

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

**AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMİYLE SIĞIR AKCİĞERİNDEN
SAFLAŞTIRILAN ANJİOTENSİN KONVERTİNG ENZİM (ACE EC 3.4.15.1)
ÜZERİNE HİPERTANSİYONU ÖNLEYİCİ BAZI ETKEN MADDELERİN *İN
VİTRO* ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

HAZIRLAYAN: Fatih KARAHAN
DANIŞMAN: Prof. Dr. Vedat TÜRKOĞLU

VAN-2019

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

**AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMİYLE SIĞIR AKCİĞERİNDEN
SAFLAŞTIRILAN ANJİOTENSİN KONVERTİNG ENZİM (ACE EC 3.4.15.1)
ÜZERİNE HİPERTANSİYONU ÖNLEYİCİ BAZI ETKEN MADDELERİN *İN
VİTRO* ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

HAZIRLAYAN: Fatih KARAHAN

Bu çalışma YYÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından **FDK-2016-5035**
No'lu proje olarak desteklenmiştir.

VAN-2019

KABUL VE ONAY SAYFASI

Kimya Anabilim Dalı'nda Prof. Dr. Vedat TÜRKOĞLU danışmanlığında, Fatih KARAHAN tarafından sunulan **Afinite Kromatografisi Yöntemiyle Sığır Akciğerinden Safılaştırılan Anjiotensin Konverting Enzim Üzerine Hipertansiyonu Önleyici Bazı Etken Maddelerin *In Vitro* Etkilerinin Araştırılması** isimli bu çalışma Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili hükümleri gereğince 18/01/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile başarılı bulunmuş ve doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Vedat TÜRKOĞLU

İmza:

Üye: Prof. Dr. İbrahim Hakkı YÖRÜK

İmza:

Üye: Doç. Dr. F. Çağlar ÇELİKEZEN

İmza:

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Mahire BAYRAMOĞLU AKKOYUN

İmza:

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Tuğba GÜR

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 0.1/02.2019 tarih ve 2019-1-9-1 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

İmza
Prof. Dr. Suat SENSÖZ
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.



Fatih KARAHAN



ÖZET

AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMİYLE SIĞIR AKCİĞERİNDEN SAFLAŞTIRILAN ANJİOTENSİN KONVERTİNG ENZİM (ACE EC 3.4.15.1) ÜZERİNE HİPERTANSİYONU ÖNLEYİCİ BAZI ETKEN MADDELERİN *İN VİTRO* ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

KARAHAN, Fatih
Doktora Tezi, Kimya Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Vedat Türkoğlu
Ocak 2019, 109 sayfa

Endotel hücreleri tarafından sentez edilen ve kan basıncının düzenlenmesinden sorumlu olan anjiotensin konverting enzim (ACE EC 3.4.15.1), sığır akciğerinden afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırıldı ve sığır akciğeri anjiotensin konverting enziminin saflaştırma oranı 1748 kat olarak hesaplandı. Saflaştırılan ACE için optimum sıcaklık ve pH sırasıyla 35-40 °C ve 7.6 olarak bulundu. SDS-PAGE ile ACE'in 57 kDa, 66 kDa ve 190 kDa molekül ağırlığında üç alt birime sahip olduğu görüldü. Daha sonra jel filtrasyon kromatografisi yöntemi ile enzimin molekül ağırlığı belirlendi ve ACE'in molekül ağırlığı 303 kDa olarak hesaplandı.

ACE inhibitörleri lisinopril, kaptopril, fosinopril, beta blokerer atenolol, propranolol, diüretikler triamteren, spironolakton ve indapamidin ACE aktivitesi üzerine etkileri araştırıldı. Ancak spironolakton ve indapamid saf su içinde çözünmediğinden dolayı çalışılmadı. ACE inhibitörleri lisinopril, kaptopril, fosinopril ve diüretik olan triamteren, ACE aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösterirken beta blokerleri herhangi bir etki göstermedi. Lisinopril, kaptopril, fosinopril ve triamterenin gibi etken maddeler ACE aktivitesi üzerine yarışmasız inhibisyon gösterdi ve grafikleri çizildi. Grafik denkleminde bu bileşiklerin IC_{50} değerleri hesaplandı. Sığır akciğeri ACE aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren bu etken maddelerin IC_{50} değerleri, sırasıyla 4.085 nM, 0.835 nM, 1.159 μ M ve 227 μ M olarak hesaplandı. 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 hesaplandı. Kaptopril, 0.835 nM IC_{50} değeri ile en yüksek inhibitör aktivitesini gösterdi.

Anahtar kelimeler: Anjiotensin konverting enzim, ACE inhibitörleri, Beta blokerler, Diüretikler. Saflaştırma.



ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE *IN VITRO* EFFECT OF SOME ACTIVE SUBSTANCE THAT PREVENT HYPERTENSION ON ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME (ACE EC 3.4.15.1) PURIFIED FROM BOVINE LUNG BY AFFINITY CHROMATOGRAPHY METHOD

KARAHAN, Fatih

Ph. D., Thesis Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Vedat TÜRKOĞLU

January 2019, 109 pages

Angiotensin converting enzyme (ACE EC 3.4.15.1) synthesized by endothelial cells and responsible for the regulation of blood pressure was purified from the bovine lung by affinity chromatography method and purification rate of angiotensin converting enzyme of bovine lung was calculated as 1748 fold. Optimum temperature and pH for the purified ACE were found to be 35-40 °C and 7.6, respectively. By means of SDS-PAGE was seen to have three subunits at 57 kDa, 66 kDa and 190 kDa molecular weight of ACE. Then, the molecular weight of the enzyme was then determined by gel filtration chromatography and the molecular weight of ACE was calculated as 303 kDa.

The effects of ACE inhibitors lisinopril, captopril, fosinopril, beta-blocker atenolol, propranolol, diuretics triamterene, spironolactone and indapamide on ACE activity were investigated. However, spironolactone and indapamide could not be studied due to dissolution in pure water. While ACE inhibitors lisinopril, captopril, fosinopril and diuretic, triamterene showed an inhibitory effect on ACE activity, B-blockers showed no effect. Active substance such as lisinopril, captopril, fosinopril and triamterenin were noncompetitive effect on ACE activity and graphs were drawn. IC_{50} values of these compounds were calculated from the graphical equation. IC_{50} values of these active substances showing inhibition effect on bovine lung ACE activity were calculated as 4.085 nM, 0.835 nM, 1.159 μ M and 227 μ M, respectively. K_i constants for lisinopril, captopril, fosinopril and triamterene were also calculated as 6.449 nM, 1.057 nM, 1.675 μ M and 419.5 μ M, respectively. Captopril showed the highest inhibitory activity with an IC_{50} value of 0.835 nM.

Keywords: Angiotensin converting enzyme, ACE inhibitors, Beta blockers, Diuretics, Purification.



ÖN SÖZ

Bu doktora tez çalışması, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Vedat TÜRKOĞLU yönetiminde Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma laboratuvarında yapılmıştır. Doktora çalışmamın planlanmasında, araştırılmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda bilgi, deneyim ve özverisini esirgemeyen, engin 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 FDK-2016-5035 ID numaralı projemizi destekleyen Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Daire Başkanlığı'na teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarında bana yardımcı olan Dr. Öğretim Üyesi Zehra BAŞI'ya teşekkür ederim. Çalışmalarım boyunca bana destek olan aileme teşekkür ederim.

2019

Fatih KARAHAN



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 Sistemi	2
1.2. Anjiotensin Konverting (Dönüştürücü) Enzim.....	5
1.3. Hipertansiyon.....	6
1.4. Anjiotensin Konverting Enzim İnhibitörleri (ACE inhibitörleri).....	7
1.4.1. Kaptopril	9
1.4.2. Fosinopril.....	9
1.4.3. Lisinopril.....	10
1.5. Beta Blokerler (β -blokerler).....	11
1.5.1. Atenolol	13
1.5.2. Propranolol	14
1.6. Diüretikler.....	15
1.6.1. İndapamid	16
1.6.2. Triamteren.....	17
1.6.3. Spironolakton.....	18
1.7. Enzimler.....	19
1.8. Enzim İnhibisyonu	21
1.8.1. Yarışmalı (kompetitif) inhibisyon	21
1.8.2. Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon	22
1.8.3. Yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyon	22
1.9. Afinite Kromatografisi.....	22

1.10. Jel filtrasyon Kromatografisi	24
1.11. Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Elektroforezi	25
1.12. Nativ (Tabii) Elektroforez	26
2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ	29
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	49
3.1. Materyal	49
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler	49
3.1.2. Kullanılan alet ve cihazlar	49
3.1.3. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması	50
3.1.3.1. Protein tayininde kullanılan çözeltiler.....	50
3.1.3.2. Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler	50
3.1.3.3. Kolon dolgu maddesi için kullanılan çözeltiler.....	51
3.1.3.4. Afinite kromatografisi kolonunda kullanılan çözeltiler	51
3.1.3.5. SDS-PAGE elektroforez için kullanılan çözeltiler.....	52
3.1.3.6. Jel filtrasyon kromatografisinde kullanılan çözeltiler	53
3.2. Yöntem.....	53
3.2.1. Protein tayini.....	53
3.2.1.1. Kalitatif protein tayini	53
3.2.1.2. Bradford yöntemiyle kantitatif protein tayini.....	53
3.2.2. Afinite kolonunun hazırlanması	54
3.2.3. Sığır akciğeri anjiyotensin konverting enziminin saflaştırılması	56
3.2.3.1. Sığır akciğeri eldesi	56
3.2.3.2. Sığır akciğerinin afinite kolonuna uygulanması ve enzim z elüsyonu	56
3.2.4. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile ACE'in saflığının kontrolü	57
3.2.5. Sığır akciğeri ACE'in alt birimlerinin SDS-PAGE ile molekül ağırlıklarının belirlenmesi	58
3.2.6. Sığır akciğeri ACE'in jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığının belirlenmesi.....	59
3.2.7. Enzim aktivitesinin ölçümü	61

3.2.8. Etken Madde Çözeltilerinin Hazırlanması.....	63
3.2.9. ACE ile yapılan kinetik çalışmalar	63
3.2.9.1. Sığır akciğeri ACE aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	63
3.2.9.2. Sığır akciğeri ACE aktivitesi üzerine pH'nın etkisi.....	64
3.2.10. Sığır akciğeri ACE aktivitesi üzerine etken maddelerin etkilerinin belirlenmesi.....	64
3.2.11. Sığır akciğeri ACE aktivitesi üzerine etkisi incelenen etken maddelerin K_i değerleri, inhibisyon türü ve IC_{50} değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar	65
4. BULGULAR	67
4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Grafik.....	67
4.2. Sığır Akciğeri Anjiotensin Konverting Enziminin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması Sonuçları.....	67
4.2.1. Sığır akciğeri anjiotensin konverting enzimi için saflaştırma sonuçları... 68	
4.3. Sığır Akciğeri ACE'in Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi Sonuçları.....	69
4.4. Sığır Akciğeri ACE'in Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi Sonuçları.....	70
4.5. Sığır Akciğeri ACE'in SDS-PAGE ile Saflığının Kontrolü.....	71
4.6. Sığır Akciğeri ACE'in Alt Birimlerinin SDS-PAGE ile Molekül Ağırlığının Belirlenmesine Ait Sonuçlar.....	72
4.7. Sığır Akciğeri ACE'in Jel Filtrasyon Kromatografisi ile Molekül Ağırlığının Belirlenmesine Ait Sonuçlar	73
4.8. Sığır Akciğeri ACE Aktivitesi Üzerine Etken Maddelerin Etkilerinin Belirlenmesine Ait Çalışma Sonuçları.....	74
4.9. Sığır Akciğeri ACE Aktivitesi Üzerine İnhibitör Etkisi Gösteren Etken Maddelerin İnhibisyon Türünün Belirlenmesine Ait Çalışma Sonuçları	77
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	81
KAYNAKLAR.....	95
ÖZ GEÇMİŞ.....	109

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. SDS-PAGE için ayırma jeli ve yığıma jeli konsantrasyonları	59
Çizelge 3.2. Sığır akciğeri ACE'inin etken madde içeren aktivite ölçüm kuvvet içeriği.....	66
Çizelge 4.1. Sığır akciğeri ACE'in saflaştırma basamakları	69
Çizelge 4.2. Sığır akciğeri ACE'in sıcaklık, aktivite ve % aktivite değerleri	70
Çizelge 4.3. Sığır akciğeri ACE'in pH, aktivite ve % aktivite değerleri.....	71
Çizelge 4.4. Sığır akciğerindeki ACE'in kaptopril konsantrasyonuyla değişen aktivite ve % aktivite değerleri	74
Çizelge 4.5. Sığır akciğerindeki ACE'in fosinopril konsantrasyonuyla değişen aktivite ve % aktivite değerleri	75
Çizelge 4.6. Sığır akciğerindeki ACE'in lisinopril konsantrasyonuyla değişen aktivite ve % aktivite değerleri	76
Çizelge 4.7. Sığır akciğerindeki ACE'in triamteren konsantrasyonuyla değişen aktivite ve % aktivite değerleri	76
Çizelge 4.8. Sığır akciğeri ACE için bulunan IC_{50} ve K_i değerleri ve inhibisyon türü.....	77



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1.1. Renin Anjiotensin Sistemi (RAS)	4
Şekil 1.2. Kaptopril'in molekül yapısı	9
Şekil 1.3. Fosinopril'in molekül yapısı	10
Şekil 1.4. Lisinoprilin molekül yapısı	11
Şekil 1.5. Atenolol molekül yapısı	14
Şekil 1.6. Propranolol molekül yapısı	15
Şekil 1.7. İndapamid molekül yapısı	17
Şekil 1.8. Triamteren molekül yapısı	18
Şekil 1.9. Spironolakton molekül yapısı	19
Şekil 4.1. Bradford yöntemi ile proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart grafik	67
Şekil 4.2. Afinite kolonundan alınan sığır akciğeri fraksiyonlarının kantitatif protein tayinleri ve aktivite değerleri.....	69
Şekil 4.3. Sığır akciğeri ACE'in Sıcaklık - % Aktivite grafiği.....	70
Şekil 4.4. Sığır akciğeri ACE'in pH - % Aktivite grafiği	71
Şekil 4.5. Sığır akciğerinden saflaştırılan ACE'in SDS-PAGE bantları.....	72
Şekil 4.6. Sığır akciğeri anjiotensin konverting enziminin SDS-PAGE ile alt birimlerinin molekül ağırlığının belirlenmesinde kullanılan standart grafik	73
Şekil 4.7. Sığır akciğeri ACE'in jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığının belirlenmesinde kullanılan standart grafik	74
Şekil 4.8. Sığır akciğerindeki ACE üzerine kaptopril bileşiğinin etkisi.....	75
Şekil 4.9. Sığır akciğerindeki ACE üzerine fosinopril bileşiğinin etkisi.....	75
Şekil 4.10. Sığır akciğerindeki ACE üzerine lisinopril bileşiğinin etkisi	76

Şekil	Sayfa
Şekil 4.11. Sığır akciğerindeki ACE üzerine triamteren bileşiminin etkisi	77
Şekil 4.12. Sığır akciğeri ACE aktivitesi üzerine kaptopril bileşiminin etkisi.....	78
Şekil 4.13. Sığır akciğeri ACE aktivitesi üzerine fosinopril bileşiminin etkisi	78
Şekil 4.14. Sığır akciğeri ACE aktivitesi üzerine lisinopril bileşiminin etkisi.....	79
Şekil 4.15. Sığır akciğeri ACE aktivitesi üzerine triamteren bileşiminin etkisi.....	79



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	Toksik ilaçlar için kullanılan ve % 50 inhibisyona neden olan inhibitör konsantrasyonu (Molarite cinsinden)
kcal	Kilokalori
Kkat	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
nM	Nanomolar

Simgeler**nm****°C****V_{max}****Açıklama**

Nanometre

Santigrat derece

Maksimum hız

Kısaltmalar**ACE****AGT****CCl₄****CH₃COONa****CNS****COOH****CSA****DCP1****DEAE****EC****EDTA****EI****ENaC****ERPF****ES****ESI****FAD****FAPGG****FOS****GFR****Hb****Hc****Açıklama**

Anjiotensin konverting enzim

Anjiotensinojen

Dietilaminoetil

Karbon tetraklorür

Merkezi sinir sistemi

Karboksilik asit

Damar duvarının enine kesit alanı

Dipeptidil karboksipeptidaz I

Sodyum asetat

Enzim komisyonu

Etilendiamin tetra asetik asit

Enzim inhibitör kompleksi

Epitelyal sodyum kanalı

Renal plazma akışı

Enzim substrat kompleksi

Enzim substrat inhibitör kompleksi

Flavin adenin dinükleotid

N-[3-(2-Furil)akriloil]-Fenil-Glisil-Glisin

Fermente istiridye sosu

Glomerüler filtrasyon hızı

Hemoglobin

Hemotokrit

Kısaltmalar**Açıklama**

HEPESNa	2-[4-(2-hidroksietil)piperazin-1-il] etan
HHL	Hippuril-histidil-lösin
HPLC	High-performance liquid chromatography
HT	Hipertansiyon
HTCZ	Hidroklorotiyazid
JG	Jukstaglomerüler hücreler
KCl	Potasyum klorür
LDL	Düşük yoğunluklu protein
mRNA	Haberçi RNA
Na₂B₄O₇	Sodyum borat
NaCl	Sodyum klorür
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotid
NaHCO₃	Sodyum bikarbonat
NaNO₃	Sodyum nitrat
NHS	N-hidroksisüksinimid
NMR	Nükleer manyetik rezonans
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
RAAS	Renin anjiotensin aldosteron sistemi
REN	Renin
RNA	Ribonükleik asit
RVH	Renovasküler hipertansiyon
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SHRSP	Spontan hipertansif rat
SQ	Anjiotensin konverting enzim inhibitörü sülfonik asit sodyum
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilendiamin
TPDR	Total preferik damar resistansı
Tris	Trihidroksimetil amino metan
WKY	Wistar-kyoto ratları
ZnCl₂	Çinkoklorür



1. GİRİŞ

Anjiotensin konverting enzim (ACE EC 3.4.15.1) kan basıncının düzenlenmesinde görev alan klorüre bağımlı hidrolaz sınıfına ait bir enzimdir (Bunning ve Rioordan, 1985). Anjiotensin konverting enzim ayrıca güçlü bir damar genişletici volan bradikininin yok edilmesinden sorumlu enzimlerden biridir (Ng ve Vane, 1967). Anjiotensin konverting enzim (ACE) inhibitörlerinin ACE'yi inhibe ederek anjiotensin I'ın anjiotensin II'ye dönüşümünü önlemektedir. Aynı zamanda kan damarlarını genişleterek kan basıncını düşürmekte ve böylece yüksek tansiyonun dengelenmesine yardımcı olmaktadır (Abrams, 1985; DiBianco, 1985; Sokolow ve McIlroy, 1986). Anjiotensin konverting enzim inhibitörlerin vücudun su ve elektrolit dengesinin sağlanmasına önemli ölçüde katkı sağladığı görülmüştür. Anjiotensin konverting enzim inhibitörü olan kaptopril kalp yetmezliği durumunda kanda aşırı derecede biriken azotun ve sodyumun dengelenmesini sağlamaktadır ve serum keratin düzeyini düşürmektedir (Braunwald, 1984; Abrams, 1985; Packer ve ark., 1985; Levine ve ark., 1986; Nelson, 1986;). ACE inhibitörleri, β -blokerler, diuretikler gibi antihipertansif ilaçlar yüksek tansiyonun ve daha spesifik olarak birincil ve ikincil hipertansiyonun tedavisinde kullanılmaktadır (Zisaki ve ark., 2015).

Hipertansiyon (yüksek kan basıncı) pek çok avrupa ülkesinde yaygın olarak görülen kronik bir hastalıktır. Amerika'da, ulusal kalp derneğinin açıklamış olduğu verilerde yaklaşık olarak 35-40 milyon insanın hipertansiyon hastası olduğu belirlenmiştir. Hipertansiyondan etkilenen kişi sayısının fazla olması nedeniyle bu hastalığı tedavi etmek için büyük miktarda sağlık harcaması yapılmaktadır. Hipertansiyon kalp krizi, kalp çarpıntısı gibi sağlık sorunlarına neden olduğu için böbrek, kalp, göz, kan damarları gibi organlara zarar vermektedir. Bu nedenle kan basıncını düşürmek için gerekli tedbirler alınmalıdır. Uzun zamandır yüksek kan basıncını düşürmek için büyük bir ilerleme kaydedilmektedir. Çünkü tedavi edilmemiş yüksek tansiyon hem fiziksel hem de sağlık açısından olumsuz sonuçlar doğurabilir, bu yüzden erken tedavi ve tedbirleri almak önemlidir, ancak yüksek kan basıncına sahip olup ve hala hastalığı teşhis edilmemiş çok fazla insan bulunmaktadır. Yüksek kan basıncını tedavi etmek için anjiotensin konverting enzim (ACE) inhibitörleri üzerine yapılan çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır (Moser ve ark., 1992).

1.1. Renin Anjiotensin Sistemi

Renin-anjiotensin aldosteron sistemi (RAAS), arteriyel basıncın, doku perfüzyonunun ve hücre dışı hacminin homeostatik kontrolünde önemli bir rol oynamaktadır. Renin hormonu bir asırdan önce keşfedilmiş olmasına rağmen, bu sistemi bloke edebilen spesifik farmakolojik ajanların varlığı nedeniyle son 30 yılda kabul görmüştür. Tigerstedt ve Bergmann, 1898'de, tavşan renal korteksinin ham ekstraktlarında arteriyel basınçta sürekli bir artışa neden olan ve ısıya dayanıksız bir maddenin varlığını araştırmışlardır. Daha sonra böbrek tarafından salgılanan bu madde "renin" olarak adlandırılmıştır (Piepho ve Beal, 2000; Atlas, 2007).

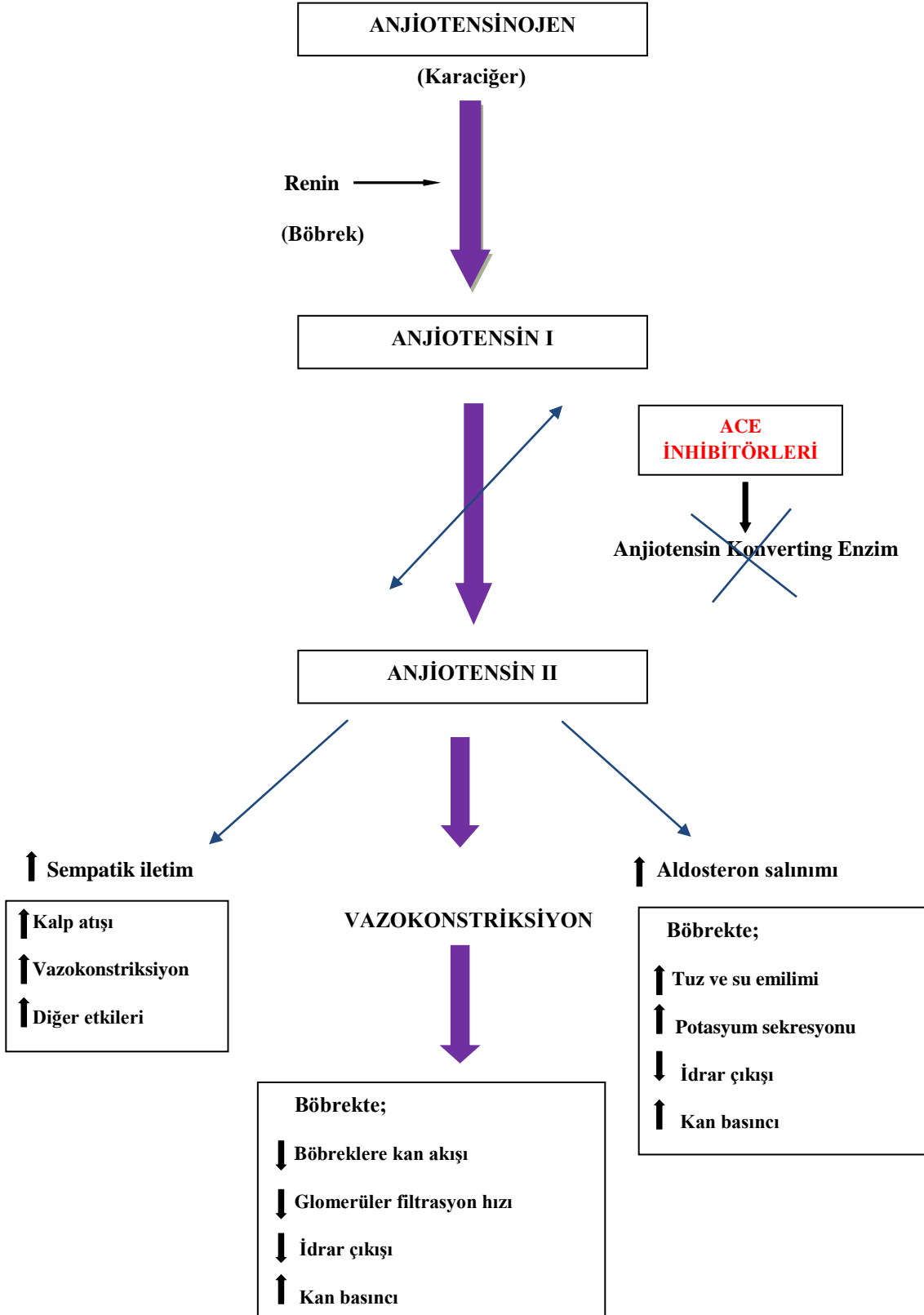
Bir asit proteazı olan renin, proreninden renal kallikrein etkisi ile böbreğin jukstaglomerüler hücrelerinde (JG) sentezlenir (Onat ve ark., 2006). Renin-anjiotensin sistemi kan basıncı ve elektrolit metabolizmasının düzenlenmesinde görev almaktadır. Böbreğin kan basıncında ve kan hacminde azalma meydana gelmesi renin salgılanmasını uyarmaktadır. Böbrek kan basıncında azalma jukstaglomerüler aparatta bulunan baroreseptörlerle hissedilmekte ve hemen renin salgılanmaktadır. Kanama ve postür (duruş) değişikliği ise kalbe gelen kanın azalmasına, böylece kalbin atrial (kulakçığa ait) duvarındaki baroreseptörlerin uyarılmasına neden olur. Bu uyarı kraniyal sinirler ile medulla oblongatadaki (omurilik soğanı) vazomotor merkeze ve oradan da β -adrenerjik sinirlerle jukstaglomerüler hücrelere ulaşarak renin salgılanması gerçekleşir (Gürdöl ve Ademoğlu, 2010).

Renin anjiotensin sistemi (RAS) kan basıncını düzenleyen karmaşık zincirdeki bileşenlerden biridir (Rigatto ve ark., 2004). Renin, 386 amino asitten oluşmuş inaktif öncül bir peptid olan pro-renin enziminin etkisiyle oluşur. Renin, molekül ağırlığı 42.000 Da olan 343 amino asitlik bir enzimdir. Karaciğerde sentezlenen ve plazmada α_2 -globulin fraksiyonunda bulunan anjiotensinojen reninin substratıdır (Guyton ve Hall, 2006). RAS'ın hipertansiyon patofizyolojisinde oynadığı rol, bu sistemde yer alan proteinlerin ekspresyonunu düzenleyen genlerde olduğu gibi, kapsamlı bir şekilde çalışılmıştır. Renin anjiotensin sisteminin tuz, su ve vasküler tonus homeostazisine etki ettiği belirlenmiştir (Rigatto ve ark., 2004). Renin anjiotensin sistemi (RAS), renin (REN), anjiotensinojen (AGT), anjiotensin konverting enzim (ACE) ve anjiotensin II reseptörleri (AII) gibi dört ana protein grubundan oluşmaktadır. Tüm RAS bileşenleri

kalp, beyin, böbrek, böbreküstü bezleri, kan damarları ve üreme organları dokularında bulunmuştur (Rigatto ve ark., 2004; Santos ve ark., 2006).

Renin, karaciğerde oluşan anjiotensinojen (AGT) üzerine etki etmektedir ve anjiotensin I (AI) 'nin oluşumuna yardımcı olmaktadır. Anjiotensin konverting enzim, Anjiotensin I'i, doğrudan bir vasokonstriktör olan AII'ye çevirmektedir. Anjiotensin II (AII) merkezi sinir sistemi, sempatik sinir sistemi ve aldosteron sekresyonu ile dolaylı olarak etkileşime giren güçlü bir bileşiktir (Rigatto ve ark., 2004).

AII nin düzenleyici etkileri, G proteini ile efektörlere, fosforilaz C'ye ve adenil siklaza bağlanan hücre yüzeyi reseptörleri tarafından yönlendirilmektedir (Bergsma ve ark., 1992). Anjiotensin reseptörlerinin farmakolojik olarak dört ayırt edici sınıfı, AT1, AT2, AT4 ve AT₁₋₇ tip 1 olarak belirlenmiştir (Rigatto ve ark., 2004; Santos ve ark., 2006). Reninin birçok türü sadece bir gen tarafından kodlanmaktadır. İnsanda, REN geni 1q32 bölgesinde bulunur. Haberci RNA (mRNA), aktif renin oluşuncaya kadar 401 aminoasit kalıntısı ile ön prorenin adı verilen aktif olmayan bir forma dönüştürülür. Anjiotensinojen (AGT) 1q42-43 kromozomunda AGT geni tarafından kodlanır ve anjiotensin I veya anjiotensin II'yi doğrudan üretmek için farklı enzimlerle ayrılabilir. Anjiotensin konvertin enzim (ACE), kromozom 17q23'te bulunan ACE-geni tarafından kodlanmaktadır. ACE, damar genişletici ve natriüretik olan AII üretiminin artmasına ek olarak, aynı zamanda bradikinin degradasyonundan da sorumludur (Santos ve ark., 2006). RAS'ı kodlayan bir takım genlerin hipertansiyon, koroner hastalık, mitral kapak prolapsusu sendromu, kalp hipertrofisi, obstrüktif uyku apnesi ve Alzheimer etyopatogenezinde rol oynadığı görülmüştür (Lima ve ark., 2007).



Şekil 1. 1. Renin Anjiotensin Sistemi (RAS).

1.2. Anjiotensin Konverting (Dönüştürücü) Enzim

Anjiotensin konverting enzim (ACE, EC 3.4.15.1 peptidil-dipeptidaz A, peptidil-dipeptidaz I, dipeptidil karboksipeptidaz I (DCP1), peptidildipeptidaz I, kininaz II, peptidaz P, karboksi katepsin) ilk olarak renin-anjiotensin sisteminin önemli bir bileşeni olarak tanımlanmıştır (Corvol ve ark., 1995). ACE, anjiotensin-I'in güçlü bir vazokonstrüktör olan anjiotensin-II'ye dönüşümünü sağlarken aynı zamanda da vazodilatör bradikininini inaktive etmektedir. Bu güçlü vazokonstrüktör olan anjiotensin II, Na-tutucu bir steroidin salınmasında rol oynayarak kan basıncını arttırmaktadır (Li ve ark., 2004). ACE, kan basıncının ve elektrolit dengesinin korunmasından sorumlu olan homeostatik mekanizmanın bir parçası olarak görülmektedir. İki spesifik ACE inhibitörü olan lisinopril ve kaptopril ACE'yi inhibe ederek anjiotensin I'in anjiotensin II'ye dönüşümünü engellemektedir (Corvol ve ark., 1995).

ACE yüksek molekül kütleli bir glikozil integral mebran proteini olup genellikle hücre mebranlarının yüzeyinde bulunur. ACE membrana bağlı bir enzim olup dokularda, biyolojik sıvılarda, plazmada, menide, bağırsak epitel hücrelerinde, beyinde, testiste, akciğerde bulunur (Hopper, 1991). Aktif merkezinde çinko bulunan ACE böbreğin mikrozomal kısmında konsantre edilmiş ve plazmadan saflaştırılmıştır (Fyhrequist ve ark., 1984).

Anjiotensin konverting enzim (EC. 3.4.15.1) ilk olarak at kanından izole edilmiştir (Skegg ve ark., 1956). Aynı zamanda ACE'nin böbrek ve diğer dokularda da mevcut olduğu görülmüştür. Özellikle ACE yüksek derecede vaskularize edilmiş akciğerler ve testislerde bol miktarda bulunmaktadır. Aktif N ve C bölgelerinden oluşan insan somatik anjiotensin konverting enzim (sACE), 26 eksondan oluşan bir gen tarafından şifrelenmektedir. Sadece yetişkin testisinde (tACE) bulunan ACE'nin küçük bir formu aynı gen tarafından kodlanmaktadır (Hubert ve ark., 1991).

Üreme sisteminde ACE'nin fizyolojik fonksiyonları tam olarak belirlenememesine rağmen üremede rol aldığına dair kanıtların var olduğu görülmüştür. Erkek farelerin üremesindeki bozukluklarda hem somatik hemde testiküler ACE'nin büyük ölçüde azaldığı belirlenmiştir (Krege ve ark., 1995; Esther ve ark., 1997). Atların spermatozoanın (sperm hücresi) periakrozomal plazma membranından 70 kDa molekül ağırlığına sahip bir protein izole edilmiştir. Spermatozoanın periakrozomal plazma

membranı, spermin epitelyal hücelere ve zona pellucida (memelilerde yumurta zarını çevreleyen jelimsi örtü) 'ya bağlanmasında rol oynadığı belirtilmiştir (Dobrinski ve ark., 1997).

Anjiotensin I, renal kan akışındaki bozukluk, tuz tükenmesi ve β -adrenerjik stimülasyon gibi uyarıcılara tepki olarak böbrek tarafından salgılanan bir enzim olan renin tarafından parçalanır. Anjiotensin I öncü bir protein olan anjiotensinojenden meydana gelmektedir. ACE tarafından aktive edilen anjiotensin I'in sadece vasküler düz kas hüceleri üzerindeki AT1 reseptörleri ile anjiotensin II'nin etkileşimiyle vazokonstriksiyona neden olur. Aynı zamanda anjiotensin I bileşiminin sıvı ve elektrolit homeostazını düzenleyen aldosteron üretimini de uyardığı görülmüştür (Sturrock ve ark., 2004).

Bradikinin bileşiminin, kallikrein proteazının aktive edilmesi ile oluşan kininojenden meydana geldiği ve aynı zamanda kininaz I ve kininaz II tarafından da inaktive edildiği görülmüştür. Bradikinin bileşiminin vasodilatör özelliklerinin yanında koruyucu nitrik oksit oluşumunu teşvik ettiği için kardiyoprotektif özelliklere sahip olduğu da belirlenmiştir (Henriksen ve Jacob, 2003).

1.3. Hipertansiyon

Hipertansiyon, dünya nüfusunun % 25'inden fazlasını etkileyen küresel bir sağlık sorunudur (Kearney ve ark., 2005). Hipertansiyon genellikle belirli bir eşik değerinin üzerine çıkan sistemik arter basıncının yükselmesi olarak tanımlanmaktadır (Giles ve ark., 2009). Hipertansiyon veya yüksek tansiyon, birçok sağlık problemine yol açabilen veya komplike olabilen çok yaygın ve ciddi bir durumdur. İnme, anjina, kalp yetmezliği, böbrek yetmezliği veya kardiyovasküler nedenlerden kaynaklanan erken ölüm risklerinin doğrudan kan basıncı (BP) ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Hipertansiyon genellikle "sessiz katil" olarak adlandırılmaktadır. Çünkü ciddi komplikasyonlar gelişene kadar genellikle hiçbir semptom göstermemektedir (Siyad, 2011).

Temel ya da primer hipertansiyon, vücutta bilinen bir nedeni olmadığı zaman ortaya çıkan bir hastalıktır. Bu hipertansiyon türüne sahip hastaların tedavi ile iyileşmesi çok zordur, ancak bu hipertansiyon türü sadece kontrol altına alınabilmektedir. Hipertansiyonu olan bireylerin % 90'ından fazlası esansiyel

hipertansiyona sahiptir. Genetik faktörlerin, esansiyel hipertansiyonun ilerlemesinde önemli bir role sahip olacağı belirtilmiştir (Siyad, 2011).

Hipertansiyon vücutta başka bir durumdan veya hastalık sürecinden kaynaklandığında bu sekonder hipertansiyon olarak adlandırılmaktadır. Hastaların % 10'undan daha azı sekonder hipertansiyona sahip olduğu görülmüştür. Sekonder hipertansiyona genelde komorbid bir hastalık veya ilaçların sorumlu olduğu belirtilmiştir. Bu vakaların çoğunda ağır kronik böbrek hastalığı veya renovasküler hastalıktan kaynaklanan böbrek fonksiyon bozukluğu en sık görülen ikincil neden olarak görülmektedir (Siyad, 2011).

ABD'de 25,000'den fazla hasta, hipertansiyondan kaynaklanan böbrek hasarı için diyalize başlamaktadır. Kan basıncını kontrol etmek karmaşık bir süreçtir, çünkü kan basıncı regülasyonuna doğrudan veya dolaylı olarak birçok farklı sistem katkıda bulunmaktadır. Böbrek, tuz ve su atılımını düzenleyerek arterial kan basıncını kontrol etmede önemli bir role sahiptir. Ayrıca çeşitli nörohormonal mekanizmalar yoluyla periferik vasküler tonusunun kontrol edilmesini sağlar. Sistemik kan basıncının yani hipertansiyonun hem akut hemde kronik böbrek hastalıkları olan hastalarda geçici olsa bile yükselmekte olduğu görülmüştür (Josephson ve ark., 1992).

1.4. Anjiotensin Konverting Enzim İnhibitörleri (ACE inhibitörleri)

Anjiotensin konverting enzim (ACE) inhibisyonunun, hipertansiyon tedavisinde yararlı bir tedavi yaklaşımı olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle, yüksek tansiyonu kontrol etmek için ACE'yi inhibe eden ilaçların geliştirilmesi büyük bir önem kazanmıştır. İnsanlarda esansiyel hipertansiyon ve kalp yetmezliğinin tedavisinde halen kullanılan kaptopril, enalapril, alasepril ve lisinopril gibi ACE inhibitörlerinin sentezi ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır (Ondetti, 1977).

Anjiotensin konverting enzim inhibitörleri (ACE inhibitörleri), vücutta anjiotensin II üretimini inhibe eden ilaçlardır. Anjiotensin II, kanda dolaşan ve kardiyovasküler sistem üzerinde birçok etkiye sahip olan bir hormondur ve aynı zamanda kan damarlarının da daralmasına neden olmaktadır. Kan damarlarındaki daralma sonucunda kalbin daha hızlı çalışarak vücudun ana arterlerine kan pompalaması artmakta ve yüksek tansiyona neden olmaktadır. Kalbin çok hızlı çalışması neticesinde kalp kasının zayıflayarak kalp yetmezliği ve kalp krizine neden olabileceği görülmüştür.

ACE inhibitörleri anjiotensin II üretimini bloke ederek kan damarlarının daralmasını önler ve böylece tansiyonu düşürür. ACE inhibitörlerin kan damarlarının daralmasını önlemesiyle kalbin kan pompalama anındaki enerji miktarını azalttığı belirlenmiştir. Birçok kardiyovasküler hastalıkta, çok yüksek miktarlarda anjiotensin II bulunduğu görülmüştür. Yüksek seviyelerde anjiotensin II'nin neden olduğu hasarı azaltmanın önemi gittikçe daha fazla önem kazanmaktadır. Anjiotensin II, arterleri daraltma ve kan basıncını yükseltmede oynadığı rolün yanı sıra, çeşitli kardiyovasküler yapıların boyut ve kalınlıklarında artışa neden olarak, negatif bir şekilde büyümeyi sağlamaktadır. Dolaşımında yüksek seviyelerdeki anjiotensin II, hipertrofi (kalbin kalınlaşması) olarak bilinen bir duruma yol açar. Kalp hipertrofisi, uzun zamandır kalp hastalığının neden olduğu yüksek ölüm riski için bir belirteç olarak kabul edilmiştir. Yüksek seviyelerde anjiotensin II varlığında, kan damarlarının duvarları da daha kalın ve daha sert hale gelir ve böylece arterlerdeki kolesterol birikimlerine ve tıkanıklıklara yol açarak kalp krizlerine ve felçlere neden olabileceği düşünülmektedir. Bu yüzden ACE inhibitörlerinin, anjiotensin II üretimini inhibe ederek kalp ve damar duvarlarının hipertrofisini, kalbin çok hızlı bir şekilde çalışmasını ve kan damarlarının daralmasını önlediği ve yüksek tansiyonu düşürdüğü görülmüştür (Sweitzer, 2003).

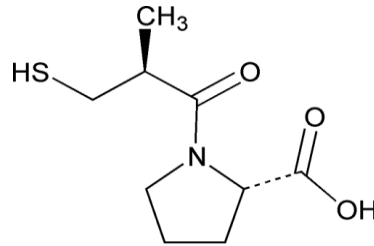
Anjiotensin konverting inhibitörlerinin, diüretiklere, beta blokerlere ve diğer sempatotik ilaçlara göre hemodinamik etkilerinin özelliği ve yan etkilerinin az olması bakımından üstünlükleri vardır. ACE inhibitörleri kardiyovasküler hemodinamiğin düzenlenmesine katkıda bulunan lokal ve refleks mekanizmaları bozmazlar, hatta düzeltirler. Kan basıncının baroreseptör (kan basıncını düzenleyen mekanizma) kontrol mekanizmasının duyarlılığını olumlu şekilde ayarlamaktadırlar. Bu yüzden ACE inhibitörlerinin yaptığı kan basıncı düşmesi, taşikardi (kalp ritim bozukluğu) ve plazma noradrenalin düzeyinde artma gibi sonuçlara neden olmazlar. Diğer ilaçların bazılarında oluşan uyuşukluk, zihinsel depresyon, glukoz ve lipid metabolizmasının bozulması, ekzersiz kapasitesinde azalma, hipovolemi (kan hacim düşüklüğü) gibi yan etkiler oluşturmazlar. Ayrıca erkeklerde seksüel fonksiyon üzerinde bozucu etkileri yoktur. Hipokalemi (potasyum eksikliği) oluşturmazlar ve aldosteron düzeylerini düşürdükleri için toplayıcı tübüllerde Na^+/K^+ değiş tokuşunu azaltmaktadırlar. Hipertansiyonun böbrek üzerindeki olumsuz etkilerine karşı böbreği koruyabilirler. Diyabetik

nefropatililerde ve deneysel diyabette gelişen proteinürüyi (idrarda protein varlığı) azaltırlar (Kayaalp, 2005).

1.4.1. Kaptopril

Anjiotensin konverting enzim (ACE) inhibitörleri sınıfına ait olan kaptopril (1 - [(2S) -3-merkpto-2-metilpropiyonil] -L-prolin), yaygın olarak arteriyel hipertansiyon tedavisinde kullanılırken aynı zamanda diyabetik nefropati ve konjestif kalp yetmezliğinde de kullanılmaktadır. Kaptopril, bir dipeptit ile olan benzerliğinden dolayı ACE ile etkileşmekte ve aynı zamanda kaptoprilin sülfidril grubu da anjiotensin konverting enziminin aktif bölgesinde bulunan çinko atomuna kovalent olarak bağlanmaktadır (Rang ve ark., 2000; Page ve ark., 2002; Katzung, 2004; Schmidt ve ark., 2009). Kaptopril suda serbestçe çözünebilen ve molekül yapısında pK_1 'i 3.7 olan karboksil grubu ve pK_2 ' si 9.8 olan tiyol grubu içeren bir bileşiktir (Ravazzi ve ark., 2018).

Antihipertansif sınıfının bir temsilcisi olan kaptopril (CPL) üzerine birçok sayıda çalışma yapılmıştır. Kaptopril üzerine yapılan çalışmaların fazla sayıda olmasının birinci nedeni, antihipertansif sınıfının en yaygın olarak kullanılan ilaçlarından biri olmasıdır. İkinci nedeni ise COOH, C = O, SH ve prolin azotu gibi polar grupların bulunmasından dolayı suda çözünebilir olmasıdır (Bartosz ve ark., 1997).



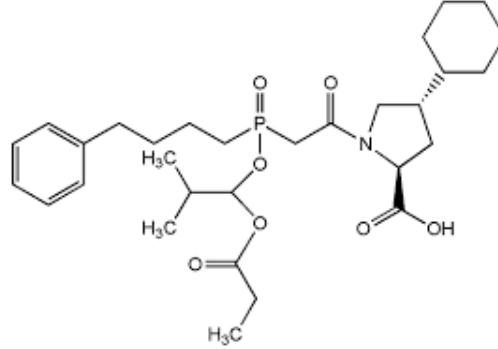
Şekil 1.2. Kaptopril'in molekül yapısı, 1 - [(2S) -3-merkpto-2-metilpropiyonil] -L-prolin.

1.4.2. Fosinopril

Fosinopril (4-sikloheksil-1- [2 - [(2-metil-1-propanoiloksi-propoksi) - (4-fenilbütil) fosforil] asetil] -pirrolidin-2-karboksilik asit), anjiotensin konverting enzim (ACE) inhibitörünün fosfor içeren bir ester ön ilacıdır. Gastrointestinal mukoza ve karaciğerindeki aktif diasit, eşsiz farmakolojik özelliklere sahip fosinoprilat ile hidrolize

edilir. Diğer ACE inhibitörlerinin aktif kısımlarının çoğunluğu idrarla atılır. Öte yandan, fosinoprilat hem idrarda hem safrada (temokaprilat, zofenoprilat ve spiraprilatta olduğu gibi) atılır. Bu ilaç kan basıncında veya diğer olumsuz etkilerde aşırı bir düşüş olasılığını azaltmak için, orta ve şiddetli böbrek fonksiyon bozukluğu olan hastalarda uygun dozajlarda kullanılmaktadır (Shionoiri ve ark., 1997).

Fosinopril, vücutta karaciğer ve böbrekler tarafından temizlenmektedir. Fosinopril, esansiyel hipertansiyonu olan hastaları tedavi etmek için kullanılan ACE inhibitörüdür. Fosinopril şu an mevcut olan ACE inhibitörleri arasında benzersiz olduğu görülmüştür. Fosinopril günde bir kez verilen ve 10 ile 40 mg arasında etki gösteren antihipertansif bir ajandır. Normotensif deneklerde, 10 ile 640 mg dozlarda oral olarak alınan fosinoprilin 1 saat sonra plazma ACE aktivitesini tamamen inhibe ettiği belirtilmiştir. Oral uygulamadan sonra, fosinopril yavaş yavaş emilir, ancak daha sonra hızlı bir şekilde aktif diasit, fosinoprilat, gastrointestinal mukoza ve karaciğerde esterazlara dönüştürülür (Murdoch ve Tavish, 1992).



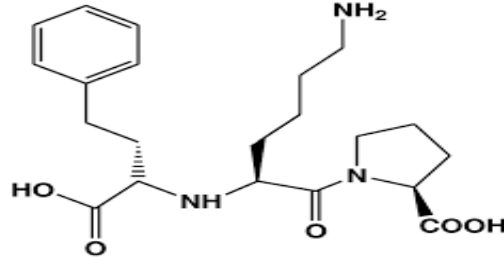
Şekil 1.3. Fosinopril'in molekül yapısı, 4-sikloheksil-1- [2 - [(2-metil-1-propanoiloksi-propoksi) - (4-fenilbütil) fosforil] asetil] -pirrolidin-2-karboksilik asit.

1.4.3. Lisinopril

Lisinopril (S)-1-[N2-(1-karboksi-3-fenilpropil)-lizil-prolin]dihidrat, anjiotensin konverting enzim (ACE) inhibitörü olan enalapril'in, aktif metaboliti olan enalaprilatın bir lisin türevidir. Lisinopril, günde bir kez 20 ile 80 mg'lık dozajlarda, esansiyel hipertansiyonun tüm derecelerinde kan basıncını düşürmede etkili olan ve oral olarak alınan aktif bir anjiotensin konverting enzim (ACE) inhibitörüdür. Ayrıca lisinoprilin, esansiyel hipertansiyonun ve konjestif kalp yetmezliğinin tedavisinde umut veren bir ACE inhibitörü olduğu belirlenmiştir. Lisinopril, anjiotensin II ve aldosteronun plazma

konsantrasyonlarını azalttığı ve ayrıca plazma renin aktivitesinide arttırdığı görülmüştür. Konjestif kalp yetmezliği olan konvansiyonel tedaviye dirençli hastalarda, günde bir kez 2.5 ile 20 mg lisinopril, kardiyak fonksiyon indeksini iyileştirmiş ve kontrollü bir çalışmada kaptoprilden daha fazla yarar sağladığı görülmüştür. Lisinoprilin faydalı hemodinamik etkilerinin ACE'yi iyi bir şekilde inhibe etmesinden kaynaklandığı belirlenmiştir. ACE'nin inhibe olması doğrudan ya da dolaylı olarak periferik damarların dilatasyonuna (genişlemesine) aynı zamanda azalmış vasküler dirence neden olan anjiotensin II üretiminin azalmasına neden olduğu için faydalı bir ACE inhibitörü olduğu görülmüştür. Lisinopril vücutta çok iyi tolere edilen ACE inhibitörüdür. Lisinopril, insanlarda belirgin bir şekilde metabolize edilmez ve emilen ilaç temel olarak idrarla değişmeden atılır. Ayrıca lisinoprilin polifazik eliminasyon kinetiğine sahip olduğu görülmüştür (Lancaster ve Todd, 1988).

Lisinopril'in pleiotropik (bir genin birden fazla özelliğe etki etmesi) farmakolojik etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Anti-hipertansif tedavilerin kan basıncını düşürücü etkileri üzerinde, lisinoprilin yardımcı etkilerinin bulunduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda lisinopril, anjiotensin II'nin etkisini azaltarak antienflamatuar etkiye aracılık ettiği gözlemlenmiştir (Amoghmath ve Suresha, 2018).



Şekil 1. 4. Lisinoprilin molekül yapısı, (S)-1-[N2-(1-karboksi-3-fenilpropil)-lizil-prolin)dihidrat.

1.5. Beta Blokerler (β -blokerler)

Beta blokerler (β -blokerler), yaklaşık 40 yıldır idiopatik (nedeni belli olmayan) arteriyel hipertansiyon tedavisinde yaygın bir şekilde kullanılan ilaçlar olarak görülmüştür (Lindholm ve ark., 2005; Bradley ve ark., 2006). Beta-blokerlerin kardiyovasküler mortaliteyi (ölüm oranı) azalttığı ve aynı zamanda hipertansiyonun tedavi edilmesine yardımcı olarak sağlıklı bir yaşam süresi sunduğu belirtilmiştir (Wikstrand ve ark., 1988). Hipertansiyonu önlemekte kullanılan beta blokerler üzerine

pek çok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaların çoğunda atenolol kullanıldığı belirlenmiştir (Tsalta ve ark., 2008). Atenolol, metoprolol ve propranolol gibi geleneksel beta blokerler, öncelikle kronotropik (kalp hızını değiştiren) ve inotropik (kasılma gücünü değiştiren) inhibitör mekanizmalarla kardiyak outputun (kalp debisi) azaltılması yoluyla kan basıncını azaltmaktadır. Düşük kardiyak output, kan basıncını korumak için kompanseuar periferik vazokonstriksiyonu indükler ve böylece kronik hipertansiyonun ayırt edici özelliği olan periferik direnci artırır (Messerli ve Grossman, 2004).

100'den fazla beta blokerinin geliştirilmiş olduğu ancak klinik kullanım için yaklaşık olarak 30 tanesinin kullanıldığı belirtilmiştir (Frishman ve Charlap, 2003). Suda çözünen beta blokerler (Atenolol, Nadolol) daha uzun yarı ömre sahip olma eğiliminde olmakla birlikte böbrek yoluyla elimine edilmektedirler. Yağda çözünen beta blokerler (metoprolol, propranolol) karaciğerde metabolize edilmekte ve aynı zamanda bu beta blokerlerin daha kısa bir yarı ömre sahip olduğu da belirtilmiştir (Koch-Weser ve Frishman, 1981). Beta blokörler üzerine yapılan çalışmalarının çoğunda, beta bloker kullanımının kronik kalp hastalarında mortalitede % 30, hastanede yatışlarında % 40 azalma olduğu görülmüş aynı zamanda ani ölümlerde de % 38 azalma olduğu belirlenmiştir (Teerlink ve Massie, 2000; Foody ve ark., 2002).

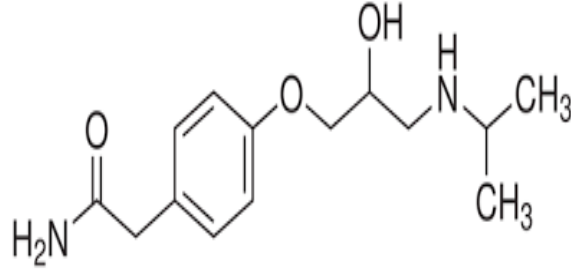
Beta blokerler kalbin atış hızında, atış hacminde, kalp debisinde azalma meydana getirirler. Bununla beraber kısmen refleks sonucunda ve kısmende damar yataklarında sempatoadrenal tonusunun maske edilmiş vazodilatör (damar genişletici) komponentinin ortadan kalkması sonucu total preferik damar rezistansı (TPDR) artar. Bu durum kalp debisindeki azalmadan beklenen artiyel kan basıncı azalmasını önler veya bu azalmanın beklenenden daha az olmasına neden olur. Beta blokerlerin devamlı kullanımıyla birlikte preferik damar rezistansı düşer ve böylece artiyel kan basıncı belirgin bir şekilde azalır. Beta blokerler, sistolik kan basıncını, diyastolik kan basıncından daha fazla düşürürler. Fiziksel ekzersiz esnasında kan basıncında fizyolojik olarak meydana gelen artmayı azaltırlar. Beta blokerler diğer antihipertansif ilaçların çoğunun yaptığından farklı olarak, kan basıncındaki düşme hem ayakta hemde yatar durumda daha belirgindir. Uzun süre kullanıldıkları zaman hipotansif (tansiyon düşüklüğü) etki gelişmemektedir. Beta blokerler esansiyel hipertansiyon yanında renal kaynaklı sekonder hipertansiyon olgularında da etkilidirler (Kayaalp, 2005).

1.5.1. Atenolol

Atenolol (4 - (2- hidroksi - 3 - [(1- metiletil) amino] propoksi), benzenasetamid kardiyoselektif bir β -blokerdir. Atenolol, molekül ağırlığı 266.34 olan bir β -bloker ajandır. 37 °C'de 26.5 mg/mL suda çözünürlüğü olan nispeten polar bir hidrofilik bileşiktir. Yağda çözünmeyen hidrofilik bileşikler (atenolol, sotalol, nadolol) sadece böbrekler tarafından atılmakta ve ayrıca bu bileşiklerin düşük beyin penetrasyonuna da sahip olduğu belirlenmiştir. Atenolol'un membran stabilize edici ve intrinsik semptomimetik (sempatik sinir sistemini uyarıcı ilaç) aktivitelerinin olmadığı görülmüştür. Atenolol klinik olarak en çok kullanılan β -blokerlerinden biri olmasının yanı sıra, hipertansiyonun randomize kontrollü çalışmalarında sıklıkla referas ilaç olarak kullanılmıştır (Wander ve ark., 2009).

Atenololün vücutta yaklaşık olarak % 50'si emilmektedir, ancak emilen dozun çoğunluğunun sistemik dolaşıma katıldığı ve kan seviyelerindeki en üst seviyeye yemekten iki veya dört saat sonra ulaştığı belirtilmiştir. Propranolol veya metoprololün aksine, atenololün karaciğerden çok az metabolizmaya geçtiği ve absorbe edilen kısmın ise böbrek tarafından uzaklaştırıldığı belirtilmiştir. İntravenöz (damar içi) verilen dozun % 85'inden fazlası, oral olarak alınan dozun ise % 50'si 24 saat içinde idrarla atıldığı gözlemlenmiştir. Atenololün, intravenöz dozun uygulanmasından sonra 5 dakika içinde en yüksek plazma seviyelerine ulaştığı görülmüştür. Ayrıca atenololün eliminasyon yarı ömrünün 6 ile 7 saat olduğu belirtilmiştir (Wander ve ark., 2009).

Atenololün hipertansif hastalarda böbrek vasküler direncini azalttığı görülmüştür (Dreslinski ve ark., 1982). Seçici olmayan β -blokörlerinin aksine atenolol, kreatinin klirensi, glomerüler filtrasyon hızı veya renal kan akışı üzerinde herhangi bir etkiye sahip olmadığı gözlemlenmiştir (Wander ve ark., 2009). Diğer β -bloker ajanlar gibi, atenolol da renin salınımını inhibe ettiği (Dreslinski ve ark., 1982), lipolizi inhibe ettiği (Smith, 1980; Weidmann ve ark., 1985) ve artan plazma trigliserit seviyelerinde aynı zamanda HDL konsantrasyonunda düşüşe neden olduğu görülmüştür (Wander ve ark., 2009).

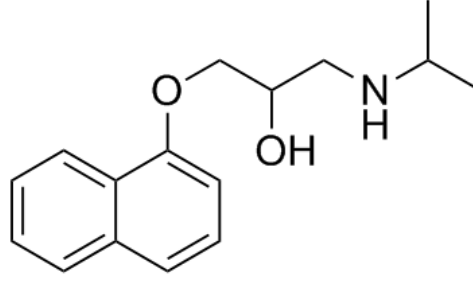


Şekil 1.5. Atenolol molekül yapısı (4-(2-hidroksi-3-[(1-metiletil)amino]propoksi) benzenasetamid.

1.5.2. Propranolol

Seçici olmayan beta adrenoreseptör bloke edici bir ajan olan propranolol, özellikle kardiyak hastalıklar ve hipertansiyonun tedavisinde klinik tıpta yaygın olarak kullanılmaktadır (Oppenheim, 1983). Propranolol, kardiyak çıkışın bastırılması ile renin salınımının inhibisyonu ile beyindeki vazomotor merkezinden tonik sempatik çıkış akımının azalması ve presinaptik β -reseptörlerinin inhibisyonu ile kan basıncını düşürdüğü belirlenmiştir (Bhagat, 1979). Ayrıca propranolol hipertansiyon tedavisinin yanında, feokromositoma (böbreküstü bezlerinde oluşan bir tümör), miyokard enfarktüsü (kalp krizi), kardiyak aritmiler (kalp ritminin düzensizleşmesi), angina pectoris (göğüs ağrısı), hipertrofik kardiyomiyopati (kalp kası hastalığı), hipertiroidizm (troit hastalığı), anksiyete bozuklukları gibi hastalıklarının tedavisinde de kullanıldığı belirtilmiştir (Al-Majed ve ark., 2017). Bir $\beta_{1,2}$ -adrenoreseptör antagonisti olan propranololün, katekolaminlerle reseptör seviyesinde rekabet ettiği ve ortosepatik etkileri bloke ettiği gözlemlenmiştir (Black ve ark., 1964).

Propranolol, kan-beyin bariyerini hızla geçen ve çok yüksek beyin konsantrasyonlarına sahip olan oldukça lipofilik bir bileşiktir (Oppenheim, 1983). Propranololün oral olarak uygulandıktan sonra tamamen emildiği belirtilmiştir. Propranololün hem epinefrin hem de katekolaminlerin etkisini inhibe ettiği ve kandaki ve merkezi sinir sistemindeki (CNS) seviyelerini azalttığı belirlenmiştir. Böylece kan basıncının düşmesini ve kardiyak aritmilerin önlenmesini sağladığı görülmüştür (Haddad ve Winchester, 1990).



Şekil 1.6. Propranolol molekül yapısı, 1- (izopropilamino) -3- (1-naftiloksi) -2-propano.

1.6. Diüretikler

Dünyada en yaygın kullanılan ilaç kategorilerinden birini temsil eden diüretikler, vücuttan sodyum ve suyun renal atılımını arttırabilen ajanlar olduğu belirtilmiştir. Diüretiklerin klinik uygulamaları modern tıbbın en önemli ilerlemelerinden biri olduğu ön görülmüştür. Diüretiklerin ana hedef organı olan böbrekler, nefron boyunca sodyum geri emilimini düzenleyerek, hücre dışı sıvı hacmini korumaktadırlar. Glomerulus tarafından süzülen sodyum ve suyun büyük bir çoğunluğu (% 99) luminal (idrara tarafı) ve bazolateral (kan tarafı) membranlarında spesifik iyon taşıyıcılarına sahip olan bir dizi benzersiz polarize epitel hücresi tarafından yeniden emilir (Breyer ve Jacobson, 1990).

Diüretikler nefronun farklı bölgelerinde sodyum klorür reabsorpsiyonunu azaltarak idrardan sodyum ve dolayısıyla su kaybını arttırdığı görülmüştür (Wile, 2012). Hipertansiyon, kalp yetmezliği, böbrek yetmezliği, nefrotik sendrom ve siroz gibi çeşitli klinik durumlarda negatif sıvı ve sodyum dengesini indüklemek için kullanıldıkları gözlemlenmiştir (Reddy ve Mooradian, 2009).

Diüretikler iyon transport inhibitörleridir ve nefronun çeşitli bölgelerinden sodyum geri emilimini engellerler. Bunun sonucunda sodyum ile beraber klor gibi diğer iyonlar normalden daha yüksek miktarda idrara geçerler ve ozmotik dengeyi koruyabilmek için su da bu iyonlarla beraber pasif olarak idrarla atılır. Böylece diüretikler idrar miktarını arttırırlar ve idrar ve kanın iyon içeriği ile beraber idrar pH'sını da değiştirirler. Farklı grup diüretiklerin etkinlikleride farklıdır; potasyum tutucu zayıf diüretikler ile sodyum atılımı % 2'nin altındayken, henle kulbuna etkili güçlü diüretikler de bu oran % 20'nin üstündedir. Temel kullanım alanları aşırı sıvı tutulumunun (ödem) tedavisi veya diüretik etkileriyle kan hacmini azalttıklarından dolayı hipertansiyon tedavisinde kullanılmalarıdır (Mycek ve ark., 1997).

Diüretikler hipervolemiyi (vücutta dolaşan kan hacminde artış) düzeltip kalbin art yükünü (kalbin yenmesi gereken güç) azaltırlar, vasküler konjestiyonu (vücudun bir alanında aşırı miktarda kan bulunması) ve solunum zorluğunu düzeltirler. Ancak aşırı dozlarda ve çok sık verilmemelidirler. Bu takdir de dolaşan kan hacmini fazla azaltarak zaten varolan kalp debisi ve böbrek kan akımı azalmasını daha da azaltırlar ve böylece azotemi (kanda aşırı azot bulunması) arttırılır ve sendromun diğer belirtilerini şiddetlendirebilirler (Kayaalp, 2005).

Diüretiklerin hipertansiyon tedavisinde yaygın olarak kullanılmalarının başlıca nedenleri; antihipertansif etkinlikleri 1958'den beri denenmiş ve tedavideki temel ilaç olarak önemlerinden bir şey kaybetmemiş olmaları, günde birkez verilmeleri, uzun süre kullanılmaları sonucunda hipertansiyonun ilerlemesini yavaşlattıkları ve inme, konjestif kalp yetmezliği ve böbrek yetmezliği gibi komplikasyonların insidensini azaltmaları epidemiyolojik incelemelerle kanıtlanmıştır (Kayaalp, 2005).

1.6.1. İndapamid

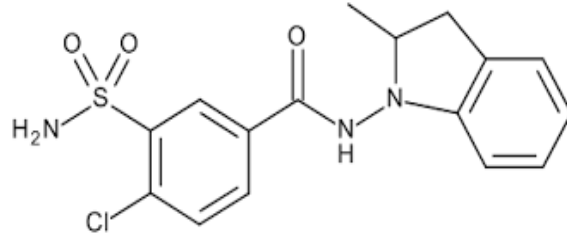
İndapamid (3- (aminosülfonil) -4-kloro-N- (2,3-dihidro-2-metil-1-H-indol-1-il) benzamid) , esansiyel arteriyel hipertansiyonun tedavisinde oral olarak günde 2,5 mg dozunda kullanılan antihipertansif bir diüretiktir. İndapamid hafif ve orta hipertansiyonlu vakaların yaklaşık % 65'inde kan basıncını etkili bir şekilde kontrol ettiği görülmüştür (Reyes ve Leary, 1983).

İndapamid pKa'sı 8.3 sahip zayıf bir asittir. İndapamid bir polar klorosülfamoil benzamid bileşeni ve polar olmayan metil indolin bileşiminin bir kombinasyonundan oluşmaktadır (Campbell ve ark., 1977). İndapamidin kan basıncında devamlı bir azalmayı sağladığı ve aynı zamanda hipokalemi ve hiperglisemi insidansında çok düşük olduğu belirtilmiştir (Ambrosioni ve ark., 1998). Aynı zamanda indapamid sol ventrikül hipertrofisini enalapril veya atenolol monoterapisinden daha büyük oranda azalttığı görülmüştür (Gosse ve ark., 2000; Luca ve ark., 2004; Dahlöf ve ark., 2005). Ayrıca indapamid diyabet ve hipertansiyonlu hastalarda mikroalbuminürinin azaltılmasında etkili olduğu belirtilmiştir (Puig ve ark., 2007).

İndapamidin yağda çözünürlüğü yüksek olduğu için diüretiklerin çoğundan farklı olduğu görülmüştür. Aynı zamanda indapamidin idrarla çok azı atılmakta ve bu

yüzden düşük bir diüretik aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir (Campbell ve Moore, 1981).

İnsanlara oral yoldan verilen indapamidin, maksimum 140 ng/mL'lik bir kan konsantrasyonunda 1 saat içinde hızla ve tamamen emildiği gözlemlenmiştir. İndapamid, plazma proteinlerine (% 79) bağlanmakta ve iyi bir şekilde metabolize edilmektedir. Ayrıca indapamidin dokularda çok iyi bir dağılıma sahip olduğu da belirlenmiştir (Marmo ve ark., 1985).



Şekil 1.7. İndapamid molekül yapısı, (3- (aminosülfonyl) -4-kloro-N- (2,3-dihidro-2-metil-1-H-indol-1-il) benzamid).

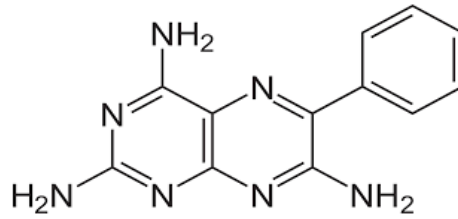
1.6.2. Triamteren

Triamteren (2, 4, 7-triamino-6-fenil-pteridin) 1961'den beri potasyum tutucu bir diüretik olarak kullanıldığı gözlemlenmiştir. Triamteren hipertansiyonun kontrol altına alınması için bir antihipertansiyon ajanı olarak kullanılmış ve aynı zamanda interstisyel sıvı birikiminin (ödem) tedavisi için kullanıldığı belirtilmiştir. Diğer diüretik sınıflarının aksine, potasyum tutucu diüretikler idrarda kayda değer miktarda potasyum kaybı olmadan diürez (idrara atılımı) gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Triamteren, ABD'de hastaların tedavi edilmesi için antihipertansif ilaç olarak kullanımı önerilmiştir (Chobanian ve ark., 2003). Ancak triamteren ABD'de antihipertansiyon ilacı olarak kullanım miktarı, kullanılan hipertansiyon ilaçlarının yaklaşık olarak % 3'ünü oluşturduğu belirtilmiştir. Potasyum tutucu diüretik sınıfının diğer üyeleri, spironolakton ve amilorid, bazı önemli açılardan triamterenden kimyasal olarak farklı olduğu görülmüştür (Wang ve ark., 2007; Gu ve ark., 2012).

Triamteren molekül ağırlığı 253.26 (O'Neil, 2006) olan folik asitin zayıf bir antagonisti ve ışığa duyarlı bir ilaç olduğu belirtilmiştir (NTP, 1993; Vargas ve ark., 1998). Triamteren böbrek içindeki toplama tüpünün lümen tarafındaki epitelyal sodyum kanalını bloke eden bir potasyum tutucu diüretiktir. Triamteren fizyolojik özelliği,

sodyum iyonlarının taşınmasını engellemesi ve aynı zamanda kan hacmini azaltarak yüksek tansiyonu dengelemesi olarak görülmüştür (Busch ve ark., 1996).

Triamteren, sodyumun geri emilimini baskılamak, potasyum ve hidrojen atılımını azaltmak için doğrudan distal tübül üzerine etki etmektedir. Triamteren, köpekler ve kedilerde nadiren kullanılmakta ve aynı zamanda triamteren neredeyse hiçbir zaman tek bir diüretik ajan olarak kullanılmadığı görülmüştür. Hipokalemi gelişen bir hastada potasyum atılımını azaltmak için genellikle diğer diüretiklerin, furosemid ile kombinasyon halinde uygulandığı belirtilmiştir (Maddison ve ark., 2008).



Şekil 1.8. Triamteren molekül yapısı, 2,4,7-triamino-6-fenil-pteridin.

1.6.3. Spironolakton

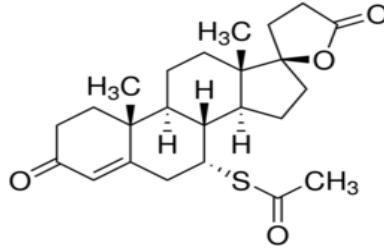
Spironolakton (7 α , 17 α) -7- (Asetiltio) -17-hidroksi-3-oksopregn-4-en-21-karboksilik asit, γ -lakton), temel olarak hipertansiyon ve ödem tedavisinde kullanılan potasyum tutucu bir diüretiktir. Özellikle hipertansiyona neden olan primer hiperaldosteronizm (aldosteron hormon fazlalığı), kalp yetmezliği, hepatik siroz, nefrotik sendrom tedavisinde kullanıldığı belirtilmiştir. Triamteren veya amiloride göre daha yavaş bir şekilde etki gösterdiği görülmüştür. Ancak spironolaktonun natriüretik etkisinin uzun süreli tedavi sırasında daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Spironolakton, aldosteronun distal konvolüsyon (sarmal) tübül üzerinde sodyum-tutucu etkilerini bloke ettiği ve ödem üretiminden sorumlu mekanizmaların etkisini azalttığı görülmüştür. Aynı zamanda spironolaktonun da sadece aldosteron varlığında etkili olduğu belirlenmiştir. Nispeten zayıf bir diüretik olan spironolakton genellikle diazetikler, tiyazidler gibi diüretiklere yardımcı olarak kullanıldığı belirtilmiştir. Spironolakton diğer diüretiklerle kombine olarak kullanıldığında sodyum atılımını arttırdığı ve aynı zamanda potasyum atılımını da azalttığı gözlemlenmiştir (Gennaro, 1995; Hardman ve ark., 1996).

Spironolakton zayıf bir natriüretik ajan olup renin anjiotensin-aldosteron sistemini bloke ettiği ve böylece kan basıncını düşürdüğü görülmüştür. Aynı zamanda

maksimum hipotansif etkilerinin de yaklaşık olarak 3 yada 4 hafta içinde gösterdiği belirlenmiştir (Sica, 2005).

Spirolakton, sitoplazmik aldosteron reseptörü için rekabet eden sentetik bir steroiddir. Su ve sodyum salgısını arttırdığı gözlemlenmiştir. Aynı zamanda spironolakton nefronun distal tübülünde aldosterona duyarlı Na^+/K^+ kanalı için rekabet ederek potasyum (K^+) atılımını azalttığı belirlenmiştir. Bunun yanı sıra filtrelenmiş sodyumun (Na^+) da yaklaşık % 5'nin idrarla atıldığı gözlemlenmiştir (Volz ve Felker, 2009).

Spirolakton, çocuklarda plazma gonadotropin seviyesini yükseltmek ve hedef doku düzeyinde antiandrojen olarak hareket etmek için hem gonadal hem de adrenal steroidogenezi etkilediği belirlenmiştir (Loriaux ve ark., 1976). Spirolakton, birçok hastalığın patolojisinde yer alan çeşitli sitokinlerin üretimini engellemekle kalmaz, aynı zamanda spironolaktonun modern anti-enflamatuar ajanlara ekonomik olarak cazip bir alternatif olduğu düşünülmüştür (Bendtzen ve ark., 2003).



Şekil 1.9. Spirolakton molekül yapısı, (7 α , 17 α)-7-(Asetiltio)-17-hidroksi-3-oksopregn-4-en-21-karboksilik asit, γ -lakton.

1.7. Enzimler

Enzimler biyolojik sistemlerde oluşan tepkimelerde etkili olan biyolojik katalizörler olarak tanımlanmaktadır. Bazı RNA yapısındaki enzim benzeri maddeler (ribozimler) dışında enzimlerin tümü protein yapısındadırlar. Bu nedenle proteinlere ait tüm yapısal özellikleri göstermektedirler. Enzimler bir tepkimeyi katalize etmesi ve bir veya birkaç substrata özgüllük göstermesi enzimlerin en önemli özelliklerinden birisidir. Genel olarak enzimler bir substrat molekülünün en azından bir kısmına karşı mutlaka optik spesifite göstermektedirler. Örnek olarak etkisini α -glukozidler üzerinde gösteren maltaz enzimi, β -glukozidlere etki etmemektedir (Onat ve ark., 2002).

Bir enzim sadece belirli bir kimyasal grup üzerine etkilidir. Glukozidazlar glukozidlere, alkol dehidrogenaz enzimi sadece alkol üzerine etki etmekte, pepsin ve tripsin enzimi ise peptid bağlarının parçalanmasını katalize etmektedirler. Bazı enzimler ise daha ileri grup özgülüğü göstermektedirler. Peptid bağlarının hidrolitik parçalanmasında görevli olan kimotripsin sadece aromatik amino asitlerin oluşturduğu peptid bağlarını parçalamaktadırlar. Benzer şekilde karboksi peptidaz, proteinin karboksil ucuna yakın olan, aminopeptidazlar ise amino ucuna yakın olan peptid bağlarının yıkılığını katalize etmektedirler. Bazı enzimlerin aktiviteleri için protein olmayan kofaktörlere gereksinimleri bulunmaktadır. Bir metal iyonu (Zn^{+2} gibi) veya koenzim olarak bilinen bir organik molekül kofaktör olabilmektedir. Koenzimler genellikle suda çözünen vitamin türevi bileşiklerdir (NAD^+ , FAD, Koenzim A). Eğer enzim-kofaktör bağlanması çok gevşek ise kofaktöre koenzim adı verilmektedir (Onat ve ark., 2002).

Enzimlerin çoğu protein yapısında katalizörlerdir. Başlıca hücre içinde bulunurlar ve az miktarlardadırlar. Pıhtılaşma faktörleri ve sindirim enzimleri gibi bazı enzimler ise hücre dışına salgılandıktan sonra fonksiyon gösterirler. Bununla beraber tanısal açıdan önemli enzimlerin çoğu sentezlendikleri hücre içinde aktiflerdir. Ayrıca molekül kütleleri de fazla olduğu için hücre zarlarından kolayca geçemezler. Bu nedenlerden dolayı hücre içi enzimleri çok az miktarda kana veya diğer vücut sıvılarına geçerler. Hücre dışına çıkan enzimlerin miktarı çok az olduğundan dolayı enzim kütlesi ölçülememektedir. Ancak aktiviteleri ölçülerek izlenebilir (Laker, 1998).

Enzimatik çalışmalar büyük öneme sahiptir. Çünkü bazı hastalıklarda, özellikle kalıtsal genetik bozukluklarda bir ya da daha fazla enzimin eksikliği veya tamamen yokluğu söz konusu olabilmektedir. Başka bir grup hastalığa da enzimin aşırı aktivitesi neden olabilir. Eritrositlerde, kan plazmasında, ya da doku örneklerinde enzimlerin aktivitelerinin ölçümü belli hastalıkların teşhisinde büyük bir öneme sahiptir. Birçok ilaç biyolojik etkilerini enzimlerle etkileşerek ortaya çıkarmaktadır. Enzimler sadece tıpta değil, aynı zamanda kimya endüstrinde, yiyecek hazırlanmasında ve ziraatte de uygulanan önemli maddelerdir (Nelson ve Cox, 2000).

1.8. Enzim İnhibisyonu

Enzim inhibisyonu, enzimatik bir tepkimenin hızının inhibitör adı verilen bazı maddeler tarafından azaltılması veya tamamen durdurulmasıdır (Onat ve ark., 2002). Enzim inhibisyonu, doğal ve deneysel olarak enzim aktivitesinin düzenlenme şekillerinden biridir. Birçok ilaç, spesifik bir enzimi inhibe ederek etki gösterir. Yine canlılarda, koagülasyon, fibrinoliz, kompleman aktivasyonu, inflamasyon reaksiyonları gibi birçok süreç enzim inhibisyonu ile düzenlenmektedir (Gürdöl ve Ademoğlu, 2010; Keha ve Küfrevioğlu, 2012).

Enzim inhibisyonları; geri dönüşümlü inhibisyon ve geri dönüşümsüz inhibisyon olarak iki temel grupta incelenmektedir. Geri dönüşümlü inhibisyonda, inhibitör ortamdan uzaklaştırıldığında enzim aktivitesi yeniden kazanılabilmektedir. Geri dönüşümsüz inhibisyonda ise enzim inhibitör tarafından geriye dönüşümsüz olarak inaktif duruma gelmektedir (Nelson ve Cox, 2000; Keha ve Küfrevioğlu, 2012).

Enzim inhibisyonu çok kompleks inhibisyonlar karışımı olmakla birlikte, kompetitif (yarışmalı), nonkompetitif (yarışmasız), unkompetitif (yarı yarışmalı) inhibisyon olmak üzere üç ana grupta incelenmektedir.

1.8.1. Yarışmalı (kompetitif) inhibisyon

Yarışmalı inhibisyonda, inhibitör enzimin aktif bölgesine bağlanmak için substrat ile yarışır. Yapıları substrata benzeyen bu bileşikler, aktif bölgeye kolayca bağlanmakta, ancak ürüne dönüşmemektedir. İnhibitör aktif bölgeyi işgal ettiği için substratın enzime bağlanması engellenir (Gürdöl ve Ademoğlu, 2010).

Süksinik aside yapısal olarak çok benzeyen malonik asit, süksinat dehidrogenazın kompetitif inhibitörüdür. Bu tür inhibisyonda enzimin substrata olan ilgisini azaltan inhibitör madde, K_M değerinin büyümesine yol açmaktadır. İnhibitör ile substrat arasındaki kompleksin oluşumuna ilişkin K_i sabit değeri büyüdükçe EI gevşek bağlı olmakta ve K'_M değeri K_M değerine yaklaşmakta, tersine K_i değeri küçüldükçe EI kompleksi sıkı bağlı olmakta ve K'_M değeri artmaktadır (Onat ve ark., 2002). Sonuç olarak K_M artarken, V_{max} değişmemektedir (Keha ve Küfrevioğlu, 2012).

1.8.2. Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon

Bu tür inhibisyonda substrat ile inhibitör madde kimyasal yapı yönünden benzerlik göstermemektedir. Enzime bağlanmada aralarında herhangi bir yarış yoktur. İnhibitör madde enzim üzerinde substratın bağlandığı bölge dışındaki başka bir bölgeye tersinir olarak bağlanmaktadır. ESI kompleksi ürün vermek üzere ES kompleksinden daha yavaş parçalandığı için tepkimenin hızı yavaşlamamaktadır. Enzimatik tepkimede bu tür inhibisyon ile tepkimenin V_{max} değeri azalmakta, K_M değeri değişmemektedir (Onat ve ark., 2002).

1.8.3. Yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyon

Yarı yarışmalı inhibisyonda inhibitör sadece ES kompleksine bağlanır. Bu inhibisyon çeşidi tek substratlı reaksiyonlara kıyasla iki substratlı ve çift yer değiştirmeli reaksiyonlarda daha sık görülmektedir. Yarı yarışmalı inhibisyona örnek olarak intestinal alkalin fosfatazın L-fenilalanin ile inhibisyonudur. Yarı yarışmalı inhibisyonda inhibitör varlığında ortamdan ES kompleksi sürekli uzaklaşacağı için K_M değeri azalır. Ayrıca ortamda ESI kompleksi sürekli bulunacağından V_{max} değeri de azalmaktadır. Böylece yarı yarışmalı inhibisyonda hem K_M hem de V_{max} değeri azalır (Gürdöl ve Ademoğlu, 2010; Keha ve Küfrevioğlu, 2012).

1.9. Afinite Kromatografisi

Afinite kromatografisi, belirli bir molekülün veya kompleks karışımlarındaki bir grup molekülün saflaştırılması için kullanılan en güçlü kromatografik yöntemlerden biridir. Enzim-substrat, reseptör- ligand veya antikor-antijen gibi iki molekül arasındaki biyokimyasal etkileşimlerin spesifikliğinden yararlanılarak birbirinden ayrılması esasına dayanmaktadır. Tersinir olan bu etkileşimler, hedef molekülün hareketli fazda iken sabit bir faz oluşturmak üzere bir afinite ligandı olarak adlandırılan etkileşimli moleküllerden birinin bir katı matriks üzerine yerleştirilmesiyle gerçekleşir (Urh ve ark., 2009).

Afinite kromatografisi yönteminde, kolona yüklenen çapraz bağlı bir polimer veya jelle enzimin spesifik bir inhibitörü kovalent olarak bağlanır ve daha sonra saflaştırılacak enzim bu kolondan geçirilir. Kolona bağlanmış inhibitör için önemli bir afinitesi olmayan bütün proteinler doğrudan kolondan geçerek hareket ederken

inhibitörü tanıyan proteinler afinite sabiti ile orantılı olarak kolondan geçer (Cuatrecasas ve ark., 1968).

Afinite kolonu, uygun pH ve iyonik şiddet sahip yıkama çözeltisi ile yıkandıktan sonra inhibitöre bağlanmış olan proteinler ligand kompleks ayrışmasına uygun bir çözücü ile elüe edilir. Afinite kromatografisinde proteinlerin afinite ligandına spesifik ve güçlü bir şekilde bağlanmalarından dolayı genellikle proteinler tek yada iki basamakta saflaştırılabilmektedirler (Varady ve ark., 1993; Hage ve ark., 1998). Afinite kromatografisi ile yapılan çalışmalarda, hem durağan faz hem de destek malzemesi olarak işlev gören çözünmeyen materyaller kullanılır. Çünkü bunların güçlü bir ayırım kapasitesi olduğu belirlenmiştir. Örneğin, Starkenstein tarafından kullanılan çözünmez nişasta, hem bir destek malzemesi hem de amilaz için bir substrat olarak kullanılmış ve böylece bu enzimin bağlanması ve tutulması sağlanmıştır. Benzer şekilde diğer araştırmacılar tarafından 1920'lerde ve 1940'larda nişasta ve amilaz ile çalışmalar yapılmıştır (Ambard, 1921; Hockenhull ve Herbert, 1945). Bu çalışmalardan birinde enzimin 300 kat saflaştırıldığı görülmüştür (Hockenhull ve Herbert, 1945). Aynı zaman da afinite kromatografisi ile bir kristalin protein olan edestin kullanımı yoluyla pepsin enzimi saflaştırılmıştır (Northrup, 1934). Yapılan başka bir çalışmada afinite kromatografisi yöntemiyle insan plazmasından antitrombin III (kan pıhtısı oluşumunu engelleyen, kandaki bir protein) proteini saflaştırılmıştır (Andersson ve ark., 1974). Yatohgo ve ark'larının yapmış olduğu çalışmada insan plazmasından vitronektinin (Hücre dışı matrikste bulunan ve yapışmayı sağlayan bir protein) proteini saflaştırılmıştır (Yatohgo ve ark., 1988). Ayrıca afinite kromatografisi yöntemi ile insan plazmasından plazminojen saflaştırılmıştır (Deutsch ve Mertz, 1970). Diğer bir çalışmada ise insan eritropoietin, siklik peptid ligandları kullanılarak afinite kromatografisi ile saflaştırılmıştır (Kish ve ark., 2018). Bitkilerden calmodulinin (hücre içi düzenleyici protein) afinite kromatografisi ile saflaştırılmıştır (Charbonneau ve Cormier, 1979). Aynı zamanda afinite kromatografisi ile insan karaciğerinden glutatyon S-transferaz enzimi de saflaştırılmıştır (Simons ve Vander, 1977).

Biyomoleküllerin ayrılması ve saflaştırılması çok yakın zamana kadar, modern biyoteknolojinin daha ampirik (deneysel) yönlerinden biri olarak sabit kalmıştır. Ancak daha sonra çeşitli adsorpsiyon kromatografilerinden biri olan afinite kromatografisi yöntemi ile yapılan çalışmalar neticesinde biyomoleküllerin etkili bir şekilde

saflaştırılabilmesi için uygun bir yöntem olduğu görülmüştür. Bu yöntemde izole edilecek maddelerin iyi bir saflık derecesinde etkili bir şekilde saflaştırıldığı belirlenmiştir (Roque ve Lowe, 2008). Günümüzde bu alanların dışında birçok enzim afinite kromatografisi yöntemiyle saflaştırılmaktadır.

1.10. Jel filtrasyon Kromatografisi

Jel filtrasyon kromatografisi, proteinlerin moleküler ağırlığını belirlemek için kullanılan en güçlü ve en basit yöntemlerden biridir. Bu yöntem ile elde edilen numuneler enzimatik, immünolojik gibi proteinlere özgü analizlerde kullanılmasından dolayı numune saflığının çok yüksek olması gerekmemektedir. Jel filtrasyon kromatografisi, proteinin kimyasal ve fiziksel yapısını bozmaması, hızlı olması nedeniyle son derece hassas yöntemdir (Ackers, 1970). Jel filtrasyon kromatografisi ayrıca proteinin SDS jel elektroforezi gibi denatüre edici koşullar altında elde edilen alt birimlerinin stokiyometrisinin belirlenmesinde de yararlı olabildiği görülmüştür (Ackers, 1970). Jel filtrasyon kolonları, çapraz bağlı poliakrilamid, agaroz, dekstran ve bunların herhangi birinin bir kombinasyonu olan kolon dolgu maddelerinden oluşur. Proteinler ve polimerler gibi büyük moleküller porlara giremez ancak küçük molekül proteinlerden daha önce kolondan çıkarlar (Scopes, 1993).

Jel filtrasyon kromatografisi yöntemi ile molekül ağırlığı bilinmeyen bir proteinin molekül ağırlığını belirleyebilmek için proteinin elüsyon hacmi ile molekül ağırlığı bilinen çeşitli protein standartlarının kıyaslanması ile bulunur (Rhodes ve ark., 2009). Jel filtrasyon kromatografisi proteinlerin molekül ağırlıklarının belirlenmesinde çok tercih edilen bir yöntemdir. Bu yöntemde proteinler kolona yüklenir ve proteinlerin kolondan geldiğini gösteren 280 nm'deki absorbansına karşılık gelen elüsyon hacmi ile proteinin molekül ağırlığı arasında bir ilişki vardır. Öncelikle molekül ağırlığı bilinen proteinler kolondan geçirilir ve standart bir grafik elde edilir. Bu grafik 280 nm 'de en yüksek absorbansın elde edildiği tüp sayısına karşı molekül ağırlığının logaritmasının çizilmesi ile hazırlanır. Daha sonra molekül ağırlığı bilinmeyen proteinin kaçınıcı tüplerde geldiği belirlenir ve grafik denkleminde molekül ağırlığı hesaplanır (Keha ve Küfrevioğlu, 2012).

1.11. Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Elektroforezi

Elektroforez, protein karışımlarını ayırmak, proteinlerin alt birimlerini araştırmak ve protein örneklerinin homojenliğini doğrulamak için kullanılan bir yöntemdir. Aynı zamanda proteinleri saflaştırmakta da kullanılmaktadır. Proteinler bir poliakrilamid jel matrisinde gözenekler aracılığıyla bir elektrik alanına tepki olarak göç ederler. Gözenek boyutu, artan akrilamid konsantrasyonu ile azalmaktadır. Gözenek büyüklüğü, protein yükü, boyutu ve şekli proteinin göç hızını belirler (Gallagher, 2006).

Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) biyoteknoloji, biyokimya, moleküler biyoloji, adli bilimler ve diğer yaşam bilimleri laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılan bir elektroforetik teknik olarak bilinmektedir. SDS-PAGE'de, proteinler, moleküler ağırlığına dayalı olarak bir poliakrilamid jeli içinde ayrılmaktadır. Proteinler amfoterik moleküllerdir, yani hem pozitif hem de negatif yüklere sahiptirler. Proteinleri tek bir yönde hareket ettirmek için, üzerlerinde düzgün bir negatif yük oluşturulmaktadır. Proteinler SDS ile karıştırıldığında, negatif yükü yüklenirler. SDS negatif yüklü bir deterjandır ve bu nedenle anyonik bir deterjan olarak bilinmektedir. SDS, kovalent olmayan kuvvetleri bozarak doğal proteinleri denatüre eder. Kovalent olmayan kuvvetler hidrojen bağlamayı içermektedir. Ayrıca kovalent olmayan kuvvetler, bir doğal proteinin üç boyutlu yapısından sorumlu olan hidrojen bağlama, hidrofobik ve iyonik etkileşimleri içerir. SDS, protein moleküllerine eşit bir net negatif yük vermektedir. Denatüre olmuş doğrusal protein molekülleri, akrilamid monomerlerinin polimerize edilmesiyle yapılan poliakrilamid jeli (PAGE) üzerine yüklenir. PAGE, akrilamid, bisakrilamid, TEMED, amonyum persülfat ve Tris-HCl tamponu kullanılarak hazırlanır. PAGE, yığılma jeli ve ayırma jeli olmak üzere iki faza sahiptir. Uygulanan bir elektrik alan altında, yığılma jeli SDS yüklü doğrusal protein moleküllerini yoğunlaştırırken, ayırma jeli proteinleri moleküler ağırlığına göre ayırır. Daha sonra, PAGE jeli Coomassie Brilliant Blue R250 boya çözeltisine birkaç saat boyunca boyama için yerleştirilir ve ayrılan protein moleküllerini bantlar halinde ortaya çıktığı görülmektedir (Saraswathy ve Ramalingam, 2011).

Bu yöntem, karakterize edilmiş polipeptidler ve molekül ağırlığı bilinen standart proteinlerin jelde yürütülmesi ile yapılmaktadır. Polipeptidlerin molekül ağırlığının

\log_{MA} değeri ve R_f değeri arasında bir lineer bağlantı bulunur. Ön tarafı boyanmış jelin üstündeki mesafe ile ayrılan polipeptid jelinin üst mesafesinden standart proteinlerin R_f değerleri ölçülerek eğim belirlenir ve karakterize edilen proteinin de R_f değeri aynı şekilde belirlenmektedir. \log_{MA} ve R_f değerleri ile grafik çizilir ve bu grafikten elde edilen eğride verilen denklem kullanılarak istenilen proteinin molekül ağırlığı hesaplanabilir (Davis, B. J., 1964; Shapiro ve ark., 1967; Laemmli, 1970).

1.12. Nativ (Tabii) Elektroforez

Proteinlerin biyolojik aktiviteye sahip oldukları, fonksiyonel olarak aktif durumlarına nativ formları denmektedir. Enzimatik aktiviteye sahip, suda çözünebilen ve agregat oluşturmeyen proteinlerin fonksiyon çalışmaları için nativ elektroforez yapılması önerilmektedir. Nativ elektroforez ile proteinler jelde biyolojik aktivitelerini korurlar. Nativ elektroforez çalışmalarında, jellerin hazırlanması, yürütülmesi ve boyanmaları aşamasında dikkat edilecek en önemli noktalar, proteinlerin yapısını ve yükünü bozacak herhangi bir denatüre edici ajanlar kullanılmamalıdır. Genelde kullanılmaması gereken denatüre ajanlar, SDS, üre, tiyoüre, iyonik deterjanlar, yüksek sıcaklık, kaynatma, 2-merkaptoetanol veya DTT'dir. Bu yapıların dışında genel uygulama tekniği nativ ve denatüre sistemler için aynıdır (Bollag ve ark., 1996; Kamp ve ark., 1997; Kellner ve ark., 1999).

Tabii koşullarda proteinlerin ayrılması boyut, şekil ve tabii yük gibi birçok faktöre bağlıdır. Nativ jel elektroforezinde SDS ve SDS-PAGE standartları olan indirgeyici ajanlar (DTT) kullanılmamaktadır. Jel ve elektroforez çözeltileri SDS kullanılmadan hazırlanması gerekmektedir.

Nativ ya da non denatüre jel elektroforezi SDS olmadan çalıştırılır. SDS ile elektroforezde proteinlerin elektroforetik hareketliliği öncelikle moleküler kütesine bağlı iken nativ elektroforezde hareketlilik hem protein yüküne hem de hidrodinamik boyutuna göre değişir. Elektrik yükü ile çalışan elektroforez, yürütme tampon pH'sında protein üzerindeki iç yüklerle yönetilir. Protein katlanmış yapısını koruduğu için jel üzerindeki hidrodinamik boyut ve hareketlilik bu konformasyonun doğası ile değişecektir. Eğer nativ elektroforez asit ve alkaline denatürasyonundan kaçınmak için nötral pH'da gerçekleştirilirse proteinin kendi kendine birleşmesini, agregatlanma ve

diğer protein ya da bileşiklerin bağlanması gibi çalışmalar için kullanılabilir (Laemmli, 1970; Studier, 1973; Deyl, 1979; Hames, 1990).





2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ

Anjiotensin konverting enzim rat akciğerinde çoğunlukla membranöz subselüler parçacıklarla birlikte bulunmaktadır. Anjiotensin konverting enzim, sodyum deoksikolat ile çöktürülerek rat akciğerinin parçacıklı bir fraksiyondan çözüldürülmüş ve daha sonra DEAE-selüloz ve Sephadex G-200 kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Sephadex G-200 kromatografisinden elde edilen anjiotensin konverting enzim aktivitesine sahip olan fraksiyonun, jel filtrasyonu ile molekül ağırlığının yaklaşık 270.000 Da olduğu görülmüştür. Preparatın analitik disk jel elektroforezi ile tek bir bant gösterdiği gözlemlenmiştir. Saflaştırılan preparatın spesifik anjiotensin konverting enzim aktivitesi, substrat olarak (hippurilhistidillösün) kullanılarak dakikada mg başına 17.6 $\mu\text{mol/dk/mg}$ olduğu gözlemlenirken, anjiotensin 1 kullanılarak ise dakikada mg başına 1.8 $\mu\text{mol/dk/mg}$ olduğu görülmüştür. Bu da subselüler parçacıkların aktivitesinin 100 kattan daha fazla saflaştırılmış olduğu göstermiştir (Lanzillo ve Fanburg, 1974).

Anjiotensin konverting enzim [EC 3.4.15.1], insan böbrek korteksinin membran fraksiyonundan tripsin kullanılarak çözüldürülmüştür. Daha sonra anjiotensin konverting enzim DEAE-Sephadex A-50 kolon kromatografisi, preparatif izoelektrik odaklama ve Sephadex G-200 jel filtrasyonu ile saflaştırılmıştır. Enzimin veriminin % 13.9 olduğu belirlenmiştir. Enzimin molekül ağırlığı sedimantasyon denge metodu ile 199.000 Da olarak tahmin edilmiştir. Enzimin sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) kullanılarak denatüre edilmesi ve indirgenmesiyle elde edilen molekül ağırlığının 170.000 Da olduğu belirlenmiştir. Saflaştırılan enzimin spesifik aktivitesinin 96.0 $\mu\text{mol/dak/mg}$ protein olduğu görülmüş ve substrat olarak da (hippurilhistidillösün) kullanılmıştır. Hippurilhistidillösün substratı için enzimin K_m ve K_{kat} değeri ayrıca hidrolitik katsayısı (K_{kat}/K_M) sırasıyla 2.0 mM, 545 s^{-1} ve 273 $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ olarak belirlenmiştir (Takada ve ark., 1981).

İnsan ve fare derisindeki anjiotensin konverting enzimin (ACE) kimyasal özellikleri karakterize edilmiştir. İnsan ve fare derisindeki ACE'in hem çözünebilir hem de patikül formları mevcuttur. Bu nedenle insan ve fare derisinden 50 mM Tris tamponu ile bir süpernatant ve Triton-X 100 ile bir pellet oluşturulmuştur. Jel filtrasyon ile süpernatanttaki ACE'in molekül ağırlığı 330.000 Da olarak hesaplanmıştır. Ancak Triton X-100 ile çözünen ACE'in molekül ağırlığı 430.000 Da olarak bulunmuştur.

Elektroforez işlemi ile iki enzim fraksiyonunun yük farkı gösterdiği belirlenmiştir. Enzimler için optimum pH 8.1 ve 7.7 ve HHL ve anjiotensin I için K_M değerleri sırasıyla 2.6 mM ve 0.11 mM olarak bulunmuştur. Sonuçlarda insan ve fare enzimlerinin kimyasal özelliklerinin benzer olduğunu görülmüştür (Hara ve ark., 1982).

Afinite kromatografisi yöntemiyle anjiotensin konverting enzim tek basamakta tavşan ve insan plazmasından saflaştırılmıştır. Tavşan akciğerinden saflaştırma oranının 1000 kat olduğu görülürken, insan plazmasındaki saflaştırma oranının ise 100.000 olduğu görülmüştür. Güçlü bir anjiotensin konverting enzim inhibitörü olan lisinopril saflaştırma işleminde kullanılmıştır (Bull ve ark., 1985).

Yapılan bir çalışmada peptidil-dipeptidaz A (anjiotensin konverting enzim, ACE, EC 3.4.15.1), afinite kromatografisi yöntemiyle lisinopril inhibitörü (ligand) kullanılarak domuz böbreği ve striatumundan (beyin düğümü)) saflaştırılmıştır. Afinite kromatografisi kolonunda kullanılan 2.8 nm'lik bir uzantı kolu daha önceki çalışmada kullanılan 1.4 nm'lik uzantı kolu ile karşılaştırıldığında verimi daha da artırdığı görülmüştür. Sitriatal ACE' nin iki formu (Mr 180000 ve 170000) mevcuttur, fakat böbrekteki anjiotensin enzimin sadece tek formu (Mr 180000) prosedürde belirtildiği gibi saflaştırılmıştır. Sitriatal ve böbrekteki anjiotensin enzimi arasında substrat spesifikliği ve inhibitör duyarlılığı bakımından büyük bir fark tespit edilmemiştir. Özellikle amidatlanmış nöropeptid ve P maddesi her iki preparat için aynı şekilde hidrolizlenmiş ve tachykinin (takikinin) nörokinin A ve nörokinin B peptidlerinin hidroliziyle arasında önemli bir fark tespit edilmemiştir. Domuz beyindeki belirlenebilir ACE formları birbirinin izoenzimleri değildir fakat beyindeki hücre tiplerin farklı glikosilasyondan meydana gelmektedir (Hooper ve Turner, 1987).

Anjiotensin konverting enzim domuz böbreğinden dört farklı yöntemden biri ile membrandan çözündürüldükten sonra afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırılmıştır. Triton X-100, tripsin ya da enzimin üretilen tüm hidrofilik formlarının mikrovillar membranlardaki endojen aktivitesi ile çözündürme Triton X-114 içinde faz ayrımı ile değerlendirilmiştir olup lipozom içine dahil edilememiştir. Sadece çözündürme ve saflaştırma işlemi, enzimin üretilebilen amfipatik formu (membran ya da m-formu) EDTA (10 mM) varlığında Triton X-100 ile etkilenmiştir. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile membran formunun molekül ağırlığının

(yaklaşık 180.000 Da), hidrofilik formunun molekül ağırlığından (yaklaşık 170.000 Da) daha büyük olduğu görülmüştür (Hooper ve ark., 1987).

İnsan kalbinden anjiotensin konverting enzim afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırılmıştır. Bu yöntemde immobilize N-[1(S)karboksi-5-aminopentil]-Gly-Gly kullanılmıştır. Anjiotensin konverting enzim 1660 kat saflaştırılmış ve enzimin spesifik aktivitesi 38 ünit/mg protein olarak belirlenmiştir. SDS elektroforezi ile molekül ağırlığı 150.000 Da olarak bulunmuştur. İnsan kalbi ACE'yi SQ 20.881 inhibitörü ($IC_{50}=40$ nM) ile inhibe edilir. İnsan kalbindeki anjiotensin konverting enzim Cl^{-1} varlığında NaCl, $CaCl_2$ ve Na_2SO_4 ile aktive edilirken CH_3COONa ve $NaNO_3$ ACE'in aktivitesi üzerine hiçbir etki göstermemiştir (Sakharov ve ark., 1987).

Anjiotensin konverting enzim [ACE (peptidil-dipeptidaz A, EC 3.4.15.1)] fare bağırsak mukozasının toplam hücre membran fraksiyonundan saflaştırılmıştır. Anjiotensin konverting enzim jel filtrasyon ve lisinopril-Sepharose afinite kolon kromatografisi ile 4500 kat saflaştırılmıştır. Molekül ağırlığı 160,000 olan enzimin sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile homojen olduğu belirlenmiştir. Saflaştırılmış olan protein % 12 N-bağlı karbonhidrat içeren bir glikoenzim olduğu görülmüştür. Saflaştırılan ACE'nin spesifik aktivitesi benzoil-Gly-His-Leu substratı kullanılarak 65 U/mg protein olarak hesaplanmıştır. Yapılan kinetik analizler sonucunda, enzimin COOH-terminal ucunda prolin içeren substratlar ile maksimum hıza ulaştığını göstermiştir. İnhibitör çalışmaları esnasında enzimin bir metaloprotein olduğu görülmüştür (Erickson ve ark., 1992).

Yapılan başka bir çalışmada ise, *theromyzon tessulatum* sülüğünde anjiotensin konverting enziminin membran ve çözünebilir formlarının mevcut olduğu görülmüştür. Bu enzim *theromyzon tessulatum* sülüğünden kaptopril-sepharose-afinite kromatografisi, iyon - değişim kromatografisi ve jel geçirgenlik kromatografisi ve ters-faz HPCL yöntemiyle dört aşamada saflaştırılmıştır. Peptidil dipeptidaz, anjiotensin I'in fenil ve histidin bağının hidrolizlenmesiyle oluşan glikolize bir enzimdir. Çözünen anjiotensin enzimi yüksek bir katalitik aktivite gösterse de K_M ve spesifik aktivite de aynı etkiyi göstermiştir. Bu hidroliz, ACE inhibitörü kaptopril tarafından inhibe edilmiştir. Ayrıca anti-ACE immünostokimya anjiotensin enziminin iki formunun varlığını göstermiştir. Bu materyaller glia (beyin hücrelerini besleyen) ve nöronlarda bulunmaktadır. Omurgasız hayvanın merkezi sinir sisteminde anjiotensin enziminin

hücrel lokalizasyonu ve biyokimyasal karakterizasyonu ilk kez bu çalışmayla belirlenmiştir. Böylece bu çalışma sülük beyinde bu enzimleri çalışabilmek için basit bir model oluşturmuştur (Vandenbulcke ve ark., 1997).

Anjiotensin konverting enzimi afinite kromatografisi yöntemi ile birkaç basamakta domuz serumundan yüksek verimle (% 40) saflaştırılmış ve bu saflaştırma işleminde epoxy-activated sepharose 6B kullanılmıştır. Anyon değişim kromatografisinin iki basamağı farklı pH'larda (pH 9.0 ve pH 6.0) yapılmıştır. Substrat olarak FAPGG (N- [3- (2-furil) akriloil] L-fenilalanil glisil glisin) kullanılmıştır. Ayrıca biyolojik sıvılarda anjiotensin konverting (ACE) aktivitesini doğru, hassas bir şekilde belirlemek için geliştirilen ters-faz HPLC metodu ile ayırma yöntemi ve substrat olarak kullanılan FAPGG'nin (N- [3- (2-furil) akriloil] L-fenilalanil glisil glisin) hidrolizine dayanmaktadır. Bu metotta bazı kinetik parametreler belirlenmiştir. FAPGG için K_M ve K_{kat} değerlerinin sırasıyla 0.793 ± 0.052 mM ve 5830 s⁻¹ olduğu belirlenmiştir. Ayrıca iki spesifik ACE inhibitörü olan lisinopril ve kaptoprilin I_{50} değerlerinin de sırasıyla 5.7 ± 0.67 nM ve $1,0 \pm 0.29$ nM olduğu hesaplanmıştır (Quassinti, 1998).

İmmobilize anjiotensin konverting enzim insan serumundan doğal olarak oluşan bir ACE bağlayıcı proteinin izole edilmesi için bir afinite ligandı olarak kullanılmıştır. ACE, lisinopril afinite kromatografisi kullanılarak çözünebilir sıgır akciğer membranından saflaştırılmıştır. Saflaştırılan bu enzimin molekül ağırlığı 180.000 Da olarak hesaplanmıştır ve immunoblot içinde tavşan testiküler ACE'i için anti ACE antikoru ile ayırt edilmiştir. ACE hem affi-jel 15 üzerine hem de epoxy sepharose üzerine immobilize edilmiştir. Affi-Jel 15 üzerine immobilize edilmiş ACE (0.176 U/mL)'nin, epoxy sepharose üzerine immobilize edilmiş ACE enzimi (0.00005 U/mL) ile karşılaştırıldığında daha yüksek katalitik aktivite sahip olduğu görülmüştür. (Thevananther ve Brecher, 1999).

Sağlıklı ve orta düzeyde hipertansif etkiye sahip tedavi edilmemiş hastalarda anjiotensin konverting enzim (ACE)'nin idrardaki izoformları incelenmiştir. Sağlıklı bireylerde ACE'nin en yüksek ve en düşük molekül ağırlığı (170 ve 65 kDa) olup tedavi edilmemiş orta düzeyde hipertansive etkiye sahip hastalarda ise ACE'nin sadece düşük molekül ağırlığının (90 ve 65 kDa) olduğu görülmüştür. ACE ile yapılan bir çalışmanın amacını, prenatal (doğum öncesi) gelişimi sırasında ACE 'nin N-terminal domaini belirlemek, prematüre ve gelişimini tamamlamış bebeklerin idrarından ACE'nin

izoformlarını karakterize etmek ve saflaştırmak olduğu belirtilmiştir. Gelişme ve gebeliğin 36. haftasına kadar tamamlanmayan nefrogenesiz prematüre bebeklerin renal tubüleri (böbrek tübüleri) tam olgunlaşmamıştır. Prematüre ve gelişimini tamamlamış bebeklerden alınan idrar amicon konsantrasyonunda konsantre edilmiş, 150 mmol/L NaCl içeren Tris-HCl tampon çözeltisi 50 mmol/L karşı aynı ekipmanla diyaliz edilerek ve aynı taponla dengelenen jel filtrasyon kolonuna verilmiştir. Bu durumda iki pik meydana gelmiştir. (prematüre bebekler için (P1 ve P2; gelişimini tamamlamış bebekler için TP1 VE TP2) hippuryl-His-Leu (K_M , 3 mmol/L) substratı ile ACE aktivitesi belirlenmiştir. Prematüre bebeklerde hippuryl-His-Leu substratı ile ölçülen P1 aktivitesi P2 aktivitesinden 12 kat daha düşük olduğu görülmüştür, fakat gelişimini tamamlamış bebeklerde TP1 ve TP2 arasındaki farkın yaklaşık olarak 1,6 kat olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar, ACE'nin aktivitesinin prematüre bebeklerin idrarında bulunan ACE'nin yanısıra N-domain ACE 'nin renal gelişimle ilgisi olduğunu göstermiştir (Hattori ve ark., 2000).

Yapılan bir araştırmada afrika göçmen çekirgesi olan *locusta migratoria* testislerinde yüksek miktarda ACE aktivitesi saptanmış ayrıca midgut (orta bağırsak) ve hemolenfide (vücut sıvısı) de düşük miktarda ACE aktivitesi gözlenmiştir. Çekirge testislerinde bulunun anjiotensin konverting enzim anyon değişimi ve jel geçirgenlik kromatografisi yöntemi ile iki aşamada saflaştırılmıştır. Anjiotensin konverting enzimin molekül ağırlığı yaklaşık olarak 80 kDa olarak bulunmuş ve aynı zamanda hem omurgalı hem de omurgasızlarda ACE'nin önemli bir aminoasit dizisi belirlenmiştir ve bu aminoasit dizisi cDNA klonlaması ile teyit edilmiştir (Macours 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 tek basamakta saflaştırılmıştır. Hem deterjanla ekstrakte edilen hem de tripsin ile ekstrakte edilen enzim için molekül ağırlığı 150 kDa olarak bulunmuştur. Deterjan ve tripsin ile ekstrakte edilen enzimler için ACE'nin spesifik aktivitesi sırasıyla 294 U mg^{-1} ve 326 U mg^{-1} olarak hesaplanmıştır. Optimum pH aralığı 7-8.5 ve optimum sıcaklık 50 °C olarak hesaplanmıştır. Optimum klorür konsantrasyonunun, sentetik substrat FAPGG (N- [3-(2-furil) akriloil] L-fenilalanil glisil glisin) ve anjiotensin I için yaklaşık (200 mM) ve bradikinin için (10 mM) olduğu görülmüştür. FAPGG için K_M ve K_{kat} değerleri sırasıyla

0.608±0.07 mM ve 249 s⁻¹ olarak bulunmuştur. ACE'nin iki spesifik inhibitörü olan kaptopril ve lisinoprilin IC₅₀ değerleri sırasıyla 68±12.55 nM ve 6.763±0.66 nM olarak hesaplanmıştır (Miano ve ark., 2003).

Anjiotensin I konverting enzim, anjiotensin I'in vazokonstriktör anjiotensin II'ye dönüşümünü katalizleyerek kan basıncının düzenlenmesinde büyük bir rol oynar. Anjiotensin konverting enzim Concanavalin-A Sepharose 4B ve Lisinopril Sepharose 6B afinite kromatografisi kullanılarak iki basamakta domuz akciğerinden saflaştırılmıştır. Aynı saflaştırma şeması, enzimin aktif bölgesinde bulunan çinko (Zn⁺²) iyonunun kobalt iyonu (Cobalt-ACE) ile yer değiştirmesini sağlamak için kullanılmıştır. Cobalt-ACE görünür spektrumu 500 nm'den 600 nm'ye karakteristik geniş bir pik göstermektedir. Bu piklerin şekil ve maksimum absorptivitesi, katalitik bölgeye bağlı olan ACE inhibitörleri ile değişmektedir (Andújar Sánchez ve ark., 2003).

Tavşan akciğerinden anjiotensin konverting enzim kısmı olarak 3 adımda saflaştırılmıştır. Amonyum sülfat ile çöktürme, jel filtrasyon kromatografi (sephadex G-75) ve iyon değişim kromatografisi (CM- sephadex). Enzimin aktivitesi, anjiotensin konverting enzim vasıtasıyla hippuril-L-histidin-L-lösin hidrolizi ile hippurik asit üretim hızının monitörden izlenmesiyle tayin edilmiştir. Enzim CM-sephadex kolonu üzerinde % 21 verimle 6.25 kat saflaştırılmıştır. Tavşan akciğerinden saflaştırılan anjiotensin konverting enzim için optimum pH aralığı 8.0-8.3 ve optimum sıcaklık ise 37 °C olarak hesaplanmıştır. Hippuril-L-histidin-L-lösinin kinetik sabitlerinin belirlenmesi için yapılan başlangıç hızı çalışmalarında Km ve Vmax değerleri sırasıyla 1.8 ve 0.4 µmol dak⁻¹ olduğu görülmüştür. Ayrıca anjiotensin konverting enzim aktivitesini EDTA inhibe ederken, Mg²⁺, Ca²⁺, Na⁺ ve K⁺ iyonları enzim aktivitesini etkilememiştir (Abdulazeez Mansurah ve ark., 2013).

Bu çalışmada, kan basıncının düzenlenmesinden sorumlu olan anjiotensin - konverting enzim (ACE, peptidildipeptidaz A, EC 3.4.15.1) insan plazmasından NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow kolon dolgu maddesi kullanılarak afinite kolonu ile tek basamakta saflaştırılmıştır. Enzim afinite kromatografisi yöntemiyle 12.860 kat saflaştırılmış ve aynı zamanda enzimin spesifik aktivitesi 5080 EU / mg protein olarak hesaplanmıştır. Enzim 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 görülmüştür. ACE'nin nativ moleküler ağırlığı, jel

filtrasyon kromatografisi ile 260 kDa olarak bulunmuştur. *Nigella sativa* bitkisinin (Ranunculaceae) doğal yağ asitleri kolon kromatografisi ile izole edilmiştir. Bu bileşiklerin yapıları, NMR ve GC-MS kullanılarak belirlenmiştir. Sonuçlar, yüksek linoleik, oleik ve palmitik asit konsantrasyonlarının bitkiden izole edildiğini göstermiştir. ACE aktivitesi üzerine altı fraksiyonun (Fr 1-6) etkisi incelenmiştir. Fraksiyon 3, ACE aktivitesini arttırırken, diğer fraksiyonların enzim aktivitesini azalttığı gözlemlenmiştir. Enzimin aktivitesini inhibe eden fraksiyonların konsantrasyonları Lineweaver – Burk grafiği kullanılarak 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).

Hafif ile orta dereceli esansiyel hipertansiyona sahip olan 10 hastada, anjiotensin konverting enzim inhibitörü olan fosinoprilin kardiyovasküler hastalık üzerine etkileri incelenmiştir. Bu hastalara oral yoldan 10 mg fosinopril dozunun uygulanması periferik dirençte % 24'lük bir düşüşe neden olmuş ve bu da ortalama arter basıncını düşürmüştür. Kısa süreli tedavi (12 hafta) boyunca toplam periferik direnç ($p < 0.01$) azalmış ve böylece ortalama arter basıncındaki ($p < 0.05$) azalmanında devam ettiği görülmüştür. Ayrıca böbrek kan akımı, glomerüler filtrasyon hızı ve filtrasyon fraksiyonu değişmeden kalırken renal vasküler direncin azaldığı görülmüştür ($p < 0.05$). Sol ventrikül kütesinin % 11 azaldığı görülürken ($p < 0.01$), miyokardiyal kontraktilitenin değişmediği belirlenmiştir. Böylece, fosinopril tarafından arteriyel basınç düşürülmesi, böbrek hemodinamiği ve azalmış sol ventrikül kütlesi ile ilişkili olduğu görülmüştür (Oren ve ark., 1991).

Başka bir çalışmada apolipoprotein (Apo E) eksikliği olan farelerde anjiotensin konverting enzim inhibitörü olan fosinoprilin antiaterosklerotik (kalp ve damar sistemini koruyucu ve onarıcı) etki mekanizmaları araştırılmıştır. Apo E eksikliği olan 8 haftalık bir fareye, içme suyuna plasebo ya da yüksek dozda (25 mg/kg/d) fosinopril ilave edilerek verilmiştir. 12 haftalık bir tedaviden sonra fosinopril, plasebo grubu ile karşılaştırıldığında aort lezyon boyutunun (hacminin) % 70 oranında azaldığı görülmüştür ($p < 0.005$). Bu dozdaki fosinopril, tedaviden önce 93 ± 2 mm Hg olan kan basıncını tedavinin sonlarına doğru 70 ± 2 mm Hg kadar düşürmüştür. Fosinopril ayrıca bakır sülfat (CuSO_4) kaynaklı LDL (kötü kolesterol)'e karşı farelerin direncini arttırırken malondialdehit içerikli LDL düzeyini de % 90 oranında azaltmıştır.

Fosinopril LDL oksidasyonunun başlaması için gerekli olan zamanı da plasebo ile tedavi edilmiş farelerde 100 dakika, fosinopril ile tedavi edilmiş farelerde ise 240 dakikadan fazla bir süre geciktirmiştir ($p<0.001$). Fosinopril ile tedavi edilen fareler, plasebo ile tedavi edilen farelere göre bakır sülfat oksidasyon kaynaklı LDL' nin etkisini inhibe etmiş ve lipid peroksitler ve hidroperoksi-kolesteril linoleat içerikli LDL' nin etkisini de % 18 ve % 37 oranında azaltmıştır ($p<0.01$). Düşük dozdaki fosinopril (5/mg/kg/d) plazma ACE'nin aktivitesini ve LDL eğilimini azaltmak için yeterli iken yüksek kan basıncını düşürmek için ise yeterli olmadığı görülmüştür. Bu düşük doz ayrıca Apo E eksikliği olan farelerde aort lezyon boyutunu (hacmini) % 40 oranında azaltmıştır. Sonuç olarak Apo E eksikliği olan farelerde fosinoprilin antiaterojenik etkilerinin, sadece kan basıncını düşürmekle kalmadığı aynı zamanda LDL oksidasyonunun inhibisyonu ile ilişkili olan anjiotensin II bağımlı inhibisyon etkisinde azaltığı belirlenmiştir (Hayek ve ark., 1999).

Böbrek fonksiyonu normal olan esansiyel hipertansif hastalarda anjiotensin konverting enzim inhibitörü olan fosinopril ile anjiotensin reseptör blokleri irbesartanın eritropoez (eritrosit oluşumu) üzerine etkisi karşılaştırılmıştır. Yaş ortalaması (57.4 ± 11.5) ya da (65.2 ± 8.7) olan 30 hasta üzerinde yapılan çalışmada 12 hafta boyunca hastalara günde bir kez 20 mg fosinopril veya 150 mg irbesartan rastgele verilmiştir. Plazma eritropoietin, hemoglobin (Hb) ve hematokrit (Hc) düzeyleri tedaviye başladıktan sonra günlük ve aylık olarak ölçülmüştür. Çalışma sonucunda irbesartan eritropoietin düzeyleri başlangıçtaki (20.7 ± 1.3 vs 18.1 ± 3.7 mU / ml, $p=0.019$) değerlere göre azalmış ancak fosinoprilin başlangıç değerleri (18.8 ± 1.3 vs. 18.6 ± 1.6 mU/ml) değişmemiştir. Hemoglobin (Hb) değerleri irbesartan grubunda başlangıçtaki (13.8 ± 1.2 vs. 13.5 ± 1.1 g/dl, $p = 0.029$) değerlere göre düşmüştür, fakat fosinopril ile tedavi edilen hastalarda değişmemiştir (14.6 ± 1.3 vs 14.5 ± 1.3 g/dl). Hematokrit (Hc) başlangıç değerleri irbesartan grubunda (40.9 ± 3.7 vs. 40.8 ± 3.3 %) ve fosinopril grubunda (14.6 ± 1.3 vs. 14.5 ± 1.3 %) herhangi bir değişiklik göstermemiştir. İrbesartan esansiyel hipertansif hastalarda eritropoietin salgısı ve hemoglobin düzeylerini düşürmüştür. Fosinoprilin ise eritropoietin sekresyonunu etkilemediği ve hemoglobin düzeylerini düşürmediği görülmüştür (Robles ve ark., 2003).

Esansiyel hipertansiyonu olan dokuz hastada, sınırsız sodyum alımı ($n=8$) ve düşük sodyum diyetinde ($n=1$) anjiotensin konverting enzimin kaptopril ile akut

inhibisyonunun, renal hemodinami üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Kaptoprilin 60 dakika içerisinde, maksimum olan arter basıncında hızlı ve anlamlı bir düşüşe neden olduğu gözlemlenmiştir. Aynı zamanda etkin renal plazma akışının (ERPF) arttığı, glomerüler filtrasyon hızının (GFR) değişmediği ve kaptoprilden sonra filtrasyon fraksiyonunun (FF) azaldığı görülmüştür. Sodyum atılımında bir değişiklik olmadığı ve idrarla atılan potasyumunda bir azalma meydana gelmediği de belirlenmiştir. Düşük sodyum diyeti olan hastada, kaptopril GFR ve ERPF'de çarpıcı artışlara neden olmuştur (sırasıyla % 64 ve % 106). Bu çalışma sonucunda esansiyel hipertansiyonu olan hastalarda, anjiotensinin, efferent arteriolar (kılcal damarlara kan dağıtan böbrek kan damarları) seviyesinde renal vasküler tonusun korunmasında aktif olarak rol oynadığını görülmüştür (Mimran ve ark., 1979).

Anjiotensin konverting enzim inhibitörü olan kaptopril, 13 hipertansif hastaya ortalama 9 haftalık bir süre boyunca günde iki kez uygulanmıştır. Ayakta tedavi edilen hastalarda sürekli kan basıncı kontrollü bir şekilde ölçülmüştür. Bununla beraber, düzenli böbrek fonksiyonuna sahip olan sekiz hastada kaptoprilin sabah verilen dozu alınmadan önce plazma konverting enzim aktivitesinin normal düzeyde olduğu görülmüştür. Sadece böbrek yetmezliği olan beş hastada 12 saatten daha fazla bir süre boyunca plazma anjiotensin konverting enzimin bloke olduğu görülmüştür. Ölçülen plazma anjiotensin konverting enzim aktivitesi pulmoner vasküler yatakta dönüşüm ve anjiotensin 1 dönüşümünü göstermektedir. Plazma anjiotensin konverting enzim aktivitesinin plazma aldosteron seviyelerindeki değişiklikler ile paralel olduğu belirlenmiştir. Kaptoprilin alınması ile birlikte plazma epinefrin veya norepinefrin düzeylerinde herhangi bir değişiklik olmadığı görülmüştür. Anjiotensin konverting enzimin normal aktivitesi karşısında kan basıncındaki düşme, kaptoprilin spesifik renine bağlı (kaynaklı) etkisi ya da spesifik olmayan etkilerinden olduğu düşünülmektedir. Çünkü bu etkinin uyarılmış hormonların atardamarlarda cevapsız bir ruhsal duruma yol açtığı gözlemlenmiştir (Waeber ve ark., 1980).

Yapılan bir başka çalışmada, oral yoldan alınan anjiotensin konverting enzimin aktif bir inhibitörü olan kaptopril'in (SQ 14.225), primer hipertansiyon üzerine olan etkileri araştırılmıştır. 32 hastaya dört hafta boyunca kaptopril verilmiş ve böylece 26/16 mm Hg supin (sırt üstü yatma) ve 30/16 mm Hg ayakta iken kan basıncı ölçülmüş ve ortalama kan basıncında (BP) azalma olduğu görülmüştür. Ayrıca bu süreçte ciddi

bir yan etkinin gözlenmediği belirtilmiştir. Kan basıncının (BP) düşürücü etkisinin, tedavi öncesi plazma renin aktivitesi ile ilişkili olduğu ve düşük renin hipertansiyonunda daha az olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$ 'ten az). Kaptoprilin idrar kallikrein ekskresyonunun yanı sıra anjiotensin II (0.05'ten az), plazma ($p=0.005$ 'ten az) ve idrar aldosteronu ($p<0.001$ 'in altında) azalttığı görülmüştür ($p=0.005$ 'ten az). Kaptoprilin, özellikle renin-anjiotensin-aldosteron sistemi (RAAS) aktive edildiğinde, hipertansiyonu düşüren güçlü bir antihipertansif etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (Ohman ve ark., 1981).

Alkalaz enzimin etkileşimiyle hazırlanan soya proteinindeki ACE inhibitör peptidlerinin spontan hipertansif ratlar (SHR) üzerindeki hipotansif etkisi test edilmiştir. Bir ACE inhibitörü olan kaptopril hipertansiyon tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Kaptopril uygulanan grup, ACE inhibitör peptidleri uygulanan grup ve kontrol grubu karşılaştırılmıştır. Soya ACE inhibitör peptidleri üç farklı doz seviyelerinde (100, 500, ve 1000 mg/vücut ağırlığı/gün kg) oral olarak alındığında spontan hipertansif ratların (SHR) sistolik kan basıncında anlamlı bir azalma olduğu gözlemlenmesine rağmen ($p<0.05$), en yüksek dozlarda bile normotansif ratların kan basıncında çok az bir değişiklik meydana geldiği görülmüştür. Bir ay süren beslenmeden sonra spontan hipertansif ratların (SHR) ölçülen kan basıncı değeri en düşük dozda başlangıç seviyesinden 38 mm Hg kadar düştüğü gözlemlenmiştir. Ayrıca soya ACE inhibitör peptidleri uygulanan gruplarda sabit ve devamlı hipotansif etkinin mevcut olduğu görülmüştür. Kaptopril her ne kadar güçlü bir hipotansif etkiye sahip olsa da açık bir dalgalanma ancak üçüncü haftada gözlemlenmiştir. Soya ACE inhibitör peptidleri uygulanan kontrol grubunda serum, aort, akciğer ve serum lipit içeriğinin ACE aktivitesinde büyük bir farklılık görülmemiş, kaptopril grubunda ise serum ACE aktivitesi artmış, aort ACE aktivitesi de önemli ölçüde azalmıştır ($p<0.05$). Peptid uygulanan grup ve kaptopril uygulanan grup kontrol grubu ile karşılaştırıldığında her iki grupta serum Na^+ konsantrasyonunda önemli ölçüde düşüş gözlenirken, serum Ca^{2+} ve serum K^+ konsantrasyonlarında herhangi bir düşüş gözlenmemiştir. Bu sonuçlar soya proteininden elde edilen ACE inhibitör peptitlerinin, hipotansif etkiye ve kısmen de tuz/su dengesi üzerinde bir etkiye sahip olabileceği göstermiştir (Wu ve Ding, 2001).

Lisinoprilin antihipertansif etkinliği ve güvenliği, on iki haftalık bir çalışmada ortalama yaşı 75 olan 60 hastada değerlendirilmiştir. On iki haftalık tedaviden sonra bu

hastalarda oturma sırasında kan basıncının, 190/106±3.3 / 1.8 mm Hg'den 162/89±3.2 / 1.6 mm Hg'ye düştüğü görülmüştür (p <0.001). Aynı zamanda kalp hızında da anlamlı bir değişiklik olmadığı ve postural hipertansiyonunda oluşmadığı gözlemlenmiştir. Başlangıçta ortalama glomerüler filtrasyon oranı 61.6±3.4 mL/dakika iken 12 haftalık tedaviden sonra değişmediği ve 62.2±3.0 mL/dakika olduğu belirtilmiştir. On dört hastaya ise bir yıl süreyle lisinopril vermeye devam edilmiştir. Bu süre boyunca kan basıncının kontrol altında kaldığı ve kalp hızında değişmeden kaldığı belirlenmiştir. Ayrıca bu süre içinde ortalama arteriyel basınçta 128.8±1.9 mm Hg ile 105.1±1.5 mm Hg arasında anlamlı bir azalma olduğu görülmüştür (p<0.001). Lisinopril ile uzun süreli tedaviyi takiben renal kan akımında belirgin bir artış olduğu (p<0.025) ve renovasküler dirençte ise (p<0.001) bir azalma olduğu gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, lisinopril genellikle iyi tolere edilmiştir ve yaşlı hipertansif hastalarda kan basıncını düşürmede oldukça etkili olduğu görülmüş aynı zamanda böbrek fonksiyonunu da olumsuz yönde etkilemediği belirtilmiştir (Laher ve ark., 1988).

Siklosporin A kaynaklı hipertansiyonda, sodyum ve hacim retansiyonunun meydana gelebildiği belirtilmiştir. Bu yüzden altı hafta boyunca lisinoprilin (günde birkez 10-20 mg) ve nitrendipinin (günde iki kez 10-20 mg) ofis (bir sağlık merkezinde ölçülen) kan basıncı ve 24 saatlik ambulatuvar (ayakta) kan basıncı üzerine antihipertansif etkileri incelenmiştir. Aynı zamanda kalp kalp transplantasyonu sonrası bu ilaçların sol ventrikül fonksiyonu üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Nitrendipin ve lisinoprilin, ofis ve ambulatuvar sistolik ve diyastolik kan basınçlarını düşürmede eşit derecede etkili olduğu görülmüştür. Ayrıca sodyum atılımının lisinopril ile tedavi sırasında belirgin bir şekilde arttığı, ancak nitrendipin sırasında sadece hafif bir artış gösterdiği gözlemlenmiştir. Böylece anjiotensin konverting enzim inhibisyonunun siklosporin A ile ilişkili hipertansiyonu önleyebileceği ve kalp transplantasyonda alıcılarının sodyum tutma durumunu iyileştirebileceği görülmüştür (Hartmann ve ark., 1993).

Yapılan başka bir çalışma, lisinoprilin, yan etkilere neden olmadan istenmeyen reaksiyonları indükleyen diğer antihipertansif ilaçların yerini alma yeteneğini incelemiştir. Bu çalışmada 88 hastaya diüretikler, beta-blokerler, metildopa, klonidin, vazodilatörler ve kalsiyum antagonistleri dahil olmak üzere ilaç kombinasyonlarını verilmiştir. Daha sonra kan basıncı başlangıç seviyesine eşit yada daha düşük olana

kadar günde en fazla 40 mg'a kadar olmak şartıyla ilk doz olarak 10 mg lisinopril verilmiştir. Kan basıncı iki haftada bir ölçülmüş ve yaşam kalitesi, tedaviye başlamadan önce ve tedavi süresince değerlendirilmiştir. Lisinopril tedavisinin kan basıncında önemli bir düşüşe neden olduğu görülmüştür. Ortalama sistolik kan basıncının tedaviden önce 167 ± 19 mm Hg iken tedaviden sonra 147 ± 14 mm Hg'ya düştüğü belirlenmiştir. Aynı zamanda diyastolik kan basıncında ortalama 101 ± 6 mm Hg'dan 89 ± 8 mm Hg 'ya düştüğü gözlemlenmiştir. Ortalama kalp hızının da lisinopril tedavisinden önce ve sonra değişmeden kaldığı görülmüştür. Ayrıca hiçbir hastada ilaç toleransı gelişmediği ve ortostaza (ayağa kalkınca ani basınç düşmesi) veya taşikardi (aritmi) gözlenmediği belirtilmiştir. Lisinopril tedavisinden sonra önemli bir yan etki oluşmadığı görülmüştür. Aynı zamanda daha önceki tedaviler sırasında oluşan bacak ödemi, kızarma, uyku bozuklukları, ağız kuruluğu, baş ağrısı ve iktidarsızlık gibi yan etkilerin lisinopril tedavisinden sonra oluşma sıklığının azaldığı gözlemlenmiştir. Bu çalışma neticesinde lisinoprilin yaşam kalitesini artırabilecek kadar güvenli ve etkili bir ilaç olduğu belirtilmiştir (Rosenthal ve ark., 1995).

Kardiyoselektif bir β -adrenerjik bloke edici ajan olan atenolol, farklı derecelerde şiddetli hipertansiyona sahip 20 hastaya 8-12 hafta boyunca tek hipotansif ilaç olarak verilmiştir. Hastaların başlangıçtaki sistolik kan basıncı 162-238 mm Hg (ortalama \pm SEM 196 ± 5.5 mm Hg) ve diyastolik kan basıncı 105-145 mm Hg (118 ± 2.5 mm Hg) arasında olduğu belirlenmiştir. Hastaların üçünde hızlanmış hipertansiyon, altı hastada efor dispnesi (eforla birlikte ortaya çıkan nefes darlığı) ve kardiyomegali (kalp büyümesi) görülmüş ve ayrıca hastaların üçünün diyabetik olduğu belirtilmiştir. Atenolol, günde bir kez 100-300 mg dozlarında hastalara verilmiş ve bu hastaların hem sırt üstü hem de ayakta kan basıncını kontrol edilmiştir. Atenolol ile yapılan tedavi sonrası 17 hastanın kan basınçlarında 20/10 mm Hg'den daha fazla kan basıncının düştüğü gözlemlenmiştir (İbrahim ve Mossallam, 1981).

Atenololun klinik olarak en çok kullanılan beta blokerlerden biri olduğu ve sıklıkla hipertansiyonun randomize kontrollü çalışmalarında referans ilaç olarak kullanıldığı belirtilmiştir. Bu çalışmada atenololün primer hipertansif hastalarda kardiyovasküler morbidite ve mortalite üzerindeki etkisini sistematik olarak değerlendirilmiştir. Atenolol ile plasebo grubunun kıyaslanması ve ayrıca diğer antihipertansif ilaçların atenolol ile kıyaslanması yapılmıştır. Atenolol ve plasebo

grupları arasında kan basıncını düşürmede önemli farklılıkların olmadığı görülmüştür. Ayrıca atenololün diğer antihipertansiflerle karşılaştırıldığında da tedavi kolları arasında kan basıncında düşme önemli bir farklılık göstermediği görülmüştür. Bununla birlikte, inme riski, atenololda plasebo grubuna göre daha düşük olma eğiliminde olduğu gözlemlenmiştir. Ortalama 4-6 yıl boyunca 6825 hastada kardiyovasküler mortalite veya miyokardiyal enfarktüs takip edilmiştir. Kardiyovasküler mortalite, atenolol tedavisi ile diğer antihipertansif tedavi karşılaştırıldığında atenolol ile tedavi edilen grupta daha yüksek olma eğiliminde olduğu belirlenmiştir (Carlberg ve ark., 2004).

Hafif esansiyel hipertansiyonu olan 450 hastada, tek başına propranolol (P), propranolol artı hidroklorotiyazid (P+T), propranolol artı hidralazin (P+H), propranolol artı hidroklorotiyazid artı hidralazin (P +T+H) ve reserpine artı hidroklorotiazitin (R+T) etkileri karşılaştırılmıştır. Hipertansiyona olan bu hastalara altı aylık bir tedavi uygulanmıştır. Bu hastaların başlangıçtaki diyastolik kan basınçları (BP) 90 mm Hg olarak dikkate alınmıştır. Altı aylık bir tedaviden sonra P +T+H verilen hastaların % 92'sinde, R+T verilen hastaların % 88'inde, P+T verilen hastaların % 81'inde, P+H verilen hastaların % 72'sinde ve sadece P verilen hastaların % 52'sinde kan basınçlarının anlamlı bir derecede düştüğü gözlemlenmiştir. Ayrıca yapılan bu çalışmada P+T ve P + T+H ilaçları verilen hastaların kan basıncındaki düşüşün P ve P+H ilaçları verilen hastalarinkine göre daha etkili olduğu belirlenmiştir (VACSG, 1967).

İnme eğilimli spontan hipertansif ratlarda (SHRSP) beyin arteriollerini üzerine anjiyotensin konverting enzim inhibitörü olan perindopril ve bir β -blokeri olan propranololün etkisi araştırılmıştır. Tedavi edilmemiş ya da 3 ay boyunca günde 2 mg/kg ve 0.3 mg/kg perindopril, 250 mg/kg propranolol tek başına veya perindoprilin düşük dozdaki kombinasyonu ile tedavi uygulanmış Wistar-Kyoto ratları (WKY) ve Spontan hipertansif ratlarının (SHRSP) beyin arteriollerinin yapısı ve mekanigi incelenmiştir. Maksimum bir şekilde genişletilmiş (EDTA ile) beyin arteriollerindeki damar duvarlarının enine kesit alanı, dış çapı ve basıncı ölçülmüştür. Spontan hipertansif ratlara perindopril'in yüksek dozu ya da propranolol kombinasyonu ve perindoprilin düşük dozlu tedavisi uygulanmıştır. Beyin damarlarındaki normalleştirilmiş ortalama basınç değerleri ise Wistar-Kyoto ratlarında 50 ± 1 mm Hg'ye karşı 50 ± 1 ve 43 ± 2 mm Hg ve tedavi edilmemiş spontan hipertansif ratlarda ise 94 ± 3 mm Hg olarak ölçülmüştür ($P<0.05$). Nabız basıncı Wistar-Kyoto ratlarında 13 ± 1 mm

Hg'ye karşı $15\pm 1,16\pm 1$ mm Hg ve tedavi edilmemiş spontan hipertansif ratlarda 35 ± 1 mm Hg olarak ölçülmüştür ($P<0.05$). Ayrıca damar duvarlarının enine kesit alanı (CSA) Wistar-Kyoto ratlarında $1057\pm 49 \mu\text{m}^2$ 'ye karşı $1103\pm 53 \mu\text{m}^2$ iken tedavi edilmemiş spontan hipertansif ratlarda $1281\pm 62 \mu\text{m}^2$ 'ye karşı $1099\pm 51 \mu\text{m}^2$ olarak ölçülmüştür ($P<0.05$). Buna karşılık, spontan hipertansif ratlarda perindopril veya propranolol düşük dozları ile uygulanan tedavi tek başına arterioller nabız basıncını (24 ± 1 ve 21 ± 1 mm Hg) normal değere getirememiştir ve damar duvarlarının enine kesit alanındaki (CSA) artışı da (1282 ± 77 ve $1267\pm 94 \mu\text{m}^2$) önleyemediği görülmüştür. Perindopril, propranolol ve perindopril kombinasyonu ile yapılan tedavi belirgin bir şekilde spontan hipertansif ratların (SHRSP) beyin damarlarının dış çapını arttırdığı (99 ± 3 , 103 ± 2) ve tedavi edilmemiş spontan hipertansif ratlarda ise $87\pm 2 \mu\text{m}^2$ ye karşı $98\pm 3 \mu\text{m}^2$ artış olduğu görülmüştür ($P<0.05$). Ancak propranolol tek başına beyin damarlarının dış çapını arttırmadığı görülmüştür (94 ± 3 mm; $P>0.05$). Bu bulgular spontan hipertansif ratların (SHRSP) beyin damarında hipertrofi (hacimsel olarak aşırı büyüme) üzerine anjiotensin konverting enzim inhibitörlerinin etkisi, özellikle nabız basıncı ve damar basıncı etkisine bağlı olmasına rağmen beyin damarlarındaki dış çapın azalması ile oluşan yeniden yapılanmanın basınçtan bağımsız olabileceği görülmüştür (Chillon ve Baumbach, 1999).

Yapılan bir çalışmada, günde bir kez alınan 50 mg triamteren dozu, 25 mg hidroklorotiyazid, 5 mg amilorid ve 50 mg hidroklorotiyazid etkileri randomize olarak karşılaştırılmıştır. Hafif ile orta şiddette hipertansiyonu sahip olan ve diyastolik kan basınçları 90-115 mm Hg olan 84 erişkin hasta üzerinde çalışılmıştır. Üç haftalık plasebo giriş süresinden sonra, altı haftalık tedavi periyodu ile birlikte toplam dokuz hafta tedavi uygulanmıştır. Triamteren-hidroklorotiyazid ve amilorid-hidroklorotiyazid ilaçları uygulanan hastalarda, bu ilaçların tedavinin son haftalarında antihipertansif etkileri karşılaştırılmıştır. Bu iki ilaç kombinasyonu kullanan hastalarda ortalama supin sistolik ve diyastolik kan basınçları önemli ölçüde azaldığı görülmüştür. Triamteren-hidroklorotiyazid alan 41 hastanın 24'ünde kan basıncı % 59 oranında düşerken, amilorid-hidroklorotiyazid alan 43 hastanın 29'unda ise kan basıncı % 67 oranında düştüğü gözlemlenmiştir (Maxwell ve ark., 1985).

Triamteren, hipertansiyon tedavisinde sıklıkla tiyazid diüretiklerle birlikte kullanılan potasyum tutucu bir diüretiktir. Triamteren kortikal toplama kanalındaki

epitelyal sodyum kanalını (ENaC) inhibe ederek, potasyum sekresyonunu azalttığı ve böylece hipokalemi (kandaki potasyum düşüklüğü) riskini düşürdüğü belirlenmiştir. Triamterenin kan basıncı (BP) üzerine bir etkisi olup olmadığı hakkında fazla çalışma olmadığı belirlenmiştir. Bu yüzden, hidroklorotiyazid (HCTZ) ile tedavi edilen hipertansiyonlu hastalarda ek olarak triamteren kullanımının kan basıncının (BP) düşürülmesine etki sağlayıp sağlamadığını belirlemek için bu çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaya 2004-2012 yılları arasında hipertansiyon tanısı konmuş 17.291 hastanın katıldığı belirtilmiştir. Hipertansiyon tanısı konmuş hastalara triamteren+ hidroklorotiyazid (HCTZ) karışımı ve tek başına hidroklorotiyazid (HCTZ) ilaçları verilmiş ve bu hastaların kan basınçları değerlendirilmiştir. Triamteren+ hidroklorotiyazid (HCTZ) karışımı verilen hastaların kan basıncındaki düşüş tek başına HCTZ verilen hastalara göre 3.8 mm Hg daha düşük olduğu gözlemlenmiştir ($p<0.0001$). Bu çalışma neticesinde triamterenin, hidroklorotiyazid (HCTZ)'nin kan basıncını düşürmeye olan etkisini arttırdığı bulunmuştur. Aynı zamanda triamterenin potasyum tutucu etkisine ek olarak, hipertansiyon tedavisinde kan basıncını düşürmede etkili olduğu belirlenmiştir (Tu ve ark., 2015).

Esansiyel hipertansiyona sahip ortalama yaşı 50 olan yirmi altı hasta tek başına veya başka ilaçlarla kombinasyon halinde, günde 4 kez 2.5 mg indapamid ile tedavi edilmiştir. Tedaviden önce hastaların ortalama kan basınçlarının 208/128 mm Hg olduğu belirtilmiştir. Esansiyel hipertansiyona sahip altı hastaya tek başına hidroklorotiyazid, onbir hastaya rezerpin, veya dokuz hastaya metildopa, hidralazin, propranolol, metoprolol veya guanethidin ile en az 6 aylık bir tedavi uygulandığı belirtilmiştir. Tedavi sırasında indapamid hidroklorotiazidin yerini almak için reçete edilmiş ve antihipertansif ilaçları alan hastalar aynen tedaviye devam ettiği görülmüştür. Sırt üstü ölçülen ortalama kan basıncı, dört haftalık tedavi sırasında 148/93 mm Hg'den hidroklorotiyazid ile 143/92 mm Hg'ye düşerken indapamid ile 135/86 mmHg'ye düştüğü görülmüştür. Böylece indapamidin, hidroklorotiyazide göre kan basıncını düşürmede daha etkili olduğu gözlemlenmiştir. Çalışma sonucunda esansiyel hipertansiyona sahip hastalar indapamid ile tedavi sırasında kendilerini çok daha iyi hissettiklerini söyledikleri belirtilmiştir (Lemieux ve Homme, 1983).

Distal renal tübüller üzerinde etkili olduğu düşünülen bir metilindolin diüretik olan indapamidin, vasküler düz kas vazopresör reaktivitesini düşürdüğü ve muhtemelen

bir kalsiyum-antagonist etkiye sahip olabileceği belirtilmiştir. Bir takım avrupalı araştırmacının 1973'ten beri, hipertansiyona sahip 301 hastanın indapamid ile tedavi edilmesine yönelik on altı çalışma gerçekleştirdikleri belirlenmiştir. Yapılan bu çalışmalarda hafif hipertansiyona sahip hastaların yaklaşık % 53'ünde, orta derecede hipertansiyona sahip olan hastaların ise yaklaşık % 43'ünde diastolik kan basıncında tatmin edici bir düşüş olduğu görülmüştür (90 mm'den düşük Hg). İndapamidin hipertansiyon tedavisinde geleneksel diüretik ajanlarla karşılaştıran klinik çalışmalarda yapılmıştır. Yapılan kırk haftalık bir çalışmada, hafif ve orta şiddette sahip hipertansiyon hastalığının tedavisinde günlük 50 mg olan hidroklorotiyazid ile günlük 2.5 mg ve 5 mg'lık indapamidin antihipertansif etkileri karşılaştırılmıştır. Tedavi öncesi hastaların diastolik kan basınçlarının ortalama 101 mm Hg olduğu belirtilmiştir. Tedavi süresinde günlük olarak 2.5 mg indapamid uygulanan hastalarda diastolik basınç kan basıncında 15 mm Hg'lik bir düşüş, günlük 5 mg indapamid uygulanan hastalarda 16 mm Hg'lik bir düşüş olduğu görülmüştür. Aynı zamanda 50 mg hidroklorotiyazid uygulanan hastaların diastolik basınç kan basıncında ise 15 mm Hg düşüş olduğu gözlemlenmiştir. Hipertansiyona sahip hastalarda, günlük 2.5 mg indapamid alan hastaların kan basınçlarında yaklaşık % 75, 5 mg indapamid alan hastaların kan basıncında ise yaklaşık % 88 azalma olduğu görülmüştür. Çalışma sonucunda indapamid, hafif veya orta dereceli hipertansiyonun tedavi edilmesinde iyi bir toleransa sahip olan antihipertansif bir ajan, güçlü bir vazodilatör ve kalsiyum-antagonist özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir (Morledge, 1983).

Oligo-anurik hemodiyaliz hastalarında spironolaktonun kan basıncı ve renin-anjiyotensin-aldosteron sistemine etkisini değerlendirmek için randomize, çift kör, plasebo kontrollü, çapraz bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Sekiz hemodiyaliz hastasına 2 hafta boyunca günde iki kez 50 mg spironolakton ve plasebo oral olarak uygulanmıştır. Daha sonra 3 haftalık bir arınma periyodu uygulanmış ve hastalar 2 hafta daha tedavi görmüştür. Spironolaktonun 2 hafta süreyle uygulanması, hastaların prediyaliz sistolik kan basıncını 142.0 ± 19.6 'dan 131.4 ± 18.2 mm Hg'ye düşürdüğü gözlemlenmiştir ($P < 0.05$). Spironolakton plasebo ile karşılaştırıldığında, iki haftalık tedavi sonrasında prediyaliz ve postdiyaliz plazma potasyum veya aldosteron konsantrasyonları üzerinde hiçbir etkisinin olmadığı görülmüştür. Aynı zamanda renin aktivitesi üzerine de hiçbir etki göstermemiştir. Yapılan çalışma sonucunda, spironolaktonun prediyaliz sistolik kan

basıncını düşürdüğü aynı zamanda oligo-anurik hemodiyaliz hastalarında hiperkalemiye neden olmadığı belirlenmiştir (Gross ve ark., 2005).

Spirolaktonun 1960'lardan beri yüksek tansiyonu tedavi etmek için kullanılan bir ilaç olduğu belirtilmiştir. Bu çalışma, spironolaktonun kan basıncını düşürüp düşürmediğini, spironolaktonun olumsuz etki profilini ve hipertansiyon için kullanımının klinik etkisini araştırmak için yapılmıştır. Araştırmada, hem spironolakton, hem de plasebo rastgele bir sırayla alınan toplam 137 hasta ile 5 çapraz deneme yapılmıştır. Ayrıca diğer bir denemede 42 hastaya ve bu hastaların 22'sine spironolakton verilirken 20'sine de plasebo verilmiştir. Bu çalışmalarda günlük olarak kullanılan spironolakton dozları günlük 25-500 mg arasında değiştiği belirtilmiştir. Çalışmalardaki bu hastalara 4 ile 8 haftalık bir tedavi uygulandığı belirtilmiştir. Spirolaktonun klinik etkisi incelendiğinde, çalışmaların hiçbirinde spironolaktonun kalp krizlerine ve felçlere neden olduğu hakkında olumsuz bir rapor görülmemiştir. Ayrıca yapılan meta-analizler sonucunda da spironolaktonun sistolik ve diyastolik kan basıncını plaseboya kıyasla yaklaşık 20/7 mm Hg azalttığı görülmüştür. Böylece hipertansiyon hastalarında spironolakton kullanımının etkili olabileceği belirtilmiştir (Batterink ve ark., 2010).

Flavan-3-ols ve prosiyanidinlerin anjiotensin I konverting enzim (ACE) aktivitesi üzerinde bir inhibitör etkisine sahip olduğu görülmüştür. Bu inhibitör etkisinin prosiyanidin oluşturan epikaçin birimlerinin sayısına bağlı olduğu belirlenmiştir. Flavan-3-ols ve prosiyanidinlerin inhibisyonunun, N-hippuril-L-histidil-L-lösin(HHL) ve N-[3-(2-furil)akrilolil]-L-fenilalanilglisilglisin (FAPGG) substratları kullanılarak yarışmalı olduğu görülmüştür. Aynı zamanda tetramer ve heksamer fraksiyonların güçlü bir inhibitör özelliğine sahip olduğu belirlenirken bu fraksiyonların K_i değerlerinin ise sırasıyla 5.6 ve 4.7 μ M olduğu belirlenmiştir. Anjiotensin konverting enzim (ACE) bir membran proteini olup flavanollerin ve prosiyanidinlerin ACE ile etkileşiminin, membran yüzeyinde absorblanma kapasitesini belirleyen prosiyanidinler üzerindeki hidroksil gruplarının sayısı ile ilişkili olabileceğini göstermiştir (Actis-Goretta ve ark., 2003).

Fermente istiridye sosun'dan (FOS) anjiotensin konverting enzim (ACE) inhibitörü, SP-Sephadex C-25 iyon değişimi kromatografisi, Sephadex G-50 jel kromatografisi, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılarak

saflaştırılmıştır. İstiridye 6 ay boyunca 20 °C sıcaklıkta ağırlıkça % 25 NaCl (w/w) ile fermente edilmiştir. Fermente istiridye sosu (FOS) 40 gözenekli bir elekten geçirildikten sonra, elektrodiyalizler kullanılarak tuzu giderilmiş ve liyofilize edilmiştir. Daha sonra fermente istiridye sosun'dan saflaştırılan inhibitörün IC₅₀ değerinin 0.0874 mg/mL olduğu hesaplanmıştır. Ayrıca saflaştırılan inhibitörün, anjiotensin konverting enzim (ACE) aktivitesi üzerine yarışmalı inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir. Saflaştırılan inhibitör oral yoldan spontan hipertansif ratlara (SHRs) uygulanarak antihipertansif etkisi değerlendirilmiştir. İnhibitör enjeksiyonundan sonra ratların kan basıncının önemli ölçüde azaldığı görülmüştür (Je ve ark., 2005).

Yapılan başka bir çalışmada, keçi sütünden yapılan ticari bir kefirde güçlü bir anjiotensin konverting enzim (ACE) inhibitör aktivitesi olduğu belirlenmiştir. Fermantasyon sırasında kazeinlerden salınan düşük molekül kütleli peptidlerin esas olarak bu aktiviteden sorumlu olduğu görülmüştür. Aynı zamanda HPLC-tandem kütle spektrometresi ile on altı peptid tanımlanmıştır. Tanımlanan bu peptidlerden ikisi PYVRYL ve LVYPFTGPIPn peptidleri güçlü bir ACE inhibitör özelliği göstermiştir. Aynı zamanda kefir peptidlerinin ACE inhibitör aktivitesi üzerine gastrointestinal sindirimin etkisi değerlendirilmiştir. Bu peptidlerden bazıları, Corolase PP ile hidrolizini takip eden pepsin inkübasyonuna karşı direnç gösterdiği belirtilmiştir (Quirós ve ark., 2005).

Yapılan bir çalışmada brokoli (*Brassica oleracea Italica*) ekstraktlarından anjiotensin konverting enzim (ACE) inhibitörü saflaştırılmış ve yapısı tanımlanmıştır. Brokoli ekstraktları % 50 aseton, etil asetat, n-bütanol ve su kullanılarak hazırlanmıştır. Daha sonra suda çözünen brokoli ekstraktının % 76.9 ACE inhibitör aktivitesine sahip olduğu görülürken, diğer organik solvent ekstraktlarının ise ACE inhibitör aktivitelerinin düşük olduğu gözlemlenmiştir. ACE inhibitör peptidi, Amberlite XAD-4, Sephadex LH-20 ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemleri kullanılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırılan ACE inhibitör peptidinin bir tripeptit (Tyr-Pro-Lys) olduğu belirlenmiş ve IC₅₀ değerinin 0.5 µg protein/mL olduğu hesaplanmıştır (Lee ve ark., 2006).

Anjiotensin konverting enzim (ACE) inhibitör peptidi, iyon değiştirme kromatografisi, jel filtrasyon kromatografisi ve ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemleri kullanılarak karabuğdaydan (*Fagopyrum esculentum*

Moench) saflaştırılmış ve tanımlanmıştır. Karabuğday proteini ekstresi, 30 dakika boyunca suda (pH 9.0) karıştırılarak hazırlanmıştır. Ardından 20 dakika 15,000 rpm'de santrifüjleme işlemi yapılmıştır. Protein ekstresi daha sonra bir YM-10 membranı kullanılarak filtrelenmiştir. Daha sonra saflaştırılan ACE inhibitör peptidinin IC₅₀ değeri protein sekanslama sistemi ve elektrosprey-LC-kütle spektrometrisi ile 6.25 µg protein/ml olarak hesaplanmıştır. Ayrıca saflaştırılan ACE inhibitör peptidinin bir tripeptid (Gly-Pro-Pro) olduğu belirlenmiştir (Ma ve ark., 2006).

Proteinler, özellikle deniz kökenli proteinler, doğal ilaçlar ve gıda katkı maddelerinin potansiyel kaynaklarıdır. Yapılan bu çalışmada ACE inhibitör peptidleri köpek balığı eti hidrolizatından ultrafiltrasyon, jel filtrasyonu ve RP-HPLC yöntemleri kullanılarak saflaştırılmış ve tanımlanmıştır. Saflaştırılan peptidlerinin yüksek ACE inhibitör aktivitesine sahip olan 4 yeni peptid olduğu belirlenmiştir. İkincil İyon Kütle Spektrometresi ile belirlenen peptid dizileri Cys-Phe, Glu-Tyr, Met-Phe ve Phe-Glu olarak tanımlanmıştır. Bu peptid dizilerinin üçü (Cys-Phe, Glu-Tyr ve Phe-Glu) yeni ACE inhibitör peptitleri olarak kabul edilmiştir. Tanımlanan ACE inhibitör peptidelerinin IC₅₀ değerleri sırasıyla 1.96, 2.68 ve 1.45 µM olarak hesaplanmıştır. Hipertansiyon tedavisinde veya klinik beslenmede bu peptidlerin iyi bir potansiyele sahip olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Wu ve ark., 2008).



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Mezbananede yeni kesilmiş sığır akciğeri laboratuara getirilerek akciğerin değişik bölgelerinden 100 g kadar kesilerek alındı. Bu alınan kısım bir bistüri yardımıyla küçük kübik parçalara ayrıldı. Parçalanmış akciğere 500 mL lik hacimde 3.0285 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 önendi. Elde edilen homojenat daha ileri bir parçalanma için ultrasonik homojenizatörde 10-15 dakika homojenizasyon işlemi uygulandı.

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmalarımızda kullanılan NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow, HapesNa (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, trihidroksimetilaminometan (Tris), β-merkapt etanol, lisinopril, MWGF 1000 jel filtrasyon markır (mavi dekstran, albümin, alkol dehidrogenaz, β-amilaz, karbonik anhidraz, Apoferritin, Tiroglobulin), 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 markır LC5688 Himark 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

pH metre: Inolab WTW series pH 720

Elektroforez tankı: P8DS Vertical Electrophoresis System (dikey)

Güç kaynağı: Thermo scientific

Peristaltik pompa: Eyela Micro Tube Pump MP-3

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

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

Jel filtrasyon kromatografisi kolonu: 2.25 cm x 55 cm cam kolon

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 sirkülasyon 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 çözeltiye 100 mL % 95'lik ortofosforik asitten yavaşça eklendi. Hazırlanan çözeltinin 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 µM ZnCl₂ pH 7.5: 3.254 g HepesNa, 4.38 g NaCl ve 0.00034 g ZnCl₂ alınarak 200 mL bidistile 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 µL metanol içinde çözüldü ve hacmi bidistile su ile 25 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.3. Kolon dolgu maddesi için kullanılan çözeltiler

1.) 1mM HCl: 0.041 mL HCl alınarak bir 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 mL bidistile 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-asetat ve 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 / 0.3 M 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 / 0.3 M 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 Na₂B₄O₇.10H₂O (Sodyum borat) pH'sı 9.0 (Afinite jeline tutunmuş olan anjiyotensin 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 ve 0.025 g Coomassie brillant blue R-250 reaktifinin çözümlenerek hacim bidistile su ile 100 mL'ye tamamlandı

9.) I. Jel yıkama çözeltisi: 50 mL metanol, 10 mL asetik asit ve 40 mL bidistile su karıştırılarak elde edildi

10.) II. Jel yıkama çözeltisi: 5 mL metanol, 7 mL asetik asit ve 88 mL bidistile su karıştırılarak elde edildi

11.) Su ile doyurulmuş n-bütanol: 10 mL n-bütanol ve 1 mL bidistile su karıştırıldı.

12.) % 0.1'lik brom timol mavisi çözeltisi: 0.01 g indikatör, 1 mL bidistile su içerisinde çözüldü ve toplam hacim bidistile su ile 10 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.6. Jel filtrasyon kromatografisinde kullanılan çözeltiler

- 1.) 50 mM Tris / 100 mM KCl pH=7.5 (Kolonunun paketlenmesi ve dengelenmesi için kullanılan tampon): 6.057 g Tris ve 7.455 g KCl alınarak 950 mL bidistile suda çözüldü. pH'sı 8.0'e ayarlandıktan sonra toplam hacim bidistile su ile 1L'ye tamamlandı.
- 2.) % 5 Gliserin çözeltisi: 500 µL gliserin 2mL 50 mM Tris / 100 mM KCl tamponunda çözüldü ve toplam hacim 10 mL'ye 50 mM Tris / 100 mM KCl tamponu ile tamamlandı.
- 3.) Mavi dekstran çözeltisi (boşluk hacminin belirlenmesi için): 4 mg mavi (blue) dekstran (2 mg/mL) 2 mL % 5 gliserin içeren dengeleme tamponunda çözüldü.
- 4.) Standart protein çözeltileri: Albumin 20 mg (10 mg/mL), Alkol dehidrogenaz 10 mg (5 mg/mL), β-Amilaz 8 mg (4 mg/mL) Karbonik anhidraz 6 mg (3 mg/mL) Apoferritin 20 mg (10 mg/mL), Tiroglobulin 16 mg (8 mg/mL) tartılarak her bir protein 2 mL % 5 gliserin içeren dengeleme tamponunda çözüldü.

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 absorbanans göstermesi esasına dayanılarak kalitatif protein tayini yapılmaktadır (Carlberg ve Mannervik, 1981). Sığır akciğerinden elde edilen enzim numunelerinde kalitatif protein tayini bu yöntemle göre belirlendi. Fraksiyonlar kuvars küvetlere alınarak absorbanansları 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 absorbanans 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. Proteine boyanın bağlanması çok hızlı gelişmektedir (ortalama 2 dk.). 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

Önceden aktive edilmiş kolon dolgu maddesine biyospesifik ligandları bağlayarak afinite kromatografisinin kullanımı ve hazırlanması başarılı ve iyi belgelenmiş teknikle yaygın şekilde kullanılmaktadır. NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow mevcut kimyasallarla birleştirme 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 sağlar ve özellikle küçük protein ve peptid bağları 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- hidrokisisüksinimid 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-aktif 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/5 mM Lisinopril) eklendi. Birleştirme normal olarak oda sıcaklığında çok hızlı gerçekleşir. Bu yüzden ligandın biyolojik aktivitesini sürdürmesi için birleştirme zamanını optimize etmek çok önemlidir. Reaksiyon 4 °C'de gerçekleştirildi ve bir gece 4 °C'de bekletildi. Birleştirme tamamlandıktan sonra kolon dolgu maddesi üzerindeki herhangi tepki vermeyen grupların (non-reacted) engellenmesi 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) değiştirilerek yıkandı. 0.1 M Tris-HCl tamponu (pH 8.5) ve 0.1 M asetat tamponu (pH 4.5) kullanıldı ve bu dönüşüm 3-6 kez tekrarlandı. Bu işlemlerden sonra NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow üzerine dengeleme tamponu (20 mM Tris/0.3 M NaCl, pH=8.0) eklenerek jel süspansiyonu edildi. Süspansiyonu edilmiş jel 2.25 cm x 55 cm kapalı sistemden oluşan soğutmalı 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. Sığır akciğeri anjiotensin konverting enziminin saflaştırılması

3.2.3.1. Sığır akciğeri eldesi

Mezbananede yeni kesilmiş taze sığır akciğeri laboratuara getirildi. Akiğerin değişik bölgelerinden 100 g kadar kesilerek alındı. Bu alınan kısım bir bistüri yardımıyla küçük kübik parçalara ayrıldı. Parçalanmış akciğer 500 ml lik hacimde 3.0285 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 önlendi. 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 8000 devirde +4 C'de santrifüj edildi. Bu işlem birkaç kez yapıldı. Santrifüjden sonra tüpün üst kısmındaki sıvı alınarak saflaştırma işleminde kullanılmak üzere derin dondurucuda saklandı.

3.2.3.2. Sığır akciğerinin afinite kolonuna uygulanması ve enzim elüsyonu

2.25 cm x 55 cm boyutlarındaki afinite kolonuna NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow kolon dolgu maddesi Tris tamponu ile yüklendi. Sığır akciğeri Tris tamponu ile dengelenmiş olan NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow afinite kolonuna peristaltik pompa kullanılarak uygulandı. Akciğer 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. Bu yıkama, spektrofotometrede takip edilerek kolona giren ve kolondan çıkan tamponun absorbans değerleri eşit oluncaya kadar devam edildi. Kolon yıkandıktan sonra elüsyon tamponu (50 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, pH=9.0) ile elüe edildi. Bu yöntem Pantalano metodundan modifiye edilmiştir (Pantalano, 1984; Sabeur ve ark., 2001).

Sığır akciğerinden 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 kabine 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 yığma jeli hazırlandı. Hazırlanan yığma 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). Yığma jelinin katılması beklenirken ıslatılmış süzgeç kâğıdı sistemin üzerine kapatıldı ve jelin üst kısmının çok kuruması engellendi. Yığma jelinin katılaştığı 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 4.5).

Ayırma jeli: 5 mL 1.5 M 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 mL bidistile 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 için ayırma 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. Sığır akciğeri ACE'in alt birimlerinin SDS-PAGE ile molekül ağırlıklarının belirlenmesi

Sığır akciğeri 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 molekül kütle 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 kit LC5688 Himark Thermo Fisher 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 $R_f = \text{enzimin yürüme mesafesi/boyanın yürüme mesafesi}$ formülünden hesaplanarak $R_f = \log M_A$ standart grafiği oluşturuldu. Bu grafikten ve grafiğin denkleminde yararlanarak R_f değeri hesaplanan sığır akciğeri anjiyotensin konverteng enzimin molekül ağırlığı hesaplandı (Şekil 4.6) (Laemmli, 1970).

3.2.6. Sığır akciğeri ACE'in jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığının belirlenmesi

Jel filtrasyon kromatografisi proteinlerin boyutu ve molekül ağırlığını belirlemek için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde protein çözeltisi kolona verilirken büyük proteinler porlara giremez ama küçük proteinlerden daha hızlı kolondan çıkarak akarlar. Bu protein molekülleri molekül ağırlığı büyükten küçüğe doğru azalarak kolondan elüe edilir. Bilinmeyen proteinlerin molekül ağırlığının belirlenmesi, molekül ağırlığı bilinen protein standartlarının V_e/V_o değeri ile bilinmeyen proteinin V_e/V_o oranı kıyaslanarak bulunur (V_e elüsyon hacmi ve V_o boşluk hacmidir) verilen kolonun V_o değeri mavi dekstran gibi büyük bir molekülün (molekül ağırlığı ~2000 kDa) elüsyonu için istenen akış (artık) hacmine dayanır. Protein standartlarının bilinen molekül ağırlıklarının işaretli logaritmaları onların kendi V_e/V_o değerlerine karşı bir lineer kalibrasyon eğimi üretir (Whitaker, 1963; Andrews, 1965).

V_e/V_o aslında kolon büyüklüğü ve protein konsantrasyonundan bağımsızdır ama bazı proteinler için sıcaklığı bağlı olabilir. Eğer protein jel ile kompleks oluşturuyorsa, büyük miktarda karbohidrat içeriyorsa, büyük kompleksler agregat oluşturuyorsa veya kullanılan koşullar altında alt birimlere ayrışıyorsa güvenilir olmayan molekül ağırlıkları elde edilebilir. Saf olmayan bir proteinin moleküler ağırlığı eğer protein için spesifik bir tanıma (algılama) metodu mevcut ise jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak belirlenebilir (Whitaker, 1963; Andrews, 1965).

Jel filtrasyon kromatografisi ile ACE'nin molekül ağırlığının belirlenmesi için 15 g Sephadex G-100 (40 mL yatak hacmi elde etmek için) 250 mL saf su içine alındı. Bir gece oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletilerek polimer materyal (Sephadex G-100) şişirildi. Daha sonra şişirilmiş materyalin içindeki hava, su trompu ile vakumlanarak uzaklaştırıldı. Polimer materyal pH 7,5 100 mM KCl içeren 50 mM Tris-HCl tamponuyla dolu 2.25 cm x 55 cm boyutlarındaki 219 mL hacimli kolona verildi ve kolonun içinde hava kabarcığı kalmasını engelleyecek şekilde paketlenerek aynı tamponla dengeleme işlemi yapıldı. Kolonun dengelendiğini belirlemek için, üstten eklenen tamponla alttan alınan tamponun 280 nm'de absorptans değerleri belirli aralıklarla ölçüldü ve bu absorptans değerleri aynı oluncaya kadar dengeleme işlemi sürdürüldü. Kolonun akış hızı 3 mL/h olarak ayarlandı ve kolona mavi dekstran çözeltisi verilerek boşluk hacmi belirlendi. Sığır akciğeri anjiyotensin konvertan enzimün molekül ağırlığının belirlenmesinde kullanılacak olan standart grafiği elde etmek için önce kolona standart proteinler verildi. Standart olarak, mavi (blue) dekstran (2 mg/mL); 2 000 kDa ve standart protein çözeltileri; Albumin 66 kDa (10 mg/mL), Alkol dehidrogenaz 150 kDa (5 mg/mL), β -Amilaz 200 kDa (4 mg/mL), Karbonik anhidraz 29 kDa (3 mg/mL), Apoferritin 443 kDa (2 mg/mL), Tiroglobulin 669 kDa (8 mg/mL) ayrı ayrı kolona uygulandı (Whitaker, 1963; Andrews, 1965).

Boşluk hacmini belirlenmesi için 2 mg/mL konsantrasyonda % 5 gliserol içeren dengeleme tamponunda (50 mM Tris/100 mM KCl, pH=7.5) mavi dekstran (blue dextran) kolona verildi. Mavi dekstran konsantrasyonu pik fraksiyonu yaklaşık ~1 olacak şekilde 280 nm'de absorptans alındı ve boşluk hacmi (V_0) belirlendi. Elüsyon hacmi için dengelenen kolonun, jel üzerindeki tampon çözeltisi jel seviyesine indirildi. Kolona her bir protein çözeltisinden 2 mL uygulandı. Kolona uygulanan protein çözeltisi jel tarafından tamamen absorplandıktan sonra üzerine birkaç mL elüsyon tamponu (pH'sı 7,5 100 mM KCl içeren 50 mM Tris-HCl) eklenerek tekrar jelle yedirildi. Daha sonra kolonun üstüne elüsyon tamponu eklenerek, elüatlar 1'er mL olacak şekilde tüplere alındı. Kör olarak elüsyon tamponu kullanıldı ve toplanan elüatların 280 nm'de absorptansları ölçüldü. Daha sonra bu absorptans değerleri kaydedildi. 280 nm'deki absorptans değerleri 0 oluncaya kadar elüsyon işlemine devam edildi. ACE elüe edilirken alınan tüplerin spektrofotometrede 345 nm'de aktiviteleri ölçüldü. 280 nm'de kalitatif ölçüm için alınan absorptans değerleri tüp sayısına karşı

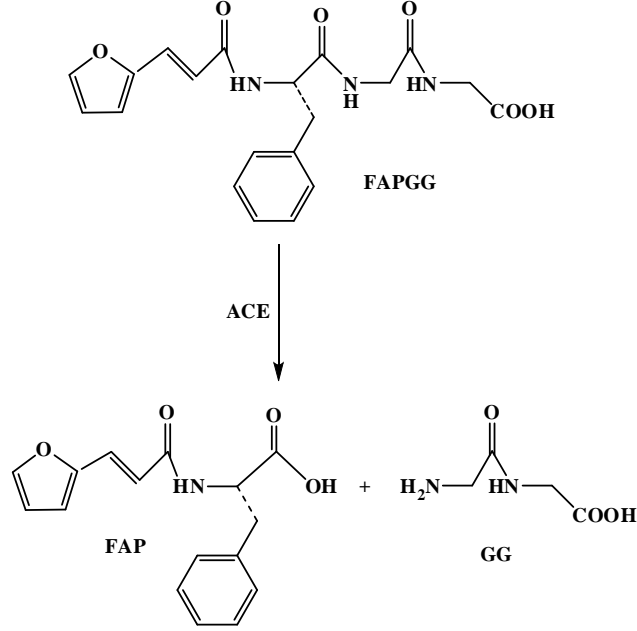
grafiğe geçirildi. Daha sonra ACE'in moleköl ağırlığını belirlemek amacı ile her bir protein için ayrı ayrı K_{av} değerleri ve $\text{Log } M_A$ değerleri hesaplandı. $\text{Log } M_A$ - K_{av} grafiği çizildi. Sığır akciğeri anjiotensin konverting enziminin K_{av} değeri belirlenerek grafik denkleminde enzimin doğal halinin moleköl ağırlığı hesaplandı. Aşağıdaki formöl kullanılarak K_{av} değeri hesaplandı. Bu değerler ve moleköl ağırlığı bilinen standart proteinlerin $\text{Log } M_A$ değeri ile $\text{Log } M_A$ - K_{av} grafiği çizildi ve bu grafikten ACE'in moleköl ağırlığı hesaplandı (Whitaker, 1963; Andrews, 1965; Keha ve Küfrevioğlu, 2012) (Şekil 4.7).

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o} \quad (3.1)$$

V_o = Boşluk (void) hacmi, V_e = elüsyon, V_t = kolon yatak hacmi

3.2.7. Enzim aktivitesinin ölçümü

Aktivite ölçümü için; kontrol (kör) ve numunu olmak üzere iki tüp alındı ve tüplerin her birine 100 μL uygun saf enzim eklendi. Daha sonra kontrol tüpüne 900 μL HEPES tamponu eklendi ve karıştırıldı. Spektrofotometre kontrol küveti ile sıfırlandı. Numune tüpüne ise 700 μL 50 mM (pH 7.5) HEPES tamponu ve 200 μL 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 Holmqvist metodundan modifiye edilmiştir (Holmqvist ve ark., 1979; Andújar Sánchez ve ark., 2003).

Enzim ünitesi hesaplamalarında aşağıdaki formül kullanıldı.

$$A = \frac{\Delta\text{OD}}{0.517} \times \frac{V_c}{V_e} \times f \quad (3.2)$$

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 mM⁻¹ cm⁻¹: Ekstinksiyon katsayısı

3.2.8. Etken Madde Çözeltilerinin Hazırlanması

Çalışmamızda kaptopril, lisinopril, fosinopril, atenolol, propranolol, triamteren, indapamid, spironolakton etken maddeleri kullanıldı.

Kaptopril; 0.5 mikrogram kaptopril bileşiği tartılarak alındı, bir miktar saf suda çözüldükten sonra saf su ile hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

Lisinopril; 10.5 mikrogram lisinopril bileşiği tartılarak alındı daha sonra bir miktar saf suda çözüldükten sonra saf suyla hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

Fosinopril; 21 miligram fosinopril bileşiği tartılarak alındı ve bir miktar saf suda çözüldükten sonra saf su ile hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

Triamteren; 3 mg triamteren bileşiği tartılarak alındı daha sonra bir miktar saf suda çözüldükten sonra hacmi saf su ile hacmi 5 mL'ye tamamlandı.

Atenolol; 5 mg atenolol bileşiği tartılarak alındı ve bir miktar saf suda çözüldükten sonra hacmi saf su ile hacmi 3 mL'ye tamamlandı.

Propranolol; 5 mg propranolol bileşiği tartılarak alındı ve bir miktar saf suda çözüldükten sonra hacmi saf su ile hacmi 3 mL'ye tamamlandı.

İndapamid; 25 mg indapamid bileşiği önceli olarak bir miktar saf su içerisinde çözdürülmeye çalışıldı ancak indapamid suda çözünmedi daha sonra 1 mL metanolde çözdükten sonra üzerine saf su koyunca çökme gerçekleşti.

Spironolakton; 5 mg spironolakton bileşiği tartılarak alındı daha sonra 3 mL saf su, 1 mL metanol içinde çözdürülmeye çalışıldı ancak spironolakton saf suda ve metanolde çözünmedi.

3.2.9. ACE ile yapılan kinetik çalışmalar

3.2.9.1. Sığır akciğeri ACE aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Sığır akciğerinden saflaştırılan ACE'in optimum sıcaklığı, sabit sıcaklık sirkülasyon banyosu kullanılarak belirlendi. Aktivite ölçümü için kullanılacak olan HEPES tamponu, ACE ve FAPGG substratı küvet içerisine eklendi, bir vorteks yardımı ile karıştırıldı ve spektrofotometrede ilk absorbans alındı. Daha sonra numune sıcaklığı ayarlanan sabit sıcaklık sirkülasyon banyosuna bırakıldı. Otuz dakika sonunda tekrar

sabit sıcaklık sirkülasyon banyosundan çıkarılıp spektrofotometrede son absorbans okundu. 20-55 °C arasında 5'er °C aralıklarla aktivite ölçümleri yapıldı.

3.2.9.2. Sığır akciğeri ACE aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

Sığır akciğerinden saflaştırılan ACE'in optimum pH'sını belirlemek için pH'sı 5.8, 6.0, 6.2, 6.4, 6.6 olan sodyum fosfat (NaH_2PO_4) tamponları ve 6.8, 7.0, 7.2, 7.4, 7.6, 7.8, 8.0, 8.2 olan HEPES tamponları hazırlandı. Bu pH'daki tamponlar kullanılarak tek tek ACE aktiviteleri ölçüldü. Aktivite ölçümü için aynı yöntem uygulandı. Aktivite ölçümü 0.2 birim aralıkta olmak üzere 5.8-8.2 pH değerleri arasında gerçekleştirildi. 5.8-8.2 pH değerleri arasında 0.2 birim aralıklarla ölçüm yapıldı.

3.2.10. Sığır akciğeri ACE aktivitesi üzerine etken maddelerin etkilerinin belirlenmesi

Sığır akciğerinden saflaştırılan anjiotensin konverting enzim aktivitesi üzerine etken maddelerin etkilerini belirlemek için önce etken maddelerin stok çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözeltisi ölçümde kullanılarak en uygun konsantrasyon aralığı belirlendi. Konsantrasyon aralığını belirlemek için stok çözelti bir ya da birkaç kez seyreltilerek enzim aktivitesi ölçüldü. Enzim aktivitesi ölçümü normal prosedür uygulanarak yapıldı. Ancak ölçüm küvetine konulacak etken maddeler küvetin toplam hacmini (1 mL) aşmayacak şekilde tampon miktarından aynı hacim düşülerek eklendi. Bütün kinetik çalışmalarda bu işlem uygulandı.

Sığır akciğerinden saflaştırılan ACE aktivitesi üzerine etken maddelerin etkilerini belirlemek için lisinopril, kaptopril, fosinopril, atenolol, propranolol, triamteren, indapamid, spironolakton etken maddeleri çalışıldı. Bu etken maddelerden elde edilen sonuçlar çizelge 4.4-4.7 ile Şekil 4.8-4.15'te gösterildi.

Çizelge 3.2. Sığır akciğeri ACE'inin etken madde içeren aktivite ölçüm küvet içeriği

	<u>Kontrol Küveti</u>	<u>Numune Küveti</u>
50 mM HEPESNa / 0.3 M NaCl / 10 μ M ZnCl ₂	900 μ L	700 μ L
1 mM FAPGG	-	200 μ L
Sığır akciğeri	100 μ L	100 μ L
Etken madde	Değişken	Değişken
	35 °C'de 30 dakika inkübasyon	

3.2.11. Sığır akciğeri ACE aktivitesi üzerine etkisi incelenen etken maddelerin K_i değerleri, inhibisyon türü ve IC_{50} değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar

Etken maddelerin değişik konsantrasyonlarda küvet içeriğine eklenerek ACE aktiviteleri ölçüldü. Bu aktivitelerden % Aktivite – [I] değeri ile grafikler çizildi. Elde edilen grafik denklemlerinden IC_{50} değerleri hesaplandı.

Etken maddelerin inhibisyon türünü belirlemek için sığır akciğerinden saflaştırılan ACE aktivitesini yarıya düşüren etken madde konsantrasyonu ile bu değer altında ve üstünde 3 sabit etken madde 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 4.8'da verildi.

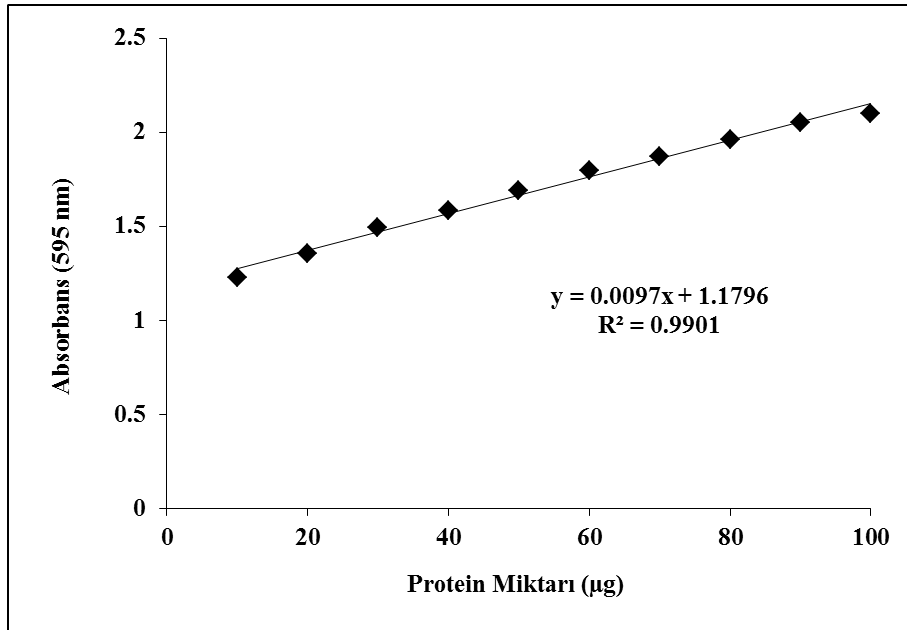


4. BULGULAR

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/mL 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. Sığır Akciğeri Anjiotensin Konverting Enziminin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması Sonuçları

Yapılan çalışmada sığır akciğeri afinite kromatografisi ile saflaştırılan anjiotensin konverting enzim numuneleri için elde edilen sonuçlar şekil 4.2'de verilmiştir.

4.2.1. Sığır akciğeri anjiotensin konverting enzimi için saflaştırma sonuçları

Akciğer homojenatı için mL'deki enzim ünitesi 48.36 EU/mL, mL'deki protein miktarı da 11.965 mg protein/mL olarak bulundu.

Akciğer homojenatı için spesifik aktivite aşağıda gösterildiği gibi hesaplandı.

$$\frac{\text{EU / mL}}{\text{mg protein / mL}} = \frac{48.36}{11.965} = 4.041 \quad (4.1)$$

Sığır akciğerinden saflaştırılan enzim çözeltisinin de Bradford yöntemi ile kantitatif protein tayini yapıldı. Ayrıca enzimin aktivitesi tayin edilerek enzim ünitesi EU/mL cinsinden hesaplandı. Anjiotensin konverting enzimin enzim ünitesi hem homojenatta hem de saflaştırma sonucunda elde edilen elüsyonlarda belirlendi. Sığır akciğerinden saflaştırılan enzim çözeltisi için mL'deki enzim ünitesi 73.50 EU/mL, mL'deki protein miktarı da 0.0104 mg/mL olarak hesaplandı.

Saflaştırılan akciğer anjiotensin konverting için spesifik aktivite aşağıdaki gibi bulunmuştur.

$$\frac{\text{EU / mL}}{\text{mg protein / mL}} = \frac{73.50}{0.0104} = 7067 \quad (4.2)$$

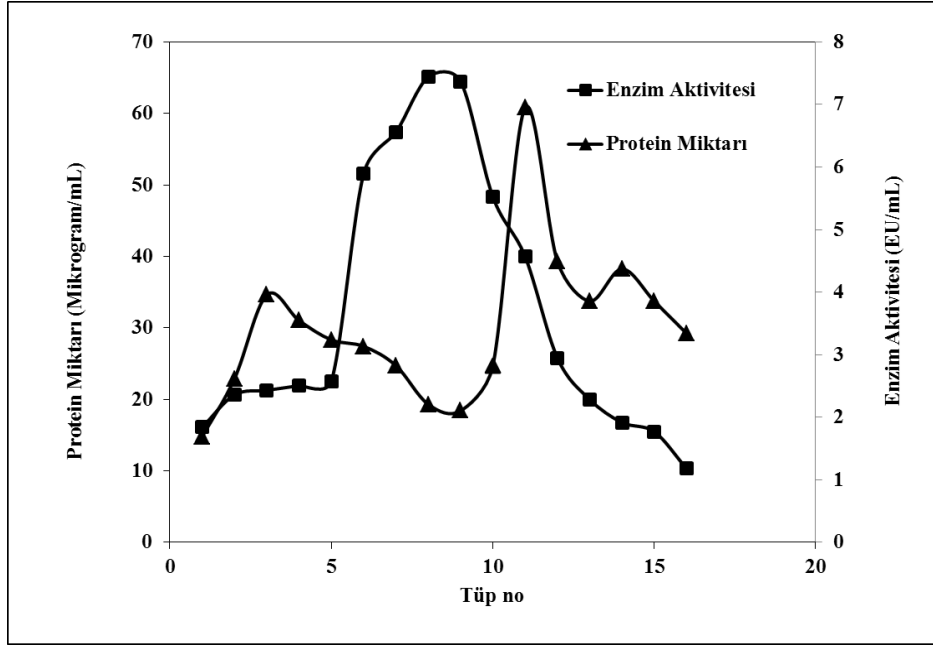
Saflaştırma oranı ise;

$$\frac{\text{Spesifik Aktivite1}}{\text{Spesifik Aktivite2}} = \frac{7067}{4.041} = 1748 \quad (4.3)$$

olarak hesaplandı.

Bu değere göre homojenatın doğrudan afinite kolonuna uygulanması sonucunda enzim homojenattan 1748 kat saflaştırıldı.

Saflaştırılan fraksiyonlardaki protein miktarı 595 nm'de verilen standart eğrinin regrasyon denkleminden her bir fraksiyon için µg/mL protein miktarları belirlendi. Grafikten de anlaşılacağı üzere yaklaşık 7-12 nolu fraksiyonların hem yüksek protein miktarı ve hemde yüksek enzim aktivitesi gösterdiği görülmektedir. (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Afinite kolonundan alınan sığır akciğeri fraksiyonlarının kalitatif protein tayinleri ve aktivite değerleri.

Çizelge 4.1. Sığır akciğeri ACE'in saflaştırma basamakları

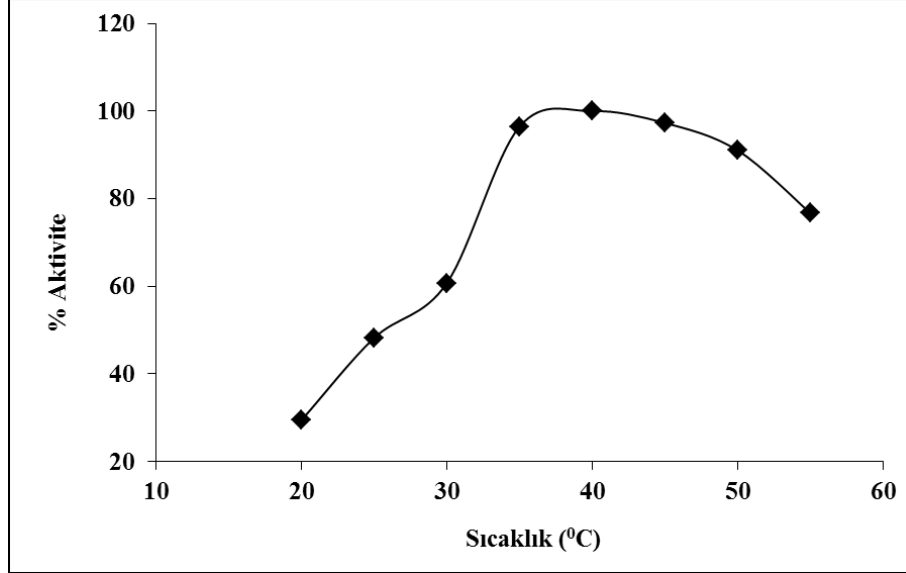
Saflaştırma Basamakları	Aktivite(EU/mL)	Toplam Hacim (mL)	Protein (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (EU)	Spesifik Aktivite (EU/mg)	Verim (%)	Saflaştırma Katsayısı
Sığır akciğeri	48.36	100	11.965	1196.5	4836	4.041	100	1.0
NHS-Activated Sepharose 4 Fast Flow Kromatografisi	73.50	40	0.0104	0.416	2940	7067	40	1748

4.3. Sığır Akciğeri ACE'in Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi Sonuçları

Sığır akciğeri ACE' inin optimum sıcaklığını belirlemek üzere optimum pH'ya sahip tampon çözelti kullanıldı. 20 °C ile 55 °C arasında her 5 °C'de bir olmak üzere bölüm 3.2.9.1'de anlatıldığı gibi aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen değerler çizelge 4.2 ve şekil 4.3'te gösterildi.

Çizelge 4.2. Sığır akciğeri ACE'in sıcaklık, aktivite ve % aktivite değerleri

(°C)	20	25	30	35	40	45	50	55
EU	21.27	34.81	43.84	69.63	72.21	70.27	65.76	55.45
%Akt.	29.45	48.20	60.71	96.42	100	97.31	91.06	76.79



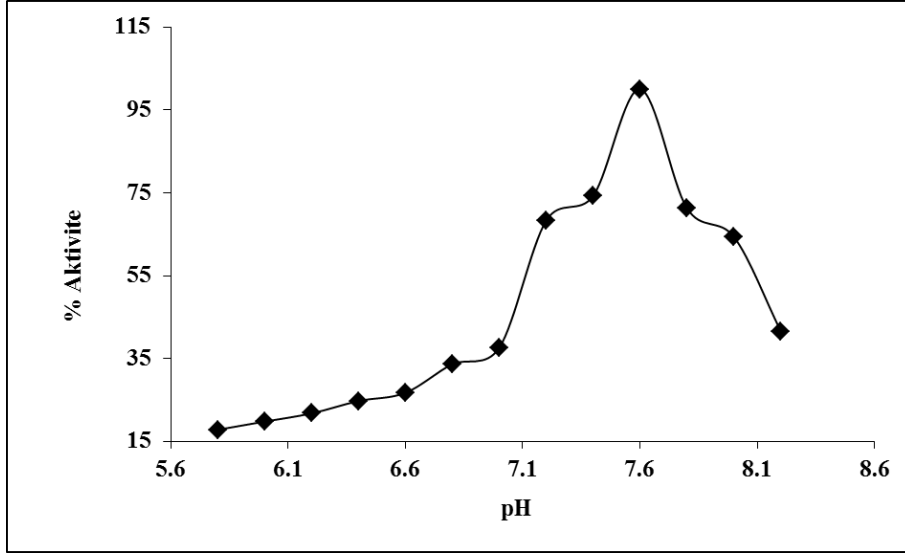
Şekil 4.3. Sığır akciğeri ACE'in Sıcaklık - % Aktivite grafiği.

4.4. Sığır Akciğeri ACE'in Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi Sonuçları

Sığır akciğeri ACE' in optimum pH'sını belirlemek için bölüm 3.2.9.2'de anlatıldığı gibi pH değeri 5.8 ile 8.2 arasında değişen tamponda ölçüm yapıldı. Bu amaçla tamponun pH'sı her seferinde 0.2 birim değiştirilerek 5.8 - 8.2 değerleri arasında 13 farklı pH'da aktivite ölçümleri yapılarak elde edilen değerler çizelge 4.3 ve şekil 4.4'de gösterildi.

Çizelge 4.3. Sığır akciğeri ACE'in pH, aktivite ve % aktivite değerleri

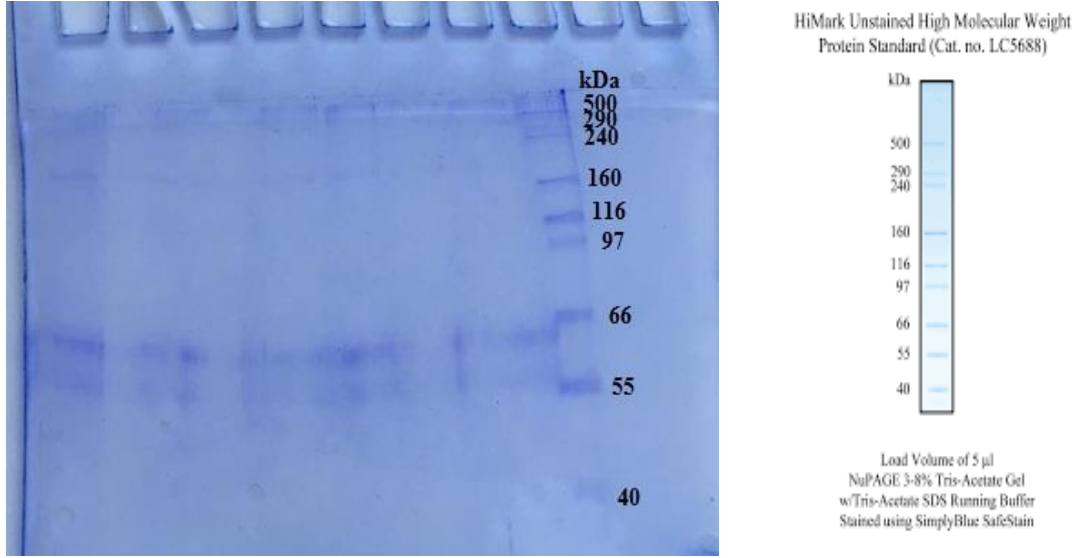
pH	5.8	6.0	6.2	6.4	6.6	6.8	7.0	7.2	7.4	7.6	7.8	8.0	8.2
EU	11.60	12.89	14.18	16.12	17.41	21.92	24.50	44.49	48.36	65.12	46.42	41.91	27.08
%Akt.	17.81	19.79	21.77	24.75	26.73	33.66	37.62	68.32	74.26	100	71.28	64.36	41.58



Şekil 4.4. Sığır akciğeri ACE'in pH - % Aktivite grafiği.

4.5. Sığır Akciğeri ACE'in SDS-PAGE ile Saflığının Kontrolü

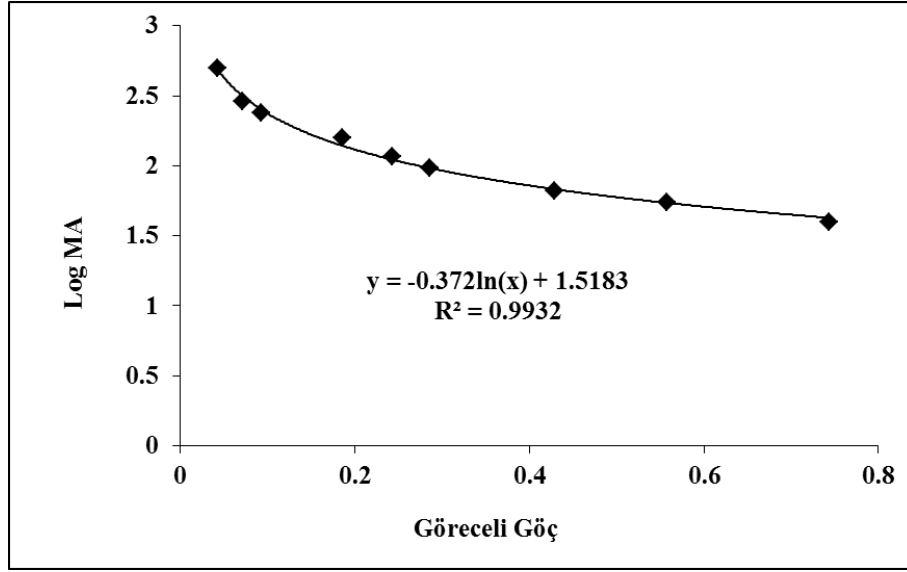
Sığır akciğerinden afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzimin (ACE) saflığını kontrol etmek ve molekül ağırlığını belirlemek için SDS-PAGE yöntemi kullanıldı. Bu amaçla % 4-10 kesikli dikey SDS-PAGE elektroforez sistemi uygulanarak birkaç kuyucuğa saf enzim, en uçtaki iki kuyucuğada protein markırı doldurularak proteinler yürütüldü. Elektroforez jeli üzerinde elde edilen bantları gösteren fotoğraf şekil 4.5'te gösterilmektedir.



Şekil 4.5. Sığır akciğerinden saflaştırılan ACE'in SDS-PAGE bantları.

4.6. Sığır Akciğeri ACE'in Alt Birimlerinin SDS-PAGE ile Molekül Ağırlığının Belirlenmesine Ait Sonuçlar

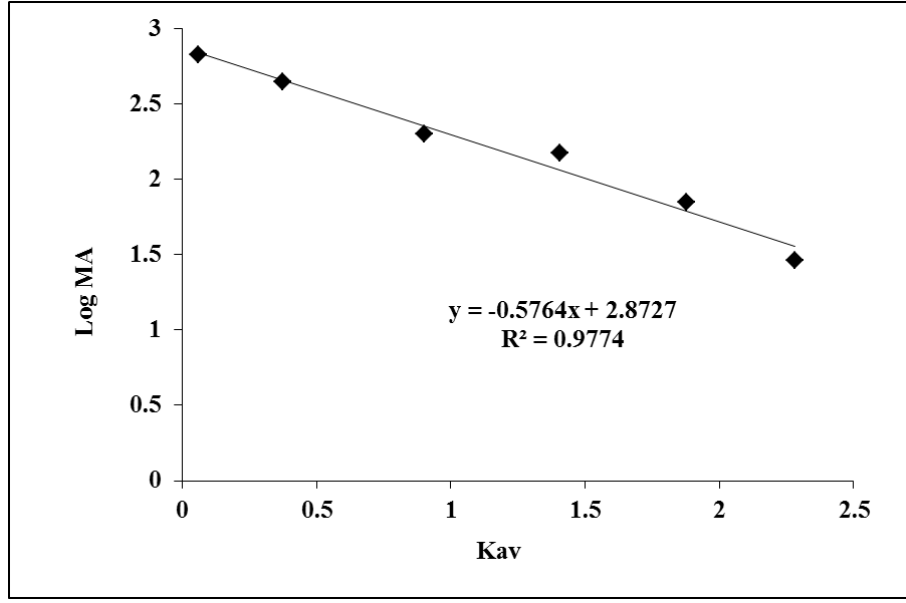
Sığır akciğeri ACE'in alt birimlerinin molekül ağırlıklarının belirlenmesi bölüm 3.2.4'te anlatıldığı gibi yapıldı. Enzim numuneleri SDS-PAGE'de yürütüldü. Elde edilen bantların fotoğrafları çekildi. Yürütülen standartların ve enzimlerin R_f değerleri ölçülüp hesaplanarak Göreceli Göç (R_f) – $\log M_A$ standart grafiği çizildi. İnsan plazması anjiyotensin konverting enzimin alt birimlerinden birinin molekül ağırlığı 57 kDa, 66 kDa ve diğerinin 190 kDa olarak belirlendi.



Şekil 4.6. Sığır akciğeri anjiotensin konverting enziminin SDS-PAGE ile alt birimlerinin molekül ağırlıklarının belirlenmesinde kullanılan standart grafik.

4.7. Sığır Akciğeri ACE'in Jel Filtrasyon Kromatografisi ile Molekül Ağırlığının Belirlenmesine Ait Sonuçlar

Sığır akciğeri ACE'in molekül ağırlığının belirlenmesi bölüm 3.2.6'da anlatıldığı gibi yapıldı. Bu yöntemde önce molekül ağırlığı bilinen proteinler kolondan geçirildi. Daha sonra saflaştırılan ACE kolona verildi. Yürütülen standartların değerleri ölçülüp hesaplanarak K_{av} -log M_A standart grafiği çizildi. Elde edilen değerler şekil 4.7'de gösterildi. Sığır akciğeri anjiotensin konverting enzimin molekül ağırlığı grafik denkleminden 303 kDa olarak belirlendi.



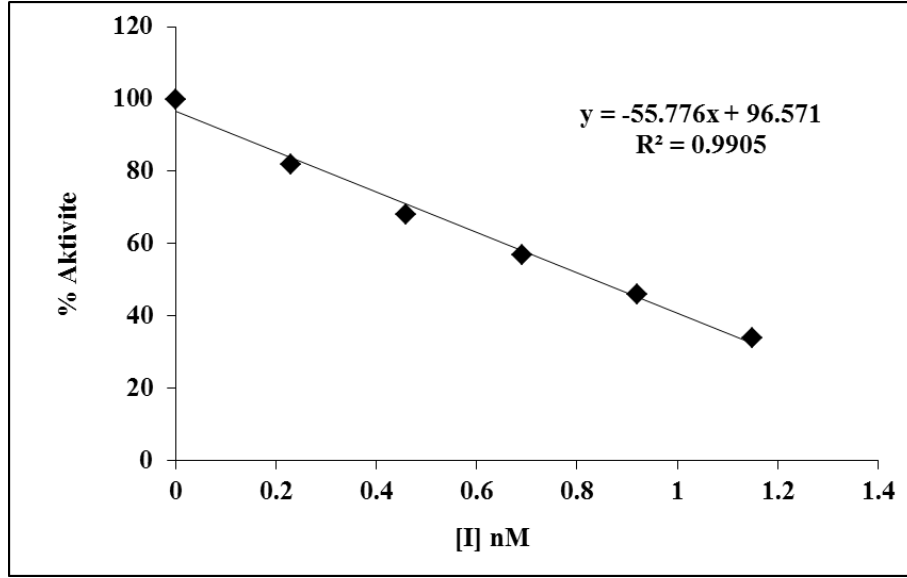
Şekil 4.7. Sığır akciğeri ACE'in jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığının belirlenmesinde kullanılan standart grafik.

4.8. Sığır Akciğeri ACE Aktivitesi Üzerine Etken Maddelerin Etkilerinin Belirlenmesine Ait Çalışma Sonuçları

Sığır akciğerinden saflaştırılan ACE aktivitesi üzerine etken maddelerin etkilerini belirlemek için lisinopril, kaptopril, fosinopril, atenolol, propranolol, triamteren, indapamid, spironolakton etken maddeleri çalışıldı. Bu etken maddelerden elde edilen sonuçlar çizelge 4.4-4.7 ile şekil 4.8-4.15'te gösterildi.

Çizelge 4.4. Sığır akciğerindeki ACE'in kaptopril konsantrasyonu ile değişen aktivite ve % aktivite değerleri

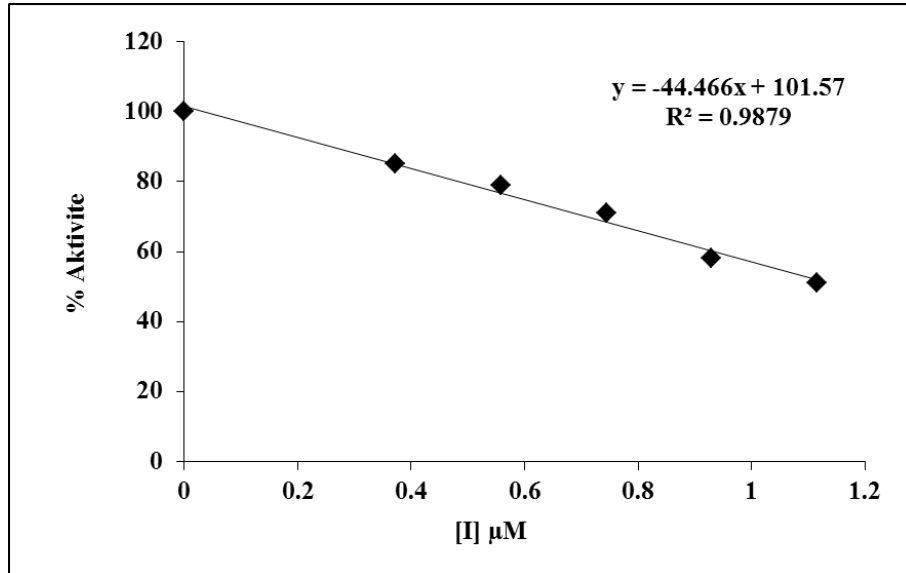
I(nM)	0	0.23	0.46	0.69	0.92	1.15
EU	64.47	52.86	43.84	36.75	29.66	21.92
%Akt.	100	82	68	57	46	34



Şekil 4.8. Sığır akciğerindeki ACE üzerine kaptopril bileşiğinin etkisi.

Çizelge 4.5. Sığır akciğerindeki ACE'in fosinopril konsantrasyonuyla değişen aktivite ve % aktivite değerleri

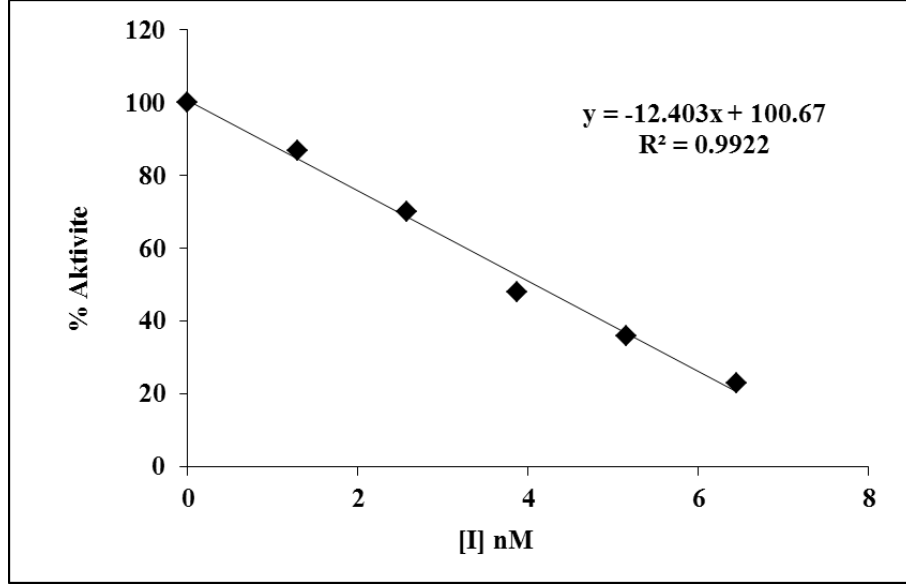
I(µM)	0	0.372	0.558	0.744	0.93	1.116
EU	64.47	54.80	50.93	45.78	37.40	32.88
%Akt.	100	85	79	71	58.01	51



Şekil 4.9. Sığır akciğerindeki ACE üzerine fosinopril bileşiğinin etkisi

Çizelge 4.6. Sığır akciğerindeki ACE'in lisinopril konsantrasyonuyla değişen aktivite ve % aktivite değerleri

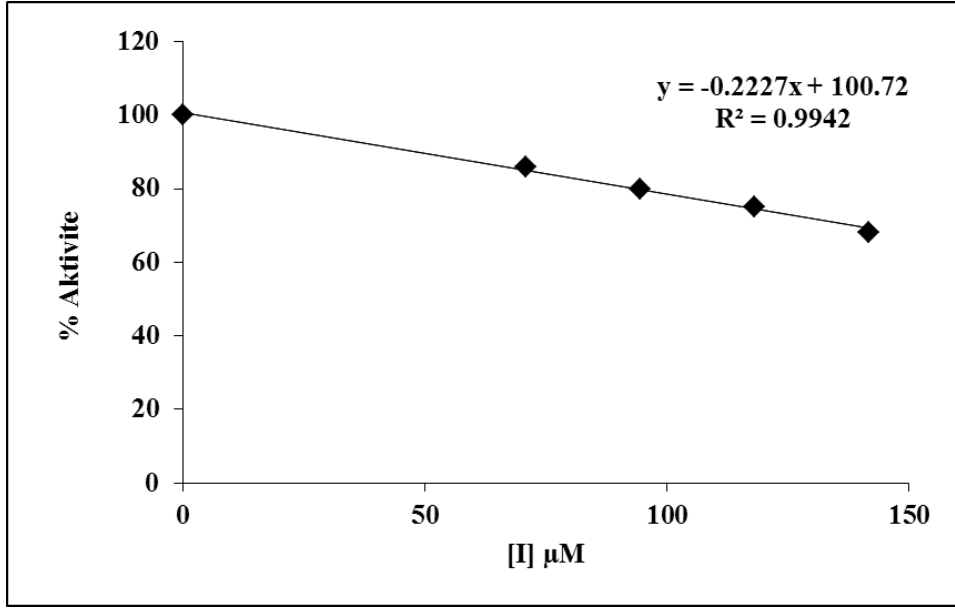
I(nM)	0	1.29	2.58	3.87	5.16	6.45
EU	64.47	56.09	45.13	30.95	23.21	14.83
%Akt.	100	87	70	48	36	23



Şekil 4.10. Sığır akciğerindeki ACE üzerine lisinopril bileşiminin etkisi.

Çizelge 4.7. Sığır akciğerindeki ACE'in triamteren konsantrasyonuyla değişen aktivite ve % aktivite değerleri

I(µM)	0	70.8	94.4	118	141.6
EU	64.47	55.44	51.58	48.35	43.83
%Akt.	100	86	80	75	68



Şekil 4.11. Sığır akciğerindeki ACE üzerine triamteren bileşiğinin etkisi.

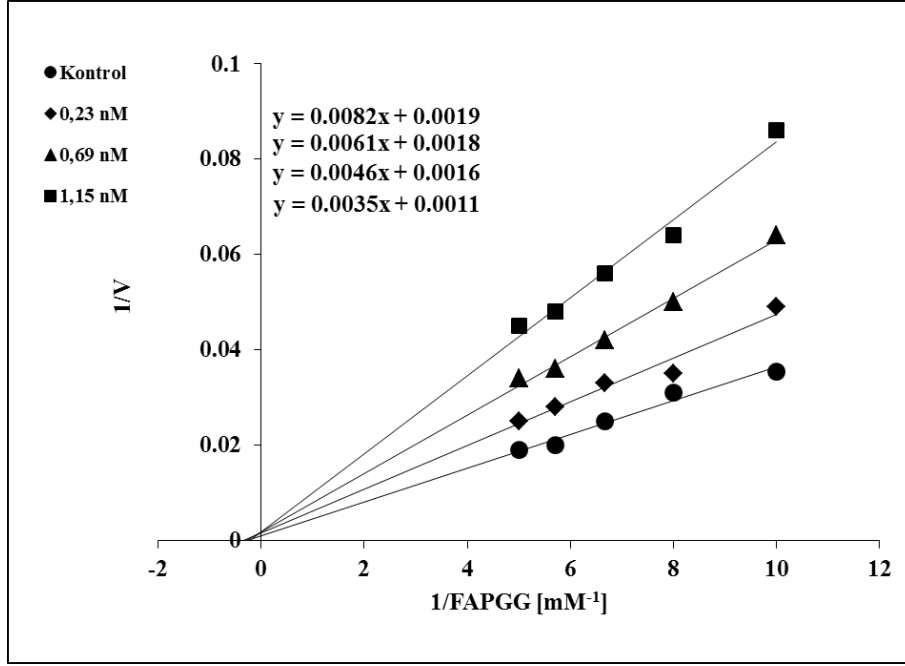
Çizelge 4.8. Sığır akciğeri ACE için bulunan IC_{50} ve K_i değerleri ve inhibisyon türü

İnhibitör	IC_{50}	K_i	İnhibisyon türü
Kaptopril	0.835 nM	1.057 nM	Yarışmasız
Fosinopril	1.159 µM	1.675 µM	Yarışmasız
Lisinopril	4.085 nM	6.449 nM	Yarışmasız
Triamteren	227 µM	419.55 µM	Yarışmasız
Atenolol	-	-	-
Propranolol	-	-	-
İndapamid	-	-	-
Spirolakton	-	-	-

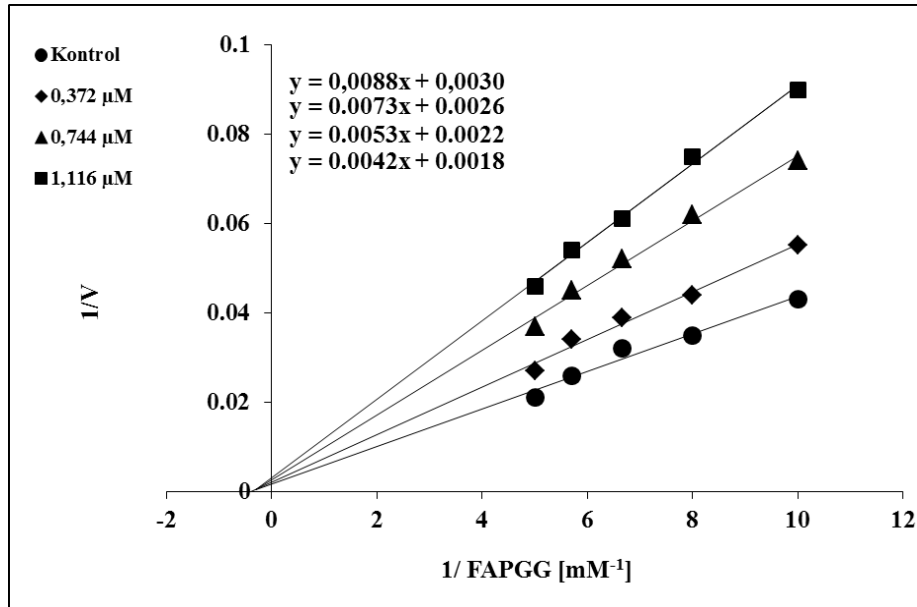
4.9. Sığır Akciğeri ACE Aktivitesi Üzerine İnhibitör Etkisi Gösteren Etken Maddelerin İnhibisyon Türünün Belirlenmesine Ait Çalışma Sonuçları

Sığır akciğerinden saflaştırılan anjiotensin konverting enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren kaptopril, fosinopril, lisinopril, triamteren bileşiklerinin inhibisyon türünü belirlemek için bölüm 3.2.11'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

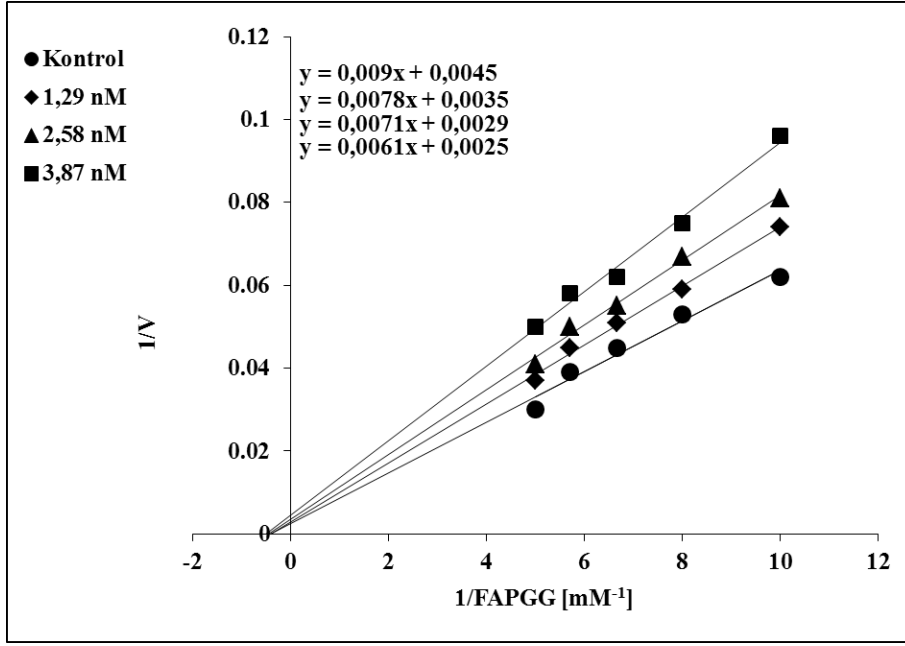
kesişen doğruların oluşturduğu grafiği veren etken maddelerin inhibisyon türü yarışmasız inhibisyon olarak belirlendi.



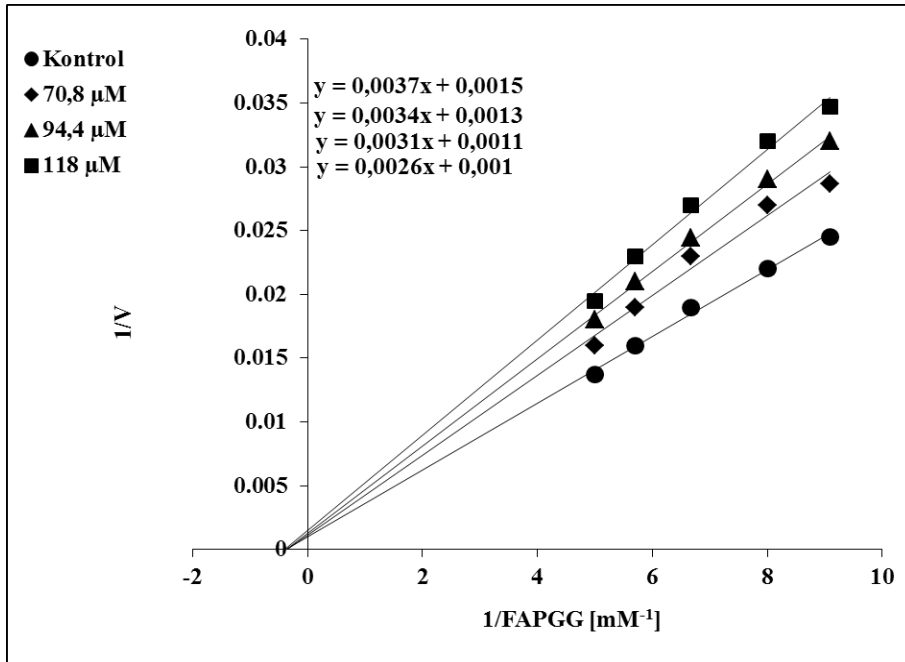
Şekil 4.12. Sığır akciğeri ACE aktivitesi üzerine kaptopril bileşiminin etkisi.



Şekil 4.13. Sığır akciğeri ACE aktivitesi üzerine fosinopril bileşiminin etkisi.



Şekil 4.14. Sığır akciğeri ACE aktivitesi üzerine lisinopril bileşiminin etkisi.



Şekil 4.15. Sığır akciğeri ACE aktivitesi üzerine triamteren bileşiminin etkisi.



5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Anjiotensin konverting enzim [ACE (peptidil-dipeptidaz A, EC 3.4.15.1)], hem arteryel kan basıncını hem de vücudun tuz ve su dengesini düzenler aynı zamanda renin anjiotensin sisteminde de önemli fizyolojik bir rol oynar (Laragh ve ark., 1972). ACE, anjiotensin I' i bir oktapeptit olan anjiotensin II' ye dönüştürür. Anjiotensin II, kan basıncına doğrudan etki ederek kan basıncını yükseltir. Ayrıca ACE, vazodilatasyon (damar genişletici) etkisi gösteren bradikinin'i de yok eder. Bu nedenle ACE'nin inhibe olması, anjiotensin II oluşumunu azaltarak hipertansiyon oluşumunu önlemektedir (Laragh ve ark., 1972; Takenaka, 2011).

ACE, kan basıncı regülasyonunda önemli bir rol oynar. Günümüzde giderek artmakta olan hipertansiyon hastalığı birçok bozukluğa yol açabilmektedir. Hipertansiyon, miyokard enfarktüsü (MI), serebrovasküler olaylar, konjestif kalp yetmezliği, periferik arter yetmezliği gibi bir çok hastalığa neden olmaktadır (Levy ve ark., 1996). Hipertansiyon tedavisinde kullanılan bir çok yöntem olmasına rağmen, hipertansiyonun tedavisinde tercih edilen ilk seçenek anjiotensin konverting enzim (ACE) inhibitörleri olmuştur (Bicket, 2002; Lonn ve ark., 2003). ACE inhibitörlerinin anjiotensin Ang (I)' in Ang (II)' ye dönüşümünü ve kinin hidrolizini inhibe ederek hipertansiyonun önlenmesine etki ettiğine bilinmektedir (Brooks ve Robinson, 1997).

ACE birçok farklı kaynaklardan saflaştırılmıştır. Saf ACE aktivitesi üzerine birçok sentetik ve bitkisel kaynaklı bileşiklerin inhibitör etkileri incelenmiştir. Anjiotensin konverting enzim, kurbağa yumurtalıklarından (Miano ve ark., 2003), theromyzon tessulatum sülüğünden (Vandenbulcke ve ark., 1997), domuz böbreğinden (Hoper ve ark., 1987), locusta migratoria testislerinden (Macours ve ark., 2003), tavşan akciğerinden (Abdulazeez Mansurah ve ark., 2013), fare derisinden (Hara ve ark., 1982), köpek testisinden (Sabeur ve ark., 2001), insan böbrek korteksinden (Takada ve ark., 1981) böbrek ve striatumundan (Hooper ve Turner, 1987), seminal plazmadan (Lanzillo ve ark., 1985), insan akciğerinden (Friedland ve ark., 1981) saflaştırılmıştır.

Yaptığımız bu çalışmada ACE, sığır akciğerinden saflaştırıldı ve karakterize edildi. Hipertansiyonu önleyen etken maddeler lisinopril, kaptopril, fosinopril, atenolol, propranolol, triamteren, indapamid ve spironolaktonun ACE üzerine etkileri incelendi.

ACE sığır akciğerinden afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırıldı. Bu yöntemde NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow kolon dolgu maddesi kullanıldı. NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow mevcut kimyasallarla birleştirme seçeneklerini artıran, önceden aktive edilmiş önemli 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 sağlamakta ve özellikle küçük protein ve peptid bağları için uygundur. NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow; 6-amino hekzanoik asit aralayıcı kol ve sepharose 4 fast flow maddesinin birleştirilmesi ile hazırlanan yüksek derecede çapraz bağlı 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 esere doğrudan bağlanmaktadır. Birleştirme basamağından önce ön-aktive edilmiş kolon dolgu maddesinin bağlanma kapasitesini en yüksek seviyede tutmak için çözeltiler soğukta (0°C'den 4°C'ye) kullanıldı, tüm yıkama basamaklarının zaman aralığı azaltılarak ligandla birleştirilmeden önce tüm çözeltiler hazırlandı.

Bu çalışmada sığır akciğeri ACE'in biyokimyasal karakterizasyonu belirlendi. Sığır akciğerinden ACE enzimini saflaştırmak için lisinopril afinite kolonu kullanıldı. ACE'nin kısmi saflaştırılması farklı ligandlar ile denenmiş ve başarılı olunmuştur. Daha önceki çalışmalarda kolon dolgu maddesi olarak epoxy-activated sepharose 4B kullanılmış ve aynı zamanda elüsyon tamponu olarak HEPES kullanılmıştır. Elüsyon tamponuna lisinopril inhibitörü eklenerek enzim geri alındığı için diyalize gerek duyulmuştur (Bull ve ark., 1985). Çok aşamalı protokoller, güçlü dönüştürücü enzim inhibitörü olan lisinopril ile bir afinite jeli kullanılarak daha basit ve daha az zahmetli olan protokolle değiştirilmiştir. Bu çalışmada ise kolon dolgu maddesi olarak NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow kullanıldı ve sodyum tetraborat (pH 9) elüsyon tamponuna lisinopril inhibitörü ilave edilmeden saflaştırılan enzim elüe edildi. Elüsyon tamponunda inhibitör kullanılmadığı için diyaliz işlemi yapılmadı. Bu da kullandığımız bu yöntemin en önemli üstünlüğüydü.

Çekirge testislerinde bulunun anjiotensin konverting enzim anyon değişimi ve jel geçirgenlik kromatografisi yöntemi ile iki aşamada saflaştırılmıştır. Anjiotensin konverting enzimin molekül ağırlığı yaklaşık olarak 80 kDa olarak bulunmuştur

(Macours ve ark., 2003). Anjiotensin konverting enzim kurbağa yumurtalıklarından afinite kromatografisi yöntemiyle saflaştırılmıştır. Kolon dolgu maddesi olarak Sepharose 6B ve ligand olarak lisinopril kullanılmıştır. Hem deterjanla ekstrakte edilen hem de tripsin ile ekstrakte edilen enzim için molekül ağırlığı 150 kDa olarak bulunmuştur. Deterjan ve tripsin ile ekstrakte edilen enzimler için ACE'nin spesifik aktivitesi sırasıyla 294 U mg^{-1} ve 326 U mg^{-1} olarak hesaplanmıştır. Optimum pH aralığı 7-8.5 ve optimum sıcaklık ise 50°C olarak hesaplanmıştır (Miano ve ark., 2003).

Bu çalışmamızda daha önce hiçbir kısmi saflaştırma adımı kullanmadan ligand bağlı afinite kromatografisi yöntemiyle tek adımla sığır akciğerinden saflaştırılan ACE'in saflaştırma oranı 1748 kat olarak bulunmuştur. Sığır akciğeri ACE'in spesifik aktivitesi 7067 EU/mg protein olarak hesaplanmıştır.

Anjiotensin konverting enzim [ACE (peptidil-dipeptidaz A, EC 3.4.15.1)] fare bağırsak mukozasının toplam hücre membran fraksiyonundan saflaştırılmıştır. Anjiotensin konverting enzim jel filtrasyon ve lisinopril-Sepharose afinite kolon kromatografisi ile 4500 kat saflaştırılmıştır (Erickson ve ark., 1992), İnsan kalbinden 1660 kat (Sakharov ve ark., 1987), insan akciğerinden 2660 kat (Friedland ve ark., 1981), tavşan akciğerinden 1000 kat (Bull ve ark., 1985), insan serumundan 130.000 kat (Harris ve ark., 1981), insan plazmasından 12,860 (Basi ve Turkoglu, 2018) saflaştırılmıştır.

Saflaştırma sırasında elüatların protein içerikleri belirlemek için 280 nm'de absorbans ölçümleri gerçekleştirildi. Yapılan kalitatif tayin, protein yapısında bulunan fenil alanin, tirozin ve triptofan amino asitlerinin bu dalga boyunda absorbans vermesi esasına dayanmaktadır. Bradford yöntemiyle de kantitatif protein tayinleri gerçekleştirildi. Bu yöntemde fosforik asitli ortamda, proteinler coomassie brilliant blue G-250 reaktifi ile kompleks oluştururlar. Negatif yüklü bir gruba sahip olan coomassie brilliant blue G-250 protein üzerindeki pozitif yüklü grubla bağlanmaktadır. Boyanın kırmızı (maksimum dalga boyu 465 nm) ve mavi (maksimum dalga boyu 596 nm) olmak üzere iki formu bulunmaktadır. Boya üzerindeki negatif yüke proteinin bağlanması ile kırmızı form mavi forma dönüşmektedir. Bu yöntem, çok kısa sürede yapılması, protein boya kompleksinin çözeltide uzun süre kalması sebebiyle protein tayin yöntemleri arasında en çok tercih edilen bir yöntemdir. Bu yöntemin hassasiyeti 1-

100 µg arasında değişmektedir. Reaksiyon tekrarlanabilir ve hızlı bir şekilde meydana gelmektedir. Reaksiyon yaklaşık olarak iki dakikada gerçekleşir. Renk stabilitesi yaklaşık iki saatin üzerinde devam etmektedir. Bu yönteminin hassasiyeti daha da artırılabilir (5-100 µg protein.mL⁻¹). Renk oluşumunda proteinin amino asit bileşiminin reaksiyon üzerinde etkili olduğu gözlemlenmiştir (Bradford, 1976).

Sığır akciğerinden saflaştırılan anjiotensin konverting enziminin aktivitesinin en yüksek olduğu optimum sıcaklık ve optimum pH aralığı belirlendi. Yapılan çalışmada sığır akciğerinden saflaştırılan ACE için optimum pH 7.4-7.6 ve optimum sıcaklık 35-40 °C arasında bulundu. Miano ve ark'larının yaptığı bir çalışmada kurbağa yumurtalıklarında (*Rana esculenta*) bulunan anjiotensin konverting enzim (ACE) saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Optimum pH aralığı 7-8.5 ve optimum sıcaklık ise 50 °C olarak hesaplanmıştır. Başka bir çalışmada ise insan ve fare derisindeki anjiotensin konverting enzimin (ACE) kimyasal özellikleri karakterize edilmiştir ve optimum pH aralığı 7.7-8.1 olarak belirlenmiştir. Yapılan başka bir çalışmada ise tavşan akciğerinden saflaştırılan ACE için optimum pH 8.0-8.3 ve optimum sıcaklık 37 °C olarak belirlenmiştir (Abdulazeez Mansurah ve ark., 2013).

Çalışmamızda enzimin saflığını kontrol etmek ve molekül ağırlığını belirlemek için SDS-PAGE yapıldı. SDS-PAGE elektroforez jel fotoğrafında saflaştırdığımız enzimin 57 kDa, 66 kDa ve 190 kDa molekül ağırlığına sahip üç bant verdiği görüldü (şekil 4.5). Elde edilen molekül ağırlığı enzimin alt birimine ait molekül ağırlıklarıdır. Çünkü SDS-PAGE elektroforezinde oligomerik enzimler denatüre olarak alt birimlere ayrılmaktadırlar. Enzimin denatüre olmamış halinin molekül ağırlığı daha sonra uyguladığımız jel filtrasyon kromatografisi ile belirlenmiştir.

Sağlıklı ve orta düzeyde hipertansive etkiye sahip tedavi edilmemiş hastalarda anjiotensin konverting enzim (ACE)'nin idrardaki izoformları incelenmiştir. Sağlıklı bireylerde ACE'nin en yüksek ve en düşük molekül ağırlığı 170 ve 65 kDa olup tedavi edilmemiş orta düzeyde hipertansive etkiye sahip hastalarda ise ACE'nin sadece düşük molekül ağırlığı 90 ve 65 kDa olduğu görülmüştür (Hattori ve ark., 2000).

Anjiotensin konverting enzim insan plazmasından afinite kromatografisi yöntemi kullanılarak saflaştırılmıştır. ACE'nin saflığı SDS-PAGE ile belirlenmiş ve jel

üzerinde 60 kDa ve 70 kDa olmak üzere iki bant görüldüğü belirlenmiştir (Basi ve Turkoglu, 2018).

ACE; testis, kan plazması gibi bir çok dokudan jel filtrasyon veya hidoksilapatit kromatografisi kullanılarak iki basamaklı basit bir yöntemle saflaştırılmıştır. Testisteki ACE enziminin hem 90 kDa hem de 140 kDa'luk iki alt birimden oluştuğu gözlemlenmiştir (Lanzillo ve ark., 1985).

Saflaştırdığımız ACE'in monomerlerinin sayısını ve tabii molekül ağırlığını belirlemek için jel-filtrasyon kromatografisi yapıldı. Çünkü protein jel ile kompleks oluşturuyorsa, fazla miktarda karbohidrat ihtiva ediyorsa, büyük kompleksler agregat meydana getiriyorsa veya alt birimlere ayrışıyorsa güvenilir olmayan molekül ağırlıkları elde edilebilmektedir.

Enzimin doğal yapısının korunduğu gerçek molekül ağırlığını belirlemek için sephadex-G 100 kolon dolgu maddesi kullanılarak jel filtrasyon kromatografisi yapıldı ve grafik çizildi. Grafik denkleminde ACE molekül ağırlığı 303 kDa olarak belirlendi (şekil 4.7). Bu sonuç SDS-PAGE jel elektroforezi sonuçlarıyla karşılaştırıldığında enzimin üç farklı alt birime (monomere) sahip olduğu ve bu üç alt birimin toplam molekül ağırlığının jel filtrasyon kromatografisi yöntemiyle bulunan molekül ağırlığı ile örtüştüğü belirlendi. Yani enzimin 57 kDa, 66 kDa ve 190 kDa olmak üzere üç alt birime sahip ve denatüre olmamış halinin molekül ağırlığının da yaklaşık 303 kDa olduğu görülmüştür. Bu iki sonuç böylelikle birbirini doğrulamış oldu.

ACE'in çözünebilir ve membran formlarının katalitik aktivitesi araştırılmıştır. Yüzey aktif madde hidrasyon derecesi (misel boyutu) üzerine iki enzim formunun katalitik aktivitesi, çeşitli aktif oligomerik enzim formlarına karşılık gelmektedir. Bu yüzden ACE'nin çözünebilir ve membran formlarının eğimleri farklı olduğu görülmüştür.

Anjiotensin konverting enzim rat akciğerinde çoğunlukla membranöz subselüler parçacıklarla birlikte bulunmaktadır. Anjiotensin konverting enzim, sodyum deoksikolat çöktürülerek rat akciğerinin parçacıklı bir fraksiyondan çözündürülmüş ve daha sonra DEAE-selüloz ve Sephadex G-200 kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Daha sonra jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığın 270 000 Da olduğu belirlenmiştir (Lanzillo ve Fanburg, 1974).

Anjiotensin konverting enzim [ACE (peptidil-dipeptidaz A, EC 3.4.15.1)] fare bağırsak mukozasının toplam hücre membran fraksiyonundan saflaştırılmıştır. Molekül ağırlığı 160,000 olan enzimin sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile homojen olduğu belirlenmiştir (Erickson ve ark., 1992).

ACE kurbağa yumurtasından deterjan ve tripsin ile ekstrakte edilerek tek basamakta saflaştırılmıştır. Hem deterjanla ekstrakte edilen hem de tripsin ile ekstrakte edilen enzim için molekül ağırlığı 150 kDa olarak bulunmuştur (Miano ve ark., 2003).

ACE rat beyin korpus striatumundan ve akciğerinden izole edilmiştir. Beyin enzimi molekül ağırlığı SDS elektroforezi ile 165.000 Da olarak hesaplanırken, akciğer enzimi molekül ağırlığı 175.000 Da olarak hesaplanmıştır (Strittmatter ve ark., 1985).

ACE çekirge testislerinde bulunun anjiotensin konverting enzim anyon değişimi ve jel geçirgenlik kromatografisi yöntemi ile iki aşamada saflaştırılmıştır. Anjiotensin konverting enzimin molekül ağırlığı yaklaşık olarak 80 kDa olarak bulunmuştur (Macours ve ark., 2003).

Anjiotensin konverting enzim insan akciğerinden saflaştırılmıştır. Sükroz yoğunluk gradienti santrifüjleme yöntemi ile ACE'in molekül ağırlığı ile 150.000 Da olarak belirlenmiştir. Ayrıca yapılan SDS-PAGE yöntemiyle ACE'nin 130.000 Da molekül ağırlığına sahip olduğu görülmüş ve tek bir polipeptid zincirinden oluştuğu görülmüştür (Friedland ve ark., 1981).

ACE (anjiotensin konverting enzim [EC 3.4.15.1], ilk olarak renin-anjiotensin sisteminin önemli bir bileşeni olarak tanımlanmıştır. Ayrıca ACE normal kan basıncı ve elektrolit dengesinin korunmasından sorumlu olan homeostatik mekanizmanın bir parçasıdır (Corvol ve ark., 1995).

Anjiotensin II, miyokardiyumda sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonunu artırma kabiliyeti ile miyokardiyal inotropiyi artıran güçlü bir doğrudan sistemik ve koroner vazokonstriktördür. Bu nedenle miyokardiyal oksijen kaynağı ve talebi arasındaki dengeyi olumsuz yönde etkilemektedir (Krasney ve ark., 1967; Gavras ve ark., 1971; Dempsey ve ark., 1971; Dzau, 1992; Lindpainter ve Ganten, 1991; Kiowski ve ark., 1991).

Anjiotensin II, kanda dolaşan ve kardiyovasküler sistem üzerinde birçok etkiye sahip olan bir hormondur ve aynı zamanda kan damarlarının da daralmasına neden

olmaktadır. Kan damarlarındaki daralma sonucunda kalbin daha hızlı çalışarak vücudun ana arterlerine kan pompalaması artmakta ve yüksek tansiyona neden olmaktadır.

ACE inhibitörleri (kaptopril, fosinopril, ramipril, lisinopril, enalapril gibi) anjiotensin II üretimini bloke ederek kan damarlarının daralmasını önler ve böylece tansiyonu düşürür. ACE inhibitörlerin kan damarlarının daralmasını önlemesiyle kalbin kan pompalama anındaki enerji miktarını azalttığı belirlenmiştir. Birçok kardiyovasküler hastalıkta, çok yüksek miktarlarda anjiotensin II bulunduğu görülmüştür. Bu yüzden ACE inhibitörlerinin, anjiotensin II üretimini inhibe ederek kalp ve damar duvarlarının hipertrofisini, kalbin çok hızlı bir şekilde çalışmasını ve kan damarlarının daralmasını önlediği ve yüksek tansiyonu düşürdüğü görülmüştür (Sweitzer, 2003).

ACE inhibitörlerinin hipertansif hastalarda ortalama, sistolik ve diastolik basıncı etkili bir şekilde düşürdüğü gözlemlenmiştir (Vidit ve ark., 1982; Todd ve Heel, 1986; Pool ve ark., 1987).

Kalp krizi geçiren kişilerde ACE inhibitörlerinin etkileri araştırılmıştır. ACE inhibitörlerinin kalp hastalığından kaynaklanan ölümleri engellediği gösterilmiştir. Yapılan bir çalışma, kalp krizi geçirme veya gelişmesi için yüksek risk altındaki hastalar incelenmiştir. Kalp yetmezliği (arterlerde, diyabet veya hipertansiyonda bilinen tıkanıklığı olan kişilerde) ACE inhibitörüyle yapılan tedavinin bu insan gruplarında kalp hastalığından gelecek kalp krizlerini ve ölümlerini önlediğini görülmüştür. ACE inhibitörleri, diyabetli hastalarda yüksek tansiyon ve kalp krizlerini azaltmak için özellikle etkili ilaçlar olarak görüldüğü belirtilmiştir. Bu ilaçlar diyabet hastaları olan hastalarda böbrek fonksiyonlarını da koruyabileceği görülmüştür. ACE inhibitörleri binlerce hasta tarafından alınan ve çok güvenli ilaçlar olarak bilinmektedir (Sweitzer, 2003).

Anjiotensin konvertin enzim (ACE) inhibitörlerinin diğer ilaçlara göre avantajı, glomerüler hipertansiyonun daha iyi bir şekilde kontrolünü sağlaması ve böbrek fonksiyonunu daha iyi bir şekilde koruması gösterilmiştir. ACE inhibitörlerinin aynı zamanda anjiotensin I'in anjiotensin II'ye dönüşümünü engellemesi ve böylece güçlü bir vazokonstriktör olan anjiotensin II enzimini inhibe etmesi bu inhibitörlerin bir avantajı olarak görülmüştür. ACE inhibitörü olan kaptopril ile yapılan uzun süreli

tedavide, diyabetik nefropatide böbrek yetmezliğinin ilerlemesini yavaşlattığı görülmüştür. Kaptopril, enalapril, alazepril delapril silazapril ve lisinopril gibi ACE inhibitörleri, Japonya'da böbrek hipertansiyonuna odaklanan çok merkezli klinik çalışmalarda kan basıncını düşürmede etkili olduğu gözlemlenmiştir (Omata ve ark., 1996).

Yapılan diğer bir çalışmada ise, bosna-hersek bölgesinde 5 sağlık kurumunda yürütülen çalışmalardan üç ardışık tıbbi muayene yapılan 270 hastaya Lisinopril/hidroklorotiazid kombinasyonu uygulanmıştır. Bu hastalardaki analizler bosna-hersek'teki çeşitli şehirlerdeki aile hekimleriyle yapılan işbirliği ile toplanan veriler değerlendirilmiştir. Bu analizler sonucunda bu hastalarda ortalama olarak kan basıncındaki toplam azalma sistolik kan basıncında 32.8 mm Hg iken diyastolik kan basıncında ise 17.1 mm Hg olduğu görülmüştür. Lisinopril/hidroklorotiazid kombinasyonunun kan basıncı üzerindeki etkisinden dolayı iç hastalıkları alanında da değerli bir terapi olduğu belirtilmiştir. Aynı zamanda bu ilacın hipertansiyon tedavisinde de etkili olduğu belirtilmiştir (Sukalo ve ark., 2016).

Beta blokerler plazmada proteinlere (albümin, ve α_1 -glikoproteinlere) değişik oranlarda bağlanırlar. Genellikle lipofilik olanlar proteinlere daha yüksek oranda bağlı bulunurlar (örneğin propranolol % 93, asebutolol % 84-85). Propranolol ve diğer lipofilik ilaçlar esas olarak karaciğerde büyük ölçüde metabolize edilmek suretiyle inaktive edilirler. Atenolol ise hidrofilik olmasından dolayı fazla metabolize edilmemekte ve aynı zamanda büyük kısmı değişmeden böbreklerden atılmaktadır (Kayaalp, 2005).

Beta blokerler kalbin iş yükünü β_1 reseptörlerini bloke ederek azaltırlar. Aynı zamanda kardiyak debiyi azaltarakta kalbin yükünü azaltan ilaçlar olarak bilinirler. Kalbin yükünü azaltmalarından dolayı kalbin çok fazla kan pompalamasını azaltarak kan basıncının düşmesine yardımcı olurlar. Beta blokerler anjinal atakların sayısını ve ağırlığını azaltmaktadırlar. Beta blokerler kan basıncını kardiyak debiyi azaltarak düşürürler. Aynı zamanda böbrekten renin salgılanmasını azaltarak anjiotensin II oluşumunu ve aldosteron salgısını azaltırlar. Beta bloker ilaçlar arasında hem β_1 hemde β_2 reseptörlerinin her ikisinde de en çok kullanılan ilaçlar atenolol ve propranolol olarak bilinmektedir (Mycek ve ark., 1997).

Atenololün primer hipertansif hastalarda kardiyovasküler morbidite ve mortalite üzerindeki etkisini sistematik olarak değerlendirilmiştir. Atenolol ile plasebo grubunun kıyaslanması ve ayrıca diğer antihipertansif ilaçların atenolol ile kıyaslanması yapılmıştır. Atenolol ve plasebo grupları arasında kan basıncını düşürmede önemli farklılıkların olmadığı görülmüştür. Atenolol tedavisi ile diğer antihipertansif tedavi karşılaştırıldığında atenolol ile tedavi edilen grupta daha yüksek olma eğiliminde olduğu belirlenmiştir (Carlberg ve ark., 2004).

1964'ten beri çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan beta-adrenerjik reseptör bloke edici bileşik olan propranolol, ABD'de son zamanlarda hipertansiyon tedavisinde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Propranololun, arteriyel basıncın azaltılmasında son derece etkili olduğu görülmüştür. Aynı zamanda propranolol, vazodilatör ve diüretik ilaçların kombinasyonunun, refleksive kardiyak stimülasyon olmaksızın, sodyum ve sıvı retansiyonunu önleyerek vasküler direncini azalttığı belirlenmiştir (Frohlich, 1977).

Beta-reseptör bloke edici ajan olan atenololün antihipertansif etkisi, çift-kör bir çalışmada incelenmiştir. Bu çalışmada, esansiyel hipertansiyonlu 45 hasta, plasebo veya atenolol tedavisine rastgele ayrılmıştır. Atenololün, kan basıncında istatistiksel olarak ve klinik olarak anlamlı bir azalmaya neden olduğu görülmüştür. Orta derecede şiddete sahip olan hipertansiyon hastaları için optimum günlük doz 200 mg olarak belirlenmiştir. Atenololun yararlı bir antihipertansif etkisinin olduğu ve en azından teorik olarak diğer beta-adrenerjik bloke edici ajanlara göre avantajlarının olduğu gözlemlenmiştir (Hansson ve ark., 1976).

Diüretik ilaçlar nefronların belirli segmentlerinde Na^+ ve su reabsorpsiyonunu inhibe ederek böbreklerden su ve tuz kaybını arttıran ilaçlardır. Konjestif kalp yetmezliği, hipertansiyon gibi hastalıklar esnasında oluşan su ve tuz tutulması ile ödemi (aşırı sıvı yükü) ortadan kaldırmak veya ortaya çıkmasını önlemek amacıyla bu sendromun tedavisi için diğer tür ilaçlarla birlikte sık sık kullanılırlar. Hipervolemiyi düzelterip kalbin art yükünü azaltırlar. Bütün hipertansiyon şekillerinde gerek sistolik ve gerekse diyastolik kan basıncını düşürürler. Hafif hipertansiyon olgularında tek başlarına kullanıldıklarında, yaptıkları kan basıncı düşmesi genellikle yeterli derecede olmakta ve başka bir antihipertansif ilaç kullanılmasına gerek kalmamaktadır. Orta ve

ağır hipertansiyon olgularında ise genellikle diğer bir gruptan antihipertansif ilaçlarla kombine olarak kullanılabilirler. Diüretiklerin antihipertansif etki yapmalarındaki esas sebep, su ve tuz kaybına yol açmaları ve ekstrasellüler sıvı hacminin azalmasına (hacim depleksiyonuna) neden olmaları aynı zamanda daha uzun süre vazodilatasyon da rol oynamaları gösterilmektedir (Kayaalp, 2005).

Yapılan bir çalışmada spironolaktonun kan basıncını düşürüp düşürmediğini, spironolaktonun olumsuz etki profilini ve hipertansiyon için kullanımının klinik etkisini araştırılmıştır. Araştırmada, hem spironolakton, hem de plasebo grupları toplam 137 hasta ile 5 çapraz deneme yapılarak incelenmiştir. Çalışmalardaki bu hastalara 4 ile 8 haftalık bir tedavi uygulandığı belirtilmiştir. Spironolaktonun klinik etkisi incelendiğinde, çalışmaların hiçbirinde spironolaktonun kalp krizlerine ve felçlere neden olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca yapılan meta-analizler sonucunda da spironolaktonun sistolik ve diyastolik kan basıncını plaseboya kıyasla yaklaşık 20/7 mm Hg azalttığı görülmüştür. Böylece hipertansiyon hastalarında spironolakton kullanımının etkili olabileceği belirtilmiştir (Batterink ve ark., 2010).

Distal renal tübüller üzerinde etkili olduğu düşünölen bir metilindolin diüretik olan indapamidin, vasküler düz kas vazopresör reaktivitesini düşürdüğu ve muhtemelen bir kalsiyum-antagonist etkiye sahip olabileceği belirtilmiştir. Bir takım avrupalı araştırmacının 1973'ten beri, hipertansiyona sahip 301 hastanın indapamid ile tedavi edilmesine yönelik on altı çalışma gerçekleştirdikleri belirlenmiştir. Yapılan bu çalışmalarda hafif hipertansiyona sahip hastaların yaklaşık % 53'ünde, orta derecede hipertansiyona sahip olan hastaların ise yaklaşık % 43'ünde diastolik kan basıncında tatmin edici bir düşüş olduğu görülmüştür. (90 mm'den düşük Hg). Çalışma sonucunda indapamid, hafif veya orta dereceli hipertansiyonun tedavi edilmesinde iyi bir toleransa sahip olan antihipertansif bir ajan, güçlü bir vazodilatatör ve kalsiyum-antagonist özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir (Morledge, 1983).

İndapamidin (tek dozda 2.5 mg/gün) kan basıncı üzerine toleransını değerlendirmek için 2497 hipertansif hastada üzerinde bir çalışma yapılmıştır. Üç aylık bir süre içinde, indapamidin kan basıncında kademeli bir azalma (ortalama 24/14 mmHg azalma) meydana getirdiği ve başlangıçtaki diyastolik basıncı ile gözlemlenen azalma arasında doğrudan bir korelasyon olduğunu görülmüştür. Aynı zamanda altmış beş

yaşın üzerindeki hastaların analiz sonuçlarına indapamidin etkisi ve toleransının genç hastalardakine benzer olduğunu gözlemlenmiştir (Wheeley ve ark., 1982).

İki potasyum tutucu diüretik spironolakton ve triamterenin arteriyel basınç, intravasküler volüm, renin-anjiyotensin aldosteron sisteminin yanıtları, serum elektrolitleri ve böbrek fonksiyonları üzerine etkileri esansiyel hipertansiyonu olan 13 hastada çapraz denemeler yapılarak karşılaştırılmıştır. Diüretik olan spironolakton ve triamterenin karşılaştırılmasında, spironolakton ile indüklenen sırtüstü ve dik pozisyonlardaki (tüm $p < 0.005$) sistolik, diyastolik ve ortalama arteriyel basınçlardaki düşüş, triamterenden daha yüksek olduğu görülmüştür. Böylece her iki diüretik bileşiğin kan basıncı ve arteriyel basınç üzerinde etkili olduğu gözlemlenmiştir (De Carvalho ve ark., 1980).

Çalışmamızda saflaştırılan ACE aktivitesi üzerine hipertansiyonu önleyen ACE inhibitörleri kaptopril, fosinopril, lisinopril, β blokerler atenolol ve propranolol ve diüretiklerden triamteren, indapamid ve spironolakton etken maddelerinin etkisi araştırıldı. Kaptopril, fosinopril, lisinopril ve triamteren etken maddeleri sıgır akciğerinden saflaştırdığımız ACE aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösterdi. Ancak beta bloker olan atenolol ve propranolol ACE aktivitesi üzerine hiçbir etki göstermedi. Diüretik olan indapamid ve spironolakton suda çözünmediğinden dolayı çalışılmadı. İnhibisyon etkisi gösteren bu ACE inhibitörlerinin ve diüretik etken maddelerin inhibisyon grafikleri çizilerek bu grafiklerden IC_{50} değerleri hesaplandı. ACE aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren bu maddelerin IC_{50} değerleri sırasıyla 0.835 nM, 1.159 μ M, 4.085 nM ve 227 μ M olarak hesaplandı. Kaptoprilin 0.835 nM değeri ile en yüksek inhibitor aktivitesine sahip olduğu belirlendi. Aynı zamanda inhibisyon etkisi gösteren etken maddelerin K_i değerleri hesaplandı. Bu etken maddelerin K_i değerlerinin sırasıyla 1.057 nM, 1.675 μ M, 6.449 nM ve 419.55 μ M olduğu belirlendi.

Anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) torakotomide elde edilen insan akciğer dokusundan, Triton X-100 ile çözündürme ve sonikasyondan sonra iyon değişimi DEAE selüloz kromatografisi ve Sepharose 4B jel filtrasyonu yöntemi ile yaklaşık olarak 7000 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılan ACE enziminin kaptopril tarafından inhibe edildiği görülmüştür. Ayrıca kaptoprilin IC_{50} değerinin 4.5×10^{-9} mol/l olduğu belirlenmiştir (Grönhagen-Riska ve Fyhrquist, 1980).

Yapılan başka bir çalışmada anjiotensin I konverting enzim (ACE) inhibitörü fermente istiridye sosundan (FOS) izole edilmiş ve saflaştırılmıştır. Fermente istiridye sosu'nun (FOS) anjiotensin konverting enzim (ACE) aktivitesi incelenmiş ve IC₅₀ değerinin 2.45 mg /mL olduğu belirlenmiştir (Je ve ark., 2005).

Yang ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada anjiotensin I konverting enzim aktivitesi için inhibitör etkisi gösteren 4 yeni peptit (MRWRD, MRW, LRIPVA ve IAYKPAG), ıspanak rubisco (Ribuloz bifosfat karboksilaz/oksijenaz) enziminin pepsin-pankreatin sindiriminden HPLC yöntemi kullanılarak izole edilmiştir. Bu saflaştırılan peptitlerin IC₅₀ değerlerinin sırasıyla 2.1, 0.6, 0.38, ve 4.2 µM olduğu belirlenmiştir (Yang ve ark., 2003).

Doğal olarak oluşan anjiotensin konverting enzim (ACE) inhibitör peptidlerini araştırmak için brokoli (*Brassica oleracea Italica*) ekstraktları peptidleri saflaştırma ve tanımlama amacıyla kullanılmıştır. ACE inhibitör peptidi Amberlite XAD-4, Sephadex LH-20 ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemleri kullanılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırılan inhibitör peptidinin bir tripeptid (Tyr-Pro-Lys) olduğu tanımlanmış ve IC₅₀ değerinin 0.5 µg protein/mg olarak hesaplanmıştır (Lee ve ark., 2006).

Çalışmamızda sonuç olarak, sığır akciğerinden ACE enzimi saflaştırıldı. ACE enzimi kan basıncının düzenlenmesinden sorumlu çok önemli bir enzimdir. Hipertansiyon hastalarında bu enzimin aktivitesi yüksek olduğu için kan basıncı artmakta ve bu hastalığın tedavisinde genellikle ACE inhibitörleri kullanılmaktadır. Bizim çalışmamızda, ACE enzimi sığır akciğerinden afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırıldı. Saflaştırma katsayısı 1748 olarak hesaplandı. Saflaştırdığımız enzimin saf olduğu SDS-PAGE elektroforez yöntemi belirlendi. SDS-PAGE jel elektroforezinde 40-500 kDa molekül ağırlıklı protein markırı ile yürüttüğümüz saf ACE'nin, 57 kDa, 66 kDa ve 190 kDa olmak üzere üç bant verdiği görüldü. Aynı zamanda saflaştırdığımız enzimin jel filtrasyon kromatografisi ile nativ molekül ağırlığının 303 kDa olduğu belirlendi.

ACE inhibitörleri, beta blokerler ve diüretikler günümüzde farklı mekanizmalarla tansiyon üzerine etki ederek tansiyon düşürücü ilaçlarda etken madde olarak kullanılır. ACE inhibitörleri, anjiotensin konverting I enziminin anjiotensin

konverting II enzimine dönüşümünü engelleyerek kan basıncını dengelemektedir. Beta blokerler öncelikle kronotropik (kalp hızını değiştiren) ve inotropik (kasılma gücünü değiştiren) inhibitör mekanizmalarla kardiyak outputun (kalp debisi) azaltılması yoluyla kan basıncını azaltarak tansiyonu dengelemektedir. Diüretikler ise idrar atılımını arttırarak aşırı sıvı tutulumunun (ödem) veya diüretik etkileriyle kan hacmini azaltarak kan basıncını ve böylece tansiyonu dengelemektedir. Böylece diüretiklerinde, ACE inhibitörleri gibi ACE'yi inhibe ederek kan basıncını düşürmede etkili olduğu ve aynı zamanda hipertansiyonun tedavi edilmesine yardımcı olarak sağlıklı bir yaşam süresi sunduğu belirlenmiştir. Bu da bize yapmış olduğumuz çalışmada, saflaştırdığımız ACE üzerine, ACE inhibitörleri, beta blokerler ve diüretik etken maddelerinin inhibisyon etkilerinden dolayı ileride yapılacak çalışmalara yön vermesi açısından önemli bir çalışma olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda, sığır akciğerinden anjiotensin konverting enzimi (ACE) saflaştırmak, saflaştırılan enzimin saflığını ve molekül ağırlığını belirlemek, enzimin optimum şartlarını ortaya çıkarmak, saf enzim üzerine hipertansiyon hastalarının kullandığı hipertansiyonu önleyici bazı ilaçların etken maddelerinin, ACE inhibitörleri (Kaptopril, fosinopril, lisinopril), β blokerler (atenolol, propranolol), diüretikler (triamteren, indapamid, spironolakton)'in inhibisyon etkilerini araştırmaktır. Bu amaçla anjiotensin konverting enzim NHS- activated Sepharose 4 fast flow afinite kromatografisi kolonuyla tek basamakta başarılı bir şekilde 1748 kat saflaştırıldı. Saflaştırılan enzimin saflığı ve molekül ağırlığı önce SDS-PAGE ve daha sonra jel filtrasyon kromatografisi ile doğrulanarak tayin edildi. Bilindiği üzere SDS proteinleri denatüre edici ajanlardan biridir. SDS-PAGE ile yapılan elektroforezde eğer enzim birden fazla monomere (alt birim) sahipse her bir alt birimin molekül ağırlığına göre bir bant verir. Bu işlemde enzimimiz üç farklı bölgede bant verdi. Bu bantların molekül ağırlıkları tespit edildiğinde; bunların 57, 66 ve 190 kDa olduğu görüldü. Daha sonra yapılan jel filtrasyon kromatografisi yöntemi ile enzimin denatüre olmamış tabii yapısının molekül ağırlığı 303 kDa olarak belirlendi. Bundanda enzimin üç monomere sahip yaklaşık 313 kDa molekül ağırlığında bir enzim olduğu tespit edilmiş oldu.

Saf sığır akciğeri ACE 'nin optimum pH'sı 7.4-7.6 olarak, optimum sıcaklığın ise 35-40 °C aralığı olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar farklı kaynaklardan saflaştırılan anjiotensin konverting enzimin optimum şartlarıyla örtüşmektedir.

Saf enzim üzerine hipertansiyonu önlemede kullanılan bazı ilaçların etken maddelerinin etkilerini araştırmak için inhibisyon kinetiği çalışıldı. Bu ilaç etken maddelerinin uygun konsantrasyonda çözeltileri hazırlandı. İnhibisyon grafikleri çizildi. Bu grafiklerden inhibisyon etkisi gösterenlerin IC₅₀ değerleri bulundu. Bu etken maddelerden β blokerler (propranolol, atenolol) hiçbir inhibisyon etkisi göstermedi. Bu da β blokerlerin farklı bir mekanizma ile hipertansiyonu düşürücü etkisinde olduğu ve ACE'ini inhibe etmediği sonucunu ortaya çıkarmış oldu. Diüretiklerden (spironolakton, indapamid) ise apolar yapılarından dolayı hiçbir şekilde suda ya da metil alkolde çözünmedi. Çözelti ortamına alınamayan bu maddelerin inhibisyon kinetiği çalışılmadı. Diüretiklerden triamteren çok düşük düzeyde de olsa inhibisyon etkisi gösterdi.

ACE inhibitörleri etken maddelerinin (Kaptopril, fosinopril, lisinopril) tümü inhibisyon etkisi gösterdiler. Bunların IC₅₀ değerleri sırasıyla 0.835 nM, 1.159 µM ve 4.085 nM dır. Buradanda en etkili inhibisyonun kaptopril tarafından yapıldığı anlaşılmaktadır.

Önemli bir enzim olan anjiotensin konverting enzimi saflaştırılarak bu saf enzimin in vitro kinetiği in vivo çalışmalar içinde belirleyici bir özellik taşımaktadır. Afinite kromatografisi ile enzim saflaştırmak tek adamlı ve etkili bir yöntemdir. Yöntem uygun bir şekilde oturtulursa başarılı sonuçlar alınmaktadır. Çalışmamızda 1748 kat enzim saflaştırılarak başarılı bir saflaştırılma işlemi gerçekleştirilmiştir. Enzimin saflığı ve molekül ağırlığı SDS-PAGE jel elektroforezi ve jel filtrasyon kromatografisi ile etkili bir şekilde belirlenmiştir. Bu sonuçlarla da literatürdeki bazı farklı değerlerin daha iyi yorumlanmasına katkı sağlamıştır. Ayrıca tedavi amaçlı kullanılan hipertansiyonu önleyici ilaçların önemlilerinden bazılarının etken maddeleri bu enzim üzerine etkilerinin ne olacağı araştırılmış ve bu çalışmayla da inhibisyon etkisi gösteren bileşiklerin Ki ve IC₅₀ değerleri belirlenmiş ve literatüre önemli bir katkı sağlamıştır.

KAYNAKLAR

- Abdulazeez Mansurah, A., Aimola, I. A., Annette R. O., Abdullahi, S., 2013. Isolation, partial purification and characterization of angiotensin converting enzyme (ACE) from rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) lungs. *American Journal of Drug Discovery and Development*, **3**: 120-129.
- Abrams, J., 1985. Vasodilator therapy for chronic congestive heart failure. *JAMA*, **254** (21): 3070-3074.
- Ackers, G. K., 1970. Analytical gel chromatography of proteins. *In Advances In Protein Chemistry*, **24**: 343-446.
- Actis-Goretta, L., Ottaviani, J. I., Keen, C. L., Fraga, C. G., 2003. Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) activity by flavan-3-ols and procyanidins. *FEBS Lett*, **555** (3): 597-600.
- Al-Majed, A. A., Bakheit, A. H. H., Aziz, H. A. A., Alajmi, F. M., Rabiah, H. A., 2017. Chapter Six – Propranolol. *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*, **42**: 287-338.
- Ambard, L., 1921. Amylase: Its estimation and the mechanism of its action. *Bull. Soc. Chim. Biol*, **3**: 51-65.
- Ambrosioni, E., Safar, M., Degaute, J. P., Malin, P. L., MacMahon, M., Pujol, D. R., de Cordoüe, A., Guez, D., 1998. Low-dose antihypertensive therapy with 1.5 mg sustained-release indapamide: results of randomised double-blind controlled studies. European study group. *Journal of Hypertension*, **16**: 1677-1684.
- Amoghimath, S., Suresha, R. N., 2018. Anti-inflammatory activity of lisinopril in albino rats. *National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology*, **8** (4): 493-496.
- Andersson, M. M., Borg, H., Anderson, L. O., 1974. Purification of antithrombin III by affinity chromatography. *Thrombosis Research*, **5** (4): 439-452.
- Andrews, P., 1965. The gel-filtration behaviour of proteins related to their molecular weights over a wide range. *Biochemical Journal*, **96** (3): 595-606.
- 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.
- 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.
- Bartosz, M., Kedziora, J., Bartosz, G., 1997. Antioxidant and Prooxidant Properties of Captopril and Enalapril. *Free Radical Biology and Medicine*, **23** (5): 729-735.
- 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** (5): e4175.
- Batterink, J., Stabler, S. N., Tejani, A. M., Fowkes, C. T., 2010. Spironolactone for hypertension. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, **8** (8): 265.
- Bendtsen, K., Hansen, P. R., Rieneck, K., 2003. Spironolactone/Arthritis Study Group. Spironolactone inhibits production of proinflammatory cytokines, including

- tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma, and has potential in the treatment of arthritis. *Ugeskrift for Laeger*, **166** (37): 3203.
- Bergsma, D. J., Ellis, C., Kumar, C., Nuthulaganti, P., Kersten, H., Elshourbagy, N., 1992. Cloning and characterization of a human angiotensin II type 1 receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **183** (3): 989-95.
- Bhagat, B. D., 1979. Mechanism of the antihypertensive effect of propranolol. *General Pharmacology*, **10** (4): 291-296.
- Bicket, D. P., 2002. Using ACE inhibitors appropriately. *American Family Physician*, **66** (3): 461-468.
- Black, J. W., Crowther, A. F., Shanks, R. G., Smith, L. H., Dornhorst, A. C., 1964. A new adrenergic betareceptor antagonist. *The Lancet*, **283** (7342): 1080-1081.
- Bollag, D. M., Rozycki, M. D., Edelman, S. J., 1996. *Protein Methods*, 2nd Edition. Wiley-Liss. Inc., New York. 432.
- 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.
- Bradley, H. A., Wysong, C. S., Volmink, J. A., Mayosi, B. M., Opie, L. H., 2006. How strong is the evidence for use of beta-blockers as first-line therapy for hypertension? Systematic review and meta-analysis. *Journal of Hypertension*, **24** (11): 2131-2141.
- Braunwald, E., 1984. *Heart Disease*. 2nd ed., Saunders Company, Philadelphia, London. 539-541.
- Breyer, J., Jacobson, H. R., 1990. Molecular mechanisms of the diuretic agents. *Annual Review of Medicine*, **41**(1): 265-75.
- Brooks, W. W., Bing, O. H., Robinson, K. G., Slawsky, M. T., Chaletsky, D. M., Conrad, C. H., 1997. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on myocardial fibrosis and function in hypertrophied and failing myocardium from the spontaneously hypertensive rat. *Circulation*, **96** (11): 4002-4010.
- Bull H. B., Thornberry N. A., Cordes E. H., 1985. Purification of angiotensin converting enzyme from rabbit lung and human plasma by affinity chromatography. *Journal of Biological Chemistry*, **260** (5): 2963-2972.
- Bünning, P., Riordan, J. F., 1985. The functional role of zinc in angiotensin converting enzyme. Implications for the enzyme mechanism. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **24** (3): 183-198.
- Busch, A. E., Suessbrich, H., Kunzelmann, K., Hipper, A., Greger, R., Waldegger, S., 1996. Blockade of epithelial Na⁺ channels by triamterenes - underlying mechanisms and molecular basis. *Pflugers Arch*, **432** (5): 760-6.
- Campbell, D. B., Moore, R. A., 1981. The pharmacology and clinical pharmacology of indapamide. *Postgraduate Medical Journal*, **57**: 7-17.
- Campbell, D. B., Taylor, A. R., Hopkins, Y. W., Williams, J. R. B., 1977. Pharmacokinetics and metabolism of indapamide: A review. *Current Medical Research and Opinion*, **5**: 13-24.
- Carlberg, B., Samuelsson, O., Lindholm, L. H., 2004. Atenolol in hypertension: is it a wise choice. *The Lancet*, **364** (9446): 1684-9.
- 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** (2): 531-536.

- Charbonneau, H., Cormier, M. J., 1979. Purification of plant calmodulin by fluphenazine-Sepharose affinity chromatography. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **90** (3): 1039-1047.
- Chillon, J. M., Baumbach, G. L., 1999. Effects of an Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor and a b-Blocker on Cerebral Arterioles in Rats. *Hypertension*, **33** (3): 856-861.
- Chobanian, A. V., Bakris, G. L., Black, H. R., Cushman, W. C., Green, L. A., Izzo, J. L., 2003. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *Jama*, **289** (19): 2560-2571.
- Corvol, P., Williams, T. A., Soubrier, F., 1995. Peptidyl dipeptidase A: angiotensin-I converting-enzyme. In *Proteolytic Enzymes: Aspartic and Metallo Peptidases. Methods Enzymol*, **248**: 283-305.
- Cuatrecasas, P., Wilchek, M., Anfinsen, C. B., 1968. Selective enzyme purification by affinity chromatography. *Proceedings of The National Academy of Sciences*, **61** (2): 636-643.
- Dahlöf, B., Gosse, P., Guéret, P., Dubourg, O., De Simone, G., Schmieder, R., Karpov, Y., García-Puig, J., Matos, L., De Leeuw, P. W., 2005. Perindopril/indapamide combination more effective than enalapril in reducing blood pressure and left ventricular mass: the PICXEL study. *Journal of Hypertens*, **23** (11): 2063–2070.
- Davis, B. J., 1964. Disc Electrophoresis–2, Method and Application to Human Serum Proteins. *Annals of The New York Academy of Sciences*, **121** (2): 404-427.
- De Carvalho, J. G., Emery, A. C., Frohlich, E. D., 1980. Spironolactone and triamterene in volume-dependent essential hypertension. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, **27** (1): 53-6.
- Luca, N. D., Mallion, J. M., O'Rourke, M. F., O'Brien, E., Rahn, K. H., Trimarco, B., Romero, R., De Leeuw, P. W., Hitzenberger, G., Battagay, E., 2004. Regression of left ventricular mass in hypertensive patients treated with perindopril/indapamide as a first-line combination: the REASON echocardiography study. *American Journal of Hypertension*, **17** (8): 660–667.
- Dempsey, P. J., McCallum, Z. T., Kent, K. M., Cooper, T., 1971. Direct myocardial effects of angiotensin II. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, **220** (2): 477-481.
- Deutsch, D. G., Mertz, E. T., 1970. Plasminogen: purification from human plasma by affinity chromatography. *Science*, **170** (3962): 1095-6.
- Deyl, Z., 1979. *Electrophoresis: A Survey of Techniques and Applications. Part A: Techniques*. Elsevier, Amsterdam. 390.
- DiBianco, R., 1985. Angiotensin converting enzyme inhibition. *Postgraduate Medicine*, **78**: 229-248.
- Dobrinski, I., Ignatz, G. G., Fagnan, M. S., Ashley, I. Y., Ball, B., 1997. Isolation and characterization of a protein with homology to angiotensin converting enzyme from the periacrosomal plasma membrane of equine spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, **48** (2): 251-260.
- Dreslinski, G. R., Messerli, F. H., Dunn, F. G., Suarez, D. H., Reisin, E., Frohlich, E. D., 1982. Haemodynamics, biochemical and reflexive changes produced by atenolol in hypertension. *Circulation*, **65** (7): 1365-1368.

- Dzau, V. J., 1992. Angiotensin converting enzyme inhibitors and the cardiovascular system. *Supplement: Official Journal of The International Society of Hypertension*, **10** (3): 3-10.
- Erickson, R. H., Suzuki, Y., Sedlmayer, A., Song, I. S., Kim, Y. S., 1992. Rat intestinal angiotensin-converting enzyme: purification, properties, expression, and function. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, **263** (4): 466-73.
- Esther, C. R., Marino, E. M., Bernstein, K. E., 1997. The role of Angiotensin-converting enzyme in blood pressure control, renal function, and male fertility. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, **8** (5): 181-6.
- Foody, J. M., Farrell, M. H., Krumholz, H. M., 2002. β Blocker therapy in heart failure. Scientific review. *Jama*, **287** (7): 883-889.
- Friedland, J., Silverstein, E., Drooker, M., Setton, C., 1981. Human lung angiotensin converting enzyme purification and antibody preparation. *The Journal of Clinical Investigation*, **67**(4): 1151-1160.
- Frishman, W. H., Charlap, S., 2003. Alpha and beta-adrenergic blocking drugs. *Cardiovascular Pharmacotherapeutics*, 2nd ed. New York McGraw-Hill. 67-97.
- Frohlich, E. D., 1977. Pathophysiology of propranolol in hypertension. *Southern Medical Journal*, **70** (1): 95-9.
- Fyhrequist, F., Riska, C.G., Forslund, T., Hortling, L., 1984. Physiological and pharmacological aspects of angiotensin converting enzyme. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology*, **79**: 39-43.
- Gallagher, S. R., 2006. One-dimensional SDS gel electrophoresis of proteins. *Current Protocols In Molecular Biology*, **75** (1): 10-2.
- Gavras, H., Brown, J. J., Lever, A. F., Macadam, R. F., Robertson, J. I. S., 1971. Acute renal failure, tubular necrosis and myocardial infarction induced into the rabbit by intravenous angiotensin-II. *The Lancet*, **298** (7714): 19-22.
- Gennaro, A.R., 1995. Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 19th Ed, Easton, PA, Mack Publishing Co, 2: 1048.
- Giles, T. D., Materson, B. J., Cohn, J. N., Kostis, J. B., 2009. Definition and classification of hypertension: an update. *The Journal of Clinical Hypertension*, **11** (11): 611-4.
- Gosse, P., Sheridan, D. J., Zannad, F., Dubourg, O., Guéret, P., Karpov, Y., de Leeuw, P. W., Palma-Gamiz, J. L., Pessina, A., Motz, W., 2000. Regression of left ventricular hypertrophy in hypertensive patients treated with indapamide SR 1.5 mg versus enalapril 20 mg: the LIVE study. *Journal of Hypertension*, **18** (10): 1465-1475.
- Gross, E., Rothstein, M., Dombek, S., Juknis, H. I., 2005. Effect of Spironolactone on Blood Pressure and the Renin-Angiotensin-Aldosterone System in Oligo-Anuric Hemodialysis Patients. *American Journal of Kidney Diseases*, **46** (1): 94-101.
- Grönhagen-Riska, C., Fyhrequist, F., 1980. Purification of human lung angiotensin-converting enzyme. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, **40** (8): 711-9.
- Gu, Q., Burt, V. L., Dillon, C. F., Yoon, S., 2012. Trends in antihypertensive medication use and blood pressure control among United States adults with hypertension: the National Health and Nutrition Examination Survey, 2001 to 2010. *Circulation*, **126** (17): 2105-14.

- Guyton, A. C., Hall, J. E., 2006. *Textbook of Medical Physiology*. 11th edition. Elsevier Saunders, Philadelphia. 1152.
- Gürdöl, F., Ademoğlu, E., 2010. *Biyokimya*. Nobel Tıp Kitapevi, Hadımköy, İstanbul. 691.
- Haddad, L. M., Winchester, J. F., 1990. *Clinical Management of Poisoning and Drug Overdose*. 2nd ed. W.B. Saunders Company, 1315-1326.
- Hage, D. S., Katz, E., Eksteen, R., Shoemakers, P., Miller, N., Dekker, M., 1998. Affinity chromatography. *In Handbook of HPLC*, 483–498.
- Hames, B. D., 1990, One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. In *"Gel Electrophoresis of Proteins. A Practical Approach"*. Oxford University Press, New York. 1-147.
- Hansson, L., Karlberg, B. E., Aberg, H., Westerlund, A., Henningsen, N. C., Jameson, S., 1976. Clinical evaluation of atenolol in hypertension. *Clinical Science and Molecular Medicine*, **3**: 513-515.
- Hara, A., Fukuyama, K., Epstein, W. L., 1982. Partial purification and characterization of angiotensin-converting enzyme in mouse and human skin. *The Journal of Investigative Dermatology*, **78** (6): 503-507.
- Hardman, J. G., Limbird, L. E., Molinoff, P. B., Ruddon, R. W., Gillman, A. G., 1996. *Goodman & Gilman's, The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9th Ed, 707–709.
- Harris, R. B., Ohlsson, J. T., Wilson, I. B., 1981. Purification of human serum angiotensin I-converting enzyme by affinity chromatography. *Analytical Biochemistry*, **111** (2): 227-234.
- Hartmann, A., Schwietzer, G., Stratmann, D., Kaltenbach, M., Kober, G., 1993. Effects of nitrendipine and lisinopril on blood pressure and sodium excretion in ciclosporin-associated hypertension after heart transplantation. *Cardiology*, **83** (3): 141-9.
- Hattori, M. A., Del Ben, G. L., Carmona, A. K., Casarini, D. E., 2000. Angiotensin I-converting enzyme isoforms (high and low molecular weight) in urine of premature and full-term infants. *Hypertension*, **35** (6): 1284-90.
- Hayek, T., Attias, J., Coleman, R., Brodsky, S., Smith, J., Breslow, J. L., Keidar, S., 1999. The angiotensin-converting enzyme inhibitor, fosinopril, and the angiotensin II receptor antagonist, losartan, inhibit LDL oxidation and attenuate atherosclerosis independent of lowering blood pressure in apolipoprotein E deficient mice. *Cardiovascular Research*, **44** (3):579-87.
- Henriksen, E. J., Jacob, S., 2003. Modulation of metabolic control by angiotensin converting enzyme (ACE) inhibition. *Journal of Cellular Physiology*, **196** (1): 171–179.
- Hockenhull, D. J. D., Herbert, D., 1945. The amylase and maltase of *Clostridium acetobutylicum*. *Biochemical Journal*, **39** (1): 102–106.
- 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., Keen, J., Pappin, D. J. C., Turner, A. J., 1987. Pig kidney angiotensin converting enzyme Purification and characterization of amphipathic and hydrophilic forms of the enzyme establishes C-terminal anchorage to the plasma membrane. *The Biochemical Journal*, **247** (1): 85-93.

- Hooper, N. M., Turner, A. J., 1987. Isolation of two differentially glycosylated forms of peptidyl-dipeptidase A (angiotensin converting enzyme) from pig brain: a re-evaluation of their role in neuropeptide metabolism. *Biochemical Journal*, **241** (3) 625-633.
- Hopper, N. M., 1991. Angiotensin converting enzyme: implication from molecular biology for its physiological functions. *The International Journal of Biochemistry*, **23** (7-8): 641-647.
- Hubert, C., Houot, A. M., Corvol, P., Soubrier, F., 1991. Structure of the angiotensin I-converting enzyme gene. Two alternate promoters correspond to evolutionary steps of a duplicated gene. *Journal of Biological Chemistry*, **266** (23): 15377-15383.
- İbrahim, M. M., Mossallam, R., 1981. Clinical evaluation of atenolol in hypertensive patients. *Circulation*, **64** (2): 368-74.
- Je, J. Y., Park, J. Y., Jung, W. K., Park, P. J., Kim, S. K., 2005. Isolation of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitor from fermented oyster sauce, *Crassostrea gigas*. *Food Chemistry*, **90** (4): 809-814.
- Josephson, S., Lännergren, K., Eklöf, A. C., 1992. Partial ureteric obstruction in weanling rats. II. Long-term effects on renal function and arterial blood pressure. *Urologia Internationalis*, **48** (4): 384-390.
- Kamp, R. M., Choli-Papadopoulou, T., Wittmann-Liebold, B., 1997. *Protein Structure Analysis Preparation, Characterization, and Microsequencing*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York in. 302.
- Katzung, B. G., 2004. *Basic and Clinical Pharmacology*, 9th ed, McGraw Hill: New York, 1604.
- Kayaalp, O., 2005. *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji* 1.cilt 11.baskı. Hacetepe Taş Dağıtım. 704.
- Kearney P. M., Whelton, M., Reynolds, K., Muntner, P., Whelton, P. K., He, J., 2005. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *The Lancet*, **365** (9455): 217-223.
- Keha, E., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2012. *Biyokimya*. 9. baskı. Aktif Yayınevi, Erzurum. 643.
- Kellner, R., Lottspeich, F., Meyer, H. E., 1999. *Microcharacterization of Proteins*, Second Edition. WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim. 514.
- Kiowski, W., Zuber, M., Elsassar, S., Erne, P., Pfisterer, M., Burkart, F., 1991. Coronary vasodilation and improved myocardial lactate metabolism after angiotensin converting enzyme inhibition with enalapril in patients with congestive heart failure. *American Heart Journal*, **122** (5): 1382-1388.
- Kish, W. S., Roach, M. K., Sachi, H., Naik, A. D., Menegatti, S., Carbonell, R. G., 2018. Purification of human erythropoietin by affinity chromatography using cyclic peptide ligands. *Journal of Chromatography B*, **15** (1085): 1-12.
- Koch-Weser, J., Frishman, W. H., 1981. Beta-adrenoceptor antagonists: New drugs and new indications. *New England Journal of Medicine*, **305** (9): 500-6.
- Krasney, J. A., Thompson, J. L., Lowe, R. F., 1967. Cardiac effects of angiotensin injections into perfused right coronary artery. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, **213** (1): 134-138.
- Krege, J. H., John, S. W. M., Langenbach, L. L., Hodgins, J. B., Hagaman, J. R., Bachman, E. S., Smithies, O., 1995. Male-female differences in fertility and blood pressure in ACE-deficient mice. *Nature*, **375** (6527): 146-148.

- Laemmli, U.K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227** (5259): 680-685.
- Laher, M. S., Donohoe, J. F., Kelly, J. G., Doyle, G. D., 1988. Antihypertensive and renal effects of lisinopril in older patients with hypertension. *The American Journal of Medicine*, **85** (3): 38-43.
- Laker, M. F., 1998. *Klinik Biyokimya*. Nobel tıp kitapevi, İstanbul, çeviri editörü (E. Ulukaya), 343.
- Lancaster, S. G., Todd, P. A., 1988. A Preliminary Review of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties, and Therapeutic Use in Hypertension and Congestive Heart Failure. *Drugs*, **35** (6): 646-669.
- Lanzillo, J. J., Fanburg, B. L., 1974. Membrane-bound Angiotensin-converting Enzyme from Rat Lung. *Journal of Biological Chemistry*, **249** (7): 2312-8.
- Lanzillo, J. J., Stevens, J., Dasarathy, Y., Yotsumoto, H., Fandburg, B. L., 1985. Angiotensin-converting enzyme from human tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, **260** (28): 14938-14944.
- Laragh, J. H., Baer, L., Brunner, H. R., Buhler, F. R., Sealey, J. E., Vaughan, E. D., 1972. Renin, angiotensin and aldosterone system in pathogenesis and management of hypertensive vascular disease. *The American Journal of Medicine*, **52** (5): 633-652.
- Lee, J. E., Bae, I. Y., Lee, H. G., Yang, C. B., 2006. Tyr-Pro-Lys, an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from broccoli (*Brassica oleracea Italica*). *Food Chemistry*, **99** (1): 143-148.
- Lemieux, G., L'Homme, C., 1983. The treatment of hypertension with indapamide alone or in combination with other drugs. *Current Medical Research and Opinion*, **8** (3): 87-92.
- Levine, T. B., Olivari, M. T., Cohn, J. N., 1986. Angiotensin converting enzyme inhibitors in congestive heart failure: overview in comparison of captopril and enalapril. *The American Journal of Medicine*, **81**(4): 36-39.
- Levy, D., Larson, M. G., Vasan, R. S., Kannel, W. B., Ho, K. K. L., 1996. The progression from hypertension to congestive heart failure. *Jama*, **275** (20): 1557-1562.
- Li, G. H., Le, G. W., Shi, Y. H., Shrestha, S., 2004. Angiotensin I – converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects. *Nutrition Research*, **24** (7): 469-486.
- Lima, S. G., Hatagima, A., Silva, N. L., 2007. Renin-angiotensin system: is it possible to identify hypertension susceptibility genes. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, **89** (6): 427-33.
- Lindholm, L. H., Carlberg, B., Samuelsson, O., 2005. Should b blockers remain first choice in the treatment of primary hypertension? A meta-analysis. *The Lancet*, **366** (9496): 1545-1553.
- Lindpainter, K., Ganten, D., 1991. The cardiac renin-angiotensin system: a synopsis of current experimental and clinical data. *Physiology*, **46** (3): 227-232.
- Lonn, E., Gerstein, H. C., Smieja, M., Mann, J. F. E., Yusuf, S., 2003. Mechanisms of cardiovascular risk reductions with ramipril: insights from HOPE and HOPE substudies. *European Heart Journal Supplements*, **5** (Suppl A): A43-A48.
- Loriaux, D. L., Menard, R., Taylor, A., 1976. Santen R. Spironolactone and endocrine dysfunction. *Annals of Internal Medicine*, **85** (5): 630-636.

- Ma, M. S., Bae, I. Y., Lee, H. G., Yang, C. B., 2006. Purification and identification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Food Chemistry*, **96** (1): 36-42.
- Macours, N., Vandingenen, A., Gielens, C., Hens, K., Baggerman, G., Schoofs, L., Huybrechts, R., 2003. Isolation of angiotensin converting enzyme from testes of *Locusta migratoria* (Orthoptera). *European Journal of Entomology*, **100** (4): 467-474.
- Maddison, J., Page, S., Church, D., 2008. *Small Animal Clinical Pharmacology*. 2nd Edition, 584.
- Marmo, E., Lampa, E., Rosatti, F., Berrino, L., Russo, S., Romano, A. R., Matera, C., 1985. Experimental analysis of antihypertensive properties of 5984 and its constituents: tertatolol and indapamide. *Drugs Under Experimental and Clinical Research*, **11** (10): 709–715.
- Maxwell, M. H., Brachfeld, J., Itskovitz, H., Lunn, J. A., Moser, M., Zawada, E. T., 1985. Blood pressure lowering and potassium conservation by triamterene-hydrochlorothiazide and amiloride-hydrochlorothiazide in hypertension. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, **37** (1): 61-65.
- Messerli, F. H., Grossman, E., 2004. β -blockers in hypertension: is carvedilol different. *The American Journal of Cardiology*, **93** (9): 7–12.
- 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.
- Mimran, A., Brunner, H. R., Turini, G. A., Waeber, B., Brunner, D., 1979. Effect of captopril on renal vascular tone in patients with essential hypertension. *Clinical Science*, **57** (5): 421-423.
- Morledge, J. H., 1983. Clinical efficacy and safety of indapamide in essential hypertension. *American Heart Journal*, **106** (1): 229-32.
- Moser, M., Zaret, B. L., Cohen, L. S., 1992. *Yale University School of Medicine Heart Book*, William Morrow & Co, New York, 149-166.
- Murdoch, D., Mc Tavish, D., 1992. Fosinopril. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in essential hypertension. *Drugs*, **43** (1):123-40.
- Mycek, M. J., Harvey, R. A., Chambe, P. C., 1997. *Farmakoloji*. 2.baskı Nobel tip kitap evi 462.
- N. T. P., 1993. Toxicology and Carcinogenesis Studies of Triamterene (CAS No. 396-01-0) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Feed Studies). *National Toxicology Program Technical Report Series*, **420**: 1-367.
- Nelson, D. L., Cox, M. M., 2000. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3rd ed. Worth Publishers, USA. 743.
- Nelson, E. B., 1986. Pharmacology of angiotensin converting enzyme inhibitors. *The American Journal of Medicine*, **81** (4): 13-18.
- Ng, K. K., Vane, J. R., 1967. Conversion of angiotensin-I to angiotensin-II. *Nature*, **216** (5117): 762-766.
- Northrup, J. H., 1934. Crystalline pepsin, VI: Inactivation by β - and γ -rays from radium and by ultraviolet light. *The Journal of General Physiology*, **17** (3): 359–363.

- O'Neil, M. J., 2006. *The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*. 14th ed. Whitehouse Station (NJ), 1340.
- Ohman, K. P., Karlberg, B. E., Nilsson, O. R., Wettre, S., 1981. Captopril in primary hypertension. Effects related to the renin-angiotensin-aldosterone and kallikrein-kinin systems. *Acta Medica Scandinavica*, **209** (646): 98-105.
- Omata, K., Kanazawa, M., Sato, T., Abe, F., Saito, T., Abe, K., 1996. Therapeutic advantages of angiotensin converting enzyme inhibitors in chronic renal disease. *Kidney International*, **55**: 57-62.
- Onat, T., Emerk, K., Sözmen, E., 2002. *İnsan Biyokimyası*. Palme Yayıncılık, Ankara. 711.
- Onat, T., Emerk, K., Sözmen, E., 2006. *İnsan Biyokimyası*. Palme Yayıncılık, Ankara. 813.
- Ondetti, M. A., 1977. Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: New class of orally active antihypertensive agents. *Science*, **196** (4288): 441-444.
- Oppenheim, G., 1983. Propranolol-induced depression: mechanism and management. *Australian & New Zealand Journal of Psychiatry*, **17** (4): 400-2.
- Oren, S., Messerli, F. H., Grossman, E., Garavaglia, G. E., Frohlich, E. D., 1991. Immediate and short-term cardiovascular effects of fosinopril, a new angiotensin-converting enzyme inhibitor, in patients with essential hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*, **17** (5): 1183-7.
- Page, C., Curtis, M., Sutter, M., Walker, M., Hoffman, B., 2002. *Integrated Pharmacology*, 2nd ed, Mosby: New York.
- Packer, M., Medina, N., Yushak, M., Lee, W. H., 1985. Comparative effects of captopril and isosorbide dinitrate on pulmonary arteriolar resistance and right ventricular function in patients with severe left ventricular failure: results of a randomized crossover study. *American Heart Journal*, **109** (6): 1293-1299.
- Pantoliano, M. W., Holmquist, B., Riordan, J. F., 1984. Affinity chromatographic purification of angiotensin converting enzyme. *Biochemistry*, **23** (5):1037-1042.
- Piepho, R.W., Beal, J., 2000. An overview of antihypertensive therapy in the 20th century. *The Journal of Clinical Pharmacology*, **40** (9): 967-77.
- 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. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, **9**: 36-42.
- Puig, J. G., Marre, M., Kokot, F., Fernandez, M., Jermendy, G., Opie, L., Moyseev, V., Scheen, A., Ionescu-Tirgoviste, C., Saldanha, M. H., 2007. Efficacy of indapamide SR compared with enalapril in elderly hypertensive patients with type 2 diabetes. *American Journal of Hypertension*, **20** (1): 90-97.
- 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.
- Quirós, A., Ledesma, B. H., Ramos, M., Amigo, L., Recio, I., 2005. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Activity of Peptides Derived from Caprine Kefir. *Journal of Dairy Science*, **88** (10): 3480-7.

- Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M., Moore, P. K., 2001. *Pharmacology*, 4th ed, Churchill Livingstone: New York.
- Ravazzi, C. G., Krambeck Franco, M. O., Vieira, M. C. R., Suarez, W. T., 2018. Smartphone application for captopril determination in dosage forms and synthetic urine employing digital imaging. *Talanta*, **189**: 339-344.
- Reddy, P., Mooradian, A. D., 2009. Diuretics: an update on the pharmacology and clinical uses. *American Journal of Therapeutics*, **16** (1): 74-85.
- Reyes, A. J., Leary, W. P., 1983. Indapamide: a review. *South African Medical Journal*, **19**: 1-6.
- Rhodes, D. G., Robert, E., Bossio, R. E., Laue, T. M., 2009. Determination of size, molecular weight, and presence of subunits. *In Methods In Enzymology*, **463**: 691-723.
- Rigatto, K. V., Bohlke, M., Irigoyen, M. C., 2004. Sistema renina angiotensina: da fisiologia ao tratamento. *Rev Soc Cardiol do Rio Grande do Sul*, **3**: 1-5.
- Robles, N. R., Angulo, E., Grois, J., Barquero, A., 2003. Comparative Effects of Fosinopril and Irbesartan on Haematopoiesis in Essential Hypertensives. *Renal Failure*, **26** (4): 399-404.
- Roque, A. C., Lowe, C. R., 2008. Affinity chromatography: History, perspectives, limitations and prospects. *Methods In Molecular Biology*, **421**: 1-21.
- Rosenthal, T., Ben-Aire, J., Carroll, J., Fiedel, J., Kisch, E., Leiba, M., Traub, Y., 1995. Improving quality of life in patients with hypertension: lisinopril as a replacement therapy. *Current Therapeutic Research*, **56** (1): 57-61.
- Sabeur, K., Vo, A. T., Ball, B. A., 2001. Characterization of angiotensin-converting enzyme in canine testis. *Reproduction*, **122** (1): 139-146.
- Sakharov, I. Y., Danilov, S. M., Dukhanina, E. A., 1987. Affinity chromatography and some properties of the angiotensin converting enzyme from human heart. *Biochimica et Biophysica Acta*, **923** (1): 143-149.
- Santos, R. A. S., Ferreira, A. J., Pinheiro, S. V. B., 2006. In: Brandão AA, Amodeo C, Nobre F, Fuchs FD. *Hipertensão. Rio de Janeiro: Elsevier*, 66-75.
- Saraswathy, N., Ramalingam, P., 2011. Concepts and Techniques in Genomics and Proteomics. *Concepts and Techniques in Genomics and Proteomics*, 147-158.
- Schmidt E., Melchert, W. R., Rocha, F. R. P., 2009. Flow-injection iodimetric determination of captopril in pharmaceutical preparations. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **20** (2): 236-242.
- Scopes, R., 1993. *Protein Purification: Principles and Practice* 3rd ed.. New York: Springer, 375.
- Shapiro, A. L., Viñuela, E., Maizel, J. V. Jr., 1967. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **28** (5): 815-20.
- Shionoiri, H., Naruse, M., Minamisawa, K., Ueda, S., Himeno, H., Hiroto, S., Takasaki, I., 1997. Fosinopril. Clinical pharmacokinetics and clinical potential. *Clinical Pharmacokinetics*, **32** (6): 460-80.
- Sica, D. A., 2005. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of mineralocorticoid blocking agents and their effects on potassium homeostasis. *Heart Failure Reviews*, **10** (1): 23-9.

- Simons, P. C., Vander, J. D. L., 1977. Purification of glutathione S-transferases from human liver by glutathione-affinity chromatography. *Analytical Biochemistry*, **82** (2): 334-41.
- Siyad, A. R., 2011. Hypertension. *Hygeia J. D. Med*, **3** (1): 1-16.
- Skeggs, L. T., Kahn, J. R., Shumway, N. P., 1956. The preparation and function of the hypertensionconverting enzyme. *Journal of Experimental Medicine*, **103** (3): 295–299.
- Smith, U., 1980. Adrenergic control of human adipose tissue lipolysis. *European Journal of Clinical Investigation*, **10** (5): 343-344.
- Sokolow, M., Mclroy, M. B., 1986. *Clinical Cardiology*. 4 ncü baskı, Lange Medical Publication, Los Altos, California. 317.
- 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.
- Studier, F. W., 1973, Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. *Journal of Molecular Biology*, **79** (2): 237-248.
- Sturrock, E. D., Natesh, R., Van Rooyen, J. M., Acharya, K. R., 2004. Structure of angiotensin I-converting enzyme. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **61** (21): 2677-86.
- Sukalo, A., Deljo, D., Krupalija, A., Zjajo, N., Kos, S., Curic, A., Divkovic, G., Hubjar, S., Smailagic, M., Hodzic, E., Marjanovic, D., Medjedovic, S., 2016. Treatment of Hypertension with Combination of Lisinopril/Hydrochlorothiazide. *Medical Archives*, **70** (4): 299–302.
- Sweitzer, N. K., 2003. What Is an Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor. *Circulation*, **108** (3): 16-18.
- Takada, Y., Hiwada, K., Kokubu, T., 1981. Isolation and Characterization of Angiotensin Converting Enzyme from Human Kidney. *The Journal of Biochemistry*, **90** (5): 1309-19.
- Takenaka, T., 2011. Properties of Angiotensin I -Converting Enzyme(ACE). *Soybean - Biochemistry, Chemistry and Physiology*, 642.
- Teerlink, J. R., Massie, B. M., 2000. The role of β -blockers in preventing sudden death in heart failure. *Journal of Cardiac Failure*, **6** (2): 25–33.
- Thevananther, S., Brecher, A. S., 1999. Isolation of angiotensin converting enzyme (ACE) binding protein from human serum with an ACE affinity column. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, **77** (3): 216-23.
- Todd, P. A., Heel, R. C., 1986. Enalapril: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in hypertension and congestive heart failure. *Drugs*, **31** (3): 198-248.
- Tsalia, D., Anastasakis, E., Papadogiannis, D. E., 2008. Beta-Blockers in the Treatment of Hypertension: Latest Data and Opinions. *Hellenic Journal Cardiology*, **49** (1): 37-47.
- Tu, W., He, Z., Decker, B. S., Pratt, J., 2015. Triamterene Enhances the Blood Pressure Lowering Effect of Hydrochlorothiazide in Patients with Hypertension. *Journal of General Internal Medicine*, **31** (1): 30-36.
- Urh, M., Simpson, D., Zhao, K., 2009. Affinity chromatography: general methods. *In Methods In Enzymology*, **463**: 417-438.

- Vandenbulcke, F., Laurent, V., Verger-Bocquet, M., Stefano, G. B., Salzet, M., 1997. Biochemical identification and ganglionic localization of leech angiotensin-converting enzymes. *Molecular Brain Research*, **49** (1-2): 229–237.
- Varady, L., Mu, N., Yang, Y. B., Cook, S. E., Afeyan, N., Regnier, F. E., 1993. Fimbriated stationary phases for proteins. *Journal of Chromatography A*, **631**(1-2): 107–114.
- Vargas, F., Fuentes, A., Sequera, J., Méndez, H., Fraile, G., Velásquez, M., 1998. In Vitro Approach to investigating the phototoxicity of the diuretic drug triamterene. *Toxicol In Vitro*, **12** (6): 661–7.
- VACSG., 1977. Propranolol in the treatment of essential hypertension. *Jama*, **237** (21): 2303–2310.
- Vidt, D. G., Bravo, E. L., Fouad, F. M., 1982. Captopril. *New England Journal of Medicine*, **306** (4): 214–219.
- Volz, E. M., Felker, G. M., 2009. How to use diuretics in heart failure. *Current Treatment Options In Cardiovascular Medicine*, **11** (6): 426-32.
- Waeber, B., Brunner, H. R., Brunner, D. B., Curtet, A. L., Turini, G. A., Gavras, H., 1980. Discrepancy between antihypertensive effect and angiotensin converting enzyme inhibition by captopril. *Hypertension*, **2** (2): 236-42.
- Wander, G. S., ChhabraS. T., Kaur, K., 2009. Atenolol Drug Profile. *Supplement of Japi*, **57**: 13-14.
- Wang, Y. R., Alexander, G. C., Stafford, R. S., 2007. Outpatient hypertension treatment, treatment intensification, and control in Western Europe and the United States. *Archives of Internal Medicine*, **167** (2): 141–7.
- Weidmann, P., Vehlinger, D. E., Gerber, A., 1985. Anti-hypertensive treatment and serum lipoproteins. *Journal of Hypertension*, **3** (4): 297-306.
- Wheley, M. S., Bolton, J. C., Campbell, D. B., 1982. Indapamide in hypertension: a study in general practice of new or previously poorly controlled patients. *Pharmatherapeutica*, **3** (2): 143-52.
- Whitaker, J. R., 1963. Determination of Molecular Weights of Proteins by Gel Filtration of Sephadex. *Analytical Chemistry*, **35** (12): 1950-1953.
- Wikstrand, J., Warnold, I., Olsson, G., Tuomilehto, J., Elmfeldt, D., Berglund, G., 1988. Primary prevention with metoprolol in patients with hypertension. Mortality results from the MAPHY study. *Jama*, **259** (13): 1976-1982.
- Wile, D., 2012. Diuretics: a review. *Annals of Clinical Biochemistry*, **49** (5): 419–431.
- Wu, H., He, H. L., Chen, X. L., Sun, C. Y., Zhang, Y. Z., Zhou, B. C., 2008. Purification and identification of novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from shark meat hydrolysate. *Process Biochemistry*, **43** (4): 457-461.
- Wu, J., Ding, X., 2001. Hypotensive and physiological effect of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from soy protein on spontaneously hypertensive rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49** (1): 501-6.
- Yang, Y., Marczak, E. D., Yokoo, M., Usiu, H., Yoshikawa, M., 2003. Isolation and Antihypertensive Effect of Angiotensin-I-Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Peptides from Spanach Rubisco. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51** (17): 4897-4902.

- Yatohgo, T., Izumi, M., Kashiwagi, H., Hayashi, M., 1988. Novel Purification of Vitronectin from Human Plasma by Heparin Affinity Chromatography. *Cell Structure and Function*, **13** (4): 281-292.
- Zisaki, A., Miskovic, L., Hatzimanikatis, V., 2015. Antihypertensive Drugs Metabolism: An Update to Pharmacokinetic Profiles and Computational Approaches. *Current Pharmaceutical Design*, **21** (6): 806–822.





ÖZ GEÇMİŞ

1981 yılında Gaziantep’te doğdu. İlk ve orta öğrenimini Gaziantep’te tamamladı. 2002 yılında Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü’nü kazandı ve 2009 yılında aynı bölümden mezun oldu. 2009 yılı güz döneminde Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü’nde yüksek lisans öğrenimine başladı. 2012 yılı bahar döneminde yüksek lisans öğreniminden mezun oldu. 2013 yılı bahar döneminde Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Ana Bilim Dalı’nda doktora öğrenimine başladı.



T.C
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
LİSANSÜSTÜ TEZ ORJİNALLİK RAPORU

Tarih: 31/01/2019

Tez Başlığı / Konusu: **Afinite Kromatografisi Yöntemiyle Sığır Akciğerinden Saflaştırılan Anjiotensin Konverting Enzim Üzerine Hipertansiyonu Önleyici Bazı Etken Maddelerin İn Vitro Etkisinin Araştırılması**

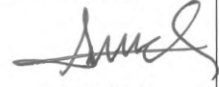
Yukarıda başlığı/konusu belirlenen tez çalışmamın Kapak sayfası, Giriş, Ana bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan toplam 122 sayfalık kısmına ilişkin, 31/01/2019 tarihinde şahsım tarafından intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtreleme uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 2 (iki) dir.

Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:

- Kabul ve onay sayfası hariç,
- Teşekkür hariç,
- İçindekiler hariç,
- Simge ve kısaltmalar hariç,
- Gereç ve yöntemler hariç,
- Kaynakça hariç,
- Alıntılar hariç,
- Tezden çıkan yayınlar hariç,
- 7 kelimededen daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit inatch size to 7 words)

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.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.



31/01/2019
Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Fatih KARAHAN

Öğrenci No:12911220086

Anabilim Dalı:Kimya

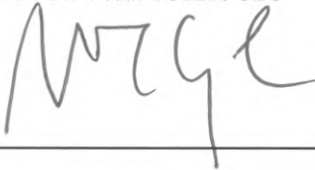
Programı: Biyokimya

Statüsü: Y. Lisans

Doktora

DANIŞMAN ONAYI
UYGUNDUR

Prof. Dr. Vedat TÜRKÖĞLU



ENSTİTÜ ONAYI
UYGUNDUR

Prof. Dr. Suat ŞENSOY
Enstitü Başkanı

(Unvan, Ad Soyad, İmza)