



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**LİTYUMUN KARBONİK ANHİDRAZ II ENZİM
AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

İlhan İRENDE

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Ahmet ALVER

TRABZON – 2019



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**LİTYUMUN KARBONİK ANHİDRAZ II ENZİM
AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

İlhan İRENDE

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Ahmet ALVER

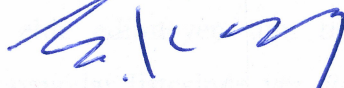
TRABZON – 2019

ONAY

Bu tez Yüksek Lisans Standartlarına Uygun Bulunmuştur

Prof. Dr. Süleyman Caner KARAHAN

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı



(İmza)

Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi İlhan İRENDE'nin hazırladığı '**Lityumun Karbonik Anhidraz II Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi**' başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Prof. Dr. Ahmet ALVER

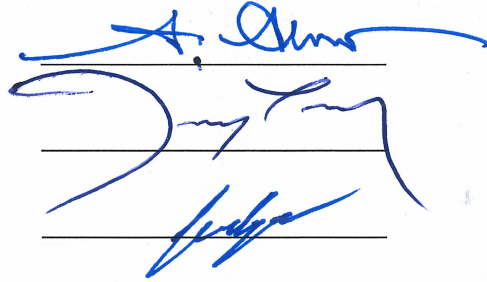


Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Ahmet ALVER

Doç. Dr. İbrahim TURAN

Dr. Öğr. Üyesi Fulya B. YÜCESAN



Tarih: .../.../201...

Bu tez KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .../.../... tarih ve ... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....

Prof. Dr. Ersan KALAY

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Tarih: .../.../20...

İlhan İRENDE

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca bana her konuda destek olan ve bu çalışmam süresince maddi ve manevi destek ve yardımlarını esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Ahmet ALVER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bilgi ve birikimlerinden her zaman yararlandığım değerli hocalarım Prof. Dr. Eşref Edip KEHA'ya, Prof. Dr. Orhan DEĞER'e Prof. Dr. Süleyman Caner KARAHAN'a, Prof. Dr. Asım ÖREM'e, Prof. Dr. Birgül KURAL'a, Doç. Dr. Ahmet MENTEŞE'ye ve Dr. Öğr. Üyesi Fulya BALABAN YÜCESAN'a teşekkür ederim.

Her zaman desteğini hissettiğim Ordu Üniversitesi Kimya Bölümü Öğretim Görevlisi, çok kıymetli hocam ve dostum Dr. Kadir AKSU'ya, deneylerin yürütülmesi sırasında değerli yardımlarını esirgemeyen Öğr. Gör. Yeşim SELVİ'ye, Araş. Gör. Elif ŞAHİN'e ve Yüksek Lisans öğrencisi Çınar ZİHNİ'ye, Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki tüm araştırma görevlisi, doktora ve yüksek lisans öğrencisi arkadaşlarıma ayrıca Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına teşekkür ederim.

Ayrıca, öğrenim hayatım boyunca maddi ve manevi yönden hiçbir desteğini esirgemeyen ve her zaman yanımda olan sevgili anneme, ağabeylerime, ablalarım ve kardeşime teşekkürü bir borç bilirim.

İlhan İRENDE

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL ve ONAY	
BEYAN	
TEŞEKKÜR	
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
KISALTMA SİMGE ve FORMÜLLER DİZİNİ	x
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	4
4.1. Lityum	4
4.1.1. Lityumun Tıpta Kullanımı	5
4.1.2. Lityumun Etki Mekanizması	6
4.1.3. Lityumun Farmakokinetik Özellikleri	7
4.1.4. Lityumun Toksisitesi	8
4.2. Karbonik Anhidraz (CA)	10
4.2.1. Karbonik Anhidraz II (CA II)	11
4.2.2. Karbonik Anhidraz Aktivitesi Tayin Yöntemleri	12
4.2.2.1. Karbonik Anhidraz CO ₂ -Hidrataz Mekanizması	13
4.2.3. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri (CAİ)	14
4.2.4. Karbonik Anhidraz Aktivatörleri	15
4.2.5. Ağır Metallerin Karbonik Anhidraz Enzimi Üzerine Etkileri	15
5. GEREÇ ve YÖNTEM	17
5.1. Gereç	17
5.1.1. Kullanılan Cihazlar, Alet ve Malzemeler	17
5.1.2. Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler	17
5.2. Yöntem	20
5.2.1. Karbonik Anhidraz Hidrataz Aktivitesi	20
5.2.1.1. Karbonik Anhidraz Hidrataz Aktivitesi Üzerine Lityumun Etkisi	20

5.2.2. Karbonik Anhidraz Esteraz Aktivitesi Tayini	21
5.2.2.1. Karbonik Anhidrazın Esteraz Aktivitesi Üzerine Lityumun Etkisi	22
6. BULGULAR	23
6.1. CA II Hidrataz Aktivitesi Sonuçları	23
6.2. CA II Esteraz Aktivitesi Sonuçları	24
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	27
8. KAYNAKLAR	30
9. ÖZGEÇMİŞ	36



TABLULAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 1. Lityumun fiziksel ve kimyasal özellikleri	4
Tablo 2. Lityumun genel farmakokinetik özellikleri	8
Tablo 3. Lityumun başlıca yan etkileri	9
Tablo 4. α -CA ailesinin yerleşimi, aktivitesi ve işlevi	11
Tablo 5. Kullanılan cihazlar ve laboratuvar malzemelerinin özellikleri	17
Tablo 6. Kullanılan kimyasal maddeler üretici firmalar ve ürün kodları	18
Tablo 7. Tez çalışmalarında kullanılan çözeltiler, hazırlanışları ve kullanıldığı yerler	19
Tablo 8. Karbonik anhidraz hidrataz aktivitesi ölçümünde kullanılan reaktiflerin ve inhibitörlerin konsantrasyon ve hacimleri	21
Tablo 9. Karbonik anhidraz esteraz aktivitesi ölçümünde kullanılan reaktiflerin ve inhibitörlerin konsantrasyon ve hacimleri	22
Tablo 10. Lityumun CA II hidrataz aktivitesi inhibisyon oranları	23
Tablo 11. Asetazolamidin CA II hidrataz aktivitesi inhibisyon oranları	24
Tablo 12. Lityumun CA II esteraz aktivitesi inhibisyon oranları	25
Tablo 13. Asetazolamidin CA II esteraz aktivitesi inhibisyon oranları	26

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1. Lityumun etki mekanizması	7
Şekil 2. Karbonik anhidraz II'nin katalizlediği CO ₂ -hidrasyon reaksiyonunun mekanizması	14
Şekil 3. Lityumun konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak CA hidrataz aktivitesindeki değişiklikleri gösteren grafik	23
Şekil 4. Asetazolamid konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak CA hidrataz aktivitesindeki değişiklikleri gösteren grafik	24
Şekil 5. Lityumun konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak CA esteraz aktivitesindeki değişiklikleri gösteren grafik	25
Şekil 6. Asetazolamid konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak CA esteraz aktivitesindeki değişiklikleri gösteren grafik	25

KISALTMA, SİMGE ve FORMÜLLER DİZİNİ**Kısaltmalar**


Akt-1	Serin treonin protein kinaz B
Ast	Asetazolamid
CA	Karbonik anhidraz
CAİ	Karbonik anhidraz inhibitörleri
CARP	Karbonik anhidraz benzeri protein
DMSO	Dimetilsülfoksit
E	Enzim
EC	Enzim kodu
EU	Enzim ünitesi
FDA	Amerikan Federal İlaç ve Gıda Dairesi
GSK3β	Glikojen sentaz kinaz 3 β
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazin etan sülfonik asit
IC₅₀	Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
IMP	İnozitol monofosfataz
Kcat	Enzimlerin katalitik verimliliği
K_i	İnhibitör sabiti
PI3K	Fosfoinozitol-3-kinaz
Tris	Trihidroksimetilaminometan

Simgeler

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
δ	Delta
ϵ	Epsilon

Formüller

CO₂	Karbondioksit
-COOH	Karboksil grubu
HCl	Hidroklorik asit
H₂SO₄	Sülfirik asit
HCO₃⁻	Bikarbonat
Li₂CO₃	Lityum karbonat
NaOH	Sodyum hidroksit
-OH	Hidroksil grubu
-SH	Sülfidril grubu



1. ÖZET

Lityumun Karbonik Anhidraz II Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

Lityum, sinir ve kas hücrelerindeki sodyum transportunu değiştiren bir metaldir. Lityum karbonat, bir lityum tuzu olup lityum iyonu kaynağı olarak kullanılır. Lityum karbonat, bipolar I bozukluk (manik atak ve koruyucu tedavisinde ve depresif ataklarda), bipolar II bozukluk, siklotimik bozukluk, yineleyici majör depresif bozukluk, akut ve şizoaffektif bozukluklarda oldukça yaygın olarak kullanılan bir ilaştır. Karbonik anhidraz (CA) karbondioksitin hidrasyonunu dönüşümlü olarak katalizleyen bir metalloenzimdir. Memelilerde geniş bir doku dağılımına sahiptir ve şimdiye kadar onaltı farklı izoenzim tanımlanmıştır (CAI-XVI). Katalizlediği reaksiyon ile asit baz dengesinin düzenlenmesi, elektrolit sekresyonu, karbondioksitin taşınması gibi bir çok fizyolojik olayda rol alır. Karbonik anhidraz inhibitörleri epilepsi, glokom gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Bazı metal iyonları da karbonik anhidraz aktivitesini inhibe etmektedir. Bu çalışmada lityumun CA II'ye etkisi *in vitro* olarak incelendi. Karbonik anhidrazın hidrataz ve esteraz aktiviteleri, enzimin 3 farklı lityum konsantrasyonlarında (0.1, 0.01, 0.001 M) inkübe edilmesiyle, potansiyometrik ve spektrofotometrik olarak ölçüldü. Güçlü bir karbonik anhidraz inhibitörü olan asetazolamidin 3 farklı konsantrasyonu (0.1, 0.01, 0.001 mM) pozitif kontrol olarak kullanıldı. Lityum çözeltilerindeki CA hidrataz aktivitesi ise IC₅₀ değeri 0.325M, esteraz aktivitesi için IC₅₀ değeri 1.095 M olarak ölçüldü. Elde edilen bulgular neticesinde lityumun karbonik anhidraz II izoenzimini az da olsa inhibe ettiği ancak bunun anlamlı bir değer taşımadığı kanaatine varıldı.

Anahtar Sözcükler: Asetazolamid, Esteraz aktivitesi, Hidrataz aktivitesi, Karbonik anhidraz II, Lityum

2. SUMMARY

Investigation of the Effects of Lithium on Enzyme Activity of Carbonic Anhydrase II

Lithium is a metal changes the transport of sodium in nerve and muscle cells. Lithium carbonate is a lithium salt and used as a lithium ion source. Lithium carbonate is a drug widely used in bipolar I disorder (in manic attack and prophylactic treatment and depressive attacks), bipolar II disorder, cyclothymic disorder, recurrent major depressive disorder, acute and schizoaffective disorders. Carbonic anhydrase (CA) is a metalloenzyme that alternately catalyzes the hydration of carbon dioxide. It has a wide tissue distribution in mammals and so far sixteen different isoenzymes have been identified (CAI-XVI). The catalyzed reaction is involved in many physiological events such as regulation of acid base balance, electrolyte secretion and transport of carbon dioxide. Carbonic anhydrase inhibitors are used in the treatment of various diseases such as epilepsy and glaucoma. Some metal ions also inhibit carbonic anhydrase activity. In this study, the effect of lithium on the CA II isoenzyme, was investigated *in vitro*. Hydratase and esterase activities of carbonic anhydrase were measured potentiometric and spectrophotometrically by incubating the enzyme at three different lithium concentrations (0.1, 0.01, 0.001 M). Three different concentrations of acetazolamide (0.1, 0.01, 0.001 mM), a potent carbonic anhydrase inhibitor, were used as positive control. The IC₅₀ value for CA hydratase activity in lithium solutions was 0.325M and value for esterase activity as 1.095 M. As a result of the findings, it was concluded that lithium inhibited carbonic anhydrase II isoenzyme slightly but it did not have a statistically significant value.

Key Words: Acetazolamide, Carbonic anhydrase II, Esterase activity, Hydratase activity, Lithium

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Lityum, kas ve sinir hücrelerindeki sodyumun taşınma sistemini değiştiren bir metaldir. Lityum karbonat (Li_2CO_3), lityum iyonu kaynağı olarak kullanılan bir lityum tuzudur. Li_2CO_3 , bipolar I ve II bozukluk, siklotimik, yineleyici majör depresif, akut ve şizoaffektif bozukluklarda oldukça yaygın olarak kullanılan bir ilaçtır (1).

Karbonik anhidraz (CA) karbondioksitin hidrasyonunu dönüşümlü olarak katalizleyen bir metalloenzimdir. Memelilerde geniş bir doku dağılımına sahiptir ve şimdiye kadar 16 farklı izoenzim tanımlanmıştır (CAI-XVI). Katalizlediği reaksiyon ile asit-baz dengesinin düzenlenmesi, elektrolit sekresyonu, karbondioksitin taşınması, kalsifikasyon ve biyosentez mekanizmaları gibi bir çok fizyolojik olayda rol alır (2).

1940 yılında sinir dokusundaki aktivitesi ispat edilen CA enzimi, beyin destek hücreleri, merkezi sinir sistemi akson ve kapiler borularında ve göz sinir ağı hücrelerinde yerleşmektedir. CA II, CA III, CA IV ve CA VII izoenzimleri ise merkezi sinir sisteminde yer almaktadır. Bu izoenzimlerin görevleri ise birbirinden farklıdır. CA enzimi, beyin omurilik sıvısının üretimi ve bu sıvının iyonik bileşimi ile pH'sının ayarlanmasında aktif rol oynar (3).

CA inhibitörlerinin epilepsi (sara), glokom gibi bazı hastalıkların tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir. Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ag^+ , Cd^{2+} ve Pb^{2+} gibi bazı metal iyonları karbonik anhidraz aktivitesini inhibe etmektedir (4).

Bu çalışmada CA'nın en yaygın doku dağılımına sahip izoenzimlerinden olan CA II ye etkisi *in vitro* olarak incelendi. Lityum, hastalarda genel olarak 300 mg'lık tabletler halinde günde 3 kez kullanılmaktadır. Karbonik anhidrazın hidrataz ve esteraz aktiviteleri, enzimin farklı lityum konsantrasyonlarında inkübe edilmesiyle, potansiyometrik ve spektrofotometrik olarak ölçüldü. Güçlü bir karbonik anhidraz inhibitörü olan asetazolamit de pozitif kontrol olarak kullanıldı. Elde edilen sonuçların bipolar hastalıkların tedavisinde kullanılan Lityumun etki mekanizmalarını ortaya konmasında veya Lityum kullanımına bağlı yan etkilerin açıklanmasında literatüre katkı sağlaması hedeflenmektedir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Lityum

Lityumun ilk tanımlanması 19. yüzyılda Johan August Arfvedson'un spodümen [$\text{LiAl}(\text{Si}_2\text{O}_6)$] olarak adlandırılan mineral üzerinde yaptığı çalışmalar neticesinde olmuştur. Lityum, en düşük yoğunluğa sahip metaldir. Atom numarası 3, atom ağırlığı ise 6.941'dir (1). Lityumun fiziksel ve kimyasal özellikleri Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Lityumun fiziksel ve özellikleri (Ober'den, 5)

Fiziksel Özellikleri

Yoğunluğu	: 0.535 g/ml
Erime Noktası	: 180.54 °C
Kaynama Noktası	: 1342 °C
Molar Hacmi	: 13.02 ml/mol
Isı İletkenliği	: 0.85 W cm ⁻¹ K ⁻¹
Özgül Isı	: 3.582 J g ⁻¹ K ⁻¹
Buharlaşma Entalpisi	: 147 kJ mol ⁻¹
Atomlaşma Entalpisi	: 159 kJ mol ⁻¹

Kimyasal Özellikleri

Kabuk Yapısı	: 2.1
Elektron İlgisi	: 59.6 kJ/mol ⁻¹
Elektronegatiflik	: 0.98 (Pauling birimi) : 0.89 (Sanderson elektronegatifliğine göre)
Atomik Yarıçapı	: 145 pm (167 pm hesaplama ile)
İyonlaşma enerjileri	
I. iyonlaşma Enerjisi	: 520.2 kJ/mol
II. iyonlaşma Enerjisi	: 7298.1 kJ/mol
III. iyonlaşma Enerjisi	: 11815 kJ/mol
Oksidasyon sayısı	: 1.indirgenme Potansiyeli: E ₀ = -3.040 volt

Tüm alkali metaller gibi bir değerlik elektronu bulunan lityum, bu tek elektronunu kaybederek pozitif iyon haline geçer. Oldukça yumuşak ve gümüş renginde bir metal olan lityum kısa sürede reaksiyona girdiğinden doğada saf halde değil bileşikleri halinde bulunur (6).

Lityum, alkali metaller grubu içinde en yüksek erime ve kaynama noktasına sahiptir. Doğada madenlere karışmış halde veya çok küçük miktarlarda yeraltı suları, deniz suyu, deniz ürünleri ve tuzları biçiminde bitki ve hayvan dokularında yer alır. İnsan vücudunda ise doğal olarak eser miktarlarda bulunur (7).

4.1.1. Lityumun Tıpta Kullanımı

Lityum, tıpta ilaç olarak ilk kez 1800'lü yılların ortalarında kullanılmaya başlanmıştır. A. Lipowitz ve Alexander Ure, *in vitro* olarak yaptıkları çalışmalarda lityum çözeltilerinin ürik asit kristallerini çözdüğünü keşfetmişlerdir. Bu keşfin ardından lityum, mesanedeki ürik asit taşlarının tedavisi ve gut hastalarında ürik asit çökelti tedavisi için kullanılmıştır (8, 9).

19. yüzyılın ikinci yarısından sonra, ürik asit dengesindeki bozulmanın pek çok hastalığa neden olabileceği görüşü yaygınlık kazanmış, böylece lityumun kullanım alanı da hızla genişlemiştir. Başta mesane yangısı olmak üzere böbrek taşları, angina, romatizmal hastalıklar, hipertansiyon, dispepsi, astım ve baş ağrısı gibi pek çok durumlarda kullanılmaya başlanmıştır (10).

Lityum, 1974 yılında, Amerikan Federal İlaç ve Gıda Dairesi'nden (FDA) ilaç olarak onaylanmıştır. Lityum, bipolar bozukluk tedavisi başta olmak üzere siklotimi, yineleyici depresyon, şizoaffektif bozukluk gibi çeşitli ruhsal hastalıkların tedavisinde kullanılan bir duygu durum düzenleyicisidir (11-13).

Lityumun psikiyatri alanındaki ilk kullanımını ise Armand Trousseau ve Alexander Haig'in depresif hastalarda lityumun etkin bir seçenek olabileceğini ileri sürmeleri sonra gerçekleştirmiştir. William A. Hammond ise lityumun manik hastalarda da etkin olduğunu gözlemlemiştir. Ancak, tedavi edici etkileri ile birlikte çeşitli yan etkileri de gözlenen lityumun toksik etkileri ortaya çıkmış ve ölümler de rapor edilmiştir (14). Buna rağmen lityum, çeşitli ruhsal hastalıkların tedavisi için dünya genelinde yaygın olarak kullanılan önemli bir ilaç olma özelliğini sürdürmektedir (10).

4.1.2. Lityumun Etki Mekanizması

Yıllardır ilaç olarak kullanılan lityumun etki mekanizması tam olarak açıklanamasa da bazı mekanizmalar ileri sürülmüştür (14, 15).

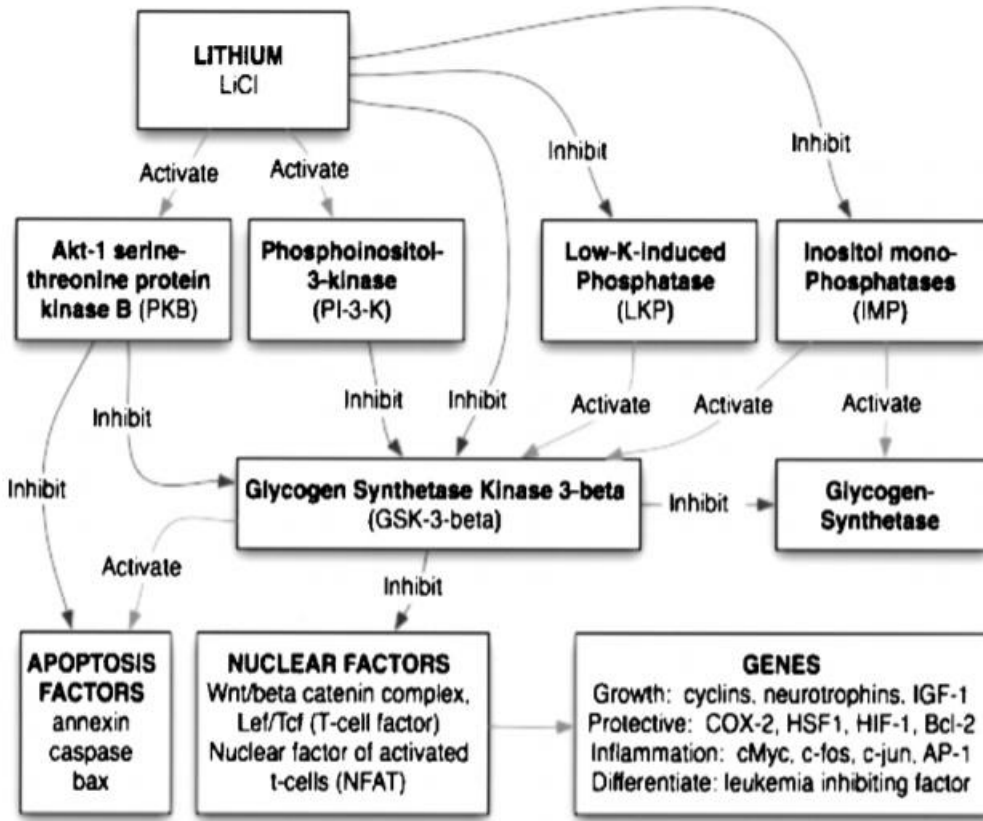
Düzenli lityum ve sodyum valproat alımlarının sıçanların beyininde miyoinozitol düzeyini azalttığı inozitolmonofosfatı ise artırdığı görülmüştür (16). Fosfoinozitol-3-kinazın (PI3K) glikojen sentaz kinaz 3β'yı (GSK3β) fosforilleyerek inhibe ettiği, (17, 18) PI3K inhibisyonunun nöron azalmasını, aktivasyonunun ise çoğalmasını sağladığı aynı zamanda PI3K'nin hücreler arası bağlantıdaki gap junctionları düzenlediği bildirilmiştir (19).

Lityum, serin treonin protein kinaz B'yi (Akt-1) aktifleştirir, Akt-1 de GSK3β'yı inhibe eder. Akt-1 apoptotik ve yaşamsal yollarda önemli bir protein kinazdır (20, 21).

Düşük K (potasyum)-uyarılmış fosfataz da dâhil olmak üzere birçok sitozolik fosfatazı inhibe ettiği belirtilen lityumun sıçan beyinciklerindeki granül hücrelerini düşük ekstraselüler potasyum düzeylerinde apoptozise karşı koruduğu tespit edilmiştir (22).

Lityumun 150 yıl önce inozitol fosfatı serbest inozitole enzimatik olarak çevirdiği ve inozitol monofosfataz (IMP) inhibisyonuna katkı sağladığı keşfedilmiştir (23). Düzenli lityum uygulamasının IMP sentezini beyinde paradoksal olarak artırdığı belirlenmiştir (24). Yıllar boyunca fosfoinozitol azalmasının lityumun etki mekanizmalarının nedeni olduğuna düşünülmüştür. Ancak en son yapılan çalışmalarda bunun lityum mekanizmalarından olmadığı ileri sürülmüştür (25). IMP'nin santral sinir sisteminde mitokondriyal biyogenezi uyaran otofajide önemli bir rol oynadığı belirtilmektedir (26).

72 saat süresince lityum ile muamele edilen insan lenfosit hücrelerinde Na/K pompa sayısının belirgin bir şekilde arttığı tespit edilmiştir. Öte yandan lityumun, insan lenfositlerindeki guanilat siklaz enziminin güçlü bir inhibitörü olduğu bilinmektedir (27). İnhibisyon etkisinin önlenmesi için ortama miyoinozitol eklenebilir. Lityum G proteini ilişkili adenilat siklaz enzimini inhibe eder böylece GSK3β düzeylerini de etkilemektedir (28). İnsan lenfositlerinde cGMP'nin birikmesini önler (29). Lityumun birçok etkisinin GSK3β üzerinde birleştiği Şekil 1'de görülmektedir.



Şekil 1. Lityumun etki mekanizması (Young'dan, 30)

4.1.3. Lityumun Farmakokinetik Özellikleri

Lityum elementer bir tuzdur bu nedenle gastrointestinal kanaldan emilimi hızlı ve tamdır (31, 32). Alındıktan sonra 2 ila 4 saat arasında plazmada en yüksek seviyesine ulaşır ve yarılanma süresi de 24 saattir (33).

Dağılımı, vücuttaki toplam su miktarına bağlı olan lityumun, kan beyin bariyerine geçişi yavaş ve dengelidir. Plazma proteinlerine bağlanmayıp plazmada dağıldıktan sonra hücre içi sıvıya geçer. Hücre içine girişi basit transport şeklindedir ve sodyumunkine benzer. Hücre dışına çıkışı ise aktif transportla gerçekleşir. Çok yavaş taşıma sistemlerinden ayrıldığı için de hücre dışına çıkışı zordur. Lityumun vücut içindeki dağılımı da farklılık gösterir. Bazı dokulardaki konsantrasyonu serum konsantrasyonundan daha yüksek iken bazı dokularda ise daha düşüktür. Örneğin beyindeki konsantrasyonu serum konsantrasyonu kadar iken tiroid bezinde ise serum konsantrasyonunun 4-5 katına kadar ulaşabilmektedir. Alyuvardaki lityum miktarı ise plazmadaki lityum miktarından çok daha azdır (10).

Lityumun genel farmakokinetik özellikleri Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. Lityumun genel farmakokinetik özellikleri (Dökmeci'den, 34)

Emilimi	Hızlı (oral) 2-4 saatte en yüksek konsantrasyona ulaşır. 6-8 saatte tamamı emilir.
Dağılımı	Plazma proteinlerine bağlanmaz. Tüm vücut sıvılarına dağılır. İntraselüler kompartman sıvısına girişi yavaştır. Dolaşıma girişi hızlı beyine girişi yavaştır Tiroid dokusunda birikir.
Plazma Yarı Ömrü	12 saattir. Kararlı durum 2 haftada oluşur.
Eliminasyonu	Eliminasyonun yarı ömrü 24 saattir. %95 böbrekler (Na'un proksimal klirensine eşdeğerdir.) Bu nedenle atılımı serum Na düzeyinden etkilenir.

4.1.4. Lityumun Toksisitesi

Lityum karbonat güvenilirlik indeksi düşük, yan etkileri oldukça fazla olan bir ilaçtır (35). Lityum 0.6-1.5 mEq/L arasında dar bir terapötik aralığa sahiptir ve bu yüzden toksisite oluşturma ihtimali yüksektir (36).

Yapılan bir araştırmada, lityumun serum içindeki düzeyi 1.5 mM'den yüksek olduğunda toksik etkiler oluşturabileceği belirtilmiştir. 2 mM'den yüksek olduğunda ise, nörolojik bazı semptomlara neden olabileceği ve uzamış lityum toksisitesinin bu konsantrasyonda gerçekleşip kalıcı beyin hasarına sebep olabileceği belirtilmiştir (37).

Öte yandan lityum, metabolik değişikliğe de neden olabilir. Sırasıyla; sodyum, potasyum, magnezyum ve kalsiyumla yarışır. Böylece hücreler arası alanda ve özellikle kemiklerde minerallerle yer değiştirir.

Lityumun tiroid bezi üzerindeki etkisi de oldukça yüksektir. En sık gelişen durumlar; guatr, subklinik ve klinik hipotiroidizm, nadiren de hipertiroididir. Tiroglobulin iyodizasyonunu ve tiroid bezinin iyot tutabilme kabiliyetini azaltır (38).

Lityum, hücre membran fizyolojisini etkileyen kalsiyum, sodyum, potasyum ve magnezyum metabolizmasını da etkiler (39).

Lityumun belirlenen yan etkilerinden birisi de erkek fertilitesine olan toksik etkisidir (40). 3 hafta boyunca lityum tedavisi almış depresyon tanılı hastalara ait spermelerin yaşam sürelerinin anlamlı oranda azaldığı gözlenmiştir (41). Lityumun başlıca yan etkileri Tablo 3'te sunulmuştur.

Tablo 3. Lityumun başlıca yan etkileri (Kayaalp'ten, 35)

Nörolojik ve Psikiyatrik	Ekstremitelerde titremeler Hafıza bozuklukları Kas zayıflaması Komaya varan bilinç bozuklukları Epilepsi nöbetleri Baş dönmesi, libido bozuklukları
Kardiyovasküler	EKG değişiklikleri T dalgasında yassılaşma, ters dönme Frekans bozuklukları Aritmiler
Gastro-intestinal	Bulantı, kusma, diyare Karın ağrısı
Sıvı ve elektrolit	Kilo artışı Ödem Poliüri
Hematolojik	Lökositoz, lenfopeni
Endokrinolojik	Guatr, hipotiroidi
Deri	Akne Psöriyazis

4.2. Karbonik Anhidraz (CA)

Karbonik anhidraz (CA, EC 4.2.1.1, karbonat hidrolizaz) çok geniş dağılımı olan bir enzimdir. Yaklaşık 260 amino asitten müteşekkildir ve 30 kDa ağırlığa sahiptir. Aktif merkezinde çinko (Zn^{2+}) iyonu ihtiva eden monomerik bir proteindir ve organizmada çok önemli işleve sahiptir.

Canlılarda bilinen beş farklı yapısal karbonik anhidraz enzim ailesi vardır. Bunlar; yeşil bitkilerin sitoplâzmasında, bakteri, alg ve omurgalılarda bulunan α -CA ailesi, genellikle bakteri, alg, tek ve çift çenekli bitki kloroplastlarında bulunan β -CA ailesi, temel olarak archealarda ve bazı bakterilerde bulunan γ -CA ailesi, bazı deniz diatomlarında bulunan δ -CA ailesi ve yakın geçmişte keşfedilen ε türleridir (2).

Alfa ailesi en fazla bilinenidir (4). Memelilerde bulunan alfa tipi CA'ların doku dağılımı, hücre içi yerleşimleri ve kinetik özellikleri farklı on altı ayrı (CA I-XVI) izoenzimi tarif edilmiştir. Bunlardan CA I, II, III, VII ve XIII sitoplazmada, IV, IX, XII, XIV ve XV'ler membran bağımlı, V mitokondride, VI tükrük salgısında, diğer üçü ise CA ilişkili proteinler olan (CARP), VIII, X ve XI'de sitozolde yer alır.

İlk kez 1933 yılında memeli eritrositlerinden saflaştırılan CA'nın temel fizyolojik fonksiyonu CO_2 'nin hidrasyonu veya bikarbonatın dehidrasyon reaksiyonlarını dönüşümlü olarak katalizlemesidir (3).



Bu reaksiyon ile beraber birçok fizyolojik ve patolojik olayda rol oynayan CA, CO_2 'in taşınmasında, bikarbonatın akciğerler ve dokular arasında metabolize olmasında, doku ve organlardaki elektrolit sekresyonunda, hücre proliferasyonu ve farklılaşması, pH homeostazisi, kemik resorpsiyonu, kalsifikasyon, tümör oluşumu, idrar asidifikasyonu, ve daha birçok biyosentez reaksiyonunda görev almaktadır (42).

CA, sülfonik, karbonik, karboksilik ve fosforik esterlerin, aldehitlerin ve pirüvatın hidrolizini de katalizlemektedir. Fakat şimdiye kadar bunların fizyolojik önemi gösterilememiştir (43).

4.2.1. Karbonik Anhidraz II (CA II)

Karbonik anhidraz II, α sınıfı CA ailesinin katalitik aktivitesi en yüksek, maksimum CO₂ hidrasyonu turnover sayısına sahip üyesidir. Katalitik etkisi, aktif merkezindeki Zn²⁺ iyonlarının 3 histidin rezüdüsüyle sağladığı koordinasyon ile gerçekleşir (44). Kataliz sırasında Zn²⁺ iyonları nükleofilik lewis asidi gibi davranır.

CA II, eritrositlerde, trombositlerde, endotel hücrelerinde, beyinde, böbrek tubulus hücrelerinde, gözde processus siliariste, mide mukozasında, karaciğerde, pankreatik kanalda ve spermatozoada bulunur. Safra kesesinin epitelyum hücrelerinde eksprese edilen CA II, bazı hücrelerde asit-baz dengesi için temel rol oynar. Üriner asidifikasyon için H⁺ salgılayan renal tubuler ve H⁺ salgılayan gastrik parietal hücrelerinde etkindir. CA II, pankreas sıvısı için pankreatik kanal hücrelerine HCO₃⁻ sağlar. Anormal derecede yüksek göz içi basıncıyla ortaya çıkan ve dönüşümsüz körlüğe sebep olan glakomda CA II enziminin önemli rolü vardır. Dünyada on milyondan fazla kişinin yüksek göz içi basıncına sahip olduğu tahmin edilmektedir. Aköz humor göz içi basıncının sağlanmasında büyük rol oynamaktadır (45). CA II enziminin aköz humorun salgılanmasında da uyarıcı etkisi vardır. Öte yandan CA II eritrositlerde, böbrekte, karaciğerde ve proksimal tübüllerde CO₂ değişimine katkı sağlar (46). CA izoenzimlerinin doku dağılımı ve işlevsel rolü Tablo 4'te sunulmuştur.

Tablo 4. α -CA ailesinin yerleşimi, aktivitesi ve işlevi (Renner'dan, 47)

Hücreiçi Yerleşim	İzoenzim	Kcat (x105) (s-1)	İşlevi	Bulunduğu Dokular
Sitozolik	I	2	Solunum Asit/baz homeostazi	Kolon, Göz, Ter Bezi, Yağ Dokusu, Kan Hücreleri
	II	14	Solunum Asit/baz homeostazi	Bütün Dokular
	III	0.1	Metabolizma Oksidatif hasar	Yağ Dokuları, İskelet Kası, Karaciğer
	VII	9.5	Nöbetler Oksidatif hasar	Beyin, Kolon, Karaciğer ve

			Kanser	İskelet Kası
	XIII	1.5	Bilinmiyor	Akciğer, Böbrek, Kalp, Beyin, İskelet Kası, Üreme Organları, Bağırsaklar
Sitozolik (CARPS)	VII	-	Motor fonksiyon Kanser çoğalması	Beyin
	X	-	CNS	Merkezi Sinir Sistemi
	XI	-	CNS Kanser çoğalması	Merkezi Sinir Sistemi
Membran Bağımlı	IV	11	Solunum Sperm hareketliliği CNS tamponlama	Akciğer, Böbrek
	IX	3.8	Gastrik homeostaz Kanser çoğalması Hipoksi	Mide, Kolon, Pankreas
	XII	4.2	Sıvı homeostazi Kanser çoğalması Hipoksi	Böbrek
	XIV	3.1	Fotoreseptör Sinyalizasyon CNS tamponlama	Beyin ve Göz
	mXV	4.7	Bilinmiyor	Böbrek
Mitokondriyal	VA	2.9	Üre sentezi Glukoneogenez Lipogenez	Karaciğer, İskelet Kası, Böbrek
	VB	9.5	Üre sentezi Glukoneogenez Lipogenez	Bütün Dokular
Salgısal	VI	3.4	Tat algılaması Diş boşlukları	Tükürük Bezleri

4.2.2. Karbonik Anhidraz Aktivitesi Tayin Yöntemleri

CA aktivitesi, enzimin CO₂ hidrasyonu, HCO₃'ün dehidrasyonu ve bazı esterleri hidrolizi gibi özelliklerinden yararlanılarak belirlenebilir. Katalizlediği reaksiyona bakıldığında, ortama göre CO₂ gazı çıkmakta veya harcanmaktadır. Aynı

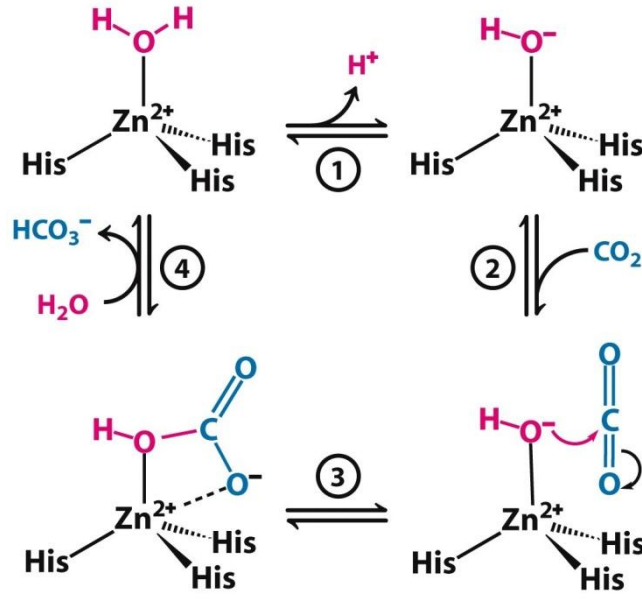
zamanda H^+ iyonu konsantrasyonu artmakta ya da azalmaktadır. Ortaya çıkan ya da azalan karbondioksit gazı, nicel olarak monomerik yolla tespit edilebilir ancak monomerik metodun, reaksiyon pH'sının değişken olması, CO_2 'nin suda sınırlı çözülmesi ve uzun zaman alması gibi dezavantajları vardır (48). İkinci olarak, H^+ konsantrasyonu, pH'nın düşmesi veya yükselmesi gibi geçen süre potansiyometrik yolla veya indikatörle belirlenebilir. Fakat bu metodun kısa zaman alması gibi avantajının yanı sıra reaksiyon sırasında pH'nın değişken olması, CO_2 'nin suda sınırlı çözülmesi ve kullanılan indikatörün inhibisyon etkisi gibi olumsuz sonuçları da vardır. Kullanılan inhibitörlerdeki farklılıklar, dönüm noktasının tespitindeki zorluklar ve inhibitörlerin düşük inhibisyon etkileri hidrataz aktivitesinin kullanımını sınırlamaktadır (49, 50). Bu dezavantajları en az düzeye indirmek için sabit pH'da titrasyon veya 0.02-0.05 birimlik pH düşüşünün indikatörlü ortamda, spektrofotometre ile ölçüm yapıldığı hızlı akış reaksiyonu gibi metodlar aktivite tayininde kullanılmaktadır.

Enzimin saflaştırılması sırasında aktivite ölçümleri genellikle Wilbur-Anderson metodu ile yapılmaktadır. Bu yöntemde, CO_2 hidratasyonunda pH'nın 8.2'den 7.0'a düşüşü için geçen süre, pH metre ile bulunur. Enzim birimi, enzimsiz CO_2 hidratasyonu süresi (t_0) ile enzimli reaksiyon süresi (t_c) arasındaki farkın t_c 'ye bölünmesi ile bulunur (51).

Karbonik anhidrazın ester hidrolizleyici özelliğinden yararlanılarak da aktivitesi ölçülebilir. Kullanılan esterin birim zamanda hidrolizlenen miktarı spektrofotometrik olarak takip edilir ve enzimin aktivitesi bulunur. Bu amaçla en çok kullanılan ester *p*-nitrofenil asetatdır. *p*-nitrofenil asetatın hidrolizi ile oluşan *p*-nitrofenolün 348 nm'de verdiği absorbansın ölçümüyle aktivite tayin edilmektedir (52, 53).

4.2.2.1. Karbonik Anhidraz CO_2 -Hidrataz Mekanizması

Karbonik anhidrazın katalizlediği CO_2 – Hidrataz mekanizması basitçe Şekil 2'de verilmiştir. Birinci basamakta Zn^{2+} iyonuna bağlı ($-OH$) grubundaki bağ yapmayan elektron çiftinin, CO_2 molekülüne nükleofilik atak yaparak karbonoksijen bağı oluşturması esnasında π -bağı açılmaktadır. Daha sonraki basamakta, negatif yüklü oksijen atomunun proton abstraktı ve su girişi ile HCO_3^- iyonu ayrılmaktadır. Son olarak bir H^+ iyonu kaybederek yeniden ilk baştaki bileşiğe dönüşmektedir.



Şekil 2. Karbonik anhidraz II'nin katalizlediği CO₂-hidrasyon reaksiyonunun mekanizması (Berg'den, 54)

Bu enzimatik mekanizmada hız belirleyici basamak protonun aktif merkezden uzaklaştırılması safhasıdır. Bu nedenle aktif bölgedeki proton taşıma kapasitesine sahip aminoasit birimleri aktivite için oldukça önemlidirler.

4.2.3. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri (CAİ)

CA, aktif bölgesindeki Zn²⁺ iyonuna bağlanan iyon ve moleküller tarafından inhibe edilmektedir. Sülfonamid türevleri olan asetazolamid klorozamid, dorzolamid ve brinzolamidler CA'nın güçlü inhibitörlerindendir (48). Siyanür ve tiyosiyanyür gibi mononegatif çözücüler ile halojenürler ise daha gevşek bağlanırlar ve zayıf inhibisyon oluştururlar. CA III izoenzimi ise bu inhibitörlere karşı en dayanıklı olanıdır (49).

Karbonik anhidraz inhibitörleri göz içi basıncını düşürmede kullanılan en güçlü ajanlardandır. 1954'ten bu yana kullanılan asetazolamid, bu inhibitörlerin sistemik formudur. Asetazolamid, epilepsi gibi merkezi sinir sistemindeki bazı fonksiyon bozukluklarının tedavisinde işlev görür. Kornea geçirgenliği yüksek, selektif karbonik anhidraz-II izoenzim inhibitörü olan dorzolamid, günümüzde kullanılan topikal karbonik anhidraz inhibitörlerindendir. Sistemik yan etkileri yüksek olan asetazolamide alternatif olarak kullanılmaktadır. 1998'den beri oftalmolojide kullanılan brinzolamid, ikinci topikal CAİ'dir. Dorzolamid ve

brinzolamid gibi topikal CAİ'lerinin başlıca avantajı oral ajanlara bağlı gelişen sistemik yan etkilerde belirgin azalmadır. Bunun yanında ciddi yan etkileri de görülebilir (55).

4.2.4. Karbonik Anhidraz Aktivatörleri

CA'lar, bazı aminoasitler ve aminler tarafından aktive edilirler. Şimdiye kadar 16 memeli izoenziminin bu moleküllerle ilişkisi araştırılmıştır. Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılan CA aktivatörleri, hafızanın gelişiminde güçlü bir ajan olarak kullanılmaktadır. Histaminle birlikte CA II izoenziminin X-ışını kristal yapısının açıklanmasıyla CA aktivasyon mekanizması ilk kez anlaşılmıştır. Bunu takiben kinetik ve X-ışını kristallografik çalışmaları, aktivatörlerin aktif bölge girişine inhibitör ve substratlardan farklı bölgeye bağlandığını göstermiştir (2).

En iyi bilinen CA aktivatörleri L-Histidin, D-Histidin, L-Triptofan, D-Triptofan, L-Fenilalanin, D-Fenilalanin amino asitleridir. Bunların yanı sıra CA'lar dopamin, histamin ve serotonin gibi aminler tarafından da aktive edilirler (56, 57).

4.2.5. Ağır Metallerin Karbonik Anhidraz Enzimi Üzerine Etkileri

Bazı enzimlerin yapısında az miktarda Cu^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} ve Mo^{2+} gibi ağır metal iyonu bulunur. Bu ağır metaller, proteinlerde histidinin imidazol, sistenin sülfidril (-SH), tirozinin hidroksil (-OH), aspartik ve glutamik asitlerin karboksil (-COOH) gibi fonksiyonel grupları üzerinde etki gösterirler. Böylelikle proteinlerin yapısında değişiklik meydana getirebilirler. Özellikle enzimlerin aktif merkezlerindeki sistein amino asitleriyle ağır metal iyonları etkileşerek merkaptan bileşiklerini oluşturmakta ve enzim aktivitesinde kaybolma gözlenmektedir (58).

Ağır metal bileşiklerinin çözeltilerinde oluşan iyonların CA enzimi üzerindeki inhibisyon etkileri araştırılmış, yapılan bu çalışmalarda birçok tek değerlikli anyonların CA enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösterdikleri belirlenmiştir (59, 60). Ayrıca insan eritrosit CA izoenzimlerinin CO_2 hidrataz aktivitesinin Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ag^+ , Cd^{2+} ve Pb^{2+} ağır metal iyonları tarafından inhibe edilirken, Co^{2+} ve Se^{4+} iyonları tarafından da aktive edildiği bulunmuştur (61-63).

Birçok metal iyonunun, metabolizma üzerinde önemli etkilere sahip olduğu bilinmektedir. Özellikle çinko bakır, demir ve kalsiyum gibi metaller enzimin aktif merkezlerinde ligandlar gibi davranırlar (64). Örneğin çinko hücreler için kritik

öneme sahip bir metaldir çünkü konsantrasyonun azalması hücrel DNA hasarını arttırabilir (65). Karbonik anhidraz ve sorbital dehidrogenaz gibi bazı enzimler ise Zn^{2+} iyonu ihtiva ederler. Çinko eksikliği, çinko içeren enzimlerin azalmasına neden olur. Bu durum birçok vücut kusurları ve metabolik bozukluklarla sonuçlanır. Örneğin, CA miktarının azalması hücrel solunum yetersizliğine neden olabilir (66).

Ağır metallerin toksikolojik etkileri çoğu zaman enzim inhibisyonu ve denatürasyon ile sonuçlanır (64, 67). Ağır metal iyonunun protein yapısına bağlanması, enzimin metal inhibisyon mekanizmasının temelini oluşturur. Metal iyonları genellikle proteinlerdeki sülfidril gruplarına ve merkaptan ürünlerine bağlanır (65).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Gereç

5.1.1. Kullanılan Cihazlar, Alet ve Malzemeler

Bu tez çalışması süresince kullanılan cihazlar, laboratuvar alet ve malzemeleri markaları ile birlikte Tablo 5'te gösterilmiştir.

Tablo 5. Kullanılan cihazlar ve laboratuvar malzemelerinin özellikleri

Kullanılan cihazlar, alet ve malzemeler	Marka/Model
Saf su cihazı	Aquatron 4AD
Derin Dondurucu	Thermo -86 °C
Etüv	Gallenkamp
Hassas terazi	Oertling NA 164
Çalkalayıcı	Nüve, SL 350
Vorteks	Nüve, NM 110
Spektrofotometre	Shimadzu UV-1601
Manyetik karıştırıcı	Ikamag RH
Otomatik pipet, 1-20 µL	Eppendorf
Otomatik pipet, 20-200 µL	Eppendorf
Otomatik pipet, 100-1000 µL	Eppendorf
Otomatik pipet, 1-5 mL	Eppendorf
pH-metre	Hanna Instruments, HI 9321

5.1.2. Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler

Tez çalışmalarında kullanılan kimyasal maddeler, üretici firmalar ve ürün kodları Tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 6. Kullanılan kimyasal maddeler, üretici firmalar ve ürün kodları

Kullanılan Kimyasallar	Üretici firmalar ve ürün kodları
Asetazolamid (N-(5-sulfamoyl-1, 3,4-thiadiazol-2-yl)acetamide)	Sigma, A6011
İnsan eritrosit karbonik anhidraz II	Sigma, Lot 078K6276
CO ₂ gazı	Ticari olarak temin edilmiştir
Lityum karbonat (Li ₂ CO ₃)	Sigma, 62470
Tris (hidroksimetil amino metan)	Merck , 616K2239987
4-nitrofenilasetat	Sigma, Lot 023K2604
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Sigma, W387520
HEPES [4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid]	Sigma, A5888
Hidroklorik asit (HCl)	Carlo Erba, 7647-01-0
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck, 6462
Sülfürik asit (H ₂ SO ₄)	Carlo Erba, 300057
Aseton	Sigma, 650501

Kullanılan çözeltiler ve bazılarının hazırlanışlarıyla yararlanıldığı yerler liste halinde Tablo 7’de gösterilmiştir. Hazırlanan tüm çözeltiler kullanılana kadar +4 °C’de saklandı. Deneyler buz banyosu içerisinde gerçekleştirildi.

Tablo 7. Tez çalışmalarında kullanılan çözeltiler, hazırlanışları ve kullanıldığı yerler

1 M NaOH	10 g NaOH saf suda çözülerek 250 mL'ye tamamlandı. Tampon çözeltilerin pH'larının ayarlanmasında kullanıldı.
1 M HCl	%36'lık, yoğunluğu 1.18 g/mL olan HCl'den 21.4 mL alındı ve saf su ile 250 mL'ye tamamlandı. Tampon çözeltilerin pH'larının ayarlanmasında kullanıldı.
0.05 M Tris-SO₄ tamponu (pH=7.4)	6.055 g (0.05 mol) Tris, 950 mL saf suda çözüldü 1M H ₂ SO ₄ ile pH=7.4'e kadar titre edildi. Daha sonra toplam hacim saf su ile 1 litreye tamamlandı. Karbonik anhidraz esteraz aktivitesi ölçümünde kullanıldı.
3 mM p-nitrofenil asetat çözeltisi	27.2 mg p-nitrofenil asetat, 1 mL asetonla çözüldü ve hızlıca karıştırılan 49 mL saf suya yavaş yavaş ilave edildi. Çalışma günü taze olarak hazırlandı. Karbonik anhidraz esteraz aktivitesi tayininde substrat olarak kullanıldı.
HEPES Tamponu	6.51 g HEPES bir miktar saf suda çözüldü. 1 M'lik HCl ile pH=8.8 olacak şekilde titre edildi. Saf su ile hacmi 1 litreye tamamlandı. Karbonik anhidraz hidrataz aktivitesi tayininde tampon olarak kullanıldı.
1 mM asetazolamid çözeltisi	0.011 g asetazolamid, %10'luk 7.5 mL DMSO'da çözüldü ve son hacim 50 mL olacak şekilde HEPES'le tamamlandı. Karbonik anhidraz esteraz aktivitesini inhibe etmek için (pozitif kontrol olarak) kullanıldı.
1 M H₂SO₄	18 M stok H ₂ SO ₄ 'den 5.5 mL alındı 80 mL saf suda biraz karıştırıldıktan sonra son hacim 100 mL'ye tamamlandı. Tampon çözeltilerin pH'larının ayarlanmasında kullanıldı.
0.2 M Lityum karbonat çözeltisi (Li₂CO₃)	0.73 g lityum karbonat tartıldı. 40 mL saf suda çözüldü üzeri saf su ile 50 mL'ye tamamlandı. Stok çözeltisi olarak kullanıldı. Karbonik anhidraz hidrataz ve esteraz aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi deneylerinde kullanıldı.
Doygun CO₂ substrat çözeltisi	250 mL saf su içeren bir erlen CO ₂ gazı ile 45 dk boyunca doyurularak hazırlandı. Karbonik anhidrazın aktivite ölçümü için kullanıldı.
CA Çözeltisi	1000 mL stoktan (1mg'da 3713 EU bulunan) hidrataz için 100 kat, esteraz için 10 kat saf su ile dilüe edilerek kullanıldı.

5.2. Yöntem

5.2.1. Karbonik Anhidraz Hidrataz Aktivitesi

Karbonik anhidraz enziminin hidrataz aktivitesi Wilbur-Anderson metodu ile ölçüldü (48). 2.87 mL HEPES tamponunun (pH=8.8) üzerine 25 µL enzim, 0.1 mL saf su (Li₂CO₃ saf suda çözüldüğü için) konuldu. Daha sonra substrat olarak doymuş haldeki CO₂ çözeltisinden 2.0 mL ilave edildi. Oluşan CO₂ hidrasyonunda pH'nın 8.20'den 7.00'ye düşüşü, pH metre ile takip edildi ve geçen süre ölçüldü. Her bir ölçüm üç defa tekrarlanıp ortalama değerler bulundu.

Enzim birimi, enzimsiz CO₂ hidrasyonu süresi (t₀) ile enzimli reaksiyon süresi (t_c) arasındaki farkın t_c'ye bölünmesi ile belirlendi.

$$\text{Wilbur-Anderson Unit (E.U)} = (t_0 - t_c) / t_c$$

Burada ;

EU : Enzim ünitesi

t₀ : Enzimsiz denemede ölçülen süre

t_c : Enzim varlığında ölçülen süre

5.2.1.1. Karbonik Anhidraz Hidrataz Aktivitesi Üzerine Lityumun Etkisi

Lityumun CA II hidrataz aktivitesi üzerine etkisi incelemek için deney tüplerine 2.87 mL HEPES tamponu (pH = 8.8), 25 µL CA II ve 0.1 mL 0.001 M, 0.01 M, ve 0.1 M lityum karbonat ilave edildi. Beş dakika inkübasyondan sonra üzerine 2.0 mL substrat çözeltisi (doymuş CO₂) eklendi. pH'nın 8.20 den 7.00'ye düşüşü pH metre ile takip edildi ve geçen süre ölçüldü.

Aynı işlemler CA II inhibitörü olan asetazolamid içinde uygulandı. Sırasıyla deney tüplerine 2.87 mL HEPES tamponu, 25 µL CA II ve 0.1 mM, 0.01 mM, 0.001 mM asetazolamidden 0.1'er mL ilave edildi ve beş dakika inkübasyondan sonra üzerine 2.0 mL substrat çözeltisi (doymuş CO₂) eklendi. pH'nın 8.20 den 7.00'ye düşüşü pH metre ile takip edildi ve geçen süre ölçüldü. Her bir ölçüm üç kez tekrarlandı ve ortalama değerler hesaplandı. Enzim ünitesi yukarıda verilen formül yardımıyla bulundu. İnhibitörsüz ölçülen hidrataz aktivitesinden sonraki aşamada inhibitör kullanılarak ölçülen hidrataz aktivitesi değerleri çıkarılarak inhibisyonlar bulundu. Hidrataz aktivitesi için gerekli reaktifler ve hacimleri Tablo 8'de verilmiştir.

Tablo 8. Karbonik anhidraz hidrataz aktivitesi ölçümünde kullanılan reaktiflerin ve inhibitörlerin konsantrasyon ve hacimleri

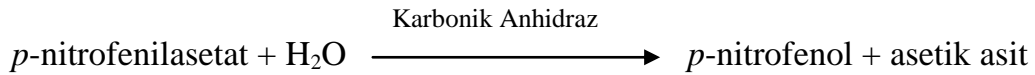
Reaktifler	E	Kör	E+Li ₂ CO ₃	Li ₂ CO ₃ +Kör	E+Ast	Ast+Kör
HEPES (mL)	2.875	2.9	2.875	2.9	2.875	2.9
Saf su (mL)	0.1	0.1	-	-	-	-
Li ₂ CO ₃ (mL)	-	-	0.1	0.1	-	-
CA II (µL)	25	-	25	-	25	-
Asetazolamid (mL)	-	-	-	-	0.1	0.1
Doygun CO ₂ (mL)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Toplam Hacim (mL)	5	5	5	5	5	5

E: Enzim

Ast: Asetazolamid

5.2.2. Karbonik Anhidraz Esteraz Aktivitesi Tayini

CA esteraz aktivitesi Armstrong ve arkadaşları tarafından geliştirilen karbonik anhidrazın *p*-nitrofenil asetatın *p*-nitrofenol ve asetata hidrolizlemesi esasına dayanarak metod ile ölçüldü (52). Oluşan *p*-nitrofenolün absorptansı 348 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülerek CA aktivitesi tayin edildi. Reaksiyon denklemi şu şekildedir:



CA II aktivitesi tayin işlemleri için önce, deney tüplerine 0.6 mL Tris-SO₄ tamponu, 0.15 mL CA II ve 0.15 mL su konularak oda sıcaklığında iyice karıştırıldı. Daha sonra üzerine 0.6 mL *p*-nitrofenilasetat çözeltisi ilave edildi ve karışım 1.5 mL hacimli spektrofotometre küvetine alınarak hemen 348 nm’de üç dakika boyunca absorptansı okundu. Başlangıçta ve üç dakika sonunda okunan absorptanslar arası fark esteraz aktivitesi olarak belirlendi. Her bir deney üç kez tekrarlandı.

5.2.2.1. Karbonik Anhidrazın Esteraz Aktivitesi Üzerine Lityumun Etkisi

Lityumun CA II esteraz aktivitesi üzerine etkisi incelemek için, deney tüplerine 0.6 mL Tris-sülfat tamponu, 0.15 mL CA II ve 10 µL 0.001 M, 0.01 M ve 0.1 M lityum karbonat ilave edildi. Bu karışım on dakika inkübasyona bırakıldı. Sonra üzerine 0.6 mL substrat çözeltisi eklendi ve küvet hacmi 1.5 ml olana kadar

saf su ilave edilerek hemen 348 nm'de üç dakika absorbansları okundu. Aynı deneyler CA II inhibitörü olan asetazolamid içinde uygulandı. 0.6 mL Tris-sülfat tamponuna, 0.15 mL CA II ve 10 µL, 0.001 mM, 0.01 mM ve 0.1 mM asetazolamid ilave edilerek aktivite ölçümleri yapıldı. Her bir ölçüm üç defa tekrarlandı. İlk aşamada bulunan esteraz aktivitesi değerinden ikinci aşamada bulunan değer çıkarılarak inhibisyon miktarları belirlendi. Esteraz aktivitesi için gerekli reaktifler ve hacimleri Tablo 9'da verilmiştir.

Tablo 9. Karbonik anhidraz esteraz aktivitesi ölçümünde kullanılan reaktiflerin ve inhibitörlerin konsantrasyon ve hacimleri

Reaktifler	E	Kör	E+Li ₂ CO ₃	Li ₂ CO ₃ +Kör	Ast+E	Ast+Kör
Tris-sülfat (mL)	0.6	0.75	0.6	0.75	0.6	0.75
CA II (mL)	0.15	-	0.15	-	0.15	-
Saf Su (mL)	0.15	0.15	0.14	0.14	0.14	0.14
Lityum karbonat (µL)	-	-	10	10	-	-
p-nitrofenil asetat (mL)	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
Asetazolamid (µL)	-	-	-	-	10	10
Toplam Hacim (mL)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5

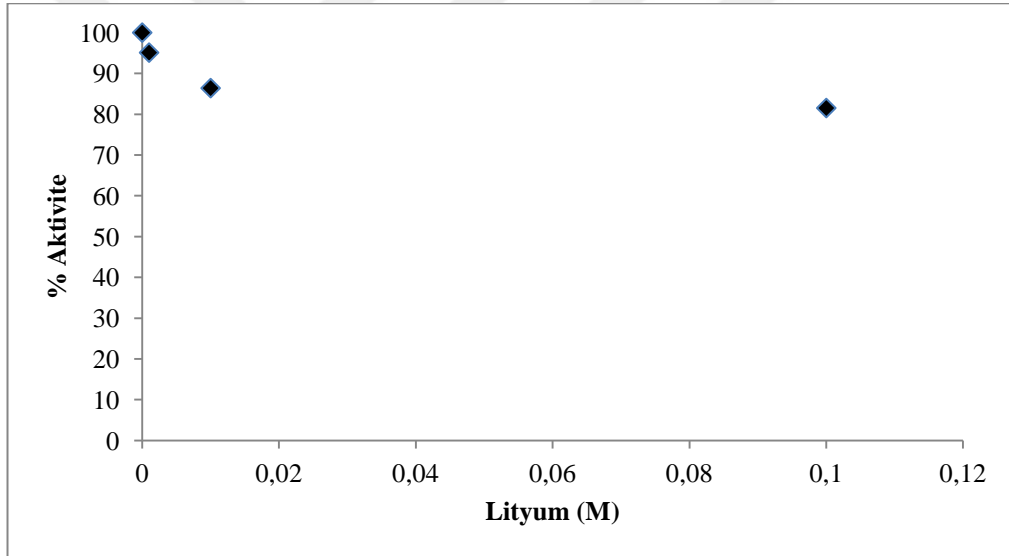
E: Enzim

Ast: Asetazolamid

6. BULGULAR

6.1. CA II Hidrataz Aktivitesi Sonuçları

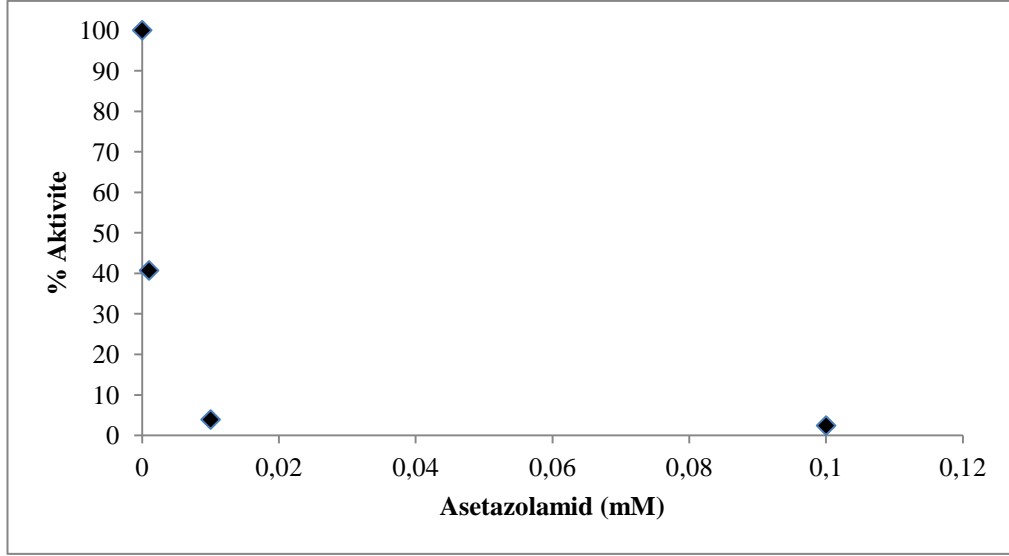
Lityumun ve asetazolamidin CA II hidrataz aktivitesi üzerine *in vitro* etkisi farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri kullanılarak belirlendi. Yapılan deneyler sonucunda, lityumun hidrataz aktivitesini az da olsa inhibe ettiği gözlemlendi. Deneylerin doğruluğunu test etmek için kullanılan asetazolamidle kıyas edildiğinde lityumun çok daha zayıf bir inhibisyona sebep olduğu gözlemlendi. Lityumun konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak CA hidrataz aktivitesindeki değişiklikler Şekil 3'te, lityumun CA II hidrataz aktivitesi inhibisyon oranları ise Tablo 10'da gösterilmiştir.



Şekil 3. Lityumun konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak CA hidrataz aktivitesindeki değişiklikleri gösteren grafik ($IC_{50} = 0.325$ M)

Tablo 10. Lityumun CA II hidrataz aktivitesi inhibisyon oranları

Lityum (M)	Enzim Ünitesi (EÜ)	% Aktivite
0	3.68	100
0.001	3.5	95.1
0.01	3.18	86.4
0.1	3.0	81.52



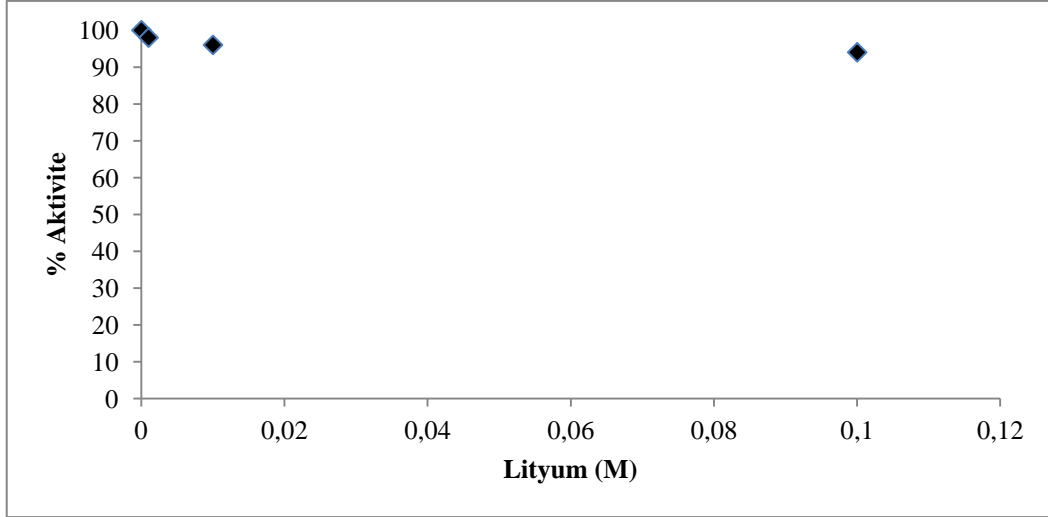
Şekil 4. Asetazolamid konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak CA hidrataz aktivitesindeki değişiklikleri gösteren grafik (IC₅₀ : 0.003 mM)

Tablo 11. Asetazolamidin CA II hidrataz aktivitesi inhibisyon oranları

Asetazolamid (mM)	Enzim Ünitesi (EÜ)	% Aktivite
0	3.68	100
0.001	1.5	40.7
0.01	0.145	3.9
0.1	0.089	2.4

6.2. CA II Esteraz Aktivitesi Sonuçları

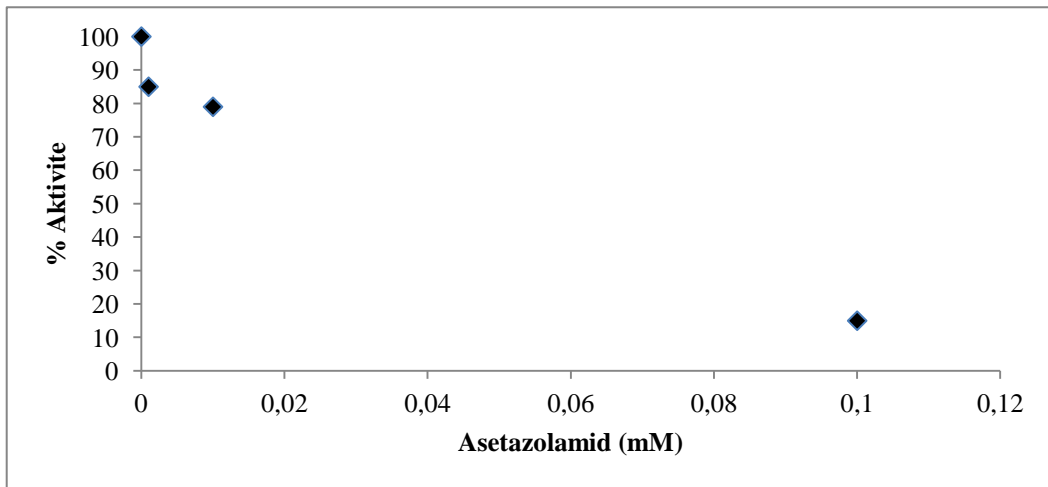
Lityumun CA II esteraz aktivitesi üzerine *in vitro* etkisi farklı konsantrasyonlarda lityum karbonat çözeltisinin belirli hacimlerinde ilave edilmesiyle belirlendi. Lityumun esteraz aktivitesini hidrataz aktivitesine oranla daha az inhibe ettiği gözlemlendi. Lityumun konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak CA esteraz aktivitesindeki değişiklikler Şekil 5'te, lityumun CA II esteraz aktivitesi inhibisyon oranları ise Tablo 12'de gösterilmiştir.



Şekil 5. Lityumun konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak CA esteraz aktivitesindeki değişiklikleri gösteren grafik ($IC_{50} = 1.095 \text{ M}$)

Tablo 12. Lityumun CA II esteraz aktivitesi inhibisyon oranları

Lityum (M)	Δ Absorbans (348nm)	% Aktivite
0	0.148	100
0.001	0.146	98
0.01	0.143	96
0.1	0.14	94



Şekil 6. Asetazolamid konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak CA esteraz aktivitesindeki değişiklikleri gösteren grafik ($IC_{50} = 0.0535 \text{ mM}$)

Tablo 13. Asetazolamidin CA II esteraz aktivitesi inhibisyon oranları

Asetazolamid (mM)	Δ Absorbans (348nm)	% Aktivite
0	0.148	100
0.001	0.127	85
0.01	0.118	79
0.1	0.022	15



7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Lityum, 60 yılı aşkın süredir duygu durum bozukluklarının tedavisinde kullanılmaktadır. Ancak terapötik etkilerini gösterirken kullandığı mekanizmalar hala belirsizliğini korumaktadır. Antidepresanlar ve antipsikotikler gibi geleneksel birçok psikofarmakolojik ajanın aksine lityum, hücresele reseptörlere bağlanmaz. Bunun yerine hücre içi ikinci haberci sistemlerinin modifikasyonu, enzim inhibisyonu yoluyla metabotropik reseptörlerin baskılanması ve devamında karmaşık ve birbirine bağımlı hücre içi enzim kaskadını değiştirerek etkisini gösterir. İki enzimatik yol lityum için hedef olarak ortaya çıkmaktadır. Fosfatidilinositol sinyal yolu içindeki inositol monofosfataz ve protein kinaz glikojen sentaz kinaz 3 beta. Lityumun bu enzimleri, çok sayıda sinyal yolunun hayati bir düzenleyicisi ve bu enzimler içinde normal bir kofaktör olan magnezyumun yerini alarak inhibe ettiği ileri sürülmüştür (68).

CA karbondioksidin hidrasyonunu dönüşümlü olarak katalizleyen bir metalloenzimdir. Doku dağılımları hücre içi yerleşimleri kinetik özellikleri birbirinden farklı 16 CA izoenzimi memelilerde tanımlanmıştır. CA vücutta pH regülasyonu, CO₂ taşınması, elektrolit salgılanması, sentez reaksiyonları gibi olaylarda rol alır. Sulfonamidler CA izoenzimlerinin kuvvetli inhibitörleridir. Bu inhibitörler glokom, epilepsi, obezite gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca metal iyonlarının da CA inhibisyonu yaptığını gösteren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (69).

Merkezi sinir sistemi de CA izoenzimleri yönünden zengin bir dokudur. Merkezi sinir sisteminde farklı bölgelerde yerleşmiş hücre tiplerinde CA izoenzimleri eksprese edilmektedir. CA II koroid pleksus, oligodendrositlerde, miyelinlenmiş liflerde ve astrositlerde sentezlenmektedir. Ayrıca CA III, IV, VA, VB, VII, VIII ve XIV izoenzimleri de beynin farklı bölgelerinde eksprese edilmektedir. Bu izoenzimler beyinde pH regülasyonu, sıvı ve iyon homeostasisi, beyin omurilik sıvısının sentezi, GABAergic sinyalleşmenin düzenlenmesi gibi çeşitli fonksiyonların yerine getirilmesinde rol alırlar. Bahsedilen roller göz önüne alındığında CA inhibitörleri antikovülson ajan olarak kullanılmaktadır. İlk kez asetazolamid 1953 yılında bu amaçla kullanılmıştır. Ayrıca asetazolamid ve methazolamid ayrı ayrı ya da kombinasyonları şeklinde anti epileptik ajan olarak da

kullanılmışlardır. Ayrıca sulthiame, zonisamid ve topiramet gibi anti-epileptik ilaçlar CA inhibisyonuna sebep olmaktadır (69).

Bu tez çalışmasında, duygu-durum bozukluklarının tedavisinde kullanılan ve sinyal yollarındaki bazı enzimleri inhibe eden lityumun, beyinde önemli fonksiyonları olan ve inhibitörleri bazı nörolojik hastalıkların tedavisinde kullanılan CA aktivitelere etkisi olup-olmadığı, üzerinde en çok araştırma yapılmış CA izoenzimi olan CA II kullanılarak (69), *in vitro* olarak test edildi. Öncelikle kullanılacak Lityumun konsantrasyonu belirlendi. Lityum kullanan hastalarda genel olarak günde üç kez 300 mg lityum karbonat tabletleri kullanılmaktadır. Dolayısıyla ortalama 900 mg lityum hastalar tarafından alınmaktadır. Çalışmada lityum karbonatın 0.1 M (7380 mg), 0.01 M (738 mg) ve 0.001 M'lık (73.8 mg) konsantrasyonları kullanıldı. Bu konsantrasyonlar hastaların aldıkları günlük dozu içine alacak şekilde tasarlandı.

Kimyasal bileşiklerin, enzimler üzerindeki inhibitör etkilerini tespit etmek için K_i ve IC_{50} değerleri hesaplanmaktadır. Bir bileşiğin inhibitör etkisinin değerlendirilmesinde K_i değeri daha hassas olmakla beraber, IC_{50} değerleri hesaplamasındaki kolaylıktan dolayı pratikte daha sıklıkla kullanılmaktadır (70). Güçlü bir CA inhibitörü olan asetazolamid, kullanılan hidrataz ve esteraz metodlarının doğru uygulandığının bir teyidi olarak, pozitif kontrol olarak kullanıldı. CA II'nin hidrataz aktivitesi için asetazolamid IC_{50} değeri 0.003 mM (Şekil 4, Tablo 11), esteraz aktivitesi içinde asetazolamidin IC_{50} değeri 0.0535 mM (Şekil 6, Tablo 13) olarak bulundu. Lityum, CA II'nin hidrataz aktivitesi için IC_{50} değeri 0.325 M olarak tespit edildi. Asetazolamid ile karşılaştırıldığında lityum hidrataz aktivitesi inhibisyonu 100 bin kat daha küçüktü. Bu haliyle lityum CA II için oldukça zayıf bir inhibitördür. CA'ların bugüne kadar tanımlanan tüm fonksiyonları hidrataz aktivitesi ile ilgilidir. Dolayısıyla lityumun yaptığı inhibisyonun farmakolojik dozlarda ciddi bir etkinliği olmayacaktır. Ancak, beyinde CA'nın proton konsantrasyonunu düzenleyerek glutamat reseptörlerinin (NMDA tip) eksitator aktivitesinden sorumlu olduğu, bikarbonat iyonunu sağlayarak GABAergic transmisyonun düzenlenmesinde rol aldığı ve nöronal eksitabilitenin düzenlenmesinde oldukça önemli olan hücre içi ve dışı pH düzenlemelerine dâhil olduğu düşünüldüğünde (69) lityum intoksikasyonunda bu zayıf inhibisyon önemli olabilir.

CA'nın esteraz aktivitesi tayini, fizyolojik bir rolünün olmamasına rağmen, hem spektrofotometrik bir yöntem olması hem de tekrarlanabilirliğinin iyi olması sebebiyle kinetik çalışmalarda araştırmacılar tarafından sıkça kullanılan bir yöntem olmuştur. Lityumun CA II esteraz aktivitesi için IC_{50} değeri 1,095 M olarak bulundu. Bu değer asetazolamidin CA II esteraz aktivitesi için hesaplanan IC_{50} değerinden 20 bin kat daha büyüktü. Hidrataz aktivitesine benzer şekilde esteraz aktivitesinde de, CA lityum tarafından oldukça zayıf bir şekilde inhibe edildi. Lityumun hidrataz ($IC_{50}=0.325$ M) ve esteraz ($IC_{50}=1.095$ M) aktivitelerinin IC_{50} değerleri karşılaştırıldığında yaklaşık 3 katlık bir farkın olduğu gözlemlendi. Bu sonuç her iki aktivitenin de substrat bağlama ve reaksiyon mekanizmalarının farklı olmasının bir sonucu olabilir (70).

Sonuç olarak, duyu durum bozukluklarında kullanılan lityumun farmakolojik dozlarda CA II izoenzimi üzerine *in vitro* olarak ciddi bir inhibisyon etkisi olmadığına, gözükten zayıf inhibisyonların lityum toksisitesinde önemli olabileceği kanaatine varıldı.



8. KAYNAKLAR

1. Kamienski CW, McDonald DP, Stark MW, Papcun JR (2000). Lithium and lithium compounds. Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology. New York. 5th ed. Kirk-Othmer; 1302-66.
2. Us D (2009). Siprofibratın insan karbonik anhidraz II ve glukoz 6- fosfat dehidrogenaz enzimlerinin aktiviteleri üzerine etkilerinin in vitro incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Trabzon.
3. Supuran CT, Scozzafava A (2007). Carbonic anhydrases as targets for medicinal chemistry. *Bioorg Med Chem* 15: 4336–4350.
4. Supuran CT (2008). Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nat Rev Drug Disc* 7: 1-12.
5. Ober JA (2001). Metals and minerals Lithium, In *Minerals Yearbook* 1: 471-6
6. Jackson T (2006). Elements of lithium. Marshall Cavendish Benchmark Yayınları. Birinci baskı, New York; 12-13
7. Frianeza-Kullberg TC (1987). The chemical nature of lithium. Johnson FN ed. *Depression and Mania*, Oxford; 579-581
8. El-Mallakh RS, Jefferson JW (1999). Prethymoleptic use of lithium. *Am J Psychiatry* 56: 461–463
9. Jefferson JW, Greist JH (2007). Lithium. Kaplan and Sadock's comprehensive textbook of psychiatry, 8th ed. Philadelphia; 2839-50.
10. Adar B (2015). Lityum karbonatın in vitro ortamda insan lenfositlerindeki sitotoksosite, genotoksosite ve oksidatif durum üzerine etkilerinin araştırılması, Tıpta Uzmanlık Tezi, Harran Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Şanlıurfa.
11. Luo J (2010). Lithium-mediated protection against ethanol neurotoxicity. *Front Neurosci* 4: 41.
12. Nciri R, Allagui MS, Vincent C, Elfeki A (2008). Effects of low doses of Li carbonate injected into mice. Functional changes in kidney seem to be related to the oxidative status. *C R Biologies* 331: 23-31.

13. Tamser M (2006). Ovariectomize ve diabetik ratlarda E vitamini ve 17- β Estradiolun lipid peroksidasyon seviyesi ile hematolojik ve plazma lipid değerleri üzerine etkileri. Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji Anabilim Dalı, Elazığ.
14. Corcoran AC, Taylor RD, Page IH (1949). Lithium poisoning from the use of salt substitutes. *J Am Med Assoc* 139: 685-688.
15. Figengül C, Figengül CB, Okay T, Dilbaz N (2004). Ellibeşinci yılında lityumun öyküsü, *Klinik Psikofarmakoloji Bülteni* 14: 50-56.
16. O'Donnell T, Rotzinger S, Nakashima T, Hanstock C, Ulrich M, Silverstone P (2003). Chronic lithium and sodium valproate both decrease the concentration of myoinositol and increase the concentration of inositol monophosphates in rat brain. *Eur Neuropsychopharmacol* 13: 199–207.
17. Lochhead PA, Coghlan M, Rice SQ, Sutherland C (2001). Inhibition of GSK-3 selectively reduces glucose-6-phosphatase and phosphatase and phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression. *Diabetes* 50: 937–946.
18. Tong, H, Imahashi K, Steenbergen C, Murphy E (2002). Phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 beta during preconditioning through a phosphatidylinositol-3-kinase-dependent pathway is cardioprotective. *Circ Res* 90: 377–379.
19. Gao Q, Katakowski M, Chen X, Li Y, Chopp M (2005). Human marrow stromal cells enhance connexin 43 gap junction intercellular communication in cultured astrocytes. *Cell Transplant* 14: 109–117.
20. Chalecka-Franaszek E, Chuang DM (1999). Lithium activates the serine/threonine kinase Akt-1 and suppresses glutamate induced inhibition of Akt-1 activity in neurons. *Proc Natl Acad Sci* 96: 8745–8750.
21. Beurel E, Steven F. Grieco, Jope RS (2015). Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): Regulation, actions, and diseases. *Pharmacol Ther* 148: 114-131.
22. Mora A, Sabio G, Gonzalez-Polo RA, Cuenda A, Alessi DR, Alonso JC, Fuentes JM, Soler G, Centeno F (2001). Lithium inhibits caspase 3 activation and dephosphorylation of PKB and GSK3 induced by K⁺ deprivation in cerebellar granule cells. *J Neurochem* 78: 199–206.
23. Agranoff BW, Fisher SK (2001). Inositol, lithium, and the turns brain. *Psychopharmacol Bull* 35: 5–18.

24. Parthasarathy LK, Seelan RS, Wilson MA, Vadnal RE, Parthasarathy RN (2003). Regional changes in rat brain inositol monophosphatase 1 (IMPase 1) activity with chronic lithium treatment. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27: 55–60.
25. Berry GT, Buccafusca R, Greer JJ, Eccleston E (2004). Phosphoinositide deficiency due to inositol depletion is not a mechanism of lithium action in brain. *Mol Genet Metab* 82: 87–92.
26. Sarkar S, Krishna G, Imarisio S, Saiki S, O’Kane CJ, Rubinsztein DC (2008). A rational mechanism for combination treatment of Huntington’s disease using lithium and rapamycin. *Hum Mol Genet* 17: 170–178.
27. Jenkins RJ, Aronson JK, Brearley CJ (1991). Increases in Na/K pump numbers in isolated human lymphocytes exposed to lithium in vitro. Reversal by myo-inositol and by inhibitors of protein kinase C and the Na/H antiport. *Biochim Biophys Acta* 1092: 138–144.
28. Risby ED, Hsiao JK, Manji HK, Bitran J, Moses F, Zhou DF, Potter WZ (1991). The mechanisms of action of lithium. II. Effects on adenylate cyclase activity and beta-adrenergic receptor binding in normal subjects. *Arch Gen Psychiatry* 48: 513–524.
29. Schubert T, Stoll L, Muller WE (1991). Therapeutic contractions of lithium and carbamazepine inhibit cGMP accumulation in human lymphocytes. A clinical model for a possible common mechanism of action? *Psychopharmacology (Berl.)* 104: 45–50.
30. Young W (2009). Review of lithium effects on brain and blood. *Cell Transplantation* 18: 951-75.
31. Keleş E, Yüceyar AN, Bayam E, Bademkiran F, Şirin H, Kocaman AS (2013). Lityum Nörotoksitesisi, Olgunun klinik ve elektrofizyolojik değerlendirilmesi *J Neurol Sci* 36: 392-400.
32. Sadock BJ, Sadock VA (2000). *Comprehensive textbook of psychiatry*. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams Wilkins.
33. Keck PH, Mc Elroy S (2002). Clinical pharmacodynamics and pharmacokinetics of antimanic and mood-stabilizing medications, *J Clin Psychiatry* 4: 3-11.
34. Dökmeci İ (2007). *Farmakolojik ilaçlar ve etkileri*. Birinci Baskı. Alfa Yayınları. İstanbul; 690-691.

35. Kayaalp O (2002). Akılcı yönleriyle tıbbi farmakoloji. Birinci Baskı. Palme Yayıncılık. Ankara; 91-92.
36. Kaleliođlu T, Taşdemir A, Genç A, Genç SE, Özver İ, Yeşilbaş D, Altınbaş K, Kurt E (2012). Lityum tekli tedavisi alan hastaların hematolojik ve biyokimyasal değerlerinin incelenmesi J Mood Dis 2: 109-14.
37. Verimer T (1976). Sıçanlarda amfetamin ile oluşan davranış değişiklikleri üzerine lityum klorürün etkileri, Doktora tezi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji Anabilim Dalı, Ankara.
38. Schou M, Amdisen A, Jensen SE, Olsen T (1968). Occurrence of goitre during lithium treatment. Br Med J 3: 710-713.
39. Eker DÖ, Eker MÇ (2010). Lityumun metabolik yan etkileri, Psikiyatride Güncel Yaklaşımlar 2: 26-51.
40. Allagui MS, Hfaiedh N, Croute F, Guermazi F, Vincent C, Soleilhavoup JP, El Feki A (2005). Side effects of low serum lithium concentrations on renal, thyroid, and sexual functions in male and female rats, C R Biologies 328: 900-911.
41. Raooft NT, Pearson RM, Turner P (1989). Lithium inhibits human sperm motility in vitro. Br J Clin Pharmacol 28: 715-717.
42. Pastarekova S, Parkkila S, Pastorek J, Supuran TC (2004). Carbonic anhydrases: current State of the art, therapeutic applications and future prospects. J Enzyme Inhib Med Chem 19: 199-229.
43. Pocker Y (2000). Water in enzyme reactions: biophysical aspects of hydrationdehydration processes. Cell Mol Life Sci 57: 1008–1017.
44. Akisawa N, Nishimari I, Miyaji E, Iwasaki S, Maedo T, Shimizu H, Sato N, Onishi S (1999). The ability of anti-carbonic anhydrase II antibody to distinguish autoimmune cholangitis from primary biliary cirrhosis in Japanese patients. Jour Gastroent 34: 366-371.
45. Maren TH, Jankowska I, Sanyal G, Edelhauser HF (1983). The Transcorneal permeability of sulfonamide carbonic anhydrase inhibitors and their effect on aqueous humor secretion. Exp Eye Res 36: 457-79.
46. Epstein DL, Grant WM (1977). Carbonic anhydrase inhibitors side effects; Serum Chemical Analysis. Arch Ophthalmol 95: 1378-82.

47. Whitney Renner S (2017). Metabolic characterization of mice lacking carbonic anhydrase III. Doctoral dissertation, University of North Carolina Genetics and Molecular Biology Curriculum, Chapel Hill.
48. Wilbur KM, Anderson NG (1948). Electrometric and Colorimetric Determination of Carbonic Anhydrase. *J Biol Chem* 76: 146.
49. Maren CH (1960). Simplified Micromethod for the Determination Carbonic Anhydrase and its Inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* 130: 26-9.
50. Alver A (1997). Belirli yaş gruplarındaki bireylerde serum total karbonik anhidraz ve karbonik anhidraz III aktivitelerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
51. Mathews CK, Holde KEV (1990). *Biochemistry*, The Benjamin Publishing Company Inc. Oxford; 308-317.
52. Verpoorte JA, Mehta S, Edsall JT (1967). Esterase Activities of Human Carbonic Anhydrases B and C. *J Biol Chem* 242: 4221-29.
53. Koester MK, Pullan LM, Noltmann EA (1981). The p-nitrophenyl Phosphatase Activity of Muscle Carbonic Anhydrase. *Arch Biochem Biophys* 211: 632-42.
54. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2012). *Biochemistry*. Sekizinci Baskı. W.H.Freeman & Co Ltd. New York; 264.
55. Supuran CT, Scozzafava A, Casini A (2003). Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Med Res Rev* 23: 146-189.
56. Temperini C, Scozzafava A, Vullo D, Supuran CT (2006). Carbonic Anhydrase Activators. Activation of Isozymes I, II, IV, VA, VII, and XIV with l- and d-Histidine and Crystallographic Analysis of Their Adducts with Isoform II Engineering Proton-Transfer Processes within the Active Site of an Enzyme. *Chem. Eur. J* 12: 7057 – 7066.
57. Briganti F, Scozzafava A, Supuran CT (1997). Carbonic Anhydrase Activators. Part 19 Spectroscopic and kinetic investigations for the interaction of isoenzymes I and II with primary amines. *Met Based Drugs* 4: 221-227.
58. Keha EE, Küfrevioğlu Öİ (2009). *Biyokimya*. Aktif Yayınevi, Erzurum.
59. Lindskog S (1997). Structure and mechanism of carbonic anhydrase. *Pharmacol. Ther* 74: 1-20.
60. Schcer A, Dietsch P (1984). A-54000 molecular weight protein with carbonic anhydrase activity in rabbit erythrocytes. *Annal New York Acad. Sci* 429: 241.

61. Arslan O, Nalbantođlu B, Demir N, Ozdemir H, Kufrevioglu OI (1996). A new method for the purification of carbonic anhydrase isozymes by affinity chromatography. *Turk. J. Med. Sci* 26: 163-166.
62. Roughton FJW, Booth VH (1946). The effect of substrate concentration, pH and other factors upon the activity of carbonic anhydrase. *Biochem. J* 40: 319.
63. Murakami H, Sly WS (1987). Purification and characterization human salivary carbonic anhydrase. *J. Biol. Chem* 262: 1382-1388.
64. Ekin D, Beydemir S (2010). Risk assessment of pesticides and fungicides for acidbase regulation and salt transport in rainbow trout tissues. *Pestic. Biochem. Phys* 97: 66-70.
65. Jomova K, Valko M (2011). Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* 283: 65–87.
66. Kűçük M (2015). Karadeniz alabalığı (*Salmo trutta Labrax*) bűbrek, karaciđer, solungaç ve kas dokularından karbonik anhidraz enziminin saflařtırılması, karakterizasyonu ve bazı metal iyonlarının enzim aktivitesi űzerine etkilerinin incelenmesi, Doktora Tezi, Atatűrk űniversitesi, Fen Bilimleri Enstitűsű, Erzurum.
67. Gulcin I, Beydemir S, Hisar O (2005). Effect of alpha-tocopherol oil antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Acta Vet. Hung* 53: 425-433.
68. Brown KM, Tracy DK (2013). Lithium: the pharmacodynamic actions of the amazing ion. *Ther Adv Psychopharmacol* 3(3): 163-76.
69. Supuran CT, Winum JY (2009). *Drug Design of Zinc-Enzyme Inhibitors: Functional, Structural, and Disease Applications*. Jhon Wiley&Sons Inc. New Jersey; 173-192.
70. Topal M (2009). Ciglitazonun glukoz 6 fosfat dehidrogenaz ve karbonik anhidraz II enzim aktiviteleri űzerine etkilerinin incelenmesi. Yűksek Lisans Tezi. Karadeniz Teknik űniversitesi. Sađlık Bilimleri Enstitűsű. Trabzon.

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı İlhan İRENDE
Doğum Tarihi 05.10.1984
E-posta ilhanirende@odu.edu.tr
Adres Ordu Üniversitesi Kimya Bölümü

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Ön Lisans	Kimya Teknolojisi	Atatürk Üniversitesi	2006
Lisans	Kimya Mühendisliği	Fırat Üniversitesi	2011
Yüksek Lisans	Tıbbi Biyokimya	KTÜ	2019

Yabancı Dil: İngilizce

