

**ERZİNCAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**İNSAN KANINDAN SAFLAŞTIRILAN KARBONİK ANHİDRAZ
I İZOENZİMİ ÜZERİNDE BAZI İLAÇLARIN
ETKİLERİNİN *IN VITRO* OLARAK İNCELENMESİ**

SİBEL TUĞRAL KAPLAN

**BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

ERZİNCAN

2014

Her Hakkı Saklıdır

Doç. Dr. Murat ÇANKAYA danışmanlığında, Sibel TUĞRAL KAPLAN tarafından hazırlanan bu çalışma 05.07.2014 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. Ekrem KÖKSAL

İmza: 

Üye : Yrd. Doç. Dr. Salih MUTLU

İmza: 

Yukarıdaki sonucu onaylarım.



Doç. Dr. Ali SÜZÜN
Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans

İNSAN KANINDAN SAFLAŞTIRILAN KARBONİK ANHİDRAZ I İZOENZİMİ ÜZERİNDE BAZI İLAÇLARIN ETKİLERİNİN IN VITRO OLARAK İNCELENMESİ

Sibel Tuğral Kaplan

Erzincan Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Murat ÇANKAYA

Kan histolojik bakımdan, hücreleri hareket eden ve esas maddesi sıvı halinde olan bir dokudur. Vücudun organları arasında madde alışverişine aracılık eden hayati sıvıdır. Kanda bulunan ve oksijen taşıma gibi çok komplike olayların seri ve hızlı bir şekilde, en az enerji harcanarak oluşmasını sağlayan, yani kimyasal tepkimelerin hızını arttıran (katalizleyen) biyomoleküllere de enzim denir.

Karbonik Anhidraz ya da karbonik dehidrataz aktif bölgesinde çinko (Zn^{2+}) iyonu içeren metaloenzim ailesinden ve yavaş bir reaksiyon olan karbondioksitin bikarbonat ve protona dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir. Kırmızı kan hücrelerinde, hayvanların diğer kısımlarında ve bitkilerde bulunan, karbonik asidi karbondioksit ve suyla parçalayan enzimdir.

Yapmış olduğumuz bu çalışmada, insan kanından karbonik anhidraz I izomerini (CAI) afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Enzimi % 62 verimle 115,64 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırmış olduğumuz CAI izomerini üzerine, insanların sıkça kullanmış olduğu bazı ilaçların etken maddelerinin in vitro şartlarda inhibisyon etkileri incelenmiştir. İnhibisyon çalışmaları sonucunda Dimenhidrinat yarışmalı inhibisyon, diğer üç inhibitörümüzde yarışsız inhibisyon göstermiştir. K_i değerleri Metoprolol Tartarat 5.49 ± 1.86 mM, Dimenhidrinat 15.89 ± 6.55 mM, Digoksin 0.0914 ± 0.0062 mM, Hiyosin - N - butilbromür 11.22 ± 2.94 mM.

2014, 60 sayfa

Anahtar Kelimeler: Kan, Karbonik anhidraz, Afinite kromatografisi

ABSTRACT

Master Thesis

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

Sibel Tuğral Kaplan

Erzincan University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Murat ÇANKAYA

According to the histology; blood is the tissue which the main material is in the liquid state and its cells are moving. This is vital red liquid which facilitates transmission of material between organs. The biomolecules who provides the fast production of the complicated events like oxygen transportation with minimum energy, in other words catalyzers for chemical processes are called enzymes.

Carbonic anhydrase or carbonic dehydrates is the enzyme from metalloenzym family which includes Zn^{2+} in its active section and which catalyzes the slow reaction for transformation of carbon dioxide to bicarbonate and protons. This is the enzyme that dismantles the carbonic acid to CO_2 and H_2O which is included in red blood cells, other parts of animals and plants.

In this study; the purification of carbonic anhydrase I isomer (CAI) from human blood using affinity chromatography method has been performed. The enzyme has been purified by 62 % and 115.64 times. The inhibitor effect of the agent materials of some medicine that human use in daily life on CAI isomer that we purified in in-vitro conditions has been investigated. At the end of inhibition studies deminhidrinat shows competitive inhibition. Remaining 3 inhibitors Show non-competitive inhibition. K_i values are, Metoprolol Tartarate 5.49 ± 1.86 mM, Dimenhidrinat 15.89 ± 6.55 mM, Digoksin 0.0914 ± 0.0062 mM, Hiosin - N - butilbromure 11.22 ± 2.94 mM.

2014, 60 pages

Key words:Blood,Carbonic anhydrase,Affinity chromatography

TEŐEKKÖR

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum bu çalıőmanın 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. Biyoloji A.B.D. araőtırma laboratuvarında deneysel ve teorik çalıőmalarımnda yardımlarını esirgemeyen Erzincan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakóltesi Biyoloji Bölümü asistanlarından Arő.Gör. Mehmet KUZUCU 'ya da teşekkür ederim.

İimize ilim sevgisini iőleyip, imkanlarını sonuna kadar bu yolda bizler için harcayan, (Rahmetli annem ve babam); Remziye-Fahrettin Tuğral'a da minnetlerimi sunarım.

Ayrıca tez çalıőmam boyunca maddi manevi desteğini benden esirgemeyen sevgili eőim Bahadır KAPLAN 'a sonsuz teőekkürler ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Kanın Yapısı,Özellikleri ve Görev.....	1
1.1.1. Kan Dolaşımı.....	1
1.2. Enzim hakkında genel bilgi.....	3
1.2.1. Afinite Kromatografisi Türleri.....	8
1.3 Karbonik Anhidraz Enzimi.....	9
1.3.1. Enzim Özellikleri ve Fizyolojik Önemi.....	9
1.3.2. Karbonik Anhidraz İzoenzimleri.....	10
1.3.2.1. α -Karbonik anhidrazlar.....	10
1.3.2.2. β -Karbonik anhidrazlar.....	10
1.3.2.3. γ -Karbonik anhidrazlar.....	10
1.3.3. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalizlediği Reaksiyonlar.....	11
1.3.4. Karbonik Anhidrazın Önemli İnhibitörleri.....	13
1.3.5. Karbonik Anhidraz Aktivitesi Tayin Metodları.....	18
1.3.5.1. Esteraz Aktivitesi.....	18
1.4.Deneyde kullanılan ilaçlar ve özellikleri.....	19
1.4.1.Metoprolol Tartarat.....	19
1.4.2.Dimenhidrina.....	20
1.4.3.Digoxin.....	21
1.4.4.Hiyosin_N_Butilbromür.....	21
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	23
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	25

3.1. Materyal.....	25
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	25
3.1.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar.....	25
3.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması.....	26
3.2. Yöntem.....	29
3.2.1. Protein Tayini.....	29
3.2.1.1. Kalitatif protein tayini.....	29
3.2.1.2. Bradford yöntemi ile protein tayini.....	29
3.2.2. Karbonik Anhidraz Aktivitesi Tayini.....	30
3.2.2.1. Esteraz aktivitesi tayini.....	30
3.2.3. Sepharose 4B-L-tirozin-sulfanilamid Afinite Jelinin Sentezi.....	30
3.2.3.1. CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye Tirozin Bağlanması.....	31
3.2.3.2. p-aminobenzensülfonamidin Kenetlenmesi.....	32
3.2.4. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının kontrolü.....	32
3.2.5. İnsan Kanından Karbonik Anhidraz İzoenziminin Saflaştırılması.....	34
3.2.5.1. İnsan kanının temini ve hemolizat hazırlanması.....	34
3.2.5.2. Afinite kolonunun paketlenmesi.....	34
3.2.5.3. Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu.....	34
4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA.....	35
4.1. Sonuçlar.....	35
4.1.1. Saflaştırma sonuçları.....	35
4.1.2. İnhibisyon çalışmaları sonuçları.....	36
4.2. Tartışma.....	42
KAYNAKLAR.....	46
ÖZGEÇMİŞ.....	52

SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ**Simgeler Açıklama**

L	Litre
mL	Mililitre
μ L	Mikrolitre
μ g	Mikrogram
μ M	Mikromolar
rpm	Devir/Dakika

Kısaltmalar Açıklama

CA	Karbonik anhidraz enzimi
HCA	İnsan 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
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
AK	Afinite Kromatografisi

ŞEKİLLER LİSTESİ	Sayfa
Şekil 1.1.Kan dolaşımı.....	2
Şekil 1.2. Dönüşümsüz inhibisyon şematik şekli.....	4
Şekil 1.3. Yarışmalı inhibisyon şematik şekli.....	5
Şekil 1.4. Yarı yarışmalı inhibisyon şematik şekli.....	6
Şekil 1.5. Afinite kromatografisinin prensibi.....	7
Şekil 1.6. Eritrosit membranının klorür-bikarbonat değiştiricisi.....	13
Şekil 1.7. Bazı CA izoenzimleri içinde katalitik olarak aktif.....	
CA izozimlerinin şematik olarak hücredeki yerleşimleri.....	15
Şekil 1.8. Bazı Sülfanamidlerin açık formülleri.....	17
Şekil 1.9. Sülfonamidlerin Karbonik Anhidraz Enzimine Bağlanması.....	18
Şekil 1.10. Metoprolol molekül yapısı.....	20
Şekil 1.11. Dimenhidrina'nin molekül yapısı.....	20
Şekil 1.12.Digoxin'in molekül yapısı.....	21
Şekil 1.13.Hiyosin - N – butilbromür'ün molekül yapısı.....	22
Şekil 3.1. Karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması için kullanılan.....	
afinite jelinin kimyasal yapısı) Matriks. CNBr ile aktifleştirilmiş.....	
Sepharose-4B b) Uzantı kolu. L-tirozin c) Sulfanilamid.....	31
Şekil 4.1.Saflaştırılmış CAI izoenzimlerinin SDS_PAGE fotoğrafı.....	36
Şekil 4.2.Metoprololun CA I izoenzime karşı I ₅₀ grafiği.....	37
Şekil 4.3.Dimenhidrinanın CA I izoenzime karşı I ₅₀ grafiği.....	37
Şekil 4.4.Digoxinin CA I izoenzime karşı I ₅₀ grafiği.....	38
Şekil 4.5.Hiyosin - N – butilbromür ın CA I izoenzime karşı I ₅₀ grafiği.....	38
Şekil 4.6.Metoprololun CA I izoenzime karşı K _i grafiği.....	39
Şekil 4.7.Dimenhidrinanın CA I izoenzime karşı K _i grafiği.....	40
Şekil 4.8.Digoxinin CA I izoenzime karşı K _i grafiği.....	40
Şekil 4.9.Hiyosin - N – butilbromür ın CA I izoenzime karşı K _i grafiği.....	41

TABLULAR LİSTESİSayfa
Tablo 1.1. Afinite kromatografisinde en sık kullanılan..... biyolojik sistemler.....	8
Tablo 1.2. Karbonik Anhidraz izoenzimlerinin Hücre..... içi Yerleşimleri ve Sülfonamidlere ilgisi.....	18
Tablo 4.1. İnsan kanında CA I izoenziminin..... afinite kolon materyali ile saflaştırılma basamakları.....	35
Tablo 4.2. Denemesi yapılan etken maddelerin I_{50} değerleri.....	39
Tablo 4.3. Denemesi yapılan etken maddelerin K_i değerleri.....	41

1. GİRİŞ

1.1.Kanın Yapısı, Özellikleri ve Görevi

Kan, vücudun organları arasında madde alış verişine aracılık eden ve damarlar içinde bulunan kırmızı renkli sıvıdır. Kan hayat için gerekli oksijeni akciğerlerden sindirilerek vücuda yarar bir duruma gelen besin maddelerini sindirim organlarından alarak organlar ve onların en küçük yapıtaşı olan hücrelere götürür. Hücrelerde metabolizma sonucu meydana gelen ve vücuda yaramayan artıkları yüklenerek böbrek, deri, akciğer organlarına getirir ve bunların vücut dışına atılmasını sağlar.

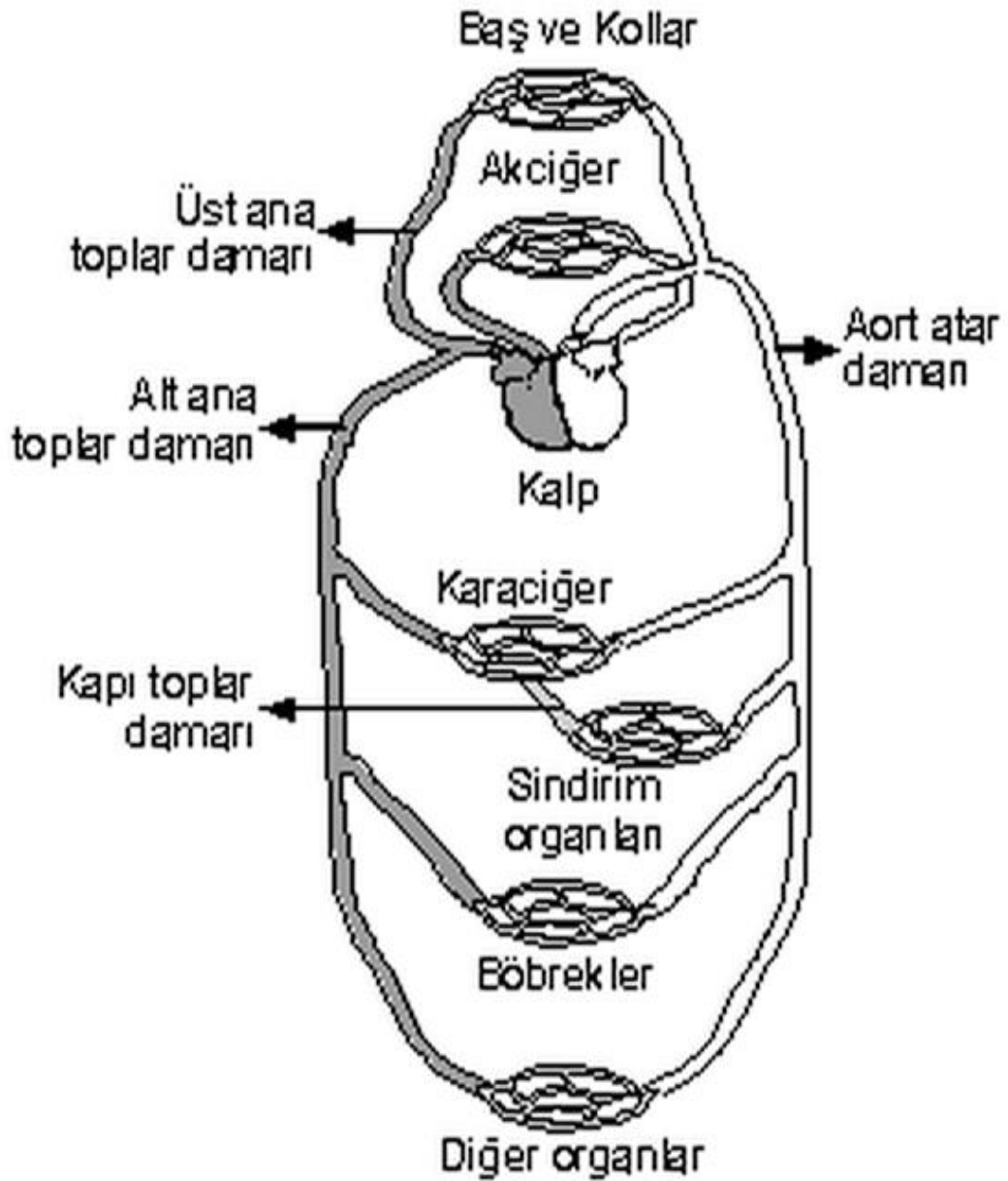
Damarlarda dolaşarak vücudun en ufak hücrelerine kadar yayılan, besin taşıyan kan, hayatın varlığı ve yaşam için son derece önemli bir maddedir. Bilimsel incelemelere göre, bir insanda yaklaşık olarak ağırlığının 12 ile 15 de biri kadar kan vardır. (Anonim 2013)

1.1.1. Kan Dolaşımı

Kan dolaşımı vücudun bütün organlarına ve dokularına ulaşan bir enerji iletim sistemidir. Kalp, içinde bol oksijen bulunan açık kırmızı renkli kanı aorta pompalar. Bu ana atardamardan ayrılan daha küçük atardamarlar ve kılcal damarlar aracılığıyla kan bütün vücuda dağılır. Kanın taşıdığı oksijen ve besin maddeleri kılcal damarların incecik duvarlarından geçerek hücrelerin içine girer. Hücrelerdeki atık maddeler de gene kılcal damarlar yoluyla kana karışır. Oksijeni azalmış olan bu koyu kırmızı renkli kan toplardamarlar aracılığıyla kalbe taşınır ve yeniden oksijen yüklenmek üzere akciğerlere gönderilir. Buradaki kılcal damarlarda akarken havanın oksijenini alır ve bir kez daha vücuda pompalanmak üzere kalbe geri döner.

İnsanın ve omurgalı hayvanların kanı, damar denen kapalı boruların içinde dolaşır ve olağan koşullarda hiçbir zaman damarların dışına çıkmaz. Buna kapalı dolaşım denir. Oysa omurgasız hayvanların çoğunda açık dolaşım vardır. Bu sistemde, damarlardan

çıkarak dokuların arasındaki boşluklara dolan kan madde alışverişini yaptıktan sonra yeniden damarlara döner. Bu gibi reaksiyonların hızlı bir şekilde devamı için enzim denilen proteinler görev alır. (Anonim 2013)



Şekil.1.1.Kan Dolaşımı genel şeması (anonim 2013)

1.2. Enzim hakkında genel bilgi

Enzimler canlı organizmalar tarafından üretilen özelleşmiş katalitik fonksiyonlara sahip protein molekülleridir. Enzimler canlı organizmaların hayatsal faaliyetlerini gerçekleştirmeleri için gerekli pek çok biyokimyasal reaksiyonlardan sorumludurlar. Bütün proteinler gibi enzimlerin de monomeri, amino asitlerdir. Enzimleri diğer protein moleküllerinden ayıran özelliği biyokimyasal reaksiyonları katalizleme yeteneğidir ve bu yeteneği sayesinde pek çok çalışma alanlarında ilgi kaynağı olmaktadır. (Wolfson et al., 2008).

Enzimler genellikle tek bir kimyasal reaksiyonu veya aynı özellikte reaksiyonları katalizler (Keha. ve Küfrevioğlu, 2010). Enzimle katalizlenen reaksiyonlar, katalizlenmeyen reaksiyonlara göre 10^8 ile 10^{20} kat daha hızlıdır. Tipik olarak, her enzim molekülü saniyede 100 ile 1000 substrat molekülünü ürüne çevirme yeteneğine sahiptir (Champe ve Harvey, 1997).

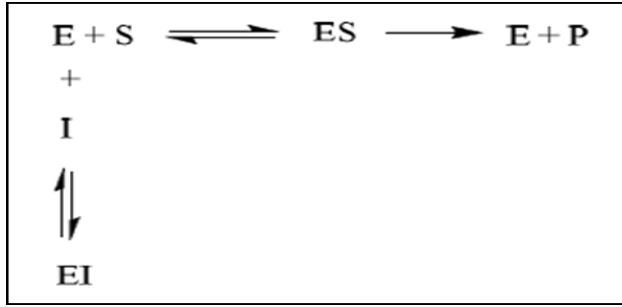
Enzimler diğer proteinler gibi, yaklaşık olarak 12.000'den 1 milyona kadar değişen molekül kütlesine sahiptirler. Bazı enzimler amino asit kalıntıları dışında aktivite için kimyasal gruplara ihtiyaç duymazlar. Diğerleri kofaktör olarak adlandırılan Fe^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} veya Se gibi bir veya daha fazla inorganik iyon veya koenzim olarak adlandırılan kompleks organik veya metalorganik moleküllere gereksinim duyarlar. Bazı enzimlerin ise aktivite gösterebilmeleri için hem koenzime hem de bir veya daha fazla metal iyonuna ihtiyacı vardır. Protein yapısına çok sıkı olarak hatta kovalent olarak bağlanan bir koenzim veya metal iyonu prostetik grup olarak adlandırılır. Metal iyonları ile veya koenzimiyle birlikte katalitik olarak aktif olan bir enzim holoenzim olarak adlandırılırken bu gibi enzimlerin sadece protein kısmı apoenzim veya apoprotein olarak adlandırılmaktadır.

Koenzimler, aldehitler ve açıl grupları gibi özgül işlevsel grupların geçici taşıyıcısı olarak görev yaparlar. Koenzimler çoğunlukla diyet ile düşük miktarlarda alınan organik besinler olan vitaminlerden temin edilirler (Nelson ve Cox, 2005).

Enzimlerin reaksiyon hızları bazı faktörler tarafından etkilenmektedir. Bu etkenler sırasıyla; Substrat konsantrasyonu, Enzim konsantrasyonu, İnhibitör veya aktivatör konsantrasyonu, Kofaktör konsantrasyonu (varsa), pH, Sıcaklık, İyonik şiddet.

Enzimlerin katalizleme güçleri, turnover sayısı ile ifade edilir. Turnover sayısı, birim zamanda bir mol enzimin ürüne dönüştürdüğü substratın mol sayısıdır. Turnover sayısı en yüksek olan enzimlerden biri de karbonik anhidrazdır (600.000s^{-1}) (Harper, 1975).

Enzim inhibisyonu, dönüşümsüz (irreversible) inhibisyon ve dönüşümlü (reversible) inhibisyon olmak üzere iki grupta incelenir. Dönüşümsüz inhibisyonda inhibitör enzime ya kovalent olarak ya da zor ayrışan bir kompleks oluşturacak şekilde bağlanır. Bu yüzden dönüşümsüz inhibitörlere “enzim inaktivatörleri” de denir (İnan ve Gül, 2011). Dönüşümsüz inhibisyonda V_{\max} azalır, K_m ise değişmeden kalır.



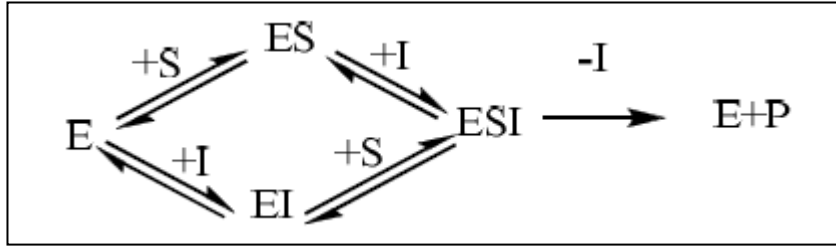
Şekil 1.2. Dönüşümsüz inhibisyon sematik şekli (Keha. ve Küfrevioğlu, 2010).

Dönüşümlü inhibisyonda, enzimle inhibitör etkileşmesi bir denge reaksiyonu şeklindedir.

Dönüşümlü inhibisyon dört grupta incelenir;

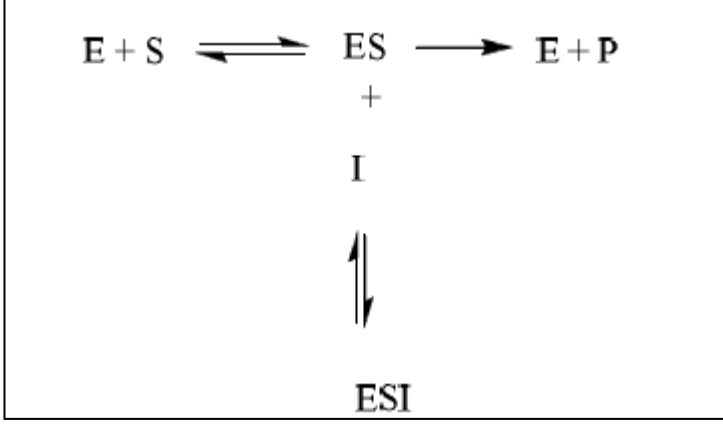
- 1) Yarışmalı inhibisyon (kompetitif)
- 2) Yarışmasız inhibisyon (nonkompetitif)
- 3) Yarı yarışmalı inhibisyon (unkompetitif)
- 4) Lineer karışık tip inhibisyon

Dönüşümlü inhibisyonun en basit tipi yarışmalı (kompetitif) inhibisyonudur. Yarışmalı inhibitör; yapı itibariyle substrata benzer ve enzimin aktif bölgesine bağlanır. Böylece substratın enzime bağlanması önlenmiş olur. Fakat substrat konsantrasyonunu artırmakla inhibisyon etkisi kaldırılabilir. Yani enzimin V_{max} değeri değişmez. Yarışmalı inhibitör belli bir substrat için belirlenmiş K_m 'i (Michaelis sabiti) yükseltir. Yani, yarışmalı bir inhibitör varlığında $1/2V_{max}$ 'a erişmek için daha fazla substrat gerekir (Supuran ve Scozzafava 2000; Sly ve Hu, 1995).



Şekil 1.3. Yarışmalı inhibisyon şematik şekli EI (enzim inhibitör) ve ESI (enzim substrat ve inhibitör) (Keha. ve Küfrevioğlu, 2010).

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. Diğer dönüşümlü inhibisyon tipi, yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyonudur. Bu inhibisyon çeşidinde, inhibitör serbest enzime bağlanamaz, ES kompleksine bağlanır. Birden fazla substratlı enzimlerde bu inhibisyon tipine daha sık rastlanır. Yarı yarışmalı inhibitör varlığında substrat konsantrasyonunun yükseltilmesi ile inhibisyon artabilir. Yarı yarışmalı inhibitör varlığında V_{max} ve K_m değeri azalır. (Keha ve Küfrevioğlu, 2010).



Şekil 1.4. Yarı yarışmalı inhibisyon şematik şekli (Keha. ve Küfrevioğlu, 2010).

Enzim inhibisyonu gibi konuları ele alan çalışmalarda enzim saflığı çok önemlidir. Enzim saflaştırılmasının amacı, özgül bir enzimi diğer birçok yapı tasını 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 yararlanılan özellikleri ise şunlardır:

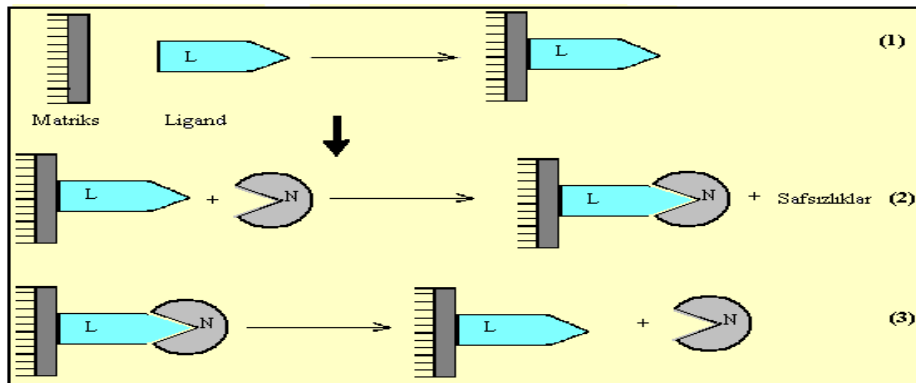
- Molekül büyüklüğü
- Çözünürlük farkı esasına dayanılarak proteinlerin ayrılması
- Elektriksel yük esasına dayanılarak proteinlerin ayrılması
- Seçimli adsorbsiyon esasına dayanılarak proteinlerin ayrılması
- Spesifik ligandları esasına dayanılarak proteinlerin ayrılması (Afinite kromatografisi)

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 imkansız olan birçok ayırma ve saflaştırma işlemi kısa zamanda gerçekleştirilebilir ve yüksek verimde binlerce kez saflaştırılmış bileşikler elde edilebilir.

Afinite kromatografisi ilk defa 1910 yılında amilazın çözünmeyen nisastaya adsorpsiyonu sonucu izolasyonunda kullanılmıştır, fakat kovalent olarak ligandların bağlanabileceği dayanıklı matrislerin bulunmamasından, bu tekniğin yaygın halde uygulanması 1967 den sonra gerçekleşebilmiştir. Bu tarihte, primer amino grubuna sahip bileşiklerin siyano bromür (CNBr) ile aktifleştirilmiş polisakkarit matris üzerine kovalent bağlanabileceği gösterilmiştir (Arslan, 1994). Ayrıca literatürde, afinite jelleri için kullanılan matrislerin aktivasyonu için, oksiran aktifleştirilmesi, karbodiimid aktifleştirilmesi gibi değişik aktifleştirilme yöntemleri de kullanılmıştır (Arslan, 1994). Bu keşiften sonra afinite kromatografisinden yararlanarak, biyospesifik ligandlarla antikorlar, bazı taşıyıcı proteinler, enzimler, nükleik asitler ve hatta bir takım hücrelerde çok saf halde elde edilmeye başlanmıştır (Arslan, 1994).



Şekil 1.5. Afinite kromatografisinin prensibi (Arslan, 1994).

Tablo 1.1. Afinite kromatografisinde en sık kullanılan biyolojik sistemler.

Safılaştırılacak madde	Ligand
Enzim	Substrat, inhibitör, kofaktör
Antikor	Antijen, virüs, hücre
Lektin	Polisakkarit, glikoprotein, hücre, hücre yüzey reseptörü
Nükleik asit	Komplementer baz dizisi, histon, nükleik asit polimeraz, bağlayıcı protein,
Hormon, vitamin	Reseptör, taşıyıcı protein
Hücre	Hücre yüzeyi spesifik proteini, lektin

1.2.1. Afinite Kromatografisi Türleri

Biyoafinite Kromatografisinin alt başlıkları,

1. Hidrofobik Kromatografi
2. İmmünoafinite Kromatografisi
3. Kovalent AK
4. Metal-Şelat AK
5. Moleküler Baskılama AK
6. Membran-Bazlı AC
7. Afinite Kuyruk Kromatografi
8. Lektin Afinite Kromatografisi
9. Boya-Ligand AK
10. Reseptör Afinitesi
11. Zayıf Etkileşim AK

12. Perfizyon AK
 13. Tiyofilik Kromatografi
 14. Yüksek Performans AK
 15. Afinite Yoğunluk Pertörbasyon
 16. Kütüphane Türevli Afinite
 17. Afinite Elektroforezi
 18. Afinite Kapiler Elektroforezi
 19. Santrifüj AK
- (Anonim 2013)

1.3. Karbonik Anhidraz Enzimi (CA: karbonat hidrolizaz, EC 4.2.1.1)

1.3.1. Enzim Özellikleri ve Fizyolojik Önemi

Karbonik Anhidraz ya da karbonik dehidrataz aktif bölgesinde çinko (Zn^{2+}) iyonu içeren metaloenzim ailesinden ve yavaş bir reaksiyon olan karbondioksitin bikarbonat ve protona dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir. Kırmızı kan hücrelerinde, hayvanların diğer kısımlarında ve bitkilerde bulunan, karbonik asidi karbondioksit ve suyla parçalayan enzimdir.

Katalizlenen reaksiyon



şeklindedir.

Bu reaksiyon karbonik anhidraz yokluğunda önemli oranda gerçekleşmesine rağmen katalizlenmeyen reaksiyon hızı çok yavaştır (Henry 1996). Çünkü reaktanları ve

ürünleri birçok fizyolojik ve biyolojik süreç için hayati öneme sahiptir, karbonik anhidraz birçok hücre türlerinde ve dokuda bulunur ve asit-baz dengesi, iyon ve CO₂ taşınması, kemik absorpsiyonu, solunum, glukoneogenez ve ürogenez gibi fizyolojik ve biyolojik aktivitelerde rol oynar (Sly and Hu,1995).

Bu karbonik anhidrazın birçok hastalığın patolojik sürecinde önemli rol oynadığı anlamına gelir. Karbonik anhidraz enzimi en az beş farklı evrimsel olarak birbirinden farklı gen ailesi tarafından kodlanır (Lindskog,1997).

1.3.2. Karbonik Anhidraz İzoenzimleri

1.3.2.1. Alfa/ α sınıfı karbonik anhidrazlar

Bakteri, alg, yeşil bitkiler ve omurgalılarda bulunur. İnsan CA-I ve CA-II izoenziminin kristal yapısı ile sığır CA-III, yassı formu bir sıçan CA-V'i ve *E. coli*'de bulunan CA formu bu yapıdaki enzim tipidir (Lesburg,1995).

1.3.2.2. Beta / β sınıfı karbonik anhidrazlar

Çoğunlukla bakterilerde, alglerde bulunur. Henüz hiçbir β -CA yapısı belirlenmemiştir. Doğal ve mutant bezelye kloroplast CA'sı çapraz bağ çalışmaları, enzimin belirlenen bir alt birimin oktamer yapısında olduğunu gösterir. (Björkback, 1997).

1.3.2.3. Gama/ γ sınıfı karbonik anhidrazlar

Bazı bakterilerde bulunur. Son araştırmalarda *Methanasarcina thermophila*'dan elde edilen bir yapı olarak γ -CA'nın yapısı ortaya konmuştur. Bu trimetrik molekül α -CA'lardan tamamen farklı katlanmalara sahip olup ve bu bölge kalıtsal bölgeyi vurgulamaktadır. (Kisker, 1996).

δ sınıfı CAs, marine diatomda (*thalassiosira weissflogii*) ve ϵ sınıfı CAs ise syanao bakteri ve özellikle bazı kemolitik bakterilerde görülmektedir. (Kisker,1996).

CA ilk olarak memeli eritrositlerinden izole edilmiştir, daha sonraki yıllarda enzim, insan eritrositleri, balık eritrositleri, sıçan eritrositleri, sıçan tükürüğü, sığır kemiği, sığır lökositleri, çeşitli bakteriler ve bitki kaynaklarından saflaştırılmış ve birçok kaynaktan karakterize edilmiştir.

Son olarak Enzimin memelilerdeki molekül kütlesi 30.000 Da civarında olduğu tespit edilmiştir (Feldstein ve Silverman, 1984; Krungkrai et al., 2001 Beydemir et al., 2002; Beydemir ve Gülçin, 2004;).

Balıkların solungaç ve salgı organlarında, bazı böcek ve bakterilerde, kabuklu hayvanların kabuk yapımında ve alglerde , enzimin değişik rolleri olduğu ayrıca ispatlanmıştır (Holmes, 1977; Wistrand, 1981; Chegwiddden et al., 2000;Supuran ve Scozzafava, 2001).

1.3.3. Karbonik Anhidraz (CA) Enziminin Katalizlediği Reaksiyonlar

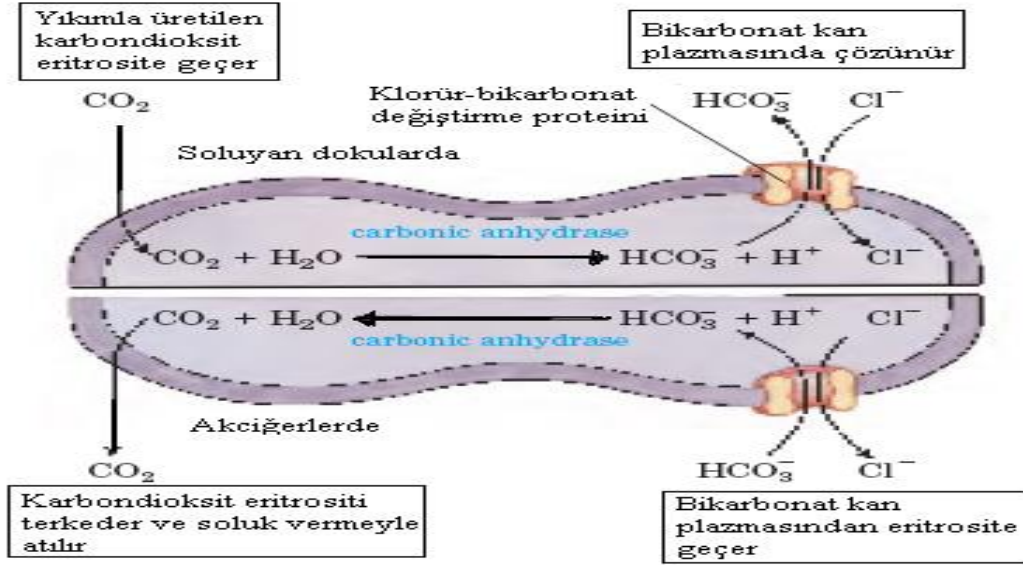
Karbonik anhidraz enzimi HCO_3^- ve H^+ oluşturmaya hem CO_2 in uzaklaştırılmasında hem de asit-baz dengesinin korunmasında önemli rol oynar. Karboksilik, sülfonik ve fosforik asit esterlerinin hidrolizleri de bu enzim tarafından katalizlenmektedir.

(1)	$O=C=O + H_2O \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$
(2)	$O=C=NH + H_2O \rightleftharpoons H_2NCOOH$
(3)	$HN=C=NH + H_2O \rightleftharpoons H_2NCONH_2$
(4)	$RCHO + H_2O \rightleftharpoons RCH(OH)_2$
(5)	$RCOOAr + H_2O \rightleftharpoons RCOOH + ArOH$
(6)	$RSO_3Ar + H_2O \rightleftharpoons RSO_3H + ArOH$
(7)	$ArOPO_3^{-2} + H_2O \rightleftharpoons HPO_3^{-2} + ArOH$
(8)	$ArF + H_2O \rightleftharpoons HF + ArOH$ (Ar=2,4 dinitrofenil)
(9)	$PhCH_2OCOCl + H_2O \rightleftharpoons PhCH_2OH + CO_2 + HCl$
(10)	$RSO_2Cl + H_2O \rightleftharpoons RSO_3H + HCl$ (R=Me;Ph)

Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyon türleri (Supuran ve Scozzafava, 2001). Yeşil bitkiler, fotosentetik hücre kloroplastları vasıtasıyla, gün ışığı varlığında fotosentez yapabilmek için atmosferden karbondioksit kullanılır. Gaz halindeki karbondioksit, bitkinin yapraklarında bikarbonat iyonları halinde taşınır. Hem kara hem de su bitkilerindeki CA enzimi, bikarbonat iyonlarının tekrar karbondioksit dönüşmesini sağlar (Arslan, 1994).

CA enziminin, hidrataz aktivitesi ile son derece önemli bir fizyolojik fonksiyonu yerine getirdiği görülmektedir. Ayrıca bazı ester bağlarını parçalaması ve aldehytlerin hidrasyonunu da katalizlemesi, bu enzimin endüstriyel organik sentezlerde kullanımını gündeme getirmiştir (Arslan, 1995).

CA enzimi eritrositleri de içine alan pek çok dokuda pH düzenleyici enzim olarak karakterize edilmiştir. Başta asit-baz dengesi olmak üzere birçok metabolik olayda rol oynamaktadır. Doku / organlar ile akciğer arasındaki CO_2 / bikarbonatın respirasyonu ve transportu ile ilgili kritik fizyolojik olaylarda, pH ve CO_2 homeostazında, elektrolit sekresyonunda, biyosentetik reaksiyonlarda (glukoneogenez, lipogenez ve üre sentezi), kemik resorpsiyonu, kalsifikasyon, tümör oluşumu ve diğer birçok fizyolojik ve patolojik olayda görev alır (Chegwidden et al., 2000; Supuran ve Scozzafava, 2000).



Şekil 1.6. Eritrosit membranının klorür-bikarbonat değiştiricisi (Lehninger, 2005).

Bu kotransport sistemi, transmembran elektriksel potansiyelde herhangi bir değişiklik yapmadan, HCO_3^- 'ın giriş ve çıkışını sağlar. Görevi kanın CO_2 taşıma kapasitesini artırmaktır (Lehninger, 2005).

1.3.4. Karbonik Anhidrazın nemli İnhibitörleri

ogu tek değerli anyon CA enzimini inhibe eder. Fakat bu iyonların konsantrasyonlar (sığır CA-II, pH 7,55'de) birkaç mikromolar seviyesinde inhibisyon gösteren CN^- iyonu ve 1 M'lik iyon konsantrasyonunda inhibisyon gösteren F^- iyonunda olduğu gibi büyük değişiklik gösterir (Lindskog, 1982).

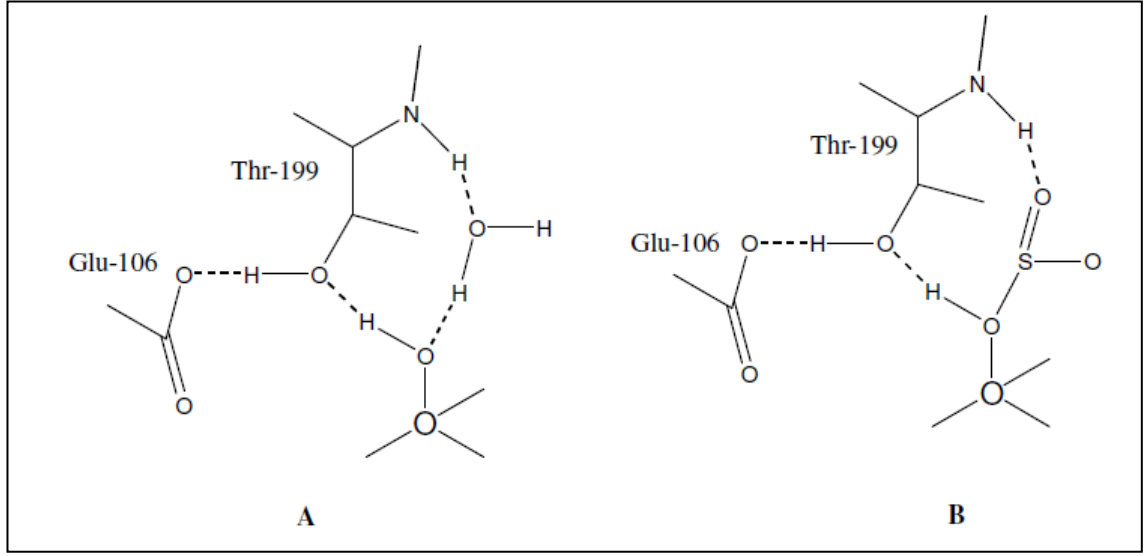
İnhibisyonun pH bağımlılığına ve 2 Co^{2+} 'nin yer değiştirdiği enzimin optik spektrum üzerindeki etkilerine ilişkin çalışmalar, anyonik inhibitörlerin metal iyonuna bağlandığı ve katalitik CO_2 hidrasyonunda önemli bir rolü olan OH^- iyonunun oluşumunu önlediği sonucuna varılmıştır. 2 Co^{2+} ile ilgili spektrumlar bazı anyonların sadece çinko bağlı çözücü molekülü yerinden ederek tetrahedral

koordinasyonu sağladığını, diğer anyonlarınsa pentahedral koordinasyon yapısı oluşturduğunu ileri sürmektedir (Lindskog, 1982).

Lund Üniversitesinde Profesör Anders Liljas'ın laboratuvarında yapılan insan CA-II çalışmaları başta olmak üzere, son kristalografik çalışmalar, anyonik inhibitörlerin çeşitli bağ biçimlerine yeni bir ışık tutmuştur. Aktif bölgenin önemli bir özelliği çinkoya bağlı H_2O veya OH^- iyonu içeren Glu-106 ve Thr-199 bulunduran indirekt liganddaki bir H bağlanma sistemidir.

Glu-106 büyük olasılıkla iyonlaşmıştır ve bu nedenle, hidrojen bağlı Thr-199 ile bir alıcı görevi görmelidir. Sonuç olarak, Thr-199'un hidroksil grubunun, metal bağlı çözücüyle bağlanmasında bir H atomu alıcısı olduğu kabul edilmelidir. Ayrıca, çinkoya bağlı H_2O veya OH^- , hidrofobik bir cepte bulunan bir başka su molekülü ile bir hidrojen bağı oluşturur. Hidrojen, Thr-199'un peptid NH 'ına bağlanır. Bu hidrojen bağı etkileşimlerinin, inhibitörlerin bağı üzerinde belirleyici etkisi olduğunu göstermektedir (Liljas et al., 1994)

Protonlanmış bir ligand atomuna sahip olan inhibitörler, tetrahedral koordinasyon geometrisini bozmaksızın metale bağlı çözücü molekülün yerini alırlar ve Thr-199'un OH grubu ile hidrojen bağı korurlar. HSO_3^- ve HS^- iyonları buna örnek olarak verilebilir. HSO_3^- iyonu derinde olan su molekülü ile yer değiştirirken bir oksijen atomu Thr-199'un NH grubu ile hidrojen bağı oluşturur. Üçüncü oksijen atomu 0,31 nm mesafeden çinkoya doğru yönelir (Mangani ve Hakansson, 1992).



Şekil 1.7. CA-II ile inhibitörler arasındaki komplekslerin yapılarının sematik çizimleri (anonim 2013).

(A İnhibe olmayan enzim B Bisülfür SO_4^{2-} gibi iki değerli anyonlar, CA'yı inhibe etmez veya çok zayıf inhibitörler gibi hareket ederler (Simonsson and Lindskog, 1982). Esasen, $\text{pH}=6,0$ 'da $2,4 \text{ M } (\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ 'ın varlığında bile, insan CA-II izoenziminin kristal yapısında sülfat iyonunun bağlandığına dair hiçbir kanıt yoktur. Negatif yüklü iyon Glu-106'nın bağlanmasını önlemektedir (Hakansson et al., 1992). Yapılan çalışmalarda karbonik anhidraz enziminin en güçlü organik inhibitörünün aromatik ve heteroaromatik sülfonamidler olduğunu göstermektedir. Sülfonamidlerin kolaylıkla iyonik yapı kazanmaları en çarpıcı özelliklerinden biridir. Bu iyonik yapı aşağıdaki reaksiyonda görülmektedir.

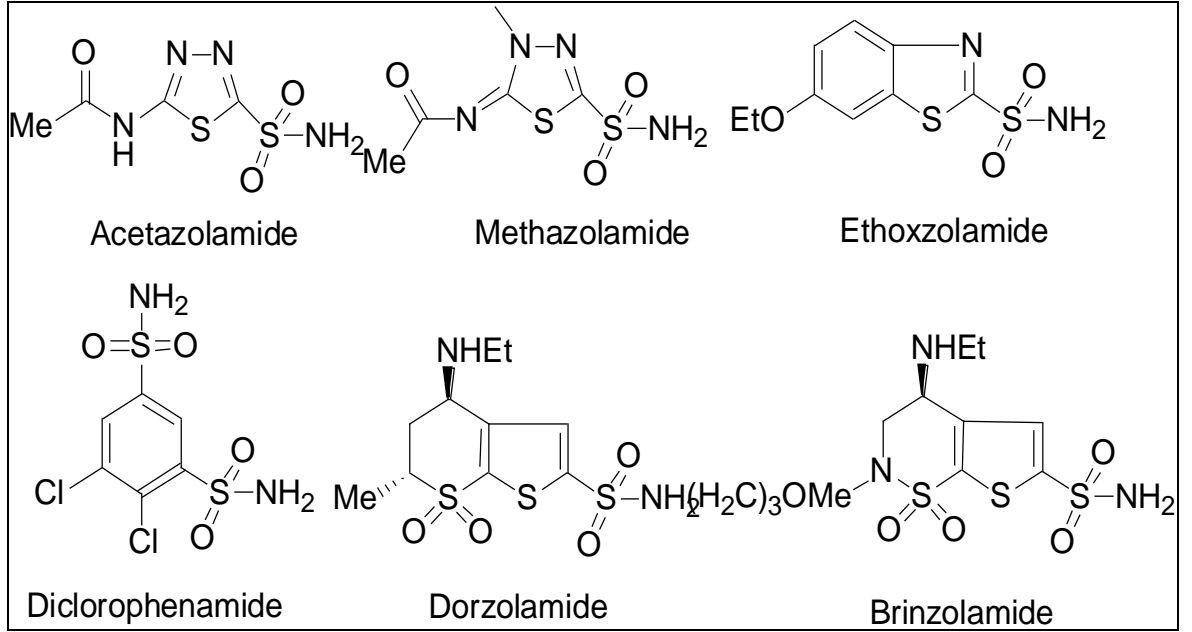


Sülfonamidin bu özelliği karbonik anhidraz enzimi üzerindeki inhibisyon için son derece önemlidir. Ayrıca sülfonamid ligand olarakta kullanılmaktadır (Roughton ve Booth, 1946; Tozlu, 1997).

CA'nın en güçlü organik inhibitörleri aromatik veya hetero aromatik sülfonamidlerdir. Sülfonamidler $-SO_2NH_2$ fonksiyonel grubuna sahip bileşiklerdir. Sülfonamidlerin genelde CA-II için K_i değerleri 10^{-5} ile 10^{-10} M arasında değişir.

Glokom hastalığı tedavisinde CA'nın güçlü inhibitörlerinden olan asetazolamid kullanılmaktadır. Oral yoldan verilen bu ilacın oldukça fazla yan etkileri vardır. Bu yan etkileri azaltmak ve daha etkili bir ilaç molekülü bulmak amacıyla bir çok sülfonamid türevi sentezlenmiş ve göz epitelyumunda bulunan CA-II üzerinde inhibisyon etkileri araştırılmıştır (Supuran ve Scozzafava, 2001; Bülbül ve arkadaşları., 2002).

Günümüzde sülfonamidler glokom hastalığı tedavisi dışında diüretik, antibakteriyel ve antifungal ilaç olarak yaygın kullanıma sahiptirler. Bu sebepten dünyanın bir çok yerinde farklı gruplar tarafından yeni sülfonamid türevleri sentezlenmektedir. Asetazolamid, metazolamid, etazolamid, diklofenamid, dorzolamid ve brinzolamid gibi bazı önemli sülfonamid türevleri aşağıda verilmiştir. Sülfonamidler antiglokom ilacı kullanımının yanı sıra CA-IX ile kanser dokularının direk ilişkisi olması sebebiyle kanser teşhisinde kullanılabilir. Ayrıca CA enzimi inhibitörü olan bu moleküllerin yapılan birçok çalışma sonucunda antiobezite, antifungal, antibakteriyel, diüretik ilaç olarakta kullanılabileceği belirtilmiştir (Supuran, 2008).

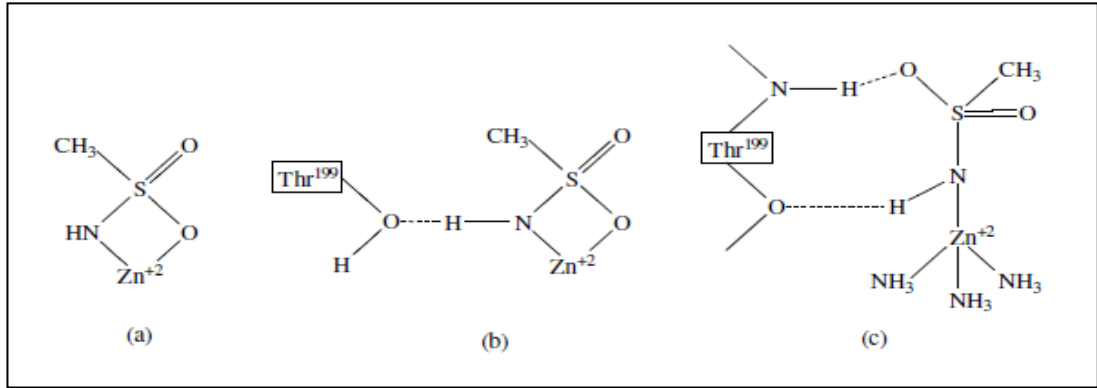


Şekil 1.8. Bazı Sülfonamidlerin açık formülleri (anonim 2013).

Tablo 1.2. Karbonik Anhidraz izoenzimlerinin Hücre içi Yerleşimleri ve Sülfonamidlere ilgisi (Lindskog, 1997)

İzoenzim	Kataliz Aktivitesi (CO ₂ hidrasyonu)	Sülfonamidler için Afinite	Hücre içi Yerleşim
CA I	Düşük (CAII'nin %10'u)	Orta	Sitozol
CA II	Yüksek	Çok yüksek	Sitozol
CA III	Çok düşük (CAII'nin %0.3'ü)	Çok düşük	Sitozol
CA IV	Yüksek	Yüksek	Membrana bağlı
CA VA	Orta-Yüksek*	Yüksek	Mitokondri
CA VB	Yüksek	Yüksek	Mitokondri
CA VI	Orta	Yüksek	Salgı halinde
CA VII	Yüksek	Çok yüksek	Sitozol
CA VIII	Akatalitik		Sitozol
CA IX	Orta	Yüksek	Transmembran
CARP X	Akatalitik		Sitozol

CARP XI	Akatalitik		Sitozol
CA XII	Düşük	Yüksek	Transmembran
CA XIII	Orta	Yüksek	Sitozol
CA XIV	Düşük	Yüksek	Transmembran
CA XV	Düşük	Yüksek	Membrana bağlı

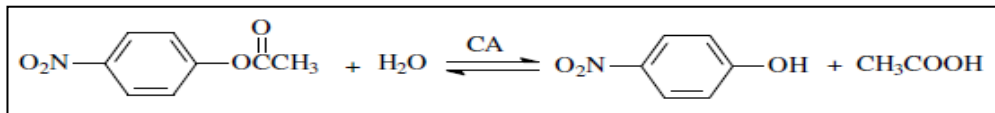


Şekil 1.9. Sülfonamidlerin Karbonik Anhidraz Enzimine Bağlanması (Özensoy, 2002).

1.3.5. Karbonik Anhidraz Aktivitesi Tayin Metodu

1.3.5.1. Esteraz Aktivitesi Ölçümüne Bağlı Yöntem

Kinetik çalışmalarda, CA aktivitesi ölçümleri bu yöntemle yapılmaktadır. Bu yöntem, CA'nın esteraz aktivitesine sahip olması esasına dayanmaktadır (Mc Intosh 1970). Prensipte olarak, karbonik anhidraz substrat olarak kullanılan p-nitrofenil asetatı, p-nitro fenol hidroliz etmekte ve bu da 348 nm dalga boyunda absorpsiyon vermektedir. Reaksiyon denklemi şöyledir;



Ölçümü yapılan 348 nm'deki dalga boyu, p-nitro fenol ve p-nitro fenolat iyonunun izosbestlik olduğu, yani her ikisinin de aynı absorpsiyon verdiği bölgedir.

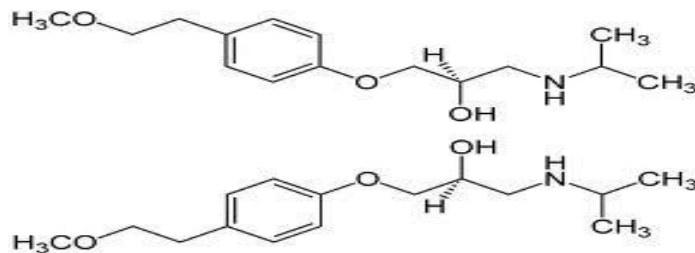
Fenol grupları asidik oldukları için ortamın pH'sına göre, değişen oranda, fenolat ve H^+ iyonlarına ayrılır. 348 nm dalga boyunda p-nitro fenol ve p-nitro fenolat iyonunun absorpsiyonları aynı anda okunabildiği için bu durum absorpsiyon ölçümünü etkilemez. p-nitro fenol bileşiğinin molar ekstiriksiyon katsayısı, $\hat{I}_{348} = 5.4 \times 10^{-3} M^{-1}$ 'dir. Bu dalga boyunda p-nitrofenil asetatın çok az bir absorpsiyonu vardır ve $\hat{I}_{348} = 0,4 \times 10^{-3} M^{-1}$ molar ekstiriksiyon katsayısına sahiptir.

1.4.Deneyde kullanılan ilaçlar ve özellikleri

1.4.1.Metoprolol Tartarat

Metoprolol kardiovasküler sisteme ait bir takım hastalıkların özellikle hipertansiyon tedavisinde kullanılan β_1 reseptör blokleri bir seçicidir. Aktive madde olan metoprolol metoprolol sülsinat veya metoprolol tartrat olarak kullanılır.(10 mg. metoprolol tartrat 95 mg. metoprolol sülsinat a tekabül eder)Tartarat hızlı salım ve sülsinat ise salınım yapar.

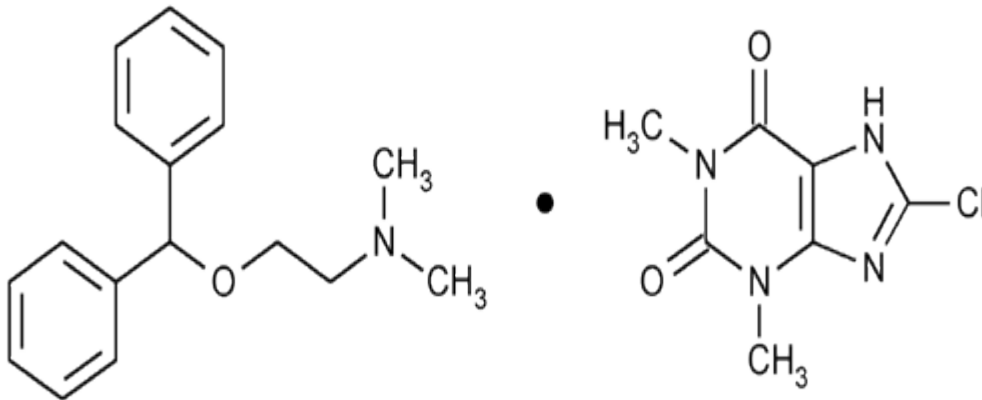
Metoprolol bir takım durumlar için kullanılırHipertansiyon, anjin, akut miyokard infarktüs, supraventriküler taşikardi, ventriküler taşikardi, konjestif kalp yetersizliği ve migren baş ağrısı. Kalp krizi tedavisi, bayılma hipertiroidizm tedavisinde yardımcı, uzun qt sendromu (özellikle astımlı hastalarda, metoprolol'un β_1 seçiciliği astım ilaçları ile az etkileşmesinden dolayı ki genellikle β_2 - adrenerjik reseptör agonist ilaçlardır. Atrium kasılmasının nüks etmesinin önlenmesi. (kontrollü salım / uzatılmış salım formu).Kalpteki Beta1 alıcılarını bloke etmedeki seçiciliğinden dolayı, metoprolol ruhsat dışı olarak performans kaygısı, sosyal kaygı bozuklukları ve diğer kaygı bozukluklarında kullanılır.



Şekil.1.10.Metoprolol kimyasalının moleküler yapısı (anonim 2013)

1.4.2. Dimenhidrinat

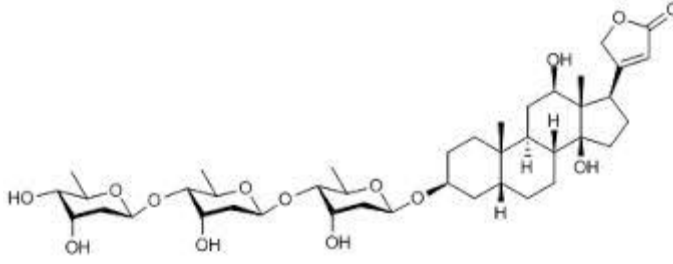
Difenhidramin dimenhidrinatin temel bileşenidir ve temel etkiyi belirler. Ana fark teofilin ile birleşmesinden dolayı düşük bir etkidir. 50 mg. dimenhidrinat 27.2 mg. difenhidramin içerir. Uyuşukluk halini etkisizleştirmek için teofilin eklenir. Teofilin kafein ve tebromin gibi orta şiddetli merkezi sinir sistemi uyarıcıları ile yakından ilgilidir. Difenhidraminin antiemetik (mide bulantısı ve kusmayı bastırma veya önleme görevi olan ilaç) etkilerini bir uyarıcı ile karıştırmakla, bir önceki madde ile şiddetli uyuşukluk hali induklenmiş olma durumu bir sonraki ile hafifletilir. Fakat; difenhidraminin neden olduğu sakinleştirme esasen kloroteofilinin sağladığı uyardıdan daha güçlüdür, böylelikle genel etki büyük oranda sakinleştiricidir. Dimenhidrinatin halen mide bulantısı ve kusmayı engellemek için kullanılması ile birlikte; kimyasal meklozinin gelişimi onun kullanımını bastırmıştır (Dramamin II olarak satılmaktadır) çünkü meklozin genellikle uyuşukluğa neden olmaz.(anonim 2013)



Şekil.1.11.Dimenhidrina kimyasalının moleküler yapısı (anonim 2013)

1.4.3.Digoxin

Dijoksin *Digitalis lanata* yapraklarından çıkarılan saflastırılmış bir aktif glikosiddir. Es aglikonu dijoksijenindir ve asetil turevi asetildijoksindir. Dijoksin yaygın olarak artiyal cirpinim, Atrium adelesinde mevcut ektopik bir odaktan çıkan impulslara bağlı olarak kalp atım sayısının çok aşırı, fazla düzenli olarak artması, başka ilaçlarla kontrol edilemeyen kalp krizi gibi çeşitli kalp problemlerinin tedavisi için kullanılır. Dijoksin hazırlanımı lanoksin, dijitek ve lanoksikap gibi markalar adı altında piyasadadırlar. Aynı zamanda 0.05 mg/ml ağız yolu solüsyonu ve 0.25 mg/ml or 0.5 mg/ml damardan alım solüsyonu olarak mevcuttur. GlaxoSmithKline ve daha birçok farmakotik üreticiler tarafından piyasa bulunmaktadır.(anonim 2013)

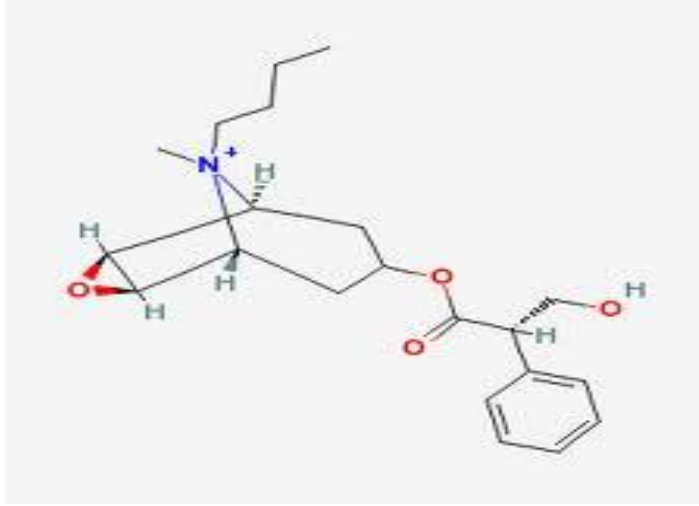


Şekil.1.12.Digoxin kimyasalının moleküler yapısı (anonim 2013).

1.4.4. Hiyosin - N – butilbromür

Hiyosin-N-butylbromür sindirim sistemi ve üreme – boşaltım sistemlerine ait düz kasları gevşeterek çalışır, böylece spazmları düzeltir ve/veya oluşmalarını önler. Hiyosin - N - butylbromür aşağıdaki durumlar ile ilgili bir ilaçtır: sindirim sisteminde oluşan spazmlar; safra yolları spazmları; spazmlarla birlikte görülen ağrılar; üreme – boşaltım sisteminde oluşan spazmlar; zorlu ve ağrılı geçen adet (regl) dönemleri; doğum esnasındaki yumuşak doku spazmları; endoskopik muayenelerde, küçük ürolojik ve jinekolojik müdahalelerde oluşan spazmların önlenmesi. Hiyosin - N -

butilbromür burada yer almayan diğer tedavi edici amaçlar için de kullanılıyor olabilir.



Şekil.1.13.Hiyosin-N-butilbromür kimyasalının moleküler yapısı (anonim 2013)

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Karbonik anhidraz enzimi, 1933 yılında Meldrum ve Roughton ile Stadie ve O'Brien tarafından ve birbirlerinden habersiz olarak keşfedilmiştir. Meldrum ve Roughton (1933) insan eritrosit karbonik anhidraz enzimini yüksek oranda saflaştırmalarına rağmen sığır eritrositlerinden saflaştırmayı 1930'lu yılların sonlarında gerçekleştirebilmiştir. Keilin ve Martin (1944), CA aktivitesinin çinko içeriği ile orantılı olduğunu bularak çinkonun katalizlemede spesifik rolü olduğunu bildirmişlerdir. Böylece CA enzimi tanımlanan ilk metalloenzim olarak tarihe geçmiştir.

Memeli dokularında şimdiye kadar 16 adet CA izoenzimi belirlenmiş ve bu izoenzimlerin farklı canlıların hangi dokularında eksprese oldukları araştırılmış ve hala bu konuda çalışmalar sürdürülmektedir (Lönnerholm et al., 1985; Okuyama et al., 1995; Parkkila et al., 1996; Christie et al., 1997).

Karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması için en çok uygulanan metod afinite kromatografisidir. Karbonik anhidraz enzimi ilk kez 1972 yılında Falkbring ve arkadaşları tarafından bir afinite jeli kullanılarak saflaştırılmış, daha sonra 1974 yılında Whitney'in, 1980 yılında Wistrand ve arkadaşlarının ve 1996'da Arslan ve arkadaşlarının, 2004'te Özensoy ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda farklı afinite jelleri sentezlenmiştir.

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

Enzim *Plasmodium falciparum*'dan katyon değiştirici Mono S kolonu, 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 (Krungkrai et al., 2001).

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

Daha sonra enzimin doğal molekül kütlesini belirlemek amacıyla jel filtrasyon kromatografisi yapılmış ve 31.000 Da olarak tespit edilmiştir. Böylece enzimin aktif formunun monomerik yapıda olduğu gösterilmiştir. Krungkrai ve arkadaşlarının (2001), yaptıkları bir araştırmada, *Plasmodium falciparum*'dan saflaştırılan CA'nın molekül kütlesi 32.000 Da olarak belirlenmiştir.

CA enzimleri hayvanlarda ve özellikle de insan hastalıklarının birçoğunun tedavisinde kullanılan ilaçlar için hedef enzim olmuştur. Asetazolamid, dorzolamid ve brinzolamid gibi sülfonamid türevleri olan ilaçlar karbonik anhidraz izoenzimlerinin kuvvetli inhibitörleridirler (Bülbül et al., 2002). Örneğin insanlarda glokom hastalığında CA inhibitörleri farmakolojik ajan olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Casini et al., 2003).

Ceyhun 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.

P. 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.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmalarımızda kullanılan standart serum albümin, N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin (TEMED), diyaliz torbaları, Siyanojen bromürle aktive edilmiş 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 brilliant blue G-250, brom timol mavisi, sodyum dodesil sülfat (SDS), agar, 1-naftilamin, amonyum persülfat, β -merkaptotanol; çalışmada kullanılan antibiyotikler ise piyasadan temin edilmiştir.

3.1.2. 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

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

3.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

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

1. 0,2 M NaHCO₃, pH=8,8 (Sepharose matrisleri üzerinde afinite jeli hazırlanırken kullanılan tampon): 16,8 g NaHCO₃, 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 Na₂SO₄, pH=8,7 (afinite jelinin dengelenmesinde kullanılan tampon): 3,0275 g Tris ve 14,2 g Na₂SO₄, 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 Na₂SO₄, pH=8,7 (hemolizatın tatbikinden sonra afinite jelinin yıkanmasında kullanılan tampon) 3,0275 g Tris ve 3,124 g Na₂SO₄, 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 NaCH₃COO / 0,5 M NaClO₄, pH= 5,6 (kolona tutunmuş CA-II enziminin elüsyonu için kullanılan tampon çözelti): 2,04 g NaCH₃COO.3H₂O ve 9,187 g NaClO₄ 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-SO₄, pH=7,4 (Esteraz aktivitesi ve diyalizde kullanılan tampon çözelti): 6,055 g Tris 950 ml destile su içerisinde çözülerek, 1 N H₂SO₄ ile pH'sı 7,4'e getirildikten sonra hacim destile su ile 1 litreye tamamlandı.

7. %0,02'lik NaN₃ çözeltisi (Afinite kolonunun bakterilerden korunması için kullanılan çözelti): 20 mg NaN₃ 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 tamamlanması ile hazırlandı ve bu tamponu kullanmadan hemen önce, 950 µl numune tamponundan 50 µl olacak şekilde β- merkaptotanol 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 kadarı 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.

3.2. Yöntem

3.2.1. Protein Tayini

3.2.1.1. 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 köre karşı okundu.

3.2.1.2. Bradford yöntemi ile protein tayini

Afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltisi ve hemolizattaki protein miktarları bu yöntemle belirlendi. Bu yöntem, proteine coomassie brilliant blue G-250'nin bağlanması esasına dayanır. Oluşan kompleks 595 nm'de maksimum absorbans gösterir. Proteine boyanın bağlanması çok hızlı gelişir. Protein-boya kompleksi çözeltilerde uzun süre kalır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır (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.

3.2.2.Karbonik Anhidraz Aktivitesi Tayini

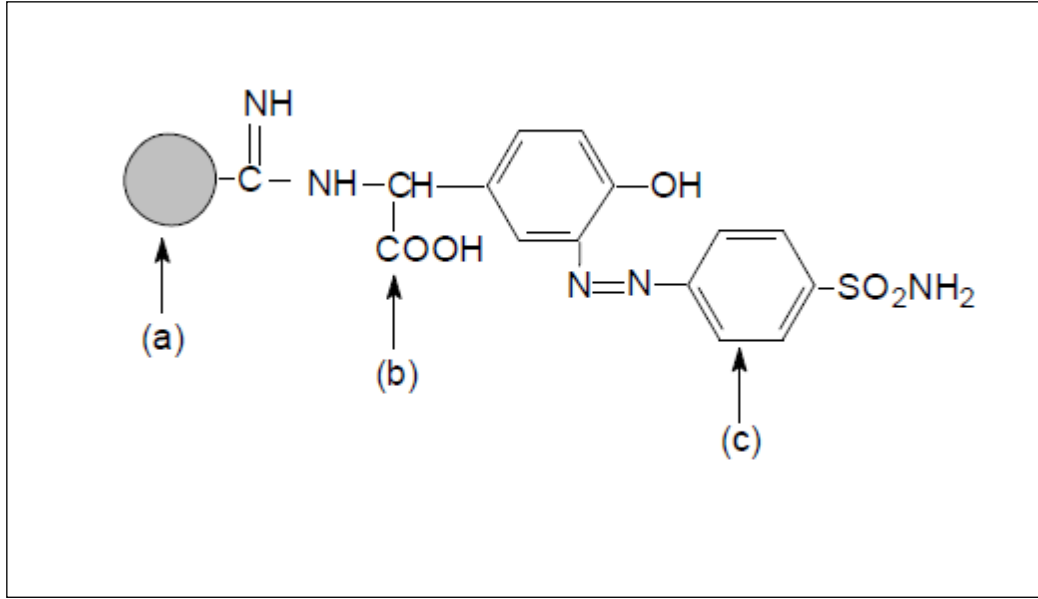
3.2.2.1. Esteraz aktivitesi tayini

Kinetik çalışmalarda karbonik anhidraz aktivitesi ölçümleri bu yöntemle yapıldı. Bu yöntem karbonik anhidrazın esteraz aktivitesine sahip olması esasına dayanmaktadır. Prensip 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 günlük hazırlandı. p-nitrofenil asetat 27 mg p-nitrofenil asetat tartılarak 1 ml aseton içinde çözüldü ve hızlıca karıştırılan 49 ml destile suya yavaş yavaş ilave edildi.

3.2. 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-aminobenzensülfonamid) uzantı koluna bağlanmasıdır. Çalışma için sentezlenen afinite jelinin yapısı Şekil-3.1 de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması için kullanılan afinite jelinin kimyasal yapısı) Matriks. CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B b) Uzantı kolu. L-tirozin c) Sulfanilamid

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.

3.2.3.1. 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).

3.2.3.2. 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)

3.2.4. 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 oluşturucu bir plaka ile düz bir plaka üst üste getirilerek kısıkaçlarla tutturuldu. Sabitleştirilen plakalar, içerisinde sızdırmayı önleyen sünger ihtiva eden jel hazırlama kabinine 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 yığma jeli hazırlandı.

Jelin üst kısmındaki boşluğa dolduruldu ve numune kuyucuklarının oluşması için tarak dikkatlice yerleştirildi.

Yığılma jelinin katılaşması beklenirken ıslatılmış süzgeç kağıdı sistemin üzerine kapatıldı ve kurumaması önlemleri alındı. Yığılma 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 anlaşıldı.

Yürütme işlemi bittikten sonra akım kesilerek plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı ve sabitleştirme çözeltisine konuldu. Sabitleştirme çözeltisinde 20 dakika bekletilen jel, çıkarılarak boyama çözeltisine konuldu ve çalkalayıcı üzerinde 2 saat bekletildi. Jel boyandıktan sonra çıkarılarak yıkama çözeltisine konuldu. Rengi açılıp, protein bantları belirginleşene kadar çalkalayıcıda yıkanan jel çıkarılarak fotoğrafı çekildi (Şekil 4.1).

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. Yığılma 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.

3.2.5. İnsan Kanından Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin Saflaştırılması

3.2.5.1.İnsan kanının temini ve hemolizat hazırlanması

Deneyde kullanılan kordon 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 KH_2PO_4 (pH=7,0) tampon çözeltisinin içinde +4 °C'de homojenize edildi. Elde edilen homojenat süzgeç kağıdı 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.

3.2.5.2. 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 paketlendi. Jel çöktükten sonra peristaltik pompa yardımıyla dengeleme tamponu ile yıkandı. Kolonun dengelenmiş olup olmadığı eluat ile tamponun 280 nm'de absorbanslarının ve pH'larının eşitlenmesinden anlaşıldı.

3.2.5.3. 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 Na_2SO_4 (pH:8.7) çözeltisi ile yıkandı. Böylece karbonik anhidraz enzimi kolona tutunmuş ve diğer safsızlıklar uzaklaştırılmış oldu. Sonra 1M NaCl/25mM Na_2HPO_4 (pH:6,3) tamponu tatbik edilerek CAI enzimi; daha sonra 0,1 M NaCH_3COO /0,5 M NaClO_4 (pH:5.6) çözeltisi kolona tatbik edilip CAII

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.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

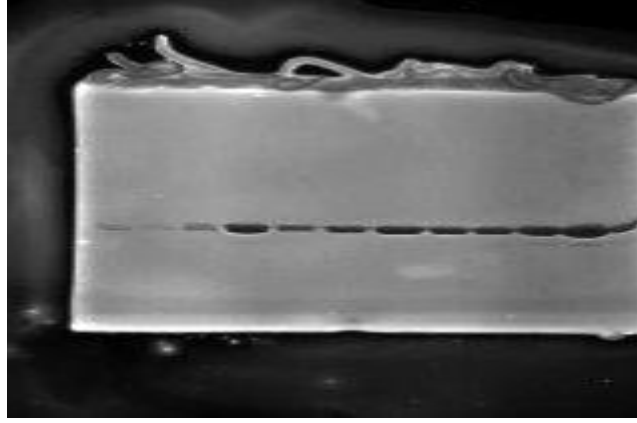
4.1. Sonuçlar

4.1.1. Saflaştırma sonuçları

Tez kapsamında yapılan çalışmalardan elde edilen veriler, bu bölümde çizelge ve şekiller ile gösterildi. Tablo 4.1'de,insan kanında CA-I izoenziminin Sepharose 4B-L-tirozin-sulfanilamid afinite kolon materyali ile saflaştırılma basamaklarının sonuçlarını vermektedir. Ayrıca afinite kromatografisi yöntemiyle saflaştırma sonucu yapılan SDS-PAGE sonuçları verilmektedir (Şekil4.1.).

Tablo 4.1.İnsan kanının CA-I izoenziminin 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	162,00	48,00	17,63	846,24	7776,00	9,19	100	1,00
CA-I	542,00	7,50	0,51	3,83	4065,00	1062,75	62	115,64



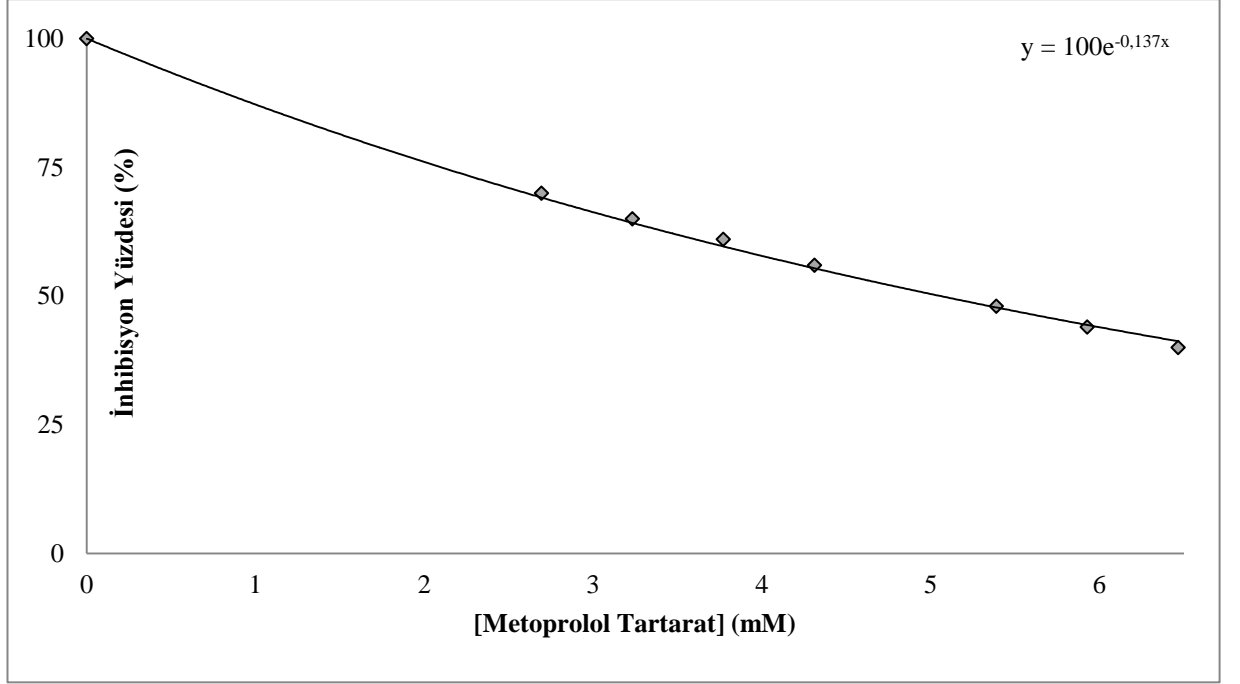
Şekil 4.1. Saflaştırılmış CA I izoenzimlerinin SDS-PAGE fotoğrafı

4.1.2. İnhibisyon çalışmaları sonuçları

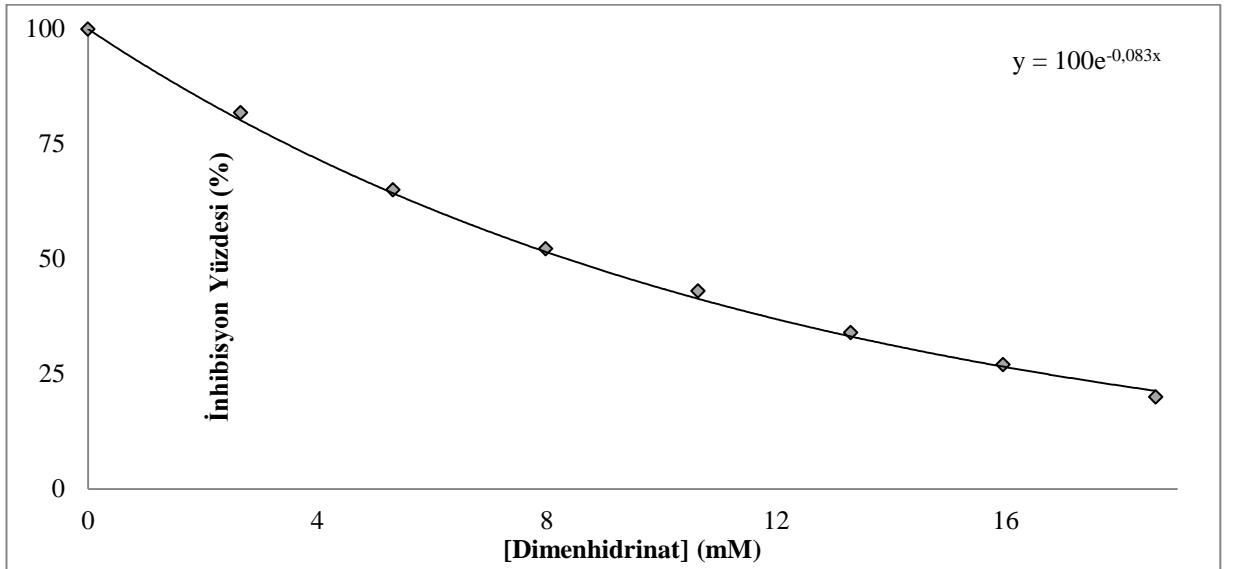
İnsan kanı karbonik anhidraz I aktivitesi üzerine Metoprolol Tartarat, Dimenhidrinat, Digoksin, Butopan inhibisyon etkilerini belirlemek amacıyla bu bileşiklerin stok çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerden değişik konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanarak insan kanından saflaştırılan karbonik anhidraz I izoenzim aktivitesi üzerine etkileri araştırıldı. Konsantrasyona karşı % aktivite (%aktivite-[I]) olarak oluşturulan grafikler Şekil 4.2-4.5’de gösterildi. Eğrilerin denkleminde I_{50} değerleri hesaplandı.

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 (Tablo4.3.)

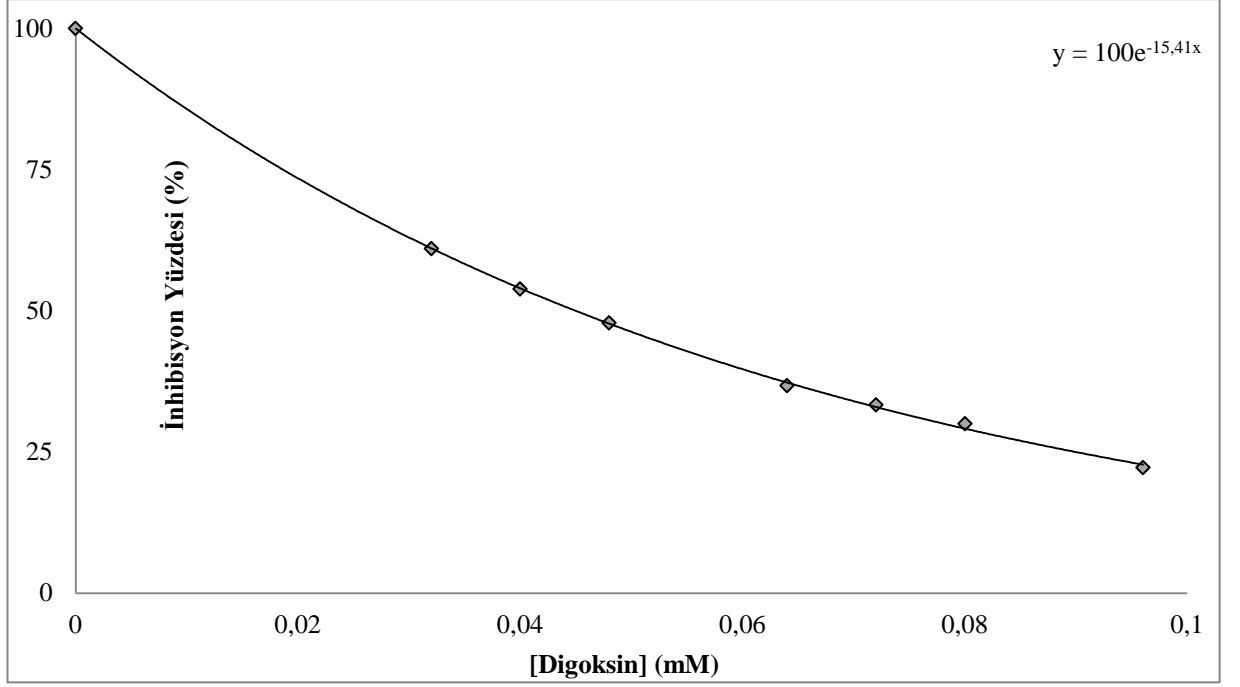
I₅₀ Grafikleri ve Değerleri



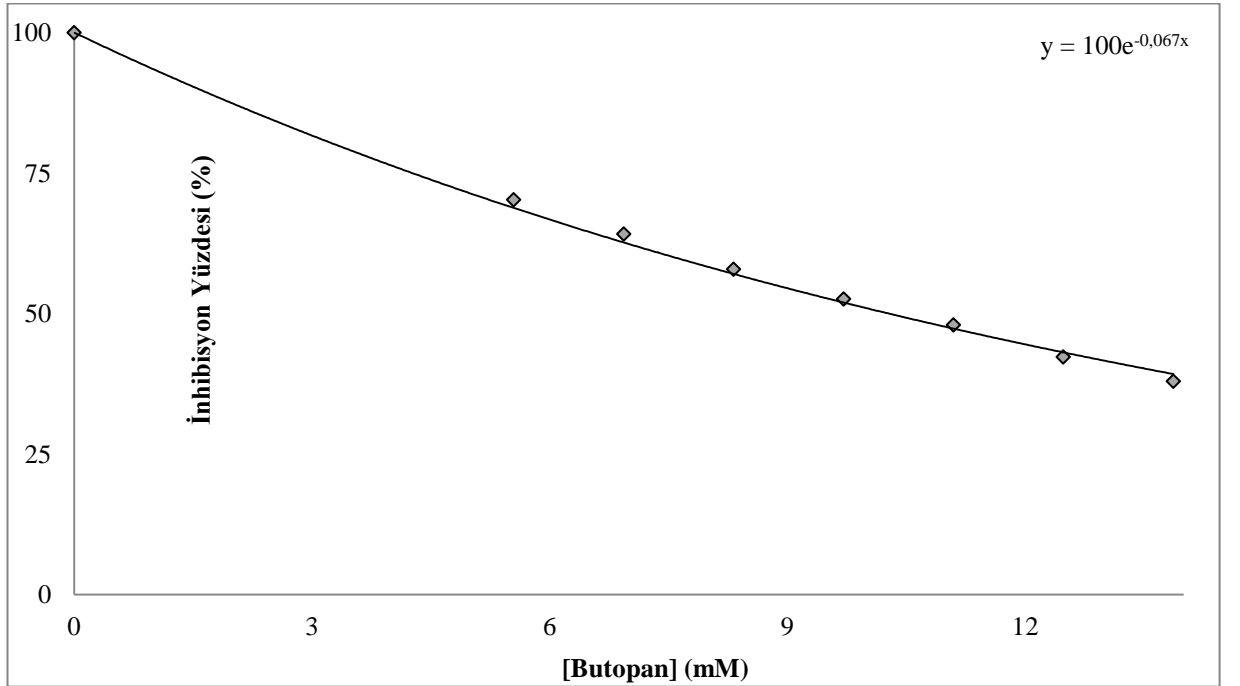
Şekil.4.2. Metoprolol Tartarat'ın CA I izoenzimine karşı I₅₀ grafiği



Şekil.4.3. Dimenhidrinat'ın CA I izoenzimine karşı I₅₀ grafiği



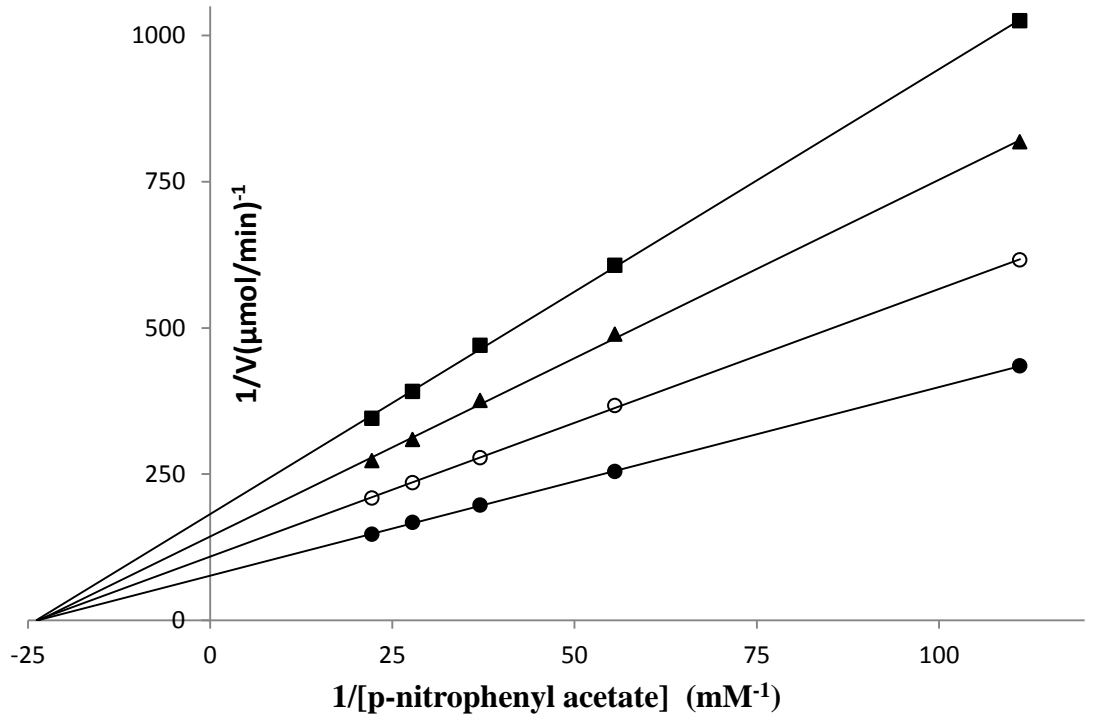
Şekil.4.4. Digoksin'in CA I izoenzimine karşı I₅₀ grafiği

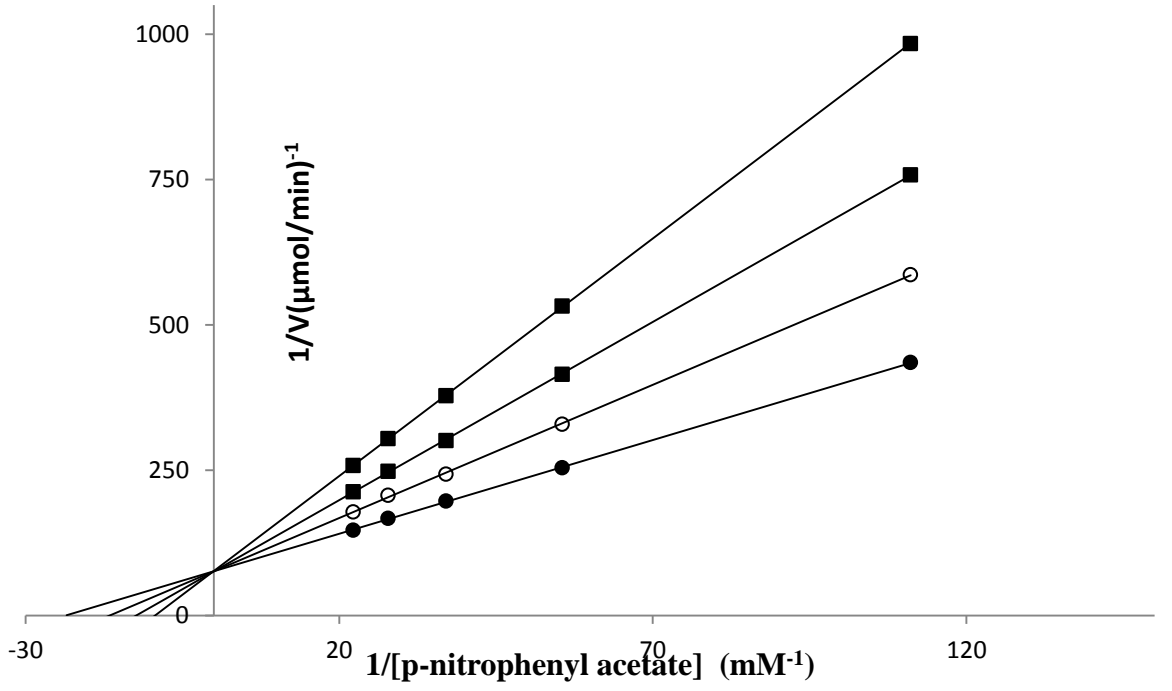


Şekil.4.5. Hiyosin - N – butilbromür'ün CA I izoenzimine karşı I₅₀ grafiği

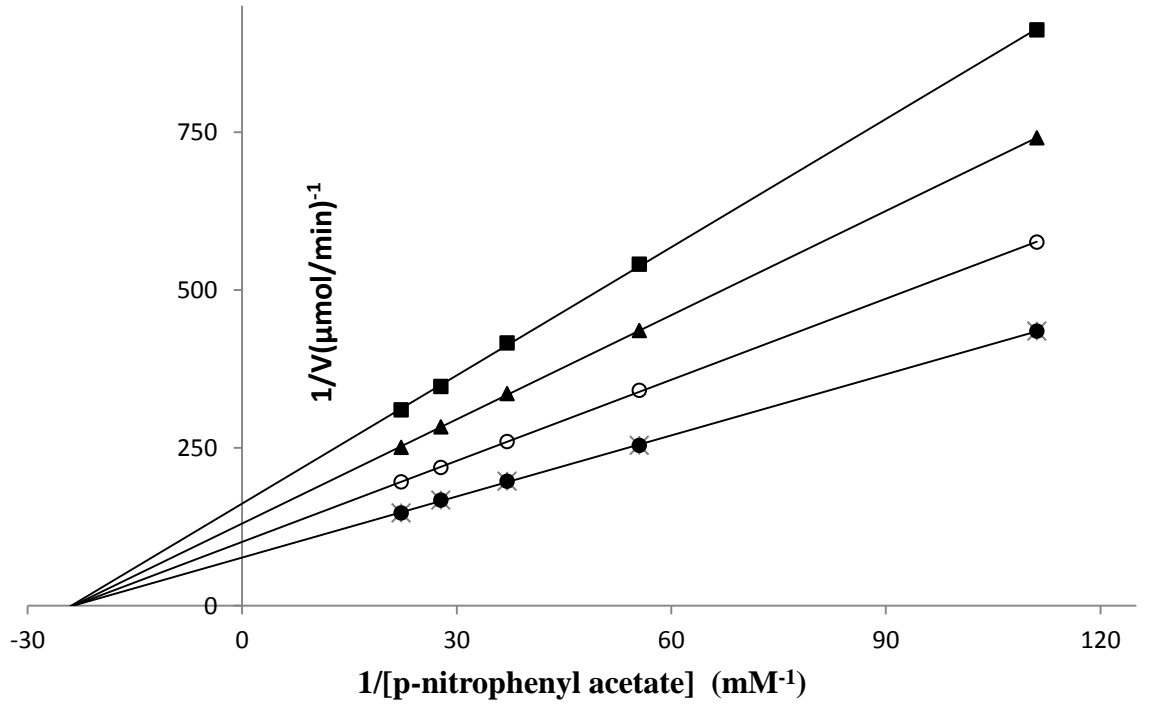
Tablo 4.2. Denemesi yapılan etken maddelerin I_{50} değerleri.

İnhibitör	CA-I I_{50} değeri (mM)
Metoprolol Tartarat	5,036
Dimenhidrinat	8,313
Digoksin	0,045
Hiyosin - N – butilbromür	10,299

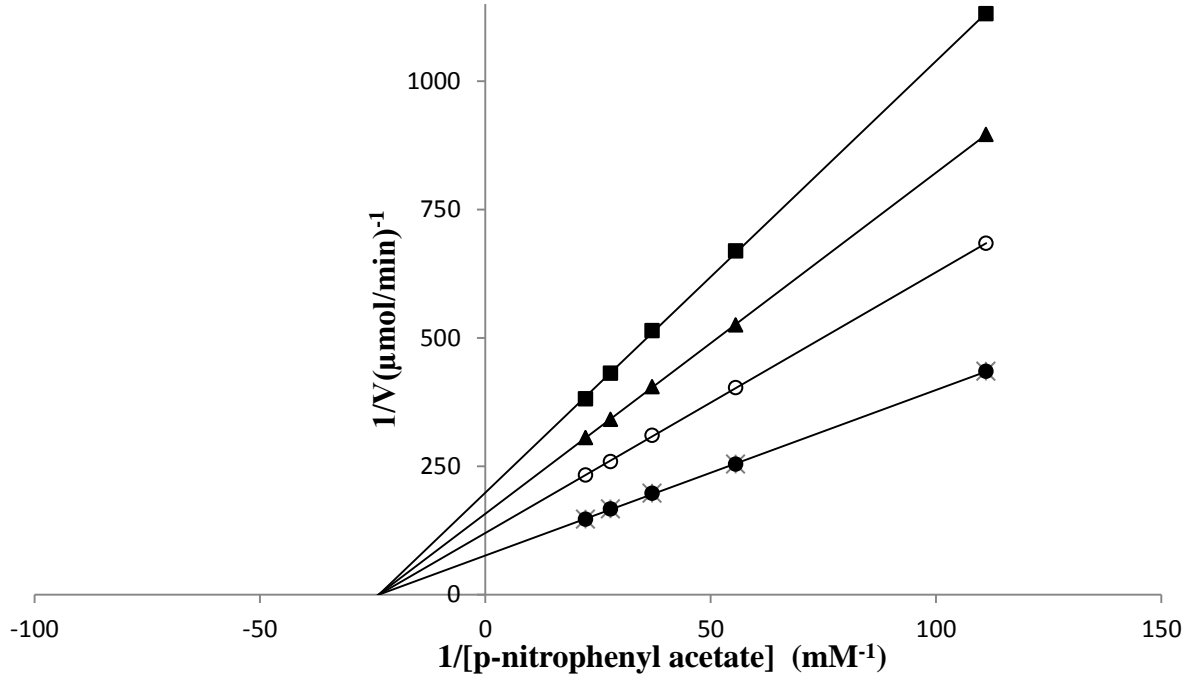
 K_i Grafikleri ve Değerleri**Şekil 4.6.** Metoprolol Tartarat'ın CA I izoenzimine karşı K_i grafiği.



Şekil 4.7. Dimenhidrinat'ın CA I izoenzimine karşı K_i grafiği.



Şekil 4.8. Digoksin'in CA I izoenzimine karşı K_i grafiği.



Şekil 4.9. Hiyosin - N – butilbromür'ün CA I izoenzimine karşı K_i grafiği

Tablo 4.3. Denemesi yapılan etken maddelerin K_i değerleri.

İnhibitör	CA I K_i değeri (mM)	İnhibisyon türü
Metoprolol Tartarat	$5,49 \pm 1,86$	Yarışmasız
Dimenhidrinat	$15,89 \pm 6,55$	Yarışmalı
Digoksin	$0,0914 \pm 0,0062$	Yarışmasız
Hiyosin - N – butilbromür	$11,22 \pm 2,94$	Yarışmasız

4.2. Tartışma

Bu çalışmamızda belirli ölçüde saflaştırılarak, saf izoenzim üzerinde farklı gruplarda dört farklı ilacın etken maddelerinin inhibisyon çalışmaları yapılmıştır. Enzimin saflığı inhibisyonu önemli derecede etkilediği düşünüldüğünde 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 aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye buna uzantı kolu olarak L-tirozin bağlandıktan sonra, diazolanmış sulfonamid 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 4.1.'de görüldüğü gibi CA I enzimi afinite kromatografisi ile insan kanından, spesifik aktivitesi 1062,75 (EÜ/mg protein) olan, %62 verimle ve yaklaşık 115 kat saflaştırılmıştır.

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

Buna ek olarak, insan eritrositlerinden CA-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).

Enzim *Plasmodium falciparum*'dan katyon değiştirici Mono S kolonu, 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 (Krungkrai et al. 2001).

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

Literatürde kromatografik matriks olarak kullanılan bir başka bileşik EUPERGIT C-250 L ticari ismi ile temin edilen ve oksiran grupları içeren jeller de kullanılmıştır. Söz konusu bileşik bağlamada spesifik olmamasına rağmen, üzerinde taşıdığı oksiran grupları ile çeşitli proteinlerin saflaştırılmasında kromatografik matriks 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 (Özensoy, 2004).

Ceyhun 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.

İnsan kanından affinite tekniğiyle saflaştırdığımız karbonik anhidraz I izoenzimi üzerinde *in vitro* inhibisyon etkileri araştırılmıştır. İnhibisyona neden olan ilaçların inhibisyon etkisi K_i ve I_{50} olmak üzere iki farklı degerle verilebilir. En pratik parametre I_{50} degeridir. Çünkü materyal ve yöntemde belirtildiği gibi K_i sabitinin belirlenmesi için en az iki sabit inhibitör konsantrasyonunda çalışmalar yapılmakta ve her bir sabit antibiyotik 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 ilaç konsantrasyonu hesaplanmaktadır. Fakat inhibisyon tipinin belirlenmesi için K_i degerinin hesaplanması gerekmektedir.

Elde edilen sonuçlara bakıldığında uygulanan ilaçlar içinde, çok düşük konsantrasyonda aktiviteyi % 50 azaltması ile CA I izoenzimi üzerinde denediğimiz en kuvvetli inhibitör Digoksin (I_{50} mM; CA I:0,045) olarak tespit edilmiştir. Bunun yanısıra Hiyosin - N – butilbromür (I_{50} mM; CA I: 10,299) ise ilaçlar arasında en az etkiye sahip olmuştur.

Sonuç olarak bu tez kapsamında;

- 1.İnsan kanından Karbonik anhidrazın I izoenzimi saflaştırılması gerçekleştirilmiştir.
2. Çalışma sonucunda insan kanından CA I enzimi % 62 verimle yaklaşık 115 kat saflaştırılabildiği görülmüştür. Enzimin saflığı elektroforezle kontrol edilerek tek bant gözlenmiştir.
- 3.İnsan kanında CA I izoenzimi üzerine bazı ilaçların inhibisyon etkileri incelenmiştir. Bu amaçla yapılan çalışmada Metoprolol Tartarat, Dimenhidrinat, Digoxin, Hiyosin_N_butilbromür ilaçlarının enzim üzerine inhibisyon etkileri incelenmiştir.

4.CAI izoenzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren ilaçların Metoprolol Tartarat, Dimenhidrinat, Digoxin, Hiyosin_N_butilbromür etken maddeleri için I_{50} ve K_i değerleri hesaplanmış ve inhibisyon tipleri belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

- Arslan, O., “Glaucoma Tedavisinde Kullanılmaya Aday Karbonik Anhidraz İnhibitorlarının Sentezi ve İnhibisyon Etkilerinin Arastırılması”, Doktora Tezi, **Ataturk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Erzurum**, (1994).
- Arslan, O., Nalbantoğlu, B., Demir, N., Ozdemir, H., and Kuhrevioğlu, İ. O., “A New Method for the Purification of Carbonic Anhydrase Isozymes by Affinity Chromatography” , **Turk J. Med. Sci.**, 26:163 (1995).
- Arslan, O., Nalbantoglu, B., Demir, N., Ozdemir, H., and Kufrevioglu O.I., “A new method for purification of carbonic anhydrase isozymes by affinity chromatography”, **Turk J. Med. Sci**, 26:163 (1996).
- Banerjee, A.L., Swanson, M., Malik, S., and Srivastava, DK., “Purification of recombinant human carbonic anhydrase-II by metal affinity chromatography without incorporating hstidine tags” , **Protein Expres. Purif**, 37:450-454 (2004).
- 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” , **Biol. Pharm. Bull.**, 25(8): 966-969 (2002).
- Beydemir, Ş., Gülçin, İ., “Effect of melatonin on carbonic anhydrase from human erythrocyte in vitro and from rat erythrocyte in vivo”. **J. Enzyme. Inhib. Med.**, 19: 193-197 (2004).
- Björkbacka, H., Johansson, I.M., Skärfstad, E., Forsman, C., “The sulfhydryl groups of Cys 269 and Cys 272 are critical for the oligomeric state of chloroplast carbonic anhydrase from *Pisum sativum*” , **Biochemistry**. 36(14):4287-4294 (1997).
- 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 (1976).

- Bülbül M., Saraçoğlu N., Küfrevioğlu Ö.İ., Çiftçi M., “Bile acid derivatives of 5-amino-1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamide as new carbonic anhydrase inhibitors: Synthesis and investigation of inhibition effects”. *Bioorg. Med. Chem.* 10: 2561 (2002).
- Ceyhun, S.B., Sentürk, M., Yerlikaya, E., Erdoğan, O., Küfrevioğlu, O.İ., Ekinci, D., “Purification and characterization of carbonic anhydrase from the teleost fish *Dicentrarchus labrax* (European seabass) liver and toxicological effects of metals on enzyme activity.” *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 32(1):69-74 (2011).
- Clanis, Y., D., "Matrix Evaluation for Preparative High-Performance affinity Chromatography", *J. Chromatogr.*, 407, Pt. A, 179-187 (1990).
- Casini, A., Antel, J., Abbate, F., Scozzafava, A., David, S., Waldeck, H., Schafer, S., Supuran, C. T., “Carbonic anhydrase inhibitors: SAR and X-ray crystallographic study for the interaction of sugar sulfamates/sulfamides with isozymes I, II, and IV” , *Bioorg Med. Chem. Lett.*, 13: 841–845(2003).
- Champe P.C, Harvey R.A.. “Biyokimya”, *Nobel tıp kitapevi*, 297. 1997
- Chappuis. P., Arnaud. J., Vitoux. D., Are Copper, “Zinc and Selenium in Erythrocytes Valuable Biological Indexes of Nutrition and Pathology?” , *J. Trace. Elem. Med. Biol.*, vol 13, pp. 113- 128, (1999).
- Chegwidden, W.R., Edwards, Y., Carter, N., *The Carbonic Anhydrases-New Horizons., Molecular Bases of Inherited Disease* (Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., and Valle, D., eds) 8th Ed, , McGraw-Hill, Inc., *New York*, 2165–2204 (2000).
- Christie, K.N., Thomson, C., Xue, L., Lucocq, J.M., Hopwood, D., “Carbonic anhydrase isoenzymes I, II, III, and IV are present in human oesophageal epithelium.” *J. Histochem. Cytochem.* 45:35-40. (1997)
- Dikmen, N., Özgünen, T., “Harper Biyokimya”, *Nobel Tıp Kitapevleri*, sayfa 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. Toxi. and pharm.*, 32: 69–74 (2011).
- Falkbring, S.O., Göthe, P.O., Nyman, L., and Porath, J., “Affinity chromatography of carbonic anhydrase”. *FEBS. Letter*, 24: 229 (1972).
- Feldstein, J.B., Silvarman D.N., “Purification and characterization of carbonic anhydrase from the saliva of the rat”, *J. Biol. Chem.*, 259(9): 5447-53 (1984).
- 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).
- Hakansson, K., Carlsson, M., Svensson, L. A. and Liljas, A., “Structure of native and apo carbonic anhydrase II”. *J. Mol. Biol*, 227 : 1192-1204 (1992).
- Holmes, R., S., “Purification, Molecular Properties and Ontogeny of Carbonic Anhydrase Isozymes Evidence for A, B and C Isozymes in Avian and Mammalian Tissues”, *Eur. J. Biochem.*, 78: 511 (1997).
- İnan, Y. ve Gül, M., “Biyokimya” ,*Nobel tıp kitapevi Ltd.Şti.*, 447 (2001).
- Keha, E.E., Küfrevioğlu, Ö. “Biyokimya”, *Aktif Yayınevi, Erzurum*, 85-95 (2010).
- Keilin, D., and Mann, T., “Activity of purified carbonic anhydrase”. *Nature* 153: 107-108 (1944).
- Kisker, C., Schindelin, H., Albert, B. E., Ferry, J. G., and Rees, D. C., “A left handed β -helix revealed by the crystal structure of a carbonic anhydrase from the archaeon *Methanasarcina thermophila*”. *EMBO*, 15: 2323-2330 (1996).
- Krungkrai, S.R., Suraveratum, N., Rochanakij, S., and Krungkrai, J., “Characterization of carbonic anhydrase in *Plasmodium falciparum*”. *Int. J. Parasitol.*, 31:661-668 (2001).

- Laemmli, D.K., "Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of Bacteriophage T4". *Nature*, 227: 680 (1970).
- Lehninger, A.L., "Principles of biochemistry". *Newyork: Worth, Publishers Inc*, (2005)
- 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 (1995).
- Liljas, A., Hakansson, K., Jonsson, B. H., and Xue, Y., "Inhibition and catalysis of carbonic anhydrase". *Eur. J. Biochem.*, 219: 1-10 (1994).
- Lindskog, S., "Carbonic anhydrase". *In Advances in horganik Biochem*, 4. bs, 115-170 (1982).
- Lindskog, S., "Structure and Mechanism of Carbonic Anhydrase" , *Pharmacol. Ther.*, 74 (1997).
- Lönnerholm, G., Selking, Ö., Wistrand, P.J., "Amount and distribution of carbonic anhydrases CA I and CA II in the gastrointestinal tract". *Gastroenterology* 88:1151-1161, (1985).
- Mangani, S., and Hakansson, K., "Crystallographic studies of the binding of protonated and unprotonated inhibitors to carbonic anhydrase using hydrogen sulphide and nitrate anions", *Eur. J. Biochem.* 210: 867-871 (1992) .
- Mc Intosh, J. E. A., "Carbonic anhydrase isoenzymes in the erythrocytes and uterus of the rabbit" , *J. Biochem.*, 120: 299 (1970).
- Meldrum, N.N., and Roughton, F.J.W., "Carbonic anhydrase: its preparation and properties". *Nature*, 80:113-142 (1933).
- Nelson, D.L., and Cox, M.M., "Lehninger Biyokimyanın İlkeleri", Çeviri Editörü: Prof. Dr. Nedret Kılıç, Üçüncü Baskıdan Çeviri, *Palme Yayıncılık*, (2005).

- Okuyama, T., Waheed, A., Kusumoto, W., Zhu, X.L., Sly, W.S., “Carbonic anhydrase .4. role of removal of c-terminal domain in glycosyl phosphatidylinositol anchoring and realization of enzyme-activity”. *Arch. Biochem. Biophys.*, 320 (2): 315-322 (1995).
- Özensoy, Ö., Arslan, O. and Oznur Sinan S., “A new method for purification of carbonic anhydrase isozymes by affinity chromatography”. *Biochemistry* , 69: 216 (2004).
- Özensoy, Ö., Eritrositlerden Karbonik Anhidraz _zoenzimlerinin Saflaştırılması için Yeni Bir Afinite Jelinin Sentezi ve Uygulanması Yüksek LisansTezi, *Balikesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilimdalı*, (2002).
- Parkkila, A.K., Parkkila, S., Rajaniemi, H., “Carbonic anhydrase isoenzyme II is located in corticotrophs of the human pituitary gland”. *J. Histochem. Cytochem.* 44:245-250 (1996).
- Roughton, F. J. W., and Booth, V. H., “The Effect of substrate concentration, Ph and other factors upon the activity of carbonic anhydrase”. *Biochem. J.* (40):319 (1946).
- Segel, I.H ., “Biochemical Calculations”, Inc, *New York*, 403 (1968).
- Simonsson, I., and Lindskog, S., “The interaction of sulfate with carbonic anhydrase”. *Eur. J. Biochem*, 123:29-36 (1982).
- Sly, W.S., Hu, P.Y., “Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies” , *Annu. Rev. Biochem.*, 64:375-401 (1995).
- Stadie, W.C., and O’Brien, H., “The catalysis of the hydration of carbon dioxide and the dehydration of carbonic acid by an enzyme isolated from red blood cells” , *J. Biol. Chem.*, 103:521–529 (1933).
- Supuran, C. T., Scozzafava, A., “Carbonic anhydrase inhibitors--Part 94. 1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamidederivatives as antitumor agents?” , *Eur. J. Med. Chem*, 35:867 (2000).
- Supuran, C.T., and Scozzafava, A., “Carbonic Anhydrase Inhibitors” , *Curr. Med. Chem.*, 1:61-97 (2001).

- Supuran, C.T., “Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications c for inhibitors and activators” *Nat. Rev. Drug. Discov.*, 1:14 (2008).
- Tozlu, İ., “Eritrositlerinden Afinite Kromatografisi ile saflaştırılan Karbonik Anhidraz Enziminin Kinetik Ve Elektroforetik Özelliklerinin incelenmesi” (Yüksek Lisans Tezi). *Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilimdalı, Van*, (1997).
- Verpoorte, J.A., Mehta, S., and Edsall, J.T., “Esterase activities of human carbonic anhydrase”. *J.Biol. Chem*, 242:4221 (1967).
- Warburg, O., Christian, W., “Isolierung und Kristallization des Gärungsferuients Enolase” , *Biochem.* 310- 384 (1941).
- Whitney, P.I., “Affinity chromatography of carbonic anhydrase” , *Anal. Biochem*, 64:267 (1974)
- Wistrand, P.J., “Solubilization and preliminary characterization of membrane bound Carbonic anhydrase” , *J. Med. Sci.*, 75-85 (1980).
- Wistrand, P. J., “The Importance of Carbonic Anhydarase B and C for the Unloading of CO₂ by the Human Erythrocyte” , *Acta Physiol. Scand.*, 343 (1981).
- Wolfson, D., Olmstead, S., Meiss, D., and Ralston, J., “Making Sense of Digestive Enzymes” , *Klaire Lab STM*, 2008.

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında ERZİNCAN da doğdu. İlk öğrenimini Erzincan da, ortaöğrenimini Mersin de ve lise öğrenimini Erzincan Anadolu Öğretmen Lisesin’de tamamladıktan sonra 2005 yılında Atatürk Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldu.2007-2009 tarihleri arasında Dil Eğitimi ve Johannes Guttenberg Üniversitesi Tıp Fakültesinde, Mainz, Almanya’da Genetik Lab. da çalışma yaptı. 2010 yılında Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nde Biyoloji A.B.D.’a yüksek lisansa başladı.