

C VİTAMİNİNİN KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİ
ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Yağmur HOŞGÖR

Yüksek Lisans Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Nisan-2012

C VİTAMİNİNİN KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI

Yağmur HOŞGÖR

Dumlupınar Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliği Uyarınca
Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Doç. Dr. Metin BÜLBÜL

Nisan – 2012

KABUL ve ONAY SAYFASI

Yağmur HOŞGÖR'ün YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "C VİTAMİNİNİN KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI" başlıklı bu çalışma, jürimizce Dumlupınar Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğın ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

..... / /2012

Üye : Doç. Dr. Metın BÜLBÜL

Üye :

Üye :

Fen Bilimleri Enstitüsünün Yönetim Kurulu'nun ... / ... / gün ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hasan GÖÇMEZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

C VİTAMİNİNİN KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Yağmur HOŞGÖR

Kimya Bölümü, Yüksek Lisans Tezi, 2012

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Metin BÜLBÜL

ÖZET

C vitamini (Askorbik asit); insanlarda sentezlenmeyen, indirgeyici ajan olarak görev yapan, antioksidan özelliği gösteren ve suda çözünen bir vitamindir. Bununla birlikte insan gözünde bulunan aköz sıvıda belirli konsantrasyonlarda askorbik asit olduğu bilinmektedir.

Karbonik anhidraz (CA), karbondioksitin bikarbonata dönüşümlü hidrasyon reaksiyonunu katalizleyen, Zn^{+2} iyonu içeren bir metaloenzimdir. CA I, CA II ve CA IV izoenzimleri insan göz dokusunda bulunmaktadır. Glokom, yüksek göz içi basıncı ile karakterize edilen ve sonunda körlüğe yol açan bir göz hastalığıdır. Humor aközün fazla salgılanmasıyla oluşan yüksek göz içi basıncını düşürmelerinden dolayı karbonik anhidraz inhibitörleri, glokom hastalığının tedavisinde kullanılmaktadırlar.

Bu çalışmada; C vitamininin karbonik anhidraz izoenzimleri olan hCA I ve hCA II üzerindeki inhibisyon etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla önce afinite kromatografisi ile insan eritrositlerinden hCA I ve hCA II izoenzimleri ayrı ayrı saflaştırıldı ve SDS-PAGE elektroforezi ile enzimlerin saflığı kontrol edildi. Daha sonra C vitamininin farklı derişimlerdeki çözeltilerinin hCA I ve hCA II izoenzimleri üzerindeki inhibisyon etkileri incelendi. C vitamininin inhibisyon etkisini belirlemek için karbonik anhidraz enziminin hidrataz ve esteraz aktiviteleri ölçüldü. Elde edilen sonuçlara göre, %Aktivite-[I] grafikleri çizildi ve IC_{50} değerleri belirlendi. Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek K_i sabitleri hesaplandı.

Son olarak, farklı derişimlerdeki C vitamini çözeltilerinin, hCA I ve hCA II izoenzimlerinin hidrataz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkisi göstermediği, ancak esteraz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edildi. Esteraz IC_{50} değerleri hCA I için $0,96 \times 10^3 - 0,07 \times 10^3 \mu M$ arasında, hCA II için ise $0,23 \times 10^3 - 0,06 \times 10^3 \mu M$ arasında bulundu. K_i değerleri hCA I için $0,97 \times 10^2 - 0,43 \times 10^2 \mu M$ arasında, hCA II için ise $1,2 \times 10^2 - 0,36 \times 10^2 \mu M$ arasında bulundu.

Anahtar Kelimeler: C Vitamini, Karbonik Anhidraz, İnhibisyon, IC_{50} Değerleri.

AN INVESTIGATION OF THE EFFECT OF VITAMIN C ON THE ENZYME CARBONIC ANHYDRASE

Yağmur HOŞGÖR

Chemistry Department, M. S. Thesis, 2012

Thesis Supervisor: Assoc. Prof. Metin BÜLBÜL

SUMMARY

Vitamin C (ascorbic acid); in humans are unable to synthesize, serving as a reducing agent, showing antioxidant properties and that a water-soluble vitamin. However, the specific concentrations of the ascorbic acid are known in aqueous fluid of human eye.

Carbonic anhydrase (CA) is a metalloenzyme that contains zinc ion. It catalyses that the reversible hydration of carbon dioxide to yield bicarbonate. Human eye tissue contains CA I, CA II and CA IV isoenzymes. Glaucoma is an eye disease which characterized by high intraocular pressure that causes eventually blindness. Carbonic anhydrase inhibitors have been used for treatment of glaucoma, because of their decrease higher intraocular pressure which occurs with excessive secretion of aqueous humor.

In this study, the inhibitory effect of vitamin C on carbonic anhydrase isoenzymes that is hCA I and hCA II were investigated. First of all, hCA I and hCA II isoenzymes were respectively purified from human erythrocytes with affinity chromatography and purity of the enzymes was checked with SDS-PAGE electrophoresis. Later, the inhibitory effects of the different concentrations of vitamin C solutions on hCA I and hCA II isoenzymes were determined. To determine inhibitory effect of vitamin C, the hydratase and esterase activities of carbonic anhydrase enzyme were measured. According to the results, %Activity-[I] graphics were drawn and the IC_{50} values were calculated. The K_i constants were calculated from Lineweaver-Burk graphics.

Finally, Any inhibitory effects of the different concentrations of vitamin C solutions were not showed on hydratase activities of hCA I and hCA II isoenzymes. But these solutions were showed inhibitory effects on the esterase activities of hCA I and hCA II isoenzymes. The IC_{50} values of compounds for esterase activity are $0,96 \times 10^3 - 0,07 \times 10^3 \mu M$ for hCA I and $0,23 \times 10^3 - 0,06 \times 10^3 \mu M$ for hCA II, respectively. The K_i values of these inhibitors are $0,97 \times 10^2 - 0,43 \times 10^2 \mu M$ for hCA I and $1,2 \times 10^2 - 0,36 \times 10^2 \mu M$ for hCA II, respectively.

Keywords: Vitamin C, Carbonic Anhydrase, Inhibition, IC_{50} Values.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında bana bu çalışma olanağını sağlayan Kimya Bölüm Başkanı, Rektör yardımcısı, değerli hocam Prof. Dr. Yunus ERDOĞAN'a, bu çalışmanın planlanması ve yürütülmesi esnasında desteğini ve ilgisini esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. Metin BÜLBÜL'e, elektroforez işlemini gerçekleştiren Doç. Dr. Azmi YERLİKAYA'ya, çalışmalar sırasında fikirlerini benimle paylaşan ve yardımını esirgemeyen Arş. Gör. Ekrem TUNCA'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Tüm hayatım boyunca yanımda olan, kişiliğimin ve karakterimin oluşmasında örnek aldığım, öğrenim hayatım boyunca her zaman bana destek olan annem Havva HOŞGÖR, babam Haluk HOŞGÖR ve ağabeyim M. Tayfur HOŞGÖR'e saygı ve sevgilerimi sunarım.

Ayrıca lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca benden maddi ve manevi desteğini esirgemeyen Fatma ve Emre BELÖZOĞLU'na teşekkürü bir borç bilirim.

Yağmur HOŞGÖR

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xv
1. GİRİŞ	1
2. C VİTAMİNİ (ASKORBİK ASİT)	2
2.1 Yapısı, Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri	2
2.2 Sentezi.....	4
2.3 Biyokimyasal Fonksiyonları	6
2.4 Kaynakları ve Günlük Gereksinimi	10
2.5 Eksikliği	12
2.6 Aköz Sıvı Üzerindeki Etkisi	12
3. ENZİMLER	13
3.1 Karbonik Anhidraz Enzimi (E.C.4.2.1.1)	18
3.1.1 α -Karbonik anhidrazlar (α -CA)	19
3.1.2 β -Karbonik anhidrazlar (β -CA)	20
3.1.3 γ -Karbonik anhidrazlar (γ -CA).....	21
3.1.4 δ -Karbonik anhidrazlar (δ -CA).....	21
3.1.5 Karbonik anhidraz enziminin katalitik mekanizması.....	22
3.2 Karbonik Anhidraz İnhibitörleri	25
4. GLOKOM	27
5. MATERYAL VE METOD	29
5.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler	29
5.2 Yararlanılan Alet ve Cihazlar	29
5.3 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışı.....	29
5.4 Yöntemler	31
5.4.1 Protein tayini.....	31
5.4.1.1 Kalitatif protein tayini.....	31
5.4.1.2 Bradford yöntemi ile protein tayini	32
5.4.2 Karbonik anhidraz aktivitesi tayini.....	32
5.4.2.1 CO ₂ -Hidrataz aktivitesi tayini.....	32
5.4.2.2 Esteraz aktivitesi tayini.....	33

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
5.4.3 Afinite jelinin hazırlanması.....	33
5.4.3.1 Siyanojen bromür ile aktifleştirilmiş sepharose-4B üzerine tirozin takılması	34
5.4.3.2 Sülfanilamid kenetlendirilmesi.....	34
5.4.4 İnsan eritrositlerinden karbonik anhidraz izoenzimleri olan hCA I ve hCA II enzimlerinin saflaştırılması.....	36
5.4.4.1 Hemolizat eldesi	36
5.4.4.2 Hemolizatın afinite kolonuna tatbiki ve enzimin elüsyonu	36
5.4.4.3 Diyaliz işlemi.....	36
5.4.4.4 SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının kontrolü	37
5.4.5 C vitamininin insan eritrosit karbonik anhidraz izoenzimleri üzerindeki inhibisyon etkilerinin incelenmesi.....	38
5.4.5.1 C vitamininin eritrosit hCA I ve hCA II izoenzimlerinin hidrataz aktiviteleri üzerindeki inhibisyon etkilerinin <i>in vitro</i> olarak incelenmesi	38
5.4.5.2 C vitamininin eritrosit hCA I ve hCA II izoenzimlerinin esteraz aktiviteleri üzerindeki inhibisyon etkilerinin <i>in vitro</i> olarak incelenmesi	39
5.4.5.3 C vitamininin eritrosit hCA I ve hCA II izoenzimlerinin esteraz aktiviteleri üzerindeki inhibisyon etkilerinden K_i sabitlerinin bulunması	39
6. ARAŞTIRMA BULGULARI	40
6.1 hCA I ve hCA II İzoenzimlerinin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması Sonuçları	40
6.2 İnsan Eritrositlerinden Elde Edilen hCA I ve hCA II İzoenzimlerinin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi Sonuçları	41
6.3 C vitamininin İnsan Eritrosit Karbonik Anhidraz Enzimleri (hCA I ve hCA II) Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin <i>In Vitro</i> Olarak İncelenmesi.....	42
6.3.1 C vitamininin insan eritrosit karbonik anhidraz enzimlerinin hidrataz aktiviteleri üzerindeki inhibisyon etkilerinin <i>in vitro</i> olarak incelenmesi	42
6.3.2 C vitamininin insan eritrosit karbonik anhidraz enzimlerinin esteraz aktiviteleri üzerindeki inhibisyon etkilerinin <i>in vitro</i> olarak incelenmesi	42
6.3.3 C vitamininin insan eritrosit karbonik anhidraz enzimlerinin esteraz aktiviteleri üzerindeki inhibisyon etkilerinden K_i sabitlerinin bulunması	53
7. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	61
KAYNAKLAR DİZİNİ	64

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Askorbik asit (C vitamini).....	2
2.2. (a) L-Askorbik asidin keto şekli ve (b) L-Askorbik asidin enol şekli.....	2
2.3. (a)- Askorbik asit, (b)- Askorbat, (c)- Askorbat dianyon.....	3
2.4. (a)- Askorbik asit ve (b)- Dehidroaskorbik asit.	3
2.5. Hayvanlarda C vitamini sentezinin metabolik yolu.	5
2.6. ROS ve Antioksidan Savunma sistemleri arasındaki denge sisteminin şematik gösterimi. 9	
2.7. Askorbat bozunma mekanizması.	10
3.1. Lineweaver-Burk grafiği.....	15
3.2. Dönüşümsüz inhibisyonun reaksiyon halinde gösterimi.....	16
3.3. Yarışmalı inhibisyonun reaksiyon halinde gösterimi.....	17
3.4. Yarışmasız inhibisyonun reaksiyon halinde gösterimi.....	17
3.5. Yarı yarışmalı inhibisyonun reaksiyon halinde gösterimi.....	18
3.6. CA II enziminin aktif bölgesi (Pembe renk ile gösterilen küre).	22
3.7. Zn ⁺² ile koordinasyon halindeki su molekülünün hidroksit grubuyla Thr199 ve Glu106 rezidüleri arasındaki etkileşimin şematik gösterimi.....	23
3.8. CA enziminin katalizlediği CO ₂ -hidratasyon reaksiyonunun mekanizmasının şematik gösterimi.	24
5.1. Afinite jelinin hazırlanması sırasında gerçekleşen reaksiyonlar.	35
6.1. Afinite kromatografisi ile eritrosit hCA I ve hCA II izoenzimlerinin saflaştırılmasına ilişkin elüsyon grafiği.	40
6.2. Bradford metoduyla protein tayini için kullanılan standart grafik.	41
6.3. Afinite kromatografisi ile saflaştırılan karbonik anhidraz izoenzimlerinin SDS-PAGE analiz fotoğrafı. (hCA I (a) ve (b) kanalı, hCA II (c) ve (d) kanalı).	41
6.4. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine %0,25' lik C vitamini çözeltisinin etkisi.....	43
6.5. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine %0,5' lik C vitamini çözeltisinin etkisi.....	44
6.6. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine %1' lik C vitamini çözeltisinin etkisi..	45
6.7. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine %2' lik C vitamini çözeltisinin etkisi..	46
6.8. hCA I izoenziminin aktivitesi üzerine %3' lük C vitamini çözeltisinin etkisi.	47
6.9. hCA II izoenziminin aktivitesi üzerine %0,25'lik C vitamini çözeltisinin etkisi.....	48
6.10. hCA II izoenziminin aktivitesi üzerine %0,5'lik C vitamini çözeltisinin etkisi.	49
6.11. hCA II izoenziminin aktivitesi üzerine %1'lik C vitamini çözeltisinin etkisi.	50
6.12. hCA II izoenziminin aktivitesi üzerine %2'lik C vitamini çözeltisinin etkisi.	51

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
6.13. hCA II izoenziminin aktivitesi üzerine %3'lük C vitamini çözeltisinin etkisi.....	52
6.14. hCA I izoenzimi üzerinde %1'lik C vitamini çözeltisinin inhibisyon etkisine ilişkin Lineweaver-Burk grafiği.....	54
6.15. hCA I izoenzimi üzerinde %2'lik C vitamini çözeltisinin inhibisyon etkisine ilişkin Lineweaver-Burk grafiği.....	55
6.16. hCA I izoenzimi üzerinde %3'lük C vitamini çözeltisinin inhibisyon etkisine ilişkin Lineweaver-Burk grafiği.....	56
6.17. hCA II izoenzimi üzerinde %1'lik C vitamini çözeltisinin inhibisyon etkisine ilişkin Lineweaver-Burk grafiği.....	57
6.18. hCA II izoenzimi üzerinde %2'lik C vitamini çözeltisinin inhibisyon etkisine ilişkin Lineweaver-Burk grafiği.....	58
6.19. hCA II izoenzimi üzerinde %3'lük C vitamini çözeltisinin inhibisyon etkisine ilişkin Lineweaver-Burk grafiği.....	59

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Bazı meyve ve sebzelerdeki C vitamini içerikleri.....	11
4.1. Ülkemizde görülen glokom tipleri ve oranı.	27
6.1. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine % 0,25' lik C vitamini çözeltisinin inhibisyon etkisinin incelenmesi amacıyla yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar. ...	43
6.2. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine % 0,5' lik C vitamini çözeltisinin inhibisyon etkisinin incelenmesi amacıyla yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar. ...	44
6.3. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine % 1' lik C vitamini çözeltisinin inhibisyon etkisinin incelenmesi amacıyla yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar. ...	45
6.4. hCA I izoenziminin aktivitesi üzerine % 2'lik C vitamini çözeltisinin inhibisyon etkisinin incelenmesi amacıyla yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.	46
6.5. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine % 3'lük C vitamini çözeltisinin inhibisyon etkisinin incelenmesi amacıyla yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar. ...	47
6.6. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine % 0,25'lik C vitamini çözeltisinin inhibisyon etkisinin incelenmesi amacıyla yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar. ...	48
6.7. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine % 0,5'lik C vitamini çözeltisinin inhibisyon etkisinin incelenmesi amacıyla yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar. ...	49
6.8. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine % 1'lik C vitamini çözeltisinin inhibisyon etkisinin incelenmesi amacıyla yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar. ...	50
6.9. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine % 2'lik C vitamini çözeltisinin inhibisyon etkisinin incelenmesi amacıyla yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar. ...	51
6.10. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine % 3'lük C vitamini çözeltisinin inhibisyon etkisinin incelenmesi amacıyla yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar. ...	52
6.11. Farklı derişimlerde hazırlanan C vitamini çözeltilerinin esteraz IC ₅₀ değerleri.....	53
6.12. %1'lik C vitamini çözeltisinin hCA I izoenzimi üzerindeki K _i sabitinin belirlenmesi amacıyla yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.....	54
6.13. %2'lik C vitamini çözeltisinin hCA I izoenzimi üzerindeki K _i sabitinin belirlenmesi amacıyla yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.....	55
6.14. %3'lük C vitamini çözeltisinin hCA I izoenzimi üzerindeki K _i sabitinin belirlenmesi amacıyla yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.....	56
6.15. %1'lik C vitamini çözeltisinin hCA II izoenzimi üzerindeki K _i sabitinin belirlenmesi amacıyla yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.....	57
6.16. %2'lik C vitamini çözeltisinin hCA II izoenzimi üzerindeki K _i sabitinin belirlenmesi amacıyla yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.....	58
6.17. %3'lük C vitamini çözeltisinin hCA II izoenzimi üzerindeki K _i sabitinin belirlenmesi amacıyla yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.....	59
6.18. Farklı derişimlerdeki C vitamini çözeltilerinin hCA I izoenzimi üzerine inhibisyon etkisi çalışmalarından elde edilen sonuçlar doğrultusunda hesaplanan K _i değerleri. ...	60

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
6.19. Farklı derişimlerdeki C vitamini çözeltilerinin hCA II izoenzimi üzerine inhibisyon etkisi çalışmalarından elde edilen sonuçlar doğrultusunda hesaplanan K_i değerleri. ...	60
7.1. Yapılan inhibisyon çalışmalarından elde edilen esteraz IC_{50} değerleri.....	62
7.2. Yapılan inhibisyon çalışmalarından elde edilen K_i değerleri.....	63

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
Å	Angstrom
L	Litre
mg	Miligram
µg	Mikrogram
mL	Mililitre
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
mmol	Milimol
rpm	devir/dakika
<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
CA	Karbonik anhidraz enzimi
CARP	Protein bağlı karbonik anhidraz
DNA	Deoksiribonükleik asit
EC	Enzim kod numarası
EI	Enzim-inhibitör kompleksi
ESI	Enzim-substrat-inhibitör kompleksi
EU	Enzim ünitesi
hCA I	İnsan eritrosit karbonik anhidraz enzimi I
hCA II	İnsan eritrosit karbonik anhidraz enzimi II
I	İnhibitör
IOP	Göz içi basıncı (Intraocular Pressure)
PAAG	Primer açık açılı glokom
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PKAG	Primer kapalı açılı glokom
ROS	Reaktif oksijen türleri (Reactive oxygen species)
S	Substrat
SDS-PAGE	Sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin
TRIS	Trihidroksimetilaminometan

1. GİRİŞ

Normal oksijen metabolizması sırasında az miktarda süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH^{\cdot}) gibi reaktif oksijen türleri (ROS) meydana gelir. ROS fizyolojik ve patolojik koşullarda oluşabilir. Hücrel metabolizmanın hızlandığı zorlu egzersiz gibi durumlarda, inflamatuvar hücrelerin varlığında (kronik inflamatuvar hastalıklar, alerjik hastalıklar, infeksiyonlar), sigara dumanı, hava kirliliği, radyasyon, yüksek oksijen basıncı, insektisid, pestisid, ilaç ve bazı toksik maddelerle maruziyetlerde, iskemi-reperfüzyon gibi durumlarda ve yaşlanma sürecinde ROS üretimi artmaktadır (Percival, 1998).

Metabolik olaylar sonucu meydana gelen reaktif oksijen türleri hücrelerde zararlı etkiler meydana getirmektedirler (Pellegrini ve ark., 2009). Reaktif oksijen türlerinin neden olduğu oksidasyonları önleyen, reaktif oksijen türlerini yakalama ve stabilize etme yeteneğine sahip maddeler antioksidanlar olarak bilinirler (Eliot, 1999). Antioksidanlar; onarıcı, toplayıcı, bastırıcı ve zincir kırıcı olmak üzere dört ayrı şekilde etki gösterirler. Serbest oksijen radikallerinin hidrojen aktararak etkisini azaltan veya yok eden vitaminler ve flavonoidler bastırıcı etki gösterirler (Akkuş, 1995).

C vitamini, sulu fazda ROS'nin en önemli süpürücülerinden biridir. Suda eriyen bir vitamin olan C vitamini (Askorbik asit) hidrojen peroksit, süperoksit ve hidroksil radikali ile reaksiyona girerek inaktif hale gelmelerinde önemli rol oynar (Podsedeck, 2007).

C vitamini insanlar için esansiyel (diyetle alınan) bir vitamin olup önemli bir antioksidandır. Ayrıca C vitamini lipidler, DNA ve proteinler gibi makromoleküllerin oksidatif hasarına yol açan reaktif oksijen türlerinin olumsuz etkilerini azaltır bu şekilde kardiyovasküler hastalıklar, kanser, felç, nörodejeneratif hastalıklar ve katarakt oluşumu gibi kronik hastalıkların oluşumunu da azaltır (Halliwell ve Gutteridge, 1999).

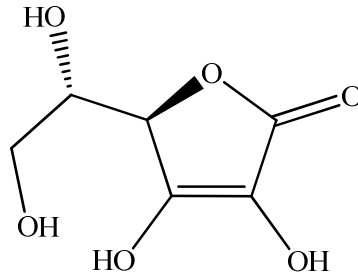
Askorbik asit organizmada birçok hidroksilasyon reaksiyonlarında indirgeyici ajan olarak görev yapar (Iqbal ve ark., 2004).

Askorbik asit vücut proteinlerinin yaklaşık üçte birini oluşturan kollagenin sentezinde önemli bir rol oynar (Akhilender ve Naidu, 2003).

2. C VİTAMİNİ (ASKORBİK ASİT)

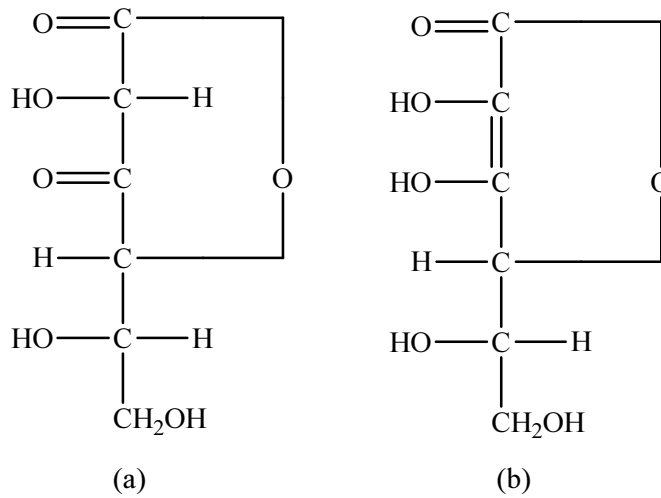
2.1 Yapısı, Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri

C vitamini, molekül formülü $C_6H_8O_6$ olan bir ketolaktondur ve molekül ağırlığı 176,12 g/mol olan suda çözünen bir vitamindir (Roberts ve ark., 1997). Kimyasal olarak 2-okso-L-treoheksano-1,4-lakton-2,3-enediol şeklinde isimlendirilir. Askorbik asitin L-enantiomer formu biyolojik olarak aktiftir ve L-askorbik asit olarak isimlendirilir, D-askorbik asit ise inaktiftir. C vitamini denildiğinde biyolojik olarak aktif olan L-askorbik asit anlaşılır (Şekil 2.1) (Goldman ve ark., 1981).



Şekil 2.1 Askorbik asit (C vitamini).

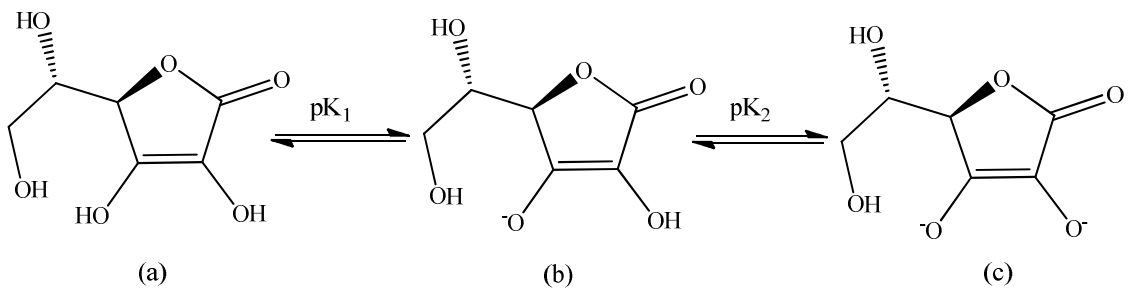
L-askorbik asit, L-gulonik asidin enediol laktonudur (Şekil 2.2). C vitamininin asidik karakteri 1. karbon atomuna bağlı $-COOH$ grubundan değil, 3. karbon atomuna bağlı enolik hidrojenlerden ileri gelir.



Şekil 2.2 (a) L-askorbik asidin keto şekli ve (b) L-askorbik asidin enol şekli.

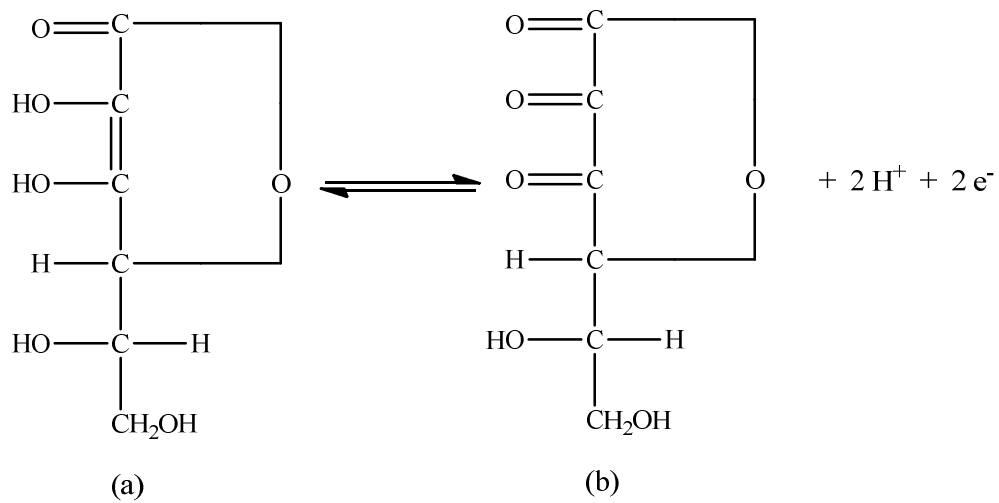
C vitamini, indirgeyici özelliğe sahip olup, bu özellik 2. ve 3. karbon atomlarına bağlı hidroksil (OH) gruplarındaki hidrojenlerin serbest hale geçmesinden kaynaklanır (Bayşu ve Sözbilir Bayşu, 2008). Konjuge olmuş karbonil ve enediol sistemi üzerinden π elektronlarının delokalizasyonu ile askorbik asit stabilize olur (Davies, 1992).

C vitamininin asidik formu olan askorbik asit iyonlaşabilen iki hidroksil grubuna sahiptir. Askorbik asit birinci H^+ iyonunu kaybettiğinde kısmen zayıf asittir (pK_1 : 4,25) ve ikinci H^+ iyonunu kaybettiğinde çok zayıf asittir (pK_2 : 11,79) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 (a)-Askorbik asit, (b)-Askorbat, (c)-Askorbat dianyon.

Askorbik asit güçlü bir indirgendir ve reversibl (tersinir) olarak dehidroaskorbik aside oksitlenir. Askorbik asidin dehidroaskorbik aside oksidasyonu iki elektronlu bir redoks reaksiyonudur (Şekil 2.4). Biyolojik sistemlerde yükseltgenme-indirgenme reaksiyonlarında etkilidir.

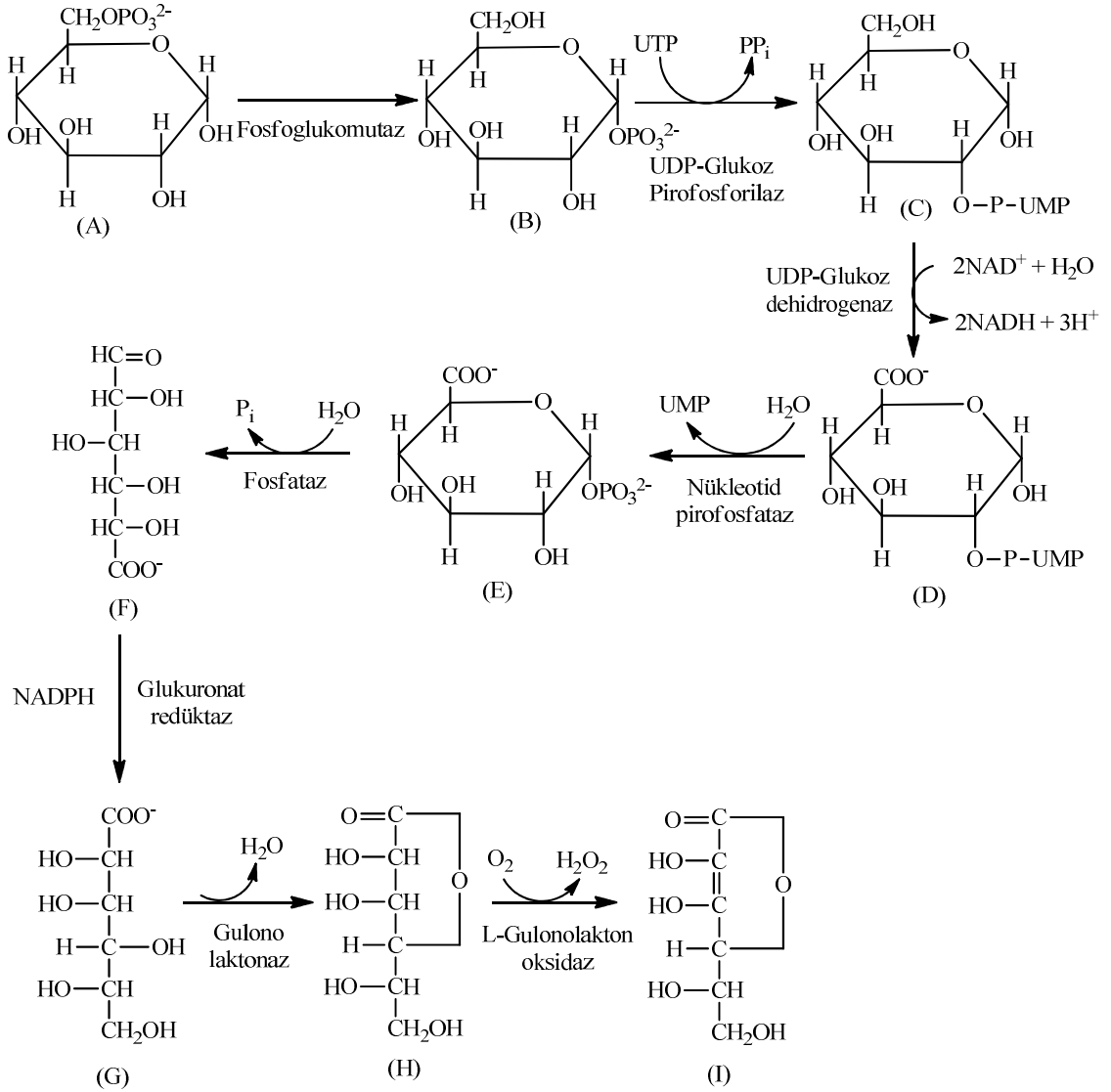


Şekil 2.4 (a)-Askorbik asit ve (b)-Dehidroaskorbik asit.

2. ve 3. karbon atomlarındaki enediol grupları okside olur, iki hidrojen atomu verip diketo şekline dönüşerek dehidroaskorbik aside yükseltgenir ve bu reaksiyon tersinir olduğundan uygun koşullar altında dehidroaskorbik asidin redüksiyona uğramasıyla yeniden askorbik asit oluşur. Bundan dolayı askorbik asit ve dehidroaskorbik asit vücut sıvılarında denge halinde bulunurlar. Her iki şekilde de fizyolojik olarak aktiftir. (Packer ve Fuchs, 1997; Kayaalp, 1989).

2.2 Sentezi

C vitamini, bitkilerde ve hayvanlarda (Şekil 2.5) glukozdan sentezlenir. İnsanlarda, kobaylarda (hint domuzu) ve insan benzeri primatlarda (maymun) L-gulonolakton oksidaz (E.C 1.1.3.8) enziminin bulunmaması sebebiyle C vitaminini sentezleyemezler. Bu enzimin eksikliğinden dolayı insanlar C vitaminini diyetle almak zorundadırlar (Nishikimi ve Yagi, 1991; Nishikimi ve Yagi, 1996).



Şekil 2.5 Hayvanlarda C vitamini sentezinin metabolik yolu.

(A) Glukoz-6-P, (B) Glukoz-1-P, (C) UDP-Glukoza, (D) UDP-Glukuronat,
 (E) D-Glukuronat-1-P, (F) D-Glukuronat, (G) L-Gulonat, (H) L-Gulono-1,4-lakton,
 (I) L-Askorbik asit. (Smirnoff, 2001).

L-Askorbik asit sürüngenlerde, amfibialarda ve filogenetik kuşların bazı türlerinde böbrekte sentezlenirken, insanlar, kobaylar ve insan benzeri primatlar dışında kalan memelilerde ise karaciğerde glukuronik asit yolu ile sentezlenir (Stevenson, 1974).

2.3 Biyokimyasal Fonksiyonları

Askorbik asidin vücutta bazı biyokimyasal fonksiyonları vardır.

- Redoks sistemi olarak hidrojen/elektron transferinde,
- Kollagen sentezinde prolin ve lizin hidroksilasyonunda,
- Karnitin ve Tirozin biyosentezinde,
- Katekolamin oluşum metabolizmasında,
- Antibakteriyel ve immünolojik aktivitede,
- Histamin birikiminin önlenmesinde,
- Demir metabolizması ve demir absorpsiyonunda,
- E vitamini yenilenmesinde,
- Reaktif oksijen türlerinin (ROS) zararlı etkilerine karşı korumada C vitamininin önemli fonksiyonları vardır (Ottoway, 1993).

Redoks sistemi olarak hidrojen/elektron transferindeki görevi:

Askorbik asit güçlü bir indirgeyici ajandır ve dehidroaskorbik asit ile bir redoks sistemi oluştururlar. Standart şartlarda indirgen ve yükseltgen kapasite eşitken fizyolojik şartlarda bu eşitlik sağlanmaz. Bu nedenle fizyolojik şartlarda askorbik asit elektron vericisi olarak görev yapar ve bu özelliği sayesinde biyolojik sistemlerde askorbik asit hidrojen taşıyıcısı olarak önemli rol oynar (Asard ve ark., 2004; Combs, 1998).

Kollagen sentezinde prolin ve lizin hidroksilasyonundaki görevi:

Askorbik asit vücut proteinlerinin yaklaşık üçte birini oluşturan kollagenin sentezinde önemli bir rol oynar (Akhilender ve Naidu, 2003). Kollagen sentezinde prolin ve lizinin hidroksilasyonu için gereklidir. Hidroksilasyon reaksiyonunu katalizleyen prolin ve lizin hidroksilaz enzimleri Fe^{+2} iyonu içeren dioksigenaz tipi enzimlerdir ve aktiviteleri için askorbik aside ihtiyaç duyarlar.

Karnitin ve Tirozin biyosentezindeki görevi:

Askorbik asit, tirozinden norepinefrin sentezinde dopamin β -hidroksilaz basamağında ve lizinden karnitin sentezinin hidroksilasyon basamağında kofaktör olarak etkilidir (Aksoy ve ark., 2005).

Katekolamin oluşumundaki görevi:

Katekolamin sentezinde dopamin β -monooksijenaz reaksiyonunda kofaktör olarak görev alır (Aksoy ve ark., 2005).

Antibakteriyel ve immünolojik aktivitedeki görevi:

Askorbik asidin enfeksiyon hastalıklarına karşı organizmanın direncini artırıcı rolü vardır. Bu nedenle bu vitamin antienfeksiyöz vitamin olarak da isimlendirilmiştir. C vitamininin antienfeksiyöz etkisiyle antikorların yapımı ve lökositlerin bakterileri fagosit etme yeteneğinin artırılması sonucunda toksinlerin zararlı etkisi ortadan kalkar (Iqbal ve ark., 2004).

Histamin birikiminin önlenmesindeki görevi:

Askorbik asit antihistaminik role sahiptir. Bu vitamin ya doğrudan histamin detoksifikasyonunda görev alır yada histamin metabolizmasından sorumlu olan enzimlerin seviyelerinin ayarlanmasında etkilidir (Nakamoto ve ark., 1984).

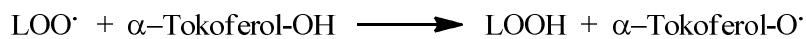
Demir metabolizması ve demir absorpsiyonundaki görevi:

Askorbik asit prooksidan görevi görerek Fe^{+3} 'ü Fe^{+2} 'ye indirir. Bu şekilde fenton reaksiyonunda da görev alır ve proteine bağlı ferri demiri ferro demire indirgeyerek hidrojen peroksitle (H_2O_2) etkileşmeye uygun hale getirir (Paolini ve ark., 1999).

Midede ferri demiri ferro demire indirgeyerek absorpsiyonunu kolaylaştırır. (Iqbal ve ark., 2004).

E vitamini yenilenmesindeki görevi:

E vitamini güçlü bir antioksidan olmasının yanı sıra hücre membran fosfolipitlerinde bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini serbest radikal etkisinden koruyan bir savunma elemanıdır. E vitamini singlet oksijen, süperoksit, hidroksil ve lipid peroksil radikallerini ve diğer radikalleri etkisiz hale getirir. Lipid peroksil radikallerinin neden olduğu lipid peroksidasyonunu inhibe eder. Lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonları şeklinde gerçekleşir, E vitamini zincir kırıcı bir antioksidan olması nedeniyle bu etkiyi ortadan kaldırır (Halliwell, 1995). E vitamininin hidrofobik kısmına hidrojenini kolaylıkla verebilen $-OH$ grubu bağlıdır ve lipid peroksidasyonu sırasında oluşan lipid peroksil radikalleri yağ asidi yerine α -tokoferolle birleşerek reaksiyon zinciri kırılmış olur.



Oluşan tokoferoksil radikalının başka bir yağ asidiyle birleşme aktivitesi düşüktür. Bu radikal membran dış yüzeyinde askorbik asitle reaksiyona girerek tekrar α -tokoferole dönüşür.



C vitamini yetersiz olduğunda oluşan tokoferoksil radikalleri GSH (Glutasyon) ile reaksiyona girerek α -tokoferole dönüşür. Ancak bu durumda hücrede GSH miktarı azalır. (Chao ve ark., 2002; Singh ve Jialal, 2004).

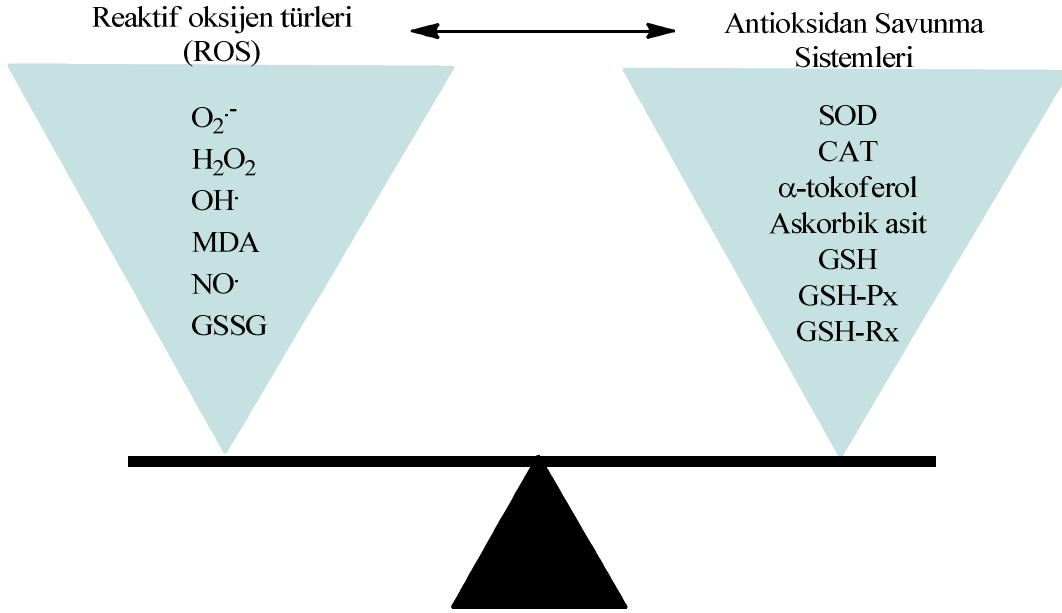
Reaktif oksijen türlerinin (ROS) zararlı etkilerine karşı korumadaki görevi:

Reaktif oksijen türlerinin neden olduğu oksidasyonları önleyen, reaktif oksijen türlerini yakalama ve stabilize etme yeteneğine sahip maddeler antioksidanlar olarak bilinirler (Eliot, 1999). Antioksidanlar; onarıcı, toplayıcı, bastırıcı ve zincir kırıcı olmak üzere dört ayrı şekilde etki gösterirler. Serbest oksijen radikallerinin hidrojen aktararak etkisini azaltan veya yok eden vitaminler ve flavonoidler bastırıcı etki gösterirler (Akkuş, 1995).

ROS seviyelerini azaltan enzimatik ve non-enzimatik antioksidanlar mevcuttur. Enzimatik antioksidanlara örnek olarak; Süperoksit Dismutaz (SOD), Katalaz (CAT), Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) ve Glutasyon redüktaz (GSH-Rx) enzimleri verilebilir. Non-enzimatik antioksidanlara örnek olarak; C vitamini, E vitamini ve redükte glutasyon (GSH) verilebilir (Halliwell, 1996).

C vitamini, reaktif oksijen (Süperoksit, hidrojen peroksit, singlet oksijen, peroksil, hidroksil radikalleri), reaktif azot (Peroksinitrit, azot dioksit, azot oksit radikali) ve reaktif klor (hipoklorik asit) türlerinin zararlı etkilerini ortadan kaldırarak diğer substratları oksidatif stresten korur (Halliwell, 1996).

Sağlıklı bir yetişkinde oksidatif stres ve antioksidan savunma mekanizmaları arasında bir denge söz konusudur (Şekil 2.6) (Wratten ve ark., 2000). Hücrel antioksidan seviyesinin, reaktif oksijen türlerinin seviyelerine karşı yetersiz kalması sonucunda toksik etkiye neden olması “oksidatif stres” olarak ifade edilir (Deaton ve Marlin, 2003). Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve antioksidan savunma sistemleri tarafından bu türlerin inaktivasyonu arasındaki dengesizliğin bir sonucu olarak meydana gelmektedir (Gupta ve ark., 2004).



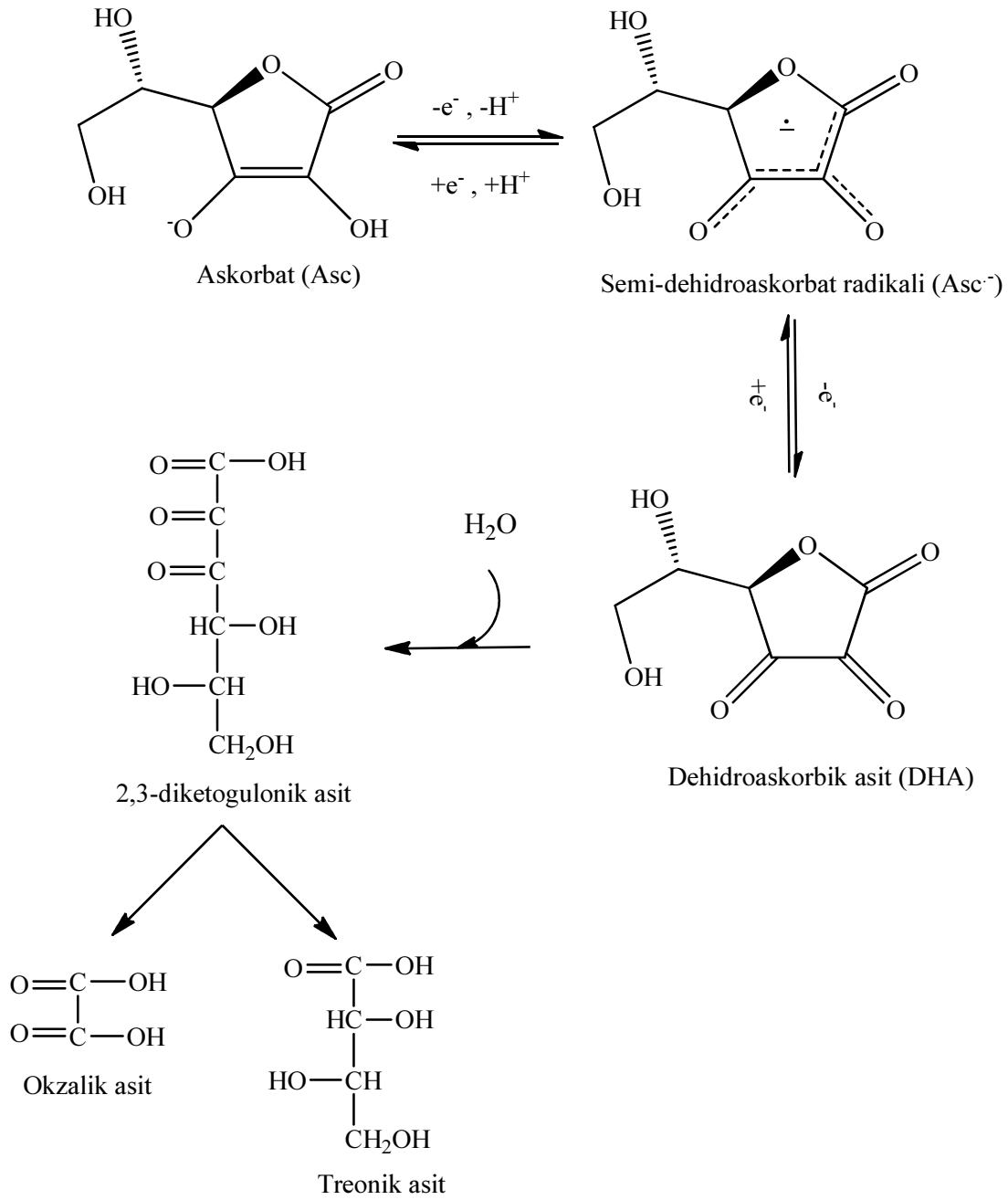
Şekil 2.6 ROS ve Antioksidan Savunma sistemleri arasındaki denge sisteminin şematik gösterimi.

Kaynak: Deaton ve Marlin, 2003.

Oksidatif stres DNA mutasyon ve kırıklarına, lipit peroksidasyonuna, protein oksidasyonuna ve sinyal iletilerinde bozulmalara yol açabilir (Percival, 1998).

C vitamini lipidler, DNA ve proteinler gibi makromoleküllerin oksidatif hasarına yol açan reaktif oksijen türlerinin olumsuz etkilerini azaltır bu şekilde kardiyovasküler hastalıklar, kanser, felç, nörodejeneratif hastalıklar ve katarakt oluşumu gibi kronik hastalıkların oluşumunu da azaltır (Halliwell ve Gutteridge, 1999).

Antioksidan ve pro-oksidan özelliği gösteren C vitamini, fizyolojik koşullarda askorbat (Asc) şeklinde bulunur. Askorbat molekülü proton kaybettiğinde semi-dehidroaskorbat radikali (Asc[•]) oluşurken, semi-dehidroaskorbat radikali tekrardan protonlandığında ilk ürün olan okside askorbat meydana gelir (Halliwell ve Gutteridge, 1999). Askorbat radikali dehidroaskorbik asite dönüşür (Schorah ve ark., 1996). Dehidroaskorbik asit oldukça kararsızdır ve hızlı bir şekilde bozunur, bozunma sonucunda meydana gelen ürünler okzalik asit ve treonik asittir (Şekil 2.7) (Halliwell ve Gutteridge, 1999).



Şekil 2.7 Askorbat bozunma mekanizması.

2.4 Kaynakları ve Günlük Gereksinimi

Tipik diyetle C vitamininin %90'ı meyve ve sebzelerden alınır, turuncgiller, domates, domates suyu ve patates bunların başlıcalarıdır (Sinha ve ark., 1993). Diğer kaynaklar arasında brüksel lahanası, karnabahar, brokoli, lahana, maydanoz, ıspanak ve çilek sayılabilir. Çizelge 2.1'de çeşitli C vitamini kaynakları ve miktarları belirtilmiştir. C vitamini bazı işlenmiş

kaynaklara antioksidan olarak eklenir. Gıdaların C vitamini içeriği, yetiştirme şartlarına, mevsime, olgunluk evresine, yetiştiği bölgeye, pişirme ve saklama koşullarına bağlı olarak değişir (Erdman ve Klein, 1982).

Çizelge 2.1 Bazı meyve ve sebzelerdeki C vitamini içerikleri.

	Gıda	C vitamini miktarı (mg)
Meyve	Muz	8-16
	Elma	3-30
	Ananas	15-25
	Kiraz	15-30
	Portakal	30-50
	Greyfurt	30-70
	Limon	40-50
	Çilek	40-70
	Frenk üzümü	50-200
	Kuşburnu	250-800
Sebze	Soğan	10-15
	Domates	10-20
	Turp	25
	Ispanak	35-40
	Lahana	30-70
	Karnabahar	50-70
	Brokoli	80-90
	Brüksel lahanası	100-120
	Tatlı Biber	150-200
	Maydanoz	200-300
Patates	10-12	

Kaynak: Johnson ve ark., 1998.

Suda çözünen bir vitamin olan C vitamini vücut tarafından kolaylıkla emilir ancak vücutta depo edilmez. Yetişkinlerde (>19 yaş) günlük ortalama alınması gereken askorbik asit miktarı kadınlarda 75 mg/gün, erkeklerde ise 90 mg/gün olarak yeterli bulunmuştur (Frei ve Traber 2001). Sağlıklı bireylerde vücut havuzlarını (nötrofiller, lökositler ve diğer dokular) doyumak için günde 100 mg askorbik asit tüketiminin yeterli olduğu belirlenmiştir. Klinik ve epidemiyolojik çalışmalara dayanarak, 100 mg/gün askorbik asit alınmasının kalp hastalıkları, felç ve kanserden ölüm oranlarını azalttığı ileri sürülmüştür (Carr ve Frei, 1999). Ancak stres, sigara, alkol, ateş ve viral enfeksiyonlar kan-askorbik asit seviyesinde hızlı bir düşüşe neden olur (Naidu, 2003).

2.5 Eksikliği

Askorbik asidi sentezleyemeyen canlılarda, askorbik asit eksikliğine bağlı olarak çeşitli belirtiler görülmektedir. Bu vitaminin eksikliğinde en sık görülen belirtiler anemi, bağışıklık sisteminde zayıflık, infeksiyonlar, diş etlerinde kanamalar, yara iyileşmelerinde gecikmeler, kaslarda dejenerasyonlar, nörolojik bozukluklar ve skorbit hastalığıdır. Skorbit hastalığı, C vitamini eksikliğinden kaynaklanan bir hastalıktır ve buna bağlı olarak kollagen sentezinde de aksaklık meydana gelir. Skorbit hastalığı deride kahverengi lekeler, süngerimsi diş etlerine ve tüm mukozaya zarlarında kanamalara neden olur. Deride meydana gelen lekeler daha çok uyluk ve bacaklarda görülür. Skorbit hastalarında halsizlik, depresyon ve uyuşukluk gibi belirtiler vardır. Hastalığı ilerleyen vakalarda habis iltihaplı yaralar, diş kaybı görülür ve hatta ölüme sonuçlanabilir (Iqbal ve ark., 2004; MedlinePlus Encyclopedia).

2.6 Aköz Sıvı Üzerindeki Etkisi

Reaktif oksijen türlerinin hasarına karşı koruyucu katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, E ve C vitamini gibi enzimatik ve non-enzimatik antioksidanlar göze ait dokularda da mevcuttur (Hull, 1990). Askorbik asidin insan gözünde bulunan aköz sıvıdaki konsantrasyonu 1.4 mmol/litredir. Plazmadaki askorbik asit konsantrasyonu 0.06 mmol/litredir ve aköz sıvıdaki askorbik asit konsantrasyonu, plazmadaki askorbik asit konsantrasyonundan 20 kat fazladır (Taylor ve ark., 1991). Aköz sıvıdaki askorbik asit konsantrasyonu diyet ile alınan askorbik asit miktarıyla doğru orantılı olarak belli bir seviyeye kadar artmaktadır. Oral yolla 150-250 mg/gün civarı alındığında hem aköz sıvı hem de plazma sıvıları doygunluğa ulaşmaktadır (Taylor ve ark., 1997). Askorbik asidin aköz sıvıdaki temel fonksiyonunun güneş ışığının etkisiyle oluşan reaktif oksijen türlerinin meydana getirdiği hasara karşı göz içi dokularını korumak olduğuna inanılmaktadır (Williams ve Paterson, 1986).

3. ENZİMLER

Canlı sistemlerde biyokimyasal reaksiyonların hemen hemen tamamına yakını temelde protein yapılı olan ve enzimler olarak bilinen bir seri biyolojik katalizörler aracılığıyla gerçekleşir (Voet ve ark., 1999).

Enzimler, canlı organizmalardaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürün oluşumuna fırsat vermeden %100'lük ürün verimi sağlayan protein yapılı biyolojik katalizörlerdir (Keha ve Küfrevioğlu, 2009).

Enzimler protein yapısındaki özel katalizörlerdir. Enzimatik katalizörler, diğer katalizörlerden farklı üç önemli özelliğe sahiptirler. Bunlar;

1. Enzimler son derece hızlı çalışırlar. Örneğin; asetilkolinesteraz enzimi bir dakikada 1.500.000 molekülü, karbonik anhidraz ise bir dakikada 36.000.000 molekülü ürüne çevirir.

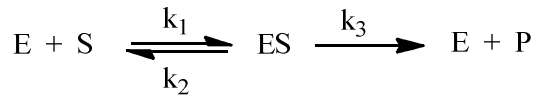
2. Katalizörlerin çoğu çeşitli kimyasal reaksiyonlarda katalizör olarak görev yapmalarına rağmen, enzimler genellikle tek tip reaksiyonu spesifik olarak katalize ederler.

3. Katalizörler kimyasal reaksiyonu başlatmazlar, sadece ölçülemeyecek derecede yavaş meydana gelen kimyasal reaksiyonların hızını arttırlar. Enzimler, inorganik katalizörlere oranla aktivasyon enerjisini etkili bir biçimde düşürerek reaksiyonların daha düşük sıcaklıkta ve daha az enerjiyle yürümelerini sağlarlar (Bayşu ve Sözbilir Bayşu, 2008).

Enzimlerin bir kısmı substrat adının sonuna '-az' eki getirilerek adlandırılırken (örneğin; üreaz, fosfataz) bazıları da o enzimleri ilk bulan kişilerin verdikleri isimlerle tanınır (örneğin; tripsin, pepsin). Ancak bu isimlerin çoğu enzimlerin fonksiyonları hakkında eksik bilgi verdiği için ve enzim sayısının artmasından dolayı Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB) tarafından sistematik bir sınıflandırma yapılmıştır. Bu sınıflandırmaya göre enzimler altı ana sınıfa (oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar ve ligazlar) ve bunlar da kendi içinde alt ve alt alt gruplara ayrılmışlardır. Ayrıca her enzime dört rakamlı bir enzim kod numarası (E.C.) verilmiştir. Bu çalışmada kullanılan karbonik anhidraz enziminin kod numarası E.C.4.2.1.1 olup sistematik adı karbonat hidroliyazdır (Lehninger ve ark., 2005; Keha ve Küfrevioğlu, 2009).

Metabolik aktivitenin regülasyonunda izoenzimlerde görev alır. Protein yapıları farklı, fakat katalizledikleri kimyasal reaksiyon aynı olan enzimler izoenzimler olarak bilinirler (Bayşu ve Sözbilir Bayşu, 2008). İzoenzimlere örnek olarak karbonik anhidraz (CA) verilebilir. Karbonik anhidraz enziminin 16 izoenzimi belirlenmiştir (Keha ve Küfrevioğlu, 2009).

1913 yılında Leonor Michaelis ve Maud Menten, enzimli reaksiyonların ilk basamağında bir ES kompleksinin oluşmasından ve enzimlerin doygunluk özelliğinden yola çıkarak, bir model geliştirdiler. Bu modele göre, enzim substratla tersinir olarak bağlanır ve sonradan enzim serbest hale geçerek ürüne yıkılan bir ES kompleksi meydana getirir. Bu model ile birçok enzimin kinetik özelliği açıklanabilmiştir. Bir substrat molekülünü kapsayan model aşağıda gösterilmiştir (Keha ve Küfrevioğlu, 2009).



Bu kimyasal reaksiyona göre Michaelis-Menten eşitliği aşağıdaki şekildedir:

$$V = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

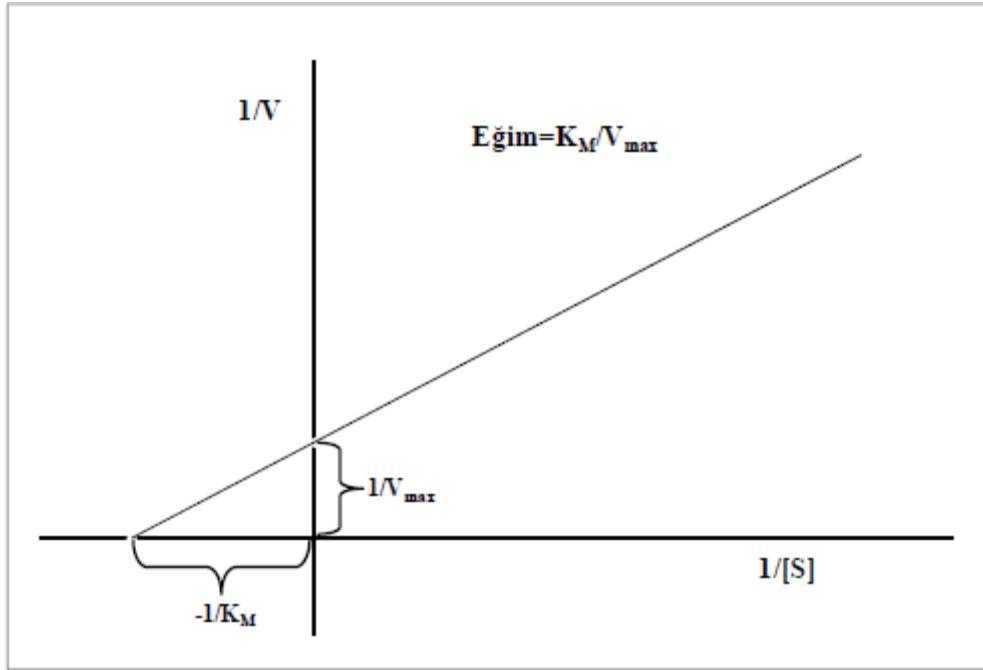
Michaelis-Menten eşitliği

Bir enzimin kinetik özellikleri hakkında en faydalı bilgiler, Michaelis-Menten eşitliğindeki K_M sabiti (enzimin aktif bölgesinin yarısının dolduğu substrat konsantrasyonu) ve V_{\max} (enzimin substrata doyduğu andaki hız) değerlerinden elde edilir. Bu iki değer deneysel olarak bulunur.

Michaelis-Menten eşitliğinden yola çıkılarak y ekseninde hız (V), x ekseninde substrat konsantrasyonu ([S]) olacak şekilde Michaelis-Menten grafiği çizilir ve bu grafik hiperbolik bir eğri verir. Bu eğriden ekstrapolasyonla V_{\max} ve K_M değerleri sağlıklı bir biçimde belirlenemez. Bu nedenle Michaelis-Menten eşitliği ters çevrilerek Lineweaver-Burk eşitliği elde edilir. Bu eşitlikten yararlanılarak çizilen Lineweaver-Burk grafiği doğrusal bir grafikdir (Şekil 3.1). Bu sayede K_M ve V_{\max} değerleri doğru bir şekilde belirlenebilir (Keha ve Küfrevioğlu, 2009; Voet ve ark., 2003; Lehninger ve ark., 2005).

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

Lineweaver-Burk eşitliği



Şekil 3.1 Lineweaver-Burk grafiği.

Kaynak: Keha ve Küfrevioğlu, 2009.

Bir çözelti veya doku ekstraktı içerisindeki enzim miktarı, enzimin katalitik aktivitesinden yararlanarak bulunur. Enzim aktivitesi “enzim ünitesi” cinsinden verilir. 25°C 'da ve optimal şartlarda 1 mikromol (10^{-6} mol) substratı bir dakikada ürüne çeviren enzim miktarına “1 enzim ünitesi (EU)” denir. Ancak uluslararası ölçü sistemine göre zaman birimi saniye, madde miktarı birimi mol olarak alındığından enzim aktivite birimine “katal” denilmektedir. Spesifik aktivite ise, 1mg protein başına düşen enzim ünitesi (EU/mg protein) olarak tanımlanır ve bu enzim saflığının bir ölçüsüdür. Enzim aktivitesine etki eden faktörler; substrat konsantrasyonu, pH, sıcaklık, enzim miktarı, iyonik şiddet, varsa kofaktör konsantrasyonu, inhibitör ve aktivatör konsantrasyonları olarak sayılabilir (Keha ve Küfrevioğlu, 2009).

Enzim moleküllerinde aktif bölge adı verilen özel bir cep yada yuva bulunur. Bir enzimin aktif bölgesi substrata komplementer (tamamlayıcı) olan ve üç boyutlu bir yüzey oluşturan aminoasit yan zincirleri içerir. Aktif bölge substratı bağlayarak ES kompleksi meydana getirir (Harvey ve ark., 2007).

Enzim inhibisyonu, enzimler üzerine çalışılan önemli konulardan biridir. Enzimlerin hem *in vivo* hem de *in vitro* aktivitelerinin bazı maddeler tarafından azaltılması yada tamamen ortadan kaldırılması olayı enzim inhibisyonu şeklinde tanımlanır. Enzim inhibisyonuna neden

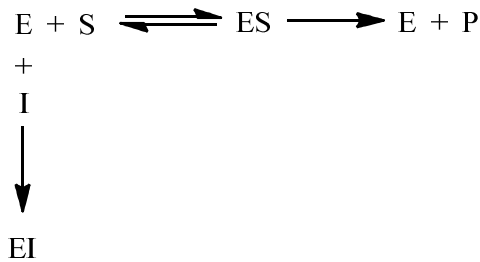
olan bu maddelere inhibitör adı verilir. İnhibitörler genellikle küçük molekül ağırlığına sahip bileşikler veya iyonlardır. Birçok ilaç ve toksik madde enzimleri inhibe ederek etki gösterir (Keha ve Küfrevioğlu, 2009). Buna örnek olarak; karbonik anhidraz enzimi inhibitörleri olan ve halen daha günümüzde ilaç olarak kullanılan sülfonamid türevleri verilebilir.

Enzim inhibisyonu dönüşümsüz ve dönüşümlü olmak üzere ikiye ayrılır. Dönüşümlü inhibisyon ise yarışmalı (kompetitif), yarışmasız (nonkompetitif), yarı yarışmalı (unkompetitif) ve Lineer karışık (kompetitif-nonkompetitif) olmak üzere dört çeşittir (Keha ve Küfrevioğlu, 2009).

Dönüşümsüz inhibisyon:

Dönüşümsüz inhibisyonda inhibitör enzime ya kovalent olarak bağlanır yada zor ayrışabilen bir kompleks oluşturur (Şekil 3.2) (Keha ve Küfrevioğlu, 2009).

Dönüşümsüz inhibisyonda K_M değeri sabit kalırken, V_{max} değeri azalır. Bu nedenle dönüşümsüz inhibisyon, yarışmasız inhibisyona benzemektedir (Segel, 1976).



Şekil 3.2 Dönüşümsüz inhibisyonun reaksiyon halinde gösterimi.

Dönüşümsüz inhibisyona örnek olarak sinir uyarılarının iletiminde görevli olan asetilkolin esterase enziminin sinir gazı zehirleri tarafından inhibisyonu verilebilir (Keha ve Küfrevioğlu, 2009).

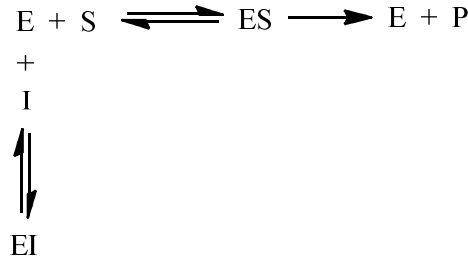
Dönüşümlü inhibisyon:

Dönüşümlü inhibisyonda, enzim ile inhibitör arasındaki etkileşim bir denge reaksiyonu şeklindedir.

1. Yarışmalı (kompetitif) inhibisyon:

Yarışmalı inhibisyonda, inhibitör yapı bakımından substrata benzer ve enzimin aktif bölgesine bağlanır. Böylece substratın enzime bağlanması önlenir. İnhibitör konsantrasyonu

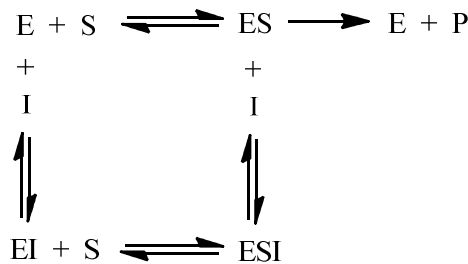
arttırıldıkça eğim de artar dolayısıyla K_M değeri artar, V_{max} değişmez. Bu da yüksek substrat konsantrasyonlarında inhibisyonun ortadan kalktığını gösterir. Çünkü substrat ve inhibitör aktif bölgeye bağlanmak için yarışma halindedir ve substrat konsantrasyonu yüksek olduğunda aktif bölgenin tamamı substrat ile dolar (Şekil 3.3) (Keha ve Küfrevioğlu, 2009).



Şekil 3.3 Yarışmalı inhibisyonun reaksiyon halinde gösterimi.

2. Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon:

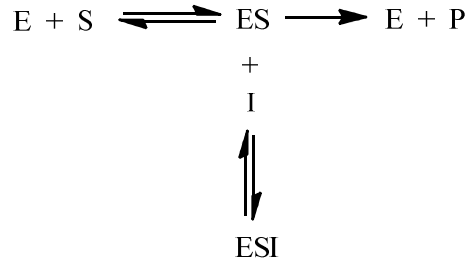
Yarışmasız inhibisyonda, inhibitör ve substrat enzime aynı anda bağlanabilir. Bu, bağlanmanın enzimin aynı bölgesine olmadığını kanıtlar. Enzimin V_{max} değeri azalırken, K_M yarışmasız inhibitörden etkilenmez. Yarışmasız inhibisyon, substrat konsantrasyonunu arttırmakla ortadan kaldırılamaz. Substrat ve inhibitör farklı bölgelere bağlanabildiğinden enzimin iki çeşit inaktif kompleksi meydana gelir: EI ve ESI (Şekil 3.4) (Keha ve Küfrevioğlu, 2009).



Şekil 3.4 Yarışmasız inhibisyonun reaksiyon halinde gösterimi.

3. Yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyon:

Yarı yarışmalı inhibisyonda, inhibitör serbest enzime bağlanmaz, direkt olarak ES kompleksine bağlanır (Şekil 3.5). İnhibitör varlığında ortamdan sürekli ES kompleksi uzaklaştığı için K_M azalır ve ortamda ESI kompleksi sürekli oluşacağından V_{max} da düşer.



Şekil 3.5 Yarı yarışmalı inhibisyonun reaksiyon halinde gösterimi.

Yarı yarışmalı inhibisyon bir substratlı reaksiyonlarda nadiren görülür, buna rağmen iki substratlı reaksiyonlarda yaygındır.

İnhibitörleri yarışmalı ve yarışmasız olacak şekilde kesin sınırlarla birbirinden ayırmak mümkün değildir. Esasen inhibisyon genellikle karışıktır (Keha ve Küfrevioğlu, 2009).

4. Lineer Karışık Tip İnhibisyon:

Lineer karışık tip inhibisyon yarışmasız inhibisyonun özel bir türüdür. Bu inhibisyon, substrat EI kompleksine ve inhibitör ES kompleksine bağlandığı durumda gerçekleşir. Her iki durumda da katalitik olarak inaktif olan ESI kompleksi oluşur. Ancak burada EI kompleksinin substrata ilgisi serbest enzime göre daha azdır (Arslan, 2003).

3.1 Karbonik Anhidraz Enzimi (E.C.4.2.1.1)

Karbonik anhidraz (CA), karbondioksitin bikarbonata reversibl (dönüşümlü) hidratasyon reaksiyonunu katalizleyen, Zn^{+2} iyonu içeren bir metaloenzimdir.



Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği bu reaksiyonun çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik fonksiyonları vardır. Pek çok farklı dokuda bulunan bu enzim kemik oluşumu, kalsifikasyon, CO_2 ve iyon taşınımı, asit-baz dengesi gibi farklı fizyolojik proseslerde görev alır (Gilmour ve Perry, 2009).

Karbonik anhidraz enzimi ilk olarak insan eritrositlerinde keşfedilmiştir (Meldrum ve Roughton, 1933) hemen hemen tüm memeli doku ve hücre tiplerinde ilerleyen yıllarda bir çok izoenzimi bulunmuştur. Solunum, doku ve akciğerler arasındaki CO_2/HCO_3^- taşınımı, pH regülasyonu, iyon taşınımı, kalsifikasyon, tümör gelişimi ve biyosentetik reaksiyonlar (glukoneogenez, lipogenez ve üre sentezi) gibi fizyolojik proseslere katılmaktadır (Supuran,

2008). CA bitkilerde ve mavi-yeşil alglerde bol miktarda bulunur, fotosentetik CO₂ fiksasyonu için gereklidir (Badger ve Price, 1994).

CA izoenzimlerinin bir çoğu önemli terapötik ajanlardır. Bu enzim inhibitörleri ödem, glokom, obezite, kanser, epilepsi ve osteoporoz gibi bir dizi bozukluğun tedavisinde kullanılır.

CA, prokaryot ve ökaryotlarda birbirinden bağımsız dört gen ailesi tarafından kodlanır. Bunlardan; α -CA'lar omurgalılar, bakteri, alg ve yeşil bitkilerin sitoplazmasında, β -CA'lar ağırlıklı olarak bakteri, alg, monokotiledon ve dikotiledon bitkilerin kloroplastlarında, γ -CA'lar özellikle arkeler ve bazı bakterilerde ve δ -CA'lar deniz flagellatlarında bulunur (Supuran, 2008).

α -, γ -, δ -CA'ların aktif bölgelerinde çinko iyonu ile üç histidin rezidüsü koordinasyon halindedir, halbuki β -CA'ların aktif bölgelerinde çinko iyonu ile bir histidin ve iki sistein rezidüsü koordinasyon yapmış durumdadır (Cox ve ark., 2000).

3.1.1 α -Karbonik anhidrazlar (α -CA)

Memelilerde hücre içindeki yerleşimi ve dokulardaki dağılımına göre farklı katalitik aktiviteye sahip 16 farklı α -CA izoenzimi ve CA bağlantılı protein (CARP) tanımlanmıştır. Bunlardan beş tanesi sitozolik (CA I, CA II, CA III, CA VII ve CA XIII), beş tanesi membrana bağlı (CA IV, CA IX, CA XII, CA XIV ve CA XV), iki tanesi mitokondriyal (CA V_A ve CA V_B) ve bir tanesi salgısal (CA VI) geriye kalan üç tanesi ise non-katalitiktir (CA VIII, CA IX ve CA X) (Supuran, 2008). CA VIII, CA X ve CA XI izoenzimleri CA bağlantılı proteinler (CARP) olup, çinko iyonu ile bağlantılı bir yada daha fazla histidin rezidüsünden yoksun olmaları nedeniyle katalitik aktiviteye sahip değildirler (Kato, 1990; Hewett-Emmett ve Tashian, 1996; Lovejoy ve ark., 1998).

Sitozolik enzimlerden CA I (K_{cat} : $2.0 \times 10^5 s^{-1}$), CA II (K_{cat} : $1.4 \times 10^6 s^{-1}$) ve CA III (K_{cat} : $1.3 \times 10^4 s^{-1}$) izoenzimlerinin K_{cat} değerleri kıyaslanacak olursa; CA I izoenzimi, CA II izoenziminin katalitik aktivitesinin yaklaşık %10'una sahipken, CA III izoenzimi ise sadece %1'ine sahiptir (Hilvo ve ark., 2008; ve Supuran, 2008).

CA I izoenzimi; plasenta ile fetal membranlarda, kornea endotelinde, göz merceğinde, ter bezlerinde, adipoz dokuda, nötrofillerde ve adrenal kortekste bulunan zona glomerulosa bölgesinde bulunur (Venta ve ark., 1987; Parkkila ve ark., 1993; Campbell ve ark., 1994; Muhlhauser ve ark., 1994; Sly ve Hu, 1995).

CA II son derece aktif bir enzimdir ve CA izoenzimleri arasında en geniş alana sahiptir. Bundan dolayı, çeşitli fizyolojik reaksiyonlarda önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir.

Midede bulunan yüzey epitel hücreleri ve paryetal hücrelerinde bol miktarda CA II izoenzimi bulunur. Paryetal hücrelerinde CA II enzimi gastrik asit için proton üretir ve daha fazla asit sindiriminden yüzey epitel ve paryetal hücrelerini korumak için bikarbonat sağlar. (Davenport, 1939; Parkkila ve ark., 1994). CA II izoenzimi aynı zamanda duodenum, kolon, karaciğer, safra kesesi, pankreas ve beyinde bulunmaktadır (Maren, 1967; Parkkila ve ark., 1994; Kumpulainen ve Korhonen, 1982).

İnsanlarda CA II enzimi eksikliği osteopetrozis, renal tübüler asidoz, mental retardasyon, serebral kalsifikasyon ve büyüme geriliği gibi sendromlara yol açabilir (Sly ve ark., 1983; Sly ve ark., 1985).

CA III izoenzimi diğer CA izoenzimleri arasında, düşük katalitik aktiviteye sahip olması, sülfonamid türevi olan asetazolamid inhibitörlerine karşı direnç göstermesi ve dokularda nadiren görülen bir dağılıma sahip olması gibi benzersiz özelliklere sahiptir (Cabiscol ve Levine, 1995).

CA IV izoenzimi jejunum, ileum ve kolon epitel hücrelerinin apikal yüzeyleri üzerinde bulunur. Buna ek olarak, yapılan immün sistem çalışmaları safra kesesinde de bu enzimin bulunduğunu göstermiştir (Fleming ve ark., 1995).

Mitokondriyal izoenzimlerden CA V_A insan karaciğerine özgüdür, CA V_B ise kalp, iskelet kası, pankreas, böbrek, tükürük bezi, omurilik gibi diğer dokularda bulunur (Fujikawa-Adachi ve ark., 1999).

İnsanlarda tek salgısal CA izoenzimi olan CA VI, tükürük ve meme bezlerinde bulunmaktadır (Karhumaa ve ark., 2001; Kivela ve ark., 1997).

3.1.2 β -Karbonik anhidrazlar (β -CA)

β -CA enzimleri, α -CA enzimlerine göre daha az kapsamlı olduğu bilinmektedir. β -CA'lar bitkiler, algler, arke ve eubakteriler, fungi aleminden *Saccharomyces cerevisiae* (bira mayası) ve *Schizosaccharomyces pombe* (fasyon mayası) türlerinde bulunmaktadır (Hewett-Emmett ve Tashian, 1996; Smith ve Ferry, 1999; Gotz ve ark., 1999).

Simbiyotik alg türü olan *Coccomyxa* da ve yüksek bitkilerin sitozol ve kloroplastlarında da β -CA mevcuttur (Fett ve Coleman, 1994; Hiltonen ve ark., 1998).

β -CA'larda çinko ligandların koordinasyonu, α -CA'lara göre oldukça farklıdır. X-ışını absorpsiyon spektroskopisi (EXAFS) yöntemiyle ıspanak ile yapılan çalışmalarda β -CA'ların aktif bölgelerindeki çinko iyonu ile bir histidin ve iki sistein rezidüsünün koordinasyon halinde olma olasılığının olduğunu göstermiştir (Rowlett ve ark., 1994; Bracey ve ark.,1994). Son zamanlarda yapılan çalışmalar sonucunda kırmızı alg (*Porphyridium purpureum*) ve yeşil bezelye (*Pisum sativum*)'den β -CA izoenzimi saflaştırılmıştır (Mitsuhashi ve ark., 2000; Kimber ve Pai, 2000).

3.1.3 γ -Karbonik anhidrazlar (γ -CA)

γ -CA, arkebakteri türü olan *Methanosarcina thermophila* da keşfedilmiştir (Alber ve Ferry, 1994). γ -CA, *Methanosarcina thermophila* dan saflaştırılarak, yapısı aydınlatılmıştır. Bu yapı α -CA ve β -CA'nın yapısından çarpıcı biçimde bir farklılık gösterir. Her bir monomerin yapısına sol el β -heliks yapısı hakimdir.

γ -CA, α -CA'nın yapısında olduğu gibi aktif bölgedeki çinko iyonu ile üç histidin rezidüsü tarafından koordine edilmiş durumdadır. *M. thermophila*'da çinko iyonunu koordine eden histidin rezidülerinin ikisi (His 81 ve His 122) bir monomere ait iken, diğeri ise (His117) bir başka monomere aittir. Buna rağmen aktif bölge monomerlerin yüzeyindedir, bundan dolayı γ -CA'nın aktif bölgesinin yapısı α -CA'nın yapısına benzemektedir (Kisker ve ark.,1996).

Bazı γ -CA'lar çinko iyonu bulundururken, bazıları ise süstitü-kobalt bulundururlar. Çinko iyonu bulunduran γ -CA'lar da koordinasyon geometrisi üçgen bipiramit iken, süstitü-kobalt bulunduran γ -CA'da koordinasyon geometrisi oktahedraldir (Iverson ve ark., 2000).

3.1.4 δ -Karbonik anhidrazlar (δ -CA)

Son zamanlarda bir flagellat olan *Thalassiosira weissflogii* de bir karbonik anhidraz enzimi olduğu belirlenmiştir (Roberts ve ark., 1997). Yapılan çalışmada, *T. weissflogii*'den CA enzimi izole edilmiş ve saflaştırılan proteinlerden kısmi bir aminoasit sekansı elde edilmiştir. Bu sekans bilgisi kullanılarak, PCR yöntemiyle bir DNA fragmenti amplifiye edilmiş ve bu fragment cDNA kütüphanelerinde tarama yapılması amacıyla kullanılmıştır. Sonuçta varsayılan karbonik anhidraz cDNA'sının bilinen üç karbonik anhidraz gen ailesinden hiçbirine ait olmadığı tespit edilmiştir.

Morel ve grubu, kadmiyum bağlı CA'nın, çinko bağlı CA'nın yerini alıp alamayacağı üzerine bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmaya göre, *T. weissflogii* düşük seviyede çinko içeren ancak kadmiyum bulunan bir ortama bırakılarak CA aktivitesi izlenmiştir. Buna göre *T. weissflogii*'nin ortamda sınırlı oranda çinko bulunduğu, kadmiyum bağlı CA sentezlediği ve

faaliyetlerini sürdürdüğü anlaşılmıştır. Bu farklılıklardan dolayı bu tip karbonik anhidrazlar δ -CA şeklinde sınıflandırılmaktadır (Lane ve Morel, 2000).

3.1.5 Karbonik anhidraz enziminin katalitik mekanizması

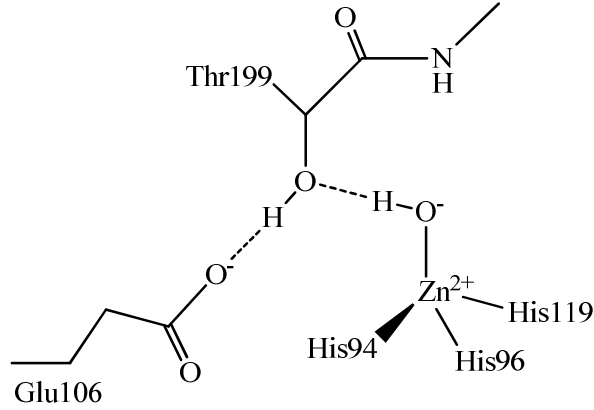
Bugüne kadar incelenen tüm α -CA enzimlerinin aktif bölgelerinde yer alan Zn^{+2} iyonunun kataliz için gerekli olduğu saptanmıştır. X-ray kristalografi verileri, üç histidin rezidüsü (His94, His96 ve His119) ve bir su molekülü/hidroksit iyonu tarafından koordine edilen bu iyonun aktif bölge yarığının 15Å derinliğinde olduğunu göstermiştir (Şekil 3.6).



Şekil 3.6 CA II enziminin aktif bölgesi (Pembe renk ile gösterilen küre).

Kaynak: Supuran, 2008.

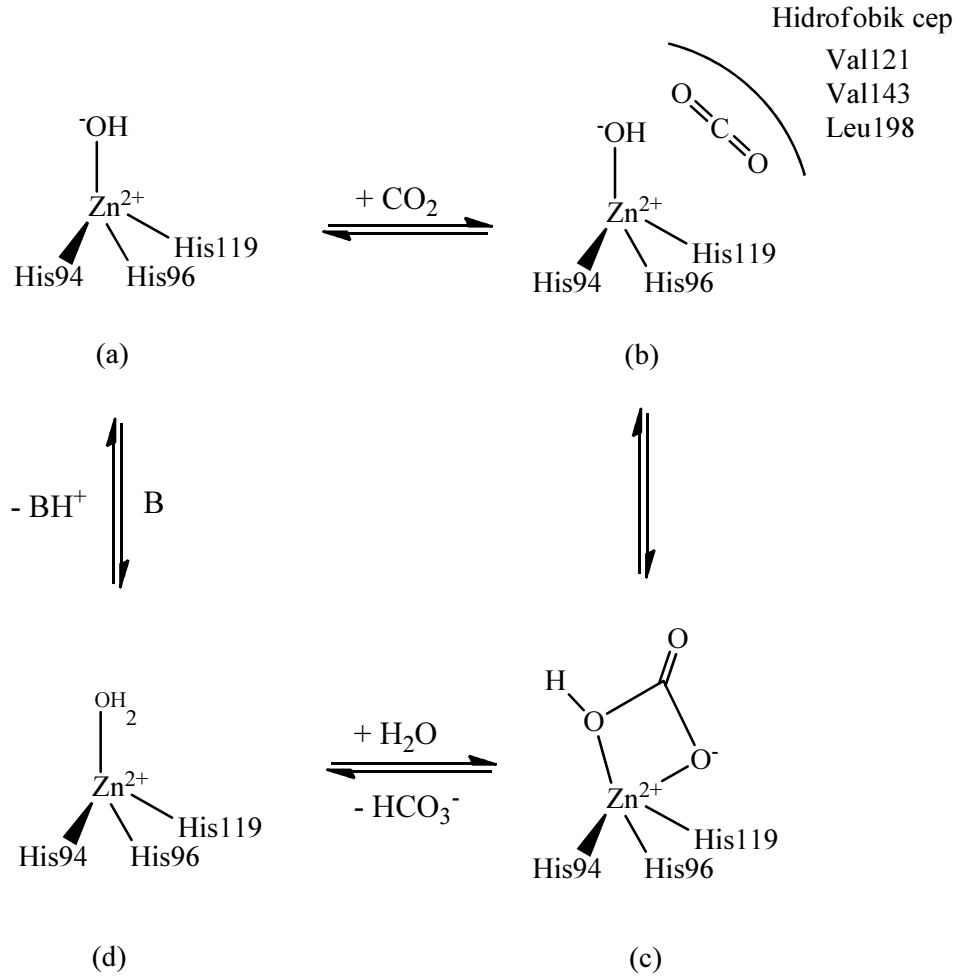
Glu106 rezidüsünün karboksilat kısmı ile köprü oluşturmuş olan Thr199 rezidüsünün hidroksil grubu ile çinko iyonuyla koordinasyon halindeki su molekülünün hidroksil grubu arasında hidrojen bağı vardır (Şekil 3.7). Bu etkileşimler çinko ile koordinasyon halindeki su molekülünün nükleofilitesini artırır ve substratı (CO_2) nükleofilik saldırı için elverişli bir konuma yönlendirir (Supuran, 2008).



Şekil 3.7 Zn⁺² ile koordinasyon halindeki su molekülünün hidroksit grubuyla Thr199 ve Glu106 rezidüleri arasındaki etkileşimin şematik gösterimi.

Kaynak: Supuran ve Scozzafava, 2007.

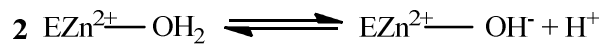
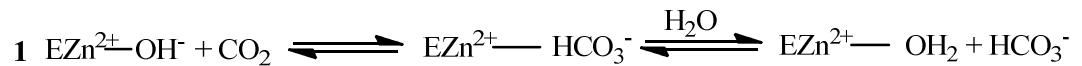
Zn⁺² iyonuna hidroksitin bağlanmasıyla enzimin aktif formu oluşur (Şekil 3.8.a). Enzimin aktif formu, güçlü nükleofilik yapısıyla CO₂ molekülüne saldırır, bağlanma aktif bölgeye komşu hidrofobik cep sınırlarında gerçekleşir (Şekil 3.8.b). (İnsan CA II izoenziminde substrat bağlanma bölgeleri Val121, Val143 ve Leu198 rezidülerini kapsamaktadır.) Neticede Zn⁺² iyonu ile koordine olmuş bikarbonat oluşur (Şekil 3.8.c). Daha sonra bikarbonat iyonu, su molekülü ile yer değiştirir ve çözeltiye geçer, su molekülü ile Zn⁺² iyonu koordine olur ve enzimin asit formu oluşur, enzim bu formda katalitik olarak inaktif durumdadır (Şekil 3.8.d) (Supuran, 2008).



Şekil 3.8 CA enziminin katalizlediği CO₂-hidratasyon reaksiyonunun mekanizmasının şematik gösterimi.

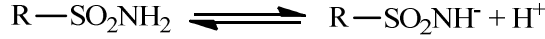
Kaynak: Supuran, 2008.

Enzim, aktif bölgesindeki His64 rezidüsü (His64 rezidüsü CA I, II, IV, VI, VII, IX ve XII-XIV izoenzimlerinde proton mekiği gibi davranır.) veya ortamda bulunan tamponlar aracılığıyla çevresine proton transferi gerçekleştirerek aktif formu yeniden kazanır. Bu süreç **1** ve **2** reaksiyonlarıyla şematik olarak gösterilmiştir (Supuran, 2008).



3.2 Karbonik Anhidraz İnhibitörleri

Karbonik anhidraz enziminin en güçlü inhibitörlerinin aromatik ve heterosiklik sülfonamidler olduğu bilinmektedir. Sülfonamidler, süstitüe olmamış bir $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ veya bir $-\text{SO}_2\text{NH}(\text{OH})$ grubu bulunduran inhibitörlerdir. Sülfonamidlerin kolaylıkla iyonik yapı kazanmaları en çarpıcı özelliklerinden biridir.



Bu özelliği nedeniyle sülfonamidler, karbonik anhidraz enzimi inhibisyonu üzerinde önemli role sahiptir (Roughton ve Booth, 1946).

Sülfonamidler, yaklaşık 50 yıldan beri diüretikler ve sistemik antiglokoma ilaçlarının yapısında klinik olarak kullanılmaktadır (Supuran, 2010).

Sülfonamid yapısındaki karbonik anhidraz inhibitörleri genellikle diüretik olarak kullanılırlar. Ayrıca glokoma, epilepsi, mide-bağırsak ülseri, kalp yetmezliği, nörolojik hastalıklar ve osteoporoz gibi hastalıkların tedavisinde kullanılır (Supuran ve Scozzafava, 2000). Bu inhibitörlerin birçok tümörün gelişimini engelleyen güçlü inhibitörler olduğu belirlenmiştir (Sugrue, 2000; Supuran ve Scozzafava, 2000).

Karbonik anhidraz inhibitörleri sistemik ve topikal olmak üzere sınıflandırılır. Sistemik karbonik anhidraz inhibitörleri; asetazolamid, metazolamid ve diklorfenamiddir. Topikal karbonik anhidraz inhibitörleri; dorzolamid ve brinzolamiddir.

Asetazolamid oral diüretik olarak antihipertansif tedavide kullanılmaya başlandıktan sonra göz içi basıncını da düşürdüğü anlaşılmıştır. Göz içi basıncını düşürücü etkisi diüretik etkisi ile alakalı değildir. Humor aköz yapımını azaltarak etki gösterir ve metabolik asidoza yol açar. Metabolik asidoz, optik sinir kan akımını artırarak glokoma hastalarda görme fonksiyonunu korumaktadır. Baş ağrısı, işitme azalması, el ve ayaklarda uyuşma, depresyon, ağızda acı tat hissi, idrar taşı oluşumu, bulantı, libido kaybı ve kan diskrazisi gibi yan etkilere neden olmaktadır (Shields, 1998).

Dorzolamid günümüzde hala kullanılan topikal karbonik anhidraz inhibitörlerinden olup, kornea geçirgenliği yüksek, selektif CA II inhibitörüdür. Bundan dolayı, sistemik yan etkileri yüksek olan asetazolamide alternatif olarak kullanılır (Preiffer, 1997; Maren ve ark., 1997). Humor aköz sekresyonunu azaltarak etki etmektedir. Göz içi basıncını yaklaşık %18 oranında azalttığı belirlenmiştir. İritasyon, yanma gibi yan etkileri mevcuttur (Schnyder ve ark., 1999).

Glokom hastalığının tedavisinde kullanılan sistemik ve topikal karbonik anhidraz enzim inhibitörlerinin neden olduğu yan etkilerden dolayı günümüzde çeşitli inhibisyon çalışmaları yapılmaktadır. Bu çalışmada ise, insan eritrositlerinden saflaştırılan hCA I ve hCA II izoenzimleri üzerinde C vitamininin *in vitro* olarak inhibisyon etkisi incelenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen verilerden yola çıkılarak IC_{50} ve K_i değerleri hesaplanmıştır.

4. GLOKOM

Gözün şeklini ve optik özelliklerini koruyabilmesi için yeterli ve sürekli bir iç basınca sahip olması gerekmektedir. Bunu da silyer cisimden salgılanan ve ön segment içini dolduran humor aköz olarak adlandırılan sıvı sağlamaktadır. Humor aköz sürekli olarak salgılanarak yenilenmekte ve hem gözden çıkışındaki ayarlamalar hem de salınım hızı yoluyla göz içi basıncı düzenlenmekte ve dengelenmektedir (Guyton ve Hall, 1996). Göz içi basıncı gün içerisinde kardiyak ve solunum sistemi faaliyetlerine göre değişebilmektedir. Günlük göz içi basıncı değişimi ortalama 3-5 mm Hg arasındadır. Günlük göz içi basınç değişimi 10 mm Hg değerinin üzerinde olduğu kişilerde glokom hastalığı oluşma riski yüksektir (Ziemer, 1996).

Glokom, yüksek göz içi basıncı (IOP) sebebiyle optik sinir başında geri dönüşümsüz hasara neden olan, ilerlemesi durumunda görme fonksiyonunda kayıplara yol açan ve körlükle sonuçlanan kronik, dejeneratif göz hastalığı olarak tanımlanmaktadır (Supuran, 2008).

21. yüzyılın başlarında dünyada 70 milyonu aşkın glokomlu hasta olduğu sanılmaktadır. Bunların yaklaşık %53'ü primer açık açılı glokom (PAAG), %36'sı primer kapalı açılı glokom (PKAG) ve geri kalan %11'i ise sekonder glokomlu hastalardır. Özellikle tedaviye dirençli sekonder glokom tiplerinin varlığı nedeniyle göz hastalıkları içinde %15-20 gibi yüksek bir oranda körlüğe en sık neden olan hastalıklardan biri olarak bilinir. Ülkemizde yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen verilerin ortalamasına göre çeşitli glokom tiplerinin dağılımı ve oranı Çizelge 4.1'de gösterilmiştir (Turaçlı, 2004).

Çizelge 4.1 Ülkemizde görülen glokom tipleri ve oranı.

Glokom Tipleri		Oran (%)
		Primer Açık Açılı Glokom
	Psödoeksfolyatif Glokom	15.6
	Normotansif Glokom	10.14
	Primer Kapalı Açılı Glokom	6.06
Tedaviye Dirençli Glokom Tipleri	Neovasküler Glokom	2.83
	Oküler İnflamasyona İkincil Glokom	2.47
	Afakik ve Psödoafakik Glokom	3.61
	Lense bağlı Glokom	1.48
	Travmatik Glokom	1.36
	Primer Konjenital Glokom	0.92
	Pigmenter Glokom	0.91
	Göz İçi Tümörlerine bağlı Glokom	0.74

Prostaglandin analogları, beta blokerlar, alfa blokerlar ve karbonik anhidraz inhibitörleri göz içi basıncını düşüren topikal ajanlardır. Ancak bunlardan prostaglandin analoglarının göz içi inflamasyonu, beta blokerlar ve alfa blokerların ise kardiyak ve sistemik tansiyon üzerinde yan etkiler gösterdiği bildirilmiştir. Topikal karbonik anhidraz inhibitörlerinin de elektrolit seviyeleri üzerinde yan etkisi olduğu bildirilmiştir (Scherer ve ark., 1998; Arıcı ve ark., 2006; Schwenn ve ark., 2001; Feist ve ark., 1995).

5. MATERYAL VE METOD

5.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tez çalışması için kullanılan siyanojen bromür ile aktifleştirilmiş sepharose-4B, p-nitrofenil asetat, N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin (TEMED), L-tirozin, tris (hidroksimetil) aminometan, sodyum sülfat, sodyum klorür, sodyum hidrojen fosfat, sodyum perklorat, sodyum barbital, sodyum bikarbonat, sodyum asetat, sodyum hidroksit, hidroklorik asit, fosforik asit, sülfürik asit, etanol, aseton, akrilamid, N,N'-metilen bisakrilamid, coomassie brilliant blue G-250 ve R-250, karbon dioksit ve L-askorbik asit (C vitamini) Merck ve Sigma Aldrich firmalarından temin edilmiştir.

5.2 Yararlanılan Alet ve Cihazlar

Çalışmalar sırasında aşağıdaki alet ve cihazlardan yararlanılmıştır. Kullanılan aletler ve cihazlar T.C. Dumlupınar Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Araştırma Laboratuvarında bulunmaktadır.

Spektrofotometre:	Shimadzu UV-1700 Pharma Spec.
Soğutmalı Santrifüj:	Sigma K30
Santrifüj:	Nüve NF800
Peristaltik Pompa:	Ismatec MS-4/8 Reglo Digital
pH metre:	Schott Instruments Lab. 850
Karıştırıcı:	Vortex-Genie, Heidolph
Magnetik Karıştırıcı:	Heidolph MR 3001
Hassas Terazi:	Ohaus-Adventurer
Çalkalayıcı:	GFL
Otomatik Pipetler:	Biohit Proline

5.3 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışı

Biyokimyasal çalışmalarda kullanılan çözeltilerin kullanım yerleri ve hazırlanma şekilleri aşağıda belirtilmiştir.

1. Esteraz aktivitesi ölçümü ve diyalizde kullanılan tampon (0,05 M Tris-SO₄, pH=7,4): 6,055 g Tris, 950 mL saf suda çözüldü. 1 N H₂SO₄ ile pH=7,4 olana dek titre edildikten sonra hacim saf su ile 1 L'ye tamamlandı.

2. Sepharose-4B matriksi üzerinde afinite jeli hazırlanırken kullanılan tampon (0,2 M NaHCO_3 , pH=8,8): 16,8 g NaHCO_3 , 950 mL saf suda çözüldü. 1 N NaOH ile pH=8,8 olana dek titre edildikten sonra hacim saf su ile 1 L'ye tamamlandı.

3. Hidrataz aktivitesi ölçümleri sırasında kullanılan tampon (0,0025 M Veronal tamponu): 5,15 g sodyum barbital, 950 mL saf suda çözüldü. 0,1 M HCl ile pH=8,2 olana dek titre edildikten sonra hacim saf su ile 1 L'ye tamamlandı.

4. Afinite jelinin dengelenmesinde kullanılan tampon (25mM Tris-HCl/0,1 M Na_2SO_4 , pH=8,7): 3,0275 g Tris ve 14,2 g Na_2SO_4 , 950 mL saf suda çözüldü. 1 N HCl ile pH=8,7 olana dek titre edildikten sonra hacim saf su ile 1 L'ye tamamlandı.

5. Hemolizatın tatbikinden sonra afinite jelinin yıkanmasında kullanılan tampon (25 mM Tris-HCl/22 mM Na_2SO_4 , pH=8,7): 3,0275 g Tris ve 3,124 g Na_2SO_4 , 950 mL saf suda çözüldü. 1 N. HCl ile pH=8,7 olana dek titre edildikten sonra hacim saf su ile 1 L'ye tamamlandı.

6. İzoenzimlerin elüsyonunda kullanılan çözeltiler;

(a) Kolona tutunmuş olan hCA I izoenziminin elüsyonu için kullanılan tampon (0,025 M Na_2HPO_4 /1 M NaCl, pH=6,3): 8,875 g Na_2HPO_4 ve 14,625 g NaCl, 200 mL saf suda çözüldü. 1 N HCl ile pH=6,3 olana dek titre edildikten sonra hacim saf su ile 250 mL'ye tamamlandı.

(b) Kolona tutunmuş olan hCA II izoenziminin elüsyonu için kullanılan tampon (0,1 M CH_3COONa /0,5 M NaClO_4 , pH=5,6): 9,187 g NaClO_4 ve 2,09 g $\text{NaCH}_3\text{COO}\cdot\text{H}_2\text{O}$, 120 mL saf suda çözüldü. 1 N HCl ile pH=5,6 olana dek titre edildikten sonra hacim saf su ile 150 mL'ye tamamlandı.

7. SDS-Elektroforezinde kullanılan numune tamponu: 0,65 mL 1 M Tris-HCl pH=6,8, 3 mL %1'lik SDS, 1 mL %100'lük gliserin ve 1 mL %0,1'lik brom timol mavisi karıştırılarak, son hacmin saf su ile 10 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı. Bu tampona kullanılmadan hemen önce 950 μL numune tamponunda 50 μL olacak şekilde merkaptolanol ilave edildi.

8. SDS-Elektroforezinde kullanılan yürütme tamponu: 1,5 g Tris ve 7,2 g glisin, 50 mL suda çözüldü. Daha sonra bunun üzerine 5 mL %1'lik SDS ilave edilerek hacim saf su ile 500 mL'ye tamamlandı.

9. CO_2 -hidrataz aktivitesinde kullanılan çözelti: 0 °C'de 30 dk süreyle saf su içerisinde $\text{CO}_{2(g)}$ geçirilerek hazırlandı.

10. Proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti (Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi): 100 mg Coomassie brilliant blue G-250, 50 mL %95'lik etanolde çözüldü. Bu çözeltiye 100 mL %95'lik fosforik asit ilave edilerek hacim saf su ile 1 L'ye tamamlandı.

11. SDS-Elektroforezinde jelin boyanması için kullanılan boyama çözeltisi: 0,1 g Coomassie brilliant blue R-250, %50 metanol, %10 asetik asit ve %40 saf su olacak şekilde yeterli miktarda hazırlandı.

12. SDS-Elektroforezinde jelin yıkanması için kullanılan yıkama çözeltisi: %10 asetik asit olacak şekilde metanol ve su karıştırılarak yeterli miktarda hazırlandı.

13. SDS-Elektroforezinde jeldeki proteinlerin sabitleştirilmesi için kullanılan sabitleştirme çözeltisi: %50 izopropanol, %10 TCA, %40 saf su olacak şekilde yeterli miktarda hazırlandı.

14. Hidrataz aktivitesi tayininde kullanılan çözelti (%0,04'lük brom timol mavisi çözeltisi): 0,1 g indikatör 16 mL 0,01 N NaOH içerisinde çözüldükten sonra, hacmi saf su ile 250 mL'ye tamamlandı.

15. İnhibitör stok çözeltileri:

%0,25'lik stok çözelti: 6,25 mg L-askorbik asit, 25 mL saf suda çözülerek hazırlandı.

%0,5'lik stok çözelti: 12,5 mg L-askorbik asit, 25 mL saf suda çözülerek hazırlandı.

%1'lik stok çözelti: 25 mg L-askorbik asit, 25 mL saf suda çözülerek hazırlandı.

%2'lik stok çözelti: 50 mg L-askorbik asit, 25 mL saf suda çözülerek hazırlandı.

%3'lük stok çözelti: 75 mg L-askorbik asit, 25 mL saf suda çözülerek hazırlandı.

5.4 Yöntemler

5.4.1 Protein tayini

5.4.1.1 Kalitatif protein tayini

Kromatografi işlemleri sonunda eşit hacimde alınan bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Bu metodun esası; proteinlerin yapısında bulunan tirozin ve triptofanın 280 nm'de maksimum absorbanans göstermesine dayanmaktadır. Fraksiyonlar kuvarz küvetlere alınarak absorbanansları spektrofotometrede köre (ilgili tampon çözeltiye) karşı okundu.

5.4.1.2 Bradford yöntemi ile protein tayini

Bu yöntemle, afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltisinde ve hemolizatta protein tayini yapıldı. Bu yöntem, coomassie brilliant blue G-250'nin fosforik asitli ortamda proteinlere bağlanması esasına dayanır. Oluşan kompleks, 595 nm'de maksimum absorbans gösterir. Proteine boyanın bağlanması çok hızlı gelişir (2 dakika). Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır (Bradford, 1976).

Tayin işlemlerinde; 1 mL'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart hemolizat çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 µL alındı ve saf su ile tüm tüplerin hacmi 0,1 mL'ye tamamlandı. 5 mL coomassie brilliant blue G-250 reaktifi tüplere ilave edildi ve vorteks ile karıştırıldı. 10 dakika sonra 595 nm'de 3 mL'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak 0,1 mL aynı tampon ve 5 mL coomassie brilliant blue G-250 reaktifinden oluşan karışım kullanıldı. Absorbans değerlerine karşılık gelen mikrogram (µg) protein değerleri standart grafik şeklinde verildi (Şekil 6.2).

5.4.2 Karbonik anhidraz aktivitesi tayini

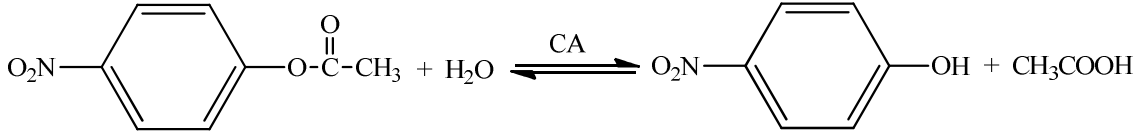
5.4.2.1 CO₂-Hidrataz aktivitesi tayini

Karbonik anhidraz enziminin aktivite tayini Wilbur-Anderson metodu ile yapıldı. Bu yöntemde; CO₂'in hidratasyonu sonucu açığa çıkan H⁺ sebebiyle pH'ın 8,2'den 6,3'e düşmesi için geçen süre pH-stat metodu kullanılarak bulundu. Tampon olarak da pH'ı 8,2 olan veronal tamponu kullanıldı (Wilbur ve Anderson, 1948; Maren, 1960). Enzim birimi ise; enzimsiz CO₂ hidratasyon süresi (t₀) ile enzimli reaksiyon süresi (t_c) arasındaki farkın, (t_c)'ye bölünmesiyle belirlendi.

Deneyde reaksiyon tüpüne önce 1 mL veronal tamponu, 0,1 mL brom timol çözeltisi, 0,5 mL su, 0,1 mL enzim ve 2,5 mL doymuş CO₂ çözeltisi konuldu. İndikatör olarak kullanılan brom timolün mavi renginin sarımsı yeşile dönmesi için geçen süre ölçüldü (t_c). Aynı işlemler her numunenin çalışılmasından önce, enzim çözeltisi yerine saf su konularak yapıldı (t₀). İnhibitörlü çalışmalarda ise; suyun hacmi, kullanılan inhibitör hacmi kadar azaltılarak yerine inhibitör eklendi. Böylece aktivite ölçüm ortamının hacmi 4,2 mL'de sabit tutulmuş oldu. Bu yöntemle göre CA aktivitesi için bir enzim ünitesi (EU), enzimsiz olarak meydana gelen CO₂ hidratasyon süresini yarıya indiren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır. Yani; $EU = (t_0 - t_c) / t_c$ formülüne göre, kullanılan enzim çözeltisinin hacmi için enzim ünitesi hesaplanmıştır.

5.4.2.2 Esteraz aktivitesi tayini

Bu yöntem, karbonik anhidrazın esteraz aktivitesine sahip olması esasına dayanmaktadır. Prensipte olarak, karbonik anhidraz enzimi substratı olarak kullanılan p-nitrofenil asetatı, 348 nm'de absorbanı veren p-nitrofenol veya p-nitrofenolat'a hidroliz etmektedir.



348 nm'de p-nitrofenol ve p-nitrofenolat'ın her ikisi de aynı absorbanı göstermektedir. Bu nedenle fenol grubundaki H^+ iyonunun ayrışıp ayrışmaması ölçümü etkilememektedir (Armstrong ve ark., 1966; Kandel ve ark., 1970; Landolfi ve ark., 1997). Substrat olarak kullanılan p-nitrofenil asetatın da bu dalga boyunda çok az absorpsiyonu olduğundan kör olarak kullanılmaktadır. Tayin işlemlerinde kuvarz küvetlere 1 mL substrat, 1,3 mL tampon, 0,6 mL su ve 0,1 mL enzim konulup 25 °C'de 348 nm'de 3 dakika süresince absorbandaki değişim kaydedildi. Spektrofotometre, daha önce enzim yerine 0,1 mL tampon konularak, karışımın 3 dakika sonraki absorbanı ile sıfıra ayarlandı. Bu suretle; 3 dakika içerisinde esterın kendi kendine hidrolizlenen kısmı ve p-nitrofenil asetatın absorpsiyonunda düzeltme yapıldı. İnhibitörlü çalışmalarda ise suyun hacmi azaltılarak, yerine azaltılan miktar kadar inhibitör eklenerek aktivite tayinleri yapıldı.

Bu deneyde kullanılan p-nitrofenil asetat yani substrat çözeltisi taze olarak hazırlandı. Bunun için 27,2 mg ester, 1 mL aseton içerisinde çözüldü ve hızlıca karıştırılan 49 mL saf suya yavaş yavaş ilave edildi. Bu çözelti 3 mM'lık olup, daha derişğini hazırlamak esterın sınırlı çözünürlüğü nedeniyle mümkün değildir. Aseton ise diğer organik çözücülere oranla hidroliz reaksiyonunu en az inhibe eden çözücü olması sebebiyle seçildi (Armstrong ve ark., 1966). 0,05 M Tris- SO_4 , pH=7,4 olan tampon çözeltisi ile enzim çözeltisinin tamponlanması sağlandı (Kohn ve Wilchek, 1978).

5.4.3 Afinite jelinin hazırlanması

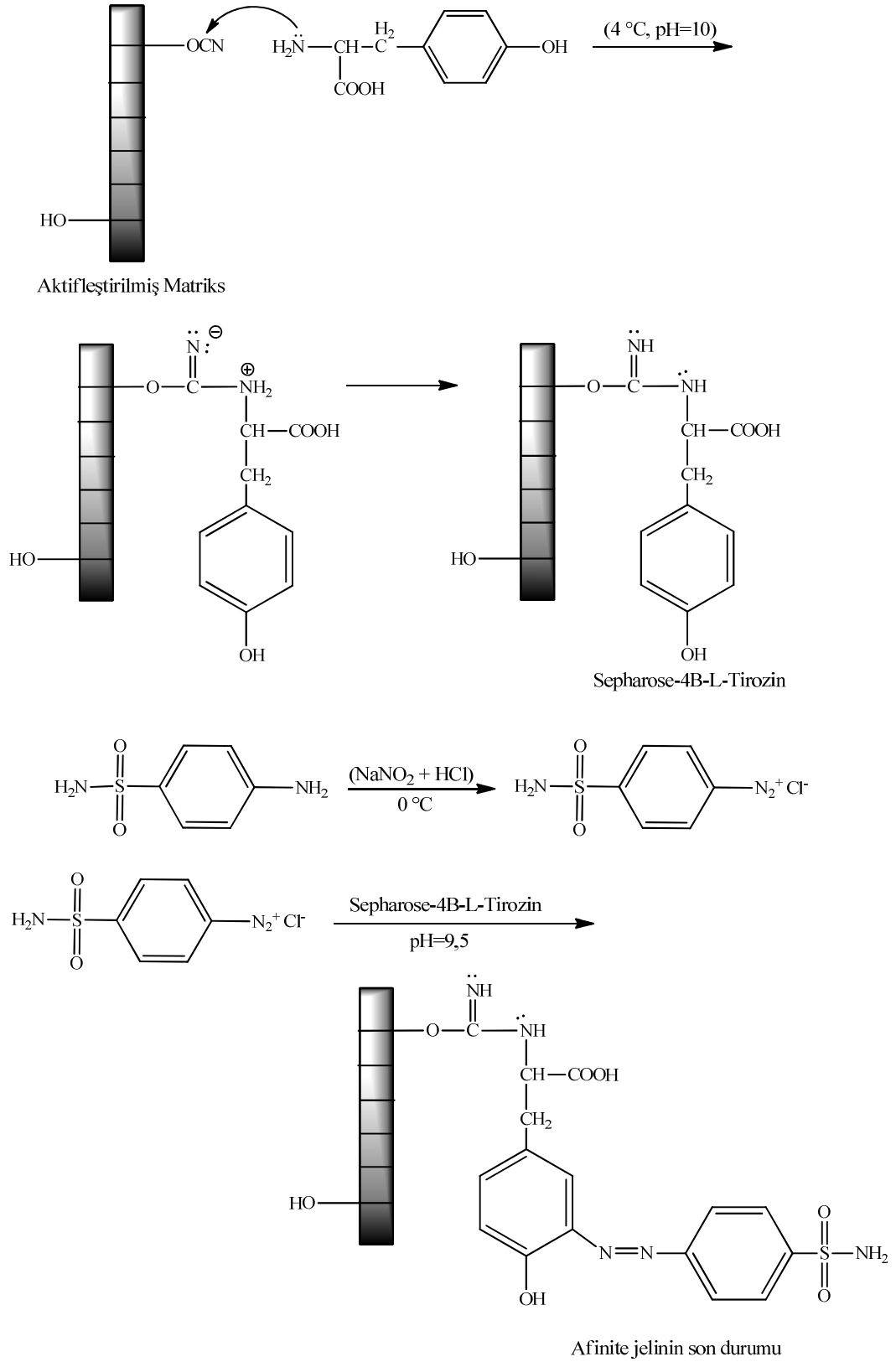
Afinite jeli, Sepharose-4B matriksi üzerinde hazırlandı. CNBr ile aktifleştirilmiş olan Sepharose-4B üzerine tirozin kovalent olarak takıldı. Daha sonra sülfanilamid diazolanarak tirozine kenetlendi. Burada tirozin afinite jelinin uzantı kolunu, sülfanilamid ise enzimi spesifik olarak bağlayan kısmını oluşturmaktadır. Sülfanilamid karbonik anhidrazın spesifik bir inhibitörü olup, afinite jelinin yapısına katılarak söz konusu enzimin yüksek oranda saflaştırılmasında başarıyla kullanılmaktadır (Kohn ve Wilchek, 1978).

5.4.3.1 Siyanojen bromür ile aktifleştirilmiş sepharose-4B üzerine tirozin takılması

7,5 g CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B saf su ile iyice şişirildi ve saf su dekante edildi. Daha sonra pH'ı 10 olan 250 mL NaHCO₃ tamponuna alındı. Aynı tamponun 20 mL'sinde 80 mg tirozin çözüldü ve behere ilave edilerek karıştırıldı. Daha sonra süspansiyon 4 °C'de 2 saat süreyle karıştırıldı ve 16 saat bu sıcaklıkta bekletildi. Bu sürenin sonunda jel, yıkama suyu 280 nm'de absorbanı vermeyinceye kadar bol suyla yıkandı. Bu şekilde reaksiyona girmeyen tirozin tamamen uzaklaştırılmış oldu. Yıkama işlemi 100 mL 0,2 M NaHCO₃ tamponu ile (pH=8,8) tekrarlandı ve tirozin takılı jel aynı tamponun 40 mL'si içerisinde alındı (Arslan ve ark., 1997; Laemmli, 1970).

5.4.3.2 Sülfanilamid kenetlenmesi

25 mg sülfanilamid, yaklaşık 0 °C'de 10 mL 1 M HCl içerisinde çözüldü. 75 mg NaNO₂ ihtiva eden 0 °C'deki 5 mL çözelti, sülfanilamid çözeltisine 10 dakikada damla damla ilave edildi. Daha sonra diazolanmış olan sülfanilamid, 40 mL Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonuna eklendi. 1 M NaOH ile pH=9,5 değerine ayarlanarak sabit tutuldu. Oda sıcaklığında 3 saat süreyle yavaş yavaş karıştırıldı. Daha sonra 1 L saf su ve 200 mL 0,05 M Tris-SO₄ (pH=7,4) tamponuyla yıkandı ve aynı tampon içerisinde muhafaza edildi (Cuatracases, 1970). Afinite jelinin hazırlanması sırasında gerçekleşen reaksiyonlar Şekil 5.1'de gösterilmiştir.



Şekil 5.1 Afinite jelinin hazırlanması sırasında gerçekleşen reaksiyonlar.

5.4.4 İnsan eritrositlerinden karbonik anhidraz izoenzimleri olan hCA I ve hCA II enzimlerinin saflaştırılması

5.4.4.1 Hemolizat eldesi

Kan, antikoagülanlı kan torbasına alındıktan sonra 4 °C’de muhafaza edildi ve en fazla 2 gün içerisinde tüketildi. Eritrositleri ayırmak için kan 10 mL’lik tüplere alınarak, 2500 rpm’de 15 dk santrifüj edildi. Daha sonra tüplerin üst kısmındaki plazma ve lökosit tabakası birbirinden dikkatli bir biçimde ayrıldı. Sonra altta kalan eritrositler % 0,9’luk NaCl çözeltisi ile birkaç defa yıkayıp, 2500 rpm’de 15 dk santrifüjlenerek üstte kalan kısımlar atıldı. Eritrositler hacimlerinin 1,5 katı 0 °C’deki saf su ile hemoliz edildi. Hemoliz edilen eritrositler toplanarak hemolizin tam olarak gerçekleşebilmesi için 30 dk süreyle karıştırıldı. Hücre zarlarının ayrılması için hemolizat 4 °C’de 20.000 rpm’de 30 dk santrifüj edildi. Daha sonra tüplerin dibine çöken hücre zarları atılarak üstteki hemolizat dikkatlice alındı. Hücre zarlarından ayrılan hemolizatın pH’ı katı Tris ile 8,7’ye ayarlandı. Böylece hemolizat kolona tatbik edilecek hale geldi (Rickli ve ark., 1964).

5.4.4.2 Hemolizatın afinite kolonuna tatbiki ve enzimin elüsyonu

Hazırlanan afinite jeli 1,5 cm²x 50 cm ebatlarındaki bir kolona paketlenerek 25 mM Tris-HCl/0,1 M Na₂SO₄ (pH=8,7) çözeltisi ile dengelendi. Daha sonra hazırlanan hemolizat kolona tatbik edildi. Kolondan 25 mM Tris-HCl/25 mM Na₂SO₄ (pH=8,7) yıkama çözeltisi geçirildi. Yıkama işlemine 280 nm’de köre (yıkama tamponu) karşı 0,05 absorbans değerine ulaşıncaya kadar devam edildi. Bu işlem sonucunda kolona tutunmuş olan karbonik anhidraz izoenzimleri dışındaki safsızlıklar giderilmiş oldu. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra hCA I ve hCA II izoenzimlerinin elüsyonu için sırasıyla 25 mM Na₂HPO₄/1 M NaCl (pH=6,3) ve 0,1 M CH₃COONa/0,5 M NaClO₄ (pH=5,6) çözeltileri kolondan geçirildi (Rickli ve ark., 1964). Elüatlar beşer mL’lik fraksiyonlar halinde tüplere alındı (Şekil 6.1). Elüatlarda 280 nm’de protein tayini ve CO₂-hidrataz aktivitesi tayini yapıldı. Aktivite gösteren fraksiyonlara diyaliz işlemi uygulandı.

5.4.4.3 Diyaliz işlemi

Biyolojik moleküllerin ayırımında kullanılan ve seyreltik bir çözeltideki moleküllerin boyutlarına göre ayrılması temeline dayanan bir yöntemdir. Bu teknikte kullanılan diyaliz torbasının porları genellikle 10.000 Da’dan daha fazla olan makro moleküllerin geçişine izin vermeyecek kadar küçüktür. Bu nedenle, diyaliz tüpünün içindeki küçük iyonlar dışarı çıkarken, içeride ayrımı istenen molekülün konsantre bir çözeltisi kalır. Küçük moleküllerin çıkışı tüpün

içi ile dıştaki tamponun konsantrasyonları eşit oluncaya kadar devam eder. Çalışılan hacme bağlı olarak 4-6 saat sürede dengeye ulaşılır. Dengeye ulaştıktan sonra, dışarıdaki çözelti taze tamponla değiştirilir ve diyalize devam edilir. Böylece, ayırım tamamlanıncaya kadar diyaliz işlemi 1-2 gün sürdürülebilir (Temizkan ve Arda, 2004).

Diyaliz işleminde kullanılan yarı geçirgen zarlar (diyaliz tüpleri veya torbaları) çeşitli materyallerden (selofan, selüloz) yapılmış malzemelerdir. Por çapı zardan geçecek moleküllerin büyüklüğüne göre belirlenir. Diyaliz yöntemi, tuzları ve iyonik veya iyonik olmayan tüm küçük molekülleri ortamdan uzaklaştırmak ve konsantre etmek için ucuz ve etkili bir yöntemdir. Ayrıca, biyolojik moleküllere zayıf şekilde bağlı olan küçük iyonlar ve molekülleri de bu yöntemle ortamdan uzaklaştırmak mümkündür (Temizkan ve Arda, 2004).

Çalışmamızda kolondan elüe edilen enzim çözeltileri diyaliz torbalarına doldurulup, 4 °C'de diyaliz tamponu kullanılarak diyaliz işlemi yapılmıştır. 24 saat boyunca işleme devam edilip, her 4 saatte bir diyaliz tamponu değiştirilmiştir. Diyaliz işlemleri sonunda elde edilen enzim çözeltisi artık kısmen saf hale getirilmiştir. Yapılan tüm işlemler sonunda elde edilen enzim çözeltisi, *in vitro* inhibisyon çalışmalarında kullanılmak üzere üçer ml'lik tüplere konularak, -20 °C'de derin dondurucuda depolanmıştır.

5.4.4.4 SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının kontrolü

Enzimlerin saflaştırılmasından sonra %3-10 kesikli, sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) Laemmli tarafından açıklandığı şekilde (Laemmli, 1970) yapılarak saflaştırılan enzimlerin saflık derecesi kontrol edildi.

Bunun için elektroforez plakaları önce su, sonra alkol ile iyice yıkandı. Plakaları birleştiren aralık koyuculara vazelin ince bir tabaka halinde sürüldü. İki cam plaka birbiri üzerine yerleştirildi ve kısıkaçlarla tutturularak jel hazırlama cihazına konuldu. Cam plakaların altı, kaynama sıcaklığına getirilerek çözünmesi sağlandı ve daha sonra 40-50 °C'ye soğutulmuş agar dökülerek kapatıldı. Ayırma jeli hazırlanarak plakalar arasına enjektör vasıtasıyla ilave edildi. Hava almamasına dikkat edildi. Jel yüzeyinin düzgün olması için %1'lik SDS ile ince bir tabaka oluşturuldu. Katılaşıncaya kadar 30 dk bekletildi. Daha sonra yığılma jeli, üst düzeye kadar ilave edildi. Üzerine tarak dikkatlice yerleştirildi. Tarağın üzerine nemli süzgeç kağıdı konularak bir gece bekletildi. Ertesi gün tarak dikkatlice çıkarılarak plakalar elektroforez tankına yerleştirildi. Oluşan kuyular işaretlenerek jelin üstü önce saf su, daha sonra yürütme tamponu ile yıkandı. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konuldu.

Numuneler kuyuların her birinde 20 µg protein olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim 100 µL olacak şekilde 1:1 oranında numune tamponu katıldı. 3 dk kaynar su banyosunda inkübe edildi. Numuneler soğutularak, jeldeki kuyulara bir enjektör vasıtasıyla tatbik edildi. Tank kapağı kapatılarak alt taraftan (+)-kablo (anot), üstten (-)-kablo (katot) yerleştirildi. Önce 80 voltta 30 dk bekletildi. Daha sonra 150 volta ayarlanarak 4-5 saat oda sıcaklığında tatbik edildi. Akım kesilerek, cam plakalar arasındaki jel sabitleştirme çözeltisinde (%50 izopropanol + %10 TCA + %40 saf su) 30-40 dk bekletildi. Daha sonra fikse çözeltisinden çıkartılan jel, özel kabına konularak boyama çözeltisi üstünü tamamen örtene kadar ilave edildi. 1,5-2 saat kadar çalkalayıcı üzerinde bırakıldı. Daha sonra boyama çözeltisinden çıkarılarak, yıkama çözeltisine alındı. Belirli zaman periyotlarında değiştirilme suretiyle jelin zemin rengi açıldı ve protein bantları belirginleşinceye kadar 1-2 gün bu çözelti içerisinde çalkalandı. Mavi renge boyanan renksizleştirme çözeltisi, aktif karbon üzerinden geçirilerek tekrar kullanıldı. Jel renksizleştirme çözeltisinden çıkarıldıktan sonra fotoğrafı çekildi (Şekil 6.3).

Ayırma jeli hazırlanması için; 15 mL 1 M. Tris-HCl (pH=8,8), 10,66 mL %30'luk akrilamid-%0,8'lik bisakrilamid, 0,61 mL %1'lik SDS, 0,4 mL %5'lik TEMED (N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin) ve 11,94 mL su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine en son olarak 0,8 mL %1,5'lik amonyum persülfat ((NH₄)₂S₂O₈) ilave edildi. Amonyum persülfat kullanılmadan hemen önce taze olarak hazırlandı.

Yığıma jeli hazırlanması sırasında; 1,24 mL 1 M'lık Tris-HCl (pH=6,8), 1mL %30'luk akrilamid-%0,8'lik bisakrilamid, 0,1 mL %1'lik SDS, 0,1 mL %5'lik TEMED ve 7,36 mL saf su alınarak karıştırıldı. Son olarak yine taze hazırlanmış, 0,2 mL %1,5'lik (NH₄)₂S₂O₈ eklendi.

5.4.5 C vitamininin insan eritrosit karbonik anhidraz izoenzimleri üzerindeki inhibisyon etkilerinin incelenmesi

5.4.5.1 C vitamininin eritrosit hCA I ve hCA II izoenzimlerinin hidrataz aktiviteleri üzerindeki inhibisyon etkilerinin *in vitro* olarak incelenmesi

İnsan eritrosit CA enzimlerinin hidrataz aktiviteleri üzerinde C vitamininin inhibisyon etkisi glokom hastalığı tedavisi için klinikte lokal olarak kullanılan miktar olan %1'lik çözeltisi ve buna ilaveten %0,25, %0,5, %2 ve %3'lük çözeltileri hazırlanarak enzim üzerine tatbik edilmek suretiyle araştırıldı. Bunun için insan kanından elde edilen hCA I ve hCA II izoenzimleri için beş farklı uygun inhibitör konsantrasyonu için hidrataz aktivite ölçümleri yapıldı ve %Aktivite-[I] grafikleri çizildi. [I] değerleri aktivite ölçüm ortamı için hesaplanan değerlerdir (toplam hacim 4,2 mL).

5.4.5.2 C vitamininin eritrosit hCA I ve hCA II izoenzimlerinin esteraz aktiviteleri üzerindeki inhibisyon etkilerinin *in vitro* olarak incelenmesi

İnsan eritrosit CA enzimlerinin esteraz aktiviteleri üzerinde C vitamininin inhibisyon etkisi glokom hastalığı tedavisi için klinikte lokal olarak kullanılan miktar olan %1'lik çözeltisi ve buna ilaveten %0,25, %0,5, %2 ve %3'lük çözeltileri hazırlanarak, enzim üzerine tatbik edilmek suretiyle araştırıldı. Bunun için insan kanından elde edilen hCA I ve hCA II izoenzimleri için beş farklı uygun inhibitör konsantrasyonu için esteraz aktivite ölçümleri yapıldı ve %Aktivite-[I] grafikleri çizilerek IC_{50} değerleri hesaplandı. Tablo ve grafiklerdeki [I] değerleri aktivite ölçüm ortamı için hesaplanan değerlerdir (toplam hacim 3 mL).

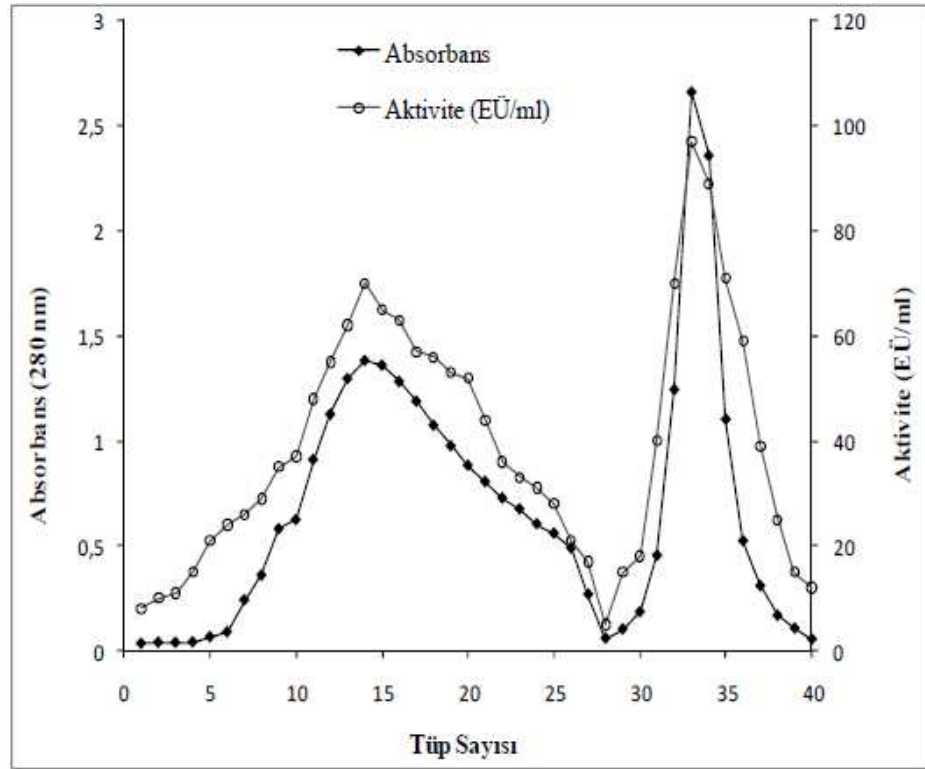
5.4.5.3 C vitamininin eritrosit hCA I ve hCA II izoenzimlerinin esteraz aktiviteleri üzerindeki inhibisyon etkilerinden K_i sabitlerinin bulunması

K_i değerlerini bulmak için eritrosit hCA I ve hCA II izoenzimlerinin esteraz aktiviteleri üzerinde C vitamininin inhibisyon etkileri; enzim üzerine tatbik edilmek suretiyle araştırıldı. İnhibitörlü ve inhibitörsüz olarak beş farklı substrat konsantrasyonu için esteraz aktivite ölçümü yapıldı. %0,25, %0,5, %1, %2 ve %3'lük C vitamini çözeltilerinin her birinin, hCA I ve hCA II izoenzimleri üzerindeki inhibisyon etkilerini gösteren Lineweaver-Burk grafikleri ayrı ayrı çizildi. Bu grafiklerden elde edilen denklemlerden K_M ve V_{max} değerleri belirlendi. Bu değerlerden faydalanılarak K_i değerleri hesaplandı.

6. ARAŞTIRMA BULGULARI

6.1 hCA I ve hCA II İzoenzimlerinin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması Sonuçları

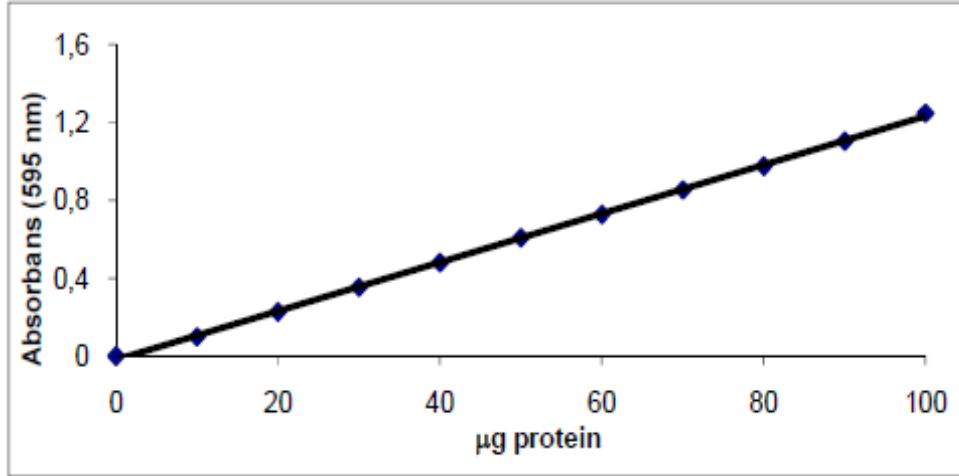
Afinite kolonuna jelin yerleştirilmesi, tamponla dengelenmesi, insan kanından elde edilen hemolizatin kolona tatbik edilmesi ve yıkama işlemlerinden sonra hCA I izoenzimi 0,025 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/1$ M NaCl (pH=6,3) tamponu ile, hCA II izoenzimi 0,1 M $\text{CH}_3\text{COONa}/0,5$ M NaClO_4 (pH=5,6) tamponu ile kolondan elüe edildi. Elüatlar beşer mL'lik fraksiyonlar halinde toplanarak her tüpteki numune için 280 nm'de kalitatif protein tayini yapıldı (Şekil 6.1).



Şekil 6.1 Afinite kromatografisi ile eritrosit hCA I ve hCA II izoenzimlerinin saflaştırılmasına ilişkin elüsyon grafiği.

Elüe edilen hCA I ve hCA II enzimlerinden aktivite gösteren tüplerde CO_2 -hidrataz ve esteraz aktivitesi tayinleri yapıldı. Buna ek olarak; Bradford metoduyla protein tayini yapıldı. Protein tayini ise; 100 μL enzim çözeltisi için ölçülmüştür. Hemolizatta aktivite tayini ve protein miktar tayini ise; her bir hemolizattan 1 mL alınıp 10 mL'ye seyreltilmiş ve bundan 100 μL alınarak ölçümler yapılmıştır.

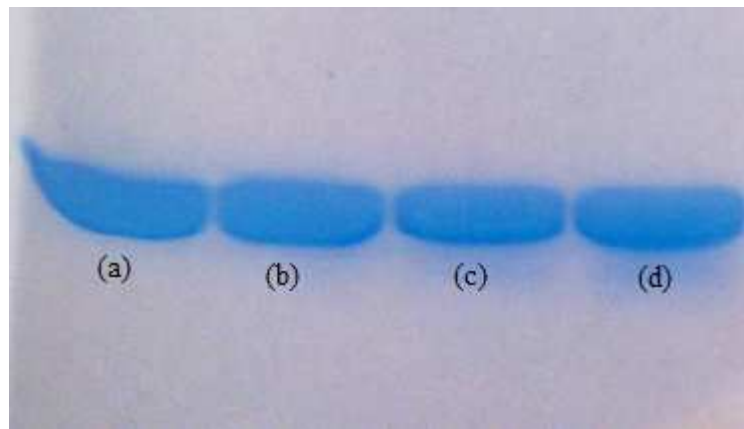
Bradford metoduyla yapılan kantitatif protein tayininde standart eğri referans alınarak, hemolizatta ve saflaştırılan enzim çözeltilerindeki protein miktarları bu eğriye göre belirlendi. Standart grafikten yararlanarak, ölçülen absorbans değerlerine karşılık gelen μg protein miktarları belirlendi (Şekil 6.2).



Şekil 6.2 Bradford metoduyla protein tayini için kullanılan standart grafik.

6.2 İnsan Eritrositlerinden Elde Edilen hCA I ve hCA II İzoenzimlerinin SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi Sonuçları

Afinite kolonundan elüe edilen hCA I ve hCA II izoenzimlerinin saflığını kontrol etmek amacıyla SDS-poliakrilamid jel elektrofrezisi yapıldı. Elektrofrezis işlemi 5.4.4.4'de anlatıldığı şekilde uygulandı. Belirginleşen protein bantlarının fotoğrafı çekildi (Şekil 6.3).



Şekil 6.3 Afinite kromatografisi ile saflaştırılan karbonik anhidraz izoenzimlerinin SDS-PAGE analiz fotoğrafı. (hCA I (a) ve (b) kanalı, hCA II (c) ve (d) kanalı).

6.3 C vitamininin İnsan Eritrosit Karbonik Anhidraz Enzimleri (hCA I ve hCA II) Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin *In Vitro* Olarak İncelenmesi

6.3.1 C vitamininin insan eritrosit karbonik anhidraz enzimlerinin hidrataz aktiviteleri üzerindeki inhibisyon etkilerinin *in vitro* olarak incelenmesi

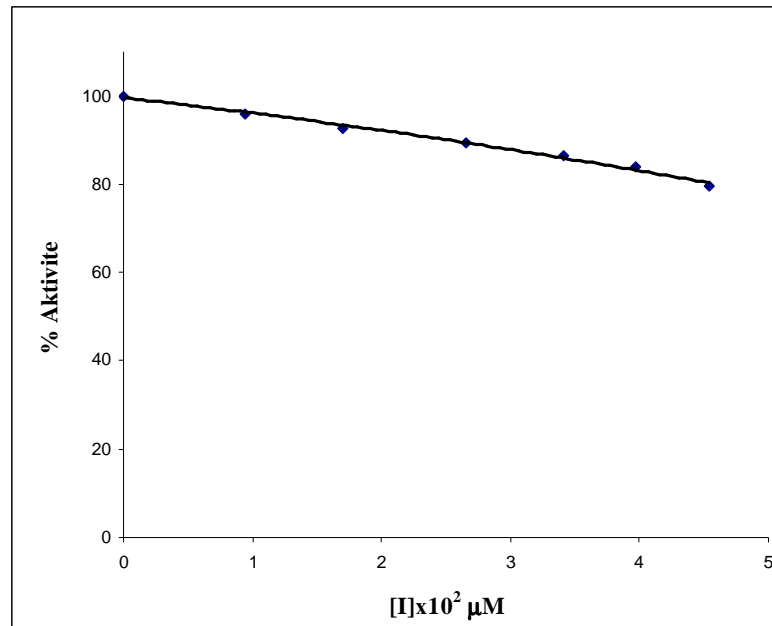
İnsan eritrosit CA enzimlerinin hidrataz aktiviteleri üzerinde C vitamininin inhibisyon etkisi glokom hastalığı tedavisi için klinikte lokal olarak kullanılan miktar olan %1'lik çözeltisi ve buna ilaveten %0,25, %0,5, %2 ve %3'lük çözeltileri hazırlanarak enzim üzerine tatbik edilmek suretiyle araştırıldı. Bunun için insan kanından elde edilen hCA I ve hCA II izoenzimleri için beş farklı uygun inhibitör konsantrasyonu için hidrataz aktivite ölçümleri yapıldı. Yapılan deneylerde, hazırlanan C vitamini çözeltilerinin tamamının hCA I ve hCA II izoenzimlerinin hidrataz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkisi göstermedikleri sonucuna varılmıştır.

6.3.2 C vitamininin insan eritrosit karbonik anhidraz enzimlerinin esteraz aktiviteleri üzerindeki inhibisyon etkilerinin *in vitro* olarak incelenmesi

İnsan eritrosit CA enzimlerinin esteraz aktiviteleri üzerinde C vitamininin inhibisyon etkisi glokom hastalığı tedavisi için klinikte lokal olarak kullanılan miktar olan %1'lik çözeltisi ve buna ilaveten %0,25, %0,5, %2 ve %3'lük çözeltileri hazırlanarak enzim üzerine tatbik edilmek suretiyle araştırıldı. Bunun için insan kanından elde edilen hCA I ve hCA II izoenzimleri için beş farklı uygun inhibitör konsantrasyonu için esteraz aktivite ölçümleri yapıldı ve %Aktivite-[I] grafikleri çizilerek IC₅₀ değerleri hesaplandı. Tablo ve grafiklerdeki [I] değerleri aktivite ölçüm ortamı için hesaplanan değerlerdir (toplam hacim 3 mL).

Çizelge 6.1 hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine %0,25'lik C vitamini çözeltisinin inhibisyon etkisinin incelenmesi amacıyla yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

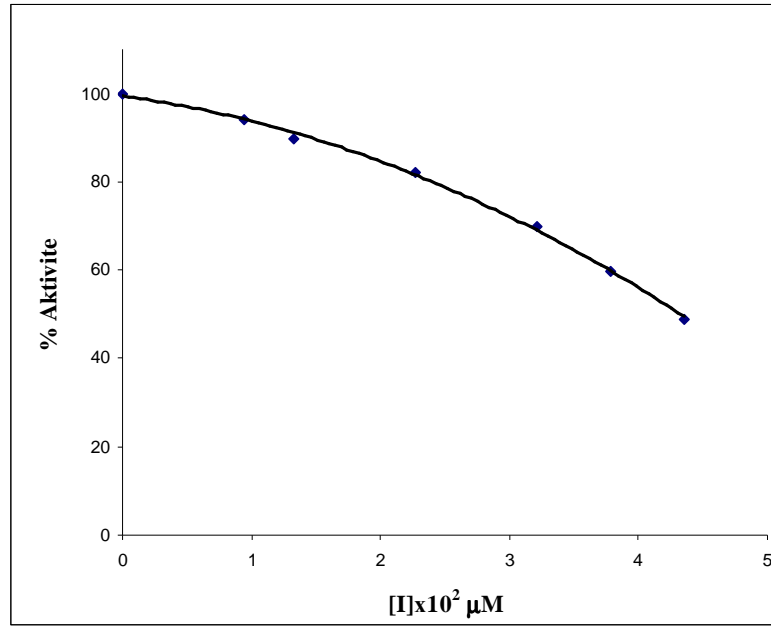
İnhibitör stok çözeltisi (%)	Substrat (µL)	Tris-SO ₄ Tamponu (µL)	Enzim (µL)	İnhibitör (µL)	Saf Su (µL)	%Aktivite	[I]x10 ² (µM)
%0,25	1000	1300	100	-	600	100	0
	1000	1300	100	50	550	95,9	0,94
	1000	1300	100	90	510	92,8	1,7
	1000	1300	100	140	460	89,5	2,65
	1000	1300	100	180	420	86,6	3,4
	1000	1300	100	210	390	83,9	3,98
	1000	1300	100	240	360	79,5	4,54



Şekil 6.4 hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine %0,25'lik C vitamini çözeltisinin etkisi.

Çizelge 6.2 hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine %0,5'lik C vitamini çözeltisinin inhibisyon etkisinin incelenmesi amacıyla yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

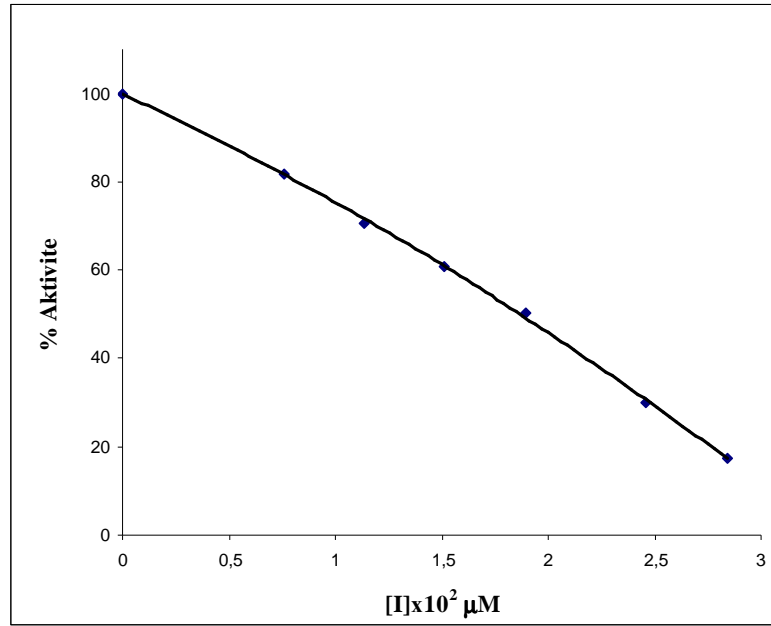
İnhibitör stok çözeltisi (%)	Substrat (µL)	Tris-SO ₄ Tamponu (µL)	Enzim (µL)	İnhibitör (µL)	Saf Su (µL)	%Aktivite	[I]x10 ² (µM)
%0,5	1000	1300	100	-	600	100	0
	1000	1300	100	50	550	94	0,94
	1000	1300	100	70	530	89,8	1,3
	1000	1300	100	120	480	82	2,27
	1000	1300	100	170	430	70	3,2
	1000	1300	100	200	400	59,8	3,79
	1000	1300	100	230	370	49	4,35



Şekil 6.5 hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine %0,5'lik C vitamini çözeltisinin etkisi.

Çizelge 6.3 hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine %1'lik C vitamini çözeltisinin inhibisyon etkisinin incelenmesi amacıyla yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

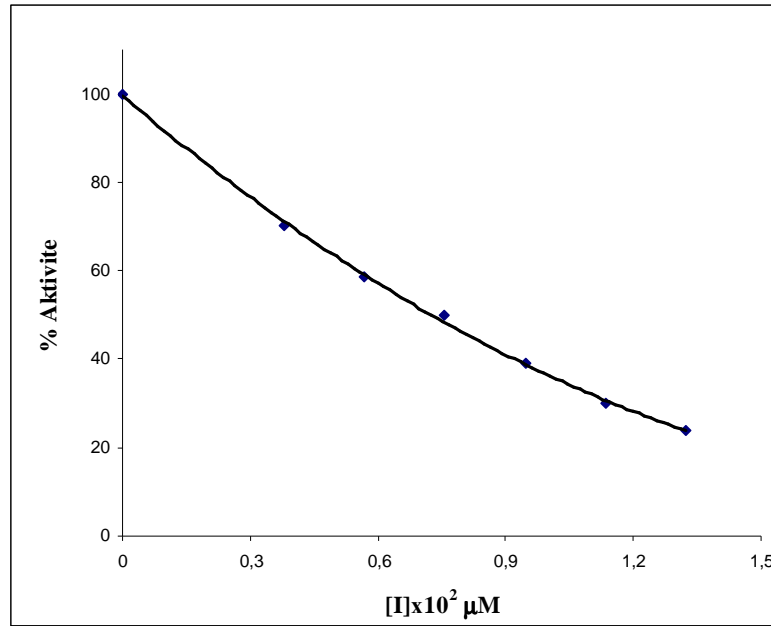
İnhibitör stok çözeltisi (%)	Substrat (µL)	Tris-SO ₄ Tamponu (µL)	Enzim (µL)	İnhibitör (µL)	Saf Su (µL)	%Aktivite	[I]x10 ² (µM)
%1	1000	1300	100	-	600	100	0
	1000	1300	100	40	560	82	0,76
	1000	1300	100	60	540	70,7	1,14
	1000	1300	100	80	520	60,9	1,51
	1000	1300	100	100	500	50,4	1,9
	1000	1300	100	130	470	30	2,46
	1000	1300	100	150	450	17,3	2,84



Şekil 6.6 hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine %1'lik C vitamini çözeltisinin etkisi.

Çizelge 6.4 hCA I izoenziminin aktivitesi üzerine %2'lik C vitamini çözeltisinin inhibisyon etkisinin incelenmesi amacıyla yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

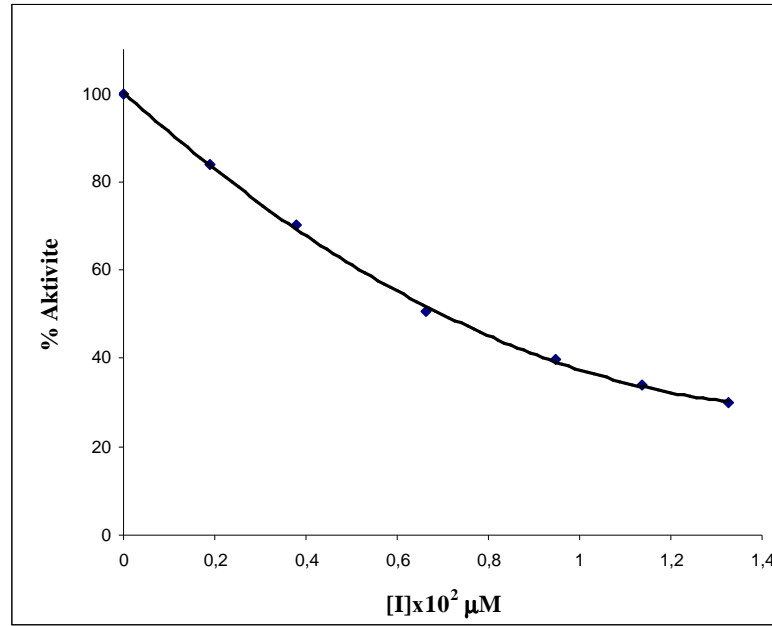
İnhibitör stok çözeltisi (%)	Substrat (µL)	Tris-SO ₄ Tamponu (µL)	Enzim (µL)	İnhibitör (µL)	Saf Su (µL)	%Aktivite	[I]x10 ² (µM)
%2	1000	1300	100	-	600	100	0
	1000	1300	100	20	580	70	0,38
	1000	1300	100	30	570	58,5	0,57
	1000	1300	100	40	560	49,9	0,76
	1000	1300	100	50	550	39,1	0,95
	1000	1300	100	60	540	30,2	1,14
	1000	1300	100	70	530	23,8	1,32



Şekil 6.7 hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine %2'lik C vitamini çözeltisinin etkisi.

Çizelge 6.5 hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine %3'lük C vitamini çözeltisinin inhibisyon etkisinin incelenmesi amacıyla yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

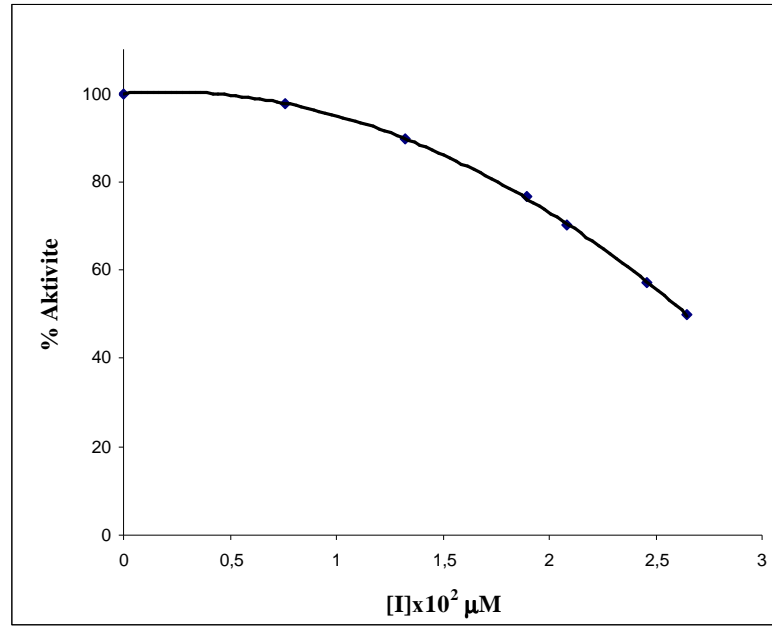
İnhibitör stok çözeltisi (%)	Substrat (µL)	Tris-SO ₄ Tamponu (µL)	Enzim (µL)	İnhibitör (µL)	Saf Su (µL)	%Aktivite	[I]x10 ² (µM)
%3	1000	1300	100	-	600	100	0
	1000	1300	100	10	590	83,8	0,19
	1000	1300	100	20	580	70,2	0,38
	1000	1300	100	35	565	50,6	0,66
	1000	1300	100	50	550	39,7	0,95
	1000	1300	100	60	540	34	1,14
	1000	1300	100	70	530	30	1,32



Şekil 6.8 hCA I izoenziminin aktivitesi üzerine %3'lük C vitamini çözeltisinin etkisi.

Çizelge 6.6 hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine %0,25'lik C vitamini çözeltisinin inhibisyon etkisinin incelenmesi amacıyla yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

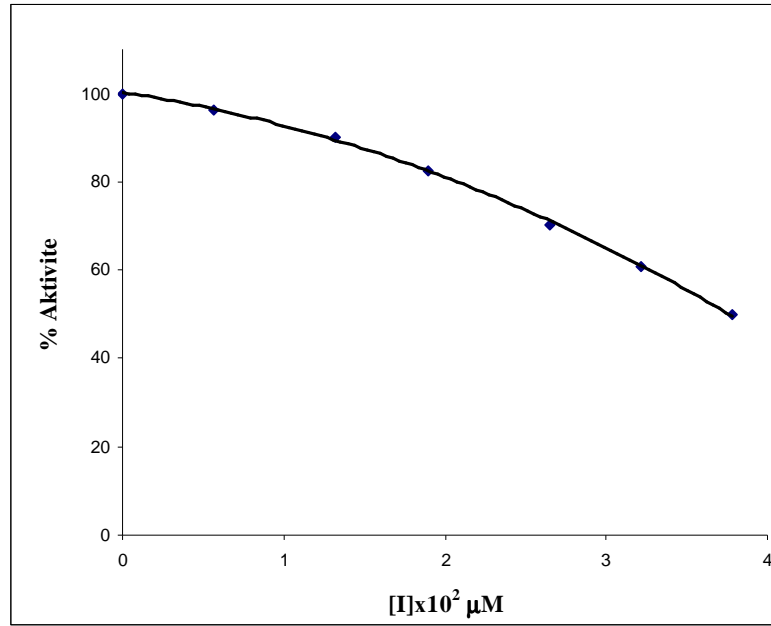
İnhibitör stok çözeltisi (%)	Substrat (µL)	Tris-SO ₄ Tamponu (µL)	Enzim (µL)	İnhibitör (µL)	Saf Su (µL)	%Aktivite	[I]x10 ² (µM)
%0,25	1000	1300	100	-	600	100	0
	1000	1300	100	40	560	97,9	0,76
	1000	1300	100	70	530	89,6	1,32
	1000	1300	100	100	500	76,8	1,89
	1000	1300	100	110	490	70	2,08
	1000	1300	100	130	470	57,2	2,46
	1000	1300	100	140	460	49,9	2,65



Şekil 6.9 hCA II izoenziminin aktivitesi üzerine %0,25'lik C vitamini çözeltisinin etkisi.

Çizelge 6.7 hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine %0,5'lik C vitamini çözeltisinin inhibisyon etkisinin incelenmesi amacıyla yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

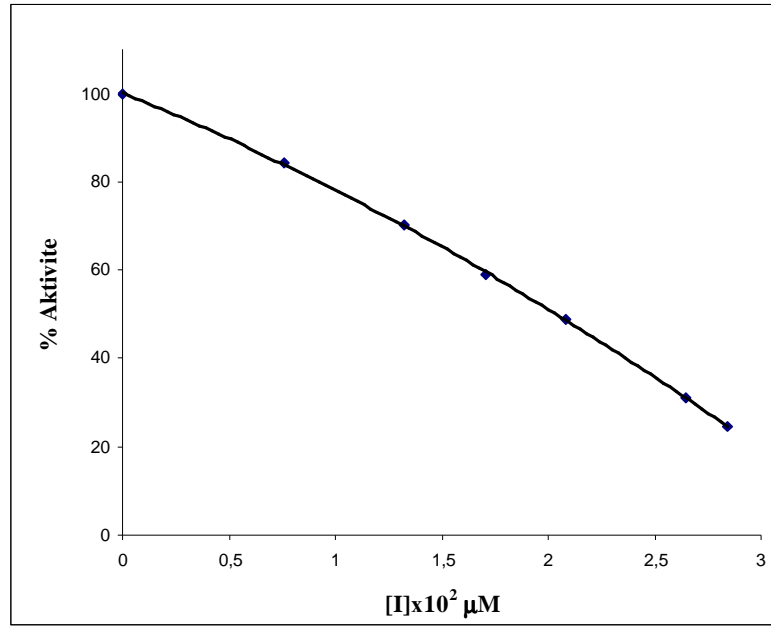
İnhibitör stok çözeltisi (%)	Substrat (µL)	Tris-SO ₄ Tamponu (µL)	Enzim (µL)	İnhibitör (µL)	Saf Su (µL)	%Aktivite	[I]x10 ² (µM)
%0,5	1000	1300	100	-	600	100	0
	1000	1300	100	30	570	96,4	0,57
	1000	1300	100	70	530	90,2	1,32
	1000	1300	100	100	500	82,6	1,89
	1000	1300	100	140	460	70,2	2,65
	1000	1300	100	170	430	61	3,21
	1000	1300	100	200	400	50	3,79



Şekil 6.10 hCA II izoenziminin aktivitesi üzerine %0,5'lik C vitamini çözeltisinin etkisi.

Çizelge 6.8 hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine %1'lik C vitamini çözeltisinin inhibisyon etkisinin incelenmesi amacıyla yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

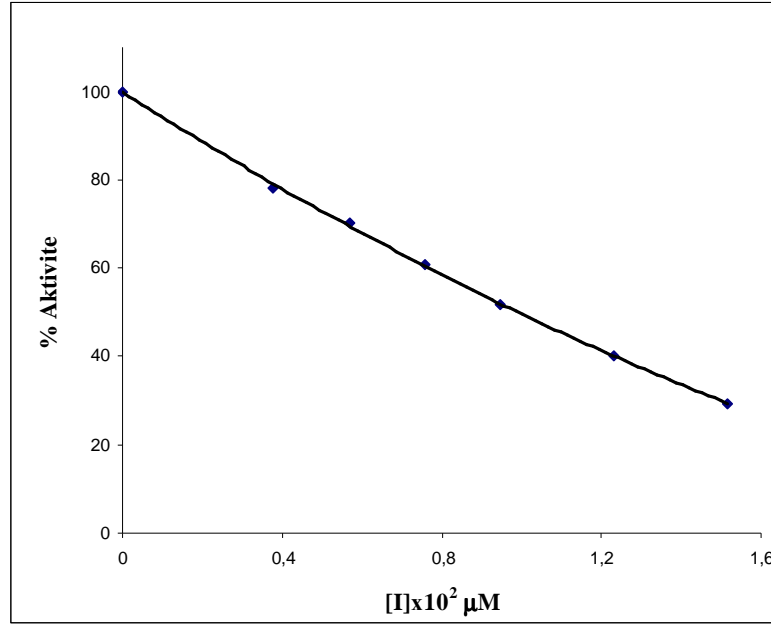
İnhibitör stok çözeltisi (%)	Substrat (µL)	Tris-SO ₄ Tamponu (µL)	Enzim (µL)	İnhibitör (µL)	Saf Su (µL)	%Aktivite	[I]x10 ² (µM)
%1	1000	1300	100	-	600	100	0
	1000	1300	100	40	560	84	0,76
	1000	1300	100	70	530	70,3	1,32
	1000	1300	100	90	510	58,9	1,7
	1000	1300	100	110	490	48,9	2,08
	1000	1300	100	140	460	31,2	2,65
	1000	1300	100	150	450	24,6	2,84



Şekil 6.11 hCA II izoenziminin aktivitesi üzerine %1'lik C vitamini çözeltisinin etkisi.

Çizelge 6.9 hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine %2'lik C vitamini çözeltisinin inhibisyon etkisinin incelenmesi amacıyla yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

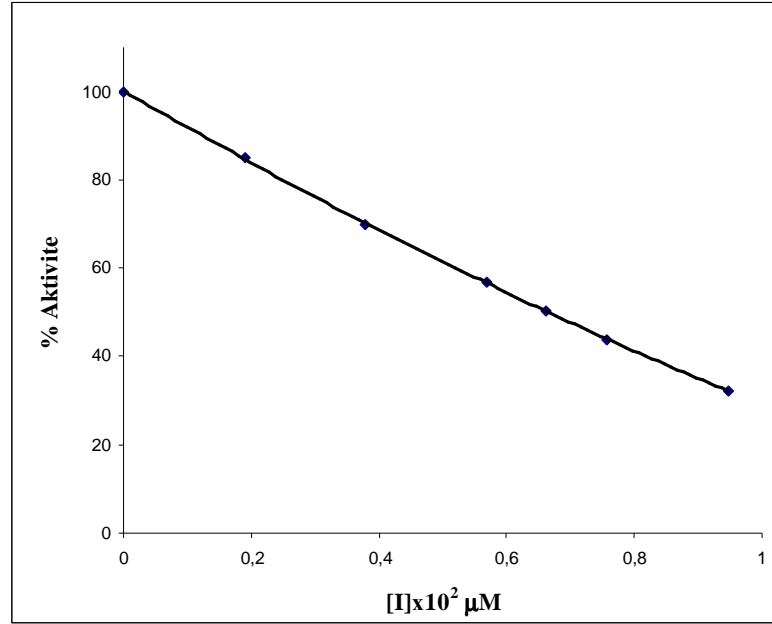
İnhibitör stok çözeltisi (%)	Substrat (µL)	Tris-SO ₄ Tamponu (µL)	Enzim (µL)	İnhibitör (µL)	Saf Su (µL)	%Aktivite	[I]x10 ² (µM)
%2	1000	1300	100	-	600	100	0
	1000	1300	100	20	580	78,2	0,38
	1000	1300	100	30	570	70	0,57
	1000	1300	100	40	560	60,9	0,76
	1000	1300	100	50	550	51,8	0,95
	1000	1300	100	65	535	40,1	1,23
	1000	1300	100	80	520	29,4	1,51



Şekil 6.12 hCA II izoenziminin aktivitesi üzerine %2'lik C vitamini çözeltisinin etkisi.

Çizelge 6.10 hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine %3'lük C vitamini çözeltisinin inhibisyon etkisinin incelenmesi amacıyla yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

İnhibitör stok çözeltisi (%)	Substrat (µL)	Tris-SO ₄ Tamponu (µL)	Enzim (µL)	İnhibitör (µL)	Saf Su (µL)	%Aktivite	[I]x10 ² (µM)
%3	1000	1300	100	-	600	100	0
	1000	1300	100	10	590	85	0,19
	1000	1300	100	20	580	70	0,38
	1000	1300	100	30	570	56,8	0,57
	1000	1300	100	35	565	50,5	0,66
	1000	1300	100	40	560	43,6	0,76
	1000	1300	100	50	550	32,3	0,95



Şekil 6.13 hCA II izoenziminin aktivitesi üzerine %3'lük C vitamini çözeltisinin etkisi.

Hazırlanan C vitamini çözeltilerinin hCA I ve hCA II izoenzimlerinin esteraz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisinin incelenmesine dair yapılan çalışmalardan elde edilen grafiklerden (Şekil 6.4 – Şekil 6.13) hesaplanan IC₅₀ değerleri Çizelge 6.11’de verilmiştir.

Çizelge 6.11. Farklı derişimlerde hazırlanan C vitamini çözeltilerinin esteraz IC₅₀ değerleri

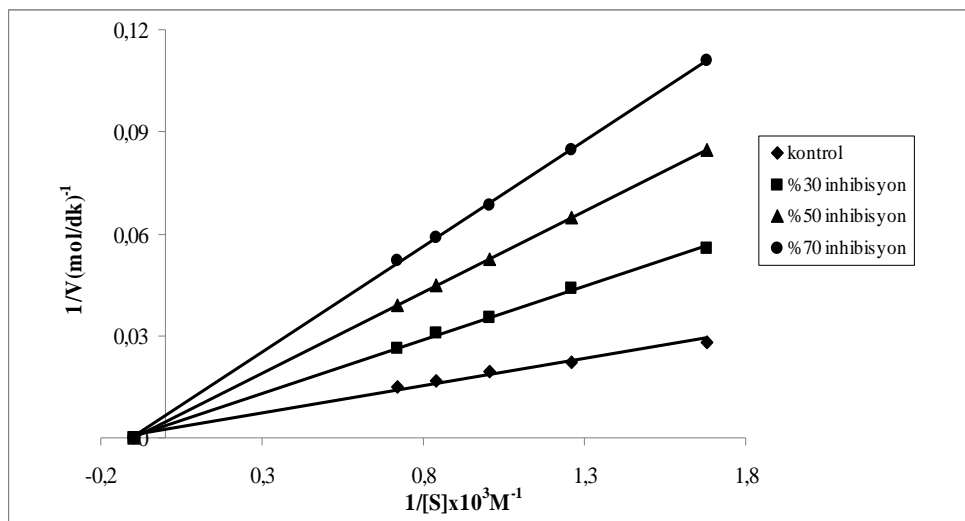
İnhibitör	Esteraz IC ₅₀ (µM)				
	%0,25	%0,5	%1	%2	%3
hCA I	0,96x10 ³	0,41x10 ³	0,18x10 ³	0,073x10 ³	0,07x10 ³
hCA II	0,23x10 ³	0,38x10 ³	0,21x10 ³	0,099x10 ³	0,066x10 ³

6.3.3 C vitamininin insan eritrosit karbonik anhidraz enzimlerinin esteraz aktiviteleri üzerindeki inhibisyon etkilerinden K_i sabitlerinin bulunması

Ki değerlerini belirlemek amacıyla eritrosit hCA I ve hCA II izoenzimlerinin esteraz aktiviteleri üzerine farklı derişimlerde hazırlanan C vitamini çözeltilerinin inhibisyon etkileri; enzim üzerine tatbik edildiği deneylerde, inhibitörlü ve inhibitörsüz olarak beş farklı substrat konsantrasyonu için esteraz aktivite ölçümleri yapılarak bulundu. Bu amaçla bölüm 5.4.2.2'de anlatıldığı şekilde hazırlanan p-nitrofenil asetat çözeltilerinden istenilen konsantrasyonu sağlayacak biçimde kuvars küvetlere beş farklı miktarda eklendi. Daha sonra Tris-SO₄ tamponundan 1,3 mL ve enzim çözeltilerinden 0,1 mL eklendi. Toplam hacim 3 mL olacak şekilde saf su ilave edildi, inhibitörlü çalışmalarda ise saf suyun hacmi eklenen inhibitör miktarı kadar azaltılarak hacim 3 mL'de sabit tutuldu. Bu işlemler bittikten sonra 348 nm'de 3 dk boyunca absorbans değişimi kaydedildi. Kullanılan çözeltiler miktarları ve buna karşılık gelen substrat konsantrasyonları ile eklenen inhibitör miktarları aşağıdaki çizelgelerde verilmektedir. Ölçülen absorbans değerlerinden faydalanarak aktivite birimleri (reaksiyon hızları) µmol/dakika cinsinden hesaplandı. Bütün inhibitörler için üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonu ve beş farklı substrat konsantrasyonunda elde edilen aktivite değerlerinden yararlanılarak 1/V ve 1/[S] değerleri hesaplandı. Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek K_i değerleri hesaplandı.

Çizelge 6.12 %1'lik C vitamini çözeltisinin hCA I izoenzimi üzerindeki K_i sabitinin belirlenmesi amacıyla yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

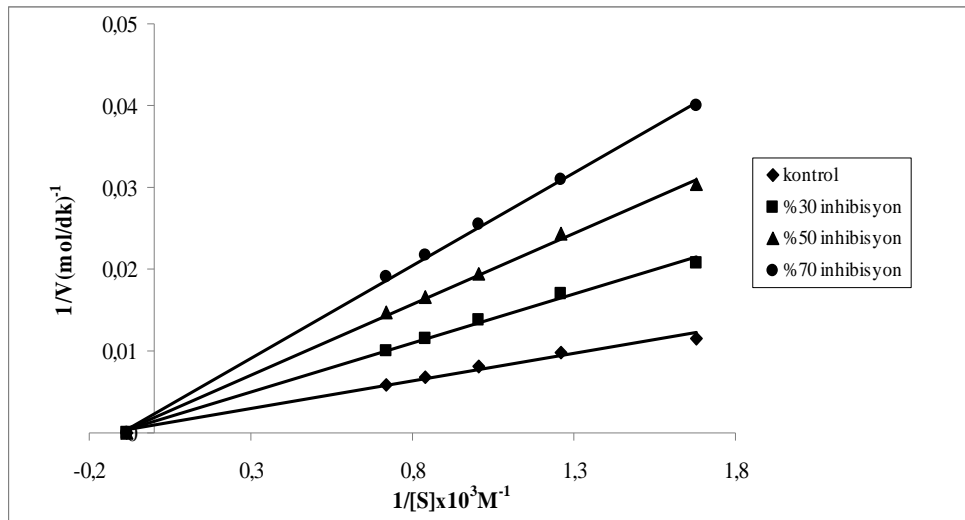
İnhibitör stok çözeltisi (%)	Substrat (μL)	Tris- SO_4 Tamponu (μL)	Enzim (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	$1/[\text{S}]$ (M^{-1})	$1/V$ ($\mu\text{mol/dk}$) $^{-1}$
%1	600	1300	100	-	1000	$1,68 \times 10^3$	0,028
	600	1300	100	60	940	$1,68 \times 10^3$	0,056
	600	1300	100	100	900	$1,68 \times 10^3$	0,085
	600	1300	100	130	870	$1,68 \times 10^3$	0,111
	800	1300	100	-	800	$1,26 \times 10^3$	0,022
	800	1300	100	60	740	$1,26 \times 10^3$	0,044
	800	1300	100	100	700	$1,26 \times 10^3$	0,065
	800	1300	100	130	670	$1,26 \times 10^3$	0,085
	1000	1300	100	-	600	$1,00 \times 10^3$	0,019
	1000	1300	100	60	540	$1,00 \times 10^3$	0,035
	1000	1300	100	100	500	$1,00 \times 10^3$	0,053
	1000	1300	100	130	470	$1,00 \times 10^3$	0,068
	1200	1300	100	-	400	$0,84 \times 10^3$	0,017
	1200	1300	100	60	340	$0,84 \times 10^3$	0,031
	1200	1300	100	100	300	$0,84 \times 10^3$	0,045
	1200	1300	100	130	270	$0,84 \times 10^3$	0,059
	1400	1300	100	-	200	$0,72 \times 10^3$	0,015
	1400	1300	100	60	140	$0,72 \times 10^3$	0,026
	1400	1300	100	100	100	$0,72 \times 10^3$	0,038
	1400	1300	100	130	70	$0,72 \times 10^3$	0,052



Şekil 6.14 hCA I izoenzimi üzerinde %1'lik C vitamini çözeltisinin inhibisyon etkisine ilişkin Lineweaver-Burk grafiği.

Çizelge 6.13. %2'lik C vitamini çözeltisinin hCA I izoenzimi üzerindeki K_i sabitinin belirlenmesi amacıyla yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

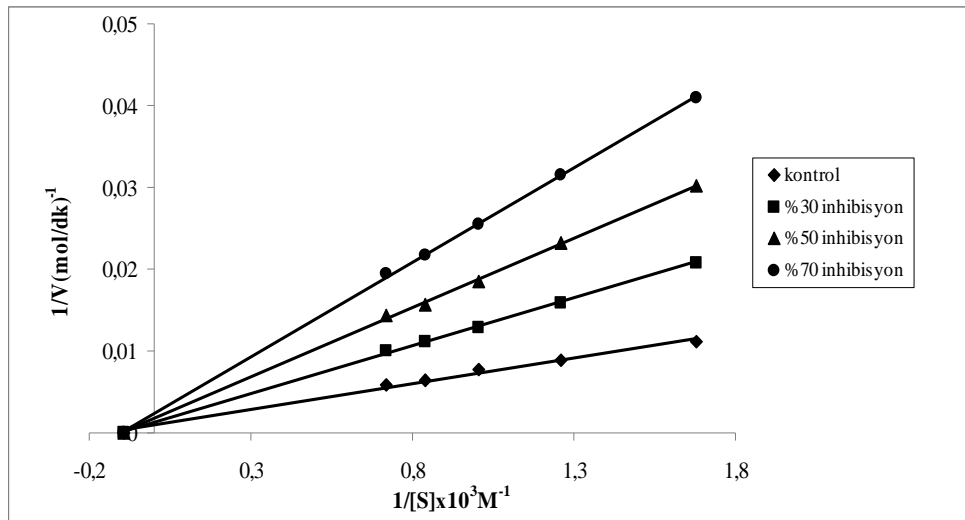
İnhibitör stok çözeltisi (%)	Substrat (μL)	Tris- SO_4 Tamponu (μL)	Enzim (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	$1/[\text{S}]$ (M^{-1})	$1/V$ ($\mu\text{mol/dk}$) ⁻¹
%2	600	1300	100	-	1000	$1,68 \times 10^3$	0,012
	600	1300	100	20	980	$1,68 \times 10^3$	0,021
	600	1300	100	40	960	$1,68 \times 10^3$	0,030
	600	1300	100	60	940	$1,68 \times 10^3$	0,040
	800	1300	100	-	800	$1,26 \times 10^3$	0,009
	800	1300	100	20	780	$1,26 \times 10^3$	0,017
	800	1300	100	40	760	$1,26 \times 10^3$	0,024
	800	1300	100	60	740	$1,26 \times 10^3$	0,031
	1000	1300	100	-	600	$1,00 \times 10^3$	0,008
	1000	1300	100	20	580	$1,00 \times 10^3$	0,014
	1000	1300	100	40	560	$1,00 \times 10^3$	0,019
	1000	1300	100	60	540	$1,00 \times 10^3$	0,026
	1200	1300	100	-	400	$0,84 \times 10^3$	0,007
	1200	1300	100	20	380	$0,84 \times 10^3$	0,011
	1200	1300	100	40	360	$0,84 \times 10^3$	0,017
	1200	1300	100	60	340	$0,84 \times 10^3$	0,022
	1400	1300	100	-	200	$0,72 \times 10^3$	0,006
	1400	1300	100	20	180	$0,72 \times 10^3$	0,010
	1400	1300	100	40	160	$0,72 \times 10^3$	0,015
	1400	1300	100	60	140	$0,72 \times 10^3$	0,019



Şekil 6.15 hCA I izoenzimi üzerinde %2'lik C vitamini çözeltisinin inhibisyon etkisine ilişkin Lineweaver-Burk grafiği.

Çizelge 6.14 %3'lük C vitamini çözeltisinin hCA I izoenzimi üzerindeki K_i sabitinin belirlenmesi amacıyla yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

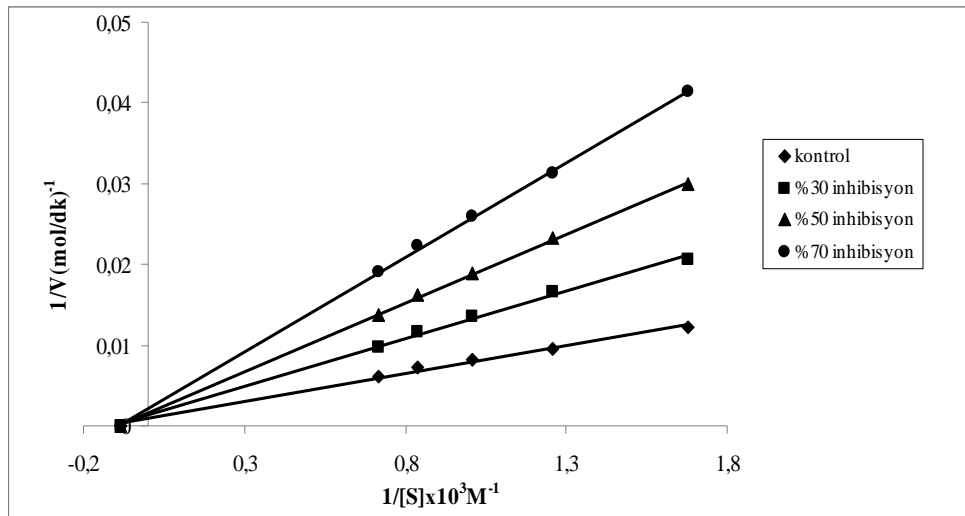
İnhibitör stok çözeltisi (%)	Substrat (μL)	Tris- SO_4 Tamponu (μL)	Enzim (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	$1/[\text{S}]$ (M^{-1})	$1/V$ ($\mu\text{mol/dk}$) $^{-1}$
%3	600	1300	100	-	1000	$1,68 \times 10^3$	0,011
	600	1300	100	20	980	$1,68 \times 10^3$	0,021
	600	1300	100	35	965	$1,68 \times 10^3$	0,030
	600	1300	100	70	930	$1,68 \times 10^3$	0,041
	800	1300	100	-	800	$1,26 \times 10^3$	0,009
	800	1300	100	20	780	$1,26 \times 10^3$	0,016
	800	1300	100	35	765	$1,26 \times 10^3$	0,023
	800	1300	100	70	730	$1,26 \times 10^3$	0,031
	1000	1300	100	-	600	$1,00 \times 10^3$	0,008
	1000	1300	100	20	580	$1,00 \times 10^3$	0,013
	1000	1300	100	35	565	$1,00 \times 10^3$	0,019
	1000	1300	100	70	530	$1,00 \times 10^3$	0,025
	1200	1300	100	-	400	$0,84 \times 10^3$	0,007
	1200	1300	100	20	380	$0,84 \times 10^3$	0,011
	1200	1300	100	35	365	$0,84 \times 10^3$	0,016
	1200	1300	100	70	330	$0,84 \times 10^3$	0,022
	1400	1300	100	-	200	$0,72 \times 10^3$	0,006
	1400	1300	100	20	180	$0,72 \times 10^3$	0,010
	1400	1300	100	35	165	$0,72 \times 10^3$	0,014
	1400	1300	100	70	130	$0,72 \times 10^3$	0,019



Şekil 6.16 hCA I izoenzimi üzerinde %3'lük C vitamini çözeltisinin inhibisyon etkisine ilişkin Lineweaver-Burk grafiği.

Çizelge 6.15 %1'lik C vitamini çözeltisinin hCA II izoenzimi üzerindeki K_i sabitinin belirlenmesi amacıyla yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

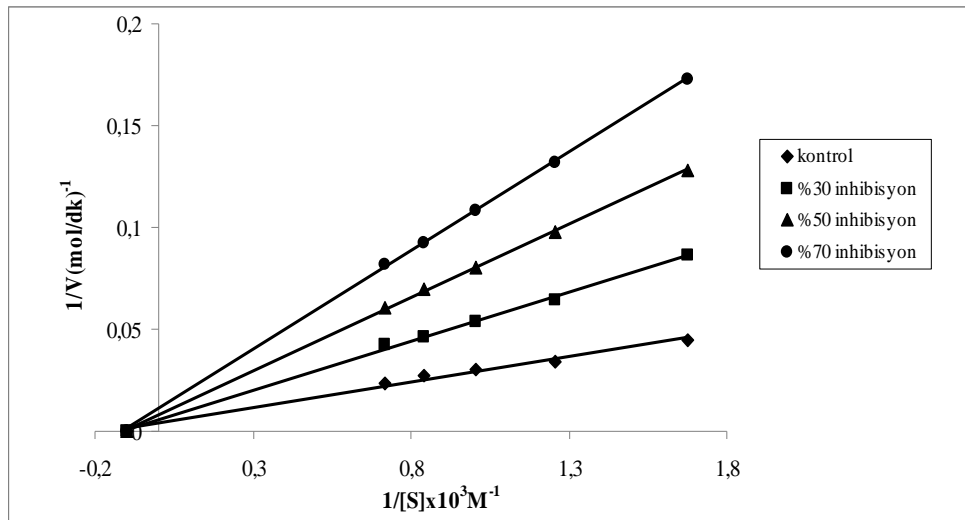
İnhibitör stok çözeltisi (%)	Substrat (μL)	Tris-SO ₄ Tamponu (μL)	Enzim (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	1/[S] (M^{-1})	1/V ($\mu\text{mol/dk}$) ⁻¹
%1	600	1300	100	-	1000	$1,68 \times 10^3$	0,012
	600	1300	100	70	930	$1,68 \times 10^3$	0,021
	600	1300	100	110	890	$1,68 \times 10^3$	0,030
	600	1300	100	140	860	$1,68 \times 10^3$	0,041
	800	1300	100	-	800	$1,26 \times 10^3$	0,009
	800	1300	100	70	730	$1,26 \times 10^3$	0,016
	800	1300	100	110	690	$1,26 \times 10^3$	0,023
	800	1300	100	140	660	$1,26 \times 10^3$	0,031
	1000	1300	100	-	600	$1,00 \times 10^3$	0,008
	1000	1300	100	70	530	$1,00 \times 10^3$	0,013
	1000	1300	100	110	490	$1,00 \times 10^3$	0,019
	1000	1300	100	140	460	$1,00 \times 10^3$	0,026
	1200	1300	100	-	400	$0,84 \times 10^3$	0,007
	1200	1300	100	70	330	$0,84 \times 10^3$	0,011
	1200	1300	100	110	290	$0,84 \times 10^3$	0,016
	1200	1300	100	140	260	$0,84 \times 10^3$	0,023
	1400	1300	100	-	200	$0,72 \times 10^3$	0,006
	1400	1300	100	70	130	$0,72 \times 10^3$	0,010
	1400	1300	100	110	90	$0,72 \times 10^3$	0,014
	1400	1300	100	140	60	$0,72 \times 10^3$	0,019



Şekil 6.17 hCA II izoenzimi üzerinde %1'lik C vitamini çözeltisinin inhibisyon etkisine ilişkin Lineweaver-Burk grafiği.

Çizelge 6.16 %2'lik C vitamini çözeltisinin hCA II izoenzimi üzerindeki K_i sabitinin belirlenmesi amacıyla yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

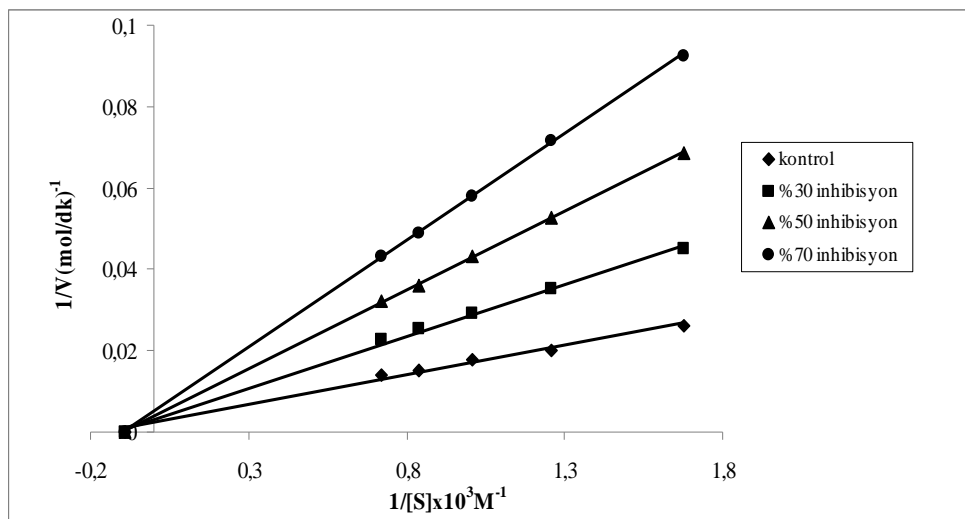
İnhibitör stok çözeltisi (%)	Substrat (μL)	Tris- SO_4 Tamponu (μL)	Enzim (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	$1/[\text{S}]$ (M^{-1})	$1/V$ ($\mu\text{mol/dk}$) ⁻¹
%2	600	1300	100	-	1000	$1,68 \times 10^3$	0,045
	600	1300	100	30	970	$1,68 \times 10^3$	0,086
	600	1300	100	50	950	$1,68 \times 10^3$	0,128
	600	1300	100	80	920	$1,68 \times 10^3$	0,172
	800	1300	100	-	800	$1,26 \times 10^3$	0,034
	800	1300	100	30	770	$1,26 \times 10^3$	0,064
	800	1300	100	50	750	$1,26 \times 10^3$	0,098
	800	1300	100	80	720	$1,26 \times 10^3$	0,132
	1000	1300	100	-	600	$1,00 \times 10^3$	0,031
	1000	1300	100	30	570	$1,00 \times 10^3$	0,054
	1000	1300	100	50	550	$1,00 \times 10^3$	0,081
	1000	1300	100	80	520	$1,00 \times 10^3$	0,109
	1200	1300	100	-	400	$0,84 \times 10^3$	0,027
	1200	1300	100	30	370	$0,84 \times 10^3$	0,046
	1200	1300	100	50	350	$0,84 \times 10^3$	0,069
	1200	1300	100	80	320	$0,84 \times 10^3$	0,093
	1400	1300	100	-	200	$0,72 \times 10^3$	0,024
	1400	1300	100	30	170	$0,72 \times 10^3$	0,043
	1400	1300	100	50	150	$0,72 \times 10^3$	0,060
	1400	1300	100	80	120	$0,72 \times 10^3$	0,082



Şekil 6.18 hCA II izoenzimi üzerinde %2'lik C vitamini çözeltisinin inhibisyon etkisine ilişkin Lineweaver-Burk grafiği.

Çizelge 6.17 %3'lük C vitamini çözeltisinin hCA II izoenzimi üzerindeki K_i sabitinin belirlenmesi amacıyla yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

İnhibitör stok çözeltisi (%)	Substrat (μL)	Tris- SO_4 Tamponu (μL)	Enzim (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	$1/[\text{S}]$ (M^{-1})	$1/V$ ($\mu\text{mol/dk}$) $^{-1}$
%3	600	1300	100	-	1000	$1,68 \times 10^3$	0,026
	600	1300	100	20	980	$1,68 \times 10^3$	0,045
	600	1300	100	35	965	$1,68 \times 10^3$	0,068
	600	1300	100	50	950	$1,68 \times 10^3$	0,093
	800	1300	100	-	800	$1,26 \times 10^3$	0,020
	800	1300	100	20	780	$1,26 \times 10^3$	0,035
	800	1300	100	35	765	$1,26 \times 10^3$	0,053
	800	1300	100	50	750	$1,26 \times 10^3$	0,071
	1000	1300	100	-	600	$1,00 \times 10^3$	0,018
	1000	1300	100	20	580	$1,00 \times 10^3$	0,029
	1000	1300	100	35	565	$1,00 \times 10^3$	0,043
	1000	1300	100	50	550	$1,00 \times 10^3$	0,058
	1200	1300	100	-	400	$0,84 \times 10^3$	0,015
	1200	1300	100	20	380	$0,84 \times 10^3$	0,025
	1200	1300	100	35	365	$0,84 \times 10^3$	0,036
	1200	1300	100	50	350	$0,84 \times 10^3$	0,049
	1400	1300	100	-	200	$0,72 \times 10^3$	0,014
	1400	1300	100	20	180	$0,72 \times 10^3$	0,022
	1400	1300	100	35	165	$0,72 \times 10^3$	0,032
	1400	1300	100	50	150	$0,72 \times 10^3$	0,043



Şekil 6.19 hCA II izoenzimi üzerinde %3'lük C vitamini çözeltisinin inhibisyon etkisine ilişkin Lineweaver-Burk grafiği.

Çizelge 6.18 Farklı derişimlerdeki C vitamini çözeltilerinin hCA I izoenzimi üzerine inhibisyon etkisi çalışmalarından elde edilen sonuçlar doğrultusunda hesaplanan K_i değerleri.

İnhibitör stok çözeltisi (%)	[I] (μM)	K_i (μM)	Ortalama K_i (μM)	İnhibisyon Türü
%1	$0,11 \times 10^3$	$0,08 \times 10^3$	$0,97 \times 10^2$	Yarışmasız
	$0,19 \times 10^3$	$0,11 \times 10^3$		
	$0,25 \times 10^3$	$0,10 \times 10^3$		
%2	$0,38 \times 10^2$	$0,27 \times 10^2$	$0,38 \times 10^2$	Yarışmasız
	$0,76 \times 10^2$	$0,40 \times 10^2$		
	$1,14 \times 10^2$	$0,47 \times 10^2$		
%3	$0,38 \times 10^2$	$0,32 \times 10^2$	$0,43 \times 10^2$	Yarışmasız
	$0,66 \times 10^2$	$0,39 \times 10^2$		
	$1,32 \times 10^2$	$0,58 \times 10^2$		

Çizelge 6.19 Farklı derişimlerdeki C vitamini çözeltilerinin hCA II izoenzimi üzerine inhibisyon etkisi çalışmalarından elde edilen sonuçlar doğrultusunda hesaplanan K_i değerleri.

İnhibitör stok çözeltisi (%)	[I] (μM)	K_i (μM)	Ortalama K_i (μM)	İnhibisyon Türü
%1	$1,32 \times 10^2$	$0,10 \times 10^3$	$1,20 \times 10^2$	Yarışmasız
	$0,21 \times 10^2$	$0,13 \times 10^3$		
	$0,27 \times 10^2$	$0,12 \times 10^3$		
%2	$0,57 \times 10^2$	$0,42 \times 10^2$	$0,52 \times 10^2$	Yarışmasız
	$0,95 \times 10^2$	$0,52 \times 10^2$		
	$1,51 \times 10^2$	$0,61 \times 10^2$		
%3	$0,38 \times 10^2$	$0,26 \times 10^2$	$0,36 \times 10^2$	Yarışmasız
	$0,66 \times 10^2$	$0,40 \times 10^2$		
	$0,95 \times 10^2$	$0,43 \times 10^2$		

7. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

C vitamini (Askorbik asit) insanlar için esansiyel (diyetle alınan) bir vitamin olup önemli bir antioksidandır (Halliwell ve Gutteridge, 1999). Ayrıca C vitamini lipidler, DNA ve proteinler gibi makromoleküllerin oksidatif hasarına yol açan reaktif türlerin olumsuz etkilerini azaltır bu şekilde kardiyovasküler hastalıklar, kanser, felç, nörodejeneratif hastalıklar ve katarakt oluşumu gibi kronik hastalıkların oluşumunu da azaltır (Halliwell ve Gutteridge, 1999). Askorbik asidin insan gözünde bulunan aköz sıvıdaki konsantrasyonu 1.4 mmol/litredir. Aköz sıvıdaki askorbik asit konsantrasyonu diyet ile alınan askorbik asit miktarıyla doğru orantılı olarak belli bir seviyeye kadar artmaktadır. Oral yolla 150-250 mg/gün civarı alındığında hem aköz sıvı hem de plazma sıvıları doygunluğa ulaşmaktadır (Taylor ve ark., 1997).

İlk olarak insan eritrositlerinde keşfedilen (Meldrum ve Roughton, 1933) karbonik anhidraz enzimi (CA), karbondioksitin bikarbonata reversibl hidrasyon reaksiyonunu katalizleyen ve Zn^{+2} iyonu içeren bir metaloenzimdir (Gilmour ve Perry, 2009). CA izoenzimlerinin bir çoğu önemli terapötik ajanlardır. Bu enzim inhibitörleri ödem, glokom, obezite, kanser, epilepsi ve osteoporoz gibi bir dizi bozukluğun tedavisinde kullanılır.

Glokom, yüksek göz içi basıncı (IOP) sebebiyle optik sinir başında geri dönüşümsüz hasara neden olan, ilerlemesi durumunda görme fonksiyonunda kayıplara yol açan ve körlükle sonuçlanan kronik, dejeneratif göz hastalığı olarak tanımlanmaktadır (Supuran, 2008). Glokom hastalığının tedavisinde karbonik anhidraz enzimi inhibitörleri yıllardan beri kullanılmaktadır.

Karbonik anhidraz inhibitörleri sistemik ve topikal olmak üzere sınıflandırılır. Sistemik karbonik anhidraz inhibitörleri; asetazolamid, metazolamid ve diklorfenamiddir. Topikal karbonik anhidraz inhibitörleri; dorzolamid ve brinzolamiddir. Sistemik karbonik anhidraz inhibitörleri göz epitelyumunda bulunan hCA II ve hCA IV izoenzimlerini inhibe eder ve buna bağlı olarak humor aköz sekresyonunu azaltır bundan dolayı glokom tedavisinde kullanılmaktadır. Topikal karbonik anhidraz inhibitörleri de humor aköz sekresyonunu azaltarak etki eder ancak lokal olarak uygulandığından dolayı sistemik inhibitörlere alternatif olarak kullanılmaktadır (Supuran ve Scozzafava, 2000). Sistemik inhibitörler; baş ağrısı, işitme azalması, el ve ayaklarda uyuşma, depresyon, ağızda acı tat hissi, idrar taşı oluşumu, bulantı, libido kaybı ve kan diskrazisi gibi yan etkilere neden olurken (Shields, 1998), topikal inhibitörler; irritasyon, yanma gibi yan etkileri mevcuttur (Schnyder ve ark., 1999).

Glokom hastalığının tedavisinde kullanılan sistemik ve topikal karbonik anhidraz enzim inhibitörlerinin neden olduğu yan etkilerden dolayı günümüzde çeşitli inhibisyon çalışmaları yapılmaktadır.

Bu çalışmada ise, insan eritrositlerinden saflaştırılan hCA I ve hCA II izoenzimleri üzerinde C vitamininin *in vitro* olarak inhibisyon etkisi incelendi. Ayrıca C vitamininin insan gözündeki aköz sıvıda belirli miktarlarda bulunması bu çalışmada yol gösteren bir unsur olmuştur.

Bir inhibitörün inhibisyon etkisinin belirlenmesinde IC₅₀ değerleri kullanılmaktadır. İnsan eritrositlerinden saflaştırılan hCA I ve hCA II izoenzimlerinin hidrataz aktiviteleri üzerinde C vitamininin inhibisyon etkisi glokom tedavisinde klinikte lokal olarak kullanılan miktar olan %1'lik çözeltisi ve buna ilaveten %0,25, %0,5, %2 ve %3'lük çözeltileri hazırlanarak enzim üzerine tatbik edilmek suretiyle araştırıldı. Yapılan deneylerde, hazırlanan C vitamini çözeltilerinin tamamının hCA I ve hCA II izoenzimlerinin hidrataz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkisi göstermedikleri sonucuna varıldı.

İnsan eritrosit hCA I ve hCA II izoenzimlerinin esteraz aktiviteleri üzerinde C vitamininin inhibisyon etkisi glokom tedavisinde klinikte lokal olarak kullanılan miktar olan %1'lik çözeltisi ve buna ilaveten %0,25, %0,5, %2 ve %3'lük çözeltileri hazırlanarak enzim üzerine tatbik edilmek suretiyle araştırıldı. Yapılan deneylerde, hazırlanan C vitamini çözeltilerinin hCA I ve hCA II izoenzimlerinin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edildi ve IC₅₀ değerleri hesaplandı.

K_i değerlerinin belirlenmesinde ise beş farklı substrat konsantrasyonunun her biri için üçer farklı inhibitör konsantrasyonunda esteraz aktivitesi ölçümleri yapıldı ve Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Bu grafiklerden yola çıkılarak K_i sabitleri bulundu. Aşağıdaki tablolarda %0,25, %0,5, %1, %2 ve %3'lük C vitamini çözeltilerinin hCA I ve hCA II izoenzimi üzerindeki esteraz IC₅₀ ve %1, %2 ve %3'lük C vitamini çözeltilerinin hCA I ve hCA II izoenzimi için K_i değerleri verilmiştir.

Çizelge 7.1 Yapılan inhibisyon çalışmalarından elde edilen esteraz IC₅₀ değerleri.

İnhibitör	Esteraz IC ₅₀ (µM)	
	hCA I	hCA II
%0,25	0,96x10 ³	0,23x10 ³
%0,5	0,41x10 ³	0,38x10 ³
%1	0,18x10 ³	0,21x10 ³
%2	0,073x10 ³	0,099x10 ³
%3	0,07x10 ³	0,066x10 ³

Çizelge 7.2 Yapılan inhibisyon çalışmalarından elde edilen K_i değerleri.

İnhibitör	K_i değerleri (μM)	
	hCA I	hCA II
%1	$0,97 \times 10^2$	$1,20 \times 10^2$
%2	$0,38 \times 10^2$	$0,52 \times 10^2$
%3	$0,43 \times 10^2$	$0,36 \times 10^2$

Asetazolamidin hCA I ve hCA II için esteraz IC_{50} değerleri sırasıyla 4,210 ve 3,122, Asetazolamidin hCA I ve hCA II için K_i değerleri sırasıyla 3,102 ve 2,201, Sülfanilamidin hCA I ve hCA II için IC_{50} değerleri sırasıyla 6,120 ve 5,201, Sülfanilamidin hCA I ve hCA II için K_i değerleri sırasıyla 4,603 ve 3,802'dir. Yukarıdaki (Çizelge 7.1 – Çizelge 7.2) verilen değerler, karbonik anhidraz inhibitörleri olarak kullanılan asetazolamid ve sülfanilamid ile kıyaslanacak olursa; klinikte lokal olarak kullanılan miktar %1'lik C vitamini çözeltisi ve buna ilaveten %2 ve %3'lük C vitamini çözeltilerinin asetazolamid ve sülfanilamidden daha az inhibisyon gösterdiği anlaşılmaktadır. Ancak tablodaki değerler kendi aralarında değerlendirildiğinde %0,25 ve %0,5'lik C vitamini çözeltilerine göre %1, %2 ve %3'lük değerlerin daha iyi inhibisyon sonuçları verdiği anlaşılmaktadır. Yani, C vitamini derişimi arttıkça (%1-%2-%3), hCA I ve hCA II izoenzimleri üzerindeki inhibisyon etkisinin arttığı söylenebilir. İnsan vücudunda pek çok işlevi olan C vitamininin fazla alınımı toksisiteye sebep olmaz ancak yüksek derişimlerde kullanılması yukarıda da bahsedildiği gibi bazı enzimler üzerinde inhibisyon etkisine neden olabileceği bu çalışma neticesinde anlaşılmıştır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- [1] Akbaş, H., 2008. Pirazol karboksilik asitlerin amitleşme ürünlerinin sığır CA'sı (Karbonik anhidraz enzimi) üzerindeki inhibisyon etkisinin incelenmesi, Yüksek lisans tezi, Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 74s.
- [2] Akkuş, İ., 1995. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri, Mimoza Yayınları, Konya, 157 s.
- [3] Akhilender, K. and Naidu, K., 2003. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. *Nutr. J.*, 2; 7-16.
- [4] Aksoy, N., Vural, H., Sabuncu, T., Arslan, O., Aksoy, S., 2005. Beneficial effect of vitamins C and E against oxidative stress in diabetic rats. *Nutr. Res.*, 25; 625-630.
- [5] Alber, B.E. and Ferry, J.G., 1994. A carbonic anhydrase from the archaeon *Methanosarcina thermophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.*, 91; 6909-6913.
- [6] Arıcı, M.K., Erdoğan, H., Toker, I., Vural, A., Topalkara, A., 2006. The effect of latanoprost, bimatoprost, and travoprost on intraocular pressure after cataract surgery. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 22; 33-34.
- [7] Armstrong, J., Mc, D., Myers, D.V., Verpoorte, J.A. and Edsall, J.T., 1966. Purification and properties of human erythrocyte carbonic anhydrase. *J.Biol. Chem.*, 214; 5137.
- [8] Arslan, O., 2003. Biyomoleküller Teori ve Uygulamalarıyla. Balıkesir, 275s.
- [9] Arslan, O., Nalbantoğlu, B., Demir, N., Özdemir, H. and Küfrevioğlu, Ö.İ., 1997. A new method for the purification of carbonic anhydrase isozymes by affinity chromatography. *Tr. J. of Med. Sci.*, 27; 559.
- [10] Asard, H., May, J.M., Smirnoff, N., 2004. Vitamin C Function and Biochemistry in animals and plants. *Free Radical Bio. Med.*, 173-220.
- [11] Bayşu, N., Sözbilir Bayşu, N., 2008. Biyokimya, Güneş Tıp Kitapevleri, İstanbul, 632 s.
- [12] Badger, M.R. and Price, G.D., 1994. The role of carbonic anhydrase in photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 45; 369-392.
- [13] Bracey, M.H., Christiansen, J., Tovar, P., Cramer, S.P. and Bartlett, S.G., 1994. Spinach carbonic anhydrase: Investigation of the zinc-binding ligands by site-directed mutagenesis, elemental analysis and EXAFS. *Biochemistry*, 33; 13126-13131.
- [14] Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, 72; 248.
- [15] Cabisco, E. and Levine, R.L., 1995. Carbonic anhydrase III. Oxidative modification in vivo and loss of phosphatase activity during aging. *J. Biol. Chem.*, 270; 24: 14742-14747.
- [16] Campbell, A.R., Andress, D.L. and Swenson, E.R., 1994. Identification and characterization of human neutrophil carbonic anhydrase. *J. Leukoc. Biol.*, 55; 343-348.
- [17] Carr, A.C. and Frei, B., 1999. Does vitamin C act as pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB, J.*, 13; 1007-1024.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- [18] Chao, J.C., Huang, C.H., Wu, S.J., Yang, S.C., Chang, N.C., Shieh, M.J., Lo, P.N., 2002. Effects of beta-carotene, vitamin C and E on antioxidant status in hyperlipidemic smokers. *J. Nutr. Biochem.*, 13; 427-434.
- [19] Combs, G.F., 1998. *Vitamin C: Fundamental aspects in nutrition and health*. Academic Press, New York, 245-275.
- [20] Cox, E.H., McLendon, G.L., Morel, F.M., Lane, T.W., Prince, R.C., Pickering, I.J. and George, G.N., 2000. The active site structure of *Thalassiosira weissflogii* carbonic anhydrase. 1. *Biochemistry*, 39; 12128-12130.
- [21] Cuatrecasas, P., 1970. Protein purification by affinity chromatography. Derivatizations of agarose and polyacrylamide beads. *J. Biol. Chem.*, 245; 3059.
- [22] Davenport, H.W., 1939. Gastric carbonic anhydrase. *J. Physiol.*, 97; 32-43.
- [23] Davies, M.B., 1992. Reactions of L-Ascorbic acid with transition metal complexes. *Polyhedron*, 11; 285-321.
- [24] Deaton, C.M., Marlin, D.J., 2003. Exercise-associated oxidative-stress, *Clinical Techniques in Equine Practice*, 2; 278-291.
- [25] Eliot, J.G., 1999. Application of antioxidant vitamins in foods and beverages. *Food Tech.*, 53(2); 46-48.
- [26] Erdman, J.W., Jr., Klein, B.P. 1982. The influence of harvesting, processing, and cooking on vitamin C in foods. In: Seib, P.A., Tolbert, B.M., eds. *Ascorbic acid: Chemistry, Metabolism and Uses*. Washington, DC: American Chemical Society., 499-532.
- [27] Feist, R.M., Palmer, D.J., Fiscella, R., Ernest, J.T., Tripathi, R., Torczynski, E., Farber, M., 1995. Effectiveness of apraclonidine and acetazolamide in preventing postoperative intraocular pressure spike after extracapsular cataract extraction. *J. Cataract Refract. Surg.*, 21; 191-195.
- [28] Fett, J.P. and Coleman, J.R., 1994. Characterization and expression of 2 cDNAs encoding carbonic anhydrase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*, 105; 707-713.
- [29] Fleming, R.E., Parkkila, S., Parkkila, A.K., Rajaniemi, H., Waheed, A. and Sly, W.S., 1995. Carbonic anhydrase IV expression in rat and human gastrointestinal tract regional, cellular and subcellular localization. *J. Clin. Invest.*, 96; 6: 2907-2913.
- [30] Frei, B. and Traber, M., 2001. The new US dietary reference for vitamins C and E. *Redox Rep.*, 6; 5-9.
- [31] Fujikawa-Adachi, K., Nishimori, I., Taguchi, T. and Onishi, S., 1999. Human mitochondrial carbonic anhydrase VB. cDNA cloning, mRNA expression, subcellular localization and mapping to chromosome x. *J. Biol. Chem.*, 274; 30: 21228-21233.
- [32] Gilmour, K.M., Perry, S.F., 2009. Carbonic anhydrase and acid-base regulation in fish. *J. Exp. Biol.*, 212; 1647-1661.
- [33] Goldman, H.M., Gould, B.S., Munro, H.N., 1981. The antiscorbutic action of L-ascorbic acid and Disoascorbic acid (erythorbic acid) in the guinea pig. *Am. J. Clin. Nutr.*, 34; 24-33.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- [34] Gotz, R., Gnann, A. and Zimmermann, F.K., 1999. Deletion of the carbonic anhydrase-like gene NCE103 of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* causes an oxygen-sensitive growth defect. *Yeast* 15; 855-864.
- [35] Gupta, P., Narang, M., Banerjee, B.D. and Basu S., 2004. Oxidative stress in term small for gestational age neonates born to undernourished mothers; a case control study. *B.M.C Pediatrics*, 4; 14.
- [36] Guyton, A.C., Hall, J.E., 1996. Eye. In: *Textbook of medical physiology*. Sanders W.B., Philadelphia, 632-633.
- [37] Halliwell, B., 1995. Oxygen radicals, nitric oxide and Human inflammatory joint disease. *Ann. Rheum Dis.* 54; 505-510.
- [38] Halliwell, B., 1996. Antioxidants in human health and disease. *Annu. Rev. Nutr.*, 16; 33-50.
- [39] Halliwell, B., 1996. Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant in vivo?, *Free Radical Research*, 25; 439-454.
- [40] Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1999. Ascorbic acid. In: *Free radicals in biology and medicine*. 3rd ed. Oxford Press, Oxford. 200-208.
- [41] Harvey, R. A., Champe, P. C. and Ferrier, D. R., 2007. Çeviri Editörü: Engin Ulukaya, Lippincot Biyokimya, Nobel Tıp Kitapevleri, Bursa, 536 s.
- [42] Hewett-Emmett, D. and Tashian, R.E., 1996. Functional diversity, conservation, and convergence in the evolution of the α -, β - and γ -carbonic anhydrase gene families. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 5; 50-77.
- [43] Hiltonen, T., Björkbacka, H., Formsan, C., Clarke, A.K. and Samuelsson, G., 1998. Intracellular beta-carbonic anhydrase of the unicellular green alga *Coccomyxa*. *Plant Physiol.*, 117; 1341.
- [44] Hilvo, M., Innocenti, A., Monti, S.M., De Simone, G., Supuran C.T. and Parkkila, S., 2008. Recent advances in research on the most novel carbonic anhydrases, CA XIII and XV. *Curr. Pharm. Des.*, 14; 672-678.
- [45] Hull, D.S., 1990. Oxygen free radicals and corneal endothelium. *Trans Am Ophthalmol Soc.*, 88; 463-511.
- [46] Iqbal, K., Khan, A., Khattak, M.M.A.K., 2004. Biological significance of ascorbic acid (vitamin C) in human health: A review. *Pakistan J. Nutr.*, 3; 5-13.
- [47] Iverson, T.M., Alber, B.E., Kisker, C., Ferry, J.G. and Rees, D.C., 2000. A closer look at the active site of γ -class carbonic anhydrases: High-resolution crystallographic studies of the carbonic anhydrase from *Methanosarcina thermophila*. *Biochem.*, 39; 9222-9231.
- [48] Johnson, C.S., Steinberg, F.M., Rucker, R.B., 1998. Ascorbic acid. *Handbook of Vitamins*, Third Edition Edited by Rucker, R.B., Suttie, J.W., McCormick, D.B., Machlin IJ Marcel Dekker Inc. New York., 529-585.
- [49] Kandel, M., Gonall, A.G., Wong, S. and Kondel, S.I., 1970. Some characteristics of human, bovine and horse carbonic anhydrase as revealed by inactivation studies. *J. Biol. Chem.*, 245; 2444.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- [50] Karhumaa, P., Leinonen, J., Parkkila, S., Kaunisto, K., Tapanainen, J. and Rajaniemi, H., 2001. The identification of secreted carbonic anhydrase VI as a constitutive glycoprotein of human and rat milk. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 98; 11604-11608.
- [51] Kato, K., 1990. Sequence of a novel carbonic anhydrase-related polypeptide and its exclusive presence in Purkinje cells. *FEBS. Lett.*, 271; 137-140.
- [52] Kayaalp, S. O., 1989. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Cilt 3; 4. Baskı, 2864s.
- [53] Keha, E. E., Küfrevioğlu, Ö. İ., 2009. *Biyokimya, Aktif Yayınevi, Erzurum*, 645 s.
- [54] Kimber, M.S. and Pai, E.F., 2000. The active site architecture of *Pisum sativum* β -carbonic anhydrase is a mirror image of that of α -carbonic anhydrases. *EMBO J.*, 19; 1407-1418.
- [55] Kisker, C., Schindelin, H., Alber, B.E., Ferry, J.G. and Rees, D.C., 1996. A left-handed beta-helix revealed by the crystal structure of a carbonic anhydrase from the archaeon *Methanosarcina thermophila*. *EMBO J.* 15, 2323-2330.
- [56] Kivela, J., Parkkila, S., Waheed, A., Parkkila, A.K., Sly, W.S. and Rajaniemi, H., 1997. Secretory carbonic anhydrase isoenzyme (CA VI) in human serum. *Clin. Chem.*, 43; 2318-2322.
- [57] Kohn, J. and Wilchek, M.A., 1978. Colorimetric method for monitoring activation of sepharose by cyanogen bromide. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 7; 14.
- [58] Kumpulainen, T. and Korhonen, L.K., 1982. Immunohistochemical localization of carbonic anhydrase isoenzyme C in the central and peripheral nervous system of the mouse. *J. Histochem. Cytochem.*, 30; 283-292.
- [59] Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227; 680.
- [60] Landolfi, C., Marchetti, M., Ciocci, G. and Milanese, C., 1997. Development and pharmacological characterization of a modified procedure for the measurement of carbonic anhydrase activity. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, 38; 169-172.
- [61] Lane, T.W. and Morel, F.M.M., 2000. A biological function for cadmium in marine diatoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA.*, 97; 4627-4631.
- [62] Lehninger, A.L., Nelson, D.L., and Cox, M.M., 2005. *Lehninger Principles of Biochemistry*, 3. baskıdan çeviri (Çeviri editörü: Kılıç, N.), Palme Yayıncılık, 1152 s.
- [63] Lovejoy, D.A., Hewett-Emmett, D., Porter, C.A., Cepoi, D., Sheffield, A., Vale, W.W. and Tashian, R.E. 1998. Evolutionarily conserved, "acatalytic" carbonic anhydraserelated protein XI contains a sequence motif present in the neuropeptide sauvagine: the human CA-RP XI gene (CA11) is embedded between the secretor gene cluster and the DBP gene at 19q13.3. *Genomics*, 54; 484-493.
- [64] Maren, C.H., 1960. A simplified micromethod for the determination of carbonic anhydrase and its inhibitors, *J. Pharmac. Exp. Ther.*, 26;130.
- [65] Maren, T.H., 1967. Carbonic anhydrase: chemistry, physiology, and inhibition. *Physiol. Rev.*, 47; 595-781.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- [66] Maren, T.H., Conroy, C.W., Wynns, G.C., Levy, N.S., 1997. Ocular absorption, blood levels and excretion of dorzolamide, a topically active carbonic anhydrase inhibitor. *J. Ocul. Pharmacol Ther.*, 13; 23-30.
- [67] MedlinePlus Encyclopedia, Ascorbic acid.
- [68] Meldrum N.U., Roughton F.J.W., 1933. Carbonic anhydrase: Its preparation and properties. *Cambridge. J. Physiol.*, 80; 113-142.
- [69] Mitsuhashi, S., Mizushima, T., Yamashita, E., Yamamoto, M., Kumasaka T., Moriyama, H., Ueki, T., Miyachi, S. and Tsukihara, T., 2000. X-ray structure of beta-carbonic anhydrase from the red alga, *Porphyridium purpureum*, reveals a novel catalytic site for CO₂ hydration. *J. Biol. Chem.*, 275; 5521-5526.
- [70] Muhlhauser, J., Crescimanno, C., Rajaniemi, H., Parkkila, S., Milovanov, A.P., Castellucci, M. and Kaufmann, P., 1994. Immunohistochemistry of carbonic anhydrase in human placenta and fetal membranes. *Histochemistry*, 101; 91-98.
- [71] Nakamoto, T., McCroskey, M., Mallek, H.M., 1984. The role of ascorbic acid deficiency in human gingivitis- A new hypothesis. *Journal of Theoretical Biology*, 108; 163-171.
- [72] Nishikimi, M., Yagi, K., 1991. Molecular basis for the deficiency in humans of gulonolactone oxidase, a key enzyme for ascorbic acid biosynthesis. *Am J Clin Nutr.*, 54: 1203-1208s.
- [73] Nishikimi, M., Yagi, K., 1996. Biochemistry and molecular biology of ascorbic acid biosynthesis. *Subcell Biochem.*, 25; 17-39.
- [74] Ottoway, P.B., 1993. Stability of vitamins in food. In: *The Tecnology of Vitamins in foods*, P.B., Ottoway, ed., 90-113.
- [75] Packer, L., Fuchs, J., 1997. *Vitamin C in Health and Disease*, Marcel Dekker, Inc., New York.
- [76] Paolini, M., Pozetti, L., Pedulli, G.F., Marchesi, E., 1999. The nature of prooxidant activity of vitamin C. *Life Sci.*, 64(23); 273-278.
- [77] Parkkila, A.K., Parkkila, S., Juvonen, T. and Rajaniemi, H., 1993. Carbonic anhydrase isoenzymes II and I are present in the zona glomerulosa cells of the human adrenal gland. *Histochemistry*, 99; 37-41.
- [78] Parkkila, S., Parkkila, A.K., Juvonen, T. and Rajaniemi, H. 1994. Distribution of the carbonic anhydrase isoenzymes I, II, and VI in the human alimentary tract. *Gut.*, 35; 646-650.
- [79] Pellegrini, N., Miglio, C., Del Rio, D., Salvatore, S., Serafini, M., Brighenti, F., 2009. Effect of domestic cooking methods on the total antioxidant capacity of vegetables. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 60; 12-22.
- [80] Percival, M., 1998. Antioxidants. *Clinical Nutrition Insights.*, 10; 1-4.
- [81] Podsedek, A., 2007. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassicavegetables: A review. *L.W.T.*, 40; 1-11.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- [82] Preiffer, N., 1997. Dorzolamide: development and clinical application of a topical carbonic anhydrase inhibitor. *Surv. Ophthalmol.*, 42; 137-151.
- [83] Rickli, E.E., Ghazanfar, S.A., Gibbons, B.H., Edsall, J.T., 1964. Carbonic anhydrases from human erythrocytes. Preparation and properties of two enzymes. *J. Biol. Chem.*, 239; 1065-1078.
- [84] Roberts, Jr. J.L., Holenberg, J.L., Postma, J.M., 1997. *Chemistry in the Laboratory*. 4th ed. Freeman, 809-820.
- [85] Roberts, S.B., Lane, T.W. and Morel, F.M.M., 1997. Carbonic anhydrase in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.*, 33; 845-850.
- [86] Roughton, F.J.W. and Booth, V.H., 1946. The effect of substrate concentration, pH and other factors upon the activity of carbonic anhydrase. *Biochem. J.*, 40; 319.
- [87] Rowlett, R.S., Chance, M.R., Wirt, M.D., Sidelinger, D.E., Royal, J.R., Woodroffe, M., Wang, Y.F.A., Saha, R.P. and Lam, M.G., 1994. Kinetic and structural characterization of spinach carbonic anhydrase. *Biochemistry*, 33; 13967-13976.
- [88] Scherer, W.J., Mielke, D.L., Tidwell, P.E., Hauber, F.A., 1998. Effect of latanoprost on intraocular pressure following cataract extraction. *J. Cataract Refract. Surg.*, 24; 964-967.
- [89] Schnyder, C.C., Tran, V.T., Mermoud, A., Herbort, C.P., 1999. Sterile mucopurulent conjunctivitis associated with the use of dorzolamide eyedrops. *Arch. Ophthalmol.*, 117; 1429-1431.
- [90] Schorah, C.J., Downing, C., Piripitsi, A., Gallivan, L., Al-Hazaa, A.H., Sanderson, M.J., Bodenham, A., 1996. Total vitamin C, ascorbic acid, and dehydroascorbic acid concentrations in plasma of critically ill patients. *Am. J. Clin. Nutr.*, 63; 760-765.
- [91] Schwenn, O., Xia, N., Krummenauer, F., Dick, H.B., 2001. Prevention of early postoperative increase in intraocular pressure after phacoemulsification. Comparison of different antiglaucoma drugs. *Ophthalmol.* 98; 934-943.
- [92] Segel, H.I., 1976, *Biochemical Calculations*, John Wiley and Sons, USA 441 p.
- [93] Shields, B.M., 1998. Carbonic anhydrase inhibitors. *Textbook of Glaucoma*. Williams and Wilkins, Baltimore., 431-439.
- [94] Singh, U., Jialal, I., 2004. Anti-inflammatory effects of alpha-tocopherol. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1031; 195-203.
- [95] Sinha, R., Block, G., Taylor, P.R., 1993. Problems with estimating vitamin C intakes. *Am. J. Clin. Nutr.*, 5; 547-550.
- [96] Sly, W.S., Hewett-Emmett, D., Whyte, M.P., Yu, Y.S. and Tashian, R.E., 1983. Carbonic anhydrase II deficiency identified as the primary defect in the autosomal recessive syndrome of osteopetrosis with renal tubular acidosis and cerebral calcification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 80; 2752-2756.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- [97] Sly, W.S., Whyte, M.P., Sundaram, V., Tashian, R.E., Hewett-Emmett, D., Guibaud, P., Vainsel, M., Baluarte, H.J., Gruskin, A., Al-Mosawi, M., Sakati, N. and Ohlsson, A., 1985. Carbonic anhydrase II deficiency in 12 families with the autosomal recessive syndrome of osteopetrosis with renal tubular acidosis and cerebral calcification. *N. Engl. J. Med.*, 313; 139-145.
- [98] Sly, W.S. and Hu, P.Y., 1995. Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies. *Annu. Rev. Biochem.*, 64; 375-401.
- [99] Smirnoff, N., 2001. L-Ascorbic acid biosynthesis. *Vitam. Horm.*, 61; 241-266.
- [100] Smith, K.S. and Ferry, J.G., 1999. A plant-type (beta-class) carbonic anhydrase in the thermophilic metanoarchaeon *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *J. Bacteriol.*, 181; 6247-6253.
- [101] Stevenson, N.R., 1974. Active transport of L-ascorbic acid kinetics in the human ileum. *Gastroenterology*, 67(5); 952-956.
- [102] Sugrue, M.F., 2000. Pharmacological and Ocular Hypotensive Properties of Topical Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Progr. Ret. Eye Res.*, 19; 87-112.
- [103] Supuran, C.T., 2008. Carbonic anhydrases. An overview, *Curr. Pharm. Des.*, 14; 603-614.
- [104] Supuran, C.T., 2008. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nature reviews drug discovery* 7; 168-181.
- [105] Supuran, C.T., 2010. Carbonic anhydrase inhibitors., *Bioorganic and medicinal chemistry letters.*, 20; 3467-3474.
- [106] Supuran, C.T., Scozzafava, A., 2000. Carbonic anhydrase inhibitors and their therapeutic potential. *Exp.Opin.Ther. Patents.*, 10; 575-600.
- [107] Supuran, C.T., Scozzafava, A., 2000. Carbonic anhydrase inhibitors- part 94. 1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamide derivatives as antitumor agents. *Eur. J. Med. Chem.*, 35; 867-874.
- [108] Supuran, C.T., Scozzafava, A., 2007. Carbonic anhydrases as targets for medicinal chemistry. *Bioorg. and Med. Chem.*, 15; 4336-4350.
- [109] Taylor, A., Jacques, P.F., Nadler, D., Morrow, F., Sulsky, I.S., Shepard, D., 1991. Relationship in humans between ascorbic acid consumption and levels of total and reduced ascorbic acid in lens, aqueous humor and plasma., 10(8); 751-759.
- [110] Taylor, A., Jacques, P.F., Nowell, T., Perrone, G., Blumberg, J., Handelman, G., 1997. Vitamin C in human and guinea pig aqueous, lens and plasma in relation to intake. *Curr. Eye Res.*, 16; 857-864.
- [111] Temizkan, G. ve Arda, N., 2004. Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler. *Nobel Tıp Kitabevleri*, İstanbul.
- [112] Turaçlı, M.E., 2004. Açık açılı glokomların epidemiyolojisi ve risk faktörleri. *Türkiye Klinikleri Oftalmoloji Dergisi*. 13;1, 1-6.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- [113] Venta, P.J., Montgomery, J.C. and Tashian, R.E., 1987. Molecular genetics of carbonic anhydrase isozymes. *Isozymes Curr. Top. Biol. Med. Res.*, 14; 59-72.
- [114] Voet, Donald., Voet, Judith G., Pratt, Charlotte W., 1999. *Fundamentals of Biochemistry*. JohnWiley & Sons, Inc., USA.
- [115] Voet, Donald., Voet, Judith G., Pratt, Charlotte W., 2003. *Biochemistry*. JohnWiley & Sons, Inc., USA.
- [116] Wilbur, K.M. and Anderson, N.G., 1948. Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase, *J. Biol. Chem.*, 176; 147-154.
- [117] Williams, R.N., Paterson, C.A., 1986. A protective role for ascorbic acid during inflammatory episodes in the eye. *Exp. Eye Res.*, 42; 211-218.
- [118] Wratten, M.L., Tetta, C., Ursini, F., Sevanian, A., 2000. Oxidant stress in hemodialysis: Prevention and treatment strategies. *Kidney Int.*, 58; 126-132.
- [119] Ziemer, R.C., 1996. Circadian variations in intraocular pressure. Ritch, R., Shields, M.B., Krupin, T., *The Glaucomas*. Vol. 1, Mosby, st. Louis, 429-445.