

**T.C.
ERZİNCAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**İNSAN KANINDAN SAFLAŞTIRILAN KARBONİK ANHİDRAZ I VE II
İZOENZİMLERİ ÜZERİNDE BAZI İLAÇLARIN ETKİLERİNİN IN VITRO
OLARAK İNCELENMESİ**

Reyhan ÖZKAN

Danışman: Doç. Dr. Murat ÇANKAYA


**BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**ERZİNCAN
2017**

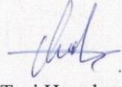
Her Hakkı Saklıdır

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

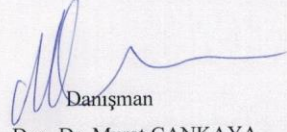
Adı-Soyadı: Reyhan ÖZKAN

İmza : 

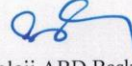
İnsan Kanından Safılaştırılan Karbonik Anhidraz I- ve II İzoenzimleri Üzerinde Bazı İlaçların Etkilerinin In Vitro Olarak İncelenmesi adlı Yüksek Lisans tezi, Erzincan Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi 'ne uygun olarak hazırlanmıştır.



Tezi Hazırlayan
Reyhan ÖZKAN



Danışman
Doç. Dr. Murat ÇANKAYA



Biyoloji ABD Başkanı
Prof. Dr. Salih DOĞAN

Doç. Dr. Murat ÇANKAYA danışmanlığında, Reyhan ÖZKAN tarafından hazırlanan bu çalışma 27.01.2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Biyoloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Doç. Dr. Murat ÇANKAYA

İmza:

Üye : Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

İmza:

Üye : Yrd. Doç. Dr. Esra DİLEK

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

17.02.2017



Prof. Dr. Paşa YALÇIN
Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

**İNSAN KANINDAN SAFLAŞTIRILAN KARBONİK ANHİDRAZ I VE II
İZOENZİMLERİ ÜZERİNDE BAZI İLAÇLARIN ETKİLERİNİN IN VITRO
OLARAK İNCELENMESİ**

Reyhan ÖZKAN

Erzincan Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Murat ÇANKAYA

Karbonik anhidraz enzim ailesi canlı vücudunda karbondioksitin hidratasyonu ve bikarbonatın dehidratasyon reaksiyonlarını tersinir olarak katalizlerler. Karbonik anhidrazlar aktif bölgelerinde Zn^{2+} iyonunu bulundurlar. Canlılar için hayati öneme sahip olan bu enzim ailesi 16 farklı izoenzimden oluşmaktadır. Bu çalışmada insan kanından karbonik anhidraz I ve II izoenzimlerini (hbCA I ve hbCA II) afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda saflaştırılan hbCA I ve II izoenzimleri üzerine, insanların sıkça kullanmış olduğu bazı ilaçların etken maddelerinin *in vitro* şartlarda inhibisyon etkileri ilk defa incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara bakıldığında hbCA I 106,04 kat ve hbCA II de 425,33 kat saflaştırılmıştır. Amikasin Sülfat, Metilprednisolon, Feniramidol HCl, Tramadol HCl ilaç etken maddelerin hepsi hbCA I üzerinde inhibisyon etkisinin olmasına karşın Amikasin Sülfat, Tramadol HCl etken maddeleri hbCA II üzerinde inhibisyon göstermiştir. Bu da her enzimin kendine has bir kinetiği olduğu ve inhibitörlerin her bir enzim de farklı etkileri olduğunu göstermektedir.

2017, 52 sayfa**Anahtar Kelimeler:** Afinite kromatografisi, Kan, Karbonik anhidraz

ABSTRACT

Master Thesis

**THE EFFECTS OF SOME MEDICINE ON THE CARBONIC ANHYDRASE
I AND II ENZYME (IN IN-VITRO CONDITIONS) WHICH WERE PURIFIED FROM
HUMAN BLOOD**

Reyhan ÖZKAN

Erzincan University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Murat ÇANKAYA

The carbonic anhydrase enzyme family reversibly catalyzes the carbondioxide hydration and bicarbonate dehydration reactions in the living body. Carbonic anhydrides contain Zn^{+2} ions in active sites. This enzyme family, which has vital importance for living things, consists of 16 different isoenzymes. In this study, purification of carbonic anhydrase I and II isoenzymes (HBcA I and HBcA II) from human blood by affinity chromatography. At the same time, on the purified HBcA I and II isoenzymes, the inhibitory effects of some of the active ingredients in humans on in vitro conditions were investigated for the first time. Based on the results obtained, HBcA I was 106.04 fold and HBcA II was 425.33 fold. Amikacin Sulfate, Methylprednisolone, Feniramidol HCl, Tramadol HCl all of the active ingredients had inhibitory effect on HBcA I, whereas Amikacin Sulfate, Tramadol HCl active substances had effect on HBcA II. This suggests that each enzyme has its own kinetics and inhibitors have different effects on each enzyme. In this study, human blood carbonic anhydrase I and II isoenzymes (hbcA I and hbcA II) were purified by affinity chromatography method. The inhibitor effect of the agent materials of some medicine that human use in daily life on CAI and II isoenzymes that we purified in in-vitro conditions has been investigated. At the end of inhibition studies deminhidrinat shows competitive inhibition.

2017, 52 pages**Keywords:** Affinity chromatography, Blood, Carbonic anhydrase

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum bu alıőmanın deneysel kısmı Erzincan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakóltesi Biyoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalıőmamda bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, tezimin her aőamasında her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen tez danıőmanım değerli hocam Sayın Doç. Dr. Murat ÇANKAYA'ya derin minnet ve őükranlarımı sunarım. Ayrıca, Biyoloji A.B.D. araştırma laboratuvarında deneysel ve teorik çalıőmalarımda yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Mehmet KUZUCU 'ya teőkükür ederim.

İimize ilim sevgisini iőleyip, imkânlarını sonuna kadar bu yolda bizler için harcayan, babam ve annem; Mustafa-Makbule Baydaő'a da minnetlerimi sunarım.

Ayrıca tez çalıőmam boyunca maddi manevi desteğini benden esirgemeyen sevgili eőim Prof. Dr. Engin ÖZKAN 'a sonsuz teőkükürler ederim.

Reyhan ÖZKAN

Ocak, 2017

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER LİSTESİ	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
TABLolar LİSTESİ.....	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Enzimler	1
1.1.1. Enzimlerin reaksiyon hızını etkileyen faktörler.....	3
1.1.1.1. Substrat konsantrasyonu.....	4
1.1.1.2. Enzim konsantrasyonu	6
1.1.1.3. Isı ve sıcaklık.....	7
1.1.1.4. pH.....	8
1.1.1.5. Zaman.....	8
1.1.1.6. Işık ve diğer fiziksel etkenler	9
1.1.1.7. İyonların doğası ve konsantrasyonu.....	9
1.1.1.8. Hormonlar ve diğer biyokimyasal maddeler.....	9
1.1.1.9. Reaksiyon ürünleri	9
1.1.2. Enzim inhibisyonu	10
1.1.2.1. Yarışmalı inhibisyon (kompetitif).....	10
1.1.2.2. Yarışmasız inhibisyon (nonkompetitif).....	11
1.1.2.3. Yarı yarışmalı inhibisyon (unkompetitif)	11
1.1.3. Afinite kromatografisi	13

1.2. Karbonik Anhidraz Enzimi	14
1.2.1. Karbonik anhidraz enziminin fizyolojik fonksiyonları	15
1.2.2. Karbonik anhidraz enziminin izomerleri	15
1.2.2.1. Karbonik anhidraz I (CA I)	17
1.2.2.2. Karbonik anhidraz II (CA II)	17
1.2.3. Karbonik anhidraz enziminin inhibitörleri	18
1.2.4. Karbonik anhidraz enziminin aktivitesinin tayin metodu	19
1.3. Deneyde Kullanılan İlaçlar ve Özellikleri	20
1.3.1. Tramadol HCl	20
1.3.2. Feniramidol HCl	21
1.3.3. Metilprednisolon.	21
1.3.4. Amikasin sülfat	22
2. MATERYAL ve YÖNTEM.....	23
2.1. Materyal	23
2.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler	23
2.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar	23
2.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması.....	24
2.2. Yöntem.....	27
2.2.1. Protein tayini	27
2.2.1.1. Kalitatif protein tayini	27
2.2.1.2. Bradford yöntemi ile protein tayini	27
2.2.2. Karbonik anhidraz aktivitesi tayini	28
2.2.3. Sepharose 4B-L-tirozin-sulfanilamid afinite jelinin sentezi	28
2.2.3.1. CNBr ile aktifleştirilmiş sepharose-4B'ye tirozin bağlanması... 29	
2.2.3.2. p-aminobenzen-sülfonamidin kenetlenmesi	29
2.2.4. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının kontrolü	30

2.2.5. İnsan kanından karbonik anhidrazi izoenziminin saflaştırılması.....	31
2.2.5.1. İnsan kanının temini ve hemolizat hazırlanması	31
2.2.5.2. Afinite kolonunun paketlenmesi.....	31
2.2.5.3. Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu.....	32
3. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	33
3.1. Araştırma Bulguları.....	33
3.1.1 Saflaştırma sonuçları.....	33
3.1.2. İnhibisyon çalışmaları sonuçları	34
3.2. Tartışma.....	41
4. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	45
KAYNAKLAR	47
ÖZGEÇMİŞ	52

SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
L	Litre
mL	Mililitre
rpm	Devir/Dakika
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
Kısaltmalar	Açıklama
AK	Afinite Kromatografisi
CA	Karbonik anhidraz enzimi
CARP	Protein bağlı karbonik anhidraz
E. C	Enzim kod numarası
E. U	Enzim ünitesi
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit
EI	Enzim inhibitör kompleksi
ESI	Enzim inhibitör substrat kompleksi
hbCA	İnsan kanı karbonik anhidraz enzimi
I	İnhibitör
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PER	Amonyum persülfat
S	Substrat
SDS	Sodyum dodesilsülfat
TCA	Triklor asetik asit
TEMED	N,N,N',N'-tetramet etilendiamin
Tris	Trihidroksimetilaminometan

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1.1. Enzim kofaktör bağlanma kompleksi	2
Şekil 1.2. V_{max} ve substrat konsatrasyon ile çizilen Michaelis-Menten grafiği	4
Şekil 1.3. $1/V'$ 'ye karşılık $1/S$ ile çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	6
Şekil 1.4. Enzimatik reaksiyonunun hızının konsantrasyon ile ilişkisi	7
Şekil 1.5. Sıcaklığın enzimlerin reaksiyonun hızına etkisi	8
Şekil 1.6. Enzim İnhibisyonu	12
Şekil 1.7. Enzim İnhibisyon grafikleri	12
Şekil 1.8. Spesifik kromatografik metod olan afinitenin basamakları	14
Şekil 1.9. Tramadol HCl kimyasalının moleküler yapısı	20
Şekil 1.10. Feniramidol HCl kimyasalının moleküler yapısı	21
Şekil 1.11. Metilprednisolon kimyasalının moleküler yapısı	21
Şekil 1.12. Amikasin sülfat kimyasalının moleküler yapısı.....	22
Şekil 3.1. Saflaştırılmış hbCA I ve II izoenzimlerinin SDS-PAGE fotoğrafı, standard Proteinler	34
Şekil 3.2. Tramadol HCl'in hbCA I izoenzimine karşı IC_{50} grafiği.....	35
Şekil 3.3. Feniramidol HCl hbCA I izoenzimine karşı IC_{50} grafiği.....	35
Şekil 3.4. Amikasin Sülfat hbCA I izoenzimine karşı IC_{50} grafiği.....	36
Şekil 3.5. Metilprednisolon hbCA I izoenzimine karşı IC_{50} grafiği	36
Şekil 3.6. Amikasin Sülfat hbCA II izoenzimine karşı IC_{50} grafiği.....	37
Şekil 3.7. Tramadol HCl'in hbCA II izoenzimine karşı IC_{50} grafiği	37
Şekil 3.8. Tramadol HCl hbCA I izoenzimine karşı K_i grafiği	38
Şekil 3.9. Feniramidol HCl hbCA I izoenzimine karşı K_i grafiği.....	38
Şekil 3.10. Amikasin Sülfat hbCA I izoenzimine karşı K_i grafiği.....	39

Şekil 3.11. Metilprednisolon hbCA I izoenzimine karşı K_i grafiği	39
Şekil 3.12. Amikasin sülfat hbCA II izoenzimine karşı K_i grafiği.....	40
Şekil 3.13. Tramadol HCl hbCA II izoenzimine karşı K_i grafiği	40

TABLÖLAR LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 3.1. hbCA I ve II izo enzimlerinin insan kanından Sepharose 4B-L-tirozin-sulfanilamid afinite kolon materyali ile saflaştırılma basamakları	33
Tablo 3.2. Denemesi yapılan etken maddelerin IC ₅₀ değerleri	37
Tablo 3.3. Denemesi yapılan etken maddelerin K _i değerleri	41

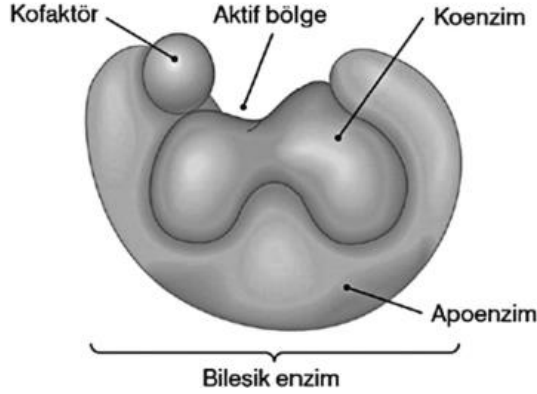
1. GİRİŞ

1.1. Enzimler

Enzimler, canlı hücreler tarafından sentezlenen ve canlı metabolizmasındaki başlamış kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve herhangi bir yan ürün oluşturmadan %100 ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Ribozimlerin (katalitik RNA molekülleri) küçük bir grubu hariç olmak üzere, bütün enzimler protein yapısındadır. Canlılarda bulunan proteinlerin en büyük ve özelleşmiş grubunu teşkil ederler (Keha ve Küfrevioğlu, 2015).

Enzimlerin katalizlediği tepkimelere katılan kimyasal moleküllere substrat adı verilir. Enzimler spesifik oluşları ve düşük konsantrasyonlarda dahi substrat reaksiyonlarını katalizlemelerinden dolayı sanayide, gıda ve kimya endüstrisinde, tıp, eczacılık, ziraat gibi alanlarda çeşitli amaçlarla kullanılmaktadırlar.

Enzimlerin büyük bir kısmının etki gösterebilmesi için protein yapılı olmayan bir kofaktöre gereksinimi vardır. Kofaktör, koenzim adı verilen organik bir bileşik veya metal iyonlu olabilir. Kofaktörü ile beraber bulunan enzimlere holoenzim, holoenzimin kofaktörsüz protein kısmına ise apoenzim denir (Şekil 1.1). Kofaktör gerektiren enzimlerde; uygun kofaktör yoksa apoenzimin biyolojik aktivitesi yoktur (İnan 2001). Bazı enzim-kofaktör bağlanmaları kovalent yapıdadır veya diyalizle uzaklaştırılmayacak kadar sıkı bağlanmıştır. Bu şekilde bağlanan kofaktörler “prostetik grup” olarak isimlendirilir (Harper 1975). Kofaktör olarak metal iyonu bulunduran enzimlere de metaloenzim adı verilir. Enzimin yapısına katılan metal iyonları ya asit-baz katalizi, ya kovalent kataliz yapar, yada enzimin konformasyonunda değişiklik yaparak substratın bağlanmasını kolaylaştırır (İnan 2001).



Şekil 1.1. Enzim kofaktör bağlanma kompleksi

Enzimler diğer kimyasal katalizörlerden birçok açıdan farklıdır. Her şeyden önce katalitik etkinlikleri kimyasal katalizörlerden kat kat daha fazladır. Biyolojik katalizör olarak bir enzimin fonksiyonu, kimyasal tepkimeyi başlatmak değil başlamış tepkimenin aktivasyon enerjisini düşürmek suretiyle bir reaksiyonun hızını artırmaktır (Tüzün, 1997).

Enzimlerin katalitik aktiviteleri, doğal protein konformasyonunun sağlamlığına bağlıdır. Enzim denatüre olursa veya alt birimlerine ayrılırsa katalitik aktivitesi genellikle yok olur (Lehninger, 2011).

Enzimlerin katalizleme güçleri “turnover sayısı” adı verilen bir değerle ifade edilir ve birim zamanda bir mol enzimin ürüne dönüştürdüğü substratın mol sayısı demektir.

Enzimlerin adlandırılmasını, uluslararası enzim komisyonu katalizledikleri reaksiyon tipleri ve reaksiyon mekanizmalarına göre bir sınıflandırılmaya tabi tutularak yapmıştır. Örneğin E.C.2.7.1.2. kod birinci numara sınıfını, 2. numara alt sınıfını, 3. numara grubunu, 4. numara da kendine özgü sıra numarasını verir.

Biyolojik katalizörler olarak adlandırılan enzimler katalizledikleri reaksiyon tiplerine ve mekanizmalarına göre 6 sınıfta incelenmiştir;

1.Oksiredüktazlar: 2 substrat arasında yükseltgenme indirgenme reaksiyonlarını yani redoks reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.

2.Transferazlar: İki substrat arasında bir fonksiyonel grubun bir bileşikten diğerine transferini katalizleyen enzimlerdir.

3.Hidrolazlar: Kimyasal tepkimede büyük moleküllerin yıkılması için kimyasal bağa su eklemek yoluyla hidrolizini katalizleyen enzimlerdir.

4.Liyazlar: Substratlara hidrolitik olmayan yolla grupların eklenmesi veya grupların uzaklaştırılıp, çift bağların oluşturulduğu reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir.

5.İzomerazlar: Geometrik, optik veya yapısal izomerlerin birbirine dönüştürülmesini yani molekül içi değişiklikleri katalizleyen enzimlerdir.

6.Ligazlar: ATP ve GTP gibi yüksek enerjili fosfat bileşiklerinin parçalanmasıyla ortaya çıkan enerji yardımıyla eş zamanlı olarak iki molekülün bağlanması reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir (Lehninger 2011; Keha ve Küfrevioğlu, 2015).

1.1.1. Enzimlerin reaksiyon hızını etkileyen faktörler

Enzimlerin canlı organizmada birçok reaksiyonu katalizlemektedirler. Bu katalizlemeyi etkileyen çok sayıda faktör vardır. Bu faktörlerden bazıları aşağıdaki gibidir;

1- Substrat konsantrasyonu

2- Enzim konsantrasyonu

3-pH

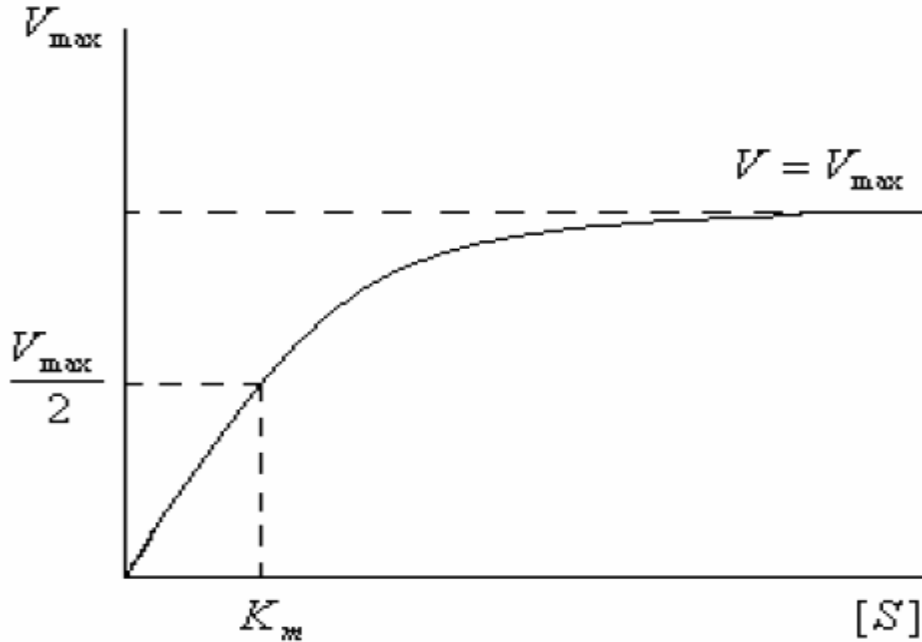
4-Isı veya sıcaklık

5-Zaman

- 6-Işık ve diğer fiziksel faktörler
- 7-İyonların doğası ve konsantrasyonu
- 8-Hormonlar ve diğer biyokimyasal faktörler
- 9-Reaksiyon ürünleri

1.1.1.1. Substrat konsantrasyonu

Enzim, substratı ürüne dönüştürürken önce onunla bir "Enzim-Substrat kompleksi" oluşturur, daha sonra da bu kompleks ürün ve enzime dönüşür. Enzim reaksiyonları üzerinde ilk geniş kinetik çalışmalar 1913 yılında Michaelis-Menten tarafından yapılmıştır. Michaelis-Menten kinetiğine göre belli bir enzim konsantrasyonu ve nispeten düşük substrat konsantrasyonu için, reaksiyon hızı substrat konsantrasyonu ile doğrusal orantılı olarak artar; substrat konsantrasyonunun artırılması, enzim ve substrat moleküllerinin birbirine rastlama hızının artması demektir. Sonuçta hiperbolik bir fonksiyon ve eğri elde edilir (Şekil 1.2). Bu fonksiyonun çözümü ile Michaelis-Menten bağıntısı bulunur.



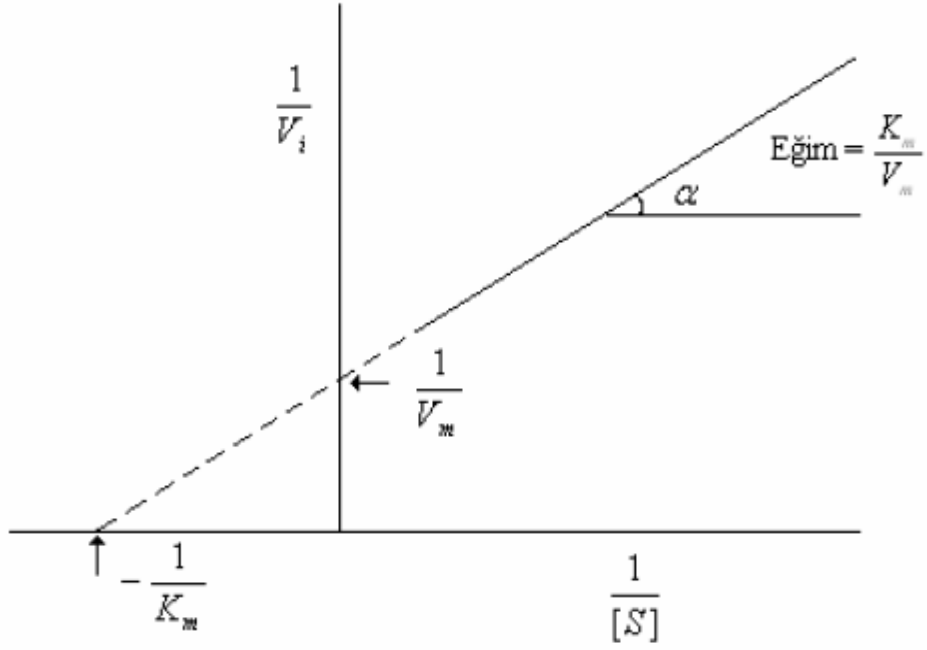
Şekil 1.2. V_{max} ve substrat konsantrasyonu ile çizilen Michaelis-Menten grafiği

$$V = \frac{V_m \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (\text{Michaelis-Menten Bağıntısı})$$

V_{\max} : hiperbol asimtodunun y eksenini kestiği noktayı gösterir ve maksimum hız olarak ifade edilir. Grafikte maksimum hızın yansına ($V_{\max}/2$) karşılık gelen substrat derişimi K_m (Michaelis-Menten sabiti) değeri olarak belirtilir. Bir enzimin aktivitesi V_{\max} ve K_m gibi önemli enzim sabitleriyle belirlenir. Michaelis-Menten grafiği ile bir hiperbol elde edildiğinden, uygulamalarda kolaylık sağlamak amacı ile bunun bir doğru denklemi haline getirilmesi gerekmektedir. Eksen ölçekleri uygun şekilde değiştirilerek, hiperbol değişik yollardan doğru denklemine dönüştürülmüştür. Bu denklemlerden en çok tercih edileni Lineweaver-Burk denklemdir (Lineweaver ve Burk, 1934).

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (\text{Lineweaver-Burk denklemi})$$

Bu denkleme göre ordinatı $1/V_{\max}$, apsisti $1/[S]$ değerlerini almak üzere bir doğru elde edilir. Oluşan doğrunun eğimi ise K_m/V_{\max} tır (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. $1/V$ 'ye karşılık $1/S$ ile çizilen Lineweaver-Burk grafiği

1.1.1.2. Enzim konsantrasyonu

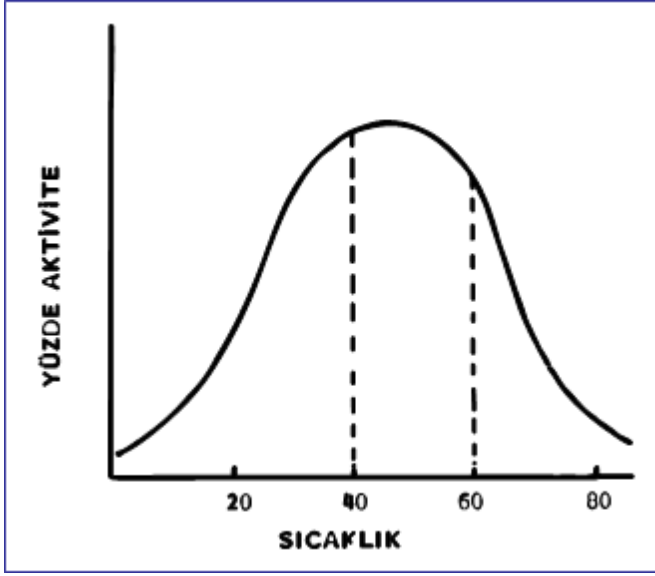
Substratın çok bol olduğu optimal şartlarda ki bir ortamda enzimatik bir reaksiyonun ölçülen ilk hızı, enzim konsantrasyonu ile doğru orantılı olacaktır (Şekil 1.4) (Kalaycıoğlu vd., 2010).



Şekil 1.4. Enzimatik reaksiyonunun hızının konsantrasyon ile ilişkisi

1.1.1.3. Isı ve sıcaklık

Sıcaklık, enzimlerin hem hızını hem de stabilitesini etkileyen önemli bir faktördür. Sıcaklık artışıyla enzimatik reaksiyonun hızındaki artış, belli bir değere kadar devam eder; yüksek sıcaklıklarda enzim denatüre olarak aktivitesini kaybeder ve reaksiyon hızı azalır. Enzimatik reaksiyonun hızının maksimuma ulaştığı sıcaklık derecesine *optimum sıcaklık* denir (Tüzün, 1997) (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. Sıcaklığın enzimlerin reaksiyonun hızına etkisi

1.1.1.4. pH

Her reaksiyonun gerçekleşebilmesi ortamın pH'ını belirleyen $[H^+]$ ve $[OH^-]$ iyonları konsantrasyonuna bağlıdır. pH eğrileri çan şeklindedir ve enzim hızı pH'ın her iki yanında da giderek azalmaktadır. Her enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH değerine enzimin *optimum pH değeri* denir.

1.1.1.5. Zaman

Reaksiyon ürünlerinin kendi aralarında birleşerek aksi yönde bir reaksiyon meydana getirmeleri, enzimin zaman içinde inaktive olması, tepkimenin gerçekleşmesini önleyen maddelerin oluşması, substratın tükenmesi gibi sebeplerle bir reaksiyonun hızı zamanla azalır.

1.1.1.6. Işık ve diğer fiziksel etkenler

Işık, bazı enzimlerin aktivitesini artırırken bazı enzimlerin aktivitesini azaltır. Enzim çözeltilerinin kuvvetli çalkalanması da enzimi denatüre etmektedir.

1.1.1.7. İyonların doğası ve konsantrasyonu

Metal iyonları enzimatik katalizde farklı mekanizmalarla rol alır. Metaloenzimlerde kofaktör olarak bulunan metal iyonları, tepkimeye doğrudan katılırlar. Bir metal iyonu, enzimde biçimsel bir değişiklik yapar; aktif olan tersiyer veya kuarterner yapıyı sürdürmede görev alır. Bir enzim için esas substrat, metal-substrat kompleksi olabilir; enzim de ancak bu komplekse bağlanabilir. Başka bir enzim için ise, enzim-metal kompleksi oluşuktan sonra bu kompleks substrata bağlanabilir ve oluşan kompleks üzerinden ürün oluşur. Bir metal, ürün ile kompleks yaparak ürünün tekrar substrata dönüşümünü engeller bu şekilde reaksiyonu hızlandırabilir

1.1.1.8. Hormonlar ve diğer biyokimyasal maddeler

Hormonlar, amino asitler ve diğer maddeler enzimlerin gerçekleştirdiği tepkimenin hızını etkileyebilirler. Örneğin, glutamat dehidrojenaz enzimi gevşek olarak bağlanmış 4 alt üiteden oluşmaktadır. Bu alt üiteler ayrışarak enzimin aktivitesinin kaybolmasına neden olabilirler. Enzim yapısındaki bu değişme çeşitli hormonlar tarafından meydana getirilebilir. Bu durum esansiyel aminoasitle, ADP, L-lösin, L-metiyonin ve L-izolösin tarafından geri çevrilebilir.

1.1.1.9. Reaksiyon ürünleri

Bir reaksiyon da ürünler oluştuğça enzimatik reaksiyonun hızı azalır. Çünkü enzimatik reaksiyonlar geri dönüşümlüdür; reaksiyon ürünleri kendi aralarında birleşerek aksi yönde bir reaksiyon meydana getirirler: $A \leftrightarrow B + C$ reaksiyonu, ancak

B ve C oluşur oluşmaz ortamdan uzaklaştırılırlarsa hep soldan sağa yürür. Reaksiyon ürünlerinden bir kısmı substrat ile yapısal benzerlik gösterir ve enzimle birleşerek onun aktivitesini azaltabilir.

1.1.2. Enzim inhibisyonu

Enzimlerin hem hücre içi hem de hücre dışı aktivitelerinin enzime bağlanan bazı bileşikler tarafından azaltılması hatta yok edilmesi olayına “inhibisyon” adı verilir. İnhibisyona sebep olan bileşiklere “inhibitör” denilir. Bunlar genellikle küçük molekül kütlesine sahip bileşikler veya iyonlardır. Bu şekilde enzimatik aktivitenin inhibisyonu, biyolojik sistemlerde başlı başına bir kontrol mekanizması oluşturduğundan, önemli bir olaydır. Birçok ilaçlar ve zehirli bileşiklerde etkilerini bu yolla gösterir. İnhibitörler hem enzim etki mekanizmalarının, hem de metabolik yolların aydınlatılmasında önemlidir (Keha ve Küfrevioğlu, 2015).

Enzim inhibisyonu, dönüşümsüz (irreversible) inhibisyon ve dönüşümlü (reversible) inhibisyon olmak üzere iki grupta incelenir. Dönüşümsüz inhibisyonda inhibitör enzime ya kovalent olarak yada zor ayrılacak bir kompleks oluşturacak şekilde bağlanır. Bu yüzden dönüşümsüz inhibitörlere “enzim inaktivatörleri”de denir (İnan ve Gül, 2001). Dönüşümsüz inhibisyonda V_{max} azalır, K_m ise değişmeden kalır. Dönüşümlü inhibisyonda, enzimle inhibitör etkileşmesi bir denge reaksiyonu şeklindedir.

Dönüşümlü inhibisyon üç gruba ayrılarak incelenir (Şekil 1.6, Şekil 1.7).

1.1.2.1. Yarışmalı inhibisyon (Kompetitif)

Dönüşümlü inhibisyonun en basit tipi olan yarışmalı (kompetitif) inhibisyon da substrat ve inhibitör enzime aynı zamanda bağlanamaz. Yarışmalı inhibitör; yapı itibariyle substrata benzediği için enzimin aktif bölgesine bağlanır. Böylece substratın enzime bağlanması önlenmiş olur. Fakat substrat konsantrasyonunu

artırmakla inhibisyon etkisi kaldırılabilir. Yarışmalı inhibitör enzimin V_{max} değerini değiştirmezken, belli bir substrat için belirlenmiş K_m 'i (Michaelis sabiti) yükseltir. Yani, yarışmalı bir inhibitör varlığında $\frac{1}{2} V_{max}$ 'a erişmek için daha fazla substrat gerekir (Supuran ve Scozzafava, 2003; Sly ve Hu, 1995).

1.1.2.2. Yarışmasız inhibisyon (Nonkompetitif)

Dönüşümlü bir tip olan yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyonda inhibitör ve substrat, enzim moleküllerine aynı anda bağlanabilir. Dolayısıyla bağlanma enzimin aynı bölgesinde değildir. Yarışmasız bir inhibitör etkisini, enzimin turnover sayısını, yani katalitik aktivitesini düşürerek gösterir. Burada substrat ve inhibitör arasında yarışma söz konusu değildir. Substrat konsantrasyonunu artırmakla inhibisyon kaldırılmaz. Enzimin V_{max} değeri azalırken, K_m sabit kalır. Substrat ve inhibitör farklı bölgelere bağlanabildiğinden, enzimin iki farklı inaktif kompleksi meydana gelir.

1.1.2.3. Yarı yarışmalı inhibisyon (Unkompetitif)

Yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyon çeşidinde, inhibitör serbest enzime bağlanamaz, ES kompleksine bağlanır. Birden fazla substratlı enzimlerde bu inhibisyon tipine daha sık rastlanır. Yarı yarışmalı inhibitor varlığında substrat konsantrasyonunun yükseltilmesi ile inhibisyon artabilir. Yarı yarışmalı inhibitör varlığında V_{max} ve K_m değeri azalır (Keha ve Küfrevioğlu, 2015).

Enzim İnhibisyonu (Mekanizma)

	Kompetitif	Non-kompetitif	Unkompetitif
	<p>Substrat Aktif bölge için yarışır inhibitör</p>	<p>Farklı bağlanma bölgesi</p>	
	$E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P$ $+ I$ $\downarrow \uparrow$ E/I	$E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P$ $+ I$ $\downarrow \uparrow$ $E/I + S \rightarrow E/IS$	$E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P$ $+ I$ $\downarrow \uparrow$ E/IS
	[I] sadece serbest [E]'e bağlanır ve [S] ile yarışır; [S]'i arttırmak [I] etkisini engeller.	[I] serbest [E] ya da [ES] Kompleksine bağlanabilir; [S]'i arttırmak etkiyi kaldırmaz.	[I] sadece [ES] kompleksine bağlanır, [S]'i arttırmak [I] etkisini artırır.

Juang RH (2004) BCbasics

Şekil 1.6. Enzim inhibisyonu

	Competitive	Non-competitive	Uncompetitive
Direct Plots	<p>v_o vs $[S]$, mM</p>	<p>v_o vs $[S]$, mM</p>	<p>v_o vs $[S]$, mM</p>
	V_{max} unchanged K_m increased	V_{max} decreased K_m unchanged	Both V_{max} & K_m decreased
Double Reciprocal	<p>Intersect at Y axis</p>	<p>Intersect at X axis</p>	<p>Two parallel lines</p>

Şekil 1.7. Enzim inhibisyon grafikleri

1.1.3. Afinite Kromatografisi

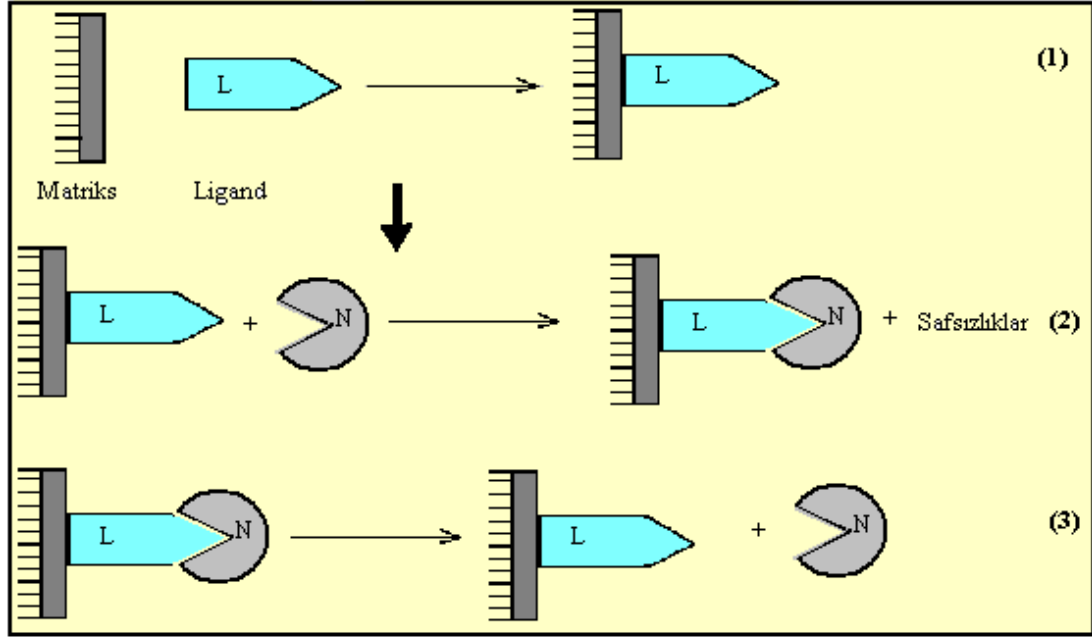
Enzim inhibisyonu gibi konuları ele alan çalışmalarda enzim saflığı çok önemlidir. Enzim saflaştırılmasının amacı, özgül bir enzimi diğer birçok yapı taşıyı içeren ham bir hücre özütünden ayırmaktır. Bir enzimin saf bir şekilde hücreden veya dokudan izolasyonu oldukça zordur. Buna rağmen birçok enzim saf olarak elde edilmiştir. 1000'in üzerinde enzim kısmen saflaştırılmış ve 200'den fazlası ise kristal olarak elde edilmiştir. Proteinlerden globüler proteinler suda ve sulu tuz çözeltilerinde çözünürler bu özelliklerinden yararlanarak saflaştırma işlemleri yapılmaktadır.

Globüler proteinlerin saflaştırma işleminde kullanılan özellikleri ise şunlardır:

- Molekül büyüklüğü
- Çözünürlük farkı esasına dayanılarak proteinlerin ayrılması
- Elektriksel yük esasına dayanılarak proteinlerin ayrılması
- Seçimli adsorbsiyon esasına dayanılarak proteinlerin ayrılması
- Spesifik ligandları esasına dayanılarak proteinlerin ayrılması (Bkz. Şekil 1.8)
(Afinite kromatografisi)

Karbonik anhidraz enzimi için, bu saflaştırma yöntemlerinden en uygun, en doğru sonucu veren afinite kromatografisi (spesifik ligandları esasına dayanılarak proteinlerin ayrılma yöntemi) yöntemidir ve bu yöntemle karbonik anhidraz enzimini saflaştırılarak karakterizasyon incelenmesi yapılabilmektedir. Bu yöntemde; ligand, enzime çok spesifik olduğundan enzime kolayca bağlanır. Safsızlıklar ise kolon materyaline tutunamadıklarından kolonun akış yönünde ilerleyerek uzaklaşırlar ve enzim kolonda kalır. Kolonda kalan enzim, uygun tamponlarla elde edilir. (Dikmen

ve Özgünen, 2004). Bu yöntem sayesinde çok yorucu, zor ve bazı hallerde imkânsız olan birçok ayırma ve saflaştırma işlemi kısa zamanda gerçekleştirilebilir ve yüksek verimde binlerce kez saflaştırılmış bileşikler elde edilebilir.



Şekil 1.8. Spesifik kromatografik metod olan afinitenin basamakları (Arslan, 1994).

1.2. Karbonik Anhidraz Enzimi

Karbonik anhidrazlar (CA, Karbonat Hidroliyaz, EC 4.2.1.1) tüm canlı gruplarında bulunan, dağılımı geniş ve birbirinden bağımsız dört gen ailesi tarafından kodlanan çinko (Zn^{2+}) içeren metaloenzimlerdir. Omurgalılar, bakteriler, algler ve yeşil bitkilerin sitoplazmasında, bakteriler, algler ve tek ve çift çenekli bitkilerin kloroplastlarında, Archea ve bazı bakterilerde ve deniz diatomlarında bulunan farklı üç boyutlu yapılara sahip (α, β, γ ve δ CA'lar gibi) CA'lar olarak sınıflandırılmaktadırlar. Memelilerde doku dağılımı ve subselüler lokalizasyonu oldukça farklı olan onaltı ayrı α -CA izoenzimi ve CA benzeri protein (CARP) bulunmaktadır. CA, ilk defa, memelilerin eritrositlerinden 1933 yılında saflaştırılmıştır.

1.2.1. Karbonik anhidraz enziminin fizyolojik fonksiyonları

Metabolizma için CO_2 ve HCO_3^- 'in birbirlerine dönüşümleri çok önemlidir. CO_2 hücre içine ve hücre dışına çok kolay geçebilmesine rağmen HCO_3^- lipitlerde az çözüldüğü için hücre membranından geçemez. İşte bu yüzden gerekli durumlarda bikarbonatın hücre içine geçmesi ve karbondioksitin hücre içerisinde tutulabilmesi için bu reaksiyon gerçekleşmektedir. Fizyolojik pH'da bu olay kendi kendine gerçekleşmez ve çok uzun zaman alır. CA bu tepkimeyi enzimatik olarak katalizleyerek çok hızlı bir şekilde gerçekleşmesini sağlar (Keha ve Küfrevioğlu, 2015; Smith ve Ferry, 2000).

CA'nın hayvan, bitki ve bakterilerde iyon değişimi, asit-baz dengesi, elektrolit sekresyonu, üre döngüsü ve glukoneojenez gibi metabolik yollar için öncül maddelerin sentezlenmesi gibi fizyolojik ve metabolik olaylarda rolü olduğu bulunmuştur (Sly ve Hu, 1995; Smith vd., 2000).

CA, hayvan metabolizmasında özellikle eritrositler olmak üzere birçok dokuda pH düzenleyicisi olarak görev yapar (Parui vd., 1991). CA'nın bitkilerde de kloroplastik pH'ların düzenlenmesinde rol oynadığı ve değişken durumlardaki pH değişimlerinden oluşabilecek denatürasyonlardan koruduğu bildirilmiştir (Reed ve Graham, 1981). Karbamoil fosfat sentetaz-I ve piruvat karboksilaz enzimlerine sıralı olarak bikarbonat iyonu sağlamasından dolayı, üre devri ve glukoneojenezde rol oynadığı düşünülmektedir. CA'nın ayrıca lipojeniz olayında da rol oynadığı tespit edilmiştir.

1.2.2. Karbonik anhidraz enziminin izoenzimleri

Aynı canlı türünde aynı reaksiyonu katalizleyen ancak farklı kimyasal ve fiziksel özellikleri olan enzimlere *izoenzim* veya *izozim* denir. Enzimlerin izoenzimlerinin substratlarına, kofaktörlerine ve inhibitörlerine karşı ilgileri farklıdır. İzoenzimlerin başlıca özellikleri arasında amino asit sayısı ve sırasının farklı olması, izoelektrik pH

değerinin farklı olması, her bir alt ünitenin ayrı geninin olması ve elektroforetik hareketliliklerinin farklı olması sayılabilir. İzoenzimler farklı dokularda lokalize olabildiği gibi, bir hücrenin subsellüler fraksiyonlarında da yerleşebilirler (Keha ve Küfrevioğlu, 2015).

Hayvanlar aleminde karbonik anhidraz'ın 16 izoenzimi vardır. Bunların beş tanesi sitoplazmik (CA I, II, III, VII ve XIII), iki tanesi mitokondriyal (CA VA, VB), bir tanesi salgısal (CA VI), dört tanesi membrana bağlı (CA IV, IX, XII ve XIV), üç tanesi nonkatalitiktir (CA VIII, X, XI) (Tashian vd., 1983; Dodgson vd., 1991; Supuran, 2010). CA XV'in ise katalitik aktivitesinin düşük olduğu ve CA IV ile benzer özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir. CA VIII, IX ve XII izozimlerinin tümörojen olduğu belirlenmiştir. İnsanda farklı izoenzimlerin gen yapısı belirlenmiş ve bu izoenzimlerin hayati fonksiyonlarının doku ve organlara göre farklılık gösterdiği bulunmuştur.

CA I, CA II ve CA III kristallendirilmiş ve yapıları hakkında detaylı bilgilere ulaşılmıştır. Üç izoenzim de sitoplazmada çözünmüş halde bulunur. Molekül ağırlıkları 28000 dalton olup, 259 veya 260 amino asitten ibaret tek bir polipeptid zincir halindedir. Her bir enzim molekülünün aktif bölgesi, yaklaşık tetrahedral geometriye sahip, üç histidin imidazol halkası ve bir su molekülü ile koordine olmuş Zn^{2+} iyonu ihtiva etmektedir. Zn^{2+} iyonunun kataliz olayındaki fonksiyonu vazgeçilmez olup, uzaklaştırılmasıyla elde edilen apo-CA'lar tam manasıyla aktiveden yoksundurlar (Armstrong vd., 1966; Scher, 1984).

Karbonik anhidraz izoenzimlerinin izoelektrik pH'ları türden türe farklılık göstermekte ve aktivitesi ile bir korelasyona rastlanmamaktadır (Rickli vd., 1964). Amino asit bileşimleri yönünden benzerlik gösteren memeli, bakteri ve balık CA'ları ise bunlara nispeten daha yüksek seviyede siseitin taşırlar (Nyman, 1964).

1.2.2.1. Karbonik anhidraz I (CA I)

hbCA I, eritrositlerde hemoglobinden sonra en bol bulunan bir protein olup konsantrasyonu 12 mg hbCA I/(gram hemoglobin)'dir. İnsan eritrositlerinde hbCA II'den yaklaşık 6 kat daha bol bulunan, fakat aktivitesi hbCA II'nin %15'i kadar olan bir izoenzimidir ($K_{cat}=2.105^{s^{-1}}$). Sağlam yetişkin eritrositlerinde hbCA I total CA aktivitesinin yaklaşık %50 'sini oluşturmaktadır. hbCA I, Cl^- tarafından inhibisyonda hbCA II'den daha fazla ve sülfonilamid inhibitörlerinden de hbCA II'ye göre daha az etkilenir. hbCA I, kalın bağırsağın epitelyumunda, kornea epitelyumunda, lenste, ter bezlerinde ve adipoz dokuda bulunur. hbCA I insan fetal eritrositlerinde bulunmaz. Kırmızı kan hücrelerinde hemoglobinden sonra en bol bulunan protein olmasına rağmen hiçbir hematolojik anomaliler onun eksikliği sonucu ortaya çıkmaz. hbCA I izoenziminin fizyolojik önemi belli değildir. Diğer CA izoenzimlerinin ve başka mekanizmaların hbCA I eksikliğini telafi edebildiği tahmin edilmektedir (Wistrand vd., 1986).

1.2.2.2. Karbonik anhidraz II (CA II)

hbCA-II izoenzimi karbonik anhidrazın en çok çalışılan izoformudur. Bu izoenzimin turnover sayısı 25 °C de $10^6 s^{-1}$ olarak bulunmuştur. İnsan eritrosit hücrelerinden 8 saflaştırılan hbCA-II izoenzimi miktarı 2 mg/g hemoglobin olarak hesaplanmıştır ve bu değer hbCA-I'e kıyasla daha azdır. Göz lensi, kornea ve siliyer epitelyumda ise HCA-II ve HCA-IV izoenzimleri bol miktarda bulunmaktadır. Bu dokuda bulunan HCA-II izoenziminin önemi glaukoma hastalığı tedavisi için yapılan araştırmalar sonucu ortaya çıkarılmıştır (Renzi et al., 2000). Böbrek korteksinde ise membrana yapışık halde olan HCA-II izoenzimi ile Na^+ ve suyun geri emilimi sağlanmaktadır. HCA-II izoenzimi ile ilgili olarak CA-II eksikliği sendromu belirlenmiştir. Bunun da kemiklerin kireçlenmesi, böbrek taşı oluşumu ve beyinde kireçlenme ile ilgili olduğu

gösterilmiştir. Bu da HCA-II izoenziminin kemik, böbrek ve beyin dokuları için ne derece önemli olduğunu ortaya koymaktadır (Maren et al., 1997).

1.2.3. Karbonik Anhidraz Enziminin İnhibitörleri

Karbonik anhidraz enzimi dört farklı mekanizmayla inhibe edilmektedir:

1. Zn^{+2} iyonuna bağlı su/hidroksit iyonunun inhibitörle yer değiştirmesiyle Zn^{+2} 'yi tetrahedral geometrisine yönlendirmektedir. Bu duruma örnek olarak sülfanilamidlerin bağlanması verilebilir
2. Metal koordinasyon küresine inhibitörün eklenmesiyle Zn^{+2} iyonu trigonal-bipiramidal geometrisi oluşturmaktadır. Bu geometri oluşumu tiyosiyanatın bağlanmasıyla gözlenmektedir.
3. Zn^{+2} iyonuna su veya hidroksit iyonu bağlıyken inhibitörün Zn^{+2} ye tutunmasıyla inhibisyon gözlenmektedir. Bu şekil inhibisyon mekanizması en iyi fenollerde oluşmaktadır.
4. Aktivitör bağlanan bölgeye inhibitör bağlanmasıyla aktif bölge oyuğu tıkanır, kumarin ve lakosamid bağlama mekanizması bu şekilde oluşmaktadır (Supuran, 2010).

Karbonik anhidraz inhibitörleri, inorganik anyon ve katyonlar bir de organik inhibitörler olmak üzere iki sınıfta incelenmektedir. Çoğu tek değerli olan anyonlar CA enzimini inhibe ederler (Lindskog, 1997).

Yapılan çalışmalar, CA'nın en güçlü organik inhibitörünün aromatik ve heteroaromatik sülfonamidler olduğunu göstermektedir. Sülfonamidlerin kolaylıkla iyonik yapı kazanmaları en çarpıcı özelliklerinden biridir. Sülfonamidler esas itibarı

ile p-aminobenzensülfonamid (sülfanilamid) maddesinin türevidir. Bu sınıfa asetazolamid, metazolamid, klorozolamid, benzolamid, sülfanilamid ve etoksizolamid girer. Bu bileşikler farklı şekillerde CA'a etki ederler. Asetazolamid ve azid, CA'ın CO₂ hidrasyon aktivitesini inhibe ederler. Bu iki madde bilinen bütün memeli CA'ları inhibe eder. Sülfonamidler, süstitüe olmamış bir -SO₂NH₂ grubu veya bir -SO₂NH(OH) grubu içeren etkin inhibitörlerdir. Sülfonamid grubunun azot atomu aracılığıyla ilk olarak; enzimin aktif bölgesindeki metal iyonuna anyonlar şeklinde, (R-SO₂NH- veya R-SO₂N-OH-) iyonik olarak bağlanırlar. İkinci olarak da hidrofobik etkileşmelerle inhibitörün enzime bağlanması tamamlanmış olur. Sülfonamidlerin, CA'a güçlü bir şekilde bağlanması; bu iki etkinin toplamının bir sonucudur (Maren, 1987; Arslan, 2001). Süstitüe ya da alkil sülfonamidlerin enzime bağlanmasında; yalnızca hidrofobik etkileşmeler olduğu için, aromatik ve heteroaromatik yan grup taşıyanlara göre daha zayıf inhibitörlerdir. İnorganik anyonlar ise; yalnızca hidrofobik bağlanmadan dolayı, CA için sülfonamidler kadar güçlü inhibitörler değildir (Maren vd., 1983).

Glokom hastalığı tedavisi için CA enzimi üzerinde yapılan inhibisyon çalışmalarıyla, hastalıkların tedavi ve teşhisinde karbonik anhidraz inhibitörlerinin önemi ortaya çıkarılmıştır. Yapılan çalışmalarda, CA enziminin kataliz mekanizmalarının aydınlatılmasının yanı sıra, bu enzimin dokulara dağılımı ve bu dokulardaki hayati fonksiyonların anlaşılmasında etkili olmuştur. Farklı CA izoenzimlerinin aktivitelerinin temel işlevleri, yeni ilaçların ve tedavi araçlarının geliştirilmesine fırsat vermektedir (Winum *et al.*, 2004; Franchi *et al.*, 2003).

1.2.4. Karbonik anhidraz aktivitesi tayin metodları

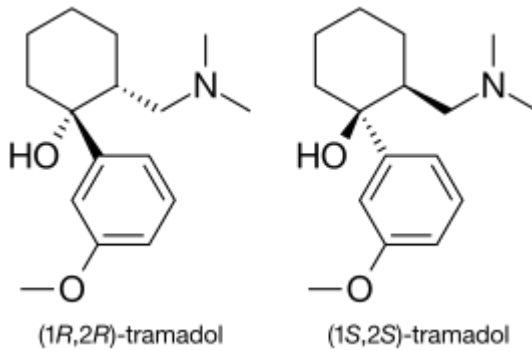
Enzimin CO₂'i hidrasyonu, bikarbonatın dehidrasyonu ve bazı esterleri hidrolizi gibi özelliklerinden yararlanılarak belirlenir. Ortamda CO₂ gazı çıkmakta veya harcanmaktadır. Aynı zamanda H⁺ konsantrasyonu artmakta veya azalmaktadır. Ortamdaki H⁺ konsantrasyonu; pH'nın yükselmesi veya düşmesi için geçen süre potansiyometrik yolla inhibitörle belirlenebilir.

Enzimin saflaştırma basamağında aktivite ölçümleri, genellikle bütün araştırmacılar tarafından Wilbur-Anderson metodu ile yapılmaktadır. Bu yöntemde; CO₂ hidratasyonunda pH'nın 8,2'den 6,3'e düşmesi için geçen süre, pH-stat metodu kullanılarak bulunmaktadı. Enzim birimi ise, enzimsiz CO₂-hidratasyon süresi (t₀) ile enzimli reaksiyon süresi (t_c) arasındaki farkın, t_c'ye bölünmesi ile belirlenmektedir. Buna göre enzim ünitesi, enzimsiz reaksiyon süresini yarıya düşüren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır. Enzimin esteraz aktivitesi ise, p-nitro fenil asetatın hidrolizi ile açığa çıkan p-nitro fenol miktarının 348 nm'de spektrofotometrik ölçümü ile tayin edilmektedir (Landolfi vd., 1998; Verpoorte vd., 1967)

1.3. Deneyde Kullanılan İlaçlar ve Özellikleri

1.3.1. Tramadol HCl

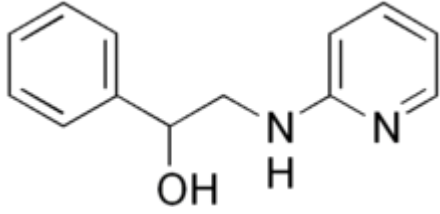
Bu ürün yeşil reçete ile verilmesi gereken ürünlerdendir. Orta veya şiddetli ağrıların tedavisinde etkilidir. Cerrahi operasyon sonrası, kırık ve yaralanmalara bağlı ağrılar ile non - narkotik analjeziklerin yetersiz kaldığı kanser ve diğer değişik kaynaklı ağrılarda kullanılan güçlü bir analjeziktir (Güneş, 2006).



Şekil 1.9. Tramadol HCl kimyasalının moleküler yapısı (Wikipedia, 2016)

1.3.2. Feniramidol HCl

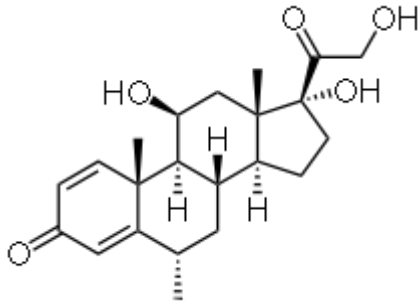
Miyorelaksan ve analjezik olarak olarak, çizgili kas ve hareket sisteminin diğer yapılarında akut ve kronik ağrıların tedavisinde endikedir. Bel ağrıları, lumbago, siyatik, disk rahatsızlıkları, medikomekanik veya siropratik, örneğin su altı masajları gibi diğer tedavileri destekleyici olarak kullanılır (Güneş, 2006).



Şekil 1.10. Feniramidol HCl kimyasalının moleküler yapısı (Wikipedia, 2016)

1.3.3. Metilprednisolon

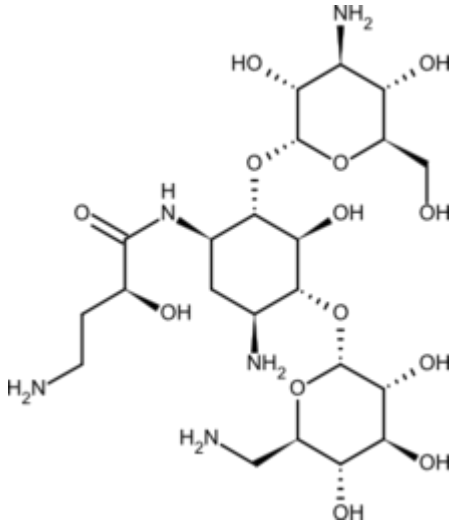
Romatizmal hastalıklar, kollajen doku hastalıklar, deri hastalıkları, göz hastalıkları, alerjik reaksiyonlar, solunum sistemi hastalıkları, hematolojik hastalıklar, sinir sistemi hastalıkları, sindirim sistemi hastalıkları, standart akut şok tedavisine yanıt vermeyen şoklarda kullanılır. Sistemik fungal enfeksiyonlar ve metilprednisolona aşırı duyarlılıkta kontrendikedir (Güneş, 2006).



Şekil 1.11. Metilprednisolon kimyasalının moleküler yapısı (Wikipedia, 2016)

1.3.4. Amikasin Sülfat

Duyarlı bakterilerin neden olduğu ciddi enfeksiyonların kısa süreli tedavisinde endikedir. Klinik çalışmalar, amikasinin septisemi (neonatal sepsis dahil), ciddi solunum yolu enfeksiyonları, kemik ve eklem, santral sinir sistemi (menenjit dahil), cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları, intraabdominal enfeksiyonlar (peritonit dahil), yanık ve postoperatif enfeksiyonlarda (post-vasküler cerrahi dahil), komplike ve tekrarlayan üriner sistem enfeksiyonlarında etkili olduğu gösterilmiştir. (Güneş, 2006).



Şekil 1.12. Amikasin Sülfat kimyasalının moleküler yapısı (Wikipedia, 2016)

2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmalarımızda kullanılan standart serum albümin, N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin (TEMED), diyaliz torbaları, siyanojen bromürle aktiveleştirilmiş Sepharose 4B ve L-trozin Sigma Chemical Comp.'den; sodyum hidroksit, trihidroksimetilaminometan (Tris), sodyum klorür, sodyum asetat, hidroklorik asit, glisin, fosforik asit, sodyum azotür, gliserin, potasyum fosfat, potasyum bisfosfat, potasyum asetat, potasyum klorür, etanol, metanol, asetik asit, sodyum asetat, izopropanol E.Merck AG'den; akrilamid, N,N'-metilen bisakrilamid, coomassie brillant blue G-250, brom timol mavisi, sodyum dodesil sülfat (SDS), agar, 1-naftilamin, amonyum persülfat, β -merkaptotanol; çalışmada kullanılan ilaçlar ise piyasadan temin edilmiştir.

2.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

Çalışmalar esnasında aşağıdaki alet ve cihazlardan faydalanılmıştır.

Soğutmalı santrifüj : Hettich UNIVERSAL 320

Spektrofotometre : TU- 1810 DASPC UV-VIS

pH metre : Radiometer meterlab PHM 210

Elektroforez tankı : BIO RAD (dikey)

Peristaltik pompa : Ismatec MCL

Karıştırıcı (Vorteks) : Heidolph Reaxtop 26

Hassas terazi : Gecavery (UK)

Otomatik pipet : Eppendorf

Çalkalayıcı : Midi Dual 14

Magnetik karıştırıcı : Heidolph

Saf su cihazı : Nüve

Kar makinesi : Scotsman AF-20

Güç kaynağı : 1-Bio Rad Power Pac 3000

Buzdolapları : Bosch

Derin dondurucu (-20 °C'ye kadar): Ariston

2.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

Çözelti hazırlamak amacıyla kullanılan su, saf ve deiyonize sudur. Ayrıca bazı çözeltilerde kullanılan su sterilize edilmiştir.

1. 0,2 M NaHCO_3 , pH=8,8 (Sepharose matrisleri üzerinde afinite jeli hazırlanırken kullanılan tampon): 16,8 g NaHCO_3 , 950 ml destile suda çözülerek, 1N NaOH ile pH=8,8'e titre edildikten sonra, toplam hacim destile su ile 1 litreye tamamlandı.

2. 25 mM Tris-HCl/0,1M Na_2SO_4 , pH=8,7 (afinite jelinin dengelenmesinde kullanılan tampon): 3,0275 g Tris ve 14,2 g Na_2SO_4 , 950 ml destile suda çözülerek 1 N HCl ile pH=8,7'ye getirildikten sonra destile su ile hacim 1 litreye tamamlandı.

3. 25 mM Tris-HCl/22 mM Na_2SO_4 , pH=8,7 (hemolizatın tatbikinden sonra afinite jelinin yıkanmasında kullanılan tampon) 3,0275 g Tris ve 3,124 g Na_2SO_4 , 950 ml destile suda çözülerek 1 N HCl ile pH=8,7'ye getirildikten sonra destile su ile hacim 1 litreye tamamlandı.

4. 0,1 M NaCH_3COO / 0,5 M NaClO_4 , pH= 5,6 (kolona tutunmuş CA-II enziminin elüsyonu için kullanılan tampon çözelti): 2,04 g $\text{NaCH}_3\text{COO} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ve 9,187 g

NaClO_4 120 ml destile su ile çözülerek, 1 N HCl ile pH = 5,6'ya getirildikten sonra destile su ile hacim 150 ml'ye tamamlandı.

5. %0,9'luk NaCl (Homojenatın yıkanması için kullanılan çözelti): 4,5 g NaCl alınıp hacmi saf su ile 500 ml'ye tamamlandı.

6. 0,05 M Tris- SO_4 , pH=7,4 (Esteraz aktivitesi ve diyalizde kullanılan tampon çözelti): 6,055 g Tris 950 ml destile su içerisinde çözülerek, 1 N H_2SO_4 ile pH'sı 7,4'e getirildikten sonra hacim destile su ile 1 litreye tamamlandı.

7. %0,02'lik NaN_3 çözeltisi (Afinite kolonunun bakterilerden korunması için kullanılan çözelti): 20 mg NaN_3 alınarak hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

8. SDS-PAGE'de kullanılan numune tamponu: 0,65 ml 1M Tris-HCl (pH=6,8) 1 ml %10'luk SDS ve 1 ml %100'lük gliserin, 1 ml %0,1'lik brom timol mavisi karıştırılarak, son hacim saf su ile 10 ml'ye tamamlanarak hazırlandı ve bu tamponu kullanmadan hemen önce, 950 μl numune tamponundan 50 μl olacak şekilde β -merkaptoetanol ilave edildi.

9. SDS-PAGE'de kullanılan yürütme tamponu: 1,5 g Tris ve 7,2 g glisin 50 ml suda çözüldü, daha sonra bunun üzerine 5 ml %10'luk SDS ilave edilerek toplam hacim saf su ile 500 ml'ye tamamlandı.

10. Boyama çözeltisi (elektroforez jelinin boyanması için kullanılan çözelti): 0,1 g Coomassie brilliant blue R-250, %50 metanol, %10 asetik asit ve %40 saf su olacak şekilde yeteri kadar hazırlandı.

11. Yıkama çözeltisi (elektroforez jelinin yıkanması için kullanılan çözelti): %50 metanol, %10 asetik asit ve %40 saf su olacak şekilde yeteri kadar hazırlandı.

12. Sabitleştirme çözeltisi (elektroforez jelindeki proteinlerin sabitleştirilmesi için kullanılan çözelti): %50 izopropanol, %10 TCA, %40 saf su olacak şekilde yeteri kadar hazırlandı.
13. Coomassie brilliant blue G-250, reaktifi (proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti): 100 mg coomassie brilliant blue G-250, 50 ml %95'lik etanolde çözüldü, bu çözeltiye %95'lik 100 ml fosforik asit ilave edilerek çözeltinin hacmi, saf su ile 1 litreye tamamlandı.
14. %0,04'lük brom timol mavisi çözeltisi (CO_2 -hidrataz aktivitesinde indikatör olarak kullanılan çözelti): 0,1 g indikatörün 16 ml 0,01 N NaOH içerisinde çözüldükten sonra hacminin saf suyla 250 ml'ye tamamlanmasıyla hazırlandı.
15. 1 M Tris-HCl pH=8,8: 12,1 g Tris 90 ml suda çözülüp 1 M HCl ile istenen pH'ya kadar titre edildi ve daha sonra saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.
16. 1 M Tris-HCl pH=6,8: 2,42 g Tris 5 ml suda çözülüp 1 M HCl ile istenen pH'ya kadar titre edildi ve daha sonra saf su ile 20 ml'ye tamamlandı.
17. %30'luk Akrilamid-%0,8 bisakrilamid çözeltisi: 6 g akrilamid, 0,16 g bisakrilamid alınıp 13,84 ml suda çözüldü.
18. %10'luk SDS çözeltisi: 0,5 g SDS alınıp 4,5 ml suda çözüldü.
19. Standart serum albumin çözeltisi (1 mg/ml; protein tayini için kullanılan çözelti): 25 mg standart serum albuminin 25 ml saf suda çözülmesiyle hazırlandı. (Kaplan, 2014)

2.2. Yöntem

2.2.1. Protein Tayini

2.2.1.1. Kalitatif protein tayini

Kalitatif protein tayini, 280 nm’de proteinlerin yapısında bulunan triptofan ve tirozinin maksimum absorbans göstermesi esasına dayanmaktadır (Segel, 1968). Bu metod yardımıyla kromatografi işlemlerinde fraksiyon toplayıcısı yardımıyla eşit hacimde alınan bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Fraksiyonlar kuvarz küvetlere alınarak, absorbansları spektrofotometrede okundu.

2.2.1.2. Bradford yöntemi ile protein tayini

Bir çözeltideki protein içeriğinin saptanması için boya-temelli hızlı ve güvenilir bir ölçümdür. Saflaştırılan enzim çözeltisi ve hemolizattaki protein miktarları bu yöntemle belirlendi. Bu yöntem de, asidik çözelti Comassie Brilliant Mavisı protein bağlandığında 595 nm’de maksimum absorbans gösterir. Bu ölçüm duyarlıdır ve 1.2 mg/ml altındaki protein düzeyleri ölçümü için tasarlanmıştır. Biüret tekniğinden daha düşük düzeyleri düzeyleri ölçer. 0.5 mg/ml altındaki protein düzeylerini elde etme tercih edilebilir. Bradford yöntemi Protein boya bağlanma prensibini kullanarak mikrogram miktarlarda protein tayini için hızlı duyarlı bir yöntemdir. (Bradford, 1976).

Tayin işlemlerinde şu prosedür takip edildi: 1 ml’sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albümin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µl alındı. Saf su ile tüm tüplerin hacmi 0,1 ml’ye tamamlandı ve 5 ml renklendirme reaktifi tüplere ilave edilip 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 renklendirme reaktifinden oluşan karışım kullanıldı ve absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri standart grafik haline getirildi. Protein

tayini yapılan numuneler için aynı yöntem uygulandı ve standart grafikten miktar tayini yapıldı.

2.2.2. Karbonik Anhidraz Aktivitesi Tayini

Bu tezde ki kinetik çalışmalarda karbonik anhidraz aktivitesi ölçümleri esteraz aktivitesi yöntemiyle yapıldı. Bu yöntem karbonik anhidrazın esteraz aktivitesine sahip olması esasına dayanmaktadır. Prensipte olarak karbonik anhidraz substrat olarak kullanılan p-nitrofenil asetatı p-nitrofenole hidroliz etmekte ve bu da 348 nm'de absorpsiyon vermektedir ($\epsilon_{348} = 5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Verpoorte et al., 1967).

Tayin işlemlerinde şu prosedür uygulandı: Kuvartz küvetlere tamponlanmış enzim çözeltisi (0,05 M Tris-SO₄ pH=7,4 içinde) ve 1,5 ml substrat (+inhibitör) konulmasından 3 dakika sonra 25°C'da 348 nm'de absorbans değeri köre karşı okundu. Bu deneyde kullanılan p-nitrofenil asetat 2-3 saatlik hazırlandı. p-nitrofenil asetat 0,027 mg p-nitrofenil asetat tartılarak 2 ml aseton içinde çözüldü ve hızlıca karıştırılan 48 ml destile suya yavaş yavaş ilave edildi.

2.2.3. Sepharose 4B-L-tirozin-sulfanilamid Afinite Jelinin Sentezi

CA izoenzimlerinin 2. adımdaki saflaştırılması için, afinite jelinin organik sentezi yapılmıştır (Arslan, 1995). Matriks olarak kullanılan CNBr aktive edilmiş Sepharose-4B kullanılmıştır. Matriksle enzim arasındaki sterik engeli azaltmak amacı ile L-tirozin uzantı kolu, siyanojen bromür ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye bağlanmıştır. Bundan sonraki adım ise, ligandın (p-aminobenzen-sülfonamid) uzantı koluna bağlanmasıdır. Çalışma için sentezlenen afinite jelinin yapısı (Bkz. Şekil-3.1) gösterilmiştir.

Burada tirozin afinite jelinin uzantı kolunun, sulfanilamid ise enzimi spesifik olarak bağlayan kısmını oluşturmaktadır. Sulfanilamid karbonik anhidraz enziminin spesifik bir inhibitörü olup afinite jelinin yapısına girerek söz konusu enzimin yüksek oranda

saflaştırılmasında başarıyla kullanılmıştır. Afinite jeli aşağıdaki prosedüre göre hazırlanmıştır.

2.2.3.1. CNBr ile aktifleştirilmiş sepharose-4B'ye tirozin bağlanması

CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B Buchner hunisine alındı ve 4°C'de 250 mL NaHCO₃ (0.1 M, pH 10.0) tamponu ile yıkandı. Daha sonra 20 mL tamponun içerisine alınan CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B ile aynı tampon içerisinde 15 mg tirozin içeren çözeltisi ilave edilerek 90 dakika yavaş tempoda 4°C'de karıştırıldı. Bundan sonra süspansiyon 16 saat 4°C'de bekletildi. Bu sürenin bitiminde, yıkama suyu 280 nm dalga boyunda, absorbans vermeyinceye kadar destile su ile yıkandı. Böylece reaksiyona girmeyen tirozin tamamen uzaklaştırılmış oldu. Yıkama son olarak 100 mL 0.2 M NaHCO₃ (pH 8.80) tamponu ile tekrarlandı. Tirozinle modifiye edilen CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B aynı tamponun 40 mL si içine alındı (Arslan, 1995).

2.2.3.2. p-aminobenzensülfonamidin kenetlenmesi

25 mg p-aminobenzensülfonamidin 0°C civarında 10 mL 1M HCl içerisinde çözüldü. 75 mg NaNO₂ İhtiva eden 0°C'deki 5 mL çözelti, p-aminobenzensülfonamid çözeltisine damla damla katıldı. 10 dakika reaksiyondan sonra diazolanmış bulunan sülfanilamid 40 mL Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonuna ilave edildi. pH 9.5' a çıkarılarak sabit tutuldu ve 3 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Daha sonra 1 litre destile su ve 200 mL 0.05 M Tris-SO₄ (pH 7.5) tamponu ile yıkandı ve aynı tampon içerisinde muhafaza edildi (Clanis, 1990; Warburg ve Christian, 1941).

2.2.4. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının kontrolü

Enzim saflaştırıldıktan sonra %3-8 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) Laemmli metoduna göre yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi (Laemmli, 1970).

Bunun için elektroforez plakaları önce su ile sonra alkol ile iyice yıkandı. Her iki kenarında aralık oluşturu bir plaka ile düz bir plaka üst üste getirilerek kısıkaçlarla tutturuldu. Sabitleştirilen plakalar, içerisinde sızdırmayı önleyen sünger ihtiva eden jel hazırlama kabine konuldu. Önce ayırma jeli hazırlandı ve enjektörle plakaların arasına üst kesimde 5 cm kalıncaya kadar dolduruldu. İki saat jelin donması beklendi, ayırma jelinin katılaştığından emin olunduktan sonra yığıma jeli hazırlandı. Jelin üst kısmındaki boşluğa dolduruldu ve numune kuyucuklarının oluşması için tarak dikkatlice yerleştirildi. Yığıma jelinin katılaşması beklenirken ıslatılmış süzgeç kağıdı sistemin üzerine kapatıldı ve kuruması önendi. Yığıma jeli katılaştıktan sonra tarak dikkatlice çıkartılarak numune kuyuları belirlendi. Önce saf su, sonra da yürütme tamponuyla yıkandı ve jel plakalarla birlikte elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu dolduruldu. Enzim örnekleri yaklaşık 20 µg protein olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim 50 µl olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu katıldı. Üç dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi. Elektroforez tankı kapatılarak alt tarafından (+) anot, üst taraftan ise (-) katot yerleştirildi. Önce 80 voltta 20 dakika yürütüldü ve örnek ayırma jeline kadar gelip yığıldı. Sonra akım 100 volt'a çıkartılarak numunelerin jelin alt sınırına gelmesine kadar yürütüldü. Numunelerin takip edilmesi, numune tamponuna katılan brom timol mavisi yardımıyla yapıldı.

Yürütme işlemi bittikten sonra akım kesilerek plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı ve sabitleştirme çözeltilisine konuldu. Sabitleştirme çözeltilisinde 20 dakika bekletilen jel, çıkarılarak boyama çözeltilisine konuldu ve çalkalayıcı üzerinde 2 saat bekletildi. Jel boyandıktan sonra çıkarılarak yıkama çözeltilisine konuldu. Rengi

açılıp, protein bantları belirginleşene kadar çalkalayıcıda yıkanan jel çıkarılarak fotoğrafı çekildi.

Ayırma jeli şöyle hazırlandı: 5 ml 1 M Tris-HCl pH=8,8, 4,4 ml %30'luk akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,2 ml % 0,1'lik SDS, 0,13 ml % 5'lik TEMED (N,N, N',N'-Tetrametil etilen diamin) ve 3,13 ml saf su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine en son olarak 0,27 ml %5'lik PER [amonyum persülfat, (NH₄)₂S₂O₈] eklendi. Yığıma jeli şöyle hazırlandı: 0,41 ml 1 M Tris-HCl pH=6,8, 0,44 ml %30'luk Akrilamid-%0,8 bisakrilamid, 0,03 ml % 0,1'lik SDS, 0,03 ml % 5'lik TEMED ve 2, 45 ml saf su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine en son olarak 0,07 ml %5'lik PER eklendi (Güller, 2014).

2.2.5. İnsan kanından karbonik anhidraz izoenzimlerinin saflaştırılması

2.2.5.1. İnsan kanının temini ve hemolizat hazırlanması

Deneyde kullanılan insan kanı Erzincan devlet hastanesinden temin edildi. Doku örneği kan ve diğer kirlilikleri elimine etmek için % 0,9'luk NaCl çözeltisi ile üç defa yıkandı. Doku homojenatını hazırlamak için, ilk olarak doku küçük parçalara ayrıldı. Daha sonra, 3 ml/g olacak şekilde 5 mM KH₂PO₄ (pH=7,0) tampon çözeltisinin içinde +4°C'de homojenize edildi. Elde edilen homojenat süzgeç kâğıdı kullanılarak süzme işlemine tabi tutuldu. Bu işlemden sonra süspansiyon 60 dakika 13000 rpm'de 2 defa santrifüj edildi. Santrifüj sonrası çökelek atıldı, süpernatant bir sonraki saflaştırma basamağında kullanıldı.

2.2.5.2. Afinite kolonunun paketlenmesi

Hazırlanan jel dengeleme tamponu (Tris-HCl, pH=7,8) içine alınarak jel süspanse edildi ve su trombu kullanılarak vakum ile havası alındı Süspanse edilmiş jel, 1x10 cm'lik kapalı sistemden oluşan soğutmalı kolona paketlenildi. Jel çöktükten sonra peristaltik pompa yardımıyla dengeleme tamponu ile yıkandı. Kolonun dengelenmiş

olup olmadığı eluat ile tamponun 280 nm'de absorbanlarının ve pH'larının eşitlenmesinden anlaşıldı.

2.2.5.3. Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu

Katı Tris ile pH sı 8,7'ye ayarlanmış olan hemolizat kolona tatbik edildi ve kolon 400 ml 25 mM Tris-HCl/22 mM Na₂SO₄ (pH:8.7) çözeltisi ile yıkandı. Böylece karbonik anhidraz enzimi kolona tutunmuş ve diğer safsızlıklar uzaklaştırılmış oldu. Sonra 1M NaCl/25mM Na₂HPO₄ (pH:6,3) tamponu tatbik edilerek CA I enzimi; daha sonra 0,1 M NaCH₃COO/0,5 M NaClO₄ (pH:5.6) çözeltisi kolona tatbik edilip CA II enzimi elüe edildi. Fraksiyon toplayıcı yardımıyla elüatlar 5'er ml halinde tüplere alındı ve 280 nm'deki absorbanlarına bakıldı. Peristaltik pompa vasıtasıyla kolonun akış hızı 20 ml/saat'e ayarlandı (Kaplan, 2014).

3. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

3.1. Araştırma Bulguları

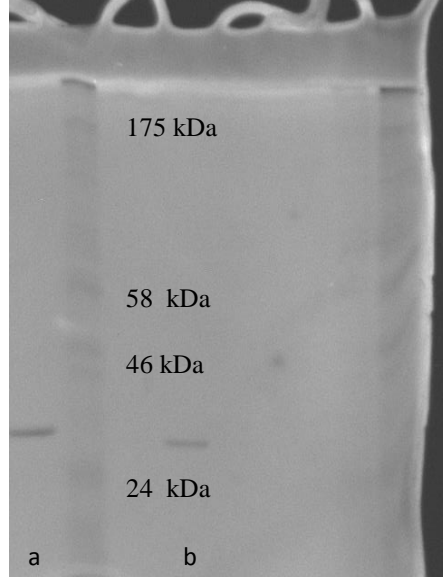
3.1.1. Saflaştırma sonuçları

Tez kapsamında yapılan çalışmalardan elde edilen veriler, bu bölümde çizelge ve şekiller ile gösterildi. Tablo 3.1’de, insan kanında hbCA I ve hbCA II izoenzimlerinin Sepharose 4B-L-tirozin-sulfanilamid afinite kolon materyali ile saflaştırılma basamaklarının sonuçlarını vermektedir.

Tablo 3.1. hbCA I ve II izo enzimlerinin İnsan kanınından Sepharose 4B-L-tirozin-sulfanilamid afinite kolon materyali ile saflaştırılma basamakları.

Numune türü	Aktivite (EÜ/ml)	Toplam hacim (ml)	Protein (mg/ml)	Toplam protein (mg)	Toplam aktivite	Spesifik aktivite (EÜ/mg)	% verim	Saflaştırma katsayısı
Hemolizat	157,00	39,50	19,01	750,90	6201,50	8,26	100	1,00
hbCA I	485,00	7,90	0,53	4,19	3831,50	915,09	58	106,04
hbCA II	624,00	5,35	0,17	0,91	3338,40	3670,59	51	425,33

Afinite kromatografisi yöntemiyle saflaştırılan enzim çözeltisinin SDS-PAGE sonuçları Şekil 3.1’ de verilmektedir.



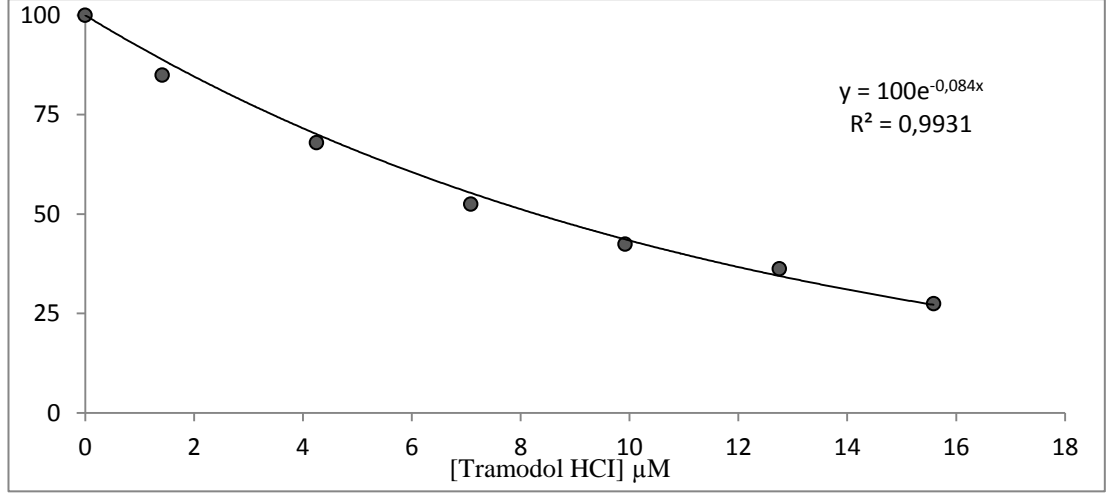
Şekil 3.1. Saflaştırılmış CA izoenzimlerinin SDS-PAGE fotoğrafı, standard proteinler, 1: maltose bağlayıcı protein – β - galactosidase (175 kDa); 2: kitin bağlayıcı domain (58 kDa); 3: CBD–Mkse Intein–2CBD (46 kDa), 4: soya tripsin inhibitörü (24 kDa). Kanal a: hbCA II, kanal b: hbCA I

3.1.2. İnhibisyon çalışmaları sonuçları

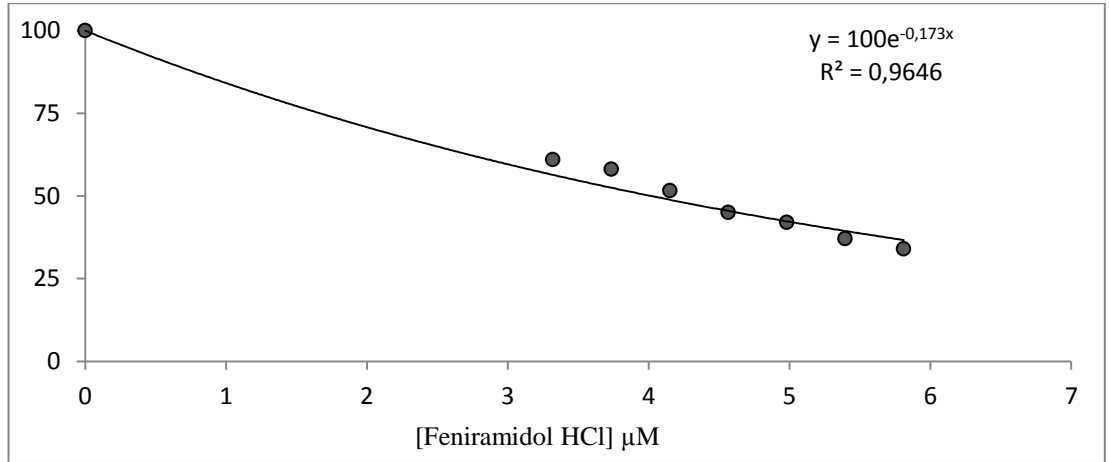
İnsan kanı karbonik anhidraz I ve II aktivitesi üzerine Amikasin Sülfat, Metilprednisolon, Feniramidol HCl, Tramadol HCl inhibisyon etkilerini belirlemek amacıyla bu bileşiklerin stok çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerden değişik konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanarak insan kanından saflaştırılan karbonik anhidraz I ve II izoenzimlerinin aktivitesi üzerine etkileri araştırıldı. Konsantrasyona karşı % aktivite (%aktivite-[I]) olarak oluşturulan grafikler Şekil 3.2-3.7’de gösterildi. Eğrilerin denkleminde IC_{50} değerleri hesaplandı (Bkz. Tablo 3.2).

Bu inhibitörlerin K_i değerlerini belirlemek amacıyla, dört sabit inhibitör konsantrasyonunda uygun 5 farklı substrat konsantrasyonu için elde edilen aktivite değerleri ile her bir inhibitör için Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Grafik denkleminde yarışmalı ve yarışmasız inhibisyon formüllerinden yararlanılarak K_i

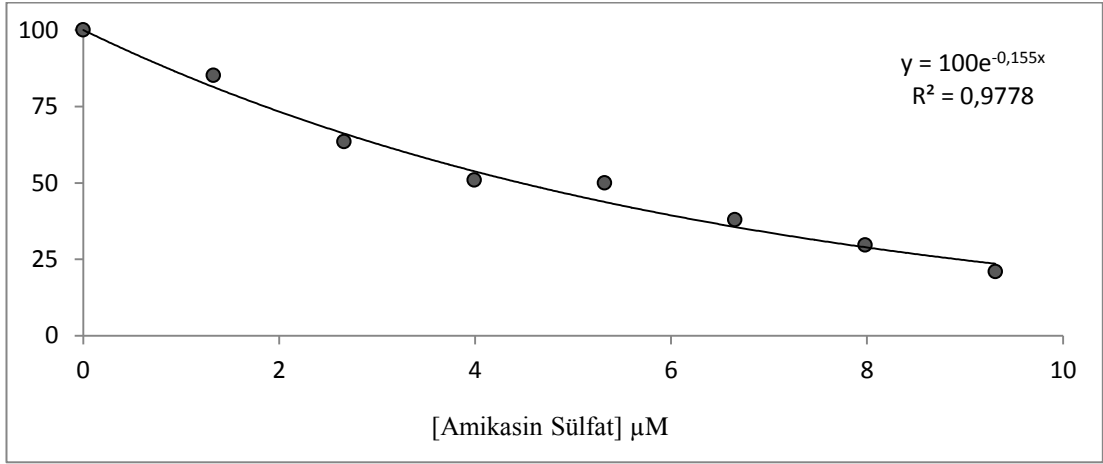
değerleri belirlendi (Bkz. Tablo 3.3). Bunlara ilaveten Ki grafiklerinde Şekil 3.8-3.13'de gösterildi.



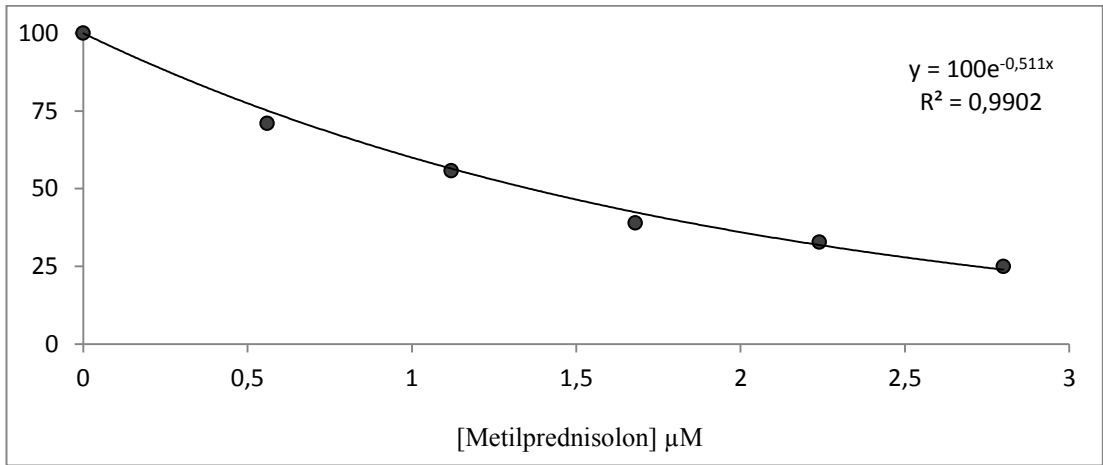
Şekil 3.2. Tramadol HCl'in hbCA I izoenzimine karşı IC₅₀ grafiği.



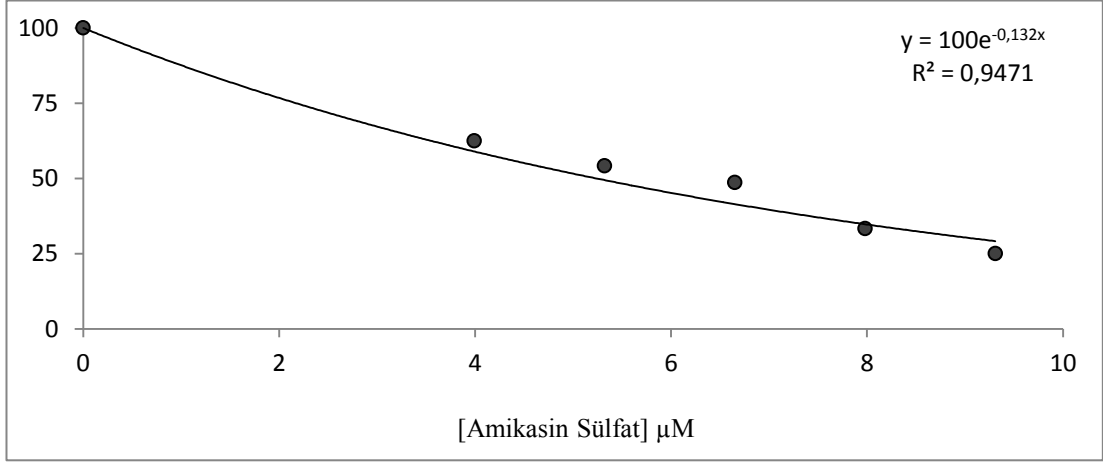
Şekil 3.3. Feniramidol HCl hbCA I izoenzimine karşı IC₅₀ grafiği.



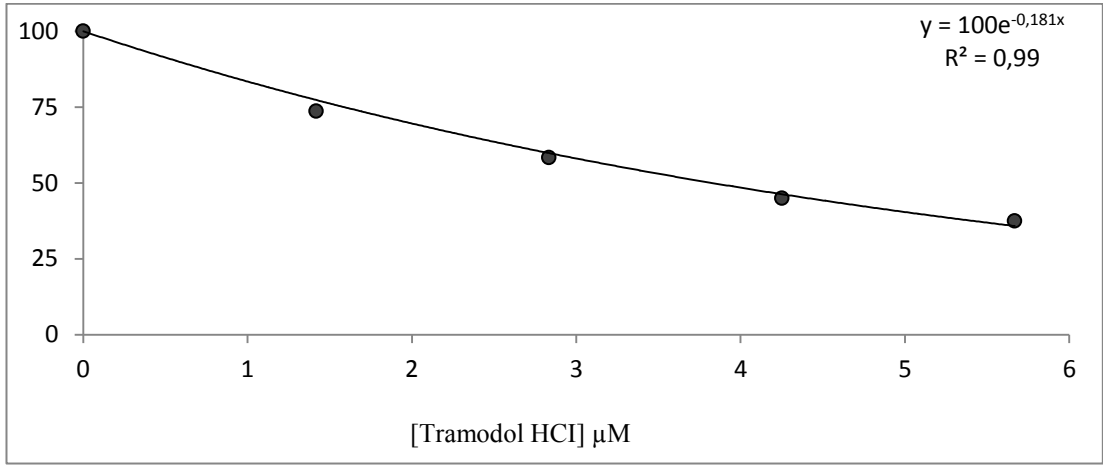
Şekil 3.4. Amikasin Sulfat hbCA I izoenzimine karşı IC_{50} grafiği.



Şekil 3.5. Metilprednisolon hbCA I izoenzimine karşı IC_{50} grafiği.



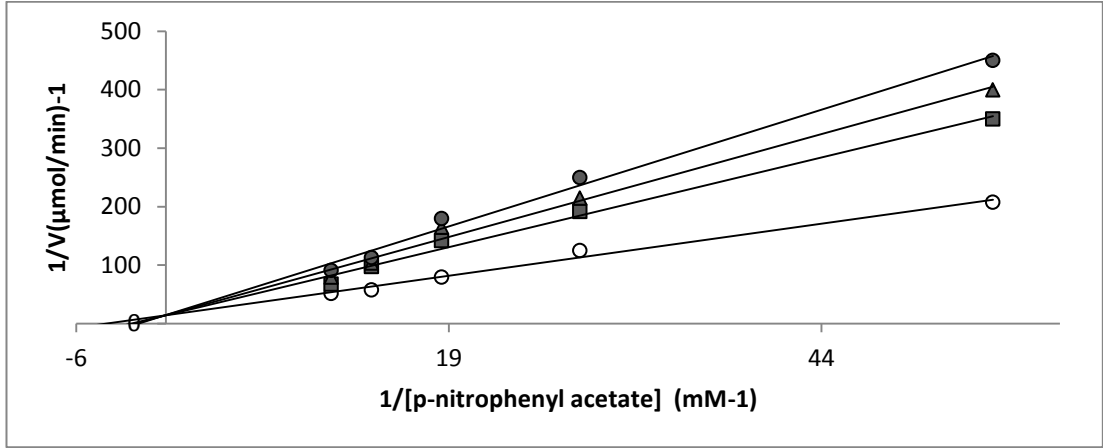
Şekil 3.6. Amikasin Sulfat hbCA II izoenzimine karşı IC_{50} grafiği.



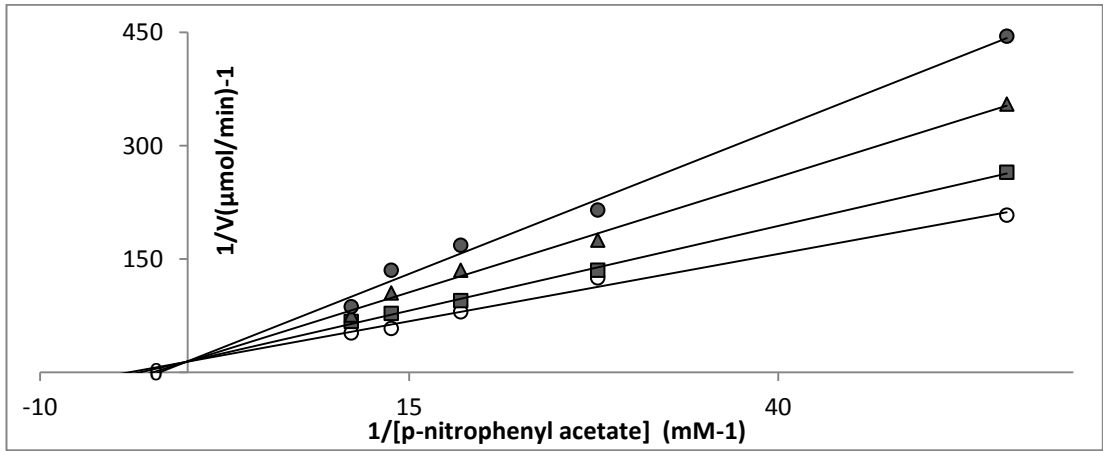
Şekil 3.7. Tramodol HCl'in hbCA II izoenzimine karşı IC_{50} grafiği.

Tablo 3.2. Denemesi yapılan vitaminlerin IC_{50} değerleri.

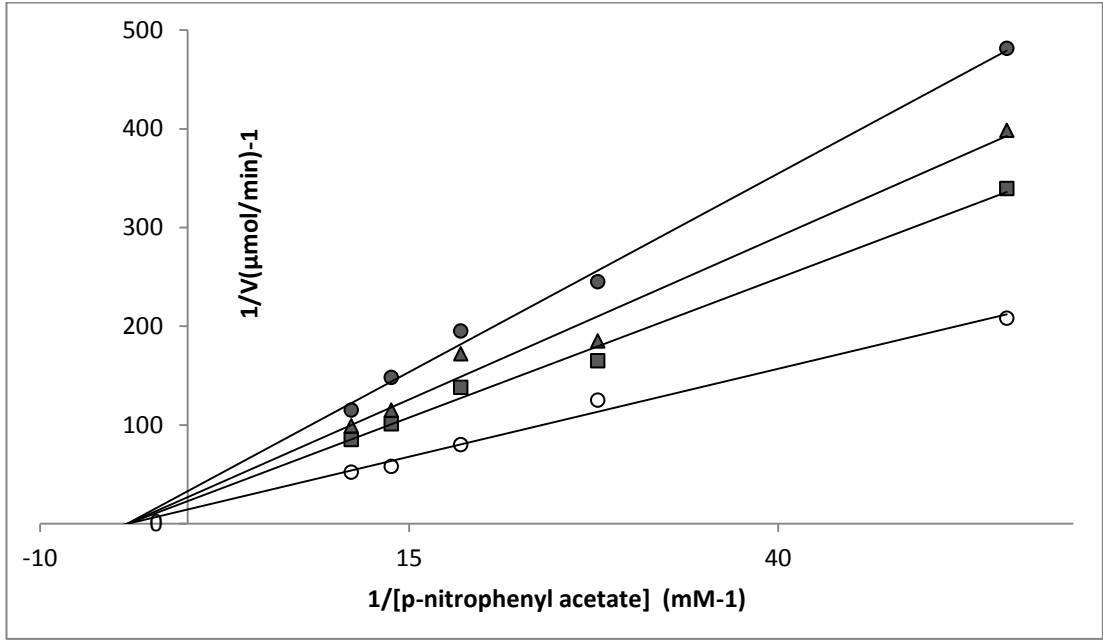
İnhibitör	CA-I IC_{50} değeri	CA-II IC_{50} değeri
	(μM)	(μM)
Tramodol HCl	8,2	3,81
Feniramidol HCl	3,98	
Amikasin Sulfat	4,45	5,22
Metilprednisolon	1,35	



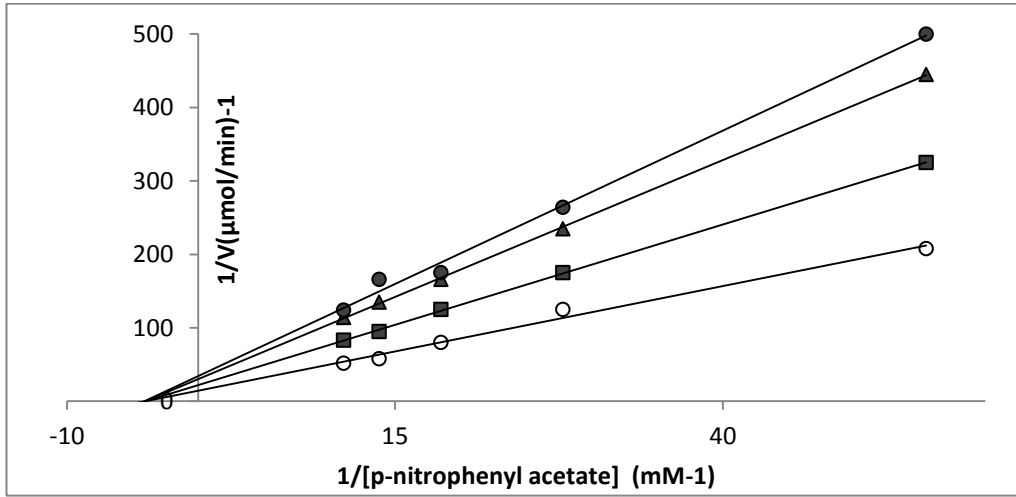
Şekil 3.8. Tramadol HCl hbCA I izoenzimine karşı K_i grafiği.



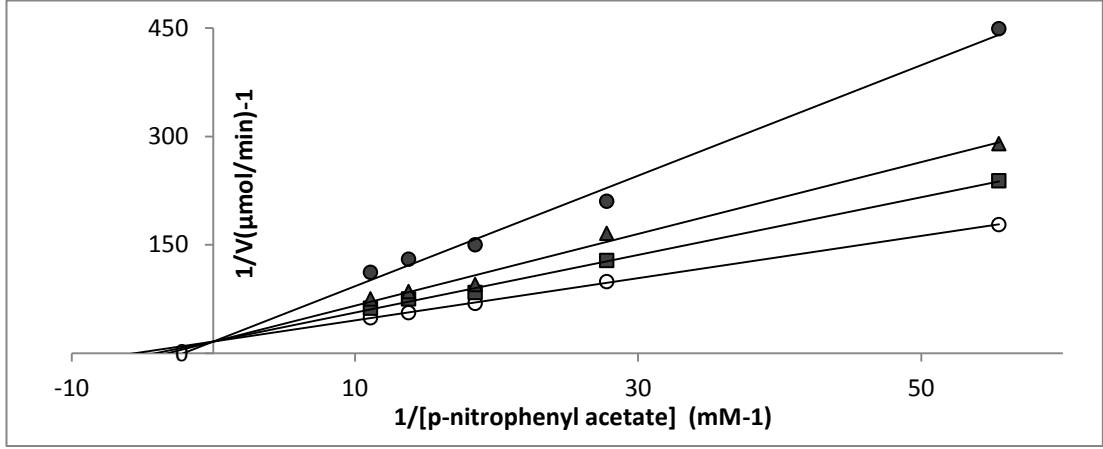
Şekil 3.9. Feniramidol HCl hbCA I izoenzimine karşı K_i grafiği



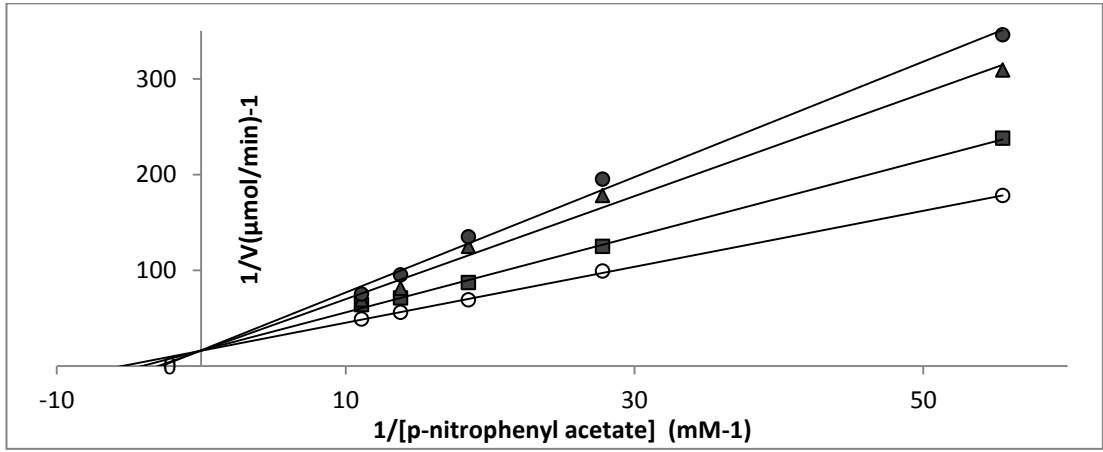
Şekil 3.10. Amikasin Sülfat hbCA I izoenzimine karşı K_i grafiği



Şekil 3.11. Metilprednisolon hbCA I izoenzimine karşı K_i grafiği



Şekil 3.12. Amikasin Sülfat hbCA II izoenzimine karşı K_i grafiği



Şekil 3.13. Tramadol HCl hbCA II izoenzimine karşı K_i grafiği.

Tablo 3.3. Denemesi yapılan vitaminlerin K_i değerleri.

İnhibitör	hbCA I K_i değeri (mM)	İnhibisyon türü	hbCA II K_i değeri (mM)	İnhibisyon türü
Tramodol HCl	10.34±0,38	Yarışmalı	3,88±0,02	Yarışmalı
Feniramidol HCl	8.11±4,62	Yarışmalı		
Amikasin Sülfat	14.29±0,19	Yarışmasız	9,08±2.59	Yarışmalı
Metilprednisolon	2,22±0,65	Yarışmasız		

3.2. Tartışma

Bu alışmamızda belirli ölçüde saflaştırılarak, saf izoenzimler üzerinde farklı ilaç etken maddelerinin inhibisyon çalışmaları yapılmıştır. Enzimin saflığının inhibisyonu önemli derecede etkilediği düşünöldüğünde daha sağlıklı sonuçların elde edilebilmesi için enzimin saflaştırılmasının zorunluluğu ortaya çıkmaktadır. Bu amaçla, bu çalışmada tek bir basamakta yüzlerce kat saflaştırmayı sağlayan afinite kromatografi tekniği kullanılmıştır.

Araştırmamızda matriks olarak seçilen Sepharose-4B'ye ligand (p-aminobenzen sulfonamid) L-tirozin bileşiği aracılığı ile immobilize edilmiştir. Burada tirozin, afinite jelinin uzantı kolunu sülfanilamid ise enzimi spesifik olarak bağlayan kısmını oluşturmaktadır. Sülfanilamid, karbonik anhidraz enziminin spesifik bir inhibitörü olup, söz konusu izoenzimlerin kolonda yüksek pH'da bağlayarak çalışmamızda başarıyla kullanılmıştır.

Afinite kromatografisinde kullanılan jel, ardışık iki basamakta sentezlenmiştir. Önce matriks olarak seçilen CNBr ile aktive edilmiş Sepharose-4B'ye buna uzantı kolu olarak L-tirozin bağlandıktan sonra, diazolanmış sülfanamid bileşiği katıldı. Sepharose-4B'nin matriks olarak seçilmesinin başlıca sebebi çok iyi akış özelliğine

sahip olması ve ayrıca serbest –OH grupları taşıdığından, CNBr ile çok kısa bir süre içerisinde aktifleştirilebilmesidir. Tablo 3.1 de görüldüğü gibi hbCA I ve II izoenzimleri afinite kromatografisi ile insan kanından, hbCA I enzimi spesifik aktivitesi 485,00 (EÜ/mg protein) olan, %58 verimle ve yaklaşık 106,04 kat; hbCA II enzimi ise, spesifik aktivitesi 624,00 (EÜ/mg protein) olan, %51 verimle ve yaklaşık 425,33 kat saflaştırılmıştır.

Hall ve Schaer (1983) sırası ile kloroform-etanol ekstraksiyonu, Sephadex G-75 jel filtrasyon kromatografisi ve DEAE Biogel iyon değişim kolonu kullanarak gökkuşağı alabalıkları eritrositlerinden CA enzimini 3,7 kat saflaştırmışlardır.

Buna ek olarak, insan eritrositlerinden hCA I izoenzimi 10366 EÜ/mg protein spesifik aktivite, %39,5 verimle ve yaklaşık 1000 kat ve hCA II ise 52200 EÜ/mg protein spesifik aktivite, %22,4 verimle ve yaklaşık 5000 kat saflaştırılmıştır (Beydemir *et al.*, 2002).

Krungkrai ve arkadaşları (2001), karbonik anhidraz enzimini *Plasmodium falciparum*'dan katyon değiştirici Mono S kolonu ve anyon değiştirici Mono Q kolonu ve Sepharose 12 jel filtrasyon kromatografisinin kombine edilmesiyle 18 EÜ/mg protein spesifik aktivite, %6,5 verimle ve 66,7 kat saflaştırılmıştır.

Banerjee ve arkadaşları (2004), rekombinant hCA-II'yi Sepharose-IDA-Zn²⁺ afinite kromatografi yöntemini kullanarak 0,74 EÜ/mg protein spesifik aktivite, %76 verimle ve 4,6 kat saflaştırmışlardır.

Özensoy'un (2004), yaptığı bir çalışmada karbonik anhidraz saflaştırmak için EUPERGIT C-250 L ticari ismi ile bilinen ve oksiran grupları içeren jeller de kullanılmıştır. Söz konusu bileşik bağlamada spesifik olmamasına rağmen, üzerinde taşıdığı oksiran grupları ile çeşitli proteinlerin saflaştırılmasında kromatografik matris olarak seçilmiştir. Ayrıca bu jel herhangi bir aktivasyona gerek duyulmadan ligand immobilize edilebilmektedir. Bunun yanında uzun süre kullanılabilir olması,

mekanik etkilere karşı dayanıklı olması ve akış özelliğinin iyi olması sebebiyle de oldukça kullanışlıdır. Fakat yapılan bir çalışmada sepharose-4B ile sentezlenen afinite jeli ile Eupergit ile hazırlanan afinite jeli karşılaştırıldığında Sepharose-4B ile daha iyi akışkanlık ve saflık elde edilmiştir.

Supuran ve arkadaşları (2011) *Dicentrarchus labrax* solungaçlarından CA enzimini Sepharose-4B-aniline-sulfanilamid afinite kolonunun kullanılmasıyla 935,42 EÜ/mg protein spesifik aktivite, % 72,42 verimle 108,4 kat saflaştırılmışlardır.

Ekinci ve arkadaşları (2011) *Dicentrarchus labrax* karaciğer dokusundan CA enzimini Sepharose-4B-tirozin-sulfanilamid afinite kolonunun kullanılmasıyla 751,72 EÜ/mg protein spesifik aktivite, % 46 verimle 78,8 kat saflaştırılmışlardır.

Chappuis ve arkadaşları (1999) yeni doğanların eritrositlerinde yaptıkları bir eser element analizinde, karbonik anhidrazın kofaktörü olan çinko elementinin miktarını ve hangi patolojik vakalarla ilgisinin olduğunu araştırmışlardır.

Pe'riquet ve arkadaşları (2005) 26-42 haftalık fetüslerde kordon kanındaki çinko bakır, selenyum, A vitamini, E vitamini, A vitamini bağlayıcı protein, transthyretin, albumin ve transferin miktarlarını; cinsiyet ve süre değişkenleri durumlarında izlemişlerdir. Bu çalışma sonucu A Vitamini 0.55 ± 0.17 $\mu\text{mol/L}$, çinko 20.4 ± 3.8 $\mu\text{mol/L}$ olarak tespit edilmiştir.

Ting-yu Li ve arkadaşları (2009) yaptıkları bir çalışmada gebelik sırasında A vitamini, E vitamini ve C vitamininin bebeğin zihinsel gelişimi ile ilgisi üzerinde incelemeler yapmışlardır. 150 Çinli anne üzerinde yapılan çalışmayla doğumdan önce ve 2 yıl boyunca, çocukların zihinsel gelişimi bu vitaminlerin seviyeleriyle paralel olarak incelenmiştir. Sonuç olarak antioksidant olan bu enzimlerin konuşma, sosyal davranış gibi birçok zihinsel gelişim parametresinde olumlu rolü olduğu kanısına varılmıştır.

Outi Tammela ve arkadaşları (1999) tarafından yapılan bir çalışmada erken doğan bebeklerin kordon kanlarındaki A vitamininin konsantrasyonları çalışılmıştır. Çalışmada A vitamin konsantrasyonunun kordon kanındaki miktarı 1.05 mmol/ l standart değer olarak kabul edilmiş ve çocukların doğdukları andaki sağlık durumları, kiloları gibi bazı verileri değerlendirilmiştir. Bu verilere göre erken doğum yapan annelerdeki A vitamini eksikliği bebeğin sağlığı açısından birçok probleme neden olduğu belirtilmiştir.

Geertje Goedhart ve arkadaşlarının (2011) yaptıkları bir çalışmada B-12 vitamininin yeni doğanlarda aşırı ağlamayla ilgisi üzerine incelemelerde bulunulmuştur. Bu çalışmada B-12 vitaminin seviyesi yeterli durumlarda yeni doğanlardaki bu rahatsızlığın ortadan kalktığı gözlemlenmiştir.

İnsan kanından affinite tekniğiyle saflaştırdığımız karbonik anhidraz I ve II izoenzimleri üzerinde *in vitro* inhibisyon etkileri araştırılmıştır. İnhibisyona neden olan ilaç etken maddelerinin inhibisyon etkisi K_i ve IC_{50} olmak üzere iki farklı değerle verilebilir. En pratik parametre IC_{50} değeridir. Çünkü materyal ve yöntemde belirtildiği gibi K_i sabitinin belirlenmesi için en az iki sabit inhibitör konsantrasyonunda çalışmalar yapılmakta ve her bir sabit vitamin konsantrasyonunda beş farklı substrat konsantrasyonu için hız değerleri belirlenmektedir. Bu amaçla substrat konsantrasyonları sabit tutularak, değişik inhibitör konsantrasyonlarında, yüzde aktiviteler belirlenmekte ve daha sonra grafik yolu ile % 50 inhibisyona sebep olan etken maddelerin konsantrasyonu hesaplanmaktadır. Fakat inhibisyon tipinin belirlenmesi için K_i değerinin hesaplanması gerekmektedir.

4. SONUÇ ve ÖNERİLER

Elde edilen sonuçlara göre deneyde kullanılan ilaç etken maddelerinden Amikasin Sülfat, Metilprednisolon, Feniramidol HCl, Tramodol HCl hbCA I izoenzimi üzerine, Tramodol HCl ve Amikasin Sülfat ise hbCA II izoenzimi üzerine inhibisyon gözlenmiştir. hbCA I ve II izoenzimleri için ilaç etken maddelerinin IC₅₀ değerleri; Tramodol HCl (IC₅₀ mM; hbCA I: 8,2; hbCA II: 3,81), Feniramidol HCl (IC₅₀ mM; hbCA I: 3,98), Amikasin Sülfat (IC₅₀ mM; hbCA I: 4,45; hbCA II: 5,22) ve Metilprednisolon (IC₅₀ mM; hbCA I: 1,35) olarak gözlenmiştir. Uygulanan ilaç etken maddeleri içinde, çok düşük konsantrasyonda aktiviteyi % 50 azaltması ile hbCA I ve II izoenzimleri üzerinde denediğimiz en kuvvetli inhibitör hbCA I için Metilprednisolon ve hbCA II için ise Tramodol HCl olarak tespit edilmiştir. Bunun yanısıra IC₅₀ değerlerine göre Tramodol HCl hbCA I için ve Amikasin Sülfat hbCA II için deneyde kullanılan etken maddeler arasında en az inhibisyon etkisine sahip olmasıyla dikkat çekmiştir.

Sonuç olarak bu tez kapsamında;

1. İnsan kanından Karbonik anhidrazın I ve II izoenzimlerinin saflaştırılması gerçekleştirilmiştir.
2. Çalışma sonucunda CA I enzimi % 58 verimle yaklaşık 106,04 kat saflaştırılabildiği. Enzimin saflığı elektroforezle kontrol edilerek tek bant gözlenmiştir.
3. CA II enzimi % 51 verimle yaklaşık 425,33 kat saflaştırılabildiği. Enzimin saflığı elektroforezle kontrol edilerek tek bant gözlenmiştir.
4. CA I ve II izoenzimleri üzerine bazı ilaç etken maddelerinin inhibisyon etkileri incelenmiştir. Bu amaçla Amikasin Sülfat, Metilprednisolon, Feniramidol HCl, Tramodol HCl enzim üzerine inhibisyon etkileri incelenmiştir.

5. hbCA I ve II izoenzimleri üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Amikasin Sülfat, Metilprednisolon, Feniramidol HCl, yeşil reçete olarak verilen Tramodol HCl için IC_{50} ve K_i değerleri hesaplanmış ve inhibisyon tipleri belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

Arslan, O. , “Glaucoma Tedavisinde Kullanılmaya Aday Karbonik Anhidraz İnhibitorlarının Sentezi ve İnhibisyon Etkilerinin Araştırılması”, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, **Fen Bilimleri Enstitüsü**, Kimya Anabilim Dalı, Erzurum, (1994).

Armstrong, J., Mc, D., Myers, D. V., Verpoorte, J. A., and Edsall, J. T., “Purification and properties of human erythrocyte carbonic anhydrase”. **J. Biol. Chem.** 214, 5137 p. (1966).

Beydemir, Ş., Çiftçi, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., “Effects of gentamicine sulfate on enzyme activities of carbonic anhydrase from human erythrocytes in vitro and from rat erythrocytes in vivo”, **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, 25(8): 966-969 (2002).

Bradford, M.M., “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”. **Analytical Biochemistry**, 72, 248-254 (1976).

Björkbacka, H., Johansson, I. M. , Skarfstad, E. and Formsan, C., “The sulfhydryl groups of Cys269 and Cys272 are critical for oligomeric state of chloroplast carbonic anhydrase from *Pisum sativum*”. **Biochem.**, (1997).

Clanis, Y., D., "Matrix Evaluation for Preparative High-Performance affinity Chromatography", **J. Chromatogr.**, 407, Pt. A, 179-187 (1990).

Chappuis. P., Arnaud. J., Vitoux. D., “Are Copper, Zinc and Selenium in Erythrocytes Valuable Biological Indexes of Nutrition and Pathology?”, **Trace Elements Medicine and Biology** ,vol 13, pp. 113- 128 (1999).

Dikmen,N., Özgünen,T., “Harper Biyokimya”, **Nobel Tıp Kitapevleri**, 928 (2004).

Ekinci D., Ceyhun S. B., Şentürk M., Yerlikaya E., Erdoğan O., Küfrevioğlu Ö. İ., “Purification and characterization of carbonic anhydrase from the teleost fish *Dicentrarchus labrax* (European seabass) liver and toxicological effects of metals on enzyme activity”. **Env toxic and pharm.** 32: 69–74 (2011).

Geertje. G.,Marcel. F., Manon. E., Gouke J. B., “Maternal vitamin B-12 and folate status during pregnancy and excessive infant crying”, **Early Human Development**, 87 , 309–314 (2011).

Güller, U., “Mitokondriyal Glutamat Dehidrogenaz Enziminin Koyun Karaciğerinden Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı

Metal İyonlarının Etkilerinin İncelenmesi”, Doktora Tezi, *Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Erzurum, 35-36 (2014).

Güneş, B., “ VadeMecum” , *Farma Tıp Yayıncılık*, Ankara, (2006).

Hall, G. E. and Schraer, R.,”Characterization of a high activity carbonic anhydrase isozyme purified from erythrocytes of *Salmo gairdneri*”. *Comp. Biochem. Phys.*, 75B:81-92 (1983).

Harper, H.. “Review of physiological chemistry”. Californiyalos Altos”, *15th Edition*. P 126-172 (1975).

Hewett- Emmett, D. and Tashian, R. E. “Functional diversity, conversation, and convergence in the evolution of a-, b-, and y-carbonic anhydrase gene families”. *Mol. Phylogener. Evol.* 5: 50-77 (1996).

İnan, Y. ve Gül, M., “Biyokimya”, *Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti.*, 447 s. (2001).

İnternet: Wikipedia “ Tramadol” <https://en.wikipedia.org/wiki/Tramadol> (2016).

İnternet: Wikipedia “Feniramidol” <https://en.wikipedia.org/wiki/Feniramidol> (2016).

İnternet: Wikipedia “Metilprednisolon” <https://en.wikipedia.org/wiki/Methylprednisolone> (2016).

İnternet: Wikipedia “ Amikasin Sülfat” <https://en.wikipedia.org/wiki/Amikacin> (2016).

Kalaycıoğlu L., Serpek, B., Nizamlıoğlu M., Başpınar, N. ve Tiftik, A.M., “Biyokimya”, *Nobel Yayınevi*, Ankara (2010).

Kaplan, S. T., “ İnsan Kanından Saflaştırılan Karbonik Anhidraz I İzoenzimi Üzerinde Bazı İlaçların Etkilerinin In Vitro Olarak İncelenmesi” Yüksek Lisans Tezi, *Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Erzincan, 26-28 (2014).

Keha, E. E., Küfrevioğlu, Ö. İ., “Biyokimya, Muhtelif kısımlar”. *Şafak Yayınevi*, Erzurum, (2015).

Krungkrai, S.R., Suraveratum, N., Rochanakij, S., and Krungkrai, J., “Characterization of carbonic anhydrase in *Plasmodium falciparum*”. *International Journal of Parasitology*, 31: 661-668 (2001).

Laemmli, D.K., “Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of Bacteriophage T4”. *Nature*, 227: 680 (1970).

- Landolfi, C., Marchetti, M., Ciocci, G. and Milanese, C., "Development and pharmacological characterization of a modified procedure for the measurement of carbonic anhydrase activity", *J. Pharm. And. Toxicol. Meth.*, 38, 169-172p. (1998).
- Lehninger A.L., "Principles of biochemistry". *Newyork: Worth, Publishers Inc*, (2011).
- Lesburg, C. A. and Christianson, D. W., "X – ray crystallographic studies of engineered hydrogen bond Networks in a protein – zinc binding site". *J. Am. Soc.*, 117: 6368-6844 p. (1995).
- Lineweaver, H., Burk, D., "The determination of enzyme dissociation constant". *J. Am. Chem. Soc.*, 56: 658 (1934).
- Lindskog, S., "Structure and Mechanism of Carbonic Anhydrase", *Pharmacol. Ther*, 74 (1997).
- Maren, T.H., Conroy, C.W., Wynns, G.C., Godman, D.F., "Renal and cerebrospinal fluid formation pharmacology of a high molecular weight carbonic anhydrase inhibitor". *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 280, 98-104 (1997).
- Maren, T. H. and Jankowska, L., "Ocular pharmacology of sulfonamides: The cornea as barrier and depot". *Cur. Eye. Res.*, 4, 399 p. (1985).
- Nyman, P. O. and Lindskog, S., "Amino acid compositions of the various forms of bovine and human erythrocyte carbonic anhydrase". *Biochem. Biophys. Acta.*, 85, 1411 (1964).
- Outi, T., Marjo. A., Sami, I., "Cord blood concentrations of vitamin A in preterm infants", *Early Human Development* ,56 , 39–47 (1999).
- Özensoy, Ö., Arslan, O. and Oznur Sinan S., "A new method for purification of carbonic anhydrase isozymes by affinity chromatography". *Biochemistry(Moscow)*, 69: 216 (2004).
- Pauri R, Gambhir KK, Mehrotra PP., "Changes in carbonic anhydrase may be the initial step of altered metabolism in hypertension". *Biochem Int* 23:779-789 (1991).
- Pe'riquet. B., Galinier. A., Lambert. W., Garcia. J., Assouline. C., Rolland. M., Thouvenot. J., "Reference range for micronutrients and nutritional marker proteins in cord blood of neonates appropriated for gestational ages", *Early Human Development* , 81, 583-593 (2005).

Reed ML, Graham D., “Carbonic anhydrase in plants: distribution, properties and possible physiological roles”. *In L Reinhold, JB Harbome, T Swain, eds, Progress in Phytochemistry*, Vol 7. Pergamon Press, Oxford, UK, pp 47-94 (1981).

Renzi, G., Scozzafava, A., Supuran, C.T., “Carbonic anhydrase inhibitors, Topical sulfonamide antiglaucoma agents incorporating secondary amine moieties”. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 10, 673-676 (2000).

Rickli, E. E., Ghazanfar, S. A. S., Gibbons, B. H. and Edsall, J. T., “Carbonic anhydrase from human erythrocytes”. *J. Biol. Chem.* 239,1065 (1964).

Segel, I.H., “Biochemical Calculations: Enzim kinetics”. *John Wiley and Sons, Inc, New York*, p213 (1968).

Scher, A. and Dietsch, P., “A 54 000 molecular weigth protein with carbonic anhydrase activitiy in rabbit erythrocytes. In Biology and Chemistry of the carbonic anhydrase”. *Annals New York Acad. Sci.*, 429,241 (1984).

Sly, W.S., Hu, P.Y., “Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies”. *Annu Rev Biochem*, 64, 375-401 (1995).

Smith, K.S. and Ferry, J.G., “Prokaryotic carbonic anhydrases.” *FEMS Microbiology Reviews*, 24, 335-366 (2000).

Supuran, C.T., Scozzafava, A., Casini, A., “Carbonic anhydrase inhibitors”. *Medical Research Reviews*, 23, 146-157 (2003).

Supuran, C.T., “Carbonic Anhydrase Inhibition/Activation: Trip of a Scientist Around the World in the Search of Novel Chemotypes and Drug Targets”. *Curr. Pharm. Des.*, 16, 3233-3245 (2010).

Tashian, R. E., Hewett-Emmett, D., Goodman, M., “On the evolution and genetics of carbonic anhydrase I, II and III. Isozymes”, *Current Topics in Biological and Medical Research*, volume 7: Molecular Structure and Regulation, 79, 100, Alan R. Liss Inc. New York, (1983).

Tashian, R. E., Hewett-Emmett , D., and Goodman, M., “Isomes”, *“Current Topics in Biological and Medical Research”* Vol.7,(1983)

Ting-yu. L.,Ke. C.,Xuan. Z .,Xiao-ping. W., Ping. Q., You-xue L., “Antioxidant vitamin status during pregnancy in relation to cognitive development in the first two years of life” , *Early Human Development* ,85 ,421–427 (2009).

Tüzün, C., “Biyokimya”, *Palme Yayınevi*, Ankara, (1997).

Verpoorte, J. A., Mehta, S. And Edsall, J. T., “Esterease activities of human carbonic anhydrase”. *J. Biol. Chem.*, 242, 4221 p. (1967).

Wistrand, P. J., Schenholm, M. and Loennerholm, G. "Carbonic anhydrase isozymes CA I and CA II in the human eye". *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 27, 419 (1986).

Warburg, O., Christian, W., "Isolierung und Kristallization des Gärungsferuient's Enolase", *Biochem.* 310- 384 (1941).

ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında ERZİNCAN da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Erzincan da tamamladıktan sonra 2001 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldu. 2005 de Atatürk Üniversitesi K. K. Eğitim Fakültesi OFMA Bölümü Biyoloji A.B.D.'da Tezsiz yüksek lisanstanı tamamladı. Evli ve 3 çocuk annesidir. Halen Erzincan Anadolu İHL'sinde Biyoloji öğretmeni olarak görev yapmaktadır.