleme mikroskobu (FLIM), invazif olmayan, hücresel çözünürlükte, 3 boyutlu bir fonksiyonel görüntüleme tekniğidir. Skala ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada endojen metabolik kofaktör olan nikotinamid adenin dinükleotidinin (NADH) çoklu foton FLIM'i kullanılarak metabolik görüntüleme ile *in vivo* prekanser tanı potansiyeli araştırılmıştır. Oral karsinogenezin dimetilbenz [α] antrasen (DMBA) ile işlenmiş hamster yanak kılıfı modeli ve MCF10A hücre mono tabakaları 780-nm eksitasyonunda multiphoton FLIM kullanılarak görüntülenmiştir. Normal hamster yanak kese epitel hücrelerinin sitoplazması, sırasıyla serbest ve proteine bağlı NADH'ye dayandırılan kısa (0.29 ± 0.03 ns) ve uzun ömürlü bileşenlere (2.03 ± 0.06 ns) sahiptir. Düşük dereceli prekanserler (hafif ila orta dereceli displaziler (dokuda gelişim bozukluğu)) ve yüksek dereceli prekanserler (yerinde ağır displaziler ve karsinomlar), normal dokulardan, protein bağlı NADH ömürleri azaldıkça ayırt edilmiştir (p<0.05). Hücre mono tabakalarındaki hücresel glikolizin ve oksidatif fosforilasyonun inhibisyonu, protein-bağlı NADH ömrü boyunca sırasıyla bir artış ve azalma üretmiştir (p<0.05). Sonuçlar, displazi ile proteine bağlı NADH ömründeki azalmanın, neoplastik metabolizma tahminleriyle tutarlı bir şekilde oksidatif fosforilasyondan glikolize geçişine bağlı olduğunu göstermektedir. Multhoton FLIM'in invazif olmayan karakterizasyon ve *in vivo* epitelyal prekanserlerin tespiti için güçlü bir araç olduğunu göstermiştir (Skala ve ark., 2007).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Mezbahannede yeni kesilmiş koyun böbreği laboratuvara getirilerek böbreğin değişik bölgelerinden 20 g kadar kesilerek alındı. Bu alınan kısım bir bistüri yardımıyla küçük kübik parçalara ayrıldı. Parçalanmış böbreğe 100 mL lik hacimde 0.6057 g Tris (50 mM, pH 7.4), tamponu içine ilave edildi. Bu karışım mikser yardımıyla 3 dakika parçalanmaya maruz bırakıldı. Bu esnada mikserin etrafına buz konularak ısınması önlenildi. Elde edilen homojenat daha ileri bir parçalanma için ultrasonik homojenizatörde 10-15 dakika homojenizasyon işlemi uygulandı.

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmalarımızda kullanılan NADH, FAD, NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow, HepesNa (2-[4-(2-hidroksietil) piperazin-1-il] etan sülfonik asit sodyum), FAPGG (N-[3-(2-Furil) akrilolil]-Fenil-Glisil-Glisin), ZnCl₂ (çinko klorür), sodyum tetra borat, serum albumin, trihidroksimetil aminometan (Tris), β-merkapt etanol, lisinopril Sigma Chemical Comp.'den temin edildi. N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin (TEMED), akrilamid, N,N'-metilen bisakrilamid, brom timol mavisi, bromfenol mavisi, sodyum dodesil sülfat (SDS), amonyum persülfat, AppliChem GmbH'den temin edildi. Sodyum klorür, hidroklorik asit, fosforik asit, sodyum azid, gliserin, etanol, metanol, asetik asit, Coomassie brilliant blue G-250, E. Merck AG'den satın alındı. Elektroforez markırı SM0671 fermentas Life Science Thermo Fisher Scientific'ten temin edildi.

3.1.2. Kullanılan alet ve cihazlar

Spektrofotometre: Shimadzu UV Spectrophotometer UV-1800

İnkübatör: G24 Enviromental Incubatur Shaker

Soğutmalı klinik santrifüj: Hettich Zentrifugen Universal 320 R

Klinik santrifüj: Hettich Zentrifugen Universal 320 R

Elektroforez tankı: P8DS Vertical Electrophoresis System (dikey)

Peristaltik pompa: Eyela Micro Tube Pump MP-3

Peristaltik pompa: Easy-load master flex model 7518-10

Güç kaynağı: Thermo scientific

pH metre: Inolab WTW series pH 720

Karıştırıcı (Vorteks): Mixer VM 20

Hassas terazi: Gec Avery

Hassas terazi: Shimadzu Uni Bloc AUW 220D

Afinite Kromatografisi kolonu: Sigma 1.5 cm x 30 cm

Otomatik pipetler: Eppendorf, Volac (5-50 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL)

Homojenizatör: Wiggen Hauser 220-240 volt 50-60 Hz

Parçalayıcı mikser: Warning Commercial Laboratory Blender. Country of origin U.S.A.

Sabit sıcaklık banyosu: Julabo Labortechnik GMBH D-7633

Sabit sıcaklık sirkülasyon banyosu: Grand Technical. Specification LTD 6G-20 to 100°C

3.1.3. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması

Bütün çözeltiler bidistile su kullanılarak hazırlandı.

3.1.3.1. Protein tayininde kullanılan çözeltiler

1.) Coomassie brilliant blue G-250 renk reaktifi (Protein tayininde kullanılan stok çözelti): 100 mg coomassie brilliant blue G-250, 50 mL % 95'lik etanolde çözüldü. Bu çözeltiliye 100 mL % 95'lik ortofosforik asitten yavaşça eklendi. Hazırlanan çözeltilinin hacmi bidistile su ile 1 Lye tamamlandı.

2.) Standart serum albumin çözeltisi (Protein tayininde kullanılan standart çözelti): 10 mg sığır serum albumininden alınıp bir miktar destile suda köpürtülmeden yavaşça çözüldü ve hacmi bidistile su ile 10 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.2. Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler

- 1.) 50 mM HepesNa/0.3 M NaCl/10 μ M ZnCl₂ pH 7.5: 3.254 g HepesNa, 4.38 gNaCl ve 0.00034 g ZnCl₂ alınarak 200 mLbidistile suda çözüldü. HCl çözeltisi ile pH 7.5'a ayarlandı. Daha sonra toplam hacim bidistile su ile 250 mL'ye tamamlandı.
- 2.) 1 mM FAPGG çözeltisi: 0.01 g FAPGG alınarak %5'lik 1250 μ L metanol içinde çözüldü ve hacmi bidistile su ile 25 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.3. Kolon dolgu maddesi için kullanılan çözeltiler

- 1.) 1 mM HCl: 0.041 mL HCl alınarakbir miktar bidistile suda çözüldü ve hacmi bidistile su ile 500 mL'ye tamamlandı.
- 2.) 0.2 M NaHCO₃/ 0.5 M NaCl/ 5mM Lisinopril pH=8.3 (Kolon dolgu maddesini ligandla birleştirmek için kullanılan tampon): 0.804 g NAHCO₃ ve 1.461 g NaCl alınarak 40 mLbidistile suda çözüldü. pH'sı 8.3'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 50 mL'ye tamamlandı. Çözeltiye 0.1104 g lisinopril eklendi ve çözelti 1 gece 4 °C de bekletildi.
- 3.) 0.1 M Tris-HCl pH=8,5 (Kolon dolgu maddesini yıkamak için kullanılan tampon): 6.057 g Tris alınarak 450 ML bidistile suda çözüldü. HCl çözeltisi ile pH 8.5'a ayarlandı. Daha sonra toplam hacim bidistile su ile 500 mL'ye tamamlandı.
- 4.) 0.1 M K-asetat /0.5 M NaCl pH=4,5 (Kolon dolgu maddesini yıkamak için kullanılan tampon): 4.907 g K-asetatve 14.61 g NaCl alınarak 450 mL bidistile suda çözüldü. pH 4.5'a ayarlandı. Daha sonra toplam hacim bidistile su ile 500 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.4. Afinite kromatografisi kolonunda kullanılan çözeltiler

- 1.) 20 mM Tris/0.3M NaCl pH=8.0 (Kolonunun paketlenmesi ve dengelenmesi için kullanılan tampon): 2.423 g Tris ve 17.532 g NaCl alınarak 950 mL bidistile suda çözüldü. pH'sı 8.0'e ayarlandıktan sonra toplam hacim bidistile su ile 1L'ye tamamlandı.
- 2.) 20 mM Tris/0.3M NaCl pH=8.0 (Numune tatbik ettikten sonra afinite kromatografisi kolonunun yıkanması için kullanılan tampon): 2.423 g Tris ve 17.532 g NaCl alınarak

950 mL bidistile suda çözüldü. pH'sı 8.0'e ayarlandıktan sonra toplam hacim bidistile su ile 1L'ye tamamlandı.

3.) 50 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (Sodyum borat) pH'sı 9.0 (Afinite jeline tutunmuş olan anjiotensin konverting enzimin elüsyonu için kullanılan tampon): 1.907 g Sodyum borat 90 mL bidistile suda çözüldü. pH 9.0'a ayarlandı ve daha sonra toplam hacim bidistile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

4.) % 0.02'lik NaN_3 (Sodyum azid) çözeltisi (Kromatografi kolon meteryallerini bakterilerden korumak için): 10 mg NaN_3 alınarak 50 mL bidistile suda çözüldü.

3.1.3.5. SDS-PAGE elektroforez için kullanılan çözeltiler

1.) 1.5 M Tris-HCl (pH= 8.8): 18.17 g Tris (0.1 mol) tartılarak 80 mL bidistile suda çözüldü, pH ayarı yapıldıktan sonra hacmi bidistile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

2.) 0.5 M Tris-HCl (pH= 6.8): 6.057 g Tris (0.1 mol) tartılarak 80 mL bidistile suda çözüldü, pH ayarı yapıldıktan sonra hacmi bidistile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

3.) % 30 Akrilamid - % 2.7 Bisakrilamid çözeltisi: 14.6 g akrilamid, 0.4 g bisakrilamid 40 mL bidistile suda çözüldü ve hacmi bidistile su ile 50 mL'ye tamamlandı.

4.) % 10'luk amonyum persülfat çözeltisi: 1 g amonyum persülfat tartılarak bidistile su ile hacmi 10 mL'ye tamamlandı.

5.) % 10'luk SDS: 1 g SDS tartılarak bidistile su ile 10 mL'ye tamamlandı.

6.) Yürütme tamponu: 3.028 g Tris ve 14.410 g glisin tartılarak 950 mL bidistile suda çözüldü, % 10'luk SDS'den 10 mL ilave edildi, pH= 8.3'e ayarlandı ve toplam hacim bidistile su ile 1 L'ye tamamlandı.

7.) Numune tamponu: 1.5 M Tris-HCl (pH= 6.8)'den 2.5 mL, %10'luk SDS'den 4 mL, % 100'lük gliserinden 2 mL ve β -merkaptetanolden 1 mL alınarak hacmi bidistile su ile 10 mL'ye tamamlandı.

8.) Jel boyama çözeltisi: 40 mL metanol, 7 mL asetik asit içinde 0.025 g Coomassie brilliant blue R-250 reaktifi çözümlenerek hacim bidistile su ile 100 mL'ye tamamlandı

9.) I. Jel yıkama çözeltisi: 50 mL metanol - 10 mL asetik asit - 40 mL bidistile su karıştırılarak hazırlandı.

10.) II. Jel yıkama çözeltisi: 5 mL metanol - 7 mL asetik asit - 88 mL bidistile su karıştırılarak hazırlandı.

11.) Su ile doayurulmuş n-bütanol: 10 mL n-bütanol ve 1mL bidistile su karıştırılarak hazırlandı.

12.) % 0.1'lik brom timol mavisi çözeltisi: 0.01 g indikatör, 1 mLbidistile su içerisinde çözündü ve toplam hacim bidistile su ile10 mL'ye tamamlandı.

3.2.Yöntem

3.2.1. Protein tayini

3.2.1.1. Kalitatif protein tayini

Afinite kolonundan elde edilen fraksiyonların her birinin kalitatif protein tayinleri yapıldı. 280 nm'de proteinlerin yapısında bulunan triptofan ve tirozinin maksimum absorbands göstermesi esasına dayanılarak kalitatif protein tayini yapılmaktadır (Carlberg ve Mannervik, 1981). Koyun böbreğinden elde edilen enzim numunelerinde kalitatif protein tayini bu yönteme göre belirlendi. Fraksiyonlar kuvars küvetlere alınarak absorbandsları köre karşı okundu. Kör olarak elüsyon tamponu kullanıldı.

3.2.1.2. Bradford yöntemiyle kantitatif protein tayini

Afinite kolonundan elde edilen fraksiyonların her birinin kantitatif protein tayinleri yapıldı. Bu yöntemde o-fosforik asitli ortamda proteinler Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi ile kompleks oluşturmakta ve bu kompleks 595 nm'de maksimum absorbands göstermektedir. Negatif bir yüke sahip olan Coomassie Brilliant Blue G-250 bu yöntemde boya olarak kullanılır ve protein üzerindeki pozitif yüke bağlanır. Boyanın kırmızı (maksimum dalga boyu 465 nm) ve mavi (maksimum dalga boyu 596 nm) formu mevcuttur. Proteinin boya üzerindeki negatif yüke bağlanmasıyla kırmızı form mavi forma dönüşür. Protein-boya kompleksi çözeltilerde uzun süre kalır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg dır. Reaksiyon çok fazla tekrarlanabilir ve hızlı bir şekilde oluşur. Reaksiyon yaklaşık olarak iki dakikada tamamlanır. Renk stabilitesi yaklaşık iki saatin üzerinde devam etmektedir. Renk oluşumunda proteinin amino asit bileşiminin (özellikle arginin gibi bazik aminoasitler ile aromatik amino asitler) reaksiyon üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir. (Bradford, 1976).

Ölçüm şu şekilde yapıldı; 1 mL'sinde 1mg protein içeren standart sığır albumin çözeltisinde tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µL alındı. Tüm tüplerin hacmi bidistile su ile 0.1 mL'ye tamamlandı. 5 mL Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi tüplere ilave edilerek vorteks mikser ile karıştırıldı. 10 dk inkubasyondan sonra

595 nm'de 3 mL'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak 0.1 ml aynı tampon ve 5 mL Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifinden oluşan çözelti kullanıldı. Okunan absorbans değerlerine karşılık gelen μg protein değerleri kullanılarak standart grafik çizildi.

Hazırlanan enzim çözeltilerinden (her bir fraksiyondan) ayrı ayrı 0.1 mL alındı. 5 mL Coomassie reaktifi ilave edildi ve vorteks ile karıştırılarak 10 dk inkübasyona bırakıldı. Yine kör olarak 0.1 mL aynı tampon ve 5 mL Coomassie reaktifinden oluşan çözelti kullanılarak 595 nm'de absorbans değerleri okundu. Her bir fraksiyon için bulunan absorbans değerleri standart grafikten μg .protein değerine çevrildi.

3.2.2. Afinite kolonunun hazırlanması

Afinite kromatografisi yöntemi, önceden aktive edilmiş kolon dolgu maddesiyle biyospesifik ligandları birleştirerek saflaştırılma yapılmasına dayanan başarılı bir yöntemdir. NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow, mevcut kimyasallarla bağlanma seçimini artıran önceden aktive edilmiş agaroz bir matriksidir. NHS (N-hidroksisüksinimid), primer amino grupları içeren ligandlarla kimyasal olarak stabil bir amid bağı oluşturur. NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow, bir aralayıcı kol sağlar ve bu nedenle özellikle küçük protein ve peptid ligandlarının immobilize edilmesi için uygundur. NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow; 6-amino hekzanoik asit aralayıcı kol ve sepharose 4 fast flow maddesinin birleştirilmesi ile hazırlanmış yüksek derecede çapraz bağlı (boncuk şekillendirilmiş) bir pre-aktif matrikstir. Terminal karboksil grup N- hidroksisüksinimid ile esterleşerek aktive edilmiştir. Primer amino grubu içeren ligandlar kimyasal açıdan çok kararlı bir amid bağı oluşturmak için bu aktif maddeye doğrudan bağlanmaktadır. NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow yüksek aktivitesini korumak için kullanılmadan önce uzaklaştırılması gereken % 100 izopropanol içinde bir süspansiyon olarak temin edilir. Kolon dolgu maddesinden izopropanolün uzaklaştırılması için talimatlar ve ligand ile birleştirmek için aşağıdaki işlemler yapıldı. Birleştirme basamağından önce ön-aktive edilmiş kolon dolgu maddesinin bağlanma kapasitesini maksimum seviyede tutmak için çözeltiler soğukta (0°C'den 4°C'ye) kullanıldı, tüm yıkama basamaklarının zaman aralığı azaltıldı ve ligandla birleştirilmeden önce tüm çözeltiler hazırlandı.

NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow (25 mL) önce 1 mM soğuk HCl ile yıkandı. Daha sonra kolon dolgu maddesinin üzerine birleştirme tamponu (0.2 M NaHCO₃ / 0.5 M, NaCl / 5mM Lisinopril) eklendi. Reaksiyon 4 °C'de bir gecede gerçekleştirildi. Birleştirme tamamlandıktan sonra, ortamdaki reaksiyona girmemiş grupların bloke edilmesi için 0.1 M Tris-HCl (pH 8.5) çözeltisi içinde birkaç saat bekletildi. Birleştirmeden sonra kolon dolgu maddesi iki farklı tampon (sırasıyla yüksek ve düşük pH) ile yıkandı. İlk yıkama için yaklaşık 250 mL 0.1 M Tris-HCl tamponu (pH 8.5) kullanıldı ve yıkama 3-6 kez tekrarlandı. Daha sonra ikinci yıkama için yaklaşık 250 mL 0.1 M asetat tamponu (pH 4.5) kullanıldı ve bu yıkama da 3-6 kez tekrarlandı. Bu işlemlerden sonra NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow üzerine dengeleme tamponu (20 mM Tris/0.3M NaCl, pH=8.0) eklenerek jel süspanse edildi. Süspanse edilmiş jel, 1.5 cm x 30 cm'lik kolona yerleştirilerek paketlenildi. Kolona eklenen jel çöktükten sonra peristaltik pompa kullanılarak dengeleme tamponu ile 3 gün boyunca dengelendi. Eluat ile dengeleme tamponununun 280 nm'de absorbanlarının birbirine eşitlenmesinden kolonun dengelenmiş olduğu belirlendi. Bu şekilde afinite kolonu saflaştırma yapmak için hazır hale getirilmiş oldu.

3.2.3. Koyun böbreği anjiyotensin konverting enziminin saflaştırılması

3.2.3.1. Koyun böbreği eldesi

Mezbananede yeni kesilmiş taze koyun böbrekleri laboratuvara getirildi. Böbreklerin sağlıklı görünen birkaçının değişik bölgelerinden 20 g kadar doku kesilerek alındı. Bu alınan kısım bir bistüri yardımıyla küçük kübik parçalara ayrıldı. Parçalanmış böbrek 100 mL'lik hacimde 0.6057 g Tris (50 mM, pH 7.4), tamponu içine eklendi. Bu karışım mikser yardımıyla 3 dakika parçalanmaya maruz bırakıldı. Bu esnada mikserin etrafına buz konularak ısınması önlenildi. Elde edilen homojenat daha ileri bir parçalanma için ultrasonik homojenizatörde 10-15 dakika uygulandı.

Karıştırma sırasında beherin etrafına buz bırakıldı ve daha sonra beherdeki karışım santrifüj tüplerine konup soğutmalı santrifüj cihazında 8500 devirde +4 °C'de 1 saat boyunca santrifüj edildi. Bu işlem birkaç kez yapıldı. Santrifüjden sonra tüpün üst

kısımındaki sıvı alınarak saflaştırma işleminde kullanılmak üzere derin dondurucuda saklandı.

3.2.3.2. Koyun böbreğinin afinite kolonuna uygulanması ve enzim elüsyonu

1.5 cm x 30 cm boyutlarındaki afinite kolonuna NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow kolon dolgu maddesi tris tamponu ile yüklendi. Kolon aynı tampon ile 20 mL/saat akış hızı ile 4 gün boyunca dengelendi. Koyun böbreği homojenatı tris tamponu ile dengelenmiş olan NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow afinite kolonuna peristaltik pompa kullanılarak uygulandı. Böbrek homojenat çözeltisinin tamamı kolondan geçtikten sonra kırmızı renk tamamen yok oluncaya kadar dengeleme tamponu geçirilmeye devam edildi ve bu şekilde kolonun yıkanması sağlandı. Daha sonra kolondan 20 mM Tris / 0.3 M NaCl (pH=8.0) geçirilerek yıkandı. Yıkama ise spektrofotometrik okumada absorbans değerinin 0.1 olmasıyla tamamlandı. Kolon yıkandıktan sonra elüsyon tamponu (50 mM Na₂B₄O₇.10H₂O, pH= 9.0) ile elüe edildi. Bu işlemlerin tümünde peristaltik pompanın akış hızı 20 mL/saat olarak ayarlandı. Bu yöntem Pantaliano metodundan modifiye edilmiştir (Pantaliano, 1984; Sabeur ve ark., 2001).

Koyun böbreğinden saflaştırılan ACE ile çalışılırken literatürde kullanılan optimal şartlar uygulandı. Elüsyonlar 3'er mL olacak şekilde tüplere alındı, her birinde aktivite değerleri okundu. Yüksek enzim aktivitesi gösteren tüpler birleştirildi. Birleştirilen bu tüplerden oluşan stok enzim çözeltisinin son aktivitesi belirlendi. Tüpler daha sonra gerek kinetik çalışmalar ve gerekse enzim karakterizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere küçük porsiyonlar halinde derin dondurucuda saklandı.

3.2.4. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile ACE'in saflığının kontrolü

ACE saflaştırıldıktan sonra % 4-10 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemi kullanılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi (Laemmli, 1970). Öncelikle elektroforez plakaları su ile ve daha sonra alkol ile iyice yıkandı. Plakaların her iki kenarında aralık oluşturucu çubuklar kullanılarak

plakalar üst üste getirildi ve kısıkaçlarla tutturuldu. Plakalar sabitleştirildikten sonra içerisinde sızdırmayı engelleyen sünger içeren jel hazırlama kabineye konuldu. Önce ayırma jeli hazırlandı ve enjektörle plakaların arasına üst kesimde 0.3 cm kalıncaya kadar dolduruldu. Bu jelin donması beklenirken üzerine ince bir n-bütanol tabakası dökülerek jelin pürüzsüz olması sağlandı (dökme işlemi yana eğilerek yapılır). Bir saat ayırma jelinin donması beklenip ayırma jelinin katılaştığı belirlendikten sonra yığılma jeli hazırlandı. Hazırlanan yığılma jeli, ayırma jelinin üst kısmındaki boşluğa dolduruldu ve numune kuyucuklarını oluşturmak için tarak jelin içine dikkatli bir şekilde yerleştirildi. Tarak uçlarında hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edildi (hava kabarcığı oluşur ise oksijen, polimerizasyonu inhibe edecek ve kuyucukların alt tarafındaki jel yüzeyinde bozukluğa neden olacaktır). Yığılma jelinin katılaşması beklenirken ıslatılmış süzgeç kâğıdı sistemin üzerine kapatıldı ve jelin üst kısmının çok kuruması engellendi. Yığılma jelinin katılaşması belirlendikten sonra tarak dikkatli bir şekilde çıkarılarak numune kuyuları belirlendi. Her bir kuyucuk saf su ile yıkandı, daha sonra kuyucuklar yürütme tamponu ile dolduruldu ve jel plakalarla birlikte elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu dolduruldu. Enzim örneklerine numune tamponu eklendikten sonra üzerine takip boyası olarak % 0.1 bromtimol mavisi damlatıldı. Toplam hacim 200 µL olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu eklendi ve bu karışım 65 °C'de su banyosunda 90 saniye bekletildi. Her bir kuyucuğa 20, 30, 40 ve 50 µL enzim örneği ilave edildi. Numuneler ince bir enjektör ile jeldeki kuyulara enjekte edildi. Elektroforez tankı kapatılarak alt tarafından (+) anot, üst taraftan ise (-) katot yerleştirildi. Önce 60 voltta 20 dakika yürütüldü ve örnekler ayırma jeline kadar gelerek burada birikti. Sonra akım 80 volt'a çıkartılarak numunelerin jelin alt sınırına gelmesine kadar yürütme işlemine devam edildi. Numune tamponuna katılan brom timol mavisi ile numune bantları takip edildi ve takip boyası aşağıya ulaştığında akım kesildi. Yürütme işlemi bittikten sonra akım kesilerek plakalar arasındaki jel dikkatli bir şekilde çıkarıldı ve jel boyama çözeltisine bırakıldı ve çalkalayıcı üzerinde 2 saat bekletilerek boyanması sağlandı. Jel boyandıktan sonra çözeltiden çıkarılarak I. yıkama çözeltisine bırakıldı. Daha sonra bantların daha iyi belirginleşmesi için jel II. yıkama çözeltisine bırakıldı. Jelin rengi açılıp, protein bantları belirginleşene kadar çalkalayıcı üzerinde yıkanan jel çıkarılarak fotoğrafı çekildi (Şekil 4.3).

Ayırma jeli: 5 mL 1.5M Tris-HCl (pH= 8.8), 6.6 mL % 30 akrilamid- % 2.7 bisakrilamid, 0.2 mL % 10'luk SDS, 6.6 µL TEMED, 100 µL % 10'luk amonyum persülfat (APS) ve 8 mLbidistile su karıştırıldı.

Yığıma jeli: 2.5 mL 0.5 M Tris-HCl (pH= 6.8), 1.33 mL % 30 akrilamid % 2.7 bisakrilamid, 0.1 mL % 10'luk SDS, 5 µL TEMED, 50 µL % 10'luk APS ve 6.1 mL bidistile su karıştırıldı. APS çözeltisi taze hazırlandı ve jel çözeltisi karıştırılırken hemen APS eklendi.

Çizelge 3.1.SDS-PAGE elektroforezi içinayırma jeli ve yığıma jeli konsantrasyonları

	Ayırma Jeli	Yığıma Jeli
Tris-HCl (pH= 8.8)	5 mL	-
Tris-HCl (pH= 6.8)	-	2.5 mL
% 30 akrilamid - % 2.7 bisakrilamid	6.6 mL	1.33 mL
% 10'luk SDS	0.2 mL	0.1 mL
TEMED	6.6 µL	5 µL
% 10'luk APS	100 µL	50 µL
Bidistile su	8 mL	6.1 mL

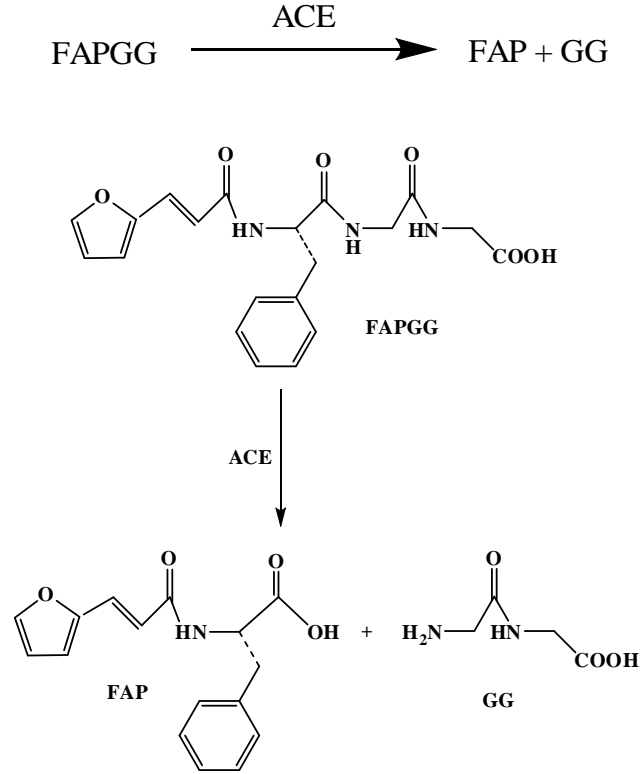
3.2.5. Koyun böbreği ACE'in alt birimlerinin SDS-PAGE ile molekül ağırlıklarının belirlenmesi

Koyun böbreği ACE enziminin alt birimlerinin molekül ağırlığını belirlemek için sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı. SDS proteinleri denatüre ederek alt birimlerine ayırır. Elektroforez resminde gözlenen bant toplam molekülkütle değil, alt birimlerinin molekül ağırlığıdır. Bu amaçla yapılan elektroforez 3.2.4'te anlatıldığı gibi yapıldı. Enzimin alt birimlerinin molekül ağırlığını belirlemek için standart protein karışımı (protein markırı)'dan da yürütülmesi gereklidir. Bu nedenle molekül ağırlıkları 40 kDa ile 500 kDa aralığında değişen standart proteinlerden oluşan ticari belirteç Fermentas SM0671 kullanıldı. Jel hazırlanıp elektroforez tankına yerleştirildikten sonra kuyulardan birine 5 µL standartları içeren çözelti yüklendi. Diğer kuyulara ise enzim numuneleri tatbik edilerek yürütüldü. Yürütme işlemi bittikten sonra jel boyama ve yıkama işleminden sonra jelin fotoğrafı çekildi. Enzim ve standartların R_f değerleri $R_f = \text{enzimin yürütme mesafesi/boyanın}$

yürüme mesafesi formülünden hesaplanarak $R_f = \log M_A$ standart grafiği oluşturuldu. Bu grafikten ve grafiğin denkleminde yararlanarak R_f değeri hesaplanan koyun böbreği anjiotensin konverting enzimin molekül ağırlığı hesaplandı (Şekil 4.4) (Laemmli, 1970).

3.2.6. Enzim aktivitesinin ölçümü

Aktivite ölçümü için; kontrol (kör) ve numunu olmak üzere iki tüp alındı ve tüplerin her birine 100 μ L uygun saf enzim eklendi. Daha sonra kontrol tüpüne 900 μ L HEPES tamponu eklendi ve karıştırıldı. Spektrofotometre kontrol küveti ile sıfırlandı. Numune tüpüne ise 700 μ L 50 mM (pH 7.5) HEPES tamponu ve 200 μ L 1 mM'lık substrat (FAPGG) eklendi ve karıştırıldı ve 345 nm'de absorbans ölçüldü. Numune tüpü 30 dakika 35°C'de inkübasyona bırakıldı. 30 dakika sonra tüplerin 345 nm'deki absorbansları tekrar ölçülerek absorbanslarındaki azalış miktarı bulundu.



Yukarıdaki reaksiyonda reaksiyona giren FAPGG 345 nm'de maksimum absorbans vermektedir. Reaksiyon ortamına katılan ACE enzimi FAPGG'nin azalmasına sebep olmaktadır. Bu azalma spektrofotometrik olarak 345 nm'de takip

edilmektedir. Bu yöntem Holmquist metodundan modifiye edilmiştir (Holmquist ve ark., 1979; Andújar Sánchez ve ark., 2003).

Enzim ünitesi hesaplamalarında aşağıdaki “Eş.3.1” kullanıldı.

$$A = \frac{\Delta OD}{0.517} \times \frac{V_c}{V_e} \times f \quad (3.1)$$

A: mL başına enzim ünitesi (EU/mL)

ΔOD : Bir dakikadaki absorbans değişimi

V_c : Ölçümün yapıldığı toplam küvet hacmi

V_e : Ölçümün yapıldığı küvete eklenen enzim numunesinin hacmi

f: Seyreltme faktörü

0.517 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$: Ekstinksiyon katsayısı

3.2.7. NADH ve FAD Bileşiklerinin Çözeltilerinin Hazırlanması

Çalışmamızda NADH ve FAD bileşikleri kullanıldı.

NADH; 20 miligram NADH bileşiği tartılarak alındı, bir miktar saf suda çözüldükten sonra saf su ile hacmi 5 mL'ye tamamlandı.

FAD; 1 miligram FAD bileşiği tartılarak alındı daha sonra bir miktar saf suda çözüldükten sonra saf suyla hacmi 1 mL'ye tamamlandı.

3.2.8. ACE ile yapılan kinetik çalışmalar

3.2.8.1. Koyun böbreği ACE aktivitesi üzerine NADH ve FAD Bileşiklerinin etkilerinin belirlenmesi

Koyun böbreğinden saflaştırılan anjiotensin konverting enzim aktivitesi üzerine NADH ve FAD bileşiklerinin etkisini belirlemek için önce stok çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözeltisi ölçümde kullanılarak en uygun konsantrasyon aralığı belirlendi. Konsantrasyon aralığını belirlemek için stok çözelti birçok kez seyreltilerek enzim

aktivitesi ölçüldü. Enzim aktivitesi ölçümü normal prosedür uygulanarak yapıldı. Ancak ölçüm küvetine konulacak bileşikler küvetin toplam hacmini (1 mL) aşmayacak şekilde tampon miktarından aynı hacim düşülerek eklendi. Bütün kinetik çalışmalarda bu işlem uygulandı.

Koyun böbreğinden saflaştırılan ACE aktivitesi üzerine NADH ve FAD bileşiklerinin etkisi belirlendi. Bu bileşiklerden elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3 ile Şekil 4.5 ve Şekil 4.6’te gösterildi.

Çizelge 3.2.Koyun böbreği ACE’nin NADH ve FAD içeren aktivite ölçüm küvet içeriği

	<u>Kontrol Küveti</u>	<u>Numune Küveti</u>
50 mM HEPES/Na/0.3 M NaCl/10 μ M ZnCl ₂	900 μ L	700 μ L
1 mM FAPGG	-	200 μ L
Koyun böbreği	100 μ L	100 μ L
NADH veya FAD	Değişken	Değişken
35 °C’de 30 dakika inkübasyon		

3.2.9. Koyun böbreği ACE aktivitesi üzerine etkisi incelenen NADH bileşiğinin K_i değeri, inhibisyon türü ve IC₅₀ değerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar

NADH bileşiği değişik konsantrasyonlarda küvet içeriğine eklenerek ACE aktiviteleri ölçüldü. Bu aktivitelerden % Aktivite – [İnhibitör] değeri ile grafikler çizildi. Elde edilen grafik denklemlerinden IC₅₀ değerleri hesaplandı.

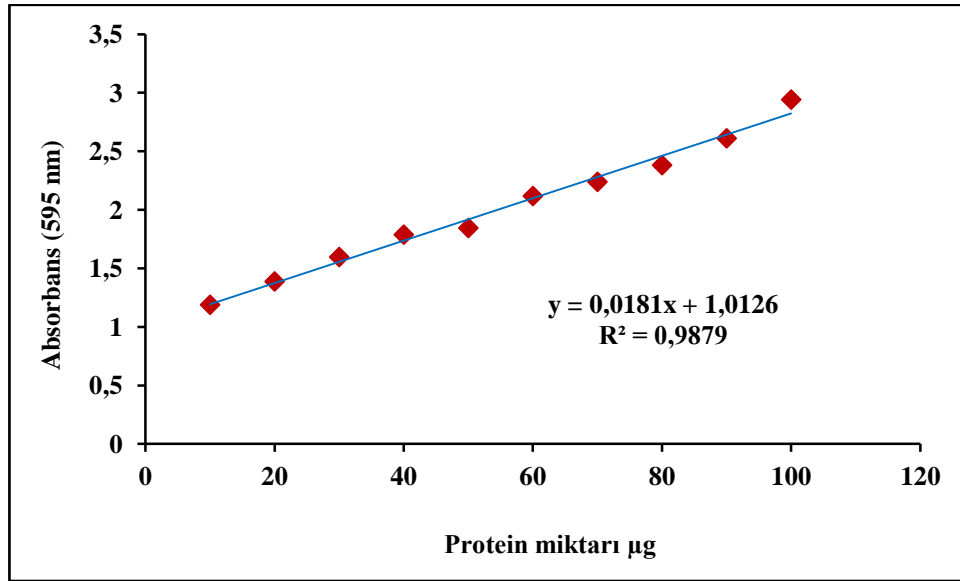
NADH bileşiğinin inhibisyon türünü belirlemek için koyun böbreğinden saflaştırılan ACE aktivitesini yarıya düşüren NADH konsantrasyonu ile bu değer altında ve üstünde 3 sabit NADH konsantrasyonlarında uygun 5 substrat konsantrasyonu ile aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen değerlerle her bir inhibitör için Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Grafiklerden inhibisyon türü belirlendi. Sonuçlar Çizelge 4.3’de verildi.

4. BULGULAR

4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Grafik

Kantitatif protein tayininde Bradford yöntemi kullanıldı. Yöntemle tayin yapabilmek için önceden standart bir grafik hazırlandı. Bu grafik bilgisayar ortamında Microsoft Excel 2010 programı kullanılarak çizildi. 10-100 µg protein/MI konsantrasyon aralığındaki protein çözeltileri ile bu çözeltilerin 595 nm'deki absorbansları arasında çizilen bu standart grafik çizildi. Bu standart grafik yardımıyla hem homojenat hem de saf enzim çözeltilerindeki protein miktarı belirlendi.

Standart grafik çiziminde kullanılan protein çözeltilerinin konsantrasyonları ve bu konsantrasyonlara karşılık gelen 595 nm'deki absorbans değerleri Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Bradford yöntemi ile proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart grafik.

4.2. Koyun böbreği Anjiotensin Konverting Enziminin Afinitive Kromatografisi ile Saflaştırılması Sonuçları

Yapılan çalışmada koyun böbreği afinitive kromatografisi ile saflaştırılan

anjiotensin konverting enzim numuneleri için elde edilen sonuçlar Şekil 4.2’de verilmiştir.

4.2.1. Koyun böbreği anjiotensin konverting enzimi için saflaştırma sonuçları

Böbrek homojenatı için mL’deki enzim ünitesi 45.133 EU/mL, mL’deki protein miktarı da 24.387 mg protein/mL olarak bulundu.

Böbrek homojenatı için spesifik aktivite “Eş.4.1” deki gibi hesaplandı.

$$\frac{\text{EU / mL}}{\text{mg protein / mL}} = \frac{45.133}{24.387} = 1.851 \quad (4.1)$$

Koyun böbreğinden saflaştırılan enzim çözeltilisinin Bradford yöntemi ile kantitatif protein tayini yapıldı. Ayrıca enzimin aktivitesi belirlenerek enzim ünitesi EU/mL cinsinden hesaplandı. Anjiotensin konverting enzimin enzim ünitesi hem homojenatta hem de saflaştırma sonucunda elde edilen elüsyonlarda belirlendi. Koyun böbreğinden saflaştırılan enzim çözeltilisi için mL’deki enzim ünitesi 78.015 EU/mL, mL’deki protein miktarı da 0.00409 mg/mL olarak hesaplandı.

Saflaştırılan böbrek anjiotensin konverting için spesifik aktivite aşağıdaki gibi bulunmuştur.

$$\frac{\text{EU / mL}}{\text{mg protein / mL}} = \frac{78.015}{0.00409} = 19074.572 \quad (4.2)$$

Saflaştırma oranı ise;

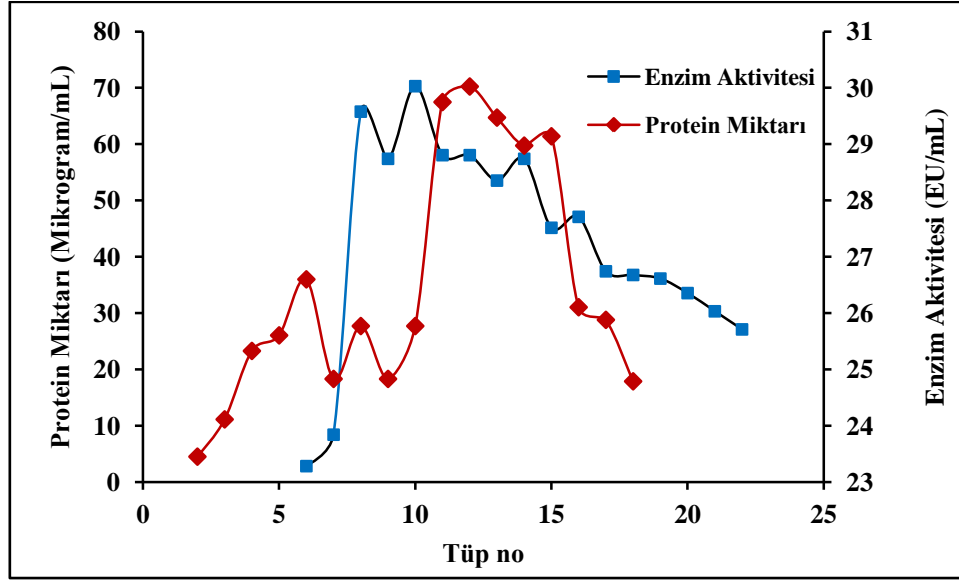
$$\frac{\text{Spesifik Aktivite1}}{\text{Spesifik Aktivite2}} = \frac{19074.572}{1.851} = 10305 \quad (4.3)$$

olarak hesaplandı.

Bu değere göre homojenatın doğrudan afinite kolonuna uygulanması sonucunda enzim homojenattan 10305 kat saflaştırıldı.

Saflaştırılan fraksiyonlardaki protein miktarı 595 nm’de verilen standart eğrinin

regresyon denkleminde her bir fraksiyon için $\mu\text{g/mL}$ protein miktarları belirlendi. Grafikten de anlaşılacağı üzere yaklaşık 7-15 nolu fraksiyonların hem yüksek protein miktarı ve hem de yüksek enzim aktivitesi gösterdiği görülmektedir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Afinité kolonundan alınan koyun böbreği fraksiyonlarının kalitatif protein tayinleri ve aktivite değerleri.

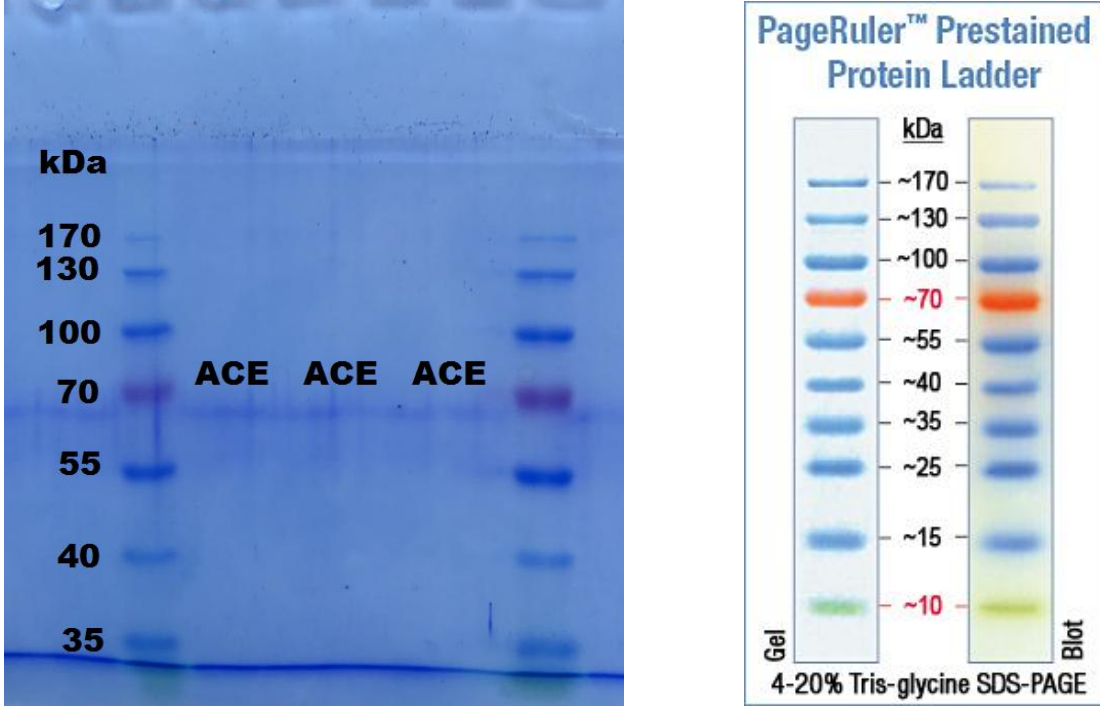
Çizelge 4.1. Koyun böbreği ACE'in saflaştırma basamakları

Saflaştırma Basamakları	Aktivite(EU/mL)	Toplam Hacim (mL)	Protein (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (EU)	Spesifik Aktivite (EU/mg)	Verim (%)	Saflaştırma Katsayısı
Koyun böbreği	45.133	80	24.387	1950.96	3610.64	1.851	100	1.0
NHS-Activated Sepharose 4 Fast Flow Kromatografisi	78.015	40	0.00409	0.1636	3120.6	19074.572	50	10305

4.3. Koyun böbreği ACE'in SDS-PAGE ile Saflığının Kontrolü

Koyun böbreğinden afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzimin (ACE) saflığını kontrol etmek ve moleköl ağırlığını belirlemek için SDS-PAGE yöntemi kullanıldı. Bu amaçla % 4-10 kesikli dikey SDS-PAGE elektroforez sistemi uygulanarak birkaç kuyucuğa saf enzim, en uçtaki iki kuyucuğada protein markırı

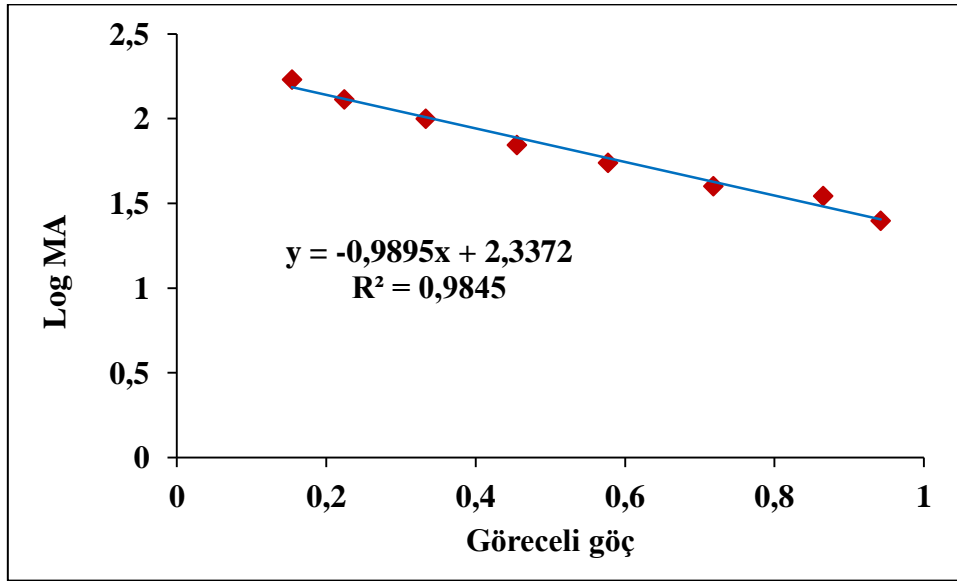
doldurularak proteinler yürütüldü. Elektroferez jeli üzerinde elde edilen bantları gösteren fotoğraf şekil 4.3'te gösterilmektedir.



Şekil 4.3. Koyun böbreğinden saflaştırılan ACE'in jel elektroferez fotoğrafı ve standart belirteç (markır)'in orijinal göstergesi.

4.4. Koyun böbreği ACE'in Alt Birimlerinin SDS-PAGE ile Molekül Ağırlığının Belirlenmesine Ait Sonuçlar

Koyun böbreği ACE'in alt birimlerinin molekül ağırlıklarının belirlenmesi bölüm 3.2.4'te anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. Enzim numuneleri SDS-PAGE'de yürütüldü. Elde edilen bantların fotoğrafları çekildi. Yürütülen standartların ve enzimlerin R_f değerleri ölçülüp hesaplanarak Göreceli Göç (R_f) – $\log M_A$ standart grafiği çizildi. Koyun böbreği anjiotensin konverting enzimin alt birimlerinden birinin molekül ağırlığı çizilen grafik denkleminden 60 kDa ve diğerinin 70 kDa olarak hesaplandı.



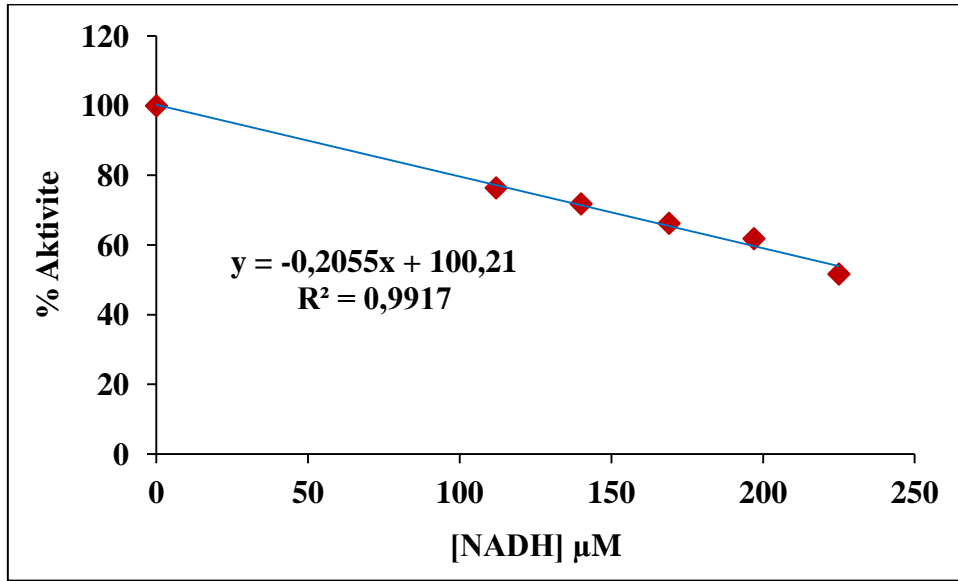
Şekil 4.4. Koyun böbreği anjiotensin konverting enziminin SDS-PAGE ile altbirimlerinin molekül ağırlıklarının belirlenmesinde kullanılan standart grafik.

4.5. Koyun böbreği ACE Aktivitesi Üzerine NADH ve FAD Bileşiklerinin Etkilerinin Belirlenmesine Ait Çalışma Sonuçları

Koyun böbreğinden saflaştırılan ACE aktivitesi üzerine etken maddelerin etkilerini belirlemek için NADH ve FAD bileşikleri çalışıldı. Bu bileşiklerden elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3 ile Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'te gösterildi.

Çizelge 4.2. Koyun böbreğindeki ACE'in NADH konsantrasyonu ile değişen aktivite ve % aktivite değerleri

I (µM)	0	112	140	169	197	225
EU	70.92	54.20	50.94	46.99	43.86	36.65
%Akt.	100	76.42	71.83	66.25	61.85	51.68



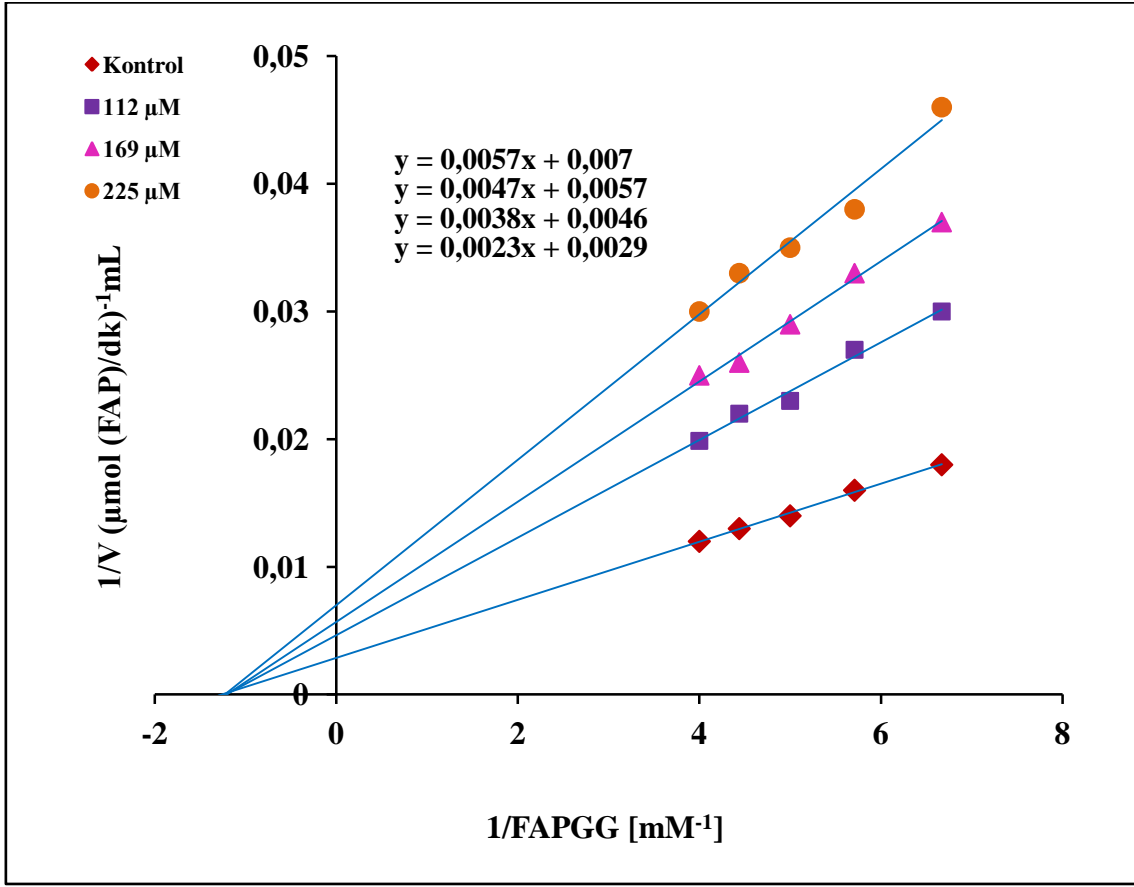
Şekil 4.5. Koyun böbreğindeki ACE üzerine NADH bileşiğinin etkisi.

Çizelge 4.3. Koyun böbreği ACE için bulunan IC_{50} ve K_i değerleri ve inhibisyon türü

İnhibitör	IC_{50}	K_i	İnhibisyon türü
NADH	244.33 µM	175.08 µM	Yarışmasız
FAD	-	-	-

4.6. Koyun böbreği ACE Aktivitesi Üzerine İnhibitör Etkisi Gösteren NADH Bileşiğinin İnhibisyon Türünün Belirlenmesine Ait Çalışma Sonuçları

Koyun böbreğinden saflaştırılan anjiotensin konverting enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren NADH bileşiğinin inhibisyon türünü belirlemek için bölüm 3.2.9'de anlatıldığı gibi aynı etken maddenin 3 uygun inhibitör konsantrasyonu ve 5 substrat konsantrasyonu belirlenerek aktivite değerleri ölçüldü. Bu değerlerden Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. x ekseninde kesişen doğruların oluşturduğu grafiği veren etken maddelerin inhibisyon türü yarışmasız inhibisyon olarak belirlendi.



Şekil 4.6. Koyun böbreği ACE aktivitesi üzerine NADH bileşiğinin etkisi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Son yıllarda, stresli yaşam tarzları ve beslenme alışkanlıkları hipertansiyon problemlerini bir araya getirmiştir. Uzun süreli, stresli ve kademeli olarak yükselen hipertansiyon; miyokard enfarktüsü, serebrovasküler olaylar, konjestif kalp yetmezliği, periferik arter yetmezliği, erken ölüm ve glomerüloskleroz ve böbrek arter anevrizmasına yol açan böbrek fonksiyon bozukluğu gibi birçok rahatsızlığa yol açabilir. Bazı tedaviler mevcuttur, ancak anjiotensin konverting enzim (ACE) inhibitörleri; hipertansiyon, konjestif kalp yetmezliği, sol ventrikül sistolik disfonksiyonu ve miyokard enfarktüsü için tercih edilen birinci basamak tedavi olmuştur. ACE inhibitörleri son yirmi yıldır kullanılmaktadır ve bunlara ilgi hala artmaktadır. Son zamanlarda, etki alanı seçici ACE inhibitörlerinin ve renin-anjiotensin sisteminin (yani, anjiotensin-dönüştürücü enzim 2) yeni üyelerinin keşfedilmesi, yine araştırmacıların ilgisini çekmiştir (Bicket, 2002; Lonn ve ark., 2003; Hanif ve ark., 2010).

Anjiotensin konverting enzim (veya kininaz II) endotel, epitelyal ve nöroepitelyal hücrelerde ve beyinde bir membran enzimi olan iki değerli bir dipeptidil karboksil metalopropeptidazdır; aynı zamanda kanda çözünür bir biçimde ve çok sayıda vücut sıvısında bulunur. ACE, C-terminal dipeptidi anjiotensin I ve bradikininden ayırır, böylece aynı anda RAS ve kallikrein-kinin sistemi ile etkileşime girer. ACE'nin bradikininin vazodilatuar ve natriüretik özellikleri ile anjiotensin II'nin vazokonstriktif ve tuz tutma özellikleri arasındaki dengede çok önemli bir rol oynadığı sonucu ortaya çıkmıştır. ACE aktivitesindeki bir artış bu hassas dengeyi bozar, vazokonstriktif ve tuz tutucu anjiotesin II'yi teşvik eder ve vazodilatuar ve natriüretik bradikininini azaltır. ACE inhibitörleri, anjiotensin II oluşumunu ve bradikinin yıkımını azaltması ile bu dengeyi geri kazandırarak yüksek kan basıncını düşürür (Skidgel ve Erdös, 1993; Brown ve ark., 1998; Hanif ve ark., 2010).

Bu çalışmada ACE koyun böbreğinden saflaştırıldı ve karakterize edildi. ACE afinite kromatografisi yöntemi ile tek basamakta 10305 kat saflaştırıldı ve spesifik aktivitesi 19075 EU/mg protein olarak belirlendi. Stewart ve arkadaşları tarafından

yapılan bir çalışmada ACE insan akciğerinin membran fraksiyonundan ve karşılaştırma için insan ve domuz böbreğinden saflaştırılmıştır. Membran bağlı akciğer enzimi 1800 kat ve böbrek enzimi 640 kat saflaştırılmış ve Bz-Gly-His-Leu ile spesifik aktiviteler akciğer enzimi için 81 ve böbrek enzimi için 65 $\mu\text{mol/dak/mg}$ olarak hesaplanmıştır (Stewart ve ark., 1981). Başka bir çalışmada afinite kromatografisi ile köpek testislerinden ACE 1588 kat saflaştırılmış ve ACE'nin spesifik aktivitesi $4239 \pm 2600 \text{ mU mg}^{-1}$ protein olarak hesaplanmıştır (Sabeur ve ark., 2001). Anjiotensin konverting enzim Concanavalin-A Sepharose 4B ve Lisinopril Sepharose 6B afinite kromatografisi kullanılarak iki basamakta domuz akciğerinden 530 kat saflaştırılmıştır (Andújar Sánchez ve ark., 2003). Benzer çalışmalarla karşılaştırıldığında çalışmamızdaki yüksek saflaştırma katsayısı tek basamakta başarılı bir saflaştırma yapıldığını kanıtlamaktadır.

Çalışmamızda NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow kolon dolgu maddesi kullanılarak afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırma yapıldı. NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow mevcut kimyasallarla bağlanma seçeneklerini artıran, önceden aktive edilmiş bir agaroz matriksidir. NHS (N-hidroksisüksinimid) primer amino grupları içeren ligandlarla kimyasal olarak amid bağlı formları birleştirmektedir. NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow bir boşluk kolu oluşturur ve özellikle küçük protein ve peptidleri bağlamak için uygundur. NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow; 6-amino heksanoik asit aralayıcı kol ve sepharose 4 fast flow maddesinin birleştirilmesi ile hazırlanmış yüksek derecede çapraz bağlı (boncuk şekillendirilmiş) bir pre-aktif matrikstir. Terminal karboksil grup N-hidroksisüksinimid ile esterleşerek aktive edilmiştir. Primer amino grubu içeren ligandlar kimyasal açıdan çok kararlı bir amid bağı oluşturmak için bu aktif bileşiğe doğrudan bağlanır. Birleştirme basamağından önce ön-aktive edilmiş kolon dolgu maddesinin bağlanma kapasitesinin maksimum seviyede olması için çözeltiler soğukta (0°C 'den 4°C 'ye) hazırlandı ve muhafaza edildi.

Bu çalışmada koyun böbreğinden saflaştırılan ACE' nin saflığı ve moleküler ağırlığı SDS-PAGE ile belirlendi ve jelin üzerinde 60 kDa ve 70 kDa olmak üzere iki bant gözlemlendi. Benzer şekilde, yetişkin ev sineklerinden (*Musca domestica*) afinite kromatografisiyle saflaştırılan anjiotensin dönüştürücü enzimin moleküler ağırlığı, SDS-PAGE ile 67 kDa olduğu bulunmuştur (Lamango ve ark., 1996). Köpek testisten afinite kromatografisi ile saflaştırılan ACE'nin moleküler ağırlığı, SDS-PAGE ile 70

kDa olarak belirlenmiştir (Sabeur ve ark., 2001). Strittmatter ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, ACE rat beyin korpus striatumundan saflaştırılan ACE'nin molekül ağırlığı SDS-PAGE ile 165 kDa ve akciğerinden saflaştırılan ACE için 175 kDa olarak bulunmuştur (Strittmatter ve ark., 1985). Anjiotensin konverting enzim Concanavalin-A Sepharose 4B ve Lisinopril Sepharose 6B afinite kromatografisi kullanılarak iki basamakta domuz akciğerinden saflaştırılan ACE'nin molekül ağırlığı SDS-PAGE ile 170 kDa olarak belirlenmiştir (Andújar Sánchez ve ark., 2003). Devekuşu (*Struthio camelus*) akciğerinden saflaştırılan ACE'nin moleküler ağırlığı yaklaşık 200 kDa olarak belirlenmiştir (Mojallal-Tabatabaei ve ark., 2013). Anjiotensin konverting enziminin birincisi somatik dokulardaki daha yüksek molekül ağırlığına sahip olan (150-180 kDa) somatik form, ikincisi ise germ (üreme) hücrelerinde olan ve daha küçük molekül ağırlığına sahip olan (90-110 kDa) testis formları olmak üzere iki izoenzimi bulunmuştur (Langford ve ark., 1993; Gatti ve ark., 1999; Sabeur ve ark., 2001). Bu yüzden yapılan birçok çalışmada farklı kaynaklarda bu enzimin farklı molekül ağırlıklara sahip olduğu belirlenmiştir.

Dipeptidil karboksipeptidaz gibi görev yapan anjiotensin konverting enzimin çözünebilir ve membrana bağlı olmak üzere iki çeşidi bulunmaktadır. Akciğer, böbrek, kalp, testis ve vücudun birçok organında membrana bağlı olan ACE bulunmaktadır. Serum, plazma, embriyoyu saran sıvı, beyin omurilik sıvısı, lenf ve seminal sıvı gibi tüm vücut sıvılarında ise çözünebilir ACE mevcuttur (Atlas, 2007). Birçok çalışmada böbrek, akciğer ve testis gibi dokulardan membrana bağlı olan ACE saflaştırıldığı zaman deterjan kullanımıştır. Bu işlemin yapılmasının sebebi membrana bağlı olan enzimin çözünebilir forma dönüştürülerek homojenat ortamına alınmasıdır. Örneğin, Hooper ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ACE domuz böbreğinden Triton X-100 ile membrandan çözüldürüldükten sonra afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırılmıştır (Hooper ve ark., 1987). Köpek testislerindeki ACE deterjanla ekstrakte edilmiş, proteaz inhibitörleri varlığında parçalanmış ve afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırılmıştır (Sabeur ve ark., 2001). Anjiotensin konverting enzim kurbağa yumurtalıklarından afinite kromatografisi yöntemiyle deterjan ve tripsin ile ekstrakte edilerek saflaştırılmıştır (Miano ve ark., 2003). Bizim çalışmamızda ise Triton X-100,

Nonidet P-40 gibi deterjanlar kullanılmadan tek basamakta başarılı bir saflaştırma gerçekleştirildi. Bu da zaman ve maliyet açısından büyük bir avantaj sağladı.

Ortak Ulusal Komite (JNC) VII'ye göre, ACE inhibitörleri hipertansiyon için birinci basamak ilaçlardan biridir. Evre I hipertansiyonu olan hastalar (sistolik kan basıncı (KB): 140-159 veya diyastolik KB: 90-99 mmHg) ACE inhibitörleri ile tedavi edilmelidir. ACE inhibitörleri hipertansif hastalarda ve ayrıca tuz tüketen normotansif deneklerde ortalama, sistolik ve diyastolik basınçları azaltmada etkilidir. Kan basıncındaki keskin değişim, tedavi öncesi plazma renin aktivitesi ve anjiotensin seviyeleri ile ilişkilidir. Kan basıncındaki en büyük düşüşler plazma renin aktivitesinin en yüksek olduğu hastalarda görülür. ACE inhibitörlerinin karakteristik özelliklerinden biri, kalp hızında telafi edici bir artışa neden olmadan veya baroreseptör aktivitesini değiştirmeden periferik vasküler direnci düşürmeleridir (Hanif ve ark., 2010). ACE inhibitörlerinin antihipertansif etkilerinden bağımsız olarak kalp damar hipertrofisini önlediği gösterilmiştir. ACE inhibitörleri, hipertansiyonun neden olduğu kardiyovasküler ölüm riskini azaltır. Aynı zamanda bu inhibitörler, böbreklerin damarlarını genişleterek ve böbrek kan akışını artırarak sodyum ve su salgılanmasına yardımcı olur. Bu da ödem ve kan hacmini azaltmaya yardımcı olur. ACE inhibitörleri kalpteki anjiotensin II seviyelerinin düşürülmesinden kaynaklanan kalpteki patolojik değişiklikleri önler (Solski ve Longyhore, 2008; Hanif ve ark., 2010). Bununla birlikte, bu inhibitörlerin cilt döküntüleri, öksürük, tat bozuklukları, alerjik reaksiyonlar ve lokalize potasyum seviyeleri gibi yan etkilere neden olduğu tespit edilmiştir. Bu yüzden yan etkisi en az olan doğal kaynaklar önemli bir araştırma alanı oluşturmaktadır. Birçok çalışmada antioksidan bileşikler, doğal peptidler ve bitkiler gibi doğal kaynakların üzerine ACE aktivitesi üzerine inhibitör etkisi araştırılmıştır.

Antioksidan bileşikler olan GSH, karnosin, homoskarnosin ve anserin bileşiklerinin ACE aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi araştırılmıştır. Bu bileşikler ACE aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi göstermiş ve IC₅₀ değerleri sırasıyla 32.4 µM, 5.216 mM, 6.147 mM ve 6.967 mM, GSH ve karnosin için Ki değerleri ise 49.7 µM ve 3.899 mM olarak tespit edilmiştir (Hou ve ark., 2003).

İnsan plazmasından saflaştırılan ACE aktivitesi üzerine okside glutatyon (GSSG) peptidi ve indirgenmiş glutatyon (GSH) peptidinin etkisi incelenmiştir.

Lisinopril referans inhibitörü olarak kullanılmıştır. GSSG ACE aktivitesi üzerinde aktivasyon etkisi gösterirken, GSH inhibisyon etkisi göstermiştir. GSH ve lisinopril için IC₅₀ değerleri sırasıyla 16.2 µM ve 0.781 nM olarak hesaplanmıştır. Lineweaver-Burk grafiğinden GSH ve lisinopril için inhibisyon çeşidi non-kompetitif inhibisyon olarak belirlenmiştir. GSH ve lisinopril için K_i değerleri sırasıyla 11.7 µM ve 0.662 nM olarak bulunmuştur (Basi ve Turkoglu, 2019).

Bu çalışmada ise koyun böbreğinden saflaştırılan ACE aktivitesi üzerine NADH ve FAD bileşiklerinin inhibisyon etkisi araştırıldı. NADH saflaştırılmış ACE aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösterirken FAD hiçbir etki göstermedi. NADH bileşiğinin farklı konsantrasyonları kullanılarak % Aktiviteye karşı İnhibitör grafiği çizildi. Bu grafiğin denkleminde NADH bileşiğinin IC₅₀ değeri 244.33 µM olarak hesaplandı. NADH bileşiğinin inhibisyon tipini ve K_i değerini belirlemek için 3 inhibitör ve 5 substrat konsantrasyonu kullanılarak Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Grafikte inhibisyon çeşidi non-kompetitif ve K_i değeri 175.08 µM olarak belirlendi. Bu sonuçlara dayanarak NADH bileşiğinin önemli ölçüde bir inhibisyon etkisi gösterdiği gözlemlendi.

Yapılan birçok çalışmada oral veya intravenöz yoldan alınan NADH bileşiği hipertansiyon, depresyon, Alzheimer Hastalığı ve Parkinson Hastalığı gibi hastalıkların tedavisinde önemli derecede etkili olduğu gözlemlenmiştir.

Bushehri ve ark. yaptığı bir çalışmada, doğal bir koenzim olan oral B-nikotinamid adenin dinükleotidi (NADH), temelde çeşitli nörolojik rahatsızlıkları tedavi etmek için kullanılmasına rağmen, benzer tip bir ajan olan koenzim Q10'da olduğu gibi bu ajanın kan basıncını düşürme ve kardiyovasküler sistem için faydalı olma gibi bir potansiyele sahip olup olmadığı araştırılmıştır. Oral NADH'nin etkilerini belirlemek için kendiliğinden hipertansif ratlar (SHR) kullanılmıştır. Kör, plasebo kontrollü bir çalışmada, on rata plasebo verilmiştir. Kör, plasebo kontrollü bir çalışmada, on rata on hafta boyunca plasebo ve NADH verilmiştir. Her ne kadar sistolik kan basıncı her iki grup arasında ilk ayda farklılık göstermese de, oral NADH alan kendiliğinden hipertansif rat gruplarında çalışmanın geri kalanı için sistolik kan basıncında belirgin bir şekilde azalma görülmüştür. 60 günün sonunda, NADH ile muamele edilmiş SHR'deki sistolik kan basıncı (184 mm Hg[±] 2.8 (SEM)), kontrol SHR'deki sistolik kan basıncı

ile karşılaştırıldığında (201 mm Hg[±] 2.1 (SEM)) azaldığı gözlemlenmiştir (p <0.001). NADH alımı toplam kolesterolü (p <0.002) ve LDL'yi (p <0.02) azaltmıştır. Doğal bir koenzim olan NADH bileşiğinin oral alımı yüksek kan basıncında ve buna bağlı olarak çeşitli kardiyovasküler hastalıkların önlenmesinde faydalı olabileceği sonucuna varılmıştır (Bushehri ve ark., 1998).

Stabilize oral indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotidi (NADH) kullanılarak alzheimer hastalığı (AD) olan hastalarda bilişsel işlevsellik üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. NADH, hücresel enerji üretiminde kilit bir rol oynayan ve dopamin üretimini uyaran bir koenzimdir. Daha önceki çalışmalarda NADH'nin Parkinson hastalığı, depresyon ve AD olan hastaların bilişsel işleyişini iyileştirdiği belirlenmiştir. Bu çalışma randomize, plasebo kontrollü, eşleştirilmiş çiftler, çift kör gruplardan oluşan 6 aylık bir klinik çalışmadır. Muhtemel AD'li (n = 26) hastalar stabilize oral NADH (10 mg / gün) veya plasebo almak için randomize edilmiştir. Mattis Demans Derecesi Ölçeği (MDRS) ve Mini Zihinsel Durum İncelemesinde on iki denek çifti yaş ve temel toplam puan için eşleştirilmiştir. 6 aylık tedaviden sonra, NADH ile tedavi edilen denekler, ilerleyen bilişsel bozulma kanıtı göstermemiştir ve MDRS'de plasebo ile tedavi edilenlere kıyasla önemli derecede daha yüksek toplam puan almıştır (p <0.05). MDRS alt ölçeklerinin analizi, NADH deneklerinin sözel akıcılık ölçütleri (p = 0.019), görsel-yapısal yetenek (p = 0.038) ve soyut sözel akıl yürütme ölçütünde daha iyi performans eğilimi (p = 0.08) ölçümlerinde anlamlı olarak daha iyi performans gösterdiği belirlenmiştir. Gruplar arasında dikkat, hafıza veya klinisyen demans şiddeti derecelerinde (Klinik Demans Derecesi) farklılık bulunmamıştır. Daha önceki çalışmalarla tutarlı olarak, mevcut bulgular AD için bir tedavi olarak NADH'yi desteklemektedir (Demarin ve ark., 2004).

Reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif azot türleri (RNS); proteinler, karbonhidratlar, DNA ve lipidler gibi makromoleküllere saldırarak hücre hasarına yol açan serbest radikaller olarak bilinir. İnsan vücudunda doğal olarak veya hava kirliliği, ozon, sigara içimi ve endüstriyel kimyasallar gibi dış kaynaklar tarafından üretilen söz konusu serbest radikaller oksidatif strese neden olur. Oksidatif stresin Alzheimer, Parkinson, kalp hastalıkları, hipertansiyon gibi pek çok hastalığa önemli katkı sağladığı düşünülmektedir. Glutatyon, glutatyon redüktaz, katalaz, koenzim Q10 ve transferrin

gibi antioksidanlar hücre hasarını önlemek için serbest radikallerle etkileşime girerek oksidatif stresi engeller (Stefanis ve Burke, 1997; Shi ve ark., 1999; Lobo ve ark., 2010). Aynı zamanda yapılan birçok bu antioksidan bileşiklerin oksidatif stresi önlerken hipertansiyon tedavisinde de etkili olduğu belirlenmiştir. Doğal olarak oluşan bir koenzim olan nikotinamid adenin dinükleotid (NADH) bileşiğide antioksidan bir bileşiktir ve hücrelerin enerji üretiminde kilit rol oynar. Aynı zamanda NADH sinir ileticilerin metabolizmasını da etkiler (Birkmayer ve Birkmayer, 1991; Vrecko ve ark., 1993). Bu çalışmada da antioksidan bir bileşik olan NADH saflaştırılan ACE aktivitesi üzerine $244.33 \mu\text{M}$ IC_{50} değeri ile önemli derecede inhibisyon etkisi gösterdi. Bu sonuçlar NADH bileşiğinin hipertansiyon tedavisinde etkili olabileceğini ve ACE inhibitörlerine doğal bir alternatif kaynak olabileceğini gösterdi.

Çalışmamızda ilk defa anjiotensin konverting enzim (ACE) koyun böbreğinden afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırıldı ve kolon dolgu maddesi olarak NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow ve ligand olarak spesifik bir ACE inhibitörü olan lisinopril kullanıldı. Diyaliz, ultrafiltrasyon, nötral tuzlarla çöktürme gibi yöntemler ve deterjan kullanılmadan tek basamakta 10305 kat bir yüksek saflaştırma katsayısı ile başarılı bir saflaştırma gerçekleştirildi. Saf ACE aktivitesi üzerine NADH ve FAD bileşiklerinin inhibisyon etkisi araştırıldı. Doğal bir koenzim ve antioksidan bir bileşik olan NADH bileşiği düşük bir IC_{50} ($244.33 \mu\text{M}$) değeri ile yüksek derecede inhibisyon etkisi gösterdi.

Çalışmamızda antioksidan bileşiklerden olan NADH ve FAD bileşiklerinin kan basıncının düzenlenmesinden sorumlu olan ve saflaştırdığımız ACE enzimi aktivitesi üzerine etkisi araştırıldı. Antioksidanlar oksidatif stresin ortaya çıkardığı birçok hastalığın önlenmesinde etkilidir. NADH antioksidan karakteri olan bir bileşiktir. Bu bileşik saflaştırdığımız enzim üzerine yarışmasız inhibisyon etkisi göstermiştir. Böylece serbest radikallerin zararlı etkilerini bertaraf etmede etkili olan antioksidanlar birçok metabolik olayda olduğu gibi hipertansiyonu önlemede de olumlu yönde etkisi olacaktır.

FADH₂ bileşiği de redükte bir bileşiktir. Ancak FADH₂ sulu ortamda hemen elektronlarını kaybeder ve reaksiyon çok hızlı gerçekleşir. Bu nedenle FADH₂'nin kararlılığının korunması mümkün olmadığından, bu bileşik ile çalışma imkanı olmaz.

Biz de bu çalışmamızda FADH₂ bileşiminin okside hali olan FAD bileşimini inceledik. FAD bileşiminin ACE enzimini aktive etmesi beklenirken hiçbir etki göstermedi. Bu bileşimin aktivite göstermesi gerekirken niçin hiçbir etki göstermemesinin sebebi olarak; FAD ya da FADH₂'nin sulu ortamda aşırı tepkici olması ve sonuç vermemesidir. Zira yaptığımız literatür araştırmalarında aynı sorunla karşılaşılan çalışmalar bulunmaktadır. Bunun yanında kararsız olduğu için FADH₂ bileşiminin ticari olarak üretimi de yapılmamaktadır.



KAYNAKLAR

- Ahmad, K. A., YuanYuan, D., Nawaz, W., Ze, H., Zhuo, C. X., Talal, B., Taleb, A., Mais, E., Qilong, D., 2017. Antioxidant therapy for management of oxidative stress induced hypertension. *Free Radical Research*, **51(4)**: 428-438.
- Aktümsek, A., 2009. *Anatomi ve Fizyoloji-İnsan Biyolojisi*. Nobel Yayın Dağıtım. 436.
- Andújar-Sánchez, M., Cámara-Artigas, A., Jara-Pérez, V., 2003. Purification of angiotensin I converting enzyme from pig lung using concanavalin-A sepharose chromatography. *Journal of Chromatography B*, **783**: 247-252.
- Ardalan, M. R., Rafieian-Kopaei, M., 2014. Antioxidant supplementation in hypertension. *J Renal Inj Prev*, **3**: 39-40.
- Atlas, S. A., 2007. The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *Journal of Managed Care Pharmacy*, **13** (8 Suppl B): 9-20.
- Bahorun, T., Soobrattee, M. A., Luximon-Ramma, V., Aruoma, O. I., 2006. Free radical and antioxidants in cardiovascular health and disease. *Internet J. Med. Update*, **1**: 1-17
- Balti, R., Baugatet, A., Sila, A., Guillachon, D., Dhulster, P., Nedjar-Arroume, N., 2015. Nine novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from cuttlefish (*Sepia officinalis*) muscle protein hydrolysates and antihypertensive effect of the potent active peptide in spontaneously hypertensive rats. *Food Chem*, **170**: 519-25.
- Baradaran, A., Nasri, H., Rafieian-Kopaei, M., 2014. Oxidative stress and hypertension: Possibility of hypertension therapy with antioxidants. *Journal of Research in Medical Sciences*, **19** (4): 358-67.
- Basi, Z., Turkoglu, V., 2018. Purification of angiotensin-converting enzyme from human plasma and investigation of the effect of some active ingredients isolated from *Nigella sativa* L. extract on the enzyme activity. *Biomedical Chromatography*, **32**: 1-8.
- Basi, Z., Turkoglu, V., 2019. In vitro effect of oxidized and reduced glutathione peptides on angiotensin converting enzyme purified from human plasma. *Journal of Chromatography B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci*, **1104**: 190-195.
- Behradmanesh, S., Nasri, H., 2013. Association of serum calcium with level of blood pressure in type 2 diabetic patients. *J Nephrothol*, **2**: 254-7.
- Bell, L., Madri, J., 1990. Influence of the angiotensin system on endothelial and smooth muscle cell migration. *Am J Pathol*, **137**: 7-12.
- Bernstein, K.E., Ong, F. S., Blackwell, W. L., Shah, K. H., Giani, J. F., Gonzalez-Villalobos, R. A., Shen, X. Z., Fuchs, S., Touyz, R. M. A., 2012. Modern understanding of the traditional and nontraditional biological functions of angiotensin-converting enzyme. *Pharmacol, Rev*, **65**: 1-46.
- Bicket, D. P., 2002. Using ACE inhibitor appropriately. *Am Fam Physician*, **66**: 461-468.
- Birkmayer, J. G. D., Birkmayer, W., 1991. The co-enzyme nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) as biological antidepressant agent. Experience with 205 patients. *New Trends in Neuropharmacology*, **5**: 15-23.

- Birkmayer, J. G., Vrecko, C., Volc, D., Birkmayer, W., 1993. Nicotinamide adenine dinucleotide (NADH)—a new therapeutic approach to Parkinson's disease. Comparison of oral and parenteral application. *Acta Neurologica Scandinavica. Supplementum*, **146**: 32-5.
- 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**: 248-54.
- Briones, A. M., Touyz, R. M., 2010. Oxidative stress and hypertension: Current concepts. *Curr Hypertens Rep*, **12**: 135-42.
- Brown, N. J., Vaughan, D. E., 1998. Angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Circulation*, **97**: 1411-1420.
- Bushehri, N., Jarrell, S. T., Lieberman, S., Mirdamadi-Zonozi, N., Birkmayer, G., Preuss, H. G., 1998. Oral reduced B-nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) affects blood pressure, lipid peroxidation, and lipid profile in hypertensive rats (SHR). *Geriatric Nephrology and Urology*, **8(2)**: 95-100.
- Carlberg, I., Mannervik, B., 1981. Purification and characterization of glutathione reductase from calf liver. An improved procedure for affinity chromatography on 2',5'-ADP-Sepharose-4B. *Analytical Biochemistry*, **116**: 531-536.
- Chatterjee, M., Saluja, R., Kanneganti, S., et al. 2007. Biochemical and molecular evaluation of neutrophil NOS in spontaneously hypertensive rats. *Cell Mol. Biol*, **53**: 84-93.
- Chobanian, A. V., Bakris, G. L., Black, H. R., Cushman, W. C., Green, L. A., Izzo, J. L., Jr, Jones, D. W., Materson, B. J., Oparil, S., Wright, J. T., Jr, Roccella, E. J., Joint National Committee on Prevention DE, Treatment of High Blood Pressure. National Heart L, Blood I, National High Blood Pressure Education Program Coordinating C. 2003. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension*, **42**: 1206-1252.
- Cohen, M. L., Kurz, K. D., 1982. Angiotensin converting enzyme inhibition in tissues from spontaneously hypertensive rat after treatment with captopril MK-421. *J Pharmacol Exp Ther*, **220**: 63-69.
- Cotton, J., Hayashi, M. A., Cuniasso, P., Vazeux, G., Ianzer, D., De Camargo, A. C., Dive, V., 2002. Selective inhibition of the C-domain of angiotensin I converting enzyme by bradykinin potentiating peptides. *Biochemistry*, **41**: 6065-6071.
- Daemen, M. J., Lombardi, D. M., Bosman, F. T., Schwartz, S. M., 1991. Angiotensin II induces smooth muscle cell proliferation in the normal and injured rat arterial wall. *Circ Res*, **68**: 450-456.
- Danser, A. H., vanKats, J. P., Admiraal, P. J., Derkx, F. H., Lamers, J. M., Verdouw, P. D., Saxena, P. R., Schalekamp, M. A., 1994. Cardiac renin and angiotensin : uptake from plasma versus in situ synthesis. *Hypertension*, **24**: 37-48.
- Demarin, V., Podobnik, S. S., Storga-Tomic, D., Kay, G., 2004. Treatment of Alzheimer's disease with stabilized oral nicotinamide adenine dinucleotide: a randomized, double-blind study. *Drugs under experimental and clinical research*, **30(1)**: 27-33.
- Dicpinigaitis, P. V., 2006. Angiotensin-converting enzyme inhibitor-induced cough: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*, **129**: 169S-173S.

- Dostal, D. E., Booz, G. W., Baker, K. M., 1996. Angiotensin II signalling path ways incardiac fibroblasts: conventional versus novelmechanisms in mediating cardiac growth and function. *Mol Cell Biochem*, **157**: 15–21.
- Dzau, V. J., 1993. Vascular renin angiotensin system and vascular protection. *J Cardiovasc Pharmacol*, **22(suppl)**: S1–S9.
- Eisele, T., Stressler, T., Kranz, B., Fischer, L., 2012. Automated multi-step purification protocol for Angiotensin-I-Converting-Enzyme (ACE). *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **911**: 64-70.
- Ezzati, M., Lopez, A. D., Rodgers, A., Vander Hoorn, S., Murray, C. J., 2002. Comparative Risk Assessment Collaborating G. Selectedmajor risk factorsand global andregionalburden of disease. *Lancet*, **360**: 1347–1360.
- Fabris, B., Jackson, B., Cubela, R., Mendelsohn, F. A. O., Johnston, C. I., 1989. Angiotensin converting enzyme in theratheart: studies of itsinhibition in vitroandexvivo. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **16**: 309 –313.
- Gatti, J. L., Druart, X., Guerin, Y., Dacheux, F., Dacheux, J. L., 1999.A 105 to 94 kilodalton protein in the epididymal fluids of domestic mammals is angiotensin-converting enzyme (ACE); evidence that sperm arethesource of ACE. *Biology of Reproduction*, **60**: 937-945.
- Gavazzi, G., Banfi, B., Deffert, C., Fiette, L., Schappi, M., Herrmann, F., et al. 2006. Decreased blood pressure in NOX1-deficient mice. *FEBS Lett*, **580**: 497–504.
- Genestra, M., 2007. Oxyradicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Review. Cell Signal*,**19**: 1807-1819.
- Given, B. D., Taylor, T., Hollenberg, N. K., Williams, G. H., 1984.Duration of action and short-term hormonal response stoenal april (MK-421) in normal subjects. *J Cardiovasc Pharmacol*, **6**: 436–441.
- Gözükara, M.E., 1997. *Biyokimya*. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
- Guo, M., Chen, X., Wu Y., Zhang, L., Huang, W., Yuan, Y., Fang, M., Xie, J., Wei, D., 2017. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from Sipuncula (Phascolosoma esculenta): Purification, identification, molecular docking and antihypertensive effects on spontaneously hypertensive rats, *Process Biochemistry*, **63**: 84-95.
- Guyton, A. C., Hall, J. E., 2006. *Textbook of Medical Physiology. 11th edition*. Elsevier Saunders, Philadelphia. 1152.
- Hackam, D. G., Quinn, R. R., Ravani, P.,et al. 2013. Canadian Hypertension Education Program (CHEP) Recommendation sforblood pressureeme asurement, diagnosis, assessment of risk, prevention, andtreatment of hypertension. *Can J Cardiol*, **29**: 528-42.
- Halliwell, B., 2007. Biochemistry of oxidativestress. *Biochem. Soc. Trans*,**35**: 1147-1150.
- Hanif, K., Bid, H. K., Konwar, R., 2010. Reinventing the ACE inhibitors: some old and new implications of ACE inhibition. *Hypertens Res*, **33**: 11-21.
- Holmquist, B., Bünning, P., Riordan, J. F., 1979. A continuous spectrophotometric assay for angiotensin converting enzyme. *Analytical Biochemistry*, **95** (2): 540-548.
- Hooper, N. M., Turner, A. J., 1987. Isolation of two differentially glycosylated forms of peptidyl-dipeptidase A (angiotensin converting enzyme) from pig brain: a

- reevaluation of their role in neuropeptide metabolism. *The Biochemical Journal*, **241** (3): 625-33.
- Hou, W. C., Chen, H. J., Lin , Y. H., 2003. Antioxidant peptides with Angiotensin converting enzyme inhibitory activities and applications for Angiotensin converting enzyme purification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**: 1706-1709.
- Huckle, W. R., Earp, H. S., 1994.Regulation of cell proliferation and growth by angiotensin II. *Prog Growth Factor Res*, **5**: 177-194.
- Itoh, H., Mukoyama, M., Pratt, R. E., Gibbons, G. H., Dzau, V. J., 1993. Multiple autocrine growth factor smodulate vascular smooth muscle cell growth responseto angiotensin II. *J Clin Invest*, **91**: 2268 -2274.
- Karahan, F., 2019. *Afinite Kromatografisi Yöntemiyle Sığır Akciğerinden Saflaştırılan Anjiotensin Konverting Enzim Üzerine Hipertansiyonu Önleyici Bazı Etken Maddelerin İn Vitro Etkilerinin Araştırılması* (doktora tezi, basılmamış). Van YYÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tuşba, Van.
- Kearney, P. M., Whelton, M., Reynolds, K., Muntner, P., Whelton, P. K., He, J., 2005. Global burden of hypertension. *Analysis of worldwide data*, *Lancet* **365**: 217-223.
- Keha, E., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2012. *Biyokimya*. 9. baskı. Aktif Yayınevi, Erzurum. 643.
- Laemmli, U.K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.
- Lamango, N. S., Sajid, M., Isaac, R. E., 1996.The endopeptidase activity and the activation by Cl- of angiotensin-converting enzyme is evolutionarily conserved: purification and properties of an an angiotensin-converting enzyme from the housefly, *Musca domestica*. *Biochemical Journal*, **314**: 639-646.
- Langford, K. G., Zhou, Y., Russell, L. D., Wilcox, J. N., Bernstein, K., 1993. Regulated expression of testis angiotensin converting enzyme during spermatogenesis in mice. *Biology of Reproduction*, **48**: 1210-1218.
- Lin , Y. H., Chen, G. W., Yeh, C. H., Song, H., Tsai, J. S., 2018. Purification and Identification of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides and the Antihypertensive Effect of Chlorella sorokiniana Protein Hydrolysates. *Nutrients*, **10**: 1-14.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N., 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, **4**: 118-126.
- Lonn, E., Gerstein, H. C., Smieja, M., Mann, J. F. E., Yusuf, S., 2003. Mechanisms of cardiovascular risk reduction swithramipril: insights from HOPE and HOPE substudies. *Eur Heart J*, **5(Suppl A)**: A43-A48.
- Marketou, M., Kintsurashvili, E., Papanicolaou, K. N., Lucero, H. A., Gavras, I., Gavras, H., 2010. Cardio protective effects of a selective B(2) receptoragonist of bradykinin postacute myocardial infarct. *Am J Hypertens*, **23**: 562-568.
- Miano, A., Quassinti, L., Maccari, E., Murri, O., Amici, D., Bramucci, M., 2003. Purified angiotensin converting enzyme from *Rana esculenta* ovary influences ovarian steroidogenesis *in vitro*. *Journal of Physiology and Biochemistry*, **59** (4): 269-76.
- Mira, M. L., Silva, M. M., Manso, C. F., 1994.The scavenging of oxygen free radicals by angiotensin converting enzyme inhibitors: the importance of the sulfhydryl

- group in the chemical structure of the compounds. *Ann N Y Acad Sci*, **723**: 439–441.
- Mojallal-Tabatabaei, Z., Asoodeha, A., Housaindokhta, M. R., Chamani, J., 2013. Purification and biochemical characterization of angiotensin I-converting enzyme (ACE) from ostrich lung: The effect of 2,2,2-trifluoroethanol on ACE conformation and activity. *Process Biochemistry*, **48**: 1091–1098.
- Montezano, A. C., Touyz, R. M., 2012. Oxidative stress, Noxs, and hypertension: Experimental evidence and clinical controversies. *Ann Med*, **44(Suppl 1)**: S2-16
- Nakajima, T., Oshima, G., Yeh, H. S. J., Igit, R., Erdös, E. G., 1973. Purification of the angiotensin I-converting enzyme of the lung. *Biochimica et Biophysica Acta*, **315**: 430-438.
- Nasri, H., 2012. Comment on: Serum cholesterol and LDL-C in association with level of diastolic blood pressure in type 2 diabetic patients. *J Renal Inj Prev*, **1**: 13–4.
- Nelson, D. L., Cox, M. M., 2000. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3rd ed. Worth Publishers, USA. 743.
- Özcan N., 2001. *Hipertansiyon*. Gülhane As. Tıp Akademisi Tıp Fakültesi Kitabı, Ankara.
- Pacher, P., Beckman, J. S., Liaudet, L., 2007. Nitric oxide and peroxynitrite in heart disease. *Physiol. Rev*, **87**: 315-424.
- Pantoliano, M. W., Holmquist, B., Riordan, J. F., 1984. Affinity chromatographic purification of angiotensin converting enzyme. *Biochemistry*, **23** (5):1037-1042.
- Parthasarathy, S., Santanam, N., Ramachandran, S., Meilhac, O., 1999. Oxidants and antioxidants in atherogenesis: an appraisal. *J. Lipid Res*, **40**: 2143-2157.
- Pham-Huy, L. A., He, H., Pham-Huy, C., 2008. Freeradicals, antioxidants in disease and health. *International journal of biomedical science*, **4(2)**: 89-96.
- Pinheiro-Junior, E. L., Boldrini-França, J., de Campos Araujo, L. M. P., Santos-Filho, N. A., Bendhack, L. M., Cilli, E. M., Arantes, E. C., 2018. LmrBPP9: A synthetic bradykinin-potentiating peptide from Lachesis muta rhombeata venom that inhibits the angiotensin-converting enzyme activity in vitro and reduces the blood pressure of hypertensive rats. *Peptides*, **102**: 1-7.
- Pool, J. L., Gennari, J., Goldstein, R., Kochar, M. S., Lewin, A. J., Maxwell, M. H., McChesney, J. A., Mehta, J., Nash, D. T., Nelson, E. B., Rastogi, S., Rofman, B., Weinberger, M., 1987. Controlled multicenter study of antihypertensive effects of lisinopril, hydrochlorothiazide, and lisinopril plus hydrochlorothiazide in the treatment of 394 patients with mild to moderate essential hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*, **3**: S36–S42.
- Quassinti, L., Miano, A., Bramucci, M., Maccari, E., Amici, D., 1998. Purification of swine serum angiotensin converting enzyme with high recovery of activity using lisinopril coupled to epoxy activated sepharose 6B. *Biochemistry and Molecular Biology for Life Scientists*, **44** (5): 887-895.
- Rafieian-Kopaei, M., Nasri, H., 2012. Ginger and diabetic nephropathy. *J Renal Inj Prev*, **2**: 9–10.
- Rodrigo, R., González, J., Paoletto, F., 2011. The role of oxidative stress in the pathophysiology of hypertension. *Hypertens Res*, **34**: 431–40.
- Rodrigo, R., Prat, H., Passalacqua, W., Araya, J., Bächler, J. P., 2008. Decrease in oxidative stress through supplementation of vitamins C and E is associated with


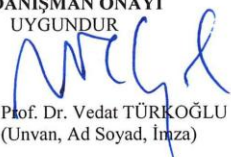
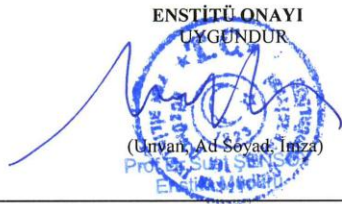
- areduction in blood pressure in patient swithessential hypertension. *Clin Sci (Lond)*, **114**: 625–34.
- Sabeur, K., Vo, A. T., Ball, B. A., 2001. Characterization of angiotensin-converting enzyme in canine testis. *Reproduction*, **122** (1): 139-146.
- Sealey, J. E., Laragh, J. H., 1990. The renin-angiotensin-aldosterone system for normal regulation of blood pressure and sodium and potassium homeostasis. In: Laragh JH, Brenner BM, eds. Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Management. *New York, NY: Raven Pres Ltd*, 1287–1317.
- Shi, H. L., Noguchi, N., Niki, N., 1999. Comparative study on dynamics of antioxidative action of α -tocopherylhydroquinone, ubiquinol and α -tocopherol, again stlipidperoxidation, *Free Radic Biol Med*, **27**: 334–346.
- Skala, M. C., Riching, K. M., Bird, D. K., Gendron-Fitzpatrick, A., Eickhoff, J., Eliceiri, K. W., Keely, P. J., Ramanujam, N., 2007. In vivo multiphoton fluorescence lifetime imaging of protein-bound and free nicotinamide adenine dinucleotide in normal and precancerous epithelia. *Journal of Biomedical Optics*, **12**(2): 024014.
- Skeggs, L. T., Dorer, F. E., Kahn, J. R., Lentz, K. E., Levine, M., 1976. The biochemistry of the renin-angiotensin system and its role in hypertension. *Am J Med*, **60**: 737–748.
- Skidgel, R. A., Erdos, E., 1993. Biochemistry of angiotensin I-converting enzyme. In: Robertson JIS, Nicholls MG, eds. The Renin-Angiotensin System. New York, NY: *Raven Press Ltd*, **10**: 1–10.10.
- Smith, C., Marks, A. D., Lieberman, M., 2007. *Marks' Temel Tıbbi Biyokimyası Klinik Yaklaşım* (İnal, M. E., Atik, U., Aksoy, N., Haşimi, A., çeviri editörleri .) Güneş Tıp Kitapevleri, Ankara. 976.
- Solski, L. V., Longyhore, D. S., 2008. Prevention of type 2 diabetes mellitus with angiotensin-converting-enzyme inhibitors. *Am J Health Syst Pharm.*, **65**: 935-940.
- Stefanis, L., Burke, R. E., Greene, L. A., 1997. Apoptosis in neurodegenerative disorders, *Curr Opin Neurol*, **10**: 299–305.
- Stewart, T. A., Weare, J. A., Erdös, E. G., 1981. Human peptidyl dipeptidase (converting enzyme, kininase II). *Methods in Enzymology*, **80**: 450-460.
- Strittmatter, S. M., Thiele, E. A., Kapiloff, M. S., Snyder, S. H., 1985. A rat brain isozyme of angiotensin-converting enzyme unique specificity for amidated peptide substrates. *The Journal of Biological Chemistry*, **260** (17): 9825-9832.
- Timmermans, P. B., Wong, P. C., Chiu, A. T., Herblin, W. F., Benfield, P., Carini, D. J., Lee, R. J., Wexler, R. R., Saye, J. A., Smith, R. D., 1993. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharm Rev*, **45**: 205–251.
- Todd, P. A., Heel, R. C., 1986. Enalapril: a review of its pharmaco dynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use hypertension and congestive heart failure. *Drugs*, **31**: 198 –248.
- Touyz, R. M., Schiffrin, E. L., 2001. Increased generation of superoxide by angiotensin II in smooth musclecells from resistance arteries of hypertensive patients:Role of phospholipase D-dependent NAD(P)H oxidase-sensitive path ways. *J Hypertens*, **19**: 1245–54.
- Ujhelyi, M. R., Ferguson, R. J., Vlasses, P. H., de 1989. Angiotensin-converting enzyme inhibitors: mechanistic controversies. *Pharmacotherapy*, **9**: 351–362.

- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., et al. 2006. Freeradicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Mini-review. Chem. Biol. Interact*, **160**: 1-40.
- Vrecko, K., Birkmayer, J. G. D., Krainz, J., 1993. Stimulation of dopamine biosynthesis in cultured PC 12 pheochromocytoma cells by the co-enzyme nicotinamide adenine dinucleotide (NADH). *J Neur Trans*, **5**: 147–156.
- Waeber, B., Gavras, I., Brunner, H. R., Cook, C. A., Charocopos, F., Gavras, H. P., 1982. Prediction of sustained antihypertensive efficacy of chronic captopril therapy: relation ships to immediate blood pressure response and control plasma renin activity. *Am Heart J*, **103**: 384 –390.
- Willcox, J. K., Ash, S. L., Catignani, G. L., 2004. Antioxidant sand prevention of chronic disease. *Review. Crit. Rev. Food. Sci. Nutr*, **44**: 275-295.
- Xue, L., Wang, X., Hu, Z., Wu, Z., Wang, L., Wang, H., Yang, M., 2018. Identification and characterization of an angiotensin-converting enzyme inhibitory peptide derived from bovine casein. *Peptides*, **99**: 161-168.
- Young, I., Woodside, J., 2001. Antioxidants in healt hand disease. *J. Clin. Pathol*, **54**: 176-186.
- Zusman, R. M., 1987. Effects of converting-enzyme inhibitors on the renin angiotensin-aldosterone, bradykinin, and arachidonicacid-prostaglandin systems: correlation of chemical structure and biologic activity. *Am J Kidney Dis*, **10**: 13–23.

ÖZ GEÇMİŞ

1993 yılında Van'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Van'da tamamladı. 2010 yılında Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Eğitim Fakültesi Fen Bilgisi Öğretmenliği Bölümü'nü kazandı ve 2014 yılında aynı bölümden mezun oldu. 2016 yılı güz döneminde Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde yüksek lisans öğrenimine başladı. 2019 yılında Fen Bilgisi Öğretmeni olarak göreve başladı.



T.C VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ LİSANSÜSTÜ TEZ ORJİNALLİK RAPORU	
Tarih: 04/07/2019	
Tez Başlığı / Konusu:	
<p>“Afinite Kromatografisi Yöntemiyle Koyun Böbreğinden Saflaştırılan Anjiotensin Konverting Enzimi (ACE, E.C.3.4.15.1) Aktivitesine NADH ve FAD Bileşiklerinin <i>In Vitro</i> Etkilerinin Araştırılması”</p> <p>Yukarıda başlığı/konusu belirlenen tez çalışmamın Kapak sayfası, Giriş, Ana bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan toplam 71 sayfalık kısmına ilişkin, 04/07/2019 tarihinde şahsım tarafından Turnitin intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtreleme uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 5 (Beş) dir.</p> <p>Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Kabul ve onay sayfası hariç, - Teşekkür hariç, - İçindekiler hariç, - Simge ve kısaltmalar hariç, - Gereç ve yöntemler hariç, - Kaynakça hariç, - Alıntılar hariç, - Tezden çıkan yayımlar hariç, - 7 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit inatch size to 7 words) <p>Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.</p> <p>Gereğini bilgilerinize arz ederim.</p>	
 04/07/2019 Tarih ve İmza	
Adı Soyadı: Ayşenur KIYLIK Öğrenci No: 169102037 Anabilim Dalı: Kimya Programı: Biyokimya Statüsü: Y. Lisans <input checked="" type="checkbox"/> Doktora <input type="checkbox"/>	
DANIŞMAN ONAYI UYGUNDUR  Prof. Dr. Vedat TÜRKOĞLU (Unvan, Ad Soyad, İmza)	ENSTİTÜ ONAYI UYGUNDUR  (Unvan, Ad Soyad, İmza)