

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BIYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

BELİRLİ YAŞ GRUPLARINDAKİ SAĞLIKLI BİREYLERDE SERUM TOTAL KARBONİK
ANHİDRAZ VE KARBONİK ANHİDRAZ III AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

58830

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AHMET ALVER

AĞUSTOS, 1997
TRABZON

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

BELİRLİ YAŞ GRUPLARINDAKİ SAĞLIKLI BİREYLERDE SERUM TOTAL KARBONİK
ANHİDRAZ VE KARBONİK ANHİDRAZ III AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

AHMET ALVER

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 14 Ağustos 1997

Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 12 Eylül 1997

Tez Danışmanı

: Yrd. Doç. Dr. S. Caner KARAHAN

Jüri Üyesi

: Prof. Dr. Orhan DEĞER

Jüri Üyesi

: Doç. Dr. Asım ÖREM

Enstitü Müdürü

: Doç. Dr. Murat ERTÜRK

AĞUSTOS, 1997
TRABZON

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Enzimler Hakkında Genel Bilgi	2
2.2. Karbonik Anhidraz Hakkında Genel Bilgi	4
2.2.1. Karbonik Anhidraz İzoenzimleri	4
2.2.2. Karbonik Anhidrazın Metabolik Rolü	5
2.2.3. Karbonik Anhidraz III Hakkında Bilgi	6
2.2.4. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri	7
3. MATERYAL VE METOD	8
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Malzemeler	8
3.2. Kullanılan Cihazlar ve Aletler	8
3.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanmaları	8
3.4. Nümunelerin Toplanması	9
3.5. Karbonik Anhidraz Aktivitesi Tayini	10
3.6. Kullanılan İstatistiksel Metodlar	11
4. BULGULAR	12
5. TARTIŞMA	16
5.1. Metodların Tartışması	16
5.2. Bulguların Tartışması	18
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	20
7. ÖZET	21
8. İNGİLİZCE ÖZET	22
9. KAYNAKLAR	23

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Karbonik anhidraz (CA) aktif bölgesinde Zn^{2+} ihtiva eden monomerik bir proteindir. Günümüze kadar yedi tane CA izoenzimi tarif edilmiştir (CA I, II, III, IV, V, VI ve VII). Bu izoenzimler canlılarda yaygın olarak bulunurlar, ayrıca doku dağılımları ve hücre içi yerleşimleri farklıdır.

Karbonik anhidrazın fizyolojik rolü CO_2 hidrasyonunu dönüşümlü olarak katalizlemesinden ileri gelmektedir. Vücut sıvılarında asit-baz dengesinin sağlanması, membranlardan iyon transportu, beyin omurilik sıvısı ve gözün ön kamera sıvısının sentezi ve rezorbsiyonu ve bazı metabolitlerin sentezi gibi birçok olayda CA izoenzimleri önemli rol oynarlar.

CA III (CA M) iskelet kaslarına yüksek spesifikliğe sahip olan ve üzerinde en çok çalışma yapılan CA izoenzimidir. Çeşitli kas distrofilerinde, iskelet kası hasarına neden olan hadiselerde, ayrıca yüksek kan total kreatin kinaz aktivitelerinin izah edilmesinde önemli bir markör olduğu ortaya konulmuştur.

CA aktivitesi tayininde; manometrik, potansiyometrik ve kolorimetrik metodlar kullanılmaktadır. Ayrıca RIA ve EIA gibi spesifik metodlarla izoenzim tayinleri yapılmaktadır. Çeşitli hastalıklarda dokularda ve vücut sıvılarında CA miktarları tayin edilmiş ancak sağlıklı şahıslarda kan total CA ve CA III aktivitelerini belirleyen bir çalışma yapılmamıştır.

Bu çalışmada, CA'nın p-nitrofenil asetat esterini hidrolizleyici aktivitesini esas alan esteraz metodu ile sağlıklı bireylerin oluşturduğu belirli yaş gruplarında serum total CA ve CA III aktivitelerinin tayin edilmesi amaçlandı. Bu sahada benzeri bir çalışmanın olmaması ve CA izoenzimlerinin klinik önemi göz önüne alındığında bu çalışmanın ilgili sahada önemli bir boşluğu doldurma yönünde kıymetli bir adım olacağı aşikardır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Enzimler Hakkında Genel Bilgi:

Enzimler canlı ve cansız ortamlardaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir. Proteinlerin en büyük ve en spesifikleşmiş gurubunu oluştururlar. Canlılardaki reaksiyonların hemen tamamı enzimlerle katalizlenir. Enzimler subsrat adı verilen küçük moleküllere spesifik olarak bağlanır ve onları ürüne dönüştürürler. Kimyasal reaksiyonun gerçekleşmesi için gerekli olan aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyonu hızlandırırlar ve reaksiyonlara kontrol edilebilen bir hız kazandırırılar. Bu hız genellikle 10^3 - 10^8 kat arasındadır. Subsratlarına ve katalizledikleri reaksiyon tiplerine oldukça spesifiktirler. Reaksiyonlarda %100 verim sağlarlar ve hiç bir yan ürün oluşmasına izin vermezler(1-4).

Bazı enzimler katalitik aktivitelerini protein yapılarıyla gösterirlerken bir çoğu protein yapısında olmayan, kofaktör denilen kompleks organik bileşiklere ve metal iyonlarına ihtiyaç duyarlar.Kofaktörler genellikle enzime gevşek bağlıdır, ancak prostetik grup adı verilen kofaktörler enzime kovalent olarak bağlanırlar. Bunlara prostetik grup denir. Örneğin karbonik anhidraz enziminin yapısındaki Zn^{2+} prostetik gruptur(4,5-8).

Şimdiye kadar yaklaşık 3000 enzim tanımlanmış, bir çoğu saflaştırılmış ve kinetik özellikleri incelenmiştir. Tarif edilen enzim sayısının süratle artması ve bunların katalizledikleri reaksiyonların tipi ve mekanizmalarının açıklayıcı bir şekilde ifade edilebilmesi için Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) enzim komisyonu enzimleri yeniden tasnif etmiştir. Bu sınıflamada enzimler altı anagruba ayrılmaktadır.(Oksidoredüktazlar, Transferazlar, Hidrolazlar, Liyazlar ,İzomerazlar, Ligazlar) Her anagrup ise kendi içinde alt ve alt alt gruplara bölünmektedir. Her enzimin ismi ve sistematik kod numarası bulunmaktadır. Örneğin; karbonik anhidrazın sistematik kod numarası (E.C. 4.2.1.1)dir. Ancak buna rağmen enzimlerin katalitik etkisini gösterdikleri subsratın sonuna '-az' eki getirilmesine dayalı eski sınıflama pratikte hala kullanılmaktadır, üreaz, lipaz, amilaz, gibi (1,3,4,8).

Enzimlerin aktivitesini azaltan veya ortadan kaldıran bileşiklere inhibitör, bu olaya ise inhibisyon denir. İnhibitörler enzimin aktif bölgesine yada başka bir kısmına bağlanarak etkilerini gösterirler. Enzim inhibisyonu dönüşümlü ve dönüşümsüz olarak iki şekilde meydana gelir. Dönüşümsüz inhibisyonda inhibitör enzime ya kovalent bağlanır ya da zor ayrışabilen bir kompleks oluşturur. Dönüşümlü inhibisyonda ise enzim ile inhibitör etkileşmesi bir denge reaksiyonu şeklindedir. Enzim inhibisyonundan enzimlerin etki mekanizmasının incelenmesinde, bir metabolik yolun aydınlatılmasında, enzim aktivitesinin düzenlenmesinde ve enzim aktivitesinin tayininde yararlanılmaktadır(5,8-10).

Bir canlı türünde aynı reaksiyonu katalizleyen ancak farklı kimyasal yapıya sahip enzimlere izoenzim veya izozim denir. İzoenzimlerin substratlarına, kofaktörlerine ve inhibitörlerine karşı ilgileri farklıdır. Bu nedenle aktiviteleri de farklıdır. İzoenzimler farklı dokularda lokalize olabildiği gibi, bir hücrenin farklı subsellüler fraksiyonlarında da yerleşebilirler. Bu farklı yerleşim dokunun metabolik özelliğini belirleyen önemli bir faktördür(1,10-11).

Bir enzimin katalizleme gücü turnover sayısı ile ifade edilir. Turnover sayısı 1 mol enzimin birim zamanda ürüne dönüştürdüğü substratın mol. sayısı olarak ifade edilir. Bilinen enzimler içinde turnover sayısı en yüksek olan enzim karbonik anhidrazdır(600000 mol.sn⁻¹). Bir dokudaki veya çözeltideki enzim miktarı direkt konsantrasyon tayini veya enzim aktivitesi cinsinden belirtilmektedir. Enzim aktivitesi enzim ünitesi cinsinden verilir. Genel olarak 25 C⁰ de 1 mikromol substratı 1 dakikada ürüne çeviren enzim miktarına bir enzim ünitesi (EU veya U) denir. Eğer zaman birimi saniye madde miktarı mol olarak alınırsa enzim aktivitesi birimi katal olur. Spesifik aktivite ise 1 miligram protein başına düşen enzim ünitesi olarak tarif edilir (E.Ü/ mg protein) ve enzim saflaştırılması işleminde enzim saflığının bir göstergesi olarak kabul edilir. Enzim konsantrasyonu, substrat konsantrasyonu, pH, iyonik şiddet, sıcaklık, inhibitörler ve aktivatörler enzimlerin katalitik aktivitesini etkileyen en önemli faktörlerdir(1,11).

Enzimoloji günümüzde başlıbaşına bir bilim dalıdır. Enzimler ve bunların katalizlediği reaksiyonlardan kimya endüstrisi, gıda mühendisliği, tarım ve çevre mühendisliği ve tıp başta olmak üzere bir çok alanda yararlanılmaktadır. Tıp enzimlerin çok önemli kullanım alanlarından biridir ve enzimlerin tıptaki kullanımını dört ana başlık altında toplanabilir:

1- Dokularda ve vücut sıvılarındaki enzim miktarının ve aktivitelerinin tayini ile doku fonksiyonlarının taranması, patolojilerinin tespiti ve takibi yapılabilir.

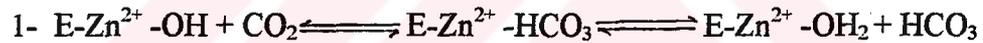
2- Canlı materyallerinde birçok molekülün miktar tayininde analitik bir araç olarak enzimler kullanılır.(Enzimatik tayin metodları)

3- Bir metabolik yolda görev alan enzimlerin inhibisyonu ile o metabolik yolun aydınlatılması mümkün olmuştur.

4- Günümüzde özellikle kalıtsal enzim defeklerine bağlı hastalıkların tedavisinde bizzat ilaç olarak enzimler kullanılmaktadır(10-11).

2.2. Karbonik Anhidraz Hakkında Bilgi:

Karbonik anhidraz (CA) sistematik adıyla karbonat hidrolizaz (E.C.4.2.1.1), 259-260 amino asit rezidüsü ihtiva eden 29-30 kDa molekül ağırlığına sahip monomerik bir proteindir. Aktif bölgesinde bir adet Zn^{2+} iyonu ihtiva eder ve bu metal iyonu katalitik aktivite için gereklidir. Karbonik anhidraz korbondioksitin(CO_2) hidrasyonunu veya bikarbonatın (HCO_3^-) dehidrasyonunu dönüşümlü olarak katalizler(12).



Şekil 1: Karbonik anhidraz tarafından katalizlenen CO_2 hidrasyonu reaksiyon mekanizması

Karbonik anhidraz yukarıdaki reaksiyonun yanında karbosilik, sülfonik, karbonik ve fosforik esterlerin ,aldehitlerin ,piruvatın hirolizininide katalizler. Ancak bunların fizyolojik önemi henüz gösterilmemiştir(13).

2.2.1. Karbonik Anhidraz İzoenzimleri:

Karbonik anhidraz canlılarda en yaygın metaloenzimdir. Memelilerde yedi farklı CA izoenzimi izole edilmiştir. CAI(B), II(C), III(M), IV, V, VI ve VII. Karbonik anhidraz izoenzimlerinin hücre içi yerleşimleri farklılık göstermektedir.Bunlardan CAI, II, III, VII sitozolde, IV hücre membranına bağlı, V mitokondride bulunur. CAVI ise sekrete edilir. CA izoenzimleri farklı bir doku dağılımı da gösterirler. CAI eritrositlerde bol miktarda bulunur,

diğer dokularda ise sınırlı miktardadır. CAI ve CAII hemen hemen bütün dokularda mevcuttur. CAIII iskelet kasları, diafragma ve özefagusta yüksek konsantrasyonda mevcuttur. CAIV özellikle akciğer ve böbreklerin proksimal tubullerinde bulunur. CAV karaciğer hücresi mitokondrisinde, CAVI insan, rat ve koyun tükrüğünde gösterilmiştir (14-16).

2.2.2. Karbonik Anhidrazın Metabolik Rolü:

Karbonik anhidrazın fizyolojik rolü CO₂ hidrasyonunu döşümlü olarak katalizlemesinden ileri gelmektedir. Akciğerlerde ve böbreklerde CO₂ atılımı ve asit- baz dengesi CAII ve CAIV tarafından düzenlenmektedir. Eritrositler bol miktarda CA ihtiva ederler, hemoglobinden sonra eritrositlerde en fazla bulunan protein CA dır. Eritrositlerde yüksek miktarda oluşan bu reaksiyon ve anyon kanalı vasıtasıyla asit- baz dengesine katkı yapılmaktadır, ayrıca CO₂ taşınabilmektedir. Kemiklerde remodeling fazının bir bölümünde osteoklastlar ihtiva etikleri CAII nin oluşturduğu asidik ortam sayesinde kemik rezorbsiyonunu gerçekleştirirler. Ayrıca bu yolla kemikten kalsiyum ve fosfat mobilisyonu sağlanır(15,17-19).

Sinir sistemi dokuları için CA esansiyeldir ve burada CAII, III ve IV bol miktarda bulunur. Santral sinir sisteminde asit- baz dengesini kontrolünde, miyelin sentezinde, beyin omurilik sıvısının sentezi, salgısı ve rezorbsiyonunda, ayrıca nöronal aktivitenin kontrolünde bu izoenzimlerin rol oynadığı ifade edilmiştir(20-21).

Lens ve cornea dokusunda CAII ve IV bulunduğu ve ön kamera sıvısının sekresyonu ve rezorbsiyonunda etkili olduğu bilinmektedir. Glokom tedavisinde uzun zamandan beri CA inhibitörleri kullanılmaktadır(22).

Dokularda, özellikle iskelet kasları ve kalp kasında metabolizma sonucu açığa çıkan asidik ürünlerin ve protonların tamponlanması CA aracılığı ile olmaktadır(14,23).

Hepatositlerde yağ asitlerinin sentezi sırasında substratlardan biri olan HCO₃⁻ CO₂ nin hidrasyonu ile temin edilmektedir(17,24)

Gastrik mukoza pariyetal hücrelerinden HCl salgılanması CA aracılığıyla olmaktadır. Tükürüğe salgılanan CAVI ve sindirim sisteminin üst dokularında bulunan CAII'nin tükürüğün proton ve tamponlama kapasitesini sağladıkları ve sindirim sisteminin üst kısımlarının asidik ortama karşı korunmasında rol aldıkları ifade edilmiştir(25).

Üre siklusu ve primidin nükleotidleri sentezinin başlangıç devresinde korbamoil fosfat sentezi reaksiyonlarının ihtiyaç duyduğu HCO_3^- substratı da CA'larca temin edilir. Piruvatın piruvat karboksilaz katalizörlüğünde oksaloasetata dönüşerek glukoneogenezde kullanılması da CA'larca temin edilen HCO_3^- varlığında olmaktadır(24).

Bilinen enzimler içersinde katalitik aktivitesi en yüksek olan enzim karbonik anhidrazdır($600000 \text{ mol.sn}^{-1}$). CA izoenzimlerinin aktif bölgelerindeki amino asit rezidülerinin farklılığından dolayı katalitik aktiviteleri birbirinden farklıdır. Katalitik aktivite sırası; CAII > CAIV > CAI > CAIII şeklindedir. Örneğin insan CAII maksimal CO_2 hidrasyonu turnoveri; $1.4 \cdot 10^6 \text{ sn}^{-1}$, insan CAIII için; $1 \cdot 10^4 \text{ sn}^{-1}$ dir(26).

2.2.3 Karbonik Anhidraz III Hakkında Bilgi:

Karbonik anhidraz III 30 kDa molekül ağırlığına sahip, 259-260 amino asit rezidüsünden ibaret ve sitozolik yerleşimli monomerik bir proteindir. Omurgalı iskelet kasları, özellikle tip I lifleri çok yüksek konsantrasyonlarda CAIII ihtiva ederler. Kastaki sitozolik proteinlerin yaklaşık %10 kadarı karbonik anhidrazdır. Ayrıca kalp kası, sindirim sistemi dokuları, tükrük bezleri, prostat, süt bezleri gibi dokularda da düşük miktarda mevcuttur(18,24,16,27).

CAIII aktif bölgesinin kendine has bir yapısı vardır. Aktif bölgedeki Zn^{2+} iyonuna bağlı amino asit rezidüleri lizin veya arginin 64, arginin 67 ve arginin 197 dir. Ayrıca aktif bölgedeki hidrofobik kısımda fenilalanin 198 ve izolösin 207 vardır. Bu yapı farklılığından dolayı CAIII'ün aktif bölgesi diğer izoenzimlere göre daha dar bir kavite oluşturmaya meyillidir. Aktif bölgenin bu özellikleri CAIII'ün CO_2 hidrasyonu aktivitesini ve CA inhibitörlerine ilgisini sınırlamaktadır(26).

CAIII'ün kesin fizyolojik rolü bilinmemektedir. Ancak kas hücresi metabolizması sonucu oluşan laktatın hücre dışına taşınırken beraberinde çıkaracağı H^+ iyonlarının intertisyel yüzeylerde neden olacağı ani pH düşmelerini $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ dengesini sağlayarak engellediği sanılmaktadır. Kalp kasında ise laktat ve yağ asitleri ile birlikte hücre içine giren H^+ iyonlarını temin ettiği düşünülmektedir(23,28).

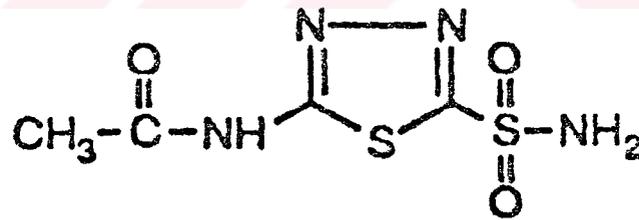
CAIII'ün yüksek iskelet kası spesifikliğı nedeniyle çeşitli nöromusküler hastalıklarda ve iskelet kası hasarına neden olan hadiselerde AST (aspartat aminotransferaz) ve CK (kreatin kinaz)'dan daha spesifik bir markör olduğu, ayrıca serum CK yüksekliklerinin

ayırıcı tanısında önemli bir markör olarak kullanılabilceği yapılan birçok çalışma ile ortaya konulmuştur(29,30).

2.2.4. Karbonik anhidraz inhibitörleri:

Karbonik anhidrazlar aktif bölgelerinde bulunan Zn^{2+} iyonuna bağlanan birçok iyon ve bileşik tarafından inhibe edilirler. Mononegatif anyonlar (halojenürler, N_3^- , NCO^- , SCN^- , CN^- gibi) ve bazı nötral organik bileşikler (sülfonamidler) enzime sıkıca bağlanarak dönüşümlü inhibisyona neden olurlar. Alkoller, organik solventler ve amid bileşikleri gibi diğer nötral inhibitörler ise enzime gevşek bağlanarak zayıf bir inhibisyon meydana getirirler(31-33).

Sülfonamid türevleri (asetazolamid, etokzolamid, metazolamid, klorzolamid gibi) CA'nın spesifik ve güçlü inhibitörleridir. İnhibisyon etkilerini ya enzimin aktif bölgesindeki Zn^{2+} iyonuna bağlı su molekülü ile yer değiştirerek ya da Zn^{2+} iyonuna ilave bir ligand bağıyla bağlanarak gösteren bu inhibitörler dönüşümlü inhibisyona neden olurlar. Bunlar daha çok deneysel inhibisyon için kullanılırlar. Ancak bunlardan en çok bilineni ve kullanılanı asetazolamidtir. Asetazolamid, farmakokinetik ve metabolik özelliklerinin uygunluğundan dolayı eskiden beri glokom, epilepsi, irtifa hastalığında ve diüretik tedavide kullanılmaktadır(18,31,34).



Şekil 2: Asetazolamid

Aktif bölgesinin farklılığından dolayı CA izoenzimlerinin asetazolamide karşı ilgileri birbirinden farklıdır. İnhibisyon konsantrasyonları sırasıyla; CAI: 200 nM, CAII: 10 nM CAIII: 306 nM ve CAIV: 35 nM şeklindedir. Görüldüğü gibi CAIII asetazolamid inhibisyonuna en dirençli izoenzimdir. Bu özellik CAIII'ün aktif bölgesindeki Zn^{2+} iyonuna bağlı amino asit rezidülerinin elektrostatik etkileri ve Zn^{2+} iyonunun diğer izoenzimlere göre çok daha dar bir kavitede yer almasına bağlanmaktadır. Ayrıca asetazolamid inhibisyonu yoluyla materyellerde total CA ve CAIII aktiviteleri tayini yapılabilmektedir(26,35).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Malzemeler:

Çalışmalarda kullanılan tris (hidroksimetilaminometan), sodyum hidroksit, sülfirik asit E. Merck AG(Almanya)'den; asetazolamid, p-nitrofenil asetat Sigma Chemical Comp.(ABD)'dan; aseton ise Birpa Ltd. Şti.(Türkiye)'den temin edildi. Deneyler sırasında deiyonize su kullanıldı ve tüm deney malzemeleri deiyonize sudan geçirildikten sonra kullanıldı.

3.2. Kullanılan Cihazlar ve Aletler:

Çalışmalar sırasında aşağıdaki cihaz ve aletlerden faydalanıldı:

Spektrofotometre	: LKB Ultraspec K-4053
Mağnetik karıştırıcı	: IKA- Labortechnik IKAMAG RH
Hassas terazi	: Chyo, electronic balance MP-300
Santrifüj	: Nüve NF-1215 ve Heraus sepatech, labofuge 200
pH metre	: Hanna instruments- 8416
Semiotomatik pipetler	: Socorex ve Biohit proline
Vorteks	: Stuart scientific autovortex mixer SA2
Kuartz küvet	: LKB Ultraspec cells

3.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanmaları:

Çalışmalar sırasında aşağıdaki çözeltiler hazırlandı ve kullanıldı(30):

1. 0.05 M tris-SO₄ tamponu (pH=7.00): 6.057 gram tris yaklaşık 900 mL deiyonize suda çözüldü ve 1N H₂SO₄ ile pH=7.00 oluncaya kadar titre edildi. Sonra toplam hacim deiyonize su ile 1 litreye tamamlandı. Bu çözelti numunelerdeki esteraz aktivitesi tayini için stok tampon çözeltisi olarak kullanıldı.

2. 1N H₂SO₄ çözeltisi: %98.8 lik ve yoğunluğu 1.84 kg/L olan H₂SO₄ ten 1.3 mL alınıp 60-70 mL deiyonize suya yavaşça ilave edildi sonra hacim deiyonize su ile 100 mL'ye tamamlandı. Bu çözelti tris-SO₄ (pH= 7.00) tamponu hazırlanmasında kullanıldı.

3. 1N NaOH çözeltisi: 4 gram NaOH 70-80 mL deiyonize suda çözüldü ve hacim deiyonize su ile 100 mL'ye tamamlandı. Bu çözelti eşdeğer tampon ve inhibitör çözeltilerinin hazırlanmasında kullanıldı.

4. Eşdeğer tampon çözeltisi: 4.8 mL 1N NaOH çözeltisi alındı ve üzerine 0.05 M tris-SO₄ (pH=7.00) çözeltisi ilave edilerek hacim 50 mL'ye tamamlandı. Bu çözelti esterase aktivitesi tayinlerinde inhibitör çözeltilerinde bulunan NaOH'dan kaynaklanacak pH değişmelerini engellemek amacıyla kullanıldı(36-37).

5. 0.1 M asetazolamid çözeltisi: 1.11 gram asetazolamid alındı ve bunun tamamen çözünebildiği minimum miktar olan 4.8 mL 1N NaOH içinde çözüldü. Daha sonra 0.05 M tris-SO₄ (pH=7.00) çözeltisi ile hacim 50 mL'ye tamamlandı. Bu çözelti numunedeki karbonik anhidraz aktivitesini tamamen inhibe etmek için stok inhibitör çözeltisi olarak kullanıldı.

6. 0.001 M asetazolamid çözeltisi: 0.1 M asetazolamid çözeltisinden 0.5 mL alınarak üzerine 4.8 mL NaOH ilave edildi. Daha sonra hacim 0.05 M tris-SO₄ (pH=7.00) ile 50 mL'ye tamamlandı. Bu çözelti numunedeki total karbonik anhidraz aktivitesini kısmen inhibe etmek için stok inhibitör çözeltisi olarak kullanıldı.

7. 3 mM p-nitrofenil asetat çözeltisi: 27.2 mg p-nitrofenil asetat 1 mL aseton içinde çözüldükten sonra yüksek hızda karıştırılan 49 mL deiyonize suya yavaş yavaş ilave edildi. Bu çözelti esterase aktivitesi tayinlerinde substrat olarak kullanıldı. P-nitrofenil asetatın kendine hidrolizi gözönüne alınarak bekletilmenin ölçüm sonuçlarını değiştirecek muhtemel etkisini engellemek için her deneyden önce taze olarak hazırlandı. P-nitrofenil asetatın sınırlı çözünürlüğünden dolayı daha derişğini hazırlamak mümkün olmamış, ayrıca diğer organik çözücülere nisbeten hidroliz reaksiyonunu en az inhibe ettiği için çözücü olarak aseton tercih edilmiştir(36).

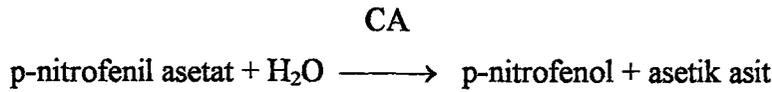
3.4.Nümunelerin Toplanması:

Normal kan total CA ve CAIII aktivitelerini tayin edebilmek amacıyla fizik muayneleri ve laboratuvar tetkikleri sonunda normal olarak ifade edilen, yaşları 1-70 arasında değişen çeşitli yaş guruplarına mensup 90 şahıs (45 erkek ve 45 kadın) seçildi. Bu şahısların açlık kan nümuneleri normal tüplere alındı. Pıhtılaşması beklenen nümuneler 1000 g de 15 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Nümunelerin alınması ve serumların eldesi sırasında hemoliz riskine karşı son derece dikkatli çalışıldı. Hemolizli serumlar

çalışmaya dahil edilmedi. Bekletilmeye bağlı CA aktivitesi kaybını engellemek için serum nümunelerinde hemen aktivite tayinleri yapıldı.

3.5. Karbonik Anhidraz Aktivitesi Tayini:

Serum CA aktivitesi tayinleri Amstrong ve arkadaşları tarafından geliştirilen esteraz metoduna göre yapıldı. Bu metod CA'nın p-nitrofenil asetatı p-nitrofenol ve asetata hidrolizlemesi ve oluşan p-nitrofenolün 348 nm'de verdiği absorbansın spektrofotometrik olarak takip edilmesi esasına dayanır. Reaksiyon sonunda oluşan p-nitrofenolün absorbansı CA aktivitesi ile direkt ilişkilidir. Reaksiyonun denklemi şu şekildedir(36):



Serum total CA ve CAIII aktiviteleri tayini için sırasıyla şu işlemler yapıldı:

İlk önce serumdaki toplam esteraz aktivitesini bulmak için; kuartz küvete 1.3 mL tris-SO₄ (pH=7.00) tamponu, 0.1 mL eşdeğer tampon ve 0.1 mL serum konularak iyice karıştırıldı. Üzerine 1.5 mL p-nitrofenil asetat ilave edilerek son hacim 3 mL'ye tamamlandı; karıştırıldı ve 348 nm'de absorbansı hemen okundu. Sonra 3 dakika boyunca absorbanslar okundu ve $\Delta A/\Delta t$ değeri bulunarak total esteraz aktivitesi U/L cinsinden hesaplandı.

İkinci olarak; serum total esteraz aktivitesi içindeki total CA aktivitesi payını bulabilmek için kuartz küvetlere 1.3 mL tris-SO₄, 0.1 mL serum ve 0.1 M asetazolamid çözeltisinden 100 μL eklendi. Enzim-inhibitör etkileşmesinin tamamlanabilmesi için 10 dakika inkübasyona bırakıldı. 10 dakikanın sonunda küvete 1.5 mL p-nitrofenil asetat ilave edildi ve hemen absorbansı okundu. Üç dakika boyunca absorbanslar takip edildi ve $\Delta A/\Delta t$ değeri bulunarak esteraz aktivitesi hesaplandı. Hesaplanan bu değer serum total CA aktivitesi dışındaki esteraz aktivitesini yansıtmaktaydı.

Üçüncü safhada ise serum CAIII aktivitesini tayin etmek için; kuartz küvete 1.3 mL tris-SO₄ (pH= 7.00) , 0.1 mL serum ve 0.001 M asetazolamid çözeltisinden 100 μL ilave edildi, karıştırıldı ve 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Sonra küvete 1.5 mL p-nitrofenil asetat ilave edilerek hemen absorbansı okundu. Üç dakika boyunca absorbanslar takip edildi ve $\Delta A/\Delta t$ değeri bulunarak esteraz aktivitesi hesaplandı. Hesaplanan bu değer serumdaki

CAIII ve CA dışındaki moleküllerden kaynaklanan esteraz aktivitesini yansıtmaktaydı. Buna göre:

1. Basamak: serumdaki total esteraz aktivitesini,
2. Basamak: serumda total CA aktivitesi dışındaki moleküllerin esteraz aktivitesini,
3. Basamak: serumda CAIII ve CA dışı moleküllerin esteraz aktivitesi toplamını ifade etmektedir. Basamaklar arasında gerekli sadeleştirme yapıldığında; 1-2 = serumdaki total CA aktivitesini ve 3-2 = serumdaki CAIII aktivitesini verecektir.

Nümunelerdeki esteraz aktiviteleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı(38):

$$b = \frac{\Delta A \times V \times 1000}{\epsilon \times d \times \Delta t \times v} = \frac{\Delta A \times 1000}{\epsilon \times d \times \Delta t \times \phi}$$

b: katalitik aktivite (U/L)

A: absorbans

V: toplam hacim (3 mL)

ϵ : p-nitrofenil asetatın molar absorbtivite katsayısı ($0.5 \text{ mmol}^{-1} \times \text{mm}^{-1}$)

d: ışık yolu (10 mm)

v: örnek hacmi (0.1 mL)

ϕ : v/V oranı

Buna göre CA aktivitesi; $b = \Delta A / \Delta t \times 6000$ üzerinden hesaplanır.

3.6 Kullanılan İstatistiksel Metodlar:

Bütün gruplarda elde edilen değerlerin aritmetik ortalamaları (X), standart sapmaları (SD) hesaplandı. Hesaplanan X ve SD değerlerinden grupların normal dağılıma uygunlukları test edildi. Grup ortalamaları arasındaki farkın önemini belirtmek için varyans analizleri, cinsiyetlere ait ortalamalar yönünden grup içinde ve gruplar arasındaki farkın önemini belirtmek için ise Mann-Whitney U testi kullanıldı. Bu istatistiksel analizler IBM marka bilgisayar ve SPSS 6.1.3 istatistik programında yapıldı(39).

X: Aritmetik ortalama

SD: Standart sapma

p: İstatistiksel önemlilik

4. BULGULAR

Belirli yaş gruplarına ait sağlıklı 90 şahısta(45 erkek ve 45 kadın) esteraz metoduna göre ölçülen total CA ve CAIII aktiviteleri tablo-1 ve tablo -2'de verilmiştir.

Tablo I : Serum total CA aktivitesi düzeyleri (U/L)

Yaş grubu	Cinsiyet	n	X ± SD	Güvenirlik sınırı %95
1-20	Erkek	15	318 ± 116 ^a	318-404
	Kadın	15	405 ± 96 ^b	
	Toplam	30	361 ± 114 ^d	
20-40	Erkek	15	206 ± 56 ^{ac}	158-208
	Kadın	15	160 ± 74	
	Toplam	30	183 ± 68	
40 ve üzeri	Erkek	15	158 ± 53 ^a	144-182
	Kadın	15	166 ± 53	
	Toplam	30	163 ± 52	
GENEL	Erkek	45	228 ± 104	197-259
TOPLAM	Kadın	45	243 ± 137	201-285
	Toplam	90	235 ± 121	210-260

^a Gruplar arasında p<0.05 düzeyinde fark vardır.

^b 1-20 yaş gurubu ortalama değerleri diğer yaş gruplarından p<0.001 düzeyinde farklıdır.

^c İki cinse ait ortalamalar arasında p<0.005 düzeyinde fark vardır.

^d 1-20 yaş grubu ortalama değerleri diğer yaş gruplarından p<0.05 düzeyinde farklıdır.

Tablo II : Serum total CA III aktivitesi düzeyleri (U/L)

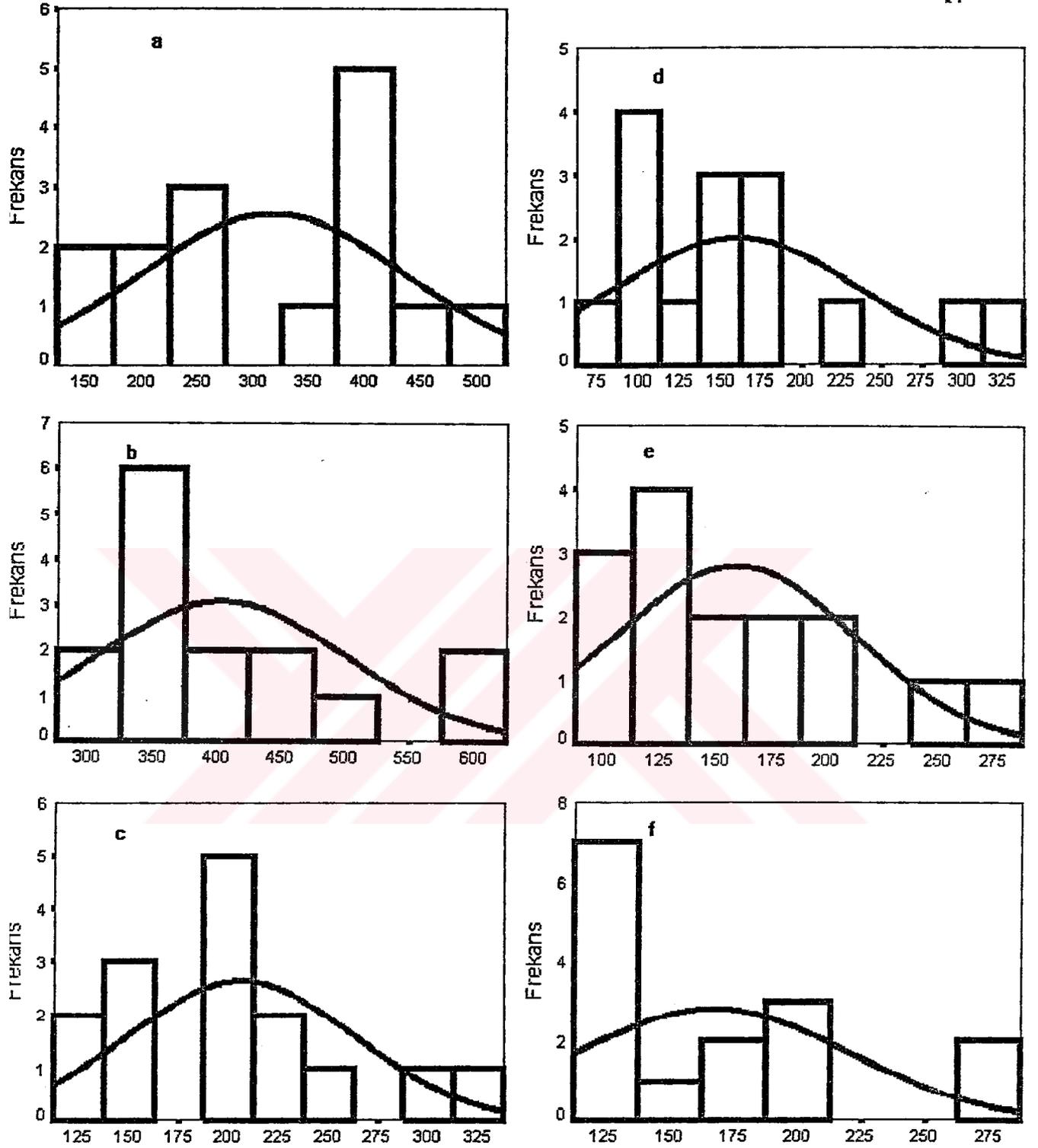
Yaş grubu	Cinsiyet	n	X ± SD	Güvenirlilik sınırı %95
1-20	Erkek	15	191 ± 119 ^a	154-246
	Kadın	15	208 ± 128 ^{b,c}	
	Toplam	30	200 ± 122 ^d	
20-40	Erkek	15	107 ± 47 ^a	82-118
	Kadın	15	94 ± 48 ^b	
	Toplam	30	100 ± 47	
40 ve üzeri	Erkek	15	76 ± 42 ^a	74-114
	Kadın	15	113 ± 57 ^c	
	Toplam	30	94 ± 53	
GENEL	Erkek	45	125 ± 91	98-152
TOPLAM	Kadın	45	137 ± 98	107-167
	Toplam	90	132 ± 94	112-152

^a Gruplar arasında p<0.05 düzeyinde fark vardır.

^b 1-20 yaş grubu ortalama değerleri 20-40 yaş grubundan p<0.001 düzeyinde farklıdır.

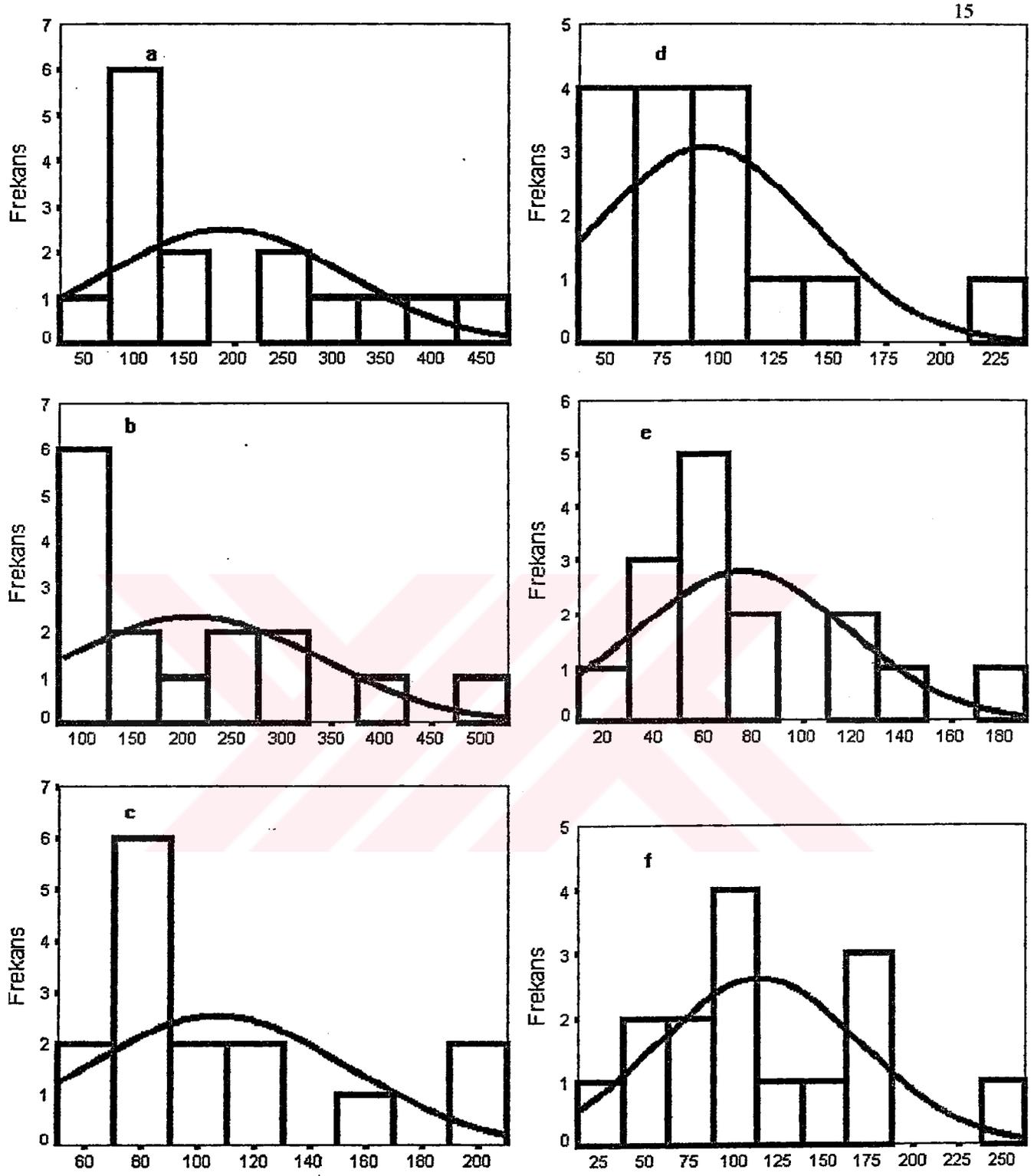
^c 1-20 yaş grubu ortalama değerleri 40 ve üzeri yaş grubundan p<0.05 düzeyinde farklıdır.

^d 1-20 yaş grubu ortalama değerleri diğer yaş gruplarından <p0.05 düzeyinde farklıdır.



Şekil 3: Total CA aktivitesi düzeylerinin yaş grupları ve cinsiyetlere göre dağılım histogramları

- a) 1-20 yaş grubu, erkek b) 1-20 yaş grubu, kadın c) 20-40 yaş grubu, erkek
d) 20-40 yaş grubu, kadın e) 40 ve üzeri yaş grubu, erkek f) 40 ve üzeri yaş grubu, kadın



Şekil 4: CAIII aktivitesi düzeylerinin yaş grupları ve cinsiyetlere göre dağılım histogramları

- a) 1-20 yaş grubu, erkek b) 1-20 yaş grubu, kadın c) 20-40 yaş grubu, erkek
d) 20-40 yaş grubu, kadın e) 40 ve üzeri yaş grubu, erkek f) 40 ve üzeri yaş grubu, kadın

5. TARTIŞMA

5. 1. Metodların Tartışması:

Karbonik anhidraz aktivitesi tayininde çeşitli metodlar kullanılmaktadır. Manometrik metodlar; karbonik anhidrazın katalizlediği reaksiyonda ortamda artan yada azalan CO₂ gazı kısmi basıncının ölçülmesi esasına dayanır. Hassasiyetinin azlığı, deneyler sırasında hızlı ve şiddetli karışırmalarda enzimin denatüre olması gibi dezavantajları vardır. Potansiyometrik metodlarda CO₂ hidrasyonu sonrası açığa çıkan H⁺ 'dan kaynaklanan pH değişimi takip edilir. Kolorimetrik metodlarda ise, reaksiyonda meydana gelen pH değişimini izleyen indikatörün renk dönüşümü için geçen süre hesaplanarak enzim aktivitesi tayin edilir. Ancak CO₂ gazının sudaki sınırlı çözünürlüğü, reaksiyon sırasında pH'da meydana gelen sürekli değişimler, kullanılan indikatörün reaksiyonu inhibe edici etkisi gibi önemli dezavantajlar mevcuttur. Bu faktörler metodların hassasiyetlerini ve analitik sensitiviteğini azaltmaktadır(40-41).

Karbonik anhidraz izoenzimlerinin RIA ve EIA gibi spesifik metodlarla tayin edilmesi çalışmaları devam etmektedir. İzoenzimlerden üzerinde en çok çalışılan CAIII olup bunun tayini için geliştirilen RIA ve EIA esasına dayalı kitler kullanıma sunulmuştur. Henüz kullanım imkanı bulamamamıza rağmen hassasiyetleri ve spesifitlikleri yüksek olan bu metodların prosedürleri incelendiğinde rutin kullanım için uygun olmadıkları görülmektedir. Tayinin birkaç safadan oluşması ve birkaç saatlik uzun bir süreyi kapsaması ayrıca reaktiflerinin belirli nümune sayısı için kullanıma uygun olması bu metodların daha ziyade biriktirilmiş nümunelerde veya araştırmaya yönelik çalışmalarda CAIII tayini için uygun olduğunu ifade etmektedir. CAIII tayini için gerekli reaktiflerin maliyeti ve teminindeki zorlukların da gözardı edilmemesi gerekmektedir(16,25).

Karbonik anhidraz aktivitesi tayininde enzimin ester hidrolizleyici özelliğini(esteraz aktivitesi) esas alan çeşitli metodlar geliştirilmiştir. Bunlardan üzerinde en çok çalışılanlar enzimin p-nitrofenol asetat üzerine hidrolizleyici etkisine dayananlardır. Buna göre, karbonik anhidrazın katalizlediği reaksiyonla p-nitrofenilasetat p-nitrofenole dönüşür.

oluşan bu sarı renkli ürün 348 nm dalga boyunda verdiği absorbans takip edilerek esterez aktivitesi hesaplanır. Nümunelerde p-nitrofenil asetatı hidrolizleyen başka moleküllerin varlığı bilindiği için bulunan bu değer total esterez aktivitesidir. Bu değer içerisinde CA aktivitelerinin payını belirlemek için ortama spesifik CA inhibitörü olan asetazolamid ilave edilmektedir. Asetazolamid deney ortamına değişen konsantrasyonda ilave edilerek CA tamamen veya kısmen inhibe edilmektedir. Böylece nümunedeki total esterez aktivitesi içindeki total CA aktivitesi ve CAIII aktivitesi payları bulunmaktadır. Ortamda p-nitrofenil asetatı hidrolizleyen başka moleküllerin varlığı metodun spesifikliğini düşürmekte isede spesifik CA inhibitörü kullanılması bu dezavantajı gidermektedir. Ayrıca spesifik CA inhibitörü kullanılması zorunluğu nedeniyle deney süresi total CA aktivitesi tayini için yaklaşık 20 dakika, CAIII aktivitesi için yaklaşık 40 dakikaya ulaşmaktadır. Bu süre rutin analizler için uzun gözükse de deneyin manueliği ve CA aktivitesi tayininde kullanılan diğer metodların özellikleri düşünüldüğünde kıymetli bir alternatif olduğu kanısındayız(42-43).

Metodun uygulamadaki basitliği ve kolaylığı, gerekli reaktiflerin ucuzluğu ve kolay temin edilebilmesi, ayrıca lüzumu halinde tekrarlanabilme imkanı bu tayin metodunun her laboratuvar tarafından yapılabileceğini göstermektedir. Bu metodun kullanılması esnasında nümunelerin bekletilmesi söz konusu değildir. Böylece nümunelerde bekletilmeden veya stok edilmeden kaynaklanacak değişiklikler sorun olmayacaktır. Ancak enzimatik bir reaksiyon söz konusu olduğu için kullanılan reaktiflerin hazırlanması ve ekipmanların temizliği, cihazların hassasiyeti çok önemli bir etkidir. Tampon, substrat ve inhibitör çözeltilerinin hazırlanması esnasında, deneylerin yapıldığı ekipmanın temizliğinde ve hassasiyetinde, kullanılan cihazların hassasiyetinde ve deney ortamı sıcaklığındaki değişmelerinin deney sonuçlarını ciddi bir şekilde etkileyeceği unutulmamalıdır.

Çalışılan nümune kan ise kan örneklerinin alınması ve serumlarının ayrılması arasındaki bütün safalar önem kazanır. Eritrositler çok fazla miktarda CA izoenzimleri ihtiva ettiği için nümunelerde meydana gelecek hemoliz kandaki CA aktivitesini yükseltecek ve yanlış sonuçlara neden olacaktır(14,24).

Kullandığımız metodun presizyonunu belirleyebilmek amacıyla , yani deney içi ölçümler arası farklılık miktarını belirlemek amacıyla hazırladığımız bir serum havuzundan aynı gün içinde tekrarlanan tayinler yaptık. Sonuçta; Total CA için $X \pm SD = 345 \pm 14$ ve bağıl değişim katsayısı (CV) = 4, CAIII için $X \pm SD = 104 \pm 8$ ve bağıl değişim katsayısını

(CV) = 7.6 olarak bulduk. Bu sonuçlar bize ölçümler arasında farklılık miktarının düşük olduğunu yani metodun performansının iyi olduğunu göstermektedir.

Manometrik, potansiyometrik, kolorimetrik ölçümlerin yukarıda bahsedilen dezavantajlarından, RIA ve EIA gibi metodların gerek teminindeki zorluklar gerekse de maliyetleri göz önüne alınarak çalışmalarımızda Armstrong ve arkadaşları tarafından geliştirilen esteraz metodu kullanıldı.

5.2. Bulguların Tartışması:

Karbonik anhidrazlar canlılarda yaygın olarak bulunurlar ve geniş bir doku dağılımına sahiptirler. Daha önce de ifade edildiği gibi metabolik fonksiyonlara önemli katkıları vardır. Bugüne kadar CA'lar hakkında pekçok araştırma yapılmış olup son yıllarda CAII, III ve IV üzerinde çalışmalar hızlanmıştır. Ancak kanda total CA aktivitesi seviyeleri ve bu aktiviteye iştirak eden izoenzimlerin cinsi ve aktivite paylarını ifade eden bir çalışma mevcut değildir. Bu nedenle bir başlangıç kademesi olarak bu çalışma planlandı ve belirli yaş gruplarına mensup kadın ve erkeklerden oluşan 90 şahısta kan total CA ve CAIII aktivitesi seviyeleri tespit edildi.

Genel olarak total CA ve CAIII aktivitesi seviyeleri yönünden gruplar arasında bir mukayese yapıldığında birinci gruptaki aktivite seviyelerinin diğer iki gruptan anlamlı olarak yüksek olduğu gözlemlendi($p < 0.05$). Birinci grubun 1-20 yaş arasındaki şahıslardan oluştuğu hatırlandığında sentez, büyüme ve metabolik faaliyetlerin en hızlı olduğu dönem olması nedeniyle bu yaş grubunda daha yüksek total CA ve CAIII aktivitesi seviyelerine rastlanması beklenen bir netice oldu(27,44-45).

Her grup, cinsiyetler arasındaki aktivite farklılıkları yönünden kendi içinde değerlendirildiğinde ise total CA aktivitesi seviyeleri grup 1 ve 3'de farklı bulunmazken grup 2'de anlamlı olarak farklı bulundu($p < 0.05$). CAIII aktiviteleri yönünden değerlendirme yapıldığında ise her üç grupta da bu seviyelerin cinsiyetler arasında farklı olmadığı gözlemlendi. Total CA aktivitelerinin sadece ikinci grupta cinsiyetler arasında farklı bulunması erişkin erkek ve kadın kas kitlesi farklılığına bağlanabilir. Ancak CAIII seviyelerinin de buna uygun olarak ikinci grupta farklı olması beklenirdi(29-30,45-46).

Her iki cinsin kendi ortalama total CA ve CAIII aktivite değerlerinin gruplar arasında mukayesesi yapıldığında, birinci gruptaki total CA ve CAIII aktivitesi seviyeleri diğer gruplardan anlamlı olarak yüksek bulundu(sırasıyla $p < 0.05$ ve $p < 0.001$). İkinci ve üçüncü

gruplar arasında bu yönden anlamlı bir fark yoktu. Total CA ve CAIII aktivitelere ait bu farklılığı yine 1-20 yaş grubu şahısların biyolojik ve metabolik özelliklerine bağlamak mümkündür(27,44-45).

Hem total CA hem de CAIII aktivitesi seviyelerinin hayatın ilk 20 yılında diğer gruplara göre yüksek bir değerden başlayarak yaşla azaldığı ve ileri yaşlarda bu değer biraz daha azalarak devam ettiği görülmektedir. İleri yaşlardaki bu değişikliği sentez hızının azalmasına, kaybın ve yıkımın artmasına dolayısıyla kas kitlesinin de azalmasına bağlayabiliriz(46).

CAIII'ün iskelet kaslarında yüksek miktarda bulunduğunu ifade etmiştik. Kas kitlesi göz önüne alındığında kan CA aktivitesine kas kaynaklı CA izoenzimlerinin katkısının yüksek miktarda olacağı aşıkardır. Nitekim yapılan tayinlerde gruplarda ve her iki cinsde serum CAIII aktivitesinin total CA aktivitesinin hemen hemen yarısı kadar bulduk. Serum total CA aktivitesinin tam olarak hangi izoenzimlerden kaynaklandığını bilmemekle beraber bulunan sonuçlar bu aktivitenin yarıya yakın bir kısmının CAIII'den ileri geldiğini göstermektedir. Ayrıca bazı nöromusküler hastalıklarda(Duchenne kas distrofisi, Rabdomiyoliz ve Progressif Musküler Distrofi gibi) ve iskelet kası travmasına maruz kalan şahıslarda yapılan CAIII aktivitesi tayinlerine yönelik çalışmalar bu payın daha da artığını hatta total CA aktivitesinin büyük bir kısmına ulaştığını göstermektedir(29,47).

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar kanda karbonik anhidraz aktiviteleri hakkında bir ön fikir sağlama açısından kıymetli görünmektedir. Ayrıca klinisyenlerin ve bu sahadaki araştırmacıların yaralanabileceği bir kaynak vazifesi görecektir.

6.SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmadan ve bulgulardan elde edilen sonuçlar şu şekilde ifade edilebilir:

1- Esteraz metodu kan total CA ve CAIII aktiviteleri tayini için iyi performansı, diğer metodlara göre kolaylığı, ucuzluğu, pratikliği ve tayinlerin tekrarlanabilme imkanı nedeniyle her laboratuvar tarafından rahatça kullanılabilir.

2- Yaşa ve cinse bağımlı olarak CA aktiviteleri farklılık göstermektedir. Bu çalışma yaş grubu sayısı ve nümune sayısı artırılarak tekrar edilirse bu konuda önemli bir referans olacaktır.

3- Kan total CA aktivitesinin önemli bir kısmının CAIII'den kaynaklandığı görülmektedir. Diğer kısma iştirak eden CA izoenzimlerinin tanımlanmasına yönelik çalışmalar yapılabilir.

4- CAIII tayinlerinde referans metod olarak görülen EIA ve RIA reaktifleri temin edilerek metodlararası mukayese yapılabilir ve esteraz metodunun özellikleri daha ayrıntılı ifade edilebilir.

5- Özellikle doku hasarı sonrası CA'ların kana sızma, pik yapma ve normale dönme sürelerini takip eden bir çalışma yapılabilir.

7.ÖZET

Karbonik anhidrazlar Zn^{2+} iyonu ihtiva eden monomerik enzimlerdir. CO_2 hidrasyonu veya HCO_3^- dehidrasyonunu katalizlerler. Fizyolojik öneme sahip bu reaksiyon yardımıyla asit-baz dengesi, membranlardan iyon ve sıvı transportu, yağ asitleri ve nükleotidlerin sentezi gibi birçok metabolik olayda önemli bir role sahiptirler. Ancak günümüze kadar kanda CA aktivitesi seviyelerini ifade etmeye yönelik bir çalışma mevcut değildir. Bu çalışmada belirli yaş gruplarına ait sağlıklı bireylerde kan total CA ve CAIII aktiviteleri tayin edildi.

Analizlerde esteraz metodu kullanıldı ve reaktifleri laboratuvarında hazırlandı. Çalışma kapsamına 45 erkek ve 45 kadın olmak üzere toplam 90 kişi dahil edildi.

Total CA aktiviteleri(aritmetik ortalama \pm standart sapma,U/L) 1-20 yaş grubunda erkeklerde(n=15) 318 ± 116 ve bayanlarda(n=15) 405 ± 96 , 20-40 yaş grubunda erkeklerde(n=15) 206 ± 56 ve bayanlarda(n=15) 160 ± 74 , 40 ve üzeri yaş grubunda erkeklerde(n=15) 158 ± 53 ve bayanlarda 166 ± 53 olarak bulundu. CAIII aktiviteleri ise 1-20 yaş grubunda erkeklerde(n=15) 191 ± 119 ve bayanlarda(n=15) 208 ± 128 , 20-40 yaş grubunda erkeklerde(n=15) 107 ± 47 ve bayanlarda(n=15) 94 ± 48 , 40 ve üzeri yaş grubunda erkeklerde(n=15) 76 ± 42 ve bayanlarda(n=15) 113 ± 57 şeklindeydi.

Buradaki veriler total CA ve CAIII aktiviteleri için referans değerlere ait bir ön çalışma olarak kabul edilebilir.

SUMMARY

Carbonic anhydrases are monomeric enzymes which contain zinc ion and catalyse the hydration of CO_2 or dehydration of HCO_3^- . The reaction has an important physiological role in many metabolic processes such as acid-base equilibrium, ion and fluid transport from the membranes and the synthesis of fatty acids and nucleotides. In spite of that, there are not any study to define the blood CA activity until now. In the present study, serum total CA and CAIII activities of healthy individuals were assayed.

In analysis, esterase method was used and its reagents were prepared in our laboratory. Study group included 90 individuals (45 male and 45 female).

Total CA activities (arithmetic mean \pm standard deviation, U/L) were found as 318 ± 116 for male (n=15) and 405 ± 96 for female (n=15) with the age of 1-20, 206 ± 56 for male (n=15) and 160 ± 74 for female (n=15) with the age of 20-40 and 158 ± 53 for male (n=15) and 166 ± 53 for female (n=15) with the age greater than 40. CAIII activities for male (n=15) and female (n=15) with the age of 1-20 were 191 ± 119 and 208 ± 128 , with the age of 20-40 were 107 ± 47 and 94 ± 48 , and with the age of above 40 were 76 ± 42 and 113 ± 57 , respectively.

The data obtained in the study may be accepted as a preliminary study about reference ranges of CA and CAIII activities.

9.KAYNAKLAR

1. Keha, E.E. ve Küfrevioğlu, I. : Biyokimya. İkinci Baskı. Derya kitabevi, Trabzon, 1993, s. 89 - 134
2. Stryer, L. :Biochemistry. Third edition W. H. Freeman and Company, New York, pp. 177 - 260
3. Karlson, P. :Tıp ve Fen Bilimcileri İçin Biyokimya (Çev. A. Telefoncu). Arkadaş Tıp Kitapları, Kırklareli, 1988, s. 64 - 82
4. Champe, P.C. and Harvey, R.A. : Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry. Second Edition. J.B. Lippincott Company, Philadelphia, 1994, pp. 47 - 60
5. Onat, T. ve Emerk, K. :Temel Biyokimya. Saray Medikal Yayıncılık San. ve Tic. Ltd. Şti. , İzmir, 1996, s. 269 - 283
6. Ersoy, E. ve Bayşu N. : Biyokimya. Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 1986, s. 360 - 465
7. Baldwin, E. : The Nature of Biochemistry. Second Edition. Cambridge at The University Press, 1967, pp. 36 -47
8. Smith, E.L. , Lehman, I.R. , Lefkowitz, R.J. ,Handler, P. , White, A. : Principles of Biochemistry General Aspects. Seventh Edition. McGraw-Hill Book Company, Hamburg, 1985 pp. 179 - 240
9. Montgomery, R. , Conway, T. W. , Spector, A. A. : Biochemistry A Case - Oriented Approach. Fifth Edition. The C.V. Mosby Company, Philadelphia, 1990 pp. 95 - 146
10. Bhagavan, N.V. : Medical Biochemistry. Jones and Bartlett Publishers, Boston, 1992, pp. 82 - 124
11. Gözükar, E. M. :Biyokimya. İkinci Baskı. Evin Matbaası, Malatya, 1994 s. 572 - 720
12. Lindskog, S. , Behravan, G. , Engstrand, C. , Forsman, C. , Jossion, B.H. , Liang, Z. , Ren X. , Xue, Y. : Structure-Function Relations in Human Carbonic Anhydrase II as Studied by Site-Directed Mutagenesis. In The Carbonic Anhydrase from Biochemistry and Physiology and Clinical Medicine. Botré F. Storey, B. T. Gros, G. (Eds) VCH Publishers, Wienheim,1991 pp. 1 - 13

13. Pocker, Y. : Moleküler Control of Carbonic Anhydrase Activity: Ionic Effectors, Differential Modifiers and Novel İnhibitors. In The Carbonic Anhydrase from Biochemistry and Physiology and Clinical Medicine. Botré F. Storey, B. T. Gros, G. (Eds) VCH Publishers, Wienheim, 1991 pp.74 - 86
14. Keha, E. E. , Küfrevioğlu, I. : Karbonik Anhidraz: I. İzoenzimleri ve Canlılardaki Dağılımı. *Biyokiya Dergisi.* , 14 (1) : 65 - 74, 1989
15. Scriver, C.R. , Beaudet, A.L. , Sly, S.W. , Valle, D. : The Metabolic Basis of Inherited Disease. Sixth Edition. McGraw-Hill Information Services Company, New York, 1989 pp.2857 - 2866
16. Kato, K. and Mukuno, K. : Distribution of Immunoreactiver Carbonic Anhydrase III in Various Human Tissues Determined by A Sensivite Enzyne İmmunoassay Method. *Clinica Chimica Acta.* , 141 : 169 - 177, 1984
17. Foster, E. R. : Carbonic Anhydrase: The Unwithhered Enzyme or The Divine Discrepancies. In The Carbonic Anhydrase from Biochemistry and Physiology and Clinical Medicine. Botré F. Storey, B. T. Gros, G. (Eds) VCH Publishers, Wienheim, 1991 p.p. 443 - 457
18. Wistrand, J. P. and Lindqvist, A. : Design of Carbonic Anhydrase İnhibitors and The Relationship Between Parmacodynamics and Phmacokinetics of Acetazolamid In The Carbonic Anhydrase from Biochemistry and Physiology and Clinical Medicine. Botré F. Storey, B. T. Gros, G. (Eds) VCH Publishers, Wienheim, 1991 pp. 352 - 374
19. Gay, V. C. : The Role of Carbonic Anhydrase in Bone Resorbing Cells. . In The Carbonic Anhydrase from Biochemistry and Physiology and Clinical Medicine. Botré F. Storey, B. T. Gros, G. (Eds) VCH Publishers, Wienheim, 1991 p.p. 419 - 422
20. Sapirstein, V. S. and Less, M. B. : Purification of Myelin Carbonic Anhydrase. *J. Neurochem.* 31: 505-11, 1978
21. Ridderstrale, Y. and Sperber, I. : Histochemical localization of Carbonic Anhydrase in Mammalian Liver: A Comparative Study. In The Carbonic Anhydrase from Biochemistry and Physiology and Clinical Medicine. Botré F. Storey, B. T. Gros, G. (Eds) VCH Publishers, Wienheim, 1991 p.p. 327 - 38
22. Buono, R.J. , Linser, P.J. , Cuthbertson, R.A. , Piatigorsky, J. : Molecular Analyses of Carbonic Anhydrase II Expression and Regulation in The Developing Chiken Lens. *Dev-Dyn* 194 (1): 33-42 , 1992
23. Bruns, W. and Gros, G. : Membrane-Bound Carbonic Anhydrase in Cardiac muscle. In The Carbonic Anhydrase from Biochemistry and Physiology and Clinical Medicine. Botré F. Storey, B. T. Gros, G. (Eds) VCH Publishers, Wienheim, 1991 p.p.278 - 82

24. Deutsch, H.F. : Carbonic Anhydrase. *Int. J. Biochem.* , 19 (2): 101 - 103, 1967
25. Parkkila, S. , Parkkila, A-K. , Vierjoki, T. , Stahlberg, T. , Rajaniemi, H. : Competitive Time-Resolved Immunofluorometric Assay for Quantifying Carbonic Anhydrase VI in Saliva. *clin. chem.* 39 (10): 2154-57,1993
26. Paranawithana, S.R. , Tu, C. , Jevll, A.D. , Laipis, P.J. , Silverman, D.N.: Catalytic Enhancement of Carbonic Anhydrase III by Introduction of Histidine 64 as A Proton Shuttle. In *The Carbonic Anhydrase from Biochemistry and Physiology and Clinical Medicine*. Botré F. Storey, B. T. Gros, G. (Eds) VCH Publishers, Wienheim, 1991 pp. 14- 21
27. Carter, N. , Jeffery, S. , Shiels, A. , Edwards, Y. , Tipler, T. , Hopkins, D.A.: Characterization of Human Carbonic Anhydrase III from Skeletal Muscle. *Biochemical Genetics.* 17(9): 837-54, 1979
28. Maren, T.H. : Carbonic Anhydrase: Chemistry Physiology and İnhibition. *Physiological Reviews* 47 (4) : 595 - 781, 1967
29. Karahan, S. :İskelet Kası Travması ve Miyokard Enfarktüsü Geçiren Şahıslarda Serum Karbonik Anhidraz III ve Total Kreatin Kinaz Seviyeleri Arasındaki İlişki. Uzmanlık Tezi. Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi. Trabzon,1994 (Yayınlanmış)
30. Nalbantoğlu, B. : Serumda Kreatin Kinaz ve Karbonik Anhidraz III Enzim Aktiviteleri Arasındaki Münasebet. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enst. Erzurum, 1986 (Yayınlanmış)
31. Liang, J.Y. , Lipscom, W.N. : Substrate and Inhibitor Binding to Human Carbonic Anhydrase II: A Theoretical Study. İnhibitors. In *The Carbonic Anhydrase from Biochemistry and Physiology and Clinical Medicine*. Botré F. Storey, B. T. Gros,G. (Eds) VCH Publishers,Wienheim, 1991 pp. 50 - 64
32. Bertini, I. , Banci, I. , Luchinat, C. , Sola, M. : The Interaction of İnhibitors with Carbonic Anhydrase. In *The Carbonic Anhydrase from Biochemistry and Physiology and Clinical Medicine*. Botré F. Storey, B. T. Gros,G. (Eds) VCH Publishers,Wienheim, 1991 p.p.86-94
33. Supuran, C.T. , Manole, G. , Andruh, M. : Carbonic Anhydrase İnhibitors, Part 11. Coordination Compounds of Heterocyclic Sulfonamides with Lanthanides are Potent İnhibitors of Isozymes I and II. *J. Inorg. Biochem.* 49: 97-103,1993
34. Maren, T.H. : The Links Among Biochemistry, Physiology and Pharmacology in Carbonic Anhydrase Mediated Systems. In *The Carbonic Anhydrase from Biochemistry and Physiology and Clinical Medicine*. Botré F. Storey, B. T. Gros,G. (Eds) VCH Publishers,Wienheim, 1991 p. 199

35. Edwards, Y.H. , Badge, R.L. , Tweedie, S. :Carbonic Anhydrase III Expressions and Promoter Function: Preliminary Studies on Cultured Cells and Transgenic Mice. In *The Carbonic Anhydrase from Biochemistry and Physiology and Clinical Medicine*. Botré F. Storey, B. T. Gros,G. (Eds) VCH Publishers,Wienheim, 1991 p.p.144 - 150
36. Verpoorte, J.A: , Mehta, S. , Edsall, J.T. : Esterase Activities of Human Carbonic Anhydrase B and C. *J. Biol Chem.* 12 (18): 4221-29, 1967
37. Wells, J.W. , Kandel, S.I. , Kandel, M. , Gornal, A.G. : The Esterase Activity of Bovine Carbonic Anhydrase B Above pH 9. *Biol Chem.* 250: 3522-30, 1975
38. Bergmeyer, U. and Graßl, M. : *Methods of Enzymatic Analysis. Samples, Reagents, Assessment of Results. Third Edition. Volume II.* VCH Publishers,Wienheim, 1988 pp. 441 - 456
39. Sümbüloğlu, K. ve Sümbüloğlu, V. :*Biyostatistik. Özdemir Yayıncılık, Cemal Gürsel Cad. 43/c Cebeci Ankara 1993. s. 48 - 185*
40. Wilbur, K.M. , Anderson, N.G. : Electrometric and Colorimetric Determination of Carbonic Anhydrase. *J. Biol. Chem.* 176 : 147-54 , 1948
41. McIntosh, J.E.A. : Assay of Carbonic Anhydrase by Titration at Constant pH. *Biochem J.* 109: 203-7 , 1968
42. Livesey, D.L. : OnThe Colorimetric Method of Assaying Carbonic Anhydrase(EC 4.2.1.1). *Anal Biochem.* 77 : 552-61, 1977
43. Koester, M.K. , Pullan, L.M. , Noltmann, E.A. : The P-nitrophenyl Phosphatase Activity of Muscle Carbonic Anhydrase. *Arch Biochem; Biophys.* 211(2): 632-42 , 1981
44. Kalervo, H. , Vaananen, M.D. , Timo, E.S. , Takala, M.D. , Tolonen, U. , Vuori, J. , Myllyla, V.V. : Muscle-Specific Carbonic Anhydrase III Is a More Sensitive Marker of Muscle Damage than Creatin Kinase in Neuromuscular Disorders. *Arch Neurol* 45 : 1254 - 1256,1988
45. Vaananen, H.K. , Leppilampi, M. Vuori, J. , Takala, T.E. : Liberation of Muscle Carbonic Anhydrase Into Serum During Extensive Exercise. *Appl-Physiol.* 61(2): 561 - 4, 1986
46. Jeffry, S. , Merry, B.J. , Holehan, A.M. , Carter, N.D. : The Effects of Again on Carbonic Anhydrase Concentrations in Rat Liver and Skeletal Muscle. *Biochem-J.* 250(1): 303-5,1988

47. Ohta, M. , Itagaki, Y. , Itoh, N. , Hayashi, K. , Nishitani, H. , Ohta, K. :
Carbonic Anhydrase III in Serum in Muscular Dystrophy and Other
Neurological Disorders: Relationship with Creatin Kinase. *Clin. Chem.*
37(1): 36 - 39, 1991

27

